

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047725**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.08.30

(21) Номер заявки
202393401

(22) Дата подачи заявки
2022.01.13

(51) Int. Cl. **A61K 31/115** (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

(54) **СРЕДСТВО ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ**

(31) **2021120402**

(32) **2021.07.12**

(33) **RU**

(43) **2024.03.14**

(86) **PCT/RU2022/050007**

(87) **WO 2023/287322 2023.01.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЛАСКАВЫЙ ВЛАДИСЛАВ
НИКОЛАЕВИЧ (RU)**

(72) Изобретатель:
**Ласкавый Владислав Николаевич,
Шурдов Михаил Аркадьевич (RU)**

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

(56) **RU-C1-2077882**

Mitochondrial Diseases. Cleveland
Clinic medical professionalon [online]
31.05.2018 [retrieved on 2021-09-28].
Retrieved from: <[https://my.clevelandclinic.org/
health/diseases/15612-mitochondrial-diseases](https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/15612-mitochondrial-diseases)>
US-A1-2014065099

(57) Изобретение относится к области экспериментальной медицины и касается создания нового эффективного средства для коррекции митохондриальной дисфункции у лабораторных животных. Технической проблемой заявляемого изобретения является создание эффективного и простого в применении средства для коррекции митохондриальной дисфункции в эксперименте. Техническим результатом является повышение мембранного потенциала митохондрий и повышение кислородзависимого метаболизма нейтрофилов. Технический результат достигается применением иммуномодулирующего средства для внутримышечных инъекций, содержащего муравьиный альдегид в количестве 0,076-0,078% в изотоническом растворе хлорида натрия 0,85-0,95%-ной концентрации в качестве средства для повышения мембранного потенциала митохондрий и повышения кислородзависимого метаболизма нейтрофилов.

B1

047725

047725 B1

Изобретение относится к области экспериментальной медицины, и касается создания нового эффективного средства для коррекции митохондриальной дисфункции у лабораторных животных.

Митохондриальные заболевания включают в себя нарушения, вызываемые огромным разнообразием молекулярных повреждений или дефектов, причем фенотипическое проявление заболевания дополнительно усложняется стохастическими распределениями митохондрий в различных тканях.

Известна генетическая конструкция для коррекции митохондриальной дисфункции (см. патент РФ № 2642972 по кл. МПК А61К48/00, опуб. 29.01.2018), представляющая собой участок митохондриальной ДНК, отсутствующий в мутантной ДНК, содержащий на концах последовательности нуклеотидов, комплементарные олигонуклеотидам SEQ ID №1 и SEQ ID №2 из набора олигонуклеотидов.

Данная конструкция только в перспективе может быть использована для коррекции митохондриальной дисфункции. Однако, следует учесть, что все эксперименты проведены пока только на культуре клеток и нет исследований на животных.

Известен способ коррекции митохондриальной дисфункции при ишемии мозга в эксперименте (см. патент Украины № 104516 по кл. МПК А61Р 25/28, опуб. 10.02.2016), заключающийся во введении нейрорепротективного средства, в качестве которого используют цереброкурин, который вводят внутривентриально раз в сутки в дозе 0,02 мл / 100 г веса животного в течение 21 дня.

Однако, следует принять во внимание, что наилучшие результаты этот препарат показал при интрацеребральном введении (инъекция непосредственно в мозг) при исследовании на монгольских песчанках (*Meriones unculatus*). Данный метод введения травматичен и нежелателен при массовом применении препарата.

Наиболее близким к заявляемому является иммуномодулирующее средство для инъекций, содержащее активное начало и целевые добавки (см. патент РФ № 2077882 по кл. МПК А61К 31/115, опуб. 27.04.1997). В качестве активного начала оно содержит формальдегид, а в качестве целевых добавок NaCl и дистиллированную воду, при этом оно представляет собой инъекционный раствор, содержащий, мас. %: формальдегид 0,07 0,24, NaCl 0,9 0,95, дистиллированная вода - остальное до 100%.

Приведенные аналоги показывают, что создание средств для коррекции митохондриальных дисфункций является далеко не решенной задачей. Поэтому поиск новых средств коррекции весьма актуален.

Технической проблемой заявляемого изобретения является создание эффективного и простого в применении средства для коррекции митохондриальной дисфункции в эксперименте.

