

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046719**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

**2024.04.16**

(21) Номер заявки

**201400729**

(22) Дата подачи заявки

**2012.12.10**

(51) Int. Cl. *A61K 31/225* (2006.01)  
*A61K 31/4439* (2006.01)  
*A61K 31/70* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01)  
*A61P 17/06* (2006.01)  
*A61P 1/04* (2006.01)  
*A61P 17/14* (2006.01)  
*A61P 5/48* (2006.01)  
*A61P 21/04* (2006.01)  
*A61K 31/05* (2006.01)  
*A61K 31/12* (2006.01)  
*A61K 31/16* (2006.01)  
*A61K 31/19* (2006.01)  
*A61K 31/216* (2006.01)  
*A61K 31/26* (2006.01)  
*A61K 31/385* (2006.01)  
*A61K 31/47* (2006.01)

(54) **СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ АУТОИММУННОГО И/ИЛИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО НАРУШЕНИЯ, ВЫБРАННОГО ИЗ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА ИЛИ КЛИНИЧЕСКИ ИЗОЛИРОВАННОГО СИНДРОМА (CIS), ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, ТВЕРДАЯ ПЕРОРАЛЬНАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА И НАБОР ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В УКАЗАННОМ СПОСОБЕ**

(31) **11194292.6; 12004652.9; 61/663,761;****13/654,632**(32) **2011.12.19; 2012.06.21; 2012.06.25;****2012.10.18**(33) **EP; EP; US; US**(43) **2014.12.30**(86) **PCT/EP2012/074915**(87) **WO 2013/092269 2013.06.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**БЬЁРН КОЛИН КАРС (CH)**

(72) Изобретатель:

**Карс Бьёрн Колин (CH)**

(74) Представитель:

**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,  
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов  
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,  
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) **WO-A2-2004098510****WO-A1-2011039175****US-A1-2011281829**

**RUPJYOTI TALUKDAR ET AL.:** "Pancreatic stellate cells: New target in the treatment of chronic pancreatitis", *JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY*, vol. 23, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 34-41, XP055055864, ISSN: 0815-9319, DOI: 10.1111/j.1440-1746.2007.05206.x, the whole document

**H.E. FERGUSON ET AL.:** "Electrophilic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Ligands Have Potent Antifibrotic Effects in Human Lung Fibroblasts",

*AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY*, vol. 41, no. 6, 1 December 2009 (2009-12-01), pages 722-730, XP55052108, ISSN: 1044-1549, DOI: 10.1165/rmb.2009-00060C, the whole document

**MROWIETZ U. ET AL.:** "Dimethylfumarate for psoriasis: more than a dietary curiosity", *TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE, ELSEVIER CURRENT TRENDS, GB*, vol. 11, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 43-48, XP027724348, ISSN: 1471-4914 [retrieved on 2005-01-01], abstract

**ROBERTSHAW H. ET AL.:** "Pioglitazone: a promising therapy for psoriasis", *BRITISH JOURNAL OF DERMATOLOGY, PUBLISHED FOR THE BRITISH ASSOCIATION OF DERMATOLOGISTS BY BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS NOT ETC.*, vol. 152, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 189-191, XP002565656, ISSN: 0007-0963, DOI: 10.1111/J.1365-2133.2005.06369.X [retrieved on 2005-01-05], page 189

**A. BAGHDASARYAN ET AL.:** "Curcumin improves sclerosing cholangitis in Mdr2<sup>-/-</sup> mice by inhibition of cholangiocyte inflammatory response and portal myofibroblast proliferation", *GUT*, vol. 59, no. 4, 23 March 2010 (2010-03-23), pages 521-530, XP055058566, ISSN: 0017-5749, DOI: 10.1136/gut.2009.186528, abstract

**DINA S. EL-AGAMY ET AL.:** "Prevention and treatment of induced liver fibrosis in mice", *INFLAMMOPHARMACOLOGY; EXPERIMENTAL AND CLINICAL STUDIES - OFFICIAL PUBLICATION OF THE GASTROINTESTINAL SECTION OF THE INTERNATIONAL UNION OF PHARMACOLOGY (IUPHAR)*, BIRKHÄUSER-VERLAG, BA, vol. 19, no. 6, 23 September 2011 (2011-09-23), pages 307-316, XP019986143, ISSN: 1568-5608, DOI: 10.1007/S10787-011-0092-6, the whole document

**DATABASE MEDLINE [Online], US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US;**

**046719 B1**

**046719**

**B1**

July 2009 (2009-07), JHA RAJIV K. ET AL.: "Acute pancreatitis: a literature review", XP002694923, Database accession no. NLM19564840, abstract & JHA RAJIV K. ET AL.: "Acute pancreatitis: a literature review", MEDICAL SCIENCE MONITOR: INTERNATIONAL MEDICAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL RESEARCH, JUL 2009, vol. 15, no. 7, July 2009 (2009-07), pages RA147-RA156, ISSN: 1643-3750

RAU OLIVER ET AL.: "Carnosic acid and carnosol, phenolic diterpene compounds of the labiate herbs rosemary and sage, are activators of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma", PLANTA MEDICA, THIEME VERLAG, DE, vol. 72, no. 10, 1 August 2006 (2006-08-01), pages 881-887, XP009126063, ISSN: 0032-0943, the whole document  
WO-A2-010039529

Y. KIM: "An Inducible Pathway for Degradation of FLIP Protein Sensitizes Tumor Cells to TRAIL-induced Apoptosis", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 25, 14 June 2002 (2002-06-14), pages 22320-22329, XP055056033, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M202458200, the whole document

SHISHODIA S. ET AL.: "CURCUMIN: GETTING BACK TO THE ROOTS", ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING, INC, US, vol. 1056, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 206-217, XP009067987, ISSN: 0077-8923, DOI: 10.1196/ANNALS.1352.010, the whole document

WO-A1-2009089545

US-A1-2002164385

- 
- (57) Изобретение относится к способу лечения аутоиммунного и/или воспалительного нарушения, выбранного из рассеянного склероза или клинически изолированного синдрома (CIS), включающему одновременное, раздельное или последовательное введение PPAR гамма агониста, выбранного из группы глитазонов и их солей с Nrf2 активатором, выбранным из группы сложных эфиров фумаровой кислоты и их солей. Изобретение также относится к фармацевтической композиции, твердой пероральной лекарственной форме и набору, содержащим указанные PPAR гамма агонист и Nrf2 активатор, для применения в указанном способе.

046719 B1

046719 B1

В настоящем изобретении описан способ лечения аутоиммунного и/или воспалительного нарушения, выбранного из рассеянного склероза или клинически изолированного синдрома (CIS), включающий одновременное, раздельное или последовательное введение PPAR гамма агониста, выбранного из группы глитазонов и их солей с Nrf2 активатором, выбранным из группы сложных эфиров фумаровой кислоты и их солей. Изобретение также относится к фармацевтической композиции, твердой пероральной лекарственной форме и набору, содержащим указанные PPAR гамма агонист и Nrf2 активатор, для применения в указанном способе.

PPAR агонисты и Nrf2 активаторы (каждый далее "агент" и совместно "агенты").

Рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом (PPAR), активируют транскрипцию путем связывания с элементами ДНК последовательностей, известные как элементы ответа для пролифератора пероксисом (PPRE), в форме гетеродимера с рецепторами ретиноида X (известного как RXR). Были идентифицированы и описаны три подтипа PPAR человека: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  (PPAR гамма) и PPAR $\delta$  (или NUC1). PPAR $\alpha$  экспрессируется главным образом в печени, тогда как PPAR $\delta$  встречается повсюду. PPAR $\gamma$  наиболее широко изучен из этих трех подтипов. См., например, "Differential Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Subtypes During the Differentiation of Human Keratinocytes", Michel Rivier et al., *J. Invest. Dermatol.*, 111, 1998, p. 1116-1121, в котором перечислены большое количество библиографических ссылок, относящихся к рецепторам типа PPAR. Также следует упомянуть отчет под названием "The PPARs: From orphan receptors to Drug Discovery", Timothy M. Willson, Peter J. Brown, Daniel D. Sternbach и Brad R. Henke, *J. Med. Chem.*, 2000, vol. 43, p. 527-550. Показано, что PPAR $\gamma$  играет решающую роль в регуляции дифференциации адипоцитов, где он значительно экспрессируется. Он также играет чрезвычайно важную роль в системном липидном гомеостазе.

Было описано, что тиазолидиндионовый класс соединений (группа так называемых глитазонов), включая росиглитазон, росиглитазон малеат, пиоглитазон, гидрохлорид пиоглитазона, троглитазон и сиглитазон и или их солевые формы, являются эффективными и селективными активаторами PPAR-гамма (так называемые PPAR гамма агонисты) и связываются непосредственно с PPAR-гамма рецептором (J.M. Lehmann et al., *J. Biol. Chem.* 12953-12956, 270 (1995)), обеспечивая доказательства того, что PPAR-гамма является возможной мишенью для терапевтических действий тиазолидиндионов. В связи с таким наблюдением было показано, что активация этого ядерного гормонального рецептора имеет плейотропные и негипогликемические эффекты. Клиническое применение агентов для лечения сахарного диабета 2 типа (или инсулин-независимого сахарного диабета (NIDDM)) связано с сенсбилизацией к эффектам инсулина понижать уровень глюкозы, а также потенцированием других биологических действий инсулина в тканях-мишенях. При использовании в качестве монотерапии была описана задержка жидкости, что приводит к увеличению объема и у некоторых пациентов к клиническому отеку. Полагают, что частота отеков повышается, если оба этих агента используются в комбинации с инсулином (Nesto R.W. et al., 2003, *Circulation*, 108, 2941-2948). Тем не менее механизмы, вовлеченные в эти эффекты, не были хорошо описаны, но природа презентации предполагает интегрированный физиологический ответ, который включает влияние на почечный солевой и водный баланс. PPAR гамма рецепторы были обнаружены в собирательных трубках почек (Guan Y. et al., 2001, *Kidney Int.* 60, 14-30), и, следовательно, PPAR гамма агонисты могут быть вовлечены непосредственно в почечный трубчатый метаболизм или могут оказывать вторичные воздействия на солевой и водный гомеостаз. PPAR гамма агонист пиоглитазон был предложен в качестве лечения псориаза, например, в *British Journal of Dermatology*, 2005, 152, p. 176-198. Ядерный фактор эритроид-2 связанный фактор 2 или ядерный фактор E2p45-связанный фактор (Nrf2) представляет собой "основной транскрипционный фактор лейциновой застезка типа "cap-and-collar", регулирующий транскрипционную программу, которая поддерживает клеточный окислительно-восстановительный гомеостаз и защищает клетки от окислительного инсульта (Rangasamy T., et al., *J. Clin. Invest.* 114, 1248 (2004); Thimmulappa R.K., et al., *Cancer Res.* 62, 5196 (2002); So H.S., et al., *Cell Death Differ* (2006)). NRF2 активирует транскрипцию его генов-мишеней посредством связывания специфически с антиоксидант-отвечающим элементом (ARE), обнаруженном в промоторах этих генов. NRF2-регулируемая транскрипционная программа включает широкий спектр генов, включая антиоксиданты, такие как модифицирующая субъединица  $\gamma$ -глутамил цистеин синтетазы (GCLm), каталитическая субъединица  $\gamma$ -глутамил цистеин синтетазы (GCLc), гем-оксигеназа-1, супероксиддисмутаза, глутатион-редуктаза (GSR), глутатионпероксидаза, тиоредоксин, тиоредоксинредуктаза, пероксиредоксины (PRDX), переносчик цистеин/глутамат (SLC7A11) (7, 8), ферменты детоксификации фазы II [NADP(H) хиноноксидоредуктаза 1 (NQO1), GST, UDP-глюкуронозилтрансфераза (Rangasamy T., et al., *J. Clin. Invest.* 114:1248 (2004); Thimmulappa R.K., et al., *Cancer Res.* 62:5196 (2002)), и некоторые АТФ-зависимые лекарственные эффлюксные насосы, включая MRP1, MRP2 (Hayashi A., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310:824 (2003)); Vollrath V., et al., *Biochem. J.* (2006)); Nguyen T., et al., *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43:233 (2003)). Взаимосвязанным с Nrf2 является KEAP1, который представляет собой цитоплазматический якорь Nrf2, также функционирующий в качестве субстратного адаптерного белка для Cul3-зависимого E3 убиквитин лигазного комплекса для поддержания равновесных уровней NRF2 и NRF2-зависимой транскрипции (Kobayashi et al., *Mol. Cell Biol.* 24:7130 (2004); Zhang D., et al., *Mol. Cell*

Biol. 24:10491 (2004)). Keap1 ген расположен в локусе хромосомы человека 19p13.2. KEAP1 полипептид имеет три основных домена: (1) N-концевой широкий комплекс, Tramtrack, и "Bric-a-brac" (BTV) домен; (2) центральный интронный участок (IVR) и (3) серии шести C-концевых Kelch повторов (Adams J., et al., Trends Cell Biol. 10:17 (2000)). Kelch повторы KEAP1 связывают Neh2 домен Nrf2, в то время как IVR и BTV домены необходимы для чувствительного к окислительно-восстановительным процессам регулированию Nrf2 посредством серий реакционно-способных цистеинов, присутствующих в этом участке (Wakabayashi N., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:2040 (2004)). KEAP1 конститутивно экспрессирует Nrf2 активность при отсутствии стресса. Оксиданты, ксенобиотики и электрофилы препятствуют KEAP1-опосредованному протеасомному разложению Nrf2, что приводит к повышенному накоплению в ядре и, в свою очередь, транскрипционной индукции генов-мишеней, которые обеспечивают выживание клеток (Wakabayashi N., et al., Nat. Genet. 35:238 (2003)). Было показано, что протимозин  $\alpha$ , новый связывающий партнер KEAP1, является внутриядерным диссоциатором NRF2-KEAP1 комплекса и может повышенно регулировать экспрессию целевых генов Nrf2 (Karapetian R.N., et al., Mol. Cell Biol. 25:1089 (2005)). Предполагают определенные взаимодействия между Nrf2 и PPAR гамма, например Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2010; 182:170-182.

Nrf2 активаторы в соответствии с настоящим изобретением представляют собой агенты, которые после введения приводят к стимулированной и/или повышенной ядерной транслокации Nrf2 белка и вызывают последующее повышение генных продуктов, которые детоксифицируют и элиминируют цитотоксические метаболиты.

Nrf2 активаторы в соответствии с настоящим изобретением могут действовать непосредственно на Nrf2, KEAP1, NRF2-KEAP1 комплекс и/или другим образом. Nrf2 активаторы согласно настоящему изобретению содержат один или более сложных эфиров фумаровой кислоты, т.е. моно- и/или диэфиры фумаровой кислоты, которые предпочтительно выбирают из группы моноалкил гидрофумарата и диалкилфумарата, такого как монометил гидрофумарат, диметилфумарат, моноэтил гидрофумарат и диэтилфумарат или фармакологически активного производного или аналога вышеуказанных агентов.

Чрезвычайно предпочтительными Nrf2 активаторами для применения в комбинации с PPAR гамма агонистами в соответствии с настоящим изобретением являются сложные эфиры фумаровой кислоты.

Сложные эфиры фумаровой кислоты разрешены в Германии для лечения псориаза, проходят испытания в США для лечения псориаза и рассеянного склероза и были предложены для применения для лечения разнообразных иммунологических, аутоиммунных и воспалительных заболеваний и состояний. FAE и другие производные фумаровой кислоты были предложены для применения для лечения различных заболеваний и состояний, вовлекающих иммунологические, аутоиммунные и/или воспалительные процессы, включая псориаз (Joshi и Strebel, WO 1999/49858; US 6277882; Mrowietz и Asadullah, Trends Mol. Med. 2005, 111(1), 43-48; и Yazdi и Mrowietz, Clinics Dermatology, 2008, 26, 522-526); астму и хронические обструктивные заболевания легких (Joshi et al., WO 2005/023241 и US 2007/0027076); сердечную недостаточность, включая недостаточность левого желудочка, инфаркт миокарда и стенокардию (Joshi et al., WO 2005/023241; Joshi et al., US 2007/0027076); митохондриальные и нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, пигментарную ретинопатию и митохондриальную энцефалопатию (Joshi и Strebel, WO 2002/055063, US 2006/0205659, US 6509376, US 6858750 и US 7157423); трансплантацию (Joshi и Strebel, WO 2002/055063, US 2006/0205659, US 6359003, US 6509376 и US 7157423; и Lehmann et al., Arch. Dermatol. Res. 2002, 294, 399-404); аутоиммунные заболевания (Joshi и Strebel, WO 2002/055063, US 6509376, US 7157423 и US 2006/0205659), включая рассеянный склероз (MS) (Joshi и Strebel, WO 1998/52549 и US 6436992; Went и Lieberburg, US 2008/0089896; Schimrigk et al., Eur. J. Neurology, 2006, 13, 604-610; и Schilling et al., Clin. Experimental. Immunology, 2006, 145, 101-107); ишемию и реперфузионное повреждение (Joshi et al., US 2007/0027076); AGE-индуцированное повреждение генома (Heidland, WO 2005/027899); воспалительные заболевания кишечника, такие как болезнь Крона и неспецифический язвенный колит; артрит и др. (Nilsson et al., WO 2006/037342 и Nilsson и Müller, WO 2007/042034). Все эти показания и заболевания можно лечить или предотвращать с помощью комбинированного лечения согласно настоящему изобретению.

