



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **129400**

(13) **C2**

(51) МПК

**A61K 35/30** (2015.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ  
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ  
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

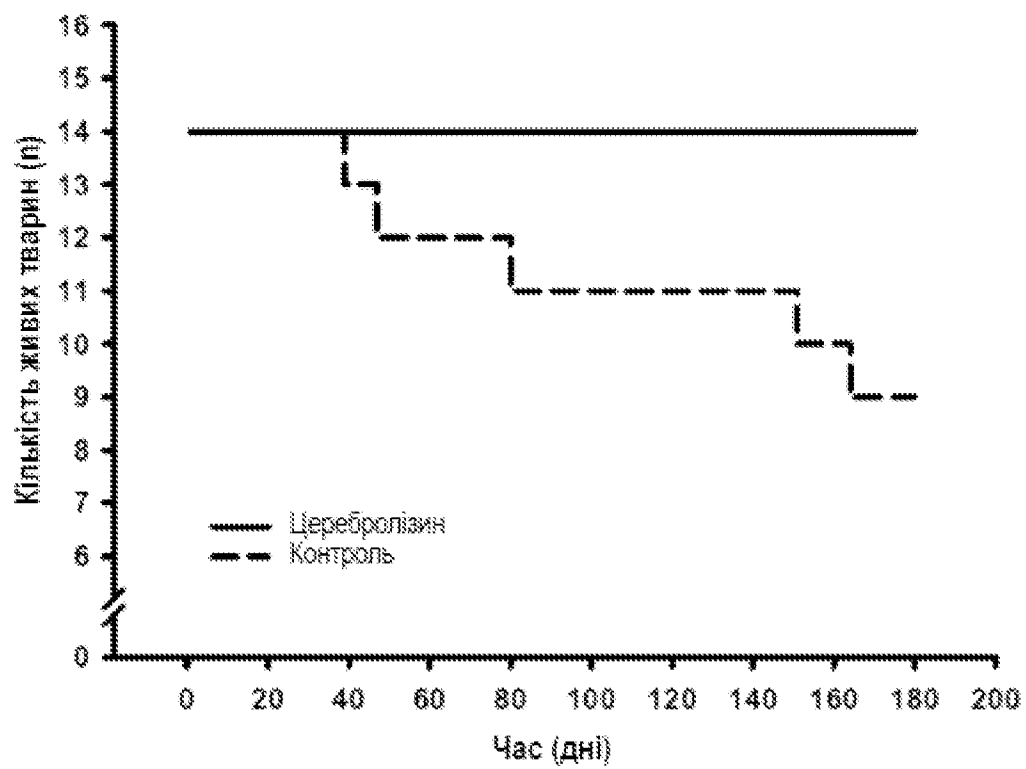
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(21) Номер заявки: <b>а 2020 01881</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>28.08.2018</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: <b>17.04.2025</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>17188180.8</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>28.08.2017</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>EP</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>10.07.2020, Бюл.№ 13</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: <b>16.04.2025, Бюл.№ 16</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ <b>PCT/EP2018/073106, 28.08.2018</b></p> | <p>(72) Винахідник(и):<br/><b>Вінтер Штефан (АТ),<br/>Мьослер Герберт (АТ)</b></p> <p>(73) Володілець (володільці):<br/><b>ЕВЕР НЕЙРО ФАРМА ГМБХ,<br/>Oberburgau 3, 4866 Unterach am Attersee,<br/>Austria (АТ)</b></p> <p>(74) Представник:<br/><b>Петров Андрій Володимирович, реєстр.<br/>№139</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:<br/><b>FORMICHI P. et al. Effects of cerebrolysin administration on oxidative stress-induced apoptosis in lymphocytes from CADASIL patients. NEUROLOGICAL SCIENCES. IT, 10.08.2012. Vol. 34. No. 4. P. 553-556 DOI: 10.1007/s10072-012-1174-y</b><br/><b>CHEN N. et al. Cerebrolysin for vascular dementia. COCHRANE DATABASE OF SYSTEMATIC REVIEWS. 31.01.2013. Issue 1. Art. No. CD008900 DOI: 10.1002/14651858.CD008900.pub2</b><br/><b>DONATO I. D. et al. Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL) as a model of small vessel disease: update on clinical, diagnostic, and management aspects. BMC MEDICINE. 24.02.2017. Vol. 15. No. 1. Art. No. 41 DOI: 10.1186/s12916-017-0778-8</b></p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**(54) ЗАСТОСУВАННЯ ЦЕРЕБРОЛІЗИНУ ДЛЯ ЗМЕНШЕННЯ СМЕРТНОСТІ В ПАЦІЄНТІВ З CADASIL**

**(57) Реферат:**

Винахід стосується церебролізину для застосування для зменшення смертності в пацієнтів з CADASIL (церебральна аутосомно-домінантна артеріопатія із субкортикальними інфарктами й лейкоенцефалопатією).

**UA 129400 C2**



Фіг. 1

Даний винахід стосується лікування CADASIL.

CADASIL (скорочення для церебральної аутосомно-домінантної артеріопатії із субкортикальними інфарктами й лейкоенцефалопатією; або: CADASIL синдром) є причиною типу лакунарного синдрому, що має відношення до розсіяності, ключовими характерними рисами якого є рецидивуючі субкортикальні ішемічні події й судинна деменція і який пов'язаний з дифузійними аномаліями білої речовини головного мозку при нейровізуалізації. CADASIL успадковується за аутосомно-домінантним типом. Найбільш уражені індивідууми мали ураженням одного з батьків; поява патогенних варіантів *de novo* є рідкісною. Кожна дитина ураженої особи має 50 % ризик успадкування патогенного варіанта й розвитку ознак захворювання. Можливо внутрішньоутробне тестування при вагітності при підвищеному ризyku й передімплантаційне генетичне діагностування, якщо відомий патогенний варіант у родині; однак запити на внутрішньоутробне тестування порушень, що типово починаються в дорослому періоді, надзвичайно рідко зустрічаються. При патологічному дослідженні виявляють множинні невеликі, глибокі церебральні інфаркти, лейкоенцефалопатію, і неатеросклеротичну, неамілоїдну ангіопатію, з ураженням головним чином невеликих церебральних артерій. Спостерігаються деякі зміни гладком'язових клітин судин при ультразвуковому аналізі. Мутантний ген був картований на 19 хромосомі й були ідентифіковані мутації гена *Notch3* людини в пацієнтів з CADASIL, які викликають серйозне руйнування цього гена. У дійсності, більш ніж 95 % індивідуумів з CADASIL мають патогенні міссенс варіанти в *Notch3* (Rutten і ін., в: Pagon і ін. (ред.) *Genereviews*® (2000; оновлено 2016); Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017; Joutel і ін., *Nature* 383 (1996), 707-710). У той час як більше 95 % *Notch3* мутацій у пацієнтів з CADASIL представляють собою міссенс мутації, інші представляють собою невеликі делеції усередині рамки зчитування або мутації сайту сплайсингу. Дивно, що всі патологічні мутації приводять до непарного числа залишків цистеїну в межах даного EGFR. Вважають, що залишки цистеїну сприяють структурній цілісності білка, отже, додаткові або пропущені цистеїнові залишки можливо порушують правильне укладання білка. *De novo* мутації зустрічаються рідко, але були описані окремі випадки.

