

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202491208 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.04

(51) Int. Cl. *A61K 31/4152* (2006.01)
A61K 31/045 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.11.03

(54) ПРИМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ЭДАРАВОН И ДЕКСБОРНЕОЛ, В ОБЕСПЕЧЕНИИ УЛУЧШЕНИЯ ПРИ НАРУШЕНИИ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ ИЛИ ЕГО ЛЕЧЕНИИ

(31) 202111311631.1

(32) 2021.11.08

(33) CN

(86) PCT/CN2022/129456

(87) WO 2023/078325 2023.05.11

(71) Заявитель:

НЬЮРОДОН ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КО., ЛТД.; СИМСЕРЕ
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД (CN)

(72) Изобретатель:

Чжан Чжэнпин, Ван Лэй, Чэнь Жун,
Ян Шибao, Жэнь Цзиньшэн (CN)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Применение композиции в обеспечении улучшения при нарушении когнитивных функций или его лечении. Композиция содержит 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-он или его фармацевтически приемлемую соль и борнеол или дексборнеол. Нарушение когнитивных функций включает болезнь Альцгеймера (AD), сосудистую деменцию (VD), легкое нарушение когнитивных функций (MCI) и другие типы деменции.

A1

202491208

202491208

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581199EA/061

ПРИМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ЭДАРАВОН И ДЕКСБОРНЕОЛ, В ОБЕСПЕЧЕНИИ УЛУЧШЕНИЯ ПРИ НАРУШЕНИИ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ ИЛИ ЕГО ЛЕЧЕНИИ

Настоящая заявка испрашивает право приоритета по заявке на патент Китая № 202111311631.1, поданной в Национальное управление интеллектуальной собственности Китая 8 ноября 2021 года и озаглавленной "APPLICATION OF COMPOSITION CONTAINING EDARAVONE AND DEXBORNEOL IN IMPROVING OR TREATING COGNITIVE IMPAIRMENT", которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область техники

Настоящее изобретение принадлежит к области фармацевтики и относится к применению композиции с 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-оном или его фармацевтически приемлемой солью и борнеолом при лечении нарушения когнитивных функций.

Предпосылки изобретения

Деменция представляет собой синдром, в основе которого лежит приобретенное нарушение когнитивных функций, и она приводит к явному снижению повседневной активности, способности к обучению, трудоспособности и способности к социальной коммуникации пациентов. Нарушение когнитивных функций у пациентов затрагивает память, способность к обучению, ориентацию, понимание, способность к рассуждению, способность производить вычисления, речь, зрительно-пространственную функцию, а также способность к анализу и решению проблем и зачастую сопровождается психическими, поведенческими и личностными нарушениями на определенной стадии в ходе протекания заболевания. Деменция включает дегенеративную и недегенеративную деменцию, при этом дегенеративная деменция включает болезнь Альцгеймера (AD), деменцию с тельцами Леви (DLB), дегенерацию лобно-височных долей (FTLD) и т. д., а недегенеративная деменция включает сосудистую деменцию (VaD), нормотензивную гидроцефалию и деменцию, вызванную другими заболеваниями, такими как черепно-мозговая травма, инфекция, иммунные заболевания, опухоли, отравления и метаболические заболевания (Guidelines for the diagnosis and treatment of dementia and cognitive impairment in China (2018), National Medical Journal of China, 2018.98 (13), p: 965-970).

AD представляет собой нейродегенеративное заболевание, которое начинается медленно и постепенно ухудшается с течением времени, и в настоящее время является единственным заболеванием, для которого не существует лечения, предупреждения или даже задержки прогрессирования. AD заняла седьмое место среди десяти основных причин смерти в мире по заявлению WHO в 2020 году. Наиболее распространенным ранним симптомом AD является потеря кратковременной памяти (трудности при

запоминании недавних событий). По мере прогрессирования заболевания могут постепенно проявляться такие симптомы, как нарушение речи, дезориентация (в том числе способность легко заблудиться), эмоциональная нестабильность, потеря мотивации, неспособность заботиться о себе и поведенческие проблемы. По мере усугубления заболевания пациенты зачастую отстраняются от семьи и общества. Постепенно утрачиваются функции организма, что в конечном итоге приводит к смерти. Хотя течение заболевания варьируется среди людей, средняя ожидаемая продолжительность жизни после постановки диагноза составляет приблизительно 3-9 лет.

Согласно Всемирному отчету о болезни Альцгеймера за 2021 год, опубликованному Международной федерацией ассоциаций по борьбе с болезнью Альцгеймера, по состоянию на 2019 год в мире насчитывалось в общей сложности 55 миллионов пациентов с болезнью Альцгеймера. С учетом тенденции старения населения оценочное количество пациентов с AD во всем мире достигнет 78 миллионов к 2030 году и 129 миллионов к 2050 году. Китай вступил в стадию быстрого роста старения, и количество пожилых людей продолжает повышаться. К концу 2018 года количество пожилых людей в возрасте 60 лет и старше в Китае достигло 249 миллионов, что составляет 17,9% от общей численности населения, а количество пожилых людей в возрасте 65 лет и старше в Китае достигло 166 миллионов, что составляет 11,9% от общей численности населения. По данным национального эпидемиологического исследования психических заболеваний в Китае в 2017 году распространенность сенильной деменции среди пожилых людей в возрасте 65 лет и старше в Китае составляла 5,56% (*The Lancet Psychiatry*, 2019. 6(3): p. 211-224). Метаанализ последних лет продемонстрировал, что общая распространенность деменции среди людей в возрасте 60 лет и старше в Китае составляла 5,3%. Количество пациентов с деменцией в возрасте 60 лет и старше в Китае согласно оценкам составляет 10-11 миллионов, 60% из которых являются пациентами с AD (*The Lancet Neurology*, 2020. 19(1): p. 81-92.).

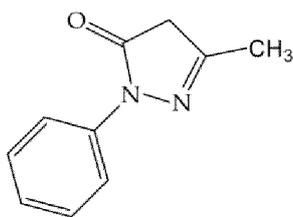
Пять "старых лекарственных средств" были одобрены FDA для облегчения определенных симптомов у пациентов с AD, в том числе четыре ингибитора холинэстеразы такрин (ушел с рынка по причине гепатотоксичности), донепезил, галантамин и ривастигмин, а также один антагонист NMDAR мемантин (*Molecules*, 2020. 25(24)). Кроме того, у пациентов с AD от легкой до умеренной степени когнитивную функцию улучшает Ganlutena Jiaonang (九期一®), GV-971, низкомолекулярный кислый олигосахарид), целенаправленно воздействующий на ось кишечник - головной мозг, который был условно одобрен NMPA в Китае в ноябре 2019 года (*First Approval. Drugs*, 2020. 80(4): p. 441-444). Адуканумаб (Aduhelm®), моноклональное антитело к A β), который был условно одобрен FDA 7 июня 2021 года, представляет собой лекарственное средство на основе моноклональных антител IgG1, целенаправленно воздействующее на растворимые и нерастворимые амилоидные белки A β , и его применяют для лечения пациентов с легким нарушением когнитивных функций или легкой степенью AD (*First Approval. Drugs*, 2021. 81(12): p. 1437-1443.). Однако в настоящее время ни одним из

одобренных лекарственных средств нельзя излечить AD, и существует острая клиническая потребность в лекарственных средствах для лечения AD, которые будут более эффективными и в большей степени способными задерживать прогрессирование заболевания.