Fumaderm®, таблетка, покрытая кишечнорастворимой оболочкой, содержащая солевую смесь моноэтил фумарата и диметилфумарата, который быстро гидролизуется до монометил фумарата, была разрешена в Германии в 1994 г. для лечения псориаза. Fumaderm® дозируется три раза в сутки в дозе 1-2 г/сутки при введении для лечения псориаза.

Biogen Idec Inc. в настоящее время проводит клинические испытания диметилфумарата под торговым названием BG-12 для лечения возвратно-ремиттирующего рассеянного склероза. Лекарственное средство рассматривается регулирующими органами США и Европы.

Производные фумаровой кислоты (Joshi и Strebel, WO 2002/055063, US 2006/0205659 и US 7157423 (амидные соединения и конъюгаты протеин-фумарат); Joshi et al., WO 2002/055066 и Joshi и Strebel, US 6355676 (моно- и диалкиловые эфиры); Joshi и Strebel, WO 2003/087174 (карбоциклические и окскарбоциклические соединения); Joshi et al., WO 2006/122652 (тиосукцинаты); Joshi et al., US 2008/0233185

(диалкиловые и диариловые эфиры) и соли (Nilsson et al., US 2008/0004344) разрабатываются для преодоления существующих в настоящее время недостаточных терапий с помощью сложных эфиров фумаровой кислоты. Фармацевтические композиции с контролируемым высвобождением, которые содержат сложные эфиры фумаровой кислоты, были описаны Nilsson и Müller, WO 2007/042034. Пролекарства были описаны Nielsen и Bundgaard, J. Pharm. Sci. 1988, 77(4), 285-298 и в WO 2010/022177.

#### Подробное описание

Предпочтительно термин "алкил" специфически включает группы, имеющие любую степень или уровень насыщенности, т.е. группы, имеющие только единственную углерод-углеродную связь, группы, имеющие одну или более двойных углерод-углеродных связи, группы, имеющие одну или более тройных углерод-углеродных связей, и группы, имеющие комбинации единственную, двойную и тройную углерод-углеродные связи.

Если подразумевается специфический уровень насыщенности, используются термины "алканил", "алкенил" и "алкинил". В определенных вариантах осуществления алкильная группа может иметь от 1 до 20 атомов углерода (C<sub>1-20</sub>), в определенных вариантах осуществления от 1 до 10 атомов углерода (C<sub>1-10</sub>), в определенных вариантах осуществления от 1 до 8 атомов углерода (C<sub>1-8</sub>), в определенных вариантах осуществления от 1 до 6 атомов углерода (C<sub>1-6</sub>), в определенных вариантах осуществления от 1 до 4 атомов углерода (C<sub>1-4</sub>) и в определенных вариантах осуществления от 1 до 3 атома углерода (C<sub>1-3</sub>).

Термин "алкокси" относится к группе О-алкил, где алкил имеет значение, указанное выше.

Термин "перфторалкил" относится к алкильной группе, в которой все атомы водорода могут быть заменены фтором.

"Лечение" или "лечить" любого заболевания относится к реверсии, облегчению, остановке или облегчению заболевания или по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания, уменьшения риска приобретения заболевания или по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания, ингибирования прогрессирования заболевания или по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания или уменьшения риска развития заболевания или по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания. "Лечение" или "лечить" также относится к ингибированию заболевания либо физически, (например, стабилизация явного симптома), физиологически, (например, стабилизация физического параметра) или обеих и к ингибированию по меньшей мере одного физического параметра, который может быть или может не быть различимый пациентом. В определенных вариантах осуществления "лечение" или "лечить" относится к замедлению начала заболевания или по меньшей мере его одного или более симптомов у пациента, который может быть подвержен или предрасположен к заболеванию, даже если пациент еще не испытал или у него не проявлялись симптомы заболевания.

"Терапевтически эффективное количество" относится к количеству соединения, которое при введении субъекту для лечения заболевания или по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания, достаточно для осуществления такого лечения заболевания или его симптома. "Терапевтически эффективное количество" может изменяться в зависимости, например, от соединения, заболевания и/или симптомов заболевания, тяжести заболевания и/или симптомов заболевания или нарушения, возраста, веса и/или состояния здоровья пациента, подвергаемого лечению и решения лечащего врача. Подходящее количество в каждом конкретном случае может быть определено квалифицированным специалистом в данной области техники или может быть определено с помощью общепринятых экспериментов.

"Терапевтически эффективная доза" относится к дозе, которая обеспечивает эффективное лечение заболевания или нарушения у пациента. Терапевтически эффективная доза может изменяться для различных соединений и для разных пациентов и может зависеть от таких факторов, как состояние пациента и путь доставки. Терапевтически эффективная доза может быть определена в соответствии с общепринятыми фармакологическими процедурами, известными специалисту в данной области техники. Для всего описания термин "выделенный Nrf2 активатор" предпочтительно относится к Nrf2 активатору, который, если встречается в природе, по существу отделен от других компонентов и других молекул, которые в природе сопровождают соответствующий Nrf2 активатор. Термин охватывает Nrf2 активатор, который был удален из его встречающегося в природе окружения или его природного состояния посредством стадий очистки, которые отделяют другие молекулы, в природе ассоциированы с ним, например, с помощью известных общепринятых методов, таких как хроматография, кристаллизация и дистилляция. Термин "выделенный Nrf2 активатор" предпочтительно все еще относится к Nrf2 активатору в смеси с различными количествами воды, такими как вплоть до приблизительно 20 мас.%. Термин "выделенный Nrf2 активатор" предпочтительно исключает такие Nrf2 активаторы, которые все еще находятся в их природном состоянии, например которые все еще содержатся в их источнике происхождения или его частях, таких как растение, независимо от того, этот или не этот источник происхождения высушен. Кроме того, термин "выделенный Nrf2 активатор" предпочтительно относится к природной или синтетически приготовленной молекуле, которая имеет чистоту приблизительно 70 мас.%, предпочтительно приблизительно 80 мас.% и более предпочтительно приблизительно 90 мас.%, такую как приблизительно 95 мас.%, приблизительно 97 мас.% или приблизительно 99 мас.% перед приготовлением в виде фармацевтической композиции, если это является желательным. В случае, если Nrf2 активатор встречается в природе, например, в виде природного продукта, то он предпочтительно представляет собой выделенный Nrf2 акти-

ватор, т.е. не в форме, например, растительного препарата.

В случае если PPAR гамма агонист встречается в природе, например в виде природного продукта, то он предпочтительно представляет собой выделенный PPAR гамма агонист, т.е. не в форме, например, растительного препарата.

Далее представлено подробное описание определенных вариантов осуществления соединений, композиций, и способов. Описанные варианты осуществления изобретения не предназначены для ограничения пунктов формулы изобретения.

В соответствии с настоящим изобретением существенно улучшенные результаты лечения были получены для лечения аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний, если PPAR гамма агонист и Nrf2 активатор используют для лечения заболевания в комбинации по сравнению с лечением с применением PPAR гамма агониста или Nrf2 активатора, отдельно. Совместное введение PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора или введение фиксированной дозы комбинации PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора приводят к улучшенному терапевтическому эффекту, который может быть большим, чем аддитивный эффект, по сравнению с введением PPAR гамма агониста или Nrf2 активатора соответственно, вводимых в виде монотерапии.

В частности, комбинированное лечение, содержащее по меньшей мере один PPAR гамма агонист, может не иметь существенного или только незначительное модулирующее или активирующее влияние на Nrf2, и по меньшей мере один Nrf2, который может не иметь существенного или только незначительное модулирующее или активирующее влияние на PPAR гамма, приводит к улучшенным и синергетическим терапевтическим эффектам по сравнению с введением такого PPAR гамма агониста или такого Nrf2 активатора соответственно, вводимого в виде монотерапии. Синергетический эффект часто более выражен с такими комбинациями, где применяемые агенты являются главным образом либо PPAR гамма агонистами, либо Nrf2 активаторами, где каждый не имеет существенной активности на соответствующую другую мишень. Маловероятно, что соединение, имеющее двойные действия на мишени PPAR гамма и Nrf2, проявляет идеально распределенный эффект на обе мишени для терапевтического применения. При использовании настоящего изобретения каждая мишень может быть направлена индивидуально и активирована с помощью подходящих и приемлемых концентраций соответствующих агентов. Таким образом, предпочтительными являются варианты осуществления, где по меньшей мере один агент не является как PPAR гамма агонистом, так и Nrf2 активатором одновременно.

Предпочтительными являются комбинированные лечения и комбинации в фиксированных дозах в соответствии с настоящим изобретением, которые содержат по меньшей мере два различных агента, имеющих либо PPAR гамма агонистические, либо Nrf2 активирующие эффекты при концентрациях, используемых в комбинации.

Настоящее изобретение относится к комбинированным лечениям, композициям, содержащим комбинацию в соответствии с изобретением агентов и родственными комбинациям в фиксированных дозах, где PPAR гамма агонист и Nrf2 активатор являются различными соединениями, которые имеют предпочтительно различную химическую структуру, например имеют отличия в атомах углерода по меньшей мере на 3 атома углерода, предпочтительно по меньшей мере 5 или по меньшей мере 10 атомов углерода, и не относятся к одному и тому же химическому классу. Для всего описания использование единственного числа также включает множественное число, если специально не указано иначе.

Предпочтительными PPAR гамма агонистами являются соединения, имеющие агонистический эффект без существенной активации Nrf2. Это предпочтительно соединения, не имеющие способности образовывать ковалентные связи с органическими тиольными группами в физиологических условиях, такими как глутатион. Таким образом, предпочтительные PPAR гамма агонисты представляют собой соединения, которые, в отличие от, например, 15-дезоксидельта(12,14)-простагландин J(2) (15d-PGJ(2)), не может ковалентно связываться, например, с помощью реакции присоединения Михаэля с PPA рецептором. PPAR агонисты представляют собой глитазоны.

PPAR агонисты представляют собой PPAR гамма активаторы (например, PPAR гамма агонист представляет собой PPAR гамма активаторы). Определение "PPAR агонист" и "PPAR гамма агонист" в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно включает такие агонисты, т.е. соединения, которые непосредственно связываются с PPA рецептором и имеют агонистическое, т.е. активирующее влияние, а также так называемые физиологические PPAR агонисты и физиологические PPAR гамма агонисты, которые необязательно связываются с PPAR рецептором, но приводят к активации PPAR посредством других путей, например путем повышения концентрации эндогенного PPAR гамма агониста 15-дезоксидельта(12,14)-простагландин J(2) (15d-PGJ(2)).

Известно большое количество природных и синтетических PPAR агонистов (например, см. Michalik et al., (2006), *Pharmacological Reviews*, 58:726-725; Gilde et al., (2003), *Circulation Research*, 92(5):518-524; Peraza et al., (2005), *Toxicological Sciences*, 90(2):269-295; и Desvergne & Wahli (1999), *Endocrine Reviews* 20(5):649-688). Некоторые из этих известных агонистов являются специфическими для единственного PPAR изотипа, тогда как другие нацелены на многие мишени PPAR подтипов. PPAR агонисты являются предпочтительными, если PPAR агонист более сильно активирует PPAR гамма или PPAR альфа одновременно, чем другие изоформы.

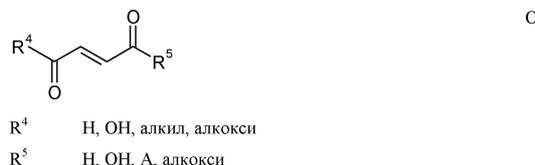
В одном варианте осуществления PPAR агонист выбран из PPAR гамма агонистов, таких как глитазоны. В еще других вариантах осуществления глитазон может быть выбран из группы, включающей тро-глитазон, пиоглитазон, росиглитазон, сиглитазон, энглитазон, дарглитазон, нетоглитазон, изаглитазон, MC-555, балаглитазон, ривоглитазон и др. Пиоглитазон и росиглитазон являются особенно предпочтительными, и наиболее предпочтительными являются гидрохлорид пиоглитазона и росиглитазон малеат.

Nrf2-активирующие соединения могут быть классифицированы на основе их химической структуры: дифенолы, акцепторы реакции Михаэля, изотиоцианаты, тиокарбаматы, тривалентные мышьяковистые препараты, 1,2-дителиол-3-тионы, гидропероксиды, выцинальные димеркаптаны, тяжелые металлы, и полиены. Кроме того, Nrf2 активаторы (i) все являются химически реакционно-способными; (ii) почти все являются электрофилами; (iii) большинство являются субстратами для глутатионовых трансфераз и (iv) все могут модифицировать сульфгидрильные группы путем алкилирования, окисления, или восстановления (PNAS 17 февраля 2004 г., том 101 № 7 2040-2045, Mol. Cell. Biol. 2009, 29(2):493). Активность соединений можно идентифицировать с помощью известных методов. Предпочтительные Nrf2 активаторы представляют собой соединения без существенного PPAR гамма агонистического эффекта. Они предпочтительно представляют собой соединения, которые могут или не могут ковалентно связываться с PPA рецептором, но не способны изменять конформацию PPAR и предпочтительно PPA гамма рецептора до такой степени, что это может приводить к активации PPA рецептора. В соответствии с настоящим изобретением эти предпочтительные Nrf2 активаторы имеют небольшой и низкий молекулярный вес. В этих соединениях предпочтительно отсутствуют структурные элементы для связывания с PPA рецептором, что приводит к изменению конформации и активации PPA рецептора. В предпочтительном варианте осуществления Nrf2 активаторы могут связываться ковалентно с PPA рецептором, например, посредством реакции Михаэля с тиольной группой PPA рецептора, не приводя к конформационному изменению PPA рецептора. Тем не менее благодаря их ограниченному размеру эти предпочтительные Nrf2 активаторы могут не предотвращать PPAR агонисты и, в частности, PPAR гамма агонисты, в особенности глитазоны, такие как пиоглитазон или росиглитазон, от нековалентного связывания с PPA рецептором, что приводит к конформационному изменению. В очень предпочтительном примере ковалентное связывание Nrf2 активатора, такого как монометил гидрофумарат или диметилфумарат, и нековалентное связывание PPAR гамма агониста, такого как глитазон, также пиоглитазон или росиглитазон, приводит к синергетическим и значительно улучшенным терапевтическим результатам.

В одном варианте осуществления предпочтительные Nrf2 активаторы выбирают из сложных эфиров фумаровой кислоты и их солей.

Nrf2 активаторы способны провоцировать или индуцировать стимулированную и/или повышенную ядерную транслокацию Nrf2 белка.

Nrf2 активаторы представляет собой соединение O, представленное ниже, включая его таутомеры и стереоизомеры:



Алкокси предпочтительно представляет собой группу O-алкил, где алкил имеет значения, как указано выше. Предпочтительно алкокси представляет собой группу  $-\text{O}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ , где n представляет собой 0, 1, 2, 3 или 4, более предпочтительно метокси или этокси. Перфторалкил предпочтительно представляет собой неразветвленную или разветвленную алкильную цепь, имеющую 1-8 атомов углерода, предпочтительно 1-6 атомов углерода, и где все атомы водорода заменены атомами F, предпочтительно, например, трифторметил или пентафторэтил. Перфторалкокси предпочтительно представляет собой группу O-перфторалкил, где перфторалкил имеет значения, как указано выше. Перфторалкокси предпочтительно представляет собой  $\text{OCF}_3$ .

$\text{R}^4$  предпочтительно представляет собой H, OH, алкокси, таким как метокси.

$\text{R}^5$  предпочтительно представляет собой H или A.

Предпочтительные Nrf2 активаторы выбирают из сложных эфиров фумаровой кислоты, т.е. моно-и/или диэфиров фумаровой кислоты, которые предпочтительно выбирают из группы моноалкил гидрофумарата и диалкилфумарата, такого как монометил гидрофумарат, диметилфумарат, моноэтил гидрофумарат и диэтилфумарат.

Чрезвычайно благоприятным является тот факт, что применение PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора в соответствии с настоящим изобретением может предоставлять возможность для максимальной дозы каждого агента, который используется в моно-терапии, что приводит к максимальному терапевтическому эффекту. Можно наблюдать отсутствие или только незначительное повышение неблагоприятных побочных эффектов, известных для индивидуальных PPAR гамма агонистов или Nrf2 активаторов. Также может быть благоприятно уменьшать дозу одного или обоих агентов, применяемых для комбинированного лечения согласно настоящему изобретению. Таким образом, побочных эффектов, которые

можно наблюдать при монотерапии с агентами, можно избегать или уменьшать.

Для всего описания термин "фармакологически активные производные" представляет собой предпочтительно соли, амиды и сложные эфиры, такие как алкиловые сложные эфиры, включая сложные метиловые и этиловые эфиры, фармакологически активных кислот и сложные эфиры алканоевых кислот и простые эфиры фармакологически активных спиртов, такие как сложные эфиры уксусной кислоты и метиловые простые эфиры, а также амиды алканоевых кислот фармакологически активных аминов, такие как соответствующий амид уксусной кислоты.

