

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202191880** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2021.11.23

(22) Дата подачи заявки  
2020.02.10

(51) Int. Cl. *A61K 31/194* (2006.01)  
*A61K 31/198* (2006.01)  
*A61K 31/405* (2006.01)  
*A61K 31/4172* (2006.01)  
*A61P 25/00* (2006.01)  
*A61K 31/4415* (2006.01)  
*A61K 31/51* (2006.01)

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ АМИНОКИСЛОТЫ, ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

---

(31) 102019000002109

(32) 2019.02.13

(33) IT

(86) PCT/IB2020/051027

(87) WO 2020/165731 2020.08.20

(71) Заявитель:

**ПРОФЕШНЛ ДИЕТЕТИКС С.П.А.  
(IT)**

(72) Изобретатель:

**Джорджетти Паоло Лука Мария (IT)**

(74) Представитель:

**Нилова М.И. (RU)**

---

(57) Композиция для применения для лечения заболевания центральной нервной системы, при этом композиция содержит действующее вещество, где указанное действующее вещество содержит аминокислоты: лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин, и карбоновые кислоты: лимонную кислоту, янтарную кислоту, яблочную кислоту.

**A1**

**202191880**

**202191880**

**A1**

# КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ АМИНОКИСЛОТЫ, ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

## Область, к которой относится изобретение

5 Настоящее описание в целом относится к композициям, содержащим аминокислоты. В частности, описание относится к композициям, содержащим аминокислоты, для применения для лечения повреждений центральной нервной системы у субъекта.

## Уровень техники

10 Центральная нервная система (ЦНС) включает головной мозг, координирующий функции более высокого уровня, и спинной мозг, который главным образом обеспечивает связь головного мозга с периферией. Инвалидность в результате повреждений центральной нервной системы зависит от вида, тяжести и анатомической локализации повреждения. Независимо от начальной локализации повреждения относительно ЦНС, повреждение является поступательным процессом, при этом первичное повреждение  
15 приводит к последовательности разрушительных явлений, которые могут повлиять как на тело клетки, так и на функцию аксонов, что вызывает продолжительную дисфункцию и длительную дегенерацию.

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) и травма спинного мозга (ТСМ) появляются, когда внешнее физическое повреждение вызывает травму, и могут варьироваться по степени  
20 тяжести от легкой до тяжелой. Травма спинного мозга является причиной инвалидности с неблагоприятными неврологическими исходами и ограниченными терапевтическими возможностями. Существует два основных типа травмы спинного мозга (ТСМ): рассечение спинного мозга и ушиб спинного мозга. ТСМ приводит к частичной или полной потере моторных или сенсорных функций в области ниже повреждения с  
25 разрушительными последствиями для пациента как на физическом, так и на психологическом уровне. Патологической основой указанных заболеваний является потеря нервной ткани, которая прерывает нервные импульсы от центральной нервной системы к мышцам. Ежегодно во всем мире травмы спинного мозга получают примерно 250000–500000 человек (что соответствует частоте 30–60 людей каждый час). Указанным  
30 пациентам требуется пожизненная обширная медицинская помощь, стоимость которой с учетом расчетной продолжительности жизни оценивается в 1–4 миллиона евро на одного пациента. Несмотря на то, что ТСМ представляет собой серьезное социальное и экономическое бремя, в настоящее время имеется все лишь несколько новых возможных методов лечения. За последние 30 лет прогресс в области медицинской помощи позволил  
35 увеличить выживаемость пациентов с ТСМ. Однако фундаментальные и

междисциплинарные исследования не привели к существенному улучшению неврологических исходов.

### **Краткое описание изобретения**

5 В настоящем описании представлены композиции на основе аминокислот, которые, в частности, эффективны при лечении повреждений центральной нервной системы у субъекта.

Согласно настоящему описанию, вышеупомянутая задача решается благодаря объекту изобретения, определенным образом раскрытому в следующих пунктах формулы изобретения, которые считаются составляющей неотъемлемой частью этого изобретения.

10 Вариант реализации настоящего изобретения обеспечивает композицию для применения для лечения повреждения центральной нервной системы у субъекта, при этом композиция содержит действующее вещество, где указанное действующее вещество содержит аминокислоты: лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин, и карбоновые кислоты: лимонную кислоту, янтарную кислоту, яблочную кислоту).

15 В одном или нескольких вариантах реализации действующее вещество композиции дополнительно содержит одну или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из гистидина, фенилаланина, метионина, триптофана, цистеина и тирозина.

В предпочтительном варианте реализации повреждение центральной нервной системы выбрано из группы, состоящей из повреждения головного мозга, повреждения спинного мозга, повреждения периферического нерва, демиелинизирующего заболевания. В одном или нескольких вариантах реализации повреждение спинного мозга включает контузионное повреждение спинного мозга.

25 Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения обеспечивает способ лечения повреждений центральной нервной системы у субъекта, при этом способ включает выбор композиции, содержащей действующее вещество, которое содержит аминокислоты: лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин, и карбоновые кислоты: лимонную кислоту, янтарную кислоту и яблочную кислоту), и введение указанной композиции для лечения повреждений центральной нервной системы.

### **Краткое описание графических материалов**

30 Далее изобретение будет описано только в качестве примера со ссылкой на прилагаемые фигуры, где:

- На фигуре 1 показаны результаты количественного определения площади

митохондрий при дифференцировке нервных стволовых клеток (НСК) *in vitro* после применения добавки композиции в соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения. Данные представлены в виде: среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего значения (SEM). \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ;

5 - На фигуре 2 показаны результаты количественной оценки окислительного метаболизма при дифференцировке НСК *in vitro* при применении добавки композиции в соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения. Анализатор внеклеточного потока Seahorse позволяет оценить различные биоэнергетические параметры при последовательном введении различных ингибиторов митохондриальной  
10 цепи транспорта электронов. Инъекция ротенона и антимицина А позволяет определить немитохондриальную норму расхода кислорода (НРК) и митохондриальное дыхание на исходном уровне. Инъекция олигомицина позволяет оценить дыхание, связанное с синтезом АТФ, при этом максимальное дыхание индуцируют разобщающим агентом митохондриального окислительного фосфорилирования (FCCP). Данные представлены в  
15 виде: среднее значение  $\pm$  SEM. \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ;

- На фигуре 3 показан паттерн нейронального созревания дифференцирующихся НСК *in vitro* при добавлении композиции в соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения. Графики А и В показывают результаты количественного анализа  
20 нейронов MAP2<sup>+</sup> после 10 дней развития (DIV) в контрольной группе после применения ALPHA5 0,1 %, ALPHA5 0,5 % и ALPHA5 1 %. Данные представлены в виде: среднее значение  $\pm$  SEM. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ;

- На фигуре 4 показано созревание дендритных шипиков и экспрессия маркеров возбуждающего синапса в дифференцирующихся НСК *in vitro* при добавлении композиции в соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения. Данные  
25 представлены в виде: среднее значение  $\pm$  SEM. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ ;

- На фигуре 5 показана масса животных при выполнении хирургической операции в трех различных сериях экспериментов (BCaa1-TCM, BCaa2-TCM, BCaa3-TCM). Данные представлены в виде: среднее значение  $\pm$  SEM. TCM = травма спинного мозга;

30 - На фигуре 6 показан результат анализа восстановления функции опорно-двигательного аппарата у контрольных и получавших композицию животных после тяжелой TCM. На графике показана оценка BMS в группе, получавшей композицию

(линия с треугольниками), и контрольной группе (линия с квадратами) после тяжелой ТСМ. Стрелка указывает на день начала применения композиции (3 dpi). Мыши с повреждением получали добавку композиции в стерильной воде (n = 22 из 3 экспериментов) или только стерильную воду (мыши контрольной группы; n = 25 из 3 экспериментов). Данные показаны в виде: среднее значение  $\pm$  SEM. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ . BMS = шкала оценки мышей Бассо; dpi = день после повреждения;

- На фигуре 7 показан график, представляющий оценку движения голеностопного сустава в контрольной группе (линия с квадратами) и у получавших композицию мышей (линия с треугольниками) после тяжелой ТСМ. Данные показаны в виде: среднее значение  $\pm$  SEM. \*\*  $p \leq 0,01$ , \*  $p < 0,05$ . BMS = шкала оценки мышей Бассо; dpi = день после повреждения;

- На фигуре 8 показан график, представляющий оценку дневного диуреза в контрольной группе (линия с квадратами) и у получавших композицию мышей (линия с треугольниками) после тяжелой ТСМ. Данные показаны в виде: среднее значение  $\pm$  SEM;

- На фигуре 9 показаны поперечные иммуноокрашенные срезы спинного мозга, демонстрирующие реакцию глиального рубца и площадь кисты у контрольных животных и мышей, получавших композицию, после тяжелой ТСМ. Поперечные срезы спинного мозга, иммуноокрашенные специфическим астроцитарным маркером GFAP и TO-PRO3™ для контрольной группы (A) и группы мышей, получавших композицию (B), демонстрируют области, рассматриваемые при выполнении количественной оценки. Поперечные срезы спинного мозга, иммуноокрашенные специфическим астроцитарным маркером GFAP и TO-PRO3™ для контрольной группы (C) и группы мышей, получавших композицию (D). Серым пунктиром обозначена область глиального рубца. Белым пунктиром обозначена кистозная область. Области, обозначенные белыми и серыми пунктирными линиями (очерченные белой линией), соответствуют общей площади поражения. (E) График, представляющий процентное соотношение площади кисты к общей площади поражения у мышей в контрольной группе и мышей в группе, получавшей композицию. (F) График, представляющий процентное соотношение площади глиального рубца к общей площади поражения у мышей в контрольной группе и мышей в группе, получавшей композицию. Количественные данные выражены в виде: среднее значение  $\pm$  SEM; \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ . Для каждой группы анализировали n = 3

животных и 8 срезов /животное. GFAP = глиофибриллярный кислый белок;

- На фигуре 10 показан график, демонстрирующий процентное соотношение площади глиального рубца к общей площади среза в контрольной группе и группе мышей, получавших композицию, после тяжелой ТСМ. Количественные данные выражены в виде: среднее значение  $\pm$  SEM; \* $p \leq 0,05$ . Для каждой группы анализировали  $n = 3$  животных и 8 срезов/животное;

- На фигуре 11 показан график, демонстрирующий количество NeuN-положительных клеток в спинном мозге животных, получавших композицию, и контрольных животных в области вокруг поражения. Данные представлены в виде: среднее значение  $\pm$  SEM; для каждой группы анализировали  $n = 3$  животных и 8 срезов/животное. \*\*  $P < 0,01$ ;

- На фигуре 12 показан график, представляющий процентное соотношение участков, занятых Нейрофиламентом-200, в выбранной исследуемой области (ROI) у получавших композицию мышей и животных в контрольной группе. Количественные данные выражены в виде: среднее значение  $\pm$  SEM; ТСМ = травма спинного мозга; для каждой группы анализировали  $n = 3$  животных и 8 срезов /животное;

- Фигура 13: на панели А и В показаны поперечные срезы спинного мозга, окрашенные Luxol Fast Blue (LFB), для животных, получавших композицию, и мышей контрольной группы, соответственно. LFB позволяет установить содержание миелина в паренхиме спинного мозга из демиелинизированной области (белая область). С) График показывает процентное содержание миелина в заднем столбе отделов спинного мозга мышей после применения композиции и в контрольной группе, рассчитанное как миелин-положительные пиксели в заднем столбе относительно пикселей общей площади заднего столба. Данные представлены в виде: среднее значение  $\pm$  SEM; для каждой группы анализировали  $n = 3$  животных и 8 срезов/животное. ns= незначимо. ТСМ = травма спинного мозга.

