

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393400 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.02(51) Int. Cl. *A61K 31/4174* (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2022.06.02(54) СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ СОЕДИНЕНИЙ-АГОНИСТОВ PPAR И ИХ
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ

(31) 63/196,013; 63/196,826

(32) 2021.06.02; 2021.06.04

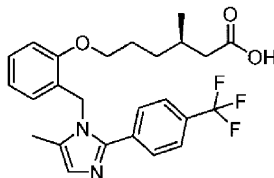
(33) US

(86) PCT/US2022/031977

(87) WO 2022/256540 2022.12.08

(71) Заявитель:
АСТЕЛЛАС ФАРМА ИНК. (JP);
МИТОБРИДЖ, ИНК. (US)(72) Изобретатель:
Канемицу Наотоси, Ито Мотоцугу
(JP), Маллиган Джордж (US), Такае
Сеидзи, Танака Марина (JP)(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам применения агониста дельта-рецепторов, активируемых пероксисомным пролифератором (PPAR δ) (например, соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль, раскрытые в настоящем документе), например, для лечения пациентов, имеющих первичные митохондриальные миопатии (PMM). Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, включающей агонист дельта-рецепторов, активируемых пероксисомным пролифератором (PPAR δ), и кроскармеллозу натрия.



A1

202393400

202393400

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579964EA/019

СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ СОЕДИНЕНИЙ-АГОНИСТОВ PPAR И ИХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США No. 63/196013, поданной 2 июня 2021 г., и 63/196826, поданной 4 июня 2021 г. Полное содержание каждой из вышеупомянутых заявок включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способам применения агониста дельта-рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом (PPAR δ) (например, соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль, раскрытые в настоящем документе), например, для лечения пациентов, имеющих первичные митохондриальные миопатии (PMM). Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, включающим агонист дельта-рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом (PPAR δ), и кроскармеллозу натрия.

Уровень техники изобретения

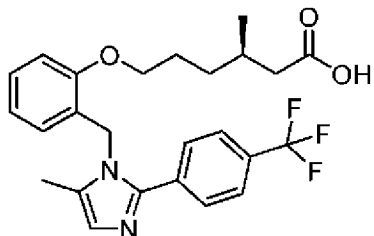
Дельта-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом (PPAR δ), представляет собой ядерный рецептор, способный регулировать биосинтез митохондрий. Как показано в WO2017/062468, включенном в настоящий документ в качестве ссылки, модуляция активности PPAR δ полезна для лечения заболеваний, задержек развития и симптомов, связанных с митохондриальной дисфункцией, таких как болезнь Альперса, MERRF-миоклоническая эпилепсия и заболевание с рваными красными волокнами, синдром Пирсона и тому подобное. Модуляция активности PPAR δ эффективна при лечении других состояний, таких как мышечные заболевания, демиелинизирующие заболевания, сосудистые заболевания и метаболические заболевания. Действительно, PPAR δ является важной биологической мишенью для соединений, используемых для лечения и профилактики митохондриальных заболеваний, мышечных заболеваний и расстройств, а также других связанных состояний.

Первичные митохондриальные миопатии (PMM) включают большую гетерогенную группу заболеваний, возникающих в результате мутаций или мутаций/делеций в генах, которые влияют на функцию митохондрий и приводят к мышечным заболеваниям. Эти заболевания могут характеризоваться дисфункцией дополнительных систем органов и значительной вариабельностью клинических проявлений. В настоящее время не существует одобренного лечения митохондриальных миопатий.

В скелетных и сердечных мышцах дисфункция митохондрий способствует плохой выработке энергии, увеличению лактата, снижению восстановления мышц и усилению воспаления. PPAR δ представляет собой ядерный рецептор, который при активации индуцирует программу транскрипции, повышающую способность клеток

транспортировать и окислять жирные кислоты, которые могут сохранять глюкозу и уменьшать воспаление и фиброз.

В WO2017/062468 и WO2018/067860, включенных в настоящий документ в качестве ссылки, описаны соединения-агонисты PPAR δ . Одно из соединений, называемое в настоящем документе «соединение (I)», показано ниже:



Соединение (I)

Химическим названием соединения (I) является (R)-3-метил-6-(2-((5-метил-2-(4-(трифторметил)фенил)-1H-имидазол-1-ил)метил)-фенокси)гексановая кислота. Получение соединения (I) описано в примере 2d WO2017/062468.

Существует необходимость в разработке способов применения соединений-агонистов PPAR δ , таких как соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль, например, для лечения пациентов, страдающих РММ.

Также существует необходимость в разработке фармацевтических композиций соединений-агонистов PPAR, таких как соединение (I) (или его фармацевтически приемлемая соль), в которых соединение-агонист PPAR является стабильным и может быть эффективно доставлено пациенту.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к способам применения агониста дельта-рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPAR δ) (например, соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль, раскрытые в настоящем документе), например, для лечения пациентов, имеющих первичные митохондриальные миопатии (РММ). Настоящее изобретение также предоставляет улучшенные фармацевтические композиции, включающие соединение-агонист PPAR δ , такое как соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль, и кроскармеллозу натрия. В частности, фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем документе, являются стабильными и подходят для медицинского применения. Фармацевтические композиции, раскрытые в настоящем документе, имеют превосходную скорость растворения с высокой стабильностью растворения, что соответствует требованиям клинического применения, а активный фармацевтический ингредиент достигает хорошей биодоступности *in vivo*.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена схема исследования примера 1. † До тех пор, пока не будет определен уровень дозы для части фазы 3, участник останется на уровне дозы части фазы 2. После определения уровня дозы выбранная доза исследуемого соединения (т.е. соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли) будет выдаваться со

следующего визита, включая внеплановый визит далее. ‡ Дополнительные уровни доз, такие как 50 мг и/или 125 мг, могут быть протестированы на основе новых фармакокинетических данных, полученных в группах с дозами 30 и 75 мг во время части фазы 2 исследования.

На фиг. 2 показана схема визита исследования примера 1. † До тех пор, пока не будет определен уровень дозы для части фазы 3, участник останется на уровне дозы части фазы 2. После определения уровня дозы части фазы 3 выбранная доза исследуемого соединения (т.е. соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли) будет выдаваться со следующего визита, включая внеплановый визит далее. § Выбранный уровень дозы исследуемого соединения (т.е. соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли) будет выдан. В зависимости от уровня дозы, выбранного для части фазы 3, может быть принят другой уровень дозы.

На фиг. 3А-3Е показано, как модуляция PPAR δ модулирует гены, регулирующие гомеостаз глюкозы и окисление жирных кислот в клетках, несущих митохондриальные мутации. Фибробласты пациентов, несущих митохондриальные мутации, относящиеся к синдрому Лея/LHON, MELAS, KSS и цибридной клеточной линии с нокаутной мутацией в MERRF, обрабатывали соединением (I) (Лея/LHON) в течение 24 или 48 часов (отдых). 3А) Регулятор глюкозы и ингибитор липопротеинлипазы ANGPTL4 в значительной степени индуцируется обработкой соединением (I) и используется в качестве маркера взаимодействия с мишенью. 3В) Активация транскрипции гена-консерватора глюкозы PDK4 наблюдалась в четырех протестированных клеточных линиях с увеличением в 10-100 раз. 3С-3Е) Гены, участвующие в импорте, упаковке и катаболизме жирных кислот в митохондрии для OXPHOS, активируются обработкой соединением (I) в четырех клеточных линиях с митохондриальными мутациями. Данные представляют собой коробчатые диаграммы, выражающие средние, минимальные и максимальные значения, статистический анализ, выполненный с использованием непарного t-критерия или однофакторного дисперсионного анализа * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Статистические данные рассчитывались и отображались при $n=3$ биологических повторах. Графики без отображаемых статистических данных отображают $n=2$ биологических повторов или не достигли значимости в $n=3$ группах.

На фиг. 4А и 4В показано, что несколько генетических вариантов фибробластов пациентов с РММ демонстрируют опосредованный жирными кислотами дефицит OXPHOS по сравнению с фибробластами здоровых пациентов, который улучшается при обработке соединением (I). 4А) Фибробласты пациентов с MELAS демонстрировали дефицит OXPHOS по сравнению с контрольными здоровыми донорами. Тенденция к врожденному OXPHOS, опосредованному жирными кислотами, наблюдается в других клетках РММ по сравнению с контрольной группой здоровых доноров, хотя вариабельность доноров и тяжесть заболевания заслуживают исследования большего количества фибробластов пациентов с РММ и фибробластов здоровых доноров. Фибробласты здоровых доноров были сопоставлены по возрасту и полу с их

сравнительным фибробластам РММ. 4В) Обработка соединением (I) увеличивала ОХРНOS жирных кислот при 3, 9 и 30 нМ. Данные представляют собой коробчатые диаграммы, выражающие средние, минимальные и максимальные значения, статистический анализ, выполненный с использованием непарного t-критерия или однофакторного дисперсионного анализа * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Статистические данные рассчитывались и отображались при $n=3$ биологических повторах. Графики без отображаемых статистических данных отображают $n=2$ биологических повторов

На фиг. 5А-5I показано, как фармакологическая модуляция PPAR δ улучшает результаты упражнений на выносливость у старых мышей с ожирением, вызванным диетой (DIO). Мышам-самцам с DIO (28 недель) вводили носитель или соединение (I) через пероральный зонд один раз в день в дозе 30 мг/кг после 5 недель лечения. 5А-5В) Анализ экспрессии генов четырехглавой мышцы для генов взаимодействия с мишенями Angptl4 и Pdk4 после 5 недель лечения ($n=10$ мышей). 5С-5Е) Анализ экспрессии генов четырехглавой мышцы на наличие PPAR δ -чувствительных генов FAO ($n=8$ животных). Конечные точки бега на выносливость частота падений (5F), количество посещений сетки (5G) и пройденная дистанция (5H). Объединение показателей бега дает представление об усталости животных с помощью индекса усталости (5I) ($n=10$ животных). Данные представляют собой коробчатые диаграммы, выражающие средние, минимальные и максимальные значения, статистический анализ, выполненный с использованием непарного t-критерия * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

На фиг. 6А-6Е показаны воздействие на ткани, состав тканей организма и дополнительные показатели активности у старых мышей с DIO, обработанных соединением (I). Мышам-самцам с DIO (28 недель) вводили носитель или соединение (I) через пероральный зонд один раз в день в дозе 30 мг/кг после 5 недель лечения. 6А) Воздействие соединения (I) на ткани при введении в икроножную мышцу. 6В-6С) Масса тела (г) и состав тканей организма. 6D-6Е) Измерения активности у животных, обработанных носителем, по сравнению с животными, обработанными соединением (I) ($n=10$ животных на группу лечения). Данные представляют собой коробчатые диаграммы, выражающие средние, минимальные и максимальные значения, статистический анализ, выполненный с использованием непарного t-критерия. Никаких статистически значимых различий между животными, получавшими носитель, и животными, получавшими соединение (I), не наблюдалось в составе тканей организма или произвольной активности.

На фиг. 7А-7С показано, как старые мыши с ожирением, вызванным диетой (DIO), демонстрируют повышенную утомляемость и снижение произвольной активности по сравнению со старыми животными, получавшими обычное питание. 7А) Индекс усталости. 28-недельные мыши с DIO демонстрировали повышенную утомляемость по сравнению с 28-недельными мышами, получавшими обычный корм. 7В-7С) Произвольная активность и вертикальная двигательная активность, определяемые как общее количество прерывания лучей по осям ху и z, соответственно. Мыши с DIO в возрасте 28 недель показали значительно меньшую активность, чем их сородичи, получавшие обычный корм

(n=10 животных на группу лечения). Данные представляют собой коробчатые диаграммы, выражающие средние, минимальные и максимальные значения, статистический анализ, выполненный с использованием однофакторного дисперсионного анализа *p<0,05, **p<0,01.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение предоставляет способы применения агониста дельта-рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом (PPAR δ) (например, соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль, раскрытые в настоящем документе), например, для лечения РММ. В частности, изобретение предоставляет безопасные и эффективные режимы дозирования агониста PPAR δ , такого как соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль, которые могут быть использованы для длительного лечения.

Настоящее изобретение также предоставляет улучшенные фармацевтические композиции, включающие соединение-агонист PPAR δ , например, соединение, раскрытое в WO2017/062468 или WO2018/067860. В некоторых вариантах осуществления изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, включающую соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль и кроскармеллозу натрия. В одном конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция включает гемисульфатную соль соединения (I).

В некоторых вариантах осуществления изобретение предоставляет способ лечения РММ, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, количества от примерно 30 мг до примерно 125 мг соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли в количестве, эквивалентном от примерно 30 мг до примерно 125 мг соединения (I) в день. Например, способ может включать введение соединения (I) в количестве от примерно 30 мг до примерно 75 мг в день, количестве от примерно 30 мг до примерно 50 мг в день, количестве от примерно 50 мг до примерно 125 мг в день, количестве от примерно 75 мг до примерно 125 мг в день, количестве от примерно 50 мг до примерно 75 мг в день или фармацевтически приемлемой соли соединения (I) в количестве, эквивалентном любому из вышеуказанных.

В некоторых вариантах осуществления соединения (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально.

В некоторых вариантах осуществления пациенту, нуждающемуся в этом, вводят гемисульфатную соль соединения (I).

В некоторых вариантах осуществления количество соединения (I) составляет 5 мг/день или количество его фармацевтически приемлемой соли в размере, эквивалентном 5 мг/день соединения (I).

В некоторых вариантах осуществления количество соединения (I) составляет 8 мг/день или количество его фармацевтически приемлемой соли в размере, эквивалентном 8 мг/день соединения (I).

