



(51) МПК  
*A61K 38/07* (2006.01)  
*A61K 38/38* (2006.01)  
*A61K 31/315* (2006.01)  
*A61P 25/28* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*A61K 38/07 (2022.05); A61K 38/38 (2022.05); A61K 31/315 (2022.05); A61P 25/28 (2022.05)*

(21)(22) Заявка: 2021123180, 03.08.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
03.08.2021

Дата регистрации:  
11.08.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 03.08.2021

(45) Опубликовано: 11.08.2022 Бюл. № 23

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.  
Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Токтаревой  
Т.М.

(72) Автор(ы):

Патраханов Евгений Александрович (RU),  
 Покровский Михаил Владимирович (RU),  
 Корокин Михаил Викторович (RU),  
 Чуев Владимир Петрович (RU),  
 Бузов Андрей Анатольевич (RU),  
 Казакова Валентина Сергеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Акционерное общество  
 "Опытно-экспериментальный завод  
 "ВладМиВа" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: RU 2709539 C1, 18.12.2019. RU  
 2588143 C2, 24.10.2011. ПРИВАЛОВА А. М. и  
 др. Интраназальное введение - перспективный  
 способ доставки лекарственных веществ в  
 мозг // Нейрохимия. - 2012. - Т. 29. - N 2. - С.  
 93-105. GOYAL D. et al. Rationally Designed  
 Peptides and Peptidomimetics as Inhibitors of  
 Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) Aggregation: Potential  
 Therapeutics of (см. прод.)

(54) Способ лечения нейродегенеративных заболеваний

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к неврологии, и может быть использовано при лечении нейродегенеративных заболеваний. Способ включает использование фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество пептида НАЕЕ в эквимольном комплексе НАЕЕ-Zn-HSA с цинком и человеческим сывороточным альбумином в

форме спрея для назального применения. Использование изобретения позволяет повысить удобство введения композиции НАЕЕ-Zn-HSA наряду с сохранением биодоступности и длительности действия активной субстанции - пептида НАЕЕ, улучшить когнитивные функции у экспериментальных животных. 6 табл., 3 ил., 3 пр.

(56) (продолжение):

Alzheimer's Disease. ACS Comb Sci. 2017 Feb 13; 19(2): 55-80. doi: 10.1021/acscombsci.6b00116. Epub 2017, Jan 18. PMID: 28045249.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 38/07* (2006.01)  
*A61K 38/38* (2006.01)  
*A61K 31/315* (2006.01)  
*A61P 25/28* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*A61K 38/07 (2022.05); A61K 38/38 (2022.05); A61K 31/315 (2022.05); A61P 25/28 (2022.05)*

(21)(22) Application: **2021123180, 03.08.2021**

(24) Effective date for property rights:  
**03.08.2021**

Registration date:  
**11.08.2022**

Priority:  
(22) Date of filing: **03.08.2021**

(45) Date of publication: **11.08.2022** Bull. № 23

Mail address:  
**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul. Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, Toktarevoj T.M.**

(72) Inventor(s):  
**Patrakhanov Evgenij Aleksandrovich (RU),  
Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),  
Korokin Mikhail Viktorovich (RU),  
Chuev Vladimir Petrovich (RU),  
Buzov Andrej Anatolevich (RU),  
Kazakova Valentina Sergeevna (RU)**

(73) Proprietor(s):  
**Aksionernoe obshchestvo  
"Opytno-eksperimentalnyj zavod "VladMiVa"  
(RU)**

(54) **METHOD FOR TREATING NEURODEGENERATIVE DISEASES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, namely, to neurology, and can be used in treating neurodegenerative diseases. Method includes the use of a pharmaceutical composition containing an effective amount of the HAEE peptide in an equimolar complex HAEE-Zn-HSA with zinc and human serum albumin in the form of a nasal spray.

EFFECT: possibility of raising the convenience of administering the composition of HAEE-Zn-HSA combined with the maintained bioavailability and longevity of effect of the active substance - the HAEE peptide; improvement in the cognitive functions in experimental animals.

1 cl, 6 tbl, 3 dwg, 3 ex

**RU 2 777 871 1 C1**

**RU 2 777 871 1 C1**

Изобретение относится к области медицины и представляет собой способ лечения нейродегенеративных заболеваний путем использования содержащей эффективное количество пептида НАЕЕ в эквимольном комплексе с цинком и человеческим сывороточным альбумином фармацевтической композиции НАЕЕ-Zn-HSA в форме спрея для местного назального применения.

