

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201792437** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.04.30

(22) Дата подачи заявки
2016.05.17

(51) Int. Cl. **A61M 1/16** (2006.01)
B01D 11/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СТАРЕНИЕМ

(31) **62/163,222**

(32) **2015.05.18**

(33) **US**

(86) **PCT/US2016/032907**

(87) **WO 2016/187217 2016.11.24**

(88) **2017.01.05**

(71) Заявитель:

**ЗЕ БОАРД ОФ ТРАСТИЗ ОФ ЗЕ
ЛЕЛАНД СТЭНФОРД ДЖУНИОР
ЮНИВЕРСИТИ; ЗЕ РЕГЕНТС
ОФ ЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ
КАЛИФОРНИЯ; АЛКАХЕСТ,
ИНК.; Ю. С. ГОВЕРНМЕНТ ЭЗ
РЕПРЕЗЕНТИД БАЙ ДЕПАРТМЕНТ
ОФ ВЕТЕРАНС ЭФФЭЙРС (US)**

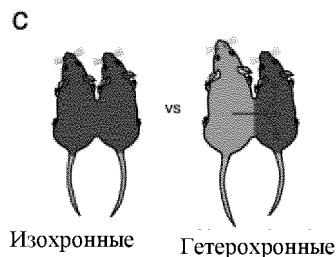
(72) Изобретатель:

**Висс-Корэй Антон, Вилледа Саул А.,
Николич Кароли (US)**

(74) Представитель:

**Угрюмов В.М., Лыу Т.Н., Глухарёва
А.О., Гизатуллина Е.М., Карпенко
О.Ю., Строкова О.В., Дементьев В.Н.
(RU)**

(57) Предполагаются способы лечения взрослого млекопитающего от нарушения, ассоциированного со старением. Аспекты способов включают в себя снижение уровня β 2-микроглобулина (B2M) у млекопитающего в степени, достаточной для лечения млекопитающего от нарушения, ассоциированного со старением. Ряд нарушений, ассоциированных со старением, можно лечить посредством практического осуществления способов, причем данные нарушения включают в себя когнитивные нарушения.



201792437

A1

A1

201792437

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СТАРЕНИЕМ

ОПИСАНИЕ

Права правительства

Настоящее изобретение было выполнено при правительственной поддержке по контрактам AG027505, OD012178 и TR000004, предоставленным Национальными институтами здравоохранения США. Правительство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

Ссылка на родственные заявки

В соответствии с § 119 (е) статьи 35 Кодекса законов США (U.S.C.) согласно настоящей заявке испрашивается приоритет по дате подачи предварительной заявки на патент США с серийным номером 62/163222, поданной 18 мая 2015 года, причем раскрытие этой заявки включено в данный документ посредством ссылки.

Данная заявка также является частично продолжающей заявкой для заявки на патент США с серийным номером 14/280939, поданной 19 мая 2014 года; причем эта заявка является продолжающей заявкой для заявки на патент США с серийным номером 13/575437, поданной 9 октября 2012 года, на данный момент отозванной; причем данная заявка представляет собой перешедшую в национальную фазу в США РСТ заявку с серийным номером РСТ/US2011/022916, поданную 28 января 2011 года; причем согласно этой заявке в соответствии с § 119 (е) статьи 35 U.S.C. испрашивается приоритет по дате подачи предварительной заявки на патент США с серийным номером 61/298998, поданной 28 января 2010 года; причем раскрытия этих заявок включены в данный документ посредством ссылки.

Введение

Старение в организме сопровождается накоплением изменений со временем. В нервной системе старение сопровождается структурными и нейрофизиологическими изменениями, которые приводят к снижению когнитивных способностей и чувствительности к дегенеративным нарушениям у здоровых индивидов. (Heeden & Gabrieli, "Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience," Nat. Rev. Neurosci. (2004) 5: 87-96; Raz et al., "Neuroanatomical correlates of cognitive aging: evidence

from structural magnetic resonance imaging," *Neuropsychology* (1998) 12:95-114; Mattson & Magnus, "Ageing and neuronal vulnerability," *Nat. Rev. Neurosci.* (2006) 7: 278-294; и Rapp & Heindel, "Memory systems in normal and pathological aging," *Curr. Opin. Neurol.* (1994) 7:294-298). В эти изменения включены в потеря синапсов и потеря функции нервной ткани, которая является ее результатом. Таким образом, несмотря на то что значительная гибель нейронов, как правило, не наблюдается при естественном процессе старения, нейроны в стареющем головном мозге уязвимы к сублетальным возрастным изменениям в структуре, целостности синапсов и процессинге молекул на синапсе, все из которых нарушают когнитивную функцию.

Дополнительно к нормальной потере синапсов в ходе естественного старения потеря синапсов является ранним патологическим явлением, общим для многих нейродегенеративных состояний, и она наилучшим образом коррелирует с нейронным и когнитивным нарушением, ассоциированным с этими состояниями. Действительно, старение остается единственным наиболее преобладающим фактором риска для связанных с деменцией нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера (AD) (Bishop et al., "Neural mechanisms of ageing and cognitive decline," *Nature* (2010) 464: 529-535 (2010); Heeden & Gabrieli, "Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience," *Nat. Rev. Neurosci.* (2004) 5:87-96; Mattson & Magnus, "Ageing and neuronal vulnerability," *Nat. Rev. Neurosci.* (2006) 7:278-294).

По мере того как возрастает продолжительность жизни людей, все большая часть населения страдает от когнитивных нарушений, ассоциированных со старением, что делает крайне важным выявление средств, под действием которых поддерживается целостность когнитивных процессов посредством защиты от эффектов старения или даже противодействия им (Hebert et al., "Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census," *Arch. Neurol.* (2003) 60:1119-1122; Bishop et al., "Neural mechanisms of ageing and cognitive decline," *Nature* (2010) 464:529-535).

β -2-микроглобулин (B2M) представляет собой компонент главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса, комплекса из нескольких белков, обнаруживающегося на поверхности практически всех ядерных клеток млекопитающих. Эти комплексы функционируют посредством презентирования фрагментов чужеродных антигенов или пептидов на поверхности клетки для того, чтобы иммунная система могла распознавать и уничтожать инфицированные клетки. Белки-компоненты МНС I класса кодируются несколькими генами, каждый из которых имеет несколько аллелей, и типы экспрессируемых МНС I класса варьируют у индивидов. Вследствие того, что МНС

является полиморфным, он является важным фактором, который следует учитывать при трансплантации органов, поскольку иммунная система хозяина может отторгать органы с чужеродными МНС. В злокачественных клетках экспрессия МНС может быть дефектной, что позволяет таким клеткам избегать выявления и уничтожения иммунной системой.

Несвязанный внеклеточный В2М также обнаруживается в человеческих физиологических жидкостях, таких как сыворотка крови, моча и спинномозговая жидкость. Вследствие своего небольшого размера белок нормально фильтруется из крови, а затем реабсорбируется в некотором количестве почкой. Высокие концентрации В2М в сыворотке крови часто сопутствуют наличию нескольких заболеваний, таких как неходжкинская лимфома и менингит (Hällgren et al., "Lactoferrin, lysozyme, and beta 2-microglobulin levels in cerebrospinal fluid: differential indices of CNS inflammation," *Inflammation* (1982) 6:291-304; et al., "Prognostic significance of serum beta-2 microglobulin in patients with non-Hodgkin lymphoma," *Oncology* (2014) 87:40-7). Если он присутствует в организме в сыворотке в высоких концентрациях, белок может образовывать амилоидные фибриллы (Corland & Heegaard, "B (2)-microglobulin amyloidosis," *Sub-cellular Biochemistry* (2012) 65:517-40). Отложение В2М в тканях и жидкостях организма как осложнение хронического заболевания почек у индивидов, проходящих диализ, подвергалось всестороннему изучению. У пациентов с пониженной функцией почек отложение ассоциировано со слабостью и болью в суставах и костях. Измеренные уровни В2М в моче указывают на повреждение почек и нарушения фильтрации (Acchiardo et al., "Beta 2-microglobulin levels in patients with renal insufficiency," *American Journal of Kidney Diseases* (1989) 13:70-4; Astor et al., "Serum Beta-2-microglobulin at discharge predicts mortality and graft loss following kidney transplantation," *Kidney International* (2013) 84:810-817).

Поскольку белковые агрегаты В2М играют роль в провоцировании остеоартрита, существует опасение, что белок может быть токсичным для нервных клеток, чувствительных к аномальным отложениям белков (Giorgetti et al., "beta2-Microglobulin is potentially neurotoxic, but the blood brain barrier is likely to protect the brain from its toxicity," *Nephrology Dialysis Transplantation* (2009) 24:1176-81). Белок был вовлечен в развитие нейронов, нормальную гиппокамп-зависимую память и образование синапсов и пластичность синапсов (Bilousova et al., "Major histocompatibility complex class I molecules modulate embryonic neuritogenesis and neuronal polarization," *Journal of Neuroimmunology* (2012) 247:1-8; Harrison et al., "Human brain weight is correlated with

expression of the ‘housekeeping genes’ beta-2-microglobulin and TATA-binding protein,” *Neuropathology and Applied Neurobiology* (2010) 36:498-504). Изменения в белках МНС I класса, таких как бета-2-микроглобулин, могут нарушать синаптическую пластичность и приводить к когнитивным расстройствам в стареющем, поврежденном или пораженном заболеванием головном мозге (Nelson et al., “MHC class I immune proteins are critical for hippocampus-dependent memory and gate NMDAR-dependent hippocampal long-term depression,” *Learning & Memory* (2013) 20:505-17). Недостаточность В2М также может приводить в результате к потере асимметрии между левой и правой частями области гиппокампа в головном мозге (Kawahara et al., “Neuronal major histocompatibility complex class I molecules are implicated in the generation of asymmetries in hippocampal circuitry,” *The Journal of Physiology* (2013) 591:4777-91).

Кроме того, В2М служит в качестве молекулярного маркера, который можно применять для определения ослабленного иммунитета или активации иммунных реакций в центральной нервной системе (Svatoňová et al., “Beta2-microglobulin as a diagnostic marker in cerebrospinal fluid: a follow-up study,” *Disease Markers* (2014) 2014). Уровни белка могут указывать на степень воспалительной реакции в центральной нервной системе. В обзоре В2М и его применения в качестве маркера заболеваний говорится о том, что повышенные уровни В2М в спинномозговой жидкости отражают рассеянный склероз, поражение нервной системы при болезни Бехчета, саркоидоз, комплекс синдром приобретенного иммунодефицита-деменция и метастазы злокачественных опухолей в оболочки головного мозга (Adachi, “Beta-2-microglobulin levels in the cerebrospinal fluid: their value as a disease marker. A review of the recent literature,” *European Neurology* (1991) 31:181-5). Другие исследования говорят о том, что В2М потенциально может служить в качестве клинического маркера для риска когнитивного нарушения или в качестве инструмента для прогнозирования развития заболевания у индивидов, страдающих от ряда заболеваний, в том числе почечной недостаточности, ВИЧ-инфекции и болезни Альцгеймера (Almeida, “Cognitive impairment and major depressive disorder in HIV infection and cerebrospinal fluid biomarkers,” *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* (2013) 71:689-92; Annunziata et al., “Serum beta-2-microglobulin levels and cognitive function in chronic dialysis patients,” *Clinica Chimica Acta* (1991) 201:139-41; Doecke et al., “Blood-based protein biomarkers for diagnosis of Alzheimer disease,” *Archives of Neurology* (2012) 69:1318-25; Isshiki et al., “Cerebral blood flow in patients with peritoneal dialysis by an easy Z-score imaging system for brain perfusion single photon emission tomography,” *Therapeutic Apheresis and Dialysis* (2014) 18:291-6).

Повышенные уровни в сыворотке имеют особую значимость для прогнозирования у взрослых людей множественной миеломы, лимфоцитарного лейкоза и лимфомы (Kantarjian et al., "Prognostic significance of elevated serum beta 2-microglobulin levels in adult acute lymphocytic leukemia," *The American Journal of Medicine* (1992) 93:599-604; Wu et al., "Prognostic significance of serum beta-2 microglobulin in patients with non-Hodgkin lymphoma," *Oncology* (2014) 87:40-7). Во все большем количестве исследований продолжают изучать воздействия аномальных уровней В2М в сыворотке и тканях на развитие злокачественной опухоли, сердечно-сосудистого заболевания, шизофрении и активности системных заболеваний (Chittiprol et al., "Longitudinal study of beta2-microglobulin abnormalities in schizophrenia," *International Immunopharmacology* (2009) 9:1215-7). В некоторых случаях В2М являлся мишенью при терапии заболеваний (Morabito et al., "Analysis and clinical relevance of human leukocyte antigen class I, heavy chain, and beta2-microglobulin down regulation in breast cancer," *Human Immunology* (2009) 70:492-5; Yang et al., "Identification of beta2-microglobulin as a potential target for ovarian cancer," *Cancer Biology & Therapy* (2009) 8:232-8).

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Предполагаются способы лечения взрослого млекопитающего от нарушения, ассоциированного со старением. Аспекты способов включают в себя снижение уровня β 2-микроглобулина (В2М) у млекопитающего в степени, достаточной для лечения млекопитающего от нарушения, ассоциированного со старением. Ряд нарушений, ассоциированных со старением, можно лечить посредством практического осуществления способов, причем данные нарушения включают в себя когнитивные нарушения.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1a-1k. В2М представляет собой компонент подвергающейся старению системной среды, который нарушает гиппокамп-зависимую когнитивную функцию и нейрогенез во взрослом возрасте. Фиг. 1a и 1c, схематическое изображение сравнения не объединенных в пару молодых и старых мышей (фиг. 1a) и сравнение молодых изохронных и гетерохронных парабионтов (фиг. 1c). Фиг. 1b и 1c, изменения концентрации В2М в плазме крови с возрастом в 3, 6, 12, 18 и 24 месяца (фиг. 1b) и у молодых изохронных и молодых гетерохронных парабионтов спустя пять недель после парабиоза (фиг. 1d). Данные от 5 мышей на группу. Фиг. 1e и 1f, изменения

концентраций B2M в плазме крови (фиг. 1e; $r = 0,51$; $p < 0,0001$; 95% доверительный интервал = 0,19-0,028) и CSF (спинномозговая жидкость) (фиг. 1f) с возрастом у здоровых субъектов-людей. Фиг. 1g и 1k, молодым взрослым (3 месяца) мышам вводили инъекцией интраорбитально B2M или контроль в виде PBS (среда) пять раз за 12 суток. Фиг. 1g, схематическое изображение, иллюстрирующее хронологический порядок, используемый для обработки B2M и тестирования когнитивных способностей. Фиг. 1h и 1i, гиппокампальное обучение и память оценивали с помощью RAWM (фиг. 1h) и контекстуального замирания (фиг. 1i). Фиг. 1h, количество ошибочных входов в рукав лабиринта перед нахождением платформы. i, время замирания в процентах через 24 часа после тренировки. Данные от 9-10 мышей на группу. Фиг. 1j, типичное поле зрения с Dcx-положительными клетками для каждой группы обработки (масштабная метка: 100 мкм). Фиг. 1k, количественный анализ нейрогенеза в зубчатой извилине (DG) после обработки. Данные от 7-8 мышей на группу. Все данные представлены в виде точечных диаграмм для среднего значения или столбчатых графиков для среднего значения $\pm$ SEM; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, используется t-критерий (фиг. 1d, 1f, 1i и 1k), ANOVA, апостериорный критерий Тьюки (фиг. 1b), U-критерий Манна-Уитни (e), и для повторных измерений используется ANOVA, апостериорный критерий Бонферрони (фиг. 1k).

Фиг. 2a-2e. Гиппокамп-зависимое обучение и память. Фиг. 2a-2e, обучение и память оценивали в ходе нормального старения у молодых животных (возрастом 3 месяца) в сравнении со старыми животными (возрастом 18 месяцев) с использованием моделей RAWM (фиг. 2a и 2b) и контекстуального замирания (фиг. 2c и 2e). $n = 10$ на группу. Фиг. 2a, старые мыши демонстрируют нарушенное обучение и память в отношении местоположения платформы в ходе фазы тестирования в задаче RAWM. Ослабление когнитивных способностей количественно определяли в виде количества ошибочных входов в рукав лабиринта, совершаемых перед нахождением целевой платформы. Фиг. 2b, выявляли отсутствие различий в скоростях плавания между молодыми и старыми животными. Фиг. 2c, молодые и старые животные проявляли подобное исходное время замирания в ходе тренировки условно-рефлекторного замирания. Фиг. 2d, при контекстуальном замирании старые мыши демонстрируют уменьшенное время замирания в ходе тестирования контекстуальной памяти. Фиг. 2e, выявляли отсутствие различий в памяти, обусловленной сигналом, через 24 часа после тренировки. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ s.e.m.; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; n.s. - не значимое; t-критерий (фиг. 2a-2c и 2e), для повторных измерений использовался

ANOVA, апостериорный критерий Бонферрони (фиг. 2d).

Фиг. 3a-3d. Масса, скорости плавания и память, обусловленная сигналом, не изменяются при системном введении B2M. Фиг. 3a-3d, молодым взрослым (3 месяца) мышам вводили инъекцией интраорбитально B2M или контроль в виде PBS (среда) пять раз за 12 суток перед исследованием поведения. Фиг. 3a, средняя масса мышей в группах, обработанных B2M и средой. Фиг. 3b, скорости плавания мышей, которым вводили инъекцией B2M или среду в ходе фазы тестирования в RAWM. Фиг. 3c и 3d, условно-рефлекторная реакция страха проявлялась в виде замирания. Фиг. 3c, животные из всех групп обработки проявляли подобное исходное время замирания в ходе тренировки. Фиг. 3d, отсутствие различий в памяти, обусловленной сигналом, между группами выявляли при повторном воздействии условно-рефлекторного стимула (звук и свет) в новом контексте через 24 часа после тренировки. Данные от 9 мышей на группу. Все данные представлены в виде среднего значения+SEM; n.s. - не значимое; t-критерий.

Фиг. 4a и 4b. Системное введение B2M снижает нейрогенез в DG у молодых животных. Фиг. 4a и 4b, молодым взрослым мышам (3-4 месяца) вводили инъекцией B2M или контроль в виде PBS (среда) посредством интраорбитальных инъекций пять раз за 12 суток. Перед умерщвлением бромдезоксидуридин (BrdU) вводили посредством интраперитонеальных инъекций в течение трех суток. Количественное определение MCM2-положительных и BrdU-положительных клеток в зубчатой извилине (DG) после обработки. Данные от 5 мышей на группу. Все данные представлены в виде среднего значения + SEM; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; t-критерий.

Фиг. 5a-5h. Локальная экспрессия B2M повышается в гиппокампе в ходе старения и нарушает гиппокамп-зависимую когнитивную функцию и нейрогенез во взрослом возрасте. Фиг. 5a и 5b, типичный вестерн-блот и количественный анализ лизатов гиппокампов, меченных антителами к B2M и к актину, от молодых (3 месяца) и старых (18 месяцев) животных, не объединенных в пары (фиг. 5a), или молодых изохронных и молодых гетерохронных парабионтов через пять недель после парабиоза (фиг. 5b). Фиг. 5c-5e, молодым взрослым (3 месяца) мышам дикого типа (WT) и мышам, нокаутным по транспортеру 1, связанному с процессингом антигена (Tap1^{-/-}), вводили посредством унилатеральных стереотаксических инъекций B2M или контроль в виде среды. Фиг. 5c, типичное поле зрения с Dcx-положительными клетками в смежных сторонах DG в пределах одного и того же среза показано для WT и Tap1^{-/-} животных из групп обработки. Фиг. 5d и 5e, количественное определение нейрогенеза в DG у WT (d) и Tap1^{-/-} (фиг. 5e) мышей после стереотаксического введения B2M. Данные от пяти мышей на

группу. Фиг. 5f-5h, молодым взрослым мышам вводили посредством билатеральных стереотаксических инъекций B2M или среду шесть суток перед исследованием поведения. Фиг. 5f, схематическое изображение, иллюстрирующее хронологический порядок, используемый для локального введения B2M и тестирования когнитивных способностей. Фиг. 5g и 5h, обучение и память оценивали с помощью RAWM (фиг. 5h) и контекстуального замирания (фиг. 5g) после стереотаксических инъекций. Данные от 10 животных на группу. Все данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; n.s. - не значимое; ANOVA, t-критерий (фиг. 5a,5b,5d,5e и 5h), для повторных измерений использовался ANOVA, апостериорный критерий Бонферрони (фиг. 5g).

Фиг. 6a-6c. Скорости плавания и память, обусловленная сигналом, не изменяются при локальном введении B2M. Фиг. 6a-6c, молодым взрослым мышам вводили посредством билатеральных стереотаксических инъекций B2M или контроль в виде PBS (среда) шесть суток перед исследованием поведения. Фиг. 6a, скорости плавания мышей, которым вводили инъекцией B2M или среду в ходе фазы тестирования в RAWM. Фиг. 6b, животные из всех групп обработки проявляли подобное исходное время замирания в ходе тренировки условно-рефлекторного замирания. Фиг. 6c, отсутствие различий в памяти, обусловленной сигналом, между группами выявляли при повторном воздействии условно-рефлекторного стимула (звук и свет) в новом контексте через 24 часа после тренировки. Данные от 10 мышей на группу. Все данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM; n.s. - не значимое; t-критерий.

Фиг. 7a-7e. Наблюдали отсутствие различий в нейрогенезе в DG у молодых животных, не объединенных в пары, или молодых изохронных WT и Tap1^{-/-} животных. Фиг. 7a, количественное определение даблкортин (Dcx)-положительных клеток в DG молодых взрослых (3 месяца) не объединенных в пары мышей дикого типа (WT) и Tap1^{-/-} мышей. Данные от 5 мышей на группу. Фиг. 7b, схематическое изображение молодых изохронных парабионтов WT и Tap1^{-/-}. Фиг. 7c-7e, количественное определение Dcx, транскрипционного фактора T-box Tbr2 и BrdU с помощью иммуноокрашивания у молодых изохронных парабионтов WT и Tap1^{-/-} через пять недель после парабиоза. Данные от 6-8 мышей на группу. Все данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM; n.s. - не значимое; t-критерий (фиг. 7a); ANOVA, апостериорный критерий Тьюки (фиг. 7c-7e).

Фиг. 8a-8d. Снижение эндогенной экспрессии МНС I на поверхности клеток отчасти ослабляет отрицательные эффекты гетерохронного парабиоза в отношении

нейрогенеза во взрослом возрасте у молодых животных. Фиг. 8a, схематическое изображение молодых изохронных парабионтов из животных дикого типа (WT) и нокаутных по *Tap1* животных (*Tap1*^{-/-}) и молодых гетерохронных парабионтов из WT и *Tap1*^{-/-}. Фиг. 8b и 8c, типичное поле зрения (фиг. 8b) и количественное определение (фиг. 8c) даблкортина с помощью иммуноокрашивания у молодых изохронных и гетерохронных парабионтов через пять недель после парабиоза (стрелками указаны отдельные клетки, масштабная метка: 100 мкм). Фиг. 8d, перед умерщвлением животным вводили инъекцией бромдезоксисуридин (BrdU) в течение трех суток и количественно определяли пролиферирующие клетки с включенным BrdU в DG после парабиоза. Данные от 8 молодых изохронных WT, 6 молодых изохронных *Tap1*^{-/-}, 8 молодых гетерохронных WT и 8 молодых гетерохронных *Tap1*^{-/-} парабионтов. Все данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM; * $P < 0,05$; ANOVA, апостериорный критерий Тьюки.

Фиг. 9a и 9b. Снижение эндогенной экспрессии МНС I на поверхности клеток отчасти ослабляет уменьшение количества предшественников нервных клеток у молодых мышей после гетерохронного парабиоза. Фиг. 9a, схематическое изображение молодых изохронных парабионтов из животных дикого типа (WT) и нокаутных по *Tap1* животных (*Tap1*^{-/-}) и молодых гетерохронных парабионтов из WT и *Tap1*^{-/-}. Фиг. 9b, количественное определение транскрипционного фактора T-box *Tbr2* с помощью иммуноокрашивания у молодых изохронных и гетерохронных парабионтов через пять недель после парабиоза. Данные от 8 молодых изохронных WT, 6 молодых изохронных *Tap1*^{-/-}, 8 молодых гетерохронных WT и 8 молодых гетерохронных *Tap1*^{-/-} парабионтов. Все данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM; * $P < 0,05$; ANOVA, апостериорный критерий Тьюки.

Фиг. 10a-10j. Отсутствие эндогенного B2M улучшает гиппокамп-зависимую когнитивную функцию и нейрогенез во взрослом возрасте у старых животных. Фиг. 10a-10d, обучение и память оценивали у молодых (3 месяца) и старых (15-16 месяцев) мышей дикого типа (WT) и нокаутных по B2M мышей (*B2M*^{-/-}) с помощью RAWM (фиг. 10a, 10c) и контекстуального замирания (фиг. 10b и 10d). Данные от 10 молодых и 8-12 старых мышей на генотип. Фиг. 10e - 10j, нейрогенез анализировали с помощью иммуноокрашивания в отношении Dcx-положительных клеток в DG у молодых и старых WT и *B2M*^{-/-} мышей. Типичное поле зрения и результаты количественного определения Dcx-положительных клеток показаны для молодых (фиг. 10e и 10f) и старых (фиг. 10e и 10g) WT и *B2M*^{-/-} животных (стрелками указаны отдельные незрелые нейроны,

масштабная метка: 100 мкм). Данные от 8 молодых и 10 старых мышей на генотип. Фиг. 10h и 10j, WT и B2M-/- мышам вводили BrdU посредством интраперитонеальных инъекций в течение шести суток и умерщвляли 28 суток спустя. Фиг. 10h, типичный результат конфокальной микроскопии DG на срезах головного мозга, подвергнутых иммуноокрашиванию в отношении BrdU (красный) в комбинации с NeuN (зеленый). Фиг. 10i и 10j, количественное определение относительного количества клеток, положительных как по BrdU, так и по NeuN, из общего количества BrdU-положительных клеток в DG у молодых (фиг. 10i) и старых (фиг. 10j) животных WT и B2M-/-. Данные от 8 мышей на группу (3 среза на мышшь). Все данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; n.s. - не существенное; t-критерий (фиг. 10b, 10d, 10f, 10i, 10j); для повторных измерений использовался ANOVA, апостериорный критерий Бонферрони (фиг. 10a, фиг. 10c).

