

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040978**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.25

(51) Int. Cl. **A61K 35/30** (2015.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(21) Номер заявки
202090108

(22) Дата подачи заявки
2018.08.28

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ЦЕРЕБРОЛИЗИНА

(31) 17188180.8

(32) 2017.08.28

(33) EP

(43) 2020.03.31

(86) PCT/EP2018/073106

(87) WO 2019/042983 2019.03.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭВЕР НЕЙРО ФАРМА ГМБХ (AT)

(72) Изобретатель:
Винтер Штефан, Мёсслер Херберт (AT)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) PATRIZIA FORMICHI ET AL.: "Effects of cerebrolysin administration on oxidative stress-induced apoptosis in lymphocytes from CADASIL patients", NEUROLOGICAL SCIENCES (TESTO STAMPATO), vol. 34, no. 4, 10 August 2012 (2012-08-10), pages 553-556, XP055439021, IT ISSN: 1590-1874, DOI: 10.1007/s10072-012-1174-y cited in the application

NING CHEN ET AL.: "Cerebrolysin for vascular dementia", COCHRANE DATABASE OF SYSTEMATIC REVIEWS, 31 January 2013 (2013-01-31), XP055439033, DOI: 10.1002/14651858.CD008900.pub2

ILARIA DI DONATO 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, vol. 15, no. 1, 24 February 2017 (2017-02-24), XP055439039, DOI: 10.1186/s12916-017-0778-8

(57) Настоящее изобретение относится к церебролизину для применения в снижении смертности пациентов с CADASIL (церебральной аутосомно-доминантной артериопатией с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией).

B1

040978

**040978
B1**

Настоящее изобретение относится к лечению CADASIL (церебральная аутосомно-доминантная артериопатия с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией, или синдром CADASIL).

CADASIL вызывает тип лакунарного синдрома, сопровождающийся забывчивостью, ключевые признаки которого включают рецидивирующие ишемические явления и сосудистую деменцию, и ассоциированный с диффузными отклонениями белого вещества при нейровизуализации. CADASIL наследуется аутосомно-доминантно. У большинства страдающих им индивидуумов есть также страдающим им родитель; патогенные варианты *de novo* редки. Каждый ребенок страдающего CADASIL индивидуума имеет 50%-ный риск наследования патогенного варианта и развития признаков заболевания. Пренатальное тестирование в случае беременности с повышенным риском и преимплантационная генетическая диагностика возможны, если в семье известен патогенный вариант; однако, запросы на пренатальное тестирование нарушений с дебютом, как правило, во взрослом возрасте не распространены. При патологическом исследовании выявляют множество небольших, глубоких церебральных инфарктов, лейкоэнцефалопатию и неатеросклеротическую, неамилоидную ангиопатию, затрагивающую, в основном, небольшие мозговые артерии. При ультраструктурном анализе очевидны тяжелые изменения гладкомышечных клеток сосудов. Мутантный ген картирован на хромосоме 19, и у пациентов с CADASIL идентифицированы мутации гена *Notch3* человека, вызывающие тяжелые повреждения этого гена. Фактически, более 95% индивидуумов с CADASIL имеют патогенные миссенс-варианты *Notch3* (Rutten et al. в Pagon et al. (Eds.) *GeneReviews*® (2000 года; обновление 2016 года); Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017; Joutel et al., *Nature* 383 (1996), 707-710). Хотя более 95% мутаций *Notch3* у пациентов с CADASIL являются миссенс-мутациями, остальные мутации представляют собой небольшие делеции в рамке считывания или мутации участка сплайсинга. Удивительно, но все патологические мутации приводят к возникновению нечетного количества остатков цистеина в конкретном EGF_r. Считают, что остатки цистеина вносят вклад в структурную целостность белка, и, таким образом, дополнительные или отсутствующие остатки цистеина, возможно, нарушают правильный фолдинг белка. Мутации *de novo* являются редкими, но описаны отдельные случаи.

