



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104042600 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 17

(21) 申请号 201410152946. X

(22) 申请日 2010. 02. 02

(30) 优先权数据

61/149, 310 2009. 02. 02 US

61/183, 548 2009. 06. 02 US

(62) 分案原申请数据

201080015722. 4 2010. 02. 02

(71) 申请人 帝斯曼知识产权资产有限公司

地址 荷兰海尔伦

(72) 发明人 K·尤科-毛罗

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东

(51) Int. Cl.

A61K 31/202 (2006. 01)

A61P 25/28 (2006. 01)

A61P 9/06 (2006. 01)

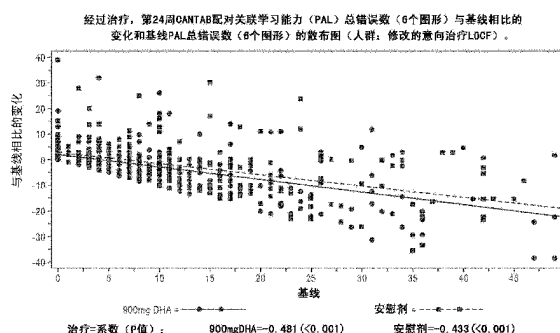
权利要求书1页 说明书34页 附图18页

(54) 发明名称

改善认知功能和降低心率的方法

(57) 摘要

本发明涉及通过给予含二十二碳六烯酸(DHA)而基本不含二十碳五烯酸(EPA)的剂型来提高与衰老相关的认知下降或轻度认知缺陷对象的认知功能的方法和降低对象心率的方法。



1. DHA 在制备治疗对象的轻度认知缺陷(MCI)的药物中的用途,其特征在于,该药物在基本不含二十碳五烯酸(EPA)和花生四烯酸(ARA)的剂型中含有约 0.84g 到约 1g 二十二碳六烯酸(DHA)。

2. 如权利要求 6 所述的应用,其特征在于,DHA 为该剂型总脂肪酸的约 30%到约 99.5% (w/w)。

3. 如权利要求 7 所述的应用,其特征在于,DHA 为该剂型总脂肪酸的约 35%到约 65% (w/w)。

4. 如权利要求 6 所述的应用,其特征在于,DHA 占该剂型总重的约 40%到约 50% (w/w)。

5. 如权利要求 8 所述的应用,其特征在于,DHA 占该剂型总脂肪酸含量的约 40%到约 45% (w/w)。

6. 如权利要求 6 所述的应用,其特征在于,DHA 占该剂型总重的约 35%到约 45% (w/w)。

7. 如权利要求 8 所述的应用,其特征在于,DHA 占该剂型总脂肪酸含量的约 35%到约 45% (w/w)。

8. 如权利要求 6 所述的应用,其特征在于,DHA 占该剂型总重的约 85%到约 96% (w/w)。

改善认知功能和降低心率的方法

[0001] 本发明专利申请是国际申请号为PCT/US2010/022952,国际申请日为2010年02月02日,进入中国国家阶段的申请号为201080015722.4,名称为“改善认知功能和降低心率的方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请根据35U.S.C. § 119(e) 要求2009年2月2日提交的美国申请第61/149,310号以及2009年6月2日提交的美国申请第61/183,548号作为优先权,且将其内容以引用的方式纳入本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及一种通过给予含二十二碳六烯酸(DHA)而基本不含二十碳五烯酸(EPA)的剂型来提高衰老相关的认知能力下降或轻度认知能力缺陷人群的认知能力和/或降低心率的方法。

背景技术

[0005] 衰老相关的认知缺陷被认为是痴呆发生的重要风险因素。由于老年人口的增加和有效的医疗方法尚未获得,研发预防和改善的方法至关重要。

[0006] 先前的研究推测增加鱼类和n-3多不饱和脂肪酸(PUFAs)的摄入可能对衰老相关认知能力的下降有保护作用。进一步研究表明血浆中二十二碳六烯酸(DHA,其为大脑中主要的长链 ω -3脂肪酸)的降低与健康老年对象和患或不患阿尔茨海默病的认知缺陷对象的认知能力下降有关。参见例如,Nelson等,Lipids32:1129-1136(1997);Knapp等,N Engl. J Med. 320:1037-1043(1989);和Bonaa等,N. Engl. J Med. 322:795-801(1990)。DHA在神经和视觉发育以及多种脑部功能中发挥重要作用。血浆DHA的下降与健康老年人和阿尔茨海默病患者的认知能力下降有关。参见例如,Heude等,Am. J Clin. Nutr. 77:803-808(2003);Tully等,Br. J Nutr. 89:483-490(2003)。更多的DHA摄入和更高的血浆DHA水平与偶发性阿尔茨海默病(AD)和全因痴呆症的相对风险呈负相关。参见例如,Morris等,Arch. Neurol. 60:194-200(2003);Schaefer等,Arch. Neurol. 63:1545-1550(2006)。给予藻类来源的DHA甘油三酯油降低了患有阿尔茨海默病的老年APPsw(Tg2576)小鼠模型的可溶性淀粉样蛋白水平(70%)、A β 42水平(49%)和斑块负荷(40%)以及3xTg-AD小鼠的A β 和tau水平。参见例如,Calon等,Neuron43:633-645(2004);Lim等,J. Neurosci. 25:3032-40(2005);和Green等,J. Neurosci. 27:4385-95(2007)。

[0007] 发明概述

[0008] 一方面,本发明涉及一种提高轻度认知能力缺陷或与衰老相关的认知能力下降的对象的认知能力的方法,包括:给予需要的对象每天约0.8克到约4克的二十二碳六烯酸(DHA),所述DNA基本不含二十碳五烯酸(EPA)。

[0009] 另一方面,本发明涉及一种降低对象心率的方法,包括:给予需要的对象每天约0.8克到约4克的二十二碳六烯酸(DHA),所述DHA基本不含二十碳五烯酸(EPA)。在一些

实施方式中,进行降低心率治疗的对象可有或没有相关的轻度认知缺陷或衰老相关的认知降低。

[0010] 在一些实施方式中,提供的 DHA 基本不含花生四烯酸(ARA)。

[0011] 在一些实施方式中,给予对象至少一个单位剂量的所述剂型。在一些实施方式中,该单位剂量含有约 0.2 克到约 1 克的 DHA。

[0012] 附图简述

[0013] 图 1 是经过治疗,第 24 周 CANTAB 配对关联学习能力(PAL)总错误数(6 个图形)与基线相比的变化和基线 PAL 总错误数(6 个图形)的散布图。

[0014] 图 2 是经过治疗,第 24 周 CANTAB 配对关联学习能力(PAL)总错误数(6 个图形)与基线相比的变化和基线 WMS III 逻辑记忆总分(即时)的散布图(人群:修改的意向治疗 LOCF)。

[0015] 图 3 是经过治疗,第 24 周 CANTAB 配对关联学习能力(PAL)总错误数(6 个图形)与基线相比的变化和基线 WMS III 逻辑记忆总分(延时)的散布图(人群:修改的意向治疗 LOCF)。

[0016] 图 4 是经过治疗,第 24 周 CANTAB 配对关联学习能力(PAL)总错误数(6 个图形)与基线相比的变化和 DHA 血浆浓度(重量%)与基线变化的对数值的散布图(人群:修改的意向治疗 LOCF)。

[0017] 图 5A 是 DHA 方案的一级功效分析表:第 24 周 CANTAB 配对关联学习能力(PAL)总错误数(6 个图形)与基线相比的变化汇总(人群:改良的意图治疗的 LOCF)。图 5B 显示 DHA 方案的二级功效分析:第 24 周其它认知和功能测试与基线相比的变化汇总(人群:修改的意向治疗 LOCF)。

[0018] 图 6 是 DHA 方案的一级功效分析表:第 24 周 CANTAB 配对关联学习能力(PAL)总错误数(6 个图形)与基线相比的变化汇总(人群:完成治疗 LOCF)。

[0019] 图 7 是一级功效分析表:第 24 周 CANTAB 配对关联学习能力(PAL)总错误数(6 个图形)与基线相比的变化汇总(人群:意向治疗的 LOCF)。

[0020] 图 8A 和 8B 显示二级功效分析:通过调查其他共变量基线 WMS III 逻辑记忆总分参数(即时或延时),CANTAB 配对关联学习能力(PAL)总错误数(6 个图形)与基线相比的变化汇总,(人群:修改的意向治疗 LOCF)。图 8A = 即时记忆,图 8B = 延时记忆。

[0021] 图 9A 到 9D 是二级功效分析:通过调查得到的 CANTAB 语音识别记忆(VRM)参数与基线相比的变化汇总(人群:改良的意图治疗的 LOCF)。图 9A = VRM 自主回忆的总正确数(即时);图 9B = VRM 总假阳性(延时);图 9C = VRM 识别的总正确数(即时);图 9D = VRM 识别的总正确数(延时)。

[0022] 图 10 是显示 24 周给予约 900mg DHA/天或安慰剂的对象的血浆磷脂脂肪酸水平 III 的表格。

[0023] 图 11 是显示在选择功效和安全性参数中和基线相比的变化与 24 周 DHA 血浆浓度(重量%)对数的表格,还包括心率与基线相比的变化。

[0024] 图 12A 和 12B 是安全性分析表:通过调查,生命体征参数与基线相比的变化汇总(观察到群体安全性)。图 12A = 体重和收缩压,图 12B = 舒张压和心率。

[0025] 发明详述

[0026] 本发明提供提高对象记忆, 认知能力和 / 或降低心率的方法, 包括给予需要的对象每天约 0.8 克到约 4 克基本不含 EPA 的 DHA。如下进一步讨论, 在一些实施方式中, 本文所述的方法涉及对有轻度认知缺陷或衰老相关的认知降低的对象的治疗以提高认知能力或降低对象认知缺陷或下降的严重性, 该方法包括给予需要的对象每天约 0.8 克到约 4 克基本不含 EPA 的 DHA。

[0027] 在本文中, DHA 给药还显示能降低治疗对象的心率。因此, 在一些实施方式中, 给予 DHA 也可以用于降低对象心率(特别是那些会从降低心脏负荷中受益的对象), 该方法包括给予需要的对象每天约 0.8 克到约 4 克基本不含 EPA 的 DHA。在一些实施方式中, DHA 可用于治疗患有轻度认知缺陷或衰老相关的认知下降的对象并可同时用于降低对象心率, 该方法包括给予需要的对象每天约 0.8 克到约 4 克基本不含 EPA 的 DHA。

[0028] 因此, 在一些实施方式中, 本发明提供一种提高患有轻度认知缺陷或衰老相关的认知降低的对象的认知能力和 / 或降低心率的方法, 包括给予需要的对象每天约 0.8 克到约 4 克基本不含 EPA 的 DHA。在一些实施方式中, 该剂型也基本不含花生四烯酸(ARA)。

[0029] 如下进一步讨论的, 在一些实施方式中, 给予对象的 DHA 剂量是每天约 0.8 克到约 4 克。在一些实施方式中, 给予的剂量是每天约 0.84 克到约 4 克 DHA。在一些实施方式中, 给予的剂量是每天约 0.84 克到约 1.5 克 DHA。在一些实施方式中, 给予的剂量是每天约 0.84 克到约 1.0 克 DHA。在一些实施方式中, 所述剂型是单位剂量, 因此给予的 DHA 至少是一个单位剂量。

[0030] 本文的方法中, “二十二碳六烯酸”和“DHA”可互换使用表示化学命名是(全顺式)-4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸的化合物以及它的任何盐类或衍生物。因此, DHA 包括 DHA 游离酸和 DHA 酯以及含有 DHA 的甘油三酯。DHA 是一种 ω -3 多不饱和脂肪酸。因此, 在各种实施方式中, 本文的方法中用到的 DHA 可以是磷脂, 甘油三酯, 游离脂肪酸和 / 或酯类的形式。

[0031] 在一些实施方式中, DHA 可以是甘油单酯、二酯或三酯的形式。例如, 一个、两个或三个 DHA 分子可存在于甘油单酯、二酯或三酯分子中。

[0032] 在一些实施方式中, DHA 可以是酯的形式。术语“酯”是指 DHA 分子的羧基团上的氢被别的取代基取代。典型的酯类是本领域人员熟知的, Higuchi, T. 和 V. Stella 著的 *Pro-drugs as Novel Delivery Systems* (第 14 卷, A. C. S. 座谈会系列), Ed. Edward B. Roche 著的 *Bioreversible Carriers in Drug Design* (美国医学协会, Pergamon 出版, 1987 年) 和 McOmie ed. 编的 *Protective Groups in Organic Chemistry* (Plenum 出版, 纽约, 1973 年) 对这些酯类有所讨论。最常见酯的例子包括甲酯、乙酯、丙酯、丁酯、戊酯, 叔丁酯, 苄酯, 硝基苄酯, 甲氧基苄酯, 二苯甲酯和三氯乙酯。在一些实施方式中, 酯是一种羧酸保护性酯基团, 含有芳烷基(如苄基, 苯乙基)的酯, 含有低级烯基(如烯丙基, 2-丁烯基)的酯, 含有低级烷基低级烷氧基(如甲氧基甲基, 2-甲氧基乙基, 2-乙氧基乙基)的酯, 含有低级烷酰氧基低级烷基(如乙酰基甲基, 新戊酰氧基甲基, 1-新戊酰氧基甲基)的酯, 含有低级烷氧基羰基低级烷基(如甲氧基羰基甲基, 异丙氧基羰基甲基)的酯, 含有羧基低级烷基(如羧甲基)的酯, 含有低级烷氧基羰基氧基低级烷基(如 1-(乙氧基羰基氧基)乙基, 1-(环己基氧基羰基氧基)乙基)的酯, 含有氨基甲酰基氧基低级烷基(如氨基甲酰基氧基甲基)的酯, 等等。在一些实施方式中, 加入的取代基团是直链或环状烃基, 如 C_1 - C_6 烷基酯, C_1 - C_6 环烷基酯, C_1 - C_6

烯基酯或 C₁-C₆ 芳基酯。

[0033] 在一些实施方式中, DHA 酯是烷基酯, 如甲酯, 乙酯或丙酯。更具体的说, 该酯是一种乙酯。在一些实施方式中, 当 DHA 处于纯化或半纯化状态时, 将酯的取代基团加到 DHA 游离酸分子上。或者, 将甘油三酯转变后形成 DHA 酯。。本领域技术人员能够理解一些非酯化的 DHA 分子可用于本发明, 如未被酯化的 DHA 分子或被切割(如水解)的 DHA 酯键(DHA linkages)。在一些实施方式中, 非酯化的 DHA 分子占总 DHA 分子的量少于 3% (摩尔/摩尔), 约 2% 到约 0.01% (摩尔/摩尔), 约 1% 到约 0.05% (摩尔/摩尔)或约 5% 到约 0.1% (摩尔/摩尔)。或者, 在一些实施方式中, DHA 可以是游离酸的形式和 / 或盐的形式。

[0034] DHA 可以有各种来源, 如来源于油脂性微生物。如本文所用, “油脂性微生物”指能够以脂质形式累积超过其细胞干重 20% 的微生物。在一些实施方式中, DHA 来源于光养或异养的单细胞或多细胞生物, 如藻类。例如, DHA 可来源于海洋藻类, 如隐甲藻属(*Cryptocodinium* sp.), 破囊壶菌属(*Thraustochytrium* sp.), 裂殖壶菌属(*Schizochytrium* sp.)或其组合。因此, 在一些实施方式中 DHA 来自于藻类。在一些实施方式中, 藻类来源是隐甲藻(*Cryptocodinium cohnii*)或裂殖壶菌属。

[0035] DHA 的来源包含微生物来源, 包括假菌界 (Stramenopiles), 破囊壶菌门 (Thraustochytrids) 和拉普利门 (Labrinthulids)。假菌界微生物包括: 微藻 (microalgae) 和类似藻的微生物 (algae-like microorganisms), 包括以下微生物: 汉姆门 (Hamatores), 普罗特蒙门 (Proteromonads), 欧帕门 (Opalines), 德维尔派门 (Develpayella), 戴普罗弗门 (Diplophrys), 拉普利门 (Labrinthulids), 破囊壶菌门 (Thraustochytrids), 拜尔瑟门 (Biosecids), 水霉门 (Oomycetes), 海植戴尔门 (Hypochytridiomycetes), 康曼门 (Commation), 瑞可罗门 (Reticulosphaera), 普莱格门 (Pelagomonas), 普莱格可门 (Pelagococcus), 欧里可拉门 (Ollicola), 奥瑞可门 (Aureococcus), 小壳藻门 (Parnales), 硅藻门 (Diatoms), 黄藻门 (Xanthophytes), 褐藻门 (Phaeophytes, 褐藻类), 黄绿藻门 (Eustigmatophytes), 绿鞭藻门 (Raphidophytes), 新纽门 (Synurids), 爱科斯汀门 (Axodines) (包括瑞佐克姆纲 (Rhizochromulinaales), 硅鞭藻纲 (Pedinellales), 硅鞭藻纲 (Dictyochales)), 克里索达纲 (Chrysomeridales), 萨西诺达纲 (Sarcinochrysidales), 水树藻目 (Hydrurales), 蟄居金藻目 (Hibberdiales) 和色金藻目 (Chromulinales)。破囊壶菌门包括: 裂殖壶菌属 (*Schizochytrium*) (种包括黄金石斛 (aggregatum)、黎姆蔡瑟 (limnaceum)、芒格 (mangrovei)、迷你藻 (minutum)、欧托 (octosporum)), 破囊壶菌属 (*Thraustochytrium*) (种包括阿迪门多 (arudimentale), 奥雷姆 (aureum), 碧席考拉 (benthicola), 格罗波 (globosum), 凯尼 (kinnei), 摩迪 (motivum), 茂迪待 (multirudimentale), 派凯 (pachydermum), 普罗弗 (proliferum), 罗素 (roseum), 斯托特 (striatum)), 吾肯氏壶菌属 (*Ulkenia*) (种包括埃摩拜迪 (amoeboida), 科格尼斯 (kerguelensis), 米钮塔 (minuta), 普罗弗达 (profunda), 雷迪安 (radiate), 塞仑 (sailens), 赛卡瑞那 (sarkariana), 斯佐凯 (schizochytrops), 维格斯 (visurgensis), 优克尼斯 (yorkensis)), 破囊壶菌属 (*Aplanochytrium*) (种包括海罗迪 (haliotidis), 科格仑斯 (kerguelensisi), 普罗弗达 (profunda), 斯托凯 (stocchinoi)), 日本壶菌属 (*Japonochytrium*) (种包括麦尼 (marinum)), 阿尔托尼氏壶菌属 (*Althornia*) (种包括克劳迪 (crouchii)) 和埃氏壶菌属 (*Elina*) (种包括玛瑞萨

(marisalba), 欣诺瑞弗卡 (sinorifica))。拉普利门包括拉普利属 (Labyrinthula) (种包括埃格瑞尼 (algeriensis), 考诺赛斯 (coenocystis), 查托尼 (chattonii), 玛克赛斯 (macrocystis), 大西洋玛克赛斯 (macrocystis atlantica), 双重玛克赛斯 (macrocystis macrocystis), 玛瑞那 (marina), 迈纽塔 (minuta), 罗斯科弗尼 (roscofiensis), 凡卡诺维 (valkanovii), 维丽那 (vitellina), 太平洋维丽那 (vitellina pacifica), 双重维丽那 (vitellina vitellina), 佐普菲 (zopfii), 拉普利索属 (Labyrinthomyxa) (种包括玛瑞那 (marina)), 拉普利诺属 (Labyrinthuloides) (种包括海罗迪 (haliotidis), 优克尼斯 (yorkensis), 戴普罗弗属 (Diplophrys) (种包括阿凯瑞 (archeri)), 皮霍索属 (Pyrrhosorus*) (种包括玛瑞纽斯 (marinus)), 索罗迪普罗属 (Sorodiplophrys*) (种包括斯特考瑞 (stercorea)) 和克莱米多属 (Chlamydomyxa*) (种包括拉普利诺 (labyrinthuloides), 蒙塔那 (montana)) (*= 对于这些属的准确分类学定位目前尚未达成一致)。