Техническим результатом является повышение мембранного потенциала митохондрий и повышение кислородзависимого метаболизма нейтрофилов.

Технический результат достигается применением иммуномодулирующего средства для внутримышечных инъекций, содержащего муравьиный альдегид в количестве 0,076-0,078% в изотоническом растворе хлорида натрия 0,85-0,95%-ной концентрации в качестве средства для повышения мембранного потенциала митохондрий и повышения кислородзависимого метаболизма нейтрофилов.

Известно, что естественный метаболит - альдегид муравьиной кислоты используется для иммунокоррекции при различных нарушениях иммунного статуса организма (см. патент РФ № 2077882), для лечения вирусных инфекций (см. патент РФ № 2146134), в качестве холестеринорегулирующего средства (см. патент РФ № 2352331), для активизации собственных стволовых клеток организма (см. патент РФ № 2376985).

Однако, до настоящего времени неизвестно использование препарата на основе муравьиного альдегида для коррекции митохондриальной дисфункции у лабораторных животных.

Изобретение поясняется иллюстрациями, где представлено:

на фиг. 1 - субпопуляции клеток крови мышей всех групп, оцененных на предмет включения митохондриального красителя JC-1 и маркера апоптоза BCL-2, где А - оценка $\delta\psi$ потенциала митохондрий в пределах лимфоцитов (CD45+ Ly6G-), моноцитов (Ly6G+CD45+) и нейтрофилов (Ly6G+CD45low), Б - количество BCL-2+, основного белка участвующего в апоптозе клеток.

На фиг. 2 - пример оценки $\delta\psi$ потенциала митохондрий различных популяций, а также пропорции мономеров и агрегатов лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов крови мыши: где А - точечный график расположения клеток оцениваемых популяций образца в пределах лимфоцитов (популяция CD45+ Ly6G-), в пределах моноцитов (популяция Ly6G+CD45+ клетки), в пределах нейтрофилов (популяция Ly6G+CD45low клеток), Б - пропорция мономеров (правый нижний квадрант) - 68,5% и пропорция агрегатов (активированные клетки, правый верхний квадрант) - 30,8% в пределах популяции лимфоцитов; В - пропорция мономеров (правый нижний квадрант) - 92,7% и пропорция агрегатов (правый верхний квадрант) - 7,3% в пределах нейтрофилов; Г - пропорция мономеров (правый нижний квадрант) - 66,1% и пропорция агрегатов (активированные клетки, правый верхний квадрант) - 33,9% в пределах популяции моноцитов.

На фиг. 3, 4, 5 - изменения показателей кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов крови через 3 ч после введения средства (фиг. 3), через 24 ч (фиг. 4), через 3 недели (фиг. 5);

на фиг. 6 - сравнение средних показателей кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов крови методом хемиллюминесценции во всех анализируемых группах мышей.

Водный раствор муравьиного альдегида (альдегид муравьиной кислоты) - прозрачная бесцветная жидкость со своеобразным острым запахом, смешивающаяся с водой и спиртом во всех соотношениях.

Муравьиный альдегид - представитель класса альдегидов HCHO. Представляет собой бесцветный газ с резким запахом, мол. массой 30,03, плотность его при 20°C равна 0,815, температура плавления 92°C, температура кипения 19,2°C. Хорошо растворим в воде, спирте.

Изотонический раствор натрия хлорида для инъекций - бесцветная прозрачная жидкость солоноватого вкуса. Раствор стерилен, апирогенен.

Хлорид натрия - кубические кристаллы или белый кристаллический порошок соленого вкуса, без запаха. Растворим в воде (1:3).

Заявляемое средство представляет собой прозрачную бесцветную жидкость без запаха слегка солоноватого вкуса.

Средство готовят следующим образом:

берут 2 весовых части 36,5-37,5%-ного медицинского раствора муравьиного альдегида, добавляют его в 998 весовых частей стерильного 0,85-0,95%-ного раствора хлорида натрия для инъекций до получения 0,076-0,078%-ного раствора альдегида. Средство хранят в темном месте при температуре 15-35°C.

Для доказательств возможности коррекции митохондриальной дисфункции при введении заявляемого средства лабораторным животным проводилось 2 теста.