#### **Подробное описание предпочтительных вариантов реализации изобретения**

В нижеследующем описании приведены многочисленные конкретные детали для полного понимания вариантов реализации изобретения. Варианты реализации могут быть осуществлены без одной или нескольких определенных деталей или с другими способами, компонентами, материалами и т.д. В других случаях хорошо известные структуры, материалы или операции не показаны или описаны не полностью, чтобы избежать

затруднения понимания аспектов вариантов реализации.

Упоминание в данном описании «одного варианта реализации» или «варианта реализации» означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в рамках варианта реализации, включены по меньшей мере в один вариант реализации.

5 Таким образом, фразы «в одном варианте реализации» или «в варианте реализации» в различных местах данного описания не обязательно все относятся к одному и тому же варианту реализации. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим образом в одном или более вариантах реализации изобретения. Заголовки, представленные в данном документе, предназначены  
10 только для удобства и не влияют на объем или значение вариантов реализации изобретения.

Автор изобретения в настоящей заявке неожиданно обнаружил, что при добавлении определенных карбоновых кислот в определенных количествах в композицию, содержащую комбинацию лейцина, изолейцина, валина, треонина и лизина,  
15 обеспечивается высокая эффективность относительно благоприятствования и увеличения окислительного метаболизма в дифференцирующихся нейронных клетках.

Особенностью дифференцированных зрелых нейронов является переход от гликолиза к более окислительному метаболизму (Zheng и соавт., 2016 г.). Для изучения способности добавки описанной здесь композиции усиливать метаболический переход  
20 (прооксидативный метаболизм) и способствовать дифференцировке нейронов проанализировали влияние добавки композиции на дифференцирующиеся НСК, полученные из субвентрикулярной зоны (SVZ). Кроме того, для дальнейшего изучения влияния описанной здесь композиции на дифференцировку и созревание нейрональных клеток для НСК другого происхождения анализ был расширен на нейрогенных подобных  
25 лучевым глиоцитам клетках, присутствующих в мозговых оболочках (Bifari и соавт., 2017с).

Менингеальные НСК и НСК, полученные из SVZ, были выделены, как описано ранее (Bifari и соавт., 2017 г.), и отсортированы по экспрессии маркеров PDGFR $\beta$  и CD133 / Prominin-1, соответственно.

30 После культивирования менингеальные НСК и НСК, полученные из SVZ, были подвергнуты экспансии как нейросферы и дифференцированию в нейроны путем изменения условий среды (Bifari и соавт., 2009 г.). В среду добавляли композицию с

увеличивающейся концентрацией в соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения, начиная от 0,1 % до 0,5 % и 1 %.

Показано, что композиция согласно вариантам реализации настоящей заявки усиливает созревание нейронов *in vitro*, как указано в разделе «*Результаты*».

5 Кроме того, после получения многообещающих и неожиданных результатов анализа *in vitro* автор изобретения в настоящей заявке также выполнил оценку эффекта применения композиции на доклинической животной модели полного (тяжелого) контузионного повреждения спинного мозга (ТСМ).

10 ТСМ приводит к частичной или полной потере моторных или сенсорных функций в области ниже повреждения с разрушительными последствиями для пациента как на физическом, так и на психологическом уровне.

15 Описанная здесь композиция, содержащая в качестве действующего вещества аминокислоты: лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин, в комбинации с тремя карбоновыми кислотами, которые являются субстратами цикла трикарбоновых кислот, включая лимонную кислоту, янтарную кислоту и яблочную кислоту в определенных количествах, показала очень высокую эффективность для предупреждения потери нервной ткани и способствует регенерации нейронов после полной контузионной ТСМ, то есть повреждения, которое не имеет спонтанного восстановления и в основном отражает состояние, наблюдаемое у людей. Описанные здесь композиции значительно более  
20 эффективны, чем аналогичная композиция на основе аминокислот, не содержащая указанных определенных карбоновых кислот.

В одном или более вариантах реализации изобретения в раскрытой здесь композиции массовое соотношение между общим количеством лимонной кислоты, янтарной кислоты и яблочной кислоты и общим количеством аминокислот лейцина, изолейцина, валина, треонина, лизина составляет от 0,05 до 0,3, предпочтительно от 0,1 до  
25 0,25.

В одном или более вариантах реализации действующее вещество может дополнительно содержать одну или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из гистидина, фенилаланина, метионина, триптофана, цистеина и тирозина.

30 В одном или более вариантах реализации карбоновые кислоты, содержащиеся в композиции, могут состоять из лимонной кислоты, янтарной кислоты и яблочной кислоты.

В другом варианте реализации действующее вещество раскрытой здесь композиции может также включать аспарагиновую кислоту и/или орнитин L-альфа кетоглутарат (ОКГ).

Согласно одному из вариантов реализации композиция содержит действующее  
5 вещество, состоящее из лейцина, изолейцина, валина, треонина, лизина, гистидина, фенилаланина, метионина, триптофана, цистеина и необязательно тирозина, а также лимонной кислоты, янтарной кислоты и яблочной кислоты, причем указанные аминокислоты являются единственными аминокислотами, содержащимися в композиции. Лимонная кислота, янтарная кислота и яблочная кислота могут быть единственными  
10 карбоновыми кислотами, содержащимися в композиции.

В другом варианте реализации изобретения композиция может содержать аминокислоты изолейцин, лейцин и валин в количестве от 35% до 65% по массе, предпочтительно от 42% до 56% по массе относительно массы действующего вещества.

В одном или более вариантах реализации массовое соотношение между лейцином  
15 и лимонной кислотой составляет от 5 до 1, предпочтительно от 2,50 до 3,50.

В другом варианте реализации массовое или молярное количество лимонной кислоты выше, чем массовое или молярное количество каждой из яблочной или янтарной кислоты. В предпочтительном варианте массовое или молярное количество лимонной кислоты выше, чем массовое или молярное общее суммарное количество яблочной и  
20 янтарной кислоты. В другом варианте реализации массовое соотношение между лимонной кислотой и суммой яблочной кислоты и янтарной кислоты составляет от 1,0 до 4,0, предпочтительно от 1,5 до 2,5. В предпочтительном варианте массовое соотношение лимонная кислота:яблочная кислота:янтарная кислота составляет от 10:1:1 до 2:1,5:1,5, предпочтительно от 7:1:1 до 1,5:1:1; более предпочтительно от 5:1:1 до 3:1:1. В  
25 предпочтительном варианте реализации изобретения массовое соотношение лимонная кислота:яблочная кислота:янтарная кислота составляет 4:1:1.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предпочтительное молярное соотношение изолейцин:лейцин находится в диапазоне 0,2-0,7, предпочтительно в диапазоне 0,30-0,60, и/или предпочтительное массовое  
30 соотношение валин:лейцин находится в диапазоне 0,2-0,70, предпочтительно в диапазоне 0,30-0,65.

В другом варианте реализации молярное соотношение треонин: лейцин находится

в диапазоне 0,10-0,90, предпочтительно в диапазоне 0,20-0,70, и/или массовое соотношение лизин:лейцин находится в диапазоне 0,20-1,00, предпочтительно в диапазоне 0,40-0,90.

5 В предпочтительном варианте реализации изобретения отношение между общим молярным количеством лимонной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты и общим молярным количеством метионина, фенилаланина, гистидина и триптофана составляет более 1,35.

10 В одном или более вариантах реализации массовое соотношение суммарного количества лимонной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты и суммарного количества аминокислот с разветвленной цепью: лейцина, изолейцина, валина, составляет от 0,1 до 0,4, предпочтительно от 0,15 до 0,35.

15 В другом варианте реализации совокупное массовое количество аминокислот с разветвленной цепью: лейцина, изолейцина, валина плюс треонина и лизина, выше, чем совокупное массовое количество трех карбоновых кислот, таких как лимонная кислота, яблочная кислота и янтарная кислота. В предпочтительном варианте массовое количество отдельной карбоновой кислоты (лимонной кислоты, янтарной кислоты или яблочной кислоты) меньше массового количества каждой аминокислоты отдельно: лейцина, изолейцина, валина, треонина и лизина.

20 В другом варианте реализации изобретения совокупное молярное количество лизина и треонина выше, чем совокупное молярное количество трех карбоновых кислот: лимонной кислоты, янтарной кислоты и яблочной кислоты. Предпочтительно соотношение между совокупным молярным количеством трех карбоновых кислот: лимонной кислоты, янтарной кислоты, яблочной кислоты, и совокупным молярным количеством лизина и треонина составляет от 0,1 до 0,7, предпочтительно от 0,15 до 0,55.

25 В одном или более вариантах реализации описанная здесь композиция дополнительно содержит витамины, предпочтительно выбранные из группы витаминов В, таких как витамин В<sub>1</sub> и/или витамин В<sub>6</sub>. В еще одном варианте реализации настоящего изобретения композиция может включать углеводы, добавки и/или вкусоароматические вещества.

30 В одном или более вариантах реализации описанные здесь композиции предназначены для применения при лечении повреждений центральной нервной системы, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из повреждения головного мозга,

повреждения спинного мозга, повреждения периферических нервов, демиелинизирующего заболевания. Повреждение спинного мозга может включать контузионное повреждение спинного мозга.

5 При приготовлении композиций в соответствии с настоящим изобретением и, в частности, действующего вещества, предпочтительно избегать аминокислоты аргинина. Кроме того, другими аминокислотами, которых предпочтительно избегать при приготовлении описанной здесь композиции, могут быть серин, пролин, аланин. Такие аминокислоты могут быть неэффективными или даже вредными в некоторых концентрациях или стехиометрических соотношениях в композиции.

10 Аминокислоты, описанные в настоящей заявке, могут быть заменены соответствующими фармацевтически приемлемыми производными, а именно солями.

Согласно еще одному варианту реализации изобретения содержащие аминокислоты композиции могут включать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как, например, белки, витамины, углеводы, натуральные  
15 и искусственные подсластители и/или вкусоароматические вещества. В предпочтительном варианте реализации фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества могут быть выбраны из сывороточных белков, мальтодекстринов, фруктозы, казеината кальция, рыбьего жира, сукралозы, сложных эфиров сахарозы, витамина D3, витаминов группы В.

Для перорального применения композици согласно описанию могут быть в форме  
20 таблеток, капсул, гранул, геля, способного к гелеобразованию порошка или порошка.

