

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393069** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.12.28

(22) Дата подачи заявки
2022.05.06

(51) Int. Cl. *A61K 9/08* (2006.01)
A61K 31/455 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 27/06 (2006.01)

(54) **РАСТВОР ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ НА ОСНОВЕ ЦИТИКОЛИНА И
НИКОТИНАМИДА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ГЛАУКОМЫ**

(31) **102021000011852**

(32) **2021.05.10**

(33) **IT**

(86) **PST/IV2022/054202**

(87) **WO 2022/238833 2022.11.17**

(71) Заявитель:

ОМИКРОН ИТАЛИА С.Р.Л. (IT)

(72) Изобретатель:

**Вирно Кристиано, Малициа Марко
(IT)**

(74) Представитель:

Кузнецова С.А. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к композиции для перорального применения в форме водного раствора, содержащего цитиколин и никотинамид, и к указанной композиции для применения в лечении глаукомы. Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтической форме в виде водного раствора, характеризующейся высокой биодоступностью.

A1

202393069

202393069

A1

**РАСТВОР ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ НА ОСНОВЕ
ЦИТИКОЛИНА И НИКОТИНАМИДА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ
ГЛАУКОМЫ**

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение по существу относится к композиции для перорального применения в форме водного раствора, содержащего цитиколин и никотинамид. Указанная композиция используется для применения в лечении нейродегенеративных патологий, в частности для применения в лечении глаукомы.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Глаукома представляет собой нейродегенеративную офтальмологическую хроническую патологию, характеризующуюся повреждением ганглиозных клеток сетчатки (RGC), волокон зрительных нервов и прогрессирующим уменьшением поля зрения. Она является вторичной причиной необратимой слепоты, а самая частая и даже наиболее коварная форма представляет собой открытоугольную глаукому (OAG). Возраст, наследственность, тяжелая миопия, высокое внутриглазное давление (IOP) являются только некоторыми факторами риска, которые могут повысить вероятность развития данного заболевания. Высокое IOP представляет собой единственный модифицируемый фактор риска, и на этом основан первый терапевтический подход, предполагающий применение глазных капель или, если этого недостаточно, лазерного или хирургического вмешательства.

Гистологические и *in vivo* исследования с визуализацией, проведенные среди людей, продемонстрировали, что при наличии глаукомы весь оптический путь участвует в процессе трансинаптической дегенерации, который вызывает повреждение зрительного нерва и структур головного мозга, таких как коленчатое ядро и зрительная кора, где находится первичная зрительная область. Такой процесс, активируемый гипербарическим повреждением, вызывает в качестве анатомического и функционального последствия прогрессирующее истончение слоя нервных волокон сетчатки, прогрессирующую экскавацию головки зрительного нерва и затем снижение зрительной функции, характеризующееся

возникновением и прогрессирующим увеличением скотомных областей (отсутствия видимости) в поле зрения.

Недавние исследования продемонстрировали, что глаукома представляет собой нейродегенеративную патологию, подобную болезни Альцгеймера и Паркинсона. Они представляют собой заболевания, при которых нейроны, локализованные в разных местах, подвергаются дегенерации и погибают вследствие апоптоза. При заболевании Альцгеймера процесс начинается в гиппокампе, при заболевании Паркинсона — в *черном веществе*, а при глаукоме процесс начинается на уровне ганглиозных клеток сетчатки.

После первичного кровоизлияния, имеющего гипербарическую природу, запускается апоптоз нейронов, который препятствует обычному кровоснабжению на уровне капиллярного участка этой структуры, и обычный аксональный антеградный и ретроградный транспорт метаболитов и нейротрофинов, необходимый для выживания ганглиозной клетки, нарушается. Апоптоз отвечает за вторичное кровоизлияние, связанное с механизмами местной эксайтотоксичности вследствие гиперстимуляции рецепторов NMDA глутаматом, высвобождаемым клетками в апоптозе. В действительности глутамат, если он присутствует в избыточной концентрации во внеклеточном пространстве, гиперстимулирует рецепторы NMDA на поверхности окружающих нейронов, которые определяют открытие каналов для Ca^{2+} , триггера биохимического каскада, приводящего к апоптозу самого нейрона; затем создается механизм, способный самостоятельно подпитываться даже при отсутствии первичных кровоизлияний.

Было продемонстрировано, что глаукома повреждает нейроны посредством различных механизмов, среди которых окислительный стресс, нейровоспаление и митохондриальная дисфункция. Окислительный стресс, связанный с накоплением свободных радикалов при наличии высокого IOP, бьет по особенно чувствительным клеткам, какими являются CGR, ставя под угрозу функциональность митохондрий, которые представляют собой внутриклеточные органеллы, обеспечивающие энергию и выполняющие различные функции (например, регуляцию гомеостаза клеток). Ганглиозные клетки сетчатки имеют больше митохондрий, чем любой нейрон центральной нервной системы, поскольку для их правильной работы необходимо очень высокое и непрерывное потребление

энергии. Когда окислительный стресс повреждает митохондрии, они не могут обеспечивать такое количество энергии, которое необходимо для ганглиозных клеток сетчатки, которые претерпевают дисфункцию и в наиболее тяжелых случаях — апоптоз.

Функциональный результат такой дегенерации, затрагивающей оптические пути, заключается в постепенном сужении поля зрения с областями отсутствия видимости (скотомные области), которые обычно сначала появляются в периферической части, а затем распространяются до центральных областей до полной потери зрения.

В настоящее время некоторые клинические данные подтверждают, что у пациентов с глаукомой, несмотря на эффективный контроль давления, годами сохраняется тенденция к прогрессированию повреждения с последующим уменьшением поля зрения. Исследование EMGT (исследование ранних проявлений глаукомы), проведенное Национальным институтом здравоохранения, выявило, что, несмотря на гипотензивный контроль, у 45% пациентов с глаукомой происходит прогрессирование кампиметрического повреждения.

В нескольких исследованиях оценена возможность уменьшения или по меньшей мере замедления такого дегенеративного процесса посредством приема дополнительно к гипотензивным лекарственным средствам молекул, называемых нейропротекторными молекулами, напрямую нацеленных на сохранение функциональности и снижение уязвимости CGR.

Особый интерес в области нейропротекции вызывают цитиколин (цитидин-5'-дифосфохолин) и никотинамид (или витамин B3) благодаря механизму их действия, а также экспериментальным и клиническим результатам, полученным среди пациентов с глаукомой.

Нейропротекторные свойства цитиколина при глаукоматозной патологии впервые были оценены с помощью инъекционного состава, уже применяемого в течение некоторого времени при нейродегенеративных патологиях центральной нервной системы. В действительности в публикации Virno et al. на примере исследования с 10-летним последующим наблюдением продемонстрировано уменьшение периметрического дефекта, оцениваемого по области отсутствия восприятия, достигнутое при лечении пациентов с глаукомой посредством внутримышечного

введения цитиколина. Данные результаты были подтверждены дополнительным долгосрочным исследованием (8 лет последующего наблюдения), которое подтвердило эффективность цитиколина благодаря значительному улучшению биоэлектрических ответов сетчатки и коры головного мозга у пациентов с ОАГ.

Введение цитиколина внутримышечно для лечения глаукомы затем показало эффективность у пациентов с глаукомой, даже несмотря на то, что такое введение было явно очень дискомфортным для хронического пациента и связано с необходимостью присутствия человека, способного выполнять инъекции.

Результаты, полученные с применением формы для системного воздействия, способствовали разработке перорального состава на основе цитиколина с целью улучшения соблюдения режима лечения пациентов с глаукомой. Исследование пациентов с контролируемым IOP (< 18 мм рт. ст.) при лечении β -блокаторами показало, что лечение пероральной формой цитиколина вызывало улучшение ширины сигнала паттерн-электроретинографии (PERG) ($p < 0,01$) и сокращение времени задержки зрительного вызванного потенциала (VEP) ($p < 0,01$) по сравнению с проверками по исходным значениям. Затем на основании данных результатов был разработан состав раствора для перорального введения, с применением которого выполняли следующее клиническое исследование (1), реализованное в университете в Палермо, которое в двойном слепом сравнении с плацебо продемонстрировало, что цитиколин в растворе для перорального введения (500 мг/сутки) замедляет потерю нервных волокон на слое сетчатки, по данным сканирующей лазерной поляриметрии (GDX), по сравнению с пациентами, получавшими только антигипертензивную терапию. Дополнительно было продемонстрировано, что циклы цитиколина в растворе для перорального введения обеспечивают возможность замедления потери электрофизиологически демонстрируемой зрительной функциональности (время задержки по pEV и ширина по pERG). Цитиколин в растворе для перорального введения в действительности улучшает электрофункциональные параметры путем увеличения, в частности на 100%, ширины пути P50-N95 по pERG.

Что касается никотинамида, в совсем недавнем экспериментальном исследовании, проведенном в Лаборатории Джексона / Медицинском институте Говарда Хьюза и Глазном институте Баскома Палмера в Майами, результаты которого

опубликованы в журнале Science, продемонстрировано, что витамин B3 снижает частоту возникновения глаукомы в группе, получавшей лечение (2). Исследователи выполнили ряд генетических, метаболических и нейробиологических тестов в группе мышей, которые были генетически модифицированы для обеспечения предрасположенности к развитию глаукомы, а также в здоровой контрольной группе. Результаты подтвердили, что уровень никотинамида с возрастом снижается и введение данной молекулы дополнительно к питьевой воде защищает мышей от возникновения глаукомы.

В свете вышесказанного проблема обеспечения новых композиций для лечения глаукомы все еще очень актуальна.

ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Техническая задача, поставленная и решенная в настоящем изобретении, заключается в обеспечении композиции для перорального применения для лечения глаукомы, характеризующейся высокой биодоступностью, в частности сравнимой с биодоступностью раствора, вводимого внутривенно.

Данная задача решена с помощью композиции для перорального применения в форме водного раствора на основе цитиколина и никотинамида. В действительности глаукома имеет многофакторную патогенную природу и характеризуется трансинаптической дегенерацией, которая проходит вдоль зрительных путей от ганглиозных клеток сетчатки к зрительной коре и вызывает постепенное уменьшение поля зрения.

Преимуществом является то, что авторами настоящего изобретения обнаружено, что описанный в настоящем документе состав в виде водного раствора обеспечивает столь высокую биодоступность цитиколина и никотинамида, что она может быть сравнима с биодоступностью, получаемой при введении данных действующих веществ внутривенно. Если действующее вещество находится в растворе, то оно в действительности находится в форме, мгновенно доступной для стадии всасывания, и это гарантирует более высокую биодоступность по сравнению с тем, когда его вводят в твердом состоянии, например в таблетке или в суспензии.

