

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041725**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.28

(21) Номер заявки
201990302

(22) Дата подачи заявки
2013.04.11

(51) Int. Cl. **A61K 31/506** (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ АКТИВАТОРА ТРОПОНИНА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

(31) **61/623,003; 61/646,842; 61/693,061;
61/735,809**

(32) **2012.04.11; 2012.05.14; 2012.08.24;
2012.12.11**

(33) **US**

(43) **2019.10.31**

(62) **201491666; 2013.04.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САЙТОКИНЕТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Малик Фейди, Джаспер Джеффри Р.,
Кеннеди Адам, Хвее Даррен (US)**

(74) Представитель:
Хмара М.В. (RU)

(56) HARRISON Charlotte. Troponin activator improves muscle function. Nature Reviews Drug Discovery, 2012, 11, pp. 272-273, doi:10.1038/nrd3703, с. 272

RUSSELL Alan J. et al.: Activation of fast skeletal muscle troponin as a potential therapeutic approach for treating neuromuscular diseases. Nat Med., 2012, 18(3): pp. 452-455. doi:10.1038/nm.2618.

US-A1-20090029345

(57) Предложено применение активатора тропонина скелетных мышц, который представляет собой 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид или его фармацевтически приемлемую соль для получения лекарственного средства. Указанное лекарственное средство предназначено для повышения устойчивости скелетных мышц к утомлению у субъекта, страдающего от инфаркта миокарда, для лечения непереносимости физической нагрузки у пациента, страдающего сердечной недостаточностью, или для повышения физической выносливости у пациента, страдающего сердечной недостаточностью.

041725

B1

041725

B1

Настоящая заявка выделена из заявки № 201491666 на выдачу египетского патента на изобретение, поданной 11.04.2013 г., с испрашиванием приоритета по дате подачи следующих заявок: US 61/623003, поданной 11.04.2012, US 61/646842, поданной 14.05.2012, US 61/693061, поданной 24.08.2012 и US 61/735809, поданной 11.12.2012.

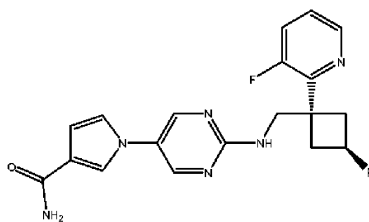
В данной заявке испрашивается приоритет заявок на патент США 61/623003, поданной 4/11/2012, 61/646842, поданной 5/14/2012, 61/693061, поданной 8/24/2012 и 61/735809, поданной 12/11/2012, включенных во всей полноте путем ссылки.

Мышечное утомление часто описывают как обратимое снижение генерируемой силы в ходе мышечной деятельности. Развитие мышечного утомления характеризуется взаимодействием центрального и периферического компонентов. Степень мышечного утомления периферического происхождения зависит от нескольких факторов, в том числе от типа мышечных волокон и частоты стимуляции. Тетаническое сокращение зачастую незначительно ослабевает вскоре после начала мышечной стимуляции, затем сила сокращения постепенно уменьшается и наконец быстро падает до исходного уровня. В различных исследованиях с участием людей в качестве субъектов было обнаружено, что утомление только частично зависело от уменьшения величины потенциалов действия или недостаточной активации "сенсора напряжения" саркоплазматического ретикула (СР), но в большей степени определялось метаболическими изменениями в мышечных волокнах, нарушающими контрактильную функцию. Так, при усиленной мышечной работе мышцы нагреваются, значение pH внутри клеток снижается, концентрация неорганического фосфата (Фн) и АДФ повышается вследствие распада АТФ и креатинфосфата, а концентрация активных форм кислорода (АФК) повышается. Каждый из этих факторов вызывает снижение мышечного напряжения, скорости и мощности сокращения быстросокращающихся скелетных мышц в ответ на стимул. Внутриклеточный Фн и протоны (H^+) непосредственно подавляют генерирование силы поперечными мостиками и, что важно, сдвигают вправо отношение сила-рСа. Снижение отношения сила-рСа означает, что для того, чтобы вызвать заданное напряжение, требуются более высокие концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . Повышение уровня АФК также снижает чувствительность быстрых волокон скелетных мышц к Ca^{2+} и играет роль в возникновении феномена утомления. При инициации мышечного сокращения концентрация Ca^{2+} остается высокой и снижение чувствительности к кальцию не влияет на максимальную силу. При длительном мышечном сокращении уменьшается ток ионов Ca^{2+} и вследствие пониженной чувствительности к Ca^{2+} , вызванной Фн и H^+ (и, возможно, АФК), сила падает. Это лежит в основе феномена утомления периферического происхождения (Allen D.G. et al. *Physiol Rev* 88: 287-332, 2008; Fitts, *J Appl Physiol* 104:551-558, 2008; Allen, *Appl Physiol*. 2011 Aug;111(2):358-66).

Помимо утомления периферического происхождения, при котором изменения происходят как в нервно-мышечных синапсах, так и удаленно от них, как описано выше, также существует утомление центрального происхождения (S. C. Gandevia, *Physiol. Rev.*, 81: 1726-1788, 2001). Утомление центрального происхождения можно описать как прогрессивное снижение произвольной активации мышц при физической нагрузке, при которой человек испытывает чувство утомления и ощущает напряженность. Это ощущение напряженности связано с различными соматосенсорными сигналами, эмоциональным состоянием, дискомфортом, болью, температурным стрессом и жаждой (Noakes et al. *Br J Sports Med*. August; 38(4): 511-514, 2004, J.W. Williamson, *Exp Physiol* 95: 1043-1048, 2010). Этот сложный механизм предохраняет систему от разрушения, запуская мышечное утомление за счет меньшего вовлечения мышц в активность, вследствие чего максимальная произвольная сила может оказаться ниже истинной максимальной силы мышцы. Изменение ощущаемой напряженности, происходящее в присутствии активатора тропонина скелетных мышц, может уменьшить степень утомления. Средства, позволяющие снизить утомление, в определенных ситуациях могут обладать терапевтическим потенциалом, особенно при некоторых заболеваниях, в том числе при сердечной недостаточности. Механизм нарушения мышечной функции при заболеваниях может быть различным. Следовательно, существует необходимость в разработке новых соединений, модулирующих сократимость скелетных мышц и новых способов, повышающих устойчивость скелетных мышц к утомлению.

Сущность изобретения

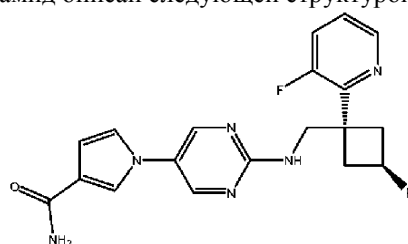
В первом аспекте изобретения оно относится к применению терапевтически эффективного количества активатора тропонина скелетных мышц для получения лекарственного средства для повышения устойчивости скелетных мышц к утомлению у субъекта, страдающего от инфаркта миокарда, где указанный активатор тропонина скелетных мышц представляет собой 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид или его фармацевтически приемлемую соль, где 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид описан следующей структурой:



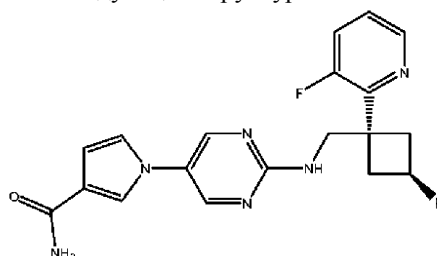
В одном из воплощений изобретения активатор тропонина скелетных мышц повышает субмаксимальное напряжение в скелетной мышце.

В еще одном воплощении изобретения активатор тропонина скелетных мышц снижает уровень внутриклеточного кальция, необходимый скелетной мышце для генерирования силы.

Во втором аспекте изобретения оно относится к применению терапевтически эффективного количества активатора тропонина скелетных мышц для получения лекарственного средства для лечения непереносимости физической нагрузки у пациента, страдающего сердечной недостаточностью, где указанный активатор тропонина скелетных мышц представляет собой 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид или его фармацевтически приемлемую соль, где 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид описан следующей структурой:



В третьем аспекте изобретения оно относится к применению терапевтически эффективного количества активатора тропонина скелетных мышц для получения лекарственного средства для повышения физической выносливости у пациента, страдающего сердечной недостаточностью, где указанный активатор тропонина скелетных мышц представляет собой 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид или его фармацевтически приемлемую соль, где 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид описан следующей структурой:



В одном воплощении изобретения активатор тропонина скелетных мышц подходит для введения пациенту со вторым видом лечения.

В еще одном воплощении изобретения второй вид лечения выбран из антиагрегантного препарата, диуретика, блокатора кальциевых каналов, бета-блокатора, ингибитора АПФ, статина, антагониста рецептора ангиотензина II и антагониста альдостерона.

В еще одном воплощении изобретения второй вид лечения выбран из дигоксина, аспирина, тиклопидина, клопидогреля, метопролола, карведилола, эплеренона и спиронолактона.

В еще одном воплощении изобретения второй вид лечения выбран из ангиопластики, стентирования и хирургической операции.

В еще одном воплощении изобретения активатор тропонина скелетных мышц подходит для одновременного введения со вторым видом лечения.

В еще одном воплощении изобретения активатор тропонина скелетных мышц подходит для последовательного введения со вторым видом лечения.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 показывает влияние Соединения С на продолжительность бега на вращающемся барабане до развития утомления у здоровых крыс.

Фиг. 2 показывает фракцию укорочения (%), измеренную с помощью эхокардиографии, в модели сердечной недостаточности у крыс (лигирование левой передней нисходящей артерии (ЛПН)).