[0036] 在一些实施方式中, 藻类来源是隐甲藻 (Cryptothecodinium cohnii)。隐甲藻 (C. cohnii) 的样本已在位于马里兰州洛克维尔 (Rockville, MD) 的美国典型培养物保藏中心保藏, 指定登录号为 40750, 30021, 30334-30348, 30541-30543, 30555-30557, 30571, 30572, 30772-30775, 30812, 40750, 50050-50060, 和 50297-50300。

[0037] 本文中所述术语“微生物”, 或任何生物体的特定类型包括野生型, 突变体或重组型和能够增量生产含 DHA 的油的生物体。还包括设计出来的, 能有效利用低成本底物生产等量 DHA (与同等的野生型相比) 的微生物。腰鞭毛虫如隐甲藻的培养先前已有描述。参考例如, 美国专利 5, 492, 938 和 Henderson 等人, Phytochemistry 27:1679-1683。DHA 生产中有用的生物还包括任何方式的转基因生物或别的遗传修饰生物, 如发酵培养或作物栽培的植物 (如谷物诸如玉米, 大麦, 小麦, 水稻, 高粱, 珍珠粟, 玉米 (corn), 黑麦和燕麦, 或菜豆, 大豆, 黑胡椒, 莴苣, 豌豆, 芸苔属物种 (如甘蓝, 椰菜, 花椰菜, 抱子甘蓝, 油菜籽和萝卜), 胡萝卜, 甜菜, 茄子, 菠菜, 黄瓜, 南瓜, 甜瓜, 哈密瓜, 向日葵, 红花, 芸苔, 亚麻, 花生, 芥末, 油菜籽, 鹰嘴豆, 小扁豆, 红苜蓿, 橄榄, 棕榈, 琉璃苣, 月见草, 亚麻籽和烟草。

[0038] 适用于本发明组合物和方法的含 DHA 的油的另一种来源包括动物来源。动物来源的例子包括水生动物 (例如, 鱼、海洋哺乳动物和甲壳动物, 如磷虾和其他磷虾目浮游甲壳动物 (euphausiid)) 和动物组织 (例如, 脑、肝、眼等) 和动物产物如卵或乳汁。因此, 在一些实施方式中, 本发明的方法包含每天给予对象含有二十二碳六烯酸 (DHA) 而基本不含二十碳五烯酸 (EPA) 的剂型, 其中, 所述 DHA 获自非藻类来源 (如鱼类)。

[0039] DHA 可纯化至各种级别。DHA 纯化可用本领域技术人员熟知的任何方法实现, 并可包括从生产 DHA 的生物体提取总油。在一些实施方式中, 之后通过例如色谱方法从总油中除去 EPA 和 / 或 ARA。或者, DHA 纯化可通过从生产 DHA、如生产也仅生产少量的 EPA 和 / 或 ARA 的生物体中提取总油来实现。

[0040] 本发明方法中使用的微生物油可通过本领域已知的任何适当的方式从微生物来源获得。例如, 可采用诸如氯仿、己烷、二氯甲烷、甲醇等溶剂进行萃取, 或者通过超临界流体提取回收油。或者, 可采用如美国专利 6, 750, 048 和国际公开号第 W001053512 号所述的萃取技术提取油, 二者均在 2001 年 1 月 19 日以“无溶剂提取方法”为名提交, 其全部内容以引用的方式纳入本文。

[0041] 其他提取和 / 或纯化技术参见：国际公开号第 W001076715 号；国际公开号第 W001076385 号；美国公开号第 20070004678 号；美国公开号第 20050129739 号；美国公开号第 6,399,803 号和国际公开号第 W001051598 号，其全部内容被纳入本文作为参考。提取的油经减压蒸发得到浓缩的油料样品。用于回收脂质的生物质酶处理方法参见：国际公开号第 W02003092628 号；美国公开号第 20050170479 号；欧洲专利公开号第 0776356 号和美国专利号第 5,928,696 号，题为“利用离心力从天然物质混合物提取非水溶性天然产物的方法”，所有文献的内容都以引用的方式纳入本文。

[0042] 在一些实施方式中，DHA 可用如下的方法以酯的形式制备：a) 在醇和碱存在下使含有多不饱和脂肪酸的组合物反应，由甘油三酯生成多不饱和脂肪酸的酯；和 b) 蒸馏该组合物，以回收包含该多不饱和脂肪酸的酯的组分；任选地，该方法还包括：c) 在介质中将包含该多不饱和脂肪酸的酯的组分和尿素混合；d) 降温或浓缩该介质，以产生含有尿素的沉淀和液体组分；和 e) 从液体组分中分离沉淀。参见例如，美国公开号第 20090023808 号，该全文以引用的方式纳入本文。在一些实施方式中，纯化过程包括起始于精制、漂白、除臭的油（RBD 油），然后用丙酮进行低温分馏得到浓缩物。浓缩物可以通过碱催化的酯交换反应、蒸馏和二氧化硅精制获得，用于生产最终 DHA 产物。

[0043] 本领域已知测定脂肪酸纯度等级的方法，可包括例如色谱法如 HPLC 银离子色谱柱（ChromSpher5 脂质 HPLC 柱，哥罗派克（Chrompack），新泽西州拉里坦）。或者，纯度等级可通过将 DHA 转化或不转化成相应的甲酯后，用气相色谱测定。

[0044] 为了治疗轻度认知下降，衰老相关的认识缺陷的对象和 / 或为了降低心率，给予对象各种剂量的 DHA。术语“日剂量”，“每日剂量水平”，“每日剂量”或“每天剂量”都指每天（约 24 小时）DHA 给予总量。因此，例如给予对象 DHA 日剂量 2 克表示对象每天收到总量为 2 克的 DHA，无论是给予含有 2 克 DHA 的单一剂型，还是给予每剂型含 500 毫克 DHA 的 4 个剂型（DHA 总量 2 克）。在一些实施方式中，DHA 每日剂量或每天剂量约为 4 克 DHA 或更少，约 200 毫克到约 3.8 克 DHA，约 500 毫克到约 3.7 克 DHA，约 750 毫克到约 3.5 克 DHA，或约 1 克到约 2 克 DHA。在一些实施方式中，DHA 日剂量为约 520 毫克到约 4 克，约 540 毫克到约 4 克，约 560 毫克到约 4 克，约 580 毫克到约 4 克。在一些实施方式中，DHA 日剂量少于 3.8 克，约为 900 毫克到约 3.6 克 DHA 或约 1.8 克到约 2.7 克。在一些实施方式中，DHA 日剂量包括约 100 毫克，200 毫克，300 毫克，400 毫克，450 毫克，500 毫克，520 毫克，540 毫克，600 毫克，700 毫克，800 毫克，900 毫克，1 克，1.5 克，1.8 克，2.0 克，2.5 克，2.7 克，3.0 克，3.2 克，3.3 克，3.4 克，3.5 克，3.6 克，3.7 克，3.8 克，3.9 克，4.0 克，4.5 克，5.0 克，6.0 克，6.5 克，7 克，8 克，9 克，或 10 克 DHA。

[0045] 在一些实施方式中，DHA 日剂量或每天剂量为约 0.8 克到约 4 克 DHA。在一些实施方式中，DHA 每天剂量为约 0.84 克到约 4 克 DHA。在一些实施方式中，DHA 每天剂量为约 0.84 克到约 1.5 克 DHA。在一些实施方式中，DHA 每天剂量为约 0.84 克到约 1.0 克 DHA。

[0046] 在一些实施方式中，DHA 可以单一剂型方式给药，即单位剂量，或以 2 个或更多剂型方式给药，即 2 个或更多单位剂量。本文中，“单位剂量”指以一个单位剂型的形式给予对象的 DHA 量，如一粒凝胶胶囊。术语“单位剂量”还可指可以在很短时间内吞咽的一个单位的药学上合适的液体，糖浆，饮料，或食物。因此，每天给予治疗对象至少一个单位剂量。在一些实施方式中，每天可单次或多次服用剂型。例如，如果每天服用四粒胶囊，每个胶囊

含有 DHA500 毫克,那么可每天一次服用所有四粒胶囊,或每天服用两次每次两粒胶囊,或每六小时服用一次每次一粒胶囊。单位剂量中的 DHA 可为各种含量。在一些实施方式中,剂型包含少于约 10 克的 DHA,少于约 5 克的 DHA,约 100 毫克到约 4.8 克的 DHA,约 200 毫克到约 4.6 克的 DHA,或约 500 毫克到约 4.0 克的 DHA。在一些实施方式中,单位剂量包含约 0.2 克到约 2 克的 DHA。在一些实施方式中,单位剂量包含约 0.2 克,0.3 克,0.4 克,0.45 克,0.50 克,0.6 克,0.7 克,0.8 克,0.9 克,1 克,1.1 克,1.2 克,1.3 克,1.4 克,1.5 克,1.8 克,2.0 克,2.5 克,2.7 克,3.0 克,3.2 克,3.3 克,3.4 克,3.5 克,3.6 克,3.7 克,3.8 克,3.9 克,4.0 克,4.5 克,5.0 克,6.0 克,6.5 克,7 克,8 克,9 克,或 10 克 DHA。

[0047] 在一些 DHA 以酯的形式存在(优选为烷基酯如甲酯,乙酯,丙酯或其组合)的实施方式中,剂型或单位剂量可包含约 430 毫克到约 480 毫克 DHA 酯,特别是乙酯。在一些实施方式中,剂型或单位剂量可包含约 860 毫克到约 950 毫克,或约 870 毫克到约 930 毫克 DHA 酯,特别是乙酯。

[0048] 在一些实施方式中,单位剂量总重量为约 0.2 到约 2 克。例如但不限于,一粒胶囊可包含总重量约为 0.2 克的海藻油,该海藻油包含占该油总脂肪酸含量一定重量%的 DHA 和 / 或占该油总重量特定重量%的 DHA。在一些实施方式中,单位剂量的总重量为约 0.20 克,0.25 克,0.30 克,0.35 克,0.40 克,0.45 克,0.50 克,0.55 克,0.60 克,0.65 克,0.70 克,0.75 克,0.80 克,0.85 克,0.90 克,0.95 克,1.0 克或 1.05 克。

[0049] 在一些实施方式中,DHA 约为剂型或单位剂量的总脂肪酸含量的 30% (w/w) 或更多,是剂型或单位剂量的总脂肪酸含量的约 30% 到约 99.9% (w/w),是剂型或单位剂量的总脂肪酸含量的约 35% 到约 99.9% (w/w),是剂型或单位剂量的总脂肪酸含量的约 35% 到约 60% (w/w),是剂型或单位剂量的总脂肪酸含量的约 35% 到约 50% (w/w),是剂型或单位剂量的总脂肪酸含量的约 37% 到约 45% (w/w),或是剂型或单位剂量的总脂肪酸含量的约 38% 到约 43% (w/w)。在一些实施方式中,DHA 占剂型或单位剂量的总脂肪酸含量的比例(w/w)大于约 35%,大于约 37%,大于约 38%,大于约 39%,或大于约 40%。在一些实施方式中,DHA 是剂型总脂肪酸含量的约 30% 到约 99.5% (w/w),或是剂型或单位剂量总脂肪酸含量的约 40% 到约 65% (w/w)。

[0050] 在一些实施方式中,DHA 占剂型或单位剂量总脂肪酸含量的比例(w/w) 大于约 80%,是剂型或单位剂量总脂肪酸含量的约 80% 到约 99.9% (w/w),是剂型或单位剂量总脂肪酸含量的约 85% 到约 99% (w/w),是剂型或单位剂量总脂肪酸含量的约 87% 到约 98% (w/w),或是剂型或单位剂量总脂肪酸含量的约 90% 到约 97% (w/w)。在一些实施方式中,DHA 占剂型或单位剂量的总脂肪酸含量的比例(w/w) 大于约 95%,大于约 97%,大于约 98%,大于约 99%,或大于约 99.5%。

[0051] 在一些实施方式中,DHA 可占剂型或单位剂量总脂肪酸含量约 40% 到约 45% (w/w)。在一些实施方式中,DHA 是剂型或单位剂量总脂肪酸含量的约 35% 到约 45% (w/w)。在一些实施方式中,DHA 可占剂型或单位剂量总脂肪酸含量的约 55% 到约 67% (w/w)。在一些实施方式中,DHA 可占剂型或单位剂量总脂肪酸含量的约 70% 以上(w/w)。在一些实施方式中,DHA 可占剂型或单位剂量总脂肪酸含量的约 85% 到约 99.5% (w/w)。

[0052] 在一些实施方式中,剂型或单位剂量中的 DHA 可占该剂型或单位剂量(如海藻油)重量的约 35% 到约 96% (w/w)。在一些实施方式中,剂型或单位剂量中的 DHA 可占该剂型

或单位剂量重量的约 38% 到约 42% (w/w)。在一些实施方式中,剂型或单位剂量里的 DHA 可占该剂型或单位剂量总重的约 35% 到约 45% (w/w)。在一些实施方式中,剂型或单位剂量里的 DHA 可占该剂型或单位剂量总重的约 55% 到约 57% (w/w)。在一些实施方式中,剂型或单位剂量里的 DHA 可占该剂型或单位剂量总量的约 85% 到约 96% (w/w)。

[0053] 如上所述,在本文的一些实施方式中,剂型里基本不含二十碳五烯酸(EPA)。术语“EPA”或“二十碳五烯酸”在本文中可互换使用,表示化学名称是(全顺式) 5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酸的化合物及其任何盐类或衍生物。因此,术语“EPA”包括 EPA 游离酸以及 EPA 烷基酯和含有 EPA 的甘油三酯。EPA 是一种 ω -3 多不饱和脂肪酸。本文中,术语“基本不含 EPA”表示剂型中的 EPA 占该剂型总脂肪酸的量少于约 3% (w/w)。在一些实施方式中,剂型中的 EPA 占该剂型总脂肪酸的量少于约 2% (w/w),占该剂型总脂肪酸的量少于约 1% (w/w),占该剂型总脂肪酸的量少于约 0.5% (w/w),占该剂型总脂肪酸的量少于约 0.2% (w/w),或占该剂型总脂肪酸的量少于约 0.01% (w/w)。在一些实施方式中,剂型里无可检测量的 EPA。

[0054] 在本方法中,剂型也基本不含花生四烯酸(ARA)。本文中术语“ARA”和“花生四烯酸”可互换使用,表示化学名称是全顺式 5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸(也可表示 (5Z, 8Z, 11Z, 14Z)-二十碳-5, 8, 11, 14-四烯酸)的化合物及其任何盐类或衍生物。因此,术语“ARA”包括 ARA 游离酸以及 ARA 烷基酯和含有 ARA 的甘油三酯。ARA 是一种 ω -6 多不饱和脂肪酸。本文中,术语“基本不含 ARA”表示剂型中的 ARA 占该剂型总脂肪酸的量少于约 3% (w/w)。在一些实施方式中,剂型中的 ARA 占该剂型总脂肪酸的量少于约 2% (w/w),占该剂型总脂肪酸的量少于约 1% (w/w),占该剂型总脂肪酸的量少于约 0.5% (w/w),占该剂型总脂肪酸的量少于约 0.2% (w/w),或占该剂型总脂肪酸的量少于约 0.01% (w/w)。在一些实施方式中,剂型里无可检测量的 ARA。

[0055] 在本方法中,剂型或单位剂量中可存在其它脂肪酸。这些脂肪酸可包括纯化过程中没有除去的脂肪酸,即与 DHA 共同从生物体分离出的脂肪酸。本文中,术语“脂肪酸”包括脂肪酸的任何盐类或衍生物。因此,术语“脂肪酸”包括游离脂肪酸以及脂肪酸的酯和含脂肪酸的甘油三酯。因此,在各种实施方式中,脂肪酸可是磷脂,甘油三酯,游离脂肪酸,和 / 或酯类的形式。这些脂肪酸可以各种浓度存在。在一些实施方式中,剂型含有 0.1% 到 60% 的一种或多种下述脂肪酸:(a) 癸酸;(b) 月桂酸;(c) 肉豆蔻酸;(d) 棕榈酸;(e) 棕榈油酸;(f) 硬脂酸;(g) 油酸;(h) 亚油酸;(i) α -亚麻酸;(j) 二十二碳五烯酸,22:5n-3, 22:5w3(DPAn3);(k) 二十二碳五烯酸 22:5n-6, 22:5w6(DPAn6);和 (l) 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 二十八碳八烯酸 (C28:8)。

[0056] 在一些实施方式中,剂型包含 20% 到 40% 的一种或多种下述脂肪酸:(a) 癸酸;(b) 月桂酸;(c) 肉豆蔻酸;(d) 棕榈酸;(e) 棕榈油酸;(f) 硬脂酸;(g) 油酸;(h) 亚油酸;(i) α -亚麻酸;(j) 二十二碳五烯酸,22:5n-3, 22:5w3(DPAn3);(k) 二十二碳五烯酸 22:5n-6, 22:5w6(DPAn6);和 (l) 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 二十八碳八烯酸 (C28:8)。

[0057] 在一些实施方式中,剂型或单位剂量的特征是含有约 0.1% 到约 20% (w/w) 脂肪酸含量的一种或多种下述脂肪酸:(a) 癸酸;(b) 月桂酸;(c) 肉豆蔻酸;(d) 棕榈酸;(e) 棕榈油酸;(f) 硬脂酸;(g) 油酸;(h) 亚油酸;(i) α -亚麻酸;(j) 二十二碳五烯酸,22:5n-3, 22:5w3(DPAn3);(k) 二十二碳五烯酸 22:5n-6, 22:5w6(DPAn6);和

(1) 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 二十八碳八烯酸 (C28:8)。

[0058] 在一些实施方式中, 剂型或单位剂量的特征是约 1.0% 到约 5% (w/w) 脂肪酸含量的一种或多种下述脂肪酸: (a) 癸酸; (b) 月桂酸; (c) 肉豆蔻酸; (d) 棕榈酸; (e) 棕榈油酸; (f) 硬脂酸; (g) 油酸; (h) 亚油酸; (i) α -亚麻酸; (j) 二十二碳五烯酸, 22:5n-3, 22:5w3 (DPAn3); (k) 二十二碳五烯酸 22:5n-6, 22:5w6 (DPAn6); 和 (1) 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 二十八碳八烯酸 (C28:8)。

[0059] 在一些实施方式中, 剂型或单位剂量的特征是少于 1% (w/w) 脂肪酸含量的每种下述脂肪酸: (a) 癸酸; (b) 月桂酸; (c) 肉豆蔻酸; (d) 棕榈酸; (e) 棕榈油酸; (f) 硬脂酸; (g) 油酸; (h) 亚油酸; (i) α -亚麻酸; (j) 二十二碳五烯酸, 22:5n-3, 22:5w3 (DPAn3); (k) 二十二碳五烯酸 22:5n-6, 22:5w6 (DPAn6); 和 (1) 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 二十八碳八烯酸 (C28:8)。在本说明书中, 术语“少于”包括无可检测量的特定脂肪酸。在一些实施方式中, 本文中的剂型不包含可测量的二十二碳五烯酸 22:5n-3, 22:5w3 (DPAn3), 二十二碳五烯酸 22:5n-6, 22:5w6 (DPAn6), 和 / 或 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 二十八碳八烯酸 (C28:8)。