Болезнь Альцгеймера (далее БА) является самой распространенной нейродегенеративной патологией в мире и клинически сопровождается неуклонным снижением когнитивных функций (Гаврилова С.И. (2007). Фармакотерапия болезни Альцгеймера. Москва: Пульс.). Наследственные варианты болезни Альцгеймера составляют менее 1% всех случаев этой патологии и ассоциированы с мутациями в генах (Rogaev E.I., Sherrington R., Rogaeva E.A., Levesque G., Ikeda M., Liang Y., Chi H., Lin C., Holman K., Tsuda T., and Et Al. (1995) Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*. 376, 775-778), приводящими к конституциональному превышению физиологически нормального уровня бета-амилоида (Ав), – короткого гетерогенного по С-концу полипептида длиной 39-43 аминокислотных остатков (Querfurth H.W., and Laferla F.M. (2010) Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*. 362, 329-344).

В патенте РФ № 2414925, публ.27.03.2011 представлено применение терапевтического человеческого альбумина для изготовления лекарственного средства для лечения пациентов, страдающих когнитивными расстройствами путем терапевтической плазмафильтрации. При этом, альбумин присутствует в среде замены при концентрации от 4% вплоть до 25 мас.%/об. При некоторых применениях альбумин присутствует при концентрации примерно от 4,5% до 5,5 мас.%/об. Причем независимо от концентрации бета-амилоида в крови, при применении терапевтической плазмафильтрации и замены объема нормоволемии альбумина с определенной частотой терапии происходит увеличение объема гиппокампа, которому сопутствует улучшение клинических симптомов болезни Альцгеймера. Это может быть следствием факторов, которые являются растворимыми и проницаемыми через гематоэнцефалический барьер. Однако способ плазмафильтрации часто вызывает осложнения и применим не для всех категорий пациентов.

Согласно широко принятой «амилоидной гипотезе», превращение физиологически нормального Ав из мономерного состояния в растворимые нейротоксичные олигомеры, а затем в нерастворимые полимерные агрегаты, которые в конце концов накапливаются в виде амилоидных бляшек, является пусковым процессом патогенеза БА (Karran E., Mercken M., and De Strooper B. (2011) The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 10, 698-712.). Поэтому предотвращение церебрального амилоидогенеза путем ингибирования патологической олигомеризации Ав, т.н. анти-амилоидная терапия, считается наиболее перспективной стратегией лечения БА (Schenk D., Basl G.S., and Pangalos M.N. (2012) Treatment Strategies Targeting Amyloid в-Protein. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.). Было найдено, что синтетический пептид НАЕЕ специфически связывается с металл-связывающим доменом 1-16 Ав по участку 11-14, блокирует цинк-индуцированную димеризацию домена и замедляет агрегацию полноразмерного Ав in vitro (Tsvetkov P.O., Cheglakov I.B., Ovsepyan A.A., Mediannikov O.Y., Morozov A.O., Telegin G.B., and Kozin S.A. (2015) Peripherally Applied Synthetic Tetrapeptides НАЕЕ and RADD Slow Down the Development of Cerebral beta-Amyloidosis in AbetaPP/PS1 Transgenic Mice. *J Alzheimers Dis*. 46, 849-853). Внутривенные инъекции пептида НАЕЕ замедляли развитие церебрального амилоидогенеза у мышей линии B6C3-Tg(APP<sup>swe</sup>, PSEN1-dE9)85Dbo/j, которые

