

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043430**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.24

(21) Номер заявки
202090510

(22) Дата подачи заявки
2018.08.13

(51) Int. Cl. **A61K 31/451** (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА ПРИДОПИДИНОМ

(31) **62/545,315**

(32) **2017.08.14**

(33) **US**

(43) **2020.06.08**

(86) **PCT/US2018/046481**

(87) **WO 2019/036358 2019.02.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ПРИЛЕНИЯ
НЬЮРОТЕРАПЬЮТИКС ЛТД. (IL)**

(72) Изобретатель:
**Гева Михал, Лауфер Ральф, Хейден
Майкл, Зац Нета (IL)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) TANGUI MAURICE ET AL.:
"Sigma-1 ([sigmajl] Receptor in Memory and
Neurodegenerative Diseases", In: "HANDBOOK
OF EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY", 9
March 2017 (2017-03-09), SPRINGER, CHAM,
BERLIN, DE, XP009509283, ISSN: 0171-2004,
ISBN: 978-3-319-65853-7, vol. 244, pages 81-108,
DOI: https://doi.org/10.1007/164_2017_15 [retrieved
on 2017-03-09], pages 14-16, item 4.3

MICHAL GEVA ET AL.: "Pridopidine
Activates Neuroprotective Pathways Impaired in
Huntington Disease", HUMAN MOLECULAR
GENETICS, vol. 25, no. 18, 27 July 2016
(2016-07-27), pages 3975-3987, XP055489491, GB,
ISSN: 0964-6906, DOI: 10.1093/hmg/ddw238, cited
in the application, abstract, figure 2
WO-A1-2016138135

PHILIP VAN DAMME ET AL.:
"Modelling Amyotrophic Lateral Sclerosis: Progress
and Possibilities", DISEASE MODELS &
MECHANISMS, vol. 10, no. 5, May 2017 (2017-05),
pages 537-549, XP055523187, GB, ISSN: 1754-8403,
DOI: 10.1242/dmm.029058, the whole document

DMITRY PETROV ET AL.: "ALS Clinical
Trials Review: 20 Years of Failure. Are We Any Closer
to Registering a New Treatment?", FRONTIERS
IN AGING NEUROSCIENCE, vol. 9, 22 March
2017 (2017-03-22), pages 1-11, XP055523204, DOI:
10.3389/fnagi.2017.00068, the whole document

(57) В документе представлен способ лечения человеческого субъекта, страдающего боковым амиотрофическим склерозом, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества придопидина в качестве монотерапии или вместе с рилузолем, эдаравоном или декстрометорфаном/хинидином в качестве комбинированной или дополнительной терапии.

B1**043430****043430****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По заявке на данное изобретение испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/445315, поданной 14 августа 2017 г., содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

Предшествующий уровень техники

Боковой амиотрофический склероз.

Боковой амиотрофический склероз (БАС) - это разрушительное дегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующей потерей моторных нейронов в моторной коре, стволе мозга и спинном мозге (Peters 2015). Это быстро приводящее к смерти заболевание начинается очагово и распространяется, приводя к слабости мышц конечностей, дыхательных мышц и мышц глазного яблока. Непосредственно перед смертью наблюдается почти полная потеря функции конечностей и дыхательной функции, а также потеря способности жевать, глотать и говорить.

БАС - это редкое заболевание, для которого средний уровень заболеваемости составляет 2,8 на 100000 в Европе и 1,8 на 100000 в Северной Америке, а средний уровень распространенности составляет 5,40 на 100000 в Европе и 3,40 на 100000 в Северной Америке (Bozzoni, 2016).

Примерно в 10% случаев БАС классифицируется как семейный БАС (FALS), в то время как в остальных 90% заболевание является спорадическим (SALS) и случайным образом встречается в сообществе (Riva, 2016). Более 60% пациентов умирают в течение 3 лет после начала заболевания, обычно от дыхательной недостаточности и около 10% выживают в течение более 10 лет (Zou, 2016). В настоящее время в данной области техники неизвестно никакой модифицирующей заболевание терапии БАС, хотя рилузол замедляет скорость прогрессирования заболевания и продлевает выживаемость на 2 или 3 месяца.

Клинические проявления БАС включают мышечную слабость и гипотрофию, фасцикуляции и спазмы, спастический гипертонус и гиперрефлексию, которые являются основными клиническими проявлениями. У некоторых пациентов также наблюдаются дизартрия, дисфагия и слабость дыхания. Немоторные симптомы включают поведенческие нарушения, нарушение управляющих функций и лобно-височную деменцию.

Нейропатологические особенности БАС включают атрофию мышц, потерю клеток переднего рога и склероз боковых столбов серого вещества спинного мозга (Martel, 2016). Глиоз, определяемый как активация астроцитов и микроглии, также является отличительной чертой БАС.

Придопидин.

Придопидин (ранее ACR16, Huntexil®) - это уникальное соединение, разработанное для лечения пациентов с болезнью Хантингтона. Химическое название придопидина - 4-(3-(метилсульфонил)фенил)-1-пропилпиперидин, а его регистрационный номер - CAS 346688-38-8 (CSID: 7971505, 2016). Регистрационный номер придопидина гидрохлорида - CAS 882737-42-0 (CSID: 25948790 2016). Способы синтеза придопидина и его фармацевтически приемлемой соли раскрыты в патенте США № 7923459 и публикации заявки РСТ № WO 2017/015609. Патент США № RE46117 раскрывает придопидин для лечения различных заболеваний и расстройств.

Было показано, что придопидин модулирует двигательную активность путем подавления гиперактивности или усиления гипoaктивности. Придопидин также демонстрирует нейропротективные свойства, которые, как полагают, можно объяснить его высокой аффинностью к рецептору сигма-1 (S1R, IC₅₀ связывания ~70-80 нМ) (Sahlholm, 2013), тогда как предполагается, что двигательная активность придопидина опосредована в первую очередь его низкой аффинностью, антагонистической активностью в отношении рецептора дофамина D2 (D2R) (IC₅₀ связывания ~10 мкМ) (Ponten, 2010, Sahlholm, 2015). Придопидин демонстрирует низкую или умеренную аффинность связывания с дополнительными рецепторами в микромолярном диапазоне.

S1R представляет собой белок-шаперон эндоплазматического ретикулума (ЭР), участвующий в клеточной дифференцировке, нейропластичности, нейропротекции и когнитивной функции в головном мозге. Недавно транскриптомный анализ стриатума крысы показал, что лечение придопидином активирует экспрессию BDNF, дофамина рецептора 1 (D1R), глюкокортикоидного рецептора (GR) и путей серин-треонин-специфической протеинкиназы B (Akt)/фосфоинозитид-3-киназы (PI3K). Было показано, что придопидин усиливает секрецию нейропротективного нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) в клеточной линии нейробластомы S1R-зависимым образом (Geva, 2016) и восстанавливает нарушения спинного мозга и aberrантную передачу сигналов кальция путем активации S1R (Ryskamp, 2017).

Публикация международной патентной заявки РСТ № WO 2016/138135 раскрывает применение агонистов S1R для лечения, в частности, семейного бокового амиотрофического склероза взрослых (БАС) и ювенильного бокового амиотрофического склероза (БАС).

Сохраняется неудовлетворенная потребность в обеспечении эффективного лечения БАС, в частности спорадического БАС.

Изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на неожиданном экспериментальном открытии того, что лечение придопидином улучшает дефицит аксонального транспорта, усиливает активацию ERK (внеклеточно регулируемой киназы) и восстанавливает активность нервно-мышечного со-

единения (НМС) в совместных культурах мышечных клеток с нарушением SOD1, уменьшает агрегаты мутантной SOD1 в спинном мозге и ослабляет разрыв НМС и последующее истощение мышц у мышей с нарушениями SOD1.

Изобретение обеспечивает способ лечения субъекта, страдающего боковым амиотрофическим склерозом (БАС), включающий периодическое введение субъекту количества придопида, эффективного для лечения человеческого субъекта.

Изобретение также обеспечивает придопидин для применения при лечении человека, страдающего БАС.

Изобретение также обеспечивает способ лечения БАС, включающий периодическое введение субъекту, нуждающемуся в этом, количества придопида, эффективного для лечения БАС.

В некоторых вариантах осуществления субъект страдает спорадическим БАС.

Изобретение также обеспечивает фармацевтическую композицию для лечения человека, страдающего БАС, содержащую эффективное количество придопида.

Изобретение также обеспечивает применение придопида в производстве лекарственного средства для лечения БАС.

Кроме того, обеспечивается упаковка, содержащая придопидин и, при необходимости, инструкции по применению придопида для лечения БАС.

В одном варианте осуществления придопидин применяют в качестве монотерапии у субъекта, страдающего БАС. В других вариантах осуществления субъекта, страдающего БАС, лечат с помощью придопида и одного или нескольких дополнительных агентов.

Далее предложен способ лечения субъекта, страдающего БАС, включающий периодическое применение у субъекта количества рилузола и количества придопида.

Далее предложен способ лечения субъекта, страдающего БАС, включающий периодическое применение у субъекта количества эдаварона и количества придопида.

Далее предложен способ лечения субъекта, страдающего БАС, включающий периодическое применение у субъекта количества декстрометорфана/хинидина и количества придопида.

Далее обеспечивается упаковка, включающая:

(а) первую фармацевтическую композицию, содержащую количество агента, представляющего собой рилузол, эдаварон или декстрометорфан/хинидин; и

(b) вторую фармацевтическую композицию, содержащую количество придопида и фармацевтически приемлемый носитель.

В дополнительном варианте осуществления упаковка также содержит:

(с) инструкции по применению для первой и второй фармацевтических композиций вместе для лечения субъекта, страдающего БАС.

В некоторых вариантах осуществления вторая фармацевтическая композиция представляет собой рилузол, эдаварон, комбинацию декстрометорфана/хинидина или лаквинимод.

Кроме того, обеспечивается придопидин для применения в качестве дополнительной терапии или в комбинации с рилузолом при лечении субъекта, страдающего БАС. Кроме того, обеспечивается придопидин для применения в качестве дополнительной терапии или в комбинации с эдавароном при лечении субъекта, страдающего БАС. Кроме того, обеспечивается придопидин для применения в качестве дополнительной терапии или в комбинации с декстрометорфаном/хинидином при лечении субъекта, страдающего БАС.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей количество рилузола, эдаварона или декстрометорфана/хинидина и количество придопида и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

Данное изобретение также обеспечивает использование:

(а) количества рилузола, эдаварона или декстрометорфана/хинидина и

(b) количества придопида при приготовлении комбинации для лечения субъекта, страдающего БАС, где количество рилузола, эдаварона или декстрометорфана/хинидина и количество придопида вводят одновременно или последовательно.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, включающей количество рилузола, эдаварона или декстрометорфана/хинидина, для применения при лечении субъекта, страдающего двигательным расстройством, в сочетании с количеством придопида, путем периодического применения у субъекта фармацевтической композиции и количества придопида.

Настоящее изобретение также обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую количество придопида для применения с целью лечения субъекта, страдающего двигательным расстройством, в комбинации с количеством рилузола, эдаварона или декстрометорфана/хинидина, путем периодического введения субъекту фармацевтической композиции и количества рилузола, эдаварона или декстрометорфана/хинидина соответственно.

Настоящее изобретение также относится к рилузолу и придопидину для лечения субъекта, страдающего двигательным расстройством, где рилузол и придопидин вводят одновременно или последовательно.

Настоящее изобретение также относится к продукту, содержащему количество рилузола и количество придопидина, для одновременного или последовательного применения при лечении субъекта, страдающего БАС.

В другом аспекте изобретение обеспечивает комбинацию придопидина и рилузола, эдаравона или декстрометорфана/хинидина для применения в качестве лекарственного средства для лечения, профилактики или облегчения БАС.

В другом аспекте изобретение предлагает комбинацию придопидина и рилузола, эдаравона, лаквинимода или декстрометорфана/хинидина для применения в качестве лекарственного средства.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество придопидина и терапевтически эффективное количество рилузола, эдаравона, лаквинимода или декстрометорфана/хинидина, вместе с одним или несколькими адъювантами, наполнителями, носителями и/или разбавителями.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения БАС в организме животного, включая человека, который включает стадию введения такому животному, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества придопидина; в комбинированной терапии с рилузолом, эдаравоном, лаквинимодом или декстрометорфаном/хинидином.

В другом аспекте изобретение относится к набору из частей, включающему по меньшей мере две отдельные стандартные лекарственные формы (А) и (В), где (А) содержит придопидин; а (В) содержит рилузол, эдаравон или декстрометорфан/хинидин; и при необходимости (С) инструкции для одновременного или последовательного введения придопидина (А) и рилузола, эдаравона или декстрометорфана/хинидина (В) пациенту, нуждающемуся в этом.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего БАС, включающему введение субъекту комбинации терапевтически эффективного количества придопидина и терапевтически эффективного количества рилузола, эдаравона, лаквинимода или декстрометорфана/хинидина, где эти количества, будучи взятые вместе, эффективны для лечения пациента человека.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1a-1c. Анализ аксонального транспорта.

Фиг. 1a. Экспериментальная схема для анализа аксонального транспорта.

Фиг. 1b. Схематическое изображение экспериментальной системы для отслеживания аксонального транспорта в моторных нейронах (МН).

Фиг. 1c. Покадровые изображения аксонального транспорта Qdot-BDNF (ярко-оранжевый).

Фиг. 2a, 2b. Графики, показывающие влияние придопидина на мгновенные значения скорости и количество остановок частиц Qdot-BDNF вдоль аксона (LM (однопольные животные) = WT (дикий тип)).

Фиг. 2a. Влияние придопидина на мгновенные значения скорости (мкм/с) для частиц Qdot-BDNF в моторных нейронах WT (синий), SOD1G93A (красный) или нокаутных по рецептору Sigma-1 (S1R-/-) (серый).