Патологическим признаком CADASIL являются электронно-плотные гранулы в средней оболочке артериол и повышенное окрашивание *Notch3* в стенках артерий, которое можно оценивать при биопсии кожи. В настоящее время не существует лечения CADASIL с доказанной эффективностью. Зачастую используют антитромбоцитарное лечение, но оно не имеет доказанной эффективности при CADASIL. Мигрень необходимо лечить симптоматически и профилактически в зависимости от частоты проявлений. Необходимо лечить сопутствующую гипертензию, диабет или гиперхолестеринемию. Для страдающих индивидуумов и их семей подходит поддерживающая терапия (практическая помощь, эмоциональная поддержка и консультирование). Однако, есть рекомендации по избеганию таких средств, как средства для ангиографии и антикоагулянты, которые могут провоцировать нарушения мозгового кровообращения. Также известно, что курение повышает риск ишемических явлений. Тромболитическая терапия (внутривенный тромболитизис) противопоказан из-за предполагаемого повышенного риска внутримозгового кровоизлияния (Pagon et al., 2000; обновление 2016 года).

Т.к. эффективное лечение CADASIL недоступно, лечение направлено на поиск возможных стратегий, модифицирующих течение заболевания, для уменьшения клинических проявлений. Однако до настоящего времени описано лишь несколько предварительных исследований.

В нескольких случаях для лечения такой мигрени также использовали вальпроат натрия. Описано, что ингибиторы ацетилхолинэстеразы не являются эффективными в отношении первичной конечной точки лечения, снижения когнитивных функций (шкала оценки сосудистой деменции после 18 недель), но наблюдали некоторое улучшение фронтальной субкортикальной дисфункции. Тестировали антитромбоцитарные лекарственные средства для первичной и вторичной профилактики инсульта, однако, с недоказанной и спорной пользой. Ацетазолamid тестировали на повышение перфузии головного мозга, оцениваемой посредством перфузионной МРТ, транскраниальной доплерографии и ^{99m}Tc-ECD SPECT перфузии головного мозга. Кроме того, его использовали для профилактики мигрени, стремясь к снижению частоты приступов мигрени в случае аторвастатина, но не сообщали об эффектах в отношении мозгового кровотока, тестируемого с помощью транскраниальной доплерографии. L-аргинин демонстрировал индуцируемую вазореактивность, тестируемую с помощью транскраниальной доплерографии. Конечные результаты для сапроптерина (200–400 мг дважды в сутки в течение 24 месяцев) в отношении первичной конечной точки (среднее различие индекса реактивной гиперемии) являлись незначимыми для любого улучшения периферической вазореактивности. С помощью модели на мышах показано, что комбинация фактора стволовых клеток и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора ограничивает патологическое прогрессирование CADASIL (обзор в Di Donato et al., *BMC Medicine* (2017) 15:41; DOI 10.1186/s12916-017-0778-8).

В случае признаков более тяжелого течения заболевания у индивидуумов с сосудистыми факторами риска, в частности, курением и гипертензией, в качестве важной части лечения CADASIL рассматривают контроль сосудистых факторов риска. Что касается антитромбоцитарных лекарственных средств, таких как аспирин или клопидогрел, при лечении пациентов с CADASIL большинство неврологов обращаются к руководствам, используемым в случае спорадического инсульта. Однако целесообразность этого под-

хода не определена. Фактически, тромботический генез ишемических явлений при этом заболевании пока не доказан. С другой стороны, во многих сообщениях упор сделан на наличие микрокровоизлияний (микрокровоотечений) у значительной доли пациентов с CADASIL. По этим причинам безопасность антитромбоцитарных лекарственных средств при этом заболевании еще предстоит определить. Аналогично, польза тромболизиса не ясна, хотя предполагают, что он приносит пользу при спорадическом лакунарном инсульте.

В многоцентровом исследовании донепезила на 168 пациентах не наблюдали улучшения первичного исхода по шкале оценки сосудистой деменции и подшкале когнитивных функций. Однако отмечали улучшения нескольких показателей способности к целенаправленной деятельности, но клиническая значимость этих результатов не ясна. Осложнения CADASIL, такие как депрессия и мигрень, по-видимому, отвечают на лечение, схожее с лечением, используемым при спорадическом заболевании (Di Donato et al., 2017). Обзор использования церебролизина при сосудистой деменции представлен в Chen et al. (Cochrane Database of System. Rev. 1 (2013): DOI: 10.1002/146 1858.CD008900.pub).

В отсутствие конкретных данных по CADASIL, большинство неврологов используют аспирин при вторичной профилактике после ишемических инсультов у пожилых пациентов, например, возрастом более 40 лет, но не существует доводов за или против его использования. Подходит ли эта стратегия для CADASIL, не определено и требует дальнейшего исследования, учитывая возможный повышенный риск кровоизлияния. Пациентов, которым необходима антикоагулянтная терапия по очевидным показаниям, таким как высокий риск фибрилляции предсердий, необходимо подвергать тщательному последующему наблюдению, учитывая описанный риск внутримозгового кровоизлияния.