используются в качестве животной модели БА: среднее число амилоидных бляшек на срезе мозга уменьшалось с  $14.2 \pm 3.1$  (для контрольных животных) до  $5.8 \pm 2.1$  (для животных, подвергнутых терапевтическому воздействию) (Tsvetkov P.O., Cheglakov I.B., Ovsepyan A.A., Mediannikov O.Y., Morozov A.O., Telegin G.B., and Kozin S.A. (2015) Peripherally Applied Synthetic Tetrapeptides HAEE and RADD Slow Down the Development of Cerebral beta-Amyloidosis in AbetaPP/PS1 Transgenic Mice. *J Alzheimers Dis.* 46, 849-853.). По этому показателю эффективность препарата HAEE значительно превосходит антиамилоидное действие Alzhemed (Tramiprosate) - одного из самых известных антиагрегационных лекарственных кандидатов для лечения болезни Альцгеймера (Aisen P.S., Gauthier S., Ferris S.H., Saumier D., Haine D., Garceau D., Duong A., Suhy J., Oh J., Lau W.C., and Sampalis J. (2011) Tramiprosate in mild-to-moderate Alzheimer's disease - a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre study (the Alphase Study). *Arch Med Sci.* 7, 102-111.). При использовании Alzhemed в трансгенных мышах линии TgCRND8 происходило уменьшение числа амилоидных бляшек на 30% по сравнению с контрольными животными (Gervais F., Paquette J., Morissette C., Krzywkowski P., Yu M., Azzi M., Lacombe D., Kong X., Aman A., Laurin J., Szarek W.A., and Tremblay P. (2007) Targeting soluble A $\beta$  peptide with Tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis. *Neurobiology of Aging.* 28, 537-547.). Таким образом, в настоящее время пептид HAEE является одним из самых эффективных антиамилоидных препаратов в мире (Goyal D., Shuaib S., Mann S., and Goyal B. (2017) Rationally Designed Peptides and Peptidomimetics as Inhibitors of Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) Aggregation: Potential Therapeutics of Alzheimer's Disease. *ACS Combinatorial Science.* 19, 55-80.). Молекулярный механизм антиамилоидного действия тетрапептида HAEE хорошо установлен (Козин С.А., Барыкин Е.П., Митькевич В.А., Макаров А.А. (2018) Антиамилоидная терапия болезни Альцгеймера: современное состояние и перспективы. *Биохимия.* 83, 1331-1342.), и для оказания своего терапевтического воздействия эта субстанция должна проникать сквозь гематоэнцефалический барьер (ГЭБ).

Из уровня техники известно изобретение с целью лечения нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера, имеющее отношение к новому пептидному соединению Ra-R1-R2-R3-R4-Rb (I) или Ra-R4-R3-R2-R1-Rb (II), где Ra представляет собой N-концевую первичную аминную группу аминокислоты R1 или R4, либо свободную, либо замещенную аминозащитной группой, Rb представляет собой гидроксильную группу C-концевой карбоксильной группы аминокислоты R1 или R4, либо свободную, либо замещенную гидроксизащитной группой, и R1-R2-R3-R4 или R4-R3-R2-R1 представляют собой HAED, KADD, DDAK, RADD, DDAR, KAED, DEAK, RAED, DEAR, HADE, EDAN, KADE, EDAK, RADE, EDAR, HAEE, EEAN, KAEE, EEAK, RAEE и EEAR, главным образом используемому для связывания с в-амилоидными пептидами и/или предотвращения или уменьшения образования амилоидных бляшек, главным образом за счет ингибирования полимеризации вышеупомянутого амилоидного пептида в виде амилоидных бляшек. Причем, предпочтительно пептидное соединение, соответственно данному изобретению, выбрано из соединений с формулой (I) или (II), где R1-R2-R3-R4 или R4-R3-R2-R1, представлено одним из двух тетрапептидов HAEE и RADD. Наиболее предпочтительные пептидные соединения соответствуют формулам Ac-HAEE-NH<sub>2</sub> и Ac-RADD-NH<sub>2</sub>. Также описана композиция для снижения или предотвращения связывания ионов Zn (II) с в-амилоидным пептидом, содержащая в качестве активного вещества указанное пептидное соединение, степень чистоты которого составляет по меньшей мере 98%, и фармацевтически приемлемый носитель для парентерального, чрескожного или чресслизистого введения. (патент РФ № 2588143 от 24.10.2011 года, правообладатель КИМОНЕЛЛА ВЕНЧЕРС ЛТД (СУ)).

Однако известно, что короткие заряженные пептиды типа НАЕЕ имеют очень короткое время жизни в плазме крови (от нескольких секунд до нескольких минут) и с трудом проходят через ГЭБ, что существенно ослабляет эффективность их терапевтического воздействия (Fosgerau K., and Hoffmann T. (2015) Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*. 20, 122-128; Wade J., and Otvos L. (2014) Current Challenges in Peptide-based Drug Discovery. *Frontiers in Chemistry*. 2.).

