

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045539**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.12.01**

**(21)** Номер заявки  
**202290094**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2020.06.18**

**(51)** Int. Cl. **C07C 327/30** (2006.01)  
**A61K 31/16** (2006.01)  
**A61P 3/00** (2006.01)

---

**(54) СУКЦИНАТНОЕ ПРОЛЕКАРСТВО, КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ  
СУКЦИНАТНОЕ ПРОЛЕКАРСТВО, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** **РА201970382; РА201970383;  
РА201970384**

**(32)** **2019.06.19**

**(33)** **DK**

**(43)** **2022.04.04**

**(86)** **PCT/EP2020/066923**

**(87)** **WO 2020/254484 2020.12.24**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**АБЛИВА АБ (SE)**

**(72)** Изобретатель:  
**Ханссон Магнус Йоаким, Гронберг  
Альвар, Эльмер Матс Эскиль,  
Фармери Марк Рикард (SE), Мосс  
Стивен Джеймс, Уэбстер Ли Роберт,  
Грегори Мэттью Алан (GB)**

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

**(56)** S. MURLI ET AL.: "Chemobiosynthesis of novel 6-deoxyerythronolide B analogues by mutation of the loading module of 6-deoxyerythronolide B synthase 1", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 71, № 8, 5 August 2005 (2005-08-05), pages 4503-4509, XP055131230, American Society for Microbiology, Washington, DC, US, ISSN: 0099-2240, DOI: 10.1128/aem.71.8.4503-4509.2005, cited in the application, table 1, 15th entry; page 4505, left-hand column, lines 20-37  
US-A1-2017105961  
US-A1-2017100359

---

**(57)** Изобретение относится к новому выделенному сукцинатному пролекарству в виде свободного соединения или его соли, гидрата, сольвата или комплекса, проникаемого для клеток и направленного на увеличение продукции АТФ в митохондриях. Соединение может быть использовано при лечении ряда заболеваний, в пищевых добавках, нутрикосметических средствах и косметических средствах.

---

**B1**

**045539**

**045539**

**B1**

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области химии, фармакологически активным соединениям, фармацевтическим композициям, содержащим такие соединения, и питанию. В частности, изобретение относится к проникаемым для клеток предшественникам сукцинатов, используемых в качестве лекарственных средств и пищевых добавок.

### Предпосылки изобретения

Митохондрии представляют собой органеллы в эукариотических клетках, которые производят большую часть запасов аденозинтрифосфата (АТФ), используемого в качестве источника энергии. Таким образом, митохондрии необходимы для производства энергии, для выживания эукариотических клеток и для правильной функции клеток. Помимо обеспечения энергией, митохондрии участвуют в ряде других процессов, таких как окислительно-восстановительный и ионный баланс, передача сигналов клеток, клеточная дифференциация, гибель клеток, а также контроль метаболических процессов, клеточного цикла и роста клеток. В частности, митохондрии являются решающими регуляторами апоптоза клеток, а также играют важную роль в ряде форм не апоптотической гибели клеток, таких как некроз.

Дисфункция митохондрий способствует широкому спектру заболеваний и может быть вызвана мутациями или делециями в митохондриальном или ядерном геноме, первичным или вторичным нарушением митохондриальной респираторной системы или другими механизмами, связанными с аномальной функцией митохондрий. В настоящее время не существует лечения митохондриальных заболеваний.

Окисление питательных веществ с целью получения полезной химической энергии в форме АТФ в значительной степени происходит в митохондриях через серию химических реакций в цикле трикарбоновых кислот и цепи переноса электронов. NADH, образующийся в цикле трикарбоновых кислот, входит в комплекс I в цепи переноса электронов. Сукцинат является промежуточным продуктом метаболизма цикла трикарбоновых кислот в митохондриях и уникален тем, что непосредственно метаболизируется ферментом сукцинатдегидрогеназой комплекса II в цепи переноса электронов. Сукцинат также может действовать как сигнальная молекула, отражающая состояние клеточного метаболизма.

Ввиду признанной важности поддержания или восстановления нормальной функции митохондрий или увеличения производства энергии клетками (АТФ) при лечении заболеваний и состояний, связанных с дисфункцией митохондрий или улучшением функции митохондрий, существует потребность в соединениях, обладающих проникаемостью для клеток, способностью высвободить внутриклеточный сукцинат или предшественник сукцината, низкой токсичностью соединения и побочными продуктами внутриклеточного высвобождения, а также физико-химическими свойствами, соответствующими введению субъекту или пациенту.

Сукцинатные соединения были получены в качестве пролекарств других активных агентов, например, в WO 2002/28345 описан бис(2,2-диметилпропионилоксиметилловый) эфир янтарной кислоты, дибутырилоксиметилловый эфир янтарной кислоты и бис-(1-бутирилоксиэтиловый) эфир янтарной кислоты. Эти соединения в готовом виде доставляют формальдегид и предназначены для различных медицинских применений по сравнению с существующими соединениями.

В данной области известны различные производные сложных эфиров сукцината.

В WO 97/47584 описаны сукцинаты полиолов, содержащие несколько сукцинатных фрагментов, связанных вместе.

В WO 2015/155231 описаны сукцинаты и предшественники сукцината, которые проникаемы для клеток.

Murli et al. (Appl. Environ. Microbiol., 71:2005:4503-4509) описали попытку хемобиосинтеза аналогов 6-дезоксиритронолида В путем кормления бактерий *Escherichia coli* и *Streptomyces coelicolor* ацилтиоэфирами. В таблице структур представлены различные ацилтиоэфиры, включая формальную структуру метил-3-[(2-ацетиламиноэтилтио)карбонил]пропионата, но синтез не удался и не дал желаемого продукта.

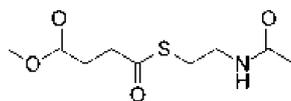
Существует потребность в эффективных и безопасных новых вариантах лечения заболеваний, возникших в результате дисфункции митохондрий, или в улучшении метаболизма путем доставки субстрата метаболизма. Также существует потребность в новых пищевых добавках, нутрикосметических средствах, космецевтических средствах и косметических средствах для стимулирования энергии у субъекта и в качестве антиоксиданта. Такие новые методы лечения, пищевые добавки, нутрикосметические средства, космецевтические средства и косметические средства должны обладать привлекательными комбинациями свойств, включая высокую активность для увеличения выработки митохондриальной энергии и/или в качестве антиоксиданта, хорошую биодоступность, длительный период полувыведения из плазмы, стабильность в составе продукта и низкую токсичность. В частности, существует потребность в таких новых лечебных средствах, пищевых добавках, нутрикосметических средствах, космецевтических средствах и косметических средствах, которые основаны на активном ингредиенте, обладающем высокой растворимостью в воде, хорошей проникаемостью для клеток и, если желательно, высоким уровнем проникновения через гематоэнцефалический барьер, и/или приводят к снижению выработки лактата.

### Сущность изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному метил 3-[(2-ацетиламиноэтилтио)карбонил]пропионату (соединение 1) в твердой форме. Оно может быть в свобод-

ной форме или в виде соли, гидрата, сольвата или комплекса.

Соединение 1 имеет следующую структуру (формула 1)



В настоящее время неожиданно было обнаружено, что проникаемое для клеток соединение 1 имеет замечательную комбинацию полезных свойств. Оно обладает мощной активностью *in vivo* по стимулированию выработки энергии в митохондриях и обладает хорошей биодоступностью при пероральном приеме, проникаемостью через гематоэнцефалический барьер, хорошей стабильностью в плазме, а также снижает выработку лактата и восстанавливает уровни сукцината. В то же время соединение 1 обладает чрезвычайно высокой растворимостью в воде и водных системах. Оценка растворимости показала растворимость, превышающую 500 мг/мл, что соответствует ~2,1 М. Эта чрезвычайно высокая растворимость в воде, вероятно, происходит из-за низкой температуры плавления соединения 1 (менее 55°C), и при добавлении водного растворителя он смешивается с водным растворителем. Это делает возможным очень высокую концентрацию водных составов, позволяя перорально вводить высокие дозы соединения, которое, по сути, является пролекарством субстрата для метаболизма.

В одном варианте осуществления выделенное соединение 1 представляет собой твердый продукт с температурой плавления или интервалом плавления в диапазоне от около 35°C до около 55°C. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения выделенное соединение 1 имеет чистоту по меньшей мере 80% мас./мас., например по меньшей мере 85% мас./мас., по меньшей мере 90% мас./мас., например, по меньшей мере 95% мас./мас., но оно также может иметь более низкую чистоту, например, по меньшей мере 30% мас./мас., по меньшей мере 40% мас./мас., по меньшей мере 45% мас./мас., по меньшей мере 50% мас./мас., по меньшей мере 55% мас./мас., по меньшей мере 60% мас./мас., по меньшей мере 65% мас./мас., по меньшей мере 70% мас./мас. или по меньшей мере 75% мас./мас. В зависимости от способа производства и условий хранения соединение 1 может содержать кристаллы и/или оно может содержать не кристаллы, такие как аморфные формы соединения 1 и их смеси. Как видно из приведенных в настоящем документе примеров, все используемые способы приводят к соединению 1 со степенью кристалличности.

Предполагается, что может существовать более одной кристаллической формы соединения 1, а также соединение 1 также может существовать в виде аморфного твердого вещества. В данном контексте все формы соединения 1 входят в объем настоящей заявки, включая смеси двух или более форм соединения 1. Таким образом, термин "соединение 1" обозначает соединение формулы 1 в твердой форме, но независимо от того, находится ли соединение в кристаллической форме, в аморфной форме, в полиморфной форме, в форме порошка или в виде их смесей.

В частности, было обнаружено, что соединение 1 имеет ряд твердых форм с различными свойствами. Например, как аморфное твердое вещество или как в основном аморфное твердое вещество, оно показывает более высокую кинетическую растворимость.

Оно также имеет кристаллические формы (или в основном кристаллические формы), которые были образованы и показывают другие улучшенные свойства при обращении с ним в твердой форме. Также было обнаружено, что чистота влияет на свойства препарата. В частности, температура плавления является низкой и близка к температуре тела и изменяется из-за наличия примесей. Стабильность препаратов соединения 1 также изменяется из-за присутствия примесей, например, в неочищенной воде, которые снижают стабильность соединения 1.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей выделенное соединение 1.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к космецевтическому средству, содержащему выделенное соединение 1.

В четвертом аспекте настоящее изобретение относится к нутрикосметическим средствам, содержащим выделенное соединение 1.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения выделенного соединения 1, где указанный способ включает следующие стадии:

а) взаимодействие N-ацетилцистеамина и монометилсукцината в присутствии связующего реагента в органическом растворителе при температуре в диапазоне между 0 и 100°C; и

б) выделение соединения 1,

с получением таким образом выделенного соединения 1.

Способ обычно включает стадию очистки для повышения чистоты соединения.

Соединения, представленные соединением 1 по изобретению, могут быть использованы для увеличения или восстановления выработки энергии в митохондриях. В частности, соединения могут использоваться в медицине, нутрикосметике, пищевых добавках, космецевтике и в косметике. Соединения, представленные соединением 1, можно использовать для профилактики или лечения нарушений или заболе-

ваний, имеющих компонент, относящийся к митохондриальной дисфункции, и/или компоненту дефицита энергии (АТФ), а также для использования клеточных сигнальных свойств сукцината и его анаплеротических эффектов на промежуточные продукты метаболизма.

Кроме того, по сравнению с известными сукцинатными пролекарствами (такими как, например, упомянутые в WO 97/47584), выделенное соединение 1 по настоящему изобретению демонстрирует улучшенные свойства для лечения и использования в качестве пищевой добавки и косметического продукта, включая лучшую проницаемость клеток, более длительный период полувыведения из плазмы, хорошую биодоступность при пероральном приеме, сниженную токсичность, повышенное высвобождение энергии в митохондриях и улучшенные свойства препарата, например, благодаря улучшенной растворимости в воде.

В другом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединения, представленные соединением 1.

Фармацевтическая композиция может быть твердым составом или твердым составом для восстановления перед применением.

Альтернативно, она может быть в форме жидкости, такой как водный раствор, включая, например, водный состав с фосфатно-солевым буфером (PBS). Обычно фармацевтическая композиция по изобретению содержит соединение 1 в концентрации по меньшей мере 10% мас./мас., по меньшей мере 30% мас./мас., по меньшей мере 50% мас./мас., по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70% мас./мас. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой раствор соединения 1 в очищенной воде, необязательно изотонично по отношению к крови.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению соединения 1 в составе композиции для лечения или предупреждения метаболического заболевания, митохондриальной дисфункции, заболевания, связанного с митохондриальной дисфункцией, митохондриального нарушения, митохондриального дефицита энергии, митохондриальных побочных эффектов, вызванных лекарственными средствами, рака, диабета, черепно-мозговой травмы, острого повреждения печени и фибрилляции предсердий.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей соединение 1.

#### Краткое описание фигур

На фиг. 1 показан ЖХМС анализ соединения 1, партия 3, отображающий единицы абсорбции (AU) в зависимости от времени с использованием метода ВЭЖХ 2.

На фиг. 2 показан ЖХМС анализ соединения 1, партия 3, отображающий общее количество ионов по нормализованной шкале в зависимости от времени с использованием метода ВЭЖХ 2.

На фиг. 3 показан ЖХМС анализ соединения 1, партия 3, отображающий интенсивность (%) в зависимости от  $m/z$  с использованием метода ВЭЖХ 2.

На фиг. 4 показан ЖХМС анализ соединения 1, партия 12, отображающий единицы абсорбции (AU) в зависимости от времени с использованием метода ВЭЖХ 2.

На фиг. 5 показан ЖХМС анализ соединения 1, партия 12, отображающий общее количество ионов по нормализованной шкале в зависимости от времени с использованием метода ВЭЖХ 2.

На фиг. 6 показан ЖХМС анализ соединения 1, партия 12, отображающий интенсивность (%) в зависимости от  $m/z$  с использованием метода ВЭЖХ 2.

На фиг. 7А и 7В показана внутривенная инфузия PBS или соединения 1 анестезированной свинье, показывающая концентрацию сукцината в плазме в зависимости от времени инфузии (А), а также концентрацию фумарата в ткани (В).

На фиг. 7С показана внутривенная инфузия PBS или соединения 1 анестезированной свинье, демонстрирующая влияние на концентрацию лактата в крови.

На фиг. 8 показана внутривенная инфузия PBS или соединения 1 анестезированной свинье, одновременно введенная с ингибитором комплекса 1 ротеноном, отображающая концентрации сукцината в тканях в конце инфузии (А), а также концентрации лактата в микродиализатах мозга, выраженные в процентах от исходного значения до начала инфузии в зависимости от времени (В).

На фиг. 9 показана обработка мышей *Ndufs4* KO соединением 1 в питьевой воде, отображающая изменение массы тела в зависимости от времени (А) и процент выживаемости в зависимости от времени (В).

На фиг. 10 показана обработка крыс, инъектированных ротеноном, соединением 1 в питьевой воде, показывающая количество вертикальных стояний по сравнению с обработкой (А), расстояние смещения в тесте на постуральную нестабильность по сравнению с обработкой (В) и концентрацию лактата в крови по сравнению с обработкой (С).

На фиг. 11 показан порошковый рентгеноструктурный анализ соединения 1, партия 12.

На фиг. 12 показан порошковый рентгеноструктурный анализ соединения 1, партия 15.

На фиг. 13 показан ЖХМС анализ соединения 1, партия 3, отображающий единицы абсорбции (AU) в зависимости от времени, с использованием метода ВЭЖХ 1.

На фиг. 14 показан ЖХМС анализ соединения 1, партия 3, отображающий общее количество ионов по нормализованной шкале в зависимости от времени с использованием метода ВЭЖХ 1.

На фиг. 15 показан ЖХМС анализ соединения 1, партия 3, отображающий интенсивность (%) в за-

в зависимости от  $m/z$  с использованием метода ВЭЖХ 1.

На фиг. 16 показан ЖХМС анализ соединения 1, партия 12, отображающий единицы абсорбции (AU) в зависимости от времени с использованием метода ВЭЖХ 1.

На фиг. 17 показан ЖХМС анализ соединения 1, партия 12, отображающий общее количество ионов в нормализованной шкале в зависимости от времени с использованием метода ВЭЖХ 1.

На фиг. 18 показан ЖХМС анализ соединения 1, партия 12, отображающий интенсивность (%) в зависимости от  $m/z$  с использованием метода ВЭЖХ 1.

На фиг. 19 показан порошковый рентгеноструктурный анализ соединения 1, партия 3.

На фиг. 20 показан порошковый рентгеноструктурный анализ соединения 1, партия 18.

На фиг. 21 показан порошковый рентгеноструктурный анализ соединения 1, партия 13.

На фиг. 22 показан порошковый рентгеноструктурный анализ соединения 1, партия 14.

На фиг. 23 показан порошковый рентгеноструктурный анализ соединения 1, партия 19.

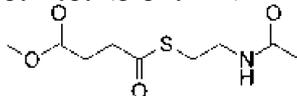
На фиг. 24 показан порошковый рентгеноструктурный анализ соединения 1, партия 16.

На фиг. 25 показан порошковый рентгеноструктурный анализ соединения 1, партия 17.

### Описание изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному метил 3-[(2-ацетиламиноэтилтио)карбонил]пропионату (соединение 1) в твердой форме. Оно может быть в свободной форме или в виде соли, гидрата, сольвата или комплекса.

Соединение 1 имеет следующую структуру (формула 1):



Как указано выше, соединение 1 может быть в виде соли. Подходящие соли включают фармацевтически приемлемые соли, такие как гидрохлоридная соль, гидробромидная соль, ацетат, цитрат, лактат, малеат, малонат или т.п.

Соединение 1 также может быть сольватом. Подходящие сольваты могут включать гидраты, этанолаты.

Соединение 1 также может быть в виде комплекса. Примерами подходящих комплексов может быть соединение 1 в комплексе с циклодекстрином, липидами, триглицеридами, углеводами, PVA,

В одном варианте осуществления выделенное соединение 1 представляет собой твердый продукт с температурой плавления или интервалом плавления в диапазоне от около 35°C до около 55°C. Как видно из приведенных в настоящем документе примеров, соединение 1 имеет разные температуры плавления, наиболее вероятно, в зависимости от содержания различных форм соединения 1, таких как кристаллические формы, аморфные формы и т.д. В частности, были обнаружены температуры плавления в диапазоне от 39 до 51°C, такие как температура плавления 39°C и температуры плавления в диапазоне от 46 до 51°C, такие как около 46-47, 48-49 и 50-51°C.

В предпочтительных вариантах осуществления изобретения выделенное соединение 1 имеет чистоту по меньшей мере 80% мас./мас., например по меньшей мере 85% мас./мас., по меньшей мере 90% мас./мас., например по меньшей мере 95% мас./мас. или по меньшей мере 97% мас./мас., но оно также может иметь более низкую чистоту, например по меньшей мере 30% мас./мас., по меньшей мере 40% мас./мас., по меньшей мере 45% мас./мас., по меньшей мере 50% мас./мас., по меньшей мере 55% мас./мас., по меньшей мере 60% мас./мас., по меньшей мере 65% мас./мас., по меньшей мере 70% мас./мас. или по меньшей мере 75% мас./мас. В зависимости от способа производства и условий хранения соединение 1 может содержать кристаллы и/или оно может содержать не кристаллы, такие как аморфные формы соединения 1 и их смеси. Как видно из приведенных в настоящем документе примеров, все используемые способы приводят к соединению 1 со степенью кристалличности. Соединение 1 также может иметь вид порошка.

Как видно из приведенных в настоящем документе примеров, соединение 1 имеет превосходную растворимость в воде при комнатной температуре (20-25°C). При pH 7,4 и в водной среде, исследованной в примерах, соединение 1 имеет растворимость в воде по меньшей мере 300 мг/мл. Растворимость соединения 1 в воде зависит от кристалличности соединения; таким образом, чем ниже степень кристалличности, тем выше растворимость в воде. Как видно из примера 10 в настоящем документе, в основном аморфный материал может иметь растворимость в воде 850 мг/мл. Поэтому предполагается, что растворимость соединения 1 в воде находится в диапазоне от 300 мг/мл до около 900 мг/мл.

Также была определена кинетическая растворимость, и было обнаружено, что константы скорости кинетической растворимости находятся в диапазоне от 0,005 до 0,2 с<sup>-1</sup>, например в диапазоне от 0,01 до 0,15 с<sup>-1</sup>. Кинетическая растворимость может зависеть от различных факторов, таких как размер частиц, кристалличность, содержание аморфного материала и т.д.

Что касается кристалличности соединения 1, оно может иметь степень кристалличности в диапазоне от 0 до 100%, например, от 10 до 100%, от 20 до 100%, от 30 до 100%, от 40 до 100%, от 50 до 100%, от 60 до 100%. Как видно из приведенных в настоящем документе примеров, многие партии, полученные

описанным в настоящем документе способом, имеют кристалличность по меньшей мере 50%, например, в диапазоне от примерно 50% до примерно 80%.

Как видно из данных порошкового рентгеноструктурного анализа, приведенных в примерах, кристаллы соединения 1 характеризуются порошковой дифракционной рентгенограммой с сигналами при 21,4, 22,2, 22,8, 23,1 и 23,3 ( $\pm 0,2^\circ$ , значения 2-тета).

Кристаллы соединения 1 также могут иметь один или несколько сигналов при 10,9, 13,1, 14,9, 16,2, 20,1, 24,0, 24,8, 26,1, например два или более, три или более, четыре или более, шесть или более, семь или более или восемь. Как видно из примеров, почти все исследуемые соединения имеют сигналы, соответствующие этим градусам ( $\pm 0,2^\circ$ , значения 2-тета).

Из данных, представленных в примерах, предполагается, что сигналы при 11,1 и 16,9 ( $\pm 0,2^\circ$ , значения 2-тета) относятся к полиморфной форме соединения 1 (форма 1). Таким образом, кристаллы соединения 1 могут иметь порошковую дифракционную рентгенограмму с сигналами при 11,1 и 16,9 ( $\pm 0,2^\circ$ , значения 2-тета) либо в дополнение к одному или нескольким из сигналов, упомянутых выше, либо в качестве альтернативы.

Как упоминалось выше, соединение 1 находится в твердой форме, в частности, включая кристаллы соединения. Температура плавления довольно низкая, но предпочтительно, чтобы соединение 1 не находилось в форме масла. Во-первых, с соединением 1 будет легче обращаться при производстве фармацевтической/косметической композиции (например, измельчение, сыпучесть порошка и прессируемость). Во-вторых, кристаллическая форма обычно является наиболее стабильной формой, а некристаллический (менее упорядоченный) материал имеет тенденцию со временем менять форму на кристаллическую (более упорядоченную, с меньшей энергией).

#### Определения.

Термин "соединение 1" обозначает соединение формулы 1 в твердой форме, и этот термин включает все кристаллические формы, все аморфные формы, все полиморфные формы и их смеси, включая смеси в одной и той же форме или в разных формах. Соединение 1 также может быть в виде порошка.

Термин "чистота", используемый в настоящем документе по отношению к соединению 1, означает степень, в которой композиция соединения 1 представляет собой метил 3-[(2-ацетиламиноэтилтио)карбонил]пропионат (соединение 1) по отношению к общему количеству соединения 1 и связанных примесей, являющихся побочными продуктами, аберрантными формами соединения 1 (близкородственная структура) и предшественниками синтеза для соединения 1. Следовательно, в композиции, содержащей 10% мас./мас. соединения 1, чистота указанного соединения 1 может быть, например, 95 или 50 мас.%, что означает, что соединение 1, используемое для получения указанной композиции, имеет чистоту 95 или 50 мас.% соответственно. Чистоту можно оценить одним из ряда методов, включая qЯМР (количественная спектроскопия ЯМР), ВЭЖХ и т.д. В qЯМР известное количество аналита растворяют в растворителе для ЯМР с известным количеством внутреннего стандарта. Получают спектр  $^1\text{H}$  ЯМР с достаточным количеством сканирований для уменьшения отношения сигнал/шум. Примерный резонанс во внутреннем стандарте и аналите объединены. Отношение этих интегралов в сочетании со знанием того, сколько протонов содержит сигнал, и молекулярных масс как аналита, так и внутреннего стандарта, затем используется для определения чистоты в % мас./мас. В ВЭЖХ чистота оценивается как площадь под кривой (AUC) для аналита по сравнению с другими сигналами с другим временем удерживания.

Термин "выделенный", используемый в настоящем документе в отношении соединения 1, означает продукт соединения 1 метил 3-[(2-ацетиламиноэтилтио)карбонил]пропионат, полученный в результате синтетической реакции и выделенный, например, очисткой от различных побочных продуктов, предшественников синтеза и аберрантных форм соединения 1.

Термин "нутрикосметические средства", как используется в настоящем документе, относится к пищевым добавкам или косметическим средствам, специально разработанным для поддержания здоровья кожи, волос и ногтей с активными ингредиентами, которые поддерживают физиологические функции для достижения более здорового и более молодого внешнего вида с течением времени. В отличие от кремов для местного применения или лечения,нутрикосметические средства принимаются внутрь и действуют изнутри, чтобы способствовать здоровью кожи, волос или ногтей изнутри.

Термин "косметическое средство", как используется в настоящем документе, предназначен для обозначения косметического продукта с биоактивными ингредиентами, которые, как предполагается, обладают медицинскими преимуществами. Косметические продукты продаются как косметические средства, но, по общему мнению, содержат по крайней мере один биологически активный ингредиент. Примеры косметических средств включают кремы против морщин для кожи с такими ингредиентами, как альфа-липоевая кислота и диметиламиноэтанол, и кремы, содержащие "сыворотку для восстановления клеток", которая, как утверждается, обладает "антивозрастными свойствами".

Термин "лечение", как используется в настоящем документе, предназначен для обозначения проведения терапии с целью уменьшения тяжести или частоты симптомов. Как используется в настоящем документе, термин "лечение" относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам.

