

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091605** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.09

(22) Дата подачи заявки
2018.12.28

(51) Int. Cl. *A01N 37/18* (2006.01)
A61K 38/095 (2019.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ И ДРУГИХ РАССТРОЙСТВ

(31) 62/612,906

(32) 2018.01.02

(33) US

(86) PCT/US2018/067876

(87) WO 2019/135992 2019.07.11

(71) Заявитель:

**РАШ ЮНИВЕРСИТИ МЕДИКАЛ
СЕНТЕР (US)**

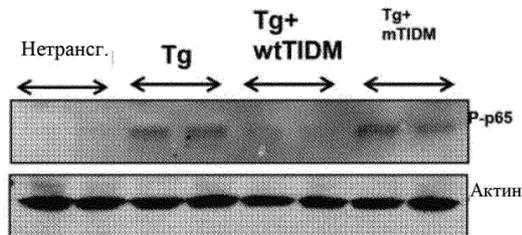
(72) Изобретатель:

Пахан Калипада (US)

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение в целом относится к способам лечения неврологических и других расстройств, включая аутоиммунные расстройства. Один аспект изобретения относится к способу лечения расстройства, при котором активация Toll-подобного рецептора 2 (TLR2) путем связывания с MyD88 (от англ. myeloid differentiation primary response 88) играет роль в патогенезе заболевания, в одном воплощении способ включает введение композиции, включающей пептидную последовательность, ингибирующей активацию TLR2 с помощью MyD88.



**202091605
A1**

**202091605
A1**

PCT/US2018/067876**МПК:** *A01N 37/18* (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)*A61K 38/095* (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)*A61K 38/10* (2006.01) *C07H 21/04* (2006.01)

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ И ДРУГИХ РАССТРОЙСТВ

Родственные заявки

[001] В настоящей заявке на патент испрашивается приоритет предварительной заявки на патент US 62/612906, поданной 2 января 2018 г., содержание которой включено путем ссылки.

ЗАЯВЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО ПРАВ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ, СДЕЛАННЫЕ ПРИ ФИНАНСИРОВАНИИ ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТОК ИЗ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТА

[002] Данное изобретение было сделано при поддержке государственных грантов от Управления медицинских исследований и материально-технического обеспечения армии США (W81XWH-12-1-0065) и NIH (AGQ5G431), гранта Zenith Fellows Award (ZEN-17-438829) от Ассоциации Альцгеймера и почетного гранта (1P018X003033) Министерства по делам ветеранов США. Федеральное правительство имеет определенные права на данное изобретение.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[003] Настоящее изобретение в целом относится к способам лечения неврологических и других расстройств, включая аутоиммунные расстройства. Один аспект изобретения относится к способу лечения расстройства, при котором активация Toll-подобного рецептора 2 (TLR2) путем связывания с белком MyD88 (от англ. myeloid differentiation primary response 88) играет роль в патогенезе заболевания. В одном воплощении способ включает введение композиции, включающей пептидную последовательность, которая ингибирует активацию TLR2, обусловленную MyD88.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[004] Болезнь Альцгеймера (БА) - наиболее распространенное нейродегенеративное заболевание человека, которое приводит к потере памяти. Широко распространено мнение о том, что БА - это многофакторное заболевание, на которое влияет сочетание генетических факторов, факторов окружающей среды и образа жизни (1-3). С точки зрения невропатологии, БА характеризуется наличием сенильных бляшек и нейрофибриллярных клубков (НФК) (4-6). Ряд исследований (7-13) также предполагают,

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛСТ

что активация глии и связанное с ней воспаление играют важную роль в патогенезе заболевания, и что регуляция нейровоспаления может представлять терапевтический интерес для ослабления нейродегенерации при БА.

[005] Toll-подобные рецепторы (TLR) служат важной связью между врожденным и адаптивным иммунитетом, прежде всего за счет реакции на бактерии, бактериальные продукты, вирусы, вирусные продукты и флагеллин (14, 15). В настоящее время сообщается о существовании 11 различных TLR у человека, и известно, что все основные типы клеток ЦНС экспрессируют TLR (15, 16). Однако микроглия - единственные клетки ЦНС, которые экспрессируют почти все известные на сегодняшний день TLR (16). За исключением TLR3, каждому TLR для нисходящей сигнализации требуется MyD88 (14, 15). Авторы изобретения (17) и другие (18, 19) показали, что фибриллярным пептидам A β требуется TLR2 для воспаления микроглии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВОПЛОЩЕНИЙ

[006] В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения нарушения у пациента, где нарушение представляет собой такое нарушение, при котором передача сигналов TLR2-MyD88 играет роль в патогенезе заболевания. В одном воплощении способ включает введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества композиции, включающей пептид, содержащий TLR2-взаимодействующий домен MyD88. Терапевтически эффективное количество - это количество, которое по меньшей мере уменьшает передачу сигналов TLR2-MyD88.

[007] В одном воплощении взаимодействующий с TLR2 домен MyD88 включает последовательность PGANQK (SEQ ID NO: 1). В другом воплощении взаимодействующий с TLR2 домен MyD88 содержит от 6 до 10 аминокислот, включая последовательность PGANQK (SEQ ID NO: 1). В еще одном воплощении пептид дополнительно включает гомеодомен Antennapedia, связанный с С-концом пептида, содержащего взаимодействующий с TLR2 домен MyD88. В другом воплощении пептидная последовательность представляет собой drqikiwfnrmtkwkkgahqk (SEQ ID NO: 2). В еще одном воплощении пептид связан с вектором доставки, обеспечивающим внутриклеточную доставку по меньшей мере в одну из клеток и прохождение через гематоэнцефалический барьер.

[008] В некоторых воплощениях нарушение представляет собой неврологическое расстройство, например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию с тельцами Леви, болезнь Хантингтона или множественную системную атрофию. В других воплощениях нарушение представляет собой аутоиммунное заболевание, например,

рассеянный склероз или ревматоидный артрит. В других воплощениях нарушение представляет собой бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию, паразитарную инфекцию, вирусную инфекцию, сепсис или абсцесс головного мозга.

[009] В другом аспекте изобретения предложена композиция, включающая пептидную последовательность P_{GANQK} (SEQ ID NO: 1), связанную с вектором доставки, обеспечивающим внутриклеточную доставку по меньшей мере в одну из клеток и прохождение через гематоэнцефалический барьер. В одном воплощении вектор доставки представляет собой гомеодомен *Antennapedia*. В другом воплощении композиция включает пептид, имеющий последовательность drqikiwfnrrmkwkkpgahqk (SEQ ID NO: 2).

[010] Композиция также может включать по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых воплощениях композицию вводят интраназально. В других воплощениях композицию вводят путем, выбранным из группы, состоящей из перорального, подкожного, внутрисуставного, внутрикожного, внутривенного, внутривентрикулярного и внутримышечного путей.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[011] Фиг. 1 (A-S). Мониторинг уровней TLR2, TLR4 и MyD88 в ЦНС в случаях, клинически диагностированных как отсутствие когнитивных нарушений (ОКН), легкие когнитивные нарушения (ЛКН) и болезнь Альцгеймера (БА). (A) Гомогенаты префронтальной коры (25 мкг) при ОКН (голубой), ЛКН (темно-синий) и БА (серый) исследовали методом иммуноблоттинга с использованием антител к TLR2, TLR4 и MyD88. Для нормализации сигналов, полученных при денситометрии (NIH ImageJ), использовали актин. Кумасси использовали для верификации количества нанесенного белка. Три независимых эксперимента включали двенадцать случаев ОКН, одиннадцать ЛКН и десять случаев БА. MyD88 (B) был значительно повышен при БА по сравнению как с ОКН ($p < 0,001$), так и с ЛКН ($p < 0,001$). TLR2 (C) был значительно выше при БА по сравнению с субъектами ЛКН ($p < 0,05$) при использовании критерия Краскела-Уоллиса. TLR4 (D) существенно не различался в трех группах. MyD88 (E; 0,371, $p = 0,033$) и TLR2 (F; 0,463, $p = 0,007$) положительно коррелировали с оценкой по шкале Браака по критерию Краскела-Уоллиса. Такой корреляции между TLR4 (G; - 0,012, $p = 0,947$) и оценкой по шкале Браака обнаружено не было. MyD88 отрицательно коррелировал с баллами краткой шкалы оценки психического состояния (MMSE) (H; -538, $p = 0,001$) и суммарным когнитивным z-индексом (GCS) (I; -475, $p = 0,005$). Однако, отрицательная корреляция TLR2 с MMSE (J; -278, $p = 0,117$) и GCS (K; -177, $p = 0,326$) не

была значимой. TLR4 также не имел отрицательной корреляции с MMSE (L; -173, $p = 0,336$) и GCS (M; 0,047, $p = 0,794$). кДа, килодальтон; OD, оптическая плотность. Осуществляли двойное окрашивание срезов гиппокампа головного мозга ОКН и БА с использованием антител против Iba-1 (микроглия), а также TLR2, TLR4 или MyD88. Клетки, положительные по TLR2 (N, кора; O, CA1), MyD88 (P, кора; Q, CA1) и TLR4 (R, кора; S, CA1), подсчитывали на двух срезах (два изображения на слайд) от каждого из четырех разных пациентов; $a: p$ менее 0,001 по сравнению с ОКН согласно двухвыборочным t-критериям; NS, не достоверно.

[012] Фиг. 2 (A-H). Конструирование пептида для нарушения взаимодействия TLR2 и MyD88. (A) Компьютерная модель стыковки TLR2 (синий) и MyD88 (зеленый) мыши (электростатическая энергия = -7,750 ккал / моль; энергия десольватации = - 24,99 ккал / моль; энергия Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий = 105,25 ккал / моль; суммарная энергия = -22,216 ккал / моль), построенная методом жесткого докинга, показывает сильное взаимодействие между 245–250 аминокислотами петли CD MyD88 и петли BB TLR2. Следовательно, пептид, соответствующий этому домену MyD88 (TIDM), использовали для разобщения взаимодействия между TLR2 и MyD88. (B) Взаимодействующие TLR2-MyD88 образовывали комплекс с wtTIDM (электростатическая энергия = -4,516 ккал/моль; энергия десольватации = -24,027 ккал / мСм; энергия Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий = 16,724 ккал / моль; суммарная энергия = -26,871 ккал / моль). (C) Конструирование рекомбинантного белка TLR2, меченного сМус на С-конце (сTLR2). Аффинность связывания wtTIDM (D) и mTIDM (E) в нарастающих концентрациях с сTLR2 *in vitro* исследовали методом поверхностного плазмонного резонанса ($n = 2$ повтора на концентрацию в 3 независимых экспериментах). (F) График показателей реакции связывания в зависимости от концентраций пептидов wtTIDM (круги) и mTIDM (квадраты). G) Кривая плавления белка сTLR2 в отдельности (черный) и вместе с wtTIDM (зеленый). Анализ термического сдвига показал сдвиг температуры плавления (ΔT_m) на 4,96°C ($n=2$ повтора на концентрацию в 3 независимых экспериментах). (H) Кривая плавления белка сTLR2 в отдельности (черный) и вместе с пептидами mTIDM (красный), указывающая ΔT_m 0,87°C ($n=2$ повтора на концентрацию в 3 независимых экспериментах).

[013] Фиг. 3 (A-L). Избирательное нарушение взаимодействия TLR2 и MyD88 с помощью wtTIDM. Компьютерный анализ взаимодействий wtTIDM с TLR1, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 и TLR9. Анализ взаимодействия жестких тел выполняли с использованием инструмента компьютерного анализа *pyDock*. Показаны комплексы TLR1- wtTIDM (A),

TLR4-wtTIDM (B), TLR5-wtTIDM (C), TLR6-wtTIDM (D), TLR7-wtTIDM (E) и TLR9 - wtTIDM (F). (G) Клетки микроглии BV-2, предварительно инкубированные с пептидами wtTIDM и mTIDM в течение 1 ч, стимулировали 1 мкМ фибриллярного A β 1-42 в бессывороточных условиях. Через 1 час осуществляли иммунопреципитацию клеточных экстрактов с помощью антитела против MyD88 с последующим вестерн-блоттингом иммунопреципитатов с использованием антитела против TLR2. Клеточные экстракты, для иммунопреципитации которых использовали нормальный IgG, служили качестве контроля. Также осуществляли иммуноблоттинг нанесенного материала с использованием антител к TLR2 и MyD88. (H) Полосы сканировали и приводили значения TLR2, нормализованные к количеству нанесенного белка, в сравнении с контролем (n=2 повтора/условие в 3 независимых экспериментах). Результаты анализировали с помощью двухвыборочного t-критерия. (I) Клетки микроглии BV-2, предварительно инкубированные с пептидами wtTIDM и mTIDM в течение 1 ч, стимулировали LPS в бессывороточных условиях. Через 1 час осуществляли иммунопреципитацию клеточных экстрактов с помощью антитела против MyD88 с последующим вестерн-блоттингом иммунопреципитатов с использованием антител к TLR4. Клеточные экстракты, для иммунопреципитации которых использовали нормальный IgG, служили качестве контроля. Также осуществляли иммуноблоттинг нанесенного материала с использованием антител к TLR4 и MyD88. 4) Полосы сканировали и приводили значения TLR4, нормализованные к количеству нанесенного белка, в сравнении с контролем (n=2 повтора/условие в 3 независимых экспериментах). Результаты анализировали с помощью двухвыборочного t-критерия. (K) клетки микроглии BV-2 трансдуцировали лентивирионами pLenti-cMyc-cTlr2 и через 48 ч после трансдукции клетки обрабатывали wtTIDM и mTIDM в течение 1 ч с последующей стимуляцией фибриллярным A β 1-42. Через 1 час осуществляли иммунопреципитацию клеточных экстрактов с помощью антитела против MyD88 с последующим вестерн-блоттингом иммунопреципитатов с использованием антител к c-Myc. Также выполняли иммуноблоттинг иммуно-обедненных (ID) фракций, служивших качестве контроля, с использованием антитела к c-Myc. (L) Полосы сканировали и приводили значения c-Myc, нормализованные к количеству нанесенного белка, в сравнении с контролем (n=2 повтора/условие в 3 независимых экспериментах). Результаты анализировали с помощью двухвыборочного t-критерия.

[014] Фиг. 4 (A-R). Влияние пептидов wtTIDM и mTIDM на индукцию активации NF- κ B и экспрессию провоспалительных молекул в клетках микроглии. Клетки микроглии BV-2, предварительно инкубированные с 10 мкМ пептидов wtTIDM/mTIDM в течение 1 ч,

стимулировали 1 мкМ фибриллярного А β 1-42 (А - С), 1 мкМ МРР + (D - F), 250 нг/мл LTA (G - I), 1 мкг / мл LPS (J - L), 1 мкМ флагеллина (M - O) и 1 мкМ CpG ДНК (P - R) в бессывороточных условиях. После 1 ч стимуляции отслеживали активацию NF- κ B в экстрактах ядер с помощью EMSA (А, фибриллярный А β ; D, МРР +; G, LTA; J, LPS; M, флагеллин, P; CpG ДНК). Через 4 часа стимуляции отслеживали экспрессию мРНК IL-1 β (B, E, H, K, N и Q) и iNOS (C, F, I, L, O и R) с помощью ПЦР в реальном времени. (B - C, фибриллярный А β ; E - F, МРР +; H - I, LTA; K - L, LPS; N - O, флагеллин; Q - R, CpG ДНК) (n=2 повтора/концентрацию в 3 независимых экспериментах); а: p менее 0,001 по сравнению с контролем; b: p менее 0,001 по сравнению с активацией, согласно двухвыборочным t-критериям.

[015] Фиг. 5 (A-G). После интраназальной доставки пептид wtTIDM проникает в гиппокамп и подавляет активацию глии и уменьшает количество бляшек в гиппокампе мышей Tg (трансгенных). Мыши Tg (в возрасте 6 месяцев) получали одну дозу пептида wtTIDM (0,1 мг/кг массы тела) интраназальным путем. После 60 мин воздействия мышам выполняли перфузию стерильным физиологическим раствором, гиппокампы гомогенизировали и анализировали wtTIDM в супернатанте с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI-MS) (А, стандарт wtTIDM; В, Tg без воздействия; С, Tg при воздействии wtTIDM). Мышам Tg вводили пептиды wtTIDM и mTIDM (0,1 мг/кг массы тела/2 дня) интраназальным путем. Через 30 дней осуществляли двойное окрашивание срезов гиппокампа с использованием антител к Iba-1 и P-p65 (D), а также Iba-1 и iNOS (Фиг. 16). Подсчитывали клетки, положительные по Iba-1 (E, CA1; F, CA3), P-p65 (G, CA1; H, CA3) и iNOS (I, CA1; J, CA3), на двух срезах (два изображения на слайд) у каждой из шести разных мышей (n = 6) на группу; а: p менее 0,001 по сравнению с нетрансгенными; b: p менее 0,001 по сравнению с Tg, согласно двухвыборочным t-критериям. Осуществляли иммуноблоттинг экстрактов гиппокампа мышей всех групп (n = 4 на группу) с использованием антитела к iNOS (K). В качестве контроля количества нанесенного белка использовали актин. Полосы сканировали и приводили значения (L, iNOS/актин) по отношению к нетрансгенным контролям; а: p менее 0,001 по сравнению с нетрансгенными; b: p менее 0,001 по сравнению с Tg, согласно двухвыборочным t-критериям. (M) Срезы гиппокампа окрашивали моноклональным антителом (mAb) 82E1. Подсчитывали амилоидные бляшки (N, кора головного мозга; G, гиппокамп) подсчитывали на двух срезах (два изображения на слайд) от каждой из шести разных мышей на группу; а: p менее 0,001 по сравнению с нетрансгенными; b: p менее 0,001 по сравнению с Tg, согласно двухвыборочным t-критериям. (P) Экстракты гиппокампа (n-4

на группу) анализировали на A β с помощью вестерн-блоттинга с использованием mAb 6E10. Стрелкой указана полоса A β 4 кДа. Полосы сканировали и приводили значения A β , нормализованные к актину, по отношению к нетрансгенным контролям (Q); a: p менее 0,001 по сравнению с нетрансгенными; b: p менее 0,001 по сравнению с Tg, согласно двухвыборочным t-критериям.

[016] Фиг. 6 (A-N), интраназальная доставка пептида wtTIDM, но не mTIDM, ингибирует апоптоз нейронов *in vivo* в гиппокампе и улучшает память и обучение у трансгенных мышей. Трансгенным мышам (в возрасте 6 месяцев) вводили пептиды wtTIDM и mTIDM (0,1 мг/кг массы тела / 2 дня) интраназальным путем. Через 30 дней воздействия мышей подвергали эвтаназии и проводили двойное окрашивание срезов гиппокампа для TUNEL и NeuN (A). TUNEL-положительные клетки (B, CA1; C, CA3) подсчитывали на двух срезах (два изображения на слайд) от каждой из шести разных мышей (n = 6) на группу; a: p менее 0,001 по сравнению с нетрансгенными; b: p менее 0,001 по сравнению с трансгенными, согласно двухвыборочным t-критериям. Экстракты гиппокампа мышей всех групп (n=4) анализировали методом иммуноблоттинга с использованием антитела к расщепленной каспазе 3 (D). Для контроля количества нанесенного материала использовали актин. (E) Полосы сканировали и приводили значения расщепленной каспазы 3, нормализованные к актину, по отношению к нетрансгенным контролям. Результаты выражены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для четырех мышей в группе; a: p менее 0,001 по сравнению с нетрансгенными, b: p менее 0,001 по сравнению с Tg, согласно двухвыборочным t-критериям. Уровни белков PSD-95, NR2A и GluR1 в экстрактах гиппокампа исследовали с помощью вестерн-блоттинга (F). Полосы сканировали и приводили значения (G - PSD-95/актин; H - NR2A/актин; I - GluR1/актин) по отношению к нетрансгенным контролям. Результаты выражены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего для четырех мышей на группу; a: p менее 0,001 по сравнению с нетрансгенными; b: p менее 0,001 по сравнению с Tg согласно двухвыборочным t-критериям. Мышей исследовали в лабиринте Барнса (J, задержка; K, количество сделанных ошибок) и Т-лабиринта (L, количество положительных поворотов; M количество отрицательных поворотов). Кратковременную память также контролировали с помощью теста на распознавание нового объекта, выраженного индексом различения (N). В каждой группе использовали восемь мышей (n = 8), и результаты анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа.

[017] Фиг. 7 (A-V). Пептид wtTIDM, но не mTIDM, защищает мышей от экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ) и коллаген-

индуцированного артрита (КИА). (А) ЭАЭ индуцировали у самцов мышей C57/BL6 иммунизацией MOG35-55, и с 10 дня после иммунизации мышам вводили пептиды wtTIDM и mTIDM (0,1 мг /кг веса тела/день) интраназальным путем. Мышей (n = 6 на группу в двух независимых экспериментах) оценивали ежедневно. Как видно из анализа однофакторного дисперсионного анализа с повторными измерениями, пептид wtTIDM достоверно защищал от ЭАЭ [F2, 94 = 22,59 (более Fc = 3,093)]. На 22 день после иммунизации оценивали общую двигательную активность с помощью системы для оценки активности в «открытом поле» Ethovision XT 13.0 (Noldus) (B, тепловая карта, отображающая общую двигательную активность; C, пройденное расстояние; D, вставание на дыбы; E, скорость; F, ускорение) и вращающегося стержня (G). Также проводили анализ отпечатка стопы (H - длина шага; I - длина отпечатка; J - ширина шага; K - размах пальцев). (L) КИА индуцировали у самцов мышей DBA/1J путем иммунизации бычьим коллагеном II типа, и с 29 дня после иммунизации мышам вводили пептиды wtTIDM и mTIDM (1 мг/кг веса тела/день) путем внутрибрюшинной инъекции. Мышей (n = 6 на группу в двух независимых экспериментах) оценивали ежедневно. Однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями показал, что пептид wtTIDM достоверно защищал от КИА [F2, 45 = 4,927 (более Fc = 3,093)]. На 60 день после иммунизации оценивали общую двигательную активность с помощью системы Ethovision (M, тепловая карта, отображающая общую двигательную активность; N - пройденное расстояние; O - вставание на задние лапы; P - скорость), вращающегося стержня (Q) и по силе захвата (R). Также проводили анализ отпечатка стопы (S - длина шага; T - длина отпечатка; U - ширина шага; V - размах пальцев). Шесть мышей (n = 6 на группу) использовали в двух независимых экспериментах; a: p менее 0,001 и b: p менее 0,05 по сравнению с контролем; c: p менее 0,001 и d: p менее 0,05 по сравнению с ЭАЭ или КИА по двухвыборочным t-критериям.

[018] Фиг. 8 (A-D). Мониторинг TLR2, TLR4 и MyD88 в ЦНС в случаях клинически диагностированного отсутствия когнитивных нарушений (ОКН) и болезни Альцгеймера (БА). Проводили двойное окрашивание срезов гиппокампа головного мозга при ОКН и БА с использованием антител к Iba-1 (микроглия) и TLR2 (A), Iba-1 и MyD88 (B), а также Iba-1 и TLR4 (C). Результаты представляют собой анализ двух срезов головного мозга от каждого из четырех разных животных. Клетки, положительные по Iba-1 (D, кора; E, CA1), подсчитывали на двух срезах (два изображения на слайд) каждого из четырех разных пациентов; a: p менее 0,001 по сравнению с ОКН согласно двухвыборочным t-критериям.

[019] Фиг. 9 (A-D). Статус TLR2 в ЦНС нетрансгенных и трансгенных мышей (5XFAD). A-B) Выполняли двойное окрашивание срезов гиппокампа мозга нетрансгенных и трансгенных мышей в возрасте 6 месяцев с использованием антител против Iba-1 (микроглия) и TLR2. Результаты представляют собой анализ двух срезов от каждой из шести разных мышей. (C) Иммуноблоттинг экстрактов гиппокампа мышей всех групп мышей (n=4) с использованием антитела против TLR2. В качестве контроля количества нанесенного белка использовали актин. (D) Полосы сканировали с использованием программного обеспечения NIH ImageJ и представляли значения TLR2, нормализованные к актину, по отношению к нетрансгенным контролям; a: p менее 0,001 по сравнению с нетрансгенными, согласно двухвыборочным t-критериям.

[020] Фиг. 10 (A-D). Статус MyD88 в ЦНС нетрансгенных мышей и мышей Tg (5XFAD). A-B) Выполняли двойное окрашивание срезов гиппокампа мозга нетрансгенных и трансгенных мышей в возрасте 6 месяцев с использованием антител против Iba-1 (микроглия) и MyD88. Результаты представляют собой анализ двух срезов от каждой из шести разных мышей. (B) Иммуноблоттинг экстрактов гиппокампа мышей всех групп (n=4) с использованием антитела против MyD88. В качестве контроля количества нанесенного белка использовали актин. (D) Полосы сканировали с использованием программного обеспечения NIH ImageJ и представляли значения MyD88, нормализованные к актину, по отношению к нетрансгенным контролям; a: p менее 0,001 по сравнению с нетрансгенными, согласно двухвыборочным t-критериям.

[021] Фиг. 11 (A-G). Применение стратегии компьютерного моделирования на основе гомологии для построения структуры TLR-взаимодействующего домена различных TLR мыши. Исходные структуры TIR (A, TLR1; B, TLR2; C, TLR4; D, TLR5; E, TLR6; F, TLR7; G, TLR9) моделировали с помощью Deep View 3.7 β 2, онлайн инструмента для анализа макромолекул аналитической системы ExPASy. Качество каждой смоделированной структуры оценивали с помощью инструмента для анализа качества QMEAN.

[022] Фиг. 12 (A-E). Докинг-анализ wtTIDM и mTIDM в комплексе с TIR-доменом белка TLR2. (A) Компьютерный анализ структуры TIR-домена TLR2 и пептида wtTIDM. Состыкованное положение белок-белок получено с помощью инструмента жесткого докинга ruDock. Показана наиболее стабильная структура, полученная с помощью j mol viewer. (B) Аналогичный анализ проводили с mTIDM. (C) Дальнейший анализ выявил сильное электростатическое взаимодействие между wtTIDM и TLR2 (~2,31 Å (0,231 нм): слева) и слабое взаимодействие с mTIDM (~7,26Å (0,726 нм): справа) (D) Более крупное изображение комплекса, образованного петлей BB TLR2 (синий) и петлей CD MYD88

(зеленый). Продемонстрировали, что сферы ВДВ перекрываются друг с другом. Е) При образовании комплексов с wtTIDM (зеленый) облака ВДВ у MYD88 (розовый) сместились далеко от таковых TLR2 (синий).

[023] Фиг. 13 (A-F). Влияние пептидов wtTIDM и mTIDM на экспрессию провоспалительных молекул в клетках микроглии. Клетки микроглии BV-2, предварительно инкубированные с 10 мкМ wtTIDM/mTIDM пептидов в течение 1 ч, стимулировали 1 мкМ фибриллярного A β 1-42 (A), 1 мкМ MPP+ (B), 250 нг/мл LTA (C), 1 мкг/мл LPS (D), 1 мкМ флагеллина (E) и 1 мкМ CpG ДНК (F). После 4 ч стимуляции оценивали экспрессию мРНК IL-1 β и iNOS с помощью RT-PCR (n = 2 повтора/условие в 3 независимых экспериментах).

[024] Фиг. 14 (A-D). Влияние wtTIDM и mTIDM на опосредованную poly IC активацию NF- κ B и экспрессию провоспалительных молекул в клетках микроглии. Клетки микроглии BV-2, предварительно инкубированные с 10 мкМ пептидов wtTIDM/mTIDM в течение 1 ч, стимулировали 50 мкМ poly IC. (A) Через 1 час стимуляции оценивали активацию NF- κ B в экстрактах ядер с помощью EMSA (анализ изменения электрофоретической подвижности). Через 4 часа стимуляции оценивали экспрессию мРНК IL-1 β и iNOS с помощью полуколичественной RT-PCR (B) и ПЦР в реальном времени (C, IL-1 β ; D, iNOS) (n = 2 повтора/условие в 3 независимых экспериментах), a: p менее 0,001 по сравнению с контролем; b: p менее 0,001 по сравнению с активацией согласно двухвыборочным t-критериям.

