

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035678**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.07.24

(21) Номер заявки
201692017

(22) Дата подачи заявки
2015.04.08

(51) Int. Cl. *A61K 31/225* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07C 323/25 (2006.01)
C07D 281/18 (2006.01)
C07D 417/04 (2006.01)

(54) НОВЫЕ КЛЕТОЧНО-ПРОНИЦАЕМЫЕ СУКЦИНАТНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

(31) PA 2014 70190

(32) 2014.04.08

(33) DK

(43) 2017.02.28

(86) PCT/EP2015/057606

(87) WO 2015/155231 2015.10.15

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**НЬЮРОУВИВ ФАРМАСЬЮТИКАЛ
АБ (SE)**

(72) Изобретатель:
**Элмер Эскил, Ханссон Магнус
Йоаким, Эингер Карл Хенрик
Йоханнес (SE), Мосс Стивен (GB)**

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

(56) WO-A2-0228345

WO-A1-9747584

MOORE A. ET AL.: "Model reactions for CoA transferase involving thiol transfer. Anhydride formation from thiol esters and carboxylic acids.", J. BIOL. CHEM, vol. 257, 1 January 1982 (1982-01-01), pages 10882-10892, XP055131373, the first compound; table IV

(57) Изобретение предоставляет новые клеточно-проницаемые сукцинаты и клеточно-проницаемые предшественники сукцината, направленные на увеличение производства АТФ в митохондриях. Основная часть производимой АТФ и используемой в эукариотической клетке создается при митохондриальном окислительном фосфорилировании процесса, по которому высокоэнергетические электроны предоставляются циклом Кребса. Не все полупродукты цикла Кребса являются легко проницаемыми для клеточной мембраны, одним из них является сукцинат. Предоставление новых клеточно-проницаемых сукцинатов предусмотрено для обеспечения возможности их проникновения через клеточную мембрану, и такие клеточно-проницаемые сукцинаты могут быть использованы для усиления эффекта производства АТФ, относящегося к митохондриям.

B1

035678

035678

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новым клеточно-проницаемым сукцинатам и клеточно-проницаемым предшественникам сукцината, направленным на увеличение продуцирования АТФ в митохондриях. Основная часть АТФ, продуцируемая и используемая в эукариотической клетке, поступает от относящегося к митохондриям окислительного фосфорилирования процесса, по которому высокоэнергетические электроны предоставляются циклом Кребса. Не все полупродукты цикла Кребса являются легко проницаемыми для клеточной мембраны, одним из них является сукцинат. Предоставление новых клеточно-проницаемых сукцинатов предусматривается для того, чтобы обеспечить проникновение через клеточную мембрану, и такие клеточно-проницаемые сукцинаты могут быть использованы для усиления продуцирования АТФ, относящегося к митохондриям.

Кроме того, настоящее изобретение также предоставляет клеточно-проницаемые сукцинаты или эквиваленты сукцинатов, которые помимо того, что являются клеточно-проницаемыми и высвобождаемыми в цитозоль сукцинатами, потенциально также могут обеспечивать организм дополнительной энергией при помощи гидролитических продуктов, являющихся результатом либо химического или ферментативного гидролиза сукцинатных производных.

Настоящее изобретение также предоставляет способы получения соединений по изобретению, которые обладают улучшенными свойствами для применения в медицине и/или в косметологии. Особенно соединения по настоящему изобретению полезны при предупреждении или лечении связанных с митохондриями заболеваний, в поддержании нормальной митохондриальной функции, усилении митохондриальной функции, т.е. продуцировании АТФ больше, чем обычно, или в восстановлении нарушений в митохондриальной дыхательной системе.

Предпосылки создания изобретения

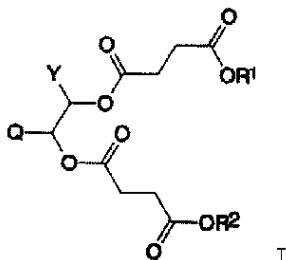
Митохондрии являются органеллами эукариотических клеток. Они генерируют большую часть снабжения клеток аденозинтрифосфатом (АТФ), который используется в качестве источника энергии. Таким образом, митохондрии необходимы для производства энергии, для выживания эукариотических клеток и для правильного функционирования клеток. В дополнение к снабжению энергией митохондрии участвуют в ряде других процессов, таких как клеточная передача сигналов, клеточная дифференцировка, смерть клеток, а также контроль клеточного цикла и роста клеток. В частности, митохондрии играют ключевую роль в регулировании апоптоза клеток, а также они играют важную роль в нескольких формах неапоптозной смерти клеток, такой как некроз.

В последние годы были опубликованы многочисленные документы, описывающие вклад митохондрий в различные заболевания. Некоторые заболевания могут быть вызваны мутациями или делециями в митохондриальном или ядерном геноме, в то время как другие могут быть вызваны первичной или вторичной недостаточностью митохондриальной дыхательной системы или другими механизмами, относящимися к митохондриальной дисфункции. В настоящее время нет доступного лечения, которое может вылечить митохондриальные заболевания.

С учетом признания важности сохранения или восстановления нормальной митохондриальной функции или расширения производства энергии клеток (АТФ) существует необходимость в разработке соединений, которые обладают следующими свойствами: клеточной проницаемостью первичного источника, способностью освобождать внутриклеточный сукцинат или предшественник сукцината, низкой токсичностью первичного соединения и высвобождаемых продуктов и физико-химическими свойствами, согласующимися с введением пациенту.

Сукцинатные соединения были получены в качестве пролекарств других активных средств, например, в WO 2002/28345 описан бис(2,2-диметилпропионил оксиметил) эфир янтарной кислоты, дибутирилоксиметил эфир янтарной кислоты и бис(1-бутирилоксиэтил) эфир янтарной кислоты. Эти соединения получены в качестве средств для освобождения от формальдегида и направлены на различные медицинские цели для существующих в настоящее время соединений.

Соединения предшествующего уровня техники включают соединения WO 9747584, в котором описан ряд полиолсукцинатов



В приведенном там примере Y представляет собой H или алкильную группу. Каждое сукцинатное соединение содержит несколько сукцинатных остатков, связанных группой структуры C(Y)-C(Q), и каждый сложный эфир кислоты поэтому непосредственно связан с остатком, содержащим минимум два атома углерода в форме этильной группы O-C-C. Каждое описываемое соединение содержит более одной

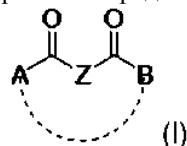
сукцинатных групп, и остаток сукцината не защищен группой типа O-C-X, где X представляет собой гетероатом.

В данной области техники известны различные сложные эфиры сукцинатных соединений. Диметилсукцинат, монометилсукцинат и диметилсукцинат показаны в иллюстративных анализах ниже как неактивные и не входят в объем настоящего изобретения.

Кроме того, патент США 5871755 относится к дегидроаланиновым производным сукцинамидов, используемых в качестве средств против окислительного стресса и для косметических целей.

Описание изобретения

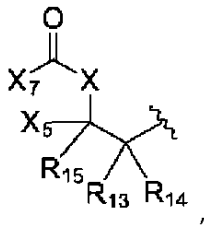
Соединение согласно настоящему изобретению представлено формулой (I)



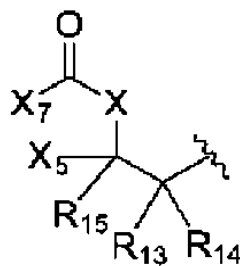
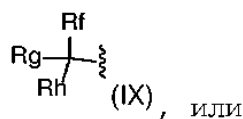
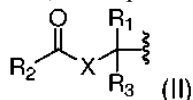
или его фармацевтически приемлемой солью, где пунктирная связь между A и B обозначает необязательную связь с возможностью формирования закрытой кольцевой структуры, и где

Z представляет собой $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$,

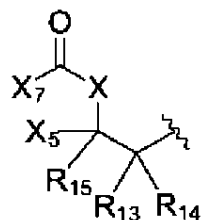
A представляет собой $-\text{SR}$, где R представляет собой



В представляет собой $-\text{O}-\text{R}'$, $-\text{SR}''$ или $-\text{OH}$; и R' представляет собой формулу



R'' представляет собой формулу ниже



R₁ представляет собой H, Me, Et, пропил, изопропил, бутил, изобутил, O-C₁₋₁₀-алкил, N-C₁₋₁₀-алкил, X-C₁₋₁₀-ацил, CH₂X-C₁₋₁₀-алкил, CH₂X-C₁₋₁₀-ацил, F, CH₂COOH, CH₂CO₂C₁₋₁₀-алкил,

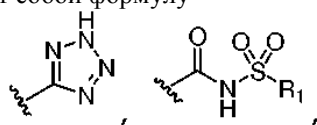
R₃ представляет собой H, Me, Et, пропил, изопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, O-C₁₋₁₀-алкил, N-C₁₋₁₀-алкил, X-C₁₋₁₀-ацил, CH₂X-C₁₋₁₀-алкил, CH₂X-C₁₋₁₀-ацил, F, CH₂COOH, CH₂CO₂C₁₋₁₀-алкил,

X представляет собой O, NH, S,

R₂ представляет собой Me, Et, пропил, изопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, C(O)CH₃, C(O)CH₂C(O)CH₃, C(O)CH₂CH(OH)CH₃,

R₆ представляет собой H, Me, Et, пропил, изопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, ацетил, пропионил, бензоил или формулу (II),

X₅ представляет собой -H, Me, Et, пропил, изопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, -COOH, -C(=O)XR₆, CONR₁R₃ или представляет собой формулу



X₇ представляет собой R₁ или -NR₁R₃,

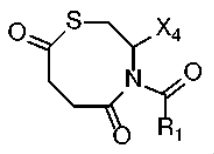
R₉ представляет собой H, Me, Et или O₂CCH₂CH₂COXR₈,

R₈ представляет собой H, Me, Et, пропил, изопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, ацетил, пропионил, бензоил или формулу (II),

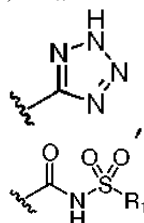
R₁₃, R₁₄ и R₁₅ независимо являются одинаковыми или различными и представляют собой H, Me, Et, пропил, изопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, -COOH, O-C₁₋₁₀-алкил, N-C₁₋₁₀-алкил, X-C₁₋₁₀-ацил, CH₂X-C₁₋₁₀-алкил,

R_f, R_g и R_h независимо являются одинаковыми или различными и представляют собой X-C₁₋₁₀-ацил, -CH₂X-C₁₋₁₀-алкил, -CH₂X-C₁₋₁₀-ацила и R₉,

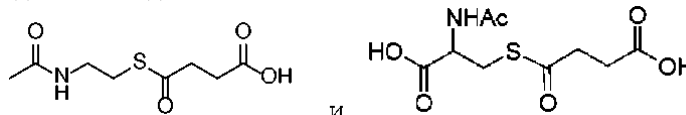
и когда пунктирная связь между А и В присутствует, соединение, соответствующее формуле (I), представлено как



где X₄ представляет собой -COOH, -C(=O)XR₆,



при условии, что данным соединением не является

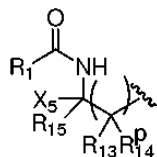


Соединения формулы (I) (и любые их фармацевтически приемлемые соли) в настоящем описании названы как "соединение по настоящему изобретению", "соединения по настоящему изобретению" или как "соединения настоящего изобретения".

Особый интерес представляют такие соединения по настоящему изобретению, где Z представляет собой -CH₂CH₂-, и А представляет собой -SR.

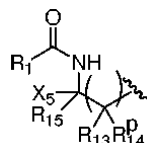
Особый интерес представляют такие соединения по настоящему изобретению, где Z представляет собой -CH₂CH₂-, А представляет собой SR, и В представляет собой OH или В представляет собой SR^{'''}.

Особый интерес представляют такие соединения по настоящему изобретению, где Z представляет собой -CH₂CH₂-, А представляет собой SR, В представляет собой OH или В представляет собой SR^{'''}, где R^{'''} представляет собой

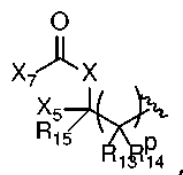


Особый интерес представляют такие соединения по настоящему изобретению, где Z представляет собой -CH₂CH₂-, А представляет собой SR и В представляет собой OH.

Особый интерес представляют такие соединения по настоящему изобретению, где Z представляет собой -CH₂CH₂-, А представляет собой SR, В представляет собой OH или В представляет собой SR, где R представляет собой

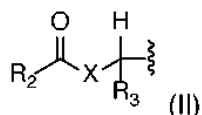


Особый интерес представляют такие соединения по настоящему изобретению, где Z представляет собой -CH₂CH₂-, А представляет собой NR, В представляет собой OH и R представляет собой

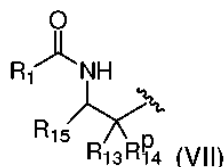


и X представляет собой S.

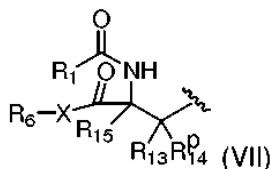
Предпочтительно, и что касается формулы (II), по меньшей мере один из R₁ и R₃ представляет собой -H, так что формула (II) представлена



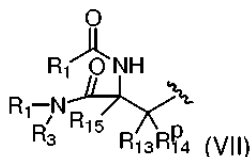
Предпочтительно, и что касается формулы (VII), р равен 1, и X₅ представляет собой -H, так что формула (VII) представлена



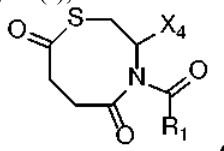
Предпочтительно, и что касается формулы (VII), р равен 1, и X₅ представляет собой COXR₆, так что формула (VII) представлена



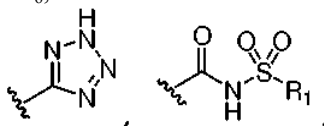
Предпочтительно, и что касается формулы (VII), р равен 1, и X₅ представляет собой CONR₁R₃, так что формула (VII) представлена



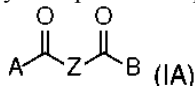
Соединение, соответствующее формуле (I), может быть представлено формулой



где X₄ выбран из -COOH, -C(=O)XR₆,



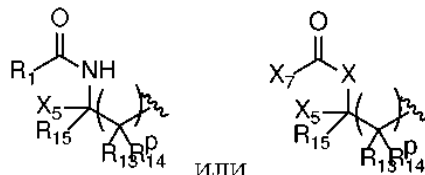
В частности, соединение по настоящему изобретению представлено формулой (IA)



или его фармацевтически приемлемая соль, где

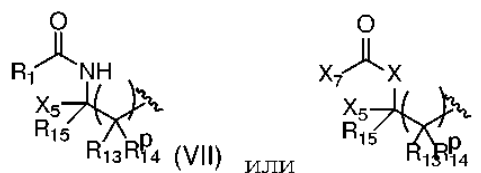
Z представляет собой -CH₂-CH₂-,

A выбран из -SR', и R' представляет собой



B выбран из -O-R', -SR''' или -OH; и

R' и R''' независимо являются одинаковыми или различными и выбраны из одной из формул ниже



R_1 и R_3 независимо являются одинаковыми или различными и выбраны из H, Me, Et, пропила, O-Me, O-Et, O-пропила, X выбран из O, NH, S,

r представляет целое число и равен 1,

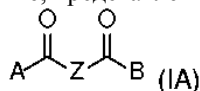
R_6 выбран из H, Me, Et,

X_5 выбран из -H, Me, Et, -COOH, -C(=O)XR₆, CONR₁R₃,

X_7 выбран из R_1 , -NR₁R₃,

R_{13} , R_{14} и R_{15} независимо являются одинаковыми или различными и выбраны из H, Me, Et, пропила, изопропила, бутила, изобутила, трет-бутила, -COOH, O-ацила, O-алкила, N-ацила, N-алкила, X-ацила, CH₂X-алкила, где алкил и ацил являются такими, как определено выше.

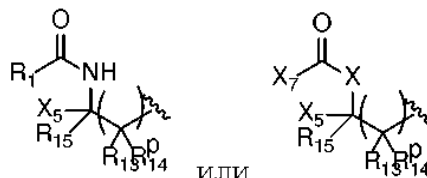
Особый интерес представляет соединение, представленное формулой (IA)



или его фармацевтически приемлемая соль, где

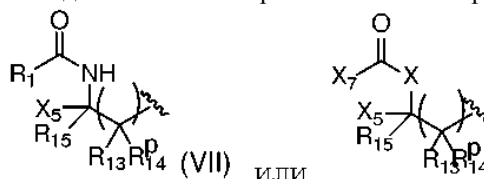
Z представляет собой -CH₂-CH₂-,

A выбран из -SR и R представляет собой



B выбран из -O-R', -SR''' или -OH; и

R' и R''' независимо являются одинаковыми или различными и выбраны из одной из формул ниже



R_1 и R_3 независимо являются одинаковыми или различными и выбраны из H, Me, Et, пропила, O-Me, O-Et, O-пропила,

X выбран из O, NH, S,

r представляет целое число и равен 1,

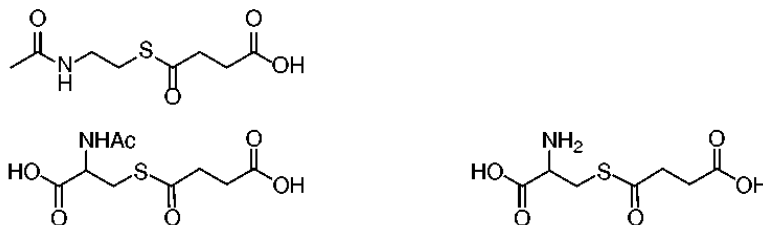
R_6 выбран из H, Me, Et,

X_5 выбран из -H, Me, Et, -COOH, -C(=O)OR₆, CONR₁R₃,

X_7 выбран из R_1 , -NR₁R₃,

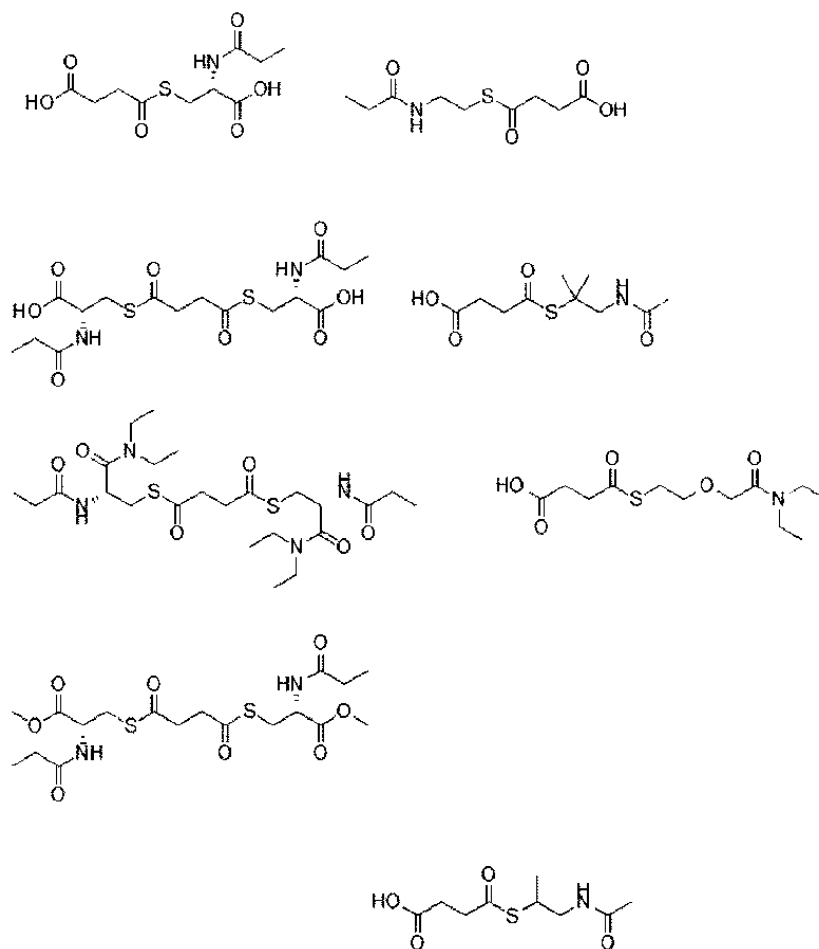
R_{13} , R_{14} и R_{15} независимо являются одинаковыми или различными и выбраны из H, Me, Et, -COOH.

Следующие соединения являются известными из Moore et al. J. Biol. Chem., 1982, 257, pp. 10882-10892:



Однако настоящее изобретение может включать или нет эти соединения в применении при лечении относящихся к митохондриальным заболеваний, как обсуждено в данном описании, или при изготовлении медицинских средств для/при лечении относящихся к митохондриальным заболеваний, как обсуждено в данном описании.

Конкретными соединениями, согласно настоящему изобретению, являются



Общие химические методы

Специалисту в данной области техники будет очевидно, что соединения по настоящему изобретению могут быть получены различными путями по известным методикам. Пути, приведенные ниже, являются только иллюстрацией некоторых методик, которые могут быть использованы для синтеза соединений формулы (I).

Соединения по настоящему изобретению можно получить, исходя из янтарной кислоты, монозамещенной янтарной кислоты, моноактивированной янтарной кислоты, монозащищенной метилмалоновой кислоты или моноактивированной метилмалоновой кислоты.

Защитные группы включают, но не ограничиваясь ими, бензил и трет-бутил. Другие защитные группы для карбониллов и их удаление подробно описаны в 'Greene's Protective Groups in Organic Synthesis' (Wuts and Greene, Wiley, 2006). Защитные группы могут быть удалены способами, известными специалистам в данной области техники, включающими гидрирование в присутствии гетерогенного катализатора для сложных бензиловых эфиров и обработку органическими или неорганическими кислотами, предпочтительно трифторуксусной кислотой или разбавленной HCl, для сложных трет-бутиловых эфиров.

Активирующие группы включают, но не ограничиваясь ими, смешанные ангидриды и ацилхлориды.

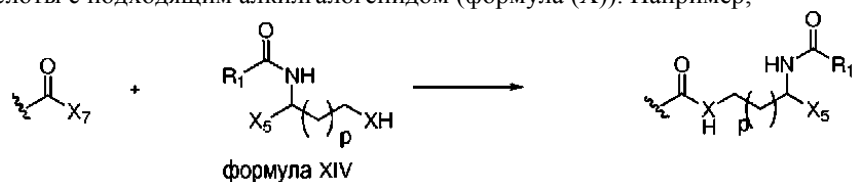
Таким образом, чтобы соединения формулы (I) были симметричными, выбирают симметричные исходные вещества. Выбирают либо симметричную дикарбоновую кислоту, либо деактивированную карбоновую кислоту. Предпочтительно выбранным соединением является янтарная кислота или сукцинилхлорид.

Когда соединение формулы (I) является асимметричным, тогда выбранное исходное вещество является асимметричным. Что включает "кислоту-защищенную кислоту", "кислоту-активированную кислоту" и "защищенную кислоту-активированную кислоту". Предпочтительно включает монобензиловый эфир янтарной кислоты, моно-трет-бутиловый эфир янтарной кислоты, 4-хлор-4-оксомаляновую кислоту.

Альтернативно, для асимметричного соединения формулы (I) выбирают симметричное исходное соединение, предпочтительно янтарную кислоту, и используют исходное вещество, образующее несущественное количество производных.

Следующие общие методики не являются исчерпывающими, и специалисту в данной области техники будет очевидно, что можно применять другие методики для получения соединений по настоящему изобретению. Данные методики можно применять совместно или по отдельности.

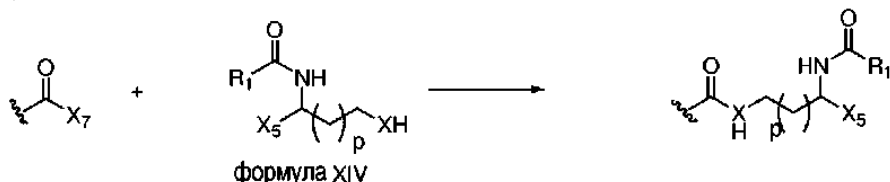
Соединения формулы (I), которые включают формулу (II), можно получить путем взаимодействия карбоновой кислоты с подходящим алкилгалогенидом (формула (X)). Например,



где Hal представляет галоген (например, F, Cl, Br или I) и R_1 , R_2 и R_3 являются такими, как определено в формуле (II). Данное взаимодействие может быть удобно осуществлено в растворителе, таком как дихлорметан, ацетон, ацетонитрил или N,N-диметилформамид, с подходящим основанием, таким как триэтиламин, диизопропилэтиламин или карбонат цезия, при температуре, например, в интервале от -10°C до 80°C , предпочтительно при комнатной температуре. Данное взаимодействие может быть осуществлено с необязательными добавками, такими как йодид натрия или тетраалкиламмонийгалогениды (например, тетрабутиламмониййодид).

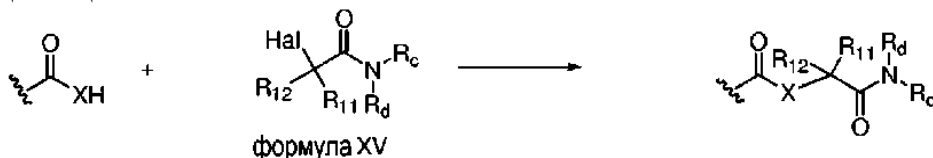
Соединения формулы X или являются коммерчески доступными, или могут быть удобно получены литературными способами, такими как указано в Journal of the American Chemical Society, 43, 660-7; 1921, или Journal of medicinal chemistry (1992), 35(4), 687-94.

Соединения формулы (I), которые включают формулу (VII), можно получить путем взаимодействия активированной карбоновой кислоты с соединением формулы XIV, необязательно в присутствии активирующих веществ



где X_5 и R_1 являются такими, как определено в формуле (VII), и X_7 представляет собой Hal (Cl, F, Br) или смешанный ангидрид. Предпочтительно X_7 является Cl. Данное взаимодействие может быть удобно осуществлено в растворителе, таком как дихлорметан, ацетон, ТГФ, ацетонитрил или N,N-диметилформамид, с подходящим основанием, таким как триэтиламин, диизопропилэтиламин или карбонат цезия, при температуре, например, в интервале от -10°C до 80°C , предпочтительно при комнатной температуре.

Соединения формулы (I), которые включают формулу (VIII), можно получить путем взаимодействия активированной карбоновой кислоты с соединением формулы XIV, необязательно в присутствии активирующих веществ



где Hal представляет галоген (например, F, Cl, Br или I), и R_{11} , R_{12} и R_c и R_d являются такими, как определено в формуле (VIII). Данное взаимодействие может быть удобно осуществлено в растворителе, таком как дихлорметан, ацетон, ацетонитрил или N,N-диметилформамид, с подходящим основанием, таким как триэтиламин, диизопропилэтиламин или карбонат цезия, при температуре, например, в интервале от -10°C до 80°C , предпочтительно при 80°C . Данное взаимодействие может быть осуществлено с необязательными добавками, такими как йодид натрия или тетраалкиламмонийгалогениды (например, тетрабутиламмониййодид).

Соединения формулы (X) или являются коммерчески доступными или могут быть удобно получены литературными способами, в которых амин подвергают взаимодействию с ацилхлоридом.

Соединения формулы (I), которые включают формулу (IX), можно получить комбинацией способов, описанных выше, и другими способами, известными специалистам в данной области техники.

Общее применение соединений по настоящему изобретению

Соединения, как описано в данном описании, могут быть использованы в медицине или в косметологии или при изготовлении композиций для такого применения. Такое медицинское средство может быть использовано в любых случаях, где требуется усиление или восстановление производства энергии (АТФ), таких как при лечении метаболических заболеваний или при лечении заболеваний или состояний митохондриальной дисфункции, лечения или подавлении митохондриальных расстройств. Данные соединения могут применяться для стимуляции производства митохондриальной активности и при восстановлении вызванной лекарственным средством митохондриальной дисфункции, такой как, например, сенсорно-неврическая потеря слуха или звон в ушах (побочный эффект от некоторых антибиотиков из-за митохондриальной токсичности) или лактоацидоз. Данные соединения могут применяться при лечении

рака, диабета, острого голода, эндотоксемии, сепсиса, синдрома системного воспалительного ответа, синдрома множественной дисфункции органов и последующей гипоксии, ишемии, удара, инфаркта миокарда, острой ангины, острой почечной недостаточности, окклюзии коронарных сосудов и фибрилляции предсердий или для избегания или противодействия реперфузионному повреждению. Кроме того, предполагается, что соединения по настоящему изобретению могут быть полезны при лечении мужского бесплодия.

