РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 582 223** (13) **C2**

(51) МПК
A61K 36/24 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2012134341/15, 10.01.2011**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.01.2011

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
11.01.2010 US 61/293,812

(43) Дата публикации заявки: **20.02.2014** Бюл. № **5**

(45) Опубликовано: **20.04.2016** Бюл. № **11**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **13.08.2012**

(86) Заявка PCT:
US 2011/020672 (10.01.2011)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2011/085307 (14.07.2011)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры"

(72) Автор(ы):
ЭДДИНГТОН Отис С. (US),
НЬЮМАН Роберт А. (US)

(73) Патентообладатель(и):
ФЕНИКС БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ИНК. (US)

RU 2582223 C2

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ СЕРДЕЧНЫМИ ГЛИКОЗИДАМИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к способу лечения неврологического состояния, выбранного из болезни Альцгеймера, болезни Хантингтона и инсульта. Способ лечения неврологического состояния, выбранного из болезни Альцгеймера, болезни Хантингтона и инсульта у индивидуума, включающий: введение композиции, содержащей сердечный гликозид в эффективном количестве, где сердечный гликозид является олеандрином, включенным в экстракт, полученный сверхкритической флюидной экстракцией из растительной массы олеандра CO_2 или сверхкритической флюидной экстракцией из растительной массы олеандра CO_2 в присутствии модификатора, выбранного из метанола, этанола и пропанола, и экстракт дополнительно содержит одно или несколько других терапевтически эффективных средств, полученных вместе с сердечным гликозидом при экстракции, включающих, по меньшей мере, олеазид А, олеандригенин, нериталозид и одорозид, при этом сердечный гликозид исключает нерифолин. Способ улучшения клинического статуса статистически значимого количества индивидуумов в популяции индивидуумов с неврологическим состоянием. Способ снижения или предотвращения повышения частоты развития неврологического состояния. Отсроченный способ лечения инсульта у индивидуума. Вышеописанный способ

RU 2582223 C2

эффективен для лечения неврологического состояния, выбранного из болезни Альцгеймера, болезни Хантингтона и инсульта. 4 н. и 24 з.п. ф-лы, 7 ил., 13 пр.

(56) (продолжение):
US 20060135443 A1, 22.06.2006. US 20080200401 A1, 21.08.2008. WANG et all. Cardiac glycosides provide neuroprotection against ischemic stroke: discovery by a brain slice-based compound screening platform //Proc Natl Acad Sci USA. 5 Jul 2006, 103(27). US 20070026092 A1, 01.02.2007.

RU 2582223 C2

RU 2582223 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 582 223** (13) **C2**

(51) Int. Cl.
A61K 36/24 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2012134341/15, 10.01.2011**

(24) Effective date for property rights:
10.01.2011

Priority:
(30) Convention priority:
11.01.2010 US 61/293,812

(43) Application published: **20.02.2014** Bull. № **5**

(45) Date of publication: **20.04.2016** Bull. № **11**

(85) Commencement of national phase: **13.08.2012**

(86) PCT application:
US 2011/020672 (10.01.2011)

(87) PCT publication:
WO 2011/085307 (14.07.2011)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3, OOO "JUridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):
EDDINGTON Otis S. (US),
NJUMAN Robert A. (US)

(73) Proprietor(s):
FENIKS BAJOTEKNOLODZHI, INK. (US)

RU 2582223 C2

(54) METHOD OF TREATING NEUROLOGICAL DISORDERS WITH CARDIAC GLYCOSIDES

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutics.

SUBSTANCE: invention refers to pharmaceutical industry, namely to a method of treating a neurological disorder specified in Alzheimer disease, Huntington disease and cerebral accident. A method of treating a neurological disorder specified in Alzheimer disease, Huntington disease and cerebral accident in an individual involving: administering a composition containing a cardiac glycoside in an effective amount, wherein the cardiac glycoside is oleandrin as a part of an extract produced by supercritical fluid extraction from vegetable mass of oleander in CO_2 or supercritical fluid extraction from vegetable mass of oleander in CO_2 in the presence of a modifier specified in methanol, ethanol and propanol; the extract additionally contains one or more other therapeutically effective agents taken together with the cardiac glycoside in extraction, containing at least oleaside A, oleandrigenine, neritaloside and odoroside; the cardiac glycoside contains nerifoline. A method for improving the clinical status of a statistically significant number of individuals in the population of individuals with the neurological disorder. A method for reducing or preventing a higher frequency of neurological disorder development. A remote method of treating cerebral accident in the individual.

EFFECT: method is effective for treating the neurological disorder specified in Alzheimer disease, Huntington disease and cerebral accident.

28 cl, 7 dwg, 13 ex

RU 2582223 C2

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способу лечения неврологических состояний соединениями сердечных гликозидов или содержащими их препаратами. В частности, изобретение относится к способу лечения неврологического заболевания или нарушения посредством введения сердечного гликозида нуждающемуся в этом индивидууму.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Неврологические заболевания и нарушения влияют на функционирование головного мозга. Предпринимали множество попыток разработать лечебные или смягчающие способы терапии данных заболеваний и нарушений; однако, не разрабатывали всеобъемлющую или универсальную лечебную терапию, хотя существует множество медикаментозных подходов, доказавших свою эффективность против различных заболеваний и нарушений.

Болезнь Хантингтона (HD) является наследственным заболеванием головного мозга, затрагивающим нервную систему. Оно вызвано дефектным геном, который передается от родителя к ребенку. Ген HD влияет на производство конкретного белка, известного как "хантингтин", по-видимому, являющегося ключевым для правильного развития мозга. Классические признаки HD включают эмоциональные, когнитивные и моторные нарушения. Болезнь Хантингтона характеризуется отрывистыми непроизвольными движениями (хореей), но иногда вызывает ригидность без аномальных движений, изменения в использовании конечностей (апраксию), потерю контроля функций организма и деменцию, в том числе прогрессирующее ухудшение памяти, скорости мышления, суждения и недостаточное осознание проблем и планирования. Не существует известного лечения болезни Хантингтона. Хотя существует ряд лекарственных средств для помощи в контролировании симптомов, связанных с HD, таких как эмоциональные и двигательные проблемы, не существует лечения для остановки или реверсирования течения заболевания. Болезнь Хантингтона понимают как заболевание с общей мембранной аномалией. В мембранах эритроцитов и базальных ганглиев пациентов с болезнью Хантингтона наблюдают значимо повышенные уровень и активность (10-кратное повышение) Na/K-АТФазы по сравнению с нормальными (Butterfield DA, Oeswein JQ, Prunty ME, Hisle K.C., Markesbery W.R.). Increased sodium, potassium adenosine triphosphatase activity in erythrocyte memberanes in Huntington's diseased. Ann Neurology, 4: 60-62, 1978) мембранами фибробластов, полученных из кожи пациентов с болезнью Хантингтона (Schroeder F, Goetz IE, Roberts E, Membrane anomalies in Huntington's disease fibroblasts. J. Neurochem. 43: 526-539, 1984).

Болезнь Альцгеймера является формой деменции, нейродегенеративным заболеванием, поражающим мыслительные функции головного мозга (память, ориентацию, вычисление и т.д.), но обычно с сохранением его моторной функции. При болезни Альцгеймера умственные способности постепенно ухудшаются, вызывая потерю памяти, спутанность сознания, дезориентацию, нарушенное суждение и другие проблемы, которые могут влиять на способность индивидуума выполнять нормальную повседневную деятельность. Тип, тяжесть, последовательность и прогрессирование психических изменений сильно различаются. Не существует известного лечения болезни Альцгеймера и известного способа замедлять ее прогрессирование. Для некоторых людей на ранних или средних стадиях заболевания лекарственное средство, такое как такрин, может облегчать некоторые когнитивные симптомы. Арисепт (донепезил) и экселон (ривастигмин) являются обратимыми ингибиторами ацетилхолинэстеразы, предписываемыми для лечения от легкой до умеренной деменции по типу болезни Альцгеймера. Данные лекарственные средства (называемые ингибиторами холинэстераз)

действуют, повышая уровни нейромедиатора ацетилхолина в головном мозге, помогая восстанавливать связь между клетками головного мозга. Некоторые лекарственные средства могут помогать контролировать поведенческие симптомы, такие как бессонница, возбуждение, бродяжничество, тревожность и депрессия. Данные способы лечения направлены на то, чтобы пациенту стало комфортнее. Хотя не известно лекарственное средство для излечения болезни Альцгеймера, ингибиторы холинэстераз могут улучшать выполнение повседневной деятельности или снижать поведенческие проблемы. Тестируемые в настоящее время лекарственные средства для лечения болезни Альцгеймера включают эстрогены, нестероидные противовоспалительные средства, витамин Е, селегилин (карбекс, элдеприл) и растительный препарат гинкго билоба.

В нормальных условиях нейроны сохраняют свой мембранный потенциал покоя и функции, регулируемые мембраносвязанными, гомеостатическими, энергозависимыми Na/K-АТФазными насосами. Ишемия запускает изменения ионного гомеостаза, потенциально приводящие к необратимым повреждениям ткани. Предполагают, что нарушенная активность Na/K-АТФазы играет роль в нейропатологическом и апоптотическом процессах на некоторых моделях фокальной ишемии и травматического повреждения головного мозга. Показано, что роль Na/K-АТФазы в инсульт-опосредованном ишемическом повреждении головного мозга связана с несколькими различными молекулярными механизмами. Ингибирование каталитической активности Na/K-АТФазы может, например, приводить к снижению потребления АТФ при ишемии-реперфузии. Кроме того, удаление цитозольного Ca^{2+} может вызывать гибель нервных клеток. Таким образом, ингибирование Na/K-АТФазы, такое как ингибирование сердечными гликозидами, может приводить к повышению уровней внутриклеточного Ca^{2+} и снижению выхода внутриклеточного Ca^{2+} через Na-Ca обменник. В соответствии с этим, в нейронах гиппокампа CA1 наблюдают относительно низкие уровни внутриклеточного Ca^{2+} через три дня после транзиторной ишемии и считают, что повышение уровней кальция обеспечивает защиту от поздней гибели нейронов в широком диапазоне времени постишемического лечения.

Один из фармакологических механизмов действия сердечных гликозидов включает их способность связываться с ионообменным насосом, Na/K-АТФазой, и ингибировать активность данного конкретного фермента. Na/K-АТФаза, трансмембранный белок, катализирующий активный транспорт Na^+ и K^+ через цитоплазматическую мембрану, является общепризнанным фармакологическим рецептором для сердечных гликозидов. Данный фермент гидролизует АТФ и использует свободную энергию для запуска транспорта K^+ в клетку и Na^+ из клетки против их электрохимических градиентов (Hauptman, P. J., Garg, R., и Kelly, R. A. Cardiac glycosides in the next millennium. Prog. Cardiovasc. Dis. 41: 247-254, 1999).

Na/K-АТФаза состоит из двух гетеродимерных субъединиц, каталитической α-субъединицы и гликозилированной β-субъединицы. Также существует γ-субъединица, но она не изучена подробно. α-субъединица имеет участки связывания для АТФ, Na^+, K^+ и сердечных гликозидов. β-субъединица действует, стабилизируя α-субъединицу, а также может играть регуляторную роль. В клетках млекопитающих идентифицировали четыре различные α-изоформы (α1, α2, α3, α4) и три различные β-изоформы (β1, β2 и β3). Относительная экспрессия каждого типа субъединиц значимо изменяется в нормальном и патологическом состояниях. Кроме того, кажущееся сродство сердечных гликозидов к различным изоформам сильно отличается. Связывание сердечных

гликозидов с изоформой α1 является меньшим, чем связывание с изоформами α2 и α3, более чувствительными к ингибированию данным типом лекарственных средств в 250 раз или больше (Blanco, G. и Mercer, R. W. Isozymes of the Na,K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. Am. J. Physiol. 275 (Renal Physiol. 44): F633-F650, 1998). Sakai et al. (FEBS Letters 563: 151-154, 2004) сообщали, что в клетках колоректального рака человека экспрессия α3-изоформы субъединицы повышена по сравнению с нормальными клетками толстого кишечника.

Существует широкий диапазон относительной водорастворимости в противоположность жирорастворимости сердечных гликозидов. В то время как большинство сердечных гликозидов может связываться с Na/K-АТФазой и ингибировать ее активность, сердечные гликозиды, относительно более водорастворимые (гидрофильные), чем жирорастворимые (липофильные или гидрофобные) обладают только ограниченной способностью преодолевать липидный барьер в головном мозге, известный как гематоэнцефалический барьер. Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является границей межу циркулирующей кровью и цереброспинальной жидкостью (CSF), поддерживаемой хориоидным сплетением в центральной нервной системе (ЦНС). Эндотелиальные клетки ограничивают диффузию микроскопических объектов (например, бактерий) и больших или гидрофильных молекул в CSF, в то же время позволяя диффундировать небольшим гидрофобным молекулам (O_2, гормонам, жирорастворимым сердечным гликозидам и т.д.)

Nerium oleander является декоративным растением, широко распространенным в субтропической Азии, юго-восточной части США и Средиземноморье. Его медицинские и токсикологические свойства уже давно признаны. Его применяют, например, в лечении геморроя, язв, проказы, укусов змей и даже в вызывании абортов. Олеандрин, важный, но не единственный компонент экстракта олеандра, является сердечным гликозидом.

Экстракция гликозидов из растений видов *Nerium* предоставляет фармакологически/терапевтически активные ингредиенты *Nerium oleander*. Среди них олеандрин, нерифолин и другие соединения сердечных гликозидов. Олеандриновые экстракты, получаемые экстракцией горячей водой из *Nerium oleander*, продаваемые под торговой маркой ANVIRZEL™, содержат концентрированную форму или порошковую форму экстракта *Nerium oleander*, полученного экстракцией горячей водой. Завершена фаза I исследования экстракта олеандра, полученного экстракцией горячей водой (т.е. Anvirzel™) (Mekhail et al., Am. Soc. Clin. Oncol., vol. 20, p. 82b, 2001). Сделан вывод, что экстракт олеандра, обеспечивающий приблизительно 57 мкг олеандрина/сутки, можно безопасно вводить в дозах до 1,2 мл/м^2/сутки. Не обнаруживали ограничивающую дозы токсичность.

Huachansu является экстрактом, получаемым из кожи жабы, и он содержит буфадиенолиды, такие как буфалин, сердечный гликозид. HuaChanSu является одобренным лекарственным средством для лечения злокачественных новообразований в Китае. Его применяют для лечения различных злокачественных новообразований, включая рак печени, желудка, легких, кожи и пищевода.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к способу лечения неврологического состояния, включающему введение нуждающемуся в этом индивидууму композиции, содержащей сердечный гликозид в эффективном количестве, для лечения указанного неврологического состояния.

Другой аспект изобретения относится к способу лечения у нуждающегося в этом индивидуума неврологического заболевания или нарушения с этиологией, связанной с измененной активностью Na/K-АТФазы, композицией, содержащей сердечный

гликозид, где способ, включает:

определение того, что индивидуум страдает неврологическим заболеванием или нарушением с этиологией, связанной с измененным отношением Na/K-АТФаза α3-изоформы и α1-изоформы субъединицы или

связанной с измененной активностью Na/K-АТФазы; и

указание по введению индивидууму композиции, содержащей сердечный гликозид.

Некоторые варианты осуществления изобретения включают варианты, где: 1) индивидууму назначают и вводят терапевтически адекватную дозу композиции, содержащей сердечный гликозид; 2) индивидууму вводят композицию, содержащую сердечный гликозид, по предписанной схеме дозирования; 3) индивидууму вводят композицию, содержащую экстракт, содержащий сердечный гликозид; 4) экстракт дополнительно содержит одно или несколько других терапевтически эффективных средств, получаемых при экстракции вместе с сердечным гликозидом; 5) экстракт дополнительно содержит одно или несколько других терапевтически эффективных средств, получаемых при экстракции вместе с сердечным гликозидом; 6) композиция дополнительно содержит один или несколько других терапевтически эффективных средств, не являющихся сердечными гликозидами; и/или 7) индивидууму вводят экстракт, полученный экстракцией горячей водой из растительного или животного источника, содержащий сердечные гликозиды, в диапазоне от 2 мг до 22,5 мг в сутки, или концентрированный экстракт (например, экстракты, полученные экстракцией сверхкритическим CO_2 или экстракцией органическими растворителями) из растительного или животного источника сердечных гликозидов в диапазоне от 0,6 до 4,8 мг, или чистую химическую форму сердечного гликозида в диапазоне от 10 до 500 мкг.

Изобретение также относится к способу лечения неврологического состояния у нуждающегося в этом индивидуума, включающему:

определение того, является ли или нет неврологическое состояние у индивидуума болезнью Альцгеймера, болезнью Хантингтона, инсультом или другим неврологическим состоянием;

указание по введению сердечного гликозида;

введение начальной дозы сердечного гликозида индивидууму по предписанной начальной схеме дозирования в течение периода времени;

периодическое определение адекватности клинического ответа и/или терапевтического ответа индивидуума на лечение сердечным гликозидом; и

если клинический ответ и/или терапевтический ответ индивидуума является адекватным, то продолжают лечение сердечным гликозидом по мере необходимости до достижения желаемой клинической конечной точки; или

если клинический ответ и/или терапевтический ответ индивидуума является неадекватным при начальной дозе и начальной схеме дозирования, то применяют повышенную или сниженную дозу до достижения желаемого клинического ответа и/или терапевтического ответа индивидуума.

Изобретение также относится к способу предотвращения или снижения частоты развития неврологического состояния в популяции индивидуумов с риском такового, где способ, включает:

введение эффективной дозы сердечного гликозида на регулярной основе в течение продолжительного периода времени одному или нескольким индивидуумам в популяции индивидуумов с риском развития неврологического состояния, такого как болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, инсульт или другое неврологическое состояние,

таким образом, предотвращая или снижая частоту неврологического состояния в популяции.

Изобретение также включает варианты осуществления, где: a) способ дополнительно включает указание по введению сердечного гликозида одному или нескольким индивидуумам; b) способ дополнительно включает введение эффективной дозы сердечного гликозида индивидууму по предписанной схеме дозирования в течение периода времени; c) способ дополнительно включает периодическое определение адекватности клинического ответа и/или терапевтического ответа одного или нескольких индивидуумов на лечение сердечным гликозидом; d) если клинический ответ и/или терапевтический ответ индивидуума является адекватным, то способ дополнительно включает продолжение лечения сердечным гликозидом по мере необходимости до достижения желаемой клинической конечной точки; e) если клинический ответ и/или терапевтический ответ индивидуума является неадекватным при начальной дозе и начальной схеме дозирования, то способ дополнительно включает повышение или снижение дозы до достижения желаемого клинического ответа и/или терапевтического ответа индивидуума; f) сердечный гликозид вводят многим индивидуумам в популяции; g) регулярная основа представляет собой введение ежедневно, через день, каждый второй день, каждый третий день, каждый четвертый день, каждый пятый день, каждый шестой день, еженедельно, через неделю, каждую вторую неделю, каждую третью неделю, ежемесячно, дважды в месяц, раз в полмесяца, через месяц, каждый второй месяц, раз в квартал, через квартал, раз в триместр, сезонно, раз в полгода и/или ежегодно; h) продолжительный период представляет собой одну или несколько недель, один или несколько месяцев, один или несколько кварталов и/или один год или несколько лет; i) эффективную дозу вводят один или несколько раз в сутки; j) способ дополнительно включает идентификацию популяции индивидуумов с риском развития неврологического состояния, такого как болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, инсульт или другое неврологическое состояние; и/или k) популяция индивидуумов с риском отличается преклонным возрастом индивидуумов, семейным анамнезом неврологического состояния, генетической предрасположенностью к неврологическому состоянию, наличием и экспрессией гена ApoE4 у индивидуумов, женским полом (женщины заболевают болезнью Альцгеймера в два раза чаще мужчин), сердечно-сосудистым заболеванием (например, высоким артериальным давлением и высокими уровнями холестерина), диабетом (в особенности, типа 2 или формы данного заболевания с началом во взрослом возрасте), синдромом Дауна, повреждением головы, низким уровнем формального образования, курением, избыточным потреблением алкоголя и/или лекарственной зависимостью.

