

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292776** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.11.22

(22) Дата подачи заявки
2021.04.05

(51) Int. Cl. *A61K 31/352* (2006.01)
A61K 31/473 (2006.01)
A61K 31/66 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ НАЦЕЛЕННЫХ НА МИТОХОНДРИИ АНТИОКСИДАНТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТЯЖЕЛЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

(31) 63/004,893; 63/011,920

(32) 2020.04.03; 2020.04.17

(33) US

(86) PCT/IB2021/000219

(87) WO 2021/198786 2021.10.07

(71) Заявитель:

МИТОТЕХ С.А. (LU)

(72) Изобретатель:

Скулачев Максим, Зиновкин Роман,
Андреев-Андриевский Александр,
Егоров Максим, Каргер Елена (RU),
Петров Антон (LU), Фридрихс Лоренс
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Нацеленные на митохондрии антиоксиданты применяют для предотвращения и лечения тяжелых воспалительных состояний, включая вирусную инфекцию (такую как COVID-19), системный шок, травму, ожоги, хирургическое вмешательство, связанное со значительным повреждением тканей, токсическое повреждение и повреждение, связанное с аутоиммунными реакциями.

202292776
A1

202292776

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 576115EA/081

НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ПРИМЕНЕНИЕ НАЦЕЛЕННЫХ НА МИТОХОНДРИИ АНТИОКСИДАНТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТЯЖЕЛЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США No. 63/004893, поданной 03 апреля 2020, и предварительной заявки США No. 63/011920, поданной 17 апреля 2020, обе из которых включены с помощью ссылки в настоящее изобретение во всей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

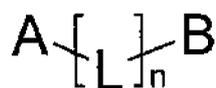
При таких заболеваниях, как тяжелые вирусные инфекции (включая COVID-19), синдром системной воспалительной реакции, травма или хирургическое вмешательство, сопровождающееся значительным повреждением тканей, холодовый или тепловой шок, токсический шок, адекватных способов лечения не существует. Существует потребность в улучшенных способах профилактики и лечения данных заболеваний, включая тяжелые воспалительные реакции и связанные с ними повреждения органов и тканей.

СУЩНОСТЬ

Настоящая технология обеспечивает способы применения нацеленных на митохондрии антиоксидантов для оказания помощи в профилактике и лечении пациентов в критических состояниях, связанных с тяжелым и системным воспалением. Данные состояния могут быть вызваны, например, тяжелыми вирусными и бактериальными инфекциями, синдромом системной воспалительной реакции различного генеза, травмой и хирургическим вмешательством, сопровождающимся значительным повреждением тканей, холодовым и тепловым шоком, токсическим шоком, аутоиммунными заболеваниями, анафилактическим шоком и другими патологиями, связанными с тяжелым и системным воспалением.

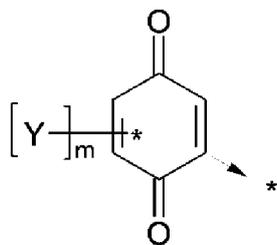
Технология может быть дополнительно обобщена следующим списком признаков.

1. Способ для оказания помощи в лечении или предотвращении воспалительного состояния у нуждающегося субъекта, причем способ включает введение нацеленного на митохондрии антиоксиданта формулы I (SkQ)

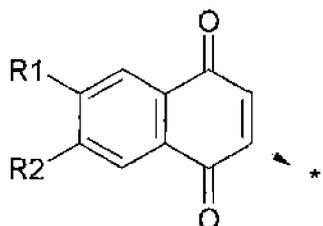


Формула I;

где A представляет собой эффекторный фрагмент/антиоксидант, необязательно имеющий следующую структуру:



и/или ее восстановленную форму, где m представляет собой целое от 1 до 3; каждый Y независимо выбран из группы, состоящей из C1-6 алкила, C1-6 алкокси, или двух соседних Y групп, вместе с атомами углерода, с которыми они соединены, образуя следующую структуру:



и/или ее восстановленную форму, где $R1$ и $R2$ могут быть одинаковыми или различными, и каждый независимо представляет собой C1-6 алкил или C1-6 алкокси; где L представляет собой линкерную группу, включающую:

а) нормальную или разветвленную углеводородную цепь, которая может быть необязательно замещена одним или более заместителями и необязательно содержит одну или более двойных или тройных связей; и/или

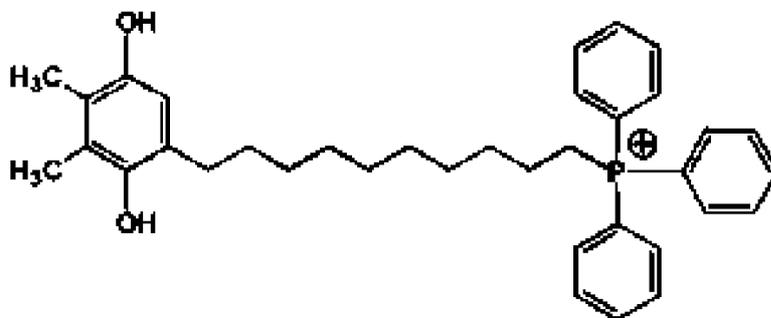
б) природную изопреновую цепь;

где n представляет собой целое от 1 до 40;

где V представляет собой нацеливающую на митохондрии группу, содержащую липофильный катион и фармацевтически приемлемый анион;

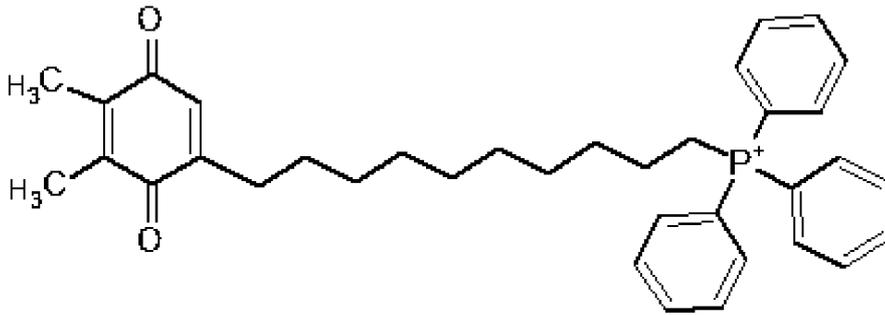
и/или его сольватов, солей, изомеров или пролекарств.

2. Способ по пункту 1, где SkQ представляет собой соединение SkQ1, представленное ниже, в его восстановленной или окисленной форме:



(восстановленная

форма),



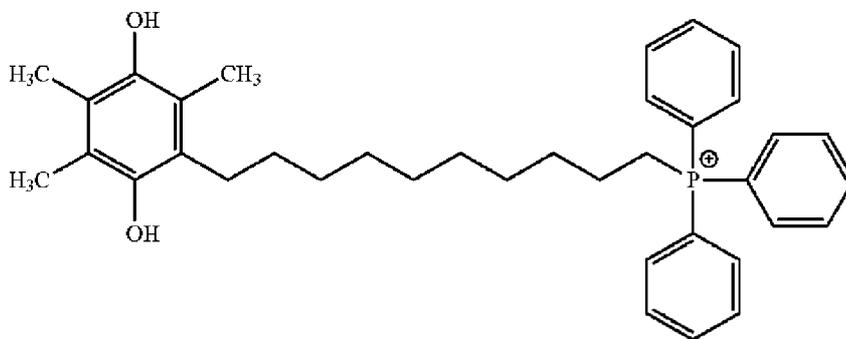
(окисленная

форма),

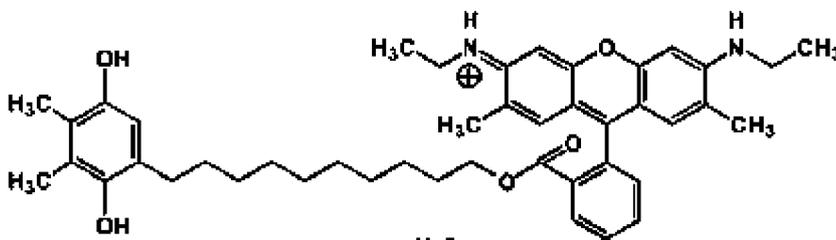
или их комбинации.

3. Способ по пункту 1, где SkQ представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из следующих соединений:

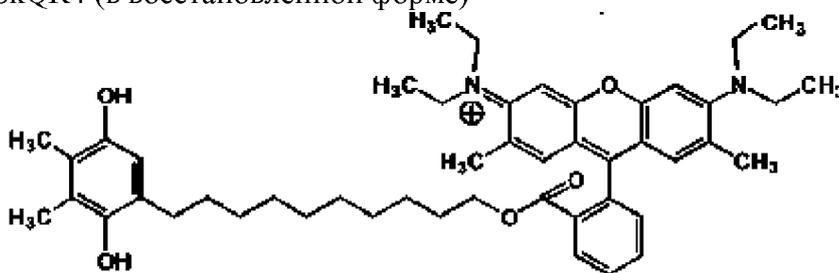
SkQ3 (в восстановленной форме)



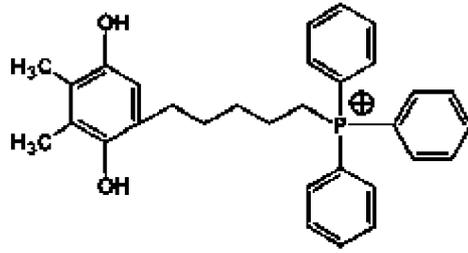
SkQR1 (в восстановленной форме)



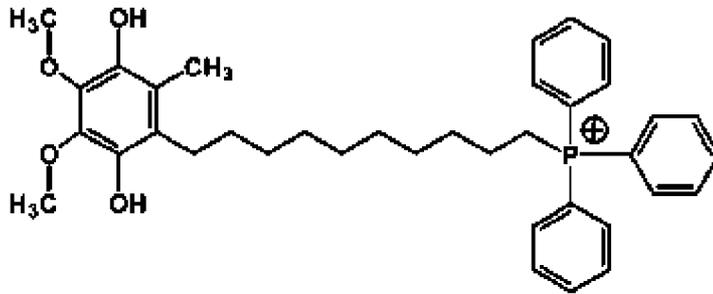
SkQR4 (в восстановленной форме)



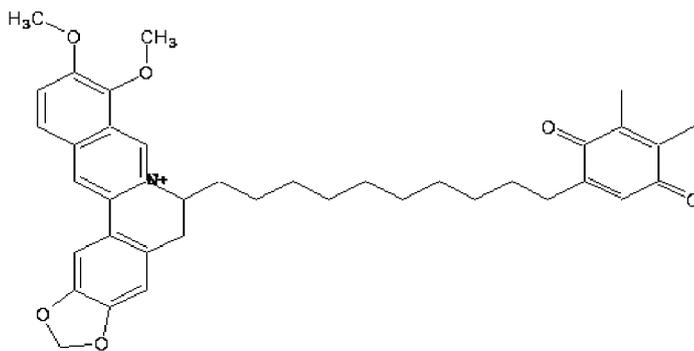
SkQ5 (в восстановленной форме)



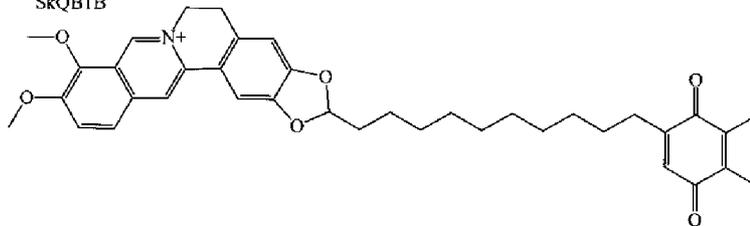
MitoQ (в восстановленной форме)



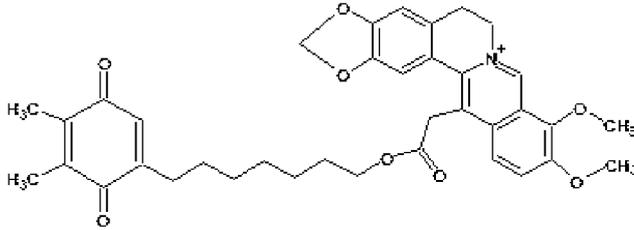
SkQB1A



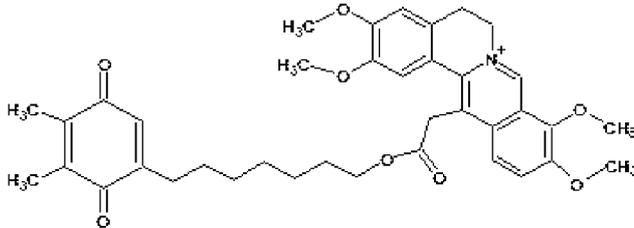
SkQB1B



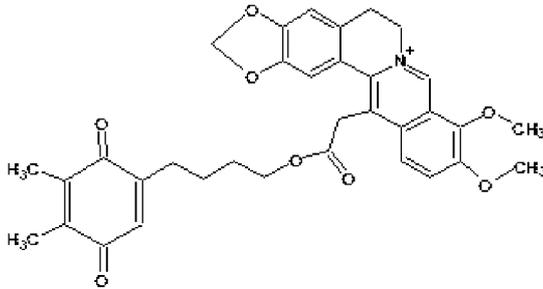
SkQB1:



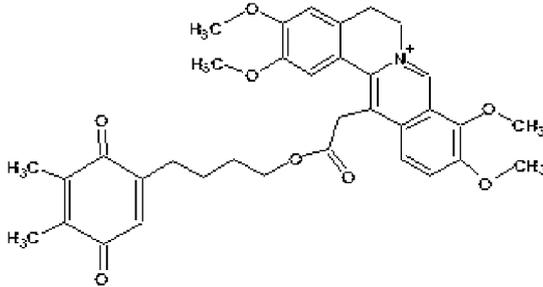
SkQBP1:



SkQB5



SkQBP5:



4. Способ по любому из предшествующих пунктов, где воспалительное состояние связано с инфекцией, COVID-19, сепсисом или септическим шоком, цитокиновым штормом или ССВО, повреждением эндотелия сосудов, активацией эндотелиальных клеток сосудов, PAMPS, DAMPS, холодным шоком, тепловым шоком, токсическим шоком, ожоговой травмой, хирургическим вмешательством, аутоиммунным заболеванием, анафилаксией, раком, ишемическим заболеванием или наличием CIRP и/или HMGB1 в крови пациента.

5. Способ по пункту 4, где инфекция представляет собой бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию или вирусную инфекцию.

6. Способ по пункту 5, где вирусная инфекция представляет собой инфекцию вирусом гриппа или коронавирусом, таким как SARS-CoV-2.

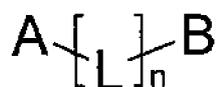
7. Способ по любому из предшествующих пунктов, где SkQ вводят внутривенной инъекцией или вливанием, внутривожной инъекцией, или в виде состава или устройства с медленным высвобождением.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, где способ предотвращает разборку межклеточных контактов между эндотелиальными клетками субъекта.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий введение дополнительного терапевтического агента.

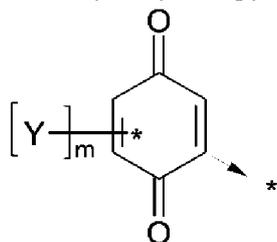
10. Способ по любому из предшествующих пунктов, где способ предотвращает заражение субъекта COVID-19.

11. Набор, содержащий нацеленный на митохондрии антиоксидант SkQ формулы I ниже и инструкции по осуществлению способа по любому из предшествующих пунктов:

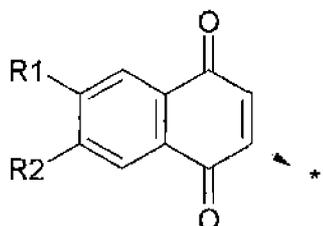


Формула I;

где **A** представляет собой эффекторный фрагмент/антиоксидант, необязательно имеющий следующую структуру:



и/или ее восстановленную форму, где **m** представляет собой целое от 1 до 3; каждый **Y** независимо выбран из группы, состоящей из C1-6 алкила, C1-6 алкокси, или двух соседних **Y** групп, вместе с атомами углерода, с которыми они соединены, образуя следующую структуру:



и/или ее восстановленную форму, где **R1** и **R2** могут быть одинаковыми или различными, и каждый представляет собой независимо C1-6 алкил или C1-6 алкокси;

где **L** представляет собой линкерную группу, включая:

a) нормальную или разветвленную углеводородную цепь, которая может быть необязательно замещена одним или более заместителями и необязательно содержит одну или более двойных или тройных связей; и/или

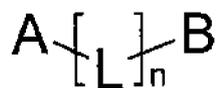
b) природную изопреновую цепь;

где **n** представляет собой целое от 1 до 40;

где **B** представляет собой нацеливающую на митохондрии группу, содержащую липофильный катион и фармацевтически приемлемый анион;

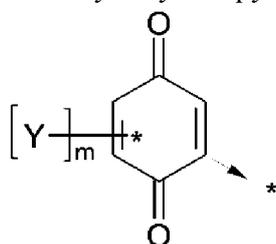
и/или его сольваты, соли, изомеры или пролекарства.

12. Композиция для лечения или предотвращения воспалительного состояния у нуждающегося субъекта, причем композиция содержит нацеленный на митохондрии антиоксидант формулы I (SkQ)

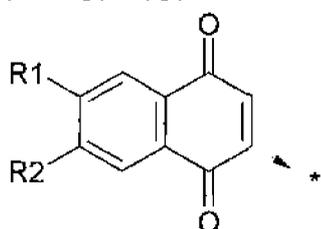


Формула I;

где **A** представляет собой эффекторный фрагмент/антиоксидант, необязательно имеющий следующую структуру:



и/или ее восстановленную форму, где **m** представляет собой целое от 1 до 3; каждый **Y** независимо выбран из группы, состоящей из C1-6 алкила, C1-6 алкокси, или двух соседних **Y** групп, вместе с атомами углерода, с которыми они соединены, образуя следующую структуру:



и/или ее восстановленную форму, где **R1** и **R2** могут быть одинаковыми или различными, и каждый независимо представляет собой C1-6 алкил или C1-6 алкокси;

где **L** представляет собой линкерную группу, включая:

а) нормальную или разветвленную углеводородную цепь, которая может быть необязательно замещена одним или более заместителями и необязательно содержит одну или более двойных или тройных связей; и/или

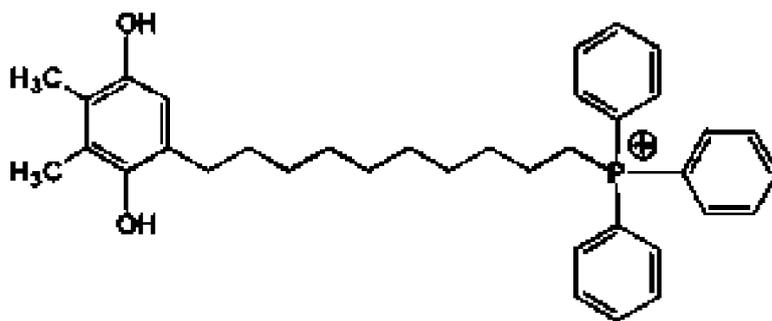
б) природную изопреновую цепь;

где **n** представляет собой целое от 1 до 40;

где **B** представляет собой нацеливающую на митохондрии группу, содержащую липофильный катион и фармацевтически приемлемый анион;

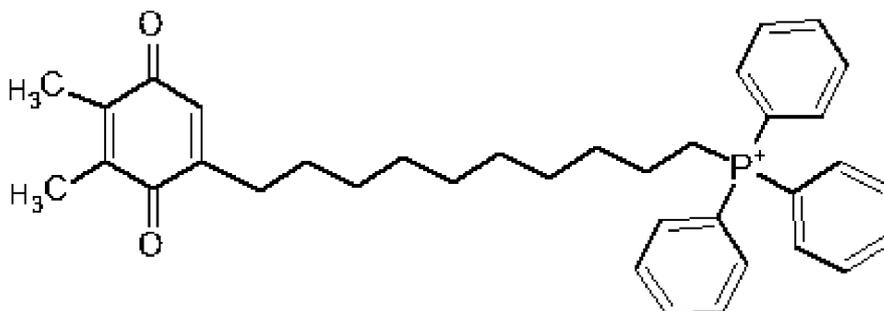
и/или его сольваты, соли, изомеры или пролекарства.

