

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041095**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.09.13

(21) Номер заявки
201990653

(22) Дата подачи заявки
2009.10.16

(51) Int. Cl. **A61K 31/19** (2006.01)
A61K 31/4015 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ БРИВАРАЦЕТАМ, ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ КОГНИТИВНОЙ ФУНКЦИИ

(31) **61/105,847; 61/152,631; 61/175,536**

(32) **2008.10.16; 2009.02.13; 2009.05.05**

(33) **US**

(43) **2019.11.29**

(62) **201170571; 2009.10.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЗЕ ДЖОНС ХОПКИНС
ЮНИВЕРСИТИ (US)**

(72) Изобретатель:
**Галлахер Михела, Хаберман Ребекка,
Кох Мин Тен (US)**

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

(56) ROZZINI R. ET AL.: "Treatment of cognitive impairment secondary to degenerative dementia: Effectiveness of oxiracetam therapy." ACTA NEUROLOGICA FEB 1993, vol. 15, no. 1, February 1993 (1993-02), pages 44-52, XP009127254 ISSN: 0001-6276, page 44-46, the whole document

MARINI G. ET AL.: "PLACEBO-CONTROLLED DOUBLE-BLIND STUDY OF PRAMIRACETAM CI-879 IN THE TREATMENT OF ELDERLY SUBJECTS WITH MEMORY IMPAIRMENT", ADVANCES IN THERAPY, vol. 9, no. 3, 1992, pages 136-146, XP009127252, ISSN: 0741-238X, the whole document

LIPPA CAROL ET AL.: "Levetiracetam: Seizure management for elderly patients with cognitive impairment", NEUROLOGY, vol. 70, no. 11, Suppl. 1, March 2008 (2008-03), page A97, XP009127253 & 60TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ACADEMY-OF-NEUROLOGY; CHICAGO, IL, USA; APRIL 12-19, 2008, ISSN: 0028-3878, the whole document

US-A-5886023

US-A1-2006063707

US-A1-2007244143

US-A1-2007298098

EP-A-1731149

US-A1-2008076820

WO-A-2009109547

"P.5.017 Use of valproate in treatment of behavioural and psychological disturbances of dementia", EUROPEAN NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, AMSTERDAM, NL, vol. 15, 1 January 2005 (2005-01-01), page S565, XP025327109, ISSN: 0924-977X [retrieved on 2005-01-01], the whole document

(57) Данное изобретение касается применения фармацевтической композиции, содержащей бриварацетам или его фармацевтически приемлемую соль в количестве 0,7-180 мг, для улучшения когнитивной функции у субъекта с возрастным когнитивным расстройством или риском его возникновения.

041095**B1****041095****B1**

Данная заявка заявляет приоритет и преимущество по предварительным патентным заявкам США 61/105847 (от 16 октября 2008), 61/152631 (от 13 февраля 2009) и 61/175536 (от 5 мая 2009). Содержание и раскрытие каждой из этих предшествующих предварительных заявок включено здесь в виде ссылки во всей своей полноте.

Область изобретения

Данное изобретение касается применения фармацевтической композиции, содержащей бриварацетам или его фармацевтически приемлемую соль, для улучшения когнитивной функции у субъекта с возрастным когнитивным расстройством или риском его возникновения.

Предпосылки изобретения

Когнитивная способность может ухудшаться, что является обычным следствием старения. Кроме того, существенная часть пожилых людей испытывает ухудшение когнитивной способности, которое превышает ухудшение, типичное для нормального старения.

Такая возрастная утрата когнитивной функции характеризуется клинически прогрессирующей потерей памяти, познавательной способности, рассудительности и способности принимать решение. Среди расстройств, связанных с такой возрастной утратой когнитивной функции, находится умеренное когнитивное расстройство (MCI), связанное с возрастом нарушение памяти (AAMI), возрастное когнитивное ухудшение (ARCD) или аналогичные клинические группы. Согласно некоторым оценкам, только в США имеется более 16 миллионов людей с AAMI (Barker et al., 1995), и, как определено, MCI затрагивает 5,5-7 миллионов людей в США старше 65 лет (Plassman et al., 2008). Следовательно, существует потребность в эффективном лечении возрастного когнитивного расстройства и улучшении когнитивной функции у пациентов с диагнозами MCI, AAMI, ARCD и аналогичными возрастными когнитивными расстройствами или с риском их развития.

Краткое содержание изобретения

Согласно аспекту настоящего изобретения, обеспечено применение фармацевтической композиции, содержащей бриварацетам (SV2A-ингибитор) или его фармацевтически приемлемую соль в количестве 0,7-180 мг, для улучшения когнитивной функции у субъекта с возрастным когнитивным расстройством или риском его возникновения. В некоторых вариантах изобретения SV2A-ингибитор присутствует в количестве 5-140 мг.

В некоторых вариантах изобретения бриварацетам или его фармацевтически приемлемую соль вводят каждые 12 или 24 ч при ежедневной дозе примерно 7-15 мг. В некоторых вариантах изобретения бриварацетам или его фармацевтически приемлемую соль вводят каждые 12 или 24 ч при ежедневной дозе примерно 0,7-180 мг. В некоторых вариантах изобретения бриварацетам или его фармацевтически приемлемую соль вводят каждые 12 или 24 ч при ежедневной дозе примерно 2,5-180 мг. В некоторых вариантах изобретения бриварацетам или его фармацевтически приемлемую соль вводят каждые 12 или 24 ч при ежедневной дозе примерно 4-130 мг.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 изображена повышенная экспрессия мРНК гена, кодирующего SV2A, в зубчатой извилине гиппокампа крыс с возрастными нарушениями (AI) по сравнению с молодыми крысами (Y) и старыми крысами без нарушений (AU). Строят график нормированных величин сигналов набора маркеров Affymetrix GeneChip (Y-ось) в качестве меры экспрессии мРНК относительно показателей обучаемости различных крыс как меры когнитивного расстройства.

На фиг. 2 изображены эффекты введения левитирацетама на сохранение пространственных данных в памяти 6 крыс с возрастными изменениями (AI) в тесте Морриса с водным лабиринтом (MWM).

На фиг. 3 изображены эффекты введения левитирацетама на сохранение пространственных данных в памяти десяти крыс с возрастными нарушениями (AI) в тесте с бассейном, имеющим радиальные рукава (RAM).

Подробное описание изобретения

Если не определено по-другому, используемые в данной заявке научные и технические термины имеют значения, которые, как правило, понятны рядовым специалистам в данной области. Вообще номенклатура и технологии, используемые в отношении описанных здесь клеточных и тканевых культур, молекулярной биологии, клеточной биологии и биологии рака, нейробиологии, нейрохимии, вирусологии, иммунологии, микробиологии, фармакологии, генетики и химии белков и нуклеиновых кислот, хорошо известны и обычно применяются в данной области.

Если не указано иное, способы и методики по настоящему изобретению обычно выполняют в соответствии с обычными способами, которые хорошо известны в данной области и описаны в различных общих и более специфических ссылках, которые цитируются и обсуждаются в этой спецификации. См., например, "Principles of Neural Science", McGraw-Hill Medical, New York, N.Y. (2000); Motulsky, "Intuitive Biostatistics", Oxford University Press, Inc. (1995); Lodish et al., "Molecular Cell Biology, 4th ed.", W. H. Freeman & Co., New York (2000); Griffiths et al., "Introduction to Genetic Analysis, 7th ed.", W. H. Freeman & Co., N.Y. (1999); Gilbert et al., "Developmental Biology, 6th ed.", Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass. (2000).

Употребляемые здесь химические термины используют в соответствии с общеизвестным употреб-

лением в данной области, как проиллюстрировано в работе "The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms", Parker S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco, C.A. (1985).

