



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.08

(51) Int. Cl. *A61K 31/165* (2006.01)
A61P 25/14 (2006.01)

(21) Номер заявки
202092742

(22) Дата подачи заявки
2019.05.28

(54) САФИНАМИД ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МИОТОНИИ

(31) 18000481.4

(32) 2018.05.29

(33) EP

(43) 2021.02.19

(86) PCT/EP2019/063733

(87) WO 2019/229028 2019.12.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЗАМБОН С.П.А (IT)

(72) Изобретатель:
**Дезафи Жан-Франсуа, Пьерно
Сабата, Конте Диана, Меллони Эльса,
Ваилати Сильвия, Падоани Глория,
Каччья Карла (IT)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-2012329800
CATTANEO CARLO ET AL.: "Long-term Efficacy of Safinamide on Parkinson's Disease Chronic Pain", ADVANCES IN THERAPY, HEALTH COMMUNICATIONS, METUCHEN, NJ, US, vol. 35, no. 4, 14 March 2018 (2018-03-14), pages 515-522, XP036486108, ISSN: 0741-238X, DOI: 10.1007/S12325-018-0687-Z [retrieved on 2018-03-14], abstract, page 520, column 1, paragraph 4, page 520, column 2, paragraph 4

CARLO CATTANEO ET AL.: "Safinamide as Add-On Therapy to Levodopa in Mid- to Late-Stage Parkinson's Disease Fluctuating Patients: Post hoc

Analyses of Studies 016 and SETTLE", JOURNAL OF PARKINSON'S DISEASE, vol. 6, no. 1, 30 March 2016 (2016-03-30), pages 165-173, XP055520782, NL, ISSN: 1877-7171, DOI: 10.3233/JPD-150700, abstract page 166, column 1, paragraph 2-5, page 172, column 2, paragraph 3

E.L. LOGIGIAN ET AL.: "Mexiletine is an effective antimyotonia treatment in myotonic dystrophy type 1", Neurology, 4 May 2010 (2010-05-04), pages 1441-1448, XP055520786, United States, DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181dc1a3a, Retrieved from the Internet: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2871004/pdf/7651.pdf> [retrieved on 2018-11-02], abstract, page 1441, paragraph 1, page 1445, column 2, last paragraph - page 1446, column 2, paragraph 1

N. EIJKELKAMP ET AL.: "Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels", BRAIN, vol. 135, no. 9, 1 September 2012 (2012-09-01), pages 2585-2612, XP055080350, ISSN: 0006-8950, DOI: 10.1093/brain/aws225, page 2603, column 1, paragraph 1

LIBERO VITIELLO ET AL.: "Drug Repurposing for Duchenne Muscular Dystrophy: The Monoamine Oxidase B Inhibitor Safinamide Ameliorates the Pathological Phenotype in mdx Mice and in Myogenic Cultures From DMD Patients", FRONTIERS IN PHYSIOLOGY, vol. 9, 14 August 2018 (2018-08-14), XP055608356, DOI: 10.3389/fphys.2018.01087, abstract, page 2, column 2, paragraph 1

(57) Изобретение относится к сафинамиду или его фармацевтически приемлемой соли для применения в лечении состояния, вызванного патологической гипервозбудимостью сарколеммы, и/или любого другого состояния, при котором восстановление нормальной возбудимости сарколеммы может дать терапевтический эффект или улучшение, при этом указанное состояние предпочтительно является миотоническим расстройством.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к сафинамиду или его фармацевтически приемлемой соли для применения в лечении миотонии. В частности, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим сафинамид или его фармацевтически приемлемую соль, для применения в лечении заболевания или состояния, при котором миотония является нежелательным аспектом.

Уровень техники настоящего изобретения

Миотонию можно определить как непроизвольное постоянное сокращение скелетных мышц после активации, которое вызывает скованность и боль.

Миотония возникает из-за аномалии мембраны мышечных волокон (патологическая гипервозбудимость сарколеммы), которая приводит к длительной задержке расслабления мышц после сокращения, может быть болезненной и серьезно мешать повседневной двигательной активности и качеству жизни. Мышца начинает сокращение по команде, но электрическая активность продолжается после окончания нервного сигнала, вызывая жесткость или "блокировку" мышцы.

Деструктивное замедленное расслабление мышц, которое испытывают пациенты с миотоническими расстройствами, вызвано непроизвольной активацией потенциалов действия (ПД). В физиологических условиях потоки хлоридов (опосредованные хлоридным каналом ClC-1), которые составляют от 70 до 80% проводимости мембраны мышц в состоянии покоя, компенсируют деполяризующее влияние накопления K^+ в Т-трубочках мышц (Adrian and Bryant, J. Physiol. 1974; 240:505-515) и предотвращают открытие потенциалзависимого канала Na^+ , тем самым предотвращая непроизвольный ПД и повторяющиеся разряды импульсов, наблюдаемые при миотонии.

Мутации в генах, кодирующих хлоридные (CLCN1) и/или натриевые каналы (SCN4A) в скелетных мышцах, приводят к множественным дефектам в воротном механизме ионных каналов, что приводит к гипервозбудимости мышц и миотоническим разрядам (Burge and Hanna, Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 2012; 12:62-69).

Миотония представляет собой характерный симптом различных генетических и приобретенных заболеваний, которые можно классифицировать как миотонические нарушения, такие как недистрофические миотонии и миотонические дистрофии.

Недистрофические миотонии (НДМ) представляют собой чисто скелетные мышечные заболевания без поражения сердца или мышц пищеварительного тракта. В зависимости от типа и серьезности расстройства миотония может поражать все, от ног, лица, рук, бедер, плеч, ступней, век до способности человека четко говорить, эмоциональные потрясения, холод, калий или упражнения-потенциальные инициаторы миотонии.

