

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090187 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.23

(51) Int. Cl. A61K 31/381 (2006.01)
A61K 31/397 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.01.18

(54) СКРИНИНГОВАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ИЛИ СРЕДСТВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ
АЛЬЦГЕЙМЕРА

(31) 62/530,125; 62/535,589

(72) Изобретатель:
Танзи Рудольф, Куинти Луиза, Ким
Доо Йеон (US)

(32) 2017.07.08; 2017.07.21

(33) US

(86) PCT/US2018/014220

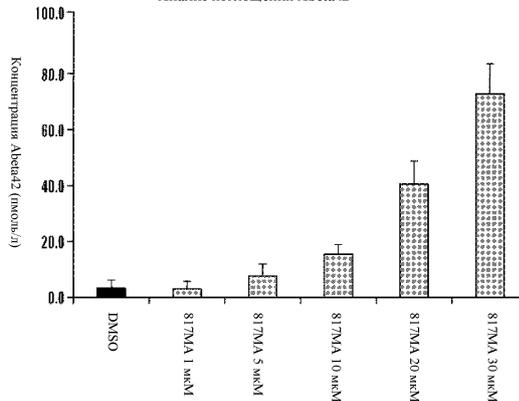
(74) Представитель:
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Гизатуллин Ш.Ф., Лебедев В.В.,
Угрюмов В.М., Парамонова К.В. (RU)

(87) WO 2019/013838 2019.01.17

(71) Заявитель:
ДЗЕ ДЖЕНЕРАЛ ХОСПИТАЛ
КОРПОРЕЙШН (US)

(57) Раскрываются способы и композиции для скрининга кандидатных веществ для предупреждения или лечения нейродегенеративных нарушений, таких как болезнь Альцгеймера. Настоящее раскрытие также относится к идентификации механизмов действия для известных или предполагаемых лекарственных средств против болезни Альцгеймера и в целом к композициям и способам модуляции функции клеток, экспрессирующих CD33.

Анализ поглощения Abeta42



A1

202090187

202090187

A1

**СКРИНИНГОВАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ
ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ИЛИ СРЕДСТВ ДЛЯ
ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

ОПИСАНИЕ

Ссылка на родственные заявки

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет по 35 U.S.C. § 119(e) в соответствии с находящейся на рассмотрении заявкой на выдачу патента США № 62/530125, поданной 8 июля 2017 года, и находящейся на рассмотрении заявкой на выдачу патента США № 62/535589, поданной 21 июля 2017 года, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном своем объеме.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

[0002] Настоящее раскрытие в целом относится к способам и композициям для скрининга кандидатных веществ для предупреждения или лечения нейродегенеративных нарушений. Настоящее раскрытие также в целом относится к композициям и способам модуляции функции клеток, экспрессирующих CD33.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0003] Нейродегенеративные заболевания являются серьезной, распространенной и распространяющейся во всем мире проблемой. К ним относятся болезнь Альцгеймера (AD), когнитивное нарушение, болезнь Паркинсона, деменция, шизофрения, боковой амиотрофический склероз (ALS), болезнь Хантингтона или рассеянный склероз. Особенно у пожилых людей нейродегенеративные заболевания вызывают страдания, снижают качество жизни и являются основным прогностическим фактором смертности. Болезнь Альцгеймера (AD) является наиболее распространенной формой нейродегенеративного заболевания у пожилых людей, и с ростом численности пожилых людей в США и во всем мире AD достигает масштабов эпидемии. AD характеризуется прогрессирующей деменцией и дисфункцией личности. Аномальное накопление амилоидных бляшек вблизи дегенерирующихся нейронов и реактивных астроцитов является патологической характеристикой AD.

[0004] Микроглия представляет собой резидентные иммунные клетки головного мозга, ответственные за выведение токсических патогенов, таких как амилоид- β (A β). Во время прогрессирования AD микроглия переходит из нейропротекторного/профагоцитарного в нейротоксическое состояние, характеризующееся повышенной секрецией провоспалительных цитокинов (Heneka et al. *Nature Immunology*, 2015). В анализе GWAS большой семьи обнаружили, что микроглиальный рецептор CD33 является фактором риска позднего начала AD (Bertram et al., *Am. J. Hum. Genet.*, 2008). Также обнаружили, что CD33 стимулирует амилоидную патологию, ингибируя поглощение и выведение A β в микроглиальных клетках (Griciuc et al., *Neuron*, 2013).

[0005] Лекарственные средства, такие как донепезил и мемантин, лечат симптомы AD, но они не лечат само заболевание. Новое лекарственное средство T-817MA (1-{3-[2-(1-бензотиофен-5-ил)этокси]пропил}-3-азетидинол малеат) находится в фазе 1 и 2 клинических испытаний, и его нейропротекторные эффекты против токсичности A β и действия, способствующие росту нейритов хорошо задокументированы (Takamuga et al., *Neurobiol Aging*, 2014). Как эти лекарственные средства взаимодействуют и модулируют активность CD33, неизвестно. Кроме того, сохраняется необходимость в открытии новых способов лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как AD. Например, способы быстрого скрининга, которые могут применяться для биологически релевантных соединений и комбинаций соединений, и их зависимый от дозы ответ обеспечат существенный прогресс в этой области и приведут к прорывным способам лечения и лекарственным средствам, которые могут помочь искоренить и контролировать эти заболевания.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

[0006] Настоящее раскрытие относится к открытию способов скрининга кандидатных веществ для предупреждения или лечения нейродегенеративных нарушений. Настоящее раскрытие также относится к открытию микроглиального рецептора CD33 как фактора риска при нейродегенеративных заболеваниях, а также к композициям и способам модуляции функции клеток, экспрессирующих CD33 как скрининговому анализу и механистическому зонду.

[0007] Согласно одному аспекту представлен способ тестирования терапевтической эффективности кандидатного вещества для предупреждения или лечения нейродегенеративного нарушения. Как правило, способ предусматривает обработку

иммунных или иммуноподобных клеток, экспрессирующих полноразмерный человеческий CD33, также называемых экспрессирующими CD33 иммунными или подобными иммунным клетками в настоящем документе, кандидатным веществом при соответствующей концентрации, дальнейшую обработку указанных обработанных экспрессирующих CD33 иммунных или иммуноподобных клеток амилоидом- β (Abeta, A β) при соответствующей концентрации или липополисахаридом и измерение внутриклеточного содержания A β (для обработанных A β клеток) или содержания в культуральной среде провоспалительных цитокинов (для обработанных липополисахаридом клеток). Экспрессирующие CD33 иммунные или иммуноподобные клетки необязательно могут быть культивированы до обработки кандидатным веществом.

[0008] Согласно вариантам осуществления способа, предусматривающего обработку с помощью A β , более высокое содержание A β в экспрессирующих CD33 клетках, обработанных кандидатным веществом, относительно отрицательного контроля указывает на то, что тестируемое кандидатное вещество обладает терапевтической эффективностью. Согласно вариантам осуществления способа, предусматривающего обработку липополисахаридом, более низкое содержание одного или нескольких провоспалительных цитокинов в культуральной среде экспрессирующих CD33 клеток, обработанных кандидатным веществом, относительно отрицательного контроля указывает на то, что тестируемое кандидатное вещество обладает терапевтической эффективностью.

[0009] Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает обработку экспрессирующих CD33 иммунных или иммуноподобных клеток кандидатным веществом при соответствующей концентрации; дополнительную обработку указанных обработанных экспрессирующих CD33 иммунных или иммуноподобных клеток амилоидом- β (Abeta, A β) при соответствующей концентрации и измерение внутриклеточного содержания A β в указанных экспрессирующих CD33 клетках, при этом более высокое содержание A β в клетках CD33, обработанных кандидатным веществом, относительно отрицательного контроля указывает на то, что тестируемое кандидатное вещество обладает терапевтической эффективностью.

[0010] Согласно некоторым вариантам осуществления способ предусматривает обработку экспрессирующих CD33 иммунных или иммуноподобных клеток кандидатным веществом при соответствующей концентрации; дополнительную обработку указанных обработанных экспрессирующих CD33 иммунных или иммуноподобных клеток липополисахаридом и измерение содержания провоспалительных цитокинов в культуральной среде указанных экспрессирующих CD33 клеток, при этом более низкое содержание провоспалительных цитокинов в культуральной среде экспрессирующих

CD33 клеток, обработанных кандидатным веществом, относительно отрицательного контроля указывает на то, что тестируемое кандидатное вещество обладает терапевтической эффективностью.

[0011] Согласно другому аспекту представлен способ тестирования связывающего взаимодействия вещества с человеческим CD33. Как правило, способ предусматривает обработку указанных экспрессирующих CD33 иммунных или иммуноподобных клеток кандидатным веществом при соответствующей концентрации и измерение регистрируемого показателя связывающего взаимодействия с использованием стандартного анализа, при этом более высокий регистрируемый показатель в клетках CD33, обработанных веществом, относительно отрицательного контроля указывает на связывающее взаимодействие. Экспрессирующие CD33 иммунные или иммуноподобные клетки необязательно могут быть культивированы до обработки кандидатным веществом.

[0012] Согласно некоторым вариантам осуществления различных аспектов, раскрываемых в настоящем документе, экспрессирующие CD33 иммунные или иммуноподобные клетки представляют собой микроглиальные клетки.

[0013] Согласно некоторым вариантам осуществления различных аспектов, раскрываемых в настоящем документе, экспрессирующие CD33 иммунные или иммуноподобные клетки необязательно могут быть культивированы до обработки кандидатным веществом.

[0014] Вещества, идентифицированные как обладающие терапевтической эффективностью или связывающим взаимодействием с CD33, могут быть использованы для модуляции функции микроглиальных клеток. Микроглиальная клетка может быть *in vitro*, *in vivo*, или *ex vivo*. Соответственно, согласно другому аспекту в настоящем документе представлен способ модуляции функции микроглиальной клетки у субъекта. Как правило, способ предусматривает введение больному или субъекту при необходимости этого вещества, идентифицированного способом, раскрываемым в настоящем документе.

[0015] Согласно некоторым вариантам осуществления вещество, которое вводят субъекту, идентифицируют как обладающее терапевтической эффективностью способом, раскрываемым в настоящем документе.

[0016] Согласно некоторым вариантам осуществления вещество, которое вводят субъекту, представляет собой 1-(3-(2-(1-бензотиофен-5-ил)этокси)пропил)азетидин-3-ол или его соль.

[0017] Согласно некоторым вариантам осуществления способ может быть использован для лечения или предупреждения нейродегенеративного заболевания у субъекта. Например, путем введения больному или субъекту при необходимости этого

терапевтической дозы или дозировок вещества, идентифицированного способом, раскрываемым в настоящем документе. Иллюстративные нейродегенеративные нарушения включают в себя без ограничения болезнь Альцгеймера, легкое когнитивное нарушение, болезнь Паркинсона, деменцию, шизофрению, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона и рассеянный склероз. Например, способы могут быть применены к болезни Альцгеймера.

[0018] Согласно другому аспекту представлена фармацевтическая композиция для модуляции функции микроглиальных клеток. Как правило, фармацевтическая композиция включает в себя 1-(3-(2-(1-бензотиофен-5-ил)этокси)пропил)азетидин-3-ол или его соль.

[0019] Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция, кроме того, включает в себя фармацевтически приемлемое вспомогательное средство или носитель.

[0020] Согласно некоторым вариантам осуществления различных аспектов, раскрываемых в настоящем документе, способ усиливает фагоцитоз или ингибирует продуцирование цитокина в микроглиальных клетках.

[0021] Согласно некоторым вариантам осуществления различных аспектов, раскрываемых в настоящем документе, соединение представляет собой 1-(3-(2-(1-бензотиофен-5-ил)этокси)пропил)азетидин-3-ол малеат, также называемый T-817MA в настоящем документе.

[0022] Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из подробного описания и из формулы изобретения. Таким образом, другие аспекты настоящего изобретения описываются в следующем раскрытии и попадают в объем настоящего изобретения.

Краткое описание графических материалов

[0023] На фиг. 1 показаны результаты в виде столбчатого графика из анализа токсичности лактатдегидрогеназы (LDH) на наивных микроглиальных клетках BV2 после 5 часов обработки с помощью DMSO, 817MA, 817A11 и 614P. Статистически значимую токсичность не наблюдали при этих концентрациях.

[0024] На фиг. 2 показаны результаты в виде столбчатого графика из анализа токсичности LDH на экспрессирующих CD33 wt микроглиальных клетках после 5 часов обработки с помощью DMSO, 817MA, 817A11 и 614P. Статистически значимую токсичность не наблюдали при этих концентрациях.

[0025] На фиг. 3 показаны результаты для анализа поглощения Abeta42 в наивных микроглиальных клетках BV2 в виде линейного графика. Показаны результаты для DMSO, 817MA, 817A11 и 614P в наивных микроглиальных клетках BV2. Соединения 817MA и 817A11 характеризуются подобными EC₅₀ поглощения Abeta42. Соединение 614P характеризуется более высокой EC₅₀.

[0026] На фиг. 4 показаны результаты для анализа поглощения Abeta42 в экспрессирующих CD33 wt клетках BV2 в виде линейного графика. Показаны результаты для DMSO, 817MA, 817A11 и 614P в экспрессирующих CD33 wt клетках BV2. Соединения 817MA и 817A11 характеризуются подобными EC₅₀ поглощения Abeta42. Соединение 614P характеризуется более высокой EC₅₀.

[0027] На фиг. 5 показаны результаты для анализа поглощения Abeta40 в наивных микроглиальных клетках BV2 в виде линейного графика. Показаны результаты для DMSO, 817MA, 817A11 и 614P в наивных микроглиальных клетках BV2. Соединение 817A11 характеризуется более низкой EC₅₀ поглощения, чем 817MA. Соединение 614P характеризуется более высокой EC₅₀, чем и 817MA, и 817A11.

[0028] На фиг. 6 показаны результаты для анализа поглощения Abeta40 в экспрессирующих CD33 wt клетках BV2 в виде линейного графика. Показаны результаты для DMSO, 817MA, 817A11 и 614P в экспрессирующих CD33 wt клетках BV2. Соединение 817A11 характеризуется более низкой EC₅₀ поглощения, чем 817MA. Соединение 614P характеризуется более высокой EC₅₀, чем и 817MA, и 817A11.

[0029] На фиг. 7 представлена таблица, демонстрирующая активацию с помощью LPS. Десять цитокинов параллельно анализировали в микроглиальной кондиционированной среде. Цитокины KC/GRO, IL-6, IL-10 и TNF- α демонстрировали выявляемое содержание при активации LPS. KC/GRO может быть выявлен только в неразбавленной среде. Цитокины IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-12p70, IL-1 β и IL-4 не выявлялись.

[0030] На фиг. 8 показаны результаты первого эксперимента по активации TNF α с помощью LPS в BV2 в виде линейного графика. График демонстрирует реакцию продуцирования концентрации TNF α как функцию добавленных концентраций DMSO, 817MA, 817A11 и 614P. Соединение 817MA является единственным соединением, эффективно снижающим продуцирование TNF α .

[0031] На фиг. 9 показаны результаты второго эксперимента по активации TNF α с помощью LPS в BV2 в виде линейного графика. График демонстрирует реакцию продуцирования концентрации TNF α как функцию добавленных концентраций DMSO, 817MA, 817A11 и 614P. Соединение 817MA является единственным соединением, эффективно снижающим продуцирование TNF α .

[0032] На фиг. 10 показаны результаты первого эксперимента по активации IL-6 с помощью LPS в BV2 в виде линейного графика. График демонстрирует реакцию продуцирования концентрации IL-6 как функцию добавленных концентраций DMSO, 817MA, 817A11 и 614P. Соединение 817MA является наиболее эффективным соединением для снижения продуцирования IL-6.

[0033] На фиг. 11 показаны результаты второго эксперимента по активации IL-6 с помощью LPS в BV2 в виде линейного графика. График демонстрирует реакцию продуцирования концентрации IL-6 как функцию как функцию добавленных концентраций DMSO, 817MA, 817A11 и 614P. Соединение 817MA является наиболее эффективным соединением для снижения продуцирования IL-6.

[0034] На фиг. 12 показаны результаты первого эксперимента по активации IL-10 с помощью LPS в BV2 в виде линейного графика. График демонстрирует реакцию продуцирования концентрации IL-10 как функцию добавленных концентраций DMSO, 817MA, 817A11 и 614P. Соединение 817MA является наиболее эффективным соединением для снижения продуцирования IL-10.

[0035] На фиг. 13 показаны результаты второго эксперимента по активации IL-10 с помощью LPS в BV2 в виде линейного графика. График демонстрирует реакцию продуцирования концентрации IL-10 как функцию добавленных концентраций DMSO, 817MA, 817A11 и 614P. Соединение 817MA является наиболее эффективным соединением для снижения продуцирования IL-10.

[0036] На фиг. 14 показаны результаты первого эксперимента по активации KC/GRO с помощью LPS в BV2 в виде линейного графика. График демонстрирует реакцию продуцирования концентрации KC/GRO как функцию добавленных концентраций DMSO, 817MA, 817A11 и 614P.

[0037] На фиг. 15 показаны результаты второго эксперимента по активации KC/GRO с помощью LPS в BV2 в виде линейного графика. График демонстрирует реакцию продуцирования концентрации KC/GRO как функцию добавленных концентраций DMSO и 817MA.

[0038] На фиг. 16 показаны результаты на столбчатом графике, построенном по данным первого теста в системе 3D культуры клеток ReN AD. Тест представляет собой анализ LDH в среде HReN30-mGAP30 после однедельной обработки тестируемыми соединениями DMSO, T-817MA (817MA), T-817A11(817A11) и T-614 (614P). n равняется 3 или 4 для каждой клеточной линии.

[0039] На фиг. 17 показаны результаты на столбчатом графике, построенном по данным второго теста в системе 3D культуры клеток ReN AD. Тест представляет собой

анализ LDH в среде HReN30-mGAP10#D4 после однонедельной обработки тестируемыми соединениями DMSO, T-817MA (817MA), T-817A11(817A11) и T-614 (614P). n равняется 3 или 4 для каждой клеточной линии.

[0040] На фиг. 18A - 18H представлена серия столбчатых графиков данных по содержанию растворимого (среда) (горизонтальная ось) и нерастворимого Abeta (вертикальная ось) после обработок лекарственным средством. Тестируемыми соединениями являются T-817MA (817MA), T-817A11(817A11) и T-614 (614P). На фиг. 18A показан Abeta40 в среде HReN30 (HReN-mGAP30). На фиг. 18B показан Abeta42 в среде HReN30 (HReN-mGAP30). На фиг. 18C показан Abeta40 в нерастворимой фракции HReN30 (HReN-mGAP30). На фиг. 18D показан Abeta42 в нерастворимой фракции HReN30 (HReN-mGAP30). На фиг. 18E - 18H представлены эксперименты с ReN-mGAP#D4. На фиг. 18E показан Abeta40 в среде ReN-mGAP10#D4 (ReN-mGAP#D4). На фиг. 18F показан Abeta42 в среде ReN-mGAP10#D4 (ReN-mGAP#D4). На фиг. 18G показан Abeta40 в нерастворимой фракции ReN-mGAP10#D4 (ReN-mGAP#D4). На фиг. 18H показан Abeta42 в нерастворимой фракции ReN-mGAP10#D4 (ReN-mGAP#D4).

[0041] На фиг. 19A - 19D представлена серия столбчатых графиков данных по содержанию нерастворимого p-tau и суммарного p-tau после обработок лекарственным средством. Тестируемыми соединениями являются DMSO, T-817MA (817MA), T-817A11(817A11) и T-614 (614P). На фиг. 19A и 19B представлены тесты HReN-mGAP30. На фиг. 19A показана концентрация pTau181 (единицы/мл) в нерастворимой фракции HReN30. На фиг. 19B показана концентрация pTau181 (пг/мл) в нерастворимой фракции HReN30. На фиг. 19C и фиг. 19D представлены тесты ReN-mGAP#D4. На фиг. 19C показана концентрация pTau181 (единицы/мл) в нерастворимой фракции ReN-mGAP10#D4. На фиг. 19D показана концентрация pTau181 (пг/мл) в нерастворимой фракции ReN-mGAP10#D4.

[0042] На фиг. 20 представлена серия изображений в ReN-mGAP#D4 (4-недельная дифференцировка).

[0043] На фиг. 21 представлена серия изображений в HReN-mGAP30 (7-недельная дифференцировка).

[0044] На фиг. 22 представлен столбчатый график данных по исследованиям токсичности с использованием нитропрусида натрия (SNP) в 3D культуре клеток ReN AD. Данные получены в анализе WST-8 на клетках ReN без B27 после односуточной обработки с помощью SNP.

[0045] На фиг. 23 представлен столбчатый график данных по анализу WST-8 на клетках ReN без B27 после четырех суток обработки с помощью 817MA и одних суток обработки с помощью SNP.

[0046] На фиг. 24 представлен столбчатый график данных по анализу WST-8 (% жизнеспособности) на клетках ReN без B27 после четырех суток обработки с помощью 817MA и одних суток обработки с помощью SNP.

[0047] На фиг. 25 представлен столбчатый график данных по анализу токсичности (LDH) на микроглиальных клетках. Тестируемым соединением является 817MA при различных концентрациях и включении контроля DMSO. Концентрацию 50 мкМ исключали из анализа поглощения.

[0048] На фиг. 26 представлен столбчатый график данных для анализа поглощения Abeta42. Данные подтверждают поглощение Abeta42 с помощью 817MA в микроглиальных клетках. EC₅₀ составляет приблизительно 20 мкМ после 24 часов предварительной обработки соединением.

[0049] На фиг. 27A и 27B представлены иллюстративные временные линейные диаграммы для обработок с помощью 817MA.

[0050] На фиг. 28 представлен столбчатый график данных по жизнеспособности клеток относительно концентрации SNP в день 26.

[0051] На фиг. 29 представлен столбчатый график данных по жизнеспособности клеток при выбранных концентрациях. $n = 3$ или 4 для каждой клеточной линии.

[0052] На фиг. 30A и 30B представлены столбчатые графики, показывающие данные по эффекту 817MA в отношении индуцированной SNP токсичности через 3 суток (фиг. 30A) и через 3 недели (фиг. 30B).

[0053] На фиг. 31A и 31B представлены столбчатые графики, показывающие данные по эффекту 817MA в отношении жизнеспособности клеток (без SNP) в течение 3 суток (фиг. 31A) и в течение 3 недель (фиг. 31B).

[0054] На фиг. 32 представлена серия полученных с помощью микроскопа изображений, иллюстрирующих эффект SNP в отношении клеток.

[0055] На фиг. 33 представлена вторая серия полученных с помощью микроскопа изображений, иллюстрирующих эффект SNP в отношении клеток.

[0056] На фиг. 34 представлен столбчатый график данных по эффекту четырехсуточной обработки с помощью 817MA в отношении индуцируемой SNP токсичности в клетках, на являющихся AD.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

[0057] Настоящее раскрытие частично основано на открытии ценных инструментов для изучения потенциальных лекарственных средств для лечения нейродегенеративных заболеваний или нарушений. Настоящее раскрытие также частично основано на получении клеток, экспрессирующих микроглиальные рецепторы, которые являются фактором риска при поздней AD и которые приводят к амилоидной патологии. Как раскрывается в настоящем документе, обнаружили, что такие клетки можно использовать для скрининга потенциальных кандидатов лекарственных средств в качестве терапевтических средств для нейродегенеративных нарушений. Клетки также обеспечивают представление о механизме лекарственной активности и обнаружение важных особенностей (например, взаимосвязей структуры к активности) эффективных способов лечения лекарственными средствами. Кроме того, настоящее раскрытие относится к композициям, которые эффективны при лечении нейродегенеративных нарушений, а также к их влиянию на экспрессирующие CD33 клетки.

[0058] Следовательно, согласно одному варианту осуществления представлен способ тестирования терапевтической эффективности кандидатного вещества для предупреждения или лечения нейродегенеративного нарушения. Как правило, способ предусматривает обработку иммунных или иммуноподобных клеток, экспрессирующих полноразмерный человеческий CD33, кандидатным веществом при соответствующей концентрации. Способ также предусматривает обработку обработанных экспрессирующих CD33 иммунных или иммуноподобных клеток амилоидом- β при соответствующей концентрации и измерение внутриклеточного содержания A β . Согласно альтернативному варианту осуществления обработки с помощью A β способ предусматривает обработку экспрессирующих CD33 иммунных или иммуноподобных клеток липополисахаридом и измерение содержания провоспалительных цитокинов в культуральной среде этих клеток. Экспрессирующие CD33 иммунные или иммуноподобные клетки необязательно могут быть культивированы перед обработкой (A β или липополисахаридами) с кандидатным веществом.

[0059] Терапевтическое средство относится к любому лекарственному средству, веществу, соединению, комбинации соединений, лечебному средству или лечебной терапии, которые используют с целью облегчения симптомов или излечения заболевания, состояния или нарушения. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство может представлять собой тестируемое соединение, для

которого эффективность соединения не известна до завершения скринингового анализа или теста.

[0060] Терапевтическая эффективность относится к тому, насколько эффективным является тестируемое соединение (например, вещество, соединение, комбинация соединений, лечебное средство или лечебная терапия). Тестируемое соединение, обладающее терапевтической эффективностью, означает, что оно более эффективно для облегчения симптомов или излечения заболевания или состояния по сравнению с контролем. Кроме того, высокая терапевтическая эффективность тестируемого соединения означает, что оно более эффективно для облегчения симптомов или излечения заболевания или состояния по сравнению с другим тестируемым соединением с более низкой терапевтической эффективностью. Например, контроль может представлять собой соединение, которое обладает более низкой терапевтической эффективностью, чем тестируемое соединение с терапевтической эффективностью, и контроль не настолько эффективен для облегчения симптомов или излечения заболевания или состояния. Термин «более эффективный» может включать в себя то, что более низкая дозировка терапевтического средства обеспечивает такую же величину пользы, имеет меньше нежелательных, вредных или токсических побочных эффектов, или более эффективное терапевтическое средство имеет дополнительные преимущества (например, пользу для здоровья, экономические выгоды) по сравнению с менее эффективным терапевтическим средством.

[0061] Токсичность и терапевтическая эффективность могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами в клеточных культурах или на экспериментальных животных, например, для определения LD_{50} (дозы, летальной для 50% популяции) и ED_{50} (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Отношение дозы между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс и может быть выражено как отношение LD_{50}/ED_{50} . Предпочтительными являются композиции, которые демонстрируют большие терапевтические индексы. Используемый в настоящем документе термин «ED» означает эффективную дозу и используется применительно к животным моделям. Термин «EC» означает эффективную концентрацию и используется применительно к *in vitro* моделям.

[0062] Используемый в настоящем документе термин «контроль» означает лекарственное средство, вещество, соединение, соединения и/или условие тестирования с известным терапевтическим эффектом, таким как отсутствие терапевтического эффекта или эффективности или некоторая определенная величина терапевтического эффекта или эффективности. Используемый в настоящем документе термин «отрицательный

контроль» может означать контроль, который обладает физическими характеристиками, подобными таковым тестируемой терапевтической композиции, но, как известно, не оказывает терапевтического эффекта. Например, отрицательный контроль может представлять собой растворитель, разбавитель или средство доставки, с которым тестируемое соединение растворяется/объединяется во время теста, но в отрицательном контроле тестируемое соединение исключается из растворителя, разбавителя или средства доставки. Например, тестируемое соединение может быть любым одним или несколькими из растворителя, DMSO, воды, спирта, мицеллы, везикулы, белка, полимера или комплексообразующего средства. Термин «положительный контроль» может означать контроль, который обладает известным терапевтическим эффектом и, следовательно, может обеспечивать положительный результат в тесте на предмет данного терапевтического эффекта.

[0063] Используемые в настоящем документе термины «кандидатное соединение», «кандидатное вещество», «тестируемое соединение» или «тестируемое средство» относятся к любым соединению, молекуле или средству, подлежащим тестированию. Используемые в настоящем документе термины, которые используют взаимозаменяемо, относятся к биологическим или химическим соединениям, таким как простые или сложные органические или неорганические молекулы, малые молекулы, пептиды, белки, олигонуклеотиды, полинуклеотиды, углеводы или липопротеины. Огромное количество соединений может быть синтезировано, например, олигомеры, такие как олигопептиды и олигонуклеотиды, и синтетические органические соединения, на основе различных ядерных структур, и они также охватываются терминами, отмеченными выше. Кроме того, различные природные источники могут обеспечивать соединения для скрининга, такие как растительные или животные экстракты и т. п. Соединения могут быть протестированы отдельно или в комбинации друг с другом. Средства или кандидатные соединения могут быть отобраны случайно, или отобраны рационально, или разработаны. Как используется в настоящем документе, средство или кандидатное соединение указывается как «отобранное случайно», если средство выбирают случайно без рассмотрения определенного взаимодействия между средством и целевым соединением или участком. Как используется в настоящем документе, средство указывается как «отобранное рационально или разработанное», если средство выбирают преднамеренно с учетом определенного взаимодействия между средством и целевым сайтом и/или конформации по отношению к действию средства. Согласно некоторым вариантам осуществления анализа, раскрываемые в настоящем документе, могут быть использованы для определения рационального дизайна, например, путем обеспечения механистического

понимания эффективности тестируемого соединения, которое вводится итеративным образом в серию анализов или скринов при уточнении отбора тестируемых соединений. Тестируемое соединение может быть контрольным соединением.

[0064] Используемый в настоящем документе термин «малая молекула» может относиться к соединениям, которые являются «подобными натуральному продукту», однако термин «малая молекула» не ограничивается «подобными натуральному продукту» соединениями. Скорее, малая молекула обычно характеризуется тем, что она содержит несколько углерод-углеродных связей и имеет молекулярную массу более приблизительно 50, но менее приблизительно 5000 Дальтон (5 кДа). Предпочтительно малая молекула имеет молекулярную массу менее 3 кДа, еще более предпочтительно менее 2 кДа и наиболее предпочтительно менее 1 кДа. В некоторых случаях предпочтительно, чтобы малая молекула имела молекулярную массу, равную или меньшую 700 Дальтон.

[0065] В зависимости от того, какой конкретный вариант осуществления применяется на практике, тестируемые соединения могут быть обеспечены свободными в растворе или могут быть прикреплены к носителю или твердой подложке, например, к гранулам. Ряд подходящих твердых подложек может быть использован для иммобилизации тестируемых соединений. Примеры подходящих твердых подложек включают в себя агарозу, целлюлозу, декстран (коммерчески доступный как, например, сефадекс, сефароза), карбоксиметилцеллюлозу, полистирол, полиэтиленгликоль (PEG), фильтровальную бумагу, нитроцеллюлозу, ионообменные смолы, пластиковые пленки, сополимер полиаминметилвинилового эфира малеиновой кислоты, стеклянные гранулы, аминокислотный сополимер, сополимер этилена и малеиновой кислоты, нейлон, шелк и т. д. Кроме того, для способов, раскрываемых в настоящем документе, тестируемые соединения могут быть подвергнуты скринингу по отдельности или группами. Групповой скрининг особенно применим, когда ожидается, что коэффициенты попадания для эффективных тестируемых соединений будут низкими, так что не следует ожидать более одного положительного результата для данной группы. Групповой скрининг также применим для определения попаданий, которые могут действовать синергетически.

