

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036957**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

**2021.01.20**

(21) Номер заявки

**201890777**

(22) Дата подачи заявки

**2014.01.21**

(51) Int. Cl. **A61K 31/66** (2006.01)  
**A61K 31/4353** (2006.01)  
**A61K 31/4355** (2006.01)  
**A61K 31/352** (2006.01)  
**A61P 39/06** (2006.01)

(54) **СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО РАССТРОЙСТВА**(31) **61/755,234**(32) **2013.01.22**(33) **US**(43) **2018.08.31**(62) **201591383; 2014.01.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ООО МИТОТЕХ (RU)**

(72) Изобретатель:

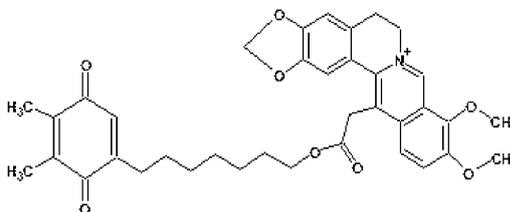
**Скулачев Максим В., Скулачев  
Владимир П., Плотников Егор И.,  
Зоров Дмитрий Б., Зиновкин  
Роман А., Лукашев Александр Н.,  
Егоров Максим В., Ловат Максим Л.  
(RU)**

(74) Представитель:

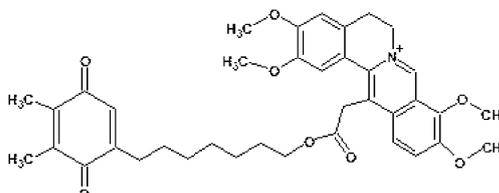
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **WO-A1-2012167236  
US-A1-20110053895  
RU-C1-2244546**

(57) Изобретение относится к области фармакологии и медицины и, в частности, к лечению воспалительного расстройства, выбранного из группы, состоящей из острого пиелонефрита, гепатита и панкреатита, где способ включает введение субъекту одного или более антиоксидантов, направленных на митохондрии, где антиоксидант выбирают из SkQB1:



или его восстановленной (хинольной) формы SkQB1H<sub>2</sub> или SkQBP1:



или его восстановленной (хинольной) формы SkQBP1H<sub>2</sub>.

**036957**  
**B1**

**036957**  
**B1**

### Перекрестные ссылки на родственные заявки

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет и преимущества предварительной заявки на патент США № 61/755234, озаглавленной "Способ лечения воспалительных состояний с помощью антиоксидантов, направленных на митохондрии" ("Method of Treatment of Inflammatory Conditions With Mitochondrially Targeted Antioxidants"), зарегистрированной 22 января 2013 г, содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области фармакологии и медицины и, в частности, к лечению воспалительного расстройства, выбранного из группы, состоящей из острого пиелонефрита, гепатита и панкреатита.

### Предпосылки создания изобретения

Инфильтрация лейкоцитов в ответ на бактериальную инвазию может привести к повреждению ткани (Gupta et al. (1996b), *Kidney Int.* 49:26-33). Инфильтрация лейкоцитов в ответ на инфекцию патогеном не приводит к патологическим изменениям в ткани, поскольку реакционноспособные виды кислорода (ROS), образованные макрофагами и лейкоцитами, остаются в фагоцитарных вакуолях внутри этих клеток. Однако основной механизм антипатогенного ответа (в случае воспаления, вызванного инфекцией) вовлекает образование ROS НАДФН оксидазами нейтрофилов и макрофагов (Sanmun et al. (2009), *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 297:C621-631). Выход ROS из клеток становится разрушительным и ведет к повреждению и дисфункции ткани (Mundi et al. (1991), *Infect. Immun.* 59:4168-4172). Кроме высвобождения ROS, воспалительная реакция вовлекает также высвобождение цитокинов, эйкозаноидов, активацию комплемента и мобилизацию деструктивных ферментов (Nassar and Badr (1998) *J. Nephrol.* 11:177-184), и мононуклеарных клеток (MNC), т.е. макрофагов и моноцитов, которые играют определенную роль в таких повреждениях ткани (Friedewald and Rabb (2004), *Kidney Int.* 66:486-491). Так, например, было показано, что такой симптом повреждения ткани, как фиброз, намного меньше выражен, когда снижен уровень инфильтрации моноцитов в почки.

Острый пиелонефрит (APN) представляет собой пример расстройства, первоначально вызванного бактериальной инфекцией, в случае которого воспалительный ответ на инфекцию ведет к повреждению почки и дисфункции. Хотя в норме и почка, и мочевыводящие пути являются стерильными, в процессе жизни примерно у 40% женщин и 12% мужчин возникают инфекции мочевыводящих путей (UTI) (O'Hanley, (1996) In: *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management* (Mobley et al., eds), (Washington, DC: ASM Press), p. 405-425). Острый пиелонефрит (APN) относится к потенциально опасным для жизни инфекциям мочевыводящих путей (UTI), который возникает, если инфекция развивается и захватывает верхние мочевыводящие пути. Чаще всего, уропатоген, связанный с этим заболеванием, относится к пиелонефритогенной подгруппе *Escherichia coli*, которая обнаруживается в 85% случаев осложненных и неосложненных инфекций мочевыводящих путей (UTI) (Hill et al. (2005), *Qbstet. Gynecol.* 105:18-23).

Фармакологическое лечение острого пиелонефрита (APN) применяется для контроля реакций окислительного стресса, что дает терапевтический эффект в направлении предотвращения развития почечных патологий (Aydogdu et al. (2006), *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33:119-124; Koynier et al. (2008), *Nephron. Exp. Nephrol.* 109:e109-117; Polo-Romero et al. (2004), *Ren. Fail.* 26:613-618; Rodrigo et al. (2004), *Nephrol. Dial-Transplant.* 19:2237-2244; Sadeghi et al. (2008), *Pediatr. Nephrol.* 23:1503-1510; Singh et al. (2004), *Toxicology*, 201:143-151). Однако лечение такого рода осложняется многообразием механизмов образования множества ROS, а также их различным вкладом в создание защиты организма от инфекций и повреждений коллатеральных тканей. Митохондрии и НАДФН оксидазы представляют собой два основных источника ROS, хотя их относительный вклад в воспалительную патологию еще не совсем хорошо определен.

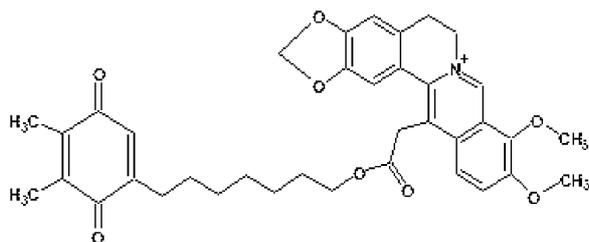
Таким образом, имеется потребность в усовершенствованных способах лечения, или подавления, или предупреждения повреждений тканей, связанных с высвобождением ROS, которые возникают в результате воспаления, сопровождающего некоторые заболевания.

### Краткое описание сущности изобретения

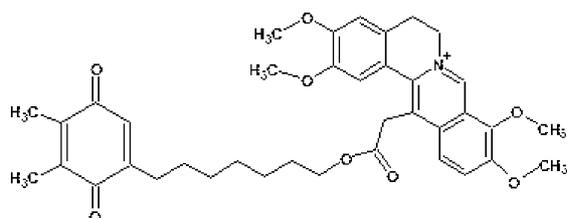
Было показано, что ключевым элементом в развитии некоторых воспалительных расстройств является избыточное образование реакционноспособных видов кислорода (ROS), отмечаемое на всех стадиях прогрессирования патологического процесса. На основании этого открытия были разработаны применяемые в настоящее время способы ослабления или снижения окислительного стресса в некоторых тканях за счет использования целевых МТА, направленных на митохондрии, как на мишени, в этих тканях. Было также обнаружено, что указанные МТА препятствуют активации нейтрофилов в ходе воспалительного процесса, что способствует снижению вредных воздействий воспаления при разного рода расстройствах и заболеваниях.

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения воспалительного расстройства, выбранного из группы, состоящей из острого пиелонефрита, гепатита и панкреатита, где способ включает введение субъекту одного или более антиоксидантов, направленных на митохондрии, где антиоксидант выбирают из

SkQB1:

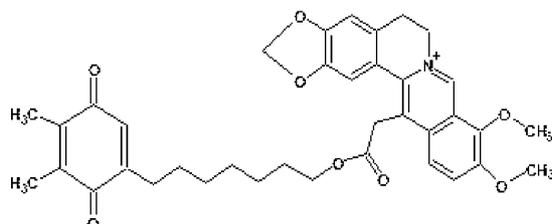


или его восстановленной (хинольной) формы SkQB1H<sub>2</sub> или SkQBP1:



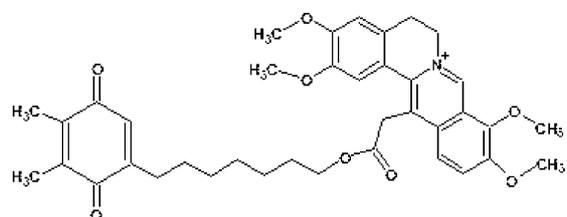
или его восстановленной (хинольной) формы SkQBP1H<sub>2</sub>.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанный антиоксидант представляет собой SkQB1:



или его восстановленную (хинольную) форму SkQBP1H<sub>2</sub>.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанный антиоксидант представляет собой SkQBP1:



или его восстановленную (хинольную) форму SkQBP1H<sub>2</sub>.

#### Краткое описание чертежей

Указанные выше и другие объекты настоящего изобретения, их различные характеристики, а также в целом само изобретение будут более полно представлены в приведенном ниже описании и станут более понятными, если его читать, просматривая сопровождающий описание графический материал, где:

на фиг. 1А показана фотография нормальной почки из контрольного организма;

на фиг. 1В показана фотография почки, пораженной пиелонефритом;

на фиг. 1С показана фотография почки, пораженной пиелонефритом, но при проведении лечения с использованием SkQR1;

на фиг. 2А показана фотография гистологического среза коры почки от контрольной крысы, после его окрашивания гематоксилином и эозином;

на фиг. 2В показана фотография гистологического среза коры почки от крысы с пиелонефритом;

на фиг. 2С показана фотография гистологического среза коры почки от крысы с пиелонефритом, после лечения с использованием SkQR1;

на фиг. 3А показана фотография гистологического среза мозгового вещества от контрольного организма, после окрашивания среза гематоксилином и эозином;

на фиг. 3В показана фотография гистологического среза мозгового вещества от крысы с пиелонефритом, после окрашивания среза гематоксилином и эозином;

на фиг. 3В показана фотография гистологического среза мозгового вещества от крысы с пиелонефритом при проведении лечения с использованием SkQR1;

на фиг. 4 приведен график, иллюстрирующий воспалительный индекс (см. методы) в мозговом веществе и коре почки, показанных на фиг. 2 и 3;

на фиг. 5A приведен график, иллюстрирующий воспаление в почке, где указанное воспаление сопровождалось окислительным стрессом, как это было видно по уровню накопления MDA в ткани;

на фиг. 5B приведен график, иллюстрирующий воспаление в почке, где указанное воспаление сопровождалось окислительным стрессом, на основании результатов определения активности MPTO (масштабное обозначение, 50 мкм. \*  $p < 0,01$ , \*\* -  $p < 0,05$ );

на фиг. 6A приведена микрофотография почечноканальцевых клеток (RTC) из контрольного организма, полученная с помощью конфокального микроскопа, с последующим окрашиванием DCF-DA (масштабное обозначение, 50 мкм), где не отмечается какой-либо заметной флуоресценции DCF;

на фиг. 6B приведено изображение контрольных почечноканальцевых клеток (RTC), инкубированных с активированными лейкоцитами (LC) вместе с бактериальным лизатом (BL) и окрашенных с использованием DCF-DA (масштабное обозначение, 50 мкм), где отмечается усиленная флуоресценция;

на фиг. 7A приведен график, показывающий количественные результаты и эффекты, относящиеся к RTC, которые были обработаны различными способами и затем окрашены с использованием DCF-DA (масштабное обозначение, 50 мкм);

на фиг. 7B приведен график, показывающий концентрацию нитрита как индикатора общей продукции NO в RTC, которые были обработаны различными способами;

на фиг. 7C приведен график, иллюстрирующий образование NO в RTC, по результатам оценки DAF-2FM флуоресценции в RTC, которые были обработаны различными способами;

на фиг. 7D приведен график, иллюстрирующий гибель клеток RTC и защитные эффекты некоторых лекарственных средств (\* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,05$ );