Все указанные выше и любые другие публикации, патенты и опубликованные патентные заявки, упоминаемые в этой заявке, специально включены здесь в виде ссылки. В случае противоречия настоящая спецификация, включающая свои конкретные определения, является регулирующей.

Понятно, что на всем протяжении спецификации слово "содержать" или его вариации, такие как "содержит" или "содержащий", подразумевают включение указанного целого числа (или компонента) или группы целых чисел (или компонентов), но не исключение некоторого другого целого числа (или компонента) или группы целых чисел (или компонентов).

Выражение "включая" используют для обозначения выражения "включая, но не ограничиваясь этим". Выражения "включая" и "включая, но не ограничиваясь этим" используют попеременно.

Выражения "когнитивная функция" или "когнитивный статус" относятся к некоторому интеллектуальному мозговому процессу высшего порядка или состоянию мозга, соответственно, вовлеченному в познание и/или память, в том числе, но не ограничиваясь этим, вниманию, накоплению информации, обработке информации, рабочей памяти, краткосрочной памяти, долговременной памяти, антероградной памяти, ретроградной памяти, восстановлению памяти, дифференцировочному обучению, принятию решений, контролю ингибиторных реакций, изменению набора качеств, относящихся к вниманию, замедленному закреплению обучаемости, переделке навыка, временной интеграции произвольного поведения и выражению интереса к окружающей среде и потребности самообслуживания.

У людей когнитивную функцию можно определить (без ограничения), например, посредством глобального клинического представления по шкале оценки изменений (шкала CIBIC-plus); мини-исследования ментального состояния (MMSE); нервно-психиатрического опросника (NPI); по клинической рейтинговой шкале деменции (CDR); посредством кембриджского нейропсихологического теста с автоматизированной батареей (CANTAB) или клинической гериатрической оценки фирмы Sandoz (SCAG). Смотри работы Folstein et al., J Psychiatric Res 12: 189-98, (1975); Robbins et al., Dementia 5: 266-81, (1994); Rey, L'examen clinique en psychologie, (1964); Kluger et al., J Geriatr Psychiatry Neurol 12: 168-79, (1999).

На животных модельных системах когнитивную функцию можно определить различными общеизвестными способами, известными в данной области, включая использование водного лабиринта Морриса (MWM), кругового лабиринта Барнса, приподнятого лабиринта с радиальными рукавами, Т-лабиринта или любых других лабиринтов, в которых животные используют пространственную информацию. Для оценки когнитивной функции также можно использовать другие тесты, известные в данной области, например, задачи распознавания нового объекта и распознавание запаха.

Когнитивную функцию также можно определить, применяя такие методики как позитронная эмиссионная томография (PET), функциональное магнитно-резонансное изображение (fMRI), однофотонная эмиссионная компьютерная томография (SPECT) или какая-либо другая методика получения изображений, которая позволяет определять функцию головного мозга. У животных когнитивную функцию можно также определить посредством электрофизиологических методик.

Выражения "возрастное когнитивное расстройство" или "когнитивное расстройство" относятся к когнитивной функции у пожилых субъектов, которые не так здоровы, как это ожидается для обычного субъекта согласно возрасту (т.е. субъекта со средней оценкой в когнитивном тесте для данного возраста) или как это ожидается для молодых взрослых субъектов. В некоторых случаях когнитивная функция снижена примерно на 5%, примерно на 10%, примерно на 30% или более, по сравнению с когнитивной функцией, ожидаемой для обычного субъекта согласно возрасту. В некоторых случаях ожидают когнитивную функцию согласно возрасту обычного субъекта, но пониженную примерно на 5%, примерно на 10%, примерно на 30%, примерно на 50% или более, по сравнению с когнитивной функцией, ожидаемой для молодого взрослого субъекта. Возрастное ослабление когнитивной функции может быть связано с умеренным когнитивным расстройством (MCI), возрастным нарушением памяти (AAMI) и возрастным когнитивным ухудшением (ARCD).

"Стимуляция" когнитивной функции касается воздействия на ослабленную вследствие возраста когнитивную функцию так, чтобы она более близко походила на функцию подходящего по возрасту нормального субъекта без нарушений или функцию молодого взрослого субъекта. Когнитивную функцию можно стимулировать до некоторой детектируемой степени, но у людей предпочтительно стимулировать ее в достаточной мере, чтобы позволить субъекту с нарушениями осуществлять повседневные действия обычной жизни с таким же уровнем умения как подходящий по возрасту нормальный субъект без нарушений или молодой взрослый субъект.

"Сохранение" когнитивной функции касается воздействия на нормальную или ослабленную когнитивную функцию таким образом, чтобы она не ухудшалась или не понижалась ниже значения, наблюдаемого для субъекта после первого представления или диагноза, или замедлила такое ухудшение.

Выражение "улучшение" когнитивной функции включает стимуляцию когнитивной функции и/или сохранение когнитивной функции у субъекта.

Выражение "умеренное когнитивное расстройство" или "MCI" относится к состоянию, характери-

зующемуся отдельным ухудшением памяти, не сопровождаемым другими когнитивными нарушениями, и сравнительно нормальными функциональными способностями. Один набор критериев для клинического описания MCI устанавливает следующие характеристики: (1) жалобы на память (которые сообщает пациент, информант или лечащий врач), (2) нормальные действия повседневной жизни (ADL), (3) нормальная глобальная когнитивная функция, (4) отклоняющаяся от нормы для данного возраста память (определяют, как более чем 1,5-кратные стандартные отклонения ниже среднего значения для данного возраста) и (5) отсутствие показателей деменции (которые определяют DSM-IV нормативы). Petersen et al., *Srch. Neurol.* 56: 303-308 (1999); Petersen, "Mild cognitive impairment: Aging to Alzheimer's Disease", Oxford University Press, N.Y. (2003).

При диагнозе MCI обычно назначают объективную оценку когнитивного расстройства, которую собирают посредством использования твердо установившихся нейропсихологических тестов, включающих мини-исследования ментального состояния (MMSE), кембриджский нейропсихологический тест с автоматизированной батареей (CANTAB) и индивидуальные тесты, такие как тест Рея на слуховую и вербальную обучаемость (AVLT), подтест на логическую память по исправленной шкале памяти Векслера (WMS-R) и тест Нью-Йоркского университета (NYU) на воспроизведение абзаца. Смотри работы Folstein et al., *J Psychiatric Res* 12: 189-98 (1975); Robbins et al., *Dementia* 5: 266-81 (1994); Kluger et al., *J Geriatric Psychiatry Neurol* 12: 168-79 (1999).

Выражение "возрастное ухудшение памяти (AAMI)" касается ухудшения памяти в результате старения. Можно считать, что пациент имеет AAMI, если его возраст составляет по меньшей мере 50 лет, и он удовлетворяет всем следующим критериям: а) пациент замечает ухудшение проявления памяти, б) пациент хуже выполняет стандартный тест на память по сравнению с молодыми взрослыми людьми, в) все другие очевидные причины ухудшения памяти, кроме обычного старения, исключены (другими словами, ухудшение памяти не может быть приписано другим причинам, таким как недавний сердечный приступ или повреждение головы, депрессия, неблагоприятные реакции на лечение, Болезнь Альцгеймера и др.).

Выражение "возрастное когнитивное ухудшение (ARCD)" касается ухудшений памяти и когнитивных способностей, которые являются обычным следствием старения у людей (например, Craik & Salthouse, 1992). Это также справедливо фактически для всех видов млекопитающих. Выражение "возрастное нарушение памяти" касается пожилых персон с объективными ухудшениями памяти относительно их молодых лет, но когнитивная деятельность которых является нормальной относительно людей их возраста (Crook et al., 1986). Соответствующее возрасту ухудшение памяти является менее разрушительным признаком, который подчеркивает, что это обычные эволюционные изменения (Crook, 1993; Lattabee, 1996), которые не являются патофизиологическими (Smith et al., 1991) и редко прогрессируют до явной деменции (Yangjohn & Crook, 1993). DSM-IV (1994) кодифицирует диагностическую классификацию ARCD.