Таким образом, очевидно, что необходимы новые, рациональные терапевтические вмешательства для пациентов с CADASIL, направленные на симптомы и прогрессирование заболевания, особенно, терапевтические вмешательства, которые позволят снизить смертность или повысить выживаемость, соответственно.

Таким образом, настоящее изобретение относится к церебролизину для применения в снижении смертности пациентов с CADASIL (церебральной аутосомно-доминантной артериопатией с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией).

Церебролизин является пептидным препаратом, получаемым посредством стандартизованного ферментативного расщепления белков головного мозга и содержащим низкомолекулярные пептиды (<10 кДа) и свободные аминокислоты.

Церебролизин представляет собой смесь пептидов с нейротрофно-подобными свойствами, улучшающими поведенческие и когнитивные дефициты в доклинических моделях и у пациентов с деменцией и улучшающими двигательную функцию, когнитивную функцию и способность к повседневной деятельности при инсульте, а также ТБИ. Механизм действия церебролизина является плеiotропным, в диапазоне от нейропротективных свойств, таких как снижение эксайтотоксичности и образования свободных радикалов, до усиленного восстановления посредством повышения нейропластичности и нейрогенеза.

Церебролизин используют при инсульте и сосудистой деменции. Сообщают о благоприятном эффекте в отношении когнитивной функции у людей с сосудистой деменцией, возможно, благодаря снижению накопления бета-амилоида. Церебролизин одобрен для лечения инсульта во многих странах Европы и Азии.

В рамках настоящего изобретения неожиданно наблюдали, что церебролизин оказывает значительное влияние на снижение смертности и, таким образом, улучшения выживаемости пациентов с CADASIL. Хотя не наблюдали эффекта в отношении вакуолизации белого вещества, характерного признака CADASIL (что делает настоящее изобретение даже более неожиданным), показано статистически значимое снижение показателя смертности при лечении церебролизинем в модели CADASIL на мышах, известной в этой области.

Этот эффект был полностью неожиданным, особенно в свете того, что в предшествующей публикации описано, что нет протективного эффекта церебролизина *in vitro* против индуцируемого оксидативным стрессом апоптоза в клетках пациентов с CADASIL (Formichi et al., *Neurol. Sci.* 34 (2013), 553-556; DOI: 10.1007/s10072-012-1174-y).

В этом исследовании Formichi et al. использовали лимфоциты периферической крови (PBL) 15 пациентов с CADASIL (диапазон возраста 34-70 лет) и восстанавливающий сахар 2-дезоксид-рибозу (dRib) в качестве примера проапоптотического стимула. Апоптоз анализировали посредством проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии. Добавление церебролизина к PBL пациентов с CADASIL, культивируемых в стандартных условиях, не имело эффекта в отношении процентной доли апоптотических клеток. Добавление церебролизина к PBL, культивируемым с dRib, вызывало значительное снижение апоптоза после 48 ч. культивирования лишь у 5 пациентов, в то время как у других 10 пациентов лечение церебролизинем не было ассоциировано с какими-либо значимыми различиями процентной доли апоптоза. Этот результат свидетельствует о протективном эффекте церебролизина против индуцируемого оксидативным стрессом апоптоза только у 30% пациентов с CADASIL. Таким образом, делали вывод о том, что ген Notch3, вероятно, не влияет на антиапоптотические свойства церебролизина *in vitro*. Этим также можно объяснить результат, полученный в рамках настоящего изобретения, касающийся того, что

церебролизин не имел эффекта в отношении вакуолизации. Таким образом, как бы то ни было, полностью неожиданным являлось то, что церебролизин может иметь эффект в отношении первичного параметра, смертности.

Несмотря на результаты, полученные Formichi et al., и несмотря на то, что пациенты с CADASIL имеют мутацию гена Notch3, церебролизин можно эффективно применять для лечения всех пациентов с CADASIL для достижения эффектов по настоящему изобретению.

CADASIL, как правило, диагностируют генетически, предпочтительно, посредством секвенирования всего гена Notch3. Гетерозиготные укорачивающие патогенные варианты экзона 33 NOTCH3 (кодирующего домены PEST внутриклеточной части белка) описаны при латеральном менингеальном синдроме (синдроме Лемана). Предполагают, что эти патогенные варианты действуют через приобретение сигнальной функции Notch3 и отличаются от патогенных вариантов NOTCH3 при CADASIL. Патогенный вариант экзона 25 Notch3 (с.4556T>C, p.Leu1519Pro) описан при аутосомно-доминантном инфантильном миофибромадозе.

При магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного мозга пациентов с CADASIL наблюдают области гипоинтенсивности на T1-взвешенных изображениях и области гиперинтенсивности на T2-взвешенных изображениях, и, как правило, характерны множественные сливные очаги различного размера в белом веществе. Эти очаги сконцентрированы вокруг базальных ганглиев, перивентрикулярного белого вещества и моста и схожи с очагами, наблюдаемыми при болезни Бинсвангера. Эти очаги в белом веществе также наблюдают у индивидуумов без симптомов с мутантным геном. Хотя МРТ не используют для диагностики CADASIL, с помощью нее можно наблюдать прогрессирование изменений белого вещества даже через десятилетия после появления симптомов.

Изменения белого вещества у пациентов с CADASIL зачастую затрагивают переднюю часть височной доли, наружную капсулу и верхнюю лобную извилину. Показано, что изменения переднего височного полюса имеют высокую чувствительность и специфичность для заболевания (приблизительно 90% для каждого), и их можно использовать в диагностике. В азиатских популяциях вовлечение передней части височной доли менее распространено. Изменения наружной капсулы также имеют высокую чувствительность (приблизительно 90%), но меньшую специфичность (приблизительно 50%). Фактически, недавно проведенный систематический анализ показал схожее вовлечение наружной капсулы при CADASIL и спорадическом SVD. Отклонения сигнала мозолистого тела, изредка возникающие при спорадическом SVD, описаны при CADASIL; такие отклонения также являются признаком рассеянного склероза, что является одной из причин неправильной диагностики CADASIL в качестве рассеянного склероза. Микрокровоотечения в головном мозге, видимые на изображениях градиентного эха с точкообразными очагами гипоинтенсивности, возникают в разном количестве случаев (30-70%) и, как правило, повышаются с возрастом и при наличии факторов риска, таких как высокое артериальное давление, и у ряда пациентов описаны внутримозговые кровоизлияния, особенно, у пациентов азиатского происхождения (di Donato et al., 2017).

CADASIL имеет код диагноза ICD-10-CM, классифицируемый как I67.8 ("Другие уточненные цереброваскулярные заболевания") и определяемый как субкортикальное заболевание, но в недавних исследованиях с использованием высокопольной МРТ 7-Tesla, делающей возможной визуализацию с более высоким разрешением, определяли первичное вовлечение коры, включая демонстрацию микроинфарктов и ранних диффузных кортикальных изменений в лобной и теменной областях, чаще всего имеющих симметричный паттерн в обоих полушариях. Эти изменения не связаны с истончением коры или субкортикальными очагами, и предполагают, что они вторичны по отношению к плотности венозных сосудов или интрамиелиновым отеком. Схожие данные также получены с использованием экспериментальных моделей. Кроме того, субкортикальные изменения могут индуцировать вторичные кортикальные изменения. В долгосрочном исследовании инцидентные лакуны отслеживали по истончению коры конкретно в соединенных областях головного мозга. Другая недавняя разработка представляет собой использование диффузионно-тензорной томографии для характеристики повреждения ткани. Типичным изменением при диффузном измерении, наблюдаемым у пациентов с CADASIL, является снижение фракционной анизотропии (меры направленности диффузии) и повышение кажущегося коэффициента диффузии или средней диффузионной способности (мера степени диффузии). Анализ гистограмм предложен в качестве чувствительного инструмента для поперечного и продольного измерения связанных с CADASIL изменений (обзор диагностики и дифференциальной диагностики в di Donato et al., 2017 и Rutten et al., 2000, обновление 2016 года).

Хотя CADASIL все равно считается редко диагностируемым, его диагностика заметно улучшилась за последние 20 лет и в настоящее время является гораздо более точной.

Церебролизин является фармацевтическим препаратом нейропептидов, протеолитически полученных из очищенных белков головного мозга. Церебролизин доступен на рынке, зачастую в виде стандартизованного продукта. Церебролизин содержит от 15 до 30% низкомолекулярных пептидов (<10 кДа) и от 70 до 85% свободных аминокислот, таких как аланин, аспарагиновая кислота, аргинин, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, цистеин и валин. Раствор, предпочтительно, является стерильным и готовым для инъек-

ции или инфузии (т.е. он соответствует всем стандартам и требованиям для фармацевтических препаратов, подлежащих введению пациентам-людям). Препараты церебролизина описаны в EP 0452299 A1 CN и Gromova et al. (Difficult Patient 8 (2010), 25-31).