Фиг. 11a-11f. Скорости плавания и память, обусловленная сигналом, не изменяются у старых B2M-/- животных. Фиг. 11a-11f, гиппокампальное обучение и память оценивали у старых взрослых (17 месяцев) животных WT в ходе фазы тестирования в RAWM. Животные проявляли подобное исходное время замирания в ходе тренировки условно-рефлекторного замирания вне зависимости от генотипа. Отсутствие различий в памяти, обусловленной сигналом, между генотипами выявляли при повторном воздействии на мышей условно-рефлекторного стимула (звук и свет) в новом контексте через 24 часа после тренировки. Данные от 12 WT и 8 B2M-/- мышей. Все данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM; n.s. - не значимое; t-критерий.

Фиг. 12a-12e. Отсутствие эндогенного B2M повышает пролиферацию, но не дифференцировку астроцитов зависимым от возраста образом *in vivo*. Фиг. 12a-12c, для оценки пролиферации молодым (3 месяца) и старым (15-16 месяцев) мышам дикого типа (WT) и нокаутным по B2M мышам (B2M-/-) вводили BrdU посредством интраперитонеальных инъекций в течение трех суток перед умерщвлением. Фиг. 12b и 12c, иммуноокрашивание BrdU-положительных клеток количественно оценивали в DG у молодых (фиг. 12b) и старых (фиг. 12c) животных. Данные от 8 молодых и 10 старых мышей на генотип. Фиг. 12c-12e, для оценки дифференцировки астроцитов WT и B2M-/ мышам вводили BrdU посредством интраперитонеальных инъекций в течение шести суток и умерщвляли 28 суток спустя. Фиг. 12c, типичный результат конфокальной микроскопии DG в срезах головного мозга, подвергнутых иммуноокрашиванию в отношении BrdU (красный) в комбинации с GFAP (синий). Фиг. 12d и 12e, количественное определение относительного количества клеток, положительных как по

BrdU, так и по GFAP, из общего количества BrdU-положительных клеток в DG у молодых (фиг. 12d) и старых (фиг. 12e) животных WT и B2M^{-/-}. Данные от 8 мышей на группу (3 среза на мыш). Все данные представлены в виде среднего значения + SEM; $**P < 0,01$; n.s. - не значимое; t-критерий.

Фиг. 13. Относительные уровни бета-2-микроглобулина определяли в образцах плазмы крови здоровых мужчин-доноров возрастом 18, 30, 45, 55 и 66 лет с помощью протеомного анализа SomaScan (Somalogic, Inc, Boulder, CO). Для каждой возрастной группы плазму крови от 40 индивидов анализировали в виде 8 пулов из 5 индивидов на группу. Статистический анализ выполняли с использованием двухстороннего t-критерия Стьюдента с логарифмическим преобразованием значений, в также с помощью анализа тенденций изменения для непреобразованных данных с использованием критерия Джонкхиера-Терпстра. Наблюдаемые изменения считались высоко значимыми, когда р-значение с t-критерием составляло $1,1 \times 10^{-4}$ (возраст 66 лет в сравнении возрастом 18 лет), и р-значение для JT-критерия составляло $1,3 \times 10^{-7}$ (все возрастные группы). (RFU относится к «относительным единицам флуоресценции» в протеомном анализе SomaScan).

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Предполагаются способы лечения взрослого млекопитающего от нарушения, ассоциированного со старением. Аспекты способов включают в себя снижение уровня β 2-микроглобулина (B2M) у млекопитающего в степени, достаточной для лечения млекопитающего от нарушения, ассоциированного со старением. Ряд нарушений, ассоциированных со старением, можно лечить посредством практического осуществления способов, причем данные нарушения включают в себя когнитивные нарушения.

Перед тем как данные способы и композиции будут описаны, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретным описанным способом или композицией, поскольку они, конечно, могут изменяться. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления, и не предполагается ограничение ею, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только пунктами прилагаемой формулы изобретения.

В случае, когда представлен диапазон значений, следует понимать, что также специально раскрыто каждое промежуточное значение между верхним и нижним

пределами этого диапазона до десятых долей единицы в нижнем пределе, если контекст явно не предписывает иное. Каждый меньший диапазон между любым изложенным значением или промежуточное значение в изложенном диапазоне и любое другое изложенное или промежуточное значение в этом изложенном диапазоне охватываются настоящим изобретением. Верхний и нижний пределы в этих меньших диапазонах могут быть независимо включены в диапазон или исключены из него, и каждый диапазон, в котором один из пределов, ни один из пределов или оба из пределов включены в меньшие диапазоны, также охватывается настоящим изобретением с учетом любого специально исключенного предела в изложенном диапазоне. В случае, когда изложенный диапазон включает в себя один или оба из пределов, диапазоны, исключающие любой из этих включенных пределов или оба из них, также включены в настоящее изобретение.

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понятно квалифицированному специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, можно применять при практическом осуществлении или испытании настоящего изобретения, далее будут описаны некоторые возможные и предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки с раскрытием и описанием способов и/или материалов, в связи с которыми цитируются публикации. Понятно, что настоящее раскрытие заменяет собой любое раскрытие из включенной публикации в той мере, в которой существует противоречие.

Как будет понятно специалисту в данной области техники при изучении настоящего раскрытия, каждый из отдельных вариантов осуществления, описанных и проиллюстрированных в данном документе, имеет отдельные компоненты и признаки, которые могут быть легко отделены или объединены с признаками любого из нескольких других вариантов осуществления без отступления от объема или идеи настоящего изобретения. Любой изложенный способ можно выполнять в изложенном порядке действий или в любом другом порядке, который является возможным с точки зрения логики.

Следует отметить, что при использовании в данном документе и прилагаемой формуле изобретения формы в единственном числе включают в себя соответствующие формы во множественном числе, если контекст явно не предписывает иное. Таким

образом, например, упоминание «клетки» включает в себя множество таких клеток, и упоминание «пептида» включает в себя упоминание одного или нескольких пептидов и их эквивалентов, например, полипептидов, известных специалистам в данной области техники, и так далее.

Публикации, обсуждаемые в данном документе, представлены исключительно для их раскрытия до даты подачи данной заявки. Ничто в данном документе не следует толковать как допущение, что настоящему изобретению может быть противопоставлена такая публикация в силу более раннего изобретения. Кроме того, представленные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут нуждаться в независимом подтверждении.

Способы

Как кратко изложено выше, аспекты настоящего изобретения включают в себя способы лечения нарушения, ассоциированного со старением, у взрослого млекопитающего. Нарушение, ассоциированное со старением, может проявляться различным образом, например, в виде ассоциированного со старением когнитивного нарушения и/или физиологического нарушения, например, в форме повреждения центральных или периферических органов организма, как например, без ограничения, поражение клеток, повреждение ткани, дисфункция органа, ассоциированное со старением сокращение продолжительности жизни и канцерогенез, при этом конкретные органы и ткани, представляющие интерес, включают в себя, без ограничения, кожу, нервную ткань, мышцу, поджелудочную железу, головной мозг, почку, легкое, желудок, кишечник, селезенку, сердце, жировую ткань, семенники, яичник, матку, печень и кость; в форме уменьшенного нейрогенеза и т.д.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нарушение, ассоциированное со старением, представляет собой ассоциированное со старением нарушение когнитивной способности у индивида, т.е. когнитивное нарушение, ассоциированное со старением. Под «когнитивной способностью» или «когнитивной деятельностью» подразумеваются умственные процессы, которые включают в себя внимание и концентрацию, обучение сложным задачам и понятиям, память (усвоение, сохранение и воспроизведение новой информации в короткий и/или длительный срок), обработку информации (касается информации, собранной при помощи пяти чувств), функцию пространственного зрения (зрительное восприятие, восприятие глубины, использование мысленного представления, копирование рисунков, конструирование

объектов или форм), воспроизведение и понимание речи, плавность речи (поиск слов), решение проблем, принятие решений и управляющие функции (планирование и расстановка приоритетов). Под «снижением когнитивных способностей» подразумевается прогрессирующее снижение одной или нескольких из этих способностей, например, ухудшение памяти, речи, мышления, способности к оценке ситуации и т.д. Под «нарушением когнитивной способности» и «когнитивным нарушением» подразумевается снижение когнитивной способности по сравнению со здоровым индивидом, например, здоровым индивидом того же возраста, или по сравнению со способностью этого же индивида в более ранние моменты времени, например, за 2 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 6 месяцев, 1 год, 2 года, 5 лет или 10 лет до этого или раньше. Когнитивные нарушения, ассоциированные со старением, включают в себя нарушения когнитивной способности, которые, как правило, являются ассоциированными со старением, в том числе, например, когнитивное нарушение, ассоциированное с естественным процессом старения, например, умеренное когнитивное нарушение (M.C.I.); и когнитивное нарушение, ассоциированное с нарушением, ассоциированным со старением, то есть нарушением, которое наблюдается с возрастающей частотой при дальнейшем старении, например, с нейродегенеративным состоянием, таким как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, лобно-височная деменция, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, глаукома, миотоническая дистрофия, сосудистая деменция и т.п.

Под «лечением» подразумевается, что достигается по меньшей мере ослабление одного или нескольких симптомов, ассоциированных с нарушением, ассоциированным со старением, которое поражает взрослое млекопитающее, причем ослабление используется в широком смысле в отношении по меньшей мере снижения величины параметра, например, симптома, ассоциированного с нарушением, которое подлежит лечению. Само по себе лечение также включает в себя ситуации, когда патологическое состояние или по меньшей мере симптомы, ассоциированные с ним, полностью подавляются, например, их возникновение предупреждается или останавливается, например, прекращается, в результате чего взрослое млекопитающее больше не страдает от нарушения или по меньшей мере от симптомов, которые характеризуют нарушение. В некоторых случаях «лечение», «осуществление лечения» и т.п. относится к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим в виде полного или частичного предупреждения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим в виде частичного или полного излечения

от заболевания и/или неблагоприятного эффекта, свойственного заболеванию. «Лечение» может представлять собой любое лечение заболевания у млекопитающего, и оно включает в себя: (a) предупреждение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого заболевание еще не было диагностировано; (b) ингибирование заболевания, т.е. купирование его развития или (c) облегчение заболевания, т.е. обеспечение регресса заболевания. Лечение может приводить в результате к ряду разных физических проявлений, например, модуляции генной экспрессии, повышенному нейрогенезу, омоложению ткани или органов и т.д. Лечение протекающего заболевания, при котором лечение стабилизирует или снижает нежелательные клинические симптомы у пациента, осуществляется в соответствии с некоторыми вариантами осуществления. Такое лечение может осуществляться до полной потери функции у пораженных тканей. Терапию субъекту можно назначать во время симптоматической стадии заболевания и в некоторых случаях после симптоматической стадии заболевания.

В некоторых случаях, когда нарушение, ассоциированное со старением, представляет собой ассоциированное со старением снижение когнитивных способностей, лечение с помощью способов согласно настоящему раскрытию замедляет или уменьшает прогрессирование ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей. Иными словами, когнитивные способности у индивида снижаются медленнее, если они вообще снижаются, после лечения с помощью раскрытых способов, чем до лечения или в отсутствие лечения с помощью раскрытых способов. В некоторых случаях лечение с помощью способов согласно настоящему раскрытию стабилизирует когнитивные способности у индивида. Например, прогрессирование снижения когнитивных способностей у индивида, страдающего от ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей, останавливается после лечения с помощью раскрытых способов. В качестве другого примера, снижение когнитивных способностей у индивида, например, у индивида возрастом 40 лет или старше, который, как предполагается, страдает от ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей, предупреждается после лечения с помощью раскрытых способов. Иными словами, не наблюдается (дальнейшего) когнитивного нарушения. В некоторых случаях лечение с помощью способов согласно настоящему раскрытию снижает когнитивное нарушение или вызывает его регресс, например, что можно наблюдать по улучшению когнитивных способностей у индивида, страдающего от ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей. Иными

словами, когнитивные способности у индивида, страдающего от ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей, после лечения с помощью раскрытых способов становятся лучше, чем они были до лечения с помощью раскрытых способов, т.е. они улучшаются при лечении. В некоторых случаях лечение с помощью способов согласно настоящему раскрытию устраняет когнитивное нарушение. Иными словами, когнитивные способности у индивида, страдающего от ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей, восстанавливаются, например, до их уровня, когда индивид был в возрасте приблизительно 40 лет или менее, после лечения с помощью раскрытых способов, например, что подтверждается улучшенными когнитивными способностями у индивида, страдающего от ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей.

В некоторых случаях лечение взрослого млекопитающего в соответствии с данными способами приводит в результате к изменению в центральном органе, например, органе центральной нервной системы, таком как головной мозг, спинной мозг и т.д., причем изменение может проявляться различным образом, например, как более подробно описано ниже, в том числе, без ограничения, на молекулярном, структурном и/или функциональном уровне, например, в форме усиленного нейрогенеза.

Как кратко изложено выше, способы, описанные в данном документе, представляют собой способы лечения нарушения, ассоциированного со старением, например, которое описано выше, у взрослого млекопитающего. Под взрослым млекопитающим подразумевают млекопитающее, которое достигло зрелости, т.е. которое является полностью развитым. В связи с этим взрослые млекопитающие не являются ювенильными. Виды млекопитающих, которые могут получать лечение с применением данных способов, включают в себя собак и кошек; лошадей; коров; овец и т.д., а также приматов, в том числе людей. Заявленные способы, композиции и реактивы также можно применять к модельным животным, в том числе мелким млекопитающим, например, мышам, зайцеобразным и т.д., например, в экспериментальных исследованиях. Приведенное ниже обсуждение будет фокусироваться на применении заявленных способов, композиций, реактивов, устройств и наборов в отношении людей, но квалифицированному специалисту в данной области техники будет понятно, что такие описания можно легко модифицировать для других млекопитающих, представляющих интерес, с учетом знаний, доступных в уровне техники.

Возраст взрослого млекопитающего может варьировать в зависимости от типа млекопитающего, которое получает лечение. В случае, когда взрослое млекопитающее

представляет собой человека, возраст человека обычно составляет 18 лет или старше. В некоторых случаях взрослое млекопитающее представляет собой индивида, страдающего от нарушения, ассоциированного со старением, или имеющего риск нарушения, такого как ассоциированное со старением когнитивное нарушение, причем взрослое млекопитающее может представлять собой таковое, для которого было определено, например, в форме постановки диагноза, что оно страдает от нарушения, ассоциированного со старением, или имеет риск нарушения, такого как ассоциированное со старением когнитивное нарушение. Фраза «индивид, страдающий от ассоциированного со старением когнитивного нарушения, или имеющий риск такого нарушения» относится к индивиду, который возрастом приблизительно 50 лет или старше, например, 60 лет или старше, 70 лет или старше, 80 лет или старше и иногда не старше чем 100 лет, как например, 90 лет, т.е. возрастом приблизительно от 50 до 100 лет, например, возрастом 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или приблизительно 90 лет. Индивид может страдать от состояния, ассоциированного со старением, например, когнитивного нарушения, ассоциированного с естественным процессом старения, например, М.С.И. В качестве альтернативы, индивид может иметь возраст 50 лет или старше, например, 60 лет или старше, 70 лет или старше, 80 лет или старше, 90 лет или старше и иногда не старше чем 100 лет, т.е. возрастом приблизительно от 50 до 100, например, возрастом 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или приблизительно 100 лет, и у него еще не начали проявляться симптомы состояния, ассоциированного со старением, например, когнитивного нарушения. В соответствии с другими вариантами осуществления индивид может иметь любой возраст, причем индивид страдает от когнитивного нарушения, обусловленного ассоциированным со старением заболеванием, например, болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона, лобно-височной деменцией, болезнью Хантингтона, боковым амиотрофическим склерозом, рассеянным склерозом, глаукомой, миотонической дистрофией, деменцией и т.п. В некоторых случаях индивид представляет собой индивида любого возраста, у которого было диагностировано заболевание, ассоциированное со старением, которое, как правило, сопровождается когнитивным нарушением, например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, лобно-височная деменция, прогрессирующий надъядерный паралич, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз, спинальная мышечная атрофия, рассеянный склероз, мультисистемная атрофия, глаукома, атаксия, миотоническая дистрофия, деменция и т.п., причем у индивида еще не начали проявляться симптомы когнитивного нарушения.

Как кратко изложено выше, аспекты способов включают в себя снижение уровня β 2-микроглобулина (B2M) у млекопитающего в степени, достаточной для лечения связанного со старением нарушения у млекопитающего, например, которое описано выше. Под снижением уровня B2M подразумевают снижение количества B2M у млекопитающего, как например, количества внеклеточного B2M у млекопитающего. Несмотря на то что величина снижения может варьировать, в некоторых случаях величина снижения является 2-кратной или большей, как например, 5-кратной или большей, в том числе 10-кратной или большей, например, 15-кратной или большей, 20-кратной или большей, 25-кратной или большей (по сравнению с подходящим контролем), причем в некоторых случаях величина является такой, что количество выявляемого несвязанного B2M в кровеносной системе индивида составляет 50% или менее, как например, 25% или менее, в том числе 10% или менее, например, 1% или менее, по сравнению с количеством, которое выявлялось перед вмешательством в соответствии с настоящим изобретением, и в некоторых случаях после вмешательства количество является не выявляемым.

Уровень B2M можно снижать с использованием любого удобного протокола. В некоторых случаях уровень B2M снижают посредством удаления системного B2M из взрослого млекопитающего, например, посредством удаления B2M из кровеносной системы взрослого млекопитающего. В таких случаях можно использовать любой удобный протокол для удаления циркулирующего B2M. Например, кровь может быть получена от взрослого млекопитающего и подвергнута экстракорпоральной обработке для удаления B2M из крови с получением обедненной B2M крови, причем данную полученную в результате обедненную B2M кровь можно затем вернуть во взрослое млекопитающее. В таких протоколах может использоваться ряд разных методик с целью удаления B2M из полученной крови. Например, полученную кровь можно приводить в контакт с фильтрующим компонентом, например, мембраной и т.д., который обеспечивает возможность прохождения B2M, но препятствует прохождению других компонентов крови, например, клеток и т.д. В некоторых случаях полученную кровь можно приводить в контакт с абсорбирующим B2M компонентом, например, композицией пористых гранул или частиц, которая абсорбирует B2M из крови. В других случаях полученную кровь можно приводить в контакт со связывающим элементом для B2M, устойчиво ассоциированным с твердой подложкой, в результате чего B2M связывается со связывающим элементом и благодаря этому иммобилизуется на твердой подложке, тем самым обеспечивая отделение B2M от других составляющих

крови. Используемый протокол может быть сконфигурирован для селективного удаления B2M из полученной крови, если это желательно, или же он может не быть сконфигурирован для этой цели. Известен ряд различных технологий для удаления B2M из крови, и они могут быть использованы в вариантах осуществления настоящего изобретения, причем такие технологии включают в себя описанные в патентах США №№ 4872983; 5240614; 6416487; 6419830; 6423024; 6855121; 7066900; 8211310; 8349550; а также опубликованные в публикации заявки на патент США № 20020143283 и опубликованные в РСТ публикации международных заявок № WO/1999/006098 и № WO/2003/020403; причем раскрытия данных заявок включены в данный документ посредством ссылки.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления уровень B2M снижают посредством введения млекопитающему эффективного количества средства, снижающего уровень B2M. В связи с этим, при практическом осуществлении способов в соответствии с этими вариантами осуществления настоящего изобретения взрослое млекопитающее обеспечивается эффективным количеством активного средства, например, модулирующего B2M средства.

В зависимости от конкретных практически осуществляемых вариантов осуществления можно использовать ряд различных типов активных средств. В некоторых случаях средство модулирует экспрессию РНК и/или белка с гена таким образом, чтобы это неким образом меняло экспрессию РНК или белка с гена-мишени. В этих случаях средство может изменять экспрессию РНК или белка различными способами. В соответствии с определенными вариантами осуществления средство представляет собой средство, которое снижает, в том числе ингибирует, экспрессию белка B2M. Ингибирование экспрессии белка B2M можно осуществлять с применением любых подходящих средств, в том числе с применением средства, которое ингибирует экспрессию белка B2M, как например, без ограничения, средства для RNAi, средства на основе антисмысловых молекул, средства, которые препятствуют связыванию транскрипционных факторов с промоторной последовательностью гена B2M, или посредством инактивации гена B2M, например, с помощью методик на основе применения рекомбинантной ДНК и т.д.

Например, уровень транскрипции белка B2M можно регулировать посредством сайленсинга гена с применением средств для RNAi, например, двухцепочечной РНК (см., например, Sharp, Genes and Development (1999) 13: 139-141). Методики RNAi, как например, интерференция двухцепочечной РНК (dsRNAi) или малой интерферирующей

РНК (siRNA), были всесторонне описаны в документах на нематод *C. elegans* (Fire, et al, Nature (1998) 391:806-811) и обычно применяются для «нокдауна» генов в различных системах. Средства для RNAi могут представлять собой dsRNA или матрицу для транскрипции интерферирующей рибонуклеиновой кислоты, которую можно применять для продуцирования dsRNA в клетке. В соответствии с этими вариантами осуществления матрица для транскрипции может представлять собой ДНК, которая кодирует интерферирующую рибонуклеиновую кислоту. Способы и процедуры, связанные с RNAi, также описаны в РСТ публикациях международных заявок № WO 03/010180 и № WO 01/68836, причем раскрытия данных заявок включены в данный документ посредством ссылки. dsRNA можно получить в соответствии с любым из ряда способов, которые известны в уровне техники, в том числе *in vitro* и *in vivo* способов, а также с помощью подходов химического синтеза. Примеры таких способов включают в себя, без ограничения, способы, описанные в Sadher et al., Biochem. Int. (1987) 14:1015; Bhattacharyya, Nature (1990) 343:484; и в патенте США № 5795715, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки. Одноцепочечную РНК также можно получить с применением комбинации ферментативного и органического синтеза или с помощью только органического синтеза. Применение способов химического синтеза обеспечивает возможность введения желаемых модифицированных нуклеотидов или нуклеотидных аналогов в dsRNA. dsRNA также можно получить *in vivo* согласно ряду хорошо известных способов (см., например, Sambrook, et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.; Transcription and Translation (B. D. Hames, and S. J. Higgins, Eds., 1984); DNA Cloning, volumes I and II (D. N. Glover, Ed., 1985); и Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, Ed., 1984, причем каждый из источников включен в данный документ посредством ссылки). Ряд вариантов можно использовать для доставки dsRNA в клетку или популяцию клеток, как например, в клеточную культуру, ткань, орган или эмбрион. Например, РНК может быть введена непосредственно внутрь клетки. В таких случаях обычно используются различные физические способы, такие как введение посредством микроинъекции (см., например, Zernicka-Goetz, et al. Development (1997) 124:1133-1137; и Wianny, et al., Chromosoma (1998) 107: 430-439). Другие варианты для доставки в клетки включают в себя пермеабелизацию клеточной мембраны и электропорацию в присутствии dsRNA, опосредованную липосомами трансфекцию или трансфекцию с применением химических соединений, таких как фосфат кальция. Ряд широко известных методик генной терапии также можно использовать для введения dsRNA в клетку. Посредством введения вирусной конструкции внутри вирусной

частицы, например, можно достичь эффективного введения экспрессионной конструкции в клетку и транскрипции РНК, кодируемой конструкцией. Конкретные примеры средств для RNAi, которые можно использовать с целью снижения экспрессии B2M, включают в себя, без ограничения, dsRNA и короткую интерферирующую РНК (siRNA), соответствующую B2M со следующими смысловой и антисмысловой последовательностями (смысловая) 5'-GAUUCAGGUUUACUCACGUdTdT-3' (SEQ ID NO:01) и (антисмысловая) 5'-ACGUGAGUAAACCUGAAUCdTdT-3' (SEQ ID NO:02) (которые описаны в Matin, et al., "Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells," *Stem Cells* (2004) 22: 659-68) и в международной заявке № WO/2004/085654; shRNA (GCCACTCCCACCCCTTCTCAT) (SEQ ID NO:03) (которая раскрыта в Goyos, et al., "Involvement of nonclassical MHC class Ib molecules in heat shock protein-mediated anti-tumor responses ," (2007) 37: 1494-501); а также средства для RNAi, раскрытые в Figueiredo, et al., "Generation of HLA-deficient platelets from hematopoietic progenitor cells," *Transfusion* (2010) 50: 1690-701, Bhatt, et al., "Knockdown of beta2-microglobulin perturbs the subcellular distribution of HFE and hepcidin," *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2009) 378: 727-31, Elders, et al., "Targeted knockdown of canine KIT (stem cell factor receptor) using RNA interference," *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2011) 141:151-6, Heikkila, et al., "Internalization of coxsackievirus A9 is mediated by beta 2-microglobulin, dynamin, and Arf6 but not by caveolin-1 or clathrin," (2010) 84: 3666-81, Figueiredo, et al., "Class-, gene-, and group-specific HLA silencing by lentiviral shRNA delivery (2006) 84: 425-37, в международной заявке № WO/2004/020586, заявках на патент США № US20040127445 и № US20130096370.

В некоторых случаях антисмысловые молекулы можно применять для понижающей регуляции экспрессии гена B2M в клетке. Реактив на основе антисмысловой последовательности может представлять собой антисмысловые олигодезоксинуклеотиды (ODN), в особенности, синтетические ODN, имеющие химические модификации относительно нативных нуклеиновых кислот, или конструкции нуклеиновой кислоты, которые экспрессируют такие антисмысловые молекулы в виде РНК. Антисмысловая последовательность является комплементарной мРНК белка-мишени и ингибирует экспрессию белка-мишени. Антисмысловые молекулы ингибируют экспрессию гена посредством различных механизмов, например, посредством снижения количества мРНК, доступной для трансляции, посредством активации РНКазы Н или стерического затруднения. Можно вводить одну

антисмысловую молекулу или комбинацию антисмысловых молекул, причем комбинация может включать в себя несколько разных последовательностей.