[0060] 在本文描述的 DHA 剂型的一些实施方式中, 剂型或单位剂量用一种或多种下述脂肪酸 (由总脂肪酸含量的重量%表示) 表征。本文提供的实施方式还可含有约 2% (w/w) 或更少的癸酸 (C10:0)。本文的实施方式还可包含约 6% (w/w) 或更少的月桂酸 (C12:0)。本文的实施方式还可包含约 20% (w/w) 或更少, 优选约 5 到约 20% (w/w) 的肉豆蔻酸 (C14:0)。本文的实施方式还可包含约 20% (w/w) 或更少, 优选约 5 到约 20% (w/w) 的棕榈酸 (C16:0)。本文的实施方式还可包含约 3% (w/w) 或更少的棕榈油酸 (C16:1n-7)。本文的实施方式还可包含约 2% (w/w) 或更少的硬脂酸 (C18:0)。本文的实施方式还可包含约 40% (w/w) 或更少, 优选约 10 到约 40% (w/w) 的油酸 (C18:1n-9)。本文的实施方式还可包含约 5% (w/w) 或更少的亚油酸 (C18:2)。本文的实施方式还可包含约 2% (w/w) 或更少的神经酸 (C24:1)。本文的实施方式还可包含约 3% (w/w) 或更少的其它脂肪酸。具有上述特征的 DHA 剂型或单位剂量可包括 **DHASCO®**, 一种源自含二十二碳六烯酸 (DHA) 的隐甲藻的油。

[0061] 一种示例性的源自隐甲藻的含 DHA 的油由表 1 中所列的特定含量组分表征, 表中“最大”表示该组分的含量所能达到的最高指定含量。

[0062] 表 1

[0063]

脂肪酸	
10:0	最大 2%
12:0	最大 6%
14:0	5-20%
16:0	5-20%
16:1	最大 3%
18:0	最大 2%

18:1	10-40%
18:2	最大 5%
22:6DHA	40 至 45%
24:1	最大 2%
其它：	最大 3%
元素组合物	
砷	最大 0.5ppm
铜	最大 0.1ppm
铁	最大 0.5ppm
铅	最大 0.2ppm
汞	最大 0.04ppm
磷	最大 10ppm
化学特性	
过氧化物值	最大 5.0meq/kg
游离脂肪酸	最大 0.4%
不皂化物	最大 3.5%

[0064] 在本文描述的 DHA 剂型的一些实施方式中,剂型或单位剂量用一种或多种下述脂肪酸(由总脂肪酸含量的重量%表示)表征。本文提供的实施方式还可含有约 12% (w/w)或更少,优选约 6 到约 12% (w/w)的肉豆蔻酸 (C14:0)。本文提供的实施方式还可含有约 28% (w/w)或更少,优选约 18 到约 28% (w/w)的棕榈酸 (C16:0)。本文提供的实施方式还可含有约 2% (w/w)或更少的硬脂酸 (C18:0)。本文提供的实施方式还可含有约 8% (w/w)或更少的油酸 (C18:1n-9)。本文提供的实施方式还可含有约 2% (w/w)或更少的亚油酸 (C18:2)。本文提供的实施方式还可含有约 2% (w/w)或更少花生四烯酸 (C20:4)。本文提供的实施方式还可含有约 3% (w/w)或更少的二十碳五烯酸 (C20:5)。本文提供的实施方式还可含有约 18% (w/w)或更少,优选约 12 到约 18% (w/w)的二十二碳五烯酸 (22:5n-6)。本文提供的实施方式还可含有约 10% (w/w)或更少的其他脂肪酸。在一些实施方式中, DHA 重量%和 DPA n6 重量%的比值为约 2.5 到约 2.7。具有上述特性的 DHA 剂型和单位剂量可包括 Life's DHA™(之前称为 DHA™-S 和 **DHASCO®-S**),一种源自含高含量 DHA 并含有二十二碳五烯酸 (n-6) (DPA n-6) 的破囊壶菌门裂殖壶菌属的油。

[0065] 一种示例性的源自裂殖壶菌属的含 DHA 的油由表 2 中所列的特定含量组分表征，表中“最大”表示该组分的含量所能达到的最高指定含量。

[0066] 表 2

[0067]

脂肪酸	
14:0	6-12.0%
16:0	18-28%
18:0	最大 2%
18:1	最大 8%
18:2	最大 2%
20:4ARA	最大 2%
20:5EPA	最大 3%
22:5n-6DPA	12-18%
22:6DHA	最小 35%
其它：	最大 10%
元素组合物	
砷	最大 0.2ppm
铜	最大 0.05ppm
铁	最大 0.2ppm
铅	最大 0.1ppm
汞	最大 0.04ppm
化学特性	
过氧化物值	最大 5.0meq/g
游离脂肪酸	最大 0.25%
水分和挥发物	最大 0.05%

不皂化物	最大 4.5%
反式脂肪酸	最大 1%

[0068]

[0069] 在本文描述的 DHA 剂型的一些实施方式中,剂型或单位剂量用一种或多种下述脂肪酸(由总脂肪酸含量的重量%表示)表征。本文提供的实施方式还可含有约 2% (w/w) 或更少的癩酸 (C10:0)。本文提供的实施方式还可含有约 6%(w/w)或更少的月桂酸 (C12:0)。本文提供的实施方式还可含有约 20% (w/w)或更少,优选约 10 到约 20% (w/w)的肉豆蔻酸 (C14:0)。本文提供的实施方式还可含有约 15% (w/w)或更少,优选约 5 到 15% (w/w)的棕榈酸 (C16:0)。本文提供的实施方式还可含有约 5% (w/w)或更少的棕榈油酸 (C16:1n-7)。本文提供的实施方式还可含有约 2% (w/w)或更少的硬脂酸 (C18:0)。本文提供的实施方式还可含有约 20% (w/w) 或更少,优选约 5%到约 20% (w/w) 的油酸 (C18:1n-9)。本文提供的实施方式还可含有约 2% 或更少的亚油酸 (C18:2)。本文提供的实施方式还可含有约 2% 或更少的神经酸 (C24:1)。本文提供的实施方式还可含有约 3% 或更少的其他脂肪酸。具有上述特征的 DHA 剂型和单位剂量可以是一种源自含二十二碳六烯酸(DHA)的隐甲藻的油。

[0070] 一种示例性的源自隐甲藻的含 DHA 的油由表 3 中所列的特定含量组分表征,表中“最大”表示该组分的含量所能达到的最高指定含量。

[0071] 表 3

[0072]

脂肪酸	
10:0	0-2%
12:0	0-6%
14:0	10-20%
16:0	5-15%
16:1	0-5%
18:0	0-2%
18:1	5-20%
18:2	0-2%
22:6n-3DHA	57-65%
24:1	0-2%
其它	0-3%

元素组合物	
砷	最大 0.5ppm
铜	最大 0.1ppm
铁	最大 0.5ppm
铅	最大 0.2ppm
汞	最大 0.2ppm
磷	最大 10ppm
化学特性	
过氧化物值	最大 5.0meq/kg
游离脂肪酸	最大 0.4%
不皂化物	最大 3.5%
反式脂肪酸	<3.5%
水分和挥发物	<0.1%
不溶性杂质	<0.1%

[0073]

[0074] 在一些实施方式中,剂型和单位剂量中的 DHA 构成的 DHA 重量%和 DPAn6 重量%的比值为约 2.5 到约 2.7。在一些这样的实施方式中,剂型和单位剂量中的 DHA 占该剂型或单位剂量总脂肪酸的量为约 70% 以上(w/w)。具有上述特性的 DHA 剂型和单位剂量中的 DHA 可以是源自破囊壶菌门裂殖壶菌属的海藻油的 DHA 酯形式,优选烷基酯,如甲酯,乙酯,丙酯或其组合。

[0075] 在本文描述的 DHA 剂型的一些实施方式中,剂型或单位剂量用一种或多种下述脂肪酸(由总脂肪酸含量的重量%表示)表征。本文提供的实施方式还可含有约 0.1% (w/w) 或少到不可检测水平的肉豆蔻酸 (C14:0)。本文提供的实施方式还可含有约 0.5% (w/w) 或更少的棕榈酸 (C16:0)。本文提供的实施方式还可含有约 0.5% (w/w) 或更少的棕榈油酸 (C16:1n-7)。本文提供的实施方式还可含有约 0.5% (w/w) 或更少,或不可检测水平的硬脂酸 (C18:0)。本文提供的实施方式还可含有约 4% (w/w) 或更少的油酸 (C18:1n-9)。本文提供的实施方式还可含有少于 0.1% (w/w) 的或不可检测水平的亚油酸 (C18:2)。本文提供的实施方式还可含有少于 0.1% (w/w) 的或不可检测水平的二十碳五烯酸 (C20:5)。本文提供的实施方式还可含有约 2% (w/w) 或更少的二十二碳五烯酸 (22:5n-3)。本文提供的实施方式还可含有约 1% (w/w) 或更少的二十八碳八烯酸 (28:8n-3)。本文提供的实施方式还可

含有约 0.5% (w/w) 或更少的二十四碳一烯酸 (24:1 ω 9)。本文提供的实施方式还可含有约 1% (w/w) 或更少的其他脂肪酸。具有上述特性的 DHA 剂型和单位剂量中的 DHA 可以是源自隐甲藻海藻油的 DHA 酯形式, 优选烷基酯, 如甲酯, 乙酯, 丙酯或其组合。

[0076] 一种源自隐甲藻海藻油的含 DHA 的油由表 4 中所列的特定含量组分表征, 其中 DHA 包含一种乙酯。

[0077] 表 4

[0078]

DHA 含量 (mg/g)	
855-945	
脂肪酸含量 :% 总 EE	
二十碳五烯酸 (20:5 ω 3)	ND
肉豆蔻酸 (14:0)	0.1%
棕榈酸 (16:0)	0.5%
棕榈油酸 (16:1 ω 7)	0.4%
硬脂酸 (18:0)	ND
油酸 (18:1 ω 9)	4%
亚油酸 (18:2 ω 6)	ND
二十二碳五烯酸 (22:5 ω 3)	1.3%
二十八碳八烯酸 (28:8 ω 3)	0.9%
(24:1 ω 9)	0.3%
其它	1.1%
元素组合物	
砷	最大 0.5ppm
铜	最大 0.1ppm
铁	最大 0.5ppm
铅	最大 0.2ppm
汞	最大 0.04ppm

化学特性	
过氧化物值	最大 10.0meq/kg

[0079]

[0080] ND= 未检测到

[0081] 在一些实施方式中,DHA 酯可源自单细胞微生物来源的未稀释油,并且在一些实施方式中,DHA 酯可源自未稀释的**DHASCO-T[®]**(马太克生物科学公司(Martek Biosciences Corporation))。在一些实施方式中,DHA 的原料油包括通过受控的发酵程序制造的,并在之后用植物油工业常规的方法进行油提取和纯化的单细胞微生物油。在某些实施方式中,提取和纯化油的步骤包括精制,漂白和除臭。在一些实施方式中,未稀释的 DHA 油包括约 40%到约 50% (重量%)的 DHA (每克油约含 400-500mg DHA)。在某些实施方式中,未稀释的 DHA 油通过低温分馏富集(得到的油含约 60%(w/w)的 DHA 甘油三酯),该油中的 DHA 组分可任意的发生酯交换反应,并进行进一步的下流处理以生产活性 DHA。在一些实施方式中,油的下流处理包括蒸馏和 / 或二氧化硅精炼。

[0082] 因此,在某些方面,为了生产 DHA 的原料油,可进行如下步骤:发酵生产 DHA 的微生物;收获生物质;喷雾干燥生物质;从生物质中提取出油;精炼油;漂油;低温过滤油;对油除臭;和在油中加入抗氧化剂。在一些实施方式中,微生物培养从小规模发酵罐逐渐转移到生产规模发酵罐。在一些实施方式中,在受控生长一段预定的时间后,通过离心收获培养物,然后巴氏消毒和喷雾干燥。在某些实施方式中,用氮气冲洗干燥的生物质并包装后冷冻存放于-20℃。在某些实施方式中,通过将生物质和正己烷或异己烷用能破坏细胞并分离油和细胞碎片的间歇法混合,从干燥的生物质中提取 DHA 油。在某些实施方式中,溶剂随后被除去。

[0083] 在一些实施方式中,DHA 粗油然后经过精制工艺除去游离脂肪酸和磷脂。DHA 精制油转移到真空漂白容器中,以助于除去任何残留的的极性化合物和前氧化金属(pro-oxidant metals),并分解脂质氧化产物。精制和漂白后的 DHA 油通过冷却和过滤进行最终澄清步骤,以促进任何残留的不溶脂肪,腊和固体的去除。

[0084] 任选的,DHA 在填充柱,逆流蒸汽汽提除臭器中真空除臭。可任选的将抗氧化剂如抗坏血酸棕榈酸盐和 α -生育酚加入已除臭的油中,以帮助稳定该油。在一些实施方式中,最终的、未稀释的 DHA 油在进一步操作前冷冻保存在-20℃。一种示例性的未稀释的 DHA 油由表 5 中所列的组分的量表征,表中“最大”表示该组分的含量所能达到的最高指定含量。

[0085] 表 5:未稀释 DHA 油的特性

[0086]

组分	规格
DHA 含量(每克油中 DHA 毫克数,)	480mg/g
游离脂肪酸	最大 0.4%
氧化物值(PV)	最大 5meq/kg

茴香胺值	最大 20
水分和挥发物 (M&V)	最大 0.02%
不皂化物	最大 3.5%
不溶性杂质	最大 0.1%
反式脂肪酸	最大 1%
砷	最大 0.5ppm
镉	最大 0.2ppm
铬	最大 0.2ppm
铜	最大 0.1ppm
铁	最大 0.5ppm
铅	最大 0.2ppm
锰	最大 0.04ppm
汞	最大 0.04ppm
钼	最大 0.2ppm
镍	最大 0.2ppm
磷	最大 10ppm
硅	最大 500ppm
硫	最大 100ppm
18:1n-9 油酸	最大 10%
20:5n-3EPA	最大 0.1%
未知脂肪酸	最大 3.0%

[0087]

[0088] 在一些实施方式中,通过本领域已知的方法将 DHA 油转化为 DHA 酯。在一些实施方式中,可通过如下步骤由 DHA 油生产 DHA 酯:低温分馏和过滤 DHA 油(产生例如约 60% 的甘油三酯油);直接酯交换反应(产生约 60% 的 DHA 乙酯);分子蒸馏(产生约 88% 的 DHA 乙酯);二氧化硅精炼(产生约 90% DHA 乙酯);和添加抗氧化剂。

[0089] 在一些实施方式中,低温分馏步骤如下所示:含有约 5000mg/g DHA 的未稀释 DHA 油(甘油三酯)与丙酮混合并在有 -80℃ 冷冻能力的容器中以受控速率冷却。饱和甘油三酯从溶液中结晶出来,同时含约 600mg/g DHA 的多不饱和甘油三酯仍保持液态。用 20 微米不锈钢筛网将包含约 300mg/g 的固体从含约 600mg/g DHA 的液态物流中筛出。然后加热(熔化)并收集固体物流。该 600mg/g DHA 液体物流在加热和真空下除去溶剂,然后转入酯交换反应器。

[0090] 在一些实施方式中,用 600mg/g DHA 油进行酯交换反应步骤,其中酯交换反应通过乙醇和乙醇钠参与的直接酯交换反应完成。完成酯交换反应的材料(DHA-EE)再经过分子蒸馏和进一步的蒸馏(3 次,重馏分,轻馏分和重馏分)以除去大部分其他饱和脂肪酸,一些固醇和非皂化材料。然后 DHA-EE 流经二氧化硅柱以进一步精制。

[0091] 在一些本文的实施方式中,剂型是一种药物剂型。“药学上可接受的”是在可靠的医疗判断范围内适于接触人体和动物组织而不会产生在合理的作用/风险比下的过度毒性或并发症的组合物。在一些实施方式中,本文中的化合物(如 DHA),组合物和剂型是药学上可接受的。

[0092] 在一些本文的实施方式中,剂型是一种营养品剂型。术语“营养品”指具有如下特性的任何物质(1) 进食或饮食中提供药物和/或健康益处的单一物品,或(2) 旨在补充饮食,具有或含有一种或多种下述饮食成分的产品:维生素,矿物质,药草或其他植物性药材,氨基酸,人们通过增加每日总摄取量来补充饮食的膳食物质,或上述这些提供医学和/或健康益处的成分的浓缩物,代谢物,组成成分,提取物或其组合。医学和/或健康益处可包括通过增加认知能力和/或降低心率来减少疾病风险。例如在一些实施方式中,正常衰老会降低对象的记忆和学习能力。DHA 可改善,改进和/或提高一个人衰老过程的学习和记忆能力。

[0093] DHA 可配制成剂型。这些剂型可包括,但不限于,含有本文中所述有效量的 DHA 的片剂、胶囊、扁囊剂、球剂、丸剂、凝胶胶囊(gel cap)、粉剂和粒剂,和肠胃外的剂型包括但不限于溶液、混悬剂、乳剂、包被颗粒和干粉。在一些实施方式中,剂型可加入或混合入食物中。本领域已知各种用于包裹颗粒的物质,包括纤维素衍生物如微晶纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素,聚亚烷基二醇如聚乙二醇,滑石粉,淀粉,甲基丙烯酸酯,等等。在一些实施方式中,剂型是填充有含 DHA 的溶液、混悬液或乳剂的胶囊。本领域也已知活性成分可含在含有药学上可接受的赋形剂(如稀释剂、填充剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、表面活性剂、疏水赋形剂、水溶性赋形剂、乳化剂、缓冲剂、润湿剂、保湿剂、增溶剂、防腐剂、食用香料、掩味剂、甜味剂等)的制剂中。合适的赋形剂可包括如植物油(如玉米油(corn),大豆油,红花油,葵花籽油或菜籽油)。在一些实施方式中,防腐剂可以是抗氧化剂如亚硫酸钠,亚硫酸钾,焦亚硫酸盐,亚硫酸氢盐,硫代硫酸盐,硫代甘油,硫代山梨醇(thiosorbitol),盐酸半胱氨酸,丁羟甲苯,丁羟茴醚(BHA);抗坏血酸及其衍生物如抗坏血酸棕榈盐;没食子酸盐如没食子酸丙酯和没食子酸;奎宁;生育酚如 α -、 β -、 γ -和 δ -生育酚;类胡萝卜素如叶黄素,番茄红素和 β -胡萝卜素;及以上物质的组合。本领域已知制备给药剂型的方式和方法,并且技术员可查阅各种药学参考文献寻求指南。例如,可参见 Banker 和 Rhodes 的《现代药剂学》(Modern Pharmaceutics),印富玛健康护理(Informa Healthcare)公司,第 4 版(2002);《Goodman&Gilman 的治疗的药理学基础》(Goodman&Gilman's The Pharmaceutical

Basis of Therapeutics), 麦克劳 - 希尔 (McGraw-Hill) 公司, 纽约, 第 10 版 (2001); 和《雷明顿药物科学》(Remingtons' s Pharmaceutical Sciences), 第 20 版 (2001)。