1. Проводилась оценка потенциала мембраны митохондрий с применением митохондриального флуоресцентного красителя JC-1, а также оценка пропорции клеток с признаками апоптоза на основании оценки пропорции BCL2+ популяций. Оба показателя оценивались иммунологически с применением метода проточной цитометрии.

2. Проводилась оценка кислород-зависимой активации нейтрофилов методом хемиллюминесценции.

В первом тесте проводилась индивидуальная оценка активности митохондрий клеток крови каждого животного, во втором тесте для достижения адекватных результатов кровь животных пулировалась, при этом для каждой группы животных оценивалось 2 образца - кровь контрольной группы и пулированная кровь опытной группы.

Исследования проводились на 140 половозрелых мышах-самцах гибридах F1 (CBAxС57В16). Животные находились в стандартных полипропиленовых боксах для содержания животных в условиях вивария, при естественном световом режиме, на стандартном пищевом рационе (брикетированный корм ПК-120-1 ООО "Лабораторснаб", РФ) со свободным доступом к поилкам с водой.

Вся работа с лабораторными животными выполнялась в соответствии с общепринятыми этическими нормами и соответствовала правилам Европейской конвенции по защите животных, используемых для научных целей (ETS 123).

Средство вводили однократно внутримышечно в дозе 12,5 мл/кг, что соответствовало 0,25 мл препарата на мышь (масса тела мышей в среднем составляла 20,5±0,24 г.). Забой животных осуществляли методом декапитации под эфирным наркозом через 1, 3 и 24 ч после введения препарата. Контрольным животным вводили внутримышечно 0,25 мл 0,9% раствора хлористого натрия (физиологический раствор).

Оценка активности митохондрий под влиянием средства проводилась в нескольких группах животных:

1 - контроль (животные получали аналогичный испытываемому препарату объем физиологического раствора (0,9% раствор NaCl) - 10 животных;

2 - животные, получившие указанную дозу препарата и подвергнутые эвтаназии через 1 ч от введения - 20 животных;

3 - животные, получившие указанную дозу препарата и подвергнутые эвтаназии через 3 ч от введения - 20 животных;

4 - животные, получившие указанную дозу препарата и подвергнутые эвтаназии через 24 ч от введения - 20 животных;

5 - животные, получившие препарат и подвергнутые эвтаназии через 3 недели отведения препарата - 20 животных;

6 - животные, получившие препарат двукратно (1-одномоментно с животными 2-5 групп и повторное введение через 3 недели от первого) и подвергнутые эвтаназии через 3 ч от повторного введения - 20 животных.

Забор крови производили в одноразовые стерильные пробирки с раствором K₂ЭДТА.

Пример 1. Изучение мембранного потенциала митохондрий ($\delta\psi$).

Энергия, выделяемая в ходе реакций окисления в митохондриальной дыхательной цепи, хранится в виде отрицательного электрохимического градиента мембраны митохондрий, и $\delta\psi$ является поляризованным. Коллапс $\delta\psi$ приводит к деполяризации мембранного потенциала митохондрий, и часто, но не всегда, наблюдается на ранних стадиях апоптоза, также изменения данного показателя описаны во время процессов некроза (в результате деполяризации мембраны) и процессов остановки клеточного цикла (в результате гиперполяризации мембраны). Несмотря на идущие научные дискуссии, было сделано обоб-

шение, что деполяризация митохондрий является одним из первых событий, происходящих во время апоптоза, и может даже быть предпосылкой для высвобождения цитохрома с.

Таким образом, деполяризация показателя $\delta\psi$ опосредовано может указывать на снижение функционального потенциала мембраны митохондрий, то есть об их деактивации, возможно в итоге приводящей к гибели клеток.

В настоящее время проточная цитометрия стала методом выбора для анализа мембранного потенциала митохондрий $\delta\psi$ в целых клетках. При этом в качестве тестового зонда используют мембранно-проницаемые липофильные катионные флуорохромы которые проникают в клетки, и их флуоресценция является отражением $\Delta\psi$. Одним из предложенных к оценке данного состояния флуорохромов является JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтил-бензимидазол карбоцианин йодид), который является агрегатообразующим катионным красителем, чувствительным к $\delta\psi$.