Описанная здесь композиция может быть введена субъекту в суточной дозе действующего вещества в диапазоне от 8,0 г до 24,0 г.

Изобретение также обеспечивает способ лечения повреждений центральной нервной системы у субъекта, при этом способ включает выбор композиции, содержащей  
25 действующее вещество, которое содержит аминокислоты: лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин, и карбоновые кислоты: лимонную кислоту, янтарную кислоту и яблочную кислоту), и введение указанной композиции для лечения повреждений центральной нервной системы.

Дополнительные уточнения в отношении количеств и соотношений между  
30 различными аминокислотами для включения в композиции содержатся в прилагаемой формуле изобретения, которая является частью технического описания, представленного здесь в отношении изобретения.

**ПРИМЕРЫ**

В таблице 1 показаны сведения о композиции на основе аминокислот под названием «альфа 5m ( $\alpha 5m$ )», используемой при анализе *in vitro* и *in vivo*.

Таблица 1

<b>Состав (% м/м)</b>	<b><math>\alpha 5m</math></b>
<b>L-лейцин</b>	31,0885
<b>L-лизина HCl хлоргидрат</b>	16,903
<b>L-изолейцин</b>	10,3628
<b>L-валин</b>	10,3628
<b>L-треонин</b>	7,254
<b>L-цистеин</b>	3,1089
<b>L-гистидин</b>	3,1089
<b>L-фенилаланин</b>	2,0726
<b>L-метионин</b>	1,0363
<b>L-тирозин</b>	0,6218
<b>L-триптофан</b>	2,0726
<b>Витамин B1 (тиамина хлоргидрат)</b>	0,004
<b>Витамин B6 (пиридоксина хлоргидрат)</b>	0,0038
<b>Лимонная кислота безводная</b>	8,0000
<b>Яблочная кислота</b>	2,0000
<b>L-аспарагиновая кислота</b>	-
<b>Янтарная кислота</b>	2,0000
<b>Соотношение лейцин: изолейцин: валин</b>	3:1:1

5

Композиция  $\alpha 5m$  может быть приготовлена путем начального просеивания всех компонентов через сито 0,8 меш. Чтобы получить предварительную смесь каждый ингредиент (в количестве < 10% от совокупной массы) помещают в полиэтиленовый мешок вместе с порцией L-лизина HCl с получением 10% от массы всей композиции.

10 Затем мешок вручную встряхивают в течение 5 минут. После этого предварительную

смесь загружают в миксер (Planetaria) вместе с оставшимся количеством ингредиентов и перемешивают в течение 15 минут при 120 об/мин с получением конечной однородной композиции.

### МЕТОДЫ

#### 5 Культивирование и обработка клеток

К клеточным культурам менингеальных НСК, НСК, полученных из субвентрикулярной зоны (SVZ), (men-Neurons и SVZ-Neurons) добавляли композицию  $\alpha 5m$  ( $\alpha 5m$ ).  $\alpha 5m$  добавляли в определенную культуральную среду (0,1 %, 0,5 %, 1 %), затем pH среды доводили до 7,4 и фильтровали перед добавлением к различным культурам клеток.  $\alpha 5m$  заменяли каждые 2-3 дня и применяли до созревания men-Neurons и SVZ-Neurons через 10 дней *in vitro* (DIV).

#### Иммунофлуоресценция клеточных культур

Сначала клетки высевали на предметные стекла, покрытые поли-D-лизином. После стадии фиксации в 4 % параформальдегиде (PFA, Sigma-Aldrich) неспецифические сайты связывания блокировали при инкубации в блокирующем растворе (3 % фетальная бычья сыворотка, 1 % бычий сывороточный альбумин, 0,3 % Тритон X-100 в PBS 1X). Затем клетки инкубировали в растворе первичных антител (специфические первичные антитела в блокирующем растворе) в течение 1,5 ч при комнатной температуре, дважды промывали блокирующим раствором и инкубировали в растворе специфических вторичных антител (специфические вторичные антитела в блокирующем растворе) в течение 1 ч. После трех промывок в блокирующем растворе препараты инкубировали с ядерным красителем TO-PRO3 (Thermo Fisher Scientific) в течение 10 минут и помещали на стеклянные предметные стекла для количественной оценки с применением конфокального микроскопа (конфокальный микроскоп Zeiss LSM 710). Первичное антитело: Ассоциированный с микротрубочками белок 2 (кроличий MAP2, Sigma, 1: 200) для мечения зрелых нейронов, TOMM20 (мышь, 1: 200, Abcam) для мечения митохондрий. Использовали следующие вторичные антитела: ослиные анти-кроличьи Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, 1: 500), козы анти-кроличьи Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, 1: 500).

#### Животные и хирургические процедуры

30 Протокол эксперимента был одобрен и проведен в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ от 24 ноября 1986 г. (86/609 / ЕЭС) и требованиями Министерства здравоохранения Италии и соответствовал Национальному руководству по

защите животных.

Взрослых самок мышей C57BL/6J (возраст 7 недель) подвергали ламинэктомии, а контузионное повреждение (ТСМ) получали на уровне позвонка 11 грудной клетки (T11). Провели три различных эксперимента с 18, 20 и 12 животными, соответственно.

5            Перед выполнением каждой операции по поводу ТСМ всех животных взвешивали, и в экспериментах использовали только мышей с массой тела в диапазоне от 16 до 21 г. Масса животных во время операции показана на фигуре 5.

10           В результате выполнения процедуры по поводу тяжелой ТСМ в связи с тяжестью проведенных операций или осложнениями в восстановительный период погибло 1 животное из 50.

Животных содержали отдельно в чистых полипропиленовых клетках и разделили на 2 группы: 1) группа, получавшая контроль с кормом (CTRL, n = 22); 2) группа, получавшая  $\alpha 5m$  ( $\alpha 5m$ , n = 25), то есть группа животных, получавших корм с аминокислотной композицией, показанной в таблице 1.

15            Оценка функций опорно-двигательного аппарата

20           Для оценки влияния добавки  $\alpha 5m$  на восстановление двигательной функции после тяжелой ТСМ провели анализ по шкале оценки мышей Бассо (BMS) (Basso и соавт., 2006 г.). Двигательные характеристики каждой мыши оценивали в момент времени 1, 3, 5, 7 dpi в течение первой недели после операции по поводу ТСМ и два раза в неделю (10, 14, 17, 21, 28, 31 dpi) до окончания эксперимента (31 dpi), когда мышей перфузировали, и спинной мозг рассекали. В анализ были включены только мыши, показавшие оценку по шкале BMS на уровне 0 в момент времени 1 dpi; мыши с более высокой оценкой по шкале BMS были исключены из исследования.

25            Анализ движения голеностопного сустава

30           Данный параметр позволяет определить, оказывает ли применяемая композиция положительный эффект при предотвращении обострения спастического состояния мышц, связанного с движением голеностопного сустава. В рамках данного анализа оценка движения как левого, так и правого голеностопного сустава выполнялась с учетом качества их движения: «0» соответствует отсутствию движения (спастическое состояние), «0,5» - неполному движению, «1» - нормальному движению.

Оценка функциональности мочевого пузыря

Диурез животных анализировали в период от 1 dpi до окончания эксперимента.

Мочевые пузыри опорожнялись вручную, а мочу собирали и взвешивали дважды в день до момента времени 5 dpi, а затем один раз в день до окончания эксперимента.

Гистологическое исследование тканей и иммуногистохимический анализ

Фиксация и обработка спинного мозга

5 Животных анестезировали при внутрибрюшинной инъекции хлоралгидрата (2,2,2-трихлорэтан-1,1-диол, 2 мл/кг) и интракардиально перфузировали физиологическим раствором (0,9 % NaCl) с последующим введением 4 % параформальдегида (PFA, Sigma-Aldrich) с добавкой 4 % сахарозы в PBS 1X. Спинной мозг извлекали и фиксировали в течение ночи в 4 % PFA/ 4 % сахарозе. Затем хранили в 30 % растворе сахарозы при 4 °C с  
10 целью криозащиты тканей. Для гистохимического анализа фрагмент рассеченного спинного мозга размером 1,5 см (на расстоянии 0,75 см ростральнее и 0,75 см каудальнее места поражения) заливали компаундом с оптимальной температурой резки (ОСТ) и получали криосрезы (поперечные срезы толщиной 25 мкм или продольные срезы толщиной 20 мкм). Полученные срезы хранили при -20 °C и анализировали  
15 гистологическими и иммуногистохимическими методами.

Окрашивание красителем Luxol Fast Blue (фиг. 13)

Количественное содержание миелина определяли в срезах ткани с помощью окрашивания с красителем Luxol Fast Blue (LFB). Сначала готовили 0,1 % раствор LFB при растворении LFB (Sigma-Aldrich) в 95 % этаноле (EtOH, Carlo Erba) и 1,22 % ледяной  
20 уксусной кислоте (Carlo Erba). Затем срезы гидратировали в растворах EtOH (100 %, 95 %, 70 % и 50 %) и окрашивали 0,1 % раствором LFB при 40 °C в течение 40 минут. Затем их промывали водопроводной водой и расслаивали в 0,05 % растворе Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich), обезвоживали в растворах EtOH (50 %, 70 %, 95 % и 100 %), очищали в ксилоле (Carlo Erba) и готовили препарат с помощью быстрой заливочной среды Entellan (Merck-  
25 Millipore) для анализа методом светолучевой микроскопии содержания миелина (Zeiss Axioscop2).

Анализ тканей спинного мозга

Криосрезы оттаивали, промывали PBS 1X и инкубировали в течение 30 минут в блокирующем растворе (0,25 % Тритон X-100, 2 % бычий сывороточный альбумин в PBS  
30 1X) для блокирования участков неспецифического связывания. Затем препараты инкубировали в растворе первичных антител (специфические первичные антитела в блокирующем растворе) в течение ночи при 4 °C. После 6 промывок в течение 5 минут в

блокирующем растворе срезы инкубировали в растворе специфических вторичных антител (специфические вторичные антитела в блокирующем растворе) в течение 4 часов при комнатной температуре. После трех промывок в блокирующем растворе и трех в PBS 1X срезы инкубировали с ядерным красителем TO-PRO3 (Thermo Fisher Scientific) или 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, Thermo Fisher Scientific, 1:2000) в течение 10 минут и готовили препарат с использованием 1,4-диазабцикло (2.2.2) октана (DABCO, Sigma-Aldrich) для количественной оценки под микроскопом (конфокальный микроскоп Zeiss LSM 710). Используемые первичные антитела: Глиофибрилярный кислый белок (козье GFAP, 1: 200, Abcam) для мечения астроцитов (фиг. 9), Нейрофиламент-200 (кроличий NF200, 1: 200, Sigma) для мечения белка нейрофиламента 200 кДа нейронального цитоскелета (фиг. 12), NeuN (NeuN мыши, Chemicon, 1: 200) для мечения нейронов (фиг. 11). Используемые вторичные антитела: ослиные анти-мышинные Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, 1: 500), козьи анти-кроличьи Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, 1: 500), ослиные анти-мышинные Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, 1: 500), козьи анти-мышинные CY3 (Amersham, 1: 500), ослиные анти-козьи Alexa Fluor 488 (Life-technologies, 1: 500).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **Анализ in vitro**

#### **Содержание митохондрий в дифференцирующихся НСК in vitro**

При помощи иммунофлуоресценции и конфокального анализа оценивали площадь, занимаемую митохондриальным маркером TOMM20, в MAP2-положительных нейрональных клетках.