Термин "предотвращение", как используется в настоящем документе, предназначен для обозначения предотвращения полностью или частично, или улучшения, уменьшения или контроля.

Соединение 1 обычно охватывается формулой (I), указанной в WO 2015/155231, описывающей сукцинаты и сукцинатные предшественники, которые проникаемы для клеток. Однако при качественном анализе соединения 1 авторы изобретения сделали ряд новых неожиданных открытий, показывающих, что оно обладает неожиданно хорошей комбинацией свойств, которые делают его пригодным для ряда терапевтических и нетерапевтических применений. Кроме того, были сделаны удивительные открытия в отношении преимуществ определенных форм и составов соединения 1.

Общее применение соединений по изобретению.

Метил 3-[(2-ацетиламиноэтилтио)карбонил]пропионат (соединение 1) в свободной форме или его соль, гидрат, сольват или комплекс, как описано в настоящем документе, могут быть использованы в медицине, в частности, при медикаментозном лечении или предупреждении состояний, заболеваний или нарушений, связанных с митохондриями, в нутрикосметике или в косметике. Соединение 1 также можно использовать при изготовлении композиции для такого медикаментозного лечения или предупреждения в нутрикосметике или в косметике. Соединение 1 или его соль, гидрат, сольват или комплекс могут быть использованы в любой ситуации, когда желательно повышенное или восстановленное производство энергии (АТФ), например, при медикаментозном лечении заболевания. Медикаментозное лечение может относиться к метаболическим заболеваниям или при лечении заболеваний или состояний митохондриальной дисфункции или заболеваний, связанных со снижением уровней сукцината или функциональной активности сукцината, или заболевания, при котором полезен анаплеротический эффект сукцината или его сигнальные свойства, лечение или подавление митохондриальных нарушений. Соединения, представленные соединением 1, можно использовать для стимуляции выработки митохондриальной энергии и для восстановления вызванной лекарством или химическим путем митохондриальной дисфункции, такой как, например, сенсоневральная потеря слуха или шум в ушах (побочный эффект некоторых антибиотиков из-за митохондриальной токсичности), отравление химическими веществами или газами, влияющими на метаболизм митохондрий, или молочнокислый ацидоз. Соединения можно использовать при лечении рака, диабета, острого голодания, эндотоксемии, сепсиса, синдрома системной воспалительной реакции, синдрома полиорганной недостаточности и после гипоксии, ишемии, инсульта, инфаркта миокарда, острой стенокардии, острого повреждения почек, коронарной окклюзии и фибрилляции предсердий или для предотвращения реперфузионных повреждений или противодействия им. Более того, предполагается, что соединения по изобретению могут быть полезными при лечении мужского бесплодия и симптомов менопаузы у женщин.

Предполагается, что соединения, представленные соединением 1 по изобретению, будут обеспечивать проникаемые для клеток предшественники компонентов цикла Кребса и, необязательно, путей гликолиза. Предполагается, что после проникновения в клетку в результате ферментативного или химического гидролиза будет высвобождаться сукцинат. Этот гидролиз соединения 1 также считается особенно полезным, поскольку высвобождаемая тиоловая группа имеет восстановительные свойства. Многие заболевания имеют компонент нежелательного окислительного стресса, который может привести к повреждению клеточной структуры и функции клеток. Также считается, что окислительный стресс участвует в процессах старения. Соответственно ожидается, что высвобождение компонента, который может действовать как антиоксидант и улавливать свободные радикалы или уменьшать количество реагирующих с кислородом частиц, даст дополнительную пользу как для медицинского, нутриокосметического, так и для косметического применения.

Соединение 1 может быть использовано для увеличения или восстановления выработки энергии в митохондриях. Соединение 1 также можно использовать в качестве антиоксиданта и для улавливания свободных радикалов или уменьшения количества реагирующих с кислородом частиц. Соединение 1 может быть использовано для профилактики или лечения нарушений или заболеваний, имеющих компонент, относящийся к митохондриальной дисфункции и/или компоненту дефицита энергии (АТФ), а также заболеваний, связанных с пониженными уровнями сукцината или функциональной активностью сукцината, или заболеваний, при которых полезен анаплеротический эффект сукцината или его сигнальные свойства.

Увеличение производства энергии, например, актуально для субъектов, страдающих митохондриальным дефектом, нарушением или заболеванием. Митохондриальные заболевания возникают в результате дисфункции митохондрий - специализированных отделов, присутствующих в каждой клетке тела, за исключением красных кровяных телец. Когда функция митохондрий снижается, энергия, вырабатываемая внутри клетки, уменьшается, что приводит к повреждению клетки или ее гибели.

Заболевания митохондрий чаще всего возникают в органах, которые очень требовательны к энергии, таких как сетчатка, улитка, мозг, сердце, печень, скелетные мышцы, почки, а также эндокринная и дыхательная системы. Симптомы митохондриального заболевания могут включать потерю моторного контроля, мышечную слабость и боль, судороги, проблемы со зрением/слухом, сердечные заболевания, заболевания печени, желудочно-кишечные расстройства, трудности с глотанием, усталость и многое другое. Митохондриальное заболевание может передаваться по наследству или может быть вызвано

спонтанными мутациями, которые приводят к изменению функций белков или молекул РНК, обычно находящихся в митохондриях. Было обнаружено, что многие заболевания включают митохондриальную недостаточность, такую как дефицит комплекса I, II, III или IV, или дефицит фермента, например, недостаточность пируватдегидрогеназы. Однако картина сложная, и в заболевания могут быть вовлечены многие факторы.

До сих пор нет доступных лечебных процедур. Единственными доступными методами лечения являются такие, которые могут облегчить симптомы и замедлить прогрессирование болезни.

Соответственно открытия авторов настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, очень важны, поскольку они демонстрируют положительный эффект проникаемого для клеток соединения I, являющегося тиозфирным пролекарством янтарной кислоты, на выработку энергии в митохондриях.

Кроме того, по сравнению с известными сукцинатными пролекарствами (такими как, например, упомянутые в WO 97/47584), выделенные соединения, представленные соединением I по настоящему изобретению, демонстрируют улучшенные свойства для лечения и применения в качестве нутрикосметических средств, пищевой добавки, косметического средства и косметического продукта, включая лучшую проникаемость клеток, более длительный период полувыведения из плазмы, сниженную токсичность, повышенное выделение энергии митохондриям и улучшенный состав (благодаря улучшенным свойствам, включая повышенную растворимость). В некоторых случаях выделенные соединения, представленные соединением I, также являются биодоступными при пероральном введении, что упрощает их введение.

Таким образом, полезные свойства выделенного соединения по изобретению могут включать одно или несколько из следующих:

- повышенная проникаемость клеток;
- повышенная биодоступность при приеме внутрь;
- более длительный период полувыведения из плазмы;
- сниженная токсичность;
- увеличенное выделение энергии в митохондрии;
- повышенная антиоксидантная активность;
- улучшенный состав;
- повышенная растворимость.

Настоящее изобретение относится к соединению I для применения в медицине в качестве фармацевтически активного вещества, в частности, для лечения дефицита клеточной энергии (АТФ).

Соединение по настоящему изобретению можно использовать для лечения нарушения комплекса I, либо дисфункции самого комплекса, либо любого состояния или заболевания, которое ограничивает поступление NADH в комплекс I, например, дисфункция цикла Кребса, гликолиза, бета-окисления, метаболизма пирувата и даже транспорта глюкозы или субстратов, связанных с комплексом I.

Настоящее изобретение относится также к способу лечения нарушений, связанных с митохондриальным комплексом I, таких как, но не ограничиваясь ими, синдром Ли, наследственная оптическая невропатия Лебера (LHON), MELAS (митохондриальная энцефаломиопатия, молочнокислый ацидоз и эпилепсия, подобные инсульту), митохондриальная делеция синдрома, митохондриальные миопатии и MERRF (миоклоническая эпилепсия с рваными красными волокнами), который включает введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества соединения по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение относится также к применению соединений по изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения индуцированного токсином или лекарством молочнокислого ацидоза/митохондриальной дисфункции.

Выделенное соединение I также может быть использовано в любых условиях, при которых потенциально может быть полезна дополнительная выработка энергии, таких как, но не ограничиваясь этим, длительная хирургия и интенсивная терапия.

#### Митохондрии.

Митохондрии представляют собой органеллы в эукариотических клетках, которые обычно называют "электростанцией" клетки. Одной из их основных функций является окислительное фосфорилирование. Молекула аденозинтрифосфата (АТФ) функционирует как "валюта" или носитель энергии в клетке, а эукариотические клетки получают большую часть своего АТФ в результате биохимических процессов, осуществляемых митохондриями. Эти биохимические процессы включают цикл лимонной кислоты (цикл трикарбоновой кислоты или цикл Кребса), который генерирует восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (NADH) из окисленного никотинамидадениндинуклеотида (NAD<sup>+</sup>) и восстановленный флавинадениндинуклеотид (FADH<sub>2</sub>) из окисленного флавинадениндинуклеотида (FAD), а также окислительное фосфорилирование, в процессе которого NADH и FADH<sub>2</sub> снова окисляются до NAD<sup>+</sup> и FAD.

Электроны, высвобождаемые при окислении NADH, перемещаются по ряду белковых комплексов (комплекс I, комплекс II, комплекс III и комплекс IV), известных как цепь переноса электронов или дыхательная цепь. Окисление сукцината происходит в комплексе II (комплекс сукцинатдегидрогеназы), а FAD представляет собой простетическую группу в составе ферментного комплекса сукцинатдегидрогеназы (комплекс II). Дыхательные комплексы встроены во внутреннюю мембрану митохондрии. Комплекс

IV в конце цепи передает электроны кислороду, который восстанавливается до воды. Энергия, высвобождаемая при прохождении этих электронов через комплексы, используется для создания градиента протонов через внутреннюю мембрану митохондрии, который создает электрохимический потенциал на внутренней мембране. Другой белковый комплекс, комплекс V (который не связан напрямую с комплексами I, II, III и IV), использует энергию, запасенную электрохимическим градиентом, для преобразования ADP в АТФ.

Циклу лимонная/трикарбоновая кислота и окислительному фосфорилированию предшествует гликолиз, при котором молекула глюкозы расщепляется на две молекулы пирувата с чистым образованием двух молекул АТФ на молекулу глюкозы. Затем молекулы пирувата попадают в митохондрии, где они полностью окисляются до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  посредством окислительного фосфорилирования (общий процесс известен как аэробное дыхание). Полное окисление двух молекул пирувата до диоксида углерода и воды дает около 28-29 молекул АТФ в дополнение к 2 молекулам АТФ, полученным путем преобразования глюкозы в две молекулы пирувата. Если кислород недоступен, молекула пирувата не попадает в митохондрии, а превращается в лактат в процессе анаэробного дыхания.

Таким образом, общий чистый выход на молекулу глюкозы составляет примерно 30-31 молекулу АТФ. АТФ используется для питания, прямо или косвенно, почти любой другой биохимической реакции в клетке. Таким образом, дополнительные (приблизительно) по крайней мере 28 или 29 молекул АТФ, вносимые окислительным фосфорилированием во время аэробного дыхания, имеют решающее значение для правильного функционирования клетки. Недостаток кислорода препятствует аэробному дыханию и может привести к гибели почти всех аэробных организмов; некоторые организмы, такие как дрожжи, могут выжить, используя либо аэробное, либо анаэробное дыхание.

Когда клетки организма временно лишены кислорода, используется анаэробное дыхание до тех пор, пока кислород снова не станет доступным или клетка не умрет. Пируват, образующийся во время гликолиза, превращается в лактат во время анаэробного дыхания. Считается, что накопление молочной кислоты вызывает мышечную усталость в периоды интенсивной активности, когда кислород не может поступать в мышечные клетки. Когда кислород снова становится доступным, лактат снова превращается в пируват для использования в окислительном фосфорилировании.

Дисфункция митохондрий способствует возникновению различных болезненных состояний. Некоторые митохондриальные заболевания возникают из-за мутаций или делеций митохондриального генома или ядра. Если пороговая доля митохондрий в клетке является дефектной, и если пороговая доля таких клеток в ткани имеет дефектные митохондрии, могут возникнуть симптомы дисфункции ткани или органа. Практически любая ткань может быть поражена, и может присутствовать большое количество разнообразных симптомов, в зависимости от степени поражения различных тканей.

Применение соединения по изобретению.

Соединение по настоящему изобретению можно использовать в любой ситуации, когда желательно повышенное или восстановленное производство энергии (АТФ). Примеры, например, во всех клинических условиях, когда есть потенциальная польза от увеличения выработки митохондриального АТФ или восстановления митохондриальной функции, например, при восстановлении лекарственной или химически индуцированной митохондриальной дисфункции или состояний молочнокислого ацидоза, связанных с пониженным уровнем сукцината или функциональной активностью сукцинат, состояния, при которых полезен анаплеротический эффект сукцината или его сигнальные свойства, а также лечение врожденных нарушений метаболизма, рака, диабета, острого голодания, эндотоксемии, сепсиса, снижения остроты зрения слуха, синдрома системной воспалительной реакции и синдрома полиорганной дисфункции.

В частности, соединение 1 можно использовать в медицине, в частности, для лечения или предупреждения состояния, заболевания или нарушения, связанного с митохондриями, в нутрикосметике или косметике.

Дисфункция митохондрий также описана в связи с ацидозом почечных канальцев; болезни двигательных нейронов; других неврологических заболеваний; эпилепсии; генетических заболеваний; болезни Хантингтона; расстройства настроения; шизофрении; биполярного расстройства; возрастных заболеваний; нарушений мозгового кровообращения, дегенерации желтого пятна; диабета; симптомов менопаузы и рака.

Соединение 1 для использования при нарушениях или заболеваниях, связанных с митохондриями.

Соединение по изобретению могут быть использованы для предупреждения или лечения связанного с митохондриями заболевания, выбранного из следующих:

- старение;
- болезнь Альперса (прогрессирующая детская полиодистрофия);
- болезнь Альцгеймера;
- боковой амиотрофический склероз (ALS);
- аутизм;
- синдром Барта (летальная детская кардиомиопатия);
- нарушения бета-окисления, дефицит биоэнергетического обмена;
- карнитин-ацил-карнитиновая недостаточность;

дефицит карнитина;  
 синдромы дефицита креатина (синдромы церебрального креатинового дефицита (CCDS) включают дефицит гуанидиноацетат-метилтрансферазы (дефицит GAMT), дефицит L-аргинин:глицинамидино-трансферазы (дефицит AGAT) и дефицит креатинового транспортера, связанный с SLC6A8 (дефицит SLC6A8));  
 дефицит коэнзима Q10;  
 дефицит комплекса I (NADH-дегидрогеназа (дефицит NADH-CoQ редуктазы);  
 комплексный дефицит II (дефицит сукцинатдегидрогеназы);  
 дефицит комплекса III (дефицит убихинон-цитохром с оксидоредуктазы);  
 дефицит комплекса IV/дефицит COX (дефицит цитохром с оксидазы вызван дефектом комплекса IV дыхательной цепи);  
 дефицит комплекса V (дефицит АТФ-синтазы);  
 дефицит COX, CPEO (синдром хронической прогрессирующей внешней офтальмоплегии), дефицит CPT I;  
 дефицит CPT II;  
 диабет II типа;  
 атаксия Фридрейха (FRDA или FA);  
 глутаровая ацидурия II типа;  
 KSS (синдром Кернса-Сейра);  
 молочнокислый ацидоз;  
 LCAD (дефицит длинноцепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы);  
 LC-FAOD (расстройства окисления длинноцепочечных жирных кислот);  
 LCHAD, болезнь или синдром Ли (подострая некротическая энцефаломиелопатия);  
 LHON (наследственная оптическая нейропатия Лебера);  
 болезнь Люфта;  
 MCAD (дефицит ацил-КоА-дегидрогеназы со средней длиной цепи);  
 MELAS (митохондриальная энцефалопатия, молочнокислый ацидоз и инсультоподобные эпизоды);  
 MERRF (миоклоническая эпилепсия и болезнь рваных красных волокон);  
 дефицит метилмалонил-КоА-эпимеразы;  
 дефицит мутаза метилмалонил-КоА;  
 синдром деплеции митохондриальной ДНК 5;  
 синдром деплеции митохондриальной ДНК 9;  
 синдром деплеции митохондриальной ДНК 15 (гепатоцеребральный тип) (семейство 1);  
 наследственный по материнской линии диабет и глухота;  
 MIRAS (синдром митохондриальной рецессивной атаксии);  
 митохондриальная цитопатия;  
 истощение митохондриальной ДНК;  
 митохондриальная энцефалопатия, включая энцефаломиепатию и энцефаломиелопатию, митохондриальную миопатию;  
 MNGIE (мионеврогастроинтестинальное расстройство и энцефалопатия);  
 NARP (невропатия, атаксия и пигментный ретинит);  
 нейродегенеративные расстройства, связанные с болезнью Паркинсона, Альцгеймера или Хантингтона;  
 болезнь Паркинсона;  
 синдром Пирсона;  
 прогрессирующая наружная офтальмоплегия;  
 пропионовая ацидемия;  
 дефицит пируватдегидрогеназы;  
 мутации POLG;  
 недостаточность дыхательной цепи;  
 SCAD (дефицит короткоцепочечной Ацил-КоА-дегидрогеназы)  
 SCHAD и  
 VLCAD (дефицит очень длинноцепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы).  
 Особый интерес представляет применение соединения I при лечении синдрома Лея, LHON, MELAS, MERRF (миоклоническая эпилепсия с рваными мышечными волокнами) и других заболеваний/состояний, связанных с дефектами комплекса I.  
 Применение соединений по изобретению в косметике.  
 Соединения по изобретению могут быть использованы в косметике для следующих целей:  
 улучшение метаболической функции в клетках дермы (стареющая кожа);  
 вяжущее (прыщи);  
 применение соединений по изобретению в качестве пищевых добавок.

Соединения по изобретению могут быть использованы в качестве пищевых добавок для следующих целей:

повышенная потребность в энергии из-за больших физических нагрузок;  
повышенная потребность в энергии из-за декомпенсации метаболизма во время инфекций и хирургических вмешательств;

улучшенное восстановление мышц за счет быстрого распределения в тканях и обхода гликолиза.

Фармацевтические композиции, содержащие соединение по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к фармацевтической композиции, содержащей выделенные соединения, представленные соединением 1 по настоящему изобретению, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми разбавителями или носителями.

Соединение по изобретению или его состав можно вводить любым обычным способом, например, но без ограничения его можно вводить парентерально, перорально, местно (включая на слизистые, буккально, сублингвально, трансдермально или на кожу) с помощью медицинского устройства (например, стент), путем ингаляции, инъекции или инфузии (внутривенно, подкожно, внутримышечно и т.д.). Лечение может состоять из однократной дозы или множества доз в течение определенного периода времени.

Лечение может состоять из однократной дозы или множества доз в течение определенного периода времени.

Лечение может осуществляться внутривенным капельным введением один раз в день, два раза в день, три раза в день, четыре раза в день и т.д.

Хотя соединение по изобретению можно вводить отдельно, предпочтительно, представлять его в виде фармацевтического препарата вместе с одним или несколькими приемлемыми носителями. Носитель(и) должен быть "приемлемым" в том смысле, что он совместим с соединением по изобретению и не вреден для его реципиентов. Примеры подходящих носителей описаны более подробно ниже.

Составы могут быть удобно представлены в виде дозированной формы, такой как единичная дозированная форма, и могут быть получены любым из способов, хорошо известных в области фармации. Такие способы включают стадию объединения активного ингредиента (соединения по изобретению) с носителем, который представляет собой один или несколько дополнительных ингредиентов. Как правило, составы готовят путем однородного и тщательного объединения активного ингредиента с жидкими носителями или тонко измельченными твердыми носителями или с обоими, а затем, если необходимо, придания продукту формы.

Соединение по изобретению обычно вводят внутривенно, перорально или любым парентеральным путем в виде фармацевтического препарата, содержащего активный ингредиент необязательно в виде нетоксичной органической или неорганической кислоты или соли присоединения, в фармацевтически приемлемой лекарственной форме. Композиции можно вводить в различных дозах в зависимости от заболевания и пациента, подлежащего лечению, а также от пути введения.

Фармацевтические композиции должны быть стабильными в условиях производства и хранения; таким образом, предпочтительно, чтобы они были защищены от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. В зависимости от типа состава и выбранного пути введения носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль), растительные масла и их подходящие смеси.

Например, соединение по изобретению также может быть введено перорально, трансбуккально или сублингвально в виде таблеток, капсул, суппозиторий яйцевидной формы, эликсиров, гелей, растворов, эмульсий или суспензий, которые могут содержать ароматизаторы или красители, для применения с немедленным, отсроченным или контролируемым высвобождением.

Составы в соответствии с настоящим изобретением, подходящие для перорального введения, могут быть представлены в виде дискретных единиц, таких как капсулы, облатки или таблетки, каждая из которых содержит заранее определенное количество активного ингредиента; в виде порошка или гранул; в виде раствора или суспензии в водной жидкости или неводной жидкости; или в виде жидкой эмульсии масла в воде или жидкой эмульсии вода в масле. Активный ингредиент также может быть представлен в виде болюса, электролита или пасты.

Растворы или суспензии соединения по изобретению, подходящие для перорального введения, также могут содержать эксципиенты, например растворители, такие как вода, этанол и т.д., N,N-диметилацетамид, диспергенты, например, полисорбат 80, поверхностно-активные вещества и солюбилизаторы, например, полиэтиленгликоль, Phosal 50 PG (который состоит из фосфатидилхолина, соевых жирных кислот, этанола, моно/диглицеридов, пропиленгликоля и аскорбилпальмитата). Составы согласно настоящему изобретению также могут быть в виде эмульсий, где соединение 1 может присутствовать в эмульсии вода в масле или масло в воде. Масло может быть любым маслоподобным веществом, таким как, например, соевое масло, сафлоровое масло и т.д., триглицериды, такие как триглицериды со средней длиной цепи (МСТ-масло), такие как, например, кокосовое масло, пальмовое масло и т.д. или их комбинации.

Таблетки могут содержать фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как наполнители, связующие, диспергирующие агенты, разрыхлители, глidanты, агенты, регулирующие pH, стабилизаторы,

агенты, маскирующие вкус и т.д. Конкретные примеры включают микрокристаллическую целлюлозу, лактозу (например, моногидрат лактозы или безводную лактозу), цитрат натрия, карбонат кальция, двухосновный фосфат кальция и глицин, бутилированный гидрокситолуол (E321), кросповидон, гипромеллозу, разрыхлители, такие как крахмал (предпочтительно кукурузный, картофельный или тапиоковый крахмал), натрийгликолят крахмала, натрийкроскармеллозу и некоторые сложные силикаты, а также связующие для гранулирования, такие как поливинилпирролидон, гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC), гидроксипропилцеллюлоза (HPC), макрогол 8000, сахароза, желатин и аравийская камедь. Дополнительно могут быть включены лубриканты, такие как стеарат магния, стеариновая кислота, глицерил бегенат и тальк.

Таблетка может быть изготовлена прессованием или формованием, необязательно, с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми наполнителями. Прессованные таблетки могут быть приготовлены путем прессования активного ингредиента в подходящем устройстве в сыпучей форме, такой как порошок или гранулы, необязательно смешанные со связующим (например, повидоном, желатином, гидроксипропилметилцеллюлозой), лубрикантом, инертным разбавителем, консервантом, разрыхлителем (например, натрийгликолят крахмала, поперечно-сшитый повидон, поперечно-сшитая натрий карбоксиметилцеллюлоза), поверхностно-активный или диспергирующий агент. Формованные таблетки могут быть получены формованием в подходящем аппарате смеси порошкообразного соединения, смоченного инертным жидким разбавителем. Таблетки необязательно могут быть покрыты оболочкой или снабжены насечками и могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечивать медленное или контролируемое высвобождение из них активного ингредиента, используя, например, гидроксипропилметилцеллюлозу в различных пропорциях для обеспечения желаемого профиля высвобождения.

Твердые композиции подобного типа также могут использоваться в качестве наполнителей в желатиновых капсулах. Предпочтительные наполнители в этом отношении включают лактозу, крахмал, целлюлозу, молочный сахар или высокомолекулярные полиэтиленгликоли. Для водных суспензий и/или эликсиров соединения по изобретению могут быть объединены с различными подсластителями или ароматизаторами, красящими веществами или красителями, с эмульгирующими и/или суспендирующими агентами и с разбавителями, такими как вода, этанол, пропиленгликоль и глицерин и их комбинации.

Составы, подходящие для местного введения в ротовую полость, включают пленочные композиции или лепешки, содержащие активный ингредиент на ароматизированной основе, обычно на сахарозе и гуммиарабике или трагаканте; пастилки, содержащие активный ингредиент на инертной основе, такой как желатин и глицерин или сахароза и гуммиарабик; и жидкости для полоскания рта, содержащие активный ингредиент в подходящем жидком носителе.

Фармацевтические композиции, адаптированные для местного введения, могут быть составлены в виде мазей, кремов, суспензий, эмульсий, лосьонов, порошков, растворов, паст, гелей, пропитанных повязок, спреев, аэрозолей или масел, трансдермальных устройств, присыпок и т.п. Эти композиции могут быть изготовлены обычными методами, содержащими активный агент. Таким образом, они могут также включать совместимые обычные носители и добавки, такие как консерванты, растворители для действия проникновению лекарственного средства, смягчающее средство в кремах или мазях и этанол или олеиловый спирт для лосьонов. Такие носители могут составлять от около 1% до около 98% композиции. Чаще всего они составляют до около 80% композиции. Только в качестве иллюстрации, крем или мазь готовят путем смешивания достаточных количеств гидрофильного материала и воды, содержащей около 5-10% по массе соединения, в количествах, достаточных для получения крема или мази желаемой консистенции.

