



NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/137 (2006.01)
A61K 31/138 (2006.01)
A61K 31/185 (2006.01)
A61K 31/195 (2006.01)
A61K 31/197 (2006.01)
A61K 31/42 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)
A61K 31/64 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.04.22
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.01.15
(86)	Europeisk søknadsnr	12708113.1
(86)	Europeisk innleveringsdag	2012.03.01
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2013.02.27
(30)	Prioritet	2011.03.01, EP, 11305217 2011.06.06, EP, 11305687 2011.03.29, US, 201161468658 P 2011.06.06, US, 201161493606 P
(84)	Utpekte stater	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR
(73)	Innehaver	Pharnext, 11 Rue des Peupliers, 92130 Issy-les-Moulineaux, FR-Frankrike
(72)	Oppfinner	COHEN, Daniel, 61 avenue des Courlis, F-78110 Le Vésinet, FR-Frankrike CHUMAKOV, Ilya, 691 rue de la Noue, F-77000 Vaux Le Penil, FR-Frankrike NABIROCHKIN, Serguei, 49 avenue de Sully Prud'homme, F-92290 Chatenay Malabry, FR-Frankrike VIAL, Emmanuel, 78 boulevard Diderot, F-75012 Paris, FR-Frankrike GUEDJ, Mickaël, 42 rue Godefroy Cavaignac, F-75011 Paris, FR-Frankrike
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54) **Benevnelse** **Baklofen- og akamprosat-basert terapi av neurologiske lidelser**

(56) **Anførte publikasjoner**
US-A1- 2004 102 525
US-A1- 2009 197 958
US-B1- 6 391 922
WO-A1-2009/133128
C. COSTA: "Coactivation of GABAA and GABAB Receptor Results in Neuroprotection During In Vitro Ischemia", STROKE, vol. 35, no. 2, 1 February 2004 (2004-02-01), pages 596-600, XP55031403, ISSN: 0039-2499, DOI: 10.1161/01.STR.0000113691.32026.06
CUI ZHOU ET AL: "Neuroprotection of [gamma]-aminobutyric acid receptor agonists via enhancing neuronal nitric oxide synthase (Ser847) phosphorylation through increased neuronal nitric oxide synthase and PSD95 interaction and inhibited protein phosphatase activity in

cerebral ischemia", JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH, vol. 86, no. 13, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 2973-2983, XP55031404, ISSN: 0360-4012, DOI: 10.1002/jnr.21728

HAMA A T ET AL: "Synergistic interaction between intrathecal gamma-aminobutyrate (GABA) receptor agonists and an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist in rats with neuropathic spinal cord injury pain", SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACT VIEWER AND ITINERARY PLANNER, vol. 40, 2010, XP9161509, & 40TH ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY-FOR-NEUROSCIENCE; SAN DIEGO, CA, USA; NOVEMBER 13 -17, 2010

K. ENGELHARD ET AL: "Der neuroprotektive Einfluss des Glutamat-Antagonisten Acamprosat nach experimenteller zerebraler Ischämie", DER ANAESTHESIST, vol. 49, no. 9, 22 September 2000 (2000-09-22), pages 816-821, XP55031406, ISSN: 0003-2417, DOI: 10.1007/s001010070054

LYDEN PATRICK D ET AL: "Combination therapy protects ischemic brain in rats: A glutamate antagonist plus a gamma-aminobutyric acid agonist", STROKE, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, US, vol. 25, no. 1, 1 January 1994 (1994-01-01), pages 189-195, XP009160662, ISSN: 0039-2499

P. R. LOUZADA: "Taurine prevents the neurotoxicity of β -amyloid and glutamate receptor agonists: activation of GABA receptors and possible implications for Alzheimer's disease and other neurological disorders", THE FASEB JOURNAL, vol. 18, no. 3, 1 March 2004 (2004-03-01), pages 511-518, XP55033876, ISSN: 0892-6638, DOI: 10.1096/fj.03-0739com

Oppfinnelsens område

Den foreliggende oppfinnelse vedrører kombinasjoner for behandling av nevrologiske sykdommer og lidelser. Mer spesifikt vedrører den foreliggende oppfinnelse ny kombinasjonsterapi for nevrologiske lidelser, basert på baklofen- og akamprosat-kombinasjon.

Teknikkens stand

Alzheimers sykdom (AD) er den prototypiske kortikale demens som er kjennetegnet ved svekket hukommelse sammen med dysfasi (språkforstyrrelser hvor det er en forringelse av tale og av taleforståelse), dyspraksi (manglende evne til å koordinere og utføre bestemte målbevisste bevegelser og fakter i fravær av motoriske eller sensoriske svekkelser) og agnosi (evnen til å gjenkjenne objekter, personer, lyder, former eller lukter) som kan tilskrives involvering av de kortikale assosiasjonsområder. Spesielle symptomer slik som spastisk paraparese (svakhet som rammer de nedre ekstremiteter) kan også være involvert (1-4).

Forekomst av Alzheimers sykdom øker dramatisk med alderen. AD er nå den mest vanlige årsaken til demens. Den er klinisk kjennetegnet ved en global reduksjon av kognitiv funksjon som utvikler seg sakte, og etterlater pasientene til slutt bundet til sengen, med inkontinens og avhengig av pleie. Død skjer gjennomsnittlig 9 år etter diagnose (5).

Forekomstgraden av AD øker dramatisk med alder. FN sin befolkningsplan estimerer at antall mennesker som er eldre enn 80 år vil nærme seg 370 millioner i år 2050. For tiden er det estimert at 50 % av mennesker som er eldre enn 85 år er rammet av AD. Mer enn 100 millioner mennesker verden over vil derfor lide av demens om 50 år. Dette store antall mennesker som krever konstant pleie og andre tjenester vil i alvorlig grad påvirke medisinske ressurser, pengeressurser og menneskelige ressurser (6).

Svekket hukommelse er det tidlige trekket ved sykdommen, og involverer episodisk hukommelse (hukommelse for dag-til-dag hendelser). Semantisk hukommelse (hukommelse for verbal og visuell mening) er involvert senere i sykdommen. I motsetning, er arbeidshukommelse (korttidshukommelse som involverer strukturer og prosesser, anvendt for temporær lagring og manipulasjon av informasjon), og prosedyrehukommelse (ubevisst hukommelse som er langtidshukommelse i forbindelse med evner) bevart inntil sent. Når sykdommen utvikler seg, vil de

ytterligere trekk som språksvekkelse, visuelle perseptuelle og romlige mangler, agnosier og apraksier vise seg.

5 Det klassiske bildet av Alzheimers sykdom er tilstrekkelig karakteristisk til å tillate identifikasjon av omtrent 80 % av tilfellene (7). Likevel vil klinisk heterogenitet forekomme, og dette er ikke bare viktig for klinisk håndtering, men tilveiebringer ytterligere implikasjon av spesifikke medisinske behandlinger for funksjonelt forskjellige former (8).

10 Det patologiske kjennetegn på AD inkluderer amyloide plakker som inneholder beta-amyloid (A β), neurofibrillære floker (NFT) inneholdende Tau og nevronal og synaptisk dysfunksjon og tap (9-11). Det siste tiåret er to hovedtyper hypoteser for årsaken til AD blitt foreslått: "the amyloid cascade hypotese", som angir at den neurodegenerative prosessen er en rekke hendelser som utløses ved unormal
15 prosessering av "Amyloid Precursor Protein" (APP) (12), og "the neuronal cytoskeletal degeneration hypothesis" (13), som foreslår at den mest vanlig aksepterte teorien som forklarer AD-progresjon forblir den amyloide kaskadehypotesen (14-16), og AD-forskere har hovedsakelig fokusert på å bestemme mekanismene som ligger til grunn for toksisiteten forbundet med A β -proteiner. Mikrovaskulær permeabilitet og
20 remodellering, avvikende angiogenese og blod-hjerne barriere-nedbrytning er blitt identifisert som nøkkelhendelser som bidrar til APP-toksisiteten i den amyloide kaskaden (17). I motsetning har Tau-protein fått mye mindre oppmerksomhet fra den farmasøytiske industrien enn amyloid, på grunn av både fundamentelle og praktiske bekymringer. Dessuten er synaptisk densitetsforandring den patologiske lesjon som
25 best korrelerer med kognitiv svekkelse sammenliknet med de to andre. Studier har vist at amyloid patologi synes å utvikle seg på en neurotransmitterspesifikk måte, hvor de cholinergiske terminaler synes å være mest sårbare, etterfulgt av de glutamatergiske terminaler og til slutt av GABA-ergiske terminaler (11). Glutamat er den mest rikelige eksitatoriske neurotransmitter i pattedyrnervesystemet. Under
30 patologiske forhold, fører dets unormale akkumulering i synaptisk spalte til overaktiveringen av glutamatreseptorer (18). Unormal akkumulering av glutamat i synaptisk spalte fører til overaktivering av glutamatreseptorer som resulterer i patologiske prosesser, og til slutt i nevronal celledød. Denne prosess, betegnet eksitotoksitet, observeres vanligvis i nevronalt vev under akutte og kroniske
35 nevrologiske lidelser.

Det blir klart at eksitotoksisitet er involvert i patogenesen av en rekke lidelser av forskjellig etiologi, slik som: ryggmargsskade, slag, traumatisk hjerneskade, hørselstap, alkoholisme og alkoholabstinens, alkoholisk nevropati, eller nevropatisk smerte, så vel som nevrodegenerative sykdommer, slik som multippel sklerose, Alzheimers sykdom, amyotrofisk lateralsklerose, Parkinsons sykdom og Huntingtons sykdom (19-21). Utviklingen av effektiv behandling for disse sykdommer forblir viktige temaer for det offentlige helsevesen på grunn av deres hyppighet, så vel som mangel på helbredende behandlinger.

To typer av medisinerer anvendes for å forbedre eller moderere symptomer på AD som skyldes enkelte acetylcholinesterase-modulatorer og blokkere av NMDA-glutamatreseptorer (26-27).

NMDAR-antagonister som målsøker forskjellige seter for denne reseptor har blitt testet for å motvirke eksitotoksisitet. Ikke-konkurrerende NMDAR-antagonister målsøker ionekanalporen, og reduserer således kalsiuminntreden inn i postsynaptiske nevroner. Noen av dem når godkjenningsstatus. Som et eksempel er memantin nylig godkjent ved moderat til alvorlig Alzheimers sykdom. Den er klinisk testet for andre indikasjoner som inkluderer en eksitotoksisitetskomponent slik som alkoholavhengighet (fase II), amyotrofisk lateralsklerose (fase III), demens assosiert med Parkinson (fase II), epilepsi, Huntingtons sykdom (fase IV), multippel sklerose (fase IV), Parkinsons sykdom (fase IV), og traumatisk hjerneskade (fase IV). Dette molekyl har imidlertid begrenset fordel for de fleste pasienter med Alzheimers sykdom, fordi det kun har beskjedne symptomatiske effekter. En annen tilnærming for å begrense eksitotoksisitet består i inhibere presynaptisk frigivelse av glutamat. Riluzol, som nylig er godkjent for amyotrofisk lateralsklerose, viste lovende resultater i modeller med ischemi og traumatisk hjerneskade (22-25). Den er nå testet i fase II forsøk for tidlig multippel sklerose, Parkinsons sykdom (viser ikke noe bedre resultater enn placebo), så vel som ryggmargsskade. I 1995 oppnådde legemidlet legemiddelstatus for behandling av amyotrofisk lateralsklerose, og i 1996 for behandling av Huntingtons sykdom. Bruk av NMDA-reseptorantagonister slik som memantin, felbammat, akamprosat og MRZ 2/579 for å behandle depresjon er også blitt foreslått i US 2010076075.

WO 2009133128, WO 2009133141, WO 2009133142 og WO 2011054759 omhandler legemiddelkombinasjoner for anvendelse i behandling av AD. Til tross for aktiv forskning innen dette området, er der fremdeles et behov for alternative eller

forbedrede effektive terapier for neurologiske lidelser, og særlig neurologiske lidelser som er relatert til glutamat og/eller amyloid beta-toksisitet. Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer nye behandlinger for slike neurologiske sykdommer i sentralnervesystemet (CNS), og i det perifere nervesystemet (PNS).

5

Oppsummering av oppfinnelsen

Det er et formål for den foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe nye preparater for behandling av neurologiske lidelser. Mer spesielt angår oppfinnelsen preparater for å behandle neurologiske lidelser som er relatert til glutamat og/eller amyloid beta-toksisitet, basert på en kombinasjon av baklofen og akamprosat.

10

Oppfinnelsen stammer blant annet fra oppfinnernes uventede funn at kombinasjonen av baklofen og akamprosat tilveiebringer vesentlig og uventet fordel for pasienter med Alzheimers sykdom. Dessuten har oppfinnerne overraskende funnet at denne kombinasjon tilveiebringer vesentlig og uventet beskyttelse til nevronale celler mot forskjellige skader som man treffer på ved neurologiske sykdommer som inkluderer glutamat-toksisitet. Således utgjør denne kombinasjon av baklofen og akamprosat en effektiv behandling for pasienter som lider av, eller som er disponert for, eller som mistenkes for å lide av, neurologiske lidelser.

15

20

Formålet med denne oppfinnelse angår et preparat som definert i kravene. Mer spesifikt angår denne oppfinnelse preparater som omfatter en kombinasjon av baklofen og akamprosat, eller farmasøytisk aksepterbare salter derav, for anvendelse i behandling av Alzheimers sykdom, eller en relatert lidelse, valgt fra senil demens av AD-type (SDAT), Lewy legeme demens, mild kognitiv svekkelse (MCI) og aldersassosiert hukommelsessvekkelse (AAMI).

25

Preparatet ifølge oppfinnelsen kan inneholde baklofen og akamprosat som de eneste aktive bestanddeler. Alternativt kan preparatene omfatte en eller flere ytterligere aktive bestanddeler. I denne forbindelse angår et ytterligere formål med denne oppfinnelse et preparat som omfatter en kombinasjon av baklofen, akamprosat og minst én tredje forbindelse valgt fra sulfisoksazol, metimazol, prilokain, dyfyllin, quinakrin, karbenoksolon, aminokapronsyre, kabergolin, dietylkarbamazin, cinacalcet, cinnarizin, eplerenon, fenoldopam, leflunomid, levosimendan, sulodeksid, terbinafin, zonisamid, etomidat, fenformin, trimetazidin, meksiletin, ifenprodil, moksifloksasin, bromokriptin eller torasemid, for anvendelse i behandling av AD eller en relatert lidelse, i et individ med behov derfor.

30

35

Som det vil bli ytterligere omtalt i den foreliggende søknad, kan forbindelsene i en kombinasjonsterapi ifølge oppfinnelsen administreres samtidig, separat, og påfølgende og/eller gjentatte ganger til individet.

5

I en særlig utførelsesform angår oppfinnelsen et preparat som omfatter baklofen, akamprosat og donepezil, eller farmasøytisk aksepterbare salter derav.

10

Preparatene ifølge oppfinnelsen omfatter videre typisk én eller flere farmasøytisk aksepterbare eksipienser eller bærere. Forbindelsene som er anvendt i den foreliggende oppfinnelse kan også være i form av et salt, hydrat, syre, racemat eller isomer. De kan også være i form av formuleringer med forsinket frigivelse. Prodruger eller derivater av forbindelsene kan likeledes anvendes.

15

I en foretrukket utførelsesform anvendes forbindelsen som sådan eller i form av et salt, hydrat eller en form med forlenget frigivelse derav. Et særlig foretrukket salt for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse er kalsium-akamprosat.

20

Denne oppfinnelse omhandler også en fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat, hvor fremgangsmåten omfatter å blande baklofen og akamprosat i en farmasøytisk aksepterbar eksipiens eller bærer.

25

Oppfinnelsen angår også et preparat for anvendelse i en metode for å behandle nevrologiske lidelser i et pattedyrindivid med behov derfor, foretrukket et menneske med behov derfor, hvor metoden omfatter administrering til nevnte individ av en effektiv mengde av en kombinasjon ifølge oppfinnelsen.

30

Oppfinnelsen angår også et preparat for anvendelse i en metode for å behandle Alzheimer eller en relatert lidelse i et pattedyrindivid med behov derfor, foretrukket et menneske med behov derfor, hvor metoden omfatter administrering til nevnte individ av en effektiv mengde av en kombinasjon ifølge oppfinnelsen.

35

Oppfinnelsen angår også et preparat for anvendelse i en metode for å behandle en nevrologisk lidelse i et pattedyrindivid med behov derfor, foretrukket et menneske med behov derfor, hvor metoden omfatter samtidig, separat eller påfølgende administrering til nevnte individ av en effektiv mengde av baklofen og akamprosat.

Oppfinnelsen angår også et preparat for anvendelse i en metode for å behandle Alzheimer eller en relatert lidelse i et pattedyrindivid med behov derfor, foretrukket et menneske med behov derfor, hvor metoden omfatter samtidig, separat eller påfølgende administrering til nevnte individ av en effektiv mengde av baklofen og akamprosat.

Oppfinnelsen kan anvendes for å behandle AD eller en relatert lidelse i et pattedyrindivid, foretrukket i et hvilket som helst menneske, ved et hvilket som helst sykdomsstadium. Som det vil bli omtalt i eksemplene, er preparatene ifølge oppfinnelsen i stand til å forbedre den patologiske tilstanden til nevnte individer.

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1: Validering av den eksperimentelle modellen for humant β amyloid sin toksisitet på endotelceller anvendt for legemiddelscreening. En time med VEGF pre-behandling ved 10 nM beskyttet signifikant kapillærnettverket mot denne amyloidskade (+70 % av kapillærnettverk sammenliknet med amyloid intoksikasjon).

Figur 2: Effekt av baklofen (BCL) og akamprosat (ACP) kombinasjonsterapi på total lengden av kapillærnettverk i beta-amyloid intoksikerte HBMEC-kulturer. Det humane amyloidpeptidet ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μ M) produserer en signifikant intoksikasjon, over 40 %, sammenliknet med vehikkelbehandlede celler. Denne intoksikasjon forhindrer signifikant kombinasjoner av akamprosat og baklofen (A) mens, ved disse konsentrasjoner, har akamprosat (B) og baklofen (C) alene ingen signifikant effekt på intoksikasjon. \diamond : $p < 0,05$, signifikant forskjell fra $A\beta_{1-42}$ -intoksikasjon; *: $p < 0,05$, signifikant forskjell fra vehikkel; "ns" ingen signifikant effekt (ANOVA + Dunnett Post-Hoc test).

Figur 3: Effekt av baklofen (BCL) og terbinafin (TBN) kombinasjonsterapi på total lengden av kapillærnettverk i beta-amyloid intoksikerte HBMEC-kulturer. Det humane amyloidpeptidet ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μ M) produserer en signifikant intoksikasjon, over 40 %, sammenliknet med vehikkelbehandlede celler. Denne intoksikasjonen forhindres ved kombinasjonen av terbinafin og baklofen. *: $p < 0,05$: signifikant forskjell fra kontroll (ingen intoksikasjon).

Figur 4: Validering av den eksperimentelle modellen for humant β -amyloid sin toksisitet på nevronale celler anvendt for legemiddelscreening. En time med østradiol (150 nM) eller BDNF (50 ng/mL) forbehandling beskyttet signifikant nevronene fra

denne amyloide skade (-94 %), som betraktes som en positiv kontroll for nevrobeskyttelse. *: $p < 0,05$: signifikant forskjell fra kontroll (ingen intoksikasjon); \diamond : $p < 0,05$, signifikant forskjell fra $A\beta_{1-42}$ -intoksikasjon.

5 Figur 5: Effekt av akamprosot (ACP) og baklofen (BCL) kombinasjonsterapi på LDH-frigivelse ved human $A\beta_{1-42}$ -toksisitet på rotte primære kortikale celler. Det humane amyloidpeptidet ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) produserer en signifikant intoksikasjon sammen med
 10 vehikkelbehandlede nevroner. Denne intoksikasjon forhindres signifikant ved kombinasjon av akamprosot og baklofen (A) mens, ved disse konsentrasjoner, har akamprosot (B) og baklofen (C) alene ingen signifikant effekt på intoksikasjon. \diamond :
 $p < 0,05$, signifikant forskjell fra $A\beta_{1-42}$ -intoksikasjon; *: $p < 0,05$, signifikant forskjell fra
 15 vehikkel; "ns" ingen signifikant effekt. (ANOVA + Dunnett Post-Hoc test).

Figur 6: Effekt av cinacalcet (CNC) og sulfisoksazol (SFX) kombinasjonsterapi på LDH-
 15 frigivelse ved human $A\beta_{1-42}$ -toksisitet på rotte primære kortikale celler. Det humane amyloidpeptidet ($A\beta_{1-42}$ 10 μ M) produserer en signifikant intoksikasjon sammenliknet med vehikkelbehandlede nevroner. Denne intoksikasjon forhindres ved kombinasjon av cinacalcet og sulfisoksazol. *: $p < 0,05$, signifikant forskjell fra vehikkel.

20 Figur 7: Effekt av akamprosot (ACP) og baklofen (BCL) kombinasjonsterapi på total lengde av nevrnettverk i beta-amyloide intoksikerte kortikale nevroner. Det humane amyloidpeptid ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μ M) produserer en signifikant intoksikasjon, over 15 %, sammenliknet med vehikkelbehandlede celler. Denne intoksikasjon forhindres signifikant ved kombinasjonen av akamprosot og baklofen mens, ved de fleste
 25 konsentrasjoner, har akamprosot og baklofen alene ingen signifikant effekt på intoksikasjonen. \diamond : $p < 0,05$ signifikant forskjell fra $A\beta_{1-42}$ -intoksikasjon; *: $p < 0,05$, signifikant forskjell fra vehikkel (ANOVA + Dunnett Post-Hoc test).

Figur 8: Effekt av akamprosot og baklofen kombinasjonsterapi på opptreden som
 30 definert ved Y-maze-test. Amyloidpeptidet produserer en signifikant nedgang i kognisjon som målt ved prosentandel altermning (53,8 % versus 73,5 %). Denne ødeleggende effekten forhindres signifikant (48,2 % beskyttelse) ved kombinasjonen av akamprosot (0,2 mg/kg/dag) og baklofen (3 mg/kg/dag). \diamond : $p < 0,05$, signifikant forskjellig fra $A\beta_{25-35}$ -intoksikasjon; *: $p < 0,05$, signifikant forskjellig fra vehikkel
 35 (ANOVA + Dunnett Post-Hoc test).

Figur 9: Effekt av akamprosat og baklofen kombinasjonsterapi på hukommelse som definert ved passiv unngåelse (fluktlatens). Amyloidpeptidet produserer en signifikant reduksjon i hukommelsesytteevner som målt ved fluktlatens sammenliknet med kontroll. Denne ødeleggende effekt forhindres signifikant (fullstendig beskyttelse) ved kombinasjon av akamprosat (0,2 mg/kg) og baklofen (3 mg/kg). \diamond : $p < 0,05$, signifikant forskjellig fra $A\beta_{25-35}$ -intoksikasjon; *: $p < 0,05$, signifikant forskjellig fra vehikkel (ANOVA + Dunnett Post-Hoc test).

