

Даний винахід стосується застосування N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]-піридин-1-оксид-3-карбоксімідоїлхлориду в лікуванні нейродегенеративних захворювань.

Як відомо, нейродегенеративні захворювання являють собою прогресуючі, інвалідизуючі, вікові розлади. Із збільшенням очікуваної тривалості життя зустрічальність цих вікових захворювань буде різко збільшуватись протягом наступних десятиріч. На сьогоднішній день лікування цих хвороб є тільки симптоматичним; каузальної терапії не існує, великою мірою внаслідок невідомої(их) причин(и) цих поліетіологічних захворювань. Але незважаючи на те, що етіологія та фактична локалізація пошкодження і втрати клітин в центральній нервовій системі (ЦНС) при розладах, подібних до хвороби Альцгеймера (ХА), хвороби Паркінсона (ХП), множинного склерозу (МС), нейропатій, хвороби Хантінгтона (ХХ), аміотрофного латерального склерозу (АЛС), можуть відрізнятися, існує багато спільних моментів в розвитку захворювання та внутрішньоклітинних змін.

Хоча досягнуто величезний прогрес в симптоматичному лікуванні численних нейродегенеративних захворювань, все ще існує величезна незадоволена потреба у фармакологічному та біофармакологічному лікуванні, яке буде сповільнювати і, можливо, зупиняти розвиток цих захворювань.

ХА являє собою найбільш розповсюджене нейродегенеративне захворювання і найбільш розповсюджену форму деменції (відповідає приблизно за 80% всіх випадків). ХА характеризується зниженням пам'яті, погіршенням мови, порушенням візуально-просторових навичок, недалекоглядністю, байдужістю до навколишнього світу, при збереженні моторної функції. Симптоми хвороби Альцгеймера перш за все виявляються погіршенням пам'яті і, протягом кількох років, руйнуванням свідомості, особистості та здатності до функціонування. Можуть також виникати сплутаність свідомості і непосидючість. Відрізняльними характеристиками захворювання є амілоїдні бляшки та нейрофібрилярні клубки в мозку, а також виявляється втрата нервових клітин в областях мозку, які є життєво важливими для пам'яті та інших розумових здібностей. Захворювання зазвичай розпочинається після 60 років, і ризик захворіти збільшується з віком. Хоча люди молодшого віку також можуть захворіти на хворобу Альцгеймера, це явище є набагато менш розповсюдженим. Приблизно 3 % чоловіків і жінок у віці від 65 до 74 років мають ХА, і приблизно половина людей у віці 85 років і старше можуть захворіти.

На сьогоднішній день не існує засобів, для лікування хвороби Альцгеймера, і тривалість життя пацієнтів звичайно становить близько 8-10 років після встановлення діагнозу. На ринку присутня численна кількість медикаментів, які можуть сприяти запобіганню погіршення деяких симптомів на обмежений період часу. Крім того, деякі лікарські засоби можуть допомогти контролювати поведінкові симптоми ХА.

На сьогоднішній день існує чотири лікарських засоби, зареєстровані Управлінням лікарських засобів і харчових продуктів (FDA) для лікування симптомів помірної та вираженої ХА. Ці медикаменти відомі як інгібітори холінестерази, та їхня дія, за даними досліджень, полягає у запобіганні руйнуванню ацетилхоліну - хімічної речовини мозку, яка вважається важливою для пам'яті та мислення. Хоча ні один з цих медикаментів сам по собі не зупиняє розвитку захворювання, вони можуть допомогти попередити або віддалити погіршення симптомів на протязі обмеженого періоду часу, і можуть допомогти підтримувати незалежність протягом довшого періоду часу. З розвитком захворювання мозок продукує все менше і менше ацетилхоліну, і медикаменти можуть практично втрачати свою ефективність. Екселон (Exelon) і Ремініл (Reminyl) є найбільш успішними лікарськими засобами цього класу, відомими на ринку (див. Neurodegenerative Disorders: The world market 2002-2007; a Visiongain Report; VISIONGAIN™, 2003; див. також: Terry AV and Buccafusco JJ: The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development; The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 306: 821-27, 2003; та Cummings JL: Use of cholinesterase inhibitors in clinical practice: evidence based recommendations; Am J Geriatr Psychiatry 11: 131- 45, 2003).