Фиг. 3 показывает влияние Соединения С на продолжительность бега на вращающемся барабане до развития утомления у крыс с лигированием ЛПН (модель сердечной недостаточности).

Фиг. 4 показывает влияние Соединения С на зависимость между силой и частотой стимуляции демембранизированных волокон камбаловидной мышцы ложно оперированных крыс (верхняя панель) и крыс с лигированием ЛПН (нижняя панель).

Фиг. 5 показывает влияние Соединения С или носителя на зависимость между силой и частотой стимуляции демембранизированных волокон камбаловидной мышцы у ложно оперированных крыс (левые панели) и крыс с лигированием ЛПН (правые панели) по сравнению с исходным уровнем.

Фиг. 6 показывает изменение зависимости между силой и частотой стимуляции у ложно оперированных крыс (верхняя панель) и крыс с лигированием ЛПН (нижняя панель), получавших Соединение С, по сравнению с исходным уровнем.

Фиг. 7 показывает влияние Соединения С на зависимость между силой и концентрацией Ca^{2+} в демембранизированных волокнах длинного разгибателя пальцев (EDL, от лат. *extensor digitorum longus*) ложно оперированных крыс и крыс с лигированием ЛПН. Графики слева соответствуют ложно оперированным крысам, получавшим 3 мкМ Соединения С, и крысам с лигированием ЛПН, получавшим 3 мкМ Соединения С. Графики справа соответствуют ложно оперированным крысам и крысам с лигированием ЛПН.

Фиг. 8 показывает влияние Соединения С на зависимость между силой и концентрацией Ca^{2+} в демембранизированных волокнах диафрагмы ложно оперированных крыс и крыс с лигированием ЛПН. Графики слева соответствуют ложно оперированным крысам, получавшим 3 мкМ Соединения С, и крысам с лигированием ЛПН, получавшим 3 мкМ Соединения С. Графики справа соответствуют ложно оперированным крысам и крысам с лигированием ЛПН.

Фиг. 9 показывает зависимость между исходной силой и частотой стимуляции мышечных волокон диафрагмы у ложно оперированных крыс и крыс с лигированием ЛПН.

Фиг. 10 показывает влияние Соединения С на зависимость между исходной силой и частотой стимуляции мышечных волокон диафрагмы у ложно оперированных крыс (верхняя панель) и крыс с лигированием ЛПН (нижняя панель).

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтически приемлемый эксципиент" включает в себя все возможные растворители, диспергирующие среды, покрытия (оболочки), антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты и т.п. Применение таких сред и агентов вместе с фармацевтически активными веществами хорошо известно в области техники. За исключением случаев, когда стандартная среда или агент несовместимы с активным ингредиентом, предполагается, что его можно применять в составе терапевтической композиции. В состав композиций можно также вводить дополнительные активные ингредиенты. Термин "фармацевтически приемлемая соль" обозначает соли, сохраняющие биологическую эффективность и свойства соединений, описанных в данном документе, которые не являются нежелательными в биологическом или ином плане. Во многих случаях соединения, описанные в данном документе, способны образовывать кислые и/или основные соли благодаря наличию amino-и/или карбоксильных групп или подобных им групп. Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислот могут образовываться с участием неорганических кислот и органических кислот. Неорганические кислоты, которые можно использовать для получения солей, включают, например, соляную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и т.п. Органические кислоты, которые можно использовать для получения солей, включают, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, пировиноградную кислоту, щавелевую кислоту, малеиновую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, р-толуолсульфоновую кислоту, салициловую кислоту и т.п. Фармацевтически приемлемые соли присоединения основания могут образовываться с участием неорганических и органических оснований. Неорганические основания, которые можно использовать для получения солей, включают, например, натрий, калий, литий, аммоний, кальций, магний, железо, цинк, медь, марганец, алюминий и т.п. Органические основания, которые можно использовать для получения солей, включают, например, первичные, вторичные и третичные амины, замещенные амины, включая замещенные амины естественного происхождения, циклические амины, основные ионообменные смолы и т.п., в частности такие как изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триэтиламин, трипропиламин и этаноламин. В некоторых воплощениях фармацевтически приемлемая соль присоединения основания выбрана из соли аммония, калия, натрия, кальция и магния.

Термин "активный агент" обозначает соединение, обладающее биологической активностью. В некоторых воплощениях "активный агент" представляет собой соединение, пригодное для терапевтического применения. В некоторых воплощениях соединение улучшает по меньшей мере один аспект функции или активности скелетных мышц, например, развиваемую мощность, силу скелетных мышц, выносливость скелетных мышц, потребление кислорода, эффективность и/или чувствительность к кальцию.

Термины "пациент" и "субъект" означают животного, такого как млекопитающее, птица или рыба. В некоторых воплощениях пациент или субъект являются млекопитающим. Млекопитающие включают, например, мышей, крыс, собак, кошек, свиней, овец, лошадей, коров и людей. В некоторых воплощениях

пациент или субъект является человеком, например, человеком, который был или будет объектом лечения, наблюдения или эксперимента. Соединения, композиции и способы, описанные в данном документе, могут найти применение как в лечении человека, так и в ветеринарии.

В данном описании термин "скелетная мышца" включает в себя ткань скелетных мышц, а также ее компоненты, например, волокна скелетных мышц, миофибриллы, содержащие волокна скелетных мышц, саркомер скелетной мышцы, содержащий миофибриллы и различные компоненты саркомера скелетной мышцы, описанные в данном документе, включая миозин, актин, тропомиозин, тропонин С, тропонин I, тропонин Т скелетных мышц и их фрагменты и изоформы. В некоторых воплощениях "скелетная мышца" включает в себя ткань быстрых скелетных мышц, а также ее компоненты, например волокна быстрых скелетных мышц, миофибриллы, содержащие волокна быстрых скелетных мышц, саркомер быстрых скелетных мышц, содержащий миофибриллы, а также различные компоненты саркомера быстрых скелетных мышц, описанные в данном документе, включая миозин, актин, тропомиозин, тропонин С, тропонин I, тропонин Т быстрых скелетных мышц и их фрагменты и изоформы. Скелетные мышцы не включают в себя сердечную мышцу или комбинацию компонентов саркомера, присущую сердечной мышце.

В данном описании термин "терапевтический" обозначает способность модулировать сократимость быстрых скелетных мышц. В данном описании "модуляция" (и родственные термины, такие как "модулировать", "модулированный", "модулирующий") обозначает изменение функции или эффективности одного или нескольких компонентов саркомера, включая миозин, актин, тропомиозин, тропонин С, тропонин I, тропонин Т быстрых скелетных мышц, включая их фрагменты и изоформы, в качестве прямого или опосредованного ответа на присутствие соединения, описанного в данном документе, по сравнению с активностью саркомера быстрых скелетных мышц в отсутствие соединения. Изменение может представлять собой повышение активности (потенцирование) или снижение активности (ингибирование) и может быть обусловлено прямым взаимодействием соединения с саркомером, или взаимодействием соединения с одним или несколькими другими факторами, которые в свою очередь влияют на саркомер или один или несколько его компонентов. В некоторых воплощениях модуляция представляет собой потенцирование функции или эффективности одного или нескольких компонентов саркомера быстрых скелетных мышц, включая миозин, актин, тропомиозин, тропонин С, тропонин I, тропонин Т быстрых скелетных мышц, включая их фрагменты и изоформы. Модуляция может быть опосредована любым механизмом и на любом физиологическом уровне, например, вследствие повышения чувствительности к Ca^{2+} , обеспечивающей сокращение саркомера быстрых скелетных мышц при более низких концентрациях Ca^{2+} . В данном описании термины "эффективность" или "мышечная эффективность" означают отношение совершаемой механической работы к общим энергетическим затратам. Термин "мышечное утомление" или "утомление скелетных мышц" обозначает снижение сократительной способности вследствие повторяющегося использования одних и тех же мышц и представляет комбинацию утомления центрального генеза (предел возможности центральной и периферической нервной системы поддерживать активность) и утомления периферического генеза (собственно потеря мышечной функции, например, понижение эффективности процесса, называемого сопряжением возбуждения и сокращения). Вместе это приводит к понижению мышечной работоспособности при утомлении. Пониженная устойчивость к утомлению является распространенным симптомом при множестве заболеваний, вызванных различными причинами. В данном контексте утомление является основным фактором, определяющим качество жизни при таких патологических состояниях, как боковой (латеральный амиотрофический склероз) (БАС), хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), рассеянный склероз, инфаркт миокарда, перемежающаяся хромота, миастения гравис, анемия и синдром хронической усталости.

Термин "значение" обозначает численный результат. Термин "параметр" обозначает измеряемый показатель. Измерения, полученные при оценке параметра, представляют собой значения параметра. Параметры могут включать, например, время до появления боли, количество подъемов на носки до появления боли, работу до появления боли, время до развития максимального утомления, сопровождающегося болью, количество подъемов на носки до развития максимального утомления, сопровождающегося болью и работу до развития максимального утомления, сопровождающегося болью.

Термин "работа до появления боли" или "работа до развития максимального утомления, сопровождающегося болью" обозначает работу, совершенную до появления боли или развития максимального утомления, сопровождающегося болью. Работу можно определить как значение, рассчитанное по формуле: $\sin \theta \cdot \text{длина ступни} \cdot \text{масса тела}$, где θ равно углу подошвенного сгибания. Угол подошвенного сгибания можно измерить при помощи прибора, например гониометра.

