

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392164** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.10.11**

(51) Int. Cl. *A61K 31/428* (2006.01)  
*A61K 31/045* (2006.01)  
*A61P 9/10* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2022.01.26**

---

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ РИЛУЗОЛ- И БОРНЕОЛСОДЕРЖАЩЕЙ КОМПОЗИЦИИ  
ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЛЕКАРСТВА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНЫХ  
ЗАБОЛЕВАНИЙ**

---

(31) **202110141522.3**

(32) **2021.02.02**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2022/073909**

(87) **WO 2022/166695 2022.08.11**

(71) Заявитель:

**НЬЮРОДОН ФАРМАСЬЮТИКАЛ  
КО., ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:

**Чжан Чжэнпин, Ван Лэй, Чэнь Жун  
(CN)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Композиция, применяемая при получении лекарственного препарата для лечения цереброваскулярных заболеваний, в частности ишемических цереброваскулярных заболеваний. Композиция содержит 2-амино-6-трифторметоксибензотиазол или его фармацевтически приемлемую соль и борнеол. Благодаря совместимости между 2-амино-6-трифторметоксибензотиазолом и d-борнеолом, по данным неклинических клеточных испытаний и результатов испытаний на животных, при цереброваскулярных заболеваниях 2-амино-6-трифторметоксибензотиазол и d-борнеол обладают эффектом синергически увеличивая эффективность.

**A1**

**202392164**

**202392164**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 578984EA/071

### ПРИМЕНЕНИЕ РИЛУЗОЛ- И БОРНЕОЛСОДЕРЖАЩЕЙ КОМПОЗИЦИИ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЛЕКАРСТВА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет китайской патентной заявки № 202110141522.3, поданной в Национальное управление интеллектуальной собственности Китая 02 февраля 2021 г. и озаглавленной «ПРИМЕНЕНИЕ РИЛУЗОЛ- И БОРНЕОЛСОДЕРЖАЩЕЙ КОМПОЗИЦИИ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЛЕКАРСТВА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ», которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

#### ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Настоящее изобретение относится к области фармации и касается применения композиции 2-амино-6-трифторметоксибензотиазола и борнеола или (+)-2-борнеола при получении лекарственного препарата для лечения цереброваскулярных заболеваний, в частности, ишемических цереброваскулярных заболеваний.

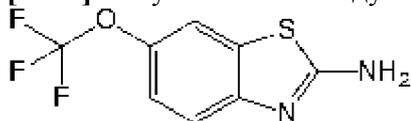
#### ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Цереброваскулярное заболевание (ЦВЗ) относится к поражениям головного мозга, вызванным различными цереброваскулярными заболеваниями, и в соответствии с процессом его патогенеза может быть разделено на острое цереброваскулярное заболевание (инсульт) и хроническое цереброваскулярное заболевание. К острым цереброваскулярным заболеваниям относятся транзиторная ишемическая атака, тромбоз головного мозга, эмболия сосудов головного мозга, гипертоническая энцефалопатия, кровоизлияние в мозг, субарахноидальное кровоизлияние и т. д.; хронические цереброваскулярные заболевания включают церебральный атеросклероз, цереброваскулярную деменцию, синдром обкрадывания церебральных артерий, болезнь Паркинсона и т. д. Ишемический инсульт - это общий термин для обозначения некроза ткани головного мозга, вызванного недостаточным кровоснабжением головного мозга вследствие стеноза или окклюзии артерий кровоснабжения головного мозга (сонной артерии и позвоночной артерии). Церебральная ишемия включает четыре типа: транзиторную ишемическую атаку (TIA), обратимый неврологический дефицит (RIND), прогрессирующий инсульт (SIE) и полный инсульт (CS). При TIA отсутствует инфаркт головного мозга, но имеются инфаркты головного мозга разной степени, присутствующие при RIND, SIE и CS.

[0004] 2-Амино-6-трифторметоксибензотиазол (рилузол) представляет собой соединение бензотиазола, которое сначала было исследовано и разработано в 1950-х годах в качестве миорелаксанта центрального действия. В 1995 году FDA США одобрило рилузол для лечения бокового амиотрофического склероз (ALS). Рилузол ингибирует высвобождение глутамата из культивируемых нейронов, срезов мозга и нейронов коры

головного мозга *in vivo*, что может быть частично связано с инактивацией потенциалзависимых натриевых каналов в окончаниях глутаматергических нервов и активацией процессов передачи сигналов, зависящих от G-белка, чувствительных к коклюшному токсину (PTX). Рилузол также блокирует определенные постсинаптические эффекты глутамата, неконкурентно блокируя рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDA) (IC<sub>50</sub> 18 мкМ) и рецепторы каиновой кислоты (IC<sub>50</sub> 167 мкМ). *In vivo* рилузол оказывает нейропротекторное, противосудорожное и седативное действие. В модели преходящей глобальной церебральной ишемии у грызунов рилузол полностью ингибирует вызванный ишемией всплеск высвобождения глутамата. *In vitro* рилузол защищает культивируемые нейроны от гипоксического повреждения, повреждения, вызванного токсическими эффектами ингибиторов захвата глутамата, и повреждения, вызванного токсическими факторами в спинномозговой жидкости пациентов с боковым амиотрофическим склерозом (Neurology, 1996, 47 (6 Suppl 4), S233S-41). Впоследствии в ходе доклинических испытаний на животных и клинических испытаниях на людях было обнаружено, что рилузол оказывает определенное терапевтическое воздействие на нейропротекцию спинного мозга, невралгию, эпилепсию, тревогу и депрессию (Chinese Pharmaceutical Journal, 2015, 50 (14): 1165-1168; Chemical and Biological Engineering, 2017, 34(2): 6-9). Кроме того, в систематическом обзоре и метаанализе рилузола для лечения нейродегенеративных двигательных заболеваний, включая PD, атипичную болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона (HD), наследственную атаксию и т. д., указано, что влияние рилузола на симптомы у пациентов с наследственной атаксией кажется многообещающим, но все еще необходимы дальнейшие подтверждающие клинические исследования (Drug Delivery, 2017, 25(1), 43-48). Кроме того, на модели окклюзии средней мозговой артерии (МСаО) у крыс однократная внутривенная инъекция рилузола в дозах 4 мг/кг и 8 мг/кг через 30 мин после ишемии может значительно уменьшить показатель неврологического дефицита и площадь инфаркта головного мозга (CNS Drug Reviews, 1997, 3(1), 83-101).

**[0005]** Рилузол имеет следующую химическую структурную формулу:



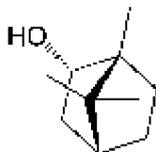
Рилузол

(молекулярная формула C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>OS; молекулярная масса 234,20)

**[0006]** Природный борнеол представляет собой кристаллы, извлеченные и обработанные из свежих ветвей и листьев *Cinnamomum camphora*, и содержит основной компонент (+)-2-борнеол (издание Китайской фармакопеи 2015 года предусматривает, что содержание (+) -2-борнеола в природном борнеоле должно быть не менее 96,0%). L-борнеолум представляет собой кристаллы, извлеченные и обработанные из свежих листьев *Blumea balsamifera*, и содержит основной компонент (-)-борнеол (издание Китайской фармакопеи 2015 г. предусматривает, что содержание (-)-борнеола в природном

борнеоле должно не менее 85,0%). Синтетический борнеол получают химическим путем, и он состоит из основных компонентов (+)-2-борнеола и (-)-борнеола. (+)-2-Борнеол проявляет разнообразную биологическую активность, такую как противовоспалительную, антиоксидантную и усиливающую функции рецептора  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (GABA) (Euro J Pharmacol, 2017 811, 1-11). Кроме того, в физиологических условиях (+)-2-борнеол также может обеспечивать доставку лекарственного средства в центральную нервную систему за счет временного обратимого повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера (BBB); при патологических состояниях (+)-2-борнеол может поддерживать целостность BBB и защищать ткани головного мозга (Drug Deliv 2017, 24:1037-1044; Drug Deliv 2018, 25:1617-1633; Biomed Pharmacother 2018, 102:874-883). В ооцитах *Xenopus laevis* (+)-2-борнеол может усиливать функцию рекомбинантной GABA<sub>A</sub>R ( $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ ), индуцируемую низкой концентрацией GABA, более чем в 10 раз, которая имеет EC<sub>50</sub> 248 мкМ (Biochemical Pharmacology, 2005, 69(7), 1101-1111). Природный борнеол оказывает защитное действие на повреждение нейронов, вызванное глутаматом (Journal of Nanjing Medical University (Natural Science Edition) 2013, 33 (5), 630-635). Кроме того, (+)-2-борнеол использовался в качестве лекарственного сырья для нового лекарственного средства класса 1 эдавароне (+)-2-борнеол для инъекций для лечения ишемического инсульта (Регистрационный номер CDE CXHS1800031).

[0007] (+)-2-Борнеол имеет следующую химическую структурную формулу:



(+)-2-Борнеол

(молекулярная формула C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O; молекулярная масса 154,25)

[0008] Таким образом, важное практическое значение имеет применение композиции, содержащей рилузол и борнеол, при лечении цереброваскулярных заболеваний.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] На основании этого в настоящем изобретении предложено применение композиции, содержащей рилузол и борнеол, при получении лекарственного препарата для лечения цереброваскулярного заболевания. Композиция содержит 2-амино-6-трифторметоксибензотиазол или его фармацевтически приемлемую соль и борнеол или (+)-2-борнеол. Кроме того, композиция содержит 2-амино-6-трифторметоксибензотиазол или его фармацевтически приемлемую соль и (+)-2-борнеол.

[0010] Для достижения вышеуказанной цели настоящего изобретения в настоящем изобретении предусмотрены следующие технические решения:

[0011] в первом аспекте в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая следующие компоненты:

[0012] компонент (I), 2-амино-6-трифторметоксибензотиазол, его производное,

фармацевтически приемлемую соль или пролекарство; и

**[0013]** компонент (II), (+)-2-борнеол, борнеол или лекарственное средство с активным ингредиентом (+)-2-борнеол.

**[0014]** В некоторых конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения компонент (I) и компонент (II) находятся в массовом соотношении 30:1-1,5:1 или 27:1-1:27.

**[0015]** В некоторых конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения компонент (I) и компонент (II) находятся в массовом соотношении 15:1-1,5:1.

**[0016]** В некоторых конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения компонент (I) и компонент (II) находятся в массовом соотношении 15:1-7,5:1.

**[0017]** В некоторых конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения компонент (I) и компонент (II) находятся в массовом соотношении 1:1, 1:3, 3:1, 9:1, 27:1, 1:9, 1:27, 20:1, 5:1, 15:1 и/или 8:1.

**[0018]** В некоторых конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения борнеол выбран из группы, включающей синтетический борнеол, (-)-борнеол, природный борнеол и их комбинацию.

**[0019]** Во втором аспекте в настоящем изобретении, кроме того, предложено лекарственное средство, содержащее композицию и фармацевтически приемлемый адъювант.

**[0020]** В третьем аспекте в настоящем изобретении, кроме того, предложено применение композиции или лекарственного средства при получении лекарственного препарата для профилактики и/или лечения цереброваскулярных заболеваний.

**[0021]** В некоторых конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения цереброваскулярное заболевание выбрано из ишемического цереброваскулярного заболевания.