13. Композиция по пункту 12 где SkQ представляет собой соединение SkQ1, показанное ниже, в его восстановленной или окисленной форме:



(восстановленная

форма),



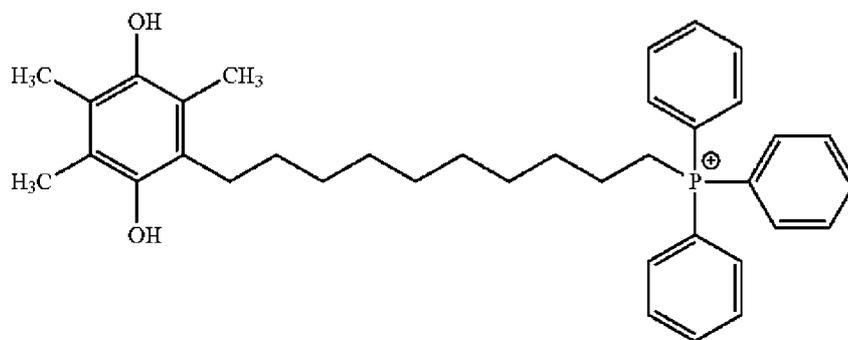
(окисленная

форма),

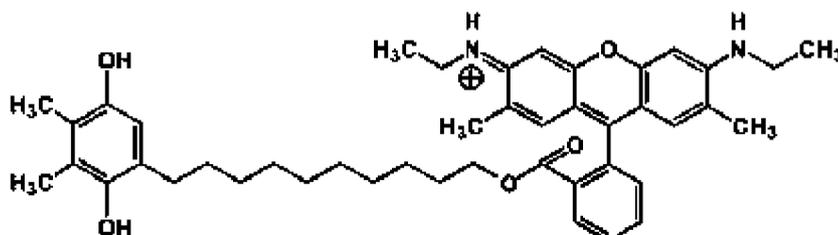
или их комбинации.

14. Композиция по пункту 12, где SkQ представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из следующих соединений:

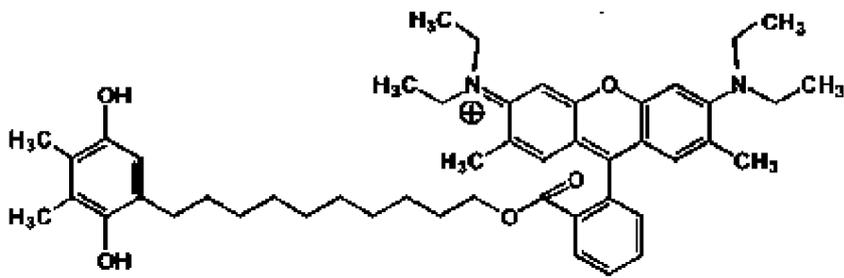
SkQ3 (в восстановленной форме)



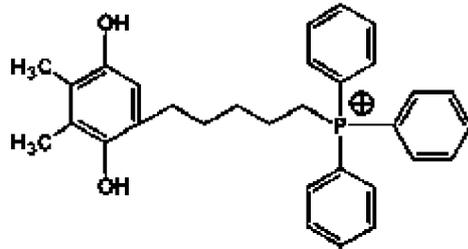
SkQR1 (в восстановленной форме)



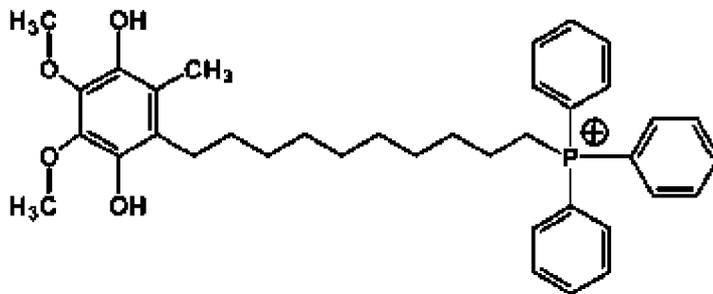
SkQR4 (в восстановленной форме)



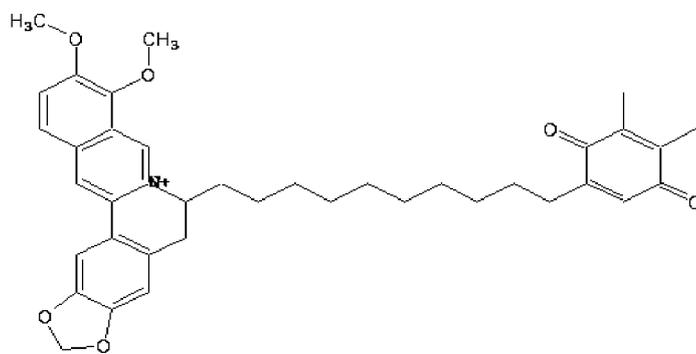
SkQ5 (в восстановленной форме)



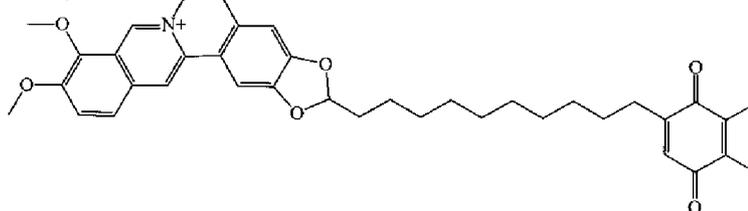
MitoQ (в восстановленной форме)



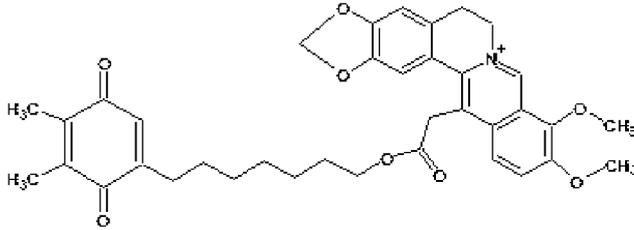
SkQB1A



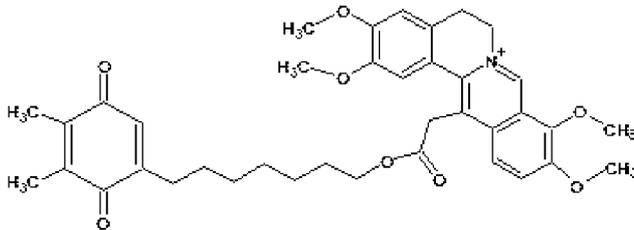
SkQB1B



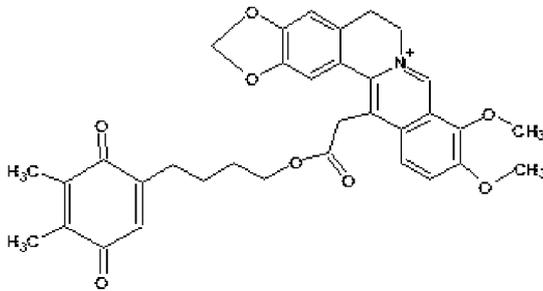
SkQB1:



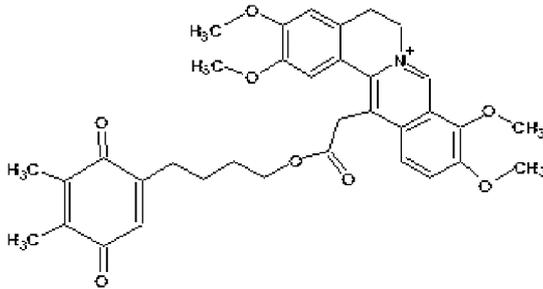
SkQBP1:



SkQB5



SkQBP5:



15. Композиция по любому из пунктов 12-14, где воспалительное состояние связано с инфекцией, COVID-19, сепсисом или септическим шоком, цитокиновым штормом или ССВО, повреждением эндотелия сосудов, активацией эндотелиальных клеток сосудов, PAMPS, DAMPS, холодовым шоком, тепловым шоком, токсическим шоком, ожоговой травмой, хирургическим вмешательством, аутоиммунным заболеванием, анафилаксией, раком, ишемическим заболеванием, или наличием CIRP и/или HMGB1 в крови пациента.

16. Композиция по пункту 15, где инфекция представляет собой бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию или вирусную инфекцию.

17. Композиция по пункту 16, где вирусная инфекция представляет собой инфекцию вирусом гриппа или коронавирусом, таким как SARS-CoV-2.

В контексте настоящего изобретения термин “приблизительно” относится к диапазону в пределах плюс или минус 10%, 5%, 1%, или 0,5% указанной величины.

В контексте настоящего изобретения термин "по существу состоит из" обеспечивает включение материалов и стадий, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики формулы изобретения. Любое упоминание в настоящем изобретении термина «содержащий», в частности, в описании компонентов композиции или в описании элементов устройства, может быть заменено альтернативным выражением «состоящий из» или «состоящий по существу из».

КРАКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигуры 1A-1D показывают результаты измерения LCMS/MS концентрации SkQ1 в зависимости от времени в образцах крови от SPF категории крыс Вистар. Фигура 1A показывает концентрации SkQ1 в крови в зависимости от времени после введения SkQ1 внутривенной инъекцией. Фигура 1B показывает концентрации в крови после введения SkQ1 внутрибрюшинной инъекцией. Фигура 1C показывает концентрации в крови после введения SkQ1 внутрикожной инъекцией. Фигура 1D слева показывает сравнительные данные LCMS/MS площади под кривой (AUC) после внутривенной (в/в), внутрибрюшинной (в/б) и внутрикожной (в/к) инъекции. На правой стороне фигуры 1D построен график относительной биодоступности, нормализованной с применением в/в как 100%.

Фигура 2 показывает графики продленного наличия концентрации SkQ1 в крови в зависимости от времени при введении с помощью контейнеров с насосом медленного высвобождения, введенных внутрикожно крысам Вистар.

Фигура 3 показывает результаты вестерн-блоттинга по высвобождению эндотелиального маркера (сосудистый эндотелиальный кадгерин) после воздействия на клеточные культуры эндотелиальных клеток человека сыворотки из образцов крови, взятых у пациентов с сепсисом. Культуры клеток предварительно обрабатывали различными указанными количествами SkQ1, затем обрабатывали 5-10% сывороткой, полученной при сепсисе, после чего проводили 1-часовое исследование VE-кадгерина (смотри пример 2). Контроль, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH), показан внизу.

Фигура 4 показывает результаты флуоресцентной микроскопии после воздействия на клеточные культуры эндотелиальных клеток человека сыворотки, полученной от пациентов (возраст 18-75 лет) с диагностированным ССВО. Культуры клеток предварительно обрабатывали различными количествами SkQ1, обрабатывали 5-10% сывороткой ССВО. Условия для контроля, сыворотка ССВО, сыворотка ССВО+2 нМ SkQ1, сыворотка ССВО+20 нМ SKQ1 и сыворотка ССВО+200 нм SkQ1 по сравнению с актином, VE-кадгерин и ядро были такими, как описано в примере 2.

Фигура 5 показывает эффект SkQ1 при лечении мышей, инфицированных вирусом гриппа. Показан процент животных в критическом состоянии (мыши Balb/c, 10-12 г) после инокуляции назальной инъекцией вируса гриппа H5N1 (штамм

куриный/курганский/5/2005). Мышей обрабатывали в/б инъекцией плацебо (n=11), SkQ1 333 нмоль/кг (n=9), SkQ1 1000 нмоль/кг (n=9) или SkQ1 3000 нмоль/кг (n=11). Каждое животное обрабатывали в/б инъекцией 450 мкл физиологического раствора, содержащего указанную дозу SkQ1 или плацебо (смотри пример 3).

Фигура 6 показывает % выживаемость в зависимости от дней после заражения вирусом гриппа (те же условия как на фигуре 5).

Фигура 7 показывает кривые выживания после инъекции суспензии выделенных митохондрий печени в хвостовую вену мышей при указанных обработках. SkQ1, среду или C12 TPP вводили за пять дней до инъекции митохондрий, а также в течение пяти дней после инъекции.

Фигура 8 показывает кривые выживания после резкого холодового шока мышей, вызванного воздействием на животных температуры -20°C в течение 90 минут. Условия обработки были такими же, как для фигуры 7.

Фигура 9 показывает кривые выживания после обработки мышей токсичными высокими концентрациями C12 TPP с и без предобработки SkQ1.

Фигура 10 показывает кривые выживания после инъекции после инъекции суспензии выделенных митохондрий печени в хвостовую вену мышей, с или без обработки SkQ1 через одну минуту после инъекции митохондрий.

Фигура 11 показывает процент выживаемости мышей, подвергшихся шоку, вызванному 90-минутными -20°C с или без немедленной обработки SkQ1 (смотри пример 6).

Фигура 12 показывает кривые выживания мышей, подверженных токсической концентрации C12 TPP (34 мкмоль/кг) с или без обработки SkQ1 (1,5 мкмоль/кг), введенного через 4,5 часа после инъекции C12 TPP и 0,5 часа после инъекции C12 TPP.

Фигура 13 показывает кривые выживания мышей, подверженных токсической концентрации C12 TPP (42 мкмоль/кг) с или без SkQ1 (1,5 мкмоль/кг), введенного через 1 час после введения C12 TPP.

Фигура 14А показывает $\text{TNF}\alpha$ концентрацию в крови мышей как функцию времени после инъекции митохондрий печени с или без инъекции SkQ1. Фигура 14В показывает IL-6 концентрацию в крови мышей как функцию времени после инъекции митохондрий печени с или без инъекции SkQ1.

Фигура 15А показывает $\text{TNF}\alpha$ концентрацию в крови мышей как функцию времени после холодового шока с инъекцией SkQ1 или среды. Фигура 15В показывает IL-6 концентрацию в крови мышей как функцию времени после холодового шока с инъекцией SkQ1 или среды.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Известно, что значительное ухудшение здоровья и даже смерть больных при различных критических состояниях часто наступает вследствие опасных реакций иммунной системы, активируемых в организме пациента триггером, которым может быть заболеванием или другим патологическим состоянием. Примерами данных триггеров

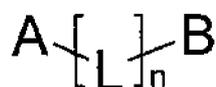
являются тяжелые инфекции, такие как вирусные инфекции (включая COVID-19, то есть заражение вирусом SARS-CoV-2), бактериальные или грибковые инфекции (включая сепсис), травма, холодовый или тепловой шок (включая ожоги), тканевые повреждения, возникшие в результате хирургического вмешательства, повреждения, вызванные токсическими веществами, аутоиммунные реакции, и анафилаксия или тяжелые аллергические реакции.

Примером опасного исхода, характерного для многих из упомянутых выше состояний, является синдром системного воспалительного ответа (ССВО). ССВО часто ассоциируется с развитием и прогрессированием острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС). В условиях пандемии COVID-19 госпитали столкнулись с чрезмерным спросом на лечение пациентов в критическом состоянии. У пациентов с COVID-19 в критическом состоянии часто возникает дыхательная недостаточность, их подключают к аппаратам искусственной вентиляции легких, получая при этом специализированную помощь при осложнении критических состояний.

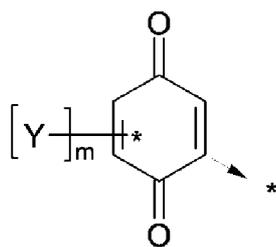
Наиболее тяжелые случаи COVID-19 приводят к ОРДС, который представляет собой опасное для жизни состояние легких, которое может быть вызвано вирусом и широким спектром патогенов. Осложнения ОРДС, связанного с COVID-19, могут включать повреждение сердца, включая кардиомиопатию, перикардит, перикардальный выпот, аритмию и внезапную сердечную смерть, острое повреждение почек (ОПП), повреждение печени (повышение активности печеночных ферментов), сепсис и шок. Может быстро возникнуть критическое состояние, известное как синдром полиорганной дисфункции (СПОН).

Настоящая технология обеспечивает способы для того, чтобы способствовать лечению или предотвращению критического состояния, связанного с тяжелым и/или системным воспалением; она не включает способы лечения или предотвращения местного воспаления второстепенного характера. Технологию можно применять для того, чтобы способствовать лечению или предотвращению летального или опасного для жизни состояния, связанного с воспалением в организме субъекта, независимо от причины. Способы также можно применять для снижения риска развития данного состояния у субъекта, у которого есть риск развития данного состояния. Способы включают введение нуждающемуся субъекту (т.е. субъекту, у которого имеется или считается, по мнению медицинского работника, вероятное развитие состояния, связанного с тяжелым воспалением) митохондриально направленного антиоксиданта типа SkQ. Данные соединения имеют общую формулу I. Данные соединения способны защищать субъекта от развития состояний, связанных с тяжелым воспалением, и также способны лечить или способствовать лечению данных состояний.

Формула I

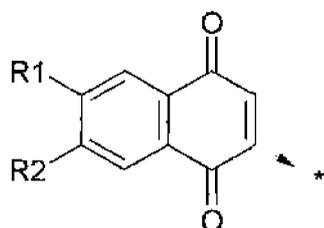


где **A** представляет собой эффекторный фрагмент, который предпочтительно представляет собой антиоксидант, необязательно имеющий следующую структуру:



и/или ее восстановленную форму (содержащую, например, одну или более =O, восстановленных до -OH),

где **m** представляет собой целое от 1 до 3; каждый **Y** независимо выбран из группы, состоящей из: C1-6 алкила (низший алкил), C1-6 алкокси (низший алкокси); или две соседние **Y** группы, вместе с атомами углерода, с которыми они соединены, образуют следующую структуру:



и/или ее восстановленную форму;

где **R1** и **R2** могут быть одинаковыми или различными, и каждый независимо представляет собой C1-6 алкил или C1-6 алкокси;

L представляет собой линкерную группу, включая:

a) нормальную или разветвленную углеводородную цепь, которая может быть необязательно замещена одним или более заместителями и необязательно содержит одну или более двойных или тройных связей; и/или

b) природную изопреновую цепь;

n представляет собой целое от 1 до 40;

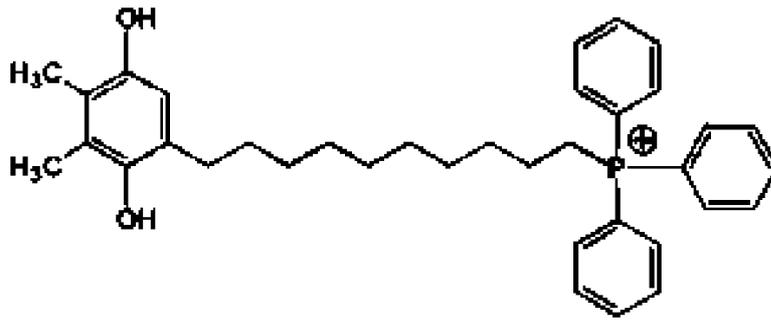
B представляет собой нацеленную на митохондрии группу, содержащую липофильный катион и фармацевтически приемлемый анион;

и/или их сольваты, соли, изомеры или пролекарства.

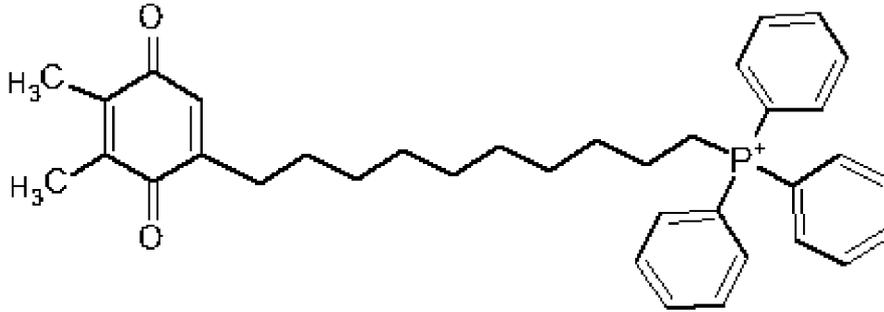
Как применяют в настоящем изобретении, изопреновая цепь или природная изопреновая цепь относится к $-\text{[CH}_2\text{C(Me)=CHCH}_2\text{]}_e-$ или $-\text{[CH}_2\text{C(Me)=CHCH}_2\text{]}_e\text{-OH}$ (один концевой -OH), где **e** представляет собой 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; или где **e** находится в диапазоне, определяемым любыми двумя членами группы; или где **e** находится в диапазоне 1-40.