График на фигуре 1 показывает результаты количественной оценки митохондриальной площади (то есть площади TOMM20+) на дендрит MAP2+ в дифференцирующихся нейронах, что демонстрирует, что добавка  $\alpha 5m$  позволяет увеличивать содержание митохондрий в концентрации 0,5 %.

#### **Окислительный метаболизм в дифференцирующихся НСК in vitro**

Окислительный метаболизм дифференцирующихся клеток НСК оценивали путем анализа нормы расхода кислорода (НРК) в контрольной группе и группе, получавшей  $\alpha 5m$  (концентрация 0,5 %), для men-Neurons и SVZ-Neurons с использованием технологии анализа клеточного метаболизма Seahorse.

Статистически значимое увеличение НРК наблюдалось в дифференцирующихся

нейронах при использовании добавки композиции  $\alpha 5m$  (фиг. 2A), и, соответственно, увеличение базального и максимального дыхания, как показано на фиг. 2B и C.

Следует отметить, что продуцирование АТФ удваивалось (men-Neurons: с 125,1 до 280,1 пмоль/мин/мкг, фиг. 2D; SVZ-Neurons: с 156,1 до 523,0 пмоль/мин/мкг), что указывает на более высокую передачу энергии.

Таким образом, в соответствии с ранее полученными результатами, увеличение митохондриальной функциональности наблюдалось для клеток при использовании добавки композиции по настоящей заявке.

#### Дендритное разветвление дифференцирующихся клеток НСК

Men-Neurons и SVZ-Neurons показали увеличение окислительного метаболизма и митохондриальной активности после применения добавки  $\alpha 5m$ . Для сравнения созревания нейронов менингеальных и НСК, полученных из SVZ, в контрольной группе и в условиях с применением добавки индуцировали нейросферы для их дифференцировки в нейроны, а морфологические изменения анализировали с помощью иммунофлуоресценции и конфокального анализа нейронального маркера MAP2 в момент времени 10 DIV.

Несмотря на то, что добавка  $\alpha 5m$  не изменяла процент дифференцирующихся клеток MAP2<sup>+</sup>, наблюдалось значительное увеличение морфологии зрелых нейронов, включая ветвление дендритов и дендритные шипики (фиг. 3 и фиг. 4).

При анализе морфологии ветвистых клеток MAP2<sup>+</sup> наблюдалось статистическое увеличение среднего числа ветвей (т.е. сегмента MAP2<sup>+</sup>, находящегося между двумя точками соединения) /клетка для men-Neurons при применении добавки с концентрацией 0,5 % (от 15,07 до 18,55 ветвей, фиг. 3A), и аналогичная тенденция наблюдалась также для SVZ-Neurons при применении добавки с концентрацией 0,5 % (от 15,27 до 17,07 ветвей).

Увеличение среднего числа ветвей соответствовало статистическому увеличению общей длины дендритов в обеих популяциях при применении добавки композиции  $\alpha 5m$  (men-Neurons: от 301,6 до 458,6 мкм, фиг. 3B; SVZ-Neurons: от 225,5 до 285,2 мкм). Полученные данные свидетельствуют об увеличении сложности клеток после добавления  $\alpha 5m$  и увеличении области покрытия дендритов.

Для дополнительного изучения ускорения созревания нейронов при применении добавки  $\alpha 5m$  оценивали количество и плотность дендритных шипиков для каждого условия эксперимента с программным обеспечением ImageJ. Число дендритных шипиков постепенно увеличивается в нейронах при применении добавки с концентрацией 0,5 %

(men-Neurons: от 119,6 до 198,2 шипиков/ нейрон MAP2+, фиг. 4А; SVZ-Neurons: от 109,2 до 152,0 шипиков/ нейрон MAP2+). Специфическую морфологию шипика анализировали с помощью программного обеспечения Neuron Studio (Rodriguez и соавт., 2008 г.). Дендритные шипики зрелых нейронов изменяют морфологию от удлинённых тонких шипиков до более устойчивых коротких и грибовидных шипиков.

Для men-Neurons увеличение коротких шипиков наблюдалось в концентрации композиции  $\alpha 5m$  0,1 % и 0,5 % (от 36,15 % до 48,62 % и 47,56 %, соответственно), а для SVZ-Neurons увеличение доли грибовидных шипиков на 0,1 % и 0,5 % (с 22,81 % до 28,58 % и 29,03 %, соответственно).

Полученные данные демонстрируют, что дендритные шипики как у men-Neurons, так и у SVZ-Neurons, при применении добавок композиции  $\alpha 5m$ , приобретают стабильную морфологию (т.е. короткие и грибовидные формы, соответственно), что подтверждает эффект добавки  $\alpha 5m$  на ускорение созревания нейронов.

Для подтверждения созревания дифференцирующихся нейронов оценивали наличие синапсов путем анализа экспрессии маркеров пре- и постсинаптического возбуждения синаптофизина и PSD95 в контрольной группе и в нейронах при применении добавки  $\alpha 5m$  с программным обеспечением ImageJ (Dzyubenko и соавт., 2016 г.).

Количество иммунореактивных точек синаптофизина (фиг. 4В), а также количество иммунореактивных точек PSD95 (фиг. 4С) увеличивалось в нейронах при применении добавки в сравнении с контрольной группой.

Полученные результаты подтверждают ускоренное созревание нейронов при применении добавки  $\alpha 5m$  в сравнении с контрольной группой, поскольку имеется больше ветвей, больше зрелых шипиков и больше синаптических маркеров из-за усиления окислительного метаболизма в дифференцирующихся нейронах.

### *Анализ in vivo*

Взрослых самок мышей C57BL/6J подвергали ламинэктомии, а контузионное повреждение получали на уровне позвонка 11 грудной клетки (T11). В результате выполнения процедуры по поводу ТСМ в связи с тяжестью проведенных операций или осложнениями в восстановительный период погибло 1 животное из 50.

Добавку композиции  $\alpha 5m$  (3 г/день в питьевой воде) применяли через три дня после ТСМ (3dpi). Данный терапевтический подход начинают примерно в конце подострой фазы патогенеза ТСМ. Добавку продолжали применять в течение 31 дня.

Сравнивали восстановление функций опорно-двигательного аппарата и результаты гистологического исследования тканей животных в группе, получавшей композицию, и контрольной группе.

#### Оценка функций опорно-двигательного аппарата

5 Для оценки влияния добавки  $\alpha 5m$  на восстановление двигательной функции после тяжелой ТСМ был проведен анализ по шкале оценки мышей Бассо (BMS). Двигательные характеристики каждой мышцы оценивали в момент времени 1, 3, 5, 7 dpi в течение первой недели после операции по поводу ТСМ и два раза в неделю (10, 14, 17, 21, 28, 31 dpi) до окончания эксперимента (31 dpi), когда мышей перфузировали, а спинной мозг рассекали.

10 В анализ были включены только мышцы, показавшие оценку по шкале BMS на уровне 0 в момент времени 1 dpi; мышцы с более высокой оценкой по шкале BMS были исключены из исследования.

График на фиг. 6 показывает оценку по шкале BMS для группы, получавшей композицию  $\alpha 5m$  (линия вверху с треугольниками), и контрольной группы (линия внизу с квадратами) после тяжелой ТСМ. Стрелка указывает на день начала применения композиции  $\alpha 5m$  (3 dpi). Мыши с повреждением получали композицию  $\alpha 5m$  в стерильной воде ( $n = 22$  из 3 экспериментов) или только стерильную воду ( $n = 25$  из 3 экспериментов).

Оценка по шкале BMS мышей, получавших композицию, постепенно и значительно увеличивается в сравнении с мышами с ТСМ в контрольной группе в течение

20 28 дней применения композиции.

В момент времени 31 dpi мышши, получавшие композицию, показали среднюю оценку по шкале BMS  $1,773 \pm 0,2434$ , в то время как в контрольной группе наблюдалась средняя оценка по шкале BMS  $0,92 \pm 1,772$  (разницу между условиями эксперимента анализировали с помощью двухстороннего теста ANOVA и апостериорного теста Тьюки).

25 Поэтому мышши, получавшие композицию  $\alpha 5m$ , показали значимое улучшение восстановления опорно-двигательного аппарата в сравнении с мышами контрольной группы. Как показано на фигуре 6, апостериорный анализ выявил значительные различия между группами в оценках по шкале BMS в момент времени 14, 17, 21, 24, 28, 31 dpi.

#### Анализ движения голеностопного сустава

30 «Спастичность» является распространенным симптомом, возникающим в результате травмы (Adam и Nick, 2005 г), и основной причиной инвалидности у людей, имеющих различные заболевания центральной нервной системы (такие как рассеянный

склероз, инсульт и мозговой паралич) и травмы (включая ТСМ и повреждение головного мозга).

Для определения влияния добавки композиции  $\alpha 5m$  на предотвращение обострения спастического состояния мышц провели оценку степени подвижности голеностопного сустава. Спастичность каждой мышцы, получавшей композицию, и мышцы в контрольной группе оценивали ежедневно, начиная с момента времени 21 dpi до окончания эксперимента (31 dpi), фиг.7.

Гибкость голеностопного сустава животных, получавших композицию, значительно улучшилась в сравнении с контрольной группой. В момент времени 31 dpi движение голеностопного сустава у животных, получавших композицию, составляло  $0,6888 \pm 0,0455$ , в то время как в контрольной группе  $0,5939 \pm 0,0651$  (разницу между условиями эксперимента анализировали с помощью двухстороннего теста ANOVA и апостериорного теста Тьюки).

Таким образом, мышцы, получавшие композицию  $\alpha 5m$ , продемонстрировали значительно большее движение голеностопного сустава в сравнении с мышцами контрольной группы в период от 21 dpi до 29 dpi, что указывает на более быстрое восстановление при спастичности мышц после травмы.

#### Оценка функциональности мочевого пузыря

Одним из наиболее частых эффектов после ТСМ является нарушение функции мочевого пузыря. После ТСМ мочевой пузырь, обычно называемый нейрогенным мочевым пузырем, претерпевает значительные изменения, при которых он становится спастическим или вялым (Taweel W.A и соавт., 2015 г.). Для изучения положительного влияния композиции  $\alpha 5m$  на восстановление функциональности мочевого пузыря после тяжелой ТСМ провели анализ дневного диуреза мышей, получавших композицию  $\alpha 5m$ , и мышей контрольной группы.