**[0022]** В некоторых конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения ишемическое цереброваскулярное заболевание выбрано из ишемического инсульта.

**[0023]** Борнеол, описанный в приведенной выше композиции, выбран из группы, включающей природный борнеол, (-)-борнеол и синтетический борнеол.

**[0024]** Композиция лекарственного средства по настоящему изобретению может быть использована при получении лекарственного препарата для лечения цереброваскулярного заболевания. В том числе цереброваскулярное заболевание, предпочтительно, представляет собой ишемическое цереброваскулярное заболевание, более предпочтительно, ишемический инсульт.

**[0025]** Настоящее изобретение имеет следующие положительные эффекты:

**[0026]** В настоящем изобретении объединены 2-амино-6-трифторметоксибензотиазол и (+)-2-борнеол. Результаты неклинических клеточных испытаний и испытаний эффективности на животных показывают, что 2-амино-6-трифторметоксибензотиазол и (+)-2-борнеол обладают синергетическим действием на цереброваскулярные заболевания.

**КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

[0027] На ФИГ. 1 показано влияние рилузола и (+)-2-борнеола на NMDA-индуцированное нейрональное повреждение; где А показывает влияние рилузола на NMDA-индуцированное повреждение нейронов; В показывает влияние (+)-2-борнеола на NMDA-индуцированное повреждение нейронов;

[0028] На ФИГ. 2 показана скорость ингибирования NMDA-индуцированного нейронального повреждения рилузолом и (+)-2-борнеолом;

[0029] На ФИГ. 3 показано влияние рилузола, (+)-2-борнеола и их композиции на возбуждающее повреждение NMDA-индуцированных первичных нейронов;

[0030] На ФИГ. 4 показано действие рилузола, (+)-2-борнеола и композиции (20:1) на NMDA-индуцированное повреждение возбудимости нервов; где А показывает влияние рилузола, (+)-2-борнеола и композиции (20:1) на NMDA-индуцированное повреждение возбудимости нервов; В показывает влияние (+)-2-борнеола на NMDA-индуцированное повреждение возбудимости нервов; С показывает влияние композиции рилузола и (+)-2-борнеола (20:1) на NMDA-индуцированное повреждение возбудимости нервов;

[0031] На ФИГ. 5 представлена кривая доза-эффект (А), медианная диаграмма эффекта (В) и диаграмма Fa-CI (С) композиции рилузола и (+)-2-борнеола (20:1), рассчитанные с помощью программного обеспечения CompuSyn;

[0032] На ФИГ. 6 показано влияние рилузола, (+)-2-борнеола и композиции (5:1) на NMDA-индуцированное повреждение возбудимости нервов; где А показывает влияние рилузола на NMDA-индуцированное повреждение возбудимости нервов; В показывает влияние (+)-2-борнеола на NMDA-индуцированное повреждение возбудимости нервов; С показывает влияние композиции рилузола и (+)-2-борнеола (5:1) на NMDA-индуцированное повреждение возбудимости нервов;

[0033] На ФИГ. 7 показано влияние рилузола, (+)-2-борнеола и их комбинации (1:1) на NMDA-индуцированное повреждение возбудимости нервов; где А показывает влияние рилузола на NMDA-индуцированное повреждение возбудимости нервов; В показывает влияние (+)-2-борнеола на NMDA-индуцированное повреждение возбудимости нервов; С показывает влияние композиции рилузола и (+)-2-борнеола (1:1) на NMDA-индуцированное повреждение возбудимости нервов;

[0034] На ФИГ. 8 показано влияние композиции рилузола и (+)-2-борнеола на симптом неврологического дефицита у крыс МСАО;

[0035] На ФИГ. FIG. 9 показано влияние композиции рилузола и (+)-2-борнеола на область инфаркта головного мозга;

[0036] На ФИГ. 10 представлены кривая доза-эффект (А), график медианного эффекта (В) и график Fa-CI (С) композиций рилузола и (+)-2-борнеола (с массовым соотношением 8:1 и 15:1), уменьшающий площадь церебрального инфаркта у крыс МСАО, рассчитанный с помощью программного обеспечения CompuSyn;

[0037] На ФИГ. 11 показано влияние композиций рилузола с (+)-2-борнеолом, (-)-борнеолом или синтетическим борнеолом на показатель неврологического дефицита и

площадь церебрального инфаркта у крыс МСАО; где А показывает влияние композиций рилузола с (+)-2-борнеолом, (-)-борнеолом или синтетическим борнеолом на показатель неврологического дефицита у крыс МСАО; В показывает влияние композиций рилузола с (+)-2-борнеолом, (-)-борнеолом или синтетическим борнеолом на область церебрального инфаркта у крыс МСАО.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0038]** Настоящее изобретение относится к применению композиции, содержащей рилузол и борнеол, при получении лекарственного препарата для лечения цереброваскулярного заболевания. Специалисты в данной области техники могут обратиться к содержанию данного документа и надлежащим образом улучшить параметры способа для практического осуществления настоящего изобретения. В частности, следует отметить, что все подобные замены и модификации очевидны специалистам в данной области техники, и все они считаются включенными в настоящее изобретение. Способ и применение по настоящему изобретению описываются в предпочтительных вариантах осуществления, и специалисты в данной области техники, очевидно, могут вносить модификации или соответствующие изменения и создавать комбинации способа и применения, описанных в настоящем документе, не отступая от содержания, сущности и объема настоящего изобретения для практического осуществления и применения технологии настоящего изобретения.

**[0039]** При применении композиции, содержащей рилузол и борнеол, при получении лекарственного препарата для лечения цереброваскулярного заболевания, предложенного в настоящем изобретении, все используемые исходные материалы и реагенты были коммерчески доступными.

**[0040]** Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано ниже на примерах:

Пример 1. Влияние рилузола и (+)-2-борнеола на NMDA-индуцированное возбуждающее повреждение первичных нейронов коры

**[0041]** 1 Материалы и методы

**[0042]** 1.1 Животные

**[0043]** Беременные крысы SD, Shanghai Slac Experimental Animal Co., Ltd. (номер лицензии на производство: SCXK (Шанхай) 2017-0005)

**[0044]** 1.2 Реагенты и расходные материалы

Наименование	Номер по каталогу/номер партии	Производитель
Нейробазал	21103-049	Gibco
B27	17504-044	Gibco
GlutaMax	2110349	Gibco
CellTiter-Glo	G7571	Promega
Поли-D-лизин (PDL)	P6407	Sigma

DMEM	11995-040	Gibco
DMEM без сахара	1763966	Gibco
Пенициллин Стрептомицин (P/S)	15140-122	Gibco
Фетальная бычья сыворотка (FBS)	10099-141	Gibco
Планшет для культивирования клеток	Corning 3610/96-луночный планшет для культивирования клеток	Corning
Рилузол	R129533-5g (Lot1502089)	Aladdin
(+)-2-Борнеол	KC20171205-1-2	Jiangsu Simovay Pharmaceutical Co., Ltd.
Люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellCounting-Lite 2.0	LOT 7E322D9	Nanjing vazyme Medical Technology Co., Ltd.

---

#### [0045] 1.3 Получение первичных корковых нейронов

[0046] Беременных крыс SD на 18-й день беременности умерщвляли путем смещения шейных позвонков. У крыс рассекали матку и извлекали головной мозг плода крысы E18. Ткань коры головного мозга эмбрионов крыс отделяли в ледяной DMEM. Мозговые оболочки и кровеносные сосуды на кортикальной ткани удаляли под препаровальным микроскопом. Корковую ткань переносили в ледяную среду DMEM, разрезали на куски (около 1 мм<sup>3</sup>) и расщепляли трипсином при температуре 37°C в течение 10 мин. Расщепление останавливали с помощью FBS. Полученные клетки осторожно продували пипеткой Пастера и пропускали через сито 200 меш. Отфильтрованную клеточную суспензию переносили в центрифужную пробирку на 15 мл и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин. Супернатант отбрасывали. Затем клеточную массу на дне центрифужной пробирки осторожно продували подогретой до температуры 37°C полной средой (нейробазал+B27+GlutaMax+1% P/S). Клетки подсчитывали с помощью гемоцитометра, разбавляли полной средой до 5×10<sup>5</sup> клеток/мл и высевали в 96-луночный планшет, покрытый PDL (100 мкл/лунка). На следующий день половину среды для культивирования клеток заменяли полной средой. Клетки культивировали *in vitro* до 11-го дня, когда нейроны дифференцировались и созревали, а затем использовали для исследования на кислородно-глюкозную депривацию.

[0047] 1.4 Исследование NMDA-индуцированного возбуждающего повреждения на первичных корковых нейронах

**[0048]** Культуральную среду первичных нейронов, созревших *in vitro*, заменяли различными концентрациями (100, 33,3, 11,1, 3,7, 1,23 и 0,41 мкМ) рилузола (R) или (+)-2-борнеола в буфере Локка (NaCl 154 мМ, KCl 5,6 мМ, NaHCO<sub>3</sub> 3,6 мМ, CaCl<sub>2</sub> 2,3 мМ, D-глюкоза 5,6 мМ, HEPES 5 мМ, pH 7,4). После инкубации при температуре 37°C в течение 10 мин добавляли возбуждающий индуктор (NMDA в конечной концентрации 100 мкМ и глицин в конечной концентрации 10 мкМ) для индукции клеток в течение 30 мин. После удаления индуцирующего буфера клетки однократно промывали буфером Локка, содержащим 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, и восстанавливали для инкубации в течение 4 ч, заменяя полной средой (100 мкл).

**[0049]** 1.5 Определение жизнеспособности нейронных клеток

**[0050]** Жизнеспособность клеток первичных нейронов определяли с помощью набора для анализа жизнеспособности люминесцентных клеток. Согласно инструкции добавляли реагенты по 100 мкл/лунка и встряхивали в течение 10 мин. Значение хемилюминесценции (LUM) считывали на многофункциональном планшет-ридере SpectraMax i3X (Molecule Device) и рассчитывали относительную активность нейронов.

**[0051]** Формула расчета: относительная активность нейронов  $V(\%) = (LUM - LUM_{фон}) / (LUM_{нормальная\ контрольная\ группа} - LUM_{фоновая\ группа}) \times 100\%$ . LUM<sub>фон</sub> представлял собой фоновое считывание реагента Luminescent Cell Viability Assay, добавленного в лунку полной бесклеточной среды.

**[0052]** 1.6 Нейропротекторное действие соединений

**[0053]** Нейропротекторное действие соединений в отношении возбуждающего повреждения был показан при использовании соединений для ингибирования возбуждающего повреждения нейронов. Относительная скорость ингибирования  $= 100\% \times (V_{соединение} - V_{NMDA\ модель}) / (V_{нормальная\ контрольная\ группа} - V_{NMDA\ модель})$ , где V представляет собой относительную активность нейронов.

**[0054]** Выстраивание кривой EC<sub>50</sub> соединений: Log[концентрация соединения] использовали в качестве оси абсцисс, а относительную скорость ингибирования использовали в качестве оси ординат. Зависимость Log(ингибитор) от реакции - кривая с переменным наклоном (четыре параметра) была выстроена с помощью Prism 8 (GraphPad) для получения IC<sub>50</sub> соединений.