Термин "терапевтически эффективное количество" или "эффективное количество" обозначает такое количество соединения, выбранного из изложенных формул, которое достаточно для эффективного лечения, согласно описанию ниже, при введении млекопитающему, нуждающемуся в таком лечении. Терапевтически эффективное количество будет варьировать в зависимости от субъекта и патологического состояния, подлежащего лечению, веса и возраста субъекта, тяжести патологического состояния, конкретного соединения, выбранного из изложенных формул, режима дозирования, времени введения, способа введения и т.п., все эти параметры может легко установить специалист в данной области техники.

"Лечение" или "лечить" означает любое лечение заболевания у пациента, включая:

- (a) предупреждение заболевания, что означает отсутствие развития клинических симптомов заболевания;
- (b) подавление заболевания;
- (c) замедление или задержка развития клинических симптомов и/или
- (d) облегчение заболевания, что означает регрессию клинических симптомов.

В данном описании "развиваемая мощность" мышцы определяется как отношение работы к продолжительности цикла и может быть рассчитана, исходя из свойств мышцы, по формуле $PoLo/$ продолжительность цикла. Развиваемую мощность можно модулировать при изменении, например, параметров активации при циклическом изменении длины мышцы, включая длительность стимуляции (фаза активации) и интервал стимуляции (рабочий цикл).

"АТФаза" обозначает фермент, гидролизующий АТФ. АТФазы включают в себя белки, содержащие молекулярные моторы, такие как миозины. В данном описании "селективное связывание" или "селективно связываться" обозначает предпочтительное связывание с белком-мишенью в мышцах или мышечных волокнах одного типа по сравнению с другими типами. Например, соединение селективно связывается с тропонином С быстрых скелетных мышц, если соединение предпочтительно связывается с тропонином С в составе тропонинового комплекса волокон или саркомера быстрых скелетных мышц по сравнению с тропонином С в составе тропонинового комплекса волокон или саркомера медленных мышц или с тропонином С в составе тропонинового комплекса саркомера сердечной мышцы.

Соединения, описанные в данном документе, избирательно повышают чувствительность быстрых скелетных мышц к кальцию за счет связывания с тропониновым комплексом. За счет повышения чувствительности к кальцию тропонин-тропомиозиновый регуляторный комплекс, который является кальциевым сенсором в составе саркомера, способным регулировать взаимодействие актина и миозина, приводящее к генерированию силы, соединения повышают силу, создаваемую мышцами. Благодаря такому влиянию на тропонин-тропомиозиновый комплекс соединения усиливают мышечный ответ на приходящий нервный импульс, а также понижают утомляемость мышц. Таким образом, соединения будут повышать мышечную силу, несмотря на утомление, как у здоровых субъектов, так и у субъектов, имеющих нейромышечную патологию или другие состояния, характеризующиеся мышечной слабостью.

Утомление скелетных мышц представляет собой сложный феномен, в котором, выражаясь общими терминами, могут быть задействованы центральная нервная система, возбуждение двигательных нейронов, деполяризация мышечных клеток/распространение потенциала действия, высвобождение кальция из саркоплазматического ретикулума (СР), активация тропонина тонких филаментов и циклическое движение поперечных мостиков миозина, взаимодействующего с актином при генерировании силы. Как правило, считают, что развитие утомления у людей обусловлено вовлечением центральной нервной системы или нервно-мышечных синусов, т.е. "утомлением центрального генеза" в минимальной степени, а скорее обусловлено в первую очередь самими миоцитами. Утомление часто классифицируют либо как низкочастотное (low frequency fatigue), вызванное повторяющейся тетанической стимуляцией, либо как высокочастотное (high frequency fatigue), вызванное продолжительной стимуляцией с высокой частотой. При продолжительном максимальном произвольном сокращении напряжение медленно падает (низкочастотное утомление).

При продолжительном сокращении скелетных мышц концентрации Фн и АДФ повышаются вследствие расщепления АТФ и креатин-фосфата. В различных исследованиях было продемонстрировано, что Фн является важным фактором, вызывающим снижение мышечной функции (N.C. Millar and E. Homsher. *J. Biol. Chem.* Vol. 265, No. 33, Issue of November 25, pp. 20234-20240, 1990; Allen D.G. et al. *Physiol Rev*; 88:287-332. 2008). Поскольку Фн высвобождается из актин-миозиновых поперечных мостиков в точке цикла поперечного мостика, ассоциированной с генерированием силы, предполагают, что повышенный уровень Фн увеличивает скорость обратной реакции и таким образом снижает мышечную силу (Takagi Y. et al. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004 December 29; 359(1452): 1913-1920; Fitts et al. *J Appl Physiol* 104:551-558, 2008). Кроме снижения силы Фн снижает чувствительность тропонина к Ca^{2+} (H. Westerblad et al. *Cellular mechanisms of fatigue in skeletal muscle.* *Am. J. Physiol.* 261 (Cell Physiol. 30): C195-C209, 1991). Например, в демембранизированных поясничных мышцах кролика при повышении концентрации Фн в инкубаторе от 0,2 мМ до 13,8 мМ, чувствительность к Ca^{2+} при развитии напряжения снижалась от $pCa=6,81$ до $pCa=6,42$, а коэффициент Хилла увеличивался от 2,5 до 4,74 (Millar 1990). Если работа демембранизированного мышечного волокна производилась при температурах, близких к физиологическим ($\sim 30^{\circ}C$), негативное влияние на чувствительность быстрых волокон скелетных мышц к Ca^{2+} было более выраженным, чем при низкой температуре ($10-20^{\circ}C$). Так, низкие концентрации Ca^{2+} ($pCa > 5,8$), высокий уровень Фн уменьшают силу, создаваемую каждым поперечным мостиком, и существенно повышают уровень свободного Ca^{2+} , необходимый для достижения силы, равной половине максимальной силы (низкий pCa_{50}) (E. P. Debold et al. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C1041-C1050, 2006.). Кроме того, Allen и соотр. исследовали роль Фн в снижении чувствительности к Ca^{2+} при сокращении интактных мышц мыши (Allen, D.G. et al. *J. Appl Physiol* 111: 358-366, 2011). В этих исследованиях было

обнаружено, что снижение мышечной силы сопровождается повышением концентрации Фн (определение с помощью ^{31}P -ЯМР), а также снижением концентрации кальция в цитоплазме мышечных клеток (миоплазме) и саркоплазматическом ретикулуме (СР) при тетанусе в ходе протоколов, стимулирующих развитие утомления. Таким образом, при утомлении Фн также препятствует высвобождению Ca^{2+} из СР (Allen 2008) и вызывает снижение концентрации кальция в СР, возможно за счет преципитации Ca^{2+} в СР (D. G. Allen and H. Westerblad *Journal of Physiology* (2001), 536.3, pp.657-665). Вместе, пониженное высвобождение Ca^{2+} из СР, Фн-индуцированный сдвиг вправо отношения рСа-сила и прямое негативное влияние Фн на циклическое движение поперечных мостиков возможно оказывают синергическое влияние и снижают мышечную силу и развиваемую мощность. Debold и соавт. (2006) приводят пример, в котором при снижении внутриклеточного Ca^{2+} от рСа 5,0 до 6,0 (что является типичным падением свободного внутриклеточного Ca^{2+} , наблюдающимся после продолжительной стимуляции интактных мышечных волокон) при физиологической температуре в присутствии 30 мМ Фн (типичным для волокон в состоянии утомления), сила, генерируемая волокнами II типа, снижается приблизительно на 90%. Падение мышечной работоспособности вследствие снижения уровня свободного внутриклеточного Ca^{2+} и снижения чувствительности к кальцию быстрых мышечных волокон позволяют предположить возможность применения активаторов тропонина быстрых скелетных мышц для уменьшения утомления.