Фармацевтические композиции, адаптированные для трансдермального введения, могут быть представлены в виде отдельных пластырей, предназначенных для сохранения тесного контакта с эпидермисом реципиента в течение длительного периода времени. Например, активный агент может быть доставлен из пластыря с помощью ионофореза.

Для нанесения на внешние ткани, например, на рот и кожу, композиции предпочтительно наносят в виде мази или крема для местного применения. В составе мази активный агент можно использовать либо с парафиновой, либо со смешиваемой с водой мазевой основой.

Альтернативно, активный агент может быть составлен в виде крема на основе крема типа масло в воде или основе вода в масле.

Для парентерального введения жидкие стандартные лекарственные формы или инфузии готовят с использованием активного ингредиента и стерильного носителя, например, но без ограничения воды, спиртов, полиолов, глицерина и растительных масел, предпочтительно воды. Активный ингредиент в зависимости от используемого носителя и концентрации может быть коллоидным, суспендированным или растворенным в носителе. При приготовлении растворов активный ингредиент можно растворить в воде для инъекций и стерилизовать, например, стерилизацией фильтрованием, перед заполнением подходящего флакона или ампулы и герметическим закрытием.

Такие агенты, как местные анестетики, консерванты и буферные агенты преимущественно могут быть растворены в носителе. Для повышения стабильности композицию можно заморозить, например, с помощью сублимационной сушки после заполнения флакона и удаления воды под вакуумом. Затем су-

хой лиофилизированный порошок герметично закрывают во флаконе, и может быть предоставлен сопровождающий флакон с водой для инъекций для восстановления жидкости перед использованием.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, подходящие для инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии. Кроме того, композиции могут быть в виде стерильных порошков для немедленного приготовления таких стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях конечная форма для инъекций должна быть стерильной и должна быть жидкой, чтобы ее можно было набирать с помощью шприца.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают составы, подходящие для внутриглазного введения. Они состоят из терапевтически эффективного количества соединения 1, одного или нескольких фармацевтически приемлемых наполнителей или фармацевтически приемлемого носителя. Такие фармацевтические композиции могут быть обычной дозированной формой глазных капель или другой композицией, имеющей лучшую биодоступность. Такие композиции, преодолевающие барьеры доставки лекарств в глаза и имеющие улучшенную биодоступность в глазах, представляют собой, например, эмульсии, мази, суспензии, водные гели, наномицеллы, наночастицы, липосомы, дендримеры, наносуспензии, микроиглы и термочувствительные гели *in situ*.

Суспензии для парентерального введения готовят по существу таким же образом, как и растворы, за исключением того, что активный ингредиент суспендируют в носителе, а не растворяют, и стерилизация не может быть осуществлена фильтрацией. Активный ингредиент можно стерилизовать воздействием оксида этилена перед суспендированием в стерильном носителе. Преимущественно в композицию включают поверхностно-активное вещество или смачивающий агент для облегчения равномерного распределения активного ингредиента.

Как видно из приведенных в настоящем документе примеров, следует избегать наполнителей, содержащих карбонат, особенно в жидких или полутвердых составах. Предпочтительно концентрация карбоната должна быть меньше 0,85 мМ.

Следует учитывать, что помимо ингредиентов, конкретно указанных выше, составы по настоящему изобретению могут включать другие агенты, обычно используемые в данной области, с учетом типа рассматриваемого состава, например, агенты, подходящие для перорального введения, могут включать ароматизаторы. Специалисту в данной области известно, как выбрать подходящий состав и как его приготовить (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences 18 ed. or later). Специалисту в данной области известно также, как выбрать подходящий способ введения и дозировку.

Настоящее изобретение относится к способу получения жидкой фармацевтической композиции по любому из предшествующих пунктов, где указанный способ включает следующие стадии:

- a) получение метил 3-[(2-ацетиламиноэтилтио)карбонил]пропионата (соединение 1) в свободной форме или его соли, гидрата, сольвата или комплекса;
- b) необязательно нагревание до температуры ниже 90°C, например 60°C, или выдерживание при комнатной температуре;
- c) добавление водной жидкости (например, фосфатно-солевого буфера с рН 7,4), физиологического раствора или чистой воды;
- d) необязательно содействие растворению с помощью обработки ультразвуком;
- e) перемешивание при комнатной температуре для получения указанной фармацевтической композиции.

Специалисту в данной области будет понятно, что оптимальное количество и диапазоны индивидуальных доз соединения по изобретению будут определяться природой и степенью состояния, которое лечат, видом, путем и местом введения, а также возрастом и состоянием конкретного субъекта, которого лечат, и что в конечном итоге подходящие дозы, которые будут использоваться, определяются врачом. Указанная доза может повторяться так часто, как это необходимо. Если развиваются побочные эффекты, количество и/или частоту дозирования можно изменить или уменьшить в соответствии с обычной клинической практикой.

Все упомянутые в настоящем документе значения в % выражены в % мас./мас., если иное не требуется в контексте.

Нутрикосметические композиции, содержащие соединение по изобретению.

Нутрикосметические средства представляют собой продукты для перорального применения. Настоящее изобретение также относится к нутрикосметической композиции, содержащей соединения, представленные соединением 1. Нутрикосметические композиции содержат соединение 1 в свободной форме или его соль, гидрат, сольват или комплекс вместе с одним или несколькими перорально приемлемыми разбавителями или носителями. Нутрикосметические композиции очень похожи на фармацевтические композиции для перорального введения.

Следовательно, типичные композиции представляют собой таблетки, капсулы, ячейки, эликсиры, гели, растворы или суспензии.

Косметические композиции, содержащие соединение по изобретению.

Косметические композиции обычно наносят на кожу или слизистую оболочку. Иногда их также можно вводить в виде инъекций. Настоящее изобретение также относится к косметической компози-

ции, содержащей соединения, представленные соединением 1. Космецевтические композиции содержат соединение 1 в свободной форме или его соль, гидрат, сольват или комплекс вместе с одним или несколькими перорально приемлемыми разбавителями или носителями.

Типичные космецевтические композиции включают такие, которые упомянуты в настоящем документе выше, подходящие для нанесения на кожу, слизистую оболочку или путем инъекции.

Другие аспекты изобретения.

Настоящее изобретение относится также к комбинации (например, для лечения митохондриальной дисфункции) соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой формы, как определено выше, и одного или нескольких агентов, независимо выбранных из следующих:

- производные хинона, например убихинон, идебенон, MitoQ;
- витамины, например токоферолы, токоτριенолы и тролокс (витамин E), аскорбат (C), тиамин (B1), рибофлавин (B2), никотинамид (B3), менадион (K3);
- антиоксиданты в дополнение к витаминам, например TPP-соединения (MitoQ), Sk-соединения, эпикатехин, катехин, липоевая кислота, мочевиная кислота, мелатонин;
- дихлорацетат;
- метиленовый синий;
- L-аргинин;
- пептиды Сзето-Шиллера, элампретид и аналоги элампретиды;
- креатин;
- бензодиазепины;
- модуляторы PGC-1 $\alpha$ ;
- модуляторы AMPK;
- модуляторы митохондриального деления и слияния;
- PPAR альфа/бета/гамма-агонисты;
- аналоги тролокса, производные карбоксиамида;
- активаторы HRF-2;
- модуляторы NAD<sup>+</sup>;
- прекурсоры NAD<sup>+</sup>;
- кетогенная диета.

Еще один аспект изобретения заключается в том, что любое из соединений, представленных соединением 1, описанных в настоящем документе, можно вводить вместе с любыми другими соединениями, такими как, например, бикарбонат натрия (в виде болюса (например, 1 мг-экв/кг) с последующей непрерывной инфузией) в качестве лекарственного средства, сопутствующего соединениям, описанным в настоящем документе.

Молочнокислый ацидоз или побочные эффекты, вызванные лекарствами, из-за связанного с комплексом I нарушения митохондриального окислительного фосфорилирования.

Настоящее изобретение относится также к предупреждению или лечению молочнокислого ацидоза и побочных эффектов, связанных с митохондриями. В частности, соединения, представленные соединением 1 по изобретению, используются для предупреждения или лечения побочных эффектов лекарственного средства, относящегося к митохондриям, или токсин-индуцированных на уровне комплекса I или выше его, или выраженные иным образом, в изобретении предложено в соответствии с изобретением для предотвращения или лечения прямое ингибирование комплекса I, вызванное лекарственными средствами, или любого лекарственного эффекта, ограничивающего поступление NADH к Комплексу I (например, помимо прочего, влияние на цикл Кребса, гликолиз, бета-окисление, метаболизм пирувата и даже лекарства, которые влияют на транспорт или уровни глюкозы или других субстратов, связанных с комплексом I).

Митохондриальная токсичность, вызванная лекарствами, может быть частью желаемого терапевтического эффекта (например, митохондриальная токсичность, вызванная противораковыми лекарствами), но в большинстве случаев митохондриальная токсичность, вызванная лекарствами, является нежелательным эффектом. Митохондриальная токсичность может заметно увеличить гликолиз, чтобы компенсировать клеточную потерю митохондриального образования АТФ за счет окислительного фосфорилирования. Это может привести к повышению уровня лактата в плазме, что, если оно чрезмерное, приводит к молочнокислому ацидозу, который может быть летальным. Молочнокислый ацидоз типа А в первую очередь связан с гипоксией тканей, тогда как аэробный молочнокислый ацидоз типа В связан с лекарствами, токсинами или системными нарушениями, такими как заболевания печени, диабет, рак и врожденные нарушения метаболизма (например, митохондриальные генетические дефекты).

Многие известные лекарственные вещества отрицательно влияют на митохондриальное дыхание (например, нейролептики, местные анестетики и антидиабетические средства), и, соответственно, существует необходимость в идентификации или разработке средств, которые можно использовать для обхода или смягчения негативных митохондриальных эффектов, вызванных использованием такого лекарственного вещества. Кроме того, некоторые химические вещества и газы отрицательно влияют на метаболизм и функцию митохондрий.

Настоящее изобретение относится к соединениям, представленным соединением I, для применения для предупреждения или лечения молочнокислого ацидоза и побочных эффектов, вызванных митохондриальными лекарствами или токсинами. В частности, сукцинатные пролекарства используются для профилактики или лечения связанных с митохондриями побочных эффектов, вызванных лекарственными средствами, на уровне комплекса I или выше него, или выраженные иным образом, в изобретении предложены сукцинатные пролекарства для предотвращения или лечения лекарственного прямого ингибирования комплекса I, других респираторных комплексов или любого вызванного лекарственным средством эффекта, который ограничивает поступление NADH в комплекс I (таких как, но не ограничиваясь ими, эффекты на цикл Кребса, гликолиз, бета-окисление, метаболизм пирувата и даже лекарства, которые влияют на транспорт или уровни глюкозы или других субстратов, связанных с комплексом I).

Как указано выше, повышенный уровень лактата в плазме часто наблюдается у пациентов, принимающих препараты, которые могут иметь побочные эффекты, связанные с митохондриями. Настоящее изобретение основано на экспериментальных результатах, показывающих, что метформин (терапия первой линии при лечении диабета 2 типа и который был связан с молочнокислым ацидозом в качестве редкого побочного эффекта) подавляет митохондриальную функцию клеток периферической крови человека в комплексе I во времени: и дозозависимый способ при концентрациях, соответствующих интоксикации метформином. Метформин также вызывает значительное увеличение выработки лактата интактными тромбоцитами с течением времени.

Соответственно, изобретение относится к соединениям, соответствующим формуле (I), для применения для предупреждения или лечения молочнокислого ацидоза. Однако, поскольку результаты, представленные в настоящем документе, основаны на молочнокислом ацидозе, связанном с прямым ингибированием комплекса I или связанном с дефектом на уровне комплекса I или выше него, предполагается, что соединения по изобретению подходят для применения для предупреждения или лечения связанных с митохондриями побочных эффектов, вызванных лекарственными средствами, на уровне комплекса I или выше него. Соединения по настоящему изобретению также могут противодействовать лекарственным эффектам, нарушающим метаболизм перед комплексом I (непрямое ингибирование комплекса I, которое может включать любое лекарственное действие, ограничивающее поставку NADH в комплекс I, например, действие на цикл Кребса, гликолиз, бета-окисление, метаболизм пирувата и даже лекарства, которые влияют на уровни глюкозы или других субстратов, связанных с комплексом I). Соединения могут также противодействовать дефектам после комплекса I (комплекс III, IV и V за счет увеличения движущей силы протонов).

Предполагается, что соединение I можно использовать в промышленных приложениях, например, *in vitro* для уменьшения или ингибирования образования лактата или для увеличения доступности АТФ коммерческих или промышленных клеточных линий. Примеры включают использование в культуре клеток, при сохранении органов и т.д.

Соединения по настоящему изобретению используются для лечения или предотвращения вызванных лекарственными средствами побочных эффектов, связанных с митохондриями, или для увеличения или восстановления клеточных уровней энергии (АТФ) или сукцината при лечении. В частности, они используются для лечения или предотвращения прямых или косвенных побочных эффектов, связанных с митохондриями комплекса I. В частности, они используются для лечения или профилактики молочнокислого ацидоза, такого как молочнокислый ацидоз, вызванный лекарственным веществом.

Изобретение относится также к комбинации соединения I и лекарственного вещества, которое может вызывать побочный эффект, связанный с митохондриями, в частности, побочный эффект, который вызван прямым или косвенным нарушением комплекса I лекарственным веществом. Такая комбинация может использоваться в качестве профилактического предупреждения митохондриального побочного эффекта или, в случае появления побочного эффекта, для облегчения и/или лечения митохондриального побочного эффекта.

Предполагается, что соединение I будет эффективным при лечении или предупреждении побочных эффектов, вызванных лекарственными средствами, в частности побочных эффектов, связанных с прямым или косвенным ингибированием комплекса I.

Лекарственные вещества, которые, как известно, вызывают дефекты, сбои или нарушения работы комплекса I и/или, как известно, вызывают молочнокислый ацидоз как побочный эффект, а именно  
анальгетики, включая парацетамол, капсаицин;  
антиангинальные средства, включая амиодарон, пергекселин;  
антибиотики, включая линезолид, тровафлоксацин, гентамицин;  
противоопухолевые препараты, включая хиноны, включая митомицин С, адриамицин;  
противосудорожные препараты, включая вальпроевую кислоту;  
противодиабетические средства, включая метформин, фенформин, бутилбигуанид, троглитазон и розиглитазон, пиоглитазон;  
анти-гепатит В, включая фиалуридин;  
антигистаминные препараты;  
антипаркинсонизм, включая толкапон;

антипсихотики рисперидон;  
 антишизопренический зотепин, клозапин;  
 антисептики, соединения четвертичного аммония (ЧАС);  
 противотуберкулезные препараты, включая изониазид;  
 фибраты, включая клофибрат, ципрофибрат, симвастатин;  
 снотворные, включая пропופол;  
 иммуносупрессивный модифицирующий болезнь противоревматический препарат (DMARD) лефлуномид;  
 местные анестетики, включая бупивакаин, диклофенак, индометацин и лидокаин;  
 миорелаксант, включая дантролен;  
 нейролептики, включая нейролептики, такие как хлорпромазин, флуфеназин и галоперидол;  
 NRTI (ингибиторы нуклеотидной обратной транскриптазы), включая эфавиренц, тенофовир, эмтрицитабин, зидовудин, ламивудин, рилпивирин, абакавир, диданозин;  
 НПВП, включая нимесульфид, мефенамовую кислоту, сулиндак;  
 барбитуровые кислоты.

Другие лекарственные вещества, которые, как известно, вызывают молочнокислый ацидоз как побочный эффект, включают бета2-агонисты, адреналин, теofilлин или другие гербициды. Спирты и кокаин также могут вызывать молочнокислый ацидоз.

Более того, предполагается, что соединения по изобретению также могут быть эффективными при лечении или предупреждении молочнокислого ацидоза, даже если он не связан с дефектом комплекса I.

Комбинация лекарств и соединений по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к комбинации лекарственного вещества и соединения по настоящему изобретению для использования при лечении и/или предупреждении вызванного лекарством побочного действия, выбранного из молочнокислого ацидоза и побочного действия, связанного с дефектом, ингибированием или нарушением комплекса I, где

- i) лекарственное вещество используется для лечения заболевания, для которого показано лекарственное вещество; и
- ii) соединение по изобретению используется для предотвращения или облегчения побочных эффектов, индуцированных или индуцируемых лекарственным веществом, при этом побочные эффекты выбраны из молочнокислого ацидоза и побочных эффектов, связанных с дефектом, ингибированием или нарушением работы комплекса I.

Любая комбинация такого лекарственного вещества с любым соединением по изобретению входит в объем настоящего изобретения. Соответственно, на основе описания, представленного в настоящем документе, специалист в данной области поймет, что сущность изобретения заключается в обнаружении ценных свойств соединений по изобретению, позволяющих избежать или уменьшить побочные эффекты, описанные в настоящем документе. Таким образом, потенциальное использование соединений по изобретению, способных проникать в клетки и доставлять сукцинат и, возможно, другие активные фрагменты в комбинации с любым лекарственным веществом, которое имеет или потенциально имеет побочные эффекты, описанные в настоящем документе, очевидно из настоящего описания.

Изобретение также относится к

- i) композиции, содержащей лекарственное вещество и соединение по изобретению, где лекарственное вещество имеет потенциальный вызванный лекарством побочный эффект, выбранный из молочнокислого ацидоза и побочных эффектов, связанных с дефектом, ингибированием или нарушением работы комплекса I;
- ii) композиции, описанной выше в пункте i), где соединение по настоящему изобретению используется для предотвращения или облегчения побочных эффектов, индуцированных или индуцируемых лекарственным веществом, причем побочные эффекты выбраны из молочнокислого ацидоза и побочных эффектов, связанных с дефектом, ингибированием или нарушением работы комплекса I.

Композиция может быть в виде двух отдельных упаковок.

Первая упаковка, содержащая лекарственное вещество или композицию, содержащую лекарственное вещество, и вторая упаковка, содержащая соединение I по изобретению или композицию, содержащую соединение по изобретению. Композиция также может быть единой композицией, содержащей как лекарственное вещество, так и соединение I по изобретению.

В случае если композиция включает две отдельные упаковки, лекарственное вещество и соединение I по изобретению можно вводить разными путями введения (например, лекарственное вещество путем перорального введения и соединение по изобретению путем парентерального введения или введения через слизистые оболочки) и/или их можно вводить по существу одновременно, или лекарственное вещество можно вводить перед соединением изобретения, или наоборот.

Наборы.

Изобретение относится также к набору, содержащему:

- i) первый контейнер, содержащий лекарственное вещество, которое имеет потенциальный вызванный лекарством побочный эффект, выбранный из молочнокислого ацидоза и побочных эффектов, свя-

занных с дефектом, ингибированием или нарушением работы комплекса I; и

ii) второй контейнер, содержащий соединение 1 по изобретению, которое имеет потенциал для предотвращения или облегчения побочных эффектов, индуцированных или индуцируемых лекарственным веществом, при этом побочные эффекты выбраны из молочнокислого ацидоза и побочных эффектов, связанных с дефектом, ингибированием или нарушением работы комплекса I.

Способ лечения/предупреждения побочных эффектов.

Изобретение относится также к способу лечения субъекта, страдающего вызванным лекарством побочным эффектом, выбранным из молочнокислого ацидоза и побочного эффекта, связанного с дефектом, ингибированием или нарушением работы комплекса I, где способ включает введение субъекту эффективного количества соединения, представленного соединением 1 по изобретению, и к способу предотвращения или облегчения вызванного лекарством побочного эффекта, выбранного из молочнокислого ацидоза и побочного эффекта, связанного с дефектом, ингибированием или нарушением работы комплекса I, у субъекта, который страдает от заболевания, которое лечится лекарственным веществом, которое потенциально вызывает побочный эффект, выбранный из молочнокислого ацидоза и побочного эффекта, связанного с дефектом, ингибированием или нарушением работы комплекса I, где способ включает введение субъекту эффективного количества соединения, представленного соединением 1 по изобретению, до, во время или после лечения указанным лекарственным веществом.

Метформин.

Метформин представляет собой антидиабетический препарат, относящийся к классу бигуанидов. Это лечение первой линии диабета 2 типа, на который приходится около 90% случаев диабета в США. Антидиабетический эффект приписывают снижению выработки глюкозы в печени, увеличению биологического эффекта инсулина за счет увеличения поглощения глюкозы периферическими тканями и уменьшения поглощения глюкозы в кишечнике, но точные механизмы действия полностью не выяснены. Несмотря на свои преимущества перед другими антидиабетическими средствами, его связывают с редкими случаями молочнокислого ацидоза (LA) как побочного эффекта. LA определяется как увеличенная анионная щель, уровень лактата в артериальной крови выше 5 мМ и  $pH \leq 7,35$ .

Следующий список неограничивающих вариантов осуществления дополнительно иллюстрирует изобретение.

1. Выделенный метил 3-[(2-ацетиламиноэтилтио)карбонил]пропионат (соединение 1) в свободной форме или его соль, гидрат, сольват или комплекс.

2. Выделенное соединение 1 в соответствии с вариантом осуществления 1, который является твердым продуктом.

3. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, которое представляет собой или содержит кристаллический продукт, такой как полиморф, имеющий порошковую рентгенограмму соединения 1, партия 12 (фиг. 7), или имеющий порошковую рентгенограмму соединения 1, партия 15 (фиг. 8), или имеющий положение ( $^{\circ}$ 2тета), равное 11,2 ( $\pm 0,2$ ) и 16,9 ( $\pm 0,2$ ).

4. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-2, которое представляет собой или содержит аморфный продукт.

5. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, имеющее чистоту по меньшей мере 20% мас./мас., по меньшей мере 30% мас./мас., по меньшей мере 40% мас./мас., по меньшей мере 50% мас./мас., по меньшей мере 60% мас./мас., по меньшей мере 70% мас./мас., по меньшей мере 75% мас./мас., по меньшей мере 80% мас./мас., по меньшей мере 90% мас./мас., по меньшей мере 95% мас./мас., по меньшей мере 97% мас./мас., по меньшей мере 98% мас./мас. или по меньшей мере 99% мас./мас.

6. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, имеющее содержание родственных примесей меньше чем 75% мас./мас., меньше чем 70% мас./мас., меньше чем 65% мас./мас., меньше чем 60% мас./мас., меньше чем 55% мас./мас., меньше чем 50% мас./мас., меньше чем 45% мас./мас., меньше чем 40% мас./мас., меньше чем 35% мас./мас., меньше чем 30% мас./мас., меньше чем 25% мас./мас., меньше чем 20% мас./мас., меньше чем 15% мас./мас., меньше чем 10% мас./мас., меньше чем 5% мас./мас., меньше чем 3% мас./мас., меньше чем 2% мас./мас. или меньше чем 1% мас./мас.

7. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, имеющее содержание предшественников синтеза меньше чем 50% мас./мас., меньше чем 40% мас./мас., меньше чем 30% мас./мас., меньше чем 25% мас./мас., меньше чем 20% мас./мас., меньше чем 15% мас./мас., меньше чем 10% мас./мас., меньше чем 5% мас./мас., меньше чем 3% мас./мас., меньше чем 2% мас./мас. или меньше чем 1% мас./мас.

8. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, имеющее чистоту, достаточную для фармацевтического применения.

9. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, которое находится в свободной форме.

10. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, которое

представляет собой соль.

11. Выделенное соединение 1 в соответствии с вариантом осуществления 10, которое представляет собой гидрохлоридную соль, гидробромидную соль, ацетатную соль, цитратную соль, лактатную соль, малеатную соль или малонатную соль.

12. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-8, которое представляет собой гидрат, такие как моногидрат.

13. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления для применения у людей или животных.

14. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления для применения у людей.

15. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления для применения в медицине.

16. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления для применения в качестве активного фармацевтического ингредиента в фармацевтическом продукте.

17. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления для применения при лечении или предупреждении метаболического заболевания, митохондриальной дисфункции, заболевания, связанного с митохондриальной дисфункцией, митохондриального нарушения, митохондриального дефицита энергии, митохондриального расстройства, дефицита митохондриальной энергии, вызванными лекарствами митохондриальных побочных эффектов, рака, диабета, черепно-мозговой травмы, гипоксии при остановке сердца, ишемии, инсульта, инфаркта миокарда, острой стенокардии, острого повреждения печени, коронарной окклюзии, фибрилляции предсердий, мужского бесплодия и симптомов менопаузы у женщин.