Примеры нацеленных на митохондрии антиоксидантов формулы (I) представляют собой:

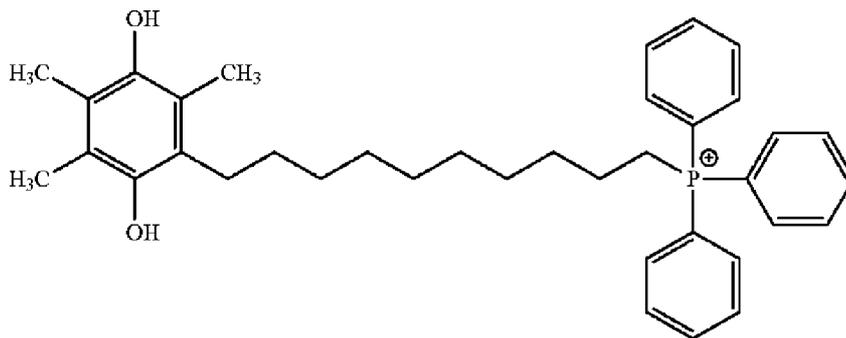
SkQ1 (в восстановленной форме):



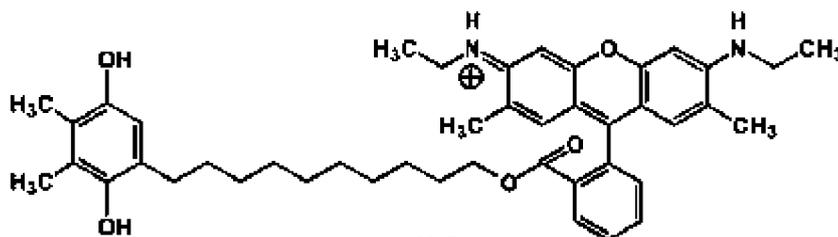
SkQ1 (в окисленной форме)



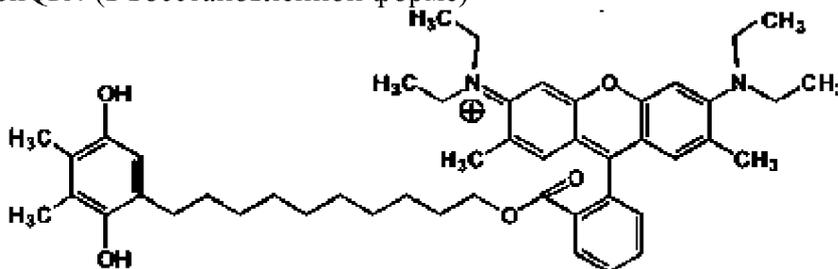
SkQ3 (в восстановленной форме)



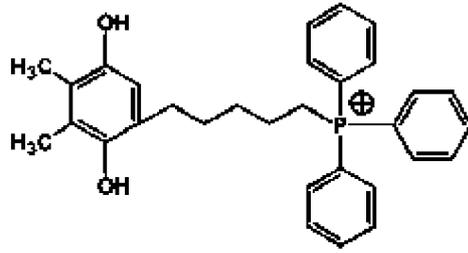
SkQR1 (в восстановленной форме)



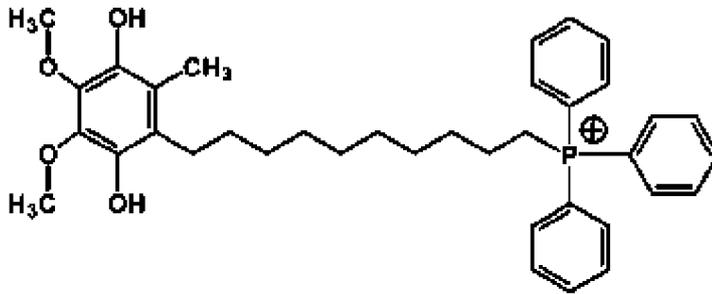
SkQR4 (в восстановленной форме)



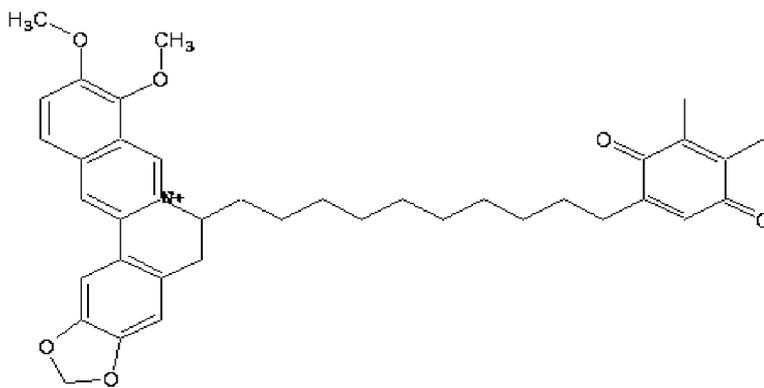
SkQ5 (в восстановленной форме)



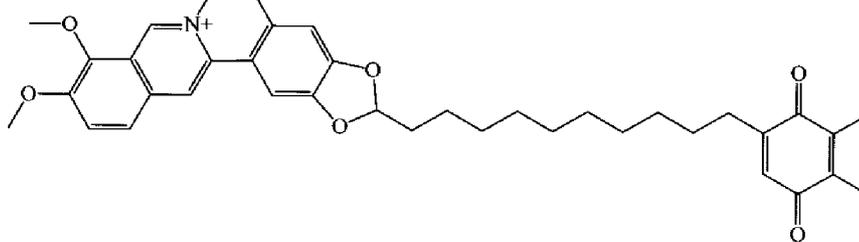
MitoQ (в восстановленной форме)



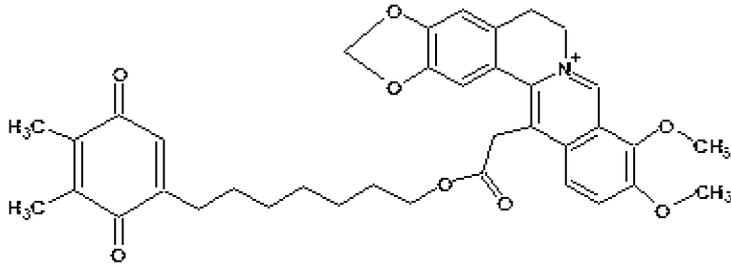
SkQB1A



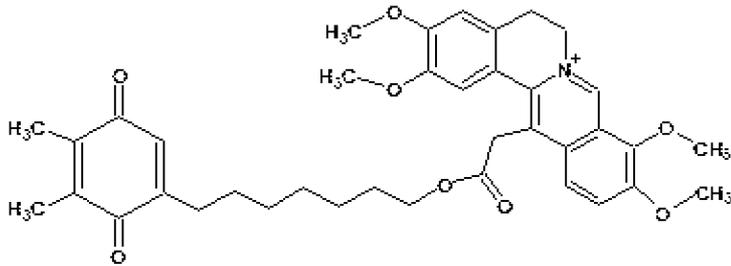
SkQB1B



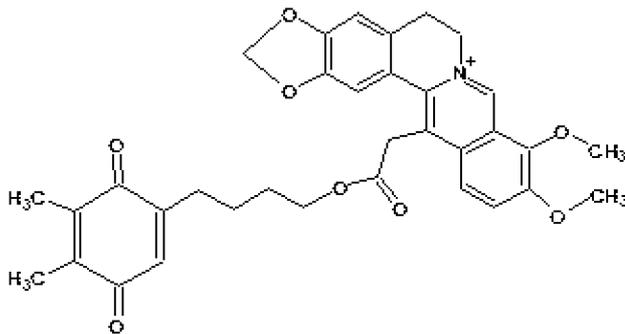
SkQB1:



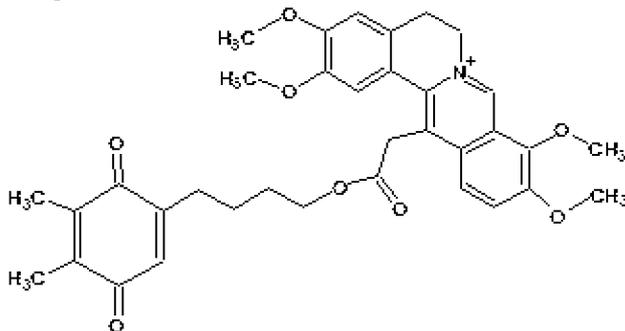
SkQBP1:



SkQB5

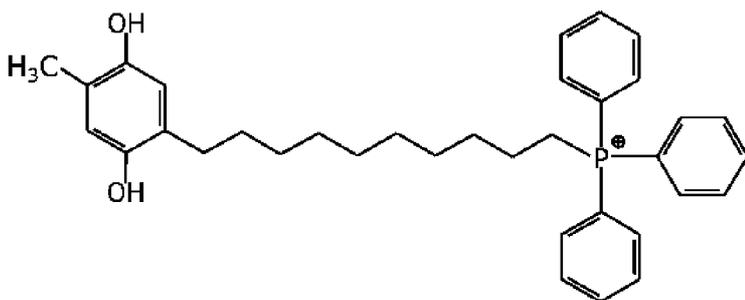


SkQBP5:

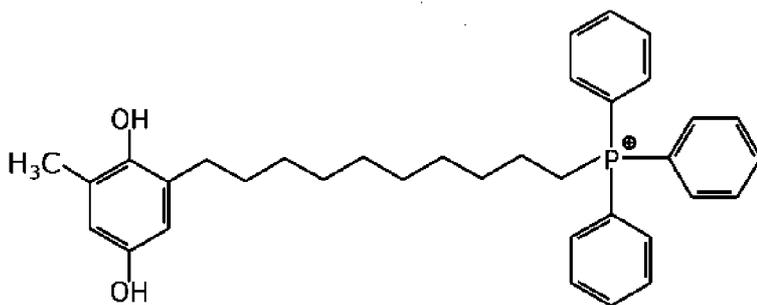


Дополнительные SkQ соединения для применения в способах, описанных в настоящем изобретении, можно получить из SkQ1 или любого из соединений выше, например, удалением метильной группы из эффекторного фрагмента, А. Таким образом, любой из способов может включать введение нацеленного на митохондрии антиоксиданта SkQ, такого как следующие (в восстановленной или окисленной форме):

SkQT1(p)



SkQT1(m)



или их комбинации.

Все из соединений выше (SkQ) могут быть или в восстановленной или окисленной формах, или в виде их смеси. Восстановленная форма может содержать, например, одну или более =O, восстановленных до -OH, и окисленная форма может содержать окисленную хиноновую группу (как это показано для SkQ1 выше).

Каждый вариант SkQ соединений можно применять в виде соли с фармацевтически приемлемым анионом, таким как хлорид, бромид, сульфат, фосфат, мезилат, цитрат или ацетат. "Нейтральные" формы соединений можно выделить контактированием солевой формы с основанием или кислотой с высвобождением исходного соединения традиционным способом и выделением, например, осаждением, элюированием с колонки или экстракцией. Исходная форма соединения может отличаться от солевых форм некоторыми физическими свойствами, например, растворимостью в полярных растворителях.

SkQ соединения, или отдельно или в комбинации, можно обеспечивать с диапазоном чистоты от приблизительно 80% до приблизительно 100%, от приблизительно 90% до приблизительно 100%, от приблизительно 95% до приблизительно 100%, от приблизительно 99% до приблизительно 100%, от приблизительно 99,5% до приблизительно 100%, от приблизительно 99,9% до приблизительно 100%. Примерами измерения чистоты являются применение детектора с диодной матрицей для мониторинга элюата из колонки УВЭЖХ и интегрирования основного пика поглощения (SkQ) вместе с любыми пиками примесей. Например, соединения SkQ, описанные в настоящем изобретении, можно формулировать в виде пролекарств образованием сложных эфиров между группой -OH соединения SkQ и подходящей трансформирующейся группой, такой как глициловый эфир, аминоэфир и полимерный эфир.

Один из путей введения данных соединений (SkQ) пациентов представляет собой в/в инъекцию. Экспериментальные результаты показывают, что приемлемый диапазон доз для людей может составлять от приблизительно 1 мг до приблизительно 22 мг SkQ1 в день (пример 4). Диапазон доз можно необязательно разделять на несколько инъекций (например, 1 инъекция каждые 12 часов). Диапазон доз для людей может быть в диапазоне от приблизительно 1 мг до приблизительно 5 мг SkQ1 в день, от приблизительно 1 мг до приблизительно 10 мг SkQ1 в день, от приблизительно 1 мг до приблизительно 15 мг SkQ1 в день, от приблизительно 1 мг до приблизительно 20 мг SkQ1 в день, или от приблизительно 1 мг до приблизительно 22 мг SkQ1 в день. При меньшей биодоступности, в зависимости от пути введения, верхний предел может быть большим. Другим способом введения может быть постепенное внутривенное вливание SkQ (пример 1). SkQ также можно вводить внутрикожной или внутривентриальной инъекцией в вышеописанном диапазоне доз. Составление в/в составов, внутрикожных или внутривентриальных составов может включать корректировку осмоляльности состава для соответствия в/в, внутрикожным или внутривентриальным условиям. Необязательно можно включать вспомогательные вещества, консерванты, другие активные вещества (например, комбинированная или коктейльная терапия).

Известно, что РДСВ тесно связан с системным воспалением, возникающим у пациентов с массивными вирусными инфекциями. Одним из ключевых элементов системного воспаления является так называемый «цитокиновый шторм», поражающий в первую очередь эндотелий сосудов. ССВО или другие механизмы, связанные с воспалением, часто приводят к повреждению эндотелия сосудов. Ухудшение здоровья и риск смерти при многих критических состояниях может происходить из-за повреждения эндотелия. Одно из применений настоящей технологии заключается в содействии лечению или предотвращению повреждения эндотелия сосудов, связанного с тяжелым или системным воспалительным состоянием защитой эндотелия сосудов SkQ (смотри пример 2).

Нацеленные на митохондрии антиоксиданты, описанные в настоящем изобретении, могут предотвращать разрушение межклеточных контактов между эндотелиальными клетками сосудов человека в культуре при обработке данных клеток образцами сыворотки крови пациентов с ССВО или сепсисом. Результаты вестерн-блоттинга VE-кадгерина представлены на фигуре 3, где клеточную культуру эндотелиальных клеток человека предварительно обрабатывают различными дозами SkQ1, затем подвергают воздействию сыворотки пациентов с диагнозом сепсис. Справа на фигуре 3 интенсивность VE-кадгерина при воздействии 200 нМ SkQ1 и сыворотки примерно равна интенсивности контроля слева.

На фигуре 4 образцы крови взяты у больных с диагнозом ССВО в возрасте от 18 до 75 лет. Культуру клеток эндотелиальных клеток человека предварительно обрабатывают различными дозами SkQ1, затем обрабатывают 5-10% сывороткой из образцов крови ССВО. В верхней части Фигуры 4 VE-кадгерин (флуоресцентная микроскопия)

напоминает VE-кадгерин в нижней части фигуры 4 (сыворотка ССВО+200 нМ SkQ1). Визуализации актина и ядра на фигуре 4 соответствуют наблюдениям VE-кадгерина.

Чтобы продемонстрировать, что различные критические состояния можно лечить или предотвращать SkQ, были проведены эксперименты на нескольких животных моделях данных критических состояний. Эксперименты были выбраны для моделирования критических потребностей. В примере 3 представлена модель тяжелой вирусной инфекции. Назальная инъекция вируса гриппа H5N1 вызывает у большинства мышей критическое состояние в условиях плацебо (450 мкл физиологического раствора), показанное на фигуре 5. Внутривенное введение SkQ1 (1000 нмоль/кг и 3000 нмоль/кг) защищает от критического состояния. Процент выживаемости представлен на фигуре 6.

В примере 5, на мышах моделируют тяжелый шок внутривенной инъекцией митохондрий, охлаждением (-20°C) или отравлением С12 TPP. В моделях внутривенной инъекции митохондрий и охлаждения предварительная и последующая обработка мышей SkQ1 являются эффективными для достижения высокого процента выживаемости. Фигура 7 показывает процент выживаемости при внутривенной инъекции митохондрий, и фигура 8 показывает процент выживания при холодовом шоке. В модели С12 TPP (фигура 9) условия без предварительной обработки SkQ1 показывают 90% смертность в течение 1 дня, в то время как предварительная обработка SkQ1 предотвращает смертность, так же как она предотвращает смертность, вызванную в/в инъекцией митохондрий или холодовым шоком. Пример 6 демонстрирует эффективность немедленного (около одной минуты) введения нацеленных на митохондрии антиоксидантов. В примере 7 дополнительно исследуют эффекты SkQ1 на цитокины TNF α и IL-6. Таким образом, пример технологии предлагает собой применение соединения SkQ для профилактики и лечения пациентов, являющихся людьми, в критических состояниях, соответствующих продемонстрированным животным моделям.

Например, лечение пациента нацеленным на митохондрии антиоксидантом, описанным в настоящем изобретении, можно проводить сразу после или после воздействия триггера критического состояния, в течение примерно 30 секунд после, в пределах приблизительно 1 минуты после, в пределах приблизительно 5 минут после, в пределах приблизительно 30 минут после, в пределах приблизительно часа после, в пределах приблизительно 2 часов после, в пределах приблизительно 5 часов после, в пределах приблизительно 1 дня после или в пределах приблизительно 3 дней после. Например, неотложное или спасающее жизнь лечение может включать лечение сразу после или после воздействия триггера критического анализа. Примеры предварительного лечения могут включать лечение пациента приблизительно за 10 дней, приблизительно за 5 дней, приблизительно за 1 день, приблизительно за 12 часов, приблизительно за 6 часов или приблизительно за 1 час до наступления критического состояния. Примеры последующего лечения могут включать лечение пациента приблизительно через 10 дней, приблизительно 5 дней, приблизительно 1 день, приблизительно 12 часов,

приблизительно 6 часов или приблизительно 1 час после критического состояния. Как показано на фигуре 2, можно применять непрерывное вливание терапий и композиций.

Изобретатели настоящего изобретения продемонстрировали, что летальные последствия различных форм шока, причем каждый связан с тяжелым системным воспалением, можно предотвратить или лечить введением соединения SkQ. Например, летальные эффекты (а) инъекции митохондрий в кровь мышей, (б) гипотермии и (в) инъекции С12 ТРР при токсических концентрациях можно предотвратить введением присоединенного на митохондрии антиоксиданта SkQ1.

Данные результаты показывают, что соединения SkQ могут предотвращать критические состояния, вызванные самыми разными состояниями, связанными с воспалением, в организме млекопитающих. Данные состояния, по-видимому, имеют общие основные механизмы, такие как цитокины, сигнальные мессенджеры и, возможно, белки. Не намереваясь ограничивать технологию каким-либо конкретным механизмом, предполагают по меньшей мере два кандидата для данных общих базовых механизмов: индуцируемый холодом РНК-связывающий белок (CIRP) и белок B1 из группы высокой подвижности (HMGB1). Таким образом, другим примером технологии является способ профилактики или лечения воспалительного состояния, причем способ включает введение эффективной и безопасной дозы SkQ пациенту с состоянием, вызванным механизмом, включающим CIRP, или HMGB1, или другой мессенджер, который непосредственно или опосредованно взаимодействует с toll-подобными рецепторами.

Другой пример технологии включает введение SkQ пациенту, перенесшему заболевание и подверженному риску развития состояния, характеризующегося тяжелым и системным воспалением. Данное лечение включает (но не ограничивается) внутрикожное, внутрибрюшинное или внутривенное введение SkQ. Введение может осуществляться с помощью аварийного автоинъектора и аварийной ручки. Данные состояния включают вирусные инфекции, бактериальные инфекции (включая сепсис), грибковую инфекцию, аутоиммунные заболевания, ССВО, повреждение эндотелия сосудов, тромбоз, травму, холодовый или тепловой шок (включая ожоги), хирургическое вмешательство, связанное со значительным повреждением ткани, и повреждение от воздействия токсичного вещества. Родственным примером является защита эндотелиальных клеток сосудов пациента от апоптоза, некроза и/или воспалительной активации.

Абсорбция с помощью кожных (местно) составов или введением микрочастиц или наночастиц любым из способов, описанных выше, считается включенным в настоящую технологию. Другими примерами составов для введения SkQ являются составы для ингаляции, включая ингаляцию частиц и тумана, и пероральный состав.

Способ получения лекарственного средства или состава для защиты и лечения пациентов в критических состояниях включает стадии: обеспечение среды, и контакт среды с нацеленным на митохондрии антиоксидантом типа SkQ (соединение общей формулы I). Соединение общей формулы I можно обеспечивать в виде соли, например, фармацевтически приемлемой соли. Примеры включают, но не ограничиваются, цитрат,

гексаноат, гексилрезорцинат, гидрабамин, гидробромид, гидрохлорид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат, гидроксинафтоат, йодид, изотионат, лактат, лактобионат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, манделат, мезилат, метансульфонат, метилсульфат, мукат, 2-нафталинсульфонат, напсилат, никотинат, нитрат, аммониевую соль N-метилглюкамина, олеат, оксалат, памоат (эмбонат), пальмитат, клавуланат, циклопентанпропионат, диглюконат, дигидрохлорид, додецилсульфат, эдетат, эдисилат, эстолат, эзилат, этансульфонат, формиат, фумарат, глюцептат, глюкогептонат, глюконат, глутамат, глицерофосфат, гликолиларсанилат, гемисульфат, гептаноат, пантотенат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат/дифосфат, пикрат, пивалат, полигалактуронат, пропионат, салицилат, стеарат, сульфат, субацетат, сукцинат, таннат, тартрат, теоклат, тозилат, триэтиодид, ундеканоат, валерат, ацетат, адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бикарбонат, бисульфат, битартрат, борат, бромид, бутират, кальциевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (эдетат), камфорат, камфорсульфонат, камзилат, карбонат и хлорид. Среда может быть газом, твердым веществом или жидкостью. В одном примере, лекарственное средство или состав состоит из водной среды и соединения общей формулы I или его соли.