Известно, что альбумин обеспечивает транспорт ряда пептидов, включая бета-амилоид, через ГЭБ (Boada M., Anaya F., Ortiz P., Olazaran J. (2017) Efficacy and Safety of Plasma Exchange with 5% Albumin to Modify Cerebrospinal Fluid and Plasma Amyloid- $\beta$  Concentrations and Cognition Outcomes in Alzheimer's Disease Patients: A Multicenter, Randomized, Controlled Clinical Trial. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 56, 129-143.) и образует стабильный комплекс с одним ионом цинка (Blindauer C.A., Harvey I., Bunyan K.E., Stewart A.J., Sleep D., Harrison D.J., Berezenko S., and Sadler P.J. (2009) Structure, Properties, and Engineering of the Major Zinc Binding Site on Human Albumin. *Journal of Biological Chemistry*. 284, 23116-23124.).

Известно, что НАЕЕ образует специфический эквимольный комплекс с цинк-связанным альбумином - НАЕЕ-Zn-HSA. (патент №2709539), который в форме раствора для внутривенного введения, где фармацевтически приемлемым носителем является, например, физиологический раствор, позволяет при внутривенном введении

экспериментальным животным:

- \_ в два раза увеличить время полувыведения НАЕЕ из организма;
- \_ в пять раз увеличить биодоступность этой субстанции в мозге;
- \_ на 20% улучшить когнитивные функции экспериментальных животных, по сравнению с чистым тетрапептидом НАЕЕ.

Недостатком является то, что внутривенное введение композиции НАЕЕ-Zn-HSA требует специально обученного медицинского персонала. Кроме того, недостаточное повышение когнитивных функций экспериментальных животных при внутривенном введении указанной композиции.

Задачей изобретения является расширение арсенала способов лечения нейродегенеративных заболеваний с использованием композиции НАЕЕ-Zn-HSA.

Технический результат – повышение удобства введения композиции НАЕЕ-Zn-HSA наряду с сохранением биодоступности и длительности действия активной субстанции - пептида НАЕЕ, а также когнитивных функций у экспериментальных животных. Дополнительным преимуществом является отсутствие существенных различий между назальной и внутривенной формами выпуска препарата.

Поставленная задача достигается тем, что способ лечения нейродегенеративных деменций, в том числе болезни Альцгеймера, включает введение фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество субстанции НАЕЕ в эквимольном комплексе с цинком и человеческим сывороточным альбумином (НАЕЕ-Zn-HSA) в форме спрея для местного назального применения. Спрей как лекарственная форма (ЛФ) сейчас очень активно начинает использоваться в медицинской практике, т.к. его применение не требует использования специально обученного медицинского персонала, отсутствует опасность загрязнения лекарственного препарата извне, за счет того баллон герметически закрыт, обеспечивается точная дозировка при использовании дозирующих клапанов, и др.

Авторами настоящего изобретения экспериментально доказано, что способ введения композиции НАЕЕ-Zn-HSA в форме спрея для местного назального применения, по сравнению с ее введением внутривенно, характеризуется не только более практичным

и универсальным способом применения, но и имеет доказанный уровень эффективности воздействия тетрапептида НАЕЕ.

Изобретение иллюстрируется следующими фигурами.

5 Фиг.1. График «Результаты анализа пространственной памяти у экспериментальных животных по итогам теста Водный лабиринт Морриса».

Фиг.2. График «Результаты анализа пространственной долговременной памяти у экспериментальных животных по итогам теста Т-образный водный лабиринт».

Фиг.3. График «Результаты анализа формирования долговременной памяти у экспериментальных животных в тесте «формирование страха».

10 ПРИМЕР 1.

Исследования фармакокинетики субстанции НАЕЕ в композиции НАЕЕ-Zn-HSA, меченой тритием (радиохимическая чистота более 98%), выполнены на кроликах породы Шиншилла. Определяли значения основных фармакокинетических показателей при однократном внутривенном и назальном введении композиции НАЕЕ-Zn-HSA.

15 Усредненные значения основных фармакокинетических показателей субстанции НАЕЕ после однократного назального и однократного внутривенного введения композиции НАЕЕ-Zn-HSA кроликам в дозе 120 мкг/кг приведены в таблице 1.