Figur 10: Effekt av akomprosat og baklofen kombinasjonsterapi på hukommelse som definert ved passiv unngåelse ("step-through" latens). Amyloidpeptidet produserer en signifikant reduksjon i hukommelsesytteevnen som målt ved "step-through" latens, over 44 %, sammenliknet med kontroll. Denne ødeleggende effekt forhindres signifikant (78,8 % av beskyttelseeffekt) ved kombinasjonen av akamprosat (0,2 mg/kg) og baklofen (3 mg/kg) mens, ved disse konsentrasjoner, har akamprosat og baklofen alene en lavere effekt på intoksikasjon. \diamond : $p < 0,05$, signifikant forskjellig fra $A\beta_{25-35}$ -intoksikasjon; *: $p < 0,05$, signifikant forskjellig fra vehikkel (ANOVA + Dunnett Post-Hoc test).

Figur 11: Effekt av akamprosat og baklofen kombinasjonsterapi på nevrandensitet i hippokampus. Amyloidpeptidet produserer en signifikant reduksjon av nevronal densitet som målt ved antall nevrone pr. millimeter i hippokampus, over 21 %, sammenliknet med kontroll. Denne nevronale skade forhindres signifikant (63,2 % av skadede nevrone beskyttes) ved kombinasjon av akamprosat (0,2 mg/kg) og baklofen (3 mg/kg). \diamond : $p < 0,05$, signifikant forskjellig fra $A\beta_{25-35}$ -intoksikasjon; *: $p < 0,05$, signifikant forskjellig fra vehikkel (ANOVA + Dunnett Post-Hoc test).

Figur 12: Effekt av akamprosat og baklofen kombinasjonsterapi på blod-hjerne barriere integritet. Amyloidpeptidet påvirker blod-hjerne barrieren (BBB), og induserer en signifikant øking av dens permeabilitet, over 51 %, sammenliknet med kontroll. Skadene på blod-hjerne barrieren forhindres signifikant (66 % av integritet restituert) ved kombinasjonen av akamprosat (0,2 mg/kg) og baklofen (3 mg/kg). \diamond : $p < 0,05$, signifikant forskjellig fra $A\beta_{25-35}$ -intoksikasjon; *: $p < 0,05$, signifikant forskjellig fra vehikkel (ANOVA + Dunnett Post Hoc test).

Figur 13: Effekt av akamprosat og baklofen kombinasjonsterapi på den synaptiske densiteten som reflektert ved synaptofysinkonsentrasjon. Amyloidpeptidet påvirker synapsefunksjonen, og induserer en signifikant reduksjon av synaptofysin-

konsentrasjonen i hjernen, over 34 %, sammenliknet med kontroll. Skadene på den synaptiske densiteten forhindres signifikant (76 %) ved kombinasjonen av akamprosat (0,2 mg/kg/dag) og baklofen (3 mg/kg/dag). \diamond : $p < 0,05$, signifikant forskjellig fra $A\beta_{25-35}$ -intoksikasjon; *: $p < 0,05$, signifikant forskjellig fra vehikkel (ANOVA + Dunnett Post-Hoc test).

Figur 14: Beskyttende effekt av akamprosat og baklofen kombinasjonsterapi på oksidativt stress i hippokampus. Amyloidpeptidet induserer en signifikant økning av oksidativt stress i hippokampus som målt ved lipidperoksidasjon, over 59 %, sammenliknet med kontroll. Dette oksidative stress forhindres signifikant (65,9 %) ved kombinasjon av akamprosat (0,2 mg/kg/dag) og baklofen (3 mg/kg/dag). \diamond : $p < 0,05$, signifikant forskjellig fra $A\beta_{25-35}$ -intoksikasjon; *: $p < 0,05$, signifikant forskjellig fra vehikkel (ANOVA + Dunnett Post-Hoc test).

Figur 15: Effekt av baklofen og akamprosat kombinasjonsterapi mot glutamattoksisitet på nevronale kortikale celler. Glutamatintoksikasjon forhindres signifikant kombinasjonen av baklofen (400 nM) og akamprosat (1,6 nM) mens, ved disse konsentrasjoner, har baklofen og akamprosat alene ingen signifikant effekt på intoksikasjon. \diamond : $p < 0,001$, signifikant forskjellig fra glutamatintoksikasjon (ANOVA + Dunnett Post-Hoc test).

Figur 16: Effekt av donepezil, akamprosat og baklofen kombinasjonsterapi på opptreden og kognitiv yteevne som definert ved Y-maze-test. Amyloidpeptidet produserer en signifikant reduksjon i kognisjon, som målt ved prosentandel alternering (51,5 % versus 71,8 %). Denne ødeleggende effekt forhindres signifikant (98 % beskyttelse) ved kombinasjon av donepezil (0,25 mg/kg/dag), akamprosat (32 μ g/kg/dag) og baklofen (480 μ g/kg/dag), mens ved disse konsentrasjoner har legemidler alene ingen signifikant effekt. \diamond : $p < 0,01$, signifikant forskjellig fra $A\beta_{25-35}$ -intoksikasjon; *: $p < 0,01$, signifikant forskjellig fra vehikkel (ANOVA + Dunnett Post-Hoc test).

Figur 17: Sammenlikning av beskyttende effekt av akamprosat og dets derivat homotaurin forbehandling i humane $A\beta_{1-42}$ -toksisitetsanalyser på rotte primære kortikale celler. $A\beta_{1-42}$ produserer en signifikant intoksikasjon sammenliknet med vehikkelbehandlede nevroner. Intoksikasjonen forhindres like signifikant ved homotaurin og akamprosat (99 %, 8 nM). \diamond : $p < 0,0001$: signifikant forskjellig fra $A\beta_{1-42}$ -intoksikasjon.

Figur 18: Effekt av akamprosat og baklofen kombinasjonsterapi på utviklingen av kronisk progressiv eksperimentell autoimmun encefalomyelitt (EAE) som definert ved klinisk skår. Immunisering inducerer en signifikant reduksjon i fysiske trekk som målt ved klinisk skår. Den ødeleggende effekten forhindres signifikant (p -verdi $< 0,01$) ved kombinasjon av akamprosat (2 mg/kg/dag) og baklofen (30 mg/kg/dag).

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer nye preparater for å behandle neurologiske lidelser. Oppfinnelsen angår nye legemiddelkombinasjoner som tillater en effektiv korreksjon av slike sykdommer, og kan anvendes i et hvilket som helst pattedyrindivid.

Oppfinnelsen angår preparater egnet for å behandle neurologiske lidelser hvor β -amyloid eller glutamat eksitoksisitet er involvert.

Nevrodegenerative lidelser refererer til sykdommer slik som Alzheimers og relaterte lidelser, amyotrofisk lateralsklerose (ALS), multippel sklerose (MS), Parkinsons sykdom (PD), Huntingtons sykdom (HD), som omfatter et progressivt funksjonstap og død av nevroner.

Nevropatier refererer til tilstander hvor nerver i det perifere nervesystemet skades, og dette inkluderer skade på det perifere nervesystem fremkalt ved genetiske faktorer, inflammatorisk sykdom, eller ved kjemisk substans som inkluderer legemidler (vinkristin, oksaliplatin, etylalkohol). Behandlingen av nevropatier inkluderer også behandlingen av nevropatisk smerte.

Oppfinnelsen er særlig egnet for å behandle AD og relaterte lidelser. I forbindelse med denne oppfinnelse, inkluderer betegnelsen "relatert lidelse" senil demens av AD-type (SDAT), Lewy legeme demens, vaskulær demens, mild kognitiv svekkelse (MCI) og aldersassosiert hukommelsessvekkelse (AAMI).

Som anvendt her inkluderer "behandling" terapi, forebygging, profylakse, retardasjon eller reduksjon av symptomer fremkalt ved, eller av, årsaken til de overnevnte sykdommer og lidelser. Betegnelsen behandling inkluderer særlig kontroll av sykdomsprogresjon av assosierte symptomer. Betegnelsen behandling inkluderer særlig en beskyttelse mot toksisitet bevirket ved amyloid-beta, eller en reduksjon eller

retardasjon av nevnte toksisitet, og/eller ii) en beskyttelse mot glutamat-eksitotoksisitet, eller en reduksjon eller retardasjon av nevnte toksisitet, i de behandlede individer. Betegnelsen behandling betyr også en forbedring av kognitivt symptom eller en beskyttelse av nevronale celler.

5

I forbindelse med den foreliggende oppfinnelse, skal betegnelsen på et spesifikt legemiddel eller forbindelse være ment til å inkludere ikke bare det spesifikt betegnede molekyl, men også et hvilket som helst farmasøytisk aksepterbart salt, hydrat, derivat, isomer, racemat, konjugat, prodrug eller derivat derav, av en hvilken

10

Betegnelsen "kombinasjons- eller kombinatorisk behandling/terapi" betegner en behandling hvor minst baklofen og akamprosat koadministreres til et individ til å bevirke en biologisk effekt. I en kombinert terapi ifølge denne oppfinnelse, kan de i

15

det minste to legemidler administreres sammen eller separat, samtidig eller påfølgende. Baklofen og akamprosat kan også i det minste administreres gjennom forskjellige ruter og protokoller. Som et resultat, skjønt de kan være formulert sammen, kan legemidlene i en kombinasjon også være formulert separat.

20

Betegnelsen "prodrug" som anvendt her refererer til et hvilket som helst funksjonelt derivat eller forløper av en forbindelse ifølge oppfinnelsen som, når administrert til et biologisk system, danner nevnte forbindelse som et resultat av f.eks. én eller flere spontane kjemiske reaksjoner, én eller flere enzymkatalyserte kjemiske reaksjoner, og/eller én eller flere metabolske kjemiske reaksjoner. Prodruger er vanligvis inaktive eller mindre aktive enn de resulterende legemidler, og kan f.eks. anvendes for å

25

forbedre de fysiokjemiske egenskapene til legemidlet, for å målrette et legemiddel mot et spesifikt vev, for å forbedre de farmakokinetiske og farmakodynamiske egenskapene til legemidlet og/eller for å redusere uønskede bivirkninger. Noen av de vanlig funksjonelle gruppene som er mottakelig for prodrug design inkluderer, men er

30

ikke begrenset til, karboksylgrupper, hydroksylgrupper, amingrupper, fosfat/fosfonatgrupper og karbonylgrupper. Prodruger som typisk er produsert via modifikasjon av disse grupper inkluderer, men er ikke begrenset til, estere, karbonater, karbamater, amider og fosfater. Spesifikk teknisk veiledning for seleksjon av passende prodruger er generell vanlig kunnskap (29-33). Videre kan fremstillingen

35

av prodruger gjennomføres ved konvensjonelle metoder som er kjent for de fagkyndige på området. Metoder som kan anvendes for å syntetisere andre prodruger er beskrevet i en rekke omtaler om dette temaet (30; 34-40). Arbaklofen placarbil er

f.eks. listet opp i ChemID pluss "Advance database" (website: chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/) og arbaklofen placarbil er et vel kjent prodrug av baklofen (41-42).

5 Betegnelsen "derivat" av en forbindelse inkluderer et hvilket som helst molekyl som er funksjonelt og/eller strukturelt relatert til nevnte forbindelse, slik som en syre, amid, ester, eter, acetyleret variant, hydroksylert variant, eller en alkylert (C1-C6) variant av en slik forbindelse. Betegnelsen derivat inkluderer også strukturelt relatert forbindelse som har tapt én eller flere substituenten som angitt ovenfor. Homotaurin er f.eks. et
10 deacyleret derivat av akamprosot. Foretrukne derivater er en forbindelse av molekyler med en vesentlig grad av likhet med nevnte forbindelse, som bestemt ved kjente metoder. Tilsvarende forbindelser sammen med deres indekser angående likhet med et modermolekyl finner man i en rekke databaser slik som PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>) eller DrugBank
15 (<http://www.drugbank.ca/>). I en mer foretrukket utførelsesform bør derivater ha en Tanimoto similaritetsindeks som er større enn 0,4, foretrukket større enn 0,5, og mer foretrukket større enn 0,6, til og med enda mer foretrukket større enn 0,7 med et moderlegemiddel. Tanimoto similaritetsindeksen er omfattende anvendt for å måle grad av strukturell likhet mellom to molekyler. Tanimoto similaritetsindeksen kan
20 beregnes ved programvare slik som "the Small Molecule Subgraph Detector (43-44), tilgjengelig online (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/SMSD/>). Foretrukne derivater bør være både strukturelt og funksjonelt relatert til en moderforbindelse, dvs. de bør også bibeholde i det minste en del av aktiviteten til moderlegemidlet, mer foretrukket bør de ha en beskyttende effekt mot A β eller glutamattoksisitet.

25 Betegnelsen derivater inkluderer også metabolitter av et legemiddel, f.eks. et molekyl, som resulterer fra én eller flere av (biokjemisk) modifikasjon/modifikasjoner, eller bearbeiding av nevnte legemiddel etter administrering til en organisme, vanligvis gjennom spesialiserte enzymsystemer og som fremviser eller bibeholder en biologisk
30 aktivitet til legemidlet. Metabolitter er blitt omtalt som å være ansvarlig for mye av den terapeutiske virkningen til moderlegemidlet. I en spesifikk utførelsesform betyr en "metabolitt" som anvendt her, et modifisert eller prosessert legemiddel som bibeholder i det minste en del av aktiviteten til moderlegemidlet, foretrukket som har en beskyttende aktivitet mot A β -toksisitet eller glutamattoksisitet.

35 Betegnelsen "salt" refererer til et farmasøytisk akseptert og relativt ikke-toksisk, uorganisk eller organisk syreaddisjonssalt av en forbindelse ifølge oppfinnelsen.

Farmasøytisk saltdannelse består av paring av surt, basisk eller zwitterionisk legemiddelmolekyl med et motion for å danne en saltversjon av legemidlet. En rekke kjemiske arter kan anvendes i nøytraliseringsreaksjonen. Farmasøytisk aksepterbare salter ifølge oppfinnelsen inkluderer således dem som er oppnådd ved å reagere

5 hovedforbindelsen, som funksjonerer som en base, med en uorganisk eller organisk syre for å danne et salt, f.eks. salter av eddiksyre, salpetersyre, vinsyre, saltsyre, fosforsyre, metansulfonsyre, kamfersulfonsyre, oksalsyre, maleinsyre, ravsyre eller sitronsyre. Farmasøytisk aksepterbare salter ifølge oppfinnelsen inkluderer også dem

10 hvor hovedforbindelsen virker som en syre, og reageres med en passende base for å danne f.eks. natrium-, kalium-, kalsium-, magnesium-, ammonium- eller cholinsalter. Skjønt de fleste salter av et gitt aktivt prinsipp er bioekvivalenter, kan noen, blant andre, ha økte solubilitetsegenskaper eller biotilgjengelighetsegenskaper. Saltseleksjon er nå en vanlig standardprosedyre i prosessen med legemiddelutvikling som omtalt av H. Stahl og C.G. Wermuth i deres håndbok (45).

15 Som omtalt ovenfor, angår oppfinnelsen spesielle legemiddelkombinasjoner som har en sterk uventet effekt på en rekke biologiske prosesser involvert i nevrologiske lidelser. Disse legemiddelkombinasjoner representerer derfor nye tilnærminger for behandling av nevrologiske lidelser, slik som Alzheimers sykdom og relaterte lidelser.

20 Mer spesifikt angår oppfinnelsen preparater som omfatter baklofen i kombinasjon med akamprosat, som tilveiebringer en signifikant effekt in vivo på nevrologiske lidelser.

Oppfinnelsen viser faktisk, i den eksperimentelle delen, at kombinasjonsterapier som omfatter baklofen og akamprosat i alt vesentlig kan forbedre tilstanden til pasienter

25 som er rammet av nevrologiske lidelser. Særlig har oppfinnerne uventet oppdaget at baklofen- og akamprosatkombinasjoner har en sterk uventet effekt på lengden av kapillærnettverk eller LDH-frigivelse i beta-amyloid intoksikerte nerveceller, og representerer en ny terapeutisk tilnærming til AD. Eksempler viser også at, i kombinasjonsterapien ifølge oppfinnelsen, kan baklofen være effektiv i en dose på 80

30 nM eller lavere, og akamprosat kan være effektiv i en dose på 1 nM eller lavere. Disse resultater er bemerkelsesverdige og særlig fordelaktige, da eventuelle mulige bivirkninger unngås ved slike lave doser.

Videre beskytter disse kombinasjoner effektivt nevronale celler fra forskjellige plager, slik som glutamattoksisitet, oksidativt stress og forhindrer BBB-permeabilisering eller

35 nevronal celleindusert apoptose som er involvert i en rekke nevrologiske lidelser.

Den foreliggende oppfinnelse foreslår derfor en ny terapi for nevrologiske lidelser, basert på baklofen- og akamprosatpreparater. Mer spesielt angår den foreliggende oppfinnelse derfor en ny terapi av Alzheimers sykdom og relaterte lidelser basert på baklofen- og akamprosatkombinasjoner.

5

I denne forbindelse angår, i en særlig utførelsesform, oppfinnelsen et preparat som omfatter baklofen og akamprosat for anvendelse i behandling av AD eller en relatert lidelse.

10 Oppfinnelsen angår også anvendelsen av baklofen og akamprosat for fremstilling av et medikament for behandling av AD eller AD-relaterte lidelser.

Illustrerende CAS-nummere for baklofen og akamprosat er tilveiebrakt i tabell 1 nedenfor. Tabell 1 angir også, på en ikke-begrensende måte, vanlige salter, racemater, prodruger, metabolitter eller derivater av disse forbindelser.

15

Tabell 1

Legemiddel	CAS-nummer	Klasse eller Tanimoto similaritetsindeks
Akamprosat og relaterte forbindelser		
Akamprosat	77337-76-9; 77337-73-6	NA
Homotaurin	3687-18-1	0,73
Etyldimetylammonio-propansulfonat	/	0,77
Taurin	107-35-7	0,5
Baklofen og relaterte forbindelser		
Baklofen	1134-47-0; 66514-99-6; 69308-37-8; 70206-22-3; 63701-56-4; 63701-55-3	NA
3-(p-klorfenyl)-4-hydroksymørsyre	/	Metabolitt
Arbaklofen placarbil	847353-30-4	Prodrug

20 Spesifikke eksempler på prodruger av baklofen er gitt i Hanafi et al., 2011 (41), særlig baklofenestere og baklofenesterkarbamater, som er av særlig interesse for CNS-målretting. Følgelig er slike legemidler særlig egnet for preparater ifølge denne

oppfinnelse. Baklofen placarbil som nevnt tidligere, er også et velkjent prodrug, og kan således anvendes i stedet for baklofen i preparater ifølge oppfinnelsen. Andre prodruger av baklofen kan man finne i de etterfølgende patentsøknader: WO 2010102071, US 2009197958, WO 2009096985, WO 2009061934, WO 2008086492, 5 US 2009216037, WO 2005066122, US 2011021571, WO 2003077902, WO 2010120370.

Anvendbare prodruger for akamprosat slik som pantoinsyreester neopentylsulfonylestere, neopentylsulfonylesterprodruger eller maskerte 10 karboksylatneopentylsulfonylesterprodruger av akamprosat er særlig angitt i WO 2009033069, WO 2009033061, WO 2009033054, WO 2009052191, WO 2009033079, US 2009/0099253, US 2009/0069419, US 2009/0082464, US 2009/0082440 og US 2009/0076147.

15 Baklofen og akamprosat kan anvendes alene, eller kan være videre kombinert med ytterligere forbindelser. I denne sammenheng kan, i en særlig utførelsesform, preparatene ifølge oppfinnelsen ytterligere omfatte minst én forbindelse valgt fra sulfisoksazol, metimazol, prilokain, dyfyllin, quinakrin, karbenoksolon, aminokapronsyre, kabergolin, dietylkarbamazin, cinacalcet, cinnarizin, eplerenon, 20 fenoldopam, leflunomid, levosimendan, sulodeksid, terbinafin, zonisamid, etomidat, fenformin, trimetazidin, meksiletin, ifenprodil, moksifloksasin, bromkriptin eller torasemid. Illustrerende CAS-nummere for hver av disse forbindelsene er tilveiebrakt i tabell 2 nedenfor.

25 **Tabell 2**

Legemiddelnavn	CAS-nummer
Aminokapronsyre	60-32-2
Bromkriptin	25614-03-3
Kabergolin	81409-90-7
Karbenoksolon	5697-56-3
Cinacalcet	226256-56-0
Cinnarizin	298-57-7
Dietylkarbamazin	90-89-1
Dyfyllin	479-18-5
Eplerenon	107724-20-9
Etomidat	33125-97-2
Fenoldopam	67227-57-0

Ifenprodil	23210-56-2 eller 23210-58-4
Leflunomid	75706-12-6
Levosimendan	141505-33-1
Metimazol	60-56-0
Meksiletin	5370-01-4 eller 31828-71-4
Moksifloksasin	354812-41-2
Fenformin	114-86-3
Prilokain	721-50-6 eller 14289-3-7 eller 14289-32-8
Quinakrin	83-89-6
Sulfisoksazol	127-69-5
Sulodeksid	57821-29-1
Terbinafin	91161-71-6
Torasemid	56211-40-6 eller 72810-59-4
Trimetazidin	5011-34-7 eller 13171-25-0
Zonisamid	68291-97-4

I en særlig utførelsesform angår oppfinnelsen anvendelsen av denne kombinasjon for å behandle AD eller en relatert lidelse i et individ med behov derfor.

5

Som omtalt i eksemplene, har kombinasjonsterapier ved å anvende minst baklofen og akamprosat en sterk uventet virkning på biologiske prosesser som fører til nevronale skader. Videre viste disse kombinasjoner også in vivo en svært effektiv evne til å korrigere symptomer på nevrologiske sykdommer. Disse kombinasjoner representerer derfor nye tilnærminger for å behandle nevrologiske lidelser, slik som Alzheimers sykdom, 10 multippel sklerose, amyotrofisk lateralsklerose, Parkinsons sykdom, Huntingtons sykdom, nevropatier (f.eks. nevropatisk smerte eller alkoholneuropati), alkoholisme eller alkoholabstinens, og ryggmargsskade. Disse preparater forhindrer effektivt toksisitet av amyloid β (A β) peptid eller glutamateksitotoksitet på nevronale 15 celler. Dessuten fører disse preparater in vivo til en forbedring av en rekke kognitive symptomer, så vel som en beskyttelse av nevronale celler. De representerer således nye og potente metoder for å behandle slike lidelser.

Den eksperimentelle delen viser ytterligere at de ovennevnte preparater også er 20 effektive i) ved synergistisk beskyttelse in vitro av nevronale celler fra glutamateksitotoksitet, og ii) til å gi klinisk fordel i in vivo modeller for sykdommer relatert til glutamateksitotoksitet.

Preparatene ifølge oppfinnelsen kan omfatte 2, 3, 4 eller 5 distinkte legemidler, mer foretrukket 2, 3 eller 4 distinkte legemidler for kombinasjonsbehandling av Alzheimers sykdom (AD), eller AD relaterte lidelser. I en foretrukket utførelsesform er legemidlene ifølge oppfinnelsen anvendt i én eller flere kombinasjoner for kombinert, separat eller sekvensiell administrering, for å tilveiebringe den mest effektive effekt.