на фиг. 8A приведен график, иллюстрирующий увеличенное число лейкоцитов в крови у контрольных крыс, у крыс с пиелонефритом и у крыс с пиелонефритом, которых лечили с использованием SkQR1;

на фиг. 8B приведен график, иллюстрирующий увеличенное число нейтрофилов у контрольных крыс, у крыс с пиелонефритом и у крыс с пиелонефритом, которых лечили с использованием SkQR1;

на фиг. 8C приведен график, показывающий концентрацию моноцитов в крови у контрольных крыс, у крыс с пиелонефритом и у крыс с пиелонефритом, которых лечили с использованием SkQR1 (\* $p < 0,05$  в сравнении с контролем; \*\* $p < 0,05$  в сравнении с группой APN);

на фиг. 8D приведен график, показывающий уровень лимфоцитов у контрольных крыс, у крыс с пиелонефритом и у крыс с пиелонефритом, которых лечили с использованием SkQR1 (\* $p < 0,05$  в сравнении с контролем; \*\* $p < 0,05$  в сравнении с группой APN);

на фиг. 8E приведен график, показывающий уровень лимфоцитов у крыс после индукции пиелонефрита, где наблюдается продукция провоспалительного TNF $\alpha$ ;

на фиг. 8F приведен график, показывающий концентрацию нейтрофилов в крови у крыс после индукции пиелонефрита и лечения с использованием SkQ1;

на фиг. 8G приведен график, иллюстрирующий активность миелопероксидазы (MPO) у крыс через 7 дней после индукции пиелонефрита и лечения с использованием SkQ1;

на фиг. 9A-9C приведены сканы, показывающие, что увеличение числа нейтрофилов сопровождается бурным ростом уровня ROS в этих клетках;

на фиг. 9D проиллюстрировано предотвращение воспалительных изменений в результате лечения с использованием SkQR1 (\* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,05$ );

на фиг. 10A приведено изображение результатов анализа в ДСН-геле, где наблюдается антиапоптотный Bcl-2 у контрольных крыс, у крыс с пиелонефритом и у крыс с пиелонефритом, которых лечили с использованием SkQR1;

на фиг. 10B приведено изображение результатов анализа в ДСН-геле, где показан Bcl-2 в изолированных митохондриях из контрольных крыс, крыс с пиелонефритом и крыс с пиелонефритом, которых лечили с использованием SkQR1;

на фиг. 10C приведен график, иллюстрирующий результаты, показанные на фиг. 10A;

на фиг. 10D приведен график, иллюстрирующий результаты, показанные на фиг. 10B;

на фиг. 11 приведен график, иллюстрирующий уровень выживаемости для контрольных крыс, крыс с пиелонефритом и крыс с пиелонефритом, которых лечили с использованием SkQR1;

на фиг. 12 приведена диаграмма, схематически иллюстрирующая изменения в количестве лейкоцитов и почечных клеток и имеющихся в них митохондрий после бактериальной инвазии (синим цветом обозначены элементы, относящиеся к выжившим животным, и красные, к погибшим). NOX =-НДЦФН оксидаза; iNOS - индуцибельная NO-синтаза; TNFR - рецептор для TNF- $\alpha$ ; RIRR - ROS-индуцированный каскад высвобождения ROS; P-GSK-3 $\beta$  и GSK-3 $\beta$ , относящиеся к характерным для выживающих животных (фосфорилированные) и проапоптотным (дефосфорилированные) формам киназы гликоген-синтазы 3 $\beta$ ;

на фиг. 13A приведен график, иллюстрирующий продукцию TNF $\alpha$  в совместной культуре RTC и активированных лейкоцитов (LC+BL), которую не обрабатывали или обрабатывали с использованием

Тролокса (Trolox), SkQR1, где видно, что уровень  $TNF\alpha$  значительно выше в активированных LC, чем в контрольных LC, особенно в варианте совместной культуры с RTC, тогда как инкубирование с указанными лекарственными средствами не оказало никакого эффекта;

на фиг. 13В приведен график, иллюстрирующий продукцию  $TNF\alpha$  в RTC в нормальной и кондиционированной лейкоцитами среде, по данным оценки флуоресценции DCF (\* $p < 0,01$ );

на фиг. 14А приведена фотография ДСН-геля, на которой проиллюстрирована активация NF- $\kappa$ B пути, на основании экспрессии I $\kappa$ B $\alpha$  в лейкоцитах контрольных крыс, крыс с пиелонефритом и крыс с пиелонефритом, которых лечили с использованием SkQR1;

на фиг. 14В приведена фотография ДСН-геля, показывающая экспрессию P-GSK3 $\beta$  в лейкоцитах контрольных крыс, крыс с пиелонефритом и крыс с пиелонефритом, которых лечили с использованием SkQR1;

на фиг. 14С приведена фотография ДСН-геля, показывающая содержание I $\kappa$ B в лейкоцитах контрольных крыс, крыс с пиелонефритом и крыс с пиелонефритом, которых лечили с использованием SkQR1;

на фиг. 14D приведена фотография ДСН-геля, показывающая концентрацию фосфорилированного Akt в лейкоцитах контрольных крыс, крыс с пиелонефритом и крыс с пиелонефритом, которых лечили с использованием SkQR1;

на фиг. 14E приведена фотография ДСН-геля, показывающая уровни фосфо-GSK-3 $\beta$  у контрольных крыс, крыс с пиелонефритом и крыс с пиелонефритом, которых лечили с использованием SkQR1;

на фиг. 15А приведена микрофотография изображения, полученного с помощью сканирующего микроскопа, на которой видно отсутствие взаимодействия в совместной культуре RTC и активированных лейкоцитов, где стрелками показаны взаимодействия в случае тесного контакта между RTC и лейкоцитами после 24 ч совместного культивирования (бар, 10 пм, 3 пм);

на фиг. 15В приведена микрофотография изображения, полученного с помощью сканирующего микроскопа, на которой видно наличие межклеточного взаимодействия в совместной культуре RTC и активированных лейкоцитов, где стрелками показаны взаимодействия в случае тесного контакта между RTC и лейкоцитами после 24 ч совместного культивирования (бар, 10 пм, 3 пм);

на фиг. 16 приведен график, иллюстрирующий выживание лейкоцитов после активации бактериальным лизатом, по результатам определения числа GFP-позитивных лейкоцитов на чашке Петри, где почечные клетки культивировали вместе с лейкоцитами, содержащими GFP, что помогало разграничить эти два вида клеток. В условиях совместного культивирования выживание активированных лейкоцитов было выше, чем это наблюдалось в варианте культивирования без почечных клеток (1-  $p < 0,01$ );

на фиг. 17 приведен график, демонстрирующий противовоспалительный и антидиабетический эффекты разных концентраций SkQ1 и глюкозы на контакты эндотелиальных клеток, по данным определения относительного содержания VE-кадгерина;

на фиг. 18 приведена схема, демонстрирующая противовоспалительный эффект различных концентраций SkQ1 и f-MLP на нейтрофилы человека (активность желатиназы, определяемая по активности MMP9);

на фиг. 19 приведена схема, показывающая, что лечение с использованием SkQ1 предупреждает развитие отека поджелудочной железы, на экспериментальной модели острого панкреатита, где показан вес в граммах поджелудочной железы в 4 группах (приведено среднее значение и СКО).

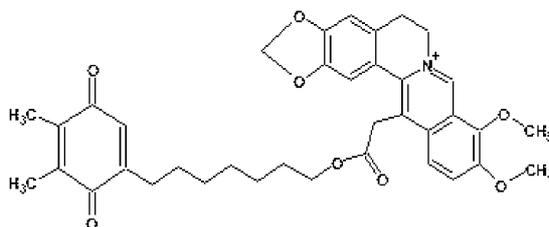
#### Подробное описание

В тексте настоящего документа приводятся ссылки на различные патенты, заявки на патенты и публикации, которые включены полностью в настоящее описание в качестве цитируемого материала, с тем, чтобы более обстоятельно охарактеризовать достигнутый уровень техники, согласно известным специалистам данным, имевшимся на момент написания и регистрации настоящего изобретения. В случае возникновения расхождения между данными, приведенными в патентах, заявках на патенты и публикации, и настоящим описанием следует рассматривать настоящее описание как приоритетный вариант.

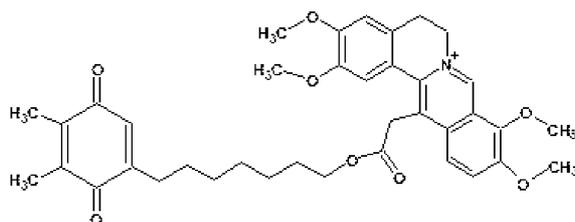
Антиоксиданты, направленные на митохондрии (МТА).

В настоящем изобретении было показано, что направленные на митохондрии антиоксиданты (МТА) оказывают эффект в направлении предупреждения и лечения воспаления, ассоциированного с множественным заболеваниями, расстройств и травм.

МТА представляет собой соединение, которое выбирают из SkQB1:



или его восстановленной (хинольной) формы SkQB1H<sub>2</sub>, или SkQB1:



или его восстановленной (хинольной) формы SkQB1H<sub>2</sub>.

Эти МТА применяются с целью профилактики и лечения патологических состояний воспалительной природы, достигаемых, по меньшей мере частично, за счет снижения или предупреждения поражения тканей, вызванного воспалением. Такие патологические состояния включают, без ограничения, пиелонефрит, панкреатит, гепатит.

Модели на основе пиелонефрита.

Пиелонефрит исследовали в качестве репрезентативной патологии воспалительной природы, поскольку митохондриальные ROS представляют собой источник повреждения клеток почки, как это было показано на экспериментальной модели APN, как в рамках стандартной *in vivo* модели, полученной при инокуляции бактерий в мочевой пузырь, так и в варианте новой *in vitro* модели воспаления, основанной на взаимодействии лейкоцитов, активированных патогенном/эндотоксином, с эпителиальными клетками почки в клеточной культуре. В результате такого рода стресса отмечалось прогрессирование окислительного стресса в клетках почки *in vitro* и гибель этих клеток. Указанный окислительный стресс вызывали лейкоциты, генерирующие ROS, а этот процесс, в свою очередь, инициировал их взаимодействие с бактериальными антигенами. После активации лейкоциты выделяли в среду ROS, NO и TNF. Подавление НАДФ-оксидазы лейкоцитов приводило к резкому снижению уровня ROS в клетках, что можно рассматривать как аргумент в пользу того, что именно лейкоциты отвечают за избыточное образование ROS в почке при пиелонефрите.

Было обнаружено, что направленные на митохондрии антиоксиданты (МТА) (например, SkQ1 и SkQR1) способны оказывать протективные эффекты (пример 1). Обработка с использованием МТА предотвращала достижение "точки невозврата" на пути к клеточной гибели (Kroemer et al. (1995), FASEB J. 9:1277-1287).

Защита клеток почки под действием SkQ1 и SkQR1 была еще более выраженной, чем это достигалось при использовании известного водорастворимого антиоксиданта, Тролокса (Trolox). Этот факт свидетельствует в пользу той роли, которую выполняет целевая направленность антиоксиданта на митохондрии в предупреждении начала и развития патологии почки. Важно отметить, что эти МТА не оказывали никакого эффекта на образование TNF $\alpha$  лейкоцитами, контактирующими с бактериальным лизатом, что позволяет предположить, что МТА не действуют за счет подавления каких-либо стадий воспаления. Таким образом, направленное воздействие на митохондриальные ROS благоприятно в условиях имеющейся инфекции, когда стандартные противовоспалительные средства действуют в направлении удаления микробов.

На экспериментальной *in vivo* модели APN была продемонстрирована роль опосредованного митохондриями окислительного стресса в поражении клеток почек. В одном из исследований уровень малонового диальдегида (MDA), который является индикатором перекисного окисления липидов (Cherubini, et al. (2005), Free Radic. Biol. Med. 39:841-852; Gupta et al. (1996a), FEMS Immunol. Med. Microbiol. 13:35-42), возрастал в почках крыс с экспериментальным APN, указывая на окислительное повреждение почки.

Кроме того, наблюдались повышенные уровни образования ROS в лейкоцитах крови у крыс с пиелонефритом. Направленный на митохондрии антиоксидант SkQR1 нормализовал уровень ROS в лейкоцитах крови и в почках животных с пиелонефритом. Лечение с использованием SkQR1 приводило также к подавлению инфильтрации нейтрофилов в пораженную заболеванием почку, а также уровня TNF $\alpha$  в ткани, указывая на высокую эффективность направленных на митохондрии антиоксидантов в предупреждении воспалительного повреждения почки.