Антисмысловые молекулы могут продуцироваться при экспрессии всей последовательности гена-мишени или ее части в соответствующем векторе, причем точка инициации транскрипции сориентирована таким образом, чтобы антисмысловая цепь продуцировалась в виде молекулы РНК. В качестве альтернативы, антисмысловая молекула представляет собой синтетический олигонуклеотид. Антисмысловые олигонуклеотиды, в целом, будут иметь длину по меньшей мере приблизительно 7, обычно по меньшей мере приблизительно 12, как правило, по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов и не более чем приблизительно 500, обычно не более чем приблизительно 50, как правило, не более чем приблизительно 35 нуклеотидов, причем длина определяется эффективностью ингибирования, специфичностью, в том числе отсутствием перекрестной реактивности и т.п. Короткие олигонуклеотиды, имеющие длину от 7 до 8 оснований, могут быть сильными и селективными ингибиторами экспрессии гена (см. Wagner et al., *Nature Biotechnol.* (1996)14:840-844).

Выбирают специфический участок или участки эндогенной смысловой цепи последовательности мРНК, чтобы антисмысловая последовательность была комплементарна этому участку(участкам). При выборе специфической последовательности для олигонуклеотида можно применять эмпирический способ, при котором несколько последовательностей-кандидатов подвергают анализу в отношении ингибирования экспрессии гена-мишени *in vitro* или в животной модели. Также можно применять комбинацию последовательностей, где для комплементарного взаимодействия с антисмысловой последовательностью выбраны несколько участков последовательности мРНК.

Антисмысловые олигонуклеотиды могут быть химически синтезированы с помощью способов, известных в уровне техники (см. Wagner et al. (1993), выше). Олигонуклеотиды могут подвергаться химической модификации относительно нативной фосфодиэфирной структуры с целью повышения их внутриклеточной стабильности и аффинности связывания. В литературе был описан ряд таких модификаций, которые изменяют химический состав остова, сахара или гетероциклические основания. К числу полезных изменений в химическом составе остова относятся фосфоротиоаты; фосфородитиоаты, в которых оба из атомов кислорода, не участвующих в образовании мостиковых связей, заменены серой; фосфороамидиты; алкил-фосфотриэфиры и боранофосфаты. Ахиральные фосфатные

производные включают в себя 3'-O-5'-S-фосфоротиоат, 3'-S-5'-O-фосфоротиоат, 3'-CH₂-5'-O-фосфонат и 3'-NH-5'-O-фосфороамидат. В пептидо-нуклеиновых кислотах весь рибозо-фосфодиэфирный остов заменен пептидной связью. Модификации сахаров также применяют для повышения стабильности и аффинности. Можно применять α -аномер дезоксирибозы, в котором основание инвертировано в сравнении с природным β -аномером. 2'-ОН в рибозном сахаре может быть изменена с образованием 2'-О-метил- или 2'-О-аллил-сахаров, что обеспечивает устойчивость к разрушению, не затрагивая аффинность. Модификация гетероциклических оснований должна поддерживать надлежащее спаривание оснований. Некоторые полезные замены включают в себя замену дезоксиуридином дезокситимидина; замену 5-метил-2'-дезокситидином и 5-бром-2'-дезокситидином дезокситидина. Было показано, что 5-пропинил-2'-дезоксуридин и 5-пропинил-2'-дезокситидин повышают аффинность и биологическую активность в случае, когда они заменяют дезокситимидин и дезокситидин, соответственно. Конкретные примеры средств на основе антисмысловых молекул, которые могут использоваться для снижения экспрессии B2M, включают в себя, без ограничения:

Код	Олигонуклеотид
MB-00027	$\beta A * \beta G * dT * dT * dG * dC * dC * dA * dG * dC * dC * dC * dT * \beta Z * \beta Z$
MB-00540	$Eru * SS * \beta A * \beta G * dT * dT * dG * dC * dC * dA * dG * dC * dC * dC * dT * \beta Z * \beta Z$
MB-00541	$Myr * SS * \beta A * \beta G * dT * dT * dG * dC * dC * dA * dG * dC * dC * dC * dT * \beta Z * \beta Z$
MB-00542	$Dier * SS * \beta A * \beta G * dT * dT * dG * dC * dC * dA * dG * dC * dC * dC * dT * \beta Z * \beta Z$
MB-00543	$Ermy * SS * \beta A * \beta G * dT * dT * dG * dC * dC * dA * dG * dC * dC * dC * dT * \beta Z * \beta Z$

(SEQ ID NO: 04-08),

которые описаны в международной заявке № WO/2004/004575; а также средства на основе антисмысловых молекул, описанные в: Lichtenstein, et al., "Effects of beta-2 microglobulin anti-sense oligonucleotides on sensitivity of HER2/neu oncogene-expressing and nonexpressing target cells to lymphocyte-mediated lysis," Cell Immunology (1992) 141: 219-32, Ogretmen, et al., "Molecular mechanisms of loss of beta 2-microglobulin expression in drug-resistant breast cancer sublines and its involvement in drug resistance," Biochemistry (1998) 37: 11679-91, в международных заявках № WO/2004/020586; № WO/2006/130949; в документах 7553484 и 8715654.

В качестве альтернативы антисмысловым ингибиторам для ингибирования экспрессии гена можно применять каталитические соединения нуклеиновых кислот, например, рибозимы, антисмысловые конъюгаты и т.д. Рибозимы можно синтезировать *in vitro* и вводить пациенту, или они могут быть закодированы в экспрессионном векторе, с которого рибозим синтезируется в клетке-мишени (например, см. публикацию международной патентной заявки № WO 9523225, и Beigelman et al. Nucl. Acids Res. (1995) 23:4434-42). Примеры олигонуклеотидов с каталитической активностью описаны в международной заявке № WO 9506764. Конъюгаты антисмысловых ODN с комплексными соединениями металлов, например, терпиридил-Cu(II), способные опосредовать гидролиз мРНК, описаны в Bashkin et al. Appl. Biochem. Biotechnol. (1995) 54:43-56.

В соответствии с другим вариантом осуществления ген В2М инактивируют таким образом, чтобы он больше не экспрессировал функциональный белок. Под инактивацией подразумевается то, что ген, например, его кодирующая последовательность и/или регуляторные элементы, подвергают генетической модификации таким образом, чтобы он больше не экспрессировал функциональный белок В2М, например, функциональный по меньшей мере в отношении активности В2М при нарушении, связанном со старением. Изменение или мутация могут принимать ряд различных форм, например, посредством делеции одного или нескольких нуклеотидных остатков, посредством изменения одного или нескольких нуклеотидных остатков и т.п. Одним из средств для создания таких изменений в кодирующей последовательности является гомологичная рекомбинация. Способы создания модификаций в гене-мишени посредством гомологичной рекомбинации являются известными в уровне техники, в том числе способы, описанные в патентах США №№ 6074853; 5998209; 5998144; 5948653; 5925544; 5830698; 5780296; 5776744; 5721367; 5614396; 5612205; причем раскрытия данных патентов включены в данный документ посредством ссылки.

В соответствии с определенными вариантами осуществления интерес также представляют доминантные отрицательные мутанты белков В2М, причем экспрессия таких мутантов в клетке приводит в результате к модуляции, например, снижению, опосредованного В2М нарушения, связанного со старением. Доминантные отрицательные мутанты В2М представляют собой мутантные белки, которые проявляют доминантную отрицательную активность В2М. Используемый в контексте данного документа термин «доминантная отрицательная активность В2М» или «доминантная отрицательная активность» относится к ингибированию, подавлению или снижению

определенных конкретных активностей В2М и, в частности, опосредованного В2М нарушения, связанного со старением. Доминантные отрицательные мутации легко создаются для соответствующих белков. Они могут действовать посредством нескольких различных механизмов, включающих в себя мутации в субстрат-связывающем домене; мутации в каталитическом домене; мутации в белок-связывающем домене (например, в доменах, участвующих в образовании мультимеров, эффекторных или связывающих активирующий белок доменах); мутации в домене клеточной локализации и т.д. Мутантный полипептид может взаимодействовать с полипептидами дикого типа (образующимися с другого аллеля) и образовывать нефункциональный мультимер. В соответствии с определенными вариантами осуществления мутантный полипептид будет продуцироваться в избыточном количестве. Производят точковые мутации, которые оказывают такое воздействие. Кроме того, слияние разных полипептидов различной длины с концом белка или делеция специфических доменов может давать в результате доминантных отрицательных мутантов. Доступны общие стратегии получения доминантных отрицательных мутантов (см., например, Herskowitz, *Nature* (1987) 329:219, и источники, цитируемые выше). Такие методики применяют для создания мутаций с потерей функции, которые являются полезными для определения функции белка. Способы, которые являются хорошо известными специалистам в данной области техники, можно применять для конструирования экспрессионных векторов, содержащих кодирующие последовательности и соответствующие сигналы управления транскрипцией и трансляцией для повышенной экспрессии экзогенного гена, введенного в клетку. Эти способы включают в себя, например, осуществляемые *in vitro* методики на основе использования рекомбинантной ДНК, методики синтеза и осуществляемую *in vivo* генетическую рекомбинацию. В качестве альтернативы, РНК, способную кодировать последовательности генного продукта, можно синтезировать химически, например, с применением синтезаторов. См., например, методики, описанные в "Oligonucleotide Synthesis", 1984, Gait, M. J. ed., IRL Press, Oxford.

В соответствии с другими вариантами осуществления средство представляет собой средство, которое модулирует, например, ингибирует, активность В2М посредством связывания В2М и/или ингибирования связывания В2М со вторым белком, например, белком-членом МНС1. Например, интерес представляют малые молекулы, которые связываются с В2М и ингибируют его активность. Встречающиеся в естественных условиях или синтетические соединения-малые молекулы, представляющие интерес,

включают в себя многочисленные химические классы, такие как органические молекулы, например, малые органические молекулы, имеющие молекулярную массу более чем 50 и менее чем приблизительно 2500 дальтон. Средства-кандидаты содержат функциональные группы для структурного взаимодействия с белками, в особенности, для образования водородных связей, и, как правило, функциональные группы включают в себя по меньшей мере аминную, карбонильную, гидроксильную или карбоксильную группу, предпочтительно, по меньшей мере две из функциональных химических групп. Средства-кандидаты могут включать в себя циклические углеродные или гетероциклические структуры и/или ароматические или полиароматические структуры, замещенные одной или несколькими вышеуказанными функциональными группами. Средства-кандидаты также обнаруживаются среди биологических молекул, в том числе пептидов, сахаридов, жирных кислот, стероидов, пуринов, пиримидинов, производных, структурных аналогов или их комбинаций. Такие молекулы могут быть идентифицированы, среди прочих способов, посредством использования протоколов скрининга, описанных ниже. Конкретные примеры средств на основе малых молекул, которые могут использоваться для снижения экспрессии B2M, включают в себя, без ограничения: риамицин SV: (7S,9E,11S,12R,13S,14R,15R,16R,17S,18S,19E,21Z)-2,15,17,27,29-пентагидрокси-11-метокси-3,7,12,14,16,18,22-гептаметил-26-{(E)-[(4-метилпиперазин-1-ил)имино]метил}-6,23-диоксо-8,30-диокса-24-азатетрацикло[23.3.1.14,7.05,28]триаконта-1(28),2,4,9,19,21,25(29),26-октаен-13-ил-ацетат (который раскрыт в Woods, et al., "Ligand binding to distinct states diverts aggregation of an amyloid-forming protein" *Nature Chemical Biology* (2011) 7: 730-9); меклоциклин, доксициклин, 4-эпи-окситетрациклин, ролитетрациклин, ангидрохлортетрациклин, метациклин и окситетрациклин (который описан в Giorgetti, et al., "Effect of tetracyclines on the dynamics of formation and destructure of beta2-microglobulin amyloid fibrils," *The Journal of Biological Chemistry* (2011) 286: 2121-31); пептиды D-TLKIVW, D-TWKLVL, D-YVIER и D-DYYFEF (которые описаны в документе № 8754034); а также средства, описанные в: Morozov, et al., "Survey of small molecule and ion binding to beta 2-microglobulin—possible relation to BEN," (1991) 34: S85-8, Regazzoni, et al., "Screening of fibrillogenesis inhibitors of B2-microglobulin: integrated strategies by mass spectrometry capillary electrophoresis and in silico simulations," *Analytica Chimica Acta* (2011) 685: 153-61, Quaglia, et al., "Search of ligands for the amyloidogenic protein beta2-microglobulin by capillary electrophoresis and other techniques," *Electrophoresis* (2005) 26: 4055-63, Ozawa, et al., "Inhibition of beta2-microglobulin amyloid fibril formation

by alpha2-macroglobulin,” The Journal of Biological Chemistry (2011) 286: 9668-9676, Pullara and Emanuele, “Early stages of beta2-microglobulin aggregation and the inhibiting action of alphaB-crystallin,” (2008) 73: 1037-46, Wanchu, et al., “Suppression of beta 2 microglobulin by pentoxiphylline therapy in asymptomatic HIV infected individuals,” (2001) 113: 75-7, Brancolini, et al., “Can small hydrophobic gold nanoparticles inhibit B2-microglobulin fibrillation?,” Nanoscale (2014) 6: 7903-11, в заявках на патент США № US20040127445 и № US20130331327.

В соответствии с определенными вариантами осуществления вводимое активное средство представляет собой В2М-специфический связывающий элемент. В целом, подходящие В2М-специфические связывающие элементы, проявляют аффинность (K_d) в отношении целевого В2М, такого как человеческий В2М, которая является достаточной для обеспечения желаемого снижения активности В2М, связанной с нарушением, ассоциированным со старением. При использовании в контексте данного документа термин «аффинность» относится к константе равновесия для обратимого связывания двух средств; «аффинность» может быть выражена в виде константы диссоциации (K_d). Аффинность может быть по меньшей мере 1-кратно большей, по меньшей мере 2-кратно большей, по меньшей мере 3-кратно большей, по меньшей мере 4-кратно большей, по меньшей мере 5-кратно большей, по меньшей мере 6-кратно большей, по меньшей мере 7-кратно большей, по меньшей мере 8-кратно большей, по меньшей мере 9-кратно большей, по меньшей мере 10-кратно большей, по меньшей мере 20-кратно большей, по меньшей мере 30-кратно большей, по меньшей мере 40-кратно большей, по меньшей мере 50-кратно большей, по меньшей мере 60-кратно большей, по меньшей мере 70-кратно большей, по меньшей мере 80-кратно большей, по меньшей мере 90-кратно большей, по меньшей мере 100-кратно большей или по меньшей мере 1000-кратно большей или более, чем аффинность антитела в отношении нерелевантных аминокислотных последовательностей. Аффинность специфического связывающего элемента в отношении белка-мишени может составлять, например, от приблизительно 100 наномоль/литр (нМ) до приблизительно 0,1 нМ, от приблизительно 100 нМ до приблизительно 1 пикомоль/литр (пМ) или от приблизительно 100 нМ до приблизительно 1 фемтомоль/литр (фМ) или более. Термин «связывание» относится к непосредственной ассоциации между двумя молекулами, обусловленной, например, ковалентными, электростатическими, гидрофобными и ионными взаимодействиями и/или взаимодействиями с образованием водородных связей, включая такие взаимодействия, как солевые мостики и водные мостики. В соответствии с некоторыми

вариантами осуществления антитела связывают человеческий B2M с наномолярной аффинностью или пикомолярной аффинностью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитела связывают человеческий B2M с Kd, составляющей менее приблизительно 100 нМ, 50 нМ, 20 нМ, 20 нМ или 1 нМ.

Примеры B2M-специфических связывающих элементов включают в себя антитела к B2M и их связывающие фрагменты. Неограничивающие примеры таких антител включают в себя антитела, направленные на любой эпитоп B2M. Также охватываются биспецифические антитела, т.е. антитела, в которых каждый из двух связывающих доменов распознает отличающийся связывающий эпитоп. Аминокислотная последовательность человеческого B2M раскрыта в Cunningham, et al., "The complete amino acid sequence of beta-2-microglobulin," *Biochemistry* (1973) 12: 4811-4821.

Специфические связывающие элементы на основе антител, которые можно использовать, включают в себя полные антитела или иммуноглобулины любого изотипа, а также фрагменты антител, которые сохраняют специфическое связывание с антигеном, в том числе, без ограничения, Fab, Fv, scFv и Fd фрагменты, химерные антитела, гуманизированные антитела, одноцепочечные антитела и слитые белки, содержащие антигенсвязывающую часть антитела и белок, отличный от антитела. Антитела могут быть помечены выявляемой меткой, например, радиоизотопом, ферментом, который образует выявляемый продукт, флуоресцентным белком и т.п. Антитела могут быть дополнительно конъюгированы с другими фрагментами, такими как члены пар, специфически связывающиеся друг с другом, например, с биотином (членом член пары специфически связывающихся молекул биотин-стрептавидин) и т.п. Термином также охватываются Fab', Fv, F(ab')₂ и/или другие фрагменты антител, которые сохраняют специфическое связывание с антигеном, и моноклональные антитела. Антитело может быть моновалентным или бивалентным.

«Фрагменты антител» содержат часть интактного антитела, например, антигенсвязывающего или вариабельного участка интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают в себя Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv фрагменты; диатела; линейные антитела (Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 (1995)); одноцепочечные молекулы антител; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Расщепление антител папаином дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых «Fab» фрагментами, каждый из которых имеет один антигенсвязывающий сайт, и остаточный «Fc» фрагмент, причем данное обозначение отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином дает на выходе

F(ab')₂ фрагмент, который имеет два антигенсвязывающих активных центра антитела и при этом все еще способен к перекрестному связыванию с антигеном.

«Fv» представляет собой минимальный фрагмент антитела, который содержит полный сайт распознавания и связывания антигена. Этот участок состоит из димера одного вариабельного домена тяжелой цепи и одного вариабельного домена легкой цепи в прочной нековалентной ассоциации. Для данной конфигурации характерно, что три CDR в каждом вариабельном домене взаимодействуют, определяя сайт связывания антигена на поверхности димера VH-VL. В совокупности шесть CDR придают антителу специфичность связывания антигена. Тем не менее, даже один вариабельный домен (или половина Fv, содержащая только три CDR, специфические в отношении антигена) обладает способностью к распознаванию и связыванию антигена, хотя и с более низкой аффинностью, чем полный сайт связывания.

«Fab» фрагмент также содержит константный домен легкой цепи и первый константный домен (CH1) тяжелой цепи. Fab фрагменты отличаются от Fab' фрагментов добавлением нескольких остатков на карбоксильном конце CH1 домена тяжелой цепи, в том числе одного или нескольких цистеинов из шарнирного участка антитела. Fab'-SH представляет собой обозначение в данном документе для Fab', в котором цистеиновый остаток(цистеиновые остатки) в константных доменах несут свободную тиольную группу. F(ab')₂ фрагменты антител первоначально получали в виде пар Fab' фрагментов, которые имели между собой цистеины из шарнирного участка. Также известны другие молекулы, полученные в результате химического связывания фрагментов антител.

«Легкие цепи» антител (иммуноглобулинов) из любого вида позвоночных можно отнести к одному из двух явно отличающихся типов, называемых каппа и лямбда, исходя из аминокислотных последовательностей их константных доменов. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей иммуноглобулины можно отнести к разным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2.

«Одноцепочечные Fv» или «sFv» фрагменты антител содержат VH и VL домены антитела, причем эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид Fv дополнительно содержит полипептидный линкер между VH и VL доменами, который обеспечивает возможность образования sFv необходимой структуры для связывания с антигеном. Для

обзора sFv см. Pluckthun в *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Таким образом, антитела, которые можно применять вместе с данным раскрытием, охватывают моноклональные антитела, поликлональные антитела, биспецифические антитела, Fab фрагменты антител, F(ab)₂ фрагменты антител, Fv фрагменты антител (например, VH или VL), одноцепочечные Fv фрагменты антител и dsFv фрагменты антител. Более того, молекулы антител могут представлять собой полностью человеческие антитела, гуманизированные антитела или химерные антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулы антител представляют собой моноклональные полностью человеческие антитела.

Антитела, которые можно применять вместе с данным раскрытием, могут включать в себя переменный участок любого антитела, зрелого или не подвергнутого процессингу, связанный с константным участком любого иммуноглобулина. Если переменный участок легкой цепи связан с константным участком, тот может представлять собой константный участок каппа-цепи. Если переменный участок тяжелой цепи связан с константным участком, тот может представлять собой человеческий константный участок гамма 1, гамма 2, гамма 3 или гамма 4, более предпочтительно, гамма 1, гамма 2 или гамма 4 и еще более предпочтительно гамма 1 или гамма 4.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полностью человеческие моноклональные антитела, направленные против B2M, получают с применением трансгенных мышей, несущих части человеческой иммунной системы, вместо мышинной иммунной системы.

Незначительные вариации в аминокислотных последовательностях антител или молекул иммуноглобулинов охватываются настоящим изобретением при условии, что вариации в аминокислотной последовательности сохраняют по меньшей мере 75%, например, по меньшей мере 80%, 90%, 95% или 99% последовательности. В частности, предполагаются консервативные аминокислотные замены. Консервативные замены представляют собой такие, которые имеют место в пределах семейств аминокислот, которые являются близкими по своим боковым цепям. Приводит ли изменение аминокислоты к функциональному пептиду, можно легко определить посредством анализа специфической активности производного полипептида. Фрагменты (или аналоги) антител или молекул иммуноглобулинов могут быть легко получены квалифицированным специалистом в данной области техники. Предпочтительные

амино- и карбокси-концы фрагментов или аналогов находятся возле границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены можно идентифицировать посредством сравнения данных о нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности с общедоступными или проприетарными базами данных с последовательностями. Предпочтительно, компьютеризованные методы сравнения применяют для идентификации мотивов последовательности или прогнозируемых конформационных доменов белка, которые находятся в других белках с известной структурой и/или функцией. Способы идентификации последовательностей белков, которые сворачиваются в известную трехмерную структуру, являются известными. Мотивы последовательности и структурные конформации можно применять для определения структурных и функциональных доменов в соответствии с настоящим изобретением.

Конкретные примеры средств на основе антител, которые могут использоваться для снижения экспрессии В2М, включают в себя, без ограничения: антитело к В2м В1-1G6 (иммуноглобулин G2a [IgG2]), В2-62-2 (IgG2a) и С21-48А (IgG2b) от Immunotech S.A. (Марсель, Франция); антитело к В2м МАb НС11-151-1 (IgG1) (которое раскрыто в Corbeau, et al., "An early postinfection signal mediated by monoclonal anti-beta 2 microglobulin antibody is responsible for delayed production of human immunodeficiency virus type 1 in peripheral blood mononuclear cells," *Journal of Virology* (1990) 64: 1459-64); клон В2, мышинный IgG1 (Sero-tec Ltd., Оксфорд, Великобритания); мышинные mAb к человеческому В2М, которые раскрыты в Yang, et al., "Targeting beta(2)-microglobulin for induction of tumor apoptosis in human hematological malignancies," (2006) 10: 295-307; 1В749 (IgG2a) и НВ28 (IgG2b) (которые раскрыты в Pokrass, et al., "Activation of complement by monoclonal antibodies that target cell-associated B2-microglobulin: implications for cancer immunotherapy," (2013) 56: 549-60); антитело к В2-микроглобулину (антитело ВВМ.1) (которое раскрыто в Brodsky, et al., "Characterization of a monoclonal anti-beta 2-microglobulin antibody and its use in the genetic and biochemical analysis of major histocompatibility antigens," *European Journal of Immunology* (1979) 9: 536-45; ВВМ-1 (которое раскрыто в Korkolopoulou, "Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP -1) in lung cancer," *British Journal of Cancer* (1996) 73: 148-53; антитела В1.1G6, С23.24.2, В2.62.2 и С21.48А1 (которые раскрыты в Liabeuf, et al., "An antigenic determinant of human beta 2-microglobulin masked by the association with HLA heavy chains at the cell surface: analysis using monoclonal antibodies," *Journal of Immunology* (1981) 127: 1542-8); а также те средства на основе антител, описанные в: Zhang, et al., "Anti-B2М

monoclonal antibodies kill myeloma cells via cell- and complement-mediated cytotoxicity,” International Journal of Cancer (2014) 135: 1132-41, Yang, et al., “Anti beta2-microglobulin monoclonal antibodies induce apoptosis in myeloma cells by recruiting MHC class I to and excluding growth and survival cytokine receptors from lipid rafts,” Blood (2007) 110: 3028-35, Jossen, et al., “Inhibition of B2-microglobulin/hemochromatosis enhances radiation sensitivity by induction of iron overload in prostate cancer cells,” (2013) 8: e68366, Par and Falus, “Serum beta 2-microglobulin (beta 2m) and anti-beta 2m antibody in chronic hepatitis,” Acta Medica Hungarica (1986) 43:343-9, Huang, et al., “Androgen receptor survival signaling is blocked by anti-beta2-microglobulin monoclonal antibody via a MAPK/lipogenic pathway in human prostate cancer cells,” The Journal of Biological Chemistry (2010) 285: 7947-56, Tam and Messner, “Differential inhibition of mitogenic responsiveness by monoclonal antibodies to beta 2-microglobulin,” (1991) 133: 219-33, Domanska, et al., “Atomic structure of a nanobody-trapped domain-swapped dimer of an amyloidogenic beta2-microglobulin variant,” Proc Natl Acad Sci U S A. (2011) 108(4):1314-9, Falus, et al., “Prevalence of anti-beta-2 microglobulin autoantibodies in sera of rheumatoid arthritis patients with extra-articular manifestations,” Annals of the Rheumatic Diseases, (1981) 40: 409-413, Shabunina, et al., “Immunosorbent for Removal of B2-microglobulin from Human Blood Plasma,” Bulletin of Experimental Biology and Medicine (2001) 132: 984-986), в патентных документах №№ WO/2010/017443, 7341721, WO/1996/002278, WO/2003/079023 и WO/1990/013657.