Предполагается, что соединения по настоящему изобретению будут обеспечивать клеточно-проницаемые предшественники компонентов цикла Кребса и необязательно пути гликолиза. Предполагается, что после вхождения в клетку, ферментный или химический гидролиз будет высвобождать сукцинат или метилмалонат необязательно наряду с другими энергоснабжающими веществами, такими как ацетат и глюкоза.

Соединения по настоящему изобретению могут быть использованы для усиления или восстановления производства энергии в митохондриях. В частности, данные соединения могут быть использованы в медицине или в косметологии. Данные соединения могут быть использованы при предупреждении или лечении расстройств или заболеваний, имеющих компонент, связанный с митохондриальной дисфункцией, и/или компонент энергетического дефицита (АТФ).

Усиление производства энергии происходит, например, у субъектов, страдающих митохондриальным нарушением, расстройством или заболеванием. Митохондриальные заболевания возникают в результате дисфункции митохондрий, которые являются специализированными компартментами, присутствующими в каждой клетке организма, кроме красных кровяных телец. При ослаблении митохондриальной функции, снижается энергия внутри клетки и приводит к повреждению клетки или смерти клетки. Если этот процесс повторяется по всему организму, жизни субъекта серьезно угрожает опасность.

Заболевание митохондрий чаще всего появляется в органах, требующих сильных энергетических затрат, таких как сетчатка, ушная улитка, мозг, сердце, печень, скелетные мышцы, почки и эндокринная и дыхательная системы.

Симптомы митохондриального заболевания могут включать потерю двигательного контроля, мышечную слабость и боль, судороги, зрительные/слуховые проблемы, сердечно-сосудистые заболевания, заболевания печени, желудочно-кишечные расстройства, глотательные трудности и многое другое.

Митохондриальные болезни могут быть наследственными или вызванными спонтанными мутациями, которые приводят к изменению функции белков или молекул РНК, обычно находящихся в митохондриях.

Было обнаружено, что многие болезни включают митохондриальную недостаточность, такую как дефицит комплекса I, II, III и IV или дефицит фермента, подобно дефициту пирувата дегидрогеназы. Однако данная картина является комплексной, и в эти заболевания вовлечены многие факторы.

До сих пор нет доступных терапевтических методов лечения. Доступными методами лечения являются только такие, которые могут облегчить симптомы и задержать прогрессирование заболевания.

Таким образом, выводы настоящих авторов и описанное в настоящем изобретении является очень важным, поскольку они демонстрируют благотворное влияние клеточно-проницаемых соединений янтарной кислоты на производство энергии в митохондриях.

Кроме того, по сравнению с известными сукцинатными пролекарствами (такими как, например, указано в WO 97/47584), они проявляют улучшенные свойства при лечении указанных выше и связанных с ними заболеваний, включающие улучшенную клеточную проницаемость, более длительный период полувыведения из плазмы, уменьшенную токсичность, увеличенный выход энергии в митохондриях и улучшенное формулирование (в связи с улучшенными свойствами, включая повышенную растворимость). В некоторых случаях данные соединения также являются биодоступными перорально, что позволяет упростить введение.

Таким образом, предпочтительные свойства соединений по настоящему изобретению могут включать одно или несколько из следующих:

- увеличенную клеточную проницаемость,
- длительный период полувыведения из плазмы,
- сниженную токсичность,
- увеличенный выход энергии в митохондриях,
- улучшенное формулирование,
- повышенную растворимость,
- повышенную пероральную биодоступность.

Настоящее изобретение предоставляет соединение по настоящему изобретению для применения в качестве фармацевтического средства, в частности, при лечении дефицита клеточной энергии (АТФ).

Соединения по настоящему изобретению могут применяться при лечении недостаточности комплекса I, либо дисфункции комплекса самого по себе, или любого состояния или заболевания, при котором ограничивается поступление NADH к комплексу I, например дисфункции цикла Кребса, гликолиза, β-окисления, метаболизма пирувата и даже транспорта глюкозы или других, связанных с комплексом I субстратов.

Настоящее изобретение также предоставляет способ лечения относящихся к комплексу I митохондриальных заболеваний, таких как, но не ограничиваясь ими, синдром Лейга, наследственная оптическая нейропатия Лебера (LHON), MELAS (митохондриальная энцефаломиопатия, лактоацидоз и инсультоподобные явления) и MERRF (миоклоническая эпилепсия с 'рваными' красными волокнами), включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также предоставляет применение соединения по настоящему изобретению при изготовлении медицинских средств для лечения вызванного лекарственным средством лактоацидоза.

Соединение по настоящему изобретению также может быть полезно в любых условиях, где продуцирование дополнительной энергии потенциально будет полезным, например, но не ограничиваясь ими, при длительной хирургии и интенсивной терапии.

Митохондрии.

Митохондрии представляют собой органеллы в эукариотических клетках, так называемая "электростанция" клеток. Одной из их основных функций является окислительное фосфорилирование. Молекулы аденозинтрифосфата (АТФ) функционируют в качестве энергетического "средства обращения" или энергоносителя в клетке, и эукариотические клетки производят большую часть АТФ от их биохимических процессов, осуществляемых митохондриями. Такие биохимические процессы включают цикл лимонной кислоты (цикл трикарбоновой кислоты или цикл Кребса), по которому генерируется восстановленный никотинамид-аденин-динуклеотид (NADH) из окисленного никотинамид-аденин-динуклеотида (NAD⁺) и восстановленный флаavin-аденин-динуклеотид (FADH₂) из окисленного флаavin-аденин-динуклеотида (FAD), а также окислительное фосфорилирование, во время которого NADH и FADH₂ окисляются назад в NAD⁺ и FAD.

Движение выпущенных при окислении NADH электронов между серийными белковыми комплексами (комплексом I, комплексом II, комплексом III и комплексом IV) известно как дыхательная цепь. Окисление сукцината происходит на комплексе II (сукцинатдегидрогеназный комплекс), и FAD представляет собой простетическую группу в ферментном комплексе сукцинат-дегидрогеназа (комплекс II). Дыхательные комплексы внедряются во внутреннюю мембрану митохондрий. Комплекс IV в конце цепи передает электроны кислорода, который восстанавливается до воды. Энергия, выделяемая в виде этих электронов, двигающихся сквозь комплексы, используется для создания протонного градиента через внутреннюю мембрану митохондрий, который создает электрохимический потенциал через внутреннюю мембрану. Другой белковый комплекс, комплекс V (который напрямую не связан с комплексами I, II, III и IV), использует энергию, запасенную электрохимическим градиентом для преобразования ADP в АТФ.

Цикл лимонной кислоты и окислительное фосфорилирование предшествуют гликолизу, в котором молекулы глюкозы разбиваются на две молекулы пирувата с образованием в результате двух молекул АТФ на молекулу глюкозы. Молекулы пирувата затем вводятся в митохондрии, где они полностью окисляются до CO₂ и H₂O через окислительное фосфорилирование (общий процесс, называемый аэробным дыханием). Полное окисление двух молекул пирувата до диоксида углерода и воды дает по меньшей мере около 28-29 молекул АТФ, в добавление к 2 молекулам АТФ, генерированным путем преобразования глюкозы в две молекулы пирувата. Если нет кислорода, молекула пирувата не входит в митохондрии, а скорее преобразовывается в лактат в ходе процесса анаэробного дыхания.

Таким образом, общий чистый выход на молекулу глюкозы составляет приблизительно по меньшей мере 30-31 АТФ молекул. АТФ используется для питания, прямо или косвенно, почти всех других биохимических реакции в клетке. Таким образом, исключительно (приблизительно) по меньшей мере 28 или 29 молекул АТФ, способствовавших окислительному фосфорилированию во время аэробного дыхания, имеют решающее значение для надлежащего функционирования клетки. Недостаток кислорода препятствует аэробному дыханию и приводит, в конечном итоге, к гибели почти всех аэробных организмов; несколько организмов, таких как дрожжи, могут выживать, используя или аэробное, либо анаэробное дыхание.

Когда клетки в организме временно лишены кислорода, анаэробное дыхание используется до тех пор, пока кислород снова станет доступным, или клетка умирает. Пируват, генерированный во время гликолиза, преобразуется в лактат во время анаэробного дыхания. Накопление молочной кислоты считается ответственным за мышечную усталость во время периодов интенсивной активности, когда кислород не может поставляться в мышечные клетки. Когда кислород снова становится доступным, лактат преобразуется обратно в пируват для использования в окислительном фосфорилировании.

Митохондриальная дисфункция способствует различным болезненным состояниям. Некоторые митохондриальные заболевания возникают из-за мутаций или делеций в митохондриальном геноме или ядре. Если пороговое соотношение митохондрий в клетке нарушено, и если пороговое соотношение таких клеток в ткани имеют нарушенные митохондрии, это может вызвать симптомы дисфункции органов или тканей. Практически любая ткань может быть затронута и может присутствовать большое разнообразие симптомов в зависимости от степени их вовлеченности в этих различных тканях.

Применение соединений по настоящему изобретению

Соединения по настоящему изобретению могут применяться в любой ситуации, где требуется уси-

ление или возобновление производства энергии (АТФ). Примерами являются, например, все клинические состояния, где имеется потенциальная польза в увеличении относящегося к митохондриям производства АТФ или восстановлении митохондриальной функции, такие как восстановление митохондриальной дисфункции, вызванной лекарственным средством, или лактоацидоз, и при лечении рака, диабета, острого голода, эндотоксемии, сепсиса, восстановлении слуха и остроты зрения, синдрома системного воспалительного ответа и синдрома множественной дисфункции органов. Данные соединения также могут быть полезны при последующей гипоксии, ишемии, ударе, инфаркте миокарда, острой ангине, острой почечной недостаточности, окклюзии коронарных сосудов, фибрилляции предсердий и при предупреждении или ограничении реперфузионных повреждений.

В частности, соединения по настоящему изобретению могут быть использованы в медицине, особенно при лечении или предупреждении связанных с митохондриями состояний, заболеваний или расстройств, или в косметологии.

Дисфункция митохондрий также описана в отношении почечного трубчатого ацидоза; заболеваний двигательного нейрона; других неврологических заболеваний; эпилепсии; генетических заболеваний; болезни Гентингтона; расстройств настроения; шизофрении; биполярного расстройства; заболеваний, связанных с возрастом; церебрально-сосудистых осложнений, макулярной дегенерации; диабета; и рака.

Соединения по настоящему изобретению для применения при связанных с митохондриями расстройствах и заболеваниях.

Соединения по настоящему изобретению могут применяться при предупреждении или лечении связанных с митохондриями заболеваний, выбранных из таких как

болезнь Альперса (прогрессирующая полидистрофия мозга в детском возрасте),
амитотрофический боковой склероз (ALS),

аутизм,

синдром Барата (летальная детская кардиомиопатия),

нарушения β -окисления,

дефицит биоэнергетического метаболизма,

дефицит карнитин-ацил-карнитина,

дефицит карнитина,

синдромы дефицита креатина (синдромы церебрального дефицита карнитина (CCDS) включают дефицит гуанидиноацетат-метилтрансферазы (дефицит GAMT), дефицит L-аргинин:глицин-амидинотрансферазы (дефицит AGAT) и дефицит SLC6A8-креатинсвязанного транспортера (дефицит SLC6A8),

дефицит коэнзима Q10,

дефицит комплекса I (дефицит NADH-дегидрогеназы (NADH-CoQ редуктаза)),

дефицит комплекса II (дефицит сукцинат-дегидрогеназы),

дефицит комплекса III (дефицит убихинон-цитохром с оксидоредуктазы),

дефицит комплекса IV/дефицит COX (дефицит цитохром с оксидазы вызван нарушением в комплексе IV дыхательной цепи),

дефицит комплекс V (дефицит АТФ синтазы),

дефицит COX,

CPEO (синдром хронической внешней офтальмоплегии),

дефицит CPT I,

дефицит CPT II,

наследственная атаксия Фридрейха (FRDA или FA),

глутарацидурия типа II,

KSS (синдром Кирнса-Сейра),

лактоацидоз,

LCAD (дефицит длинноцепочечной ацил-CoA-дегидрогеназы),

LCHAD,

болезнь или синдром Лея (подострая некротическая энцефаломиелопатия),

LHON (наследственная оптическая нейропатия Лебера),

болезнь Люфта,

MCAD (дефицит среднецепочечной ацил-CoA-дегидрогеназы),

MELAS (митохондриальный энцефалопатический лактоацидоз и инсультоподобные явления),

MERRF (миоклоническая эпилепсия и болезнь разорванных красных волокон),

MIRAS (синдром митохондриальной рецессивной атаксии),

митохондриальная цитопатия,

митохондриальное истощение ДНК,

митохондриальная энцефалопатия включает энцефалопатию, энцефаломиелопатию,

митохондриальная миопатия,

MNGIE (мионейрогастроинтестинальное заболевание и энцефалопатия),

NARP (нейропатия, атаксия и пигментный ретинит),

нейродегенеративные заболевания, связанные с болезнью Паркинсона, Альцгеймера или Хантингтона,
 синдром Пирсона,
 дефицит пирувата карбоксилазы,
 дефицит пирувата дегидрогеназы,
 мутации POLG,
 недостаточность дыхательной цепи,
 SCAD (дефицит короткоцепочечной ацил-СоА-дегидрогеназы),
 SCHAD (дефицит короткоцепочечной L-3-гидроксиацил-СоА дегидрогеназы (SCHAD), также относится к дефициту 3-гидроксиацил СоА дегидрогеназа HADH,
 VLCAD (дефицит сверхдлинноцепочечной ацил-СоА-дегидрогеназы),
 диабет,
 острый голод,
 эндотоксемию,
 сепсис,
 синдром системного воспаленного ответа (SIRS),
 множественная полиорганная недостаточность.

Со ссылкой на информацию из веб-страницы Организации фонда митохондриальных болезней (www.umdf.org) некоторые из приведенных выше заболеваний рассматриваются более подробно следующим образом.

Дефицит комплекса I. Внутренний митохондрийон - группа белков, которые несут электроны в ходе четырех цепных реакций (комплексы I-IV), в результате производя энергию. Эта цепь называется транспортной цепью электронов. Пятая группа (комплекс V) выпускает АТФ. Вместе с транспортной цепью электронов и синтезом АТФ образуется дыхательная цепь, и весь процесс называется окислительным фосфорилированием или ОХРОС.

Комплекс I, первая ступень в этой цепи, является наиболее распространенным сайтом для митохондриальной аномалии, присутствующей в одной трети дефицитов дыхательной цепи. Часто присутствующим при рождении или в раннем детстве дефицитом комплекса I обычно является прогрессирующее нейродегенеративное расстройство, и он отвечает за разнообразие клинических симптомов, особенно в органах и тканях, которые требуют высоких уровней энергии, таких как мозг, сердце, печень и скелетные мышцы. Ряд конкретных митохондриальных расстройств, связанных с дефицитом комплекса I, включает наследственную оптическую нейропатию Лебера (LHON), MELAS, MERRF и синдром Лейга (LS). MELAS обозначает митохондриальную энцефаломиопатию, лактоацидоз и инсультоподобные явления, и MERRF обозначает миоклоническую эпилепсию с 'рваными' красными волокнами.

LHON характеризуется слепотой, которая происходит в среднем возрасте от 27 до 34 лет; слепота может развиваться в обоих глазах одновременно или последовательно (сначала в одном глазу развивается слепота, а затем в другом глазу спустя в среднем два месяца). Могут быть вызваны также другие симптомы, такие как сердечные аномалии и неврологические осложнения.

Существует три основных формы дефицита комплекса I:

- i) фатальное детское мультисистемное расстройство характеризуется плохим мышечным тонусом, лактоацидозом, задержкой развития, болезнью сердца и дыхательной недостаточностью;
- ii) миопатия (мышечная болезнь) - начиная с детства или взрослой жизни и характеризуется слабостью или непереносимостью к физическим нагрузкам;
- iii) митохондриальная энцефаломиопатия (мозговые и мышечные заболевания) - начиная с детства или взрослой жизни и с участием комбинаций переменных симптомов, которые могут включать: паралич мышц глаз, пигментную ретинопатию (изменения цвета сетчатки с потерей зрения), потерю слуха, сенсорную нейропатию (повреждение нерва с участием органов чувств), судороги, слабоумие, атаксию (ненормальная мышечная координация) и произвольные движения. Эта форма дефицита комплекса I может привести к синдрому Лейга и MELAS.

В большинстве случаев дефицит комплекса I является результатом аутосомно-рецессивного наследования (комбинация нарушения ядерных генов от матери и отца). Реже данное расстройство является матерински унаследованным или спорадическим, и генетическое нарушение находится в митохондриальной ДНК.

Лечение. Как и все митохондриальные заболевания, в настоящее время отсутствует лечение дефицита комплекса I. Различные методики, которые являются или нет эффективными, могут включать такие средства метаболической терапии, как рибофлавин, тиамин, биотин, коэнзим Q10, карнитин и кетогенная диета. Методы лечения детской мультисистемной формы были безуспешными.

Клинический курс и прогноз для пациентов с комплексом I сильно варьируется и может зависеть от специфического генетического нарушения, времени начала, вовлеченных органов и других факторов.

Дефицит комплекса III. Симптомы включают такие четыре основные формы как

- i) фатальная детская энцефаломиопатия, врожденный лактоацидоз, гипотония, дистрофическое застывание, припадки и кома. 'Рваные' красные волокна в мышечной ткани являются общими;

ii) энцефаломиопатия с момента начала (с детства к взрослой жизни): различные комбинации слабости, небольшого роста, атаксии, слабоумия, потери слуха, сенсорной нейропатии, пигментной ретинопатии и пирамидальные признаки. 'Рваные' красные волокна являются общими. Возможен лактоацидоз;

iii) миопатия, с непереносимостью к физическим нагрузкам, превращаемая в фиксированную слабость. 'Рваные' красные волокна являются общими. Возможен лактоацидоз;

iv) детская гистиоцитозидная кардиомиопатия.

Дефицит комплекса IV/дефицит COX. Симптомы включают две основные формы, такие как

1) энцефаломиопатия; обычно нормальная для первых 6-12 месяцев жизни и затем проявляется развитие регрессии, атаксии, лактоацидоза, атрофии зрительного нерва, офтальмоплегии, нистагма, дистонии, пирамидальных признаков и дыхательных проблем. Частые припадки. Может привести к синдрому Лейга;

2) миопатия; два варианта

1 - фатальная детская миопатия; может начинаться вскоре после рождения и сопровождается гипотонией, слабостью, лактоацидозом, 'рванными' красными волокнами, недостаточностью дыхания и проблемами с почками;

2 - начальная детская миопатия; может начинаться вскоре после рождения и сопровождается гипотонией, слабостью, лактоацидозом, 'рванными' красными волокнами, недостаточностью дыхания, но (если ребенок выживает) с последующим спонтанным улучшением.

KSS (синдром Кирнса-Сейра). KSS - это медленно прогрессирующая мультисистемная митохондриальная болезнь, которая часто начинается с опущения век (птоза). Другие мышцы глаза в конечном итоге тоже принимают участие, что приводит к параличу движения глаз. Дегенерация сетчатки обычно вызывает проблемы со зрением в тускло освещенной среде.

KSS характеризуется тремя основными признаками, такими как

обычное начало к 20 годам, хотя могут возникать в младенчестве или взрослой жизни,

паралич конкретных глазных мышц (называемый хронической прогрессирующей внешней офтальмоплегией - CPEO),

дегенерация сетчатки, вызывающая ненормальное накопление пигментного (цветного) вещества (пигментная ретинопатия).

Кроме того, присутствует одно или более из следующих состояний:

блокирование электрических сигналов в сердце (нарушение сердечной проводимости),

повышенный белок в спинномозговой жидкости,

нарушение движений (атаксия).

Пациенты с KSS также могут иметь проблемы, такие как глухота, деменция, дисфункция почек и мышечная слабость. Эндокринные нарушения, включающие замедление роста, низкорослость или диабет, также могут проявляться.

KSS является редким расстройством. Оно обычно вызвано одной большой делецией (удалением) генетического материала в ДНК митохондрии (мтДНК), а не в ДНК клеточного ядра. Эти делеции, которые насчитывают более 150 видов, обычно возникают спонтанно. Реже мутации передаются по материнской линии.

Как и для всех митохондриальных заболеваний, отсутствует какое-либо лечение для KSS.

Средства лечения основаны на типах симптомов и органов и могут включать коэнзим Q10, инсулин для диабета, сердечные препараты и кардиостимуляторы, которые могут спасти жизнь. Хирургическое вмешательство для опущенных век может рассматриваться, но должно проводиться специалистами в офтальмологических хирургических центрах.

KSS медленно прогрессирует, и прогноз варьируется в зависимости от тяжести. Смерть обычно случается в третьем или четвертом десятилетии и может произойти из-за системной недостаточности органов.

Болезнь или синдром Лея (подострая некротическая энцефаломиелопатия). Симптомы: судороги, гипотония, усталость, нистагм, слабые рефлексы, трудности при приеме пищи и глотании, проблемы с дыханием, плохая двигательная функция, атаксия. Причины: дефицит пирувата дегидрогеназы, дефицит комплекса I, дефицит комплекса II, дефицит комплекса IV/дефицит COX, NARP.

Болезнь Лея является прогрессирующим нейрометаболическим расстройством с общим началом в младенчестве или детстве, часто после вирусной инфекции, но может также возникать у подростков и взрослых. На МРТ характеризуется видимым некротическим поражением (мертвые или умирающие ткани) головного мозга, особенно в среднем мозге и стволе мозга.

Ребенок часто появляется нормальным при рождении, но, как правило, начинается проявление симптомов в течение нескольких месяцев до двух лет, хотя сроки возникновения могут быть гораздо раньше или позже. Начальные симптомы могут включать потерю основных навыков, таких как сосание, держание головы, хождение и разговорная функция. Они могут сопровождаться, наряду с другими проблемами, например раздражительностью, потерей аппетита, рвотой и судорогами. При этом могут возникать периоды резкого снижения или временного восстановления некоторых функций. В конце концов, у ребенка могут также возникнуть осложнения на сердце, почки, зрение и дыхание.

Существует более чем одно нарушение, которое вызывает болезнь Лея. К ним относятся дефицит пирувата дегидрогеназы (PDHC) и ферментные нарушения дыхательной цепи комплексов I, II, IV и V. В зависимости от нарушения режим наследования может являться X-связанной доминантой (нарушение на X-хромосоме, болезнь обычно возникает только у мужчин), аутосомно-рецессивным (наследовано от генов матери и отца) и материнской (только от матери). Там также могут возникать спонтанные случаи, которые вообще не наследуются.

Отсутствует какое-либо лечение болезни Лея. Лечение обычно включает вариации витамина и дополнительной терапии, часто в комбинации "коктейля" и являются только частично эффективными. Различные местные ресурсы включают возможное использование тиамина, коэнзима Q10, рибофлавина, биотина, креатина, сукцината и идебенона. Экспериментальные препараты, такие как дихлорацетат (DCA), также рассматриваются в некоторых клиниках. В некоторых случаях могут быть рекомендованы специальные диеты, что должно находиться под наблюдением диетолога, компетентного в метаболических расстройствах.

Прогноз для болезни Лея является неудовлетворительным. В зависимости от нарушения такие люди обычно живут в пределах от нескольких лет до среднего подросткового возраста. Пациенты с диагнозом подобно синдрому Лея, или у которых не проявляются симптомы до зрелого возраста, как правило, живут дольше.

MELAS (митохондриальный энцефаломиопатический лактоацидоз и инсультоподобные явления). Симптомы: низкорослость, судороги, удар, как эпизоды с сфокусированными неврологическими дефицитами, периодические головные боли, когнитивная регрессия, прогрессирование болезни, 'рваные' красные волокна. Причина: точечные митохондриальные мутации ДНК: A3243G (наиболее распространенная).

MELAS - митохондриальная миопатия (мышечная слабость), энцефалопатия (заболевание головного мозга и центральной нервной системы), лактоацидоз (наращивание продукта от анаэробного дыхания) и инсультоподобные явления (частичный паралич, частичная потеря зрения или другие неврологические отклонения от нормы).

MELAS - прогрессирующее нейродегенеративное расстройство с началом обычно в возрасте от 2 до 15 лет, хотя это может произойти в младенчестве или в зрелом возрасте. Первоначальные симптомы могут включать эпизодический удар, судороги, мигреневые головные боли и периодическую рвоту.

Обычно такой пациент появляется нормальным новорожденным, хотя обычно с низкорослостью. Менее распространенные симптомы проявляются на ранней стадии развития и могут включать задержку в развитии, обучении или расстройство дефицита внимания. Непереносимость к физическим нагрузкам, слабость конечностей, потеря слуха и диабет может также предшествовать возникновению инсультоподобных эпизодов.

Инсультоподобные эпизоды часто сопровождаются припадками, что является визитной карточкой симптомов MELAS, и вызывают частичный паралич, потерю зрения и фокальные неврологические нарушения. Постепенное совокупное воздействие этих эпизодов часто приводит к переменной комбинации к потере двигательных навыков (речи, движение и прием пищи), нарушению восприятия (потеря зрения и потеря ощущений тела) и психической недостаточности (деменция). Пациенты с MELAS могут также страдать дополнительными симптомами, включающими мышечную слабость, дисфункцию периферических нервов, диабет, потерю слуха, проблемы с сердцем и почками, и пищеварительными аномалиями. Молочная кислота обычно накапливается на высоком уровне в крови, спинно-мозговой жидкости или обоих.

MELAS наследуется по материнской линии из-за нарушения в ДНК митохондрий. Существует по меньшей мере 17 различных мутаций, которые могут вызвать MELAS. Наиболее распространенным является мутация A3243G, которая составляет около 80% случаев.

Отсутствует какое-либо лечение или специфическое лечение MELAS. Хотя клинические испытания не доказали свою эффективность, общее лечение может включать такие метаболические терапевтические средства, как CoQ10, креатин, филлохинон и другие витамины и добавки. Лекарственные средства, такие как противосудорожные средства и инсулин, могут потребоваться для дополнительного симптоматического лечения. Некоторым пациентам с мышечной дисфункцией можно помочь путем умеренных физических нагрузок под контролем. В некоторых случаях другие терапевтические средства, которые могут быть предписаны, включают дихлорацетат (DCA) и менадион, хотя они не являются обычно используемыми из-за их потенциальной возможности вредных побочных эффектов.

Прогноз для MELAS является слабым. Как правило, возраст возможной смерти составляет от 10 до 35 лет, хотя некоторые пациенты могут жить дольше. Смерть может наступить в результате резкого похудения из-за прогрессирующего слабоумия и мышечной слабости или от осложнений других пораженных органов, таких как сердце или почки.

MERRF является прогрессирующим мультисистемным синдромом, обычно начинающимся в детстве, но наступление может произойти в зрелом возрасте. Скорость прогрессии различается. Начало и выраженность симптомов могут различаться среди пострадавших родных братьев и сестер.

Классические признаки MERRF включают

миоклонус (иными словами, внезапное подергивание, мышечные спазмы) - наиболее характерный симптом,

эпилептические припадки,

атаксию (нарушение координации),

'рваные' красные волокна (характерная микроскопическая аномалия наблюдается в мышечной биопсии у пациентов с MERRF и другими митохондриальными расстройствами). Дополнительные симптомы могут включать потерю слуха, лактоацидоз (повышенный уровень молочной кислоты в крови), низкорослость, непереносимость физических нагрузок, деменция, сердечные нарушения, глазные аномалии и недостаточность речи.

Хотя несколько случаев MERRF являются спорадическими, большинство случаев наследуются по материнской линии из-за мутаций в митохондриях. Наиболее распространенной MERRF мутацией является A8344G, которая приходит в более чем 80% случаев. Сообщалось, что четыре другие митохондриальные мутации ДНК вызывают MERRF. В то время как мать передает свою MERRF мутацию всему своему потомству, у некоторых могут никогда не проявляться симптомы.