[0066] Используемый в настоящем документе термин «нейродегенеративное заболевание» относится к разнообразной группе нарушений центральной нервной системы, характеризующихся постепенной и прогрессирующей потерей нервной ткани и/или функции нервной ткани. Нейродегенеративное заболевание представляет собой класс неврологических нарушений или заболеваний, и при этом неврологическое заболевание характеризуется постепенной и прогрессирующей потерей нервной ткани

и/или измененной неврологической функцией, как правило, неврологическая функция снижается в результате постепенной и прогрессирующей потери нервной ткани. Примеры нейродегенеративных заболеваний включают в себя, например, без ограничения болезнь Альцгеймера (AD), болезнь Паркинсона (PD), болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз (ALS, также называемый болезнью Лу Герига) и рассеянный склероз (MS), нарушения полиглутаминовой экспансии (например, HD, дентаторубропаллидолюисовую атрофию, болезнь Кеннеди (также называемую спинобульбарной мышечной атрофией), спиноцеребеллярную атаксию (например, 1 типа, 2 типа, 3 типа (также называемую болезнью Мачадо-Джозефа), 6 типа, 7 типа и 17 типа), другие нарушения экспансии тринуклеотидных повторов (например, синдром ломкой X-хромосомы, умственную отсталость, ассоциированную с хрупкой XE-хромосомой, атаксию Фридрейха, миотоническую дистрофию, спиноцеребеллярную атаксию 8 типа и спиноцеребеллярную атаксию 12 типа), болезнь Александра, болезнь Альпера, телеангиоэктатическую атаксию, болезнь Баттена (также называемую болезнью Шпильмейера-Фогта-Шегрена-Баттена), болезнь Канавана, синдром Кокейна, кортикобазальную дегенерацию, болезнь Крейцфельда-Якоба, ишемический инсульт, болезнь Краббе, деменцию с тельцами Леви, множественную системную атрофию, болезнь Пелицеуса-Мерцбахера, болезнь Пика, первичный боковой склероз, болезнь Рефсума, болезнь Сандхоффа, болезнь Шилдера, повреждение спинного мозга, спинальную мышечную атрофию (SMA), болезнь Стила-Ричардсона-Ольшевского, сухотку спинного мозга и т. п. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание представляет собой подмножество этих заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, легкое когнитивное нарушение, болезнь Паркинсона, деменция, шизофрения, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона или рассеянный склероз. Согласно некоторым другим вариантам осуществления нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера.

[0067] Раскрываемый в настоящем документе термин «культивирование клеток» или «культивирование клетки» относится к выращиванию клеток для увеличения их популяции. Это может быть выполнено в «среде для культивирования клеток» (также называемой в настоящем документе «культуральной средой» или «средой»), которая, как упоминается в настоящем документе, является средой для культивирования клеток, содержащей питательные вещества, которые поддерживают жизнеспособность клеток и обеспечивают пролиферацию. Среда для культивирования клеток может включать в себя любой из следующих компонентов в соответствующей комбинации: соль(и), буфер(ы), аминокислоты, глюкоза или другой сахар(а), антибиотики, сыворотку или заменитель

сыворотки, а также другие компоненты, такие как пептидные факторы роста и т. д. Клеточные культуральные среды, обычно используемые для определенных типов клеток, известны специалистам в данной области. Кроме того, для анализов и целей тестирования, раскрываемых в настоящем документе, клеточная культура может представлять собой 2D клеточную культуру, такую как тонкая пленка или монослой, или 3D клеточную культуру. В настоящее время существует широкий ряд методик для культивирования клеток в 3D структурах. Без ограничений такие модели 3D клеточных культур могут включать в себя полимерные жесткие каркасы, биологические каркасы, микропланшеты с микроструктурированной поверхностью, микропланшеты для культивирования методом «висячей капли», сфероидные микропланшеты, содержащие покрытия сверхнизкого прикрепления или микрофлюидные 3D клеточные культуры. Согласно некоторым вариантам осуществления может быть использована система 3D культуры клеток ReN AD, например, описанная в *A 3D human neural cell culture system for modeling Alzheimer's disease*, Y. H Kim et al., Nat Protoc. 2015 Jul; 10(7): 985–1006.

[0068] Используемые в настоящем документе термины «иммунные» клетки и «иммуноподобные» клетки означают любые из различных клеток, которые захватывают, разрушают или обезвреживают патогены. Например, клетки, которые могут функционировать в иммунной системе, защищая от патогенов и способствуя восстановлению тканей. К ним относятся белые кровяные клетки (например, лейкоциты, белые клетки, белое кровяное тельце), которые вырабатываются в костном мозге. Иммунные клетки включают в себя нейтрофилы, макрофаги, дендритные клетки, эозинофилы, базофилы, лимфоциты и моноциты и могут быть обнаружены в крови, лимфе и других тканях. Они также могут включать в себя «микроглиальные клетки», которые являются резидентными клетками центральной нервной системы. Согласно некоторым вариантам осуществления используют линию иммортализованных микроглиальных клеток мыши BV-2.

[0069] CD33 является трансмембранным миелоидно-специфическим представителем семейства рецепторов, связывающих сиаловую кислоту, и в высокой степени экспрессируется в миелоидных клетках-предшественниках, но при значительно более низких уровнях в дифференцированных клетках. Связывание сиаловой кислоты активирует CD33, что приводит к ингибированию моноцитов через иммунорецепторные домены с ингибиторным мотивом на основе тирозина. Человеческий CD33 имеет два остатка тирозина в своем цитоплазматическом домене (Y340 и Y358). Согласно некоторым вариантам осуществления CD33 может включать в себя «полноразмерный» пептид. Аминокислотная последовательность для CD33 известна в уровне техники и

приведена ниже для справки: mplllllpll wagalamdpn fwlqvqesvt vqeglcvlvp ctfhpiipyu dknspvhgyw fregaiisrd spvatnkldq evqeetqgrf rllgdpsrnn cslsivdarr rdngsyffirm ergstkysyk spqlsvhvtd lthrpkilip gtlepghskn ltcsvswace qgtppifswl saaptslgpr tthssvliit prpqdhgtnl tcqvkfagag vttertiqln vtyvpqnptt gifpgdgsgk qetravvvhg aiggagvtal lalclcliff ivkthrrkaa rtavgrndth pttgsaspkh qkksklhgpt etsscsgaap tvemdeelhy aslnfhgmnp skdtsteyse vrtq (SEQ ID NO: 1). Необязательно, согласно некоторым вариантам осуществления могут быть использованы усеченные пептиды без связывающего сиаловую кислоту домена.

[0070] Согласно некоторым вариантам осуществления используют линию иммортализованных микроглиальных клеток мыши BV-2. Согласно некоторым вариантам осуществления используют экспрессирующие полноразмерный человеческий CD33 клетки BV-2, тогда как согласно другим вариантам осуществления используют клетки BV-2, экспрессирующие CD33 без связывающего сиаловую кислоту домена. Согласно некоторому варианту осуществления анализов, раскрываемых в настоящем документе, клетки могут представлять собой выделенную популяцию практически чистых клеток.

[0071] Используемый в настоящем документе термин «обработка» клетки веществом означает введение клетки в контакт с веществом на протяжении любого периода времени. Например, объединение клетки и соединения непосредственно или объединение их в среде, такой как растворители, буферы или другие среды. Например, среда может включать в себя среду для выращивания клеток, биологические жидкости, такие как спинномозговая жидкость, кровь или плазма, или имитационные биологические жидкости. Обработка может осуществляться на протяжении любого периода времени, например, на протяжении от 1 секунды до нескольких суток, например, 60 или более суток. Например, обработка может осуществляться на протяжении от одной минуты до 60 суток, от 1 часа до 45 суток, от 1 суток до 30 суток, на протяжении от 1 до 7 суток, от 1 до 3 суток. Обработка также может включать в себя инкубацию (например, при температурах от 5 до 50°C, от 25 до 40°C, приблизительно 37°C), смешивание, мечение, выделение, обработку ультразвуком, центрифугирование, фильтрацию, лиофилизацию и облучение одновременно с обработкой, до или после обработки.

[0072] Тестируемое соединение или терапевтическое средство может быть протестировано при любой желаемой концентрации. Используемый в настоящем документе термин «соответствующая концентрация» относится к концентрации, близкой к концентрации, которая, как ожидается, обладает эффектом и может быть составлена в лекарственное средство для введения субъекту. Например, тестируемое соединение может быть протестировано при конечной концентрации от 0,01 нМ до приблизительно 10 мМ. Кроме того, тестируемое соединение может быть протестировано при 2 или более (например,

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) разных концентрациях. Это может быть применимо, если тестируемое соединение является активным только в диапазоне концентрации. При тестировании тестируемого соединения при 2 или более разных концентрациях различие концентраций может варьировать от 10 до 10000 раз (например, от 10 до 5000 раз, от 10 до 1000 раз, от 10 до 500 раз или от 10 до 250 раз). Кроме того, два или более разных соединений можно тестировать параллельно или при последовательном добавлении в любой комбинации порядка и концентраций.

[0073] Используемый в настоящем документе термин «амилоид-β» или «β-амилоидный пептид» (Aβ или Abeta) означает группу пептидов длиной 36-43 аминокислот, которые являются основным компонентом липкого скопления, называемого амилоидными бляшками, обнаруживаемыми в головном мозге больных AD. Пептиды могут быть получены из белка-предшественника амилоида (APP), который расщепляется бета-секретазой и гамма-секретазой с получением Aβ. Двумя основными изоформами Aβ являются Aβ42 из 42 остатков (Abeta42) и Aβ40 из 40 остатков (Abeta40). Aβ42 имеет два дополнительных остатка на C-конце по сравнению с Aβ40. Амилоидные бляшки в головном мозге больных болезнью Альцгеймера могут состоять в основном из Aβ42, а некоторые бляшки содержат только Aβ42, хотя концентрация Aβ40 в сосудах в несколько раз выше, чем концентрация Aβ42. Aβ согласно вариантам осуществления может иметь как природную, так и синтетическую форму.

[0074] Используемый в настоящем документе термин «липополисахарид» означает соединение, в котором молекула липида связана с полисахаридом ковалентной связью. Например, эндотоксин, который может относиться к любому ассоциированному с клетками бактериальному токсину или может относиться к комплексу, ассоциированному с внешней мембраной грамотрицательных патогенов, таких как *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* и *Vibrio cholera*. Термин может относиться к молекуле, включающей в себя гидрофобную липидную часть, гидрофильное полисахаридное ядро и повторяющуюся гидрофильную O-антигенную боковую цепь полисахарида. Липидная часть может состоять из β-глюкозамин-(1→6)-глюкозамин-1-фосфатной основы со сложными эфирами жирных кислот, присоединенными к обоим углеводам. Гидрофильное полисахаридное ядро может включать в себя внутреннее и внешнее ядро. Внутреннее полисахаридное ядро обычно включает в себя от 1 до 4 молекул KDO (3-дезоксид-α-D-маннооктулозоновой кислоты), присоединенных к дисахаридному ядру. Внутреннее ядро, содержащее KDO, также может быть модифицировано гептулозными (кетогептозными) моносахаридами, наиболее распространенным из которых является L-глицеро-α-D-манно-гептопираноза. Гликаные

остатки внутреннего ядра могут быть фосфорилированы или модифицированы содержащими фосфат группами, например, пирофосфатом или 2-аминоэтилфосфатом. Внешнее ядро липополисахарида может включать в себя более распространенные гексозы, в том числе глюкозу, галактозу и N-ацетилглюкозамин, и может быть структурно более разнообразным, чем внутреннее ядро. O-антиген представляет собой повторяющееся олигосахаридное звено, обычно содержащее от двух до шести сахаров.

[0075] Используемый в настоящем документе термин «цитокины» относится к малым белкам, которые могут высвободиться клетками и влиять на взаимодействия и связи между клетками. Цитокины включают в себя лимфокины (цитокины, вырабатываемые лимфоцитами), монокины (цитокины, вырабатываемые моноцитами), хемокины (цитокины с хемотаксической активностью) и интерлейкины (цитокины, вырабатываемые одним лейкоцитом и действующие на другие лейкоциты). Цитокины могут действовать на клетки, которые их секретируют (аутокринное действие), на соседние клетки (паракринное действие) или на отдаленные клетки (эндокринное действие). Существуют как провоспалительные цитокины (такие как TNF α , IL-1, IL-6, IL-8), так и противовоспалительные цитокины (такие как TGF- β и IL-10). Согласно некоторым вариантам осуществления цитокины могут включать в себя без ограничения IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-12p70, IL-1 β , IL-4, KC/GRO, IL-6, IL-10 и TNF- α .

[0076] Используемый в настоящем документе термин «измерение», например, при измерении внутриклеточных уровней или измерительных уровней, может означать качественный, полуколичественный или количественный способ измерения. Например, качественное измерение может включать в себя выявление присутствия или отсутствия индикатора, который может быть выявлен по присутствию или отсутствию цвета в образце. Согласно некоторым вариантам осуществления качественное измерение обнаруживает присутствие или отсутствие A β или провоспалительных цитокинов, например, посредством индикаторной молекулы или метки. Полуколичественный способ может предусматривать ранжирование двух или более образцов, например, от самого высокого до самого низкого или от более интенсивного до менее интенсивного в отношении цветового индикатора. Количественное измерение может включать в себя численное значение концентрации аналита в образце. Согласно некоторым вариантам осуществления измерение обеспечивает концентрацию A β и провоспалительных цитокинов в тестируемом образце. Согласно некоторым вариантам осуществления измеряют поглощение, флуоресценцию или % жизнеспособности клеток. Например, иммуносорбентный анализ с иммобилизованными ферментами (ELISA) можно использовать для количественного определения A β , используя набор ELISA для

человеческого амилоида-бета 40 или набор ELISA для человеческого амилоида-бета 42 (коммерчески доступный от компании Thermo Scientific). Согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают измерение токсичности тестируемого соединения. Например, токсичность можно тестировать с использованием теста на цитотоксичность (LDH), например, с набором для анализа цитотоксичности LDH Pierce™ (Thermo Scientific) или анализа LDH CytoTox-ONE™ (Promega, WI). Согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают измерение цитокинов. ELISA можно использовать для измерения цитокинов, как и варианты ELISA, в которых используется поверхность, такая как адресуемая гранула (например, Luminex® Multiplex Assays, Invitrogen-thermofisher).

[0077] Используемый в настоящем документе термин «Т-817» или «817» относится к соединению 1-(3-(2-(1-бензотиофен-5-ил)этокси)пропил)азетидин-3-олу. Соединение «Т-817МА» или «817МА» относится к эдонерпику или эдонерпик малеату, который представляет собой 1-(3-(2-(1-бензотиофен-5-ил)этокси)пропил)азетидин-3-ол малеат.

[0078] Используемый в настоящем документе термин «Т-817A11» или «817A11» относится к 1-{3-[2-(1-бензотиофен-5-ил)этокси]пропил}азетидин-3-олу.

[0079] Используемые в настоящем документе термины «Т-614Р» и «614Р» относятся к соединению игуратимод с химическим названием N-(3-формамидо-4-оксо-6-фенокси-4Н-хромен-7-ил).

[0080] Используемый в настоящем документе термин «связывающее взаимодействие» или «аффинность связывания» означает количественную или качественную меру силы связывающего взаимодействия между двумя веществами, такими как два белка, белок-малая молекула или белок и нуклеиновая кислота. Аффинность связывания может быть измерена и представлена в виде равновесной константы диссоциации (K_D), которую используют для оценки и ранжирования сил бимолекулярных взаимодействий. Чем меньше значение K_D , тем выше аффинность связывания лиганда с его мишенью. На аффинность связывания влияют нековалентные межмолекулярные взаимодействия, такие как водородные связи, электростатические взаимодействия, гидрофобные силы и силы Ван-дер-Ваальса между двумя молекулами. Термин «стандартный анализ» относится к анализу, который известен в уровне техники или может быть выбран обычным способом. Некоторые стандартные анализы для измерения аффинности связывания включают в себя ELISA, анализы сдвига в геле, анализы с опусканием, равновесный диализ, аналитическое ультрацентрифугирование, цитометрию, поверхностный плазмонный резонанс (SPR), изотермическую титрационную калориметрию и спектроскопические анализы. Стандартные анализы обеспечивают «регистрируемый показатель», такой как число,

предоставляемое посредством электронного носителя или распечатки, которое относится к степени, например, связывающего взаимодействия, непосредственно или посредством калибровки. Регистрируемый показатель также может представлять собой изменение цвета, которое можно наблюдать или измерять, необязательно с использованием микроскопа. Регистрируемый показатель также может быть представлен в виде графических данных, таких как излучение в УФ и видимой областях спектра, флуоресценция или поглощение.

[0081] Некоторые варианты осуществления предусматривают фармацевтическую композицию. Как описывается подробно ниже, фармацевтические композиции могут быть специально составлены для введения в твердой или жидкой форме, в том числе адаптированы для следующего: (1) пероральное введение, например, жидкие лекарственные формы (водные или неводные растворы или суспензии), пастилки, драже, капсулы, пилюли, таблетки (например, предназначенные для буккального, подъязычного и системного поглощения), болюсы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; (2) парентеральное введение, например, путем подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекции в виде, например, стерильного раствора или суспензии, или состава замедленного высвобождения; (3) местное нанесение, например, в виде крема, мази, или пластырь контролируемого высвобождения, или наносимый на кожу аэрозоль; (4) внутривагинально или внутриванально, например, в виде пессария, крема или пенки; (5) подъязычно; (6) в глаз; (7) чрескожно; (8) через слизистую или (9) назально. Кроме того, средства могут быть имплантированы больному или введены инъекцией с использованием системы доставки лекарственного средства. См., например, Urquhart, et al., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24: 199-236 (1984); Lewis, ed. "Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals" (Plenum Press, New York, 1981); патент США № 3773919 и патент США № 35 3270960.

[0082] Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемые» относится к таким соединениям, материалам, композициям и/или дозированным формам, которые, в рамках здравого медицинского суждения, подходят для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения в соответствии с разумным отношением пользы и риска.

[0083] Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемые материал, композицию или среду-носитель, такие как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное средство, технологическая добавка (например, смазывающее средство, тальк, стеарат

магния, кальция или цинка, или стеариновая кислота), или материал, инкапсулирующий растворитель, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения от одного органа или части организма в другой орган или часть организма. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами состава и не причинять вреда больному. Некоторые примеры материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, включают в себя (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, микрокристаллическая целлюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) смазывающие средства, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк; (8) вспомогательные средства, такие как масло какао и воски для суппозитория; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) многоатомные спирты, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную воду; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) забуференные растворы с определенной pH; (21) сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; (22) объемобразующие средства, такие как полипептиды и аминокислоты; (23) сывороточный компонент, такой как сывороточный альбумин, HDL и LDL; (22) C₂-C₁₂спирты, такие как этанол; и (23) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах. Смачивающие средства, красители, средства высвобождения, покрывающие средства, подсластители, ароматизаторы, отдушки, консерванты и антиоксиданты также могут присутствовать в составе. Термины, такие как «вспомогательное средство», «носитель», «фармацевтически приемлемый носитель» или подобные, используют в настоящем документе взаимозаменяемо.

[0084] Некоторые варианты осуществления предусматривают способы модуляции функции микроглиальных клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления микроглиальные клетки модулируют *in vitro*, например, в клеточной культуре. Согласно другим вариантам осуществления клетки модулируют *in vivo*, при этом клетки находятся у субъекта. Согласно следующим аспектам клетки модулируют *ex vivo*, например, из биоптата или образца от субъекта.

[0085] Микроглиальные клетки функционируют как первичные иммунные клетки центральной нервной системы (CNS) и похожи на периферические макрофаги. После активации, например, в ответ на патоген или повреждение, они функционируют как основной тип воспалительных клеток в головном мозге. Активированные клетки могут функционировать с быстрым изменением морфологии, пролиферировать и мигрировать в участок инфекции/повреждения, где посредством фагоцитоза они уничтожают патогены, а также удаляют поврежденные клетки. В рамках своей функции ответа микроглиальные клетки могут также секретировать цитокины и хемокины, а также простагландины, NO и активные формы кислорода. Высвобождающие цитокины, такие как CCl_2 , микроглиальные клетки также важны для привлечения лейкоцитов в CNS. Микроглия функционирует также со взаимодействием с инфильтрирующимися T-лимфоцитами и, таким образом, опосредует иммунный ответ в головном мозге. В рамках своей функции они обладают способностью стимулировать пролиферацию TH1- и TH2-CD4-позитивных T-клеток. Кроме того, они функционируют, помогая в разрешении воспалительного ответа путем продуцирования противовоспалительных цитокинов, таких как $IL-10$.

[0086] Используемый в настоящем документе термин «фагоцитоз» относится к процессу, посредством которого определенные клетки (например, фагоциты) поглощают или захватывают другие клетки, фрагменты клеток, микроорганизм или чужеродные частицы. Например, путем локального складывания клеточной мембраны и выпячивания ее цитоплазмы вокруг складки до тех пор, пока материал не будет окружен и захвачен закрытием мембраны и образованием вакуоли. Это характерно для некоторых типов иммунных клеток.

[0087] Согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают введение больному терапевтической дозы или дозировки композиций, которые идентифицируют как возможное лекарственное средство в раскрываемом анализе. Используемый в настоящем документе термин «терапевтическая доза» или «терапевтически эффективное количество» означает такое количество, которое необходимо, по меньшей мере частично, для достижения желаемого эффекта или для задержки проявления, ингибирования прогрессирования или полного прекращения проявления или прогрессирования конкретного заболевания или нарушения, подлежащего лечению. Это включает в себя как терапевтическое, так и профилактическое лечение. Такие количества будут, конечно, зависеть от конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния и индивидуальных параметров больного, в том числе возраста, физического состояния, размера, массы и сопутствующего лечения. Эти

факторы хорошо известны специалистам в данной области и могут быть рассмотрены с помощью обычных экспериментов.

[0088] Используемый в настоящем документе термин «вводить» или «введение» относится к размещению композиции у субъекта способом или путем, который приводит по меньшей мере к частичной локализации композиции на желаемом участке, так что осуществляется желаемый эффект. Соединение или композиция, раскрываемые в настоящем документе, могут быть введены любым подходящим путем, известным в уровне техники, в том числе без ограничения пероральным или парентеральным путями, в том числе внутривенным, внутримышечным, подкожным, чрескожным, воздушным (аэрозоль), легочным, назальным, ректальным и местным (в том числе буккальным и подъязычным) введением. Соединения можно вводить на очень ранних стадиях заболевания, или до раннего проявления, или после значительного прогрессирования. При применении к отдельному активному ингредиенту, вводимому отдельно, термин относится только к этому ингредиенту. Применительно к комбинации термин относится к объединенным количествам активных ингредиентов, которые дают терапевтический эффект, независимо от того, вводятся ли они в комбинации, последовательно или параллельно.

[0089] Иллюстративные пути введения включают в себя без ограничения инъекцию, инфузию, инстилляцию, ингаляцию или проглатывание. Термин «инъекция» включает в себя без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интравентрикулярную, внутрикапсулярную, внутриорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутриспинальную, интрацереброспинальную и внутригрудинную инъекцию и инфузию.

[0090] Согласно некоторым вариантам осуществления предусматривается совместное введение соединений. Это может относиться к введению двух или более соединений субъекту, при этом два или более соединений могут быть введены параллельно или в разные моменты времени, лишь бы они работали аддитивно или синергетически. Соединения могут быть введены в одном составе или в отдельных составах. При введении в отдельных составах соединения могут быть введены в пределах любого момента времени друг после друга. Например, соединения могут быть введены в пределах 24 часов, 12 часов, 6 часов, 5 часов, 4 часов, 3 часов, 2 часов, 1 часа, 45 минут, 30 минут, 25 минут, 20 минут, 15 минут, 10 минут, 5 минут или меньше друг после друга. При введении в отдельных составах любое соединение может быть введено первым. Кроме того, для совместного введения не требуется, чтобы разные соединения были введены одним и тем

же путем, т. е. компоненты комбинации могут быть введены субъекту одним и тем же или разными путями введения. Таким образом, каждое может быть введено независимо или в виде обычной дозированной формы. Подобным образом, термин «совместное тестирование» может относиться к тестированию двух или более соединений в анализе, при этом два или более соединений можно тестировать параллельно или в разные моменты времени, например, чтобы определить, работают ли они аддитивно или синергетически. При совместном тестировании двух или более соединений может быть заранее не известно, работают ли соединения синергетически, и тестирование может заключаться в том, чтобы определить, существует ли синергетический эффект, совместимы ли два соединения, существует ли аддитивный эффект, существует ли отрицательный синергетический эффект, или существуют ли любые другие комбинированные эффекты.

[0091] Как упоминается в настоящем документе, скрининговый анализ или тестирование могут быть выполнены в любом подходящем контейнере или устройстве, доступном специалисту в данной области для культивирования клеток. Например, анализ можно выполнять в 24-, 96- или 384-луночных планшетах. Согласно одному варианту осуществления анализ выполняют в 384-луночном планшете.

[0092] Согласно некоторым вариантам осуществления способ скрининга или тестирования является скринингом с высокой пропускной способностью. Скрининг с высокой пропускной способностью (HTS) представляет собой способ для научных экспериментов, в котором используются роботизированные устройства, программное обеспечение для обработки и контроля данных, устройства для обработки жидкостей и чувствительные детекторы. Скрининг с высокой пропускной способностью или HTS позволяет исследователю быстро провести миллионы биохимических, генетических или фармакологических тестов. Скрининг с высокой пропускной способностью хорошо известен специалисту в данной области, например, описан в патентах США №№ 5976813, 6472144, 6692856, 6824982 и 7091048, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном своем объеме.

[0093] В HTS используют автоматизацию для проведения скрининга анализа против библиотеки кандидатных соединений. Типичные библиотеки для скрининга HTS или «наборы» могут включать в себя от 100000 до более чем 2000000 соединений.

[0094] Основным лабораторным оборудованием или сосудом для тестирования при HTS является микротитрационный планшет: небольшой контейнер, обычно одноразовый и изготовленный из пластика, в котором имеется сетка небольших открытых углублений, называемых лунками. Современные микропланшеты для HTS, как правило, имеют 384,

1536 или 3456 лунок. Все они кратны 96, что соответствует исходному 96-луночному микропланшету с разнесенными 8×12 9-мм лунками. Согласно некоторым вариантам осуществления автоматизацию используют для планшетов с более крупными лунками, например, для планшетов, имеющих 24 или 96 лунок.

[0095] Для подготовки к анализу исследователь заполняет каждую лунку планшета соответствующими реагентами, с которыми он или она желает провести эксперимент, например, клеткой. После того, как прошло некоторое время инкубации для обеспечения поглощения реагента, связывания или иным образом реагирования (или отсутствия реагирования) с соединениями в лунках, проводят измерения во всех лунках планшета, либо вручную, либо с помощью машины. Ручные измерения часто необходимы, если исследователь использует микроскопию (например) для поиска изменений, которые компьютер самостоятельно не может легко определить. В противном случае специализированная машина автоматического анализа может выполнять в лунках ряд экспериментов, таких как колориметрические измерения, подсчет радиоактивности и т. д. В этом случае машина выводит результат каждого эксперимента в виде сетки числовых значений, при этом каждое число имеет взаимно-однозначное соответствие значению, полученному из одной лунки. Высокоэффективная аналитическая машина может измерять десятки планшетов в течение нескольких минут, очень быстро генерируя таким образом тысячи точек экспериментальных данных.

Некоторые выбранные определения

[0096] Для удобства в данном разделе собраны некоторые термины, используемые в настоящем документе, в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения. Если не указано иное или не подразумевается из контекста, следующие термины и фразы предусматривают значения, приведенные ниже. Если явно не указано иное или не очевидно из контекста, приведенные ниже термины и фразы не исключают того значения, которое данные термин или фраза имеют в той области, к которой они относятся. Определения предоставлены с целью описания конкретных вариантов осуществления и не предназначены для ограничения заявленного изобретения, поскольку объем настоящего изобретения ограничивается исключительно формулой изобретения. Кроме того, если контекст не требует иного, термины в единственном числе предусматривают множественное число, а термины во множественном числе предусматривают единственное число.

[0097] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, что и общепринятые известные специалисту

в области, к которой относится настоящее изобретение. Хотя любые известные способы, устройства и материалы могут быть использованы при практическом применении или тестировании настоящего изобретения, при этом способы, устройства и материалы раскрываются в настоящем документе.

[0098] Используемые в настоящем документе термины «включающий в себя», «включает в себя», «содержит» или «содержащий» используют в отношении композиций, способов и их соответствующего компонента(ов), которые важны для настоящего изобретения, но открыты для включения неуказанных элементов, существенных или нет.

[0099] Термины в единственном числе включают в себя упоминаемые объекты во множественном числе, если в контексте явно не указано иное. Подобным образом, слово «или» предназначено для включения «и», если в контексте явно не указано иное.

[00100] За исключением рабочих примеров или указания иного, все числа, выражающие количества ингредиентов или условия реакции, используемые в настоящем документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «приблизительно». Термин «приблизительно» при использовании в соединении с процентными отношениями может означать $\pm 5\%$ (например, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$ или $\pm 1\%$) от упомянутой величины.

[00101] Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные раскрываемым в настоящем документе, могут использоваться при практическом применении или тестировании настоящего раскрытия, ниже описываются подходящие способы и материалы. Термин «например» используют в настоящем документе для указания неограничивающего примера. Таким образом, термин «например» является синонимом термина «в качестве примера».

[00102] Используемый в настоящем документе термин «в настоящем документе» используется для обозначения всего настоящего раскрытия и не предназначен для ограничения конкретным разделом или подразделом настоящего раскрытия.

[00103] Используемые в настоящем документе термины «уменьшать», «сниженный», «снижение», «снижать» или «ингибировать», как правило, означают уменьшение на статистически значимое значение. Однако во избежание сомнений термины «уменьшать», «сниженный», «снижение», «снижать» или «ингибировать» означают уменьшение по меньшей мере на 1% по сравнению с эталонным уровнем, например, уменьшение по меньшей мере на приблизительно 10%, или по меньшей мере на приблизительно 20%, или по меньшей мере на приблизительно 30%, или по меньшей мере на приблизительно 40%, или по меньшей мере на приблизительно 50%, или по меньшей мере на приблизительно 60%, или по меньшей мере на приблизительно 70%, или по меньшей мере на приблизительно 80%, или по меньшей мере на приблизительно 90%, или уменьшение на

вплоть до 100% (например, отсутствие уровня по сравнению с эталонным образцом), или любое уменьшение на 1-100% по сравнению с эталонным уровнем.