Изобретение также относится к отсроченному способу лечения инсульта у индивидуума, включающему:

введение начальной дозы сердечного гликозида по начальной схеме дозирования в течение приемлемого периода задержки после развития инсульта у индивидуума;

определение адекватности клинического ответа и/или терапевтического ответа индивидуума на лечение сердечным гликозидом; и

если клинический ответ и/или терапевтический ответ индивидуума является адекватным, то продолжают лечение сердечным гликозидом по мере необходимости до достижения желаемой клинической конечной точки; или

если клинический ответ и/или терапевтический ответ индивидуума является неадекватным при начальной дозе и начальной схеме дозирования, то повышают или снижают дозу до достижения желаемого клинического ответа и/или терапевтического

ответа индивидуума.

Некоторые варианты осуществления изобретения включают варианты, где: 1) период задержки составляет 10 часов или менее, 8 часов или менее, 6 часов или менее, 4 часа или менее, 3 часа или менее, 2 часа или менее, 1 час или менее, 45 минут или менее, 30 минут или менее, 20 минут или менее или 10 мин или менее; 2) определение адекватности клинического и/или терапевтического ответа индивидуума осуществляют посредством оценки любой слабости лица, руки и/или ноги на одной стороне тела, онемения лица, руки и/или ноги на одной стороне тела, неспособности понимать устную речь, неспособности говорить или говорить четко, неспособности писать, головокружения и/или нарушения походки, двоения в глазах и необычно тяжелой головной боли; или 3) их сочетание.

Изобретение также относится к применению сердечного гликозида в производстве лекарственного средства для лечения неврологического состояния у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления производство такого лекарственного средства включает: получение сердечного гликозида; включение дозы сердечного гликозида в фармацевтическую лекарственную форму; и упаковку фармацевтической лекарственной формы. В некоторых вариантах осуществления производство можно осуществлять, как описано в международной заявке PCT № PCT/US06/29061. Производство также может включать один или несколько дополнительных этапов, таких как: доставка упакованной лекарственной формы поставщику (оператору розничной торговли, оптовику и/или дистрибьютору); продажа или иное предоставление упакованной лекарственной формы индивидууму с неврологическим состоянием; включение в упаковку вместе с лекарственным средством ярлыка и вкладыша, представляющего инструкции по применению, схему дозирования, введения, описание содержимого и токсикологический профиль лекарственной формы. В некоторых вариантах осуществления лечение неврологического состояния включает: определение того, что индивидуум имеет неврологическое заболевание или нарушение; указание по введению сердечного гликозида индивидууму по схеме дозирования; введение индивидууму одной или нескольких фармацевтических лекарственных форм, содержащих сердечный гликозид, где одну или несколько фармацевтических лекарственных форм вводят по схеме дозирования.

Изобретение также относится к сердечному гликозиду или содержащей сердечный гликозид композиции, т.е. фармацевтическому составу или лекарственной форме, для лечения неврологического состояния. В некоторых вариантах осуществления содержащая сердечный гликозид композиция является такой, как описано в настоящем документе или в патенте США № 7402325, международной заявке PCT № PCT/US06/29061, заявке США № 12/019435, полное описание которых включено, таким образом, в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления индивидуум с неврологическим состоянием, т.е. нуждающийся в этом индивидуум, является частью популяции таких индивидуумов. Изобретение относится к способу улучшения клинического статуса статистически значимого числа индивидуумов в популяции индивидуумов с неврологическим состоянием, способ, включающий: введение популяции индивидуумов сердечного гликозида или содержащей сердечный гликозид композиции; и определение клинического статуса индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления статистически значимое количество составляет, по меньшей мере, 5% популяции.

В некоторых вариантах осуществления неврологическое состояние является болезнью Альцгеймера, болезнью Хантингтона, инсультом или другим неврологическим

состоянием, таким, как описано в настоящем документе. Лекарственное средство можно производить посредством включения сердечного гликозида в фармацевтическую лекарственную форму, содержащую один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов.

Лечение индивидуума сердечным гликозидом продолжают по мере необходимости. Дозу или схему дозирования по мере необходимости можно регулировать до достижения пациентом желаемой клинической конечной точки (точек), такой как снижение или смягчение специфических неврологических симптомов, связанных с заболеванием. Определение адекватности клинического ответа и/или терапевтического ответа может осуществлять практикующий врач, хорошо знакомый с подвергаемым лечению неврологическим состоянием.

В некоторых вариантах осуществления неврологическое состояние выбрано из группы, состоящей из неврологического заболевания, неврологического нарушения и инсульта. В некоторых вариантах осуществления неврологическое заболевание является нейродегенеративным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления нейродегенеративное заболевание выбрано из группы, состоящей из болезни Хантингтона, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, бокового амиотрофического склероза, губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота, рассеянного склероза, диабетической нейропатии, аутизма и ювенильного нейронального восковидного липофусциноза. В некоторых вариантах осуществления инсульт является ишемическим инсультом или инсульт-опосредованным ишемическим повреждением.

В некоторых вариантах осуществления: 1) сердечный гликозид выбран из группы, состоящей из олеандрина, уабаина, буфалина, дигитоксина, цинобуфаталина, цинобуфагина и резибуфогенина; 2) сердечный гликозид находится в чистой форме, полученной посредством экстракции из растительного или животного источника, синтезированной или произведенной посредством химической модификации (например, получения производных) доступного сердечного гликозида; 3) сердечный гликозид присутствует в экстракте; 4) сердечный гликозид присутствует в фармацевтическом составе или композиции; 5) сердечный гликозид получают из растительной массы олеандра; 6) растительная масса олеандра содержит виды *Nerium*, такие как *Nerium oleander*, или виды *Thevetia*, такие как *Thevetia neriifolia* (известный также как желтый олеандр); 7) после введения индивидууму сердечный гликозид преодолевает гематоэнцефалитический барьер (ГЭБ); 8) экстракт с сердечным гликозидом получали сверхкритической флюидной экстракцией (SCF), необязательно, в присутствие модификатора; 9) сердечный гликозид является олеандрином; 10) сердечный гликозид имеет скорость выведения для ткани головного мозга не более чем 4 л/час; и/или 11) после введения любым из путей, описываемых в настоящем документе, сердечный гликозид остается в ткани головного мозга в течение периода, по меньшей мере, 8 часов. В некоторых вариантах осуществления сердечный гликозид исключает нерифолин.

В некоторых вариантах осуществления: 1) SCF-экстракт дополнительно содержит, по меньшей мере, одно другое фармакологически активное средство помимо сердечного гликозида, указанное другое фармакологически активное средство получали вместе с сердечным гликозидом при экстракции, применяемой для получения экстракта; 2) SCF-экстракт дополнительно содержит, по меньшей мере, одно другое фармакологически активное средство, не являющееся сердечным гликозидом; 3) другое фармакологически активное средство может способствовать терапевтической эффективности сердечного гликозида при введении экстракта индивидуума; 4) другое фармакологически активное средство функционирует аддитивно или синергично, способствуя терапевтической

эффективности сердечного гликозида; и/или 5) экстракт получали из кожи жабы или ее выделений.

В некоторых вариантах осуществления неврологическое состояние обладает этиологией, связанной со специфическими изменениями активности Na/K-АТФазы через повышение активности фермента, например, связанной с ювенильным аутизмом (Clin. Biochem. 2009; 42(10-11), 949-957), снижение активности фермента, например, наблюдаемое при диабетической нейропатии (Neuroscience 2009), болезни Баттена (Exp. Cell Res. 2008, 314(15):2895-2905), возрастной деменции и болезни Альцгеймера (J. Alzheimers Dis. 2008, 14(1): 85-93; Neurobiol. Aging 2007, 28(7):987-994), или конкретными мутациями структуры субъединицы Na/K-АТФазы, например, связанными с болезнью Паркинсона (Human Gen. 2009, 126(3):431-447).

Отдельные этапы способов по изобретению можно осуществлять в различных группах обслуживания или в одной группе.

В некоторых вариантах осуществления нейроны находятся *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления нейроны являются нейронами CA-1.

Изобретение также относится к: способу лечения неврологического состояния; способу лечения неврологического заболевания или нарушения с этиологией, связанной с измененной активностью Na/K-АТФазы, у нуждающегося в этом индивидуума; применению сердечного гликозида в производстве лекарственного средства для лечения неврологического состояния; и/или сердечному гликозиду или содержащей сердечный гликозид композиции для лечения неврологического состояния, по существу, как показано и описано в настоящем документе.

Изобретение включает все сочетания аспектов, вариантов осуществления и подвариантов осуществления описываемого в настоящем документе изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Следующие фигуры образуют часть настоящего описания, и с их помощью описывают примеры вариантов осуществления описываемого в заявке изобретения. В свете данных фигур и описания в настоящем документе специалисты в данной области будут способны осуществлять изобретение на практике без излишнего экспериментирования.

На фиг. 1A-1C изображены результаты сравнительной оценки олеандрина и нерифолина в анализе нейропротективного действия при "инсульте" на основе срезов головного мозга (пример 8), где количество здоровых кортикальных нейронов определяют после 5-6 минут кислородного и глюкозного голодания (OGD) в присутствие или отсутствие данных средств. Представлены результаты трех независимых экспериментов.

На фиг. 1D изображены данные концентрация-ответ, полученные при сравнительной оценке олеандрина и нерифолина, контроля, в анализе нейропротективного действия при "инсульте" на основе срезов головного мозга (пример 11), где количество здоровых кортикальных нейронов определяют после 5-6 минут кислородного и глюкозного голодания (OGD) в присутствие или отсутствие данных средств.

На фиг. 1E изображены результаты анализа концентрация-ответ для содержащего олеандрин SCF-экстракта в анализе нейропротективного действия при "инсульте" на основе срезов головного мозга, как описано в настоящем документе (пример 11), где не применяли кислородное или глюкозное голодание в качестве контроля.

На фиг. 2A-2C изображены результаты сравнительной оценки олеандрина и нерифолина в анализе нейропротективного действия при "не-инсульте" на основе срезов головного мозга (пример 8), где количество здоровых кортикальных нейронов определяют без OGD в присутствие или отсутствие данных средств.

На фиг. 3A-3C изображены результаты сравнительной оценки олеандрина и олеандринового экстракта в анализе нейропротективного действия при "болезни Альцгеймера" на основе срезов головного мозга (пример 9), где количество здоровых кортикальных нейронов определяют после APP/Aβ-индуцированной дегенерации в присутствие или отсутствие изменяющегося количества данных средств.

На фиг. 4A-4D изображены результаты дублируемых экспериментов при сравнительной оценке олеандрина в анализе нейропротективного действия при "болезни Хантингтона" при совместном культивировании кортико-стриарных нейронов (пример 10), где процент сохраненных относительно контроля кортикальных нейронов и стриарных нейронов, трансфицированных мутантной формой белка хантингтина (htt), определяют в присутствие или отсутствие изменяющегося количества олеандрина.

На фиг. 4E изображена кривая концентрация-ответ для олеандрина в контексте его относительной способности предотвращать нейрональное повреждение и гибель по причине трансфекции болезни Хантингтона (результаты анализа *in vitro*; пример 10).

На фиг. 5 изображены результаты анализа отсроченного нейропротективного действия при "инсульте" на основе срезов головного мозга, как описано в настоящем документе (пример 13), где "подвергнутую инсульту" ткань головного мозга обрабатывают содержащим сердечный гликозид раствором (содержащий олеандрин SCF-экстракт) после истечения приблизительно 2, приблизительно 4 или приблизительно 6 часов после OGD.

На фиг. 6 изображен график отношения концентрация-время в плазме и ткани головного мозга для олеандрина в течение 24-часового периода после i.p. введения содержащего олеандрин SCF-экстракта (треугольники, идентификационный код: PBI-05204) и олеандрина мыши CD1 (круги). Представлена средняя концентрация +SD олеандрина в головном мозге (нг/г) и плазме (нг/мл) для 5 мышей. PBI-05204 (38 мг/кг, содержащие 0,8 мг/кг олеандрина, 50 мкл) и олеандрин (3 мг/кг, 100 мкл) растворяли в наполнителе DMSO:PEG400, 50:50 об./об. (PBI-05204, 28,6 мг/мл) или 25:75 об./об. (олеандрин, 1 мг/мл). Контрольные группы получали только наполнитель DMSO: PEG400. Через 0,5, 1, 2, 4, 8 и 24 часов плазму и ткань головного мозга собирали для анализа жидкостной хроматографией с тандемной масс-спектрометрией. Быстрое и длительное проникновение в ЦНС наблюдали после введения и PBI-05204, и олеандрина.

На фиг. 7A и 7B изображены результаты анализа нейропротективного действия на основе срезов головного мозга, проведенного, как описано в настоящем документе. На фиг. 7A изображена кривая концентрация-ответ, демонстрирующая отношение для олеандрина (серые закрашенные круги). Совокупность 6 серий экспериментов, нормализованных по различию между внутренним положительным (не-OGD) и отрицательным (OGD) контролями для каждой серии экспериментов на 100%; представлены средние + SEM. Отношение концентраций для нерифолина (не закрашенные квадраты) перепечатано из Wang et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006), 103(27), 10461-10466) для сравнения. На фиг. 7B изображена кривая концентрация-ответ, демонстрирующая отношение для PBI-05204 (закрашенные черным квадраты). Совокупность 13 серий экспериментов, нормализованных по различию между внутренним положительным (не-OGD) и отрицательным (OGD) контролями для каждой серии экспериментов на 100%; представлены средние + SEM. Данные из фиг. 7A для олеандрина перечерчены на фиг. 7B с учетом 3% композиции для олеандрина в экстракте PBI-05204.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к способу лечения неврологического состояния введением

нуждающемуся в этом индивидууму эффективной дозы сердечного гликозида. Сердечный гликозид вводят по схеме дозирования, наиболее подходящей индивидууму, пригодность дозы и схемы дозирования определяют клинически в соответствии с общепринятой клинической практикой и клиническими конечными точками лечения для подвергаемого лечению неврологического состояния.

В некоторых вариантах осуществления подвергаемое лечению нейродегенеративное нарушение или неврологическое состояние обладает этиологией, связанной со связывающей активностью Na/K-АТФазы или с нарушением регуляции Na/K-АТФазы в клетке или ткани. В некоторых вариантах осуществления подвергаемое лечению нейродегенеративное нарушение или неврологическое состояние обладает этиологией, связанной со связывающей активностью HIF-1α или с нарушением регуляции HIF-1α в клетке или ткани. Такое нарушение регуляции может происходить, например, в виде значительного изменения степени ферментативной активности. В свою очередь это может являться результатом изменения функции фермента, содержания фермента или даже его распределения в пораженной ткани.

Подвергаемый лечению индивидуум по изобретению будет проявлять терапевтический ответ. "Терапевтический ответ" означает, что индивидуум страдающий заболеванием или нарушением, получает пользу, по меньшей мере, от одного из следующих клинических преимуществ в результате лечения сердечным гликозидом: облегчения заболевания или нарушения, снижения развития симптомов, связанных с заболеванием или нарушением, частичной ремиссии заболевания или нарушения, полной ремиссии заболевания или нарушения или увеличения времени до прогрессирования. Другими словами, терапевтический ответ может являться полным или частичным терапевтическим ответом.

Терапевтический ответ также можно описывать, как ответ, при котором улучшают качество жизни пациента, страдающего нейродегенеративным заболеванием. Улучшение качества жизни может происходить, например, через снижение развития, частоты или тяжести связанных с заболеванием симптомов (например, тремора, непроизвольных сокращений мышц, потери или частичную потерю нервно-мышечной координации, сохранения в памяти и т.д.).

"Предотвращение развития неврологического состояния в популяции индивидуумов с риском" означает, что неврологическое состояние не будет возникать в течение заранее определенного периода времени в демографически заранее определенной популяции индивидуумов с риском развития неврологического состояния. Предотвращение в течение заранее определенного периода времени происходит в результате того, что индивидуумам в данной популяции вводят сердечный гликозид по способам по изобретению. Например, если содержащую сердечный гликозид композицию вводят в течение заранее определенного периода времени индивидуумам в популяции индивидуумов с риском развития инсульта, инсульт не будет возникать у тех индивидуумов в течение заранее определенного периода времени. В частности, содержащую сердечный гликозид композицию постоянно вводят в течение одного года популяции индивидуумов с риском развития болезни Альцгеймера, и индивидуумы в такой популяции не проявляют симптомы, связанные с болезнью Альцгеймера, в течение этого одного года.

"Снижение частоты развития неврологического состояния в популяции индивидуумов с риском" относится к "предотвращению повышения частоты", за исключением того, что "снижение частоты развития" допускает развитие неврологического состояния в демографически заранее определенной популяции индивидуумов, но с интенсивностью

развития или уровнем тяжести, сниженными по сравнению с иной демографически схожей заранее определенной популяцией индивидуумов с риском, которым не вводят содержащую сердечный гликозид композицию по способам по изобретению.

Как применяют в настоящем документе, "время до прогрессирования" является периодом, продолжительностью или длительностью времени после диагностики (или лечения) заболевания до начала ухудшения заболевания. Оно представляет собой период времени, в течение которого уровень заболевания сохраняется без дальнейшего прогрессирования заболевания, и период времени заканчивается, когда заболевание снова начинает прогрессировать. Прогрессирование заболевания определяют по "стадийности заболевания" у индивидуума, страдающего неврологическим состоянием до терапии или в начале терапии. Например, неврологический статус индивидуума определяют до терапии или в начале терапии. Затем индивидуума лечат сердечным гликозидом и периодически проверяют неврологический статус. Через некоторый момент времени симптомы неврологического состояния могут ухудшаться, таким образом, отмечая прогрессирование заболевания и конец "времени до прогрессирования". Период времени, в течение которого заболевание не прогрессирует или в течение которого уровень или тяжесть заболевания не ухудшается, является "временем до прогрессирования".

Схема дозирования включает терапевтически адекватную дозу (или эффективную дозу) одного или нескольких сердечных гликозидов, вводимых по схеме дозирования. Таким образом, терапевтически адекватная доза является терапевтической дозой, при которой наблюдают терапевтический ответ на лечение сердечным гликозидом при заболевании или нарушении и при которой индивидууму можно вводить сердечный гликозид без чрезмерного количества нежелательных или вредоносных побочных эффектов. Терапевтически адекватная доза является не летальной для индивидуума, даже если она может вызывать у пациента некоторые побочные эффекты. Она является дозой, при которой уровень клинического преимущества для индивидуума, которому вводят сердечный гликозид, превышает уровень вредоносных побочных эффектов, испытываемых индивидуумом из-за введения сердечного гликозида. Терапевтически адекватная доза будет варьироваться среди индивидуумов в соответствии с множеством общепринятых фармакологических, фармакодинамических и фармакокинетических принципов. Однако, терапевтически адекватная доза (адекватная, например, для олеандрина), как правило, не будет превышать 25, 100, 250, 500 или 1000 микрограммов сердечного гликозида/сутки, или она может находиться в диапазоне 25-500 или 25-1000 микрограммов сердечного гликозида/сутки. В данной области известно, что точное количество лекарственного средства, необходимое для получения намеченного терапевтического результата у индивидуума, может варьироваться среди индивидуумов в соответствии с основными принципами фармакологии.

Терапевтически адекватную дозу можно вводить по любой схеме дозирования, как правило, применяемой при лечении неврологических или нейродегенеративных заболеваний или нарушений. Терапевтически адекватную дозу можно вводить один, два, три или более раз в сутки по схеме дозирования. Ее можно вводить через день, каждый третий день, каждый четвертый день, каждый пятый день, раз в полнедели, еженедельно, два раза в неделю, каждые три недели, каждые четыре недели, ежемесячно, дважды в месяц, раз в полмесяца, каждые три месяца, каждые четыре месяца, раз в полгода, ежегодно или в соответствии с сочетанием любых из перечисленных выше для достижения подходящей схемы дозирования. Например, терапевтически адекватную дозу можно вводить один раз в сутки в течение одной или нескольких недель.