Комбинированное лечение согласно настоящему изобретению можно дополнительно комбинировать с лечениями и лекарственными средствами, которые в целом используются при различных показаниях в качестве стандартного лечения. Для лечения рассеянного склероза, например, комбинированное лечение согласно настоящему изобретению можно дополнительно комбинировать с интерфероном, таким как интерферон бета 1b или интерферон бета 1a (Rebif, Avonex) или глатирамер ацетат (Coraone), модулятор сфингозин 1-фосфат рецептора, такой как Финголимод (Gilenya) и/или метотрексат. Комбинированное лечение согласно настоящему изобретению можно дополнительно комбинировать с RXR специфическими лигандами, такими как 9- цис-ретиноевая кислота (RA), для получения еще дополнительно улучшенных результатов, особенно для лечения псориаза.

Комбинированную терапию согласно настоящему изобретению можно применять в особенности для лечения болезни Паркинсона, можно дополнительно комбинировать с разрешенными терапевтическими агентами, хорошо известными в данной области для лечения заболевания, такими как леводопа, обычно комбинируемая с ингибитором допа декарбоксилаза, такими как карбидопа или бензеразид или СОМТ ингибитор, такой как энтакапон, толкапон или нитекапон. Кроме того, комбинированную терапию согласно настоящему изобретению можно дополнительно комбинировать с агонистами допамина, такими как бромкриптин, перголид, прамипексол, ропинирол, пирибедил, кабергодин, апоморфин или лизурид или ротиготин, и MAO-B ингибиторами, такими как селегилин или разагилин.

Комбинированную терапию в соответствии с настоящим изобретением можно вводить в виде одно-временной или последовательной схемы, также обозначаемой как со-введение. Если введение является последовательным, то комбинацию можно вводить за два или больше введений. Также представляется возможным комбинировать любой PPAR гамма агонист с Nrf2 активатором в единичной лекарственной форме для одновременного или последовательного введения пациенту.

В целом, для композиций, содержащих сложные эфиры фумаровой кислоты, предпочтительным является введение два раза в сутки (BID) или три раза в сутки (TID). Дозировки индивидуальных агентов регулируются соответствующим образом. Со-введение PPAR гамма агониста с Nrf2 активатором в соответствии с изобретением в целом и предпочтительно относится к одновременному или последовательному введению PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора таким образом, что терапевтически эффективные количества PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора оба присутствуют одновременно в организме пациента.

Со-введение включает одновременное введение и введение агента в соответствии с изобретением перед или после введения другого агента, например введение обоих агентов в соответствии с изобретением в течение секунд, минут или часов. В одном варианте осуществления вводят первый агент, после этого через часовой период времени, например 0,25-12 ч, предпочтительно 0,5-3 ч наиболее предпочтительно 1-2 ч), вводят второй агент.

Комбинированная терапия и со-введение в соответствии с изобретением часто обеспечивает "синергизм" и "синергетический эффект", т.е. терапевтический эффект, достигаемый при совместном использовании PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора, является больше, чем аддитивный, т.е. больше суммы эффектов, которые получают при использовании каждого агента отдельно.

Подходящую дозу PPAR агониста и Nrf2 активатора или фармацевтической композиции, которая содержит PPAR агонист и Nrf2 активатор для применения в настоящем изобретении, можно определить в соответствии с любым из нескольких хорошо известных протоколов. Например, исследования на животных, такие как исследования с использованием мышей, крыс, собак, и/или обезьян, можно использовать для определения подходящей дозы фармацевтического соединения. Результаты исследований на животных можно экстраполировать для определения доз для применения на других видах, таких как, например, люди. В целом, предпочтительный PPAR гамма агонист вводят в комбинации с предпочтительным Nrf2 активатором в соответствии с изобретением, предпочтительно перорально, в суточных дозах от 0,01 до 50 мг на 1 кг веса тела, в зависимости от активности и безопасности соответствующего PPAR гамма агониста. Если специально не указано иначе, дозировки, указанные выше и ниже, отображают количество свободного основания PPAR гамма агониста, даже если используется в форме малеата или другой соли присоединения кислоты.

Предпочтительные Nrf 2 активаторы представляют собой диалкилфумарат, такой как диметилфумарат и диэтилфумарат.

Диалкилфумараты, используемые в соответствии с изобретением, приготавливают с помощью процессов, известных в данной области (см., например, EP 0312697). Предпочтительно активные компоненты, т.е. агенты, используются для приготовления пероральных препаратов в форме таблеток, микро-

таблеток, пеллет или гранулятов, необязательно в капсулах или саше. Препараты в форме микро-таблеток или пеллет, которые необязательно заполняют в капсулы или саше, являются предпочтительными и также составляют объект настоящего изобретения. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления средний размер или диаметр соответственно пеллет или микротаблеток находится в диапазоне от 300 до 2,000 мкм, в особенности в диапазоне 500 или 1,000 мкм.

Пероральные препараты могут иметь энтеросолюбильное покрытие. Капсулы могут представлять собой мягкие или твердые желатиновые капсулы.

Диалкилфумараты, используемые в соответствии с изобретением, могут использоваться самостоятельно или в виде смеси нескольких соединений, необязательно в комбинации с общепринятыми носителями и наполнителями. Используемое количество выбирают таким образом, чтобы получаемые препараты, такие как таблетки, содержали активный компонент в количестве, соответствующем от 10 до 300 мг фумаровой кислоты на дозированную единицу.

Предпочтительные препараты в соответствии с изобретением содержат общее количество от 10 до 300 мг диметилфумарата и/или диэтилфумарата. Предпочтительными являются комбинации в фиксированных дозах PPAR агониста и предпочтительно PPAR гамма агониста с Nrf2 активатором. Особенно предпочтительными являются комбинации в фиксированных дозах росиглитазона с диметилфумаратом. Особенно предпочтительными являются комбинации в фиксированных дозах пиоглитазона с диметилфумаратом

В частности, росиглитазон предпочтительно вводят в соответствии с изобретением в форме его малята в суточных дозах от 0,01 до 0,2 мг на 1 кг веса тела, более предпочтительно в суточных дозах от 0,02 до 0,16 мг на 1 кг веса тела и наиболее предпочтительно в суточных дозах от 0,025 до 0,14 мг на 1 кг веса тела, например в суточных дозах от 0,03, 0,06 или 0,12 мг на 1 кг веса тела. Особенно предпочтительными являются суточные пероральные дозы 2, 4 и 8 мг росиглитазона на пациента. В частности, пиоглитазон предпочтительно вводят в соответствии с изобретением в форме его гидрохлорида в суточных дозах от 0,05 до 1 мг на 1 кг веса тела, более предпочтительно в суточных дозах от 0,1 до 0,8 мг на 1 кг веса тела и наиболее предпочтительно в суточных дозах от 0,15 до 0,7 мг на 1 кг веса тела, например в суточных дозах приблизительно 0,2 мг, приблизительно 0,4 мг или приблизительно 0,6 мг на 1 кг веса тела. Особенно предпочтительными являются суточные пероральные дозы приблизительно 15 мг, приблизительно 30 мг и приблизительно 45 мг пиоглитазона на пациента. В частности, сиглитазон или троглитазон предпочтительно вводят в соответствии с изобретением в суточных дозах от 1 до 20 мг на 1 кг веса тела, более предпочтительно в суточных дозах от 2 до 15 мг на 1 кг веса тела и наиболее предпочтительно в суточных дозах от 3 до 10 мг на 1 кг веса тела. Особенно предпочтительными являются пероральные дозы. В целом, предпочтительный Nrf2 активатор вводят в комбинации с предпочтительным PPAR гамма агонистом, предпочтительно перорально, в суточных дозах от 0,1 до 20 мг на 1 кг веса тела, в зависимости от активности и безопасности соответствующего Nrf2 активатора.

В частности, диметилфумарат предпочтительно вводят в соответствии с изобретением в суточных дозах от 1 до 20 мг на 1 кг веса тела, более предпочтительно в суточных дозах от 2 до 15 мг на 1 кг веса тела и наиболее предпочтительно в суточных дозах от 3 до 12 мг на 1 кг веса тела, например в суточных дозах приблизительно 3,4 мг, приблизительно 7 мг или приблизительно 10 мг на 1 кг веса тела. Особенно предпочтительными являются суточные пероральные дозы приблизительно 240 мг, приблизительно 480 мг и приблизительно 720 мг диметилфумарата на пациента.

Соотношение между дозами PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора, используемое в комбинациях в соответствии с настоящим изобретением, зависит от активности конкретного предпочтительного PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора.

Особенно предпочтительными являются суточные пероральные дозы 2, 4 и 8 мг росиглитазона на пациента.

Особенно предпочтительными являются суточные пероральные дозы приблизительно 120 мг, приблизительно 240 мг, приблизительно 360 мг, приблизительно 480 мг, приблизительно 600 мг и приблизительно 720 мг диметилфумарата на пациента.

Если Nrf2 активатор представляет собой диметилфумарат, то предпочтительным является дозирование один или два раза в сутки. Предпочтительные лекарственные формы и, в частности, пероральные лекарственные формы, такие как таблетки или капсулы могут содержать:

Для введения раз в сутки, лекарственные формы, такие как таблетки или капсулы, могут содержать предпочтительно приблизительно 2 мг росиглитазона и приблизительно 25 мг бардоксолона метила или приблизительно 2 мг росиглитазона и приблизительно 75 мг бардоксолона метила или приблизительно 2 мг росиглитазона и приблизительно 150 мг бардоксолона метила или приблизительно 4 мг росиглитазона и приблизительно 25 мг бардоксолона метила или приблизительно 4 мг росиглитазона и приблизительно 75 мг бардоксолона метила или приблизительно 4 мг росиглитазона и приблизительно 150 мг бардоксолона метила или приблизительно 8 мг росиглитазона и приблизительно 25 мг бардоксолона метила или приблизительно 8 мг росиглитазона и приблизительно 150 мг бардоксолона метила. Наиболее предпочтительно лекарственная форма может содержать приблизительно 8 мг росиглитазона и приблизительно 150 мг бардоксо-

лон метила.

Для введения три раза в сутки, предпочтительные лекарственные формы, такие как таблетки или капсулы, могут содержать приблизительно 0,7 мг, предпочтительно приблизительно 0,67 мг, росиглитазона и 240 мг диметилфумарата или приблизительно 1,3 мг, предпочтительно приблизительно 1,33 мг, росиглитазона и приблизительно 240 мг диметилфумарата или приблизительно 2,7 мг предпочтительно приблизительно 2,67 мг, росиглитазона и приблизительно 240 мг диметилфумарата или приблизительно 0,7 мг, предпочтительно приблизительно 0,67 мг, росиглитазона и 120 мг диметилфумарата или приблизительно 1,3 мг, предпочтительно приблизительно 1,33 мг, росиглитазона и приблизительно 120 мг диметилфумарата или приблизительно 2,7 мг предпочтительно приблизительно 2,67 мг, росиглитазона и приблизительно 120 мг диметилфумарата. Наиболее предпочтительно лекарственная форма может содержать приблизительно 2,7 мг предпочтительно приблизительно 2,67 мг, росиглитазона и приблизительно 240 мг диметилфумарата.

Для введения два раза в сутки, предпочтительные лекарственные формы, такие как таблетки или капсулы, могут содержать приблизительно 1 мг росиглитазона и приблизительно 240 мг диметилфумарата или приблизительно 2 мг росиглитазона и приблизительно 240 мг диметилфумарата или приблизительно 4 мг росиглитазона и приблизительно 240 мг диметилфумарата. Для введения три раза в сутки предпочтительные лекарственные формы, такие как таблетки или капсулы, могут содержать приблизительно 5 мг пиоглитазона и 240 мг диметилфумарата, или приблизительно 10 мг пиоглитазона и приблизительно 240 мг диметилфумарата, или приблизительно 15 мг пиоглитазона и приблизительно 240 мг диметилфумарата, или приблизительно 5 мг пиоглитазона и 120 мг диметилфумарата, или приблизительно 10 мг пиоглитазона и приблизительно 120 мг диметилфумарата, или приблизительно 15 мг пиоглитазона и приблизительно 120 мг диметилфумарата, Наиболее предпочтительно лекарственная форма может содержать приблизительно 15 мг пиоглитазона и приблизительно 240 мг диметилфумарата.

Для введения два раза в сутки, предпочтительные лекарственные формы, такие как таблетки или капсулы, могут содержать приблизительно 7,5 мг пиоглитазона и приблизительно 240 мг диметилфумарата или приблизительно 15 мг пиоглитазона и приблизительно 240 мг диметилфумарата или приблизительно 22,5 мг пиоглитазона и приблизительно 240 мг диметилфумарата. Кроме того, предпочтительными являются фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением, которые содержат в качестве PPAR гамма агониста приблизительно 5 мг, приблизительно 7,5 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 22,5 мг или приблизительно 25 мг пиоглитазона. Также, предпочтительными являются фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением, которые содержат в качестве PPAR гамма агониста приблизительно 0,7 мг, приблизительно 1 мг, приблизительно 1,3 мг, приблизительно 2 мг, приблизительно 2,7 мг, приблизительно 3 мг, приблизительно 3,5 мг, приблизительно 4 или приблизительно 5 мг росиглитазона.

Предпочтительными являются фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением, которые содержат приблизительно 120 мг, приблизительно 200 мг или приблизительно 240 мг диметилфумарата.

Предпочтительные соотношения между росиглитазоном и диметилфумаратом выбирают от 1/20 до 1/400 (мас./мас., росиглитазон/диметилфумарат), предпочтительно от 1/25 до 380, более предпочтительно от 1/28 до 1/360. Наиболее предпочтительно соотношения составляют приблизительно 1/30, приблизительно 1/45, например, приблизительно 1/44,4, приблизительно 1/60, приблизительно 1/90, например, приблизительно 1/88,9 или приблизительно 1/92,3, приблизительно 1/120, приблизительно 1/180, например, 1/171,4 или 1/184,6, приблизительно 1/240, приблизительно 1/340, например, приблизительно 1/342,9.

Предпочтительные соотношения между пиоглитазоном и диметилфумаратом выбирают от 1/3 до 1/60 (мас./мас., пиоглитазон/диметилфумарат), предпочтительно от 1/4 до 1/55, более предпочтительно от 1/5 до 1/52. Наиболее предпочтительно соотношения составляют приблизительно 1/5,3, приблизительно 1/8, приблизительно 1/10, например, 1/10,7, приблизительно 1/12, приблизительно 1/16, приблизительно 1/24, приблизительно 1/32, приблизительно от 1 до 48.

Предпочтительными являются лекарственные формы и, в частности, пероральные лекарственные формы, такие как таблетки или капсулы, содержащие как PPAR гамма агонист, так и Nrf2 активатор в комбинации с фиксированными дозами, содержащие вышеуказанные композиции в данных соотношениях.

Комбинации в фиксированных дозах, такие как таблетки, содержащие активные компоненты в вышеуказанных количествах и соотношениях, являются наиболее предпочтительными.

Фармацевтические композиции, обеспеченные настоящим раскрытием, могут содержать терапевтически эффективное количество PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора совместно с подходящим количеством одного или более фармацевтически приемлемых наполнителей таким образом, чтобы обеспечить композицию для надлежащего введения пациенту. Подходящие фармацевтические наполнители описаны в данной области техники.

В определенных вариантах осуществления PPAR гамма агонист и Nrf2 активатор могут быть совместно инкорпорированы в фармацевтические композиции для введения перорально. Пероральное ве-

дение таких фармацевтических композиций может приводить к поглощению PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора через кишечник и поступлению в системный кровоток. Такие пероральные композиции могут быть приготовлены с помощью способа, известного в области фармацевтики, и содержат PPAR гамма агонист и Nrf2 активатор и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый наполнитель. Пероральные фармацевтические композиции могут включать терапевтически эффективное количество PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора и подходящее количество фармацевтически приемлемого наполнителя таким образом, чтобы обеспечивать подходящую форму для введения пациенту.

PPAR гамма агонист и Nrf2 активатор могут быть совместно инкорпорированы в фармацевтические композиции для введения любым другим подходящим путем введения, включая внутрикожный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный, пероральный, сублингвальный, внутримозговой, внутривагинальный, трансдермальный, ректальный, ингаляционный или местный.

Фармацевтические композиции, которые содержат PPAR гамма агонист и Nrf2 активатор, могут быть приготовлены с помощью общепринятых процессов смешивания, растворения, грануляции, приготовления драже, растирания в порошок, эмульсификации, инкапсулирования, захватывания или лиофилизации. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены в виде препарата общепринятым способом, используя один или более физиологически приемлемых носителей, разбавителей, наполнителей, или вспомогательных веществ, которые облегчают переработку PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора или их кристаллических форм и один или более фармацевтически приемлемых наполнителей в препараты, которые могут использоваться фармацевтически. Специфический препарат зависит от выбранного пути введения. Фармацевтические композиции, обеспеченные настоящим раскрытием, могут быть приготовлены в форме растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, пеллет, капсул, капсул, содержащих жидкости, порошков, препаратов с замедленным высвобождением, суппозиториях, эмульсий, аэрозолей, спреев, суспензий, или любой другой формы, подходящей для введения пациенту. Фармацевтические композиции, обеспеченные настоящим раскрытием, могут быть приготовлены в виде препарата в единичной лекарственной форме. Единичная лекарственная форма относится к физически дискретной единице, подходящей в виде однократной дозы для пациентов, подвергаемых лечению, где каждая единица содержит заранее определенное количество PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора, рассчитанное для получения предназначенного терапевтического эффекта. Единичная лекарственная форма может быть представлена в виде однократной суточной дозы для введения 2 раза в сутки или одной из многократных суточных доз, например, 3 или более раз в сутки. Если используются многократные суточные дозы, то единичная лекарственная форма может быть одинаковой или различной для каждой дозы. Одна или более лекарственных форм могут содержать дозу, которую можно вводить пациенту в один момент времени или в течение временного интервала.