При получении лекарственного средства или состава, соединение общей формулы I можно обеспечивать в жидкой, газообразной, мелкодисперсной или твердой форме и может необязательно включать распределение размера частиц, измеренное, например, относительно объема, количества или веса, включая диапазон от нескольких нанометров до приблизительно 1 миллиметра. Способ может дополнительно включать добавление фармацевтически приемлемого носителя, или среда может представлять собой фармацевтически приемлемый носитель. Способ может включать микронизацию, измельчение, звуковое смешивание или обработку ультразвуком, гомогенизацию или их комбинацию.

Соединение общей формулы I можно предоставлять в терапевтически эффективном количестве. Лекарственное средство или состав можно обеспечивать в концентрированной форме, которую затем разбавляют до терапевтически эффективного количества. Разбавление можно осуществлять инъекцией или введением концентрированного раствора или состава. Терапевтически эффективное количество может обеспечивать дневную дозу для людей в диапазоне от приблизительно 1 мг до приблизительно 5 мг соединения общей формулы I в день или каждые 12 часов, от приблизительно 1 мг до приблизительно 10 мг соединения общей формулы I в день или каждые 12 часов, от приблизительно 1 мг до приблизительно 15 мг соединения общей формулы I в день или каждые 12 часов, от приблизительно 1 мг до приблизительно 20 мг соединения общей формулы I в день или каждые 12 часов, или от приблизительно 1 мг до приблизительно 22 мг соединения общей формулы I в день или каждые 12 часов. Как применяют в настоящем изобретении, безопасное и эффективное количество или безопасная доза может составлять приблизительно верхний предел терапевтически эффективных количеств, описанных в настоящем изобретении. Если биодоступность

является низкой, в зависимости от пути введения безопасное и эффективное количество или безопасная доза могут быть скорректированы до большей величины с учетом низкой биодоступности, например, как показано на фигуре 1D.

Способ получения лекарственного средства или состава может включать регулирование pH, применяя любую фармацевтически приемлемую кислоту или основание. Например, цитрат можно применять для регулирования pH внутрикожных составов из-за низкого раздражения кожи, и другие примеры включают HCl, малеиновую кислоту, винную кислоту, молочную кислоту, уксусную кислоту, бикарбонат натрия и фосфат натрия. pH лекарственного средства или состава может быть в диапазоне приблизительно 3,0-9,0, в диапазоне приблизительно 4,0-8,0, в диапазоне приблизительно 5,0-8,0, в диапазоне приблизительно 6,0-8,0, или в диапазоне приблизительно 7,0-8,0, или приблизительно 5,0, или приблизительно 7,4. Например, внутрикожной лекарственное средство или состав может иметь приблизительно pH 5,0. в/в лекарственное средство или состав может иметь приблизительно pH 7,4. Осмолярность лекарственного средства или состава можно регулировать добавлением, например, NaCl, KCl, Na/KH₂PO₄, сахарозы, ионов или буферов. Осмолярность лекарственного средства или состава может составлять приблизительно 300 мОсм/кг, или приблизительно 600 мОсм/кг, или в диапазоне от приблизительно 200 мОсм/кг до приблизительно 700 мОсм/кг, или в диапазоне от приблизительно 200 мОсм/кг до приблизительно 600 мОсм/кг, или в диапазоне от приблизительно 300 мОсм/кг до приблизительно 600 мОсм/кг. Гипертонический раствор можно применять для уменьшения общего объема вводимого раствора, но более высокая гипертоничность может вызвать инъекционную боль, и верхний предел 600 мОсм/кг может свести к минимуму боль, вызванную гипертоничностью.

Способы введения могут включать энтеральное введение, такое как пероральное, сублингвальное и ректальное; местные, такие как чрескожный, внутрикожный и окулдермальный; и парентеральное. Подходящие парентеральные способы введения включают инъекции, например, внутривенные, внутримышечные, подкожные, внутрибрюшинные, внутриартериальные и другие инъекции, и неинъекционные способы, такие как вагинальные, назальные, ректальные, а также способы введения фармацевтической композиции в виде покрытия ангиопластического стента. Лекарственное средство или состав можно вводить путями, включая, например, внутрибрюшинный, внутривенный, внутриартериальный, парентеральный и ингаляционный.

Способ может включать обеспечение других ингредиентов, например, органических растворителей (например, этанола, метанола, ДМСО, ацетонитрила, пропиленгликоля(ей), N-метил-2-пирролидона, гликофуrolа, глицеринформаля, ацетона, тетрагидрофурурилового спирта, диглима, диметилизосорбида и этиллактата), другие активные агенты, консерванты, агенты, повышающие растворимость, буферы, биопрепараты, клетки, хелатирующие агенты и красители.

SkQ соединения можно применять для изготовления лекарственного средства для

защиты и лечения пациентов с тяжелыми или системными воспалительными состояниями. Составы и способы, описанные в настоящем изобретении, можно предоставлять в наборе для оказания неотложной помощи пациенту. Набор можно применять для предотвращения перехода тяжелого воспалительного состояния в летальное состояние, например, во время транспортировки пациента в учреждение неотложной помощи. Например, способы и композиции, описанные в настоящем изобретении, можно предоставлять в виде набора для экстренной помощи для лечения горячего или холодного шока, системного шока, вирусной инфекции, для лечения кровеносных сосудов с целью предотвращения или устранения повреждений, вызванных COVID-19, для лечения токсического шока или отравления, шока при тяжелом повреждении тканей, септическом шоке или для профилактики летальных состояний, возникающих в результате еще не диагностированного конкретно шока или воспалительного состояния у больного. Набор может включать ручка для экстренного введения, включая инъекционный разъем SkQ. Набор может включать шприц, содержащий инъекционный состав SkQ. Набор может включать SkQ в проницаемом флаконе и в ампуле, и также можно предоставлять шприц для наполнения SkQ.

В другом примере, способ защиты субъекта, подозреваемого в том, что он подвергся воздействию состояния, вызывающего тяжелое или системное воспалительное заболевание, может включать введение SkQ до, во время и после воздействия. Например, человек, входящий в зону, содержащую или предположительно содержащую токсины, тепло, холод, бактерии, вирусы, такие как грипп, SARS-CoV-2, и других лиц, инфицированных вирусом и другим микробом, могут получить профилактическую дозу SkQ.

Введение соединений SkQ или содержащих их композиций можно осуществлять, например, непрерывным внутривенным вливанием соединения или композиций. Введение можно осуществлять с помощью носимой дыхательной маски, наполненной аэрозолем, частицами или парами, содержащими SkQ. Также предполагается носимое устройство для лиц, о которых известно, что они подвергаются воздействию состояний, приводящих пациента в критическое состояние, или для лиц, о которых известно, что они подвергаются воздействию экстремально высоких или низких температур, или любой предполагаемой опасности для здоровья и безопасности. Устройства, включающие устройства для капельного введения, вливания и имплантирования катетеров, обеспечивают контроль количества и скорости SkQ, вводимого нуждающемуся пациенту. Устройства, описанные в настоящем изобретении, включают стационарные вентиляторы, такие как больничные вентиляторы, содержащие SkQ во вдыхаемый воздух.

Представленные в настоящем изобретении способы, применяя нацеленные на митохондрии антиоксидантные соединения SkQ, можно применять для лечения воспаления из различных источников. Примеры включают аллергические реакции, побочные реакции на химические вещества, лекарства или продукты питания, стресс, бактериальные инфекции, вирусные инфекции, острый респираторный дистресс-синдром

(РДСВ), синдром системной воспалительной реакции (ССВО) или сепсис, реакцию трансплантат против хозяина (РТПХ), трансплантацию органа, синдром лизиса опухоли, рассеянный склероз, панкреатит и реакцию на вакцину и терапевтический белок. В некоторых случаях воспалительная реакция может спровоцировать цитокиновый шторм или синдром высвобождения цитокинов (CRS), который можно лечить введением нацеленного на митохондрии антиоксиданта, как описано в настоящем изобретении. Примеры вирусных инфекций, связанных с воспалением, которое можно лечить введением нацеленного на митохондрии антиоксидантного соединения, как описано в настоящем изобретении, включают COVID-19, SARS, MERS, грипп и лихорадку Эбола.

Составы и способы лечения, обеспечиваемые настоящим технологием, могут обеспечивать терапию пациента, состояние которого могло ухудшиться до критического состояния в клинических условиях или для предотвращения данного возникновения. У пациента могут быть начальные клинические проявления, которые быстро переходят в критическое состояние, например, кашель, лихорадку, боль в горле, отит/боль в ушах, инфекции верхних дыхательных путей, боль в животе, рвота, диарея с рвотой или без нее, острый дерматит или сыпь, травма, воспаление суставов и конечностей, боль и симптомы со стороны ЦНС. Примеры состояний, приводящих к ухудшению состояния пациента до критического состояния, могут быть вызваны хроническими состояниями, такими как болезнь Альцгеймера, артрит, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), депрессия, диабет, болезни сердца, высокое кровяное давление, длительное воздействие токсинов или лекарственных средств, высокий уровень холестерина, ожирение, остеопороз или инсульт.

Соединения и способы настоящего изобретения можно применять для лечения или предотвращения тяжелых или системных состояний, вызванных, например, острой крапивницей, аллергическим ринитом, анафилаксией, ранами от укусов животных, аппендицитом, артритом (например, ювенильным ревматоидным артритом, ЮРА), астмой или приступом астмы, атопическим дерматитом, скрытой бактериемией, опухолью головного мозга, переломом кости, бронхитом, ожогом, флегмоной, шейным аденитом, хламидиозным пневмонитом, закрытой черепно-мозговой травмой, коликами, простудой, осложнениями во время беременности (например, внутрипеченочным холестаазом), врожденной гиперплазией надпочечников, врожденным вывихом бедра, конъюнктивитом, запором, контактным дерматитом, крупом, муковисцидозом, дегидратацией, диабетическим кетоацидозом (ДКА), лекарственной реакцией, энкопрезом, острой задержкой развития, фебрильными судорогами, аспирацией инородного тела, гастритом, гастроэнтеритом, гастроэзофагеальным рефлюксом, лямблиями, головными болями (мигренью, напряжением), сердечным приступом, гемолитико-уремическим синдромом, гепатитом, гидроцефалией, импетиго/целлюлитом, ущемленной грыжей, повышенным внутричерепным давлением, другими инфекциями (например, токсическим тенозиновитом, септическим артритом, остеомиелитом), воспалительным заболеванием кишечника (ВЗК), острыми травмами в результате жестокого обращения с детьми,

травмами в результате падения или автомобильной аварии, инвагинацией кишечника, болезнью Кавасаки, болезнью Легга-Кальве-Пертеса, лейкемией/опухолями, злокачественными новообразованиями, мастоидитом, менингитом, комбинированными микробными (например, грибковой или бактериальной) инфекциями, выпотом из среднего уха, злоупотреблением лекарствами средствами и медикаментами, монилиальными кожными инфекциями, мононуклеозом, подвывиха плечелучевого сустава с компрессией кольцевидной связки-ротатора у детей, болезнью Осгуда-Шлаттера, остеомиелитом, средним отитом, перекрутом яичников/яичек, воспалительным заболеванием органов малого таза (ВЗОМТ), пептической язвой, периорбитальным/орбитальным целлюлитом, паратонзиллярным и заглоточным абсцессом, коклюшом, фарингитом (например, стрептококковым, без скарлатины или вирусным), пневмонией, прионами, психогенной болью в животе, пиелонефритом, стенозом привратника, бешенством, рецидивирующим средним отитом, респираторной инфекцией, ревматической лихорадкой,

розеолой, чесоткой, скарлатиной, себорейным дерматитом, состояниями, вторичными по отношению к инфекциям (например, стрептококковым фарингитом, отитом), судорожными расстройствами, фебрильными судорогами, септическим артритом, серповидно-клеточным кризом, синуситом, смещением эпифиза головки бедренной кости, синдромом Стивенса-Джонсона, острым фарингитом, тендинитом, столбняком, лишайными инфекциями, тонзиллитом, туберкулезом, необъяснимым шоком, инфекцией верхних дыхательных путей (ОРИ), инфекцией мочевыводящих путей (ИМП), пиелонефритом, васкулитом (например, пурпурой Шенлейна-Геноха, HSP), вирусными экзантемами, (ветряная оспа, корь или краснуха, пятое заболевание), подозрением на вирусное заболевание (неподтвержденное или неспецифическое) или заворотом кишок/непроходимостью кишечника.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Исследование биодоступности SkQ1: сравнение внутривенного, внутрикожного, внутрибрюшинного введения.

Биодоступность SkQ1 определяли после применения различных способов введения. Использовали крыс Wistar категории SPF. Концентрацию SkQ1 в образцах крови измеряли с помощью ЖХ-МС/МС, где SkQ1 вводили в дозе 2 мг/кг, и образцы крови отбирали в указанные моменты времени. Введение осуществлялось внутривенной инъекцией (фигура 1A), внутрибрюшинной инъекцией (фигура 1B) или внутривенной инъекцией (фигура 1C). Общую дозу SkQ1 рассчитывали как площадь под кривой (AUC), как показано слева на фигуре 1D. Биодоступность SkQ1 нормализовали к таковой при в/в введении, и она показана справа на фигуре 1D. Биодоступность SkQ1 при внутрибрюшинном введении составила 35%, и при внутривенном введении составила 44% от биодоступности после внутривенного введения.

Из описанных выше экспериментов можно сделать вывод, что SkQ1 быстро исчезает из крови. В следующем эксперименте присутствие SkQ1 в крови продлевали с

помощью насоса для вливания с медленным высвобождением, введенным внутрикожно крысам Вистар. Образцы крови у данных животных отбирали в моменты времени, указанные на фигуре 2, и измеряли концентрацию SkQ1, как описано выше. Результаты, представленные на фигуре 2, демонстрируют, что концентрацию SkQ1 в крови можно стабилизировать, применяя медленное высвобождение соединения. Данный эксперимент также моделирует введение SkQ1 с применением внутривенного вливания.

Пример 2. SkQ1 подавляет разрушение монослоя эндотелия кровеносных сосудов, вызванное образцами сыворотки крови пациентов с ССВО.

Нацеленный на митохондрии антиоксидант SkQ1 предотвращал нарушение межклеточных контактов между эндотелиальными клетками сосудов человека в культуре при обработке данных клеток образцами сыворотки крови больных с синдромом системного воспалительного ответа (ССВО) или сепсисом. Нарушение данных контактов приводит к повреждению эндотелия, что обычно происходит с развитием критического состояния больного. Было обнаружено, что SkQ1 подавляет ответ на воспаление эндотелия сосудов.

Образцы крови отбирали у пациентов в возрасте 18-75 лет с диагнозом ССВО. Клеточные культуры эндотелиальных клеток человека предварительно обрабатывали различными количествами SkQ1, после чего культуры обрабатывали 5-10% сывороткой из образцов крови ССВО. Одновременное исследование VE-кадгерина проводили с помощью флуоресцентной микроскопии с последующим вестерн-блоттингом. Результаты эксперимента представлены на фигуре 3 (вестерн-блоттинг) и фигуре 4 (микроскопия). Данные результаты демонстрируют действие SkQ1 в предотвращении повреждения эндотелия сосудов при системном воспалении.

Пример 3. SkQ1 увеличивает выживаемость и продлевает период без симптомов в мышинной модели тяжелой вирусной инфекции.

Нацеленный на митохондрии антиоксидант SkQ1 отсрочил как развитие ухудшения состояния здоровья, так и гибель мышей, вызванную инфекцией вируса гриппа H5N1.

В нулевой день мышам balb/c (10-12 г) инокулировали назальной инъекцией вирус гриппа H5N1 (штамм куриный/Курганский/5/2005). Животные были разделены на 4 экспериментальные группы:

1. плацебо (n=11)
2. SkQ1 333 нмоль/кг (n=9)
3. SkQ1 1000 нмоль/кг (n=9)
4. SkQ1 3000 нмоль/кг (n=11).

Начиная со 2 дня (третий день после заражения) каждому животному вводили в/б инъекцию 450 мкл физиологического раствора, содержащего соответствующую дозу SkQ1 или плацебо. Отслеживали время развития критического состояния и время гибели животных.

Результаты эксперимента представлены в фигуре 5 (критическое состояние) и

фигуре 6 (смерть). Данные результаты показывают, что обработка SkQ1 может защитить организм от развития критического состояния и смерти, вызванных тяжелой вирусной инфекцией.

Пример 4. токсикологическое исследование SkQ1: острое и хроническое внутрикожное введение.

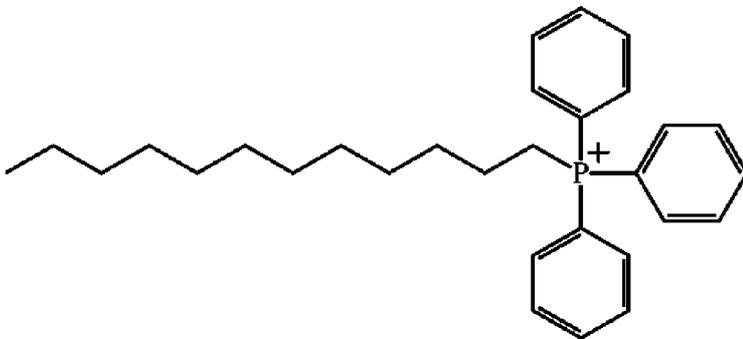
Острую токсичность раствора SkQ1 при внутрикожном введении изучали на самцах и самках мышей CD-1 SPF. Летальный эффект высоких доз SkQ1 наблюдали в первые часы после введения из-за остановки дыхания, и признаки гепато- и нефротоксичности обнаруживали у мышей, выживших через 14 дней после введения токсических доз SkQ1. LD50 составила 31 (20,5-37,2) мг SkQ1/кг у самцов и 26,8 (23-31) мг SkQ1/кг у самок.

28-дневную хроническую токсичность раствора SkQ1 с 14-дневным восстановлением изучали на самцах и самках мышей CD-1 SPF при внутрикожной дозе SkQ1 0,6, 2,5 и 10 мг/кг один раз в сутки. При дозе 2,5 мг SkQ1/кг не было выявлено побочных эффектов (NOAEL) ни в конце дозирования, ни в конце восстановления. При дозе 10 мг/кг $\approx 15\%$ животных погибали от перитонита и обнаруживали изменения различных систем, большинство из которых восстановились в течение 14 дней после восстановления. Перитонит возник из-за местного язвенного действия состава, и побочные реакции систем/органов, по-видимому, были следствием перитонита.

Пример 5. Предварительная обработка SkQ1 защищает мышей от смерти, вызванной внутривенной инъекцией митохондрий, холодовым шоком или токсичными концентрациями C12 TPP.

SkQ1 защищал мышей в трех различных моделях тяжелых критических состояний у мышей. Первое критическое состояние было вызвано инъекцией взвеси выделенных митохондрий печени в хвостовую вену мыши. Второе критическое состояние было вызвано резким холодовым шоком помещением мышей на 90 минут в среду -20°C . Третье состояние было вызвано введением токсической концентрации липофильного катиона C12 TPP, формула которого показана ниже:

C12TPP



Инъекция митохондрий в кровоток воспринимается организмом млекопитающего как сигнал о тяжелых инфекциях, и реакция организма напоминает септический шок, как если бы кровоток был заражен бактериями и вирусами. Однако после внутривенного

введения суспензии митохондрий в крови отсутствуют инфекционные агенты. Явления данного рода называются молекулярными паттернами, связанными с повреждением (DAMP), и относятся к высвобождению провоспалительных эндогенных опасных молекул, высвобождаемых из поврежденных клеток в ответ на механическое повреждение. Это контрастирует с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP), в которых провоспалительные молекулы высвобождаются в ответ на микробные инфекции. Митохондриальные DAMP имеют эволюционно консервативное сходство с бактериальными PAMP и, следовательно, могут вызывать воспалительное состояние, подобное септическому шоку. Наличие митохондрий в кровотоке может быть связано с активацией иммунной системы (например, при вирусной инфекции), которая образует поры в клеточной мембране, что приводит к лизису клеток или экстракции клеточных органелл, включая митохондрии, в кровоток.