Фиг. 2b. Влияние придопидина на количество остановок частиц (число отсчитанных остановок Qdot-BDNF в секунду).

Фиг. 3. Схематическая иллюстрация экспериментальной процедуры для методов совместного культивирования нейромышечных клеток с измерением иннервации мышц и функции нейромышечного соединения (НМС). Спинальный эксплантат культивируют в проксимальном компартменте, а первичные миоциты культивируют в дистальном компартменте.

Фиг. 4. График, показывающий влияние придопидина на аксональный рост для WT и SOD1G93A, который измеряет количество полостей с аксонами, пересекающими мышечный компартмент.

Фиг. 5a, 5b. Результаты анализов совместного культивирования в микрофлюидном компартменте (МФК).

Фиг. 5a. Верхняя панель: фазовое изображение миоцита в дистальном компартменте, соединенном аксонами (зеленые стрелки). Нижняя панель: изображения миоцитов с высоким увеличением: точки контакта МН.

Фиг. 5b. Следы сокращения мышц, взятые из измерений интенсивности сокращения мышц по времени.

Фиг. 6. График, показывающий влияние придопидина на частоту иннервации в миоцитах WT и SOD1G93A.

Фиг. 7a, 7b. Графики, показывающие уровень сокращения миоцитов в совместной культуре МН-миоцитов.

Фиг. 7a. Процент сокращающихся миобластов в совместных культурах срезов вентрального спинного мозга (WT или SOD1G93A) и первичных миоцитов (SOD1G93A или LM контроля).

Фиг. 7b. Влияние придопидина на нервно-мышечное соединение (НМС) в мышечной ткани от WT или SOD1G93A и моторных нейронах от мышей WT или S1R-/-.

Фиг. 8a, 8b. Влияние придопидина на уровень ERK.

Фиг. 8a. Влияние придопидина на уровень общей ERK (tERK) и фосфорилированной ERK (pERK), показанные путем вестерн-блоттинга экстрактов культур моторных нейронов WT, SOD1G93A и S1R-/-.

Фиг. 8b. Количественная оценка эффекта активации ERK придопидином, измеренная с помощью tERK/pERK.

Фиг. 9a-9c. Влияние придопидина на агрегаты SOD1.

Фиг. 9a. Визуализация и количественная оценка флуоресцентно меченных клеток спинного мозга с помощью NC500 для маркировки агрегатов мутантной SOD1 в спинном мозге WT и SOD1G93A, с обработкой или без обработки придопидином.

Фиг. 9b. Количественный анализ числа агрегатов на площадь, выявленных в сером веществе. Фиг. 9c. Количественный анализ числа агрегатов на площадь, выявленных в белом веществе.

Фиг. 10a, 10b. Влияние придопидина на мышечную ткань.

Фиг. 10a. Примерные изображения окрашенных гематоксилином-эозином поперечных срезов икроножной мышцы мышей WT или SOD1G93A, получавших или не получавших придопидин.

Фиг. 10b. Оценка влияния придопидина на истощение мышечных волокон: количественный анализ влияния придопидина на диаметр мышечных волокон.

Фиг. 11a, 11b. Влияние придопидина на НМС.

Фиг. 11a. Влияние придопидина на сохранение НМС in vivo.

Фиг. 11b. Количественный анализ влияния придопидина на процент иннервированных НМС.

Подробное описание изобретения

Изобретение обеспечивает способ лечения субъекта, страдающего боковым амиотрофическим склерозом (БАС), включающий периодическое введение субъекту количества придопидина, эффективно для лечения субъекта-человека.

В одном варианте осуществления изобретения БАС является спорадическим БАС.

В одном варианте осуществления изобретения БАС является семейным БАС (FALS). В некоторых вариантах осуществления БАС представляет собой ювенильный БАС (JALS).

В некоторых вариантах осуществления БАС не является FALS. В некоторых вариантах осуществления БАС не является ювенильным БАС (JALS).

В одном из вариантов осуществления изобретения тип БАС представляет собой классический, бульбарный, разболтанность рук, разболтанность ног, пирамидальный и респираторный БАС, прогрессирующую мышечную атрофию, первичный латеральный склероз или прогрессирующий бульбарный паралич.

В одном варианте осуществления изобретения субъект несет мутантную версию гена, которая вызывает или способствует патогенезу БАС. В некоторых вариантах осуществления мутантная версия гена выбрана из группы генов, состоящей из генов супероксиддисмутазы 1 (SOD1), TAR-ДНК-связывающего белка (TARDBP), кодирующего TDP-43, слитого с саркомой (FUS), p62 (SQSTM1), убихина-2 (UBQLN2), TANK-связывающей киназы 1 (TBK1), профилина 1 (PFN1), VCP или p97 (VCP), ангиогенина (ANG), оптиневрина (OPTN), C9orf72, рецептора сигма-1 (S1R), тубулина альфа-4A (TUBA4A), диактина (DCTN1), hnRNPA1 (HNRNPA1), матрина 3 (MATR3), содержащего домен суперспираль-спираль-суперспираль-спираль белка 10 (CHCHD10), и любой их комбинации.

В одном варианте осуществления изобретения количество придопидина является эффективным для ингибирования или уменьшения прогрессирования симптома БАС у субъекта.

В варианте осуществления изобретения симптом БАС является клиническим симптомом БАС.

В одном варианте осуществления изобретения симптомом БАС являются мышечная слабость и гипотрофия, фасцикуляции и судороги, спастический гипертонус, гиперрефлексия, дизартрия, дисфагия и респираторная слабость, поведенческие расстройства, нарушения управляющих функций или лобно-височная деменция.

В одном варианте осуществления изобретения симптом БАС представляет собой невропатологический симптом.

В некоторых вариантах осуществления симптомом является бульбарный паралич или псевдобульбарный эффект (ПБА).

В одном варианте осуществления изобретения симптомом БАС является атрофия мышц, потеря моторных нейронов, потеря клеток переднего рога, склероз боковых столбов серого вещества спинного мозга или глиоз.

В одном варианте осуществления симптомом БАС является скорость ухудшения (а) легочной функции, (b) функциональной инвалидности или (с) показателей способности нижних конечностей. В одном варианте осуществления изобретения количество придопидина является эффективным для того, чтобы обеспечить выживание субъекта или нейропротекцию у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение субъекта придопидином приводит к ослаблению ухудшения или к улучшению состояния субъекта в одной или нескольких из следующих областей: (1) речь, (2) слюноотделение, (3) глотание, (4) почерк, (5) нарезка пищи и манипуляции посудой (с гастростомой или без неё), (6) одевание и гигиена, (7) переворачивание в постели и обращение с постельным бельем, (8) ходьба, (9) подъем по лестнице, (10) дыхание, (11) одышка, (12) одышка в положении лежа и (13) недостаточность.

В некоторых вариантах осуществления пациентов контролируют на предмет изменений в вышеука-

занных областях с использованием шкалы оценок, например шкалы функционального рейтинга бокового амиотрофического склероза (ALSFRS) или пересмотренной шкалы ALSFRS (ALSFRS-R), и отслеживают функциональные изменения у пациента по времени.

В некоторых вариантах осуществления у пациентов контролируют псевдобульбарный аффе́кт (ПБА). В некоторых вариантах осуществления тяжесть и/или частота эмоциональных всплесков у субъектов, испытывающих ПБА, снижается при лечении придопидином.

В одном из вариантов осуществления изобретения придопидин вводят ежедневно.

В одном варианте осуществления изобретения придопидин вводят чаще, чем один раз в сутки.

В одном варианте осуществления изобретения придопидин вводят два раза в сутки.

В одном варианте осуществления изобретения придопидин вводят три раза в сутки.

В одном варианте осуществления изобретения придопидин вводят реже чем один раз в сутки, например в чередующиеся дни, три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю.

В одном варианте осуществления изобретения придопидин вводят перорально.

В некоторых вариантах осуществления единичная доза фармацевтической композиции содержит 10-250 мг придопидина. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит 45, 67,5, 90 или 112,5 мг придопидина.

В одном варианте осуществления пациенту вводят от 10 до 225 мг придопидина в сутки. В другом варианте осуществления пациенту вводят от 45 до 180 мг придопидина в сутки. В другом варианте осуществления пациенту вводят 10, 22,5, 45, 67,5, 90, 100, 112,5, 125, 135, 150 или 180 мг придопидина в сутки.

В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят два раза в сутки. В другом варианте осуществления равное количество фармацевтической композиции применяют при каждом введении. В одном варианте осуществления две дозы вводят с интервалом по меньшей мере 6 ч, по меньшей мере 7 ч, по меньшей мере 8 ч, по меньшей мере 9 ч, по меньшей мере 10 ч, по меньшей мере 11 ч. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в течение по меньшей мере 12 недель, по меньшей мере 20 недель, по меньшей мере 24 недель, по меньшей мере 26 недель, по меньшей мере 52 недель или по меньшей мере 78 недель.

В одном варианте осуществления изобретения придопидин представляет собой придопидина гидрохлорид.

В одном варианте осуществления изобретения субъект является человеком.

Изобретение также обеспечивает придопидин для применения при лечении человека, страдающего БАС.

Изобретение также предусматривает фармацевтическую композицию для применения при лечении человека, страдающего БАС, содержащую эффективное количество придопидина.

Изобретение, кроме того, обеспечивает способ лечения БАС, включающий периодическое введение субъекту, нуждающемуся в этом, количества придопидина, эффективного для лечения БАС.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит количество придопидина и количество второго соединения, например соединения, полезного при лечении пациентов с БАС.

В некоторых вариантах осуществления второе соединение представляет собой рилузол, эдаравон, комбинацию декстрометорфана и хинидина или лаквинимод.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция для применения при лечении субъекта, страдающего БАС, содержит придопидин и второе соединение, которые готовят для одновременного или последовательного введения.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция находится в единичной дозированной форме, полезной для лечения субъекта, страдающего БАС, которая включает:

(a) количество придопидина;

(b) количество второго соединения,

где соответствующие количества указанного второго соединения и указанного придопидина в указанной композиции эффективны при одновременном введении указанному субъекту одной или нескольких из указанных единичных дозированных форм указанной композиции для лечения субъекта.

В некоторых вариантах осуществления второе соединение представляет собой рилузол, эдаравон или декстрометорфан/хинидин.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит количество придопидина для применения при лечении субъекта, страдающего БАС, в качестве дополнительной терапии ко второму соединению, которое представляет собой рилузол. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит количество придопидина для применения при лечении субъекта, страдающего БАС, в качестве дополнительной терапии ко второму соединению, которым является эдаравон. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит количество придопидина для применения при лечении субъекта, страдающего БАС, в качестве дополнительной терапии ко второму соединению, которое представляет собой декстрометорфан/хинидин.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит количество придопидина для применения при лечении субъекта, страдающего БАС, одновременно или последовательно со вто-

Изобретение также относится к соединению, которое представляет собой рилузол, для применения в качестве дополнительной терапии к придопидину при лечении субъекта, страдающего БАС.

Изобретение также обеспечивает соединение, которое представляет собой декстрометорфан/хинидин, для применения в качестве дополнительной терапии к придопидину при лечении субъекта, страдающего БАС.

Изобретение также обеспечивает придопидин для применения в качестве дополнительной терапии к соединению, которое представляет собой эдавон, при лечении субъекта, страдающего БАС.

Изобретение также обеспечивает придопидин для применения в качестве дополнительной терапии к соединению, которое представляет собой лаквинимод, для лечения субъекта, страдающего БАС.

Изобретение также обеспечивает комбинацию соединения, которое представляет собой рилузол и придопин, для применения при лечении, профилактике или облегчении симптома БАС.

Изобретение также обеспечивает комбинацию соединения, которое представляет собой декстрометорфан/хинидин и придопидин, для применения при лечении, профилактике или облегчении симптома БАС.

Способ, применение и композиция дополнительно включают уменьшение скорости неврологического ухудшения у субъекта.

В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно включают введение субъекту терапевтически эффективного количества второго соединения, которое представляет собой рилузол или эдаравон. В одном варианте осуществления способы по настоящему изобретению дополнительно включают введение субъекту терапевтически эффективного количества второго соединения, которое представляет собой декстрометорфан/хинидин. В одном варианте осуществления второе соединение представляет собой рилузол. В другом варианте осуществления второе соединение представ-

ляет собой эдаравон. В другом варианте осуществления второе соединение представляет собой декстрометорфан/хинидин. В другом варианте осуществления второе соединение представляет собой лаквинимод.

В варианте осуществления изобретения придопидин и второе соединение вводят в одной единице. В другом варианте осуществления придопидин и второе соединение вводят более чем в одной единице.

В одном варианте осуществления количество придопидина и количество второго соединения вводят одновременно. В одном варианте осуществления количество придопидина и количество второго соединения вводят последовательно.

В другом варианте осуществления введение второго соединения предшествует введению придопидина. В другом варианте осуществления введение придопидина предшествует введению второго соединения.

В одном варианте осуществления субъект получает терапию эдаравоном до начала терапии придопидином. В другом варианте осуществления субъект получает рилузол до начала терапии придопидином. В другом варианте осуществления субъект получает лаквинимод до начала терапии придопидином. В другом варианте осуществления субъект получает декстрометорфан/хинидин для начала лечения придопидином.

В другом варианте осуществления субъект получает терапию эдаравоном в течение по меньшей мере 24, 28, 48 или 52 недель до начала терапии придопидином. В другом варианте осуществления субъект получает терапию рилузолом в течение по меньшей мере 24, 28, 48 или 52 недель до начала лечения придопидином. В другом варианте осуществления субъект получает терапию декстрометорфаном/хинидином в течение по меньшей мере 1, 2, 4 или 6 недель до начала терапии придопидином.