Выражение "лечение" состояния или пациента касается стадий приема с целью получения целебных или желательных результатов, в том числе клинических результатов. Целебные или желательные клинические результаты включают, но не ограничены этим, облегчение или уменьшение одного или большего количества симптомов, связанных с возрастным когнитивным расстройством, задержка или замедление этого расстройства, уменьшение, временное облегчение или стабилизация этого нарушения и другие целебные результаты, такие как улучшение когнитивной функции или снижение скорости ухудшения когнитивной функции у субъектов с возрастным когнитивным расстройством или риском его возникновения.

"Снабжение" или "введение" вещества, соединения или агента субъекту можно выполнить, применяя один из разнообразных способов, известных специалистам в данной области. Например, соединение или агент можно вводить внутривенно, артериально, внутривенно, внутримышечно, внутривенно, подкожно, глазным способом, подязычно, перорально (путем проглатывания), интраназально (путем ингаляции), интраспинально, интрацеребрально и трансдермально (путем абсорбции, например, через кожные каналы). Соединение или агент можно также вводить подходящим образом при помощи перезагружаемых или биodeградируемых полимерных устройств или других устройств, например, пластырей и помп или препаратов, которые обеспечивают продолжительное, медленное или регулируемое высвобождение соединения или агента. Введение также можно осуществлять, например, за один или несколько раз и/или в течение одного или нескольких продолжительных периодов. В некоторых аспектах термин "снабжение" включает непосредственное введение, в том числе самостоятельный прием, и не прямое введение, в том числе акт предписания лекарства. Например, как здесь используется, пациента снабжает лекарством лечащий врач, который инструктирует пациента по поводу самостоятельного приема лекарства или приобретения лекарства, вводимого другими, и/или тот, кто обеспечивает пациента лекарством, отпускаемым по рецепту.

Подходящие способы введения субъекту вещества, соединения или агента также зависят, например, от возраста субъекта, от того, является ли субъект активным или неактивным во время введения, имеет ли субъект когнитивные нарушения во время введения, степени нарушения и химических и биологических свойств соединения или агента (например, растворимости, усвояемости, биодоступности, ста-

бильности и токсичности). Предпочтительно вводить субъекту соединение или агент перорально, например, путем проглатывания. В некоторых вариантах перорально вводимое соединение или агент представляет собой препарат с продолжительным высвобождением или медленным высвобождением, или вводят препарат с применением устройства для такого медленного или продолжительного высвобождения.

"Терапевтически эффективным количеством" лекарства или агента является количество лекарства или агента, которое, будучи введено субъекту, оказывает предполагаемый терапевтический эффект, например, улучшая когнитивную функцию субъекта, например, пациента с возрастным когнитивным расстройством или пациента, находящегося под риском его возникновения. Полный терапевтический эффект не обязательно имеет место при введении одной дозы и может иметь место только после введения серии доз. Таким образом, терапевтически эффективное количество можно вводить за один или более приемов. Точное эффективное количество, необходимое субъекту, зависит, например, от размера, здоровья и возраста субъекта, природы и степени когнитивного расстройства, терапевтических средств или комбинации терапевтических средств, выбранных для введения, и способа приема. Квалифицированный специалист может легко определить эффективное количество для данной ситуации посредством рутинного экспериментирования.

"Протеин-2 синаптических везикул (SV2)" представляет собой семейство белков синаптических везикул, которое состоит из трех членов: указанного SV2A, SV2B и SV2C. SV2A является наиболее широко распространенным членом семейства, экспрессируемым повсеместно в головном мозге. Эти протеины представляют собой интегральные мембранные белки и имеют низкий уровень гомологии (20-30%) с семейством бактериальных и грибковых транспортных белков с двенадцатью трансмембранными сегментами, которые транспортируют сахар, цитрат и ксенобиотики (Bajjalien et al., Science, 257: 1271-1273. (1992)). Протеины семейства SV2 присутствуют в головном мозге и эндокринных клетках и также присутствуют во всех синаптических и эндокринных везикулах. Сообщается, что протеины SV2 играют некоторую роль в нормальной синаптической функции и действуют на стадии созревания затравочных везикул, которые переводят везикулы в $Ca(2+)$ - и синаптотаксис-чувствительное состояние (Sudhof et al., 2009). Сообщается, что функционально протеины SV2 усиливают синаптические токи и повышают вероятность высвобождения трансмиттера при сохранении размера легко высвобождаемого пула везикул (Custer et al., 2006).

Выражение "SV2A-ингибитор" относится к любому агенту, веществу или соединению, которое связывается с SV2A и снижает синаптическую функцию посредством уменьшения высвобождения пресинаптических везикул (см., например, работы Noyer et al. 1995; Fuks et al. 2003; Lynch et al. 2004; Gillard et al. 2006; Custer et al., 2006; Smedt et al., 2007; Yang et al., 2007; и пример 8 из WO 2001/62726, которые все специально включены здесь в виде ссылок). Вещество, или соединение, или агент до тех пор является SV2A-ингибитором (даже если он сам не связывается с SV2A), пока он вызывает или воздействует на способность другого соединения или агента связывать SV2A или снижать синаптическую функцию посредством уменьшения высвобождения пресинаптических везикул. SV2A-ингибиторы, которые здесь используют, включают их фармацевтически приемлемые соли и сольваты.

В некоторых вариантах изобретения активностью SV2A-ингибитора является бриварацетам, или его фармацевтически приемлемая соль, или сольват, или композиция, содержащая такой бриварацетам, и изобретение касается такого бриварацетама или бриварацетамсодержащих композиций и способа применения такого бриварацетама или такой композиции для улучшения когнитивной функции у пациентов, страдающих от возрастного когнитивного расстройства или с риском его возникновения, причем указанный способ включает стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества бриварацетама или содержащей его композиции. В других вариантах используют аналоги или производные бриварацетама и его фармацевтически приемлемую соль или сольват.

Субъект, подлежащий лечению способами и композициями по этому изобретению, демонстрирует возрастное когнитивное расстройство или находится под риском его возникновения. В некоторых вариантах возрастное когнитивное расстройство включает (без ограничения) MCI, ARCD и AAMI.

Будет оценено, что соединения, применяемые в композициях и способах по настоящему изобретению, предпочтительно должны легко проникать через гематоэнцефалический барьер, если их вводят периферически. Однако соединения, которые не могут проникать гематоэнцефалический барьер, тем не менее, можно эффективно вводить непосредственно в центральную нервную систему, например, интравентрикулярным способом.

В некоторых вариантах терапевтические способы по изобретению включают введение композиции соединения или агента наружно, системно или локально. Например, терапевтические композиции соединения по изобретению можно приготовить в виде препарата для приема, например, посредством инъекции (например, внутривенно, подкожно или внутримышечно), ингаляции или инсuffляции (через рот или через нос) или посредством перорального, буккального, подъязычного, трансдермального, назального или парентерального приема. Композиции описанных здесь можно приготовить как часть имплантата или устройства или приготовить для медленного или продолжительного высвобождения. При введении терапевтическая композиция соединений для применения по этому изобретению представляет собой фи-

зиологически приемлемую форму, не содержащую пирогенов. Методики и препараты, как правило, можно найти в работе Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA.

