

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В  
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРОМ О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация  
Интеллектуальной Собственности  
Международное бюро



(10) Номер международной публикации  
**WO 2023/287322 A1**

(43) Дата международной публикации  
19 января 2023 (19.01.2023)

WIPO | PCT

(51) Международная патентная классификация:  
A61K 31/115 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)  
A61K 9/08 (2006.01)

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2022/050007

(22) Дата международной подачи:  
13 января 2022 (13.01.2022)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:  
2021120402 12 июля 2021 (12.07.2021) RU

(72) Изобретатели; и

(71) Заявители: ЛАСКАВЫЙ, Владислав Николаевич  
(LASKAVY, Vladislav Nikolaevich) [RU/RU]; ул. Усть-  
Курдюмская, д. 4, кв. 174 г. Саратов, 410018, g. Saratov  
(RU). ШУРДОВ, Михаил Аркадьевич (SHURDOV,  
Mikhail Arkadevich) [RU/RU]; ул. Усачева, д. 2, стр. 3,  
кв. 233 Москва, 119049, Moscow (RU).

(74) Агент: ГЕМБИЦКАЯ, Елена Ивановна  
(GEMBITSKAYA, Elena Ivanovna); ул. Посадского, д.  
228/244, кв.59 Саратов, 410005, Saratov (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для  
каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM,  
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ,  
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,  
HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN,  
KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,  
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,  
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,  
SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для  
каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ,  
UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,  
TJ, TM), европейский (AL, AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,  
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,  
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,  
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Декларации в соответствии с правилом 4.17:

— касающаяся установления личности изобретателя  
(правило 4.17 (i))

Опубликована:

— с отчётом о международном поиске (статья 21.3)  
— в черно-белом варианте; международная заявка в  
поданном виде содержит цвет или оттенки серого и  
доступна для загрузки из PATENTSCOPE.

(54) Title: AGENT FOR CORRECTING MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION

(54) Название изобретения: СРЕДСТВО ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

(57) Abstract: The invention relates to the field of experimental medicine and concerns the creation of a novel effective agent for correcting mitochondrial dysfunction in laboratory animals. The claimed invention addresses the technical problem of creating an effective and easy-to-use agent for the experimental correction of mitochondrial dysfunction. The technical result consists in increasing mitochondrial membrane potential and increasing neutrophil oxygen-dependent metabolism. This technical result is achieved by using an immunomodulatory agent for intramuscular injection, containing formaldehyde in an amount of 0.076-0.078% in an isotonic solution of sodium chloride at a concentration of 0.85-0.95%, as an agent for increasing mitochondrial membrane potential and increasing neutrophil oxygen-dependent metabolism.

(57) Реферат: 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.



WO 2023/287322 A1

## СРЕДСТВО ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

Изобретение относится к области экспериментальной медицины, и касается создания нового эффективного средства для коррекции  
5 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  
10 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  
15 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  
20 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 нейропротективного средства, в качестве которого используют цереброкурин, который вводят внутривентриально раз  
25 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  
30 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  
5 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.

10 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  
15 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  
20 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  
25 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-),  
30 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  
35 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 часа после введения средства (фиг. 3), через 24 часа (фиг. 4), через 3 недели (фиг.5);

на фиг. 6 – сравнение средних показателей кислород-зависимого метаболизма нейтрофилов крови методом хемилюминесценции 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 HCOH. 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 хемилюминесценции

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 (CBAxС57Bl6). 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  $20,5 \pm 0,24$  г.). Забой животных осуществляли методом декапитации под эфирным наркозом через 1, 3 и 24 часа 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 испытуемому препарату объем физиологического раствора (0,9% раствор NaCl) -10 животных

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

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

4 – животные, получившие указанную дозу препарата и подвергнутые эвтаназии через 24 часа от введения – 20 животных

5 - животные, получившие препарат и подвергнутые эвтаназии через 3 недели от введения препарата -20 животных

5           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 часа от повторного введения -20 животных.