Спектр излучения флуоресценции JC-1 зависит от его концентрации, которая, в свою очередь, определяется состоянием $\delta\psi$. JC-1 может существовать в двух различных состояниях, агрегатах или мономерах, каждый из которых имеет разные спектры излучения. JC-1 образует мономеры при низких концентрациях красителя и агрегаты при более высоких концентрациях. Как агрегаты JC-1, так и мономеры проявляют флуоресценцию в зеленом конце спектра, которая измеряется в зеленом канале (FL-1) на проточных цитометрах.

Когда живые клетки инкубируются с JC-1, JC-1 проникает в плазматическую мембрану клетки как мономер. Поглощение JC-1 в митохондрии обусловлено $\delta\psi$. Далее $\Delta\psi$ нормальных, здоровых митохондрий поляризуется и JC-1 быстро поглощается такими митохондриями. Это поглощение увеличивает градиент концентрации JC-1, что приводит к образованию агрегатов JC-1 (известных как J-агрегаты) в митохондриях.

Агрегаты JC-1 демонстрируют красный спектральный сдвиг, приводящий к более высоким уровням излучения красной флуоресценции, которое измеряется в красном канале (FL-2) на большинстве проточных цитометров.

Таким образом, на основании оценки количества JC-1green+ (мономеры) и JC1red+ (агрегаты) клеток можно говорить о состоянии мембраны митохондрий в изучаемом пуле клеток и преобладание JC1red+ (агрегаты) клеток будет косвенно указывать на активацию митохондрий.

Важно, что краситель JC-1 может использоваться как качественная (учитывая сдвиг от зеленого к красному излучению флуоресценции), так и количественная (учитывая только чистую интенсивность флуоресценции) мера мембранного потенциала митохондрий.

Накопление флуоресцентных красителей в митохондриях можно оптически обнаружить с помощью проточной цитометрии, флуоресцентной микроскопии, конфокальной микроскопии и с помощью считывателя флуоресцентных пластин.

Использование определения коэффициента флуоресценции дает исследователям возможность сравнивать измерения мембранного потенциала, а также оценивать процент деполяризации митохондрий, происходящей в патологическом состоянии (например, клеточный стресс, апоптоз и т.д.).

Учитывая то, что таким образом изучается не столько активация митохондрий, сколько апоптоз, то для исключения вероятности данного процесса параллельно те же самые клетки крови животных изучены на предмет количества BCL-2+ клеток с применением метода многопараметровой проточной цитометрии.

Оценка $\delta\psi$ потенциала митохондрий и количество BCL-2+ клеток изучалось иммунологически с применением методов проточной цитометрии в крови в пределах нескольких популяций цельной крови мышей.

В пределах лейкоцитов - CD45+ клетки, в пределах лимфоцитов (популяция CD45+ Ly6G-) в пределах моноцитов (популяция Ly6G+CD45+ клетки), в пределах нейтрофилов (популяция Ly6G+CD45low клеток), а также дополнительно количество BCL-2+ клеток оценено в пределах CD45+CD3+ Т-клеток. Оцениваемые популяции представлены на фиг 1 А, Б.

На фиг. 2А - показан точечный график расположения клеток оцениваемых популяций образца в пределах лимфоцитов (популяция CD45+ Ly6G-), в пределах моноцитов (популяция Ly6G+CD45+ клетки), в пределах нейтрофилов (популяция Ly6G+CD45low клеток).

На фиг. 2Б видно, что пропорция мономеров (правый нижний квадрант) составляет 68,5%. Пропорция агрегатов (активированные клетки, правый верхний квадрант) - 30,8% в пределах популяции лимфоцитов крови мыши.

На фиг. 2В видно, что пропорция мономеров (правый нижний квадрант) составляет 92,7%. Пропорция агрегатов (правый верхний квадрант) - 7,3% в пределах нейтрофилов.

На фиг. 2Г - пропорция мономеров (правый нижний квадрант) - 66,1%. Пропорция агрегатов (правый верхний квадрант) - 33,8% в пределах моноцитов периферической крови мыши.

Пример 2. Оценка кислород-зависимой активации нейтрофилов проводилась методом хемилюминисценции.

Пулированную периферическую кровь (5 контролей и 10 опытных особей) разбавляли рабочим рас-

твором Хэнкса с гепарином в соотношении 1:1 и выделяли мононуклеары посредством центрифугирования при 3000 об/мин 1 час на градиенте плотности фиколл-гиппак (10 мл 10771 г/см³ и 10 мл г/см³ 11191 Мерс).