Различные исследования показали, что нарушенное высвобождение Ca^{2+} из СР в миоплазму играет важную роль в развитии утомления (D. G. Allen et al. *Journal of Physiology* (1989), 415. pp. 433-458; Allen et al. 1995 *Exp. Physiol.* 80, 497-527; Favero 1999 *J. Appl Physiol.* 87: 471-483). Использование модуляторов высвобождения Ca^{2+} сыграло большую роль в понимании роли высвобождения Ca^{2+} из СР. Введение 20 мкМ дантролена (миорелаксанта, ингибирующего высвобождение Ca^{2+} из СР за счет блокады рианодиновых рецепторов (RyR)) в длинный разгибатель пальцев мышцы понижало исходный уровень напряжения, при котором формируется тетаническое сокращение, и при этом предотвращало развитие общего утомления (E. Germinario et al. *J Appl Physiol* 96:645-649, 2004). Напротив, кофеин (стимулирующий высвобождение Ca^{2+} из СР и повышающий концентрации свободного внутриклеточного Ca^{2+}) повышал исходный уровень напряжения, при котором формируется тетаническое сокращение длинного разгибателя пальцев, но ускорял и усугублял мышечное утомление при повторной стимуляции с частотой 60 Гц в течение 6 мин (Germinario 2004). В отличие от влияния на утомление дантролена и кофеина, когда исходный уровень тетанического напряжения на фоне введения соединений находился в обратной зависимости с последующей утомляемостью мышц, активаторы тропонина быстрых скелетных мышц, описанные в данном документе, повышают исходное (субмаксимальное) напряжение и также повышают устойчивость к утомлению. Другим важным аспектом высвобождения Ca^{2+} из СР является активация Ca^{2+} /кальмодулинзависимой киназы легкой цепи миозина скелетных мышц (skMLCK), которая затем фосфорилирует регуляторную легкую цепь (РЛЦ) миозина саркомера (H.L. Sweeney et al. *Am J Physiol Cell Physiol* 264:C1085-C1095, 1993; J.T. Stull et al. *Arch Biochem Biophys.* 2011 June 15; 510(2): 120-128). Фосфорилирование головок миозина поперечных мостиков приводит к изменению положения головок миозина толстых филаментов (Sweeney 1993) и повышает активность АТФазы, регулируемой тонкими филаментами, повышая чувствительность к Ca^{2+} при генерировании силы, а также скорость развития силы (D.T. Szczesna et al. *J Appl Physiol* 92:1661-1670, 2002). Повторная стимуляция интактной мышцы и следовательно фосфорилирование РЛЦ увеличивает мышечную работу и мощность. Поскольку усилие, развиваемое поперечно-полосатой мышцей, зависит от того, выполняла ли она недавно работу, это позволяет говорить о мышечной "памяти". Наряду с метаболизм-индуцированными изменениями функции поперечных мостиков фосфорилирование РЛЦ механистически повышает чувствительность саркомера к Ca^{2+} с увеличением мышечной силы, работы и мощности, в частности, при утомлении. Исследования функции саркомера показывают, что фосфорилирование РЛЦ вызывает сдвиг отношения сила-рСа влево за счет увеличения создаваемой силы при субмаксимальной, но не при максимальной активации Ca^{2+} (H.L. Sweeney et al. *Am J Physiol Cell Physiol* 250:C657-C660, 1986; Stull 2011). Полагают, что фосфорилирование РЛЦ скорее приводит к увеличению количества поперечных мостиков, способных смещаться относительно тонких филаментов, а не увеличивает силу, создаваемую каждым поперечным мостиком во время цикла. В этом отношении эффект фосфорилирования регуляторных легких цепей аналогичен эффекту активаторов тропонина быстрых скелетных мышц, описанных в данном документе. Таким образом, и фосфорилирование РЛЦ, и активаторы тропонина быстрых скелетных мышц увеличивают количество поперечных мостиков, совершающих циклическое движение, обеспечивают сдвиг влево отношения сила-рСа, повышают скорость развития силы и замедляют скорость релаксации демембранизированных волокон скелетных мышц. Фосфорилирование РЛЦ может увеличивать силу, работу и мощность, генерируемые при субмаксимальном сокращении *in vivo* (Stull 2011), этот эффект был также продемонстрирован для активаторов тропонина быстрых скелетных мышц в данной работе и предыдущих исследованиях (Russell AJ et al., *Nature Medicine*, 2011;378:667-75). Как фосфорилирование РЛЦ, так и активаторы тропонина быстрых скелетных мышц могут повышать силу/мощность мышц при низкочастотной стимуляции, что способствует сохранению мышечной функции при утомлении.

Большая часть энергии, потребляемой миоцитами, обеспечивает два АТФ-зависимых процесса, циклическое движение поперечных мостиков и циклическое поступление Ca^{2+} через клеточные мембраны. В со-

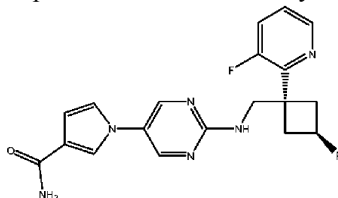
стоянии покоя SERCA1 отвечает за поддержание низкой (< 100 nM) концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле. В длинном разгибателе пальцев мыши потребление АТФ SERCA отвечает приблизительно за 50% энергозатрат в покое (S.M. Norris et al. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:C521-C529, 2010). Активаторы тропонина быстрых скелетных мышц снижают потребность мышц в Ca^{2+} , необходимом для генерирования напряжения, т.е. то же самое напряжение может быть генерировано при более низком уровне Ca^{2+} (Russell 2011). Снижение потребности в свободном цитоплазматическом Ca^{2+} , необходимом для генерирования силы, под действием активаторов тропонина быстрых скелетных мышц предполагает значительное снижение потребления АТФ SERCA в миоцитах, что в результате приведет к существенной экономии энергии и повышению устойчивости мышц к утомлению. Такое снижение потребности в Ca^{2+} , необходимом для генерирования силы, может играть определенную роль в повышении устойчивости мышц к утомлению под воздействием активаторов тропонина быстрых скелетных мышц.

При утомлении запускается сложная последовательность молекулярных событий, которые, действуя в синергизме, подавляют Ca^{2+} -активированное сокращение саркомера (Debold 2006). Так, повторная стимуляция мышечных волокон нарушает передачу сигнала при деполяризации Т-трубочек и высвобождение Ca^{2+} из СР, снижает содержание Ca^{2+} в СР (возможно вследствие преципитации, обусловленной Фн), снижает высвобождение Ca^{2+} из СР опосредовано через отрицательные метаболические эффекторы, такие как АДФ, Фн, Mg^{2+} и H^+ , понижает чувствительность тропонина к Ca^{2+} вследствие повышения уровней Фн, H^+ и АФК (Westerblad 1991; Allen 2008) и фосфорилирования RyR1 (S. Gehlert et al. *PLoS One*. 2012; 7(11):e49326) и снижает способность сократительных элементов генерировать напряжение (Debold 2006). Высвобождение ионов кальция из изолированных везикул СР может быть снижено у человека практически на 40% при продолжительной или интенсивной физической нагрузке (Allen 2008). Повышение чувствительности саркомера к Ca^{2+} , вызванное активаторами тропонина быстрых скелетных мышц, разрешает эти важные проблемы регулирования Ca^{2+} при мышечном утомлении, в частности связанные с пониженной чувствительностью к Ca^{2+} вследствие повторных сокращений (Westerblad 1991). За счет нормализации чувствительности к Ca^{2+} в сокращающейся мышце активаторы тропонина быстрых скелетных мышц понижают утомляемость мышцы *in vitro*, *in situ* и *in vivo*. Таким образом, активаторы тропонина быстрых скелетных мышц представляют собой важный терапевтический подход, позволяющий усилить мышечную функцию при нервно-мышечной слабости и уменьшить утомляемость. При мышечном сокращении отношение сила-скорость описывается гиперболой, где при больших нагрузках уменьшается скорость сокращения, но развивается большее напряжение. Влияние силовой тренировки заключается в увеличении максимального изометрического напряжения (P_o) мышцы. Хотя тренировка не увеличивает максимальную скорость сокращения без нагрузки (V_o), более сильная тренированная мышца может перемещать груз в изотонических условиях при большей скорости. Другим аспектом действия активаторов тропонина быстрых скелетных мышц является сходство с физическими упражнениями. Так, силовые упражнения у пожилых мужчин приводили к 45% повышению V_o в волокнах I типа латеральной широкой мышцы бедра и увеличению мощности от 25,5 до 41,1 мкН*длину волокна/сек (Trappe et al. *J. Appl. Physiol.* 89:143-152, 2000). В волокнах I типа латеральной широкой мышцы бедра отношение сила-скорость повышалось после выполнения упражнений, аналогичное изменение кривых сила-скорость наблюдалось в данном исследовании на мышцах после применения активаторов тропонина быстрых скелетных мышц. Аналогично, физические упражнения постепенно увеличивали развиваемую мощность у этих субъектов (Trappe 2000), что напоминало увеличение мощности, описанное для терапии активаторами тропонина быстрых скелетных мышц. Физические упражнения были связаны с улучшением транспорта Ca^{2+} в скелетных мышцах (Ferreira *Exp Biol Med* 235:497-505, 2010) и физической работоспособности (G.C. Bogdanis. *Frontiers in Physiol.* May 2012, Vol. 3, Article 142, pp. 1-15).

Следует отметить, что все воздействия, при которых кривая сила-рСа сдвигается влево, такие как фосфорилирование РЛЦ миозина скелетных мышц, физические упражнения или связывание активатора тропонина быстрых скелетных мышц с тропониновым комплексом, снижают утомляемость мышц. Схожие изменения в мышечной работоспособности при этих воздействиях подчеркивают, что чувствительность саркомера к Ca^{2+} имеет важное значение для мышечной работоспособности и устойчивости к утомлению. В отличие от попыток усилить мышечную работоспособность, за счет активации протеинкиназы, активируемой АМФ, (например, физических упражнений или применения низкомолекулярного соединения AICAR (5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотид), требующей длительного изменения экспрессии различных генов-мишеней, активаторы тропонина быстрых скелетных мышц, например, описанные в данном документе, быстро (т.е., за несколько минут или часов) увеличивают генерируемую субмаксимальную мышечную силу и снижают утомляемость и являются специфичными в отношении тропонинового комплекса быстрых скелетных мышц. Это позволяет проводить избирательную фармакотерапию, направленную на улучшение функции скелетных мышц при различных возможных патологических состояниях, особенно таких, при которых утомление является ведущим симптомом. Развитие мышечного утомления зачастую описывают как снижение способности мышцы развивать максимальную силу или мощность, что означает, что при возникновении мышечного утомления могут поддерживаться субмаксимальные сокращения. Мышечное утомление можно охарактеризовать как неспособность гене-