18. Выделенное соединение 1 в соответствии с вариантом осуществления 17, где указанное заболевание митохондриальной дисфункции или заболевание, связанное с митохондриальной дисфункцией, выбрано из следующих:

- старение;
- болезнь Альперса (прогрессирующая детская полиодистрофия);
- болезнь Альцгеймера;
- боковой амиотрофический склероз (ALS);
- аутизм;
- синдром Барта (летальная детская кардиомиопатия);
- нарушения бета-окисления, дефицит биоэнергетического обмена;
- карнитин-ацил-карнитиновая недостаточность;
- дефицит карнитина;
- синдромы дефицита креатина (синдромы церебральной креатиновой недостаточности (CCDS), включая дефицит гуанидиноацетат-метилтрансферазы (дефицит GAMT), дефицит L-аргинин:глицинамидино-трансферазы (дефицит AGAT) и дефицит креатинового транспортера, связанный с SLC6A8 (дефицит SLC6A8));
- дефицит коэнзима Q10;
- дефицит комплекса I (NADH-дегидрогеназа (дефицит NADH-CoQ редуктазы);
- комплексный дефицит II (дефицит сукцинатдегидрогеназы);
- дефицит комплекса III (дефицит убихинон-цитохром с оксидоредуктазы);
- дефицит комплекса IV/дефицит COX (дефицит цитохром с оксидазы вызван дефектом комплекса IV дыхательной цепи);
- дефицит комплекса V (дефицит АТФ-синтазы);
- дефицит COX, CPEO (синдром хронической прогрессирующей внешней офтальмоплегии), дефицит CPT I;
- дефицит CPT II;
- диабет II типа;
- атаксия Фридрейха (FRDA или FA);
- глутаровая ацидурия II типа;
- KSS (синдром Кернса-Сейра);
- молочнокислый ацидоз;
- LCAD (дефицит длинноцепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы);
- LC-FAOD (болезнь окисления длинноцепочечных жирных кислот);
- LCHAD, болезнь или синдром Ли (подострая некротическая энцефаломиелопатия);
- LHON (наследственная оптическая нейропатия Лебера);
- болезнь Люффа;
- MCAD (дефицит ацил-КоА-дегидрогеназы со средней длиной цепи);
- MELAS (митохондриальная энцефаломиеопатия, молочнокислый ацидоз и инсультоподобные эпизоды);
- MERRF (миоклоническая эпилепсия и болезнь рваных красных волокон);

дефицит метилмалонил-КоА-эпимеразы;  
 дефицит мутазы метилмалонил-КоА;  
 синдром деплеции митохондриальной ДНК 5;  
 синдром деплеции митохондриальной ДНК 9;  
 синдром деплеции митохондриальной ДНК 15 (гепатоцеребральный тип) (семейство 1);  
 наследственный по материнской линии диабет и глухота;  
 MIRAS (синдром митохондриальной рецессивной атаксии);  
 митохондриальная цитопатия;  
 истощение митохондриальной ДНК;  
 митохондриальная энцефалопатия, включая энцефаломиопатию и энцефаломиелопатию, митохондриальную миопатию;  
 MNGIE (мионеврогастроинтестинальное расстройство и энцефалопатия);  
 NARP (невропатия, атаксия и пигментный ретинит);  
 нейродегенеративные расстройства, связанные с болезнью Паркинсона, Альцгеймера или Хантингтона;  
 синдром Пирсона;  
 болезнь Паркинсона;  
 прогрессирующая наружная офтальмоплегия;  
 пропионовая ацидемия;  
 дефицит пируватдегидрогеназы;  
 мутации POLG;  
 недостаточность дыхательной цепи;  
 SCAD (дефицит короткоцепочечной Ацил-КоА-дегидрогеназы);  
 SCHAD;  
 VLCAD (дефицит очень длинноцепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы).

19. Выделенное соединение 1 в соответствии с вариантом осуществления 18, где указанное заболевание митохондриальной дисфункции или заболевание, связанное с дисфункцией митохондрий, приписывается дисфункции комплекса I и выбрано из синдрома Ли, наследственной оптической невропатии Лебера (LHON), MELAS (митохондриальная энцефаломиопатия, молочнокислый ацидоз и инсультподобные эпизоды) и MERRF (миоклоническая эпилепсия с рваными мышечными волокнами).

20. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-17 для применения при лечении или предупреждении метаболической дисфункции.

21. Выделенное соединение 1 в соответствии с вариантом осуществления 20, где указанная метаболическая дисфункция представляет собой диабет, такой как нарушение секреции инсулина (диабет 2 типа).

22. Выделенное соединение 1 в соответствии с вариантом осуществления 20, где указанная метаболическая дисфункция представляет собой побочные эффекты лекарственного средства на митохондрии.

23. Выделенное соединение 1 в соответствии с вариантом осуществления 22, где указанные побочные эффекты, индуцированные лекарственным средством на митохондрии, выбраны из ингибирования комплекса I, индуцированного метформином (молочнокислый ацидоз), индуцированного парацетамолом/ацетаминофеном (печеночная недостаточность) или вызванного лекарственным средством митохондриального истощения.

24. Выделенное соединение 1 в соответствии с вариантом осуществления 20, где указанная метаболическая дисфункция представляет собой химически индуцированные побочные эффекты на митохондрии.

25. Выделенное соединение 1 в соответствии с вариантом осуществления 24, где указанные химически индуцированные побочные эффекты на митохондрии выбраны из ингибирования ротеноном комплекса I (симптомы, подобные болезни Паркинсона), ингибирования вызванных пестицидами респираторных комплексов и митохондриальных ферментов, ингибирования вызванных химическими агентами респираторных комплексов и митохондриальных ферментов и отравления газами респираторных комплексов и митохондриальных ферментов, например, отравление угарным газом.

26. Выделенное соединение 1 в соответствии с вариантом осуществления 20, где указанная метаболическая дисфункция представляет собой генетическую митохондриальную дисфункцию.

27. Выделенное соединение 1 в соответствии с вариантом осуществления 26, где указанная генетическая дисфункция митохондрий выбрана из дисфункциональной выработки энергии из-за уменьшения количества митохондрий, дисфункциональных факторов транскрипции митохондрий, дисфункциональных факторов транскрипции для митохондриальных белков митохондриальной мембраны, которые способствуют стабилизации комплексов крупной митохондриальной ДНК (мтДНК)-белок, называемых нуклеоидами, дисфункциональной выработки энергии, дефицита пируватдегидрогеназы, дефицита комплекса I, II, III или IV или дефицита фермента, например, дефицита пируватдегидрогеназы, дисфункции ферментов, участвующих в синтезе сукцината, например, пропионил-КоА-карбоксилазы, метилмалонил-КоА-мутаза и сукцинил-КоА-синтетаза.

28. Выделенное соединение 1 в соответствии с вариантом осуществления 27, где указанное эффек-

тивное количество находится в диапазоне от 1 мг до 5,0 г в день, от 10 мг до 2,0 г в день, от 25 мг до 1 г в день, от 50 до 500 мг в день, от 100 до 1000 мг в день, от 250 до 1000 мг в день, или от 50 до 500 мг в день соединения 1 или его соли, гидрата, сольвата или комплекса.

29. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из вариантов осуществления 15-28, где указанное соединение 1 или его соль, гидрат, сольват или комплекс вводят указанному субъекту от одного раза в день до 10 раз в день или от одного раза в день до 4 раз в день.

30. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из вариантов осуществления 15-29, где указанное лечение или предупреждение является предварительным лечением, например, применение перед операцией, применение перед плановым медицинским вмешательством с высокой метаболической потребностью, а также перед тем как субъект попадет в зону боевых действий или в другую опасную среду.

31. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из вариантов осуществления 15-30, где указанное лечение или предупреждение представляет собой хроническое лечение.

32. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-14, для нефармацевтического применения у людей или животных.

33. Выделенное соединение 1 в соответствии с вариантом осуществления 19, для применения в качестве косметического средства или нутрикосметического средства.

34. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из вариантов осуществления 28, 29, для применения в качестве энергетического напитка или крема.

35. Композиция, содержащая выделенное соединение 1 в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления.

36. Косметическое средство, содержащее выделенное соединение 1 в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-14.

37. Нутрикосметические средства, содержащие выделенное соединение 1 в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-14.

38. Энергетический напиток, содержащий выделенное соединение 1 в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-14.

39. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное соединение 1 в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-33.

40. Способ получения выделенного соединения 1 в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-33, где указанный способ включает следующие стадии:

а) взаимодействие N-ацетилцистеина и монометилсукцината в присутствии связующего реагента в органическом растворителе при температуре в диапазоне между 0 и 100°C;

б) выделение соединения 1,

с получением таким образом выделенного соединения 1.

41. Способ в соответствии с вариантом осуществления 40, где стадию а) проводят, когда независимо растворителем является дихлорметан, связующий реагент представляет собой карбонилдиимидазол, и температура составляет 15-30°C.

42. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 40-41, где стадия б) включает экстракцию водным кислым раствором (необязательно, 20%-ный хлорид аммония) и затем экстракцию органического слоя другой водной средой (подходящим насыщенным солевым раствором или водой).

43. Способ в соответствии с вариантом осуществления 42, где органический слой удаляют в вакууме, а остаток растворяют в органическом растворителе с подходящими свойствами растворения для кристаллизации, таком как метил-трет-бутиловый эфир (МТБЭ).

44. Способ в соответствии с вариантом осуществления 42, где раствор охлаждают, подходящим образом приблизительно до 5°C, и добавляют антирастворитель, такой как n-гептан, и после перемешивания в течение периода времени, предпочтительно приблизительно 24 ч, соединение 1 собирают фильтруют и промывают антирастворителем.

45. Выделенное соединение 1 в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-3, где положение ( $^{\circ}2\theta$ ) равно 11,2 ( $\pm 0,2$ ) и 16,9 ( $\pm 0,2$ ).

46. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 39, которая представляет собой твердый состав.

47. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 46, которая представляет собой твердый состав для восстановления перед применением.

48. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 46, которая представляет собой водный состав.

49. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 48, которая представляет собой водный состав с фосфатно-солевым буфером (PBS).

50. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 46-49, которая имеет концентрацию соединения 1 по меньшей мере 10% мас./мас., по меньшей мере 30% мас./мас., по меньшей мере 50% мас./мас., по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70% мас./мас.

51. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 46-50, которая предназначена для перорального введения, для подкожного введения, для внутривенного введения,

для парентерального введения, для введения в глаза или для местного введения.

52. Фармацевтическая композиция в соответствии с вариантом осуществления 51, которая представляет собой напиток или гель.

53. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 46-52, которая содержит от 1 мг до 5,0 г, от 10 мг до 2,0 г, от 25 мг до 1 г, от 50 до 500 мг, от 100 до 1000 мг, от 250 до 1000 мг или от 50 до 500 мг соединения 1 или его соли, гидрата, сольвата или комплекса.

54. Фармацевтическая композиция в соответствии с любым из вариантов осуществления 46-53, которая представляет собой состав с немедленным высвобождением.

### Примеры

Общие методы, вещества и анализы.

Метод ВЭЖХ для анализа чистоты.

Метод ВЭЖХ 1.

Растворителем А является вода+0,1% NH<sub>4</sub>OH.

Растворителем В является 2,5 л ацетонитрила+130 мл H<sub>2</sub>O+0,1% NH<sub>4</sub>OH.

Градиент: T=0 мин, V%=5, скорость потока=1 мл/мин; T=0,1 мин, V%=5, скорость потока=1 мл/мин; T=9,5 мин, V%=95, скорость потока=1 мл/мин; T=10,2 мин, V%=95, скорость потока=1 мл/мин; T=10,3 мин, V%=95, скорость потока=1,5 мл/мин; T=11,1 мин, V%=95, скорость потока=1,5 мл/мин; T=11,15 мин, V%=5, скорость потока=1,5 мл/мин; T=11,5 мин, V%=5, скорость потока=1,5 мл/мин;

Колонка представляет собой Waters XSelect CSH C18 3,5 мкм, 2,1×50 мм.

Наблюдение за абсорбцией осуществляют на диодно-матричном детекторе при 234 нм.

Концентрация пробы 1 мг/мл, объем впрыска 1 мкл.

Метод ВЭЖХ 21.

Растворителем А является вода+1,57 г NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>+5 мл муравьиной кислоты.

Растворителем В является 2,5 л ацетонитрила+130 мл H<sub>2</sub>O+4,5 мл муравьиной кислоты.

Градиент: T=0 мин, V%=0, скорость потока=1 мл/мин; T=1 мин, V%=0, скорость потока=1 мл/мин; T=9,5 мин, V%=20, скорость потока=1 мл/мин; T=10,3 мин, V%=95, скорость потока=1 мл/мин; T=10,5 мин, V%=95, скорость потока=1,5 мл/мин; T=11,0 мин, V%=95, скорость потока=1,5 мл/мин; T=11,05 мин, V%=0, скорость потока=1,5 мл/мин; T=11,5 мин, V%=0, скорость потока=1,5 мл/мин.

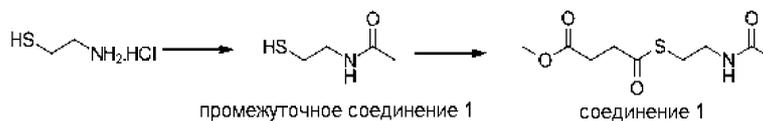
Колонка представляет собой Waters XSelect CSH C18 3,5 мкм, 2,1×50 мм.

Наблюдение за абсорбцией осуществляют на диодно-матричном детекторе при 230 нм.

Концентрация пробы 1 мг/мл, объем впрыска 1 мкл.

Пример 1. Синтез метил 3-[(2-ацетиламиноэтилтио)карбонил]пропионата (соединение 1).

Подробное описание синтеза и выделения соединения 1.



Соединение 1 было получено тремя отдельными способами (А, В и С, ниже).

Способ А.

К раствору гидрохлорида 2-аминоэтантиола (226 г, 2 моль), КОН (114 г, 2 моль) и NaHCO<sub>3</sub> (168 г, 2 моль) в воде (4 л) добавляли по каплям уксусный ангидрид (204 г, 2 моль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Реакционную смесь экстрагировали EtOAc (8×2 л), сушили над MgSO<sub>4</sub> и растворитель удаляли при пониженном давлении с получением промежуточного соединения 1 (190 г, 80%-ный выход) в виде масла светло-желтого цвета.

К раствору 4-метокси-4-оксомаляной кислоты (209 г, 1,583 моль) и НОВТ (214 г, 1,583 моль) в дихлорметане (4 л) добавляли гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида (304 г, 1,583 моль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Добавляли по каплям промежуточное соединение 1 (189 г, 1,583 моль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Добавляли по каплям триэтиламин (160 г, 1,583 моль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Полученную смесь промывали водой (2 л) и насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (2×2 л), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали при пониженном давлении с получением сырого соединения 1 (350 г) в виде масла желтого цвета. Сырое соединение 1 очищали хроматографией на колонке с силикагелем (2000 г силикагеля, элюирование смесью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH=от 100/1 до 80/1) с получением соединения 1 (201 г, 94,9% по данным ЖХМС) в виде твердого вещества белого цвета. Сырые побочные фракции после очистки (110 г) очищали хроматографией на колонке с силикагелем (1200 г силикагеля, элюирование смесью CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH=от 100/1 до 80/1) с получением соединения 1 (40 г, 96,7% по данным ЖХМС) в виде твердого вещества белого цвета.

Способ В.

К раствору гидрохлорида 2-аминоэтантиола (11,3 г, 0,1 моль), КОН (5,6 г, 0,1 моль) и NaHCO<sub>3</sub> (5,88 г, 0,07 моль) в воде (200 мл) при комнатной температуре добавляли по каплям уксусный ангидрид (7,14 г, 0,07 моль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 45 мин. Реакционную

смесь экстрагировали EtOAc (8×200 мл), сушили над MgSO<sub>4</sub> (1 ч) и затем растворитель удаляли в вакууме при температуре 50°C с получением сырого промежуточного соединения 1 (7 г, 84%-ный выход) в виде жидкости слегка желтого цвета.

К раствору 4-метокси-4-оксомасляной кислоты (9,24 г, 0,07 моль) в дихлорметане (200 мл) добавляли по частям 1,1'-карбонилдиимидазол (11,34 г, 0,07 моль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Добавляли по каплям промежуточное соединение 1 (7 г, 0,059 моль) и затем смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Полученную смесь промывали HCl (1 н., 3×150 мл) и насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (3×150 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 ч) и затем растворитель удаляли в вакууме при температуре 50°C с получением 9,5 г соединения 1 в виде твердого вещества желтого цвета.

#### Способ С.

К раствору K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,71 кг, 13,2 моль) и Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,00 кг, 9,43 моль) в воде (15 л) добавляли гидрохлорид 2-аминоэтантиола (1,5 кг, 13,2 моль). К полученному прозрачному раствору темно-фиолетового цвета при температуре +22°C добавляли по каплям уксусный ангидрид (0,96 кг, 9,43 моль), поддерживая внутреннюю температуру ниже +30°C в процессе добавления (время добавления составляло 24 мин). Реакционную смесь перемешивали при температуре +20°C в течение 1 ч 35 мин. Добавляли дихлорметан (23 л) и смесь перемешивали при температуре +28±2°C в течение 20 мин. Слои разделяли. Водную фазу экстрагировали дихлорметаном (2×15 л), доводя внутреннюю температуру до +28±2°C в процессе экстракции. Органические фазы объединяли и растворитель удаляли в вакууме. Затем промежуточное соединение 1 сушили в вакууме при температуре +40°C в течение 18 ч. Выход 996 г и чистота >97 по площади-% (GC). Сырое промежуточное соединение 1 получали в виде масла коричневого цвета.

Перегонка. 933 г Промежуточного соединения 1 перегоняли с использованием установки для тонкослойной перегонки при следующих условиях: T=+110°C, P=1 мбар, скорость 202 г/ч. Промежуточное соединение 1 получали в виде прозрачного бесцветного масла.

К раствору 4-метокси-4-оксомасляной кислоты (1,33 кг, 10,07 моль) в DCM (10 л) по частям добавляли 1,1'-карбонилдиимидазол (CDI) (1,63 кг, 10,07 моль). В процессе добавления наблюдали интенсивное пенообразование и выделение газа. После завершения добавления смесь перемешивали при температуре от +20 до +25°C в течение 1 ч. Добавляли раствор в дихлорметане (5 л) промежуточного соединения 1 (1,00 кг, 8,39 моль), поддерживая внутреннюю температуру ниже +30°C. Реакционную смесь перемешивали при температуре от +20 до +25°C в течение 2 ч. Добавляли 20%-ный водный раствор NH<sub>4</sub>Cl (10 л) и смесь перемешивали в течение 20 мин. Слои разделяли. Органическую фазу экстрагировали 13%-ным водным раствором NaCl и водой, последовательно (10 и 5 л отдельно). После этого растворитель (DCM) заменяли на MTBE при перегонке. Раствор соединения 1 в MTBE (приблизительно 6 л) постепенно охлаждали до +5°C. Кристаллизация начиналась, когда внутренняя температура достигала +12°C. К взвеси добавляли n-гептан (15 л) и смесь перемешивали при температуре от 0 до +5°C в течение 20 ч (в течение ночи). Взвесь фильтровали и осадок на фильтре промывали n-гептаном (2×3л). Продукт сушили, пропуская через него воздух в течение 42 ч. Выход составлял 1,26 кг (64%), чистота 98,5% по площади (ВЭЖХ).

Описанным выше синтезом получали несколько партий соединения 1. Партии очищали различными методами очистки, как описано в способах А, В и С.

Партия 3 (или соединение 1-s3) получали способом А.

Партия 12 (или соединение 1-s12), 13 (или соединение 1-s13) и 14 (или соединение 1-s14) получали способом В.

Партия 15 (или соединение 1-s15), 16 и 17 получали способом С.

Пример 2. Характеристика соединения 1 разных партий.

Номер партии	Способ получения	Данные XRPD	Кристалличность по данным XRPD
2	Способ А		
3	Способ А	Фигура 19	74,4%
4	Способ А		
5	Способ В		
6	Способ В		

11	Способ А затем очищали по способу В		
12	Способ В	Фигура 11	
13	Способ В	Фигура 21	70,2%
14	Способ В	Фигура 22	56,2%
15	Способ С	Фигура 12	
16	Способ С	Фигура 24	65,2%
17	Способ С затем очищали преп-ВЭЖХ и лиофилизировали	Фигура 25	63,7%
18 (хранимая партия 12)	Партия 12, хранимая в виде твердого продукта при температуре -20°C в течение 20 месяцев	Фигура 20	70,4%
19 (хранимая партия 15)	Партия 15, хранимая в виде твердого продукта при температуре -20°C в течение 14 месяцев	Фигура 23	69,7%

Следует отметить, что в процессе порошкового рентгеноструктурного анализа температура увеличивается. Поскольку соединение 1 имеет низкую температуру плавления (и предполагается, что аморфная форма имеет более низкую температуру плавления, чем кристаллическая форма), степень кристалличности, указанная в таблице выше, может рассматриваться как минимальные значения.

Партия 3.

При анализе TGA потеря партии 3 составляла 0,04% по массе при температурах 20-150°C. На фиг. 1-3 показаны спектры анализа ЖХМС партии 3. Температура плавления партии 3 составляла 50,4°C, как определено с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC).

Партия 12.

Партию 12 анализировали теми же способами, которые использовались для анализа вышеописанной партии 3.

Потери при анализе TGA составляли 0,12% по массе при температурах 20-150°C. Результаты ЖХМС показаны на фиг. 4-6, чистота по данным qЯМР составляла 96,1%, и температура плавления была 48,6°C.

Партия 13.

Партию 13 анализировали теми же способами, которые использовались для анализа вышеуказанных партий.

Потери при анализе TGA составляли 0,18% по массе при температурах 20-150°C. Спектры ЖХМС не показаны, но результаты суммированы в табл. 1. Чистота по данным qЯМР составляла 96,3% и температура плавления была 49,0°C.

Партия 14.

Партию 14 анализировали теми же способами, которые использовались для анализа вышеуказанных партий.

Потери при анализе TGA составляли 0,45% по массе при температурах 20-150°C. Спектры ЖХМС не показаны, но результаты суммированы в табл. 1. Чистота по данным qЯМР составляла 91,6% и температура плавления была 46,9°C.

Партия 15.

Партию 15 анализировали некоторыми из тех же способов, которые использовались для анализа вышеуказанных партий.

Спектры ЖХМС не показаны, но результаты суммированы в табл. 1. Чистота по данным qЯМР составляла 98,9% и температура плавления была 39°C.

Сравнение свойств партий: партии 3, 12, 13, 14, 15 и 16.

В табл. 1 также суммированы чистота, температура плавления и визуальное описание твердого соединения 1. Партии твердого соединения 1 выглядели как белый сыпучий порошок; см. табл. 1.

Кроме того, в табл. 1 показано, что растворимость всех приготовленных партий соединения 1 составляла по меньшей мере 366-398 мг/мл, и внешний вид такой композиции в воде визуально выглядел как чистый и прозрачный или полупрозрачный раствор.

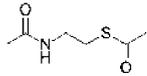
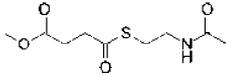
Таблица 1

## Сводка результатов анализов различных партий соединения 1

	Партия 3	Партия 12	Партия 13	Партия 14	Партия 15	Партия 16
Способ финальной очистки	Очищали хроматографией на колонке с силикагелем	Промывали, сушили и удаляли растворитель	Промывали, сушили и удаляли растворитель	Промывали, сушили и удаляли растворитель	Промывали, осаждали и сушили	Промывали, осаждали и сушили
Чистота по данным ВЭЖХ с высоким рН (%)	99,1	97,7	96,7	99,3	98,5	98,1
Анализ чистоты по данным qЯМР (%)	98,1	96,1	96,3	91,7	98,9	95,6
Температура плавления (°С)	50,4	48,6	49,0	46,9	39	
Визуальное описание форм	Белый сыпучий порошок; темного «комковатое» вещество	Большие белые восковидные комочки; немного белого, сыпучего порошка	Большие белые восковидные комочки; немного белого, сыпучего порошка	Большие белые восковидные комочки; немного белого, сыпучего порошка	Белый сыпучий порошок	Белый сыпучий порошок
400 мг соединения в 0,7 мл воды, измеренная концентрация (мг/мл)	381	378	395	366	414	435
Визуальное описание состава в воде	Бесцветный прозрачный раствор	Мутный полупрозрачный раствор	Бесцветный прозрачный раствор	Бесцветный прозрачный раствор	Бесцветный прозрачный раствор	Бесцветный прозрачный раствор

Таблица 2

## Сводка анализа чистоты и содержания примесей в партиях соединения 1 (профилирование примесей ЖХМС2 с высоким рН)

RT (мин)	0,69	1,57	1,86	2,18	2,22	6,24
RRT (мин)	0,439	1,000	1,185	1,389	1,414	3,975
Кажущаяся молекулярная масса	161,0	233,0	319,9	247,0	305,0	278,0
Структура (предполагаемая по данным m/z)			ТВС	ТВС	ТВС	ТВС
% при 234 нм, партия 3	0,52	99,14		0,35		
% при 234 нм, партия 12		97,65	1,41	0,24	0,38	0,32
% при 234 нм, партия 13	0,47	96,71	2,44	0,39		
% при 234 нм, партия 14	0,34	99,34	0,32			

Пример 3. Получение водных составов соединения 1.

Протокол приготовления состава.

1. Взвешивают необходимое количество соединения 1, затем добавляют необходимое количество эксципиента (0,9% мас./об. физиологический раствор, 100 мМ PBS рН 7,4, вода) к твердому соединению 1 с получением требуемой концентрации в мг/мл соединения 1. Например, для получения состава с концентрацией 400 мг/мл соединения 1 в воде отвешивают 400 мг соединения 1 и добавляют 0,7 мл воды.

2. Раствор подвергают воздействию ультразвуком в течение 10 мин и затем встряхивают в течение 20 мин, чтобы убедиться, что соединение 1 полностью растворилось.

3. Раствор можно центрифугировать (13000 об/мин, 10 мин) для удаления каких-либо твердых частиц, если это необходимо.

4. При необходимости раствор можно стерилизовать фильтрованием.

Таблица 3

Данные для составов в воде различных партий соединения 1, приготовленных в соответствии с протоколом, приведенным выше

Образец	Целевая концентрация (мг/мл)	Объем впрыска (мкл)	Коэффициент разбавления	Вычисленная конц. (мг/мл)	Чистота (%)
Партия 3 в водопроводной воде	400	2	1000	381	98,8
Партия 12 в водопроводной воде	400	2	1000	378	99,2
Партия 13 в водопроводной воде	400	2	1000	395	99,1
Партия 14 в водопроводной воде	400	2	1000	366	99,4

Приготовление состава с концентрацией 50% мас./об.

Четыре партии соединения 1 были приготовлены в PBS при 50% мас./об.

~500 мг Соединения отвешивали во флакон, добавляли ~500 мкл 100 мМ PBS pH 7,4 и флакон подвергали воздействию ультразвуком в течение 10 мин, затем встряхивали в течение 20 мин. Затем отбирали образец, разбавляли 1/2000 и рассчитывали концентрацию с помощью анализа ВЭЖХ.

Таблица 4

Приготовление составов соединения 1 в PBS при pH 7,4

Образец	Количество добавленного соединения 1 (мг)	Количество добавленного 100 мМ PBS pH 7,4 (мкл)	Вычисленная концентрация по данным ВЭЖХ (мг/мл)
Партия 3	525	525	535
Партия 4	514	514	526
Партия 5	494	494	531
Партия 6	481	481	543

Концентрацию соединения 1 определяли в растворимом составе с помощью ВЭЖХ.