Как и у всех митохондриальных расстройств, отсутствует какое-либо лечение для MERRF. Терапевтические средства могут включать коэнзим Q10, L-карнитин и различные витамины, часто в комбинации "коктейль". Лечение припадков обычно требует противосудорожных препаратов. Назначение лекарственных средств для контроля за другими симптомами также может являться необходимым.

Прогноз MERRF варьируется в зависимости от наступившего возраста, типа и тяжести симптомов, вовлеченных органов и других факторов.

Митохондриальное истощение ДНК. Симптомы включают три основные формы, такие как

1) врожденная миопатия: неонатальная слабость, гипотония, требующая вспомогательной вентиляции легких, возможная почечная дисфункция, тяжелый лактоацидоз, видимые 'рваные' красные волокна. Смерть из-за дыхательной недостаточности обычно происходит до одного года;

2) детская миопатия: после нормального раннего развития до одного года появляется слабость и быстро ухудшается, вызывая дыхательную недостаточность и смерть, обычно в течение нескольких лет;

3) гепатопатия: увеличение печени и хроническая печеночная недостаточность, миопатия, тяжелый лактоацидоз. Смерть обычно наступает в течение первого года.

Наследственная атаксия Фридрейха.

Наследственная атаксия Фридрейха (FRDA или FA) аутосомно-рецессивное нейродегенеративное и кардиодегенеративное расстройство, вызванное снижением уровня белка фратаксина. Фратаксин имеет важное значение для самосборки железо-серных кластеров в комплексах митохондриальной дыхательной цепи. Оценки распространенности FRDA в Соединенных Штатах варьируются от 1 на 22000-29000 человек (см. www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/001411.htm) до 1 на 50000 человек. Заболевание приводит к постепенной потере добровольной двигательной координации (атаксия) и сердечным осложнениям. Симптомы обычно проявляются в детстве, и заболевание постепенно ухудшается по мере того, как пациент становится старше; пациенты в конечном итоге оказываются в инвалидной коляске из-за нарушений двигательных функций.

В добавление к врожденным расстройствам, включая унаследованные нарушения митохондрий, можно предположить, что приобретенная митохондриальная дисфункция содействует заболеваниям, особенно нейродегенеративным расстройствам, связанным с возрастными болезнями Паркинсона, Альцгеймера и Хантингтона. Инциденты соматических мутаций в митохондриальной ДНК увеличиваются экспоненциально с возрастом; уменьшение активности дыхательной цепи повсеместно распространена у пожилых людей. Митохондриальная дисфункция также органически связана с эксайтотоксичностью, нейрональными травмами, церебральными сосудистыми инцидентами таким образом, что сопровождается судорогами, инсультом и ишемией.

Фармацевтические композиции, содержащие соединение по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую соединение по настоящему изобретению вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми разбавителями или носителями.

Соединение по настоящему изобретению или его композиция может быть введена любым общепринятым методом, например, но без ограничения, парентерально, перорально, местно (включая буккальное, сублингвальное или трансдермальное введение), через средство медицинского устройства (например стента), ингаляцией или посредством инъекции (подкожной или внутримышечной). Данная обработка может состоять из одноразовой дозы или множественных доз за период времени.

Такую обработку можно проводить путем введения один раз в день, два раза в день, три раза в день, четыре раза в день и т.д. Обработка также может представлять собой длительное введение, такое как, например, внутривенное введение по каплям.

Хотя возможно вводить соединение по настоящему изобретению как таковое, лучше, чтобы оно присутствовало в виде фармацевтического препарата, вместе с одним или более приемлемыми носителями. Носитель должен быть "приемлемым" в том смысле, чтобы быть совместимым с соединением по настоящему изобретению и не наносить вреда его реципиенту. Примеры подходящих носителей описаны

в данном описании более подробно ниже.

Данные лекарственные препараты могут быть предоставлены в единичной дозированной форме и получены любым из способов, известных в области фармации. Такие способы включают стадию объединения активного ингредиента (соединения по настоящему изобретению) с носителем, который составляет один или более вспомогательных ингредиентов. Как правило, лекарственные препараты получают равномерным и тщательным объединением активного ингредиента с жидкими носителями или тонко измельченными твердыми носителями или обоими, и затем, при необходимости, формированием продукта.

Введение соединения по настоящему изобретению обычно будет осуществляться внутривенно, перорально или любым парентеральным путем в форме фармацевтического лекарственного препарата, содержащего активный ингредиент, необязательно в виде нетоксичной органической или неорганической, кислотной или основной аддитивной соли, в фармацевтически приемлемой дозированной форме. В зависимости от расстройства и пациента, подвергаемого лечению, а также пути введения, композиции могут быть введены в различных дозах.

Фармацевтические композиции должны быть стабильными в условиях изготовления и хранения; так что предпочтительно должны сохраняться от загрязняющих воздействий микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носителем может быть растворитель или дисперсная среда, содержащая, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль), растительные масла и их подходящие смеси.

Например, соединение по настоящему изобретению также может быть введено перорально, буккально или сублингвально в форме таблеток, капсул, суппозиторий, эликсиров, растворов или суспензий, которые могут содержать ароматизаторы или красители, для немедленного, с задержкой или контролируемого высвобождения.

Лекарственные препараты по настоящему изобретению, подходящие для перорального введения, могут присутствовать в виде дискретных единиц, таких как капсулы, облатки или таблетки, каждая из которых содержит определенное количество активного ингредиента; как порошок или гранулы; как раствор или суспензия в водной жидкости или неводной жидкости или как жидкая эмульсия масло-в-воде или жидкая эмульсия вода-в-масле. Активный ингредиент также может присутствовать в виде болуса, электуарии или пасты.

Растворы или суспензии соединения по настоящему изобретению, подходящие для перорального введения, также могут содержать эксципиенты, например N,N-диметилацетамид, дисперсанты, например полисорбат 80, поверхностно-активные вещества и солюбилизаторы, например полиэтиленгликоль, фосфат 50 PG (который состоит из фосфадилхолина, соевых жирных кислот, этанола, моно/диглицеридов, пропиленгликоля и аскорбилпальмитата). Лекарственные препараты по настоящему изобретению также могут быть в форме эмульсий, где соединение, соответствующее формуле (I), может присутствовать в водной масляной эмульсии. Масло может представлять собой любое маслоподобное вещество, такое как, например, масло соевых бобов или сафлоровое масло, среднецепочечные триглицериды (МСТ-масло), такие как, например, кокосовое масло, пальмовое масло и т.д., или их комбинации.

Таблетки могут содержать эксципиенты, такие как микрокристаллическая целлюлоза, лактоза (например, моногидрат лактозы или безводная лактоза), цитрат натрия, карбонат кальция, двухосновной фосфат кальция и глицин, бутилированный гидрокситолуол (Е321), кросповидон, гидромеллоза, дезинтегранты, такие как крахмал (предпочтительно кукурузный, картофельный или тапиоковый крахмал), натрийглицоляткарахмал, натрийкроскармеллоза и некоторые комплексные силикаты, и связующие грануляции, такие как поливинилпирролидон, гидроксипропилметилцеллюлоза (НРМС), гидроксипропилцеллюлоза (НРС), макрогол 8000, сахароза, желатин и аравийская камедь. Дополнительно может содержать лубриканты, такие как стеарат магния, стеариновая кислота, глицерилбегенат и тальк.

Таблетки можно получить прессованием или формованием литьем необязательно с одним или более вспомогательными ингредиентами. Спрессованные таблетки могут быть получены прессованием в специализированной машине активного ингредиента в свободно-текущей форме, такой как порошок или гранулы, необязательно смешанного со связующим (например, повидоном, желатином, гидроксипропилметилцеллюлозой), лубрикантом, инертным разбавителем, консервантом, дезинтегрантом (например, натрийглицоляткарахмалом, поперечно-связанным повидоном, поперечно-связанной натрийкарбоксиметилцеллюлозой), поверхностно-активным веществом или диспергирующим агентом. Формованные таблетки можно получить формованием в подходящей машине смеси порошкообразной смеси, смоченной инертным жидким разбавителем. Такие таблетки могут быть необязательно покрыты или иметь риск и могут быть сформулированы таким образом, чтобы обеспечивать замедленное или контролируемое высвобождение активного ингредиента при использовании, например, гидроксипропилметилцеллюлозы в различных пропорциях для обеспечения требуемого профиля высвобождения.

Твердые композиции такого же типа, также могут применяться в качестве наполнителей в желатиновые капсулы. Предпочтительные эксципиенты в этой связи включают лактозу, крахмал, целлюлозу, молочный сахар или высокомолекулярные полиэтиленгликоли. Для водных суспензий и/или эликсиров соединения по настоящему изобретению могут быть комбинированы с различными подсластителями или ароматизирующими агентами, окрашивающими веществами или красителями, эмульгаторами и/или сус-

пендирующими агентами и разбавителями, такими как вода, этанол, пропиленгликоль и глицерин, и их комбинации.

Лекарственные препараты, подходящие для местного введения в ротовую полость, включают таблетки для рассасывания, содержащие активный ингредиент в ароматизированной основе, как правило, в сахарозе, и аравийскую камедь или трагакант; пастилки, содержащие активный ингредиент в инертной основе, такой как желатин и глицерин, или сахарозу и аравийскую камедь; и ополаскиватель для рта, содержащий активный ингредиент в подходящем жидком носителе.

Фармацевтические композиции, адаптированные для местного введения, могут быть сформулированы в виде мазей, кремов, суспензий, лосьонов, порошков, растворов, паст, гелей, пропитанных перевязочных материалов, спреев, аэрозолей или масел, трансдермальных устройств, пудр и т.п. Такие композиции могут быть получены общеизвестными способами, включая активный агент. Таким образом, они могут также включать совместимые обычные носители и добавки, такие как консерванты, растворители, способствующие проникновению лекарственного средства, смягчители в кремах или мазях и этанол или олеиловый спирт для лосьонов. Такие носители могут присутствовать в количестве от около 1 до около 98% композиции. Обычно они составляют примерно до 80% композиции. В качестве только иллюстрации крем или мазь изготавливают путем смешивания достаточного количества гидрофильных веществ и воды, содержащей около 5-10% по массе данного соединения, в достаточных количествах для изготовления крема или мази с желаемой консистенцией.

Фармацевтические композиции, адаптированные для трансдермального введения, могут присутствовать в виде дискретных пластырей, оставляемых в тесном контакте с эпидермисом реципиента в течение длительного периода времени. Например, активный агент может доставляться из пластыря ионофорезом.

Для приложений к внешним тканям, например полости рта и кожи, данные композиции предпочтительно применяют в виде местных мазей или кремов. При формулировании в мазь активный агент может быть сформулирован либо на парафиновой или смешиваемой с водой мазевой основе.

Альтернативно, активный агент может быть сформулирован в крем на кремовой основе масло-в-воде или вода-в-масле.

Для парентерального введения жидкие лекарственные формы изготавливают, используя активный ингредиент и стерильный носитель, например, но без ограничения, воду, спирты, полиолы, глицерин и растительные масла, предпочтительно воду. Активный ингредиент в зависимости от носителя и концентрации может быть либо коллоидным, суспендированным или растворенным в носителе. При получении растворов активный ингредиент может быть растворен в воде для инъекций и подвергнут фильтрационной стерилизации перед заполнением в подходящий флакон или ампулу и герметизирован.

Предпочтительно агенты, такие как местные анестетики, консерванты и буферизирующие агенты, могут быть растворены в носителе. Для усиления стабильности композиция может быть заморожена после заполнения в пробирку и вода удалена в вакууме. Сухой лиофилизированный порошок затем закупоривают во флаконе, и может поставляться сопутствующий флакон с водой для инъекций для воссоздания жидкости перед применением.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, подходящие для применения в форме инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии. Кроме того, композиции могут быть в форме стерильных порошков для экстемпорального приготовления таких инъекционных дисперсий или стерильных растворов. Во всех случаях окончательные инъекционные формы должны быть стерильными и должны быть, по существу, жидкими для легкой проходимости через иглу.

Парентеральные суспензии изготавливают в основном так же, как растворы, за исключением того, что активный ингредиент суспендирован в носителе вместо растворения и стерилизации, что не может быть достигнуто фильтрацией. Активный ингредиент может быть стерилизован от воздействия этиленаоксида перед суспендированием в стерильном носителе. Предпочтительно включать поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты в композицию для содействия равномерному распределению активного ингредиента.

Следует понимать, что в добавление к ингредиентам, особенно приведенным выше, в композиции настоящего изобретения можно включать другие агенты, общепринятые в данной области техники, с учетом типа лекарственного препарата, о котором идет речь, например, композиции, подходящие для перорального введения, могут включать ароматизаторы. Специалистам в данной области известно, как выбрать подходящий препарат и как его изготовить (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences 18 изд. или позже). Специалисту в данной области также известно, как выбрать подходящий путь введения и дозировку.

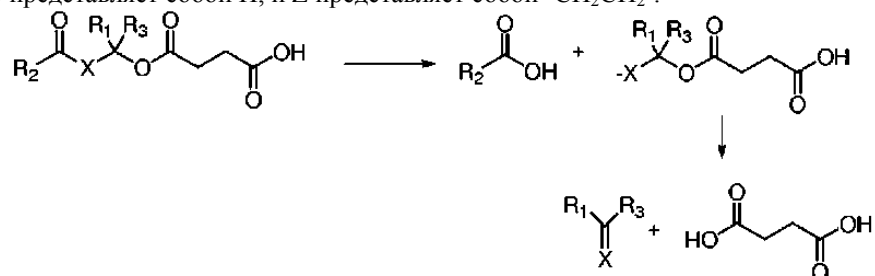
Специалисту в данной области будет очевидно, что оптимальное количество и интервалы отдельных дозировок соединения по настоящему изобретению будут определяться природой и состоянием, подвергаемому лечению, формой, путем и местом введения, возрастом и состоянием конкретного субъекта, подвергаемому лечению, и что врач будет, в конечном итоге, определять соответствующие дозы для применения. Дозирование может повторяться так часто, как необходимо. Если побочные эффекты развиваются от количества и/или частоты дозы, она может быть изменена или уменьшена, в соответствии с

обычной клинической практикой.

Все % значения, приведенные в данном описании, представлены в % мас./мас., если в контексте не указано иное.

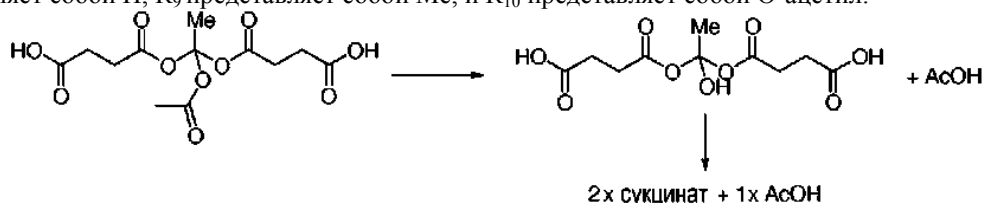
Соединения по настоящему изобретению все могут трансформироваться в биологическую матрицу для освобождения от янтарной кислоты, сукцинилового кофермента А или одних и тех же канонических форм. Они могут сделать это следующим образом.

В случае если R', R'' или R''' представляет собой соединение формулы (II), ацильная группа, включающая R₂, может расщепляться подходящим ферментом, предпочтительно эстеразой. Это освобождает гидроксиметилловый эфир, аминометилловый эфир или тиолметилловый эфир, который может самопроизвольно преобразовываться в карбонильную, иминную или тиокарбонильную группу и свободную карбоновую кислоту. В качестве примера в формуле (I), где А представляет собой OR', с R', являющимся формулой (II), и В представляет собой H, и Z представляет собой -CH₂CH₂-.

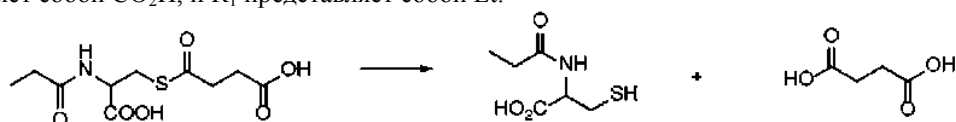


Когда В представляет собой -SR''', тиольная группа высвобождается. Это рассматривается как представляющее особый интерес, поскольку тиольная группа обладает восстановительными свойствами. Многие болезни имеют нежелательный оксидативный стрессовый компонент, который может привести к повреждению в клеточной структуре и функции клеток. Соответственно, ожидается, что высвобождение компонента, который может выступать в качестве антиоксиданта и собирать свободные радикалы или уменьшать реакционную способность кислородных молекул, даст дополнительную выгоду в медицинском или косметическом применении.

В случае если R', R'' или R''' представляет собой соединение формулы (V), заместитель на группе R₁₀ может быть удален воздействием подходящего фермента или посредством химического гидролиза *in vivo*. В качестве примера в формуле (I), где А представляет собой OR' с R', представляющим собой формулу (V), и В представляет собой H, и Z представляет собой -CH₂CH₂-, X представляет собой O, и R₈ представляет собой H, R₉ представляет собой Me, и R₁₀ представляет собой O-ацетил.

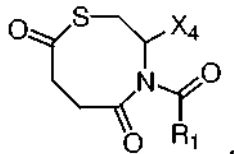


В случае если R', R'' или R''' представляет собой соединение формулы (VII), данная группа может быть удалена воздействием подходящего фермента или посредством химического гидролиза *in vivo* для освобождения от янтарной кислоты. В качестве примера в формуле (I), где А представляет собой SR с R, представляющим собой формулу (VII), и В представляет собой OH, и Z представляет собой -CH₂CH₂-, X₅ представляет собой CO₂H, и R₁ представляет собой Et.

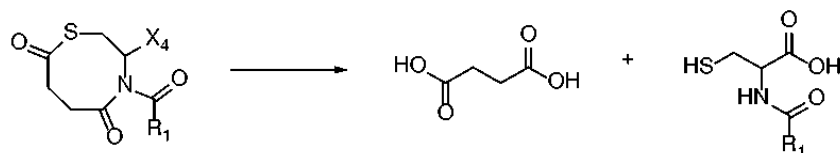


Альтернативно, для соединения формулы VII в сущности само по себе может непосредственно действовать в цикле Кребса в месте действия сукцинила-СоА.

В случае если формула (I) представляет собой



данное соединение может гидролизироваться, что дает соединение согласно схеме ниже, и когда X₄ представляет собой -COOH.



Другие аспекты настоящего изобретения

Настоящее изобретение также предоставляет комбинацию (например, для лечения митохондриальной дисфункции) соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой формы, как определено в данном описании, и одного или более средств, независимо выбранных из

производных хинона, например убихинона, идебенона, MitoQ, витаминов, например токоферолов, токотриенолов и тролокса (витамин E), аскорбата (C), тиамина (B1), рибофлавина (B2), никотинамида (B3), менадиона (K3),

антиоксидантов в добавление к витаминам, например TPP-соединений (MitoQ), Sk-соединений, эпикатехина, катехина, липоевой кислоты, мочево́й кислоты, мелатонина,

дихлорацетата,

метилена голубого,

l-аргинина,

пептидов Szeto-Schiller,

креатина,

бензодиазепинов,

модуляторов PGC-1 α ,

кетогенной диеты.

Одним из аспектов настоящего изобретения является то, что любое из соединений, как описано в данном описании, может быть введено вместе с любым из соединений, таких как, например, бикарбонат натрия (в виде болюса (например, 1 мЭкв/кг) после непрерывной инфузии) в качестве сопутствующего медикаментозного лечения к настоящим соединениям, описанным в данном описании.

Лактоацидоз или вызванные лекарственным средством побочные эффекты из-за недостаточности связанного комплексом I митохондриального окислительного фосфорилирования.

Настоящее изобретение также относится к предупреждению или лечению лактоацидоза и связанных с митохондриями побочных эффектов, вызванных лекарственным средством. В частности, соединения по настоящему изобретению используются при предупреждении или лечении связанных с митохондриями побочных эффектов, вызванных лекарственным средством, нарушающим транспорт электронов в комплексе I, или, выражаясь иначе, настоящее изобретение обеспечивает, согласно настоящему изобретению, предупреждение или лечение вызванного лекарственным средством направленного ингибирования комплекса I или любого вызванного лекарственным средством воздействия, которое ограничивает поступление NADH к комплексу I (такого как, но не ограничиваясь ими, воздействия на цикл Кребса, гликолиз, β -окисление, метаболизм пирувата, а также действие лекарственных средств, которые влияют на транспорт или уровни глюкозы или других, связанных с комплексом I субстратов).

Митохондриальная токсичность, вызванная лекарственным средством, может быть частью желаемого терапевтического эффекта (например, относящейся к митохондриям токсичностью, вызванной противораковыми лекарственными средствами), но в большинстве случаев, митохондриальная токсичность, вызванная лекарственным средством, является нежелательным эффектом. Митохондриальная токсичность может заметно увеличивать гликолиз, чтобы компенсировать клеточную потерю формирования митохондриальной АТФ посредством окислительного фосфорилирования. Это может привести к увеличению уровней лактата в плазме, которые если чрезмерны, в результате переходит в лактоацидоз, что может быть смертельным. Тип А лактоацидоза, прежде всего, связан с тканевой гипоксией, в свою очередь, тип В аэробного лактоацидоза связан с лекарственными средствами, токсином или системными расстройствами, такими как заболевания печени, диабет, рак и врожденные нарушения метаболизма (например, митохондриальные генетические нарушения).

Многие из известных лекарственных веществ негативно влияют на митохондриальное дыхание (например, нейролептики, местные анестетики и антидиабетические средства), и, соответственно, существует необходимость в определении или разработке средств, которые смогут быть полезны для избегания или смягчения негативных митохондриальных последствий, вызванных использованием такого лекарственного вещества.

Настоящее изобретение предоставляет соединения для применения при предупреждении или лечении лактоацидоза и связанных с митохондриями побочных эффектов, вызванных лекарственным средством. В частности, сукцинатные пролекарства используют при предупреждении или лечении связанных с митохондриями побочных эффектов, вызванных лекарственным средством, нарушающим транспорт электронов в комплексе I, или, выражаясь иначе, настоящее изобретение предоставляет сукцинатные пролекарства для предупреждения или лечения вызванного лекарственным средством направленного ингибирования комплекса I или вызванного лекарственным средством воздействия, которое ограничива-

ет поступление NADH к комплексу I (такого как, но не ограничиваясь ими, воздействия на цикл Кребса, гликолиз, β -окисление, метаболизм пирувата, а также действие лекарственных средств, которые влияют на транспорт или уровни глюкозы или других, связанных с комплексом I субстратов).

Как указано выше, увеличение уровней лактата в плазме часто наблюдается у пациентов, подвергаемых лечению препаратами, которые могут вызывать относящиеся к митохондриям побочные эффекты. Настоящее изобретение основано на экспериментальных результатах, показывающих, что метформин (первая линия лечения диабета типа 2, и который связан с лактоацидозом в виде редкого побочного эффекта) тормозит митохондриальные функции клеток периферической крови человека в комплексе I зависимым от времени и дозы образом в концентрациях, соответствующих метформинной интоксикации. Метформин также вызывает значительное увеличение продуцирования лактата в интактных тромбоцитах с течением времени. Использование соединений по настоящему изобретению значительно снижает продуцирование лактата в интактных, подвергнутых воздействию метформина тромбоцитах. Экзогенно применяемый сукцинат, сам по себе субстрат, не снижает индуцированную метформином продукцию лактата.

В другом исследовании продуцирование лактата было обнаружено за несколько часов в ингибированных ротеноном тромбоцитах (т.е. условие, при котором нарушена функция комплекса I). Применение соединения по настоящему изобретению (но не сукцината) ослабляло индуцированное ротеноном продуцирование лактата в интактных тромбоцитах человека. Респирометрические эксперименты повторяли на фибробластах человека и мышечных волокнах человеческого сердца, и полученные результаты подтвердили нахождение клеток в крови.

Соответственно, настоящее изобретение предоставляет соединения формулы (I) для применения в профилактическом лечении лактоацидоза. Однако предоставленные в данном описании результаты основаны на лактоацидозе, связанным с прямым ингибированием комплекса I или связанным с нарушением или с транспортом электронов в комплексе I, при этом предполагается, что соединения по настоящему изобретению подходят для применения при предупреждении или лечении связанных с митохондриями побочных эффектов, вызванных лекарственным средством, нарушающим транспорт электронов в комплексе I. Соединения по настоящему изобретению также могут блокировать действие лекарственных средств, нарушающих связанный с комплексом I метаболизм (косвенное ингибирование комплекса I, которое охватывает любое воздействие лекарственного средства, ограничивающее поступление NADH к комплексу, например воздействия на цикл Кребса, гликолиз, β -окисление, метаболизм пирувата, а также действие лекарственных средств, которые влияют на уровни глюкозы и других, связанных с комплексом I субстратов).

Предполагается, что соединения по настоящему изобретению также могут быть использованы в промышленном применении, например, *in vitro* для снижения или ингибирования образования лактата или увеличения коммерческой доступности АТФ или производства клеточных линий. Примеры включают использование в клеточной культуре, в сохранении органа и др.

Соединения по настоящему изобретению могут применяться при лечении или предупреждении связанных с митохондриями побочных эффектов, вызванных лекарственным средством, или для увеличения или восстановления клеточного энергетического уровня (АТФ) при лечении. В частности, они полезны при лечении или предупреждении связанных с митохондриями побочных эффектов, прямо или косвенно вызванных лекарственным средством в комплексе I. В частности, они полезны при лечении или предупреждении лактоацидоза, такого как лактоацидоз, вызванный лекарственным веществом.

Настоящее изобретение также относится к комбинации соединения формулы (I) и лекарственного вещества, которое может вызывать относящийся к митохондриям побочный эффект, в частности побочный эффект, который связан, прямо или косвенно, с недостаточностью комплекса I, вызванной лекарственным веществом. Такая комбинация может быть использована в качестве профилактического предупреждения относящегося к митохондриям побочного эффекта, или в случае появления побочного эффекта в качестве облегчения и/или лечения относящегося к митохондриям побочного эффекта.

Предполагается, что соединения, как описано ниже, будут эффективными при лечении или предупреждении вызванных лекарственным средством побочных эффектов, в частности побочных эффектов, прямо или косвенно относящихся к ингибированию комплекса I.

Лекарственными веществами, которые, как известно, способствуют началу появления нарушений, дисфункций или недостаточности в комплексе I, и/или известны, как вызывающие лактоацидоз в качестве побочного эффекта, являются

болеутоляющие средства, включая ацетаминофен, капсаицин, антибиотики, включая линезолид, тровафлоксацин, гентамицин, противораковые лекарственные средства, включая хиноны, митомицин С, адриамицин, противосудорожные лекарственные средства, включая вальпроевую кислоту, антидиабетические лекарственные средства, включая метформин, фенформин, бутилбигуанид, троглитазон и росиглитазон, пиоглитазон, лекарственные средства против гепатита В, включая фиалуридин,

антигистамины,
 лекарственные средства против болезни Паркинсона, включая толкапон,
 противопсихотическое средство рисперидон,
 противошизофреническое средство зотепин, клозапин,
 антисептики, соединения четвертичного аммония (QAC),
 противотуберкулезное средство, включая пиразинамид,
 фибраты, включая клофибрат, ципрофибрат, симвастатин,
 снотворные, включая пропофол.
 иммуносупрессивные болезнь модифицирующие противоревматические лекарственные средства (DMARD) лефлуномид,
 местные анестетики, включая бупивакаин, диклофенак, индометацин и лидокаин,
 мышечные релаксанты, включая дантролен,
 нейролептики, включая антипсихотические нейролептики, такие как хлорпромазин, флуфеназин и галоперидол,
 NRTI (нуклеотидные обратные транскриптазы), включая эфавиренц, тенофовир, эмтрицитабин, зидовудин, ламивудин, рилпивирин, абакавир, диданозин,
 NSAID, включая нимесулид, мефенамовую кислоту, сулиндак,
 барбитуровые кислоты.
 Другие лекарственные вещества, которые вызывают лактоацидоз в качестве побочных эффектов, включают β_2 -агонисты, эпинефрин, теофиллин или другие гербициды. Спирты и кокаин также могут привести в лактоацидозу.