Oppfinnelsen angår preparater som anvendes i behandling av nevrologiske lidelser slik som Alzheimers sykdom (AD) eller AD-relaterte lidelser som omfatter én av de etterfølgende legemiddelkombinasjoner, for kombinert, separat eller påfølgende administrering:

- baklofen og akamprosatsat,
- baklofen og akamprosatsat og dietylkarbamazin,
- baklofen og akamprosatsat og cinacalcet,
- baklofen og akamprosatsat og sulfisoksazol,
- baklofen og akamprosatsat og torasemid,
- baklofen og akamprosatsat og ifenprodil,
- baklofen og akamprosatsat og meksiletin,
- baklofen og akamprosatsat og eplerenon,
- baklofen og akamprosatsat og levosimendan,
- baklofen og akamprosatsat og terbinafin, eller
- baklofen og akamprosatsat og leflunomid.

Som omtalt i den eksperimentelle delen, tilveiebringer kombinasjonsterapier ifølge oppfinnelsen vesentlig terapeutisk og biologisk effekt for å forbedre Alzheimers sykdom eller relaterte lidelser i mennesker. De induserer en sterk nevrobeskyttende effekt mot A β -toksisitet og gir positive resultater i opptredenmessige yteevner og biokjemiske analyser in vivo. Resultater viser at preparater ifølge oppfinnelsen i) effektivt korrigerer molekylære spor som in vivo er trigget av A β -aggregater, og ii) fører til en forbedring av nevrofysiologiske svekkelser som observeres i syke dyr som nevronoverlevelse eller synapseintegritet.

Dessuten viser resultatene som er angitt også at de overnevnte kombinasjonsterapier har en viktig synergistisk nevrobeskyttende effekt mot glutamateksitotoksisitet (figur 15), et spor som er implisert i forskjellige nevrologiske sykdommer som AD, MS, PD, ALS, HD, nevropatier (f.eks. nevropatisk smerte eller alkoholisk nevropati),

alkoholisme eller alkoholabstinens, eller ryggmargsskade. Disse terapier gir positive resultater i in vivo eller in vitro modeller for disse sykdommer.

5 I tillegg viser in vivo resultater at preparatene ifølge oppfinnelsen effektivt utbedrer blod-hjerne barriere integritet og forhindrer, retarderer eller nedsetter apoptoseutløsning, som er kjent for å være svekket ved en rekke nevrologiske sykdommer.

10 Videre tillater den særlig høye synergistiske interaksjon som observeres for disse to legemidler, anvendelsen av legemiddelkonsentrasjoner som viser ingen effekt når anvendt i enkeltlegemiddelbehandling. Dessuten, som vist i den eksperimentelle del, bevirker baklofen- og akamprosatkombinasjon en terapeutisk fordel på Alzheimers sykdom sammenliknet med andre terapeutiske kombinasjoner. Disse kombinasjoner forhindrer effektivt de toksiske effekter av amyloid β -protein eller peptid på humane
15 celler og i en in vivo modell og representerer nye og potente metoder for å behandle slik lidelse.

Et formål med denne oppfinnelse ligger således også i et preparat som definert ovenfor, for å behandle Alzheimers sykdom (AD), eller AD-relaterte lidelser.

20

Som indikert tidligere kan, i en kombinasjonsterapi ifølge denne oppfinnelse, forbindelser eller legemidler formuleres sammen eller separat og kan administreres sammen, separat eller påfølgende.

25 Oppfinnelsen angår også anvendelsen av et preparat som definert ovenfor for fremstilling av et medikament for å behandle en nevrologisk lidelse slik som Alzheimers sykdom (AD) eller AD-relaterte lidelser.

30 Oppfinnelsen omhandler også et preparat for anvendelse i en metode for å behandle en nevrologisk lidelse slik som Alzheimers sykdom (AD) eller AD-relaterte lidelser, som omfatter administrering til et individ med behov derfor av en effektiv mengde av et preparat som omtalt ovenfor.

35 Oppfinnelsen angår også et preparat for anvendelse i en metode for å behandle en nevrologisk lidelse slik som Alzheimers sykdom (AD) eller AD-relaterte lidelser hvor metoden omfatter samtidig, separat eller påfølgende administrering til et individ med behov derfor av en effektiv mengde av et preparat som angitt ovenfor.

Oppfinnelsen angår også et preparat for anvendelse i en metode for å behandle en nevrologisk lidelse slik som Alzheimers sykdom (AD) eller AD-relaterte lidelser i et individ med behov derfor som omfatter samtidig, separat eller påfølgende administrering til individet av en effektiv mengde av baklofen og akamprosat.

Preparatene ifølge oppfinnelsen omfatter typisk én eller flere farmasøytisk aksepterbare bærere eller eksipienser. Også, for anvendelse i den foreliggende oppfinnelse, blandes legemidler eller forbindelser vanligvis med farmasøytisk aksepterbare eksipienser eller bærere.

I denne forbindelse angår denne oppfinnelse også en fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat, hvor fremgangsmåten omfatter blanding av de ovennevnte forbindelser i en passende eksipiens eller bærer.

Oppfinnelsen angår f.eks. en fremgangsmåte som omfatter å blande baklofen og akamprosat i en passende eksipiens eller bærer.

I henhold til foretrukne utførelsesformer av oppfinnelsen, som indikert ovenfor, anvendes forbindelsene som sådan eller i form av et farmasøytisk aksepterbart salt, prodrug, derivat eller formulering derav med forsinket frigivelse.

Skjønt svært effektiv in vitro og in vivo, avhengig av individet eller den spesifikke tilstand, kan kombinasjonsterapien ifølge oppfinnelsen videre anvendes i forbindelse eller assosiasjon eller kombinasjon med ytterligere legemidler eller behandlinger som er fordelaktige for den behandlede nevrologiske tilstand i individene.

Andre terapier anvendt i forbindelse med ett eller flere legemidler eller én eller flere legemiddelkombinasjoner ifølge oppfinnelsen kan omfatte ett eller flere legemidler som forbedrer symptomene på Alzheimers sykdom, en AD-relatert lidelse, MS, PD, ALS, HD, nevropatier (for eksempel nevropatisk smerte eller alkoholisk nevropati), alkoholisme eller alkoholabstinens, eller ryggmargsskade, eller ett eller flere legemidler som kan anvendes for palliativ behandling av disse lidelser. Resultater viser f.eks. også at de ovennevnte kombinasjonsterapier har en viktig synergistisk nevrobeskyttende effekt når kombinert med donepezil (figur 16). Illustrerende terapier som derved kan anvendes med kombinasjoner ifølge oppfinnelsen er

donepezil (CAS: 120014-06-4), gabapentin (CAS: 478296-72-9; 60142-96-3), rivastigmin (123441-03-2) eller memantin (CAS: 19982-08-2).

5 I denne forbindelse, i en særlig utførelsesform, kan legemidlet/legemidlene eller preparatene ifølge den foreliggende oppfinnelse være ytterligere kombinert med *Ginkgo Biloba*-ekstrakter. Passende ekstrakter inkluderer, uten begrensning, *Ginkgo biloba*-ekstrakter, forbedrede *Ginkgo biloba*-ekstrakter (for eksempel anriket med aktive bestanddeler eller redusert med hensyn til kontaminerende midler), eller et hvilket som helst legemiddel som inneholder *Ginkgo biloba*-ekstrakter.

10

Terapi ifølge oppfinnelsen kan tilveiebringes hjemme, på legens kontor, i en klinikk, i sykehusets poliklinikk eller på sykehus, slik at legen kan observere terapieffektene nøye og gjøre eventuelle justeringer etter behov.

15

Varigheten av terapien avhenger av stadiet sykdommen behandles på, pasientens alder og tilstand, og hvordan pasienten responderer på behandlingen. Dose, hyppighet og administreringsmåte for hver komponent av kombinasjonen kan reguleres uavhengig. Ett legemiddel kan f.eks. administreres oralt, mens det andre legemiddel kan administreres intramuskulært. Kombinasjonsterapi kan gis i på-og-av-sykluser, som inkluderer hvileperioder slik at pasientens kropp har en sjanse til restituering fra eventuelle til nå ikke-forutsette bivirkninger. Legemidlene kan også formuleres sammen slik at en administrering avleverer alle legemidler.

20

25

Administreringen av hvert legemiddel i kombinasjonen kan gjennomføres ved et hvilket som helst passende middel som resulterer i en konsentrasjon av legemiddel som, kombinert med den andre komponent, er i stand til å bedre pasientens tilstand eller effektivt behandle sykdommen eller lidelsen.

30

Mens det er mulig for legemidlene i kombinasjonen å bli administrert som et rent kjemikalie, er det foretrukket å presentere dem som et farmasøytisk preparat, også omtalt i denne sammenheng som en farmasøytisk formulering. Eventuelle preparater inkluderer dem som er passende for oral, rektal, topisk (som inkluderer transdermal, bukkal og sublingual) eller parenteral (som inkluderer subkutan, intramuskulær, intravenøs og intradermal) administrering.

35

Mer vanlig forskrives disse farmasøytiske formuleringer til pasienten i "pasientpakker", som inneholder et antall doseringsenheter eller andre midler for administrering av

målte enhetsdoser for anvendelse under en avklart behandlingsperiode i en enkelt pakning, vanligvis en blisterpakning. Pasientpakningen har en fordel fremfor tradisjonelle medisiner hvor en farmasøyt oppdeler en pasients forråd av et farmasøytikum fra et bulkforråd, ved at pasienten alltid har tilgang til

5 pakningsvedlegget som er inneholdt i pasientpakningen og som normalt mangler ved tradisjonelle medisiner. Innlemmelsen av et pakningsvedlegg er blitt vist til å forbedre pasientens overholdelse av legens instruksjoner. Oppfinnelsen inkluderer således videre en farmasøytisk formulering, som beskrevet i det foregående, i kombinasjon med pakningsmateriale egnet for nevnte formuleringer. I en slik pasientpakning kan

10 den tiltenkte bruken av en formulering for kombinasjonsbehandlingen bli antydnet ved instruksjoner, hjelpemidler, regler, tilpasninger og/eller andre midler for å hjelpe til med å bruke formuleringen mest passende for behandlingen. Slike forholdsregler gjør en pasientpakning særlig egnet for, og tilpasset for, anvendelse for behandling med kombinasjonen ifølge oppfinnelsen.

15 Legemidlet kan være inneholdt i en hvilken som helst passende mengde og i en hvilken som helst passende bærersubstans. Legemidlet kan være tilstede i en mengde på opptil 99 vekt% av totalvekten av preparatet. Preparatet kan tilveiebringes i en doseform som er egnet for oral, parenteral (f.eks. intravenøs, intramuskulær), rektal,

20 kutan, nasal, vaginal, inhalasjon, hud (plaster) eller okulær administreringsrute. Således kan preparatet være i form av f.eks. tabletter, kapsler, piller, pulvere, granulater, suspensjoner, emulsjoner, oppløsninger, geler som inkluderer hydrogeler, pastaer, salver, kremer, plaster, drikker, osmotiske avleveringsanordninger, stikkpiller, klystér, injiserbare preparater, implantater, sprayer eller aerosoler.

25 De farmasøytiske preparater kan formuleres i henhold til konvensjonell farmasøytisk praksis (se f.eks. Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20. utgave), red. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, red. J. Swarbrick og J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, New York).

30 Farmasøytiske preparater ifølge oppfinnelsen kan formuleres til å frigi det aktive legemidlet i alt vesentlig umiddelbart ved administrering, eller ved en hvilken som helst forhåndsbestemt tid eller tidsperiode etter administrering.

35 Formuleringene med kontrollert frigivelse inkluderer (i) formuleringer som kan danne en i alt vesentlig konstant konsentrasjon av legemidlet i kroppen over en forlenget tidsperiode; (ii) formuleringer som etter en forhåndsbestemt forsinkelsestid danner en

i alt vesentlig konstant konsentrasjon av legemidlet i kroppen over en forlenget tidsperiode; (iii) formuleringer som opprettholder legemiddelvirkning under en forhåndsbestemt tidsperiode ved å opprettholde et relativt konstant effektivt legemiddelnivå i kroppen med en samtidig minimalisering av uønskede bivirkninger forbundet med variasjoner i plasmanivået av den aktive legemiddelsubstansen; (iv) formuleringer som lokaliserer legemiddelvirkinger f.eks. ved romlig plassering av et preparat med kontrollert frigivelse i umiddelbar nærhet av, eller i det syke vevet eller organet; og (v) formuleringer som målretter legemiddelvirkingen ved å anvende bærere eller kjemiske derivater for å avlevere legemidlet til en spesiell målcelletype.

10

Administrering av legemidler i form av en formulering med kontrollert frigivelse er særlig foretrukket i tilfeller hvor legemidlet har (i) en snever terapeutisk indeks (dvs. forskjellen mellom plasmakonsentrasjonen som fører til skadelige bivirkninger eller toksiske reaksjoner og plasmakonsentrasjonen som fører til en terapeutisk effekt er liten; generelt er den terapeutiske indeks TI, definert som forholdet mellom median dødelighetsdose (LD50) og median effektiv dose (ED50)); (ii) et snevert absorpsjonsvindu i fordøyelseskanalen; eller (iii) en svært kort biologisk halveringstid slik at hyppig dosering i løpet av en dag er nødvendig for å opprettholde plasmanivået på et terapeutisk nivå.

20

En rekke strategier kan følges for å oppnå kontrollert frigivelse, hvor frigivelsesraten oppveier metaboliseraten for det aktuelle legemiddel. Kontrollert frigivelse kan oppnås ved passende valg av forskjellige formuleringsparametere og ingredienser som inkluderer f.eks. forskjellige typer av preparater og belegg med kontrollert frigivelse. Således formuleres legemidlet med passende eksipienser til et farmasøytisk preparat som, ved administrering, frigir legemidlet på en kontrollert måte (enkeltenhetstablett eller multippelenhetstablett eller kapselpreparater, oljeoppløsninger, suspensjoner, emulsjoner, mikrokapsler, mikrokuler, nanopartikler, plastre og liposomer).

30

Faste doseformer for oral anvendelse

Formuleringer for oral anvendelse inkluderer tabletter som inneholder preparatet ifølge oppfinnelsen i en blanding med ikke-toksiske farmasøytiske aksepterbare eksipienser. Disse eksipienser kan f.eks. være inerte fortynningsmidler eller fyllstoffer (f.eks. sukrose, mikrokrySTALLinsk cellulose, stivelser som potetstivelse, kalsiumkarbonat, natriumklorid, kalsiumfosfat, kalsiumsulfat eller natriumfosfat; granuleringsmidler og desintegrerende midler (f.eks. cellulosederivater som inkluderer mikrokrySTALLinsk cellulose, stivelser som inkluderer potetstivelse, natriumkryss-

35

karmellose, alginater eller alginsyre); bindemiddel (f.eks. akasie, alginsyre, natriumalginat, gelatin, stivelse, pregelatinert stivelse, mikrokrySTALLINSK cellulose, natriumkarboksymetylcellulose, metylcellulose, hydroksypropylcellulose, etylcellulose, polyvinylpyrrolidon, eller polyetylglykol); og smøremidler, glidemidler og antiklebemidler (f.eks. stearinsyre, silikaforbindelser eller talkum). Andre farmasøytisk aksepterbare eksipienser kan være fargestoffer, smaksstoffer, mykningsmidler, fuktemidler, buffermidler og liknende.

Tablettene kan være ikke-belagt eller de kan være belagt ved hjelp av kjente teknikker, eventuelt for å utsette desintegrasjon og absorpsjon i fordøyelseskanalen og derved tilveiebringe en opprettholdt virkning over en lengre periode. Belegget kan være tilpasset til å frigi den aktive legemiddelsubstansen i et bestemt mønster (f.eks. for å oppnå en kontrollert frigivelsesformulering), eller kan tilpasses til ikke å frigi den aktive legemiddelsubstansen inntil etter passering i magen (enterisk belegg). Belegget kan være et sukkerbelegg, et filmbelegg (f.eks. basert på hydroksypropylmetylcellulose, metylcellulose, metylhydroksyetylcellulose, hydroksypropylcellulose, karboksymetylcellulose, akrylatkopolymerer, polyetylglykoler og/eller polyvinylpyrrolidon), eller et enterisk belegg (f.eks. basert på metakrylsyrekopolymerer, celluloseacetatftalat, hydroksypropylmetylcelluloseftalat, hydroksypropylmetylcelluloseacetatsuksinat, polyvinylacetatftalat, skjellakk og/eller etylcellulose). Et materiale med forsinkelse, f.eks. glycerylmonostearat eller glyceryldistearat kan anvendes.

De faste tablettpreparater kan inkludere et belegg som er tilpasset til å beskytte preparatet mot uønskede kjemiske forandringer (f.eks. kjemisk nedbrytning før frigivelse av den aktive legemiddelsubstans). Belegget kan tilføres den faste doseringsform på en måte som er tilsvarende den som er beskrevet i Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.

Legemidler kan blandes sammen i tablettene eller kan være fordelt. For eksempel er et første legemiddel inneholdt på innsiden av tablettene og et andre legemiddel er på utsiden, slik at en vesentlig andel av det andre legemidlet frigis før frigivelsen av det første legemiddel.

Formuleringer for oral anvendelse kan også være i form av tyggbare tabletter eller som harde gelatinkapsler, hvor den aktive bestanddelen blandes med et inert fast fortynningsmiddel (f.eks. potetstivelse, mikrokrySTALLINSK cellulose, kalsiumkarbonat,

kalsiumfosfat eller kaolin), eller som myke gelatinkapsler hvor den aktive bestanddel av blandet med vann eller et oljemedium, f.eks. flytende parafin eller olivenolje. Pulvere og granulater kan fremstilles ved å anvende bestanddelene som nevnt ovenfor under tabletter og kapsler på en vanlig måte.

5

Preparater med kontrollert frigivelse for oral anvendelse kan f.eks. være konstruert til å frigi det aktive legemiddel ved å kontrollere oppløsningen og/eller diffusjonen av den aktive legemiddelsubstans.

10

Oppløsnings- eller diffusjonskontrollert frigivelse kan oppnås ved passende belegning av en tablett-, kapsel-, pellet- eller granulatformulering av legemidler, eller ved å innlemme legemidlet i en passende matriks. Et belegg med kontrollert frigivelse kan inkludere én eller flere av belegningssubstansene som er nevnt ovenfor og/eller f.eks.

15

skjellakk, bivoks, glykovoks, hydrogenert risinusolje, karnaubavoks, stearylalkohol, glycerylmonostearat, glyceryldistearat, glyserolpalmitostearat, etylcellulose, akrylharpikser, dl-polymelkesyre, celluloseacetatbutyrat, polyvinylklorid, polyvinylacetat, vinylpyrrolidon, polyetylen, polymetakrylat, metylmetakrylat, 2-hydroksymetakrylat, metakrylathydrogeler, 1,3-butylenglykol, etylenglykolmetakrylat, og/eller polyetylenglykoler. I en matriksformulering med kontrollert frigivelse kan

20

matriksmaterialet også inkludere f.eks. hydratisert metylcellulose, karnaubavoks og stearylalkohol, karbopol 934, silikon, glyceryltristearat, metylakrylatmetylmetakrylat, polyvinylklorid, polyetylen og/eller halogenert fluorkarbon.

25

Et preparat med kontrollert frigivelse som inneholder ett eller flere av legemidlene i de patentsøkte kombinasjoner kan også være i form av en flytende tablett eller kapsel (dvs. en tablett eller kapsel som ved oral administrering, flyter på toppen av mageinnholdet i en bestemt tidsperiode). En flytende tablettformulering av ett eller flere legemidler kan fremstilles ved å granulere en blanding av

30

legemiddelet/legemidlene med eksipienser og 20-75 % vekt/vekt hydrokolloider, slik som hydroksyetylcellulose, hydroksypropylcellulose eller hydroksypropylmetylcellulose. De oppnådde granuler kan deretter komprimeres til tabletter. Ved kontakt med magesaftene, danner tablettene en i alt vesentlig vannimpermeabel gelbarriere rundt dens overflate. Denne gelbarriere deltar i opprettholdelse av en densitet som er mindre enn én, og tillater derfor tablettene å forbli flytende i

35

magesaften.

Væsker for oral administrering

Pulvere, dispergerbare pulvere eller granuler egnet for fremstilling med en vandig suspensjon ved tilsetning av vann, er passende doseringsformer for oral administrering. Formuleringen som en suspensjon tilveiebringer en aktiv bestanddel i en blanding med et dispersjonsmiddel eller fuktemiddel, suspensjonsmiddel og ett eller flere konserveringsmidler. Passende suspensjonsmiddel er f.eks. natriumkarboksymetylcellulose, metylcellulose, natriumalginat og liknende.

Parenterale preparater

Det farmasøytiske preparat kan også administreres parenteralt ved injeksjon, infusjon eller implantasjon (intravenøs, intramuskulær, subkutan eller liknende) i doseformer, formuleringer eller via passende avleveringsanordninger eller implantater som inneholder konvensjonelle, ikke-toksiske farmasøytisk aksepterbare bærere og adjuvanser. Formuleringen og fremstilling av slike preparater er vel kjent for de fagkyndige på området innen farmasøytisk formulering.

Preparater for parenteral anvendelse kan tilveiebringes i enhetsdoseformer (f.eks. i enkeltdoseampuller), eller i hetteglass som inneholder flere doser og et passende konserveringsmiddel kan tilsettes (se nedenfor). Preparatet kan være i form av en oppløsning, en suspensjon, en emulsjon, en infusjonsanordning eller en avleveringsanordning for implantasjon, eller det kan være presentert i form av et tørt pulver som skal rekonstitueres med vann eller annen passende vehikkel før bruk. Bortsett fra det eller de aktive legemidler, kan preparatet inkludere passende parenteralt aksepterbare bærere og/eller eksipienser. Det eller de aktive legemidler kan være innlemmet i mikrokuler, mikrokapsler, nanopartikler, lipisomer eller liknende for kontrollert frigivelse. Preparatet kan inkludere suspensjonsmidler, solubiliseringmidler, stabiliseringsmidler, pH-justerende midler og/eller dispergeringsmidler.

Det farmasøytiske preparatet ifølge oppfinnelsen kan være i en form som er egnet for steril injeksjon. For å fremstille et slikt preparat blir det eller de passende aktive legemidler suspendert i en parenteral akseptierbar flytende vehikkel. Blant aksepterbare vehikler og løsningsmidler som kan anvendes er vann, vann innstilt til en passende pH ved tilsetning av en passende mengde saltsyre, natriumhydroksid eller en passende buffer, 1,3-butanol, Ringers oppløsning og isotonisk natriumklorid-oppløsning. Den vandige formuleringen kan også inneholde ett eller flere konserveringsmidler (f.eks. metyl-, etyl- eller n-propyl p-hydroksybenzoat). I tilfeller der ett av legemidlene kun er sparsomt eller i liten grad oppløselig i vann, kan et

oppløsningsøkende middel eller solubiliseringmiddel tilsettes, eller løsningsmidlet kan inkludere 10-60 % vekt/vekt propylenglykol eller liknende.