Приведенные ниже примеры включают доказательство эффективности сердечных гликозидов при неврологических состояниях, таких как неврологические заболевания, неврологические нарушения и инсульт. В примере 3 подробно описывают способ лечения болезни Альцгеймера сердечным гликозидом или сочетанием сердечного гликозида с одним или несколькими другими терапевтическими средствами. В примере 4 подробно описывают способ лечения болезни Хантингтона сердечным гликозидом или сочетанием сердечного гликозида с одним или несколькими другими терапевтическими средствами. В примере 5 подробно описывают способ лечения инсульт-опосредованного ишемического повреждения головного мозга сердечным гликозидом или сочетанием сердечного гликозида с одним или несколькими другими терапевтическими средствами.

В основном, индивидуума с неврологическим состоянием лечат следующим образом. Индивидуума с неврологическим состоянием оценивают для определения того, является ли неврологическое состояние болезнью Альцгеймера, болезнью Хантингтона, инсультом или другим неврологическим состоянием. Предписывают введение сердечного гликозида. Начальные дозы сердечного гликозида вводят индивидууму по предписанной схеме дозирования в течение периода времени. Периодически определяют клинический ответ и уровень терапевтического ответа индивидуума. Если уровень терапевтического ответа слишком низок при одной дозе, то дозу повышают по заранее определенной схеме повышения дозы до достижения желаемого уровня терапевтического ответа индивидуума. Лечение индивидуума сердечным гликозидом продолжают по мере необходимости. Дозу или схему дозирования можно регулировать по мере необходимости до достижения пациентом желаемой клинической конечной точки (точек), такой как прекращение самого заболевания, снижение связанных с заболеванием симптомов и/или снижение прогрессирования патологического процесса.

В примере 8 представлено подробное описание анализа *in vitro*, применяемого для оценки эффективности сердечных гликозидов для лечения инсульт-опосредованного ишемического повреждения нейронов. Анализ является анализом на основе срезов головного мозга при кислородном и глюкозном голодании (OGD), применяемом для индукции >50% потери здоровых кортикальных нейронов через 24 часа. Сердечный гликозид нерифолин (3 мкМ) применяют в качестве положительного контроля. Олеандрин тестировали на подвергнутых OGD срезах головного мозга (модель инсульта, фиг. 1A-1C) и не подвергнутых OGD срезах головного мозга (модель не-инсульта, фиг. 2A-2C). Данные свидетельствуют о том, что олеандрин обеспечивает значительное нейропротективное действие, если срезы головного мозга (нейроны) подвергали воздействию растворов олеандрина с диапазоном концентраций от 0,1 до 3 мкМ. Хотя не проводили прямых измерений на головном мозге человека после системной дозы олеандрина, из полученных в фазе I исследования данных для экстракта олеандра, а также ранее полученных в исследованиях грызунов данных, в которых исследовали способность олеандрина специфически преодолевать гематоэнцефалитический барьер, можно предполагать, что уровень дозы для достижения данной концентрации олеандрина в головном мозге человека, вероятно, будет составлять приблизительно 1-10 нг, приблизительно 3-6 нг или приблизительно 4 нг.

Доказательство наличия в SCF-экстракте одного или нескольких фармакологически активных компонентов, иных, чем олеандрин, получали сравнением кривых концентрация-ответ для раствора, содержащего чистый олеандрин, с раствором, содержащим SCF-экстракт. На фиг. 1D изображены результаты анализа концентрация-ответ для водного раствора, содержащего чистый олеандрин, в анализе

нейропротективного действия при "инсульте" на основе срезов головного мозга, как описано в примере 11. Концентрация олеандрина в водном растворе варьировалась от 0,0069 до 230 мкг/мл. На фиг. 1E изображены результаты анализа концентрация-ответ для содержащего олеандрин SCF-экстракта видов *Nerium* в анализе нейропротективного действия при "инсульте" на основе срезов головного мозга, как описано в настоящем документе (пример 11). Данные свидетельствуют о том, что экстракт более эффективен, чем чистый олеандрин, это означает, что экстракт содержит одно или несколько фармакологически активных средств, обеспечивающих нейропротективное действие.

В примере 11 представлено подробное описание анализа *in vitro*, применяемого для оценки эффективности экстракта или его композиции для лечения инсульт-опосредованного ишемического повреждения нейронов. Анализ является анализом на основе срезов головного мозга при кислородном и глюкозном голодании (OGD), применяемом для индукции >50% потери здоровых кортикальных нейронов через 24 часа. Исходный не фракционированный SCF-экстракт видов *Nerium*, например, *Nerium oleander*, применяют в качестве положительного контроля.

Таким образом, изобретение относится к способу защиты нейронов от потери активности, вызываемой кислородным голоданием или кислородным и глюкозным голоданием, посредством воздействия на подвергнутые кислородному и/или глюкозному голоданию нейроны эффективным количеством олеандрина или содержащего олеандрин экстракта для минимизации потери активности, снижения скорости потери активности, прекращения потери активности, замедления развития потери активности и/или потери защиты функции нейронов, вызываемой воздействием состояний с кислородным и/или глюкозным состоянием.

В примере 9 представлено подробное описание анализа *in vitro*, применяемого для оценки эффективности сердечных гликозидов для лечения болезни Альцгеймера. Анализ представляет собой анализ на основе срезов головного мозга при APP/Aβ-индуцированной (APP: белок-предшественник амилоида) дегенерации кортикальных пирамидальных нейронов. После расщепления ферментом секретазой APP восстанавливается до пептидов Aβ, которые, как считают, являются этиологическим фактором в образовании бета-амилоидных бляшек. Aβ-белки связаны с образованием бета-амилоидных бляшек и считаются отличительным признаком, если не этиологическим фактором при болезни Альцгеймера. Для введения витальных маркеров, таких как YFP (маркерный желтый флуоресцентный белок), и для введения конструкций гена заболевания в те же популяции нейронов в срезах головного мозга применяют биолистическую трансфекцию. YFP котрансфицируют с изоформами APP, приводящими к прогрессирующей дегенерации кортикальных пирамидальных нейронов в течение трех-четырех дней после получения срезов головного мозга и трансфекции. Данные (фиг. 3A-3C) свидетельствуют о том, что олеандрин и содержащий олеандрин SCF-экстракт обеспечивали зависящее от концентрации нейропротективное действие в APP-трансфицированных срезах головного мозга, таким образом, поддерживая уровни, близкие к уровням, обеспечиваемым ингибирующими BACE лекарственными средствами, т.е. лекарственными средствами-ингибиторами бета-секретазы. Фермент бета-секретаза расщепляет белок-предшественник APP до токсического Aβ-белка. Содержащий олеандрин SCF-экстракт, по-видимому, обеспечивает большее нейропротективное действие, чем олеандрин в отдельности. Данные на фиг. 3A-3C являются значимыми для тех нескольких соединений или терапевтических стратегий по литературным данным, демонстрировавших любой значимый протективный эффект для нейронов при данном анализе *in vitro*, представляющем болезнь Альцгеймера. Данные свидетельствуют о

том, что сердечные гликозиды, такие как олеандрин, будут эффективными в качестве единственных средств, или при наличии в экстрактах, применяемых в качестве монотерапии, или в сочетании с другими препаратами, такими как ингибиторы BASE, для лечения болезни Альцгеймера.

Таким образом, изобретение относится к способу защиты нейронов от потери активности, вызываемой болезнью Альцгеймера, способу, включающему: подвергание нейронов, проявляющих характеристики болезни Альцгеймера, воздействию эффективного количества олеандрина или содержащего олеандрин экстракта для минимизации потери активности, снижения скорости потери активности, прекращения потери активности, замедления развития потери активности и/или потери критической функции нейронов, вызываемой болезнью Альцгеймера.

В примере 10 представлено подробное описание анализа, применяемого для оценки эффективности сердечных гликозидов для лечения болезни Хантингтона. Мутантный белок htt вводят посредством электропорации в смешанные совместные культуры кортикальных нейронов, стриарных нейронов и глии с высокой плотностью. Стриарные и кортикальные нейроны трансфицировали различными цветными флуоресцентными белками, таким образом, облегчая раздельную идентификацию различных типов нейронов в совместной культуре. Цветные флуоресцентные белки являются флуоресцентными и "испускают" цвет после активации источником света с подходящей длиной волны. Данные (фиг. 4A-4D) свидетельствуют о том, что олеандрин и содержащий олеандрин SCF-экстракт являются более эффективными, чем KW6002 (антагонист рецептора аденозина 2a) в контексте сохранения большего количества выживших нейронов. Таким образом, изобретение относится к способу защиты нейронов от потери активности, вызываемой болезнью Хантингтона, способу, включающему: подвергание нейронов, проявляющих характеристики болезни Хантингтона, воздействию эффективного количества олеандрина или содержащего олеандрин экстракта для минимизации потери активности, снижения скорости потери активности, прекращения потери активности, замедления развития потери активности, и/или потери нормальной функции нейронов, вызываемой болезнью Хантингтона.

В примере 13 подробно описывают пример анализа срезов головного мозга, применяемого в качестве модели для оценки эффективности сердечного гликозида в лечении инсульта у индивидуума после завершения периода задержки после инсульта. Анализ срезов головного мозга с кислородным и глюкозным голоданием проводили, как описано в настоящем документе; однако, чаще, чем профилактическую обработку срезов головного мозга сердечным гликозидом, проводили обработку сердечным гликозидом после периодов задержки 0, 1, 2, 4 и 6 часов. Данные, приведенные на фиг. 5, свидетельствуют о том, что сердечный гликозид, такой как олеандрин или содержащий олеандрин SCF-экстракт, эффективен в обеспечении значимого нейропротективного действия в течение периода задержки до 1, до 2, до 3, до 4, до 5, до приблизительно 6 часов после инсульта.

Таким образом, изобретение относится к отсроченному способу лечения инсульта у индивидуума посредством введения дозы сердечного гликозида индивидууму после развития инсульта у индивидуума. В течение приемлемого периода задержки после развития инсульта у индивидуума вводят начальную дозу сердечного гликозида по начальной схеме дозирования. Затем определяют адекватность клинического ответа и/или терапевтического ответа индивидуума на лечение сердечным гликозидом. Если клинический ответ и/или терапевтический ответ индивидуума является адекватным, то лечение сердечным гликозидом продолжают по мере необходимости до достижения

желаемой клинической конечной точки. Альтернативно, если клинический ответ и/или терапевтический ответ индивидуума является неадекватным при начальной дозе и начальной схеме дозирования, дозу повышают или снижают до достижения желаемого клинического ответа и/или терапевтического ответа индивидуума. Повышение или снижение дозы можно осуществлять в сочетании с изменением схемы дозирования, таким как изменение частоты дозирования или общего периода введения дозы.

Некоторые анализы срезов головного мозга в настоящем документе проводят в условиях, где ткань головного мозга обрабатывают сердечным гликозидом до OGD. В этих условиях данные доказывают применимость сердечных гликозидов, применяемых профилактически, обеспечивающих нейропротективное действие при повреждении, вызываемым инсультом.

Если врач собирается лечить индивидуума с неврологическим состоянием сочетанием сердечного гликозида и одного или нескольких других терапевтических средств, и известно, что конкретное неврологическое состояние, которым страдает индивидуум, является, по меньшей мере, частично терапевтически отвечающим на лечение указанными одним или несколькими другими терапевтическими средствами, то настоящий способ по изобретению включает: введение нуждающемуся в этом индивидууму терапевтически адекватной дозы сердечного гликозида и терапевтически адекватной дозы указанного одного или нескольких других терапевтических средств, где сердечный гликозид вводят по первой схеме дозирования и одно или несколько других терапевтических средств вводят по второй схеме дозирования. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая схемы дозирования одинаковы. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая схемы дозирования отличаются.

Если подвергаемое лечению неврологическое состояние является болезнью Альцгеймера, одно или несколько других терапевтических средств можно выбирать из группы, состоящей из ингибиторов BACE или ингибиторов ацетилхолинэстеразы. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств можно выбирать из группы, состоящей из Namenda™ (хлорида мемантина), Aricept™ (донепезила), Razadyne™ (галантамина), Exelon™ (ривастигмина) и Cognex™ (такрина).

Если подвергаемое лечению неврологическое состояние является болезнью Хантингтона, одно или несколько других терапевтических средств можно выбирать из группы, состоящей из природных препаратов, антиконвульсантов, антагонистов рецептора NMDA (n-метил-d-аспартата) и блокаторов натриевых каналов. Примеры средств включают витамин E, баклофен (производное CoQ10), ламотригин (антиконвульсант), ремацемид (анестетик, являющийся низкоаффинным антагонистом NMDA) и рилузол (блокатор Na-каналов). Эффективность каждого из данных средств считают низкой (Mestre T. et al, Chochrane Database Systematic Reviews 8 July 2009; 8(3): CD006455) в отдельности; однако, ожидают, что введение лекарственной формы, содержащей олеандрин или содержащий олеандрин экстракт, индивидуумам, получающим одно или несколько данных других средств, будет обеспечивать улучшенный клинический эффект у индивидуума с неврологическим нарушением по сравнению с введением данных средств без олеандрина.

Если подвергаемое лечению неврологическое состояние является инсульт-опосредованным ишемическим повреждением головного мозга (ишемическим инсультом), то терапевтические способы лечения, описываемые в литературе (Gutierrez M. et al. "Cerebral protection, brain repair, plasticity и cell therapy in ischemic stroke" Cerebrovasc. Dis. 2009; 27 Suppl 1: 177-186), например, внутривенный тромболизис, можно применять

в дополнение к способу по изобретению на основе олеандрина или олеандринового экстракта. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько других терапевтических средств можно выбирать из группы, состоящей из лекарственных средств, таких как альтеплаза (тромболитическое средство).

Одно или несколько других терапевтических средств можно вводить в дозах и по схемам дозирования, признанным врачом терапевтически эффективными, или в дозах, признанных врачом терапевтически субэффективными. Клиническое преимущество и/или терапевтический эффект, обеспечиваемый введением сочетания сердечного гликозида и одного или нескольких других терапевтических средств, может являться аддитивным или синергичным, такой уровень преимущества или эффекта, определяемый сравнением введения сочетания с введением сердечного гликозида и одного или нескольких других терапевтических средств в отдельности. Одно или несколько других терапевтических средств можно вводить в дозах и по схемам дозирования, рекомендуемым или описанным Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств, Всемирной организацией здравоохранения, Европейским агентством по контролю за оборотом лекарственных средств (E.M.E.A.), Австралийской администрацией лекарственных средств (TGA, Australia), Панамериканской организацией здравоохранения (PAHO), Управлением по безопасности лекарственных средств и изделий медицинского назначения Новой Зеландии (Medsafe, New Zealand) или различными министерствами здравоохранения по всему миру.

Сердечный гликозид может являться любым сердечным гликозидом, о котором известно, что он обладает связывающей Na/K-АТФазу активностью и/или связывающей HIF-1α (индуцируемый гипоксией фактор альфа) активностью. Сердечный гликозид способен преодолевать гематоэнцефалический барьер и сохраняться в ткани головного мозга в течение продолжительного периода времени после введения. В связи с этим сердечный гликозид должен сохраняться в головном мозге в течение, по меньшей мере, 8 часов после введения сердечного гликозида по причине связывания тканью и, в результате, низкой скоростью выведения.

Сердечный гликозид может присутствовать в чистой форме или в качестве смеси с одним или несколькими другими соединениями. Сердечный гликозид может присутствовать в качестве экстракта. Экстракт можно получать сверхкритической экстракцией (SCF) диоксидом углерода (CO_2) или химической модификацией такого экстракта (например, экстракта, включающего этанол или полученного с применением SCF CO_2 и этанола; пример 1). Экстракт можно получать экстракцией из растительного материала с применением органического растворителя, например, этанола, метанола, пропанола или других таких растворителей. Экстракт можно получать из растительного или животного материала. Животный материал может являться выделениями жабы (например, *Bufo bufo*). Растительный материала может являться растительной массой, например, получаемой из видов *Nerium*, таких как *Nerium oleander*, или видов *Thevetia*, таких как *Thevetia neriifolia* или *Thevetia puruviana* (также известного как желтый олеандр). Способ экстракции можно осуществлять на высушенном порошке листьев *Nerium oleander,* полученном по способу, описываемому в рассматриваемой в настоящее время предварительной заявке США № 60/653210, зарегистрированной 15 февраля 2005 года от имени Addington, или заявке США №. 11/340016, зарегистрированной 26 января 2006 года от имени Addington, заявке США № 11/191650, зарегистрированной 28 июля 2006 года (в настоящее время патенте США № 7402325, опубликованном 22 июля 2008 года) от имени Addington, или международной патентной заявке PCT № PCT/US06/29061, зарегистрированной 26 июля 2006 года, полное описание которых включено, таким

образом, в качестве ссылки, или по описываемому в настоящем документе способу.

Как применяют в настоящем документе, термин "олеандрин" означает все известные формы олеандрина, если не указано иначе. Олеандрин может присутствовать в рацемической, оптически чистой или оптически обогащенной форме. Материал растения *Nerium oleander* можно получать, например, от коммерческих поставщиков растений, таких как Aldridge Nursery, Atascosa, Texas.

Наша работа показала, что олеандрин обладает хорошей способностью преодолевать ГЭБ и оставаться в тканях головного мозга в течение продолжительного периода времени. Т.е. продолжительность переработки олеандрина в головном мозге больше ожидаемой с учетом клиренса данной молекулы из плазмы экспериментальных животных. В связи с этим относительно большая продолжительность переработки олеандрина в головном мозге представляет явное преимущество данного жирорастворимого сердечного гликозида по сравнению с водорастворимыми сердечными гликозидами, такими как дигоксин.

Экстракт можно получать модифицированной (например, этанолом) или не модифицированной сверхкритической флюидной экстракцией из содержащей сердечный гликозид растительной массы. Экстракт, полученный сверхкритической флюидной экстракцией, может содержать, по меньшей мере, одно другое фармакологически активное средство, являющееся сердечным гликозидом, и/или, по меньшей мере, одно другое фармакологически активное средство, не являющееся сердечным гликозидом, способствующее терапевтической эффективности сердечного гликозида, если экстракт вводят индивидууму. Оно может действовать аддитивно или синергично по отношению к терапевтической эффективности сердечного гликозида. Как применяют в настоящем документе, термин "фармакологически активное средство, не являющееся сердечным гликозидом" (или компонент) означает соединение, не являющееся сердечным гликозидом.

Экстракт можно получать множеством различных способов. Экстракт можно получать способом, разработанным Dr. Huseyin Ziya Ozel (патент США № 5135745), описывающим способ получения экстракта растения в воде. Как сообщают, водный экстракт содержит несколько полисахаридов с молекулярными массами, варьирующимися от 2 кДа до 30 кДа, олеандрин и олеандригенин, одорозид и нериталозид. Как сообщают, полисахариды включают кислые гомополигалктуронаны или арабиногалактуронаны. В патенте США № 5869060 Selvaraj et al. описывают экстракт, полученный экстракцией горячей водой из видов *Nerium,* и способы его получения, например, в примере 2. Затем получаемый экстракт можно лиофилизировать для получения порошка. В патенте США № 6565897 (патентная заявка США № 20020114852, опубликованная через 18 месяцев с даты приоритета, и международная публикация PCT № WO 2000/016793 Selvaraj et al.) описывают способ экстракции горячей водой для получения, по существу, стерильного экстракта. Erdemoglu et al. (J. Ethnopharmacol. (2003) Nov. 89(1), 123-129) описывают результаты сравнения водного и этанолового экстрактов растений, включая *Nerium oleander*, в зависимости от их антиноцицептивной и противовоспалительной активностей. Экстракты *Nerium oleander*, получаемые с помощью органических растворителей, описывают Adome et al. (Afr. Health Sci. (2003) Aug. 3(2), 77-86; этаноловый экстракт), el-Shazly et al. (J. Egypt Soc. Parasitol. (1996), Aug. 26(2), 461-473; этаноловый экстракт), Begum et al. (Phytochemistry (1999) Feb. 50(3), 435-438; метаноловый экстракт), Zia et al. (J. Ethnolpharmacol. (1995) Nov. 49(1), 33-39; метаноловый экстракт) и Vlasenko et al. (Farmatsiia. (1972) Sept.-Oct. 21 (5), 46-47; спиртовой экстракт). В патентной заявке США № 20040247660 Singh et al.,

опубликованной через 18 месяцев с даты приоритета, описывают получение белкового стабилизированного липосомальный состав олеандрина для применения в лечении злокачественного новообразования. В патентной заявке США № 20050026849 Singh et al., опубликованной через 18 месяцев с даты приоритета, описывают водорастворимый состав олеандрина, содержащий циклодекстрин. В патентной заявке США № 20040082521 Singh et al., опубликованной через 18 месяцев с даты приоритета, описывают получение белковых стабилизированных составов наночастиц с олеандрином из экстракта, полученного с помощью горячей воды.