Кроме того, предполагается, что соединения по настоящему изобретению также могут быть эффективными при лечении или профилактике лактоацидоза, даже если он не относится к нарушению комплекса I.

Комбинация лекарственных средств и соединений по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к комбинации лекарственного вещества и соединения по настоящему изобретению для применения при лечении и/или предупреждении вызванного лекарственным средством побочного эффекта, выбранного из лактоацидоза и побочного эффекта, относящегося к нарушению, ингибированию или дисфункции комплекса I, где

- i) данное лекарственное вещество используют при лечении заболевания, для которого показано данное лекарственное вещество, и
- ii) соединение по настоящему изобретению используют для предупреждения или смягчения побочных эффектов, вызванных или вызываемых данным лекарственным веществом, где побочные эффекты выбраны из лактоацидоза и побочных эффектов, связанных с нарушением, ингибированием или дисфункцией комплекса I.

Любая комбинация такого лекарственного вещества с любым соединением по настоящему изобретению входит в объем настоящего изобретения. Соответственно, на основе приведенной в данном описании информации специалисту в данной области будет понятно, что существом настоящего изобретения являются обнаружение ценных свойств соединений по настоящему изобретению, для избегания или уменьшения побочных эффектов, описанных в данном описании. Таким образом, потенциальной применимостью соединений по настоящему изобретению является возможность введения в клетки и доставки сукцината и возможно других активных остатков в комбинации с любым лекарственным веществом, которое вызывает или может вызывать побочные эффекты, описанные в данном описании, что видно из предлагаемого настоящего изобретения.

Настоящее изобретение дополнительно относится к

- i) композиции, содержащей лекарственное вещество и соединение по настоящему изобретению, где данное лекарственное вещество имеет потенциальную возможность вызывать лекарственный побочный эффект, выбранный из лактоацидоза и побочных эффектов, связанных с нарушением, ингибированием или дисфункцией комплекса I,
- ii) композиции, как описано выше в пункте i), где соединение по настоящему изобретению используют для предупреждения или облегчения побочных эффектов, вызванных или вызываемых данным лекарственным веществом, где побочные эффекты выбраны из лактоацидоза и побочных эффектов, связанных с нарушением, ингибированием или дисфункцией комплекса I.

Композиция может быть представлена в форме двух отдельных блоков:

- первого блока, содержащего лекарственное вещество или композицию, содержащую данное лекарственное вещество, и
- второго блока, содержащего соединение по настоящему изобретению или композицию, содержащую соединение по настоящему изобретению.

Композиция также может быть представлена в единой композиции, содержащей как данное лекарственное вещество, так и соединение по настоящему изобретению.

В том случае, если композиция состоит из двух отдельных блоков, лекарственное вещество и соединение по настоящему изобретению могут быть введены различными путями введения (например, ле-

карственное вещество путем перорального введения и соединение по настоящему изобретению путем парентерального или мукозального введения) и/или они могут быть введены, по существу, одновременно, или лекарственное вещество может быть введено перед соединением по настоящему изобретению или наоборот.

Способ лечения

Настоящее изобретение также относится к способу лечения заболеваний, связанных с митохондриальной дисфункцией у субъекта, включающему введение эффективного количества соединения по настоящему изобретению указанному субъекту перед, в ходе или после лечения указанным лекарственным веществом.

Метформин.

Метформин является антидиабетическим лекарственным средством, принадлежащим к классу бигуанидов. Он является первой линией лечения диабета 2 типа, который составляет около 90% случаев диабета в США. Антидиабетический эффект объясняется снижением продуцирования глюкозы в печени, увеличивая биологический эффект инсулина путем увеличения поглощения глюкозы в периферических тканях и снижения поглощения глюкозы в кишечнике, но точные механизмы действий полностью не выяснены. Несмотря на свои преимущества по сравнению с другими антидиабетиками, он был связан с редкими случаями лактоацидоза (LA) в качестве побочного эффекта. LA определяется как увеличение анионной разницы уровней лактата в артериальной крови выше 5 мМ и $\text{pH} \leq 7,35$. Хотя точный патогенез, связанный с вызванным метформином LA, до сих пор полностью не раскрыт, было предложено ингибирование глюконеогенеза и, в результате, накопление гликогенных предшественников, таких как аланин, пируват и лактат. С другой стороны, однако, было предложено, что вмешательство лекарственного средства в митохондриальную функцию является ключевым фактором для обоих терапевтических средств при глюкозоснижающем эффекте, а также при развитии связанного с метформином LA. В качестве последовательности митохондриального ингибирования клетка будет частично переходить от аэробного к анаэробному метаболизму, промотируя гликолиз с повышенными в результате уровнями лактата. Фенформин, другое антидиабетическое средство того же класса лекарственных средств, как метформин, был удален с рынка в большинстве стран из-за высоких инцидентов с LA (4 случая на 10000 лечений в год). По сравнению с инцидентами LA, связанными с метформином, для фенформина они составляют десятую долю, и поэтому он считается довольно безопасным терапевтическим средством. Связанный с метформином LA наблюдается в основном у пациентов, у которых имеются дополнительные предрасполагающие условия, влияющие на сердечно-сосудистую систему, печень или почки. В этих условиях очищение организма от лекарства нарушается, что, если не обнаружено вовремя, приводит в результате к возрастанию концентраций метформина в крови. Поскольку использование метформина, как ожидается, будет расти из-за увеличения распространенности диабета типа 2, исследование митохондриальной токсичности, вызванной метформином, и LA становится текущей и неотложной проблемой. Исследование митохондриальной токсичности метформина выдает несогласованные результаты. Kane et al. (2010) не обнаружили ингибирования метформином основного дыхания и максимальной дыхательной способности *in vivo* в скелетных мышцах у крыс и ни в одной из мышечных биопсий у подвергнутых лечению метформином пациентов с диабетом типа 2. В отличие от этого имеются другие описания токсических эффектов метформина и фенформина на митохондрии и связанный с этим LA в тканях животных. Данных на тканях человека не хватает, особенно *ex vivo* или *in vivo*. Большинство данных о метформине и LA основаны на ретроспективных исследованиях из-за трудностей с получением образцов тканей человека. Protti et al. (2010), однако сообщали о снижении системного потребления кислорода у пациентов со связанным с бигуанидами LA, и как Protti et al. (2012b), так и Larsen et al. (2012) описали митохондриальную дисфункцию *in vitro* в ответ на воздействие метформина при ≤ 10 мМ в скелетных мышцах человека и тромбоцитах соответственно. Protti et al. (2012b) далее сообщили об увеличении высвобождения лактата в тромбоцитах человека в ответ на воздействие метформина при 1 мМ. Хотя метформин не обнаруживался при этой концентрации в терапевтических условиях, было показано сближение этих уровней в крови во время интоксикации, и, как известно, накопление в 7-10-кратном размере в желудочно-кишечном тракте, почках, печени, слюнных железах, легких, селезенке и мышцах по сравнению с плазмой.

В исследовании, приведенном в данном описании, целью была оценка митохондриальной токсичности метформина и фенформина в клетках крови человека при использовании респирометрии высокого разрешения. Фенформин был включен для сравнения активности двух аналогичных по структуре лекарственных средств и изучения связи между митохондриальной токсичностью и распространенности LA, описанных для пациентов людей. Для того чтобы исследовать проницаемость мембран и конкретные мишени токсичности этих бигуанидов, использовали модель для тестирования лекарственных средств на токсичность с использованием мембран как интактных, так и с нарушенной проницаемостью клеток крови с последовательным добавлением конкретных субстратов дыхательного комплекса и ингибиторов.

Другие аспекты содержатся в пунктах прилагаемой формулы изобретения. Все детали и данные использованы с известными соответствующими поправками к указанным аспектам.

Определения.

Единственное число используется в данном описании со ссылкой на один или более чем один грамматический объект (т.е. по меньшей мере один) данного предмета. В качестве примера "аналог" означает один аналогичный или более чем один аналогичный.

Как использовано в данном описании, термины "клеточно-проницаемые сукцинаты", "соединение(я) настоящего изобретения", "клеточно-проницаемые сукцинатные производные" и "клеточно-проницаемые предшественники сукцината" используются взаимозаменяемо и направлены на соединения формулы (I).

Как использовано в данном описании, термин "биодоступность" относится к степени, в которой, или скорости, при которой препарат или другое вещество поглощается или становится доступным на сайте биологической активности после введения. Это свойство зависит от числа факторов, включающих растворимость соединения, скорость поглощения в кишечнике, степень связывания белков и метаболизм и т.д. Различные тесты на биодоступность, которые известны специалистам в данной области техники, описаны в данном описании (см. также Trepapier et al., 1998, Gallant-Haidner et al., 2000).

Как использовано в данном описании, термины "недостаточность", "ингибирование", "нарушение", используемые в отношении дыхательной цепи комплекса I, предназначены для обозначения того, что данное лекарственное вещество имеет негативное влияние на комплекс I или на относящийся к митохондриям метаболизм, связанный с комплексом I, которое может охватывать любое влияние лекарственного средства, ограничивающее поступление NADH к комплексу I, например воздействия на цикл Кребса, гликолиз, β -окисление, метаболизм пирувата, а также действие лекарственных средств, которые влияют на транспорт или уровни глюкозы или других, связанных с комплексом I субстратов. Как описано в данном описании, избыток лактата у субъекта часто является признаком негативного влияния на аэробное дыхание, включая комплекс I.

Как использовано в данном описании, термин "побочный эффект", используемый в отношении функции комплекса I дыхательной цепи, может представлять собой побочный эффект, относящийся к лактоацидозу, или может представлять собой побочный эффект, относящийся к аллергической реакции органа на токсическое лекарственное средство, например гепатотоксичности, нейротоксичности, кардиотоксичности, почечной токсичности и мышечной токсичности, включая, но не ограничиваясь ими, например, офтальмоплегию, миопатию, нейросенсорную недостаточность слуха, припадки, удар, инсультподобные явления, атаксию, птоз, когнитивную недостаточность, измененные состояния сознания, нейропатическую боль, полинейропатию, нейропатические желудочно-кишечные проблемы (гастроэзофагеальный рефлюкс, запор, псевдо-непроходимость кишечника), проксимальную трубчатую дисфункцию почек, нарушение сердечной проводимости (блокада сердца), кардиомиопатию, гипогликемию, гликогенные нарушения, безалкогольную печеночную недостаточность, оптическую нейропатию, потерю зрения, диабет и недостаточность экзокринной поджелудочной железы, усталость, проблемы с дыханием, включая периодическое чувство нехватки воздуха.

Как использовано в данном описании, термин "вызванные лекарственным средством" в связи с термином "побочный эффект" следует понимать в широком смысле. Таким образом, он включает не только лекарственные вещества, но и другие вещества, которые могут привести к нежелательному присутствию лактата. Примерами являются гербициды, токсичные грибы, ягоды и др.

Фармацевтически приемлемые соли соединения по настоящему изобретению включают обычные соли, образованные из фармацевтически приемлемых неорганических или органических кислот или оснований, такие как четвертичные кислотнo-аддитивные аммонийные соли. Более конкретные примеры подходящих кислотных солей включают хлористоводородную, бромистоводородную, серную, фосфорную, азотную, хлорную, фумаровую, уксусную, пропионовую, янтарную, гликолевую, муравьиную, молочную, малеиновую, винную, лимонную, пальмитиновую, малоновую, гидроксималеиновую, фенилуксусную, глутаминовую, бензойную, салициловую, фумаровую, толуолсульфоновую, метансульфоновую, нафталин-2-сульфоновую, бензолсульфоновую, гидроксинафтойную, иодистоводородную, яблочную, стероидную, дубильную и подобные кислоты. Другие кислоты, такие как щавелевая, сами по себе не являющиеся фармацевтически приемлемыми, могут быть полезны при получении солей, полезных в качестве промежуточных продуктов при получении соединений по настоящему изобретению и их фармацевтически приемлемых солей. Более конкретные примеры подходящих основных солей включают соли натрия, лития, калия, магния, алюминия, кальция, цинка, N,N'-дибензилэтилендиамина, хлорпрокаина, холина, дизаноламина, этилендиамина, N-метилглюкамина и прокаина.

Как использовано в данном описании, термин "алкил" относится к любой прямой или разветвленной цепи, состоящей только из sp^3 атомов углерода, полностью насыщенной атомами водорода, такой как, например, $-C_nH_{2n+1}$ для алкилов с прямой цепью, где n может составлять интервал от 1 до 10, таких как, например, метил, этил, пропил, изопропил, n-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, n-пентил, неопентил, изопентил, гексил, изогексил, гептил, октил, нонил или децил. Алкил, как использовано в данном описании, может быть дополнительно замещенным.

Как использовано в данном описании, термин "циклоалкил" относится к циклическим/кольцевым структурированным углеродным цепям, имеющим общую формулу $-C_nH_{2n-1}$, где n равен 3-10, таким как,

например, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил или циклооктил, бицикло[3.2.1]октил, спиро[4,5]децил, норпинил, норбонил, норкаприл, адамантил и т.п.

Как использовано в данном описании, термин "алкен" относится к прямой или разветвленной цепи, состоящей из атомов углерода и водорода, где по меньшей мере два атома углерода связаны двойной связью, такой как, например, C₂₋₁₀алкенильная ненасыщенная углеводородная цепь, имеющая от двух до десяти атомов углерода и по меньшей мере одну двойную связь. C₂₋₆алкенильные группы включают, но не ограничиваясь ими, винил, 1-пропенил, аллил, изопропенил, н-бутенил, н-пентенил, н-гексенил и т.п.

Термин "C₁₋₁₀алкокси" в настоящем контексте обозначает -O-C₁₋₆алкильную группу, используемую отдельно или в комбинации, где C₁₋₁₀алкил является таким, как определено выше. Примерами линейных алкоксигрупп являются метокси, этокси, пропокси, бутокси, пентокси и гексокси. Примерами разветвленных алкокси являются изопропокси, втор-бутокси, трет-бутокси, изопентокси и изогексокси. Примерами циклических алкокси являются циклопропилокси, циклобутилокси, циклопентилокси и циклогексиллокси.

Термин "C₃₋₇гетероциклоалкил", как использовано в данном описании, обозначает радикал полностью насыщенного гетероцикла, подобно циклическим углеводородам, содержащим в цикле один или более гетероатомов, независимо выбранных из азота, серы и кислорода. Примеры гетероциклов включают, но не ограничиваясь ими, пирролидин (1-пирролидин, 2-пирролидин, 3-пирролидин, 4-пирролидин, 5-пирролидин), пиазолидин (1-пиазолидин, 2-пиазолидин, 3-пиазолидин, 4-пиазолидин, 5-пиазолидин), имидазолидин (1-имидазолидин, 2-имидазолидин, 3-имидазолидин, 4-имидазолидин, 5-имидазолидин), тиазолидин (2-тиазолидин, 3-тиазолидин, 4-тиазолидин, 5-тиазолидин), пиперидин (1-пиперидин, 2-пиперидин, 3-пиперидин, 4-пиперидин, 5-пиперидин, 6-пиперидин), пиперазин (1-пиперазин, 2-пиперазин, 3-пиперазин, 4-пиперазин, 5-пиперазин, 6-пиперазин), морфолин (2-морфолин, 3-морфолин, 4-морфолин, 5-морфолин, 6-морфолин), тиоморфолин (2-тиоморфолин, 3-тиоморфолин, 4-тиоморфолин, 5-тиоморфолин, 6-тиоморфолин), 1,2-оксатиолан (3-(1,2-оксатиолан), 4-(1,2-оксатиолан), 5-(1,2-оксатиолан)), 1,3-диоксолан (2-(1,3-диоксолан), 3-(1,3-диоксолан), 4-(1,3-диоксолан)), тетрагидропиран (2-тетрагидропиран, 3-тетрагидропиран, 4-тетрагидропиран, 5-тетрагидропиран, 6-тетрагидропиран), гексагидропирадин (1-(гексагидропирадин), 2-(гексагидропирадин), 3-(гексагидропирадин), 4-(гексагидропирадин), 5-(гексагидропирадин), 6-(гексагидропирадин)).

Термин "C₁₋₁₀алкил-C₃₋₁₀циклоалкил", как использовано в данном описании, относится к циклоалкильной группе, как определено выше, присоединенной через алкильную группу, как определено выше, имеющую определенное число атомов углерода.

Термин "C₁₋₁₀алкил-C₃₋₇гетероциклоалкил", как использовано в данном описании, относится к гетероциклоалкильной группе, как определено выше, присоединенной через алкильную группу, как определено выше, имеющую определенное число атомов углерода.

Термин "арил", как использовано в данном описании, предназначен для включения карбоциклических ароматических кольцевых систем. Арил также предназначен для включения частично гидрогенизированных производных карбоциклических систем, перечисленных ниже.

Термин "гетероарил", как использовано в данном описании, включают гетероциклические ненасыщенные кольцевые системы, содержащие один или более гетероатомов, выбранных среди азота, кислорода и серы, такие как фурил, тиенил, пирролил, а также предназначен для включения частично гидрогенизированных производных гетероциклических систем, перечисленных ниже.

Термины "арил" и "гетероарил", как использовано в данном описании, относятся к арилу, который может быть необязательно незамещенным или моно-, ди- или тризамещенным. Примеры "арила" и "гетероарила" включают, но не ограничиваясь ими, фенил, бифенил, инденил, нафтил (1-нафтил, 2-нафтил), N-гидрокситетразолил, N-гидрокситриазолил, N-гидроксиимидазолил, антраценил (1-антраценил, 2-антраценил, 3-антраценил), фенантренил, флюоренил, пенталенил, азуленил, бифениленил, тиофенил (1-тиенил, 2-тиенил), фурил (1-фурил, 2-фурил), фуранил, тиофенил, изоксазолил, изотиазолил, 1,2,3-триазолил, 1,2,4-триазолил, пиранил, пиридазинил, пиазинил, 1,2,3-триазинил, 1, 2, 4-триазинил, 1,3,5-триазинил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил, 1,2,3-тиадиазолил, 1,2,4-тиадиазолил, 1,2,5-тиадиазолил, 1,3,4-тиадиазолил, тетразолил, тиадиазинил, индолил, изоиндолил, бензофуранил, бензотиофенил (тианафтелил), индолил, оксадиазолил, изоксазолил, хиразолил, флюоренил, ксантенил, изоинданил, бензгидрил, акридинил, бензизоксазолил, пуридил, хиразолил, хинолидинил, хинолинил, изохинолинил, хиноксалинил, нафтиридинил, фтеридинил, азепинил, диазепинил, пирролил (2-пирролил), пиазолил (3-пиазолил), 5-тиофен-2-ил-2Н-пиазол-3-ил, имидазолил (1-имидазолил, 2-имидазолил, 4-имидазолил, 5-имидазолил), триазолил (1,2,3-триазол-1-ил, 1,2,3-триазол-2-ил, 1,2,3-триазол-4-ил, 1,2,4-триазол-3-ил), оксазолил (2-оксазолил, 4-оксазолил, 5-оксазолил), тиазолил (2-тиазолил, 4-тиазолил, 5-тиазолил), пиридил (2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил), пиримидинил (2-пиримидинил, 4-пиримидинил, 5-пиримидинил, 6-пиримидинил), пиазинил, пиридазинил (3-пиридазинил, 4-пиридазинил, 5-пиридазинил), изохинолил (1-изохинолил, 3-изохинолил, 4-изохинолил, 5-изохинолил, 6-изохинолил, 7-изохинолил, 8-изохинолил), хинолил (2-хинолил, 3-хинолил, 4-хинолил, 5-хинолил, 6-хинолил, 7-хинолил, 8-хинолил), бензо[b]фуранил (2-бензо[b]фуранил, 3-бензо[b]фуранил, 4-бензо[b]фуранил, 5-бензо[b]фуранил, 6-бензо[b]фуранил, 7-бензо[b]фуранил), 2,3-дигидробензо

[b]фуранил (2-(2,3-дигидробензо[b]фуранил), 3-(2,3-дигидробензо[b]фуранил), 4-(2,3-дигидробензо[b]фуранил), 5-(2,3-дигидробензо[b]фуранил), 6-(2,3-дигидробензо[b]фуранил), 7-(2,3-дигидробензо[b]фуранил)), бензо[b]тиофенил (2-бензо[b]тиофенил, 3-бензо[b]тиофенил, 4-бензо[b]тиофенил, 5-бензо[b]тиофенил, 6-бензо[b]тиофенил, 7-бензо[b]тиофенил), 2,3-дигидробензо[b]тиофенил (2-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил), 3-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил), 4-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил), 5-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил), 6-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил), 7-(2,3-дигидробензо[b]тиофенил)), индолил (1-индолил, 2-индолил, 3-индолил, 4-индолил, 5-индолил, 6-индолил, 7-индолил), индазолил (1-индазолил, 2-индазолил, 3-индазолил, 4-индазолил, 5-индазолил, 6-индазолил, 7-индазолил), бензимидазолил (1-бензимидазолил, 2-бензимидазолил, 4-бензимидазолил, 5-бензимидазолил, 6-бензимидазолил, 7-бензимидазолил, 8-бензимидазолил), бензоксазолил (1-бензоксазолил, 2-бензоксазолил), бензотиазолил (1-бензотиазолил, 2-бензотиазолил, 4-бензотиазолил, 5-бензотиазолил, 6-бензотиазолил, 7-бензотиазолил), карбазолил (1-карбазолил, 2-карбазолил, 3-карбазолил, 4-карбазолил). Неограничивающими примерами частично гидрогенизированных производных являются 1,2,3,4-тетрагидронафтил, 1,4-дигидронафтил, пирролинил, пиразолинил, индолинил, оксазолинил, оксазолинил и т.п.

Как использовано в данном описании, термин "ацил" относится к карбонильной группе $-C(=O)R$, где группа R является любой из определенных выше групп. Конкретными примерами являются формил, ацетил, пропионил, бутирил, пентаноил, гексаноил, гептаноил, октаноил, нонаноил, деканоил, бензоил и т.п.

"Необязательно замещенный" применительно к любой группе означает, что указанная группа, при необходимости, может быть замещена одним или более заместителями, которые могут быть одинаковыми или различными. "Необязательно замещенный алкил" включает как "алкил", так и "замещенный алкил".

Примеры подходящих заместителей для "замещенного" и "необязательно замещенного" фрагментов включают галоген (фтор, хлор, бром или йод), C_{1-6} алкил, C_{3-6} циклоалкил, гидрокси, C_{1-6} алкокси, циано, amino, нитро, C_{1-6} алкиламино, C_{2-6} алкениламино, ди- C_{1-6} алкиламино, C_{1-6} ациламино, ди- C_{1-6} ациламино, C_{1-6} арил, C_{1-6} ариламино, C_{1-6} ароиламино, бензиламино, C_{1-6} ариламино, карбокси, C_{1-6} алкоксикарбонил или $(C_{1-6}арил)(C_{1-10}алкокси)карбонил$, карбамоил, моно- C_{1-6} карбамоил, ди- C_{1-6} карбамоил или любой из указанных выше, в котором гидрокарбонильный фрагмент сам по себе замещен галогеном, циано, гидрокси, C_{1-2} алкокси, amino, нитро, карбамоилом, карбокси или C_{1-2} алкоксикарбонилом. В группах, содержащих атом кислорода, таких как гидрокси и алкокси, атом кислорода может быть заменен серой, с образованием групп, таких как тио (SH) и тиоалкил (S-алкил). Необязательные заместители поэтому включают группы, такие как S-метил. В тиоалкильных группах атом серы может быть дополнительно окисленным с образованием сульфоксида или сульфона, и такие необязательные заместители, поэтому включают такие группы, как S(O)-алкил и S(O)₂-алкил.

При замещении могут образовываться двойные связи и могут включать гетероатомы. Таким образом, алкильную группу с карбонилем (C=O) вместо CH_2 можно считать замещенной алкильной группой.

Замещенные группы, таким образом, включают, например, CFH_2 , CF_2H , CF_3 , CH_2NH_2 , CH_2OH , CH_2CN , CH_2SCH_3 , CH_2OCH_3 , OMe, OEt, Me, Et, $-OCH_2O-$, CO_2Me , $C(O)Me$, i-Pr, SCF_3 , SO_2Me , NMe_2 , $CONH_2$, $CONMe_2$ и т.д. В случае арильных групп замещение может быть в форме колец из смежных атомов углерода в арильном кольце, например циклические ацетали, такие как O- CH_2 -O.

Настоящее изобретение проиллюстрировано следующими чертежами.

Фиг. 1 - схематическое изображение оценки анализа на повышение функции продуцирования митохондриальной энергии в комплексе I ингибированных клеток. Протокол оценки соединений по настоящему изобретению. В анализе митохондриальную функцию в интактных клетках подавляли ротеноновым ингибитором дыхательного комплекса I. Лекарственные средства-кандидаты сравнивали с эндогенными (клеточно-непроницаемыми) субстратами перед и после пермеабиллизации мембран плазмы для оценки биоэнергетической стимуляции или ингибирования.

Фиг. 2 - схематическое изображение анализа на стимуляцию и ингибирование функции продуцирования митохондриальной энергии в интактных клетках. Протокол оценки потенции соединений по настоящему изобретению. В анализе митохондриальную активность стимулировали разобщением митохондрий протонофором FCCP. Лекарственные средства-кандидаты титровали для получения уровня максимального конвергентного дыхания (произведенного комплексом I и комплексом II). После добавления ротенона получали зависимую стимуляцию комплекса II. Добавляли антимуциновый ингибитор комплекса III для оценки немитохондриального потребления кислорода.

Фиг. 3 - схематическое изображение анализа на предотвращение накопления лактата в клетках, подвергнутых воздействию ингибитора митохондриального комплекса I. Протокол оценки потенции соединения по настоящему изобретению. В анализе митохондриальную функцию в интактных клетках подавляли ротеноновым ингибитором дыхательного комплекса I. По мере сдвига клеток к гликолизу, лактат накапливался в среде. Лекарственные средства-кандидаты сравнивали с эндогенными (клеточно-непроницаемыми) субстратами, и сниженная скорость накопления лактата указывает на восстановление митохондриального продуцирования АТФ.

Фиг. 4 - изображение накопления лактата на модели острого метаболического кризиса у свиней. Накопление лактата на модели острого метаболического кризиса у свиней. На животной модели мито-

хондриальную функцию подавляли путем инфузии ротенонового ингибитора дыхания комплекса I. По мере сдвига клеток к гликолизу лактат накапливался в организме. Значения концентраций артериального лактата показаны для животных, обработанных ротеноном и носителем при указанных скоростях инфузии. Лекарственные средства-кандидаты оценивали у обработанных ротеноном животных, и снижение скорости накопления лактата указывает на восстановление митохондриального продуцирования АТФ.

Фиг. 5 - влияние метформина на митохондриальное дыхание в мононуклеарных пермеабилizированных клетках периферической крови человека (РВМС) и тромбоцитах. (а) По представленному графику одновременного измерения оценивали потребление O_2 при обработке метформинном (1 мМ, черная линия) или носителем (H_2O , серая линия) пермеабилizированных РВМС путем последовательного добавления указанных субстратов конкретных комплексов дыхания и ингибиторов. Графики фазы стабилизации благодаря помехам, возникшим из-за реоксигенации камеры и введения субстрата комплекса IV, были опущены (пунктирные линии). Фрагменты нижних графиков точно определяют дыхательные комплексы, использованные для дыхания при окислении данных субстратов, комплекс I (CI), комплекс II (CII) или оба (CI+II), а также дыхание точно определяли по указанным частям протокола. Оценки дыхания в трех различных состояниях дыхания и комбинации субстратов проиллюстрированы для РВМС (b) и тромбоцитов (c), для контроля (H_2O) и указанных концентраций метформина: способность к окислительному фосфорилированию поддерживается субстратами комплекса I ($OXP_{HOS_{CI}}$), комплекса II, зависящего от максимального потока через электронную транспортную систему (ETS_{CII}) после титрования протонофором FCCP, и комплекса IV (CIV). Значения выражены как среднее значение \pm SEM (стандартная ошибка среднего). * обозначает $P < 0,05$, ** обозначает $P < 0,01$, и *** обозначает $P < 0,001$ при использовании многократных методов сравнения односторонней ANOVA с Holm-Sidak, $n=5$. OXP_{HOS} обозначает окислительное фосфорилирование. ETS обозначает транспортную систему электронов. ROX обозначает концентрацию остаточного кислорода.