Характерною патологічною ознакою CADASIL є електронно щільні гранули в стінці артеріол, і збільшення *Notch3* фарбування артеріальної стінки, які можуть бути оцінені при біопсії шкіри. У цей час відсутнє лікування з доведеною ефективністю для CADASIL. Часто використовують антиагрегатне лікування, але його ефективність не доведена для CADASIL. Мігрень можна лікувати як симптоматично, так і профілактично, залежно від частоти проявів. Також слід лікувати супутні гіпертонію, діабет або гіперхолестеринемію. Застосовують підтримуюче лікування (практична допомога, емоційна підтримка й психологічна допомога) для уражених осіб і їх родин. Проте, існують рекомендації щодо агентів, яких слід уникати, таких як ангіографія й антикоагулянти, які можуть провокувати гострі порушення мозкового кровообігу. Також відомо, що куріння підвищує ризик ішемічних подій. Тромболітична терапія (внутрішньовенний тромболізис) протипоказана у зв'язку з доведеним підвищеним ризиком геморагічного інсульту (Pagon і ін., 2000; оновлено 2016).

Оскільки ефективне лікування для CADASIL недоступно, то лікування спрямоване на пошук можливих стратегій модифікації захворювання для зм'якшення клінічних проявів. Проте, дотепер було описано декілька й дуже попередніх досліджень.

У практичних випадках також використовували вальпроат натрію для лікування мігрені. Описано, що інгібітори ацетилхолінестерази не є ефективними при аналізі первинної кінцевої точки при лікуванні зниження когнітивних здатностей (шкала оцінки судинної деменції через 18 тижнів), але спостерігалася деяке поліпшення фронтальної-субкортикальної дисфункції. Антиагрегантні препарати тестували для запобігання первинного й вторинного удару; однак, з непідтвердженими й спірними перевагами. Ацетазоламід тестували щодо збільшення перфузії головного мозку, оцінюваної за допомогою перфузійної MPT, транскраніальної доплерівської сонографії й Тс-99 m позаклітинний домен перфузії головного мозку SPECT. Крім того, його використовували як профілактику при мігрені, з метою зменшення частоти нападів мігрені Для аторвастатину, не описано впливів на мозковий кровообіг, що тестували за допомогою транскраніальної доплерографії. L-Аргінін виявив індуковану вазореактивність, що тестували за допомогою транскраніальної доплерографії. Кінцеві результати для сапроптерину (200-400 мг два рази 3 на добу протягом 24 місяців) були недостовірними, для первинної кінцевої точки (середня відмінність в індексі реактивної гіперемії), щодо будь-якого поліпшення периферичної вазореактивності. На мишиній моделі, описано, що комбінація фактора росту стовбурних клітин і гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора обмежує патологічну регресію CADASIL (усе розглянуте в: Di Donato і ін., *BMC Medicine* (2017) 15:41; DOI 10.1186/s12916-017-0778-8).

Враховуючи відомості щодо більш важкого перебігу захворювання в індивідуумів із

судинними факторами ризику, особливо курінням й гіпертонією, контролювання судинних факторів ризику розглядається як важлива частина боротьби з CADASIL. Відносно застосування антиагрегантних препаратів, таких як аспірин або клопідогрель, більшість невропатологів дотримуються вказівок застосування для спорадичного удару при лікуванні пацієнта з CADASIL.

Проте, доцільність цього підходу не визначена. Дійсно, тромботичне походження ішемічних подій при цьому захворюванні дотепер не підтверджене. З іншого боку, у багатьох звітах підкреслюється присутність мікрогеморагії (мікрокрововиливи) у багатьох пацієнтів з CADASIL. Із цих міркувань, безпека антиагрегантних препаратів при цьому захворюванні потребує підтвердження. Аналогічно до цього, переваги тромболізу сумнівні, хоча представлені дані, що свідчать про його корисність при спорадичному лакунарному ударі.

У багатоцентровому дослідженні в 168 пацієнтів із застосуванням донепезилу не спостерігали покращення первинного результату лікування згідно зі шкалою оцінки судинна деменція – когнітивна підшкала. Незважаючи на це, поліпшення відзначали для деяких показників здатності до цілеспрямованої діяльності, але клінічна значимість цих даних не зрозуміла. Припускають, що ускладнення CADASIL, такі як депресія й мігрень, відповідають на лікування, подібні до тих, які застосовуються при спорадичному захворюванні (Di Donato і ін., 2017). Церебралізін для судинної деменції розглянутий Chen і ін. (Cochrane Database of System. Rev. 1 (2013): DOI: 10.1002/146 1858.CD008900.pub).

При відсутності специфічних даних для CADASIL, більшість невропатологів застосовують аспірин для вторинного запобігання після ішемічних інсультів у літніх пацієнтів, наприклад, старше 40 років, але відсутні підтвердження або протипоказання для його застосування. Незалежно від того, чи буде ця стратегія підходящою при CADASIL, вона не визначена й буде потребувати подальшого дослідження, обумовлюючи можливий підвищений геморагічний ризик. Пацієнти, які потребують проведення антикоагуляції у зв'язку з очевидним показанням, таким як високий ризик фібриляції передсердь, повинні обережно здійснювати вказане лікування, враховуючи описаний ризик інтрагеморагічного інсульту.