Фигура 7 показывает результаты эксперимента с инъекцией митохондрий, выделенных из мышинной печени, в хвостовую вену мышей. Инъекция митохондрий не влияла на выживаемость в течение первого дня (выжило 100% животных). Однако в следующие два дня выжило только 60% животных. Эта степень выживаемости сохранялась в течение по меньшей мере 16 дней. Когорта мышей, получавших антиоксидант SkQ1 за пять дней до инъекции митохондрий и затем через пять дней после инъекции, продемонстрировала гораздо более высокую выживаемость (90% животных выжили). Смотри фигуру 7. В данном эксперименте отчетливо наблюдали сильное снижение веса в первые 3 дня после инъекции митохондрий. Затем выжившие животные стали выздоравливать - смертность исчезла, и масса тела стала увеличиваться. В контрольном эксперименте вместо SkQ1 применяли C12 TPP. В случае C12 TPP 20% мышей погибали в первые полдня после инъекции митохондрий, и через двое суток смертность возрастала до 80%.

В следующем эксперименте, критическое состояние вызывали совсем другим стрессом, а именно холодовым шоком в результате выдерживании мышей в течение 1,5 часов при -20°C . На фигуре 8 видно, что холодовый шок приводил к резкому увеличению смертности между 5 и 8 днями, в результате чего выживаемость составила 40%. Премедикация SkQ1 и обработка после шока полностью предотвратили гибель животных, тогда как премедикация и обработка C12 TPP повысили смертность до 100% к шестым суткам.

В следующем эксперименте критическое состояние у мышей вызывали в/в инъекцией токсической дозы C12 TPP (34 мкмоль/кг). Учитывая мембранопроницающие и мембраноразрушающие свойства C12 TPP, можно ожидать, что летальный эффект в/в инъекции C12 TPP возникает за счет разрушения клеток сосудистой системы, в том числе эндотелиальных клеток сосудов. Фигура 9 показывает, что инъекция 34 мкмоль/кг C12 TPP приводила к 90% смертности в течение 1 дня, и данная смертность была предотвращена предварительной обработкой мышей SkQ1; это происходит по тому же механизму, что и предотвращение смертности, вызванной холодовым шоком или в/в

инъекцией митохондрий.

Пример 6. Постобработка SkQ1 защищает мышей от смерти, вызванной внутривенной инъекцией митохондрий, холодовым шоком или токсическими концентрациями C12 TPP.

В предыдущих экспериментах было показано, что премедикация SkQ1 защищает мышей от шока, вызванного появлением митохондрий в крови, резким охлаждением тела или инъекцией C12 TPP. В следующей серии экспериментов исследовали, можно ли спасти животных обработкой SkQ1, вводимого одновременно с инъекцией и даже после инъекции. Как видно на фигурах 10 и 11, смертность от инъекции митохондрий в кровотоки (фигура 10) или от холодового шока (фигура 11) значительно снижались инъекцией SkQ1 практически сразу (через одну минуту) после индукции шокового стимула.

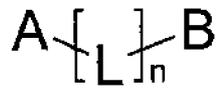
Данную серию экспериментов продолжали с применением летального шока, вызванного токсическими концентрациями C12 TPP. Применяли две дозы C12TPP: 34 мл/кг C12TPP (фигура 12) и 42 мл/кг C12TPP (фигура 13). В данных, представленных на фигуре 12, SkQ1 (доза 1,5 мкмоль/кг) вводили каждой из мышей как за 4,5 часа до введения C12 TPP, так и через 0,5 часа после введения C12 TPP. Без SkQ1 приблизительно 80% мышей погибло в течение 32 часов после инъекции C12 TPP; с SkQ1 уровень смертности был снижен до 40%. В эксперименте, описанном на фигуре 13, количество C12 TPP увеличивали до 42 мкмоль/кг. Как видно на фигуре 13, все 12 животных погибли в течение 1,5 часов после данной обработки в контрольной группе. В экспериментальной группе SkQ1 вводили однократно в течение 1 часа после обработки C12 TPP. В группе обработки SkQ1 выжила 1/3 животных (фигура 13).

Пример 7. Эффект SkQ1 на цитокины TNF α и IL-6.

Было показано, что воспаление при коронавирусной инфекции стимулируется рядом цитокинов. В частности, TNF α и IL-6 считаются маркерами наличия воспаления. В данном эксперименте внутривенная инъекция митохондрий печени вызывала значительное повышение концентрации в крови TNF α и IL-6 у мышей. Данный эффект, который достигал максимума приблизительно через 3 часа после инъекции митохондрий, почти полностью подавлялся внутрибрюшинной инъекцией SkQ1 (фигура 14A и фигура 14B). Аналогичные результаты получали в эксперименте с холодовым шоком (фигура 15A и фигура 15B). Данные результаты свидетельствуют о том, что SkQ не только защищает организм в случае возникновения состояний, связанных с цитокиновым штормом, но и способен подавлять ключевые элементы цитокинового шторма.

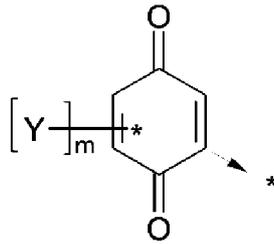
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ оказания помощи в лечении или предотвращении воспалительного состояния у нуждающегося субъекта, причем способ включает введение нацеленного на митохондрии антиоксиданта формулы I (SkQ)

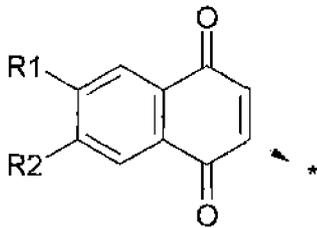


Формула I;

где **A** представляет собой эффекторный фрагмент/антиоксидант, необязательно имеющий следующую структуру:



и/или ее восстановленную форму, где **m** представляет собой целое от 1 до 3; каждый **Y** независимо выбран из группы, состоящей из C1-6 алкила, C1-6 алкокси, или двух соседних **Y** групп, вместе с атомами углерода, с которыми они соединены, образуя следующую структуру:



и/или ее восстановленную форму, где **R1** и **R2** могут быть одинаковыми или различными, и каждый независимо представляет собой C1-6 алкил или C1-6 алкокси;

где **L** представляет собой линкерную группу, включая:

а) нормальную или разветвленную углеводородную цепь, которая может быть необязательно замещена одним или более заместителями и необязательно содержит одну или более двойных или тройных связей; и/или

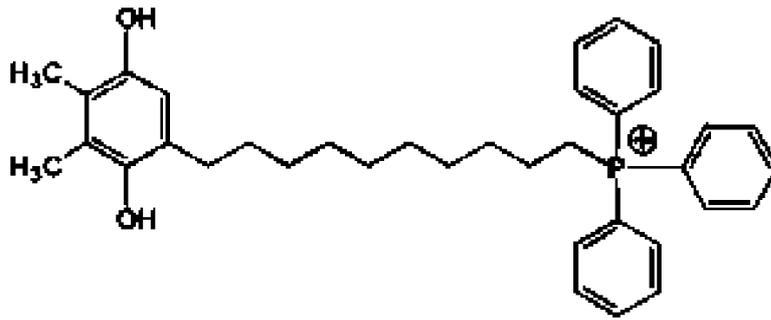
б) природную изопреновую цепь;

где **n** представляет собой целое от 1 до 40;

где **B** представляет собой нацеливающую на митохондрии группу, содержащую липофильный катион и фармацевтически приемлемый анион;

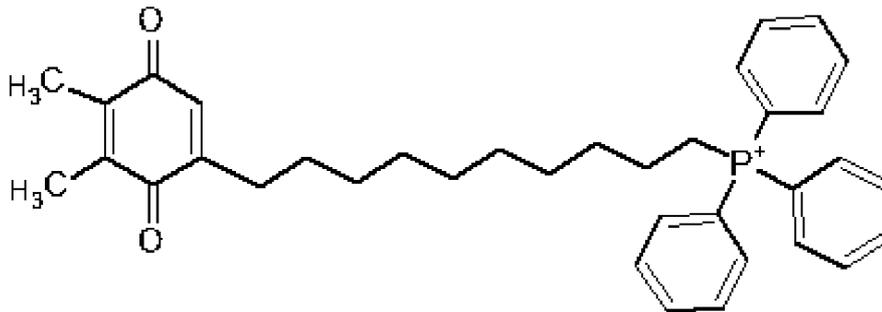
и/или его сольватов, солей, изомеров или пролекарств.

2. Способ по п. 1 где SkQ представляет собой соединение SkQ1, показанное ниже, в его восстановленной или окисленной форме:



(восстановленная

форма),



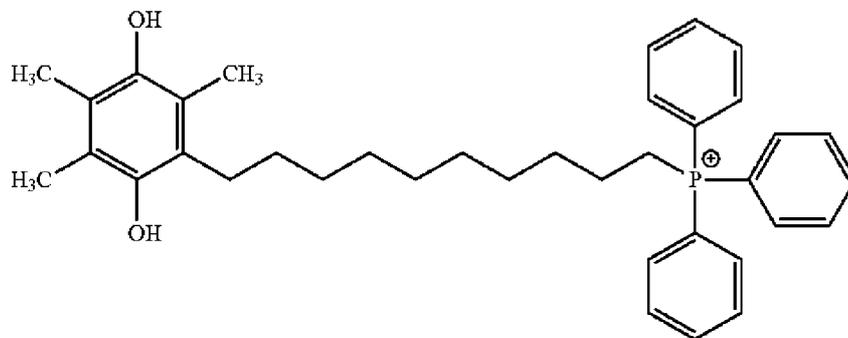
(окисленная

форма),

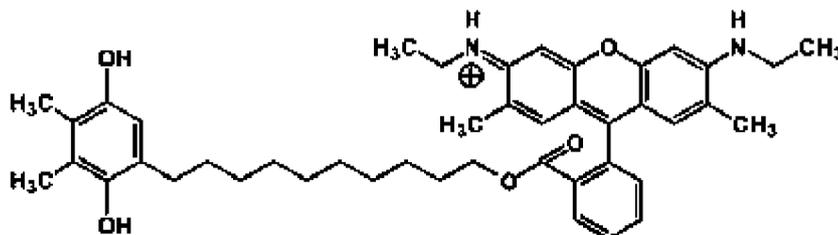
или их комбинации.

3. Способ по п. 1, где SkQ представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из следующих соединений:

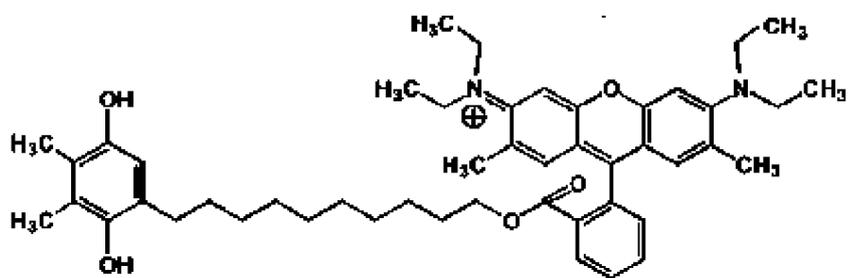
SkQ3 (в восстановленной форме)



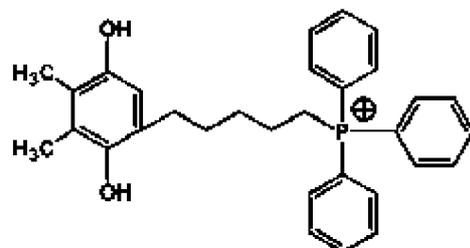
SkQR1 (в восстановленной форме)



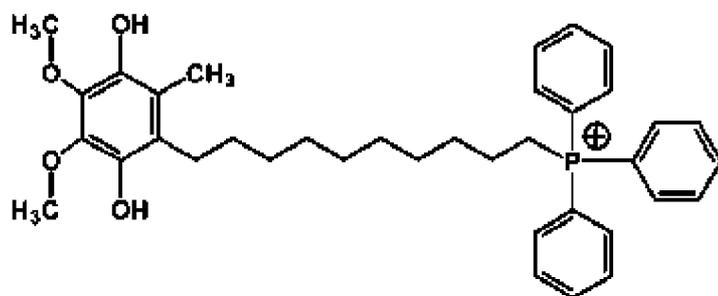
SkQR4 (в восстановленной форме)



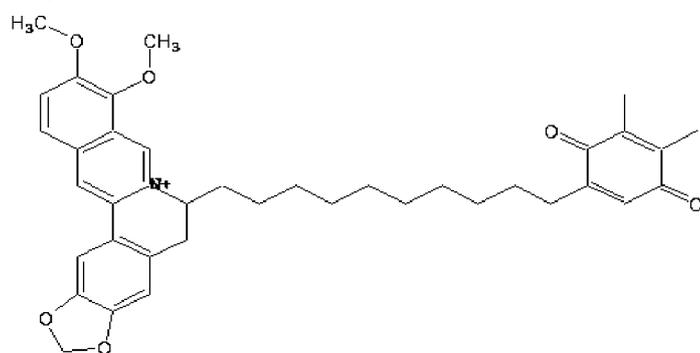
SkQ5 (в восстановленной форме)



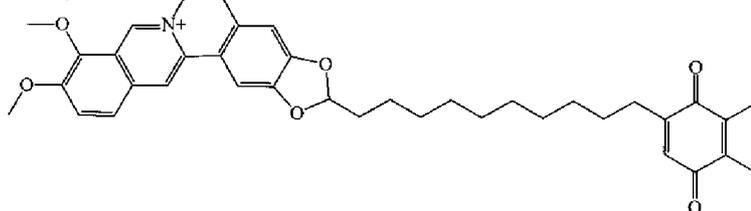
MitoQ (в восстановленной форме)



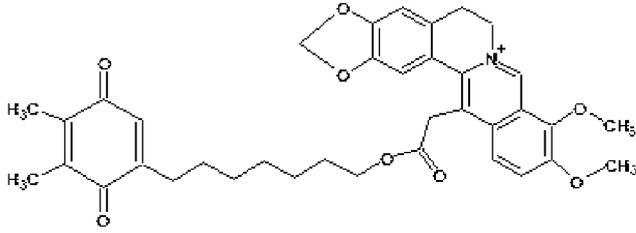
SkQB1A



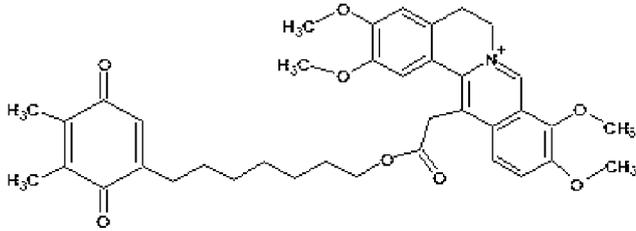
SkQB1B



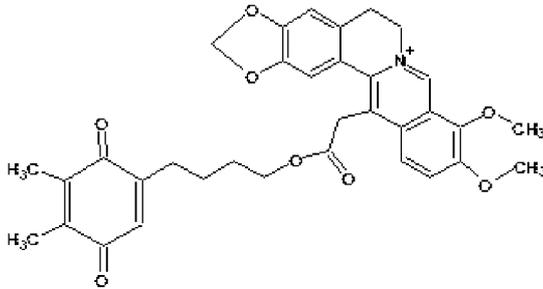
SkQB1:



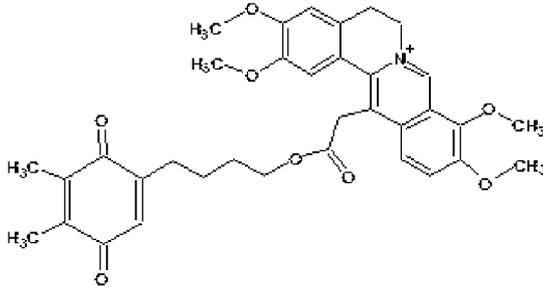
SkQBP1:



SkQB5



SkQBP5:



4. Способ по любому из предшествующих пунктов, где воспалительное состояние связано с инфекцией, COVID-19, сепсисом или септическим шоком, цитокиновым штормом или ССВО, повреждением эндотелия сосудов, активацией эндотелиальных клеток сосудов, PAMPS, DAMPS, холодным шоком, тепловым шоком, токсическим шоком, ожоговой травмой, хирургическим вмешательством, аутоиммунным заболеванием, анафилаксией, раком, ишемическим заболеванием или наличием CIRP и/или HMGB1 в крови пациента.

5. Способ по п. 4, где инфекция представляет собой бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию или вирусную инфекцию.

6. Способ по п. 5, где вирусная инфекция представляет собой инфекцию вирусом гриппа или коронавирусом, таким как SARS-CoV-2.

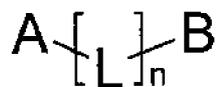
7. Способ по любому из предшествующих пунктов, где SkQ вводят внутривенной инъекцией или вливанием, внутривенной инъекцией, или в виде состава или устройства с медленным высвобождением.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, где способ предотвращает разборку межклеточных контактов между эндотелиальными клетками субъекта.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий введение дополнительного терапевтического агента.

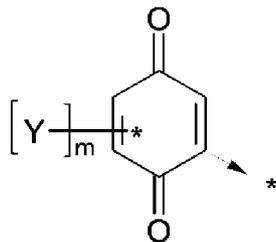
10. Способ по любому из предшествующих пунктов, где способ предотвращает заражение субъекта COVID-19.

11. Набор, содержащий нацеленный на митохондрии антиоксидант SkQ формулы I ниже и инструкцию по осуществлению способа по любому из предшествующих пунктов:

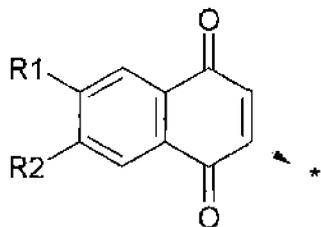


Формула I;

где **A** представляет собой эффекторный фрагмент/антиоксидант, необязательно имеющий следующую структуру:



и/или ее восстановленную форму, где **m** представляет собой целое от 1 до 3; каждый **Y** независимо выбран из группы, состоящей из C1-6 алкила, C1-6 алкокси, или двух соседних **Y** групп, вместе с атомами углерода, с которыми они соединены, образуя следующую структуру:



и/или ее восстановленную форму, где **R1** и **R2** могут быть одинаковыми или различными, и каждый независимо представляет собой C1-6 алкил или C1-6 алкокси;

где **L** представляет собой линкерную группу, включая:

а) нормальную или разветвленную углеводородную цепь, которая может быть необязательно замещена одним или более заместителями и необязательно содержит одну или более двойных или тройных связей; и/или

б) природную изопреновую цепь;

где **n** представляет собой целое от 1 до 40;

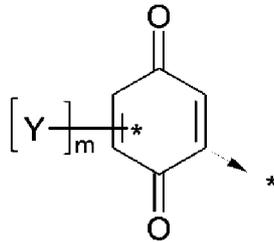
где **B** представляет собой нацеливающую на митохондрии группу, содержащую липофильный катион и фармацевтически приемлемый анион;
и/или его сольваты, соли, изомеры или пролекарства.