Parenterale preparater med kontrollert frigivelse kan være i form av vandige suspensjoner, mikrokuler, mikrokapsler, magnetiske mikrokuler, oljeoppløsninger, oljesuspensjoner eller emulsjoner. Alternativt kan det eller de aktive legemidler være innlemmet i biokompatible bærere, liposomer, nanopartikler, implantater eller infusjonsanordninger. Materialer for anvendelse i fremstillingen av mikrokuler og/eller mikrokapsler er f.eks. bionedbrytbare/bioeroderbare polymerer slik som polygalaktin, poly-(isobutylcyanoakrylat), poly(2-hydroksyetyl-L-glutamin). Biokompatible bærere som kan anvendes ved utforming av en parenteral formulering med kontrollert frigivelse er karbohydrater (f.eks. dekstraner), proteiner (f.eks. albumin), lipoproteiner eller antistoffer. Materialer for anvendelse i implantater kan være ikke-bionedbrytbare (f.eks. polydimetylsiloksan) eller bionedbrytbare (f.eks. poly(kaprolakton), poly(glykolsyre) eller poly(ortoestere)).

Alternative ruter

Skjønt mindre foretrukne og mindre passende, kan man regne med andre administreringsruter og derfor andre formuleringer. I denne forbindelse, for rektal tilførsel, inkluderer passende doseringsformer for et preparat stikkpiller (emulsjonstype eller suspensjonstype) og rektale gelatinkapsler (oppløsninger eller suspensjoner). I en typisk stikkpilleformulering, blir det eller de aktive legemidler kombinert med en passende farmasøytisk akseptert stikkpillebasis slik som kakaosmør, forestrede fettsyrer, glyserinert gelatin og forskjellige vannoppløselige eller dispergerbare baser slik som polyetylen glykoler. Forskjellige tilsetningsstoffer, forsterkere eller surfaktanter kan være innlemmet.

De farmasøytiske preparater kan også administreres topisk på huden for perkutan absorpsjon i doseformer eller formuleringer inneholdende konvensjonelle ikke-toksiske farmasøytisk aksepterbare bærere og eksipienser som inkluderer mikrokuler og liposomer. Formuleringene inkluderer kremer, salver, lotioner, linimenter, geler, hydrogeler, oppløsninger, suspensjoner, stifter, sprayer, pastaer, plastre og andre typer av transdermale legemiddelavleveringssystemer. De farmasøytisk aksepterbare bærere eller eksipienser kan inkludere emulgeringsmidler, antioksidanter, buffermidler, konserveringsmidler, fuktemiddel, penetreringsøkende midler, gelateringsmidler, geldannende midler, salvebaser, parfymmer og hudbeskyttende midler.

Konserveringsmidlene, fuktemidlene, de penetreringsøkende midlene kan være parabener slik som metyl- eller propyl-p-hydroksybenzoat og benzalkoniumklorid, glyserin, propylenglykol, urea, osv.

5

De farmasøytiske preparater som beskrevet ovenfor for topisk administrering på huden, kan også anvendes i forbindelse med topisk administrering på eller nær den delen av kroppen som behøver behandling. Preparatene kan være tilpasset for direkte tilførsel eller for tilførsel ved hjelp av spesielle legemiddelavleveringsanordninger slik som bandasjer eller alternative plastre, puter, svamper, strimler eller andre former for passende fleksibelt materiale.

10

Doser og varighet av behandlingen

15

Det vil forstås at legemidlene i kombinasjonen kan administreres konkomitant, enten i den samme eller forskjellig farmasøytisk formulering, eller påfølgende. Dersom det er en påfølgende administrering, bør forsinkelsen i administrering av den andre (eller ytterligere) aktive bestanddel ikke være slik at man taper fordelene av den effektive effekten av kombinasjonen av de aktive bestanddeler. Et minimumskrav for en kombinasjon i henhold til denne beskrivelse er at kombinasjonen bør være tenkt for kombinert bruk med fordelene av den effektive effekten av kombinasjonen av de aktive bestanddeler. Den tiltenkte bruken av en kombinasjon kan være antydning ved hjelp av hjelpemidler, regler, tilpasninger og/eller andre midler for å hjelpe til med å anvende kombinasjonen ifølge oppfinnelsen.

20

25

Terapeutisk effektive mengder av legemidlene i en kombinasjon ifølge oppfinnelsen inkluderer f.eks. mengder som er effektive for å redusere symptomer på Alzheimers sykdom, stanse eller nedsette progresjonen av sykdommen når den er blitt klinisk fastslått eller forhindre eller redusere risikoen for å utvikle sykdommen.

30

Skjønt de aktive legemidlene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan administreres i oppdelte doser, for eksempel to eller tre ganger daglig, er en enkelt daglig dose av hvert legemiddel i kombinasjon foretrukket, med en enkelt daglig dose av alle legemidlene i et enkelt farmasøytisk preparat (enhetsdoseform) som mest foretrukket.

35

Administrering kan være én eller flere ganger daglig i fra flere dager til flere år, og kan til og med være for resten av livet til pasienten. Kronisk eller i det minste periodisk gjentatt langtidsadministrering er indikert i de fleste tilfeller.

Betegnelsen "enhetsdoseform" refererer til fysisk adskilte enheter (slik som kapsler, tabletter, eller fylte sprøytesylindre) som er egnet for enhetsdoseringer i mennesker, idet hver enhet inneholder en forutbestemt mengde aktivt materiale eller materiale som er beregnet til å produsere den ønskede terapeutiske effekt, i forening med den nødvendige farmasøytiske bærer.

Mengden av hvert legemiddel i et foretrukket enhetsdosepreparat avhenger av en rekke faktorer som inkluderer administreringsmetode, pasientens kroppsvekt og alder, sykdomsstadiet, risikoen for eventuelle bivirkninger idet man vurderer den generelle helsetilstanden til personen som behandles. I tillegg kan farmakogenomisk (effekten av genotype på farmakokinetikken, farmakodynamikken eller effektivitetsprofilen til et terapeutikum) informasjon om en særlig pasient påvirke dosen som anvendes.

Unntatt når man responderer på særlig svekkede tilfeller, hvor høyere doser kan være nødvendig, vil den foretrukne dosen av hvert legemiddel i kombinasjon vanligvis ligge innenfor området av doser som ikke er over den dosen som vanligvis er beskrevet for langtidsbehandling eller som har vist seg å være sikker i fase 3 kliniske studier.

En bemerkelsesverdig fordel av oppfinnelsen er at hver forbindelse kan anvendes ved lave doser i en kombinasjonsterapi mens det produseres, i kombinasjon, en vesentlig klinisk fordel for pasienten. Kombinasjonsterapien kan faktisk være effektiv ved doser hvor forbindelsen individuelt har liten eller ingen effekt. Følgelig ligger det en særlig fordel med oppfinnelsen i evnen til å anvende sub-optimale doser av hver forbindelse, dvs. doser som er lavere enn de terapeutiske doser som vanligvis forskrives, foretrukket 1/2 av terapeutiske doser, mer foretrukket 1/3, 1/4, 1/5 eller til og med foretrukket 1/10 av terapeutiske doser. I spesielle eksempler blir doser helt ned til 1/20, 1/30, 1/50, 1/100, eller til og med lavere, av terapeutiske doser anvendt.

Ved slike sub-terapeutiske doseringer, vil forbindelsene ikke utvise noen bivirkning, mens kombinasjonen(e) ifølge oppfinnelsen er fullt ut effektive med hensyn til behandling av Alzheimers sykdom.

En foretrukket dose svarer til mengder fra 1 % opp til 50 % av dem som vanligvis forskrives for langtids vedlikeholdsbehandling.

Den mest foretrukne dosen kan tilsvare mengder fra 1 % opp til 10 % av dem som vanligvis forskrives for langtids vedlikeholdsbehandling.

Spesifikke eksempler på doser av legemidler for anvendelse i oppfinnelsen er tilveiebrakt nedenfor:

- Akamprosot mellom 1 og 1000 mg/dag, foretrukket mindre enn 400 mg pr. dag, mer foretrukket mindre enn 200 mg/dag, enda mer foretrukket mindre enn 50 mg/dag, idet slike doser er særlig egnet for oral administrering.
- Baklofen mellom 0,01 til 150 mg pr. dag, foretrukket mindre enn 100 mg pr. dag, mer foretrukket mindre enn 50 mg/dag, enda mer foretrukket mindre 25 mg/dag, idet slike doser er særlig egnet for oral administrering.
- Aminokapronsyre oralt fra omtrent 0,1 g til 2,4 g pr. dag,
- Bromkriptin oralt fra omtrent 0,01 til 10 mg pr. dag,
- Dietylkarbamazin oralt fra omtrent 0,6 til 600 mg pr. dag,
- Kaberglin oralt fra omtrent 1 til 10 µg pr. dag,
- Cinacalcet oralt fra omtrent 0,3 til 36 mg pr. dag,
- Cinnarizin oralt fra omtrent 0,6 til 23 mg pr. dag,
- Dyfyllin oralt fra omtrent 9 til 320 mg pr. dag,
- Eplerenon oralt fra omtrent 0,25 til 10 mg pr. dag,
- Ifenprodil oralt fra omtrent 0,4 til 6 mg pr. dag,
- Leflunomid oralt fra omtrent 0,1 til 10 mg pr. dag,
- Levosimendan oralt fra omtrent 0,04 til 0,8 mg pr. dag,
- Meksiletin oralt fra omtrent 6 til 120 mg pr. dag,
- Moksifloksacin oralt fra omtrent 4 til 40 mg pr. dag,
- Fenformin oralt fra omtrent 0,25 til 15 mg pr. dag,
- Quinakrin oralt fra omtrent 1 til 30 mg pr. dag,
- Sulfisoksazol oralt fra omtrent 20 til 800 mg pr. dag,
- Sulodeksid oralt fra omtrent 0,05 til 40 mg pr. dag,
- Terbinafin oralt fra omtrent 2,5 til 25 mg pr. dag,
- Torasemid oralt fra omtrent 0,05 til 4 mg pr. dag,
- Trimetazidin oralt fra omtrent 0,4 til 6 mg pr. dag,
- Zonisamid oralt fra omtrent 0,5 til 50 mg pr. dag.

Når preparatet omfatter, som aktiv bestanddel, kun baklofen og akamprosot, kan disse to forbindelser anvendes i forskjellige forhold, f.eks. i et vektforhold av

akamprosat/baklofen som er mellom 0,05 til 1000 (vekt:vekt), foretrukket mellom 0,05 til 100 (vekt:vekt), mer foretrukket mellom 0,05 til 50 (vekt:vekt).

5 Det vil forstås at mengden av legemiddel som faktisk administreres vil bestemmes av en lege i lys av de relevante forhold som inkluderer den tilstanden eller de tilstander som behandles, den nøyaktige sammensetning som skal administreres, den individuelle pasientens alder, vekt og respons, alvorligheten av pasientens symptomer og den valgte administreringsrute. De ovennevnte doseområder skal derfor tilveiebringe generell veiledning og støtte for læren heri, men skal ikke begrense
10 rammen for oppfinnelsen.

De etterfølgende eksempler er gitt for illustrerende formål, og skal ikke anses som begrensende.

15 **EKSEMPLER**

Omsorgen for dyrene og dyreholdet så vel som forsøkene er gjennomført i henhold til rettleddningene til "the Committee for Research and Ethical Issue of the I.A.S.P. (1983).

20 **A) BEHANDLING AV SYKDOMMER RELATERT TIL A β -TOKSISITET**

I denne forsøksserien, er kandidatkombinasjoner blitt testet for deres evne til å forhindre eller redusere de toksiske effektene av human A β ₁₋₄₂. A β ₁₋₄₂ er full-lengde peptidet som utgjør aggregatet funnet i biopsier fra humane pasienter som er rammet av AD. Effekten bestemmes på forskjellige celletyper, for ytterligere å dokumentere
25 aktiviteten av kombinasjonene i in vitro modeller som illustrerer forskjellige fysiologiske trekk for AD. In vivo studier gjennomføres også i en musemodell for AD, som bekrefter den beskyttende effekten ved å evaluere effekten av kombinasjon på i) den kognitive yteevnen til dyr, og ii) på molekylære kjennemerker (apoptose-induksjon, oksidativt stress-induksjon, inflammasjonsprosessinduksjon) i AD.

30

I. BAKLOFEN-AKAMPROSAT KOMBINASJONSTERAPIER FORHINDRER TOKSISITET AV HUMANT A β ₁₋₄₂ IN VITRO

I.1 Effekt på toksisiteten av humant A β ₁₋₄₂-peptid på humane HBME-celler

35 Mikrovaskulær endotelcelle-kulturer fra menneskehjerne ble anvendt for å studere den beskyttelsen som gis ved den eller de kandidatforbindelsene på A β ₁₋₄₂-toksisitet.

Mikrovaskulære endotel-cerebralceller fra menneskehjerne (HBMEC, ScienCell ref.: 1000, frosset ved passering 10) ble raskt tint i et vannbad ved +37°C. Supernatanten ble umiddelbart innført i 9 ml Dulbeccos modifiserte Eagles medium (DMEM; Pan Biotech ref.: P04-03600) som inneholdt 10 % føtalt kalveserum (FCS; GIBCO ref.: 10270-106). Cellesuspensjon ble sentrifugert ved 180 x g i 10 min. ved +4°C, og pelleten ble suspendert i CSC serumfritt medium (CSC serumfritt, Cell System, ref.: SF-4Z0-500-R, batch 51407-4) med 1,6 % serumfri RocketFuel (Cell System, Ref.: SF-4Z0-500-R, batch 54102), 2 % penicillin 10000 U/ml og streptomycin 10 mg/ml (PS; Pan Biotech ref.: P0,6-07100 batch 133080808) og ble utsådd ved densiteten av 20000 celler pr. brønn i 96-brønns plater (matrigel-lag biobelegg angiogenesesystem, BD, ref.: 354150, batch A8662) i et sluttvolum på 100 µl. På matrigelbærer, startet hjerneendotelceller spontant prosessen med kapillært nettverk-morfogenese (33). Tre separate kulturer ble gjennomført pr. betingelse, 6 brønner pr. betingelse.

15 **Testforbindelser og human amyloid- β_{1-42} -behandling**

Kort, ble A β_{1-42} -peptid (Bachem, ref.: H1368 batch 1010533) rekonstituert i definert dyrkingsmedium ved 20 µM (stamopløsning) og ble sakte rystet ved +37°C i 3 dager i mørke. Kontrollmediet ble fremstilt ved de samme betingelser.

20 Etter 3 dager ble humant amyloid peptid anvendt som på HBMEC ved 2,5 µM fortynnet i kontrollmedium (optimal inkubasjonstid). A β_{1-42} -peptidet ble tilsatt 2 timer etter HBMEC-utsåing på matrigel for 18 timers inkubasjon.

En time etter HBMEC-utsåing på matrigel, ble testforbindelser og VEGF-165 oppløst i 25 dyrkingsmedium (+ 0,1 % DMSO), og pre-inkubert med HBMEC i 1 time før A β_{1-42} -applikasjon (i et sluttvolum pr. dyrkingsbrønn på 100 µl). En time etter testforbindelser eller VEGF-inkubasjon (to timer etter celleutsåing på matrigel), ble 100 µl av A β_{1-42} -peptid tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 2,5 µM fortynnet i kontrollmedium i nærvær av testforbindelser eller VEGF (i et 200 µl 30 totalvolum/brønn), for å unngå ytterligere legemiddelfortynninger.

Organisering av dyrkingsplater

VEGF-165 kjent for å være en pro-angiogen isoform av VEGF-A ble anvendt for alle 35 forsøk i denne studien, som referanseforbindelse. VEGF-165 er én av de mest rikelige VEGF-isoformer som er involvert i angiogenese. VEGF ble anvendt som referansetestforbindelse ved 10 nM (figur. 1).

De etterfølgende betingelser ble vurdert:

- **Negativ kontroll:** medium alene + 0,1 % DMSO
- **Intoksikasjon:** amyloid- β_{1-42} (2,5 μ M) i 18 timer
- **Positiv kontroll: VEGF-165** (10 nM) (1 referanseforbindelse/kultur) 1 time
5 før $A\beta_{1-42}$ (2,5 μ M) tilsetning for en 18 timers inkubasjonstid
- **Testforbindelser:** En eller flere testforbindelser 1 time før $A\beta_{1-42}$ (2,5 μ M)
tilsetning for en 18 timers inkubasjonstid.

Kvantifisering av kapillærnettverk

10 Pr. brønn ble 2 bilder med 4x linse tatt ved å anvende InCell AnalyzerTM 1000 (GE Healthcare) i lystransmisjon. Alle bilder ble tatt ved de samme betingelser. Analyser av angiogenesenettverkene ble gjennomført ved å anvende Developer programvare (GE Healthcare). Totallengden for kapillærnettverket ble anslått.

15 Dataprosessering

Data ble uttrykt i prosentandel av kontrollbetingelser (ingen intoksikasjon, ingen amyloid = 100 %) for å uttrykke amyloid skade. Alle verdier ble uttrykt som gjennomsnitt +/- SEM (s.e. gjennomsnitt) av 3 kulturer (n = 6 brønner pr. betingelse). Statistiske analyser ble utført på forskjellige betingelser (ONE-WAY
20 ANOVA etterfulgt av Dynnetts test når den var tillatt, Statview programvare versjon 5.0).

Resultater

25 Baklofen-akamprosat-kombinasjon gir en signifikant beskyttende effekt mot toksisitet av humant $A\beta_{1-42}$ -peptid i HBMEC-modell (en reduksjon på 24 % av $A\beta_{1-42}$ -peptidskade observeres), som vist i figur 2. Resultatene viser klart at intoksikasjon ved humant amyloid peptid ($A\beta_{1-42}$ 2,5 μ M) forhindres signifikant ved legemiddelkombinasjon mens, ved disse konsentrasjoner, har legemidlene alene ingen signifikant effekt på intoksikasjon ved de eksperimentelle betingelser som er beskrevet ovenfor.

30

Motsatt, gir kombinasjon av baklofen og terbinafin (som er presentert her kun av sammenlikningsårsak) en svakere beskyttelse (en reduksjon på 15 % av $A\beta_{1-42}$ -peptidskade observeres) mot $A\beta_{1-42}$ (figur 3).

35 Således, skjønt disse to kombinasjoner tillater en beskyttelse mot $A\beta_{1-42}$, skiller kombinasjonen baklofen-akamprosat seg klart ut. Disse legemidler ved konsentrasjoner som ikke har noen effekt alene, tillater faktisk signifikant beskyttelse

av humane HBME-celler mot A β ₁₋₄₂ når anvendt i kombinasjon. Videre er baklofen-akamprosat-kombinasjonen mer effektiv enn baklofen-terbinafin-kombinasjonen. En slik effekt av baklofen og akamprosat representerer en bemerkelsesverdig forbedring med 60 % sammenliknet med f.eks. effekten av kombinasjonen av baklofen-
5 terbinafin.

Dessuten er konsentrasjonen av baklofen anvendt i baklofen-akamprosat-kombinasjonen mye lavere enn konsentrasjonen av baklofen anvendt i baklofen-terminafin-kombinasjonen (25-ganger reduksjon).
10

I.2 Effekt på toksisiteten av humant A β ₁₋₄₂-peptid på primære kortikale nevronceller

Dyrking av primære kortikale nevroner

15 Rotte-kortikale nevroner ble dyrket som beskrevet av Singer et al. (47). Kort ble gravide hunnrotter med 15 dagers svangerskapsperiode avlivet ved cervikal dislokasjon (Rats Wistar) og fostrene ble fjernet fra uterus. Korteks ble fjernet og plassert i et iskaldt medium av Leibovitz (L15) inneholdende 2 % penicillin 10000 U/ml og streptomycin 10 mg/ml og 1 % bovint serumalbumin (BSA). Kortekser ble
20 dissosiert med trypsin i 20 min. ved 37°C (0,05 %). Reaksjonen ble stanset ved tilsetning av Dulbeccos modifiserte Eagles medium (DMEM) inneholdende DNase1 kvalitet II og 10 % føtalt kalveserum (FCS). Celler ble deretter mekanisk dissosiert i 3 seriepasseringer gjennom en 10 ml pipette, og sentrifugert ved 515 x g i 10 min. ved +4°C. Supernatanten ble fjernet, og pelleten av celler ble resuspendert i et definert
25 dyrkingsmedium som består av Neurobasal supplert med B27 (2 %), L-glutamin (0,2 mM), 2 % PS-oppløsning og 10 ng/ml BDNF. Levedyktige celler ble talt i et Neubauer-cytometer ved anvendelse av trypan-blå ekskluderingsstest. Cellene ble utsådd i en densitet på 30000 celler/brønn i 96-brønns plater (brønner var pre-belagt med poly-L-lysin (10 µg/ml)), og ble dyrket ved +37°C i en atmosfære med fuktig luft (95
30 %)/CO₂ (5 %).

Tre uavhengige dyrkinger ble gjennomført pr. betingelse, 6 brønner pr. betingelse.

Testforbindelser og human amyloid β ₁₋₄₂-behandling

35 Kort ble A β ₁₋₄₂-peptid rekonstituert i definert dyrkingsmedium ved 40 µM (stamopløsning), og ble sakte rystet ved +37°C i 3 døgn i mørket. Kontrollmediet ble fremstilt ved de samme betingelser.

Etter 3 dager, ble oppløsningen anvendt på primære kortikale nevroner som følger:

Etter 10 dager med nevrondyrking, ble testforbindelser oppløst i dyrkingsmedium
 5 (+0,1 % DMSO), og deretter pre-inkubert med nevroner i 1 time før A β ₁₋₄₂-tilføring (i
 et sluttvolum pr. dyrkingsbrønn på 100 μ l). En time etter inkubasjon av én eller flere
 testforbindelser, ble 100 μ l A β ₁₋₄₂-peptid tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 10 μ M
 fortynnet i nærvær av ett eller flere legemidler, for å unngå én eller flere ytterligere
 10 testforbindelsesfortynninger. Kortikale nevroner ble intoksikert i 24 timer. Tre
 separate dyrkinger ble gjennomført pr. betingelse, 6 brønner pr. betingelse.

BDNF (50 ng/ml) og østradiol- β (150 nM) ble anvendt som henholdsvis positiv
 kontroll og referanseforbindelse. Tre separate dyrkinger ble gjennomført pr.
 15 betingelse, 12 brønner pr. betingelse.

Organisering av dyrkingsplater

Østradiol- β ved 150 nM ble anvendt som en positiv kontroll (figur 4).

Østradiol- β ble oppløst i dyrkingsmedium, og pre-inkubert i 1 time før amyloid- β ₁₋₄₂-
 20 applikasjon.

De etterfølgende betingelser ble vurdert:

- *KONTROLLPLAKK*: 12 brønner/betingelse
 - *Negativ kontroll*: medium alene + 0,1 % DMSO
 - *Intoksikasjon*: amyloid- β ₁₋₄₂ (10 μ M) i 24 timer
 - *Referanseforbindelse*: østradiol (150 nM) 1 time
- *LEGEMIDDELPLATE*: 6 brønner/betingelse
 - *Negativ kontroll*: medium alene + 0,1 % DMSO
 - *Intoksikasjon*: amyloid- β ₁₋₄₂ (10 μ M) i 24 timer
 - *Testforbindelse/forbindelser*: testforbindelse/testforbindelser – 1 time
 30 etterfulgt av amyloid- β ₁₋₄₂ (10 μ M) i 24 timer.