**[0055]** 1.7 Статистика

**[0056]** Экспериментальные данные выражались как среднее значение ± стандартное отклонение (среднее ± SD) (n=3). После выполнения одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с помощью Prism 8 (GraphPad) различия между двумя группами анализировали с помощью нескорректированного LSD Фишера. p < 0,05 означает значительную разницу. ###p < 0,001 по сравнению с контрольной группой; \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 по сравнению с модельной группой NMDA.

**[0057]** 2 Результаты экспериментов

**[0058]** 2.1 Влияние рилузола и (+)-2-борнеола на NMDA-индуцированное повреждение нейронов

**[0059]** В диапазоне концентраций 0,41-100 мкМ рилузола в зависимости от концентрации повышал жизнеспособность нейронов, индуцированных NMDA, и мог значительно повышать жизнеспособность нейронов при концентрациях 33,3 и 100 мкМ (ФИГ. 1А). В диапазоне концентраций 0,41-3,7 мкМ (+)-2-борнеола в зависимости от концентрации повышал жизнеспособность нейронов с возбуждательным повреждением, но при увеличении концентрации (10-100 мкМ) жизнеспособность нейронов имела тенденцию к снижению (ФИГ. 1В).

**[0060]** Согласно кривой зависимости концентрации соединения от скорости ингибирования,  $EC_{50}$  рилузола и (+)-2-борнеола для нейропротекции составляла около 40 мкМ ( $E_{max}$ -60%) и 2 мкМ ( $E_{max}$ -15%), соответственно (ФИГ. 2).

Пример 2. Влияние композиций рилузола и (+)-2-борнеола на NMDA-индуцированное возбуждающее повреждение первичных нейронов коры

**[0061]** 1 Материалы и методы

**[0062]** 1.1 Животные были такими же, что и в примере 1.

**[0063]** 1.2 Реагенты и расходные материалы были такими же, что и в примере 1.

**[0064]** 1.3 Получение первичных корковых нейронов проводили тем же способом, что и в примере 1.

**[0065]** 1.4 Эксперимент по NMDA-индуцированному возбуждающему повреждению первичных корковых нейронов

**[0066]** Культуральную среду первичных нейронов, созревших *in vitro*, заменяли различными концентрациями рилузола (R), (+)-2-борнеола (B) или композициями рилузола и (+)-2-борнеола (RB) в буфере Локка (NaCl 154 мМ, KCl 5,6 мМ, NaHCO<sub>3</sub> 3,6 мМ, CaCl<sub>2</sub> 2,3 мМ, D-глюкоза 5,6 мМ, HEPES 5 мМ, pH 7,4) (см. таблицу 1). После инкубации при температуре 37°C в течение 10 мин добавляли возбуждающий индуктор (NMDA в конечной концентрации 100 мкМ и глицин в конечной концентрации 10 мкМ) для индукции клеток в течение 30 мин. После удаления индуцирующего буфера клетки однократно промывали буфером Локка, содержащим 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, и восстанавливали для инкубации в течение 4 ч, заменяя полной средой (100 мкл/лунка).

Таблица 1. Ортогональный дизайн композиций рилузола и (+)-2-борнеола

DMCO	R1	R2	R3	R4	R5	R6
B1	R1B1	R2B1	R3B1	R4B1	R5B1	R6B1
B2	R1B2	R2B2	R3B2	R4B2	R5B2	R6B2
B3	R1B3	R2B3	R3B3	R4B3	R5B3	R6B3
B4	R1B4	R2B4	R3B4	R4B4	R5B4	R6B4
B5	R1B5	R2B5	R3B5	R4B5	R5B5	R6B5
B6	R1B6	R2B6	R3B6	R4B6	R5B6	R6B6

**[0067]** Примечание: R представляет собой рилузол, B представляет собой (+)-2-борнеол, R<sub>X</sub>B<sub>Y</sub> представляет собой композиции рилузола и (+)-2-борнеола, X/Y 1-6 представляет собой концентрации соответствующих соединений, соответственно, 100,

33,3, 11,1, 3,7, 1,23 и 0,41 мкМ. Каждая группа лекарственных средств имела по 5 повторных лунок (n=5). Все соединения сначала растворяли в ДМСО, и конечная концентрация ДМСО в культуральной среде составляла 0,2%.

**[0068]** 1.5 Определение жизнеспособности нейронных клеток проводили тем же способом, что и в примере 1.

**[0069]** 1.6 Статистику получали тем же способом, что и в примере 1.

**[0070]** Экспериментальные данные выражались как среднее значение±стандартное отклонение (среднее±SD) (n=3). После выполнения однофакторного дисперсионного анализа с помощью Prism 8 (GraphPad) различия между двумя группами анализировали с помощью нескорректированного LSD Фишера.  $p < 0,05$  означает значительную разницу. ### $p < 0,001$ , по сравнению с контролем (контрольная группа); \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , по сравнению с модельной группой NMDA.

**[0071]** 2 Результаты экспериментов

**[0072]** 2.1 Влияние композиций рилузола и (+)-2-борнеола на возбуждающее повреждение первичных нейронов

**[0073]** Как показано на ФИГ. 3, в диапазоне концентраций 0,41-100 мкМ рилузол сам по себе в концентрации R2 (33,3 мкМ) может значительно повысить жизнеспособность нейронов с NMDA-индуцированным возбуждающим повреждением. (+)-2-Борнеол в концентрации R4 (3,7 мкМ) может значительно улучшить жизнеспособность нейронов с NMDA-индуцированным возбуждающим повреждением. Композиции рилузола и (+)-2-борнеола, а именно R1B1 (1:1), R2B1 (1:3), R2B2 (1:1), R2B3 (3:1), R2B4 (9:1), R2B5 (27:1), R3B1 (1:9), R3B2(1:3), R3B3 (1:1), R3B4 (3:1), R3B5 (9:1), R3B6 (1:27), R4B1 (1:27), R4B2 (1:9), R4B3 (1:3), R4B4 (1:1), R4B5 (3:1) и R4B6 (9:1) может значительно улучшить жизнеспособность нейронов, индуцированных NMDA. Это указывает на то, что комбинация рилузола и (+)-2-борнеола в соотношении от 27:1 до 1:27 может оказывать синергетическое действие на нейропротекцию.

Пример 3. Изучение синергетического действия композиций рилузола и (+)-2-борнеола (20:1) на защиту первичных нейронов от возбуждающего повреждения

**[0074]** 1 Материалы и методы

**[0075]** 1.1 Животные были такими же, что и в примере 1.

**[0076]** 1.2 Реагенты и расходные материалы были такими же, что и в примере 1.

**[0077]** 1.3 Получение первичных корковых нейронов осуществляли тем же способом, что и в примере 1.

**[0078]** 1.4 Эксперимент по NMDA-индуцированному возбуждающему повреждению первичных корковых нейронов

**[0079]** Культуральную среду первичных нейронов, созревших *in vitro*, заменяли различными концентрациями рилузола (R), (+)-2-борнеола (B) или композициями рилузола и (+)-2-борнеола (20: 1) в буфере Локка (см. таблицу 2). После инкубации при температуре 37°C в течение 10 мин добавляли возбуждающий индуктор (NMDA в конечной концентрации 100 мкМ и глицин в конечной концентрации 10 мкМ) для

индукции клеток в течение 30 мин. После удаления индуцирующего буфера клетки однократно промывали буфером Локка, содержащим 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, и восстанавливали для инкубации в течение 4 ч, заменяя полной средой (100 мкл/лунка).

Таблица 2. Концентрационный дизайн композиций рилузола и (+)-2-борнеола

Композиция	Рилузол (мкМ)	(+)-2-Борнеол (мкМ)
Рилузол	10	/
	20	/
	40	/
	80	/
	160	/
(+)2-Борнеол	/	0,5
	/	1
	/	2
	/	4
	/	8
Рилузол: (+)-2-борнеол=20:1	10	0,5
	20	1
	40	2
	80	4
	160	8

**[0080]** 1.5 Определение жизнеспособности нейронных клеток проводили тем же способом, что и в примере 1.

**[0081]** 1.6 Нейропротекторное влияние соединений определяли тем же способом, что и в примере 1.

**[0082]** 1.7 Анализ синергетического эффекта композиций

**[0083]** Синергический эффект на нейропротекцию композиций рилузола и (+)-2-борнеола при фиксированном соотношении анализировали с использованием программного обеспечения CompuSyn (ComboSyn, Inc).

**[0084]** 1.8 Статистика

**[0085]** Экспериментальные данные выражались как среднее значение±стандартное отклонение (среднее±SD) (n=3-6). После выполнения однофакторного дисперсионного анализа с помощью Prism 8 (GraphPad) различия между двумя группами анализировали с помощью нескорректированного LSD Фишера. p<0,05 означает значительную разницу. ###p<0,001 по сравнению с контрольной группой; \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 по сравнению с модельной группой NMDA.

**[0086]** 2 Результаты экспериментов

**[0087]** 2.1 Влияние рилузола, (+)-2-борнеола и их композиции (20:1) на возбуждающее повреждение первичных нейронов

**[0088]** Согласно результатам примера 1 концентрации соединений были рассчитаны так, чтобы составлять  $1/4 \times ED_{50}$ ,  $1/2 \times ED_{50}$ ,  $1 \times ED_{50}$ ,  $2 \times ED_{50}$  и  $4 \times ED_{50}$ , где концентрации рилузола были 10, 20, 40, 80 и 160 мкМ, концентрации (+)-2-борнеола были 0,5, 1, 2, 4 и 8 мкМ, и молярное соотношение композиций рилузола и (+)-2-борнеола было 20:1. Рилузол, (+)-2-борнеол и их композиции могут в зависимости от концентрации повышать жизнеспособность нейронов при повреждении, индуцированном NMDA, и действие композиций было лучше, чем у рилузола или (+)-2-борнеола (ФИГ. 3).

**[0089]** 2.2 Анализ синергетического эффекта на нейропротекцию композиций рилузола и (+)-2-борнеола

**[0090]** В соответствии с принципом уравнения Чжоу-Талалея показатель аддитивности (CI) композиций при фиксированном соотношении рассчитывали с использованием программного обеспечения CompuSyn (см. таблицу 3, ФИГ. 5), и композиции рилузола и (+)-2-борнеола при молярном соотношении 20:1 был  $CI < 1$ , что указывает на то, что рилузол и (+)-2-борнеол оказывают синергетическое действие на защиту нейронов от возбуждающего повреждения.