ризовать требуемую мышечную силу, прекращение активности, которая успешно поддерживалась до этого, истощение сократительной функции или, возможно, ослабление мозговой деятельности (R.M. Enoka and J. Duchateau. *J Physiol* 586.1 (2008) pp. 11-23). Механизм(ы), задействованный(е) в утомлении, зависят от выполняемой задачи и объединяют как ощущение утомления, так и механизмы, определяющие мышечную утомляемость (Enoka et al. *J. Biomech.* 45:427-433, 2012). Помимо того, что существуют различия в механизмах развития утомления при изометрическом и изотоническом мышечном сокращении, профиль утомления при использовании различных протоколов изометрического сокращения может также различаться. Так, у добровольцев, которым предлагалось либо оказывать давление рукой на преобразователь силы в направлении снизу вверх с постоянной субмаксимальной силой, либо удерживать груз в одном положении при помощи мышц-сгибателей плеча руки, характер утомления кардинально различался, несмотря на то, что величина результирующего момента силы была одинаковой в обоих заданиях (S.K. Hunter et al. *J Neurophysiol* 88:3087-3096, 2002). В этих исследованиях время выполнения задания на приложение силы (1402 с) в два раза превышало время выполнения задания на удержание положения (702 с) и характеризовалось более низким уровнем возбуждающих и тормозящих импульсов, поступающих к двигательным нейронам, по сравнению с заданием на удержание положения. Полагают, что изменения в мобилизации двигательных единиц, происходящие при утомлении, также влияют на восприятия, ассоциированные с утомительными сокращениями, например, существует сильная взаимосвязь между утомляемостью и ощущением перегрузки (Enoka and Duchateau, 2008). Таким образом, важно не только определять возможное влияние активаторов тропонина быстрых скелетных мышц на мышечную функцию *in vitro* или в моделях на животных, находящихся без сознания, но также исследовать их влияние на способность переносить физическую нагрузку и утомление в моделях на животных, находящихся в сознании, при выполнении статических и динамических упражнений. Влияние активаторов тропонина быстрых скелетных мышц можно оценивать в моделях на лабораторных животных при выполнении динамических упражнений, например, в тесте с ускоряющимся вращающимся барабаном (O. Fanellie. *Pharmacology*. 1976; 14(1):52-7; N. Boyadjiev et al. *Journal of Sports Science and Medicine* (2007) 6, 423-428), в тесте на выносливость с использованием беговой дорожки или в тесте с висением на решетках клетки, описанных в данном документе. Влияние активаторов тропонина быстрых скелетных мышц можно также оценивать в исследованиях на людях с использованием динамических упражнений, например, в тесте с подъемом на носки на обеих ногах, описанном в данном документе.

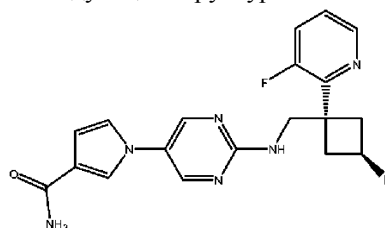
В первом аспекте изобретения оно относится к применению терапевтически эффективного количества активатора тропонина скелетных мышц для получения лекарственного средства для повышения устойчивости скелетных мышц к утомлению у субъекта, страдающего от инфаркта миокарда, где указанный активатор тропонина скелетных мышц представляет собой 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид или его фармацевтически приемлемую соль, где 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид описан следующей структурой:



В одном воплощении изобретения активатор тропонина скелетных мышц повышает субмаксимальное напряжение в скелетной мышце.

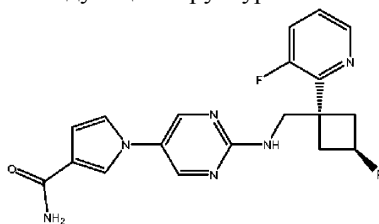
В еще одном воплощении изобретения активатор тропонина скелетных мышц снижает уровень внутриклеточного кальция, необходимый скелетной мышце для генерирования силы.

Во втором аспекте изобретения оно относится к применению терапевтически эффективного количества активатора тропонина скелетных мышц для получения лекарственного средства для лечения непереносимости физической нагрузки у пациента, страдающего сердечной недостаточностью, где указанный активатор тропонина скелетных мышц представляет собой 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид или его фармацевтически приемлемую соль, где 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид описан следующей структурой:



В третьем аспекте изобретения оно относится к применению терапевтически эффективного количе-

ства активатора тропонина скелетных мышц для получения лекарственного средства для повышения физической выносливости у пациента, страдающего сердечной недостаточностью, где указанный активатор тропонина скелетных мышц представляет собой 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид или его фармацевтически приемлемую соль, где 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид описан следующей структурой:



В одном воплощении изобретения активатор тропонина скелетных мышц подходит для введения пациенту со вторым видом лечения.

В еще одном воплощении изобретения указанный второй вид лечения выбран из антиагрегантного препарата, диуретика, блокатора кальциевых каналов, бета-блокатора, ингибитора АПФ, статина, антагониста рецептора ангиотензина II и антагониста альдостерона.

В еще одном воплощении изобретения указанный второй вид лечения выбран из дигоксина, аспирина, тиклопидина, клопидогреля, метопролола, карведилола, эплеренона и спиронолактона.

В еще одном воплощении изобретения указанный второй вид лечения выбран из ангиопластики, стентирования и хирургической операции.

В еще одном воплощении изобретения активатор тропонина скелетных мышц подходит для одно-временного введения со вторым видом лечения.

В еще одном воплощении изобретения активатор тропонина скелетных мышц подходит для последовательного введения со вторым видом лечения.

Соединение по изобретению представляет собой 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид (Соединение С) или его фармацевтически приемлемую соль.

Способы получения соединений, раскрытых в данном описании, известны в области техники: например, в WO 2011/133888 и в патенте США 7956056. Описанные в данном документе химические соединения могут найти применение в повышении устойчивости к мышечному утомлению у нуждающегося в этом субъекта. Повышение устойчивости скелетных мышц к утомлению у субъекта можно определить при помощи теста с подъемом на носки на обеих ногах, где тест с подъемом на носки на обеих ногах включает выполнение подъемов на носки с равными интервалами; регистрацию болевых симптомов; определение значений одного или нескольких параметров, выбранных из времени до появления боли, количества подъемов на носки до появления боли, работы до появления боли, времени до развития максимального утомления, сопровождающегося болью, количества подъемов на носки до развития максимального утомления, сопровождающегося болью, и работы до развития максимального утомления, сопровождающегося болью, где повышение одного или нескольких параметров указывает на повышение у субъекта устойчивости к утомлению. Тест с подъемом на носки на обеих ногах можно выполнять в любое время после введения активатора тропонина скелетных мышц, например, приблизительно через 1, 3, 6, 12, 24 или 48 или более часов после введения химического соединения.

Параметром может быть время до появления боли. Параметром может быть количество подъемов на носки до появления боли, работы до появления боли, времени до развития максимального утомления, сопровождающегося болью, количества подъемов на носки до развития максимального утомления, сопровождающегося болью, количества подъемов на носки до развития максимального утомления, сопровождающегося болью или работы до развития максимального утомления, сопровождающегося болью.

Описанные здесь химические соединения могут найти применение в лечении субъектов, имеющих заболевания, при которых повышается мышечное утомление. Такие заболевания могут включать, например, заболевание периферических артерий, перемежающуюся хромоту и ишемию мышц. При заболевании периферических артерий сосудистая недостаточность приводит к тому, что уменьшается приток крови к тканям, находящимся ниже участка обструкции, что вызывает перемежающуюся хромоту (мышечную боль при выполнении таких действий, как ходьба или подъем по лестнице). Поскольку перемежающаяся хромота является следствием недостаточного поступления артериальной крови к работающим мышцам для удовлетворения их энергетических потребностей, приводящего к ишемии и утомлению мышц, активаторы тропонина быстрых скелетных мышц можно применять для снижения утомления, вызванного такой сосудистой недостаточностью.

Описанные здесь химические соединения вводят в терапевтически эффективной дозе, например, в дозе, достаточной для того, чтобы обеспечить лечение патологических состояний, описанных ранее. Хотя дозировки описанных здесь соединений необходимо оптимизировать для человека, как правило, су-

точная доза варьируется приблизительно от 0,05 до 100 мг/кг массы тела; в некоторых воплощениях приблизительно от 0,10 до 10,0 мг/кг массы тела, а в некоторых воплощениях приблизительно от 0,15 до 1,0 мг/кг массы тела. Так для введения индивиду весом 70 кг в некоторых воплощениях доза может варьироваться приблизительно от 3,5 до 7000 мг в сут; в некоторых воплощениях приблизительно от 7,0 до 750,0 мг в сут, а в некоторых воплощениях приблизительно от 10,0 до 100,0 мг в сут. Количество вводимого химического соединения будет подбираться индивидуально для субъекта, получающего лечение, в зависимости от патологического состояния, тяжести недуга, способа и режима введения и решения лечащего врача; например возможный диапазон доз при пероральном введении может составлять приблизительно от 70 до 700 мг в сут, тогда как при внутривенном введении возможный диапазон доз может составлять приблизительно от 70 до 750 мг в сут, в зависимости от фармакокинетики соединения. В некоторых воплощениях диапазон доз составляет приблизительно 200-750 мг в сут или приблизительно 300-600 мг в сут. Конкретные значения дозировок включают 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600 и 750 мг в сут. В других воплощениях химическое соединение вводят в количестве, достаточном для поддержания в плазме средней концентрации, составляющей по меньшей мере приблизительно 5 мкг/мл в течение 24 ч, или, в альтернативном случае, 10, 12, 14, 16 или 20 мкг/мл в течение 24 ч. Введение химических соединений, описанных в данном документе, можно осуществлять любым принятым способом введения агентов, имеющих аналогичное назначение, включая пероральный, сублингвальный, подкожный, внутривенный, интраназальный, местный, трансдермальный, внутривнутрибрюшинный, внутримышечный, внутрилегочный, вагинальный, ректальный или внутриглазной способ введения, но не ограничиваясь перечисленными способами. В некоторых воплощениях применяют пероральное или парентеральное введение.

Фармацевтически приемлемые композиции включают твердые, мягкие, жидкие и аэрозольные лекарственные формы, например, такие как таблетки, капсулы, порошки, жидкости, суспензии, суппозитории, аэрозоли и т.п. Химические соединения можно также вводить в составе лекарственных форм с замедленным или контролируемым высвобождением, включая инъекции веществ с замедленным всасыванием, осмотические насосы, пилюли, трансдермальные (включая электроперенос) накладки и т.п., для непрерывного и/или периодического, пульсового введения с определенной скоростью. В некоторых воплощениях предложены композиции в виде дозированной лекарственной формы, подходящие для однократного введения точной дозы.