Забор крови производили в одноразовые стерильные пробирки с раствором К<sub>2</sub>ЭДТА.

10           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, 15 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 обобщение, что деполяризация митохондрий является одним из первых событий, происходящих во 20 время апоптоза, и может даже быть предпосылкой для высвобождения цитохрома c.

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 25 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 30 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 35 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 митохондриях 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 JC-1red+ (агрегаты) клеток можно говорить о состоянии мембраны митохондрий в изучаемом пуле клеток и преобладание JC-1red+ (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+CD45<sup>low</sup> клеток), а также дополнительно количество BCL-2+ клеток оценено в пределах CD45+CD3+ T-клеток. Оцениваемые популяции представлены на фиг 1 А, Б.

На фиг. 2 А – 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+CD45<sup>low</sup> клеток).

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

На фиг. 2 Г - 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 хемилюминесценции.

Пулированную периферическую кровь (5 контролей и 10 опытных особей) разбавляли рабочим раствором 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/см<sup>3</sup> и 10 мл г/см<sup>3</sup> 11191 Мерс).

Кольцо мононуклеаров аккуратно отбирали, мононуклеары переносили в пробирку и разбавляли раствором Хэнкса с гепарином 1:5, аккуратно ресуспендировали и центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин. В полученном образце убирали надосады, 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 таблице 1 представлены результаты исследования кислород-зависимой активации нейтрофилов методом хемилюминесценции через 3 часа 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 часа после введения препарата) не наблюдается, и можно сделать вывод о том, что спустя 3 часа 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 часа после внутримышечного введения средства представлены в таблице 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 <sub>max</sub> , mV	Опыт I <sub>max</sub> , 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<sub>max</sub>, mV.

Результаты исследований кислородзависимой активации нейтрофилов методом хемиллюминесценции 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 таблице 3.

Таблица 3

№	Контроль I <sub>max</sub> , mV	Опыт 1 I <sub>max</sub> , mV (3 недели 1-кратное введение препарата)	Опыт 2 I <sub>max</sub> , 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. таблица 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

5

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 фигуре 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.