3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-он (эдаравон) представляет собой низкомолекулярное соединение, способное захватывать свободные радикалы. На уровне *in vitro* (in vitro) эдаравон способен подавлять агрегацию мономера $A\beta_{1-42}$ в виде фибрилл $A\beta$ и дезагрегировать фибриллы $A\beta$ зависимым от концентрации образом в диапазоне концентраций от 0,156 до 5 мкМ; эдаравон способен снижать нейротоксичность $A\beta_{1-42}$ в отношении SH-SY5Y и первичных кортикальных нейронов, повышать жизнеспособность клеток и поддерживать рост нейритов. В клетках SY-SY5Y (SH-SY5Y-APP695), стабильно экспрессирующих белок APP695, эдаравон (0,3-3 мкМ) способен снижать экспрессию BACE1, расщепление APP и выработку $A\beta$ зависимым от концентрации образом, подавлять активацию GSK-3 β и снижать фосфорилирование тау-белка (Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(16): p. 5225-30). Кроме того, эдаравон способен снижать гибель первичных нейронов гиппокампа, индуцированную H_2O_2 и глутаматом, защищать синаптический рост нейронов и снижать перекисное окисление и эксайтотоксичность для нейронов (Neurotoxicology, 2021. **85**: p. 68-78). На уровне *in vivo* (in vivo) эдаравон способен улучшать когнитивную функцию в нескольких крысиных или мышинных моделях деменции и снижать уровни индикаторов окисления, нейровоспаление, образование бляшек $A\beta$, фосфорилирование тау-белка и т. д. в головном мозге. В крысиной модели деменции, индуцированной скополамином, пероральное введение эдаравона в дозе 15 мг/кг/день в течение 7 последовательных дней может уменьшать нарушения пространственного обучения и долговременной памяти, индуцированные скополамином (International Journal of Pharmacology, 2013. **9**(4): p. 271-276). В крысиной модели, в которой олигомеризованный $A\beta_{1-40}$ инъецируют в зубчатую извилину гиппокампа, внутримозговая инъекция $A\beta$ и одновременное введение эдаравона (5 мг/кг) в одно и то же место может значительно улучшить пространственное обучение и память у крыс в водном лабиринте, снизить уровень аддукта 4-гидрокси-2-ноненаля (4-HNE) в гиппокампе и восстановить повышенную активность ферментов AChE и ChAT в результате инъекции $A\beta$ (Neurological Sciences, 2015. **36**(11): p. 2067-2072). В крысиных моделях спорадической AD (SAD) с нарушениями обучения и памяти, индуцированными интрацеребровентрикулярной инъекцией STZ (ICV-STZ), после моделирования с использованием ICV-STZ внутрибрюшинное введение эдаравона в дозе 9 мг/кг/день в течение 14 последовательных дней может значительно улучшить пространственное обучение и память (по результатам теста в водном лабиринте Морриса) и непространственную долговременную память (по результатам ступенчатого теста пассивного избегания) у модельных крыс с ICV-STZ, а также может существенно восстановить уровни различных индикаторов окислительного стресса в гиппокампе и коре головного мозга, измененные в результате моделирования с использованием STZ, в том

числе малонового диальдегида (MDA), аддуктов 4-HNE, OH, карбонила белков (PC), H₂O₂, супероксиддисмутазы (SOD), восстановленного глутатиона (GSH), глутатионпероксидазы (GPx) (NeuroToxicology, 2013. **38**: р. 136-145). Кроме того, пероральное введение эдаравона (1, 3 и 10 мг/кг/день) в течение 28 последовательных дней может также улучшить когнитивную функцию у крыс с ICV-STZ в тесте в водном лабиринте и тесте пассивного избегания, а также снизить окислительный стресс, холинергическую дисфункцию и воспаление, инициированные STZ, в головном мозге (Eur J Neurosci, 2017. **45**(7): р. 987-997). В мышинной модели нарушения когнитивных функций, индуцированного AlCl₃/D-галактозой, внутрибрюшинное введение эдаравона в течение 15 последовательных дней значительно улучшает когнитивную функцию по результатам теста в водном лабиринте и ступенчатого теста (Neurotoxicology, 2021. **85**: р. 68-78). Кроме того, в крысиной модели сосудистой деменции, индуцированной L-метионином, внутрибрюшинное введение эдаравона в дозе 6 мг/кг/день в течение 9 последовательных недель может значительно улучшить пространственное обучение и память у модельных крыс в тесте в водном лабиринте с восемью рукавами (Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2020. **393**(7): р. 1221-1228). В модели на трансгенных по APP/PS1 мышах как профилактическое введение (мышам в возрасте от 3 до 9 месяцев), так и терапевтическое введение (мышам в возрасте от 9 до 12 месяцев) эдаравона в дозе 12,6 мг/кг (внутрибрюшинная инъекция два раза в неделю) могут обеспечивать улучшение при дефицитах когнитивной функции в тесте в водном лабиринте и уменьшить отложение бляшек Аβ, потерю нейронов и синапсов, нейровоспаление, фосфорилирование тау-белка (pSer396, pSer262, pSer199 и pThr231), окислительный стресс и т. д. в головном мозге. Также, исходя из пероральной биодоступности эдаравона (38%) у мышей, пероральное введение (введение с питьевой водой) в дозе 33,2 мг/кг/день мышам (в возрасте 3-12 месяцев) также может уменьшить отложение бляшек Аβ в головном мозге и улучшить когнитивную функцию у мышей (Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(16): р. 5225-30). Кроме того, пероральное введение эдаравона (8, 24 и 72 мг/кг/день, введение с питьевой водой) пожилым мышам с APP/PS (в возрасте от 14 до 17 месяцев) значительно улучшает когнитивную функцию у пожилых трансгенных мышей (Drug Design, Development and Therapy, 2018. Volume 12: р. 2111-2128). В модели лобно-височной деменции (FTD) у трансгенных по тау-белку P301L мышей пероральное введение (введение с питьевой водой) эдаравона в дозе 24 мг/кг/день в течение 3 последовательных месяцев трансгенным мышам в возрасте от 9 до 10 месяцев и в возрасте 21 месяца может значительно улучшить когнитивную функцию у животных в тесте в водном лабиринте и в тесте на распознавание новых объектов, обеспечить улучшение при двигательных дефицитах у животных и уменьшить выработку аддуктов 4-HNE и 3-NT, фосфорилирование тау-белка и нейровоспаление в ткани головного мозга (DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-306628/v1>).

Химическая структурная формула эдаравона имеет следующий вид:

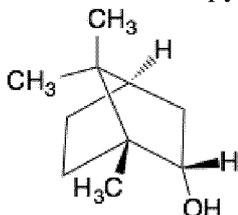


Эдаравон

(Молекулярная формула: $C_{10}H_{10}N_2O$; молекулярная масса: 174,20)

Дексборнеол ((+)-борнеол) является основным компонентом (Китайская фармакопея издания 2020 года определяет, что содержание дексборнеола в природном борнеоле составляет не менее 96%) природного борнеола, представляет собой бициклическое монотерпеноидное соединение и присутствует в эфирных маслах многих китайских лекарственных препаратов растительного происхождения. Дексборнеол может регулировать сигнальные пути NF- κ B и p38, подавлять воспалительный процесс нейровоспаления и уменьшать уровень множества провоспалительных факторов (TNF- α , IL-1 β и т. д.) и воспалительных белков (iNOS и COX-2) в головном мозге (Eur J Pharmacol, 2014. **740**: p. 522-31; Eur J Pharmacol, 2017. **811**: p. 1-11). Кроме того, дексборнеол может оказывать агонистическое действие на ингибирующие рецепторы GABA $_A$ и регулировать нарушение возбудимости нейронов (Front Pharmacol, 2021. **12**: p. 606682).

Химическая структурная формула дексборнеола имеет следующий вид:



Дексборнеол

(Молекулярная формула: $C_{10}H_{18}O$; молекулярная масса: 154,25)

Неклинические эксперименты на животных указывают на то, что комбинация 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-она и дексборнеола (массовое соотношение от 4 : 1 до 1 : 1) может синергически уменьшать размер церебрального инфаркта (выданный патент CN 101848711 B) и обеспечивать улучшение при боковом амиотрофическом склерозе (ALS) (выданный патент CN 107613976 B). При исследовании и разработке новых лекарственных средств для лечения инсульта концентрированный раствор эдаравона и дексборнеола для инъекции (комбинация 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-она и дексборнеола в массовом соотношении 4 : 1) был одобрен NMPA в 2020 году для лечения ишемического инсульта; подъязычная таблетка Y-2 (комбинация 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-она и дексборнеола в массовом соотношении 5 : 1) прошла исследование III фазы в Китае (Китайский реестр клинических испытаний, № CTR20210233) и исследование I фазы в США (*ClinicalTrials.gov*, NCT03495206).

В свете предшествующего уровня техники невозможно спрогнозировать, окажет ли комбинация 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-она и дексборнеола терапевтический эффект

на деменцию и связанное с ней нарушение когнитивных функций, а также невозможно вынести суждение о том, сможет ли существующая комбинация 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-она и дексборнеола производить синергический эффект.

Сущность изобретения

Целью настоящего изобретения является обеспечение применения фармацевтической композиции при получении лекарственного средства для обеспечения улучшения при нарушении когнитивных функций или его лечения, где фармацевтическая композиция содержит 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-он (эдаравон) или его фармацевтически приемлемую соль и борнеол.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение применения фармацевтической композиции для обеспечения улучшения при нарушении когнитивных функций или его лечения, где фармацевтическую композицию, содержащую 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-он или его фармацевтически приемлемую соль и борнеол, вводят пациенту, нуждающемуся в этом.