Описанные здесь химические соединения можно вводить либо в отдельности, либо чаще в комбинации со стандартным фармацевтическим носителем, эксципиентом и т.п. (например, маннитолом, лактозой, крахмалом, стеаратом магния, сахаринатом натрия, тальком, целлюлозой, кросскармелозой натрия, глюкозой, желатином, сахарозой, карбонатом магния и т.п.). При желании фармацевтическая композиция может также содержать минорное количество нетоксичного дополнительного вещества, например, смачивающего агента, эмульгирующего агента, солюбилизующего агента, буферного агента и т.п. (например, ацетата натрия, цитрата натрия, производных циклодекстринов, сорбитанмонолаурата, триэтанолaminaцетата, триэтанолaminaолеата и т.п.). Как правило, в зависимости от предполагаемого способа введения фармацевтическая композиция будет содержать химическое вещество в количестве приблизительно от 0,005 до 95%; в некоторых воплощениях приблизительно от 0,5 до 50% по весу. Существующие способы приготовления таких лекарственных форм известны или будут очевидны специалистам в данной области; например, см. Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania. В некоторых воплощениях композиции могут находиться в форме пилюль или таблеток и следовательно композиции будут содержать, наряду с активным ингредиентом, дилуент, такой как лактоза, сахароза, фосфат кальция и т.п.; lubricant, такой как стеарат магния и т.п. и связующее, такое как крахмал, гуммиарабик, поливинилпирролидин, желатин, целлюлоза, производные целлюлозы и т.п. Другие твердые лекарственные формы содержат порошок, пеллеты, раствор или суспензию (например, в пропиленкарбонате, растительном масле или триглицеридах), заключенные в желатиновую капсулу. Жидкие фармацевтические композиции можно изготавливать, например, путем растворения, диспергирования и т.д. по меньшей мере одного химического соединения и возможно фармацевтического адьюванта в носителе (например, воде, солевом растворе, водном растворе декстрозы, глицерине, гликоле, этаноле и т.п.) с получением раствора или суспензии. Инъекционные растворы можно изготавливать в стандартной форме, либо в виде жидких растворов или суспензий, таких как эмульсии, либо в виде твердых форм, пригодных для растворения или суспендирования в жидкости перед введением. Процентное содержание химических соединений, содержащихся в таких композициях для парентерального введения существенно зависит от их природы, а также от активности химических соединений и потребностей субъекта. Однако, в действительности процентное содержание активного ингредиента в растворе составляет от 0,01 до 10% и будет выше, если композиция находится в твердой форме и подлежит растворению до достижения указанного процентного содержания. В некоторых воплощениях композиция содержит приблизительно от 0,2 до 2% активного агента в растворе.

Фармацевтические композиции описанных здесь химических соединений также можно вводить в респираторный тракт в виде аэрозоля или раствора для небулайзера, или в виде сверхтонкого (микронизированного) порошка для инсуффляции, в отдельном виде или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В этом случае частицы фармацевтической композиции имеют диаметр, не превы-

шающий 50 микрон, в некоторых воплощениях не превышающий 10 мкм.

Соединения и композиции, описанные и/или изложенные в данном документе, можно вводить в отдельном виде или в комбинации с другими видами лечения и/или терапевтическими агентами, подходящими для лечения заболевания или нарушения.

Соединения и композиции, описанные и/или изложенные в данном документе, можно комбинировать с одним или несколькими другими видами лечения сердечной недостаточности. Подходящие дополнительные терапевтические средства включают дигоксин, омекамтив мекарбил, антиагрегантные препараты, такие как аспирин, тиклопидин и клопидогрель; бета-блокаторы, такие как метопролол или карведилол; ингибиторы АПФ (т.е. ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента), такие как периндоприл, каптоприл, эналаприл, лизиноприл и рамиприл; диуретики, такие как этакриновая кислота, торасемид, буметанид, гидрохлортиазид, ацетазоламид, метазоламид, спиронолактон, канреноат калия, амилорид и триамтерен; блокаторы кальциевых каналов, такие как амлодипин, аранидипин, азелнидипин, барнидипин, бенидипин, килнидипин, клевидипин, исрадипин, эфонидипин, фелодипин, лацидипин, лерканидипин, манидипин, никардипин, нифедипин, нилвадипин, нимодипин, нисолдипин, нитрендипин, пранидипин, верапамил, дилтиазем, мибепрадил, бепридил, флуспирилен и фендилин; статины, такие как аторвастатин, церивастатин, флувастатин, ловастатин, мевастатин, питавастатин, правастатин, розувастатин и симвастатин; антагонисты альдостерона, такие как эплеренон, канренон, проренон (progrenone) и мексренон (mexrenone) и антагонисты рецептора ангиотензина II, такие как лозартан, кандесартан, валсартан, ирбесартан, телмисартан, перосартан, олмесартан и азилсартан. Другие подходящие дополнительные виды лечения включают ангиопластику, стентирование или оперативное вмешательство (например, шунтирование или операции по удалению атеросклеротических бляшек).

Перечисленные выше терапевтические агенты, при применении в комбинации с соединениями и композициями, описанными и/или изложенными в данном документе, можно применять, например, в количестве, указанном в настольном справочнике врача или выбранном специалистом в данной области. Перечисленные выше терапевтические агенты, при применении в комбинации с соединениями и композициями, описанными и/или изложенными в данном документе, можно вводить последовательно, одновременно или в различных комбинациях. Например, если введение композиции согласно описанию обозначить "А", а дополнительного средства - "В," примеры комбинаций включают А/В/А, В/А/В, В/В/А, А/А/В, А/В/В, В/А/А, А/В/В/В, В/А/В/В, В/В/В/А, В/В/А/В, А/А/В/В, А/В/А/В, А/В/В/А, В/В/А/А, В/А/В/А, В/А/А/В, А/А/А/В, В/А/А/А, А/В/А/А, А/А/В/А и т.п. Приведенные ниже примеры позволяют лучше описать соединения и способы, раскрытые в данном документе. Очевидно, что эти примеры никоим образом не ограничивают объема изобретения, а приведены для наглядности.

Пример 1. Влияние активатора тропонина быстрых скелетных мышц на мышечное утомление у здоровых крыс

Влияние активатора тропонина быстрых скелетных мышц 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпирidin-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамида (Соединение С) на мышечное утомление у здоровых крыс оценивали по продолжительности бега на вращающемся барабане. Соединение С вводили испытуемым крысам в дозах от 0,3 до 100 мг/кг (~70 нМ-28 мкМ). В день исследования животные начинали бег с нарастающей скоростью, начиная от 14-16 об/мин, в течение 5 мин. Затем крыс принуждали к бегу с постоянно нарастающей скоростью, начиная от 12 до 25 об/мин в течение 10 мин. Регистрировали время до падения, при этом тест заканчивали через 600 с. Концентрацию соединения в плазме определяли в конце эксперимента (не при C_{max}). Концентрации в плазме для указанных доз были следующими:

Доза (мг/кг)	Концентрация в плазме (мкМ)
0,01	0,003
0,03	0,007
0,1	0,024
0,3	0,083
1	0,204
3	0,478
10	1,95
30	3,64
100	28,0

Как показано на фиг. 1, в этой модели утомления наблюдалось значимое увеличение продолжительности бега у крыс, получавших Соединение С в дозе от 0,3 до 100 мг/кг, по сравнению с контрольными животными, получавшими носитель. Таким образом, Соединение С увеличивает продолжительность бега в модели утомления с использованием вращающегося барабана у здоровых крыс.

Пример 2. Влияние активатора тропонина быстрых скелетных мышц на модели сердечной недостаточности у крыс

Для определения влияния Соединения С на функцию скелетных мышц у пациентов с сердечной не-

достаточностью использовали модель сердечной недостаточности у мышей. Самки мышей линии Sprague Dawley (весом <250 г) были приобретены в компании Charles River Laboratories, перед отправкой им была проведена операция по лигированию левой передней нисходящей артерии (крысы ЛПН-СН). Контрольные ложно оперированные животные проходили аналогичную предоперационную подготовку (ложно оперированные контроли). После трехдневной акклиматизации у всех крыс исследовали сердечную функцию, и данные показатели принимали за исходные. Животных исследовали на 4, 7 и 10 неделю для выявления прогрессирования непереносимости физической нагрузки по меньшей мере через 3 дня после проведенной эхокардиографии. Физическую работоспособность оценивали с применением протокола, в котором для развития утомления использовали вращающийся барабан (5-минутный бег с ускорением от 14-16 об/мин, с последующей оценкой продолжительности бега в течение 10 мин с ускорением от 12 до 25 об/мин). У крыс ЛПН-СН значения фракции укорочения левого желудочка составляли <25% и продолжительность бега сокращалась по сравнению с ложно оперированными контролями. Как показано на фиг. 2, фенотип сердечной недостаточности у крыс ЛПН-СН развивался через несколько недель после операции. Снижение фракции укорочения (по результатам эхокардиографии) было очевидным.

Животных распределяли по группам случайным образом, при этом половина животных получала Соединение С (10 мг/кг перорально) и половина получала носитель (19,3% ПЭГ: 80% (15%) каптизол, рН 3, 0,2% tween, 0,5% ГПМЦ) перорально через зонд за 30 мин до тестирования на вращающемся барабане в день 1 и альтернативное воздействие в день 2.