В соответствии с теми вариантами осуществления, в которых активное средство вводят взрослому млекопитающему, активное средство(активные средства) можно вводить взрослому млекопитающему с применением любого подходящего протокола введения, способного обеспечить в результате желаемую активность. Следовательно, средство может быть включено в ряд составов, например, в фармацевтически приемлемые среды, для терапевтического введения. Более конкретно, средства согласно настоящему изобретению могут быть составлены в фармацевтические композиции посредством объединения с соответствующими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями, и они могут быть составлены в препараты в твердой, полужидкой, жидкой или газообразной формах, такие как таблетки, капсулы, порошки, гранулы, мази (например, кремы для кожи), растворы, суппозитории, инъекционные растворы, препараты для ингаляции и аэрозоли. В связи с этим, введение средств может осуществляться различными путями, в том числе посредством перорального, буккального, ректального, парентерального, интраперитонеального, интрадермального, трансдермального, интратрахеального введения и т.д.

В фармацевтических лекарственных формах средства можно вводить в виде их фармацевтически приемлемых солей, или их также можно применять отдельно или в соответствующем сочетании, а также в комбинации с другими фармацевтически активными соединениями. Следующие способы и вспомогательные вещества являются только иллюстративными и не предполагают какого-либо ограничения.

В случае пероральных препаратов средства можно применять отдельно или в комбинации с соответствующими добавками для получения таблеток, порошков, гранул или капсул, например, с традиционными добавками, такими как лактоза, маннит, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; со связующими средствами, такими как кристаллическая целлюлоза, производные целлюлозы, камедь, кукурузный крахмал или желатины; с разрыхлителями, такими как кукурузный крахмал, картофельный крахмал или карбоксиметилцеллюлоза натрия; со смазывающими средствами, такими как тальк или стеарат магния; и, если это желательно, с разбавителями, буферными средствами, увлажняющими средствами, консервантами и ароматизаторами.

Средства можно составить в препараты для инъекции посредством их растворения, суспендирования или эмульгирования в водном или неводном растворителе, таком как растительное или другие подобные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, сложные эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоля; и, если это необходимо, смешивания с общепринятыми добавками, такими как солюбилизаторы, средства, обеспечивающие изотоничность, суспендирующие средства, эмульгирующие средства, стабилизаторы и консерванты.

Средства можно использовать в составе в виде аэрозоля, введение которого осуществляют посредством ингаляции. Соединения согласно настоящему изобретению можно составлять с подходящими газами-вытеснителями, находящимися под давлением, такими как дихлордифторметан, пропан, азот и т.п.

Более того, средства могут быть превращены в суппозитории посредством смешивания с рядом оснований, таких как эмульгирующие основания или водорастворимые основания. Соединения согласно настоящему изобретению можно вводить ректально посредством суппозитория. Суппозиторий может включать в себя среды, такие как какао-масло, карбоваксы и полиэтиленгликоли, которые тают при температуре тела, находясь в твердой форме при комнатной температуре.

Могут быть обеспечены единичные лекарственные формы для перорального или ректального введения, такие как сиропы, эликсиры и суспензии, в которых каждая дозированная единица, например, чайная ложка, столовая ложка, таблетка или

суппозиторий, содержит предварительно определенное количество композиции, содержащей один или несколько ингибиторов. Аналогичным образом, единичные лекарственные формы для инъекции или внутривенного введения могут содержать ингибитор(ингибиторы) в композиции в виде раствора в стерильной воде, нормальном солевом растворе или другом фармацевтически приемлемом носителе.

Используемый в контексте данного документа термин «единичная лекарственная форма» относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов-людей и субъектов-животных, причем каждая единица содержит предварительно определенное количество соединений согласно настоящему изобретению, которое согласно расчетам является количеством, достаточным для получения желаемого эффекта, совместно с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или средой. Характеристики новых единичных лекарственных форм согласно настоящему изобретению зависят от конкретного используемого соединения и от эффекта, которого нужно достичь, а также от фармакодинамических характеристик, ассоциированных с каждым соединением у хозяина.

Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как среды, вспомогательные средства, носители или разбавители, общедоступны из открытых источников. Более того, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как средства, корректирующие pH, и буферные средства, средства, регулирующие тоничность, стабилизаторы, смачивающие средства и т.п., общедоступны из открытых источников.

В случае, когда средство представляет собой полипептид, полинуклеотид, их аналог или миметик, его можно вводить в ткани или клетки-хозяева с помощью любого количества путей, в том числе с помощью вирусной инфекции, микроинъекции или слияния пузырьков. Безыгольную инъекцию также можно применять для внутримышечного введения, как описано в Furth et al., *Anal Biochem.* (1992) 205:365-368. ДНК может быть нанесена в виде покрытия на золотые микрочастицы и доставлена интрадермально с помощью устройства для бомбардировки частицами или «генной пушки», как описано в литературе (см., например, Tang et al., *Nature* (1992) 356:152-154), где на золотые микрочастицы наносят в виде покрытия ДНК, а затем бомбардируют ими клетки кожи. В случае терапевтических средств на основе нуклеиновых кислот находят применение ряд различных сред для доставки, в том числе вирусные и невирусные векторные системы, которые являются известными в уровне техники.

Специалист в данной области техники легко поймет, что уровни дозы могут варьировать в зависимости от конкретного соединения, природы среды для доставки и т.п. Предпочтительные дозировки для заданных соединений могут быть легко определены специалистом в данной области техники с помощью ряда средств.

В соответствии с теми вариантами осуществления, в которых эффективное количество активного средства вводят взрослому млекопитающему, количество или дозировка являются эффективными при введении в течение подходящего периода времени, такого как одна неделя или более, в том числе две недели или более, как например, 3 недели или более, 4 недели или более, 8 недель или более и т.д., для того, чтобы доказать ослабление нарушения, например, снижения когнитивных способностей, и/или улучшение когнитивных способностей у взрослого млекопитающего. Например, эффективная доза представляет собой дозу, которая при введении в течение подходящего периода времени, такого как по меньшей мере приблизительно одна неделя и, возможно, приблизительно две недели или более, вплоть до периода, составляющего приблизительно 3 недели, 4 недели, 8 недель или более, будет замедлять, например, приблизительно на 20% или более, например, на 30% или более, на 40% или более или на 50% или более, в некоторых случаях на 60% или более, на 70% или более, на 80% или более или на 90% или более, например, будет останавливать снижение когнитивных способностей у пациента, страдающего от естественного старения или нарушения, ассоциированного со старением. В некоторых случаях эффективное количество или доза активного средства будет не только замедлять или останавливать прогрессирование болезненного состояния, но также будет индуцировать регресс состояния, т.е. будет вызывать улучшение когнитивной способности. Например, в некоторых случаях эффективное количество представляет собой количество, которое при введении в течении подходящего периода времени, обычно по меньшей мере приблизительно одной недели и, возможно, приблизительно две недели или более, вплоть до периода, составляющего приблизительно 3 недели, 4 недели, 8 недель или более, будет улучшать когнитивные способности индивида, страдающего от ассоциированного со старением когнитивного нарушения, например, 1,5-кратно, 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, 5-кратно, в некоторых случаях 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно или 10-кратно или более в сравнении с когнитивной способностью до введения препарата крови.

При желании эффективность лечения можно оценить с применением любого подходящего протокола. Тесты когнитивных способностей и тест IQ (показатель умственного развития) для измерения когнитивной способности, например, внимания и

концентрации, способности к обучению сложным задачам и понятиям, памяти, обработки информации, функции пространственного зрения, способности к воспроизведению и пониманию речи, способности к решению сложных проблем и принятию решений, а также способности к выполнению управляющих функций являются хорошо известными в уровне техники, любой из них можно применять для измерения когнитивной способности индивида перед лечением и/или во время и после лечения субъекта препаратом крови, например, для подтверждения того, что было введено эффективное количество. Они включают в себя, например, тест для оценки врачом общей практики когнитивных способностей (General Practitioner Assessment of Cognition) (GPCOG), скрининг нарушения памяти (Memory Impairment Screen), краткую шкалу оценки психического статуса (Mini Mental State Examination) (MMSE), калифорнийский тест на слухо-речевую память (California Verbal Learning Test) во второй редакции и короткой форме для оценки памяти, тест Делис-Каплан на оценку управляющих функций (Delis-Kaplan Executive Functioning System test), шкалу оценки когнитивных функций при болезни Альцгеймера (Alzheimer's Disease Assessment Scale) (ADAS-Cog), психогериатрическую оценочную шкалу (Psychogeriatric Assessment Scale) (PAS) и т.п. Прогресс функциональных улучшений в головном мозге можно выявить с помощью методик визуализации головного мозга, таких как магнитно-резонансная томография (МРТ) или позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) и т.п. Широкий спектр дополнительных методов функциональной оценки можно применять для мониторинга повседневной деятельности, управляющих функций, подвижности и т.д. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ предусматривает стадию измерения когнитивной способности и выявления пониженной скорости снижения когнитивных способностей, стабилизации когнитивной способности и/или повышения когнитивной способности после введения препарата крови по сравнению с когнитивной способностью индивида до того, как препарат крови был введен. Такие измерения можно производить спустя неделю или более после введения препарата крови, например, спустя 1 неделю, 2 недели, 3 недели или более, например, 4 недели, 6 недель или 8 недель или более, например, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев или 6 месяцев или более.

С биохимической точки зрения под «эффективным количеством» или «эффективной дозой» активного средства подразумевается количество активного средства, которое будет ингибировать, противодействовать, уменьшать, снижать или подавлять снижение синаптической пластичности и потерю синапсов, которые происходят в ходе естественного процесса старения или в ходе прогрессирования

нарушения, ассоциированного со старением, приблизительно на 20% или более, например, на 30% или более, на 40% или более или на 50% или более, в некоторых случаях на 60% или более, на 70% или более, на 80% или более или на 90% или более, в некоторых случаях приблизительно на 100%, т.е. до перенебрежимо малых величин, а в некоторых случаях будет вызывать их регресс. Иными словами, клетки, присутствующие у взрослых млекопитающих, которые получают лечение в соответствии со способами согласно настоящему изобретению, станут более восприимчивыми к сигналам, например, сигналам, обеспечивающим активность, которые способствуют образованию и поддержанию синапсов.

Результаты способов согласно настоящему изобретению, например, которые описаны выше, могут проявляться в виде улучшений наблюдаемой синаптической пластичности как *in vitro*, так и *in vivo* в виде индукции долговременной потенциации. Например, индукция LTP в нервных цепях может наблюдаться у просыпающихся индивидов, например, посредством осуществления методик неинвазивной стимуляции на просыпающихся индивидах с целью индукции LTP-подобных долговременных изменений локализованной нейронной активности (Cooke SF, Bliss TV (2006) Plasticity in the human central nervous system. *Brain*. 129(Pt 7):1659-73); картирования пластичности и повышенной активности нервных цепей у индивидов, например, с помощью применения позитронно-эмиссионной томографии, функциональной магнитно-резонансной томографии и/или транскраниальной магнитной стимуляции (Cramer and Bastings, "Mapping clinically relevant plasticity after stroke," *Neuropharmacology* (2000)39:842-51); и посредством выявления нейронной пластичности после обучения, т.е. улучшений памяти, например, посредством анализа активности головного мозга, связанной с воспроизведением информации (Buchmann et al., "Prion protein M129V polymorphism affects retrieval-related brain activity," *Neuropsychologia*. (2008) 46:2389-402), или, например, посредством визуализации ткани головного мозга с помощью функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ) после повторения воздействия с использованием знакомых и незнакомых объектов (Soldan et al., "Global familiarity of visual stimuli affects repetition-related neural plasticity but not repetition priming," *Neuroimage*. (2008) 39:515-26; Soldan et al., "Aging does not affect brain patterns of repetition effects associated with perceptual priming of novel objects," *J. Cogn. Neurosci*. (2008) 20:1762-76). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ включает в себя стадию измерения синаптической пластичности и выявления пониженной скорости потери синаптической пластичности, стабилизации

синаптической пластичности и/или повышения синаптической пластичности после введения препарата крови по сравнению с синаптической пластичностью у индивида до того, как препарат крови был введен. Такие измерения можно производить спустя неделю или более после введения препарата крови, например, спустя 1 неделю, 2 недели, 3 недели или более, например, 4 недели, 6 недель или 8 недель или более, например, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев или 6 месяцев или более.

В некоторых случаях способы приводят в результате к изменению уровней экспрессии одного или нескольких генов в одной или нескольких тканях хозяина, например, по сравнению с подходящим контролем (таким как описанный в разделе Экспериментальная часть, ниже). Изменение уровня экспрессии заданного гена может быть 0,5-кратным или большим, как например, 1,0-кратным или большим, в том числе 1,5-кратным или большим. Ткань может варьировать, и в некоторых случаях она представляет собой ткань нервной системы, например, ткань центральной нервной системы, в том числе ткань головного мозга, например, ткань гиппокампа. В некоторых случаях модуляция генной экспрессии в гиппокампе проявляется в виде повышенной гиппокампальной пластичности, например, по сравнению с подходящим контролем.

В некоторых случаях лечение приводит в результате к повышению уровней одного или нескольких белков в одной или нескольких тканях хозяина, например, по сравнению с подходящим контролем (таким как описанный в разделе Экспериментальная часть, ниже). Изменение уровня белка для заданного белка может быть 0,5-кратным или большим, как например, 1,0-кратным или большим, в том числе 1,5-кратным или большим, причем в некоторых случаях уровень может приближаться к уровню у здорового организма дикого типа, например, в пределах 50% или менее, как например, 25% или менее, в том числе 10% или менее, например, 5% или менее от уровня у здорового организма дикого типа. Ткань может варьировать, и в некоторых случаях она представляет собой ткань нервной системы, например, ткань центральной нервной системы, в том числе ткань головного мозга, например, ткань гиппокампа.

В некоторых случаях способы приводят в результате к одному или нескольким структурным изменениям в одной или нескольких тканях. Ткань может варьировать, и в некоторых случаях она представляет собой ткань нервной системы, например, ткань центральной нервной системы, в том числе ткань головного мозга, например, ткань гиппокампа. Представляющие интерес изменения структуры включают в себя повышение плотности дендритных шипиков у зрелых нейронов в зубчатой извилине (DG) гиппокампа, например, по сравнению с подходящим контролем. В некоторых

случаях модуляция структуры гиппокампа проявляется в виде усиленного образования синапсов, например, по сравнению с подходящим контролем. В некоторых случаях способы могут приводить в результате к усилению долговременной потенциации, например, по сравнению с подходящим контролем.

В некоторых случаях практическое осуществление способов, например, описанных выше, приводит в результате к повышению нейрогенеза у взрослого млекопитающего. Повышение можно идентифицировать различными способами, например, как описано ниже в разделе Экспериментальная часть. В некоторых случаях повышение нейрогенеза проявляется в виде повышения количества Dcx-положительных незрелых нейронов, например, причем повышение может быть 2-кратным или большим. В некоторых случаях повышение нейрогенеза проявляется в виде повышения числа BrdU/NeuN-положительных клеток, причем повышение может быть 2-кратным или большим.

В некоторых случаях способы приводят в результате к улучшению обучения и памяти, например, по сравнению с подходящим контролем. Улучшение обучения и памяти можно оценить различными способами, например, с использованием моделей контекстуального замирания и/или радиального водного лабиринта с рукавами (RAWM), описанных в разделе Экспериментальная часть, ниже. При измерении с помощью модели контекстуального замирания лечение в некоторых случаях приводит в результате к повышенному замиранию в тесте контекстуальной памяти, а не в тесте памяти, обусловленной сигналом. При измерении с помощью модели RAWM лечение в некоторых случаях приводит в результате к улучшенному обучению и памяти в отношении определения местоположения платформы в ходе фазы тестирования при выполнении задачи. В некоторых случаях лечение проявляется в виде повышенного улучшения когнитивных способностей при гиппокамп-зависимом обучении и памяти, например, по сравнению с подходящим контролем.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления снижение уровня B2M, например, как описано выше, можно осуществлять совместно с активным средством, обладающим активностью, подходящей для лечения когнитивного нарушения, ассоциированного со старением. Например, было показано, что ряд активных средств имеет некоторую эффективность при лечении когнитивных симптомов болезни Альцгеймера (например, потеря памяти, спутанность сознания и проблемы с мышлением и логическим рассуждением), например, ингибиторы холинэстеразы (например, донепезил, ривастигмин, галантамин, тарцин), мемантин и витамин Е. В качестве еще одного примера, было показано, что ряд средств имеет некоторую эффективность в

лечении поведенческих или психиатрических симптомов болезни Альцгеймера, например, циталопрам (целекса), флуоксетин (прозак), пароксеин (паксил), сертралин (золофт), тразодон (десирел), лоразепам (ативан), оксазепам (серакс), арипипразол (абилифай), клозапин (клозарил), галоперидол (галдол), оланзапин (зипрекса), кветиапин (сероквель), рисперидон (риспердал) и зипрасидон (геодон).

В некоторых аспектах данных способов способ дополнительно предусматривает стадию измерения когнитивной способности и/или синаптической пластичности после лечения, например, с применением способов, описанных в данном документе или известных в уровне техники, и определения того, что скорость снижения когнитивных способностей или потеря синаптической пластичности снизилась, и/или что когнитивная способность или синаптическая пластичность улучшилась у индивида. В некоторых таких случаях определение выполняют посредством сравнения результатов теста когнитивной способности или синаптической пластичности с результатами теста, осуществляемого с тем же индивидом в более ранний момент времени, например, 2 неделями ранее, 1 месяцем ранее, 2 месяцами ранее, 3 месяцами ранее, 6 месяцами ранее, 1 годом ранее, 2 годами ранее, 5 годами ранее или 10 годами ранее или более.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данные способы дополнительно включают в себя диагностику у индивида когнитивного нарушения, например, с применением способов, описанных в данном документе или известных в уровне техники для измерения когнитивной способности и синаптической пластичности, перед введением субъекту содержащего плазму препарата крови. В некоторых случаях диагностика будет предусматривать измерение когнитивной способности и/или синаптической пластичности и сравнение результатов теста когнитивной способности или синаптической пластичности с одним или несколькими эталонными значениями, например, положительным контролем и/или отрицательным контролем. Например, эталонные значения могут представлять собой результаты теста, выполняемого одним или несколькими индивидами в соответствующей возрастной группе, которые страдают от когнитивных нарушений, ассоциированных со старением (т.е. положительные контроли), или которые не страдают от когнитивных нарушений, ассоциированных со старением (т.е. отрицательные контроли). В качестве еще одного примера, эталонные значения могут представлять собой результаты теста, выполненного тем же индивидом в более ранний момент времени, например, 2 неделями ранее, 1 месяцем ранее, 2 месяцами ранее, 3 месяцами ранее, 6 месяцами ранее, 1 годом ранее, 2 годами ранее, 5 годами ранее или 10 годами ранее или более.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данные способы дополнительно предусматривают диагностику у индивида нарушения, ассоциированного со старением, например, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, лобно-височной деменции, прогрессирующего надъядерного паралича, болезни Хантингтона, бокового амиотрофического склероза, спинальной мышечной атрофии, рассеянного склероза, мультисистемной атрофии, глаукомы, атаксии, миотонической дистрофии, деменции и т.п. Способы диагностики таких нарушений, ассоциированных со старением, являются хорошо известными в уровне техники, причем любой из них может применяться квалифицированным специалистом в данной области техники при диагностике у индивида. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данные способы дополнительно предусматривают как диагностику у индивида нарушения, ассоциированного со старением, так и наличия когнитивного нарушения.

Применение

Данные способы находят применение в лечении, в том числе в предупреждении нарушений, ассоциированных со старением, и состояний, ассоциированных с ними, таких как нарушения когнитивной способности у индивидов. Индивиды, страдающие от когнитивных нарушений, ассоциированных со старением, или имеющие риск их развития, включают в себя индивидов возрастом приблизительно 50 лет или старше, например, 60 лет или старше, 70 лет или старше, 80 лет или старше, 90 лет или старше и обычно не старше 100 лет, т.е. возрастом приблизительно от 50 до 100, например, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или приблизительно 100 лет, и страдающих от когнитивного нарушения, ассоциированного с естественным процессом старения, например, умеренного когнитивного нарушения (М.С.І.); и индивидов возрастом приблизительно 50 лет или старше, например, 60 лет или старше, 70 лет или старше, 80 лет или старше, 90 лет или старше и обычно не старше 100 лет, т.е. возрастом приблизительно от 50 до 90, например, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или приблизительно 100 лет, у которых еще не начали проявляться симптомы когнитивного нарушения. Примеры когнитивных нарушений, которые обусловлены естественным старением, включают в себя следующие:

Умеренное когнитивное нарушение (М.С.І.) представляет собой умеренное нарушение когнитивных способностей, которое проявляется в виде проблем с памятью или другими психическими функциями, такими как планирование, следование инструкциям или принятие решений, которые ухудшаются со временем, в то время как

общая психическая функция и повседневная деятельность не ухудшаются. Таким образом, несмотря на то что значительная гибель нейронов, как правило, не происходит, нейроны в стареющем головном мозге уязвимы к сублетальным возрастным изменениям в структуре, целостности синапсов и процессинге молекул на синапсе, все из которых ухудшают когнитивные функции.

Индивиды, страдающие от когнитивного нарушения, ассоциированного со старением, или имеющие риск его развития, на которых будет оказывать благоприятное воздействие лечение данным содержащим плазму препаратом крови, например, с помощью способов, раскрытых в данном документе, также включают в себя индивидов любого возраста, которые страдают от когнитивного нарушения, обусловленного нарушением, ассоциированным со старением; и индивидов любого возраста, у которых было диагностировано нарушение, ассоциированное со старением, которое, как правило, сопровождается когнитивным нарушением, причем у индивида еще не начали присутствовать симптомы когнитивного нарушения. Примеры таких нарушений, ассоциированных со старением, включают в себя следующие:

Болезнь Альцгеймера (AD). Болезнь Альцгеймера представляет собой прогрессирующую неуклонную потерю когнитивной функции, ассоциированную с избыточным количеством сенильных бляшек в коре больших полушарий головного мозга и подкорковом сером веществе, которое также содержит бета-амилоид и нейрофибриллярные клубки, состоящие из тау-белка. Обычная форма поражает индивидов возрастом >60 лет, и частота ее возникновения возрастает с увеличением возраста. Она составляет более 65% деменций у людей пожилого возраста.

Причина болезни Альцгеймера неизвестна. Заболевание встречается в семьях приблизительно в 15-20% случаев. Остальные так называемые спорадические случаи имеют некоторые генетические детерминанты. Заболевание характеризуется аутосомно-доминантным характером наследования в большинстве случаев с ранним началом и в некоторых случаях с поздним началом, но варьирующей пенетрантностью в пожилом возрасте. Факторы окружения являются предметом активного изучения.

В ходе развития заболевания происходит потеря синапсов и, в конечном счете, нейронов в коре больших полушарий головного мозга, гиппокампе и подкорковых структурах (в том числе избирательная потеря клеток в базальном ядре Мейнерта), голубом пятне и дорсальном ядре шва. Потребление глюкозы головным мозгом и перфузия снижаются в некоторых областях головного мозга (в коре теменной доли и височной доли на ранних стадиях заболевания, в префронтальной коре на поздних

стадиях заболевания). Нейритические или сенильные бляшки (состоящие из нейритов, астроцитов и глиальных клеток вокруг амилоидного ядра) и нейрофибриллярные клубки (состоящие из спаренных спиральных нитей) играют роль в патогенезе болезни Альцгеймера. Сенильные бляшки и нейрофибриллярные клубки возникают при нормальном старении, но они являются гораздо более распространенными у индивидов с болезнью Альцгеймера.

Болезнь Паркинсона. Болезнь Паркинсона (PD) представляет собой идиопатическое, медленно прогрессирующее дегенеративное нарушение ЦНС, характеризующееся медленной и ослабленной моторикой, ригидностью мышц, тремором в состоянии покоя и постуральной неустойчивостью. Первоначально считавшийся преимущественно двигательным нарушением, PD в настоящее время считается также поражающей когнитивные функции, поведенческие функции, сон, функцию автономной нервной системы и сенсорную функцию. Наиболее распространенные когнитивные нарушения включают в себя нарушение внимания и концентрации, кратковременной памяти, управляющей функции, воспроизведения речи и функции пространственного зрения.

При первичной болезни Паркинсона теряются пигментированные нейроны черного вещества, голубого пятна и другие группы дофаминергических клеток ствола головного мозга. Причина является неизвестной. Потеря нейронов черного вещества, которая переносится на хвостатое ядро и скорлупу, приводит в результате к уменьшению нейромедиатора-дофамина в этих областях. Начало заболевания обычно наступает после 40 лет с повышением частоты возникновения в более старших возрастных группах.

Вторичный паркинсонизм является результатом потери дофамина или препятствования действию дофамина в базальных ганглиях вследствие других идиопатических дегенеративных заболеваний, действия лекарственных средств или экзогенных токсинов. Наиболее распространенной причиной вторичного паркинсонизма является прием антипсихотических лекарственных средств или резерпина, которые приводят к паркинсонизму вследствие блокирования дофаминовых рецепторов. Менее распространенные причины включают в себя отравление монооксидом углерода или марганцем, гидроцефалию, структурные повреждения (опухоли, инфаркты, повреждающие средний мозг или базальные ганглии), субдуральную гематому и дегенеративные нарушения, в том числе стриатонигральную дегенерацию.