SCF-экстракцию можно осуществлять в присутствие модификатора в сверхкритической жидкости, такого как этанол, для усиления экстракции желаемого соединения (соединений) из растительной массы. Как правило, модификаторы обладают летучестью между таковой сверхкритической жидкости и экстрагируемого соединения, и они должны являться смешиваемыми со сверхкритической жидкостью. В некоторых вариантах осуществления модификатор является жидким в условиях окружающей среды. В качестве не ограничивающего примера, модификатор можно выбирать из группы, состоящей из этанола, метанола, пропанола, ацетона, этилацетата, метиленхлорида и т.д.

Экстракт является смесью фармакологически активных соединений, таких как олеандрин или другие сердечные гликозиды, олеазид и другие растительные материалы. Олеандриновый экстракт, полученный сверхкритической флюидной экстракцией, теоретически содержит олеандрин в диапазоне от 0,9% до 2,5% по массе. Получали SCF-экстракты, содержащие различное количество олеандрина. В одном из вариантов осуществления SCF-экстракт содержит приблизительно 2% по массе олеандрина.

SCF-экстракт может содержать смесь различных компонентов. Некоторые из этих компонентов включают олеандрин, олеазид A, олеандригенин, нериталозид, одорозид (Wang X, Plomley JB, Newman RA and Cisneros A. LC/MS/MS analyses of an oleander extract for cancer treatment, Analytical Chem. 72: 3547-3552, 2000) и другие неопределенные компоненты. SCF-экстрагируемые неопределенные компоненты SCF-экстракта могут включать, по меньшей мере, один другой фармакологически активный компонент, являющийся сердечным гликозидом и/или, по меньшей мере, один другой фармакологически активный компонент, не являющийся сердечным гликозидом, способствующий эффективности олеандрина в SCF-экстракте. Т.е., по меньшей мере, один другой SCF-экстрагируемый компонент действует аддитивно или синергично с олеандрином для обеспечения наблюдаемой эффективности.

Определяли, что экстракт, содержащий олеандрин или олеандрин и один или несколько других фармакологически активных компонентов (являющихся и/или не являющихся сердечными гликозидами), может обеспечивать нейропротективное действие. Таким образом, SCF-экстракт по изобретению содержит (или, по существу, состоит из) олеандрин и один или несколько других биологически активных компонентов, которые сами по себе могут являться сердечным гликозидом или не являться сердечным гликозидом, обеспечивающих нейропротективное действие.

Другое доказательство наличия одного или нескольких биологически активных компонентов, иных, чем олеандрин, в SCF-экстракте получали при сравнении кривых концентрация-ответ для водного раствора, содержащего чистый олеандрин, и раствора, содержащего SCF-экстракт. На фиг. 1D изображены результаты анализа концентрация-ответ для водного раствора, содержащего чистый олеандрин, в анализе нейропротективного действия при "инсульте" на основе срезов головного мозга, как описано в примере 11. Концентрация олеандрина в водном растворе варьировалась от

0,0069 до 230 мкг/мл.

На фиг. 1E изображены результаты анализа концентрация-ответ для содержащего олеандрин SCF-экстракта в анализе нейропротективного действия при "инсульте" на основе срезов головного мозга, как описано в настоящем документе. Данные демонстрируют, что экстракт более эффективен, чем чистый олеандрин, свидетельствуя о том, что экстракт содержит одно или несколько фармакологически активных средств, обеспечивающих нейропротективное действие.

Возможно, экстракты также отличаются по своим относительным показателям, как определяют по эффективности в анализах, включенных в настоящий документ. Тем не менее, если сердечный гликозид присутствует в количестве или концентрации в экстракте, достаточно большом для получения терапевтически адекватной дозы, то экстракт считают частью изобретения.

Сердечный гликозид можно составлять в любой подходящей фармацевтически приемлемой лекарственной форме. Парентеральные, ушные, офтальмологические, назальные, ингаляционные, буккальные, сублингвальные, энтеральные, местные, пероральные (oral), пероральные (peroral) и инъекционные лекарственные формы являются особенно пригодными. Конкретные лекарственные формы включают твердые или жидкие лекарственные формы. Примеры подходящих лекарственных форм включают таблетку, капсулу, пилюлю, каплет, пастилку, саше, раствор, суспензию, дисперсию, сосуд, мешочек, бутыль, жидкость для инъекций, i.v. (внутривенно), i.m. (внутримышечно) или i.p. (интраперитонеально) вводимую жидкость и другие такие лекарственные формы, известные специалисту в фармации.

Количество сердечного гликозида, включенного в дозу по изобретению, будет составлять, по меньшей мере, одну или несколько лекарственных форм, и ее можно выбирать в соответствии с известными принципами фармации. Специально предусматривают эффективное количество или терапевтически адекватное количество терапевтического соединения. Под термином "эффективное количество" следует понимать, в отношении, например, лекарственных средств, что предусматривают фармацевтически эффективное количество. Фармацевтически эффективное количество является количеством (amount) или количеством (quantity) активного ингредиента, достаточным для требуемого или желаемого терапевтического ответа, или другими словами, количеством, достаточным, чтобы вызывать значимый биологический ответ при введении пациенту. Значимый биологический ответ может происходить в результате введения однократной или многократных доз активного вещества. Доза может содержать одну или несколько лекарственных форм. Следует понимать, что конкретный уровень доз для любого пациента будет зависеть от множества факторов, включая подвергаемое лечению показание, тяжесть показания, здоровье пациента, возраст, пол, вес, питание, фармакологический ответ, конкретная применяемая лекарственная форма и другие такие дозы.

Желаемая доза для перорального введения составляет до 5 лекарственных форм, можно вводить от одной до десяти лекарственных форм. Примеры лекарственных форм содержат 0,6 мг SCF-экстракта на лекарственную форму, в совокупности - от 0,6 до 60 мг (от 1 до 10 уровней доз) на дозу.

Сердечный гликозид может присутствовать в лекарственной форме в количестве, достаточном для обеспечения индивидуума начальной дозой олеандрина от 12 до 1200 мкг, или более, или менее. Лекарственная форма может содержать от 0,01 до 100 мг олеандрина, олеандринового экстракта или экстракта *Nerium oleander*, содержащего олеандрин.

Для применения в лечении млекопитающих сердечный гликозид можно включать в лекарственную форму. Некоторые варианты осуществления лекарственной формы не покрыты кишечнорастворимой оболочкой и высвобождают содержащуюся в них дозу сердечного гликозида в течение периода от 0,5 до 1 часов или менее. Некоторые варианты осуществления лекарственной формы покрыты кишечнорастворимой оболочкой и высвобождают содержащуюся в них дозу сердечного гликозида ниже желудка, например, в тощей, подвздошной, тонкой кишке и/или толстой кишке (ободочной кишке). Покрытые кишечнорастворимой оболочкой лекарственные формы будут высвобождать сердечные гликозиды в системный кровоток в течение 1-10 часов после перорального введения.

На основе предварительных данных по дозировке у животных ожидают, что от 50 до 75% вводимой дозы экстракта олеандра будут перорально биодоступными, таким образом, обеспечивая от 0,25 до 0,4 мг, от 0,1 до 50 мг, от 0,1 до 40 мг, от 0,2 до 40 мг, от 0,2 до 30 мг, от 0,2 до 20 мг, от 0,2 до 10 мг, от 0,2 до 5 мг, от 0,2 до 2,5 мг, от 0,2 до 2 мг, от 0,2 до 1,5 мг, от 0,2 до 1 мг, от 0,2 до 0,8 мг, от 0,2 до 0,7 или от 0,25 до 0,5 мг олеандрина на лекарственную форму. Принимая средний объем крови взрослых людей как 5 литров, ожидаемая концентрация олеандрина в плазме будет находиться в диапазоне от 0,05 до 2 нг/мл, от 0,005 до 10 нг/мл, от 0,005 до 8 нг/мл, от 0,01 до 7 нг/мл, от 0,02 до 7 нг/мл, от 0,03 до 6 нг/мл, от 0,04 до 5 нг/мл или от 0,05 до 2,5 нг/мл. Рекомендуемая суточная доза олеандрина, присутствующего в SCF-экстракте, как правило, составляет от приблизительно 0,25 до приблизительно 50 мг дважды в сутки, или от приблизительно 0,9 до 5 мг дважды в сутки или приблизительно каждые 12 часов. Доза может составлять от приблизительно 0,5 до приблизительно 100 мг/сутки, от приблизительно 1 до приблизительно 80 мг/сутки, от приблизительно 1,5 до приблизительно 60 мг/сутки, от приблизительно 1,8 до приблизительно 60 мг/сутки, от приблизительно 1,8 до приблизительно 40 мг/сутки. Максимальная переносимая доза может составлять приблизительно 100 мг/сутки, приблизительно 80 мг/сутки, приблизительно 60 мг/сутки, приблизительно 40 мг/сутки, приблизительно 38,4 мг/сутки или приблизительно 30 мг/сутки экстракта олеандра, содержащего олеандрин, и the минимальная эффективная доза может составлять приблизительно 0,5 мг/сутки, приблизительно 1 мг/сутки, приблизительно 1,5 мг/сутки, приблизительно 1,8 мг/сутки, приблизительно 2 мг/сутки или приблизительно 5 мг/сутки.

Следует отметить, что соединение в настоящем документе может обладать одной или несколькими функциями в составе по изобретению. Например, соединение может действовать как поверхностно-активное вещество и смешиваемый с водой растворитель, или как поверхностно-активное вещество и несмешиваемый с водой растворитель.

Жидкая композиция может содержать один или несколько фармацевтически приемлемых жидких носителей. Жидкий носитель может являться водным, неводным, полярным, неполярным и/или органическим носителем. Жидкие носители включают, в качестве неограничивающих примеров, смешиваемый с водой растворитель, несмешиваемый с водой растворитель, воду, буфер и их смесь.

Как применяют в настоящем документе, применяемые взаимозаменяемо термины "водорастворимый растворитель" или "смешиваемый с водой растворитель" относятся к органической жидкости, не образующей двухфазную смесь с водой или достаточно растворимой в воде для получения водной смеси растворителя, содержащей, по меньшей мере, пять процентов растворителя без разделения жидких фаз. Растворитель подходит для введения людям или животным. Примеры водорастворимых растворителей включают, в качестве неограничивающих примеров, PEG (полиэтиленгликоль), PEG

400 (полиэтиленгликоль с приблизительной молекулярной массой приблизительно 400), этанол, ацетон, алканол, алкоголь, простой эфир, пропиленгликоль, глицерин, триацетин, полипропиленгликоль, PVP (поливинилпирролидон), диметилсульфоксид, N,N-диметилформамид, формамид, N,N-диметилацетамид, пиридин, пропанол, N-метилацетамид, бутанол, солюфор (2-пирролидон), pharmasolve (N-метил-2-пирролидон).

Как применяют в настоящем документе, применяемые взаимозаменяемо термины "нерастворимый в воде растворитель" или "несмешиваемый с водой растворитель" относятся к органической жидкости, образующей двухфазную смесь с водой или обеспечивающей разделение фаз, если концентрация растворителя в воде превышает пять процентов. Растворитель подходит для введения людям или животным. Примеры нерастворимых в воде растворителей включают, в качестве не ограничивающих примеров, триглицериды со средней/длинной цепью, масло, касторовое масло, кукурузное масло, витамин Е, производные витамина Е, олеиновая кислота, жирная кислота, оливковое масло, софтизан 645 (диглицерил каприлат/капрат/стеарат/гидроксистеаратадипинат), миглиол, каптекс (Каптекс 350: Глицерилтрикаприлат/капрат/лауринат триглицерид; Каптекс 355: глицерилтрикаприлат/Капрат триглицерид; Каптекс 355 EP/ NF: Глицерилтрикаприлат/Капрат триглицерид средней цепи).

Подходящие растворители приведены в "International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guidance for industry *Q3C Impurities: Residual Solvents*" (1997), в котором содержаться рекомендации относительно того, какие количества остаточных растворителей признают безопасными в лекарственных средствах. Примеры растворителей приведены как растворители класса 2 или класса 3. Растворители класса 3 включают, например, уксусную кислоту, ацетон, анизол, 1-бутанол, 2-бутанол, бутил, трет-бутилметиловый простой эфир, кумол, этанол, этиловый эфир, этилацетат, этилформиат, муравьиную кислоту, гептан, изобутилацетат, изопропилацетат, метилацетат, метил-1-бутанол, метилэтилкетон, метилизобутилкетон, 2-метил-1-пропанол, пентан, 1-пентанол, 1-пропанол, 2-пропанол или пропилацетат.

Другие материалы, которые можно применять в качестве несмешиваемых с водой растворителей в изобретении включают: Каптекс 100: пропиленгликоль дикапрат; Каптекс 200: пропиленгликоль дикаприлат/дикапрат; Каптекс 200 P: пропиленгликоль дикаприлат/дикапрат; пропиленгликоль дикаприлокапрат; Каптекс 300: глицерилтрикаприлат/капрат; Каптекс 300 EP/NF: глицерилтрикаприлат/капрат триглицеридов средней цепи; Каптекс 350: глицерилтрикаприлат/капрат/лауринат; Каптекс 355: глицерилтрикаприлат/капрат; Каптекс 355 EP/NF: глицерилтрикаприлат/капрат триглицеридов средней цепи; Каптекс 500: Триацетин; Каптекс 500 P: Триацетин (фармацевтической категории); Каптекс 800: Пропиленгликоль ди(2-этитексаноат); Каптекс 810 D: глицерилтрикаприлат/Капрат/линолеат; Каптекс 1000: глицерилтрикапрат; Каптекс CA: триглицериды средней цепи; Каптекс MCT-170: триглицериды средней цепи; Капмул GMO: глицерилмоноолеат; Капмул GMO-50 EP/NF: глицерилмоноолеат; Капмул MCM: моно- и диглицериды средней цепи; Капмул MCM C8: глицерилмонокаприлат; Капмул MCM C10: глицерилмонокапрат; Капмул PG-8: пропиленгликоль монокаприлат; Капмул PG-12: пропиленгликоль монолауринат; Капрол 10G10O: декаглицерин декаолеат; Капрол 3GO: триглицерилмоноолеат; Капрол ET: полиглицериновый сложный эфир смеси жирных кислот; Капрол MPGO: гексаглицерилдиолеат; Капрол PGE 860: декаглицерилмоно-, диолеат.

Как применяют в настоящем документе, "поверхностно-активное вещество" относится к соединению, содержащему полярные или заряженные гидрофильные остатки, а также

неполярные гидрофобные (липофильные) остатки; т.е. поверхностно-активное вещество является амфифильным. Термин поверхностно-активное вещество может относиться к одному или смеси соединений. Поверхностно-активное вещество может являться солюбилизатором, эмульгатором или диспергирующим средством. Поверхностно-активное вещество может являться гидрофильным или гидрофобным.

Гидрофильное поверхностно-активное вещество может являться любым гидрофильным поверхностно-активным веществом, пригодным для применения в фармацевтических композициях. Такие поверхностно-активные вещества могут являться анионными, катионными, цвиттерионными или неионными, хотя в настоящий момент предпочтительны неионные гидрофильные поверхностно-активные вещества. Как указано выше, данные неионные гидрофильные поверхностно-активные вещества, как правило, будут обладать величинами HLB больше чем приблизительно 10. Смеси гидрофильных поверхностно-активных веществ также включены в объем изобретения.

Аналогично, гидрофобное поверхностно-активное вещество может являться любым гидрофобным поверхностно-активным веществом, пригодным для применения в фармацевтических композициях. В основном, подходящие гидрофобные поверхностно-активные вещества будут обладать величиной HLB менее чем приблизительно 10. Смеси гидрофобных поверхностно-активных веществ также включены в объем изобретения.

Примеры дополнительного подходящего солюбилизатора включают: спирты и полиолы, такие как этанол, изопропанол, бутанол, бензиловый спирт, этиленгликоль, пропиленгликоль, бутандиолы и их изомеры, глицерин, пентаэритритол, сорбит, маннит, транскутол, диметилизосорбид, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, поливиниловый спирт, гидроксипропилметилцеллюлозу и другие производные целлюлозы, циклодекстрины и производные циклодекстринов; простые эфиры полиэтиленгликолей со средней молекулярной массой от приблизительно 200 до приблизительно 6000, такие как простой эфир тетрагидрофурфурилового спирта и PEG (гликофурол, коммерчески доступный в BASF под торговой маркой Тетрагликоль) или метокси PEG (Union Carbide); амиды, такие как 2-пирролидон, 2-пиперидон, капролактам, N-алкилпирролидон, N-гидроксиалкилпирролидон, N-алкилпиперидон, N-алкилкапролактам, диметилацетамид и поливинилпирролидон; сложные эфиры, такие как этилпропионат, трибутилцитрат, ацетилтриэтилцитрат, ацетилтрибутилцитрат, триэтилцитрат, этилолеат, этилкаприлат, этилбутират, триацетин, пропиленгликоль моноацетат, пропиленгликоль диацетат, капролактон и его изомеры, валеролактон и его изомеры, бутиролактон и его изомеры; и другие солюбилизаторы, известные в данной области, такие как диметилацетамид, диметилизосорбид (Arlasolve DMI (ICI)), N-метил пирролидоны (Parmasolve (ISP)), монооктаноин, диэтиленгликоль моноэтиловый простой эфир (доступный в Gattefosse под торговой маркой Транскутол) и воду. Смеси солюбилизаторов также включены в объем изобретения.

Кроме указанных исключений, указанные в настоящем документе соединения легкодоступны в стандартных коммерческих источниках.

Чистая жидкая композиция является визуально чистой при осмотре невооруженным взглядом, т.к. она будет содержать менее чем 5%, менее чем 3% или менее чем 1% по массе суспендированных твердых веществ в зависимости от общей массы композиции.

Хотя и не обязательно, композиция или набор по настоящему изобретению могут включать хелатирующее средство, консервант, антиоксидант, адсорбенты, подкислитель, подщелачивающее средство, противовспениватель, буферное средство, краситель, электролит, соль, стабилизатор, модификатор тоничности, разбавитель, другой фармацевтический эксципиент или их сочетание.

Как применяют в настоящем документе, термин "антиоксидант" означает средство, ингибирующее окисление, и его, таким образом, применяют для предотвращения деградации препаратов посредством окислительного процесса. Такие соединения включают, в качестве неограничивающих примеров, аскорбиновую кислоту, аскорбилпальмитат, витамин Е, производные витамина Е, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, гипофосфорную кислоту, монотиоглицерин, пропилгаллат, аскорбат натрия, бисульфит натрия, формальдегид сульфоксилат натрия, метабисульфит натрия и другие такие материалы, известные специалистам в данной области.

Как применяют в настоящем документе, термин "хелатирующее средство" означает соединение, хелатирующее ионы металлов в растворе. Примеры хелатирующих средств включают ЭДТА (этилендиаминтетраацетат тетранатрия), DTPA (пентанатрия диэтилентриамин-пентаацетат), HEDTA (тринатриевую соль N-(гидроксиэтил)-этилен-диаминтриуксусной кислоты), NTA (нитрилотриацетат тринатрия), этанолдиглицин динатрия (Na_2EDG), диэтанолглицин натрия (DEGNa), лимонную кислоту и другие соединения, известные специалистам в данной области.

Как применяют в настоящем документе, термин "адсорбент" означает средство, способное удерживать другие молекулы на своей поверхности физическими или химическими (хемисорбция) средствами. Такие соединения включают, в качестве неограничивающих примеров, порошковый и активированный уголь, и другие материалы, известные специалисту в данной области.

Как применяют в настоящем документе, термин "подщелачивающее средство" означает соединение, применяемое для получения щелочной среды. Такие соединения включают, в качестве неограничивающих примеров, аммиачный раствор, карбонат аммония, диэтаноламин, моноэтаноламин, гидроксид калия, борат натрия, карбонат натрия, бикарбонат натрия, гидроксид натрия, триэтаноламин и троламин, и другие средства, известные специалистам в данной области.