В інших клінічних випробуваннях засобів для лікування ХА досліджували екстракт гінкго білоба як антиоксидант, але подальші дослідження не продемонстрували чіткої ефективності у пацієнтів з ХА.

Ефективність нестероїдних протизапальних агентів, випробуваних до сьогоднішнього дня, не було доведено.

Нещодавно зареєстрований в Європі препарат Ебікса (Ebixa, мемантин), неспецифічний антагоніст рецепторів N-метил-D-аспартату (NMDA), який просувають на ринку компанії Merz і Lundbeck, призначений конкурувати з визнаним золотим стандартом лікування, препаратом Аріцепт (Aricept). До цього часу клінічні дослідження демонстрували позитивні результати (Mintzer JE: The search for better noncholinergic treatment options for Alzheimer's disease, J Clin Psychiatry 64, suppl 9:18-22, 2003; та Reisberg B et al.: Memantine in moderate to severe Alzheimer's disease, N Engl J Med 348:1333-41, 2003). Інший підхід, який до цього часу є суперечливим, полягає в імунізації, тобто розробці лікарських засобів, які були б здатні зменшувати виробництво бета-амілоїду та очищувати відкладення амілоїду шляхом імунізації.

ХП являє собою другий за розповсюдженістю та важливістю нейродегенеративний розлад. Хвороба Паркінсона виникає, коли певні клітини мозку в області мозку, відомій як чорна субстанція (substantia nigra) гинуть або стають пошкодженими. Точна причина загибелі нейронів невідома, але окиснювальний стрес та дисфункція мітохондріального ланцюга транспорту електронів - особливо зменшена активність комплексу I - є широко визнаними причинами. Зазначені нейрони продукують важливу хімічну речовину, відому як допамін, хімічний месенджер, відповідальний за передачу сигналів між substantia nigra і corpus striatum.

Симптоми хвороби Паркінсона включають наступне: основною рисою є тремор, або мимовільні ритмічні рухи кінцівок, рук, ніг та щелепи. Класично тремор виникає, коли персонa перебуває в стані спокою, і покращується при довільних рухах; поступова втрата спонтанних рухів, яка часто призводить до численних проблем, таких як "замороженість"; зниження ментальних навичок та швидкості мислення, зміна голосу, та знижена виразність обличчя; ригідність м'язів або негнучкість кінцівок, виникає у всіх групах м'язів, але найбільш розповсюджена в руках, плечах та ший; постуральна нестабільність, або сутула, зігнута постава із зігнутими ліктями, колінами і стегнами; поступова втрата автоматичних рухів, в тому числі мигання повік, і зменшена частота ковтання; нестійка хода; депресія і деменція.

Хворі на це захворювання сьогодні мають велику кількість можливостей лікування і ця кількість буде постійно зростати протягом наступних 10-15 років. Перший ефективний засіб для лікування хвороби Паркінсона - карбідопа/леводопа (Сінемет, Sinemet, Bristol-Myers Squibb) було виведено на ринок в 1970 г. що стало революцією в лікуванні захворювання. Цей засіб довів свою високу ефективність з точки зору контролю симптомів, таких як тремор, брадикінезія, рівновага і ригідність. Однак, дискінетичні побічні ефекти і зниження ефективності при тривалому лікуванні зумовлюють потребу в альтернативних лікарських засобах та/або допоміжних лікарських засобах для компенсації побічних ефектів. Агоністи допаміну, виведені на ринок в 1980-х роках, задовольнили цю потребу. Ці лікарські засоби є доведено ефективними як регулятори типу допаміну, і як монотерапія для віддалення потреби в лікуванні карбідопою/леводопою у пацієнтів з вперше встановленим діагнозом хвороби Паркінсона. Інші нещодавно розроблені засоби лікування, такі як інгібітори катехол-О-метилтрансферази (COMT), антихолінергічні засоби, а також селегілін/депреніл також здійснюють вплив, хоча менш помітний, на ринок засобів лікування ХП (див. Neurodegenerative Disorders: The world market 2002-2007; a Visiongain Report; VISIONGAIN™, 2003).