Таким чином, є очевидним, що існує потреба в нових, раціональних терапевтичних втручаннях для пацієнтів з CADASIL для боротьби із симптомами захворювання й прогресуванням захворювання, особливо терапевтичні втручання, які зменшують смертність або підвищують коефіцієнт виживання, відповідно.

Таким чином, даний винахід забезпечує церебралізін для застосування для зменшення смертності в пацієнтів з CADASIL (церебральна аутосомно-домінантна артеріопатія із субкортикальними інфарктами й лейкоенцефалопатією).

Церебралізін, пептидний препарат, одержують за допомогою стандартизованого ферментативного розкладання білків головного мозку, що містять пептиди з низькою молекулярною вагою (< 10 кДа) і вільні амінокислоти.

Церебралізін представляє собою пептидну суміш із нейротрофічно-подібними властивостями, який послабляє поведінкові й когнітивні порушення на доклінічних моделях і в пацієнтів з деменцією; і поліпшує рухові функції, когнітивну діяльність і повсякденну діяльність при ударі, а також при TBI. Механізм дії церебралізіну є плеотропний, у діапазоні від нейрозахисних властивостей, таких як зменшена ексайтотоксичність і утворення вільних радикалів, до посиленого відновлення за допомогою збільшеної нейропластичності й нейрогенезу.

Церебралізін використовують при ударі й судинній деменції. Описаний сприятливий ефект на когнітивну функцію в людей із судинною деменцією, можливо, шляхом зменшення відкладань бета-амілоїду. Церебралізін дозволений для лікування удару в багатьох країнах Європи й Азії.

У контексті даного винаходу, несподівано було виявлено, що церебралізін значно впливає на зменшення смертності й, отже, на поліпшення виживання пацієнтів з CADASIL. Незважаючи на те, що не спостерігається ефекту на вакуолізацію білої речовини, характерна ознака CADASIL (що робить даний винахід ще більш несподіваним), підтверджене високо статистично достовірне зменшення коефіцієнта смертності для лікування із застосуванням церебралізіну на відомій у даній галузі техніки мишиній моделі CADASIL.

Цей ефект є повністю несподіваним, специфічно із урахуванням того факту, що в більш ранній публікації була показана відсутність захисного ефекту *in vitro* церебралізіну до індукованого окисним стресом апоптозу в клітинах від пацієнтів з CADASIL (Formichi і ін., *Neurol. Sci.* 34 (2013), 553-556; doi: 10.1007/s10072-012-1174-y).

У цьому дослідженні, Formichi і ін. використовували лімфоцити периферичної крові (PBL) від 15 пацієнтів з CADASIL (віковий діапазон 34-70 років) і d-рибозу (dRib) високовідновлюваний цукор, як еталон проапоптотичного стимулу. Апоптоз аналізували шляхом проточної цитометрії й

флуоресцентної мікроскопії. Введення церебролізіну в PBL від пацієнтів з CADASIL, культивованих у стандартних умовах, не виявляло впливу на відсоток апоптотичних клітин. Введення церебролізіну в PBL, культивовані з dRib, викликає істотне зниження апоптозу після культивування протягом 48 годин тільки в 5 пацієнтів, у той час як в інших 10 пацієнтів, лікування із застосуванням церебролізіну не пов'язане з якою-небудь істотною відмінністю в процентному значенні апоптозу. Цей результат свідчить про те, що захисний ефект церебролізіну до індукованого окисним стресом апоптозу проявляється тільки в 30 % пацієнтів з CADASIL. Отже, був зроблений висновок про те, що імовірно, Notch3 ген не впливає на анти-апоптотичні властивості церебролізіну *in vitro*. Це також може пояснити результат, отриманий при реалізації даного винаходу, який полягає в тому, що церебролізін не впливає на вакуолізацію. У кожному разі, є повністю несподіваним, що церебролізін може впливати на основний параметр смертності.

Незважаючи на результати, отримані Formichi і ін., і незважаючи на той факт, що пацієнти з CADASIL мають мутацію гена Notch3, церебролізін може ефективно застосовуватися для лікування всіх пацієнтів з CADASIL, таким чином, що вони одержують ефекти, як заявляється відповідно до даного винаходу.

CADASIL звичайно діагностується генетично, переважно шляхом секвенування повного гена Notch3. Гетерозиготні усічені патогенні варіанти в NOTCH3 екзоні 33 (що кодують PEST домени внутрішньоклітинної частини білка) були описані при латеральному менінгеальному синдромі (синдром Лемана). Ці патогенні варіанти ймовірно діють шляхом посилення Notch3 сигнальної функції, і відрізняються від NOTCH3 патогенних варіантів в CADASIL. Notch3 екзон 25 патогенний варіант (с.4556T>C, p.Leu1519Pro) був описаний при аутосомно-домінантному інфантильному міофіброматозі.

Магнітно-резонансні томограми головного мозку (MPT) пацієнтів з CADASIL демонструють гіпоінтенсивності на T1-зважених зображеннях і гіперінтенсивності на T2-зважених зображеннях, що характерно для звичайно множинних конфлюентних уражень білої речовини різних розмірів. Ці ураження концентруються навколо базальних гангліїв, перивентрикулярної білої речовини, і варолієвого моста, і подібні до тих, які спостерігаються при хворобі Бінсвангера. Ці ураження білої речовини також спостерігаються в асимтоматичних індивідуумів з мутованим геном. Незважаючи на те, що MPT не використовується для діагностики CADASIL, воно може продемонструвати прогресуючі зміни білої речовини навіть за десятиліття до початку прояву симптомів.

Зміни білої речовини в пацієнтів з CADASIL часто задіють передню скроневу частку, зовнішню капсулу й верхню лобну звивину. Було показано, що зміни передньої скроневої частки мають високу чутливість і специфічність для захворювання (приблизно 90 % для кожного) і використовуються при діагностиці. У популяції жителів Азії, залучення передньої скроневої частки менш поширене. Зміни зовнішньої капсули також мають високу чутливість (приблизно 90 %), але є менш специфічними (приблизно 50 %). Дійсно, недавній системний аналіз продемонстрував подібне залучення зовнішньої капсули при CADASIL і спорадичному SVD. Аномалії сигналів мозолистого тіла, що рідко зустрічаються при спорадичному SVD, описані при CADASIL; такі аномалії також є характерною ознакою розсіяного склерозу, що є однією із причин неправильного діагностування CADASIL як розсіяного склерозу. Церебральні мікрокрововиливи, які представлені у вигляді градієнт-ехо зображень із точкоподібними гіпоінтенсивними вогнищами, зустрічаються в змінюваній пропорції випадків (30-70 %) і звичайно підвищуються з віком і факторами ризику, такими як високий кров'яний тиск, і інтрагеморагічний інсульт також був описаний у багатьох пацієнтів, особливо пацієнтів азіатського походження (di Donato і ін., 2017).