[025] Фиг. 15 (A-F). Влияние пептида wtTIDM на индуцированную фибриллярным A β - и LPS ядерную транслокацию p65 и p50 в клетках микроглии. Клетки микроглии BV-2, предварительно инкубированные с 10 мкМ пептида wtTIDM в течение 1 ч, стимулировали либо 1 мкМ фибриллярного A β 1-42 (A-C), либо 1 мкг/мл LPS (D-F) в бессывороточных условиях. Через различные минутные интервалы определяли уровни p65 и p50 (A, фибриллярный A β ; D, LPS) в экстрактах ядер с помощью вестерн-блоттинга. В качестве контроля количества нанесенного белка использовали гистон H3. Полосы сканировали и представляли значения p65/H3 (B и E) и p50/H3 (C и F) по отношению к контролю (n=2 повтора / условие в 3 независимых экспериментах) a: p менее 0,05, b: p менее 0,001 по сравнению с контролем; c: p менее 0,01 по сравнению с 30-мин стимуляцией; d: p менее 0,05 по сравнению с 15-мин стимуляцией; NS, не значимо согласно двухвыборочным t-критериям.

[026] Фиг. 16 (A-F). Пептид wtTIDM оставался неспособным ингибировать опосредованную фибриллярным пептидом A β 1-42 активацию NF- κ B и экспрессию

провоспалительных молекул в TLR2 (-/-) микроглии. Первичную микроглию, выделенную у мышей WT (A) и TLR2 (-/-) (B), подвергали воздействию пептида wtTIDM в различных концентрациях в течение 1 ч с последующей стимуляцией 1 мкМ фибриллярного A β 1-42 в бессывороточных условиях. Через 1 час стимуляции оценивали активацию NF- κ B с помощью EMSA. Микроглию WT (C и D) и TLR2 (-/-) (E и F) подвергали воздействию пептидов wtTIDM и mTIDM в различных концентрациях в течение 1 ч с последующей стимуляцией 1 мкМ фибриллярного A β 1-42 в бессывороточных условиях. Через 18 ч стимуляции определяли уровни TNF α (C и E) и IL-1 β (D и F) в надосадочной жидкости с помощью ELISA (n=2 повтора/условие в 3 независимых экспериментах); а: p менее 0,001 по сравнению с контролем; b: p менее 0,001 по сравнению с активацией согласно двухвыборочным t-критериям.

[027] Фиг. 17. После интраназального введения пептид wtTIDM проникает в гиппокамп мышей Tg. Пептид wtTIDM метили красителем Alexa 680-SE NIR (Life Technologies) в соответствии с протоколом производителя, и пептид, меченный Alexa 680 (2,5 мкг), вводили каждой мыши интраназально. Также, в качестве контроля вводили краситель Alexa 680-SE NIR. Через 60 минут мышам (n=3 в каждой группе) выполняли перфузию PBS и параформальдегидом, а область гиппокампа головного мозга сканировали с использованием инфракрасного сканера Odyssey (ODY-0854, Licor-Inc) в каналах 700 и 800 нм. Красный фон обусловлен фильтром 800 нм, тогда как зеленый сигнал обусловлен меченным Alexa 680 пептидом NBD в 700 нм-канале.

[028] Фиг. 18 (A-B). После интраназального введения пептид wtTIDM подавляет активацию NF- κ B в гиппокампе мышей Tg. Мышам Tg (в возрасте 6 месяцев) вводили пептиды wtTIDM и mTIDM (0,1 мг/кг массы тела/2 дня) интраназальным путем. После 30 дней воздействия экстракты гиппокампа мышей всех групп анализировали методом иммуноблоттинга с использованием антитела к фосфо-p65 (A). В качестве контроля количества нанесенного белка использовали актин. Полосы сканировали и представляли значения p-p65, нормализованные к актину, по отношению к нетрансгенным контролям (n = 4 в двух независимых экспериментах); а: p менее 0,001 по сравнению с нетрансгенными; b: p менее 0,001 по сравнению с Tg согласно двухвыборочным t-критериям.

[029] Фиг. 19. Интраназальное введение пептида wtTIDM, но не mTIDM подавляет экспрессию iNOS в гиппокампе мышей Tg. Мышам Tg (в возрасте 6 месяцев) вводили пептиды wtTIDM и mTIDM (0,1 мг/кг массы тела/2 дня) интраназальным путем. После 30 дней воздействия мышам подвергали эвтаназию и выполняли двойное окрашивание срезов

гиппокампа с использованием антител к Iba-1 и iNOS. Результаты представляют собой анализ двух срезов от каждой из шести разных мышей на группу.

[030] Фиг. 20 (А-В). Интраназальное введение пептида wtTIDM, но не mTIDM, снижает количество амилоидных бляшек в гиппокампе мышей Tg. (А) Мышам Tg (в возрасте 6 месяцев) вводили пептиды wtTIDM и mTIDM (0,1 мг/кг массы тела/2 дня) интраназальным путем. После 30 дней воздействия анализировали уровни белка Аβ в экстрактах гиппокампа мышей всех групп (n=4 на группу) с помощью вестерн-блоттинга с использованием mAb 82E1. В качестве контроля количества нанесенного белка использовали актин. (В) Полосы сканировали и представляли значения Аβ, нормализованные к актину, по отношению к нетрансгенным контролям. Результаты анализировали с помощью двухвыборочного t-критерия.

[031] Фиг. 21 (А-Ф). Интраназальное введение пептида wtTIDM, но не mTIDM, снижает уровни Аβ1-40 и Аβ1-42 в сыворотке и гиппокампе мышей Tg. Мышам Tg (в возрасте 6 месяцев) вводили пептиды wtTIDM и mTIDM (0,1 мг/кг веса тела/2 дня) интраназальным путем. После 30 дней воздействия проводили количественный анализ Аβ1-40 (А, С и Е) и Аβ1-42 (В, D и F) в сыворотке (А и В) и экстрактах ткани гиппокампа в TBS (С и D) и (TBS (солевой Трис-буфер) + Тритон X-100) (Е & F) методом ELISA. Шесть мышей (n=6 на группу) использовали в двух независимых экспериментах; a: p менее 0,01 и c: p менее 0,001 по сравнению с нетрансгенными; b: p менее 0,01 и d: p менее 0,001 по сравнению с Tg согласно двухвыборочным t-критериям.

[032] Фиг. 22 (А-В). Интраназальное введение пептида wtTIDM, но не mTIDM, снижает фосфорилирование белка тау в гиппокампе трансгенных мышей. (А) Трансгенным мышам (в возрасте 6 месяцев) вводили пептиды wtTIDM и mTIDM (0,1 мг/кг массы тела/2 дня) интраназальным путем. После 30 дней воздействия экстракты гиппокампа мышей всех групп (n=4 на группу) анализировали методом вестерн-блоттинга с использованием антител к фосфорилированному и общему белку тау. (В) Полосы сканировали и представляли значения (P-Tau/Tau) по сравнению с нетрансгенными контролями. Результаты анализировали с помощью двухвыборочного t-критерия.

[033] Фиг. 23 (А-D). Интраназальное введение пептидов wtTIDM и mTIDM не снижает двигательную активность мышей Tg. Мышам Tg (в возрасте 6 месяцев) вводили пептиды wtTIDM и mTIDM (0,1 мг/кг массы тела/2 дня) интраназальным путем. После 30 дней воздействия у мышей исследовали общую двигательную активность (А - количество движений; В - активность в горизонтальной плоскости; С - время отдыха; D - количество

стереотипий). В каждой группе использовали восемь мышей ($n = 8$ в двух независимых экспериментах). NS, не достоверно.

[034] Фиг. 24 (А-Н). Интраназальное введение пептида wtTIDM не снижает образования бляшек и не улучшает память у мышей FAD5X Tg, лишенных Tlr2 (Tg-Tlr2 -/-). А) Мышей Tlr2 -/- скрещивали с мышами Tg (мыши 5XFAD), приведена репрезентативная ПЦР для оценки экспрессии трансгенной ДНК Tlr2, App695 и Psen1 у нетрансгенных мышей, трансгенных мышей (5XFAD), Tg-Tlr2 -/- (F7) и Tlr2 -/- в возрасте 6 месяцев. Средняя масса тела (В) и масса мозга во влажном состоянии (С) для нетрансгенных мышей, мышей Tg, Tg-Tlr2-/- и Tlr2-/. При измерении массы головного мозга во влажном состоянии удаляли обонятельные доли и ствол мозга. Мышам Tg-Tlr2 -/- (в возрасте 6 месяцев) вводили пептид wtTIDM (0,1 мг/кг массы тела/2 дня) интраназальным путем. После 30 дней воздействия срезы гиппокампа окрашивали с использованием mAb 6E10 (D). Амилоидные бляшки подсчитывали на двух срезах (два изображения на слайд) каждой из четырех разных мышей на группу (E). Мышей тестировали в лабиринте Барнса (F – траектория движения; G – время задержки; H - количество допущенных ошибок). В каждой группе использовали по четыре мыши ($n = 4$). NS, не достоверно согласно двухвыборочным t-критериям.

[035] Фиг. 25 (А-D). Анализ отпечатков лап мышей с ЭАЭ после воздействия пептидов wtTIDM и mTIDM. На прогулочную дорожку накладывали полоски белой бумаги и с использованием черных чернил получали на бумаге отпечатки лап мышей разных групп (А, контроль; В, ЭАЭ; С, ЭАЭ + wtTIDM; D, ЭАЭ + mTIDM). Всего в каждой группе анализировали 30-40 следов. На основе полученных следов мышей определяли четыре различных характеристики отпечатков лап, а именно, длину шага (SL), длину отпечатка (PL), ширину шага (SWL) и размах пальцев (TS), выраженные в сантиметрах. В то время как SL обозначает расстояние между передним краем двух последовательных отпечатков одной и той же лапы, SWL обозначает расстояние между лапами, перпендикулярное направлению перемещения, а PL обозначает длину отпечатка. При этом, TS означает расстояние между первым и пятым пальцами отпечатка лапы. В двух независимых экспериментах использовали шесть мышей ($n=6$ на группу).

[036] Фиг. 26 (А-D). Анализ отпечатков лап мышей с КИА после воздействия пептидов wtTIDM и mTIDM. На прогулочную дорожку накладывали полоски белой бумаги и с использованием черных чернил получали отпечатки лап мышей разных групп (А, контроль; В, КИА; С, КИА + wtTIDM; D, КИА + mTIDM) на бумаге. Всего в каждой группе анализировали 30-40 отпечатков. На основе полученных следов мышей

определяли четыре различных характеристики отпечатков лап (SL, PL, SWL и TS), выраженные в сантиметрах. Шесть мышей ($n = 6$ на группу) использовали в двух независимых экспериментах.

[037] Фиг. 27. Морфология фибриллярных пептидов A β 1-42. Фибриллярные пептиды A β 1-42 (Bachem Bioscience) получали путем инкубации 50 мкМ свежерастворенных пептидов в стерильной дистиллированной воде при 37°C в течение 5 дней. Морфологию фибриллярных пептидов A β 1-42 исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

[038] Фиг. 28 (A-B). При интраназальном введении пептид wtTIDM ослабляет воспаление микроглии в черной субстанции мышей A53T α -syn Tg. Мышам A53T (самцы; возраст 9 месяцев; $n = 8$ на группу) вводили пептиды TIDM интраназально в дозе 0,1 мг/кг массы тела/день в течение 30 дней с последующим иммунофлуоресцентным анализом срезов черной субстанции с двойным окрашиванием антителами к Iba-1 и индуцибельной синтазе оксида азота (iNOS) (A). Увеличенные изображения выбранной области показаны в нижнем ряду. Клетки iNOS (+ve) подсчитывали на двух срезах от каждой из шести мышей в группе и представляли как число клеток/мм².

[039] Фиг. 29 (A-B). При интраназальном введении пептид wtTIDM стимулирует экспрессию аргиназы-1 в микроглии черной субстанции мышей A53T α -syn Tg. Мышам A53T (самцы; возраст 9 месяцев; $n = 6$ на группу) вводили пептиды TIDM интраназальным путем в дозе 0,1 мг/кг массы тела/день в течение 30 дней с последующим иммунофлуоресцентным анализом срезов черной субстанции с двойным окрашиванием антителами к Iba-1 и аргиназе-1 (ARG1) (A). Увеличенные изображения выбранной области показаны в нижнем ряду. Клетки ARG-1 (+ve) подсчитывали на двух срезах от каждой из шести мышей в группе и представляли как число клеток/мм².

[040] Фиг. 30 (A-C). При интраназальном введении пептид wtTIDM снижает α -синуклеинопатию в черной субстанции мышей A53T α -syn Tg. Мышам A53T (самцы; возраст 9 месяцев; $n = 6$ на группу) вводили пептиды TIDM интраназальным путем в дозе 0,1 мг/кг массы тела/день в течение 30 дней с последующим анализом экстрактов черной субстанции методом вестерн-блоттинга с использованием антитела к α -syn (A). Полосы сканировали и представляли относительно контроля A53T (B, мономерный α -syn; C, олигомерный α -syn). Результаты представляют собой среднее значение \pm SEM (стандартная ошибка среднего значения) для шести мышей в группе.

[041] Фиг. 31 (A-D). При интраназальном введении пептид wtTIDM снижает α -синуклеинопатию в черной субстанции мышей A53T α -syn Tg. Мышам A53T (самцы;

возраст 9 месяцев; n = 6 на группу) вводили пептиды TIDM интраназальным путем в дозе 0,1 мг/кг массы тела/день в течение 30 дней с последующим иммунофлуоресцентным анализом срезов черной субстанции с двойным окрашиванием антителами к TH и α -syn (антитело mJf1) (A). Увеличенные изображения выбранной области показаны в крайнем левом столбце. Рассчитывали общую площадь (B), средний размер (C) и интегральную плотность (D) α -syn-положительных клеточных включений. Анализировали пять клеток в каждом из двух срезов черной субстанции у шести мышей на группу.

[042] Фиг. 32 (A-B) При интраназальном введении пептид wtTIDM снижает α -синуклеинопатию в черной субстанции мышей A53T α -syn Tg. Мышам A53T (самцы; возраст 9 месяцев; n = 6 на группу) вводили пептиды TIDM интраназальным путем в дозе 0,1 мг/кг массы тела/день в течение 30 дней с последующим иммунофлуоресцентным анализом срезов черной субстанции с двойным окрашиванием антителами к микроглиальному маркеру Iba-1 и α -syn (антитело mJf1) (A). Увеличенные изображения выбранной области показаны в крайнем левом столбце. Подсчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) (α -syn+Iba-1)-положительных клеточных включений. Анализировали пять клеток в каждом из двух срезов черной субстанции у шести мышей на группу.

[043] Фиг. 33 (A-E). При интраназальном введении пептид wtTIDM улучшает двигательную активность мышей A53T α -syn Tg. Мышам A53T (самцы; возраст 9 месяцев; n = 6 на группу) вводили пептиды TIDM интраназально в дозе 0,1 мг/кг массы тела/день в течение 30 дней с последующим мониторингом двигательной активности с помощью системы для наблюдения за активностью в «открытом поле» Ethovision XT 13.0 (Noldus) (A, траектория движения; B, совокупная продолжительность движения; C, расстояние; D, скорость; E, вращающийся стержень). Результаты представляют собой среднее значение + SEM для шести мышей на группу.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Определения

[044] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится это изобретение. В случае конфликта настоящий документ, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Предпочтительные способы и материалы описаны ниже, хотя при осуществлении или при тестировании настоящего изобретения могут быть использованы способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе.

[045] Использование терминов в единственном числе и подобных ссылок в контексте описания изобретения (особенно в контексте приведенной ниже формулы изобретения) следует понимать, как охватывающее как единственное, так и множественное число, если не указано иное или если это явно не противоречит контексту. Перечисление диапазонов значений в данном документе просто предназначено для использования в качестве сокращенного метода индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в этот диапазон, если здесь не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было отдельно изложено в данном документе. Все способы, описанные здесь, могут выполняться в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе или иным образом не противоречит контексту. Использование любых возможных примеров или иллюстративных терминов (например, «такой как», «например»), представленных в данном документе, предназначено просто для лучшего освещения изобретения и не налагает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Никакие формулировки в описании не должны толковаться как указывающие, что какой-либо не заявленный элемент является существенным для практического применения изобретения.

[046] Термин «пациент» относится к человеку или животному.

[047] Термин «терапевтический эффект», используемый в данном документе, означает эффект, который вызывает, облегчает или иным образом вызывает улучшение патологических симптомов, прогрессирования заболевания или физиологических состояний, связанных с расстройством или сопротивляемостью к нему, например, неврологическим, аутоиммунным или другим раскрытым здесь человека или ветеринарного пациента. Термин «терапевтически эффективное количество», используемый в отношении лекарственного средства, означает количество лекарственного средства, которое придает терапевтический эффект человеку или ветеринарному пациенту.

Композиции и способы, избирательно нарушающие взаимодействие между TLR2 и MyD88, подавляют воспаление и смягчают неврологические и другие патологические состояния.

[048] Заявитель продемонстрировал, что уровни TLR2 и MyD88 во фронтальной коре и гиппокампе пациентов с БА и мышей 5XFAD *in vivo* повышены. Вариантов специфического воздействия на индуцированный TLR2 не существует. Заявитель сконструировал пептид, соответствующий взаимодействующему с TLR2 домену MyD88 (TIDM), который специфически ингибировал индуцированную передачу сигналов TLR2 и

опосредованное фибриллярным A β воспаление микроглии, не снижая активацию микроглии, опосредованную двуцепочечной РНК, бактериальным LPS, флагеллином, CpG ДНК и 1-метил-4-фенилпиридином (MPP+). Более того, интраназальное введение пептида TIDM привело к снижению активации микроглии гиппокампа, снижению нагрузки A β , подавление апоптоза нейронов и улучшение памяти и обучения у мышей 5XFAD, что подчеркивает терапевтический потенциал пептида TIDM при БА.

[049] Настоящее изобретение в целом относится к композициям и способам лечения расстройств, при которых повышенная активация TLR2 играет роль в патогенезе заболевания. Один вариант осуществления способа включает введение терапевтически эффективного количества композиции, включающей пептидную последовательность, соответствующую взаимодействующему с TLR2 домену MyD88 (TIDM), которая связывается с петлей BB только TLR2, но не других TLR, и нарушает ассоциирование TLR2 с MyD88. Композиция ингибирует сигнальные пути, запускаемые только TLR2.

[050] В одном воплощении предложен способ лечения нарушения у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей пептид, содержащий взаимодействующий с TLR2 домен MyD88. Терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое по меньшей мере снижает передачу сигналов TLR2-MyD88. Нарушение представляет собой нарушение, при котором передача сигналов TLR2-MyD88 играет роль в патогенезе заболевания. Например, нарушение может быть неврологическим расстройством, таким как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменция с тельцами Леви, болезнь Хантингтона или множественная системная атрофия. В другом воплощении нарушение представляет собой аутоиммунное заболевание, такое как рассеянный склероз или ревматоидный артрит. В еще одном воплощении нарушение представляет собой бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию, паразитарную инфекцию, вирусную инфекцию, сепсис или абсцесс мозга.

[051] В одном воплощении пептид, включающий взаимодействующий с TLR2 домен MyD88, включает последовательность PGANQK (SEQ ID NO: 1). В других воплощениях пептид содержит от 6 до 10 аминокислот, включая SEQ ID NO: 1. Например, пептид может содержать 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, включая SEQ ID NO: 1. В другом воплощении пептид включает менее 12, 13, 14 или 15 аминокислот.

[052] В другом воплощении пептид связан с вектором доставки, обеспечивающим внутриклеточную доставку по меньшей мере в одну из клеток и прохождение через гематоэнцефалический барьер. Вектор доставки может быть пептидом другого состава. В

одном воплощении вектор доставки представляет собой гомеодомен Antennapedia. Например, гомеодомен Antennapedia связан с С-концом пептида, содержащего TLR2-ингибирующий домен MyD88. В одном предпочтительном воплощении пептидная последовательность представляет собой drqikiwfnrrmkwkkpgahqk (SEQ ID NO: 2).

[053] Расшифровка механизма процесса заболевания при БА и разработка эффективных нейропротекторных терапевтических подходов для замедления или остановки прогрессирования заболевания имеют первостепенное значение. Известно, что TLR участвуют во врожденном иммунном ответе, распознавая молекулярные паттерны, связанные с патогенами, и молекулярные паттерны, связанные с эндогенными повреждениями (15). Микроглия в ЦНС экспрессирует большинство известных на сегодняшний день TLR, и ранее авторы изобретения показали, что из различных TLR фибриллярному A β 1-42 для стимуляции воспаления микроглии требуется TLR2 (17). Эта находка получила дальнейшее подтверждение в нескольких исследованиях, продемонстрировавших взаимодействие TLR2 непосредственно с A β или опосредовано через CD14, соответственно (18, 19, 33). В данном документе описана важная роль TLR2 в болезни Альцгеймера. Авторы изобретения обнаружили более высокие уровни TLR2 в гиппокампе и префронтальной коре головного мозга людей с деменцией при БА по сравнению с людьми с ЛКН или ОКН. Хотя в некоторых исследованиях сообщалось об участии TLR4 в опосредованной A β активации микроглии, авторы изобретения не обнаружили более высоких уровней TLR4 в ЦНС у лиц с деменцией при БА, что указывает на специфичность данной находки. Сообщалось, что полиморфизм Tlr2 влияет на подверженность БА (34), и РВМС пациентов с БА также экспрессируют повышенный уровень TLR2 (35). Авторы изобретения также наблюдали активацию MyD88 в ЦНС у людей с деменцией БА, согласованно с TLR2, и что интересно, как TLR2, так и MyD88 положительно коррелировали с оценкой по шкале Браака. MyD88 также отрицательно коррелировал с когнитивной функцией.

[054] Хотя TLR2 является важным компонентом врожденного иммунитета, специфический ингибитор для воздействия на TLR2 отсутствовал. Таким образом, благодаря структурному анализу взаимодействия между TLR2 и MyD88 авторы изобретения сконструировали пептид, соответствующий взаимодействующему с TLR2 домену MyD88 (TIDM) из петли CD. Поскольку петля BB TLR2 взаимодействует с петлей CD MyD88, пептид wtTIDM нарушает ассоциацию между TLR2 и MyD88. Интересно, что пептид wtTIDM пристыковывается таким образом, что он специфически взаимодействует с петлей BB TLR2, но не других TLR, тем самым ингибируя сигнальные пути,

запускаемые только TLR2. Поскольку пептид wtTIDM специфически взаимодействует с TLR2, а фибриллярному A β 1-42 для активации микроглии требуется TLR2 (17, 18), пептид wtTIDM ингибирует активацию NF- κ B микроглии и воспаление, вызванные только LTA (известным агонистом TLR2) и фибриллярным A β 1-42, но не MPP+, поли IC (агонистом TLR3), LPS (агонистом TLR4), флагеллином (агонистом TLR5) и CpG ДНК (агонистом TLR9), что указывает на избирательное ингибирование пути TLR2 пептидом wtTIDM. Более того, пептид wtTIDM не работает в отсутствие TLR2, что согласуется с нарушением взаимодействия TLR2:MyD88.

[055] Немодифицированные пептиды обычно имеют короткие периоды полужизни из-за быстрого протеолиза в крови, почках или печени и/или ускоренного почечного клиренса, представляющими собой основные проблемы большинства пептидных препаратов. Однако, было показано, что проникающий в клетки пептид, полученный из гомеодомена антеннапедии дрозофилы (гомеодомен антеннапедии), пенетратин, будучи богат положительно заряженными остатками, помогает транспортным пептидам перемещаться в клетки, тем самым позволяя избежать быстрого протеолиза (36, 37). Кроме того, немодифицированные пептиды не проникают в ЦНС, и авторы изобретения заметили, что пенетратин может нарушать плотную эндотелиальную сеть и переносить пептиды через ГЭБ (23, 38). Таким образом, авторы изобретения протестировали эффективность пенетратин-содержащего пептида wtTIDM на мышях Tg и продемонстрировали, что пептид wtTIDM снижает воспаление микроглии, снижает апоптоз нейронов и защищает когнитивные функции при БА. Выводы, сделанные авторами изобретения, основаны на следующем. Во-первых, после интраназального введения пептид TIDM поступал в гиппокамп. Во-вторых, пептид wtTIDM, но не mTIDM, ингибировал активацию NF- κ B гиппокампа и воспаление микроглии у мышей Tg. В-третьих, пептид wtTIDM, но не mTIDM, защищал нейроны гиппокампа и белки рецепторов NMDA и AMPA при болезни Альцгеймера у мышей Tg. В-четвертых, пептид wtTIDM, но не mTIDM, также улучшал обучение пространственной ориентации и память у мышей Tg. Кроме того, авторы изобретения не заметили никаких побочных эффектов, связанных с лекарством (например, выпадения волос, потери аппетита, потери веса, нежелательной инфекции и т.д.) ни у одной из мышей, получавших TIDM в ходе исследования. Однако, в одном исследовании было показано, что генетический нокдаун TLR2 ускоряет снижение когнитивных функций у мышей APP Tg (39). Это определено возможно, поскольку полный нокдаун TLR2 разрушает как базальную, так и индуцированную передачу сигнала TLR2. Более того, было показано, что TLR2 функционирует как через MyD88-зависимые,

так и независимые пути (40, 41), и прелесть настоящего открытия заключается в том, что T1DM пептид нацелен только на MyD88-зависимый индуцированный сигнальный путь TLR2, не подавляя базальную активность TLR2.

[056] Независимо от того, связаны ли бляшки непосредственно с потерей памяти при БА или нет, амилоидные бляшки являются одним из патологических признаков при БА, и также важно видеть, что под воздействием пептида wtT1DM, но не mT1DM, происходит уменьшение бляшек в гиппокампе мышей Tg. Однако, в настоящее время не известно, как воздействие пептида wtT1DM связано с уменьшением бляшек. Бета-секретаза 1 (BACE1) является ключевым ферментом, который инициирует образование A β , и было показано, что ингибирование NF- κ B предотвращает A β -индуцированную трансактивацию промотора BACE1 и что сверхэкспрессия β APP дикого типа или с мутацией Swedish не изменяют трансактивацию конструкций промотора BACE1, лишенных NF- κ B-чувствительного элемента (42). Поскольку пептид wtT1DM подавляет активацию NF- κ B, индуцированную фибриллярным A β , возможно, что пептид wtT1DM снижает количество бляшек у мышей Tg за счет ослабления пути NF- κ B-BACE1.

[057] Эффективной терапии для остановки прогрессирования БА не существует. Введение различных ингибиторов холинэстеразы, таких как Aricept®, Exelon®, Razadyne®, Cognex® и т.д. было стандартным лечением БА (43). Однако, это часто связано с рядом побочных эффектов и неудовлетворительными результатами. В данном изобретении заявитель продемонстрировал, что уровни TLR2 и MyD88 повышаются в ЦНС пациентов с БА, что TLR2 и MyD88 положительно коррелируют с оценкой по шкале Браака, что пептид wtT1DM нацелен только на TLR2, не подавляя другие сигнальные пути, и что после интраназального введения пептид wtT1DM достигает гиппокампа, подавляет активацию NF- κ B в гиппокампе, ингибирует воспаление микроглии, снижает количество бляшек в головном мозге, уменьшает апоптоз нейронов и защищает научение и память у мышей Tg. Эти результаты позволяют предположить, что избирательное воздействие на TLR2 с помощью пептида wtT1DM при интраназальном введении может иметь терапевтическое значение при БА. Более того, пептид wtT1DM также снижал функциональные нарушения и подавлял процесс заболевания при ЭАЭ и КИА у мышей. Следовательно, помимо БА, пептид T1DM может также оказаться перспективным при ряде других заболеваний.

Фармацевтические композиции и способы введения

[058] Раскрытые в данном документе способы лечения могут включать любое количество способов введения пептидной композиции или фармацевтических композиций пептидной

композиции. Способы введения могут включать таблетки, пилюли, драже, твердые и мягкие желатиновые капсулы, гранулы, пеллеты, водные, липидные, масляные или другие растворы, эмульсии, такие как эмульсии масло в воде, липосомы, водные или масляные суспензии, сиропы, эликсиры, твердые эмульсии, твердые дисперсии или диспергируемые порошки. Для приготовления фармацевтических композиций для перорального введения пептидная композиция может быть смешана с широко известными и используемыми адьювантами и эксципиентами, например, такими как камедь, тальк, крахмал, сахара (например, маннитоза, метилцеллюлоза, лактоза), желатин, поверхностно-активные вещества, стеарат магния, водные или неводные растворители, производные парафина, сшивающие агенты, диспергирующие вещества, эмульгирующие вещества, смазывающие вещества, консерванты, корригенты (например, эфирные масла), усилители растворимости (например, бензил бензоат или бензиловый спирт) или усилители биодоступности (например, GELUCIRE). В фармацевтической композиции агент также может быть диспергирован в композиции из микрочастиц, например, наночастиц.