В более тяжелых случаях НДМ могут хронически истощать организм из-за боли и жесткости мышц. В очень немногих случаях перинатальной смерти сообщалось как несчастливое осложнение тяжелого миотонического состояния, называемого SNEL (тяжелые неонатальные эпизодические ларингоспазмы) (Gay et al., Am. J. Med. Genet A 2008; 146:380-383; Lion-Francois et al., Neurology, 2010; 75(7):641-645. Portaro et al., Pediatrics, 2016; 137(4); Lehmann-Horn et al., Acta Myologica, 2017; XXXVI:125-134). Совсем недавно миотонические мутации в натриевых каналах были определены как фактор риска СВДС (синдром внезапной детской смерти) (Mannikko et al., Lancet 2018; 391(10129):1483-1492).

НДМ можно классифицировать как нарушения ионных каналов, вызванные типичными точечными мутациями или делециями в генах хлоридных или натриевых каналов с исключительной экспрессией в скелетных мышцах. Известно, что НДМ вызываются мутациями с приобретением функции в гене SCN4A, кодирующем натриевый канал $Na_v1.4$ скелетных мышц (врожденная парамиотония и миотония натриевых каналов), или мутациями с потерей функции в гене CLCN1, кодирующем ClC-1 хлоридный канал скелетных мышц (врожденная миотония).

Сниженная активность мутированных хлоридных каналов или повышенная активность мутированных натриевых каналов обуславливает патологическую гипервозбудимость сарколеммы с возникновением высокочастотных импульсных разрядов потенциала действия; последующее затруднение мышечной релаксации является причиной характерной жесткости миотонической мышцы.

НДМ включают в себя хлоридные каналопатии, такие как, например, врожденная миотония Томсена и врожденная миотония Беккера; и натриевые каналопатии, как, например, врожденная парамиотония с гиперкалиемическим периодическим параличом или без него и миотония натриевых каналов (SCMs), которые включают, например, флуктуационную миотонию, перманентную миотонию и миотонию, чувствительную к ацетазоламиду, миотонию с отягощением K^+ и тяжелые эпизодические неонатальные ларингоспазмы (SNEL). Все формы врожденной миотонии вызываются мутациями, которые приводят к потере функции хлоридного канала ClC-1, который экспрессируется исключительно в мембране скелетных мышц.

Следующее клиническое описание и возможные терапевтические варианты для перечисленных выше НСД взяты из обзорной Review Article Myotonic disorders Ami Mankodi, опубликованной в Neurology India, июль-сентябрь 2008 г., том 56, выпуск 3.

Врожденная миотония Томсена.

Название "врожденная миотония Томсена" происходит от оригинального описания болезни, сде-

ланного датским врачом в 1870-х гг. самим себе и членами его семьи с аутосомно-доминантным типом наследования. Симптомы начинаются в младенчестве или детстве. Пациенты сообщают о безболезненной жесткости мышц при активации мышц после отдыха. Миотония может уменьшаться при повторяющихся мышечных усилиях, так называемый феномен разминки. Эмоциональные потрясения, простуда или беременность могут усугубить миотонию. При медицинском обследовании у некоторых пациентов может быть выявлен атлетический вид с гипертрофией мышц конечностей и лицевых мышц. Пациенты демонстрируют миотонию хватки и миотонию век. Пациентам может быть трудно быстро сесть после того, как они пролежали в течение нескольких минут на спине, что отражает миотонию параспинальных и проксимальных мышц конечностей. Сила мышц в норме.

У большинства пациентов прогноз благоприятный. Пациентам с инвалидизирующей миотонией может быть полезен мексилетин 150 мг внутрь два раза в день с постепенным титрованием до максимальной дозы 300 мг внутрь три раза в день.

Врожденная миотония Беккера.

Миотония Беккера представляет собой аутосомно-рецессивную миотонию с хлоридным каналом. Название происходит от имени исследователя, описавшего это состояние в 1970-х гг. Клиническая картина включает генерализованную миотонию и гипертрофию мышц, аналогичную миотонии Томсена. Однако есть важные отличия: начало болезни происходит незаметно и позже, в детстве; в начале симптомы часто проявляются в нижних конечностях (так называемая врожденная восходящая миотония); медленно прогрессирующая слабость у некоторых пациентов; преходящие эпизоды слабости проксимальных мышц, продолжающиеся в течение секунд или минут, которые могут быть вызваны просьбой пациента быстро встать после нескольких минут отдыха на спине; и более выраженная гипертрофия мышц нижних конечностей. Воздействие холода, продолжительное мышечное напряжение, беременность, менструация и эмоциональное напряжение могут усугубить миотонию. При медицинском обследовании выявляется атлетический вид с гипертрофией мышц, особенно с вовлечением мышц нижних конечностей и плеч. У некоторых пациентов может наблюдаться атрофия мышц предплечий, кистей рук и передней части шеи. Миотония легко распознается во многих группах мышц, включая жевательные мышцы, мышцы языка и шеи, в дополнение к миотонии сжатия и задержке верхнего века при взгляде вниз. Наиболее характерным признаком является выраженная трудность подъема из положения лежа на спине и подъема по лестнице, которая постепенно улучшается после нескольких шагов, вторичная по отношению к феномену разминки. Считается, что это связано с сочетанием миотонии и мышечной слабости. Большинство пациентов замечают мышечную слабость при физической активности после периода отдыха. У некоторых пациентов может быть устойчивая слабость нижних конечностей, которая может приводить к потере трудоспособности в повседневной жизни. Рефлексы растяжения мышц могут быть подавлены в нижних конечностях. Уровень креатинкиназы (КК) может быть повышен. Повторная стимуляция нервов и короткие тесты с физической нагрузкой могут показать снижение амплитуды смешанного потенциала мышечного действия (СМАР). Длительный тест с физической нагрузкой может выявить небольшой спад, который не характерен для миотонии Томсена. Большинство пациентов наслаждаются хорошим качеством жизни. Симптомы прогрессируют медленно и могут стабилизироваться по достижении пациентом третьего десятилетия. Лечение направлено на изменение активности, устранение активаторов миотонии и слабости. У некоторых пациентов с инвалидизирующей миотонией эффективна фармакологическая терапия, включая мексилетин, токаирид или ацетазоламид.