Кольцо мононуклеаров аккуратно отбирали, мононуклеары переносили в пробирку и разбавляли раствором Хэнкса с гепарином 1:5, аккуратно ресуспендировали и центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. В полученном образце убирали надосадок, а осадок диспергировали в 2 мл рабочего раствора Хэнкса с гепарином.

Производили подсчет клеток в полученном растворе в камере Горяева в 16 квадратах.

Далее на люминометре LKB WALLAC 1251 Luminometer запускали программу и оценивали люминол-зависимую зимозан-индуцированную хемилюминесценцию в 10 кюветах с контрольными образцами и в 10 кюветах с опытными образцами с общей концентрацией клеток в каждой кювете $1 \cdot 10^6$ в растворе Хэнкса с добавлением люминола. Исходя из количества заданных циклов по программе, величина пика I_{max} была достигнута с последующим понижением.

В табл. 1 представлены результаты исследования кислород-зависимой активации нейтрофилов методом хемилюминесценции через 3 ч после введения средства.

Таблица 1

№	Контроль I_{max} , mV	Опыт I_{max} , mV
1	0,783	0,544
2	0,824	0,482
3	0,835	0,552
4	0,91	0,77
5	0,888	0,557
6	1,057	0,655
7	1,023	0,512
8	0,83	0,569
9	0,975	0,575
10	0,728	0,6
Среднее	0,8853	0,5816

Судя по полученным данным, видимой разницы между контролем и опытом (животные, забитые через 3 ч после введения препарата) не наблюдается, и можно сделать вывод о том, что спустя 3 ч после внутримышечного введения препарата изменения показателей кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов крови не выявлены, а скорее даже несколько подавлены с учетом данных опытной группы (см. фиг. 3). На фиг. 3 по горизонтальной оси указаны номера исследованных кювет, а по вертикальной оси указаны значения максимального показателя хемилюминесценции I_{max} , mV.

Экспериментальные данные результатов исследования кислород-зависимой активации нейтрофилов методом хемилюминесценции через 24 ч после внутримышечного введения средства представлены в табл. 2, где показано, что через сутки после достигается значительное достоверное ($p=0,01$) увеличение максимального показателя хемилюминесценции I_{max} , отношение среднего значения опытного к контролю составляет 4,655162.

Таблица 2

№	Контроль I_{max} , mV	Опыт I_{max} , mV
1	0,952	5,052
2	0,935	3,183
3	0,991	4,68
4	1,239	6,3
5	0,993	3,881
6	0,958	3,487
7	1,013	4,135
8	0,991	4,921
9	0,849	5,155
10	0,188	5,349
Среднее	0,991222	4,6143 ($p=0,01$)

Следует отметить, что в 10-й кювете в контроле явно виден дискордантный (выбивающийся из общих значений) результат, поэтому при оценке среднего результата его не учитывали.

Полученные данные позволяют говорить о существенном повышении кислородозависимого метаболизма нейтрофилов под влиянием испытуемого препарата, что опосредованно можно расценить как активация митохондрий в данной клеточной субпопуляции (см. фиг. 4). На фиг. 4 по горизонтальной оси указаны номера исследованных кювет, а по вертикальной оси указаны значения показателя I_{max} , mV.

Результаты исследований кислородзависимой активации нейтрофилов методом хемилюминесценции через 3 недели после внутримышечного (в/м) введения средства (группа 5, пул из 5 животных) и после двукратного в/м введения (группа 6, пул из 5 животных) представлены в табл. 3.

Таблица 3

№	Контроль I_{max} , mV	Опыт 1 I_{max} , mV (3 недели 1-кратное введение препарата)	Опыт 2 I_{max} , mV (3 недели+3 часа 2-кратное введение препарата)
1	0,643	1,283	0,662
2	0,642	1,597	0,658
3	0,651	1,543	0,674
4	0,675	1,103	0,688
5	0,641	1,45	0,617
Среднее	0,651	1,395	0,66

Для подтверждения результатов был выполнен дополнительный анализ оставшихся десяти животных (5 из 5 группы и 5 из 6 группы) (см. табл. 4).