[059] Для парентерального введения пептидная композиция или фармацевтические композиции пептидной композиции могут быть растворены или суспендированы в физиологически приемлемом разбавителе, например, таком как, вода, буфер, масла с или без солюбилизирующих веществ, поверхностно-активных веществ, диспергирующих веществ или эмульгирующих веществ. Например, в качестве масел можно использовать оливковое масло, арахисовое масло, хлопковое масло, соевое масло, касторовое масло и кунжутное масло, без ограничения. В более общем смысле, для парентерального введения агент или фармацевтические композиции агента могут быть в форме водного, липидного, масляного или другого типа раствора или суспензии, или даже вводиться в форме липосом или нано-суспензий.

[060] В способах лечения, предусмотренных настоящим описанием, пептидную композицию можно применять отдельно или в композициях вместе с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» означает нетоксичный, инертный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательное вещество любого типа. Некоторыми примерами материалов, которые могут служить фармацевтически приемлемыми носителями, являются сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, такие как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный

трагакант; солод; желатин; тальк; такие эксципиенты как масло какао и воски для суппозиториев; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло; сафлоровое масло; кунжутное масло; оливковое масло; кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический физиологический раствор; раствор Рингера; этиловый спирт и фосфатные буферные растворы, а также другие нетоксичные совместимые смазывающие вещества, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красители, разделяющие вещества, покровные вещества, подсластители, корригенты вкуса и запаха, консерванты и антиоксиданты могут присутствовать в составе, в зависимости от суждения составителя композиции. Другие подходящие фармацевтически приемлемые эксципиенты описаны в документе «Remington's Pharmaceutical Sciences», Mack Pub. Co., New Jersey, 1991, содержание которого непосредственно включено в данное описание путем ссылки.

[061] В некоторых воплощениях пептидную композицию можно вводить перорально людям и другим животным. Композиция может быть приготовлена для введения, и способы приготовления хорошо известны в данной области техники (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Company, Easton, PA, 19 Edition (1995)).

[062] В некоторых воплощениях составы могут представлять собой составы с пролонгированным высвобождением, что означает, что они стабильно высвобождают пептидную композицию в течение длительного периода времени. В других воплощениях составы могут быть составами с отсроченным высвобождением, что означает, что они высвобождают пептидную композицию в более позднее время, чем сразу после ее введения.

[063] Фармацевтические композиции для применения в соответствии с настоящим описанием могут быть в форме стерильных, апирогенных жидких растворов или суспензий, покрытых оболочкой капсул, лиофильно высушенных порошков или других форм, известных в данной области техники.

[064] Твердые лекарственные формы для перорального применения включают капсулы, таблетки, пилюли, порошки и гранулы. В таких твердых лекарственных формах активное соединение смешано по меньшей мере с одним инертным фармацевтически приемлемым эксципиентом или носителем, таким как цитрат натрия или дикальцийфосфат, и/или (а) наполнителями или добавками, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит

и кремниевая кислота, (б) связывающими веществами, например, такими как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидинон, сахароза и гуммиарабик, (в) увлажняющими веществами, такими как глицерин, (г) дезинтегрирующими агентами, такими как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия, (д) агентами, замедляющими растворение, такими как парафин, (е) ускорителями абсорбции, такими как соединения четвертичного аммония, (ж) смачивающими веществами, например, такими как ацетиловый спирт и моностеарат глицерина, (з) абсорбентами, такими как каолин и бентонитовая глина, и (и) смазывающими веществами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, натрия лаурилсульфат и их смеси. В случае капсул, таблеток и пилюль лекарственная форма может также содержать буферные агенты.

[065] Твердые композиции подобного типа также могут быть использованы в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах с использованием таких эксципиентов, как лактоза или молочный сахар, а также высокомолекулярных полиэтиленгликолей и т.п.

[066] Твердые лекарственные формы в виде таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул могут быть приготовлены с покрытиями и оболочками, такими как кишечнорастворимые покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области составления фармацевтических препаратов. Возможно, они могут содержать замутняющие вещества, а также могут иметь такой состав, который высвобождает активный ингредиент (ингредиенты) исключительно или предпочтительно в определенной части кишечного тракта, возможно, отсроченно. Примеры композиций для инкапсулирования, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски.

[067] Активные соединения также могут быть в микроинкапсулированной форме с одним или несколькими эксципиентами, как указано выше. Твердые лекарственные формы в виде таблеток, драже, капсул, пилюль и гранул могут быть приготовлены с покрытиями и оболочками, такими как кишечнорастворимые покрытия, покрытия, контролирующее высвобождение, и другие покрытия, хорошо известные в области составления фармацевтических препаратов. В таких твердых лекарственных формах активное соединение может быть смешано по меньшей мере с одним инертным разбавителем, таким как сахароза, лактоза или крахмал. Такие лекарственные формы могут также содержать, как это принято на практике, дополнительные вещества, кроме инертных разбавителей, например, смазывающие вещества для таблетирования и другие

вспомогательные вещества для таблетирования, такие как стеарат магния и микрокристаллическая целлюлоза. В случае капсул, таблеток и пилюль лекарственные формы могут также содержать буферные агенты. Возможно, они могут содержать замутняющие вещества, а также могут иметь такой состав, который высвобождает активный ингредиент (ингредиенты) исключительно или предпочтительно в определенной части кишечного тракта, возможно, отсроченно. Примеры композиций для инкапсулирования, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски.

[068] Жидкие лекарственные формы для перорального введения включают фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. В дополнение к активным соединениям жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области техники, например, такие как вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат (EtOAc), бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана, а также их смеси. Помимо инертных разбавителей, пероральные композиции могут также включать адьюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подсластители, корригенты вкуса и запаха.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 – Субъекты-люди

[069] В анализ вошли тридцать три участника клинического исследования Rush Religious Order Study (RROS) (44, 45) с прижизненным клиническим диагнозом отсутствия когнитивных нарушений (ОКН; n = 12), легкими когнитивными нарушениями (ЛКН; n = 11) и БА (n = 10) (таблица S1). Все участники согласились на ежегодную подробную клиническую оценку и донорство мозга в случае смерти.

Пример 2 - Клиническая и нейропатологическая оценка

[070] Клинические критерии диагностики ОКН, ЛКН и БА описаны в других источниках (44, 46). Заключительное клиническое и нейропсихологическое тестирование, которое включало краткую оценку психического состояния (MMSE) и панель из 19 когнитивных тестов, было выполнено в течение 2 лет до смерти. Суммарный когнитивный z-индекс (GCS), включающий 19 тестов, был известен для всех случаев (47). Определение стадии

нейрофибриллярных клубков (НФК) (48) по Брааку выполняли, как описано ранее (44). Субъекты с патологическим диагнозом, отличным от БА (например, инсульт, болезнь Паркинсона, деменция с тельцами Леви), исключались из исследования. Данные исследования тканей и клинические данные защищены правилами о конфиденциальности медицинской информации.

Пример 3 - Образцы тканей и вестерн-блоттинг

[071] Верхнюю лобную часть коры головного мозга (область Бродмана 9) отделяли от белого вещества при вскрытии на сухом льду для предотвращения оттаивания и хранили при -80°C до анализа. Ткань гомогенизировали и обрабатывали, как описано ранее (22). Экстракты тканей и клеточные лизаты (30 мкг) подвергали электрофорезу в 8 или 10% Bis-Tris полиакриламидных гелях в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) в непрерывной буферной системе, переносили на нитроцеллюлозные мембраны (BioRad) с помощью камеры для полусухого переноса (Pierce) и окрашивали антителами, как описано ранее (22, 49-51). Полученные двумерные изображения анализировали с помощью ImageJ (NIH) и нормализовали к β -актину (для контроля количества нанесенного белка).

Пример 4 - Получение TLR2 с С-концевой меткой (сTLR2)

[072] Полноразмерная конструкция TLR2 (pLenti-с-myc-DDK / tlr2) была приобретена у Origene. Меченный с-myc сTLR2 (640-784 аминокислоты) клонировали в лентивирусный вектор с использованием набора для клонирования TOPO TA (K5310-00; Life technologies). Вкратце, последовательность Козак включали в 5' направлении от С-концевого TIR домена TLR2. Затем сTLR2 клонировали в лентивирусный вектор с последующей упаковкой в лентивирус с использованием клеток HEK293FT. Через 48 часов среду собирали и концентрировали с помощью концентратора Lenti-X (каталожный номер 631231; Clontech). Этот концентрированный лентивирусный бульон использовали для вирусной трансдукции. Белок сTLR2 выделяли из лизата клеток HEK293, пропуская через колонку для аффинной очистки белков, содержащих эпитоп Myc. Очищенный белок обессоливали и концентрировали с использованием системы фильтрации с отсечкой по молекулярной массе 10 кДа.

Пример 5 – Поверхностный плазмонный резонанс

[073] Для анализа связывания TLR2 с пептидами TIDM проводили эксперименты на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием прибора Reichert 4SPR (Reichert Technologies, Buffalo, NY). Анализ связывания выполняли с использованием для захвата TLR2 золотого сенсор-чипа, покрытого карбоксиметил-

декстраном с молекулярной массой 500 кДа (Reichert Inc.). Иммобилизацию белка проводили при скорости тока 30 мкл/мин в PBS в течение 3 минут, используя 0,8 мг/мл раствор TLR2. Для ассоциации аналитов инжектировали различные концентрации пептидов wtTIDM и mTIDM в проточном буфере PBS вводили в течение 2,5 мин при скорости 30 мкл/мин с последующей фазой диссоциации 3 мин. Поверхность сенсора регенерировали после каждого цикла диссоциации, пропуская буфер со скоростью 40 мкл/мин в течение минимум 15 минут. Сигналы, полученные для поверхности, с которой был связан TLR2, вычитали из сигналов, полученных для референтной ячейки, в соответствии со стандартной процедурой с использованием системного программного обеспечения. Для определения аффинности связывания TLR2 с пептидами wtTIDM и mTIDM анализировали зависимость полученного сигнала от концентрации.

Пример 6 - Анализ теплового сдвига

[074] Анализы теплового сдвига выполняли в реальном времени в стандартном термоциклере Applied Biosystems 7500, как описано ранее (52, 53). Для каждой реакции очищенный белок (от 0,5 мкг до 1 мкг) добавляли к 18 мкл буфера для анализа теплового сдвига, поставляемого с набором, и 1-2 мкл красителя. Реакцию проводили в 96-луночном планшете для ПЦР в темноте и затем помещали в термоциклер с использованием двухэтапной программы [1 цикл (25°C в течение 2 минут); 70 циклов (27°C в течение 15 секунд, 26°C в течение 1 мин); автоматическое увеличение на 1°C для обоих этапов]. Устанавливали фильтр для ROX, фильтры для гасителя и пассивного стандарта не использовали.

Пример 7 – Компьютерный анализ структуры

[075] Для моделирования структур TIR-доменов различных TLR (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 и TLR9) авторы изобретения использовали Deep View 3.7β2, онлайн инструмент для анализа макромолекул ExPASy (от англ. Expert Protein Analytical System). Чтобы оценить качество смоделированных структур, авторы изобретения использовали инструмент QMEAN (от англ. Quality Measurement Analysis), инструмент для комплексной оценки, который оценивает общее качество всей модели, а также проводит локальный анализ каждого остатка в различных участках в составе модели. Взаимодействие на уровне остатков оценивали по потенциалу атомов Cβ, а дальние взаимодействия валидировали по потенциалу всех атомов. Сольватационный потенциал использовали для анализа глубины погруженности остатков. Локальную геометрию каждой структуры анализировали по торсионным углам, образуемым тремя последовательно расположенными аминокислотами. Положение доменов TIR, состыкованных с пептидом

wtTIDM или mTIDM, получали с помощью инструмента *rydock* для жесткого докинга белок-белок.

Пример 8 - Животные и интраназальная доставка пептидов TIDM

[076] Трансгенных мышей B6SJL-Tg (APPSwFILon, PSEN1*M146L*L286V)6799Vas/J (5XFAD или обозначаемых в данном документе как Tg) приобретали в Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Самцам мышей Tg в возрасте 6 месяцев вводили интраназально пептиды wtTIDM или mTIDM (0,1 мг / кг массы тела / 2 дня) в течение 30 дней. Вкратце, пептиды TIDM растворяли в 5 мкл физиологического раствора, мышей держали в положении лежа на спине и физиологический раствор вводили в одну ноздрю с помощью дозатора.

Пример 9 - Индукция хронического ЭАЭ и воздействие пептидами TIDM

[077] Самцов мышей C57BL/6 иммунизировали 100 мкг MOG35-55, как описано авторами изобретения (54, 55). Мыши также получали две дозы токсина коклюша (150 нг/мышь) в 0 и 2 дни после иммунизации (dpi). Начиная с 10 дня после иммунизации, мыши получали пептиды wtTIDM или mTIDM (0,1 мг/кг веса тела в день) интраназально.

Пример 10 - Индукция коллаген-индуцированного артрита (КИА) и воздействие пептидами TIDM

[078] Самцов мышей DBA/1 J (в возрасте 8-9 недель) иммунизировали внутрикожно у основания хвоста 100 мкг бычьего коллагена II типа, эмульгированного в неполном адьюванте Фрейнда, и *M. tuberculosis* H37RA. На 21 день после иммунизации мышам проводили бустерную инъекцию 100 мкг бычьего коллагена II типа внутривентрально. Начиная с 29 дня после иммунизации мышам вводили пептиды wtTIDM или mTIDM (1 мг/кг массы тела/день) внутривентрально.

Пример 11. Получение фибриллярного A β 1-42.

[079] Фибриллярный A β 1-42 (Anaspec, Fremont, CA) получали инкубированием 50 мкМ свежесольбутилизованных пептидов в стерильной дистиллированной воде при 37°C в течение 5 дней (56). См. Фиг. 27, где показана морфология фибриллярного A β 1-42.

Пример 12 - Полуколичественный анализ RT-PCR

[080] Общую РНК выделяли из гиппокампа с использованием реагента Ultraspec-II RNA (Biotecx Laboratories, Inc., Houston, TX) в соответствии с протоколом производителя. Чтобы удалить какие-либо примеси геномной ДНК, общую РНК обрабатывали ДНКазой. RT-PCR проводили, как описано ранее (23, 57), с использованием набора для RT-PCR (Clontech, Mountain View, CA).

Пример 13 - Анализ ПЦР в реальном времени

[081] РНК, обработанную ДНКазой, анализировали с помощью ПЦР в реальном времени в системе обнаружения последовательностей ABI-Prism7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA), как описано ранее (23, 57).

Пример 14 - Анализ изменения электрофоретической подвижности (EMSA)

[082] Выделяли экстракты ядер и проводили EMSA, как описано ранее (22, 23).

Пример 15 - Лабиринт Барнса и Т-лабиринт:

[083] Эксперименты с лабиринтом проводили, как описано авторами изобретения (52, 57).

Вкратце, мышей тренировали в лабиринте Барнса в течение 2 дней подряд, а затем исследовали на 3 день. После каждой тренировки лабиринт и туннель-убежище тщательно очищали мягким моющим средством, чтобы предупредить инстинктивное избегание мышью запаха метки, оставленной на знакомом объекте. На 3-й день лабиринт освещали светом высокой мощности, обеспечивающим достаточно света и тепла, чтобы побудить животных войти в туннель-убежище, что позволяло измерить время задержки (длительность времени до того, как все четыре лапы оказывались на полу камеры-убежища) и ошибки (неверные ответы до того, как все четыре лапы оказывались на полу камеры-убежища).

[084] Для экспериментов с Т-образным лабиринтом мышей также приучали к Т-образному лабиринту в течение двух дней в условиях отсутствия пищи, чтобы животные могли съесть пищу в качестве награды, по меньшей мере, пять раз в течение 10-минутного периода обучения. Во время каждого испытания мышь помещали в начальную точку на 30 с, а затем заставляли повернуть направо, где всегда находилась приманка в виде цветных пищевых чипсов. После каждой тренировки Т-образный лабиринт тщательно очищали мягким моющим средством. На 3-й день оценивали выполнение мышами положительных и отрицательных поворотов. Вознаграждаемая сторона всегда ассоциировалась с визуальной подсказкой. Подсчитывали количество положительных поворотов, т.е. количество раз, когда животное съедало пищу в качестве награды.

Пример 16 – Задание на распознавание нового предмета

[085] Задание на распознавание нового предмета использовали для оценки кратковременной памяти, как описано другими (58) и авторами изобретения (57). Вкратце, во время обучения мышей помещали в новую квадратную коробку (50,8 см (20 дюймов) в длину и 20,32 см (8 дюймов) в высоту), окруженную инфракрасными датчиками. Две пластиковые игрушки (от 6,35 до 7,62 см (от 2,5 до 3 дюймов)), которые различались по цвету, форме и текстуре, помещали в определенные места в окружающем пространстве на расстоянии 45,72 см (18 дюймов) друг от друга. Мыши могли свободно исследовать

окружающее пространство и предметы в течение 15 минут, а затем помещались обратно в их индивидуальные домашние клетки. Через 30 минут мышей помещали обратно в окружающее пространство с двумя предметами в тех же местах, но теперь один из знакомых предметов заменяли третьим новым предметом. Затем мышам снова позволяли свободно исследовать оба предмета в течение 15 мин. Предметы тщательно очищали мягким моющим средством.

Пример 17 - Иммуногистохимия

[086] Мышам выполняли анестезию инъекциями кетамин-ксилазина и перфузию PBS, а затем 4% (мас./об.) параформальдегидом в PBS с последующим извлечением мозга у каждой мыши для иммунофлуоресцентной микроскопии (23, 59). Вкратце, образцы инкубировали в PBS, содержащем 0,05% Твин 20 (PBST) и 10% сахарозы, в течение 3 часов, а затем 30% сахарозы в течение ночи при 4°C. Затем мозг помещали в реагент О.С.Т. (Tissue Tech) при -80°C и обрабатывали для стандартного изготовления срезов из замороженных тканей. Замороженные срезы (30 мкм) обрабатывали холодным этанолом (-2°C) с последующими двумя промываниями в PBS, блокировали с помощью 3% BSA в PBST и двойным окрашиванием двумя антителами (таблица S3). После трех промываний в PBST срезы дополнительно инкубировали с Cy2 и Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Образцы помещали в заключающую среду и наблюдали под флуоресцентным микроскопом Olympus SX81. Подсчет и анализ проводили с использованием программного обеспечения Olympus Microsuite V с помощью сенсорного модуля подсчета.

Пример 18 – Концевое мечение фрагмента ДНК

[087] Его выполняли с использованием имеющегося в продаже набора (TdT FragEL™, Calbiochem), как описано ранее (10, 22)

Пример 19 - ELISA для A β 1-42 и Ab1 β 1-40

[088] Ткани гиппокампа гомогенизировали в TBS, осаждали в течение 30 мин x 150 000 g. Осадок ресуспендировали в 3 объемах (мас./об., исходная масса ткани) TBS + 1% Triton X-100, осаждали в течение 30 мин x 150000 g, собирали надосадочную жидкость и хранили. В образцах определяли концентрацию белка и разводили в 10 раз перед проведением ELISA в соответствии с инструкциями производителя (BioLegend).

Пример 20 - Статистический анализ

[089] Сравнивали результаты клинического и биохимического исследования тканей человека при разных диагнозах с использованием непараметрических тестов (т.е. теста Краскела-Уоллиса или точного теста Фишера с поправкой Данна на множественные

сравнения), которые более устойчивы к выбросам, отсутствию нормальности и неодинаковому размеру выборок. Двусторонние ранговые корреляции Спирмена использовали для оценки ассоциации между различными когнитивными индексами и оптической плотностью белков. При поиске корреляции не осуществляли коррекцию на демографические показатели (например, возраст, пол и т.д.), так как эти показатели существенно не различались между клиническими группами. Статистический анализ выполняли с использованием SPSS 19 (IBM), устанавливали уровень значимости $\alpha = 0,05$ (двусторонний).

[090] Параметры поведения мышей исследовали с помощью независимого однофакторного дисперсионного анализа с использованием SPSS. Однородность дисперсии между исследуемыми группами проверяли с помощью критерия Левена. При необходимости, проводили апостериорный анализ с использованием тестов Тьюки или Геймса-Хауэлла. Другие данные выражали как средние значения \pm стандартное отклонение в трех независимых экспериментах. Статистические различия между средними значениями рассчитывали с помощью t-критерия Стьюдента (двусторонний). Значение p менее 0,05 (p менее 0,05) считали статистически значимым.

Пример 21 - Одобрение исследования

[091] Комитеты по исследованиям на человеке Медицинского центра Университета Раш одобрили исследование RROS. Животных содержали и эксперименты проводили в соответствии с руководящими принципами Национального института здоровья и были одобрены институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию медицинского центра Университета Раша.

Пример 22 - Активация TLR2 при БА

[092] Чтобы изучить роль TLR2 в патогенезе БА, авторы изобретения анализировали уровень TLR2 с методом иммуоблоттинга в префронтальной коре (PFC; зона Бродмана 9) у 33 субъектов, умерших с деменцией при БА ($n = 10$), легкими когнитивными нарушениями (ЛКН; $n = 11$) и сопоставимых по возрасту лиц без когнитивных нарушений ($n = 12$) (таблица S1). По таким показателям как возраст, пол, давность смерти, масса мозга или оценка по шкале Браака, значимых различий между группами не было обнаружено (таблица S1). Для сравнения авторы изобретения включили TLR4. Поскольку все TLR, кроме TLR3, используют MyD88, авторы изобретения также исследовали MyD88. Уровни TLR2 и MyD88 в PFC значительно различались между группами, при этом в случае БА экспрессия TLR2 и MyD88 была выше, чем в случае ОКН и ЛКН (Фиг. 1А-С и таблица S2). Напротив, уровень TLR4 достоверно не различался между группами

(Фиг. 1A и D; таблица S2). Ранговая корреляция Спирмена показала, что уровни TLR2 и MyD88 в префронтальной коре положительно коррелировали со стадией по шкале Браака (Фиг. 1E-F и таблица S2). С другой стороны, авторы изобретения не обнаружили никакой связи между TLR4 и оценкой по шкале Браака (Фиг. 1G и таблица S2). Важно отметить, что MyD88 также отрицательно коррелировал с краткой оценкой психического состояния (MMSE) и суммарным когнитивным z-индексом (GCS) (Фиг. 1H-M и таблица S2).

[093] Для подтверждения этих результатов наблюдений авторы изобретения провели иммунофлуоресцентный анализ срезов гиппокампа с двойным окрашиванием. Как и ожидалось, уровень Iba-1 (микроглиальный маркер) был выше в коре и гиппокампе при БА по сравнению с ОКН (Фиг. 8 A-E). Аналогично результатам вестерн-блоттинга, наблюдались более высокие уровни TLR2 (Фиг. 8A и Фиг. 1N-O) и MyD88 (Фиг. 8B и Фиг. 1P-Q) в коре и гиппокампе головного мозга при БА по сравнению с ОКН. И вновь, не было никаких различий в экспрессии TLR4 (Фиг. 8C и Фиг. 1R-S).

Пример 23 - Повышение TLR2 у трансгенных мышей 5XFAD (Tg)

[094] Затем авторы изобретения исследовали статус TLR2 и MyD88 в гиппокампе мышей 5XFAD Tg. Подобно тому, что наблюдалось в ЦНС субъектов с БА, авторы изобретения заметили более высокие уровни TLR2 (Фиг. 9A-B) и MyD88 (Фиг. 10 A-B) в коре и различных частях гиппокампа мышей Tg по сравнению с нетрансгенными мышами того же возраста. Авторы изобретения также обнаружили повышенную иммунореактивность Iba-1 и колокализацию множества Iba-1-положительных клеток с TLR2 (Фиг. 9B) и MyD88 (Фиг. 10B) в коре и гиппокампе мышей Tg. Вестерн-блоттинг также подтвердил увеличение TLR2 (Фиг. 9C-D) и MyD88 (Фиг. 10C-D) в гиппокампе мышей Tg по сравнению с нетрансгенными мышами.

Пример 24 - Конструирование пептида, соответствующего взаимодействующему с TLR2 домену Myd88 (TIDM), для специфического взаимодействия с TLR2

[095] Поскольку специфического ингибитора TLR2 не существует, авторы изобретения предприняли попытку адресного воздействия на TLR2 в терапевтических целях. После связывания лиганда TLR2 осуществляет функцию через MyD88 (14, 15). Поэтому авторы изобретения применили способ жесткого докинга белок-белок для моделирования взаимодействия между взаимодействующим с TLR доменом (TIR) TLR2 и MyD88. Поскольку кристаллические структуры TIR мышиных TLR были недоступны, авторы изобретения применили стратегию компьютерного моделирования на основе гомологии для построения трехмерных структур TIR из всех различных TLR (Фиг. 11A-G). Как и в предыдущем исследовании (20), комплекс MyD88 и TLR в состыкованном положении,

полученный в результате компьютерного моделирования, показал, что петля BB TLR2 взаимодействует с петлей CD MyD88 с сильным ван-дер-ваальсовым взаимодействием (ВДВ) (Фиг. 2А). Поэтому авторы изобретения сконструировали следующий пептид, соответствующий взаимодействующему с TLR2 домену MyD88 (TIDM) из петли CD, чтобы нарушить взаимодействие между TLR2 и MyD88:

[096] TIDM дикого типа (wt): drqikiwfnrrmkwkkPGAHQK (SEQ ID NO: 2)

[097] Мутированный TIDM (m): drqikiwfnrrmkwkkPGWHQD (SEQ ID NO: 3)

[098] Авторы изобретения добавили гомеодомен Antennapedia (строчные буквы) на С-конец этих пептидов для облегчения проницаемости клеток. Сегменты MyD88 указаны заглавными буквами, а положения мутаций подчеркнуты. Интересно, что, когда взаимодействие между TIR TLR2 и MyD88 моделировали с применением пептида wtTIDM, наблюдалось, что MyD88 связывался с определенным углом поворота, в результате чего его петля CD оказывалась далеко удаленной от петли BB TLR2 (Фиг. 2В) Согласно анализу Pydock, было обнаружено, что пептид wtTIDM пристыковывался на границе раздела между петлей CD, спиралью α B и петлей BB домена TIR TLR2 (Фиг. 12А). Это специфическое положение пептида wtTIDM заставляет распределяться его силы Ван-дер-Ваальса по петле BB TLR2 (Фиг. 12А), что было невозможно в случае пептида mTIDM (Фиг. 12В). Авторы изобретения наблюдали сильное электростатическое взаимодействие (0,231 нм (2,31 Å)) между атомом NE1 консервативного остатка гистидина (H82) петли CD и атомом ND остатка гистидина (H4) пептида wtTIDM (Фиг. 12С). Состыкованные структуры mTIDM и TLR2 ясно указывали на существование очень слабого электростатического взаимодействия (0,726 нм (7,26 Å)) между остатком H82 петли CD и остатком H4 пептида mTIDM (Фиг. 12С; правая панель). Более того, мутация лизина на аспарат в wtTIDM создала отрицательно заряженное облако, что также отодвинуло С-конец mTIDM еще дальше от петли BB и ближе к бороздке спирали α B (Фиг. 12В). Авторы изобретения также оценили возможность ВДВ взаимодействий в этом комплексе, измерив расстояние между ВДВ сферами двух близкорасположенных остатков TLR2 и MyD88 (Фиг. 12D). Авторы изобретения наблюдали значительное перекрытие ВДВ между MyD88 и TLR2 в отсутствие wtTIDM. Однако, при образовании комплекса с wtTIDM, петля BB TLR2 и петля CD MyD88 располагались далеко друг от друга, что исключало любую возможность ВДВ взаимодействий (Фиг. 12Е). Для сравнения аффинности wtTIDM и mTIDM к TLR2 с другой точки зрения, авторы изобретения провели анализ с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Вначале авторы изобретения клонировали и очистили белок TLR2 целиком. Однако он не был

стабильным, и поскольку целый белок TLR2 также отсутствовал в продаже, авторы изобретения получили только С-концевой домен TIR белка TLR2 (сTLR2) с помощью стратегии вирусного клонирования и очистили белок с помощью аффинной колонки тус (Фиг. 2С). Графики кинетики (Фиг. 2D-E) ясно показали, что при увеличении дозы как wtTIDM, так и mTIDM происходит связывание с сTLR2. Однако, wtTIDM проявлял гораздо большую аффинность к сTLR2, чем mTIDM, (Фиг. 2D-F). Согласно графику зависимости SPR-ответа от концентрации пептида в состоянии равновесия (Фиг. 2F), аффинность wtTIDM ($K_d = 8$ мкМ) к сTLR2 была примерно в 2,5 раза выше, чем у mTIDM ($K_d = 19$ мкМ). Для дальнейшего обоснования авторы изобретения провели анализ теплового сдвига, который показал, что 10 мкМ пептида wtTIDM приводило к выраженному сдвигу кривой плавления сTLR2 (Фиг. 2G). С другой стороны, в случае mTIDM наблюдался очень небольшой сдвиг (Фиг. 2H). В совокупности эти результаты позволяют предположить, что wtTIDM является мощным низкомолекулярным пептидом, который значительно препятствует взаимодействию между TLR2 и MyD88.