CADASIL має код діагнозу ICD-10-CM, класифікований як I67.8 ("Інші визначені цереброваскулярні захворювання") і визначений як підкіркове захворювання, але недавні дослідження із застосуванням MPT 7 Тесла з полем високої напруги, які надають можливість більш високої візуалізації, виявили першорядне залучення кори, включаючи демонстрацію мікроінфарктів кори й ранні дифузійні зміни кори в лобових і тім'яних ділянках, які найбільш часто мають симетричну картину в обох півкулях. Ці зміни не пов'язані зі стоншенням кори або з підкірковими вогнищами, і була запропонована гіпотеза про те, що вони є вторинними стосовно щільності венозних судин або інтрамієлінового набряку. Подібні дані також були описані на експериментальних моделях. Крім того, підкіркові зміни можуть індукувати вторинні зміни кори. У довгостроковому дослідженні, випадкові лакуни супроводжувалися стоншенням кори, специфічно у зв'язаних ділянках головного мозку. Інша остання розробка полягала в застосуванні дифузійно-тензорної методики візуалізації для характеристики ушкодження тканини. Типова зміна дифузійних показників, що спостерігається в пацієнтів з CADASIL,

представляє собою зменшення фракційної анізотропії (індикатор спрямованості дифузії) і збільшення гаданого коефіцієнта дифузії або середньої дифузності (показник ступеня дифузії). Аналізи гістограми були запропоновані як точний інструмент для визначення пов'язаних з CADASIL змін у поперечному перерізі, а також у поздовжньому напрямку (діагностика й диференціальна діагностика розглянута в di Donato і ін., 2017 і Rutten і ін., 2000, оновлено 2016).

Незважаючи на те, що усе ще розглядається як рідко діагностована, діагностика CADASIL суттєво покращилася за останні 20 років і в цей час є набагато більш точною.

Церебролізін представляє собою фармацевтичний препарат протеолітично отриманих нейропептидів, що мають походження з очищених білків головного мозку. Церебролізін доступний на ринку, часто у вигляді стандартизованого продукту. Церебролізін містить від 15 до 30 % пептидів з низькою молекулярною вагою (< 10 кДа) і від 70 до 85 % вільних амінокислот, таких як аланін, аспарагінова кислота, аргінін, глутамінова кислота, гліцин, гістидин, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, фенілаланін, пролін, серин, треонін, триптофан, цистеїн і валін. Розчин переважно є стерильним і готовим для ін'єкції або інфузії (тобто він відповідає всім стандартам і вимогам для фармацевтичних препаратів для введення пацієнтам людям). Препарати церебролізіну описані в EP 0 452 299 A1 CN і Gromova і ін. (Difficult Patient 8 (2010), 25-31).

Переважаючі концентрації церебролізіну, які використовують відповідно до даного винаходу, включають від 50 до 1000 мг, переважно від 100 до 500 мг, особливо від 150 до 250 мг, концентрату церебролізіну на мл у водному розчині. Як уже було вказано вище, церебролізін містить приблизно 85 % вільних амінокислот й 15 % пептидів з низькою молекулярною вагою (< 10 кДа), на підставі загального вмісту азоту.

Концентрат церебролізіну має стандартизований вміст специфічних амінокислот. У концентраті (концентрація якого може змінюватися, при необхідності, при введенні), церебролізін має наступний вміст амінокислот (у мг/мл концентрату церебролізіну): аланін: від 2,40 до 3,60, особливо від 3,10 до 3,50; аспарагінова кислота: від 2,40 до 3,60, особливо від 2,20 до 3,50; валін: від 1,60 до 2,40, особливо від 2,10 до 2,40; гістидин: 1,04-1,56, особливо від 1,10 до 1,50; гліцин: від 1,20 до 1,80, особливо від 1,60 до 1,90; глутамінова кислота: 3,20-4,80, особливо від 3,30 до 4,60; ізолейцин: від 1,60 до 2,40, особливо від 2,20 до 2,40; лейцин: від 4,80 до 7,20, особливо від 5,70 до 6,30; лізин: від 4,80 до 7,20, особливо від 5,80 до 7,20; метіонін: від 0,35 до 0,65, особливо від 0,40 до 0,70; пролін: від 1,60 до 2,40, особливо від 2,00 до 2,40; серин: від 0,21 до 0,39, особливо від 0,23 до 0,36; треонін: від 0,21 до 0,39, особливо від 0,26 до 0,35; триптофан: від 0,35 до 0,65, особливо від 0,40 до 0,70; фенілаланін: від 1,60 до 2,40, особливо від 1,60 до 2,40. Є очевидним, що при розведенні цього концентрату, абсолютна кількість вказаної амінокислоти на мл знижується; проте, відносний показник амінокислоти по відношенню одна до одної по відношенню до пептидів з низькою молекулярною вагою (10 тис. або менше), вказаний відносний показник, який є надзвичайно важливий елементом для терапевтичних ефектів, отриманих за допомогою даного винаходу), залишається таким же при розведенні.

Спосіб одержання церебролізіну описано в EP 0 452 299 A1 і він отриманий при ферментативному гідролізі фракції білків головного мозку свиней. Кожний мл цього продукту містить 3,00 мг аланіну, 3,00 мг аспарагінової кислоти, 0,06 г цистину, 4,30 мг глутамінової кислоти, 1,50 мг гліцину, 1,30 мг гістидину, 2,00 мг ізолейцину, 6,00 мг лейцину, 0,50 мг метіоніну, 2,00 мг фенілаланіну, 2,00 мг проліну, 0,30 г серину, 0,30 г треоніну, 0,50 г триптофану й 2,00 мг тирозину як амінокислот, а також пептиди, що мають молекулярну вагу 10 тис. або менше. Суміш пептидів і амінокислот у препаратах, описаних в EP 0 452 299 A1, містить (як для типового продукту церебролізіну) приблизно 15 % пептидів з молекулярною вагою 10 тис. або менше й приблизно 85 % вільної амінокислоти.