В случае использования высокого титра бактерий, инъецируемых в мочевой пузырь, наблюдался высокий уровень гибели экспериментальных животных, что в совокупности с высоким уровнем TNF $\alpha$  и с бактериемией свидетельствовало о прогрессирующем сепсисе. МТА значительно повышали уровень выживаемости животных с тяжелым поражением APN.

Поражение почки в случае APN в основном вызвано воспалительным процессом, ассоциированным с инфекцией, а не прямым воздействием самих бактерий на почку (Bennett et al. (1999), J. Urol. 161:1681-1684); Нагаока et al. (1994), J. Urol. 151:1078-1080); Imamoglu et al. (2006), Urology 67:1315-1319). Бактериальная инвазия в почку организма-хозяина запускает систему врожденной иммунной защиты. После распознавания бактерий сигнал, создаваемый Toll-подобным рецептором (Shirali and Goldstein, (2008), J.

Am. Soc. Nephrol. 19:1444-1450), инициирует иммунный ответ, вовлекающий ядерный фактор  $\kappa\text{B}$  и продукцию цитокинов и хемокинов (Li et al. (2002) *Respir. Res.* 3:23; Ragnarsdottir et al. (2008), *Eur. J. Clin. Invest.* 38(Suppl.) 2:12-20; Tullus et al. (1997) *Acta Paediatr.* 86:1198-1202).

Было показано, что в среде с культурой лейкоцитов, взятых от крыс с пиелонефритом, со временем повышается уровень  $\text{TNF}\alpha$  и что сама эта среда может вызвать окислительный стресс в клетках почки. Как в случае *in vitro* модели, так и в случае экспериментальной модели APN отмечалось значительное повышение уровня toll-рецепторов в клетках почки и в лейкоцитах. Применение MTA, SkQR1, приводило к нормализации экспрессии этих рецепторов в разных зонах почки, активированных за счет APN. Кроме того, начало развития APN ассоциировано с активацией провоспалительных сигнальных путей в периферических лейкоцитах. Тогда как эта активация подавлялась у крыс, которым давали SkQR1.

На фиг. 11 проиллюстрирована модель патологических событий, происходящих в клетках почки и вокруг них при пиелонефрите. Эта модель поясняет возникновение повреждения в пораженных воспалением клетках и их гибель. Один из элементов в этой модели относится к роли митохондриальных ROS на всех стадиях развития патологического процесса. На большей части патологических (промежуточных) стадий сигналы, связанные с гибелью клеток и выживанием, имеют отношение к функции митохондрий, и MTA представляют собой средства против пиелонефрита с высокой эффективностью, которые позволяют предотвратить сморщивание почек и их дисфункцию, в тех случаях, когда непосредственное антибактериальное лечение ограничено (в случае детей, беременных женщин, лиц с первичным иммунодефицитом и др.) или неэффективно (в случае резистентных к антибиотикам бактериальных штаммов).

Защита организма-хозяина от инфекции может быть достигнута за счет активности механизмов резистентности и толерантности (Medzhitov et al. (2012), *Science*, 335:936-941). В настоящем исследовании (см., например, пример 1) показано, что митохондриальные ROS вносят важный вклад в повреждение ткани, вызванное воспалением, и что целенаправленное воздействие на митохондриальные ROS может повысить уровень выживаемости организма-хозяина в случае бактериальных инфекций, которые в ином варианте были бы летальными для этого организма.

Эффект MTA на проницаемость кровеносных сосудов.

Как показано в примере 2, лечение с использованием SkQ1 предотвращало разобщение контактов среди эндотелиальных клеток, вызванное применением высоких количеств глюкозы. Это выявлялось по содержанию VE-кадгерина при проведении анализа по методу иммуноблоттинга. Контакты эндотелиальных клеток по типу клетка-клетка легко нарушаются при разного рода патологических состояниях, включающих диабет, травмы, сепсис и другие воспалительные заболевания. Это ведет к повышению проницаемости кровеносных сосудов и может даже вызвать угрожающее для жизни состояние, поэтому в таких случаях следует снижать проницаемость сосудов. Было показано, что SkQ1 действует эффективно в направлении защиты эндотелиальных клеток и сосудов от воздействия высоких количеств глюкозы и от воспалительных цитокинов, присутствующих в кровотоке, и в этой связи SkQ1 полезен для профилактики и лечения патологических состояний, вызванных расстройствами в метаболизме глюкозы, включающими диабет и гипергликемию, сепсис, травму, а также хронические и острые воспалительные заболевания.

Эффект MTA на активацию нейтрофилов.

В примере 2 также показано, что применение для лечения SkQ1 предотвращает активацию нейтрофилов человека, вызванную fMet-Leu-Phe, который представляет собой аналог бактериального продукта (что было показано путем зимографического анализа). Этот результат был неожиданным, поскольку нейтрофилы человека содержат малые количества митохондрий, которые к тому же характеризуются очень низкой метаболической активностью.

Нейтрофилы человека активируются компонентами патогенов и разрушенных клеток человека, а также провоспалительными цитокинами. MMP-9 представляет собой металлопротеиназу, высвобождаемую из активированных нейтрофилов. Избыточная активация нейтрофилов ведет к массивному повреждению тканей. Известно, что активированный MMP-9 вовлекается в патогенез бронхиальной астмы и хронического обструктивного заболевания легких (Takafuji et al. (2003), *J. Investiq. Allerqol. Clin. Immunol.* 13:50-55), ишемии (Gidday et al. (2005), *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289:558-568), острого расслоения аорты (Kurihara et al. (2012), *Circulation.* 126:3070-3080), почечной болезни, травмы, сепсиса, воспаления и многих других заболеваний и патологических состояний, которые сопровождаются перестройкой ткани.

Представленные здесь данные указывают на повреждение тканей, ассоциированное с высвобождением MMP-9 из активированных нейтрофилов человека. Было показано, что SkQ1 эффективен в направлении защиты тканей человека от MMP-9-опосредованного повреждения и повреждения, вызванного патогенами и/или воспалительными цитокинами. Таким образом, SkQ1 может применяться с целью профилактики и лечения бронхиальной астмы, хронического обструктивного заболевания легких, ишемии, острого расслоения аорты, почечной болезни, травмы, сепсиса и других воспалительных заболеваний.

Эффект MTA, показанный на других моделях воспаления.

Протективный эффект MTA был также показан на модели гепатита (пример 4) и на модели панкреатита (пример 5).

Далее будут приведены конкретные примеры, иллюстрирующие и поясняющие настоящее изобретение. Следует, однако, понимать, что указанные ниже примеры даны лишь с тем, чтобы проиллюстрировать некоторые варианты осуществления настоящего изобретения, но они не направлены ни в коей мере на ограничение области настоящего изобретения.

### Примеры

#### Пример 1.

Протективный эффект МТА, показанный на модели острого пиелонефрита.

А. Экспериментальные процедуры.

1. Первичная культура клеток почки крысы.

Отбирали в асептических условиях почки от крыс 1-3-дневного возраста. Ткань измельчали и разрушали путем обработки коллагеназой (0,5%, 30 мин при температуре 37°C). Полученную суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 50 g. Осадок ресуспендировали примерно в 10 мл среды DMEM/F12 (Gibco, USA) с добавкой 10% ФСТ (Gibco, США) и выдерживали 2 мин, после чего супернатант переносили в другую пробирку и осадок повторно ресуспендировали. Через 10 мин почечные канальцы осаждали центрифугированием, а диссоциированные клетки, оставшиеся в суспензии, удаляли. Указанные гранулы суспендировали в среде DMEM/F12 с добавкой 10% ФСТ и высевали в 24-ячеечные планшеты или на покровные стекла, помещенные в 35-мм чашки Петри со стеклянным дном.

2. Культивирование бактерий.

Штамм *E.coli* No. 85 культивировали в течение ночи в среде для культивирования, содержащей 1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта и 1% NaCl (Sigma-Aldrich, США). Среду, содержащую около  $10^9$  колониеобразующих единиц (КОЕ (CFU)) на 1 мл, центрифугировали со скоростью 300 g в течение 3 мин. Бактериальный лизат получали при разбавлении 30 мл ночной культуры (ON) и с этой целью осадок разводили в 3 мл 0,9% NaCl, после чего все автоклавировали в течение 1,5 ч при температуре 120°C.

3. Получение лейкоцитов из периферической крови.

Тщательно наносили в виде слоя 5 мл гепаринизированной крови, взятой из яремной вены взрослых самцов крыс, на 5 мл Ficoll-Urografin (плотность 1,077 г/см<sup>3</sup>), и далее проводили центрифугирование в течение 30 мин при 200 g. Эта процедура приводила к осаждению эритроцитов, тогда как мононуклеарная фракция лейкоцитов формировала межфазное кольцо на поверхности фикола (Ficoll), которое осторожно отбирали. Полученные таким образом лейкоциты переносили в другую пробирку и центрифугировали в течение 3 мин при 200 g. Образующийся осадок ресуспендировали в 5 мл среды DMEM/F12. После подсчета числа клеток в гемоцитометре, указанные клетки разбавляли до конечной концентрации примерно  $1 \times 10^5$  клеток/мл.

Для получения нейтрофилов переносили соответствующую фракцию из градиента, полученного на фиколе (Ficoll), в другую пробирку и смешивали с 10 мл среды DMEM/F12, после чего центрифугировали в течение 3 мин при 200 g. Полученный в итоге осадок, содержащий нейтрофилы, ресуспендировали в 5 мл среды DMEM/F12, подсчитывали число клеток и далее разбавляли их до уровня  $1 \times 10^5$  клеток/мл.

Применяли такую же процедуру для получения лейкоцитов из мышей GFP.

4. Модель воспаления *in vitro*.

В двухдневной культуре клеток почки культуральную среду заменяли средой DMEM/F12 (400 мкл на ячейку, 1600 мкл на чашку Петри) с добавлением (в зависимости от цели): GSK-3β ингибитора LiCl (9 мМ) (Sigma-Aldrich, США), водорастворимого антиоксиданта Тролокс (Trolox) (50 мкМ, 100 мкМ) (Sigma-Aldrich, США), МТА 10-(6-пластохинонил)децил-трифенилфосфония (SkQ1), синтезированного по методу Antonenko et al. (2008), Biochemistry (Mosc), 73:1273-87), 10 нМ, 100 нМ) и 10-(6'-пластохинонил)децилпроамина 19 SkQR1), синтезированного по методу Antonenko (2008) (1 нМ, 10 нМ или 100 нМ). Клетки почки инкубировали в этой среде в течение 2 ч с последующим добавлением в нее лейкоцитов или нейтрофилов в среде DMEM/F12 или только одной среды DMEM/F12, в случае контрольного образца (400 мкл на ячейку, 1600 мкл на чашку Петри). Одновременно добавляли бактериальный лизат или раствор липополисахарида (100 нг/мл, ЛПС (LPS), Sigma-Aldrich, США) в среде DMEM/F12 или одну только среду DMEM/F12, в случае контрольного образца (100 мкл на ячейку, 400 мкл на чашку Петри). Клетки почки и лейкоциты (нейтрофилы) культивировали вместе в течение 24 или 48 ч с бактериальным лизатом или ЛПС (LPS). Оценивали уровень погибших клеток (от некроза и апоптоза) с использованием набора Annexin-V FITC (Invitrogen, США).

5. *In vivo* модель APN на крысах.

В данном примере использовали экспериментальную *in vivo* модель APN, где бактерии вводили в мочевого пузырь крысы (Gupta et al. (1995), J. Med. Microbiol. 43:33-36). Эксперименты проводили на самках нелинейных белых крыс (180-200 г), которых не ограничивали в пище, *ad libitum*. Использовали протоколы испытаний на животных, утвержденные соответствующими Институциональными наблюдательными советами (Institutional Review Boards). Крыс анестезировали с использованием хлоралгидрата (300 мг/кг, внутривенно (в/в)). Далее, животных инфицировали через интрауретральный путь с использованием мягкого непроницаемого для излучения полиэтиленового катетера Intramedic (Clay Adams,

США). Инокулят (5 мл/кг,  $1 \times 10$  КОЕ/мл содержащих бактерии фекалий крысы) инъецировали медленно, с тем чтобы устранить возможность подтекания в мочевого пузырь. Контрольным животным не проводили инъекций. Использовали следующий терапевтический протокол, включающий SkQR1, для лечения этой патологии: в/б инъекция SkQR1 (100 нмоль/кг веса тела) через 1 ч после инъекции бактерий, с последующими инъекциями такого же количества SkQR1 через 12, 24, 36 и 48 ч; при этом в целом каждое животное получало по 500 нмоль SkQR1 на 1 кг.

На второй день после инъекции отбирали образцы крови и удаляли почки для выделения из них митохондрий, определения уровня малондиальдегида (MDA) в ткани, проведения вестерн-блоттинга и гистопатологического исследования.