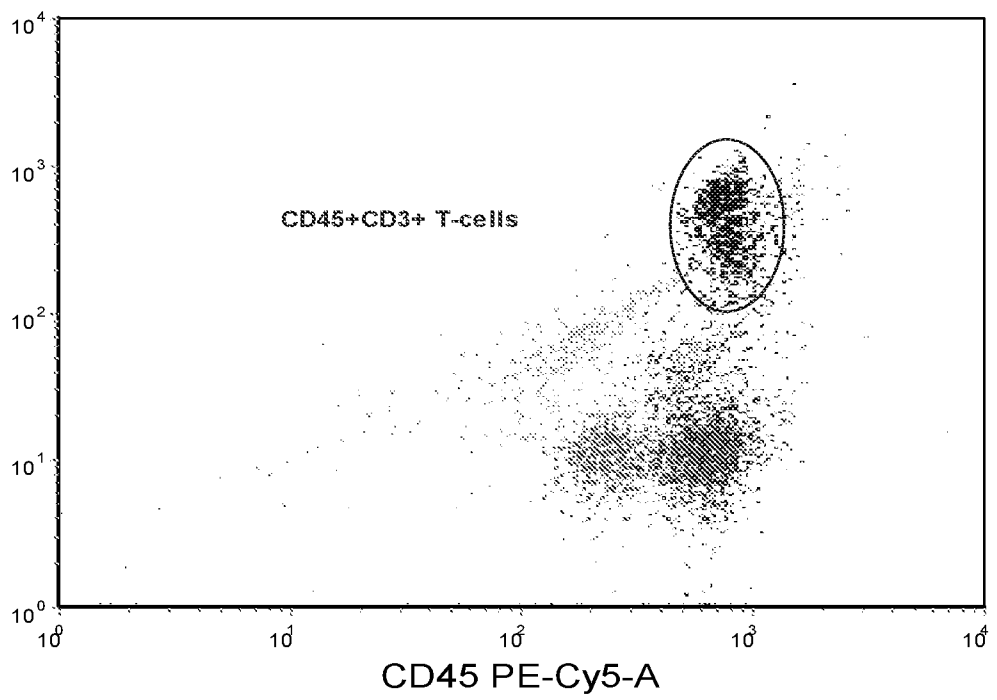
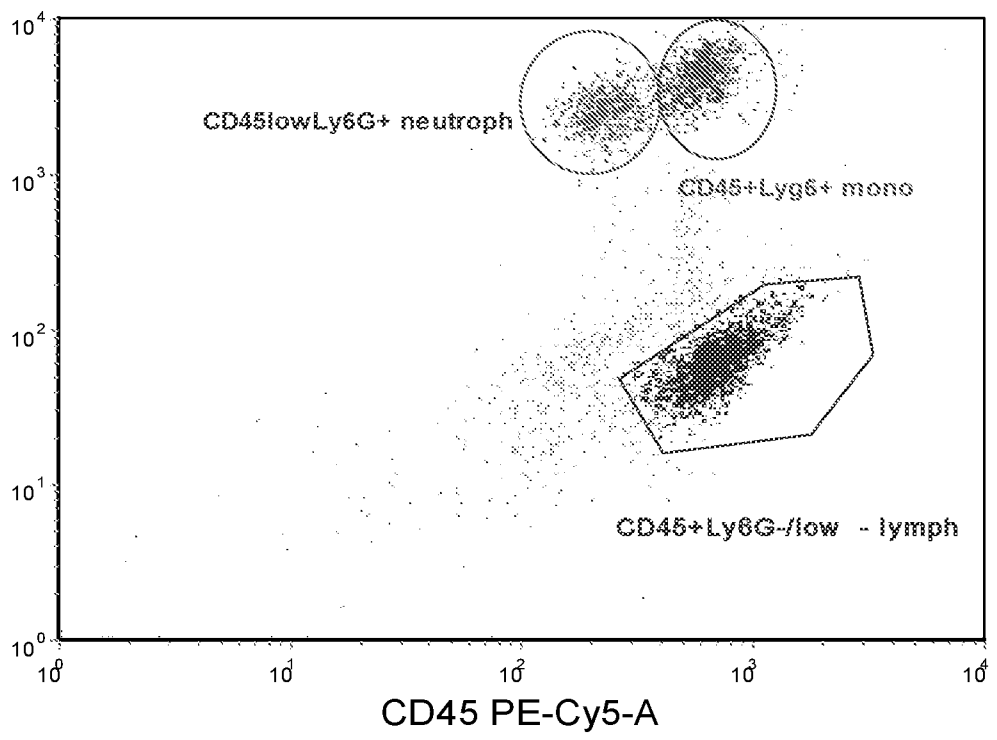
Таким образом, после проведения экспериментов выявлено влияние препарата на  $\delta\psi$  митохондрий. Через несколько часов после введения препарата происходит активация нормальных здоровых митохондрий, что проявляется в их

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 5 некоторых особей в суммарной популяции моноцитов-нейтрофилов крови. Полученные данные подтверждают возможность активации митохондрий под влиянием заявляемого средства.