В некоторых вариантах осуществления количество соединения (I) составляет 10 мг/день или количество его фармацевтически приемлемой соли в размере, эквивалентном

соединения (I) составляет 50-75 мг/день или количество его фармацевтически приемлемой соли в размере, эквивалентном 50-75 мг/день соединения (I).

В некоторых вариантах осуществления в способах лечения РММ количество соединения (I) составляет 75-100 мг/день или количество его фармацевтически приемлемой соли в размере, эквивалентном 75-100 мг/день соединения (I).

В некоторых вариантах осуществления в способах лечения РММ количество соединения (I) составляет 75-125 мг/день или количество его фармацевтически приемлемой соли в размере, эквивалентном 75-125 мг/день соединения (I).

В некоторых вариантах осуществления первичная митохондриальная миопатия представляет собой болезнь Альперса, хроническую прогрессирующую внешнюю офтальмоплегию (CPEO), синдром Кернса-Сейра (KSS), синдром истощения митохондриальной ДНК (MDS), наследственную оптическую невропатию Лебера (LHON), синдром Лея, митохондриальную энцефаломиопатию, лактат-ацидоз и инсультоподобные эпизоды (MELAS), митохондриальную неврогастроинтестинальную энцефаломиопатию (MNGIE), миоклоническую эпилепсию с рваными красными волокнами (MERRF), невропатию с атаксией и пигментным ретинитом (NARP), синдром Барта или синдром Пирсона.

В некоторых вариантах осуществления в способах лечения РММ пациент, нуждающийся в этом, предварительно получает лечение коэнзимом Q10 (CoQ10), карнитином, креатином или другими витаминами, направленными на митохондриальные заболевания, или дополнительной терапией.

В некоторых вариантах осуществления соединения (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 раз в каждую неделю. В некоторых вариантах осуществления соединения (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят непрерывно в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 5 недель, по меньшей мере 6 недель, по меньшей мере 7 недель или по меньшей мере 8 недель.

В некоторых вариантах осуществления соединения (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят непрерывно в течение по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 3 дней, по меньшей мере 4 дней, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 16 дней, по меньшей мере 17 дней, по меньшей мере 18 дней, по меньшей мере 19 дней, по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 21 дней, по меньшей мере 22 дней, по меньшей мере 23 дней, по меньшей мере 24 дней, по меньшей мере 25 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 35 дней, по меньшей мере 40 дней, по меньшей мере 45 дней или по меньшей мере 50 дней, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 5 недель, по меньшей мере 6 недель, по меньшей мере 7 недель, по меньшей мере 8 недель, по меньшей мере 9 недель,

по меньшей мере 10 недель, по меньшей мере 11 недель или по меньшей мере 12 недель.

В некоторых вариантах осуществления соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят с пищей. В некоторых вариантах осуществления соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят без еды. В некоторых вариантах осуществления, когда соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят без еды, пациент воздерживается от принятия пищи в течение 4 часов до введения (и по меньшей мере 1,5 часа после введения). В некоторых вариантах осуществления, когда соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят без еды, пациент воздерживается от принятия пищи в течение 6 часов до введения (и по меньшей мере 1,5 часа после введения). В некоторых вариантах осуществления, когда соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят без еды, пациент воздерживается от принятия пищи в течение 8 часов до введения (и по меньшей мере 1,5 часа после введения). В некоторых вариантах осуществления, когда соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят без еды, пациент воздерживается от принятия пищи в течение 10 часов до введения (и по меньшей мере 1,5 часа после введения).

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемые соли, описанные в настоящем документе, полезны в качестве активных фармацевтических ингредиентов (API), а также веществ для получения фармацевтических композиций, которые включают один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов и подходят для введения субъекту-человеку.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение фармацевтической композиции, включающей соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль и кроскармеллозу натрия. В одном конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция включает гемисульфатную соль соединения (I).

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение фармацевтической композиции, включающей соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль, где массовый процент кроскармеллозы натрия по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет от примерно 0,1% до примерно 20%. Например, массовый процент кроскармеллозы натрия по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет от примерно 0,5% до примерно 10%, от примерно 1% до примерно 15%, от примерно 5% до примерно 10%, от примерно 5% до примерно 15%, от примерно 10% до примерно 15%, от примерно 10% до примерно 20%, от примерно 12% до примерно 20% или от примерно 15% до примерно 20%.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение фармацевтической композиции, включающей соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль (например, гемисульфатная соль), где фармацевтическая композиция включает моногидрат лактозы, микрокристаллическую целлюлозу, кроскармеллозу натрия, гидроксипропилцеллюлозу и стеарат магния.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение фармацевтической композиции, включающей нижеследующие компоненты, и массовый

процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	12-17%
моногидрат лактозы	55-65%
микрористаллическая целлюлоза	5-15%
кроскармеллоза натрия	8-13%
гидроксипропилцеллюлоза	2-5%
стеарат магния	1-3%.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение фармацевтической композиции, включающей нижеследующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	5-8%
моногидрат лактозы	65-72%
микрористаллическая целлюлоза	5-15%
кроскармеллоза натрия	8-13%
гидроксипропилцеллюлоза	2-5%
стеарат магния	1-3%.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение фармацевтической композиции, включающей нижеследующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	2-4%
моногидрат лактозы	69-74%
микрористаллическая целлюлоза	5-15%
кроскармеллоза натрия	8-13%
гидроксипропилцеллюлоза	2-5%
стеарат магния	1-3%.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение фармацевтической композиции, дополнительно включающей пленкообразователь, и массовый процент пленкообразователя по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет 2-4%.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение фармацевтической композиции, включающей нижеследующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	15,4%
моногидрат лактозы	59,1%
микrokристаллическая целлюлоза	10%
кроскармеллоза натрия	10%
гидроксипропилцеллюлоза	3%
стеарат магния	2,5%.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение фармацевтической композиции, включающей нижеследующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	6,1%
моногидрат лактозы	68,4%
микrokристаллическая целлюлоза	10%
кроскармеллоза натрия	10%
гидроксипропилцеллюлоза	3%
стеарат магния	2,5%.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение фармацевтической композиции, включающей нижеследующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	3,1%
моногидрат лактозы	71,4%
микrokристаллическая целлюлоза	10%
кроскармеллоза натрия	10%
гидроксипропилцеллюлоза	3%
стеарат магния	2,5%.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение фармацевтической композиции, включающей нижеследующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	12-17%
моногидрат лактозы	53-61%
микrokристаллическая целлюлоза	8-13%
кроскармеллоза натрия	8-13%
гидроксипропилцеллюлоза	2-4%

стеарат магния	2-3%
пленкообразователь	2-4%.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение фармацевтической композиции, включающей нижеследующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	5-7%
моногидрат лактозы	64-69%
микrokристаллическая целлюлоза	8-13%
кроскармеллоза натрия	8-13%
гидроксипропилцеллюлоза	2-4%
стеарат магния	2-3%
пленкообразователь	2-4%.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение фармацевтической композиции, включающей нижеследующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	2-4%
моногидрат лактозы	67-72%
микrokристаллическая целлюлоза	8-13%
кроскармеллоза натрия	8-13%
гидроксипропилцеллюлоза	2-4%
стеарат магния	2-3%
пленкообразователь	2-4%.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение фармацевтической композиции, включающей нижеследующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	14,9%
моногидрат лактозы	57,4%
микrokристаллическая целлюлоза	9,7%
кроскармеллоза натрия	9,7%
гидроксипропилцеллюлоза	2,9%
стеарат магния	2,4%
пленкообразователь	2,9%.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение

фармацевтической композиции, включающей нижеследующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	6,0%
моногидрат лактозы	66,4%
микрокристаллическая целлюлоза	9,7%
кроскармеллоза натрия	9,7%
гидроксипропилцеллюлоза	2,9%
стеарат магния	2,4%
пленкообразователь	2,9%.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение фармацевтической композиции, включающей нижеследующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	3,0%
моногидрат лактозы	69,3%
микрокристаллическая целлюлоза	9,7%
кроскармеллоза натрия	9,7%
гидроксипропилцеллюлоза	2,9%
стеарат магния	2,4%
пленкообразователь	2,9%.

Фармацевтические композиции для применения в способах по настоящему изобретению могут быть получены с использованием различных фармацевтических добавок по желанию, при условии, что достигаются эффекты, описанные в настоящем описании. Фармацевтические добавки особо не ограничены, при условии, что каждая из них является фармацевтически приемлемой и фармакологически приемлемой. Например, может быть использован один или несколько из эксципиента, связующего, подкислителя, пенообразователя, подсластителя, вкусоароматического вещества, скользящего вещества, красителя, антиоксиданта, поверхностно-активного вещества, флюидизатора или тому подобного.

Примеры эксципиента включают, но не ограничиваются ими, сахарные спирты, такие как D-маннит, D-сорбит, эритрит, ксилит и тому подобное; сахара, такие как крахмал, лактоза, сахароза, декстран (например, декстран 40), глюкоза и тому подобное; и другие, такие как гуммиарабик, пуллулан, синтетический силикат алюминия, алюмометасиликат магния, микрокристаллическая целлюлоза, и тому подобное. Примеры связующего включают, но не ограничиваются ими, гуммиарабик, гипромеллозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксиэтилцеллюлозу, и тому подобное. Примеры подкислителя включают, но не ограничиваются ими, винную кислоту, яблочную кислоту

и тому подобное. Примеры пенообразователя включают, но не ограничиваются ими, бикарбонат натрия и тому подобное. Примеры подсластителя включают, но не ограничиваются ими, натриевый сахарин, дикалия глицирризинат, аспартам, стевию, тауматин и тому подобное. Примеры вкусоароматического вещества включают, но не ограничиваются ими, лимон, апельсин, ментол и тому подобное. Примеры скользящего вещества включают, но не ограничиваются ими, стеарат магния, стеарат кальция, стеарилфумарат натрия, тальк и тому подобное. Примеры красителя включают, но не ограничиваются ими, желтый оксид железа, красный оксид железа, оксид феррософфера и тому подобное. Примеры антиоксиданта включают, но не ограничиваются ими, аскорбиновую кислоту, токоферол, дибутилгидрокситолуол и тому подобное. Примеры поверхностно-активного вещества включают, но не ограничиваются ими, полисорбат 80, полиоксиэтиленгидрогенизированное касторовое масло и тому подобное. Примеры флюидизатора включают, но не ограничиваются ими, легкую безводную кремниевую кислоту и тому подобное. Эти и другие фармацевтические добавки можно добавлять по отдельности или в комбинации из двух или более в соответствующих количествах.

Пленочное покрытие представляет собой тонкое покрытие на полимерной основе, которое необязательно наносится на твердую фармацевтическую лекарственную форму, например таблетку. В одном варианте осуществления фармацевтической композиции подходящей для применения в способах, раскрытых в настоящем документе, пленкообразователь инкапсулирует остальные компоненты. Пленкообразователь обычно содержит полимер, пластификатор, краситель, скользящее вещество, вкусоароматическое вещество и/или модификатор вязкости.

Полимер, используемый в пленкообразователе, может представлять собой, но не ограничивается ими:

- целлюлозный полимер (такой как гидроксипропилметилцеллюлоза (НРМС), гидроксипропилцеллюлоза (НРС)).
- винил, такой как поливиниловый спирт
- сополимер поливинилового спирта, акриловой кислоты и метилметакрилата

Пластификатор, используемый в пленкообразователе, может представлять собой, но не ограничивается ими:

- многоатомный спирт, такой как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль (ПЭГ), или глицерин
- сложный эфир ацетата, такой как триацетин (триацетат глицерина) или триэтилцитрат (ТЕС)
- глицериды, такие как ацетилованные моноглицериды
- масло, такое как минеральное масло или растительные масла

Краситель, используемый в пленкообразователе, может представлять собой, но не ограничивается ими:

- водонерастворимые лаки: такие как индигокармин, тартразин, красный очаровательный и хинолиновый желтый (также могут использоваться водорастворимые

красители тех же цветов)

- неорганические пигменты: диоксид титана, оксид железа (желтый), оксид железа (красный), оксид ферросферроферата и перламутровые пигменты (содержащие слюду).

- натуральный краситель: включая овощной сок, каротиноиды и куркуму

Скользкое вещество, используемое в пленкообразователе, может представлять собой, но не ограничивается ими:

- тальк
- воски, такие как карнаубский воск
- стеараты

Вкусоароматическое вещество, используемое в пленкообразователе, может представлять собой, но не ограничивается ими:

- подсластитель, который может быть натуральным или искусственным высокой интенсивности (например, сукралоза)

- натуральное или искусственное вкусоароматическое вещество, такое как мята, ваниль или ягоды

Модификатор вязкости, используемый в пленкообразователе, может представлять собой, но не ограничивается ими:

- углеводы, такие как лактоза, полидекстроза или крахмал
- камедь, такую как аравийская или ксантановая камедь

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция, пригодная для применения способами, раскрытыми в настоящем документе, предназначена для перорального введения. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция находится в форме таблетки, необязательно, таблетки, покрытой пленочной оболочкой. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция, раскрытая в настоящем документе, находится в форме капсулы, гранулы(ов) или порошка.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к таблетке с пленочным покрытием, включающей фармацевтическую композицию, раскрытую в настоящем документе.