Врожденная парамиотония (РМС).

Врожденная парамиотония относится к миотонии, которая усугубляется при физических нагрузках, особенно при низких температурах. Симптомы появляются в младенчестве или детстве. Типичные проявления включают длительное закрытие глаз после плача у младенцев или умывания лица холодной водой и "замороженный язык" после употребления мороженого. Некоторые пациенты могут сообщать о вялой слабости после физических упражнений при низких температурах. Прием калия, отдых с последующими упражнениями и длительное голодание также могут усугубить парамиотонию. Медицинское обследование выявляет выраженную парамиотонию век, проявляющуюся как неспособность открывать глаза после многократного длительного закрытия глаза или длительного втягивания век после продолжительного взгляда вверх. Помещение пакета со льдом на веки может усугубить парамиотонию. Погружение руки в ледяную воду на 10-15 мин перед упражнением на захват может спровоцировать парамиотонию и последующую слабость. Исследования моторной и сенсорной нервной проводимости в норме. Повторная стимуляция нервов с частотой 5 Гц может привести к снижению амплитуды СМАР. Точно так же короткий тест с физической нагрузкой после воздействия холода также может привести к снижению реакции. Электромиография (ЭМГ) выявляет миотонию во многих мышцах. Потенциалы фибрилляции и положительные резкие волны могут проявиться после воздействия холода. Бесшумная контрактура мышц может возникнуть при экстремальном холоде. Одноволоконная ЭМГ может показывать увеличение флуктуации амплитуды сигнала, а иногда и блокировку. Биопсия мышц противопоказана для диагностики. У большинства пациентов для поддержания хорошего качества жизни достаточно избегать триггерных факторов, таких как упражнения и переохлаждение. Мексилетин можно применять для инвалидизирующей парамиотонии.

Калий-чувствительные миотонии.

Существует три различных миотонических нарушения натриевых каналов, при которых миотония усугубляется приемом калия. Воздействие холода обычно не усугубляет миотонию, как при врожденной парамиотонии. Слабость не является заметным симптомом.

Флуктуальная миотония характеризуется генерализованной миотонией, вызванной приемом калия или физическими упражнениями. В отличие от парамиотонии, у пациентов может наблюдаться эффект разминки после начальной нагрузки, однако миотония становится более выраженной после второй тренировки после периода отдыха продолжительностью около 20-40 мин. Пациенты сообщают о колебаниях тяжести миотонии с периодами отсутствия явной миотонии, продолжающимися от часов до дней. Мышечная масса и сила в норме. Уровни КК могут быть увеличены в два-три раза. ЭМГ может выявить потенциал миотонии и фибрилляции. Исследования нервной проводимости в норме. Биопсия мышц может выявить легкие аномалии, такие как увеличение внутренних ядер, изменчивость размера волокон и субсарколемматические вакуоли. Большинству пациентов лекарства не требуются. Может быть достаточно простого отказа от продуктов, богатых калием. Мексилетин может помочь уменьшить миотоническую скованность.

Перманентная миотония представляет собой редкую и тяжелую форму недистрофической миотонии. Клинические проявления включают начало в возрасте до 10 лет, тяжелую генерализованную миотонию и гипертрофию мышц. Слабость мышц не выражена. Тяжелая миотония с вовлечением межреберных мышц может привести к респираторной недостаточности с гипоксемией и ацидозом. Прием калия и упражнения представляют собой обычные активаторы миотонии. ЭМГ выявляет генерализованную миотонию с нормальным потенциалом двигательных единиц. Мексилетин может частично облегчить миотоническую скованность. Ацетазоламид может помочь уменьшить мышечную жесткость или судороги, вызванные физической нагрузкой.

Миотония, чувствительная к ацетазоламиду, характеризуется генерализованной миотонией, усугубляющейся приемом калия, холодом и голоданием, а также отличным восстановлением после приема ацетазоламида. Пациенты в детстве имеют прогрессирующую генерализованную миотонию, которая легко выявляется при клиническом обследовании и ЭМГ. У некоторых пациентов может наблюдаться пара-миотония век. Миотоническая жесткость может быть болезненной. Физические упражнения обычно не оказывают значительного влияния на миотонию. Лечение включает ацетазоламид в начальной дозе 125 мг в сутки с постепенным титрованием до 250 мг 3 раза в сутки при необходимости. Побочные эффекты включают образование камней в почках, парестезию, тошноту, спутанность сознания, раздражительность, депрессию, сыпь и нарушения функции печени. Рекомендуются регулярный контроль общего анализа крови и функции печени. Мексилетин также снимает миотонию.

НДМ отличаются от миотонических дистрофий отсутствием прогрессирующей слабости и системных особенностей.

Миотонические дистрофии (МД) представляют собой заболевания, характеризующиеся прогрессирующей миопатией, миотонией и поражением многих органов.

Наличие миотонии не является самым инвалидизирующим аспектом МД, но это признанные отличительная черта этого состояния и аспект заболевания, который отличает его от других форм мышечной дистрофии.

На сегодняшний день идентифицированы две различные формы, вызванные сходными мутациями: миотоническая дистрофия 1 типа (МД1) и миотоническая дистрофия 2 типа (МД2).

В частности, МД1 и МД2 являются наследственными заболеваниями человека из-за увеличения количества нуклеотидных повторов в хромосоме 19 и 3 соответственно (Meola, *Acta Myol.* 2013; 32(3):154-165). Такое изменение приводит к накоплению токсичной РНК в ядре, что влияет на нормальный процессинг белка во многих типах клеток. Таким образом, МД1 и МД2 являются мультисистемными заболеваниями, поражающими, например, ЦНС, сердце и скелетные мышцы. В последнем случае канал CIC-1 является мишенью этого токсичного процесса. Уменьшение количества белка CIC-1 и изменение его сплайсинга являются основной причиной миотонии у пациентов с МД1 и МД2 (Charlet B. et al., *Mol. Cell.* 2002; 10(1):45-53; Mankodi et al., *Mol. Cell.* 2002; 10(1):35-44 и Chen et al., *J. Mol. Biol.* 2007, 368(1):8-17).