Рассматриваемая композиция имеет огромное преимущество по сравнению с

составами предшествующего уровня техники, заключающееся в том, что она сочетает высокую биодоступность данных двух действующих веществ, сравнимую с биодоступностью при внутривенном введении, и классические преимущества перорального введения, такие как высокая степень соблюдения режима лечения, низкая стоимость и безопасность. Как выявлено посредством результатов клинических исследований, представленных в экспериментальном разделе настоящей заявки, введение композиции для перорального применения в форме водного раствора, как описано в настоящем документе, пациентам, страдающим от глаукомы, неожиданно оказалось более эффективным, в частности, с точки зрения улучшения зрительной функции, структурной защиты слоев сетчатки по сравнению с тем, что прогнозируется на основе суммарного эффекта цитиколина и никотинамида, вводимых по отдельности, что подтверждает синергию между двумя действующими веществами в композиции по настоящему изобретению.

Таким образом, настоящее изобретение относится к композиции для перорального применения в форме водного раствора, содержащего цитиколин и никотинамид, и ее применению в лечении глаукомы.

Настоящее изобретение также относится к способу получения указанной композиции.

Предпочтительные признаки настоящего изобретения представлены в зависимых пунктах формулы изобретения.

Другие преимущества, признаки и варианты применения настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного описания некоторых вариантов осуществления, представленных в качестве примера, а не с целью ограничения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Настоящее изобретение и следующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления могут быть более полно представлены со ссылкой на следующие фигуры:

Фиг. 1. Кривые биодоступности цитиколина (1a) и никотинамида (1b), введенных внутривенно, в растворе для перорального введения и в таблетках. Биодоступность цитиколина и никотинамида в растворе для перорального введения составляет

приблизительно 100%.

Фиг. 2. Технологическая блок-схема способа получения водного раствора в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления.

Фиг. 3. Количественный анализ влияния нескольких видов лечения, описанных в примере 2, на аномалии электроретинографии, оцениваемые по электроретинограмме (ERG).

Фиг. 4. Влияние нескольких видов лечения, описанных в примере 2, на апоптоз клеток (анализ с терминальным дезоксиуридиновым мечением концов разорванной нити ДНК (TUNEL)).

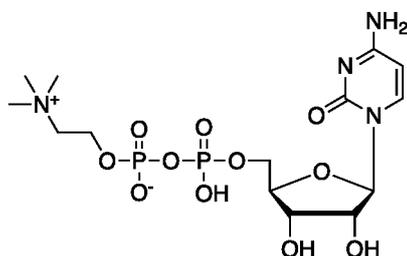
Фиг. 5. Влияние нескольких видов лечения, описанных в примере 2, на уровни каспазы-3.

Фиг. 6. Сравнение иммунофлуоресценции синаптофизина (красный) между здоровой контрольной группой, группой, получавшей плацебо, и группой, получавшей цитиколин + никотинамид.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к композиции для перорального применения в форме водного раствора, содержащего цитиколин и никотинамид.

Цитиколин, структура которого представлена ниже,



представляет собой ноотропный агент с эффективностью, широко известной при патологиях центральной нервной системы, таких как заболевание Паркинсона, рассеянный склероз, травмы и повреждения головного мозга, цереброваскулярные нарушения, когнитивные расстройства.

Цитиколин действует на различных уровнях с многофакторным механизмом действия: он сохраняет уровни кардиолипина и сфингомиелина, фосфолипидных

компонентов, соответственно, внутренней митохондриальной мембраны и мембраны аксонов ганглиозных клеток сетчатки, он восстанавливает фосфатидилхолин, один из наиболее распространенных фосфолипидов в мембранах нервных клеток, он сохраняет митохондриальную функцию посредством предотвращения окислительного повреждения и возникновения нейронального апоптоза, он стимулирует синтез глутатиона, он предотвращает эксайтотоксичность глутамата посредством снижения его концентраций, он стимулирует синтез миелина, он приводит к улучшению целостности нейрональной мембраны, он усиливает синтез нейротрансмиттеров, таких как ацетилхолин и дофамин, он предотвращает эндотелиальную дисфункцию. В частности, его влияние на фосфолипиды является основой его структурного действия, которое сопровождается дополнительным функциональным действием на нейротрансмиттеры.

Полученные недавно данные продемонстрировали, что цитиколин способен взаимодействовать с протеасомой, молекулярным комплексом, отвечающим за протеолиз на клеточном уровне. Дисфункции, касающиеся протеасомы, приводят к накоплению белков в соответствии с типичной картиной нейродегенеративных патологий. Цитиколин значительно стимулирует ферментативные свойства комплекса в отношении белков, среди которых амилоидогенные белки (α -синуклеин), таким образом оказывая нейропротекторное действие.

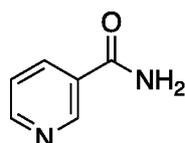
Цитиколин, принимаемый в растворе для перорального введения или парентерально, мгновенно разрушается до Р-холина и цитидин-5'-монофосфата (CMP). Фосфорилированные соединения не пересекают гематоэнцефалический барьер, затем Р-холин и CMP подвергаются дальнейшему дефосфорилированию до холина и цитидина. Холин пересекает гематоэнцефалический барьер и фосфорилируется в SNC до Р-холина, тогда как цитидин у людей превращается в уридин, который, в свою очередь, пересекает гематоэнцефалический барьер, фосфорилируется в SNC до уридинтрифосфата (UTP) и превращается в цитидинтрифосфат (CTP).

Р-холин и CTP снова образуют цитиколин благодаря действию фермента цитидин-5'-трифосфатфосфохолинцитидилтрансферазы в обратимой реакции, направление и скорость которой зависят от концентрации субстратов; это обуславливает

фундаментальное значение, более высокое, чем биодоступность других соединений принимаемого препарата.

Что касается элиминации, наблюдается низкая элиминация с калом, что является показателем оптимального всасывания и элиминации через дыхательные пути (CO_2) и мочевыводящую систему. Элиминация меченых продуктов за пять дней составила только 16%, что демонстрирует включение катаболитов в биологические структуры. Элиминация является двухфазной, первая фаза происходит за несколько часов, а вторая является очень медленной. Этот факт является дополнительным доказательством того, что абсорбированный цитиколин встраивается в клеточные мембраны и затем он выводится через последующий физиологический метаболический путь биологических структур.

Никотинамид, или витамин В3, структура которого представлена на следующем изображении:



принадлежит группе водорастворимых витаминов, которые необходимо регулярно принимать с пищей. Он является предшественником окислительно-восстановительных коферментов никотинамидадениндинуклеотид (NAD) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP), которые играют ключевую роль в клеточных реакциях окисления/восстановления и связаны с катаболическими и анаболическими процессами. Благодаря вышеупомянутому механизму действия никотинамид выполняет различные функции и, в частности, имеет фундаментальную роль в работе нервной системы, способствуя синаптической пластичности и росту аксонов.

Дефицит никотинамида и, следовательно, снижение уровня NAD и NADP, например с возрастом, являются факторами, предрасполагающими к развитию глаукомы, поскольку зрительный нерв и нервные клетки становятся более восприимчивыми к влиянию повышения внутриглазного давления.

Кишечная абсорбция перорально принятого никотинамида является высокой и может достигать даже 70%. Это в основном происходит посредством диффузии, опосредованной натрий-зависимым носителем. Никотинамид является основной формой витамина В3, присутствующего в кровотоке. Из крови он перемещается

через клеточные мембраны посредством простой диффузии, однако для транспорта в почечных канальцах и в эритроцитах необходим носитель. Внутри клетки никотинамид используется для синтеза NAD, который затем может фосфорилироваться до NADP; оба из них могут принимать два электрона и один протон, образуя NADH и NADPH. Никотинамид превращается в NAD посредством реакции с 5-фосфорибозил-1-пирофосфатом и аденозинтрифосфатом (АТФ), а NAD превращается в NADP посредством реакции с АТФ. Основным путем катаболизма никотинамида является метилирование в печени и последующее окисление. Никотинамид метаболизируется до N-метилникотинамида (NMN) с участием АТФ и Mg^{2+} , а также S-аденозилметионина в качестве донора метила. NMN может окисляться до N-метил-2-пиридонкарбоксамида (2-ПуГ) и N-метил-4-пиридонкарбоксамида (4-ПуГ), оба из которых присутствуют как в плазме, так и в моче.

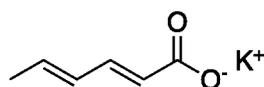
В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения цитиколин присутствует в композиции в концентрации, составляющей от 25 мг/мл до 100 мг/мл, предпочтительно в диапазоне от 49,75 до 50,25 мг/мл или приблизительно 50 мг/мл, а никотинамид имеет концентрацию, составляющую от 5 мг/мл до 20 мг/мл, предпочтительно в диапазоне от 9,95 до 10,05 мг/мл или приблизительно 10 мг/мл.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления композиция имеет соотношение между цитиколином в форме свободной кислоты и никотинамидом, предпочтительно составляющее от 2,5 : 0,5 до 10 : 2.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления композиция имеет соотношение между цитиколином в форме свободной кислоты и никотинамидом, равное 5 : 1.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения, в соответствии с описанными в настоящем документе другими вариантами осуществления, может включать в себя сорбат калия в концентрации, составляющей от 1,34 мг/мл до 3 мг/мл, предпочтительно в диапазоне от 2,67 мг/мл до 2,69 мг/мл или приблизительно 2,68 мг/мл.

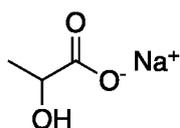
Сорбат калия, формула которого представлена ниже,



применяют в качестве консерванта, прежде всего в косметической и пищевой отрасли, благодаря его противогрибковым и антибактериальным свойствам. Он активен только при кислотных значения рН и хорошо растворим в воде. Его синтезируют посредством приведения во взаимодействие аскорбиновой кислоты, существующей в природе, с гидроксидом калия (KOH).

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения композиция может включать в себя даже 60%-й лактат натрия в концентрации, составляющей от 2,5 мг/мл до 7 мг/мл, предпочтительно в диапазоне от 4,975 до 5,025 мг/мл или приблизительно 5 мг/мл.

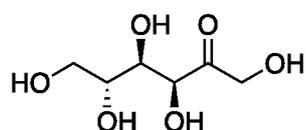
Лактат натрия, формула которого представлена на изображении ниже,



представляет собой натриевую соль молочной кислоты природного происхождения с функцией антиоксиданта. Он также действует как регулятор кислотности, увлажнитель, антистатический агент, эмульгатор и/или загуститель. Он представляет собой водорастворимое соединение, не слишком чувствительное к высоким температурам.