[0094] 本发明中的 DHA 具有口服活性且这种给药途径可用于本文所述方法。因此, 给药形式可包括, 但不限于, 含有 DHA 和一种或多种合适的药学上可接收的载体的片剂、糖衣丸、胶囊、囊片、明胶胶囊和丸剂。

[0095] 口服给药中, DHA 可以以油的形式给药或很容易的和一种或多种药学上可接受的载体混合配制。药学上可接受的载体是本领域众所周知的。此类载体使化合物可以配制为片剂、凝胶胶囊、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆、浆液、混悬剂等, 便于治疗对象口服摄取。在一些本文的实施方式中, 剂型是片剂、凝胶胶囊、丸剂或囊片。可通过以下方法获得口服用途的药物制剂: 加入固体赋形剂, 任选地研磨所得混合物, 并在加入合适的辅助剂(如果需要)后加工该颗粒混合物, 以获得片剂或糖衣丸芯体。合适的赋形剂包括但不限于填充剂如糖(包括但不限于乳糖, 蔗糖, 甘露醇和山梨醇); 纤维素制剂(包括但不限于玉米淀粉, 小麦淀粉, 水稻淀粉, 马铃薯淀粉, 明胶, 黄耆胶, 甲基纤维素, 羟丙基甲基纤维素, 羧甲基纤维素钠, 植物油如大豆油, 和聚乙烯吡咯烷酮(PVP))。需要的话, 可加入崩解剂, 比如但不限于交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、藻酸或其盐如藻酸钠。可口服使用的药物制剂包括但不限于明胶制成的压接(push-fit)胶囊, 以及明胶和增塑剂如甘油或山梨醇制成的密封软胶囊。胶囊壳可由非动物来源的成分即素食成分(例如角叉菜胶, 藻酸盐, 改性淀粉, 纤维素和/或其他多糖)组成。含 DHA 的明胶胶囊的描述见 2009 年 10 月 1 日提交的美国申请序列号第 61/247, 944 号, 标题为“二十二碳六烯酸明胶胶囊”(Docosahexaenoic Acid Gel Caps), 其内容以引用的方式纳入本文。所有的口服制剂的剂量应该适合该给药方式。

[0096] 如上所述, 在一些实施方式中, 药剂可能以膳食补充剂或药用食品的方式提供。

[0097] 表 6 列出了示例的凝胶胶囊(约 1g 明胶软胶囊)的限制规格。

[0098] 表 6 : 1 克 DHA 乙酯凝胶胶囊的规格

[0099]

测试	规格
DHA 含量(mg DHA/g 油)	855 - 945mg/g
测试	规格
乙酯	最小 90% 酯化
酸值	最大 2.0mg KOH/g
过氧化物值(PV)	最大 10meq/kg
茴香胺值(AV)	最大 20
反式脂肪酸	最大 2.0%
砷	最大 0.5ppm

铜	最大 0.1ppm
铁	最大 0.5ppm
铅	最大 0.2ppm
汞	最大 0.04ppm
大肠杆菌(E. coli)	在 1g 中不存在
总平板计数	<1000cfu/g
酵母和霉菌	<100cfu/g

[0100]

[0101] 在一些实施方式中,凝胶胶囊包含胶囊制剂,活性剂,任选的着色剂和 / 或抗氧化剂。在另一实施方式中, i) 胶囊制剂包括明胶(牛酸皮(bovine acid hide)),甘油和净化水, ii) 活性剂包括 DHA-EE, iii) 任选的着色剂选自二氧化钛, FD&C 黄 #5 (FD&C Yellow#5), FD&C 红 40 (FD&C Red40) 和它们的混合物, iv) 抗氧化剂是抗坏血酸棕榈酸。在一些实施方式中,原料是美国药典 USP 原料。

[0102] 表 7 列出了示例的凝胶胶囊(约 1g 明胶软胶囊)的限制规格。

[0103] 表 7 :1 克 DHA 乙酯凝胶胶囊的规格

[0104]

测试	规格
每胶囊 DHA EE 含量	855 - 945mg
平均填充重量	950 - 1,050mg
分解性 :	符合美国药典 USP
酸值	最大 2.0mg KOH/g
过氧化物值(PV)	最大 10meq/kg
茴香胺值(AV)	最大 20
微生物限制测试	符合美国药典 <61>USP

[0105]

[0106] 表 8 所列的是 DHA 乙酯明胶软胶囊制造中用到的组分及至少一种该组分的相应功能的示例列表。

[0107] 表 8 :1 克 DHA 乙酯凝胶胶囊的组分列表

[0108]

组分	功能
900 毫克 DHA EE	活性剂
明胶,牛酸皮	胶囊制剂
甘油	胶囊制剂
净化水	胶囊制剂
二氧化钛	着色剂
FD&C 黄 #5	着色剂
FD&C 红 #40	着色剂

[0109] 如本文所述,在一些实施方式中,本发明涉及提高对象认知能力的方法。记忆和认知能力下降被认为是人类衰老的正常结果。衰老相关的认知下降(ARD),或“衰老相关的记忆缺陷”(AAMI)是用于描述“与年轻时相比客观的记忆下降,但与同龄人相比认知功能正常的老年人”的术语。参见例如,1998年2月的APA会长特别工作组对与年龄一致的记忆下降和痴呆症的评估(APA Presidential Task Force on the Assessment of Age-Consistent Memory Decline and Dementia)。在一些实施方式中,ARCD定义为客观鉴定的在给定个人年龄的正常限度内的由衰老导致的认知功能下降。有人报道了在记住名字或约会上有问题或有难以解决复杂问题的经历。《精神障碍的诊断和统计手册》(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), Fourth 编,1994年,华盛顿特区,美国精神病学协会出版。衰老相关的认知下降与轻度认知缺陷(MCI)不同,“后者更加严重或更加一致……并可能预示疾病如痴呆症的早期阶段”。参见例如,记忆障碍计划(Memory Disorders Project),罗格斯大学(Rutgers University, 网页 <http://www.memorylossonline.com/glossary/aami.html>)。MCI 包括超过按年龄和教育所预期的范围的非痴呆对象的记忆缺陷。在一些实施方式中,对象的 MCI 诊断的标准(Petersen 等确立, Arch. Neurol. 56:303-308(1999))包括 (1) 记忆下降主诉(memory complaint), (2) 日常生活能力正常, (3) 总体认知功能正常, (4) 该年龄记忆不正常, (5) 无精神障碍。在一些实施方式中,本发明涉及提高对象的认知能力,该对象有衰老相关认知下降,且没有罹患或被诊断出如下疾病:轻度认知缺陷,阿耳茨海默病,痴呆症,血管性痴呆症,混合痴呆症,路易体痴呆,药物引起的痴呆,谵妄,抑郁或它们的组合。

[0110] 在一些实施方知中,MCI 与对象中淀粉样蛋白 β ($A\beta$), tau 蛋白, 早老-1 (PS1) 蛋白或其组合的提高了的表达水平或功能异常有关。在一些实施方式中,从脑脊液中和/或血浆中分离出淀粉样蛋白 β ($A\beta$), tau 蛋白, 早老-1 (PS1) 蛋白或其组合。因此,在一些实施方式中,本发明涉及一种提高对象认知功能的方法,该对象体内没有可检测到的淀粉样蛋白 β ($A\beta$), tau 蛋白, 早老-1 (PS1) 蛋白或其组合的相对提高了的表达水平或功能异常。在一些实施方知中,淀粉样蛋白 β ($A\beta$), tau 蛋白, 早老-1 (PS1) 蛋白的表达水平或功能异常与患有 AD 对象的相似。

[0111] 在一些实施方式中,本发明涉及改善有轻度认知缺陷的对象的认知下降。在一些实施方式中,认知下降的原因可能是未知的和/或难以(或不可能)诊断出的,或者认知下降可能是 ARCD 和 MCI 相结合的结果。因此,本文所述方法可改善有轻度认知缺陷和衰老相关的认知下降的对象的认知下降。

[0112] 在一些实施方式中,本发明方法涉及降低对象心率,该方法包括给予有需要的对象含二十二碳六烯酸而基本不含 EPA 的剂型。术语“心率”表示每分钟平均静息心跳。静息状态下,成人的平均心跳为每分钟约 60 到 80 次(bpm)。不同人的心率各有不同,从事耐力运动的个体心率可能非常低。因此,如本文所定义的,术语“降低心率”表示在 DHA 给药前后对象心率的相对降低。在一些实施方式中,心率降低在给予本发明的 DHA 一个月,二个月,三个月,六个月或一年后进行测定。本领域技术人员可测量心率,包括手动测量、听诊器(stethoscope)和听诊测量(auscultation)。一些研究已确定静息心率是心血管疾病的一个独立风险因素。参见例如 Cook, S. 等., Eur Heart J 27:2387-2393 (2006)。此外,心率降低与心肌后壁梗塞(post-myocardial infarction)患者的心脏病死亡率下降相关联。参见例如 Cucherat, M. 等., Eur Heart J 27:590 (2006)。在一些实施方式中,本文所述方法可用于降低高血压。虽然没有具体的理论限制,但降低心率和降低血压可以降低心脏负荷,因此可以降低心脏必须实现的工作量。因此,本文所述的方法可有利于总体的心血管健康。虽然没有具体的理论限制,但在一些实施方式中,本发明的方法可使如下指标正常:(a) 瞬时外向电流, (b) 延时整流电流, (c) Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶, (d) Na^{+} - Ca^{2+} -交换器(Na^{+} - Ca^{2+} -exchanger), (e) 肌浆网中 Ca^{2+} 的摄取, (f) L 型 Ca^{2+} 电流,或 (g) 它们的组合。在一些实施方式中,本发明的方法阻止 Ca^{2+} 在胞质和线粒体中过度富集,和/或降低用于生成细胞内 Ca^{2+} 操纵的信使(如二酰甘油和 IP_3)的膜磷脂酶的活性。

[0113] 在一些实施方式中,心率在静息状态下测定。在一些实施方式中,心率在“最大心率”(MHR,又名 STD 或 $\text{HR}_{\max}$)时测定,该心率是指对象心脏一分钟最高收缩次数,或对象在最大运动量时能达到的心率。在一些实施方式中,心率在“恢复心率”下测定。这是在停止活动后,于固定时间(或参考时间)测量的心率,一般测量时间超过一分钟。

[0114] 在本发明的一些实施方式中,按 DHA 方案给药约 1 个月,2 个月,3 个月,六个月或一年后的对象心率每分钟降低约 1 到 10 次,或每分钟降低约 1 到 5 次,或每分钟降低约 2 到 4 次。

[0115] 在一些实施方式中,进行降低心率的治疗对象可能也有轻度认知缺陷或衰老相关的认知降低。在这些实施方式中,心率降低的同时认知疾病也可得到治疗。因此,在一些实施方式中,用于治疗对象以降低其心率的方法还可包括选择需要降低心率的对象的步骤。这种选择可依据本文所述的评估认知疾病和评估参与治疗以降低心率的病人的标准。

[0116] 本发明的方法还涉及降低与正常年龄相关的认知功能下降的风险。因此,在一些实施方式中,本方法可阻止对象的认知降低。在一些实施方式中,本方法可降低与衰老相关认知下降有关的记忆缺失的风险,和/或保持对象健康(正常)的认知能力。在一些实施方式中,本方法涉及改善或促进已具有与衰老相关认知下降有关的症状的对象的记忆能力。

[0117] 本发明的方法还涉及提高老年对象如 50 岁以上的对象在记忆测试和/或执行能力测试中的表现。在一些实施方式中,该方法改善对象解决问题的能力,计划能力,集中注意力能力,专心能力和/或反应时间。在一些实施方式中,本发明的方法促进对象的视力健

康和 / 或视觉健康。本方法还可改善对象日常生活能力,或改善对象进行日常活动的的能力。

[0118] 本发明的方法还涉及改善用各种次级检测方法,如 CANTAB VRM, PRM, SOC, SWM, MMSE 和 / 或老年抑郁测试(Geriatric Depression tests)检测的相关认知功能。除了一些涉及计算机神经心理测试的检测如剑桥认知有限公司(Cambridge Cognition Ltd, 英国剑桥)开发的 CANTAB®, 本文进一步描述以上每个认知检测。小型智力状态测试(MMSE)是一种成人认知状况的简单定量检测(Folstein 等, Pyschiatr. Res. 12:189-198(1975)), 获自心理评估资源公司(Psychological Assessment Resources (PAR) Inc. 佛罗里达, 卢茨)。因此, 在一些实施方式中, 本发明涉及改善对象在一种或多种次级检测中的得分, 如 VRM 分数。在一些实施方式中, 本方法涉及改善患有早期认知下降或没有被诊断出任何认知下降的个体的认知功能如, 记忆功能。

[0119] 在一些实施方式中, 认知功能的检测通过 CANTAB 认知成套测试实现, 包括工作记忆测试, 记忆保留测试, 注意力测试和执行能力测试。在一些实施方式中, 认知功能的改善通过 PAL6 图形期的犯错次数来测量。在一些实施方式中, 认知功能的改善通过 WMSIII 的延迟逻辑记忆测试, CANTAB 语言识别记忆测试(the CANTAB Verbal Recognition Memory test), CANTAB 图形识别测试(the CANTAB Pattern Recognition test), CANTAB 空间工作记忆测试(the CANTAB Spatial Working memory test), 剑桥长袜测试(Sockings of Cambridge test), 或它们的组合来测量。

[0120] DHA 可给予一个逻辑记忆基线得分大于或等于 1 标准偏离, 低于年轻人平均水平的对象。在一些实施方式中, 对象为 50 岁或更老, 或 68 岁或更老。

[0121] 在一些实施方式中, 各种因素可在本文方法中的 DHA 给药的功效上起作用。例如, 痴呆症家族史可用作本发明方法中的 DHA 的功效增加的预测指标。因此, 在一些实施方式中, 本发明涉及通过给予含有二十二碳六烯酸(DHA)而基本不含二十碳五烯酸(EPA)的剂型来改善有痴呆症家族史的对象们的认知功能和 / 或降低其心率的方法。在一些实施方式中例如, 他汀类药物伴随使用可作为本发明方法中的 DHA 的功效增加的预测指标。因此, 在一些实施方式中, 本发明涉及通过给予含有二十二碳六烯酸(DHA)而基本不含二十碳五烯酸(EPA)的剂型来改善有他汀类药物伴随给药的对象们的认知能力和 / 或降低其心率的方法。

[0122] 在一些实施方式中, 本发明涉及提高对象血浆 DHA 磷脂水平, 提高对象血浆 DPA_n-6 磷脂水平和 / 或降低对象血浆花生四烯酸磷脂水平的方法。虽然不受具体理论限制, 但在一些实施方式中, 一种或多种磷脂水平的改变导致认知功能的改善和 / 或心率降低。该结果显示在图 10 和图 11 中, $r=-2.14$ ($p<0.011$), 证明随着血浆 DHA 水平的增加, 从心率基线的改变在患有衰老相关认知下降的年长成人中降低。

[0123] 认知功能可通过本文所述的本领域技术人员熟知的各种方法检测。参见例如, 实施例 1 所述的方法。与未给予含 DHA 剂型的对象相比, 对象的认知功能可得以提高。在本发明的一些实施方式中, 如本文所述检测中的一种所测, 通过上述任何技术检测的认知功能增加了 5% 以上, 或约 5% 到约 90%, 约 10% 到约 80%, 约 25% 到约 75%, 或约 30% 到约 65%。在一些实施方式中, 与给予含 DHA 和 EPA 剂型如 Lovaza® 的对象相比, 对象的认知功能可得以提高。在这些情况下, 与给予 DHA 和 EPA 的对象相比, 通过上述任何技术检测的认知功能增加了 5% 以上, 或约 5% 到约 90%, 约 10% 到约 80%, 约 25% 到约 75%, 或约 30% 到约 65%。本领域技术人员将理解, 增加的量可依赖各种参数, 如对象的初始认知功能。例如, 和具有平

均认知功能的对象相比,认知功能下降的对象其认知功能的增加量会更大。认知功能的增加还可依赖与 DHA 给药的长度和 / 或数量,或 DHA 给药的方案。例如,在一些实施方式中,对象认知下降是长期的,因此在对象余下的寿命中都会给予 DHA,或从 1 到 20 年,或 1、2、5、10 或 15 年。在一些实施方式中,在 1、5、10、15、20 年后,通过本文所列任何检测所测的对象认知功能增加 5% 以上,或约 5% 到约 90%,约 10% 到约 80%,约 25% 到约 75%,或约 30% 到约 65%。

[0124] 在一些实施方式中,认知功能的增加由给予 DHA 的对象的认知功能和年龄以及身体状况基本相似的对象即同龄人的认知功能之间的比较来测定。在一些实施方式中,认知功能的增加由根据给予对象 DHA 的发明给予 DHA 1 个月、2 个月、3 个月、6 个月,1 年或 5 年前后的个体认知功能的对比来测定。

[0125] 在一些实施方式中,本发明的 DHA 给药在相对较短的时间里,如 1 周到 26 周(第 1 周到第 26 周)就能提高认知功能。在一些实施方式中,在第 26 周,对象的认知功能提高 5% 以上,或约 5% 到约 90%,约 10% 到约 80%,约 25% 到约 75%,或约 30% 到约 65%。在一些实施方式中,DHA 每日给药,持续 1 周到 6 周(第 1 周到第 6 周)。在一些实施方式中,在第 6 周,对象的认知功能提高 5% 以上,或约 5% 到约 90%,约 25% 到约 75%,或约 30% 到约 65%。在一些实施方式中,DHA 每日给药,持续 2 周到 4 周(第 2 周到第 6 周)。在一些实施方式中,在第 6 周,对象的认知功能提高 5% 以上,或约 5% 到约 90%,约 25% 到约 75%,或约 30% 到约 65%。在一些实施方式中,DHA 每日给药,持续 28 天(第 28 天)。在一些实施方式中,到第 28 天,对象的认知功能提高 5% 以上,或约 5% 到约 90%,约 25% 到约 75%,或约 30% 到约 65%。

[0126] 本文中,术语“治疗”和“治疗处理”都指治疗性处理和预防性或预防方法,其目的是防止或减缓(缓解)不期望的生理状况、病症或疾病,或获得有益的或期望的临床结果。出于本文目的,有益的或期望的临床结果包括但不限于:与下降的认知功能有关的症状减轻,即认知老化;与下降的认知功能有关的症状程度的减轻;与下降的认知功能有关的病情、病症或疾病的状态的稳定(即不加重);与下降的认知功能有关的病情、病症或疾病发展的发作延迟或减缓;与下降的认知功能有关的病情、病症或疾病状态的改善,与下降的认知功能有关的病情、病症或疾病的缓解(部分的或所有的),不管是可检测到的或是不可检测到的;与下降的认知功能有关的病情、病症或疾病的强化,减轻,增强或改善。在降低心率的治療中,有益的或期望的临床结果包括但不限于:心血管疾病风险的降低,高血压(低血压)的降低,心肌局部缺血发生率的降低,和 / 或心血管输出的增加。治疗包括引发临床显著反应而不引起过高水平的副作用。