[00104] Используемые в настоящем документе термины «увеличенный», «увеличивать», или «усиливать», или «активировать», как правило, означают увеличение на статически значимую величину; во избежание каких-либо сомнений термины «увеличенный», «увеличивать», или «усиливать», или «активировать» означают увеличение по меньшей мере на 1% по сравнению с эталонным уровнем, например, увеличение на приблизительно 10% по сравнению с эталонным уровнем, или по меньшей мере на приблизительно 20%, или по меньшей мере на приблизительно 30%, или по меньшей мере на приблизительно 40%, или по меньшей мере на приблизительно 50%, или по меньшей мере на приблизительно 60%, или по меньшей мере на приблизительно 70%, или по меньшей мере на приблизительно 80%, или по меньшей мере на приблизительно 90%, или увеличение вплоть до 100%, или любое увеличение от 1 до 100% по сравнению с эталонным уровнем, или увеличение по меньшей мере в приблизительно 2 раза, или по меньшей мере в приблизительно 3 раза, или по меньшей мере в приблизительно 4 раза, или по меньшей мере в приблизительно 5 раз, или по меньшей мере в приблизительно 10 раз, или любое увеличение от 2 раз до 10 раз или больше по сравнению с эталонным уровнем.

[00105] Термин «статистически значимый» или «значительно» относится к статистической значимости и обычно означает, по меньшей мере два стандартных отклонения (2SD) от эталонного уровня. Термин относится к статистическому подтверждению того, что различие существует. Он определяется как вероятность принятия решения отклонить нулевую гипотезу, если нулевая гипотеза действительно верна.

[00106] Термин «клеточная линия» относится к популяции в значительной степени или практически идентичных клеток, которая обычно получена из одной клетки-предка или из определенной и/или практически идентичной популяции клеток-предков. Клеточная линия может быть сохранена или способна сохраняться в культуре в течение длительного периода времени (например, месяцы, годы, в течение неограниченного периода времени). Она может подвергаться спонтанному или индуцированному процессу трансформации, дающему неограниченную продолжительность жизни клеток в культуре. Клеточные линии включают в себя все те клеточные линии, которые известны в уровне техники как таковые. Будет понятно, что со временем клетки приобретают мутации и, возможно, эпигенетические изменения, так что по меньшей мере некоторые свойства отдельных клеток клеточной линии могут отличаться друг от друга.

[00107] Используемый в настоящем документе термин «выделенная клетка» может относиться к клетке, которая была удалена из организма, в котором она была первоначально обнаружена, или к потомку такой клетки. Необязательно клетку культивировали *in vitro*, например, в присутствии других клеток. Необязательно клетку позднее вводят во второй организм или повторно вводят в организм, из которого она (или клетка, из которой она произошла) была выделена.

[00108] Используемый в настоящем документе термин «выделенная популяция» в отношении выделенной популяции клеток относится к популяции клеток, которая была удалена и отделена от смешанной или гетерогенной популяции клеток. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенная популяция представляет собой практически чистую популяцию клеток по сравнению с гетерогенной популяцией, из которой клетки были выделены или обогащены. Согласно некоторым вариантам осуществления выделенная популяция представляет собой выделенную популяцию перепрограммированных клеток, которая представляет собой практически чистую популяцию перепрограммированных клеток по сравнению с гетерогенной популяцией клеток, содержащей перепрограммированные клетки и клетки, из которых были получены перепрограммированные клетки.

[00109] Термин «практически чистая» популяция клеток может относиться к конкретной популяции клеток, которая является чистой по меньшей мере на приблизительно 75%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90% или по меньшей мере на приблизительно 95% по отношению к клеткам, составляющие общую клеточную популяцию.

[00110] Настоящее раскрытие далее иллюстрируется следующими примерами, которые не должны рассматриваться как ограничивающие. Примеры являются исключительно иллюстративными и не предназначены для ограничения каким-либо образом любого из аспектов, раскрываемых в настоящем документе. Следующие примеры никоим образом не ограничивают настоящее изобретение.

ПРИМЕРЫ

Общие сведения

[00111] Как показано в графических материалах, соединения отбирали и тестировали на моделях микроглиальных и 3D культур клеток AD в диапазоне концентраций и на протяжении периода времени, варьирующего от часов до суток. Модели культур выбирали для изучения разных стадий и биологических аспектов болезни Альцгеймера.

Токсичность соединений оценивали, анализируя культуральную среду с помощью коммерчески доступного анализа (CytoTox-ONE™, Promega), в котором измеряют высвобождение LDH. Токсические концентрации исключали из дальнейшего тестирования. Для микроглиальных культур анализы поглощения Aβ42 и Aβ40 проводили в течение от 2 до 24 часов после 3 часов предварительной обработки соединением. Результаты эксперимента определяли путем измерения повышенного содержания интернализированных Aβ42 и Aβ40 с помощью коммерчески доступного анализа ELISA (набор ELISA для Abeta42 Wako). В качестве альтернативы, анализы активации LPS проводили в течение 3 часов после 3 часов предварительной обработки соединением. Контролировали уменьшение токсических цитокинов, высвобождаемых в культуральной среде.

[00112] Экспериментальная информация

[00113] Наивные клетки BV2 или BV2, стабильно экспрессирующие CD33 wt, высевали в 24-луночные планшеты при плотности $2,5 \times 10^5$ клеток для BV2 и 4×10^5 клеток для экспрессирующего CD33 wt клона в пролиферативную среду. На следующий день клетки обрабатывали соединениями или DMSO в качестве контроля при различных концентрациях в пролиферативной среде в течение 3 часов. Для анализов поглощения Abeta42 и Abeta40 клетки промывали два раза с помощью 500 мкл/лунка PBS и обрабатывали соединениями/DMSO в присутствии 300 нМ пептида Abeta в среде DMEM в течение 2 часов. В конце 2-часовой инкубации 150 мкл среды собирали из 24-луночных планшетов. Их центрифугировали при 4°C, 2500 оборотах в минуту в течение 10 минут, переносили в новые планшеты и использовали для оценивания токсичности соединений с помощью анализа CytoTox-ONE™ (LDH). Оставшиеся клетки в 24-луночных планшетах промывали три раза с помощью холодного PBS 500 мкл/лунка и лизировали с помощью 50 мкл буфера RIPA, дополненного не содержащим EDTA коктейлем ингибиторов протеазы Complete™, ингибитором фосфатазы HALT™ и 1,10-фенантролином, при покачивании в течение 20 минут при 4°C. Клетки центрифугировали при 4°C, 13500 оборотах в минуту в течение 15 минут и надосадочную жидкость переносили в новые микроцентрифужные пробирки. Определяли концентрации белков в надосадочных жидкостях лизата с помощью набора для анализа белка с BCA Pierce™. Анализировали 2-3 мкг/лунка белка из лизатов на предмет поглощения Abeta42 с использованием набора для ELISA Abeta42 Wako. Для поглощения Abeta40 использовали анализ Abeta40 с HTRF Cisbio.

[00114] Токсические концентрации соединений исключали из анализа Abeta42 и Abeta40.

[00115] Для экспериментов микроглиальной активации клетки обрабатывали соединениями/DMSO в присутствии 1 мкг/мл LPS в пролиферативной среде в течение 3 часов. Среду собирали, очищали от частиц и анализировали с использованием набора для анализа цитокинов с Proinflammatory Panel 1 MSD.

Тестирование соединения 817MA

[00116] Для тестирования 24-часовой предварительной обработки на микроглиальных клетках использовали следующий протокол.

[00117] В день нулевой наивные микроглиальные клетки BV2 высевали в пролиферативную среду.

[00118] Затем в день первый клетки обрабатывали с помощью 817MA или DMSO в качестве контроля в пролиферативной среде в течение 24 часов при концентрациях, варьирующих от 0 до 50 мкМ.

[00119] Затем в день второй клетки промывали два раза с помощью PBS и обрабатывали соединениями/DMSO в присутствии 300 нМ пептида Abeta42 в среде DMEM в течение 2 часов. Оценивали токсичность соединений в среде, собранной в конце обработки с помощью анализа CytoTox-ONE™ (LDH). Оставшиеся клетки лизировали с помощью буфера RIPA, дополненного ингибиторами протеазы и фосфатазы. Определяли концентрации белков с помощью набора для анализа белка с BCA Pierce™. Нормализованные лизаты анализировали на предмет поглощения Abeta42 с использованием набора для ELISA Abeta42 Wako.

Тестирование токсичности LDH

[00120] Результаты тестирования токсичности показаны со ссылкой на фиг. 1 и 2. На обеих фигурах показаны результаты в виде столбчатого графика для токсичности LDH. Тестируемыми соединениями являются DMSO, 817MA, 817A11 и 614P. На фиг. 1 показаны результаты тестирования токсичности на наивных микроглиальных клетках, а на фиг. 2 показаны результаты на экспрессирующих CD33 wt микроглиальных клетках. В обоих случаях статистически значимую токсичность не наблюдали для тестируемых соединений после пятичасовой обработки клеток соединениями.

Анализ поглощения Abeta

[00121] Анализы поглощения Abeta с тестируемыми соединениями DMSO, 817MA, 817A11 и 614P показаны со ссылкой на результаты, изображенные на фиг. 3-6. Анализировали эффект в отношении поглощения Abeta40 и Abeta42 у наивных BV2 и экспрессирующих CD33 wt клеток BV2 как функцию концентрации. На фиг. 3 показано, что 817MA и 817MA имеют более низкую EC_{50} для поглощения Abeta40 и Abeta42 во всех тестируемых типах клеток по сравнению с тестируемым соединением 614P. Анализ также различает 817MA и 817A11. Например, на фиг. 3 и 4 на наивных BV2 и экспрессирующих CD33 wt клетках BV2 показано, что обработанные 817MA и 817A11 клетки характеризуются подобным поглощением Abeta42, тогда как на фиг. 5 и 6 на наивных BV2 и экспрессирующих CD33 wt клетках BV2 показано, что обработанные 817A11 клетки имеют более низкую EC_{50} поглощения Abeta40, чем обработанные 817MA клетки.

Выявление и снижение цитокинов

[00122] На фиг. 7 в виде таблице представлены результаты тестирования активации с помощью LPS микроглиальных клеток, демонстрирующие, что цитокины KC/GRO, IL-6, IL-10 и TNF- α выявляли при активации LPS, хотя KC/GRO выявляли только в неразбавленной среде. Параллельно анализировали 10 цитокинов в микроглиальной кондиционированной среде. На фиг. 8-15 показаны результаты для анализа с тестированием эффекта тестируемых соединений DMSO, 817MA, 817A11 и 614P на цитокины KC/GRO, IL-6, IL-10 и TNF- α . Анализы показывают, что клетки BV2, обработанные с помощью 817MA, демонстрируют пониженные концентрации IL-6, IL-10 и TNF- α . В двух последовательных анализах определяли, какие из цитокинов, если есть, выявляются при активации LPS, а затем определяли снижение выявляемых цитокинов при обработке/воздействии тестируемым соединением.

Тестирование в 3D клеточной культуре AD

[00123] На фиг. 16 показаны результаты на столбчатом графике, построенном по данным первого теста в системе 3D культуры клеток ReN AD. Тест представляет собой анализ LDH в среде HReN30-mGAP30 после однонедельной обработки тестируемыми соединениями DMSO, T-817MA (817MA), T-817A11(817A11) и T-614 (614P). n равняется 3 или 4 для каждой клеточной линии.

[00124] На фиг. 17 показаны результаты на столбчатом графике, построенном по данным второго теста в системе 3D культуры клеток ReN AD. Тест представляет собой анализ LDH в среде HReN30-mGAP10#D4 после однонедельной обработки тестируемыми

соединениями DMSO, T-817MA (817MA), T-817A11(817A11) и T-614 (614P). n равняется 3 или 4 для каждой клеточной линии.

[00125] На фиг. 18А - 18Н представлена серия столбчатых графиков данных по содержанию растворимого (среда) (горизонтальная ось) и нерастворимого Abeta (вертикальная ось) после обработок лекарственным средством. Тестируемыми соединениями являются T-817MA (817MA), T-817A11(817A11) и T-614 (614P). Слева направо в каждом из этих графиков каждый столбик предназначен для DMSO (0,1%), T-817MA (0,3 мкМ), T-817MA (3 мкМ), T-817A11 (0,3 мкМ), T-817A11 (3 мкМ), DMSO (0,5%), T-614P (10 мкМ), T-614P (100 мкМ) и GuHCl/среда для дифференцировки. На фиг. 18А - 18D представлены эксперименты с HReN-mGAP30. На фиг. 18А представлен Abeta40 в среде HReN30 (HReN-mGAP30). На фиг. 18В представлен Abeta42 в среде HReN30 (HReN-mGAP30). На фиг. 18С представлен Abeta40 в нерастворимой фракции HReN30 (HReN-mGAP30). На фиг. 18D представлен Abeta42 в нерастворимой фракции HReN30 (HReN-mGAP30). На фиг. 18Е - 18Н представлены эксперименты с ReN-mGAP#D4. На фиг. 18Е представлен Abeta40 в среде ReN-mGAP10#D4 (ReN-mGAP#D4). На фиг. 18F представлен Abeta42 в среде ReN-mGAP10#D4 (ReN-mGAP#D4). На фиг. 18G представлен Abeta40 в нерастворимой фракции ReN-mGAP10#D4 (ReN-mGAP#D4). На фиг. 18Н представлен Abeta42 в нерастворимой фракции ReN-mGAP10#D4 (ReN-mGAP#D4).

[00126] На фиг. 19А - 19D представлена серия столбчатых графиков данных по содержанию нерастворимого p-tau и суммарного p-tau после обработок лекарственным средством. Тестируемыми соединениями являются DMSO, T-817MA (817MA), T-817A11(817A11) и T-614 (614P). Слева направо в каждом из этих графиков данные представлены для DMSO (0,1%), T-817MA (0,3 мкМ), T-817MA (3 мкМ), T-817A11 (0,3 мкМ), T-817A11 (3 мкМ), DMSO (0,5%), T-614P (10 мкМ), T-614P (100 мкМ) и GuHCl. На фиг. 19А и фиг. 19В представлены тесты с HReN-mGAP30. На фиг. 19А показана концентрация pTau181 (единицы/мл) в нерастворимой фракции HReN30. На фиг. 19В показана концентрация pTau181 (пг/мл) в нерастворимой фракции HReN30. На фиг. 19С и фиг. 19D представлены тесты с ReN-mGAP#D4. На фиг. 19С показана концентрация pTau181 (единицы/мл) в нерастворимой фракции ReN-mGAP10#D4. На фиг. 19D показана концентрация pTau181 (пг/мл) в нерастворимой фракции ReN-mGAP10#D4.

[00127] На фиг. 20 представлена серия изображений в ReN-mGAP#D4 (4-недельная дифференцировка). В горизонтальных рядах сверху вниз представлены изображения для DMSO 3 мкМ, 817MA 0,3 мкМ, 817MA 3 мкМ, 817A11 0,3 мкМ, 817A11 3 мкМ, DMSO 100 мкМ, 614P игуратимода 10 мкМ и 614P игуратимода 100 мкМ.

[00128] На фиг. 21 представлена серия изображений в HReN-mGAP30 (7-недельная дифференцировка). В горизонтальных рядах сверху вниз представлены изображения для DMSO 3 мкМ, 817MA 0,3 мкМ, 817MA 3 мкМ, 817A11 0,3 мкМ, 817A11 3 мкМ, DMSO 100 мкМ, 614P игуратимода 10 мкМ и 614P игуратимода 100 мкМ.

[00129] На фиг. 22 представлен столбчатый график данных по исследованиям токсичности с использованием нитропрусида натрия (SNP) в 3D культуре клеток ReN AD. Данные получены в анализе WST-8 на клетках ReN без B27 после односуточной обработки с помощью SNP. 6 столбиков слева представляют данные смешанной клональной не являющейся AD клеточной линии. 6 столбиков справа представляют данные одноклональной не являющейся AD клеточной линии. $n = 3$ или 4 для каждой клеточной линии.

[00130] На фиг. 23 представлен столбчатый график данных по анализу WST-8 на клетках ReN без B27 после четырех суток обработки с помощью 817MA и одних суток обработки с помощью SNP. 20 столбиков слева представляют данные смешанной клональной не являющейся AD клеточной линии. 20 столбиков справа представляют данные одноклональной не являющейся AD клеточной линии. $n = 3$ или 4 для каждой клеточной линии. Концентрации для обработок слева направо для 20 столбиков слева являются следующими: ReN-G2 DMSO, SNP 0 мМ; ReN-G2 817MA 0,1 мкМ, SNP 0 мМ; ReN-G2 817MA 0,5 мкМ, SNP 0 мМ; ReN-G2 817MA 1 мкМ, SNP 0 мМ; ReN-G2 817MA 3 мкМ, SNP 0 мМ; ReN-G2 DMSO, SNP 4 мМ; ReN-G2 817MA 0,1 мкМ, SNP 4 мМ; ReN-G2 817MA 0,5 мкМ, SNP 4 мМ; ReN-G2 817MA 1 мкМ, SNP 4 мМ; ReN-G2 817MA 3 мкМ, SNP 4 мМ; ReN-G2 DMSO, SNP 5 мМ; ReN-G2 817MA 0,1 мкМ, SNP 5 мМ; ReN-G2 817MA 0,5 мкМ, SNP 5 мМ; ReN-G2 817MA 1 мкМ, SNP 5 мМ; ReN-G2 817MA 3 мкМ, SNP 5 мМ; ReN-G2 DMSO, SNP 10 мМ; ReN-G2 817MA 0,1 мкМ, SNP 10 мМ; ReN-G2 817MA 0,5 мкМ, SNP 10 мМ; ReN-G2 817MA 1 мкМ, SNP 10 мМ и ReN-G2 817MA 3 мкМ, SNP 10 мМ. Концентрации для обработок слева направо для 20 столбиков справа являются следующими: #G2B2 DMSO, SNP 0 мМ; #G2B2 817MA 0,1 мкМ, SNP 0 мМ; #G2B2 817MA 0,5 мкМ, SNP 0 мМ; #G2B2 817MA 1 мкМ, SNP 0 мМ; #G2B2 817MA 3 мкМ, SNP 0 мМ; #G2B2 DMSO, SNP 2 мМ; #G2B2 817MA 0,1 мкМ, SNP 2 мМ; #G2B2 817MA 0,5 мкМ, SNP 2 мМ; #G2B2 817MA 1 мкМ, SNP 2 мМ; #G2B2 817MA 3 мкМ, SNP 2 мМ; #G2B2 DMSO, SNP 3 мМ; #G2B2 817MA 0,1 мкМ, SNP 3 мМ; #G2B2 817MA 0,5 мкМ, SNP 3 мМ; #G2B2 817MA 1 мкМ, SNP 3 мМ; #G2B2 817MA 3 мкМ, SNP 3 мМ; #G2B2 DMSO, SNP 10 мМ; #G2B2 817MA 0,1 мкМ, SNP 10 мМ; #G2B2 817MA 0,5 мкМ, SNP 10 мМ; #G2B2 817MA 1 мкМ, SNP 10 мМ и #G2B2 817MA 3 мкМ, SNP 10 мМ.

[00131] На фиг. 24 представлен столбчатый график данных по анализу WST-8 (% жизнеспособности) на клетках ReN без B27 после четырех суток обработки с помощью 817MA и одних суток обработки с помощью SNP. 4 столбика слева представляют данные смешанной клональной не являющейся AD клеточной линии ReN-G2. 4 столбика справа представляют данные одноклональной не являющейся AD клеточной линии #G2B2. $n = 3$ или 4 для каждой клеточной линии

Оптимизация кандидатного лекарственного средства

[00132] На фиг. 25 показано, что 817MA характеризуется отсутствием токсичности или низкой токсичностью ниже приблизительно 50 мкМ, например, при приблизительно 30 мкМ статистически значимую токсичность не наблюдали по сравнению с DMSO. На фиг. 26 показано, что поглощение Abeta42 выше приблизительно 1 мкМ больше, чем при контроле DMSO (например, выше приблизительно 5, выше приблизительно 10, выше приблизительно 20 мкМ) на микроглиальных клетках. EC_{50} составляет приблизительно 20 мкМ после 24 часов обработки 817MA. В данном примере показано, как можно добиться оптимизации концентрации лекарственного средства путем минимизации токсичности и максимизации поглощения Abeta.

Анализ с SNP на 3D модели AD головного мозга

[00133] На фиг. 27A и 27B представлены иллюстративные временные линейные диаграммы для обработок с помощью 817MA. На фиг. 27A показана 3-суточная обработка 817MA, которая предусматривает: (день 0) высевание клеток, начало дифференцировки; (день 25) начало 3-суточной обработки 817MA; (день 26) тестирование токсичности SNP в нескольких необрабатываемых лунках; (день 27) выполнение анализа с SNP в присутствии 817MA и (день 28) окончание эксперимента. На фиг. 27B представлена 3-недельная обработка которая предусматривает: (день 0) высевание клеток, начало дифференцировки; (день 7) начало 3-недельной 2 раза в неделю обработки 817MA; (день 26) тестирование токсичности SNP в нескольких необрабатываемых лунках; (день 27) выполнение анализа с SNP в присутствии 817MA и (день 28) окончание эксперимента. Используемыми не являющимися AD клеточными линиями были смешанные клональные ReN-G2. Используемыми клеточными линиями AD были смешанные клональные HReN30, одноклональные mGAP#D4 и mAP#E6F4. Анализ с регистрацией показателей представлял собой WST-8.

[00134] На фиг. 28 представлен столбчатый график данных по жизнеспособности клеток относительно концентрации SNP в день 26. Слева направо представлены данные

для не являющейся AD, смешанной клональной AD, одноклональной AD и одноклональной AD клеточных линий.

[00135] На фиг. 29 представлен столбчатый график данных по жизнеспособности клеток при выбранных концентрациях. Слева направо представлены данные для не являющийся AD, смешанной клональной AD, одноклональной AD и одноклональной AD клеточных линий. $n = 3$ или 4 для каждой клеточной линии.

[00136] На фиг. 30A и 30B представлены два столбчатых графика, демонстрирующих данные по эффекту 817MA в отношении индуцированной SNP токсичности. На фиг. 31A показаны данные для 817MA в течение 3 суток. На фиг. 31B показаны данные для 817MA в течение 3 недель. Слева направо в группах из четырех столбиков представлены данные для не являющийся AD, смешанной клональной AD, одноклональной AD и одноклональной AD клеточных линий. Слева направо каждый столбик предназначен для G2 DMSO + SNP 2,5 мМ; G2 817MA 0,1 мкМ, SNP 2,5 мМ; G2 817MA 1 мкМ, SNP 2,5 мМ; G2 817MA 3 мкМ + SNP 2,5 мМ; HReN30 DMSO + SNP 3 мМ; HReN30 817MA 0,1 мкМ, SNP 3 мМ; HReN30 817MA 1 мкМ, SNP 3 мМ; HReN30 817MA 3 мкМ + SNP 3 мМ; #D4 DMSO + SNP 2 мМ; #D4 817MA 0,1 мкМ, SNP 2 мМ; #D4 817MA 1 мкМ, SNP 2 мМ; #D4 817MA 3 мкМ + SNP 2 мМ; #E6F4 DMSO + SNP 2 мМ; #E6F4 817MA 0,1 мкМ, SNP 2 мМ; #E6F4 817MA 1 мкМ, SNP 2 мМ и #E6F4 817MA 3 мкМ + SNP 2 мМ.

[00137] На фиг. 31A и 31B представлены столбчатые графики, показывающие данные по эффекту 817MA в отношении жизнеспособности клеток без SNP. На фиг. 31A показаны данные для 817MA в течение 3 суток. На фиг. 31B показаны данные для 817MA в течение 3 недель. Слева направо в группах из четырех столбиков представлены данные для не являющийся AD, смешанной клональной AD, одноклональной AD и одноклональной AD клеточных линий. Слева направо каждый столбик предназначен для G2 DMSO + SNP 0 мМ; G2 817MA 0,1 мкМ, SNP 0 мМ; G2 817MA 1 мкМ, SNP 0 мМ; G2 817MA 3 мкМ + SNP 0 мМ; HReN30 DMSO + SNP 0 мМ; HReN30 817MA 0,1 мкМ, SNP 0 мМ; HReN30 817MA 1 мкМ, SNP 0 мМ; HReN30 817MA 3 мкМ + SNP 0 мМ; #D4 DMSO + SNP 0 мМ; #D4 817MA 0,1 мкМ, SNP 0 мМ; #D4 817MA 1 мкМ, SNP 0 мМ; #D4 817MA 3 мкМ + SNP 0 мМ; #E6F4 DMSO + SNP 0 мМ; #E6F4 817MA 0,1 мкМ, SNP 0 мМ; #E6F4 817MA 1 мкМ, SNP 0 мМ и #E6F4 817MA 3 мкМ + SNP 0 мМ.

[00138] На фиг. 32 представлена серия полученных с помощью микроскопа изображений, иллюстрирующих эффект SNP в отношении клеток. Изображения расположены в виде сетки. Колонки слева направо представляют DMSO, DMSO + SNP, 817MA 1 мкМ и 817MA + SNP. Ряды сверху вниз представляют ReN-G2, HReN30 и mGAP#D4.

[00139] На фиг. 33 представлена вторая серия полученных с помощью микроскопа изображений, иллюстрирующих эффект SNP в отношении клеток. Изображения расположены в виде сетки. Колонки слева направо представляют DMSO, DMSO + SNP, 817MA 3 мкМ и 817MA + SNP. Ряды сверху вниз представляют ReN-G2, HReN30 и mGAP#D4.

[00140] На фиг. 34 представлен столбчатый график данных по эффекту четырехсуточной обработки с помощью 817MA в отношении индуцируемой SNP токсичности в не являющихся AD клетках. 12 столбиков слева представляют данные смешанной клональной не являющейся AD клеточной линии. 12 столбиков справа представляют данные одноклональной не являющейся AD клеточной линии. $n = 3$ или 4 для каждой клеточной линии. Слева направо каждый столбик предназначен для ReN-G2 DMSO, SNP 0 мМ; ReN-G2 817MA 1 мкМ, SNP 0 мМ; ReN-G2 817MA 5 мкМ, SNP 0 мМ; ReN-G2 817MA 10 мкМ, SNP 0 мМ; ReN-G2 DMSO, SNP 4 мМ; ReN-G2 817MA 1 мкМ, SNP 4 мМ; ReN-G2 817MA 5 мкМ, SNP 4 мМ; ReN-G2 817MA 10 мкМ, SNP 4 мМ; ReN-G2 DMSO, SNP 5 мМ; ReN-G2 817MA 1 мкМ, SNP 5 мМ; ReN-G2 817MA 5 мкМ, SNP 5 мМ; ReN-G2 817MA 10 мкМ, SNP 5 мМ; #G2B2 DMSO, SNP 0 мМ; #G2B2 817MA 1 мкМ, SNP 0 мМ; #G2B2 817MA 5 мкМ, SNP 0 мМ; #G2B2 817MA 10 мкМ, SNP 0 мМ; #G2B2 DMSO, SNP 2 мМ; #G2B2 817MA 1 мкМ, SNP 2 мМ; #G2B2 817MA 5 мкМ, SNP 2 мМ; #G2B2 817MA 10 мкМ, SNP 2 мМ; #G2B2 DMSO, SNP 3 мМ; #G2B2 817MA 1 мкМ, SNP 3 мМ; #G2B2 817MA 5 мкМ, SNP 3 мМ и #G2B2 817MA 10 мкМ, SNP 3 мМ. $n=3$ или 4 для каждой клеточной линии. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

[00141] Все патенты и другие публикации, указанные в настоящем описании и примерах, специально включены в настоящий документ посредством ссылки для всех целей. Эти публикации представляются исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в этом отношении не должно быть истолковано как признание того, что авторы настоящего изобретения не имеют права датировать задним числом такое раскрытие в силу предшествующего изобретения или по любой другой причине. Все заявления относительно даты или представления относительно содержания этих документов основаны на информации, доступной заявителям, и не представляют собой какого-либо признания в отношении правильности дат или содержания этих документов.

[00142] Хотя предпочтительные варианты осуществления были изображены и описаны подробно в настоящем документе, специалистам в данной области должно быть очевидно, что различные модификации, дополнения, замены и подобное могут быть сделаны без отклонения от сути изобретения и поэтому считаются попадающими в объем настоящего изобретения, определяемый следующей формулой изобретения. Кроме того, если не

указано, специалистам в данной области будет понятно, что любой из различных вариантов осуществления, описанных и проиллюстрированных в настоящем документе, может быть дополнительно модифицирован с включением признаков, показанных в любом из других вариантов осуществления, раскрываемых в настоящем документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ тестирования терапевтической эффективности кандидатного вещества в качестве средства для предупреждения или лечения нейродегенеративного нарушения, при этом способ предусматривает:

a. необязательно культивирование экспрессирующих полноразмерный человеческий CD33 иммунных или иммуноподобных клеток;

b. обработку указанных экспрессирующих CD33 иммунных или иммуноподобных клеток указанным кандидатным веществом в соответствующей концентрации;

c. обработку указанных экспрессирующих CD33 иммунных или иммуноподобных клеток амилоидом- β (A β) в соответствующей концентрации;

d. измерение внутриклеточного содержания A β в указанных экспрессирующих CD33 клетках;

так что более высокое содержание A β в экспрессирующих CD33 клетках, обработанных кандидатным веществом, относительно отрицательного контроля будет указывать на терапевтическую эффективность.

2. Способ по п. 1, при котором иммунные или иммуноподобные клетки представляют собой микроглиальные клетки.

3. Способ тестирования терапевтической эффективности кандидатного вещества в качестве средства предупреждения или лечения нейродегенеративного нарушения, при этом способ предусматривает:

a. необязательно культивирование экспрессирующих полноразмерный человеческий CD33 иммунных или иммуноподобных клеток;

b. обработку указанных экспрессирующих CD33 иммунных или иммуноподобных клеток указанным кандидатным веществом в соответствующей концентрации;

c. обработку указанных экспрессирующих CD33 иммунных или иммуноподобных клеток липополисахаридом;

d. измерение содержания провоспалительных цитокинов в культуральной среде указанных экспрессирующих CD33 клеток;

так что более низкое содержание провоспалительных цитокинов в культуральной среде экспрессирующих CD33 клеток, обработанных кандидатным веществом, относительно отрицательного контроля будет указывать на терапевтическую эффективность.