Как показано на фиг. 3, продолжительность бега у ложно оперированных животных, получавших носитель, была дольше, чем у крыс ЛПН-СН, получавших носитель (198 ± 26 с по сравнению с 111 ± 32 с, $p=0,042$, среднее арифм. $\pm$ станд.откл.). На фиг. 3 также показано, что у крыс ЛПН-СН, получавших Соединение С продолжительность бега на вращающемся барабане возрастала приблизительно в 2,5 раза по сравнению с крысами, получавшими носитель (277 ± 32 с по сравнению с 111 ± 32 с, $p=0,0004$, модель ковариационного анализа, включавшая переменные: исходное состояние, когорта крыс, день лечения и последовательность). Таким образом, введение Соединения С повышало устойчивость к утомлению в данной модели сердечной недостаточности у крыс.

Пример 3. Влияние активатора быстрых скелетных мышцы *in vivo* в модели сердечной недостаточности у крыс

В конце исследования проводили исследование *in situ* на отдельных животных из примера 1 для оценки функциональных характеристик длинного разгибателя пальцев (EDL) у ложно оперированных животных и животных с лигированием ЛПН. Оценивали результаты на фоне введения Соединения С (3 мг/кг внутривенно) и в его отсутствии.

Крыс погружали в наркоз и удаляли кожу вокруг исследуемой лапы. Затем изолировали дистальный конец длинного разгибателя пальцев (EDL) и связанное с ним сухожилие. Затем крыс помещали на платформу аппарата Aurora для исследования мышц *in situ*, при этом колено иммобилизовали, а дистальный конец сухожилия отрезали и привязывали к рукоятке преобразователя силы. Мышцу стимулировали электродами из нержавеющей стали через малоберцовый нерв. Сократительные свойства мышцы оценивали при раздражении нерва электрическим током и регистрации силы, генерируемой мышцей, с использованием серводвигателя. Длину мышцы фиксировали таким образом, чтобы в ответ на субмаксимальную стимуляцию (30 Гц, импульсы 1 мс, длительность пачки 350 мс) развивалась максимальная изометрическая сила (L_0). После определения L_0 нерв стимулировали каждые 2 мин пачками импульсов с частотой 30 Гц (стимул 1 мс, длительность 350 мс) на протяжении всего эксперимента.

Когда препарат был стабилен, оценивали отношение силы к частоте, затем делали инъекцию Соединения С (3 мг/кг IV) или носителя и повторно оценивали отношение силы к частоте. Частоту стимуляции подбирали таким образом, чтобы генерируемая сила составляла 50% от максимальной и применяли протокол стимуляции утомления, с подачей 1 пачки импульсов в секунду на протяжении 5 мин.

Результаты данного эксперимента в целом выявили небольшие различия между ЛПН-СН и ложно оперированными животными. Соединение С увеличивало ответ на низкочастотную стимуляцию в обеих группах, хотя увеличение было несколько заметнее в группе ЛПН-СН (фиг. 4 и 5). Когда из показателей второго измерения напряжения в присутствии носителя вычитали исходные значения напряжения, было очевидно, что второе отношение сила-частота было существенно ниже, возможно вследствие утомления мышцы (фиг. 6). Однако, в присутствии Соединения С кривая отношения силы мышцы EDL к частоте располагалась выше как у ложно оперированных животных, так и у животных ЛПН-СН (фиг. 6). Ответ на Соединение С был выше в мышцах крыс ЛПН-СН по сравнению с ложно оперированными животными.

Пример 4. Влияние активатора тропонина быстрых скелетных мышцы *in vitro* на демембранизированные мышечные волокна на модели сердечной недостаточности у крысы

Общая процедура исследований демембранизированных волокон: Ткань мышцы для исследования демембранизированных волокон *in vitro* получали с использованием модифицированного протокола, основанного на публикации Lynch и Faulkner (Am J Physiol 275:C1548-54 (1998)). Вкратце, мышцы ложно оперированных крыс и крыс с СН быстро препарировали, промывали в физиологическом растворе и ин-

кубировали в демембранизирующем растворе (125 мМ К-пропионат, 20 мМ имидазол, 5 мМ EGTA, 2 мМ $MgCl_2$, 2 мМ АТФ, pH 7,0) с добавлением 0,5% TritonX-100 (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) в течение 30 мин при 4°C. Затем буфер заменяли на исходный раствор (125 мМ К-пропионат, 20 мМ имидазол, 5 мМ EGTA, 2 мМ $MgCl_2$, 2 мМ АТФ, глицерол 50%, pH 7,0) и хранили при -20°C для дальнейшего использования.

Для анализа демембранизированные волокна препарировали от более крупных сегментов ткани в ригорном буфере при 4°C (20 мМ MOPS, 5 мМ $MgCl_2$, 120 мМ ацетата калия, 1 мМ EGTA, pH 7,0). Затем их подвешивали между преобразователем силы 400A (Aurora Scientific, Ontario, Canada) и неподвижным фиксатором и закрепляли 2-4 мкл 5% раствора метилцеллюлозы в ацетоне. Затем волокна инкубировали при 10°C в расслабляющем буфере (20 мМ MOPS, 5,5 мМ $MgCl_2$, 132 мМ ацетата калия, 4,4 мМ АТФ, 22 мМ креатинфосфата, 1 мг/мл креатинкиназы, 1 мМ DTT, 44 млн⁻¹ пеногасителя, pH 7,0) и подбирали исходное напряжение. Напряжение генерировали в каждом волокне путем замены буфера, в котором находились волокна, на расслабляющий буфер с добавлением 1 мМ EGTA и 15 мМ раствора хлорида кальция, расчеты проводили с использованием он-лайн ресурса (www.stanford.edu/~cpatton/webmaxc/webmaxcS.htm). Соединение А добавляли в эти буферы в виде раствора в ДМСО (конечная концентрация ДМСО 1%).

Мышцы EDL изолировали у ложно оперированных животных и животных с СН, как описано выше. Как показано на фиг. 7, между отношением сила-рСА в волокнах EDL ложно оперированных животных и животных с СН различий не наблюдалось. Однако, под воздействием 3 мМ Соединения С кривая, характеризующая отношение сила- Ca^{2+} в мышцах EDL, значительно сдвигалась влево как у ложно оперированных, так и имеющих СН животных.

Пример 5. Влияние активатора тропонина быстрых скелетных мышц на демембранизированные мышечные волокна диафрагмы *in vitro* на модели сердечной недостаточности у крыс

Диафрагмальные мышцы выделяли у ложно оперированных крыс и крыс ЛПН-СН, как описано в примере 3. По сравнению с диафрагмами ложно оперированных животных волокна диафрагм животных ЛПН-СН обладали значительно более низкой чувствительностью к Ca^{2+} . Соединение С (3 мМ) значительно повышало чувствительность к Ca^{2+} в волокнах диафрагмы ложно оперированных животных и животных ЛПН-СН (фиг. 8).

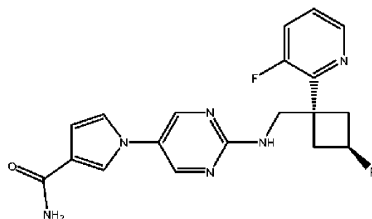
Пример 6. Влияние активатора тропонина быстрых скелетных мышц на отношение сила диафрагмы-частота *in vitro* на модели сердечной недостаточности у крыс

Силу сокращения диафрагмы измеряли при помощи стимуляции электрическим полем в инкубаторе органов согласно стандартному рабочему протоколу, взятому с сайта Treat NMD (<http://www.treat-nmd.eu/downloads/file/sops/dmd/MDX/DMD M.1.2.002.pdf>) и адаптированному. У ложно оперированных и имеющих СН животных выполняли иссечение диафрагмы и последнего подвижного ребра, прополаскивали в физиологическом растворе и помещали в термостатируемую (26-27°C) камеру с водяной рубашкой, содержащую буфер Кребса-Хензелейта (118 мМ NaCl, 10 мМ глюкозы, 4,6 мМ KCl, 1,2 мМ KH_2PO_4 , 1,2 мМ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 24,8 мМ $NaHCO_3$, 2,5 мМ $CaCl_2$, 50 мг/л тубокураина, 50 Ед/л инсулина, pH 7,4), которую постоянно аэрировали смесью 95% O_2 /5% CO_2 . После уравнивания в течение 10 мин вертикальные полоски, крепящие подвижное ребро к сухожильному центру, отрезали от диафрагмы. К сухожильному центру и подвижному ребру привязывали плетеный шелковый шовный материал и прикрепляли к преобразователю силы между двумя платиновыми электродами. Длину полосок диафрагмы подбирали таким образом, чтобы напряжение, генерируемое при сокращении, было максимальным (L_0). Профиль сила мышцы-частота получали при стимуляции мышцы с частотой в диапазоне 10-150 Гц (Grass Stimulator, продолжительность серии 800 мс, ширина импульса 0,6 мс). Соединение С растворяли в ДМСО и добавляли непосредственно в инкубатор. Как показано на фиг. 9, сила, создаваемая диафрагмальными мышцами ЛПН-СН, была значимо меньше, чем у ложно оперированных животных. 30 мМ Соединения С значимо увеличивало силу диафрагмы как у ложно оперированных (фиг. 10, верхняя панель), так и у ЛПН-СН (фиг. 10, нижняя панель) животных при субмаксимальной частоте электрической стимуляции. Таким образом, данные исследования указывают, что повышение мышечной чувствительности к Ca^{2+} при введении активатора тропонина, такого как Соединение С, повышает напряжение, развиваемое ослабленной диафрагмой.