Предпочтительные концентрации церебролизина, предназначенные для использования по настоящему изобретению, содержат от 50 до 1000 мг, предпочтительно от 100 до 500 мг, в частности от 150 до 250 мг концентрата церебролизина на мл в водном растворе. Как указано выше, церебролизин содержит приблизительно 85% свободных аминокислот и 15% низкомолекулярных пептидов (<10 кДа) в пересчете на общее содержание азота.

Концентрат церебролизина имеет стандартизированное содержание конкретных аминокислот. В концентрате (концентрацию которого можно, при необходимости, варьировать при введении) церебролизин имеет следующее содержание аминокислот (в мг/мл концентрата церебролизина): аланин: от 2,40 до 3,60, в частности от 3,10 до 3,50; аспарагиновая кислота: от 2,40 до 3,60, в частности от 2,20 до 3,50; валин: от 1,60 до 2,40, в частности от 2,10 до 2,40; гистидин: 1,04-1,56, в частности от 1,10 до 1,50; глицин: от 1,20 до 1,80, в частности от 1,60 до 1,90; глутаминовая кислота: 3,20-4,80, в частности от 3,30 до 4,60; изолейцин: от 1,60 до 2,40, в частности от 2,20 до 2,40; лейцин: от 4,80 до 7,20, в частности от 5,70 до 6,30; лизин: от 4,80 до 7,20, в частности от 5,80 до 7,20; метионин: от 0,35 до 0,65, в частности от 0,40 до 0,70; пролин: от 1,60 до 2,40, в частности от 2,00 до 2,40; серин: от 0,21 до 0,39, в частности от 0,23 до 0,36; треонин: от 0,21 до 0,39, в частности от 0,26 до 0,35; триптофан: от 0,35 до 0,65, в частности от 0,40 до 0,70; фенилаланин: от 1,60 до 2,40, в частности от 1,60 до 2,40. Очевидно, что после разведения этого концентрата абсолютное количество конкретной аминокислоты на мл снижается; однако, относительное количество аминокислот друг относительно друга и относительно низкомолекулярных пептидов (10000 или менее), являющееся важным элементом для терапевтических эффектов, достигаемых посредством настоящего изобретения, после разведения остается таким же.

Способ получения церебролизина описан в EP 0452299 A1 и представляет собой ферментативный гидролиз фракции белков головного мозга свиньи. Каждый мл этого продукта содержит в качестве аминокислот 3,00 мг аланина, 3,00 мг аспарагиновой кислоты, 0,06 г цистина, 4,30 мг глутаминовой кислоты, 1,50 мг глицина, 1,30 мг гистидина, 2,00 мг изолейцина, 6,00 мг лейцина, 0,50 мг метионина, 2,00 мг фенилаланина, 2,00 мг пролина, 0,30 г серина, 0,30 г треонина, 0,50 г триптофана и 2,00 мг тирозина, а также пептиды, имеющие молекулярную массу 10000 или менее. Смесь пептидов и аминокислот в препаратах, описанных в EP 0452299 A1, содержала (как и в случае типичного продукта церебролизина) приблизительно 15% пептидов с молекулярной массой 10000 или менее и приблизительно 85% свободных аминокислот.