Аміотрофічний латеральний склероз (АЛС), який іноді називають хворобою Лу Геріга, являє собою швидко прогресуюче, неврологічне захворювання з обов'язковим летальним кінцем, яке атакує нервові клітини (нейрони), відповідальні за контроль довільних м'язів. Захворювання являє собою найбільш розповсюджене захворювання моторних нейронів, що характеризується поступовою дегенерацією та загибеллю моторних нейронів (Rowland LP, Schneider NA: Amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med 344:1688-1700, 2001). Моторні нейрони - це нервові клітини, розташовані в мозку, стовбурі мозку і спинному мозку, які виконують функції контролюючих одиниць і життєво важливих комунікаційних зв'язків між нервовою системою і довільними м'язами тіла. Повідомлення від моторних нейронів мозку (які називають вищими моторними нейронами) передаються моторним нейронам спинного мозку (які називають нижчими моторними нейронами), а від них - до конкретних м'язів. При АЛС як вищі моторні нейрони, так і нижчі моторні нейрони дегенерують або гинуть, з припиненням надсилання повідомлень до м'язів. Нездатні функціонувати, м'язи поступово слабшають, виснажуються (атрофія) та тремтять (фасцикуляції). Практично втрачається здатність мозку розпочинати та контролювати довільні рухи. Більшість хворих на АЛС вмирають від дихальної недостатності, звичайно протягом 3-5 років з моменту появи симптомів.

Причина АЛС невідома. Однак, важливий крок у напрямку відповіді на це питання було зроблено в 1993 р., коли вчені відкрили, що мутації гену, який продукує фермент супероксиддисмутази (SOD1), асоціюються з деякими випадками родинного АЛС (Rosen D R et al.: Mutations in Cu/Zn Superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature, 362: 59-62, 1993). Цей фермент являє собою потужний антиоксидант, який захищає організм від пошкодження, спричиненого вільними радикалами. Вільні радикали являють собою дуже нестабільні молекули, які виробляються клітинами в ході нормального метаболізму (основним джерелом є мітохондрії). Якщо вільні радикали не нейтралізовані, вони можуть накопичуватися і спричиняти випадкові пошкодження ДНК, ліпідів мембран та білків всередині клітин. Хоча до цього часу чітко не з'ясовано, яким чином мутація гену супероксиддисмутази (SOD1) призводить до дегенерації моторних нейронів, дослідники теоретично припускають, що накопичення вільних радикалів може бути наслідком неправильного функціонування цього гену.

Хоча нейродегенеративні захворювання мають багато різних характеристик, розповсюдженою рисою є втрата клітин, поступова та прогресуюча деградація певних областей центральної нервової системи. Дисбаланс продукування і нейтралізації реакційноздатних форм кисню (ROS) збільшується із старінням, і нейродегенеративні захворювання погіршують ці явища. Роль супероксиддисмутази (SOD) при АЛС, як потужного антиоксиданту, який захищає мозок від пошкодження, спричиненого вільними радикалами, було описано вище. При хворобі Паркінсона реакційно здатні форми кисню (ROS) генеруються аутоокисненням під час нормального метаболізму допаміну, або під дією моноамінооксидази (Lev N et al.: Apoptosis and Parkinson's disease; Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological psychiatry 27: 245-50, 2003). При ХА ініціюючі події, які призводять до розвитку захворювання, є комплексними, але широко визнаним є те, що загибель нейронів частково опосередковується вільно-радикальним пошкодженням (Pratico D and Delanty N: Oxidative injury in diseases of the central nervous system: Focus on Alzheimer's disease, Am J Med 109: 577-85, 2000).

На цей час єдиний засіб з доведеною ефективністю для пацієнтів, що страждають на АЛС - Рілузол (Riluzole) подовжує тривалість життя приблизно на 3 місяці (Miller, R.G., Mitchell, J.D., Lyon, M. & Moore, D.H. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). Cochrane. Database. Syst. Rev. CD001447 (2002)). Таким чином, ідентифікація нових терапевтичних стратегій для використання при лікуванні АЛС залишається пріоритетним напрямком.