В соответствии с другим вариантом осуществления данного изобретения композиция может дополнительно включать в себя фруктозу в концентрации, составляющей от 150 мг/мл до 400 мг/мл, предпочтительно в диапазоне от 298,5 до 301,5 мг/мл или приблизительно 300 мг/мл.

Фруктоза, которая имеет структуру следующей формулы,

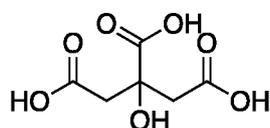


представляет собой моносахарид, топологический изомер глюкозы, от которой он отличается тем, что представляет собой кетозу, а не альдозу. Она важна для

питания людей и животных и часто применяется в качестве подсластителя, поскольку по сравнению с сахарозой имеет более высокую подслащивающую способность, она имеет несколько более низкую потребляемую калорийность, и она имеет более низкий гликемический индекс.

Дополнительный вариант осуществления настоящего изобретения может включать в себя даже безводную кислоту в концентрации, составляющей от 0,92 мг/мл до 2,00 мг/мл, предпочтительно в диапазоне от 1,82 до 1,84 мг/мл или приблизительно 1,83 мг/мл.

Лимонную кислоту, представленную на следующем изображении,



применяют в качестве ароматизатора и консерванта в пищевых продуктах и напитках. Кроме того, ее используют в качестве подкислителя, в качестве эмульгатора, в качестве заменителя лимонного сока и для регулирования значения pH красителей; в комбинации с бикарбонатом натрия ее применяют даже для получения шипучих составов.

В предпочтительном варианте осуществления предложена композиция в соответствии с любым из описанных вариантов осуществления, которая содержит или в качестве замены имеет цитиколин в концентрации, равной 50 мг/мл, никотинамид в концентрации, равной 10 мг/мл, сорбат калия в концентрации, равной 2,68 мг/мл, 60%-й лактат натрия в концентрации, равной 5 мг/мл, фруктозу в концентрации, равной 300 мг/мл, и лимонную кислоту в концентрации, равной 1,83 мг/мл.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения композиция в соответствии с другими вариантами осуществления, описанными в настоящем документе, может дополнительно включать в себя один или более эксципиентов и/или добавок. Характерными примерами эксципиентов для композиций для перорального применения в жидкой форме являются сорбит, глицерол, сахароза, глицерин, фосфат натрия, метил-п-оксибензоат, пропил-п-оксибензоат, водорастворимые ароматизаторы и т. п.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложена указанная композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, которая имеет высокую биодоступность цитиколина, в частности его биодоступность составляет от 90% до 100%, предпочтительно она будет составлять по меньшей мере 95%, предпочтительно по меньшей мере 98%.

Термин «биодоступность» относится к такому количеству действующего вещества, в данном случае цитиколина, в кровотоке, которое определяет его биологическую доступность. Предполагается, что существует соответствие между концентрацией в ткани и в плазме, поскольку между центральным отделом и периферическими тканями устанавливается равновесие. Профиль биодоступности описывается кривой концентрации в плазме в зависимости от времени, а фармакокинетические параметры, которые применяются для ее описания, представляют собой максимальную концентрацию в плазме (C_{max}), которая прямо пропорциональна скорости абсорбции, время достижения максимальной концентрации в плазме (t_{max}), которое обратно пропорционально скорости абсорбции, и площадь под кривой (AUC), которая прямо пропорциональна количеству абсорбированного действующего вещества. Биодоступность может означать как абсолютную, так и относительную биодоступность.

В частности, под выражением «абсолютная биодоступность» подразумевается соотношение между площадью под кривой при экстравазальном введении, в данном случае при пероральном введении, и площадью под кривой при внутривенном введении, каждую из которых корректируют в зависимости от введенной дозы. Этот параметр позволяет понять, насколько меньше цитиколин и никотинамид абсорбируются при пероральном введении, учитывая то, что 100% биодоступность достигается только при внутривенном введении, когда отсутствует стадия абсорбции.

Напротив, выражение «относительная биодоступность» относится к соотношению между площадями под кривыми, построенными для одного и того же действующего вещества, введенного двумя различными способами, отличными от внутривенного введения, или введенного одним и тем же способом, но в разных составах (например, действующее вещество составлено в форму таблетки и в

форму раствора для перорального введения).

Если в настоящем описании не указано иное, процент биодоступности представляет собой абсолютную биодоступность.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления композиция составлена в виде водного раствора.

Композиции для перорального применения могут сильно отличаться между собой по биодоступности, скорости и профилю абсорбции, и поскольку действующее вещество является одним и тем же, то определяющим фактором является состав. Составы для перорального введения могут быть твердыми (таблетки, капсулы, составы с замедленным высвобождением, гастропротекторные составы и т. п.) или жидкими (суспензии и растворы). Независимо от применяемого состава, для абсорбции лекарственного средства, введенного перорально, необходимо, чтобы оно растворилось в желудочно-кишечных жидкостях. Затем твердые составы для перорального введения должны высвобождать действующее вещество. Это двухстадийный процесс, который включает разрушение твердого состава и солюбилизацию самого лекарственного средства. Различные твердые формы одного и того же действующего вещества могут иметь различные профили абсорбции в зависимости от времени разрушения и солюбилизации, которое может значительно различаться в зависимости от применяемых эксципиентов, внешних факторов или химико-физических свойств.

Жидкие составы (сиропы, препараты из флаконов, саше для растворения и т. п.) могут представлять собой суспензии или растворы, и действительно последние способны гарантировать более высокую биодоступность. В действительности суспензионные составы имеют действующее вещество в форме быстрорастворимых твердых частиц, суспендированных в жидкой фазе, поэтому даже если они лишены стадии разрушения, то для абсорбции частиц необходим их переход в раствор. Растворы, напротив, преимущественно имеют уже растворенное действующее вещество, то есть в форме, мгновенно доступной для стадии абсорбции, и это гарантирует более высокую биодоступность.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления настоящего изобретения на основе любого из вариантов осуществления, описанных в

настоящем документе, водный раствор имеет значение pH, составляющее от 3,9 до 4,1, предпочтительно 4,00.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления настоящего изобретения на основе любого из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, водный раствор имеет плотность, составляющую от 1,116 до 1,156 г/мл, предпочтительно 1,136 г/мл.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения композиция предназначена для применения в лечении нейродегенеративной патологии.

Под выражением «нейродегенеративные заболевания» подразумевается ряд патологических состояний, поражающих прежде всего нейроны центральной нервной системы. Они представляют собой изнурительные и не поддающиеся лечению патологии, вызывающие прогрессирующую дегенерацию и/или гибель нервных клеток.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения композиция предназначена для применения в лечении глаукомы. В научной литературе продемонстрировано, что цитиколин обладает нейропротекторным действием, поскольку он замедляет прогрессирование кампиметрического повреждения у пациентов с глаукомой, и что никотинамид увеличивает функциональность внутреннего слоя сетчатки и увеличивает поле зрения. Таким образом, композиция, к которой относится настоящее изобретение, обеспечивает возможность нейропротекции по двум направлениям, поскольку действие никотинамида сочетается с нейропротекторным действием цитиколина в конкретном составе, имеющем высокую биодоступность.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения композицию вводят в объеме от 5 мл до 20 мл или приблизительно 10 мл один раз в сутки, предпочтительно утром, в вышеупомянутых дозировках.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения композиции, описанной в любом из вариантов осуществления настоящего изобретения. В частности, такой способ предусматривает растворение в воде и смешивание элементов, составляющих композицию.

* * *

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение композиции в соответствии с изобретением и исследование биодоступности

Водный раствор, содержащий: сорбат калия (2,6 мг/мл), 60%-й раствор лактата (5 мг/мл), фруктозу (300 мг/мл), цитиколин в форме свободной кислоты (50 мг/мл), никотинамид (10 мг/мл), безводную лимонную кислоту (1,83 мг/мл).

Внешний вид: полупрозрачный раствор

Цвет: бесцветный

pH: 4,00

Плотность: 1,136 г/мл

Способ получения: водный раствор получали из цитиколина в форме свободной кислоты, никотинамида и эксципиентов, обычно применяемых для составов такого типа, таких как: сорбат калия в качестве консерванта, лактат натрия и лимонная кислота в качестве регуляторов кислотности, фруктоза в качестве подсластителя. Компоненты взвешивали и смешивали в соответствии с вышеуказанными количествами для относительного растворения в воде. Значение pH и плотность раствора регулировали до определенных выше значений. Композицию получали в соответствии с блок-схемой, показанной на Фиг. 2.

СПОСОБЫ

Исследование биодоступности

Биодоступность цитиколина, присутствующего в композиции, к которой относится настоящее изобретение, изучали посредством проведения исследования биодоступности у крыс Спрег-Доули. В частности, 30 самцов крыс Спрег-Доули с массой 175 и 225 г выдерживали без доступа к корму в течение 16 часов до введения. Животных разделяли на три группы.

Группа 1: 10 крыс, которым внутривенно вводили цитиколин + никотинамид

Группа 2: 10 крыс, которым перорально вводили цитиколин + никотинамид в виде раствора

Группа 3: 10 крыс, которым вводили цитиколин + никотинамид в таблетках

Для получения составов с радиоактивной меткой применяли ^{14}C -метилцитиколин и ^{14}C -никотинамид.

Препараты очищали посредством ионообменной хроматографии с применением смесей изомасляная кислота : вода : аммиак : EDTA (500 : 280 : 21 : 8), н-бутанол : уксусная кислота : вода (12 : 3 : 5), этанол : 1 моль/л ацетата аммония, pH 7 (5 : 2), этанол : насыщенный раствор буры (8%) : 0,5 моль/л EDTA : 5 моль/л ацетата аммония (220 : 80 : 0,5 : 20).

Образцы анализировали с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика LSC в соответствии с программой для ^{14}C .

Для количественного анализа в качестве реагентов применяли Packard soluene (солюбилизирующий агент), H_2O_2 (отбеливающий агент) и Packard Instagel (сцинтиллятор).

Составы вводили в дозе 5 мг/кг соответственно: группа 1 — внутривенно в яремную вену; группа 2 — в растворе для перорального применения, вводимом через назогастральный зонд; группа 3 — в таблетках, растворенных в солевом растворе и вводимых через назогастральный зонд.

Сбор образцов крови примерно по 100 мкл проводили в запланированное время (через 10 мин, 20 мин, 30 мин, 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 7 ч, 24 ч после введения).