[0127] 痴呆症,阿尔茨海默病,轻度认知缺陷症,衰老相关的认知下降或衰老相关的记忆缺陷,和无法解释的记忆缺失症,都可与降低的认知功能有关。因此,在一些实施方式中,本发明涉及降低,预防或减缓痴呆症,阿尔茨海默病,轻度认知缺陷症,衰老相关的认知下降或衰老相关的记忆缺陷,前驱性阿尔茨海默病和无法解释的记忆缺失症的发展的方法,包括给予本发明的 DHA 剂量。术语“预防”可表示停止或阻止可导致认知下降的疾病、病症、或疾病或病症的症状。因此,短语“预防患有衰老相关认知下降的对象的认知功能下降”包括停止或阻止个体衰老时自然发生的认知下降的过程。

[0128] 术语“对象”指哺乳动物,如人类或灵长动物,如猿,猴,猩猩,狒狒,长臂猿和黑猩猩。对象可以是人或非人。对象可以是任何年龄。例如,在一些实施方式中,对象是大于约

50 岁,大于约 55 岁,大于约 60 岁,大于约 65 岁,大于约 68 岁,大于约 70 岁,大于约 72 岁,或大于约 75 岁的人。在一些实施方式中,对象是成年男性或成年女性。

[0129] 在一些实施方式中,对象是“有此需要的对象”。有此需要的对象是指该个体需要治疗,即有发生衰老相关认知下降的风险的对象,患有认知功能下降的对象,和 / 或需要降低心率的对象。有此需要的对象还可包括出现轻度认知缺陷,痴呆症,阿尔茨海默病和无法解释的记忆缺失症的对象。

[0130] 在本文的实施方式中,剂型可通过不同的途径给予,包括例如但不限于:胃肠外途径,皮下途径,静脉内途径(推注或输注),肌肉内途径,或腹膜内途径。适用于这些给药方式的剂型可包括常规剂型,如水溶液或悬液,适合注射前溶于水溶液或悬液中的固体形式,或乳液。在一些实施方式中,通过将剂型置于良好的物质而给药。

[0131] 在一些实施方式中,按照本文所述方法进行 DHA 给药的 DHA 药代动力学分布与包含 DHA 和 EPA 的组合物(如信赖医药公司(Reliant Pharmaceuticals)的 Lovaza®)的药代动力学分布相似,尽管本发明的 DHA 剂型中几乎不含 EPA。例如,DHA 的吸收、结合到膜上、酯酶水解、肠细胞吸收、导入乳糜微粒、超低密度脂蛋白(VLDL)、低密度脂蛋白(LDL)和高密度脂蛋白(HDL)都和采用含 DHA 和 EPA 的组合物观察结果相似。

[0132] 逆转化(Retroconversion)是一种酶促反应,通过将二碳单元逐渐从分子上移去,长链脂肪酸被转化成它们相关的短链前体脂肪酸。DHA 可逆转化为 EPA 和 DPA_n-3。参见例如 Brossard 等 Am. J Clin. Nutr. 64:577-86 (1996)。在一些实施方式中,本发明的 DHA 逆转化水平比 DHA 游离酸和 / 或盐形式,或 DHA 甘油三酯形式的低(或低速率)。例如,在一些实施方式中,在用本发明的 DHA 的方法中,相对于用 DHA 游离酸和 / 或盐或 DHA 甘油三酯形式的方法来说,只有很少的 EPA 和 / 或 DPA_n-3 产生。

[0133] 在本文一些实施方式中,可用不同方案给予 DHA 剂型,以实现所需的给药剂量。在一些实施方式中,剂型如单位剂量(例如一粒明胶胶囊)可一天给药一次,两次,三次,四次,五次,六次,七次,八次,九次,十次,十一次或十二次。例如,为了每天给药约 0.86g,可每天给予一个单位约 1g 的单位剂量,该单位剂量中含有约 86%w/w DHA。或者,含有约 430mg DHA 的单个单位剂量可每天给药两次,或每天一次给予两个单位剂量以达到相同的给药剂量。在一些实施方式中,DHA 一天给药三次,如每餐给予。在一些实施方式中,DHA 剂型每日给予,连续给药,或隔日给药(每两天)。

[0134] 治疗长度可根据例如但不限于对象年龄,病情严重程度以及治疗是针对已诊断的疾病还是针对预防效果而变化。因此,在一些实施方式中,DHA 剂型的给药至少持续 28 天,至少 3 个月,至少 6 个月,或至少 9 个月。本方法还包括短期 DHA 给药如一天一次连续 7 天、14 天、21 天或 28 天。在一些实施方式中,DHA 治疗长度可以更长,例如,每天给予特定剂量的 DHA,持续至少一年,一到五年,一到十年,一到二十年,五到十年,或五到二十年。在一些实施方式中,在处方医生推荐下治疗持续进行。在一些实施方式中,DHA 治疗持续进行,直到认知功能恢复到预先选择的由医学专家确定的目标水平。在一些实施方式中,在认知功能达到正常或边界水平或预先选择的目标水平后,DHA 给药仍持续进行。在一些实施方式中,在认知能力下降之前进行 DHA 给药,这是一种预防型措施。

[0135] 在一些实施方式中,本发明涉及提高对象认知功能的方法,该方法包括每日给予对象含约 200mg 到约 4g DHA 而基本不含 EPA 的剂型,连续 28 天到 365 天或连续 56 天到 185

天的方法。

[0136] 在一些实施方式中,连续给予 DHA。本文中,当称“给药”是“连续的”或“连贯的”时,表示给药的频率为每天至少一次。然而需要注意的是,给药频率可多于一天一次并仍可以是“连续的”或“连贯的”,如只要达到本文所述剂量水平,每天可两次甚至三次。

[0137] 在一些实施方式中,DHA 剂型的给药可与治疗认知功能降低的别的方案(即非 DHA 方案)结合使用。例如,本发明的方法可与饮食方案(如高 ω -3PUFA 饮食等),运动方案,减肥方案,或戒烟方案结合以提高认知功能。本发明的方法还可与别的药物产品结合使用,以提高对象的认知功能(如已获批的阿耳茨海默病药物治疗)。

[0138] 在一些实施方式中,DHA 剂型的给药可与治疗高血压、高胆固醇、心脏病的别的方案(即非 DHA 方案)及其组合结合使用。例如,本发明的方法可与其它心血管药结合治疗,包括如抗心律不齐药,抗高血压药,钙通道阻断剂,心脏麻痹溶液,强心剂,纤溶剂,血管收缩剂,血管扩张剂,一氧化氮供体,钾通道阻断剂,钠通道阻断剂,他汀类,贝特类(fibrates),ace- 抑制剂,或利尿钠剂(naturitetic agent)。

[0139] 他汀类药包括阿托伐他汀,美伐他汀,洛伐他汀,辛伐他汀,普伐他汀和氟伐他汀。其他有用的贝特类药例如苯扎贝特,环丙贝特,斜纹祛脂乙酯,安妥明,乙羟茶碱,安妥明,非诺贝特,吉非罗齐,皮瑞贝特(pirifibrate),双安妥明和头扣贝特(tocofibrate);尤其有用的如吉非罗齐,非诺贝特,苯扎贝特,安妥明,环丙贝特及其活性代谢物和类似物,包括任何相关的纤维酸(fibric acid)如非诺贝酸(fenofibric acid)。

[0140] 抗心率失常药常按作用机制分为四个主要种类:I 型,钠通道阻断;II 型, β -肾上腺素阻断;III 型,复极化延长;和 IV 型,钙通道阻断,并可包括利多卡因,莫雷西嗪,美西律,妥卡胺,普鲁卡因胺,恩卡胺,氟卡尼,妥卡胺,苯妥英,普罗帕酮,奎尼丁,丙吡胺,氟卡胺,普萘洛尔,艾司洛尔,胺碘酮,阿替利特,溴苄乙胺,氯非胺,艾索利特,索他洛尔,阿齐利特,多非利特,决奈达隆,艾生利特,伊布利特,替地沙米,曲西利特,维拉帕米,地尔硫卓,洋地黄类,腺苷,氯化镍,和镁离子。

[0141] 心血管药物的例子包括血管扩张剂,例如,肼苯哒嗪;血管紧张素转换酶抑制剂;抗心绞痛药物;抗心律失常药物;强心配糖体(cardioglycosides)如地高辛和毛地黄毒甙;钙离子拮抗剂如维拉帕米和硝苯地平;和利尿剂。

[0142] 其他示例的心血管药物包括,例如但不限于,环氧化酶抑制剂如阿司匹林或吲哚美辛,血小板凝集抑制剂如氯吡格雷、噻氯匹啶或阿司匹林,纤维蛋白原拮抗剂或利尿剂如氯噻嗪、氢氯噻嗪、氟甲噻嗪、氢氟甲噻、苄氟甲噻嗪、甲基氯噻嗪、三氯噻嗪、泊利噻嗪或苄噻嗪,血管紧张素转换酶抑制剂如卡托普利、佐芬普利、福辛普利、依那普利、西那普利、西扎普利、地拉普利、喷托普利、喹那普利、雷米普利、赖诺普利及它们的盐,血管紧张素 II 拮抗剂如氯沙坦、厄贝沙坦或缬沙坦,溶栓药物如组织型纤溶酶原激活剂(tPA)、重组 tPA、链激酶、尿激酶、尿激酶原、和茴香酰纤溶酶原链激酶激活剂复合物(APSAC, Eminase, 比切姆实验室(Beecham Laboratories)),钙通道阻滞剂如维拉帕米、硝苯地平或地尔硫卓,血栓素受体拮抗剂如伊非曲班,前列环素类似物,或磷酸二酯酶抑制剂。

[0143] 非 DHA 剂型可以和 DHA 用相同的剂型,或同时给予但是在单独的剂型中。在一些实施方式中,额外的非 DHA 剂型可与含 DHA 的剂型在不同的时间给药,如额外的非 DHA 剂型早上给药而含 DHA 的剂型晚上给药。

[0144] 在一些实施方式中,本发明的 DHA 在非 DHA 方案前给药。例如,DHA 剂型可首先用于提高认知功能,随后施与非 DHA 方案以维持(或进一步降低)该预先选择的认知功能水平。或者,在一些实施方式中,可先施与非 DHA 方案以提高对象的认知功能到预先选择的目标水平,然后给予本发明的 DHA 剂型以维持(或进一步降低)对象认知功能水平。因此,在一些实施方式中,本发明涉及用本文所述的 DHA 剂型维持认知功能的方法,该方法包括 (1) 施与对象非 DHA 方案以提高该对象的认知功能,直到其认知功能达到预先选择的水平,和 (2) 给予本发明的 DHA 剂型以维持该预先选择的认知功能水平。

[0145] 在一些实施方式中,本发明的方法包括每日给予对象含 DHA 而基本不含 EPA 的剂型,并与本领域人员已知的其它降低甘油三酯的方法结合使用。例如,本发明的方法可包含每日给予对象含 DHA 而基本不含 EPA 的剂型以及一种或多种额外的降低甘油三酯的药,例如但不限于胆汁酸结合树脂如消胆胺和降胆宁;烟酸;纤维酸衍生物如吉非罗齐和安妥明;他汀类药物如洛伐他汀,普伐他汀,阿托伐他汀和辛伐他汀;和它们的组合。其它降低甘油三酯的药可以和 DHA 用相同的剂型给予,或同时给予但是在单独的剂型中。在一些实施方式中,其它降低甘油三酯的药可与含 DHA 的剂型在不同的时间给药,如所述其它降低甘油三酯的药早上给药而含 DHA 的剂型晚上给药。在一些实施方式中,本发明的方法可包含每日给予对象含 DHA 而基本不含 EPA 的剂型,并与饮食变化结合使用,如低总脂肪饮食,低饱和脂肪饮食,低膳食胆固醇饮食,和/或增加淀粉和纤维素的饮食。在一些实施方式中,本发明的方法可包含每日给予对象含 DHA 而基本不含 EPA 的剂型,并与运动方案变化结合使用,如每周至少 3 到 5 次,每次至少 20 分钟的额外有氧运动。在一些实施方式中,本发明的方法可包含每日给予对象含 DHA 而基本不含 EPA 的剂型,并与减肥方案结合使用。

[0146] 本发明涉及含有将按本文所述方法给予的一个或多个剂型的药盒或包装。药盒或包装可包含一个剂型或多于一个的剂型(即多个剂型)。若药盒或包装包含多个剂型,可任选的安排该多个剂型,以相继给药。药盒可包含足量的剂型以给慢性病对象和需要长期给予本发明 DHA 的对象提供便利。每个剂型可包含约 100mg 到约 4g 的 DHA,约 500mg 到约 3g 的 DHA,或约 1g 到约 2g 的 DHA 并可在连续的天数中摄取。例如,在一些实施方式中,药盒提供足量的剂型以满足 1、2、3 或 4 个月的每日 DHA 给药。在一些本发明的实施方式中,药盒含有短期给药的剂型,如药盒可含有约 28 到 31 天的口服剂型或更多,每个剂型含约 500mg 到约 4g 的 DHA,并在连续的天数中摄取。

[0147] 本发明的药盒可任选地包含和药盒剂型相关的说明书。该说明书可以是管理药品生产、使用或销售的政府机构颁发的说明书,该说明书反映出政府机构批准其用于治疗症状或疾病的人体给药的生产、使用或销售,用于给予人以治疗症状或疾病。说明书可以任何形式,其传递按本发明的方法使用药盒中的剂型的信息。例如,说明书可以是印刷品或预先录制的媒体装置。

[0148] 在检查病人的过程中,医学专家可确定施与本发明方法之一是适于病人的,或医生可确定病人的症状(如病人可能患有痴呆症或阿尔茨海默病)可通过施与本发明方法之一而得到改善。在开出任何 DHA 方案的处方前,医生可忠告病人如与方案有关的各种风险和益处。病人可获知与方案有关的所有已知和疑似风险的全部公开内容。该忠告可以口头和书面的形式提供。在一些实施方式中,医生可提供病人方案的文献材料,如产品信息,教育材料等。

[0149] 术语“消费者信息”可包含但不限于, 英语文本, 非英文本, 可视图像, 图表, 电话纪录, 网页, 以及与现场客服代表的接触。在一些实施方式中, 消费者信息将提供根据本发明方法使用 DHA 剂型的指导, 合适的使用年龄, 适应症, 禁忌症, 合适的剂量, 警告, 网站地址的电话号码。在一些实施方式中, 本方法还包含提供专业信息给相关人士, 使之能够回答消费者有关按本发明方法的公开方案使用的问题。术语“专业信息”包括但不限于有关按本发明方法给药的方案的信息, 这些信息设计用于医学专家回答消费者提问。

[0150] “医学专家”包括例如医生, 医生助理, 执业护士, 药剂师和客服代表。本文所述的所有不同方面, 实施方式和选择可以任意和全部的变化形式组合。

[0151] 以下例子是本发明的组合物和方法的阐述性而非限制性例子。对各种条件和参数进行通常的且对本领域技术人员来说是显而易见的其它合适的修饰和适应在本发明的构思和范围之内。因此, 本发明的宽度和范围不应局限于任何上述示例性实施方式, 而仅由下面的权利要求书和其等价物来限定。

[0152] 实施例 1

[0153] 使用剑桥神经心理测试自动成套系统(CANTAB) 认知成套检测, 测试 DHA (约 900mg/day) 和安慰剂的对比效果以确定在健康的有轻度记忆下降主诉的年长对象中, 记忆、注意力的认知检测和执行能力是否得到改善。本研究的一个目标是在健康的有记忆下降主诉的年长对象中, 确定 DHA 给药和安慰剂相比在改善认知功能上的效果(即工作记忆, 记忆保留, 注意力, 处理速度和执行能力)。本研究的其他目的包括, 确定 DHA 在视敏度水平和血浆磷脂水平上的效果以及评价所给 DHA 剂量的安全性和耐受性。

[0154] 本研究是一个随机的, 双盲的, 安慰剂对照的, 平行的, 多中心设计的研究, 旨在评价口服剂量的 DHA 在健康的有记忆下降主诉的年长对象的认知功能上的作用。本研究由筛选 / 基线期和 24 周的治疗期构成。

[0155] 符合条件的男性或女性对象被随即的分入两个治疗组 DHA 组和安慰剂组中的一组。

[0156] DHA 组提供 800mg 明胶软胶囊, 每粒含有约 300mg DHA, 为来自海藻油的甘油三酯形式 (DHASCO®-S 油, 40%DHA)。除了 40% 的 DHA, DHASCO®-S 油还含有 40-60% 的饱和、单不饱和或多不饱和脂肪酸, 400ppm 的抗坏血酸棕榈酸盐, 2000ppm 的混合生育酚, 2000ppm 的迷迭香提取物, 3% 的柑橘调味料, 和 1% 的天然掩饰剂。指导对象每天服用三粒 800mg 的胶囊, 即约每天 900mg DHA。

[0157] 安慰剂组给予 800mg 明胶软胶囊, 含 48% 玉米油 (com oil), 48% 大豆油, 3% 的柑橘调味料和 1% 的天然掩蔽剂。胶囊也含有 400ppm 的抗坏血酸棕榈酸盐, 2000ppm 的混合生育酚和 2000ppm 的迷迭香提取物。与 DHA 组相似, 指导对象每天服用三粒 800mg 的胶囊。

[0158] 每组的胶囊放于瓶中供给。每瓶含有一个月用量的胶囊。指导对象每天随食物一同摄食胶囊, 从所有评估完成后的基线调查日开始, 在研究过程中 (24 周) * 连续每天服用。指导对象在研究过程中不要改变他们的正常饮食。在整个研究中给予 DHA 食物频率调查表, 用于评估饮食摄取的 ω -3 脂肪酸以及对该给药方案的顺应性。

[0159] 对象在基线期, 1 个月, 3 个月和 6 个月 (“治疗功效评估结束”) 的时候进行评估。招募有记忆下降主诉或逻辑记忆 (WMS III) 测试筛选原始分数为一个标准偏差或大大低于年轻人群的平均水平的对象。在一些研究中, 这被称为衰老相关的认知下降, 也被称为衰老

相关的记忆缺陷(AAMI),或与年龄一致的记忆下降。总共招募到约 485 个对象。

[0160] 在筛选期,根据具体的准入和排除标准(包括 Wechsler 记忆等级(WMS III)的筛选逻辑记忆辅助测试)选择对象。参见例如,Wechsler,D. 著《给药和评分手册》(Administration and Scoring Manual),第三版,德克萨斯州圣安东尼奥,哈考特布雷斯公司(Harcourt Brace&Company),1997。除了筛选逻辑记忆辅助测试外,所有参与筛选的对象还要进行小型智力状态测试(MMSE),老年抑郁测量(Geriatric Depression scale),视敏度测试和填写 DHA 食物频率调查问卷(DHA Food Frequency Questionnaire)。参见例如,Folstein 等 Pyschiatr. Res. 12:189-198(1975);Yesavage J. 等 J Psychiatr. Res. 1:37-49(1982)。满足筛选标准的合格对象要通过一个有计算机认知成套测试(CANTAB)的基线前训练过程。