Дополнительной целью настоящего изобретения является получение фармацевтической композиции, где композицию применяют для лечения нарушения когнитивных функций, и композиция содержит 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-он или его фармацевтически приемлемую соль и борнеол.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение применения 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-она или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с природным борнеолом при лечении нарушения когнитивных функций.

Более того, применение 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-она или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с борнеолом в фармацевтической композиции способно синергически увеличивать эффективность лечения нарушения когнитивных функций.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нарушение когнитивных функций представляет собой болезнь Альцгеймера (AD), сосудистую деменцию (VD), легкое нарушение когнитивных функций (MCI) и другие типы деменции; предпочтительно нарушение когнитивных функций представляет собой болезнь Альцгеймера, сосудистую деменцию и легкое нарушение когнитивных функций.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция способна улучшать когнитивную функцию у пациентов с болезнью Альцгеймера.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция способна восстанавливать долговременную потенцию (LTP) в гиппокампе и восстанавливать функцию синапсов в гиппокампе головного мозга у пациентов с болезнью Альцгеймера.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция способна обеспечивать улучшение при патологических проявлениях болезни Альцгеймера, в том числе амилоидных бляшках, астроглиозе, микроглиозе и

гиперфосфорилировании тау-белка.

В композиции по настоящему изобретению весовое соотношение 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-она или его фармацевтически приемлемой соли и борнеола составляет от 10 : 1 до 1 : 8; предпочтительно от 7,5 : 1 до 2,5 : 1; более предпочтительно 5 : 1 или 4 : 1.

Борнеол по настоящему изобретению предпочтительно представляет собой природный борнеол, который также известен как дексборнеол.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Вспомогательное вещество обычно представляет собой фармакологически неактивное вещество, составленное с активным фармацевтическим ингредиентом ("API") для лекарственного лечения. При получении лекарственных форм вспомогательные вещества зачастую применяются для увеличения объема препаратов, содержащих эффективные активные ингредиенты (поэтому их зачастую называют "сухими разбавителями", "наполнителями" или "жидкими разбавителями"), для обеспечения удобного и точного дозирования нерасфасованных лекарственных средств. Они также могут служить различным целям усиления терапевтического эффекта, таким как способствование всасыванию или растворению лекарственного средства или другие фармакодинамические соображения.

Более конкретно, композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в виде фармацевтической композиции либо в отдельности, либо в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем и могут быть составлены в виде препарата в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной форме, такой как таблетка, капсула, порошок, гранула, мазь, раствор, суппозиторий, форма для инъекции, форма для ингаляции, гель, микросфера и аэрозоль. Таким образом, введение соединения можно осуществлять различными способами, в том числе путем перорального введения, трансбуккального введения, ректального введения, парентерального введения, внутрибрюшинного введения, внутрикожного введения, трансдермального введения, внутривенного введения, внутрисуставного введения и т. д. Действующее вещество после введения может оказывать системное действие или может оказывать локальное действие при использовании регионарного введения или интрамурального введения или при использовании имплантата, который поддерживает активную дозу в месте имплантации.

Комбинированная терапия, применяемая в настоящем изобретении, может позволить снизить дозу при каждой монотерапии в сравнении с дозами, применяемыми в настоящее время при стандартных операциях, при этом достигается значительная эффективность, в том числе эффективность, превышающая эффективность, достигаемую при традиционном применении любой монотерапии. Специалисты в данной области без труда поймут, что уровни доз могут варьироваться в зависимости от конкретного соединения, тяжести симптомов и восприимчивости субъекта к побочным эффектам. Некоторые конкретные соединения более эффективны, чем другие. Предпочтительная

доза определенного соединения может быть легко определена специалистом в данной области различными способами. Предпочтительным способом является измерение физиологической эффективности определенного соединения. Применение комбинированной терапии может позволить снизить дозу при каждой монотерапии в сравнении с дозами, применяемыми в настоящее время при стандартных операциях, при этом достигается значительная эффективность, в том числе эффективность, превышающая эффективность, достигаемую при традиционном применении любой монотерапии.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Защита от индуцированного $A\beta_{1-42}$ повреждения нейронов с помощью композиции с эдаравоном и дексборнеолом.

Фиг. 2. Улучшение когнитивной функции пространственного обучения и памяти у модельных крыс с ICV-STZ с помощью композиции с эдаравоном и дексборнеолом.

Фиг. 3. Эффект композиции с эдаравоном и дексборнеолом в отношении когнитивной функции у трансгенных мышей с AD в тесте в водном лабиринте.

Фиг. 4. Эффект композиции с эдаравоном и дексборнеолом в отношении когнитивной функции у трансгенных мышей с AD в тесте в Y-образном лабиринте.

Фиг. 5. Эффект композиции с эдаравоном и дексборнеолом в отношении электрофизиологических характеристик срезов головного мозга у трансгенных мышей с AD.

Фиг. 6. Эффект композиции с эдаравоном и дексборнеолом в отношении связанной с AD патологии в головном мозге трансгенных мышей 5×FAD.

Подробное описание вариантов осуществления

Представленные далее примеры предназначены для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение. Упомянутый в примерах эдаравон представляет собой 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-он.

Пример 1. Защита от индуцированного $A\beta_{1-42}$ повреждения первичных кортикальных нейронов с помощью композиции с эдаравоном и дексборнеолом

1. Материалы и способы

1.1. Животные

Беременные крысы SD, Shanghai SLAC laboratory Animal Co., Ltd. (номер лицензии на производство: SCXK (Shanghai) 2017-0005)

1.2. Реагенты и расходные материалы

Название	№ по каталогу/№ партии	Производитель
Neurobasal	21103-049	Gibco
B27	17504-044	Gibco
GlutaMax	2110349	Gibco
CellTiter-Glo	G7571	Promega
Полилизин (PDL)	P6407	Sigma

DMEM	11995-040	Gibco
DMEM без глюкозы	1763966	Gibco
Пенициллин и 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
Эдаравон	/	Simcere Pharmaceutical Co., Ltd.
Дексборнеол	KC20171205-1-2	Jiangsu Simovay Pharmaceutical Co., Ltd.
Набор для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellCounting-Lite 2.0	Партия 7E322D9	Nanjing Vazyme Medical Technology Co., Ltd.

1.3. Получение первичных кортикальных нейронов

Беременную крысу SD при сроке беременности 18 дней умерщвляли путем цервикальной дислокации, матку крысы иссекали, головной мозг плода крысы E18 извлекали, ткань коры головного мозга плода крысы выделяли в ледяную среду DMEM, мозговую оболочку и кровеносные сосуды удаляли из кортикальной ткани под препаровальным микроскопом, кортикальную ткань переносили в ледяную DMEM и измельчали (до размера приблизительно 1 мм^3), а также расщепляли трипсином при 37°C в течение 10 мин., расщепление завершали с помощью FBS, использовали пипетку Пастера для осуществления аккуратного пипетирования и диспергирования, а затем проводили просеивание с использованием сита на 200 меш. Отфильтрованную клеточную суспензию переносили в центрифужную пробирку на 15 мл и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин. После отбрасывания надсадочной жидкости путем отсасывания клеточную массу на дне центрифужной пробирки осторожно пипетировали и диспергировали с полной средой (Neurobasal+B27+GlutaMax+1% P/S), предварительно нагретой при 37°C . Клетки подсчитывали с помощью гемоцитометра, разводили до 5×10^5 клеток/мл полной средой и высевали в 96-луночный планшет, покрытый PDL (100 мкл/лунка), для культивирования. На следующий день половину среды заменяли полной средой. Клетки культивировали *in vitro* до дня 11, когда нейроны дифференцировались и созревали для теста в условиях недостаточности кислорода и глюкозы.

1.4. Тест индуцированного $\text{A}\beta_{1-42}$ нарушения возбудимости первичных кортикальных нейронов

Среду для созревших *in vitro* первичных нейронов заменяли полной средой,

содержащей различные концентрации (1,2, 3,7, 11,1, 33,3, 100,0 мкМ) эдаравона (E), дексборнеола (B) или композиции с эдаравоном и дексборнеолом (EB), после инкубации при 37°C в течение 30 мин. добавляли олигомеризованный A β ₁₋₄₂ (конечная концентрация 50 мкМ), культивирование продолжали в течение 24 ч., и тестировали жизнеспособность нейронов. Жизнеспособность клеток у первичных нейронов тестировали с помощью набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток. Реагент добавляли в количестве 100 мкл/лунка в соответствии с инструкциями и встряхивали в течение 10 мин., величину хемилюминесценции (LUM) считывали с помощью многофункционального микропланшет-ридера SpectraMax i3X (Molecule Device), и рассчитывали относительную жизнеспособность нейронов. Формула расчета: Относительная жизнеспособность нейронов V (%)=(LUM - LUM_{фоновая})/(LUM_{нормальная контрольная группа} - LUM_{фоновая группа}) × 100%. LUM_{фоновая} представляет собой фоновый считываемый показатель в лунке с бесклеточной средой, в которую добавлены реагенты набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток.