В некоторых вариантах фармацевтические композиции, подходящие для парентерального приема, могут содержать SV2A-ингибитор в комбинации с одним или большим количеством фармацевтически приемлемых стерильных изотонических водных или неводных растворов, дисперсий, суспензий или эмульсий, или стерильных порошков, которые можно восстановить непосредственно перед применением до стерильных растворов или дисперсий для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические факторы, растворенные вещества, которые делают препарат изотоничным крови предполагаемого реципиента, или суспендирующие или загущающие агенты. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях по изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и подобные) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и органические сложные эфиры для инъекций, например этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, применяя покрывающие материалы, такие как лецитин, сохраняя требуемый размер частиц в случае дисперсий и применяя ПАВ.

Композиция, содержащая SV2A-ингибитор, также может содержать адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предупреждение действия микроорганизмов можно гарантировать, включая различные антибактериальные и противогрибковые агенты, например парабен, хлорбутанол, фенол, сорбиновую кислоту и подобные. Также может быть желательно включать в композиции изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и подобные. Кроме того, можно достичь продолжительной абсорбции фармацевтической формы, вводимой посредством инъекции, включая агенты, которые замедляют абсорбцию, такие как моностеарат алюминия и желатин.

В некоторых вариантах изобретения можно вводить композиции, содержащие SV2A-ингибитор, перорально, например, в виде капсул, облаток, пилюль, таблеток, лепешек (используя ароматизированную основу, обычно сахарозу и гуммиарабик или трагакант), порошков, гранул, или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, или в виде жидкой эмульсии "масло в воде" или "вода в масле", или в виде эликсира или сиропа, или в виде пастилок (используя инертную основу, такую как желатин и глицерин, или сахарозу и гуммиарабик) и подобного, причем каждая форма содержит предвременно определенное количество SV2A-ингибитора в качестве активного ингредиента.

В твердых дозированных формах для перорального приема (капсулах, таблетках, пилюлях, драже, порошках, гранулах и подобном) могут быть смешаны одна или более композиций, содержащих SV2A-ингибитор, с одним или большим количеством фармацевтически приемлемых носителей, таких как цитрат натрия, или дикальцийфосфат, и/или любой из следующих агентов: (1) наполнители или разбавители, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связующие, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или гуммиарабик; (3) увлажнители, такие как глицерин; (4) разрыхлители, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; (5) агенты, замедляющие растворение, такие как парафин; (6) ускорители абсорбции, такие как соединения четвертичного аммония; (7) смачивающие агенты, такие как, например, цетиловый спирт и глицеринмоностеарат; (8) абсорбенты, такие как каолиновая и бентонитовая глина; (9) лубриканты, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; и (10) красящие агенты. В случае капсул, таблеток и пилюль фармацевтические композиции могут также содержать буферные агенты. Твердые композиции аналогичного типа можно также применять в качестве наполнителей в мягких и твердых заполненных желатиновых капсулах, используя такие наполнители как лактоза или молочный сахар, а также полиэтиленгликоли с высокой молекулярной массой и подобные.

Жидкие дозированные формы для перорального приема включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Кроме SV2A-ингибитора жидкие дозированные формы могут содержать инертные разбавители, обычно применяемые в данной области, такие как вода или другие растворители, агенты, способствующие растворению, и эмульгаторы, такие как этиловый спирт (этанол), изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, масло из ростков пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и жирнокислотные эфиры сорбитана и их смеси. Кроме инертных разбавителей пероральные композиции также могут включать адъюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подсластители, вкусовые, красящие агенты, отдушки и консерванты.

Суспензии могут содержать кроме активного соединения суспендирующие агенты, такие как этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и сорбитановые сложные эфиры, микрокристаллическую целлюлозу, метатгидроксид алюминия, бентонит, агар-агар, трагакант и их смеси.

Как описано выше, композиции можно вводить, обеспечивая медленное, регулируемое или про-

должительное высвобождение. Используемое здесь выражение "продолжительное высвобождение" широко признано в области фармацевтических наук и используется здесь для обозначения регулируемого высвобождения активного соединения или агента из дозированной формы в окружающую среду в течение продолжительного периода времени, например, за период, превышающий или равный одному часу. Дозированная форма с продолжительным высвобождением высвобождает лекарственное средство по существу с постоянной скоростью в течение продолжительного периода времени, или по существу постоянное количество лекарственного средства высвобождается пошагово в течение продолжительного периода времени. Используемое здесь выражение "продолжительное высвобождение" включает выражения "регулируемое высвобождение", "продолжительное высвобождение", "непрерывное высвобождение" или "медленное высвобождение", как эти термины используют в фармацевтических науках. В некоторых вариантах применяют дозированную форму с продолжительным высвобождением в виде пластыря или помпы.

Специалист в данной области, например, лечащий врач, способен легко определить количество SV2A-ингибитора(ов), необходимое для лечения субъекта с применением композиции по этому изобретению. Понятно, что режим дозирования определяют индивидуально, принимая во внимание, например, различные факторы, которые модифицируют действие SV2A-ингибиторов: тяжесть или стадию заболевания, способ приема и характеристики, уникальные для индивидуума, такие как возраст, масса, размер и степень когнитивного расстройства.

В данной области хорошо известно, что нормирование к площади поверхности тела является подходящим способом экстраполяции доз между видами. С целью расчета эквивалентной дозы для человека (HED) из дозы, применяемой при лечении возрастного когнитивного расстройства у крыс, можно использовать формулу: $HED \text{ (мг/кг)} = \text{крысиная доза (мг/кг)} \times 0,16$ (см. работу "Определение безопасной начальной дозы в клинических испытаниях для терапии у взрослых здоровых добровольцев", декабрь 2002, Center for Biologics Evaluation and Research). Например, применение этой формулы показывает, что доза 10 мг/кг для крыс эквивалентна 1,6 мг/кг для людей. Эта конверсия основана на более общей формуле: $HED = \text{доза для животного в мг/кг} \times (\text{масса животного в кг} / \text{масса человека в кг})^{0,33}$.

В некоторых вариантах изобретения доза SV2A-ингибитора составляет от 0,1 до 5 мг/кг/день (что для типичного пациента-человека массой 70 кг составляет от 7 до 350 мг/день). Дозы, которые можно применять, включают (но не ограничены) 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5 мг/кг/день. В вариантах доза составляет 1-2 мг/кг/день (что для типичного пациента-человека массой 70 кг составляет от 70-140 мг/день). В других вариантах изобретения доза SV2A-ингибитора составляет от 0,1 до 0,2 мг/кг/день. Можно также применять другие дозы, более высокие, промежуточные или меньшие, чем эти дозы, и специалист в данной области может определить дозы, следуя способам по этому изобретению.

В некоторых вариантах изобретения доза SV2A-ингибитора составляет от 0,01 до 2,5 мг/кг/день (что для типичного пациента-человека массой 70 кг составляет примерно 0,7-180 мг/день). Дозы, которые можно применять, включают (но не ограничены) 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,06, 0,08, 0,12, 0,14, 0,16, 0,18, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,4, 1,6, 1,8, 2,0, 2,2, 2,4, 2,5 мг/кг/день. В некоторых вариантах доза составляет 0,1-2,5 мг/кг/день (что для типичного пациента-человека массой 70 кг составляет примерно 7-180 мг/день). В некоторых вариантах доза составляет 0,4-2,5 мг/кг/день (что для типичного пациента-человека массой 70 кг составляет примерно 25-180 мг/день). В некоторых вариантах изобретения доза SV2A-ингибитора составляет от 0,6 до 1,8 мг/кг/день. В некоторых вариантах изобретения доза SV2A-ингибитора составляет от 0,04 до 2,5 мг/кг/день. В некоторых вариантах изобретения доза SV2A-ингибитора составляет от 0,06 до 1,8 мг/кг/день. Можно также применять другие дозы, более высокие, промежуточные или меньшие, чем эти дозы, и специалист в данной области может определить дозу, следуя способам по этому изобретению.