4. Способ по п. 3, при котором иммунные или иммуноподобные клетки представляют собой микроглиальные клетки.

5. Способ по любому из пп. 1-4, при котором нейродегенеративное нарушение без ограничения выбрано из: болезни Альцгеймера, легкого когнитивного нарушения, болезни Паркинсона, деменции, шизофрении, бокового амиотрофического склероза, болезни Хантингтона и рассеянного склероза.

6. Способ тестирования связывающего взаимодействия вещества с человеческим CD33, при этом способ предусматривает:

- a. необязательно культивирование иммунных или иммуноподобных клеток, которые экспрессируют полноразмерный человеческий CD33;
- b. обработку указанных экспрессирующих CD33 иммунных или иммуноподобных клеток указанным веществом при соответствующей концентрации;
- c. измерение регистрируемого показателя связывающего взаимодействия с использованием стандартного анализа;

так что более высокий регистрируемый показатель в экспрессирующих CD33 клетках, обработанных веществом, относительно отрицательного контроля будет указывать на терапевтическую эффективность.

7. Способ по п. 6, при котором иммунные или иммуноподобные клетки представляют собой микроглиальные клетки.

8. Фармацевтическая композиция для модуляции функции микроглиальных клеток, которая включает в себя 1-(3-(2-(1-бензотиофен-5-ил)этокси)пропил)азетидин-3-ол или его соль.

9. Способ модуляции функции микроглиальных клеток, предусматривающий введение больному при необходимости этого 1-(3-(2-(1-бензотиофен-5-ил)этокси)пропил)азетидин-3-ола или его соли.

10. Способ по п. 9, при котором больной имеет болезнь Альцгеймера, легкое когнитивное нарушение, болезнь Паркинсона, деменцию, шизофрению, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона или рассеянный склероз.

11. Способ по пп. 8 или 9, при котором модуляции функции микроглиальных клеток усиливает фагоцитоз или ингибирует продуцирование цитокина в микроглиальных клетках.

12. Способ модуляции функции микроглиальных клеток, предусматривающий введение больному при необходимости этого вещества, идентифицируемого способом по любому из пп. 1-6.

13. Способ по п. 12, при котором вещество представляет собой 1-(3-(2-(1-бензотиофен-5-ил)этокси)пропил)азетидин-3-ол или его соль.

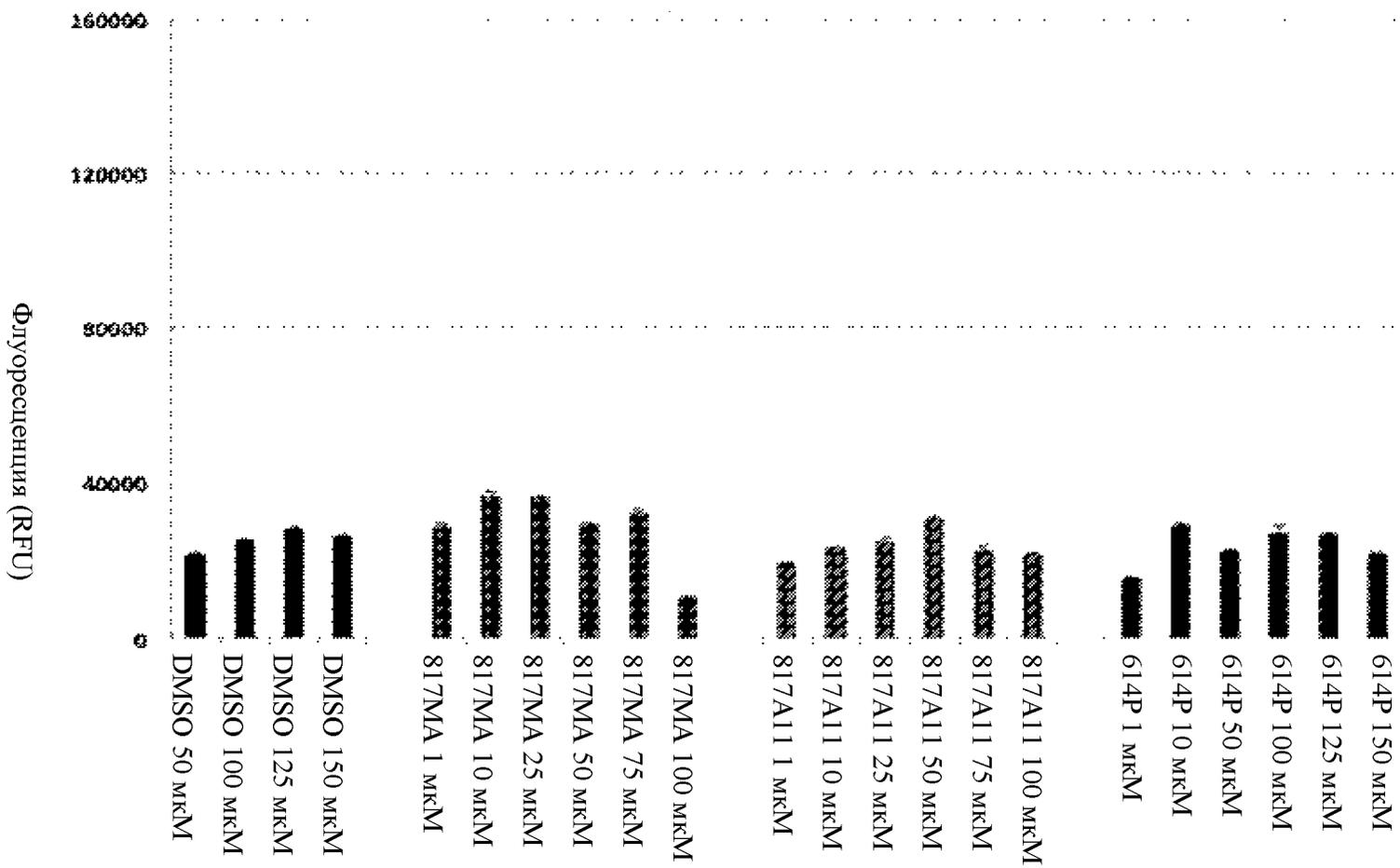
14. Способ по пп. 12 или 13, при котором больной имеет болезнь Альцгеймера, легкое когнитивное нарушение, болезнь Паркинсона, деменцию, шизофрению, боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона или рассеянный склероз.

15. Способ лечения или предупреждения нейродегенеративного заболевания, предусматривающий введение больному терапевтической дозы или дозировок композиций, которые идентифицированы как возможное лекарственное средство в раскрываемом анализе.

16. Способ по п. 15, при котором нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера.

Наивные BV2

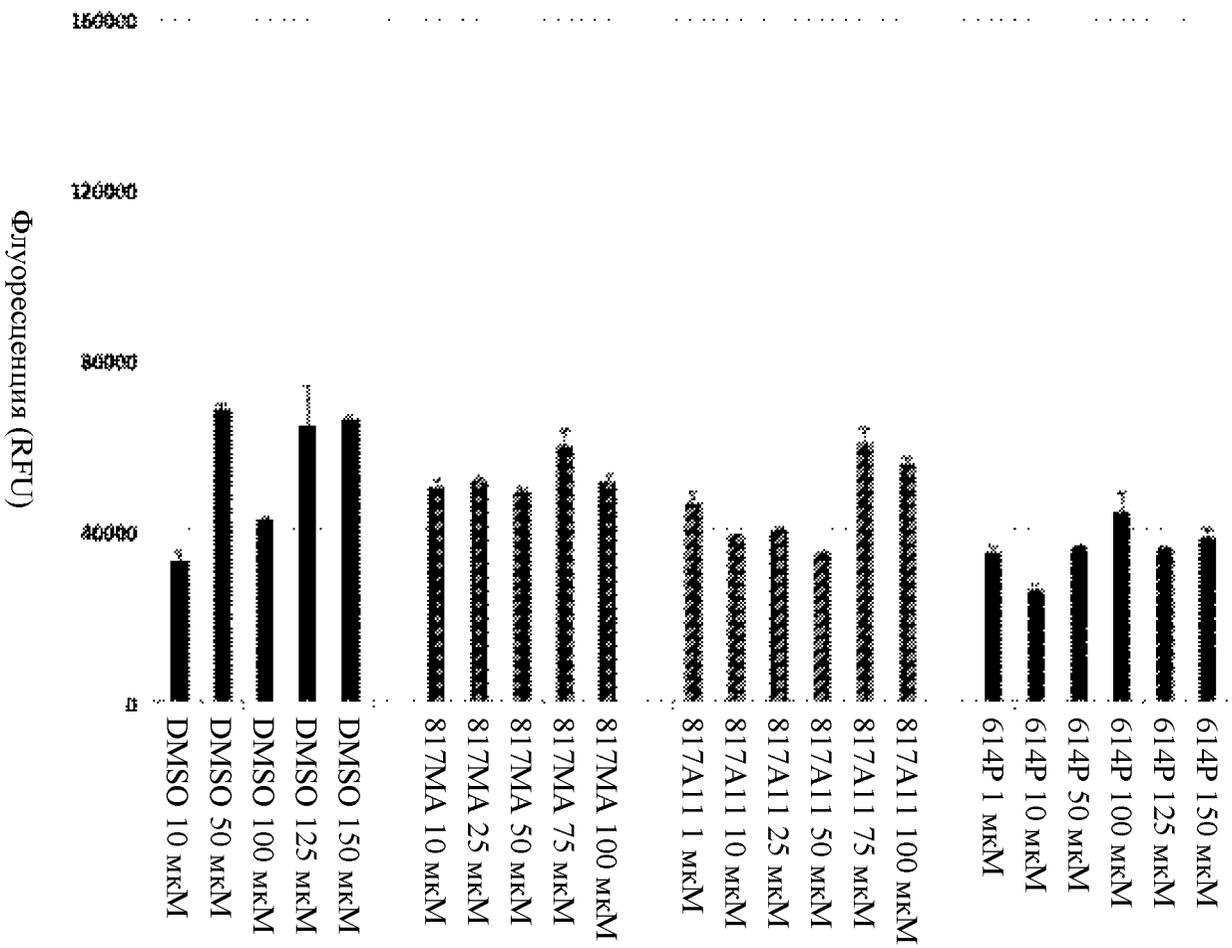
Анализ LDH на микроглиальной клетке BV2 после 5 часов обработки



Фиг. 1

Экспрессирующие CD33 wt BV2

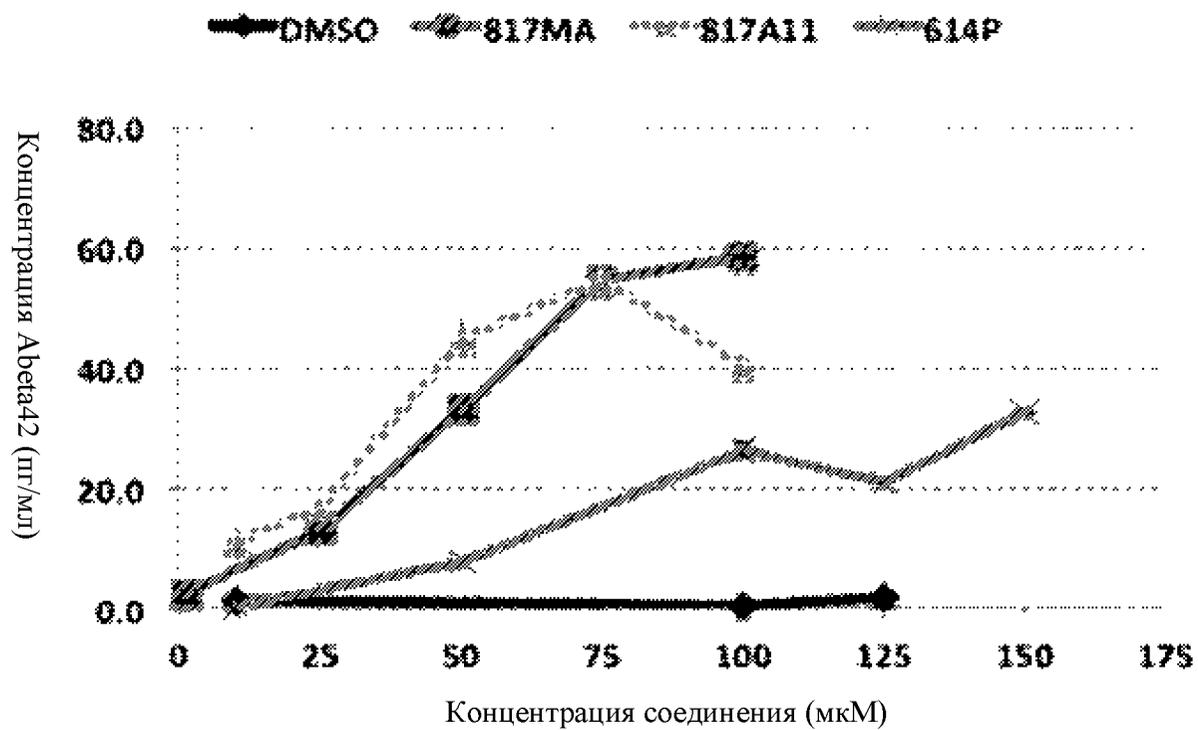
Анализ LDH на экспрессирующих CD33 wt микроглиальных клетках BV2
после 5 часов обработки



Фиг. 2

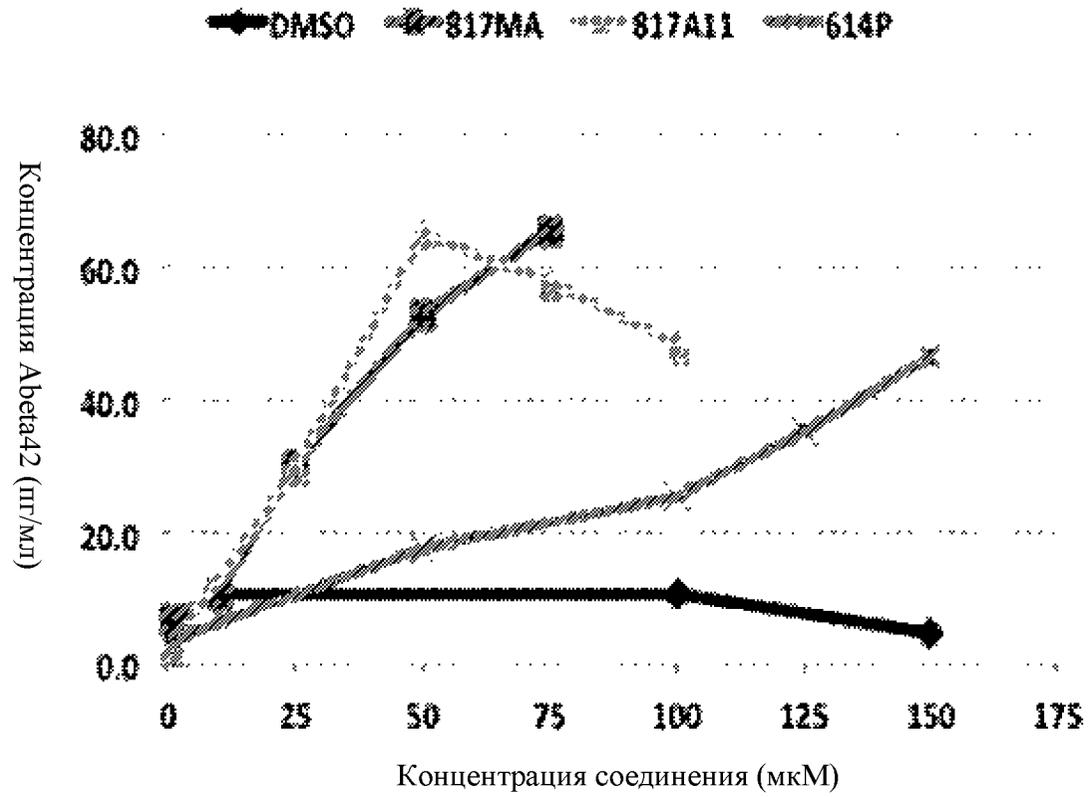
Наивные BV2

Поглощение Abeta42 в микроглиальных клетках BV2



Фиг. 3

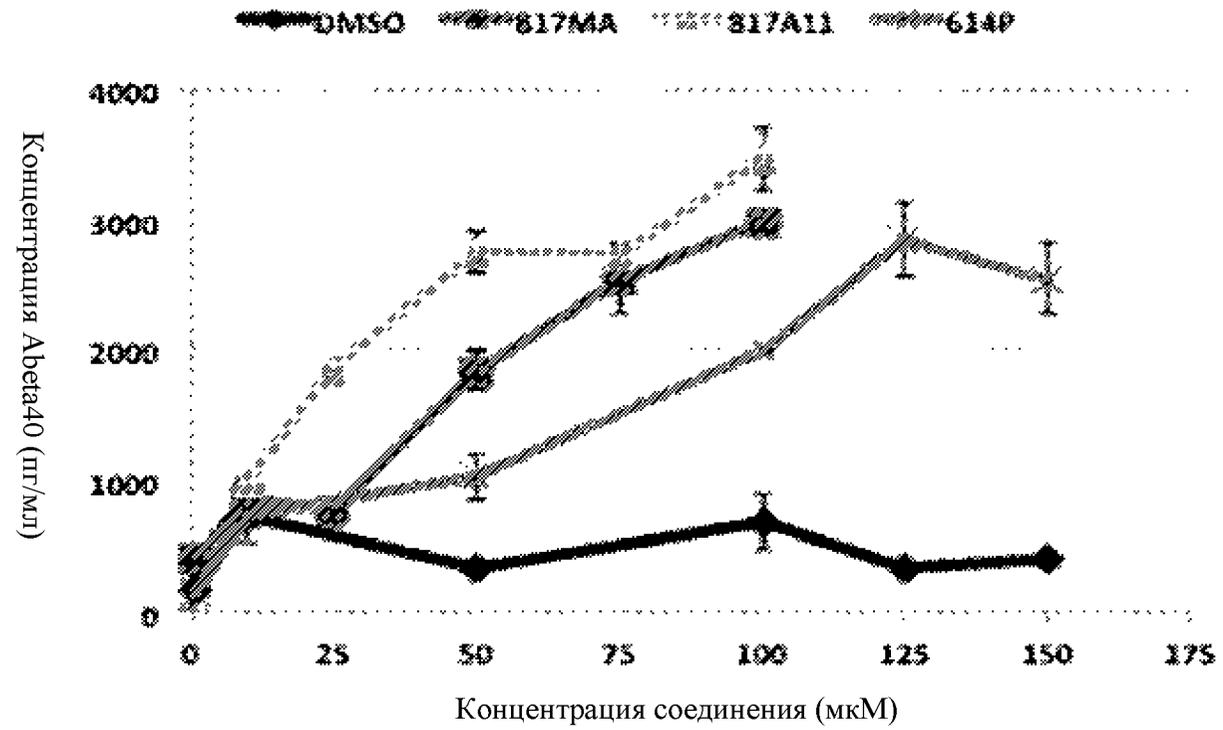
Экспрессирующие CD33 wt BV2
Поглощение Аbeta42 в экспрессирующих CD33 wt
микроглиальных клетках



Фиг. 4

Наивные BV2

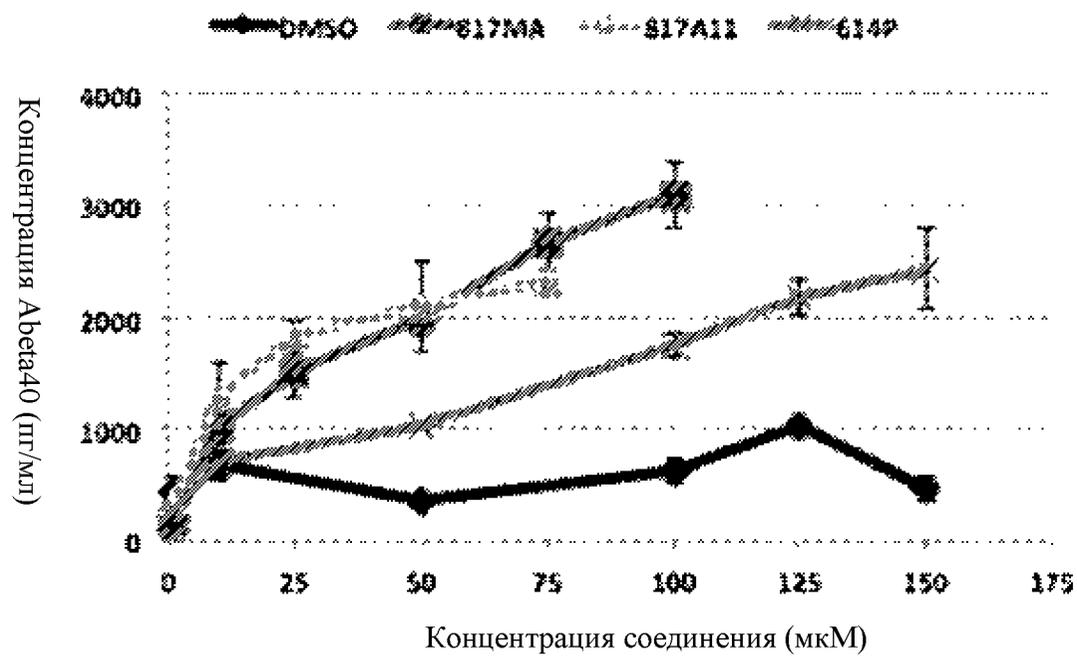
Поглощение Аbeta40 в микроглиальных клетках BV2



Фиг. 5

Экспрессирующие CD33 wt BV2

Поглощение Aβ40 в экспрессирующих CD33 wt микроглиальных клетках



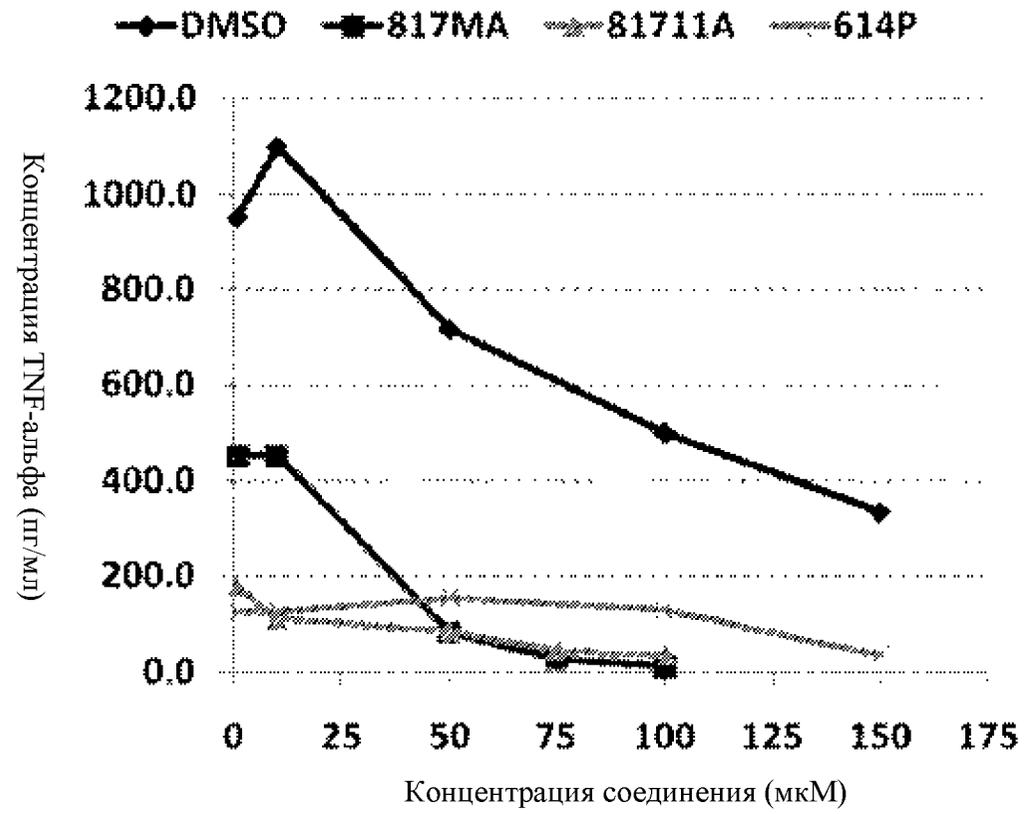
Фиг. 6

Активация микроглиальных клеток с помощью LPS

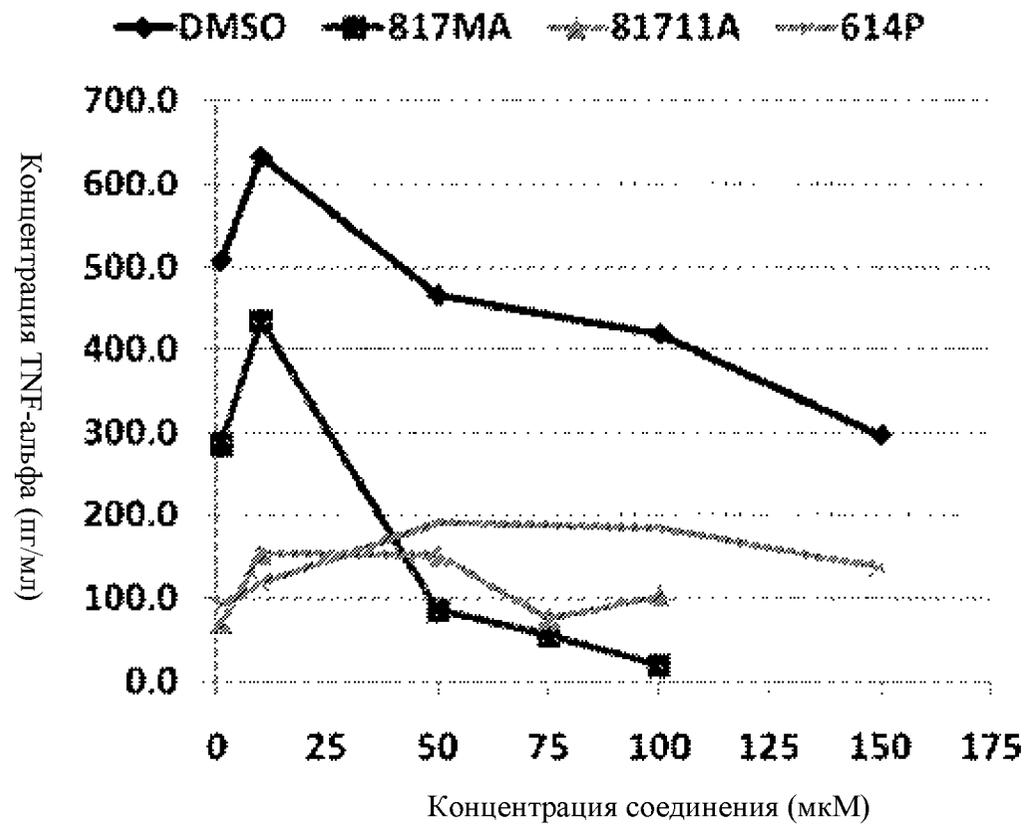
Не выявляются при активации с помощью LPS	Выявляются при активации с помощью LPS
IFN- γ	KC/GRO*
IL-2	IL-6
IL-5	IL-10
IL-12p70	TNF- α
IL-1 β	
IL-4	