Таблица 4

№	Контроль, mV	Опыт 1, mV (3 недели, 1-кратное введение препарата)	Опыт 2, mV (3 недели, 2-кратное введение препарата)
1	1,163	2,046	1,593
2	1,043	1,523	1,271
3	1,067	1,76	1,695
4	0,645	1,992	1,139
5	0,64	1,91	0,935
Среднее	0,903	1,846	1,327

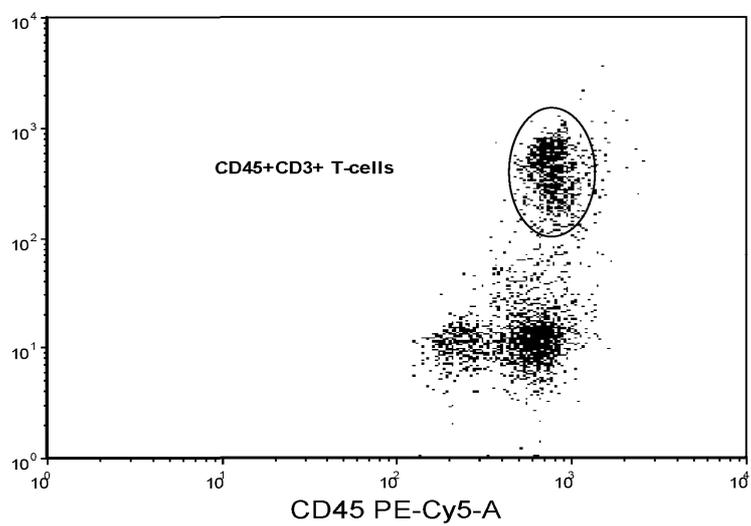
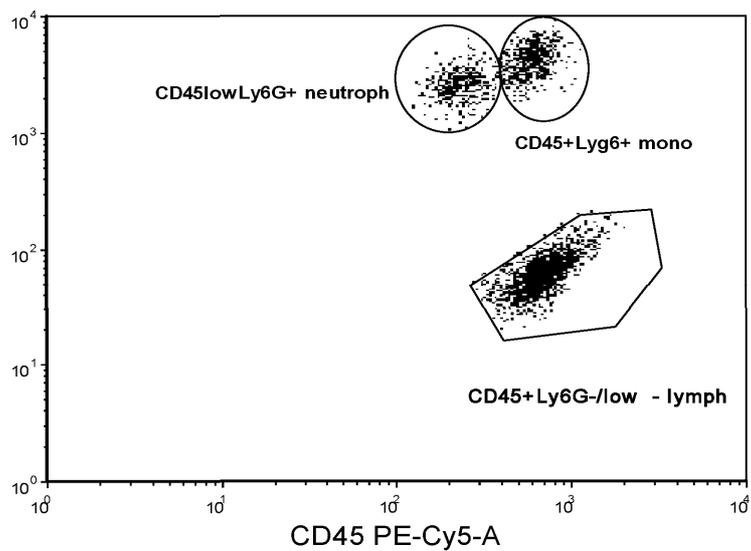
Согласно полученным данным, выявлена тенденция к практически 2-кратному повышению активности нейтрофилов у животных, исследования которых проводили через 3 недели после первого введения препарата. У отдельных животных, подвергшихся двукратному введению препарата, также выявлена разница в активации нейтрофилов в сравнении с контролем, но в целом при этом однократное введение препарата было более эффективным в сравнении с двукратным введением.

На фиг. 6 представлено сравнение средних показателей хемилюминесценции во всех анализируемых группах. По горизонтальной оси указано время исследования после инъекции препарата, а по вертикальной оси указаны результаты I_{max} , mV. На фиг. 6 представлено сравнение средних показателей хемилюминесценции во всех анализируемых группах и видно, что под влиянием заявляемого средства проявляется кислород-зависимая активация нейтрофилов. При этом максимальный эффект выявлен спустя сутки от введения препарата, данный эффект сохранялся в течение трех недель, постепенно снижаясь.