[0161] 有 CANTAB 的基线前测试作为一个训练过程,使对象熟悉电脑系统。Morris R 等 1987 年著有《痴呆症的电脑辅助评估:阿尔茨海默型痴呆和帕金森病的神经心理学缺陷对比研究》(Computer Aided Assessment of Dementia:Comparative Studies of Neuropsychological Deficits in Alzheimer Type Dementia and Parkinson's Disease)。该基线前测试 7 天(+/-2)后,进行基线测量,包括基线实验室测量,生命体征,和 CANTAB 认知成套测试。在基线过程中,根据年龄(55-69;大于等于 70)将对象分组并随即分配给约 900mg DHA 或安慰剂。随机分配的 DHA 或安慰剂胶囊在基线调查结束时发给每个对象。指导对象在以后的 24 周内每天摄入 3 粒胶囊,并于最初提供 3 个月量的胶囊。第四周结束时,对象返回实验基地进行顺应性评估和安全性评估。12 周后,对象返回实验基地进行安全性评估和功效评估并给予最后 3 个月的胶囊。24 周后,对象返回实验基地进行“研究结束”的功效和安全评估。顺应性通过食物频率调查问卷,返回的胶囊数量,和血浆 DHA 水平(第 24 周测量)来评估。CANTAB 认知成套测试包括记忆测试,学习能力测试,注意力测试,解决问题测试,和执行能力测试(即计划和组织技能)。参见例如,Fowler 等,Applied Neuropsychology2:72-78(1995);Robbins 等,Dementia5:266-281(1994);和 De Luca 等,J Clinical and Experimental Neuropsychology25:242-254(2003)。

[0162] 计算机成套测试用按键式屏幕操作,应答被纪录并保存在电脑数据库中。数据转移到已根据感兴趣的变量和分析进行格式化的中央数据库。收集每个对象的基线、第 12 周和第 24 周的 CANTAB 评估结果用于分析。CANTAB 说明书和设定由不知道对象的治疗的检察员提供。

[0163] 合适的研究对象要满足如下准入标准。

[0164] ●男性或女性,且至少 55 岁

[0165] ●有记忆下降主诉或逻辑记忆辅助测试(属于 WMS III)原始分数为一个标准偏差或大大低于年轻人群的平均水平(立即应答截止总分小于等于 28;或延迟应答截止总分小于等于 15)。

[0166] ●有能力理解本研究的要求并愿意提供书面的知情同意书(在机构伦理委员会(IRE)批准的知情同意书文件上签字为证),同意遵守研究的约束条件并会为所需的评估而返回。

[0167] ●若服用未禁止的药物,需是稳定的药物方案(3 个月前)

[0168] ●为了符合进入研究的要求,对象必须不具有以下任何排除标准。

- [0169] ●筛选 MMSE 小于 26
- [0170] ●如 DHA 食品频率调查问卷所评估,在筛选前 2 个月中每天摄取超过 200mg DHA
- [0171] ●在筛选前 2 个月中食用营养鱼油,亚麻油,ω-3 补充剂,或石杉碱(huperzine)。
- [0172] ●在筛选前 2 个月中服用乙酰胆碱酯酶抑制剂或美金刚胺。
- [0173] ●服用主要的抗精神病药物或主要的抗抑郁症药物。
- [0174] ●服用脂酶抑制剂如 **Xenical®** (奥利斯特(orlistat))。
- [0175] ●有大的医学病症史,包括缺血性中风,失去意识的头部创伤,癫痫病,精神病,血管性痴呆症,抑郁症(老年抑郁(Geriatric Depression) [15- 项]>5),心肌梗塞(一年内),不受控的糖尿病或失明。
- [0176] ●过去 6 个月中有大外科手术史。
- [0177] ●服用或 5 年内有毒品和 / 或酒精滥用史。
- [0178] ●过去 30 天内服用过任何待调查产品。
- [0179] ●无法吞咽胶囊
- [0180] 在基线和 24 周或“研究结束”调查时采集对象的血液样本,用于测定磷脂水平。样本收集到 10ml 真空收集 (vacutainer)EDTA 管,3000rpm 离心并将血浆存入 -80℃ 等待分析。血浆磷脂脂肪酸的分析如前所述。参见例如 Arterburn, L.M 等, *Lipids*42:1011-1024(2007)。脂肪酸分布以脂肪酸总图的百分比(重量比)表示。
- [0181] 24 周治疗后的配对关联学习(Paired Associate Learning, PAL) 测试中, CANTAB 测试分数的一级功效终点作为一级功效结果。一级分析根据基线分数,教育,场所,年龄层次进行调整。二级分析基于上述模型,添加了他汀类药物的伴随使用这一因素。CANTAB 的 PAL 辅助测试是视觉空间的线索回忆记忆测试,用于检测偶发记忆的变化。参见例如, de Jager 等 *Psychological Medicine*32:483-491(2002)。在纵向研究和 MCI 病人研究中,偶发记忆测试如 PAL 已显示对早期阿尔茨海默病有着高度的预测性,并在鉴定风险个体时非常有效。参见例如, Nestor 等 *Nat. Med.* 10:S34-41(2004) 和 Backman 等 *Neuropsychology*19:520-531(2005)。
- [0182] 二级功效终点包括:
- [0183] ●执行能力和计划能力的 CANTAB 测试:空间工作记忆测试 (Spatial Working Memory SPM) 和剑桥长袜测试 (Stockings of Cambridge SOC)
- [0184] ● CANTAB 语音识别记忆测试 (VRM)
- [0185] ● CANTAB 图形识别测试 (PRM)
- [0186] ●视敏度测试(用 Snellen 视力检查表,修订版检测)
- [0187] ●记忆功能调查表:遗忘-10 频率(自评量表)
- [0188] ●日常生活能力测量(ADCS-ADL PI) (自评量表)
- [0189] ●认知功能的临床检测和计算机评估由 (CANTAB) 授权的不知道对象治疗的检测员在每个实验场所进行。
- [0190] ● CANTAB 成套测试的说明
- [0191] CANTAB 成套测试的 15 个测试分为 5 个主要任务:
- [0192] ●训练和筛选
- [0193] ●注意力和记忆力

[0194] ●非关键性的学习能力和记忆力

[0195] ●持久注意力

[0196] ●正面 / 执行力任务

[0197] 参见例如,网站 cantab.com(2009年4月14访问)和剑桥认知有限公司(Cambridge Cognition Ltd,英国剑桥)提供的认知测试。

[0198] 训练和筛选测试包括运动筛选,大 / 小圆圈测定(Big/Little Circle assay),和反映时间测定。运动筛选测试在所有 CANTAB 成套测试中常见,在测试阶段的开始进行。一系列交叉线出现在在屏幕的不同位置。在示范了用惯用手的食指作出正确的指出方法后,对象需依次指出交叉线。此运动筛选测试有两个目的:(i) 作为训练程序确保对象能准确地指出,(ii) 对速度和精度提供测试,获得对象的运动技能指标。大 / 小圆圈测试(BLC)包括给对象展示一系列一大一小的成对圆圈。指导对象先指出两个圆圈中的小圆圈,20 次试验之后再指出大圆圈。设计这个视觉区分测试是为了训练对象:(i) 遵守明确的指导规则,(ii) 颠倒规则。反映时间测定(RTI)有三个目的:(i) 训练对象压住压片并触摸屏幕的技能,(ii) 筛选获得并发挥此运动技能的能力,(iii) 作为简单的单选或多选反应时间任务。当屏幕显示黄点时,对象需触摸屏幕。对于多选反应时间测试,黄点可能显示在五个位置之一。

[0199] 注意力和记忆力测试包括(i) 样品视觉搜索的匹配,(ii) 样本检测的延迟匹配,(iii) 图形识别记忆力检测,(iv) 空间识别记忆力检测,(v) 空间范围检测。样本视觉搜索的匹配(The Matching to Sample Visual Search,MTS)是速度 / 精度平衡任务,测试对象匹配视觉样本的能力并测量他们的反应时间和运动时间。屏幕中央会显示一个由四色元素组成的抽象图形。在短暂延迟后,屏幕边缘周围的一圈盒子中会显示不同数量的相似图形。其中仅有一个图形与屏幕中央的相匹配,对象需触摸该图形指出是哪一个。圈中的图形数量可能是 1、2、4 或 8 个,且不正确的图形由样品图形的篡改元素或篡改的错误选项组成。这个测试不包括在 CANTABexpedio 中。样本的延迟匹配(the Delayed Matching to Sample,DMS)是以四选项同时和延迟的识别记忆范例形式进行的一种知觉匹配的,即时和延迟视觉记忆的测试。给对象展示一个复杂的视觉图像(样本),然后短暂延迟后展示四个图像。在一些试验中,样本和选项图案同时展示,而在其他试验中,覆盖样本图和显示选项图之间有一段延迟(0 秒、4 秒或 12 秒)。图像识别记忆(the Pattern Recognition Memory,PRM)是以 2 选项强制区分范例形式进行的视觉图像识别记忆测试。屏幕中央展示一串视觉图像。这些图像设计成不能简单的用语言标记。在识别阶段,对象需要在之前见过的图像和新的图像之间进行选择。空间识别记忆(the Spatial Recognition Memory,SRM)是以 2 选项强制区分范例形式进行的空间识别记忆测试。一个白色方形依次在屏幕的 5 个不同位置显示。在识别阶段,对象会看到一系列 5 对正方形,其中之一处于之前展示阶段所处的位置上,而另一个是错误选项。五个正方形是颠倒顺序显示的。空间范围测试(the Spatial Span,SSP)测量对象的空间记忆范围。屏幕上显示一组白色正方形。一些正方形以不同的顺序依次更换颜色。更换结束后,有声音指示对象需以与它们之前展示的相同的顺序触摸每个电脑着色的盒子。正方形的数量从 2 个到 9 个。

[0200] 非关键性的学习能力和记忆能力测试包括配对关联学习测试。配对关联学习测试(the Paired Associates Learning,PAL)是一种延迟反应程序,测试用于视觉空间的关联形

成能力的两个不同方面:(i) 每个试验首次展示时正确放置的图像数量提供“列表记忆力”的指标,(ii) 对象学习所有关联需要的重复、提示展示的数量提供“列表学习能力”的衡量。屏幕上展示 6 个盒子。所有的盒子以随机的顺序打开。它们中一个或多个含有图像。对象需要记住屏幕上和不同位置关联的图像,并在测试阶段在每个图像展示时指出其正确的位置。测试开始非常简单,逐渐增加难度。

[0201] 持久注意力测试包括快速视觉信息程序测试(the Rapid Visual Information Processing)。持久视觉注意力的快速视觉信息程序测试(RVP)含有一个小的工作记忆部分。电脑屏幕中央展示一个白色的盒子,里面按伪随机顺序以每分钟 100 个数字的速度显示数字 2 到 9。对象需要发现连续的奇数或偶数序列(例如,2 — 4 — 6)并触摸垫子作出回应。

[0202] 正面 / 执行任务包括 (i) 空间工作记忆测定(Spatial Working Memory assay), (ii) ID/ED 转换测定, (iii) 剑桥长袜测定。空间工作记忆测定(SWM)测试对象保持空间信息和控制工作记忆中已记住的条目的能力。它是一种自排序任务,也评估启发式策略。试验开始时屏幕上显示许多有颜色的正方形(盒子)。总的目的是对象需找到每个盒子中的蓝色“筹码”并将它们填入屏幕右边的一个空栏里。对象需依次触摸每个盒子直到某一个打开后里面有蓝色“筹码”(一个搜索)。返回该搜索中已采样的空盒子是错误的。ID/ED 转换测定(IED)检测对象专注于复合刺激的具体特征的能力和在需要时转移该注意力的能力。测试中用到两个人工的维度:颜色填充的图形和白色的线。简单的刺激仅由这些维度中的一个组成,而复合的刺激由二者共同组成,即白线覆盖颜色填充的图形。对象通过在每个阶段满足学习能力的设置标准(6 个连续的正确响应)来通过测试。任何阶段,若 50 次试验后对象仍没能达到标准,则测试结束。剑桥长袜测试(SOC)是基于“伦敦塔”(Tower of London)测试的空间计划测试。给对象展示两个包含 3 个有色球的显示图。该显示图可很容易的被视为装在从横梁上悬挂下的长袜或短袜里的一堆有色球。这种排列帮助对象抓住涉及 3-D 概念的问题的一些规则,并顺应语言说明。对象需用低显示图中的球复制高显示图中展示的图案。

[0203] 其他测试包括 CANTABeclipse,可在 CANTABelect 成套测试中获得。感情是或不是测试(the Affective Go/No-go, AGN)评估信息处理偏见性和积极及消极刺激的抑制控制力。该测试包括数个方块,其中每个都显示一系列单词,这些单词选自三个不同的感情分类中的两类:积极的(Positive 如快乐的),消极的(如绝望的),中性的(如元素)。给对象一个目标分类(例如,积极的)并要求其在看到一个匹配该分类的单词时按压压力板,得出潜在的和总的正确 / 错误得分。语言识别测试(the Verbal Recognition Memory, VRM)评估在自主回忆和强制选择识别条件下语言信息的即时和延时记忆力。测试中,给对象看 12 个单词然后要求其:(i) 展示后立即产生出尽可能多的单词,(ii) 20 分钟延迟后,从包含原始 12 个单词和 12 个错误选项的共 24 个单词列表中识别出他们之前见过的单词,(iii) 从包含原始 12 个单词和 12 个新的错误选项的另 24 个单词列表中识别出他们之前见过的单词。测试中所有的单词都具有很高的可成像性。错误选项的频率和单词长度都和目标单词紧密匹配。

[0204] 其他二级测试包括记忆力自我评估测试(遗忘-10 频率测量(Frequency of Forgetting-10scale)) (Zelinski, E. M. 等, Aging and Mental Health 8:293-306 (200)),

阿耳茨海默病协作研究-日常生活能力预防手段(ADCS-ADL PI scale)(Galasko, D., Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 20:S152-69(200)), 小型智力状态测试(MMSE)(Folstein 等, Psychiatr. Res. 12:189-198(1975))和老年抑郁测量(Yesavage, J. 等, J Psychiatr. Res. 1:3749(198))。

[0205] **结果。**研究完成率达到90%, 平均年龄 70 ± 9 , 平均教育程度 14.6 ± 2.6 年。对于一级功效, ITT 分析证明, 相比于安慰剂组, 每天服用 900mg DHA 的对象在 PAL6 个图形阶段测试中犯的错误在 6 个月时比基线期明显减少(分数差值 -1.63 ± 0.76 , $p < 0.03$)。参见图 5A。WMSIII 的延时逻辑记忆测试高度预测了 PAL 的变化($p < 0.001$)。DHA 组和安慰剂组相比, CANTAB 语言识别记忆力测试中的即时(差值 0.4 ± 0.17 , $p < 0.02$)和延时(差值 0.4 ± 0.18 , $p < 0.02$)识别的正确回答数也与基线期显示出明显变化。两组的 CANTAB 图形识别测试和空间工作记忆测试结果没有明显差别。参见图 5-图 7。

[0206] 研究中还观察到心率的明显降低(DHA 组的 BPM 由基线期的 -3.2 变为 -1 , $p < 0.03$), 且其与第 24 周的血浆 DHA 水平有很高的关联性($p < 0.01$)。两组间血压和体重保持不变。 $A\beta_{1-40, 1-42}$ 和 hs-CRP 血浆水平没有显著不同。血浆磷脂 DHA 水平翻倍(3.2 到 6.4 重量%, $p < 0.001$)且与 PAL 响应结果($p < 0.04$)和总胆固醇的降低相关联($p < 0.01$)。顺应性大于 82%, 没有治疗相关的 SAE 报道且两个研究分组的 SAE 对象数量相同。

[0207] 24 周后 DHA 组血浆磷脂 DHA 水平明显增加了平均 3.2 重量%(平均基线水平的 3.2 重量%)。参见图 10。24 周后安慰剂组的血浆磷脂 DHA 水平有轻微的降低(平均变化 -0.08 重量%)(差值为 3.15 ± 0.16 , $p < 0.001$)。DHA 组血浆磷脂花生四烯酸(ARA)有相应的降低(平均变化 -1.37 重量%), 和安慰剂组的与基线水平相比的 ARA 变化(平均变化 -0.12 重量%)有明显不同($p < 0.001$)。补充 DHA 的组血浆磷脂 EPA 水平稍微增加(平均变化 0.16 重量%), 安慰剂组的该水平稍微降低(平均变化 -0.06 重量%), $p < 0.001$ 。24 周后, 给予 DHA 的组血浆磷脂 DPA $n-6$ 水平也有明显增加(平均变化 0.37 重量%), 而安慰剂组的 DPA $n-6$ 水平基本没有变化(平均变化 -0.004 重量%), $p < 0.001$ 。24 周时血浆磷脂 DHA 水平(用血浆浓度的对数值测量)与基线 PAL 响应的变化呈显著相关 $r = -1.85$, $p < 0.038$ 。

[0208] 顺应性主要通过 24 周时血浆 DHA 水平相对于基线的变化来测量。对于 DHA 组, 高于 1.5 重量%的变化(基于历史剂量响应的血浆 DHA 水平)视为适应。根据这种变化, 多于 82% 的 DHA 治疗对象是适应的。使用 ≤ 1.5 重量%变化, 则安慰剂组的适应性大于 99%。用胶囊数量测量的适应性二级检测证明两个小组对临床给予的材料有大于 91% 的适应性。第 24 周时, 与基线相比, DHA FFQ 结果也说明两个小组饮食摄取 DHA 每天小于 200mg 显示 98% 的适应性。DHA 组与安慰剂组相比, 一级终点的适应者分析显示出相似的改善(差值 -1.3 ± 0.89 ; $-3.1, 0.495\%$ CI), 但由于分析中有 85 人提前终止研究而没有血浆水平数据或没有遵守研究剂量方案, 该数据没有达到显著差异, $p < 0.13$ 。

[0209] 本研究的结果证明, 口服 DHA (每天约 900mg) 补充物改善了有轻度记忆下降主诉的老年人的记忆力和学习能力, 如 6 个月期间视觉空间学习错误和偶发记忆错误数量的显著降低所测的那样。与安慰剂治疗中错误数量下降相比, 补充 DHA 导致 CANTAB PAL6 图形检测中的错误有近 2 倍的降低。在实验结束时, DHA 诱导的认知改变与 DHA 血浆水平的对数值显著相关。与 CANTAB PAL 中年龄相关的标准化数据相比, DHA 补充组的 PAL 结果显示, PAL 测试表现有 7 年的改善, 而安慰剂组只有 3.6 年的改善。DHA 组

的平均基线 PAL 错误值(13.4 ± 11.5)与 72.6 岁相对应,补充 DHA6 个月后平均 PAL 错误值是 8.8 ± 9.9 ,与此测试中的 65.6 岁相对应。安慰剂处理对象的基线 PAL 标准年龄为 70.63 岁,6 个月后的标准年龄是 66.99 岁,极有可能是由于测试时的少量学习效果所致。CANTAB PAL 测试已被很好鉴定为一种依赖内侧颞叶记忆过程的偶发记忆测试。参见例如,Blackwell, A. D 等, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 17:42-8(2004) 和 de Jager, C. A. 等 *Psychological Medicine* 32:483-491(2002)。PAL 已显示可区分健康对照,轻度认知缺陷个体,阿尔茨海默病患者和抑郁症个体。参见例如, Egerhazi, A. 等 *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:746-51(2007) 和 Swainson, R 等 *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 12:265-80(2001)。这些研究证明 PAL 测试的变化在测试能指示衰老相关认知降低的早期记忆缺陷时非常精确,并可预测临床前阿尔茨海默病。用 DHA 的测试中的变化说明 DHA $\omega-3$ 脂肪酸补充可改善老龄化带来的早期记忆力和学习能力缺陷。WMS 的逻辑记忆测试是一种偶发记忆测试,用于客观的鉴定患有衰老相关认知降低的对象,并可以很好的预测使用 DHA 引起的 PAL 测试的改善。逻辑记忆延迟回忆分数的调整增强了 PAL 中 DHA 诱导的变化,这证实了对偶发记忆功能的积极效果。其他因素如痴呆症家族史和他汀类药物伴随使用也能预测 PAL 中的 DHA 响应,说明潜在的遗传和心血管易感性因素可能影响 DHA 对认知功能的效果。尽管年龄较大的组中 PAL 错误更多,但由于对象是按年龄随机分组且年龄是分析的一个辅因子,所以年龄不是一级终点变化的重要预测因子。