З матеріалів WO 97/16439 відомо, що деякі види похідних гідроксиламіну підсилюють експресію шаперону в клітинах, які піддаються фізіологічному стресу, і є корисними в лікуванні захворювань, пов'язаних з функцією системи шаперону. В опублікованій патентній заявці розкриті різноманітні нові категорії похідних гідроксиламіну. Визначений також певний клас галоїдних похідних гідроксамової кислоти, до якого належить N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлорид, але N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлорид не згадувався прямо.

N-[2-Гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлорид вперше розкрито і заявлено у WO 00/50403 як чудовий засіб, що здатний зменшувати інсулінорезистентність. Як було заявлено він є корисним в лікуванні серій хронічних діабетичних ускладнень, особливо ретинопатії, нейропатії та нефропатії, і патологічного зменшення нейродегенерації, спричиненої діабетом, поряд із зменшенням інсулінорезистентності у пацієнта. Хімічні властивості цієї сполуки і її детальний синтез також описані в названому документі.

Інше застосування N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлориду в лікуванні діабету, особливо в лікуванні діабету II типу (інсулін-незалежного, ІНЗЦД) описане у WO 03/026653. Розкритий винахід стосується антигіперглікемічної композиції, яка може застосовуватися перорально і містить

комбінацію метформіну та N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлорид як активний компонент. Помітний антигіперглікемічний ефект базується на синергізмі, що виникає при комбінації двох активних агентів. Жодна з патентних заявок, що стосується N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлорид, не вказує на застосування цієї сполуки для лікування захворювань, відмінних від діабету.

Нами було знайдено, що N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлорид має біологічні властивості, які роблять його корисним в лікуванні нейродегенеративних захворювань. У дослідженні, проведеному на трансгенних мишах лінії mSOD1^(G93A), N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлорид запобігав прогресуючій втраті моторних нейронів та функції м'язів, яка звичайно виникає у мишачій моделі АЛС.

На базі описаного вище відкриття винахід забезпечує нове застосування N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлориду у виготовленні фармацевтичних композицій для лікування або профілактики нейродегенеративних захворювань.

Переважно винахід забезпечує нове застосування N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлорид у виготовленні фармацевтичних композицій для лікування або профілактики аміотрофного латерального склерозу.

Крім того, винахід забезпечує спосіб лікування або профілактики нейродегенеративних захворювань, за яким пацієнту вводять терапевтично ефективну кількість N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлориду. Переважно винахід забезпечує спосіб лікування або профілактики аміотрофного латерального склерозу, за яким пацієнту вводять терапевтично ефективну кількість N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлориду.

В даному винаході термін N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлорид стосується N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлориду як вільної основи, її фармацевтично прийнятної солі, одержаної при додаванні мінеральної або органічної кислоти, а також рацемічної сполуки і кожного з оптично активних енантіомерів і сумішей енантіомерів та фармацевтично прийнятних солей оптично активних енантіомерів або сумішей енантіомерів.

Слід відзначити, що N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлорид переважно застосовується у формі солі, утвореної при додаванні кислоти. Крім того, слід відзначити, що оптично активні форми цієї сполуки є переважними, особливо (+)-R-N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлорид. Більш переважними є солі останнього оптично активного енантіомеру, утворені при додаванні кислоти, і найбільш переважним є (+)-R-N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлориду цитрат.

Термін «нейродегенеративне захворювання» стосується відомих типів нейродегенеративних захворювань, включаючи аміотрофний латеральний склероз (АЛС), хворобу Альцгеймера (ХА), хворобу Паркінсона (ХП), хворобу Хантінгтона (ХХ), множинний склероз (МС), та різні типи нейропатій.

Наступні біологічні тести проводили для (+)-R- N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлориду цитрату, як тестової сполуки. Ця хімічна сполука далі в цьому тексті буде називатися сполукою А.

В цьому дослідженні використовували трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A) обох статей. Всім експериментальним тваринам щоденно вводили сполуку А (10мг/кг, внутрішньочеревинно), починаючи з віку 35 днів, за розкладом, подібним до попередньо описаного Zhu et al 2002 (Zhu, S. et al. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. Nature 417, 74-78 (2002)).