Приготовление жидкого состава соединения 1.

Соединение 1 из партии 3 нагревали в печи при температуре 60°C в течение 20 мин, после чего оно становилась полупрозрачной бледно-желтой жидкостью. Добавляли 100 мМ PBS pH 7,4 (20% об./об.) и раствор перемешивали в течение 20 мин на шейкере. По истечении этого времени раствор охлаждали до комнатной температуры, и он оставался полупрозрачной жидкостью. Раствор выдерживали при температуре 4°C в течение 72 ч. Наблюдение по прошествии этого времени подтверждало, что он оставался полупрозрачной жидкостью.

Краткие выводы по составу.

Количество соединения 1, которое может быть приготовлено в водных растворах, таких как 0,9 мас./об.% физиологического раствора, 100 мМ PBS, pH 7,4 или вода, по-видимому, не имеет достижимого предела. Это, возможно, можно объяснить температурой плавления соединения 1, которая по измерениям составляла прибл. 47-50°C в некоторых партиях. Когда водный раствор добавляется к твердому веществу, он нарушает внутримолекулярные взаимодействия молекул соединения 1, он становится смешиваемым с водой.

Пример 4. Приготовление гелевого состава.

Приготовление состава соединения 1 в виде гелевых пакетов с концентрацией 2,25 мг/мл.

Детали эксперимента.

Во-первых, использовали синий пищевой краситель, чтобы увидеть, насколько легко водный раствор может смешиваться с гелем. Брали два образца геля, один выдерживали при комнатной температуре, другой плавили в микроволновой печи (1 мин). Добавляли синий пищевой краситель (1% об./об.) и растворы смешивали. Когда гель растапливался, смешивание становилось намного эффективнее. Краситель может быть полностью включен после перемешивания в течение <10 с.

Затем раствор красителя заменяли на раствор соединения 1.

К соединению 1 добавляли воду (225 мг/мл, 100-кратная требуемая концентрация) и обрабатывали ультразвуком в течение 20 мин, затем встряхивали в течение 30 мин. Образец брали для анализа ВЭЖХ, чтобы проверить концентрацию.

Таблица 5

## Измеренная концентрация соединения 1 в водном исходном растворе

Образец	Предполагаемая конц. (мг/мл)	Объем впрыска (мкл)	Коэффициент разбавления	Вычисл. мг/мл	Чистота (%)
Водный исходный раствор для добавления в гель	225	1	100	222,749	98,8

Анализ показывал, что соединение 1 полностью растворялось.

Еще 2 части геля расплавляли и добавляли водный раствор соединения 1 (1% об./об.). Гели встряхивали в течение того же времени, что и при добавлении красителя (10 с). Гели оставили для застывания.

После застывания гелей отбирали образцы для анализа ВЭЖХ, чтобы проверить, равномерно ли распределено соединение 1.

Процедура отбора проб.

1. Образец геля (100 мг) добавляли в пробирки Эппендорфа и добавляли MeOH (0,9 мл, разведение 1/10).

2. Образец встряхивали на вибраторе в течение 30 мин.

3. Образец центрифугировали (13000 об/мин, 10 мин).

4. Супернатант отбирали для анализа ВЭЖХ.

Таблица 6

## Измеренная концентрация соединения 1 в гелевых образцах

Образец	Предполагаемая конц. (мг/мл)	Объем впрыска (мкл)	Коэффициент разбавления	Вычисл. мг/мл	Чистота (%)
4°C	2,25	5	10	2,07	99,4
37°C	2,25	5	10	2,03	99,5

Концентрация соединения 1 была немного ниже ожидаемой, 2,25 мг/мл, но два образца хорошо согласуются, что предполагает, что соединение 1 было равномерно распределено и что фактор разбавления немного выше.

Один из гелевых образцов выдерживали при комнатной температуре, а другой при температуре 4°C, чтобы проверить стабильность соединения 1 в геле.

Стабильность гелевого состава.

Образцы геля отбирали, как указано выше, через регулярные промежутки времени для проверки стабильности как при температуре 4°C, так и при комнатной. Данные этих экспериментов представлены в табл. 7, 8.

Таблица 7

## Концентрации соединения 1 в образцах гелей, взятых в течение 20 дней хранения при температуре 4°C

Время (дни)	Предполагаемая конц. (мг/мл)	Объем впрыска (мкл)	Коэффициент разбавления	Вычисл. мг/мл	AUC (% при T=0)	Чистота при 230 нм (%)
0	2,25	5	10	2,071	100,0	99,4
1	2,25	5	10	2,024	97,8	99,4
5	2,25	5	10	1,937	93,5	99,4
7	2,25	5	10	1,979	95,6	99,4
11	2,25	5	10	2,007	96,9	99,4
14	2,25	5	10	2,167	104,7	99,4
20	2,25	5	10	2,218	107,1	99,5

Концентрации соединения 1 в образцах геля, взятых  
в течение 20 дней хранения при комнатной температуре (прибл. 20°C)

Время (дни)	Предполагаемая конц. (мг/мл)	Объем впрыска (мкл)	Коэффициент разбавления	Вычисл. мг/мл	AUC (% при T=0)	Чистота при 230 нм (%)
0	2,25	5	10	2,034	100,0	99,5
1	2,25	5	10	1,746	85,8	99,5
5	2,25	5	10	2,053	100,9	99,4
7	2,25	5	10	1,721	84,6	99,2
11	2,25	5	10	1,889	92,9	99,1
14	2,25	5	10	2,739	134,6	99,4
20	2,25	5	10	2,273	111,7	99,4

Общая тенденция данных, особенно данных по чистоте при 230 нм, позволяет предположить, что соединение 1 стабильно в гелевой композиции в течение по меньшей мере 20 дней. Данные AUC содержат больше ошибок из-за неточностей при взвешивании образцов геля для экстракции и, возможно, различий в локальной концентрации соединения 1 в геле.

Протокол получения гелевого состава.

Готовили 100-кратный концентрированный раствор соединения 1 в воде, чтобы его можно было добавить в гель в количестве 1/100 от объема геля. Приведенный пример относится к конечной концентрации 2,25 мг/мл в гелевой упаковке объемом 200 мл, поэтому требуется 2 мл 100× соединения 1 в воде (225 мг/мл). Также предлагается добавить пищевой краситель к исходному раствору и ввести объединенный раствор в гелевый пакет (при условии, что это не окажет отрицательного воздействия на исследование). Это дает визуальную проверку того, что раствор соединения 1 равномерно распределен в геле. Если включен пищевой краситель, рекомендуется также добавлять в гель контрольной группы пищевой краситель.

1. Отвешивали 500 мг соединения 1 во флакон на 3 мл (или аналогичный).
2. Добавляли 2 мл воды (добавление 2 мл воды к 500 мг соединения 1 составляет объем твердого соединения 1 и, как было подтверждено калибровочной кривой ВЭЖХ, составляет 225 мг/мл), обрабатывали ультразвуком в течение 20 мин, затем встряхивали в течение 30 минут (раствор может оставаться слегка мутным). Добавляли 1 мл натурального пищевого красителя (пищевой краситель покажет, что распределение было равномерным).
3. При необходимости раствор можно стерильно отфильтровать.
4. Нагревали неоткрытую гелевую упаковку, погрузив ее в воду с температурой 70°C на 10 мин, и гель становился подвижной жидкостью.
5. Набирали раствор соединения 1 в иглу/шприц (с пищевым красителем или без него).
6. Вводили раствор соединения 1 (и пищевой краситель) в гелевый пакет, проткнув иглой небольшое отверстие в гелевом пакете.
7. Повторно заклеивали гелевый пакет в месте инъекции лентой.
8. Энергично встряхивали гелевый пакет в течение 5 мин для равномерного распределения соединения 1 (если включен пищевой краситель, это станет очевидным, когда введенный раствор равномерно распределится по изменению цвета геля).
9. Давали гелю застыть, это занимало около 45 мин при комнатной температуре.
10. Использовали гель или хранили его в закрытом виде при температуре 4°C (после вскрытия рекомендуется хранить гель при температуре 4°C не более 14 дней).
11. Соединение 1 является стабильным в геле в течение по меньшей мере 14 дней при температуре 4°C и комнатной температуре.

Протокол испытаний.

Состав геля был приготовлен в соответствии с протоколом, и анализ ВЭЖХ показал, что в водном растворе и в составе геля была достигнута скорректированная концентрация соединения 1.

Таблица 9

Концентрации соединения 1 в водном исходном растворе и гелевом составе

Образец	Предполагаемая конц. (мг/мл)	Объем впрыска (мкл)	Коэффициент разбавления	Вычисл. мг/мл	Чистота при 230 нм (%)
Водный исходный раствор для добавления в гель	225	2	200	229,496	99,0
Состав геля	2,25	5	10	2,355	99,7

2 мл Исходного водного раствора добавляли к 1 мл пищевого красителя. Его разбавляли и анализировали с помощью ВЭЖХ. АУС для водного раствора, разбавленного пищевым красителем, была в 0,63 раза выше, чем для водного раствора до разбавления, что указывает на то, что соединение 1 остается растворимым при разбавлении пищевым красителем.

Итог/заключение.

Соединение 1 может быть приготовлено в составе в виде пакетов с водным гелем в концентрации 2,25 мг/мл и является стабильным при температуре как 4°C, так и при комнатной в течение по меньшей мере 20 дней.

Пример 5. Приготовление физиологического раствора соединения 1.

1. Отвешивали 400 мг соединения 1 и добавляли 0,7 мл физиологического раствора (0,9% мас./об.).
2. Обработывали ультразвуком в течение 20 мин, затем встряхивали в течение 30 мин или до тех пор, пока все соединение визуально не растворится.

Устойчивость соединения 1 к замораживанию/оттаиванию.

Способ.

1. Физиологический раствор (0,9 мас./об.%) добавляли к соединению 1 (1 мг/мл), затем обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин до полного растворения.

2. Образец брали для анализа ВЭЖХ (F/T 0).

3. Раствор замораживали при температуре -80°C в течение ночи.

4. Раствор размораживали, и брали образец для анализа ВЭЖХ (F/T 1).

5. Стадии 3&4 повторяли в 3 циклами.

Таблица 10

Чистота соединения 1 после циклов замораживания/оттаивания (FT)

Образец	FT цикл	Предполагаемая конц. (мг/мл)	Объем впрыска (мкл)	Коэфф. разбавления	Вычисл. мг/мл	Чистота (%)
Соединение 1 в физиологическом растворе		1	2	1	1,157	98,9
		1	2	1	1,148	98,8
		1	2	1	1,153	98,9
		1	2	1	1,146	98,8

Результаты (табл. 10) показывают, что нет значительного изменения в данных анализа или чистоте соединения 1 в физиологическом растворе, поэтому соединение 1 является стабильным в течение по меньшей мере 3 циклов замораживания/оттаивания.

Стабильность соединения 1 при комнатной температуре.

Способ.

1. Физиологический раствор (0,9% мас./об.) добавляли к соединению 1 (1 мг/мл), затем обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин до полного растворения.

2. Брали образец для анализа ВЭЖХ (T=0).

3. Раствор хранили при комнатной температуре.

4. Периодически отбирали образцы для анализа стабильности методом ВЭЖХ.

Результаты.

Результаты показывали, что нет значительных изменений в данных анализа или чистоте соединения 1 в физиологическом растворе (данные не показаны), поэтому соединение 1 стабильно в течение по меньшей мере 14 дней при комнатной температуре.

Приготовление состава соединения 1 при концентрации 200-500 мг/мл.

Способ.

1. Физиологический раствор (0,9% мас./об.) добавляли к соединению 1, партия 11, в различных количествах, затем обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин - образцы оставались слегка мутным.
2. Образцы встряхивали в течение 30 мин, после чего растворы становились полупрозрачными.
3. Растворы разбавляли для анализа ВЭЖХ.

Результаты.

Таблица 11

Чистота соединения 1 при возрастающих концентрациях в физиологическом растворе

Образец	RT (мин)	Объем впрыска (мкл)	Кэффиц. разбавле ния	Вычисл. мг/мл	Чистота (%)
400 мг соединения 1 в 1 мл физиологического раствора	8,21	5	1000	261	98,7
400 мг соединения 1 в 0,7 мл физиологического раствора	8,21	5	1000	403	98,7
400 мг соединения 1 в 0,4 мл физиологического раствора	8,21	5	1000	545	98,6

Результаты показывают (табл. 11), что может быть достигнута концентрация более 500 мг/мл соединения 1 в физиологическом растворе.

Приготовление состава для переноса (состав 400 мг/мл).

3. Отвешивали 400 мг соединения 1, партия 11, и добавляли 0,7 мл физиологического раствора (0,9% мас./об.).

4. Подвергали воздействию ультразвуком в течение 20 мин, затем встряхивали в течение 30 мин или до тех пор, пока все соединение визуально не растворится.

Итог/заключение.

Устойчивость соединения 1 к замораживанию/оттаиванию.

Соединение 1 является стабильным в течение по меньшей мере 3 циклов замораживания/оттаивания.

Стабильность соединения 1 при комнатной температуре.

Соединение 1 является стабильным в течение по меньшей мере 14 дней при выдерживании при комнатной температуре (сбор данных будет продолжен).

Приготовление состава соединения 1 с концентрацией 400 мг/мл.

Может быть достигнута концентрация более 500 мг/мл соединения 1 в физиологическом растворе.

Пример 6. Стабильность соединения 1 в воде и ДМСО.

Соединение 1 отдельно растворяли в воде и ДМСО при концентрации 1 мг/мл и выдерживали при комнатной температуре, 37 и 65°C для исследования стабильности в течение 40-дневного периода.

Таблица 12

Соединение 1 при выдерживании в воде при комнатной температуре в темноте (концентрация 1 мг/мл) с определением чистоты

Время (дни)	AUC при 230 нм	AUC (%) при T=0	Чистота при 230 нм (%)	Чистота по данным ЖХМС (%)
0	9041	100,0	100,0	100,0
1	8847	97,9	100,0	99,2
2	8807	97,4	100,0	98,3
4	8045	89,0	100,0	99,0
7	8588	95,0	100,0	99,2
11	8554	94,6	100,0	98,7
14	8662	95,8	100,0	95,6
17	8873	98,1	100,0	98,1
23	8561	94,7	100,0	98,9
38	8555	94,6	100,0	98,7

Отмечалось небольшое ухудшение чистоты и данных анализа для соединения 1 при выдерживании

в воде при комнатной температуре в течение 38 дней.

Таблица 13

Соединение 1 при выдерживании в воде при температуре 37°C  
в темноте (концентрация 1 мг/мл) с определением чистоты

Время (дни)	AUC при 230 нм	AUC (% при T=0)	Чистота при 230 нм (%)	Чистота по данным ЖХМС (%)
0	9044	100,0	100,0	100,0
1	9798	108,3	100,0	99,6
2	8681	96,0	100,0	97,5
4	8156	90,2	100,0	99,0
7	9106	100,7	100,0	98,9
11	8577	94,8	100,0	98,4
14	7777	86,0	100,0	96,9
17	7928	87,7	100,0	93,2
23	7567	83,7	100,0	98,4
38	7579	83,8	100,0	98,3

Отмечалось ухудшение чистоты и данных анализа для соединения 1 при выдерживании в воде при температуре 37°C в течение 38 дней. Ухудшение данных анализа было более значительным, чем наблюдаемое при выдерживании в воде при комнатной температуре.

Таблица 14

Соединение 1 при выдерживании в воде при температуре 65°C  
в темноте (концентрация 1 мг/мл) с определением чистоты

Время (дни)	AUC при 230 нм	AUC (% при T=0)	Чистота при 230 нм (%)	Чистота по данным ЖХМС (%)
0	8741	100,0	100,0	100,0
1	8614	98,5	100,0	98,3
2	8410	96,2	100,0	97,3
5	7512	85,9	100,0	95,9
8	8750	100,1	100,0	99,1
14	9095	104,0	100,0	99,0
29	4521	50,0	100,0	89,1

Ухудшение чистоты и данных анализа отмечалось для соединения 1 при выдерживании в воде в течение 29 дней. Ухудшение данных анализа было более значительным, чем наблюдаемое при выдерживании в воде при температуре 37°C.

Таблица 15

Соединение 1 при выдерживании в ДМСО при температуре 37°C  
в темноте (концентрация 1 мг/мл) с определением чистоты

Время (дни)	AUC при 230 нм	AUC (% при T=0)	Чистота при 230 нм (%)	Чистота по данным ЖХМС (%)
0	16363	100,0	100,0	98,4
1	17465	106,7	100,0	98,4
4	17041	104,1	100,0	98,2
8	17644	107,8	100,0	98,2
11	17434	106,5	100,0	99,0
14	17557	107,3	100,0	98,2
22	17353	106,1	100,0	98,0
37	17904	109,4	100,0	97,6

Для соединения 1 при выдерживании в ДМСО при температуре 37°C в течение 37 дней не было отмечено значительного ухудшения чистоты или данных анализа.

Таблица 16

Соединение 1 при выдерживании в ДМСО при температуре 65°C в темноте (концентрация 1 мг/мл) с определением чистоты.

Время (дни)	AUC при 230 нм	AUC (% при T=0)	Чистота при 230 нм (%)	Чистота по данным ЖХМС (%)
0	15834	100,0	100,0	98,1
1	16974	107,2	100,0	98,3
2	16185	102,2	100,0	96,8
5	17175	108,5	100,0	99,2
8	14415	91,0	100,0	96,7
14	13846	87,4	100,0	93,9
29	16472	100,7	100,0	97,7

Для соединения 1 при выдерживании в ДМСО при температуре 65°C в течение 29 дней не было отмечено значительного ухудшения чистоты или данных анализа.

Пример 7. Анализ соединения 1.

Вещество по способу С (партия 15) из примера 1 анализировали с помощью порошкового рентгеноструктурного анализа. Данные представлены на фиг. 12 и показывают кристаллический материал.

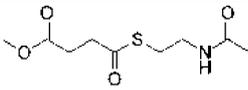
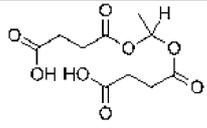
Вещество по способу А (партия 12) также анализировали с помощью порошкового рентгеноструктурного анализа, и оказалось, что оно показал кристаллический материал с таким же полиморфом (фиг. 11).

Пример 8. Сравнение растворимости соединения 1 с другими сукцинатными пролекарствами.

Растворимость соединения 1 в водных составах по сравнению с другими сукцинатными пролекарствами оценивали путем растворения твердого вещества в водных композициях и измерения его количества в растворе с помощью ВЭЖХ(-МС). Было замечено, что соединение 1 растворяется в воде при концентрации более 350 мг/мл, PBS (pH 7,4) при концентрации 190 мг/мл и более 500 мг/мл в 0,9% физиологическом растворе, тогда как другие оцениваемые сукцинатные пролекарства имели гораздо более низкую растворимость. Во многих случаях максимальная растворимость других пролекарств была ниже 100 мкМ. См. табл. 17, в которой приведены примеры данных растворимости в PBS pH 7,4 для других сукцинатных пролекарств.

Таблица 17

Растворимость примеров сукцинатных пролекарств

Исследуемый образец	Растворимость (мкМ)
<p>Соединение 1</p> 	>>100 (см. текст)
<p>A</p> 	52

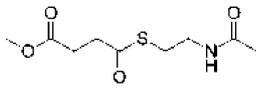
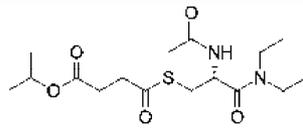
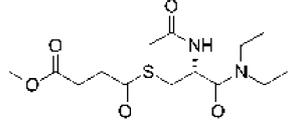
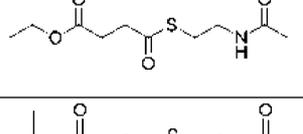
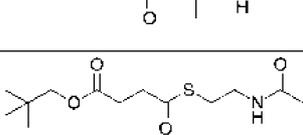
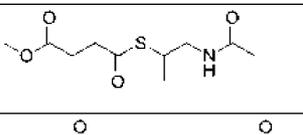
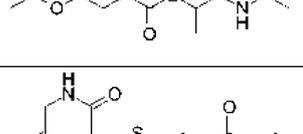
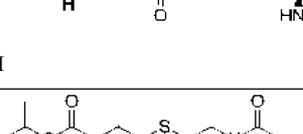
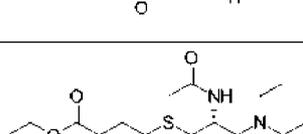
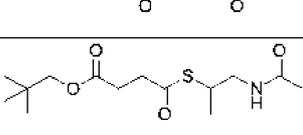
Пример 9. Сравнение биодоступности соединения 1 с другими сукцинатными пролекарствами.

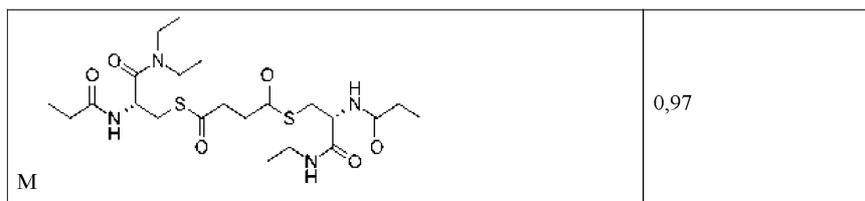
Пенетрантность клеток и возможность пероральной биодоступности соединения 1 исследовали с использованием стандартного анализа биодоступности caco-2 in vitro (вкратце, конфлюэнтных клеток Caco-2 (L1, A.P., 1992; Grass, G.M. et al., 1992, Volpe, D.A. et al., 2001) в 24-луночном формате Corning Costar Transwell, предоставленном In Vitro Technologies Inc. (IVT Inc., Baltimore, Md., USA). Апикальная камера содержала 0,15 мл сбалансированного буферного раствора Хэнка (HBBS) pH 7,4, 1% ДМСО, 0,1 мМ желтого люцифера. Базальная камера содержала 0,6 мл HBBS pH 7,4, 1% ДМСО. Контрольные и исследуемые продукты инкубировали при температуре 37°C в увлажненном инкубаторе, встряхивая при 130 об/мин в течение 1 ч. Желтый люцифер проникает только через параклеточный путь (между плотными контактами), высокая кажущаяся проницаемость (Papp) для желтого люцифера указывает на клеточное повреждение во время анализа, и все такие лунки были отклонены. Пропранолол (хорошая пассивная проницаемость без известных эффектов переносчика) и ацебуталол (плохая пассивная проницаемость, ослабленная активным оттоком Р-гликопротеина) использовались в качестве контрольных соединений. Соединения исследовали в однонаправленном и двунаправленном формате путем нанесения соединения на апикальную или базальную камеру (0,01 мМ). Соединения в апикальной или базальной камерах анализировали с помощью ВЭЖХ-МС. Результаты выражали как кажущуюся проницаемость, Papp, (нм/с) по сравнению с другими сукцинатными пролекарствами, включая несколько из WO 2015/155231. Данные представлены в табл. 18 ниже и показывают, что передача от апикальной части к базолатеральной является наивысшей для соединения 1, показывая улучшенную проницаемость и био-

доступность клеток. Это было подтверждено фармакокинетическими исследованиями *in vivo*, которые показали, что соединение 1 имеет также высокую пероральную биодоступность и проникает в мозг в отличие от других исследованных пролекарств.

Таблица 18

Биодоступность Сасо-2 соединения 1 по сравнению с другими сукцинатными пролекарствами

Соединение ID	$P_{app}(A-B)$ нм/с
Соединение 1 	4,12
A 	3,13
B 	1,92
C 	1,28
D 	1,42
E 	<0,21
F 	1,45
G 	0,87
HI 	2,62
J 	1,35
K 	1,68
L 	0,16



Пример 10. Сравнение термодинамической растворимости различных партий соединения 1.

Получали две партии соединения 1 с разной кристалличностью. Партия 2 имела более высокую кристалличность, чем партия 3, которая считалась, как имеющая более высокую степень аморфности соединения 1 - партия 2, поэтому считается более кристаллической партией, тогда как партия 3 рассматривается как более аморфная партия. Используемые способы обсуждаются в этом документе. PBS получали как обычно (NaCl (8 г/л), KCl (0,2 г/л), безводный гидрофосфат натрия (1,42 г/л) и безводный дигидрофосфат калия (0,24 г/л) добавляли к 250 мл деионизированной воды, и смесь перемешивали до растворения всего твердого вещества. pH раствора доводили до pH 7,4, используя HCl (1 М) или NaOH (1 М), если необходимо).

Образец более аморфного соединения 1, партия 3, добавляли к PBS или воде до конечной концентрации 258 мг/мл и обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин, затем встряхивали в течение 30 мин. После центрифугирования для удаления твердого материала анализ показывал, что была достигнута концентрация 258 мг/мл.

Образец более кристаллического соединения 1, партия 2, добавляли к воде для ВЭЖХ (Fisher) до конечной концентрации 30 мг/мл и обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин, затем встряхивали в течение 30 мин. После центрифугирования для удаления твердого материала анализ показал, что была достигнута концентрация 17 мг/мл.

Образец более кристаллического соединения 1, партия 2, добавляли в воду для ВЭЖХ (Fisher) до конечной концентрации 52 мг/мл и обрабатывали ультразвуком в течение 20 мин, затем встряхивали в течение 1 ч. После центрифугирования для удаления твердого материала анализ показал, что была достигнута концентрация 52 мг/мл.

Как видно из представленных данных, более аморфное вещество имеет гораздо более высокую кинетическую растворимость, чем более кристаллический материал.