Таблица 1. Ортогональная структура композиции с эдаравоном и дексборнеолом

DMSO	E1	E2	E3	E4	E5
B1	E1B1	E2B1	E3B1	E4B1	E5B1
B2	E1B2	E2B2	E3B2	E4B2	E5B2
B3	E1B3	E2B3	E3B3	E4B3	E5B3
B4	E1B4	E2B4	E3B4	E4B4	E5B4
B5	E1B5	E2B5	E3B5	E4B5	E5B5

Примечания: E означает эдаравон, B означает дексборнеол, EхВу означает композицию с эдаравоном и дексборнеолом, данные х/у 1-5 представляют собой концентрации соединений 1,2, 3,7, 11,1, 33,3 и 100,0 мкМ соответственно. Для лекарственных средств в каждой лунке готовили по 5 повторных лунок (n=5). Все соединения сначала растворяли в DMSO, и конечная концентрация DMSO в среде составляла 0,2%.

1.5. Статистический анализ данных

Различия между двумя группами анализировали с помощью нескорректированного критерия LSD Фишера после проведения однофакторного ANOVA с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad). P < 0,05 указывало на значимое различие. #p < 0,05, ####p < 0,0001: сравнение между группой Eх или группой Ву и группой DMSO; **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001: значимое различие как между группой EхВу и группой Eх, так и между группой EхВу и группой Ву.

2. Результаты экспериментов

Олигомеризованный A β ₁₋₄₂ приводил к снижению жизнеспособности клеток у первичных нейронов. Перед индукцией посредством A β ₁₋₄₂ предварительная инкубация, а затем введение эдаравона (3,7-100 мкМ) или дексборнеола (1,2-100 мкМ) были способны подавлять индуцированную A β нейротоксичность зависимым от концентрации образом,

увеличивая жизнеспособность клеток. Ортогональная композиция, содержащая различные концентрации (1,2, 3,7, 11,1, 33,3 и 100,0 мкМ) эдаравона и различные концентрации (1,2, 3,7, 11,1, 33,3 и 100,0 мкМ) дексборнеола, была способна подавлять индуцированное А β повреждение нейронов, в частности, защитные эффекты композиций E5B4 (3,3 : 1), E5B3 (9 : 1), E4B5 (1 : 3,3), E4B4 (1 : 1), E4B3 (3,3 : 1), E3B5 (1 : 9), E3B4 (1 : 3,3), E3B3 (1 : 1), E3B2 (3,3 : 1), E3B1 (9 : 1) и E2B2 (1 : 1) значительно превосходили эффекты соответствующих отдельных компонентов (Ошибка! Источник ссылки не найден). Поэтому предварительно было определено, что композиция с эдаравоном и дексборнеолом в диапазоне молярного соотношения от 9 : 1 до 1 : 9 (массового соотношения от 10 : 1 до 1 : 8) оказывала синергический эффект.

Пример 2. Улучшение когнитивной функции у крыс с деменцией, индуцированной интрацеребровентрикулярным введением STZ, с помощью композиции с эдаравоном и дексборнеолом

1. Экспериментальные материалы

1.1. Экспериментальные животные

Крысы линии Wistar, самцы, масса тела 250-300 г, 110 крыс, чистая линия, предоставлены Shanghai SLAC laboratory Animal Co., Ltd., номер лицензии: SCXK (Shanghai) 2012-0002. До и после операции осуществляли традиционное кормление, температуру в помещении поддерживали на уровне 23°C-25°C, и крысы имели свободный доступ к пище и воде.

1.2. Инструментарий для эксперимента

Водный лабиринт Морриса (программное обеспечение для анализа TopScan Lite 2.0, Clever Systems); стереотаксическое устройство для исследования головного мозга крысы (модель 51600, Stoeling); аналитические весы (модель AL104, Mettler Toledo).

1.3. Тестируемые лекарственные средства

Эдаравон в форме для инъекции (必存®), активный ингредиент: 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-он. Композиции с эдаравоном и дексборнеолом (весовые соотношения 7,5 : 1, 5 : 1 и 2,5 : 1), которые были готовы к применению, при этом контроль в виде растворителя представлял собой 8% пропиленгликоль.

2. План эксперимента

2.1. Разделение на экспериментальные группы и введение

Экспериментальных животных разделяли на 5 групп: группа с имитацией операции, модельная группа, группа эдаравона (6 мг/кг), композиция с эдаравоном и дексборнеолом (7,5 : 1) (6 мг/кг эдаравона, 0,8 мг/кг дексборнеола), с композиция с эдаравоном и дексборнеолом (5 : 1) (6 мг/кг эдаравона, 1,2 мг/кг дексборнеола) и композиция с эдаравоном и дексборнеолом (2,5 : 1) (6 мг/кг эдаравона, 2,4 мг/кг дексборнеола). Животным в модельной группе и группах с имитацией операции давали соответствующий объем холостого растворителя (8% пропиленгликоль), все введения представляли собой введения путем внутрибрюшинной инъекции, а объем введения составлял 10 мл/кг.

2.2. Процедуры эксперимента

В дополнение к группе с имитацией операции животных с успешной операцией случайным образом распределяли в модельную группу и группы введения по порядку. В соответствии с описанным выше принципом установки доз животным в каждой группе давали соответствующее лекарственное средство внутривенно через 4 часа после операции, а затем давали лекарственное средство один раз в день в течение 14 последовательных дней. Тест в водном лабиринте Морриса начинали в день 15. В ходе теста в водном лабиринте Морриса животным давали лекарственное средство один раз в день перед тестом до окончания эксперимента в целом. Животных в каждой группе подвергали тесту в водном лабиринте, а тестируемыми индикаторами были латентность спасения на скрытую платформу и время пребывания в квадранте исходной платформы после ее удаления.

3. Экспериментальные способы

3.1. Получение крысиной модели деменции, индуцированной билатеральным интрацеребровентрикулярным введением стрептозотоцина (STZ)

После анестезии крысу фиксировали в положении лежа на животе на стереотаксическом устройстве, выполняли дорсальный срединный разрез шеи, обнажая череп, и если взять брегму за точку отсчета, точка инъекции в боковой желудочек находилась на 0,8 мм кзади от брегмы и на 1,5 мм латеральнее брегмы при глубине введения иглы 3,6 мм. В течение 1 мин. в боковые желудочки с двух сторон с помощью микроинъектора инъецировали соответственно 10 мкл STZ (приготовленного с искусственной спинномозговой жидкостью), а иглу удерживали в течение 3 мин. После инъекции кожу зашивали. Доза в первый день составляла 1,5 мг/кг, способ инъекции STZ из первого дня повторяли на третий день, а общая доза инъецируемого STZ составляла 3 мг/кг. В группе с имитацией операции в боковые желудочки животных с двух сторон инъецировали равный объем искусственной спинномозговой жидкости.

3.2. Тест в водном лабиринте Морриса

Бассейн с водным лабиринтом Морриса имел диаметр 160 см, высоту 50 см и глубину воды 29 см. Платформа имела диаметр 12 см, высоту 27 см и закреплялась на глубине 2 см ниже поверхности воды в SE-квадранте (целевой квадрант). Над центром бассейна на расстоянии 2 м от дна бассейна размещали объектив камеры для синхронной регистрации траекторий движения крыс. Температуру воды поддерживали на уровне $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Эксперимент длился в общей сложности 5 дней, включая испытание со скрытой платформой и испытание с обследованием. Первые 4 дня были отведены для испытания со скрытой платформой, а последний 1 день был отведен для испытания с обследованием.

(1) Испытание со скрытой платформой

Данное испытание длилось 4 дня. Во время испытания платформу фиксировали в целевом квадранте (SE-квадранте), вход в воду осуществлялся из точек входа в воду в четырех квадрантах соответственно, во время тренировки животных осторожно помещали в воду мордочкой к знаку на стенке бассейна, регистрировали время (латентность

спасения), в течение которого животное находило платформу, а затем животному позволяли оставаться на платформе в течение 10 с. Если животное не находило платформу в течение 90 с, латентность регистрировали как 90 с, и животное отправляли к платформе и давали оставаться на ней в течение 10 с. После завершения тренировки крыс помещали обратно в клетки для молодняка и содержали в тепле. Каждый день тренировку проводили один раз в каждой из 4 точек входа в воду, и для статистического анализа использовали среднее значение 4 показателей латентности в качестве эффективности за данный день. Каждый день порядок точек входа в воду для каждого животного сохраняли единообразным, но порядок входа в воду для разных животных в одной и той же клетке был разным, чтобы исключить обмен информацией между животными в группе.