Оцінка функції м'язів і кількості моторних одиниць

Електрофізіологічну оцінку функції м'язів проводили *in vivo* на живих тваринах на м'язах-розгиначах *extensor digitorum longus* (EDL) обох задніх кінцівок для визначення ступеня розвитку захворювання. Реєстрували ізометричне напруження та оцінювали кількість моторних одиниць.

Трансгенних тварин та диких тварин одного виводку анестезували хлоральгідратом (4 % хлоральгідрат; 1 мл/100 г маси тіла, внутрішньочеревинно), і м'язи EDL готували для оцінки *in vivo* скорочувальної здатності та кількості моторних одиниць. Дистальні сухожилля м'язів EDL були розітнуті та приєднані до передавачів ізометричної сили (пристрої Dynamometer UFI) за допомогою шовкових ниток. Обидві лапи були нерухомо закріплені на столі голками. Сідничний нерв було відсічено окремо і всі його відгалуження були відрізані від нерва, що йде до м'яза EDL. Дистальний кінець нерва далі стимулювали з використанням біполярних срібних електродів. Довжину м'яза коригували до максимального напруження, одержаного за умов стимуляції нерва. Ізометричні скорочення викликали стимуляцією відрізаного кінця моторного нерва з використанням імпульсів шириною 0,02 мсек. Тетанічні скорочення викликали стимуляцією м'яза EDL при 40, 80 та 100 Гц на протязі 500 мсек.

Для оцінки кількості моторних одиниць в кожному м'язі моторні нерви м'язів EDL стимулювали кожні 4 сек. Силу стимулу поступово збільшували до одержання покрокового збільшення напруження скорочення, по мірі залучення індивідуальних моторних аксонів. Кількість покрокових збільшень рахували з одержанням приблизної кількості моторних одиниць, присутніх в кожному м'язі (Dick, J., Greensmith, L. & Vrbova, G. Blocking of NMDA receptors during a critical stage of development reduces the effects of nerve injury at birth on muscles and motoneurons. Neuromuscul. Disord. 5, 371-382 (1995)).

За даними реєстрації напруження скорочення ми оцінювали деякі скорочувальні характеристики м'язів EDL у лікованих і нелікованих трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A), в тому числі час напіврелаксації EDL, як міру часу, необхідного для релаксації м'яза після скорочення.

Оскільки в нормі EDL є швидким м'язом, він швидко втомлюється при безперервній стимуляції, демонструючи характерну модель втоми. Для дослідження моделі втоми EDL в цих експериментах м'язи обох задніх кінцівок щосекунди стимулювали при 40 Гц імпульсами довжиною 250 мсек на протязі 3 хвилин, і реєстрували скорочення м'язів.

В кінці експерименту м'язи EDL з обох лап витягали та зважували і заморожували до хрусткого стану в

розплавленому ізо-пентані. М'язи зберігали при -80°C до проведення гістологічного аналізу.

Після завершення фізіологічних експериментів оцінювали виживання моторних нейронів шляхом підрахунку кількості моторних нейронів в сідничному моторному пулі в рогах черевини з поперечних розтинів поперекового відділу спинного мозку (White, C.M., Greensmith, L & Vrbova, G. Repeated stimuli for axonal growth causes motoneuron death in adult rats: the effect of botulinum toxin followed by partial denervation. *Neuroscience* 95, 1101-1109 (2000)). Мишам робили глибоку анестезію (4% хлоральгідрат; 1 мл/100 г маси тіла, внутрішньочеревинно) та здійснювали транскардіальну перфузію фіксуючим розчином з вмістом 4 % параформальдегіду. Спинний мозок витягали та здійснювали постфіксацію поперекової області протягом 2 год в тому ж фіксуючому розчині, з криопротекцією в сахарозі (30 % в MPB) та заморожені поперечні секції розрізали в кріостаті на секції по 30 мкм і збирали на пластинки з основою. Далі секції злегка контрастно забарвлювали за Нісслом (Nissl, галоціанін). Кількість забарвлених за Нісслом моторних нейронів в обох рогах черевини підраховували з використанням світлового мікроскопу. З метою уникнення подвійного підрахунку однієї і тієї ж клітини в послідовних секціях, виживання моторних нейронів оцінювали в сідничному моторному пулі в кожній 3-й секції поперекового відділу спинного мозку поміж рівнями L2-L5. До підрахунку включали тільки ті нейрони, в яких при сильному збільшенні було чітко видиме ядро.