В одном варианте осуществления субъект получает терапию придопидином до начала терапии эдаравоном. В другом варианте осуществления субъект получает терапию придопидином в течение по меньшей мере 24, 28, 48 или 52 недель до начала терапии эдаравоном.

В одном варианте осуществления субъект получает терапию придопидином до начала терапии рилузолом. В другом варианте осуществления субъект получает терапию придопидином в течение по меньшей мере 24, 28, 48 или 52 недель до начала терапии рилузолом.

В одном варианте осуществления субъект получает терапию придопидином до начала терапии лаквинимодом. В другом варианте осуществления субъект получает терапию придопидином в течение по меньшей мере 24, 28, 48 или 52 недель до начала терапии лаквинимодом.

В одном варианте осуществления субъект получает терапию придопидином до начала терапии декстрометорфаном/хинидином. В другом варианте осуществления субъект получает терапию придопидином в течение по меньшей мере 24, 28, 48 или 52 недель до начала терапии декстрометорфаном/хинидином.

В одном варианте осуществления пациенту вводят от 0,5 до 1,5 мг лаквинимода в сутки. В другом варианте осуществления пациенту вводят 0,5 или 1,0 мг лаквинимода в сутки. В одном варианте осуществления лаквинимод вводят перорально.

В одном варианте осуществления пациенту вводят от 10 до 200 мг рилузола в сутки. В другом варианте осуществления пациенту вводят 50, 100 или 200 мг рилузола в сутки.

В одном варианте осуществления рилузол вводят перорально. В одном варианте осуществления декстрометорфан/хинидин вводят перорально.

В одном варианте осуществления пациенту вводят от 5 до 60 мг эдаравона в сутки. В другом варианте осуществления пациенту вводят 30 или 60 мг эдаравона в сутки.

В одном варианте осуществления эдаравон вводят внутривенной инфузией. В другом варианте осуществления эдаравон вводят один раз в сутки в течение 10 дней с последующим 14-дневным периодом без лекарств. В другом варианте осуществления эдаравон вводят один раз в сутки в течение 14 дней с последующим 14-дневным периодом без лекарств.

В одном варианте осуществления каждое из количества второго соединения, когда его принимают по отдельности, и количества придопидина, когда его принимают по отдельности, эффективно для лечения субъекта. В другом варианте осуществления либо количество второго соединения, когда его принимают по отдельности, либо количество придопидина, когда его принимают по отдельности, является менее эффективным для лечения субъекта. В другом варианте осуществления либо количество второго соединения, когда его принимают по отдельности, либо количество придопидина, когда его принимают по отдельности, неэффективно для лечения субъекта.

В одном варианте осуществления придопидин вводят совместно со вторым соединением. В другом варианте осуществления второе соединение вводят в дополнение к придопидину.

В одном варианте осуществления насыщающую дозу в количестве, отличном от предполагаемой дозы, вводят в течение периода времени в начале периодического применения.

В одном варианте осуществления обеспечен способ усиления аксонального транспорта BDNF в моторных нейронах у субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для усиления аксонального транспорта BDNF в моторных нейронах субъекта.

В одном варианте осуществления обеспечен способ усиления активации ERK в моторных нейронах

субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для усиления активации ERK в моторных нейронах субъекта.

В одном варианте осуществления обеспечен способ сохранения структуры нервно-мышечного соединения (НМС) в мышечных клетках субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для сохранения структуры нервно-мышечного соединения в мышцах субъекта.

Кроме того, предложен способ улучшения мышечного сокращения у субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для улучшения функции сокращения мышц у субъекта.

Кроме того, предложен способ улучшения степени иннервации мышечной ткани у субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для улучшения степени иннервации у субъекта.

В одном варианте осуществления предложен способ усиления аксонального роста моторных нейронов у субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для усиления аксонального роста моторных нейронов у субъекта.

В одном варианте осуществления обеспечен способ повышения выживаемости мышечных клеток у субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для повышения выживаемости мышечных клеток у субъекта.

В одном варианте осуществления обеспечен способ уменьшения прогрессирования истощения мышечных волокон у субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для уменьшения прогрессирования истощения мышечных волокон у субъекта.

В одном варианте осуществления обеспечен способ уменьшения аксональной дегенерации у субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для уменьшения аксональной дегенерации у субъекта.

В одном варианте осуществления предоставлен способ сохранения образования НМС у субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для сохранения образования НМС у субъекта.

В одном варианте осуществления обеспечен способ сохранения структуры и функции НМС у субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для сохранения структуры и функции НМС у субъекта.

В одном варианте осуществления обеспечен способ уменьшения агрегации белка у субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для уменьшения агрегации белка у субъекта.

В одном варианте осуществления обеспечен способ ослабления прогрессирования псевдобульбарного синдрома у субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для ослабления прогрессирования псевдобульбарного синдрома у субъекта.

Изобретение также обеспечивает упаковку, содержащую:

фармацевтическую композицию, включающую количество придопидина; и
при необходимости, инструкции по применению фармацевтической композиции для лечения субъекта, страдающего БАС.

Изобретение также обеспечивает терапевтическую упаковку для отпуска субъекту или для использования при отпуске субъекту, которая включает:

одну или несколько единичных доз, причем каждая такая единичная доза содержит количество указанного придопидина, причем количество указанного придопидина в указанной единичной дозе является эффективным при введении указанному субъекту для лечения БАС у субъекта; и

готовый фармацевтический контейнер для этого, содержащий указанную единичную дозу или единичные дозы, где указанный контейнер при необходимости дополнительно содержит или включает инструкцию, указывающую на использование указанной упаковки при лечении субъекта, страдающего БАС.

Такая стандартная доза содержит 10-250 мг придопидина или, например, 10, 22,5, 45, 67,5, 90 или 112,5 мг придопидина.

Изобретение также обеспечивает упаковку, содержащую:

первую фармацевтическую композицию, включающую количество придопидина и фармацевтически приемлемый носитель;

вторую фармацевтическую композицию, включающую количество второго соединения, которое представляет собой рилузол, эдаравон или декстрометорфан/хинидин и фармацевтически приемлемый носитель; и

при необходимости, инструкции по применению первой и второй фармацевтических композиций вместе для лечения субъекта, страдающего БАС.

В одном варианте осуществления количество второго соединения и количество придопидина готовы для одновременного или последовательного введения.

Изобретение также обеспечивает терапевтическую упаковку для дозирования субъекту, страдаю-

щему БАС, или для использования при дозировании, которая включает:

одну или несколько единичных доз, где каждая такая единичная доза включает:

количество придопидина и

количество второго соединения, которое представляет собой рилузол или эдаравон или декстрометорфан/хинидин,

где соответствующие количества указанного придопидина и второго соединения в указанной стандартной дозе эффективны при одновременном введении указанному субъекту для лечения субъекта; и

готовый фармацевтический контейнер для этого, содержащий указанную единичную дозу или единичные дозы, при необходимости дополнительно содержащий или включающий инструкцию, указывающую на использование указанной упаковки при лечении указанного субъекта.

Изобретение также предлагает способ комбинированной терапии для лечения БАС, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества придопидина и терапевтически эффективного количества рилузола, эдаравона или декстрометорфана/хинидина.

Для вышеупомянутых вариантов осуществления каждый вариант осуществления, раскрытый в данном документе, рассматривается как применимый к каждому из других раскрытых вариантов осуществления. Например, элементы, перечисленные в вариантах осуществления способа, могут быть использованы в описанных здесь вариантах осуществления фармацевтической композиции, упаковки и использования, и наоборот.

Все комбинации, подкомбинации и перестановки различных элементов способов и применений, описанных в настоящем документе, предусмотрены и находятся в пределах объема изобретения.

Фармацевтически приемлемые соли.

Используемый в настоящем документе термин "придопидин" означает основание придопидина или его фармацевтически приемлемую соль, а также производные, например, обогащенную дейтерием версию придопидина и его солей. Примеры обогащенного дейтерием придопидина и его солей и способов их получения можно найти в публикациях заявок США № 2013-0197031, 2016-0166559 и 2016-0095847, содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки во всей полноте. В некоторых вариантах осуществления изобретения придопидин представляет собой фармацевтически приемлемую соль, такую как соль HCl или тартратная соль. Предпочтительно в любых вариантах осуществления изобретения, как описано в настоящем документе, придопидин находится в форме его гидрохлоридной соли.

Примеры фармацевтически приемлемых солей присоединения включают нетоксичные соли присоединения неорганических и органических кислот, такие как гидрохлорид, гидробромид, нитрат, перхлорат, фосфат, сульфат, формиат, ацетат, аконитат, аскорбат, бензолсульфонат, бензоат, циннамат, цитрат, эмбонат, энантат, фумарат, глутамат, гликолят, лактат, малеат, малонат, миндалят, метансульфонат, нафталин-2-сульфонат, фталат, салицилат, сорбат, стеарат, сукцинат, тартрат, толуол-п-сульфонат и т.п., но не ограничиваются ими. Такие соли могут быть получены с помощью процедур, хорошо известных и описанных в данной области техники.

"Обогащенный дейтерием" означает, что содержание дейтерия в любом соответствующем участке соединения превышает количество дейтерия, естественно встречающегося в этом участке в количестве соединения. Распределение дейтерия в природе составляет около 0,0156%. Таким образом, в "обогащенном дейтерием" соединении содержание дейтерия в любом из его соответствующих участков составляет более 0,0156% и может варьировать от более 0,0156 до 100%. Обогащенные дейтерием соединения могут быть получены путем обмена водорода с дейтерием или путем синтеза соединения с обогащенными дейтерием исходными материалами.

Фармацевтические композиции.

Хотя придопидин для применения по изобретению можно вводить в форме исходного соединения, предпочтительное введение придопидина, при необходимости в форме физиологически приемлемой соли, осуществляют в фармацевтической композиции вместе с одним или несколькими адъювантами, наполнителями, носителями, буферными агентами, разбавителями и/или другие обычные фармацевтическими вспомогательными веществами.

В одном варианте осуществления изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим придопидин или его фармацевтически приемлемые соли или производные вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями и, при необходимости, другими терапевтическими и/или профилактическими ингредиентами, известными и используемыми в данной области техники, включая рилузол, эдаравон или Nuedexta® (декстрометорфан/хинидин), но не ограничиваясь ими.

Носитель (носители) должен быть "приемлемым" в смысле совместимости с другими ингредиентами препарата и подходящим для введения человеку.

Комбинированная терапия.

Когда изобретение включает комбинацию активного соединения и дополнительного одного или нескольких терапевтических и/или профилактических ингредиентов, комбинация по изобретению может быть составлена для её одновременного или последовательного введения по меньшей мере с фармацевтически приемлемым носителем, добавкой, адъювантом или растворителем. Это означает, что комбинация

ция двух активных соединений может быть введена:

в виде комбинации, которая является частью одной и той же лекарственной формы, где два активных соединения вводят одновременно, или

в виде комбинации двух единиц, каждая с одним из активных веществ, дающей возможность одновременного или последовательного введения.

Эффекты любого отдельного лекарства связаны с его абсорбцией, распределением и выведением. Когда два лекарства вводят в организм, каждое лекарство может влиять на поглощение, распределение и выведение другого, и, следовательно, изменять действие другого. Например, одно лекарство может ингибировать, активировать или индуцировать выработку ферментов, участвующих в метаболическом пути элиминации другого лекарства (Guidance for Industry, 1999).

Не только взаимодействие между двумя лекарственными средствами может влиять на предполагаемую терапевтическую активность каждого лекарственного средства, но и взаимодействие может повышать уровни токсических метаболитов (Guidance for Industry, 1999). Взаимодействие может также увеличивать или уменьшать побочные эффекты каждого препарата. Следовательно, после введения двух лекарств для лечения заболевания нельзя предсказать, какое изменение произойдет в отрицательном побочном профиле каждого лекарства.

Кроме того, трудно точно предсказать, когда проявятся эффекты взаимодействия между двумя лекарственными средствами. Например, метаболические взаимодействия между лекарственными средствами могут стать очевидными при первоначальном введении второго лекарственного средства, после того, как два препарата достигают постоянной концентрации, или после прекращения приема одного из лекарственных препаратов (Guidance for Industry, 1999).

В качестве одного примера можно привести комбинированное введение ГА и интерферона (IFN), которое аннулирует клиническую эффективность любой терапии (Brod, 2000). В другом эксперименте сообщалось, что добавление преднизона в комбинированной терапии с IFN- β противодействовало эффекту его повышающей регуляции. Таким образом, когда два лекарства вводят для лечения одного и того же состояния, нельзя предсказать, будет ли каждое из них дополнять, не оказывать влияния или влиять на терапевтическую активность другого лекарства у человека.

Применение.

Фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить любым удобным путем, который подходит для необходимой терапии. Предпочтительные пути введения включают пероральное введение, в частности, в таблетках, в капсулах, в драже, в порошке или в жидкой форме, интраназальное введение, внутрикожное введение и парентеральное введение, в частности, кожную, подкожную, внутримышечную или внутривенную инъекцию. Фармацевтическая композиция по изобретению может быть изготовлена квалифицированным специалистом с использованием стандартных способов и традиционных методик, подходящих для необходимой композиции. При необходимости могут быть использованы композиции, адаптированные для пролонгированного высвобождения активного ингредиента.