(2) Испытание с обследованием

Через 24 ч. после завершения испытания со скрытой платформой платформу удаляли. Затем осуществляли вход в воду из точки входа в воду, противоположной платформе, регистрировали путь плавания крыс в течение 120 с и проводили статистический анализ времени пребывания крыс в целевом квадранте. За животными наблюдали в отношении их способности к определению местоположения в пространстве и закономерности изменений в ходе обследования.

3.3. Статистический анализ данных

Данные выражали как среднее значение \pm SEM. Статистический анализ между группами проводили с помощью программного обеспечения Prism (GraphPad, США). Для сравнения двух или более групп использовали однофакторный или двухфакторный ANOVA, а затем для анализа был выбран критерий LSD Фишера. $P < 0,05$ указывало на значимое различие. ##### $p < 0,0001$: сравнение с группой с имитацией операции; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$: сравнение с модельной группой; & $p < 0,05$, && $p < 0,01$: сравнение между двумя указанными группами.

4. Результаты экспериментов

В испытании со скрытой платформой в водном лабиринте по сравнению с группой с имитацией операции модель интрацеребровентрикулярной инъекции STZ (ICV-STZ) характеризовалась значительно более длительной латентностью спасения, что указывает на то, что у крыс с ICV-STZ имело место нарушение когнитивных функций. Внутривентрикулярная инъекция эдаварона (6 мг/кг) или композиции с эдавароном и дексборнеолом (7,5 : 1, 5 : 1 и 2,5 : 1) могла значительно сокращать латентность спасения у крыс с ICV-STZ. По сравнению с группой введения эдаварона улучшение функции обучения у модельных крыс с ICV-STZ при использовании композиций с эдавароном и дексборнеолом (7,5 : 1, 5 : 1 и 2,5 : 1) значительно превосходило таковое при использовании эдаварона (Ошибка! Источник ссылки не найденА). В ходе испытания с обследованием пространства в водном лабиринте время пребывания модельных крыс с ICV-STZ в целевом квадранте было значительно сокращено. По сравнению с модельной группой время пребывания крыс в группе введения внутривентрикулярной инъекции эдаварона (6 мг/кг) или композиций с эдавароном и дексборнеолом (7,5 : 1, 5 : 1 и 2,5 : 1) в

целевом квадранте было значительно более длительным, и время пребывания в случае композиций с эдаравоном и дексборнеолом (5 : 1 и 2,5 : 1) значительно превосходило таковое в группе эдаравона (Ошибка! Источник ссылки не найден В). Следовательно, композиции с эдаравоном и дексборнеолом (7,5 : 1, 5 : 1 и 2,5 : 1) могли обеспечивать значительное улучшение при дефицитах когнитивной функции у крыс с ICV-STZ, и их эффективность явно превосходила эффективность эдаравона.

Пример 3. Эффект длительного введения композиции с эдаравоном и дексборнеолом в отношении когнитивной функции при AD и патологии AD у трансгенных мышей 5×FAD

1. Материалы и способы

1.1. Экспериментальные животные

Как мыши дикого типа (WT), так и трансгенные мыши 5×FAD были предоставлены исследовательской группой Si Majian Китайского фармацевтического университета.

1.2. Тестируемые лекарственные препараты и средства

Эдаравон, т. е. эдаравон в форме для инъекции (必存®, Simcere Pharmaceutical Co., Ltd.), активный ингредиент: 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-он. Композиция с эдаравоном и дексборнеолом, т. е. концентрированный раствор эдаравона и дексборнеола для инъекции (先必新®, Simcere Pharmaceutical Co., Ltd.), с массовым соотношением 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-она и дексборнеола, составляющим 4 : 1. Контроль в виде растворителя представлял собой 8% пропиленгликоль.

1.3. Экспериментальные способы

В данном эксперименте животных разделяли на 4 группы. Введение осуществляли мышам в каждой группе с 8-недельного возраста. Спустя 16 недель непрерывного ежедневного введения проводили поведенческие тесты в водном лабиринте и Y-образном лабиринте. После завершения поведенческих тестов животных умерщвляли, и тестировали электрофизиологические характеристики срезов головного мозга и патологию AD в головном мозге, включая тест на бляшки Aβ, биомаркеры, такие как GFAP и Iba-1, p-Тау, и т. д.

1.3.1. Разделение животных на группы и введение

WT: группа контроля в виде растворителя: 10 мышам дикого типа давали контроль в виде растворителя i. p. путем в дозе, составляющей 10 мл/кг, один раз в день.

5×FAD: группа растворителя: десяти мышам 5×FAD давали контроль в виде растворителя i. p. путем в дозе, составляющей 10 мл/кг, один раз в день.

5×FAD: группа эдаравона: десяти мышам 5×FAD давали 6 мг/кг эдаравона (必存®) i. p. путем в дозе, составляющей 10,0 мл/кг, один раз в день.

5×FAD: группа композиции: десяти мышам 5×FAD давали 7,5 мг/кг концентрированного раствора эдаравона и дексборнеола для инъекции (先必新®) (эдаравон : дексборнеол=4 : 1, содержащего 6 мг/кг эдаравона и 1,5 мг/кг дексборнеола) в дозе, составляющей 10,0 мл/кг, один раз в день.

1.3.2. Тест в водном лабиринте

Перед тестом мышей необходимо было поместить в тестовую комнату на приблизительно 30 мин. для акклиматизации к окружающей среде.

Подготовка к эксперименту: бассейн с постоянной температурой (внутренним диаметром 120 см и высотой 50 см) водного лабиринта заполняли чистой водой. Температуру воды поддерживали на уровне приблизительно 18°C-22°C. Выбирали четыре вершины бассейна и обозначали их как "S", "N", "W" и "E" соответственно. Платформу располагали в направлении "SW" и на 1-2 см ниже поверхности воды. В воду добавляли диоксид титана, чтобы сделать воду непрозрачной, молочно-белого цвета.

Установка параметров: время теста было установлено на 1 мин., а время пребывания мышей на платформе было установлено на 2 с.

Тренировка. Первые 5 дней были отведены для фазы тренировки в водном лабиринте: мышей каждый день помещали в бассейн в четырех разных ориентациях и регистрировали их траектории до их подъема на платформу, а также перемещение и время пребывания в каждом квадранте. В случае с мышами, которые не нашли платформу в течение 1 мин., тест завершали через 1 мин., их отправляли к платформе и давали оставаться на ней в течение 10-15 с. Конкретные ориентации размещения мышей показаны в таблице 1.

Таблица 1. Сводная информация об ориентациях размещения мышей в тренировочном тесте в водном лабиринте в разные дни

Дни	Ориентация размещения			
1	N	E	SE	NW
2	SE	N	NW	E
3	NW	SE	E	N
4	E	NW	N	SE
5	N	SE	E	NW

Тестирование. Тестирование проводили в первый день после завершения тренировки. В ходе тестирования платформу удаляли, время тестирования составляло 60 с, мышь помещали в ориентацию NE, и регистрировали количество раз, когда мышь пересекала платформу, и время пребывания в квадранте платформы в ходе тестирования.

1.3.3. Тест в Y-образном лабиринте

Перед тестом мышей необходимо было поместить в тестовую комнату на приблизительно 30 мин. для акклиматизации к окружающей среде.

Тренировка. Один рукав Y-образного лабиринта блокировали перегородкой, мышь помещали в конце одного из двух оставшихся рукавов, позволяя мыши свободно проводить обследование в течение 15 мин., и осуществляли видеорегистрацию.

Тестирование. Спустя 1 ч. тренировки перегородку удаляли, канал Y-образного лабиринта протирали спиртом для удаления запаха предыдущей мыши, подлежащую тестированию мышь помещали в то же положение на 5 мин., и осуществляли

видеорегистрацию, а также в тесте регистрировали количество раз, когда мышь входила в новооткрытый рукав, в виде процентной доли от общего количества раз, когда она входила в три рукава.