Митохондрии из почек выделяли путем гомогенизации и последующего дифференциального центрифугирования в среде, содержащей 250 мМ сахарозы, 20 мМ HEPES-KOH, 1 мМ ЭГТА и 0,1% БСА, pH 7,4. Белок, содержащийся в митохондриях, определяли с использованием набора для анализа белка с бицинхониновой кислотой (Sigma-Aldrich, США). Митохондрии из культуры клеток почки выделяли по указанному выше протоколу.

#### 6. Определение уровня ROS, NO, MDA и TNF $\alpha$ .

Чувствительный на ROS флуоресцентный зонд 2,7-DCF-DA (Molecular Probes, США), растворенный в среде DMEM/F12, не содержащей бикарбоната (конечная концентрация 10 пМ), добавляли к клеткам почки (500 мкл на ячейку 24-ячеечного планшета, 2 мл на чашку Петри) и инкубировали в течение 15 мин при температуре 37°C с последующей промывкой средой DMEM/F12 без карбоната. Малондиальдегид (MDA) определяли по описанной в литературе процедуре (Mihara and Uchiyama (1978), Anal. Biochem. 86:271-8). Другой флуоресцентный зонд, DAF-2-DA (Calbiochem, San Diego, CA, США), использовали для определения уровня NO в живых клетках. Использовали ту же процедуру, что и в случае 2,7-DCF-DA. Концентрацию нитрита/нитрата (как продуктов окисления NO) в культуральной среде определяли с использованием набора для анализа нитрита/нитрата (Nitrite/Nitrate Assay Kit (Sigma-Aldrich, США)). Уровень TNF $\alpha$  определяли с использованием набора для анализа TNF $\alpha$  у крыс по методу ИФТФА (ELISA Ready-SET-Go (Ebioscience, CIA)).

#### 7. Конфокальная и сканирующая электронная микроскопия.

Клетки почки рассматривали с использованием инвертированного конфокального микроскопа FSM510 (Carl Zeiss Inc., Jena, Германия), с длиной волны возбуждения 488 нм и длиной волны эмиссии в диапазоне 500-530 нм с диаметром диафрагмы 150 пм. Изображения обрабатывали с использованием пакета программного обеспечения ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, США).

Для проведения сканирующей электронной микроскопии клетки почки и бактерии фиксировали с использованием 2,5% глутаральдегида в буфере Хенкса, не содержащем ионы Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, с добавлением 5 мМ ЭДТА, 5 мМ фенилметилсульфонилфторида и 10 мМ HEPES, при pH 7,3. Далее, клетки подвергали следующей стадии фиксации с использованием 1% тетроксидом осмия в 0,1 М какодилате натрия с добавкой 0,1 М сахарозы, при pH 7,3 (без замены буфера, содержащего глутаральдегид), дегидратировали с помощью серии обработок ацетоном, затем проводили сушку в критической точке с использованием жидкого CO<sub>2</sub> в качестве переходной жидкости в аппарате Balzers, наносили методом напыления слой золота-палладия и рассматривали в сканирующем электронном микроскопе Camscan S-2 или JSM-6380 при 15 кВ.

#### 8. Гистологический анализ почки и оценка степени воспалительного поражения ткани.

Почку отбирали сразу же после умерщвления животного и вносили ее в охлажденный льдом ФБР. Далее, полученную почку фиксировали в 10% нейтральном забуференном растворе формалина, погружали в парафин и использовали для гистопатологического анализа. Срезы толщиной 5 мкм нарезали, депарафинировали, гидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином. Срезы почки анализировали в режиме слепой пробы на наличие воспаления и лейкоцитарную инфильтрацию в почки у всех животных, которых подвергали лечению. Изучали минимум 10 полей зрения для каждого слайда с почечным образцом и оценивали тяжесть наблюдаемой патологии.

Оценивали выраженность индикаторов воспаления (т.е., количество проникших лейкоцитов в каждом слое и наличие абсцессов) при APN с использованием указанной ниже шкалы оценок:

0: нет;

1: 5-50 лейкоцитов в поле зрения;

3: >100 в поле зрения;

4: абсцессы с гнойно-некротическим содержимым.

Распределение воспалительных изменений (т.е. сравнительный анализ инфильтрации и абсцессов) оценивали с использованием следующих критериев:

0: нет ни в одном слое;

1: инфильтрация в медулярном слое;

2: инфильтрация, достигающая коркового слоя.

9. Тест на миелопероксидазную активность.

Гомогенаты почки для определения МРО центрифугировали при 20000 g в течение 15 мин, осадок ресуспендировали в 50 мМ К-фосфатного буфера, содержащего 0,5% СТАВ. Далее, полученные образцы подвергали три раза процедуре замораживания и оттаивания и затем центрифугировали при 10600 g в течение 10 мин. В супернатантах оценивали активность МРО при проведении хромогенной реакции с о-фенилендиамином (ОФД (OPD)). Смешивали 100 мкл образца с субстратным буфером (25 мМ Na-цитрат, 50 мМ Na-фосфат, 0,45 мг/мл ОФД, 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH 5,0) и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре и затем определяли ОП при 492 нм.

#### 10. Иммуноцитохимия.

Клетки и почечные срезы промывали в ФБР, фиксировали в течение 30 мин в 4% формальдегиде с ФБР при температуре 4°C и пермеабелизировали в ФБР, содержащем 0,02% Тритона X-100, в течение 60 мин при температуре 4°C (0,5 мл на ячейку, 5 мл на срез), после чего блокировали в ФБР с добавкой 0,5% бычьего сывороточного альбумина (ФБР-БСА) в течение 60 мин при комнатной температуре (0,5 мл на ячейку, 2 мл на срез). После трех 15-минутных промываний в ФБР-БСА клетки инкубировали в течение 1 ч с вторичным антителом, разбавленным в соотношении 1:200 (FITC-конъюгированный антикроличий IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories, США). Промывали почечные срезы и покровные стекла с иммобилизованными клетками, помещали их на столик микроскопа с заливочной средой и закрепляли под покровными стеклами. Изображения в конфокальном микроскопе обрабатывали с использованием программного обеспечения ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, США).

#### 11. Анализ по методу вестерн-блоттинга.

Образцы почечных гомогенатов наносили на 15% Трис-глицин-полиакриламидные гели (10-20 мкг суммарного белка на линию). После проведения электрофореза гели переносили методом блоттинга на ПВДХ (PVDF) мембраны (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Мембраны блокировали с использованием 5% (вес/объем) нежирного молока в ФБР с содержанием 0,1 об.% Твина 20 и затем инкубировали с подходящими первичными антителами. После этого мембраны обрабатывали соответствующими антимишинными или антикроличьими вторичными антителами. Конкретные полосы визуализировали с использованием набора для вестерн-блоттинга (ECL Plus Western blotting kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK)). После сканирования определяли плотность полученного окрашивания для каждой полосы с использованием программного обеспечения ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, США).

#### 11. Статистический анализ.

Все эксперименты проводили по меньшей мере с трехкратным повтором. Все данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  СКО. Сравнения между группами делали с использованием t-критерия Стьюдента, и значение P менее 0,05 рассматривалось как указание на статистическую значимость результата.

#### В. Результаты.

##### 1. Эффект МТА SkOR1 на окислительный стресс в ткани, индуцированный APN.

На модели APN было исследовано множество симптомов воспаления и окислительного повреждения ткани (фиг. 1A-C). В почках мышей с пиелонефритом (фиг. 1B) отмечалось образование большого числа абсцессов, что в значительно меньшей степени выявлялось у крыс, которых лечили с использованием SkQR1 (фиг. 1C). Наблюдалась обширная инфильтрация лейкоцитов в почках (фиг. 2 и 3). Интерстициальные инфильтраты были иногда локальными, но зачастую покрывали значительную часть паренхимы почки и возникали исключительно из проникших в нее полиморфноядерных лейкоцитов (нейтрофилов). В некоторых очагах инфильтраты захватывали также кровеносные сосуды. Серьезные и характерные изменения выявлялись также в почечных канальцах: они набухали, их клетки дегенерировали и часто выделялись в просвет канальцев. Зачастую при этом канальцы наполнялись гнойно-некротическим и бактериальным содержимым. Патологические изменения наблюдались в основном и в большей мере в медуллярной части почки (фиг. 2-4). Клубочковые и кортикальные канальцы в большинстве случаев оставались относительно интактными. Важно отметить, что лечение с использованием SkQR1 подавляло как лейкоцитарную инфильтрацию во всех слоях почки, так и распространение воспалительного процесса (фиг. 2-4).

Концентрация гидроперекисных продуктов, таких как малондиальдегид (MDA), которая рассматривается как показатель окислительного стресса в тканях всей почки, повышалась после индукции APN (фиг. 5A), указывая на выраженное окислительное повреждение ткани. Тогда как концентрация MDA была значительно ниже у животных, которым давали SkQR1 (фиг. 5A), что указывало на защиту почечной ткани от окислительного стресса, созданную антиоксидантом, направленным на митохондрии.

Тканевая активность миелопероксидазы (МРО), как показатель инфильтрации нейтрофилов, серьезно возрастает в почках, пораженных пиелонефритом, но снова в значительной мере подавлялась у крыс, которых лечили с использованием SkQR1 (фиг. 5B).

##### 2. Окислительный и нитрозативный стресс и гибель клеток почки.

Опосредованный митохондриями окислительный стресс изучали на клеточной модели пиелонефрита, где проводили совместное культивирование почечноканальцевых клеток (RTC) с антигенами (лейкоциты, активированные бактериальным лизатом). При использовании этой модели было показано, что идет значительно более выраженный флуоресцентный сигнал от DCF, что указывало на опосредованную

участием антигена продукцию ROS (фиг. 6B), в отличие от контролей (фиг. 6A). Конкретно, уровень ROS был примерно в 5 раз выше, чем в контрольных (необработанных) клетках, что согласуется с предположением, согласно которому инициация окислительного стресса в почечных клетках опосредована участием активированных лейкоцитов. Неактивированные лейкоциты также вызывали усиление продукции ROS в клетках RTC (данные не показаны), но эти показатели были почти в два раза ниже, чем в случае активированных лейкоцитов; это можно объяснить возможной активацией лейкоцитов в процессе их получения. При использовании конфокальной микроскопии было подтверждено, что усиленный ROS сигнал, выявляемый в совместной культуре активированных лейкоцитов и почечных клеток, идет в основном от почечных клеток (фиг. 6B).

В основном для стимуляции лейкоцитов используется чистый ЛПС, выделенный из клеточной стенки бактерий (Sakaguchi et al. (2007), *Int. Immunopharmacol.* 7:191-197). В этой связи проводили сравнение эффектов ЛПС и бактериального лизата. Использование ЛПС также вызывало активацию лейкоцитов и повышало уровень ROS в почечных клетках (фиг. 7A). Конкретно, ЛПС в концентрации 100 нг/мл оказывал такой же эффект, как это наблюдалось в варианте с бактериальным лизатом. Однако утилизация бактериального лизата более приемлема с точки зрения имитации условий *in vivo* после инициации пиелонефрита. Бактериальные лизаты, как было показано, были более эффективны, чем выделенные из бактерий растворимые продукты, в направлении индукции активированного фенотипа в дендритных клетках человека. Как было показано в приведенных в настоящем описании экспериментах со специфическим ингибитором НДЦФН оксидазы, дифенилендионием (DPI) (0,5 мкМ) (Morandi et al. (2011), *Immunol. Lett.* 138:86-91), указанный фермент отвечает за первичную и/или вторичную продукцию ROS в системе, поскольку DPI ингибировал продукцию ROS внутри почечных клеток (фиг. 7A).

Для предотвращения окислительного стресса в почечных клетках, а также для снижения показателей гибели клеток использовали три лекарственных средства с мощной антиокислительной активностью: Тролокс (Trolox), водорастворимый аналог витамина E и МТА - SkQ1 и SkQR1. Обработка с использованием каждого из этих средств приводила к резкому снижению уровней продукции ROS в почечных клетках (фиг. 7A). Предварительная обработка почечных клеток с использованием 10 нМ SkQ1, 10 нМ SkQR1 или 100 мкМ Тролокса (Trolox) в течение 2 ч приводила к подавлению продукции ROS после их совместного культивирования с активированными лейкоцитами до уровней, близких к показателям, наблюдаемым в контролях. Аналогично, предварительная обработка с использованием LiCl также оказывала антиоксидантный эффект (фиг. 7A).