Фиг. 6 - сравнение токсичности в зависимости доза-ответ, показанной метформинном и фенформинном в отношении митохондриальной дыхательной способности во время окислительного фосфорилирования, поддерживаемого связанными с комплекс I субстратами ($OXP_{HOS_{CI}}$) в пермеабилizированных тромбоцитах человека. Оценка дыхания представлена как среднее значение \pm SEM, и выравнивание стандартной нелинейной кривой применяли для получения значения половины максимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}) для метформина и фенформина. * обозначает $P < 0,05$, ** обозначает $P < 0,01$, и *** обозначает $P < 0,001$ в сравнении с контролем при использовании многократных методов сравнения одностороннего ANOVA с Holm-Sidak, $n=5$.

Фиг. 7 - зависимое от времени и дозы воздействие метформина на митохондриальное дыхание в интактных тромбоцитах человека. (а) Обычное дыхание тромбоцитов, т.е. клеточное дыхание при их снабжении эндогенными субстратами и требуемым АТФ, отслеживали в течение 60 мин инкубации указанных концентраций метформина или носителя (H_2O), которое прослеживали по (b) максимальной способности дыхания, индуцированной титрованием протонофором FCCP, для определения максимального потока через систему транспорта электронов (ETS) интактных клеток. Данные выражены как среднее значение \pm SEM, $n=5$. * обозначает $P < 0,05$, ** обозначает $P < 0,01$, и *** обозначает $P < 0,001$ при использовании методов сравнения одностороннего ANOVA (b) и двустороннего ANOVA (a) с Holm-Sidak's тестом POST-hoc.

Фиг. 8 - воздействие метформина и фенформина на продуцирование лактата и pH в суспензиях интактных тромбоцитов человека. Тромбоциты инкубировали в забуференном фосфатом солевом растворе, содержащем глюкозу (10 мМ), в течение 8 ч или с метформинном (10 мМ, 1 мМ), фенформинном (0,5 мМ), ротеноновым ингибитором комплекса I (2 мкМ) или носителем (DMCO, контроль). (а) Уровни лактата определяли каждые 2 ч ($n=5$) и (b) pH измеряли каждые 4 ч ($n=4$). Данные выражены как среднее значение \pm SEM. * обозначает $P < 0,05$, ** обозначает $P < 0,01$, и *** обозначает $P < 0,001$ при использовании методов двустороннего ANOVA с Holm-Sidak's тестом POST-hoc.

Фиг. 9 - инкубация интактных тромбоцитов человека ($200 \cdot 10^6$ /мл) в PBS, содержащем 10 мМ глюкозы. (А) Клетки, инкубированные с 10 мМ метформинном, обрабатывали либо сукцинатом или NV118 в последовательных добавлениях 250 мкМ каждые 30 мин. Перед добавлением NV118 во временной точке 0 ч клетки инкубировали только с метформинном или носителем в течение 1 ч, чтобы установить равные первоначальные уровни лактата (данные не показаны). Отбирали пробы концентраций лактата каждые 30 мин. (В) Продуцирование лактата рассчитывали по выравниванию нелинейной регрессии и 95% доверительные интервалы рассчитывали для кривых время-лактат. Клетки, инкубированные с метформинном, значительно выше продуцировали лактат, чем контроль, и добавления сукцината этого не изменили. Продуцирование лактата значительно снижалось при добавлении NV118 в клетки, инкубированные с метформинном. (С) Продуцирование лактата, вызванное ротеноном, может быть аналогичным образом ослаблено повторными добавлениями NV118.

Фиг. 10 - инкубация интактных тромбоцитов человека ($200 \cdot 10^6$ /мл) в PBS, содержащем 10 мМ глюкозы. (А) Клетки, инкубированные с 10 мМ метформинном, обрабатывали либо сукцинатом или NV189 в последовательных добавлениях по 250 мкМ каждые 30 мин. Перед добавлением NV189 во временной

точке 0 ч клетки инкубировали только с метформином или носителем в течение 1 ч, чтобы установить одинаковые начальные уровни лактата (данные не показаны). Образцы концентраций лактата отбирали каждые 30 мин. (B) Продуцирование лактата рассчитывали по выравниванию нелинейной регрессии и 95% доверительные интервалы рассчитывали для кривых время-лактат. Клетки, инкубированные с метформином, имели существенно более высокое продуцирование лактата, чем контроль, и добавления сукцината этого не изменяли. Продуцирование лактата существенно снижалось при добавлении NV189 в клетки, инкубированные с метформином. (C) Продуцирование лактата, индуцированное ротеноном, может быть аналогичным образом ослаблено повторными добавлениями NV189. При добавлении также и антимицина воздействие NV189 на комплекс 2 прекращалось ингибирующим эффектом антимицина на комплекс III.

Фиг. 11 - инкубация интактных тромбоцитов человека ($200 \cdot 10^6/\text{мл}$) в PBS, содержащем 10 мМ глюкозы. (A) Клетки, инкубированные с 10 мМ метформином, обрабатывали либо сукцинатом или NV241 в последовательных добавлениях по 250 мкМ каждые 30 мин. Перед добавлением NV241 во временной точке 0 ч клетки инкубировали только с метформином или носителем в течение 1 ч, чтобы установить одинаковые начальные уровни лактата (данные не показаны). Образцы концентраций лактата отбирали каждые 30 мин. (B) Продуцирование лактата рассчитывали по выравниванию нелинейной регрессии и 95% доверительные интервалы рассчитывали для кривых время-лактат. Клетки, инкубированные с метформином, имели существенно более высокое продуцирование лактата, чем контроль, и добавления сукцината этого не изменяли. Продуцирование лактата существенно снижалось при добавлении NV241 к клеткам, инкубированным с метформином. (C) Продуцирование лактата, индуцированное ротеноном, может быть аналогичным образом ослаблено повторными добавлениями NV241.

Фиг. 12 - инкубация тромбоцитов ($200 \cdot 10^6/\text{мл}$) в PBS, содержащем 10 мМ глюкозы, с отобранными образцами концентраций лактата каждые 30 мин. (A) В течение 3 ч инкубации клетки, обработанные или ротеноном (2 мкМ), или носителем, отслеживали по изменению концентраций лактата в среде с течением времени. Также клетки инкубировали с ротеноном вместе с NV189 и отслеживали клетки с ротеноном, NV189 и антимициновым ингибитором комплекса III (1 мкг/мл). Перед добавлением NV189 во временной точке 0 ч клетки инкубировали только с ротеноном или носителем в течение 1 ч, чтобы установить одинаковые начальные уровни лактата (данные не показаны). Ротенон увеличивает продуцирование лактата клеток, но оно возвращается к нормальному (такой же наклон кривой) при совместной инкубации с NV189 (в последовательных добавлениях по 250 мкМ каждые 30 мин). В присутствии антимицина NV189 также не может функционировать на уровне комплекса II, и продуцирование лактата снова увеличивается на таком же уровне, как в присутствии только ротенона. (B) Аналогичный показатель продуцирования лактата, как с ротеноном, может быть индуцирован инкубацией с метформином при концентрации 10 мМ.

Экспериментальная часть

Общие биологические методы.

Специалист в данной области сможет определить фармакокинетику и биодоступность соединения по настоящему изобретению, используя *in vivo* и *in vitro* методы, известные специалисту в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, такие, как описано ниже и у Gallant-Haidner et al., 2000 и Terpanier et al., 1998 и в приведенных там ссылках. Биодоступность соединения определяется рядом факторов (например, растворимостью в воде, клеточной проницаемостью мембраны, степенью связывания белков и метаболизмом и стабильностью), каждый из которых может быть определен тестами *in vitro*, как описано в примерах данного описания, и оценен специалистом в данной области в том, что улучшение одного или более из этих факторов приведет к улучшению биодоступности соединения. Альтернативно, биодоступность соединения по настоящему изобретению может быть измерена методами *in vivo*, как описано более подробно ниже или в приведенных в данном описании примерах.

Для того чтобы измерить биодоступность *in vivo*, соединение может быть введено для испытания животному (например, мышь или крысы) как внутрибрюшинно (в.б.) или внутривенно (в.в), так и перорально (п.о.), и образцы крови отбираются в регулярных временных интервалах для проверки того, как изменяется концентрация препарата в плазме с течением времени. Временной курс концентрации в плазме от времени может быть использован для расчета абсолютной биодоступности данного соединения в виде процента от использования стандартных моделей. Примеры конкретных протоколов будут описаны ниже.

Например, мышей или крыс дозируют 1 или 3 мг/кг соединения по настоящему изобретению в.в. или 1, 5 или 10 мг/кг соединения по настоящему изобретению п.о. Образцы крови отбирают в 5 мин, 15 мин, 1 ч, 4 ч и 24 ч интервалы и концентрацию соединения по настоящему изобретению в образце определяют посредством ЖХМС-МС. Временную зависимость концентраций в плазме или цельной крови можно затем использовать для получения ключевых параметров, таких как площадь под кривой концентрация в плазме или в крови-время (AUC - которая прямо пропорциональна общему количеству неизмененного лекарственного препарата, которое достигает систему кровообращения), максимальная концентрация препарата (пик) в плазме или в крови, время, за которое достигается максимальная концентрация

препарата в плазме или в крови (пиковое время). Дополнительные факторы, которые используются для точного определения биодоступности, включают: конечное полувыведение данного соединения, общий клиренс, устойчивый объем распределения и F%. Эти параметры затем анализируют некомпартментными или компартментными методами, что дает вычисленный процент биодоступности, для примера этого типа метода см. Gallant-Haidner et al., 2000 и Trepanier et al., 1998, и приведенные там ссылки.

Эффективность соединения по настоящему изобретению может быть протестирована с использованием одного или нескольких методов, описанных ниже.

I. Анализ для оценки стимуляции и ингибирования функции продуцирования митохондриальной энергии в интактных клетках.

Респирометрия высокого разрешения - А - Общий метод.

Измерение митохондриального дыхания осуществляют на оксиграфе высокого разрешения (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) при постоянной температуре 37°C. Выделенные тромбоциты человека, лейкоциты, фибробласты, мышечные волокна сердца человека или другие типы клеток, содержащие живые митохондрии, суспендируют в 2 мл стеклянной камере при достаточной концентрации, с получением потребления кислорода в среде ≥ 10 пмоль O_2 c^{-1} $мл^{-1}$.

Респирометрия высокого разрешения - В (используется в исследованиях лактата).

Респирометрические измерения осуществляли в реальном времени с использованием оксиграфа высокого разрешения (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Экспериментальные условия во время измерений были следующими: 37°C, объем активной камеры 2 мл и скорость мешалки 750 об/мин. Концентрации O_2 в камере поддерживали при 200-50 мкМ с реоксигенированием камеры во время экспериментов при необходимости (Sjovall et al., 2013a). Для записи данных использовали DatLab программное обеспечение версии 4 и 5 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Настройки, ежедневную калибровку и исправления приборного фона проводили в соответствии с инструкциями производителя. Измерения дыхания выполняли или в буфере, содержащем 0,5 мМ EGTA, 3 мМ $MgCl_2$, 60 мМ К-лактобионат, 20 мМ таурин, 10 мМ KH_2PO_4 , 20 мМ HEPES, 110 мМ сахарозу и 1 г/л бычьего сывороточного альбумина (MiR05), или в забуференном фосфатом солевом растворе (PBS) с глюкозой (5 мМ) и EGTA (5 мМ), как указано в соответствующих разделах. Значения дыхания корректировали для фактора растворимости кислорода в обеих средах (0,92) (Pesta and Gnaiger, 2012). Продуцирование лактата интактных тромбоцитов человека определяли в PBS, содержащем 10 мМ глюкозы. Все измерения выполняли при концентрации тромбоцитов 200×10^6 клеток на 1 мл или при концентрации РВМС 5×10^6 клеток на 1 мл.

Оценка соединений.

Использовали четыре конкретных протокола оценки в интактных клетках.

(1) Анализ на стимуляцию функции продуцирования митохондриальной энергии в клетках с ингибированным дыхательным комплексом I.

Клетки помещали в буфер, содержащий 110 мМ сахарозу, HEPES 20 мМ, таурин 20 мМ, К-лактобионат 60 мМ, $MgCl_2$ 3 мМ, KH_2PO_4 10 мМ, EGTA 0,5 мМ, BSA 1 г/л, pH 7,1. После создания базовой линии дыхания эндогенными субстратами, комплекс I ингибировали ротеноном 2 мкМ. Соединения, растворенные в ДМСО, титровали в диапазоне от 10 мкМ до 10 мМ конечной концентрации. Затем клеточные мембраны пермеабелизировали с дигитонином ($1 \text{ мг}/1 \times 10^6$ трц) для обеспечения возможности поступления внеклеточной высвобожденной энергии субстрата или клеточно-непроницаемой энергии субстратов. После стабилизации дыхания добавляли сукцинат 10 мМ, в качестве опыта сравнения для запуска дыхания, для того чтобы вызвать нормальный транспорт электронов в комплексе I. После стабилизации дыхания эксперимент завершали добавлением антимицина в конечной концентрации 1 мкг/мл и измеряли любое остаточное немитохондриальное потребление кислорода. Увеличение частоты дыхания в описываемом протоколе тесно связано с синтезом АТФ при окислительном фосфорилировании, за исключением случаев, когда клетки являются несвязанными (т.е. протонной утечки без продуцирования АТФ). Разобшение тестировали добавлением олигомицинового ингибитора АТФ синтазы ($1-2 \text{ мкг мл}^{-1}$) по протоколу 3, по которому степень разобщения соответствует скорости дыхания после добавления олигомицина.

(2) Анализ на стимуляцию и ингибирование функции продуцирования митохондриальной энергии в интактных клетках.

Во втором протоколе использовали такой же буфер, как описано выше. После установки основного дыхания добавляли митохондриально несвязанный FCCP при концентрации 2 нМ для увеличения необходимого метаболизма. Соединения, растворенные в ДМСО, титровали в несколько стадий от 10 мкМ до 10 мМ конечной концентрации для того, чтобы оценить диапазон концентрации стимуляции и/или ингибирования дыхания. Эксперимент завершали добавлением 2 мкМ ротенона для ингибирования комплекса I, выявляя оставшийся субстрат, использованный для того, чтобы вызвать нормальный транспорт электронов в этом дыхательном комплексе, и 1 мкг/мл антимицинового ингибитора комплекса III для измерения немитохондриального потребления кислорода.

(3) Анализ для оценки разобщения в интактных клетках.

По третьему протоколу использовали такой же буфер, как описано выше. После установки базового дыхания добавляли 1 мМ соединения, растворенного в ДМСО. Затем добавляли олигомициновый ингибитор АТФ-синтазы. Измерение снижения дыхания заключается в определении количества потребленного кислорода, которое связано с синтезом АТФ. Отсутствие или только незначительное сокращение показывает, что данное соединение является стимулятором "протонной" утечки над внутренней митохондриальной мембраной. Несвязанный FCCP затем титровали для индуцирования максимального несвязанного дыхания. Затем добавляли ротенон (2 мкМ) для ингибирования комплекса I, выявляя оставшийся субстрат, использованный для того чтобы вызвать нормальный транспорт электронов в этом дыхательном комплексе. Эксперимент завершали добавлением 1 мкг/мл антимицинового ингибитора комплекса III для измерения немитохондриального потребления кислорода.

(4) Анализ на стимуляцию функции продуцирования митохондриальной энергии в клетках с ингибированным дыхательным комплексом I в плазме человека.

Интактные клетки крови человека инкубировали в плазме того же донора. После создания базовой линии дыхания с эндогенными субстратами, комплекс I ингибировали ротеноном 2 мкМ. Соединения, растворенные в ДМСО, титровали в диапазоне от 10 мкМ до 10 мМ конечной концентрации. Эксперимент завершали добавлением антимицина в конечной концентрации 1 мкг/мл и измеряли любое остаточное немитохондриальное потребление кислорода.

Свойства, предъявляемые к соединению, в анализе на дыхание.

В описанных протоколах наиболее подходящее соединение должно стимулировать дыхание в интактных клетках при низкой концентрации без ингибирующего влияния ни на стимулированное сукцинатом дыхание после пермеабилзации по протоколу 1, ни на эндогенное дыхание по протоколу 2. Диапазон концентраций от максимально стимулирующего действия до ингибирования должен быть максимально широким. После ингибирования митохондриальными токсинами дыхания в комплексе III с нормальным транспортом электронов, дыхание должно прекращаться. Следует обратиться к фиг. 1 и перечисленному ниже.

Свойства, предъявляемые к соединениям:

максимальная полезность, достигнутая при низких концентрациях лекарственного средства

a значительно больше, чем a',

a подходит к b',

c подходит к c',

d подходит к d'.

Соединения проникаемые через клеточные мембраны определены в анализе как

a подходит к a'.

Немитохондриальное потребление кислорода, индуцированное лекарственным средством-кандидатом, считается определенным, когда

d больше, чем d'.

II. Анализ на предупреждение накопления лактата в клетках, подвергнутых воздействию ингибитора митохондриального комплекса I.

Интактные тромбоциты человека, лейкоциты, фибропласты или другие типы клеток, содержащие живые митохондрии, инкубировали в забуференном фосфатом солевом растворе, содержащем 10 мМ глюкозы, в течение 8 ч с ингибирующими комплекс I лекарственными средствами, такими как либо метформин (10 мМ), фенформин (0,5 мМ) или ротенон (2 мкМ). Ингибирование митохондриального продуцирования АТФ через окислительное фосфорилирование этими соединениями увеличивает накопление лактата путем гликолиза. Уровни лактата определяли каждые 2 ч (или более часто, например каждые 30 мин) при использовании тестметра Лактат Pro™ 2 для определения лактата в крови (Akray, Alere AB, Lidingö, Sweden) или аналогичных типов измерителей. Инкубацию осуществляли при 37°C. pH измеряли в начале, спустя 4 и после 8 ч (или чаще) инкубации с использованием стандартного pH-метра, например PHM210 (Radiometer, Copenhagen, Denmark). Для анализа лекарственные средства-кандидаты добавляли сначала или спустя 30-60 мин при концентрациях в интервале от 10 мкМ до 5 мМ. Предотвращение накопления лактата сравнивали в параллельных экспериментах только с соединением-носителем, обычно ДМСО. Для того чтобы оценить специфику лекарственного средства-кандидата, его также тестировали в комбинации с обратным ингибитором дыхания, таким как антимициновый ингибитор комплекса III, при 1 мкг/мл, который отменяет действие лекарственного средства-кандидата и восстанавливает продуцирование лактата. Поэтому использование антимицина также является контролем для чрезмерного воздействия лекарственных средств-кандидатов на возможность клеток, используемых в анализе, продуцировать лактат. (см., например, фиг. 9, 10 и 11).

Данные анализов.

Статистические анализы осуществляли с использованием программного обеспечения Graph Pad PRISM (GraphPad Software version 6,03, La Jolla, California, USA). Все данные по дыханию, лактату и pH выражены как среднее значение ± SEM. Соотношения нанесены на графики в виде отдельных и средних.

Односторонний ANOVA используется для сравнения одного фактора из трех или более групп (концентрация лекарственного средства), и двусторонняя смешанная модель ANOVA используется для сравнения двух факторов (времени и концентрации лекарственного средства/обработка) из трех или более групп. Ретроспективные анализы для введения поправок при нескольких сравнениях проводили согласно Holm-Sidak. Корреляции выражены как r^2 и p значения. Выравнивание стандартной нелинейной кривой применяли для расчета значения половины максимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}). Результаты считались статистически значимыми при $P < 0,05$.

Свойства, предъявляемые к соединению, в анализе накопления клеточного лактата.

(1) Наиболее подходящее соединение должно предотвращать накопление лактата, индуцированное ингибированием комплекса I, т.е. накопление лактата, приближенное к такой же степени, как в клетках с неингибированным комплексом I.

(2) Предотвращать накопление лактата, которое отменяется ингибитором дыхания с нормальным транспортом электронов, таким как антимицин.

III. Анализ на предотвращение накопления лактата и энергетическое ингибирование на модели острого кризиса метаболизма у свиней.

Перспективные лекарственные-средства-кандидаты тестируются в доказательство концепции *in vivo* на модели метаболического кризиса из-за митохондриальной дисфункции в комплексе I. Модель имитирует тяжелые условия, которые могут возникнуть у детей с генетическими мутациями в митохондриальном комплексе I, или у пациентов, подвергнутых лечению и получивших клиническую передозировку используемых лекарственных средств, таких как метформин, который ингибирует комплекс I, когда накапливается в клетках и тканях.

В исследовании использовали самок свиней ландрас. Их подвергали анестезии, проводили хирургию, при которой им вводили катетеры для инфузии и активного мониторинга. Метаболический кризис индуцировали инфузией ротенонового ингибитора митохондриального комплекса I при скорости 0,25 мг/кг/ч в течение 3 ч, а затем инфузией при 0,5 мг/кг/ч в течение 1 ч (носителем, состоящим из 25% NMP/4% полисорбат 80/71% воды). Сердечно-сосудистые параметры, такие как артериальное давление, измеряли непрерывно через катетер, помещенный в бедренной артерии. Минутный сердечный выброс (CO) измеряли и записывали каждые 15 мин термодилуцией, и легочное артериальное давление (ЛАД, систолическое и диастолическое), центральное венозное давление (ЦВД) и SvO_2 записывали каждые 15 мин, давление заклинивания легочных капилляров (ДЗЛК) записывали каждые 30 мин с катетера Swan-Ganz. Косвенную калориметрию осуществляли, например, с помощью выбранного устройства Quark RMR ICU (Cosmed, Rome, Italy). Газы и электролиты в крови определяли как в артериальной, так и венозной крови, собранной из бедренной артерии и катетеров Swan-Ganz, и анализировали с использованием газоанализатора для крови ABL725 (Radiometer Medical Aps, Brønshøj, Denmark). Анализы включали анализ pH, BE, гемоглобина, HCO_3^- , pO_2 , pCO_2 , K^+ , Na^+ , глюкозы и лактата.

Свойства, предъявляемые к соединению, в доказательство концепции *in vivo* на модели метаболического кризиса.

Наиболее подходящее соединение должно уменьшать накопление лактата и снижать pH у свиней с метаболическим кризисом, вызванным ингибированием комплекса I. Расход энергии, сниженный после ингибирования комплекса I, должен уменьшаться. Соединение не должно вызывать каких-либо явных негативных последствий, что определяется по анализам крови и гемодинамическим анализам.

Метаболический метод.

Лейкоциты или тромбоциты собирали стандартными методами и суспендировали в MiR05, буфере, содержащем 110 mM сахарозы, HEPES 20 mM, таурин 20 mM, K-лактобионат 60 mM, $MgCl_2$ 3 mM, KH_2PO_4 10 mM, EGTA 0,5 mM, BSA 1 г/л, с или без 5 mM глюкозы, pH 7,1. Образец инкубировали при перемешивании в оксиграфе высокого разрешения (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) при постоянной температуре 37°C.

Спустя 10 мин добавляли ротенон в ДМСО (2 мкМ) и продолжали инкубацию. Спустя еще 5 мин добавляли тестируемое соединение в ДМСО, необязательно с дальнейшим тестированием соединения после и дополнительного периода инкубации. Во время инкубации измеряли потребление O_2 в режиме реального времени.

В конце инкубации клетки собирали центрифугированием и промывали 5% раствором маннитола и экстрагировали метанолом. Добавляли водный раствор, содержащий внутренний стандарт, и полученный раствор подвергали центрифугированию в подходящей трубке для центрифугирования с фильтром.

Полученный в результате фильтрат сушили в вакууме перед анализом СЕ-МС для количественной оценки различных первичных метаболитов методом Ooga et al. (2011) и Ohashi et al. (2008).

В частности, уровни метаболита в цикле ТСА и при гликолизе оценивали на предмет воздействия соединений по настоящему изобретению.

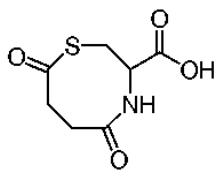
Ooga et al., *Metabolomic anatomy of an animal model revealing homeostatic imbalances in dyslipidaemia*, *Molecular Biosystems*, 2011, 7, 1217-1223 Ohashi et al., *Molecular Biosystems*, 2008, 4, 135-147.

Материалы.

Если не указано иное, все реагенты получали из коммерческих источников.

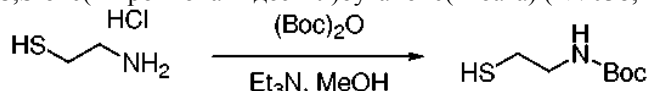
Примеры

Пример 1.

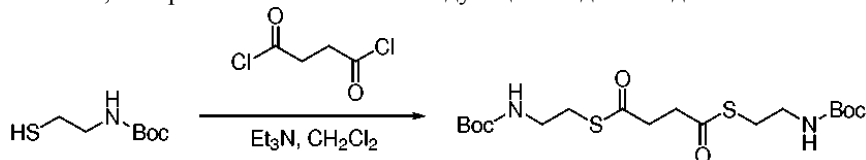


Сукцинилхлорид (0,1 моль) и триэтиламин (0,4 моль) растворяли в DCM и добавляли цистеин. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Реакционную смесь добавляли в разбавленную водную хлористоводородную кислоту и затем промывали водой и насыщенным раствором соли. Органические слои сушили над сульфатом магния и концентрировали в вакууме. Целевое соединение очищали хроматографией на силикагеле.

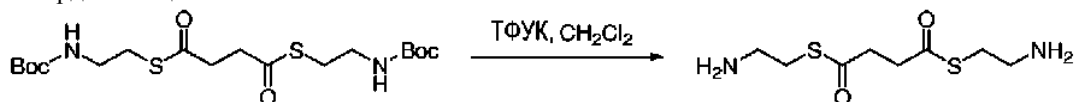
Пример 2. Синтез S,S-бис(2-пропионамидоэтил)бутанбис(тиоата) (NV038, 01-038).



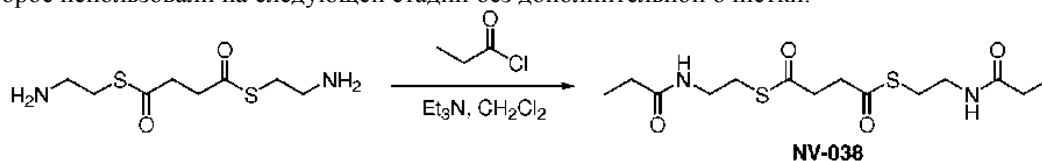
К раствору гидрохлорида цистеина (5,0 г, 44 ммоль) в CH₃OH (50 мл) добавляли Et₃N (4,4 г, 44 ммоль) с последующим добавлением (Boc)₂O (10,5 г, 48,4 ммоль), полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Полученную реакционную смесь концентрировали в вакууме. Полученный остаток растворяли в CH₂Cl₂, промывали 2М водным раствором HCl и насыщенным раствором соли, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали с получением трет-бутил 2-меркаптоэтилкарбамата в виде бесцветного масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.



Трет-Бутил 2-меркаптоэтилкарбамат (9,8 г, 55,0 ммоль) и Et₃N (5,6 г, 55,0 ммоль) растворяли в CH₂Cl₂ (100 мл), полученную смесь охлаждали до 0°C, по каплям добавляли сукцинилхлорид (2,1 г, 13,8 ммоль). Затем полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Полученную реакционную смесь концентрировали и остаток очищали колоночной хроматографией (петролейный эфир/EtOAc=1/10-1/1). S,S-бис(2-(трет-бутоксикарбониламино)этил)бутанбис(тиоат) получали в виде белого твердого вещества.

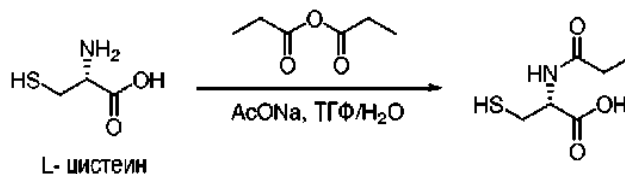


Смесь S,S-бис(2-(трет-бутоксикарбониламино)этил)бутанбис(тиоата) (2,0 г, 4,58 ммоль) и ТФУК (10 мл) в CH₂Cl₂ (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Полученную реакционную смесь концентрировали с получением S,S-бис(2-аминоэтил)бутанбис(тиоата) в виде желтого масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.