Фармацевтические композиции, которые содержат PPAR гамма агонист и Nrf2 активатор, могут быть приготовлены в виде препарата для быстрого высвобождения или контролируемого или длительно- или отсроченного.

В определенных вариантах осуществления, пероральная лекарственная форма, обеспеченные настоящим раскрытием, может представлять собой лекарственную форму с контролируемым высвобождением. Технологии контролируемого высвобождения могут улучшать абсорбцию лекарственного средства в предпочтительном участке или участках желудочно-кишечного тракта. Системы для контролируемой доставки лекарственных средств могут быть созданы для доставки лекарственного средства таким образом, чтобы уровень лекарственного средства поддерживался в течение терапевтически эффективного окна и эффективные и безопасные уровни в крови поддерживались в течение всего периода времени, пока система продолжает доставлять лекарственное средство с конкретным профилем высвобождения в желудочно-кишечный тракт. Контролируемая доставка лекарственного средства может обеспечивать существенно постоянные уровни в крови PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора в течение периода времени по сравнению с колебаниями, наблюдаемыми для лекарственных форм с быстрым высвобождением. Для некоторых PPAR гамма агонистов и Nrf2 активаторов поддержание постоянной концентрации в крови и ткани в течение всего курса лечения является наиболее желательным режимом лечения. Немедленное высвобождение PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора может вызывать пик в уровне крови выше уровня, требуемого для вызывания желательного ответа, что может вызывать утрату агентов и может вызывать или усугублять токсические побочные эффекты. Контролируемая доставка лекарственного средства может приводить к оптимальной терапии и может уменьшать не только частоту дозирования, но также частоту побочных эффектов. Примеры лекарственных форм с контролируемым высвобождением включают системы с контролируемым высвобождением, системы с контролируемой диффузией, ионообменные смолы, осмотически контролируемые системы, системы с эродруемым матриксом, pH независимые препараты, системы с задержкой в желудке и др.

Подходящая пероральная лекарственная форма для конкретной фармацевтической композиции, обеспеченной настоящим раскрытием, может зависеть, по меньшей мере частично, от свойств абсорбироваться в желудочно-кишечном тракте PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора и стабильности этих агентов в желудочно-кишечном тракте, их фармакокинетики и предназначенного терапевтического про-

филя. Подходящую пероральную лекарственную форму с контролируемым высвобождением можно выбрать для конкретного PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора. Например, пероральные лекарственные формы с задержкой в желудке могут быть подходящими для агентов, абсорбируемых главным образом в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, и пероральные лекарственные формы с замедленным высвобождением могут быть подходящими для агентов, абсорбируемых главным образом в нижнем отделе желудочно-кишечного тракта.

В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции, обеспеченные настоящим раскрытием, можно реализовать в виде лекарственных форм, адаптированных для обеспечения замедленного высвобождения PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора при пероральном введении. Пероральные лекарственные формы с замедленным высвобождением можно использовать для высвобождения PPAR гамма агониста и/или Nrf2 активатора в течение длительного периода времени и являются пригодными, если желательно, чтобы агент доставлялся в нижние отделы желудочно-кишечного тракта. Пероральные лекарственные формы с замедленным высвобождением включают любую пероральную лекарственную форму, которая поддерживает терапевтические концентрации агентов в биологической жидкости, такой как плазма, кровь, спинномозговая жидкость, или в ткани или органе в течение длительного периода времени. Пероральные лекарственные формы с замедленным высвобождением включают контролируемые диффузией системы, такие как устройства с резервуаром и матриксные устройства, контролируемые растворением системы, осмотические системы, и контролируемые эрозией системы. Пероральные лекарственные формы с замедленным высвобождением и способы их приготовления хорошо известны в данной области техники. В каждой из вышеуказанных лекарственных форм PPAR гамма агонист может быть приготовлен в виде препарата совместно в смеси или предпочтительно отдельно от Nrf2 активатора. Каждый PPAR гамма агонист и Nrf2 активатор предпочтительно может содержаться в отдельной форме в лекарственной форме, такой как пероральная лекарственная форма, которая предпочтительно представляет собой таблетку или капсулу. В такой пероральной лекарственной форме, где PPAR гамма агонист и Nrf2 активатор разделены, каждый агент может быть приготовлен в виде препарата с различными наполнителями. PPAR гамма агонист и Nrf2 активатор также может каждый содержаться в препаратах с различными профилями высвобождения, т.е. с быстрым, контролируемым или замедленным высвобождением.

Препараты и, в частности, твердые пероральные лекарственные формы, которые содержат PPAR гамма агонист и/или Nrf2 активатор, могут содержать общепринятое вспомогательное вещество в области фармацевтического препарата и также могут быть получены в соответствии с известным методом. В качестве вспомогательного вещества может быть упомянут, например, наполнитель, агент, вызывающий дезинтеграцию, связующее, смазывающее вещество, краситель, регулятор pH, поверхностно-активное вещество, агент, задерживающий высвобождение, стабилизатор, подкисляющий агент, ароматизатор, скользящее вещество и другие. Эти вспомогательные вещества используются в количестве, обычно применяемом в области фармацевтических препаратов. В качестве наполнителя могут быть упомянуты, например, крахмалы, такие как кукурузный крахмал, картофельный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, частично прежелатинизированный крахмал, прежелатинизированный крахмал, пористый крахмал и другие; сахара и сахароспирты, такие как лактоза, фруктоза, глюкоза, D-маннит, сорбит и др; безводный фосфат кальция, кристаллическая целлюлоза, осажденный карбонат кальция, силикат кальция и др. В качестве агента, вызывающего дезинтеграцию, можно использовать, например, карбоксиметилцеллюлозу, кальций карбоксиметилцеллюлозу, натрий карбоксиметил крахмал, кроскармеллозу натрия, кросповидон, гидроксипропилцеллюлозу с низкой степенью замещения, гидроксипропил крахмал и др. Используемое количество агента, вызывающего дезинтеграцию, предпочтительно составляет 0,5-25 вес.ч., более предпочтительно 1-15 вес.ч. на 100 вес.ч. твердого препарата.

В качестве связующего могут быть упомянуты, например, кристаллическая целлюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, порошок гуммиарабика и др. Используемое количество связующего предпочтительно составляет 0,1-50 вес.ч., более предпочтительно 0,5-40 вес.ч. на 100 вес.ч. твердого препарата.

Предпочтительные примеры смазывающего вещества включают стеарат магния, стеарат кальция, тальк, сложные эфиры сахарозы и жирных кислот, натрий стеарил фумарат и другие. В качестве красителя могут быть упомянуты, например, пищевые красители, такие как пищевой желтый № 5, пищевой красный № 2, пищевой синий 2 и др., пищевые красочные лаки, оксид трехвалентного железа и др. В качестве регулятора pH могут быть упомянуты цитрат, фосфат, карбонат, тартрат, фумарат, ацетат, соль аминокислоты и др. В качестве поверхностно-активного вещества могут быть упомянуты лаурилсульфат натрия, полисорбат 80, полиоксиэтилен 160 полиоксипропилен 30 гликоль и др.

В качестве агента, задерживающего высвобождение, могут быть упомянуты, например, полимеры целлюлозы, так как гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза (предпочтительно гидроксипропилметилцеллюлоза 2910, гидроксипропилметилцеллюлоза 2208 и др.), ацетат целлюлозы (предпочтительно ацетат целлюлозы, имеющий содержание ацетила 39,3-40%), диацетат целлюлозы, триацетат целлюлозы, пропионат ацетат целлюлозы, этил целлюлоза, натрий карбоксиметилцеллюлоза, кристаллическая целлюлоза натрий карбоксиметилцеллюлоза и др.; альгинат натрия, карбоксивинил по-

лимер; полимеры акриловой кислоты, такие как аминоалкилметакрилатный сополимер RS [Eudragit RS (торговое название), Rohm Pharma], суспензия сополимера этил акрилат-метил метакрилат [Eudragit NE (торговое название), Rohm Pharma] и т.д. и др. Агент, задерживающий высвобождение, может содержать, например, усилители потоков (например, хлорид натрия, хлорид калия, сахароза, сорбит, D-маннит, полиэтиленгликоль (предпочтительно полиэтиленгликоль 400 и др.), пропиленгликоль, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозы фталат, ацетат целлюлозы фталат, поливиниловый спирт, полимер метакриловой кислоты), пластификаторы (например, триацетин, ацетилованный моноглицерид, масло из виноградных косточек, оливковое масло, кунжутное масло, ацетилтрибутил цитрат, ацетилтриэтил цитрат, глицерин сорбит, диэтил оксалат, диэтил малеат, диэтилфумарат, дибутил сукцинат, диэтил малонат, диоктил фталат, дибутил себацинат, триэтил цитрат, трибутил цитрат, глицерол трибутират) и др. Предпочтительные примеры агента, задерживающего высвобождение, включают (1) покрытие полупроницаемой мембраной, содержащее ацетат целлюлозы (предпочтительно ацетат целлюлозы, имеющий содержание ацетила 39,3-40%), полиэтиленгликоль (предпочтительно полиэтиленгликоль 400 и др.) и триацетин; (2) композицию с длительным высвобождением, содержащую натрий карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу 2910, гидроксипропилметилцеллюлозу 2208 и микрокристаллическую целлюлозу и др.

В качестве стабилизатора могут быть упомянуты, например, токоферол, ЭДТА, никотинамид, циклодекстрины и др. В качестве подкисляющего агента могут быть упомянуты, например, аскорбиновая кислота, лимонная кислота, винная кислота, яблочная кислота и др. В качестве ароматизатора могут быть упомянуты, например, ментол, масло перечной мяты, лимонное масло, ванилин и другие. В качестве скользящего вещества могут быть упомянуты, например, легкая безводная кремниевая кислота, гидратированный диоксид кремния и др.

Вышеуказанные вспомогательные вещества можно использовать в смеси из двух или более их видов в подходящем соотношении.

### Применение

Подходящая доза каждого PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора может быть определена на основе нескольких факторов, включая, например, вес тела и/или состояние пациента, подвергаемого лечению, тяжесть заболевания, подвергаемого лечению, частота и/или тяжесть побочных эффектов, способ введения, и решения лечащего врача. Подходящий интервал доз может быть определен с помощью методов, известных специалисту в данной области техники.

В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает комбинацию Nrf2 активатора и PPAR гамма агониста для применения для лечения аутоиммунных заболеваний, включая рассеянный склероз. В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает PPAR гамма агонист для применения в комбинации с моно- и/или диэфиром фумаровой кислоты, отличающийся тем, что PPAR гамма агонист является селективным и не имеет существенной активности на PPAR альфа или дельта.

Терапевтически эффективное количество комбинации PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора можно вводить в виде лечебной или предупредительной меры пациенту, имеющему предрасположенность и/или в анамнезе аутоиммунные заболевания, включая рассеянный склероз.

Предпочтительно способ лечения согласно изобретению и комбинации можно использовать для профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как рассеянный склероз, клинически изолированный синдром (CIS), приводящий к рассеянному склерозу.

Рассеянный склероз (MS) представляет собой воспалительное аутоиммунное заболевание центральной нервной системы, вызываемое аутоиммунной атакой против выделенных миелиновых пластин аксонов центральной нервной системы. Демиелинизация приводит к нарушению проводимости и к тяжелому заболеванию с разрушением локальных аксонов и необратимой гибелью клеток нейронов. Симптомы MS очень сильно отличаются для каждого индивидуального пациента, проявляя широкую картину двигательных, чувствительных, и сенсорных нарушений. MS типизируют патологично с помощью множественных воспалительных очагов, бляшек демиелинизации, глиоза и патологии аксонов в головном и спинном мозге, все они вносят свой вклад в клинические проявления неврологической беспомощности (см., например, Wingerchuk, Lab. Invest. 2001, 81, 263-281; и Virley, NeuroRx 2005, 2(4), 638-649). Несмотря на то, что причины, усугубляющие MS, полностью не изучены, полученные данные свидетельствуют об аутоиммунной этиологии совместно с факторами окружающей среды, а также специфической генной предрасположенностью. Функциональное ухудшение, инвалидность и увечье выражаются в виде паралича, сенсорных и "ocintive" нарушений спазма мышц, тремора, отсутствия координации, и ухудшений зрения, которые оказывают влияние на качество жизни особи. Клиническое течение MS может изменяться для разных индивидуумов, но, без исключений, заболевание можно разделить на три формы: возвратно- ремиттирующий, вторично-прогрессирующий и первично-прогрессирующий.

Исследования подтверждают эффективность сложных эфиров фумаровой кислоты для лечения MS и проходят фазу II клинических исследований (Schimrigk et al., Eur. J. Neurology, 2006, 13, 604-610; и Wakkee и Thio, Current Opinion Investigational Drugs, 2007, 8(11), 955-962). Оценку эффективности лечения MS в клинических исследованиях можно осуществлять с использованием таких наборов, как расширенная шкала оценки состояния инвалидности (Expanded Disability Status Scale) и функциональности MS,

а также МРТ-изображения очагов поражения, биомаркеры и описания пациентами качества жизни. Животные модели MS, которые пригодны для идентификации и ратификации потенциальных лекарственных средств, включают модели на крысах экспериментального аутоиммунного /аллергического энцефаломиелимита (ЕАЕ), которые моделируют клинические и патологические проявления MS и модели ЕАЕ на примерах, отличающихся от человека.

### Введение

Комбинацию Nrf2 активатора и PPAR гамма агониста и их фармацевтических композиций можно вводить перорально или с помощью любого другого подходящего пути, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизисто-кожные выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, прямой кишки и кишечника и др.). Другие подходящие пути введения включают, но не ограничиваясь только ими, внутрикожный, внутримышечный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный, пероральный, сублингвальный, внутримозговой, интравагинальный, трансдермальный, ректальный, ингаляционный или местный.

Введение может быть локальным или местным. Известны различные системы доставки, например инкапсулирование в липосомы, микрокапсулы, микрокапсулы, капсулы и др.), которые можно использовать для введения соединения и/или фармацевтической композиции.

Для системного введения терапевтически эффективную дозу можно оценивать в начальной стадии на основе анализов *in vitro*. Например, доза может быть приготовлена в виде препарата на животных моделях для достижения благоприятного интервала концентраций циркулирующей композиции. Начальные дозы также можно определять на основе данных *in vivo*, например, животных моделях, используя техники, которые хорошо известны в данной области техники. Такую информацию можно использовать для точного определения пригодных доз для людей. Квалифицированный специалист в данной области техники может оптимизировать введения для людей на основе данных на животных. Вариант осуществления "PPAR гамма агонист для применения в комбинации с моно- и/или диэфиром фумаровой кислоты для лечения аутоиммунного и/или воспалительного заболевания" относится к способу применения по меньшей мере одного PPAR гамма агониста в комбинации с моно- и/или диэфиром фумаровой кислоты для лечения аутоиммунного и/или воспалительного заболевания.

Предпочтительные варианты осуществления изобретения описаны ниже.

1. Способ лечения аутоиммунного и/или воспалительного нарушения, выбранного из рассеянного склероза или клинически изолированного синдрома (CIS), включающий одновременное, раздельное или последовательное введение PPAR гамма агониста, выбранного из группы глитазонов и их солей, с Nrf2 активатором, выбранным из группы сложных эфиров фумаровой кислоты и их солей.

2. Способ в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления, где PPAR гамма агонист выбран из пиоглитазона и росиглитазона.

3. Способ в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления, где PPAR гамма агонист выбирают из гидрохлорида пиоглитазона и малеата росиглитазона.

4. Способ в соответствии с вышеуказанными вариантами осуществления, где пиоглитазон вводят в суточной дозе приблизительно 15 мг, приблизительно 30 мг или приблизительно 45 мг.

5. Способ в соответствии с вышеуказанными вариантами осуществления, где росиглитазон вводится в суточной дозе приблизительно 2 мг, приблизительно 4 мг или приблизительно 8 мг.

6. Способ в соответствии с вышеуказанными вариантами осуществления, где Nrf2 активатор выбран из группы диэтилфумарата, моноэтилфумарата, диметилфумарата, монометилфумарата и их солей и сложных эфиров.

7. Способ в соответствии с вышеуказанными вариантами осуществления, где Nrf2 активатор представляет собой диметилфумарат, который вводится в суточной дозе приблизительно 120 мг, приблизительно 240 мг, приблизительно 360 мг, приблизительно 480 мг, приблизительно 600 мг или приблизительно 720 мг.