Таблица 3. Эффект (Fa) и показатель аддитивности (CI) композиций рилузола и (+)-2-борнеола при защите нейронов от возбуждающего повреждения

Рилузол		(+)-2-Борнеол		Композиция риллузол/(+)-2-борнеол (20:1)		
Концентрация (мкМ)	Fa	Концентрация (мкМ)	Fa	Концентрация (мкМ)	Fa	CI
160	0,847	8	0,231	160/8	0,932	0,784
80	0,842	4	0,22	80/4	0,878	0,608
40	0,523	2	0,152	40/2	0,78	0,492
20	0,219	1	0,022	20/1	0,477	0,621
10	0,118	0,5	0,014	10/0,5	0,288	0,542

Пример 4. Изучение синергетического действия композиций рилузола и (+)-2-борнеола (5:1) на защиту первичных нейронов от возбуждающего повреждения

**[0091]** 1 Материалы и методы

**[0092]** 1.1 Животные были такими же, что и в примере 1.

**[0093]** 1.2 Реагенты и расходные материалы были такими же, что и в примере 1.

**[0094]** 1.3 Получение первичных корковых нейронов осуществляли тем же способом, что и в примере 1.

**[0095]** 1.4 Эксперимент по NMDA-индуцированному возбуждающему повреждению первичных корковых нейронов

**[0096]** Культуральную среду первичных нейронов, созревших *in vitro*, заменяли различными концентрациями рилузола (R), (+)-2-борнеола (B) или композициями рилузола и (+)-2-борнеола (5:1) в буфере Локка (см. таблицу 2). После инкубации при температуре 37°C в течение 10 мин добавляли возбуждающий индуктор (NMDA в конечной концентрации 100 мкМ и глицин в конечной концентрации 10 мкМ) для индукции клеток в течение 30 мин. После удаления индуцирующего буфера клетки однократно промывали буфером Локка, содержащим 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, и восстанавливали для инкубации в течение 4 ч, заменяя полной средой (100 мкл/лунка).

Таблица 4. Концентрационный дизайн композиций рилузола и (+)-2-борнеола

Композиция	Рилузол (мкМ)	Борнеол (мкМ)
Рилузол	2,5	/
	5	/
	10	/
	20	/
	40	/
(+)-2-борнеол	/	0,5
	/	1
	/	2
	/	4
	/	8
Рилузол:(+)-2-борнеол=5:1	2,5	0,5
	5	1
	10	2
	20	4
	40	8

**[0097]** 1.5 Определение жизнеспособности нейронных клеток проводили тем же способом, что и в примере 1.

**[0098]** 1.6 Нейропротекторное влияние соединений определяли тем же способом, что и в примере 1.

**[0099]** 1.7 Анализ синергетического эффекта композиций

**[00100]** Синергический эффект на нейропротекцию композиций рилузола и (+)-2-борнеола при фиксированном соотношении анализировали с использованием программного обеспечения CompuSyn (ComboSyn, Inc).

**[00101]** 1.8 Статистику получали тем же способом, что и в примере 3.

**[00102]** 2 Результаты экспериментов

**[00103]** 2.1 Влияние рилузола, (+)-2-борнеола и их композиции (5:1) на

возбуждающее повреждение первичных нейронов

**[00104]** Концентрации рилузола были 2,5, 5, 10, 20 и 40 мкМ, концентрации (+)-2-борнеола были 0,5, 1, 2, 4 и 8 мкМ, и молярное соотношение композиций рилузола и (+)-2-борнеола было 5:1. Рилузол, (+)-2-борнеол и их композиции могут в зависимости от концентрации повышать жизнеспособность нейронов при повреждении, индуцированном NMDA, и действие композиции (5:1) было лучше, чем у рилузола или (+)-2-борнеола (ФИГ. 6).

**[00105]** 2.2 Анализ синергетического эффекта на нейропротекцию композиций рилузола и (+)-2-борнеола

**[00106]** В соответствии с принципом уравнения Чжоу-Талалея показатель аддитивности (CI) композиций при фиксированном соотношении рассчитывали с использованием программного обеспечения CompuSyn (см. таблицу 5), и композиции рилузола и (+)-2-борнеола при молярном соотношении 5:1 имели  $CI < 1$ , что указывает на то, что рилузол и (+)-2-борнеол оказывают синергетическое действие на защиту нейронов от возбуждающего повреждения.

Таблица 5. Эффект ( $F_a$ ) и показатель аддитивности (CI) композиций рилузола и (+)-2-борнеола при защите нейронов от возбуждающего повреждения

Рилузол		(+)-2-Борнеол		Композиция риллузола/(+)-2-борнеол (5:1)		
Концентрация (мкМ)	$F_a$	Концентрация (мкМ)	$F_a$	Концентрация (мкМ)	$F_a$	CI
40	0,469	8	0,205	40/8	0,592	0,673
20	0,297	4	0,209	20/4	0,408	0,729
10	0,118	2	0,086	10/2	0,358	0,456
5	0,081	1	0,069	5/1	0,182	0,617
2,5	0,048	0,5	0,042	2,5/0,5	0,100	0,673

Пример 5. Изучение синергетического действия композиций рилузола и (+)-2-борнеола (1:1) на защиту первичных нейронов от возбуждающего повреждения

**[00107]** 1 Материалы и методы

**[00108]** 1.1 Животные были такими же, что и в примере 1.

**[00109]** 1.2 Реагенты и расходные материалы были такими же, что и в примере 1.

**[00110]** 1.3 Получение первичных корковых нейронов осуществляли тем же способом, что и в примере 1.

**[00111]** 1.4 Эксперимент по NMDA-индуцированному возбуждающему повреждению первичных корковых нейронов

**[0011]** Культуральную среду первичных нейронов, созревших *in vitro*, заменяли различными концентрациями рилузола (R), (+)-2-борнеола (B) или композициями

рилузола и (+)-2-борнеола (1: 1) в буфере Локка (см. таблицу 2). После инкубации при температуре 37°C в течение 10 мин добавляли возбуждающий индуктор (NMDA в конечной концентрации 100 мкМ и глицин в конечной концентрации 10 мкМ) для индукции клеток в течение 30 мин. После удаления индуцирующего буфера клетки однократно промывали буфером Локка, содержащим 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, и восстанавливали для инкубации в течение 4 ч, заменяя полной средой (100 мкл/лунка).

Таблица 6. Концентрационный дизайн композиций рилузола и (+)-2-борнеола

Композиция	Рилузол (мкМ)	(+)-2-Борнеол (мкМ)
Рилузол	0,5	/
	1	/
	2	/
	4	/
	8	/
(+) -2-Борнеол	/	0,5
	/	1
	/	2
	/	4
	/	8
Рилузол: (+)-2-борнеол=1:1	0,5	0,5
	1	1
	2	2
	4	4
	8	8

**[00113]** 1.5 Определение жизнеспособности нейронных клеток проводили тем же способом, что и в примере 1.

**[00114]** 1.6 Нейропротекторное влияние соединений определяли тем же способом, что и в примере 1.

**[00115]** 1.7 Анализ синергетического эффекта композиций

**[00116]** Синергический эффект на нейропротекцию композиций рилузола и (+)-2-борнеола при фиксированном соотношении анализировали с использованием программного обеспечения CompuSyn (ComboSyn, Inc).

**[00117]** 1.8 Статистику получали тем же способом, что и в примере 3.

**[00118]** 2 Результаты экспериментов

**[00119]** 2.1 Влияние рилузола, (+)-2-борнеола и их композиции (1:1) на возбуждающее повреждение первичных нейронов

**[00120]** Концентрации рилузола были 0,5, 1, 2, 4 и 8 мкМ, концентрации (+)-2-

борнеола были 0,5, 1, 2, 4 и 8 мкМ, и молярное соотношение композиций рилузола и (+)-2-борнеола было 1:1. Защитный эффект рилузола в этом диапазоне концентраций имеет определенную зависимость от концентрации. (+)-2-Борнеол и композиции (1:1) могут в зависимости от концентрации повышать жизнеспособность нейронов при повреждении, индуцированном NMDA. Композиции (1:1) имели лучший эффект, чем рилузол или (+)-2-борнеол (ФИГ. 7).

**[00121]** 2.2 Анализ синергетического эффекта на нейропротекцию композиций рилузола и (+)-2-борнеол

**[00122]** В соответствии с принципом уравнения Чжоу-Талалея показатель аддитивности (CI) композиций при фиксированном соотношении рассчитывали с использованием программного обеспечения CompuSyn (см. таблицу 7), и композиции рилузола и (+)-2-борнеола при молярном соотношении 1:1 имели  $CI < 1$ , что указывает на то, что рилузол и (+)-2-борнеол оказывают синергетическое действие на защиту нейронов от возбуждающего повреждения.

Таблица 7. Эффект (Fa) и показатель аддитивности (CI) композиций рилузола и (+)-2-борнеола в защите нейронов от возбуждающего повреждения

Рилузол		(+)-2-Борнеол		Композиция рилузол/ (+)-2-борнеол (1:1)		
Концентрация (мкМ)	Fa	Концентрация (мкМ)	Fa	Концентрация (мкМ)	Fa	CI
8	0,116	8	0,202	8/8	0,202	0,765
4	0,055	4	0,205	4/4	0,205	0,580
2	0,042	2	0,128	2/2	0,128	0,610
1	0,029	1	0,077	1/1	0,077	0,704
0,5	0,017	0,5	0,042	0,5/0,5	0,042	0,765

Пример 6. Исследование защитного действия композиций рилузола и (+)-2-борнеола на очаговое церебральное ишемически-реперфузионное повреждение

**[00123]** 1 Материалы и методы

**[00124]** 1.1 Экспериментальные животные

**[00125]** Крысы Sprague-Dawley (SD), самцы, SPF-класс, массой 250-280 г.

**[00126]** 1.2 Исследуемые лекарственные средства

**[00127]** Рилузол и (+)-2-борнеол были такими же, что и в примере 1.

**[00128]** 1.3 Экспериментальный метод

**[00129]** 1.3.1 Создание модели фокальной церебральной ишемии-реперфузии

**[00130]** Модель фокальной церебральной ишемии-реперфузии у крыс создавали методом наложения швов на внутреннюю сонную артерию. Конечности (задние конечности выше коленного сустава и передние конечности выше лучезапястного сустава) и голова анестезированной крысы были стянуты резиновыми лентами. Животное фиксировали на операционном столе в положении лежа на спине, брили бритвенным станком от головы до груди, кожу дезинфицировали спиртом. Шею крысы разрезали по средней линии и тупо отделяли подкожную клетчатку. Тонкий слой фасции на

поверхности переднего треугольника шеи отсепаровали, нижнебоковой нижней край ключично-подъязычной мышцы оттягивали кверху, при этом была видна параллельно этой мышце продольно пульсирующая артерия. Артериальную оболочку вскрывали и обнажали бифуркацию правой сонной артерии. Выделяли правую общую сонную артерию, наружную сонную артерию и внутреннюю сонную артерию. Блуждающий нерв осторожно отделяли, а наружную сонную артерию перевязывали и перерезали. Проксимальный конец общей сонной артерии пережимали. Разрез делали на дистальном конце от лигатуры наружной сонной артерии и вставляли шовную линию, которую проводили через бифуркацию общей сонной артерии во внутреннюю сонную артерию, а затем медленно вводили до достижения легкого сопротивления (примерно 20 мм от бифуркации), чтобы полностью перекрыть кровоснабжение средней мозговой артерии. Линию шва немного фиксировали ниже разреза наружной сонной артерии шелковой нитью. Шелковая нить, зажимающая проксимальный конец общей сонной артерии, ослабляли. На рану накладывали марлю, смоченную стерильным физиологическим раствором, и крысу помещали на подушку для сохранения тепла, чтобы она согрелась. Через 2,0 ч после ишемии головного мозга справа линию швов осторожно растягивали для восстановления кровоснабжения для реперфузии. Наружную сонную артерию перевязывали шелковой нитью, фиксируя линию шва. Кожу зашивали, дезинфицировали. Крыс переводили на чистый корм и наблюдали за их общим состоянием и дыханием до пробуждения от наркоза. Крысам давали пищу и воду, и они содержались обычным образом.