Таблетки могут содержать подходящие связующие вещества, лубриканты, разрыхляющие вещества (дезинтегранты), красители, ароматизаторы, средства, улучшающие текучесть, и вещества, понижающие температуру замерзания. Например, для перорального введения в форме единичной дозы таблетки или капсулы активный лекарственный компонент можно комбинировать с пероральным, нетоксичным, фармацевтически приемлемым инертным носителем, таким как лактоза, желатин, агар, крахмал, сахароза, глюкоза, метилцеллюлоза, дикальций фосфат, кальция сульфат, маннитол, сорбитол, микрокристаллическая целлюлоза и т.п. Подходящие связующие вещества включают крахмал, желатин, натуральные сахара, такие как глюкоза или бета-лактоза, кукурузный крахмал, натуральные и синтетические камеди, такие как камедь акации, камедь трагаканта или альгинат натрия, повидон, карбоксиметилцеллюлозу, полиэтиленгликоль, воски и т.п. Лубриканты, используемые в этих лекарственных формах, включают олеат натрия, стеарат натрия, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия, стеариновую кислоту, стеарилфумарат натрия, тальк и т.п. Дезинтеграторы (дезинтегранты) включают крахмал, метилцеллюлозу, агар, бентонит, ксантановую камедь, кроскармеллозу натрия, крахмалгликолят натрия и т.п., но не ограничиваются ими.

Общие методики и композиции для приготовления лекарственных форм, применимых в настоящем изобретении, описаны в следующих ссылках: Modern Pharmaceuticals, Chapters 9 and 10 (Banker & Rhodes, Editors, 1979); Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets (Lieberman 1981); Ansel, Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms 2nd Edition (1976); Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985); Advances in Pharmaceutical Sciences (David Ganderton, Trevor Jones, Eds., 1992); Advances in Pharmaceutical Sciences Vol 7. (David Ganderton, Trevor Jones, James McGinity, Eds., 1995); Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms (Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Series 36 (James McGinity, Ed., 1989); Pharmaceutical Particulate Carriers: Therapeutic Applications: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol 61 (Alain Rolland, Ed., 1993); Drug Delivery to the Gastrointestinal Tract (Ellis Horwood Books in the Biological Sciences. Series in Pharmaceutical Technology; J.G. Hardy, S.S. Davis, Clive G. Wilson, Eds); Modern Pharmaceuticals Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol. 40 (Gilbert S. Banker, Christopher T. Rhodes, Eds). Эти источники во всей полноте включены в настоящий документ по-

средством ссылки.

Термины.

Используемый здесь, и если не указано иное, каждый из следующих терминов должен иметь определение, изложенное ниже.

Используемый в настоящем документе термин "рилузол" означает рилузол или его фармацевтически приемлемую соль, а также производные, например обогащенную дейтерием версию рилузола и его солей. Рилузол описан в "Preservers' Digital Reference", который включен в настоящее описание посредством ссылки (Riluzole PDR 2017).

Используемый в настоящем документе термин "эдаравон" означает эдаравон или его фармацевтически приемлемую соль, а также производные, например обогащенный дейтерием вариант эдаравона и его солей. Эдаравон описан в "Prescribers' Digital Reference", который включен в настоящее описание посредством ссылки (Edaravone PDR 2017).

"Комбинация декстрометорфана и хинидина" или "декстрометорфан/хинидин" или "декстрометорфана гидробромид/хинидина сульфат" относится к комбинации декстрометорфана гидробромида (20 мг) и хинидина сульфата (10 мг), такой как Nuedexta®. Nuedexta® - это препарат, который в настоящее время поставляется для лечения псевдобульбарного аффекта (ПБА), среди прочего, у пациентов с БАС. Было показано, что Nuedexta® действует на рецепторы сигма-1 и NMDA в головном мозге. Последние данные показывают, что комбинация влияет на бульбарную функцию в БАС, но не влияет на другие аспекты моторных функций (Smith, 2017). Декстрометорфан гидробромид/хинидин сульфат описан в "Prescribers' Digital Reference", который включен в настоящее описание посредством ссылки (Dextromethorphan hydrobromide/quinidine sulfate PDR 2017).

Используемый в настоящем документе термин "количество" или "доза" придопидина, измеренные в миллиграммах, относится к миллиграммам недериватизированного основания придопидина, присутствующего в препарате, независимо от формы препарата. "Доза 45 мг придопидина" означает, что количество придопидина в препарате является достаточным для обеспечения 45 мг недериватизированного основания придопидина, имеющего природное распределение изотопов, независимо от формы препарата. Таким образом, в форме соли, например, придопидина гидрохлорида, масса соли в форме, необходимая для обеспечения дозы 45 мг недериватизированного основания придопидина, будет больше чем 45 мг из-за присутствия дополнительного солевого иона. Точно так же, когда он находится в форме обогащенного дейтерием производного, масса дериватизированной формы, необходимой для обеспечения дозы 45 мг недериватизированного основания придопидина, имеющего естественное распределение изотопов, будет больше чем 45 мг из-за присутствия дополнительного дейтерия.

Под любым диапазоном, раскрытым в данном документе, подразумевается, что все сотые, десятки и целочисленные единичные количества в пределах диапазона конкретно раскрыты как часть изобретения. Так, например, от 0,01 до 50 мг означает, что 0,02; 0,03, ..., 0,09; 0,1; 0,2, ..., 0,9 и 1; 2, ..., 49 мг единичных количеств включены в качестве вариантов осуществления данного изобретения. Под любым диапазоном времени, раскрытым в данном документе (т.е. неделями, месяцами или годами), подразумевается, что все отрезки времени дней и/или недель в этом диапазоне конкретно раскрываются как часть изобретения. Таким образом, например, 3-6 месяцев означает, что 3 месяца и 1 день, 3 месяца и 1 неделя и 4 месяца включены в качестве вариантов осуществления изобретения.

Используемый в настоящем документе термин "примерно" в контексте числового значения или диапазона означает $\pm 10\%$ числового значения или диапазона, указанного или заявленного.

Используемый в настоящем документе термин "монотерапия" означает лечение одним активным агентом, например, лечение одним только придопидином.

Используемый в настоящем документе термин "вспомогательный" означает лечение или применение дополнительного соединения с первичным соединением, например, для повышения эффективности или безопасности первичного соединения или для облегчения его активности.

Используемый в настоящем документе термин "периодическое введение" означает повторное/неоднократное введение, разделенное периодом времени. Период времени между введениями предпочтительно является постоянным по времени. Периодическое введение может включать введение, например, один раз в сутки, два раза в сутки, три раза в сутки, четыре раза в сутки, еженедельно, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю и т.д.

Используемый в настоящем документе термин "комбинация" означает совокупность реагентов для применения в терапии путем одновременного или последовательного введения. Одновременное введение относится к введению смеси (будь то настоящая смесь, суспензия, эмульсия или другая физическая комбинация) придопидина и второго соединения (например, рилузола). В этом случае комбинация может представлять собой смесь или отдельные контейнеры с придопидином и вторым соединением, которые объединяют непосредственно перед введением. Последовательное введение или сопутствующее введение относится к раздельному введению придопидина и второго соединения (например, рилузола) одновременно или иногда достаточно близко друг к другу, так что наблюдается аддитивная или предпочтительно синергетическая активность относительно активности либо придопидина или только второго со-

единения, или к введению в достаточно близком временном приближении, чтобы позволить отдельным терапевтическим эффектам каждого агента перекрываться.

Используемый в настоящем документе термин "дополнение" или "дополнительная терапия" означает совокупность реагентов для использования в терапии, где субъект, получающий терапию, начинает первый режим лечения одним или несколькими реагентами до начала второго режима лечения одним или несколькими отличающимися реагентами в дополнение к первому режиму лечения, так что не все реагенты, используемые в терапии, начинают применяться одновременно. Например, добавление терапии придопидином пациенту, уже получающему терапию рилузолем.

Используемый в настоящем документе термин "эффективный" применительно к количеству придопидина относится к количеству придопидина, которое является достаточным для получения необходимого терапевтического ответа. В предпочтительном варианте осуществления количество вводимого придопидина не приводит к нежелательным побочным эффектам (таким как токсичность, раздражение или аллергическая реакция).

"Введение субъекту" или "введение пациенту (человеку)" означает предоставление, отпуск или применение медикаментов, лекарств или медицинских средств для субъекта/пациента для облегчения, излечения или уменьшения симптомов, связанных с заболеванием, расстройством или состоянием, например, патологическим состоянием.

Используемое в настоящем описании "лечение" включает индукцию ингибирования, регрессии, или остановки заболевания или расстройства, или уменьшение, подавление, ингибирование, снижение тяжести, устранение, или существенное устранение или ослабление симптома заболевания или расстройства.

"Ингибирование" прогрессирования заболевания или осложнения заболевания у субъекта означает предотвращение или уменьшение прогрессирования заболевания и/или осложнения заболевания у субъекта.

"Симптом", связанный с заболеванием или расстройством, включает любое клиническое или лабораторное проявление, связанное с заболеванием или расстройством, и не ограничивается тем, что субъект может чувствовать или наблюдать.

Используемый в настоящем документе термин "субъект, страдающий" заболеванием, расстройством или состоянием, означает субъекта, у которого был клинически установлен диагноз заболевания, расстройства или состояния.

Нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF) представляет собой белок, кодируемый геном GDNF, и считается, что он способствует выживанию многих типов нейронов.

Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF) представляет собой белок, вырабатываемый нейронами, который служит для поддержания функционирования и стимулирования роста нейронов и нейрогенеза.

Следующие пронумерованные пункты определяют различные аспекты и признаки настоящего изобретения:

1. Способ лечения субъекта, страдающего боковым амиотрофическим склерозом (БАС), включающий периодическое введение субъекту количества придопидина, эффективного для лечения субъекта.

2. Способ по п.1, в котором количество придопидина является эффективным для ингибирования или уменьшения прогрессирования симптома БАС у субъекта.

3. Способ по п.2, где симптомом является ригидность мышц, мышечная слабость, истощение мышц, мышечные спазмы, затруднение речи, затруднение глотания, затруднение дыхания, затруднение жевания, затруднение ходьбы, фасцикуляции и/или ухудшение осанки.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором БАС является спорадическим БАС.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором количество придопидина вводят ежедневно или где количество придопидина вводят чаще, чем один раз в сутки.

6. Способ по любому из пп.1-4, в котором количество придопидина вводят два раза в сутки.

7. Способ по любому из пп.1-4, в котором количество придопидина вводят реже, чем один раз в сутки.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором количество придопидина вводят перорально.

9. Способ по любому из пп.1-8, в котором количество вводимого придопидина составляет от 22,5 до 225 мг в сутки.

10. Способ по п.9, в котором количество вводимого придопидина составляет от 45 до 180 мг в сутки.

11. Способ по п.9, в котором количество вводимого придопидина составляет 5, 10, 22,5, 45, 67,5, 90, 100, 112,5, 125, 135, 150 или 180 мг в сутки.

12. Способ по любому из пп.1-11, в котором периодическое введение продолжают в течение по меньшей мере 24 недель.

13. Способ по любому из пп.1-12, в котором придопидин представляет собой придопидина гидрохлорид.

14. Способ по любому из пп.1-13, в котором субъект является человеком.

15. Способ по любому из пп.1-14, дополнительно включающий введение субъекту терапевтически

эффективного количества второго соединения.

16. Способ по п.15, в котором второе соединение представляет собой рилузол, эдаравон или декстрометорфан/хинидин.

17. Способ по пп.15, 16, в котором придопидин и второе соединение вводят в одной единице.

18. Способ по пп.15, 16, в котором придопидин и второе соединение вводят более чем в одной единице.

19. Способ по любому из пп.15-18, в котором второе соединение представляет собой рилузол.

20. Способ по п.19, отличающийся тем, что субъекту вводят 10-200 или 50, 100 или 200 мг рилузола в сутки.

21. Способ по любому из пп.15-20, в котором рилузол вводят перорально.

22. Способ по любому из пп.15-18, в котором второе соединение представляет собой эдаравон.

23. Способ по п.22, где 5-60, или 30, или 60 мг эдаравона вводят субъекту в сутки.

24. Способ по любому из пп.15-18 и 22, 23, в котором эдаравон вводят путем внутривенной инфузии.

25. Способ по любому из пп.15-18 и 22-24, где эдаравон вводят один раз в сутки в течение 14 или 10 дней с последующим 14-дневным периодом без лекарства.

26. Способ по любому из пп.15-18, в котором второе соединение представляет собой декстрометорфан/хинидин.

27. Способ по п.26, в котором 10, 20 или 40 мг декстрометорфана вводят субъекту в сутки и 5, 10 или 20 мг хинидина вводят субъекту в сутки.

28. Способ по любому из пп.26, 27, в котором декстрометорфан/хинидин вводят перорально.

29. Способ по любому из пп.15-28, в котором количество придопидина и количество второго соединения вводят одновременно.

30. Способ по любому из пп.15-28, в котором введение второго соединения по существу предшествует введению придопидина.

31. Способ по любому одному из пп.15-28, в котором введение придопидина по существу предшествует введению второго соединения.

32. Способ по любому из пп.15-28, в котором субъект получает терапию эдаравоном, терапию декстрометорфаном/хинидином или терапию рилузолом до начала терапии придопидином.

33. Способ по п.32, в котором субъект получает терапию эдаравоном, терапию декстрометорфаном/хинидином или терапию рилузолом в течение по меньшей мере 24, 28, 48 или 52 недель до начала терапии придопидином.

34. Способ по любому из пп.15-28, в котором субъект получает терапию придопидином до начала терапии эдаравоном, терапии декстрометорфаном/хинидином или терапией рилузолом.

35. Способ по п.34, в котором субъект получает терапию придопидином в течение по меньшей мере 24, 28, 48 или 52 недель до начала терапии эдаравоном, терапии декстрометорфаном/хинидином или терапией рилузолом.

36. Способ по любому из пп.15-35, в котором каждое из количества второго соединения, взятого отдельно, и количества придопидина, взятого отдельно, является эффективным для лечения субъекта.

37. Способ по любому из пп.15-35, в котором либо количество второго соединения, когда его принимают по отдельности, количество придопидина, когда его принимают по отдельности, либо каждое такое количество, когда его принимают по отдельности, неэффективно для лечения субъекта.