8. Способ в соответствии с вышеуказанными вариантами осуществления, где Nrf2 активатор представляет собой диметилфумарат, который вводится в суточной дозе 1-20 мг на 1 кг веса тела, 1-15 мг на 1 кг веса тела или 2-12 мг на 1 кг веса тела.

9. Способ в соответствии с вышеуказанными вариантами осуществления, где Nrf2 активатор представляет собой диметилфумарат, который вводится в суточной дозе приблизительно 3,4 мг на 1 кг веса тела, приблизительно 7 мг на 1 кг веса тела или приблизительно 10 мг на 1 кг веса тела.

10. Способ в соответствии с вышеуказанными вариантами осуществления, где Nrf2 активатор представляет собой диметилфумарат, который вводится один раз или дважды день.

11. Фармацевтическая композиция, разработанная для применения в соответствии с вышеуказанными вариантами осуществления, которая содержит PPAR гамма агонист, выбранный из группы глитазонов и их солей, и Nrf2 активатор, выбранный из группы сложных эфиров фумаровой кислоты и их солей.

12. Фармацевтическая композиция в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления, где PPAR гамма агонист выбирают из пиоглитазона и росиглитазона.

13. Фармацевтическая композиция в соответствии с вышеуказанными вариантами осуществления,

где PPAR гамма агонист выбирают из гидрохлорида пиоглитазона и малеата росиглитазона.

14. Фармацевтическая композиция в соответствии с вышеуказанными вариантами осуществления, которая содержит приблизительно 5 мг, приблизительно 7,5 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 22,5 мг или приблизительно 25 мг пиоглитазона.

15. Фармацевтическая композиция в соответствии с вышеуказанными вариантами осуществления, которая содержит приблизительно 0,7 мг, приблизительно 1 мг, приблизительно 1,3 мг, приблизительно 2 мг, приблизительно 2,7 мг, приблизительно 3 мг, приблизительно 3,5 мг, приблизительно 4 или приблизительно 5 мг росиглитазона.

16. Фармацевтическая композиция в соответствии с вышеуказанными вариантами осуществления, где Nrf2 активатор выбирают из группы диэтилфумарата, моноэтилфумарата, диметилфумарата, монометилфумарата и их солей и сложных эфиров.

17. Фармацевтическая композиция в соответствии с вышеуказанными вариантами осуществления, содержащая приблизительно 120 мг, приблизительно 200 мг или приблизительно 240 мг диметилфумарата.

18. Твердая пероральная лекарственная форма, которая содержит фармацевтическую композицию согласно вышеуказанным вариантам осуществления.

19. Набор, разработанный для применения в способе по вышеуказанным вариантам осуществления, который содержит а) PPAR гамма агонист, выбранный из группы глитазонов и их солей, и б) Nrf2 активатор, выбранный из группы эфиров фумаровой кислоты и ее солей.

Таким образом, предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения представляют собой растворы и гели или кремы, содержащие PPAR гамма агонист, такой как глитазон, предпочтительно пиоглитазон или росиглитазон, и Nrf2 активатор, такой как сложные эфиры фумаровой кислоты, а также алкиловые и алканоиловые сложные эфиры, алкиловые простые эфиры, стереоизомеры, таутомеры и соли вышеуказанных агентов. В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления изобретения, каждый из агентов применяется в этих растворах, гелях или кремах в количестве по меньшей мере 0,1%, предпочтительно по меньшей мере 0,5 % или по меньшей мере 1, 2 или 3% (мас./мас.) общего веса раствора, крема или геля.

Роль реакционно-способных видов кислорода и антиоксидантов при воспалительных заболеваниях была описана в the Journal of Clinical Periodontology, том 24, изд. 5, 1997, с. 287-296.

Животные модели для периодонтита и гингивита хорошо известны в данной области техники, например Journal of Biomedicine и Biotechnology, том 2011, статья III 754857, 8, дата публ.: 10.1155/2011/754857.

Пиоглитазон можно использовать в энантимерно чистой или обогащенной форме, такой как описано в WO 2011/015868 и WO 2011/098746, которая особенно благоприятна для промываний полости рта, или пероральных гелей, ингаляционных растворов глазных капель и местных кремов или гелей или пластырей для лечения кожи.

Предпочтительно PPAR агонист и Nrf2 активатор, используемые в настоящем изобретении, не принадлежат к одному и тому же химическому классу соединений, т.е. Nrf2 активатор предпочтительно относится к другому классу соединений, чем PPAR агонист. Предпочтительными являются твердые пероральные лекарственные формы, содержащие комбинации в соответствии с изобретением для применения для лечения воспалительных и/или аутоиммунных заболеваний. Твердые пероральные лекарственные формы хорошо известны в данной области техники и включают порошки, гранулы, таблетки, капсулы и таблетки, такие как спрессованные таблетки (СТ), покрытые сахаром таблетки (SCT), покрытые пленочной оболочкой таблетки (FCT), покрытые кишечнорастворимой оболочкой таблетки (ECT), сложные спрессованные таблетки (MCT), которые представляют собой спрессованные таблетки, полученные с помощью более чем одного цикла прессования, слоеные таблетки, полученные путем прессования дополнительного таблетированного гранулята на ранее спрессованный гранулят, покрытые под давлением таблетки, таблетки с контролируемым высвобождением, шипучие таблетки, спрессованные суппозитории, буккальные и сублингвальные таблетки, формованные таблетки (растертые в порошок таблетки, ТТ) и подкожные таблетки (НТ). Наиболее предпочтительными являются твердые пероральные лекарственные формы, которые содержат оба агента вместе в одной фармацевтической композиции.

Также предпочтительной является композиция, которая содержит диметилфумарат, монометил фумарат, необязательно в форме его цинковой, магниевой и/или кальциевой соли и PPAR агонист. Предпочтительным также является PPAR гамма агонист для применения в комбинации с Nrf2 активатором для лечения аутоиммунного и/или воспалительного заболевания, в соответствии с любым из вышеуказанных вариантов осуществления, отличающийся тем, что лечение исключает или не включает введение гидроксимочевины (гидроксикарбамид), в частности, если PPAR гамма агонист и Nrf2 активатор не используют или вводят в смеси или в единичном фармацевтическом препарате, содержащей оба агента вместе.

Таблетки пиоглитазон и росиглитазон являются коммерчески доступными и могут использоваться как таковые для комбинированной терапии в соответствии с изобретением.

В одном варианте осуществления предпочтительные таблетки представляют собой таблетки с пле-

ночным покрытием, содержащие росиглитазон малеат в пересчете на росиглитазон, 2, 4 или 8 мг, для перорального введения, со следующими неактивными компонентами: гипромеллоза 2910, моногидрат лактозы, стеарат магния, микрокристаллическая целлюлоза, полиэтиленгликоль 3000, натрий крахмал гликолят, диоксид титана, триацетин и одно или несколько следующих: синтетический красный и желтые оксиды железа и тальк. В одном варианте осуществления предпочтительная таблетка для перорального введения содержит 15, 30 или 45 мг пиоглитазона (в виде основания), приготовленная в виде препарата со следующими наполнителями: моногидрат лактозы NF, гидроксипропилцеллюлоза NF, кальций карбоксиметилцеллюлоза NF и стеарат магния NF.

Другие препараты могут быть приготовлены аналогично US 6355676, US 7976853 и 6403121. Для всего описания термин "не существенной PPAR гамма агонистической активности" или "нет существенного PPAR гамма агонистического эффекта" обозначают, что при терапевтически пригодной концентрации Nrf2 активатора не может быть получена или измерена терапевтически пригодная PPAR гамма активация.

Для всего описания термин "нет существенного эффекта на Nrf2", или "нет существенного активирующего эффекта на Nrf2", или "нет существенного эффекта на активность Nrf2" обозначает, что при терапевтически пригодной концентрации PPAR гамма агониста не может быть получена или измерена терапевтически пригодная Nrf2 активация. Термины "моноалкил фумарат" и "моноалкил гидрофумарат" используются синонимически, такие как монометил фумарат и монометил гидрофумарат.

### Примеры

#### Пример 1.

Приготовление покрытых кишечнорастворимой оболочкой микротаблеток в капсулах, содержащих 120,0 мг диметилфумарата.

Согласно патенту US 7320999, 12,000 кг диметилфумарата дробили, смешивали и гомогенизировали с помощью сита 800. После этого приготавливали смесь наполнителей следующего состава: 17,50 кг производного крахмала (STA-RX® 1500), 0,30 кг микрокристаллической целлюлозы (Avicel® PH 101), 0,75 кг PVP (Kollidon® 120), 4,00 кг Primogel®, 0,25 кг коллоидной кремниевой кислоты (Aerosil®). Диметилфумарат добавляли к полной порошкообразной смеси, смешивали, гомогенизировали с помощью сита 200, обрабатывали обычным образом с 2% водным раствором поливидон пирролидона (Kollidon® K25), получая связанный гранулят, и после этого смешивали в безводном состоянии с наружной фазой. Указанная наружная фаза состояла из 0,50 кг стеарата Mg и 1,50 кг талька.

Порошкообразную смесь спрессовывали обычным образом в ядра микротаблеток 10 мг. Для достижения устойчивости к желудочному соку раствор 2,250 кг фталата гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMCP, Pharmacoat® HP 50) растворяли порциями в смеси следующих растворителей: 13,00 л ацетона, 13,50 л этанола (94 мас.%, денатурированного с 2% кетоном) и 1,50 л деминерализированной воды. В качестве пластификатора к конечному раствору добавляли касторовое масло (0,240 кг), которое наносили порциями на ядра микротаблеток общепринятым способом.

После завершения высушивания наносили суспензию следующего состава в виде пленочного покрытия на том же самом приборе: 0,340 кг талька, 0,400 кг оксида титана (VI) Cronus RN 56, 0,324 кг цветного лака L-Rot-lack 86837, 4,800 кг Eudragit E 12,5% и 0,120 кг полиэтилен гликоля 6000, pH 11 XI в смеси растворителей следующего состава: 8,170 кг 2-пропанола, 0,200 кг деминерализированной воды и 0,600 кг триацетата глицерина (Триацетин). С помощью этой процедуры получали покрытые кишечнорастворимой оболочкой микро-таблетки. После этого покрытые кишечнорастворимой оболочкой микро-таблетки заполняли в твердые желатиновые капсулы и запечатывали для применения в соответствии с изобретением.

Микропеллеты могут быть получены сходным образом в соответствии с US 7320999.

#### Пример 2.

Приготовление таблеток, содержащих пиоглитазон и диметилфумарат, в отдельных слоях таблеток.

В соответствии с US 807113 смесь гидрохлорида пиоглитазона (99,2 г), кроскармеллозы натрия (13,2 г) и лактозы (184,9 г) гранулировали путем распыления на ней 136,2 г водного раствора гидроксипропилцеллюлозы (6,81 г), в грануляторе с псевдооживленным слоем (производимым Rowtex Corp., Model: LAB-1). После этого полученный гранулированный порошок гранулировали путем распыления полученной суспензии путем диспергирования лактозы (36 г) в 148,6 г в водном растворе гидроксипропилцеллюлозы (7,59 г) на нем в грануляторе с псевдооживленным слоем (производимым Rowtex Corp., Model: LAB-1), получая содержащий гидрохлорид пиоглитазона гранулированный порошок, покрытый лактозой. К части полученного таким образом (23,18 г) гранулированного порошка добавляли кроскармеллозу натрия (0,728 г) и стеарат магния (0,096 г) и смешивали, получая порошок, содержащий смешанные гидрохлорид пиоглитазона. Порошок, содержащий смешанные гидрохлорид пиоглитазона, спрессовывали в форме ламината с порошком, полученным в примере 1, содержащим диметилфумарат, производное крахмала (STA-RX® 1500), микрокристаллическую целлюлозу (Avicel® PH 101), PVP (Kollidon® 120), Primogel® и коллоидную кремниевую кислоту (Aerosil®).

## Пример 3.

В соответствии с US 7976853 гидроксипропилцеллюлозу (26,4 г, Grade SSL, Nippon Soda Co., Ltd.) (вязкость 5% водного раствора при 20°C: 8 мПа·с), полиэтиленгликоль 6000 (1,32 г), оксид титана (2,64 г) и гидрохлорид пиогли tazона (16,5 г) диспергировали в воде (297 г), получая раствор для нанесения покрытия. Микро таблетки с кишечнорастворимым покрытием, полученные в примере 1, вводили в оборудование для нанесения пленочного покрытия (Hicoater-Mini, Freund Industrial Co. Ltd.) и покрывали с помощью вышеописанного раствора для нанесения покрытия, получая покрытый препарат. После этого эти покрытые кишечнорастворимой оболочкой микро таблетки, которые были покрыты с помощью гидрохлорид пиогли tazона, заполняли в твердые желатиновые капсулы и запечатывали для применения в соответствии с настоящим изобретением.

Альтернативно, в соответствии с примером 1 может быть получена покрытая кишечнорастворимой оболочкой таблетка, содержащая желательное количество диметилфумарата, после этого наносят покрытие с препаратом пиогли tazона, как описано выше. Таблетки можно использовать как таковые для комбинированного лечения в соответствии с изобретением.

## Пример 4.

Смесь гидрохлорида пиогли tazона (99,2 г), кроскармеллозы натрия (13,2 г) и лактозы (184,9 г) гранулировали путем распыления с нее 136,2 г водного раствора гидроксипропилцеллюлозы (6,81 г), в грануляторе с псевдооживленным слоем (производимым Powtex Corp., Model: LAB-1). После этого полученный гранулированный порошок гранулировали путем распыления суспензии, полученной путем диспергирования лактозы (36 г), в 148,6 г водного раствора гидроксипропилцеллюлозы (7,59 г) в нем в грануляторе с псевдооживленным слоем (производимым Powtex Corp., Model: LAB-1), получая гранулированный порошок, содержащий гидрохлорид пиогли tazона, покрытый лактозой. Желательное количество гранулированного порошка, полученного таким образом, заполняли в капсулы, содержащие покрытые кишечнорастворимой оболочкой микро таблетки с диметилфумаратом, полученные в соответствии с примером 1, которые после этого запечатывали.

## Пример 5.

Капсулу, заполненную дисперсией 20 мг аморфного бардоксолона метила в сополимер метакриловой кислоты типа C, USP в весовом соотношении 4/6 бардоксолона метила к сополимеру метакриловой кислоты типа C, USP, имеющие следующий состав, приготавливали в соответствии с US 2012/022156:

аморфный бардоксолон метил в виде 40% дисперсии: 11,36%;

SMCC (90LM, силикатированная микрокристаллическая целлюлоза, как перечислено в FDA Inactive Ingredients Guide): 36,36%;

моногидрат лактозы: 40,91%;

гидроксипропилметилцеллюлоза: 6,82%;

коллоидный диоксид кремния: 0,91%;

стеарат магния: 0,91%;

лаурил сульфат натрия: 2,73%.

Дополнительно, капсулу заполняли эквивалентом 45 мг пиогли tazона в форме его гидрохлорида в виде гранулированного порошка, покрытого лактозой, полученного в соответствии с первой частью примера 4. После этого капсулу запечатывали для применения.

Альтернативно, смесь, содержащую бардоксолон метил, и смесь, содержащую пиогли tazон, можно спрессовывать в таблетку, предпочтительно слоистую таблетку, где препараты упорядочены слоистым образом. В одном варианте осуществления на таблетку наносят кишечнорастворимую оболочку.

#### Общие экспериментальные протоколы

Если не указано иначе, то лечение следующих животных моделей состояло в или животных лечили с помощью диметилфумарата и пиогли tazона в форме его гидрохлорида, которые растворяли или диспергировали в 0,5% метоцеллюлозе/0,1% Tween 80 в дистиллированной воде и вводили с помощью перорального зонда два раза в сутки. В общем, леченые группы были такими: только наполнитель, только диметилфумарат, только пиогли tazон или комбинация диметилфумарата и пиогли tazона. Комбинация в соответствии с изобретением приводит к улучшенному ответу на лечение по сравнению с наполнителем и соответствующими агентами отдельно.

Влияние комбинаций в соответствии с настоящим изобретением для лечения злокачественного новообразования и предпочтительно гематологических злокачественных опухолей, таких как CLL и AML, можно обнаружить в соответствии с Blood. 2006 Nov 15; 108(10):3530-7 и Cancer Res June 15, 2010, 70; 4949.

Модель на животных для оценки терапевтического и профилактического эффекта комбинации PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора при воспалении полости рта и воспалении глотки, включая гингивит, периодонтит, тонзиллит.

Специфических беспатогенных C3H/HeN мышей инфицировали в соответствии с J. Periodontol. 2000 Jul; 71(7):1167-73 и лечили один раз в сутки с помощью перорального зонда в соответствии с общим примером с помощью гидрохлорида пиогли tazона, сульфорафана или трет-бутилгидрохинона или комбинаций гидрохлорида пиогли tazона и сульфорафана или гидрохлорид апиогли tazона и трет-

бутилгидрохинона. Лечение с применением комбинаций подводило к предотвращению или отсрочиванию начала и уменьшенным признакам воспаления по сравнению с индивидуальными агентами и по сравнению с нелечеными животными. Сходные качественные результаты были получены путем применения лечения один раз в сутки, промывая раствор животных в течение 2 мин с помощью раствора агентов.