Животные, получавшие композицию  $\alpha 5m$ , и животные контрольной группы во время эксперимента имели сопоставимый дневной диурез (фиг. 8). В момент времени 31 dpi в группе животных, получавших композицию, средний дневной диурез составлял  $0,6359 \text{ г} \pm 0,1073 \text{ г}$ , в то время как в контрольной группе -  $0,5889 \text{ г} \pm 0,1145 \text{ г}$ , что свидетельствует о влиянии композиции  $\alpha 5m$  на восстановление функциональности мочевого пузыря после травмы.

#### Гистологическое исследование тканей

Травматические повреждения спинного мозга приводят к механическим повреждениям и последующей дегенерации тканей. Указанные явления связаны со сдвигом клеточных мембран и аксонов, нарушением гематоэнцефалического барьера, деградацией миелина, трансмиграцией иммунных клеток и гибелью клеток спинного  
5 мозга (Zhang и соавт., 2012 г.). Для изучения влияния применения композиции  $\alpha 5m$  на регенерацию поврежденной ткани, формирование кистозных (кисты) и глиальных рубцов паренхимы спинного мозга, количество нейронов, содержание миелина.

Образование кистозных и глиальных рубцов

После ТСМ образование глиального рубца и кистозного образования (Hu R и соавт., 2010 г., Yi-Min Yuan и Cheng He, 2013 г.) вокруг места повреждения приводит к  
10 ограничению пораженной области. Однако это подавляет регенерацию аксонов после ТСМ (Rooney GE и соавт., 2009 г.) и действует как физический и молекулярный барьер (Fehlings M.G. и Tator C.H., 1999 г.).

Учитывая важность ответа глиальных клеток на повреждение, автор изобретения в  
15 настоящей заявке выполнил оценку влияния применения композиции  $\alpha 5m$  на образование рубцов и ответ астроцитов. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили с использованием специфического маркера астроцитов, глиофибрилярного кислого белка (GFAP). Анализ выполняли на поперечных срезах спинного мозга, при этом наблюдали сегмент паренхимы длиной 1,5 см (15 поперечных срезов спинного мозга /животное) с  
20 центром в месте поражения (поражение на уровне позвонка T11).

На фиг. 9 показаны поперечные срезы спинного мозга, иммуноокрашенные специфическим астроцитарным маркером GFAP и TO-PRO3™ для контрольной группы (A, C) и группы мышей, получавших композицию  $\alpha 5m$  (B, D), иллюстрирующие области, рассматриваемые при выполнении количественной оценки. Серым пунктиром обозначена  
25 область глиального рубца. Белым пунктиром обозначена кистозная область (киста). Как показано на панели E, применение описанной здесь композиции приводило к значительному уменьшению кистозной области ( $21,62 \pm 2,505 \%$ ) в сравнении с контрольной группой ( $42,94\% \pm 3,249 \%$ ). Панель F демонстрирует, что после применения  $\alpha 5m$  у животных наблюдалась значительно большая площадь глиального рубца ( $78,81\% \pm$   
30  $2,232 \%$ ) в сравнении с контролем ( $57,06\% \pm 3,294 \%$ ).

На фиг. 10 показан график, демонстрирующий процентное соотношение площади глиального рубца к общей площади среза в контрольной группе и группе мышей,

получавших  $\alpha 5m$ . После применения  $\alpha 5m$  у животных наблюдалась значительно меньшая площадь кисты ( $3,55\% \pm 0,6756\%$ ) в сравнении с животными из контрольной группы ( $7,2\% \pm 0,7068\%$ ).

5 Полученные данные демонстрируют высокую эффективность описанной здесь композиции для предупреждения потери нервной ткани после травмы.

#### Содержание нейронов

Дегенерация ткани спинного мозга в результате первого механического повреждения сопровождается вторичным поражением, которое приводит к дальнейшему разрушению нейронов (Zhang N. и соавт., 2012 г.).

10 Для изучения эффектов добавки композиции  $\alpha 5m$  на содержание нейронов после тяжелой ТСМ автор изобретения в настоящей заявке оценил количество нейронов в паренхиме поврежденного спинного мозга путем иммунофлуоресцентного окрашивания специфическим нейрональным маркером NeuN. Анализ проводили на поперечных срезах спинного мозга, включающих сегмент паренхимы длиной 1,5 см (15 поперечных срезов  
15 спинного мозга /животное) с центром в месте поражения (поражение на уровне позвонка T11).

Прежде всего выполнили оценку числа NeuN-положительных клеток в цельном срезе спинного мозга. Удивительно, но анализ показал, что в области вокруг поражения в группе животных, получавших  $\alpha 5m$ , присутствовало больше нейронов ( $613,3 \pm 24,04$ ), чем  
20 в контрольной группе ( $224,9 \pm 58,03$ ), а разница была статистически значимой (фиг. 11).

Автор изобретения в настоящей заявке также оценил, сохраняется ли разница в числе нейронов в вентральной области срезов спинного мозга, где находятся двигательные нейроны. Кроме того, в этом случае число NeuN-положительных клеток было значительно выше в группе животных, получавших  $\alpha 5m$  ( $255,8 \pm 12,35$ ), в сравнении  
25 с контрольной группой ( $62,66 \pm 13,51$ ). Разница была статистически значимой, что свидетельствовало о влиянии описанных композиций на восстановление содержания нейронов после повреждения.

#### Анализ нейрофиламентов

Основными структурными белками аксонов зрелых нейронов являются  
30 нейрофиламенты (NF). Их экспрессия напрямую связана с ростом аксонов и сохранением гомеостаза нейронов (Wang H. и соавт., 2012 г.). После ТСМ потеря нейронов в сером веществе сопровождается потерей цепей нейрофиламентов и миелиновых белков (Qian J.

и соавт., 2010 г.).

Для обнаружения повторного роста аксонов у мышей с ТСМ, получавших композицию  $\alpha 5m$ , автор изобретения в настоящей заявке выполнил иммунофлуоресцентное окрашивание с использованием специфического маркера белков нейрофиламентов, Нейрофиламента-200 (NF200). В ходе анализа автор изобретения в настоящей заявке выполнил оценку продольных срезов спинного мозга с областью паренхимы длиной 1,5 см (6 поперечных срезов спинного мозга/животное) с центром в месте поражения (поражение на уровне позвонка T11). График, показанный на фигуре 12, демонстрирует процентное соотношение участков, занятых Нейрофиламентом-200, в выбранной исследуемой области (ROI) у получавших  $\alpha 5m$  мышей и животных в контрольной группе.

В группе, получавшей композицию, наблюдается тенденция к более высокому содержанию NF200 ( $23,56 \pm 6,441 \%$ ) в сравнении с контрольной группой ( $16,22 \pm 3,31\%$ ; фиг. 12).

Полученные результаты демонстрируют способность композиции  $\alpha 5m$  к обеспечению возобновления роста аксонов после травмы.

#### Ремиелинизирующий потенциал

Демиелинизация представляет собой важный компонент патологии ТСМ и способствует утрате функций (Waxman SG и соавт., 1989 г.). Для оценки ремиелинизирующего потенциала добавки композиции  $\alpha 5m$  у мышей после тяжелой ТСМ проводили окрашивание красителем Luxol Fast Blue (LFB). LFB позволяет установить содержание миелина в паренхиме спинного мозга (синяя область) из демиелинизированной области (белая область), как показано на фиг. 13. Анализ проводили на поперечных срезах спинного мозга, включающих сегмент паренхимы длиной 1,5 см (15 поперечных срезов спинного мозга /животное) с центром в месте поражения (поражение на уровне позвонка T11). График на фиг. 13 показывает процентное содержание миелина в заднем столбе отделов спинного мозга у животных после применения  $\alpha 5m$  ( $39,64\% \pm 0,3677$ ) и в контрольной группе ( $38,47\% \pm 0,8927$ ), рассчитанное как миелин-положительные пиксели в заднем столбе относительно пикселей общей площади заднего столба. Животные в момент времени 31 dpi, которые получали добавку  $\alpha 5m$ , имели такое же содержание миелина, что и животные в контрольной группе, что свидетельствует о ремиелинизирующем потенциале композиции  $\alpha 5m$  после тяжелой

TSM.

Результаты, представленные в настоящем описании, показывают, что предложенные композиции на основе аминокислот, содержащие комбинацию лейцина, изолейцина, валина, треонина, лизина, с лимонной кислотой, янтарной кислотой и  
5 яблочной кислотой, способны усиливать окислительный метаболизм дифференцирующихся нейронов, что способствует возобновлению роста аксонов после травмы, и препятствует потере нервной ткани в животной модели TSM.

На основании вышеизложенного видно, что композиции в соответствии с настоящим изобретением применимы для лечения повреждений центральной нервной  
10 системы у субъекта, при этом повреждения предпочтительно выбраны из группы, состоящей из повреждения головного мозга, повреждения спинного мозга, повреждения периферического нерва, демиелинизирующего заболевания.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adams, M.M., and Hicks, A.L. (2005). Spasticity after spinal cord injury. *Spinal Cord* 43, 577–586.
- 5 Basso, D.M., Fisher, L.C., Anderson, A.J., Jakeman, L.B., McTigue, D.M., Popovich, PG. (2006) Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma*. 23(5), 635-659.
- Bifari, F., Decimo, I., Chiamulera, C., Bersan, E., Malpeli, G., Johansson, J., Lisi, V., Bonetti, B., Fumagalli, G., Pizzolo, G., et al. (2009). Novel stem/progenitor cells with neuronal differentiation potential reside in the leptomeningeal niche. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 3195–3208.
- 10 Bifari, F., Decimo, I., Pino, A., Llorens-Bobadilla, E., Zhao, S., Lange, C., Panuccio, G., Boeckx, B., Thienpont, B., Vinckier, S., et al. (2017). Neurogenic Radial Glia-like Cells in Meninges Migrate and Differentiate into Functionally Integrated Neurons in the Neonatal Cortex. *Cell Stem Cell* 20
- Dzyubenko E, Rozenberg A, Hermann DM, Faissner A. et al. (2016). Colocalization of synapse marker proteins evaluated by STED-microscopy reveals patterns of neuronal synapse distribution in vitro. *J Neurosci Methods*. 273, 149-159.
- 15 Hu, R., Zhou, J., Luo, C., Lin, J., Wang, X., Li, X., Bian, X., Li, Y., Wan, Q., Yu, Y., et al. (2010). Glial scar and neuroregeneration: histological, functional, and magnetic resonance imaging analysis in chronic spinal cord injury. *J. Neurosurg. Spine* 13, 169–180.
- 20 Qian, J., Herrera, J.J., and Narayana, P.A. (2010). Neuronal and axonal degeneration in experimental spinal cord injury: in vivo proton magnetic resonance spectroscopy and histology. *J. Neurotrauma* 27, 599–610.
- Rodriguez, A., Ehlenberger, D.B., Dickstein, D.L., Hof, P.R., and Wearne, S.L. (2008). Automated Three-Dimensional Detection and Shape Classification of Dendritic Spines from Fluorescence Microscopy Images. *PLoS One* 3, e1997
- 25 Rooney, G.E., Endo, T., Ameenuddin, S., Chen, B., Vaishya, S., Gross, L., Schiefer, T.K., Currier, B.L., Spinner, R.J., Yaszemski, M.J., et al. (2009). Importance of the vasculature in cyst formation after spinal cord injury. *J. Neurosurg. Spine* 11, 432–437.
- Tator, C.H., and Fehlings, M.G. (1999). Review of clinical trials of neuroprotection in acute spinal cord injury. *Neurosurg. Focus* 6, e8.
- 30 Taweel, W.A., and Seyam, R. (2015). Neurogenic bladder in spinal cord injury patients. *Res. Rep. Urol.* 7, 85–99.