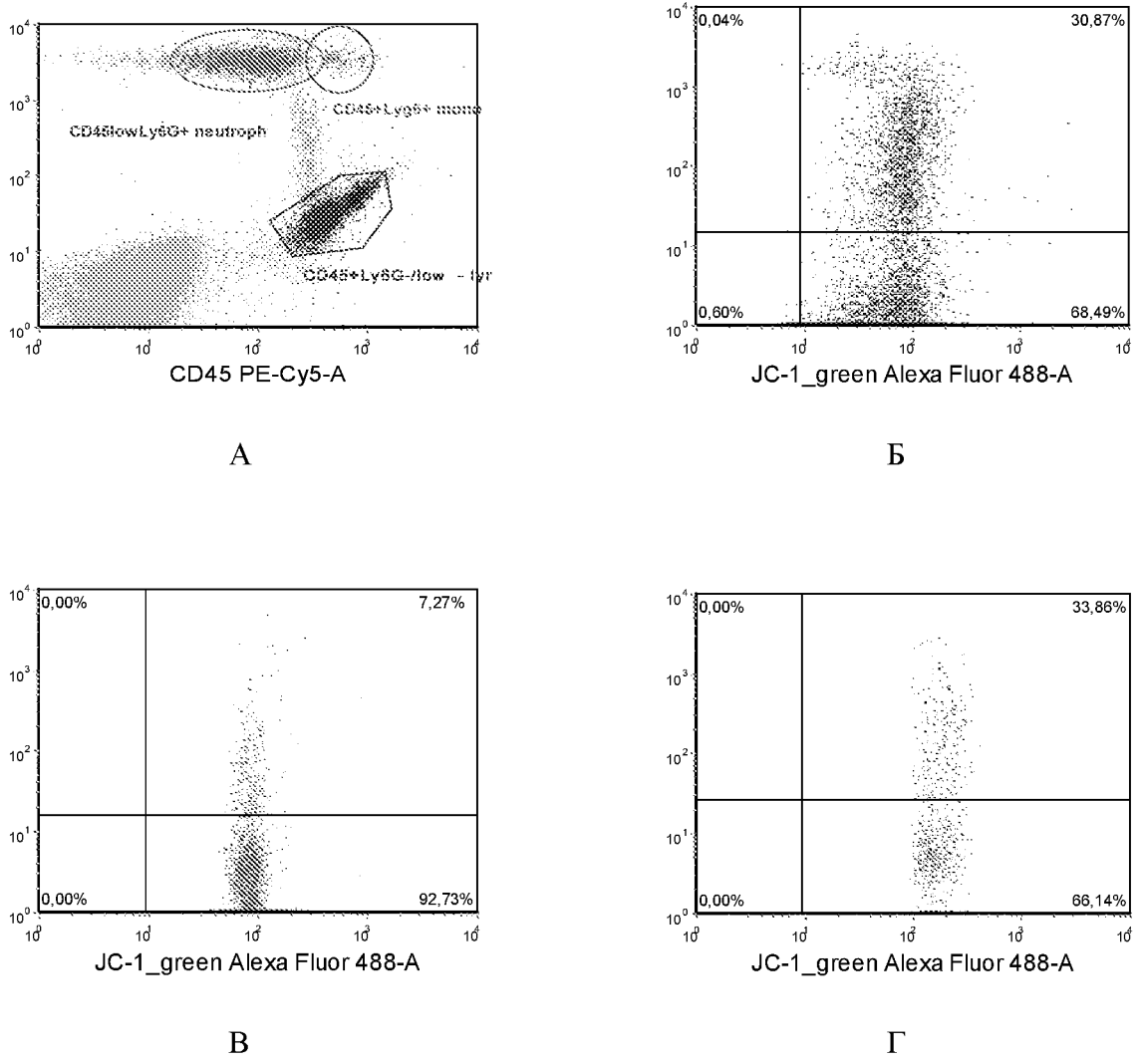
**Формула изобретения.**

5 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.