В настоящее время препараты от миотонии направлены на снижение патологической гипервозбудимости сарколеммы. Эти лекарства включают мексилетин (Logigian et al., *Neurology*, 2010; 74(18):1441-1448).

Сущность изобретения

В поисках антимиотонических препаратов, действующих через снижение патологической гипервозбудимости сарколеммы, авторы настоящего изобретения обнаружили, что сафинамид способен восстанавливать возбудимость сарколеммы в изолированных миотонических мышечных волокнах и облегчать миотонические симптомы *in vivo* на фармакологически индуцированной модели миотонии у крыс. Таким образом, настоящее изобретение основывается на этом открытии и относится к сафинамиду как к антимиотоническому лекарственному средству для лечения пациентов с миотоническими расстройствами, которые в этом нуждаются.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим сафина-

мид или его фармацевтически приемлемую соль в сочетании с подходящими наполнителями, основами или носителями, для применения при миотонических расстройствах.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано антимиотоническое действие сафинамида *in vitro* на возбудимость волокон скелетных мышц крыс в миотоническом состоянии, индуцированном 9-антраценкарбоновой кислотой (9-АК). Возбудимость волокон скелетных мышц (максимальное количество спайков, N спайков) измеряли до (контроль, ctrl), после 50 мкМ 9-АК и после одновременного применения сафинамида в шести различных концентрациях (от 0,1 до 30 мкМ). Антимиотонический эффект был обратимым с момента вымывания сафинамида (50 мкМ 9-АК, крайняя правая колонка). Результаты были выражены как среднее значение $\pm \sigma$ (стандартная ошибка); $P < 0,05$ по сравнению с одним только 9-АК, критерий Бонферрони.

На фиг. 2 показан антимиотонический эффект сафинамида *in vivo* в зависимости от дозы в фармакологически индуцированной модели врожденной миотонии на крысах. Сафинамид в дозе 0,3, 1, 3, 10 и 30 мг/кг (соответственно: черный треугольник, серый круг, пустой круг, черный круг, серый треугольник; только носитель: пустой квадрат), вводимый перорально, был способен противодействовать 9-антраценкарбоновой кислоте. (9-АК, 30 мг/кг) - индуцированное удлинение времени рефлекса выпрямления (TRR) как признак миотонии у крыс. Результаты выражали как среднее значение $\pm \sigma$ (стандартная ошибка), $n=5-7$ крыс; $P < 0,05$ по сравнению с носителем, критерий Бонферрони.

Подробное описание предпочтительного варианта осуществления

Таким образом, настоящее изобретение относится к сафинамиду или его фармацевтически приемлемой соли для применения в лечении состояния, вызванного патологической гипервозбудимостью сарколеммы, и/или любого другого состояния, при котором восстановление нормальной возбудимости сарколеммы может дать терапевтический эффект или улучшение, где подобное состояние представляет собой миотоническое расстройство. Фактически, до 30% пациентов с миотоническими расстройствами считают мексилетин (эталонный препарат при миотонических расстройствах) неэффективным (Desaphy et al., 2013; Suetterlin et al., JAMA Neurol. 2015 Dec; 72(12):1531-3; Portaro et al., 2016). Для целей настоящего изобретения миотонические расстройства, при которых мексилетин неэффективен, были определены как резистентные к мексилетину, и следующий вариант осуществления настоящего изобретения относится к применению сафинамида для лечения миотонических расстройств, резистентных к мексилетину.

Кроме того, настоящее изобретение имеет отношение к сафинамиду или его фармацевтически приемлемой соли для применения в лечении миотонического расстройства, при этом миотоническое расстройство предпочтительно представляет собой недистрофическую миотонию (НДМ).

Еще более предпочтительно пациенты с НДМ, которым может быть полезен сафинамид, несут бессмысленную мутацию в гене SCN4A. Фактически, без привязки к какой-либо конкретной теории и как более подробно описано в экспериментальной части, было обнаружено, что эффективность сафинамида, измеренная как значения IC_{50} при мембранном потенциале покоя и после повторяющихся импульсов деполяризации, не снижается по сравнению с не мутантным типом, в клетках, трансфицированных бессмысленными мутациями в канале $hNa_v1.4$ (Desaphy et al., 2001, 2003 и 2016). Ожидается, что соединение, способное блокировать натриевые каналы в зависимости от частоты применения, уменьшит аномальную активность, но не повлияет на нормальную активность мышечных волокон.

Напротив, эффективность мексилетина значительно снижается в клетках, трансфицированных точечными мутациями $hNa_v1.4$.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к сафинамиду или его фармацевтически приемлемой соли для применения в лечении НДМ, где такой НДМ предпочтительно представляет собой врожденную миотонию, такую как, например, врожденная миотония Томсена или врожденная миотония Беккера, врожденная парамиотония или миотония натриевых или хлоридных каналов; более предпочтительно, указанная миотония натриевых каналов представляет собой каналопатию $hNa_v1.4$, и пациент, таким образом, является носителем мутации в гене SCN4A, кодирующем канал $hNa_v1.4$.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение имеет отношение к сафинамиду или его фармацевтически приемлемой соли для применения в лечении врожденной миотонии, при этом такой врожденной миотонией является врожденная миотония Томсена или врожденная миотония Беккера.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение имеет отношение к сафинамиду или его фармацевтически приемлемой соли для применения в лечении врожденной парамиотонии. Кроме того, настоящее изобретение относится к сафинамиду или его фармацевтически приемлемой соли для применения в лечении миотонии с натриевыми каналами, где такой миотонией с натриевыми каналами является миотония флуктуационная, миотония перманентная или миотония, чувствительная к ацетазоламиду.