В настоящее изобретение включены фармацевтически приемлемые соли соединений, раскрытых в настоящем документе. Раскрытые соединения имеют основные аминогруппы и, следовательно, могут образовывать фармацевтически приемлемые соли с фармацевтически приемлемой кислотой(кислотами). Подходящие фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли соединений, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, соли неорганических кислот (таких как хлористоводородная кислота, бромистоводородная, фосфорная, азотная и серная кислоты) и органических кислот (таких как, например, уксусная кислота, бензолсульфоновая, бензойная, метансульфоновая и п-толуолсульфоновая кислоты). Например, в одном варианте осуществления, кислотно-аддитивная соль представляет собой гемисульфатную соль. Соединения настоящего изобретения с кислотными группами, такими как карбоновые кислоты, могут образовывать фармацевтически приемлемые соли с

фармацевтически приемлемым основанием(основаниями). Подходящие фармацевтически приемлемые основные соли включают, но не ограничиваются ими, соли аммония, соли щелочных металлов (такие как соли натрия и калия), соли щелочноземельных металлов (такие как соли магния и кальция) и соли органических оснований (такие как соль меглюмина).

Как используется в настоящем документе, термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к фармацевтическим солям, которые в рамках здравого медицинского суждения подходят для использования в контакте с тканями человека и низших животных без чрезмерной токсичности, раздражения и аллергической реакции, и соизмеримы с разумным отношением польза/риск. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области. Например, S. M. Berge, *et al.* описывают фармакологически приемлемые соли в *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66:1-19.

Нейтральные формы соединений для применения в способах по изобретению регенерируют из соответствующих солей путем контактирования соли с основанием или кислотой и выделения исходного соединения обычным способом. Исходная форма соединения может отличаться от различных форм соли определенными физическими свойствами, такими как растворимость в полярных растворителях. Нейтральные формы соединений, раскрытые в настоящем документе, также включены в способы по изобретению.

В настоящем документе термин «лечить», «лечение» или «терапия», когда он используется в связи с расстройством или состоянием, включает любой эффект, например, уменьшение, облегчение, модуляцию и/или улучшение одного или нескольких симптомов или прогрессирование заболевания; или который приводит к улучшению расстройства или состояния. Улучшение или уменьшение тяжести любого симптома расстройства или состояния можно легко оценить в соответствии со стандартными способами и методиками, известными в данной области.

Раскрыты способы лечения PPAR δ -опосредованного заболевания или состояния у субъекта. Способы могут включать введение субъекту терапевтически эффективного количества одной или нескольких композиций, представленных в настоящем документе.

В одном варианте осуществления PPAR δ -опосредованное заболевание представляет собой митохондриальное заболевание. Примеры митохондриальных заболеваний включают, но не ограничиваются ими, первичную митохондриальную миопатию или первичные митохондриальные миопатии (обе обозначаются сокращенно РММ), болезнь Альперса, СРЕО-хроническую прогрессирующую внешнюю офтальмоплегию, синдром Кернса-Сейра (KSS), наследственную оптическую невропатию Лебера (LHON), MELAS-митохондриальную миопатию, энцефаломиопатию, лактат-ацидоз и инсультоподобные эпизоды, MERRF-миоклоническую эпилепсию и заболевание с рваными красными волокнами, NARP-неврогенную мышечную слабость, атаксию, и пигментный ретинит, и синдром Пирсона.

В других вариантах осуществления PPAR δ -опосредованное заболевание

представляет собой сосудистое заболевание (например, сердечно-сосудистое заболевание или любое заболевание, при котором было бы полезно увеличить васкуляризацию в тканях с нарушенным или недостаточным кровообращением). В других вариантах осуществления PPAR δ -опосредованное заболевание представляет собой мышечное заболевание, такое как мышечная дистрофия. Примеры мышечной дистрофии включают, но не ограничиваются ими, мышечную дистрофию Дюшенна, мышечную дистрофию Беккера, конечностно-поясную мышечную дистрофию, врожденную мышечную дистрофию, фациоскапулохумеральную мышечную дистрофию, миотоническую мышечную дистрофию, окулофарингеальную мышечную дистрофию, дистальную мышечную дистрофию и мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса.

В некоторых вариантах осуществления PPAR δ -опосредованное заболевание или состояние представляет собой демиелинизирующее заболевание, такое как рассеянный склероз, болезнь Шарко-Мари-Тута, болезнь Пелицеуса-Мерцбахера, энцефаломиелит, оптиконевромиелит, адренолейкодистрофию или синдром Гийена-Барре.

В других вариантах осуществления PPAR δ -опосредованное заболевание представляет собой метаболическое заболевание. Примеры метаболических заболеваний включают, но не ограничиваются ими, ожирение, гипертриглицеридемию, гиперлипидемию, гипоальфалипопротеинемию, гиперхолестеринемию, дислипидемию, синдром X и сахарный диабет II типа.

В других вариантах осуществления PPAR δ -опосредованное заболевание представляет собой нарушение мышечной структуры. Примеры нарушений мышечной структуры включают, но не ограничиваются ими, миопатию Бетлема, болезнь центрального стержня, врожденную диспропорцию волокнистого типа, дистальную мышечную дистрофию (MD), мышечную дистрофию Дюшена-Беккера, мышечную дистрофию Эмери-Дрейфуса, фациоскапулохумеральную мышечную дистрофию, миопатию гиалиновых телец, конечностно-поясную мышечную дистрофию, нарушение функции натриевых каналов в мышцах, хондродистрофическую миотонию, миотоническую дистрофию, миотубулярную миопатию, болезнь немалиновых тел, окулофарингеальную мышечную дистрофию и недержание мочи при напряжении.

В других вариантах осуществления, PPAR δ -опосредованное заболевание представляет собой нарушение активации нейронов. Примеры нарушений активации нейронов включают, но не ограничиваются ими, боковой амиотрофический склероз, болезнь Шарко-Мари-Тута, синдром Гийена - Барре, синдром Ламберта-Итона, рассеянный склероз, болезнь Паркинсона, миастения гравис, поражение нерва, периферическая невропатия, спинно-мышечная атрофия, поздний паралич локтевого нерва, (травматическое) повреждение спинного мозга или головного мозга, (тяжелая) ожоговая травма и токсическое мионевральное расстройство.

В других вариантах осуществления PPAR δ -опосредованное заболевание представляет собой расстройство, связанное с мышечной усталостью. Примеры расстройств, связанных с мышечной усталостью, включают, но не ограничиваются ими,

миалгический энцефаломиелит/синдром хронической усталости (ME/CFS), диабет (тип I или II), нарушение отложения гликогена, фибромиалгию, атаксию Фридрейха, перемежающуюся хромоту, миопатию, обусловленную накоплением липидов, MELAS, мукополисахаридоз, болезнь Помпе и тиреотоксическую миопатию.

В некоторых вариантах осуществления PPAR δ -опосредованное заболевание представляет собой нарушение мышечной массы. Примеры нарушений мышечной массы включают, но не ограничиваются ими, кахексию, дегенерацию хряща, церебральный паралич, компартмент-синдром, миопатию критических состояний, миозит с включениями, мышечную атрофию (дисфункциональная), саркопению, стероидную миопатию и системную красную волчанку.

В других вариантах осуществления PPAR δ -опосредованное заболевание представляет собой нарушение бета-окисления. Примеры нарушений бета-окисления включают, но не ограничиваются ими, системный переносчик карнитина, дефицит карнитин-пальмитоилтрансферазы (CPT) II, дефицит очень длинноцепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы (LCHAD или VLCAD), дефицит трехфункциональных ферментов, дефицит среднецепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы (MCAD), дефицит короткоцепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы (SCAD) и рибофлавин-зависимые нарушения β -окисления (RR-MADD).

В некоторых вариантах осуществления PPAR δ -опосредованное заболевание представляет собой сосудистое заболевание. Примеры сосудистых заболеваний включают, но не ограничиваются ими, функциональную недостаточность периферических сосудов, заболевание периферических сосудов, перемежающуюся хромоту, заболевание периферических сосудов (PVD), заболевание периферических артерий (PAD), окклюзионное заболевание периферических артерий (PAOD) и заболевание периферических кровеносных сосудов.

В других вариантах осуществления PPAR δ -опосредованное заболевание представляет собой сосудистое заболевание глаз. Примеры сосудистых заболеваний глаз включают, но не ограничиваются ими, (сухую/влажную) возрастную макулярную дегенерацию (AMD), болезнь Штаргардта, гипертоническую ретинопатию, диабетическую ретинопатию, ретинопатию, дегенерацию желтого пятна, кровоизлияние в сетчатку и глаукому.

В других вариантах осуществления, PPAR δ -опосредованное заболевание представляет собой болезнь мышц глаза. Примеры болезней мышц глаза включают, но не ограничиваются ими, страбизм (косоглазие/блуждающий глаз/расходящееся косоглазие офтальмопарез), прогрессирующую внешнюю офтальмоплегию, эзотропию, экзотропию, нарушение рефракции и аккомодации, дальновзоркость, близорукость, астигматизм, анизетропию, пресбиопию, расстройство аккомодации или внутреннюю офтальмоплегию.

В других вариантах осуществления, PPAR δ -опосредованное заболевание представляет собой метаболическое заболевание. Примеры метаболических заболеваний

включают, но не ограничиваются ими, гиперлипидемию, дислипидемию, гиперхолестеринемию, гипертриглицеридемию, гипохолестеринемию HDL, гиперхолестеринемию LDL и/или нехолестеринемию HDL, гиперпротеинемию VLDL, дислипопротеинемию, гипопроотеинемию аполипопротеина А-I, атеросклероз, артериосклероз, заболевания сердечно-сосудистой системы, цереброваскулярное заболевание, заболевание периферического кровообращения, метаболический синдром, синдром X, ожирение, диабет (тип I или II), гипергликемию, инсулинорезистентность, нарушение толерантности к глюкозе, гиперинсулинизм, диабетические осложнения, сердечную недостаточность, инфаркт миокарда, кардиомиопатию, гипертензию, легочная артериальную гипертензию (ПАН), первичный билиарный холангит (РВС), неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD), неалкогольный стеатогепатит (NASH), тромб, болезнь Альцгеймера, нейродегенеративное заболевание, демиелинизирующее заболевание, рассеянный склероз, лейкодистрофия надпочечников, дерматит, псориаз, акне, старение кожи, трихоз, воспаление, артрит, астму, синдром гиперчувствительного кишечника, язвенный колит, болезнь Крона и панкреатит.

В других вариантах осуществления, PPAR δ -опосредованное заболевание представляет собой рак. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, рак толстой кишки, ободочной кишки, кожи, молочной железы, простаты, яичников и/или легкого.

В других вариантах осуществления PPAR δ -опосредованное заболевание представляет собой ишемическое поражение. Примеры ишемических поражений включают, но не ограничиваются ими, сердечную ишемию, такую как инфаркт миокарда; ишемию головного мозга (например, острый ишемический инсульт); хроническую ишемию головного мозга, такую как сосудистая деменция; и транзиторную ишемическую атаку (ТИА); ишемию кишечника, такую как ишемический колит; ишемию конечностей, такую как острая ишемия рук или ног; подкожную ишемию, такую как цианоз или гангрена; и ишемическое повреждение органа, такое как ишемическое повреждение почек (IRI).

В других вариантах осуществления, PPAR δ -опосредованное заболевание представляет собой заболевание почек. Примеры заболеваний почек включают, но не ограничиваются ими, гломерулонефрит, гломерулосклероз, нефротический синдром, гипертонический нефросклероз, острый нефрит, рецидивирующую гематурию, персистирующую гематурию, хронический нефрит, быстро прогрессирующий нефрит, острое повреждение почек (также известное как острая почечная недостаточность), хроническую почечную недостаточность, диабетическую нефропатию или синдром Барттера. В WO/2014/165827, включенной в настоящий документ посредством ссылки, показано, что генетическая и фармакологическая активация PPAR δ способствует регенерации мышц в мышинной модели острой термической травмы. Соответственно, также предусмотрено применение PPAR δ в качестве терапевтической мишени для повышения регенеративной эффективности скелетных мышц.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение раскрывает способ

лечения мышечной дистрофии Дюшенна, где способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества фармацевтической композиции, раскрытой в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение раскрывает способ лечения первичной митохондриальной миопатии или первичных митохондриальных миопатий (PMM), где способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества фармацевтической композиции, раскрытой в настоящем документе. В конкретном варианте осуществления первичная митохондриальная миопатия представляет собой болезнь Альперса, хроническую прогрессирующую внешнюю офтальмоплегию (CPEO), синдром Кернса-Сейра (KSS), синдром истощения митохондриальной ДНК (MDS), наследственную оптическую невропатию Лебера (LHON), синдром Лея, митохондриальную энцефаломиопатию, лактат-ацидоз и инсультоподобные эпизоды (MELAS), митохондриальную неврогастроинтестинальную энцефаломиопатию (MNGIE), миоклоническую эпилепсию с рваными красными волокнами (MERRF), невропатию с атаксией и пигментным ретинитом (NARP), синдром Барта или синдром Пирсона.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение раскрывает способ лечения сниженного максимального поглощения кислорода из-за плохой системной экстракции кислорода, где способ включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества фармацевтических композиций, раскрытых в настоящем документе. В одном конкретном варианте осуществления пациент страдает от миалгического энцефаломиелита/синдрома хронической усталости.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение раскрывает способ лечения заболевания, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества фармацевтической композиции, раскрытой в настоящем документе, где заболевание представляет собой легочную артериальную гипертензию (PAH), сухую возрастную макулярную дегенерацию (сухую ВМД), боковой амиотрофический склероз (ALS), первичный билиарный холангит (PBC), болезнь Паркинсона, травматическое повреждение спинного мозга/головного мозга, тяжелую ожоговую травму, мышечную дистрофию Беккера, конечностно-поясную мышечную дистрофию, фациоскапулохумеральную мышечную дистрофию или миалгический энцефаломиелит/синдром хронической усталости (ME/CFS).