Модель на животных для оценки терапевтического и профилактического эффекта комбинации PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора при ревматоидном артрите.

Животных приготавливали в соответствии с Wilder, R.L. 2001 (Streptococcal Cell Wall Arthritis) Current Protocols in Immunology. 26:15,10,1 - 15,10,12 и лечили один раз в сутки с помощью перорального зонда в соответствии с общим примером с помощью гидрохлорида пиоглиататзона, диметилфумарата или комбинации агентов.

Лечение с помощью комбинации приводило к предотвращению или отсрочиванию начала и уменьшенным признакам артрита и воспаления по сравнению с индивидуальными агентами и по сравнению с нелечеными животными.

Применение животной модели для оценки эффекта при лечении псориаза.

Мышиную модель с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) можно использовать для оценки эффективности соединений для лечения псориаза у людей (Boehncke, Ernst Schering Res. Found Workshop. 2005, 50, 213-34; и Bhagavathula et al., J. Pharmacol. Expt. 7 Therapeutics, 2008, 324(3), 938-947). SCID мыши использовали в качестве реципиентов ткани. Одну биопсию для каждого нормального или псориазического добровольца трансплантировали на дорсальную поверхность мышци-реципиента. Лечение начинали через 1-2 недели после трансплантации. Животных с трансплантатами кожи человека разделяли на леченые группы. Животных лечили два раза в сутки в течение 14 дней. После окончания лечения, животных фотографировали и затем подвергали эвтаназии. Трансплантированные ткани человека вместе с окружающей мышциной тканью хирургически удаляли и фиксировали в 10% формалине и получали образцы для микроскопии. Оценивали толщину эпидермиса. Тканевые срезы окрашивали с помощью антитела к связанному с пролиферацией антигену Ki-67 и с помощью моноклонального антитела к CD3<sup>+</sup> человека для обнаружения Т-лимфоцитов человека в трансплантированной ткани. Срезы также зондировали с помощью антител к с-тус и β-катенину. Положительный эффект на лечение оценивали по уменьшению средней толщины эпидермиса трансплантатов псориазической ткани. Положительные ответ также связан с уменьшением экспрессии Ki-67 в кератиноцитах.

Общая ЕАЕ животная модель для оценки терапевтического эффекта комбинации PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора для лечения рассеянного склероза.

Животных и ЕАЕ индицированных самок мышцей C57BL/6, в возрасте 8-10 недель (Harlan Laboratories, Livermore, CA), иммунизировали подкожно в бок и область между лопатками с помощью 200 мкг белка миелинового олигодендроцитарного гликопротеина (MOG35-Ss) (синтезированного с помощью Invitrogen), эмульсифицированного (1:1 объемное соотношение) с полным адьювантом Фрейнда (CFA) (содержащем 4 мг/мл *Mycobacterium tuberculosis*). Эмульсию приготавливали с помощью метода экстракции со шприца с двумя стеклянными шприцами с фиксатором иглы, соединенными с помощью трехходового клапана. Мыши также получали внутрибрюшинную инъекцию 200 нг коклюшевого токсина (List Biological Laboratories, Inc, Campbell, CA) в день иммунизации и во второй день после иммунизации. Мышей взвешивали и исследовали один раз в сутки относительно наличия клинических признаков экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЕАЕ). Еду и воду обеспечивали ad libitum и, как только у животных начинало проявляться заболевание, еду доставляли на дно клетки.

Клиническая оценка.

Мышей оценивали один раз в сутки, начиная с 7-го дня после иммунизации. Шкала клинической оценки была следующей (Miller and Karplus, Current Protocols in Immunology 2007, 15.1.1 - 15.1.18): 0 = нормальные; 1 = вялый хвост или слабость задних конечностей (определяется путем скольжения стоп между планками верха клетки при движении); 2 = вялый хвост и слабость задних конечностей; 3 = частичный паралич задних конечностей (определяется как отсутствие весовых нагрузок на задние конечности, но все еще может двигать одну или обе задние конечности в некоторой степени); 4 = полный паралич задних конечностей; 5 = агональное состояние (включая паралич передних конечностей) или смерть.

Животная модель для оценки терапевтического эффекта комбинации PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора для лечения рассеянного склероза.

Эксперименты осуществляли на самках мышцей в возрасте 4-6 недели, относящихся к штамму C57BL/6 весом 17-20 г. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ) активно индуцировали, используя >95% чистый синтетический белок миелиновый олигодендроцитарный гликопротеин 35-55 (MOG35-55, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK). Каждую мышцу анестезировали и вводили 200 мкг MOG белка и 15 мкг экстракта сапонина из *Quilija bark*, эмульсифицированного в 100 мкл фосфатносолевого буферного раствора. 25 мкл объема инъецировали подкожно в области четырех боков. Мышам также внутрибрюшинно инъецировали 200 нг токсина коклюша в 200 мкл PBS. Вторую, идентичную инъекцию токсина коклюша вводили через 48 ч.

Ежесуточное лечение продолжали от дня 26 до дня 36 после иммунизации. Клиническую оценку

осуществляли раз в сутки от дня 0 после иммунизации до дня 60. Клинические признаки оценивали согласно следующему протоколу: 0, отсутствуют обнаружимые признаки; 0.5, слабость дистального хвоста, появление сгиба и тихое поведение; 1, полностью вялый хвост; 1.5, вялый хвост и слабость задних лап (неустойчивая походка и плохое сцепление задними лапами); 2, односторонний паралич задних лап; 2.5, двусторонний паралич задних лап; 3, полный двусторонний паралич задних лап; 3.5, полный паралич задних лап и односторонний паралич передних лап; 4, тотальный паралич задних и передних лап (Eugster et al., *Eur. J. Immunol.* 2001, 31, 2302-2312).

Воспаление и демиелинизацию оценивали путем гистологии на срезах с ЦНС CNS EAE мышей. Мышей умертвляли через 30 или 60 дней и весь спинной мозг удаляли и помещали в 0,32 М раствор сахарозы при 40С в течение ночи. Ткани препарировали и готовили срезы. Краситель Luxol дианизидин использовали для наблюдения за областями демиелинизации. Окрашивание гематоксилином и эозином использовали для выделения областей демиелинизации путем темного окрашивания ядер мононуклеарных клеток. Иммунные клетки, окрашенные с помощью Н&Е, подсчитывали слепым способом под световым микроскопом. Секции разделяли на серое и белое вещество и каждый сектор подсчитывали вручную перед объединением, получая общее для среза. Т-клетки иммунометили с помощью анти -CD3+ моноклонального антитела. После промывания срезы инкубировали с козым антикрысиным HRP вторичным антителом. После этого срезы промывали и контрастно окрашивали метиловым зеленым. Спленциты, выделенные у мышей через 30 и 60 дней после иммунизации, обрабатывали лизирующим буфером для удаления эритроцитов. После этого клетки ресуспендировали в PBS и подсчитывали. Клетки при плотности приблизительно  $3 \times 10^6$  клеток/мл инкубировали в течение ночи с 20 мкг/мл MOG пептида. Супернатанты из стимулированных клеток анализировали относительно уровней IFN- $\gamma$  белка, используя подходящую мышиную систему иммунологического анализа IFN- $\gamma$ .

Применение животной модели для оценки эффекта при лечении воспалительного заболевания кишечника.

Животные модели воспалительного заболевания кишечника описаны Jurjus et al., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 2004, 50, 81-92; Villegas et al., *Int'l Immunopharmacol.* 2003, 3, 1731-1741 и Murakami et al., *Biochemical. Pharmacol.* 2003, 66, 1253-1261. Например, можно использовать следующий протокол для оценки влияния комбинации в соответствии с настоящим изобретением для лечения воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона и колита. Использовали самок ICR мышей. Мышей разделяли на леченные группы. Группы получали либо воду (контроль), 5% DSS в водопроводной воде вводили в начале эксперимента для индуцирования колита, или проводили лечение. После проведения лечения в течение 1 недели, 5% DSS в водопроводной воде также вводили группам, получавшим лечение в течение 1 недели.

После окончания эксперимента всех мышей убивали и толстый кишечник удаляли. Образцы слизистой оболочки толстой кишки получали и гомогенизировали. Количественно определяли провоспалительные медиаторы (например, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PGE2, и PGF2 $\alpha$ ) и концентрацию белка. Каждое иссечение толстого кишечника исследовали гистологически и оценивали повреждение толстой кишки.

Клинические исследования для оценки влияния при лечении астмы.

Регистрировали взрослых субъектов (некурящих) со стабильной от легкой до умеренной астмы (см., например, Van Schoog и Pauwels, *Eur Respir J.* 2002, 19, 997-1002). Использовали рандомизированное, двойное слепое, с контролем плацебо, двухпериодное перекрестное исследование. Плацебо, только диметилфумарат, только пиоглитазон и комбинацию диметилфумарата и пиоглитазона вводили перорально в различные руки. Комбинация в соответствии с изобретением приводит к улучшенному ответу на лечение по сравнению с наполнителем и агентами отдельно

Применение животной модели для оценки эффекта при лечении хронического обструктивного заболевания легких.

Животную модель, использующую мышей, которых хронически подвергали воздействию табачного дыма, можно использовать для оценки эффективности при лечении эмфиземы (см., например, Martorana et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005, 172, 848-835; и Cavarra et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001, 164, 886-890). Использовали самцов мышей C57B1/6J в возрасте шесть недель. При изучении непосредственных эффектов препарат, мышей подвергали воздействию либо комнатного воздуха, либо дыма пяти сигарет в течение 20 мин. При хроническом исследовании, мышей подвергали воздействию либо комнатного воздуха или дыма трех сигарет/сутки в течение 5 дней/недели в течение 7 месяцев. При изучении непосредственных эффектов препарата, мышей разделяли на три группы. После этого эти группы разделяли на четыре подгруппы по 10 мышей каждая следующим образом: (1) группа без лечения/воздействие воздуха; (2) без лечения/воздействие дыма; (3) комбинация диметилфумарата и пиоглитазона плюс воздействие дыма; (4) пиоглитазон плюс воздействие дыма и (5) диметилфумарат плюс воздействие дыма. В первой группе оценивали тролокс-эквивалент антиоксидантной способности после окончания воздействия в жидкости бронхоальвеолярного лаважа. Во второй группе определяли цитокины и хемокины в жидкости бронхоальвеолярного лаважа, используя коммерческую цитокиновую панель через 4 ч; и в третьей группе подсчитывали клетки в жидкости бронхоальвеолярного через 24 ч.

Животные модели для оценки терапевтического эффекта комбинации PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора для лечения болезни Паркинсона МРТР индуцированной нейротоксичности.

МРТР, или 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин представляет собой нейротоксин, который продуцируется синдромом Паркинсона как у людей, так и у экспериментальных животных. Исследования механизма нейротоксичности МРТР показало, что задействует генерацию основного метаболита, MPP+, образуемого посредством активности моноамин оксидазы на МРТР. Ингибиторы моноамин оксидазы блокируют нейротоксичность МРТР как у мышей, так и у приматов. Полагают, что специфичность нейротоксичных эффектов MPP+ для допаминергических нейронов возникает вследствие поглощения MPP+ с помощью синаптического допраминового транспортера. Блокаторы этого транспортера предотвращают MPP+ нейротоксичность. Было показано, что MPP+ является относительно специфическим ингибитором активности митохондриального комплекса I, связываясь с комплексом I в сайте связывания ретенона и повреждая окислительное фосфорилирование. В исследованиях *in vivo* было показано, что МРТР может истощать концентрацию АТФ в полосатом теле у мышей. Было показано, что введение MPP+ в полосатое тело продуцирует существенное истощение АТФ, а также повышает концентрацию лактата, ограниченную полосатым телом в участках инфекции. Соединения, которые повышают продукцию АТФ, могут защищать от МРТР токсичности у мышей. Мышей или крыс лечили либо одним наполнителем, только диметилфумаратом только пиоглитазоном или комбинацией диметилфумарата и пиоглитазона в течение трех недель перед лечением с помощью МРТР. МРТР вводили в подходящей дозе, интервале дозирования, и режиме введения в течение 1 недели перед умерщвлением. Контрольные группы получали либо нормальный солевой раствор или отдельно МРТР гидрохлорид. После умерщвления два полосатых тела быстро иссекали и помещали в закаленную 0,1 М перхлорную кислоту. После этого ткань обрабатывали ультразвуком и аликвоты анализировали относительно содержания белка, используя флуориметр. Также количественно определяли допамин, 3,4-дигидроксифенилуксусную кислоту (DOPAC) и гомованилиновую кислоту (HVA). Концентрации допамина и метаболитов выражали в виде нмоль/мг белка.

Индуцированное галоперидолом снижение двигательной активности.

Способность соединения обращать депрессирующие поведенческие эффекты антагонистов допамина, таких как галоперидол, у грызунов, и это является обоснованным методом для скрининга лекарственных средств с потенциальными противопаркинсоническими эффектами (Mandhane, et al., Eur. J. Pharmacol 1997, 328, 135-141). Следовательно, способность лечения блокировать индуцированные галоперидолом дефициты двигательной активности у мышей можно использовать для оценки как *in vivo*, так и потенциальной противопаркинсонической эффективности. Мышей, используемых в эксперименте, содержали в контролируемых условиях и предоставляли возможность акклиматизации перед экспериментальным использованием. За 1,5 ч до тестирования мышам вводили 0,2 мг/кг галоперидола, дозу, которая уменьшает исходную двигательную активность по меньшей мере на 50%. Лечение вводили подходяще долго перед тестированием. После этого животных помещали индивидуально в чистые, прозрачные поликарбонатные клетки с плоской перфорированной крышкой.

Горизонтальную двигательную активность определяли путем помещения клетку в рамку, содержащую 3x6 массив фотоэлементов, связанных с помощью интерфейса с компьютером, для табуляции прерывания лучей. Мышей не тревожили в течение 1 ч, и количество прерываний лучей, записанное в это время, служило в качестве индикатора двигательной активности, которую сравнивали с данными для контрольных животных для выявления статистически достоверных отличий.

Животная модель с 6-гидроксидопамином.

Нейрохимическая недостаточность, обнаруживаемая при болезни Паркинсона, может быть воспроизведена путем местной инъекции допаминергического нейротоксина, 6-гидроксидопамина (6-OHDA) в участки головного мозга, содержащие либо тела клеток или аксонные волокна nigrostriатных нейронов. Путем одностороннего повреждения nigrostriатного пути только с одной стороны головного мозга, наблюдали поведенческую асимметрию в ингибировании движения. Несмотря на то, что односторонне-пораженные животные все были подвижными и способны к самообслуживанию, оставшиеся допамин-чувствительные нейроны на пораженной стороне становятся суперчувствительными к стимуляции. Это можно подтвердить с помощью наблюдения, что при последующем системном введении агонистов допамина, таких как апоморфин, у животных проявляется резко выраженное вращение в направлении, противоположном стороне поражения. Было показано, что способность соединений индуцировать противоположное вращение в 6-OHDA пораженных крыс является чувствительной моделью для предсказания эффективности лекарственных средств для лечения болезни Паркинсона.

Самцов крыс Sprague-Dawley содержали в контролируемых условиях и предоставляли возможность акклиматизации перед экспериментальным использованием. За 15 мин до операции животным внутривенно инъецировали ингибитор норадренергического поглощения дезипрамин (25 мг/кг) для предотвращения поражения недопаминового нейрона. После этого животных помещали в клетку для анестезии и анестезировали с помощью смеси кислорода и изофлурана. После потери сознания животных переносили в стереотаксический каркас, где анестезию поддерживали через маску. Макушку головы сбивали и стабилизировали с помощью раствора йода. После высушивания осуществляли надрез дли-

ной 2 см вдоль срединной линии кожи черепа и кожу оттягивали и врезали для получения доступа к черепу. После этого в черепе просверливали небольшую дырку выше места инъекции. Для повреждения nigrostriatalного пути инъекционную канюлю медленно опускали до положения выше правого медиального пучка переднего мозга на -3,2 мм передне-задне, -1,5 мм медиалатерально от брегмы и на глубину 7,2 мм ниже твердой мозговой оболочки. Через 2 мин после опускания канюли 6-OHDA инфузирова­ли крысе со скоростью 0,5 мкл/мин в течение 4 мин, для обеспечения конечной дозы 8 мкг. Канюлю остав­ляли на этом месте дополнительно в течение 5 мин для облегчения диффузии перед медленным извлече­нием. После этого кожу тщательно закрывали, животное удаляли из стереотаксического каркаса и воз­вращали назад в его клетку. Крысам давали возможность восстановиться после операции в течение двух недель перед началом поведенческих тестов. Крутящиеся поведения измеряли с помощью ротамерной системы, имеющей миски из нержавеющей стали (45 см диаметр×15 см высота), заключенные в прозрач­ные крышки из плексигласа вокруг концов миски клетки и простирающиеся на высоту 29 см. Для облег­чения вращения крыс помещали в тканевой жакет, присоединенный к пружинному ограничению, свя­занному с оптическим ротамером, расположенным выше чашки, который облегчает движение влево или вправо либо частичное (45°), либо полное (360°) вращение.