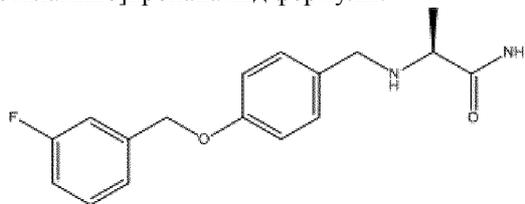
Кроме того, настоящее изобретение относится к сафинамиду или его фармацевтически приемлемой соли для применения в лечении миотонического расстройства, где такое миотоническое расстройство

предпочтительно представляет собой МД.

Более того, настоящее изобретение относится к сафинамиду или его фармацевтически приемлемой соли для применения в лечении МД, причем такой МД предпочтительно выбирают из МД1 и МД2.

В предпочтительном аспекте настоящее изобретение относится к сафинамиду или его фармацевтически приемлемой соли для применения в лечении врожденной миотонии.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к сафинамиду или его фармацевтически приемлемой соли для применения для облегчения одного или нескольких миотонических симптомов, связанных с состоянием, как определено выше, где миотонические симптомы включают скованность скелетных мышц, спазмы и боль. Согласно настоящему изобретению сафинамид представляет собой (2S)-2-[[4-[(3-фторфенил)метокси]фенил]метиламино]пропанамид формулы:



Сафинамид предпочтительно находится в форме фармацевтически приемлемой соли. Фармацевтически приемлемые соли сафинамида включают в себя дополнительные соли, образованные неорганическими кислотами, например азотной, соляной, серной, хлористоводородной и фосфорной кислотами, или органическими кислотами, например, уксусной, пропионовой, гликолевой, молочной, щавелевой, малоновой, яблочной, винной, лимонной, бензойной, коричной, миндальной, метансульфоновой и салициловой кислотами; сафинамида метансульфонат (мезилат) является предпочтительной солью.

Применяемые в настоящем изобретении термины "заболевание", "расстройство" или "состояние" применяют взаимозаменяемо.

Применяемый в настоящем изобретении термин "излечение" или "лечение" относится к получению желаемого фармакологического эффекта, включая обращение вспять, облегчение, подавление прогрессирования или предотвращение расстройства, или состояния, к которым применяется такой термин, или одного или нескольких симптомов таких расстройств или состояний.

Сафинамид или его фармацевтически приемлемая соль обычно включается в фармацевтическую композицию.

Фармацевтическая композиция для лечения миотонических нарушений, как определено выше и в соответствии с настоящим изобретением, содержит сафинамид или его фармацевтически приемлемую соль в эффективном количестве, достаточном для обеспечения желаемого терапевтического эффекта или облегчения симптомов миотонических нарушений. Фармацевтическая композиция включает фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть введена субъекту/пациенту любым удобным путем введения, системно/периферически или местно (т.е. в месте желаемого действия).

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть получена для перорального введения, местного введения, трансдермального введения, парентерального введения и их комбинаций. Предпочтительные композиции предназначены для перорального или парентерального введения. Подходящие формы для перорального введения включают таблетки, прессованные пилюли или пилюли с покрытием, пакет-саше, пастилки, грануляты, твердые или мягкие желатиновые капсулы, сублингвальные таблетки, сиропы, растворы и суспензии; для парентерального введения изобретение предлагает ампулы или флаконы, которые включают водный или неводный раствор или эмульсию; для ректального введения предусмотрены суппозитории с гидрофильными или гидрофобными носителями; и для местного применения в виде мазей и трансдермальной доставки предусмотрены подходящие системы доставки, известные в данной области.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть получены способами, которые известны per se и знакомы специалисту в данной области.

Режим дозирования сафинамида или его фармацевтически приемлемых солей и/или фармацевтических композиций, содержащих его, основан на множестве факторов, включая тип, возраст, вес, пол и медицинское состояние субъекта, тяжесть состояния и/или миотонические симптомы, связанные с указанным состоянием, и путь введения.

Таким образом, режим дозирования может широко варьироваться. Уровни дозировки порядка от приблизительно 5 до приблизительно 500 мг в день (вводимые в виде однократной или разделенной дозировки) сафинамида или его фармацевтически приемлемых солей полезны в лечении указанных выше состояний. В одном варианте осуществления общая суточная доза обычно составляет от приблизительно 10 до приблизительно 250 мг. В другом варианте осуществления общая суточная доза обычно составляет от приблизительно 50 до приблизительно 100 мг.

Пероральные таблетки сафинамида метансульфоната, покрытые пленочной оболочкой, в дозировке

50 и 100 мг в настоящее время находятся на рынке под торговым наименованием Xadago®.

В соответствии с настоящим изобретением антимиотоническая активность сафинамида оценивалась с применением экспериментальных протоколов, имитирующих миотонические условия как *in vitro* (повышенная возбудимость сарколеммы в миотонических мышечных волокнах), так и *in vivo* (фармакологически индуцированная модель врожденной миотонии на крысах, имитирующая патологическое состояние человека, при котором генетическая потеря проводимости хлорид ионов вызывает нарушение мышечной релаксации и мышечной жесткости; Desaphy et al., *Neuropharmacology*, 2013, 65:21-7; и Desaphy et al., *Exp. Neurol.* 2014; 255:96-102).

Следующие ниже примеры и сопровождающие их фиг. 1 и 2 иллюстрируют изобретение без ограничения его объема.

Экспериментальная часть

Пример 1. Антимиотоническая активность сафинамида *in vitro* в волокнах скелетных мышц крыс.

Антимиотоническую активность сафинамида оценивали путем регистрации возбудимости сарколеммы в отдельных миофибриллах изолированных мышц длинного разгибателя пальцев (*Extensor Digitorum Longus*) (EDL) с применением двухмикроэлектродного токового зажима. Модель *in vitro* врожденной миотонии получали путем инкубации EDL-мышц крысы с 9-антраценкарбонической кислотой (9-АК) (Conte Camerino et al., *Muscle Nerve*. 1989; 12(11):898-904. Altamura et al., *Br. J. Pharmacol.* 2018; 175(10):1770-1780). Повышение возбудимости сарколеммы, вызванное 9-АК через блокаду хлоридных каналов CIC-1 скелетных мышц, имитировало аномальное возбуждение потенциала действия, наблюдаемое у пациентов с врожденной миотонией.