[099] Затем авторы изобретения проверили, имеет ли wtTIDM аналогичное сродство к другим TLR. Интересно, что компьютерный анализ показал, что пептид wtTIDM стыковался далеко от петли BB TLR1 (Фиг. 3A), TLR4 (Фиг. 3B), TLR5 (Фиг. 3C), TLR6 (Фиг. 3D), TLR7 (Фиг. 3E) и TLR9 (Фиг. 3F), что позволяло предположить, что wtTIDM специфически взаимодействует с петлей BB TLR2, но не других TLR.

[0100] Затем авторы изобретения исследовали, способен ли пептид wtTIDM нарушить физическую ассоциацию между эндогенным TLR2 и MyD88. Ранее авторы изобретения установили, что фибриллярный A β 1-42 активирует микроглию через TLR2 (17). В данном случае с помощью анализа иммунопреципитатов MyD88 методом иммуноблоттинга с антителом против TLR2 авторы изобретения обнаружили, что фибриллярный A β 1-42 увеличивал ассоциацию между TLR2 и MyD88 в клетках микроглии и что это взаимодействие ингибировалось пептидом wtTIDM, но не mTIDM (Фиг. 3G-H). Подтвердили, что при различных условиях воздействия количество TLR2 и MyD88 во внесенном материале было одинаковым (Фиг. 3G). Чтобы понять специфичность, авторы изобретения исследовали влияние пептида wtTIDM на взаимодействие между TLR4 и MyD88. LPS является типичным агонистом TLR4. Обработка LPS увеличивала ассоциацию между TLR4 и MyD88 в клетках микроглии (Фиг. 3I-J), и в отличие от подавления взаимодействия TLR2:MyD88 (Фиг. 3G-H), пептид wtTIDM не влиял на взаимодействие между TLR4 и MyD88 (Фиг. 3I-J). Затем авторы изобретения проверили, может ли wtTIDM препятствовать взаимодействию между MyD88 и

новообразованным TLR2, несущим метку Мус на С-конце (сTLR2). Для этого, клетки микроглии трансдуцировали лентивирионами рLenti-сМус-сTlr2, и через 48 часов трансдукции на клетки воздействовали фибриллярным Аβ1-42 в присутствии или в отсутствие wtTIDM/mTIDM в течение 1 ч. Анализ иммунопреципитатов MyD88 методом иммуноблоттинга с антителом против с-Мус показал, что взаимодействие между новообразованными сTLR2 и MyD88 в клетках микроглии, обработанных Аβ1-42, ингибируется пептидом wtTIDM, но не mTIDM (Фиг. 3К-L).

Пример 25. Пептид TIDM подавляет воспаление микроглии, вызванное фибриллярным Аβ1-42 и липотейхоевой кислотой (LTA), но не 1-метил-4-фенилпиридином (MPP+), двухцепочечной РНК (poly IC), бактериальным липополисахаридом (LPS), флагеллином и CpG ДНК.

[0101] Микроглия, экспрессирующая различные TLR, активируется при различных патологических состояниях, таких как нейродегенерация, воспаление, вирусная и бактериальная инфекция и т.д. (7, 21). Поэтому авторы изобретения исследовали, способен ли пептид TIDM подавлять активацию микроглии, вызванную различными стимулами. Клетки микроглии, предварительно обработанные различными концентрациями пептидов wtTIDM и mTIDM в течение 1 ч, стимулировали фибриллярным Аβ1-42 (этиологический реагент БА), MPP+ (паркинсонический токсин), LTA (агонист TLR2), poly IC (агонист TLR3), LPS (агонист TLR4), флагеллином (агонист TLR5) и CpG ДНК (агонист TLR9). Как и ожидалось, фибриллярный Аβ (Фиг. 4А), MPP+ (Фиг. 4D), LTA (Фиг. 4G), poly IC (Фиг. 14А), LPS (Фиг. 4J), флагеллин (Фиг. 4М) и CpG ДНК (Фиг. 4P) индуцировали активацию NF-κB в клетках микроглии. Однако пептиды wtTIDM ингибировали активацию NF-κB, опосредованную фибриллярным Аβ и LTA (Фиг. 4А и 4G). Напротив, пептиды wtTIDM оставались неспособными подавлять активацию NF-κB в клетках микроглии, индуцированную MPP+ (Фиг. 4D), poly IC (Фиг. 14А), LPS (Фиг. 4J), флагеллином (Фиг. 4М) и CpG ДНК (Фиг. 4P). Эти результаты были специфичными, поскольку пептиды mTIDM не влияли на активацию NF-κB, индуцированную каким-либо из стимулов. Активация классического пути NF-κB включает фосфорилирование IκBα с последующей ядерной транслокацией p65 и p50. Поэтому авторы изобретения также исследовали влияние пептида wtTIDM на ядерную транслокацию p65 и p50 в активированной микроглии. Как и ожидалось, повышенная ядерная транслокация p65 и p50 наблюдалась в клетках микроглии в ответ на фибриллярный Аβ1-42 (Фиг. 15А-С) и LPS (Фиг. 15D-F). Однако воздействие пептида wtTIDM ингибировало ядерную транслокацию p65 и p50 в клетках микроглии,

стимулированных фибриллярным A β 1-42 (Фиг. 15A-C), но не LPS (Фиг. 15D-F), что указывало на специфичность пептида wtTIDM. Чтобы подтвердить эти результаты, авторы изобретения также оценивали экспрессию IL-1 β и iNOS, провоспалительных молекул, которые регулируются активацией NF- κ B. Все стимулы вызвали экспрессию IL-1 β и iNOS в клетках микроглии (Фиг. 4B-C, 4E-F, 4H-I, 4K-L, 4N-O, 4Q-R, Фиг. 13A-F и Фиг. 14B-D). Пептиды wtTIDM подавляли экспрессию провоспалительных молекул, индуцируемую только фибриллярным A β (Фиг. 13A и Фиг. 4B-C) и LTA (Фиг. 13C и Фиг. 4H-I), но не MPP+ (Фиг. 13B и Фиг. 4E-F), poly IC (Фиг. 14B-D), LPS (Фиг. S6D и Фиг. 4K-L), флагеллином (Фиг. 13E и Фиг. 4N-O) и CpG ДНК (Фиг. 13F и Фиг. 4Q-R), что согласовывалось с влиянием wtTIDM на активацию NF- κ B. Эти результаты позволяют предположить, что пептид wtTIDM специфически ингибирует воспаление микроглии, вызванное агонистами TLR2, но не других TLR.

Пример 26 - Пептид wtTIDM не ингибирует активацию микроглии, индуцированную фибриллярным A β 1-42, в отсутствие TLR2

[0102] Поскольку пептид wtTIDM нарушал физическую ассоциацию между TLR2 и MyD88, в качестве механистической проверки и подтверждения принципа авторы изобретения исследовали влияние пептида wtTIDM на активацию микроглии Tlr2 $^{-/-}$, индуцированную A β 1-42. Аналогично клеткам микроглии BV-2, фибриллярные пептиды A β 1-42 вызывали выраженную активацию NF- κ B в первичной микроглии, выделенной от мышей WT (дикий тип), которая ингибировалась пептидом wtTIDM (Фиг. 16A). С другой стороны, фибриллярные пептиды A β 1-42 вызывали слабую ДНК-связывающую активность NF- κ B в Tlr2 $^{-/-}$ микроглии (Фиг. 16A). Однако, в отличие от микроглии WT, пептид wtTIDM оставался неспособным ингибировать активацию NF- κ B в Tlr2 $^{-/-}$ микроглии индуцированную фибриллярными A β 1-42 (Фиг. 16 A-B). Для дополнительного подтверждения авторы изобретения также измерили уровни общих провоспалительных цитокинов (TNF α и IL-1 β) в надосадочных жидкостях. Аналогично активации NF- κ B, индукция образования TNF α и IL-1 β фибриллярными A β 1-42 была низкой в микроглии Tlr2 $^{-/-}$ по сравнению с микроглией дикого типа (Фиг. 16C-F). Однако, пептид wtTIDM ингибировал образование TNF α и IL-1 β , индуцированное фибриллярными пептидами A β 1-42, в микроглии WT, но не Tlr2 $^{-/-}$ (Фиг. 16C-F), что позволяло предположить, что для проявления своей функции пептиду wtTIDM необходим TLR2.

Пример 27. Интраназальное введение пептида wtTIDM подавляет воспаление, снижает количество бляшек и снижает гиперфосфорилирование белка tau в гиппокампе мышей 5XFAD Tg

[0103] Становится очевидным, что воспаление глии играет важную роль в потере нейронов при БА и других нейродегенеративных расстройствах (7, 9, 22-24). Поскольку пептид wtTIDM специфически ингибировал активацию микроглии, опосредованную фибриллярным A β 1-42, авторы изобретения решили исследовать на мышах 5XFAD Tg возможность его терапевтического применения. Вначале авторы изобретения определяли способность пептида wtTIDM проникать в гиппокамп. Мышам Tg вводили пептиды TIDM интраназально, и через 60 минут после введения пептид wtTIDM обнаруживались в гиппокампе мышей Tg с помощью масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (Фиг. 5A и C). Напротив, в гиппокампе мышей Tg, получавших физиологический раствор, пик пептида wtTIDM отсутствовал (Фиг. 5B). Уровень пептида wtTIDM составлял $23,33 \pm 14,14$ нг на грамм ткани мозга в гиппокампе мышей Tg, получавших wtTIDM, по сравнению с нулевым значением у мышей Tg, получавших физиологический раствор. После интраназального введения пептид TIDM также обнаруживался в гиппокампе методом инфракрасного сканирования (Фиг. 17). Следовательно, после интраназального введения пептид TIDM попадает в гиппокамп.

[0104] Затем авторы изобретения исследовали, способен ли пептид TIDM при интраназальном введении модулировать активацию NF- κ B в гиппокампе мышей Tg. Как свидетельствуют результаты иммунофлуоресцентного исследования срезов гиппокампа с двойным окрашиванием, уровни Iba-1 и фосфо-p65 были заметно выше у мышей Tg по сравнению с нетрансгенными мышами (Фиг. 5D-H). Однако, интраназальное введение мышам Tg пептида wtTIDM, но не mTIDM приводило к подавлению как Iba-1, так и фосфо-p65 в гиппокампе мышей Tg (Фиг. 5D-H) Это также подтверждалось исследованием тканей гиппокампа методом вестерн-блоттинга (Фиг. 18A-B). Более того, известно, что активированная микроглия экспрессирует iNOS (21, 25). Соответственно, микроглия гиппокампа мышей Tg также была положительной по iNOS (Фиг. 19 & Фиг. 5I-J). Однако, пептид wtTIDM, но не mTIDM, подавлял экспрессию iNOS в гиппокампе мышей Tg (Фиг. 19 и Фиг. 5I-J). Исследование методом вестерн-блоттинг также подтверждало ингибирование экспрессии iNOS в гиппокампе под воздействием пептида wtTIDM, но не mTIDM (Фиг. 5K-L).

[0105] Амилоидные бляшки являются важным признаком патологии БА, моделируемой у мышей 5XFAD Tg (26, 27). Поэтому далее авторы изобретения исследовали, способно ли введение wtTIDM снижать количество амилоидных бляшек в гиппокампе мышей Tg. Иммунологическое окрашивание срезов гиппокампа mAb 82E1 (Фиг. 5M-O), а также исследование тканей гиппокампа методом вестерн-блоттинг с применением mAb 6E10

(Фиг. 5P-Q) и mAb 82E1 (Фиг. 20A-B) показали заметно более высокие уровни пептидов A β в гиппокампе мышей Tg по сравнению с нетрансгенными мышами. Аналогично, исследование сыворотки (Фиг. 21A-B), фракций гиппокампа, экстрагированных TBS (Фиг. 21 C-D) и (TBS + Triton X-100) (Фиг. 21 E-F) методом ELISA также продемонстрировало заметное увеличение A β 1-40 и A β 1-42 у мышей Tg по сравнению с нетрансгенными мышами. Однако, при введении wtTIDM, но не mTIDM наблюдалось значительное снижение A β (Фиг. 20A-B, Фиг. 21 A-F и Фиг. 5M-Q). Эти результаты позволяют предположить, что интраназальное введение wtTIDM способно снизить нагрузку A β в гиппокампе мышей 5XFAD.

[0106] Гиперфосфорирование белка тау - еще одна характерная черта патологии БА (28, 29). Показано, что гиперфосфорилирование тау по Ser396 происходит в гиппокампе мышей 5XFAD на гораздо более ранней стадии, чем проявляются расстройства обучения и памяти (30). Поэтому авторы изобретения исследовали влияние пептида TIDM на статус фосфорилирования белка тау *in vivo* в гиппокампе мышей Tg. Анализ методом иммуноблоттинга указывает на заметное увеличение фосфорилированного тау в экстрактах гиппокампа мышей Tg по сравнению с нетрансгенными мышами (Фиг. 22 A-B). Однако, введение мышам Tg пептида wtTIDM, но не mTIDM, подавляло фосфорилирование белка тау в гиппокампе, не влияя на общий уровень белка тау (Фиг. 22A-B), что указывает на то, что введение пептида wtTIDM достаточно для уменьшения фосфорилирования белка тау в гиппокампе мышей Tg.

Пример 28 - Уменьшение апоптоза нейронов и защита памяти и обучения у мышей 5XFAD Tg при интраназальном введении пептида wtTIDM

[0107] Поскольку нейровоспаление может быть связано с апоптозом нейронов, далее авторы изобретения исследовали, может ли введение пептида wtTIDM снижать апоптоз нейронов в гиппокампе мышей Tg. Ряд TUNEL-положительных телец ко-локализовалось с NeuN в гиппокампе мышей Tg, при сравнении с нетрансгенными мышами (Фиг. 6A-C). Однако, пептид wtTIDM, но не mTIDM, ослаблял апоптоз нейронов в гиппокампе (Фиг. 6A-C). Этот результат был подтвержден обнаружением расщепленной каспазы 3. Как и ожидалось, уровень расщепленной каспазы 3 повышался в гиппокампе мышей Tg (Фиг. 8D-E). Однако, введение мышам Tg пептида wtTIDM, но не mTIDM, снижало повышенный уровень расщепленной каспазы 3 в гиппокампе (Фиг. 6D-E), что позволяло предположить, что введение пептида wtTIDM способно уменьшить апоптоз нейронов *in vivo* в гиппокампе мышей Tg. Соответственно, уровни молекул, связанных с пластичностью (PSD-95, NR2A и GluR1) в гиппокампе мышей Tg снижались по сравнению

с нетрансгенными мышами (Фиг. 6F-I). Однако, введение мышам Tg пептида wtTIDM, но не mTIDM, приводило к значительному восстановлению белков PSD-95, NR2A и GluR1 в гиппокампе *in vivo* (Фиг. 6F-I), что согласовывалось с подавлением апоптоза нейронов.

[0108] Конечная цель нейропротекции при БА - улучшить и/или защитить память. Основные функции гиппокампа - создание и организация долговременной памяти и пространственного обучения. Поэтому авторы изобретения исследовали, защищает ли пептид wtTIDM память и обучение у мышей Tg. Как и ожидалось, Tg-мышам потребовалось гораздо больше времени, чтобы найти углубление с пищевым вознаграждением, и демонстрировали большее время задержки [p менее 0,001 (= 0,0000213)] и большее число ошибок [p менее 0,001 (= 0,0000251)] в лабиринте Барнса по сравнению с нетрансгенными мышами. Однако, введение wtTIDM значительно улучшило функцию памяти у мышей Tg, о чем свидетельствует время задержки [$F_{3,28} = 93,153$, $p < 0,001$ (= 0,0000112)] (Фиг. 6J) и количество ошибок [$F_{3,28} = 36,339$, $p < 0,001$ (= 0,0000863)] (Фиг. 6K). Функция памяти у мышей, получавших пептид wtTIDM, также была лучше при обнаружении углубления с вознаграждением с меньшим временем задержки [p менее 0,001 (= 0,0000600)] и меньшим количеством ошибок [p менее 0,001 (= 0,0000579)] по сравнению с мышами, получавшими mTIDM. Аналогично, в Т-лабиринте не получавшие воздействия мыши Tg также демонстрировали меньшее количество положительных поворотов [p менее 0,001 (= 0,0000440)] и большее количество отрицательных поворотов [p менее 0,001 (= 0,000223)], чем нетрансгенные мыши того же возраста (Фиг. 6L-M). Однако, введение wtTIDM оказало значительное влияние на число успешных положительных поворотов [$F_{3,28} = 31,475$, p менее 0,001 (= 0,0000411)] (Фиг. 6L), а также меньшее число ошибок [$F_{3,28} = 26,653$, p менее 0,001 (= 0,0000235)] (Фиг. 6M) у мышей Tg. И снова, мыши, получавшие wtTIDM, демонстрировали большее количество положительных поворотов [p менее 0,001 (= 0,0000954)] и меньше количество отрицательных поворотов [p менее 0,001 (= 0,000123)] по сравнению с мышами Tg, получавшими mTIDM (Фиг. 6L-M). Авторы изобретения также оценивали кратковременную память мышей Tg с помощью теста на распознавание нового предмета (NOR). Мыши Tg демонстрировали значительные нарушения в тесте NOR [p менее 0,001 (= 0,0000149)], о чем свидетельствует индекс дискриминации (Фиг. 6N) по сравнению с нетрансгенными мышами того же возраста. Тем не менее, мыши, получавшие пептид wtTIDM, показали значительное улучшение (p менее 0,001) кратковременной памяти по сравнению с мышами Tg, не получавшими воздействия или получавшими mTIDM (Фиг. 6N). С другой стороны, общая двигательная активность мышей Tg и нетрансгенных

мышей была почти одинаковой (Фиг. 23). Кроме того, пептид wtTIDM или mTIDM не снижал общую двигательную активность у мышей Tg, о чем свидетельствуют количество движений, активность в горизонтальной плоскости, время отдыха и стереотипия (Фиг. 23A-D), что позволяло предположить, что улучшение памяти при введении пептида wtTIDM не связано с каким-либо изменением общей двигательной активности.

Пример 29 - Пептиду wtTIDM требуется TLR2 для уменьшения бляшек и улучшения памяти у мышей 5XFAD Tg

[0109] Чтобы подтвердить, что пептиду wtTIDM действительно требуется TLR2 для проявления своей функции *in vivo*, авторы изобретения скрестили мышей Tlr2^{-/-} с мышами Tg для получения мышей 5XFAD с отсутствием Tlr2 (Tg-Tlr2^{-/-}). Нокдаун Tlr2 не влиял на вставку или экспрессию трансгенов 5XFAD, и наоборот (Фиг. S24A). Шестимесячные мыши WT, Tlr2^{-/-}, Tg и Tg-Tlr2^{-/-} существенно не различались по общей массе тела или массе мозга во влажном состоянии (Фиг. 24B-C). Кроме того, авторы изобретения не обнаружили никаких явных фенотипических различий, включая диету, фекальный болюс, социальное взаимодействие и возбуждение между разными генотипами в этом возрасте. Хотя пептид wtTIDM уменьшал количество бляшек и улучшал пространственное обучение и память у мышей Tg (Фиг. 5-6), он по-прежнему не мог оказать такого влияния у мышей Tg-Tlr2^{-/-} (Фиг. 24D-G), что указывает на то, что пептид wtTIDM неэффективен в отсутствие Tlr2.

Пример 30 – Пептид wtTIDM, но не mTIDM подавляет патологический процесс при экспериментальном аллергическом энцефаломиелите (ЭАЭ) и коллаген-индуцированном артрите (КИА) у мышей

[0110] Будучи важным компонентом врожденного иммунитета, Myd88 -зависимая передача сигналов от TLR2 играет важную роль в патогенезе различных инфекционных и аутоиммунных заболеваний (31, 32). Поэтому авторы изобретения исследовали, ограничивается ли функция пептида wtTIDM только мышами 5XFAD или другими моделями заболевания. ЭАЭ является широко используемой моделью рассеянного склероза (MS) у животных, и хроническая форма ЭАЭ моделируется у самцов мышей C57/BL6 при иммунизации MOG35-55. Подобно эффекту у мышей 5XFAD, интраназальное введение пептида wtTIDM мышам с ЭАЭ значительно подавляло клинические симптомы ЭАЭ (Фиг. 7A). Сравнивая средние значения между группами с помощью критерия Даннета для множественных сравнений, авторы изобретения обнаружили, что средние значения между группами ЭАЭ и ЭАЭ wtTIDM существенно различаются (скорректированное значение *p* менее 0,001). С другой стороны, пептид

mTIDM не оказывал влияния (Фиг. 7A), что позволяло предположить специфичность влияния. Как и ожидалось, индукция ЭАЭ снижала двигательную активность у мышей, о чем свидетельствовал анализ тепловой карты (Фиг. 7B), пройденного расстояния (Фиг. 7C), вставания на задние лапы (Фиг. 7D), скорости (Фиг. 7E) и ускорения (Фиг. 7F). Анализ отпечатков лап (Фиг. 25) также показал уменьшение длины шага (Фиг. 7G) и длины отпечатка (Фиг. 7H) и увеличение ширины шага (Фиг. 7I) и размаха пальцев (Фиг. 7J) у мышей с ЭАЭ по сравнению с нормальными мышами. Кроме того, мыши с ЭАЭ часто волочили пальцы лап (Фиг. 25). Однако, интраназальное введение пептида wtTIDM, но не mTIDM, улучшало двигательную активность и нормализовало характеристики отпечатков лап у мышей с ЭАЭ (Фиг. 7A-K и Фиг. 25). КИА - широко используемая модель ревматоидного артрита на животных. Как и у мышей с ЭАЭ, пептид wtTIDM, но не mTIDM, также уменьшал клинические симптомы КИА у мышей (Фиг. 7L). Сравнивая средние значения между группами с помощью критерия Даннета для множественных сравнений, авторы изобретения обнаружили, что средние значения между группами КИА и КИА + wtTIDM значительно различаются [скорректированное значение $p = 0,0148$ (менее 0,05)]. Пептид wtTIDM также усиливал двигательную активность (Фиг. 7N-R) и улучшал характеристики отпечатка лап (Фиг. 7S-V и Фиг. 26).

Пример 31 - Интраназальное введение взаимодействующего с TLR2 домена пептида MyD88 (TIDM) снижает α -синуклеинопатию: последствия для болезни Паркинсона, множественной системной атрофии и деменции с тельцами Леви

[0111] Патологические изменения при болезни Паркинсона (БП) включают избирательную потерю дофаминергических нейронов в SNpc и присутствие интрацитоплазматической агрегации белка α -синуклеина (α -syn) в форме телец Леви в выживших нейронах. Помимо БП, накопление α -syn также является важным патологическим признаком деменции с тельцами Леви (ДТЛ) и множественной системной атрофии (МСА). Следовательно, уменьшение патологии телец Леви имеет терапевтическое значение при БП, ДТЛ и МСА. Активация микроглии играет важную роль в патогенезе болезней с тельцами Леви, и было показано, что для активации микроглии фибриллярному α -syn требуется TLR2. Недавно авторы изобретения продемонстрировали, что пептид, соответствующий взаимодействующему с TLR2 домену MyD88 (TIDM), избирательно подавляет активацию TLR2. Это исследование подчеркивает важность пептида TIDM в снижении α -синуклеинопатии. Интраназальное введение пептида TIDM дикого типа (wt) снижало экспрессию индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) в микроглии черной субстанции трансгенных мышей A53T (Фиг. 28

А-В). Хотя пептид wtTIDM ингибировал экспрессию iNOS, после введения wtTIDM авторы наблюдали увеличение аргиназы-1 в черной субстанции мышей A53T (Фиг. 29 А-В), что позволяло предположить, что под воздействием пептида wtTIDM активация микроглии подтипа M1 переключается в подтип M2. Ежедневное интраназальное введение пептида wtTIDM мышам A53T также приводило к снижению олигомерного и мономерного α -syn (Фиг. 30 А-С) и подавляло тельца включения, содержащие α -syn, в дофаминергических нейронах, положительных по тирозингидроксилазе (Фиг. 31 А-Д). Также наблюдалось снижение α -syn в микроглии черной субстанции у мышей A53T после введения пептида wtTIDM (Фиг. 32 А-В). Наконец, введение пептида wtTIDM улучшало двигательную активность мышей A53T (Фиг. 33 А-Е). Эти результаты были специфичными, поскольку мутированный пептид TIDM не проявлял такого защитного эффекта у мышей A53T. Следовательно, интраназальное введение пептида wtTIDM может быть полезным при БП, МСА и ДТЛ.

Список литературы

- [0112] 1. Tanzi RE, and Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Ceill*. 2005;12G(4):545-55.
- [0113] 2. Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur d, and Hutton M. Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci*. 1398;1(5):355-8.
- [0114] 3. Raichlen DA, and Alexander GE. Exercise, APOE genotype, and the evolution of the human lifespan. *Trends Neuroses*. 2014;37(5):247-S5.
- [0115] 4. Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, and Ferreira A. Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 ; 99(9) : 8384-9.
- [0116] 5. Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng !H, Wu T, et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model *Science*. 2007;316(5825)r750-4.
- [0117] 6. Benilova I, Karran E, and De Strooper B. The toxic Abeta oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci*. 2012;15(3):349-57.
- [0118] 7. Heppner FL, Ransohoff RM, and Becher B. immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 2015;18(6):358~72.
- [0119] 8. Xu H, Gelyana E, Rajsombath M, Yang T, Li S, and Selkoe D. Environmental Enrichment Potently Prevents Microglia-Mediated Neuroinflammation by Human Amyloid beta-Protein Oligomers. *J Neurosci*, 201d;3d(35):9041-56.

- [0120] 9. Nathan C, Caiingasan N, Nezezon J, Ding A, Lucia MS, La Perle K, et al. Protection from Alzheimer's-like disease in the mouse by genetic ablation of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med*. 2005;292(9):1163-9.
- [0121] 10. Jana A, and Pahan K, Fibrillar amyloid-beta-activated human astroglia kill primary human neurons via neutral sphingomyelinase: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2011;31(38):12676-89.
- [0122] 11. Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L, Jr., Baron P, Vizi Salva M, et al. Activation of microglial cells by beta-amyloid protein and interferon-gamma. *Nature*. 1995;374(6523):647-50.
- [0123] 12. Mrak RE, Sheng JG, and Griffin WS. Correlation of astrocytic A β expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997;55(3):273-9.
- [0124] 13. Vlad SC, Miller DR, Kowalek NW, and Felson DT. Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease. *Neurology*. 2008;70(19):1672-7.
- [0125] 14. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*. 2004;430(6998):257-63.
- [0126] 15. O'Neill LA, Golenbock D, and Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(6):453-60.
- [0127] 16. Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(6):429-39.
- [0128] 17. Jana M, Palencia CA, and Pahan K. Fibrillar amyloid-beta peptides activate microglia via TLR2: implications for Alzheimer's disease. *J Immunol*. 2008;181(10):7254-62.
- [0129] 18. Liu S, Liu Y, Hao W, Wolf L, Kiliaan AJ, Penke B, et al. TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid beta peptide to trigger neuroinflammatory activation. *J Immunol*. 2012;188(3):1098-107.
- [0130] 19. Reed-Geaghan EG, Reed GW, Cramer PE, and Landreth GE. Deletion of CD14 attenuates Alzheimer's disease pathology by influencing the brain's inflammatory milieu. *J Neurosci*. 2010;30(46):15389-73.
- [0131] 20. Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, and Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(8):546-58.
- [0132] 21. Gonzalez-Scarano F, and Baltuch G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:219-40.