Как применяют в настоящем документе, термин "подкислитель" означает соединение, применяемое для получения кислой среды. Такие соединения включают, в качестве не ограничивающих примеров, уксусную кислоту, аминокислоту, лимонную кислоту, фумаровую кислоту и другие альфа-гидроксикислоты, соляную кислоту, аскорбиновую кислоту и азотную кислоту, и другие средства, известные специалистам в данной области.

Как применяют в настоящем документе, термин "противовспениватель" означает соединение или соединения, предотвращающие или снижающие количество пены, образующейся на поверхности заполняющей композиции. Подходящие противовспениватели включают, в качестве неограничивающих примеров, диметикон, симетикон, октоксинол, и другие средства, известные специалистам в данной области.

Как применяют в настоящем документе, термин "буферное средство" означает соединение, применяемое для противодействия изменению pH после разбавления или добавления кислоты или щелочи. Такие соединения включают, в качестве не ограничивающих примеров, метафосфат калия, фосфат калия, одноосновный ацетат натрия и безводный цитрат натрия и дегидрат, и другие такие материалы, известные специалистам в данной области.

Как применяют в настоящем документе, термин "разбавитель" или "наполнитель" означает инертные вещества, применяемые в качестве наполнителей для достижения желаемого объема, реологических свойств и характеристик компрессии при получении таблеток и капсул. Такие соединения включают, в качестве не ограничивающих примеров, двухосновный фосфат кальция, каолин, лактозу, сахарозу, маннит,

микрокристаллическую целлюлозу, порошковую целлюлозу, осажденный карбонат кальция, сорбит и крахмал, и другие материалы, известные специалисту в данной области.

Как применяют в настоящем документе, термин "консервант" означает соединение, применяемое для предотвращения роста микроорганизмов. Такие соединения включают, в качестве неограничивающих примеров, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, бензойную кислоту, бензиловый спирт, хлорид цетилпиридиния, хлорбутанол, фенол, фенилэтиловый спирт, фенилмеркурнитрат, фенилмеркурацетат, тимеросал, метакрезол, хлорид миристил-гамма-пиколиния, бензоат калия, сорбат калия, бензоат натрия, пропионат натрия, сорбиновую кислоту, тимол и метил-, этил-, пропил- или бутил-парабены, и другие средства, известные специалистам в данной области.

Как применяют в настоящем документе, термин "краситель" означает соединение, применяемое для придания цвета фармацевтическим препаратам. Такие соединения включают, в качестве не ограничивающих примеров, FD&C Red № 3, FD&C Red № 20, FD&C Yellow № 6, FD&C Blue № 2, FD&C Green № 5, FD&C Orange № 5, FD&C Red № 8, карамель и оксид железа (черный, красный, желтый), другие красители FD&C и природные красители, такие как экстракт кожицы винограда, свекольный порошок, бета-каротин, аннато, кармин, куркуму, паприку их сочетания, и другие такие материалы, известные специалистам в данной области.

Как применяют в настоящем документе, термин "стабилизатор" означает соединение, применяемое для стабилизации активного средства в отношении физических, химических или биохимических процессов, в ином случае снижающих терапевтическую активность средства. Подходящие стабилизаторы включают, в качестве не ограничивающих примеров, альбумин, сиаловую кислоту, креатинин, глицин и другие аминокислоты, никотинамид, ацетилтриптофонат натрия, оксид цинка, сахарозу, глюкозу, лактозу, сорбит, маннит, глицерин, полиэтиленгликоли, каприлат натрия и сахарин натрия, и другие средства, известные специалистам в данной области.

Как применяют в настоящем документе, термин "модификатор тоничности" означает соединение или соединения, которые можно применять для регуляции тоничности жидкого состава. Подходящие модификаторы тоничности включают глицерин, лактозу, маннит, декстрозу, хлорид натрия, сульфат натрия, сорбит, трегалозу и другие средства, известные специалисту в данной области.

Композиция по изобретению также может включать масла, такие как жирные масла, арахисовое масло, сезамовое масло, хлопковое масло, кукурузное масло и оливковое масло; жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, стеариновая кислота и изостеариновая кислота; и сложные эфиры жирных кислот, такие как этил олеат, изопропил миристат, глицериды жирных кислот и ацетилированные глицериды жирных кислот. Композиция также может включать спирт, такой как этанол, изопропанол, гексадециловый спирт, глицерин и пропиленгликоль; глицеролкетали, такие как 2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-метанол; простые эфиры, такие как полиэтиленгликоль 450; нефтяные углеводороды, такие как минеральное масло и петролатум; воду; фармацевтически приемлемое поверхностно-активное вещество, суспендирующее средство или эмульгатор; или их смесь.

Следует понимать, что соединения, применяемые в области фармацевтического состава, как правило, служат для множества функций или целей. Таким образом, если соединение, названное в настоящем документе, указано только один раз, или его применяют для обозначения нескольких терминов в настоящем документе, его цель или функция не ограничена только указанной целью (целями) или функцией (функциями).

Один или несколько компонентов состава могут присутствовать в виде своего

свободного основания или его фармацевтически или аналитически приемлемой соли. Как применяют в настоящем документе, "фармацевтически или аналитически приемлемая соль" относится к соединению, модифицированному реакцией с кислотой по мере необходимости для образования пары с ионной связью. Примеры приемлемых солей включают общепринятые нетоксичные соли, образованные, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. Подходящие нетоксичные соли включают полученные из неорганических кислот, таких как соляная, бромистоводородная, серная, сульфоновая, сульфаминовая, фосфорная, азотная и другие кислоты, известные специалистам в данной области. Соли, полученные из органических кислот, таких как аминокислоты, уксусная, пропионовая, янтарная, гликолевая, стеариновая, молочная, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, памовая, малеиновая, гидроксималеиновая, фенилуксусная, глутаминовая, бензойная, салициловая, сульфаниловая, 2-ацетоксибензойная, фумаровая, толуолсульфоновая, метансульфоновая, этандисульфоновая, щавелевая, изэтиновая и другие кислоты, известные специалистам в данной области. Списки других подходящих солей можно найти в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th. ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418, соответствующее описание которого, таким образом, включено в качестве ссылки.

Фразу "фармацевтически приемлемый" применяют в настоящем документе в отношении тех соединений, материалов, композиций, и/или лекарственных форм, которые в соответствии с медицинской оценкой пригодны для применения в контакте с тканями человека и животных и не обладают излишней токсичностью, не вызывают раздражение, аллергический ответ или любую другую проблему или осложнение в соответствии с разумным соотношением польза/риск.

Лекарственную форму можно получать любыми общепринятыми средствами, известными в фармацевтической промышленности. Жидкую лекарственную форму можно получать, предоставляя, по меньшей мере, один жидкий носитель и олеандрин или содержащий олеандрин экстракт в контейнере. В жидкую лекарственную форму можно включать один или несколько других эксципиентов. Твердую лекарственную форму можно получать, предоставляя, по меньшей мере, один твердый носитель и олеандрин или содержащий олеандрин экстракт. В твердую лекарственную форму можно включать один или несколько других эксципиентов.

Лекарственную форму можно упаковывать с применением общепринятого упаковочного оборудования и материалов. Ее можно включать в пачку, бутыль, сосуд, мешок, шприц, оболочку, пакет, блистерную упаковку, коробку, ампулу или другой такой контейнер.

Изобретение относится к способу улучшения клинического статуса статистически значимого количества индивидуумов в популяции индивидуумов с неврологическим состоянием, способу, включающему: введение популяции индивидуумов сердечного гликозида или содержащей сердечный гликозид композиции; и определение клинического статуса индивидуумов. В некоторых вариантах осуществления статистически значимое количество составляет, по меньшей мере, 5%, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 90% популяции. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит олеандрин или экстракт, содержащий олеандрин. Экстракт необязательно содержит одно или несколько других фармакологически активных соединений, взаимодействующих с олеандрином для улучшения клинического статуса индивидуумов.

Как применяют в настоящем документе, "производное" является: a) химическим веществом, структурно относящимся к первому химическому веществу и теоретически происходящему от него; b) соединением, образованным из схожего первого соединения или соединения, которое, как можно представить, возникло из другого первого соединения, если один атом первого соединения заменять другим атомом или группой атомов; c) соединением, произошедшим или полученным из родительского соединения и содержащим важные элементы родительского соединения; или d) химическим соединением, которое можно получать из первого соединения со схожей структурой за один или несколько этапов.

Учитывая приведенное выше описание и приведенные ниже примеры, специалист в данной области способен осуществлять изобретение на практике, как заявлено, без излишнего экспериментирования. Вышесказанное будет более понятным с учетом следующих примеров, в которых подробно описывают способы получения вариантов осуществления настоящего изобретения. Все ссылки на эти примеры приведены в иллюстративных целях. Следующие примеры не следует считать исчерпывающими, но исключительно иллюстративными всего для нескольких из множества вариантов осуществления, предусматриваемых настоящим изобретением.

Олеандрин можно приобретать в Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Сверхкритическая флюидная экстракция из порошка листьев олеандра

Способ A. С применением диоксида углерода.

Порошок листьев олеандра получали, собирая, промывая и высушивая материал листьев олеандра, затем пропуская материал листьев олеандра через измельчающее и высушивающее устройство, такое как описывают в патентах США №№ 5236132, 5598979, 6517015, и 6715705. Масса применяемого начального материала составляла 3,94 кг.

Начальный материал объединяли в экстракторе с чистым CO_2 при давлении 300 бар (30 мПа, 4351 фунт/дюйм^2) и температуре 50°C (122°F). Всего применяли 197 кг CO_2 для получения отношения растворителя к исходному материалу 50:1. Затем смесь CO_2 и исходного материала пропускали через сепаратор, изменяющий давление и температуру смеси и отделяющий экстракт от диоксида углерода.

Экстракт (65 г) получали в виде коричневатого, липкого, вязкого материала с приятным ароматом. Вероятно, цвет определяется хлорофиллом. Для точного определения выхода пробирки и сепаратор промывали ацетоном, и ацетон выпаривали для получения дополнительных 9 г экстракта. Общее количество экстракта составляло 74 г. Учитывая массу начального материала, выход экстракта составлял 1,88%. Содержание олеандрина в экстракте вычисляли с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии как 560,1 мг или выход 0,76%.

Способ B. С применением смеси диоксида углерода и этанола

Порошок листьев олеандра получали, собирая, промывая и высушивая материал листьев олеандра, затем пропуская материал листьев олеандра через измельчающее и высушивающее устройство, такое как описывают в патентах США №№ 5236132, 5598979, 6517015, и 6715705. Масса применяемого начального материала составляла 3,85 кг.

Начальный материал объединяли в экстракторе с чистым CO_2 и 5% этанолом в качестве модификатора при давлении 280 бар (28 мПа, 4061 фунт/дюйм^2) и температуре 50°C (122°F). Всего применяли 160 кг CO_2 и 8 кг этанола для получения отношения

растворителя к исходному материалу 43,6:1. Затем смесь CO_2, этанола и исходного материала пропускали через сепаратор, изменяющий давление и температуру смеси и отделяющий экстракт от диоксида углерода.

После удаления этанола получали экстракт (207 г) в виде темно-зеленой, липкой, вязкой массы, очевидно содержащей некоторое количество хлорофилла. Учитывая массу начального материала, выход экстракта составлял 5,38%. Содержание олеандрина в экстракте вычисляли с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии как 1,89 г или выход 2,1%.

Пример 2

Экстракция горячей водой из порошка листьев олеандра.

Экстракцию горячей водой, как правило, применяют для экстракции олеандрина и других активных компонентов из листьев олеандра. Примеры способы экстракции горячей водой можно найти в патентах США №№ 5135745 и 5869060.

Экстракцию горячей водой осуществляли с применением 5 г порошка листьев олеандра. Десять объемов кипящей воды (по массе начального материала олеандра) добавляли к порошку листьев олеандра и смесь непрерывно перемешивали в течение 6 часов. Затем смесь фильтровали, собирали остатки листьев и снова экстрагировали в тех же условиях. Фильтраты объединяли и лиофилизировали. Внешне экстракт являлся коричневым. Высушенный экстрагированный материал весил приблизительно 1,44 г. 34,21 мг экстрагированного материала растворяли в воде и подвергали анализу содержания олеандрина с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Количество олеандрина определяли как 3,68 мг. Учитывая количество экстракта, выход олеандрина вычисляли как 0,26%. В таблице ниже приведено сравнение выходов олеандрина для двух экстракций суперкритическим диоксидом углерода из примера 1 и экстракции горячей водой.

Сравнение выходов	
Экстрагент	**Выход олеандрина с учетом общей массы экстракта**
Суперкритический диоксид углерода: пример 1, способ A	0,76%
Суперкритический диоксид углерода: пример 1, способ B	2,1%
Экстракция горячей водой: пример 2	0,26%

Пример 3

Лечение неврологического состояния, включая, в качестве не ограничивающих примеров, болезнь Альцгеймера.

Способ A. Терапия сердечным гликозидом

Индивидууму с болезнью Альцгеймера предписывают сердечный гликозид и вводят индивидууму терапевтически адекватные дозы по предписанной схеме дозирования в течение периода времени. Периодически определяют уровень терапевтического ответа индивидуума. Если уровень терапевтического ответа слишком низок при одной дозе, то дозу повышают по заранее определенной схеме повышения дозы до достижения желаемого уровня терапевтического ответа индивидуума. Лечение индивидуума сердечным гликозидом продолжают по мере необходимости, и дозу или схему дозирования можно регулировать по мере необходимости до достижения пациентом желаемой клинической конечной точки.

Способ B. Комбинированное лечение: сердечный гликозид с другим средством

Следует приведенный выше способ A за исключением того, что индивидууму предписывают и вводят одно или несколько других терапевтических средств для лечения болезни Альцгеймера или его симптомов. Затем одно или несколько других терапевтических средств можно вводить до, после или вместе с сердечным гликозидом.

Также можно осуществлять повышение (или снижение) дозы одного или нескольких других терапевтических средств. Подходящие одно или несколько других терапевтических средств включают Namenda™ (хлорид мемантина), Aricept™ (донепезил), Razadyne™ (галантамин), Exelon™ (ривастигмин) и Cognex™ (такрин).

Пример 4

Лечение неврологического состояния, включая, в качестве не ограничивающих примеров, болезнь Хантингтона.

Способ A. Терапия сердечным гликозидом

Индивидууму с болезнью Хантингтона предписывают сердечный гликозид и вводят индивидууму терапевтически адекватные дозы по предписанной схеме дозирования в течение периода времени. Периодически определяют уровень терапевтического ответа индивидуума. Если уровень терапевтического ответа слишком низок при одной дозе, то дозу повышают по заранее определенной схеме повышения дозы до достижения желаемого уровня терапевтического ответа индивидуума. Лечение индивидуума сердечным гликозидом продолжают по мере необходимости, и дозу или схему дозирования можно регулировать по мере необходимости до достижения пациентом желаемой клинической конечной точки. Вводимые дозы могут являться схожими с таковыми в примере 3 или иными, описываемыми в настоящем документе.

Способ B. Комбинированное лечение: сердечный гликозид с другим средством

Следует приведенный выше способ A за исключением того, что индивидууму предписывают и вводят одно или несколько других терапевтических средств для лечения болезни Хантингтона или его симптомов. Одно или несколько других терапевтических средств можно вводить до, после или вместе с сердечным гликозидом. Также можно осуществлять повышение (или снижение) дозы одного или нескольких других терапевтических средств. Подходящие одно или несколько других терапевтических средств включают витамин E, баклофен (производное CoQ10), ламотригин (антиконвульсант), ремацемид (анестетик, являющийся низкоаффинным антагонистом NMDA) и рилузол (блокатор натриевых каналов).

Пример 5

Лечение неврологического состояния, включая, в качестве не ограничивающих примеров, ишемический инсульт.

Способ A. Терапия сердечным гликозидом

Индивидууму с ишемическим инсультом предписывают сердечный гликозид и вводят индивидууму терапевтически адекватные дозы по предписанной схеме дозирования в течение периода времени. Периодически определяют уровень терапевтического ответа индивидуума. Если уровень терапевтического ответа слишком низок при одной дозе, то дозу повышают по заранее определенной схеме повышения дозы до достижения желаемого уровня терапевтического ответа индивидуума. Лечение индивидуума сердечным гликозидом продолжают по мере необходимости, и дозу или схему дозирования можно регулировать по мере необходимости до достижения пациентом желаемой клинической конечной точки. Вводимые дозы могут являться схожими с таковыми в примере 3 или иными, описываемыми в настоящем документе.

Способ B. Комбинированное лечение: сердечный гликозид с другим средством

Следует приведенный выше способ A за исключением того, что индивидууму предписывают и вводят одно или несколько других терапевтических средств для лечения ишемического инсульта или его симптомов. Одно или несколько других терапевтических средств можно вводить до, после или вместе с сердечным гликозидом. Также можно осуществлять повышение (или снижение) дозы одного или нескольких других

терапевтических средств.

Пример 6

ВЭЖХ-анализ содержащих олеандрин растворов

Образцы (стандарт олеандрина, SCF-экстракт и экстракт, полученный экстракцией горячей водой) анализировали на ВЭЖХ (Waters) с применением следующих условий: колонки Symmetry C18 (5,0 мкм, 150×4,6 мм I.D.; Waters); подвижная фаза MeOH:вода= 54:46 (об./об.) и скорость потока 1,0 мл/мин. Длину волны детектирования устанавливали на 217 нм. Образцы получали растворением соединения или экстракта в фиксированном количестве растворителя для ВЭЖХ для достижения приблизительной целевой концентрации олеандрина.

Пример 7

Определение экспрессии α3 и α1 в нормальной нервной ткани

Можно следовать способам, изложенным в международной заявке PCT № PCT/US08/82641, зарегистрированной 6 ноября 2008 года от имени Phoenix Biotechnology, Inc., полное описание которой, таким образом, включено в качестве ссылки.

Пример 8

Оценка сердечного гликозида в анализе *in vitro* для инсульта и не-инсульта

Способ A. Инсульт: Получение кортикальных срезов головного мозга и OGD.

Неокортикальные срезы головного мозга получали из крысят линии Спрага-Доули на 7 день после рождения. Кору головного мозга рассекали, делали срезы толщиной 400 мкм и переносили в контейнер, содержащий холодную искусственную цереброспинальную жидкость с 1 мкМ MK-801, перед нанесением; MK-801 не включали в любые последующие способы. Для имитации ишемического повреждения с применением транзиторного кислородно-глюкозного голодания (OGD) срезы из одного полушария каждого головного мозга подвергали воздействию не содержащей глюкозу N_2-барботированной искусственной цереброспинальной жидкости в течение 7,5 мин в атмосфере с низким содержанием O_2 (0,5%). Затем срезы после OGD наносили на нитроцеллюлозную проницаемую мембрану или мембрану Millicell (Millipore) параллельно с контрольными срезами из противоположного полушария, которые получали идентичным образом за исключением OGD. Через тридцать минут после нанесения пары срезов головного мозга трансфицировали, переносили на 24-луночные планшеты и инкубировали при 37°C и 5% CO_2 во влажной камере. В каждом эксперименте применяли 5-6 минут кислородно-глюкозного голодания (OGD) для индукции >50% потери здоровых кортикальных нейронов через 24 часа (сравни первые два столбика на фиг. 1A). В качестве внутреннего положительного контроля применяли фиксированную концентрацию (3 мкМ) нерифолина. В случае олеандрина все три концентрации от 0,3 до 3 мкМ, по-видимому, обеспечивали нейропротективное действие в первых двух экспериментах (фиг. 1A и 1B), таким образом, в третьей серии экспериментов снижали тестируемые концентрации олеандрина (фигура 1C) и предполагали, что пороговая концентрация для нейропротективного действия находится в диапазоне от 0,1 до 0,3 мкМ.

Способ B. Не-инсульт: анализ срезов головного мозга.