#### **[00131]** 1.3.2 Группирование животных и введение

**[00132]** Экспериментальных животных разделяли на группы, получавшие рилузол (6 мг/кг и 12 мг/кг, в/в), группы, получавшие (+)-2-борнеол (0,4 мг/кг и 0,8 мг/кг, в/в), группу, получавшую композиции рилузола и (+)-2-борнеола (6,4 мг/кг и 12,8 мг/кг, в/в, рилузол:(+)-2-борнеол=15:1) и группу модели, всего 9 групп. После создания модели церебральной ишемии животных распределяли в каждую группу однократным слепым методом с равной вероятностью. После реперфузии животным сразу однократно внутривенно вводили лекарственные средства. Животным в модельной группе вводили равный объем физиологического раствора. Симптомы неврологического дефицита оценивали через 24 ч после ишемии головного мозга, животных забивали, извлекали головной мозг, окрашивали и фотографировали для определения зоны инфаркта головного мозга.

**[00133]** 1.3.3 Оценка симптомов неврологического дефицита и определение площади инфаркта головного мозга

**[00134]** Симптомы неврологического дефицита оценивали с использованием модифицированной 5-балльной шкалы Бедерсона. Симптоматику неврологического дефицита у крыс после ишемии головного мозга оценивали однократным слепым методом. То есть разработчик теста разделял животных на группы, а тестирующий, подсчитывавший симптомы неврологического дефицита, не знал группировки животных. После подсчета очков результаты подсчета различных маркеров представлялись

разработчику, который снимал блокировку и получал оценку каждого животного в каждой экспериментальной группе.

Таблица 8. Оценка симптома неврологического дефицита по 5-балльной шкале Бедерсона

0	При подвешивании животного в воздухе за хвост обе его передние конечности были вытянуты к полу, других поведенческих дефектов не было.
1	Когда животное было подвешено в воздухе за хвост, его передняя конечность на противоположной (левой) стороне операции показала сгибание запястья и локтя, внутреннюю ротацию плеча, отведение локтя и приближение к грудной стенке.
2	Когда животное помещали на гладкую плоскую поверхность, сопротивление уменьшалось при перемещении плеча со стороны операции в противоположную сторону.
3	Когда животное свободно шло, оно кружило или поворачивалось с противоположной стороны хирургического вмешательства.
4	Конечности вялые, без спонтанных движений.

**[00135]** Степень церебрального инфаркта определяли окрашиванием ТТС. После завершения оценки симптомов неврологического дефицита животных забивали CO<sub>2</sub>. Мозг извлекали, отрезая голову. Обонятельную луковицу, мозжечок и нижнюю часть ствола мозга удаляли. Кровь на поверхности мозга промывали физиологическим раствором и удаляли остаточную воду с поверхности. Мозг помещали на 20 мин при -20°C, затем извлекали, сразу же разрезали на коронарный срез вертикально вниз в плоскости пересечения линии обзора и срезали назад каждые 2 мм. Срезы головного мозга инкубировали в 1% растворе для окрашивания ТТС (при 37°C в течение 30 мин). Нормальная мозговая ткань окрашивалась в темно-красный цвет, а ишемизированная мозговая ткань окрашивалась в бледно-белый цвет. После промывания физиологическим раствором срезы мозга быстро укладывали в ряд спереди назад, удаляли с поверхности оставшуюся воду и фотографировали.

**[00136]** Расчет площади церебрального инфаркта: фотографии обрабатывали с помощью программного обеспечения Image J, и соответствующую площадь левого полушария и неинфарктную область правого полушария рассчитывали по формуле, таким образом был рассчитан процент площади инфаркта.

**[00137]** Расчет объема инфаркта:

$$\mathbf{[00138]} \quad V=t(A_1+A_2+A_3+\dots+A_n),$$

**[00139]** t обозначает толщину среза, А обозначает площадь инфаркта.

$$\mathbf{[00140]} \quad \%I=100\% \times (V_C - V_L) / V_C,$$

**[00141]** %I обозначает процент объема инфаркта, VC обозначает объем головного мозга контрольной стороны (левое полушарие), а VL обозначает объем неинфарктной области пораженной стороны (правое полушарие).

#### **[00142]** 1.4 Анализ синергетического эффекта композиций

**[00143]** Синергический эффект на нейропротекцию композиций рилузола и (+)-2-борнеола при нефиксированном соотношении анализировали с использованием программного обеспечения CompuSyn software (ComboSyn, Inc).

#### **[00144]** 1.5 Статистика

**[00145]** Экспериментальные данные выражались как среднее значение±стандартное отклонение (среднее±SD) (n=10). После выполнения одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) различия между двумя группами анализировали с помощью LSD Фишера.  $p < 0,05$  означает значительную разницу. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , по сравнению с модельной группой МСАО; ns означает отсутствие статистических различий между группами, показанными на рисунке.

#### **[00146]** 2 Результаты экспериментов

**[00147]** 2.1 Влияние композиций рилузола и (+)-2-борнеола на симптомы неврологического дефицита

**[00148]** Как показано на ФИГ. 8, рилузол, (+)-2-борнеол и их композиция могут дозозависимо снижать показатель неврологического дефицита у крыс МСАО. По сравнению с модельной группой МСАО, показатели неврологического дефицита у крыс МСАО в группе, получавшей 8 мг/кг рилузола, группе, получавшей 1 мг/кг (+)-2-борнеола, группе, получавшей композицию (содержащую рилузол и (+)-2-борнеол в массовом соотношении 8:1) 4,5 мг/кг и 9 мг/кг, и группе, получавшей композицию (содержащую рилузол и (+)-2-борнеол в массовом соотношении 15:1) 6,4 мг/кг и 12,8 мг/кг, были значительно снижены. Кроме того, показатели неврологического дефицита в группах, получавших композицию, имели тенденцию к снижению по сравнению с группами, получавшими рилузол или (+)-2-борнеол.

**[00149]** 2.2 Действие композиций рилузола и (+)-2-борнеола на область инфаркта головного мозга

**[00150]** Как показано на ФИГ. 8, по сравнению с модельной группой МСАО, группы, получавшие 4 и 8 мг/кг рилузола, группы, получавшие 0,5 и 1 мг/кг (+)-2-борнеола, группа, получавшая композицию (содержащую рилузол и (+)-2-борнеол в массовом соотношении 8:1) 4,5 мг/кг и 9 мг/кг группа, группа, получавшая композицию (содержащую рилузол и (+)-2-борнеол в массовом соотношении 15:1) 6,4 мг/кг и 12,8 мг/кг в зависимости от дозы, значительно уменьшали площадь инфаркта головного мозга.

**[00151]** 2.3 Анализ синергетического эффекта композиций рилузола и (+)-2-борнеола на уменьшение площади инфаркта головного мозга

**[00152]** В соответствии с принципом уравнения Чжоу-Талалея показатель аддитивности (CI) композиций при нефиксированных соотношениях рассчитывали с использованием программного обеспечения CompuSyn (см. таблицу 9, ФИГ. 10), и

композиции рилузола и (+)-2-борнеола при молярном соотношении 8:1 имели  $CI < 1$ , что свидетельствует о синергическом эффекте рилузола и (+)-2-борнеола на уменьшение площади инфаркта головного мозга у крыс МСАО.

Таблица 9. Эффект (Fa) и показатель аддитивности (CI) композиций рилузола и (+)-2-борнеола на уменьшение площади церебрального инфаркта у крыс МСАО

Рилузол		(+)-2-Борнеол		Композиция рилузола и (+)-2-борнеола		
Доза (мг/кг)	Fa	Доза (мг/кг)	Fa	Доза (риллузол и (+)-2-борнеол) (мг/кг)	Fa	CI
4	0,247	0,5	0,157	4/0,5 (8:1)	0,472	0,555
8	0,380	1	0,256	8/1 (8:1)	0,602	0,499
/	/	/	/	6/0,4 (15:1)	0,541	0,463
/	/	/	/	12/0,8 (15:1)	0,699	0,435

Пример 7. Исследование защитного действия композиций рилузола и (+)-2-борнеола, (-)-борнеола и синтетического борнеола на очаговое церебральное ишемически-реперфузионное повреждение

**[00153]** 1 Материалы и методы

**[00154]** 1.1 Экспериментальные животные были такими же, что и в примере 6.

**[00155]** 1.2 Исследуемые лекарственные средства

**[00156]** Рилузол и (+)-2-борнеол были такими же, что и в примере 1.

**[00157]** (-)-Борнеол и синтетический борнеол были приобретены у компании Shanghai Aladdin Biochemical Technology Co., Ltd.

**[00158]** 1.3 Экспериментальный метод

**[00159]** 1.3.1 Создание модели фокальной церебральной ишемии-реперфузии было таким же, что и в примере 6.

**[00160]** 1.3.2 Группирование животных и введение

**[00161]** Экспериментальных животных разделяли на группу, получающую композицию рилузола и (+)-2-борнеола (8 мг/кг рилузол и 1 мг/кг (+)-2-борнеола, в/в), группу, получавшую композицию рилузола и (-)-борнеола (8 мг/кг рилузол и 1 мг/кг (-)-борнеол), группу, получающую композицию рилузола и синтетического борнеола (8 мг/кг рилузола и 1 мг/кг синтетического борнеола) и модельную группу, всего 4 группы. После создания модели церебральной ишемии животных распределяли в каждую группу однократным слепым методом с равной вероятностью. После реперфузии животным сразу внутривенно однократно вводили лекарственные средства. Животным в модельной группе вводили равный объем физиологического раствора. Симптомы неврологического дефицита оценивали через 24 ч после ишемии головного мозга, животных забивали, извлекали головной мозг, окрашивали и фотографировали для определения зоны инфаркта головного мозга.

**[00162]** 1.3.3 Оценка симптомов неврологического дефицита и определение площади инфаркта головного мозга были такими же, что и в примере 6.

**[00163]** 1.4 Статистика

**[00164]** Экспериментальные данные выражались как среднее значение±стандартное отклонение (среднее±SD) (n=10). После выполнения одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) различия между двумя группами анализировали с помощью LSD Фишера.  $p < 0,05$  означает значительную разницу. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , по сравнению с модельной группой МСАО; ns означает отсутствие статистических различий между группами, показанными на рисунке.

**[00165]** 2 Результаты экспериментов

**[00166]** 2.1 Действие композиций на симптомы неврологического дефицита и площадь церебрального инфаркта у крыс МСАО

**[00167]** Как показано на ФИГ. 11, композиция рилузола (8 мг/кг) с (+)-2-борнеолом (1 мг/кг), (-)-борнеолом (1 мг/кг) или синтетическим борнеолом (1 мг/кг) может существенно уменьшить показатель неврологического дефицита и площадь инфаркта головного мозга у крыс МСАО. Кроме того, с точки зрения оценки неврологического дефицита и площади мозгового инфаркта между тремя композициями не было различий.