Застосовувана доза переважно може знаходитися в діапазоні від 100 до 10 000 мг (від 0,5 до 50 мл концентрату церебролізіну). Переважно, пацієнт із CADASIL одержує лікування із застосуванням дози в діапазоні від 0,1 до 100 мл, переважно від 1 до 50 мл, церебролізіну, що відповідає від 21,5 до 21520 мг концентрату церебролізіну (переважний концентрат церебролізіну містить 215,2 мг/мл). При застосуванні внутрішньом'язово, доза звичайно є більш низькою, ніж при внутрішньовенному застосуванні (наприклад, переважно від 0,5 до 5 мл і переважно від 0,5 до 10 мл, внутрішньовенно). Таким чином, переважно, пацієнт із CADASIL одержує лікування із застосуванням дози, що вводиться внутрішньом'язово, від 0,1 до 10 мл, переважно від 0,5 до 5 мл, що відповідає від 21,5 мг до 2152 мг концентрату церебролізіну. Церебролізін також можна безперервно інфузувати (звичайно в об'ємах більше 10 мл) і, отже, концентрат церебролізіну можна розводити, наприклад, за допомогою 0,9 % розчину хлориду натрію (9 мг NaCl/мл), розчину Рінгера ( $\text{Na}^+$ 153,98 ммоль/л,  $\text{Ca}^{2+}$ 2,74 ммоль/л,  $\text{K}^+$ 4,02 ммоль/л,

Cl-163,48 ммоль/л), 5 % глюкози. Інфузії із тривалостями типово від 5 хвилин до 4 год., переважно від 10 хвилин до 2 год., особливо від 15 до 60 хвилин можна здійснювати (переважно щодня), наприклад, протягом від 1 до 100 днів, переважно від 5 до 50 днів, переважно від 10 до 30 днів (звичайно, введення здійснюють тільки в робочі дні, але не у вихідні, таким чином, що звичайно курс лікування проводять протягом 3-5 × 5 послідовних днів ведення). Відповідно до переважного варіанта здійснення, пацієнта із CADASIL лікують із застосуванням дози, що вводиться внутрішньовенно, від 0,1 до 100 мл, переважно від 1 до 50 мл, що відповідає від 215,2 до 21520 мг концентрату церебралізіну.

Курси лікування можна повторювати після періоду без лікування від 1 до 6, від 1 до 3, переважно від 2 до 3, місяців.

Даний винахід надалі ілюструється за допомогою наступних прикладів і фігур, але жодним чином ними не обмежується.

На Фігурі 1 показаний розрахований коефіцієнт смертності групи мишей, лікованих фізіологічним розчином, у порівнянні із групою, лікованою церебралізіном (35 % відн. 0 %).

На Фігурі 2 показані фарбування люксолом міцним синім і за Нісслом сагітальний зріз головного мозку миші з CADASIL на 0,5 мм латерально від серединної лінії. Тіло клітини темно-синє; біла речовина виглядає бірюзовою. Пунктирна лінія охоплює спостережувану ділянку, передній відділ мозолистого тіла.

На Фігурі 3 показаний передній відділ мозолистого тіла в молодій, здорової миші (А) і в миші у віці 18 місяців з CADASIL (В). Не спостерігається вакуолізації в передньому медіальному мозолистому тіла самця у віці шести тижнів C57BL/6 (А), і різко виражена вакуолізація в мишей з CADASIL (В). На відміну від круглих вакуолей, судини візуалізуються у вигляді подовжених структур (див. внутрішню рамку)).

На Фігурі 4 показана кількість вакуолей в передньому відділі мозолистого тіла трансгенної миші у віці 18 місяців CADASIL, лікованої у період 12-18 місяців трьома циклами наповнювача (ліворуч) або церебралізіном (праворуч). В обох групах, спостерігається передбачувана патологія, тобто вакуолізація білої речовини (відсутня статистично достовірна різниця між обома групами ( $p=0,12$ ; t-критерій Ст'юдента)).

Приклади:

Терапевтичний ефект церебралізіну на мишиній моделі CADASIL

Матеріали й методи

Мишина модель CADASIL: NOTCH3<sup>R169C</sup> мутація (лінія 88)

Дослідження з метою підтвердження правильності концепції для оцінки терапевтичного ефекту церебралізіну при CADASIL здійснювали на встановленій трансгенній CADASIL мишиній моделі, що експресує NOTCH3<sup>R169C</sup> мутацію (лінія 88). Ця специфічна заміна аргініну на цистеїн у залишку 169 в екзоні 4 була описана в пацієнтів з CADASIL і, як вважають, є мутацією, що часто зустрічається (Joutel і ін., 1997). Цей трансгенний мишиний штамп раніше був охарактеризований більш докладно для демонстрації деяких біохімічних аспектів CADASIL і, отже, розглядається як підходяща генетична тваринна модель для захворювання (Ghosh і ін., 2015; Joutel і ін., 2010). Joutel зі співавторами (Joutel і ін., 2010) продемонстрували, що експресія *in vivo* мутантного трансгена в мишей відтворює ендегенну картину експресії NOTCH3 і основні патологічні характерні риси CADASIL, включаючи типові NOTCH3<sup>ECOD</sup> агрегати, GOM відкладання в судинах головного мозку, прогресуюче ураження білої речовини й зменшений мозковий кровообіг. Мутантні миші проявляють ослаблені м'язові відповіді й зменшений діаметр артерій головного мозку, а також порушену церебрально-васкулярну саморегуляцію, функціональну гіперемію й істотне зменшення щільності капілярів білої речовини. У недавній характеристиці NOTCH3<sup>R169C</sup> моделі було описано важливу роль перичитів у дисфункції судин головного мозку й BBB просочування, що є етіологічним для CADASIL патології (Ghosh і ін., 2015). Автори продемонстрували, що при збільшенні віку, мутантні NOTCH3 агрегують навколо перичитів і гладком'язових клітин. Нагромадження NOTCH3 викликає апоптоз, що приводить до істотного зменшення кількості перичитів і охоплення капілярів відростками перичитів. Ці зміни пов'язані з від'єднанням синаптичних нервових закінчень астроцитів від мікросудин головного мозку, відкриваючи BBB і мікросудинну дисфункцію, що визначається за просочуванням білків плазми, зменшенням експресії білків ендотеліальних адгезійних контактів і зменшенням реакційної здатності мікросудин на вуглекислий газ.