12. Композиция для лечения или предотвращения воспалительного состояния у нуждающегося субъекта, причем композиция включает нацеленный на митохондрии антиоксидант формулы I (SkQ)

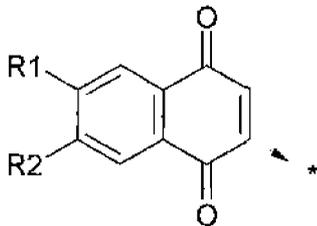


Формула I;

где **A** представляет собой эффекторный фрагмент/антиоксидант, необязательно имеющий следующую структуру:



и/или ее восстановленную форму, где **m** представляет собой целое от 1 до 3; каждый **Y** независимо выбран из группы, состоящей из C1-6 алкила, C1-6 алкокси, или двух соседних **Y** групп, вместе с атомами углерода, с которыми они соединены, образуя следующую структуру:



и/или ее восстановленную форму, где **R1** и **R2** могут быть одинаковыми или различными, и каждый независимо представляет собой C1-6 алкил или C1-6 алкокси;

где **L** представляет собой линкерную группу, включая:

а) нормальную или разветвленную углеводородную цепь, которая может быть необязательно замещена одним или более заместителями и необязательно содержит одну или более двойных или тройных связей; и/или

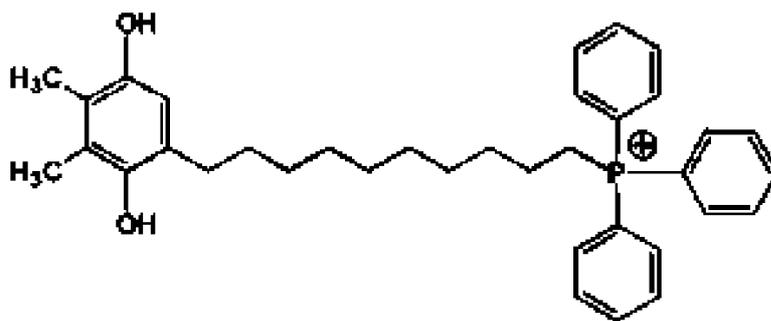
б) природную изопреновую цепь;

где **n** представляет собой целое от 1 до 40;

где **B** представляет собой нацеливающую на митохондрии группу, содержащую липофильный катион и фармацевтически приемлемый анион;

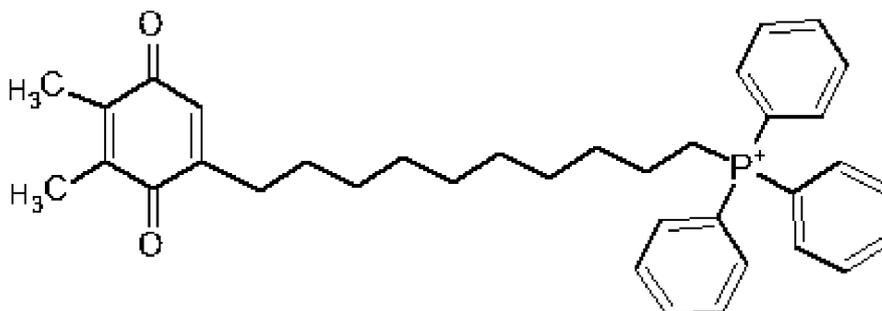
и/или его сольваты, соли, изомеры или пролекарства.

13. Композиция по п. 12 где SkQ представляет собой соединение SkQ1, показанное ниже, в его восстановленной или окисленной форме:



(восстановленная

форма),



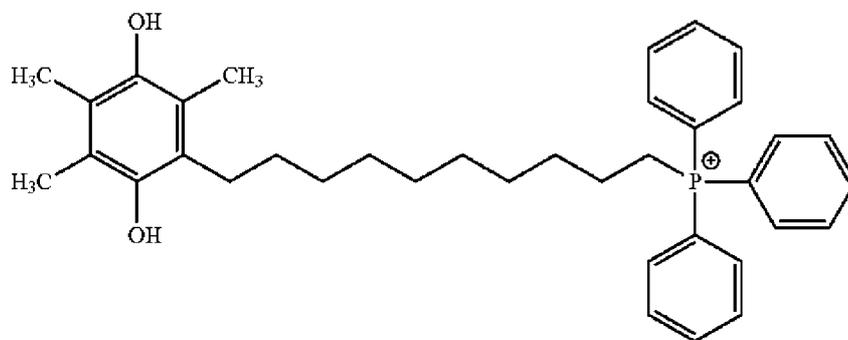
(окисленная

форма),

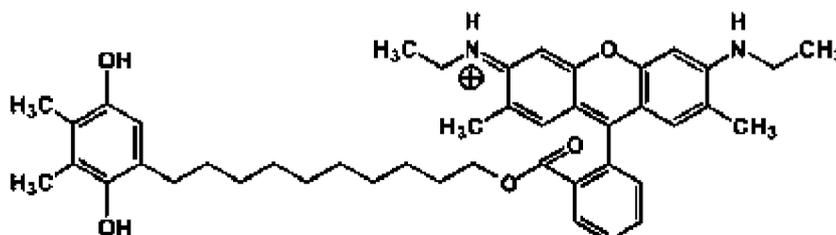
или их комбинации.

14. Композиция по п. 12, где SkQ представляет собой соединение, выбранное из группы, состоящей из следующих соединений:

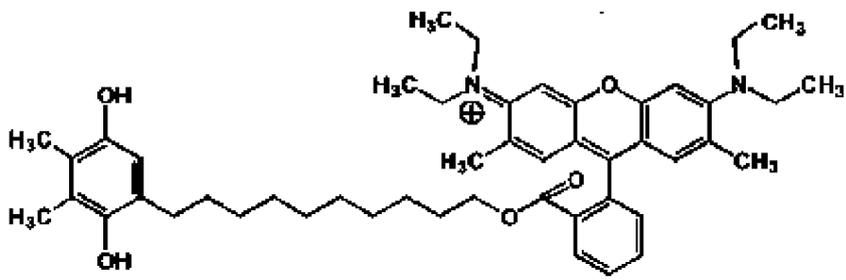
SkQ3 (в восстановленной форме)



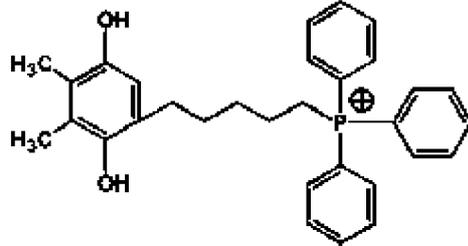
SkQR1 (в восстановленной форме)



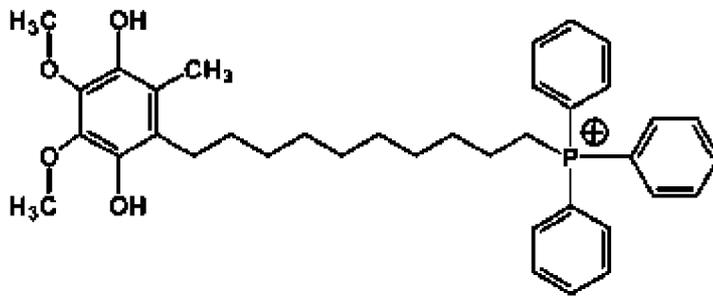
SkQR4 (в восстановленной форме)



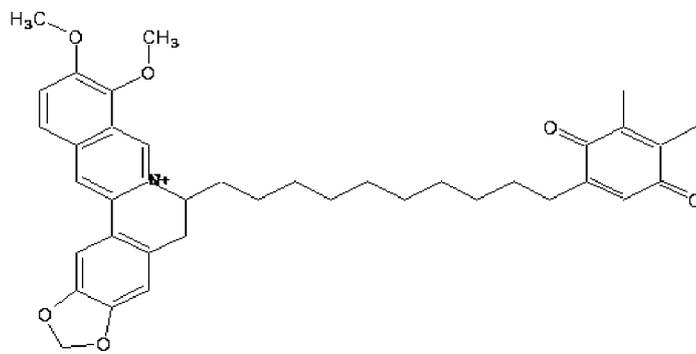
SkQ5 (в восстановленной форме)



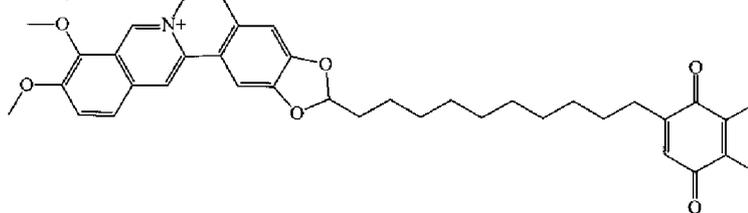
MitoQ (в восстановленной форме)



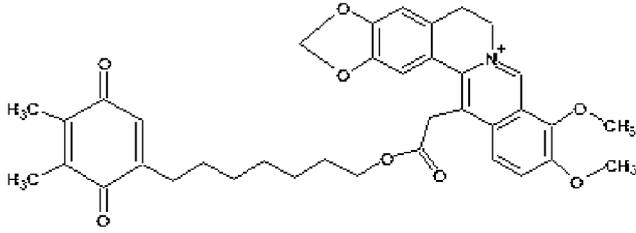
SkQB1A



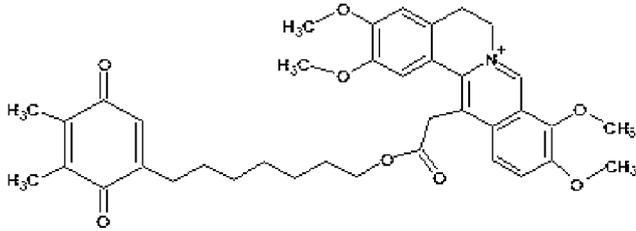
SkQB1B



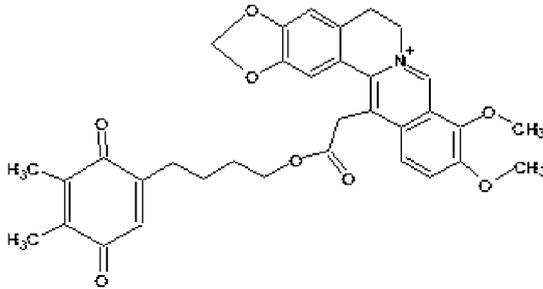
SkQB1:



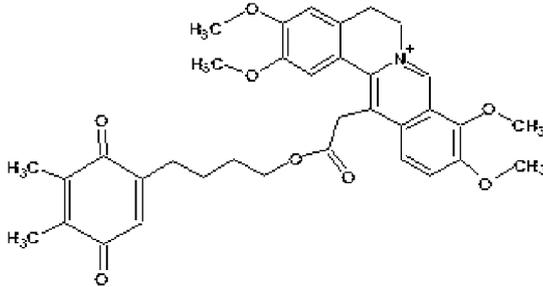
SkQBP1:



SkQB5



SkQBP5:

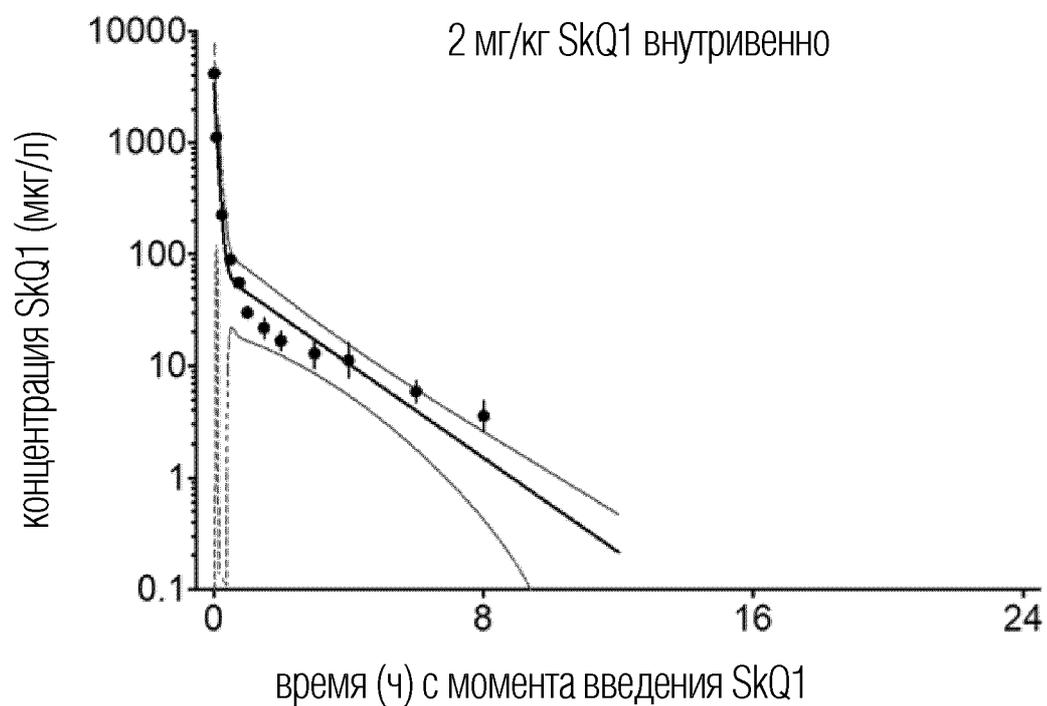


15. Композиция по любому из пунктов 12-14, где воспалительное состояние связано с инфекцией, COVID-19, сепсисом или септическим шоком, цитокиновым штормом или ССВО, повреждением эндотелия сосудов, активацией эндотелиальных клеток сосудов, PAMPS, DAMPS, холодовым шоком, тепловым шоком, токсическим шоком, ожоговой травмой, хирургическим вмешательством, аутоиммунным заболеванием, анафилаксией, раком, ишемическим заболеванием, или наличием CIRP и/или HMGB1 в крови пациента.

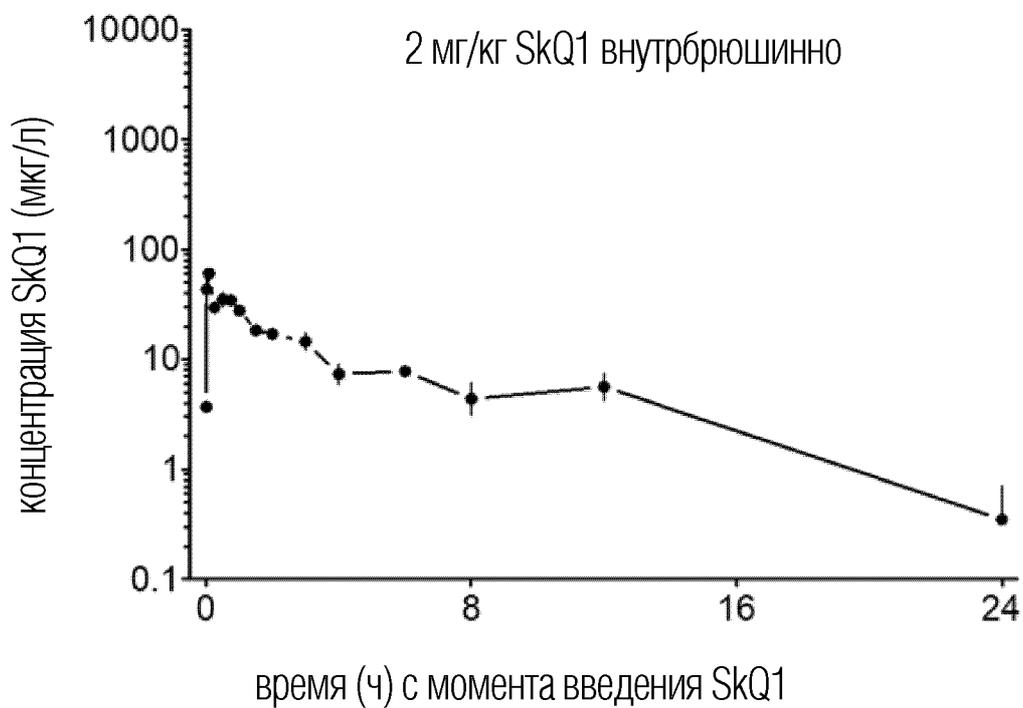
16. Способ по п. 15, где инфекция представляет собой бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию или вирусную инфекцию.

17. Способ по п. 16, где вирусная инфекция представляет собой инфекцию вирусом гриппа или коронавирусом, таким как SARS-CoV-2.