Олеандрин и PBI-05204 тестировали на срезах головного мозга при "не-инсульте"; т.е. срезы получали и трансфицировали YFP, но не подвергали дополнительному повреждению посредством OGD. Смотри указанный выше экспериментальный способ. Мы наблюдали, что ряд нейропротективных соединений, включая нерифолин, может обеспечивать умеренные уровни нейропротективного действия на таких срезах

головного мозга, по-видимому, посредством защиты от повреждения, вызываемого самим процессом получения срезов и культивирования. Как можно видеть на фиг. 2A-2C, олеандрин, по-видимому, способен обеспечивать нейропротективное действие на таких срезах головного мозга "без OGD" на схожих с нерифолином уровнях, это свидетельствует о том, что сердечные гликозиды опосредуют нейропротективное действие даже в отсутствие кислородного или глюкозного голодания.

Пример 9

Оценка сердечного гликозида в анализе APP *in vitro* в случае болезни Альцгеймера

В данной модели срезов головного мозга крысы для APP/Aβ-индуцированной дегенерации кортикальных пирамидальных нейронов применяли биолистическую трансфекцию не только для введения витальных маркеров, таких как YFP, но также и для введения конструкций гена заболевания в те же популяции нейронов на срезах головного мозга. Таким образом, в APP/Aβ-модели срезов головного мозга YFP котрансфицируют с изоформами APP, что приводит к прогрессирующей дегенерации кортикальных пирамидальных нейронов в течение 3-4 дней после получения срезов головного мозга и трансфекции. Как можно видеть на фиг. 3A-3C для трех серий экспериментов, и олеандрин, и PBI-05204, по-видимому, способны обеспечивать дозозависимое нейропротективное действие на APP-трансфицированных срезах головного мозга, поддерживая уровни, близкие к уровням, обеспечиваемым ингибирующими BACE лекарственными средствами.

Пример 10

Оценка сердечного гликозида в анализе кортикостриарных совместных культур *in vitro* в случае болезни Хантингтона

В данном анализе вместо применения интактных срезов головного мозга мутантный htt вводят посредством электропорации в смешанные совместные культуры кортикальных нейронов, стриарных нейронов и глии с высокой плотностью, анализируемые в 96-луночных планшетах. Целью анализа на данной платформе является сочетание биологической/клинической применимости комплексной системы первичной культуры, обобщающей ключевые аспекты взаимосвязи соответствующих заболеванию популяций нейронов *in vivo* со способностью проводить крупномасштабные полностью автоматизированные скрининговые исследования. В данном анализе в течение 1-2 недель *in vitro* трансфицированные конструкции мутантного htt вызывали прогрессирующую дегенерацию стриарных и кортикальных нейронов, которые затем подсчитывали с применением алгоритмов автоматизированной обработки изображений и обнаружения объектов на платформе Cellomics Arrayscan VTI. Каждую точку данных брали из 6 лунок с 16 изображениями для каждой лунки, автоматически полученными, обработанными и проанализированными на Cellomics Arrayscan с применением протоколов, разработанных при крупномасштабном скрининговом исследовании, проведенном совместно с Cure Huntington's Disease Initiative. В совокупности в каждом цикле отбирали некие 25000 изображений и анализировали, 4 цикла в неделю.

Платформа для анализа совместных кортикостриарных культур.

До нанесения нейронов получали чистые глиальные культуры для получения 96-луночных планшетов с конфлюэнтным глиальным покрытием. Затем кортикальную и стриарную ткань разделяли и "нуклеофицировали" соответствующими ДНК-конструкциями, и они являлись различимо более поздними по экспрессии различных флуоресцентных белков, таких как YFP, CFP и mCherry. Затем данные раздельно трансфицированные кортикальные и стриарные нейроны тщательно перемешивали и наносили на 96-луночные планшеты, содержащие ранее нанесенные монослои глии.

Тестировали олеандрин и PB 1-05204 (суперкритический CO_2-экстракт из *Nerium oleander*) на данной платформе совместных кортикостриарных культур, и, предварительно, данные соединения, по-видимому, являются сильнейшими попаданиями, наблюдаемыми к настоящему времени из >400 современных молекул лекарственных средств, оцениваемых в данной системе анализа. Для сравнения включен график доза-ответ для KW6002 (антагониста аденозин-2a-рецептора), соединения, которое мы регулярно включаем в качестве положительного контроля для данного анализа совместных культур (смотри фиг. 4E). Эффективность олеандрина находится на одном уровне с KW6002, в то время как его активность, по-видимому, примерно в 100 раз выше.

Пример 11

Оценка сердечного гликозида и экстракта по изобретению в анализе *in vitro* для инсульта и не-инсульта

Способ A. Инсульт: Получение кортикальных срезов головного мозга и OGD.

Неокортикальные срезы головного мозга получали из крысят линии Спрага-Доули на 7 день после рождения. Кору головного мозга рассекали, делали срезы толщиной 400 мкм и переносили в контейнер, содержащий холодную искусственную цереброспинальную жидкость с 1 мкМ MK-801, перед нанесением; MK-801 не включали в любые последующие способы. Для имитации ишемического повреждения с применением транзиторного кислородно-глюкозного голодания (OGD) срезы из одного полушария каждого головного мозга подвергали воздействию не содержащей глюкозу N_2-барботированной искусственной цереброспинальной жидкости в течение 7,5 мин в атмосфере с низким содержанием O_2 (0,5%). Затем срезы после OGD наносили на нитроцеллюлозную проницаемую мембрану или мембрану Millicell (Millipore) параллельно с контрольными срезами из противоположного полушария, которые получали идентичным образом за исключением OGD. Через тридцать минут после нанесения пары срезов головного мозга трансфицировали, переносили на 24-луночные планшеты и инкубировали при 37°C и 5% CO_2 во влажной камере. В каждом эксперименте применяли 5-6 минут кислородно-глюкозного голодания (OGD) для индукции >50% потери здоровых кортикальных нейронов через 24 часа. В качестве внутреннего положительного контроля применяли фиксированную концентрацию (3 мкМ) нерифолина (сердечного гликозида). В случае олеандрина (сердечного гликозида) все три концентрации от 0,3 до 3 мкМ, по-видимому, обеспечивали нейропротективное действие в первых двух экспериментах, таким образом, в третьей серии экспериментов снижали тестируемые концентрации олеандрина и предполагали, что пороговая концентрация для нейропротективного действия находится в диапазоне от 0,1 до 0,3 мкМ. Не фракционированный экстракт, например, из видов *Nerium*, или его фракцию также можно применять, как описано для олеандрина.

Способ B. Не-инсульт: анализ срезов головного мозга.

Олеандрин и PBI-05204, не фракционированный SCF-экстракт *Nerium oleander*, тестировали на срезах головного мозга при "не-инсульте"; т.е. срезы получали и трансфицировали YFP, но не подвергали дополнительному повреждению посредством OGD. Смотри указанный выше экспериментальный способ. Мы наблюдали, что ряд нейропротективных соединений, включая нерифолин, может обеспечивать умеренные уровни нейропротективного действия на таких срезах головного мозга, по-видимому, посредством защиты от повреждения, вызываемого самим процессом получения срезов и культивирования. Данные демонстрируют, что олеандрин и экстракт, по-видимому,

способны обеспечивать нейропротективное действие на таких срезах головного мозга "без OGD" на схожих с нерифолином уровнях, это свидетельствует о том, что сердечные гликозиды опосредуют нейропротективное действие даже в отсутствие кислородного или глюкозного голодания.

Пример 12

ВЭЖХ-анализ SCF-экстракта

Целью данного анализа является идентификация содержащего сердечный гликозид экстракта. Образец каждого экстракта анализировали следующим образом. Экстракт (1-3 мг) растворяли в 1-5 мл водно-метанолового раствора (80% метанола в воде). Разбавленный образец (10-25 мкл) анализировали на колонке Agilent Zorbax SB-C18 с применением 80% метанола в воде в качестве подвижной фазы, скорость потока 0,7 мл/мин и DAD-UV-контроль элюата при следующих длинах волн: 203210217, 230254280, 310 и 300 нм. Положительную идентификацию подтверждают формированием пика на хроматограмме при сравнении времени удержания и спектров образцов экстракта с референсными образцами.

Пример 13

Отсроченный анализ срезов головного мозга для определения нейропротективного действия

Данный анализ проводили в соответствии с примером 11 за исключением следующих изменений. Разрешали конкретный период времени между OGD и введением предполагаемого нейропротективного средства. Определяли способность PBI-05204 обеспечивать нейропротективное действие на срезах головного мозга, если обработку задерживали относительно времени подвергания OGD. Данные демонстрируют, что 2-часовая задержка введения экстрактов *Nerium oleander* хорошо переносима, демонстрируя схожие уровни нейропротективного действия с таковыми, достигнутыми при нанесении PBI-05204 непосредственно после подвергания OGD. Нейропротективное действие снижалось при задержке введения PBI-05204 от 4 до 6 часов, но находилось на уровне все еще значимого и физиологически адекватного нейропротективного действия.

Как применяют в настоящем документе, термин "приблизительно (about)" или "приблизительно (approximately)" означает +10%, +5%, +2,5% или +1% от конкретного значения. Как применяют в настоящем документе, термин "по существу" означает "в большей степени" или "по меньшей мере, большинство" или "более 50%".

Выше изложено подробное описание конкретных вариантов осуществления изобретения. Следует понимать, что хотя в настоящем документе в иллюстративных целях описывают конкретные варианты осуществления изобретения, можно осуществлять различные модификации без отступления от сущности и объема изобретения. Таким образом, изобретение не ограничено, кроме как заявленной формулой изобретения. Все варианты осуществления, описываемые и заявленные в настоящем документе, можно осуществлять и выполнять без излишнего экспериментирования в свете настоящего описания.

Формула изобретения

1. Способ лечения неврологического состояния, выбранного из болезни Альцгеймера, болезни Хантингтона и инсульта у индивидуума, включающий: введение нуждающемуся в этом индивидууму композиции, содержащей сердечный гликозид в эффективном количестве для лечения указанного неврологического состояния, где сердечный гликозид является олеандрином, включенным в экстракт, полученный сверхкритической

флюидной экстракцией из растительной массы олеандра CO_2 или сверхкритической флюидной экстракцией из растительной массы олеандра CO_2 в присутствии модификатора, выбранного из метанола, этанола и пропанола, и экстракт дополнительно содержит одно или несколько других терапевтически эффективных средств, полученных вместе с сердечным гликозидом при экстракции, включающих, по меньшей мере, олеазид А, олеандригенин, нериталозид и одорозид, при этом сердечный гликозид исключает нерифолин.

2. Способ по п. 1, включающий:

определение того, является ли или нет неврологическое состояние у индивидуума болезнью Альцгеймера, болезнью Хантингтона или инсультом;

указание по введению сердечного гликозида;

введение начальной дозы сердечного гликозида индивидууму по предписанной начальной схеме дозирования в течение периода времени;

периодическое определение адекватности клинического ответа и/или терапевтического ответа индивидуума на лечение сердечным гликозидом; и

если клинический ответ и/или терапевтический ответ индивидуума является адекватным, то продолжают лечение сердечным гликозидом по мере необходимости до достижения желаемой клинической конечной точки; или

если клинический ответ и/или терапевтический ответ индивидуума является неадекватным при начальной дозе и начальной схеме дозирования, то повышают или снижают дозу до достижения желаемого клинического ответа и/или терапевтического ответа индивидуума.

3. Способ по п. 1, где неврологическое состояние является неврологическим заболеванием или нарушением с этиологией, связанной с измененной активностью Na/K-АТФазы, где способ включает:

определение того, что индивидуум страдает неврологическим заболеванием или нарушением с этиологией, связанной с измененным отношением субъединиц Na/K-АТФазы α3-изоформы и α1-изоформы, или связанной с измененной активностью Na/K-АТФазы; и

указание по введению индивидууму содержащей сердечный гликозид композиции.

4. Способ по п. 1, где неврологическое состояние является неврологическим заболеванием или нарушением с этиологией, связанной с измененной активностью HIF-1α, где способ включает:

определение того, что индивидуум страдает неврологическим заболеванием или нарушением с этиологией, связанной с измененной активностью HIF-1α; и

указание по введению индивидууму композиции, содержащей сердечный гликозид.

5. Способ по п. 1, где после введения сердечного гликозида, он преодолевает гематоэнцефалитический барьер и остается в ткани головного мозга в течение периода по меньшей мере 8 часов.

6. Способ по п. 1, где неврологическое состояние является ишемическим инсультом или инсульт-опосредованным ишемическим повреждением головного мозга.

7. Способ по п. 1, где индивидууму назначают и вводят терапевтически эффективную дозу содержащей сердечный гликозид композиции.

8. Способ по п. 1, где индивидууму вводят содержащую сердечный гликозид композицию по предписанной схеме дозирования.

9. Способ по п. 1, где введение композиции обеспечивает концентрацию сердечного гликозида в плазме индивидуума в диапазоне от 0,005 до 10 нг/мл.

10. Способ по п. 1, где композиция содержит от 0,1 до 50 мг сердечного гликозида.

11. Способ по п. 1, где индивидууму вводят дозу сердечного гликозида от 12 до 1200 мкг.

12. Способ по п. 1, где композиция дополнительно содержит одно или несколько других терапевтически эффективных средств.

13. Способ по п. 1, где сердечный гликозид присутствует в фармацевтическом составе или композиции.

14. Способ по п. 1, где сердечный гликозид получают из растительной массы олеандра, содержащей виды Nerium или виды Thevetia.

15. Способ по п. 14, где вид Nerium представляет собой Nerium oleander, а вид Thevetia представляет собой Thevetia neriifolia.

16. Способ по п. 1, где сердечный гликозид преодолевает гематоэнцефалический барьер после введения индивидууму.

17. Способ по п. 1, где экстракт с сердечным гликозидом получали сверхкритической флюидной экстракцией в присутствии модификатора.

18. Способ по п. 1, где сердечный гликозид имеет скорость выведения для ткани головного мозга не более чем 4 л/час.

19. Способ улучшения клинического статуса статистически значимого количества индивидуумов в популяции индивидуумов с неврологическим состоянием, выбранным из болезни Альцгеймера, болезни Хантингтона и инсульта, где способ включает: введение популяции индивидуумов сердечного гликозида или содержащей сердечный гликозид композиции; и определение клинического статуса индивидуумов, где сердечный гликозид является олеандрином, включенным в экстракт, полученный сверхкритической флюидной экстракцией из растительной массы олеандра CO_2 или сверхкритической флюидной экстракцией из растительной массы олеандра CO_2 в присутствии модификатора, выбранного из метанола, этанола и пропанола, и экстракт дополнительно содержит одно или несколько других терапевтически эффективных средств, полученных вместе с сердечным гликозидом при экстракции, включающих, по меньшей мере, олеазид А, олеандригенин, нериталозид и одорозид, при этом сердечный гликозид исключает нерифолин.

20. Способ снижения или предотвращения повышения частоты развития неврологического состояния, выбранного из болезни Альцгеймера, болезни Хантингтона и инсульта, в популяции индивидуумов с риском такового, где способ включает введение эффективной дозы сердечного гликозида на регулярной основе в течение продолжительного периода времени одному или нескольким индивидуумам в популяции индивидуумов с риском развития неврологического состояния, такого как болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона или инсульт, таким образом, предотвращая повышение или снижая частоту неврологического состояния в популяции, где сердечный гликозид является олеандрином, включенным в экстракт, полученный сверхкритической флюидной экстракцией из растительной массы олеандра CO_2 или сверхкритической флюидной экстракцией из растительной массы олеандра CO_2 в присутствии модификатора, выбранного из метанола, этанола и пропанола, и экстракт дополнительно содержит одно или несколько других терапевтически эффективных средств, полученных вместе с сердечным гликозидом при экстракции, включающих, по меньшей мере, олеазид А, олеандригенин, нериталозид и одорозид, при этом сердечный гликозид исключает нерифолин.

21. Способ по п. 20, где регулярная основа представляет собой введение ежедневно, через день, каждый второй день, каждый третий день, каждый четвертый день, каждый

пятый день, каждый шестой день, еженедельно, через неделю, каждую вторую неделю, каждую третью неделю, ежемесячно, дважды в месяц, раз в полмесяца, через месяц, каждый второй месяц, раз в квартал, через квартал, раз в триместр, сезонно, раз в полгода и/или ежегодно.

22. Способ по п. 20, где продолжительный период представляет собой одну или несколько недель, один или несколько месяцев, один или несколько кварталов и/или один год или несколько лет.

23. Способ по п. 20, где эффективную дозу вводят один или несколько раз в сутки.

24. Способ по п. 20, где способ дополнительно включает идентификацию популяции индивидуумов с риском развития неврологического состояния, такого как болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона или инсульт.

25. Способ по п. 24, где популяция индивидуумов с риском отличается преклонным возрастом индивидуумов, семейным анамнезом неврологического состояния, генетической предрасположенностью к неврологическому состоянию, наличием и экспрессией гена ApoE4 у индивидуумов, женским полом, сердечно-сосудистым заболеванием, диабетом, синдромом Дауна, повреждением головы, низким уровнем формального образования, курением, избыточным потреблением алкоголя и/или лекарственной зависимостью.

26. Отсроченный способ лечения инсульта у индивидуума, включающий:

введение начальной дозы сердечного гликозида по начальной схеме дозирования в течение приемлемого периода задержки после развития инсульта у индивидуума;

определение адекватности клинического ответа и/или терапевтического ответа индивидуума на лечение сердечным гликозидом; и

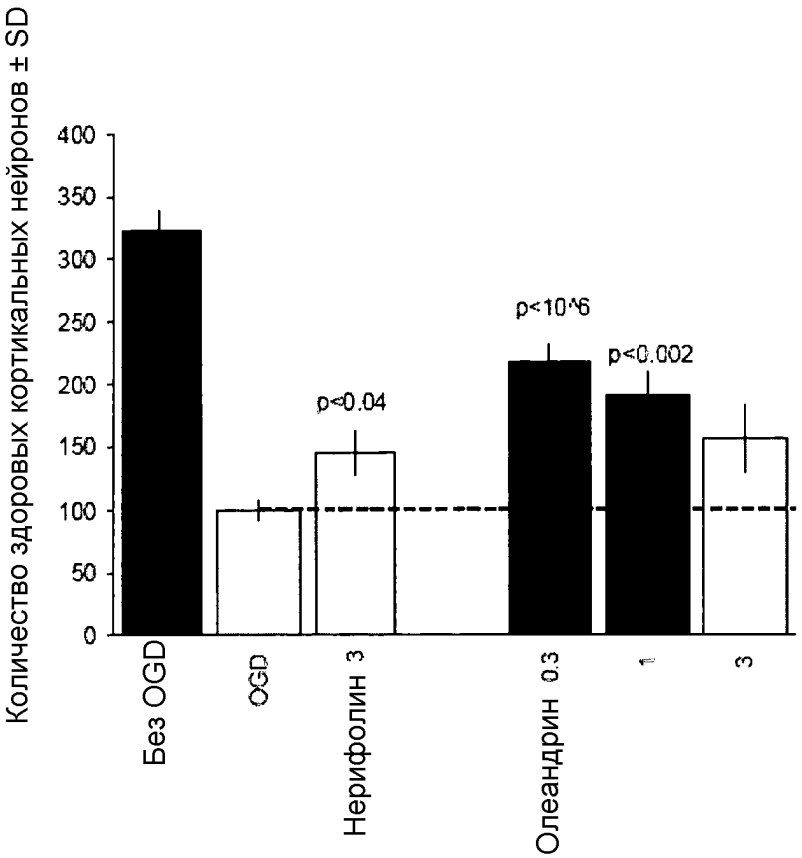
если клинический ответ и/или терапевтический ответ индивидуума является адекватным, то продолжают лечение сердечным гликозидом по мере необходимости до достижения желаемой клинической конечной точки; или

если клинический ответ и/или терапевтический ответ индивидуума является неадекватным при начальной дозе и начальной схеме дозирования, то повышают или снижают дозу до достижения желаемого клинического ответа и/или терапевтического ответа индивидуума;

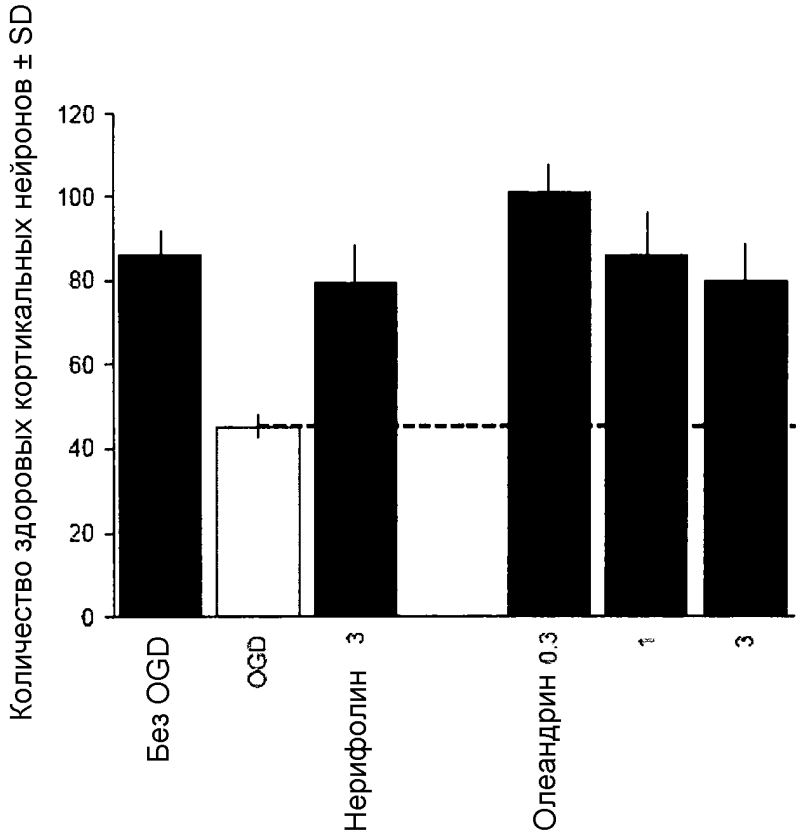
где сердечный гликозид является олеандрином, включенным в экстракт, полученный сверхкритической флюидной экстракцией из растительной массы олеандра CO_2 или сверхкритической флюидной экстракцией из растительной массы олеандра CO_2 в присутствии модификатора, выбранного из метанола, этанола и пропанола, и экстракт дополнительно содержит одно или несколько других терапевтически эффективных средств, полученных вместе с сердечным гликозидом при экстракции, включающих, по меньшей мере, олеазид А, олеандригенин, нериталозид и одорозид, при этом сердечный гликозид исключает нерифолин.