- [0133] 22. Rangasamy SB, Corbett GT, Roy A, Modi KK, Bennett DA, Mufson EJ, et al. Intranasal Delivery of NEMO-Sinding Domain Peptide Prevents Memory Loss in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2015;47(2):385-402.
- [0134] 23. Ghosh A, Roy A, Liu X, Kordower JH, Mufson EJ, Hartley DM, et al. Selective inhibition of NF-kappaB activation prevents dopaminergic neuronal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(47): 18754- 9.
- [0135] 24. Mondai S, Roy A, Jana A, Ghosh S, Kordower JH, and Pahan K. Testing NF-kappaB-based therapy in hemiparkinsonian monkeys. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2012; 7(3): 544-56.
- [0136] 25. Saha RN, and Pahan K Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(5-83):929-47.
- [0137] 26. Corbet GT, Gonzalez FJ, and Pahan K. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha stimulates ADAM10-mediated proteolysis of APR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(27);8445-50.
- [0138] 27. Oakley H, Cole SL, Logan S, Macs E, Shao P5Craft J, et al. Intra-neuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci.* 2006;26(40): 10129-40.
- [0139] 28. Mondragon-Rodriguez S, Perry G, Luna-Munoz J, Acevedo-Aquino MC, and Williams S. Phosphorylation of tau protein at sites Ser(396-404) is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014;40(2): 121 -35.
- [0140] 29. Regan P, Piers T, Yi JH, Kim DH, Hub S, Park SJ, et al. Tau phosphorylation at serine 396 residue is required for hippocampal LTD. *J Neurosci.* 2015;35(12);48Q4-12
- [0141] 30. Kanno T, Tsuchiya A, and Nishizaki T. Hyperphosphorylation of Tau at Ser396 occurs in the much earlier stage than appearance of learning and memory disorders in 5XFAD mice. *Behav Brain Res.* 2014;274:302-6.
- [0142] 31. Liu Y, Yin H, Zhao M, and Lu Q. TLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2014;47(2):136-47.
- [0143] 32. Oliveira-Nascimento L, Massari P, and Wetzler LM. The Role of TLR2 In infection and immunity. *Front Immunol.* 2012;3:79.
- [0144] 33. Reed-Geaghan EG, Savage JC, Hise AG, and Landreth GE. CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A{beta}-stimulated microglial activation, *J Neurosci.* 2009;29(38):11982-32.

- [0145] 34. Yu JT, You SM, Wang LZ, Mao OX, and Tan L. Toll-like receptor 2 -196 to -174 del polymorphism influences the susceptibility of Han Chinese people to Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2011 ;8:138.
- [0146] 35. Zhang W, Wang LZ, Yu JT, Chi ZF, and Tan L. increased expressions of TLR2 and TLR4 on peripheral blood mononuclear cells from patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 2012;315(1-2):67-71.
- [0147] 36. Balayssac S, Burlina F, Convert O, Boibach G, Chassaing G, and Lequin O. Comparison of penetratin and other homeodomain-derived cell-penetrating peptides: interaction in a membrane-mimicking environment and cellular uptake efficiency. *Biochemistry*. 2006;45(5): 1408-20.
- [0148] 37. Borrelli A, Tomesello AL, Tornesello ML, and Buonaguro FM. Cell Penetrating Peptides as Molecular Carriers for Anti-Cancer Agents. *Molecules*. 2018;23(2).
- [0149] 38. Bera S, Kar RK, Mondai S, Pahan K, and Bhunia A. Structural Elucidation of the Cell-Penetrating Penetratin Peptide in Model Membranes at the Atomic Level: Probing Hydrophobic interactions in the Blood-Brain Barrier. *Biochemistry*. 2018;55(35):4982-96.
- [0150] 39. Richard KL, Filali M, Prefontaine P, and Rivest S. Toll-like receptor 2 acts as a natural innate immune receptor to clear amyloid beta 1-42 and delay the cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2008;28(22):5784-93.
- [0151] 40. Friis LM, Keelan M, and Taylor DE. *Campylobacter jejuni* drives MyD88-independent interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2. *Infect Immun*. 2009;77(4): 1553-60.
- [0152] 41. Gao Q, Qi L, Wu T, and Wang J. *Clostridium butyricum* activates TLR2-mediated MyD88-independent signaling pathway in HT-29 cells. *Mol Cell Biochem*. 2012;361(1-2):31-7.
- [0153] 42. Buggia-Prevot V, Sevalle J, Rossner S, and Checler F. NF-kappaB-dependent control of BACE1 promoter transactivation by Abeta42. *J Biol Chem*. 2008;283(15): 10037-47.
- [0154] 43. Atri A. Effective pharmacological management of Alzheimer's disease. *Am J Manag Care*. 2011;17 Suppl 13:S348~55.
- [0155] 44. Bennett DA, Schneider JA, Arvanitakis Z, Kelly JF, Aggarwal NT, Shah RC, et al. Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology*. 2006;66(12): 1837-44.

- [0156] 45. Bennett DA, Schneider JA, Arvanitakis Z, and Wilson RS. Overview and findings from the religious orders study. *Curr Alzheimer Res.* 2012;9(6):628~45.
- [0157] 46. Bennett DA, Schneider JA, Bienias JL, Evans DA, and Wilson RS. Mild cognitive impairment is related to Alzheimer disease pathology and cerebral infarctions. *Neurology.* 2005;64(5):834-41.
- [0158] 47. Wilson RS, Beckett LA, Barnes LL, Schneider JA, Bach J, Evans DA, et al. Individual differences in rates of change in cognitive abilities of older persons. *Psychol Aging.* 2002; 17(2); 179-93.
- [0159] 48. Braak H, and Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991 ;82(4);239-58.
- [0160] 49. Jana A, Modi KK, Roy A, Anderson JA, van Breemen RS, and Pahan K. Up-regulation of neurotrophic factors by cinnamon and its metabolite sodium benzoate: therapeutic Implications for neurodegenerative disorders. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013;8(3):739-55.
- [0161] 50. Corbett GT, Roy A, and Pahan K. Gemfibrozil, a lipid-lowering drug, upregulates IL-1 receptor antagonist in mouse cortical neurons: implications for neuronal self-defense, *J Immunol.* 183(2): 1002-13.
- [0162] 51. Khasnavis S, and Pahan K. Sodium benzoate, a metabolite of cinnamon and a food additive, upregulates neuroprotective Parkinson disease protein DJ-1 in astrocytes and neurons. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2012;7(2):424-35.
- [0163] 52. Roy A, Jana M, Kundu M, Corbett GT, Rangaswamy SB, Mishra RK, et al HMG-CoA Reductase Inhibitors Bind to PPARalpha to Upregulate Neurotrophic Expression in the Brain and Improve Memory in Mice. *Cell Metab.* 2015;22(2):253-65.
- [0164] 53. Roy A, Kundu M, Jana M, Mishra RK, Yung Y, Luan CH, et al. identification and characterization of PPARalpha ligands in the hippocampus. *Nat Chem Biol.* 2016; 12(12):1075-83.
- [0165] 54. Mondal S, Martinson JA, Ghosh S, Watson R, and Pahan K. Protection of Tregs, suppression of Th1 and Th17 cells, and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis by a physically-modified saline. *PLoS ONE.* 2012;7(12):000.
- [0166] 55. Mondal S, and Pahan K. Cinnamon ameliorates experimental allergic encephalomyelitis in mice via regulatory T cells: implications for multiple sclerosis therapy. *PLoS One.* 2015;10(1):e0116568.

- [0167] 56. Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, and Cotman CW. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci.* 1993; 13(4): 1676-87.
- [0168] 57. Roy A, Jana M, Corbett GT, Ramaswamy S, Kordower JH, Gonzalez FJ, et al. Regulation of cyclic AMP response element binding and hippocampal plasticity- related genes by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Cell Rep.* 2013;4(4):724-
- [0169] 58. Mansuy IM, Mayford M, Jacob B, Kandel ER, and Bach ME. Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. *Cell*, 1998;92(1):39-49.
- [0170] 59. Khasnavis S, Roy A, Ghosh S, Watson R, and Pahan K. Protection of dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease by a physically- modified saline containing charge-stabilized nanobubbles. *J Neuroimmune Pharmacol* 2013;9(2):213-32.

[0171] Таблица S1

Таблица S1. Клинические и патологические характеристики человеческих образцов

Количество образцов	ОКН (n = 12)	ЛКН (n = 11)	БА (n = 10)
Возраст при летальном исходе (лет)	82,18±5,13	84,87±6,23	88,73±5,89
Количество мужчин	4	7	5
Количество женщин	8	4	5
Число аллелей ApoE e4	4	2	5
MMSE	27,25±2,77	25,95±1,92	13,30±5,27
GCS	0,44±0,32	0,09±0,27	-1,13±0,39
PMI (часы)	7,45±6,36	5,15±3,12	6,57±3,33
Распределение оценок по шкале Браака			
БА отсутствует	0	0	0
I/II	2	2	1
III/IV	10	7	5
V/VI	0	2	4
NIA Reagan			
БА отсутствует	0	0	0
Низкий	5	3	1
Средний	7	7	6
Высокий	0	1	3
CERAD			
БА отсутствует	5	3	0
Возможная	0	0	0
Вероятная	5	6	6
Явная	2	2	4

ОКН – отсутствие когнитивных нарушений; ЛКН – легкие когнитивные нарушения; БА – болезнь Альцгеймера; ApoE – аполипопротеин E; MMSE – краткая шкала оценки психических состояний; GCS – суммарный когнитивный z-индекс; PMI – посмертный материал; NIA – национальный институт по проблемам старения; CERAD – консорциум для разработки реестра болезни Альцгеймера

[0172] Таблица S2

Таблица S2. Корреляция между TLR2, TLR4 и MyD88 и баллами когнитивных тестов

	ОКН	ЛКН	БА	p^a	Попарные сравнения	r_s^b		
						MMSE	GCS	шкала Браака
MyD88	6,38± 1,26	14,69± 4,41	45,66± 7,72	<0,001	ОКН, ЛКН<AD	-0,538, p=0,001	-0,475, p=0,005	0,371, p=0,033
TLR2	34,75 ±6,05	29,98± 11,44	69,37± 11,47	0,018	ОКН, ЛКН <AD	-0,278, p=0,117	-0,177, p=0,326	0,463, p=0,007
TLR4	15,36 ±3,82	14,61± 4,92	10,55± 1,61	0,620	N/A	-0,173, p=0,336	0,047, p=0,794	-0,12, p=0,947

Гомогенаты префронтальной коры лиц с ОКН, ЛКН и БА анализировали методом иммуноблоттинга с использованием антител против TLR2, LR4 и MyD88. Для нормализации по количеству нанесенного белка использовали β -актин. Значения представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего (диапазон). Уровень белков TLR2, LR4 и MyD88 коррелировал с MMSE, GCS и оценкой по шкале Браака. БА – болезнь Альцгеймера; ЛКН – легкие когнитивные нарушения; ОКН – отсутствие когнитивных нарушений; MMSE – краткая шкала оценки психических состояний; GCS – суммарный когнитивный z-индекс.

^a – тест Краскела-Уоллиса с поправкой на множественные сравнения; ранговая корреляция Спирмена (2-сторонняя), нескорректированная

[0173] Таблица S3

Таблица S3. Антитела, источники, применения и использованные разведения

Антитело	Производитель	Кат. номер	Хозяин	Применение	Разведение/Количество
TLR2	Millipore	06-1119	Кролик	ВБ/ИФ	1:1000/1:100
TLR4	Abcam	Ab13556	Кролик	ВБ/ИФ	1:1000/1:150
MyD88	Millipore	AB16527	Кролик	ВБ	1:1000
MyD88	Abcam	Ab2068	Кролик	ИФ	1:150
MyD88	Santa Cruz	Sc11356	Кролик	ИП	2 мкг/реакцию
β -актин	Abcam	Ab6276	Мышь	ВБ	1:6000
β E10	Covance	Sig-339320	Мышь	ВБ	1:1000
фосфо-p65	Cell Signaling	3031S	Кролик	ВБ/ИФ	1:1000
82E1	IBL	10323	Мышь	ИГХ	1:1000
Iba-1	Abcam	Ab5076	Коза	ИФ	1:500
GFAP	Dako	Z0334	Кролик	ВБ/ИФ	1:1000/1:2000
NeuN	Millipore	NAB377	Мышь	ИФ	1:500
iNOS	BD Bioscience	610432	Мышь	ВБ/ИФ	1:200
Расщепленная каспаза 3	Santa Cruz	Sc-7148	Кролик	ВБ	1:100
PSD95	Abcam	Ab2723	Мышь	ВБ	1:1000
NR2A	Cell Signaling	4205S	Кролик	ВБ	1:250
GluR1	Cell Signaling	13185S	Кролик	ВБ	1:250

ВБ – вестерн-блоттинг; ИП – иммунопреципитация; ИГХ – иммуногистохимия; ИФ – иммунофлуоресценция

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения расстройства у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей пептид, содержащий взаимодействующий с TLR2 (Toll-подобный рецептор 2) домен MyD88, где терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое по меньшей мере снижает передачу сигнала TLR2-MyD88, и где расстройство представляет собой такое расстройство, при котором передача сигнала TLR2-MyD88 играет роль в патогенезе заболевания.

2. Способ по п. 1, где домен MyD88, взаимодействующий с TLR2, содержит последовательность PGANQK (SEQ ID NO: 1).

3. Способ по п. 2, где взаимодействующий с TLR2 домен MyD88 содержит от 6 до 10 аминокислот.

4. Способ по п. 2, где пептид дополнительно содержит гомеодомен Antennapedia.

5. Способ по п. 3, где гомеодомен Antennapedia связывается с С-концом пептида, содержащего взаимодействующий с TLR2 домен MyD88.

6. Способ по п. 2, где пептидная последовательность представляет собой drqikiwfnrrmkwkkpгахqk (SEQ ID NO: 2).

7. Способ по п. 1, где пептид связывается с вектором доставки, обеспечивая по меньшей мере одно из внутриклеточной доставки клетки и прохождения через гематоэнцефалический барьер.

8. Способ по п. 7, где вектор доставки представляет собой гомеодомен Antennapedia, и где вектор доставки связывается с С-концом пептида, содержащего взаимодействующий с TLR2 домен MyD88.

9. Способ по п. 1, где расстройство представляет собой неврологическое расстройство, выбранное из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, болезни Хантингтона и множественной системной атрофии.

10. Способ по п. 1, где расстройство выбрано из группы, состоящей из бактериальной инфекции, грибковой инфекции, паразитарной инфекции, вирусной инфекции, сепсиса и абсцесса мозга.

11. Способ по п. 1, где расстройство представляет собой аутоиммунное расстройство, выбранное из группы, состоящей из рассеянного склероза и ревматоидного артрита.

12. Способ по п. 1, где композиция дополнительно содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

13. Способ по п. 12, где композицию вводят интраназально.

14. Способ по п. 12, где композицию вводят путем, выбранным из группы, состоящей из перорального, подкожного, внутрисуставного, внутрикожного, внутривенного, внутривнутрибрюшинного и внутримышечного путей.

15. Способ по п. 1, где пациент представляет собой человека.

16. Способ лечения расстройства у пациента, включающий введение пациенту, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества композиции, содержащей пептид, содержащий последовательность P₆GAHQK (SEQ ID NO: 1), где терапевтически эффективное количество представляет собой количество, которое по меньшей мере снижает передачу сигналов TLR2-MyD88, и где расстройство представляет собой неврологическое расстройство, выбранное из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви, болезни Хантингтона и множественной системной атрофии.

17. Способ по п. 16, где пептид содержит от 6 до 10 аминокислот.

18. Способ по п. 17, где пептид дополнительно содержит гомеодомен Antennapedia.

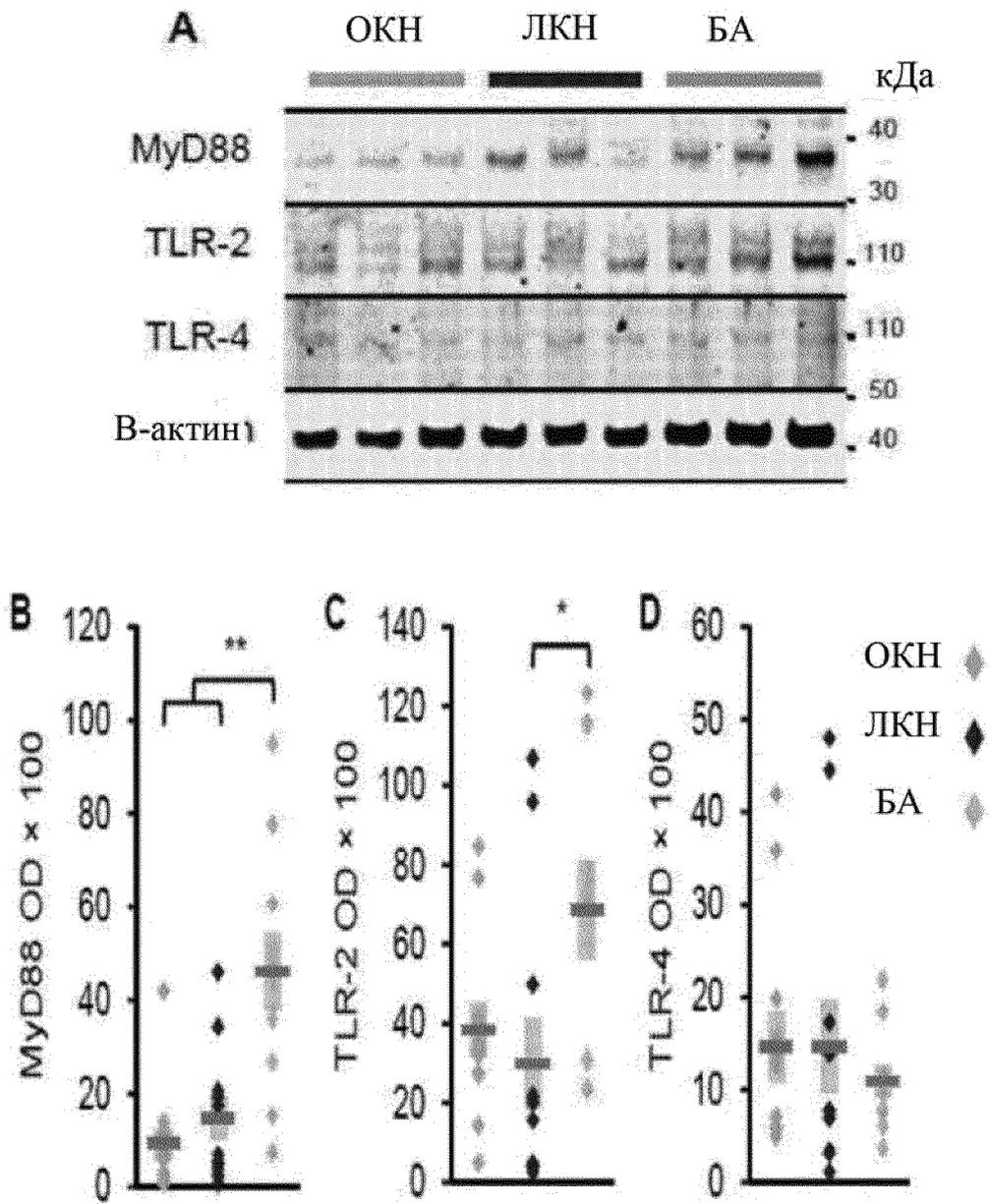
19. Способ по п. 18, где гомеодомен Antennapedia связывается с С-концом последовательности P₆GAHQK (SEQ ID NO: 1).

20. Способ по п. 19, где пептидная последовательность представляет собой drqikiwfnrrmkwkkpgahqk (SEQ ID NO: 2).

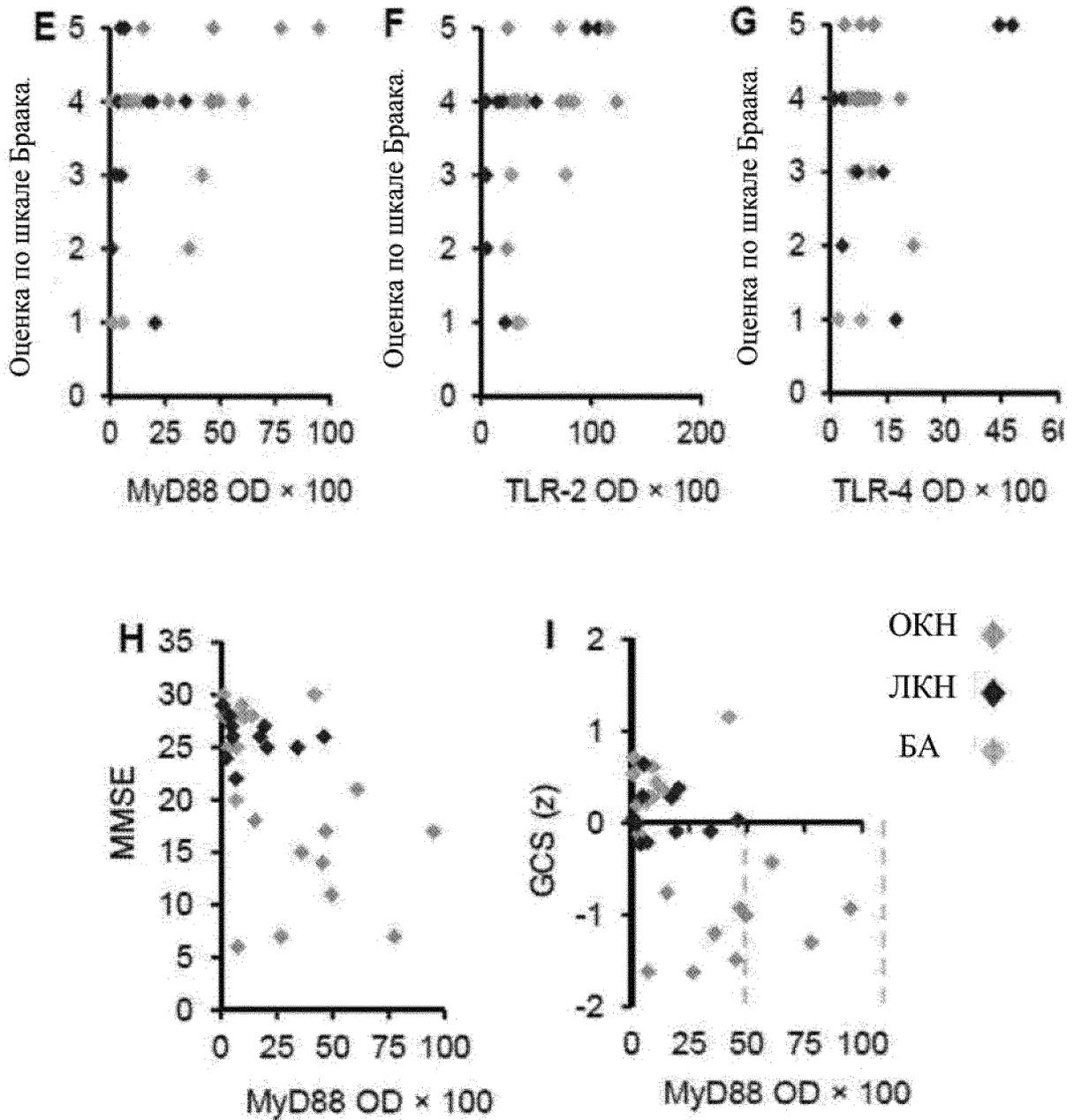
21. Композиция, содержащая пептидную последовательность P₆GAHQK (SEQ ID NO: 1), связанную с вектором доставки, обеспечивающим по меньшей мере одно из внутриклеточной доставки клетки и прохождения через гематоэнцефалический барьер.

22. Композиция по п. 21, где вектор доставки представляет собой гомеодомен Antennapedia.

23. Композиция по п. 22, содержащая пептидную последовательность drqikiwfnrrmkwkkpgahqk (SEQ ID NO: 2).

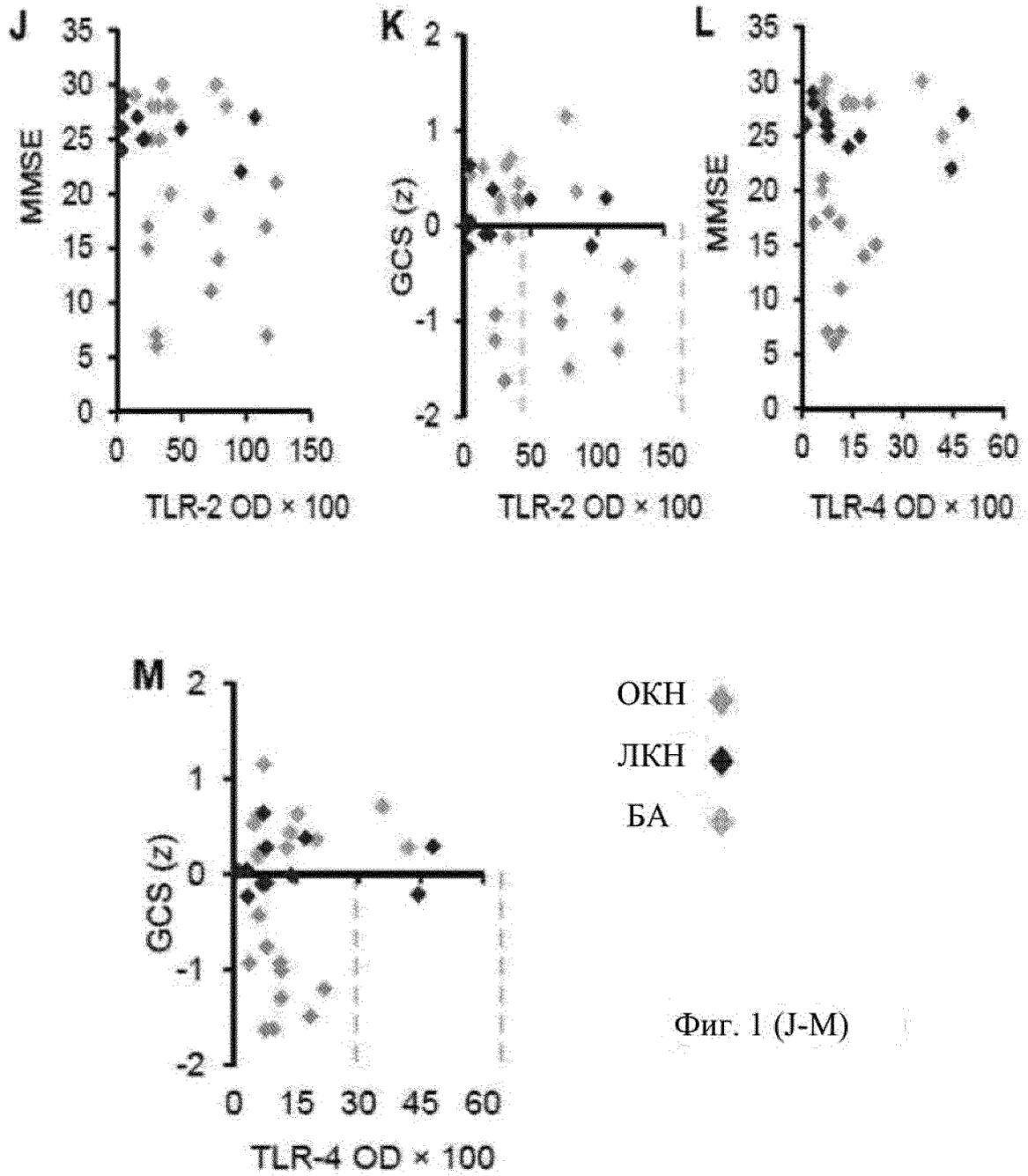


Фиг. 1 (А-Д)