Таблица 1

Фармакокинетический показатель, единица измерения	Значение при назальном введении	Значение при внутривенном введении
D, нг	440000	440000
C <sub>max</sub> , нг/мл	261	255
T <sub>max</sub> , мин	4	4
AUC(0-∞), (нг/мл)*мин	4352	4421
25 C <sub>max</sub> /AUC(0-∞), мин <sup>-1</sup>	0,06	0,058
Cl <sub>T</sub> , мл/мин	105	100
MRT, мин	26	29
K <sub>el</sub> , мин <sup>-1</sup>	0,037	0,035
T <sub>1/2</sub> (el), мин	19	20
V <sub>d</sub> (B), мл	2920	2860
30 r <sub>2</sub>	0,997	0,9980

где

D – введенная доза вещества;

C<sub>max</sub> - максимальное измеренное значение концентрации вещества в плазме крови;

T<sub>max</sub> – время достижения максимальной концентрации вещества в плазме крови;

35 AUC<sub>0-∞</sub> - площадь под фармакокинетической кривой концентрация-время от нуля до бесконечности;

C<sub>max</sub>/AUC(0-∞) - относительная скорость всасывания;

Cl<sub>T</sub> – общий клиренс (объем плазмы, который очищается от препарата в единицу времени);

40 MRT – среднее время удержания (среднее время пребывания соединения в крови);

K<sub>el</sub> - константа скорости выведения вещества из крови;

T<sub>1/2</sub>(el) - время полувыведения вещества из крови;

V<sub>d</sub> - кажущийся объем распределения вещества в центральном компартменте.

r<sub>2</sub> – коэффициент детерминации;

45 У кроликов максимальная концентрация субстанции НАЕЕ в крови независимо от способа введения отмечается через 4 минуты после применения препарата. Время полувыведения субстанции НАЕЕ из крови кролика при назальном введении составляет 19 минут, при внутривенном – 20 минут. НАЕЕ характеризуется быстрым выведением

из крови, которое обусловлено его быстрым распределением по тканям организма с последующим протеолитическим гидролизом также независимо от способа введения. Практически значения всех фармакокинетических показателей близки между собой как при назальном, так и при внутривенном способе введения композиции НАЕЕ-Zn-HSA.

Пример 2.

Однократное назальное введение мышам (N=36) композиции НАЕЕ-Zn-HSA в дозе 300 мкг/кг.

Значения концентрации субстанции НАЕЕ в крови и тканях мышей после однократного назального введения препарата в дозе 300 мкг/кг в различных временных точках приведены в таблице 2.

Таблица 2

Органы	Концентрация НАЕЕ в крови и тканях мышей, <u>пмоль/г</u>					
	2 мин	4 мин	6 мин	10 мин	15 мин	20 мин
Кровь	46±6	167±24	217±18	230±19	330±42	68±11
Мозг	4±0,6	13±2	31±5	38±11	35±7	29±6
Почки	94±11	185±27	310±45	331±37	376±44	268±33
Печень	52±7	83±6	89±6	101±16	51±6	33±2
Сердце	32±4	71±8	82±6	100±6	92±11	42±4
Сальник	1,7±0,3	3,8±0,4	6,6±0,8	7,9±0,6	9,5±1,2	3,2±0,4

Для сравнения значения концентрации субстанции НАЕЕ в крови и тканях мышей после однократного внутривенного введения препарата НАЕЕ в дозе 0,3 мг/кг в различных временных точках приведены в таблице 3.

Таблица 3

Органы	Концентрация субстанции НАЕЕ в крови и тканях мышей, <u>пмоль/г</u>					
	2 мин	4 мин	6 мин	10 мин	15 мин	20 мин
Кровь	85 ± 22	198 ± 42	248 ± 47	228 ± 52	345 ± 62	117 ± 26
Мозг	14 ± 3	21 ± 5	45 ± 8	49 ± 14	47 ± 9	29 ± 6
Почки	118 ± 14	286 ± 53	345 ± 61	364 ± 57	452 ± 74	172 ± 29
Печень	70 ± 8	96 ± 11	82 ± 13	116 ± 21	49 ± 14	38 ± 8
Сердце	40 ± 6	98 ± 16	94 ± 19	108 ± 16	89 ± 14	31 ± 7
Сальник	1,9 ± 0,3	5,6 ± 0,9	7,4 ± 1,3	8,2 ± 1,2	9,3 ± 1,8	3,5 ± 0,8

Из таблиц 3 и 4 видно, что субстанция НАЕЕ характеризуется быстрым выведением из крови, которое обусловлено его быстрым распределением по тканям организма с последующим протеолитическим гидролизом. При этом концентрация субстанции НАЕЕ в мозге через 20 минут при назальном и внутривенном введении показала одинаковое значение 29±6 пмоль/г.

Сравнение значений фармакокинетических показателей субстанции НАЕЕ в крови и внутренних органах мышей после однократного назального введения препарата НАЕЕ (Н) в дозе 300 мкг/кг, и после однократного внутривенного введения препарата НАЕЕ (В) в дозе 0,3 мг/кг приведены в таблице 4.