Wang, H., Wu, M., Zhan, C., Ma, E., Yang, M., Yang, X., and Li, Y. (2012). Neurofilament proteins in axonal regeneration and neurodegenerative diseases. *Neural Regen. Res.* 7, 620–626.

5 Waxman, S.G., Black, J.A., Kocsis, J.D., and Ritchie, J.M. (1989). Low density of sodium channels supports action potential conduction in axons of neonatal rat optic nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 1406–1410.

Yuan, Y.-M., and He, C. (2013). The glial scar in spinal cord injury and repair. *Neurosci. Bull.* 29, 421–435.

10 Zhang, N., Yin, Y., Xu, S.-J., Wu, Y.-P., and Chen, W.-S. (2012). Inflammation & apoptosis in spinal cord injury. *Indian J. Med. Res.* 135, 287–296.

Zheng, X., Boyer, L., Jin, M., Mertens, J., Kim, Y., Ma, L., Ma, L., Hamm, M., Gage, F.H., and Hunter, T. (2016). Metabolic reprogramming during neuronal differentiation from aerobic glycolysis to neuronal oxidative phosphorylation. *Elife* 5.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Композиция для применения для лечения повреждения центральной нервной системы у субъекта, содержащая действующее вещество, при этом указанное действующее вещество содержит аминокислоты: лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин, и карбоновые кислоты: лимонную кислоту, янтарную кислоту, яблочную кислоту.
2. Композиция для применения по п. 1, в которой массовое соотношение между общим количеством лимонной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты и общим количеством лейцина, изолейцина, валина, лизина, треонина составляет от 0,05 до 0,3, предпочтительно от 0,1 до 0,25.
3. Композиция для применения по п. 1 или п. 2, в которой массовое соотношение между общим количеством лимонной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты и общим количеством лейцина, изолейцина, валина составляет от 0,1 до 0,4, предпочтительно от 0,15 до 0,35.
4. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой массовое соотношение между лимонной кислотой и общим количеством яблочной кислоты и янтарной кислоты составляет от 1,0 до 4,0, предпочтительно от 1,5 до 2,5.
5. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой массовое соотношение лимонная кислота:яблочная кислота:янтарная кислота составляет от 10:1:1 до 2:1,5:1,5, предпочтительно от 7:1:1 до 1,5:1:1, более предпочтительно от 5:1:1 до 3:1:1.
6. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой указанное действующее вещество дополнительно содержит по меньшей мере одну аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из гистидина, фенилаланина, метионина, триптофана, тирозина, цистеина.
7. Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой

указанное действующее вещество дополнительно содержит гистидин, фенилаланин, метионин, триптофан, цистеин и необязательно тирозин.

5 **8.** Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой соотношение между общим молярным количеством лимонной кислоты, яблочной кислоты, янтарной кислоты и общим молярным количеством метионина, фенилаланина, гистидина и триптофана составляет более 1,35.

10 **9.** Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой соотношение между общим молярным количеством трех карбоновых кислот: лимонной кислоты, янтарной кислоты, яблочной кислоты, и общим молярным количеством лизина и треонина составляет от 0,10 до 0,70, предпочтительно от 0,15 до 0,55.

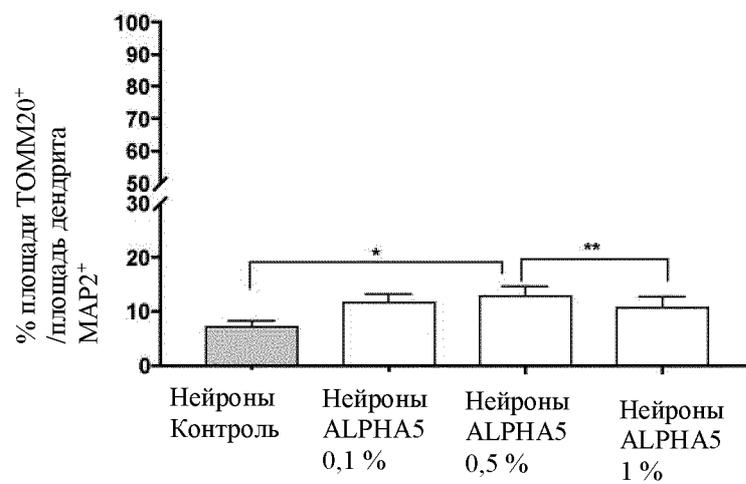
15 **10.** Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой массовое или молярное количество лимонной кислоты выше, чем общее массовое или молярное количество яблочной кислоты и янтарной кислоты.

20 **11.** Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, в которой массовое соотношение между лейцином и лимонной кислотой составляет от 5 до 1, предпочтительно от 2,50 до 3,50.

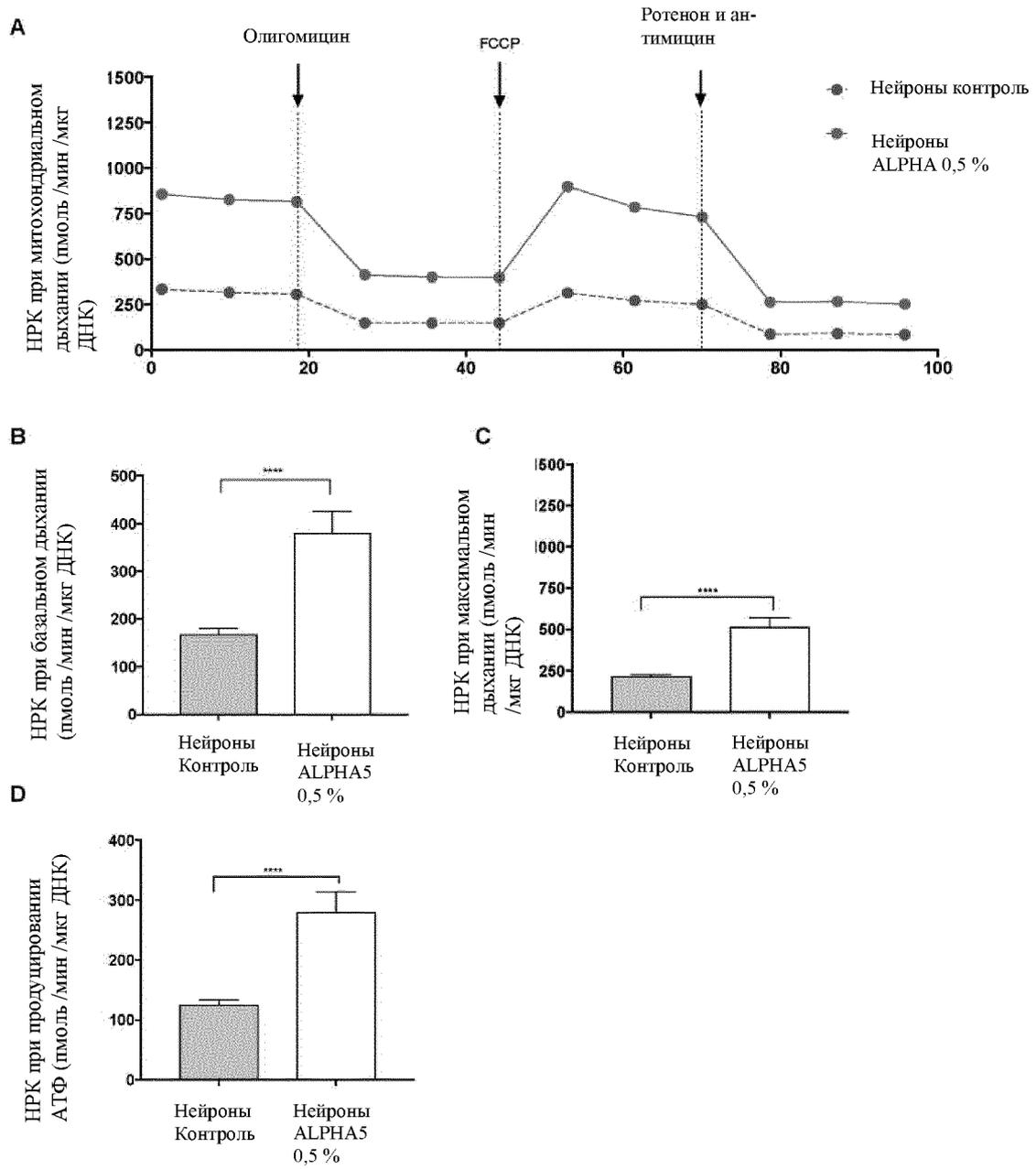
25 **12.** Композиция для применения по любому из предыдущих пунктов, которая дополнительно содержит один или более витаминов, предпочтительно выбранных из группы витаминов В, более предпочтительно витамина В1 и/или витамина В6.

**13.** Композиция для применения по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что повреждение центральной нервной системы выбрано из группы, состоящей из повреждения головного мозга, повреждения спинного мозга, повреждения периферического нерва, демиелинизирующего заболевания.

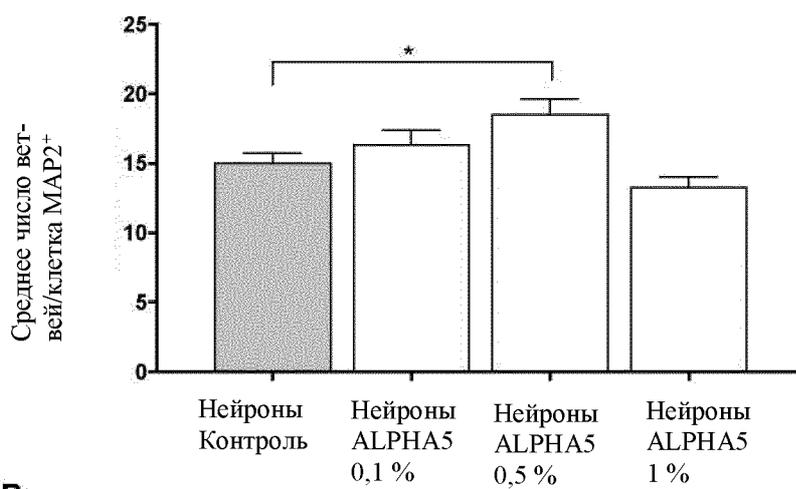
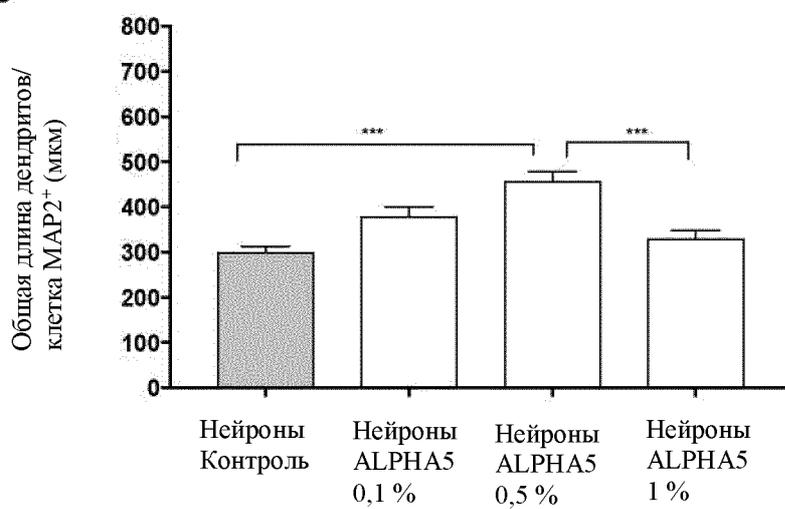
30 **14.** Композиция для применения по п. 13, отличающаяся тем, что повреждение спинного мозга включает контузионное повреждение спинного мозга.