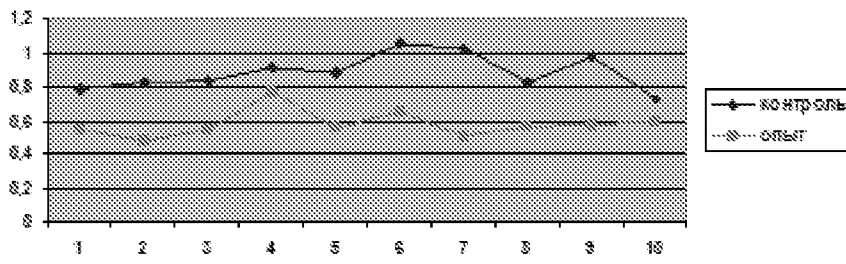
10



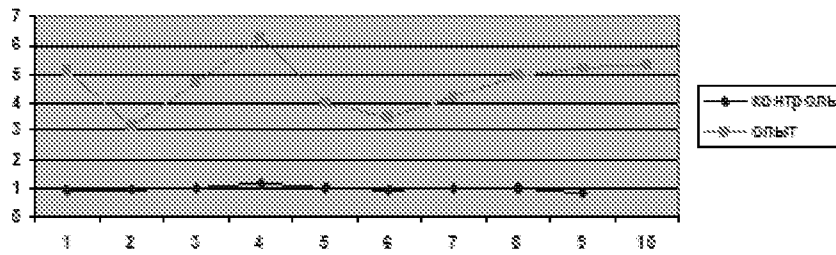
Фиг. 1



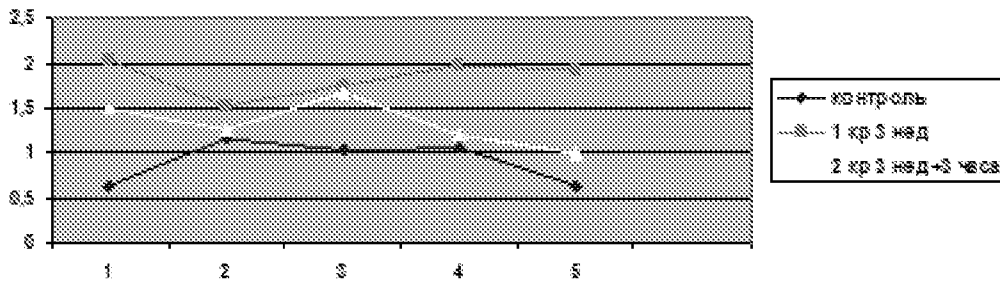
Фиг. 2



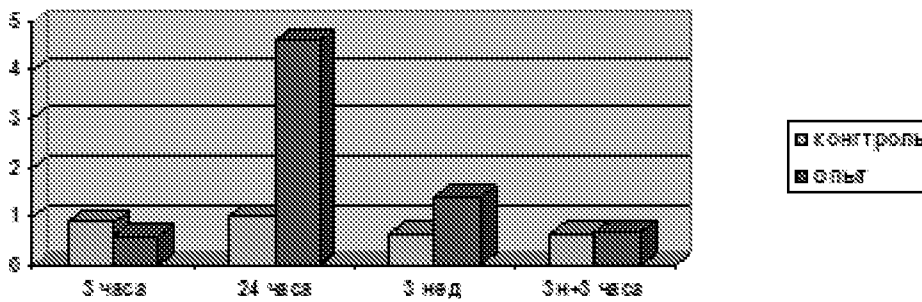
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/RU 2022/050007

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 31/115 (2006.01) A61K 9/08 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 31/00, 31/115, 9/00, 9/08, A61P 37/00, 37/02 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSearch (RUPTO Internal), USPTO, PAJ, Espacenet, Information Retrieval System of FIPS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
D, A	RU 2077882 C1 (LASKAVY VLADISLAV NIKOLAEVICH et al.) 27.04.1997, page 4, lines 1-10, the claims, examples	1
A	Mitochondrial Diseases. Cleveland Clinic medical professional on [online] 31.05.2018 [retrieved on 2021-09-28]. Retrieved from: < <a href="https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/15612-mitochondrial-diseases">https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/15612-mitochondrial-diseases</a> >	1
A	US 2014065099 A1 (ALVAREZ CARLOS CANTO et al.) 06.03.2014	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 April 2022 (21.04.2022)		Date of mailing of the international search report 05 May 2022 (05.05.2022)
Name and mailing address of the ISA/ RU Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2022/050007