ДЕТАЛИ ЭКСПЕРИМЕНТА

Получение клеточных линий PMM

Клетки синдрома Лея/наследственной оптической невропатии Лебера (LHON) выделяли от пациента, у которого были диагностированы и синдром Лея и LHON. У этого пациента было две точечные мутации: одна в мтДНК-кодируемом гене *ND4* (мутация 11778G>A) и одна в мтДНК-кодируемом гене *ND6* (мутация 14484T>C) в комплексе NADH-дегидрогеназы. m.3243A>G Клетки MELAS (митохондриальную энцефаломиопатию, лактат-ацидоз и инсультоподобные эпизоды) выделяли от пациента,

имеющего мутацию m.3243A>G в мтДНК-кодируемом гене тРНК-лейцина. Клетки фибробластов синдрома Кернса-Сейра (KSS) выделяли от пациента, имеющего общую делецию 5 тысяч нуклеотидов (Kb), и были получены из Coriell Institute вместе с контрольной линией клеток фибробластов. Трансмитохондриальные цбриды остеосаркомы MERRF m.8344A>G получены в лаборатории Moraes lab (Masucci, J.P., M.P. Schon Ea Fau - King, and M.P. King, *Point mutations in the mitochondrial tRNA(Lys) gene: implications for pathogenesis and mechanism.* (0300-8177)).

Культура клеток:

Фибробласты MELAS m.3243A>G выращивали в минимальной эссенциальной среде Игла (EMEM), дополненной 10% инактивированной нагреванием FBS, 1 mM пирувата натрия, 1x заменимой аминокислоты, 2 mM l-глутамина и 100 мкг/мл уридина. Фибробласты KSS выращивали в среде EMEM, дополненной 15% инактивированной нагреванием FBS, 1x заменимых аминокислот и 100 мкг/мл уридина. Клеточные линии фибробластов синдрома Лея/LHON выращивали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с добавлением 1 mM пирувата натрия, 10% HI FBS и 100 мкг/мл уридина. Цбридные клетки MERRF тРНК-LYS 8344 выращивали в DMEM с добавлением 10% инактивированного нагреванием FBS, 1 mM пирувата натрия и 100 мкг/мл уридина.

Все клеточные линии, за исключением фибробластов LHON/синдрома Лея, высевали с плотностью 50 тыс./лунку в 6-луночные планшеты. Соединение (I) или 0,1% DMSO добавляли через 8 часов в полную среду. Обрабатывающие среды или носитель обновляли через 24 часа, общее время обработки составляло 48 часов. Фибробласты LHON/синдрома Лея высевали на чашки и обрабатывали таким же образом, но в течение общего времени обработки 24 часа.

Выделение РНК и обратная транскрипция

мТотальную РНК выделяли с использованием наборов NucleoSpin® (Macherey-Nagel) согласно протоколу производителя. Один микрограмм тотальной РНК использовали для создания кДНК с использованием набора High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems).

Анализ экспрессии генов

Экспрессия генов фибробластов MELAS m.3243A>G, фибробластов KSS и цбрида MERRF тРНК-Lys 8344 осуществляли с использованием 5 нг кДНК и 300 нМ праймеров, которые смешивали с водой и мастер-миксом iQ SYBR Green, загружали в 384-луночные qPCR-планшеты и затем анализировали с помощью системы детекции ПЦР в реальном времени BioRad CFX384. Кратное изменение рассчитывали как ΔCt для каждого образца и рассчитывали как Ct (интересующий ген) - Ct (среднее значение референсных генов). Затем $\Delta\Delta Ct$ рассчитывали как ΔCt (экспериментальный образец) - среднее ΔCt (контрольная группа). Кратное изменение рассчитывали как $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

кДНК фибробластов LHON/синдрома Лея смешивали с dH₂O и мастер-миксом SYBR Green и 1 мкМ мкМ праймеров распределяли в планшеты с образцами-источниками

и планшеты с праймерами-источниками в 384-луночных планшетах, соответственно. Реакции загружали в SmartChip (WaferGen Bio-systems) с помощью Multisample Nanodispenser и чип анализировали в SmartChip Cycler.

Необработанные данные об экспрессии экспортировали из программного обеспечения и отображали на графике после обработки референсными генами и нормализовали по отношению к контролю с использованием программного обеспечения QBase. Для получения нормализованных значений значения калиброванных нормализованных относительных количеств (CNRQ) каждого образца делили на среднее значение CNRQ для всех образцов, обработанных носителем, чтобы получить экспрессию относительно контрольной группы.

Определение гетероплазии в клетках фибробластов MELAS M.3243A>G и цибрида MERRF тРНК-LYS 8344

Уровень варианта M.3243A>G определяли, как описано ранее у Grady, J.P., et al., *mtDNA heteroplasmy level and copy number indicate disease burden in m.3243A>G mitochondrial disease*. LID - e8262. (1757-4684). Чтобы получить стандартную кривую для соотношений известных ДНК дикого типа (WT) и мутантной (mut) ДНК, последовательности тРНК-Lys 8344 WT и mut измеряли в контрольных линиях клеток цибрида, о которых известно, что они содержат 100% ДНК WT и 100% mut ДНК. ДНК выделяли из цибридных культур с использованием набора для выделения ДНК NucleoSpin®, количественно определяли и смешивали в различных соотношениях (100/0, 80/20, 60/40, 50/50, 40/60, 20/80 и 0/100 WT:mut ДНК) с тотальной ДНК на реакцию 5 нг+50 нг ДНК спермы лосося. ДНК неизвестной цибридной линии MERRF тРНК-LYS 8344 выделяли и добавляли 5 нг ДНК для каждой ПЦР-реакции. Реакционная смесь для ПЦР была следующей: 1 супермикс универсальных зондов SsoAdvanced, зонд WT 250 нМ, зонд mut 250 нМ, по 250 нМ каждого прямого и обратного праймеров и 50 нг ДНК спермы лосося. Протокол кПЦР: 95°C в течение 3 мин, 95°C в течение 10 сек, затем 50°C в течение 30 сек (40х циклов), 95°C в течение 10 сек, кривая плавления от 65°C до 95°C с интервалом 5 секунд. На образцах проводили кПЦР на основе зонда, а изменение значения WT-mut Ct наносили на график с помощью линейной регрессии и анализировали R². Процент гетероплазии рассчитывали на основе линейной регрессии, рассчитанной на основе линейной регрессии стандартов.

Анализ окисления митохондриальных жирных кислот с помощью рестриометрии высокого разрешения

Клетки LHON/Лея обрабатывали DMSO или соединением (I) в полной среде с добавлением 0,5 мМ карнитина в течение 24 часов перед анализом. Обработанные клетки трипсинизировали, собирали в буфере Кребса-Хенселейта (КНВ) и осаждали центрифугованием.

Опосредованный пальмитатом OXPHOS измеряли с использованием Oxygraph-2k (Oroboros Instruments). Клетки (1×10^6) в КНВ загружали в каждую камеру с 250 мкМ BSA или BSA-конъюгированным пальмитатом. КНВ добавляли для достижения конечного

объема 2 мл. Дыхание измеряли при 37°C, как описано ранее у Zhang, Z., et al., *Primary respiratory chain disease causes tissue-specific dysregulation of the global transcriptome and nutrient-sensing signaling network*. (1932-6203). Вкратце, клетки, обработанные BSA и BSA-конъюгированным пальмитатом, анализировали одновременно в двух отдельных камерах. После установления основного (привычного) дыхания к различным комплексам добавляли ингибиторы в следующем порядке: олигомицин в конечной концентрации 2 мкг/мл для ингибирования АТФ-синтазы (Комплекс V, состояние LEAK), разобщающий агент FCCP (карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразон) со ступенчатым титрованием с шагом повышения дозы от 2,5 до 1,5 мкМ (максимальная дыхательная способность), ротенон в конечной концентрации 0,5 мкМ для ингибирования Комплекса I и, наконец, антимицин А для ингибирования Комплекса III в конечной концентрации 2,5 мкМ.

Данные анализировали с использованием программного обеспечения DatLab6. Данные представлены в пикомолях молекулярного кислорода в секунду на миллион клеток. Значения максимального дыхания (максимальной дыхательной способности цепи/системы переноса электронов) образцов BSA-пальмитата после добавления FCCP делили на значения максимального дыхания образца, содержащего только BSA. Немитохондриальное дыхание измеряли после последовательного добавления ротенона и антимицина А (ROX, остаточное потребление кислорода, фон) и вычитали из значений максимального дыхания. Такое соотношение BSA-пальмитата и BSA обеспечивает кратное увеличение потребления кислорода за счет окисления пальмитата.

Окисление митохондриальных жирных кислот морского конька

FAO измеряли с помощью Seahorse XF96 (Seahorse Biosciences). Фибробласты MELAS m.3243A>G, фибробласты KSS и цибриды MERRF tPHK-Lys 8344 обрабатывали DMSO или соединением (I) через 8 часов после посева в колбы. Через 24 часа после первоначальной обработки среду меняли на полную среду с DMSO или соединением (I) с пониженным содержанием глюкозы (1,1 мМ для первичных фибробластов и 5,5 мМ для цибридов) и 0,5 мМ карнитина. Через 48 часов после первоначальной обработки клетки высевали в 96-луночные микропланшеты для клеточных культур с плотностью 40000 клеток на лунку. Анализ FAO начинали через 8 часов после посева.

В холостые лунки добавляли 200 мкл КНВ и в соответствующие лунки добавляли 200 мкл КНВ, смешанного с контрольным BSA (конечное 0,074 мМ) или BSA-пальмитатом (конечное 0,074 мМ BSA, 500 мкМ пальмитата. Соединения компонентов стресс-теста добавляли в следующем последовательном порядке; 1) олигомицин, 2) FCCP и 3) ротенон и антимицин А для конечных концентраций 2,5 мкМ, 6 мкМ и 1 мкМ, соответственно. Окисление пальмитата оценивали с использованием того же соотношения, что и для фибробластов LHON/Лея.

Принудительный бег с истощением у старых мышей DIO:

Все исследования на животных проводили в соответствии с протоколами защиты животных Charles River Laboratories. Самцов мышей C57BL/6NTac с ожирением,

вызванным диетой (DIO), в возрасте 28 недель кормили пищей с высоким содержанием жиров. 20 мышей были рандомизированы в зависимости от массы тела на две группы по 10 мышей в каждой. Пять мышей были отнесены в каждую группу лечения в каждой когорте (i) носителя или (ii) соединения (I) в дозе 30 мг/кг (всего n=10 животных на обработку). Группам вводили дозы перорально через желудочный зонд один раз в день в течение 45 дней в начале темнового цикла. Мышей акклиматизировали к беговой дорожке в течение одного часа в дни тренировок или бега на выносливость. После первоначального 5-минутного периода исследования лента беговой дорожки двигалась со скоростью 5 м/мин в течение 10 минут, при этом интенсивность мотивационной сетки была установлена на 0,46 мА. Мышам потребовалось несколько посещений сетки, чтобы научиться ходить/бегать по движущейся ленте и избегать поражения электрическим током. После двух периодов акклиматизации мыши научились избегать электрической сетки и оставаться на движущейся ленте, реже попадая на электрическую сетку. Максимальная скорость бега на выносливость была ограничена 16,5 м/мин на основании скоростных акклиматизирующих забегов, что представляет собой скорость, с которой 25% животных бегут в верхней $\frac{2}{3}$ беговой дорожки под углом 5°. Мыши считались истощенными, если они оставались на электрической сетке без конечностей на ремне беговой дорожки в течение 10 секунд.

Выносливость рассчитывали как индекс усталости; это учитывает пройденное расстояние, время на беговой дорожке, количество перерывов в беге и продолжительность этих перерывов. Совокупное количество стимуляций для отдельных животных наносили на график с течением времени и рассчитывали площадь под кривой (AUC). AUC делили на расстояние, пройденное отдельными животными в ходе утомительного бега, для получения индекса усталости. Произвольную активность определяли как общее количество прерываний лазерного луча по осям X и Y, а вертикальную двигательную активность определяли как общее количество прерываний по оси Z на группу лечения.

Сбор тканей

До и после утомительного бега образцы крови брали через разрез хвостовой вены. В конце исследования (день 45) после эвтаназии CO₂ собирали цельную кровь, а также икроножные и четырехглавые скелетные мышцы.

Статистический анализ

Данные анализировали в программном обеспечении Graph Pad Prism версии 7.3. Если образцы были нормально распределены, их анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим апостериорным критерием Даннетта в сравнении с контрольными клетками DMSO или непарным двусторонним t-критерием. Если образцы не были распределены нормально, то использовали критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна против DMSO или критерий Манна-Уитни; если не указано иное.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры предназначены для иллюстрации и никоим образом не

ограничивают объем изобретения.

Таблица 1

	Пр. 1	Пр. 2	Пр. 3
Гемисульфатная соль соединения (I) (мг)	27,65	11,06	5,53
Моногидрат лактозы (мг)	106,45	123,04	128,57
Гидроксипропилцеллюлоза (мг)	5,4	5,4	5,4
Кроскармеллоза натрия (мг)	18,0	18,0	18,0
Промежуточный итог (мг)	157,5	157,5	157,5
Микрокристаллическая целлюлоза (мг)	18,0	18,0	18,0
Стеарат магния (мг)	4,5	4,5	4,5
Масса таблетки без покрытия (мг)	180,0	180,0	180,0
пленкообразователь (Opadry 03F430006) (мг)	5,4	5,4	5,4
Масса таблетки, покрытой пленочной оболочкой (мг)	185,4	185,4	185,4
Диаметр таблетки (мм)	8,1	8,1	8,1

Пример 1

В соответствии с составом таблицы 1, 829,5 г измельченного гемисульфата соединения (I), 3193,5 г моногидрата лактозы и 540,0 г кроскармеллозы натрия смешивали с использованием гранулятора с псевдооживленным слоем с получением смешанного продукта. Раствор связующего вещества (содержание твердых веществ: 7% масс.) получали растворением 162,0 г гидроксипропилцеллюлозы в воде. Смесь гранулировали путем распыления раствора связующего вещества, сушили и просеивали с получением гранулированного продукта. 4725,0 г гранул, 540,0 г микрокристаллической целлюлозы и 135,0 г стеарата магния смешивали с помощью контейнерного миксера с получением смешанного продукта перед таблетированием. Полученный смешанный продукт формовали в таблетки с использованием ротационной таблетующей машины для получения таблеток без покрытия. Таблетки не прилипают к производственному оборудованию и поэтому подходят для крупносерийного производства. Полученные таблетки покрывали пленочной оболочкой с использованием машины для нанесения пленочного покрытия путем распыления жидкости, полученной путем растворения/диспергирования пленкообразователя в воде (содержание твердых веществ: 10% масс.), с получением таблеток, покрытых пленочной оболочкой.