[0210] 补充 DHA 也能适当地改善作为另一种偶发记忆任务的 CANTAB 语言识别记忆力,这支持了 DHA 能提高变老成人中早期的、潜在分离的记忆能力的意见。在补充 DHA 的对象中没有发现工作记忆力 (SWM) 和执行能力 (SOC)、认知功能的变化,在多方面 MCI 和晚期阿尔茨海默病中,这些能力通常都受到损害。MMSE (全球通用的认知功能检测方法)和老年抑郁测量(测量老年人抑郁的方法)在 6 个月的研究中都没有发生变化,且两组的结果也没有不同,说明研究的是一个有轻度记忆缺陷且相对稳定、健康的老年人群。同样,在研究的 6 个月时间中,显示少量缺陷的 ADL 和自我感知记忆评估未受到 DHA 补充的影响,在两组对象中表现出微小但不显著的改善。

[0211] 每天约 900mg 海藻 DHA 的剂量耐受良好。已证明该剂量的适应性良好,且 6 个月后仅有 10% 放弃参与该研究。血浆磷脂脂肪酸水平如预期一样发生变化,在该剂量下 DHA 水平上升了 3.2 重量%, ARA 对应的下降了 1.4 重量%。在 DHA 摄取上升时, ARA 水平通常下降。EPA 水平的少量变化可能是由于少量脂肪酸从 DHA 逆转化而来,或是由于油中含有少量 EPA,而 DPAn-6 的增加预计也是由于油混合物中存在这种脂肪酸。DPAn-6 的明显增加可在神经信号传导和 tau 蛋白的磷酸化中发挥作用,但还有待进一步研究。参见例如, Green, K. N. 等, *J Neurosci.* 27:4385-95(2007)。

[0212] 本研究证实了对于患有衰老相关认知下降的健康成人, DHA 在临床上对改善记忆力和学习能力有重要有益效果。积极的研究结果说明每天约 900mg DHA 可作为营养神经保护剂,用于改善非常早期的衰老相关认知缺陷的模式 (pattern)。这些认知的变化很有可能随着正常衰老过程而发生,或可能在诊断出如 MCI 或轻度阿尔茨海默病之前先被检测出来。DHA 对早期偶发记忆的变化有明显的影响。如 PAL 测试所证,多人已指出偶发记忆的变化可预测临床前阿尔茨海默病。参见例如, Fowler, K. S. 等, *J Int. Neuropsychol. Soc.* 8:58-71(2002); 和 Blackwell, A. D. 等, *Dement. Geriatr. Cogn.*

Disord. 17:42-8 (2004)。本研究发现的 DHA 在认知方面的益处对老年人记忆丧失这一主要健康问题有所影响,并提供了改善衰老相关的大脑健康的一个耐受良好且有效的营养补充剂。

[0213] 总体而言,六个月的 DHA 补充(每天约 900mg)改善了患有衰老相关认知下降的健康老年人的记忆力。这种 PAL 上的改善与标准分布转移至较小年龄组相关。DHA 对可预测临床前 AD 的早期偶发记忆变化有明显的影响。六个月的 DHA 补充(每天约 900mg)还降低了患有衰老相关认知下降的健康老年人的心率。DHA 显示了有益的心血管效果,在这些老年人群中具有优异的安全性。

[0214] 本文所述的所有不同实施方式或选择可以任意或全部的变化形式组合。虽然已参照一些实施方式对本发明进行了具体展示说明,但本领域技术人员应理解,这些实施方式仅仅是示例性的,而非限制性的,它们可在不背离本发明精神和范围的情况下进行形式和细节的各种变化。因此,本发明的宽度和范围不应局限于任何上述示例性实施方式,但仅由下面的权利要求书和其等同项来定义。

[0215] 以上具体实施方式的描述完全揭示了本发明的一般性质,可以通过应用本领域技术人员的知识,在不背离本发明总体理念的基础上,他人无需过多的试验很容易对这些具体实施方式进行修改和/或调试以用于各种应用。因此,基于本文所列出的教导和指导,这些修改和改良包括在所揭示的实施方式的含义和等价内容范围之内。应当理解本文中的措词和术语仅仅是描述性的而非限制性的,因此本说明书的术语或措词可由本领域技术人员根据所述教导和指导解读。

[0216] 本说明书中提到的所有出版物和专利申请以其完整形式以引用的方式纳入本文,如各篇出版物或专利申请被具体地和单独地说明通过引用被纳入本文一样。

经过治疗，第24周CANTAB配对关联学习能力（PAL）总错误数（6个图形）与基线相比的变化和基线PAL总错误数（6个图形）的散布图（人群：修改的意向治疗LOCF）。

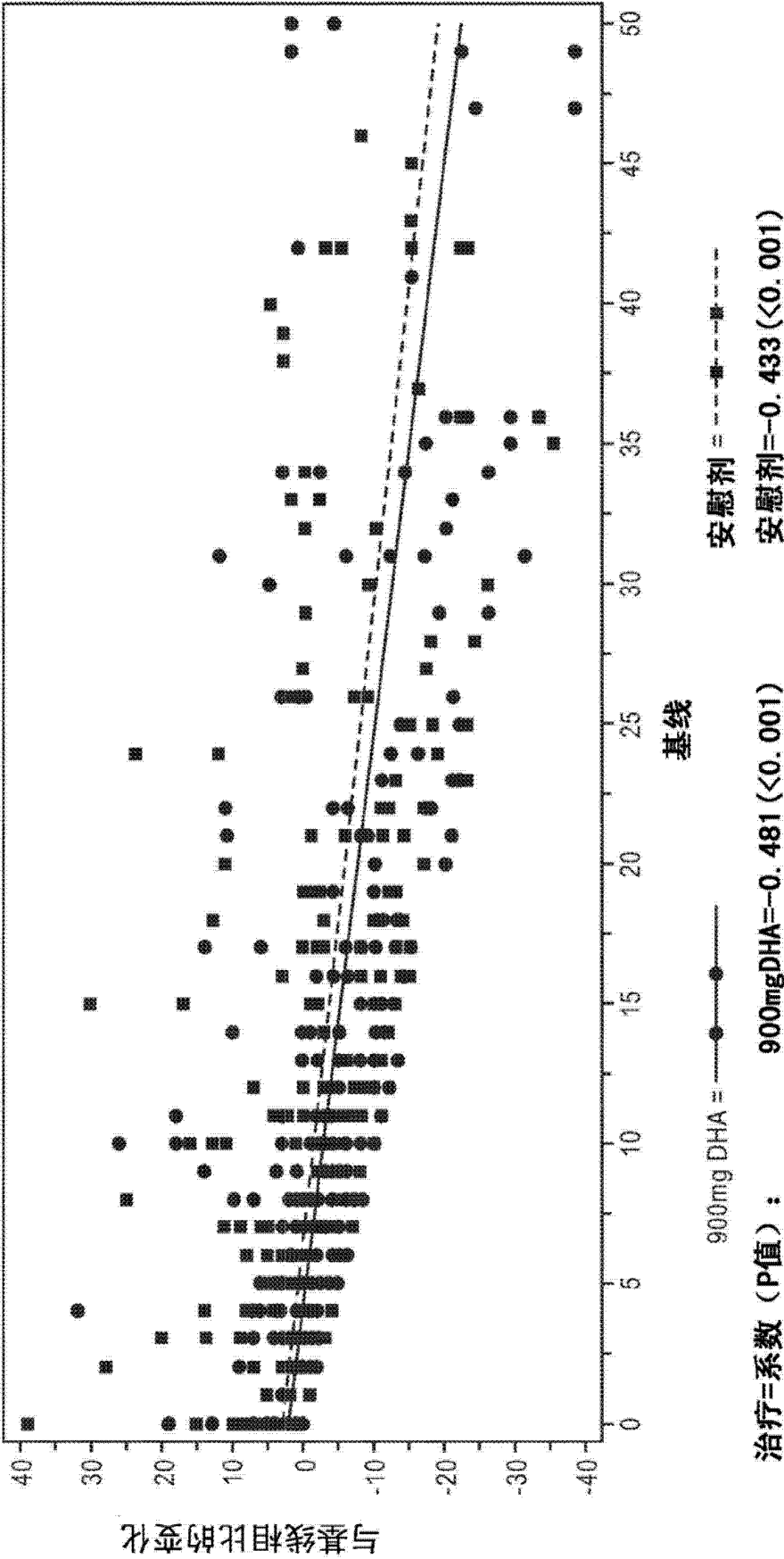


图 1

经过治疗，对象第24周CANTAB配对关联学习能力（PAL）总错误数（6个图形）与基线相比的变化和基线WMS III逻辑记忆总分（即时）的散布图（人群：修改的意向治疗LOCF）。

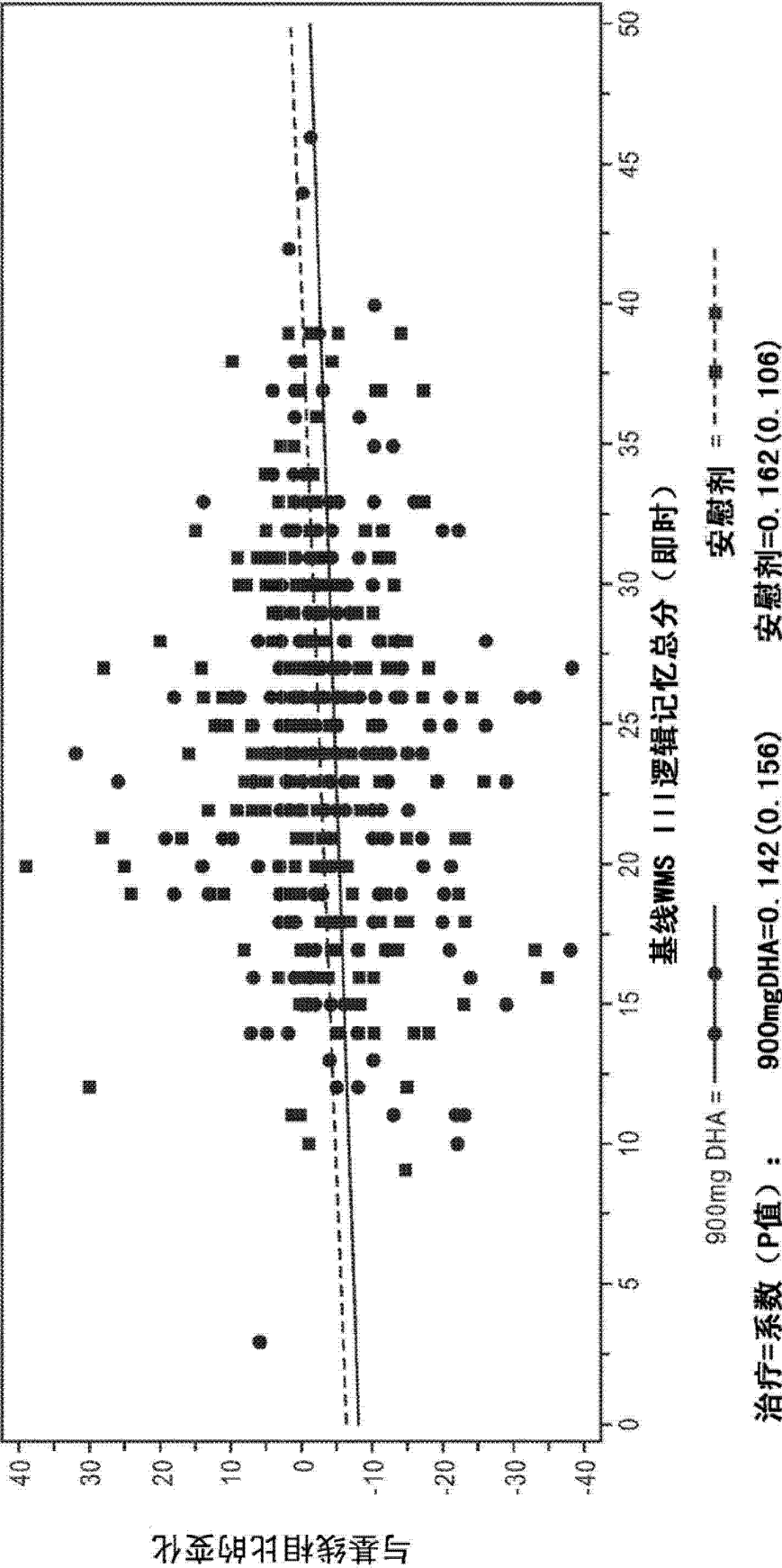


图 2

经过治疗，第24周CANTAB配对关联学习能力（PAL）总错误数（6个图形）与基线相比的变化和DHA血浆浓度（重量%）与基线相比的变化的散点图（人群：修改的意向治疗LOCF）。

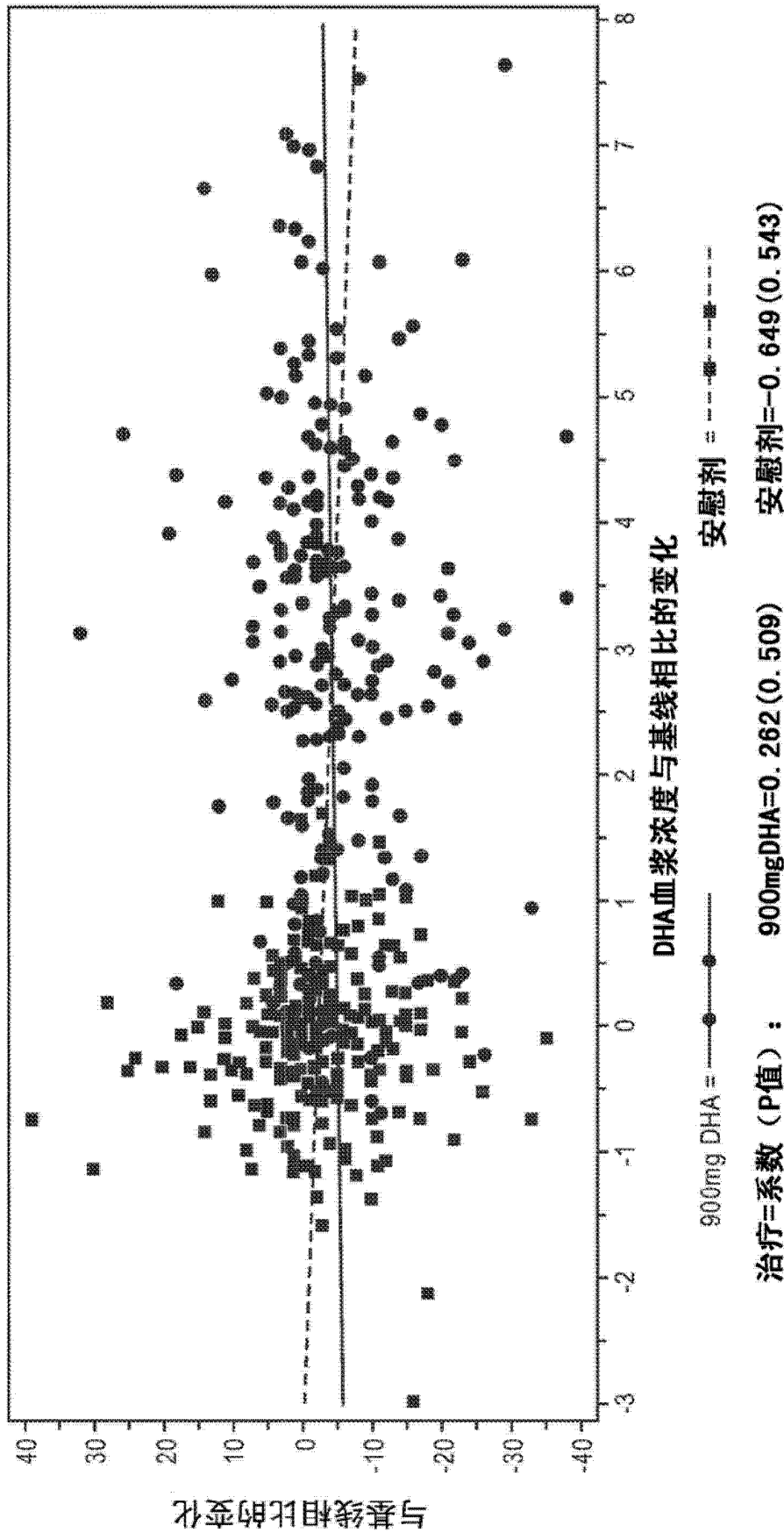


图 4

一级功效分析

第24周CANTAB配对关联学习能力（PAL）总错误数（6个图形）与基线相比的变化汇总（人群：修改的意向治疗LOCF）。

治疗	数量	基线 平均值 (SD)	基线后 平均值 (SD)	与基线相比的变化				
				平均值 (SE)	LS均值 (SE) ^a	差值 (SE) ^a	95% C.I. ^a	P值 ^a
900mg DHA	228	13.3 (11.60)	8.9 (10.01)	-4.4 (0.65)	-4.4 (0.63)	-1.55 (0.783)	(-3.09, -0.01)	0.048
安慰剂	230	12.4 (10.99)	9.9 (10.57)	-2.5 (0.64)	-2.8 (0.63)			

a 来自含有治疗效果（effects treatment），采集点，年龄组，教育水平，基线CANTAB PAL总错误数（6个图形），和采集点相互影响的治疗（如果显著的话）的ANCOVA模型。P值上的“|”表示该相互影响包括在最终的模型中。

图 5A

41

二级功效分析

第24周其它认知和能力测试与基线相比的变化汇总
(人群: 修改的意向治疗LOCF)。

治疗	第24周与 基线相比的 变化, 平均值 (SE)	P值 ^a
VRM自主回忆, 总正确数		
900mg DHA	0.1 (0.14)	0.825
安慰剂	0.1 (0.13)	
VRM, 即时, 总正确数		
900mg DHA	0.1 (0.10)	0.020*
安慰剂	0.0 (0.11)	
VRM, 延时, 正确数		
900mg DHA	0.3 (0.12)	0.020*
安慰剂	0.1 (0.11)	
RPM, 延时, 正确数		
900mg DHA	-0.9 (0.14)	0.675
安慰剂	-0.9 (0.12)	
SOC, 解决的问题		
900mg DHA	0.0 (0.10)	0.046*
安慰剂	0.3 (0.11)	
SWM, 错误差值 (between errors)		
900mg DHA	0.1 (0.55)	0.062
安慰剂	-1.0 (0.64)	
MMSE		
900mg DHA	-0.3 (0.12)	0.729
安慰剂	-0.4 (0.11)	
老年抑郁		
900mg DHA	0.1 (0.10)	0.250
安慰剂	0.0 (0.09)	
* P<-/05 基于ANCOVA模型, 该模型包括治疗效果, 采集点, 年龄组, 教育水平, 基线参数分值, 和采集点相互影响的治疗 (treatment by pooled site interaction), 如果显著的话。		