В дополнение к эффекту, связанному с уровнем ROS, лейкоциты, активированные антигеном, могут продуцировать значительные количества NO. После инкубации почечных клеток с лейкоцитами и бактериальным лизатом в течение 24 ч уровень нитрата/нитрита (основных продуктов окисления NO) в среде вырос более чем в 5 раз в сравнении с контролями (фиг. 7B). Однако эффект активации лейкоцитов на продукцию NO в почечных клетках, при оценке его по уровню флуоресценции DAF-2, представлялся менее выраженным (фиг. 7C). Нитрозативный стресс продемонстрировал менее выраженную реакцию в ответ на активацию лейкоцитов, чем окислительный стресс. Тем не менее, предварительная инкубация с тремя различными, указанными выше лекарственными средствами выявила некоторую супрессию в накоплении нитрата/нитрита (фиг. 7B).

В рамках описываемой здесь клеточной модели пиелонефрита значительная гибель почечных клеток наблюдалась после их 48-часовой экспозиции с активированными лейкоцитами (более 10% почечных клеток становились Annexin V-положительными). Преинкубация с тремя разными, указанными выше лекарственными средствами оказывала протективный эффект, при этом наибольшая эффективность была показана при использовании SkQR1 (фиг. 7D). Сравнение протективных эффектов SkQR1 и Тролокса (Trolox) на уровень окислительного стресса (фиг. 7A) и на показатели гибели клеток (фиг. 7A) продемонстрировало четкое различие между этими соединениями. В частности, МТА продемонстрировал самую высокую эффективность с точки зрения защиты почечных клеток от гибели. Аналогично, LiCl также защищал почечные клетки от гибели, и его эффект был более выраженным, чем эффект Тролокса (Trolox).

### 3. Эффект TNF на окислительный стресс в почке.

Бактериальный лизат индуцировал устойчивую продукцию TNF лейкоцитами (фиг. 12A). Интересно отметить, что высвобождение TNF в среду было еще выше после совместного культивирования активированных лейкоцитов с почечными клетками (фиг. 13A), что указывает на роль взаимодействия между почечными клетками и лейкоцитами в индукции воспаления. Тролокс (Trolox), LiCl и SkQR1 не оказывали значимого эффекта на высвобождение TNF в совместной культуре RTC-лейкоцитов.

Затем следовало выяснить, мог ли высвобожденный TNF, сам по себе, оказать эффект на почечные клетки за счет индукции окислительного стресса. С этой целью среду, в которой лейкоциты обрабатывали бактериальным лизатом, центрифугировали и добавляли к почечным клеткам. Было показано, что содержащая TNF среда повышает уровень ROS в почечных клетках, хотя и в меньшей степени, чем это наблюдалось после совместного культивирования почечных клеток с активированными лейкоцитами (см. для сравнения фиг. 7A и 13B). Таким образом, следовало отметить, что непосредственное взаимодействие почечных клеток и культивируемых вместе с ними лейкоцитов играет важную роль в индукции окислительного стресса в почечных клетках.

#### 4. Окислительный стресс и изменения в лейкоцитах крови.

Как было показано на *in vivo* модели APN, число лейкоцитов в крови через 3 дня после инфекции возрастало в два раза в сравнении с контрольным уровнем (фиг. 8A). Предварительная обработка с использованием SkQR1 предотвращала повышение уровня лейкоцитов (фиг. 8A). При этом лейкоцитоз коррелировал с нейтрофилией (уровень нейтрофилов был в три раза выше, фиг. 8B). Повышение концентрации лейкоцитов было связано, прежде всего, с увеличением доли нейтрофилов, поскольку их число возрастало почти в 5 раз (фиг. 8F). Число нейтрофилов спонтанно снижалось на 7-й день после индукции пиелонефрита у животных во всех группах. Число моноцитов было также выше у крыс с пиелонефритом (фиг. 8C), тогда как содержание лимфоцитов в крови было близким у животных во всех трех группах (фиг. 8D). На 3-й день после индукции пиелонефрита животным вводили внутривенно SkQ1 (100 ммоль/кг). При этом было показано, что эффекты APN подавлялись у тех крыс, которым вводили SkQR1, что приводило в целом к устранению лейкоцитоза и ослаблению других маркеров воспаления (фиг. 8A-8C), включая в том числе снижение концентрации нейтрофилов, которая уже на 7-й день снижалась в два раза (фиг. 8F), в сравнении с этим показателем у животных, которым не вводили SkQ1. Таким образом, лечение с использованием SkQ1 значительно снижало концентрацию лейкоцитов в крови исследуемых животных на 7-й день от начала заболевания.

Кроме того, наблюдалось также воспаление в почечной ткани. В частности, значительно возрастала активность MPO, которая представляет собой нейтрофильный фермент, продуцирующий гипохлорит в процессе развития антибактериального ответа организма. MPO представляет собой основной фермент, отвечающий за инфильтрацию нейтрофилов и за развитие окислительного взрыва в воспаленной ткани. На 7-й день развития пиелонефрита указанная энзиматическая активность в почечной ткани была примерно в 5 раз выше, чем в почках у здоровых животных (фиг. 8G). Внутривенное введение SkQ1 на третий день после индукции пиелонефрита приводило к значительному подавлению воспаления в почечной ткани, что следовало из снижения активности MPO.

Зависимая от окислительного стресса вредная тенденция, обнаруженная в почечной ткани при остром пиелонефрите, в рамках исследования на модели *in vivo*, была подтверждена при анализе лейкоцитов крови. В дополнение к высокому уровню MDA продуктов в ткани почки, пораженной пиелонефритом (фиг. 5A), было показано, что лейкоциты, взятые от крыс с APN, также характеризовались высоким уровнем ROS. Конкретно, анализ по методу проточной цитометрии показал, что средняя интенсивность флуоресценции DCF в популяции лейкоцитов, взятых от крыс с пиелонефритом, была почти в два раза выше, чем у контрольных животных (фиг. 9A, 9B). У больных животных лейкоциты находятся в более активированном состоянии. Фактически, добавление лейкоцитарных клеток, взятых от крыс с пиелонефритом, к культуре почечных клеток вызывало намного более выраженный окислительный стресс в почечных клетках, чем это наблюдалось при их совместном культивировании с лейкоцитами, взятыми от здоровых животных.

Поскольку MTA продемонстрировали высокую эффективность в направлении предотвращения окислительного стресса на модели пиелонефрита *in vitro*, была исследована их активность у крыс при APN, в рамках модели *in vivo*. Продукция ROS, определяемая по флуоресценции DCF, при ее оценке в лейкоцитах, взятых от крыс с пиелонефритом, которым вводили SkQR1, была ниже, чем у животных, которых не лечили указанным средством (фиг. 9A-9D).

Аналогично, было показано, что предварительное лечение, проводимое с использованием SkQR1, снижает в почечной ткани концентрацию TNF $\alpha$ , который выполняет важную роль в воспалительной реакции (Sanchez-Nino et al. (2010) Mediators Inflamm.). Конкретно, тогда как в рамках рассматриваемой модели APN уровень TNF $\alpha$  был в два раза выше, чем у контрольных животных, его уровень в почечной ткани у крыс с пиелонефритом, которым вводили для лечения SkQR1, был ниже, чем у крыс с APN, но которым не вводили SkQR1 (фиг. 8E). Активация продукции TNF $\alpha$  в лейкоцитах может быть опосредована NF- $\kappa$ B-зависимым механизмом, поскольку уровень I $\kappa$ B в этих клетках ниже в случае крыс с нелеченным пиелонефритом, но не у крыс, которым вводили для лечения SkQR1 (фиг. 14A).

#### 5. Изменения в антиапоптозном Bcl-2 в ткани почки при пиелонефрите.

Bcl-2 представляет собой антиапоптозный (способствующий выживанию) белок, найденный в митохондриях, уровень которого падает во время окислительного стресса.

Подавление Bcl-2 может индуцировать сниженную толерантность в связи с изменением проницаемости митохондрий в ответ на действие ROS, что ведет к росту уровня гибели клеток.

Оценивали баланс между апоптозной и антиапоптозной активностью при пиелонефрите, имея в виду в качестве цели ограничение окислительного стресса и его последствий в ткани почки, пораженной пиелонефритом, что можно рассматривать в контексте разработки защитной стратегии. Уровень антиапоптозного белка Bcl-2 в канальцевых клетках почки снижался в рамках рассматриваемой *in vivo* модели APN. В суммарных гомогенатах почки наблюдался существенно сниженный уровень Bcl-2 при индукции пиелонефрита, что отсутствовало в случае крыс с пиелонефритом, которым вводили SkQR1 (фиг. 10A и 10C). К тому же, содержание Bcl-2 в митохондриях, выделенных из почек животных с пиелонефритом, было в 1,5 раза ниже, чем в контрольных митохондриях (фиг. 10A, 10C). При этом дополнительно

к ослаблению полосы для Bcl-2 со значением 26 кДа, наблюдалась пропорционально усиленная полоса для 15 кДа, которая положительно окрашивалась на Bcl-2 (фиг. 10B и 10D), что предположительно указывало на расщепление Bcl-2 в условиях пиелонефрита. Эти изменения уменьшались после лечения с использованием SkQR1 (фиг. 10B, 10D). Таким образом, можно сделать вывод, что пиелонефрит, сопровождаемый окислительным стрессом, вызывает существенное подавление уровней антиапоптозного белка Bcl-2 в митохондриях, и этот эффект зависит от SkQR1.

#### 6. Роль межклеточных контактов лейкоцитов и почечных клеток.

Дополнительно исследовали морфологию совместно культивируемых клеток с помощью сканирующего электронного микроскопа. Почечные клетки характеризовались морфологией, типичной для эпителиальных клеток, которая в условиях рассматриваемого эксперимента выглядела как полумонослойная. После 24-часового культивирования вместе с фракцией белых клеток крови было обнаружено, что некоторые лейкоцитарные клетки (моноциты согласно их морфологии) прикрепляются к почечным клеткам (фиг. 15B). Было похоже, что эти моноциты прикрепляются либо к бесклеточному пластику, либо непосредственно к почечной клетке. В проведенном ранее исследовании было показано, с использованием рассматриваемого здесь метода, что имеет место взаимодействие лейкоцитов с поврежденными эндотелиальными клетками (Galkina et al. (2004), Med. Sci. Monit. 10:BR307-316). Как было показано в рамках используемой здесь модели пиелонефрита, происходит аналогичное взаимодействие. Тот факт, что высвобождение TNF возрастает после совместного культивирования с почечными клетками, который был продемонстрирован в чистой культуре активированных лейкоцитов (фиг. 14), указывает предположительно на вклад зависимой от непосредственного контакта клеточной коммуникации между лейкоцитами и почечными клетками. Более того, активированные лейкоциты быстро погибали, и уровень гибели был в 5 раз ниже в условиях совместной культуры (фиг. 16).

Эксперименты, проведенные с индивидуальными лейкоцитами (LC) и почечными клетками (RTC), предоставили дополнительные данные, подтверждающие идею о необходимости непосредственного контакта двух указанных видов клеток для модуляции провоспалительной реакции и гибели клеток. В другой группе экспериментов клетки из совместной культуры разделяли на пористой ПЭТ (PET) мембране с размером пор 0,4 мкм (вставка клеточной культуры, SPL Lifesciences), которая позволяет осуществлять коммуникацию через обмен диффундирующих соединений, но препятствует непосредственному контакту между клетками. В этой системе высвобождение TNF снижалось в сравнении с неограниченной в пространственном отношении совместной культурой (табл. 1).

Таблица 1

	RTC	LC	RTC + LC + бактериаль- ный лизат	RTC+LC+бактериаль- ный лизат, культивируемый с отделенными мембранами
TNF в среде, пг/мл	0 (n=6)	2,9±0,8 (n=6)	16,6±2,9 (n=12)	5,3±2,2 (n=6)
Интенсивность DCF в RTC, произвольные единицы	1,4±0,1 (n=6)	N/A	7,4±0,4 (n=12)	5,1±0,3 (n=6)

#### 7. Выживаемость животных с острым пиелонефритом.

В рамках используемой в данном исследовании *in vivo* модели APN показатель уровня смертности крыс был значительным из-за развития сепсиса (Giamaellos-Bourboulis et al. (2006) Shock 26:410-416). Примечателен тот факт, что использование для лечения SkQR1 уже в течение двух дней после инфекции приводило к заметному повышению показателя выживаемости животных (фиг. 10). Эти результаты указывают на то, что продукция митохондриальных ROS играет важнейшую роль в развитии APN-индуцированного повреждения почки и дальнейшей гибели в результате сепсиса.

#### Пример 2.

##### Эффект SkQ1 на повреждение эндотелия.

В данном эксперименте было показано, что в ходе воспалительного процесса и/или диабета возникает повреждение эндотелия.