Лобно-височная деменция. Лобно-височная деменция (FTD) представляет собой состояние, являющееся результатом прогрессирующего повреждения лобной доли

головного мозга. Со временем дегенерация может распространяться на височную долю. Уступая по распространенности только болезни Альцгеймера (AD), на долю FTD приходится 20% случаев пресенильной деменции. Симптомы классифицируют на три группы, исходя из функций пораженных лобной и височной долей: Поведенческий вариант FTD (bvFTD) с симптомами включающими в себя летаргию и аспонтанность с одной стороны и расторможенность - с другой; прогрессирующую небыструю афазию (PNFA), при которой нарушение плавности речи обусловлено сложностью артикуляции, наблюдаются фонологические и/или синтаксические ошибки, но понимание слов сохраняется; и семантическую деменцию (SD), при которой пациенты сохраняют плавность речи с нормальной фонологией и синтаксисом, но испытывают возрастающие трудности с присвоением названий и пониманием слов. Другие когнитивные симптомы, общие для всех пациентов с FTD, включают в себя нарушение управляющей функции и способности к сосредоточению. Другие когнитивные способности, в том числе восприятие, навыки ориентирования в пространстве, память и праксис, как правило, остаются интактными. FTD может быть диагностирована при наблюдении проявлений атрофии лобной доли и/или передней височной доли на структурных сканограммах, полученных с помощью МРТ.

Существует ряд форм FTD, лечение или предупреждение любой из которых можно осуществлять с применением данных способов и композиций. Например, одной формой лобно-височной деменции является семантическая деменция (SD). SD характеризуется потерей семантической памяти как в вербальной, так и в невербальной сферах. Пациенты с SD часто имеют жалобы, касающиеся затруднений с подбором слов. Клинические признаки включают в себя небыструю афазия, аномию, нарушенное понимание значения слов и ассоциативную зрительную агнозию (неспособность к подбору семантически связанных картинок или объектов). По мере прогрессирования заболевания часто наблюдаются изменения в поведении и личности, подобные наблюдаемым при лобно-височной деменции, хотя были описаны случаи «чистой» семантической деменции с незначительными поздними поведенческими симптомами. Визуализация структуры с помощью МРТ показывает характерные признаки атрофии в височных долях (преимущественно слева) с большим вовлечением в атрофию нижней части височной доли, нежели верхней, и передней части височной доли, нежели в задней.

В качестве еще одного примера, другая форма лобно-височной деменции представляет собой болезнь Пика (PiD, также PcD). Определяющей характеристикой заболевания является отложение тау-белков в нейронах, накопление в виде

окрашиваемых серебром сферических агрегатов, известных как «тельца Пика». Симптомы включают в себя потерю речи (афазию) и деменцию. Пациенты с орбито-фронтальной дисфункцией могут становиться агрессивными и социально неадекватными. Они могут красть или демонстрировать obsессивное или повторяющееся стереотипное поведение. Пациенты с дорсомедиальной или дорсолатеральной фронтальной дисфункцией могут демонстрировать отсутствие заинтересованности, апатию или уменьшенную непосредственность. Пациенты могут демонстрировать отсутствие самоконтроля, ненормальную поглощенность собой и неспособность к оценке значения. Пациенты с потерей серого вещества в билатеральной постеро-латеральной орбито-фронтальной коре больших полушарий и правой передней островковой доле больших полушарий головного мозга могут демонстрировать изменения в пищевом поведении, такие как патологическое пристрастие к сладкому. У пациентов с более фокальной потерей серого вещества в антеро-латеральной орбито-фронтальной коре больших полушарий может развиваться гиперфагия. Несмотря на то что некоторые из симптомов могут быть первоначально облегчены, заболевание прогрессирует, и пациенты часто умирают в течение двух-десяти лет.

Болезнь Хантингтона. Болезнь Хантингтона (HD) представляет собой наследственное прогрессирующее нейродегенеративное нарушение, характеризующееся развитием эмоциональных, поведенческих и психиатрических аномалий; потерей интеллектуальных или когнитивных функций и двигательными аномалиями (двигательными расстройствами). Классические признаки HD включают в себя развитие хореи – непроизвольных, быстрых, неупорядоченных, порывистых движений, которые могут затрагивать лицо, руки, ноги или туловище, а также снижение когнитивных способностей, в том числе постепенную потерю мыслительной деятельности и приобретенных интеллектуальных способностей. Может присутствовать нарушение памяти, абстрактного мышления и способности к оценке ситуации; неправильное восприятие времени, пространства или самосознания индивида (дезориентация); повышенное возбуждение и изменения в личности (распад личности). Несмотря на то что симптомы, как правило, становятся выраженными на четвертом или пятом десятилетии жизни, возраст начала заболевания изменяется и варьирует от раннего детского возраста до поздней зрелости (например, 70 или 80 лет).

HD передается в семьях как аутосомно-доминантный признак. Нарушение возникает в результате аномально длинных последовательностей или «повторов» кодируемой информации в пределах гена на хромосоме 4 (4p16.3). Прогрессирующая

потеря функции нервной системы, ассоциированная с HD, является результатом потери нейронов в определенных областях головного мозга, в том числе в базальных ганглиях и коре больших полушарий головного мозга.

Боковой амиотрофический склероз. Боковой амиотрофический склероз (ALS) представляет собой быстро прогрессирующее, неизменно смертельное неврологическое заболевание, которое поражает двигательные нейроны. Мышечная слабость и атрофия, а также признаки дисфункции клеток передних рогов спинного мозга первоначально наиболее часто заметны в кистях рук и менее часто - в ногах. Место возникновения является случайным, и прогрессирование является асимметричным. Судороги являются обычными и могут предшествовать слабости. Редко пациент проживает 30 лет; 50% умирают в течение 3 лет от начала заболевания, 20% живут 5 лет, и 10% живут 10 лет. Диагностические признаки включают в себя возникновение заболевания в течение среднего или старшего взрослого возраста и прогрессирующее генерализованное поражение заболеванием двигательных функций без сенсорных аномалий. Скорости проведения нервного импульса являются нормальными до конца развития заболевания. Недавние исследования документально подтвердили присутствие и когнитивных нарушений, в особенности, снижение непосредственной вербальной памяти, зрительной памяти, речевой и управляющей функции.

Снижение площади поверхности тела клетки, количества синапсов и общей длины синапсов наблюдалось даже в нормально выглядящих нейронах у пациентов с ALS. Предполагали, что в случае, когда пластичность активной зоны достигает своего предела, продолжающаяся потеря синапсов может приводить к функциональному нарушению. Стимулирование образования новых синапсов или предупреждение потери синапсов может поддерживать функционирование нейронов у этих пациентов.

Рассеянный склероз. Рассеянный склероз (MS) характеризуется различными симптомами и признаками дисфункции ЦНС с периодами ремиссии и рецидивирующими обострениями. Наиболее часто присутствующими симптомами является парестезия в одной или нескольких конечностях, в туловище или на одной стороне лица; слабость или неловкость ноги или руки; или зрительные расстройства, например, частичная слепота и боль в одном глазу (ретробульбарный неврит зрительного нерва), слабость зрения или скотомы. Обычные когнитивные нарушения включают в себя нарушения памяти (усвоение, сохранение и воспроизведение новой информации), внимания и концентрации (в особенности, разделенного внимания), обработки информации, управляющих функций, функций пространственного зрения и плавности

речи. Обычными ранними симптомами являются паралич глазодвигательного нерва, результатом которого является двойное зрение (диплопия), временная слабость одной или нескольких конечностей, легкая ригидность или необычная утомляемость конечности, незначительные нарушения походки, затруднение с контролем мочевого пузыря, головокружение и легкие эмоциональные расстройства; все они указывают на рассеянное поражение заболеванием ЦНС и часто возникают за месяцы или годы до того, как заболевание будет распознано. Избыточное тепло может подчеркивать симптомы и признаки.

Течение является очень изменчивым, непредсказуемым и, у большинства пациентов, ремиттирующим. Вначале эпизоды могут разделять месяцы или годы ремиссии, особенно, когда заболевание начинается с ретробульбарного неврита зрительного нерва. Тем не менее, некоторые пациенты имеют частые приступы и быстро становятся нетрудоспособными; для небольшого количества течение заболевания может быть стремительно прогрессирующим.

Глаукома. Глаукома является распространенным нейродегенеративным заболеванием, которое поражает ганглионарные клетки сетчатки (RGC). Доказательства подтверждают существование компартментализированных программ дегенерации в синапсах и дендритах, в том числе в RGC. Недавние данные также указывают на корреляцию между когнитивным нарушением у взрослых людей пожилого возраста и глаукомой (Yochim BP, et al. Prevalence of cognitive impairment, depression, and anxiety symptoms among older adults with glaucoma. J Glaucoma. 2012;21(4):250-254).

Миотоническая дистрофия. Миотоническая дистрофия (DM) представляет собой аутосомно-доминантное мультисистемное нарушение, характеризующееся дистрофической мышечной слабостью и миотонией. Молекулярный дефект представляет собой распространенный трехнуклеотидный повтор (CTG) в 3'-нетранслируемом участке гена миотонин-протеинкиназы на хромосоме 19q. Симптомы могут возникать в любом возрасте, и диапазон тяжести клинических проявлений является широким. Миотония является выраженной в мышцах кистей рук, и птоз является обычным даже в легких случаях. В тяжелых случаях возникает выраженная слабость периферических мышц, часто с катарактой, преждевременным облысением, удлинённым лицом, сердечными аритмиями, атрофией семенников и эндокринными аномалиями (например, сахарным диабетом). Задержка умственного развития является обычной при тяжелых врожденных формах, в то время как связанное со старением снижение когнитивных функций, связанных с лобными и височными областями, в

особенности, речевой и управляющей функций, наблюдается при более легких формах нарушения у взрослых. Индивиды с тяжелым поражением умирают в первые несколько лет после достижения 50 летнего возраста.

Деменция. Деменцией описывается класс нарушений, имеющих симптомы, поражающие мыслительные и социальные способности достаточно тяжело, чтобы препятствовать ежедневной деятельности. Другие примеры деменции, помимо деменции, которая наблюдается на поздних стадиях нарушений, ассоциированных со старением, которые обсуждались выше, включают в себя сосудистую деменцию и деменцию с тельцами Леви, описанные ниже.

При сосудистой деменции или «мультиинфарктной деменции» когнитивное нарушение вызывается проблемами в снабжении головного мозга кровью, как правило, вследствие серии малых инсультов или иногда одного большого инсульта, которому предшествуют или за которым следуют другие меньшие инсульты. Повреждения сосудов могут быть результатом диффузного заболевания сосудов головного мозга, как например, заболевания малых сосудов, или очаговых поражений, или их обоих из них. У пациентов, страдающих от сосудистой деменции, присутствует когнитивное нарушение, острое или подострое, после острого цереброваскулярного нарушения, после которого наблюдается прогрессирующее снижение когнитивных способностей.

Когнитивные нарушения являются подобными наблюдаемым при болезни Альцгеймера, включая нарушения речи, памяти, обработки сложных зрительных образов или управляющей функции, хотя соответствующие изменения в головном мозге обусловлены не патологией AD, а хронически уменьшенным кровотоком в головном мозге, в конечном счете приводящим в результате к деменции. Визуализацию нервной ткани с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT) и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) можно применять для подтверждения диагноза мультиинфарктная деменция в сочетании с оценками, включающими оценку психического состояния.

Деменция с тельцами Леви (DLB, также известная под рядом других названий, в том числе деменция телец Леви, болезнь диффузных телец Леви, кортикальная болезнь с тельцами Леви и сенильная деменция типа Леви) представляет собой тип деменции, характеризующийся с анатомической точки зрения наличием телец Леви (сгустков белков альфа-синуклеина и убиквитина) в нейронах, выявляемых при посмертном гистологическом анализе головного мозга. Главным признаком является снижение когнитивных способностей, в особенности, выполнения управляющих функций.

Концентрация внимания и кратковременная память будут возрастать и падать. Стойкие или повторно возникающие зрительные галлюцинации с яркими и подробными картинками часто являются ранним диагностическим симптомом. DLB на ее ранних стадиях часто путают с болезнью Альцгеймера и/или сосудистой деменцией, хотя, если болезнь Альцгеймера обычно начинается достаточно постепенно, то DLB часто имеет быстрое или острое начало. Симптомы DLB также включают в себя двигательные симптомы, подобные симптомам при болезни Паркинсона. DLB отличается от деменции, которая иногда возникает при болезни Паркинсона, временными рамками, в пределах которых возникают симптомы деменции по сравнению симптомами болезни Паркинсона. Диагноз болезнь Паркинсона с деменцией (PDD) будет поставлен в том случае, когда деменция начинается более чем через год после начала болезни Паркинсона. DLB диагностируется в случае, когда когнитивные симптомы начинаются одновременно с симптомами болезни Паркинсона или в пределах года после их появления.

Прогрессирующий надъядерный паралич. Прогрессирующий надъядерный паралич (PSP) представляет собой нарушение головного мозга, которое вызывает серьезные и прогрессирующие проблемы с контролем при ходьбе и поддержании равновесия, вместе с проблемами со сложными движениями глаз и мышлением. Одним из классических признаков заболевания является неспособность ориентировать глаза должным образом, которая возникает вследствие поражений в области головного мозга, которая координирует движения глаз. Некоторые индивиды описывают этот эффект как затуманивание. У пораженных индивидов часто проявляются изменения настроения и поведения, в том числе депрессия и апатия, а также прогрессирующая умеренная деменция. Развернутое название нарушения указывает на то, что заболевание начинается медленно, продолжает ухудшаться (*прогрессирующий*) и вызывает слабость (*паралич*) вследствие повреждения определенных частей головного мозга выше структур размером с горошину, называемых ядрами, которые контролируют движения глаз (*надъядерный*). PSP был впервые описан как отдельное нарушение в 1964 году, когда трое ученых опубликовали статью, в которой определили отличия данного состояния от болезни Паркинсона. Его иногда также называют синдромом Стила-Ричардсона-Ольшевского, что отражает объединенные фамилии ученых, которые определили данное нарушение. Несмотря на то что состояние больного при PSP постепенно ухудшается, ни один больной не умер от PSP самого по себе.

Атаксия. Люди с атаксией имеют проблемы с координацией, поскольку поражены

части нервной системы, которые контролируют движение и поддержание равновесия. Атаксия может поражать пальцы, кисти рук, руки, ноги, тело, речь и движения глаз. Слово «атаксия» часто используют для описания симптома отсутствия координации, который может быть ассоциирован с инфекциями, повреждениями, другими заболеваниями или дегенеративными изменениями в центральной нервной системе. Термин «атаксия» часто используется для обозначения группы конкретных дегенеративных заболеваний нервной системы, называемых наследственными и спорадическими атаксиями, которые выделяются как основные Национальным фондом по борьбе с атаксией (National Ataxia Foundation).

Множественная системная атрофия. Множественная системная атрофия (MSA) представляет собой дегенеративное неврологическое нарушение. MSA является ассоциированной с дегенерацией нервных клеток в конкретных областях головного мозга. Дегенерация клеток вызывает проблемы с движением, сохранением равновесия и другими автономными функциями организма, такими как контроль мочевого пузыря или регуляция кровяного давления. Причина MSA является неизвестной, и не было идентифицировано специфических факторов риска. Около 55% случаев возникает у мужчин, причем, как правило, заболевание начинается в возрасте с последних лет десятилетнего периода после 50 лет до первых нескольких лет после 60. У MSA часто присутствуют некоторые симптомы, которые являются такими же, как и у болезни Паркинсона. Тем не менее, пациенты с MSA обычно проявляют минимальный ответ, если вообще проявляют, на дофаминовые лекарственные препараты, применяемые в случае болезни Паркинсона.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления данные способы и композиции находят применение в замедлении прогрессирования когнитивного нарушения, ассоциированного со старением. Иными словами, когнитивные способности у индивида будут снижаться медленнее после лечения с помощью раскрытых способов, чем до этого или в отсутствие лечения с помощью раскрытых способов. В некоторых таких случаях данные способы лечения включают в себя измерение прогрессирования снижения когнитивных способностей после лечения и определение того, что прогрессирование снижения когнитивных способностей снизилось. В некоторых таких случаях определение производят посредством сравнения с эталонным значением, например, скоростью снижения когнитивных способностей у индивида перед лечением, например, которую определяют посредством измерения когнитивной деятельности в два или более момента времени перед введением субъекту препарата крови.

Данные способы и композиции также находят применение в стабилизации когнитивных способностей индивида, например, индивида, страдающего от ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей, или индивида с риском того, что он будет страдать от ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей. Например, индивид может демонстрировать некоторое когнитивное нарушение, ассоциированное со старением, и прогрессирование когнитивного нарушения, наблюдаемое перед лечением с использованием раскрытых способов, будет останавливаться после лечения с помощью раскрытых способов. В качестве еще одного примера, индивид может иметь риск развития ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей (например, индивид может иметь возраст 50 лет или более, или у него может быть диагностировано нарушение, ассоциированное со старением), и когнитивные способности индивида являются, по сути, неизменными, т.е. невозможно выявить снижение когнитивных способностей после лечения с помощью раскрытых способов по сравнению с периодом перед лечением с использованием раскрытых способов.

Данные способы и композиции также находят применение в снижении когнитивного нарушения у индивида, страдающего от когнитивного нарушения, ассоциированного со старением. Иными словами, когнитивная способность у индивида после лечения с помощью данных способов улучшается. Например, когнитивная способность у индивида повышается, например, 2-кратно или более, 5-кратно или более, 10-кратно или более, 15-кратно или более, 20-кратно или более, 30-кратно или более или 40-кратно или более, в том числе 50-кратно или более, 60-кратно или более, 70-кратно или более, 80-кратно или более, 90-кратно или более или 100-кратно или более после лечения с помощью данных способов по сравнению с когнитивной способностью, которая наблюдается к индивида перед лечением с помощью данных способов. В некоторых случаях лечение с помощью данных способов и композиций восстанавливает когнитивную способность у индивида, страдающего от ассоциированного со старением снижения когнитивных способностей, например, до их уровня, когда индивид имел возраст приблизительно 40 лет или менее. Иными словами, когнитивное нарушение устраняется.

Реактивы, устройства и наборы

Также предполагаются реактивы, устройства и наборы с ними для практического осуществления одного или нескольких из вышеописанных способов. Данные реактивы,

устройства и наборы с ними могут в значительной степени варьировать. Представляющие интерес реактивы и устройства включают в себя упомянутые выше применительно к способам снижения уровней В2М у взрослого млекопитающего.

В дополнение к вышеуказанным компонентам данные наборы будут дополнительно включать в себя инструкции по практическому осуществлению данных способов. Эти инструкции могут присутствовать в данных наборах в различных формах, одна или несколько из которых могут присутствовать в наборе. Одна форма, в которой эти инструкции могут присутствовать, представляет собой печатную информацию на подходящем носителе или основе, например, на листке или листках бумаги, на которых распечатана информация, в упаковке набора, на листке-вкладыше в упаковке и т.д. Еще одно средство будет представлять собой машиночитаемый носитель, например, дискету, CD, портативный флэш-накопитель и т.д., на который была записана информация. Другие средства, которые могут присутствовать, представляют собой адрес веб-сайта, который можно использовать с помощью сети Интернет для доступа к информации на удаленном сайте. Любые подходящие средства могут присутствовать в наборах.

Следующие примеры представлены с целью иллюстрации, а не ограничения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Следующие примеры используются для того, чтобы представить квалифицированному специалисту в данной области техники полное раскрытие и описание того, как осуществлять и применять настоящее изобретение, и они не предназначены ни для ограничения объема того, что предполагается авторами настоящего изобретения как их изобретение, ни для того, чтобы представить, что приведенные ниже эксперименты представляют собой все или единственные выполненные эксперименты. Были предприняты попытки для обеспечения точности в отношении используемых численных величин (например, количеств, температуры и т.д.), но некоторые ошибки эксперимента и отклонения следует принимать во внимание. Если не указано иное, части представляют собой массовые части, молекулярная масса представляет собой средневесовую молекулярную массу, температура выражена в градусах Цельсия, и давление равно или приблизительно равно атмосферному.

I. Методы

A. *Животные модели*

Использовали следующие линии мышей: C57BL/6 (The Jackson Laboratory), старые

мыши C57BL/6 (National Institutes of Aging), мутантные по $\beta 2$ -микроглобулину ($B2M^{-/-}$) мыши и мутантные по *транспортеру 1, связанному с процессингом антигена*, ($Tar1^{-/-}$) мыши (The Jackson Laboratory). Все исследования проводили на самцах мышей. Количество мышей, используемое для получения в результате статистически значимых различий, рассчитывали с использованием стандартных расчетов статистической мощности с $\alpha = 0,05$ и мощностью, составляющей 0,8. Авторами настоящего изобретения использовался онлайн-инструмент (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/index.html>) для расчета мощности и размера выборки, исходя из опыта соответствующих исследований, вариабельности анализов и различий между индивидами в пределах групп. Мышей содержали в особых условиях с отсутствием патогенов с 12-часовым циклом чередования света и темноты, и все обращение и использование животных осуществлялось в соответствии с установленными руководствами, утвержденными Комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) Калифорнийского университета, Сан-Франциско, и Комитетом по исследованиям на животных VA Palo Alto Committee on Animal Research.

В. Парабиоз

Хирургическая операция по обеспечению парабиоза следовала ранее описанным процедурам (Villeda, S.A., *et al.*, “The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function,” *Nature* (2011) 477: 90-94), (Villeda, S. A. *et al.*, “Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice,” *Nature medicine* (2014) 20:659-663). Производили зеркально расположенные разрезы в коже на левом и правом боках и более короткие разрезы делали в стенке брюшной полости. И отверстия в брюшине у связанных парабионтов сшивали вместе. Локтевые и коленные суставы у каждого парабионта сшивали вместе, и кожу каждой мыши прикрепляли степлером (9 мм Autoclip, Clay Adams) к коже связанного парабионта. Каждой мыши вводили инъекцией подкожно антибиотик байтрил и бупренекс, целью которого является снятие боли, и подвергали мониторингу в ходе восстановления. Для оценки общего состояния здоровья и сохранения поведения несколько характеристик восстановления анализировали в различные моменты времени после хирургической операции, в том числе массу и поведение, проявляющееся в уходе за поверхностью тела, у мышей, объединенных в пары.

С. Стереотаксические инъекции

Животных помещали в рамку для стереотаксических манипуляций и подвергали анестезии с использованием 2% изофлурана (скорость потока кислорода 2 л/мин.), доставляемого через носовой конус для анестезии. Офтальмологическую глазную мазь (Puralube Vet Ointment, Dechra) наносили на роговицу для предотвращения высыхания во время хирургической операции. Область вокруг разреза выстригали. Растворы вводили инъекцией билатерально в DG дорсальных частей гиппокампов с использованием следующих координат: вверх (от брегмы) = -2 мм, вбок = 1,5 мм, высота (от поверхности черепа) = -2,1 мм. Объем 2 мкл вводили инъекцией стереотаксически за 10 минут (скорость инъекции: 0,20 мкл/мин.) с использованием шприца Hamilton на 5 мкл с иглой калибра 26s. Чтобы ограничить отток по пути инъекции, иглу поддерживали *in situ* в течение 8 минут, медленно вытягивали наполовину и удерживали в этом положении в течение дополнительных двух минут. Кожу закрывали с использованием шелкового шва. Каждой мыши вводили инъекцией подкожно анальгетик бупренекс. Мышей разделяли по отдельным клеткам и подвергали мониторингу в течение периода восстановления.

D. *Введение B2M*

Не содержащий носителя очищенный человеческий $\beta 2$ -микроглобулин (Lee Biosolutions) растворяли в PBS и вводили системно (100 мкг/кг) посредством интраорбитальной инъекции молодым (3 месяца) животным дикого типа или стереотаксически (0,50 мкл; 0,1 мкг/мкл) в DG гиппокампа молодым (3 месяца) животным дикого типа и *Tap1*^{-/-} мутантам. Для гистологического анализа B2M и среду вводили в контралатеральную DG того же животного. Для поведенческого анализа B2M или среду вводили билатерально в DG и мышам позволяли восстановиться в течение шести или 30 суток перед исследованием когнитивных способностей.

E. *Введение и количественное определение BrdU*

Для кратковременного мечения с помощью BrdU 50 мг/кг BrdU вводили инъекцией интраперитонеально мышам один раз в сутки либо три, либо шесть суток до умерщвления. Для длительного мечения BrdU 50 мг/кг BrdU вводили инъекцией мышам каждые сутки в течение шести суток и животных умерщвляли через 28 суток после первого введения. Для оценки общего количества BrdU-положительных клеток в головном мозге авторами настоящего изобретения выполнялось окрашивание в отношении BrdU с использованием DAB (диаминобензидин) на каждом шестом срезе

половины мозга из общего количества, составляющего шесть срезов. Количество BrdU-положительных клеток среди гранулярных клеток и клеток субгранулярного слоя в DG подсчитывали и умножали на 12 для оценки общего количества BrdU-положительных клеток во всей DG. Для определения судьбы делящихся клеток суммарно 200 BrdU-положительных клеток в 4-6 срезах на мышь анализировали с помощью конфокальной микроскопии в отношении коэкспрессии с NeuN и GFAP. Количество положительных по двум маркерам клеток выражали в виде процента от BrdU-положительных клеток.