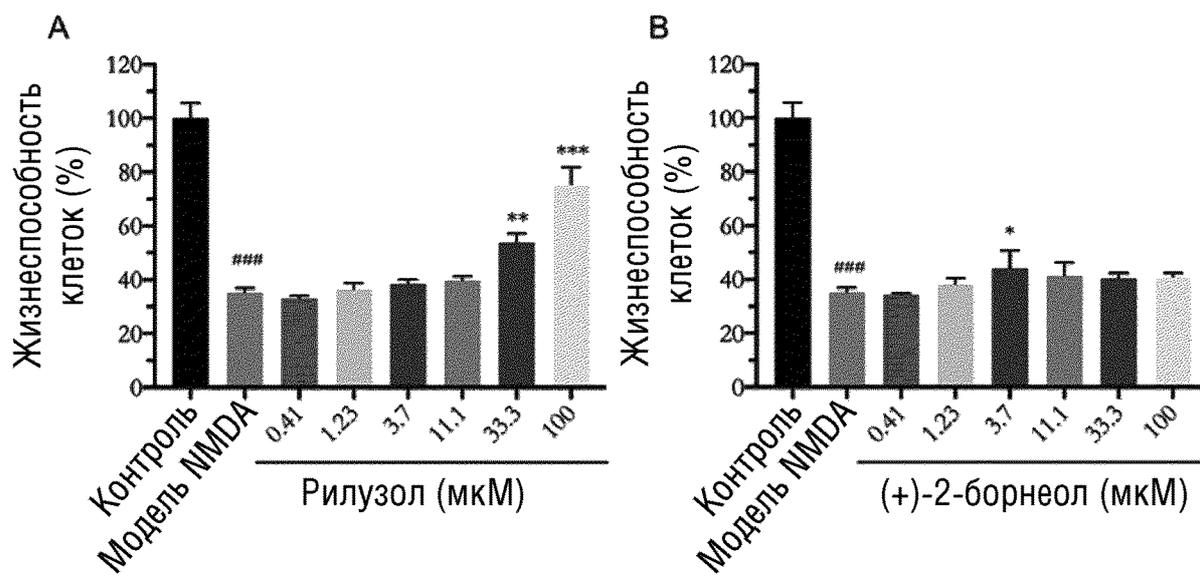
**[00168]** Применение композиции, содержащей рилузол и борнеол, при получении лекарственного препарата для лечения cerebrovascularного заболевания, предложенное в настоящем изобретении, подробно описано выше. Конкретные примеры используются в настоящем документе для иллюстрации принципа и вариантов осуществления настоящего изобретения. Описание приведенных выше примеров используется только для того, чтобы помочь понять способ и основную идею настоящего изобретения. Следует отметить, что специалистами в данной области в настоящее изобретение могут быть внесены некоторые улучшения и модификации, не отступая от принципов настоящего изобретения, и эти усовершенствования и модификации также входят в объем защиты формулы изобретения настоящего изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

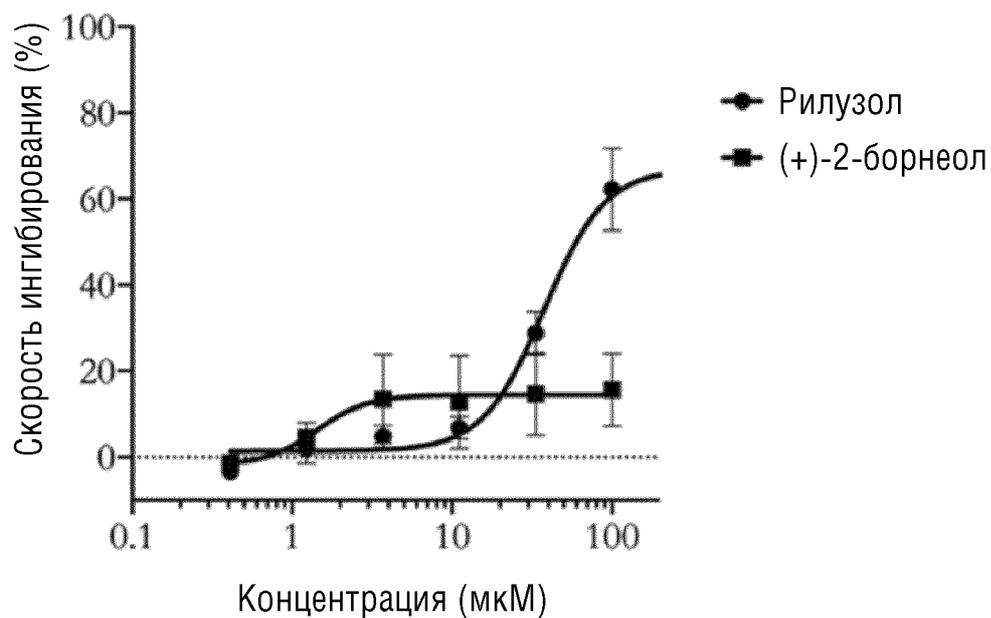
1. Композиция, содержащая следующие компоненты:  
компонент (I), 2-амино-6-трифторметоксибензотиазол, его производное, фармацевтически приемлемую соль или пролекарство; и  
компонент (II), (+)-2-борнеол, борнеол или лекарственное средство с активным ингредиентом (+)-2-борнеолом.
2. Композиция по п.1, где компонент (I) и компонент (II) находятся в массовом соотношении 30:1-1,5:1.
3. Композиция по п.1, где компонент (I) и компонент (II) находятся в массовом соотношении 15:1-1,5:1.
4. Композиция по п.1, где компонент (I) и компонент (II) находятся в массовом соотношении 15:1-7,5:1.
5. Композиция по п.1, где компонент (I) и компонент (II) находятся в массовом соотношении 1:1, 1:3, 3:1, 9:1, 27:1, 1:9, 1:27, 20:1, 5:1, 15:1 и/или 8:1.
6. Композиция по любому из пп.1-5, где борнеол выбран из группы, включающей синтетический борнеол, (-)-борнеол, природный борнеол и их комбинацию.
7. Лекарственное средство, содержащее композицию по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый адъювант.
8. Применение композиции по любому из пп.1-6 или лекарственного средства по п.7 при получении лекарственного препарата для профилактики и/или лечения цереброваскулярного заболевания.
9. Применение по п.8, где цереброваскулярное заболевание выбрано из ишемического цереброваскулярного заболевания.
10. Применение по п.8, где ишемическое цереброваскулярное заболевание выбрано из ишемического инсульта.