27. Способ по п. 26, где период задержки составляет 10 часов или менее, 8 часов или менее, 6 часов или менее, 4 часа или менее, 3 часа или менее, 2 часа или менее, 1 час или менее, 45 минут или менее, 30 мин или менее, 20 мин или менее или 10 мин или менее.

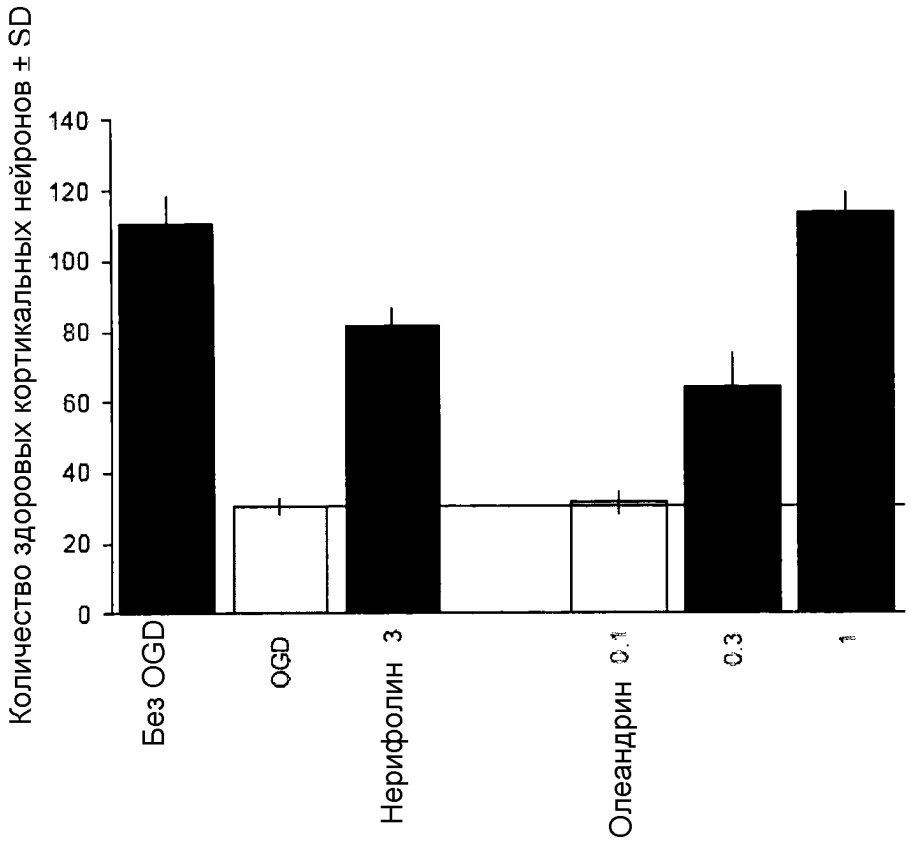
28. Способ по п. 26, где определение адекватности клинического и/или терапевтического ответа индивидуума осуществляют посредством оценки любой слабости лица, руки и/или ноги на одной стороне тела, онемения лица, руки и/или ноги на одной стороне тела, неспособности понимать устную речь, неспособности говорить или говорить четко, неспособности писать, головокружения и/или нарушения походки, двоения в глазах и необычно тяжелой головной боли.


Количество здоровых кортикальных нейронов ± SD
400
350
300
250
200
150
100
50
0
p<0.04
p<10^6
p<0.002
Без OGD
OGD
Нерифолин 3
Олеандрин 0.3
1
3

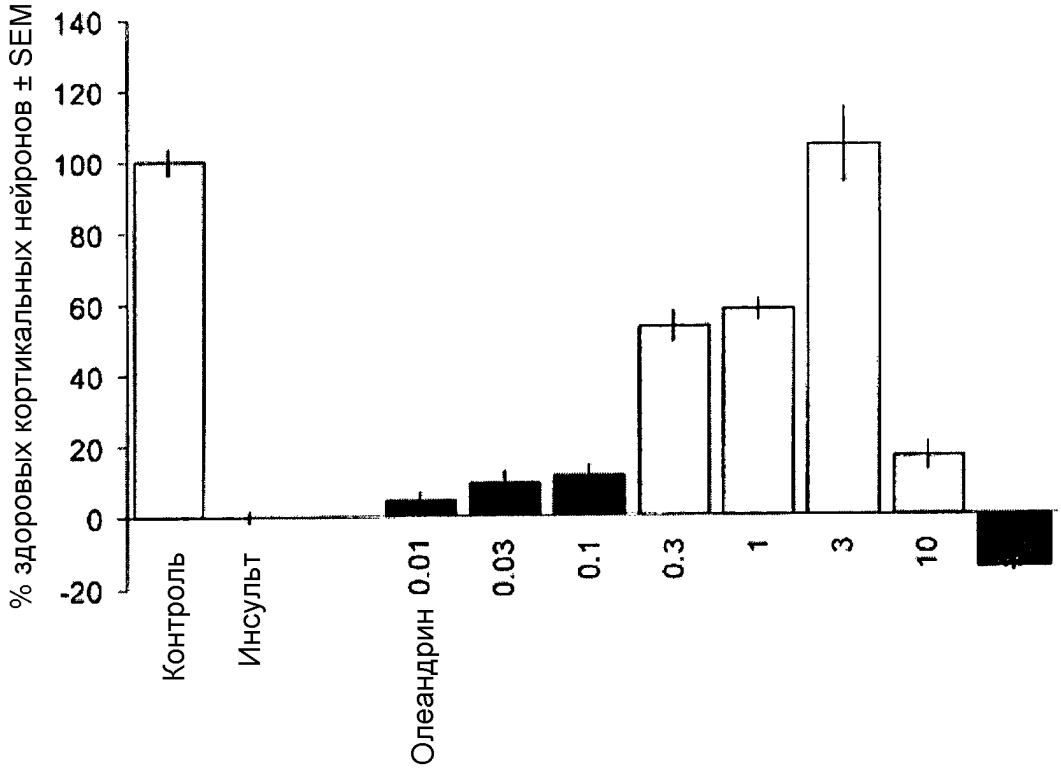
ФИГ.1А


Количество здоровых кортикальных нейронов ± SD
120
100
80
60
40
20
0
Без OGD
OGD
Нерифолин 3
Олеандрин 0.3
1
3

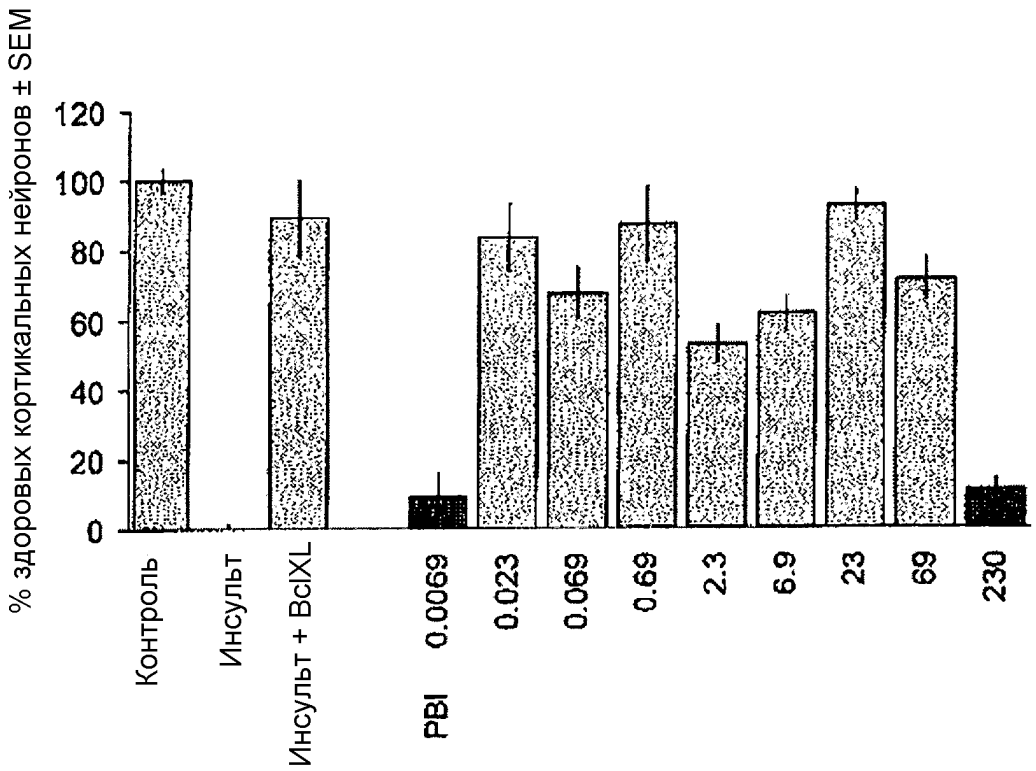
ФИГ.1В


Количество здоровых кортикальных нейронов ± SD
140
120
100
80
60
40
20
0
Без OGD
OGD
Нерифолин 3
Олеандрин 0.1
0.3
1

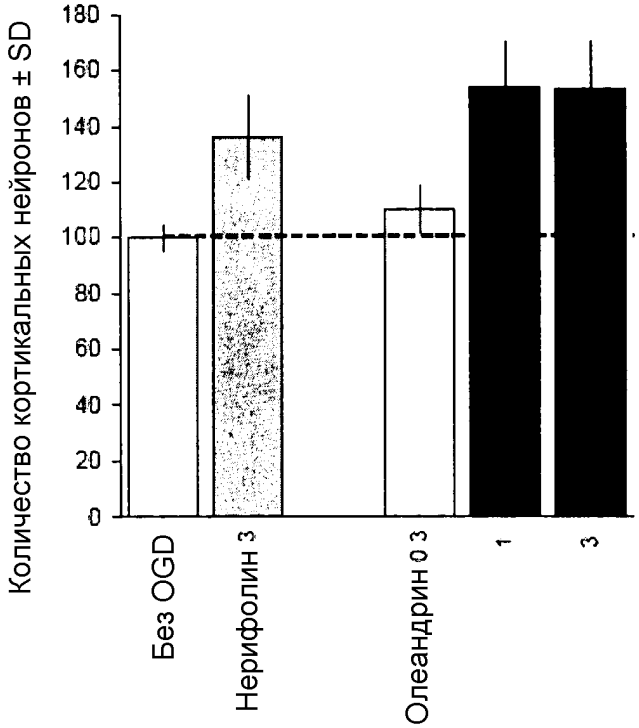
ФИГ.1C


% здоровых кортикальных нейронов ± SEM
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
Контроль
Инсульт
Олеандрин 0.01
0.03
0.1
0.3
1
3
10