38. Способ по любому из пп.15-35, в котором либо количество второго соединения, когда его принимают по отдельности, количество придопидина, когда его принимают по отдельности, либо каждое такое количество, когда его принимают по отдельности, менее эффективно для лечения субъекта.

39. Способ по любому из пп.15-38, где придопидин вводят в дополнение к второму соединению.

40. Способ по любому из пп.15-38, где второе соединение вводят в дополнение к придопидину.

41. Способ по любому из пп.1-40, где насыщающую дозу в количестве, отличном от предполагаемой дозы, вводят в течение периода времени в начале периодического введения.

42. Способ усиления аксонального транспорта BDNF в моторных нейронах у субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для усиления аксонального транспорта BDNF в моторных нейронах субъекта.

43. Способ улучшения формирования и функционирования НМС у субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для улучшения формирования НМС и функции сокращения мышц у субъекта.

44. Способ улучшения степени иннервации мышечной ткани у субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для улучшения степени иннервации у субъекта.

45. Способ усиления аксонального роста моторных нейронов у субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для усиления аксонального роста моторных нейронов у субъекта.

46. Способ усиления мышечного сокращения у субъекта, страдающего БАС, включающий введение

субъекту количества придопидина, эффективного для усиления сокращения мышц у субъекта.

47. Способ восстановления мышечного сокращения у субъекта, страдающего БАС, включающий введение субъекту количества придопидина, эффективного для улучшения сокращения мышц у субъекта.

48. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество придопидина для применения при лечении субъекта, страдающего БАС.

49. Применение количества придопидина для производства лекарственного средства для лечения субъекта, страдающего БАС.

50. Упаковка, содержащая:

а) фармацевтическую композицию, включающую количество придопидина; и при необходимости

б) инструкции по применению фармацевтической композиции для лечения субъекта, страдающего БАС.

51. Терапевтическая упаковка для дозирования субъекту или для использования при дозировании у субъекта, которая включает:

а) одну или несколько единичных доз, причем каждая такая единичная доза содержит количество придопидина, где количество указанного придопидина в указанной единичной дозе является эффективным при введении указанному субъекту для лечения БАС у субъекта; и

б) готовый фармацевтический контейнер для этого, содержащий указанную единичную дозу или единичные дозы, где указанный контейнер дополнительно включает или содержит инструкцию, указывающую на использование указанной упаковки при лечении субъекта, страдающего БАС.

52. Упаковка, содержащая:

а) первую фармацевтическую композицию, включающую количество придопидина и фармацевтически приемлемый носитель;

б) вторую фармацевтическую композицию, включающую количество второго соединения, которое представляет собой рилузол, эдаравон или декстрометорфан/хинидин, и фармацевтически приемлемый носитель; и при необходимости

с) инструкции по применению первой и второй фармацевтических композиций совместно для лечения субъекта, страдающего БАС.

53. Упаковка по п.52, в которой количество второго соединения и количество придопидина готовят для введения одновременно или последовательно.

54. Терапевтическая упаковка для дозирования субъекту, страдающему БАС, или для использования при дозировании пациенту, которая включает:

а) одну или несколько единичных доз, включающих:

i) количество придопидина и

ii) количество второго соединения, которое представляет собой рилузол, эдаравон или декстрометорфан/хинидин;

где соответствующие количества указанного придопидина и второго соединения в указанной единичной дозе эффективны при одновременном введении указанному субъекту для лечения субъекта, и

б) готовый фармацевтический контейнер для этого, содержащий указанную единичную дозу или единичные дозы, где указанный контейнер дополнительно содержит или включает инструкцию, указывающую на использование указанной упаковки при лечении указанного субъекта.

55. Фармацевтическая композиция, содержащая количество придопидина и количество второго соединения, которое представляет собой рилузол, эдаравон или декстрометорфан/хинидин.

56. Фармацевтическая композиция по п.55 для применения при лечении субъекта, страдающего БАС, где придопидин и второе соединение получают для одновременного, последовательного или сопутствующего введения.

57. Фармацевтическая композиция в единичной дозированной форме, пригодная для лечения субъекта, страдающего БАС, которая включает:

а) количество придопидина;

б) количество второго соединения, которое представляет собой рилузол, эдаравон или декстрометорфан/хинидин,

где соответствующие количества указанного второго соединения и указанного придопидина в указанной композиции эффективны при одновременном введении указанному субъекту одной или нескольких из указанных единичных дозированных форм указанной композиции для лечения субъекта.

58. Фармацевтическая композиция, содержащая количество придопидина для применения при лечении субъекта, страдающего БАС, в качестве дополнительной терапии ко второму соединению, которое представляет собой рилузол, эдаравон или декстрометорфан/хинидин.

59. Фармацевтическая композиция, содержащая количество придопидина для применения при лечении субъекта, страдающего БАС, одновременно, последовательно или совместно со вторым соединением, которое представляет собой рилузол, эдаравон или декстрометорфан/хинидин.

60. Фармацевтическая композиция, содержащая количество второго соединения, которое представляет собой рилузол, эдаравон или декстрометорфан/хинидин, для применения при лечении субъекта, страдающего

шего БАС, в качестве дополнительной терапии к придопидину.

61. Фармацевтическая композиция, содержащая количество соединения, которое представляет собой рилузол, эдаравон или декстрометорфан/хинидин, для применения при лечении субъекта, страдающего БАС, одновременно, последовательно или параллельно с придопидином.

62. Соединение, которое представляет собой рилузол, эдаравон или декстрометорфан/хинидин для применения в качестве дополнительной терапии к придопидину при лечении субъекта, страдающего БАС.

63. Придопидин для применения в качестве дополнительной терапии к соединению, которое представляет собой рилузол, эдаравон или декстрометорфан/хинидин, для лечения субъекта, страдающего БАС.

64. Дополнительная терапия по п.63, предназначенная для лечения, профилактики или облегчения симптома БАС.

65. Комбинация придопидина с соединением, которое представляет собой рилузол, эдаравон или декстрометорфан/хинидин, для применения при лечении, профилактике или облегчении симптома БАС.

В данном документе упоминаются некоторые публикации и публикации патентных заявок. Полные ссылки на публикации можно найти непосредственно перед формулой изобретения. Раскрытие этих публикаций и публикаций патентных заявок во всей полноте включено в настоящий документ посредством ссылки для более полного описания уровня техники, к которой относится это изобретение.

Это изобретение будет лучше понято при обращении к экспериментальным деталям, которые следуют, но специалисты в данной области техники легко поймут, что подробные конкретные эксперименты являются только иллюстрацией изобретения, как более полно описано в формуле изобретения, которая следует после этого.

Подробности экспериментов

Эксперимент 1. Анализ аксонального транспорта.

Здоровые моторные нейроны (МН) распространяют аксоны на большие расстояния и через различные внеклеточные микроокружения, образуя синапсы с мышцами. Способность нейрона поддерживать эту специализированную морфологию зависит от элементов цитоскелета и непрерывного транспорта белков и органелл в клеточное тело и из него. Изменения цитоскелета являются основным путем, вовлеченным в патогенез БАС, влияющим на аксональный транспорт, рост и функцию нервно-мышечного соединения (НМС) (Eykens and Robberecht, 2015). Изменения аксонального транспорта являются одними из первых клеточных процессов, которые происходят при нейродегенеративных заболеваниях, включая БАС. Аксональный транспорт оценивали, используя *in vitro* компартментальную систему микрофлюидных камер, которая отделяет тела нейрональных клеток от их аксонов и синапсов, что позволяет изучать ретроградный/антероградный транспорт посредством специфического мониторинга и манипулирования клеточными микроокружениями (фиг. 1b; Zahavi, 2015; Ionescu, 2016).

BDNF, меченный квантовой точкой (Qdot-BDNF), ретроградно транспортируется в аксонах эксплантата моторных нейронов, выращенных в микрофлюидной камере (МФК). МФК использовали для анализа аксонального транспорта Qdot-BDNF. Изучен аксональный транспорт BDNF на модели SOD1 (SOD1G93A) для БАС (Bilsland, 2010; Perlson, 2009; De Vos, 2007). Влияние придопидина на транспорт Qdot-BDNF по аксонам моторных нейронов оценивали в эксплантатах спинного мозга мышей SOD1 и WT (LM). Ход эксперимента для анализа аксонального транспорта (слева направо, фиг. 1a): эксплантаты спинного мозга SFC1G93A или дикого типа (LM) помещали в МФК. Примерно через 5 дней после введения в камеру аксоны начали переходить в дистальный компартмент. На 6-й день после помещения в камеру в оба компартмента добавляли количество придопидина. На 7-й день в дистальный компартмент добавляли Qdot-BDNF, и получали изображения аксонального транспорта. Схематическое изображение микрофлюидной камерной системы (фиг. 1b): эксплантаты спинного мозга (CM) от эмбрионов мышей WT или SOD1G93A E12.5 помещали в проксимальный компартмент микрофлюидной камеры. МН из спинного мозга направляют свои аксоны к дистальному отделу. В этот момент Qdot-BDNF применяли исключительно для этого компартмента. Аксональный транспорт Qdot-BDNF затем визуализировали и регистрировали с помощью конфокальной системы визуализации высокого разрешения с вращающимся диском.

Конфокальную микроскопию с вращающимся диском использовали для отслеживания Qdot-BDNF вдоль аксонов культур эксплантатов моторных нейронов. Покадровые изображения аксонального транспорта Qdot-BDNF получали при 60-кратном увеличении (фиг. 1c). Желтые стрелки указывают на одну частицу Qdot-BDNF, которая ретроградно транспортируется (слева) к телу клетки. Масштабный отрезок: 10 мкм. Нижняя панель показывает полную запись покадровой съемки Qdot-BDNF. Масштабные отрезки: по горизонтали 10 мкм; по вертикали 100 с (фиг. 1c).

Контрольный раствор и придопидин добавляли в обе стороны камеры в двух концентрациях (0,1 и 1 мкМ) в экспериментальный день 6, и в дистальный компартмент добавляли Qdot-BDNF после инкубации с придопидином в течение ночи (фиг. 1a и 1b). Шесть независимых биологических повторов из шести различных культур были протестированы таким образом, чтобы из каждой культуры и эксплантата с нейронами/глией ~250 частиц BDNF прослежены вдоль аксонов в полостях. Скорость μ относится

к движению одной частицы BDNF. Эксперимент был повторен с МН от мышей, нокаутных по рецептору сигма-1 (S1R KO или S1R-/-) (Langa, 2003). Срезы вентрального спинного мозга эмбрионов мышей S1R KO культивировали и помещали в МФК, как описано выше, и анализировали аксональный транспорт Qdot-BDNF.

Эксплантаты SOD1G93 и S1R KO с придопидином или без него сравнивали с одноплетным контролем (LM).

Отслеживание частиц Qdot-BDNF выполняли на Bitplane Imaris с использованием полуавтоматической функции точечного отслеживания. Критерии включения для анализа частиц: длительность трека >10 кадров; средняя скорость >0,2 мкм/с; длительность остановки: скорость <0,1 мкм/с для 3 кадров. Затем данные были экспортированы в MATLAB для дальнейшего анализа транспорта частиц, включая мгновенные скорости (фиг. 2a) из 6 независимых культур; и счет остановок (фиг. 2b).

Результаты.

На фиг. 2a показано, что придопидин усиливает мгновенную скорость аксонального транспорта BDNF в моторных нейронах SOD1G93A. Мгновенная скорость ретроградного транспорта BDNF обычно снижается в моторных нейронах SOD1G93A. МН SOD1G93A показывают более медленные скорости по сравнению с МН дикого типа. Обработка придопидином ускоряла мгновенные скорости как в моторных нейронах дикого типа (0,1 мкМ), так и в моторных нейронах SOD1G93A (0,1 и 1 мкМ). Применение 25 или 100 мкМ рилузола на МН SOD1G93A не влияло на мгновенные скорости. МН S1R-/- выявили дефекты в аксональном транспорте BDNF. Придопидин в концентрации 0,1 или 1 мкМ не смог восстановить эти дефекты в МН S1R KO (фиг. 2a).

Количество остановок частиц (число отсчитанных остановок Qdot-BDNF в секунду) показывает, что придопидин уменьшал количество пауз во время аксонального транспорта в МН WT (синий) (только 0,1 мкМ) и МН SOD1G93A (красный) (как 0,1, так и 1 мкМ). Параметры аксонального транспорта Qdot-BDNF в МН S1R-/- показывают, что они не реагируют на придопидин ни при одной из протестированных концентраций (фиг. 2b).

Эти результаты показывают, что придопидин усиливает аксональный транспорт BDNF в моторных нейронах SOD1G93A и обладает способностью исправлять связанные с БАС дефициты.

Эксперимент 2. Анализ роста/дегенерации аксонов-мышц.

Ранним событием в патогенезе БАС является дегенерация аксонов. Компартментальную микрофлюидную камерную систему для совместного культивирования использовали для определения того, изменяет ли придопидин аксональную дегенерацию (фиг. 3). Культивировали первичные мышечные клетки от бессимптомных (P60) мышей WT или SOD1G93A. На шестой день первичные скелетные миобласты культивировали в дистальном отделе МФК. Примерно через шесть дней (день 12) эксплантаты вентрального спинного мозга от эмбрионов мышей WT или SOD1G93A E12.5, которые экспрессируют HB9-GFP (специфический маркер моторных нейронов), помещали в проксимальный компартмент с последующим введением придопидина или контрольного раствора в оба компартмента. Придопидин обновляли через день. Через два дня после помещения эксплантата в камеру (день 14) рост и дегенерацию моторных аксонов оценивали с использованием визуализации в реальном времени на конфокальной системе с вращающимся диском. Рост аксонов отслеживали путем визуализации каждые 10 мин в течение 8 ч. Эксперименты повторяли три раза.

Результаты.