Лечение осуществляли в течение подходящего периода перед тестированием. Животные получали подкожную инъекцию подпороговой дозы апоморфина, и после этого их помещали в ремни. Количество вращений записывали в течение 1 ч. Общее количество полных противоположных вращений в течение часового тестируемого периода служило в качестве индекса эффективности противопаркинсонических лекарственных средств.

Животная модель для оценки терапевтического эффекта для лечения болезни Альцгеймера.

Гетерозиготных трансгенных мышей, экспрессирующие мутантный ген Swedish AD, hAPPK670N, M671L (Tg2576; Hsiao, Learning & Memory, 2001, 8, 301-308), использовали в качестве животной модели болезни Альцгеймера. Животных содержали в стандартных условиях с циклом 12:12 день/ночь, и пища и вода были доступны ad libitum. Начиная с возраста 9 месяцев, мышей разделяли на две группы. Группы животных получали лечение в течение шести недель.

Тестирование поведение осуществляли для каждой дозы лекарственного средства, используя иден­тичную последовательность в течение двух недель для всех экспериментальных групп: (1) простран­ственное переделывание навыка, (2) локомоция, (3) выработка условного рефлекса в связи с переживанием чувства страха и (4) чувствительность к шоку.

Приобретение парадигмы пространственного обучения и переделки навыка тестировали в течение первых пяти дней введения тестируемого соединения, используя введение водный Т-лабиринт, как опи­сано в Bardgett et al., Brain. Res. Bull, 2003, 60, 131-142. Мышей приучали к водному Т-лабиринту в тече­ние дней 1-3 и приобретение задачи начинали в день 4. В день 4 мышей тренировали находить спаса­тельную платформу в плече одного выбора лабиринта до тех пор, пока 6-8 правильных выборов не было сделано при последовательных следах. После этого осуществляли фазу переделки навыка в день 5. В течение фазы переделки навыка мышей тренировали находить спасательную платформу в плече одного выбора на противоположном направлении от расположения спасательной платформы в день 4. Использо­вали такие же критерии осуществления и интервалы между пробами, как и при приобретении задачи. Оценивали большие ходячие движения для определения того, что на результаты парадигмы простран­ственной переделки навыка не оказывает влияние способность передвигаться. После периода отдыха в тече­ние двух дней оценивали горизонтальные ходячие движения, исключая вертикальные и тонкие двига­тельные акты, в камере, оборудованной решеткой чувствительных детекторов движения в день 8. Коли­чество движений, сопровождаемых одновременным блокированием и разблокированием детектора в го­ризонтальном измерении, определяли в течение 1 ч.

Способность животного к контекстуальной и узнающей памяти тестировали с использованием па­радигмы выработки условного рефлекса в связи с переживанием чувства страха, начиная со дня 9. Тес­тирование проводили в камере, которая содержит кусок гигроскопической ваты, пропитанной раствором, имеющим специфический запах, например мятный экстракт, помещенный ниже решетки пола. 5-минутную, 3 пробы 80 дБ, 2800 Гц тоновую последовательность электроболевого раздражения лап жи­вотных вводили для тренировки животных в день 9. В день 10 тестировали память для контекста путем возвращения каждой мыши в клетку без воздействия тона и электроболевого раздражения лап животных и записывали присутствие или отсутствие замирания каждые 10 с в течение 8 мин. Замирание определя­ли как отсутствие движения, такое как способность передвигаться, обнюхивание или стереотипия, отли­чающееся от дыхания.

В день 11 тестировали ответ животных на альтернативный контекст и на звуковой ориентир. Коко­совый экстракт помещали в чашку и презентировали тон 80 дБ, но без электроболевого раздражения лап животных. После этого определяли присутствие или отсутствие замирания в ответ на альтернативный контекст в течение первых 2 мин исследования. После этого тон презентировали непрерывно в течение оставшихся 8 мин исследования и определяли присутствие или отсутствие замирания в ответ на тон.

В день 12 животных тестировали для оценки их чувствительности на условный стимул, т.е. элек­троболевое раздражение лап животных. После последнего дня тестирования поведения животных ане-

стежировали и головной мозг удаляли, затем фиксировали в течение ночи и нарезали срезы через гиппокамп. Срезы окрашивали для визуализации бляшек  $\beta$ -амилоида.

Данные анализировали, используя подходящие статистические методы.

Животная модель для оценки терапевтического эффекта для лечения болезни Хантингтона.

Нейрозащитные эффекты на модели болезни Хантингтона у трансгенных мышей.

Трансгенные HD мыши штамма N171-82Q и нетрансгенные однопомётные животные получали лечение в возрасте от 10 недель. Мышей помещали во вращающийся барабан ("rotarod"). Продолжительность времени, в течение которого мыши падали с вращающегося барабана, записывали в качестве оценки двигательной координации. Общее расстояние, пройденное мышью, также записывали в качестве критерия общей локомоции. Мыши, проявляющие улучшенный ответ на лечение с применением комбинации диметилфумарата и пиоглитазона, оставались на вращающемся барабане более длительный период времени и проходили дальше, чем мыши, которым вводили наполнитель или один агент отдельно.

Малонатная модель болезни Хантингтона.

Серии обратимых и необратимых ингибиторов ферментов, задействованных в пути генерирования энергии, использовали для создания животных моделей для нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона и болезнь Хантингтона. В частности, ингибиторы сукцинат дегидрогеназы, фермента, который оказывает влияние на гомеостаз клеточной энергии, использовали для получения модели болезни Хантингтона.

На этой малонатной модели болезни Хантингтона лечение проводили в подходящей дозе, интервале дозирования и пути введения, самцам крыс Sprague-Dawley. Лечение осуществляли в течение двухнедельного периода перед введением малоната и после этого в течение дополнительной недели перед умерщвлением. Малонат растворяли в дистиллированной деионизированной воде и значение pH доводили до 7,4 с помощью 0,1 М HCl. Инъекции в полосатое тело 1,5 мкл 3 мкмоль малоната осуществляли в левое полосатое тела на уровне Брегма на 2,4 мм латеральной от срединной линии и 4,5 мм вентральной к твердой мозговой оболочке. Животных умерщвляли на 7 день путем декапитации и головной мозг быстро удаляли и помещали в охлажденный на льду 0,9% солевой раствор. Головной мозг нарезали на срезы с интервалами 2 мм в форму для головного мозга. После этого срезы помещали задней стороной вниз в 2% хлорид 2,3,5-тифенилтетразолия. После этого срезы окрашивали в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин и после этого удаляли и помещали в 4% параформальдегид pH 7,3. Очаги поражения, заметные по более светлому окрашиванию, оценивали на задней поверхности каждого среза. Изменения подтверждали путем сравнения с измерениями, полученными на смешных срезах штамма Nissl.

Животная модель для оценки терапевтического эффекта для лечения бокового амиотрофического склероза.

Разрабатывали мышиную модель SOD1 ассоциированной с мутацией ALS, в которой мыши экспрессируют мутацию супероксиддисмутазы человека (SOD) глицин-аланин в остатке 93 (SOD1). Эти SOD1 мыши проявляют доминантную мутацию, при которой белковый продукт экспрессии мутантного гена приобретает новые и патологические функции SOD, и при этом развивается дегенерация и дисфункция двигательных нейронов, сходные с тем, что наблюдается при ALS у людей. SOD1 трансгенные мыши проявляют признаки слабости задних конечностей приблизительно в возрасте 3 месяцев и умирают в 4 месяца. Характерные признаки, общие с ALS человека, включают астроцитоз, микроглиоз, окислительный стресс, повышенные уровни циклооксигеназы/простагландина, и, поскольку заболевание прогрессирует, полную потерю двигательных нейронов. Исследования осуществляли на трансгенных мышях, сверхэкспрессирующих Cu/Zn-SOD G93A мутации человека (B6S JL-TgN (SOD1-G93A) 1 Gur) и нетрансгенных B6/SJL мышях и их диких однопометных животных. Мышей содержали при световом цикле 12 ч день/ночь и (начинали в возрасте 45 дней), предоставляли доступ к еде, дополненной тестируемым соединением, или к контрольной еде, обычного состава холодного прессования, переработанной в идентичные пеллеты. Генотипирование можно осуществлять в возрасте 21 день, как описано в Gurney et al., Science, 1994, 264(5166), 1772-1775. SOD1 мыши разделяли на группы и лечение осуществляли в течение подходящего периода.

Мышей наблюдали один раз в сутки и взвешивали еженедельно. Для оценки состояния здоровья мышей взвешивали еженедельно и исследовали относительно изменений слезовыделения/слиноотделения, закрытия века, подергивание ушной раковины и реакции зрачка, ориентации волосков, постуральных и выпрямительных рефлексов и суммарной оценки физического состояния в баллах. Общее патологическое исследование осуществляли во время умерщвления.

Качество двигательной координации животных можно оценить с помощью одного или более методов, известных специалисту в данной области техники. Например, двигательную координацию можно оценить с помощью метода неврологической оценки. При неврологической оценке наблюдали и записывали неврологическую шкалу для каждой конечности в соответствии с определенной 4-бальной шкалой: 0 - нормальный рефлекс на задних конечностях (животное будет выворачивать наружу свои задние конечности при поднимании его за хвост); 1 - аномальный рефлекс задних конечностей (отсутствие выворачивания наружу задних конечностей, когда животное поднимают за хвост); 2 - аномальный рефлекс конечностей и признаки паралича; 3 - отсутствие рефлекса и полный паралич и 4 - неспособность повер-

нуться правильно при переворачивании на бок в течение 30 с или смерть. Первичной конечной точкой является выживание с вторичными конечными точками неврологической шкалы и веса тела. Наблюдения за неврологической шкалой и весом тела осуществляли и записывали пять дней в неделю. Анализ данных осуществляли с использованием подходящих статистических методов. Тест вращающихся барабанов оценивает способность животного стоять на вращающемся штифте, что предоставляет возможность оценки двигательной координации и мышечно-суставной чувствительности. Прибор представляет собой автоматизированный барабан диаметром 3 см, который вращается со скоростью, например, 12 об/мин. С помощью теста вращающегося барабана можно измерить, как долго мышшь может поддерживать саму себя на барабане без падения. Тест можно остановить через произвольный предел 120 с. Если животное падает ранее 120 с, то действие записывали и осуществляли две дополнительные попытки. Рассчитывали среднее время для 3 попыток. На двигательную недостаточность указывало снижение времени перемещения. В тесте с решеткой животных помещали на решетку (длина: 37 см, ширина: 10,5 см, размер ячейки: 1×1 см<sup>2</sup>), расположенную выше плоскости поддержки. Подсчитывали, сколько раз мышшь помещали свои лапы в решетку, и это служило в качестве оценки двигательной координации. В испытании на разрыв подвешиванием грузов оценивали способность животного удерживаться на проволоке. Прибор представлял собой проволоку, натянутую горизонтально на 40 см выше стола. Животное подвешивали на проволоку с помощью его передних лап. Записывали время, необходимое животному для захвата проволоки задними лапами (максимум 60 с) в течение трех последовательных попыток.

Электрофизиологические измерения (EMG) также можно использовать для оценки состояния двигательной активности. Электромиографические записи осуществляли с использованием электромиографического прибора. При EMG мониторинге мышшь анестезировали. Измеряемыми параметрами являлись амплитуда и латентность электрического вызванного ответа мышшь (СМАР). СМАР измеряли на икроножной мышце после стимуляции седалищного нерва. Сравнительный электрод вставляли возле ахиллового сухожилия и активную иглу помещали в основание хвоста. Заземленную иглу вставляли в нижнюю часть спины мышшь. Седалищный нерв стимулировали единичным импульсом 0,2 мс со сверхмаксимальной интенсивностью (12,9 мА). Измеряли амплитуду (мВ) и латентность ответа (мс). Амплитуда указывает на количество активных двигательных единиц, в то время как дистальная латентность отображает скорость проводимости эфферентного нерва. Эффект комбинации в соответствии с настоящим изобретением также можно оценить с помощью анализа биомаркеров. Для оценки регуляции белковых биомаркеров у SOD1 мышшь при начале двигательной недостаточности, образцы поясничного отдела спинного мозга (белковые экстракты) наносили на ProteinChip Arrays с различными поверхностными химическими /биохимическими свойствами и анализировали, например, с помощью усиленной поверхностностью ионизации методом лазерной десорбции времяпролетной масс-спектрометрии. После этого, используя интегрированные методы анализа массового спектра белков, данные использовали для сравнения профилей экспрессии белков различных леченых групп. Анализ можно осуществлять с использованием подходящих статистических методов.

Животная модель для оценки терапевтического эффекта при миастении гравис.

Индукция и клиническая оценка ЕАМГ в соответствии с *International Immunology*, vol. 10, No. 9, p. 1359-1365.

В6 и мМТ мышшь иммунизировали подкожно вдоль лопаток и спины с помощью 20 мкг АСhR с СFA в общем объеме 100 мкл и бустировали два раза с месячными интервалами с помощью 20 мкг АСhR в СFA подкожно в четыре участка на лопатках и бедрах. Мышь наблюдали через день слепым образом для обнаружения признаков слабости мышшь, характерных для ЕАМГ. Клинические симптомы классифицировали между 0 и 3 (4): 0, отсутствует выраженная слабость мышшь; 1, нормальная сила в состоянии покоя, но слабость при подтягивании на лапах по полу и неспособность поднять голову после упражнений, включающих 20 последовательный зажатий лап; 2, как при оценке 1 и слабость в состоянии покоя; и 3, агония, обезвоживание и паралич. Клиническую ЕАМГ подтверждали путем инъекции неостигмин бромида и атропин сульфата. Мышь разделяли на группы и лечение проводили в течение подходящего периода перед тестированием.

Животная модель для оценки терапевтического эффекта при алопеции.

Экспериментальные лысые крысы Dundee (DEBR) и С3Н/HeJ мышшь являются хорошо изученными экспериментальными моделями для очаговой алопеции и могут быть использованы для исследований генетических аспектов, патогенеза и терапии заболевания. У С3Н/HeJ мышшь очаговая алопеция может быть экспериментально индуцирована путем прививания содержащей поражения кожи от больной мышшь гистосовместимому реципиенту, что предоставляет возможность изучения влияния различных факторов на развитие заболевания. Мышь разделяли на группы и лечение проводили в течение подходящего периода перед тестированием.

#### **Общий экспериментальный протокол**

Лечение следующих моделей на животных включало диметилфумарат, растворенный или диспергированный в 0,5% гидроксипропилметилцеллюлозе (HPMC) K4 M/0,25% Tween 20, и пиоглитазон, растворенный или диспергированный в клептозе в дистиллированной воде. Лечение вводили с помощью

перорального зонда один или два раза в сутки. Леченые группы в целом были следующими: соответствующие наполнители, диметилфумарат, пиоглитазон или комбинация диметилфумарата и пиоглитазона. Комбинация в соответствии с изобретением приводит к улучшенному ответу на лечение по сравнению с наполнителем и соответствующими агентами отдельно.

ЕАЕ животная модель для оценки терапевтического эффекта комбинации PPAR гамма агониста и Nrf2 активатора для лечения рассеянного склероза.

Самок мышей C57BL/6 заказывали (Janvier France или Charles River) в возрасте 7-8 недель и использовали в диапазоне 9-11 недель после периода акклиматизации. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ) активно индуцировали, используя >95% чистый синтетический пептид миелино-вый олигодендроцитарный гликопротеин 35-55 (MOG35-55), Met-Glu-Val-Gly-Trp-Tyr-Arg-Ser-Pro-Phe-Ser-Arg-Val-Val-His-Leu-Tyr-Arg-Asn-Gly-Lys, Ref SC1272, NeoMPS). Каждую мышь анестезировали и подкожно инъецировали 100 мкл полного адьюванта Фрейнда (Ref 263810, Difco) эмульсии, содержащей 200 мкг MOG35-55 и 250 мкг высушенных и убитых *M. Tuberculosis* H37 Ra, Ref 231141 Difco) в нижний отдел спины. Эмульсию приготавливали с помощью метода шприца с двумя шприцами, соединенными через трубку с насадкой Люэра. Мыши также получали внутрибрюшинную инъекцию 300 нг токсина коклюша (Ref BML-G100, Enzo Lifescience), разведенного в 200 мкл PBS. Инъекцию токсина коклюша повторяли через 48 ч. Мышей взвешивали и обследовали один раз в сутки для обнаружения клинических признаков ЕАЕ. Еду и воду обеспечивали *ad libitum*.

Клиническая оценка.

Животных оценивали для обнаружения неврологических дефицитов (клиническая оценка) и взвешивали раз в сутки. Клиническая шкала оценки была следующей; 0 = признаки отсутствуют; 0,5 = дистально вялый хвост; 1 = полностью парализованный хвост; 1,5 = слабость задних конечностей; 2 = односторонний частичный паралич задних конечностей; 2,5 = двусторонний частичный паралич задних конечностей; 3 = полный двусторонний паралич задних конечностей; 3,5 = слабость передних конечностей и полный двусторонний паралич задних конечностей; 4 = паралич четырех конечностей/агония; 5 = смерть от ЕАЕ.

Результаты: Оценка лечения с диметилфумаратом в комбинации с пиоглитазоном в форме его гидрохлорида.