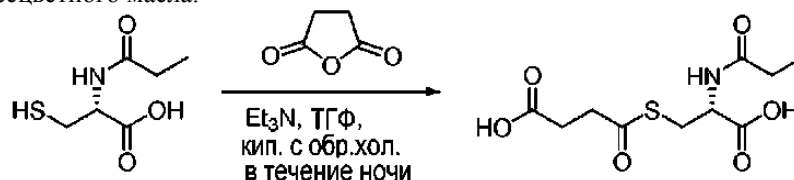
S,S-бис(2-аминоэтил)бутанбис(тиоат) (1,1 г, 4,58 ммоль) и Et₃N (1,4 г, 13,74 ммоль) растворяли в CH₂Cl₂ (15 мл), полученную смесь охлаждали до 0°C, по каплям добавляли пропионилхлорид (0,9 г, 10,07 ммоль). Затем полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Полученную реакционную смесь концентрировали и остаток очищали препаративной ТСХ (CH₂Cl₂/MeOH=15/1). S,S-бис(2-пропионамидоэтил)бутанбис(тиоат) получали в виде белого твердого вещества.

Пример 3. Синтез (R)-4-(2-карбоксит-2-пропионамидоэтилтио)-4-оксобутановой кислоты (NV-041, 01-041).



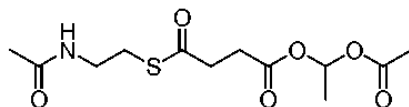
К смеси L-цистеина (2,00 г, 16,5 ммоль) в смеси ТГФ/Н₂О (8 мл/2 мл) добавляли NaOAc (2,70 г, 33,0

ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 20 мин. Полученную реакционную смесь охлаждали до 5°C перед добавлением по каплям пропионового ангидрида (2,30 г, 17,6 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и затем нагревали при кипячении с обратным холодильником в течение 4 ч. Полученную реакционную смесь охлаждали и подкисляли до pH 5 добавлением 4Н НСl. Полученный в результате раствор упаривали при пониженном давлении для удаления ТГФ. Полученный остаток очищали препаративной ВЭЖХ (элюируя H₂O (0,05% ТФУК) и CH₃CN), что давало 1,00 г (R)-3-меркапто-2-пропионамидопропановую кислоту в виде бесцветного масла.



Раствор (R)-3-меркапто-2-пропионамидопропановой кислоты (1,00 г, 5,65 ммоль), янтарного ангидрида (565 мг, 5,65 ммоль) и Et₃N (572 мг, 5,65 ммоль) в 10 мл ТГФ нагревали при кипячении с обратным холодильником в течение ночи. Полученную реакционную смесь концентрировали и остаток очищали препаративной ВЭЖХ (элюируя H₂O (0,05% ТФУК) и CH₃CN), с получением (R)-4-(2-карбоксии-2-пропионамидоэтилтио)-4-оксобутановой кислоты в виде бесцветного масла.

Пример 4.



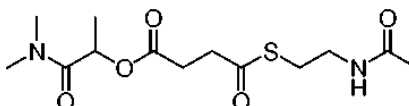
Стадия 1.

Триэтиламин (0,24 моль) добавляли к раствору N-ацетилцистеина (0,2 моль) в DCM. По каплям добавляли 4-хлор-4-оксобутановую кислоту (0,1 моль), полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Полученную смесь добавляли в разбавленную водную хлористоводородную кислоту и экстрагировали этилацетатом, затем промывали водой и насыщенным раствором соли. Органические слои сушили над сульфатом магния и концентрировали в вакууме.

Стадия 2.

Продукт стадии 3 (0,1 моль), 1-бромэтиловый эфир уксусной кислоты (0,1 моль) и карбонат цезия (0,12 моль) суспендировали в ДМФА и перемешивали при 60°C в инертной атмосфере. Полученной суспензии давали охладиться до комнатной температуры и добавляли этилацетат и тщательно промывали разбавленной водной хлористоводородной кислотой и водой. Органическую часть сушили над сульфатом магния и концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией.

Пример 5.



Стадия 1.

Триэтиламин (0,24 моль) добавляли к раствору N-ацетилцистеина (0,2 моль) в DCM. По каплям добавляли 4-хлор-4-оксобутановую кислоту (0,1 моль) и полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. Полученную смесь добавляли в разбавленную водную хлористоводородную кислоту и экстрагировали этилацетатом, затем промывали водой и насыщенным раствором соли. Органические слои сушили над сульфатом магния и концентрировали в вакууме.

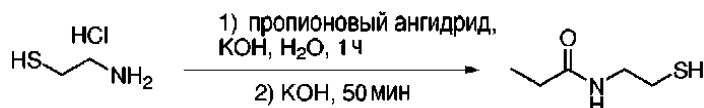
Стадия 2.

Диметиламин (0,1 моль) и триэтиламин (0,1 моль) разбавляли в дихлорметане, полученный раствор охлаждали до 0°C и добавляли 2-хлорпропионилхлорид (0,1 моль) в DCM, полученному раствору давали нагреться до комнатной температуры и оставляли перемешиваться в инертной атмосфере. Полученный раствор промывали водой. Органические части объединяли и летучие вещества удаляли в вакууме. Полученный остаток очищали хроматографией на силикагеле.

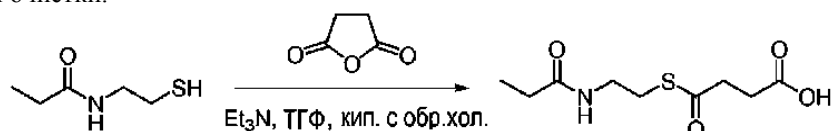
Стадия 3.

2-Хлор-N,N-диметилпропионамид (0,1 моль), продукт стадии 1 (0,1 моль), карбонат цезия (0,1 моль) и йодид натрия (0,01 моль) суспендировали в ДМФА, полученную суспензию перемешивали при 80°C в инертной атмосфере. Данную суспензию охлаждали до комнатной температуры, разбавляли этилацетатом и промывали водой. Органические части концентрировали в вакууме. Полученный остаток очищали хроматографией на силикагеле с получением целевого соединения.

Пример 6. Синтез 4-оксо-4-(2-пропионамидоэтилтио)бутановой кислоты (NV114, 01-114).

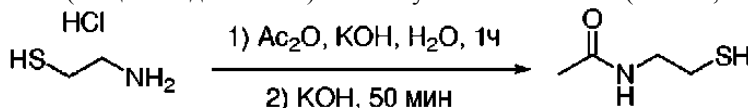


Пропионовый ангидрид (11,7 г, 89,7 ммоль) и водный KOH (8M, для поддержания pH 8) по каплям добавляли в перемешиваемый раствор гидрохлорида цистеамина (3,40 г, 30,0 ммоль) в 24 мл воды. Полученную смесь нейтрализовали добавлением 2Н HCl и перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Полученный раствор охлаждали на ледяной бане и медленно добавляли твердый KOH (6,00 г, 105 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 50 мин при комнатной температуре. После насыщения NaCl и нейтрализации 6Н HCl, полученную смесь экстрагировали CH₂Cl₂ (4×30 мл). Объединенные CH₂Cl₂ экстракты сушили (Na₂SO₄) и концентрировали в вакууме, что давало N-(2-меркаптоэтил)пропионамид в виде бесцветного масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

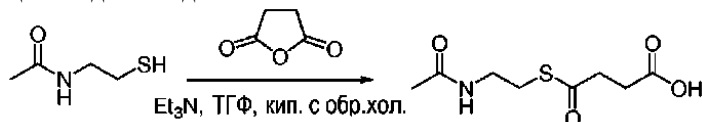


Раствор N-(2-меркаптоэтил)пропионамида (2,00 г, 15,0 ммоль), янтарного ангидрида (1,50 г, 15,0 ммоль) и Et₃N (1,50 г, 15,0 ммоль) в 20 мл ТГФ нагревали при кипячении с обратным холодильником в течение ночи. Полученную реакционную смесь концентрировали и остаток очищали препаративной ВЭЖХ (элюируя H₂O (0,05% ТФУК) и CH₃CN), с получением 4-оксо-4-(2-пропионамидоэтилтио)бутановой кислоты в виде бесцветного масла.

Пример 7. Синтез 4-(2-(2-ацетидамоэтилтио)-4-оксобутановой кислоты (NV108, 01-108).

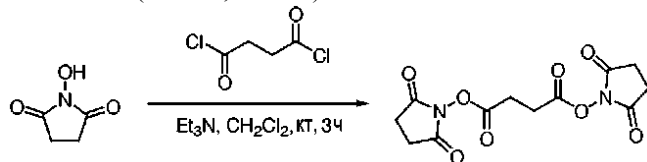


Уксусный ангидрид (8,48 мл, 90,0 ммоль) и водный KOH (8M, для поддержания pH 8) по каплям добавляли в перемешиваемый раствор гидрохлорида цистеамина (3,40 г, 30,0 ммоль) в 24 мл воды. pH затем доводили до 7 добавлением 2Н HCl. Полученную смесь перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре, затем полученный раствор охлаждали на ледяной бане. К полученному выше раствору медленно добавляли твердый KOH (6,0 г, 105 ммоль), полученную в результате смесь перемешивали в течение 50 мин при комнатной температуре. После насыщения NaCl и нейтрализации 6Н HCl полученную смесь экстрагировали CH₂Cl₂ (4×30 мл). Объединенные CH₂Cl₂ экстракты сушили (Na₂SO₄) и концентрировали в вакууме, что давало N-(2-меркаптоэтил)ацетамид в виде бесцветного масла, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

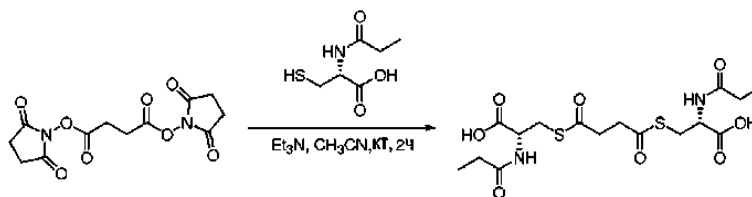


Раствор N-(2-меркаптоэтил)ацетамида (1,50 г, 12,7 ммоль), янтарного ангидрида (1,3 г, 12,7 ммоль) и Et₃N (1,3 г, 12,7 ммоль) в 20 мл ТГФ нагревали при кипячении с обратным холодильником в течение ночи. Полученную реакционную смесь концентрировали, остаток очищали препаративной ВЭЖХ (элюируя H₂O (0,05% ТФУК) и CH₃CN), с получением 4-(2-(2-ацетидамоэтилтио)-4-оксобутановой кислоты в виде бесцветного масла.

Пример 8. Синтез (R)-3-(4-((R)-2-карбоксит-2-пропионамидоэтилтио)-4-оксобутаноилтио)-2-пропионамидопропановой кислоты (NV099, 01-099).

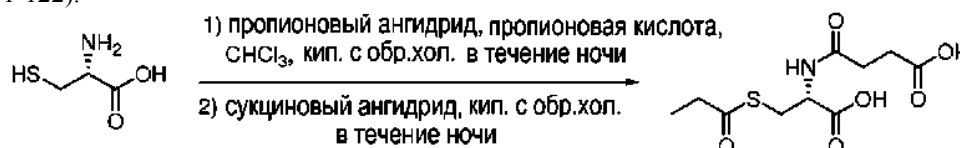


К смеси N-гидроксисукцинимида (3,00 г, 26,1 ммоль) и Et₃N (3,20 г, 31,3 ммоль) в CH₂Cl₂ (60 мл) по каплям добавляли сукцинилхлорид (2,00 г, 13,0 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч перед разбавлением водой (60 мл). Полученную в результате суспензию фильтровали, промывали водой и CH₂Cl₂. Осадок на фильтре собирали и сушили, что давало бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)сукцинат в виде серого твердого вещества.



Смесь N-(2-меркаптоэтил)пропионамида (400 мг, 2,26 ммоль), бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)сукцината (353 мг, 1,13 ммоль) и ТЕА (286 мг, 2,83 ммоль) в 3,0 мл CH_3CN перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Прозрачный реакционный раствор непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (элюируя H_2O (0,05% ТФУК) и CH_3CN) с получением (R)-3-(4-((R)-2-карбокси-2-пропионамидоэтилтио)-4-оксобутаноилтио)-2-пропионамидпропановой кислоты в виде бесцветного масла.

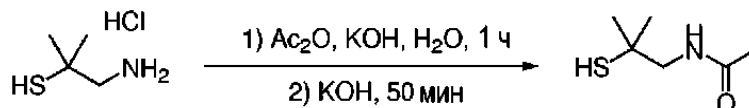
Пример 9. Синтез (R)-4-(1-карбокси-2-(пропионилтио)этиламино)-4-оксобутановой кислоты (NV122, 01-122).



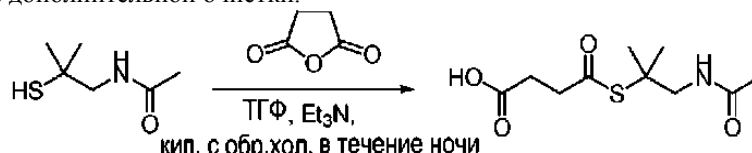
К смеси (R)-3-меркапто-2-пропионамидпропановой кислоты (1,00 г, 8,25 ммоль) и пропионовой кислоты (1,0 мл) в CHCl_3 (10 мл) по каплям добавляли пропионовый ангидрид (1,13 г, 8,67 ммоль). Полученную реакционную смесь нагревали при кипячении с обратным холодильником в течение ночи. Полученную реакционную смесь охлаждали и добавляли янтарный ангидрид (1,00 г, 9,99 ммоль). Полученную смесь кипятили с обратным холодильником в течение ночи перед концентрированием при пониженном давлении.

Полученный остаток очищали препаративной ВЭЖХ (элюируя H_2O (0,05% ТФУК) и CH_3CN) с получением (R)-4-(1-карбокси-2-(пропионилтио)этиламино)-4-оксобутановой кислоты в виде не совсем белого твердого вещества.

Пример 10. Синтез 4-(1-ацетиамидо-2-метилпропан-2-илтио)-4-оксобутановой кислоты (NV188, 01-188).

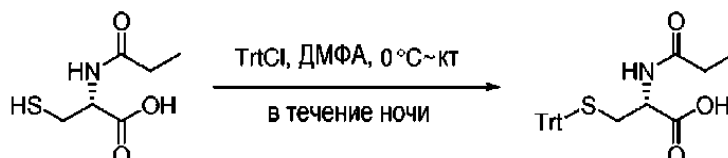


В перемешиваемый раствор гидрохлорида цистеамина (2,00 г, 14,1 ммоль) в 15 мл воды по каплям добавляли уксусный ангидрид (4,30 г, 42,4 ммоль) и водный KOH (8M, для поддержания pH 8). Полученную смесь затем нейтрализовали добавлением 2Н HCl и перемешивали в течение 1 ч при комнатной температуре. К полученному раствору, охлажденному на ледяной бане, медленно добавляли твердый KOH (2,80 г, 49,4 ммоль), и полученную смесь перемешивали в течение 50 мин при комнатной температуре. После насыщения NaCl и нейтрализации 6Н HCl , полученную смесь дважды экстрагировали CH_2Cl_2 . Объединенные CH_2Cl_2 экстракты сушили (Na_2SO_4) и концентрировали в вакууме, с получением N-(2-меркапто-2-метилпропил)ацетамида в виде белого твердого вещества, которое использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.



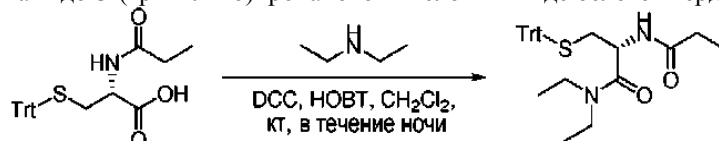
Раствор N-(2-меркапто-2-метилпропил)ацетамида (400 мг, 2,72 ммоль), янтарного ангидрида (326 мг, 3,26 ммоль) и Et_3N (330 мг, 3,26 ммоль) в 6 мл ТГФ нагревали в течение ночи. Полученную реакционную смесь концентрировали и остаток очищали препаративной ВЭЖХ (элюируя H_2O (0,05% ТФУК) и CH_3CN), с получением 4-(1-ацетиамидо-2-метилпропан-2-илтио)-4-оксобутановой кислоты в виде желтого масла.

Пример 11. Синтез S,S-бис((R)-3-(диэтиламино)-3-оксо-2-пропионамидпропил)бутанбис(тиоата) (NV185, 01-185).

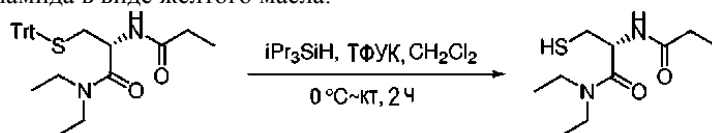


К раствору (R)-3-меркапто-2-пропионамидпропановой кислоты (5,00 г, 28,0 ммоль) в ДМФА (50

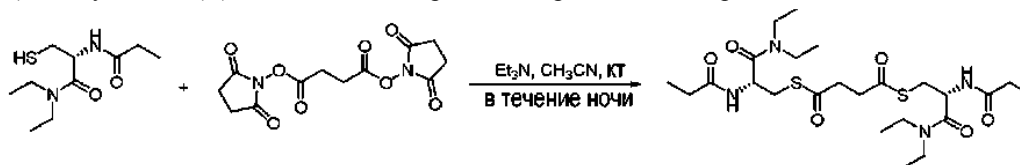
мл) добавляли трифенилметилхлорид (8,70 г, 31,0 ммоль) при 0°C. Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 30 мин и затем нагревали до комнатной температуры в течение ночи. Полученную смесь обрабатывали водой и дважды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои промывали насыщенным раствором соли, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (CH₂Cl₂/MeOH=80/1-50/1) с получением (R)-2-пропионамидо-3-(триметилтио)пропановой кислоты в виде белого твердого вещества.



В перемешиваемый раствор (R)-2-пропионамидо-3-(триметилтио)пропановой кислоты (1,7 г, 4,0 ммоль) в CH₂Cl₂ (50 мл) добавляли DCC (1,7 г, 8,0 ммоль) и HOBT (0,50 г, 4,0 ммоль) при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и затем добавляли диэтиламин (0,80 г, 8,0 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Полученную смесь промывали водой, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении, что давало неочищенный продукт, который очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc/петролейный эфир=1/6-1/1) с получением (R)-N,N-диэтил-3-меркапто-2-пропионамидопропанамид в виде желтого масла.

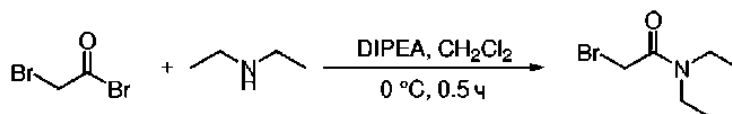


К раствору (R)-N,N-диэтил-3-меркапто-2-пропионамидопропанамид (400 мг, 0,800 ммоль) в CH₂Cl₂ (10 мл) при 0°C добавляли TFA (1 мл) и i-Pr₃SiH (253 мг, 1,60 ммоль). Полученную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. Полученный раствор упаривали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали препаративной ВЭЖХ (элюируя H₂O (0,5% TFA) и CH₃CN) с получением (R)-N,N-диэтил-3-меркапто-2-пропионамидопропанамид в виде желтого масла.

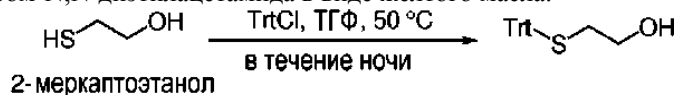


Смесь (R)-N,N-диэтил-3-меркапто-2-пропионамидопропанамид (150 мг, 0,600 ммоль), Et₃N (242 мг, 2,40 ммоль) и бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)сукцината (94 мг, 0,30 ммоль) в CH₃CN (100 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Полученную смесь упаривали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали препаративной ВЭЖХ (элюируя H₂O (0,5% TFA) и CH₃CN) с получением S,S-бис((R)-3-(диэтиламино)-3-оксо-2-пропионамидопропил)бутанбис(тиоата) (36% выход) в виде желтого твердого вещества.

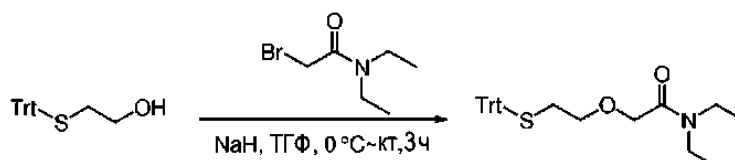
Пример 12. Синтез 4-(2-(2-(диэтиламино)-2-оксоэтокси)этилтио)-4-оксобутановой кислоты (NV193, 01-193).



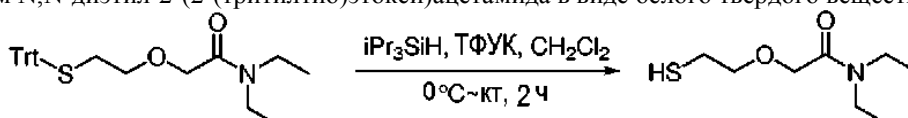
К раствору 2-бромацетилбромида (4,00 г, 20,0 ммоль) и DIPEA (2,60 г, 20 ммоль) в CH₂Cl₂ (50 мл) по каплям добавляли диэтиламин (1,60 г, 20,0 ммоль) при 0°C. Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 30 мин. Полученный раствор упаривали при пониженном давлении для удаления CH₂Cl₂. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc/петролейный эфир=1/5-1/2), с получением 2-бром-N,N-диэтилацетамида в виде желтого масла.



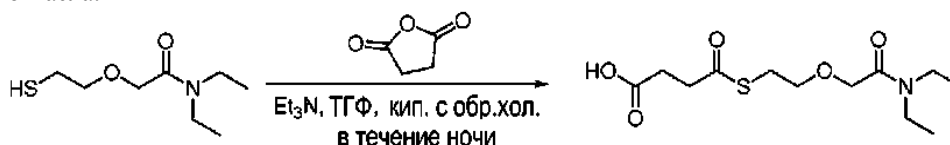
Раствор 2-меркаптоэтанола (2,50 г, 32,0 ммоль), трифенилметилхлорида (10,7 г, 38,4 ммоль) в 100 мл TFA нагревали при кипячении с обратным холодильником в течение ночи. Полученную реакционную смесь концентрировали и остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc/петролейный эфир=1/5-1/1) с получением 2-(2,2,2-трифенилэтилтио)этанола в виде белого твердого вещества.



К раствору 2-(2,2,2-трифенилэтилтио)этанола (3,50 г, 10,9 ммоль) в ТГФ (30 мл) порциями добавляли NaH (0,500 г, 13,0 ммоль, 60% в масле) при 0°C. Полученную реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч. Затем по каплям добавляли раствор 2-бром-N,N-диэтилацетамида (2,1 г, 10,9 ммоль) в ТГФ (5 мл). Полученную в результате смесь нагревали до комнатной температуры около 2 ч. Полученную смесь гасили водой и дважды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои промывали насыщенным раствором соли, сушили над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc/петролейный эфир=1/5-1/2) с получением N,N-диэтил-2-(2-(тримилтио)этокс)ацетамида в виде белого твердого вещества.

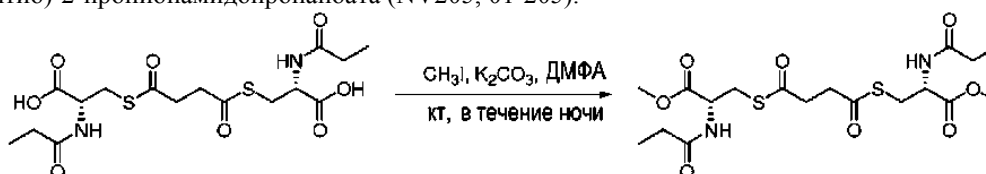


К раствору N,N-диэтил-2-(2-(тримилтио)этокс)ацетамида (2,70 г, 6,30 ммоль) в CH₂Cl₂ (20 мл) добавляли ТФУК (2 мл) и i-Pr₃SiH (2,00 г, 12,6 ммоль) при 0°C. Полученную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. Полученный раствор упаривали при пониженном давлении для удаления CH₂Cl₂. Полученный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (EtOAc/петролейный эфир=1/5-1/1), с получением N,N-диэтил-2-(2-меркаптоэтокс)ацетамида в виде бесцветного масла.



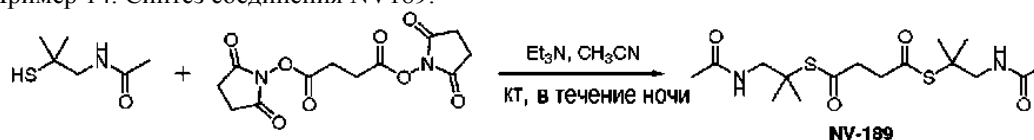
Раствор N,N-диэтил-2-(2-меркаптоэтокс)ацетамида (356 мг, 1,90 ммоль), янтарного ангидрида (200 мг, 2,10 ммоль) и Et₃N (300 мг, 2,90 ммоль) в 10 мл ТГФ перемешивали при кипячении с обратным холодильником в течение ночи. Полученную реакционную смесь концентрировали в вакууме и остаток очищали препаративной ВЭЖХ (элюируя H₂O (0,5% ТФУК) и CH₃CN) с получением 4-(2-(2-(диэтиламино)-2-оксоэтокс)этилтио)-4-оксобутановой кислоты в виде бесцветного масла.

Пример 13. Синтез (R)-метил 3-(4-((R)-3-метокси-3-оксо-2-пропионамидопропилтио)-4-оксобутаноилтио)-2-пропионамидопропаноата (NV205, 01-205).



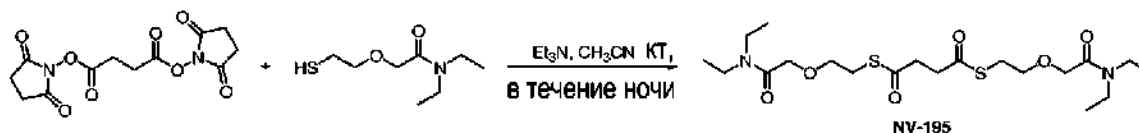
Смесь (R)-3-(4-((R)-2-карбокси-2-пропионамидоэтилтио)-4-оксобутаноилтио)-2-пропионамидопропановой кислоты (300 мг, 0,69 ммоль), CH₃I (293 мг, 2,06 ммоль) и K₂CO₃ (475 мг, 3,44 ммоль) в 4,0 мл ДМФА перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Полученную реакционную смесь фильтровали и фильтрат непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (элюируя H₂O (0,05% ТФУК) и CH₃CN), с получением (R)-метил 3-(4-((R)-3-метокси-3-оксо-2-пропионамидопропилтио)-4-оксобутаноилтио)-2-пропионамидопропаноата в виде не совсем белого твердого вещества.

Пример 14. Синтез соединения NV189.



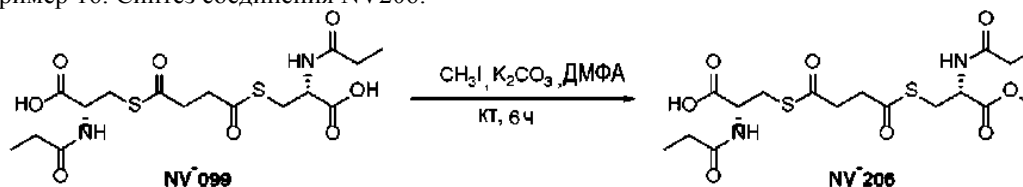
Смесь N-(2-меркапто-2-метилпропил)ацетамида (400 мг, 2,72 ммоль), бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)сукцината (339 мг, 1,09 ммоль) и Et₃N (550 мг, 5,44 ммоль) в 6 мл CH₃CN перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Полученную реакционную смесь концентрировали и остаток очищали препаративной ВЭЖХ (элюируя H₂O (0,05% ТФУК) и CH₃CN) с получением соединения NV189 в виде не совсем белого твердого вещества.