Данные показывают, что придопидин усиливал рост аксонов (фиг. 4). Миоциты, несущие мутацию SOD1G93A, имеют уменьшенное количество здоровых аксонов, которые способны проникать в дистальный компартмент микрофлюидной компартментальной камеры, по сравнению с миоцитами WT (LM). Обработка 1 мкМ придопидина (крайний правый столбец) показала увеличение количества аксонов, проходящих в дистальный компартмент (компартмент с мышечными клетками). (Ось Y - это среднее число полостей с аксонами, проходящими в мышечный компартмент).

Эти результаты показывают, что придопидин усиливает рост аксонов и обладает способностью к коррекции связанных с БАС дефицитов.

Эксперимент 3. Измерение формирования и функции нервно-мышечного соединения (НМС).

Разрушение синапса является самым ранним нарушением клеточного компартмента при БАС. Чтобы проверить способность придопидина влиять на функцию синапса на модели БАС, культуры из эксперимента 2 выращивали в течение приблизительно четырех дополнительных дней (день 18), когда аксоны распространяются в дистальный компартмент и генерируют соединения НМС. В этой совместной культуре первичные миоциты полностью дифференцировались и формировали соединения с аксонами МН, и эти соединения были постсинаптическими маркерами (AChR (ацетилхолин R)), совместно локализованными с нейронами HB9:GFP. Фиг. 5a: верхняя панель: фазовое изображение миоцита в дистальном компартменте, соединенного аксонами (зеленые стрелки). Масштабный отрезок: 20 мкм. Нижняя панель: изображения миоцитов с высоким увеличением: точки соприкосновения МН показывают образование НМС, что видно по совместной локализации постсинаптического AChR с аксонами HB9:GFP и трехмерной совместной локализации пре- и постсинаптических маркеров (coloc). Чтобы оценить функцию НМС, записи сокращения мышц были получены с частотой 30 кадров/с для 1000 кадров

(фиг. 5b). Следы сокращения мышц, извлеченные из интенсивности по времени измерения сокращения мышц, показывают плоский след не сокращающегося, неподвижного миоцита (вверху) и след сокращающегося миоцита, демонстрирующий множественные всплески активности (внизу).

Для изучения влияния придопидина на МН и формирование и функционирование НМС добавляли либо 0,1, либо 1 мкМ придопидина или контрольного раствора. Измерение % иннервации и вызванного иннервацией сокращения в миотрубках оценивали с использованием визуализации живых клеток, как сообщалось ранее (Ionescu, 2015; Zahavi, 2015). Вкратце, исследовали сократительную активность мышц в дистальном отделе МФК, на которые налагался по меньшей мере один аксон. Мышцы были разделены на две группы: "сокращающиеся" или "не сокращающиеся" в зависимости от их двигательной активности во время записи. Подвижность мышц была подтверждена путем построения графиков интенсивности для каждой мышцы (фиг. 5b). Количество сокращающихся мышечных волокон на камеру делили на общее количество мышечных волокон, проанализированных в той же камере, с получением процента сокращающихся миотрубок в качестве выхода для активности НМС.

Результаты.

Лечение мышечных клеток с помощью придопидина позволяло индуцировать иннервацию, что привело к более высокой вероятности скачкообразного профиля сокращения мышц. Уровень иннервации мышц, несущих мутацию SOD1, ниже по сравнению с мышцами WT (дикого типа) (иннервация 20% по сравнению с ~40% у WT). Придопидин в концентрации 1 мкМ восстанавливает уровень иннервации мышц, несущих мутацию SOD1, до уровня, близкого к WT (фиг. 6).

Процент сокращения мышечных волокон в совместных культурах показывает, что только ~ 10% мышц сокращались при отсутствии МН против 74% в культурах, включающих МН. Комбинации совместного культивирования, которые включают по меньшей мере один из типов клеток, экспрессирующих SOD1G93A, показывают значительно более низкий процент сокращающихся миоцитов (фиг. 7a). Обработка миоцитов SOD1G93A, совместно культивированных с придопидином (0,1 и 1 мкМ), увеличивает процент сокращения миоцитов и восстанавливает нервно-мышечную активность до уровней WT. Комбинация МН S1R-/- с миоцитами WT приводит к низкому числу сокращающихся миотрубок по сравнению с МН WT. Применение 0,1 мкМ придопидина к совместным культурам S1R-/- не восстанавливало нервно-мышечную активность, как видно для той же концентрации придопидина в совместных культурах с нейронами WT. Увеличение процента сокращающихся миоцитов, наблюдаемое после обработки 1 мкМ придопидина, значительно ниже, чем процент сокращающихся миоцитов в необработанных и обработанных культурах WT. Данные показаны как среднее $\pm$ SEM (стандартная ошибка среднего). * р-значение <0,05; ** р-значение <0,01, *** р-значение <0,001, **** р-значение <0,0001. (Т-тест Стьюдента).

Эксперимент 4. Активация ERK в МН WT и SOD1G93A.

Путь ERK способствует многочисленным клеточным функциям, включая пролиферацию и дифференцировку. Фосфорилирование (активация) ERK в нейронах связана с нейротрофической передачей сигналов, такой как стимул BDNF, который, в свою очередь, способствует нейропротекции и выживанию нейронов (Bonni 1999). Ранее было установлено, что придопидин усиливает передачу сигналов BDNF в полосатом теле крыс через S1R, что, в свою очередь, усиливает активацию ERK (Geva, 2016). Первичные культуры МН в 2DIV выдерживали в течение ночи в среде без нейротрофинов и сыворотки (PNB). На следующий день культуры обрабатывали в течение 30 мин придопидином или BDNF в качестве положительного контроля.

Результаты.

Испытание посредством вестерн-блоттинга на фосфорилированную ERK (pERK) показывает значительную активацию ERK с помощью придопидина (0,1 и 1 мкМ) уже в течение 30 мин в культурах в МН WT (левая панель) и SOD1G93A (средняя панель), но не в МН S1R-/- (правая панель) (фиг. 8a). Количественное определение pERK показывает ~3,5- и ~4-кратное увеличение количества МН WT после обработки 0,1 и 1 мкМ придопидина соответственно. SOD1G93A показывает ~2,9- и ~8,5-кратное увеличение pERK после обработки 0,1 и 1 мкМ придопидина соответственно. Придопидин не вызывал фосфорилирования ERK в МН S1R-/. Данные представлены в виде среднего отношения pERK/ERK $\pm$ SEM. * р-значение <0,05, ~ р-значение <0,1 (критерий Стьюдента) (фиг. 8b).

Эксперимент 5. Влияние придопидина на агрегаты мутантной SOD1 в спинном мозге мышей SOD1G93A.

Придопидин индуцировал нейропротекторные свойства путем активации S1R, что продемонстрировано его влиянием на аксональный транспорт, дегенерацию аксонов, функцию НМС и активацию ERK. S1R находится на мембране ЭР в непосредственной близости от внешней мембраны митохондрий, где мутантный белок SOD1 имеет тенденцию к агрегации в спинном мозге мышей SOD1G93A (Millecamps and Julien, 2013). У бессимптомных мышей SOD1G93A (в возрасте 5 недель) и контрольных мышей WT применяли физиологический раствор, 3 или 30 мг/кг придопидина, ежедневно, посредством подкожного введения в течение 11 недель (до 16-недельного возраста). В конце эксперимента поясничный отдел спинного мозга (L1-L6) извлекали, фиксировали и заливали парафином для криосекции. Затем

10 мкм срезы готовили и окрашивали красителем NSC500 для визуализации агрегатов SOD1 (Hammarstrom, 2010). Оценивали влияние лечения придопидином *in vivo* на количество агрегатов мутантной SOD1 в сером и белом веществе спинного мозга.

Результаты.

Фиг. 9а - левая панель: типичные изображения спинного мозга с флуоресцентной меткой с низкой степенью увеличения для 4 групп мышей. Правая панель: изображения с большим увеличением для областей, помеченных на левой панели квадратом. Масштаб шкалы: левая панель: 500 мкм; правая панель 50 мкм. Сверху вниз: WT с контрольным раствором, SOD1G93A с контрольным раствором, SOD1G93A с 0,3 мг/кг придопидина, SOD1G93A с 30 мг/кг придопидина, все окрашенные красителем NSC500 для маркировки агрегатов мутантного белка SOD1. Значительное увеличение количества агрегатов mSOD1 наблюдалось как в сером, так и в белом веществе спинного мозга мышей SOD1G93A по сравнению с мышами WT. Придопидин в дозе 30 мг/кг значительно уменьшал количество агрегатов как в сером, так и в белом веществе спинного мозга SOD1G93A на ~50% (фиг. 9а-9с). Данные представлены как среднее значение $\pm$ SEM. * р-значение <0,05; ** р-значение <0,01 (односторонний ANOVA, затем тесты на апостериорный критерий наименьшей значимой разности Фишера), (фиг. 9b, 9с. Ось Y - количество NSC500-положительных агрегатов SOD1 на мм²).

Эксперимент 6.: Оценка *in vivo* атрофии мышечных волокон и сохранения НМС.

Разрушение НМС и последующее истощение скелетных мышц являются двумя основными патологиями БАС. Влияние придопидина на атрофию мышечных волокон и сохранение НМС оценивали *in vivo*. Бессимптомных мышей SOD1G93A и контрольных мышей WT (5 недель) лечили либо физиологическим раствором, либо придопидином 3 или 30 мг/кг, путем ежедневного подкожного введения в течение 11 недель. Икроножные мышцы от мышей, получавших контрольный раствор или придопидин (30 мг/кг подкожно) были выделены у мышей SOD1G93A и WT в возрасте 16 недель. Мышечные поперечные срезы окрашивали гематоксилином и эозином (H&E), и средний диаметр мышечного волокна определяли количественно для каждой группы (фиг. 10а). Сохранение НМС оценивали с помощью конфокальной визуализации совместной локализации пресинаптических (NFH + синапсин-I; зеленый) и постсинаптических (AChR (BTX; красный) маркеров и подсчета количества полностью иннервированных НМС в икроножных мышцах (фиг. 11а).

Результаты.

Фиг. 10а: типичные изображения окрашенных ГЭ поперечных срезов икроножных мышц мышей из 4 групп: получавших контрольный раствор WT, получавших 30 мг/кг придопидина WT, получавших контрольный раствор SOD1G93A, и получавших 30 мг/кг придопидина SOD1G93A мышей. Мышечная гистология получавших контрольный раствор мышей SOD1G93A была плохой и показала меньший диаметр мышечного волокна по сравнению с получавшими контрольный раствор WT мышами и получавшими 30 мг/кг придопидина WT мышами (фиг. 10а, 10b). Придопидин (30 мг/кг, ежедневное подкожное введение) приводил к значительному увеличению диаметра мышечного волокна на ~4 мкм у мышей SOD1G93A и на ~5 мкм в мышцах мышей WT.

Сохранение НМС в мышцах мышей SOD1G93A, получавших контрольный раствор, указывает на ожидаемую массовую потерю НМС ~60% и морфологические изменения в постсинаптическом аппарате в мышцах мышей SOD1G93A по сравнению с мышами WT (фиг. 11а, 11b). Поразительно, что лечение придопидином ограничивало потерю НМС у мышей SOD1G93A до ~20%. Данные показаны как среднее $\pm$ SEM. * р-значение <0,05; ** р-значение <0,01; *** р-значение <0,001 (двойной слепой критерий Стьюдента).

В целом, эти результаты демонстрируют, что придопидин оказывает нейропротекторное действие на клеточных и животных моделях БАС. *In vitro*, в МН SOD1G93A придопидин усиливает аксональный транспорт BDNF, обеспечивает повышающую регуляцию активации ERK, ускоряет рост аксонов, восстанавливает иннервацию мышц и улучшает формирование и функционирование НМС. Эти нейропротекторные эффекты были опосредованы S1R. Лечение *in vivo* придопидином мышей БАС SOD1G93A уменьшало агрегацию мутантной SOD1 в спинном мозге (одно из характерных фенотипических проявлений заболевания), увеличивало диаметр мышечных волокон, уменьшенный при БАС, и сохраняло дегенерированные НМС, наблюдаемые в пораженной ткани. Эти данные подтверждают использование придопидина в качестве нейропротекторного агента и S1R в качестве терапевтической мишени для лечения пациентов с БАС.

Дополнительные животные модели БАС, полезные для тестирования придопидина, описаны, например, в McGoldrick (2013).

На фигурах приведены следующие сокращения: Geno = генотип (т.е. дикий тип (LM), мутант SOD1), Prido = придопидин, mpk = мг/кг.

Эксперимент 7. Лечение БАС у человека.

Периодическое пероральное введение придопидина обеспечивает клинически значимое преимущество в уменьшении симптомов БАС у людей, страдающих БАС. Придопидиновая терапия обеспечивает эффективность лечения пациента без нежелательных побочных эффектов и эффективна по меньшей мере

в одном из следующих вариантов осуществления:

- 1) терапия эффективна при улучшении симптомов БАС;
- 2) терапия эффективна для усиления аксонального транспорта BDNF в моторных нейронах и/или усиления активации ERK;
- 3) терапия эффективна для улучшения формирования и сохранения НМС, сохранения структуры НМС, сохранения функции НМС и/или улучшения степени иннервации мышечной ткани;
- 4) терапия эффективна для усиления роста аксонов моторных нейронов и/или уменьшения аксональной дегенерации, включая дегенерацию аксонов моторных нейронов;
- 5) терапия эффективна для повышения выживаемости мышечных клеток, увеличения диаметра и функции мышечных волокон, уменьшения прогрессирования истощения мышечных волокон и/или улучшения сокращения мышц и/или
- 6) терапия эффективна для снижения агрегации SOD1 и/или уменьшения прогрессирования псевдобульбарного синдрома.