Пример 2

В соответствии с составом таблицы 1, таблетки с пленочным покрытием примера 2 получали аналогично примеру 1.

Пример 3

В соответствии с составом таблицы 1, таблетки с пленочным покрытием примера 3

получали аналогично примеру 1.

Пример 4

Таблетки с пленочным покрытием, полученные в примере 1, упаковывали во флаконы и выдерживали в открытом состоянии при 40°C, относительной влажности 75% в течение 1 месяца и 3 месяцев. Тест на растворение проводили в соответствии с тестом на растворение (способ с использованием лопастной мешалки), описанным в Японской фармакопее, при следующих условиях для оценки скорости растворения до и после хранения. Результаты показаны в таблице 2.

- Способ с использованием лопастной мешалки, 50 об/мин
- Исследуемая среда: 0,1н HCl (pH 1,2) 900 мл
- Температура испытуемой жидкости: 37±0,5°C
- Время отбора проб: 15 минут и 30 минут
- Способ измерений : СВЭЖХ

Условия СВЭЖХ

- Длина волны измерения: 266 нм
- Колонка: YMC-Triart C18 (2,1 ммx100 мм, 1,9 мкм)
- Температура колонки: около 40°C
- Подвижная фаза: смесь ацетонитрил/вода (=3/2) +0,1% трифторуксусная кислота
- Скорость потока: регулируют таким образом, чтобы время удерживания соединения (I) составляло около 1,0 мин · Количество вводимой пробы: 10 мкл

Таблица 2

Скорость растворения (%)		15 минут	30 минут
Перед хранением (Начальная)		84,9	94,7
ОТКРЫТО	40°C, 75% RH 1 месяц	97,1	98,1
	40°C, 75% RH 3 месяца	89,6	95,7

Среднее по трем сосудам

Результаты, перечисленные выше в таблице 2, демонстрируют, что таблетки примера 1 имели высокую стабильность растворения.

Пример 5

Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое адаптивное исследование фазы 2/3 с OLE проводят для оценки эффективности, безопасности и переносимости соединения (I) у участников с первичными митохондриальными миопатиями. Эффективность (т.е. функциональное улучшение) будет оцениваться с помощью функционального двигательного теста 6MWT. Исследование состоит из следующих частей: скрининг (4 недели); часть выбора дозы фазы 2 с 2 дозами соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли по сравнению с соответствующим плацебо (2 недели); часть фазы 3 с выбранной однократной дозой лечения по сравнению с плацебо

(до 52 недель); OLE (24 недели); и последующее наблюдение (4 недели).

Часть фазы 2:

Приблизительно 30 участников будут включены в часть выбора дозы фазы 2. При рандомизации участники будут случайным образом распределены в 1 из 3 групп (30 мг соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли, 75 мг соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли или плацебо; n=10 для каждой группы) в соотношении 1:1:1. Все участники (которым назначена 1 из 2 доз соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли или соответствующего плацебо) будут принимать исследуемый препарат один раз в день в течение по меньшей мере 14 дней. На основании фармакокинетических данных (AUC_{tau} и C_{max}), полученных на день 14, к части фазы 2 может быть добавлена дополнительная когорта доз без рандомизации открытым способом. Если ни таблетка 30 мг, ни таблетка 75 мг не достигают воздействия на участников, сравнимого с воздействием капсулы фазы 1 после повторной дозы 75 мг у здоровых взрослых, будет выбран дополнительный уровень дозы, например 50 мг или 125 мг. Выбранная доза обеспечит прогнозируемые средние значения C_{max} и AUC_{tau} не более 268 нг/мл и 1530 нг·ч/мл, соответственно; что в 2 раза (200%) превышает наблюдаемые средние значения C_{max} и AUC_{tau} у здоровых взрослых после повторной дозы 75 мг в форме капсул, 37,4% и 3,7% (AUC_{24}), а также 51,2% и 1,7% (C_{max}) от уровня отсутствия наблюдаемого побочного эффекта (NOAEL, который представлял собой самую высокую испытываемую дозу) в 52-недельных исследованиях токсичности GLP на обезьянах и 26-недельных исследованиях токсичности GLP на крысах, соответственно. После того как все участники завершат оценку на день 14, наряду с дополнительным анализом фармакокинетических данных будет проведен анализ фармакодинамических данных (т.е. механической экспрессии генов, нацеленной на PPAR δ). На основании фармакокинетических и фармакодинамических данных соответствующий уровень дозы будет выбран для следующей части исследования (часть фазы 3). Участники будут поддерживать исходный уровень дозы, если новые данные о безопасности, переносимости и/или фармакокинетике не потребуют изменения дозы, и ни один новый участник не будет включен в исследование до тех пор, пока не будет определена доза фазы 3.

Часть фазы 3:

После выбора дозы фазы 3 все участники, за исключением группы плацебо, перейдут на выбранный уровень дозы соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли на оставшуюся часть фазы 3 исследования (в общей сложности до 52 недель, включая часть фазы 2). Участники, которым изначально было назначено плацебо, будут оставаться на плацебо до 52 недель. Оставшаяся группа участников (n=примерно 109 участников) будет рандомизирована в группу получения либо соединения (I), либо его фармацевтически приемлемой соли, либо соответствующего плацебо в соотношении 1:1.

Всем участникам, завершившим часть фазы 3 исследования и имеющим право на участие в OLE, будет предоставлена возможность принимать соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль в течение дополнительных 24 недель.

Данные о безопасности, включая нежелательные явления (АЕ), показатели жизненно важных функций, рутинные электрокардиограммы (ЭКГ) в 12 отведениях, лабораторные тесты безопасности, сопутствующее лечение, демографические данные и совокупные данные о АЕ, будут рассмотрены открытым способом.

Исследуемый препарат(препараты) (IP)

Соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль (дозировка таблеток составляет 10 и 25 мг), плацебо

Участники должны быть проинструктированы о необходимости принимать IP утром в одно и то же время каждый день, насколько это возможно. Не допускается измельчение таблеток. IP назначается перорально с пищей или без нее, за исключением следующих случаев:

Неделя 0 (только участники, включенные в часть фазы 2)

Для участников, включенных в часть фазы 2, перед введением IP-дозы в день 1 участникам следует воздерживаться от принятия пищи в течение ночи (т.е. не принимать пищу или напитки в течение по меньшей мере 10 часов до приема дозы и до по меньшей мере 4 часов после приема дозы). Прием воды будет запрещен по меньшей мере за 1 час до приема дозы и до момента приема IP, за исключением воды, принимаемой вместе с IP.

Неделя 2 (только участники, включенные в часть фазы 2)

Участникам следует воздерживаться от принятия пищи в течение ночи (т.е. не принимать пищу или напитки в течение по меньшей мере 10 часов до приема дозы и до по меньшей мере 4 часов после приема дозы). Прием воды будет запрещен по меньшей мере в течение 1 часа до приема дозы и до момента как минимум 2 часа после приема дозы, за исключением воды, принимаемой с IP.

Неделя 12, 36 и 64

Участникам следует воздерживаться от принятия пищи в течение ночи (т.е. не принимать пищу или напитки в течение по меньшей мере 10 часов до приема дозы и до по меньшей мере времени фармакокинетического забора крови). Прием воды будет запрещен по меньшей мере за 1 час до приема дозы и до момента приема IP, за исключением воды, принимаемой вместе с IP.

Группы лечения и продолжительность

Группа/IP Название	Соединение (I) или его фармацевтически приемлемая соль	Плацебо
Применение	Исследуемый препарат	Подобранное плацебо для соединения (I) или его фармацевтически приемлемой соли
Доза	75 мг (3 x таблетка 25 мг) § 30 мг (3 x таблетка 10 мг) §	NA (3 x таблетка)

Частота	Раз в день	Раз в день
Путь введения	Пероральный	Пероральный
Продолжительность†	52 недели	52 недели

IP: исследуемый препарат; NA: не соответствует

† Всем участникам, завершившим часть фазы 3 и имеющим право на участие в OLE, будет предложена возможность принимать соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль в течение 24 недель.

§ Уровень дозы для части фазы 3 будет определяться новыми данными по фармакокинетике/фармакодинамике, безопасности и переносимости. Может быть принят другой уровень дозы.

Пример 6

Ангиопозтин-подобный 4 (ANGPTL4), ген, который кодирует белок ANGPTL4, транскрипционно контролируется PPAR (Georgiadi, A., et al., *Circ Res*, 2010. **106**(11): p. 1712-21). Активация PPAR δ индуцирует выработку ANGLPTL4, который ингибирует липопротеинлипазу, тем самым повышая уровень триглицеридов в сыворотке. Клетки, которые обрабатывались в течение 24 или 48 часов, показали значительную индукцию *ANGPTL4* после обработки соединением (I) (фиг. 3A). Киназа пируватдегидрогеназы 4 (PDK4) активируется в части транскрипционного каскада PPAR δ . PKD4 действует как ингибитор пируватдегидрогеназы, тем самым снижая метаболизм глюкозы и способствуя утилизации альтернативных субстратов (Phua, W.W.T., et al., *International journal of molecular sciences*, 2018. **19**(5): p. 1425). Соединение (I) индуцировало PDK4 при 24- или 48-часовой обработке во всех исследованных клеточных линиях с увеличением транскрипта в 10-50 раз (фиг. 3B).

Основной функцией PPAR δ является индукция генов, вовлеченных в митохондриальную FAO (Ravnskjaer, K., et al., *Journal of lipid research*, 2010. **51**(6): p. 1370-1379). Соединение (I) тестировали на предмет способности увеличивать экспрессию генов, участвующих в FAO. Ацил-СоА-дегидрогеназа с очень длинной цепью (ACADVL) кодирует белок, ответственный за расщепление длинноцепочечных жирных кислот (с16-с18) перед их импортом в митохондриальный матрикс. Соединение (I) значительно повышающе регулировало экспрессию ACADVL в двух из исследованных линий. Клетки MELAS и MERRF показали индукцию целевого гена, но биологических повторов (n=2) было недостаточно для проведения статистического сравнения (фиг. 3C). Карнитинпальмитоилтрансфераза 1a (CPT1A) кодирует белок, ограничивающий скорость окисления жирных кислот. Он выполняет функцию импорта жирных кислот через внешнюю митохондриальную мембрану в виде ацилкарнитинов (Qu, Q., et al., *Cell Death & Disease*, 2016. **7**(5): p. e2226-e2226). Обработка соединением (I) приводила примерно к 2-кратной индукции транскрипта CPT1A во всех протестированных клеточных линиях (фиг. 3D). Семейство носителей растворенных веществ 25 член 20 (SLC25A20) кодирует

карнитин-ацил-карнитин транслоказу, которая опосредует импорт ацил-карнитинов в митохондриальный матрикс и была индуцирована обработкой соединением (I) во всех четырех исследованных клеточных линиях (фиг. 3E).

Пример 7

Соединение (I) усиливает транскрипцию генов, которые способствуют импорту, обработке и катаболизму жирных кислот, а также гена, ограничивающего превращение глюкозы в пируват (фиг. 3A-3E). Этот каскад индукции генов свидетельствует о сдвиге метаболизма в сторону жирных кислот от глюкозы. Для оценки метаболических эффектов повышенной экспрессии генов, наблюдаемых в клетках РММ, обработанных соединением (I), использовали клеточную респирометрию для измерения ОХРНОС с жирной кислотой (пальмитатом) в качестве единственного субстрата. Учитывая, что в мышечных клетках пациентов с РММ наблюдаются митохондриальные нарушения, был поставлен вопрос о том, существует ли дефицит ОХРНОС, вызванный жирными кислотами, в фибробластах пациентов с РММ. Чтобы оценить этот вопрос, было проведено измерение опосредованного жирными кислотами ОХРНОС в фибробластах пациентов с РММ в сравнении с фибробластами здоровых доноров. Клетки здорового донора и пациента с РММ были сопоставимы по возрасту и полу. Несмотря на значительную вариабельность доноров и ограниченную доступность образцов пациентов, фибробласты РММ (MELAS и KSS) демонстрировали сниженную способность к ОХРНОС, опосредованному жирными кислотами, по сравнению со здоровыми контролями со снижением на 63 и 37 процентов, соответственно. Цибриды MERRF с 60-процентной гетероплазмией tPHK-Lys 8344 не показали опосредованного жирными кислотами дефицита ОХРНОС по сравнению с контрольными цибридами (фиг. 4A).