Несмотря на то, что некоторые воплощения были показаны и описаны, могут быть сделаны различные модификации и замены, которые будут оставаться в духе и в рамках изобретения. Например, что касается целей истолкования пунктов формулы изобретения, изложенные ниже пункты формулы изобретения не предназначены для более узкого истолкования, чем их буквальная формулировка, и, таким образом, из пунктов формулы изобретения не должны выводиться типовые воплощения. Соответственно следует понимать, что данное изобретение описано для наглядности, а не для ограничения объема изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

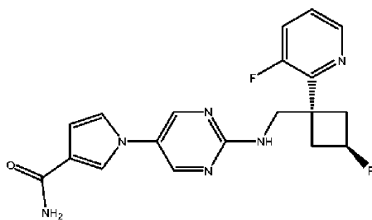
1. Применение терапевтически эффективного количества активатора тропонина скелетных мышц для получения лекарственного средства для повышения устойчивости скелетных мышц к утомлению у субъекта, страдающего от инфаркта миокарда, где указанный активатор тропонина скелетных мышц представляет собой 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид или его фармацевтически приемлемую соль, где 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид описан следующей структурой:



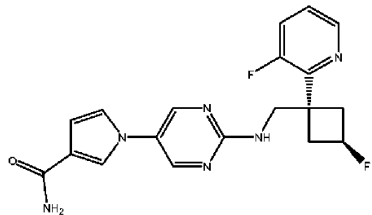
2. Применение по п.1, где активатор тропонина скелетных мышц повышает субмаксимальное напряжение в скелетной мышце.

3. Применение по п.1, где активатор тропонина скелетных мышц снижает уровень внутриклеточного кальция, необходимый скелетной мышце для генерирования силы.

4. Применение терапевтически эффективного количества активатора тропонина скелетных мышц для получения лекарственного средства для лечения непереносимости физической нагрузки у пациента, страдающего сердечной недостаточностью, где указанный активатор тропонина скелетных мышц представляет собой 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид или его фармацевтически приемлемую соль, где 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид описан следующей структурой:



5. Применение терапевтически эффективного количества активатора тропонина скелетных мышц для получения лекарственного средства для повышения физической выносливости у пациента, страдающего сердечной недостаточностью, где указанный активатор тропонина скелетных мышц представляет собой 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид или его фармацевтически приемлемую соль, где 1-(2-(((транс)-3-фтор-1-(3-фторпиридин-2-ил)циклобутил)метиламино)пиримидин-5-ил)-1Н-пиррол-3-карбоксамид описан следующей структурой:



6. Применение по п.5, где активатор тропонина скелетных мышц подходит для введения пациенту со вторым видом лечения.

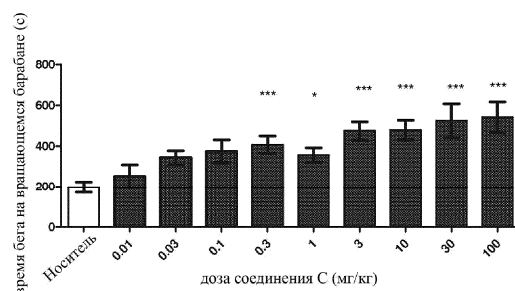
7. Применение по п.6, где второй вид лечения выбран из антиагрегантного препарата, диуретика, блокатора кальциевых каналов, бета-блокатора, ингибитора АПФ, статина, антагониста рецептора ангиотензина II и антагониста альдостерона.

8. Применение по п.7, где второй вид лечения выбран из дигоксина, аспирина, тиклопидина, клопидогреля, метопролола, карведилола, эплеренона и спиронолактона.

9. Применение по п.6, где второй вид лечения выбран из ангиопластики, стентирования и хирургической операции.

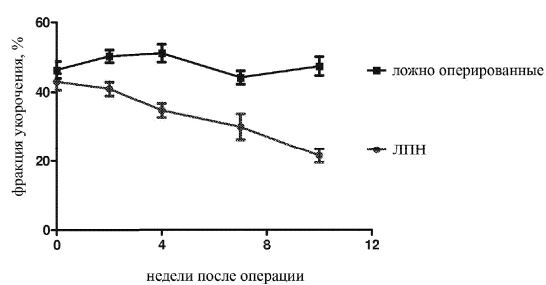
10. Применение по любому из пп.6-9, где активатор тропонина скелетных мышц подходит для одновременного введения со вторым видом лечения.

11. Применение по любому из пп.6-9, где активатор тропонина скелетных мышц подходит для последовательного введения со вторым видом лечения.

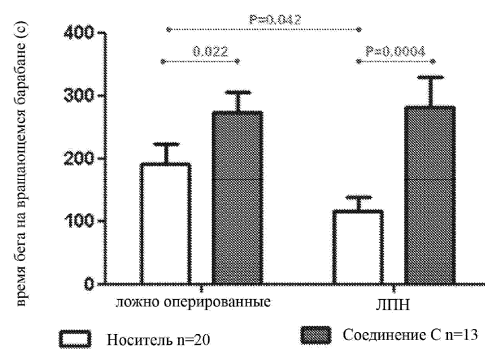


*= $P < 0.05$, ***= $P < 0.001$ однофакторный дисперсионный анализ и апостериорный тест Даннетта

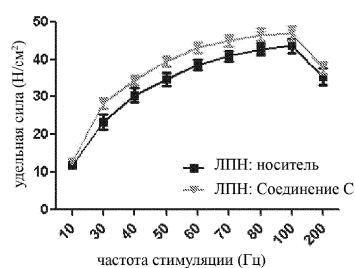
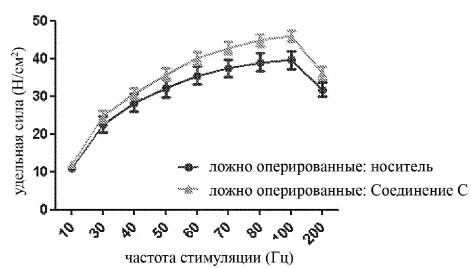
Фиг. 1



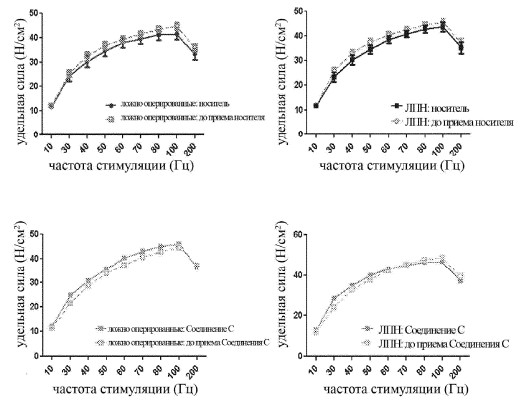
Фиг. 2



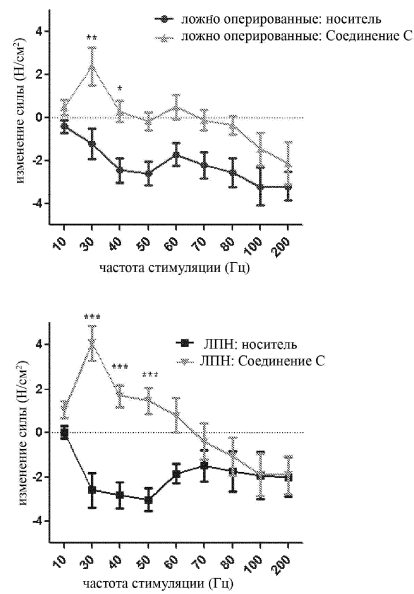
Фиг. 3



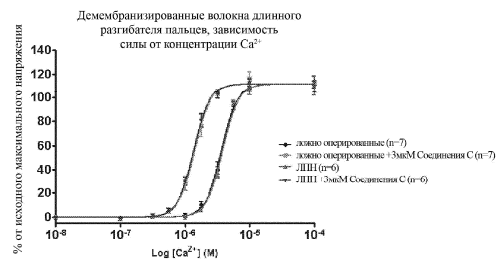
Фиг. 4



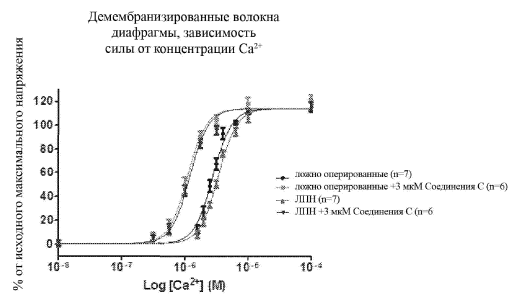
Фиг. 5



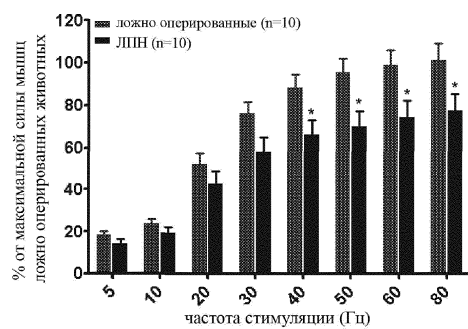
Фиг. 6



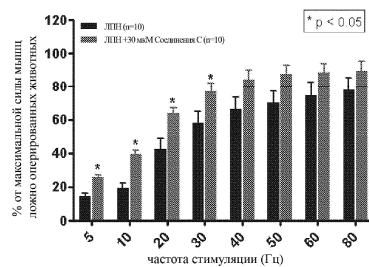
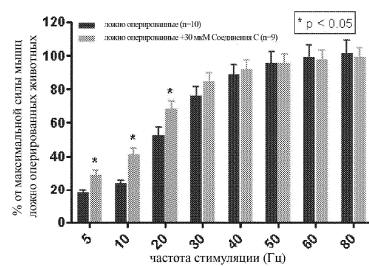
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2