Расчет абсолютной биодоступности выполняли с помощью соотношения площади под кривой (AUC) средних значений, полученных, соответственно, для введения внутривенно / в виде водного раствора и внутривенно / в виде таблеток (Фиг. 1).

Среди фармацевтических форм, вводимых перорально, состав на основе цитиколина + никотинамида в водном растворе показал более высокую биодоступность его действующих веществ по сравнению с таблеткой. Биодоступность цитиколина + никотинамида, введенных в водном растворе, была сравнима с биодоступностью для внутривенного введения.

Биодоступность ^{14}C цитиколина после введения водного раствора на основе цитиколина + никотинамида:

$$\frac{\text{AUC}_{0-24} \text{ водный раствор}}{\text{AUC}_{0-24} \text{ внутривенно}} = 0,92$$

AUC_{0–24} внутривенно: 77,42; AUC_{0–24} водный раствор.: 71,58

Биодоступность ¹⁴никотинамида после введения водного раствора на основе цитиколина + никотинамида:

$$\frac{\text{AUC}_{0-24} \text{ водный раствор}}{\text{AUC}_{0-24} \text{ внутривенно}} = 0,91$$

AUC_{0–24} внутривенно: 70,55; AUC_{0–24} водный раствор.: 64,20

Полученные результаты продемонстрировали биодоступность цитиколина и никотинамида, составленных в виде композиции для перорального применения в водном растворе, близкую к 100%. Такой результат следует связывать с фармацевтической формой, поскольку раствор для перорального введения обеспечивает мгновенную доступность действующих веществ для абсорбции и гарантирует биодоступность, сравнимую с инъекционным введением (Фиг. 1).

Пример 2. *In vivo* исследования в экспериментальной модели нейродегенерации у животных

Способы

Нейропротекторное действие комбинации цитиколин + никотинамид в растворе для перорального введения оценивали в экспериментальном исследовании, выполненном на мышах db/db. Мыши db/db имеют мутацию в гене рецептора лептина, и они представляют собой животную модель нейродегенерации сетчатки. Такая модель применяется для моделирования патофизиологических событий, которые встречаются при нейродегенеративных патологиях, таких как глаукома. 20 крыс db/db (BKS.Cg- + Leprdb/ + Leprdb/OlaHsd, самцы, 10 недель) рандомизировали на 5 групп и лечили в течение 15 дней посредством перорального введения растворов для перорального введения, содержащих в своей основе:

1. Цитиколин 0,5% (Cit.) в 10%-м растворе лактозы, вводимый через назогастральный зонд (SNG);
2. Никотинамид 0,1% (Nic.) в 10%-м растворе лактозы, вводимый через SNG;
3. Цитиколин 0,5% + никотинамид 0,1% (Cit + Nic) в 10%-м растворе лактозы, вводимые через SNG;
4. 10%-й раствор лактозы (плацебо), вводимый через SNG;

5. Здоровый контроль без диабета (контроль).

На 15-й день через 1 час после введения нескольких видов лечения мышей подвергали (i) спектральной оптической когерентной томографии (SD-OCT) очень высокого разрешения с получением *in vivo* детальных изображений, относящихся к морфологии различных слоев сетчатки. Мышей анестезировали посредством однократной внутривентрикулярной инъекции 80 мг/мл кетамина, 12 мг/мл ксилазина (Sigma-Adrich). Впоследствии, чтобы вызвать расширение зрачка, закапывали одну каплю 0,5%-го тропикамида и затем помещали каждую мышь перед объективом OCT.

У всех животных изучали только правый глаз и для каждого слоя учитывали среднее значение, полученное для трех последовательных сканирований сетчатки каждого глаза. Изображения OCT записывали посредством двухмерного сканирования (B-сканирование) в комбинации с программным обеспечением для подавления шума в ART (автоматическом реальном времени) и с использованием поля зрения 30 градусов, сфокусированного на головке зрительного нерва. После обследования с помощью OCT животных усыпляли посредством цервикальной дислокации и сразу вылущивали глаза.

Посредством (ii) общей электроретинограммы (ffERG) оценивали электрическую активность, а затем функциональность клеток сетчатки. Записанные параметры измеряли с применением платформы ERG Ganzfeld (Phoenix Research Laboratories, г. Плезантон, штат Калифорния, США) и в соответствии с рекомендациями ISCEV (Международное сообщество клинической электрофизиологии зрения).

Посредством иммуногистохимических анализов исследовали гистологические маркеры нейродегенерации (глиальную активацию и апоптоз):

(iii) Глиальную активацию оценивали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с применением антител, направленных на глиальный фибриллярный кислый белок GFAP (антитела к GFAP кролика). Для оценки уровня глиальной активации применяли оценочную систему (от 1 до 5) на основе степени окрашивания GFAP (глиального фибриллярного кислого белка).

Срезы фиксировали в метаноле (-20 °C) в течение 2 минут с последующими тремя

промывками фосфатно-солевым буфером PBS (по 5 минут каждая). Срезы обрабатывали трис-солевым буфером TBS-Triton X-100 (0,025%) и инкубировали в 1%-м растворе альбумина бычьей сыворотки BSA и 10%-м растворе козьей сыворотки в PBS в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем секции инкубировали с антителами к GFAP кролика в течение ночи при 4 °C во влажной атмосфере. После трех промывок в PBS, по 5 минут каждая, инкубировали срезы с вторичным антителом козы к антителам кролика, меченным Alexa AF488 (разведение 1 : 200, полученное в блокирующем растворе). Срезы промывали в PBS, окрашивали с помощью Hoechst и соединяли с покровным стеклом с помощью флуоресцентной заливочной среды. После высушивания опоры записывали сравнительные цифровые изображения образцов с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Fluoview FV1000 Olympus (Olympus, район Синдзюку, г. Токио, Япония) с применением одинаковых параметров яркости и контрастности.

(iv) Поиск событий клеточного апоптоза выполняли посредством анализа TUNEL с применением набора DeadEnd™ для флуориметрической системы TUNEL (PROMEGA, г. Мэдисон, штат Висконсин, США). Окрашивание TUNEL (мечение концов разорванной нити ДНК дезоксиуридин трифосфатом (dUTP) с использованием терминальной трансферазы) выполняли с применением набора DeadEnd для флуориметрической системы TUNEL (PROMEGA, г. Мэдисон, штат Висконсин, США). Замороженные срезы сетчатки пермеабелизировали посредством инкубации в течение 2 минут на льду с 0,1% Triton X-100 в 0,1%-м растворе цитрата натрия. Вторичное антитело представляло собой антитело козы к антителам кролика, меченое Alexa 488. Для оценки с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии длина волны возбуждения составляла 488 нм (обнаружение в диапазоне 515–565 нм (зеленый)).

(v) Количественное определение каспазы-3 и синаптофизина выполняли с помощью иммунофлуоресценции. Срезы фиксировали в метаноле (20 °C) в течение 1 мин и промывали буферным солевым раствором (PBS), 0,01 М при pH 7,4. Затем срезы инкубировали в 10%-м растворе NGS, 0,1% Triton X-100, PBS в течение 1

часа при комнатной температуре и впоследствии инкубировали с конкретным первичным антителом (соответственно, с моноклональным антителом кролика к каспазе-3 и синаптофизину) одну ночь при 4 °C. На следующий день после промывки срезы инкубировали с флуоресцентным вторичным антителом, меченым Alexa 594 (к антителам кролика, Life Technologies S.A, г. Мадрид, Испания), в течение 1 часа и впоследствии промывали. Наконец, окрашивали ядра с помощью Hoechst и соединяли с покровным стеклом с помощью флуоресцентной заливочной среды (Prolunga, Invitrogen). Изображения записывали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе (FV1000; Olympus, г. Гамбург, Германия). Были проанализированы пять полей (три, соответствующие центральной зоне сетчатки, и два — периферической). Интенсивность флуоресценции изображений количественно определяли с помощью программного обеспечения ImageJ.

Статистический анализ выполняли с использованием t-критерия Стьюдента для независимых данных и дисперсионного анализа. Значение $p < 0,05$ считали статистически значимым.

Результаты

(i) Оценка толщины сетчатки с помощью OCT: результаты, полученные при измерении методом SD-OCT (показанные в **таблице 1**), выявили значительное изменение толщины слоев RNFL (*слой нервных волокон сетчатки*), GC/IPL (*ганглиозные клетки / внутренний сетчатый слой*) и INL (*внутренний ядерный слой*) в группе плацебо (мыши db/db без лечения) по сравнению со здоровым контролем. У диабетических мышей, получавших только цитиколин, и в группе, получавшей только никотинамид, наблюдается меньшее снижение толщины данных слоев со значительным различием по сравнению с группой плацебо для слоев RNFL и GC/IPL ($p < 0,05$). Неожиданно было обнаружено, что такое изменение было нейтрализовано в группе, получавшей цитиколин + никотинамид, причем не было выявлено различий в толщине вышеупомянутых слоев по сравнению со здоровым контролем, что позволяет предположить синергетическое протекторное действие комбинации на ганглиозные клетки сетчатки (аксоны и сомы) от токсического действия продолжительного диабета ($p < 0,01$).

Слой (мкм)	Контроль	Плацебо	Цитиколин	Никотинамид	Цитиколин + никотинамид
RNFL	24,2 ± 2,4	19,3 ± 2,2	22,3 ± 1,3 p < 0,05 по сравнению с плацебо	21,8 ± 2,4 p < 0,05 по сравнению с плацебо	24,9 ± 2,1 NS по сравнению с контролем
GC/IPL	64,7 ± 3,2	54,1 ± 5,0	59,3 ± 4,8 p < 0,05 по сравнению с плацебо	58,8 ± 5,2 p < 0,05 по сравнению с плацебо	63,3 ± 2,4 NS по сравнению с контролем
INL	19,7 ± 2,8	22,0 ± 1,9	20,9 ± 2,5	21,1 ± 2,1	20,1 ± 2,0 NS по сравнению с контролем

Таблица 1. Влияние нескольких видов лечения на изменения толщины различных слоев сетчатки

(ii) Оценочная электроретинограмма. На **Фиг. 3** — количественный анализ ширины b-волны в зависимости от интенсивности вспышки в различных группах. У мышей db/db наблюдается уменьшение ширины b-волны на ERG в ответ на раздражители как низкой интенсивности (10 кд с/м²), так и средней интенсивности (40 кд с/м²). Такое уменьшение ослабляется как в группе Cit., так и в группе Nic. по сравнению с плацебо. Такой эффект синергетически усиливается в группе Cit + Nic со статистически значимым различием по сравнению с группой плацебо ($p < 0,05$).