Таблица 4

5	Органы	C <sub>max</sub> , нг/мл		T <sub>max</sub> , мин		AUC(0-20), (нг/мл)*мин		C <sub>max</sub> /AUC (0-20), мин-1		F <sub>T</sub> (отн.ед.)		K <sub>d</sub> (отн.ед.)	
		Н	В	Н	В	Н	В	Н	В	Н	В	Н	В
	Кровь	89	186	15	15	2420	2514	0,037	0,074	1,000	1,000	1,000	1,000
	Мозг	11,7	26,4	10	10	382	395	0,031	0,067	0,158	0,157	0,13	0,173
	Почки	211	244	15	15	3378	3437	0,062	0,071	1,396	1,367	2,37	1,431
	Печень	57,2	62,6	10	10	743	777	0,077	0,081	0,307	0,309	0,64	0,438
10	Сердце	39,6	58,3	10	10	807	845	0,049	0,069	0,333	0,336	0,45	0,425
	Сальник	3,54	5,02	15	15	65	70	0,055	0,072	0,027	0,028	0,04	0,029

где:

C<sub>max</sub> - максимальное измеренное значение концентрации вещества в плазме крови;

T<sub>max</sub> – время достижения максимальной концентрации вещества в плазме крови;

15 AUC<sub>0(0-20)</sub> - площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» от нуля до 20 минут;

C<sub>max</sub>/AUC(0-20) - относительная скорость всасывания от нуля до 20 минут;

f<sub>T</sub> – тканевая доступность фармакологического средства,  $f_T = \text{AUC}(0-20)_{\text{ткань}} / \text{AUC}(0-20)_{\text{кровь}}$ ;

20 K<sub>d</sub> – кажущийся коэффициент распределения фармакологического средства;  $K_d = \text{Сткань} / \text{Скровь}$ .

В исследовании распределения субстанции НАЕЕ между кровью и периферическими тканями, как при назальном, так и при внутрибрюшинном введении, показано, что его максимальная концентрация зафиксирована в тканях почек мышей. Наименьшая  
25 концентрация субстанции НАЕЕ отмечена в жировой ткани сальника. Для всех исследуемых органов изменение концентрации НАЕЕ во времени было пропорционально изменению его уровня в системном кровотоке. Также видно, что субстанция НАЕЕ способна преодолеть гематоэнцефалический барьер – для ткани мозга кажущийся коэффициент распределения пептида НАЕЕ при внутрибрюшинном введении имел  
30 значение K<sub>d</sub> = 0,17, при назальном K<sub>d</sub> = 0,13.

Таким образом, приведенные примеры подтверждают, что введение композиции НАЕЕ-Zn-HSA назально в форме спрея сохраняет биодоступность и длительность действия активной субстанции - пептида НАЕЕ.

35 ПРИМЕР 3. Сравнительный анализ влияния композиции НАЕЕ-Zn-HSA, представленной в инъекционной и назальной форме, на когнитивные функции экспериментальных животных.

Для сравнительной оценки влияния НАЕЕ и фармацевтической композиции НАЕЕ-Zn-HSA на характеристики памяти и обучения экспериментальных животных была использована стандартная методика оценки пространственной памяти в водном лабиринте Морриса, метод Т-образного водного лабиринта и тест моделирования  
40 страха.

Были использованы пять групп семимесячных мышей:

- мыши линии «App/PSI», подверженные болезни Альцгеймера и не получающие лечение (N «intact» = 10 голов) (группа 1),

45 - мыши линии «App/PSI» (N «НАЕЕ» = 10 голов), которым вводили препарат НАЕЕ внутривенно в дозе 50 мкг/кг три раза - в возрасте 4, 5 и 6 месяцев перед началом эксперимента) (группа 2),

- мыши линии «App/PSI» (N «НАЕЕ-Zn-HSA» = 10 голов); которым вводили



композицию НАЕЕ-Zn-HSA внутривенно в дозе 50 мкг/кг три раза - в возрасте 4, 5 и 6 месяцев перед началом эксперимента) (группа 3),

- мыши линии «App/PSI» (N «НАЕЕ-Zn-HSA» = 10 голов); которым вводили композицию НАЕЕ-Zn-HSA назально в дозе 50 мкг/кг три раза - в возрасте 4, 5 и 6 месяцев перед началом эксперимента) (группа 4),

- контрольные мыши дикого типа (N «wt» = 10 голов) (группа 5).