Обработка соединением (I) значительно увеличивала опосредованное жирными кислотами ОХРНОС в тестируемой клеточной линии Leigh/LHON. Наблюдалась тенденция изменения дозы в фибробластах пациентов как с MELAS, так и с KSS, хотя значимость с двумя биологическими повторами не удалось проверить из-за ограничений в доступности клеток. Стимуляция соединением (I) увеличивала опосредованное жирными кислотами ОХРНОС в дозах 30 нМ на тридцать процентов или более, что представляет собой частичное (MELAS) и почти полное восстановление (KSS) опосредованного жирными кислотами ОХРНОС, наблюдаемое по сравнению с фибробластами здоровых доноров. Наблюдалась дозозависимая тенденция увеличения опосредованного жирными кислотами ОХРНОС в линии цибридных клеток MERRF, хотя ответ на 30 нМ был менее выраженным (фиг. 4B).

Пример 8

Учитывая улучшение ОХРНОС, наблюдаемое в клеточных линиях РММ, была проверена эффективность соединения (I) *in vivo*. Старая мышь, страдающая ожирением, вызванным диетой (DIO), представляет собой негенетическую мышиную модель митохондриальной дисфункции скелетных мышц с зарегистрированным фенотипом уменьшения FAO скелетных мышц и снижением способности к физической нагрузке

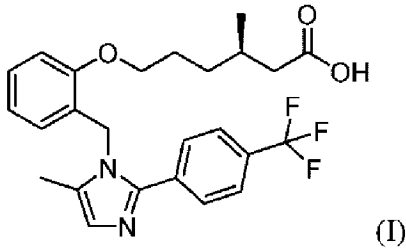
(Yokota, T., et al., American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2009. **297**(3): p. H1069-H1077 and Collins, K.H., et al., Frontiers in physiology, 2018. **9**: p. 112).

Старым мышам с DIO вводили перорально один раз в день перед началом ночного цикла 30 мг/кг соединения (I) в течение 5 недель. Анализ воздействия соединения (I) на скелетные мышцы продемонстрировал, что лекарственное средство поддается обнаружению и обеспечивает EC₅₀ мыши 14 нМ (фиг. 6A). Анализ экспрессии генов показал, что соединение (I) увеличивает экспрессию генов-мишеней PPAR δ , Angptl4 и Pdk4, в 3,5 и 2,5 раза, соответственно (фиг. 5A и 5B). Экспрессия генов FAO (Acadvl, Cpt1a и Slc25a20) также была значительно увеличена у мышей, обработанных соединением (I) (фиг. 5C-5E). Соединение (I) не изменило массу тела или состав тканей организма во время исследования (фиг. 6B и 6C). Старые животные с DIO, получавшие соединение (I) в дозе 30 мг/кг в течение 5 недель, продемонстрировали снижение частоты падений на мотивационной сетке, необходимой для содействия продолжению бега (фиг. 5F). Животные, получавшие соединение (I), имели меньшую частоту падений на мотивационной сетке, но это не соответствовало увеличению дистанции бега (фиг. 5G и 5H).

Несмотря на отсутствие изменений в дистанции бега, эти данные демонстрируют улучшение показателей бега. Для лучшей количественной оценки изменений в выносливости был установлен индекс усталости. Индекс усталости выражается как отношение совокупного количества падений с течением времени к общему пройденному расстоянию в каждой группе лечения. Этот подход был использован в независимом исследовании для подтверждения того, что старые мыши с DIO имели более высокий индекс усталости по сравнению с контрольной группой того же возраста (фиг. 7A). Используя этот индекс усталости в качестве меры выносливости, было продемонстрировано, что мыши, получавшие соединение (I), были менее утомлены, чем контрольные животные, получавшие только носитель (фиг. 5I). Более того, у мышей, получавших соединение (I), наблюдалась тенденция к увеличению произвольной активности, а также к вертикальной двигательной активности (фиг. 6D и 6E); в обоих этих видах деятельности старые животные с DIO показали худшие результаты, чем сопоставимые по возрасту животные, которых кормили обычным кормом (фиг. 7B и 7C).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения первичной митохондриальной миопатии или первичных митохондриальных миопатий, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, соединения (I) в количестве от 30 мг до 125 мг:



или его фармацевтически приемлемой соли в количестве, эквивалентном от 30 мг до 125 мг соединения (I) в день.

2. Способ по п. 1, где пациенту, нуждающемуся в этом, вводят гемисульфатную соль соединения (I).

3. Способ по п. 1 или 2, где количество соединения (I) составляет 30-50 мг/день, или количество его фармацевтически приемлемой соли составляет количество, эквивалентное 30-50 мг/день соединения (I).

4. Способ по п. 1 или 2, где количество соединения (I) составляет 50-75 мг/день, или количество его фармацевтически приемлемой соли составляет количество, эквивалентное 50-75 мг/день соединения (I).

5. Способ по п. 1 или 2, где количество соединения (I) составляет 75-125 мг/день, или количество его фармацевтически приемлемой соли составляет количество, эквивалентное 75-125 мг/день соединения (I).

6. Способ по п. 1 или 2, где количество соединения (I) составляет 30 мг/день, или количество его фармацевтически приемлемой соли составляет количество, эквивалентное 30 мг/день соединения (I).

7. Способ по п. 1 или 2, где количество соединения (I) составляет 50 мг/день, или количество его фармацевтически приемлемой соли составляет количество, эквивалентное 50 мг/день соединения (I).

8. Способ по п. 1 или 2, где количество соединения (I) составляет 75 мг/день, или количество его фармацевтически приемлемой соли составляет количество, эквивалентное 75 мг/день соединения (I).

9. Способ по п. 1 или 2, где количество соединения (I) составляет 125 мг/день, или количество его фармацевтически приемлемой соли составляет количество, эквивалентное 125 мг/день соединения (I).

10. Способ по любому из п.п. 1-9, где соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально.

11. Способ по любому из п.п. 1-10, где первичная митохондриальная миопатия представляет собой болезнь Альперса, хроническую прогрессирующую внешнюю офтальмоплегию (СРЕО), синдром Кернса-Сейра (KSS), наследственную оптическую

невропатию Лебера (LHON), синдром Лея, митохондриальную энцефаломиопатию, лактат-ацидоз и инсультоподобные эпизоды (MELAS), миоклоническую эпилепсию с рванными красными волокнами (MERRF), невропатию с атаксией и пигментным ретинитом (NARP) или синдром Пирсона.

12. Способ по любому из п.п. 1-11, где пациент, нуждающийся в этом, предварительно получает лечение коэнзимом Q10 (CoQ10), карнитином, креатином или другими витаминами, направленными на митохондриальные заболевания, или дополнительной терапией.

13. Способ по любому из п.п. 1-12, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, включающей соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль и кроскармеллозу натрия.

14. Способ по любому из п.п. 1-13, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, включающей соединение (I) или его фармацевтически приемлемую соль, моногидрат лактозы, микрокристаллическую целлюлозу, кроскармеллозу натрия, гидроксипропилцеллюлозу и стеарат магния.

15. Способ по любому из п.п. 1-14, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, включающей соединение (I), где фармацевтическая композиция включает следующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	12-17%
моногидрат лактозы	55-65%
микрокристаллическая целлюлоза	5-15%
кроскармеллоза натрия	8-13%
гидроксипропилцеллюлоза	2-5%
стеарат магния	1-3%.

16. Способ по любому из п.п. 1-14, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, включающей соединение (I), где фармацевтическая композиция включает следующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	5-8%
моногидрат лактозы	65-72%
микрокристаллическая целлюлоза	5-15%
кроскармеллоза натрия	8-13%
гидроксипропилцеллюлоза	2-5%
стеарат магния	1-3%.

17. Способ по любому из п.п. 1-14, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, включающей соединение (I), где фармацевтическая композиция

композиция включает следующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	2-4%
моногидрат лактозы	69-74%
микrokристаллическая целлюлоза	5-15%
кроскармеллоза натрия	8-13%
гидроксипропилцеллюлоза	2-5%
стеарат магния	1-3%.

18. Способ по любому из п.п. 15-17, где фармацевтическая композиция дополнительно включает пленкообразователь и массовый процент пленкообразователя по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет 2-4%.

19. Способ по любому из п.п. 1-14, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, включающей соединение (I), где фармацевтическая композиция включает следующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	15,4%
моногидрат лактозы	59,1%
микrokристаллическая целлюлоза	10%
кроскармеллоза натрия	10%
гидроксипропилцеллюлоза	3%
стеарат магния	2,5%.

20. Способ по любому из п.п. 1-14, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, включающей соединение (I), где фармацевтическая композиция включает следующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	6,1%
моногидрат лактозы	68,4%
микrokристаллическая целлюлоза	10%
кроскармеллоза натрия	10%
гидроксипропилцеллюлоза	3%
стеарат магния	2,5%.

21. Способ по любому из п.п. 1-14, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, включающей соединение (I), где фармацевтическая композиция включает следующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	3,1%
------------------------------------	------

моногидрат лактозы	71,4%
микрористаллическая целлюлоза	10%
кроскармеллоза натрия	10%
гидроксипропилцеллюлоза	3%
стеарат магния	2,5%,

22. Способ по любому из п.п. 1-14, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, включающей соединение (I), где фармацевтическая композиция включает нижеследующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	14,9%
моногидрат лактозы	57,4%
микрористаллическая целлюлоза	9,7%
кроскармеллоза натрия	9,7%
гидроксипропилцеллюлоза	2,9%
стеарат магния	2,4%
пленкообразователь	2,9%.

23. Способ по любому из п.п. 1-14, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, включающей соединение (I), где фармацевтическая композиция включает следующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	6,0%
моногидрат лактозы	66,4%
микрористаллическая целлюлоза	9,7%
кроскармеллоза натрия	9,7%
гидроксипропилцеллюлоза	2,9%
стеарат магния	2,4%
пленкообразователь	2,9%.

24. Способ по любому из п.п. 1-14, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, включающей соединение (I), где фармацевтическая композиция включает следующие компоненты, и массовый процент каждого компонента по отношению к общей массе фармацевтической композиции составляет:

гемисульфатная соль соединения (I)	3,0%
моногидрат лактозы	69,3%
микрористаллическая целлюлоза	9,7%
кроскармеллоза натрия	9,7%
гидроксипропилцеллюлоза	2,9%

стеарат магния

2,4%

пленкообразователь

2,9%.