(iii-v) Иммуногистохимические анализы

(iii) В здоровой контрольной группе экспрессия белков GFAP была обнаружена главным образом на уровне слоя GCL. Напротив, у диабетических мышей, получавших плацебо, было выявлено значительное увеличение во всех слоях сетчатки, что свидетельствует о состоянии глиальной гиперактивации вследствие нейродегенеративного воспалительного процесса. В действительности у 100% диабетических мышей в группе плацебо оценка GFAP score составила ≥ 3 (таблица 2). Введение цитиколина, а также никотинамида вызывало значительное снижение реактивного глиоза, при этом оценка GFAP score составляла ≤ 3 в обоих случаях. Неожиданно было обнаружено, что такая оценка показала существенное улучшение в группе, получавшей комбинацию Cit. + Nic, и была равна 1 у 94%

диабетических мышей (≤ 2 в 100%).

Оценка	Контроль	Плацебо	Цитиколин	Никотинамид	Цитиколин + никотинамид
1	100%	0%	71%	72%	94%
2		0%	22%	18%	6%
3		12,4%	7%	10%	0%
4		32,8%	0%	0%	0%
5		54,8%	0%	0%	0%

Таблица 2. Оценка GFAP score, измеренная для нескольких видов лечения

(iv) Посредством анализа TUNEL было выявлено, что процент апоптотических клеток в слое сетчатки GCL был значительно выше у диабетических мышей, чем у недиабетических контрольных мышей, что, таким образом, демонстрирует важное увеличение апоптотических явлений, поражающих ганглиозные клетки сетчатки после нейродегенеративных процессов, вызванных диабетом (Фиг. 4). Диабетические мыши, получавшие только цитиколин, имели более низкую степень апоптоза по сравнению с диабетическими мышами, получавшими носитель ($p < 0,05$). Даже у мышей в группе Nic. наблюдались более низкие уровни апоптоза, чем у диабетических мышей, получавших носитель, но не на статистически значимых уровнях. Неожиданно было обнаружено, что результаты в группе Cit + Nic демонстрируют синергетический эффект в отношении снижения и предотвращения апоптоза со статистически значимым различием по сравнению с монотерапией, а также с группой плацебо и без статистической значимости по сравнению с контрольной группой. Такой результат можно сравнить с синергетическим действием двух действующих веществ: многофакторного механизма действия цитиколина и противоокислительного клеточного действия никотинамида. Такая синергия отвечает за сильное протекторное действие для клеточных структур и за предотвращение апоптоза, гарантируя, таким образом, важное нейропротекторное действие.

(5) Антиапоптотическую и защитную роль синапса подтверждали результатами, связанными с уровнями каспазы-3 и синаптофизина, обнаруженными в различных группах. Каспаза-3 представляет собой фермент, участвующий в

запрограммированной клеточной смерти, активно участвующий в апоптотическом процессе, и во время нейродегенеративных процессов его уровни заметно повышаются. У мышей db/db было выявлено статистически значимое увеличение уровней каспазы-3 по сравнению с контрольной группой. Такие уровни существенно снижены в группе Cit + Nic со статистически значимым различием не только по сравнению с группой плацебо, но даже по сравнению с монотерапией при введении препаратов по отдельности (Cit.; Nic) (Фиг. 5). Синаптофизин представляет собой белок, присутствующий в пресинаптических пузырьках, и представляет собой первый показатель синаптической потери и последующей гибели нейронов. У мышей db/db, получавших плацебо, наблюдалась понижающая регуляция синаптофизина, статистически значимая по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). В группе Cit. и группе Nic. наблюдалось статистически значимое увеличение уровней синаптофизина, которые достигали значений здорового контроля в группе Cit + Nic с более высокой эффективностью по сравнению с теми же молекулами, вводимыми по отдельности (Фиг. 6). Такой результат еще раз подтверждает мощный синергетический эффект комбинации цитиколин + никотинамид, в частности, благодаря его антиапоптотическому механизму, который будет обеспечивать важную нейропротекторную терапию нейродегенеративных патологий, при которых апоптоз представляет собой первый этап нейродегенеративного процесса.

Пример 3. Клиническое наблюдение пациентов, страдающих открытоугольной глаукомой

Нейропротекторное действие комбинации цитиколин + никотинамид в растворе для перорального введения в соответствии с настоящим изобретением оценивали в клиническом наблюдении, выполняемом среди пациентов, страдающих открытоугольной глаукомой. Выбранные пациенты должны иметь диагноз открытоугольная глаукома в течение по меньшей мере 2 лет, они должны проходить любую гипотензивную лекарственную терапию для регулирования внутриглазного давления ($IOP \leq 18$ мм рт. ст.), они должны иметь скорость прогрессирования кампиметрического повреждения, равную потере по меньшей мере 1 дБ относительно среднего дефекта (MD) в год (*скорость*

прогрессирования — *RoP*), продемонстрированную по меньшей мере в 4 полях зрения в течение 2 предшествующих лет.

12 рандомизированных пациентов были включены в 4 группы:

- **СИТ. ГРУППА** — 3 пациента, получавших цитиколин в растворе для перорального введения, 10 мл/сутки, что соответствует 500 мг/сутки цитиколина дополнительно к гипотензивной терапии;
- **НИС. ГРУППА** — 3 пациента, получавших никотинамид в растворе для перорального введения, 10 мл/сутки, что соответствует 100 мг/сутки никотинамида дополнительно к гипотензивной терапии;
- **СИТ. + НИС. ГРУППА** — 3 пациента, получавших цитиколин + никотинамид в растворе для перорального введения, 10 мл/сутки, что соответствует 500 мг/сутки цитиколина и 100 мг/сутки никотинамида дополнительно к гипотензивной терапии.
- **НТ ГРУППА** — 3 пациента, получавших только гипотензивную терапию.

Пациентов лечили и наблюдали в течение 6 месяцев. На *исходном уровне* и через 6 месяцев лечения: полное обследование глаз, включая остроту зрения, контроль внутриглазного давления (IOP) методом тонометрии по Гольдману (GAT); выполняли тестирование поля зрения, электрофункциональное и морфологическое исследование.

(1) Тестирование поля зрения выполняли с помощью автоматической периметрии (HFA, протокол Sita Standard 24–2; Zeiss, г. Сан-Леандро, штат Калифорния, США). Такой анализ представляет собой золотой стандарт для диагностики и последующего наблюдения пациента с глаукомой и позволяет графически отображать расширение зрительной возможности посредством измерения даже периферического зрения. При каждом обследовании выполняли два анализа и для анализа учитывали второй тест. Для выполнения теста пациентов располагали перед прибором. Упираясь лбом и подбородком в купол, с прикрытым необследуемым глазом они начинали фиксировать центральную цель и нажимали кнопку всякий раз, когда воспринимали напротив себя световой раздражитель, даже если он был слабой интенсивности. Значение MD считали периметрическим

индексом.

Затем выполняли (2) электрофункциональный тест: электроретинограмма, полученная методом паттерн-PERG, и зрительные вызванные потенциалы PEV для оценки биоэлектрических ответов, соответственно, ганглиозных клеток сетчатки и зрительной коры, вызванных зрительными раздражителями. Пациентов располагали в полутемном помещении со звукоизоляцией перед дисплеем, окруженным равномерным полем с освещенностью 5 кд/м². Записи в PERG и в PEV выполняли с использованием одних и тех же визуальных раздражителей: на телевизионном мониторе размером 18 x 18 градусов показывали контрастную модуляцию в шахматном порядке с ритмично чередующимся по времени белыми и черными элементами (18 градусов визуальной дуги, контраст 80% и скорость две инверсии в секунду). Такой способ позволяет обнаруживать максимальную чувствительность и специфичность PERG и PEV при обнаружении ретинальных и постретинальных дисфункций в глазах с глаукомой. Сигнал на PERG и PEV регистрировали небольшим электродом Ag/AgCl, расположенным, соответственно, над нижним веком и на волосистой части головы. Транзиторный ответ на PERG характеризуется рядом волн с тремя последовательными пиками отрицательной, положительной и отрицательной полярности соответственно. У субъектов с нормальным зрением данные пики имеют следующее время задержки: 35,50 и 95 мс (N35, P50, N95, буква обозначает полярность, цифра — время задержки). Ширину между пиками измеряли при PERG P50-N95 для каждой волны. Транзиторный ответ на PEV характеризуется рядом волн с тремя последовательными пиками отрицательной, положительной, отрицательной полярности соответственно. У субъектов с нормальным зрением данные пики имеют время задержки 75, 100 и 145 мс (N75, P100, N145). Измеряли время задержки PEV P100 для каждой из средних волн, отображенных в записях. Во время сеанса записи одновременную регистрацию PERG и PEV проводили по меньшей мере дважды (от двух до шести раз), а полученные формы волны накладывали друг на друга для проверки воспроизводимости результатов. Во время сеанса записи две последовательные волны, имеющие разность в мс (для времени задержки при PEV P100) и в мкВ (для значений ширины при PERG P50-N95 и PEV

N75-P100) ниже значений внутрииндивидуальной вариабельности (2 мс для предполагаемых значений времени rev P100 и примерно $\pm 0,18$ мкВ для значений ширины PERG P50-N95 и PEV N75-P100), считали взаимно налагаемыми и, соответственно, воспроизводимыми.

(3) Оценку толщины слоя нервных волокон RNFL выполняли с помощью *спектральной* оптической когерентной томографии SD-OCT (RTVue модели RT100, версия 3.5; Optovue Inc, г. Фримонт, штат Калифорния, США). Такой анализ позволяет проводить томографию сетчатки, способную выявлять посредством поперечных сечений высокого разрешения, структурные детали клеточных слоев и их сплетения и обеспечивает возможность качественного и количественного анализа изменений сетчатки. Пациентов располагали перед прибором и просили наблюдать за светящейся мишенью: прибор после фокусировки на анализируемой структуре глаза выполняет сканирование. По результатам OCT среднее значение RNFL-T для четырех измерений на квадрант считали: верхним (RNFL-TS), нижним (RNFL-TI), назальным (RNFL-TN) и темпоральным (RNFL-TT); все данные, полученные во всех квадрантах (в среднем 16 значений), были обозначены как общее значение RNFL (RNFL-TO).

Наконец, пациентам предлагали заполнить опросный лист для оценки соблюдения терапии и возможных побочных эффектов.

Учитывали только данные, относящиеся к наихудшему глазу. Для всех тестов зафиксированный уровень значимости составлял $p < 0,05$.

Результаты

В таблице 3 — характеристики 12 пациентов на *исходном уровне*.