**A**

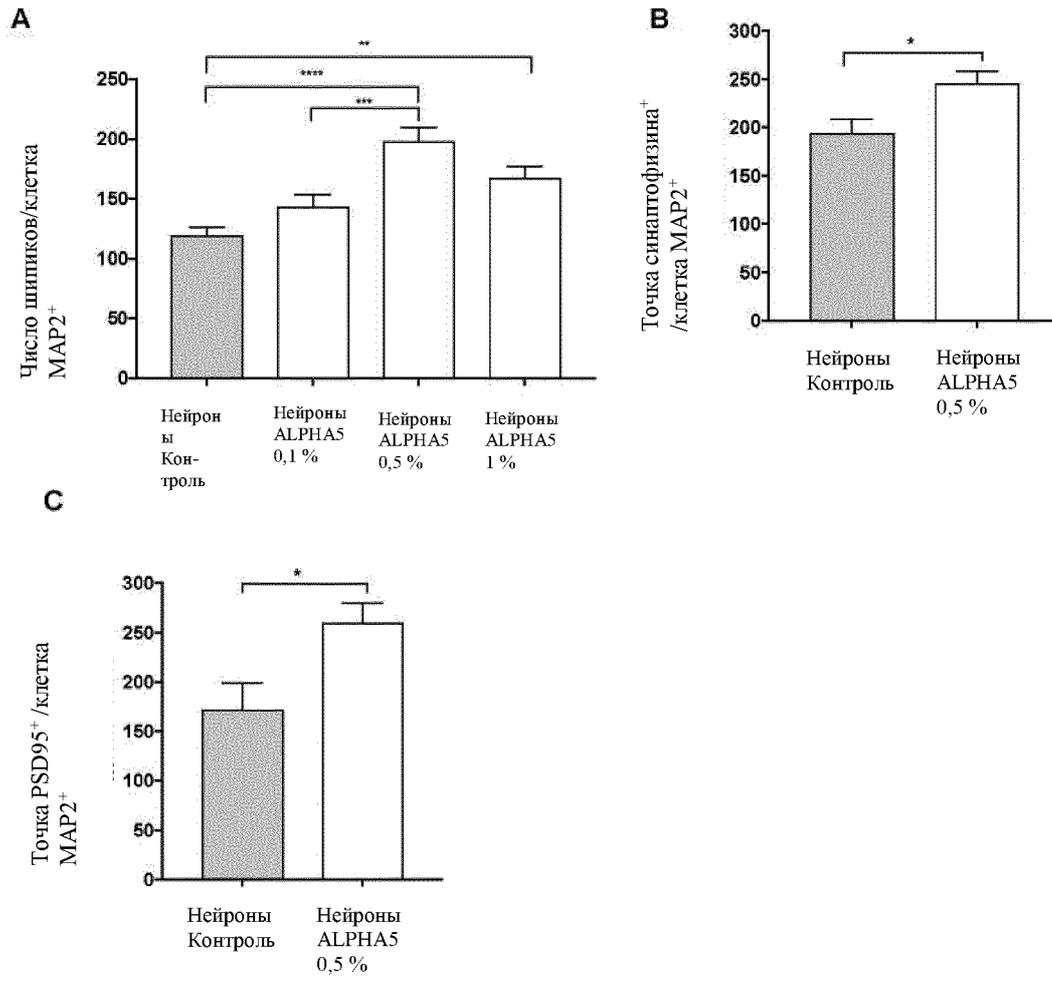
Фигура 1



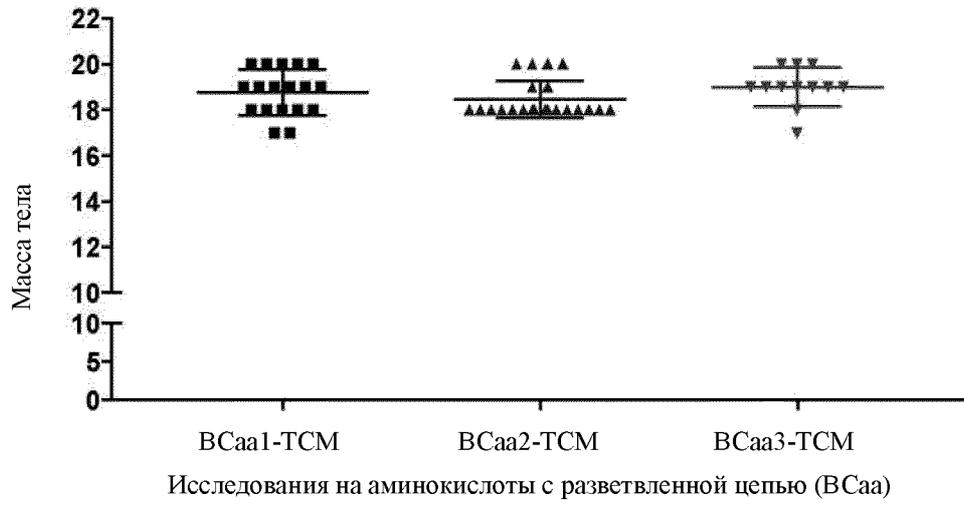
Фигура 2

**A****B**

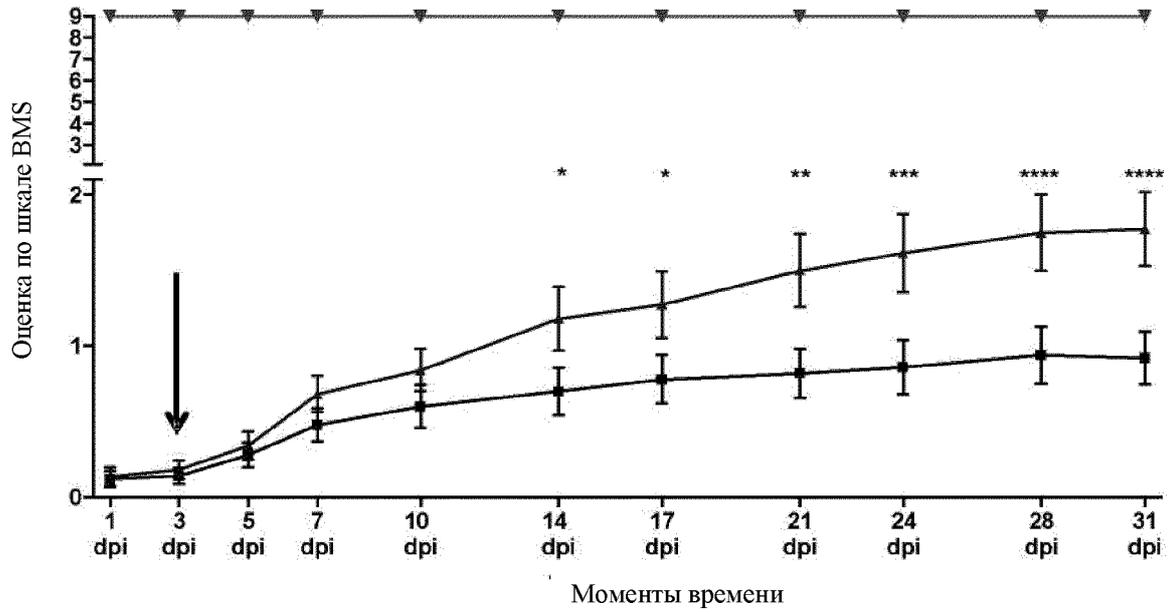
Фигура 3



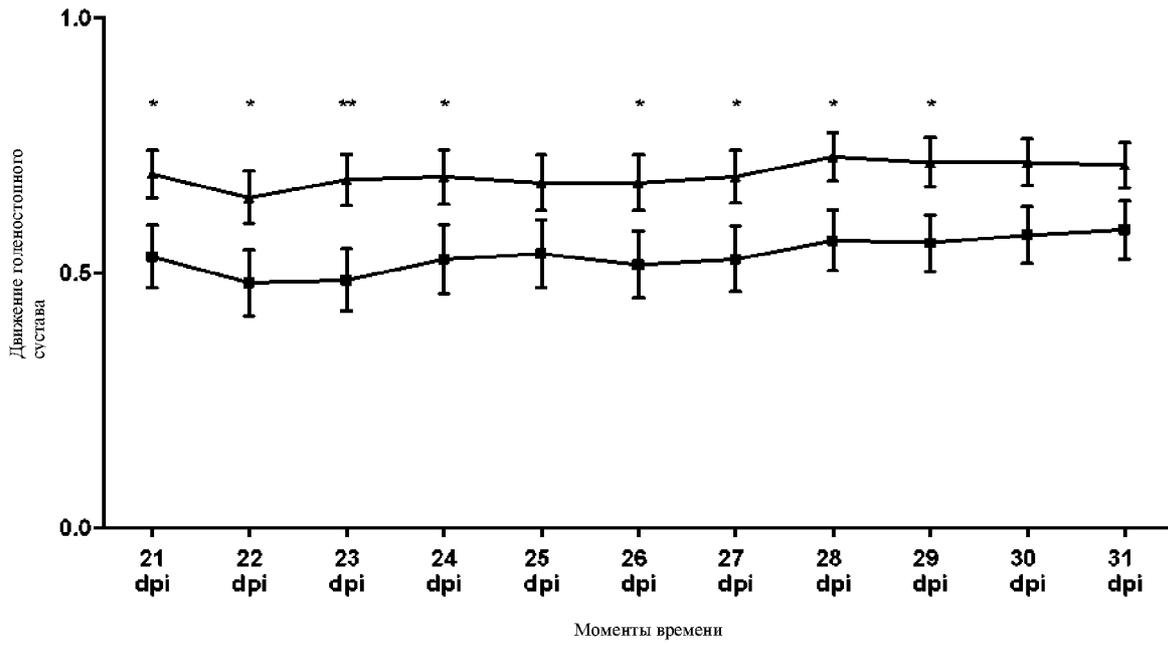
Фигура 4



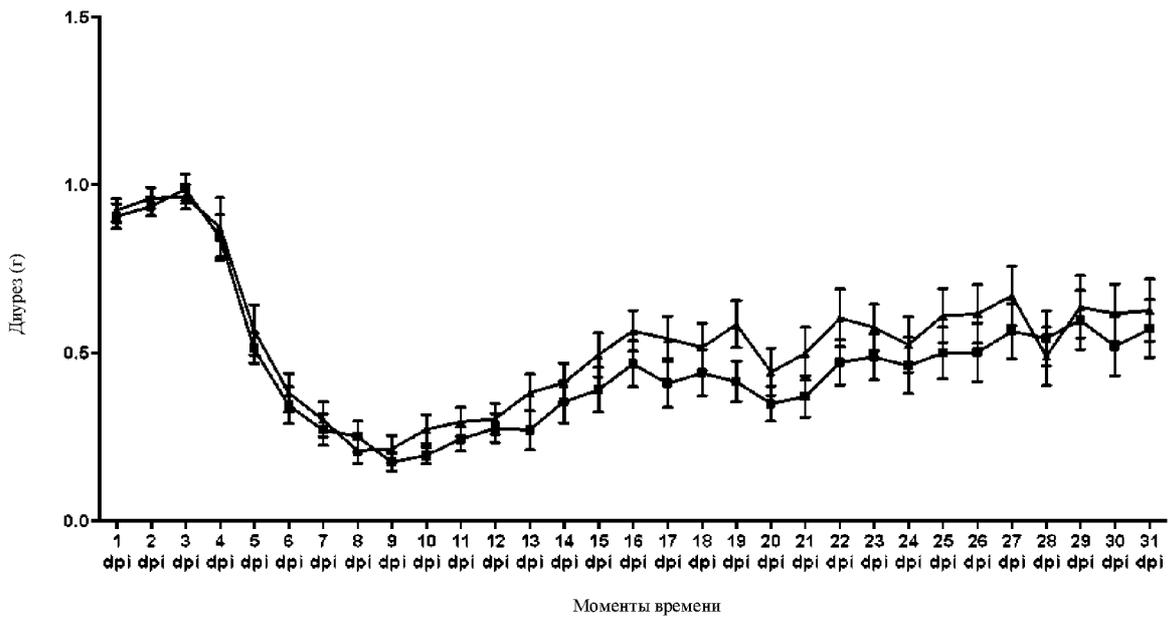
Фигура 5



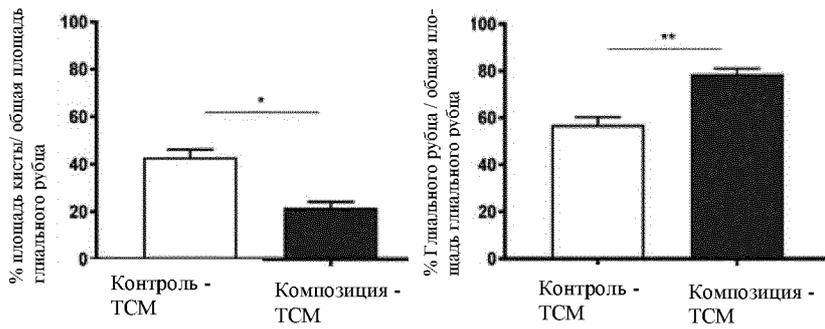