Используемая доза предпочтительно может находиться в диапазоне от 100 до 10000 мг (от 0,5 до 50 мл концентрата церебролизина). Предпочтительно пациента с CADASIL лечат с помощью дозы в диапазоне от 0,1 до 100 мл, предпочтительно - от 1 до 50 мл церебролизина, соответствующих от 21,5 до 21520 мг концентрата церебролизина (предпочтительный концентрат церебролизина содержит 215,2 мг/мл). При внутримышечном использовании, доза, как правило, является более низкой, чем внутривенная доза (например, предпочтительно от 0,5 до 5 мл и предпочтительно от 0,5 до 10 мл внутривенно). Предпочтительно пациента с CADASIL лечат, таким образом, с помощью вводимой внутримышечно дозы от 0,1 до 10 мл, предпочтительно от 0,5 до 5 мл, соответствующей от 21,5 мг до 2152 мг концентрата церебролизина. Церебролизин также можно вводить посредством непрерывной инфузии (как правило, в объемах выше 10 мл), и, таким образом, концентрат церебролизина, например, можно разводить 0,9% раствором хлорида натрия (9 мг NaCl/мл), раствором Рингера (Na^+ 153,98 ммоль/л, Ca^{2+} 2,74 ммоль/л, K^+ 4,02 ммоль/л, Cl^- 163,48 ммоль/л), 5% глюкозы. Можно использовать длительность инфузий, как правило от 5 мин до 4 ч, предпочтительно - от 10 мин до 2 ч, в частности от 15 до 60 мин (предпочтительно, каждый день), например в течение от 1 до 100 дней, предпочтительно от 5 до 50 дней, предпочтительно от 10 до 30 дней (как правило, введение осуществляют только по будням, а не в выходные, таким образом, что, как правило, используют цикл лечения 3-5×5 последовательных дней введения). В предпочтительном варианте осуществления пациента с CADASIL лечат с помощью вводимой внутривенно дозы от 0,1 до 100 мл, предпочтительно от 1 до 50 мл, соответствующей от 215,2 до 21520 мг концентрата церебролизина.

Циклы лечения можно повторять после периода без лечения от 1 до 6, от 1 до 3, предпочтительно от 2 до 3 месяцев.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими неограничивающими примерами и фигурами.

На фиг. 1 показан вычисленный показатель смертности в когорте мышей, которым вводили физиологический раствор, по сравнению с группой, которой вводили церебролизин (35% по сравнению с 0%).

На фиг. 2 показан окрашенный прочным синим люксолом и по Нисслю сагиттальный срез головного мозга мыши с CADASIL на 0,5 мм латеральнее от медиальной линии. Тело клетки указано темно-синим; белое вещество указано бирюзовым. Пунктирная линия включает наблюдаемую область, переднюю часть мозолистого тела.

На фиг. 3 показана передняя часть мозолистого тела у молодой, здоровой мыши (A) и у мыши с CADASIL возрастом 18 месяцев (B). Не наблюдали вакуолизацию в передней средней части мозолистого

тела самца мыши C57BL/6 возрастом шесть недель (А), но наблюдали выраженную вакуолизацию у мышей с CADASIL (В). В отличие от круглых вакуолей, сосуды выглядят как вытянутые структуры (см. внутреннюю рамку)).

На фиг. 4 показано количество вакуолей в передней части мозолистого тела трансгенных мышей с CADASIL возрастом 18 месяцев, подвергавшихся лечению в возрасте от 12 до 18 месяцев с использованием трех циклов введения носителя (слева) или церебролизина (справа). В обеих группах наблюдали ожидаемую патологию, т.е. вакуолизацию белого вещества (не наблюдали статистически значимых различий между группами ($p=0,12$; t -критерий Стьюдента)).

Примеры

Терапевтический эффект церебролизина в модели CADASIL на мышах.

Материалы и способы.

Модель CADASIL на мышах: мутация NOTCH3^{R169C} (линия 88).

Исследование для проверки концепции для изучения терапевтического эффекта церебролизина при CADASIL осуществляли на общепризнанной модели CADASIL на мышах, имеющих мутацию NOTCH3^{R169C} (линия 88). Эта конкретная замена аргинина цистеином в остатке 169 в экзоне 4 описана у пациентов с CADASIL и, по-видимому, является частой мутацией (Joutel et al., 1997). Эта линия трансгенных мышей ранее подробно описана для объяснения некоторых биохимических аспектов CADASIL, и, таким образом, ее считают подходящей генетической моделью заболевания на животных (Ghosh et al., 2015; Joutel et al., 2010). Joutel с соавт. (Joutel et al., 2010) показали, что с помощью экспрессии *in vivo* мутантного трансгена у мышей воспроизводили эндогенный профиль экспрессии NOTCH3 и основные патологические признаки CADASIL, включая типичные агрегаты NOTCH3^{ECD}, отложения GOM в сосудах головного мозга, прогрессирующее повреждение белого вещества и сниженный мозговой кровоток. У мутантных мышей наблюдали сниженные миогенные ответы и уменьшение калибра артерий головного мозга, а также нарушение цереброваскулярной ауторегуляции, функциональную гиперемию и значительное снижение плотности капилляров белого вещества. При недавней характеристике модели NOTCH3^{R169C} выявили важную роль перичитов в дисфункции сосудов головного мозга и проницаемости BBB, что является причиной патологии CADASIL (Ghosh et al., 2015). Авторы показали, что с возрастом мутантный NOTCH3 образует агрегаты вокруг перичитов и гладкомышечных клеток. Накопление NOTCH3 вызывает апоптоз, что приводит к значительному снижению количества перичитов и охвата капилляров отростками перичитов. Эти изменения ассоциированы с отслаиванием окончаний отростков астроцитов от микрососудов головного мозга, нарушением BBB и микрососудистой дисфункцией, измеряемыми по утечке белков плазмы, снижению экспрессии белков эндотелиальных адгезивных контактов и снижению реактивности микрососудов в отношении диоксида углерода.