1.3.4. Тест электрофизиологических характеристик срезов головного мозга

Регистрацию электрофизиологических характеристик проводили после завершения поведенческого теста у мышей. После анестезии всех мышей умерщвляли, быстро собирали ткани головного мозга и хранили их в насыщенной кислородом (95% O₂/5% CO₂) искусственной спинномозговой жидкости (ACSF) (75 mM сахарозы, 87 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 21,4 mM NaHCO₃, 0,5 mM CaCl₂, 7 mM MgCl₂ и 20 mM глюкозы) при 4°C. Срезы гиппокампа нарезали вибрирующим ножом в насыщенной кислородом ACSF при 4°C и в насыщенной кислородом ACSF при 32°C. Затем срезы инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа перед регистрацией данных. LTP в гиппокампе индуцировали двумя стимуляциями тета-вспышками (TBS). Сбор и анализ данных проводили с использованием Clampex и Clampfit 8.2 (Molecular Devices).

1.3.5. Исследование патологии AD (иммуногистохимический тест)

После завершения поведенческого теста у животных мышей подвергали перфузии сердца с последующим удалением головного мозга, и головной мозг фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 24 ч., обезвоживали 30% сахарозой, подвергали мгновенной заморозке, заливали средой для заливки и нарезали на срезы (толщиной 30 мкм). Срезы головного мозга с гиппокампальной областью отбирали, промывали посредством PBS в течение 5 мин. × 3 раза, пермеабилizировали посредством 0,2% Triton, промывали посредством PBS в течение 7 мин. × 3 раза и блокировали блокирующим буфером (2,5% BSA, 0,3% Triton) в течение 1 ч. Срезы головного мозга помещали в первичное антитело на ночь при 4°C. На второй день срезы головного мозга в первичном антителе извлекали, промывали посредством PBS в течение 5 мин. × 3 раза, помещали во второе антитело и инкубировали в течение 1 ч. при комнатной температуре в темноте. Срезы головного мозга извлекали и промывали посредством PBS в течение 5 мин. × 3 раза. По каплям добавляли гаситель флуоресценции, содержащий DAPI, и срезы заключали в среду.

1.4. Статистический анализ

Данные выражали как среднее значение ± SEM. Статистический анализ между группами проводили с помощью программного обеспечения Prism (GraphPad, США). Для сравнения двух или более групп использовали однофакторный или двухфакторный ANOVA, а затем для анализа был выбран критерий LSD Фишера. P < 0,05 указывало на значимое различие. ##p < 0,01, ###p < 0,001, ####p < 0,0001: сравнение с группой WT; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,0001, ****p < 0,0001: сравнение с модельной группой; & p < 0,05, &&p < 0,01, &&&p < 0,0001: сравнение между двумя указанными группами.

2. Результаты экспериментов

2.1. Обеспечение улучшения при дефицитах когнитивной функции у трансгенных мышей с AD с помощью композиции с эдавроном и дексборнеолом

В тесте в водном лабиринте Морриса по сравнению с мышами дикого типа (WT)

того же возраста у мышей 5×FAD в возрасте 24 недель развивались дефициты когнитивной функции, на что конкретно указывало следующее: в тренировочном тесте со скрытой платформой латентность спасения (от 2 до 5 дней) у мышей 5×FAD была значительно более длительной, чем у мышей WT; в тесте с удалением платформы как время пребывания в целевом квадранте, так и количество раз, когда мышь пересекала платформу, у мышей 5×FAD было значительно меньше, чем у мышей WT. По сравнению с контролем в виде растворителя мышам 5×FAD давали эдаравон в дозе 6 мг/кг или композицию с эдаравоном и дексборнеолом (содержащую 6 мг/кг эдаравона и 1,5 мг/кг дексборнеола) в дозе 7,5 мг/кг посредством внутрибрюшинной инъекции один раз в день в течение 16 последовательных недель с 8-недельного возраста, что могло значительно сократить латентность спасения у мышей 5×FAD в тесте со скрытой платформой в водном лабиринте (Ошибка! Источник ссылки не найден А) и увеличить время пребывания в целевом квадранте и количество раз, когда мышь пересекала платформу, в тесте с удалением платформы (Ошибка! Источник ссылки не найден В и С). По сравнению с группой введения эдаравона группа введения композиции характеризовалась более короткой латентностью спасения в день 5 теста со скрытой платформой, а также значительно более длительным временем пребывания в целевом квадранте и большим количеством раз, когда мышь пересекала платформу, в тесте с удалением платформы (Ошибка! Источник ссылки не найден А, В и С). Это демонстрировало, что как эдаравон, так и композиция с эдаравоном могут улучшить когнитивную функцию обучения и памяти у мышей 5×FAD в тесте в водном лабиринте, а эффект улучшения от композиции значительно превосходит эффект от эдаравона.

В Y-образном лабиринте по сравнению с мышами дикого типа (WT) того же возраста у мышей 5×FAD в возрасте 24 недель развивались дефициты когнитивной функции, на что конкретно указывало следующее: количество раз, когда мышь входила в новооткрытый рукав, у мышей 5×FAD значительно снижалось, то есть снижалась пространственная долговременная память. По сравнению с контролем в виде растворителя мышам 5×FAD давали эдаравон в дозе 6 мг/кг или композицию с эдаравоном и дексборнеолом (содержащую 6 мг/кг эдаравона и 1,5 мг/кг дексборнеола) в дозе 7,5 мг/кг посредством внутрибрюшинной инъекции один раз в день в течение 16 последовательных недель с 8-недельного возраста, что могло значительно увеличить количество раз, когда мышь входила в новооткрытый рукав, у мышей 5×FAD. По сравнению с эдаравоном композиция с эдаравоном и дексборнеолом характеризовалась значительно более высокой эффективностью в увеличении количества раз, когда мышь входила в новооткрытый рукав, у мышей 5×FAD (Ошибка! Источник ссылки не найден). Это демонстрировало, что как эдаравон, так и композиция с эдаравоном могут улучшить когнитивную функцию пространственной долговременной памяти у мышей 5×FAD в тесте в Y-образном лабиринте, а эффект улучшения от композиции значительно превосходит эффект от эдаравона.

2.2. Восстановление функции синаптической передачи в гиппокампе мышей с

AD с помощью композиции с эдаравоном и дексборнеолом

Долговременная потенция (LTP) отражает пластичность синаптической функции и является одним из основных механизмов обучения и памяти. После завершения тестов в водном лабиринте и Y-образном лабиринте электрофизиологический тест показал, что LTP гиппокампа у мышей 5×FAD была значительно нарушена. По сравнению с группой мышей 5×FAD в группе введения композиции можно было наблюдать значительное восстановление LTP гиппокампа у мышей, но в группе введения эдаравона не наблюдался очевидный восстановительный эффект в отношении LTP гиппокампа у мышей 5×FAD, а восстановление LTP в группе введения композиции также значительно превосходило таковое в группе эдаравона (Ошибка! Источник ссылки не найден А, В и С). Это указывало на то, что синаптическая пластичность в гиппокампе трансгенных мышей 5×FAD в возрасте 24 недель была нарушена, тогда как композиция с эдаравоном и дексборнеолом могла способствовать нейропластичности гиппокампа и восстанавливать LTP гиппокампа до лучшего уровня.

2.3. Обеспечение улучшения при патологии AD в головном мозге мышей с AD с помощью композиции с эдаравоном и дексборнеолом

У мышей 5×FAD в возрасте 24 недель развивалась очевидная патология AD (в том числе β-амилоидные бляшки, астроглиоз и микроглиоз) в головном мозге и гиперфосфорилирование тау-белка в нервных клетках гиппокампа. По сравнению с группой контроля в виде растворителя мышам 5×FAD давали эдаравон в дозе 6 мг/кг или композицию с эдаравоном и дексборнеолом (содержащую 6 мг/кг эдаравона и 1,5 мг/кг дексборнеола) в дозе 7,5 мг/кг посредством внутривентрикулярной инъекции один раз в день в течение 16 последовательных недель с 8-недельного возраста, что могло значительно уменьшать патологию AD (β-амилоидные бляшки, астроглиоз и микроглиоз) в головном мозге и гиперфосфорилирование тау-белка в гиппокампе. По сравнению с группой введения эдаравона композиция с эдаравоном и дексборнеолом характеризовалась значительными преимуществами в обеспечении улучшения при патологии AD (β-амилоидных бляшках, астроглиозе и микроглиозе) и снижении фосфорилирования тау-белка (Ошибка! Источник ссылки не найден).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение композиции в обеспечении улучшения при нарушении когнитивных функций или его лечении, где композиция содержит 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-он или его фармацевтически приемлемую соль и борнеол или дексборнеол.

2. Применение по п. 1, характеризующееся тем, что композиция содержит 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-он или его фармацевтически приемлемую соль и дексборнеол.