По доверенности

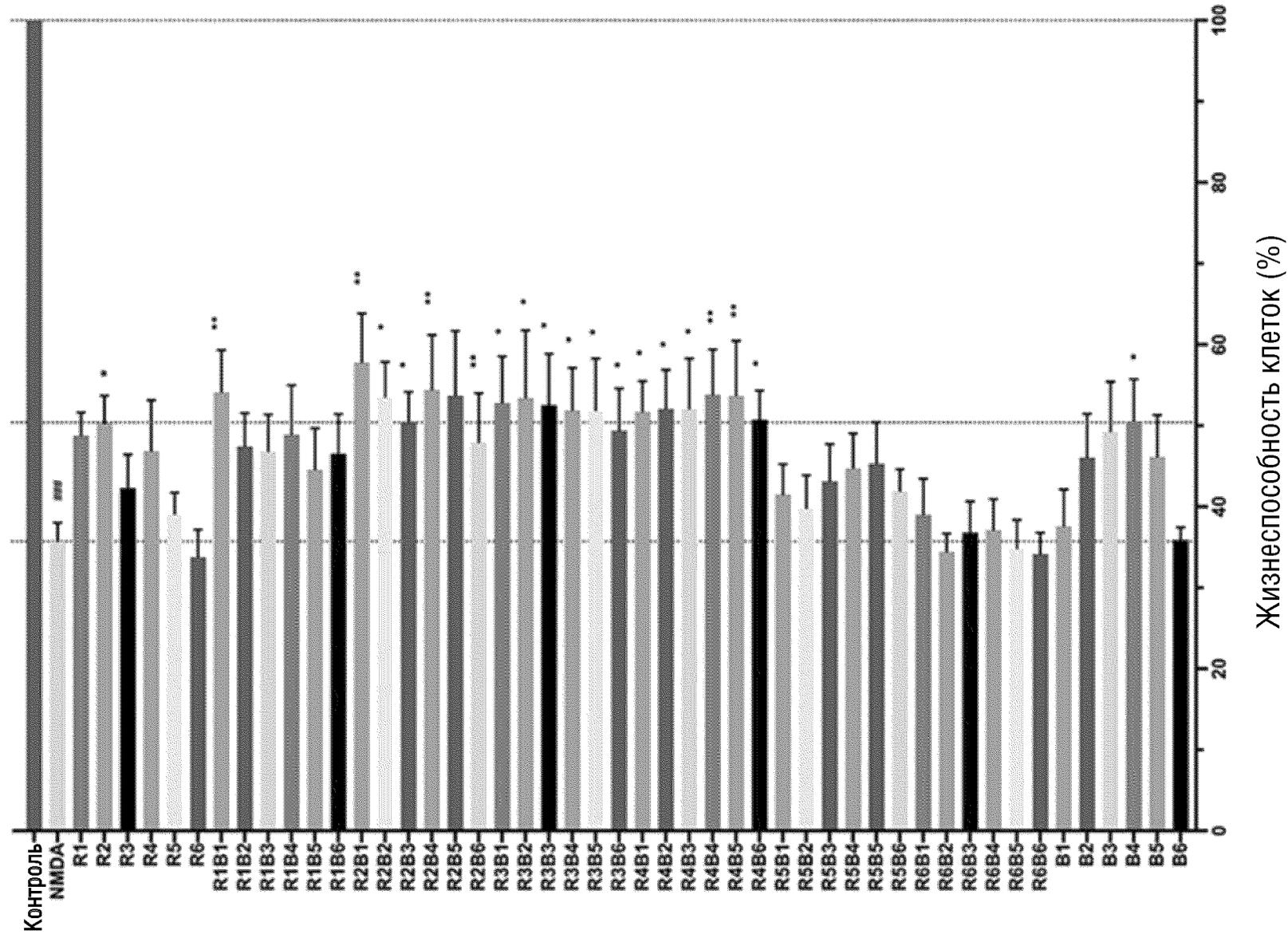
ФИГ.1



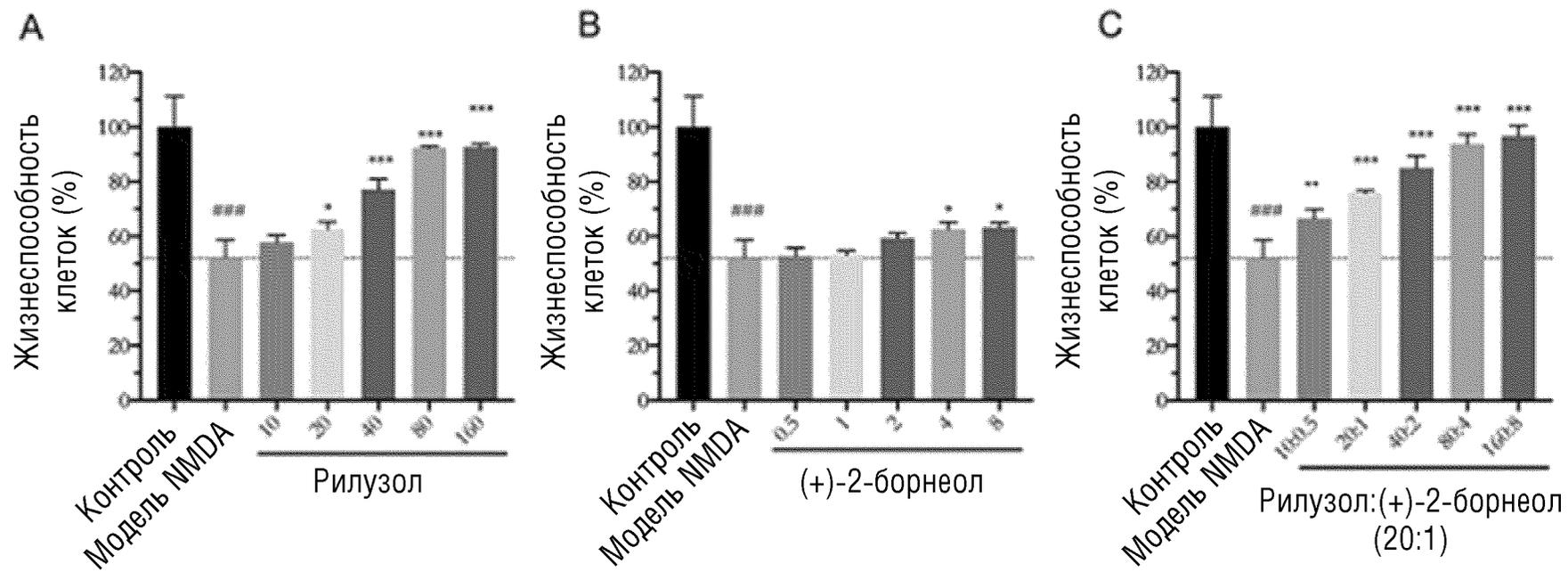
ФИГ.2



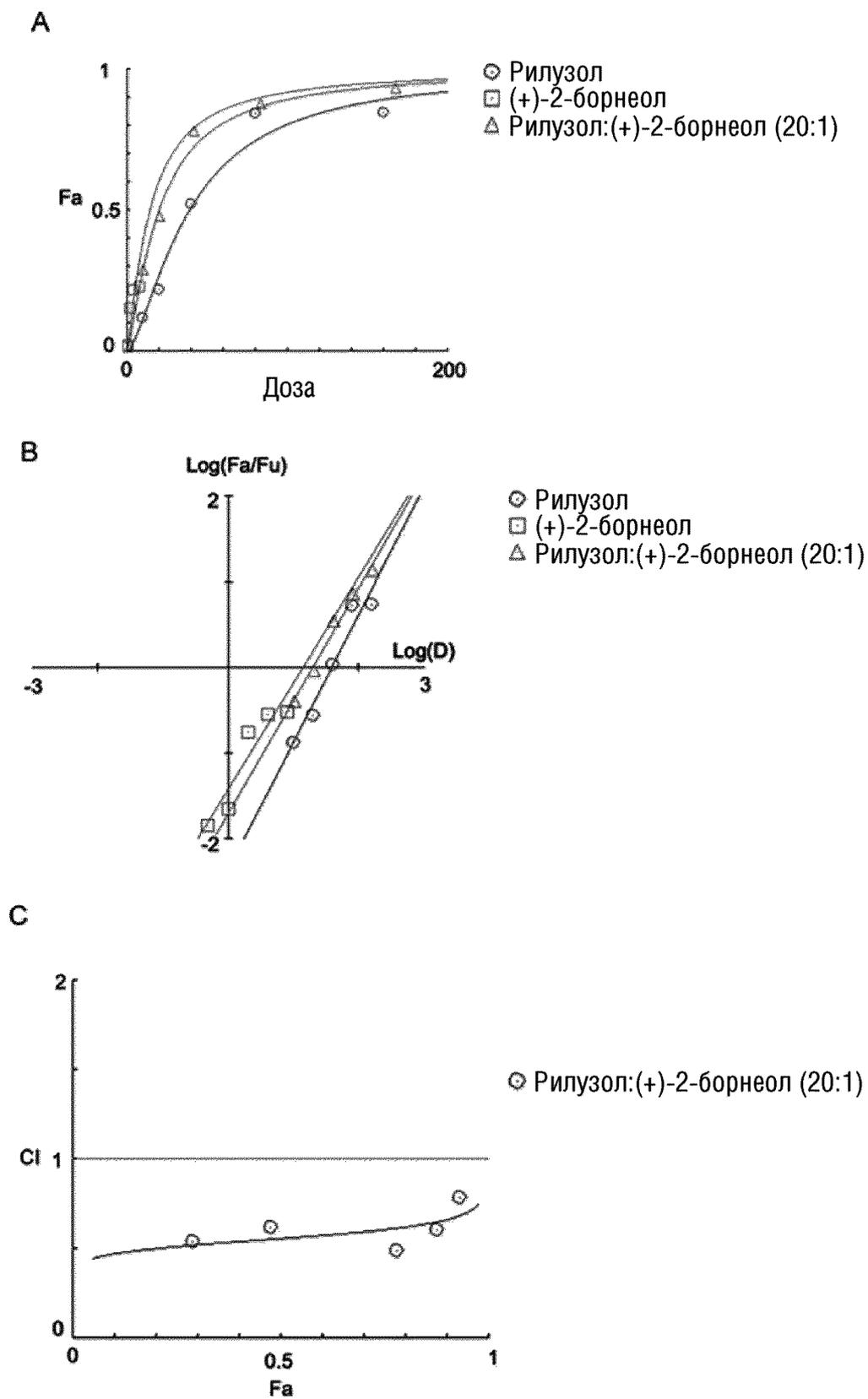
ФИГ.3



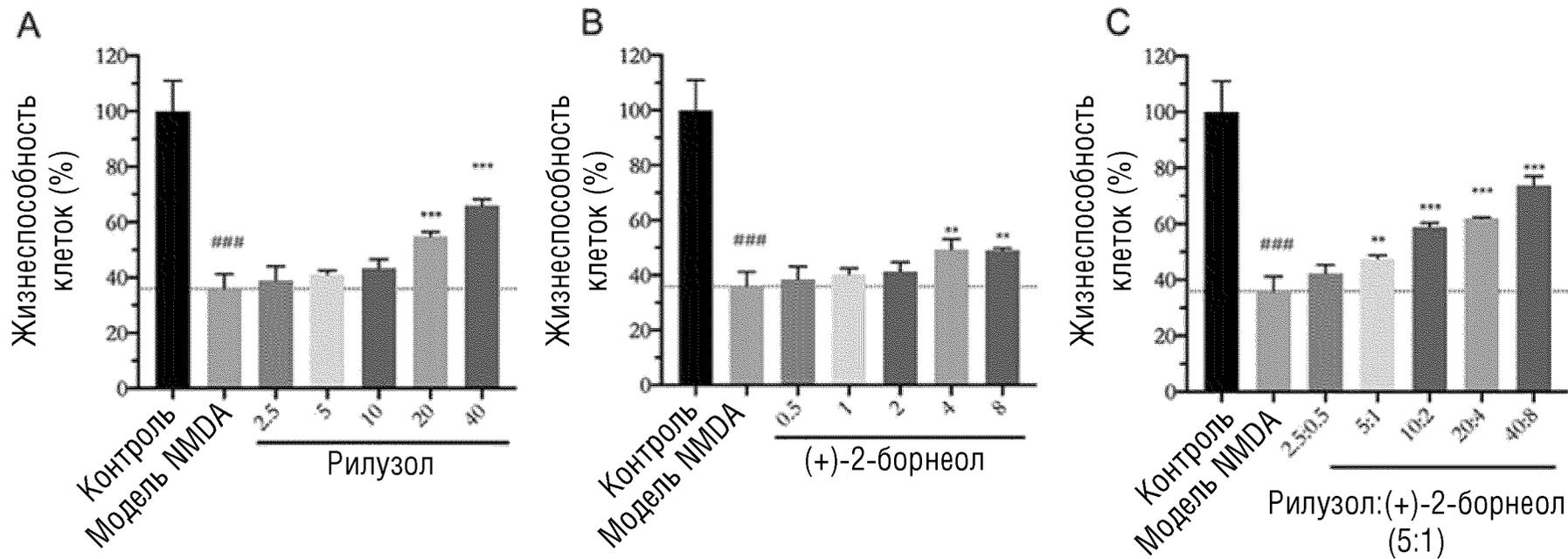
ФИГ.4