ФИГ.1D

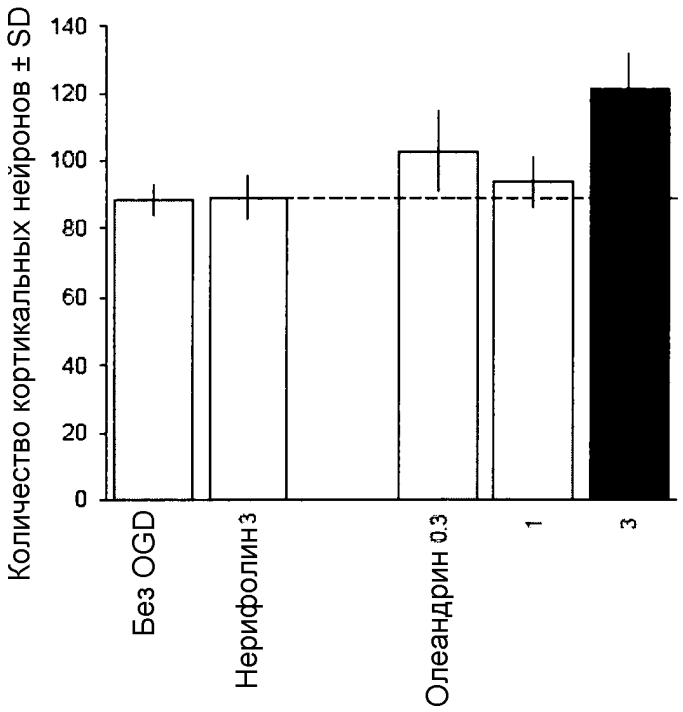


ФИГ.1E



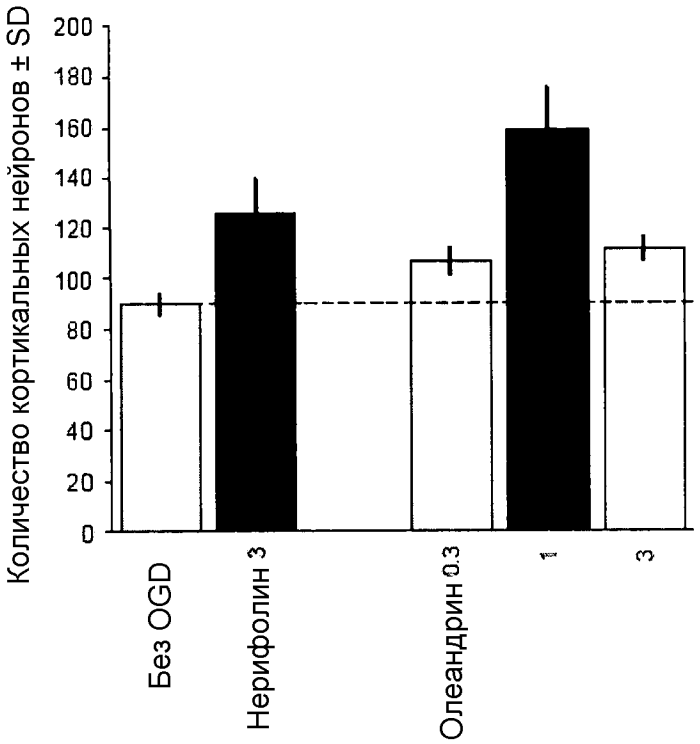
ıe-инсульт: Олеандрин, серия 1

ФИГ.2A



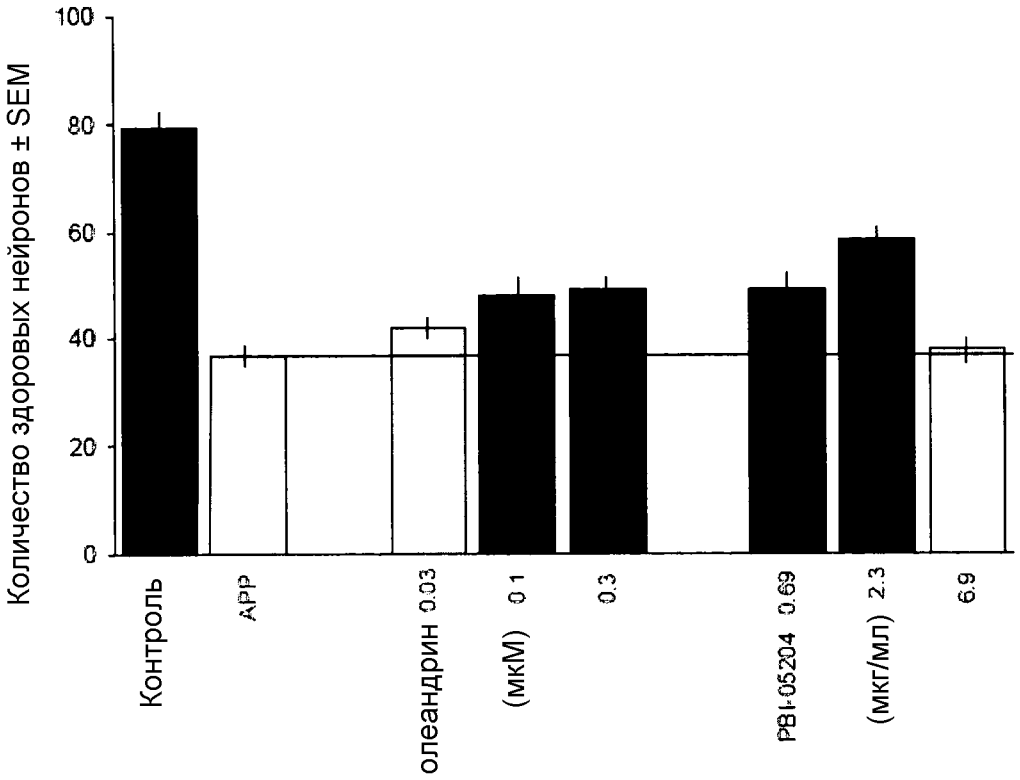
Не-инсульт: Олеандрин, серия 2

ФИГ.2В

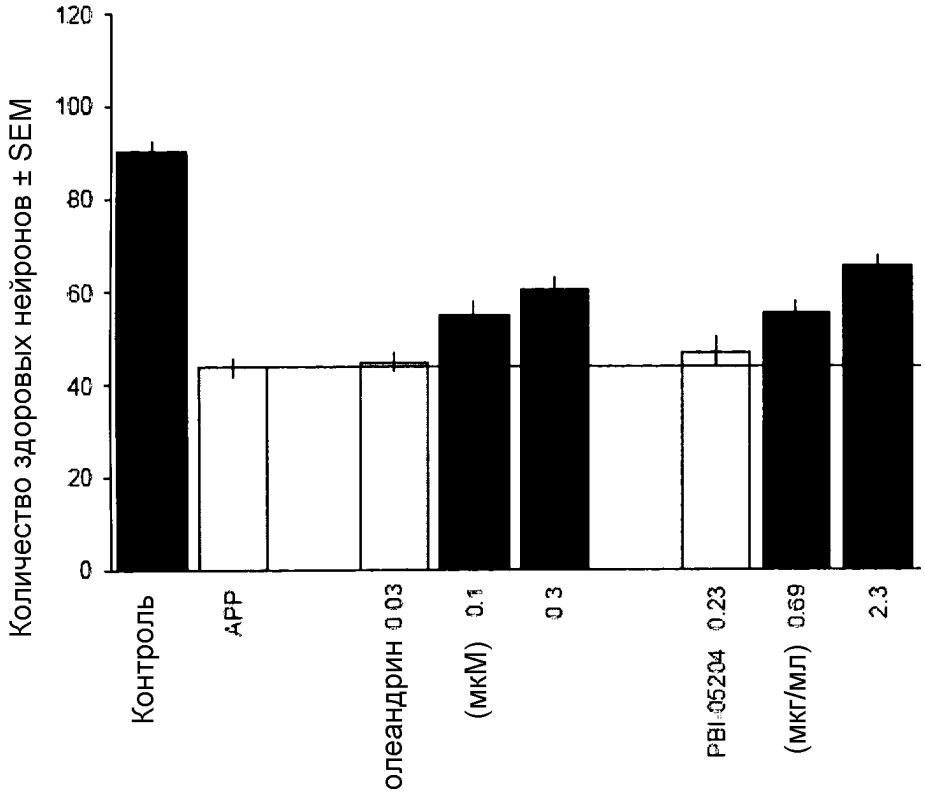


Не-инсульт: Олеандрин, серия 3

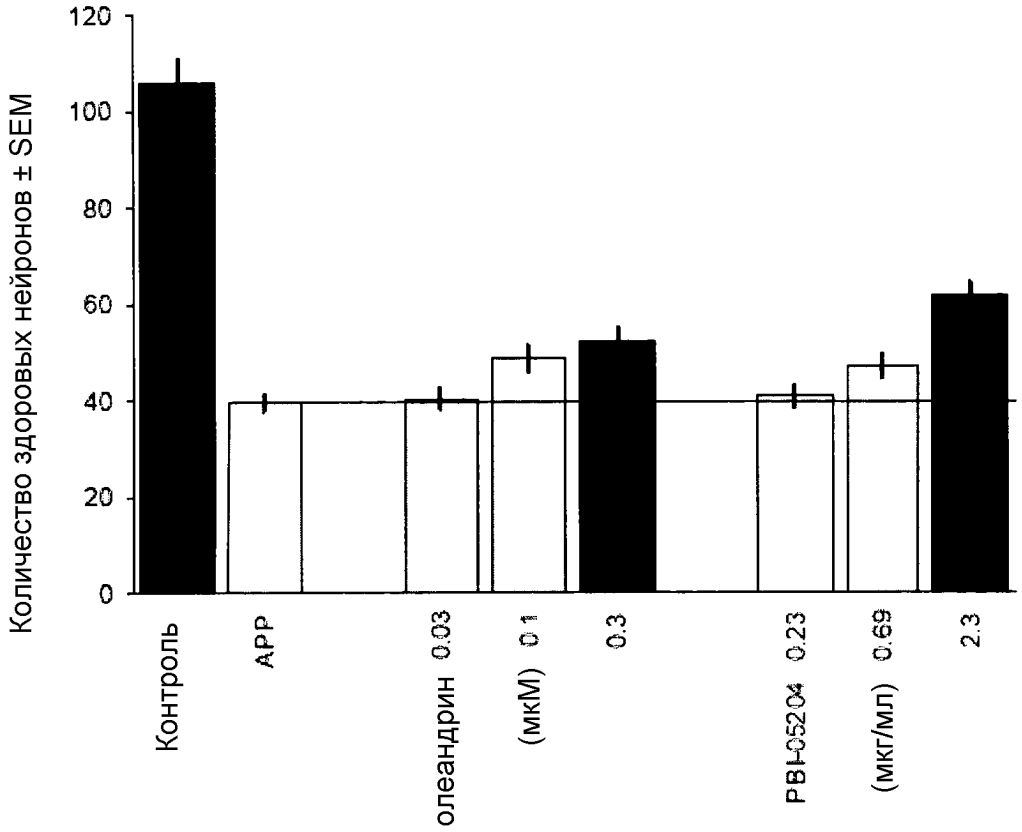
ФИГ.2С


Количество здоровых нейронов ± SEM
100
80
60
40
20
0
Контроль
APP
олеандрин 0.03
(мкМ) 0.1
0.3
PBI-05204 0.69
(мкг/мл) 2.3
6.9

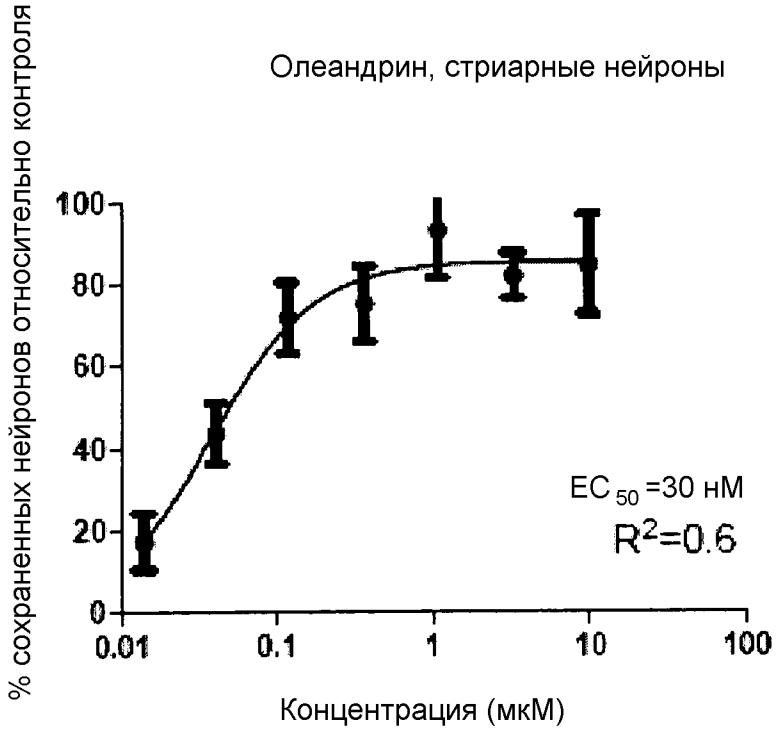
ФИГ.3А


Количество здоровых нейронов ± SEM
120
100
80
60
40
20
0
Контроль
APP
олеандрин 0.03
(мкМ) 0.1
0.3
PBI-05204 0.23
(мкг/мл) 0.69
2.3

ФИГ.3В


Количество здоровых нейронов ± SEM
120
100
80
60
40
20
0
Контроль
APP
олеандрин 0.03
(мкМ) 0.1
0.3
PBI-05204 0.23
(мкг/мл) 0.69
2.3

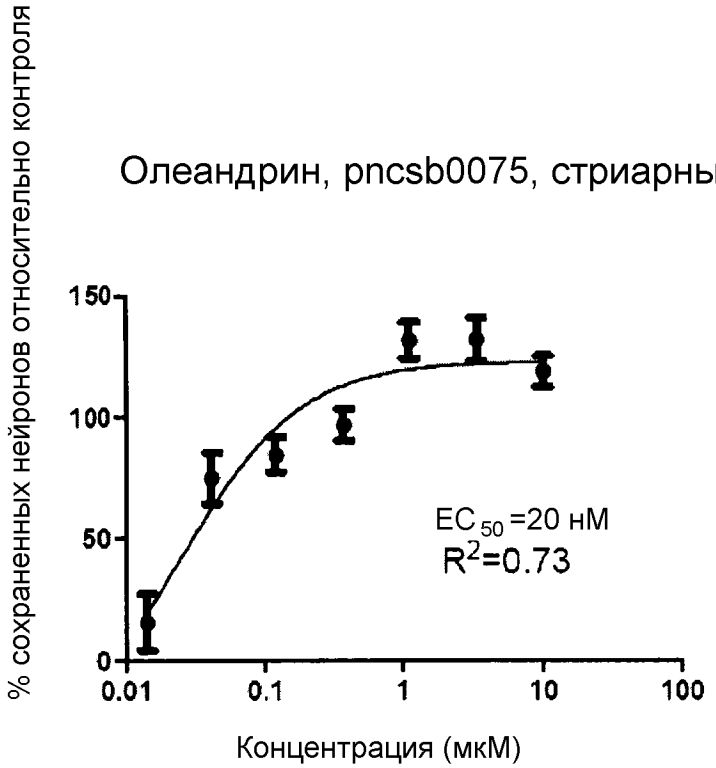
ФИГ.3С


Олеандрин, стриарные нейроны
% сохраненных нейронов относительно контроля
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
EC 50 =30 нМ
R2=0.6
Концентрация (мкМ)

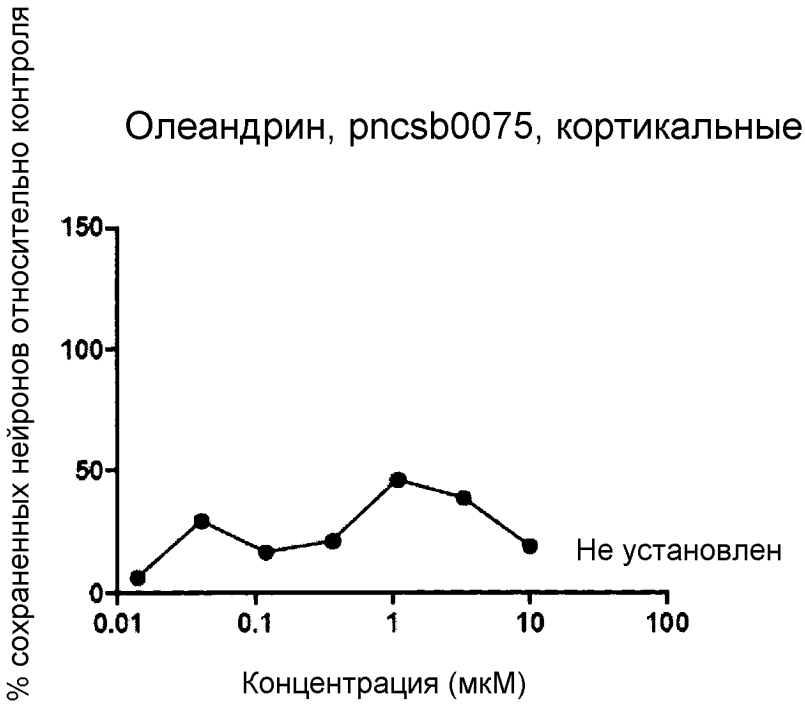
ФИГ.4А


Олеандрин, кортикальные нейроны
% сохраненных нейронов относительно контроля
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
Не установлен
Концентрация (мкМ)

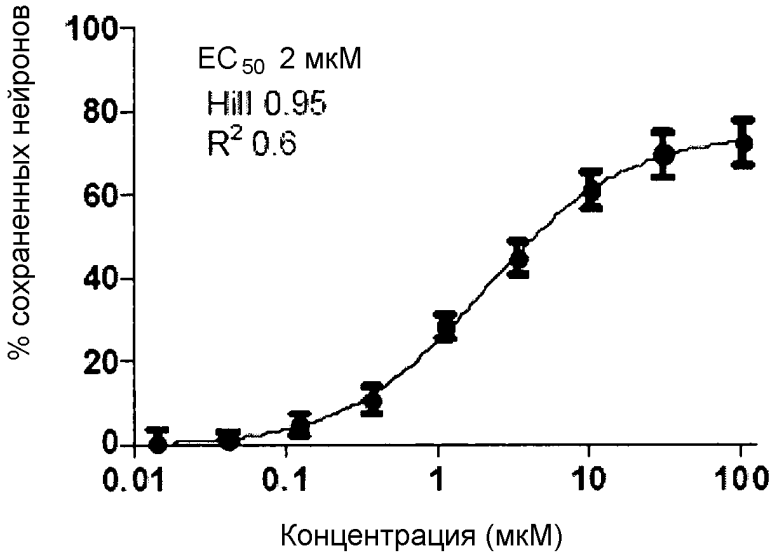
ФИГ.4B


Олеандрин, pncsb0075, стриарные нейроны
% сохраненных нейронов относительно контроля
150
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
EC50 =20 нМ
R2=0.73
Концентрация (мкМ)

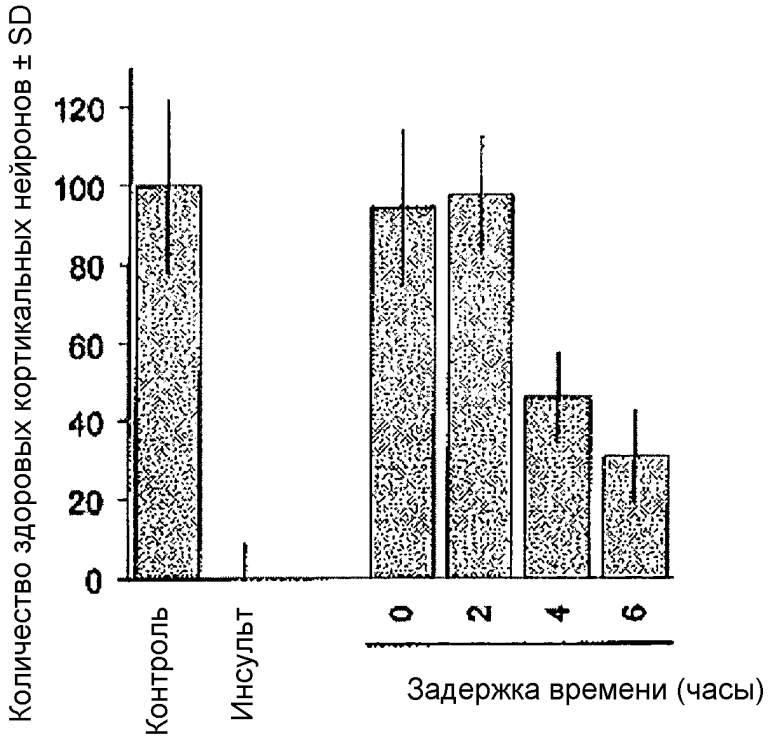
ФИГ.4C


Олеандрин, pncsb0075, кортикальные нейроны
% сохраненных нейронов относительно контроля
150
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
Не установлен
Концентрация (мкМ)

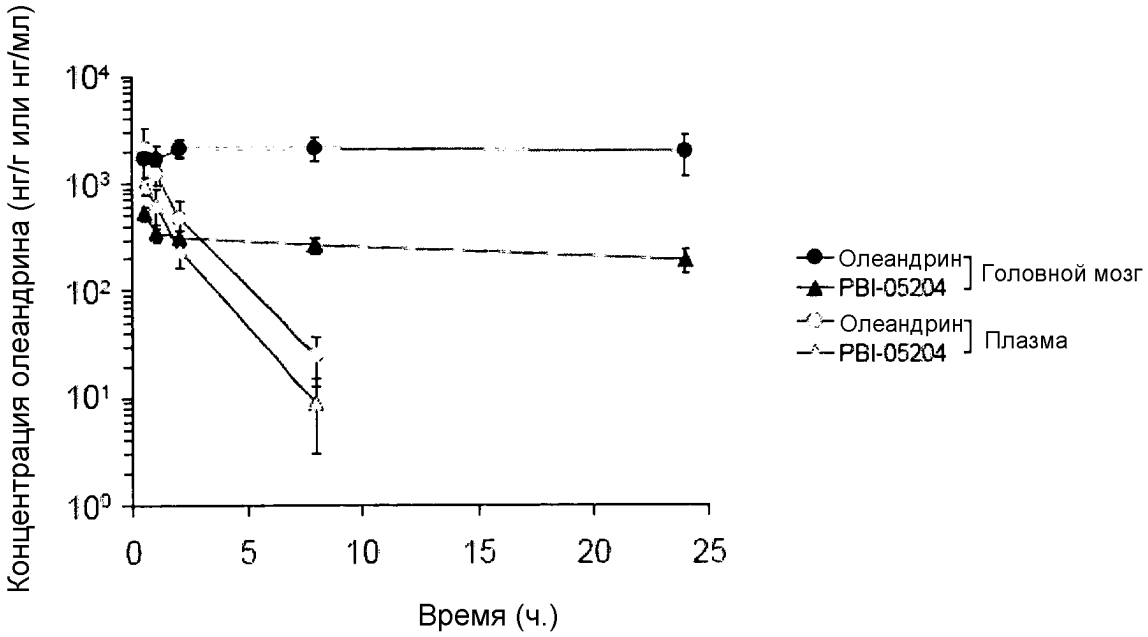
ФИГ.4D


% сохраненных нейронов
100
80
60
40
20
0
EC50 2 мкМ
Hill 0.95
R2 0.6
0.01
0.1
1
10
100
Концентрация (мкМ)

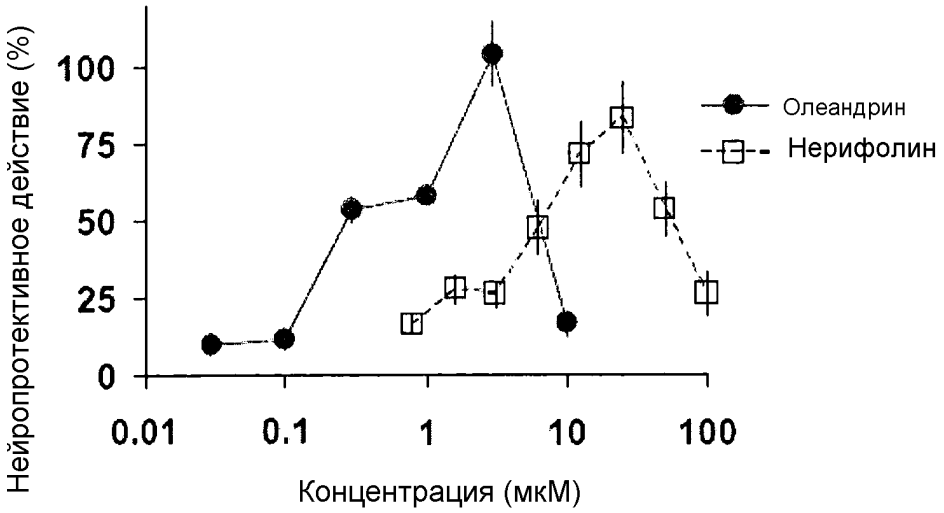
ФИГ.4E


Количество здоровых кортикальных нейронов ± SD
120
100
80
60
40
20
0
Контроль
Инсульт
0
2
4
6
Задержка времени (часы)

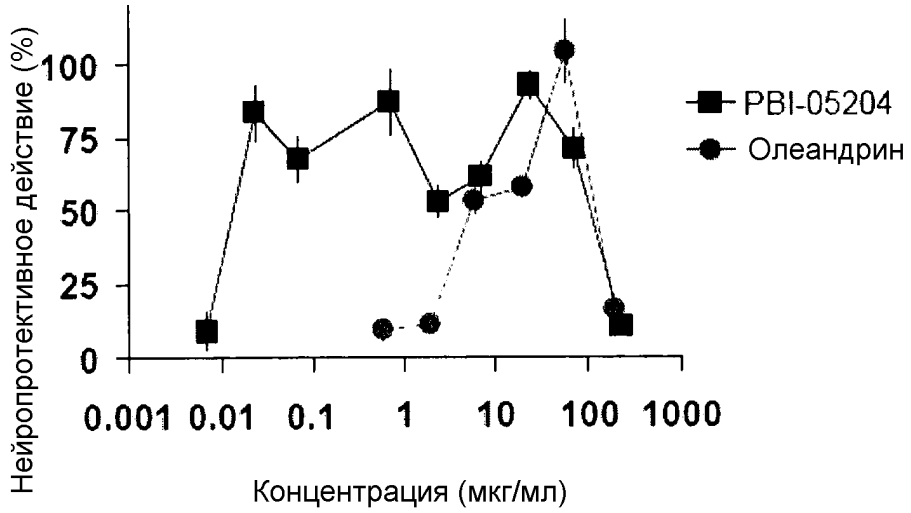
ФИГ.5


Концентрация олеандрина (нг/г или нг/мл)
10⁴
10³
10²
10¹
10⁰
0
5
10
15
20
25
Время (ч.)
Олеандрин
PBI-05204
Головной мозг
Олеандрин
PBI-05204
Плазма

ФИГ.6


Нейропротективное действие (%)
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
Концентрация (мкМ)
Олеандрин
Нерифолин

ФИГ.7А


Нейропротективное действие (%)
100
75
50
25
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Концентрация (мкг/мл)
PBI-05204
Олеандрин

ФИГ.7В