40 самок мышей C57BL/6 в возрасте 8-9 иммунизировали в соответствии с ЕАЕ протоколом, описанным в разделе "Методы". Мышей разделяли на 4 различные леченые группы (n=10), и они получали лечение с НРМС 0,5%/Tween20 0,25% (наполнитель для диметилфумарата) два раза в сутки плюс Клептоза 20% (наполнитель для пиоглитазона) один раз в сутки, диметилфумарат 60 мг/кг два раза в сутки плюс Клептоза 20% один раз в сутки, пиоглитазон 10 мг/кг один раз в сутки плюс НРМС 0,5%/Tween 20 0,25% два раза в сутки или диметилфумарат 60 мг/кг два раза в сутки плюс пиоглитазон 10 мг/кг один раз в сутки. Для простоты лечение с применением наполнителя не указывали в надписях на графике и вышеуказанные группы называли как контроль, диметилфумарат 60 мг/кг два раза в сутки, пиоглитазон 10 мг/кг один раз в сутки или диметилфумарат + пиоглитазон соответственно. Лечение с помощью лекарственного средства начинали в день 0 после иммунизации. Как показано на фиг. 1А, иммунизация C57BL/6 мышей с помощью MOG35-55 индуцировала локомоторную инвалидность с клиническими признаками, развивающимися около 9 после иммунизации. Влияние лечения с применением комбинации (диметилфумарат + пиоглитазон) существенно уменьшало среднесуточные клинические оценки (фиг. 1А). Эффективность комбинации была более четко выражена и статистически отличалась от эффекта индивидуальных лечений. Подавление индуцированной воспалением кахексии являлось надежным маркером преимуществ лечения. Комбинированное лечение (диметилфумарат + пиоглитазон) существенно улучшает вес тела по сравнению с наполнителем или лечением единственным лекарственным средством (фиг. 1В). Эффект лечения с применением лекарственного средства на распространение заболевания проанализирован на фиг. 2. Начало заболевания определяли в момент времени, когда каждая мышь впервые проявляла клиническую оценку  $\geq 1$ . На фиг. 2А представлен анализ Каплана-Мейера, показывающий, что у мышей с контрольной группы начинал развиваться ЕАЕ с дня 9 с полной чувствительностью в день 14 после иммунизации. Комбинированное лечение с диметилфумаратом + пиоглитазоном сдвинуло кривую начала ЕАЕ. Не у всех животных, получавших лечение комбинацией лекарственных средств, развивались признаки заболевания до окончания эксперимента, т.е. до дня 22 после иммунизации. Эффект комбинированного лечения статистически отличался не только по сравнению с контрольной группой, но также и по сравнению с каждым из лекарственных средств, вводимых самостоятельно. На фиг. 2В показано другое представление тех же данных. В среднем, мыши, леченные наполнителем, диметилфумаратом или пиоглитазоном отдельно, не отчетливо проявляли первые клинические симптомы заболевания приблизительно на 12-13 день после иммунизации, в то время как в группе для комбинации среднее начало ЕАЕ было около дня 17 после иммунизации. Эффект комбинированного лечения также статистически отличался от и был более сильным, чем в других леченых группах. Эти данные свидетельствуют о том, что комбинированное лечение приводит к синергетическому эффекту лечения, которое не наблюдается для индивидуальных лечений. Изменения в желудочно-кишечном тракте, включая геморрагии, являются известными побочными эффектами лечения с помощью диметилфумара-

та. Комбинированное лечение и лечение только диметилфумаратом приводит к сходной гиперплазии макровязкости желудка. Не наблюдали ухудшения симптомов при комбинированном лечении. Характерные изображения желудка мышей, которых хронически лечили в течение 22 дней с помощью диметилфумарата, пиоглитазона или их наполнителей, представлены на фиг. 3 для демонстрации некоторых из этих наблюдений. Важно, что синергетическая эффективность, обсуждаемая в предыдущих абзацах, не связана с повышением побочных явлений в желудочно-кишечном тракте.

#### Краткое описание фигур

Фиг. 1. Комбинированное лечение с диметилфумаратом + пиоглитазоном является существенно более эффективным по сравнению с каждым индивидуальным лекарственным средством в качестве самостоятельных лечений или лечений с наполнителем на средние клинические оценки и также на изменения веса тела, связанные с заболеваниями. Средние клинические оценки (A) и изменения веса тела в процентах (B) MOG35-55 мышей, леченых с помощью наполнителя, диметилфумарата, пиоглитазона или комбинации обоих лекарственных средств с дня 0 - после иммунизации. Kruskal-Wallis (непараметрический ANOVA) с Dunn's правками многократного теста применяли в A и критерий Стьюдента В. Горизонтальные полосы представляют собой  $P < 0,05$ , где  $\lambda$  сравнивает комбинированное лечение относительно наполнителя;  $\psi$  - комбинированное лечение относительно диметилфумарата и  $\Phi$  - комбинированное лечение относительно пиоглитазона.

Фиг. 2. Комбинированное лечение с диметилфумаратом + пиоглитазоном вызывает замедление начала заболевания по сравнению с каждым индивидуальным лекарственным средством в качестве самостоятельных лечений или лечением с наполнителем. При анализе Каплана-Мейера распространения заболевания кривые (A) и средний день начала заболевания (B) MOG35-55 мышей, леченых с помощью наполнителя, диметилфумарата, пиоглитазона или комбинации обоих лекарственных средств с дня 0 - после иммунизации. Начало заболевания определяли как день, когда каждая мышь впервые проявляла клиническую оценку  $\geq 1$ . Тест Gehan-Breslow-Wilcoxon применяли в A и Kruskal-Wallis с последующими Dunn's правками многократного теста в B. Горизонтальные полосы представляют собой  $P < 0,05$  где  $\lambda$  сравнивает комбинированное лечение относительно наполнителя;  $\psi$  комбинированное лечение относительно диметилфумарата и  $\Phi$  комбинированное лечение относительно пиоглитазона.

Фиг. 3. Изменения макроскопической картины желудка мышей, которых хронически лечили с помощью диметилфумарата, но не с помощью пиоглитазона или наполнителя. 40 мышей C57BL/6 иммунизировали с помощью MOG35-55 и лечили с помощью перорального зонда в течение 22 дней с применением комбинации НРМС0,5%/Tween 20 0,25% два раза в сутки плюс Клептоза 20% один раз в сутки (A, фиг. 3A), диметилфумарат 60 мг/кг два раза в сутки плюс Клептоза 20% один раз в сутки (B), пиоглитазон 10 мг/кг один раз в сутки плюс НРМС 0,5%/Tween 20 0,25% два раза в сутки (C, фиг. 3C) или диметилфумарат 60 мг/кг два раза в сутки плюс пиоглитазон 10 мг/кг один раз в сутки (D, фиг. 3D). Дополнительную группу из пяти мышей ложно иммунизировали (эмульсия без MOG35-55) и лечили с помощью НРМС0,5%/Tween 20 0,25% два раза в сутки плюс Клептоза 20% один раз в сутки (E, фиг. 3E). В течение всего эксперимента три мыши либо умерщвляли вследствие гуманных конечных точек или погибали от заболевания. 42 оставшихся животных подвергали эвтаназии с помощью летальной анестезии фенобарбиталом, правое предсердие сердца рассекали и мышей перфузировали с помощью 4% параформальдегида через левый желудочек. Желудок каждого животного разрезали путем рассечения проксимального сегмента пищевода и двенадцатиперстной кишки, после этого вскрывали путем продольного разреза через наиболее длинную возможную ось, связывающую оставшийся промежуток двенадцатиперстной кишки и дно. Каждый кусок промывали с помощью забуференного фосфатом солевого раствора и монтировали открытым. Представленные изображения получены от одной типичной мыши из каждой группы. Отмечали нормальную картину желудка во всех группах мышей, которые не получали диметилфумарата (A, C, E, фиг. 3A, 3C, 3E соответственно) и по внешнему виду патологическое повышение макровязкости желудка групп B и D, которых лечили с помощью диметилфумарата в качестве индивидуального средства или комбинированного лечения с пиоглитазоном соответственно, придавая им утолщение и ригидную картину (фиг. 3B, 3D соответственно).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения аутоиммунного и/или воспалительного нарушения, выбранного из рассеянного склероза или клинически изолированного синдрома (CIS), включающий одновременное, раздельное или последовательное введение PPAR гамма агониста, выбранного из группы глитазонов и их солей с Nrf2 активатором, выбранным из группы сложных эфиров фумаровой кислоты и их солей.

2. Способ по п.1, где PPAR гамма агонист выбран из пиоглитазона и росиглитазона.

3. Способ по п.2, где PPAR гамма агонист выбирают из гидрохлорида пиоглитазона и малеата росиглитазона.

4. Способ по пп.1-3, где пиоглитазон вводят в суточной дозе приблизительно 15 мг, приблизительно 30 мг или приблизительно 45 мг.

5. Способ по пп.1-3, где росиглитазон вводится в суточной дозе приблизительно 2 мг,

приблизительно 4 мг или приблизительно 8 мг.

6. Способ по пп.1-5, где Nrf2 активатор выбран из группы диэтилфумарата, моноэтилфумарата, диметилфумарата, монометилфумарата и их солей и сложных эфиров.

7. Способ по пп.1-6, где Nrf2 активатор представляет собой диметилфумарат, который вводится в суточной дозе приблизительно 120 мг, приблизительно 240 мг, приблизительно 360 мг, приблизительно 480 мг, приблизительно 600 мг или приблизительно 720 мг.

8. Способ по пп.1-6, где Nrf2 активатор представляет собой диметилфумарат, который вводится в суточной дозе 1-20 мг на 1 кг веса тела, 1-15 мг на 1 кг веса тела или 2-12 мг на 1 кг веса тела.

9. Способ по пп.1-6, где Nrf2 активатор представляет собой диметилфумарат, который вводится в суточной дозе приблизительно 3,4 мг на 1 кг веса тела, приблизительно 7 мг на 1 кг веса тела или приблизительно 10 мг на 1 кг веса тела.

10. Способ по пп.1-9, где Nrf2 активатор представляет собой диметилфумарат, который вводится один раз или дважды день.

11. Фармацевтическая композиция, разработанная для применения в способе по п.1, которая содержит PPAR гамма агонист, выбранный из группы глитазонов и их солей, и Nrf2 активатор, выбранный из группы сложных эфиров фумаровой кислоты и их солей.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, где PPAR гамма агонист выбирают из пиоглитазона и росиглитазона.

13. Фармацевтическая композиция по п.11 или 12, где PPAR гамма агонист выбирают из гидрохлорида пиоглитазона и малеата росиглитазона.

14. Фармацевтическая композиция по п.12 или 13, которая содержит приблизительно 5 мг, приблизительно 7,5 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 22,5 мг или приблизительно 25 мг пиоглитазона.

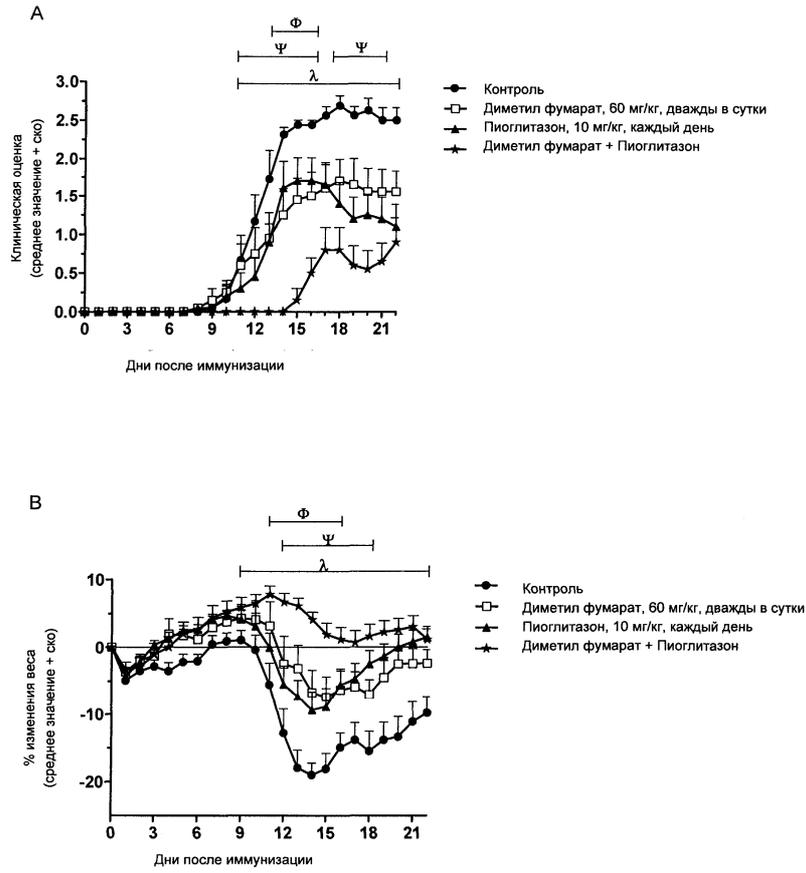
15. Фармацевтическая композиция по п.12 или 13, которая содержит приблизительно 0,7 мг, приблизительно 1 мг, приблизительно 1,3 мг, приблизительно 2 мг, приблизительно 2,7 мг, приблизительно 3 мг, приблизительно 3,5 мг, приблизительно 4 мг или приблизительно 5 мг росиглитазона.

16. Фармацевтическая композиция по пп.11-15, где Nrf2 активатор выбирают из группы диэтилфумарата, моноэтилфумарата, диметилфумарата, монометилфумарата и их солей и сложных эфиров.

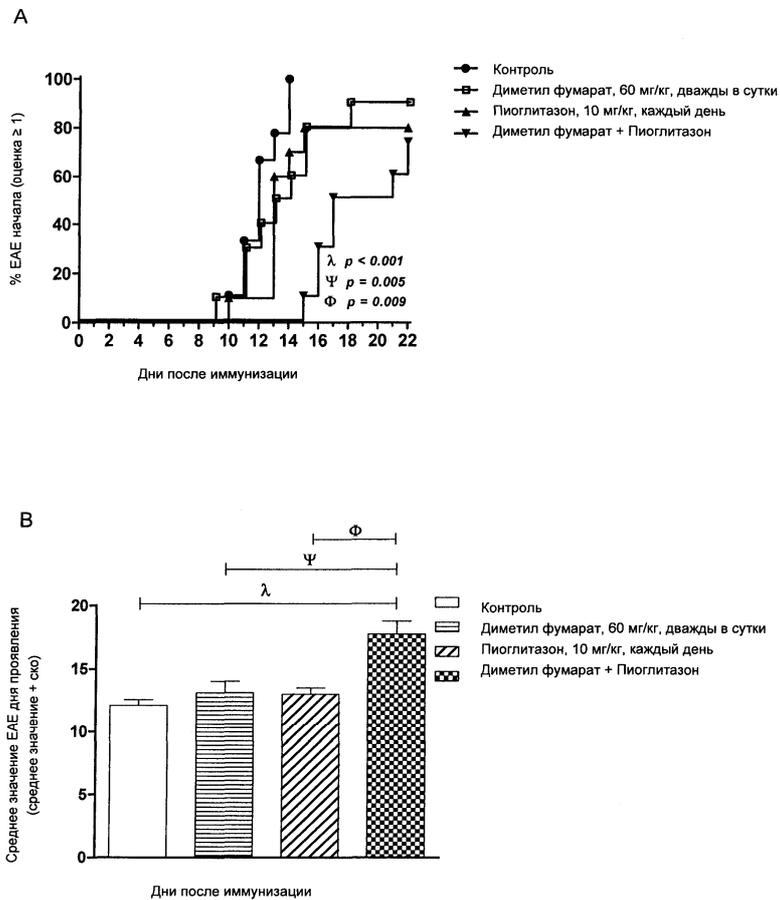
17. Фармацевтическая композиция по пп.11-16, содержащая приблизительно 120 мг, приблизительно 200 мг или приблизительно 240 мг диметилфумарата.

18. Твердая пероральная лекарственная форма, которая содержит фармацевтическую композицию согласно пп.11-17.

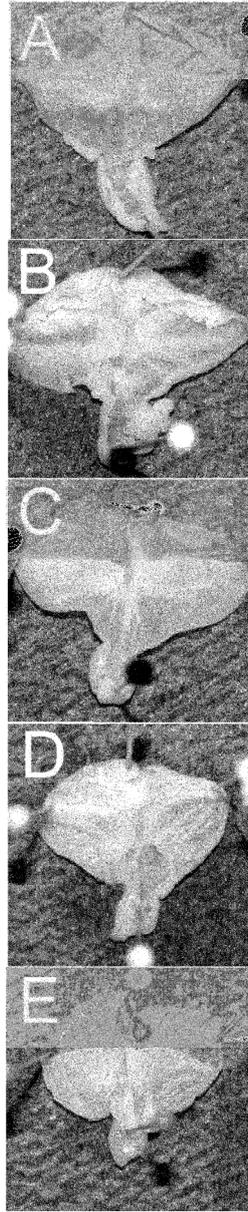
19. Набор, разработанный для применения в способе по пп.1-10, который содержит а) PPAR гамма агонист, выбранный из группы глитазонов и их солей; и б) Nrf2 активатор, выбранный из группы эфиров фумаровой кислоты и ее солей.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3