3. Применение по п. 1, характеризующееся тем, что весовое соотношение 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-она или его фармацевтически приемлемой соли и борнеола или дексборнеола составляет от 10 : 1 до 1 : 8.

4. Применение по п. 1, характеризующееся тем, что весовое соотношение 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-она или его фармацевтически приемлемой соли и борнеола или дексборнеола составляет от 7,5 : 1 до 2,5 : 1.

5. Применение по п. 1, характеризующееся тем, что весовое соотношение 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-она или его фармацевтически приемлемой соли и борнеола или дексборнеола составляет 5 : 1.

6. Применение по п. 1, характеризующееся тем, что весовое соотношение 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-она или его фармацевтически приемлемой соли и борнеола или дексборнеола составляет 4 : 1.

7. Применение по пп. 1-6, характеризующееся тем, что композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

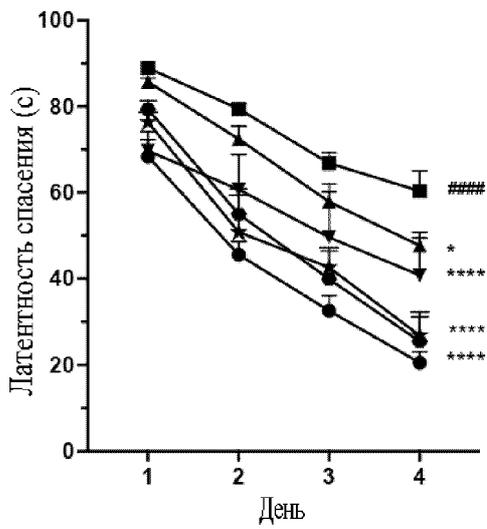
8. Применение по пп. 1-6, характеризующееся тем, что нарушение когнитивных функций относится к болезни Альцгеймера, сосудистой деменции, легкому нарушению когнитивных функций и другим типам деменции.

9. Применение по пп. 1-6, характеризующееся тем, что нарушение когнитивных функций относится к болезни Альцгеймера, сосудистой деменции и легкому нарушению когнитивных функций.

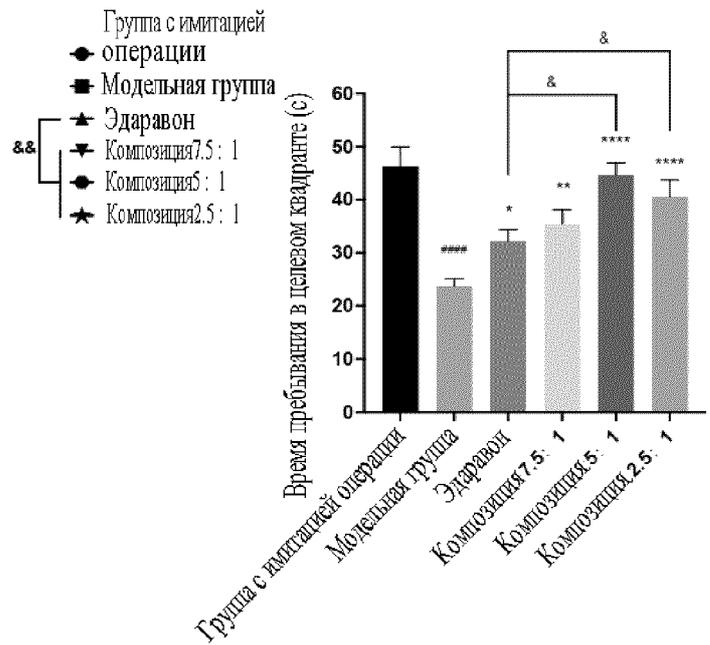
10. Применение по пп. 1-6, характеризующееся тем, что нарушение когнитивных функций относится к болезни Альцгеймера.

По доверенности

А

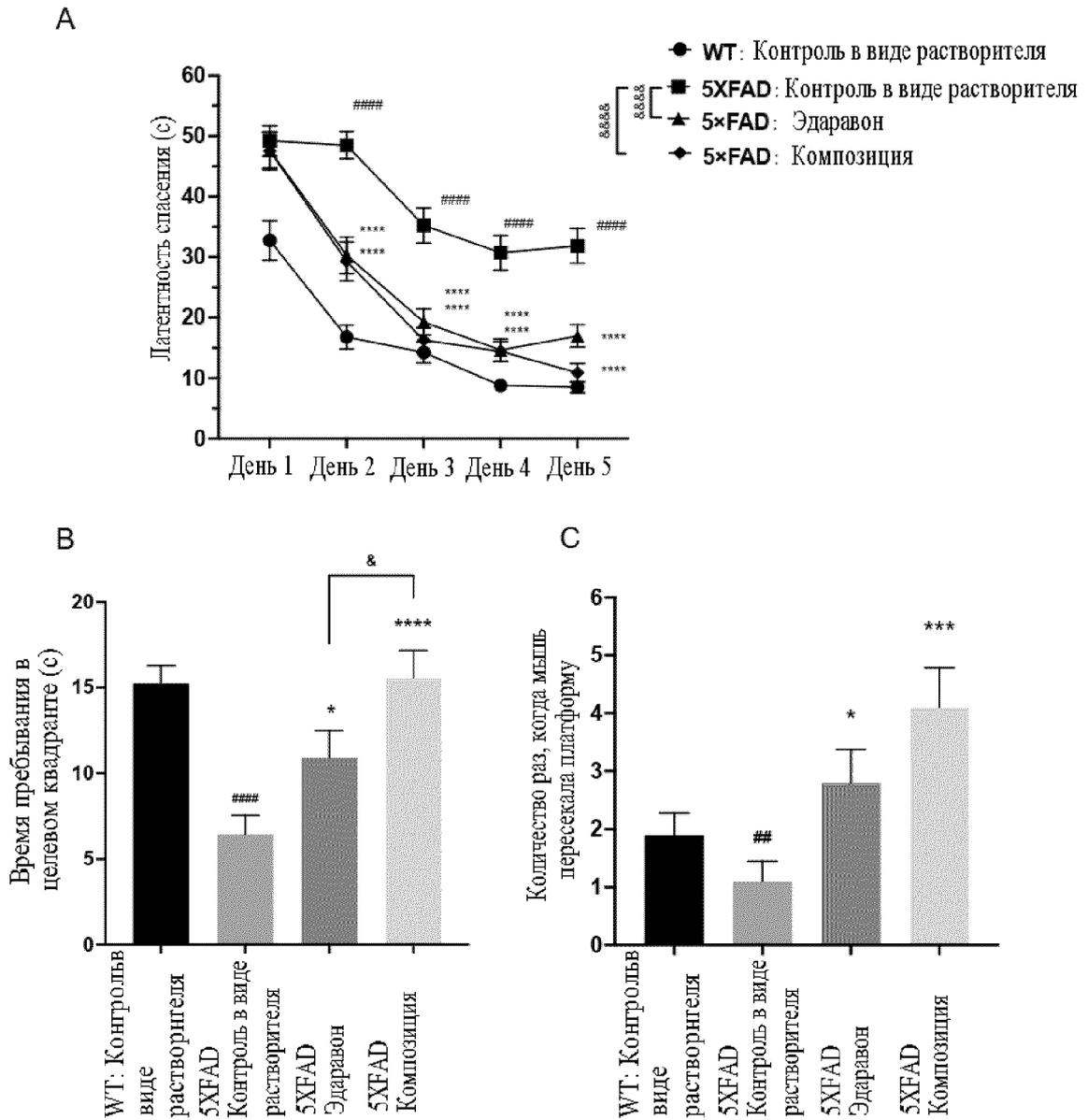


В



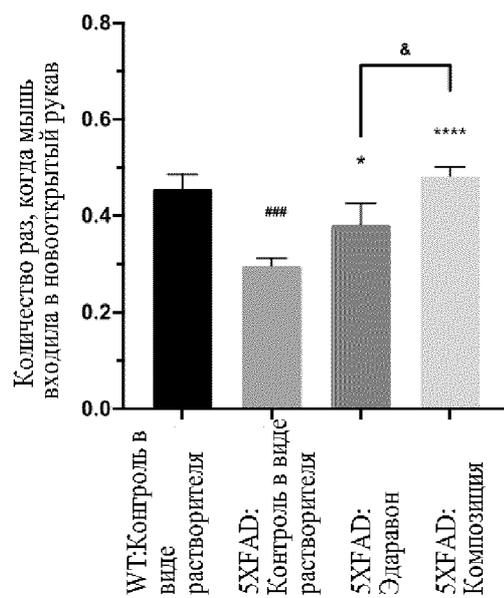
Улучшение когнитивной функции пространственного обучения и памяти у модельных крыс с ICV-STZ с помощью композиции с эдаравоном и дексборнеолом