Фиг. 7

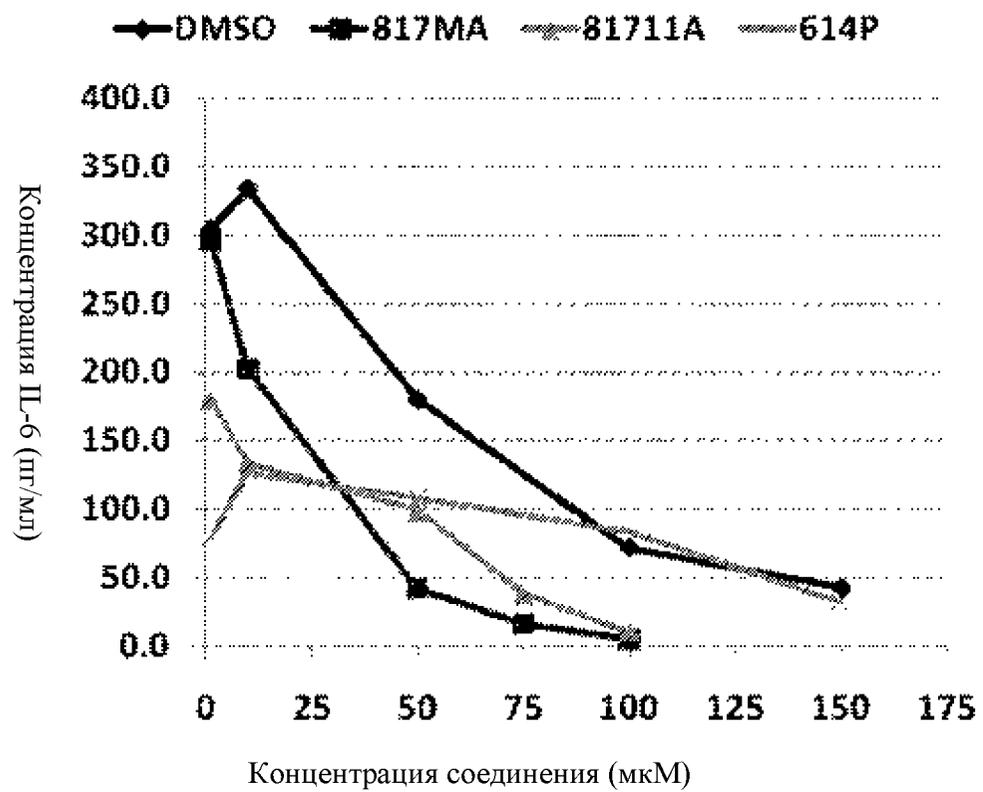
Фиг. 8



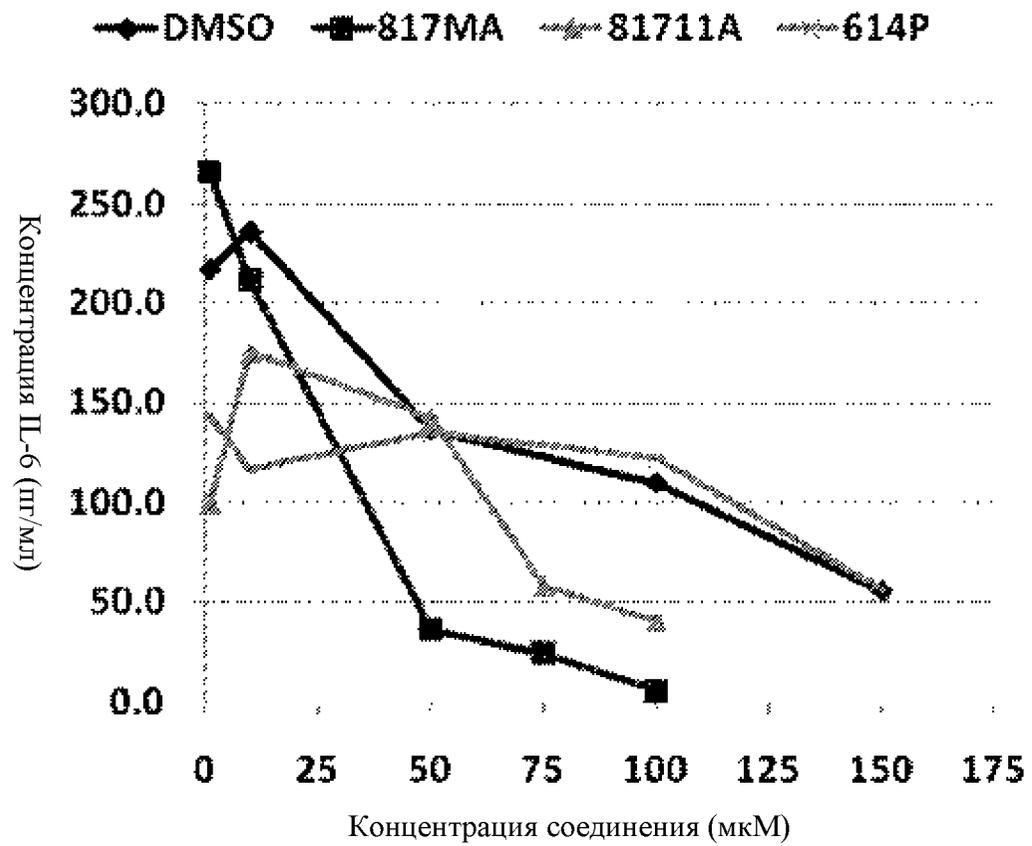
Фиг. 9



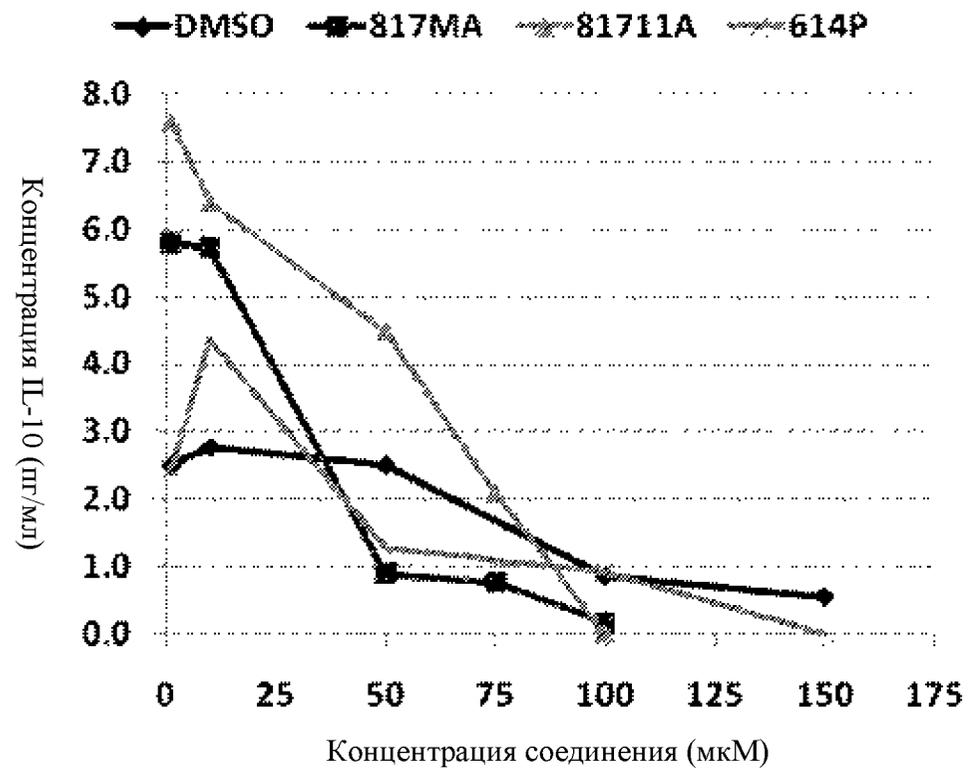
Фиг. 10



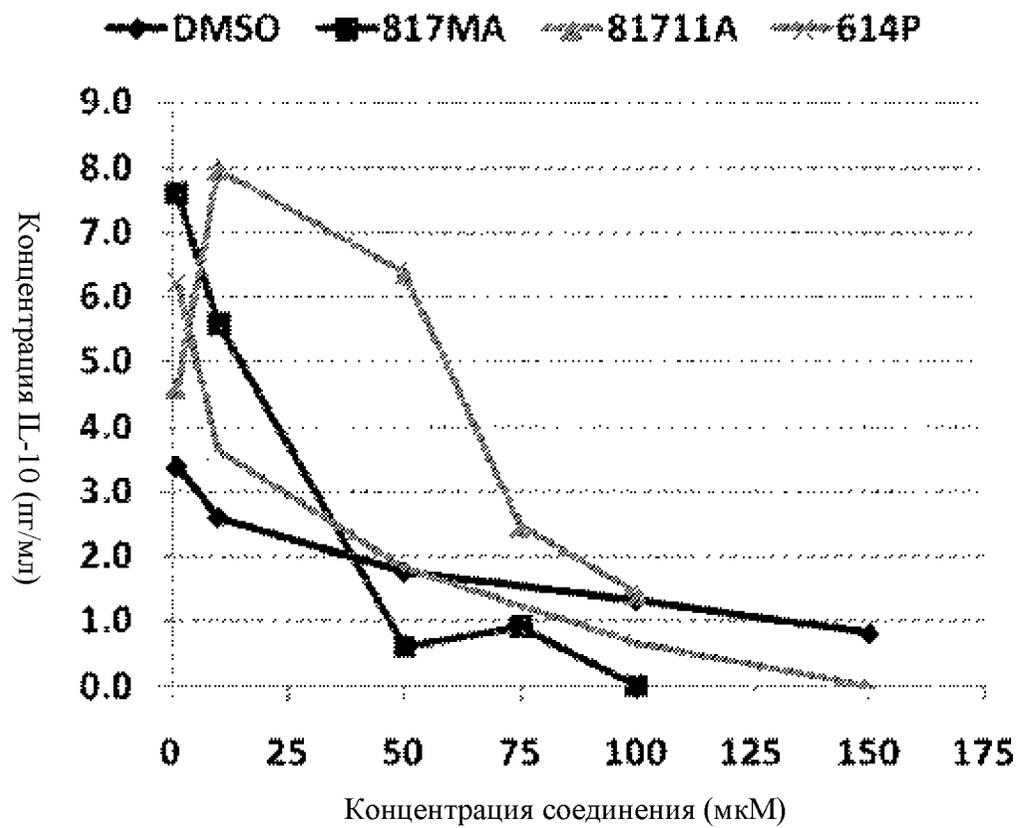
Фиг. 11



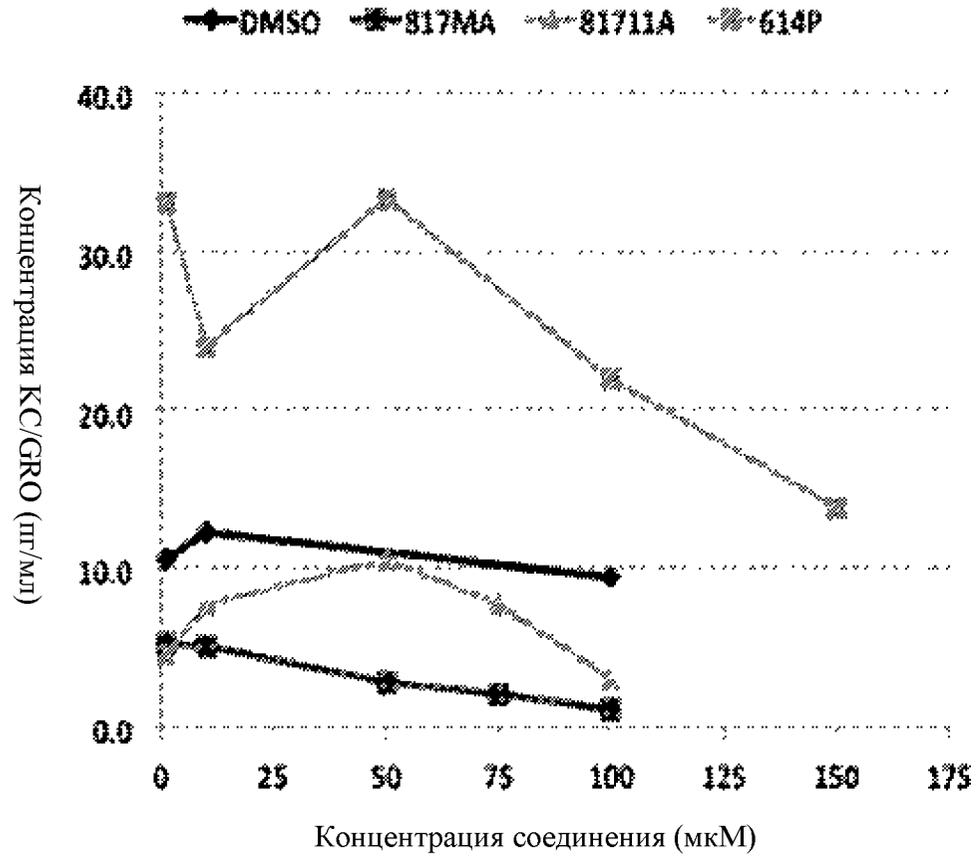
Фиг. 12



Фиг. 13

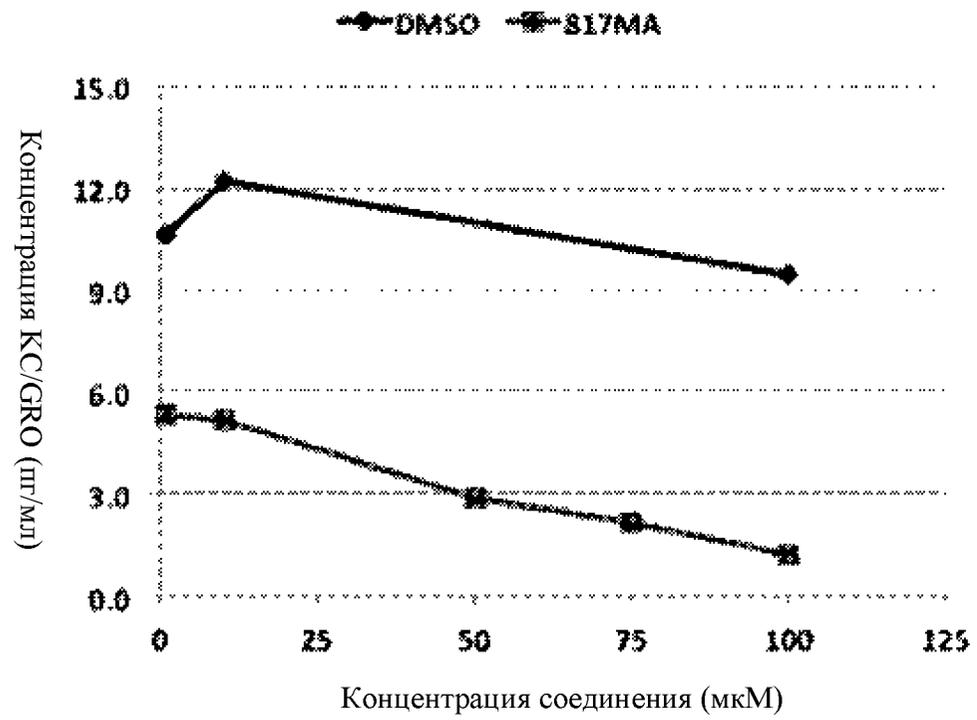


Концентрация КС/GRO в кондиционированной среде BV2



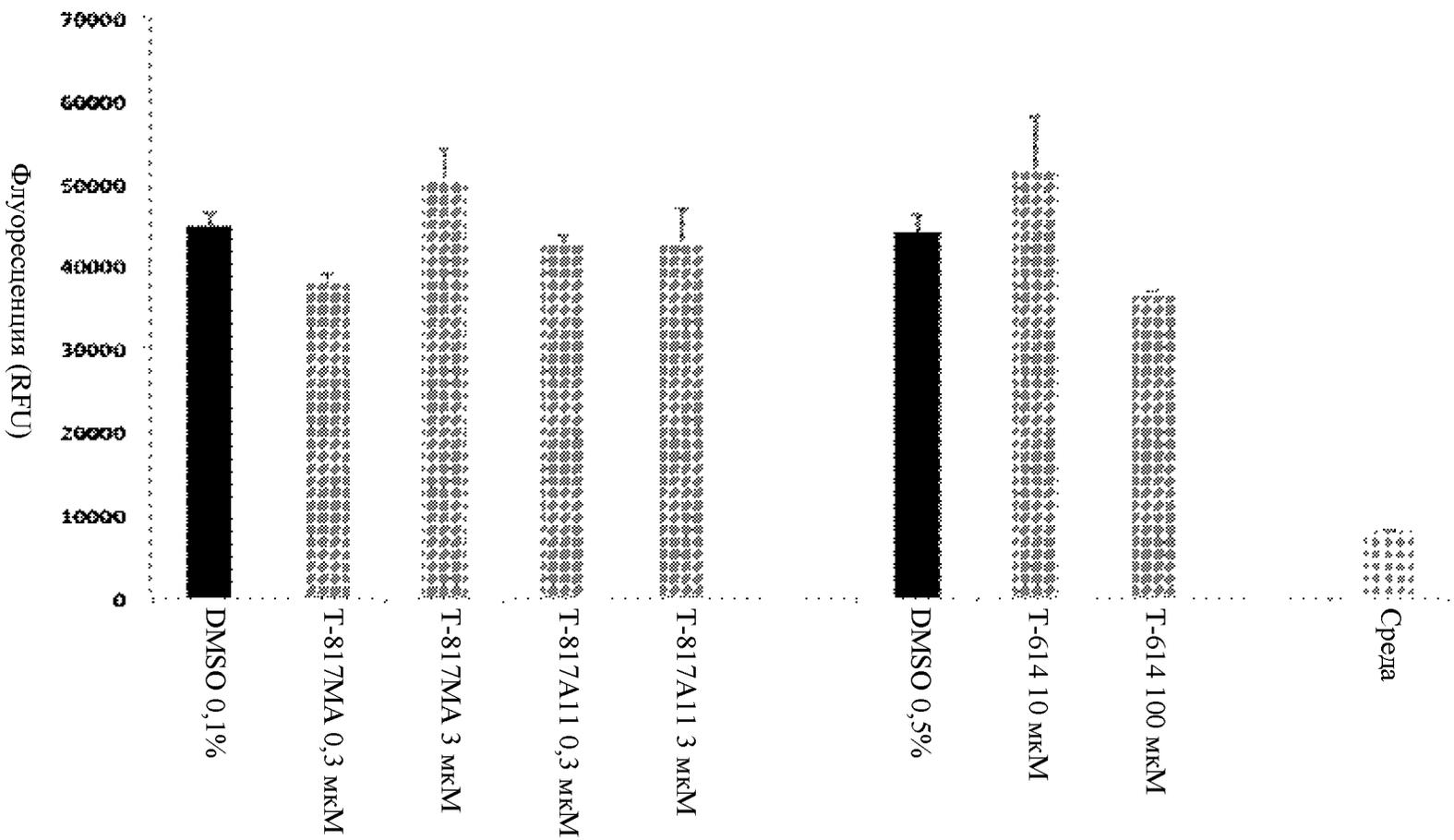
Фиг. 14

Концентрация КС/GRO в кондиционированной среде BV2



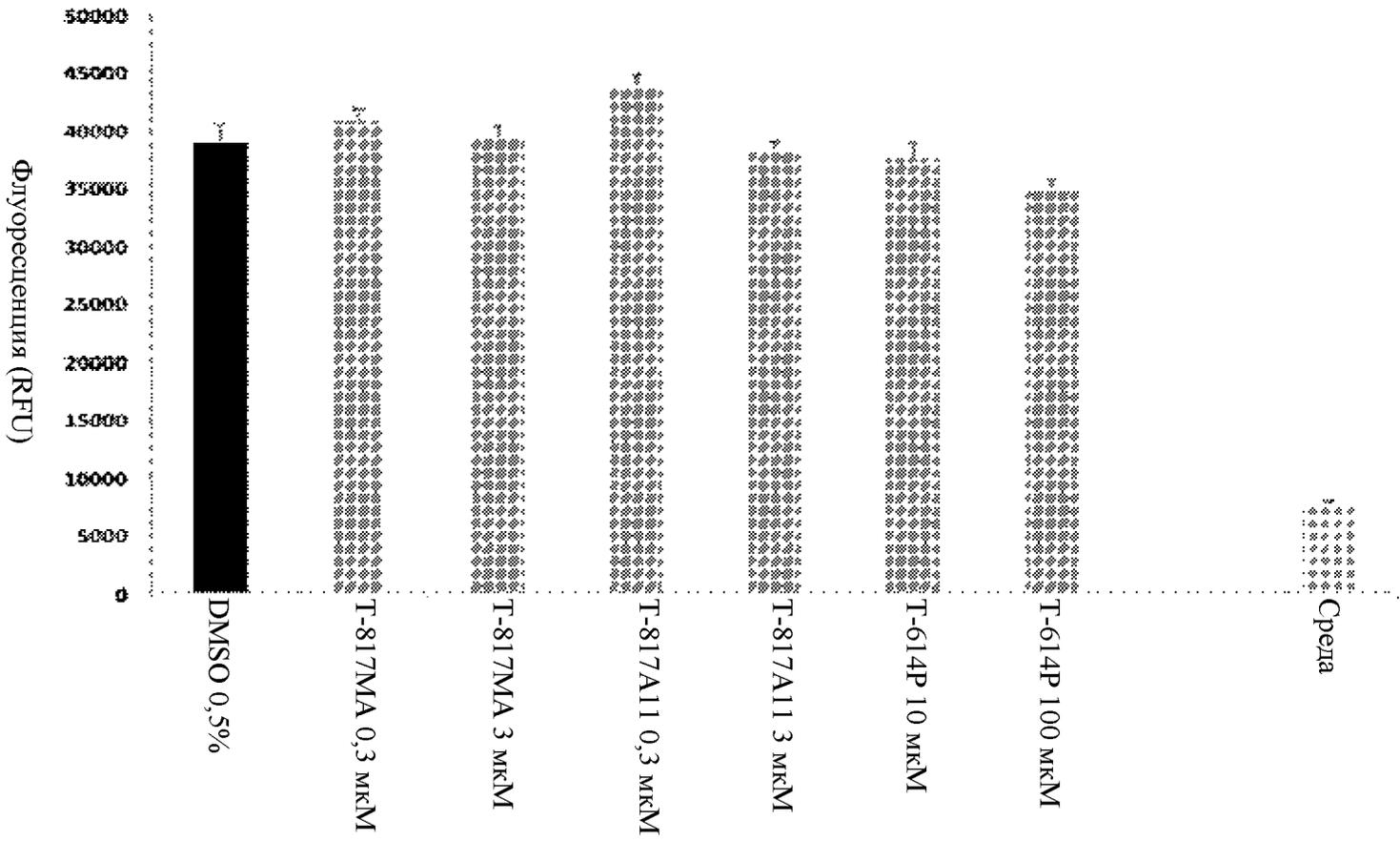
Фиг. 15

Анализ LDH в среде HReN30 после 1-недельной обработки



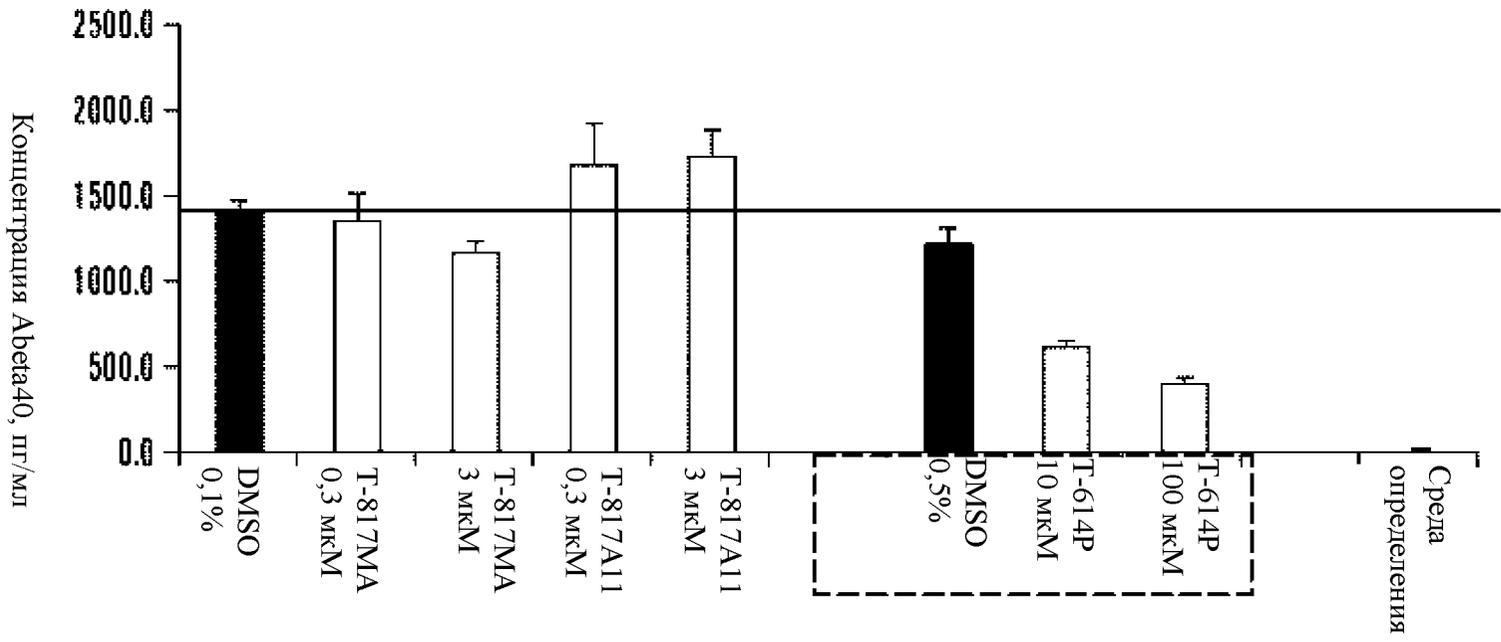
Фиг. 16

Анализ LDH в среде ReN-mGAP10#D4 после 1-недельной обработки



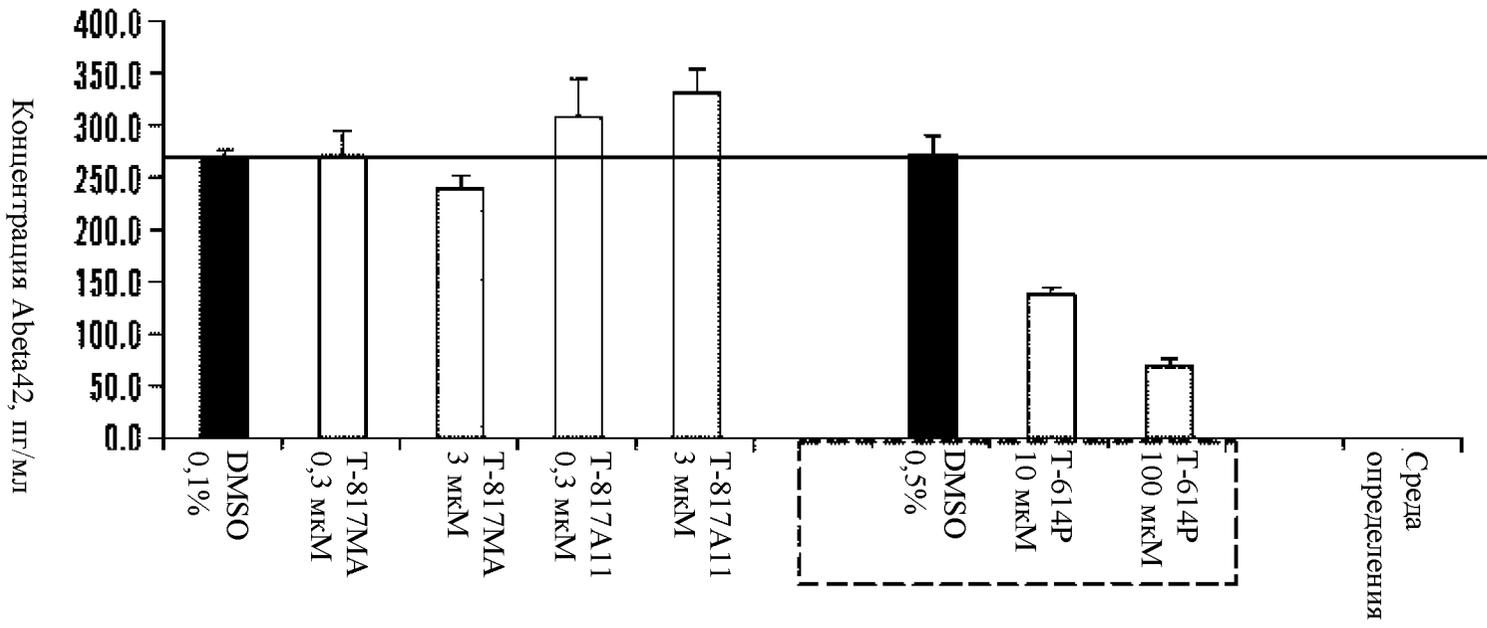
Фиг. 17

Abeta40 в среде HReN30



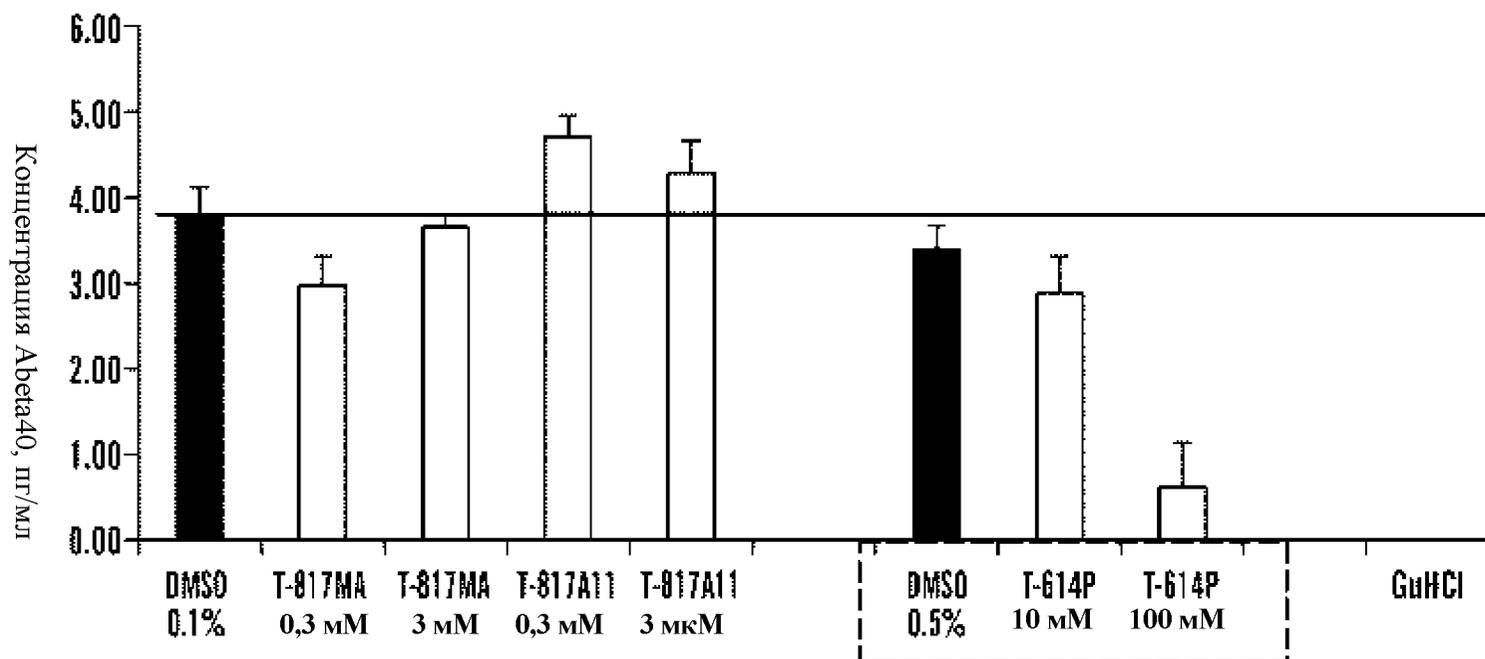
Фиг. 18А

Abeta42 в среде HReN30



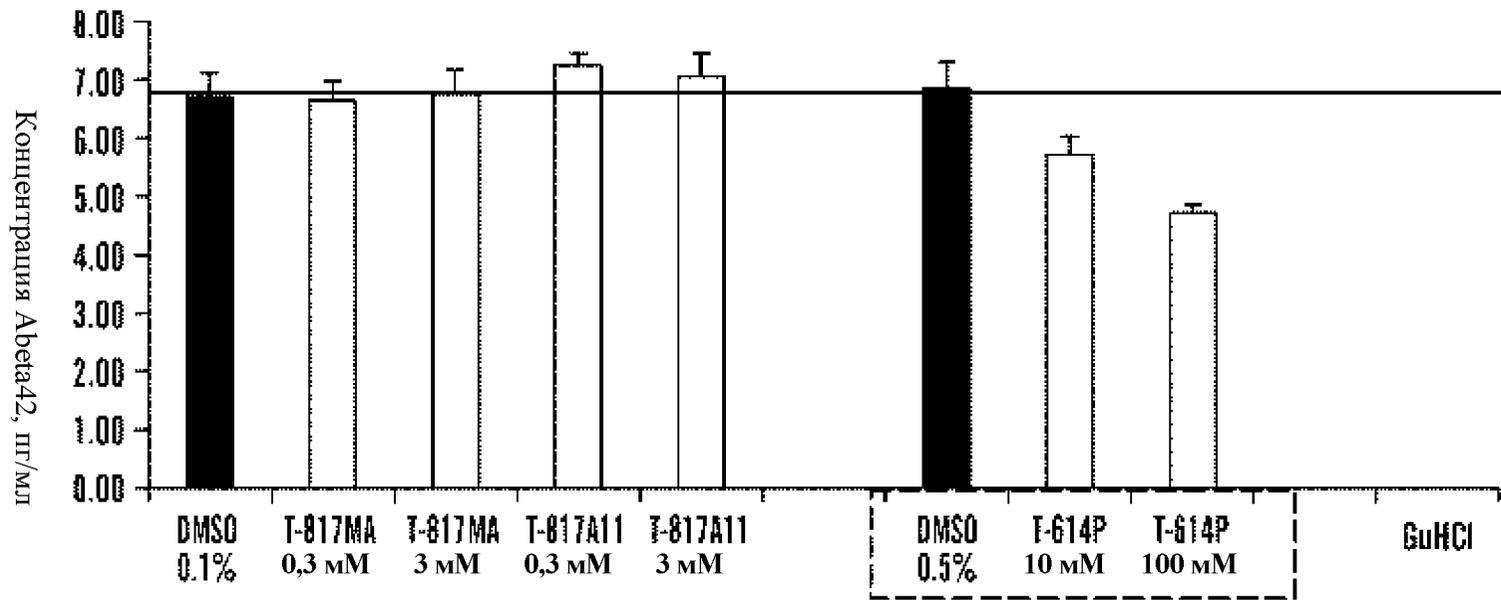
Фиг. 18В

Аbeta40 в нерастворимой фракции HReN30



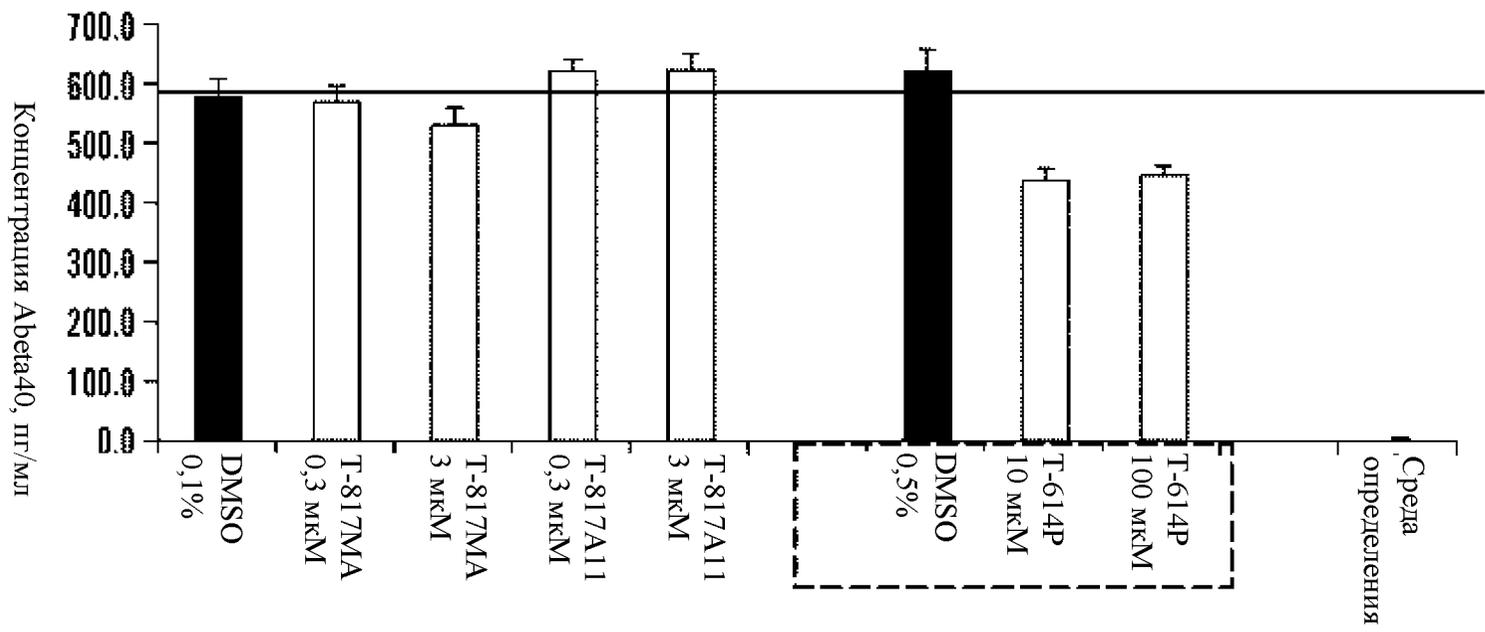
Фиг. 18С

Abeta42 в нерастворимой фракции HReN30