Для всіх оцінених параметрів результати аналізували з використанням U-тесту Манна-Уїтні для порівняння незалежних вибірок. У всіх випадках використовували двобічні тести, і рівень значущості було встановлено як $p < 0,05$.

У трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A) віком 35 днів вже виявлялися мікроскопічні ознаки дегенерації поперекових моторних нейронів, а у віці 110 днів параліч задньої кінцівки був очевидним. Вплив лікування сполукою А на функцію м'язів задньої кінцівки, а також на кількість моторних одиниць і виживання моторних нейронів оцінювали у віці 120 днів, коли трансгенні миші лінії mSOD1^(G93A) знаходилися на пізній стадії захворювання.

У диких мишей в нормі присутні $28 \pm 0,6$ (середнє значення \pm S.E.M., $n = 11$) моторних одиниць в м'язах EDL. У трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A) у віці 120 днів були наявні тільки $8,3 \pm 0,7$ (середнє значення \pm S.E.M., $n = 10$) моторних одиниць. Однак, у трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A), лікованих сполукою А, спостерігалось значне покращення виживання моторних одиниць, і у віці 120 днів були наявні $14,3 \pm 0,6$ (середнє значення \pm S.E.M., $n = 10$) моторних одиниць ($p = 0,003$).

Скорочувальні характеристики м'язів EDL

i) Із занотованих значень напруження скорочення ми також досліджували деякі скорочувальні характеристики м'язів EDL у лікованих і нелікованих трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A). В нормі EDL являють собою швидкі м'язи, що легко втомлюються, і у диких мишей час напіврелаксації EDL, як міра часу, необхідного для релаксації м'яза після скорочення, становить $25,8 \pm 2,4$ мсек (середнє значення \pm S.E.M., $n = 10$). На протилежність цьому, у нелікованих мишей час напіврелаксації уповільнюється внаслідок денервації та атрофії м'яза і становить $43,3 \pm 6,93$ мсек (середнє значення \pm S.E.M., $n = 10$). Однак, у мишей, лікованих сполукою А, час напіврелаксації істотно покращувався і становив $32,3 \pm 1,80$ мсек (середнє значення \pm S.E.M., $n = 10$), ($p = 0,030$).

ii) Модель втоми та індекс втоми м'язів EDL

Оскільки в нормі EDL являють собою швидкі м'язи, при безперервній стимуляції вони швидко втомлюються, демонструючи характерну модель втоми. Модель втоми м'язів EDL досліджували у мишей дикого типу, трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A) і лікованих трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A). Вимірювали зменшення напруження після 3 хвилин стимуляції і обчислювали індекс (FI). У трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A) у віці 120 днів м'язи EDL ставали резистентними до втоми внаслідок дегенерації моторних нейронів, денервації та подальших змін фенотипу м'язових волокон. Таким чином, у трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A) у віці 120 днів індекс втоми EDL становив $0,255 \pm 0,04$ (середнє значення \pm S.E.M., $n = 10$) в порівнянні з $0,848 \pm 0,028$ (середнє значення \pm S.E.M., $n = 10$) у мишей дикого типу. Однак, у мишей, лікованих сполукою А, індекс втоми EDL становив $0,416 \pm 0,07$ (середнє значення \pm S.E.M., $n = 10$). Таким чином, індекс втоми EDL значно покращувався у лікованих трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A) в порівнянні з нелікованими однопаметними тваринами лінії mSOD1^(G93A) ($p \leq 0,05$).