Параметры	Группа цитиколина (3)	Группа никотинамида (3)	Группа цитиколин + никотинамид (3)	Группа без лечения (3)
Средний возраст	63,9	63,1	62,9	64,8
ИОР	14,3 ($\pm 2,2$)	13,8 ($\pm 2,5$)	14,1 ($\pm 2,3$)	14,5 ($\pm 2,4$)
MD	-8,9 ($\pm 3,1$)	-8,7 ($\pm 2,9$)	-8,8 ($\pm 2,8$)	-8,9 ($\pm 2,7$)
PERG P50-N95 A (мкВ)	1,21 ($\pm 0,24$)	1,16 ($\pm 0,43$)	1,09 ($\pm 0,33$)	1,23 ($\pm 0,23$)
PEV P100 IT (мс)	127,2 ($\pm 7,51$)	128,5 ($\pm 7,24$)	126,3 ($\pm 6,78$)	126,9 ($\pm 6,88$)
RNFL-TO	65,8 ($\pm 12,2$)	62 ($\pm 13,0$)	64,7 ($\pm 11,9$)	63,4 ($\pm 12,1$)

Таблица 3. Характеристики пациентов на исходном уровне

В таблице 4 — результаты, полученные через 6 месяцев, относящиеся к IOP, MD, PERG, PEV, и значения, относящиеся к толщине RNFL.

Через 6 месяцев лечения	Группа цитиколина (3)	Группа никотинамида (3)	Группа цитиколин + никотинамид (3)	Группа без лечения (3)
IOP	13,8 (± 1,8)	14,0 (± 2,3)	13,9 (± 2,2)	14,3 (± 2,3)
MD	-8,70 (± 2,8)*	-8,92 (± 2,6)*	-8,10 (± 2,5)*	-9,4 (± 2,7)
PERG P50-N95 A (мкВ)	1,77 (± 0,27)*	1,74 (± 0,21)*	2,29 (± 0,21)*#	1,10 (± 0,43)
PEV P100 IT (мс)	119,1 (± 7,22)*	119,5 (± 7,00) *	114,3 (± 6,89)*#	127,3 (± 5,18)
RNFL-TO	65,0 (± 12,0)*	61,1 (± 12,5) *	64,5 (± 12,1)*#	61,3 (± 11,8)

* $p < 0,05$ по сравнению с группой без лечения; # $p < 0,05$ по сравнению с другими группами (цитиколин; никотинамид; без лечения).

Таблица 4. Результаты в различных группах, получавших лечение, через 6 месяцев

В группе, получавшей только цитиколин (Cit.), было выявлено значительное улучшение MD по сравнению с исходным уровнем. Такое улучшение является статистически значимым даже по сравнению с группой без лечения. В группе, получавшей только никотинамид (Nic.), в конце исследования наблюдалось более сильное снижение значения MD по сравнению с группой без лечения (NT). В группе, получавшей комбинацию Cit. + Nic. в растворе для перорального введения, неожиданно наблюдалось заметное улучшение MD. Сравнение с введением различных молекул, протестированных по отдельности, выявило синергетический эффект предложенной комбинации, поскольку оно продемонстрировало более высокую эффективность данной комбинации в отношении зрительной функции. Электрофункциональная оценка выявила улучшение параметров, относящихся к ширине для PERG и времени задержки для PEV, у всех получавших лечение пациентов. В группе без лечения наблюдалось значительное ухудшение данных параметров. Выявлена более высокая эффективность при применении комбинации

Cit + Nic в растворе для перорального введения со статистически значимым различием не только по сравнению с группой без лечения, но даже по сравнению с монотерапией ($p < 0,05$).

Наконец, морфологическое исследование подтверждает нейропротекторную эффективность различных видов лечения для слоев сетчатки. В частности, неожиданно было обнаружено, что комбинация Cit. + Nic. является самой эффективной, поскольку она останавливает утолщение нервных волокон статистически значимым образом по сравнению со всеми группами. Даже в этом случае улучшение, достигнутое с применением предложенной комбинации, является более высоким, чем суммарный эффект одних молекул, вводимых по отдельности, что подтверждает синергию действия двух действующих веществ. Такое утолщение является существенно заметным в группе без лечения. Для любого вида лечения не было зарегистрировано побочных реакций.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Morreale B, Bubella R et al. Neuroprotection of patient with open-angle chronic Glaucoma: role of citicoline in oral solution”. *Ottica Fisiopatologica* 2011.
2. Williams PA, et al. Vitamin B3 modulates mitochondrial vulnerability and prevents glaucoma in aged mice. *Science* 2017;355, 756–760.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для перорального применения в форме водного раствора, содержащего цитиколин и никотинамид.
2. Композиция по п. 1, в которой цитиколин присутствует в концентрации, составляющей от 25 мг/мл до 100 мг/мл, предпочтительно от 49,75 до 50,25 мг/мл или приблизительно 50 мг/мл.
3. Композиция по одному из пп. 1 или 2, в которой никотинамид присутствует в концентрации, составляющей от 5 мг/мл до 20 мг/мл, предпочтительно от 9,95 до 10,05 мг/мл или приблизительно 10 мг/мл.
4. Композиция по любому из пп. 1–3, в которой соотношение между цитиколином в форме свободной кислоты и никотинамидом составляет от 2,5 : 0,5 до 10 : 2, предпочтительно 5 : 1.
5. Композиция по любому из пп. 1–4, дополнительно содержащая одно или более из следующих соединений: сорбат калия, лактат натрия, фруктоза, лимонная кислота.
6. Композиция по любому из пп. 1–5, в которой сорбат калия присутствует в концентрации, составляющей от 1,34 мг/мл до 3,00 мг/мл, предпочтительно от 2,67 мг/мл до 2,69 мг/мл или приблизительно 2,68 мг/мл, и/или при этом 60%-й лактат натрия присутствует в концентрации, составляющей от 2,5 мг/мл до 7 мг/мл, предпочтительно от 4,975 до 5,025 мг/мл или приблизительно 5 мг/мл, и/или при этом фруктоза присутствует в концентрации, составляющей от 150 мг/мл до 400 мг/мл, предпочтительно в диапазоне от 298,5 до 301,5 мг/мл или приблизительно 300 мг/мл, и/или при этом безводная лимонная кислота присутствует в концентрации, составляющей от 0,92 мг/мл до 2,00 мг/мл, предпочтительно от 1,82 до 1,84 мг/мл или приблизительно 1,83 мг/мл.
7. Композиция по любому из пп. 1–6, дополнительно содержащая один или более эксципиентов и/или добавок.
8. Композиция по любому из пп. 1–7, имеющая высокую биодоступность, в частности указанная биодоступность цитиколина и никотинамида сравнима с биодоступностью при внутривенном введении, в частности она составляет от 90%

до 100%, предпочтительно она составляет по меньшей мере 98%.

9. Композиция по любому из пп. 1–8, в которой рН составляет от 3 до 5, предпочтительно от 3,9 до 4,1 или приблизительно 4,00.

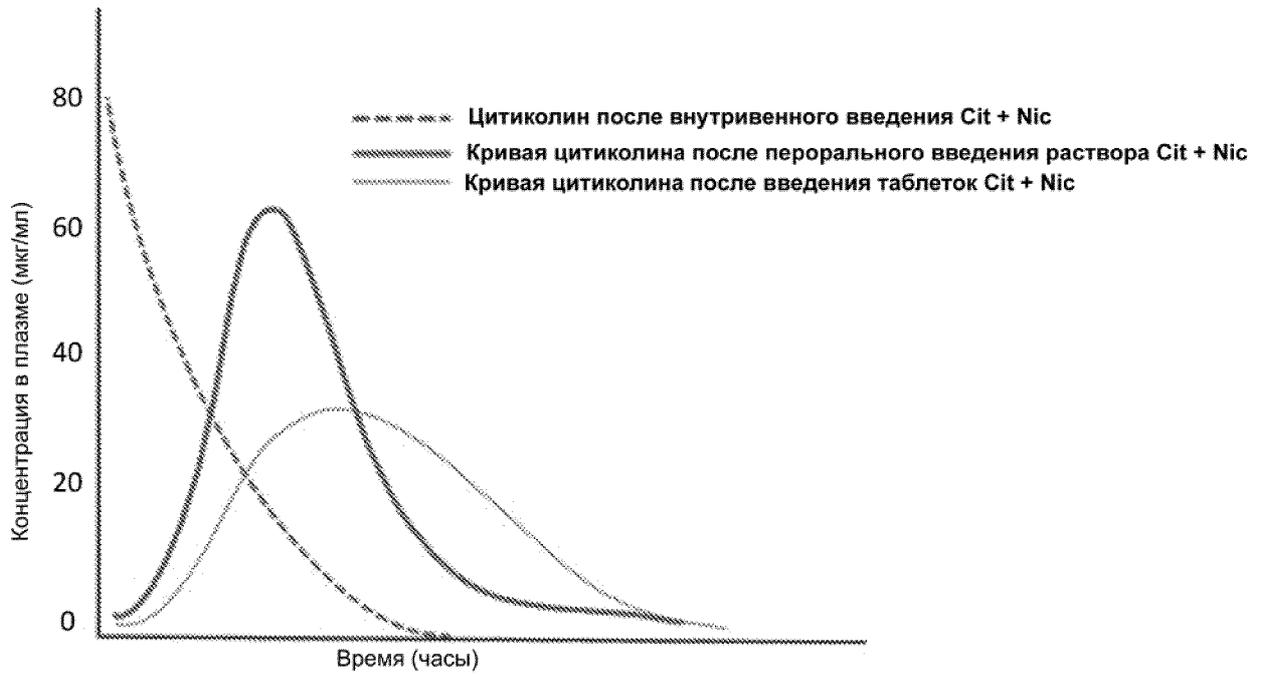
10. Композиция по любому из пп. 1–9, в которой плотность составляет от 1,116 до 1,156 г/мл, предпочтительно 1,136 г/мл.

11. Композиция по любому из пп. 1–10 для применения в лечении нейродегенеративной патологии.