В некоторых вариантах изобретения интервал введения составляет 12 или 24 ч. Можно также осуществлять прием с меньшими интервалами, например один раз каждые 6 ч. В некоторых вариантах SV2A-ингибитор вводят каждые 12 или 24 ч при общей ежедневной дозе от 0,1 до 5 мг/кг (например, в случае приема каждые 12 ч ежедневной дозы 2 мг/кг, каждый прием составляет 1 мг/кг). В некоторых вариантах SV2A-ингибитор вводят каждые 24 ч при ежедневной дозе от 1 до 2 мг/кг. В другом варианте селективный SV2A-ингибитор вводят каждые 24 ч при ежедневной дозе 0,1-0,2 мг/кг. В некоторых вариантах SV2A-ингибитор вводят каждые 12 или 24 ч при ежедневной дозе от 0,01 до 2,5 мг/кг (например, в случае приема каждые 12 ч ежедневной дозы 0,8 мг/кг, каждый прием составляет 0,4 мг/кг). В некоторых вариантах SV2A-ингибитор вводят каждые 12 или 24 ч при ежедневной дозе от 0,1 до 2,5 мг/кг. В некоторых вариантах SV2A-ингибитор вводят каждые 12 или 24 ч при ежедневной дозе от 0,4 до 2,5 мг/кг. В некоторых вариантах SV2A-ингибитор вводят каждые 12 или 24 ч при ежедневной дозе от 0,6 до 1,8 мг/кг. В некоторых вариантах селективный SV2A-ингибитор вводят каждые 12 или 24 ч при ежедневной дозе 0,04-2,5 мг/кг. В некоторых вариантах селективный SV2A-ингибитор вводят каждые 12 или 24 ч при ежедневной дозе 0,06-1,8 мг/кг.

Если вводят SV2A-ингибитор при помощи имплантата, устройства или препарата для медленного или продолжительного высвобождения, то можно проводить введение один раз или большее число раз

периодически на протяжении всей жизни пациента, как необходимо. Для клинических применений можно также применять другие интервалы введения, промежуточные или более короткие, чем эти интервалы дозирования, что может определить специалист в данной области, следуя способам по этому изобретению.

Специалист в данной области может определить желательное время приема, проводя рутинные эксперименты. Например, SV2A-ингибитор можно вводить в течение периода 1-4 недель, 1-3 месяцев, 3-6 месяцев, 6-12 месяцев, 1-2 лет или более, до периода, составляющего целую жизнь пациента.

Рядовому специалисту в данной области будет понятно, что описанные здесь композиции и способы можно адаптировать и модифицировать подходящим образом для адресного использования и что описанные здесь композиции и способы можно использовать в других подходящих применениях, и что такие другие добавки и модификации не выходят за рамки области этого изобретения.

Данное изобретение легче понять из экспериментальных подробностей, которые приведены далее. Однако специалист в данной области легко оценит, что специфические способы и обсуждаемые результаты являются только иллюстративными для изобретения, которое описано более полно в вариантах, которые приведены далее.

Примеры

Введение и модели возрастного когнитивного расстройства

Считается, что к старению относятся различные состояния, характеризующиеся когнитивными расстройствами (например, возрастными нарушениями памяти [AAMI], умеренным когнитивным расстройством [MCI] и возрастным когнитивным ухудшением [ARCD]). Животные модели служат важным средством разработки и оценки методов лечения таких возрастных когнитивных расстройств. Признаки, которые характеризуют возрастное когнитивное расстройство на животных моделях, обычно распространяются на возрастное когнитивное расстройство у людей. Таким образом, эффективность на таких животных моделях прогнозирует эффективность у людей.

Из доступных моделей особо хорошо подходит для определения различия между когнитивным расстройством, относящимся к заболеванию, и расстройством, относящимся к старению, модель когнитивного расстройства у крыс Лонга-Эванса. Действительно, исчерпывающая поведенческая характеристика идентифицирует встречающуюся в природе форму когнитивного расстройства на аутбредной линии старых крыс Лонга-Эванса (Charles River Laboratories; Gallagher et al., *Behav. Neurosci.* 107: 618-626, (1993)). В поведенческой оценке с использованием водного лабиринта Морриса (MWM) крысы обучаются и помнят расположение спасательной платформы, руководствуясь конфигурацией пространственных меток, окружающих лабиринт. Исследуют когнитивный базис действия в пробных испытаниях, применяя определения пространственного смещения животных в поисках размещения спасательной платформы. Старые крысы в исследованной популяции не имеют затруднений в плавании к видимой платформе, но зависящее от возраста расстройство детектируют, когда платформа закамуфлирована, что требует использования пространственной информации. Действия индивидуальных старых крыс в аутбредной линии Лонга-Эванса сильно варьируются. Например, часть этих крыс действуют наравне с молодыми взрослыми животными. Однако примерно 40-50% выпадают из диапазона эффективности действия молодых животных. Это непостоянство среди старых крыс отражает правдоподобные индивидуальные различия. Таким образом, в популяции старых животных некоторые животные являются когнитивно неполноценными и обозначены как неполноценные вследствие возраста (AI), и другие животные не являются неполноценными и обозначены как старые животные без нарушений (AU). См., например, работы Colombo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 14195-14199, (1997); Gallagher и Burwell, *Neurobiol. Aging* 10: 691-708, (1989); Rapp и Gallagher, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 9926-9930, (1996); Nicolle et al., *Neuroscience* 74: 741-756, (1996) и Nicolle et al., *J. Neurosci.* 19: 9604-9610, (1999).

Авторы используют эту крысиную модель для идентификации генов, вовлеченных в возрастные изменения когнитивной функции.

Пример 1. Усиленная экспрессия генов SV2A у крыс с возрастными нарушениями

Поведенческая характеристика молодых, неполноценных вследствие возраста и старых крыс без нарушений в водном лабиринте Морриса (MWM)

Поведенческие тесты выполняют на молодых (4-месячных) и старых (24-месячных) самцах крыс Лонга-Эванса, не содержащих патогенов.

MWM-приспособление состоит из большого кругового бассейна (диаметр 1,83 м; высота, 0,58 м), заполненного водой (27°C), который непрозрачен вследствие добавления нетоксического пигмента или какого-либо другого вещества. В типичной версии теста "скрытая платформа" крыс обучают находить закамуфлированную белую спасательную платформу (высота 34,5 см), которая расположена в центре одного квадранта лабиринта примерно на 1,0 см ниже поверхности воды. Эту платформу можно возвращать обратно на дно резервуара или поднимать до ее обычного положения снаружи лабиринта во время поведенческого исследования. Расположение платформы остается постоянным от испытания к испытанию. Так как отсутствуют локальные метки, которые отмечают положение платформы, способность крыс эффективно определять ее местонахождение от любого исходного положения на периметре бассейна зависит от использования информации, окружающей лабиринт. Лабиринт окружен черными занавеска-

ми, к которым прикреплены белые рисунки, обеспечивая очертания пространственных меток. Вторую платформу (высотой 37,5 см) с поверхностью, покрашенной в черный цвет, поднимают на 2 см выше поверхности воды во время тренировки по меткам для контроля факторов, не имеющих отношения к распознаванию. Поведение крысы в бассейне регистрируют при помощи фотокамеры, которая подвешена на высоте 2,5 м над центром бассейна. Фотокамеру соединяют с системой видеослежения (HVS Image Advanced Tracker VP200) и персональным компьютером, использующим HVS программное обеспечение, разработанное Ричардом Бейкером из HVS Image, Hampton, UK.