Образец более кристаллического соединения 1, партия 2, добавляли к воде для ВЭЖХ (Fisher) до конечной концентрации 2000 мг/мл и обрабатывали ультразвуком в течение 20 мин, затем встряхивали в течение 1,5 ч. После центрифугирования для удаления твердого материала анализ показал, что была достигнута концентрация 850 мг/мл. Этот результат показывает, что растворимость в воде более кристаллического соединения составляет по меньшей мере 850 мг/мл, то есть оно имеет высокую растворимость в воде, но кинетическая растворимость выше для более аморфного соединения 1.

Пример 11. Сравнение стабильности соединения 1 в очищенной или неочищенной воде.

Был проведен параллельный эксперимент по стабильности соединения 1 в "очищенной" воде для ВЭЖХ (Fisher Scientific) и "неочищенной" водопроводной воде. Вкратце, растворы соединения 1 с концентрацией 1 мг/мл были получены в "очищенной" воде для ВЭЖХ (Fisher Scientific) и в "неочищенной" водопроводной воде. Их инкубировали при комнатной температуре до 10 дней. Концентрацию и чистоту соединения 1 оценивали с течением времени с помощью ВЭЖХ по сравнению со стандартом (AUC, пик 8,21, RT при 230 нм для рассчитанной концентрации, и AUC, пик соединения 1, в сравнении с примесями для анализа чистоты). Представленные данные являются средним значением для двух выборок.

Таблица 19

Время (дни)	Предполагаемая конц. (мг/мл)	Вычисленная конц. (мг/мл)	Чистота (%)
0	1	1,06	98,5
3	1	0,98	95,7
5	1	0,93	94,4
6	1	0,89	93,3
10	1	0,83	93,0

Соединение 1, партия 3, растворенное в водопроводной воде при концентрации 1 мг/мл, выдерживали при комнатной температуре в течение количества дней, указанных в таблице.

Таблица 20

Время (дни)	Предполагаемая конц. (мг/мл)	Вычисленная конц. (мг/мл)	Чистота (%)
0	1	1,02	99,0
3	1	1,04	98,8
5	1	1,03	99,0
6	1	1,01	99,0

Соединение 1, партия 3, растворенное в воде для ВЭЖХ (Fisher Scientific) в концентрации 1 мг/мл, выдерживали при комнатной температуре в течение количества дней, указанных в таблице.

Значительное разложение соединения 1 отмечается в образцах, растворенных в (неочищенной) водопроводной воде после выдерживания при комнатной температуре в течение 6 дней, о чем свидетельствует потеря чистоты и анализ. Этого не наблюдается для образцов, растворенных в (очищенной) воде для ВЭЖХ (Fisher Scientific). Подобные данные наблюдались для двух независимых образцов из разных партий соединения 1.

Пример 12. Композиция соединения 1 с НР-циклодекстрином.

Получение эксципиента.

Клептозогидроксипропил-β-циклодекстрин (25% мас./об.), безводный дигидрофосфат натрия (0,048 мас./об.%), дигидрат гидрофосфата натрия (0,295% мас./об.) И динатрий-кальций EDTA (0,5% мас./об.) добавляли к 100 мл деионизированной воды. Смесь обрабатывали ультразвуком в течение 20 мин, затем перемешивали до растворения всего твердого вещества, затем доводили до pH 7,4 с помощью HCl (1 M).

Протокол приготовления состава.

1. Отвешивают требуемое количество соединения, 1 затем добавляют требуемое количество полученного эксципиента к твердому соединению 1 с получением требуемой концентрации в мг/мл соединения 1 (максимальная испытанная концентрация 25 мг/мл). Например, для состава 20 мг/мл соединения 1 отвешивают 20 мг соединения 1 и добавляют 1 мл полученного эксципиента.

2. Раствор подвергают воздействию ультразвуком в течение 10 мин и затем встряхивают в течение 20 мин чтобы убедиться, что соединение 1 полностью растворилось.

3. Раствор можно центрифугировать (13000 об/мин, 10 мин) для удаления каких-либо твердых частиц, если это необходимо.

4. При необходимости раствор можно стерилизовать фильтрованием.

Пример 13. Инфузия соединения 1 обеспечивает доставку сукцината, увеличивает метаболизм сукцината у свиней и снижает концентрацию лактата в крови.

Инфузия соединения 1 увеличивает уровни сукцината в плазме, увеличивает метаболизм сукцината в fumarat в тканях и снижает концентрацию лактата в крови; см. фиг. 7.

Свиней-гибридов йоркширской породы ландрас анестезировали и им имплантировали венозные катетеры для инфузий соединения 1 или носителя (PBS) и сбора образцов крови. Двое животных получали возрастающую дозу соединения 1 (2-6 мг/кг/мин) в течение 2,5 ч, при этом доза увеличивалась на 1 мг/кг/мин каждые 30 мин. Одному животному вводили инфузию с постоянной скоростью 2 мг/кг/мин. Контрольному животному вливали PBS. Образцы крови отбирали с 30-минутными интервалами, и плазму отделяли центрифугированием. Образцы плазмы и ткани хранили замороженными, а затем анализировали на содержание сукцината методом ЖХ/МС с использованием трехквadrupольного МС-прибора Thermo Vanquish UPLC+Thermo Quantis, колонки Acquity UPLC HSS C18 (100×2,1 мм, 1,8 мкм) с защитным фильтром и градиентом элюирования; А=0,1% муравьиная кислота, В=ацетонитрил. Меченый [<sup>13</sup>C] сукцинат использовали в качестве внутреннего стандарта.

Концентрации сукцината в плазме увеличивались пропорционально времени инфузии соединения 1 (фиг. 7А), демонстрируя высвобождение сукцината из соединения 1. В конце исследования содержание fumarata, первичного метаболита сукцината в цикле TCA, было выше в тканях животного, получавшего соединение 1, чем в животном-носителе, особенно в тканях с высокой метаболической активностью, таких как сетчатка, мозг и сердце. Таким образом, данные предполагают, что соединение 1 доставляет метаболизируемый сукцинат в эти ткани и обладает способностью преодолевать гематоэнцефалический барьер.

Данные о содержании лактата в крови, полученные от трех животных, были выражены в процентах от начального значения и нанесены на график как функция кумулятивной дозы во время отбора проб (фиг. 7С).

Содержание лактата снижалось по сравнению с исходными значениями после внутривенной инфу-

зии соединения 1, что позволяет предположить, что соединение 1 доставляет сукцинат в комплекс 2 и увеличивает поставку электронов в митохондриальную цепь переноса электронов, чтобы увеличить продукцию АТФ и снизить потребность в гликолитическом превращении пирувата в лактат.

Пример 14. Модель на свинье дисфункции митохондриального комплекса 1, индуцированной ротеноном.

Инфузия соединения 1 восстанавливает уровни сукцината, обедненного ротеноном, в органах и снижает индуцированный ротеноном лактат в головном мозге; см. фиг. 8.

Для изучения эффекта опосредованного ротеноном ингибирования комплекса 1 свиней-гибридов йоркширских ландрасов анестезировали и им имплантировали венозные катетеры для одновременной инфузии ротенона и соединения 1 или носителя (PBS). Ротенон (7,1 мг/ч) вводили в течение 1,5 ч. Соединение 1 вводили инфузией с постоянной скоростью 2 мг/кг/мин в течение 2,5 ч. Контрольному животному вводили инфузией PBS. Образцы крови отбирали с 30-минутными интервалами, а плазму отделяли центрифугированием. Микродиализаты собирали путем введения зонда для микродиализа в полосатое тело мозга и анализировали на содержание лактата с помощью прибора ISCUS (MDialysis). По окончании инфузии животное умерщвляли и собирали образцы крови и органов в терминальной стадии. Образцы плазмы и ткани хранили замороженными, а затем анализировали на содержание сукцината методом ЖХ/МС с использованием трехкврупольного МС-прибора Thermo Vanquish UPLC+Thermo Quantis, колонки Acquity UPLC HSS C18 (100×2,1 мм, 1,8 мкм) с защитным фильтром и градиентным элюированием; А=0,1% муравьиная кислота, В=ацетонитрил. Меченый [<sup>13</sup>C] сукцинат использовали в качестве внутреннего стандарта. Данные по содержанию лактата были выражены в процентах от исходного значения, полученного до начала инфузии ротенона.

Инфузия ротенона снижает концентрацию сукцината в тканях до уровня ниже количественного (<2 мкМ), что указывает на повышенное использование сукцината для компенсации снижения переноса электронов от комплекса 1. Введение соединения 1 восстанавливает концентрации сукцината в тканях до определяемых уровней, что позволяет предположить, что доставка сукцината соединением 1 превышала повышенное использование сукцината, вызванное ингибированием комплекса 1. Кроме того, введение соединения 1 противодействовало индуцированному ротеноном увеличению содержания лактата в головном мозге, подтверждая снижение потребности в гликолитическом превращении пирувата в лактат путем доставки сукцината в мозг.

Пример 15. Генетическая модель нокаута Ndufs4 мыши с дисфункцией комплекса 1.

Введение соединения 1 с питьевой водой (1 мг/мл) после отнятия от вскармливательной самки (21 день) приводило к временному увеличению массы тела и тенденции к увеличению выживаемости в группе с высокой концентрацией; см. фиг. 9.

Мышам C57BL/6 с генетическим устранением гена комплекса I Ndufs4 (Quintana et al., Proceedings of the National Academy of Sciences. 107, 24 (2010), 10996-11001) вводили соединение 1 (1 мг/мл) в питьевой воде или обычной питьевой воде после отнятия от вскармливательной самки. Развитие массы тела контролировали каждые 10 дней (фиг. 9А), а здоровье животных ежедневно (фиг. 9В). Соединение 1 увеличивало прибавку в весе ( $p < 0,05$ ) в течение первых 10 дней и увеличивало выживаемость ( $p = 0,0697$ ). Результаты показывали, что на генетической модели дисфункции митохондриального комплекса I с признаками синдрома Лея может быть достигнут терапевтический эффект от добавления сукцината в виде соединения 1.

Пример 16. Модель индуцированной ротеноном двигательной дисфункции и молочнокислого ацидоза на крысах.

Соединение 1, вводимое с питьевой водой, предотвращает двигательные дисфункции и снижает концентрацию лактата в крови; см. фиг. 10.

Для изучения влияния перорального введения соединения 1 на двигательные и метаболические дисфункции, вызванные ингибированием комплекса 1 использовали модель индуцированной ротеноном болезни Паркинсона у крыс (Cannon et al., Neurobiol Dis. 2009 May;34(2):279-90).

Двенадцатинедельным крысам Lewis (по 6 животных в группе) ежедневно вводили внутривентрикулярно ротенон (0,25-0,75 мг/кг) в течение 4 дней. Соединение 1 растворяли в питьевой воде в концентрации 0,25 и 0,75 мг/мл. Функциональные тесты и измерения содержания лактата проводили на 4-й день. Вертикальное стояние определяли, помещая животных в цилиндр из прозрачного стекла (высота=30 см; диаметр=18 см) на 5 мин. Чтобы классифицировать как вертикальное стояние, передние конечности должны быть подняты выше уровня плеч и контактировать со стенкой цилиндра одной или двумя передними конечностями.

Постуральную нестабильность измеряли на столешнице, покрытой наждачной бумагой P-120, отмеченной линиями и цифрами через каждый сантиметр (см. ниже). Животное держали в вертикальном положении (положение "тачки") под углом почти 90° к поверхности, осторожно прижимая одну переднюю конечность к туловищу животного. Затем центр тяжести животного смещали вперед над единственной установленной передней конечностью, чтобы вызвать два "догоняющих" шага для восстановления равновесия. Изменение положения носа регистрировалось как расстояние, на котором начинался догоняющий шаг свободной передней конечности. Эксперимент повторяли трижды для каждой передней

конечности и рассчитывали среднее значение для обеих передних конечностей. Содержание лактата в крови (фиг. 10С) определяли с помощью анализатора VetScan iSTAT-1.

Лечение ротеноном приводило к снижению активности вертикального стояния. Введение соединения 1 (0,75 мг/мл) в питьевую воду приводило к значительному увеличению вертикального стояния (фиг. 10А) и остуральной нестабильности (фиг. 10В) по сравнению с обработанными животными, получавшими воду. Таким образом, данные предполагают, что соединение 1 является биодоступным при пероральном приеме и способно улучшать моторные дисфункции, вызванные дисфункцией митохондриального комплекса 1.

Концентрация лактата в крови значительно увеличивалась у животных, получавших ротенон. Наблюдалась тенденция к снижению концентраций лактата в крови от низкой концентрации (0,25 мг/мл) соединения 1 в питьевой воде до высокой концентрации (0,75 мг/мл). Данные предполагают, что сукцинат, доставленный из соединения 1, может достигать метаболической компенсации на уровне гликолиза и превращения пирувата в лактат при пероральной доставке путем периодического введения с питьевой водой, и подразумевает его пригодность в виде перорального лечения.

Пример 17. Данные о высвобождении сукцината.

Вкратце, запас соединения 1 партии 12 был приготовлен в смеси 50/50 ДМСО/MeCN (200 мМ, ×200). Затем эту смесь разбавляли 1:10 в микросомном буфере (20 мМ, ×20), состоящем из  $K_2HPO_4$  (Sigma Aldrich, 13,9 г/л, безводный),  $KH_2PO_4$  (Sigma Aldrich, 2,72 г/л, безводный),  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (Fisher, 1,02 г/л) и EDTA (Sigma Aldrich, 0,375 г/л), растворенном в воде для ВЭЖХ. Затем готовили исходный раствор 200 мМ малоновой кислоты (Sigma Aldrich) в микросомном буфере (200 мМ, ×20). Исходный 20 мМ NADPH был также приготовлен в микросомном буфере (20 мМ, ×10). Готовили запас микросом (Sekisui XenoTech, 0,625 мг/мл) во флаконе на 7 мл. Образцы готовили для каждой временной температуры (T=0, 5, 15, 60 мин) следующим образом: 80 мкл исходного раствора микросом (конечная концентрация 0,5 мг/мл), 5 мкл исходного раствора соединения (конечная концентрация 2 мМ), 5 мкл исходного раствора малоната (конечная концентрация 10 мМ). Образец T=0 гасили добавлением 100 мкл MeOH. Затем инициировали реакцию во всех временных точках добавлением 10 мкл исходного раствора NADPH (конечная концентрация 2 мМ). В каждый момент времени реакцию останавливали добавлением 100 мкл MeOH. Образцы встряхивали в течение 1 минуты, помещали на лед на 10 мин, затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Затем супернатант анализировали с помощью ЖХМС.

Таблица 21

Время (мин)	Образцы, обнаруженные с помощью ЖХМС		
	Соединение 1 (мМ)	Янтарная кислота (мМ)	Моно-метил сукцинат(мМ)
0	0,934	0,058	0,088
5	0,688	0,136	0,161
15	0,388	0,285	0,205
60	0,080	0,599	0,308

Как видно из данных, соединение 1 высвобождает янтарную кислоту с течением времени при инкубации с микросомами.

Пример 18. Минеральная нестабильность.

Соединение 1 партии 14 (2-3 мг) растворяли в воде для инъекций при комнатной температуре (WFI) (1 мг/мл), содержащей различные источники минералов, обычно встречающихся в водопроводной воде (с разными сопутствующими противоионами, чтобы иметь возможность различать различия между эффектами катиона или аниона), и через разные интервалы времени отбирали образцы для анализа ВЭЖХ.

Минеральные источники, используемые в виде неорганических солей:  $CuCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $NiSO_4$ ,  $CoCl_2$ ,  $NH_4Cl$ ,  $MnCl_2$ ,  $NaF$ ,  $NaNO_3$ ,  $CuSO_4$ ,  $Ca(NO_3)_2$ ,  $AlSO_4$ ,  $CaCO_3$ ,  $(NH_4)_2CO_3$ .

Таблица 22

Время (дни)	Процент (%) оставшегося соединения 1 по сравнению с моментом времени T=0 для каждой различной соли, добавленной в воду для ВЭЖХ						
	WFI	CuCl2	CaCl2	NiSO4	CoCl2	NH4Cl	MnCl2
0	100	100	100	100	100	100	100
7	98,7	99,5	100	98,4	101	101	98,9
14	97,7	98,3	97,9	99,1	101	99,8	99,2
Время (дни)	Процент (%) оставшегося соединения 1 по сравнению с моментом времени T=0 для каждой различной соли, добавленной в воду для ВЭЖХ						
	NaF	NaNO3	CuSO4	Ca(NO3)2	AlSO4	CaCO3	(NH4)2CO3
0	100	100	100	100	100	100	100
7	101	99,2	100	99,4	99,8	79,5	91,3
14	100	99,4	99,4	98,9	100	66,0	87,4

Как видно из данных, соединение 1 разлагается быстрее в водном растворе с карбонат-ионами.

Пример 19а. Карбонатная нестабильность.

Соединение 1, партия 14, (2-3 мг) растворяли в воде для ВЭЖХ при комнатной температуре (1 мг/мл), содержащей различные источники ионов кальция и карбоната (две концентрации для каждого источника, с зарегистрированным pH) и через разные интервалы времени отбирали образцы для анализа ВЭЖХ.

Источники кальция и карбоната, используемые в форме неорганических солей: CaCl<sub>2</sub>, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Таблица 23

Время (дни)	Процент (%) оставшегося соединения 1 по сравнению с моментом времени T=0 для каждого отдельного минерала, добавленного в воду для ВЭЖХ				
	ВЭЖХ вода (контроль, pH 6,5)	CaCO <sub>3</sub> (3,4 мМ, pH 7,6)	CaCO <sub>3</sub> (0,34 мМ, pH 7,6)	CaCl <sub>2</sub> (3,4 мМ, pH 7,5)	CaCl <sub>2</sub> (0,34 мМ, pH 7,4)
0	100	100	100	100	100
3	94,3	93,6	93,8	101	98,4
17	91,4	49,5	50,4	96,7	95,1
Время (дни)	Процент (%) оставшегося соединения 1 по сравнению с моментом времени T=0 для каждого отдельного минерала, добавленного в воду для ВЭЖХ				
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (3,4 мМ, pH 7,2)	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (0,34 мМ, pH 7,3)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3,4 мМ, pH 9,3)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3,4 мМ, pH 8,9)	
0	100	100	100	100	
3	100	101	98,9	99,6	
17	97,1	97,5	57,5	85,5	

Как видно из данных, соединение 1 разлагается быстрее в водном растворе с карбонат-ионами.

Пример 19b. Зависимость от концентрации карбоната.

Соединение 1, партия 14, (2-3 мг) растворяли в воде для ВЭЖХ (1 мг/мл), содержащей различные концентрации карбоната кальция, и через разные интервалы времени отбирали образцы для анализа ВЭЖХ.

Таблица 24

Время (дни)	Процент (%) оставшегося соединения 1 по сравнению с моментом времени T=0 для каждого отдельного минерала, добавленного в воду для ВЭЖХ				
	CaCO <sub>3</sub> (0 мМ)	CaCO <sub>3</sub> (0,425 мМ)	CaCO <sub>3</sub> (0,85 мМ)	CaCO <sub>3</sub> (1,7 мМ)	CaCO <sub>3</sub> (3,4 мМ)
0	100	100	100	100	100
7	98,7	98,1	97,8	93,8	83,4
14	98,6	98,4	97,1	90,8	71,4

Пример 20. Кинетическая растворимость.

Партии твердого соединения s3, s12-17, (~80 мг) добавляли в лунки 96-луночного планшета с пло-

ским прозрачным дном. Добавляли PBS при температуре 5°C с получением конечной концентрации 460 мг/мл 01-354 для всех партий. После добавления PBS планшет встряхивали в течение 10 с, затем сразу же анализировали на мутность при 620 нм в реальном времени в течение 3 мин с помощью спектрофотометра Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek). Константу скорости растворения рассчитывали из экспоненциального спада записанных данных.

Таблица 25

Соединение 1, партия №	Константы скорости, k (с-1)
3	0,014
12	0,022
13	0,013
14	0,011
15	0,074
16	0,055
17	0,111

Общий способ оценки кристалличности.

Исследования порошковой рентгеновской дифракции проводились с использованием Bruker AXS D8 discover HTS.

Анод: Си анод на 40 кВ и 4 мВ; зеркало Гебеля и линейная оптика.

Детектор: линейный детектор (LYNXEYE XE) со щелью приемника 2,95°.

Измерение: диапазон сканирования 2-45° 2 $\theta$ , 1с/стадия, 0,005°/стадия.

Программа для сбора данных: Diffrac.Commander v7.3.3.0.0.

Программное обеспечение для анализа данных: Diffrac Eva v4.2.1.

Коррекция фона или сглаживание не применялись. Данные представлены как угол пика 2 $\theta$  и его интенсивность. Для определения степени кристалличности объединенную площадь для всех определенных пиков делили на общую площадь под кривой и выражали в процентах.

Список пиков.

В следующем списке подробно описаны пики, полученные после порошкового рентгеноструктурного анализа для ряда кристаллических партий. Подчеркнутые пики являются общими для большинства партий. Те, у которых есть звездочка рядом с углом, могут быть пиками, более общими или уникальными для полиморфных форм.

Список пиков NV354-s3 - партия 3

Угол	Значение d	Интенсивность	Отн. интенсивность
9,4	9,389	54	1,4%
<b><u>10,9</u></b>	<b><u>8,136</u></b>	<b><u>453</u></b>	<b><u>12,1%</u></b>
11,1*	7,997	1270	33,7%
11,4	7,777	110	2,9%
12,9	6,870	208	5,5%
13,1	6,776	1240	32,9%

<b><u>13,1</u></b>	<b><u>6,728</u></b>	<b><u>120</u></b>	<b><u>3,2%</u></b>
13,8	6,420	36	1,0%
14,5	6,104	60	1,6%
<b><u>14,9</u></b>	<b><u>5,939</u></b>	<b><u>406</u></b>	<b><u>10,8%</u></b>
15,6	5,659	63	1,7%
<b><u>16,2</u></b>	<b><u>5,476</u></b>	<b><u>179</u></b>	<b><u>4,8%</u></b>
16,9*	5,246	89	2,4%
17,9	4,941	89	2,4%
18,5	4,785	49	1,3%
19,2	4,624	176	4,7%
19,6	4,528	226	6,0%
19,7	4,499	214	5,7%
<b><u>20,1</u></b>	<b><u>4,418</u></b>	<b><u>111</u></b>	<b><u>3,0%</u></b>
<b><u>21,4</u></b>	<b><u>4,143</u></b>	<b><u>831</u></b>	<b><u>22,1%</u></b>
21,7	4,100	95	2,5%
<b><u>22,2</u></b>	<b><u>3,994</u></b>	<b><u>163</u></b>	<b><u>4,3%</u></b>
22,7	3,919	698	18,6%
<b><u>22,8</u></b>	<b><u>3,893</u></b>	<b><u>1410</u></b>	<b><u>37,4%</u></b>
<b><u>23,1</u></b>	<b><u>3,847</u></b>	<b><u>2760</u></b>	<b><u>73,4%</u></b>
<b><u>23,3</u></b>	<b><u>3,813</u></b>	<b><u>307</u></b>	<b><u>8,2%</u></b>
<b><u>24,0</u></b>	<b><u>3,711</u></b>	<b><u>3760</u></b>	<b><u>100,0%</u></b>
24,4	3,640	58	1,5%
<b><u>24,8</u></b>	<b><u>3,591</u></b>	<b><u>602</u></b>	<b><u>16,0%</u></b>
25,2	3,538	78	2,1%
25,5	3,487	283	7,5%
<b><u>26,1</u></b>	<b><u>3,409</u></b>	<b><u>1340</u></b>	<b><u>35,5%</u></b>
27,2	3,282	53	1,4%
27,7	3,221	76	2,0%
28,0	3,185	58	1,5%
28,5	3,128	48	1,3%
29,9	2,989	69	1,8%
30,2	2,956	115	3,1%
30,8	2,901	89	2,4%
30,9	2,890	73	1,9%

31,3	2,857	64	1,7%
31,6	2,829	29	0,8%
32,2	2,776	42	1,1%
32,8	2,730	27	0,7%
33,0	2,711	42	1,1%
33,2	2,694	59	1,6%
35,0	2,560	73	1,9%
35,4	2,536	37	1,0%
36,6	2,456	86	2,3%
38,6	2,333	49	1,3%
40,1	2,248	52	1,4%
41,6	2,169	58	1,5%
44,7	2,026	86	2,3%
44,8	2,022	57	1,5%

## Список пиков NV354-s12 - партия 18

Угол	Значение d	Интенсивность	Отн. интенсивность
5,6	15,805	68	3,3%
9,4	9,390	99	4,9%
10,9	8,141	233	11,5%
11,1	7,949	365	18,0%
11,2	7,883	635	31,3%
11,4	7,744	252	12,4%
12,9	6,848	183	9,0%
13,2	6,710	103	5,1%
13,8	6,432	115	5,7%
14,9	5,941	446	22,0%
15,7	5,657	91	4,5%
16,2	5,484	312	15,4%
16,9	5,243	288	14,2%
17,3	5,119	107	5,3%
18,1	4,902	87	4,3%
18,6	4,779	60	3,0%
19,3	4,607	274	13,5%
19,3	4,594	154	7,6%

## 045539

19,7	4,506	164	8,1%
20,1	4,411	505	25,0%
21,4	4,148	1030	51,1%
21,6	4,110	160	7,9%
22,2	4,001	395	19,5%
22,7	3,919	2030	100,0%
22,8	3,892	1960	96,6%
23,0	3,865	1990	98,3%
23,2	3,824	204	10,1%
24,0	3,709	90	4,5%
24,5	3,637	122	6,0%
24,8	3,593	226	11,1%
25,1	3,539	227	11,2%
25,5	3,487	126	6,2%
26,1	3,407	151	7,4%
27,8	3,210	196	9,7%
28,5	3,124	53	2,6%
32,8	2,728	41	2,0%
35,0	2,560	64	3,2%
37,7	2,386	75	3,7%
41,6	2,169	62	3,0%
43,0	2,104	26	1,3%