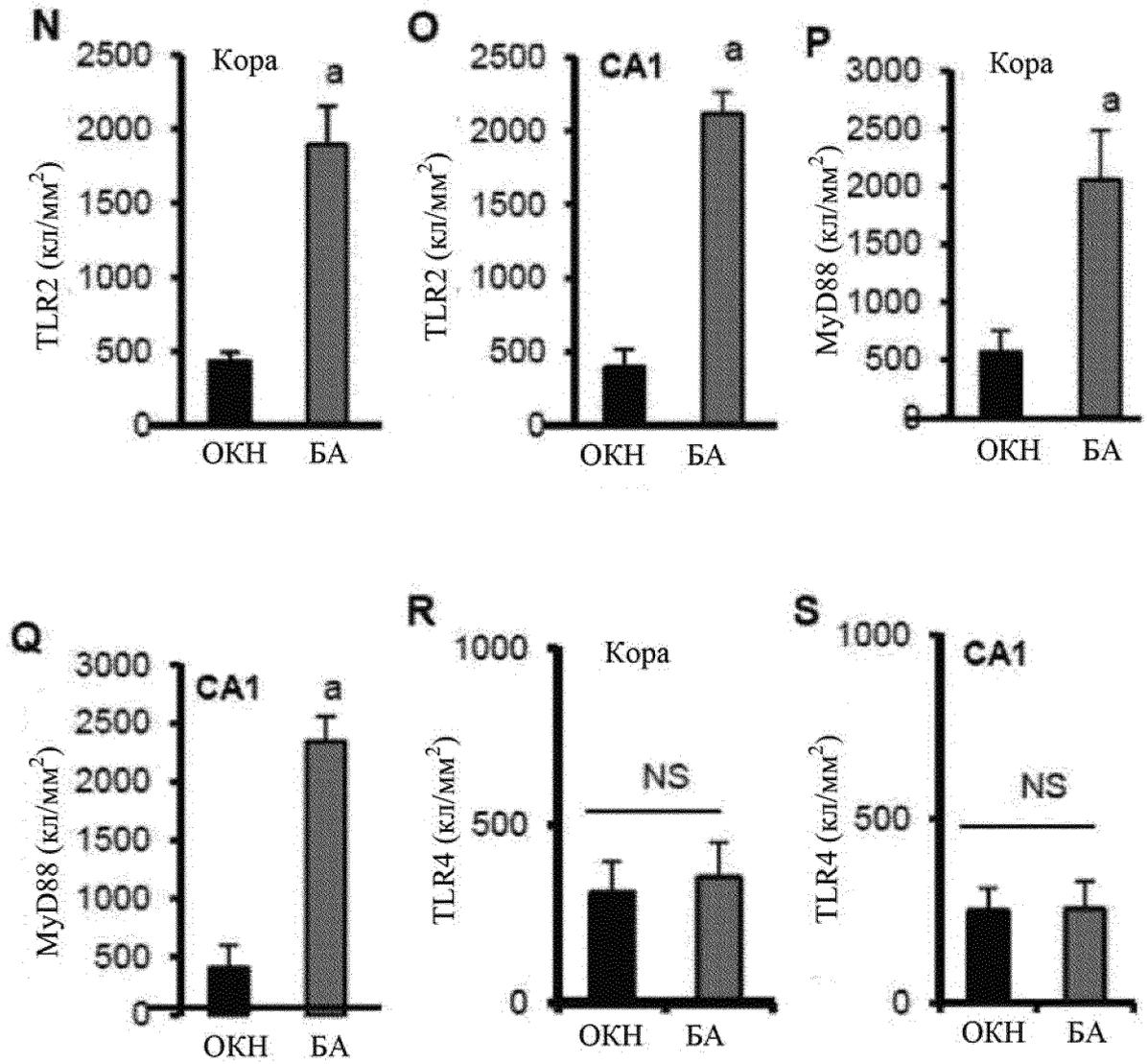
MMSE – краткая шкала оценки психического состояния;
GCS(z) – суммарный когнитивный z-индекс

Фиг. 1 (E-I)



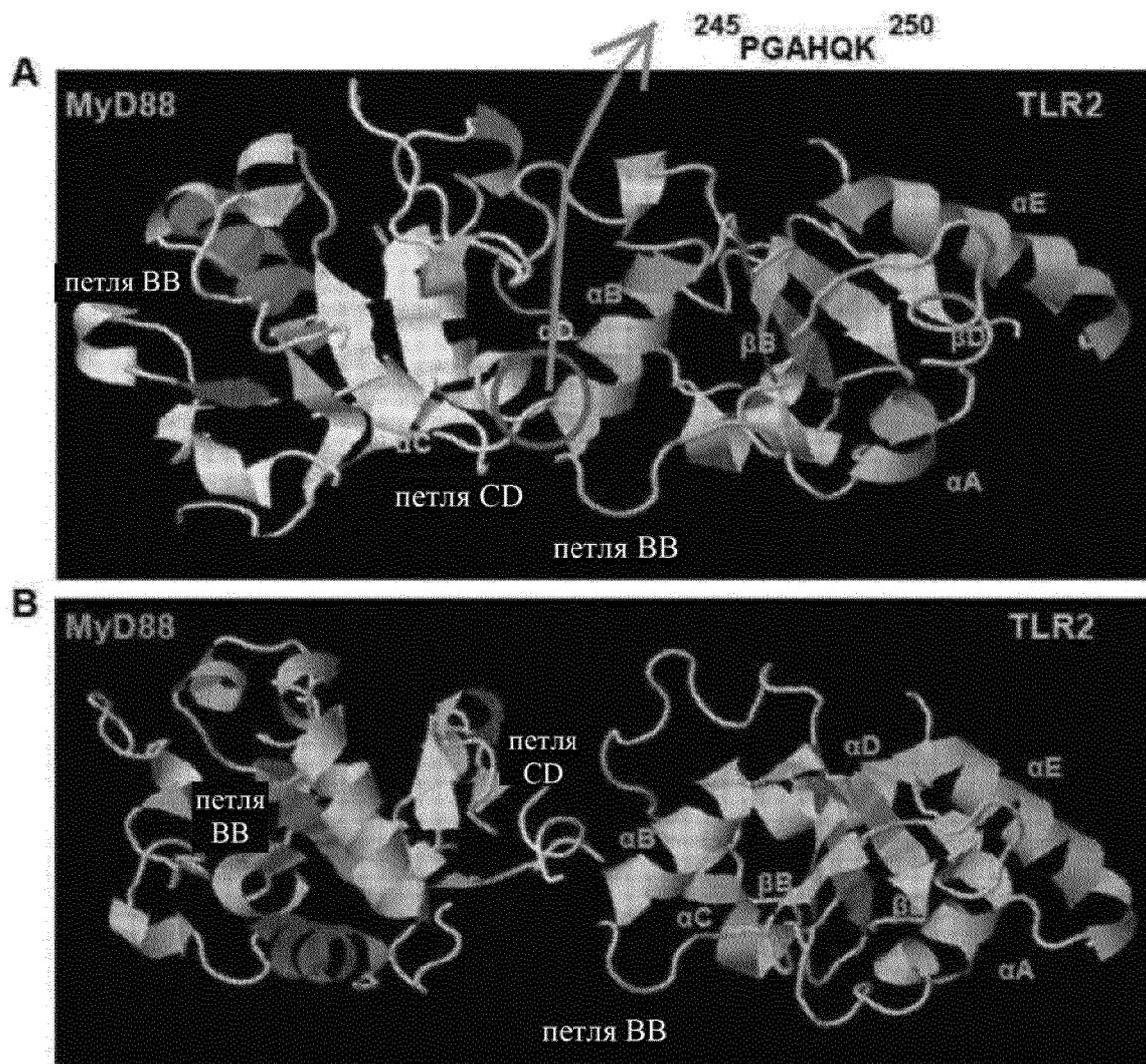
Фиг. 1 (J-M)

MMSE – краткая шкала оценки психического состояния;
GCS(z) – суммарный когнитивный z-индекс

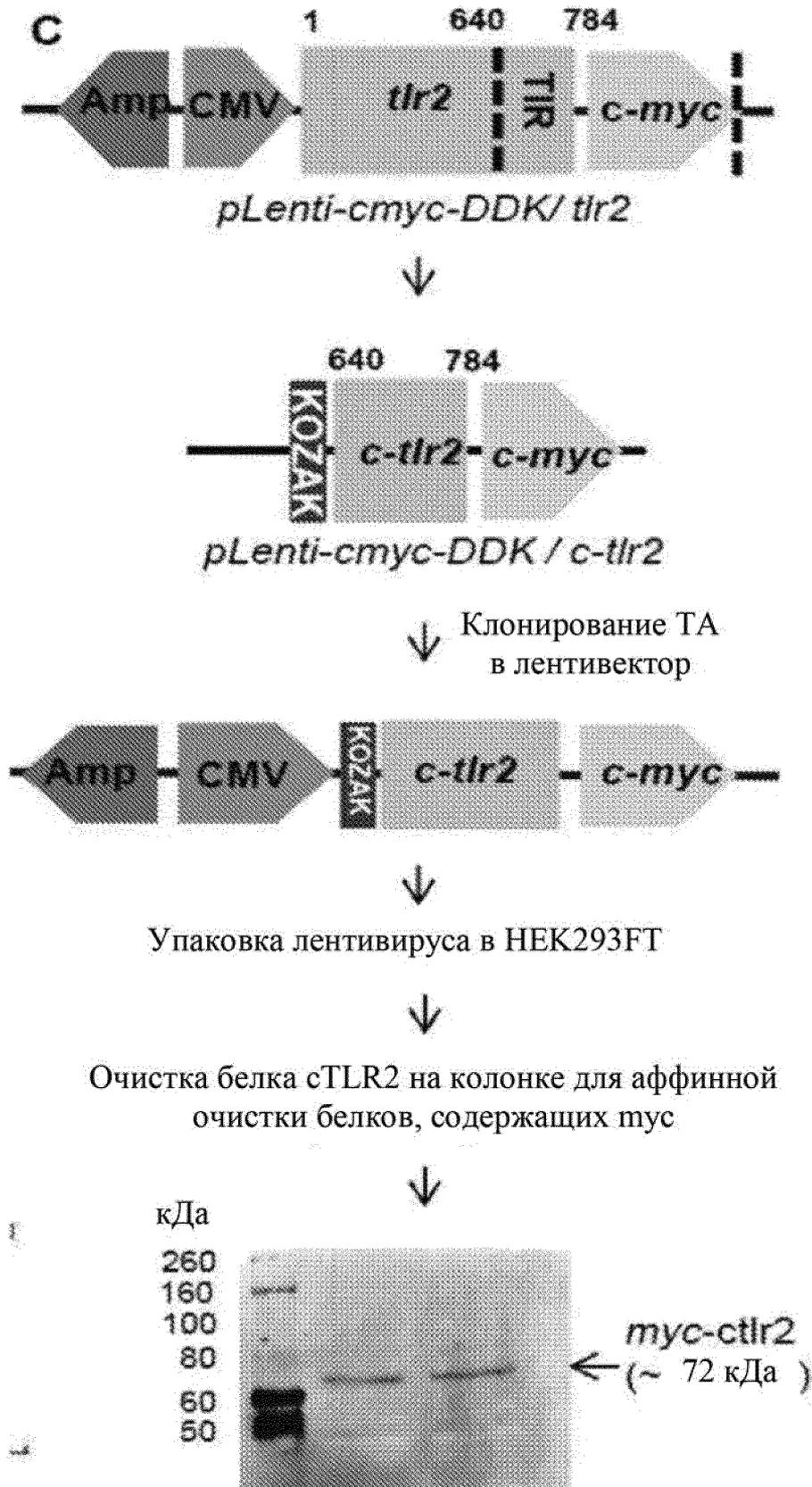


NS – не достоверно

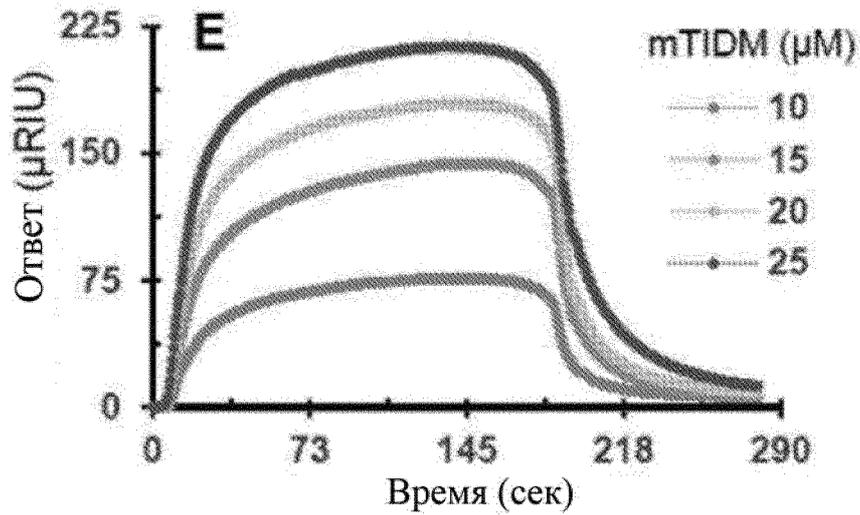
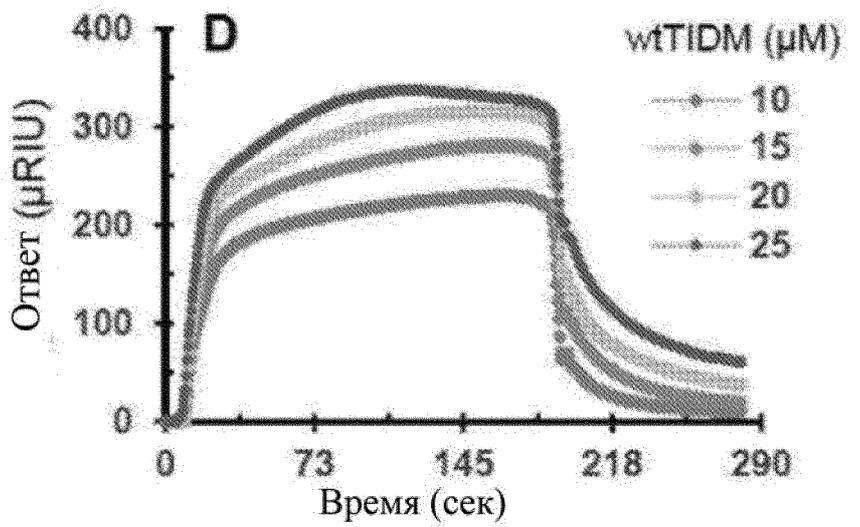
Фиг. 1 (N-S)



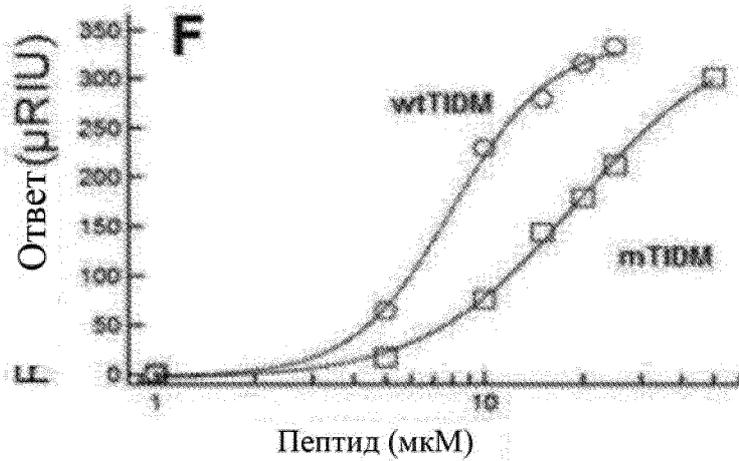
Фиг. 2 (А-В)

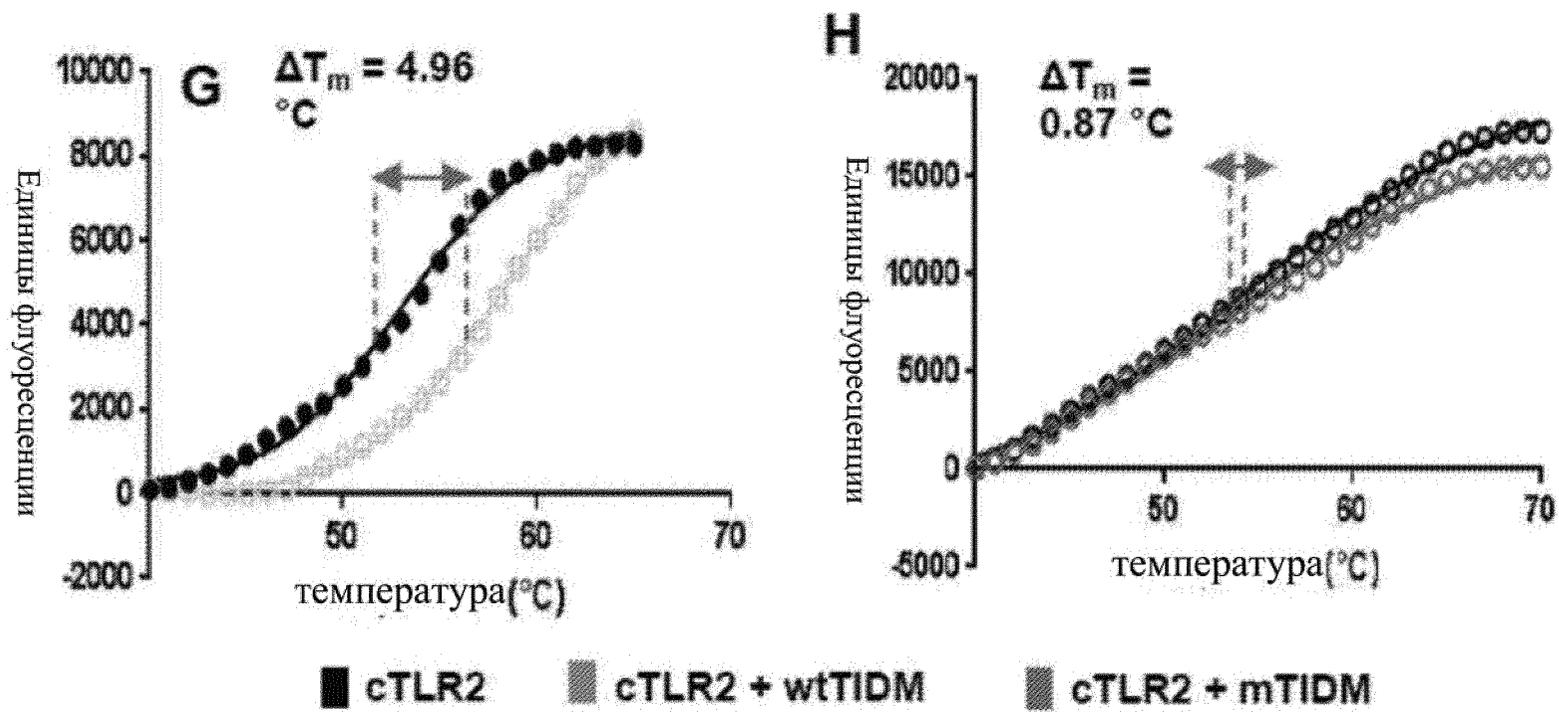


Фиг. 2 С

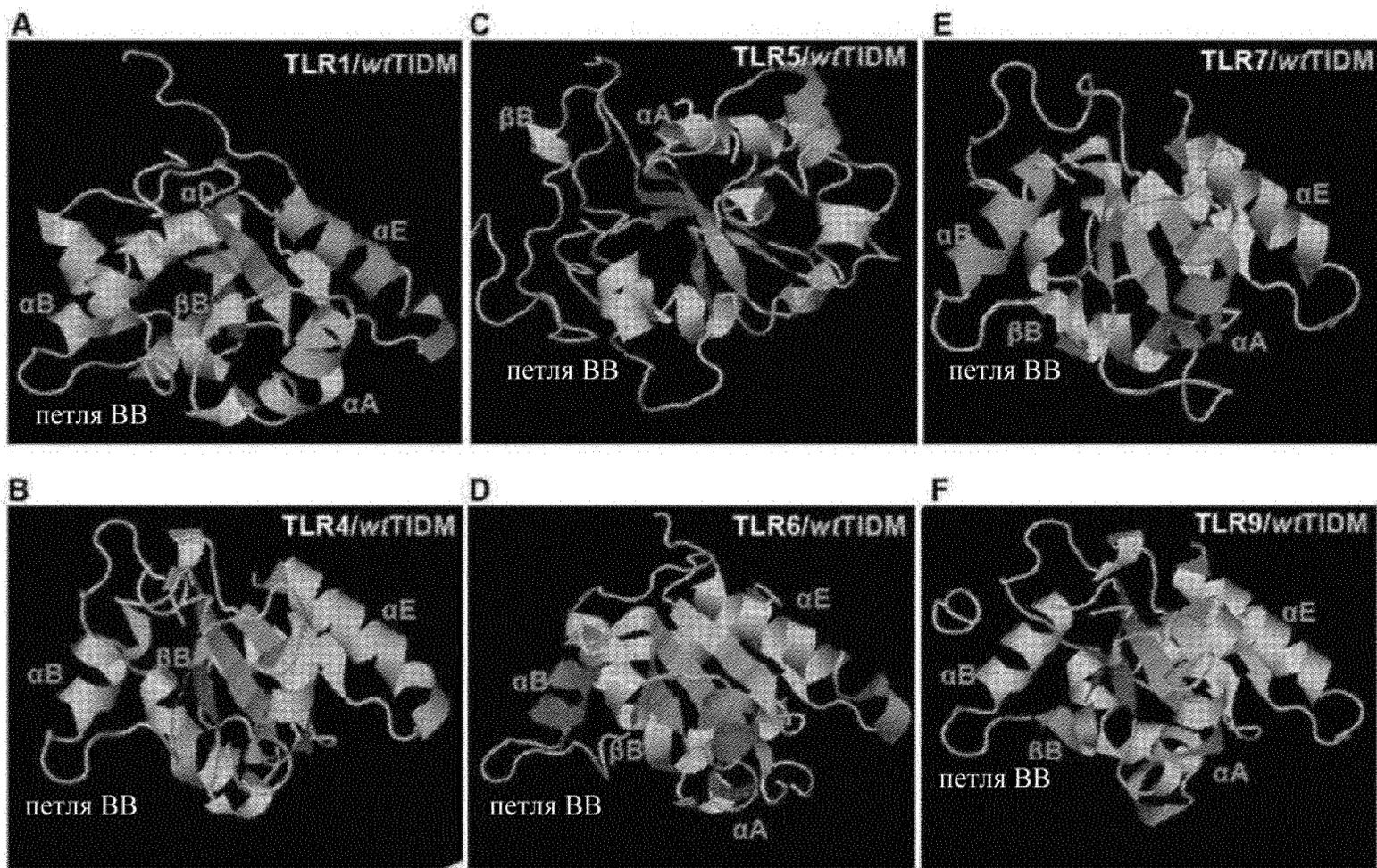


Фиг. 2 (D-F)

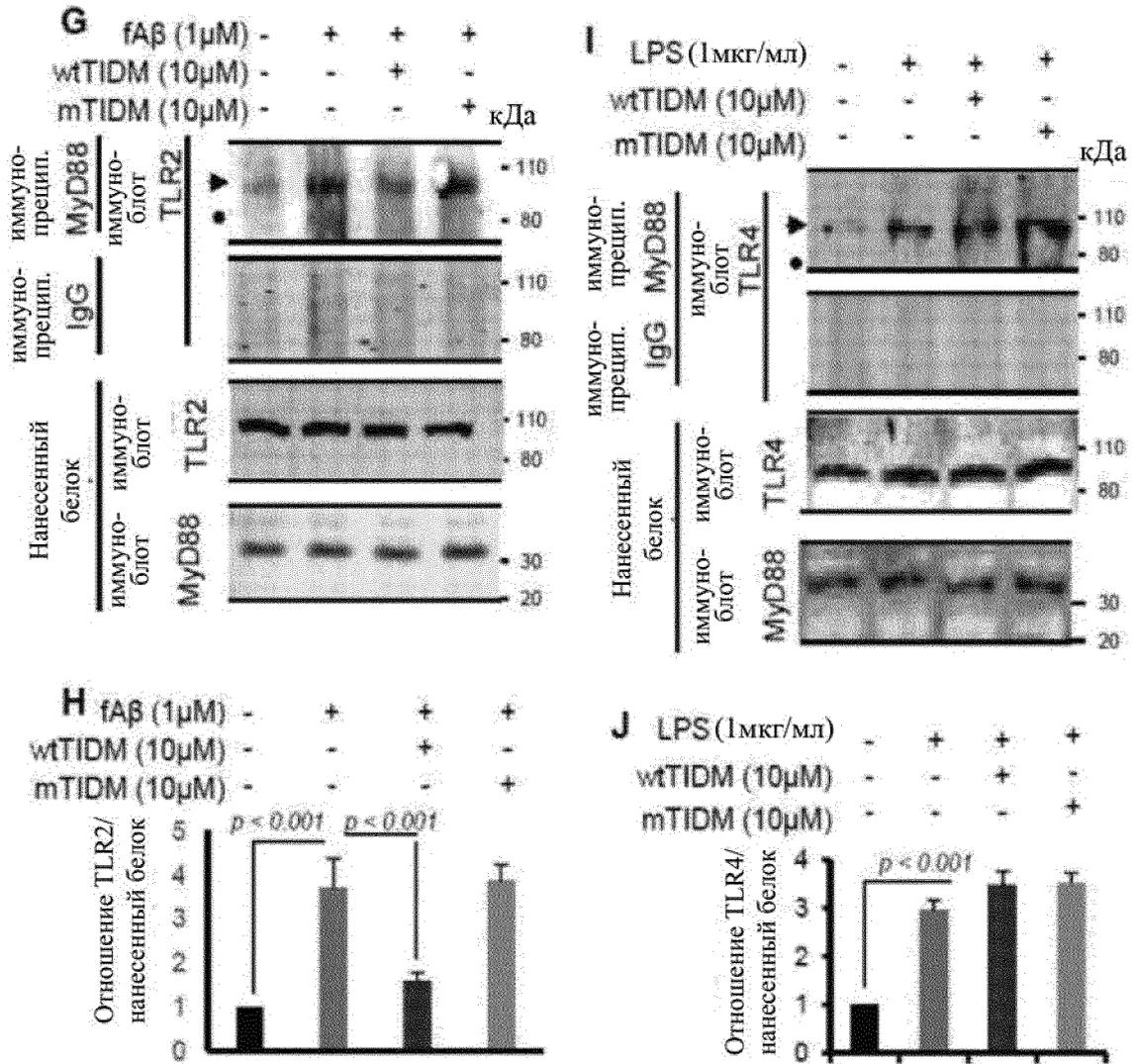




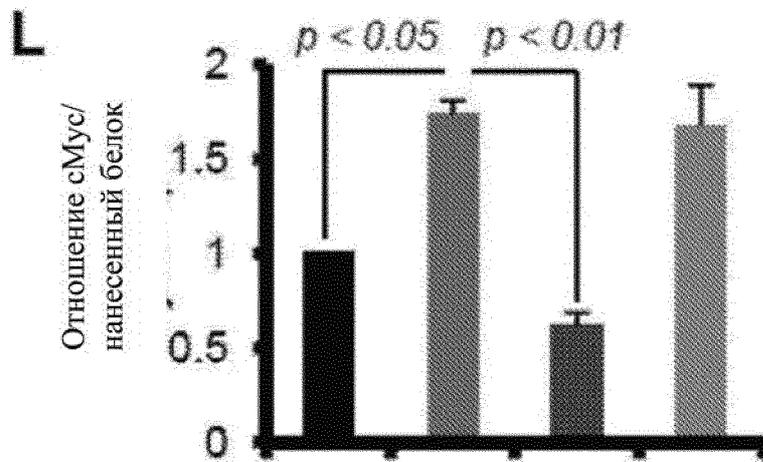
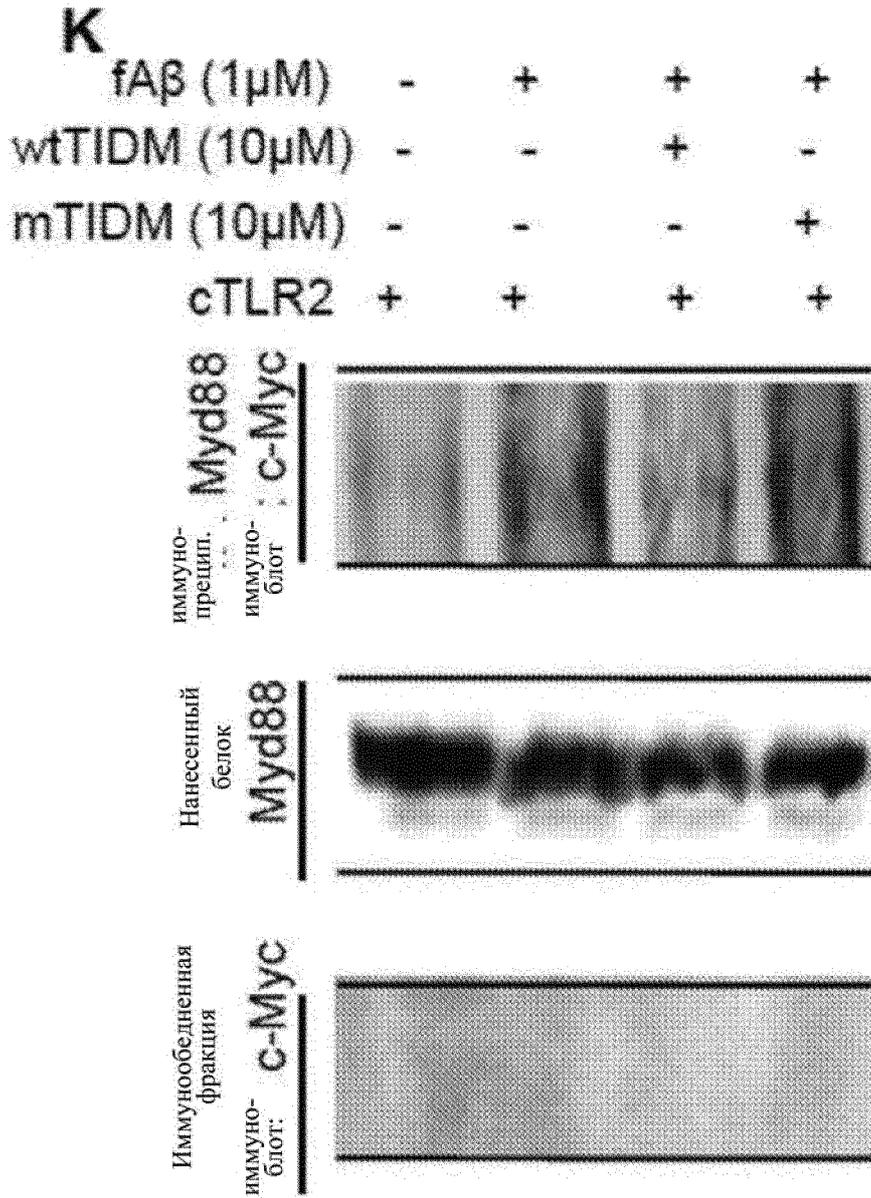
Фиг. 2 (G-H)