Проведення експерименту:

Для оцінки впливу церебралізіну на цій мишиній моделі CADASIL, виводили 28 тварин і дозволяли їм дорости до віку старше 12 місяців, після цього ініціювали три курси лікування. Мутантним мишам вводили 2,5 мл/кг церебралізіну, розведеного в 0,9 % фізіологічному розчині або фізіологічний розчин окремо. Лікування проводили рандомізованим і повністю сліпим

способом у вигляді 3-тижневих циклів по 5-тижневих в/о ін'єкцій (3 × 15 ін'єкцій на мишу на лікування в цілому). Тварин лікували у віці 12, 14 і 16 місяців, відповідно, і умертвляли для аналізу у віці 18 місяців. Цю схему лікування вибрали на підставі даних, отриманих при експериментальних дослідженнях, що тестують терапевтичний ефект церебrolізіну при різних

нейродегенеративних порушеннях. Логічне обґрунтування для досягнення віку 12 тижнів перед ініціацією лікування є наслідком спостереження, що миші цієї моделі починають проявляти типові характерні ознаки захворювання CADASIL приблизно в цьому віці (Joutel і ін., 2010).

Крім того, беручи до уваги трансляційний аспект, підхід терапевтичного, а не профілактичного втручання був обраний для представлення реальної клінічної ситуації, де терапію слід починати тоді, коли патологія розвинулась до стадії, що надає можливість діагностування. Смертність була вибрана як первинний параметр, що представляє повноцінний і клінічно значимий параметр визначення ефективності. Крім того, ступінь вираженої Cadasil-специфічного ураження білої речовини кількісно визначали при гістологічному аналізі, використовуючи фарбування люксолом міцним синім. Для цього, тварин перфузували й головні мозки фіксували в парафін. Для кожної тварини, досліджували дві аналізовані ділянки в трьох сагітальних зрізах у передньому медіальному мозолистому тілі.

#### Результати

Лікування із застосуванням церебrolізіну повністю запобігає смертності трансгенних мишей з CADASIL. Протягом періоду спостереження з 12 до 18 місяців (що відповідає віку тварин) 5 з 14 мишей у контрольній групі померло (36 %), однак жодної тварини не померло в групі, лікованій церебrolізіном. Розрахований коефіцієнт смертності для групи, лікованої фізіологічним розчином, склав 35 % у порівнянні з 0 % у групі, лікованій церебrolізіном, свідчаючи про те, що лікування церебrolізіном проявляє посилюючий ефект на виживання при цьому захворюванні (Фігура 1).

Після цього тварин умертвляли шляхом перфузійної фіксації й головний мозок видаляли, фіксували в парафін, здійснювали сагітальні зрізи й фарбували люксолом міцним синім для тестування вакуолізації в білій речовині. На Фіг. 2 показане фарбування люксолом міцним синім і за Нісслом сагітального зрізу головного мозку миші з CADASIL на 0,5 мм патерально від серединної лінії. Тіло клітини темно-синє; біла речовина виглядає бірюзовою. Пунктирна лінія охоплює спостережувану ділянку, передній відділ мозолистого тіла.

У самця у віці шість тижнів C57BL/6 не було виявлено вакуолізації в передньому медіальному мозолистому тілі (Фігура 3A), структура якого патологічно змінюється в мишей з CADASIL (Joutel і ін., J. Clin. Invest. 120 (2010), 433-445). На відміну від цього, спостерігали помітну вакуолізацію в мишей з CADASIL (Фігура 3B). Таким чином, представляється можливим відтворити патологічні зміни в білій речовині мишей CADASIL, які відомі з літератури. У тварин, лікованих із застосуванням наповнювача, вимірювали  $22 \pm 7$  вакуолі (середнє  $\pm$  стандартне відхилення,  $n=8$ ), і  $26 \pm 5$  вакуолі ( $n=14$ ) у тварин, лікованих із застосуванням церебrolізіну. Відмінності між групами не є достовірними (Фігура 4;  $p=0,12$ ; t-критерій Стюдента). Щодо цього, вважають, що церебrolізін не впливає на вакуолізацію білої речовини в мишей з CADASIL.

Враховуючи вищевикладене, виражений позитивний ефект на смертність свідчить про те, що церебrolізін є потенційним терапевтичним засобом, кандидатом для боротьби із захворюванням CADASIL.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Церебrolізін для застосування для зменшення смертності в пацієнтів з CADASIL.
2. Церебrolізін для застосування за п. 1, де пацієнт із CADASIL має мутацію в Notch3 гені.
3. Церебrolізін для застосування за п. 1 або 2, де пацієнта з CADASIL лікують препаратом церебrolізіну, що містить від 50 до 1000 мг, переважно від 100 до 500 мг, особливо від 150 до 250 мг концентрату церебrolізіну на мл у водному розчині.
4. Церебrolізін для застосування за будь-яким з пп. 1-3, де пацієнта з CADASIL лікують за допомогою дози в діапазоні від 0,1 до 100 мл, переважно від 1 до 50 мл церебrolізіну, що відповідає від 21,5 до 21520 мг концентрату церебrolізіну.
5. Церебrolізін для застосування за будь-яким з пп. 1-4, де пацієнта з CADASIL лікують за допомогою дози, що вводиться внутрішньом'язово, від 0,1 до 10 мл, переважно від 0,5 до 5 мл, що відповідає від 21,5 до 2152 мг концентрату церебrolізіну.
6. Церебrolізін для застосування за будь-яким з пп. 1-4, де пацієнта з CADASIL лікують за допомогою дози, що вводиться внутрішньовенно, від 0,1 до 100 мл, переважно від 1 до 50 мл, що відповідає від 215,2 до 21520 мг концентрату церебrolізіну.
7. Церебrolізін для застосування за будь-яким з пп. 1-6, де пацієнта з CADASIL лікують

шляхом безперервного інфузування церебrolізину.