У некоторых пациентов лечащий врач назначает тридопидин и второе соединение, где вторым соединением является рилузол, эдаравон, декстрометорфан/хинидин. В некоторых вариантах осуществления второе соединение представляет собой лаквинимод.

Список литературы

- Banci et al. (2008) SOD1 and Amyotrophic Lateral Sclerosis: Mutations and Oligomerization, PLoS One 3(2):e1677.
- Bilsland et al. (2010) Deficits in axonal transport precede ALS symptoms in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 107(47):20523-8.
- Bonni A, et al. (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. Science 286:1358-1362
- Bozzoni et al. (2016) Amyotrophic lateral sclerosis and environmental factors", Funct. Neurol. 31(1):7-19.
- Brod et al. (2000) Combination therapy with glatiramer acetate (copolymer-1) and a type I interferon (IFN- α) does not improve experimental autoimmune encephalomyelitis. Annals of Neurology, 47:127-131.
- Cedarbaum (1999) The ALSFRS-R: a revised ALS functional rating scale that incorporates assessments of respiratory function. J. Neurol. Sci. 169(1-2):13-21.
- De Vos et al. (2007) Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. Hum Mol Genet. 16(22):2720-2728.
- Eykens C, Robberecht W (2015) The genetic basis of amyotrophic lateral sclerosis: recent breakthroughs. Adv Genomics Genetics 5:327-345.
- Geva et al. (2016). Pridopidine activates neuroprotective pathways impaired in Huntington Disease. HMG 25(18): 3975–87.
- Guidance for Industry. In vivo drug metabolism/drug interaction studies - study design, data analysis, and recommendations for dosing and labeling, U.S. Dept. Health and Human Svcs., FDA, Ctr. for Drug Eval. and Res., Ctr. For Biologics Eval. and Res., Clin. Pharm., Nov. 1999
<<http://www.fda.gov/cber/gdlms/metabol.pdf>>.
- Hammarström P, et al, (2010) A fluorescent pentameric thiophene derivative detects in vitro-formed prefibrillar protein aggregates. Biochemistry 49:6838–45
- Ionescu et al. (2016) Compartmental microfluidic system for studying muscle-neuron communication and neuromuscular junction maintenance. (2016) European Journal of Cell Biology 95(2) 69-88.
- Langa F et al. (2003) Generation and phenotypic analysis of sigma receptor type I (sigma 1) knockout mice. Eur J Neurosci. 18:2188–96.
- Maier et al. (2013) Differentiated NSC-34 motoneuron-like cells as experimental model for cholinergic neurodegeneration, Neurochem. Int. 62(8):1029-38.

- Martel et al. (2016) From animal models to human disease: a genetic approach for personalized medicine in ALS, *Acta Neuropathol. Commun.* 4(1):70.
- McGoldrick et al. (2013) Rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *BBA Mol. Basis of Disease* 1832(9):1421-1436.
- Millecamps and Julien (2013) Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 14:161–76.
- Perlson, et al. (2009) A Switch in Retrograde Signaling from Survival to Stress in Rapid Onset Neurodegeneration. *J. Neurosci.* 29(31): 9903–9917.
- Peters et al. (2015) Emerging mechanisms of molecular pathology in ALS, *J. Clin. Invest.* 125(5):1767-1779.
- Ponten, et al. (2010). In vivo pharmacology of the dopaminergic stabilizer pridopidine. *Eur J Pharmacol.* 644(1-3):88-95.
- Riva et al. (2016) Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurol.* 263:1241-1254.
- Ryskamp, et al (2017) The sigma-1 receptor mediates the beneficial effects of pridopidine in a mouse model of Huntington disease. *Neurobiol of Disease* 97(Pt A):46-59.
- Sahlholm et al. (2013) The dopamine stabilizers ACR16 and (-)-OSU6162 display nanomolar affinities at the s-1 receptor. *Molec Psychiatry* 18, 12—14.
- Sahlholm et al. (2015) Pridopidine selectively occupies sigma-1 rather than dopamine D2 receptors at behaviorally active doses. *Psychopharm.* 232(18):3342-53.
- Smith, et al. (2017). Enhanced Bulbar Function in Amyotrophic Lateral Sclerosis: The Nuedexta Treatment Trial. *Neurotherapeutics*, 14(3), 762–772.
- Song et al. (2013) An update on amine oxidase inhibitors: Multifaceted drugs, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 44:118-124.
- Zou et al. (2016) Toward precision medicine in amyotrophic lateral sclerosis, *Ann. Transl. Med.* 4(2):27.
- Zahavi, et al. (2015) A compartmentalized microfluidic neuromuscular co-culture system reveals spatial aspects of GDNF functions. *J. Cell Sci.* 128, 1241–1252.
- Riluzole - Drug Summary, PDR (Prescribers' Digital Reference), www.pdr.net/drug-summary/Rilutek-riluzole-526 accessed July 28, 2017
- Edaravone- Drug Summary, PDR (Prescribers' Digital Reference), www.pdr.net/drug-summary/Radicava-edaravone-24080 accessed July 28, 2017
- Dextromethorphan hydrobromide/quinidine sulfate - Drug Summary, PDR (Prescribers' Digital Reference), <http://www.pdr.net/drug-summary/Nuedexta-dextromethorphan-hydrobromide-quinidine-sulfate-1344.3281> accessed August 14, 2017
- U.S. Patent No. 7,923,459
- U.S. Patent No. RE46117
- PCT Application Publication No. WO 2016/138135
- PCT Application Publication No. WO 2017/015609

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение придопидина для лечения субъекта, страдающего боковым амиотрофическим склерозом (БАС), причем придопидин применяется в терапевтически эффективном количестве.
2. Применение по п.1, где БАС является спорадическим БАС.
3. Применение по п.1 или 2, где количество придопидина является эффективным для ингибирования или уменьшения прогрессирования симптома БАС у субъекта.
4. Применение по п.3, где симптомом является ригидность мышц, мышечная слабость, истощение мышц, мышечные спазмы, затруднение речи, затруднение глотания, затруднение дыхания, затруднение жевания, затруднение ходьбы, фасцикуляции и/или ухудшение осанки.
5. Применение по любому из пп.1-4, где количество придопидина является эффективным для уси-

ления аксонального транспорта BDNF в моторных нейронах, усиления активации ERK в моторных нейронах, улучшения образования и сохранения NMJ, сохранения структуры NMJ, сохранения функции NMJ, улучшения уровня иннервации мышечной ткани, увеличения аксонального роста моторных нейронов, уменьшения аксональной дегенерации, уменьшения аксональной дегенерации моторных нейронов, повышения выживаемости мышечных клеток, увеличения диаметра и функции мышечных волокон, уменьшения агрегации SOD1, уменьшения прогрессирования псевдобульбарного синдрома, уменьшения прогрессирования истощения мышечных волокон и/или улучшения сокращения мышц у субъекта, страдающего БАС.

6. Применение по любому из пп.1-5, где количество придопида применяют раз в сутки или чаще чем один раз в сутки.

7. Применение по любому из пп.1-6, где количество придопида применяют два раза в сутки.

8. Применение по любому из пп.1-7, где количество придопида применяют перорально.

9. Применение по любому из пп.1-8, где количество применяемого придопида составляет от 10 до 90 мг в сутки.

10. Применение по любому из пп.1-9, где придопидин представляет собой придопида гидрохлорид.

11. Применение по любому из пп.1-10, где субъект является человеком.

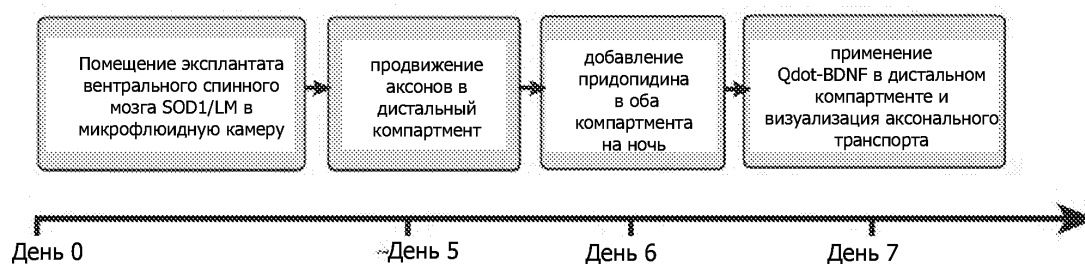
12. Применение по любому из пп.1-11, включающее введение субъекту композиции, содержащей количество придопида, эффективное для лечения этого субъекта, и дополнительно включающее введение этому субъекту терапевтически эффективного количества второго соединения, где второе соединение представляет собой рилузол, эдаварон или декстрометорфан/хинидин.

13. Применение по п.12, где введение второго соединения предшествует введению придопида.

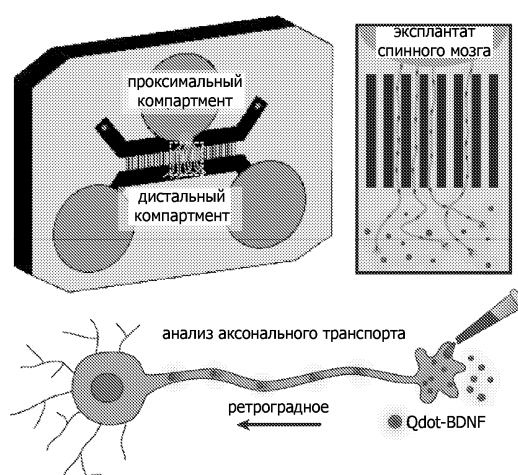
14. Применение по п.12, где введение придопида предшествует введению второго соединения.

15. Применение по п.12, где придопидин вводят в дополнение ко второму соединению.

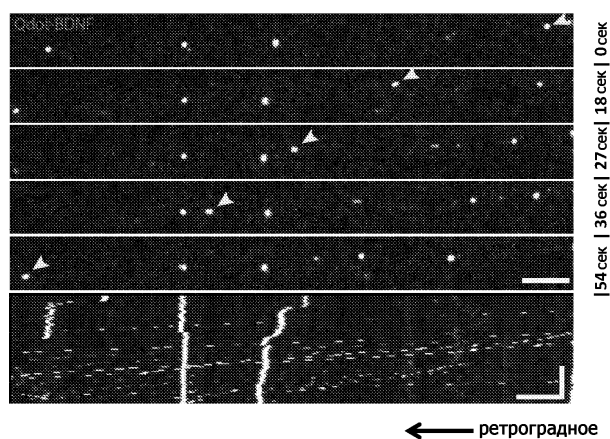
16. Применение по п.12, где второе соединение вводят в дополнение к придопиду.



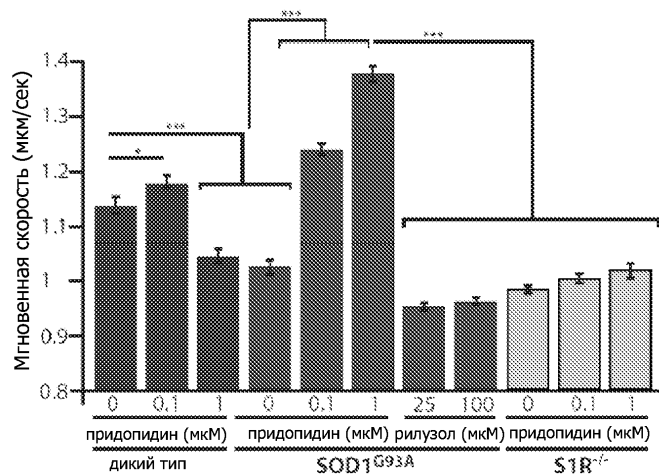
Фиг. 1а



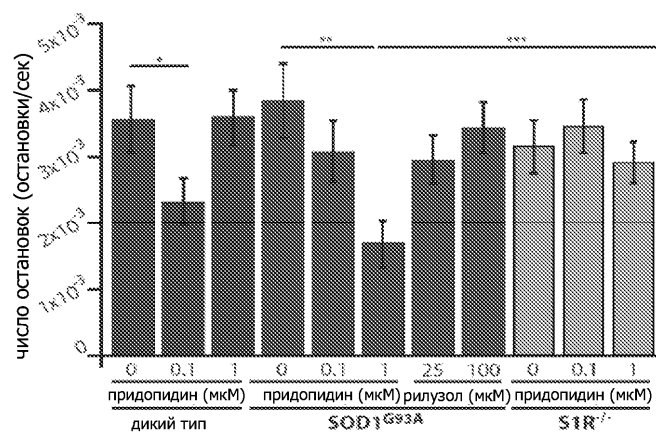
Фиг. 1б



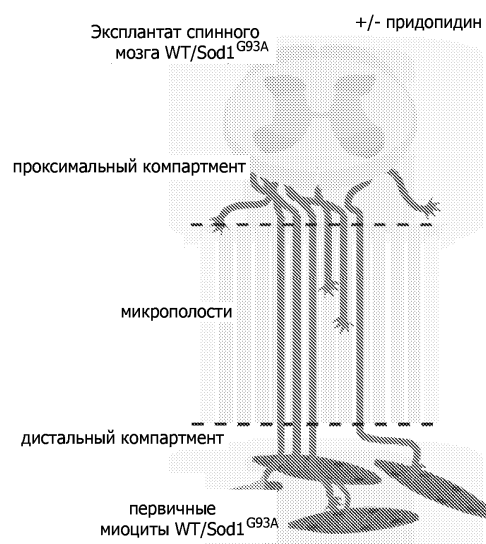
Фиг. 1с



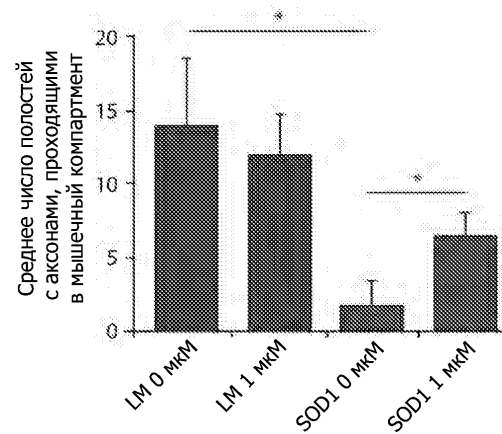
Фиг. 2а



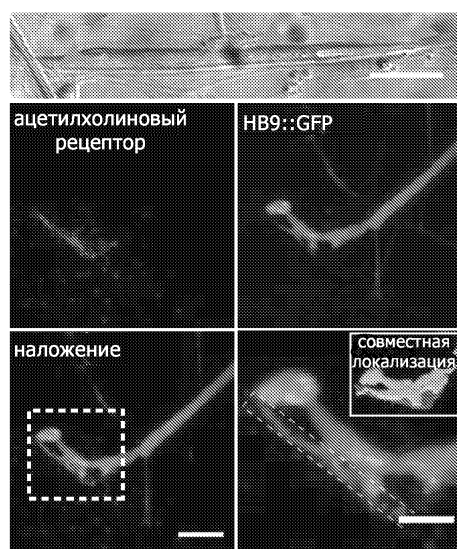
Фиг. 2b



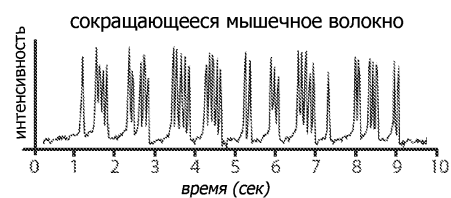
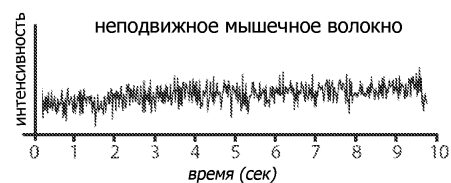
Фиг. 3