#### Пример 3.1. Водный лабиринт Морриса

Водный лабиринт Морриса является классическим инструментом для оценки пространственной памяти, зависящей от функции гиппокампа. Важно отметить, что именно в гиппокампе у пациентов при болезни Альцгеймера и у трансгенных мышей линии «App/PSI» агрессивно развивается церебральный амилоидоз.

Результаты анализа пространственной памяти животных, продемонстрировали значительную разницу между интактными и инъектированными мышами линии «App/PSI». Данные представлены в таблице 5 и на фигуре 1.

Таблица 5

Дни	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
1	70	60	60	60	55
2	65	55	52	50	45
3	62	48	47	46	40
4	55	40	39	38	30
5	58	38	35	35	26
6	63	35	30	29	23
7	63	35	23	22	19
10	68	42	26	25	22

При назальном использовании композиции НАЕЕ-Zn-HSA эффект улучшения когнитивных функций сопоставим с эффектом при внутривенных инъекциях указанной композиции и даже несколько лучше (группа 3 и группа 4), при этом заметно улучшен по сравнению с введением препарата НАЕЕ (группа 2). Таким образом, фармацевтическая композиция НАЕЕ-Zn-HSA сохраняет эффективность терапевтического действия пептида НАЕЕ при назальном введении.

#### Пример 3.2.

Установка "Т-лабиринт" позволяет исследовать рабочую память грызунов, лежащую в основе поведения чередования рукавов (спонтанного или подкрепленного) и чувствительную к дисфункции септо-гиппокампальной системы. Водный вариант теста позволяет избежать влияния обонятельных меток, оставляемых животными, и не требует пищевого подкрепления. Он сочетает в себе преимущества "сухого" Т-лабиринта и теста Морриса.

Результаты Т-образного водного лабиринта также подтверждают эффективность композиции НАЕЕ-Zn-HSA, как в инъекционной форме, так и в форме спрея. Причем введение композиции в форме назального спрея (группа 4) также как и в предыдущем примере показывает несколько лучший эффект по сравнению с введением композиции НАЕЕ-Zn-HSA в инъекционной форме (группа 3). Обе формы показывают свою эффективность по сравнению с введением препарата НАЕЕ (группа 2) и значительно превосходят группу интактных животных. Данные представлены в таблице 6 и на фигуре 2.

Таблица 6

Дни	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Группа 5
1	60	50	45	47	40
2	55	47	35	36	35
3	54	44	36	35	30
4	62	40	34	28	26
5	64	31	25	20	15
6	56	25	20	16	11
7	55	22	16	14	11
10	61	27	18	17	17

### Пример 3.3

Тест «моделирование страха» проводят в течение 3-х дней. В первый, тренировочный день, каждое животное помещают в экспериментальную установку с металлической решёткой на полу, и дают возможность свободно исследовать обстановку в течение 120 секунд. В последние 2 секунды теста на решётку подают электрический импульс. Спустя 24 часа ( на 1 день тестирования) животное помещают в ту же установку и регистрируют процент времени, проведённого животным в состоянии замирания (оцепенения) в течение 180 секунд, затем животное оставляли в установке на дополнительные 7 минут, не подавая на решётку электрический импульс. Спустя ещё 24 часа (на 2 день тестирования) животное помещали в экспериментальную установку и в течение 180 секунд измеряли процент времени, проведённого в состоянии замирания (оцепенения).[Strekalova T. et al., 2018].

Замирания являются формой реакции животных на воздействие аверсивного стимула, которым в данном тесте являлся электрический разряд, а время, проведённое животным в состоянии замирания, отражало формирование памяти у животных на контекст, в котором происходило воздействие данного аверсивного стимула. На второй день исследования, после воздействия стимула, мыши 2,3,4 и 5 групп проводили достоверно меньшее время в состоянии замирания по сравнению с животными 1 группы, что указывает на формирование рефлекса долговременной памяти у групп 2,3,4 и 5. (фигура 3).

Во всех поведенческих тестах видна заметная разница между интактными животными и животными из групп экспериментов. Суммарное улучшение когнитивных функций трех экспериментов между первой и четвертой группами составляет 2,84 раза. Эффективность фармацевтической композиции НАЕЕ-Zn-HSA( группы 3, 4) по сравнению с группой 2, которой вводили чистый пептид НАЕЕ, выше в 1,39 раза.