Мышцы EDL вырезали у самцов крыс Wistar под глубокой анестезией (80 мг/кг кетамина внутривентриально и 10 мг/кг ксилазина внутривентриально). Мышцы помещали в 25-миллилитровую ванну для мышц, поддерживаемую при 30°C, и опрыскивали физиологическим раствором (насыщенным 95% O₂ и 5% CO₂; pH 7,2-7,3). С помощью стандартной методики с двумя внутриклеточными микроэлектродами измеряли мембранный потенциал покоя и характеристики возбудимости (количество спайков) мышечных волокон в режиме токоизмерительного зажима. Характеристики возбудимости отобранных волокон определяли путем регистрации реакции внутриклеточного мембранного потенциала на прямоугольный импульс постоянного тока (100 мс). В каждом волокне мембранный потенциал был установлен постоянным током до отметки в -80 мВ перед прохождением деполяризующих импульсов. Увеличивая амплитуду импульса, авторы изобретения смогли выявить первый единичный потенциал действия, а путем дальнейшего увеличения интенсивности тока в том же волокне было измерено максимальное количество вызываемых всплесков (N всплесков) (Pierino et al., *Br. J. Pharmacol.* 2006; 149(7):909-19).

Нежелательным мышечным сокращениям препятствовал дантролен натрия (2 мг/л). Параметры возбудимости клеток (N спайков) измеряли до (контроль) и после применения только 50 мкМ 9-АК и одновременного применения сафинамида в шести различных концентрациях (от 0,1 до 30 мкМ). В этих экспериментальных условиях применяли сафинамидметансульфонат и растворяли в виде исходного раствора (10 мМ) в дистиллированной воде, затем его разбавляли до конечных концентраций в растворе мышечной ванны. Одно животное применяли для тестирования двух концентраций сафинамида: одной концентрации в каждой мышце EDL.

Как показано на фиг. 1, 9-АК вызывал состояние, подобное миотонии, за счет увеличения N-спайков на 60%. Сафинамид в дозах 1, 5, 10 и 30 мкМ значительно снижал выбросы азота на 22±6, 35±5, 42±5 и 60±6% соответственно (P<0,05 по сравнению с одним только 9-АК, t-критерий Бонферрони), восстанавливая возбудимость сарколеммы. IC₅₀ (концентрация, способная снизить на 50% эффект 9-АК), рассчитанная по подгонке кривой "концентрация-ответ", составляла 13,4±2,4 мкМ (± стандартная ошибка подбора). Антимиотонический эффект был обратимым по завершению вымывания сафинамида (9-АК, 50 мкМ).

Следует отметить, что в том же тесте IC₅₀ мексилетина был более чем в три раза выше, что указывает на более низкую эффективность.

Пример 2. Исследование антимиотонической активности сафинамида *in vivo* на модели врожденной миотонии на крысах.

Миотония у крыс вызывалась внутривентриальной инъекцией 9-АК, которая является известным блокатором хлоридных каналов CIC-1 скелетных мышц (Conte Camerino et al., *Muscle Nerve*. 1989; 12(11):898-904. Altamura et al., *Br. J. Pharmacol.* 2018; 175(10):1770-1780).

Применяли крыс-самцов линии Wistar (250-300 г). Эксперименты проводили в соответствии с Руководством по уходу и применению лабораторных животных и с разрешения Министерства здравоохранения Италии № 194/2018-ПР. Экспериментаторы были не осведомлены о методах лечения.

В этой животной модели 9-АК имитирует врожденную миотонию *in vivo*, заболевание человека, вызванное мутациями потери функции в гене CLCN1, кодирующем каналы CIC-1. После инъекции 9-АК у крыс наблюдалась явная жесткость мышц, особенно в задних конечностях, и трудности с передвижением. Тем не менее животные оставались полностью сознательными и проворными. Дыхание нормальное. Услышав неожиданный шум, животные прыгнули на месте, но им было очень трудно отойти из-за

жесткости мышц. Миотонию оценивали, измеряя время рефлекса выпрямления (TRR, время, необходимое крысе, находящейся в положении лежа на спине, чтобы повернуться обратно на четыре лапы). У крыс до введения 9-АК TRR составлял менее 0,5 с. TRR резко увеличивался приблизительно до 2 с, 10 мин после 9-АК и далее увеличивался приблизительно до 4 с, 30 мин после 9-АК. Затем TRR постепенно уменьшался с течением времени, приближаясь к 1 с, 3 ч после 9-АК. Ожидается, что антимиотонический препарат будет противодействовать индуцированному 9-АК удлинению TRR.

TRR оценивали приблизительно за 10 мин до 9-АК (время 0) и через 10, 37, 67, 127 и 187 мин после 9-АК (30 мг/кг внутривенно). TRR, измеренный в каждый момент времени, представлял собой среднее значение 7 измерений с интервалом в 1 мин (для ограничения эффекта разминки). Сафинамида метансульфонат (10 и 30 мг/кг в виде свободного основания) или с носителем вводили крысам через зонд через 17 мин после инъекции 9-АК. 9-АК и метансульфонат сафинамида растворяли в бикарбонате и 0,9% растворе NaCl соответственно. Чтобы обеспечить возможность сравнения между крысами, TRR, измеренный в каждый момент времени, был нормализован как функция TRR, измеренный через 10 мин после инъекции 9-АК у той же крысы. Затем были рассчитаны средние данные для каждой дозировки как среднее значение $\pm \sigma$ (стандартная ошибка). Статистический анализ проводился с применением одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим специальным t-критерием Бонферрони. Значение $P < 0,05$ считалось статистически значимым.