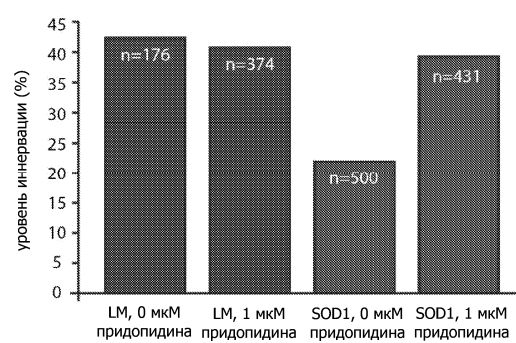
Фиг. 4



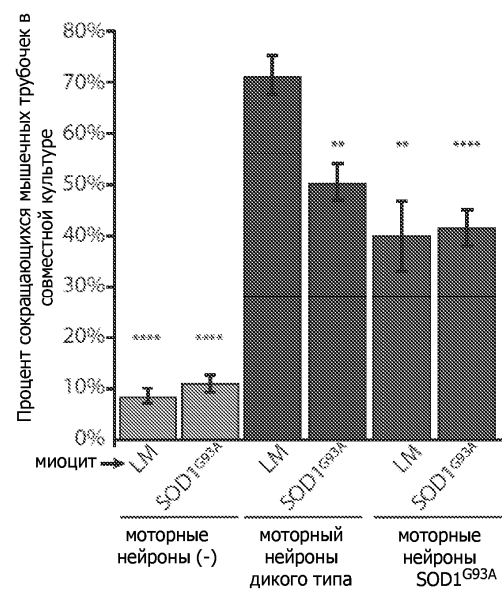
Фиг. 5а



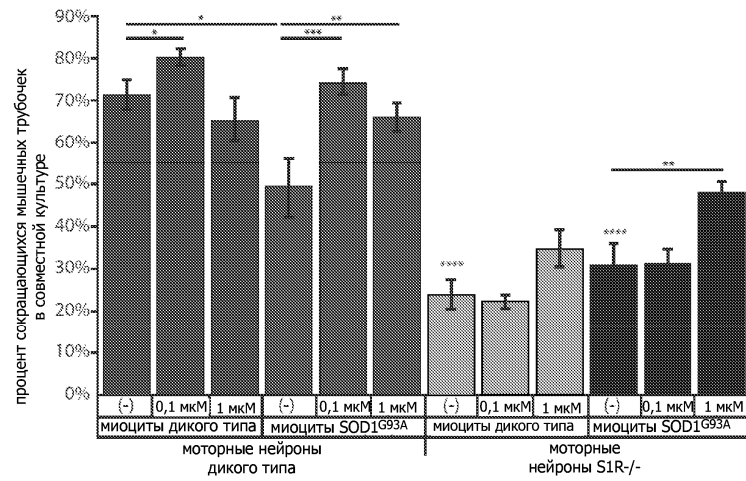
Фиг. 5b



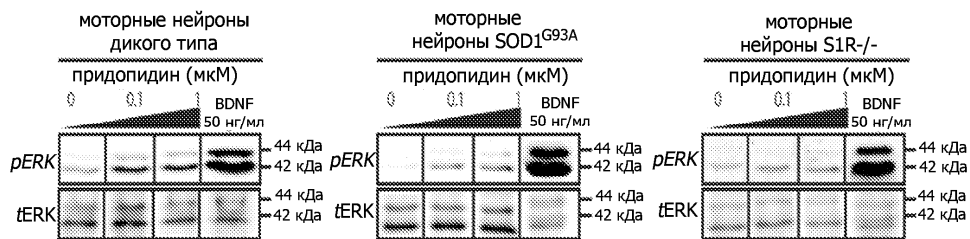
Фиг. 6



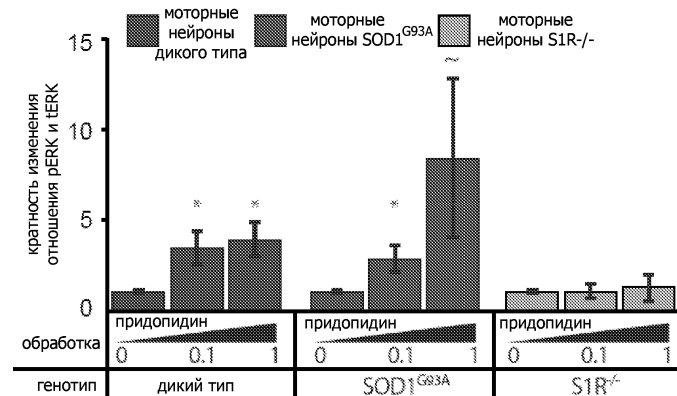
Фиг. 7a



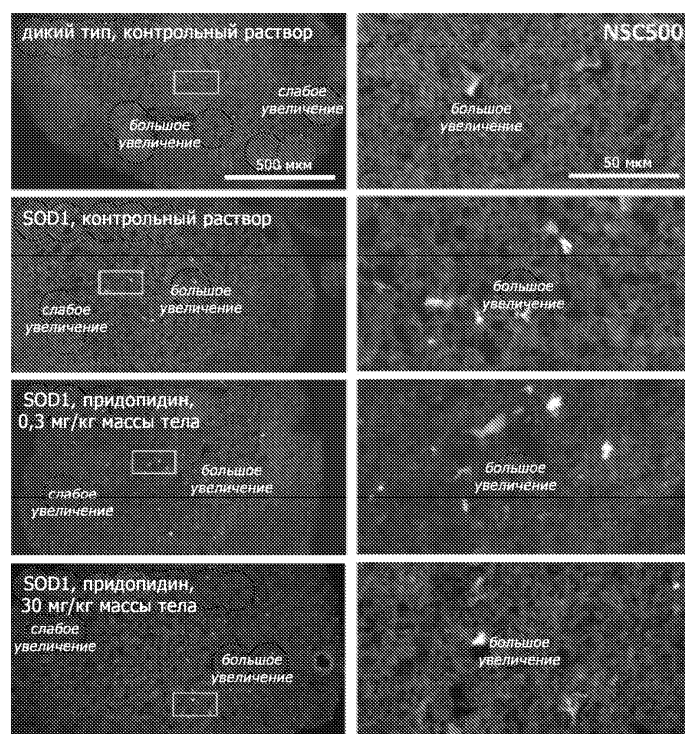
Фиг. 7b



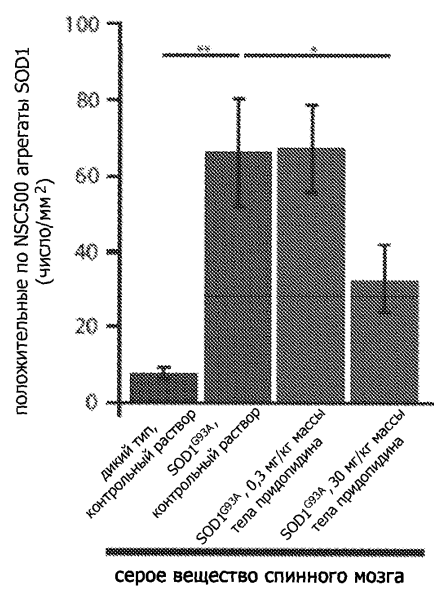
Фиг. 8a



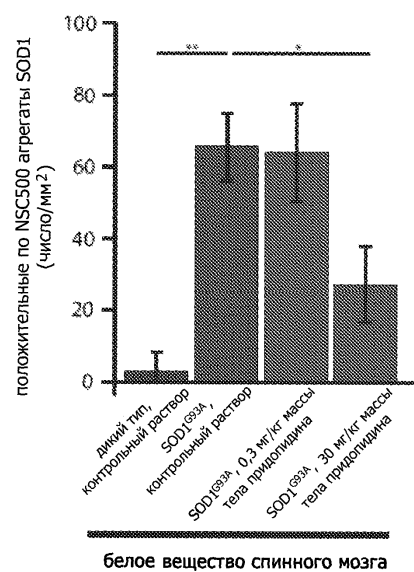
Фиг. 8b



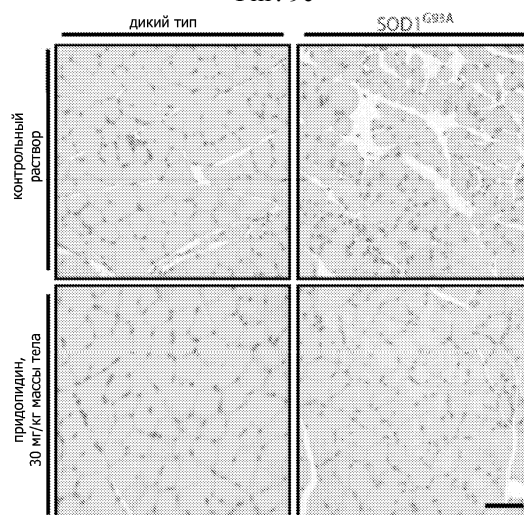
Фиг. 9а



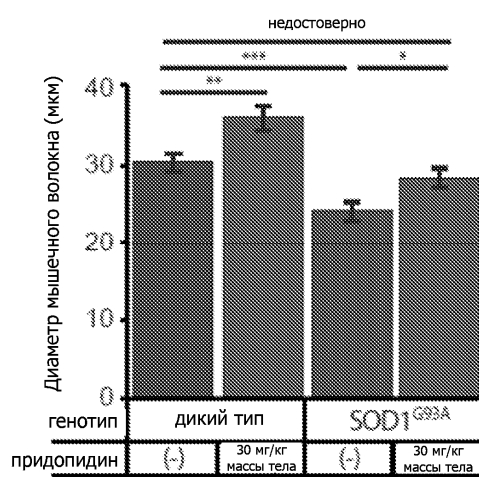
Фиг. 9б



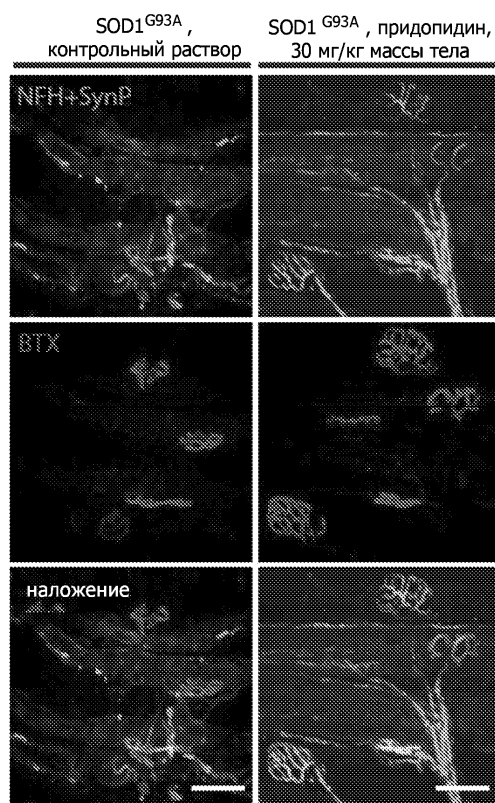
Фиг. 9с



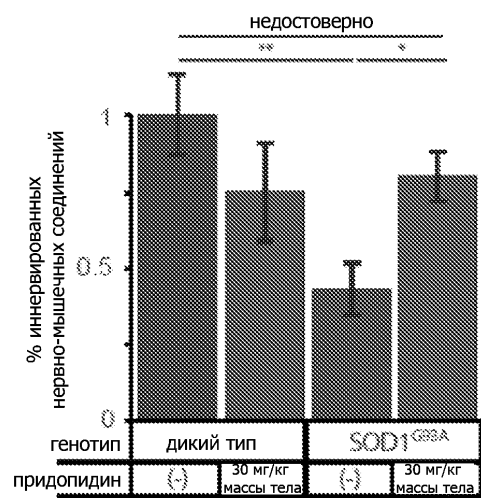
Фиг. 10а



Фиг. 10б



Фиг. 11a



Фиг. 11b