图 5B

一级功效分析

第24周CANTAB配对关联学习能力（PAL）总错误数（6个图形）与基线相比的变化汇总（人群：完成治疗LOCF）。

治疗	数量	基线 平均值 (SD)	基线后 平均值 (SD)	与基线相比的变化				
				平均值(SE)	LS均值 (SE) ^a	差值 (SE) ^a	95% C.I. ^a	P值 ^a
900mg DHA	226	13.3 (11.65)	8.9 (9.73)	-4.5 (0.57)	-4.5 (0.60)	-1.67 (0.743)	(-3.13,-0.21)	0.025
安慰剂	226	12.1 (10.67)	9.7 (10.24)	-2.4 (0.65)	-2.8 (0.60)			

^a 来自ANCOVA模型，该模型含有治疗效果，采集点，年龄组，教育水平，基线CANTAB PAL总错误数（6个图形），采集点相互影响的治疗（如果显著的话）。P值上的“|”表示该相互影响包括在最终的模型中。

图 6

43

一级功效分析

第24周CANTAB配对关联学习能力（PAL）总错误数（6个图形）与基线相比的变化汇总（人群：意向治疗的LOCF）。

治疗	数量	基线平均值 (SD)	基线 后平均值 (SD)	与基线相比的变化			
				平均值 (SE)	LS均值 (SE) ^a	差值 (SE) ^a	95% C.I. ^a
900mg DHA	240	13.4 (11.58)	8.8 (9.90)	-4.5 (0.64)	-4.3 (0.61)	-1.63 (0.757)	(-3.11, -0.14)
安慰剂	242	12.1 (10.86)	9.7 (10.41)	-2.4 (0.62)	-2.7 (0.61)		

^a 来自ANCOVA模型，该模型含有治疗效果，采集点，年龄组，教育水平，基线CANTAB PAL总错误数(6个图形)，采集点相互影响的治疗（如果显著的话）。P值上的“|”表示该相互影响包括在最终的模型中。

图 7
44

二级功效分析

通过调查其它共变量基线WMS III逻辑记忆总分参数（即时），CANTAB配对关联学习能力（PAL）总错误数（6个图形）与基线相比的变化汇总，（人群：修改的意向治疗LOCF）

共变量 调查	数 量	基线均值 (SD)	基线 后均值 (SD)	与基线相比的变化						
				平均值 (SE)	LS均值 (SE) ^a	差值 (SE) ^a	95% C.I. ^a	治疗 P值 ^a	共变量 P值 ^{a,b}	回归 系数 ^a
基线WMS III逻辑记忆总分（即时） 第12周										
900mg DHA	227	13.4 (11.62)	9.5 (11.17)	-3.8 (0.63)	-3.6 (0.61)	-0.57 (0.764)	(-2.07, 0.93)	0.455	0.011, 0.436	-0.17
安慰剂	230	12.4 (10.99)	9.5 (10.02)	-2.9 (0.63)	-3.1 (0.61)					
第24周										
900mg DHA	227	13.4 (11.62)	9.9 (10.03)	-4.4 (0.65)	-4.3 (0.63)	-1.50 (0.784)	(-3.04, 0.04)	0.057	0.096, 0.932	-0.11
安慰剂	230	12.4 (10.99)	9.9 (10.57)	-2.5 (0.64)	-2.8 (0.63)					

^a 来自ANCOVA模型，该模型含有治疗效果，采集点，年龄组，教育水平，基线CANTAB PAL总错误数(6个图形)，其它共变量，其它共变量相互影响的治疗（如果显著的话），他汀类药物伴随使用（如果显著的话），以及采集点相互影响的治疗（如果显著的话）。P值上的“C”和/或“1”表示他汀类药物伴随使用和/或采集点相互影响的治疗分别包括在最终的模型中。如果其它共变量相互影响的治疗是显著的，那么两组治疗的回归系数都会表示出。否则显示采集到的有关治疗的单一回归系数。

^b 分别表示其它共变量（最终模型）和其它共变量相互影响（完整模型）的治疗的P值

图 8A

45

二级功效分析

通过调查其它共变量基线WMS III逻辑记忆总分参数（延时），CANTAB配对关联学习能力（PAL）总错误数（6个图形）与基线相比的变化汇总，（人群：修改的意向治疗LOCF）

共变量调查		数量	基线均值 (SD)	基线 后均值 (SD)	与基线相比的变化					共变量 P值 ^{a,b}	回归 系数 ^a
					平均值 (SE)	LS均值 (SE) ^a	差值 (SE) ^a	95% C.I. ^a	治疗P值 ^a		
基线WMS III逻辑记忆总分（延时） 第12周											
900mg DHA	223	13.3 (11.71)	9.6 (11.19)	-3.7 (0.63)	-3.6 (0.62)	-0.54 (0.770)	(-2.05, 0.97)	0.483	<0.001, 0.554	-0.34	
安慰剂	223	12.4 (10.99)	9.6 (10.09)	-2.8 (0.65)	-3.0 (0.62)						
第24周											
900mg DHA	223	13.3 (11.71)	8.8 (9.94)	-4.5 (0.64)	-4.3 (0.62)	-1.73 (0.773)	(-3.25, -0.21)	0.026	<0.001, 0.125	-0.36	
安慰剂	223	12.4 (10.99)	10.1 (10.65)	-2.3 (0.65)	-2.5 (0.63)						

^a 来自ANCOVA模型，该模型含有治疗效果，采集点，年龄组，教育水平，基线CANTAB PAL总错误数(6个图形)，其它共变量，其它共变量相互影响的治疗（如果显著的话），他汀类药物伴随使用（如果显著的话），以及采集点相互影响的治疗（如果显著的话）。治疗P值上的“C”和/或“1”表示他汀类药物伴随使用和/或采集点相互影响的治疗分别包括在最终的模型中。如果其它共变量相互影响的治疗是显著的，那么两组治疗的回归系数都会表示出。否则显示采集到的有关治疗的单一回归系数。

^b 分别表示其它共变量（最终模型）和其它共变量相互影响的治疗（完整模型）的P值

图 8B

二级功效分析

通过调查, CANTAB语音识别记忆测试 (VRM) 参数与基线相比的变化汇总 (人群: 修改的意向治疗LOCF)。

参数调查	数 量	基线均值 (SD)	基线 后均值 (SD)	与基线相比的变化						基线回归 系数 ^a	
				平均值 (SE)	LS均值 (SE) ^a	差值 (SE) ^a	95% C.I. ^a	治疗P值 ^a	基线值， 共变量 P值 ^a		
VRM自主回忆的总正确数（即时）											
第12周											
900mg DHA	229	5.7 (1.98)	5.9 (2.05)	0.2 (0.12)	0.1 (0.13)	-0.2 (0.16)	(-0.5, 0.1)	0.265	<0.001	-0.41	
安慰剂	230	5.7 (1.77)	6.1 (2.04)	0.4 (0.12)	0.3 (0.13)						
第24周											
900mg DHA	229	5.7 (1.98)	5.8 (2.12)	0.1 (0.14)	0.2 (0.16)	0.0 (0.23)	(-0.4, 0.5)	0.825 ¹	<0.001	-0.51	
安慰剂	230	5.7 (1.77)	5.8 (1.99)	0.1 (0.13)	0.1 (0.16)						
^a 来自ANCOVA模型，该模型含有治疗效果，采集点，年龄组，教育水平，基线VRM参数，他汀类药物伴随使用（如果显著的话），和采集点相互影响的治疗（如果显著的话）。治疗P值上的“C”和/或“1”表示他汀类药物伴随使用和/或采集点相互影响的治疗分别包括在最终的模型中。											
交叉引用：数据列表1、4、5、7.1和16											

图 9A

47

二级功效分析

通过调查, CANTAB语音识别记忆测试 (VRM) 参数与基线相比的变化汇总 (人群: 修改的意向治疗LOCF)。

参数调查	数 量	基线均值 (SD)	基线 后均值 (SD)	与基线相比的变化					基线回 归系数 ^a	
				平均值 (SE)	LS均值 (SE) ^a	差值 (SE) ^a	95% C.I. ^a	治疗P值 ^a		基线值, 共 变量P值 ^a
VRM 总假阳性 (延时)										
第12周										
900mg DHA	229	0.8 (1.32)	1.2 (1.68)	0.3 (0.10)	0.4 (0.10)	0.2 (0.13)	(-0.1, 0.4)	0.159	<0.001	-0.28
安慰剂	230	0.9 (1.54)	1.0 (1.74)	0.2 (0.09)	0.2 (0.10)					
第24周										
900mg DHA	229	0.8 (1.32)	1.1 (1.59)	0.2 (0.10)	0.3 (0.10)	0.1 (0.13)	(-0.1, 0.4)	0.272	<0.001	-0.39
安慰剂	230	0.9 (1.54)	0.9 (1.63)	0.1 (0.09)	0.1 (0.10)					
^a 来自ANCOVA模型, 该模型含有治疗效果, 采集点, 年龄组, 教育水平, 基线VRM参数, 他汀类药物伴随使用 (如果显著的话), 和采集点相互影响的治疗 (如果显著的话)。治疗P值上的“C”和/或“I”表示他汀类药物 伴随使用和/或采集点相互影响的治疗分别包括在最终的模型中。										

图 9B

48

二级功效分析

通过调查，CANTAB语音识别记忆测试（VRM）参数与基线相比线的变化汇总（人群：修改的意向治疗LOCF）。

参数调查	数 量	基线均值 (SD)	基线 后均值 (SD)	与基线相比的变化					基线回 归系数 ^a	
				平均值 (SE)	LS均值 (SE) ^a	差值 (SE) ^a	95% C.I. ^a	治疗P值 ^a		基线值, 共 变量P值 ^a
VRM识别的总正确数（即时）										
第12周										
900mg DHA	229	10.9 (1.45)	10.9 (1.40)	0.0 (0.10)	0.0 (0.12)	0.2 (0.17)	(-0.1, 0.6)	0.164 ^l	<0.001	-0.54
安慰剂	230	10.9 (1.50)	10.9 (1.49)	0.0 (0.10)	-0.3 (0.11)					
第24周										
900mg DHA	229	10.9 (1.45)	11.0 (1.38)	0.1 (0.10)	0.1 (0.12)	0.4 (0.17)	(0.1, 0.7)	0.020 ^l	<0.001	-0.63
安慰剂	230	10.9 (1.50)	10.9 (1.44)	0.0 (0.11)	-0.3 (0.12)					

^a 来自ANCOVA模型，该模型含有治疗效果，采集点，年龄组，教育水平，基线VRM参数，他汀类药物伴随使用（如果显著的话），和采集点相互影响的治疗（如果显著的话）。治疗P值上的“C”和/或“l”表示他汀类药物伴随使用和/或采集点相互影响的治疗分别包括在最终的模型中。

图 9C

49

二级功效分析

通过调查，CANTAB语音识别记忆测试（VRM）参数与基线相比的变化汇总（人群：修改的意向治疗LOCF）。

参数调查	数 量	基线均值 (SD)	基线 后均值 (SD)	与基线相比的变化					基线回 归系数 ^a	
				平均值 (SE)	LS均值 (SE) ^a	差值 (SE) ^a	95% C.I. ^a	治疗P值 ^a		基线值, 共 变量P值 ^a
VRM识别的总正确数（延时）										
第12周										
900mg DHA	229	10.4 (1.77)	10.6 (1.49)	0.2 (0.11)	0.2 (0.14)	0.2 (0.19)	(-0.2, 0.5)	0.415 ¹	<0.001	-0.57
安慰剂	230	10.5 (1.76)	10.5 (1.76)	0.1 (0.12)	0.0 (0.13)					
第24周										
900mg DHA	229	10.4 (1.77)	10.7 (1.53)	0.3 (0.12)	0.3 (0.13)	0.4 (0.18)	(0.1, 0.8)	0.020 ¹	<0.001	-0.52
安慰剂	230	10.5 (1.76)	10.6 (1.79)	0.1 (0.11)	-0.1 (0.13)					
^a 来自ANCOVA模型，该模型含有治疗效果，采集点，年龄组，教育水平，基线VRM参数，他汀类药物伴随使用（如果显著的话），和采集点相互影响的治疗（如果显著的话）。治疗P值上的“C”和/或“1”表示他汀类药物伴随使用和/或采集点相互影响的治疗分别包括在最终的模型中。										

图 9D

50

血浆磷脂脂肪酸

脂肪酸 重量%	每天900mg DHA 与基线相比的变化	安慰剂 与基线相比的变化	p值
DHA	3.2	-0.08	0.001
AA	-1.4	-0.12	0.001
EPA	0.16	-0.06	0.001
DPA n-6	0.38	-0.004	0.001

图 10

药物动力学分析
选择功效和安全性参数中与基线相比的变化和24周DHA血浆浓度（重量%）
对数的关联总结（人群：修改的意向治疗）

功效或安全性参数	24周DHA血浆浓度（重量%）对数	
	回归系数 ^a	P值 ^a
CANTAB PAL总错误（6个图形）与基线相比的变化 ^b	-1.854	0.038
FFQ DHA 总分与基线相比的变化（mg/天） ^b	7.695	0.234
FFQ EPA总分与基线相比的变化（mg/天） ^b	5.591	0.176
收缩压与基线相比的变化（mmHg） ^c	-1.200	0.404
舒张压与基线相比的变化（mmHg） ^c	-0.414	0.641
心率与基线相比的变化（次数/分钟） ^c	-2.139	0.011
胆固醇水平与基线相比的变化（mg/dL） ^c	6.740	0.013 ^c
报道的突发性治疗不利事件的数量 ^c	-0.122	0.361

^a 来自ANCOVA模型，该模型分析功效或安全性参数，包含24周DHA血浆浓度（重量%）对数效果，采集点，年龄组，教育水平，基线参数（除了突发性治疗不利事件的数量），和他汀类药物伴使用（如果显著的话），P值上的“C”表示他汀类药物伴使用包括在最终的模型中。

^b LOCf法用于响应参数，观察法（Observed method）用于DHA血浆浓度。

^c 观察法用于响应参数和DHA血浆浓度。

图 11

安全性分析
通过调查，生命体征参数与基线相比的变化汇总
(人群：观察到的安全性)。

参数调查	数量	基线均值 (SD)	基线后均值 (SD)	与基线相比的变化				
				平均值 (SE)	LS均值 (SE) ^a	差值 (SE) ^a	95% C.I. ^a	P值 ^a
体重 (kg)								
第4周								
900mg DHA	237	76.96 (17.958)	77.18 (18.096)	0.22 (0.088)	0.42 (0.162)	0.35 (0.200)	(-0.05, 0.74)	0.084
安慰剂	242	78.05 (15.909)	78.05 (15.914)	0.00 (0.176)	0.07 (0.162)			
第12周								
900mg DHA	231	77.06 (18.007)	77.25 (18.044)	0.19 (0.126)	0.38 (0.175)	-0.01 (0.217)	(-0.44, 0.42)	0.968
安慰剂	230	77.74 (15.584)	78.02 (15.631)	0.28 (0.172)	0.38 (0.175)			
第24周								
900mg DHA	220	77.48 (17.893)	77.49 (17.839)	0.01 (0.201)	0.20 (0.260)	-0.24 (0.322)	(-0.88, 0.39)	0.451
安慰剂	221	77.90 (15.649)	78.19 (15.762)	0.29 (0.239)	0.44 (0.258)			
收缩压 (mmHg)								
第4周								
900mg DHA	237	130.4 (14.40)	129.9 (15.02)	-05 (0.95)	0.0 (1.06)	1.6 (1.31)	(-1.0, 4.2)	0.218
安慰剂	243	131.1 (14.54)	129.1 (14.99)	-2.1 (0.86)	-1.6 (1.06)			
第12周								
900mg DHA	231	130.3 (14.56)	130.2 (15.80)	-0.2 (1.01)	-0.3 (1.13)	1.0 (1.40)	(-1.8, 3.8)	0.478
安慰剂	231	130.9 (14.73)	129.7 (14.98)	-1.2 (0.93)	-1.3 (1.13)			
收缩压 (mmHg)								
第24周								
900mg DHA	220	130.5 (14.51)	131.2 (15.77)	0.7 (1.03)	0.4 (1.17)	-0.1 (1.45)	(-2.9, 2.8)	0.956
安慰剂	221	130.7 (14.70)	131.0 (15.37)	0.3 (0.99)	0.5 (1.16)			

^a 来自ANCOVA模型，该模型包含治疗效果，采集点，和他汀类药物伴使用（如果显著的话）。
P值上的“c”表示他汀类药物伴使用包括在最终的模型中。

^a 来自ANCOVA模型，该模型包含治疗效果，采集点，和他汀类药物伴随使用（如果显著的话）。
P值上的“C”表示他汀类药物伴随使用包括在最终的模型中。

图 12A

安全性分析
通过调查，生命体征参数与基线相比的变化汇总
(人群：观察到的安全性)。

参数调查	数量	基线均值 (SD)	基线后均值 (SD)	与基线相比的变化					P值 ^a
				平均值 (SE)	LS均值 (SE) ^a	差值 (SE) ^a	95% C.I. ^a		
舒张压 (mmHg)									
第4周									
900mg DHA	237	74.5 (9.33)	73.8 (9.03)	-0.7 (0.57)	-0.5 (0.65)	0.4 (0.81)	(-1.2, 2.0)		0.644
安慰剂	243	74.9 (8.51)	73.8 (8.92)	-1.0 (0.59)	-0.9 (0.65)				
第12周									
900mg DHA	231	74.5 (9.30)	77.1 (9.72)	-0.4 (0.61)	-0.2 (0.68)	0.6 (0.84)	(-1.0, 2.3)		0.460
安慰剂	231	74.8 (8.64)	73.9 (8.27)	-0.9 (0.57)	-0.8 (0.68)				
第24周									
900mg DHA	220	74.7 (9.25)	74.3 (9.94)	-0.4 (0.62)	-0.5 (0.72)	0.2 (0.90)	(-1.5, 2.0)		0.791
安慰剂	221	74.6 (8.65)	73.6 (8.95)	-1.0 (0.63)	-0.7 (0.72)				
安慰剂	221	74.6 (8.65)	73.6 (8.95)	-1.0 (0.63)	-0.7 (0.72)				
心率 (每分钟次数)									
第4周									
900mg DHA	237	68.6 (9.33)	68.0 (9.48)	-0.6 (0.58)	-0.7 (0.68)	-3.0 (0.83)	(-4.6, -1.3)		<0.001
安慰剂	243	69.0 (8.84)	71.4 (9.64)	2.3 (0.56)	2.3 (0.67)				
第12周									
900mg DHA	231	68.8 (9.30)	67.3 (9.80)	-1.5 (0.57)	-1.3 (0.68)	-1.2 (0.84)	(-2.9, 0.4)		0.146
安慰剂	231	69.0 (8.89)	68.9 (8.61)	-0.1 (0.59)	-0.1 (0.68)				
第24周									
900mg DHA	220	68.8 (9.37)	65.7 (8.77)	-3.2 (0.59)	-3.2 (0.69)	-1.8 (0.86)	(-3.5, -0.2)		0.033
安慰剂	221	69.3 (8.93)	68.2 (8.80)	-1.0 (0.61)	-1.3 (0.69)				
^a 来自ANCOVA模型，该模型包含治疗效果，采集点，和他汀类药物伴随使用（如果显著的话）。P值上的“c”表示他汀类药物伴随使用包括在最终的模型中。									

图 12B

Abstract

The present invention is directed to methods of improving cognitive function in subjects having age related cognitive decline or mild cognitive impairment and to methods of decreasing heart rate in a subject by administering dosage forms comprising docosahexaenoic acid (DHA) substantially free of eicosapentaenoic acid (EPA).