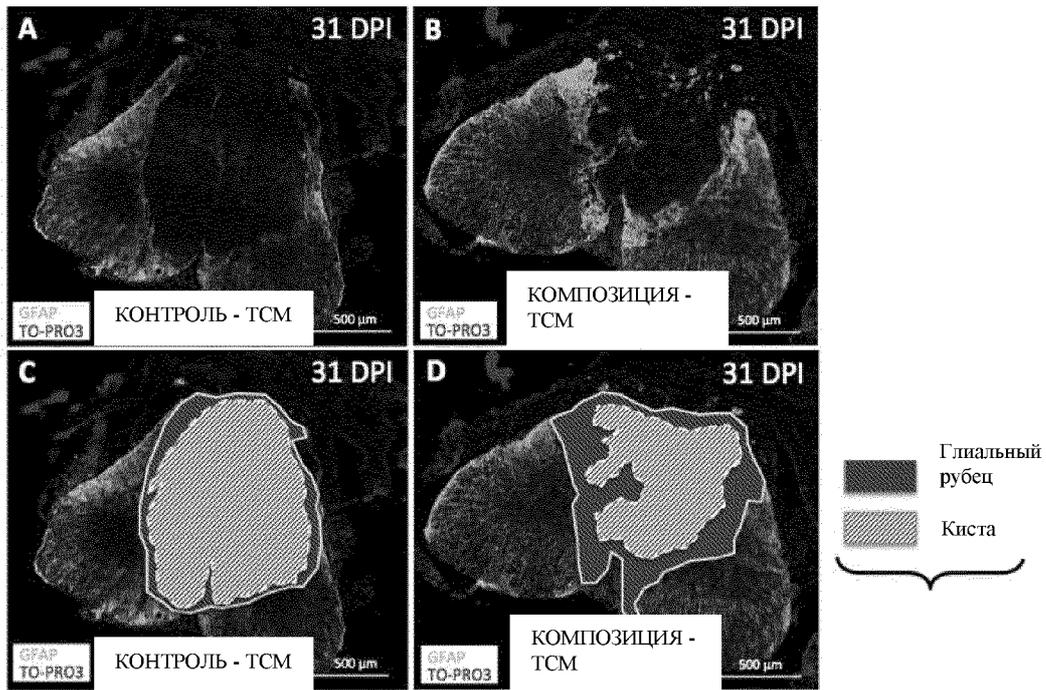
Фигура 6



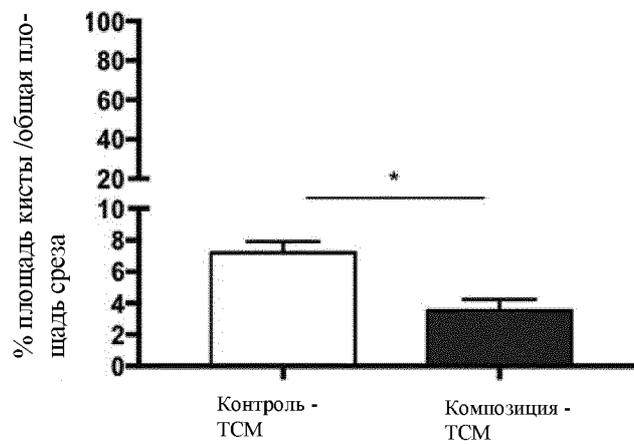
Фигура 7



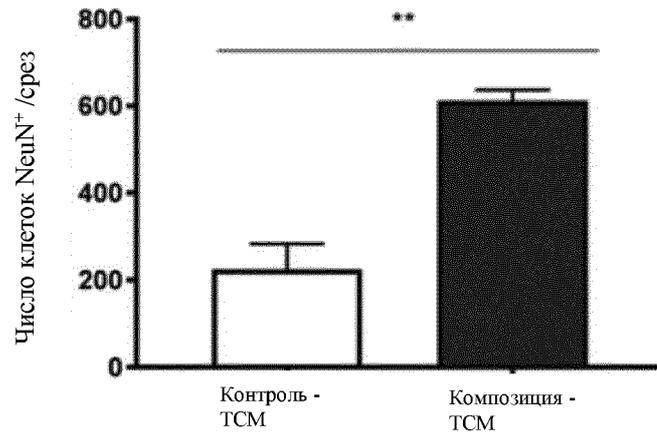
Фигура 8



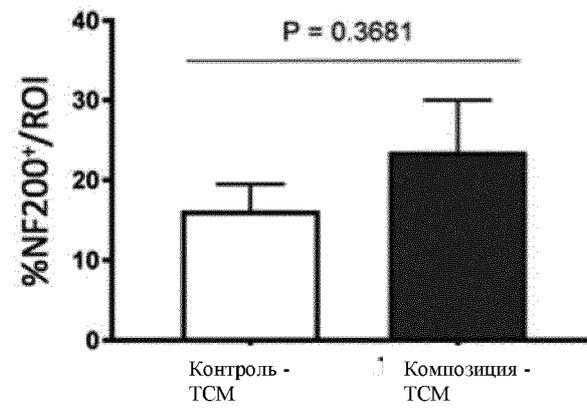
Фигура 9



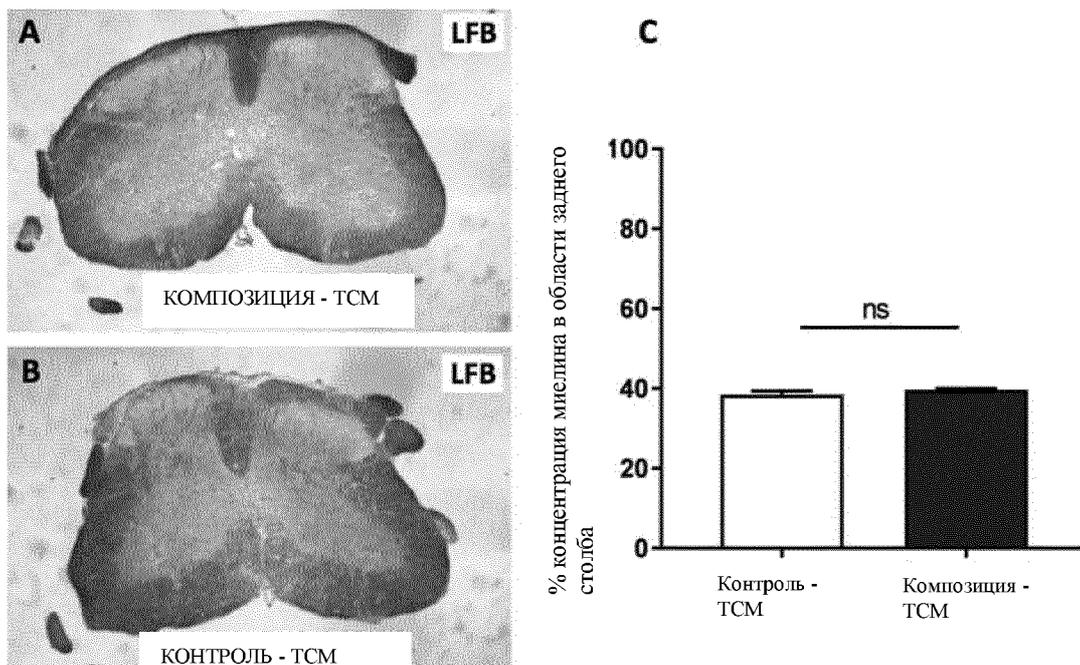
Фигура 10



Фигура 11



Фигура 12



Фигура 13