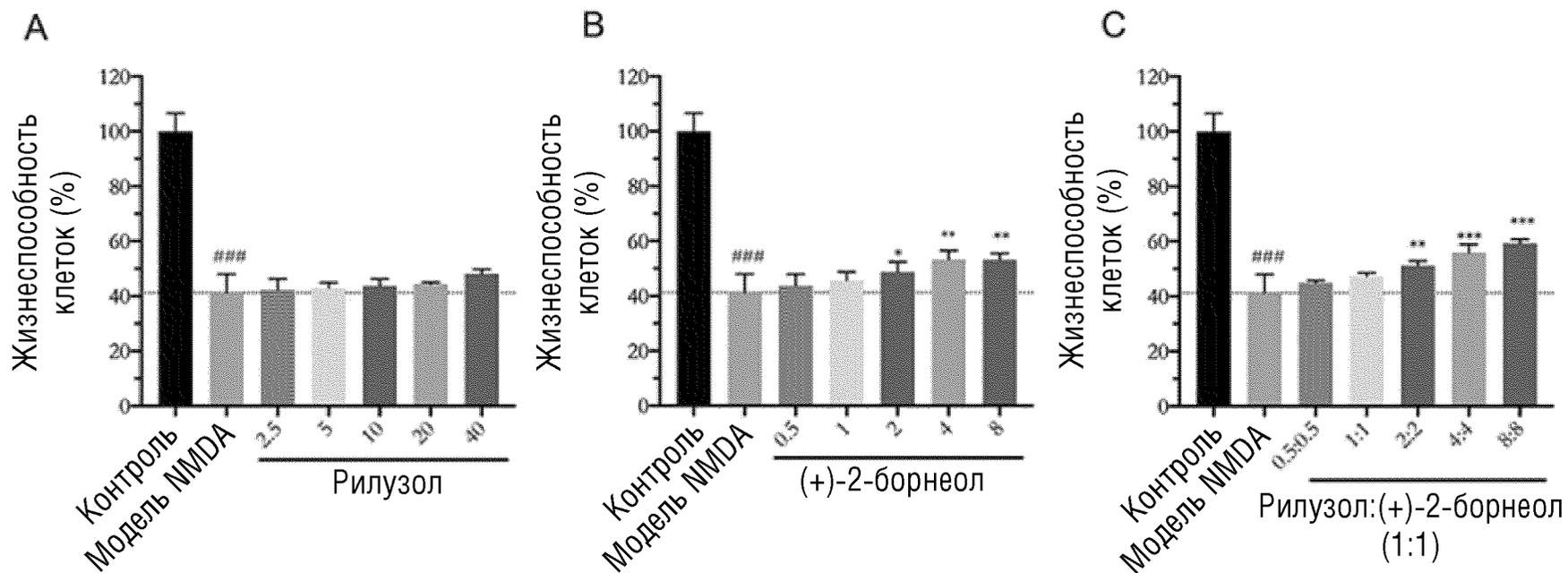
ФИГ.5



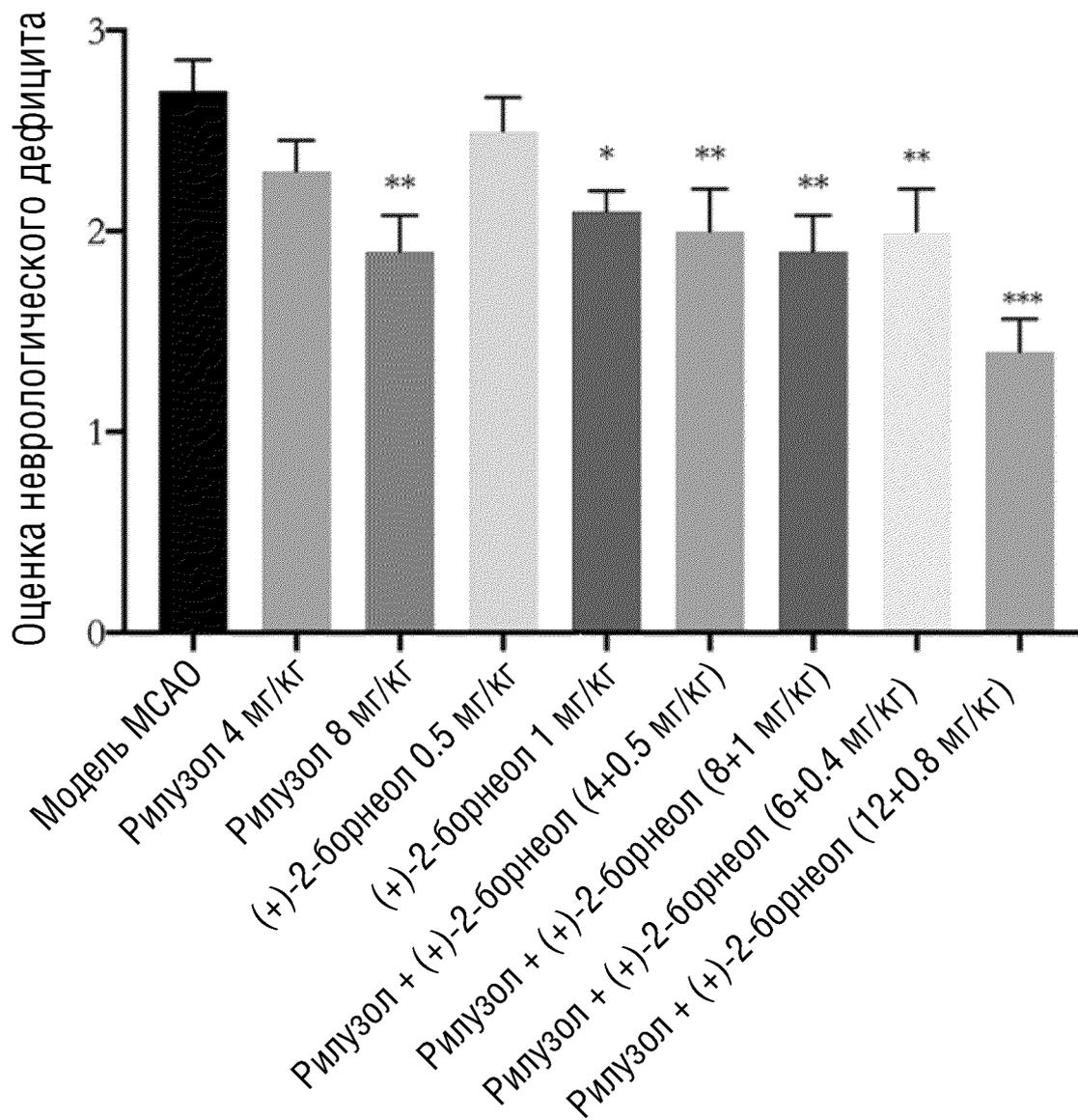
# ФИГ.6



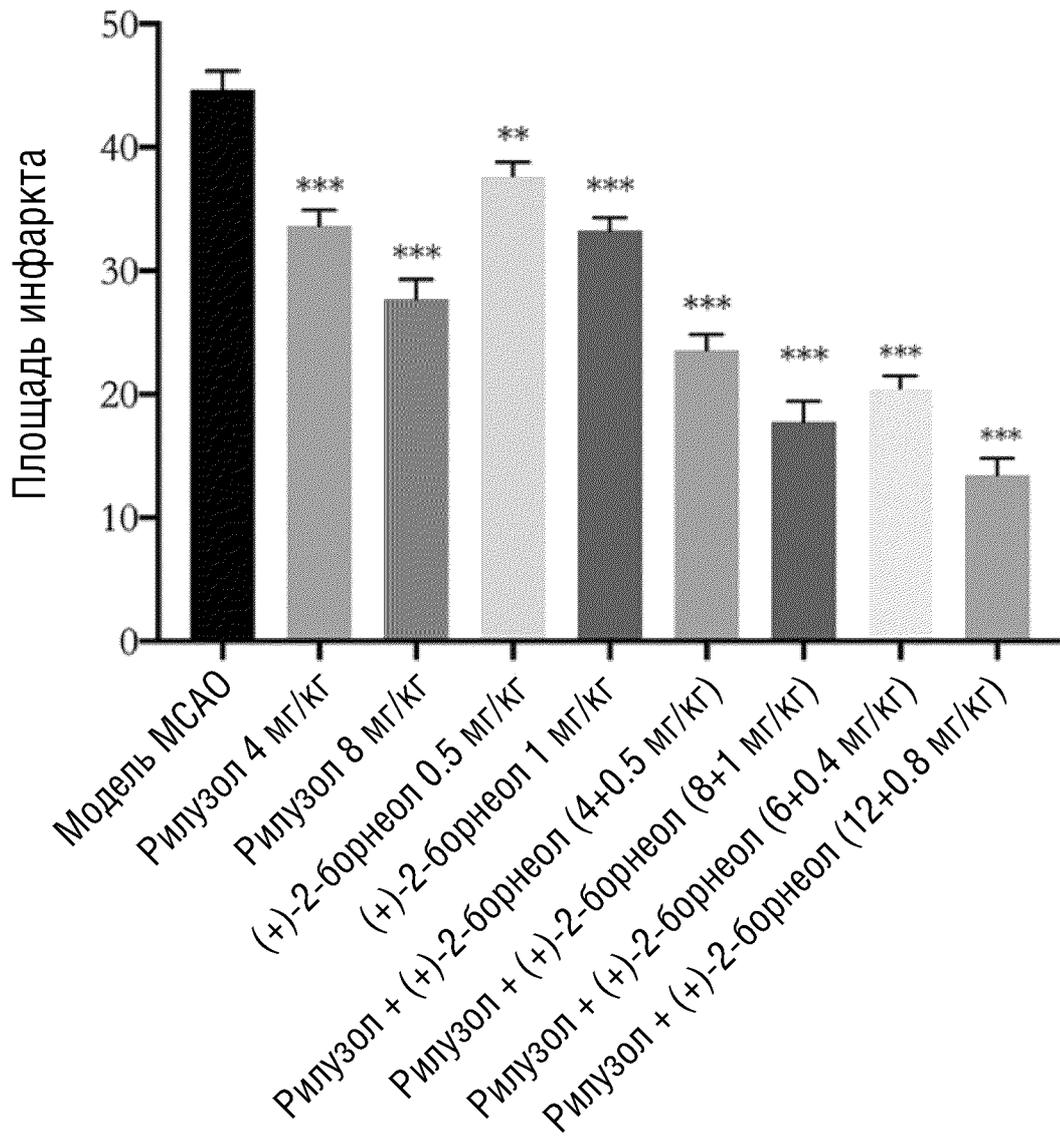
ФИГ.7



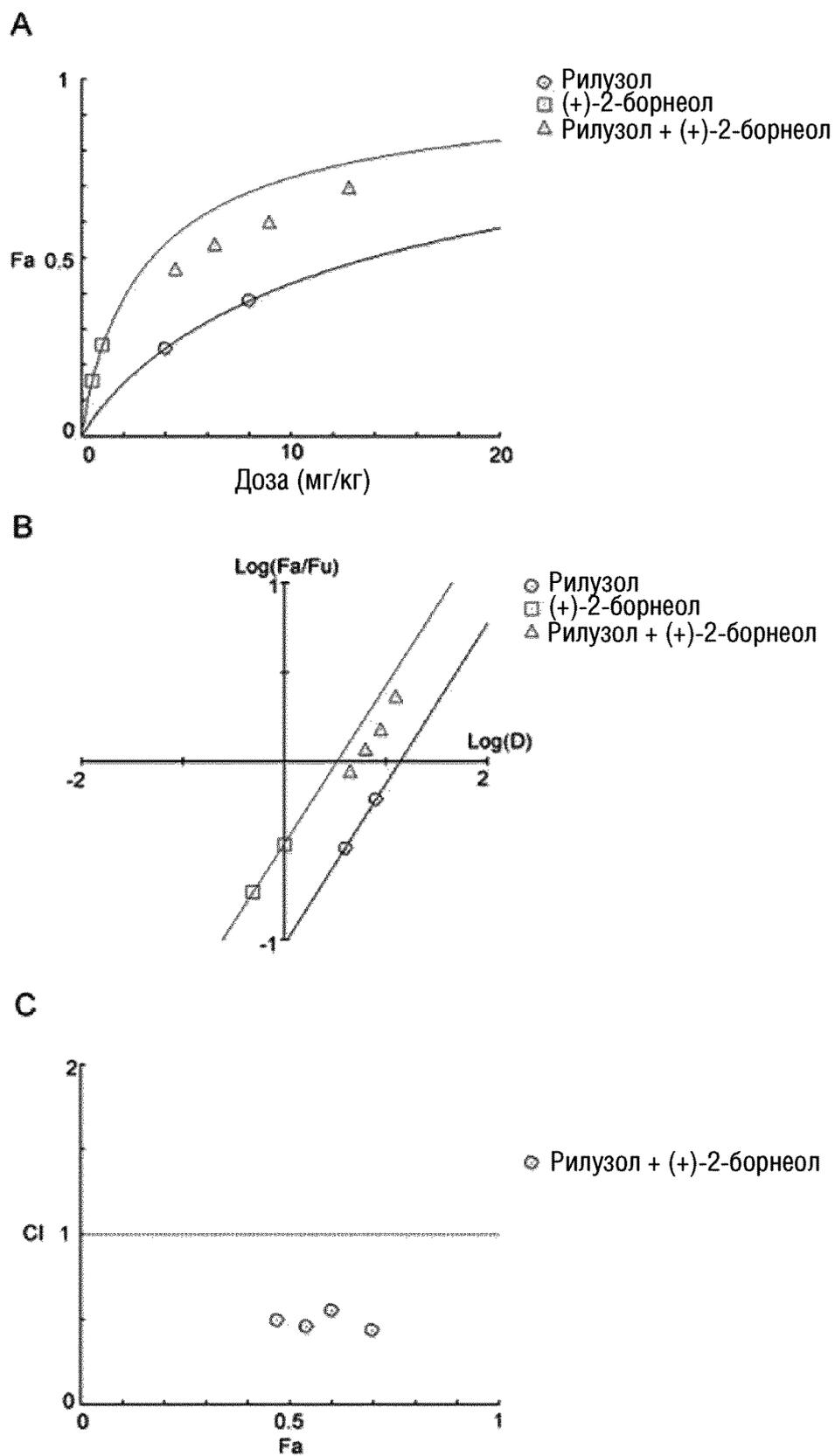
ФИГ.8



ФИГ.9



ФИГ.10



ФИГ.11