Пример 15. Синтез S,S-бис(2-(2-(диэтиламино)-2-оксоэтокс)этил)бутанбис(тиоата) (NV195, 01-195).



К раствору N,N-диэтил-2-(2-меркаптоэтокси)ацетамида (438 мг, 2,3 ммоль) в CH_3CN (10 мл) добавляли бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил)сукцинат (374 мг, 1,2 ммоль) и Et_3N (232 мг, 2,3 ммоль). Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Полученную реакционную смесь концентрировали в вакууме и остаток очищали препаративной ВЭЖХ (элюируя H_2O (0,5% ТФУК) и CH_3CN) с получением S,S-бис(2-(2-(диэтиламино)-2-оксоэтокси)этил)бутанбис(тиоата) в виде бесцветного масла.

Пример 16. Синтез соединения NV206.



Смесь (R)-3-(4-((R)-2-карбокси-2-пропионамидоэтилтио)-4-оксобутаноилтио)-2-пропионамидопропановой кислоты (400 мг, 0,916 ммоль), CH_3I (156 мг, 1,1 ммоль) и K_2CO_3 (190 мг, 1,37 ммоль) в 4 мл ДМФА перемешивали при комнатной температуре в течение 6 ч. Полученную реакционную смесь фильтровали и фильтрат непосредственно очищали препаративной ВЭЖХ (элюируя H_2O (0,05% ТФУК) и CH_3CN) с получением соединения NV206 в виде бесцветной смолы.

Пример 17. Результаты биологических экспериментов.

Соединения, приведенные в следующей таблице, подвергали анализам (1)-(4), указанным под заголовком I. Анализ для оценки усиления и ингибирования функции продуцирования митохондриальной энергии в интактных клетках. В следующей таблице показаны результаты, которые указывают на то, что все протестированные соединения обладают стабильными свойствами. Важно, что все соединения оказывают конкретное воздействие на СII-связанное дыхание, как видно из протоколов скрининга 1 и 4, а также конвергентный эффект с доступными СI-субстратами, как показано в анализе 2.

Результаты по протоколам скрининга 1-4.

Номера соединений, как это предусмотрено в примерах 1-16.

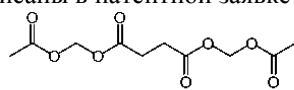
Соединение NV	Конвергентность (в установленном порядке)	Конвергентность (FCCP)	СII (плазма)	СII	Разобшение	Токсичность
01-193	(++)	+	(+)	+	+	5 мМ
01-188	+++	+++	+	+	(+)	5 мМ
01-185	(+)	+	+	+	(+)	2 мМ
01-205	+++	++	+	++	(+)	5 мМ
01-114	+++	++	+	++	(+)	10 мМ
01-041	+	+++	+	++	(+)	5 мМ
01-108	++	++	(+)	(++)	+	10 мМ

Обозначения: конвергентность (в установленном порядке) - увеличение митохондриального потребления кислорода, индуцированное данным соединением в условиях, описанных в скрининговом анализе 3; конвергентность (FCCP) - увеличение митохондриального потребления кислорода, индуцированное данным соединением в условиях, описанных в скрининговом анализе 2 (несвязанные условия); конвергентность (плазма) - увеличение митохондриального потребления кислорода, индуцированное данным соединением в клетках с ингибированным комплексом I, инкубированном в плазме человека, как описано в скрининговом анализе 4; СII - увеличение митохондриального потребления кислорода, индуцированное данным соединением в клетках с ингибированным комплексом I, как описано в скрининговом анализе 1; разобшение - уровень потребления кислорода после добавления олигомицина, как описано в скрининговом анализе 3. Ответ на каждый параметр оценивали либо как +, ++, либо как +++, в порядке повышения уровня потенциальной возможности. Скобки (()) указывают на промежуточный эффект, т.е. (+++) проявляется между ++ и +++. Токсичность - самая низкая концентрация в ходе титрования соеди-

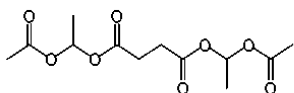
нения, при которой проявляется уменьшение потребления кислорода, как описано в скрининговом анализе 2.

Примеры 18-20. Исследования метформина.

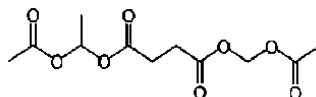
При исследовании метформина использовали следующие соединения (которые указаны в цифрах на фигурах). Данные соединения описаны в патентной заявке WO 2014/053857.



(NV118)



(NV189)



(NV241)

Сбор и получение образцов.

Исследование было проведено с одобрения регионального наблюдательного этического совета университета Лунда, Швеция (разрешение этического наблюдательного совета № 2013/181) (the regional ethical review board of Lund University, Sweden (ethical review board permit no. 2013/181)). Венозную кровь у 18 здоровых взрослых людей (11 мужчин и 7 женщин) отбирали в пробирки K₂EDTA (BD Vacutainer® Brand Tube with dipotassium EDTA, BD, Plymouth, UK) в соответствии со стандартной процедурой после получения письменного информационного согласия. Для отделения тромбоцитов центрифугировали цельную кровь (Multifuge 1 S-R Heraeus, Thermo Fisher Scientifics, Waltham, USA) при 500 g при комнатной температуре (КТ) в течение 10 мин. Обогащенную тромбоцитами плазму собирали в 15 мл пробирки Фалкона и центрифугировали при 4600 g при КТ в течение 8 мин. Полученный осадок в пробирке ресуспендировали в 1-2 мл донорской плазмы. РВМС отделяли с использованием градиентного центрифугирования Ficol (Boyum, 1968). Оставшуюся после отделения тромбоцитов кровь промывали равными объемами физиологического раствора и расслаивали по 3 мл Lymphoprep™.

После центрифугирования при 800 g при КТ (комнатная температура) в течение 30 мин слой РВМС собирали и промывали физиологическим раствором. После следующего центрифугирования при 250 g при КТ в течение 10 мин осадок в пробирке РВМС ресуспендировали в двух частях физиологического раствора и одной части донорской плазмы. Выполняли подсчет клеток как для РВМС, так и тромбоцитов с использованием автоматического гемоцитометра (Swelab Alfa, Boule Medical AB, Stockholm, Sweden).

Задача исследования, описанного в примерах 18-19.

Индукция метформином продуцирования лактата в периферической крови одноядерных клеток и тромбоцитов через ингибирование конкретного митохондриального комплекса I.

Метформин, широко используемый в качестве антидиабетического лекарственного средства, связан с редким побочным эффектом лактоацидозом (LA), для которого было выдвинуто предложение связать с митохондриальной дисфункцией, вызванной лекарственным средством. При использовании респирометрии задачей исследования, описанного в примерах 1-2, являлась оценка митохондриальной токсичности метформина в клетках крови человека по отношению к фенформину, аналогу бигуанида, отмененного в большинстве стран из-за высокой заболеваемости лактоацидозом.

Задача исследования, описанного в примере 20.

Задача заключалась в том, чтобы исследовать способность сукцинатных пролекарств облегчать или избежать побочных эффектов метформина и фенформина.

Пример 18А.

Влияние метформина и фенформина на митохондриальное дыхание в тромбоцитах человека с нарушенной проницаемостью мембраны.

Для того чтобы исследовать конкретные мишени токсичности бигуанидов, применяли протокол с использованием дигитониновой пермеабиллизации клеток крови и последовательного добавления конкретных субстратов дыхательного комплекса и ингибиторов в среду MiR05. После стабилизации обычного дыхания, т.е. клеточного дыхания с потребностью в питательном эндогенном субстрате и АТФ, добавляли метформин, фенформин или их носитель (дважды деионизированная вода). Использовали широкий диапазон концентраций препаратов 0,1, 0,5, 1 и 10 мМ метформин и 25, 100 и 500 мкМ фенформин. После инкубации с данными лекарственными средствами в течение 10 мин при 37°C тромбоциты пермеабиллизировали при помощи дигитонина с заранее определенной оптимальной концентрацией (1 мкг 10⁻⁶ тромбоцитов) для максимального индуцирования пермеабиллизации клеточной мембраны без нарушения митохондриальной функции и получения возможности измерения максимальной дыхательной способности (Sjovall et al., 2013). Для оценки способности к зависимому от комплекса I окислительному фосфорилированию (OXPHOS_{C1}), сначала последовательно добавляли NADH-связанные субстраты пи-

рувата и малата (5 мМ), затем ADP (1 мМ) и, наконец, дополнительный глютаматный субстрат комплекса I (5 мМ). Впоследствии добавляли связанный с FADH₂ субстрат сукцината (10 мМ) для определения способности к конвергентности OXPHOS (OXPHOS_{CI+II}), зависящего от комплекса I и II. LEAK_{I+II} состояние, состояние дыхания, при котором потребление кислорода компенсируется обратным потоком протонов через митохондриальные мембраны (Gnaiger, 2008), оценивали путем добавления олигомицинового ингибитора АТФ-синтазы (1 мкг мл⁻¹). Максимальную способность несвязанных электронов дыхательной транспортной системы, поддерживаемую конвергентностью входа через комплекс I и II (ETS_{CI+II}), оценивали при помощи последовательного титрования с протонофором карбонилцианида п-(трифторметокси)фенилгидразона (FCCP). Добавление ротенонового ингибитора комплекса I (2 мкМ) выявляло максимальное несвязанное дыхание (ETS_{CI}), зависящее от комплекса II. Затем добавляли антимициновый ингибитор комплекса III (1 мкг мл⁻¹) для выявления потребления остаточного кислорода (ROX). Наконец, добавляли искусственный субстрат комплекса IV дигидрохлорид N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин (TMPD, 0,5 мМ) и добавляли азиднатриевый ингибитор комплекса IV (10 мМ) для измерения активности комплекса IV и химического уровня соответственно. Активность комплекса IV рассчитывали путем вычитания значения азид натрия из значения TMPD. За исключением активности комплекса IV все состояния дыхания измеряли в стационарном состоянии и корректировали для ROX. Активность комплекса IV измеряли после определения ROX и в нестационарном состоянии. Целостность внешней митохондриальной мембраны проверяли добавлением цитохрома c (8 мкМ) в ходе OXPHOS_{CI+II} в присутствии носителя, 100 мМ метформина или 500 мкМ фенформина.

Пример 18В.

Воздействие метформина на митохондриальное дыхание в мононуклеарных клетках периферической крови человека с нарушенной проницаемостью мембраны и на митохондриальное дыхание в интактных тромбоцитах человека.

Для анализов дыхания РВМС с нарушенной проницаемостью мембраны в ответ на метформин (0,1, 1 и 10 мМ) использовали такой же протокол, как использовался для тромбоцитов с нарушенной проницаемостью мембраны, за исключением того, что концентрацию дигитонина доводили до 6 мкг 10⁻⁶ РВМС (Sjovall et al., 2013).

Результаты.

Дыхание при использовании субстратов комплекса I дозозависимо ингибировалось метформином как у РВМС человека с нарушенной проницаемостью мембраны, так и у тромбоцитов (фиг. 1). Способность OXPHOS_{CI} снижалась с увеличением концентраций метформина по сравнению с контролями с почти полным ингибированием при 10 мМ (-81,47%, P<0,001 у РВМС и -92,04%, P<0,001 у тромбоцитов), имея в результате IC₅₀ 0,45 мМ для РВМС и 1,2 мМ для тромбоцитов. Дыхательная способность при использовании обоих субстратов как комплекса I, так и комплекса OXPHOS_{CI+II} и ETS_{CI+II}, была снижена метформином аналогично OXPHOS_{CI}, о чем свидетельствует присутствие следов одновременно измененного потребления O₂ у обработанных носителем и 1 мМ метформином РВМС с нарушенной проницаемостью мембраны (фиг. 5а). В отличие от этого, способность ETS_{CI} и активность комплекса IV, по существу, не изменились в присутствии метформина по сравнению с контролями ни в любом из типов клеток (фиг. 5б, с) и ни в дыхании LEAK_{I+II} (состояние дыхательных путей, где потребление кислорода компенсировано для обратного потока протонов через митохондриальные мембраны, традиционно обозначается состоянием 4 в изолированных митохондриях, данные не показаны). Митохондриальное ингибирование комплекса I, индуцированное метформином, по-видимому, не носит обратимого характера на вне- и внутриклеточное удаление препарата путем промывки и пермеабилезирования клетки соответственно. Несмотря на серьезность повреждения комплекса I, ингибирование ослабляется путем удаления (вероятно, приписываемое к более короткому времени воздействия препарата) тромбоцитов, не восстанавливаемых в установленном порядке, и максимальная митохондриальная функция сравнима с контролем (данные не показаны). Фенформин подобным образом ингибировал OXPHOS_{CI} (фиг. 6), OXPHOS_{CI+II} и ETS_{CI+II}, но не ETS_{CI} или специфическое дыхание комплекса IV (данные не показаны). Фенформин продемонстрировал 20-кратное более мощное ингибирование OXPHOS_{CI} в тромбоцитах с нарушенной проницаемостью мембраны, чем метформин (IC₅₀ 0,058 мМ и 1,2 мМ соответственно) (фиг. 2). Метформин и фенформин не индуцируют увеличение дыхания при последующем введении цитохрома с и, следовательно, не нарушают целостность внешней митохондриальной мембраны.

После стабилизации обычного дыхания в среде MiR05 добавляли или носитель (дважды деионизированная вода), или 1, 10 и 100 мМ метформин. За обычным дыханием следили в течение 60 мин при 37°C после добавления олигомицинового ингибитора АТФ-синтазы (1 мкг мл⁻¹) для оценки дыхания LEAK. Максимальную способность несвязанных электронов дыхательной транспортной системы, поддерживаемой эндогенными субстратами (ETS), достигали титрованием FCCP. Дыхание последовательно блокировали ротеноновым ингибитором комплекса I (2 мкМ), антимициновым ингибитором комплекса III (1 мкг мл⁻¹) и азиднатриевым ингибитором комплекса IV (10 мМ) для оценки ROX, все значения дыхания корректировали. В дополнительном эксперименте цельную кровь инкубировали в пробирках K₂EDTA с различными концентрациями метформина (0,1, 0,5 и 1 мМ) в течение периода 18 ч для удаления тромбоцитов и анализов дыхания.

Результаты.

В интактных тромбоцитах человека метформин снижал обычное дыхание зависимым от дозы и времени образом (фиг. 7а). При воздействии на тромбоциты либо метформина, либо носителя проявлялось непрерывное снижение обычного дыхания с течением времени. Спустя 60 мин обычное дыхание сокращалось на -14,1% в контроле ($P<0,05$), на -17,27% при 1 мМ ($P<0,01$), на -28,61% при 10 мМ ($P<0,001$) и на -81,78% при 100 мМ метформина ($P<0,001$) по сравнению с первым измерением после добавления. Метформин при 100 мМ существенно снижал обычное дыхание в сравнении с контролем уже спустя 15 мин воздействия (-39,77%, $P<0,01$). Максимально несвязанное дыхание тромбоцитов (способность протонофор-титрованного ETS) после 60 мин инкубации, было, по существу, ингибировано 10 мМ (-23,86%, $P<0,05$) и 100 мМ (-56,86%, $P<0,001$) метформином (фиг. 3b). LEAK дыхания в интактных клетках существенно не изменялось метформином после инкубации (данные не показаны). При инкубации цельной крови при концентрации метформина 1 мМ в течение 18 ч обычное дыхание интактных тромбоцитов человека сокращалось на 30,49% ($P<0,05$).

Пример 19.

Воздействие метформина и фенформина на продуцирование лактата и pH интактных тромбоцитов человека.

Тромбоциты инкубировали в течение 8 ч или с метформином (1 мМ, 10 мМ), фенформином (0,5 мМ), ротеноном (2 мкМ) или с носителем для ротенона (ДМСО). Уровни лактата определяли каждые 2 ч ($n=5$) с использованием тестметра для определения лактата в крови Lactat Pro™ 2 (Arkray, Alere AB, Lidköping, Sweden) (Tanner et al., 2010). Инкубацию осуществляли при 37°C со скоростью перемешивания 750 об/мин и pH измеряли в начале, спустя 4 и спустя 8 ч инкубации ($n=4$) с использованием PHM210 стандартного pH-метра (Radiometer, Copenhagen, Denmark).

Результаты.

Продуцирование лактата в тромбоцитах человека увеличивалось зависимым от времени и дозы образом в ответ на инкубацию с метформином и фенформином (фиг. 8а). В сравнении с контролем обработанные метформином (1 и 10 мМ), фенформином (0,5 мМ) и ротеноном (2 мкМ) тромбоциты все продуцировали значительно больше лактата после 8-часовой обработки. При 1 мМ метформина продуцирование лактата увеличивалось от $0,30\pm 0,1$ до $3,34\pm 0,2$ в течение 8 ч и при 10 мМ метформина продуцирование лактата увеличивалось от $0,22\pm 0,1$ до $5,76\pm 0,7$ мМ. Аналогично, pH снижался от $7,4\pm 0,01$ в обеих группах до $7,16\pm 0,03$ и $7,00\pm 0,04$ для 1 мМ и 10 мМ метформина соответственно. Обработанные фенформином тромбоциты (0,5 мМ) продуцировали такой же уровень лактата, как обработанные 10 мМ метформином образцы. Уровень увеличения лактата коррелировался с уменьшением pH для всех обработанных групп. Увеличенные уровни лактата в обработанных метформином интактных тромбоцитах, также коррелированные со сниженными абсолютными значениями дыхания O_2 в интактных тромбоцитах с нарушенной проницаемостью мембраны ($r^2=0,60$, $P<0,001$). Ограниченный набор экспериментов далее показал, что интактные РВМС также показывают увеличенное высвобождение лактата при воздействии 10 мМ метформина (данные не показаны).

Обсуждение результатов примеров 18-19.

Это исследование демонстрирует необратимое токсическое действие метформина на специфические для комплекса I митохондрии в тромбоцитах человека и РВМС при концентрациях, соответствующих клиническим состояниям при метформиновой интоксикации. В тромбоцитах также была показана корреляция между сниженным дыханием комплекса I и увеличением продуцирования лактата. Митохондриальная токсичность была обследована для выработанного метформина в интактных клетках с течением времени. Фенформин, структурно связанное соединение, в настоящее время отмененное в большинстве стран из-за высокого распространения La (лактоацидоза), индуцировал высвобождение лактата и падение pH в тромбоцитах через специфический эффект комплекса I при значительно меньшей концентрации.

В настоящем исследовании с использованием модели применения респирометрии с высоким разрешением для оценки интегрированной митохондриальной функции тромбоцитов человека, было показано, что митохондриальная токсичность как метформина, так и фенформина является специфичной для дыхания комплекса I, и что аналогичное специфическое ингибирование также присутствует в РВМС. Дыхание комплекса I у РВМС с нарушенной проницаемостью мембраны было в 2,6 раза более чувствительным к метформину, чем в тромбоцитах с нарушенной проницаемостью мембраны. Однако из-за зависимой от времени токсичности метформина (см. ниже), IC_{50} , возможно, недооценена и может быть ниже, если определена после длительного времени экспозиции. Эти выводы в дальнейшем были подкреплены тем, что митохондриальная токсичность метформина не ограничивается конкретными тканями, как было показано ранее, а скорее имеется обобщенное воздействие на субклеточном уровне. Сообщение об индуцированном метформином ингибировании комплекса IV в тромбоцитах (Protti et al., 2012a, Protti et al., 2012b) не было подтверждено в этом исследовании или в более раннем исследовании Dykens et al. (2008) с использованием выделенных митохондрий крупного рогатого скота. Далее метформин и фенформин не индуцируют ингибирование дыхания через любое изменение неспецифической проницаемо-

сти внутренних или внешних митохондриальных мембран, поскольку не было каких-либо доказательств разобщения или стимулирующего ответа после добавления цитохрома *c* в присутствии лекарственного средства. Респирометрия с высоким разрешением представляет собой метод с высокой чувствительностью и дает возможность проведения измерения O_2 в пиколярном диапазоне. При применении к клеткам крови человека *ex vivo* существует возможность оценки дыхания при полностью интегрированном состоянии в интактных клетках и допускается экзогенное снабжение и контроль субстратов в интактных клетках митохондрий с нарушенной проницаемостью мембраны. Это отличается от ферментативного спектрофотометрического анализа, который большей частью был использован в исследованиях по митохондриальной токсичности метформина, например, Dykens et al. (2008) and Owen et al. (2000). Этими анализами измеряют независимую, неинтегрированную функцию отдельных комплексов и, следовательно, со сниженной физиологичностью, что может способствовать различию в результатах проводимых исследований.

Результаты данных исследований продемонстрировали существенное ингибирование дыхания, увеличение лактата и снижение pH в суспензиях интактных тромбоцитов, вызванные метформином при концентрациях относительной интоксикации уже спустя 8-18 ч. Зависимое от времени ингибирование митохондриального дыхания в сочетании с отсутствием полного изменения после замены внеклеточного буфера и разведения внутриклеточного содержания растворимого метформина с помощью пермеабилитации местной клетки в направлении внутримитохондриального накопления является ключевым фактором в развитии митохондриальной дисфункции, связанной с LA, вызванной лекарственным средством, как это было предложено другими авторами (Chan et al., 2005, Lalau, 2010).

Митохондриальная токсичность метформина была показана ранее, например, на клеточной карциноме печени клеточной линии HepG2 и выделенных митохондриях крыс и коровы. Также была продемонстрирована специфическая митохондриальная токсичность при использовании клеток крови человека. По сравнению с метформином фенформин имел более сильную митохондриальную токсическую активность в отношении тромбоцитов человека (IC_{50} 1,2 мМ и 0,058 мМ соответственно). Фенформин и метформин показали 10-15-кратное различие при клиническом дозировании и 3-10-кратное различие при терапевтической концентрации в плазме. В этом исследовании наблюдали 20-кратную разницу между фенформином и метформином в возможности ингибировать комплекс I. Применительно к пациентам при такой разнице в митохондриальной токсичности в отношении клинического дозирования появляется потенциальная возможность объяснения документально доказанного влияния фенформина на высокий уровень распространения связанного с фенформином LA.

Стандартные терапевтические концентрации метформина в плазме составляют диапазон от 0,6 до 6,0 мкМ, и токсичные концентрации составляют от 60 мкМ до 1 мМ. В случае сообщений о непроизвольной метформиновой интоксикации, предшествующей гемодиализу, сообщалось об уровне метформина в сыворотке крови сверх 2 мМ (Al-Abri et al., 2013). Исследования ткани также показали, что концентрация метформина в стационарном состоянии ниже в плазме/сыворотке крови, чем в других органах. Было показано, что по сравнению с уровнями в плазме, в желудочно-кишечном тракте накапливаются в 7-10-раз более высокие концентрации, в небольшом, но еще в значительном количестве в почках, печени, слонных железах, легких, селезенке и мышцах. В условиях, при которых клиренс метформина нарушен, таких как провоцирующие условия, влияющие на сердечно-сосудистую систему, печень или почки, в конечном итоге, могут быть достигнуты токсичные уровни. Токсические концентрации метформина, наблюдаемые в настоящем исследовании (1 мМ), таким образом, были сравнимы в том, что обнаруживались в крови у интоксцированных метформином пациентов. Хотя метформин является токсичным для клеток крови, как показано в данном исследовании, маловероятно, что тромбоциты и РВМС являются основными причинами развития LA. Поскольку метформин накапливается в других органах, и, кроме того, эти органы являются метаболически более активными, увеличенное продуцирование лактата, вероятно, в первую очередь следует рассматривать в других тканях. Показанные результаты, таким образом, укрепляют другие предположения (Brunmair et al., 2004, Protti et al., 2012b, Dykens et al., 2008), что связанное с митохондриями системное ингибирование является причиной индуцированного метформином LA.

Основываясь на предыдущих исследованиях и представленных выводах, многообещающим является возможность строить предположения, что антидиабетический эффект метформина может относиться к ингибированию аэробного дыхания. Снижение уровней глюкозы в печени и снижение поглощения глюкозы в крови в тонком кишечнике у подвергнутых лечению метформином пациентов с диабетом может происходить из-за возможного ингибирования комплекса I. Ингибирование комплекса I вызывает сокращение продуцирования АТФ, увеличение количества АМР, активацию фермента АМР-активированной протеинкиназы (АМРК) и ускорение обмена глюкозы посредством усиления гликолиза при попытке компенсировать снижение продуцирования АТФ.

До настоящего времени определение лечения связанного с метформином LA состоит из гемодиализа и гемофильтрации для удаления токсина, скорректированных для ацидоза и увеличения почечного кровотока.

Пример 20.

Воздействие клеточно-проницаемых сукцинатных пролекарств на индуцированное метформином увеличение продуцирования лактата.

Воздействие на индуцированное метформином увеличение продуцирования лактата в интактных тромбоцитах человека недавно разработанных и синтезированных клеточно-проницаемых сукцинатных пролекарств проводили в PBS, содержащем 10 мМ глюкозы. Тромбоциты подвергали воздействию либо только одним ротеноном (2 мкМ), ротеноном (2 мкМ) и антимицином (1 мкг/мл, только для клеток, обработанных NV 189) или 10 мМ метформином и спустя 60 мин добавляли или носитель (ДМСО, контроль), или клеточно-проницаемое сукцинатное пролекарство (NV118, NV189 и NV241) или сукцинат при концентрации 250 мкМ каждые 30 мин. Уровни лактата измеряли в интервалах 30 мин с момента начала эксперимента. Дополнительно измеряли pH перед первым добавлением носителя (ДМСО, контроль), различных клеточно-проницаемых сукцинатных пролекарств (NV118, NV189, NV241) или сукцината и в конце эксперимента. Скорость продуцирования лактата рассчитывали по нелинейному выравниванию с помощью 95% доверительного интервала (CI) наклона кривой лактат-время (фиг. 9, 10, 11 и 12).

Результаты, касающиеся примера 20, основаны на описанном здесь анализе.

Ослабленное добавлением клеточно-проницаемых сукцинатных пролекарств продуцирование лактата из-за инкубации ротенона и метформином в тромбоцитах.

Скорость продуцирования лактата в тромбоцитах, инкубированных с 2 мкМ ротеноном, составляла 0,86 ммоль лактата $(200 \cdot 10^6 \text{ трц} \cdot \text{ч})^{-1}$ (95% доверительный интервал [CI] 0,76-0,96), которую ослабляли NV118 (0,25 ммоль [95% CI 0,18-0,33]), NV189 (0,42 ммоль [95% CI 0,34-0,51]) и NV241 (0,34 ммоль [95% CI 0,17-0,52]), которая, по существу, не отличалась от клеток, не получавших ротенон (0,35 [95% CI 0,14-0,55]) (фиг. 9, 10 и 11). Клетки, инкубированные с антимицином в добавление к ротенону и NV189, имели продуцирование лактата, сравнимое с обработанными ротеноном клетками (0,89 ммоль [0,81-0,97]), демонстрируя специфический митохондриальный эффект клеточно-проницаемых сукцинатных пролекарств (фиг. 10).

Клетки, инкубированные с 10 мМ метформином, продуцировали лактат со скоростью 0,86 ммоль лактата $(200 \cdot 10^9 \text{ трц} \cdot \text{ч})^{-1}$ (95% CI 0,69-1,04) по сравнению с 0,22 ммоль (95% CI 0,14-0,30) в обработанных носителем (вода) клетках (фиг. 12). Совместная инкубация с любым из трех сукцинатных пролекарств ослабляла результирующей эффект метформина на продуцирование до 0,43 ммоль (95% CI 0,33-0,54) для NV118 (фиг. 9), 0,55 ммоль (95% CI 0,44-0,65) для NV189 (фиг. 10) и 0,43 ммоль (95% CI 0,31-0,54) для NV241 (фиг. 11).

Все ссылки, приведенные в данном описании, включая патенты и патентные заявки, включены в настоящее описание посредством ссылки во всей их максимально возможной полноте.

По всему описанию изобретения и формуле изобретения то, что следует, если контекст не указывает иное, за словом "включать" и его вариантами, такими как "включает" и "включая", следует понимать, как подразумеваемое включение указанного целого числа, стадии, группы целых чисел или группы стадий, но не к исключению любого целого числа, стадии, группы целых чисел или группы стадий.