Эксперименты показывают, что использование композиции НАЕЕ-Zn-HSA в форме назального спрея позволяет повысить удобство введения наряду с сохранением биодоступности и длительности действия активной субстанции - пептида НАЕЕ, а также когнитивных функций у экспериментальных животных по сравнению с внутривенным введением указанной композиции.

Таким образом, поставленная задача изобретения по расширению арсенала способов лечения нейродегенеративных заболеваний с использованием композиции НАЕЕ-Zn-HSA решена.

Технический результат – повышение удобства введения композиции НАЕЕ-Zn-HSA наряду с сохранением биодоступности и длительности действия активной субстанции - пептида НАЕЕ, а также улучшения когнитивных функций у экспериментальных животных достигнуто.

(57) Формула изобретения

Способ лечения нейродегенеративных заболеваний с использованием  
фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество пептида НАЕЕ  
5 в эквимольном комплексе НАЕЕ-Zn-HSA с цинком и человеческим сывороточным  
альбумином в форме спрея для назального применения.

10

15

20

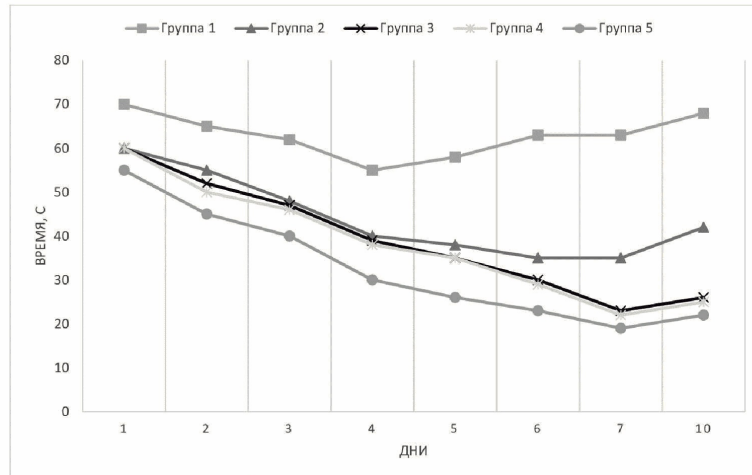
25

30

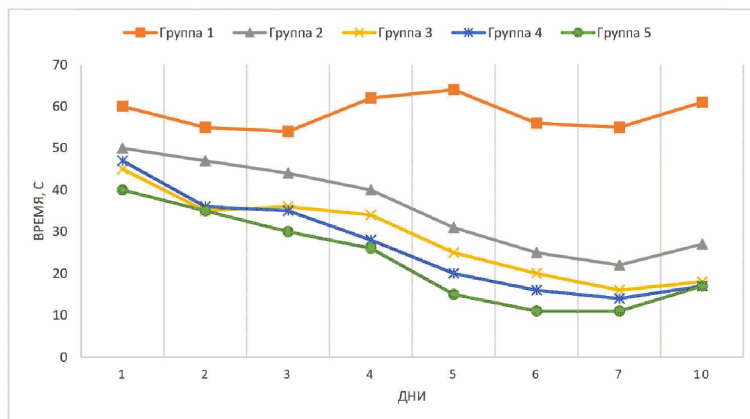
35

40

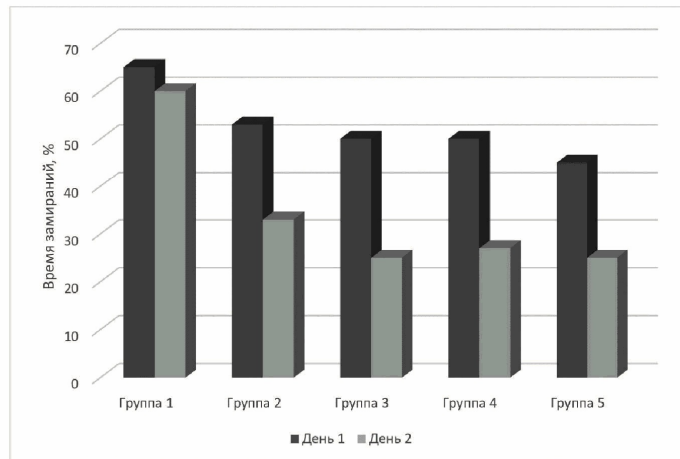
45



Фиг.1



Фиг.2



Фиг.3