Проведение эксперимента.

Для оценки эффекта церебролизина в этой модели CADASIL на мышах выращивали 28 животных и позволяли им достигнуть возраста более 12 месяцев до начала трех циклов лечения. Мутантным мышам вводили 2,5 мл/кг церебролизина, разведенного в 0,9% физиологическом растворе, или только физиологический раствор. Лечение осуществляли рандомизированным и полностью маскированным образом в виде 3-недельных циклов по 5 еженедельных инъекций IP (всего 3×15 инъекций на мышь на лечение). Животных подвергали лечению в возрасте 12, 14 и 16 месяцев, соответственно, и умерщвляли для анализа в возрасте 18 месяцев. Эту схему лечения выбирали с учетом данных, полученных в экспериментальных условиях, в которых тестировали терапевтический эффект церебролизина при разных нейродегенеративных нарушениях. Обоснование 12-месячного выращивания перед началом лечения обусловлено наблюдением о том, что мыши в этой модели начинают проявлять типичные признаки заболевания CADASIL приблизительно в этом возрасте (Joutel et al., 2010).

Кроме того, учитывая трансляционный аспект, выбирали скорее терапевтический, а не профилактический, подход вмешательства для соответствия реалистичной клинической ситуации, в которой терапию будут начинать после прогрессирования патологии до такой стадии, которую можно диагностировать. В качестве первичного параметра выбирали смертность, представляющую собой надежную и клинически значимую меру исхода. Кроме того, протяженность CADASIL-специфических очагов в белом веществе анализировали количественно посредством гистологического анализа с использованием окрашивания прочным синим люксолом. В связи с этим, животных подвергали перфузии и заключали головной мозг в парафин. Исследовали две области анализа на трех сагитальных срезах в передней средней части мозолистого тела на животное.

Результаты.

Лечение церебролизином полностью предотвращало гибель трансгенных мышей с CADASIL. За период наблюдения от 12 до 18 месяцев (соответствующий возрасту животных) погибли 5 из 14 мышей в контрольной группе (36%), однако в группе, которой вводили церебролизин, не погибло ни одно животное. Вычисленный показатель смертности в когорте, которой вводили физиологический раствор, составлял 35% по сравнению с 0% в группе церебролизина, что свидетельствует о том, что терапия церебролизином имела эффект повышения выживаемости при этом заболевании (фиг. 1).

Затем животных умерщвляли посредством перфузионной фиксации и головной мозг удаляли, за-

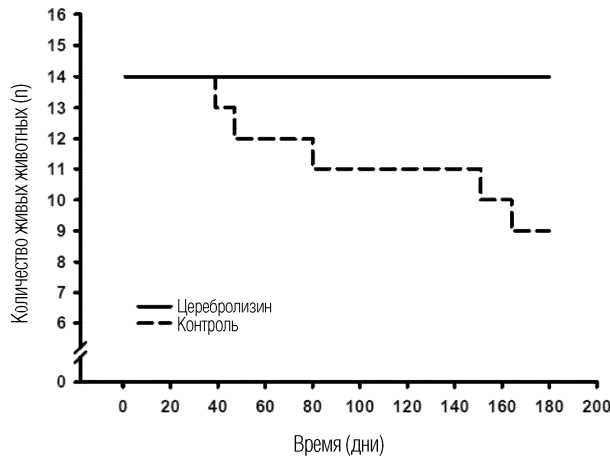
ключали в парафин, нарезали сагиттально и окрашивали прочным синим люксолом для тестирования вакуолизации в белом веществе. На фиг. 2 показан окрашенный прочным синим люксолом и по Нисслю сагиттальный срез головного мозга мыши с CADASIL на 0,5 мм латеральнее медиальной линии. Тело клетки указано темно-синим; белое вещество указано бирюзовым. Пунктирная линия включает наблюдаемую область, переднюю часть мозолистого тела.