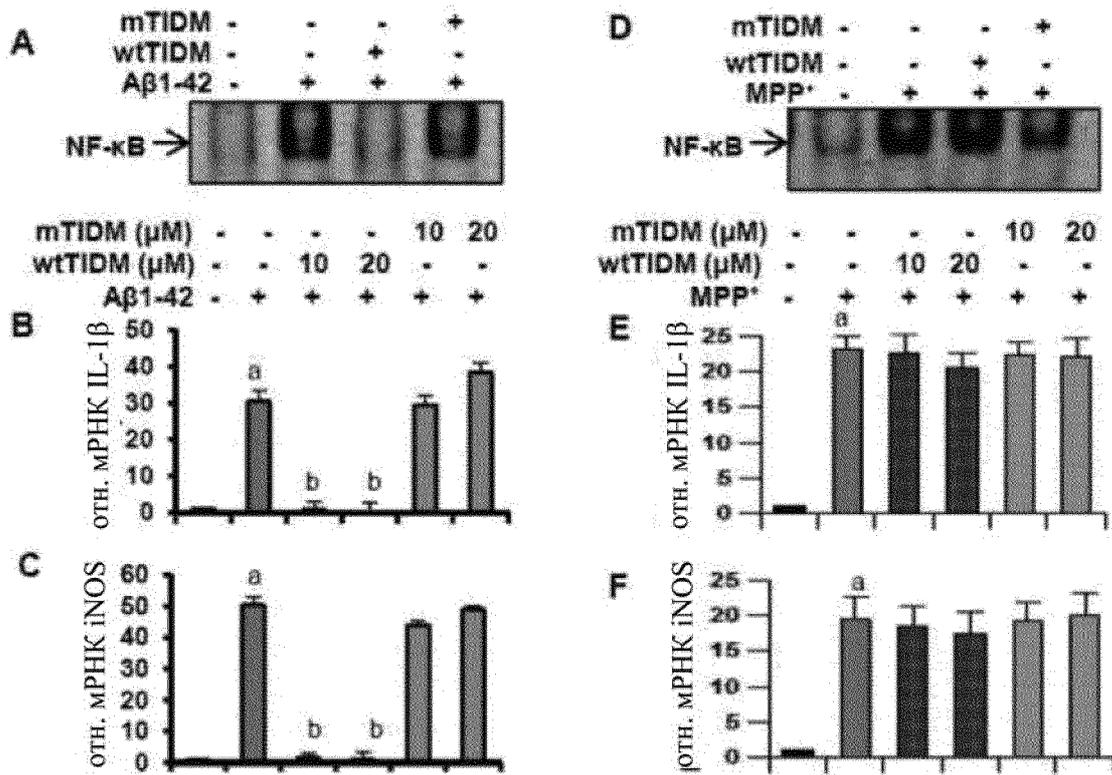
Фиг. 3 (A-F)



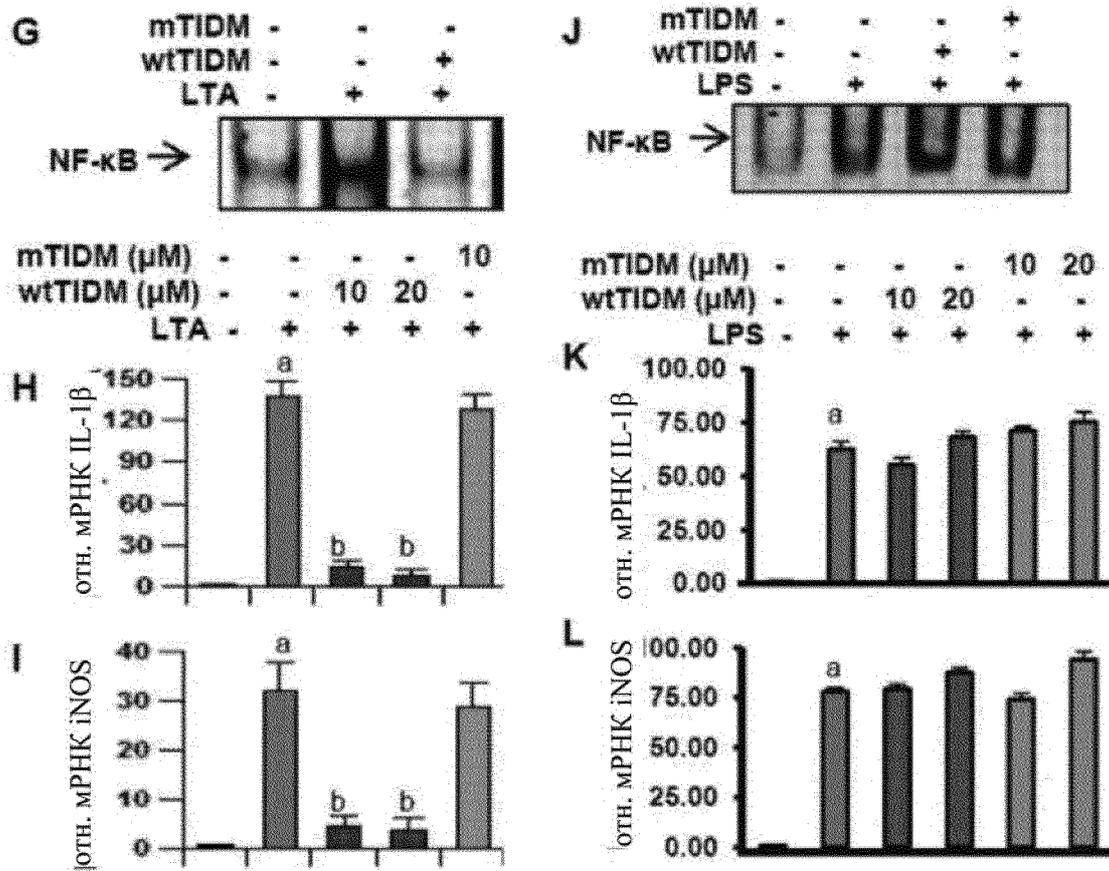
Фиг. 3 (G-J)



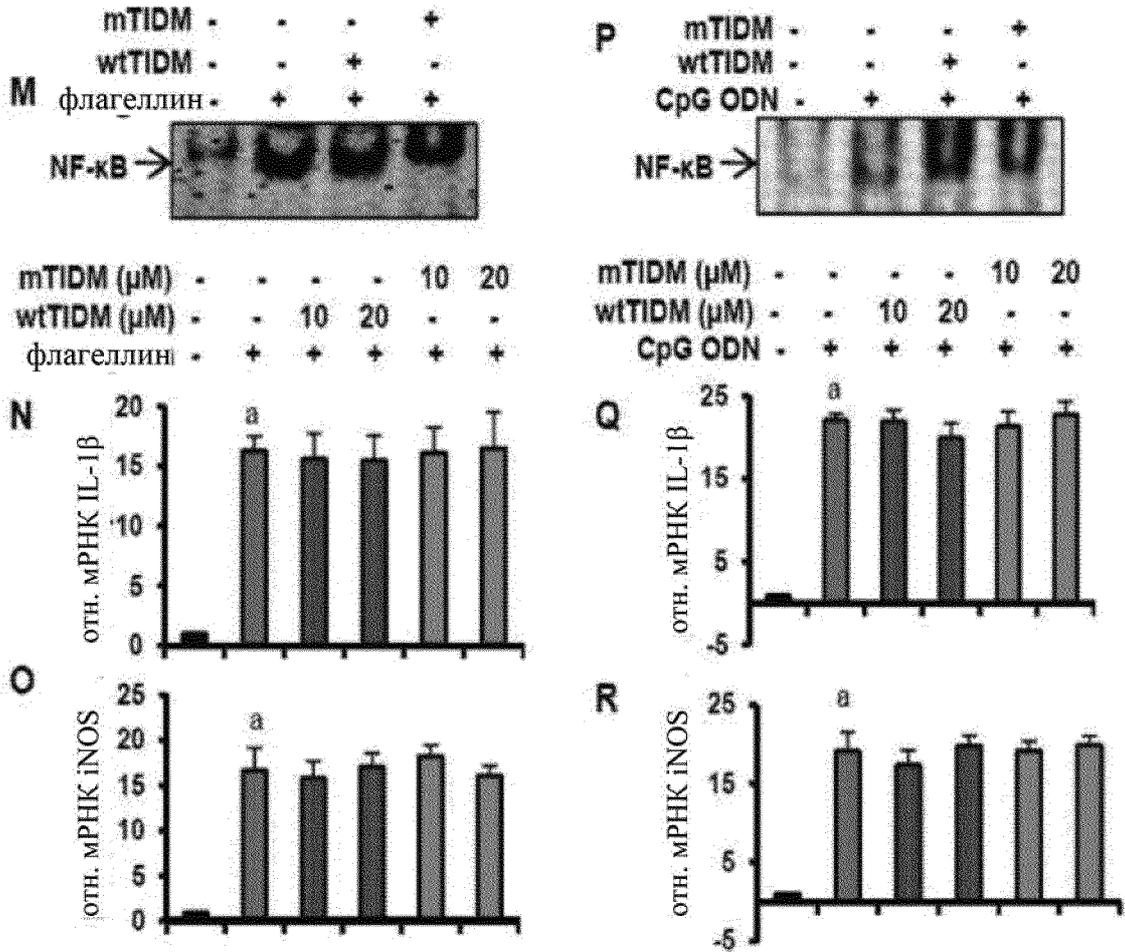
Фиг. 3 (К-Л)



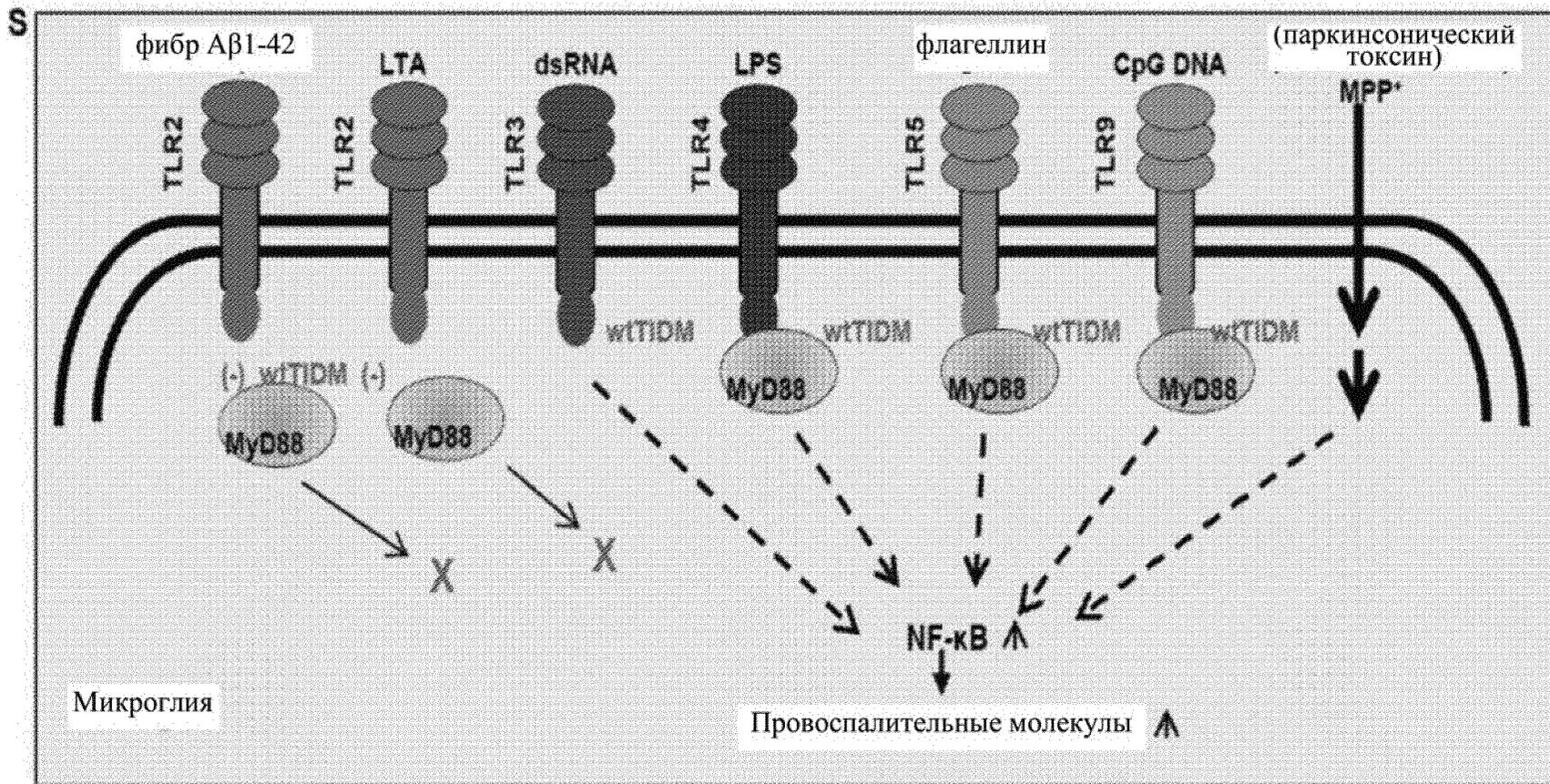
Фиг. 4 (А-Ф)



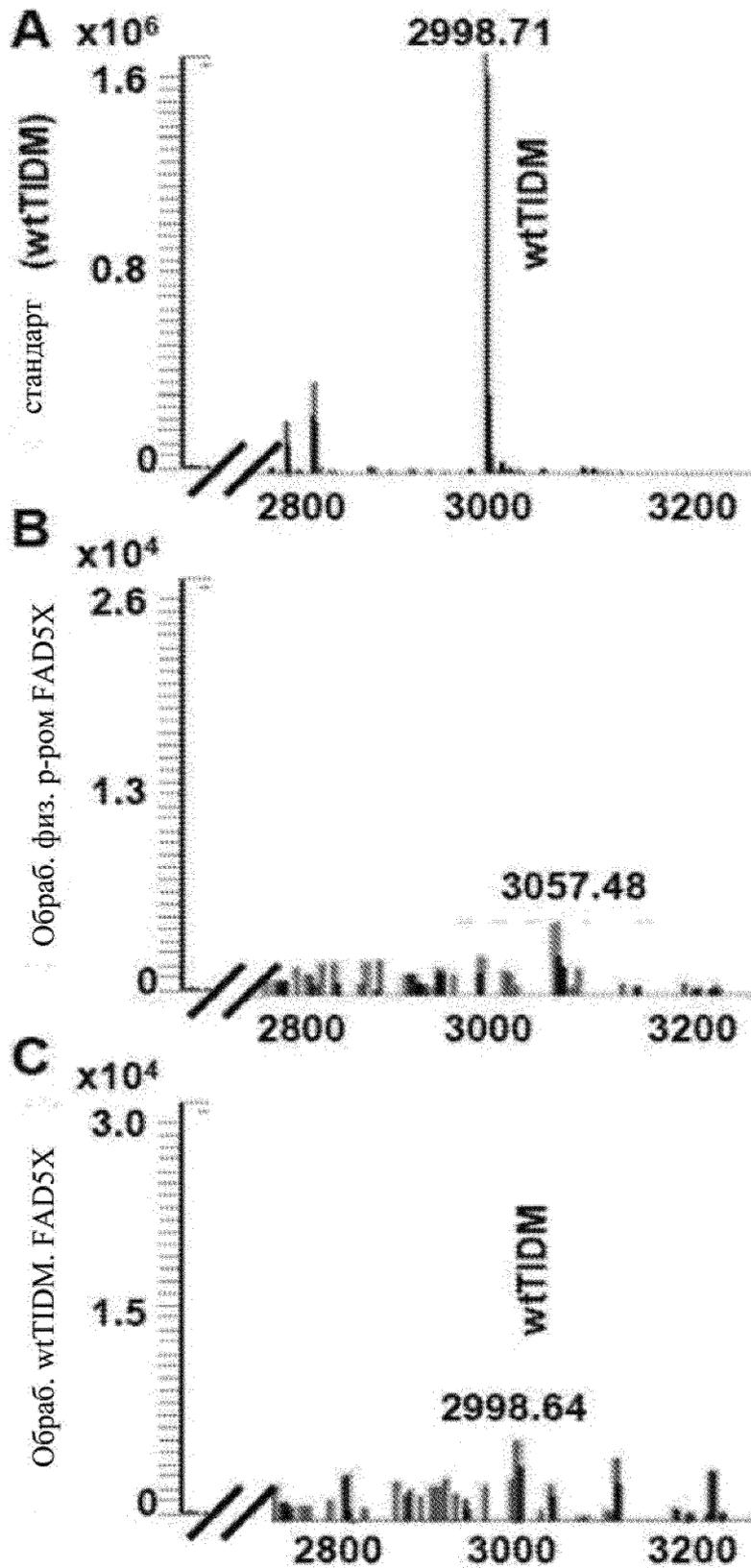
Фиг. 4 (G-L)



Фиг. 4 (M-R)

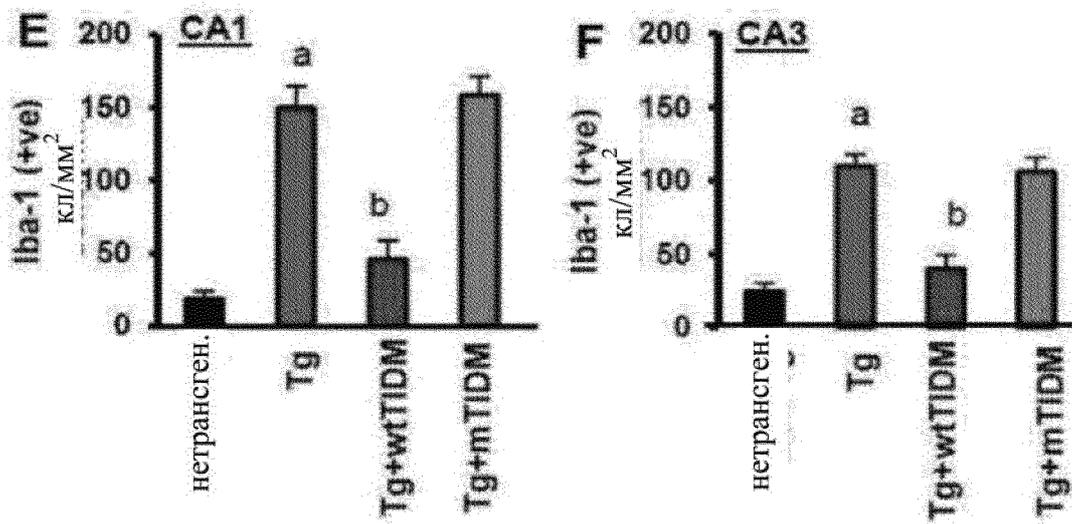
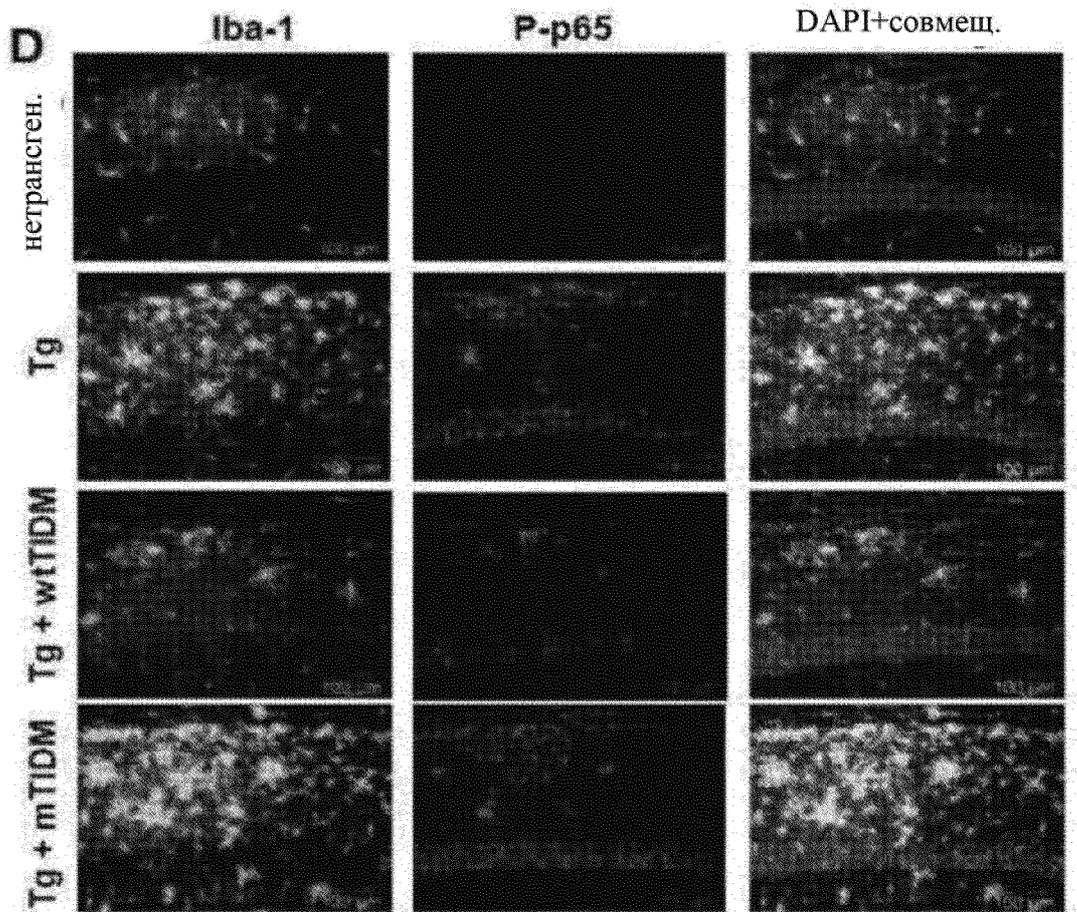


Фиг. 4 S

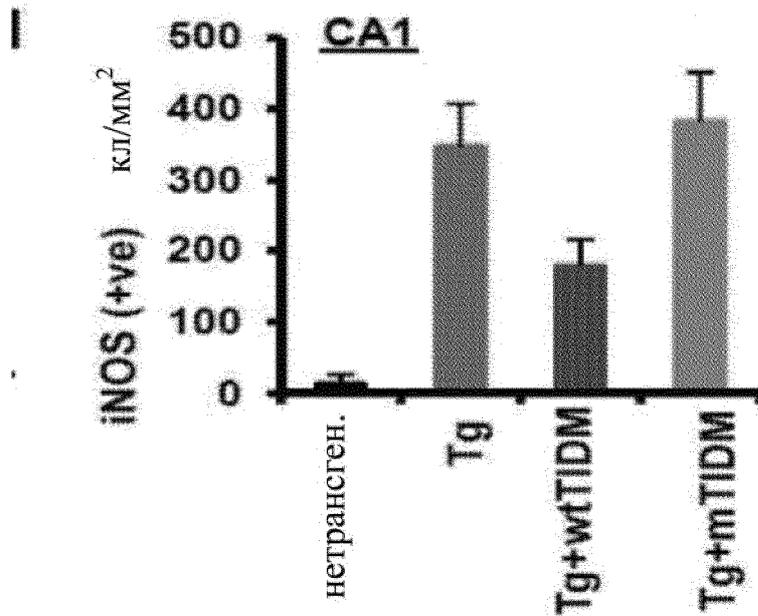
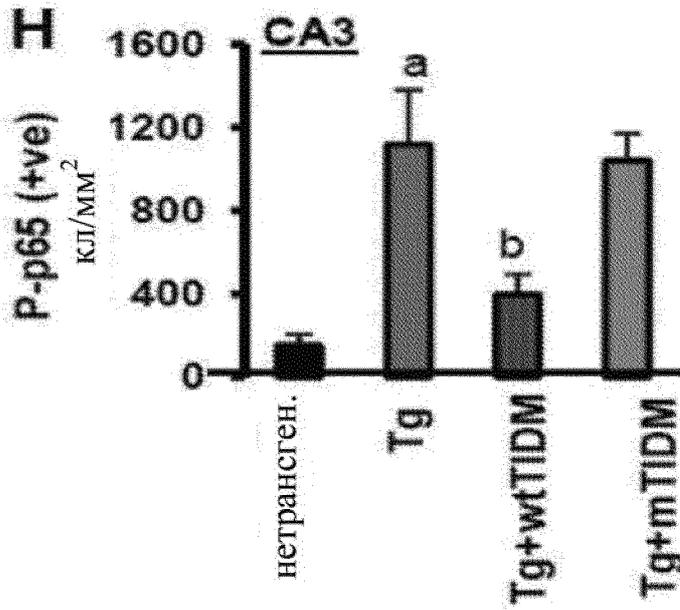
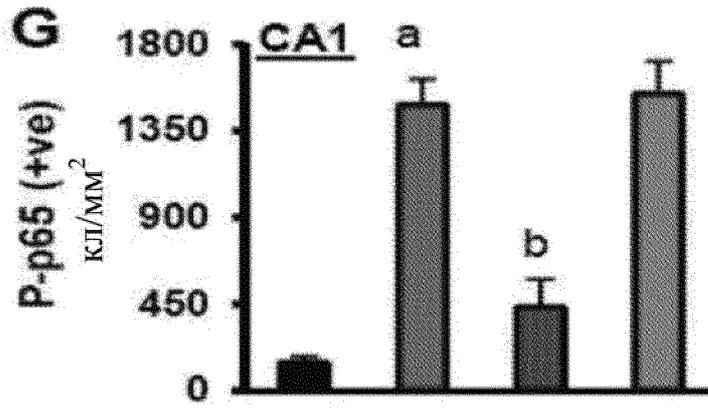


Зависимость интенсивности от отнош. массы к заряду (m/z)

Фиг. 5 (А-С)



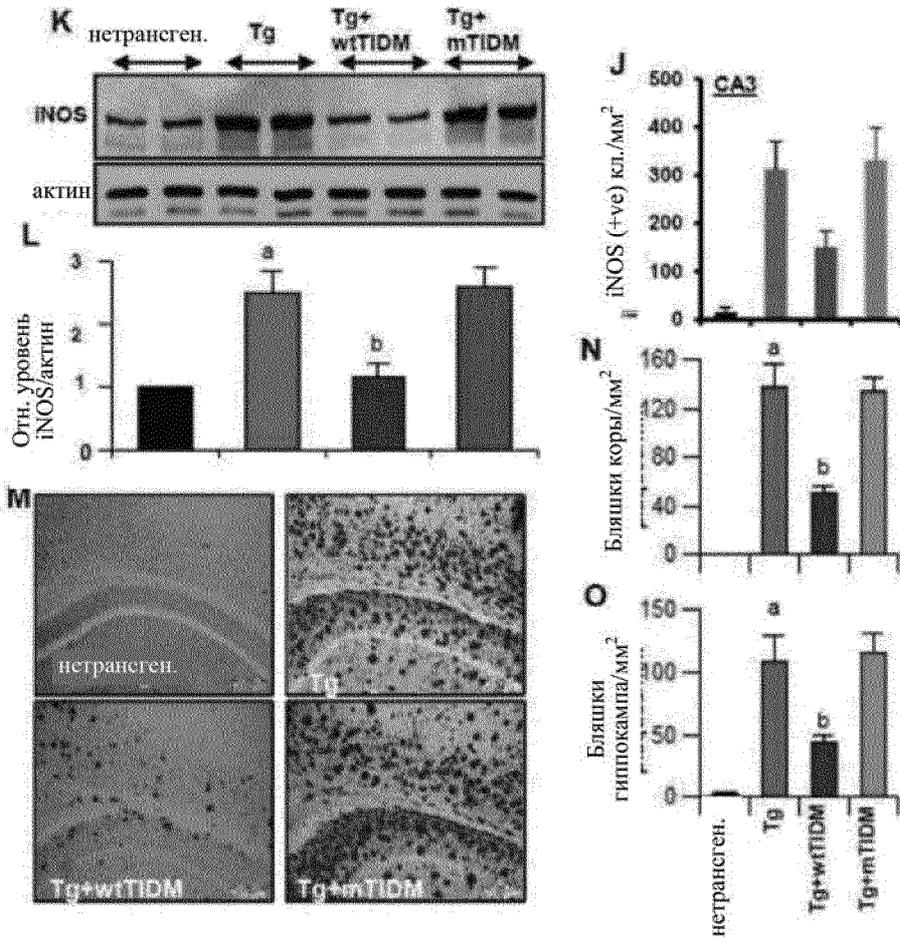
Фиг. 5 (D-F)