Ф. Иммуногистохимический анализ

Обработку ткани и иммуногистохимический анализ осуществляли на свободноплавающих срезах, следуя стандартным опубликованным методикам (Villeda, S.A., *et al.*, “The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function,” *Nature* (2011) 477: 90-94). Вкратце, мышей подвергали анестезии с использованием хлоральгидрата (Sigma-Aldrich) в дозе 400 мг/кг и при транскардиальной перфузии 0,9% солевым раствором. Головные мозги удаляли и фиксировали в 4% параформальдегиде, стабилизированном фосфатным буфером, pH 7,4, при 4°C в течение 48 часов перед тем, как их погружали в 30% сахарозу для криозащиты. Затем получали срезы головных мозгов вдоль венечного шва с шагом 40 мкм с использованием криомикротомы (Leica Camera, Inc.) и хранили их в криозащитной среде. Первичные антитела представляли собой: козье антитело к Dcx (1:500; Santa Cruz Biotechnology; sc-8066, клон: C-18), крысиное антитело к BrdU (1:5000, Accurate Chemical and Scientific Corp.; ab6326, клон: BU1/75), мышинное антитело к нестину (1:500; Millipore; MAB353; клон: rat-401) MCM2 (1:500, BD Biosciences; 610700; клон: 46/BM28), куриное антитело к Tbr2 (1:500; Millipore; AB15894), мышинное антитело к NeuN (1:1000; Millipore; MAB377; клон: A60), кроличье антитело к GFAP (1:500; DAKO; Z0334). После инкубирования в течение ночи окрашивание первичными антителами выявляли с использованием биотинилированных вторичных антител (Vector) и набора ABC (Vector) с диаминобензидином (DAB, Sigma-Aldrich) или вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентной меткой (Life Technologies). Для мечения BrdU срезы головного мозга подвергали предварительной обработке 2 н HCl при 37°C в течение 30 мин. и промывали три раза стабилизированным Tris-буфером солевым раствором с Tween (TBST) перед инкубированием с первичным антителом. Для мечения нестина и Tbr2 срезы головного мозга три раза подвергали предварительной обработке 0,1 М цитратом при 95°C в течение 5 мин. и промывали три раза стабилизированным Tris-буфером солевым

раствором с Tween (TBST) перед инкубированием с первичным антителом. Для оценки общего количества Dcx-положительных клеток в DG положительные по иммуноокрашиванию клетки среди гранулярных клеток и субгранулярного слоя клеток DG подсчитывали в каждом шестом сделанном в направлении венечного шва срезе половины мозга через гиппокамп из общего количества шесть срезов и умножали на 12.

G. *Вестерн-блоттинг анализ*

Гиппокампы мышей вырезали после перфузии животных, подвергали быстрому замораживанию и лизировали в лизирующем буфере RIPA (500 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5% дезоксихолат Na, 1% NP40, 0,1% SDS и полный набор ингибиторов протеаз; Roche). Лизаты тканей смешивали с 4× загрузочным буфером NuPage LDS (Invitrogen) и загружали на 4-12% градиентный полиакриламидный гель с SDS (Invitrogen), а затем переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Блоты блокировали в 5% молоке в стабилизированном Tris-буфером солевом растворе с Tween (TBST) и инкубировали с кроличьим антителом к актину (1:5000, Sigma; A5060) и кроличьим антителом к B2M (1:2500, Abcam; ab75853; клон: EP2978Y). Конъюгированные с пероксидазой хрена вторичные антитела (1:5000, GE Healthcare; NA934) и набор ECL (GE Healthcare/Amersham Pharmacia Biotech) использовали для выявления сигналов от белков. Несколько вариантов выдержки использовали для того, чтобы выбрать изображения в динамическом диапазоне пленки (GE Healthcare Amersham Hyperfilm™ ECL). Выбранные пленки сканировали (300 dpi) и подвергали количественному анализу с использованием программного обеспечения ImageJ (версия 1.46k). Полосы от актина использовали для нормализации.

H. *Анализы клеточной культуры*

Мышиные нервные клетки-предшественники выделяли из C57BL/6 мышей или мышей с репортерным Dcx (Couillard-Despres S, et al. “In vivo optical imaging of neurogenesis: watching new neurons in the intact brain.” *Molecular imaging*. 2008; 7:28-34.), как описано ранее (Villeda, S.A., et al., “The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function.” *Nature* (2011) 477: 90-94), (Mosher KI, et al. “Neural progenitor cells regulate microglia functions and activity.” *Nature neuroscience*. 2012; 15:1485-1487). Мозги от недавно родившихся животных (возрастом 1 сутки) вырезали с удалением обонятельных луковиц, коры больших полушарий, мозжечка и ствола мозга. После удаления поверхностных кровеносных сосудов гиппокампы в конце разрезали на

мелкие кусочки скальпелем, подвергали расщеплению в течение 30 минут при 37°C в среде DMEMB, содержащей 2,5 Ед./мл папаина (Worthington Biochemicals), 1 Ед./мл диспазы II (Boeringher Mannheim) и 250 Ед./мл ДНКазы I (Worthington Biochemicals) и механическому разъединению. NSC/предшественники очищали с использованием градиента плотности на основе 65% Percoll и высевали на непокрытые чашки для тканевых культур с плотностью, составляющей 10^5 клеток/см². NPC культивировали в стандартных условиях в течение 48 часов в среде NeuroBasal A, дополненной пенициллином (100 Ед./мл), стрептомицином (100 мг/мл), 2 mM L-глутамином, добавкой из бессывороточного B27 без витамина A (Sigma-Aldrich), bFGF (20 нг/мл) и EGF (20 нг/мл). Не содержащие носителя формы человеческого рекомбинантного B2M (Vendor) растворяли в PBS и добавляли к клеточным культурам в условиях самоподдержания раз в двое суток после посева клеток. Для оценки пролиферации измеряли включение BrdU с использованием системы для анализа клеточной пролиферации, в которой используется конъюгированное с пероксидазой антитело к BrdU вместе с окрашенным субстратом для выявления (Fisher). Для анализов биолюминисценции активность Dcx-люциферазы измеряли с использованием системы для анализа люциферазы (Promega). Дифференцировку оценивали с помощью иммуногистохимического анализа с использованием мышиного антитела к MAP2 (1:1000, Sigma; M9942; клон: HM-2) и кроличьего антитела к GFAP (1:500, DAKO; Z0334). Цитотоксичность измеряли посредством выявления лактат-дегидрогеназы (LDH) с использованием системы для анализа цитотоксичности Pierce LDH Cytotoxicity Assay system (Life Technologies).

I. Контекстуальное замирание

В этой задаче мышей обучали устанавливать ассоциативную связь контекста окружающей среды (камера для условно-рефлекторного замирания) с отрицательным раздражителем (легкое электроболевое раздражение лап животных; безусловно-рефлекторный стимул, US), что позволяет исследовать гиппокамп-зависимое контекстуальное замирание. Поскольку контекстуальное замирание является зависимым от гиппокампа и миндалины, легкое электроболевое раздражение лап животных использовалось в паре со световым и звуковым сигналом (условно-рефлекторный стимул, CS) с целью оценки зависимого от миндалины условно-рефлекторного замирания, обусловленного сигналом. Условно-рефлекторная реакция страха проявлялась в виде замирания. Конкретные параметры тренировки были следующими:

длительность звукового сигнала составляет 30 секунд; уровень составляет 70 дБ, 2 кГц; длительность электроболевого раздражения составляет 2 секунды; интенсивность составляет 0,6 мА. Эта интенсивность не является болезненной и может легко переноситься, но будет создавать неприятное ощущение. Более конкретно, в День 1 каждую мышь помещали в камеру для условно-рефлекторного замирания и позволяли изучить обстановку в течение 2 минут перед подачей 30-секундного звукового сигнала (70 дБ), заканчивающегося 2-секундным электроболевым раздражением лап животных (0,6 мА). Две минуты спустя доставляли вторую пару CS-US. В День 2 каждую мышь вначале помещали в камеру для условно-рефлекторного замирания, содержащую те же самые контекстуальные условия, но без CS или электроболевого раздражения. Замирание анализировали в течение 1-3 минут. Один час спустя мышей помещали в новые контекстуальные условия, содержащие отличающийся запах, чистящий раствор, текстуру пола, стенки и форму камеры. Животным позволяли изучить обстановку в течение 2 минут перед повторным воздействием CS. Замирание анализировали в течение 1-3 минут. Замирание измеряли с использованием системы и программного обеспечения для видео-телевизионного отслеживания FreezeScan (Cleversys, Inc).

Ж. Радиальный водный лабиринт

Пространственное обучение и память оценивали с использованием модели радиального водного лабиринта с рукавами (RAWM), следуя протоколу, описанному Alamed et al. Nat. Protocols (2006) 1: 1671-1679). В этой задаче расположение целевого рукава, содержащего платформу, остается постоянным в ходе фазы тренировки и тестирования, тогда как стартовый рукав изменяется во время каждого испытания. В первый день во время фазы тренировки мышей тренировали в ходе 15 испытаний, причем испытания чередовались между видимой и скрытой платформой. На второй день во время фазы тестирования, мышей тестировали в ходе 15 испытаний со скрытой платформой. Вход в неправильный рукав оценивается как ошибка, и ошибки усредняют по блокам тренировки (три последовательных испытания). Исследователи были лишены информации о генотипе и обработке при определении оценки.

З. Сбор плазмы и протеомный анализ

Кровь мышей собирали в покрытые EDTA пробирки посредством забора крови из хвостовой вены, забора крови из нижнечелюстной вены или забора крови из полости сердца во время умерщвления. Плазму с EDTA получали посредством

центрифугирования при 1000g свежесобранной крови и аликвоты хранили при -80°C до использования. Образцы человеческой плазмы и CSF получали от медицинского факультета Вашингтонского университета (University of Washington School of Medicine), исследовательского, образовательного и клинического центра психиатрических заболеваний при северо-западном отделении организации по делам ветеранов (Veterans Affairs Northwest Network Mental Illness Research, Education, and Clinical Center), Орегонского университета медицины и науки (Oregon Health Science University) и Калифорнийского университета из Сан-Диего (University of California San Diego). Субъектов выбирали на основании стандартизированных критериев включения и исключения, которые были описаны ранее (Villeda, S.A., *et al.*, “The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function.” *Nature* (2011) 477: 90-94), (Zhang, J. *et al.*, “CSF multianalyte profile distinguishes Alzheimer and Parkinson diseases.” *American journal of clinical pathology* (2008) 129: 526-529), (Li, G. *et al.*, “Cerebrospinal fluid concentration of brain-derived neurotrophic factor and cognitive function in non-demented subjects.” *PloS one* (2009) 4: e5424) и изложены в дополнительной таблице 1. Получали информированное согласие от субъектов-людей в соответствии с руководствами экспертных советов в соответствующих центрах.

Таблица 1.

Критерии включения субъектов с нормальным старением	Критерии исключения субъектов с нормальным старением
• Возраст: Субъекты соответствуют возрастным ограничениям для включения в конкретную диагностическую группу. • Лицо, предоставляющее информацию: Наличие лица, предоставляющего информацию, для всех субъектов. • Общее состояние здоровья: достаточно хорошее для полного завершения посещений в ходе исследования. • Индекс массы тела (BMI): 18 - 34	• Зрение и/или слух являются слишком нарушенными (даже с учетом коррекции) для того, чтобы обеспечить выполнение психометрического тестирования • Медицинские проблемы: нестабильные, плохо контролируемые или тяжелые медицинские проблемы или заболевания. • Наличие злокачественной опухоли в последние 12 месяцев (исключается плоскоклеточная СА кожи или стадия 1 СА предстательной железы). • Противопоказания к люмбальной пункции: нарушение свертываемости

-
- Стабильный прием лекарственных препаратов в течение 4 недель до посещения с забором крови или CSF.
 - Разрешенные лекарственные препараты включают в себя: ингибиторы AChE, мемантин, HRT (эстроген +/- прогестерон, люпрон), гормон щитовидной железы, антидепрессанты, статины.
 - Нормальные базовые лабораторные исследования: BUN (азот мочевины в крови), креатинин (будет допускаться уровень креатинина до 1,5), B12, TSH (тиреотропный гормон).
 - MMSE > 27/30 (исключения, если низкий статус обучения и контроля устанавливают при подробной оценке)
 - Характеристики памяти в отношении логической памяти в пределах нормального диапазона.
 - CDR = 0
 - Результаты осмотра неврологом являются нормальными, т.е. нет признаков инсульта, паркинсонизма или значительных аномалий.
- крови, применение кумадина, гепарин или подобного антикоагулянта, тромбоциты < 100000; деформация или хирургическая операция, затрагивающая пояснично-крестцовый отдел позвоночника, которые являются достаточно тяжелыми, чтобы сделать люмбальную пункцию проблематичной, кожный сепсис в пояснично-крестцовой области.
 - Неврологические нарушения: нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, CJD, FTD, PSP; инсульт в последние 12 месяцев или достаточно тяжелые остаточные эффекты более раннего инсульта с нарушением неврологической или когнитивной функции; рассеянный склероз; эпилепсия
 - Психиатрические нарушения: шизофрения, биполярное аффективное расстройство
 - Активная/ неконтролируемая депрессия: с историей болезни или с оценкой по GDS (гериатрическая шкала депрессии)
 - Злоупотребление наркотическими веществами или алкоголем в последние 2 года
 - Исключающие лекарственные препараты (за 4 недели до посещения с забором крови или CSF)
 - Нейролептики/ атипичные антипсихотические средства
-

-
- Лекарственные препараты против болезни Паркинсона (L-dopa, дофаминовые агонисты)
 - Стимуляторы ЦНС: модафинил, риталин
 - Противозепилептические лекарственные средства (исключения для нейронтин или подобных более новых AED (противозепилептические лекарственные средства), употребляемых для снятия боли)
 - Лечение инсулином
 - Кортизон (пероральное применение запрещено, допускается местное применение или применение с использованием ингалятора), лекарственные средства, подавляющие иммунную систему (например, метотрексат, цитоксан, IVIg, такролимус, циклоспорин) или противоопухолевые лекарственные средства
 - Лекарственные препараты против ВИЧ
-

Концентрации цитокинов и сигнальных молекул в плазме крови измерялись в образцах человеческой и мышинной плазмы с использованием стандартных мультиплексных иммуноанализов на основе антител (Luminex) компанией Rules Based Medicine Inc. с оплатой исполнителю отдельных услуг. Все результаты измерений Luminex получали в слепом формате. Все анализы были разработаны и валидированы согласно руководствам Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical Laboratory Standards Institute) (ранее NCCLS) на основании принципов иммуноанализа, которые описаны производителями.

L. Данные и статистический анализ

Все эксперименты рандомизировались и приводились в слепой формат

независимым исследователем перед фармакологической обработкой или оценкой генетических мышинных моделей. Исследователи оставались лишенными информации в отношении принадлежности к контрольной или экспериментальной группе в ходе гистологической, биохимической и поведенческой оценок. Информацию о группах открывали в конце каждого эксперимента при статистическом анализе. Данные выражены в виде среднего значения $\pm$ SEM. Распределение данных в каждом наборе экспериментов исследовали в отношении нормальности с использованием обобщенного критерия Д'Агостино-Пирсона или критерия Шапиро-Уилка. Отсутствие значимых различий в величине отклонения между группами выявляли с использованием F-критерия. Статистический анализ осуществляли с использованием программного обеспечения Prism 5.0 (GraphPad Software). Средние значения в двух группах сравнивали с использованием двухстороннего непарного t-критерия Стьюдента. Сравнения средних значений из нескольких групп друг с другом или с одной контрольной группой анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа с последующими соответствующими апостериорными тестами (указаны в условных обозначениях к фигурам).

II. Результаты и обсуждение

Старение остается единственным наиболее преобладающим фактором риска для связанных с деменцией нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера (Hedden & Gabrieli, "Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience.," Nature reviews. Neuroscience (2004) 5:87-96; Mattson & Magnus, "Ageing and neuronal vulnerability.," Nature reviews. Neuroscience (2006) 7:278-294; Small et al., "A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease.," Nature reviews. Neuroscience (2011) 12:585-601). В связи с этим требуется крайне важным является достижение понимания сути механизмов, посредством которых проявляются фенотипы старения в головном мозге, с целью сохранения целостности когнитивных процессов в пожилом возрасте и, следовательно, противодействовать уязвимости для нейродегенеративного заболевания. Авторами настоящего изобретения, а также другими учеными было недавно показано, что системные манипуляции, такие как гетерохронный парабиоз (при котором кровеносные системы молодого и старого животных являются соединенными) или введение плазмы крови молодых животных может приводить к частичному регрессу связанной со старением потери когнитивных и регенеративных способностей в стареющем головном мозге (Katsimpardi et al., "Vascular and neurogenic

rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors.,” *Science* (2014) 344:630-634; Villeda et al., “The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function.,” *Nature* (2011) 477:90-94; Villeda et al., “Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice.,” *Nature medicine* (2014) 20:659-663). Интересно, что исследования с гетерохронным парабиозом выявили зависимость от возраста двунаправленность влияния системного окружения, указывая на то, что способствующие омоложению факторы в крови молодых животных вызывают омоложение, тогда как способствующие старению факторы в крови старых животных запускают старение (Katsimpardi et al., “Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors.,” *Science* (2014) 344:630-634; Villeda et al., “The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function.,” *Nature* (2011) 477: 90-94; Ruckh et al., “Rejuvenation of regeneration in the aging central nervous system.,” *Cell stem cell* (2012) 10:96-103; Conboy et al., “Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment.,” *Nature* (2005) 433:760-764; Brack et al., “Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis.,” *Science* (2007) 317: 807-810). Был сделан прогноз, что за счет ослабления эффекта способствующих старению факторов можно также обеспечить эффективный подход к омоложению фенотипов, характерных для старения (Villeda *et al.*, “Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice.,” *Nature medicine* (2014) 20:659-663; Laviano, “Young blood.,” *The New England journal of medicine* (2014) 371:573-575; Bouchard & Villeda, “Aging and brain rejuvenation as systemic events.,” *Journal of neurochemistry* (2014)).

В своей традиционной роли В2М представляет собой легкую цепь молекул МНС I, которые образуют активную часть адаптивной иммунной системы (Zijlstra et al., “Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells.,” *Nature* (1990) 344:742-746). В центральной нервной системе (ЦНС) В2М и МНС I могут действовать независимо от своей канонической иммунной функции, регулируя нормальное развитие головного мозга, синаптическую пластичность и даже поведение (Lee et al. Synapse elimination and learning rules co-regulated by MHC class I H2-Db. *Nature* (2014) **509**:195-200; Loconto et al., “Functional expression of murine V2R pheromone receptors involves selective association with the M10 and M1 families of MHC class Ib molecules.,” *Cell* (2003) 112:607-618; Boulanger & Shatz, “Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease.,” *Nature reviews. Neuroscience* (2004) 5: 521-531; Shatz, “MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity.,” *Neuron* (2009) 64:40-45; Huh et al., “Functional requirement for class I MHC in

CNS development and plasticity.,” *Science* (2000) 290:2155-2159; Goddard et al., “Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2007) 104:6828-6833; Glynn et al., “MHCI negatively regulates synapse density during the establishment of cortical connections.,” *Nature neuroscience* (2011) 14:442-451). Кроме того, в своей растворимой форме B2M накапливается в системном кровотоке в результате отсоединения от поверхности клеток. Интересно, что повышенные системные уровни B2M были вовлечены в когнитивные нарушения, ассоциированные с хроническим гемодиализом (Murray, “Cognitive impairment in the aging dialysis and chronic kidney disease populations: an occult burden.,” *Advances in chronic kidney disease* (2008) 15:123-132; Corlin et al., “Quantification of cleaved beta2-microglobulin in serum from patients undergoing chronic hemodialysis.,” *Clinical chemistry* (2005) 51:1177-1184). Более того, повышение уровня растворимого B2M также наблюдалось в спинномозговой жидкости (CSF) пациентов с ВИЧ-деменцией (McArthur et al., “The diagnostic utility of elevation in cerebrospinal fluid beta 2-microglobulin in HIV-1 dementia. Multicenter AIDS Cohort Study.,” *Neurology* (1992) 42:1707-1712; Brew et al., “Predictive markers of AIDS dementia complex: CD4 cell count and cerebrospinal fluid concentrations of beta 2-microglobulin and neopterin.,” *The Journal of infectious diseases* (1996) 174:294-298) и болезнью Альцгеймера (Carrette et al., “A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease.,” *Proteomics* (2003) 3:1486-1494), что дополнительно связывает B2M с когнитивной дисфункцией.

Авторами настоящего изобретения были впервые охарактеризованы изменения системных уровней B2M в плазме крови мышей в ходе нормального старения (фиг. 1A,B) и в экспериментальной модели старения с использованием гетерохронного парабиоза (фиг. 1C,D). Авторами настоящего изобретения наблюдалось трехкратное повышение уровней B2M в плазме крови, полученной от старых животных, по сравнению с молодыми животными (фиг. 1B), а также было выявлено соответствующее повышение уровней B2M в плазме крови, полученной от молодых гетерохронных парабионтов после воздействия крови старых животных, по сравнению с молодыми изохронными парабионтами (фиг. 1D). Для подтверждения связи системных изменений, наблюдаемых для B2M у стареющих мышей, с системными изменениями, возникающими у людей, авторами настоящего изобретения измерялся уровень B2M в находящихся на хранении образцах плазмы крови и CSF от здоровых индивидов возрастом от 20 до 90 лет (таблица 1, выше). Авторами настоящего изобретения было выявлено связанное с возрастом повышение уровня B2M, измеренного как в плазме

крови, так и в CSF, согласующееся с изменениями, наблюдаемыми у стареющих мышей (фиг. 1E,F).

Идентифицировав B2M в качестве потенциального способствующего старению системного фактора, авторы настоящего изобретения затем задались вопросом, может ли повышение уровня системного B2M вызывать когнитивные нарушения, напоминающие дисфункцию, связанную со старением. В качестве контроля авторами настоящего изобретения вначале тестировалось гиппокамп-зависимое обучение и память с использованием моделей радиального водного лабиринта с рукавами (RAWM) и контекстуального замирания в когортке молодых и старых необработанных животных, и связанные со старением когнитивные нарушения наблюдались в обеих моделях исследования поведения (фиг. 2A-E). Затем авторы настоящего изобретения тестировали когнитивные способности молодых взрослых мышей, которым системно вводили растворимый белок B2M или среду посредством интраорбитальных инъекций (фиг. 1G). Животные не проявляли признаков болезни или потери массы независимо от обработки (фиг. 3A). В ходе фазы тренировки в задаче RAWM все мыши показывали подобные скорости плавания (фиг. 3B) и способность к обучению в отношении задачи (фиг. 1H). Тем не менее, в ходе фазы тестирования животные, получавшие B2M, проявляли нарушенное обучение и недостаточность памяти, совершая значительно большее число ошибок в определении местоположения целевой платформы, чем животные, получавшие контроль в виде среды (фиг. 1H). В ходе тренировки условно-рефлекторного замирания все мыши, независимо от обработки, не проявляли различий в исходном времени замирания (фиг. 3C). Тем не менее, мыши, получавшие B2M демонстрировали уменьшенное время замирания в ходе тестирования контекстуальной памяти (фиг. 1I), но не тестирования памяти, обусловленной сигналом, (фиг. 3D) по сравнению с контрольными животными, получавшими обработку средой. В совокупности эти поведенческие данные демонстрируют, что системное введение экзогенного B2M может нарушать обучение и память.

Нарушения в гиппокамп-зависимом обучении и памяти ранее связывали с пониженным нейрогенезом во взрослом возрасте (Clelland et al., "A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation," *Science* (2009) 325:210-213; Kitamura et al., "Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory," *Cell* (2009) 139:814-827; Zhang et al., "A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour," *Nature* (2008) 451:1004-1007). Хотя причинно-следственная связь между связанным со старением снижением когнитивных

способностей и пониженным нейрогенезом во взрослом возрасте остается запутанной (Drapeau et al., "Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2003) 100:14385-14390; Merrill et al., "Hippocampal cell genesis does not correlate with spatial learning ability in aged rats," *The Journal of comparative neurology* (2003) 459:201-207; Bizon & Gallagher, "Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline," *The European journal of neuroscience* (2003) 18:215-219; Seib et al. "Loss of Dickkopf-1 restores neurogenesis in old age and counteracts cognitive decline," *Cell stem cell* (2013) 12:204-214), недавние исследования с использованием гетерохронного парабиоза указывают на то, что когнитивные изменения, проявляющиеся под действием крови, являются ассоциированными с соответствующими изменениями в нейрогенезе во взрослом возрасте (Katsimpardi et al., "Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors," *Science* (2014) 344:630-634; Villeda et al., "The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function," *Nature* (2011) 477: 90-94). Затем авторы настоящего изобретения исследовали, сопровождаются ли пониженные уровни нейрогенеза в гиппокампе во взрослом возрасте также и когнитивными нарушениями, проявляющимися при повышенном системном воздействии B2M. Используя иммуногистохимический анализ, авторы настоящего изобретения выявили значительное снижение количества даблкортин (Dcx)-положительных новых образовавшихся нейронов (фиг. 1J,K) и Mcm2-положительных предшественников (фиг. 4A) в DG мышей, которым системно вводили экзогенный B2M, по сравнению с мышами, которым вводили инъекцией контроль в виде среды. В соответствии с изменениями в нейрогенезе авторами настоящего изобретения было выявлено уменьшение количества пролиферирующих клеток с включенным бромдезоксидуридином (BrdU) у животных, которым вводили инъекцией B2M, по сравнению со животными, которым вводили среду (фиг. 4B). Эти данные указывают на то, что системное воздействие экзогенного B2M является достаточным для снижения нейрогенеза во взрослом возрасте.

Для определения того, сопровождались ли системные связанные со старением изменения уровней B2M также локальными изменениями в головном мозге, авторами настоящего изобретения измерялись уровни B2M в гиппокампе молодых и старых животных с помощью анализа методом Вестерн-блоттинга и было выявлено связанное со старением повышение уровня белка B2M (фиг. 5A). Затем авторы настоящего изобретения задались вопросом, являются ли системные изменения уровней B2M,

проявляющиеся при гетерохронном парабиозе, также ассоциированными с соответствующими локальными изменениями в молодом гиппокампе после воздействия системного окружения старого животного. Авторами настоящего изобретения было выявлено повышение уровня экспрессии B2M белка в лизатах гиппокампа от молодых гетерохронных парабионтов по сравнению с молодыми изохронными контролями (фиг. 5B). В совокупности эти данные показывают, что связанные со старением изменения уровня B2M, наблюдаемые в системном окружении, сопровождаются соответствующими изменениями в головном мозге.