MWM-протокол оптимизируют в отношении чувствительности к эффектам старения на познавательную способность и относительно определений достоверных индивидуальных различий в популяции старых аутбредных крыс Лонга-Эванса (Gallagher et al. *Behav. Neurosci.* 107:618-626, (1993)). Крыс подвергают трем испытаниям в день в течение 8 последовательных дней с интервалом между испытаниями 60 с. В каждом тренировочном испытании крысу выпускают в лабиринт из одной из четырех расположенных на равном расстоянии исходных позиций вокруг периметра бассейна. Исходная позиция меняется от испытания к испытанию, предотвращая, таким образом, применение стратегии ответа (например, всегда поворот налево от исходного положения для определения местонахождения спасательной платформы). Если крыса не определяет местонахождение спасательной платформы за 90 с в каком-либо испытании, экспериментатор направляет крысу к платформе, где она остается в течение 30 с. Каждое шестое испытание является пробным испытанием с целью оценки совершенствования пространственных смещений в лабиринте. В течение этих испытаний крыса плавает в течение 30 с, при этом платформа отведена на дно бассейна, за это время платформу поднимают до ее обычного положения для завершения испытания по спасению. При завершении протокола с использованием скрытой платформы крыс оценивают на приобретение навыков в отношении меток с использованием видимой платформы. Расположение этой платформы меняется от испытания к испытанию в одной сессии из 6 тренировочных испытаний.

Близость позиции животного относительно цели используют для анализа эффективности в тренировочном и пробном испытании. Мету близости получают, определяя позиции животного в лабиринте (10 раз в с), обеспечивая регистрацию расстояния от спасательной платформы в среднем за 1 с. Для пробных испытаний и тренировочных испытаний процедуру корреляции выполняют таким образом, чтобы эффективность испытаний была сравнительно объективной при различиях в расстоянии до цели от разных стартовых позиций на периметре бассейна. При выполнении этой корреляции рассчитывают среднюю скорость плавания для каждого испытания (длина пути/латентное состояние). Затем время, необходимое для плавания до цели с такой скоростью от стартовой позиции, используемой для испытания, удаляют из зафиксированного результата до компьютерного расчета эффективности испытания, т.е. совокупного расстояния в тренировочных испытаниях и среднего расстояния от цели в пробных испытаниях. Таким образом, предполагается, что оценки, полученные с использованием меры близости, отражают ошибку поиска, представляющую отклонения от оптимального поиска, т.е. прямого пути до цели, и поиска в непосредственной близости от этой позиции в течение пробных испытаний.

Компьютерные записи видеослежения компилируют, получая данные по эффективности для каждой крысы в лабиринте. Измерения в тренировочных испытаниях и пробных испытаниях анализируют методом вариационного анализа (ANOVA).

В одной серии испытаний эффективность во время тренировок со скрытой закамуфлированной платформой различается для групп, состоящих из молодых и старых крыс [$F(1,23)=12,69$, $p<0,002$]. В этой серии испытаний не наблюдают различий между группами для тренировочных испытаний по меткам с видимой платформой. В этой серии испытаний латентность спасения в течение тренировки по меткам в среднем составляет 9,36 с для молодых и 10,60 с для старых крыс.

Используют среднюю меру близости в интерполированных пробных испытаниях для расчета коэффициента обучаемости пространственной ориентации для каждого индивидуального субъекта, как подробно описано в работе Gallagher et al., *Behav. Neurosci.* 107: 618-26, (1993). Если крыса быстро обучается искать платформу близко к ее расположению, ее коэффициент обучаемости пространственной ориентации является низким. Всегда в одной серии испытаний старые крысы отличаются от молодых крыс [$F(1,23)=15,18$, $p<0,001$]. Старых крыс классифицируют как крыс без нарушений или с нарушениями относительно профиля индекса обучаемости для популяции молодых подопытных крыс. Старые крысы, которые попадают в диапазон нормативов для молодых крыс (значения индексов <241), обозначены как старые без нарушений (AU). Остальные старые субъекты, которые имеют значения индексов вне диапазона эффективности для молодых животных, обозначены как старые с нарушениями (AI).

Получение РНК от поведенчески охарактеризованных крыс

Двадцать четыре аутбредные крысы Лонга-Эванса, поведенчески охарактеризованные, как описано выше, умерщвляют, обезглавливая живых животных, для получения свежей ткани головного мозга. У 24 охарактеризованных крыс извлекают головной мозг и выполняют микродиссекцию зубчатой извилины гиппокампальной области из 500 микронных срезов, полученных через поперечную ось единой гиппокампальной формации (оба гиппокампа, левый и правый). В каждой группе имеется по 8 животных (AI,

AU и Y).

Выделяют общую РНК с применением реагента тризола (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) согласно стандартному протоколу (гомогенизация в реагенте тризоле с последующей экстракцией хлороформом и осаждение изопропанолом). Далее общую РНК очищают, применяя мини-набор RNeasy (Qiagen, Valencia, Calif.). Затем создают пробы кРНК из образцов РНК на оборудовании Johns Hopkins Microarray Core Facility, обычно согласно спецификациям Affymetrix.

Кратко говоря, 5 мкг общей РНК используют для синтеза первой цепи кДНК, применяя олигонуклеотидные пробы с 24 олиго-dT plus T7 промотором в качестве праймера (Proligo LLC, Boulder, Calif.) и систему Superscript Choice System (Invitrogen). После синтеза двухцепочечной кДНК продукт очищают экстракцией смесью фенол-хлороформ и генерируют биотинилированную антисмысловую кРНК посредством *in vitro* транскрипции, используя набор BioArray RNA High Yield Transcript Labeling (ENZO Life Sciences Inc., Farmingdale, N.Y.). Проводят фрагментацию 15 мкг биотинилированной кРНК при 94°C в течение 35 мин. (100 mM Трих-ацетат, pH 8,2, 500 mM KOAC, 150 mM MgOAC). 10 мкг общей фрагментированной кРНК гибридизируют в анализе RAT genome 230-2 Affymetrix GeneChip array в течение 16 ч при 45°C и постоянном вращении (60 об./мин).

Затем используют Affymetrix Fluidics Station 450 для промывки и окрашивания чипов, удаляя негибридизованную мишень и проводя инкубацию с конъюгатом стрептавидин-фикоэритрин для окрашивания биотинилированной кРНК. Затем окрашивание усиливают, используя козий иммуноглобулин-G (IgG) в качестве блокирующего реагента и биотинилированное анти-стрептавидин антитело (козье), с последующей стадией второго окрашивания конъюгатом стрептавидин-фикоэритрин.

Для контроля качества общей РНК из образцов используют технологию Agilent Bioanalyzer, Lab on a Chip, для подтверждения, что все образцы имеют оптимальные соотношения рРНК (1:2 для 18S и 28S, соответственно) и чистые рабочие системы.

Для контроля качества гибридизации изображение чипа и сравнения между чипами рассматривают следующие параметры: коэффициент пересчета - относится к общей интенсивности чипа для подтверждения одинаковой интенсивности сигнала и окрашивания образцов; основа - оценка неспецифической или кросс-гибридизации; процент существующих сигналов: процент транскрипций, которые считаются существенно гибридизованными с чипом (имеются) по алгоритму; глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) (3'/5'): представление целостности РНК по определению соотношения областей 3' к 5' для гена "домашнего хозяйства" GAPDH, ее наличие в чипе и соотношение, близкое к 1 выступает в поддержку хорошей целостности целевого объекта (образца); пики (BioB/BioC) для подтверждения уровня детектирования и чувствительности после гибридизации.

Анализ данных Microarray

Детектируют флуоресценцию, используя сканер Affymetrix G3000 GeneArray Scanner, и выполняют анализ изображения каждого генного чипа, используя программное обеспечение GeneChip Operating System 1.1.1 (GCOS) от Affymetrix и стандартные настройки. Все наборы генных чипов используют короткие олигонуклеотиды для генов в образце РНК.