Известно, что высокий уровень глюкозы и/или воспалительных цитокинов вызывает разобщение контактов эндотелиальных клеток через расщепление VE-кадгерина, что в сочетании с усиленным окислительным стрессом и воспалением сосудов ведет к дисфункции эндотелия и даже к полиорганной не-

достаточности.

Использовали линию эндотелиальных клеток человека EA.hy926 (ATCC Collection; номер в каталоге CRL-2922) в качестве модели повреждения эндотелия сосудов, которое происходит в ходе воспалительного процесса и/или при диабете. Эта клеточная линия аналогична первичной клеточной линии HUVEC (Edgell et al. (1983), PNAS, 80 (12):3734-7; Edgell et al. (1990) *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 26(12):1167-72) и широко используется в качестве удобной и релевантной модели при исследовании процессов воспаления (Riesbeck et al. (1998), *Clin. Vaccine Immunol.*, 5:5675-682).

Соответственно, линию эндотелиальных клеток человека EA.hy926 предварительно инкубировали с 2 и 20 нМ раствора SkQ1 в среде Игла в модификации Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)) с добавкой 10% фетальной сыворотки (пример 1) в течение 4 дней. Далее, клетки инкубировали в течение 2 дней в среде DMEM, содержащей 1% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 5 мМ D-глюкозы. После этого клетки инкубировали в течение 2 дней с 45 мМ D-глюкозы и затем использовали для иммуноблоттинга с целью детекции VE-кадгерина.

Полученные в этом тесте результаты представлены в виде среднего значения по меньшей мере для трех отдельных экспериментов. Как показано на фиг. 17, SkQ1 препятствует отрицательной регуляции VE-кадгерина, вызванной высоким уровнем глюкозы, в сравнении с контрольным вариантом, где использован носитель, но без SkQE. Таким образом, SkQ1, как было показано, является эффективным соединением, защищающим эндотелиальные клетки от действия воспалительных цитокинов, и может использоваться для профилактики и лечения патологических состояний, вызванных расстройствами метаболизма глюкозы, включающими диабет и гипергликемию, сепсис, травму, а также хронические и острые воспалительные заболевания.

Пример 3.

Эффект SkQ1 на повреждение ткани.

Использовали нейтрофилы человека в качестве модельной системы повреждения ткани, возникающей в ходе воспалительного процесса и/или при травме.

Нейтрофилы человека выделяли из антикоагулированной крови здоровых доноров. Нейтрофилы инкубировали предварительно с 0,2, 2, 20, 200 и 500 нМ раствора SkQ1 в среде RPMI-1640 с добавкой 10% фетальной сыворотки в течение 5 ч при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Далее, клетки стимулировали с использованием 1 нМ N-формил-метионин-лейцин-фениламина (f-MLP) в течение 30 мин. Супернатанты, полученные на основе этих клеток, использовали для детектирования активности MMP-9 по методу зимографии (высвобождение MMP-9 рассматривали в качестве меры для оценки повреждения ткани). Полученные в этом тесте результаты показаны в виде среднего значения для трех отдельных экспериментов.

Как показано на фиг. 18, SkQ1 в использованных концентрациях 0,2, 2 и 200 нМ препятствовал активности нейтрофил-MMP-9, индуцируемой f-MLP, в сравнении с контролем, содержащим носитель, но без SkQ1.

Таким образом, поскольку SkQ1 эффективен с точки зрения защиты тканей человека от повреждений, вызванных патогенами и/или воспалительными цитокинами, он может применяться для профилактики и лечения бронхиальной астмы, хронического обструктивного заболевания легких, ишемии, острого расслоения аорты, болезни почек, травмы, сепсиса и других воспалительных заболеваний.

Пример 4.

Защитный эффект МТА на модели гепатита.

Экспериментальный гепатит индуцировали у 8-10-недельных крыс Вистар (Wistar) весом 80 г-120 г путем внутрибрюшинной инъекции 500 мг/кг D-галактозамина в 0,9% растворе NaCl. SkQ1 вводили в водном растворе с помощью зонда в дозе 10, 50, 250 и 1250 нмоль/кг/день начиная с 7 дня до индукции гепатита и заканчивая в день индукции. Животных умерщвляли через 24 ч после индукции гепатита. Степень воспаления оценивали в баллах для каждого животного по 3-факторной шкале в слепом эксперименте, используя окрашенные гематоксилином-эозином срезы печени.

Как показано на фиг. 19, SkQ1 в дозе 1250 нмоль/кг/день снижал степень воспаления, относительно медианного значения 2 в контрольной группе, до медианного значения 1 ( $p < 0,001$ ). SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг/день снижал степень воспаления до 1,5 ( $p < 0,01$ ).

Пример 5.

Защитный эффект МТА на модели панкреатита.

42 крысы Вистар (Wistar) (возраст: 20-25 недель, вес 400 г-750 г) распределяли по 4 экспериментальным группам с близкими значениями среднего веса. SkQ1 вводили с питьевой водой в расчетной дозе 250 или 50 нмоль/кг/день. Острый панкреатит индуцировали путем однократной внутрибрюшинной (в/б) инъекции аргинина (100 мг/100 г веса животного; 20% раствор аргинина примерно в 2,5 мл фосфатного буфера).

Экспериментальные группы включали:

- (1) группу интактных животных (n=10);
- (2) контрольную группу (n=10), в которой животным вводили аргинин в/б инъекцией;
- (3) SkQ250-SkQ1 в этой группе животных предварительно вводили дозу 250 нмоль/кг/день в течение

ние 9 дней; на 9-й день проводили в/б инъекцию аргинина и продолжали вводить SkQ1 в течение 24 ч (n=10);

(4) SkQ50-SkQ1 в этой группе животных предварительно вводили дозу 50 нмоль/кг/день в течение 9 дней. На 9-й день проводили в/б инъекцию аргинина и продолжали вводить SkQ1 в течение 24 ч (n=10).

Результаты, приведенные на фиг. 19, показывают, что обе использованные дозы SkQ1 предотвращали повышение веса поджелудочной железы, что сказывалось на резком снижении отечности, вызванной воспалением.

Активность панкреатической миелопероксидазы (MPO) также определяли с использованием процедуры, описанной в примере 1 (применительно к почечной ткани).

Полученные результаты показывают, что применение для лечения SkQ1 значительно снижает активность MPO и соответственно воспаление в гомогенатах ткани поджелудочной железы (табл. 2).

Таблица 2

Экспериментальная группа	Активность MPO	Стандартная ошибка
Интактная	6,1	2,5
Контрольная	52,9	9,9
SkQ250	15,8	3,2 (p=0,005 в сравнении с контрольной)
SkQ50	50,0	13,7

Гистопатологический анализ образцов поджелудочной железы крыс также продемонстрировал благоприятный эффект применения SkQ1. Образцы поджелудочной железы фиксировали в 10% формалине и затем подготавливали для окрашивания эозином-гематоксилином, получая срезы толщиной 5 мкм-6 мкм, с использованием стандартной методики. Окрашенные образцы (срезы) изучали, рассматривая под световым микроскопом.

Интенсивность воспаления в образцах оценивали с использованием стандартной восходящей шкалы оценок от 0 до 3. Среднее значение показателя воспаления у крыс, которым не вводили SkQ, составлял 1,5. SkQ1, используемый в дозе 250 нмоль/кг/день, в значительной мере снижал воспаление, в среднем до показателя 0,6 (p<0,01; тест Манна-Уитни (Mann-Whitney test)). Полученные результаты показаны в табл. 3.

Таблица 3

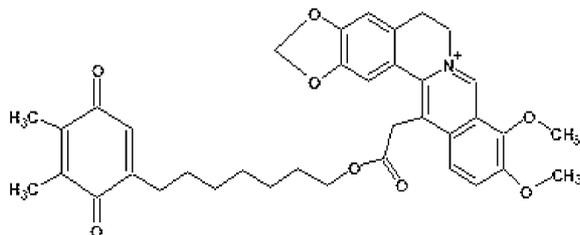
	Средний показатель воспаления
Контроль без панкреатита (n=7)	0
Нелеченный панкреатит (n=12)	1,5
SkQ50 (n= 11)	1,5
SkQ250 (n=9)	0,6 (p<0,01)

#### Эквиваленты

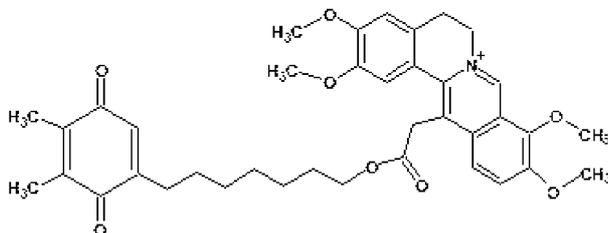
Для специалистов в данной области очевидно или они смогут это понять с использованием простых стандартных операций, что возможно множество эквивалентов конкретных, описанных здесь вариантов осуществления настоящего изобретения. И все такие эквиваленты охватываются областью приводимой ниже формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения воспалительного расстройства, выбранного из группы, состоящей из острого пиелонефрита, гепатита и панкреатита, где способ включает введение субъекту одного или более антиоксидантов, направленных на митохондрии, где антиоксидант выбирают из SkQB1:

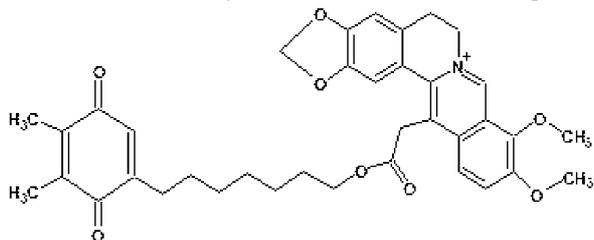


или его восстановленной (хинольной) формы SkQB1H<sub>2</sub> или SkQBP1:



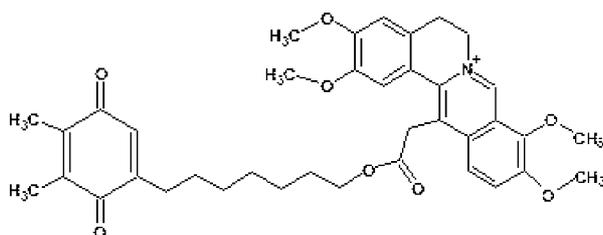
или его восстановленной (хинольной) формы SkQBP1H<sub>2</sub>.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный антиоксидант представляет собой SkQB1:

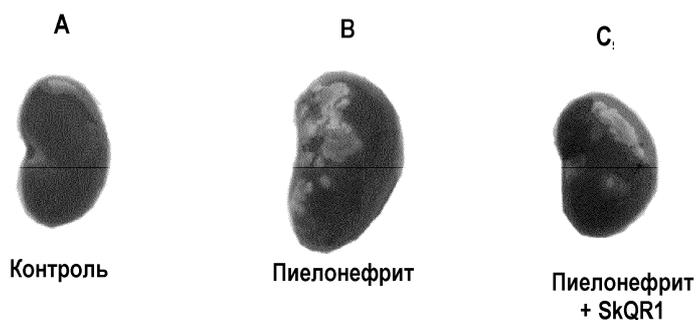


или его восстановленную (хинольную) форму SkQB1H<sub>2</sub>.

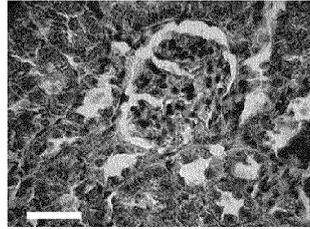
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный антиоксидант представляет собой SkQBP1:



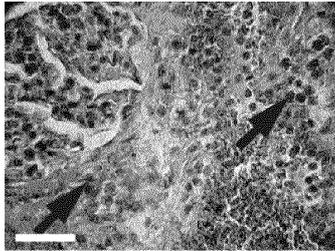
или его восстановленную (хинольную) форму SkQBP1H<sub>2</sub>.