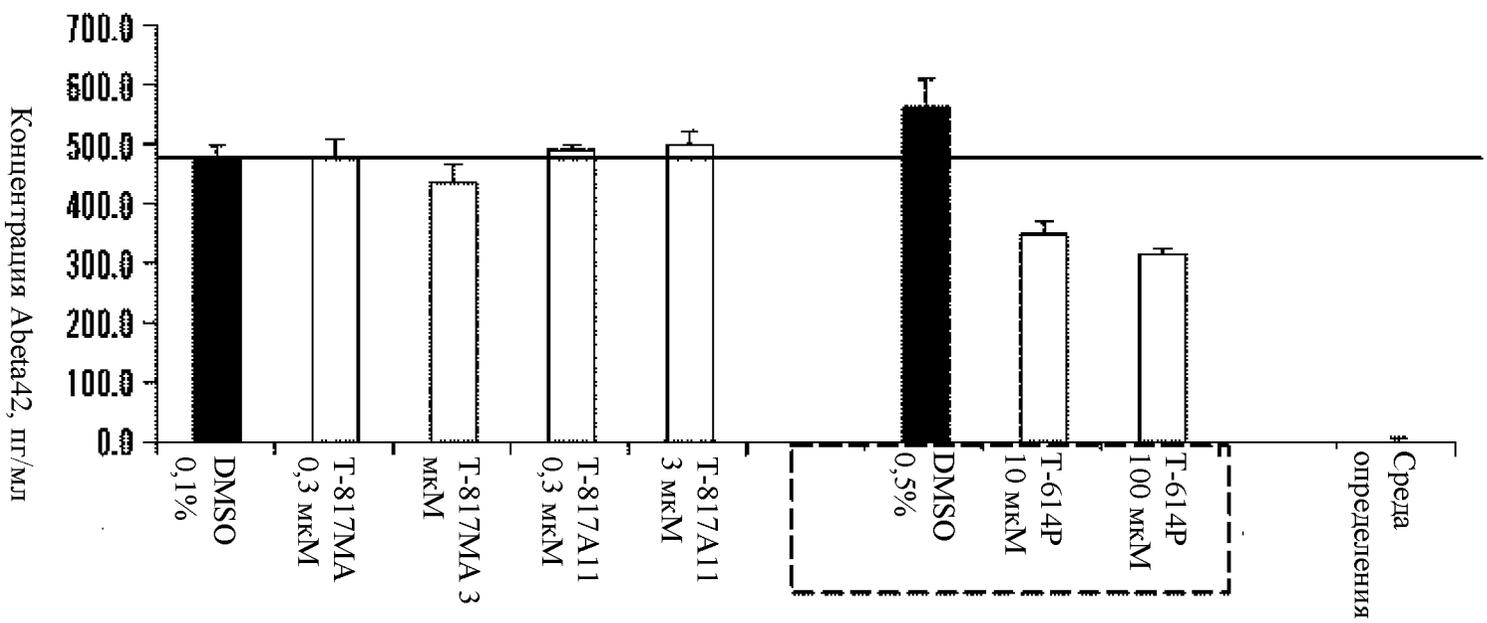
Фиг. 18D

Abeta40 в среде ReN-mGAP10#D4



Фиг. 18E

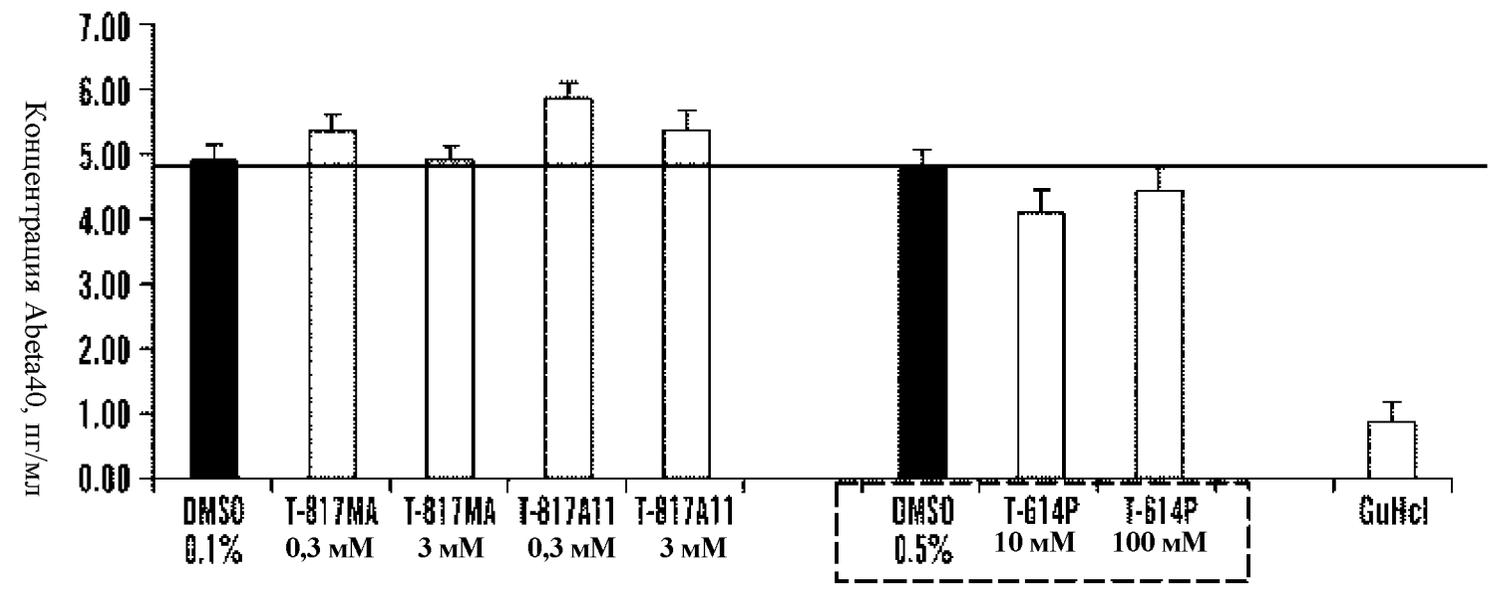
Abeta42 в среде ReN-mGAP10#D4



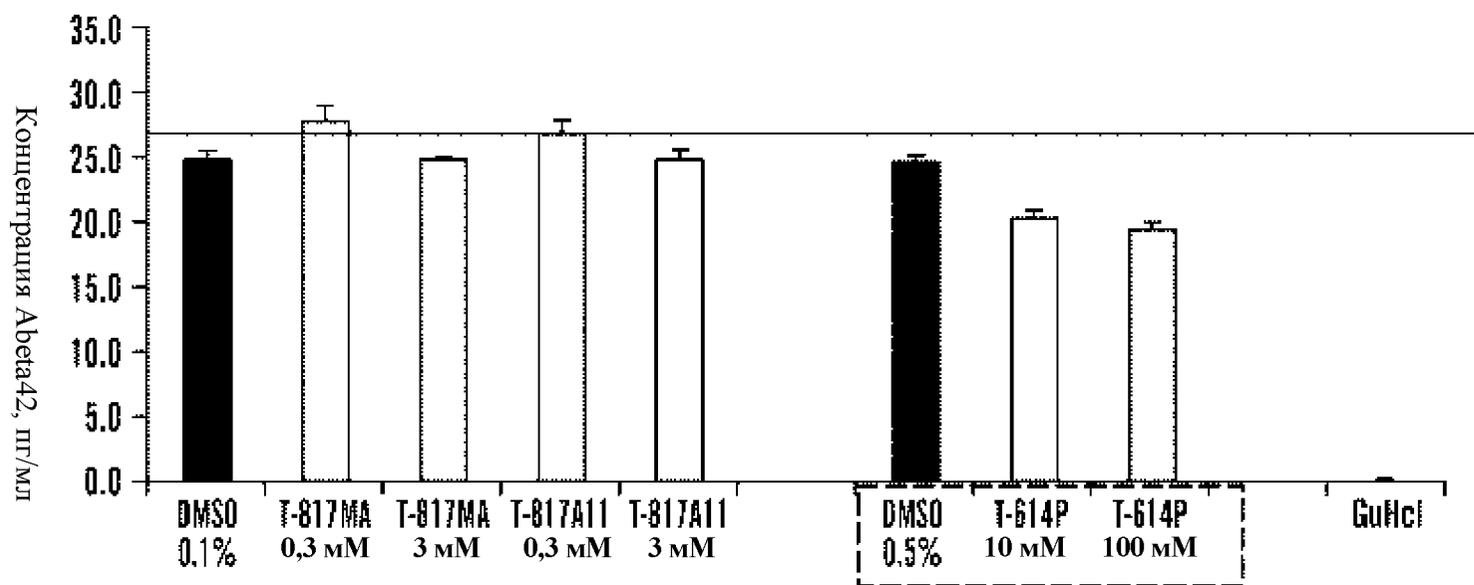
Фиг. 18F

Abeta40 в нерастворимой фракции ReN-mGAP10#D4

Фиг. 18G



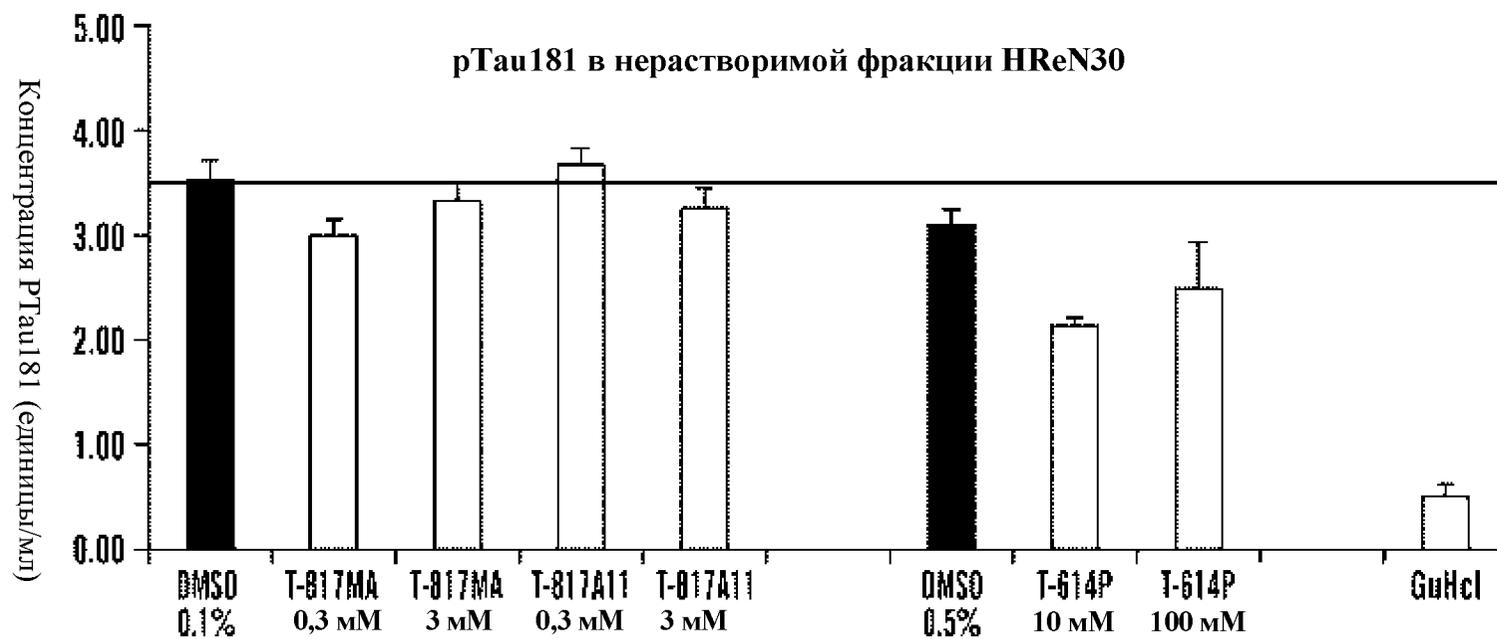
Abeta42 в нерастворимой фракции ReN-mGAP10#D4



Фиг. 18Н

Содержание нерастворимого p-тау и суммарное содержание tau после обработок лекарственным средством

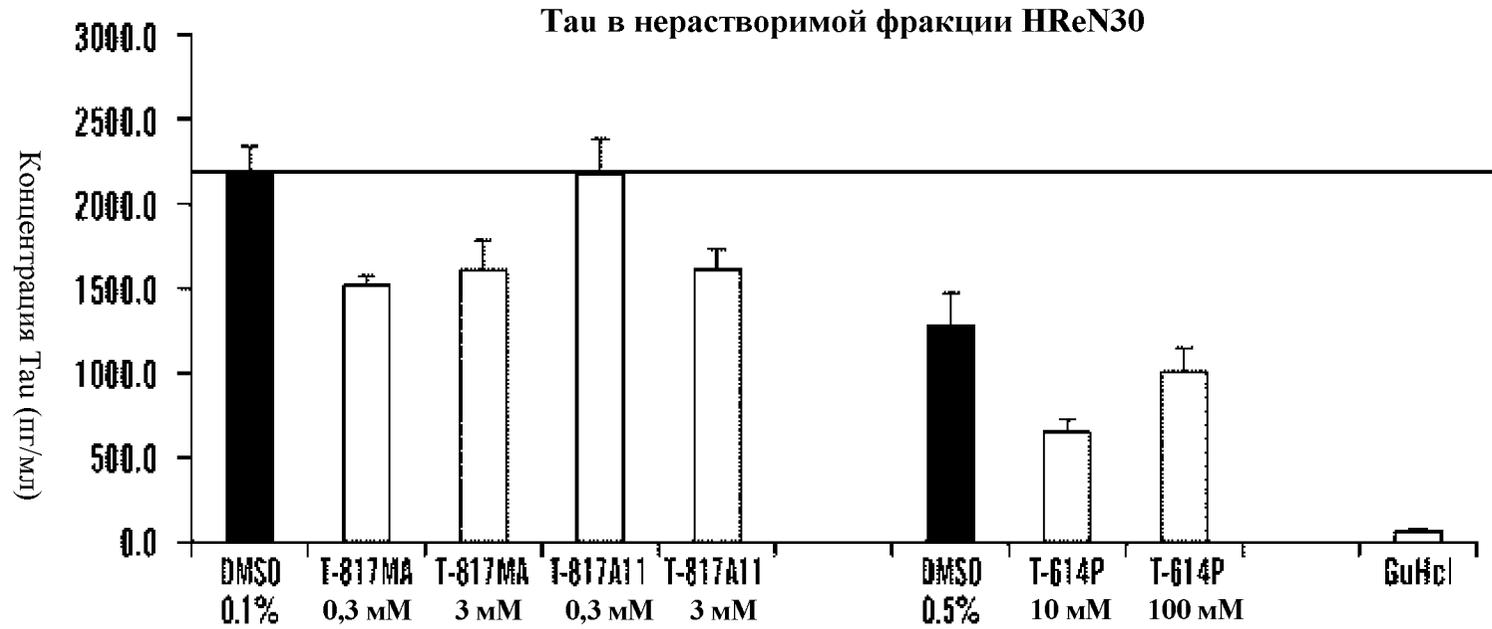
HReN-mGAP30



Фиг. 19А

Содержание нерастворимого р-tau и суммарное содержание tau после обработок
лекарственным средством

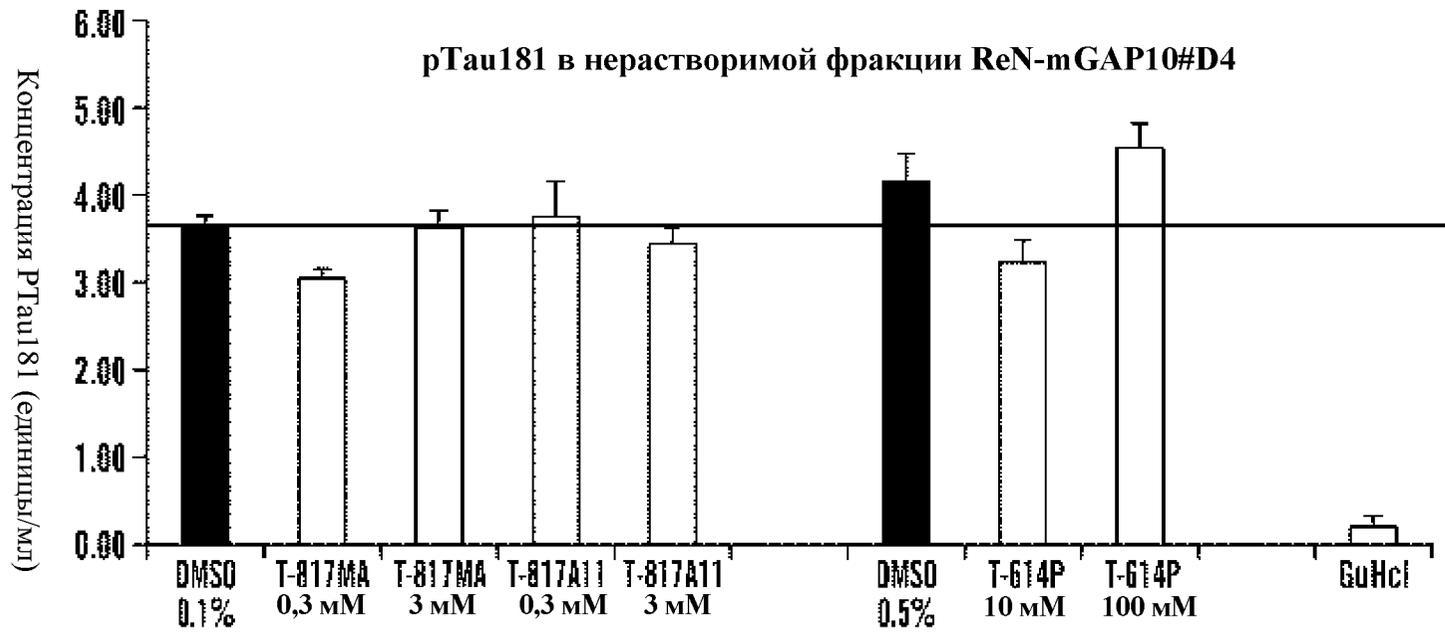
HReN-mGAP30



Фиг. 19B

Содержание нерастворимого p-tau и суммарное содержание tau после обработок
лекарственным средством

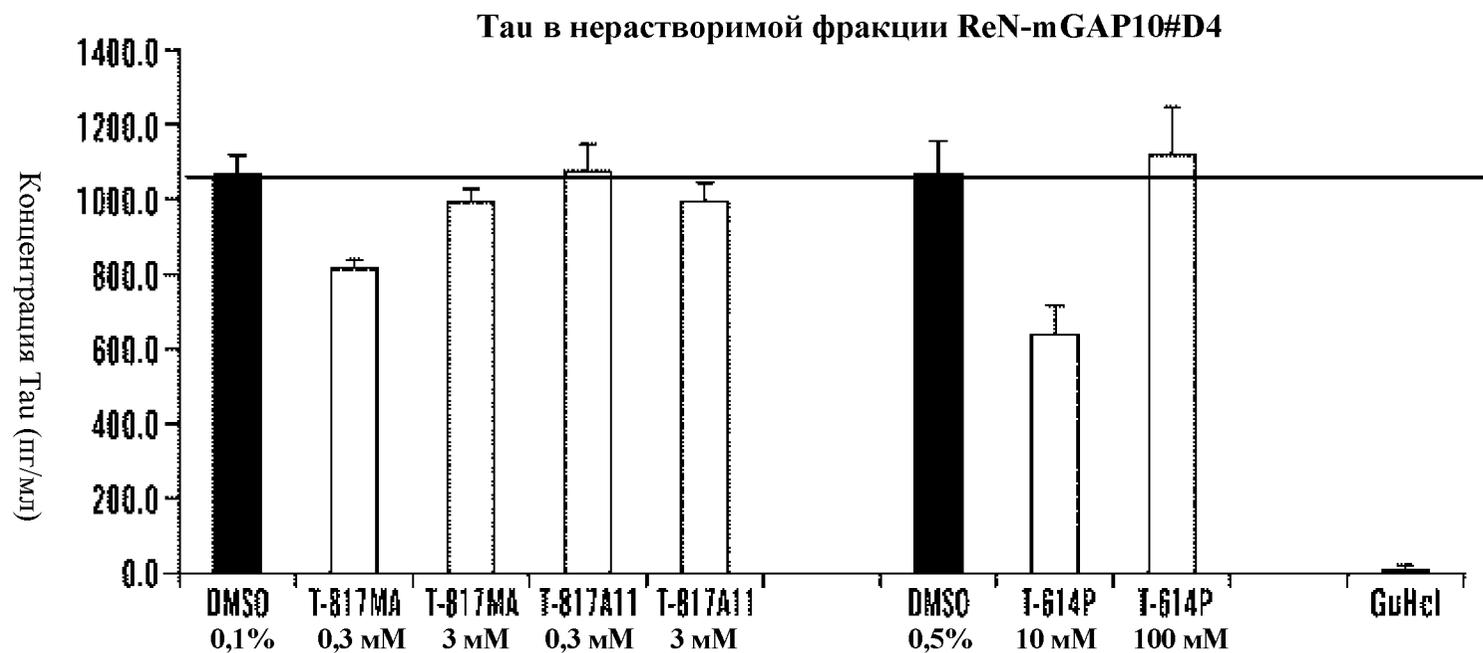
ReN-mGAP#D4



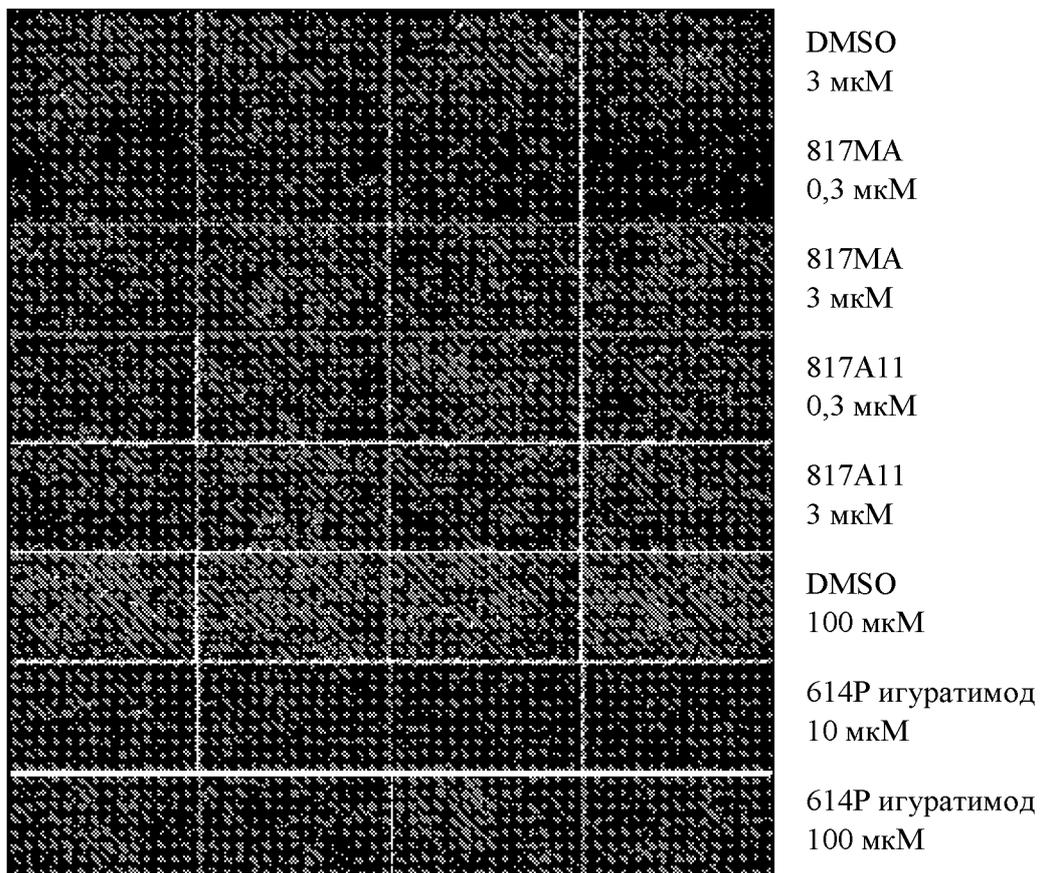
Фиг. 19С

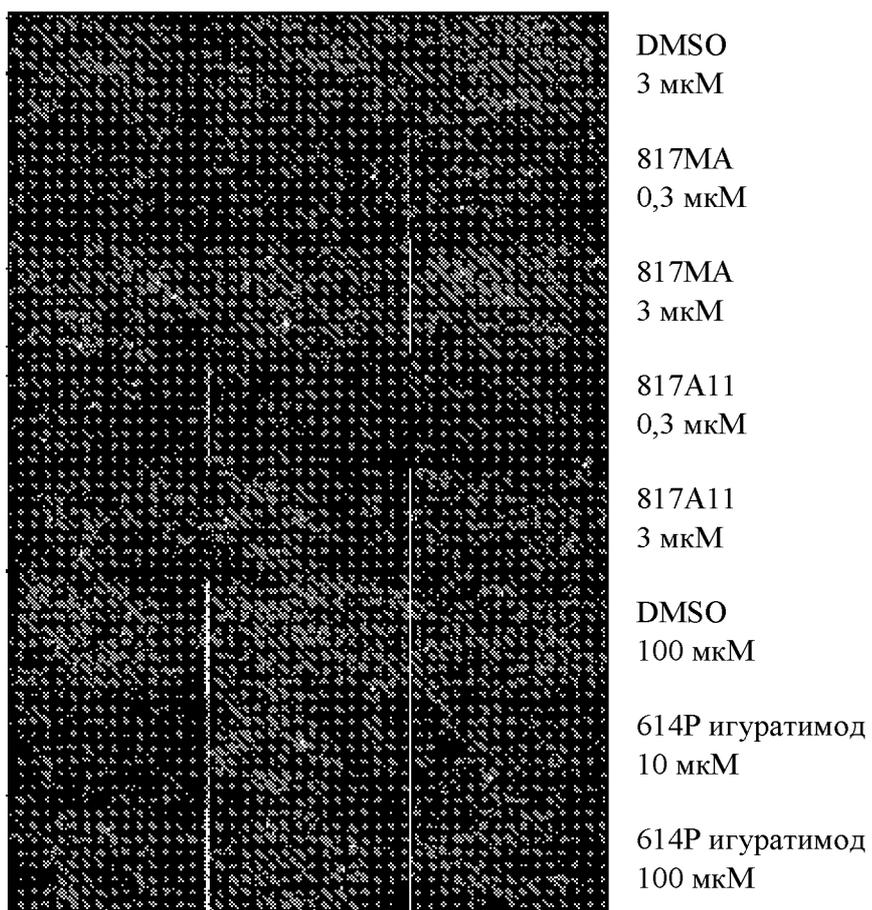
Содержание нерастворимого р-tau и суммарное содержание tau после обработок
лекарственным средством