У самца мыши C57BL/6 возрастом шесть недель не наблюдали вакуолизацию в передней средней части мозолистого тела (фиг. 3A), структура которой патологически изменена у мышей с CADASIL (Joutel et al, J. Clin. Invest. 120 (2010), 433-445). В отличие от этого, у мышей с CADASIL наблюдали выраженную вакуолизацию (фиг. 3B). Таким образом, можно воспроизводить патологические изменения в белом веществе мышей с CADASIL, известные из литературы. Измеряли 22 ± 7 вакуолей (среднее \pm стандартное отклонение, $n=8$) у животных, которым вводили носитель, и 26 ± 5 вакуолей ($n=14$) у животных, которым вводили церебролизин. Различия между группами не были значимыми (фиг. 4; $p=0,12$; t -критерий Стьюдента). В связи с этим церебролизин, по-видимому, не имеет эффекта в отношении вакуолизации белого вещества мышей с CADASIL.

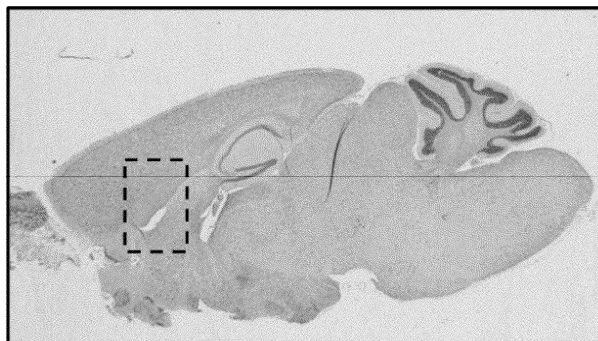
В совокупности исключительный положительный эффект в отношении смертности свидетельствует о том, что церебролизин является мощным потенциальным терапевтическим средством для лечения заболевания CADASIL.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

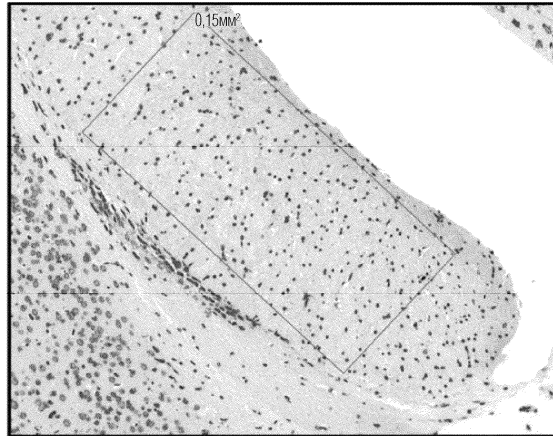
1. Применение церебролизина для снижения смертности пациентов с CADASIL.
2. Применение по п.1, где пациент с CADASIL имеет мутацию в гене Notch3.



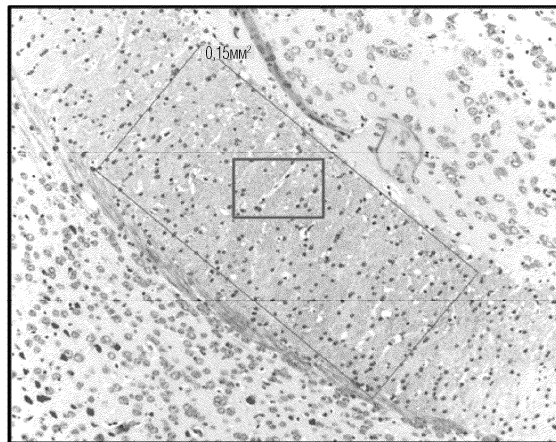
Фиг. 1



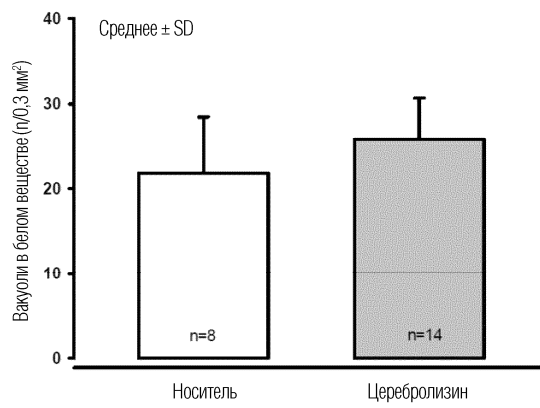
Фиг. 2



Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 4