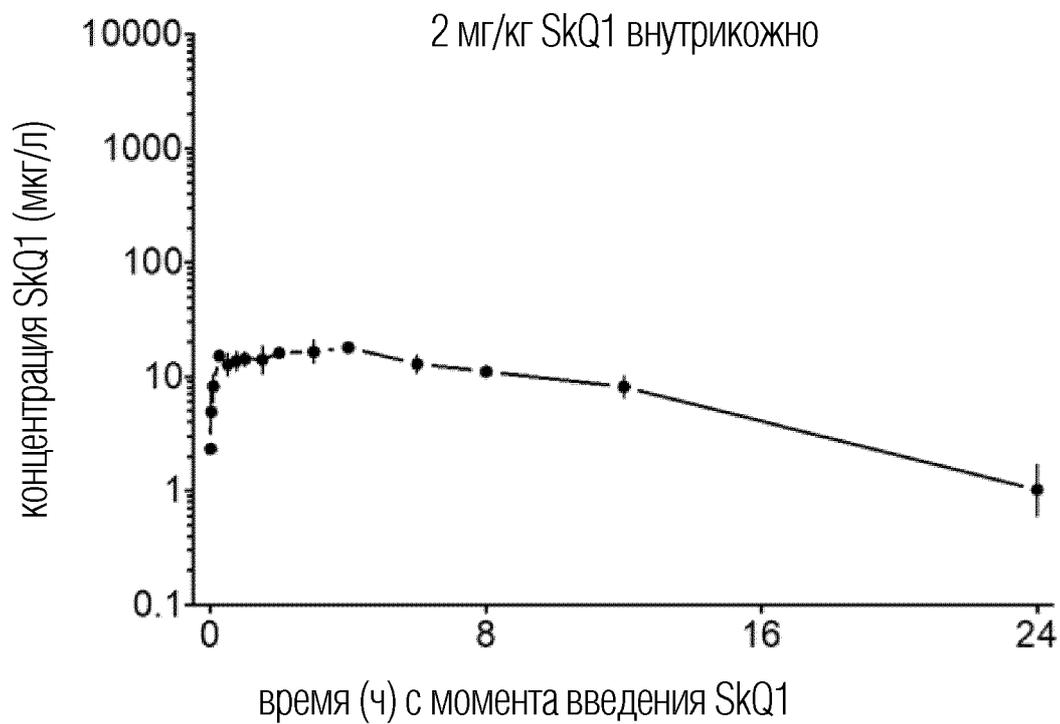
1/12



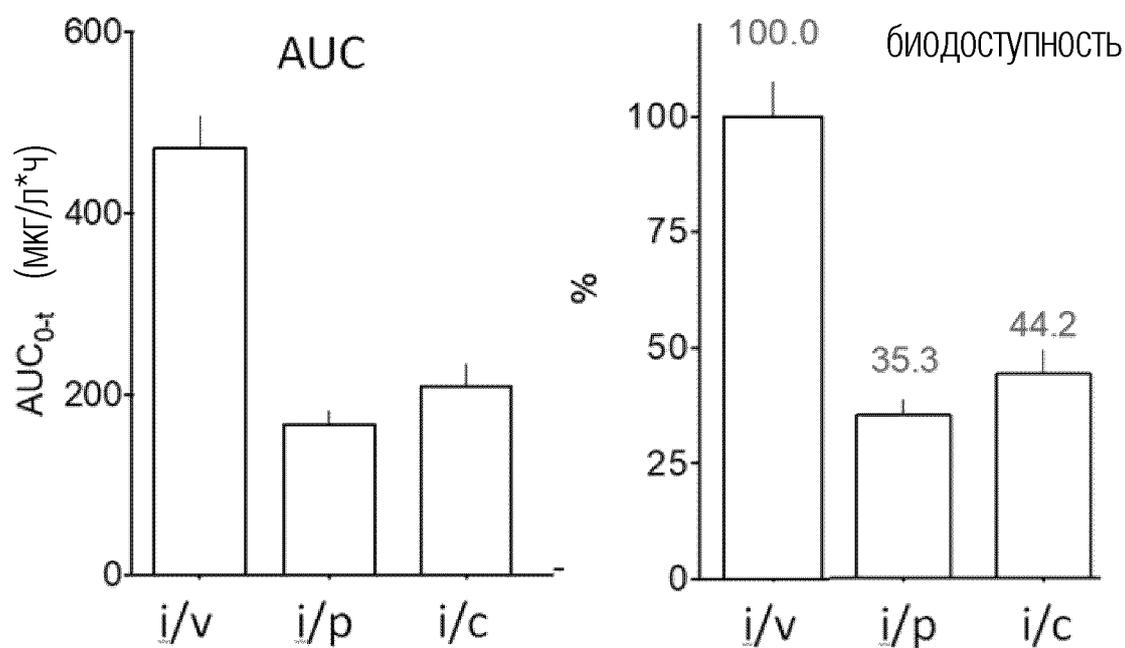
ФИГ. 1А



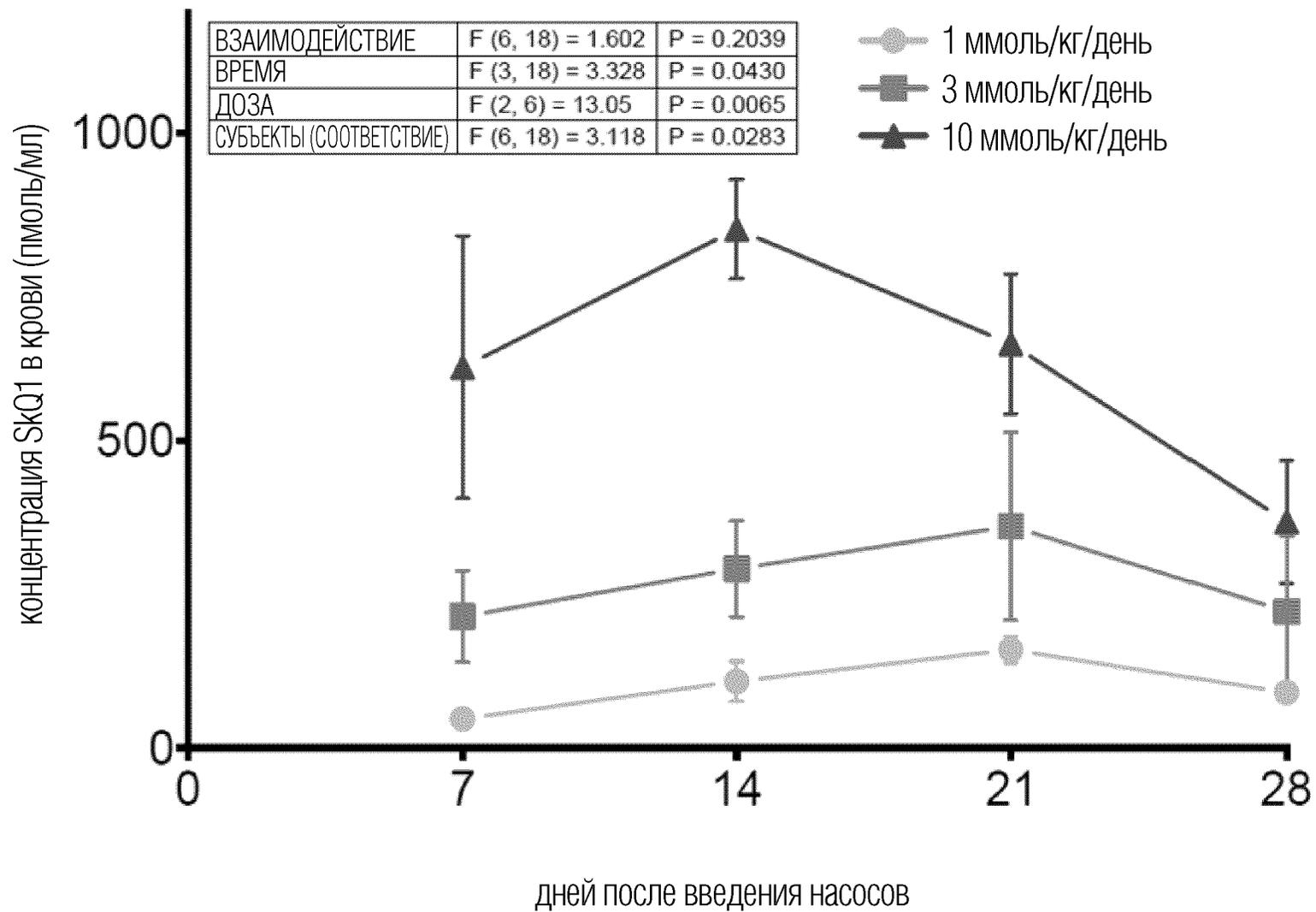
ФИГ. 1В



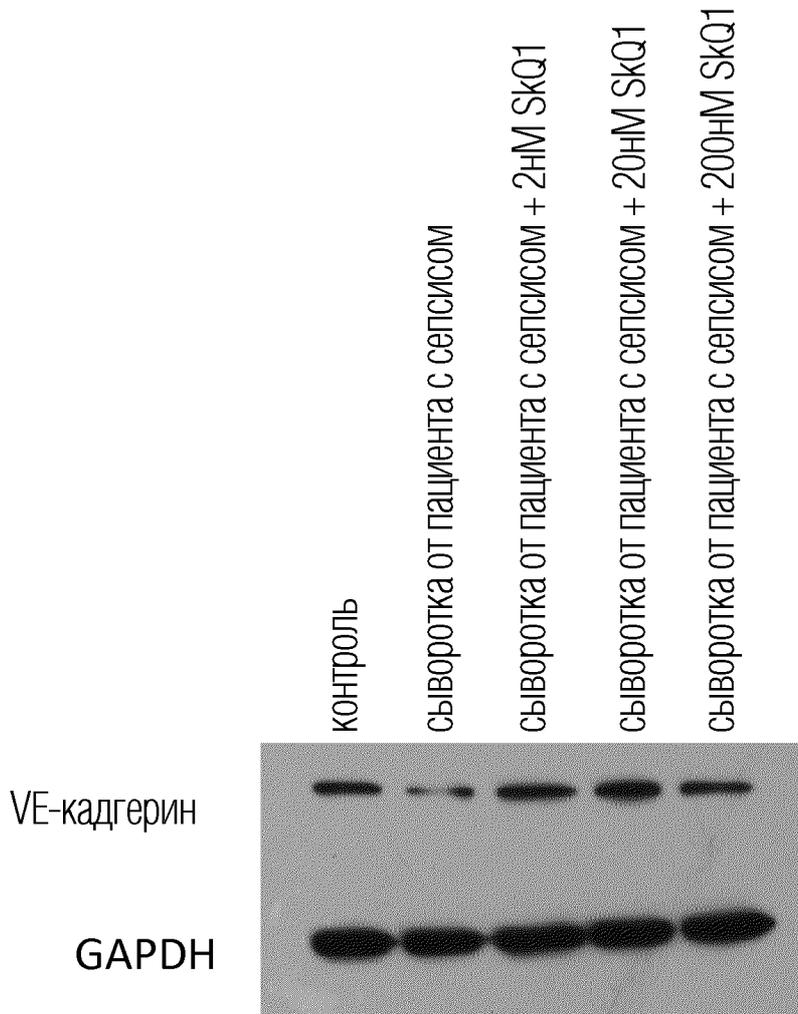
ФИГ. 1С



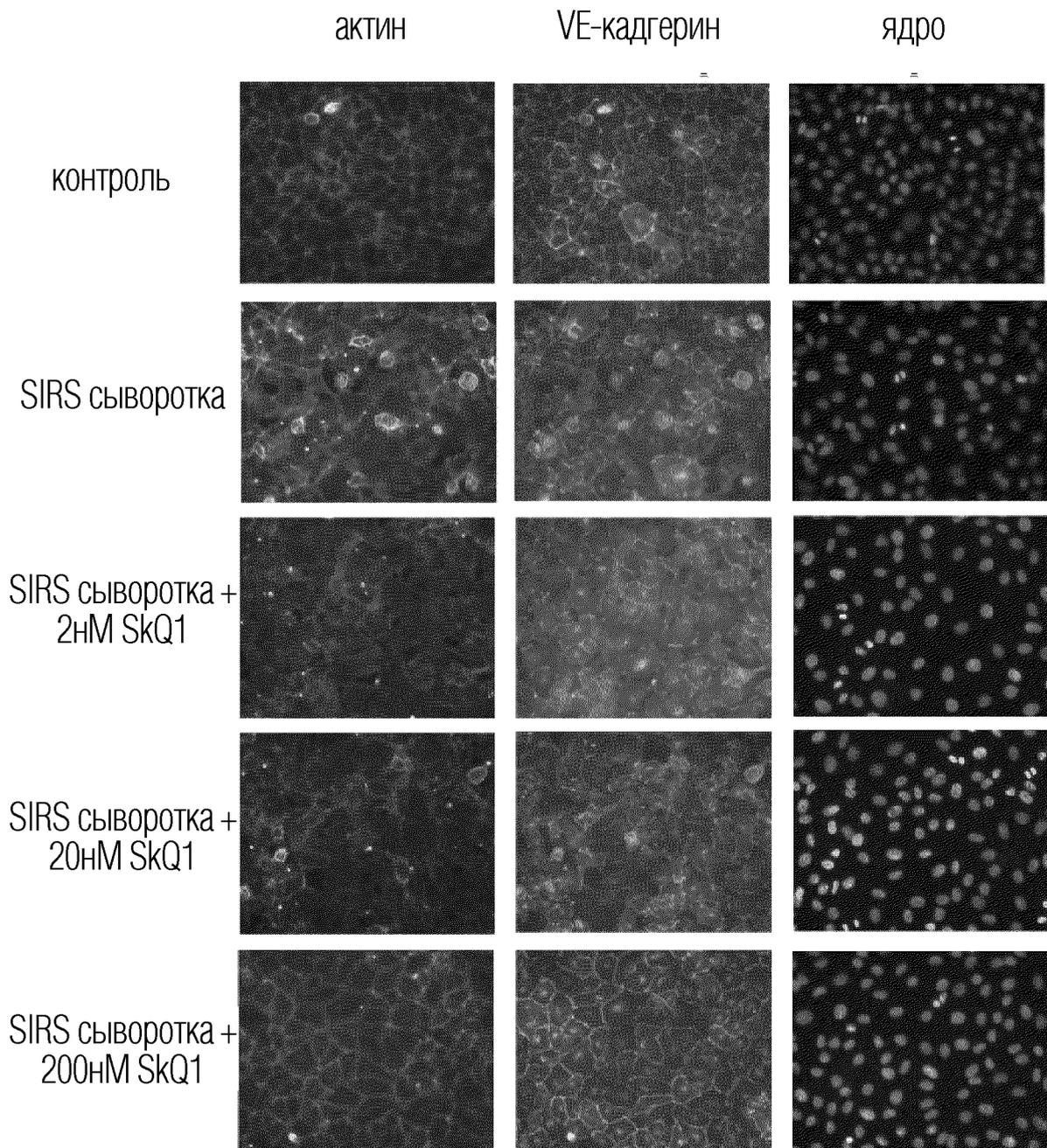
ФИГ. 1D



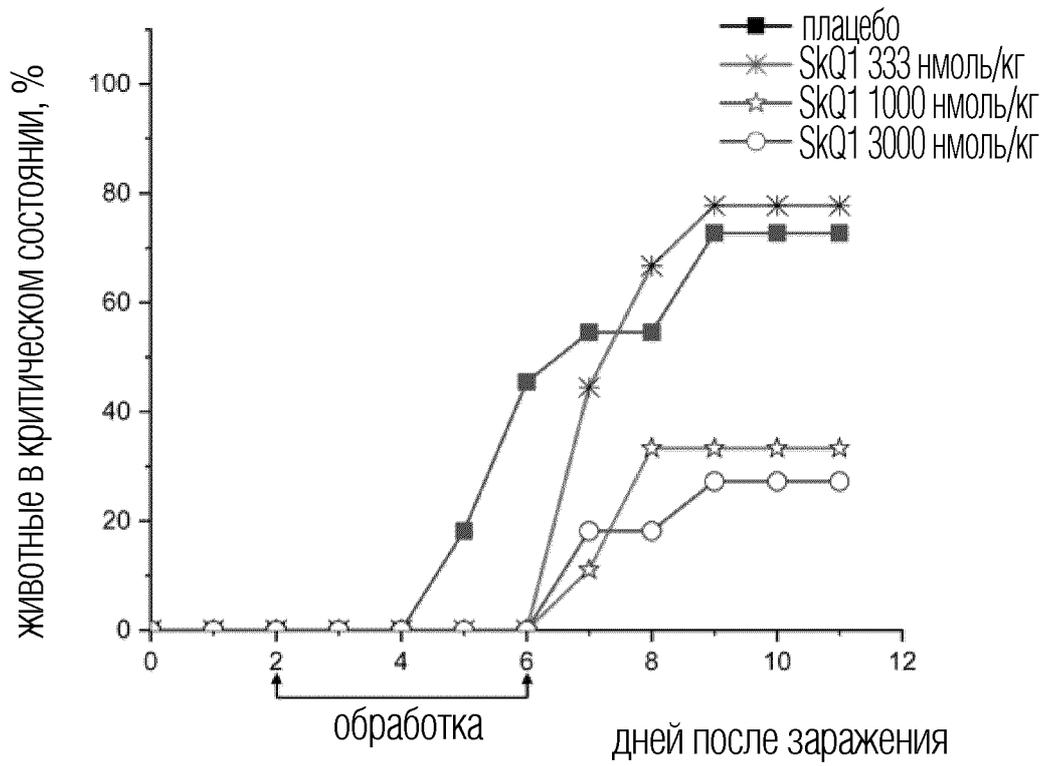
ФИГ. 2



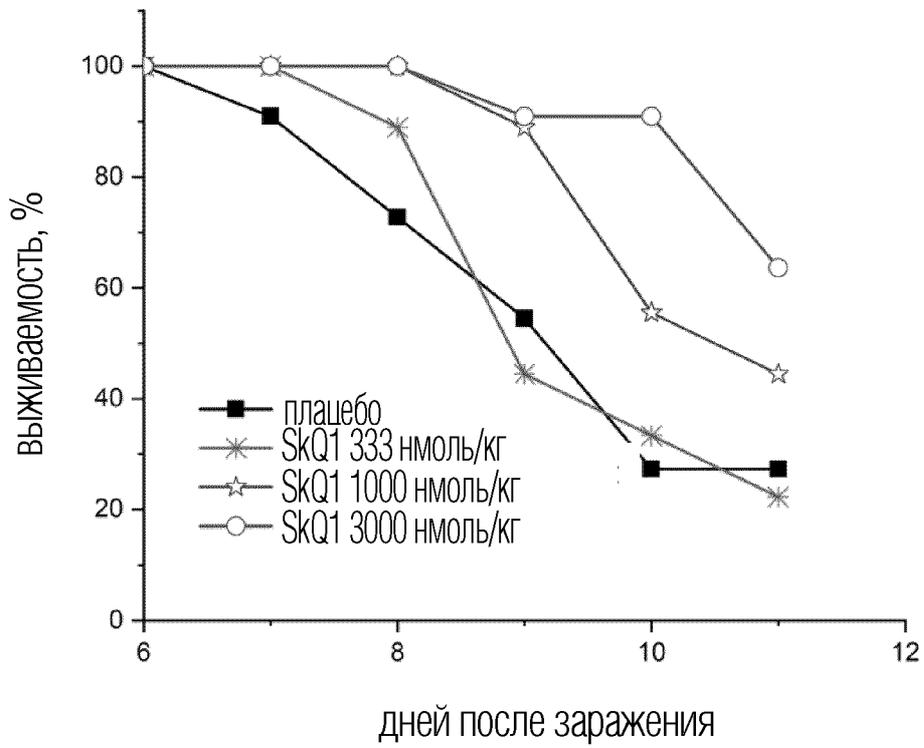
ФИГ. 3



ФИГ. 4

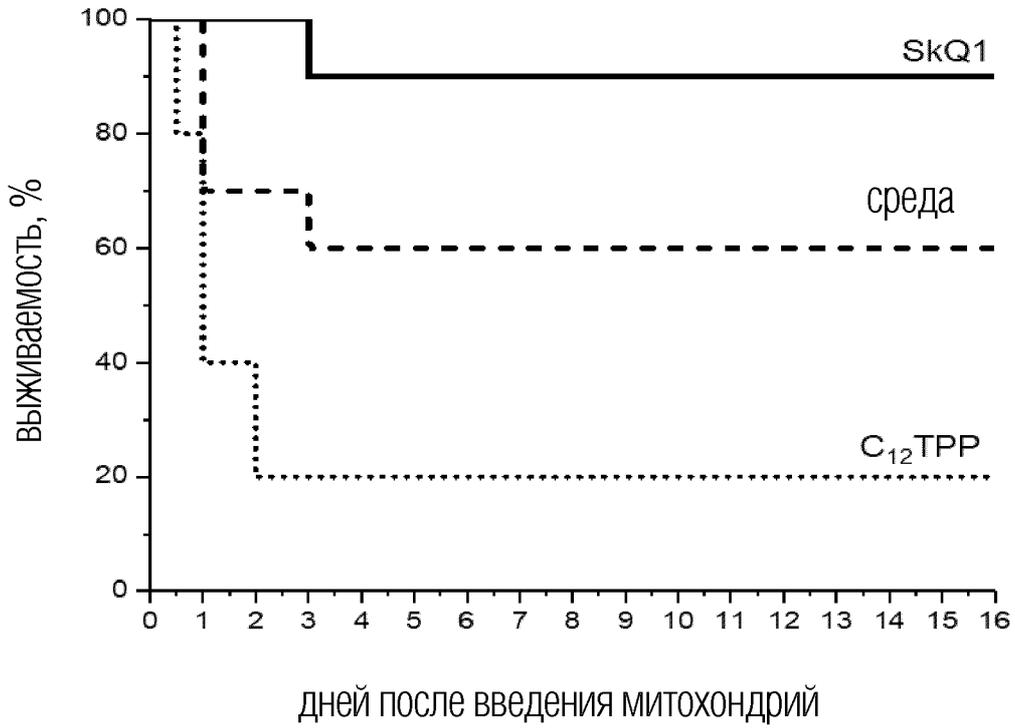


ФИГ. 5

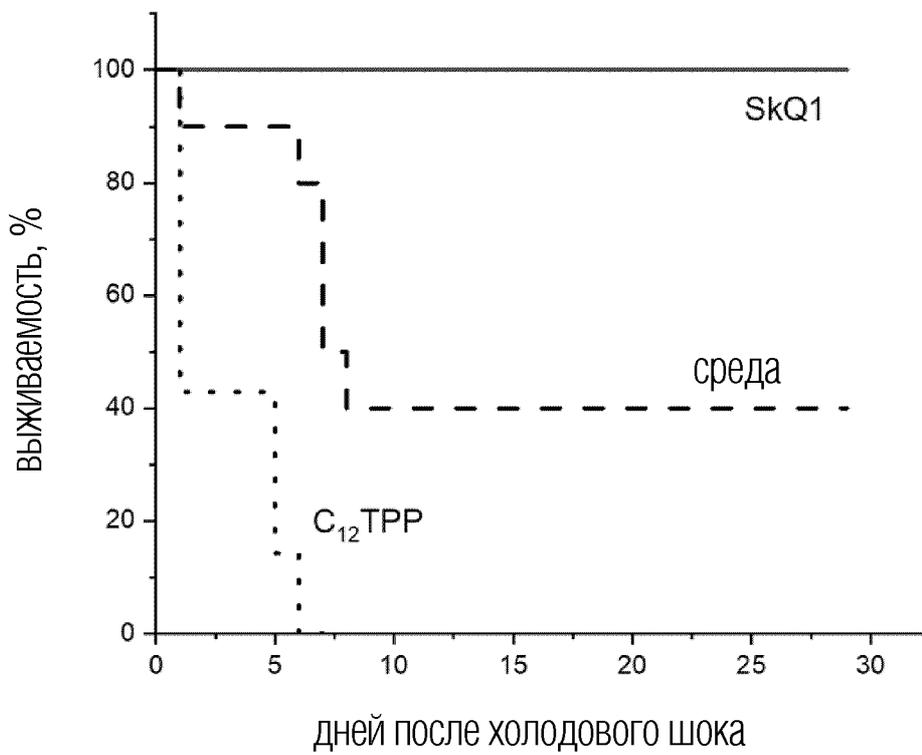


ФИГ. 6