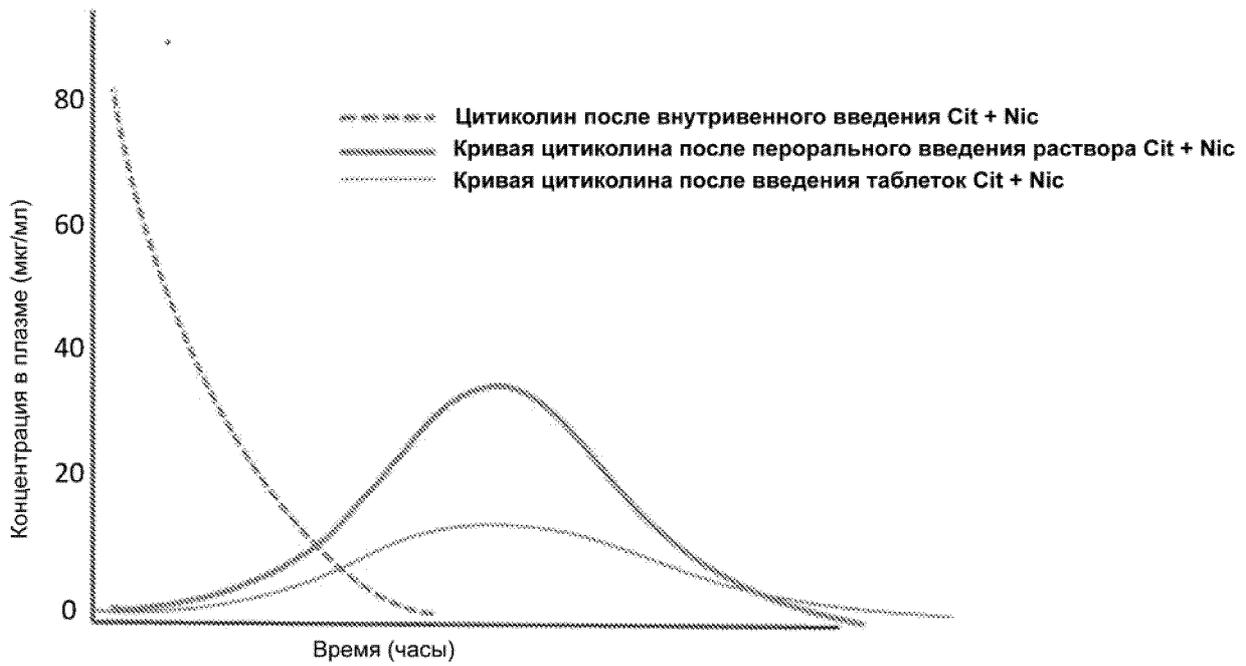
12. Композиция по любому из пп. 1–10 для применения в лечении глаукомы.

13. Композиция по п. 11 или 12, вводимая один раз в сутки, предпочтительно утром.

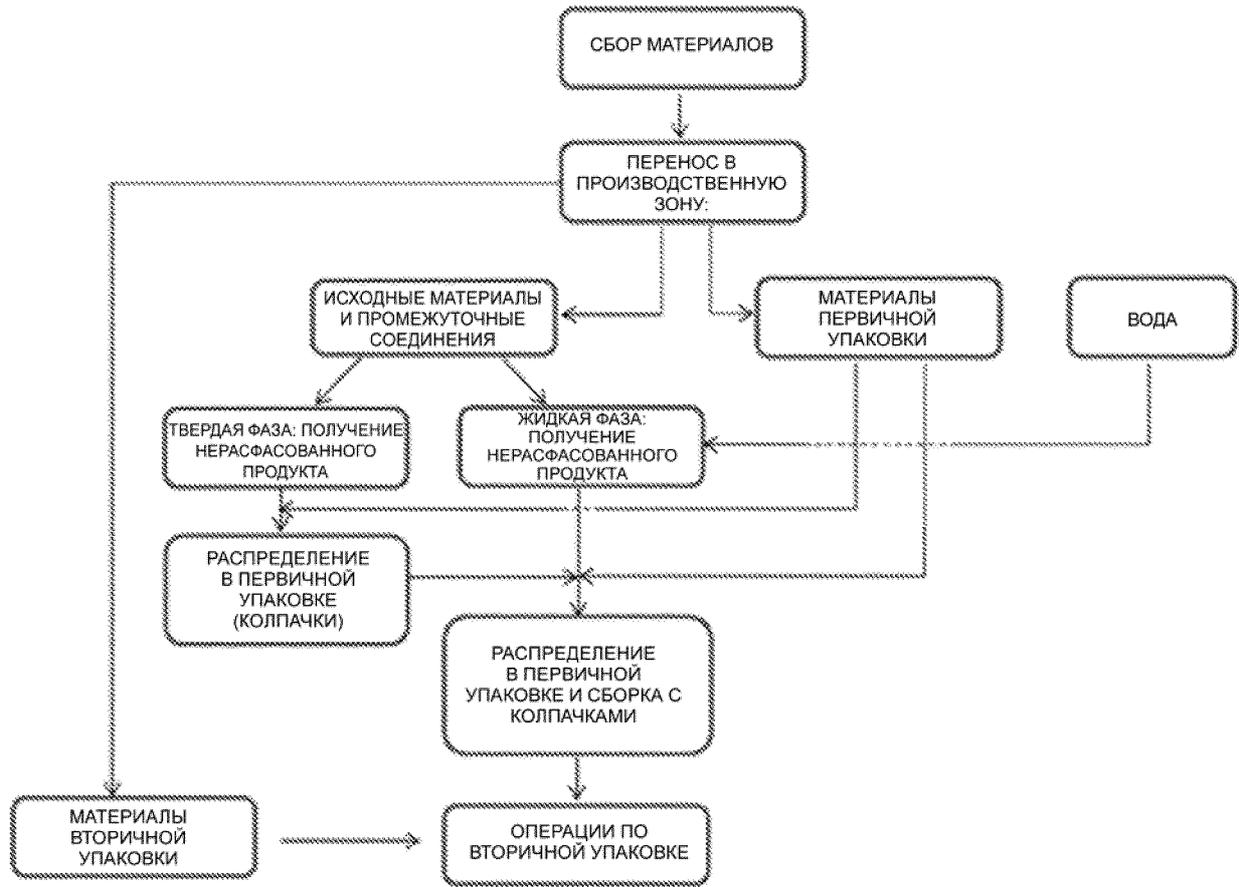
14. Способ получения композиции по пп. 1–13, включающий стадии растворения и смешивания в воде активных ингредиентов цитиколина и никотинамида.



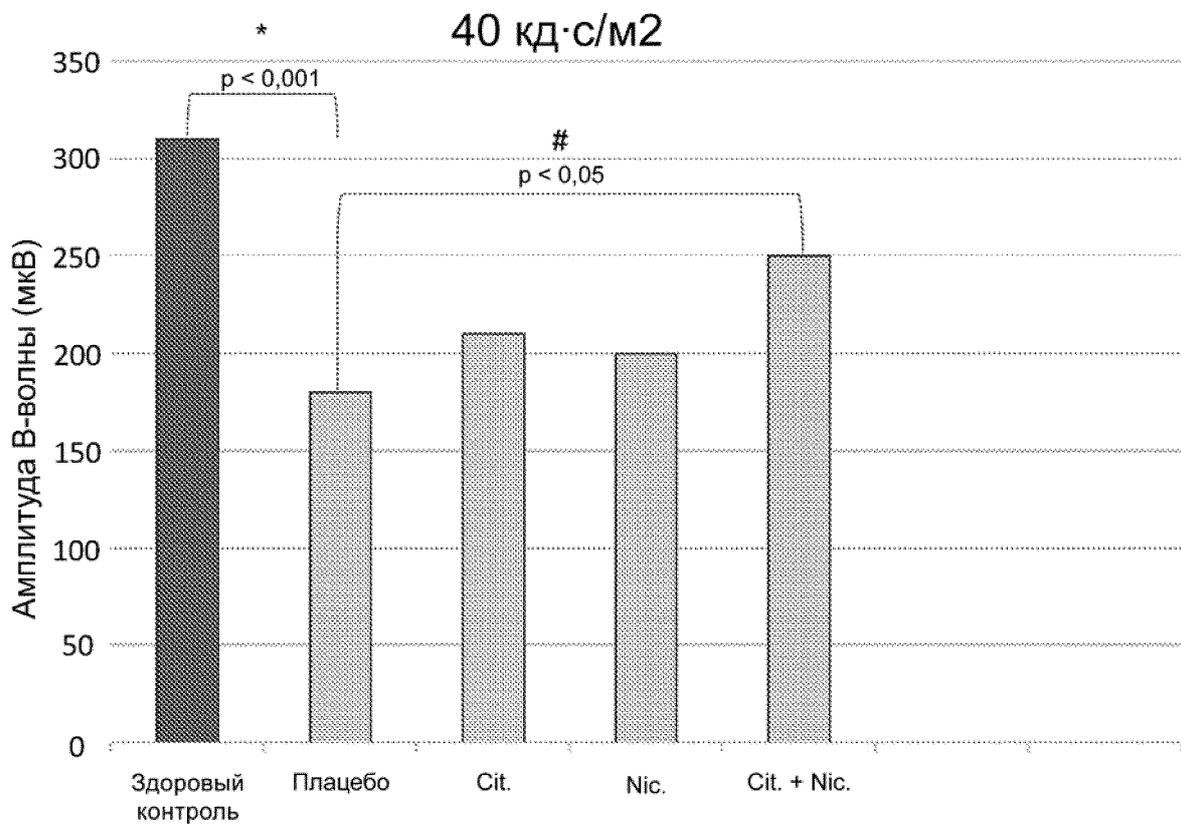
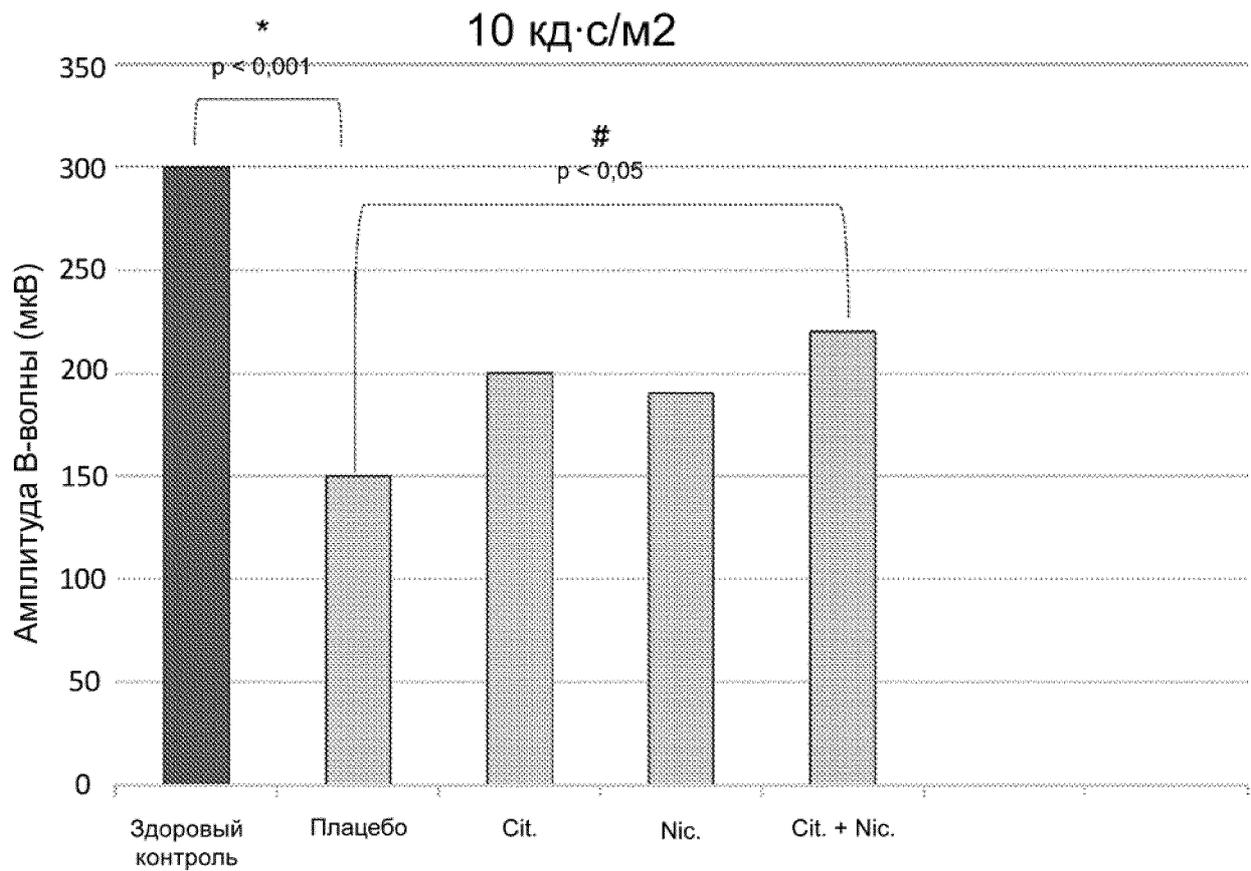
ФИГ. 1а.