Для сравнения между различными чипами применяют глобальное масштабирование, масштабирование всех наборов проб до назначенной интенсивности (TGT) 150. Общее количество существующих сигналов и коэффициенты масштабирования одинаковы для всех чипов. Дополнительный анализ на присутствие/отсутствие и статистическое различие выполняют область за областью следующим образом. Определяют, что наборы проб присутствуют в области, если они имеют существующий сигнал у четырех из восьми животных в одной группе.

Наборы проб снабжают комментариями, используя аннотацию Affymetrix от 20 июня 2005, и идентифицируют все наборы проб, представляющие специфический ген.

Выполняют анализ ANOVA величин сигналов набора проб для всех имеющихся наборов проб, объединяя две группы животных и сравнивая их с третьей группой. Выполняют анализ "AI ANOVA", где AU-группа объединена с группой молодых животных, по сравнению с AI-группой.

Рассчитывают корреляции Пирсона, сравнивающие величины сигналов набора проб с показателями обучаемости для старых животных (исключая молодых) по всем имеющимся наборам проб. Как показано на фиг. 1, экспрессия генов, кодирующих SV2A, существенно повышается у старых индивидуумов с нарушениями (AI) относительно молодых индивидуумов (Y) и старых индивидуумов без нарушений (AU) в серии экспериментов, выполненных выше. Эти результаты показывают, что повышенная SV2A экспрессия коррелирует с развитием возрастного когнитивного расстройства.

Пример 2. Эффект SV2A-ингибитора у крыс с возрастными нарушениями

Результаты исследований в водном лабиринте Морриса

Шесть крыс Лонга-Эванса с возрастными нарушениями (AI) (как охарактеризовано выше) тестируют на их запоминание новой пространственной информации в MWM, в различных условиях обработки лекарство/контроль (контрольный носитель и два разных уровня доз леветирацетама). MWM протокол по существу аналогичен протоколу, описанному в примере 1. Специально для этого исследования проводят испытание на сохранение данных в памяти после тренировочных испытаний, как описано ниже.

AI-крысам предоставляют шесть тренировочных испытаний за тренировочный день с 60-

секундным интервалом каждый раз между тренировочными испытаниями в течение двух последовательных дней. В каждом тренировочном испытании крысу выпускают в лабиринт из одной из четырех исходных позиций, расположенных на равном расстоянии вокруг периметра бассейна. Если крыса не определяет местонахождение спасательной платформы за 90 с в каком-либо испытании, экспериментатор направляет крысу к платформе, где она остается в течение 30 с. В каждый тренировочный день за 30 мин - 1 ч до всех тренировочных испытаний AI-крыс предварительно обрабатывают в условиях по одному из трех вариантов: 1) контрольный носитель (0,9% физиологический раствор); 2) SV2A-ингибитор (5 мг/кг/день) и 3) SV2A-ингибитор (10 мг/кг/день); посредством внутривенной (i.p.) инъекции. Шесть тех же AI-крыс используют для всех испытаний, так что каждые условия обработки тестируют на всех шести крысах. Следовательно, в противовес любым возможным смещениям расположение спасательной платформы и пространственные метки, окружающие водный лабиринт, различны для трех вариантов условий обработки. Следовательно, применяя один набор расположений и пространственных меток, двух крыс обрабатывают контрольным физиологическим раствором, двух леветирацетамом (5 мг/кг/день) и двух - SV2A-ингибитор (10 мг/кг/день). Применяя второй набор расположений и пространственных меток, двух крыс, обработанных контрольным физиологическим раствором в первом тесте, обрабатывают либо SV2A-ингибитором (5 мг/кг/день), либо SV2A-ингибитором (10 мг/кг/день) и двух крыс, предварительно обработанных леветирацетамом (5 мг/кг/день), обрабатывают либо контрольным физиологическим раствором, либо леветирацетамом (10 мг/кг/день) и двух крыс, предварительно обработанных SV2A-ингибитором (10 мг/кг/день), обрабатывают либо контрольным физиологическим раствором, либо SV2A-ингибитором (5 мг/кг/день). Применяя последний набор расположений и пространственных меток, снова меняют группировку крыс таким образом, что каждую группу обрабатывают в условиях, отличных от условий предыдущих обработок.

После второго тренировочного дня и завершения двенадцати тренировочных испытаний (в течение двух дней) крысу возвращают в ее родную клетку и помещают в жилую комнату. Через 24 ч отсрочки после последнего тренировочного испытания крысу подвергают одному тестовому испытанию ("испытанию на сохранение данных в памяти"), которое представляет собой аналогичную MWM-задачу, как и тренировочные испытания, но удалив спасательную платформу.

Для испытания на сохранение данных в памяти MWM-круговой бассейн делят на 4 квадранта. Особый квадрант, где размещена спасательная платформа в тренировочных испытаниях, обозначают "целевой квадрант". Особую область, где расположена платформа в тренировочных испытаниях, обозначают "целевое кольцо". В испытании на сохранение данных в памяти определяют время, которое AI-крысы проводят, плавая в целевом квадранте, и затем строят график как процент от общего времени плавания. На фиг. 2 показаны результаты одного такого набора испытаний на сохранение данных в памяти. Определяют также время, которое AI-крысы проводят в целевом кольце. В испытании на сохранение данных в памяти, время которое AI-крысы проводят в целевом квадранте, составляет примерно 25%, что соответствует эффективности, эквивалентной результатам в отсутствие в памяти информации о местоположении платформы. Эта эффективность несущественно улучшена в группе, животные которой обработаны леветирацетамом при 5 мг/кг/день. Однако группа, животные которой обработаны SV2A-ингибитором при 10 мг/кг/день, демонстрирует существенно улучшенную память по сравнению с контрольными животными, обработанными носителем, на что указывает существенное увеличение времени, проводимого в целевом квадранте, примерно до 35% от общего времени плавания. Этот уровень эффективности эквивалентен для молодых и старых крыс без нарушений, указывая, что лечение леветирацетамом 10 мг/кг/день дает существенное восстановление способности AI-крыс находить оптимальный маршрут в этом MWM. Эффективность лечения леветирацетамом 10 мг/кг/день также видна по времени, проводимому в целевом кольце.

Результаты исследований в лабиринте с радиальными рукавами

Эффекты SV2A-ингибитора на сохранение в памяти пространственных данных для старых крыс с нарушениями (AI) оценивают, ставя поведенческую задачу в лабиринте с радиальными рукавами (RAM), используя контрольный носитель и пять различных уровней дозировки SV2A-ингибитора (1,25, 2,5, 5, 10 и 20 мг/кг/день). RAM-поведенческие испытания проводят на десяти AI-крысах. Все шесть вариантов условий обработки тестируют на всех десяти крысах, как описано выше для MWM-исследования.

Используемая RAM-установка состоит из восьми равноудаленных рукавов. От каждой грани октагональной центральной платформы (диаметр 30 см, высота 51,5 см) выступает рукав приподнятого лабиринта (ширина 7 см × длина 75 см). Прозрачные боковые стенки на рукавах имеют высоту 10 см и расположены под углом 65°, образуя желоб. В дальнем конце каждого рукава размещают кювету с кормом (диаметр 4 см, глубина 2 см). В качестве награды используют Froot Loops™ (Kellogg Company). Блоки, сконструированные из Plexiglas™ (высота 30 см × ширина 12 см), можно расположить так, чтобы они препятствовали входу в какой-либо рукав. Вокруг установки с лабиринтом предусмотрены также многочисленные дополнительные метки.