Після завершення фізіологічних експериментів оцінювали виживання моторних нейронів шляхом підрахунку кількості моторних нейронів в сідничному моторному пулі в рогах черевини з поперечних розтинів поперекового відділу спинного мозку. Відповідно до збільшення виживання моторних одиниць, яке спостерігалось, кількість моторних нейронів, що вижили в сідничному моторному пулі лікованих трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A) також була значно підвищеною в порівнянні з нелікованими однопаметними тваринами лінії mSOD1^(G93A). У мишей дикого типу виявлено $593 \pm 15,8$ (середнє значення \pm S.E.M., $n = 13$) моторних нейронів у досліджуваному сегменті сідничного моторного пулу. У нелікованих трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A) у віці 120 днів значна кількість моторних нейронів загинула і вижили тільки 237 ± 14 (середнє значення \pm S.E.M., $n = 7$). Однак, у трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A), лікованих сполукою А, спостерігалось різке підвищення виживання моторних нейронів з кількістю 412 ± 28 (середнє значення \pm S.E.M., $n = 4$) моторних нейронів, що вижили, навіть у віці 120 днів ($p = 0,002$).

Ці результати показують, що після щоденного лікування трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A) сполукою А (10мг/кг ; внутрішньочеревинно) спостерігається значне збільшення моторних одиниць та підвищення виживання моторних нейронів, а також покращення функції м'язів задньої кінцівки на пізніх стадіях захворювання (120 днів).

З огляду на значне покращення кількості моторних одиниць та підвищення виживання моторних нейронів, що спостерігається у лікованих трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A) у віці 120 днів, в окремій групі мишей ми досліджували, чи лікування сполукою А буде мати вплив на тривалість життя трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A). Нами було виявлено, що середня тривалість життя нелікованих трансгенних мишей лінії mSOD1^(G93A) становила $125 \pm 1,8$ днів (середнє значення \pm S.E.M., $n = 18$), що визначалося за нездатністю покладеної на бік миші підвестися, а також за втратою приблизно 20 % маси тіла. Однак, в групі лікованих

сполукою А тварин зменшення маси тіла віддалялося і тривалість життя значно покращувалася, тобто миші лінії mSOD1^(G93A) жили в середньому $153 \pm 2,6$ днів (середнє значення \pm S.E.M., $n = 7$). Це представляє значне збільшення тривалості життя - більше, ніж на 22 % ($p \leq 0,001$).

Наведені вище біологічні властивості роблять N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлорид корисним в лікуванні нейродегенеративних захворювань. Хоча всі види нейродегенеративних захворювань можуть бути прийняті до уваги, сполука за винаходом є особливо корисною в лікуванні АПС. Доза сполуки залежить від стану і захворювання пацієнта, і добова доза становить 0,1-400 мг/кг, переважно 0,1-100 мг/кг маси тіла. В лікуванні людей пероральна добова доза переважно становить 10-300 мг. Ці дози вводять у вигляді дозованих форм, які в певних випадках можуть бути розділені на 2-3 менші дози для кожного дня, особливо при пероральному лікуванні.

Переважно застосовується стереоізомер рацемічної сполуки, більш переважно застосовується (+)-енантіомер. В цьому випадку для лікування буде достатньо меншої кількості активного інгредієнта в наведених вище межах.

Активна субстанція може бути введена у звичайні фармацевтичні композиції за способами, відомими з рівня техніки. Ці фармацевтичні композиції містять, на додаток до звичайних допоміжних речовин і носіїв, N-[2-гідрокси-3-(1-піперидиніл)пропокси]піридин-1-оксид-3-карбоксимідоїлхлорид або один з його стереоізомерів, або сіль одного з них, одержану при додаванні кислоти, як активні інгредієнти.

Фармацевтичні композиції можуть бути виготовлені у формі твердого або рідкого препарату, які загалом застосовуються для лікування. Можуть бути виготовлені таблетки без покриття або з покриттям, драже, гранули, капсули, розчини або сиропи для перорального введення. Ці лікарські засоби можуть бути одержані звичайними способами. Продукти можуть містити наповнювачі, такі як мікрокристалічна целюлоза, крохмаль або лактоза, лубриканти, такі як стеаринова кислота або стеарат магнію, покриваючі матеріали, такі як цукор, плівкоутворюючі матеріали, такі як гідрокс метил целюлоза, ароматизатори або підсолоджувачі, такі як метилпарабен або сахарин, або барвники.