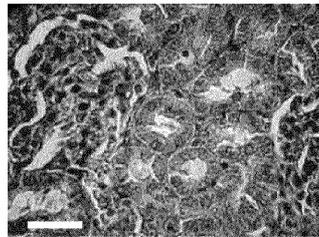
Фиг. 1



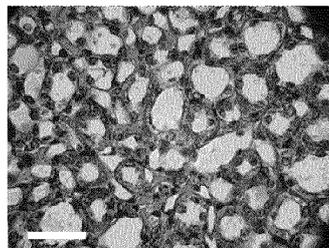
**Контроль**  
Фиг. 2А



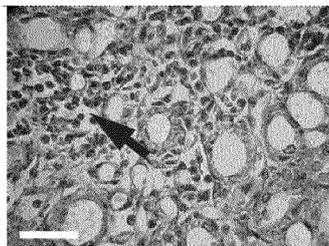
**Пиелонефрит**  
Фиг. 2В



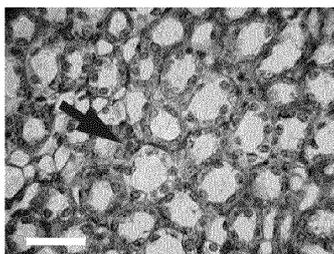
**Пиелонефрит  
+ SkQR1**  
Фиг. 2С



**Контроль**  
Фиг. 3А

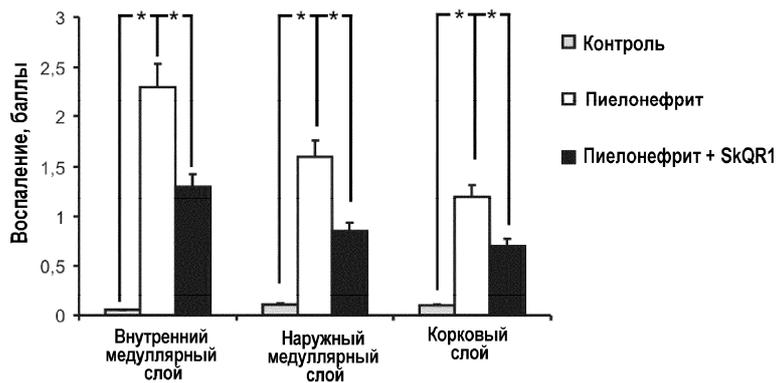


**Пиелонефрит**  
Фиг. 3В

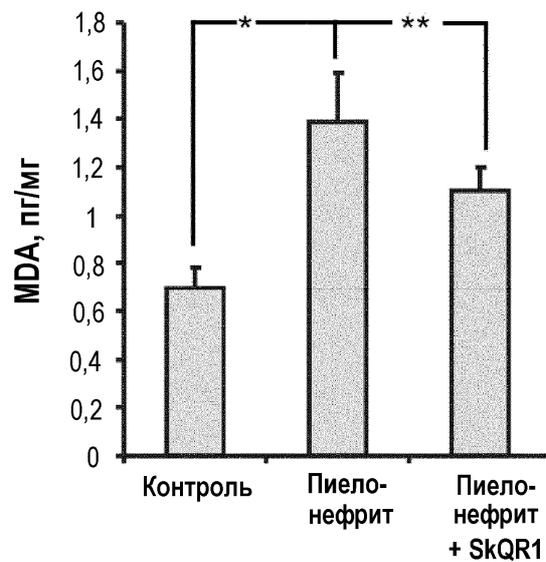


**Пиелонефрит  
+ SkQR1**

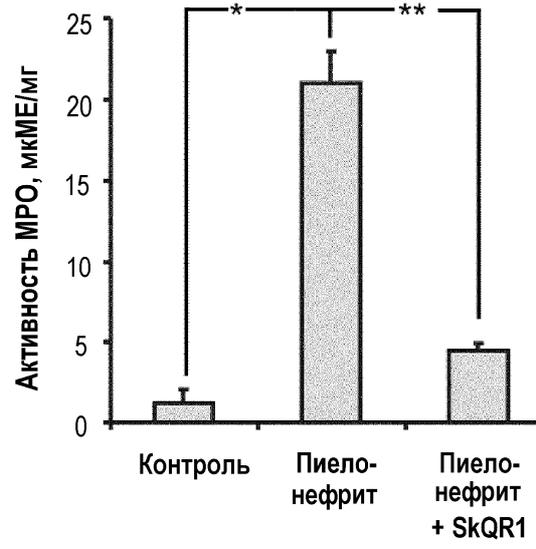
Фиг. 3С



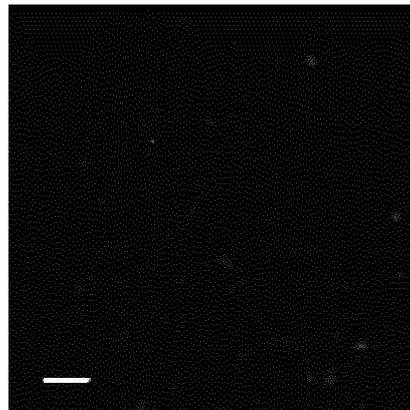
Фиг. 4



Фиг. 5А

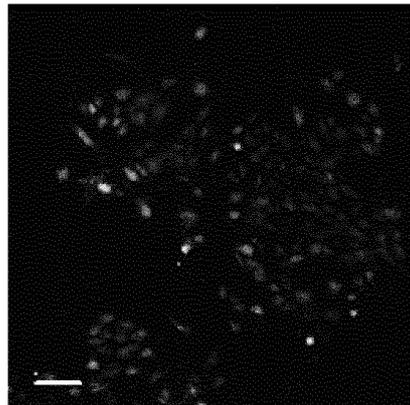


Фиг. 5В



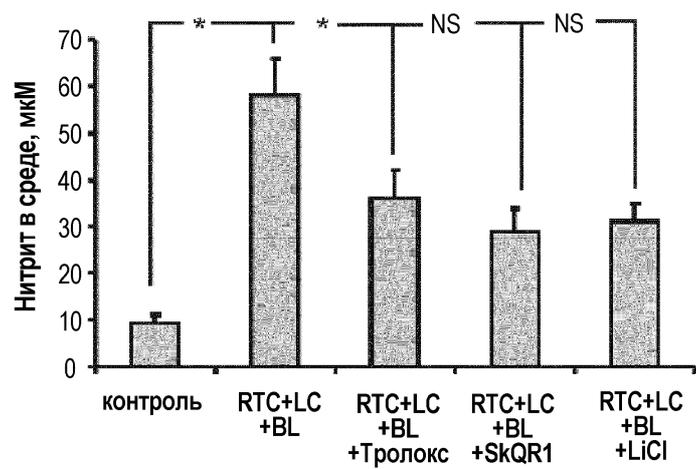
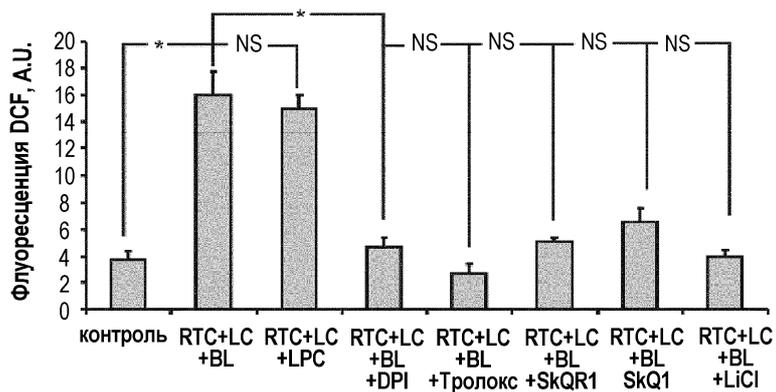
RTC, контроль

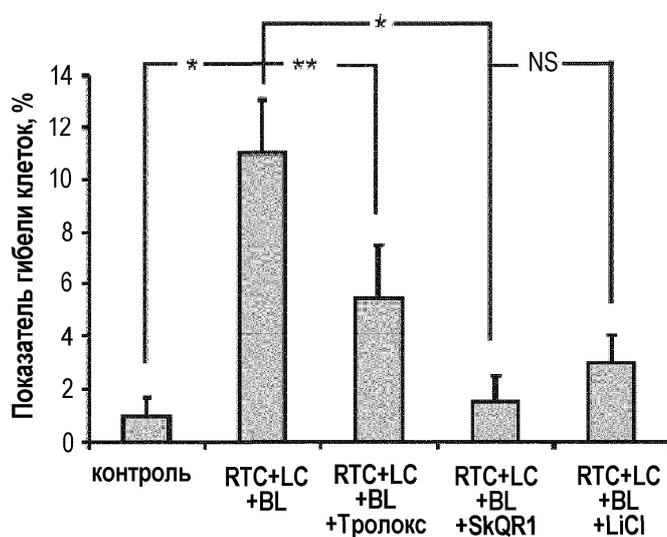
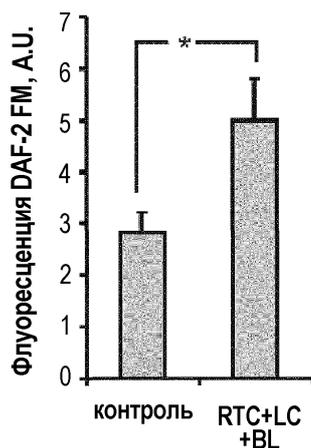
Фиг. 6А



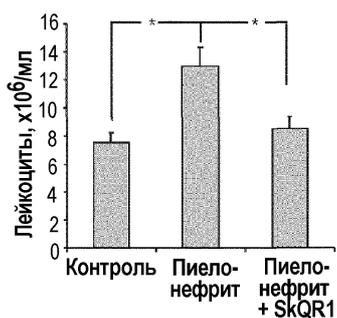
RTC+LC+BL

Фиг. 6В

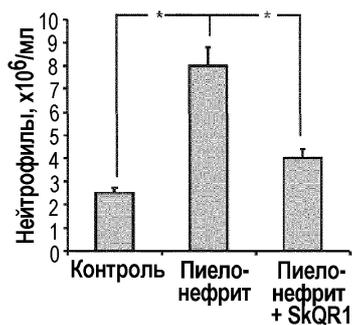




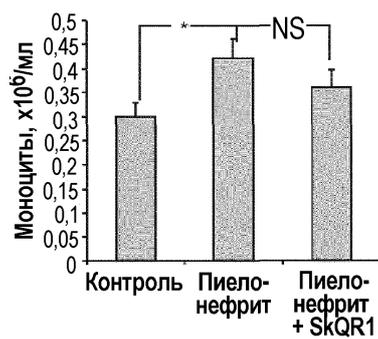
Фиг. 7С



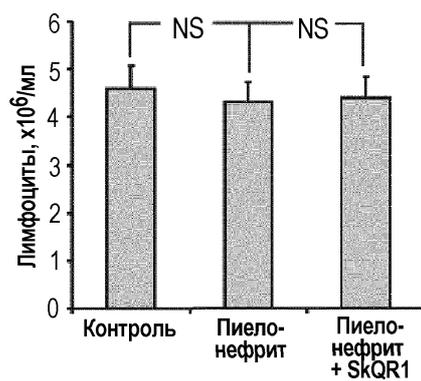
Фиг. 8А



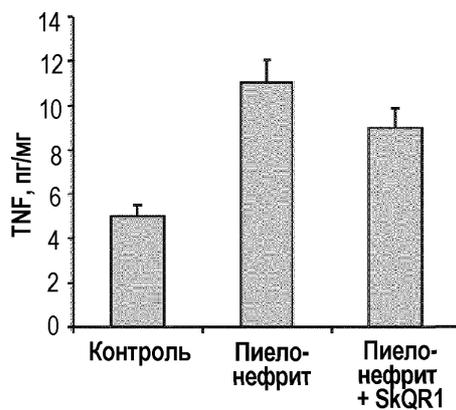
Фиг. 8В



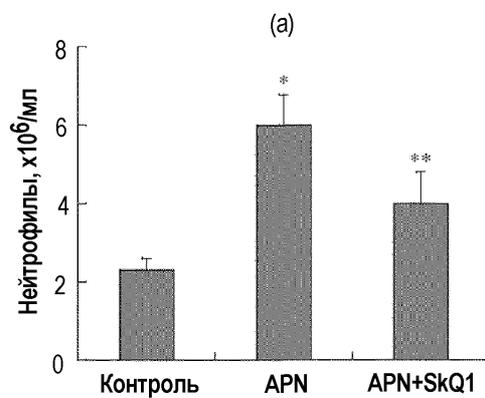
Фиг. 8С



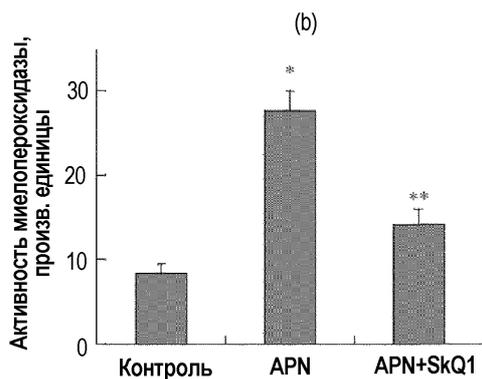
Фиг. 8D



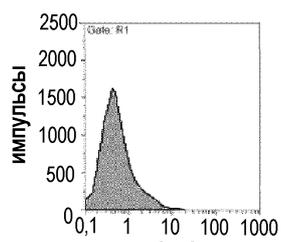
Фиг. 8E



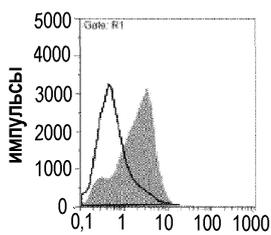
Фиг. 8F



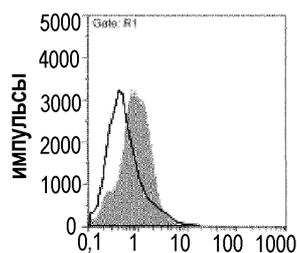
Фиг. 8G



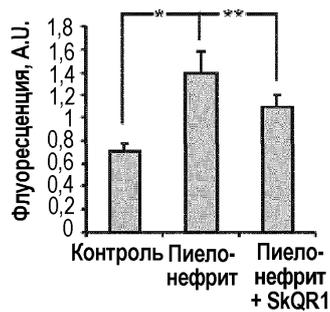
Фиг. 9А



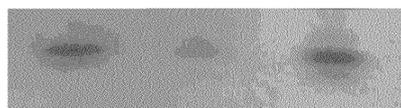
Фиг. 9В



Фиг. 9С



Фиг. 9D



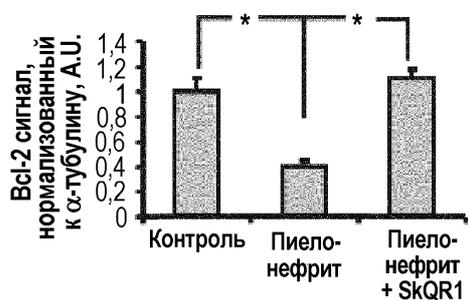
Контроль    Пиелонефрит    Пиелонефрит + SkQR1