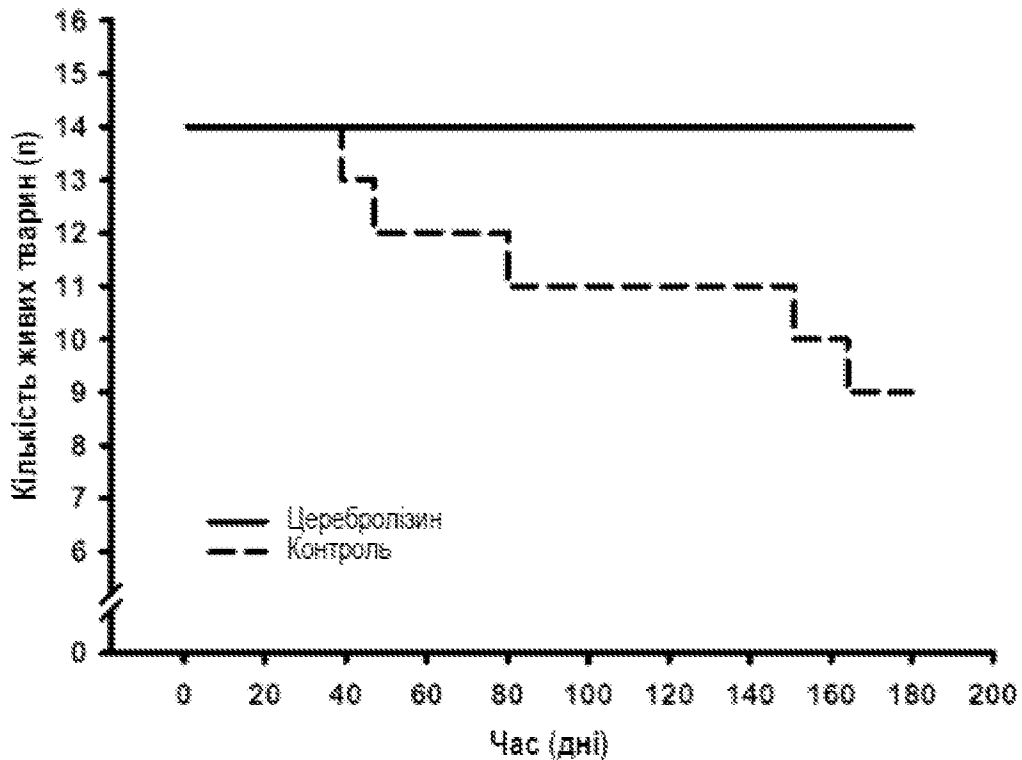
8. Церебrolізін для застосування за п. 7, де інфузію здійснюють для інфузії тривалістю від 5 хв до 4 год, переважно від 10 хв до 2 год, особливо від 15 до 60 хв; та/або де інфузію здійснюють протягом від 1 до 100 днів, переважно від 5 до 50 днів, особливо від 10 до 30 днів.

5 9. Церебrolізін для застосування за п. 8, де інфузію здійснюють один раз на добу.

10. Церебrolізін для застосування за будь-яким з пп. 1-9, де інфузію здійснюють шляхом розведення церебrolізину 0,9 % розчином хлориду натрію, розчином Рінгера або 5 % глюкозою.

11. Церебrolізін для застосування за будь-яким з пп. 1-10, де пацієнта із CADASIL лікують препаратом церебrolізину, що містить гідроксид натрію.

10 12. Церебrolізін для застосування за будь-яким з пп. 1-11, де пацієнта із CADASIL лікують курсами лікування, які повторюють після періоду відсутності лікування від 1 до 6, переважно від 1 до 3, особливо від 2 до 3 місяців.