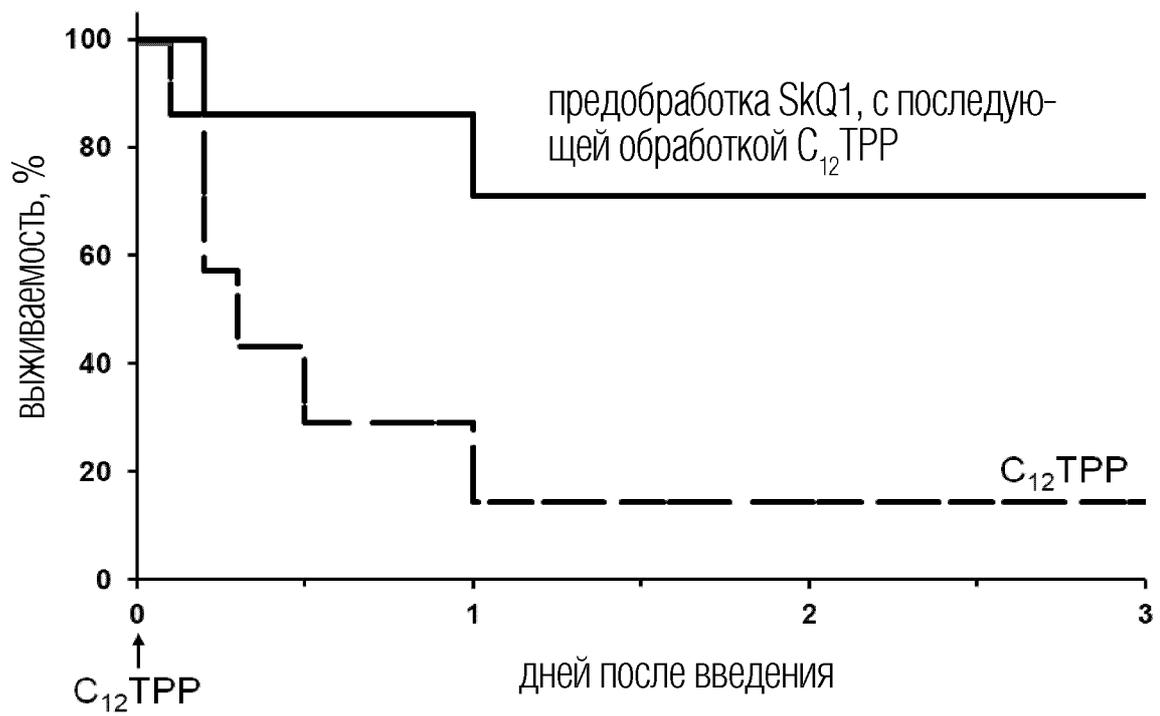
7/12



ФИГ. 7

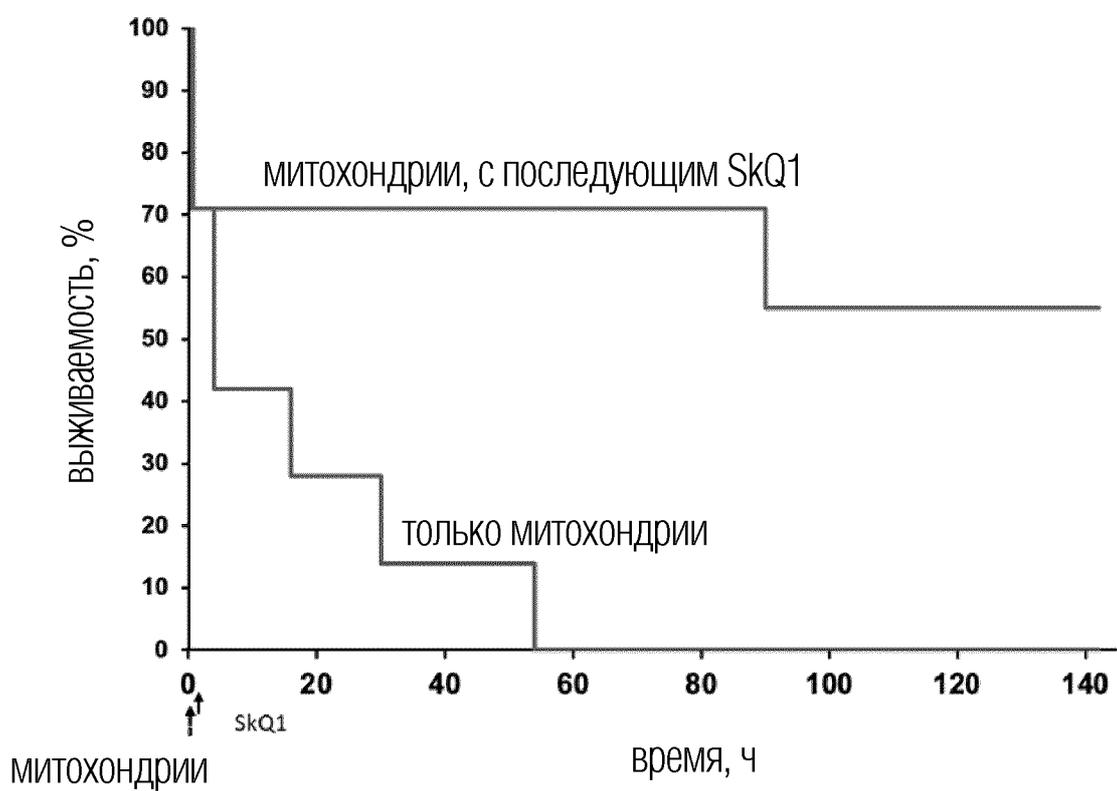


ФИГ. 8

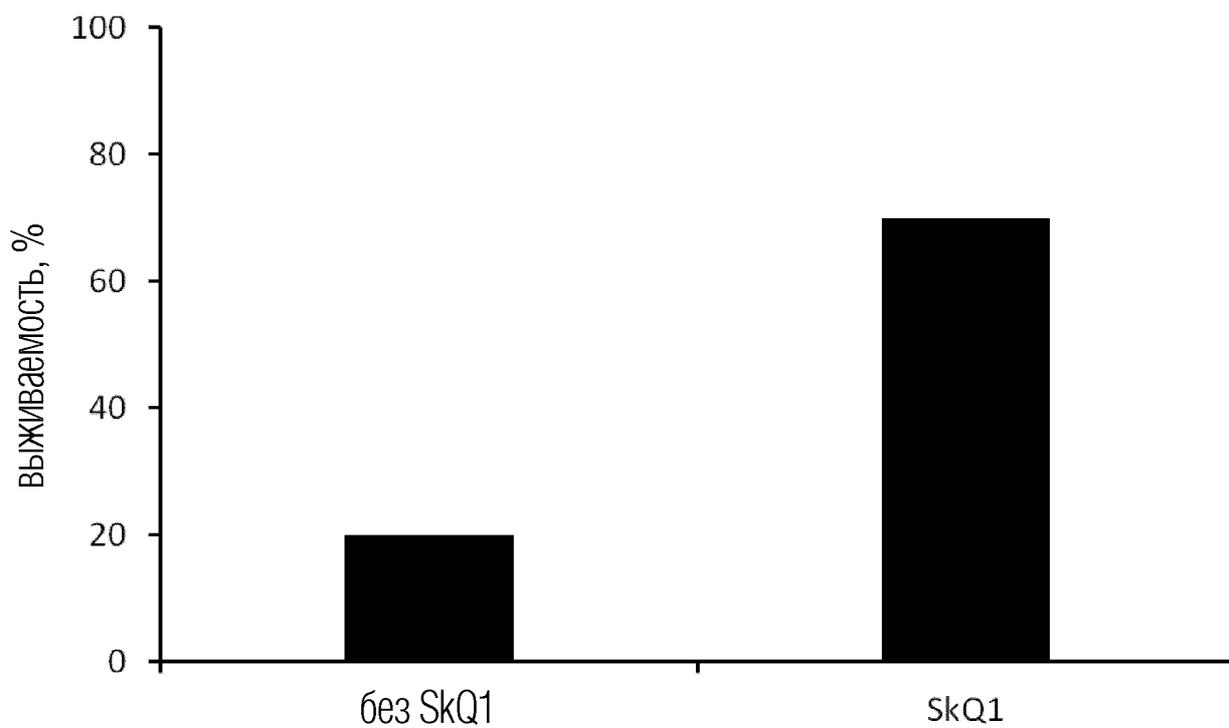


ФИГ. 9

9/12

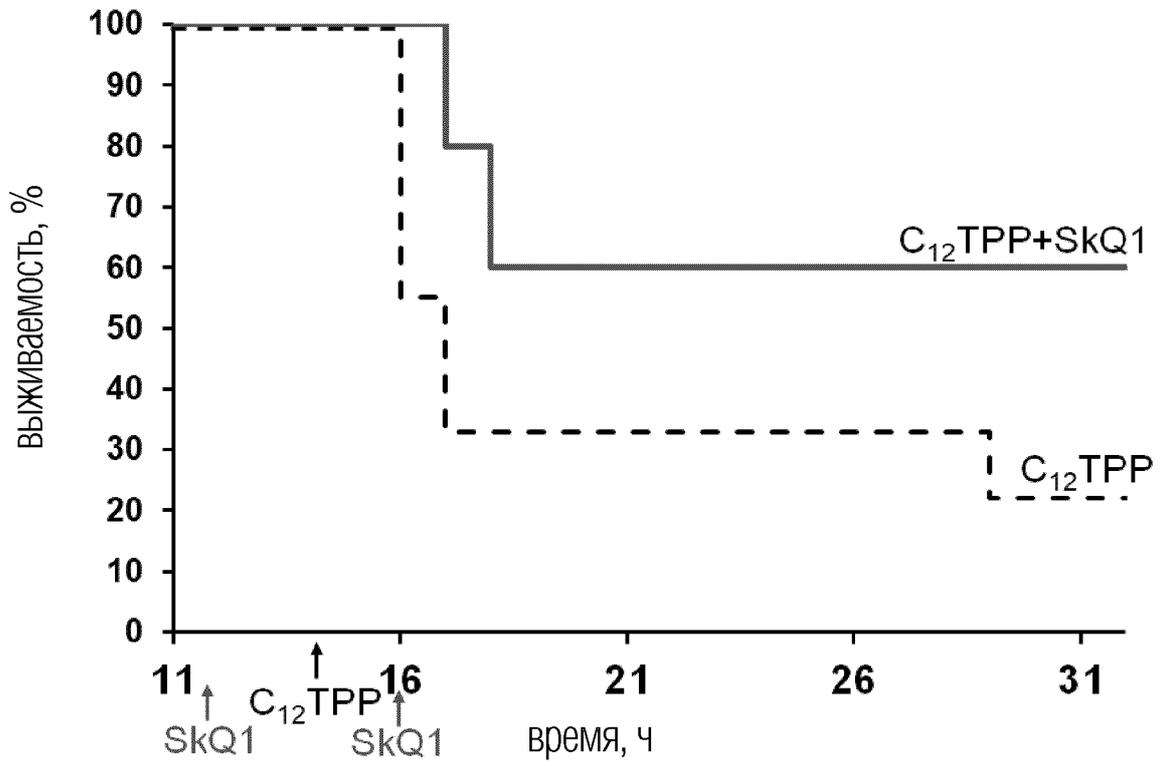


ФИГ. 10

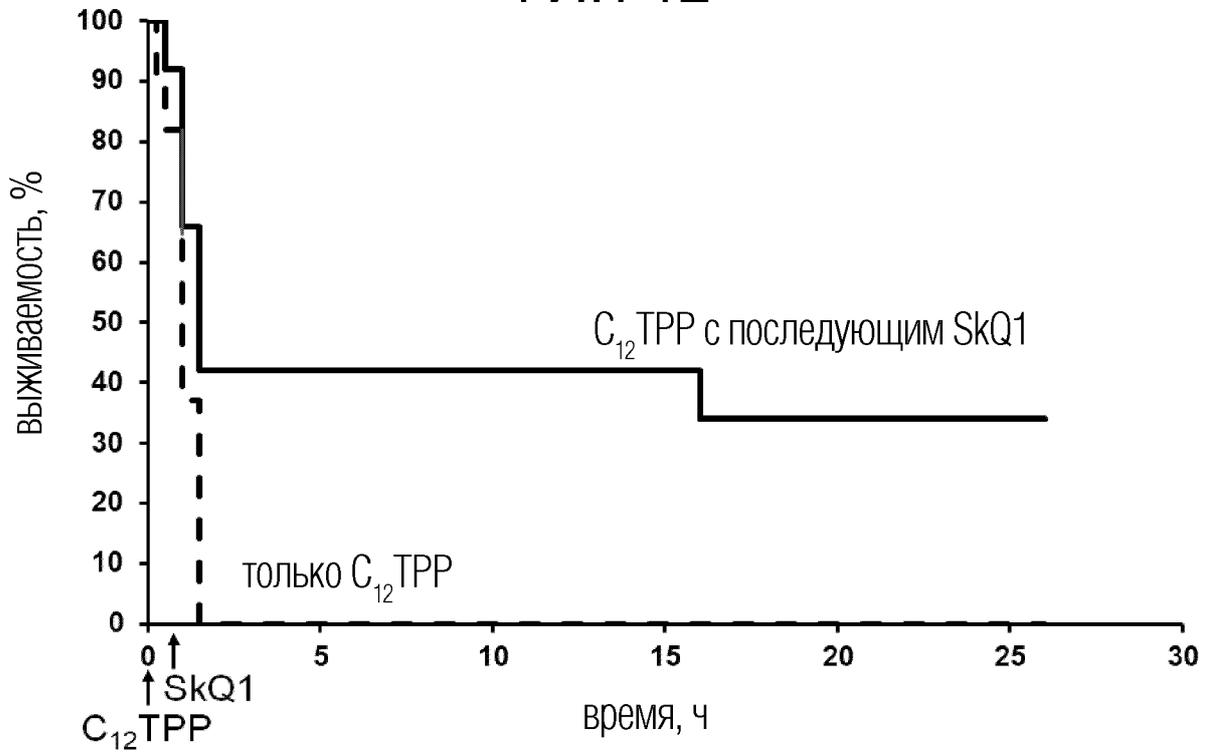


ФИГ. 11

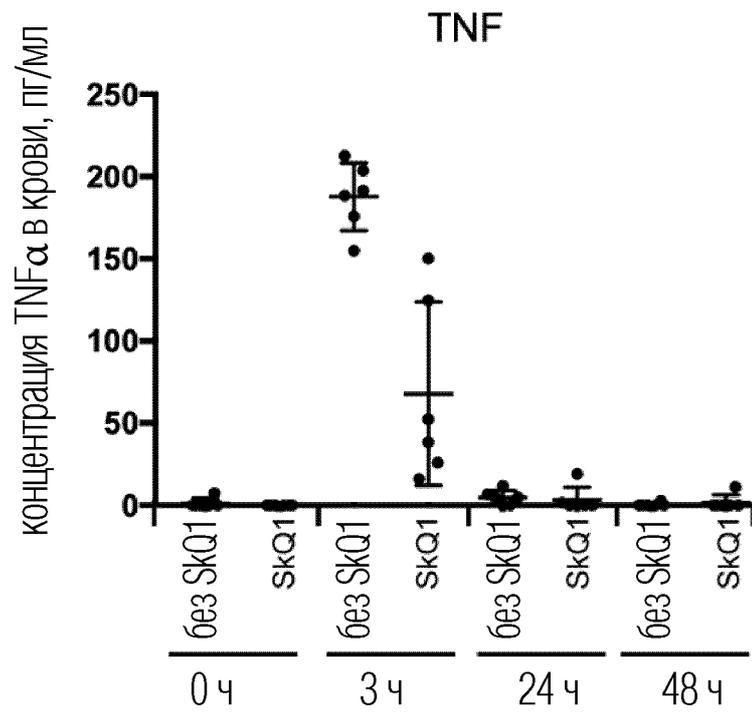
10/12



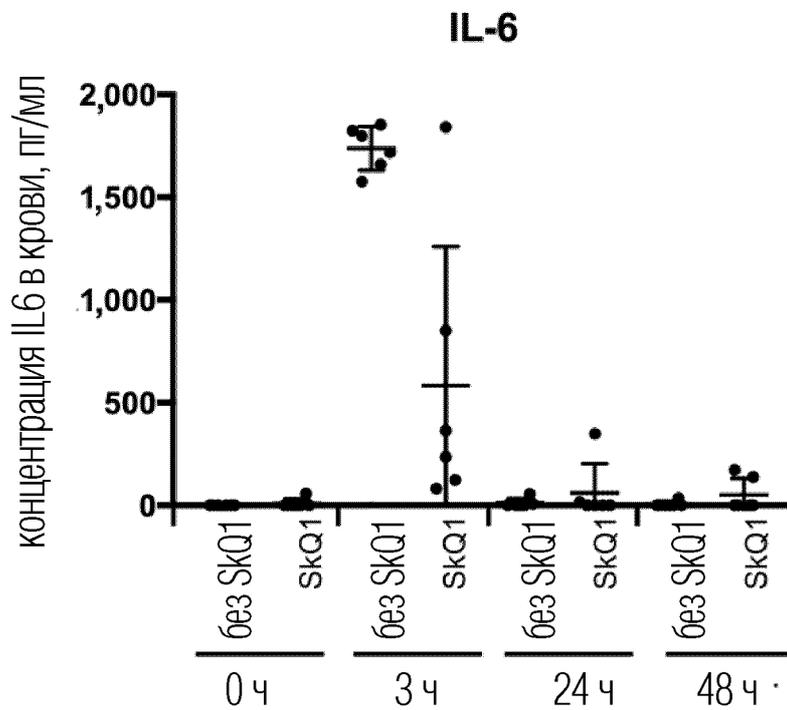
ФИГ. 12



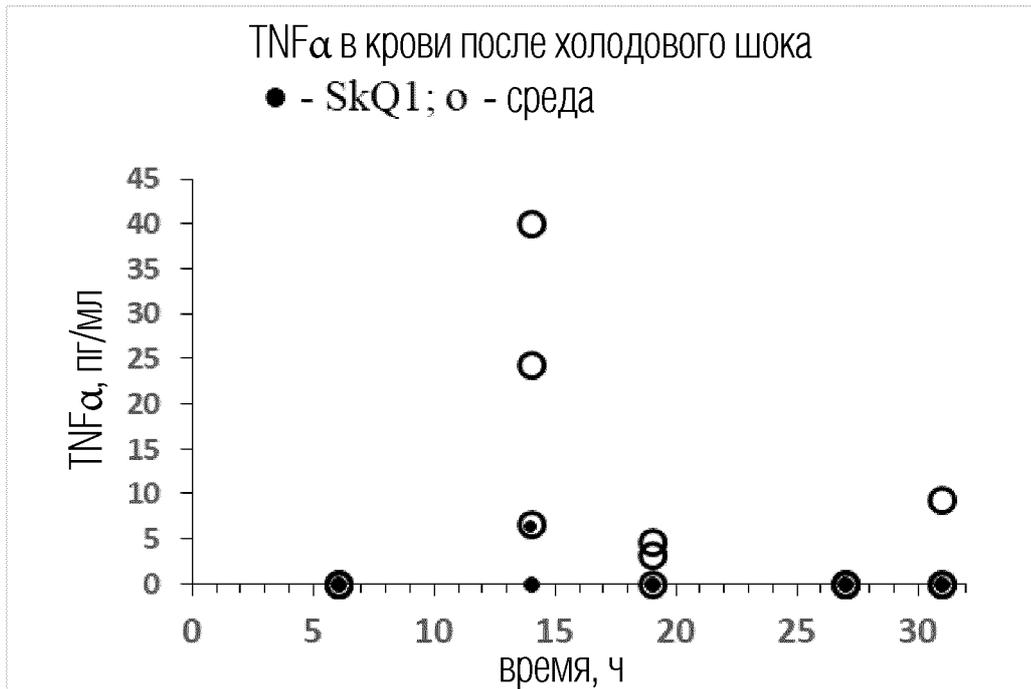
ФИГ. 13



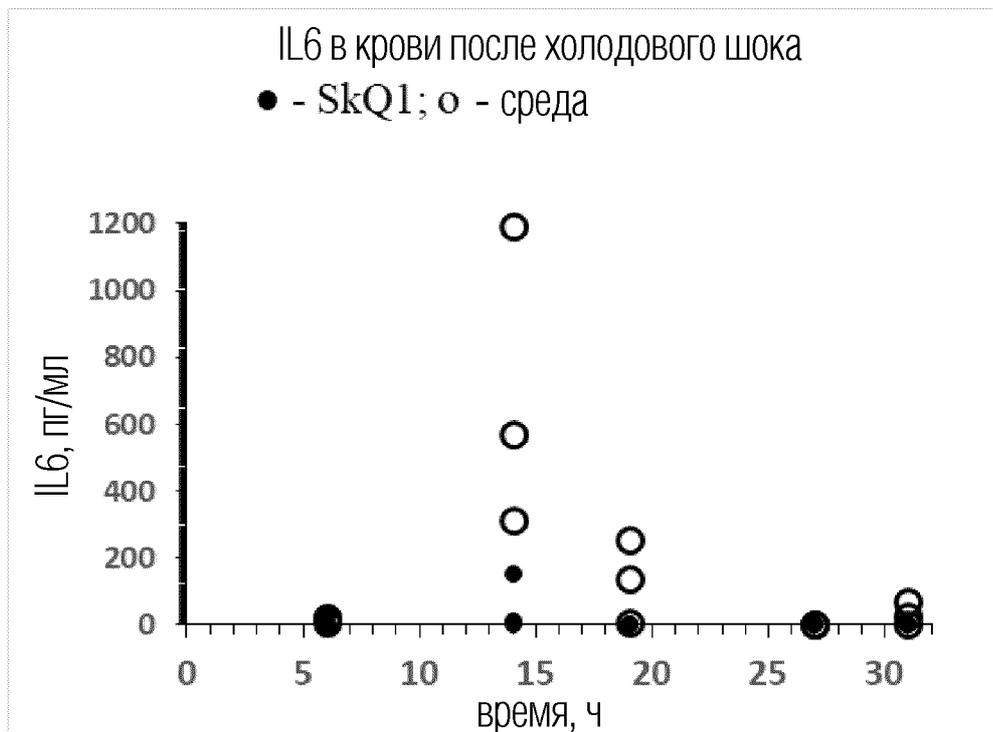
ФИГ. 14А



ФИГ. 14В



ФИГ. 15А



ФИГ. 15В