Laktatdehydrogenase (LDH) aktivitetsanalyse

24 timer etter intoksikasjon, ble supernatanten fjernet og analysert med Cytotoxicity
 35 Detection Kit (LDH, Roche Applied Science, ref.: 11644793001, batch: 11800300).
 Denne kolorimetriske analysen for kvantifisering av celletoksisitet er basert på

målingen av laktatdehydrogenase (LDH) aktivitet frigitt fra cytosolen av døende celler inn i supernatanten.

Databearbeiding

5 Data ble uttrykt i prosentandel av kontrollbetingelser (ingen intoksikasjon, intet amyloid = 100 %) for å uttrykke amyloid skade. Alle verdier ble uttrykt som gjennomsnitt +/- SEM (s.e. gjennomsnitt) av 3 kulturer (n = 6 brønner pr. betingelse). Statistiske analyser ble utført på de forskjellige betingelser (ONE-WAY ANOVA etterfulgt av Dunnetts test når den var tillatt, Statview programvare versjon 10 5.0).

Resultater

Kombinasjonen av baklofen og akamprosat induserer en signifikant beskyttende effekt mot toksisitet av humant A β_{1-42} -peptid (forbedring på 34 % celleoverlevelse) i 15 primære kortikale nevronceller som vist i figur 5. Resultatene viser klart at intoksikasjonen ved humant amyloid peptid (A β_{1-42} 10 μ M) forhindrer signifikant kombinasjonen, mens baklofen eller akamprosat i disse konsentrasjoner alene har ingen signifikant effekt på intoksikasjon.

20 Motsatt, skjønt aktiv i denne modell, gir kombinasjonen av sulfisoksazol og cinacalcet en svakere beskyttelse mot A β_{1-42} (19 %, figur 6).

Således, mens disse to kombinasjoner tillater en beskyttelse mot A β_{1-42} , skiller kombinasjonen baklofen-akamprosat seg klart ut. Ved konsentrasjoner som ikke har 25 noen effekt alene, bevirker faktisk legemidlene en signifikant beskyttelse av primære kortikale nevronceller mot A β_{1-42} når anvendt i kombinasjon. Videre er baklofen-akamprosat-kombinasjonen mye mer effektiv enn sulfisoksazol-cinacalcet-kombinasjonen. En slik effekt av baklofen og akamprosat representerer en betydelig forbedring med 60 % sammenliknet med f.eks. effekten av kombinasjonen av 30 sulfisoksazol og cinacalcet.

Sammen viser disse resultater en uventet og betydelig positiv effekt for baklofen-akamprosat-kombinasjoner i en rekke in vitro modeller av Alzheimers sykdom. Effekten som observeres er svært overlegen den som fremmes ved andre 35 baklofenbaserte kombinasjonsterapier (f.eks. baklofen-terbinafin), eller andre aktive kombinasjonsterapier (sulfisoksazol-cinacalcet).

En sammenlikning av akamprosat og homotaurin beskyttelsesaktivitet på kortikale celler er blitt utført (figur 17). Disse resultater viser at derivatet av akamprosat, betegnet homotaurin, tillater en effektiv beskyttelse mot A β ₁₋₄₂. I forbindelse med denne oppfinnelse, kan baklofen eller akamprosat således erstattes med deres
 5 derivater, med den betingelse at disse derivatene er effektive i analyser som beskrevet heri.

I.3 Beskyttelse mot toksisitet av A β ₁₋₄₂ i en nevrivvekst og synapse funksjonalitetsmodell

10 Kortikale nevroner fra rotte ble dyrket som beskrevet av Singer et al. (35). Kort ble gravide hunnrotter med 15 dagers graviditet avlivet ved cervical dislokasjon (Rats Wistar) og fostrene ble fjernet fra uterus. Korteks ble fjernet og plassert i iskaldt medium av Leibovitz (L15) inneholdende 2 % penicillin 10000 U/ml og streptomycin 10 mg/ml og 1 % bovint serumalbumin (BSA). Kortekser ble dissosiert med trypsin i
 15 20 minutter ved 37°C (0,05 %). Reaksjonen ble stanset ved tilsetning av Dulbeccos modifiserte Eagles medium (DMEM) inneholdende DNase1 kvalitet II og 10 % føtalt kalveserum (FCS). Celler ble deretter mekanisk dissosiert ved 3 seriepasseringer gjennom en 10 ml pipette, og sentrifugert ved 515 x g i 10 min. ved +4°C. Supernatanten ble fjernet, og pelleten av celler ble resuspendert i et definert
 20 dyrkingsmedium som består av Neurobasal supplert med B27 (2 %), L-glutamin (0,2 mM), 2 % PS-oppløsning, og 10 ng/ml BDNF. Levedyktige celler ble talt i et Neubauer-cytometer ved anvendelse av trypan-blå ekskluderingsstesten. Cellene ble utsådd ved en densitet på 30000 celler/brønn i 96-brønns plater (brønner var forbelagt med poly-L-lysin (10 µg/ml)), og ble dyrket ved +37°C i en fuktig luft (95 %)/CO₂ (5 %)
 25 atmosfære.

Etter 10 dagers dyrking ble cellene inkubert med legemidler. Etter 1 time, intoksikeres cellene med 2,5 µM beta-amyloid (1-42; Bachem) i definert medium uten BDNF, men sammen med legemidler. Kortikale nevroner intoksikeres i 24 timer. BDNF (10 ng/ml)
 30 anvendes som en positiv (nevrobekyttende) kontroll. Tre uavhengige dyrkinger ble gjennomført pr. betingelse, 6 brønner pr. betingelse.

Neurittlengder og synapsekvantifisering

Etter 24 timers intoksikasjon, fjernes supernatanten, og kortikale nevroner fikseres
 35 ved en kald oppløsning av etanol (95 %) og eddiksyre (5 %) i 5 min. Etter permeabilisering med 0,1 % saponin, blokkeres cellene i 2 timer med PBS inneholdende 1 % føtalt kalveserum. Deretter inkuberes celler med monoklonalt

antistoff anti-mikrotubuli-assosiert protein 2 (MAP-2; Sigma), eller med anti-synaptofysin (SYN, S5798, Sigma), sammen med anti PSD95 (P246, Sigma) antistoffer for å kvantifisere synapser. Disse antistoffene farger spesifikt cellelegemer og nevritter av nevroner av nevroner (MAP2) eller pre- og post-synaptiske elementer (henholdsvis SYN og PSD95).

Disse antistoffer avsløres med Alexa Fluor 488 geit anti-mus IgG (molekylær probe). Kjerner av nevroner ble merket med en fluorescerende markør (Hoechst oppløsning, SIGMA).

Pr. brønn ble 10 bilder tatt ved anvendelse av InCell AnalyzerTM 1000 (GE Healthcare) med 20x forstørrelse. Alle bilder tas ved de samme betingelser. Analyser av nevrnettverket gjøres ved å anvende Developer programvare (GE Healthcare) for å bestemme totallengden av nevrnettverk.

15

Resultater

Kombinasjonen av baklofen og akamprosat induserer en signifikant beskyttende effekt mot toksisiteten av humant A β ₁₋₄₂-peptid (forbedring av 80 % av nevrnettverk) i primære kortikale nevronceller som vist i figur 7. Resultatene viser klart at intoksikasjonen ved humant amyloid peptid (A β ₁₋₄₂ 2,5 μ M) forhindres signifikant ved kombinasjon, mens ved disse konsentrasjoner har baklofen eller akamprosat alene ingen signifikant effekt på intoksikasjon.

Videre er totallengden av nevrnettverk behandlet i denne kombinasjon ikke lenger signifikant forskjellig fra kontrollceller. Følgelig tillater denne kombinasjon en effektiv beskyttelse av kortikale nevronceller mot toksisiteten av humant A β ₁₋₄₂-peptid, men også en nevrvekst som er sammenliknbar med en frisk kortikal nevroncelle.

II. BAKLOFEN-AKAMPROSAT-KOMBINASJONSTERAPIER FORHINDRER TOKSISITET AV HUMANT A β ₂₅₋₃₅ IN VIVO

30

Dyr

Swiss hannrotter anvendes gjennom denne studien. Dyrene ble huset i plastbur og hadde fri tilgang til laboratoriefôr og vann, unntatt under forsøkene som angår opptreden, og ble holdt i et regulert miljø under en 12 timers lys/mørkesyklus (lys på ved klokken 08:00 a.m.). Forsøk gjennomføres i et lydtett og luftregulert forsøksrom, hvor mus hadde tilpasset seg i minst 30 minutter før hvert forsøk.

35

Kombinasjonsbehandling

Ett eller flere legemidler administreres daglig ved sondetilførsel (per os). β 25-35-peptidet og scrambled β 25-35-peptid (kontroll) er blitt oppløst i sterilt bidestillert vann, og lagres ved -20°C inntil bruk. β -amyloid peptider administreres deretter intracerebroventrikulært (i.c.v.). Kort, bedøves hver mus lett med eter og en "gauge" nål av rustfritt stål innføres unilateralt 1 mm til høyre for midtlinjepunktet ekvidistant fra hvert øye, i en lik avstand mellom øynene og ørene, og perpendikulært på skalleplanet. Peptider eller vehikler avleveres gradvis innen omtrent 3 s. Mus utviste normal opptreden innen 1 min. etter injeksjon. Administreringsstedet undersøkes ved å injisere tusjblekk i preliminære forsøk. Verken innføring av nålen eller innføring av vehikkelen har en signifikant innvirkning på overlevelse, oppførselsmessige responser eller kognitive funksjoner.

Legemiddelbehandling

På dag -1, dvs. 24 timer før $A\beta_{25-35}$ -peptidinjektjonen, blir legemiddelkombinasjoner eller vehikkeloppløsningen administrert per os ved sonde to ganger daglig (kl. 08:00 am og 6:00 pm). På dag 0 (10:00 am), fikk mus injisert i.c.v. $A\beta_{25-35}$ -peptid eller tilfeldig $A\beta_{25-35}$ -peptid (kontroll) i et sluttvolum på 3 μl (3 mM).

Mellom dag 0 og dag 7 blir legemidler, legemiddelkombinasjon eller vehikkeloppløsningen administrert per os ved sonde én eller to ganger daglig (kl. 08:00 am og 06:00 pm). En dyregruppe mottok donepezil (referanseforbindelse -1 mg/kg/dag) per os ved sonde i en enkelt injeksjon (kl. 08:00 am). Legemidler solubiliseres i vann og nyfremstilles like før hver sondeadministrering.

På dag 7 testes alle dyr for spontan alternerings-yteevne i Y-Maze testen, en indeks på romlig arbeidsminne.

På dag 7 og 8, vurderes det kontekstuelle langtidsminnet til dyrene, ved å anvende "step-down" type passiv unngåelsesprosedyre.

På dag 8 avlives dyrene. Hjernen dissekeres og holdes ved -80°C for ytterligere analyser.

35

Kombinasjoner øker atferdsmessig og kognitiv yteevne hos intoksikerte dyr
Spontan alternerings-yteevne Y-Maze test

På dag 7, testes alle dyrene for spontan alternerings-yteevne i Y-maze, en indeks på romlig arbeidsminne. Y-maze er dannet av grå polyvinylklorid. Hver arm er 40 cm lang, 13 cm høy, 3 cm bred på bunnen, 10 cm bred på toppen, og løper sammen i en lik vinkel. Hver mus plasseres i enden av én arm, og får bevege seg fritt gjennom labyrinten i løpet av en 8 min. sesjon. Seriene av arminntredener som inkluderer mulige returer inn i den samme armen, undersøkes visuelt. En alternering defineres som inntredener inn i alle tre armer i etterfølgende anledninger. Antall maksimale alterneringer er derfor det totale antall arminntredener minus to, og prosentandelen alternering beregnes (som reelle alterneringer/maksimale alterneringer) x 100. Parametere inkluderer prosentandelen alternering (hukommelsesindeks), og det totale antall arminntredener (eksplorasjonsindeks). Dyr som viste en ekstrem oppførsel (alterneringsprosentandel < 25 % eller > 85 %, eller antall arminntredener < 10) forkastes. Vanligvis står dette for 0-5 % av dyrene. Denne test tjener for øvrig til å analysere, på det atferdsmessige nivået, innvirkning og den amnesiske effekt i mus ved A β 25-35-injeksjonen.

Passiv unngåelsestest

Apparatet er en to-roms (15 x 20 x 15 cm høy) boks, hvor ett er opplyst med hvite polyvinylkloridvegger og det andre er mørknet med sorte polyvinylkloridvegger, og et gittergulv. En guillotinedør separerer hvert rom. En 60 W lampe plassert 40 cm over apparatet lyser opp det hvite rommet under forsøket. Scramled fotsjokk (0,3 mA i 3 sek.) kan avleveres til gittergulvet ved å anvende en sjokkgenerator-scrambler (Lafayette Instruments, Lafayette, USA). Guillotinedøren er først lukket under treningsdelen. Hver mus plasseres i det hvite rommet. Etter 5 sek., heves døren. Når musene går inn i det mørke rommet og plasserer alle sine poter på gittergulvet, lukkes døren og fotsjokket avleveres i 3 sek. "Step-through" latensen, dvs. ventetiden som brukes for å gå inn i det mørke rommet og antallet vokaliseringer registreres. Retensjonstesten gjennomføres 24 timer etter trening. Hver mus plasseres igjen i det hvite rommet. Etter 5 sek. heves dørene, "step-through" latensen og fluktlatensen, dvs. tiden som brukes for å returnere til det hvite rommet, registreres opp til 300 sek.

Positive resultater observeres i atferdsmessige yteevner og biokjemiske analyser gjennomført 7 dager etter β 25-35-peptid icv-injeksjon.

Kombinasjonen av baklofen og akamprosat induserer en signifikant beskyttelseeffekt på atferdsmessig og kognitiv yteevne hos intoksikerte dyr som vist i figurer 8, 9 og 10.

I figur 8, med kun 53,8 % alternering, utviste intoksikerte mus et sterkt svekket romlig arbeidsminne sammenliknet med kontroll. Med en forbedring på mer enn 48 % av deres prosentandel alternering sammenliknet med kontroll, forhindres svekkelsen signifikant i mus behandlet med baklofen og akamprosat.

Likeledes viser figurer 9 og 10 at intoksikerte dyr utviser svekket atferdsmessig og kognitiv yteevne i henhold til deres skår i henholdsvis flukt latens og "step-through" latens. I begge tester tillater kombinasjonen av baklofen og akamprosat en signifikant korreksjon av svekkelsen. Fluktlatensen til mus behandlet med denne kombinasjon er ikke lenger signifikant forskjellig fra kontrollmus (figur 9), og "step-through" latens (figur 10) er signifikant økt ved kombinasjoner ifølge oppfinnelsen, med en økt effekt av kombinasjonen sammenliknet med legemidler alene.

Hukommelsessvekkelse er det tidligste tegn på Alzheimers sykdom, og disse resultater viser klart at den toksiske effekten av amyloid peptid på atferdsmessig og kognitiv yteevne (som inkluderer hukommelse) forhindres signifikant ved kombinasjonene ifølge oppfinnelsen.

Videre viser figur 16 at ekstremt lave doser av baklofen (480 µg/kg/dag), akamprosat (32 µg/kg/dag) og donepezil (0,25 mg/kg/dag) kan kombineres for å tillate en fullstendig beskyttelse av atferdsmessig og kognitiv yteevne hos mus som målt ved Y-maze test. Mens donepezil ved denne konsentrasjon har ingen signifikant effekt (32 % beskyttelse) på romlig arbeidsminne, vil dets bruk sammen med baklofen- og akamprosat-kombinasjonen gi en fullstendig beskyttelse (98 %) av kognitiv yteevne hos intoksikerte mus. Kombinasjoner ifølge oppfinnelsen kan således kombineres ytterligere med andre terapier for å forsterke deres virkning.

Kombinasjoner forbedrer neurofysiologisk bekymring for neurologiske sykdommer

Kombinasjonsterapier er testet i in vivo modellen av Aβ-intoksikasjon. Deres effekter på flere parametere som er påvirket i neurologiske sykdommer vurderes:

- Caspaser 3 og 9 ekspresjonsnivå, betraktes som en indikator på apoptose,
- Lipidperoksidasjon, betraktes som en markør for oksidativt stressnivå,
- GFP-ekspresjonsanalyse, betraktes som en markør av nivået av hjerneinflammasjon,
- Hjerne-blod barriere integritet,

- Total synapseintegritet (synaptofysin ELISA),
- Kvantifisering av levedyktige nevroner i CA1.

Hjerne-blod barriere integritet

5 Eksperimentell design angående dyreintoksikasjon ved A β er den samme som i del III.

Den potensielle beskyttende effekten av kombinasjonsterapiene på blod-hjerne barriere (BBB) integritet er analysert i mus som er injisert intracerebroventrikulært (i.c.v) med oligomerisk amyloid- β 25-35-peptid (A β 25-35) eller scrambled A β 25-35 kontrollpeptid (Sc.A β), 7 dager etter injeksjon.

10

På dag 7 etter A β 25-35-injeksjon, testes dyrene for å bestemme BBB-integriteten ved å anvende EB (Evans Blue) metoden. EB-fargestoff er kjent til å binde til serumalbumin etter perifer injeksjon, og er blitt anvendt som en markør for serumalbumin.

15

EB-fargestoff (2 % i saltvann, 4 ml/kg) injiseres intraperitonealt (i.p.) 3 timer før transkardial perfusjon. Mus bedøves deretter med i.p. 200 μ l forblandet ketamin 80 mg/kg, xylazin 10 mg/kg, brystet åpnes. Mus underkastes perfusjon transkardialt med 250 ml saltoppløsning i omtrent 15 minutter inntil fluidet fra høyre atrium blir fargeløst. Etter dekapitasjon, fjernes hjernen og dissekeres ut i tre regioner: cerebral korteks (venstre + høyre), hippocampus (venstre + høyre), diencefalon. Deretter veies hvert hjerneområde for kvantitativ måling av EB-albumin ekstravasasjon.

20

Prøver homogeniseres i fosfatbufret saltvannsoppløsning, og blandes ved vorteksblending etter tilsetning av 60 % trikloreddiksyre for å presipitere proteinet. Prøver avkjøles ved 4°C og sentrifugeres deretter 30 minutter ved 10000 g, 4°C. Supernatanten måles ved 610 nm fra absorbans av EB ved å anvende et spektrofotometer.

30

EB kvantifiseres både som

- μ g/mg hjernevev ved å anvende en standardkurve, oppnådd ved kjent konsentrasjon av EB-albumin.
- μ g/mg protein.

35

Total synapseintegritet (synaptofysin ELISA)

Synaptofysin er blitt valgt som en markør av synapseintegritet og analyseres ved å anvende et kommersielt ELISA-kit (USCN, ref.: E90425Mu). Prøver fremstilles fra

hippocampusvev og homogeniseres i en ekstraksjonsbuffer som er spesifikk som beskrevet av produsenten og i referanselitteratur.

5 Vev renses i iskald PBS (0,02 mol/l, pH 7,0-7,2) for å grundig fjerne overskuddsblod, og veies før nitrogenfrysing og -80°C lagring. Vev skjæres i små stykker og homogeniseres i 1 ml iskald fosfatbufret saltvanns (PBS) oppløsning med en glasshomogenisator. Den oppnådde suspensjonen sonikeres med en ultralydcelledbrytningsanordning, eller underkastes to fryse-tine-sykluser for ytterligere å nedbryte cellemembranene. Deretter sentrifugeres homogenatene i 5
10 minutter ved 5000 g, og supernatanten analyseres umiddelbart.

Alle prøver analyseres in triplo.

15 Kvantifisering av proteiner gjennomføres med Pierce BCA (bicinchoninsyre) proteinanalysekit (Pierce, ref.: #23227) for å evaluere ekstraksjonsytelse og tillate normalisering.

De totale proteinkonsentrasjoner beregnes deretter fra standardkurvefortynninger, og tjener til å normalisere ELISA-resultater.

20

Kvantifisering av levedyktige nevroner i CA1

På dag 8 bedøves hver mus med 200 µl i.p. av en forblending av ketamin 80 mg/kg og xylazin 10 mg/kg og underkastes transkardial perfusjon med 100 ml saltoppløsning etterfulgt av 100 ml 4 % paraformaldehyd. Hjernene fjernes og holdes i 24 timers
25 post-fiksering i 4 % formaldehydoppløsning ved 4°C.

Etter post-fiksering, vaskes hjerner i en fosfatbuffer-saltvanns (PBS) oppløsning, deretter fjernes cerebellum og forhjernene plasseres på en vibratom plattform (Leica VT100OS, Leica, Wetzlar, Tyskland) for kutting.

30

Hjerner kuttet i koronale snitt (20 µl tykkelse) ved anvendelse av en vibratom (Leica VT100OS, Leica, Wetzlar, Tyskland). Seriesnitt plasseres på 24-brønns plater med PBS. De velges deretter til å inkludere hippocampusdannelse og 9 snitt plasseres i gelatinbelagte objektglass (ett objektglass pr. dyr for cresylviolett). Alle objektglass
35 tørkes ved romtemperatur i 48 timer for å unngå ikke-klebing. Glassene lagres ved romtemperatur inntil cresylviolett-farging.

Snitt farges med 0,2 % cresylviolettreatens (Sigma-Aldrich), dehydratiseres deretter med kvalitetsetanol, behandles med toluen og utstyres med Mountex-medium (BDH Laboratory Supplies, Poole, Dorset, UK).

5 Etter dette holdes objektglassene ved RT for 24 timers tørking. Undersøkelse av CA 1 området gjennomføres ved å anvende et lysmikroskop (Dialux 22, Leitz), med snitt digitalisert gjennom et CCD-kamera (Sony XC-77CE, Sony, Paris, Frankrike) med NIHImage® v1.63 programvare (NIH). CAI-måling og antall pyramideceller prosesseres ved å anvende ImageJ® (NIH). Data uttrykkes som gjennomsnitt av ni snitt av CA 1
10 pyramideceller pr. millimeter for hver gruppe (venstre og høyre hippocampus CAI-telling) (49).

Oksidativt stress-analyse

Mus avlives ved dekapitasjon og begge hippocampuser fjernes raskt, veies og
15 oppbevares i flytende nitrogen inntil analyse. Etter tining homogeniseres hippocampus i kald metanol (1/10 vekt/volum), sentrifugeres ved 1000 g i løpet av 5 min., og supernatanten plasseres i et eppendorfrør. Reaksjonsvolumet av hvert homogenat tilsettes til FeSO₄ 1 mM, H₂SO₄ 0,25 M, xylenol orange 1 mM, og inkuberes i 30 min. ved romtemperatur. Etter avlesning av absorbans ved 580 nm (A_{580 1}), tilsettes 10 µl
20 kumenhydroperoksid 1 mM (CHP) til prøven, og inkuberes i 30 min. ved romtemperatur, for å bestemme maksimalt oksidasjonsnivå. Absorbansen måles ved 580 nm (A_{580 2}). Nivået av lipidperoksidasjon bestemmes som CHP-ekvivalenter (CHPE) ifølge: $CHPE = A_{580 1}/A_{580 2} \times [CHP]$ og uttrykkes som CHP-ekvivalenter pr. vektenhet vev, og som prosentandel av kontrollgruppedata.