## Список пиков NV354-s13 - партия 13

Угол	Значение d	Интенсивность	Отн. интенсивность
7,9	11,190	39	2,3%
9,4	9,405	118	6,9%
10,9	8,136	668	39,3%
11,1	7,963	408	24,0%
11,2	7,884	294	17,3%
11,4	7,743	179	10,5%
12,9	6,858	209	12,3%
13,2	6,709	103	6,1%
13,8	6,432	26	1,6%
14,5	6,099	71	4,2%

## 045539

14,9	5,954	474	27,9%
15,6	5,659	155	9,1%
16,2	5,472	326	19,2%
16,9	5,250	134	7,9%
17,4	5,102	44	2,6%
18,1	4,906	89	5,2%
19,0	4,677	57	3,3%
19,2	4,619	269	15,8%
19,4	4,577	180	10,6%
19,7	4,505	162	9,5%
20,1	4,414	392	23,0%
21,4	4,145	536	31,5%
21,6	4,106	79	4,7%
22,3	3,990	396	23,3%
22,7	3,913	898	52,7%
22,9	3,887	1700	100,0%
23,1	3,855	1380	80,9%
23,3	3,812	336	19,8%
24,0	3,711	84	4,9%
24,6	3,620	131	7,7%
24,8	3,590	371	21,8%
25,2	3,536	152	8,9%
25,5	3,487	94	5,5%
26,1	3,407	195	11,4%
27,2	3,280	71	4,2%
27,8	3,210	100	5,9%
28,0	3,185	90	5,3%
29,6	3,015	47	2,8%
30,2	2,959	34	2,0%
30,8	2,902	72	4,2%
31,3	2,858	37	2,2%
31,6	2,827	27	1,6%
32,0	2,795	68	4,0%
32,8	2,730	79	4,6%
34,2	2,620	65	3,8%
34,4	2,602	52	3,0%
35,1	2,555	63	3,7%
35,4	2,535	66	3,9%
37,7	2,384	44	2,6%
40,1	2,246	35	2,1%
41,6	2,170	68	4,0%
44,2	2,049	27	1,6%

## Список пиков NV354-s14 - партия 14

Угол	Значение d	Интенсивность	Отн. интенсивность
7,9	11,145	111	5,5%
9,4	9,370	132	6,5%
10,8	8,175	130	6,4%
10,9	8,132	74	3,7%
11,1	7,992	343	16,9%
11,4	7,750	184	9,0%
12,9	6,841	73	3,6%
13,2	6,713	169	8,3%
14,9	5,935	113	5,6%
15,6	5,663	80	3,9%
16,2	5,484	161	7,9%
16,9	5,248	47	2,3%
18,0	4,937	33	1,6%
18,6	4,777	52	2,6%
19,4	4,564	220	10,9%
19,7	4,502	195	9,6%
20,1	4,421	46	2,3%
21,4	4,143	1150	56,5%
22,2	4,000	355	17,5%
22,7	3,921	2030	100,0%
22,9	3,888	509	25,1%
23,0	3,857	812	40,0%
24,5	3,624	173	8,5%
24,8	3,592	40	2,0%

## 045539

25,2	3,537	89	4,4%
25,5	3,486	346	17,0%
26,0	3,427	122	6,0%
26,2	3,397	169	8,3%
27,1	3,282	63	3,1%
27,8	3,208	262	12,9%
28,0	3,182	57	2,8%
28,6	3,123	43	2,1%
28,7	3,113	52	2,6%
29,6	3,012	30	1,5%
30,3	2,951	82	4,0%
30,8	2,901	55	2,7%
31,2	2,864	31	1,5%
32,2	2,775	22	1,1%
33,0	2,711	55	2,7%
34,2	2,618	83	4,1%
34,8	2,577	44	2,2%
35,1	2,556	57	2,8%
36,2	2,483	167	8,2%
37,3	2,408	69	3,4%
37,7	2,386	44	2,2%
39,8	2,266	26	1,3%
41,6	2,169	83	4,1%
41,7	2,164	45	2,2%

## Список пиков NV354-s15 - партия 19

Угол	Значение d	Интенсивность	Отн. интенсивность
5,6	15,862	72	4,6%
7,9	11,170	52	3,3%
9,4	9,389	134	8,5%
10,8	8,151	388	24,6%
11,1	7,976	412	26,2%
11,2	7,907	400	25,4%
11,4	7,765	121	7,7%
12,9	6,846	108	6,8%

## 045539

13,2	6,714	211	13,4%
13,7	6,440	41	2,6%
14,9	5,936	456	29,0%
15,6	5,660	134	8,5%
16,2	5,478	312	19,8%
16,9	5,252	122	7,7%
18,1	4,906	49	3,1%
19,0	4,673	58	3,7%
19,2	4,614	96	6,1%
19,7	4,506	170	10,8%
20,1	4,413	162	10,3%
21,4	4,143	943	59,9%
21,6	4,104	306	19,5%
22,2	3,997	318	20,2%
22,8	3,894	1400	88,7%
23,1	3,854	1570	100,0%
23,3	3,813	488	31,0%
23,9	3,716	81	5,1%
24,5	3,628	74	4,7%
24,5	3,627	109	6,9%
24,8	3,592	139	8,8%
25,2	3,535	147	9,3%
25,6	3,482	146	9,3%
26,1	3,406	139	8,8%
27,2	3,281	52	3,3%
27,8	3,211	122	7,8%
29,6	3,012	34	2,2%
30,8	2,900	62	3,9%
33,0	2,715	25	1,6%
41,6	2,170	38	2,4%

## Список пиков NV354-s16 - партия 16

Угол	Значение d	Интенсивность	Отн. интенсивность
5,6	15,858	91	4,2%
7,9	11,148	63	2,9%
9,4	9,395	138	6,3%
10,9	8,134	401	18,4%
11,1	7,945	354	16,3%
11,2	7,891	514	23,6%
11,4	7,748	167	7,7%
12,9	6,852	100	4,6%
13,2	6,709	175	8,0%
13,8	6,424	72	3,3%
14,5	6,091	54	2,5%
14,9	5,943	370	17,0%
15,7	5,656	151	7,0%
16,2	5,479	233	10,7%
16,9	5,244	248	11,4%
17,4	5,106	31	1,4%
18,1	4,895	106	4,9%
18,6	4,777	43	2,0%
19,2	4,613	284	13,1%
19,4	4,583	214	9,8%
19,7	4,507	179	8,2%
20,1	4,413	274	12,6%
21,4	4,147	622	28,6%
21,6	4,102	210	9,7%
22,2	3,995	293	13,5%
22,7	3,921	834	38,3%
22,8	3,891	1490	68,2%
23,1	3,855	2180	100,0%
23,3	3,813	279	12,8%
24,0	3,711	87	4,0%
24,5	3,627	100	4,6%
24,8	3,592	266	12,2%
25,2	3,533	180	8,3%
25,5	3,489	122	5,6%
26,2	3,403	162	7,4%
27,1	3,283	36	1,6%

## 045539

27,8	3,207	173	7,9%
28,0	3,184	49	2,2%
28,5	3,125	34	1,6%
29,6	3,015	33	1,5%
30,8	2,905	82	3,8%
31,6	2,829	44	2,0%
32,0	2,791	24	1,1%
32,8	2,725	42	1,9%
34,2	2,618	71	3,3%
35,0	2,559	61	2,8%
35,4	2,537	28	1,3%
36,1	2,484	35	1,6%
37,7	2,387	48	2,2%
40,2	2,244	47	2,2%
41,6	2,170	98	4,5%

## Список пиков NV354-s17 - партия 17

Угол	Значение d	Интенсивность	Отн. интенсивность
7,9	11,171	108	2,6%
9,4	9,422	77	1,8%
10,8	8,158	297	7,1%
11,1	7,984	379	9,0%
11,2	7,873	790	18,9%
11,4	7,753	134	3,2%
12,8	6,892	114	2,7%
12,9	6,845	185	4,4%
13,2	6,715	179	4,3%
13,8	6,420	77	1,8%
14,9	5,931	349	8,3%
15,7	5,649	225	5,4%
16,2	5,462	184	4,4%
16,9	5,248	303	7,2%
17,9	4,948	52	1,3%
18,5	4,785	40	0,9%
19,2	4,625	183	4,4%

19,3	4,586	263	6,3%
19,7	4,500	307	7,3%
20,1	4,416	220	5,3%
21,4	4,148	501	12,0%
21,6	4,105	145	3,5%
22,2	3,998	1100	26,3%
22,8	3,890	1700	40,6%
23,1	3,853	2000	47,7%
23,2	3,832	4190	100,0%
24,6	3,616	264	6,3%
24,8	3,590	771	18,4%
25,2	3,535	230	5,5%
25,5	3,489	127	3,0%
26,1	3,410	242	5,8%
27,8	3,207	285	6,8%
29,6	3,015	24	0,6%
30,8	2,901	151	3,6%
30,9	2,896	155	3,7%
31,2	2,861	314	7,5%
31,6	2,830	160	3,8%
33,1	2,707	38	0,9%
33,7	2,658	164	3,9%
34,2	2,621	62	1,5%
35,0	2,561	103	2,5%
38,6	2,331	95	2,3%
38,9	2,311	44	1,0%
40,7	2,216	77	1,8%
41,6	2,171	48	1,1%
42,4	2,129	34	0,8%

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный метил 3-[(2-ацетиламиноэтилтио)карбонил]пропионат (соединение 1) в твердой форме, имеющий чистоту по меньшей мере 80% мас./мас.

2. Выделенное соединение по п.1, имеющее чистоту по меньшей мере 90% мас./мас., по меньшей мере 95% мас./мас., по меньшей мере 97% мас./мас., по меньшей мере 98% мас./мас. или по меньшей мере 99% мас./мас.

3. Выделенное соединение 1 по п.1 или 2 в свободной форме или его соль, гидрат, сольват или комплекс.

4. Выделенное соединение 1 по п.1 или 2, имеющее температуру плавления или диапазон плавления от 35 до 55°C.

5. Выделенное соединение 1 по любому из предшествующих пунктов, которое является кристаллическим продуктом, или аморфным продуктом, или их смесью.

6. Выделенное соединение 1 по любому из предшествующих пунктов, имеющее растворимость в воде при комнатной температуре по меньшей мере 300 мг/мл.

7. Выделенное соединение 1 по п.5, где растворимость в воде при комнатной температуре находится в диапазоне от 300 до 900 мг/мл.

8. Выделенное соединение 1 по любому из предшествующих пунктов, имеющее кристалличность в диапазоне от 0 до 100%, например от 50 до 100%.

9. Выделенное соединение 1 по любому из предшествующих пунктов, имеющее кинетическую растворимость в воде, соответствующую константе скорости в диапазоне от 0,005 до 0,2 с<sup>-1</sup>.

10. Выделенное соединение 1 по любому из предшествующих пунктов, имеющее порошковую ди-

фракционную рентгенограмму с одним или несколькими сигналами при 21,4, 22,2, 22,8, 23,1 и 23,3 ( $\pm 0,2^\circ$ , значения 2-тета).

11. Выделенное соединение 1 по любому из предшествующих пунктов, имеющее порошковую дифракционную рентгенограмму с одним или несколькими сигналами при 10,9, 13,1, 14,9, 16,2, 20,1, 24,0, 24,8, 26,1, ( $\pm 0,2^\circ$ , значения 2-тета).

12. Применение выделенного соединения 1 по любому из предшествующих пунктов в медицине.

13. Применение по п.12 в качестве активного фармацевтического ингредиента в фармацевтическом продукте.

14. Применение по п.12 или 13 для лечения или предупреждения метаболического заболевания, митохондриальной дисфункции, заболевания, связанного с митохондриальной дисфункцией, митохондриального нарушения, митохондриального дефицита энергии, митохондриальных побочных эффектов, вызванных лекарственными средствами, рака, диабета, черепно-мозговой травмы, острого повреждения печени и фибрилляции предсердий.

15. Применение по п.12 или 13 для лечения или предупреждения метаболической дисфункции.

16. Применение по п.12 для лечения или предупреждения синдрома Лея, LHON, MELAS, MERRF (миоклоническая эпилепсия с рваными мышечными волокнами) и других заболеваний/состояний, связанных с дефектами митохондриального комплекса I.

17. Применение выделенного соединения 1 по любому из пп.1-11 при получении композиции для немедикаментозного применения у людей или животных.

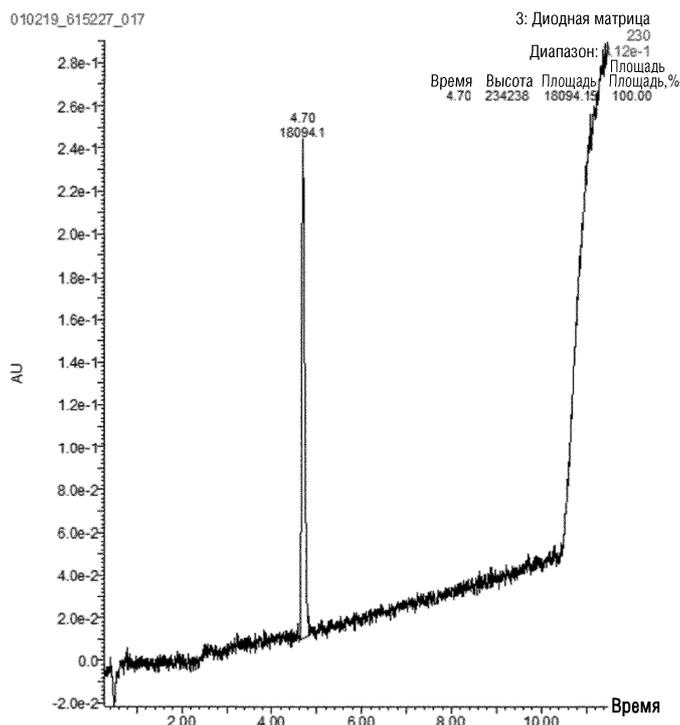
18. Косметическое средство, содержащее выделенное соединение 1 по любому из пп.1-11.

19. Нутрикосметические средства, содержащие выделенное соединение 1 по любому из пп.1-11.

20. Энергетический напиток, содержащий выделенное соединение 1 по любому из пп.1-11.

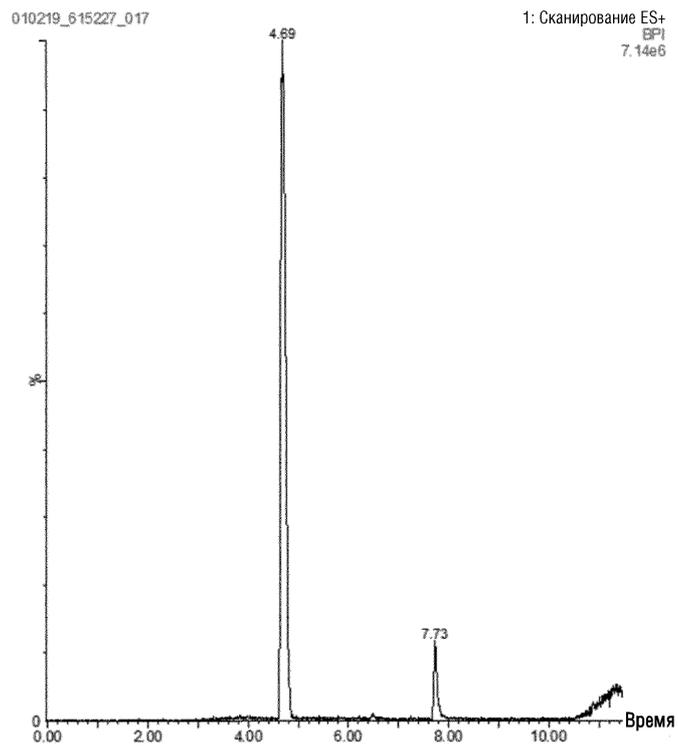
21. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное соединение 1 по любому из пп.1-11.

22. Соединение по любому из пп.1-11 в виде его кристаллического полиморфа формы I, имеющего порошковую дифракционную рентгенограмму с сигналами при 11,2, 16,9 ( $\pm 0,2^\circ$ , значения 2-тета).