AI-крыс сначала подвергают предтранировочному тестированию (Chappell et al. *Neuropharmacology* 37: 481-487, 1998). Предтранировочный тест состоит из фазы привыкания (4 дня), тренировочной фазы со стандартной задачей успех-перемещение (18 дней), другой тренировочной фазы (14 дней), на которой

назначают краткую отсрочку между презентацией подгруппы рукавов, назначенной экспериментатором (например, 5 рукавов доступны и 3 рукава заблокированы), и завершения, включающего задачу успешного перемещения с восемью рукавами (т.е., все восемь рукавов доступны).

На фазе привыкания крыс знакомят с лабиринтом в течение 8-минутной сессии на протяжении четырех последовательных дней. В каждой из этих сессий разбрасывают кормовое вознаграждение по RAM, сначала на центральной платформе и в рукавах, и затем постепенно ограничиваясь рукавами. После этой фазы привыкания применяют стандартный тренировочный протокол, в котором располагают гранулу корма в конце каждого рукава. Крыс подвергают одному испытанию каждый день в течение 18 дней. Ежедневное испытание заканчивают, когда все восемь гранул корма получены, или когда сделано 16 попыток, или истекли 15 мин. По завершении этой тренировочной фазы проводят вторую тренировочную фазу, на которой повышается требование к памяти посредством введения краткой отсрочки во время испытания. Вначале каждого испытания блокируют три рукава восьмирукавного лабиринта. Крысам позволяют получать корм в пяти рукавах, к которым разрешен доступ в течение этой начальной "информационной фазы" испытания. Затем крыс удаляют из лабиринта на 60 с, в течение которых убирают из лабиринта барьеры, разрешая, таким образом, доступ ко всем восьми рукавам. Затем крыс помещают обратно в центр платформы и разрешают получить оставшиеся кормовые награды в течение этой фазы испытания "теста с отсрочкой". Идентичность и конфигурация рукавов варьируются на протяжении испытаний.

Отслеживают количество "ошибок", которые делают AI-крысы в течение фазы теста с отсрочкой. Ошибка случается в испытании, если крысы входят в рукав, из которого уже забрали корм в части испытания до отсрочки, или если они повторно посещают рукав, который уже посещали в сессии после отсрочки.

По завершении предтренировочного теста крыс подвергают испытаниям с более продолжительными интервалами отсрочки, т.е. с отсрочкой в один час между информационной фазой (презентация с несколькими заблокированными рукавами) и тестом на сохранение информации в памяти (презентация со всеми рукавами). В течение интервала отсрочки крыс оставляют вне лабиринта в исследовательской комнате на тележках в их индивидуальных родных клетках. AI-крыс предварительно обрабатывают за 30-40 мин до ежедневных испытаний, вводя однократную дозу по одному из следующих вариантов условий: 1) контрольный носитель (0,9% физиологический раствор); 2) SV2A-ингибитор (1,25 мг/кг/день); 3) SV2A-ингибитор (2,5 мг/кг/день); 4) SV2A-ингибитор (5 мг/кг/день); 5) SV2A-ингибитор (10 мг/кг/день); 6) SV2A-ингибитор (20 мг/кг/день), посредством внутривенной (i.p.) инъекции. Инъекции делают через день, чередуя с днями промывки. В течение 23 дней тестирования каждую AI-крысу обрабатывают в условиях по всем шести вариантам. В противовес любым возможным смещениям оценивают эффект лекарственного средства, применяя серии возрастающих-убывающих доз, т.е. серии доз дают сначала в порядке возрастания и затем повторяют в порядке убывания. Следовательно, для каждой дозы имеется два определения.

В контексте введения различных доз SV2A-ингибитора и контрольного носителя применяют параметрические статистики (парные t-тесты) для сравнения эффективностей в тесте на удержание в памяти информации AI-крысами в версии RAM задачи с отсрочкой в один час (см. фиг. 3). Среднее количество ошибок, которые случаются в испытаниях, также существенно меньше при лечении SV2A-ингибитором 5 мг/кг/день (среднее количество ошибок $\pm$ стандартное отклонение от среднего (SEM) = $0,75 \pm 0,32$) и 10 мг/кг/день (среднее количество ошибок $\pm$ SEM = $0,80 \pm 0,27$), чем при использовании контрольного носителя (среднее количество ошибок $\pm$ SEM = $2,00 \pm 0,42$). Относительно лечения контрольным носителем: SV2A-ингибитор существенно улучшает эффективность памяти при 5 мг/кг/день ($t(9)=2,18$, $p=0,057$) и 10 мг/кг/день ($t(9)=2,37$, $p=0,042$).

Для расчета эквивалентной дозы для человека (HED) авторы применяют формулу: $HED (мг/кг) = \text{доза для крыс (мг/кг)} \times 0,16$ (см. работу "Определение безопасной начальной дозы в клинических испытаниях терапии на взрослых здоровых добровольцах", декабрь 2002, Center for Biologics Evaluation and Research) для дозировки SV2A-ингибитора с целью лечения возрастного когнитивного расстройства у людей. Следовательно, доза 5 мг/кг/день для крыс эквивалентна 0,8 мг/кг/день для людей и доза 10 мг/кг/день для крыс эквивалентна 1,6 мг/кг/день для людей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

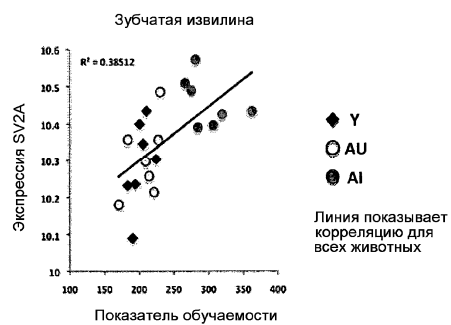
1. Применение фармацевтической композиции, содержащей бриварацетам или его фармацевтически приемлемую соль в количестве 0,7-180 мг, для улучшения когнитивной функции у субъекта с возрастным когнитивным расстройством или риском его возникновения.

2. Применение фармацевтической композиции по п.1, где бриварацетам или его фармацевтически приемлемая соль в количестве 5-140 мг.

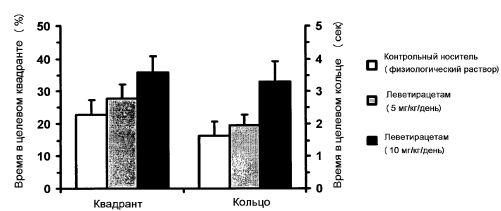
3. Применение фармацевтической композиции по п.1, где бриварацетам или его фармацевтически приемлемая соль в количестве 7-15 мг.

4. Применение фармацевтической композиции по п.1, где бриварацетам или его фармацевтически приемлемая соль в количестве 2,5-180 мг.

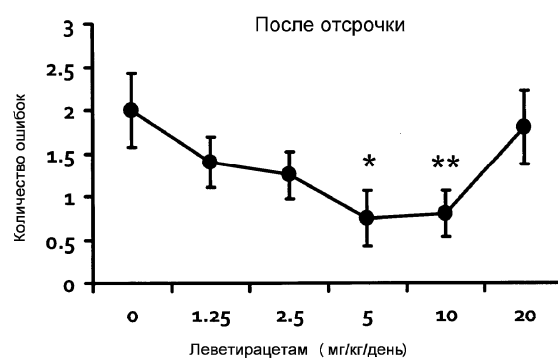
5. Применение фармацевтической композиции по п.1, где бриварацетам или его фармацевтически приемлемая соль в количестве 4,0-130 мг.



Корреляции:
Все: $r = 0.62$
Старые: $r = 0.61$
Фиг. 1



Фиг. 2



* $t(9) = 2.18, p = 0.057$
** $t(9) = 2.37, p = 0.042$
Фиг. 3