ReN-mGAP#D4

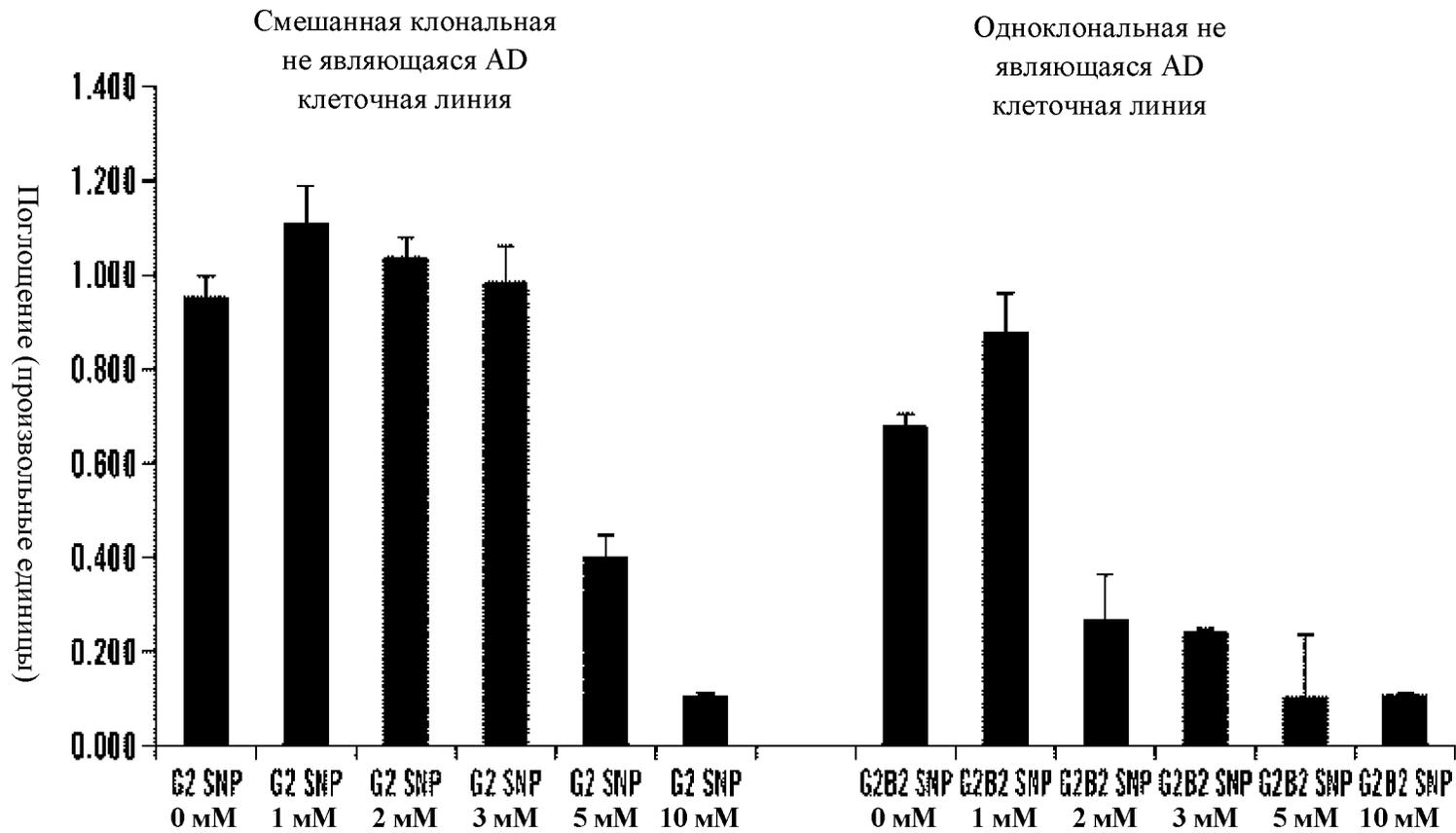


Фиг. 19D

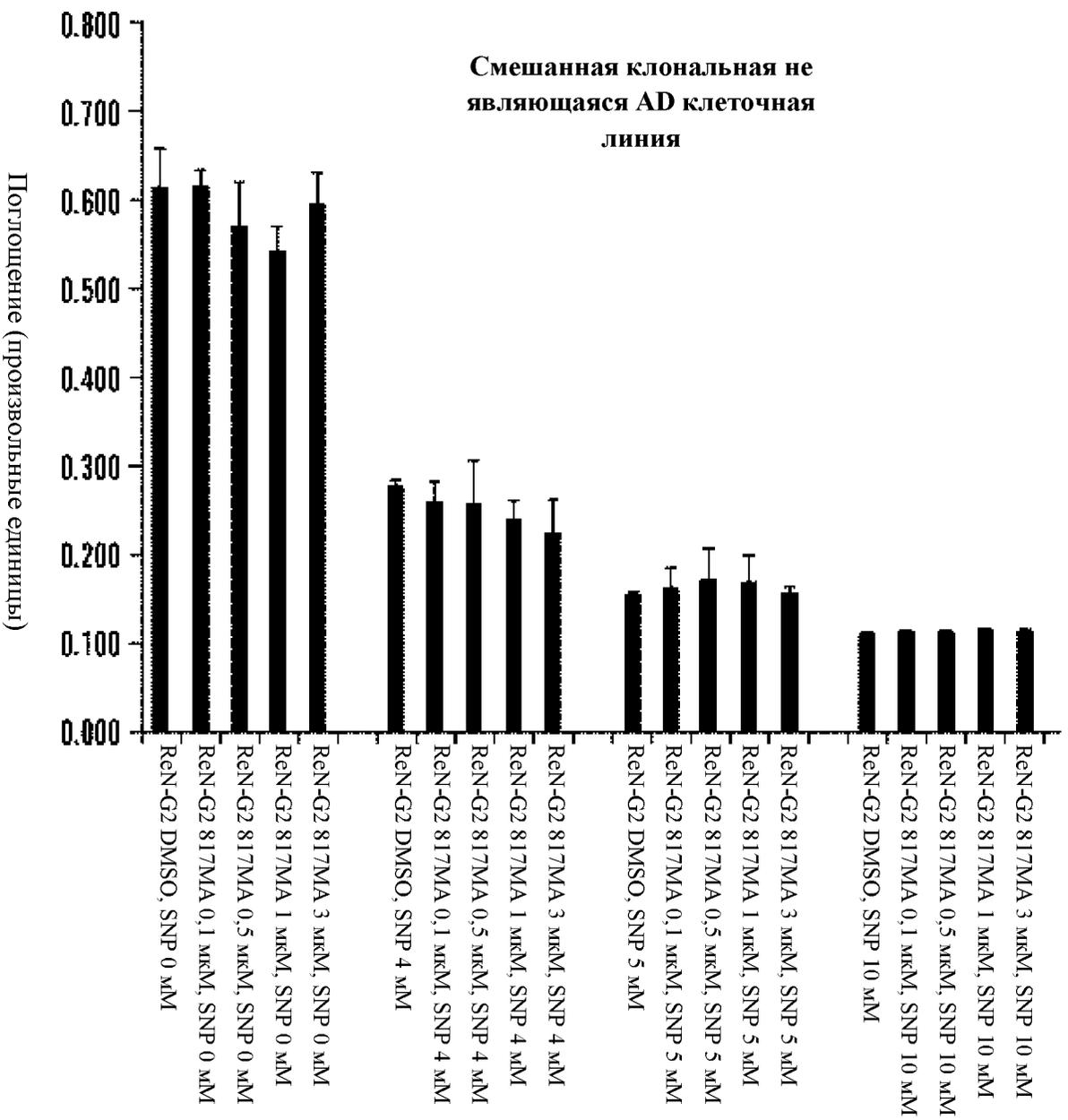
ReN-mGAP#D4**(4-недельная дифференцировка)****Фиг. 20**

HReN-mGAP30**(7-недельная дифференцировка)****Фиг. 21**

Анализ WST-8 в клетках ReN без B27 после 1-суточной обработки без SNP

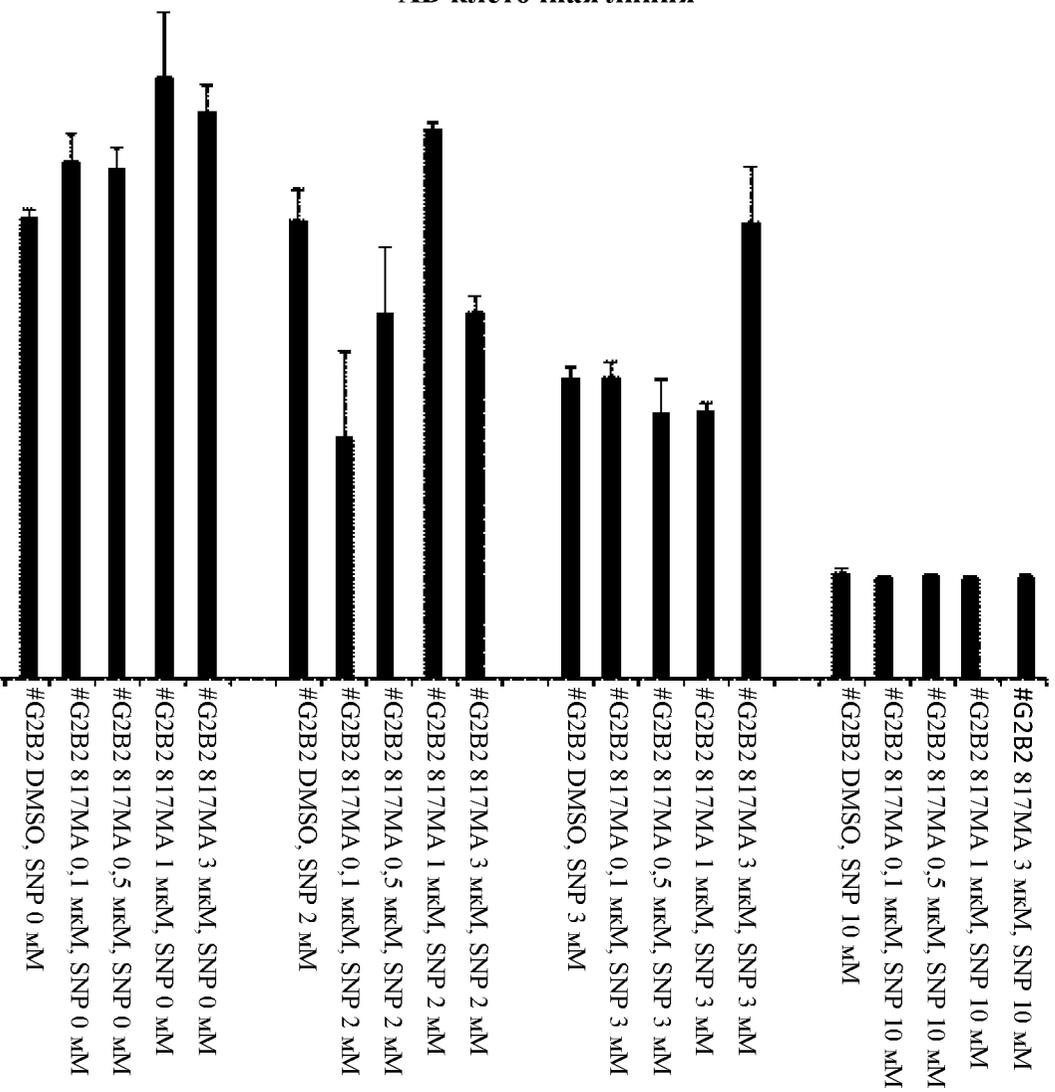


Фиг. 22



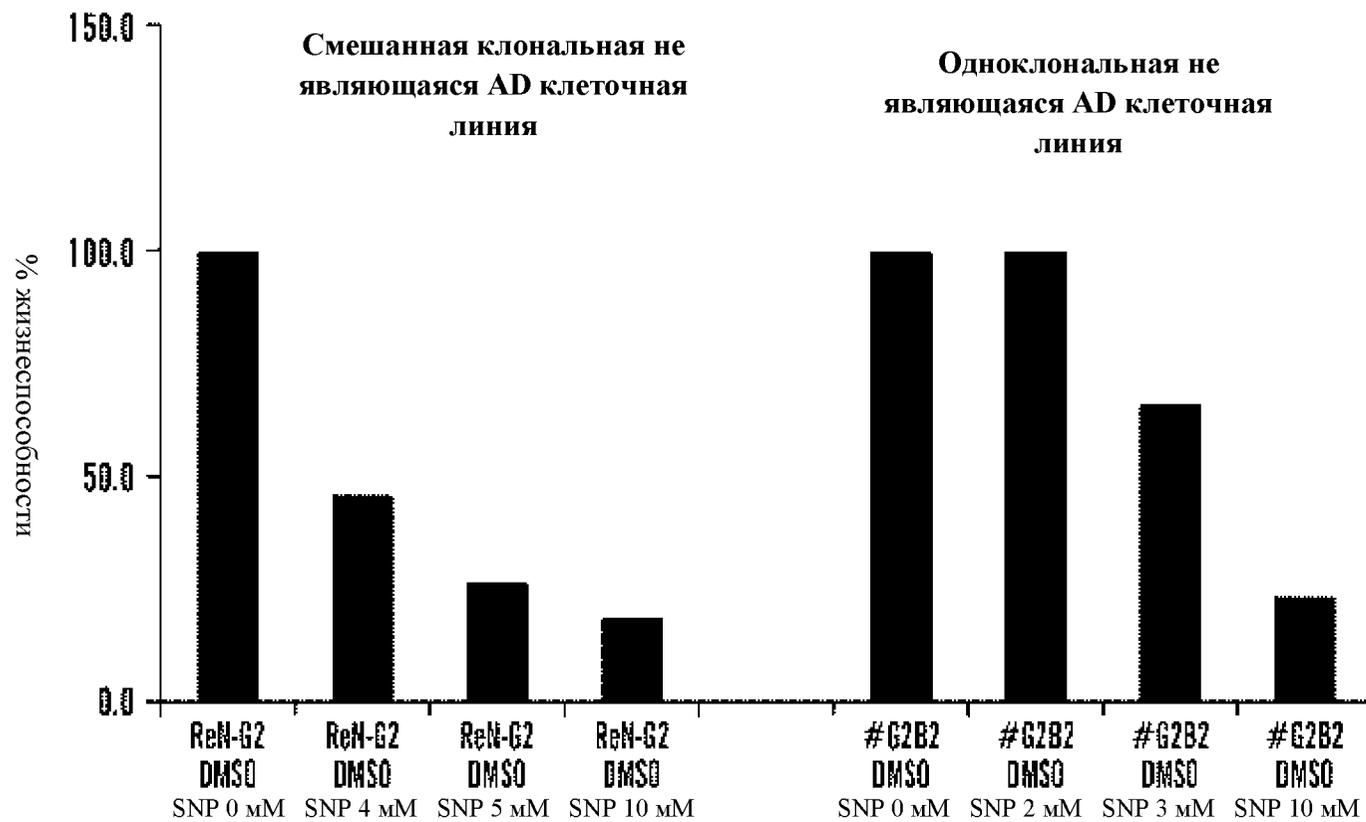
Фиг. 23

Одноклональная не являющаяся
AD клеточная линия

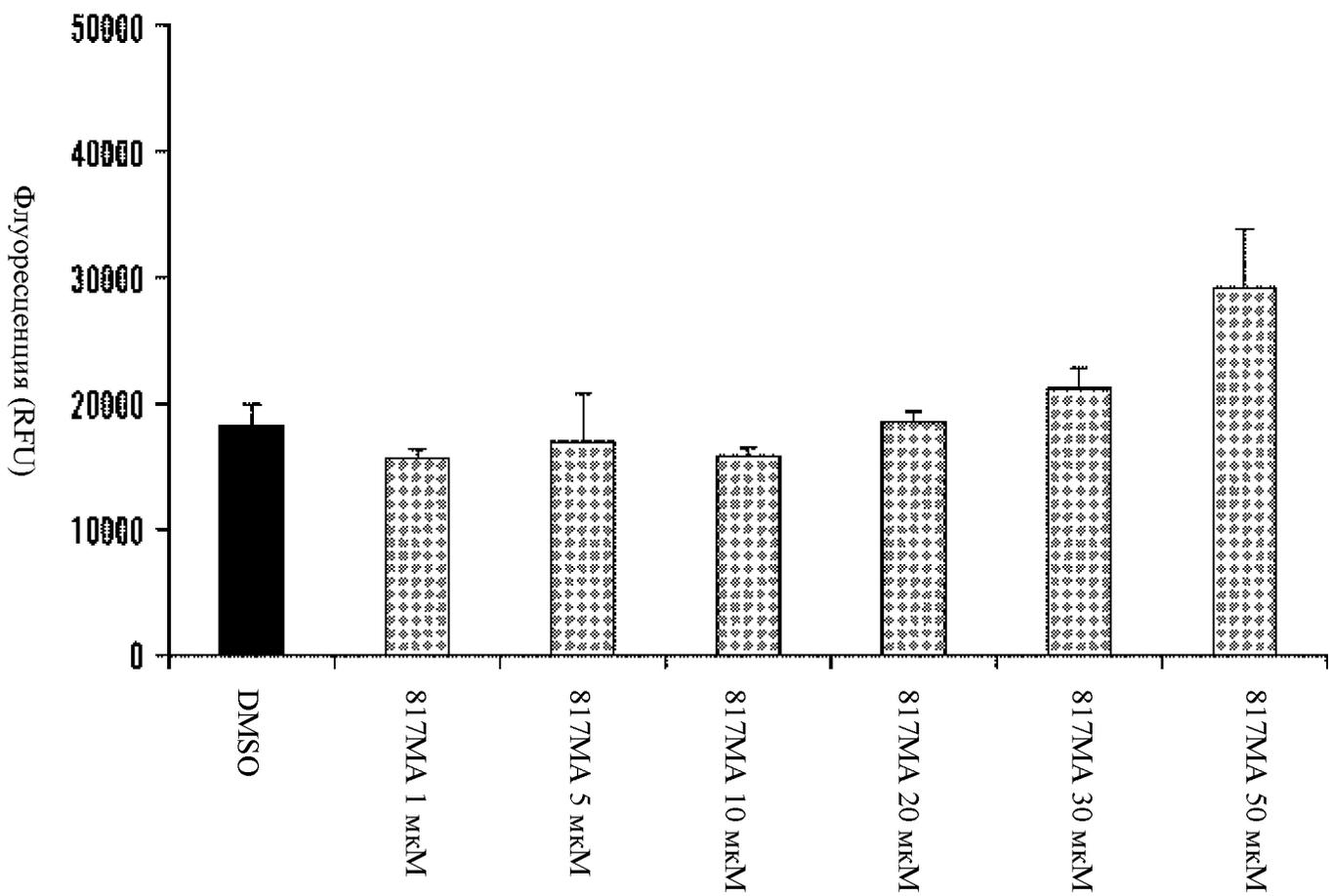


Фиг. 23 (продолжение)

Фиг. 24

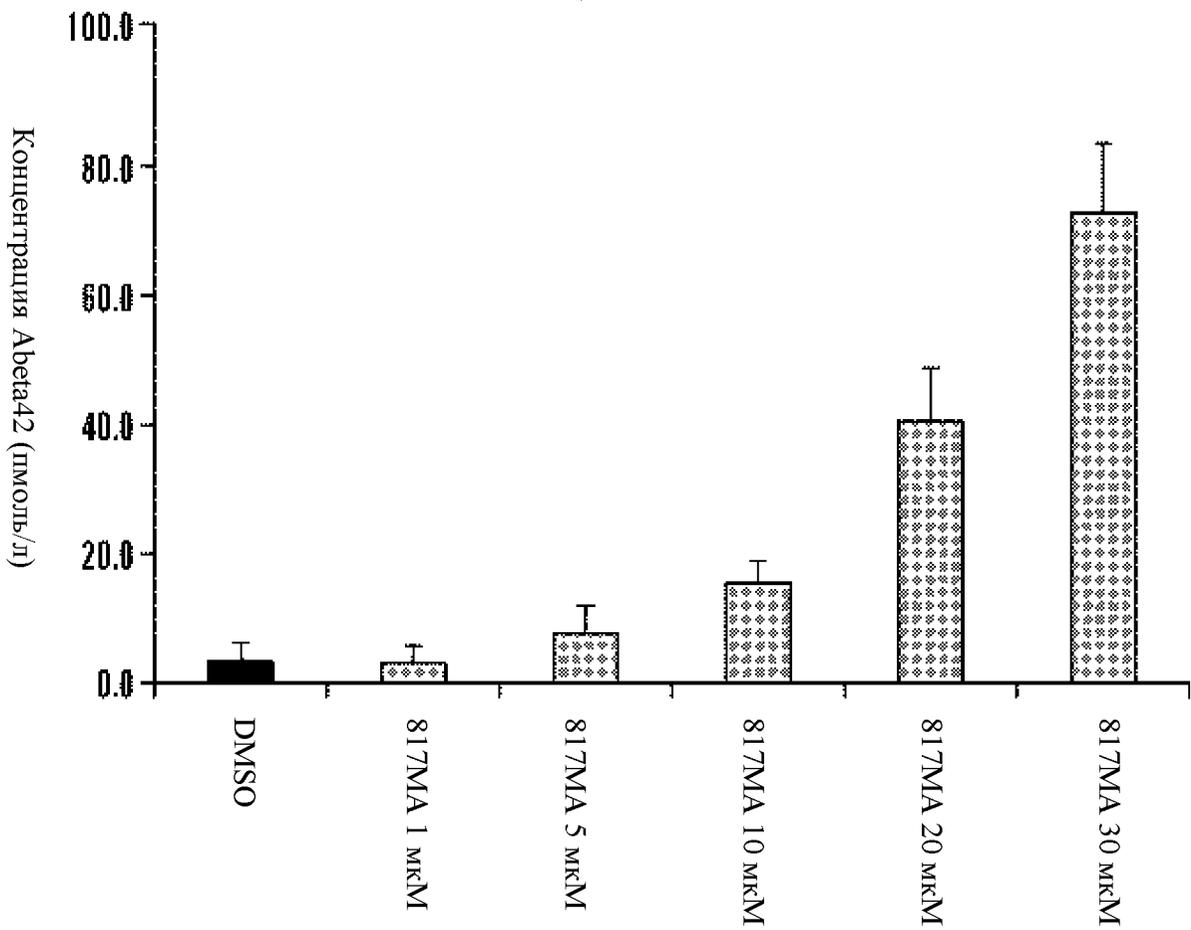


Токсичность (анализ LDH)