ФИГ. 2



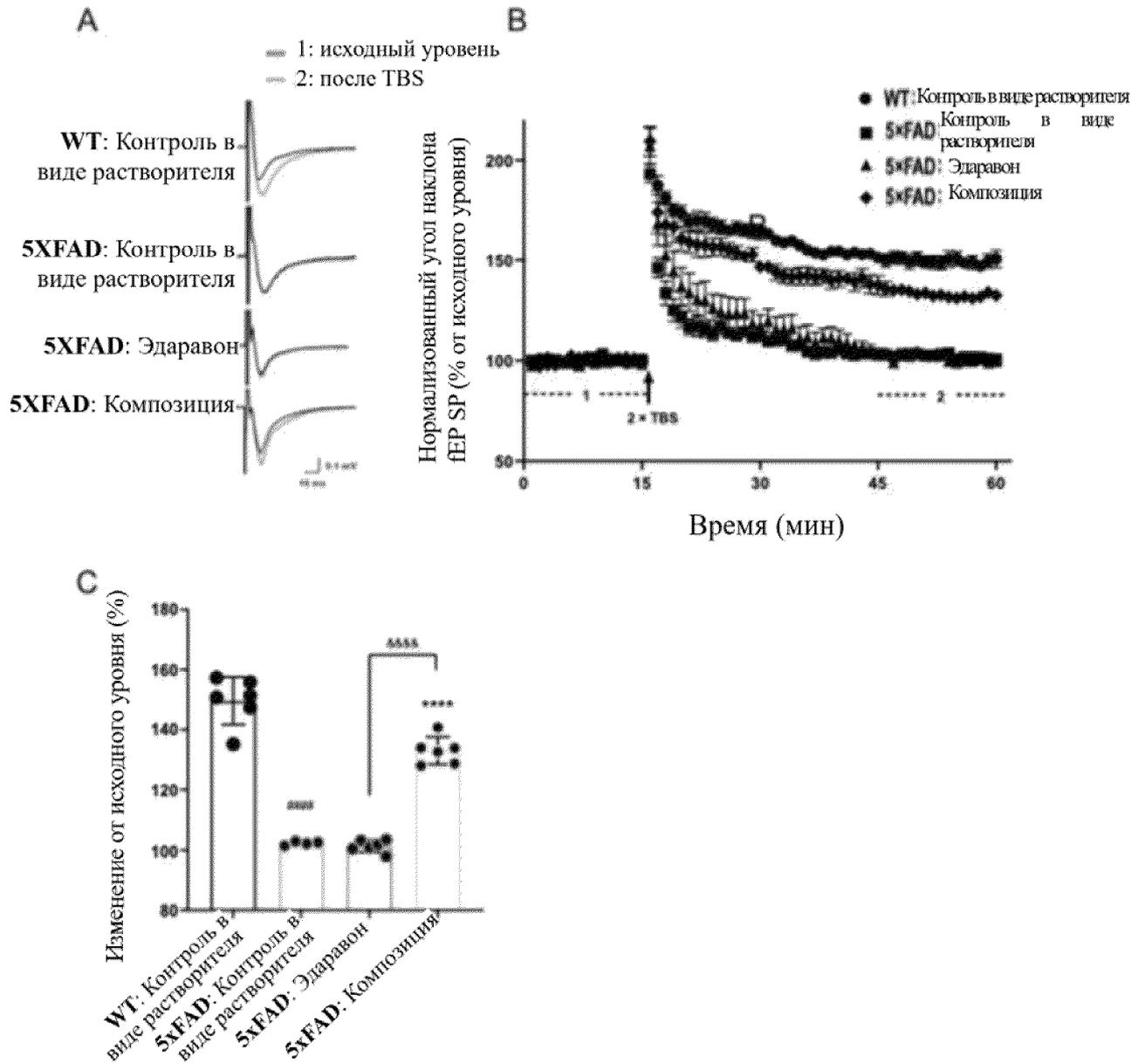
Эффект композиции с эдаравоном и дексборнеолом в отношении когнитивной функции у трансгенных мышей с AD в тесте в водном лабиринте

ФИГ. 3



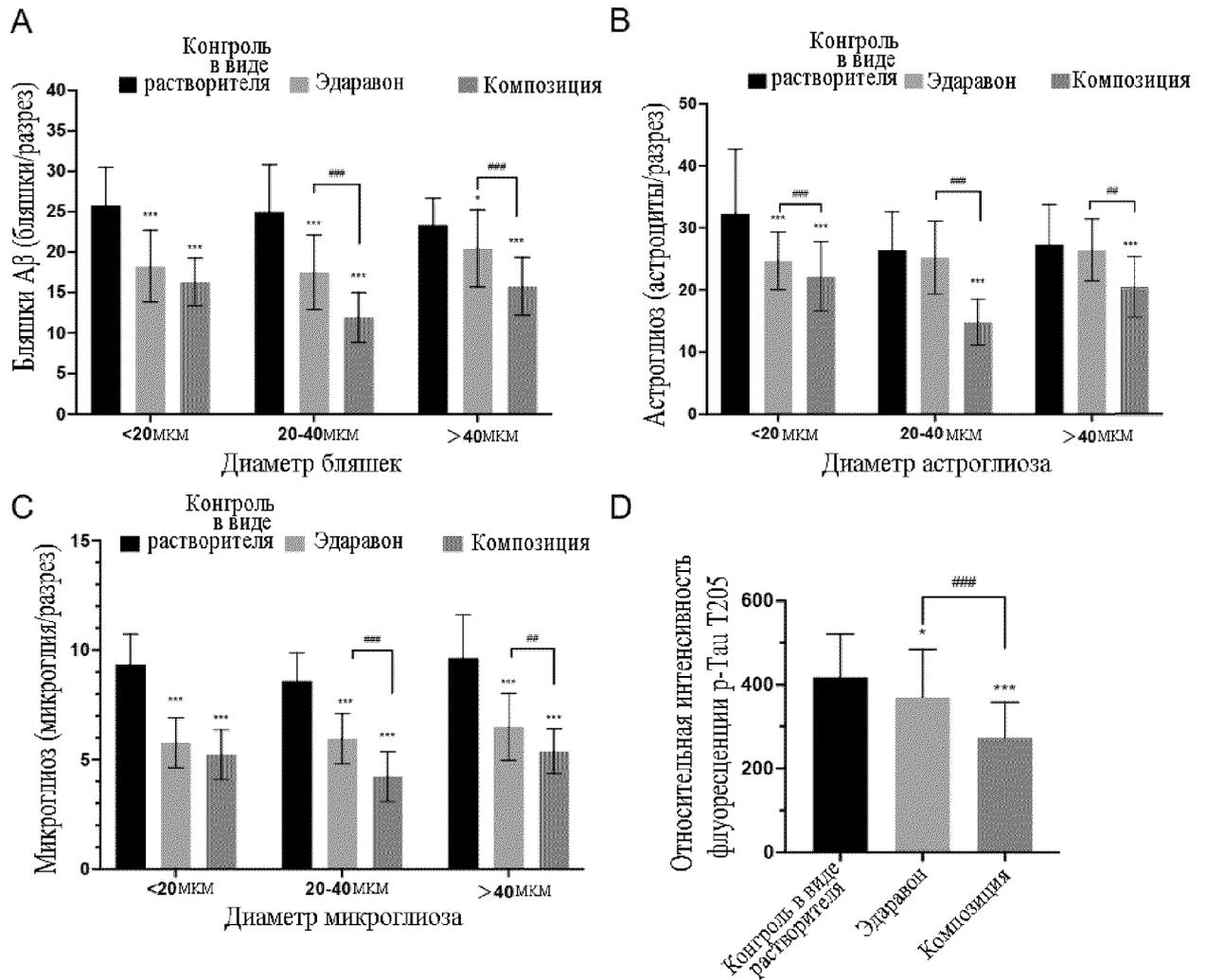
Эффект композиции с эдаравоном и дексборнеолом в отношении когнитивной функции у трансгенных мышей с AD в тесте в Y-образном лабиринте

ФИГ. 4



Эффект композиции с эдаравоном и дексборнеолом в отношении электрофизиологических характеристик срезов головного мозга у трансгенных мышей с AD

ФИГ. 5



Эффект композиции с эдаравоном и дексборнеолом в отношении связанной с AD патологии в головном мозге трансгенных мышей 5 × FAD

ФИГ. 6