Фиг. 10А

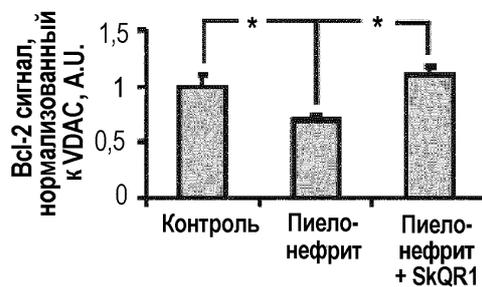


Контроль    Пиелонефрит    Пиелонефрит + SkQR1

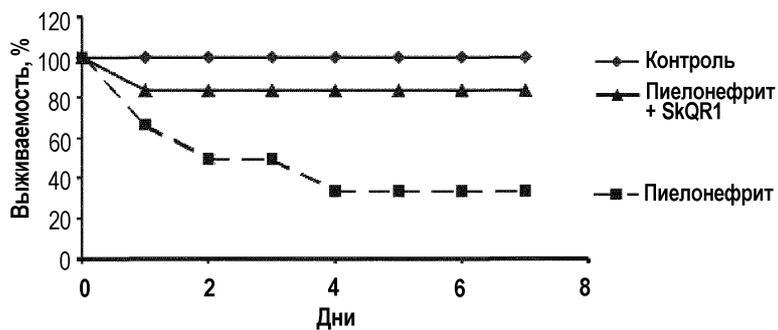
Фиг. 10В



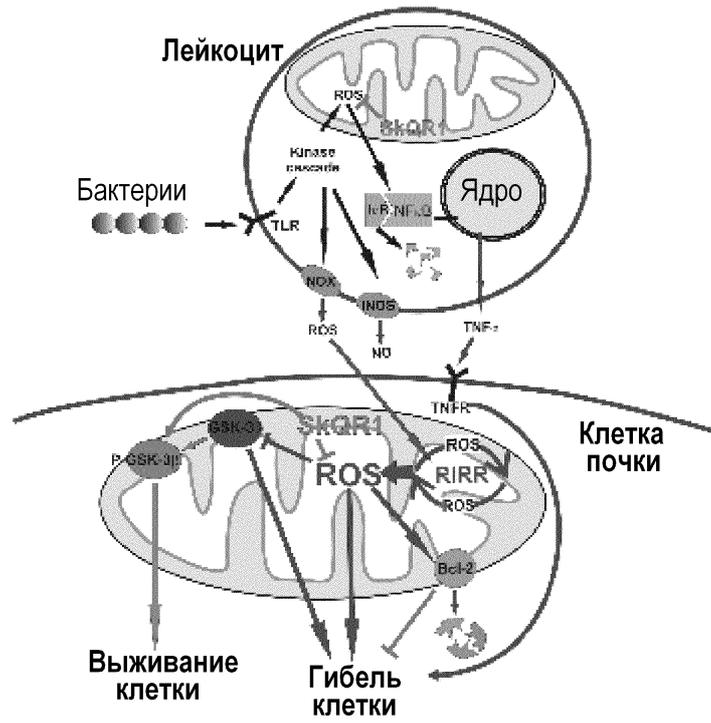
Фиг. 10С



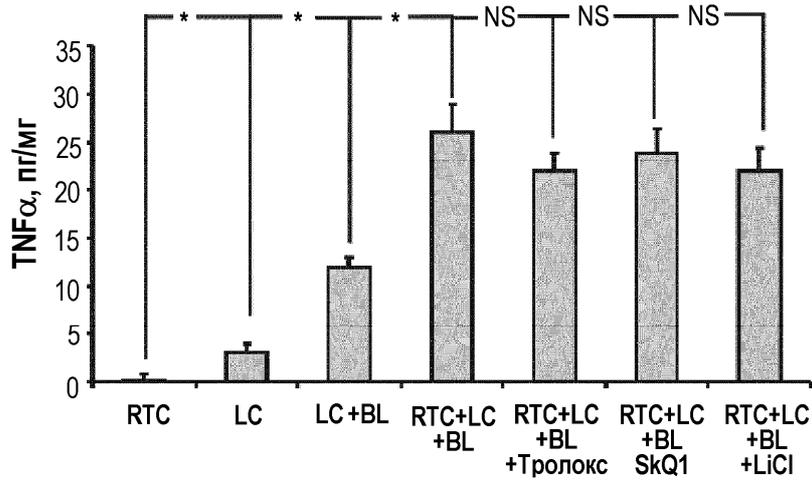
Фиг. 10D



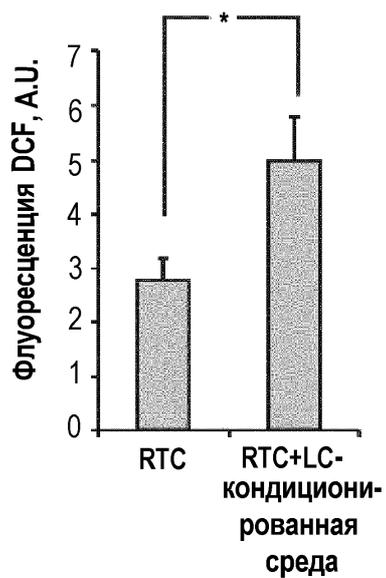
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13А



Фиг. 13В



Фиг. 14А



Фиг. 14В



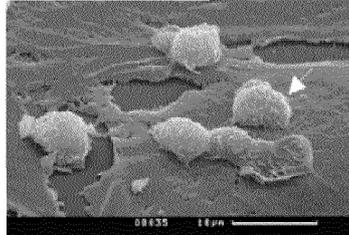
Фиг. 14С



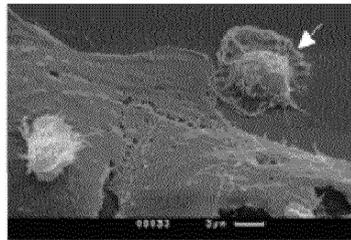
Фиг. 14D



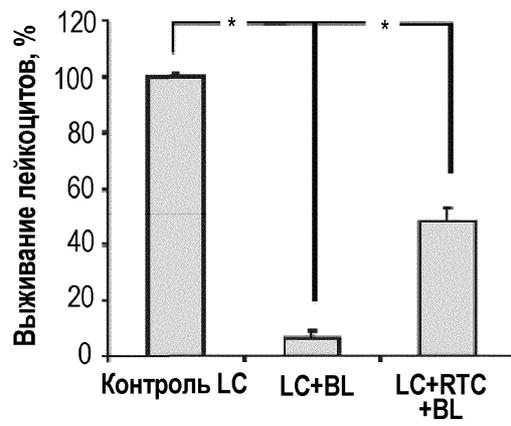
Фиг. 14Е



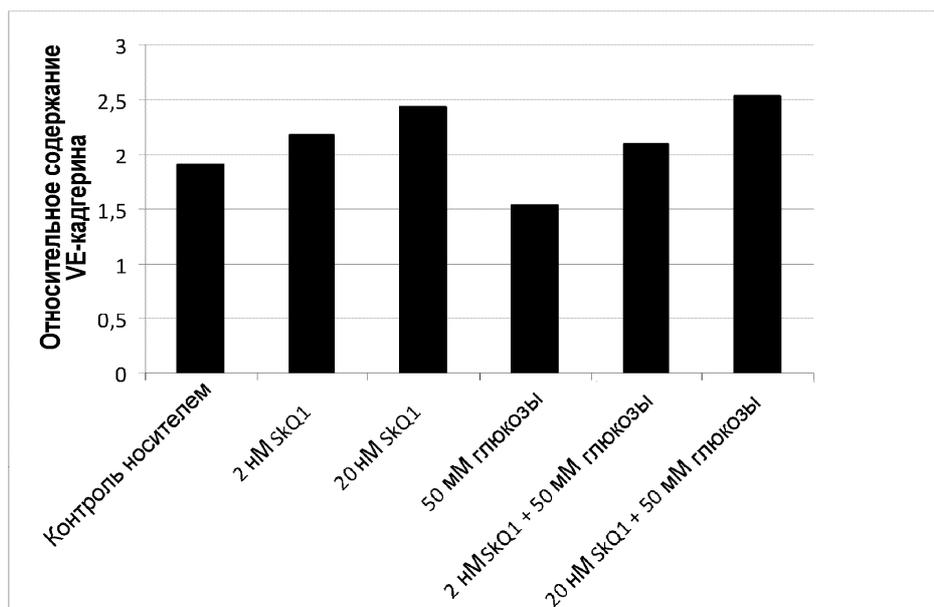
Фиг. 15А



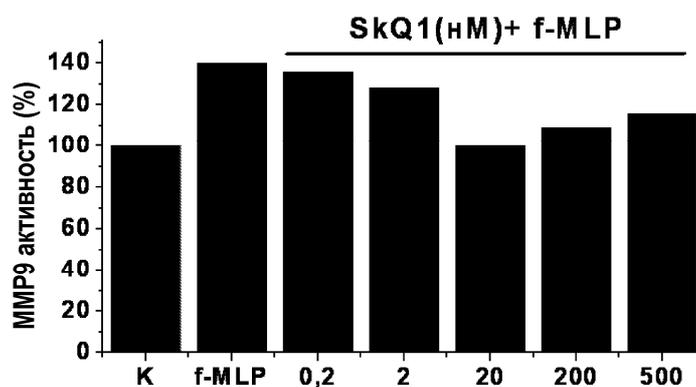
Фиг. 15В



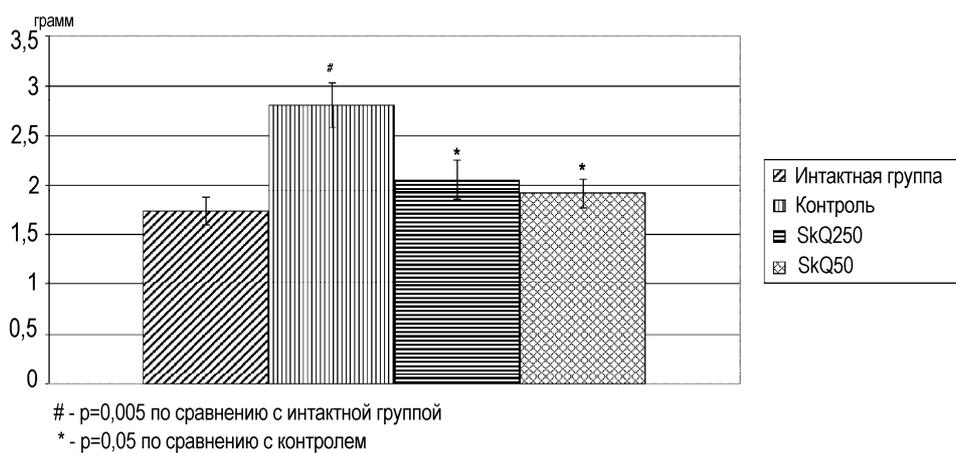
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19