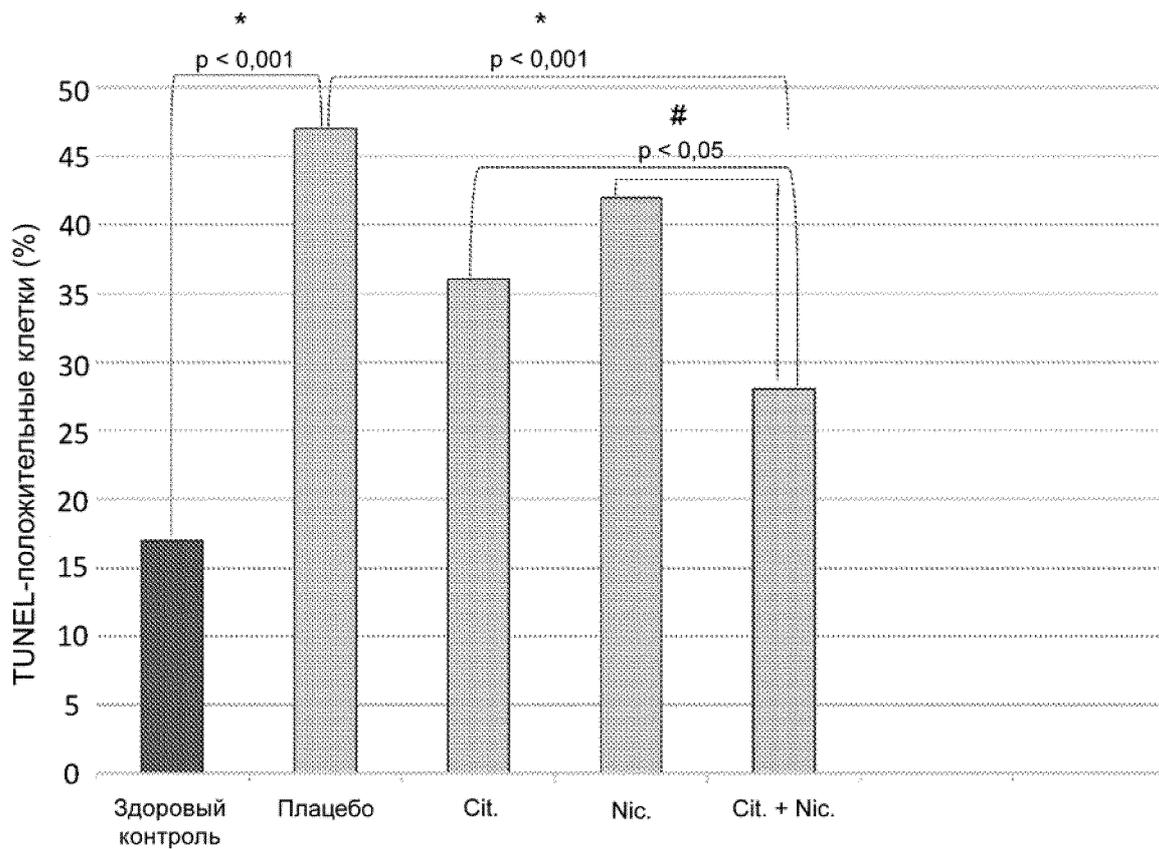
ФИГ. 1б.



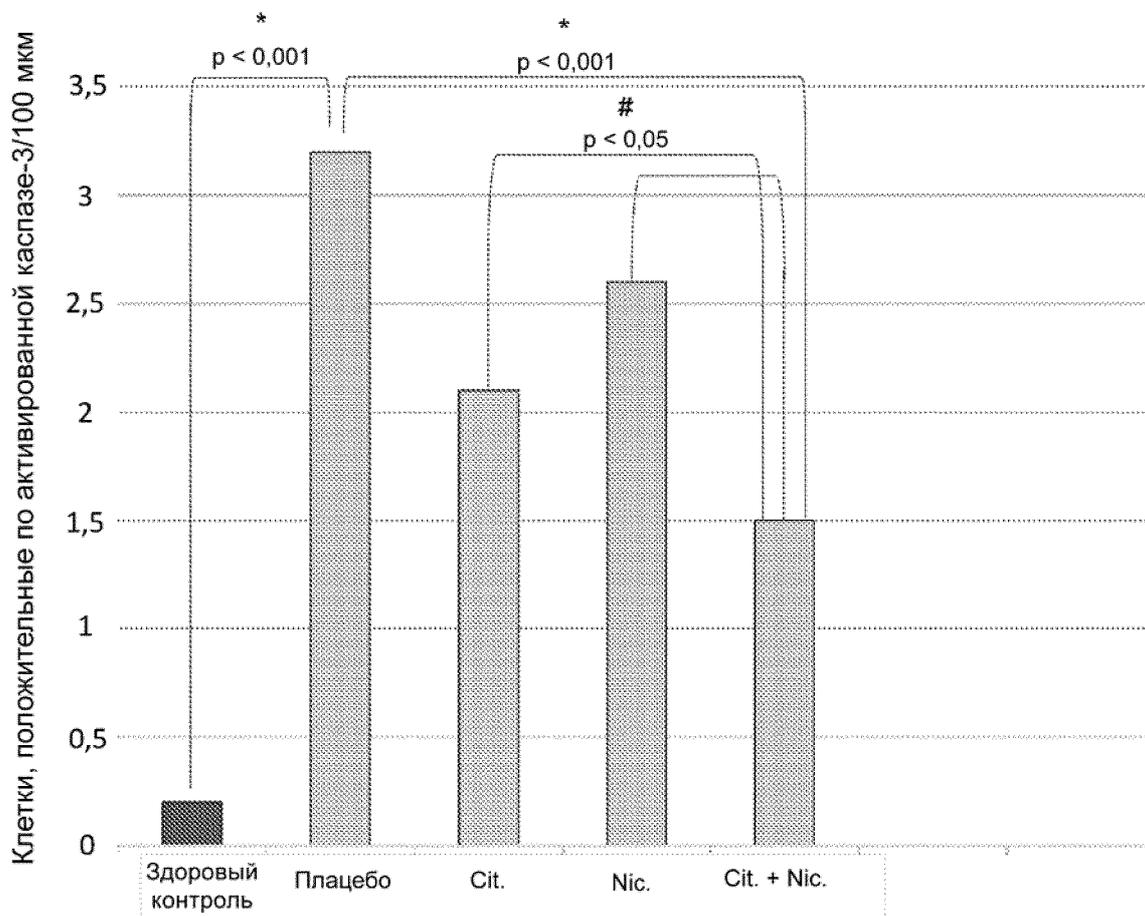
ФИГ. 2.



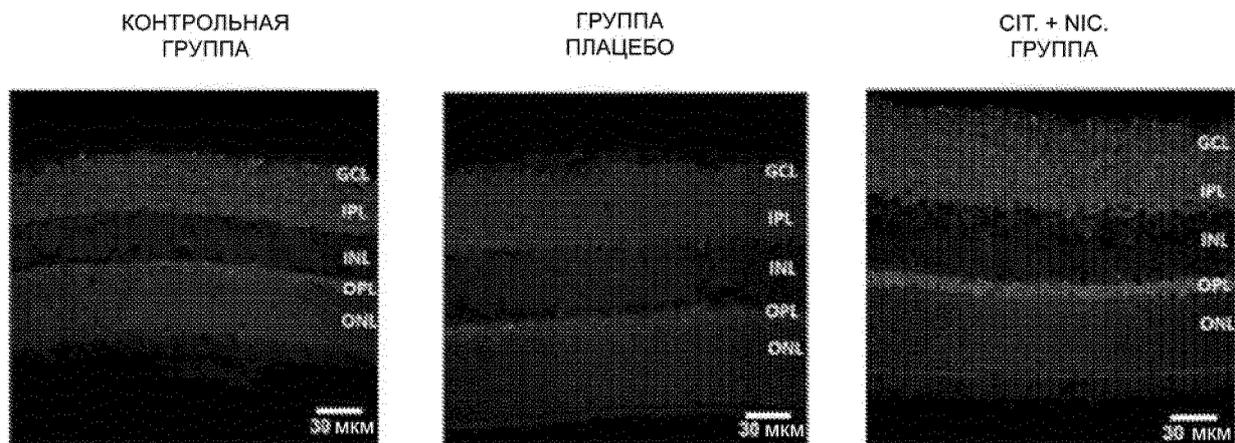
Фиг. 3.



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6