25

Kaspasespor induksjonsanalyse og GFAP-ekspresjonsanalyse

Mus avlives ved dekapitasjon og begge hippocampuser fjernes raskt, vaskes i iskald PBS (0,02 mol/l, pH 7,0-7,2) for å grundig fjerne overskuddsblod, veies og holdes i flytende nitrogen inntil analyse. Vev skjæres i små stykker og homogeniseres i 1 ml
30 iskald PBS med en glasshomogenisator. Den oppnådde suspensjonen sonikeres med ultralydcelledbrytningsanordninger eller underkastes to fryse-tine-sykluser for ytterligere å nedbryte cellemembranene. Deretter sentrifugeres homogenater ved 5000 g i løpet av 5 min. og supernatanten analyseres umiddelbart.

35 Forsøk gjennomføres med kommersiell analyse: Kaspase-3 (USCN – E90626Mu), Kaspase-9 (USCN – E90627Mu), GFAP (USCN – E90068).

Kvantifisering av proteiner gjennomføres med Pierce BCA (bicincholinsyre) proteinanalysekit (Pierce, ref.: #23227) for å evaluere ekstraksjonsytelse, og tillate normalisering.

5 Kombinasjonen av baklofen og akamprosat induserer en signifikant beskyttelseeffekt på nevrofysiologiske funksjoner av intoksikerte dyr som vist i figurer 11, 12, 13 og 14. Med en beskyttelse på mer enn 60 % sammenliknet med ikke-behandlede intoksikerte dyr, er kombinasjonen effektiv for å beskytte nevroner (figur 11) og synaptisk densitet (figur 13).

10

Likeledes viser figur 12 at kombinasjonen av baklofen og akamprosat beskytter BBB-integritet (76 %) sammenliknet med ikke-behandlede intoksikerte dyr.

15

Til slutt er kombinasjonsterapi effektiv for å redusere totalt oksidativt stress induert ved A β i hjernen til behandlede dyr når sammenliknet med ikke-behandlede intoksikerte dyr (figur 14).

20

Som vist i del A i eksempler, er en rekke nevrologiske funksjoner som er svekket ved en rekke nevrologiske lidelser som inkluderer neurodegenerative lidelser slik som Alzheimers sykdom og relaterte lidelser blitt beskyttet, og symptomer retarderes eller reduseres ved kombinasjonen baklofen-akamprosat.

B) FOREBYGGING AV GLUTAMAT-TOKSISITET PÅ NEVRONALE CELLER

25

I denne ytterligere gruppe av forsøk er kandidatforbindelser blitt testet for deres evne til å forhindre eller redusere de toksiske effekter av glutamat-toksisitet på nevronale celler. Glutamat-toksisitet er involvert i patogenesen av nevrologiske sykdommer eller lidelser slik som multippel sklerose, Alzheimers sykdom, amyotrofisk lateralsklerose, Parkinsons sykdom, Huntingtons sykdom, nevropatier, alkoholisme eller alkoholabstinens eller ryggmargsskade. Legemidlene testes først individuelt, etterfulgt av analyser av deres kombinasjonsvirkning.

30

Metoder

35

Effekten av legemiddelkombinasjoner ifølge oppfinnelsen vurderes på primære kortikale nevronceller. Protokollen som anvendes i disse analyser er den samme som beskrevet i del A.I.2 ovenfor.

Glutamat-toksisitetsanalyser

Den nevrobeskyttende effekten av forbindelser vurderes ved å kvantifisere nevrnettverket ("Neurofilament immunostaining" (NF)) som spesifikt avslører de glutamatergiske nevroner.

5 Etter 12 dager av nevrondyrking, blir legemidler av kandidatkombinasjoner oppløst i dyrkingsmedium (+0,1 % DMSO). Kandidatkombinasjoner pre-inkuberes deretter med nevroner i 1 time før glutamatskaden. En time etter inkubasjon med, tilsettes glutamat i 20 min. til en sluttkonsentrasjon på 40 μ M i nærvær av kandidat-

10 kombinasjoner for å unngå ytterligere legemiddelfortynninger. På slutten av inkubasjonen forandres medium med medium med kandidatkombinasjon men uten glutamat. Kulturen fikseres 24 timer etter glutamatskade. MK801 (Dizocilpinhydrogenmaleat, 77086-22-7 – 20 μ M) anvendes som en positiv kontroll.

Etter permeabilisering med saponin (Sigma), blokkeres celler i 2 timer med PBS

15 inneholdende 10 % geitserum, deretter inkuberes cellene med mus monoklonalt primært antistoff mot neurofilamentantistoff (NF, Sigma). Dette antistoff avsløres med Alexa Fluor 488 geit anti-mus IgG.

Kjerner i celler merkes med en fluorescerende markør (Hoechst oppløsning, SIGMA),

20 og nevrnettverk kvantifiseres. Seks brønner pr. betingelse anvendes for å fastslå nevronal overlevelse i tre forskjellige kulturer.

Resultater

Kombinasjonen baklofen-akamprosat gir en beskyttende effekt mot glutamat-

25 toksisitet for kortikale nevronale celler. Som eksemplifisert i figur 15, beskytter kombinasjoner ifølge oppfinnelsen sterkt nevroner fra glutamat-toksisitet under eksperimentelle betingelser som beskrevet ovenfor. Det er verdt å legge merke til at en effektiv beskyttelse konstateres ved å anvende legemiddelkonsentrasjoner hvorved legemidler alene har lavere beskyttende effekter. Kombinasjonen av baklofen og

30 akamprosat induserer en forbedring på mer enn 200 % sammenliknet med akamprosat alene og mer enn 47 % sammenliknet med baklofen anvendt alene.

De etterfølgende eksempler faller ikke innenfor rammen til kravene.

35 **C) FORBEDRINGER AV ANDRE LIDELSER RELATERT TIL GLUTAMAT EKSITOKSISITET VED Å ANVENDTE KOMBINASJONER IFØLGE OPPFINNELSEN**

Den ovennevnte in vitro beskyttende effekt mot glutamat-toksisitet av legemidler og legemiddelkombinasjoner ifølge oppfinnelsen kombinert med beskyttelseseffekten som eksemplifisert her i en rekke AD-modeller påvirket oppfinnerne til å teste disse legemidler og kombinasjoner i enkelte modeller av andre sykdommer i patogenesen hvor glutamat-toksisitet også er involvert, slik som MS, ALS og nevropatisk smerte.

I) BESKYTTENDE EFFEKT AV KOMBINASJONER I EN IN VIVO MODELL AV MULTIPPEL SKLEROSE

En modell hvor myelinoligodendrocytt-glykoproteinimmunisererte (MOG-immunisererte) mus utvikler kronisk progressiv EAE, anvendes for å demonstrere den fordelaktige effekten av preparater ifølge oppfinnelsen ved multipel sklerose behandling.

Dyr og kjemikalier

C57L/6J hunnmus (8 uker gamle) ble innkjøpt fra Janvier (Frankrike); etter to ukers tilvenning utvikler hunnmus (10 uker gamle) kronisk paralyse etter immunisering med MOG (myelinoligodendrocytt-glykoprotein) peptid. Den eksperimentelle encefalomyelitt er indusert med Hooke Kit MOG₃₅₋₅₅/CFA Emulsion PTX (Pertussis toksin) for EAE-induksjon (EK-0110, EK-0115; Hooke laboratories). Kontrollkittet er CK-0115 (Hooke laboratories).

Eksperimentell prosedyre

Eksperimentell encefalomyelitt induseres ved etterfølgende prosedyrer: På dag 0 gjennomføres to subkutane injeksjoner på 0,1 ml hver, én i øvre del av ryggen på musen og én i nedre del av ryggen. Hver injeksjon inneholder 100 µg MOG₃₅₋₅₅-peptid (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK), 200 µg inaktivert *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, og er emulgert i fullstendig Freund's adjuvant (CFA) (Hooke laboratories). Emulsjonen tilveiebringer antigen som er nødvendig for å ekspandere og differensiere MOG-spesifikke autoimmune T-celler.

To intraperitoneale injeksjoner av 500 ng Pertussis toksin i PBS (Hooke kit) gjennomføres 2 timer (dag 0) og 24 timer (dag 1) etter MOG-injeksjon. Pertussis toksin øker EAE-utvikling ved å tilveiebringe ytterligere adjuvans.

Mus utvikler EAE 8 dager etter immunisering og forblir kronisk paralyseret under forsøkets varighet. Etter immunisering observeres mus daglig for kliniske symptomer i en blindprosedyre. Dyr holdes i en konvensjonell patogenfri fasilitet, og alle forsøk

gjennomføres i overensstemmelse med retningslinjer som er beskrevet og godkjent av den faste lokale utvalget for bioetikk.

Ekperimentelle grupper og legemiddelbehandling:

- 5 Grupper av hunnmus som omtalt homogeniseres basert på vekt før immuniseringen:
- Kontrollgruppe: vehikkelinjeksjon ved de samme betingelser for EAE-mus (fra dag 1 til dag 28, placebo gis daglig).
 - EAE-gruppe: MOG-injeksjon (dag 0) + Pertussis toksin injeksjoner (dag 0 og 1) – fra dag -1 til dag 28, placebo gis oralt daglig.
 - 10 - EAE + positiv kontroll: MOG-injeksjon (dag 0) + Pertussis toksin injeksjoner (dag 0 og 1) – fra dag -1 til dag 28, deksametazon gis oralt daglig.
 - EAE + behandlingsgruppe: MOG-injeksjon (dag 0) + Pertussis toksin injeksjoner (dag 0 og 1). Behandlingene starter én dag for immunisering og varer til dag 28.

15

De kliniske skårene måles ved dager 0-5-8-9-12-14-16-19-21-23-26-28.

Statistisk software (Statsoft Inc.) benyttes gjennom hele for statistiske analyser.

ANOVA-analyser og Students t-test benyttes for å analysere klinisk sykdomsskår. $P < 0,05$ betraktes som signifikant.

20

Utsettelse av sykdomsforekomst, klinisk skår og utsettelse av død er blitt sammenliknet mellom hver gruppe og ved referanse "immu" gruppen med Kaplan-Meier-kurver og en Cox-modell (*R* package "survival"). Resulterende *p*-verdier er unilaterale og tester hypotesen til å være bedre enn referanse "immu" gruppen.

25

Den totale kliniske skår er sammensatt av haleskåren, bakbenskåren, forbenskåren og blæreskåren som beskrevet nedenfor:

30 Haleskår:

Skår=0	En normal mus holder sin hale oppreist under bevegelse.
Skår=1	Dersom halens ytterste ende er slapp med en tendens til å falle.
Skår=2	Dersom halen er helt slapp og sleper på bordet.

Bakbenskår:

Skår=0	En normal mus har en energetisk gange og sleper ikke labbene.
Skår=1	Hvilken som helst av de etterfølgende tester er positive:

	<p>A – Flipptest: mens halen holdes mellom tommel og pekefinger, snu dyret på ryggen og observer tiden det tar for det til å rette opp seg selv. En frisk mus vil snu seg umiddelbart. En utsettelse foreslår bakkens svakhet.</p> <p>B – Plasser musen på toppen av trådburet og observer når den krysser fra én side til den andre. Dersom én eller begge ben ofte sklir mellom trådene anser vi at der er en delvis paralyse.</p>
Skår=2	Begge tidligere tester er positive.
Skår=3	En eller begge bakben viser tegn på paralyse, men noen bevegelser er beholdt; f.eks.: dyret kan gripe og holde seg fast til undersiden av trådburtoppen i et kort øyeblikk før det slipper.
Skår=4	Når begge bakben er paralyisert og musen sleper dem ved bevegelse.

Forbenskår:

Skår=0	En normal mus anvender forlabbene aktivt for å gripe og gå, og holder hodet oppreist.
Skår=1	Gåing er mulig men vanskelig, på grunn av svakhet i én eller begge labbene, f.eks. betraktes forlabbene som svake når musen har vanskelig for å gripe undersiden av toppen av trådburet. Et annet tegn på svakhet er at hodet faller.
Skår=2	Når ett forben er paralyisert (umulig å gripe og musen snur seg omkring det paralyserte ben). På dette tidspunkt har hodet også tapt mye av sin muskeltonus.
Skår=3	Musen kan ikke bevege seg, og mat og vann er uoppnåelig.

5

Blæreskår:

Skår=0	En normal mus har full kontroll på sin blære.
Skår=1	En mus betraktes som inkontinent når nedre kroppsdel er gjennombløtt med urin.

10

Den globale skår for hvert dyr bestemmes ved addisjon av alle de ovenfor nevnte kategorier. Den maksimale skår for levende dyr er 10.

Resultater – kombinasjonsterapier er effektive i en MS-modell

En signifikant forbedring av global klinisk skår observeres i "EAE+ behandlingsgruppe" mus for baklofen- og akamprosatkombinasjon.

5 Kombinasjonen av baklofen (30 mg/kg/dag) og akamprosat (2 mg/kg/dag) induserte en signifikant beskyttende effekt mot utvikling av kronisk progressiv EAE og bekreftet
 10 følgelig den fordelaktige effekten av preparatet ved behandling av multippel sklerose (figur 18). Med mer enn 30 % reduksjon i symptomene, viser resultatene klart at kombinasjonen induserer en signifikant reduksjon av sykdomsutvikling fra dag 13. Dette resultat bekrefter den bemerkelsesverdige positive effekt av baklofen-
 15 akamprosatkombinasjon på nevronal beskyttelse som inkluderer demyelisering og dens implikasjoner. Sett under ett, viser disse resultater at denne kombinasjon muliggjør effektiv beskyttelse av nevroner mot en rekke stress som er involvert i utviklingen av nevrologisk sykdom, slik som β amyloid, BBB-nedbrytning, glutamat-eksitotoksisitet eller demyelinisering.

II. BESKYTTENDE EFFEKT AV KOMBINASJONER I MODELLER MED ALS

Effekten av kombinasjonsterapier ifølge den foreliggende oppfinnelse på ALS er blitt demonstrert in vivo, i en ko-kulturmodell og in vivo i en musemodell av ALS. Protokoller og resultater er presentert i denne delen.

II.1 Beskyttende effekt mot glutamat-toksisitet i primære kulturer av nervemuskel ko-kultur

Primære ko-kulturer av nerve- og muskelceller

25 Human muskel fremstilles i henhold til en tidligere beskrevet metode fra deler av biopsier av friske pasienter (48). Muskelceller etableres fra de dissosierte celler (10000 celler pr. brønner), utplates i gelatin belagt 0,1 % på 48-brønns plater, og dyrkes i et prolifererende medium som består av en blanding av MEM-medium og M199-medium.

30 Umiddelbart etter satellittcellefusjon, ble hele tversgående snitt av 13 dager gamle Wistar rotte embryo ryggmarg med dorsal rot ganglier (DRG) festet, plassert på muskelmonolaget, 1 eksplantat pr. brønn (i midtområdet). DRG er nødvendig for å oppnå et godt forhold mellom innervasjoner. Innerverte kulturer holdes i blandet
 35 medium. Etter 24 timer i den vanlige ko-kultur observeres nevritter som vokser ut fra ryggmargs-eksplantatene. De lager kontakt med myorør og induserer de første kontraksjoner etter 8 dager. Kort deretter, er innerverte muskelfibre som er lokalisert

i umiddelbar nærhet av ryggmargs-eksplantatene stort sett kontinuerlig kontraherende. Innerverte fibre er morfologisk og romlig adskilt fra ikke-inneverte fibre og kan lett skjelnes fra dem. En ko-kultur gjennomføres (6 brønner pr. betingelse).

5

Glutamatskade

På dag 27 inkuberes ko-kulturer med kandidatforbindelser eller riluzol én time før glutamatintoksikasjon (60 μ M) i 20 min. Deretter vaskes ko-kulturer og kandidatforbindelser eller riluzol tilsettes i ytterligere 48 timer. Etter denne inkubasjonstid, inkuberes ikke-fikserte kokulturer med α -bungarotoksin koblet med Alexa 488 ved konsentrasjon 500 nmol/L i 15 min. ved romtemperatur. Deretter fikseres ko-kulturer ved PFA i 20 min. ved romtemperatur. Etter permeabilisering med 0,1 % saponin, inkuberes ko-kulturen med anti-nevrofilament antistoff (NF).

10

15

Disse antistoffer detekteres med Alexa Fluor 568 geit anti-mus IgG (molekylær probe). Kjerner i nevroner merkes med en fluorescerende markør (Hoechst oppløsning).

20

Endepunkter er (1) total nevrittelengde, (2) antall motoriske enheter, (3) totalt motorisk enhetsområde, som er indikasjon på motorisk nevronoverlevelse og funksjonalitet.

25

For hver betingelse, blir 2 x 10 bilder tatt pr. brønn, ved å anvende InCell AnalyzerTM 1000 (GE Healthcare) med 20x forstørrelse. Alle avbildninger tas ved de samme betingelser.

Resultater

Baklofen- og akamprosat-kombinasjon beskytter effektivt motoriske nevroner og motoriske enheter i ko-kulturmodellen.

30

II.2 Kombinasjonsterapier er effektive i ALS-musemodell

Forsøk gjennomføres på hannmus. Transgene hannmus B6SJL-Tg(SOD1)^{2Gur}/J-mus og deres kontroll (henholdsvis SN2726 og SN2297 fra Jackson Laboratories, Ben Harbor, USA, og distribuert av Charles River i Frankrike) velges i denne gruppen av forsøk, for å etterlikne ALS.

35

Syke mus uttrykker *SOD1-G93A*-transgenet, designet med et mutant humant *SOD1*-gen (en enkelt aminosyresubstitusjon av glysin til alanin i kodon 93) drevet ved dets endogene humane *SOD1*-promoter. Kontrollmus uttrykker kontroll humant *SOD1*-genet.

5

Randomisering av dyrene:

Gruppetildelingen og randomiseringen av dyrene er basert på kroppsvekten; for hver gruppe gjennomføres randomiseringen én dag før første behandling.

10

Legemiddeladministrering

Mus doseres med kandidatlegemiddelbehandling fortynnet i vehikkel fra 60. dag etter fødsel til død. Fortynnete oppløsninger av legemiddelkandidater fremstilt med vann ved romtemperatur like før den begynnende administrering.

15

• I drikkevann:

Riluzol tilsettes drikkevann i en sluttkonsentrasjon på 6 mg/ml (justert til gjennomsnittlig kroppsvekt for hver gruppe) i 5 % syklodekstrin. Da en mus drikker omtrent 5 ml/dag, er den estimerte administrerte dosen 30 mg/kg/dag som er en dose som ble vist til å øke overlevelsen hos mus.

20

- Syklodekstrin anvendes som en vehikkel i en sluttkonsentrasjon på 5 %, fortynnet i vann ved romtemperatur fra stamoppløsning (syklodekstrin 20 %).

25

• Oral administrering (per os):

- Legemiddelkombinasjoner administreres per os, daglig.
- Syklodekstrin anvendes som vehikkel i sluttkonsentrasjon på 5 %, fortynnet i vann ved romtemperatur fra stamoppløsning (syklodekstrin 20 %).

30

Klinisk observasjon

Den kliniske observasjon for hver mus gjennomføres daglig, fra den første behandlingsdag (60 dagers alder) inntil død (eller avliving). Klinisk observasjon består i å studere atferdsmessige tester: inntreden av paralyse, "loss of splay", tap av "rette seg opp" refleks, og generell gange-observasjon:

35

- Inntreden av paralyse: observasjonen består av paralyseobservasjon av hver fot. Inntreden av paralyse svarer til dagen for de første tegn på paralyse.
- "Loss of splay" testen består av rapportering angående skjelvinger eller rysting, og posisjonen til bakfoten (henging eller utstrekking) når musen er opphengt i halen.
- Testen for tap av rette seg opp reflekser evaluerer musens evne til å rette seg selv i løpet av 30 min. etter at den er snudd på hver side. Rette seg opp refleksen er tapt når musen ikke er i stand til å rette seg opp. Tap av rette seg opp reflekser bestemmer sykdommens sluttstadium: mus som ikke er i stand til selv å rette seg opp, avlives.

Resultater – kombinasjonsterapier er effektive i ALS in vivo modell

En forbedring av sykdommen observeres for de syke dyrene behandlet med baklofen- og akamprosat-kombinasjon.

III) BESKYTTENDE EFFEKT AV KOMBINASJONER I OKSALIPLATININDUSERT NEVROPATI SOM EN IN VIVO MODELL FOR NEVROPATISK SMERTE

Kombinasjonsterapier ifølge foreliggende oppfinnelse testes in vivo, i passende modeller for perifer nevropati, dvs. akutt modell av oksaliplatinindusert nevropati, og kronisk modell av oksaliplatinindusert nevropati. Dyrene, protokoller og resultater er angitt i dette avsnitt.

Dyrehold

Sprague-Dawley rotter (CERJ, FRANKRIKE) som veide 150-175 g på begynnelsen av eksperimentet med oksaliplatinbehandlingen (D₀) anvendes. Dyr innkvarteres i en dyrefasilitet med begrenset tilgang ved et temperatur (19,5°C-24,5°C) og relativ fuktighet (45 %-65 %) kontrollert rom med en 12 t – lys/mørke-syklus, med ad libitum tilgang til standard pelletert laboratoriefôr og vann gjennom studien. Dyr innkvarteres 4 eller 5 pr. bur, og en én ukes akklimatiseringsperiode observeres før noen testing.

Eksperimentell design

Fire følgende grupper av rotter anvendes i alle forsøk:

35

Kontrollgrupper:

Gruppe 1: Vehikkel av oksaliplatin (destillert vann), i.p./vehikkel av kandidatkombinasjon(er) (destillert vann), p.o. daglig.

5 Gruppe 2: Oksaliplatin (destillert vann), i.p./vehikkel av kandidatkombinasjon(er) (destillert vann), p.o. daglig.

Gruppe 3: Oksaliplatin 3 mg/kg i.p./enkeltlegemiddel i destillert vann, p.o. daglig x 9.

Testet preparatgrupper:

10 Gruppe 4: Oksaliplatin 3 mg/kg i.p./kandidatkombinasjon(er) i destillert vann, p.o. daglig x 9.

Gruppe 5: Oksaliplatin 3 mg/kg i.p./gabapentin (100 mg/kg) i destillert vann, p.o. på forsøksdager (dvs. D₁ og D₈).

15

Vehikkel og testgjenstander avleveres daglig fra D-1 til D7 (dagen før siste forsøksdag) mens gabapentin administreres på forsøksdager (120 minutter før testen). Alle behandlinger administreres i en kodet og tilfeldig rekkefølge når det er mulig. Doser uttrykkes som fri aktiv substans.

20

Nevropati-induksjon

Akutt nevropati induseres ved en enkelt intraperitoneal injeksjon av oksaliplatin (3 mg/kg). Kronisk perifer nevropati induseres ved gjentatte intraperitoneale injeksjoner av oksaliplatin (3 mg/kg, i.p.) på dager 0, 2, 4 og 7 (CD = 12 mg/kg, i.p.). Kronisk nevropati er også kumulativ og ses mest vanlig i pasienter som har mottatt totale doser av oksaliplatin > eller = 540 mg/m² som tilsvarer ~ 15 mg/kg som kumulativ dose i rotter (Cersosimo R.J. 2005).

25

Den oksaliplatininduserte smertefulle nevropati i rotter reproducerer smertesymptomene i oksaliplatinbehandlede pasienter:

30

- Den termiske hyperalgesi er det tidligste symptom. Det kan måles med acetontesten eller med halenedsenkingstesten;
- Den mekaniske hyperalgesi skjer senere. Den kan kvantifiseres med "Von Frey" testen eller ved pote-trykktesten.