ФИГ.1

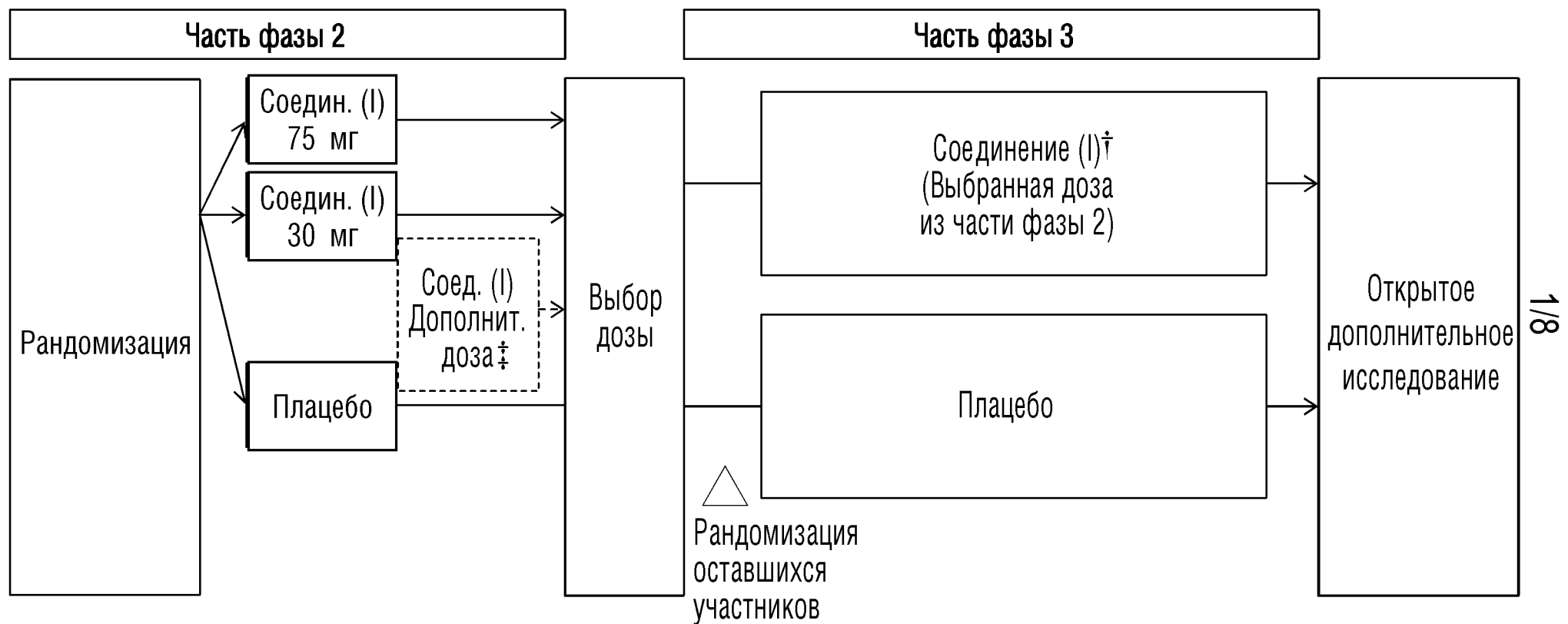


Схема исследования

ФИГ.2

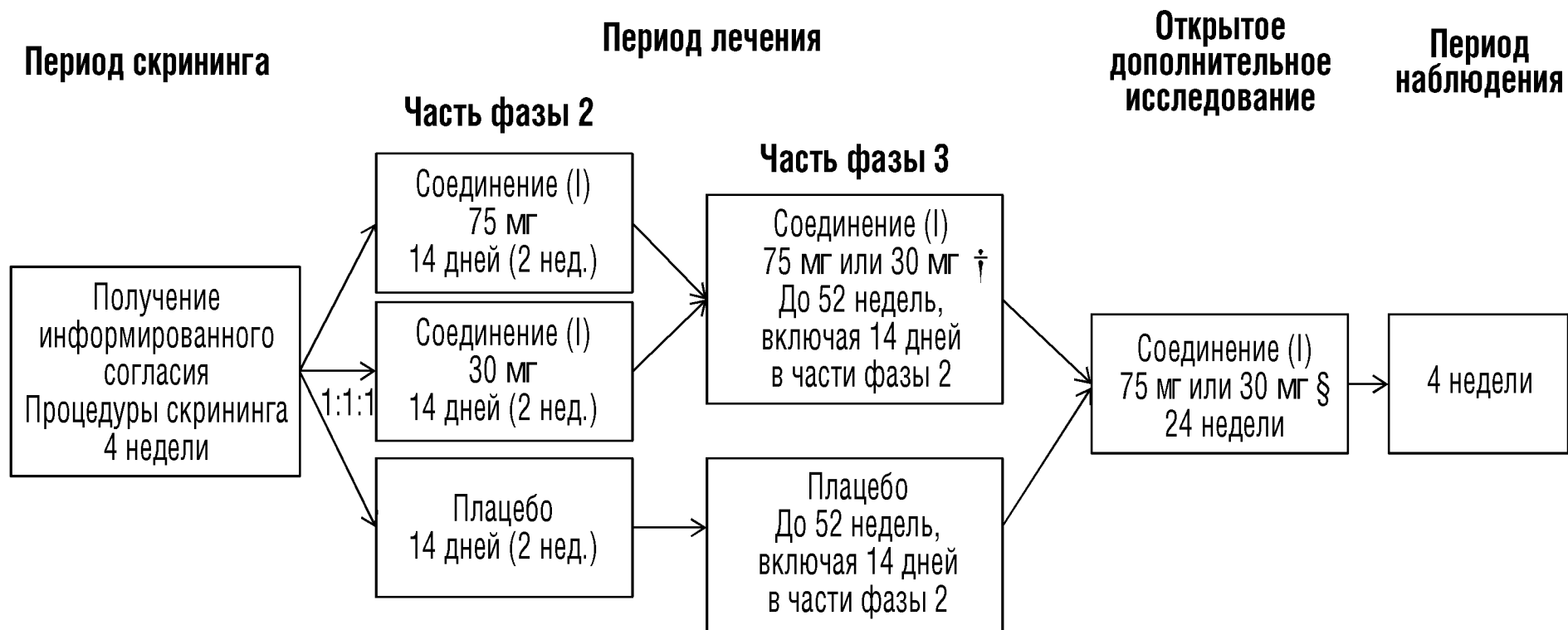
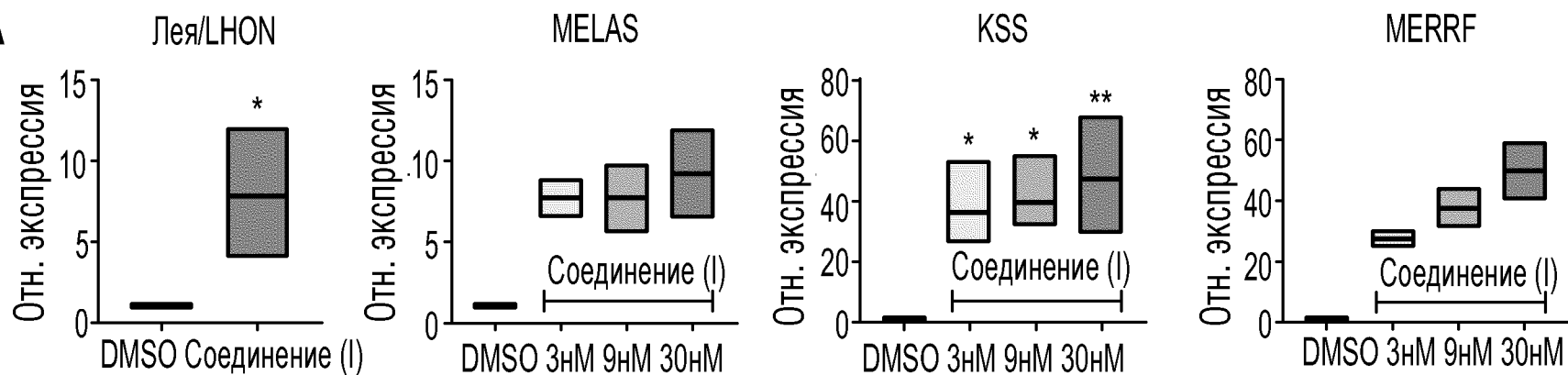
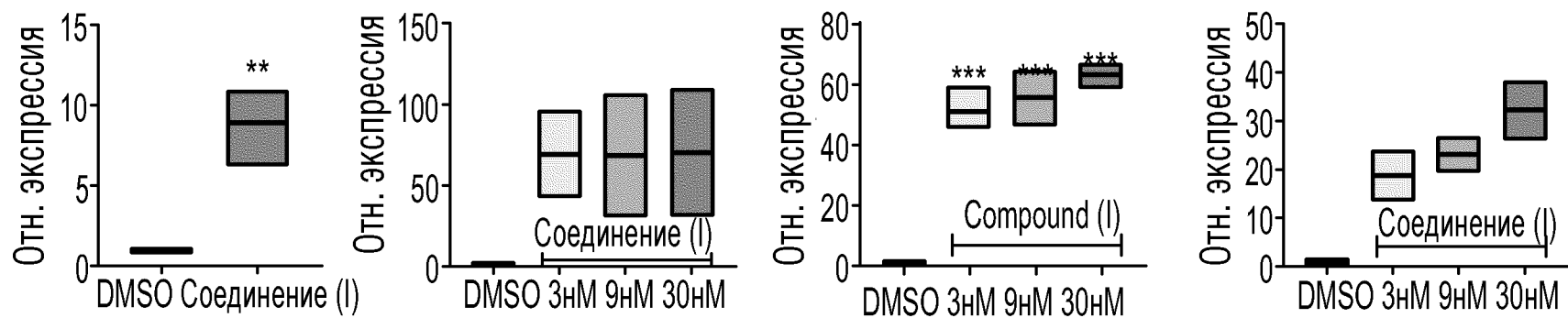