Фіг. 1

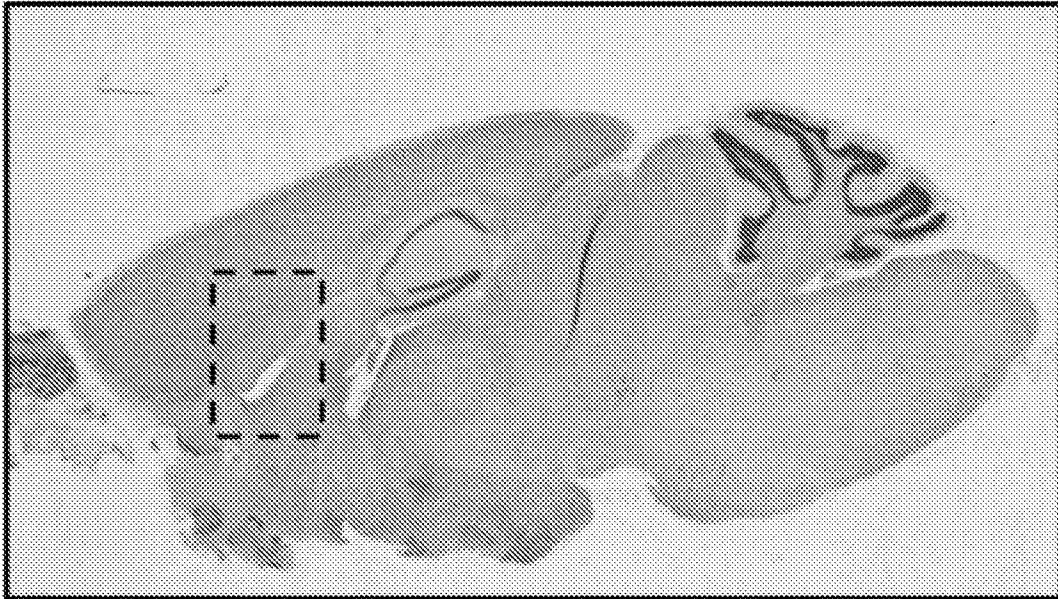


Fig. 2

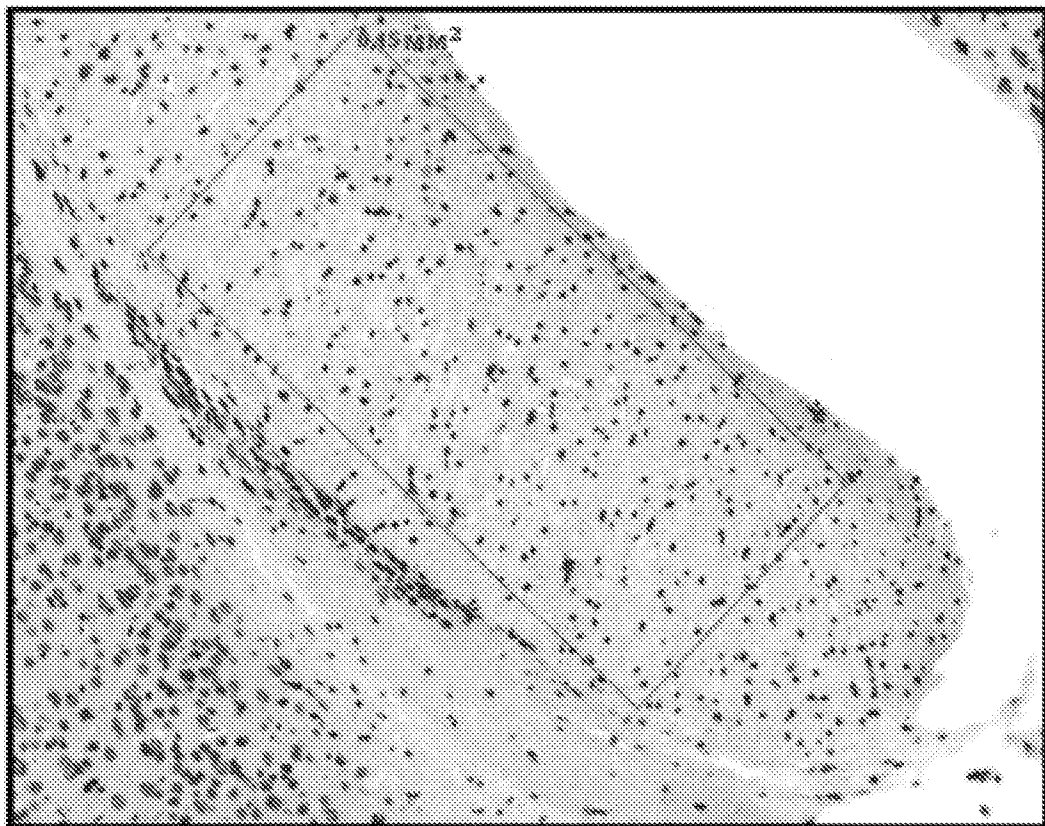


Fig. 3A

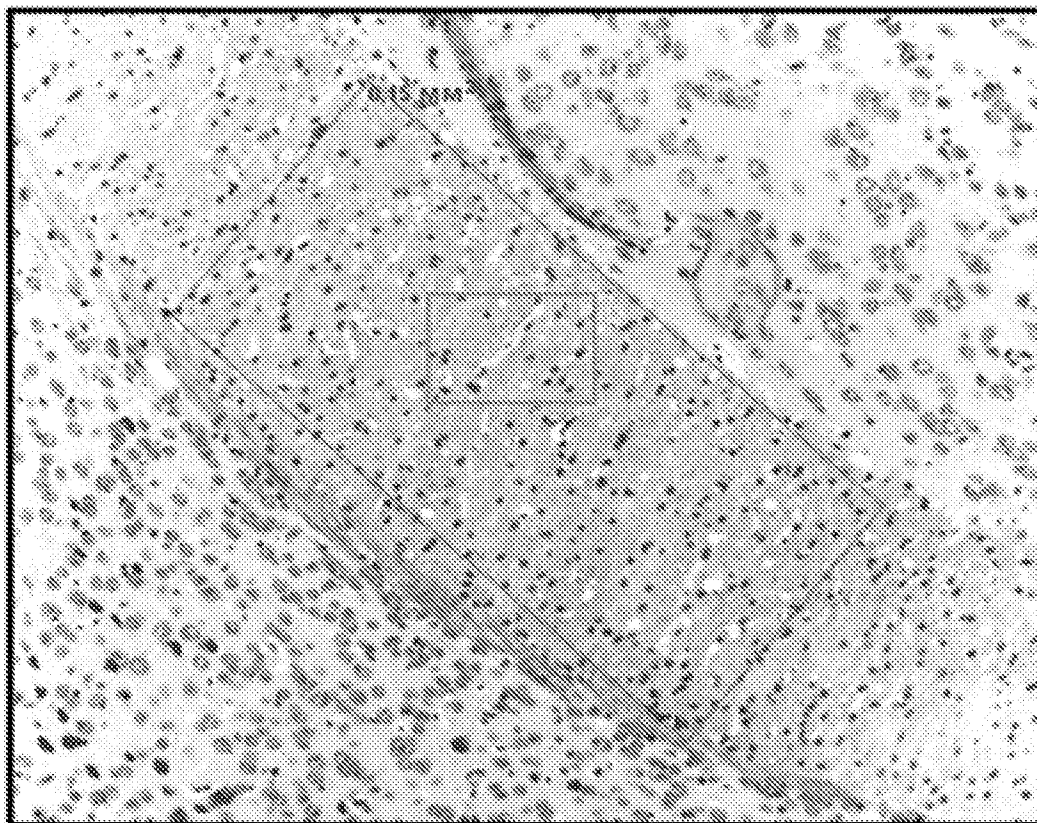


Fig. 3B

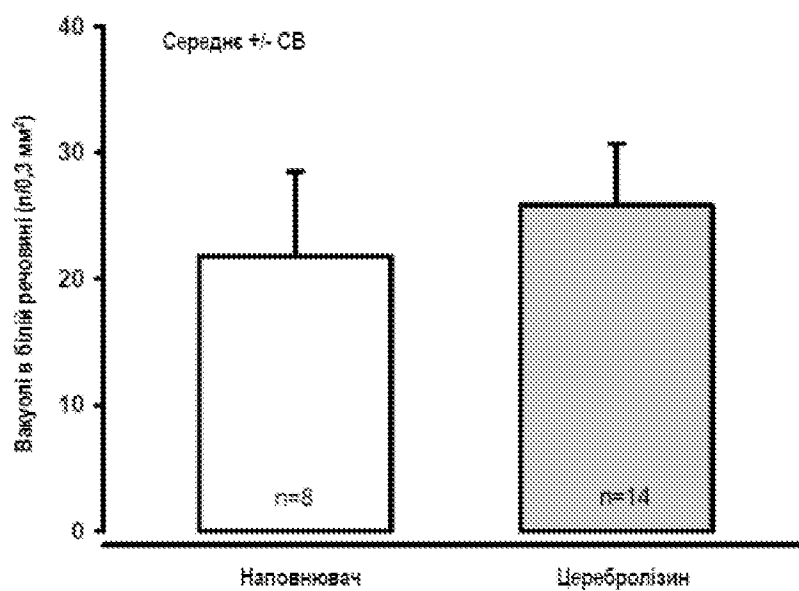


Fig. 4