35

Dosering og testing av dyr

Alle legemiddelkombinasjoner administreres fra dagen før den første intraperitoneale injeksjon av oksaliplatin 3 mg/kg (D-1) og fortsettes daglig oralt inntil D7. Under forsøksdagene (dvs. D1 og D7) administreres legemiddelkombinasjonene etter testen. Dyr fra den referansebehandlede gruppen (gabapentin) doseres kun under forsøksdagene.

Acetontest

Kald allodynia undersøkes ved å anvende acetontest ved å måle respons på termisk ikke-nociceptiv stimulering på D1 (rundt 24 t etter første injeksjon av oksaliplatin 3 mg/kg (akutt effekt av oksaliplatin), og D8 (kronisk effekt av oksaliplatin).

I acetontesten måles latens til bakfot-tilbaketrekking etter applikasjon av en dråpe aceton på plantaroverflaten av begge bakføtter (reaksjonstid) og intensiteten av responsen skåres (kald skår). Reaksjonstid inntil kjøleeffekt av aceton måles innen 20 sek. (cut-off) etter acetonapplikasjon. Responser på aceton graderes også i henhold til følgende 4-punkt skala: 0 (ingen respons); 1 (rask tilbaketrekking, rask bevegelse av poten); 2 (forlenget tilbaketrekking eller markert rask bevegelse av poten); 3 (rapportert rask bevegelse av poten med slikking eller biting).

For hver forsøksgruppe uttrykkes resultatene som:

- Reaksjonstiden definert som tiden uttrykt i sekunder som er nødvendig for å utløse potreaksjonen (gjennomsnitt av 6 målinger for hver rotte sammen \pm SEM).
- Den kumulative kaldskåren definert som summen av de 6 skårene for hver rotte sammen \pm SEM. Minimumskåren er 0 (ingen respons i noen av de 6 forsøk), og den maksimale mulige skår er 18 (gjentatt bevegelse og slikking eller biting av potene i hvert av de seks forsøk).

Statistiske analyser

Student test, unilateral, type 3 gjennomføres. Det signifikante nivået er satt til $p < 0,05$; alle gruppene sammenliknes med sykdoms+vehikkelgruppen (oksaliplatin-behandlet gruppe). Gjennomsnitt og standard feil gjennomsnitt er vist i figurene.

Resultater

Oksaliplatin induserte en signifikant reduksjon i reaksjonstid av potetilbaketrekking etter acetonapplikasjon (syk gruppe + vehikkelgruppe) under tidsforløpet. Denne

nedgang er progressiv og signifikant fra dag 1 (akutt modell av oksaliplatinindusert nevropati) til dag 8 (kronisk modell) sammenliknet med vehikkelgruppen.

• ***Anti-allodynisk effekt i akutt modell og kronisk modell for***

5 ***oksaliplatinindusert nevropati***

Baklofen- og akamprosatkombinasjon testes i begge modeller for oksaliplatinindusert nevropati. Den induserer en signifikant reduksjon i den kumulative kalde skåren, og en signifikant økning av reaksjonstid sammenliknet med oksaliplatin-

10 vehikkelbehandlet gruppe. Konkludert, beskytter denne legemiddelkombinasjon mot kronisk og akutt nevropati.

Referanser

1. Crook R. et al. (1998). A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nat Med.* 4(4): 452-5.
5
2. Houlden H., Baker M., et al. (2000). Variant Alzheimer's disease with spastic paraparesis and cotton wool plaques is caused by PS-1 mutations that lead to exceptionally high amyloid-beta concentrations. *Ann Neurol.* 48(5): 806-8.
- 10 3. Kwok J.B., Taddei K., et al. (1997). Two novel presenilin-1 mutations in early-onset Alzheimer's disease pedigrees and preliminary evidence for association of presenilin-1 mutations with a novel phenotype. *Neuroreport.* 8(6): 1537-42.
4. Verkkoniemi A., Kalimo H., et al. (2001). Variant Alzheimer disease with spastic
15 paraparesis: neuropathological phenotype. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60(5): 483-92.
5. Citron M. (2004). Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 5(9): 677-85.
- 20 6. Suh Y.H. og Checler F. (2002). Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev.* 54(3): 469-525.
7. Blacker D., Albert M.S., et al. (1994). Reliability and validity of NINCDS-ADRDA
25 criteria for Alzheimer's disease. The National Institute of Mental Health Genetics Initiative. *Arch Neurol.* 51(12): 1198-204.
8. Rossor M.N., Fox N.C., et al. (1996) Clinical features of sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurodegeneration.* 5(4): 393-7.
- 30 9. Glenner G.G., Wong C.W., et al. (1984). The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl. Pathol.* 2(6): 357-69.
10. ballatore C., Lee V.M. et al. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in
35 Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci.* 8(9): 663-72.

11. Bell K.F. og Claudio Cuello A. (2006). Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.* 545(1): 11-21.
12. Hardy J.A. og Higgins G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 256(5054): 184-5.
13. Braak H. og Braak E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82(4): 239-59.
14. Golde T.E. (2005). The Abeta hypothesis: leading us to rationally-designed therapeutic strategies for the treatment or prevention of Alzheimer disease. *Brain Pathol.* 15(1): 84-7.
15. Hardy J. og Selkoe D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 287(5580): 353-6.
16. Selkoe D.J. (2000). The genetics and molecular pathology of Alzheimer's disease: roles of amyloid and the presenilins. *Neurol Clin.* 18(4): 903-22.
17. Zlokovic B.V. The Blood Brain Barrier In Health And Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron review.* 2008, 57, 178-201.
18. Budd Haeberlein, S.L. og S.A. Lipton, *Excitotoxicity in neurodegenerative disease*, i *Encyclopedia of neuroscience*, L.R. Squire, utgiver. 2009, Elsevier. s. 77-86.
19. Hughes, J.R., *Alcohol withdrawal seizures*. *Epilepsy Behav*, 2009. **15**(2): s. 92-7.
20. Kim, A.H., G.A. Kerchner, og C. DW, *Blocking Excitotoxicity*, i *CNC Neuroprotection*, F.W. Marcoux og D.W. Choi, utgiver. 2002, Springer: New York, s. 3-36.
21. Hama A, Sagen J., Antinociceptive effect of riluzole in rats with neuropathic spinal cord injury pain. *J Neurotrauma.* 2011 jan; 28(1): 127-34.
23. Malgouris, C., et al., *Riluzole, a novel antiglutamate, prevents memory loss and hippocampal neuronal damage in ischemic gerbils*. *J Neurosci*, 1989. **9**(11): s. 3720-7.

24. Wahl, F., et al., *Effect of riluzole on focal cerebral ischemia in rats*. Eur J Pharmacol, 1993. **230**(2): s. 209-14.
25. Wahl, F., et al., *Riluzole reduces brain lesions and improves neurological function in rats after a traumatic brain injury*. Brain Res, 1997. **756**(1-2): s. 247-55.
26. McGleenon B.M., Dynan K.B. og Passmore A.P. (1999). Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br J Clin Pharmacol*. 48(4): 471-480.
27. Parsons C.G., Danysz W, Quack G. (1999). Memantine is a clinically well tolerated N-metyl-D-aspartat (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacology*. 38(6):735-67.
28. Magnaghi V, et al. GABA receptor-mediated effects in the peripheral nervous system: a cross-interaction with neuroactive steroids. *Journal of Molecular neuroscience*. 2006, 28:89-102.
29. Ettmayer, P., Amidon, G. L., Clement, B. & Testa, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem*. 47, 2393-2404 (2004).
30. Beaumont, K., Webster, R., Gardner, I. & Dack, K. Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist. *Curr. Drug Metab*. 4, 461-485 (2003).
31. heimbach, T. et al. Enzyme-mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs. *Int. J. Pharm*. 261, 81-92 (2003).
32. Yang, C. Y., Dantzig, A. H. & Pidgeon, C. Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm. Res*. 16, 1331-1343 (1999).
33. Steffansen, B. et al. Intestinal solute carriers: an overview of trends and strategies for improving oral drug absorption. *Eur. J. Pharm. Sci*. 21, 3-16 (2004).
34. Stella, V. et al. Prodrugs: Challenges and Rewards (AAPS, New York, 2007).
35. Wermuth, CG. The Practice of Medicinal Chemistry. (Hardbound, 2003). Del VI, kapittel 33: Designing prodrugs and bioprecursors.

36. Pezron, I. et al. Prodrug strategies in nasal drug delivery. *Expert Opin. Ther. Pat.*, bind 12, nr. 3, 331-340 (2002).
- 5 37. Stella, V. J. Prodrugs as therapeutics. *Expert Opin. Ther. Pat.* 14, 277-280 (2004).
38. Stella, V. J. & Nti-Addae, K. W. Prodrug strategies to overcome poor water solubility. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 677-694 (2007).
- 10 39. Higuchi, T.; Stella V. red. Prodrugs As Novel Drug Delivery Systems. *ACS Symposium Series*. American Chemical Society: Washington, DC (1975). 31.
40. Roche, E. B. Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs. *American Pharmaceutical Association: Washington, DC* (1977).
- 15 41. Lal, R., et al., Arbaclofen placarbil, a novel R-baclofen prodrug: improved absorption, distribution, metabolism and elimination properties compared with R-baclofen. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. 330(3): s. 911-21.
- 20 42. Feng Xu, Ge Peng, Thu Phan, Usha Dilip, Jian Lu Chen, Tania Chernov-Rogan, Xuexiang Zhang, Kent Grindstaff, Thamil Annamalai, Kerry Koller, Mark A. Gallop, David J. Wustrow, *Discovery of a novel potent GABAB receptor agonist*; *Bioorg Med Chem Lett*. 2011 nov. 1; 21(1): 6582-5).
- 25 43. Andrew R. Leach, Valerie J. Gillet. *An Introduction to Chemoinformatics*. Springer 2007.
44. S. Asad Rahman, M. Bashton, G. L. Holliday, R. Schrader og J. M. Thornton: Small Molecule Subgraph Detector (SMSD) Toolkit, *Journal of Cheminformatics* 2009, 1:12
30 doi:10.1186/1758-2946-1-12.
45. Stahl H., Wermuth C. G. (red.) *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*. Wiley-VCH; 2. Utgave (29. mars 2011).
- 35 46. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, Gautam B. Hassanali M. *DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets*. *Nucleic Acids Res.* 36, Issuesuppl 1. D901-D906 (2008).

47. Singer C. et al. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J. Neuroscience*, 1999, 19(7):2455-2463.
- 5
48. Braun S, Croizatb B, Lagrangec MC, Wartera JM, Poindron P. *Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord-human muscle cocultures*. *Bind 136*, utstedt 1.-2. mars 1996, sidene 17-23.
- 10
49. Meunier J, Ieni J. Maurice T. *The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid ~25-35 peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the G, reseptor*. *Br J Pharmacol*. 149, 998-1012, 2006.

PATENTKRAV

1. Preparat som omfatter baclofen og akamprosot, eller farmasøytisk aksepterbare salter derav, for anvendelse i behandling av Alzheimers sykdom eller en relatert sykdom valgt fra senil demens av AD-type (SDAT), Lewy legeme demens, mild kognitiv svekkelse (MCI) og aldersassosiert hukommelsessvekkelse (AAMI).
2. Preparat for anvendelse ifølge krav 1, som videre omfatter minst én ytterligere forbindelse valgt fra gruppen som består av sulfisoksazol, metimazol, prilokain, dyfyllin, quinakrin, karbenoksolon, aminokapronsyre, kabergolin, dietylkarbamazin, cinacalcet, cinnalrizin, eplerenon, fenoldopam, leflunomid, levosimendan, sulodeksid, terminafin, zonisamid, etomidat, fenformin, trimetazidin, meksiletin, ifenprodil, moksifloksacin, bromkriptin eller torasemid, eller farmasøytisk aksepterbare salter derav.
3. Preparat for anvendelse ifølge krav 1 eller 1, som omfatter minst:
baklofen og acamprosot,
baklofen og acamprosot og dietylkarbamazin,
baklofen og acamprosot og cinacalcet,
baklofen og acamprosot og sulfisoksazol,
baklofen og acamprosot og torasemid,
baklofen og acamprosot og ifenprodil,
baklofen og acamprosot og meksiletin,
baklofen og acamprosot og eplerenon,
baklofen og acamprosot og levosimendan,
baklofen og acamprosot og terbinafin, eller
baklofen og acamprosot og leflunomid,
eller farmasøytisk aksepterbare salter derav.
4. Preparat for anvendelse ifølge krav 1, som omfatter minst:
- baklofen, akamprosot og donepezil,
- baklofen, akamprosot og rivastigmin, eller
- baklofen, akamprosot og memantin,
eller farmasøytisk akseptable salter derav.
5. Preparat for anvendelse ifølge krav 1, som omfatter baklofen og akamprosot som det eneste aktive midlet.

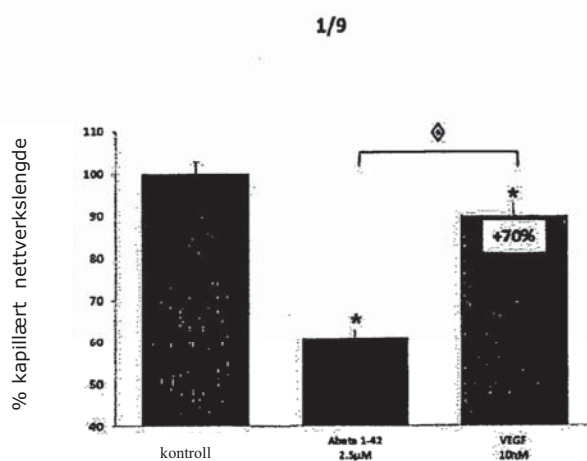
6. Preparat for anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1-5, og hvor forbindelsene er blandet med en farmasøytisk akseptert bærer eller eksipiens.
- 5 7. Preparat for anvendelse ifølge hvilke som helst av kravene 1-6, hvor forbindelsene er formulert eller administrert sammen, separat eller påfølgende.
8. Preparat for anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1-7, hvor forbindelsene er gjentakende administrert til individet.
- 10 9. Preparat for anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1-8, hvor forholdet akamprosat/baklofen (vekt:vekt) er mellom 0,05 og 1000.
- 15 10. Preparat for anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1-9, hvor dosen av baklofen er mindre enn 100 mg/dag.
11. Preparat for anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1-10, hvor dosen av akamprosat er mindre enn 1000 mg/dag.
- 20 12. Preparat for anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1-11, hvor et kalsiumsalt av akamprosat anvendes.
- 25 13. Baklofen eller et farmasøytisk akseptert salt derav, i kombinasjon med minst akamprosat eller et farmasøytisk akseptert salt derav, for anvendelse i behandling av Alzheimers sykdom eller en relatert sykdom valgt fra senil demens av AD-type (SDAT), Lewy legeme demens, mild kognitiv svekkelse (MCI) og aldersassosiert hukommelsessvikt (AAMI).
- 30 14. Baklofen eller et farmasøytisk akseptert salt derav, i kombinasjon med minst akamprosat eller et farmasøytisk akseptert salt derav, for anvendelse i forbedring av kognitive symptomer i et individ som lider av eller som er disponert for eller som mistenkes for å lide av Alzheimers sykdom.
- 35 15. Baklofen eller et farmasøytisk akseptert salt derav, i kombinasjon med minst akamprosat eller et farmasøytisk akseptert salt derav, for anvendelse i beskyttelse av nevronale celler mot amyloid-beta og/eller glutamat-toksisitet, i et

individ som lider av, som er disponert for eller som mistenkes for å lide av Alzheimers sykdom.

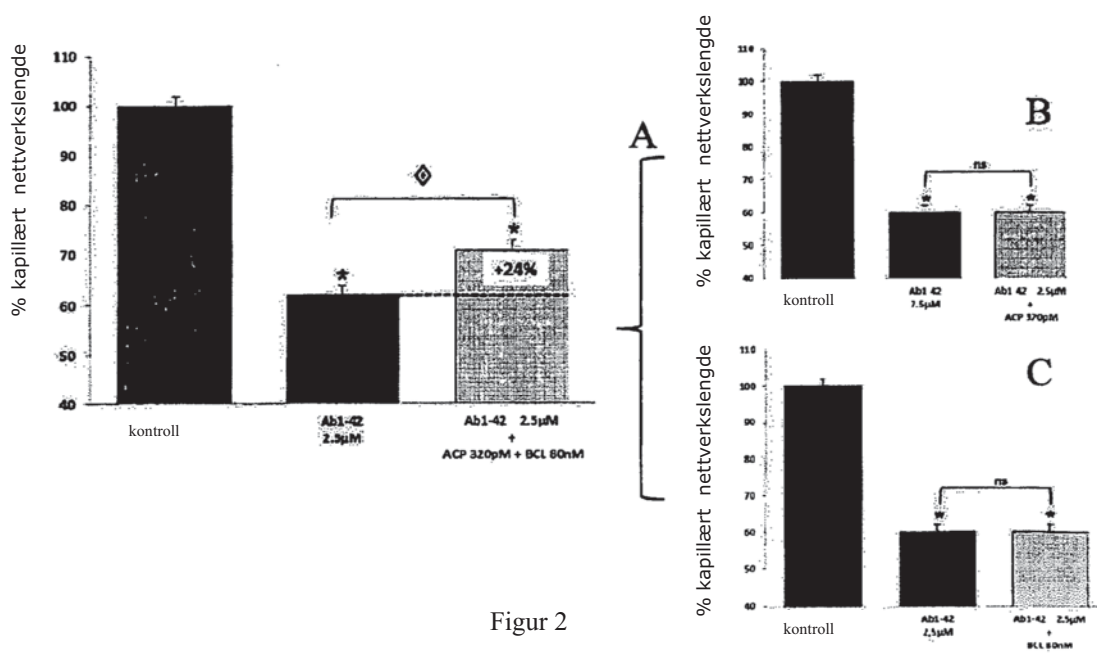
5 16. Preparat som omfatter baklofen, akamprosatsat og donepezil, eller farmasøytisk aksepterbare salter derav.

17. Preparat for anvendelse ifølge krav 11, hvor dosen av akamprosatsat er mellom 1 og 400 mg/dag, foretrukket mellom 1 og 200 mg/dag.

10 18. Preparat for anvendelse ifølge krav 17, hvor dosen av akamprosatsat er mellom 1 og 50 mg/dag.



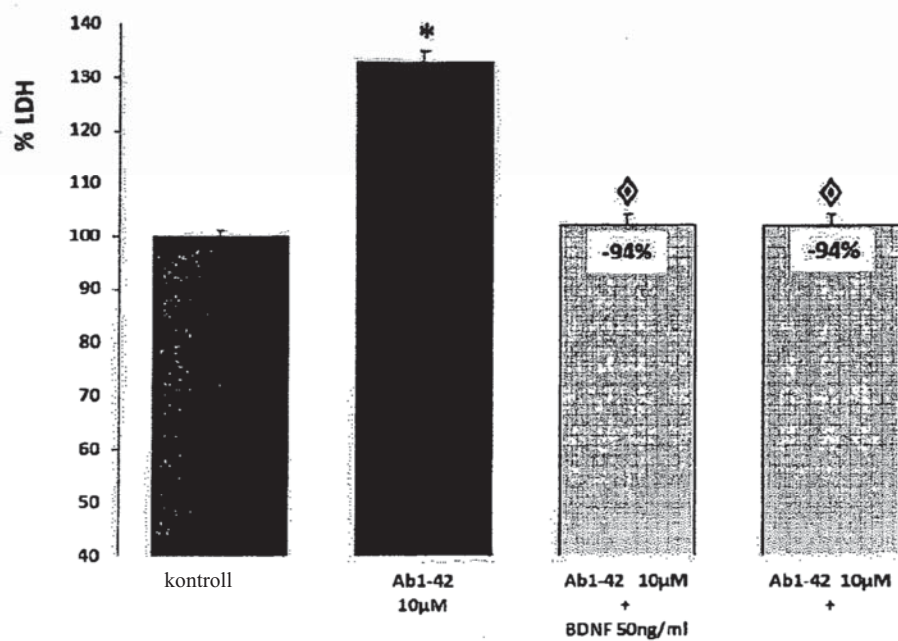
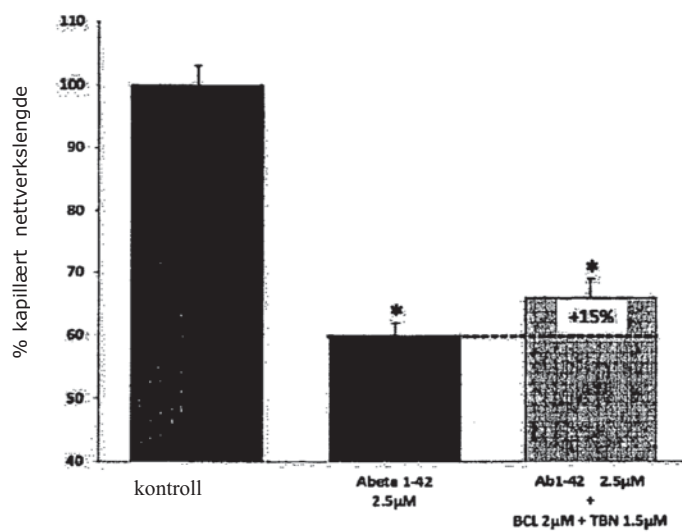
Figur 1