Для исследования эффекта локального воздействия экзогенного B2M в отношении обучения и памяти авторы настоящего изобретения вводили B2M или контроль в виде среды посредством билатеральных стереотаксических инъекций с последующим тестированием когнитивных функций с использованием RAWM и контекстуального замирания (фиг. 5C). Все мыши показывали подобные скорости плавания (фиг. 6A) и способность к обучению (фиг. 5D) в ходе фазы тренировки в задаче RAWM. В ходе фазы тестирования животные, получавшие B2M, совершали значительно большее количество ошибок в определении местоположения целевой платформы, чем животные, получавшие контроль в виде среды (фиг. 5D). В ходе тренировки условно-рефлекторного замирания ни одна из мышей не проявляла различий в исходном времени замирания (фиг. 6B). Тем не менее, мыши, получавшие B2M демонстрировали уменьшенное время замирания в ходе тестирования контекстуальной памяти (фиг. 5E), но не тестирования памяти, обусловленной сигналом, (фиг. 6C). Эти данные функциональных исследований указывают на то, что локальное воздействие B2M в DG нарушает обучение и память.

Для оценки эффекта локального воздействия экзогенного B2M в головном мозге, авторы настоящего изобретения вводили с помощью стереотаксической инъекции B2M в правую DG и контроль в виде среды в левую контралатеральную DG молодых взрослых мышей. Локальное воздействие B2M на DG приводило в результате к снижению количества Dcx-положительных клеток по сравнению с контралатеральной DG, обработанной контролем в виде среды (фиг. 5F,G). С учетом того, что B2M является активным компонентом комплекса МНС I за счет нековалентных взаимодействий на клеточной поверхности, авторы настоящего изобретения затем исследовали, опосредовался ли ингибирующий эффект экзогенного B2M в отношении нейрогенеза во взрослом возрасте экспрессией МНС I на клеточной поверхности. Белок-транспортёр 1, связанный с процессингом антигена, (Tap1) требуется для транспорта молекул МНС I к клеточной поверхности, и отсутствие Tap1 приводит в результате к тому, что очень

немногие классические молекулы МНС I достигают поверхности клетки (Boulanger & Shatz, "Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease," *Nature reviews. Neuroscience* (2004) 5:521-531; Shatz, "MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity.," *Neuron* (2009) 64:40-45; Van Kaer et al., "TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells.," *Cell* (1992) 71:1205-1214). Таким образом, для исследования того, может ли пониженная экспрессия МНС I на поверхности клетки ослаблять ингибирующий эффект экзогенного B2M, авторы настоящего изобретения вводили посредством стереотаксической инъекции молодым взрослым мышам, нокаутным по Tap1 (Tap1^{-/-}), B2M в правую DG и контроль в виде среды в левую контралатеральную DG. Наблюдали отсутствие различий в количестве Dcx-положительных клеток между DG, обработанной B2M, в сравнении с DG, обработанной контролем, у TAP1^{-/-} мышей (фиг. 5F,H). В соответствии с предыдущими сообщениями (Laguna Goya et al., "Adult neurogenesis is unaffected by a functional knock-out of MHC class I in mice," *Neuroreport* (2010) 21:349-353) авторы настоящего изобретения наблюдали отсутствие отличий в фоновых уровнях нейрогенеза между молодыми взрослыми Tap1^{-/-} животными и одноплодными животными дикого типа (WT) (фиг. 7A). В совокупности эти данные говорят о том, что повышенные локальные уровни экзогенного B2M являются достаточными для снижения нейрогенеза во взрослом возрасте зависимым от классического МНС I образом.

Затем авторы настоящего изобретения решили изучить, может ли снижение экспрессии МНС I на поверхности клеток отчасти ослаблять отрицательные эффекты крови старого животного в отношении нейрогенеза во взрослом возрасте, проявляющиеся при гетерохронном парабиозе (фиг. 8A). В соответствии с предыдущими сообщениями (Katsimpardi et al., "Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors.," *Science* (2014) 344:630-634; Villeda et al., "The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function.," *Nature* (2011) 477:90-94) авторы настоящего изобретения наблюдали снижение количества Dcx-положительных незрелых нейронов (фиг. 8B,C), Tbr2-положительных предшественников (фиг. 9A,B) и BrdU-положительных пролиферирующих клеток (фиг. 8D) у молодых гетерохронных парабионтов дикого типа по сравнению с молодыми изохронными парабионтами дикого типа. В отличие от этого, авторы настоящего изобретения не выявили сильных изменений уровней нейрогенеза у молодых Tap1^{-/-} гетерохронных парабионтов (фиг. 8B-D). В качестве контроля выявили отсутствие изменений нейрогенеза между молодыми изохронными парабионтами дикого типа и

молодыми *Tar1*^{-/-} изохронными парабионтами (фиг. 7B-D). В совокупности эти данные дополнительно подтверждают роль способствующих старению факторов в качестве движущих сил нарушения регенерации во взрослом головном мозге и, более того, вовлеченность молекул МНС I в этот процесс.

Наконец, авторы настоящего изобретения изучали, какое потенциальное благоприятное воздействие может оказать устранение эндогенной экспрессии B2M в отношении связанного со старением снижения когнитивных способностей, наблюдаемого в ходе старения. Авторами настоящего изобретения использовались нокаутные по B2M мыши (*B2M*^{-/-}), у которых отсутствовала экспрессия белка как в системном окружении, так и локально в головном мозге. Авторами настоящего изобретения оценивалось гиппокамп-зависимое обучение и память у молодых и старых *B2M*^{-/-} и контролей WT (дикий тип) с использованием RAWM и контекстуального замирания. У молодых животных наблюдали отсутствие различий в пространственном обучении и памяти между *B2M*^{-/-} и контролями WT в ходе тренировки или тестирования в модели RAWM (фиг. 10A). Интересно, что старые *B2M*^{-/-} мыши проявляли улучшенную способность к пространственному обучению в ходе фазы тренировки в модели RAWM, а также улучшенное обучение и память при определении местонахождения платформы в ходе фазы тестирования в задаче по сравнению с контролями WT (фиг. 10C). Животные в каждой возрастной группе не проявляли различий в скорости плавания вне зависимости от генотипа (фиг. 11A,D). В ходе тренировки с замиранием все мыши проявляли подобное исходное замирание независимо от генотипа (фиг. 11B,E). Кроме того, отсутствие различий в замирании наблюдали у молодых *B2M*^{-/-} мышей и мышей WT в моделях контекстуального замирания (фиг. 10B) или условно-рефлекторного замирания, обусловленного сигналом (фиг. 11C). Тем не менее, старые *B2M*^{-/-} мыши демонстрировали значительно повышенное замирание в тестировании контекстуальной памяти (фиг. 10D), но не в тестировании памяти, обусловленной сигналом, (фиг. 11F) по сравнению с контролями WT. Эти данные указывают на то, что отсутствие эндогенного B2M ослабляет связанные со старением нарушения в гиппокамп-зависимом обучении и памяти у старых животных, дополнительно указывая на вовлеченность B2M в качестве способствующего старению фактора, опосредующего снижение когнитивных способностей в ходе старения.

Затем авторы настоящего изобретения изучали, может ли отсутствие эндогенного B2M также противодействовать связанному со старением снижению нейрогенеза во взрослом возрасте. Авторами настоящего изобретения оценивались изменения в

нейрогенезе у молодых и старых взрослых B2M^{-/-} животных и однопометных животных WT с помощью иммуногистохимического анализа. Авторы настоящего изобретения наблюдали, что у молодых взрослых животных отсутствие эндогенной экспрессии B2M не оказывало эффекта на количество Dcx-положительных клеток (фиг. 10E,F). Важно, что у старых животных авторы настоящего изобретения наблюдали почти 2-кратное повышение количества Dcx-положительных новых образовавшихся нейронов у B2M^{-/-} мышей по сравнению с однопометными животными дикого типа (фиг. 10E,G). В соответствии с полученными авторами данными относительно Dcx авторами настоящего изобретения не было выявлено изменений в пролиферации при мечении BrdU у молодых животных вне зависимости от экспрессии B2M (фиг. 12A). Тем не менее, у старых B2M^{-/-} животных проявлялось значительное повышение количества BrdU-положительных клеток по сравнению с контролями WT (фиг. 12B). Затем авторы настоящего изобретения оценивали дифференцировку и выживание нейронов у B2M^{-/-} мышей с использованием модели с длительным включением BrdU, в которой зрелые дифференцированные нейроны экспрессируют как BrdU, так и маркер нейронов NeuN (фиг. 10H). У молодых взрослых B2M^{-/-} мышей не проявлялись различия в проценте клеток, экспрессирующих как BrdU, так и NeuN, по сравнению с их аналогами WT (фиг. 10I); тогда как у старых взрослых B2M^{-/-} мышей проявлялось значительное повышение процента клеток, которые экспрессировали как BrdU, так и NeuN, по сравнению с однопометными животными WT того же возраста (фиг. 10J). Авторами настоящего изобретения не было выявлено различий в дифференцировке астроцитов в любом возрасте, что количественно определялось как процент клеток, экспрессирующих маркеры BrdU и GFAP (фиг. 12C-E). В совокупности эти данные указывают на то, что потеря эндогенного B2M повышает уровни нейрогенеза в старом головном мозге, но не в молодом головном мозге, указывая на активную роль B2M в снижении способности к регенерации в ходе старения.

Продолжает демонстрироваться особенная вовлеченность B2M во взаимодействие с молекулами MHC I в патологический процесс в ЦНС (Lee et al., "Synapse elimination and learning rules co-regulated by MHC class I H2-Db.," *Nature* (2014) 509:195-200; Boulanger & Shatz, "Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease.," *Nature reviews. Neuroscience* (2004) 5:521-531; Shatz, "MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity.," *Neuron* (2009) 64:40-45; Huh et al., "Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity.," *Science* (2000) 290:2155-2159; Goddard et al., "Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I.," *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America (2007) 104:6828-6833; Glynn et al., “MHCI negatively regulates synapse density during the establishment of cortical connections.,” *Nature neuroscience* (2011) 14:442-451), причем в недавних исследованиях начинают изучать лечебный эффект устранения экспрессии МНС I в моделях повреждения головного мозга, такого как инсульт (Adelson et al., “Neuroprotection from stroke in the absence of MHCI or PirB.,” *Neuron* (2012) 73:1100-1107). Тем не менее, функциональное воздействие этих молекул или на ЦНС, или на периферические ткани в ходе старения все еще не исследовалось. Таким образом, данное исследование проливает свет на ранее неизвестную роль В2М в прогрессировании связанных со старением нарушений как когнитивных, так и регенеративных процессов. Более того, данное исследование также указывает на влияние экспрессии МНС I на поверхности клеток в частичном опосредовании отрицательных эффектов В2М и гетерохронного парабиоза в отношении регенеративной функции. Примечательно, что в исследованиях с полногеномным поиском ассоциаций (GWAS) обнаружили связь локуса МНС на хромосоме 6p21 с дегенеративными заболеваниями при старении, что говорит об активной роли этих молекул в возрастных нарушениях (Jeck et al., “Review: a meta-analysis of GWAS and age-associated diseases.,” *Aging cell* (2012) 11:727-731). Полученные данные теперь обеспечивают функциональное подтверждение такого воздействия в фенотипах, характерных для старения. Полученные авторами настоящего изобретения данные обеспечивают понимание механизма того, как связанные со старением изменения в системном окружении запускают нарушения локально в старом головном мозге, и подчеркивают вовлеченность молекул В2М и МНС I в этот процесс. С точки зрения дальнейшего развития, полученные данные показывают, что связанная со старением когнитивная и регенеративная дисфункция, наблюдаемая в ходе старения, может быть ослаблена посредством целенаправленного воздействия на В2М в пожилом возрасте.

III. Определение относительных уровней В2М

Относительные уровни бета-2-микроглобулина определяли в образцах плазмы крови здоровых мужчин-доноров возрастом 18, 30, 45, 55 и 66 лет с помощью протеомного анализа SomaScan (Somalogic, Inc, Boulder, CO). Для каждой возрастной группы плазму крови от 40 индивидов анализировали в виде 8 пулов из 5 индивидов на группу. Статистический анализ выполняли с использованием двухстороннего t-критерия Стьюдента с логарифмическим преобразованием значений, в также с помощью анализа

тенденций изменения для необработанных данных с использованием критерия Джонкхиера-Терпстра. Наблюдаемые изменения считались высоко значимыми, когда р-значение с t-критерием составляло $1,1 \times 10^{-4}$ (возраст 66 лет в сравнении возрастом 18 лет), и р-значение для JT-критерия составляло $1,3 \times 10^{-7}$ (все возрастные группы). (RFU относится к «относительным единицам флуоресценции» в протеомном анализе SomaScan). Результаты графически проиллюстрированы на фиг. 13.

Безотносительно к прилагаемым пунктам, настоящее раскрытие также определяется следующими пунктами:

1. Способ лечения взрослого млекопитающего от нарушения, ассоциированного со старением, причем способ предусматривает:

снижение уровня $\beta 2$ -микроглобулина (B2M) у млекопитающего в степени, достаточной для лечения взрослого млекопитающего от нарушения, ассоциированного со старением.

2. Способ в соответствии с пунктом 1, причем способ предусматривает снижение системного B2M у млекопитающего.

3. Способ в соответствии с пунктом 2, причем системный B2M у млекопитающего снижают посредством удаления B2M из крови млекопитающего.

4. Способ в соответствии с пунктом 3, причем способ предусматривает экстракорпоральное удаление B2M из крови млекопитающего.

5. Способ в соответствии с пунктом 1, причем уровень B2M снижают посредством введения млекопитающему эффективного количества средства, снижающего уровень B2M.

6. Способ в соответствии с пунктом 5, причем средство, снижающее уровень B2M, представляет собой средство, связывающее B2M.

7. Способ в соответствии с пунктом 6, причем средство, связывающее B2M, содержит антитело или его связывающий фрагмент.

8. Способ в соответствии с пунктом 6, причем средство, связывающее B2M, содержит малую молекулу.

9. Способ в соответствии с пунктом 5, причем средство, снижающее уровень B2M, содержит средство, ингибирующее экспрессию B2M.

10. Способ в соответствии с пунктом 9, причем средство, ингибирующее экспрессию B2M, содержит нуклеиновую кислоту.

11. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, причем

млекопитающее представляет собой примата.

12. Способ в соответствии с пунктом 11, причем примат представляет собой человека.

13. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, причем взрослое млекопитающее представляет собой пожилое млекопитающее.

14. Способ в соответствии с пунктом 13, причем пожилое млекопитающее представляет собой человека возрастом 60 лет или старше.

15. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, причем нарушение, ассоциированное со старением, включает когнитивное нарушение.

16. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, причем взрослое млекопитающее страдает от болезненного состояния, ассоциированного со старением.

17. Способ в соответствии с любым из предыдущих пунктов, причем болезненное состояние, ассоциированное со старением, представляет собой болезненное состояние со снижением когнитивных способностей.

Предшествующее описание только иллюстрирует принципы настоящего изобретения. Будет понятно, что специалисты в данной области техники будут способны разработать различные схемы, которые, хотя и не описаны явно или показаны в данном документе, воплощают принципы настоящего изобретения и включены в его идею и объем. Более того, все примеры и условные обозначения, упомянутые в данном документе, преимущественно предназначены для того, чтобы помочь лицу, изучающему заявку, в понимании принципов настоящего изобретения и идей, вклад в распространение которых в данной области техники был сделан авторами настоящего изобретения, и их следует толковать без ограничения такими специально упомянутыми примерами и условиями. Помимо этого, предполагается, что все утверждения в данном документе, излагающие принципы, аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения, а также их конкретные примеры, охватывают как свои структурные, так и функциональные эквиваленты. Кроме того, предполагается, что такие эквиваленты включают в себя как известные в настоящее время эквиваленты, так и эквиваленты, которые будут разработаны в будущем, т.е. любые разработанные элементы, которые выполняют ту же функцию вне зависимости от структуры. Таким образом, не предполагается, что объем настоящего изобретения ограничивается иллюстративными вариантами осуществления, показанными и описанными в данном документе. Скорее, объем и идея настоящего изобретения заключены в прилагаемых пунктах формулы

изобретения.

SEQUENCE LISTING

<110> ЗЕ БОАРД ОФ ТРАСТИЗ ОФ ЗЕ ЛЕЛАНД СТЭНФОРД ДЖУНИОР ЮНИВЕРСИТИ; ЗЕ РЕГЕНТС ОФ ЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ; АЛКАХЕСТ, ИНК.; Ю. С. ГОВЕРНМЕНТ ЭЗ РЕПРЕЗЕНТИД БАЙ ДЕПАРТМЕНТ ОФ ВЕТЕРАНС ЭФФЭЙРС

<120> СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СТАРЕНИЕМ

<130> STAN-1211WO

<150> US 62/163,222

<151> 2015-05-18

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 1

gauucagguu uacucacgut t

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 2

acgugaguaa accugaauct t

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<400> 3

gccactccca ccctttctca t

21

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Synthetic oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(2)
<223> Residue is a locked nucleic acid nucleoside

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> Residue is a locked nucleic acid nucleoside

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> Residue is 5-methyl cytosine

<400> 4
agttgccagc cctnn

15

<210> 5
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> Residue is a locked nucleic acid nucleoside

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Residue is modified with cis-13-Doco-senol (crucyl alcohol)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Residue is linked to a lipophilic residue with a disulfide linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> Residue is a locked nucleic acid nucleoside

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> Residue is 5-methyl cytosine

<400> 5
agttgccagc cctnn

15

<210> 6
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Residue is a locked nucleic acid nucleoside

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Residue is modified with 1-Tetradeca-nol (myristyl alcohol)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Residue is linked to a lipophilic residue with a disulfide linker

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> Residue is a locked nucleic acid nucleoside

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> Residue is 5-methyl cytosine

<400> 6
 agttgccagc cctnn

15

<210> 7
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthetic oligonucleotide

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Residue is a locked nucleic acid nucleoside

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Residue is modified with Dierucyl-alcohol

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Residue is linked to a lipophilic residue with a disulfide linker

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> Residue is a locked nucleic acid nucleoside

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(15)
 <223> Residue is 5-methyl cytosine

<400> 7

<210> 8
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> Residue is a locked nucleic acid nucleoside

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Residue is linked to a lipophilic residue with a disulfide linker

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Residue is modified with Erucyl-myristyl-glycerol

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> Residue is a locked nucleic acid nucleoside

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> Residue is 5-methyl cytosine

<400> 8
agttgccagc cctnn

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения взрослого млекопитающего от нарушения, ассоциированного со старением, причем способ предусматривает:

снижение уровня β 2-микроглобулина (B2M) у млекопитающего в степени, достаточной для лечения взрослого млекопитающего от нарушения, ассоциированного со старением.

2. Способ по п. 1, причем способ предусматривает снижение системного B2M у млекопитающего.

3. Способ по п. 2, причем системный B2M у млекопитающего снижают посредством удаления B2M из крови млекопитающего.

4. Способ по п. 3, причем способ предусматривает экстракорпоральное удаление B2M из крови млекопитающего.

5. Способ по п. 1, причем уровень B2M снижают посредством введения млекопитающему эффективного количества средства, снижающего уровень B2M.

6. Способ по п. 5, причем средство, снижающее уровень B2M, представляет собой средство, связывающее B2M.

7. Способ по п. 6, причем средство, связывающее B2M, содержит антитело или его связывающий фрагмент.

8. Способ по п. 6, причем средство, связывающее B2M, содержит малую молекулу.

9. Способ по п. 5, причем средство, снижающее уровень B2M, содержит средство, ингибирующее экспрессию B2M.

10. Способ по п. 9, причем средство, ингибирующее экспрессию B2M, содержит нуклеиновую кислоту.

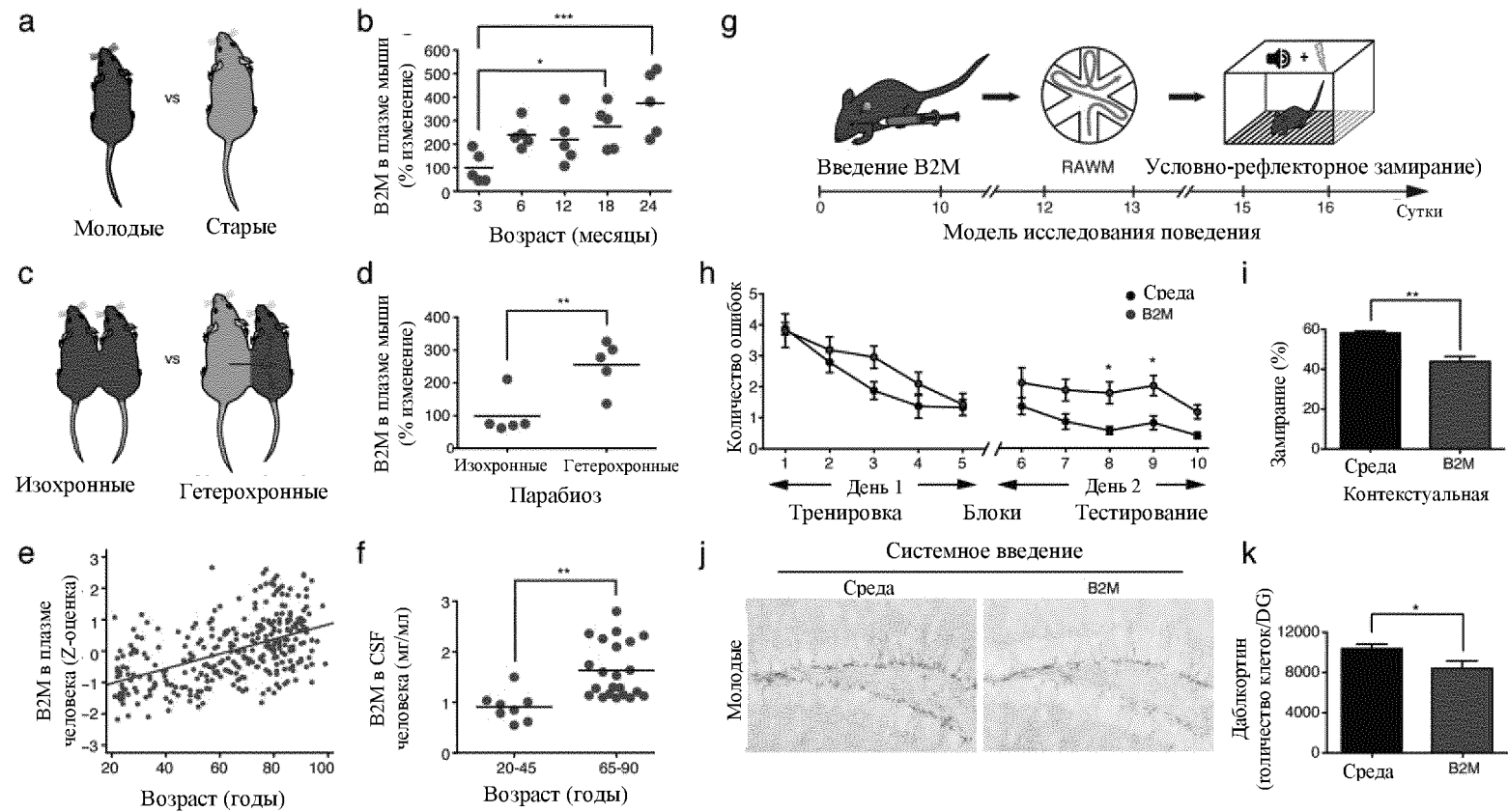
11. Способ по любому из предыдущих пунктов, причем млекопитающее представляет собой примата.

12. Способ по п. 11, причем примат представляет собой человека.

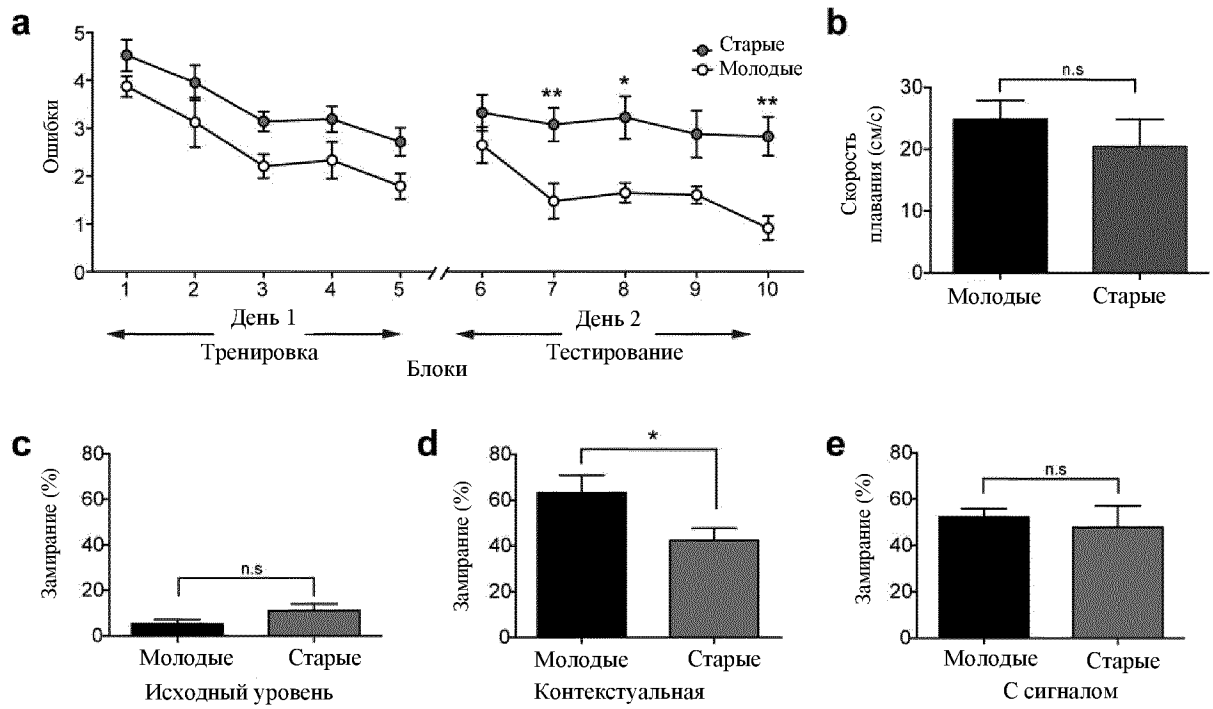
13. Способ по любому из предыдущих пунктов, причем взрослое млекопитающее представляет собой пожилое млекопитающее.