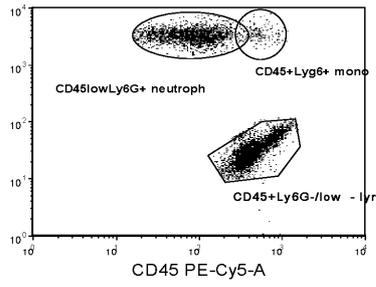
Таким образом, после проведения экспериментов выявлено влияние препарата на $\delta\psi$ митохондрий. Через несколько часов после введения препарата происходит активация нормальных здоровых митохондрий, что проявляется в их поляризации. Данные процессы выявлены на разных сроках от введения препарата и в различных клеточных популяциях. На более ранних сроках наибольший и равномерный эффект проявился на моноцитах, в то время как более длительное воздействие препарата приводило к поляризации мембран в лимфоцитах и у некоторых особей в суммарной популяции моноцитов-нейтрофилов крови. Полученные данные подтверждают возможность активации митохондрий под влиянием заявляемого средства.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

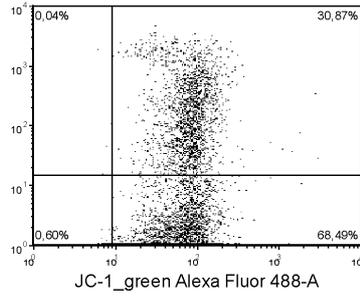
Применение иммуномодулирующего средства для внутримышечных инъекций, содержащего активную часть в виде муравьиного альдегида в количестве 0,076-0,078% и добавку в виде изотонического раствора хлорида натрия для инъекций 0,85-0,95%-ной концентрации - остальное, в качестве средства для повышения мембранного потенциала митохондрий и повышения кислородзависимого метаболизма нейтрофилов.



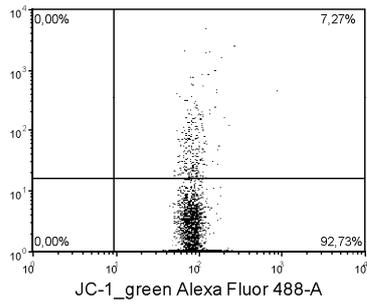
Фиг. 1



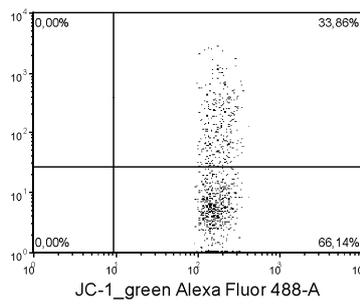
А



Б

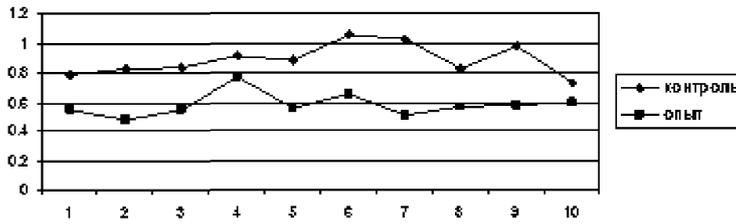


В

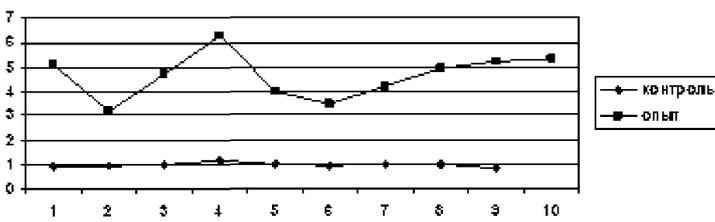


Г

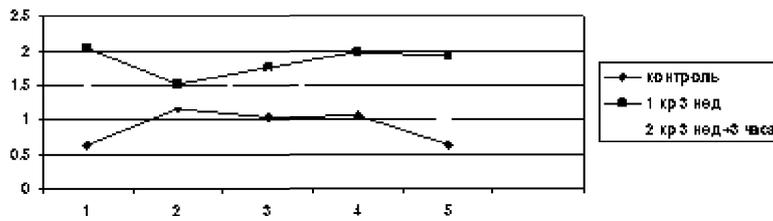
Фиг. 2



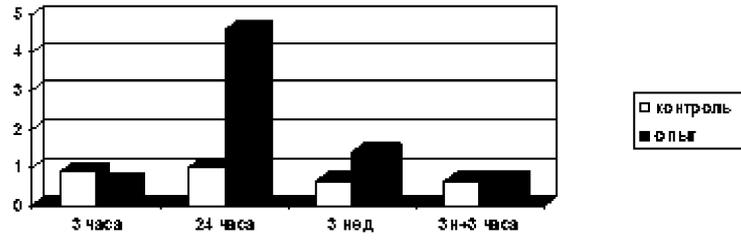
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