Схема визита на исследование

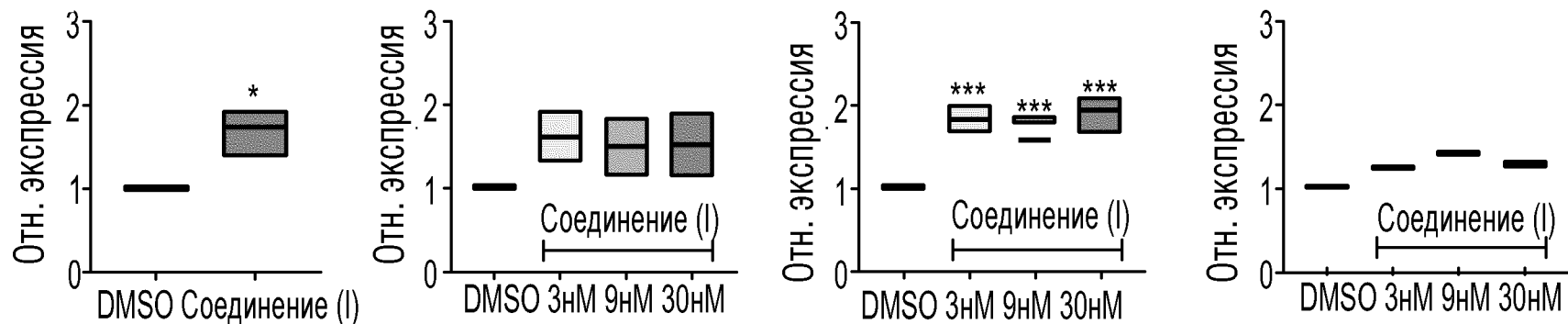
ФИГ.3А



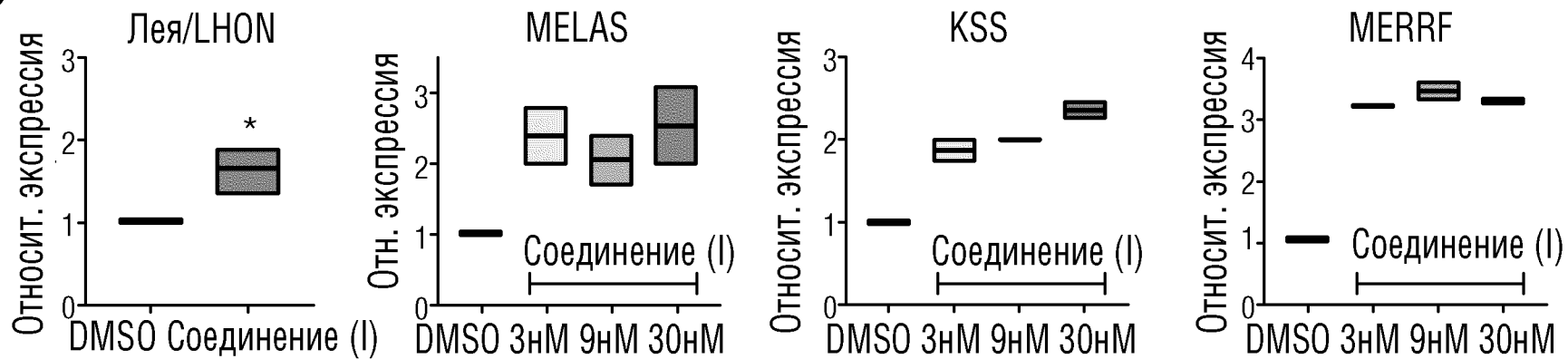
ФИГ.3В



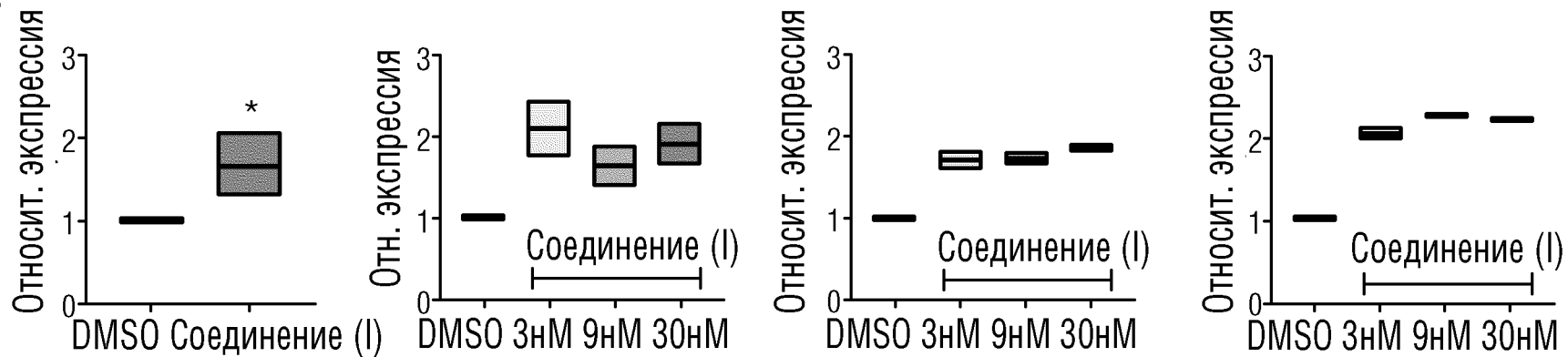
ФИГ.3С



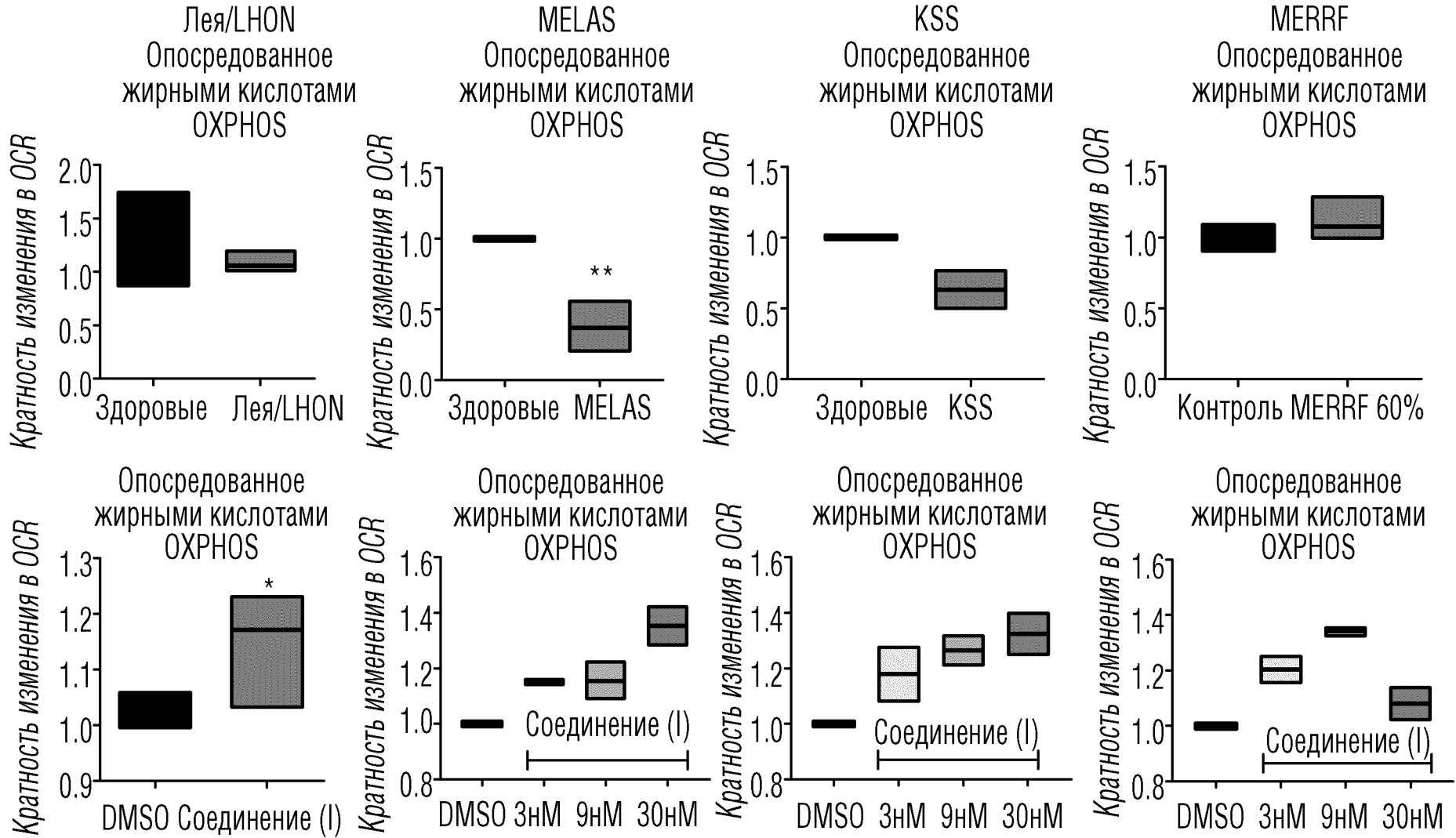
ФИГ.3D



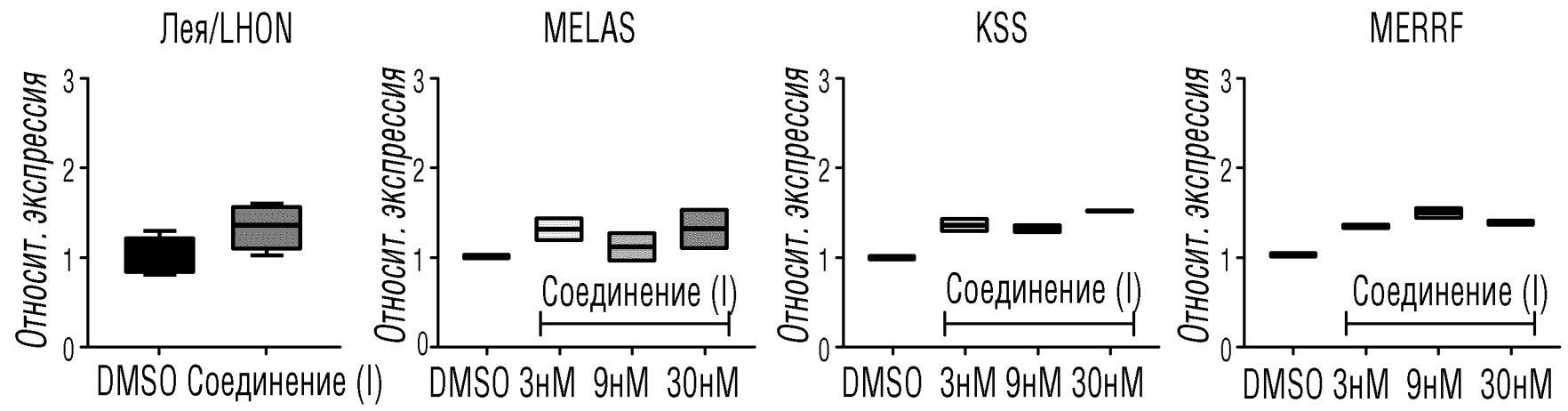
ФИГ.3Е



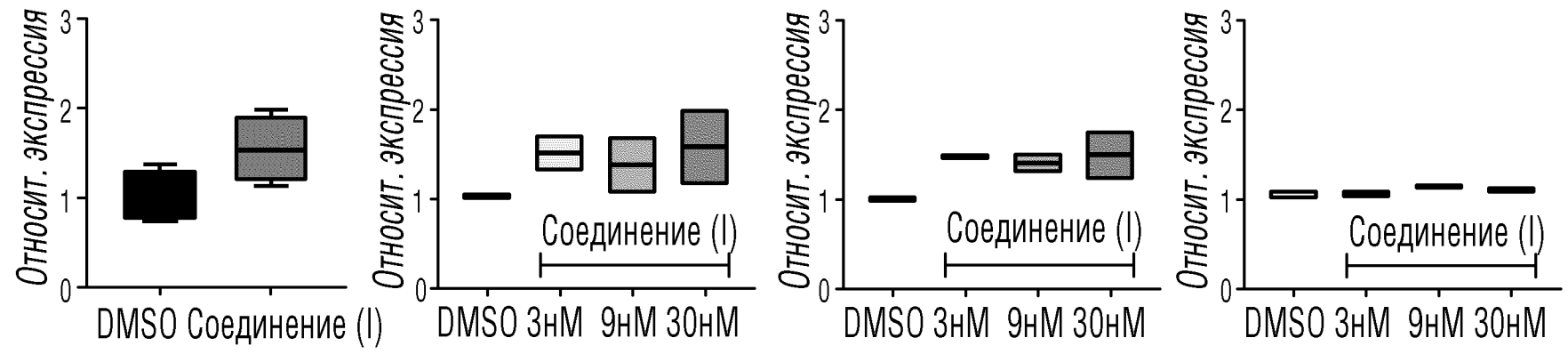
ФИГ.4



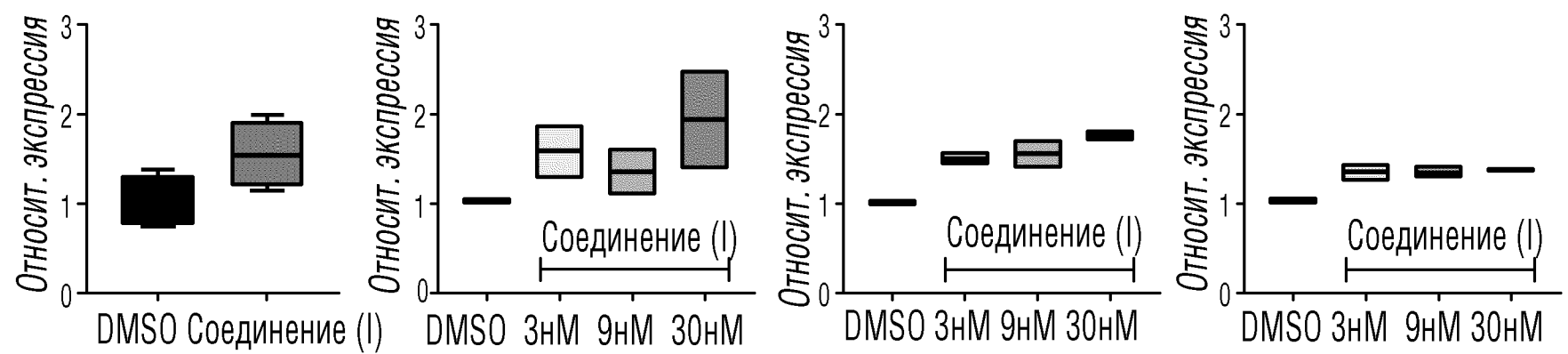
ФИГ.5А



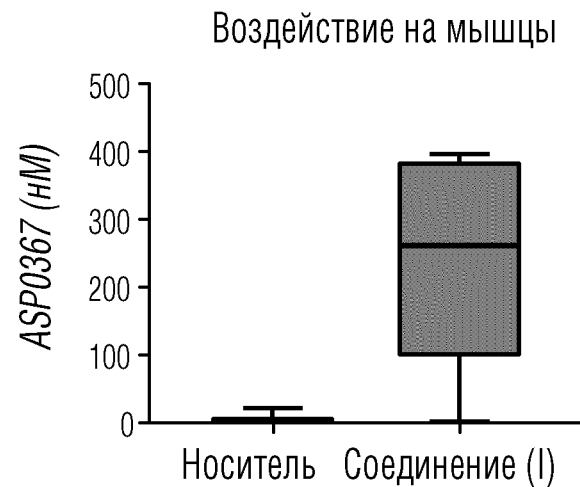
ФИГ.5В



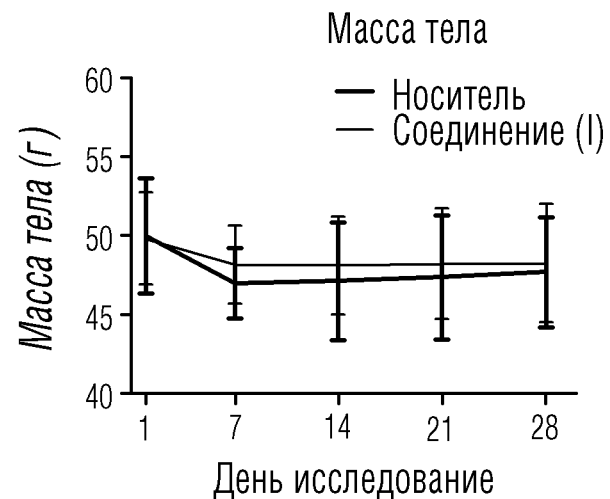
ФИГ.5С



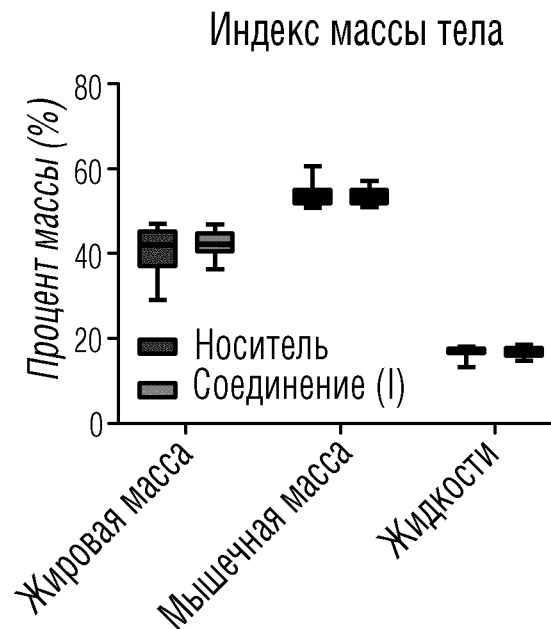
ФИГ.6А



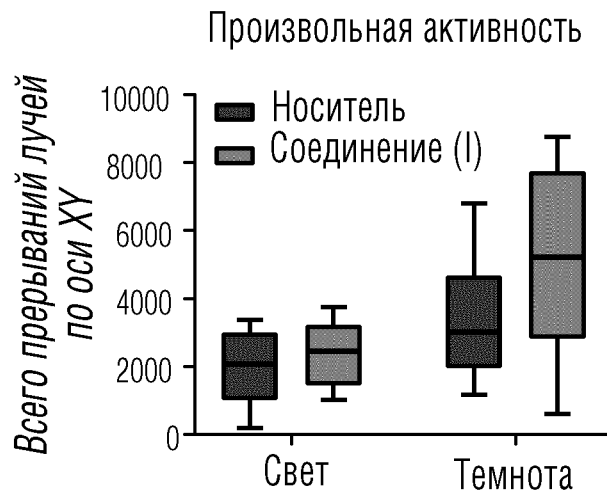
ФИГ.6В



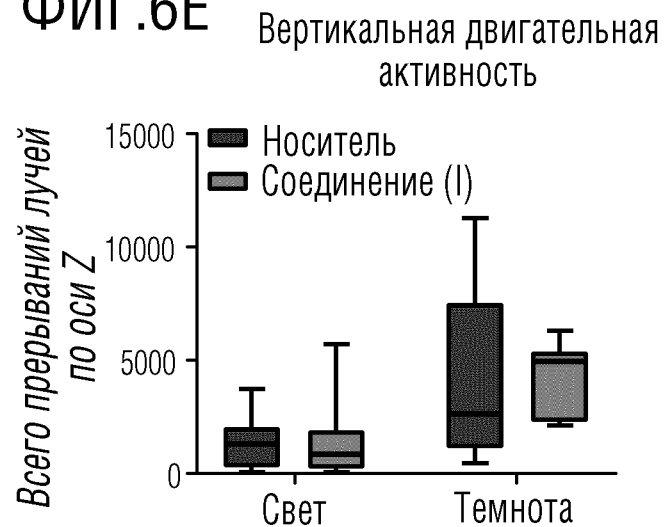
ФИГ.6С



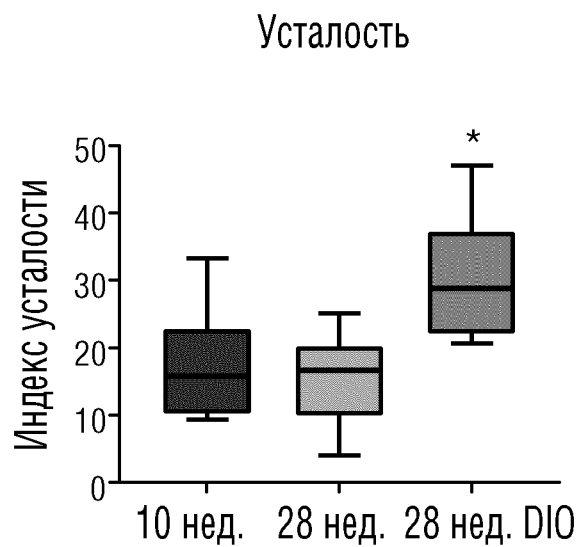
ФИГ.6D



ФИГ.6Е



ФИГ.7А



ФИГ.7В



ФИГ.7С