Как показано на фиг. 2, у крыс, получавших носитель, значительное увеличение TRR наблюдалось через 37, 67 и 127 мин после инъекции 9-АК. При максимальном эффекте (37 и 67 мин) сопутствующее лечение сафинамидом дозозависимо и значительно нейтрализовало индуцированное 9-АК удлинение TRR, и эффект продолжался до 120 мин, демонстрируя, что сафинамид *in vivo* обладает антимиотонической активностью в модели врожденной миотонии с применением крыс.

В этой модели *in vivo* также изучалась кривая доза зависимости для сафинамида метансульфоната в возрастающих дозах (0,3, 1, 3, 10 и 30 мг/кг в виде свободного основания). Чтобы обеспечить возможность сравнения между крысами, TRR, измеренный в каждый момент времени, был нормализован как функция TRR, измеренного через 10 мин после инъекции 9-АК у той же крысы. Затем были рассчитаны средние значения для каждого лекарства/дозировки как среднее $\pm \sigma$ (стандартная ошибка). Статистический анализ будет выполнен с применением одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим специальным t-критерием Бонферрони. Значение $P < 0,05$ считалось статистически значимым.

Результаты показаны на фиг. 2, который показывает, что у крыс, получавших сафинамида метансульфонат с носителем, значительное увеличение TRR наблюдалось через 37, 67 и 127 мин после инъекции 9-АК. Лечение сафинамидом дозозависимо и значительно противодействовало индуцированному 9-АК пролонгации TRR. Фактически, пероральный сафинамид был способен противодействовать индуцированному 9-антраценкарбоновой кислотой (9-АК) удлинению времени рефлекса выпрямления (TRR) как признаку миотонии у крыс.

В частности, через 37 мин снижение TRR было значительным при дозах 3, 10 и 30 мг/кг сафинамида. Через 67 мин (пиковый эффект 9-АК) ингибирование TRR было значительным также при более низкой дозе сафинамида 1 мг/кг. Через 127 мин только 10 и 30 мг/кг вызвали значительное ингибирование. Анализ кривой доза-ответ через 67 мин показал ED_{50} (эффективная доза для ингибирования 50% удлинения TRR) 1,2 мг/кг и максимальный эффект 66%, полученный при дозе 10-30 мг/кг, демонстрируя, что *in vivo* сафинамид обладал значительной антимиотонической активностью на модели врожденной миотонии у крыс.

Следует отметить, что в том же тесте эталонный препарат при миотонии, мексилетин, был приблизительно в 6 раз менее эффективен.

Пример 3. Влияние сафинамида *in vitro* на выбранные мутации миотонии $Na_v1.4$ человека в трансфицированных клеточных линиях.

Более 40 различных мутаций $hNa_v1.4$ были связаны с несколькими фенотипически разными ауто-сомно-доминантными наследственными заболеваниями скелетных мышц человека (Cummins & Bendahhou, 2009; Jurkat-Rott et al. 2010).

Канал $Na_v1.4$ в основном экспрессируется в скелетных мышцах и состоит из α -субъединицы 260 кДа, которая связана с меньшей β -субъединицей в мышце. α -субъединица состоит из четырех гомологичных доменов (I-IV), и каждый домен имеет шесть трансмембранных сегментов (S1-S6) (Noda et al., 1984). Мутации канала $Na_v1.4$, приводящие к периодическому параличу или недистрофической миотонии, были обнаружены во всех областях и сегментах этого канала и могут лежать в основе гипервозбудимости или неуравновешенности мышц за счет изменения кинетики или функции канала, тем самым вызывая изменения в микро- или макроскопических биофизических параметрах свойства канала. Было описано несколько мутаций канала $Na_v1.4$, связанных с миотонией, которые изменяют функцию канала за счет замедления быстрой инактивации, увеличения скорости восстановления после быстрой инактивации, замедления деактивации или смещения потенциалзависимой активации в сторону более отрицательных потенциалов (аккомодация) (Cummins & Bendahhou, 2009).

Эффект сафинамида оценивали на некоторых точечных мутациях $hNa_v1.4$, расположенных в сайте

инактивации.

p.P1158L: данная мутация была обнаружена у алжирской молодой девушки и связана с тяжелой перманентной миотонией (Desaphy et al., 2016).

p.V1293I: данная мутация V1293I связана с различными фенотипами, от миотонии натриевого канала до врожденной параимитонии плюс гиперкалиемического периодического паралича (Koch et al., 1995).

p.F1298C: данная мутация была обнаружена у 35-летней женщины, поступившей в 32 года с ригидностью мышц лица, верхних и нижних конечностей, в основном после сокращения (Farinato et al., 2019). Симптомы ухудшались при простуде, со слов пациента миотония была болезненной. Пациент заметил легкое улучшение миотонии при физических нагрузках.

p.I1310N: данная мутация была обнаружена у 5 родственников французского происхождения и связана с миотонией натриевых каналов (Farinato et al., 2019).

Подтип потенциалзависимых натриевых каналов скелетных мышц человека ($hNa_v1.4$), либо немутантный тип, либо миотонический мутантный тип, временно трансфицировали в клетки HEK293T с помощью метода соосаждения с фосфатом кальция. Натриевые токи во всей клетке (INa) регистрировали при комнатной температуре (20-22°C) с применением метода локальной фиксации потенциала Axon (Molecular Devices, США). Протоколы фиксации потенциала и сбор данных выполнялись с помощью программного обеспечения pCLAMP (Axon Instruments). Раствор ванны содержал (мМ) 150 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 Na-HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) и 5 глюкозы (pH 7,4). Раствор для пипетки содержал (в мМ) 120 CsF, 10 CsCl, 10 NaCl, 5 EGTA (этиленгликоль-бис-(β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота) и 5 Cs-HEPES (pH 7,2). Пэтч-пипетки, изготовленные из стекла Corning 7052 (King Glass, США), имели сопротивление от 1 до 3 МОм. Частичная компенсация емкостных токов проводилась по схеме усилителя. Для анализа учитывались только данные, полученные для ячеек с последовательными ошибками сопротивления <5 мВ. После прорыва мембранного слоя испытательный импульс длительностью 25 мс до -20 мВ от исходного потенциала (ИП) в -120 мВ подавался на ячейку с низкой частотой до стабилизации амплитуды и кинетики INa (обычно 5 мин). Сафинамид солибилизировали до конечной концентрации в растворе ванны с добавлением 0,2% ДМСО. Фиксированную клетку подвергали воздействию непрерывного потока контрольного раствора или раствора с добавлением лекарственного средства. В каждой ячейке тестировали максимум две концентрации лекарственного средства, чтобы минимизировать возможное смещение из-за замедления натриевого тока. Из-за известного спонтанного сдвига зависимости потенциала во время экспериментов с целыми клетками, большое внимание было уделено выполнению различных протоколов с соблюдением постоянной последовательности, чтобы можно было проводить сравнение между клетками.