<p>A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ</p> <p style="text-align: center;"><i>A61K 31/115 (2006.01)</i> <i>A61K 9/08 (2006.01)</i> <i>A61P 37/02 (2006.01)</i></p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>														
<p>B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p style="text-align: center;">A61K 31/00, 31/115, 9/00, 9/08, A61P 37/00, 37/02</p> <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p> <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)</p> <p style="text-align: center;">PatSearch (RUPTO Internal), USPTO, PAJ, Espacenet, Information Retrieval System of FIPS</p>														
<p>C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Категория*</th> <th>Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th>Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>D, A</td> <td>RU 2077882 C1 (ЛАСКАВЫЙ ВЛАДИСЛАВ НИКОЛАЕВИЧ и др.) 27.04.1997, страница 4, строки 1-10, формула, примеры</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Mitochondrial Diseases. Cleveland Clinic medical professionalon [онлайн] 31.05.2018 [найдено 2021-09-28]. Найдено из: &lt;<a href="https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/15612-mitochondrial-diseases">https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/15612-mitochondrial-diseases</a>&gt;</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2014065099 A1 (ALVAREZ CARLOS CANTO et al.) 06.03.2014</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>			Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	D, A	RU 2077882 C1 (ЛАСКАВЫЙ ВЛАДИСЛАВ НИКОЛАЕВИЧ и др.) 27.04.1997, страница 4, строки 1-10, формула, примеры	1	A	Mitochondrial Diseases. Cleveland Clinic medical professionalon [онлайн] 31.05.2018 [найдено 2021-09-28]. Найдено из: < <a href="https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/15612-mitochondrial-diseases">https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/15612-mitochondrial-diseases</a> >	1	A	US 2014065099 A1 (ALVAREZ CARLOS CANTO et al.) 06.03.2014	1
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №												
D, A	RU 2077882 C1 (ЛАСКАВЫЙ ВЛАДИСЛАВ НИКОЛАЕВИЧ и др.) 27.04.1997, страница 4, строки 1-10, формула, примеры	1												
A	Mitochondrial Diseases. Cleveland Clinic medical professionalon [онлайн] 31.05.2018 [найдено 2021-09-28]. Найдено из: < <a href="https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/15612-mitochondrial-diseases">https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/15612-mitochondrial-diseases</a> >	1												
A	US 2014065099 A1 (ALVAREZ CARLOS CANTO et al.) 06.03.2014	1												
<p><input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы C.      <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении</p>														
<p>* Особые категории ссылочных документов:</p> <table border="0"> <tr> <td>“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</td> <td>“Т” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</td> </tr> <tr> <td>“D” документ, цитируемый заявителем в международной заявке</td> <td>“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</td> </tr> <tr> <td>“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</td> <td>“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</td> </tr> <tr> <td>“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</td> <td>“&amp;” документ, являющийся патентом-аналогом</td> </tr> <tr> <td>“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</td> <td></td> </tr> </table>			“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	“Т” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение	“D” документ, цитируемый заявителем в международной заявке	“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности	“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста	“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	“&” документ, являющийся патентом-аналогом	“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.		“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	
“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	“Т” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение													
“D” документ, цитируемый заявителем в международной заявке	“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности													
“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста													
“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	“&” документ, являющийся патентом-аналогом													
“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.														
“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета														
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p style="text-align: center;">21 апреля 2022 (21.04.2022)</p>		<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p style="text-align: center;">05 мая 2022 (05.05.2022)</p>												
<p>Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП-3, Россия, 125993 Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37</p>		<p>Уполномоченное лицо:  Голубева Е.  Телефон № (499) 240-25-91</p>												