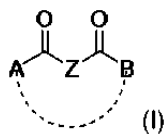
Применение части форм, которые описаны и заявлены в формуле изобретения, могут использоваться в качестве основы для приоритета в отношении любого из последующего применения. Заявление такого последующего применения может быть направлено на любой признак или комбинацию признаков, описанных в данном описании. Они могут принимать форму продукта, композиции, способа или применения заявленных объектов и могут включать посредством примера и без ограничения следующие объекты, заявленные в формуле изобретения.

Все ссылки, приведенные в данном описании, включая патенты и патентные заявки, включены в настоящее описание посредством ссылки во всей их максимально возможной полноте.

По всему описанию изобретения и формуле изобретения то, что следует, если контекст не указывает иное, за словом "включать" и его вариантами, такими как "включает" и "включая", следует понимать, как подразумеваемое включение указанного целого числа, стадии, группы целых чисел или группы стадий, но не к исключению любого целого числа, стадии, группы целых чисел или группы стадий. Слово "содержать" включает "содержит" и "состоящий из".

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

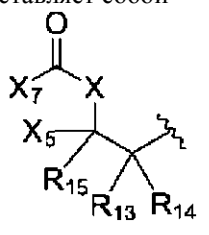
1. Соединение формулы (I)



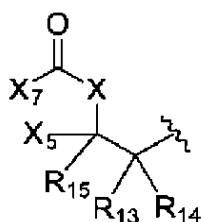
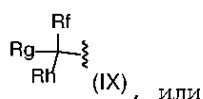
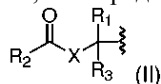
или его фармацевтически приемлемая соль, где пунктирная связь между A и B обозначает необязательную связь с возможностью формирования закрытой кольцевой структуры, и где

Z представляет собой $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$,

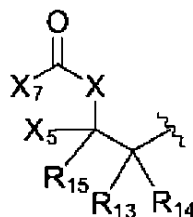
A представляет собой $-\text{SR}$, где R представляет собой



V представляет собой $-\text{O-R}'$, $-\text{SR}'''$ или $-\text{OH}$; и R' представляет собой формулу



R''' представляет собой формулу ниже



R₁ представляет собой H, Me, Et, пропил, изопропил, бутил, изобутил, O-C₁₋₁₀-алкил, N-C₁₋₁₀-алкил, X-C₁₋₁₀-ацил, CH₂X-C₁₋₁₀-алкил, CH₂X-C₁₋₁₀-ацил, F, CH₂COOH, CH₂CO₂C₁₋₁₀-алкил,

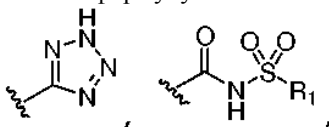
R₃ представляет собой H, Me, Et, пропил, изопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, O-C₁₋₁₀-алкил, N-C₁₋₁₀-алкил, X-C₁₋₁₀-ацил, CH₂X-C₁₋₁₀-алкил, CH₂X-C₁₋₁₀-ацил, F, CH₂COOH, CH₂CO₂C₁₋₁₀-алкил,

X представляет собой O, NH, S,

R₂ представляет собой Me, Et, пропил, изопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, C(O)CH₃, C(O)CH₂C(O)CH₃, C(O)CH₂CH(OH)CH₃,

R₆ представляет собой H, Me, Et, пропил, изопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, ацетил, пропионил, бензоил или формулу (II),

X₅ представляет собой -H, Me, Et, пропил, изопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, -COOH, -C(=O)XR₆, CONR₁R₃ или представляет собой формулу



X₇ представляет собой R₁ или -NR₁R₃,

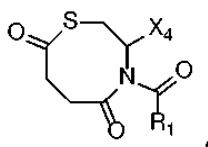
R₉ представляет собой H, Me, Et или O₂CCH₂CH₂COXR₈,

R₈ представляет собой H, Me, Et, пропил, изопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, ацетил, пропионил, бензоил или формулу (II),

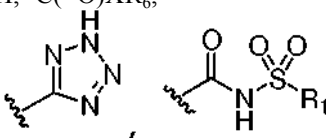
R₁₃, R₁₄ и R₁₅ независимо являются одинаковыми или различными и представляют собой H, Me, Et, пропил, изопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, -COOH, O-C₁₋₁₀-алкил, N-C₁₋₁₀-алкил, X-C₁₋₁₀-ацил, CH₂X-C₁₋₁₀-алкил,

R_f, R_g и R_n независимо являются одинаковыми или различными и представляют собой X-C₁₋₁₀-ацил, -CH₂X-C₁₋₁₀-алкил, -CH₂X-C₁₋₁₀-ацил и R₉,

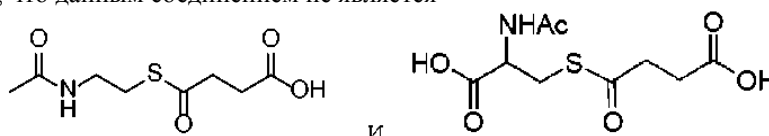
И когда пунктирная связь между A и B присутствует, соединение, соответствующее формуле (I), представлено как



где X_4 представляет собой $-\text{COOH}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{XR}_6$,



при условии, что данным соединением не является

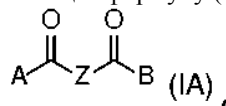


2. Соединение по п.1, где C_{1-10} -алкил выбран из Me, Et, пропила, изопропила, бутила, изобутила, трет-бутила.

3. Соединение по п.1 или 2, где C_{1-10} -ацил выбран из формила, ацетила, пропионила, изопропионила, бутирила, трет-бутирила, пентаноила, бензоила.

4. Соединение по любому из пп.1-3, где X-C_{1-10} -ацил представляет собой O-C_{1-10} -ацил или N-C_{1-10} -ацил.

5. Соединение по любому из пп.1-4, имеющее формулу (IA)

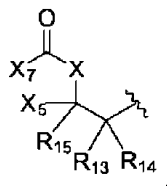


или его фармацевтически приемлемая соль, где

Z представляет собой $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$,

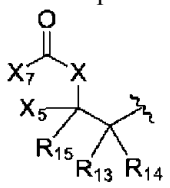
A представляет собой $-\text{SR}$ и

R представляет собой



B представляет собой $-\text{O-R}'$, $-\text{SR}''$ или $-\text{OH}$; и

R' и R'' независимо являются одинаковыми или различными и представляют собой формулу ниже



R_1 и R_3 независимо являются одинаковыми или различными и представляют собой H, Me, Et, пропил, O-Me, O-Et, O-пропил,

X представляет собой O, NH, S,

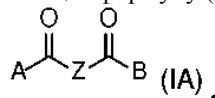
R_6 представляет собой H, Me, Et,

X_5 представляет собой $-\text{H}$, Me, Et, $-\text{COOH}$, $-\text{C}(=\text{O})\text{XR}_6$, CONR_1R_3 ,

X_7 представляет собой R_1 , $-\text{NR}_1\text{R}_3$,

R_{13} , R_{14} и R_{15} независимо являются одинаковыми или различными и представляют собой H, Me, Et, пропил, изопропил, бутил, изобутил, трет-бутил, $-\text{COOH}$, O-C_{1-10} -алкил, N-C_{1-10} -алкил, X-C_{1-10} -ацил, $\text{CH}_2\text{X-C}_{1-10}$ -алкил.

6. Соединение по любому из пп.1-5, имеющее формулу (IA)

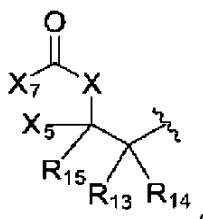


или его фармацевтически приемлемая соль, где

Z представляет собой $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$,

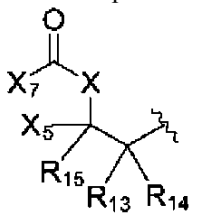
A представляет собой $-\text{SR}$ и

R представляет собой



В представляет собой -O-R', -SR''' или -OH; и

R' и R''' независимо являются одинаковыми или различными и представляют собой формулу ниже



R₁ и R₃ независимо являются одинаковыми или различными и представляют собой H, Me, Et, пропил, O-Me, O-Et, O-пропил,

X представляет собой O, NH, S,

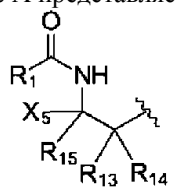
R₆ представляет собой H, Me, Et,

X₅ представляет собой -H, Me, Et, -COOH, -C(=O)OR₆, CONR₁R₃,

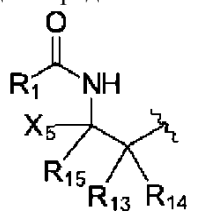
X₇ представляет собой R₁, -NR₁R₃,

R₁₃, R₁₄ и R₁₅ независимо являются одинаковыми или различными и представляют собой H, Me, Et, -COOH.

7. Соединение по любому из пп.1-6, где А представляет собой -SR и R представляет собой

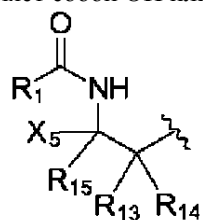


8. Соединение по любому из пп.1-7, где В представляет собой -O-R' и R' представляет собой



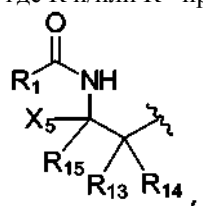
9. Соединение по любому из пп.1-7, где В представляет собой OH или SR'''.

10. Соединение по п.9, где В представляет собой OH или SR''', где R''' представляет собой

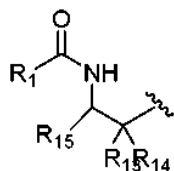


11. Соединение по п.9, где В представляет собой OH.

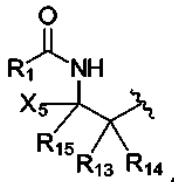
12. Соединение по любому из пп.1-10, где R и/или R''' представляет собой



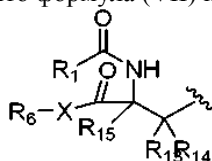
и X₅ представляет собой -H, так что формула (VII) представлена как



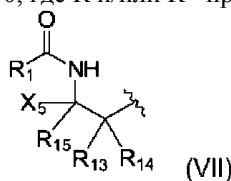
13. Соединение по любому из пп.1-10, где R и/или R''' представляет собой



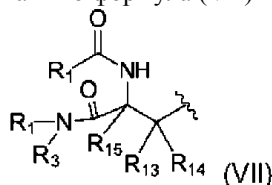
и X₅ представляет собой COXR₆, так что формула (VII) представлена как



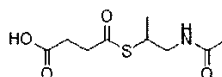
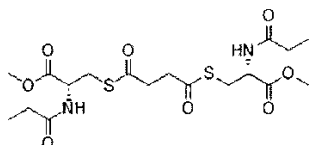
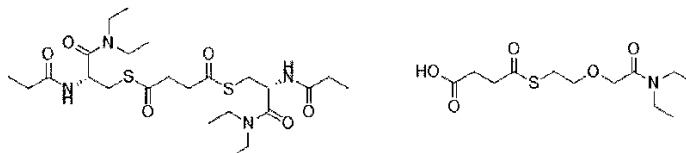
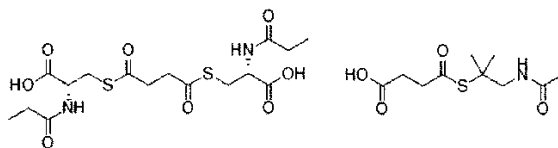
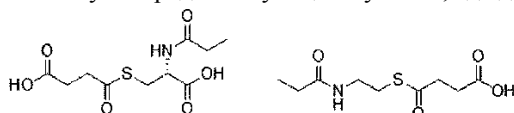
14. Соединение по любому из пп.1-10, где R и/или R''' представляет собой



и X₅ представляет собой CONR₁R₃, так что формула (VII) представлена как



15. Соединение по любому из предшествующих пунктов, где данное соединение выбрано из



16. Применение соединения по любому из пп.1-15 для лечения или предупреждения метаболиче-

ских заболеваний, включающих заболевания с митохондриальной дисфункцией, лечения или подавления митохондриальных расстройств или стимуляции продуцирования митохондриальной энергии.

17. Применение соединения по любому из пп.1-15 для получения фармацевтической композиции для лечения или предупреждения метаболических заболеваний, включающих заболевания с митохондриальной дисфункцией, лечения или подавления митохондриальных расстройств или стимуляции продуцирования митохондриальной энергии.

18. Применение по п.16, для предотвращения или лечения связанной с митохондриями дисфункции, вызванной метформином.

19. Применение по п.18, где предотвращение связанной с митохондриями дисфункции, вызванной метформином, относится к взаимодействию метформина с комплексом I.

20. Применение по п.16, где заболевания с митохондриальной дисфункцией включают митохондриальный дефицит.

21. Применение по любому из пп.16-20, где заболевания с митохондриальной дисфункцией выбраны из болезни Альперса (прогрессирующая полидистрофия мозга в детском возрасте), амиотрофического бокового склероза (ALS), аутизма, синдрома Барта (летальная детская кардиомиопатия), нарушений β -окисления, дефицита биоэнергетического метаболизма, дефицита карнитин-ацил-карнитина, дефицита карнитина, синдрома церебрального дефицита карнитина (CCDS), дефицита коэнзима Q10, дефицита комплекса I (NADH дегидрогеназа (дефицит NADH-CoQ редуктазы), дефицита комплекса II (дефицит сукцината дегидрогеназы), дефицита комплекса III (дефицит убихинон-цитохром с оксидоредуктазы), дефицита комплекса IV/дефицита COX (причиной дефицита цитохром с оксидазы является нарушение в комплексе IV дыхательной цепи), дефицита комплекса V (дефицит АТФ синтазы), дефицита циклооксигеназы (COX), синдрома хронической внешней офтальмоплегии (CPEO), дефицита карнитин пальмитилтрансферазы (CPT) I, дефицита CPT II, наследственной атаксии Фридрейха (FRDA или FA), глутарацидурии типа II, синдрома Кирнса-Сейра (KSS), лактоацидоза, дефицита длинноцепочечной ацил-CoA-дегидрогеназы (LCAD), дефицита длинноцепочечной ацил-CoA-дегидрогеназы (LCHAD), болезни или синдрома Лея (подострая некротическая энцефаломиелопатия), наследственной оптической нейропатии Лебера (LHON), болезни Люфта, дефицита среднецепочечной ацил-CoA-дегидрогеназы (MCAD), митохондриального энцефаломиопатического лактоацидоза и инсультоподобных явлений (MELAS), миоклонической эпилепсии и болезни разорванных красных волокон (MERRF), синдрома митохондриальной рецессивной атаксии (MIRAS), митохондриальной цитопатии, митохондриального истощения ДНК, митохондриальной энцефалопатии, митохондриальной миопатии, мионейрогастроинтестинального заболевания и энцефалопатии (MNGIE), нейропатии, атаксии и пигментного ретинита (NARP), нейродегенеративных заболеваний, связанных с болезнью Паркинсона, Альцгеймера или Хантингтона, синдрома Пирсона, дефицита пирувата карбоксилазы, дефицита пирувата дегидрогеназы, мутаций полимеразы гамма (POLG), недостаточности дыхательной цепи, дефицита короткоцепочечной ацил-CoA-дегидрогеназы (SCAD), дефицита короткоцепочечной L-3-гидроксиацил-CoA-дегидрогеназы (SCHAD), дефицита сверхдлинноцепочечной ацил-CoA-дегидрогеназы (VLCAD).

22. Применение по п.21, где заболевания с митохондриальной дисфункцией относятся к дисфункции комплекса I и выбраны из синдрома Лея, наследственной оптической нейропатии Лебера (LHON), митохондриального энцефаломиопатического лактоацидоза и инсультоподобных явлений (MELAS) и миоклонической эпилепсии с "рваными" красными волокнами (MERRF).

23. Применение соединения по любому из пп.1-15 для лечения или профилактики лактоацидоза.

24. Применение соединения по любому из пп.1-15 для лечения или профилактики дисфункции, вызванной метформином, выбранной из лактоацидоза и побочных эффектов, связанных с дефектом, ингибированием или нарушением комплекса I.

25. Применение соединения по любому из пп.1-15 для лечения или профилактики дисфункции, вызванной метформином, выбранной из лактоацидоза и дисфункций, связанных с дефектом, ингибированием или неправильной функцией в аэробном метаболизме, связанном с транспортом электронов в комплексе I.

26. Применение соединения по любому из пп.1-15 для лечения абсолютного или относительного дефицита клеточной энергии.

27. Применение соединения по любому из пп.1-15 для лечения вызванной метформином дисфункции, выбранной из i) лактоацидоза, ii) побочного эффекта, относящегося к нарушению, ингибированию или дисфункции комплекса I, и iii) побочных эффектов, связанных с нарушением, ингибированием или дисфункцией в аэробном метаболизме, связанном с транспортом электронов в комплексе I.

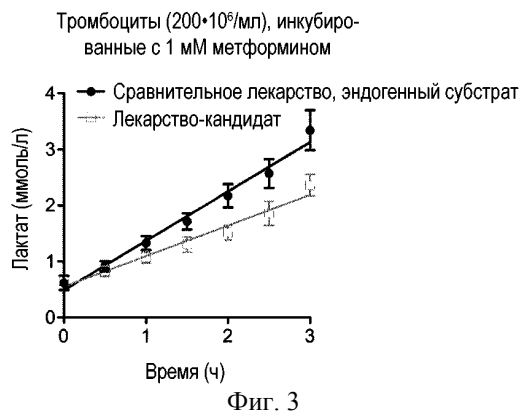
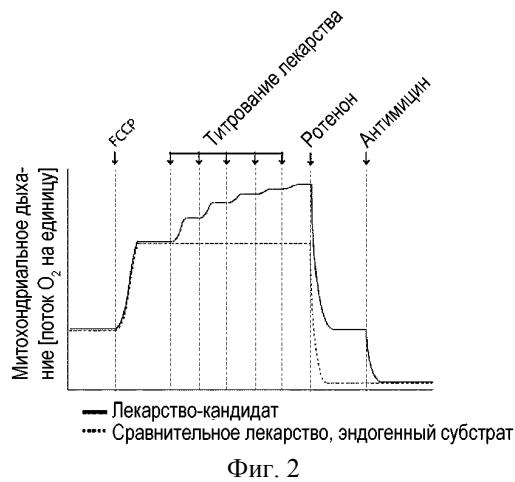
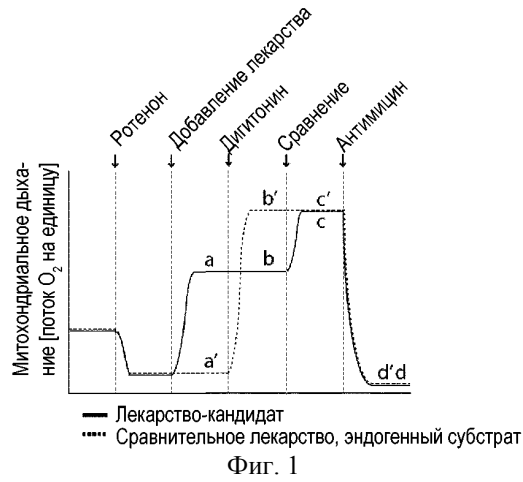
28. Применение соединения по любому из пп.1-15 для предупреждения или смягчения вызванной метформином дисфункции, выбранной из i) лактоацидоза, ii) дисфункции, относящейся к нарушению, ингибированию или дисфункции комплекса I, и iii) дисфункций, связанных с нарушением, ингибированием или дисфункцией в аэробном метаболизме, связанном с транспортом электронов в комплексе I.

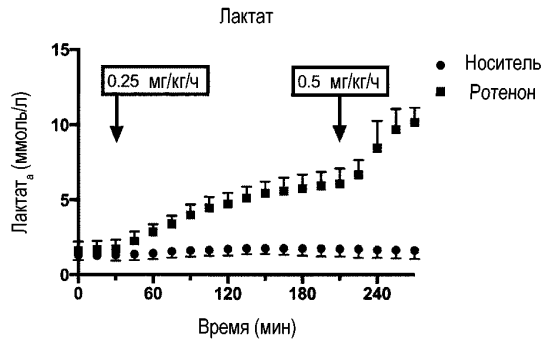
29. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение формулы (I) по любому из пп.1-15 в эффективном количестве и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов для лечения или профилактики метаболических заболеваний, включающих заболевания с митохондриальной дисфункцией.

ей, лечения или подавления митохондриальных расстройств или стимуляции производства митохондриальной энергии.

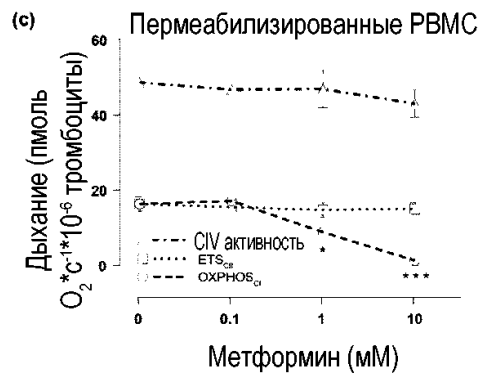
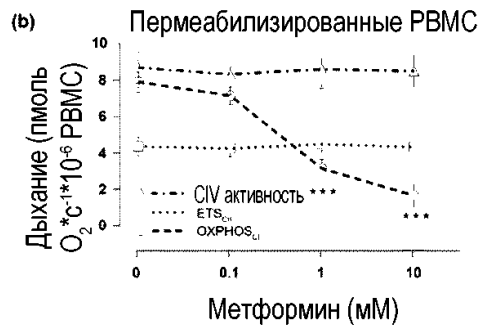
30. Способ лечения заболеваний, связанных с митохондриальной дисфункцией, у субъекта, включающий введение субъекту композиции по п.29.

31. Способ по п.30, в котором композицию вводят парентерально, перорально, местно, через медицинское устройство, путем ингаляции или инъекции подкожно или внутримышечно.

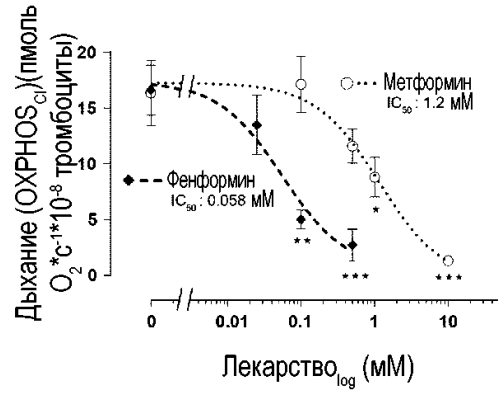




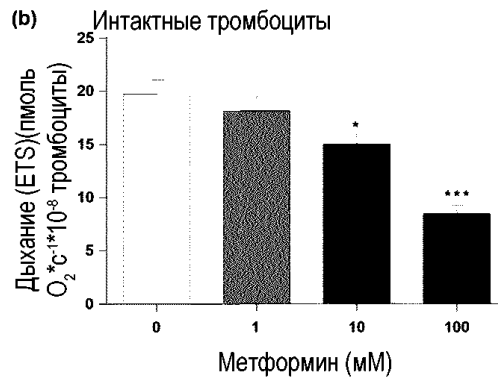
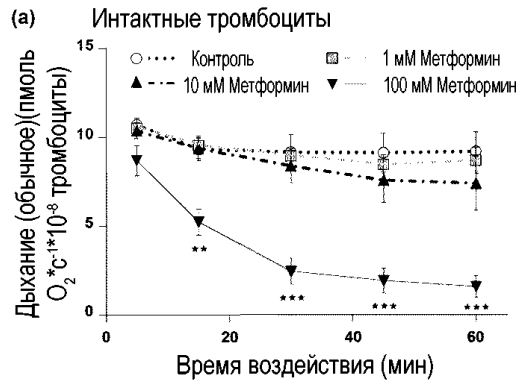
Фиг. 4



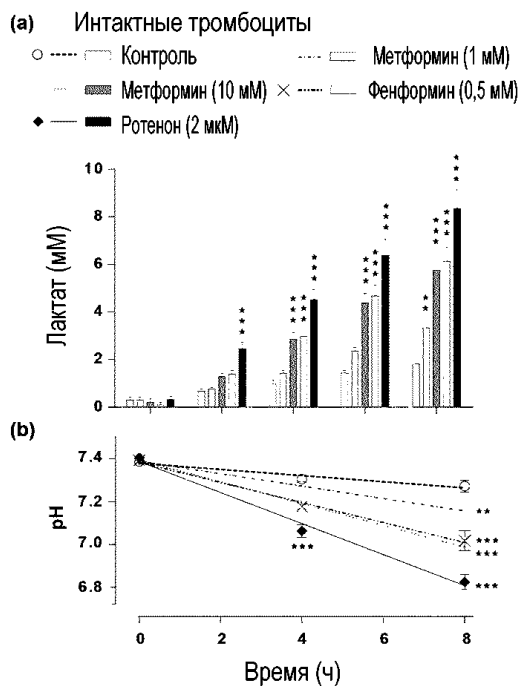
Фиг. 5



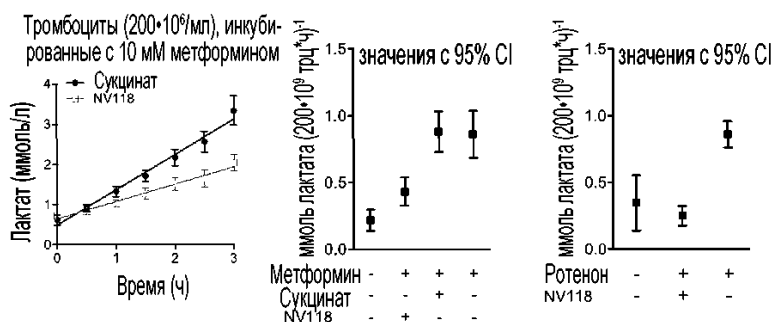
Фиг. 6



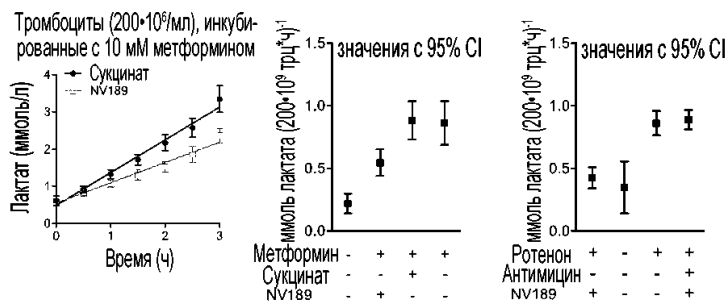
Фиг. 7



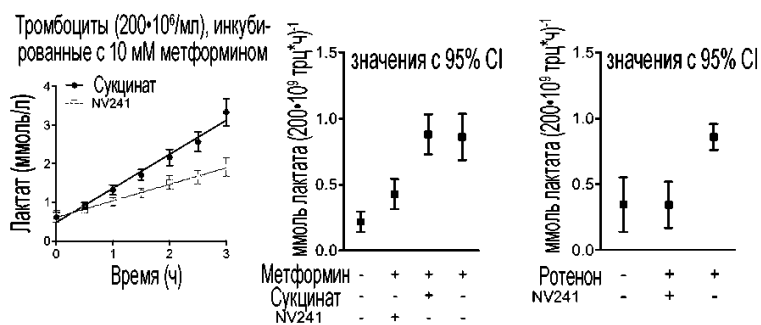
Фиг. 8



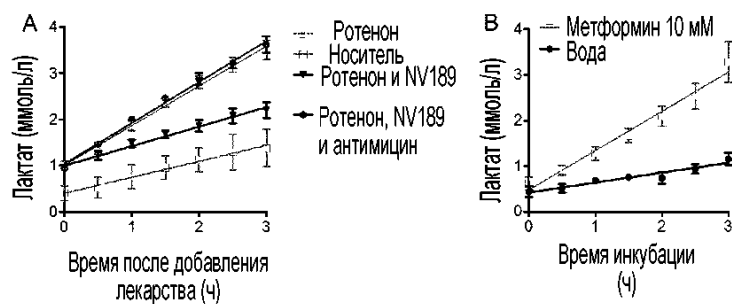
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