Ингибирование каналов $hNa_v1.4$ сафинамидом оценивали путем измерения снижения INa, вызванного исходным потенциалом (ИП) от -120 до -30 мВ при частотной стимуляции 0,1 и 10 Гц. Кривые концентрация-ответ сафинамида получали путем получения амплитуды пикового тока, измеренной в присутствии лекарства (ЛКРСТ), нормализованной к амплитуде пикового тока, измеренной в той же ячейке перед нанесением лекарства (КНТРЛ), как функции от концентрации лекарства [ЛКРСТ]. Кривые "концентрация-ответ" были адаптированы с применением функции связывания первого порядка:

$$\text{ЛКРСТ/КНТРЛ} = 1 / \{1 + ([\text{ЛКРСТ}]/\text{IC}_{50})^n\}$$

где IC_{50} - представляет собой половину максимальной ингибирующей концентрации, а n - угловой коэффициент.

Значения IC_{50} определяли при мембранном потенциале покоя (тонический блок: -120 мВ при 0,1 Гц) и после повторяющихся деполяризующих импульсов до -20 мВ при 10 Гц (применение и частотно-зависимый блок). Ожидается, что соединение, способное блокировать натриевые каналы в зависимости от использования и частоты, уменьшит аномальную активность, но не повлияет на нормальную активность мышечных волокон.

В таблице показаны эффекты сафинамида *in vitro* на миотонический мутантный тип натриевого канала $Na_v1.4$ человека в трансфицированных клеточных линиях. Результаты были выражены в виде значений $\text{IC}_{50} \pm$ стандартная ошибка соответствия (SE).

Влияние сафинамида на миотонический мутантный тип натриевого канала $Na_v1.4$ человека в линии трансфицированных клеток

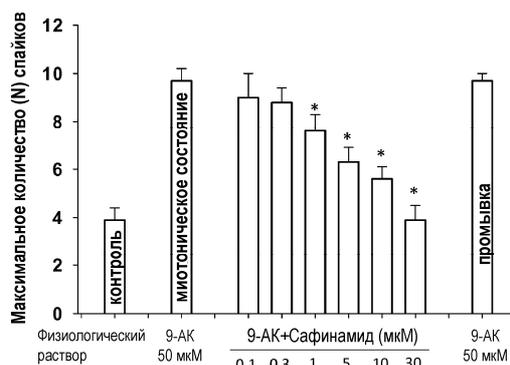
Мутация канала $hNa_v1.4$	$\text{IC}_{50} \pm \sigma$ (мкМ) Тонический блок при 0.1 Гц	$\text{IC}_{50} \pm \sigma$ (мкМ) Блок, зависящий от частоты и от частоты использования при 10 Гц
Не мутантный тип канала $hNa_v1.4$	160±18	33±4
P1158L	148±13	34±3
V1293I	171±19	47±5
F1298C	173±12	83±2
I1310N	170±26	46±7

Результаты, представленные в таблице, демонстрируют, что выбранные мутации не оказали значи-

тельного влияния на активность сафинамида (IC_{50}) на обеих частотах (0,1 и 10 Гц), поскольку значения IC_{50} были того же порядка величины, что и для не мутантного типа. Носители мутаций в канале $hNa_v1.4$ могут получить больше преимуществ от сафинамида, чем от препаратов, используемых в настоящее время. Эти результаты открывают путь к терапии миотонических расстройств, основанной на мутациях.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение сафинамида или его фармацевтически приемлемой соли для лечения миотонических расстройств, где миотоническое нарушение представляет собой недистрофическую миотонию.
2. Применение по п.1, где недистрофическая миотония является врожденной миотонией.
3. Применение по п.1, где недистрофическая миотония представляет собой миотонию по натриевому или хлоридному каналу.
4. Применение по п.3, где указанным натриевым каналом является $hNa_v1.4$.
5. Применение по п.2, где врожденная миотония представляет собой врожденную миотонию Томсена или врожденную миотонию Беккера.
6. Применение согласно любому из пп.2, 3, где миотония натриевых каналов представляет собой врожденную парамиотонию.
7. Применение согласно любому из пп.1-6 для облегчения одного или нескольких миотонических симптомов, связанных с миотоническими нарушениями, где миотоническое нарушение представляет собой недистрофическую миотонию.
8. Применение по п.7, где миотонические симптомы выбраны из группы, включающей жесткость скелетных мышц, спазм и боль.
9. Применение согласно любому из пп.1-8, где сафинамид находится в форме его метансульфонатной (мезилатной) соли.
10. Способ лечения миотонического нарушения, включающий введение сафинамида или его фармацевтически приемлемой соли, где миотоническое нарушение представляет собой недистрофическую миотонию и где суточная дозировка составляет от 5 до 500 мг в день, вводимая в виде однократной или разделенных доз.
11. Способ по п.10, где сафинамид вводят перорально или парентерально.
12. Способ по любому из пп.10, 11, где миотоническое нарушение представляет собой недистрофическую миотонию и где миотоническое нарушение является устойчивым к мексилетину.
13. Применение сафинамида для изготовления лекарственного средства для лечения миотонических расстройств или облегчения их симптомов, где миотоническое нарушение представляет собой недистрофическую миотонию.



Фиг. 1