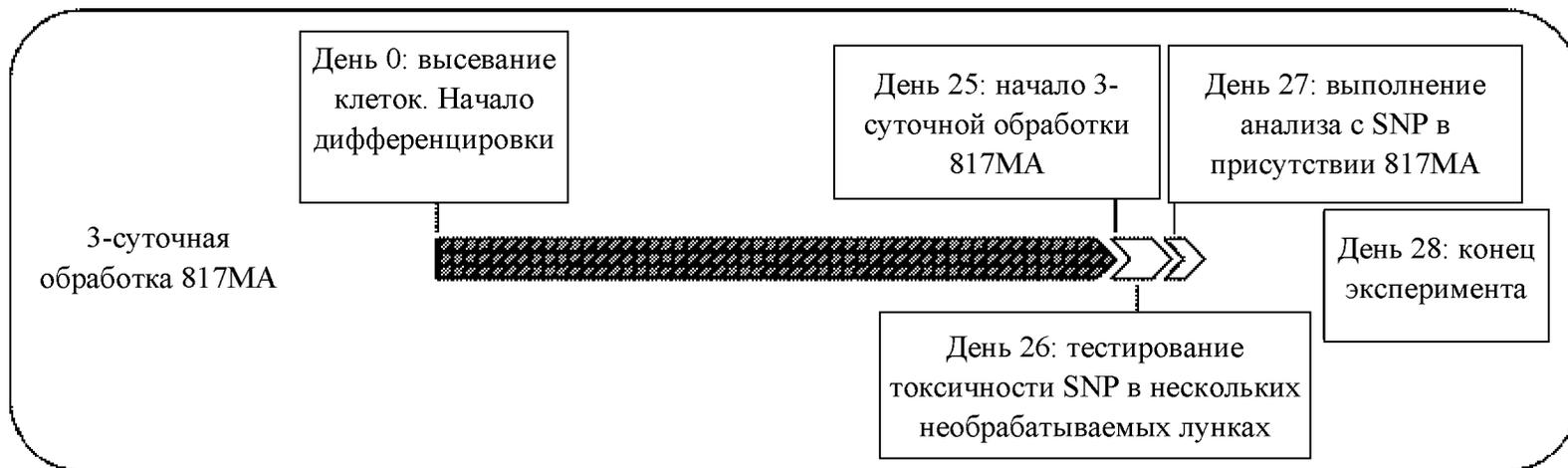
Фиг. 25

Анализ поглощения Abeta42

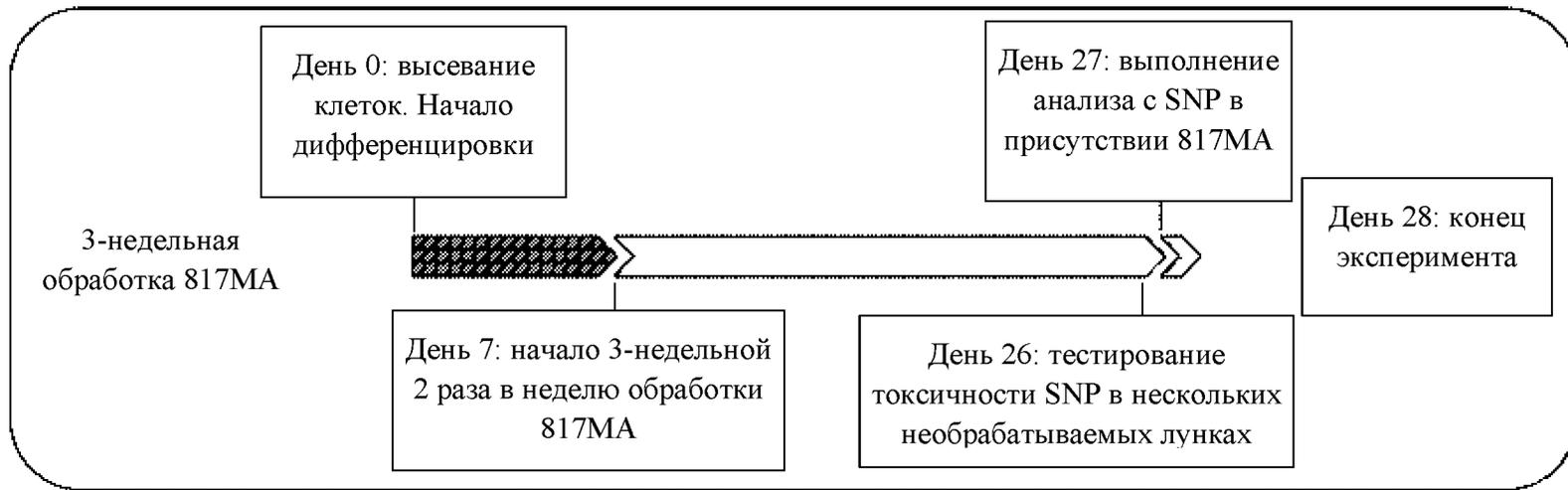


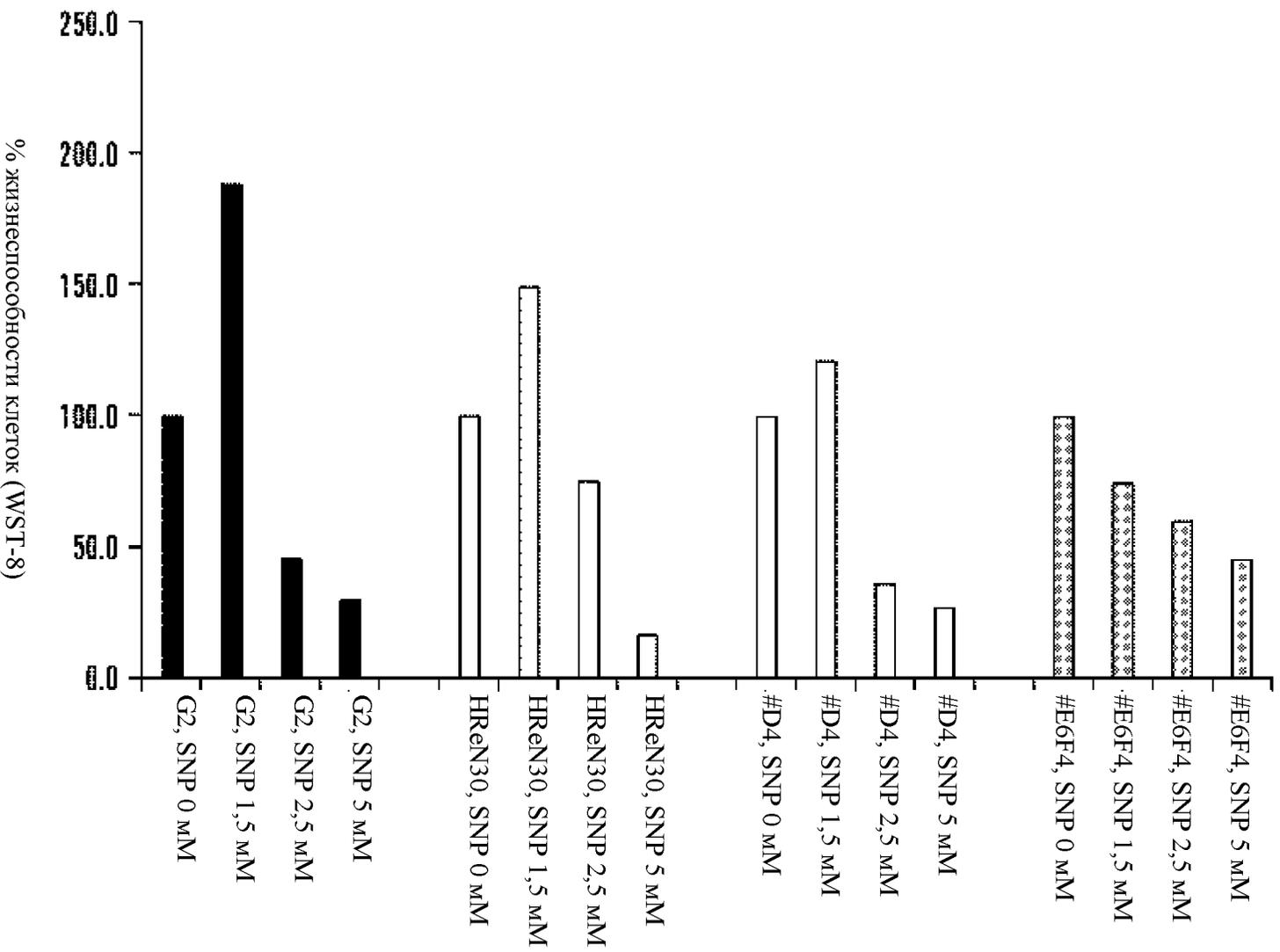
Фиг. 26

Фиг. 27А

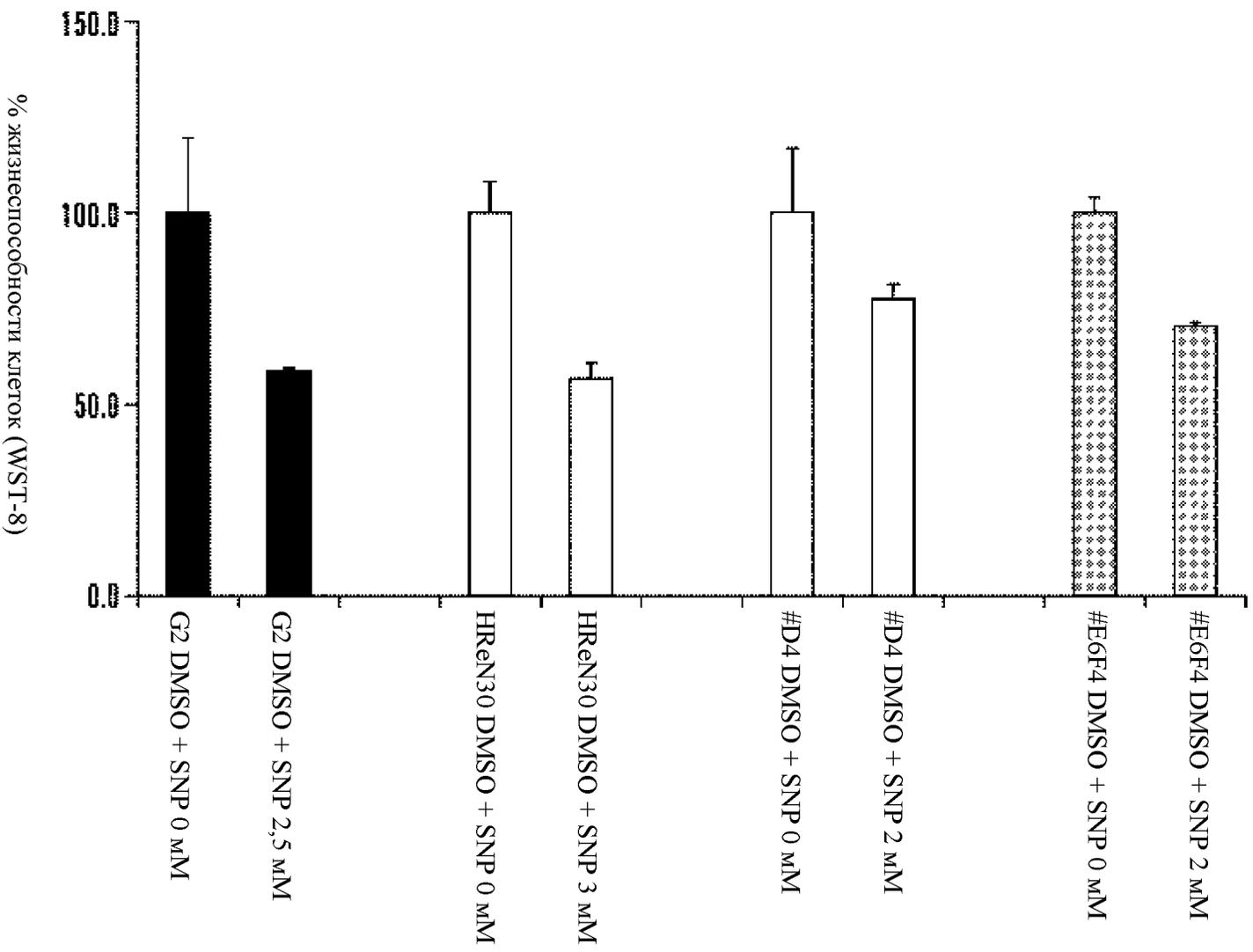


Фиг. 27В

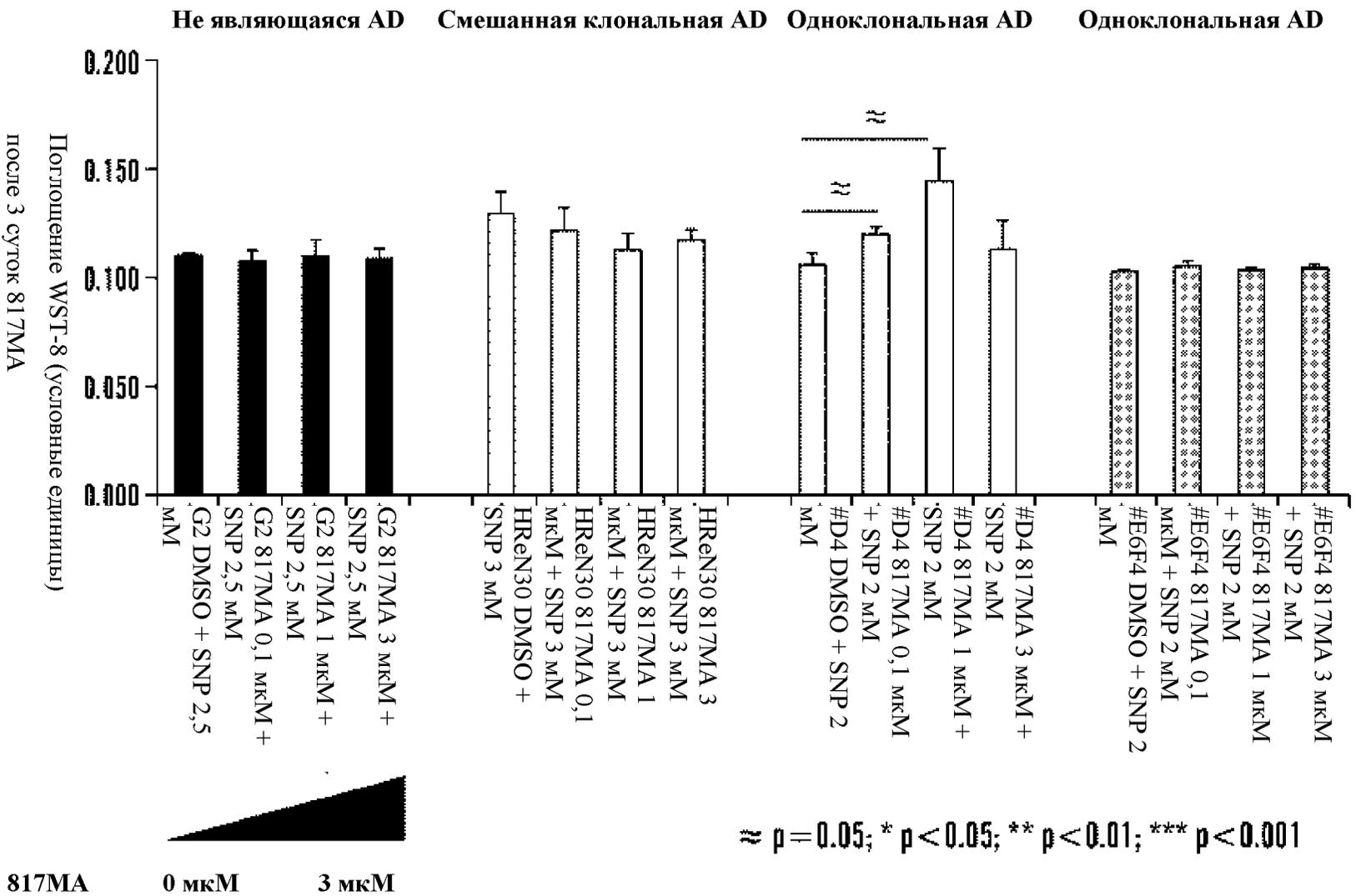




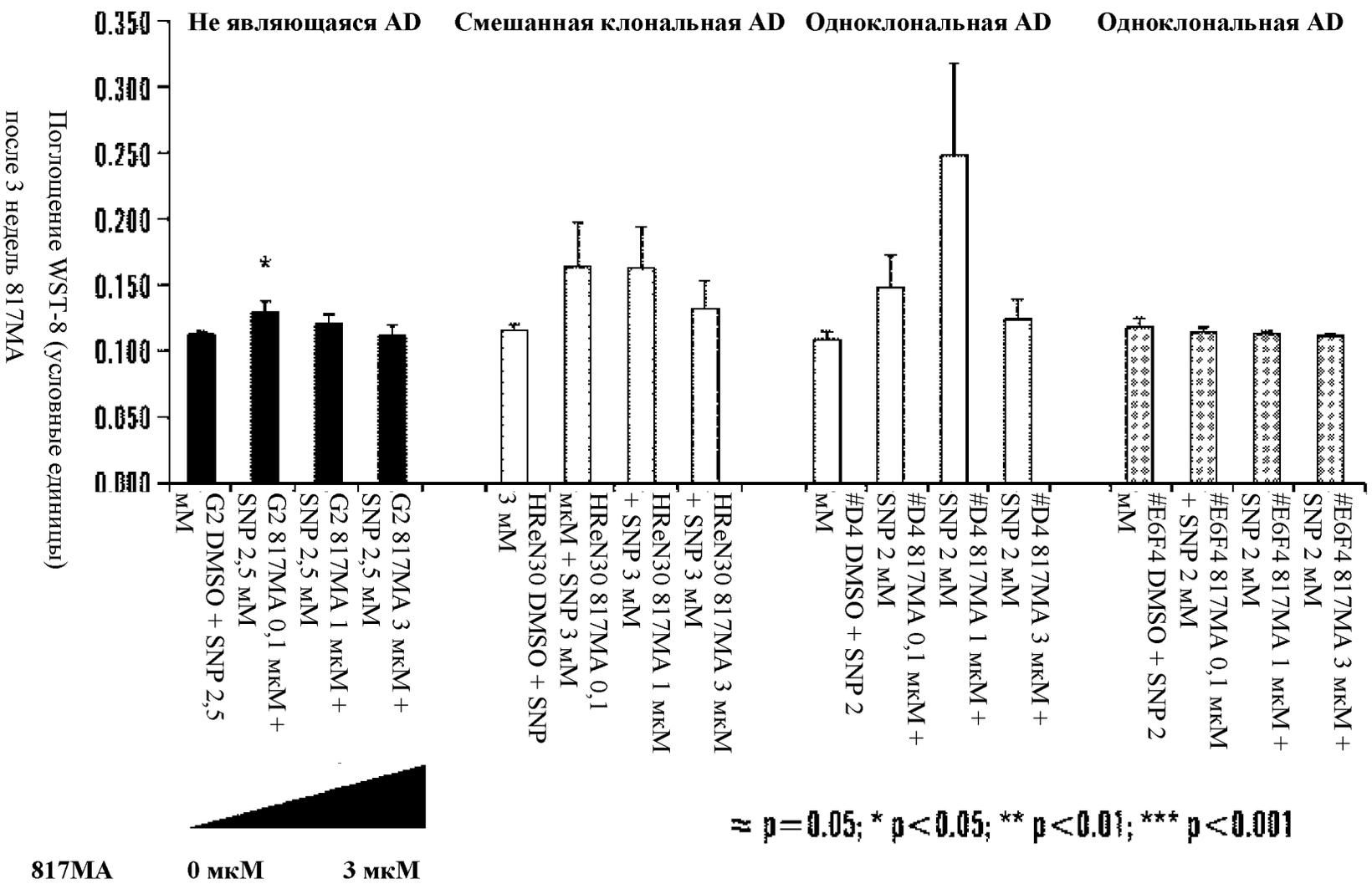
Фиг. 28



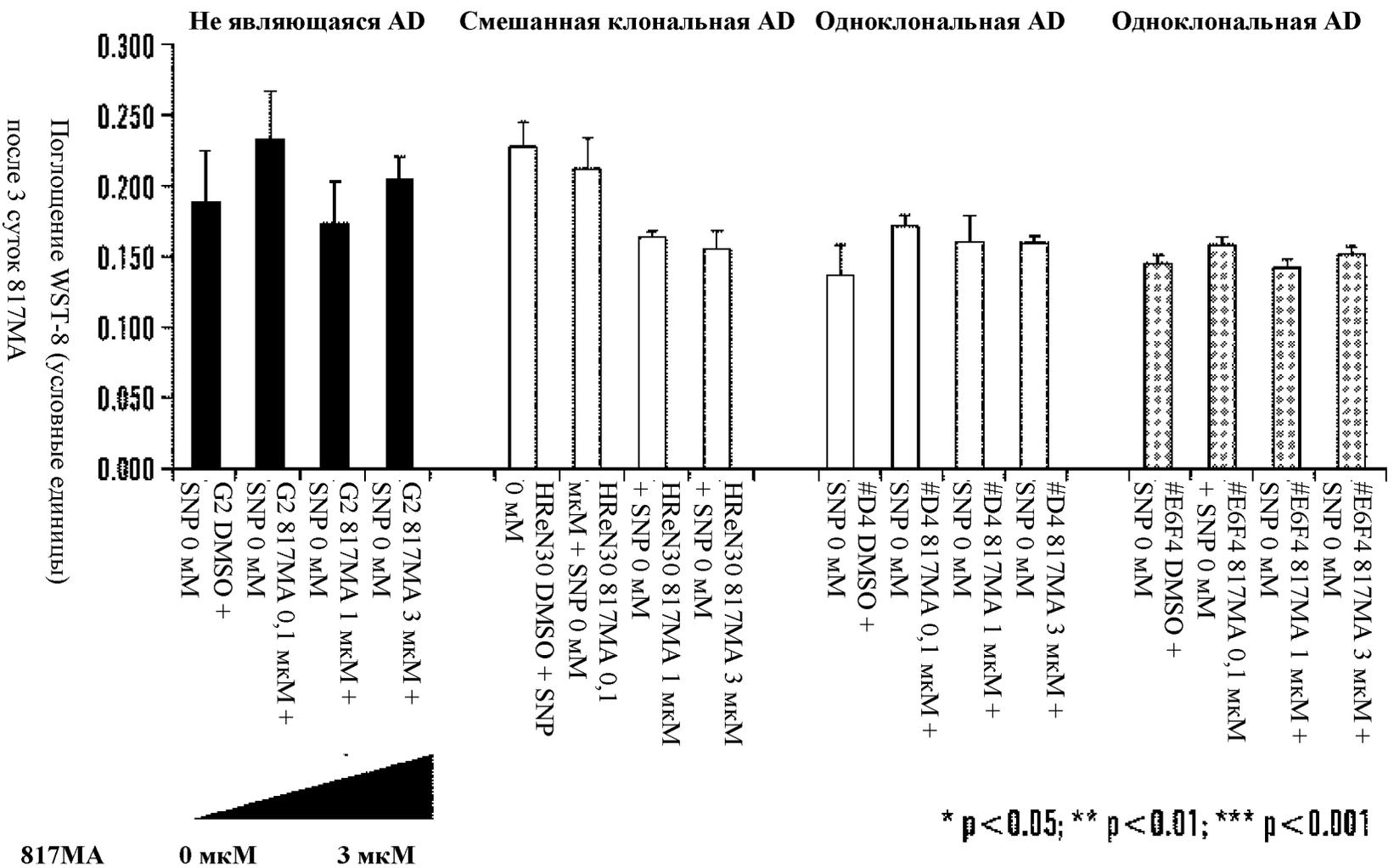
Фиг. 29



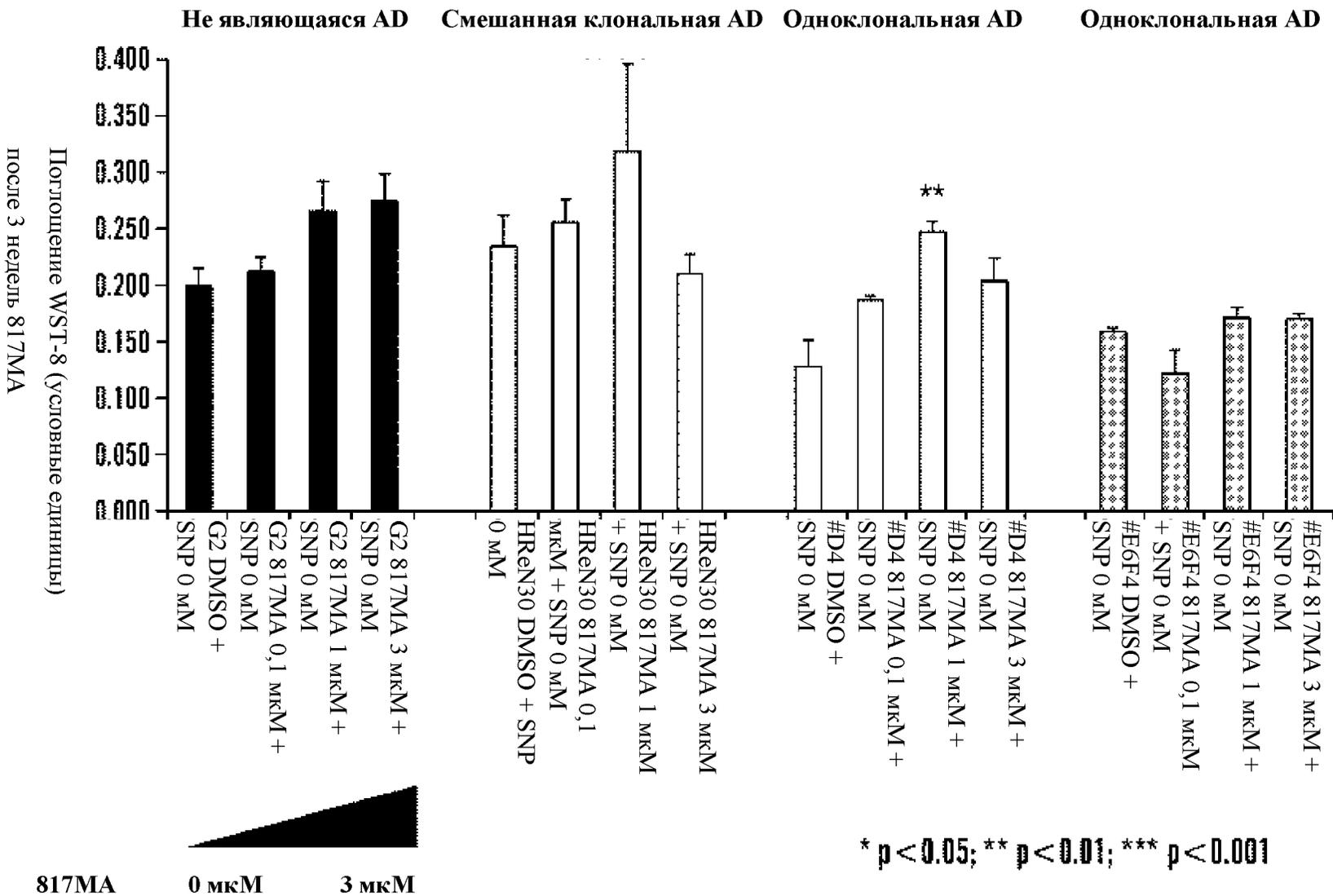
Фиг. 30А



Фиг. 30В

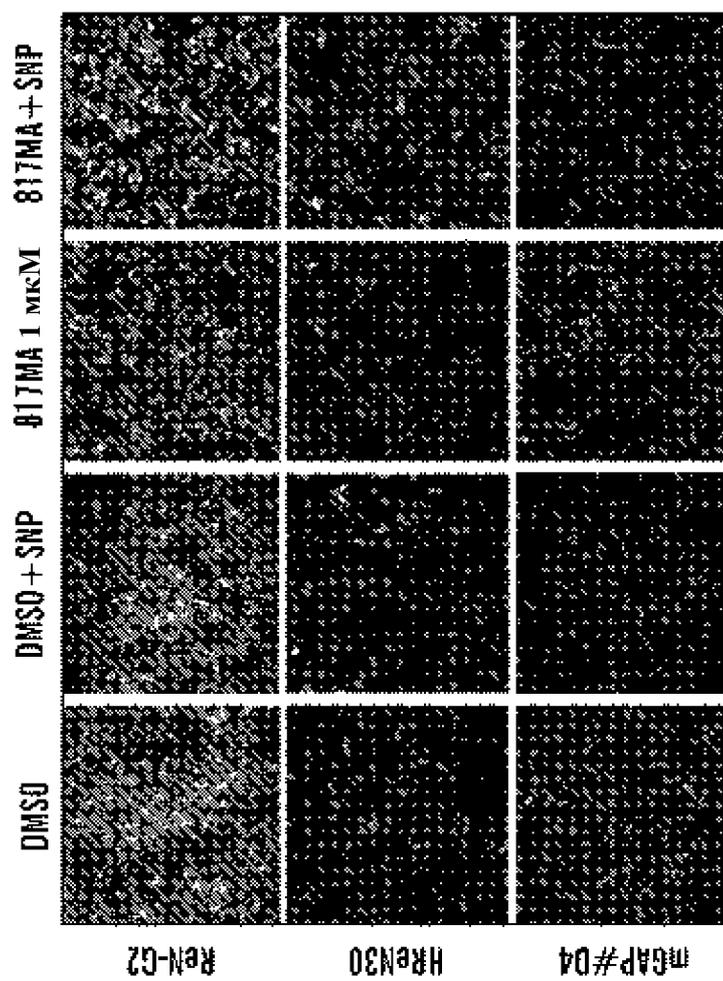


Фиг. 31А



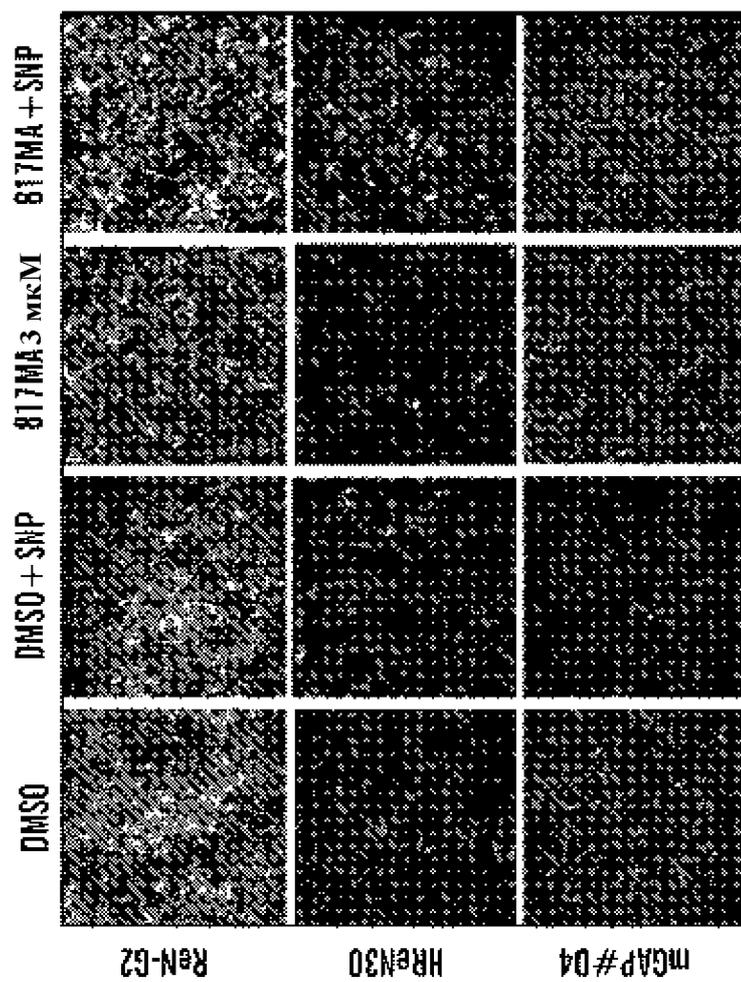
Фиг. 31В

Эффект SNP в отношении клеток
с помощью микроскопии: 817MA 1 мкМ

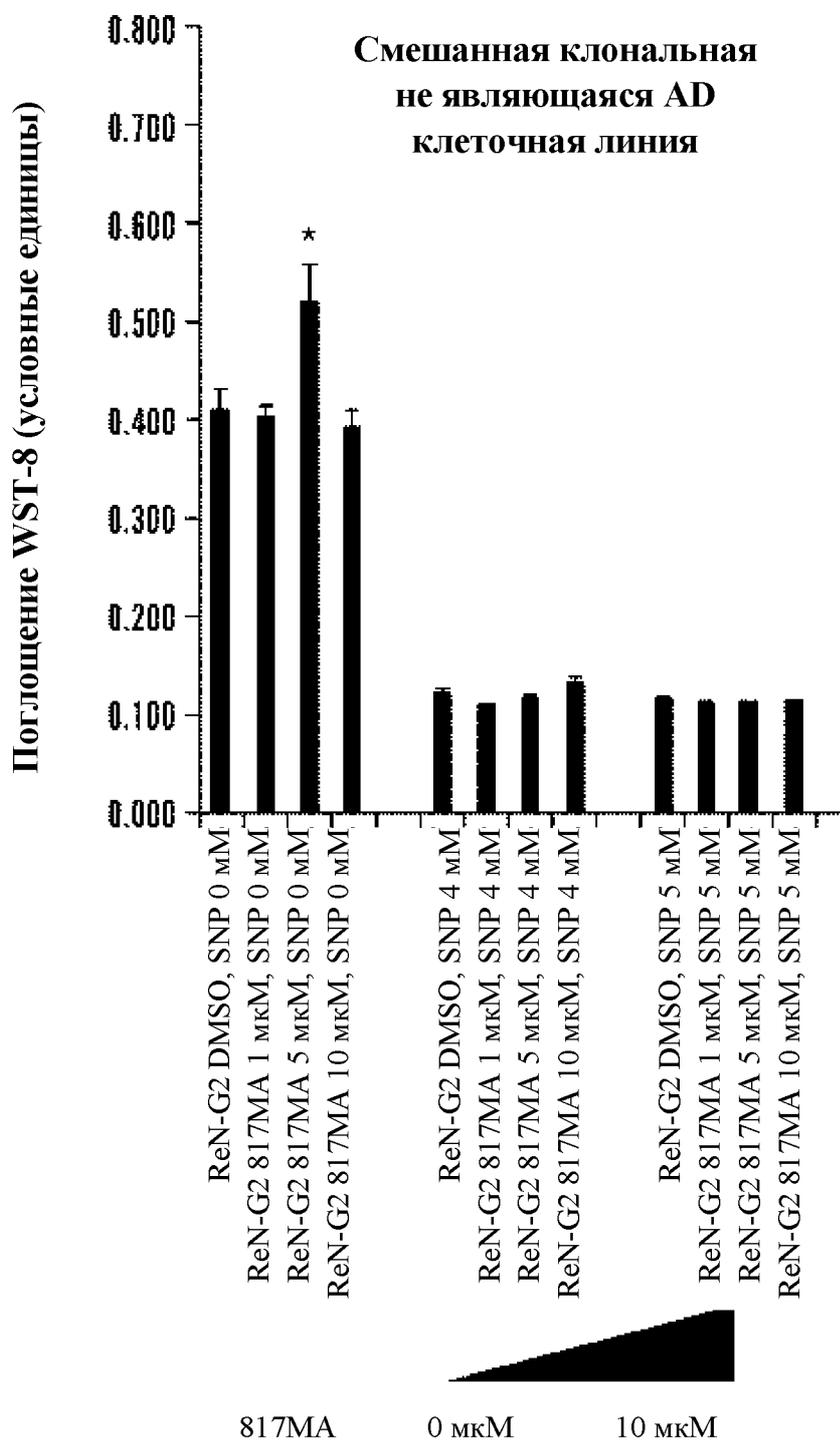


Фиг. 32

Эффект SNP в отношении клеток
с помощью микроскопии: 817MA 3 мкМ

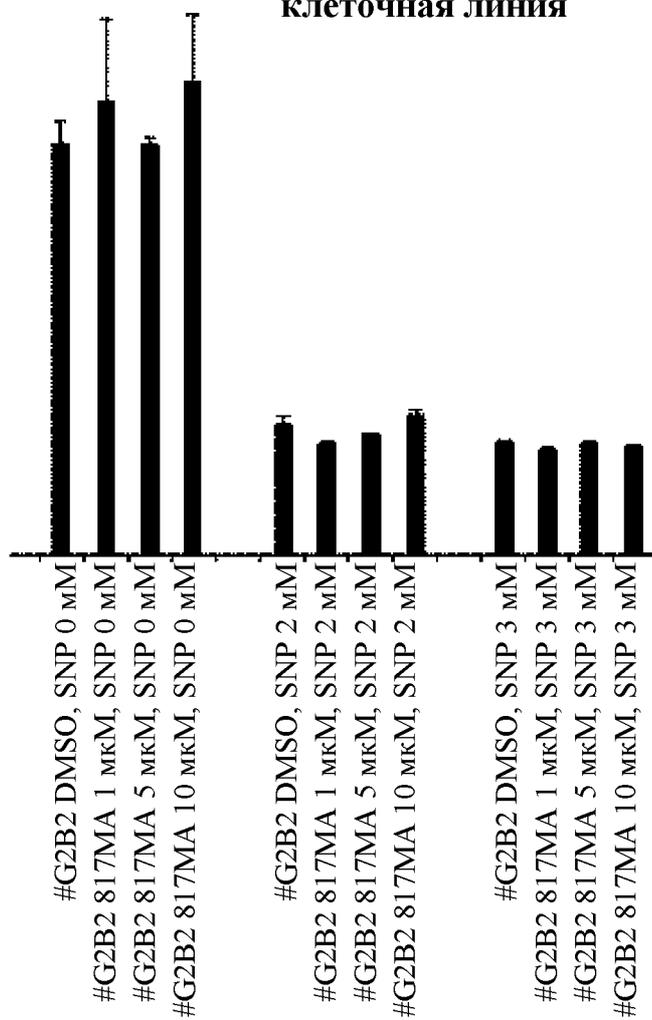


Фиг. 33



Фиг. 34

**Одноклональная не
являющаяся AD
клеточная линия**



n = 3 или 4 для каждой клеточной линии.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

Фиг. 34 (продолжение)