Figur 2

65

2/9



3/9

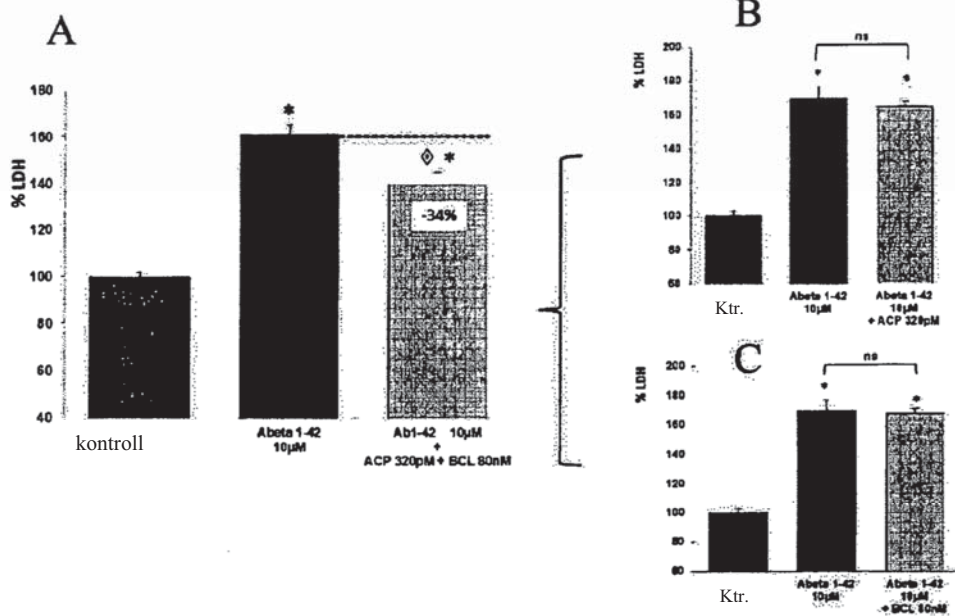


Figure 5

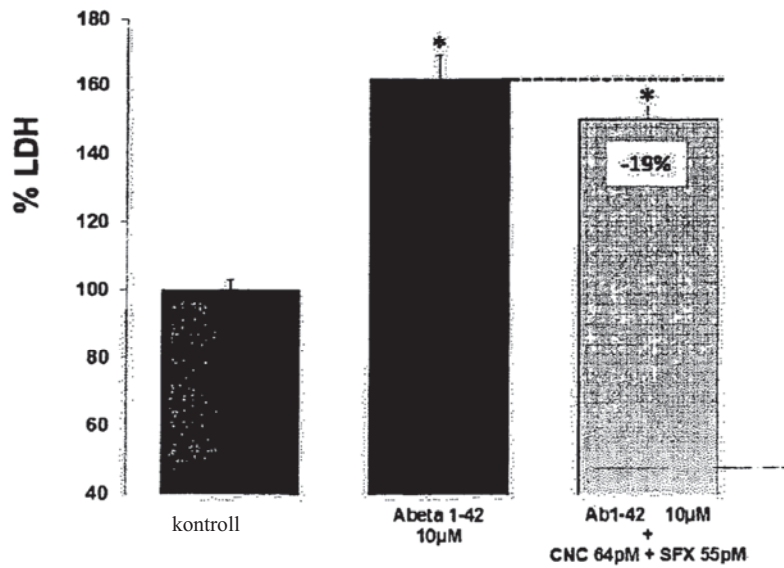
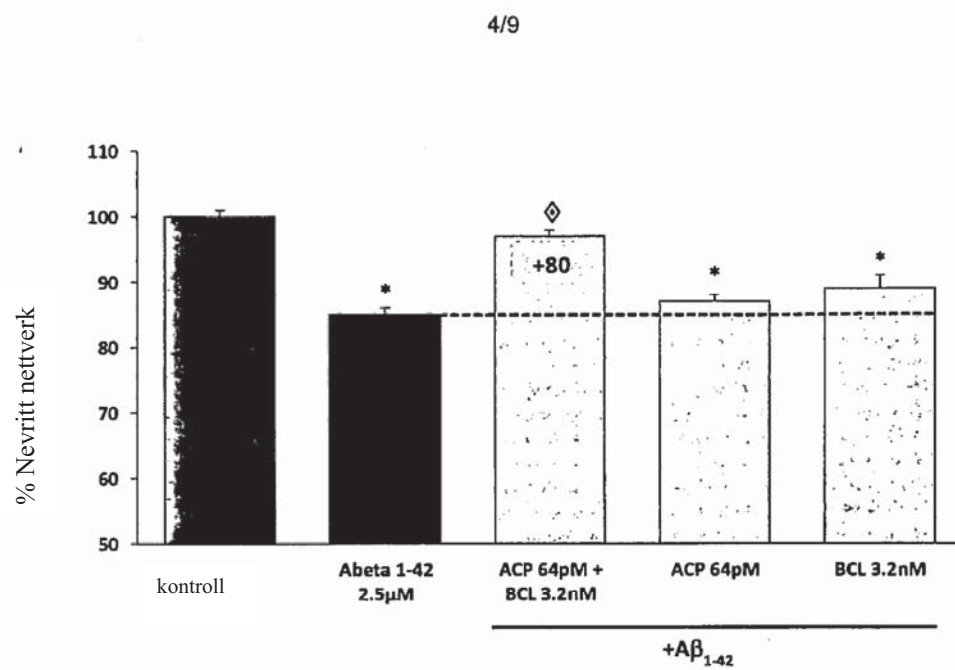
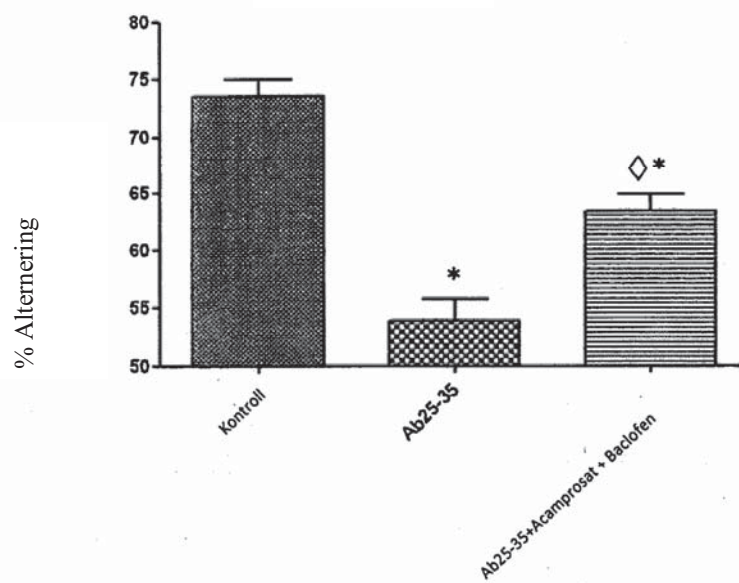


Figure 6

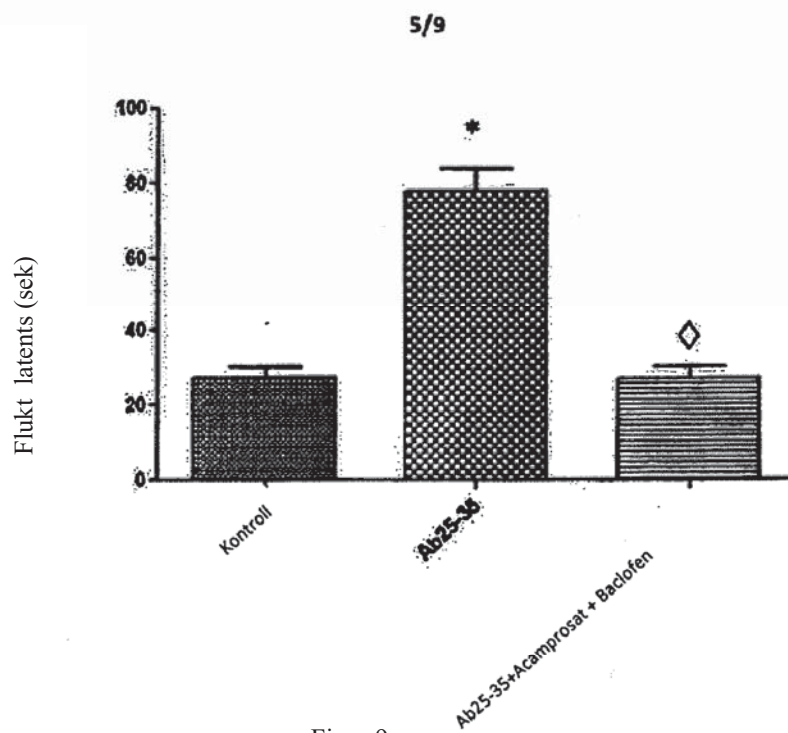
67



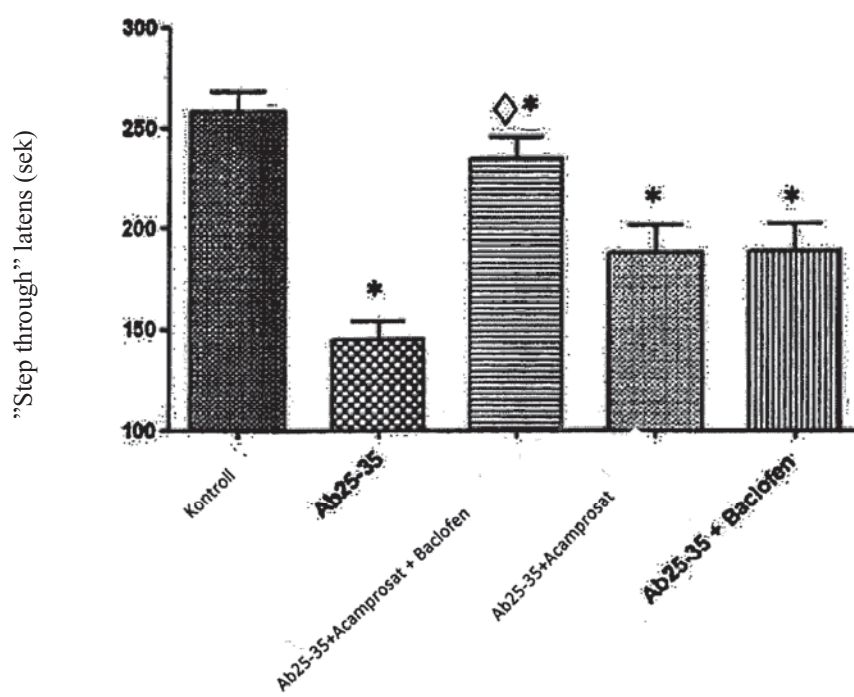
Figur 7



Figur 8

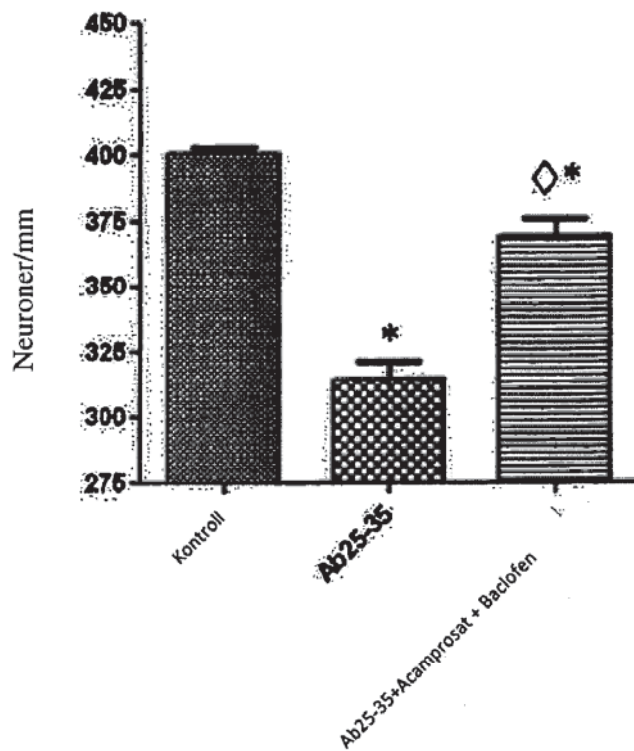


Figur 9

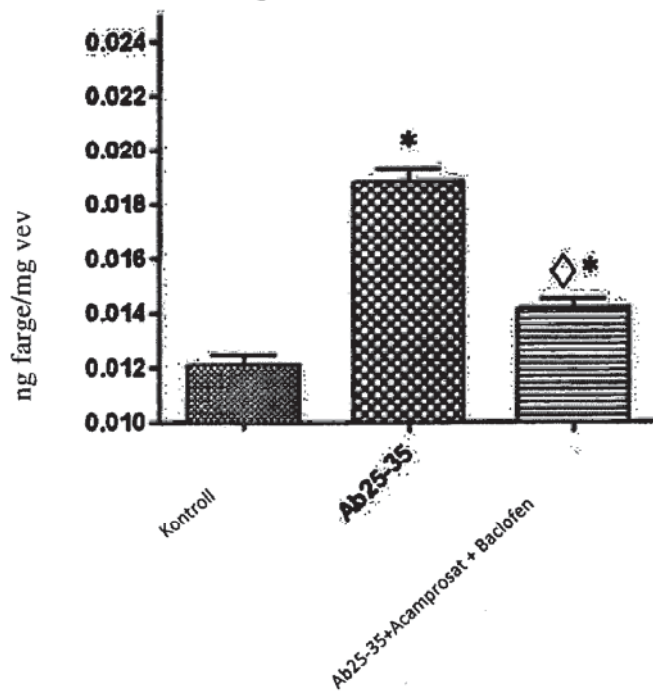


Figur 10

6/9



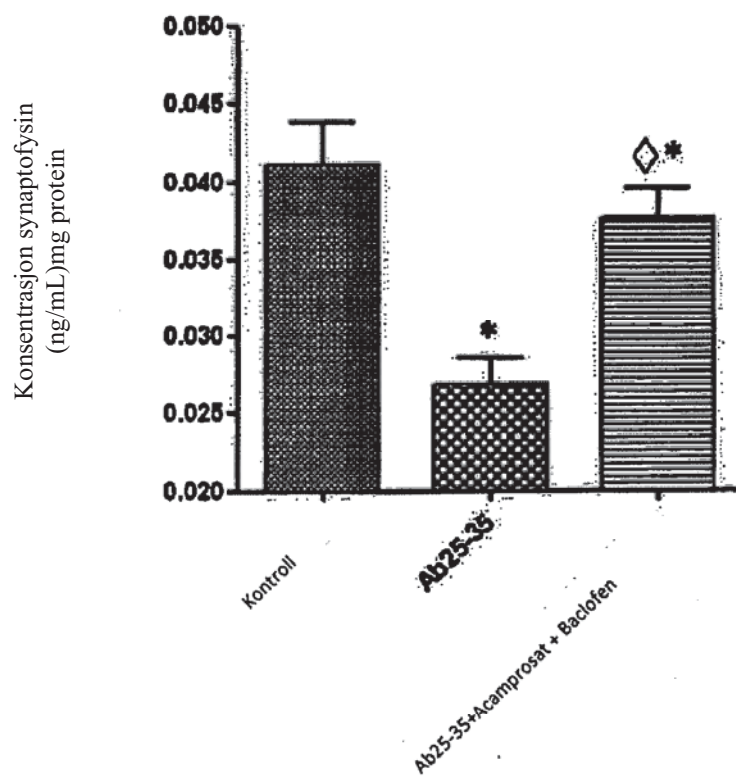
Figur 11



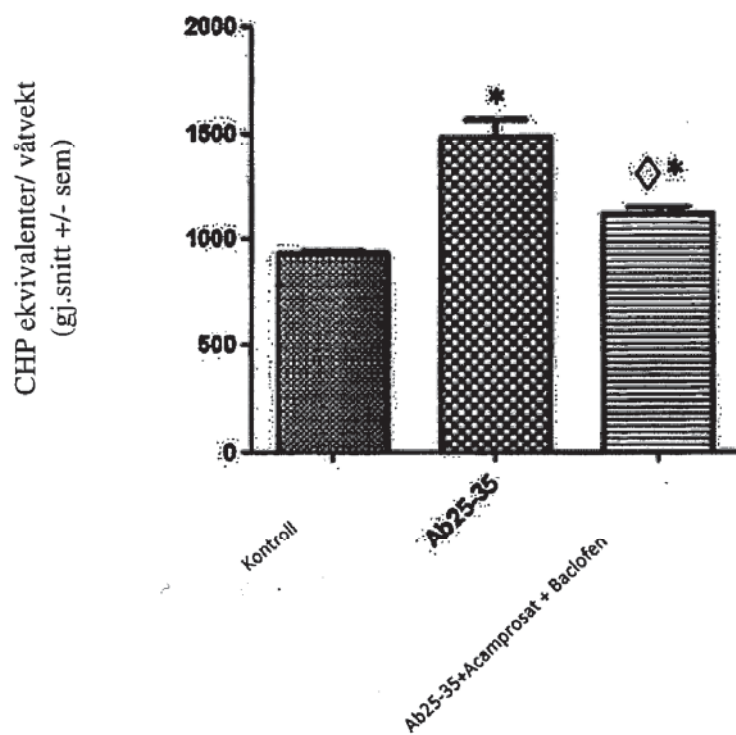
Figur 12

70

7/9

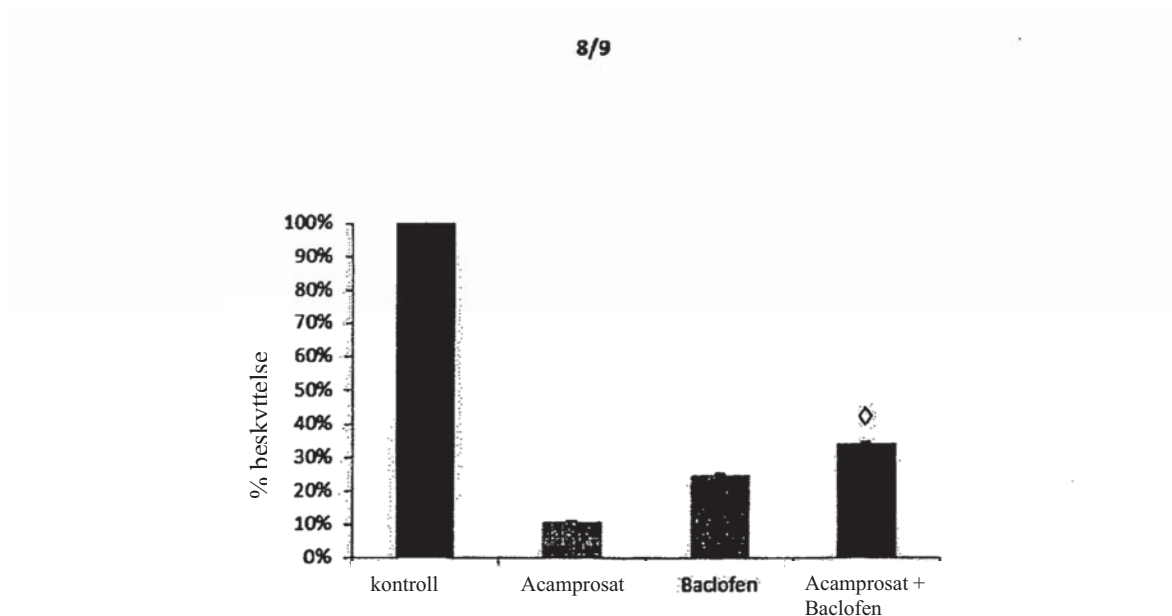


Figur 13

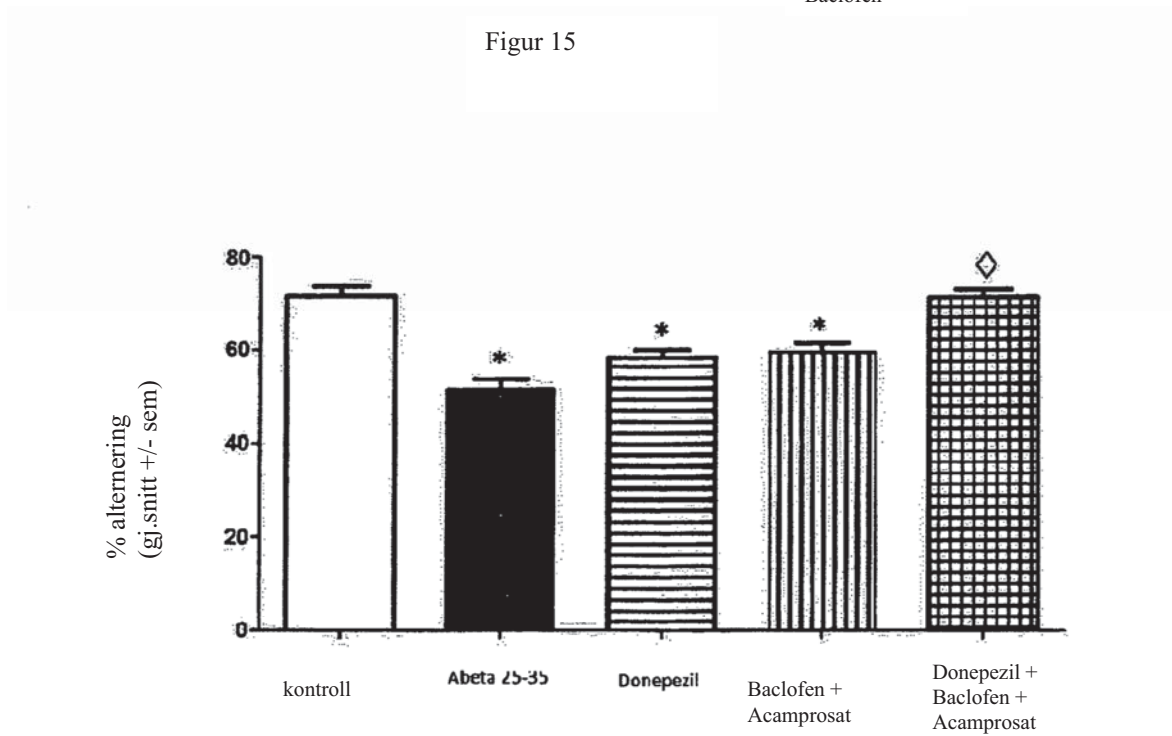


Figur 14

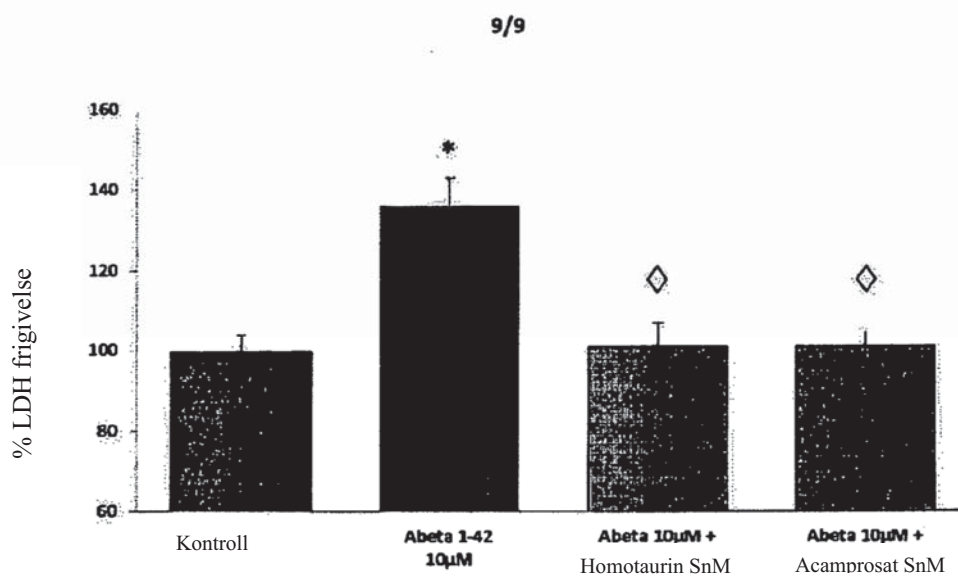
71



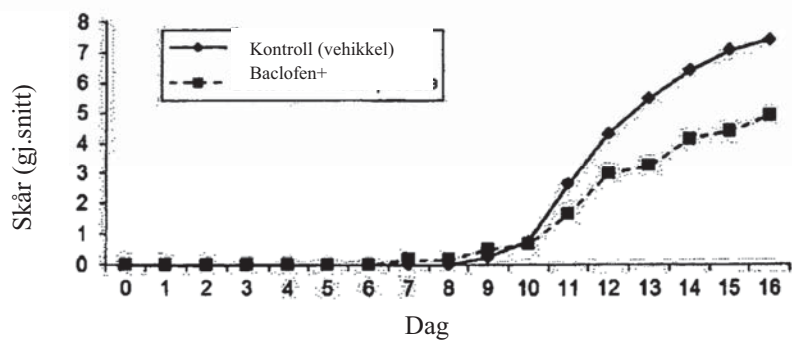
Figur 15



Figur 16



Figur 17



Figur 18