14. Способ по п. 13, причем пожилое млекопитающее представляет собой человека возрастом 60 лет или старше.

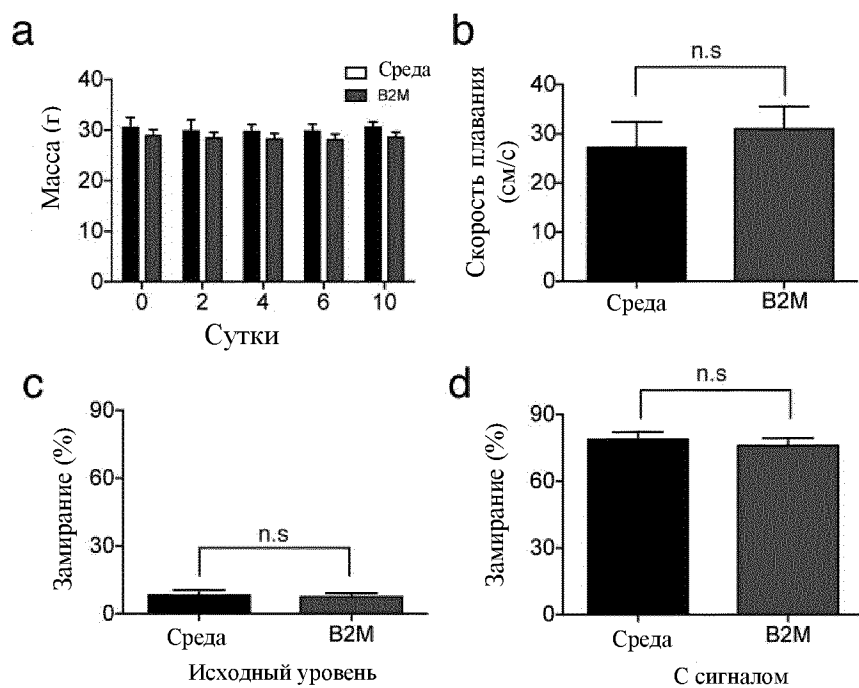
15. Способ по любому из предыдущих пунктов, причем нарушение, ассоциированное со старением, включает когнитивное нарушение.



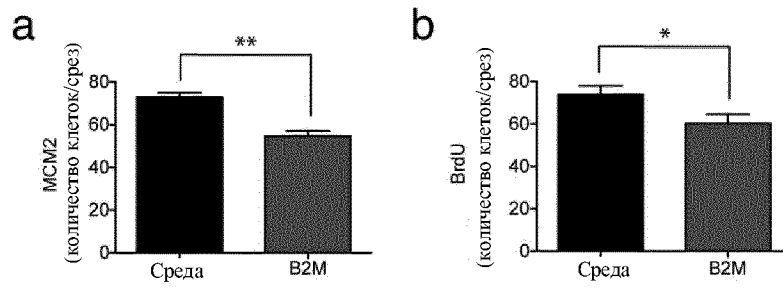
Фиг. 1



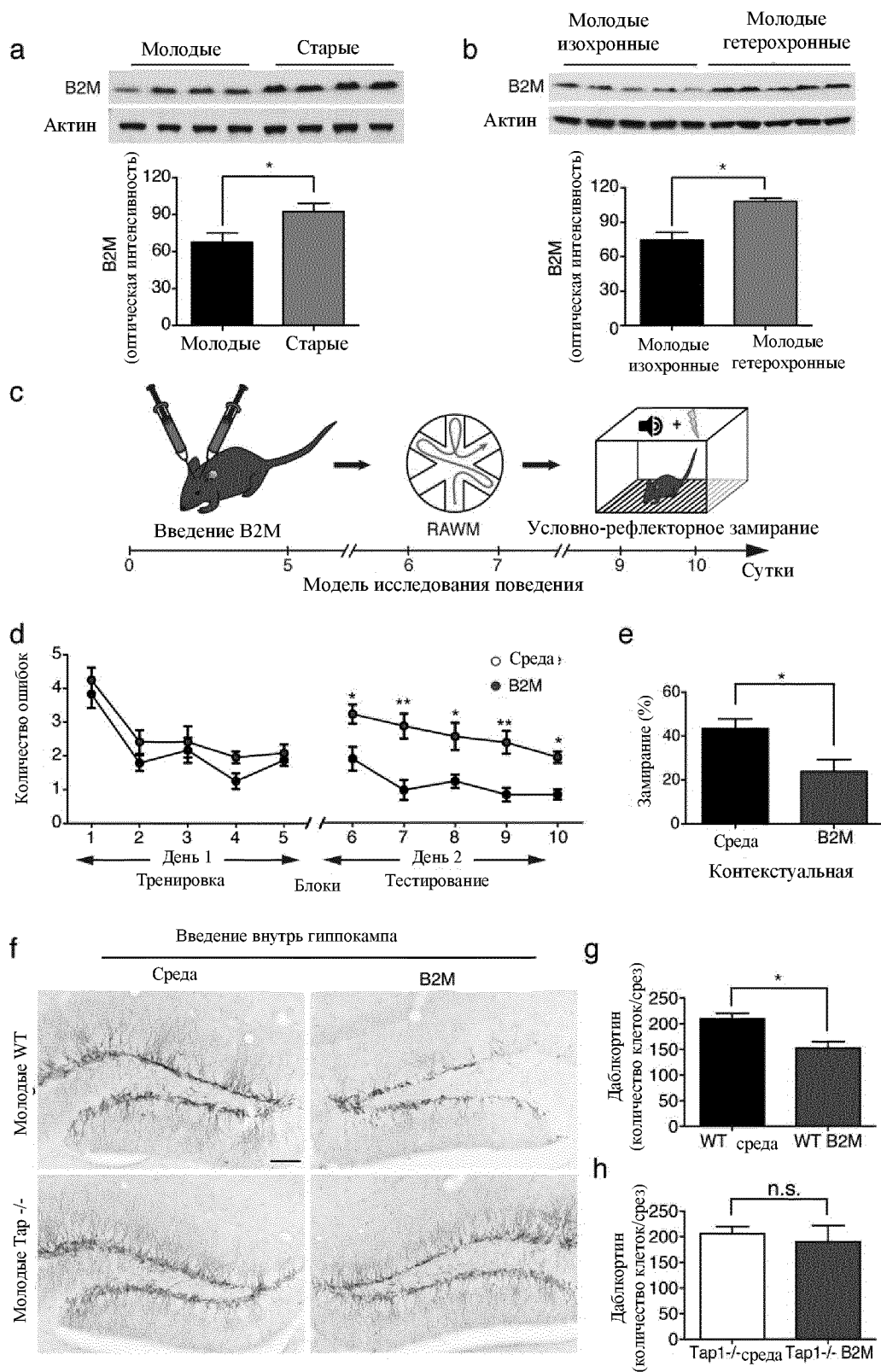
Фиг. 2



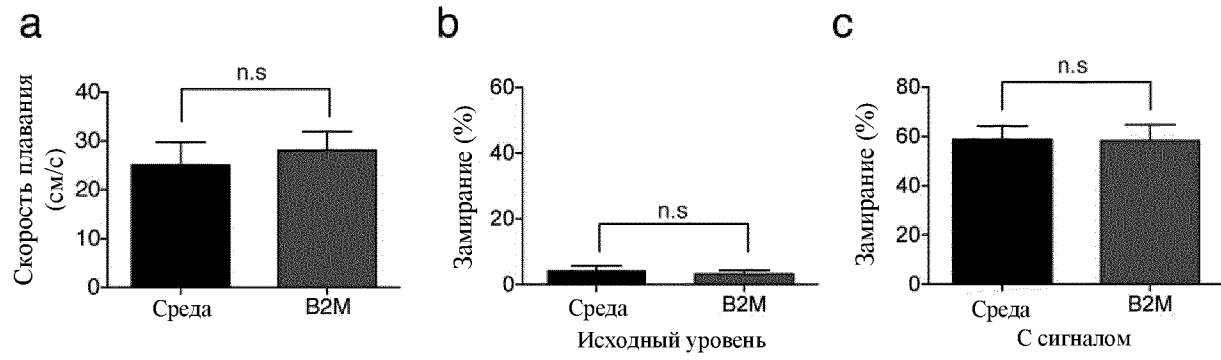
Фиг. 3



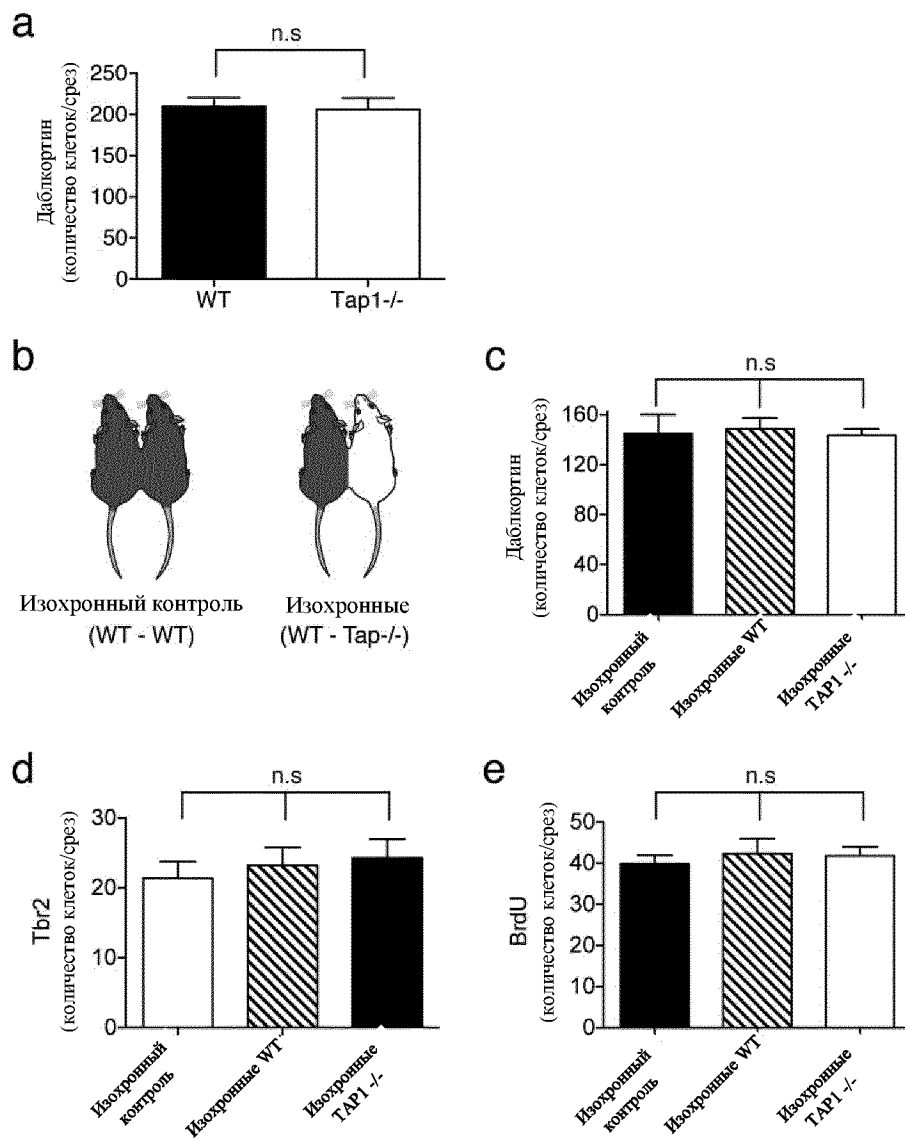
Фиг. 4



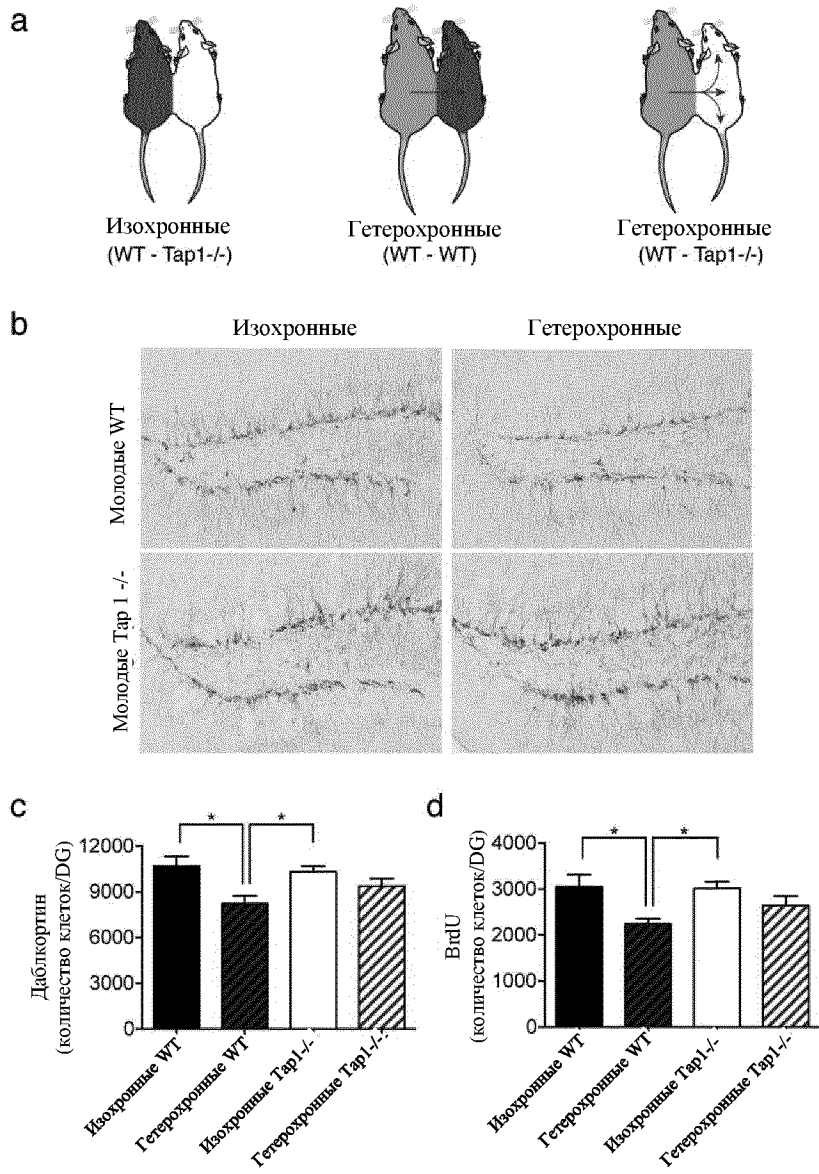
Фиг. 5



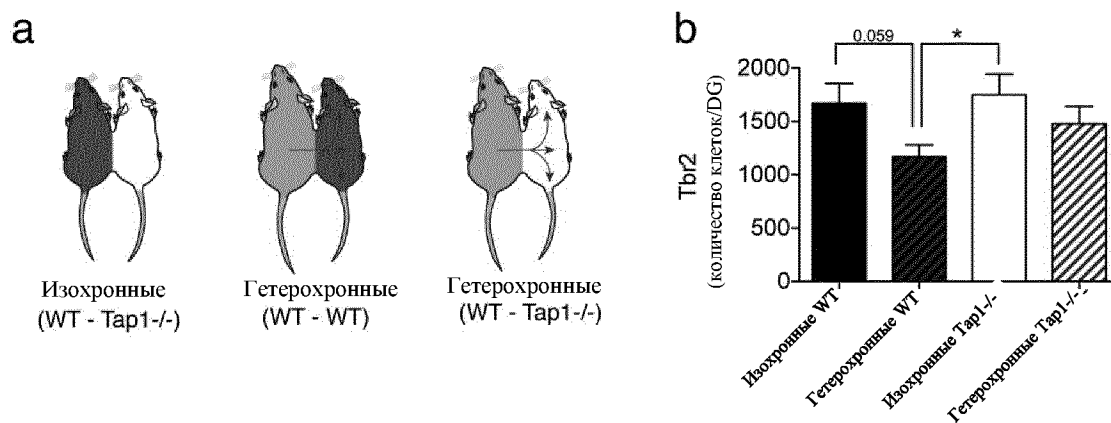
Фиг. 6



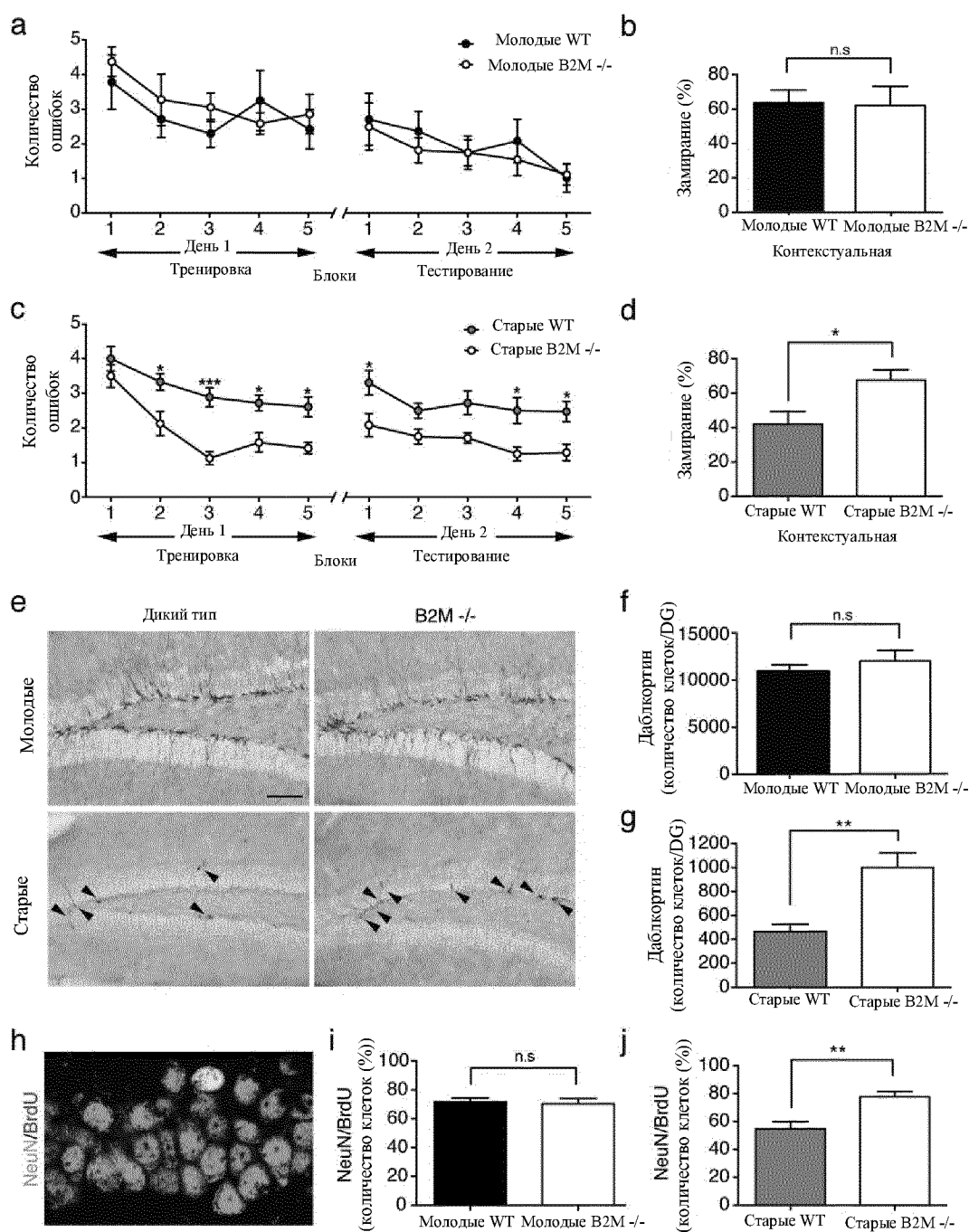
Фиг. 7



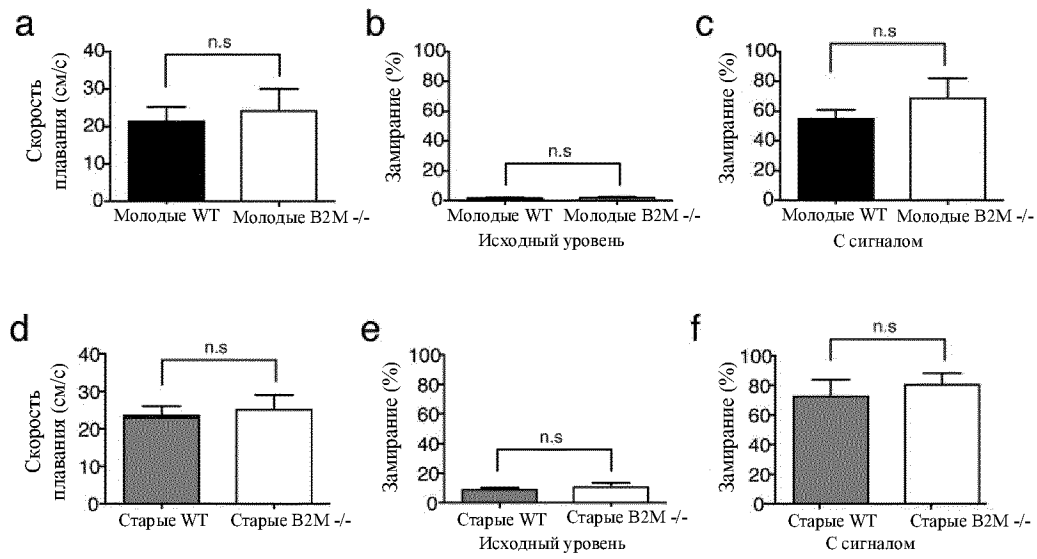
Фиг. 8



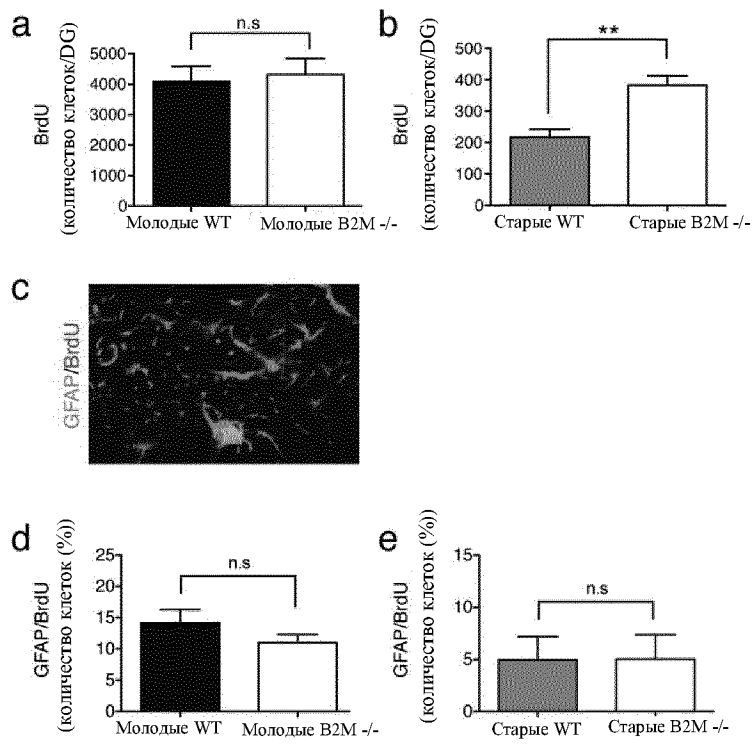
Фиг. 9



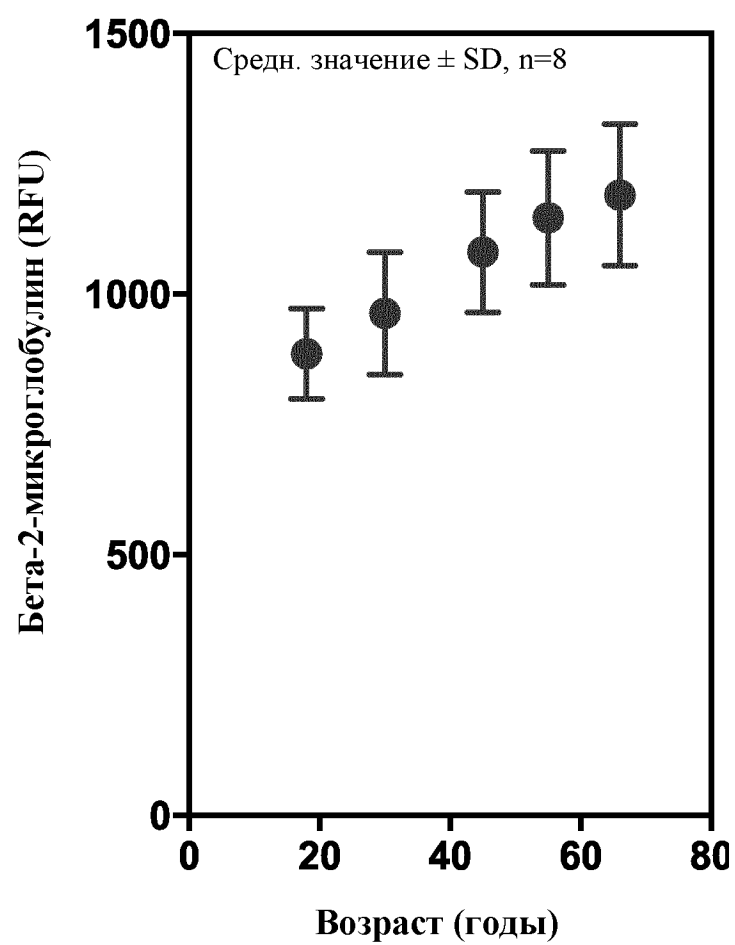
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

Бета-2-микрोगлобулин

Фиг. 13