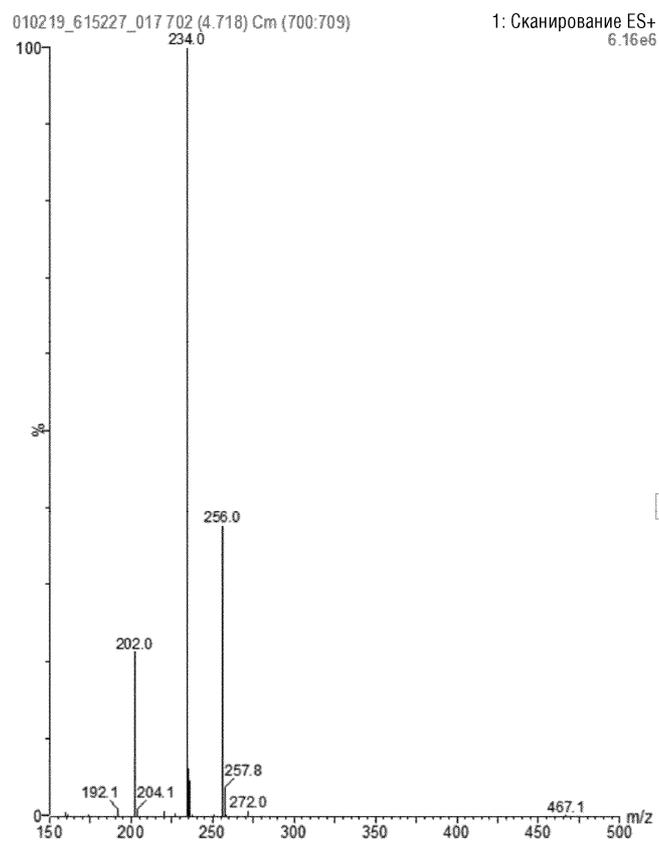


Фиг. 1

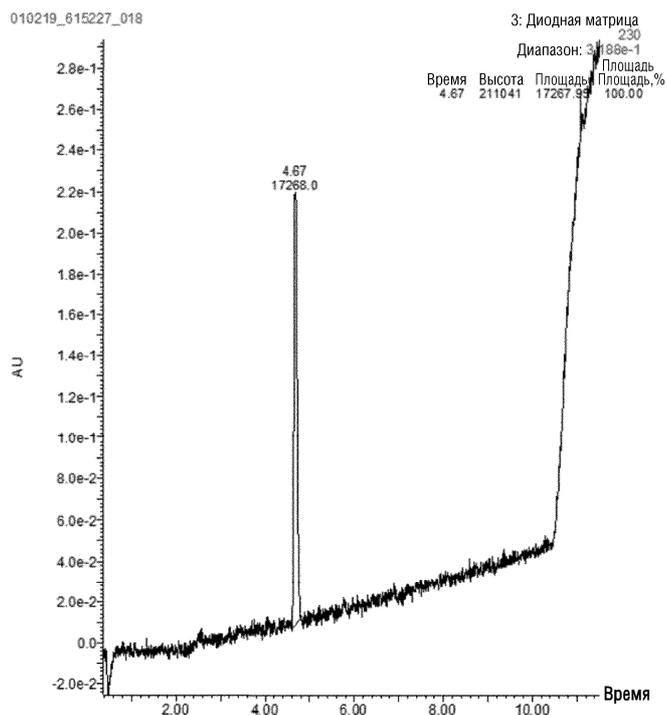
045539



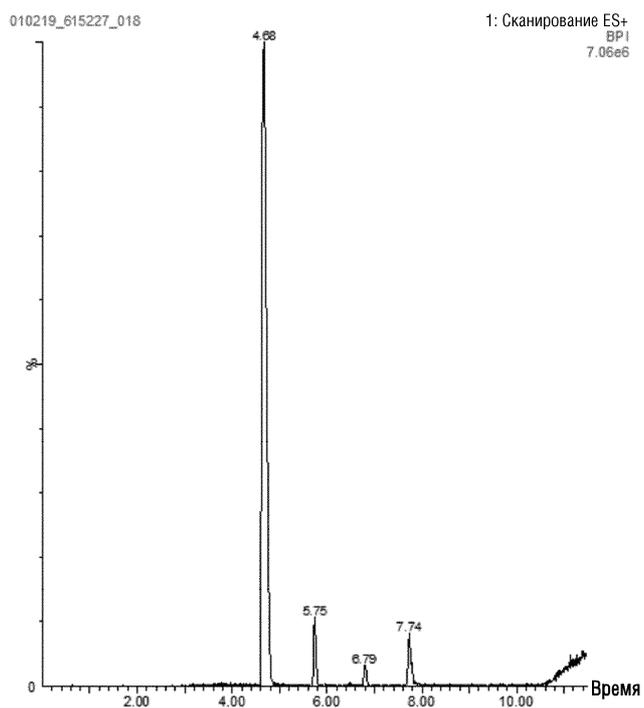
Фиг. 2



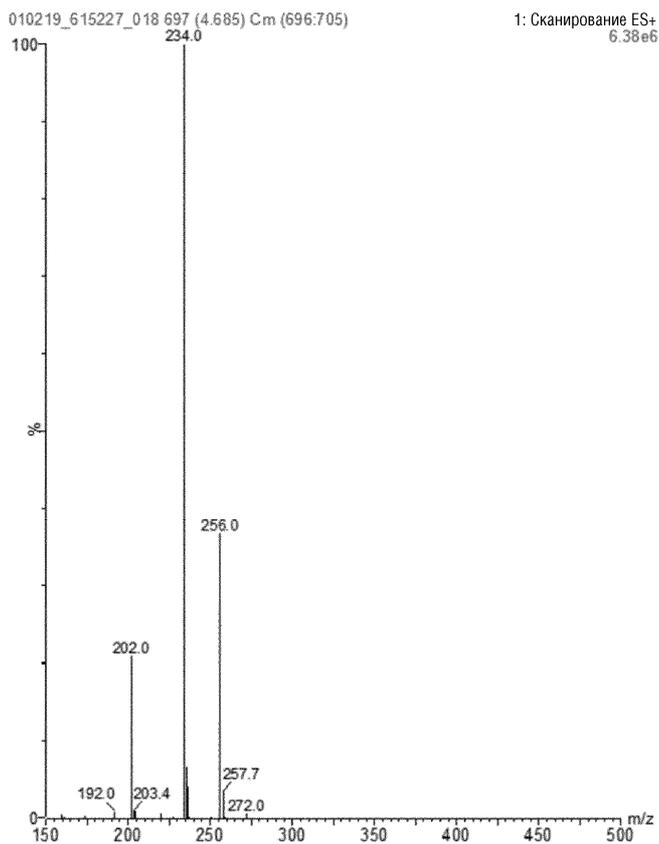
Фиг. 3



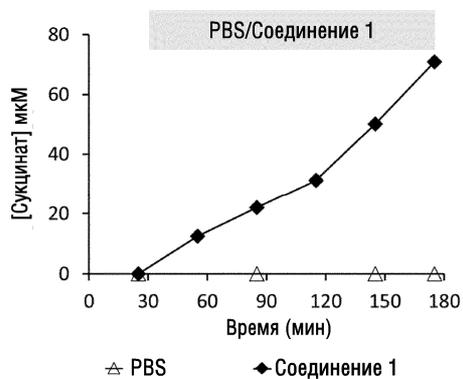
Фиг. 4



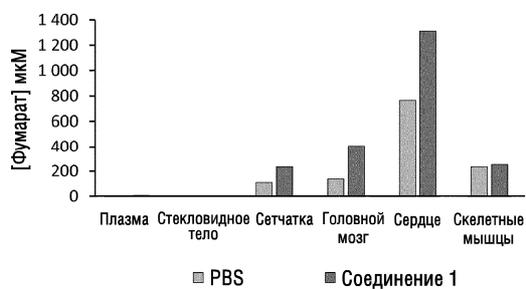
Фиг. 5



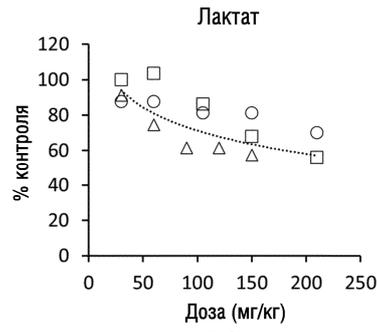
Фиг. 6



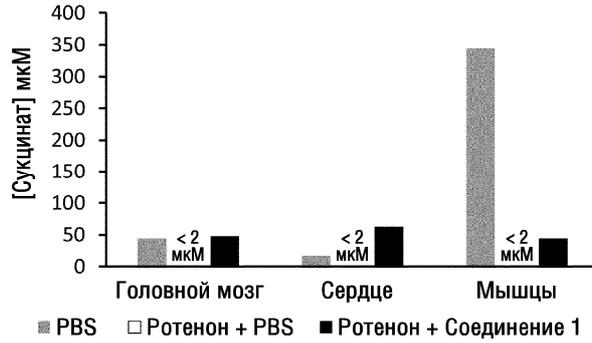
Фиг. 7А



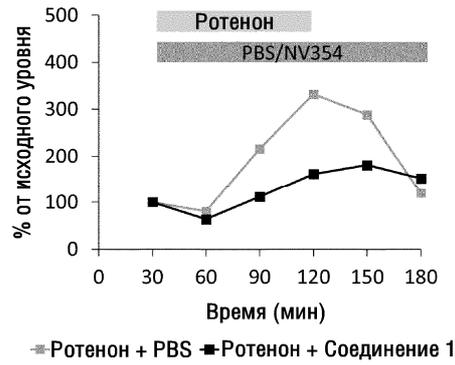
Фиг. 7В



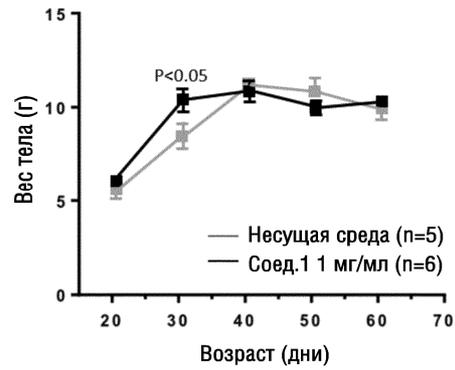
Фиг. 7С



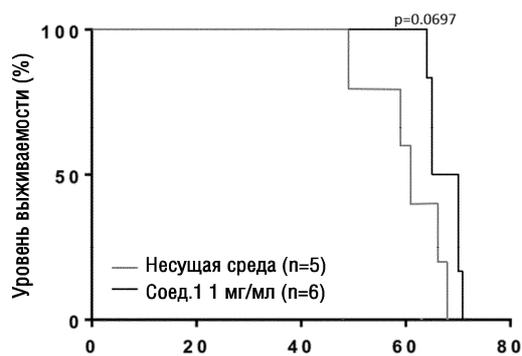
Фиг. 8А



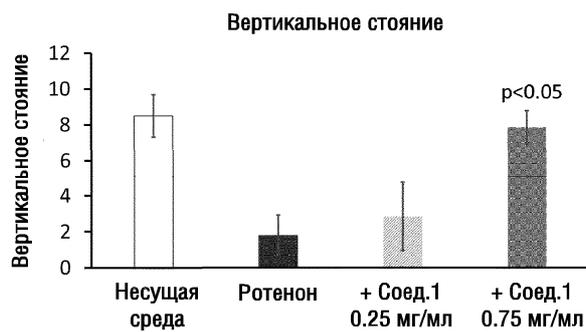
Фиг. 8В



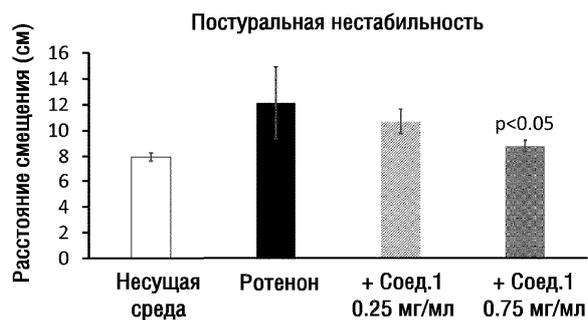
Фиг. 9А



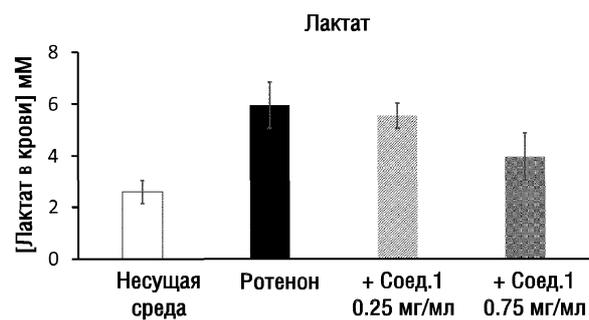
Фиг. 9В



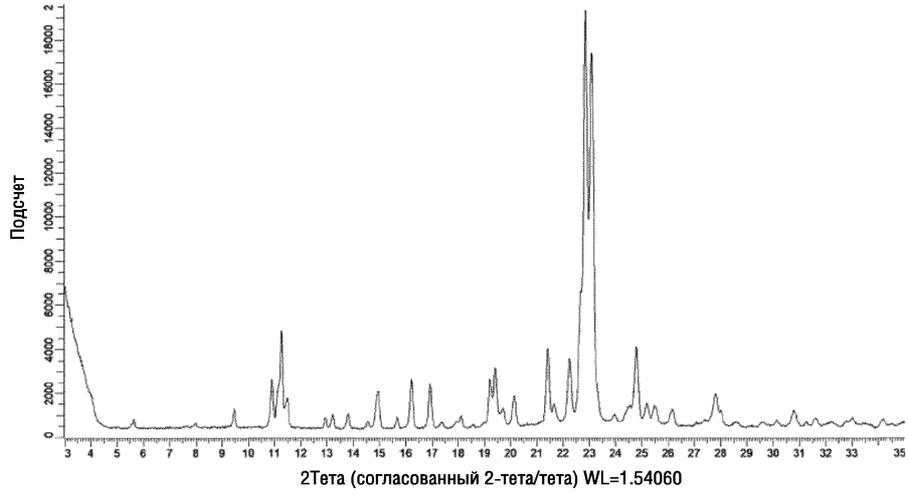
Фиг. 10А



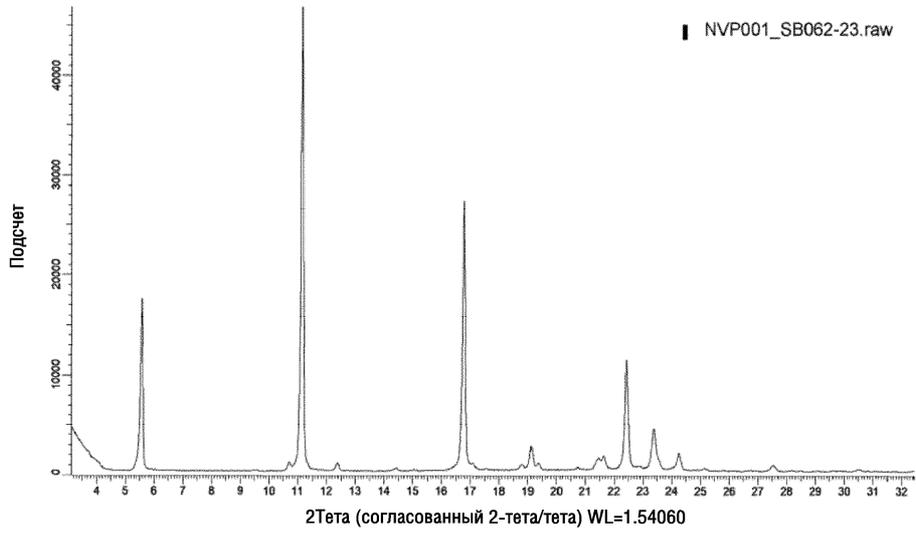
Фиг. 10В



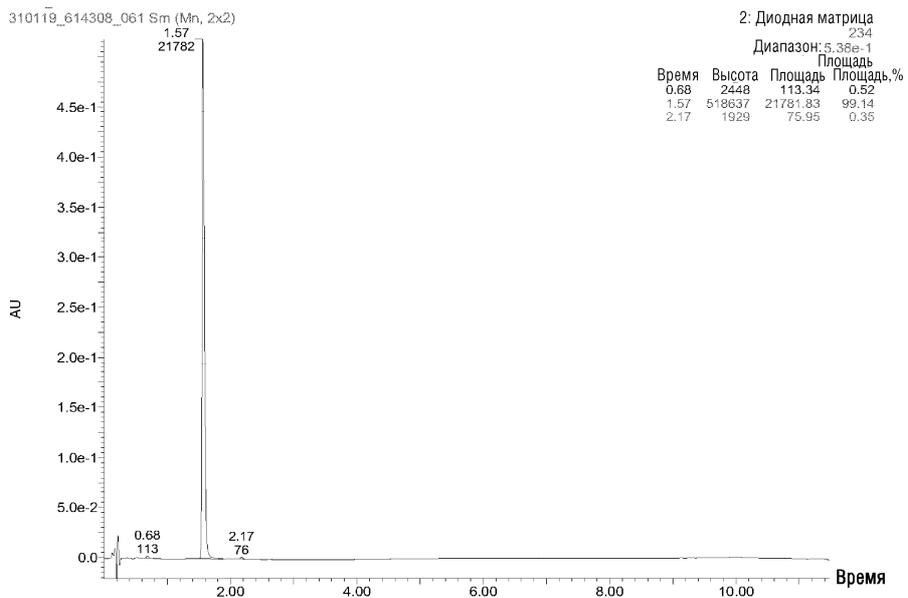
Фиг. 10С



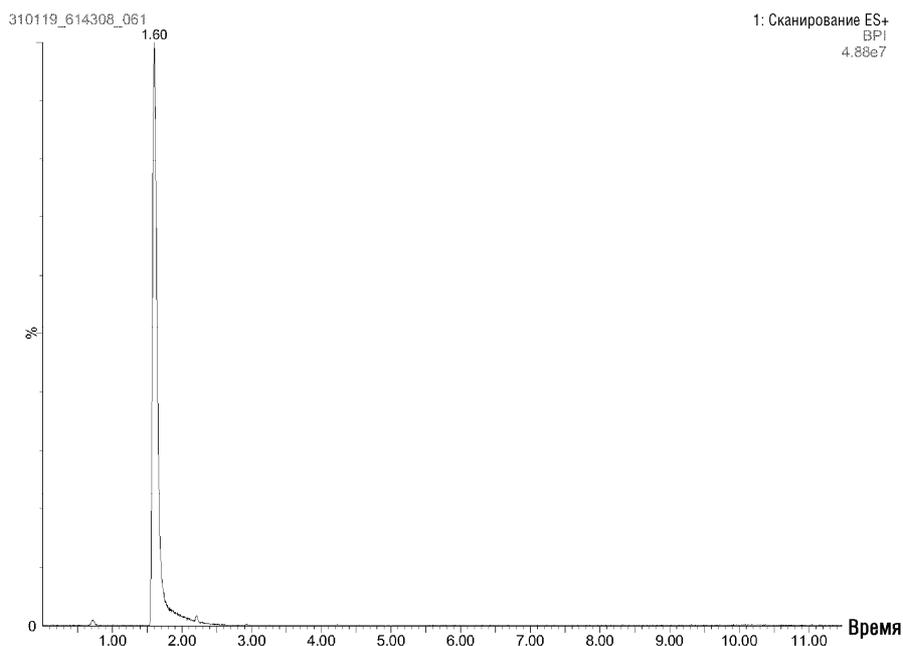
Фиг. 11



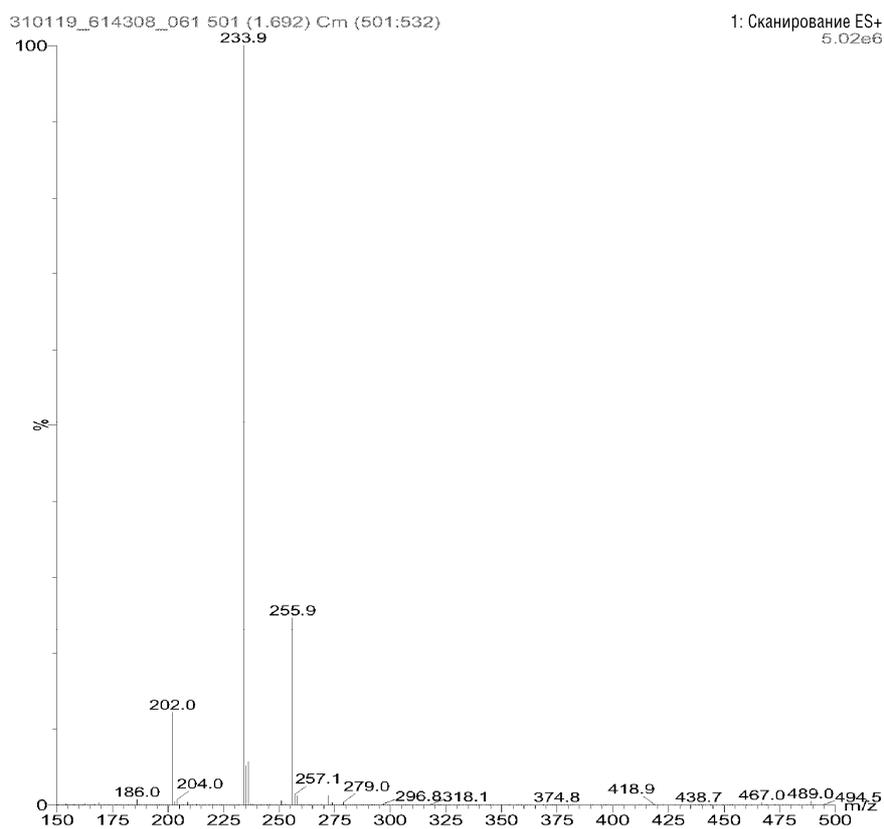
Фиг. 12



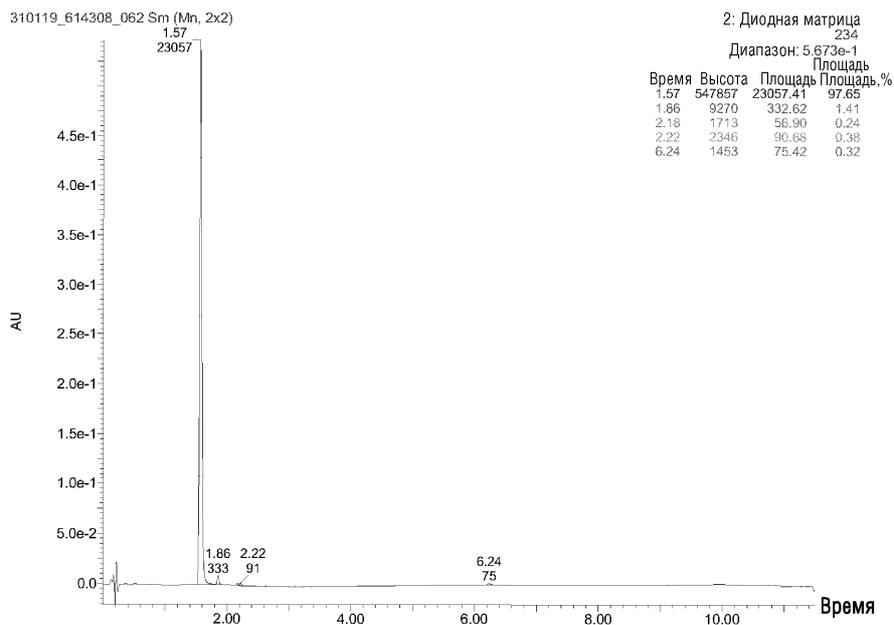
Фиг. 13



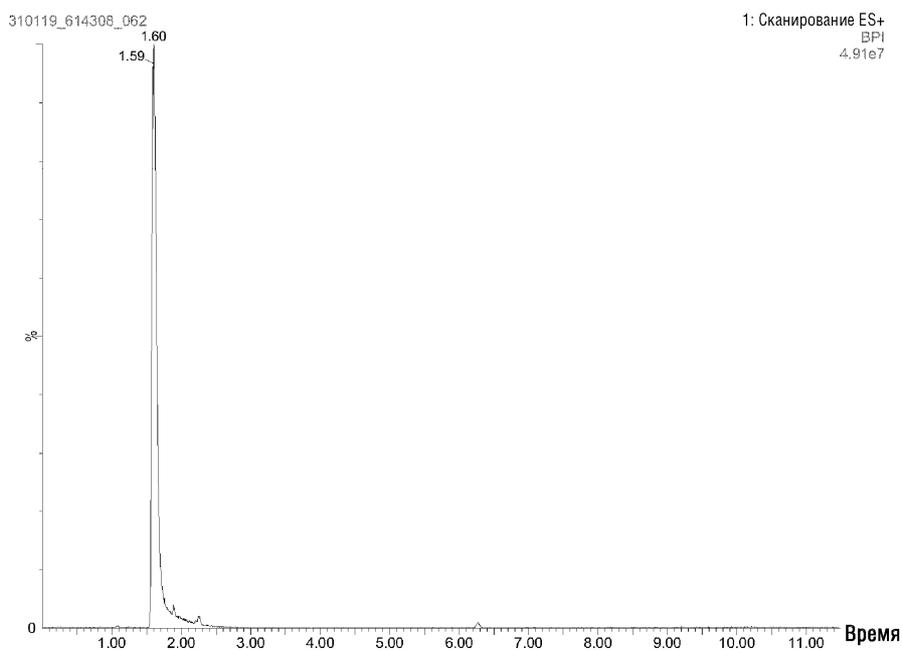
Фиг. 14



Фиг. 15

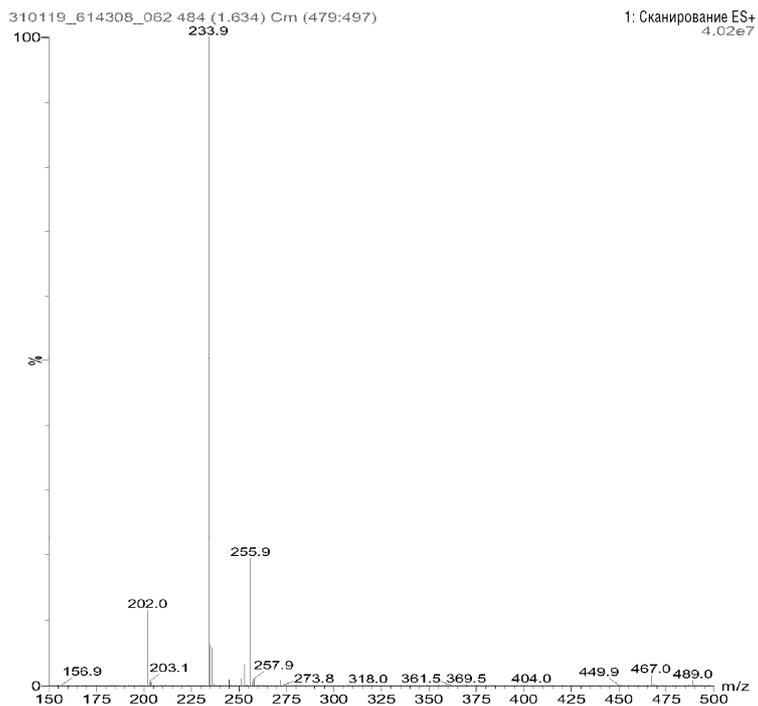


Фиг. 16

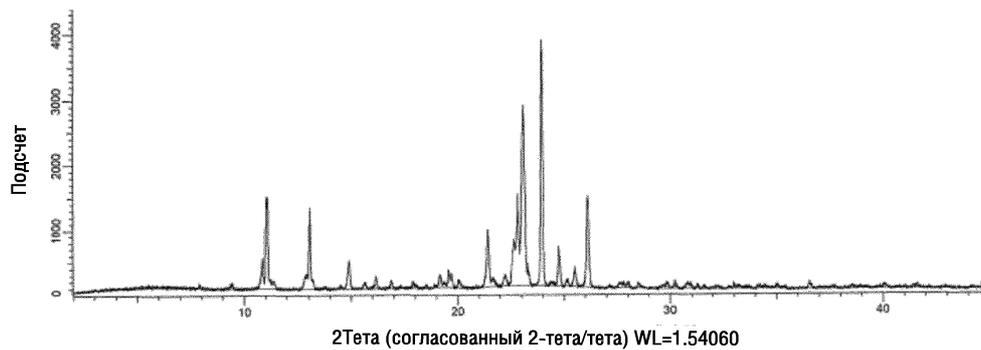


Фиг. 17

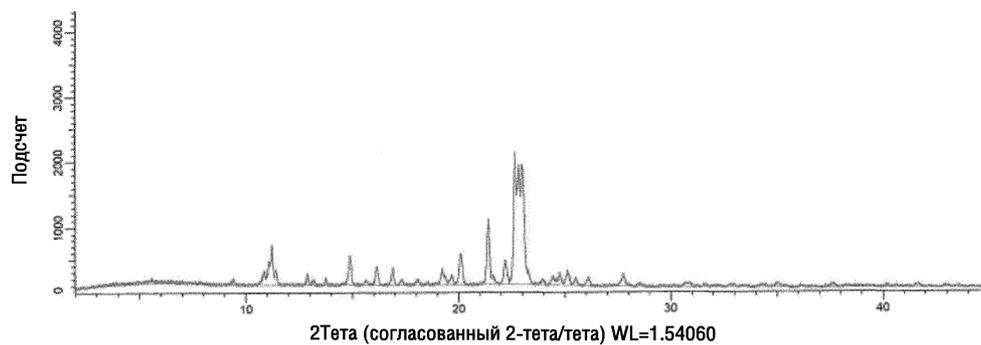
045539



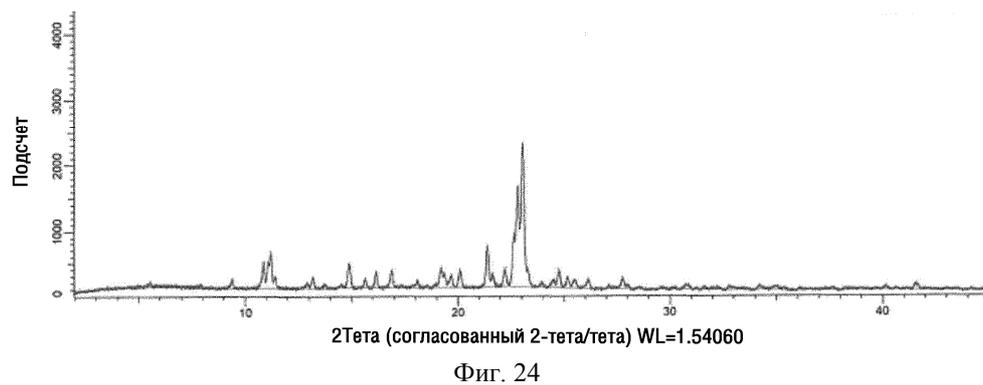
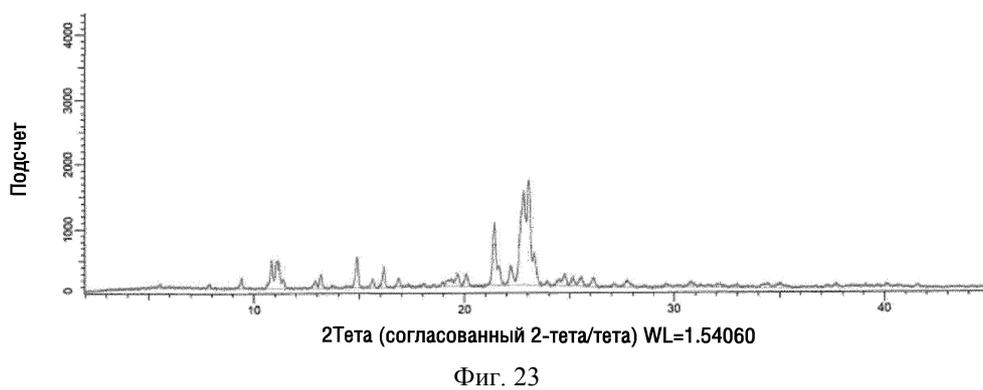
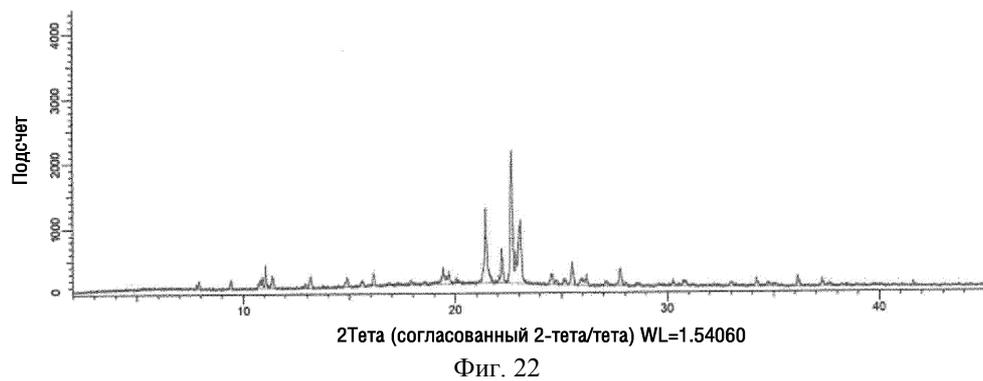
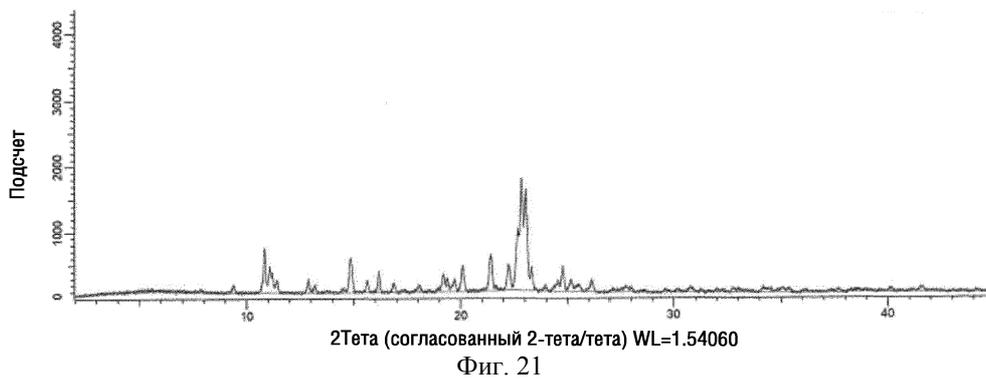
Фиг. 18



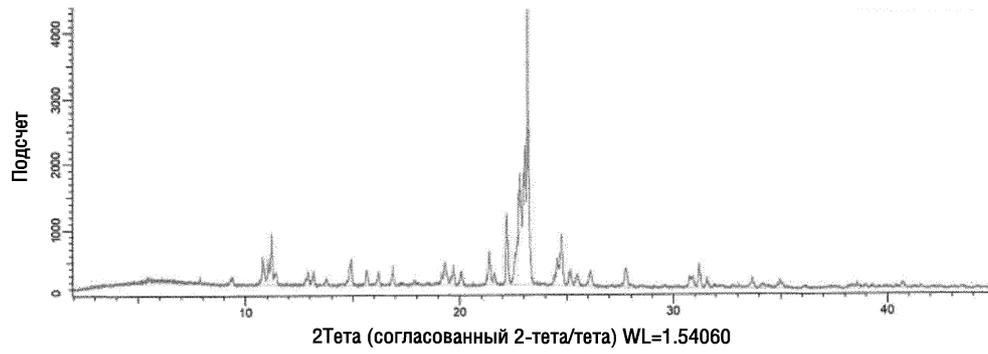
Фиг. 19



Фиг. 20



045539



Фиг. 25



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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

---