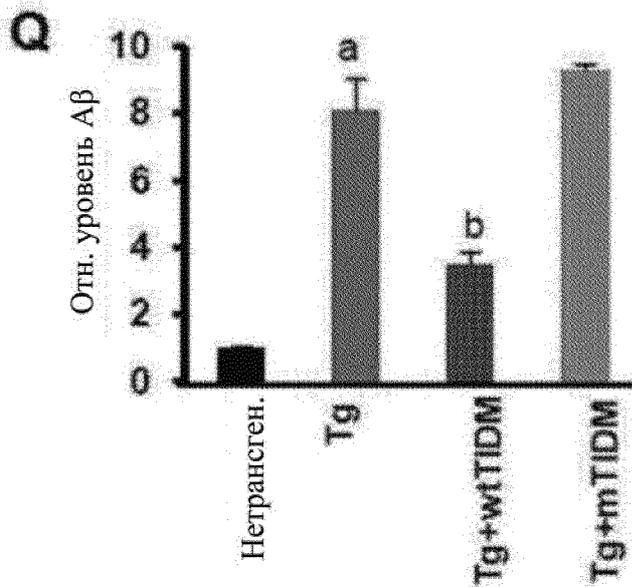
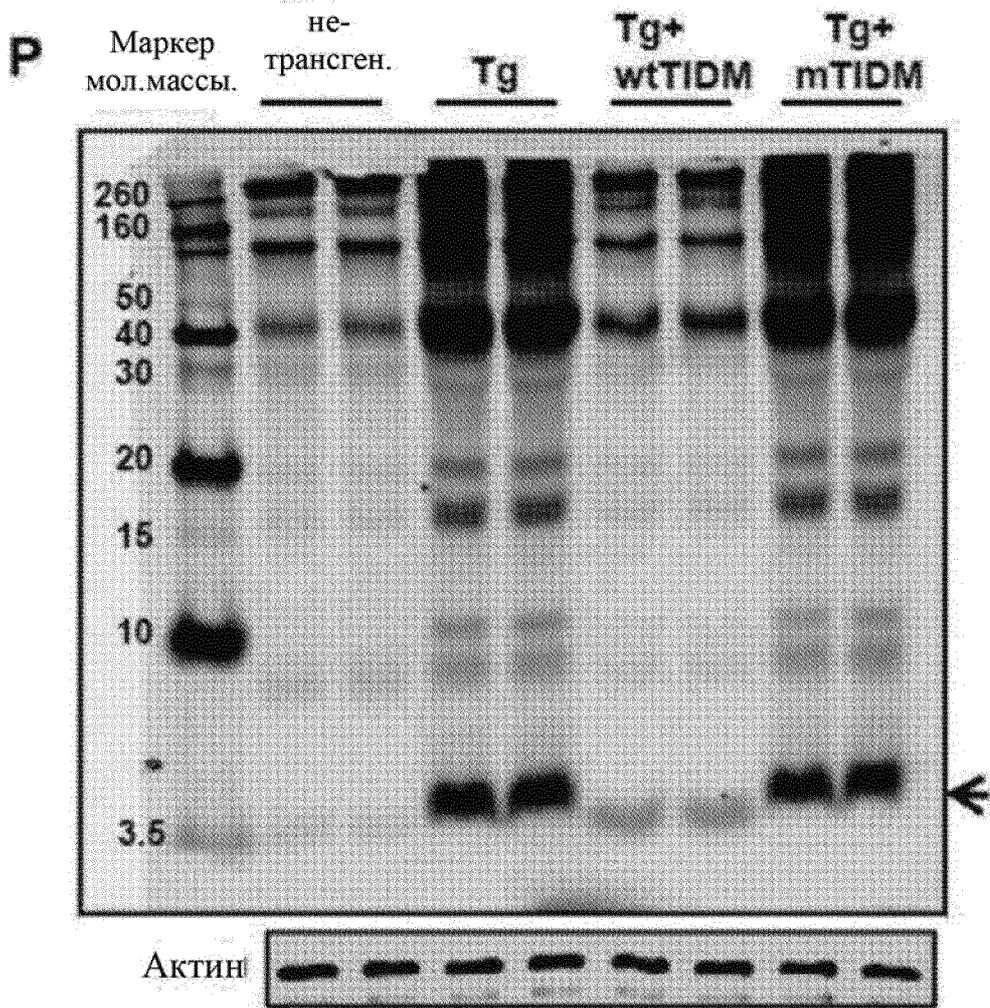
Фиг. 5 (G-I)

WO 2019/135992

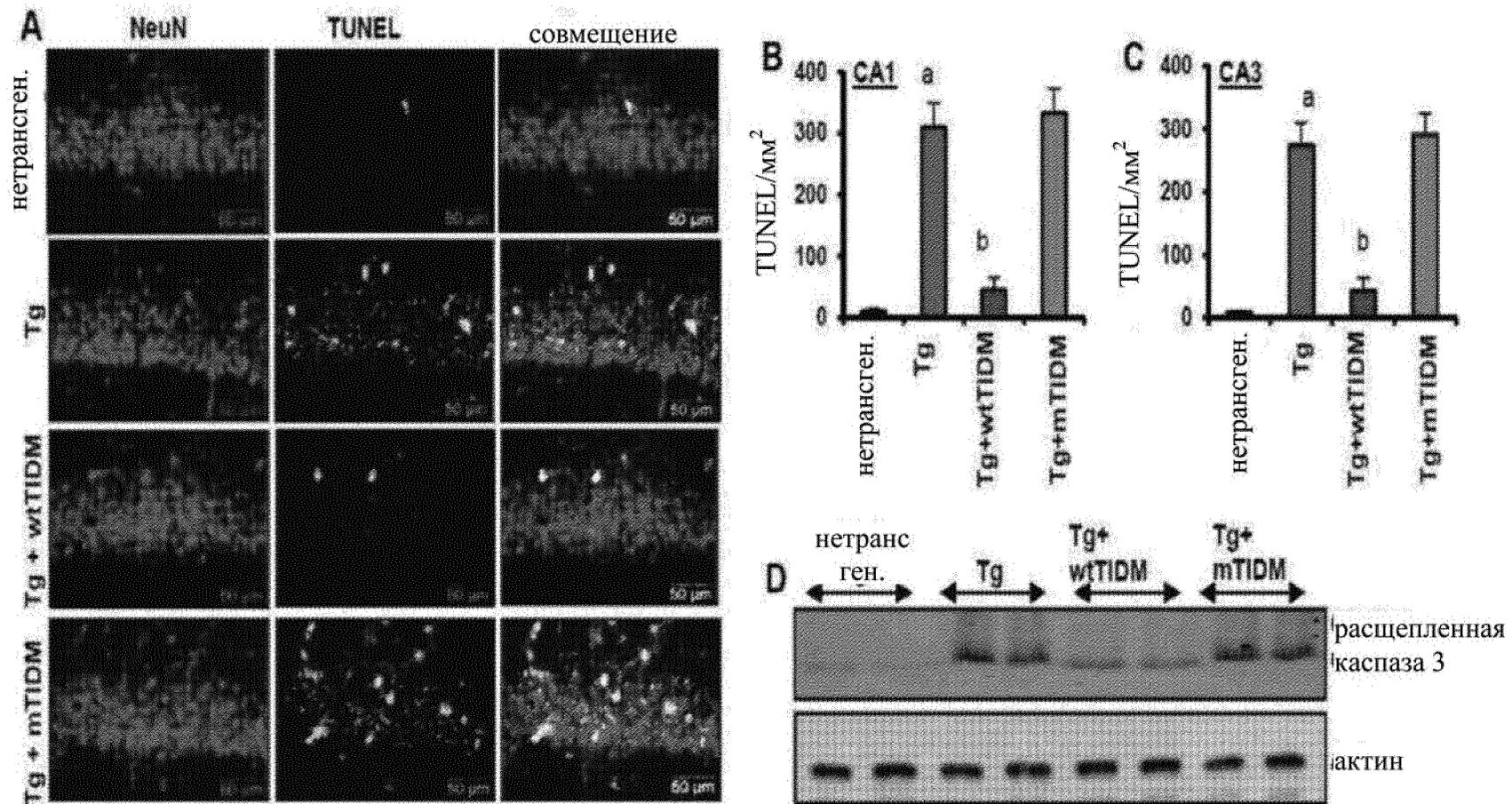
PCT/US2018/067876



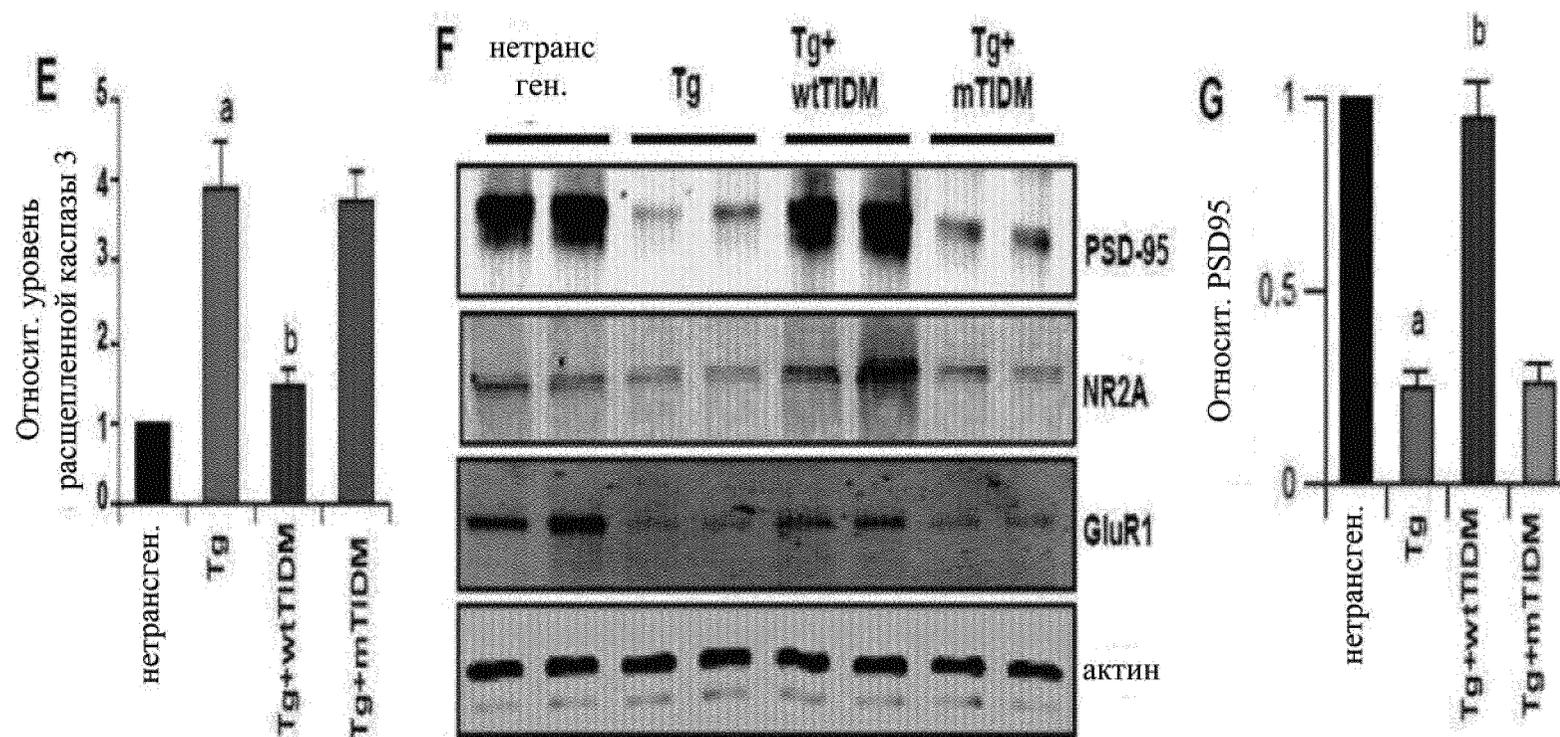
Фиг. 5 (J-O)



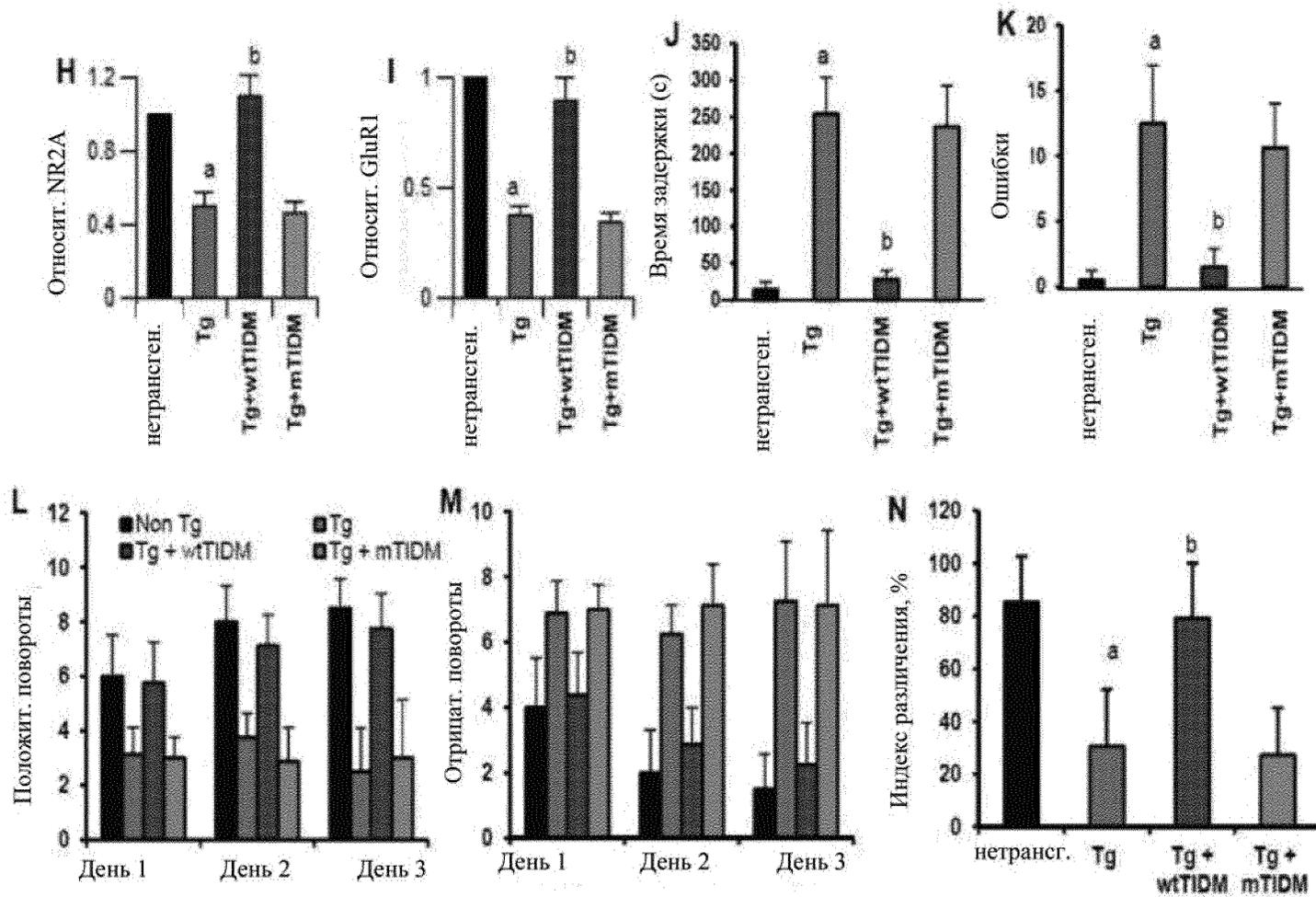
Фиг. 5 (P-Q)



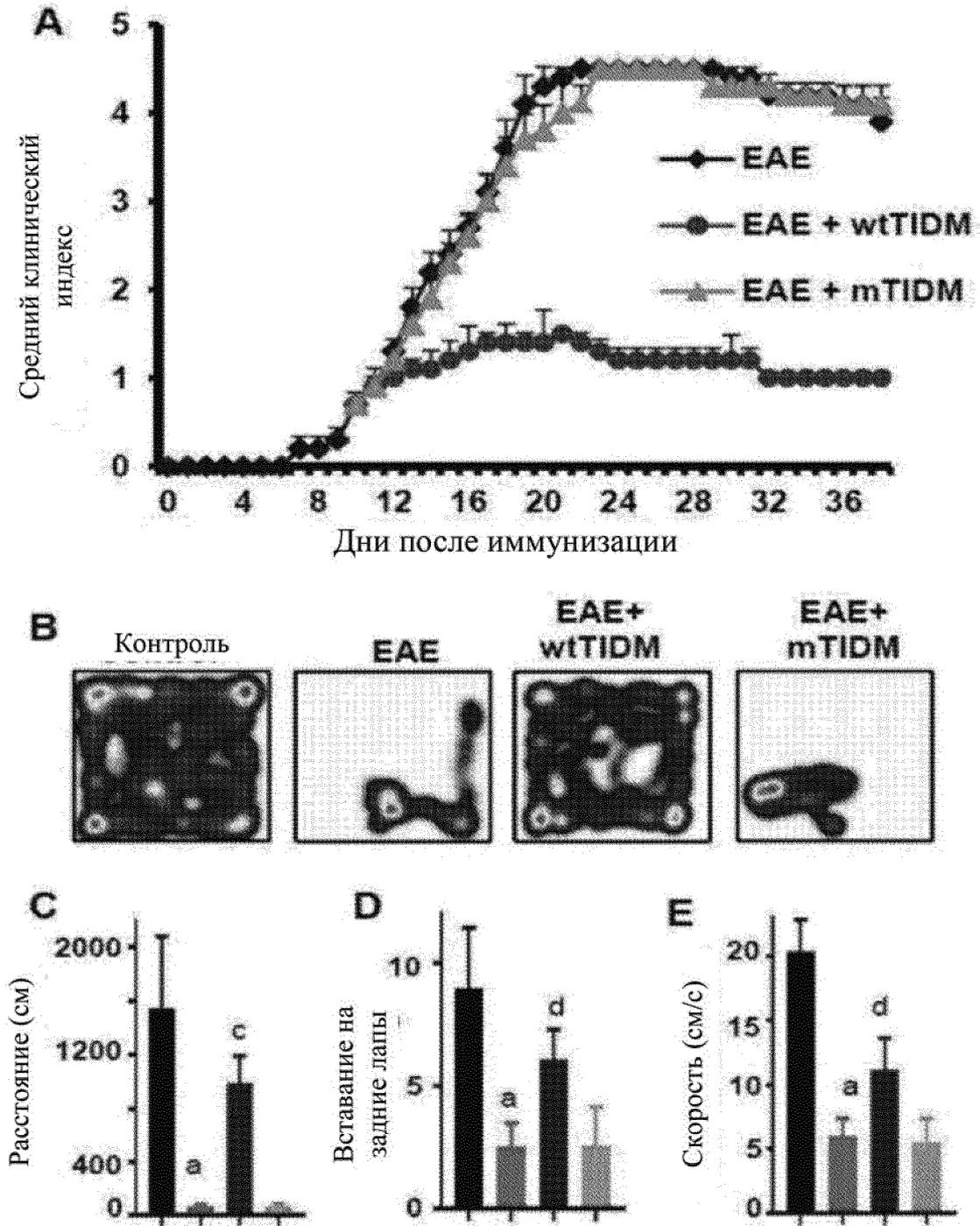
Фиг. 6 (A-D)



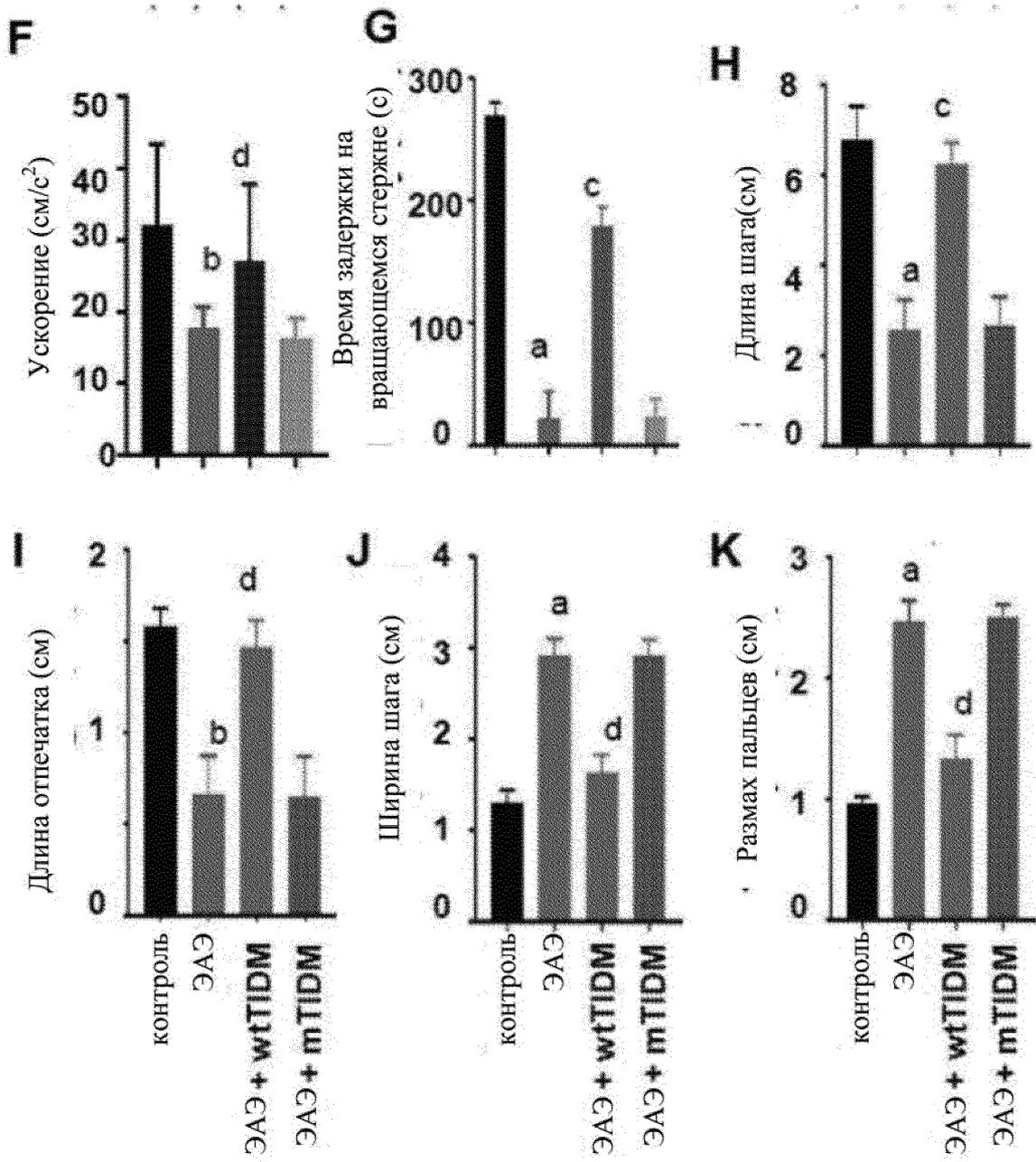
Фиг. 6 (E-G)



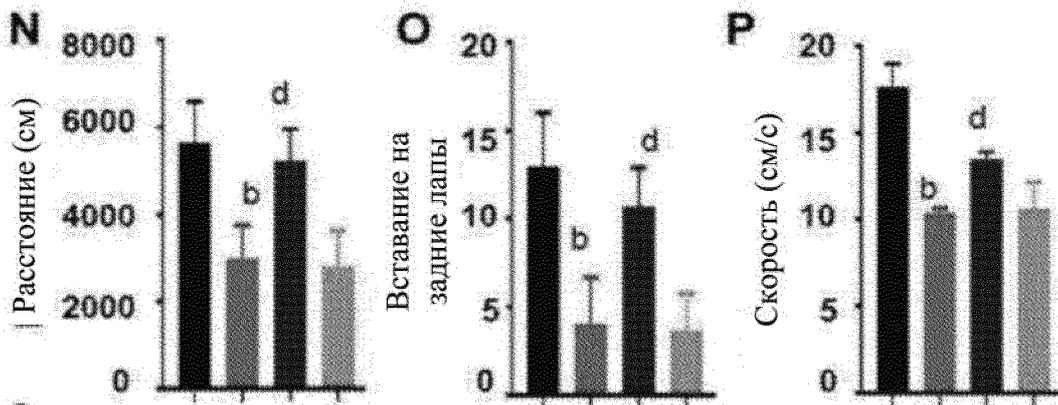
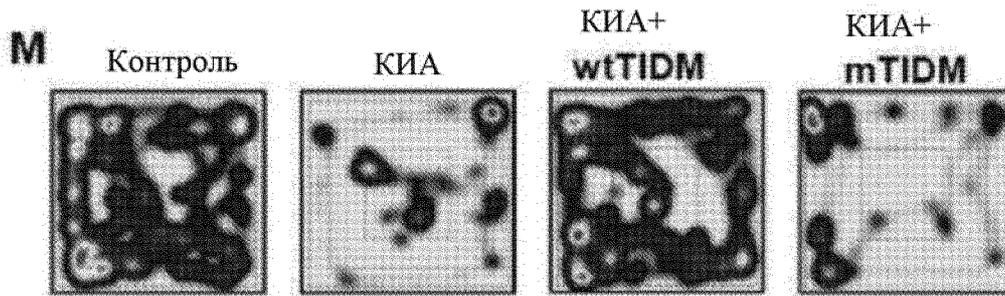
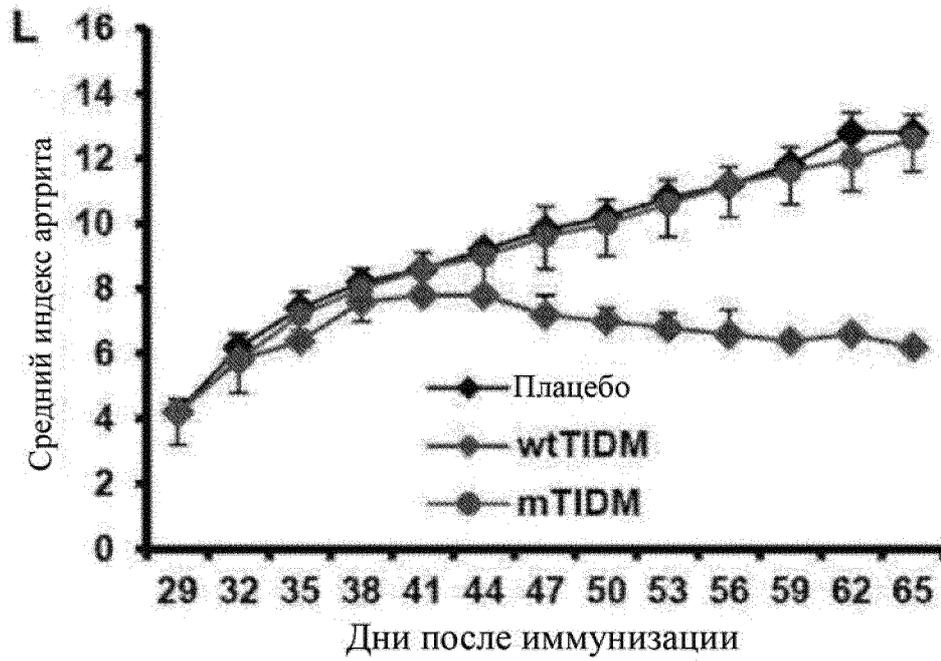
Фиг. 6 (N-H)



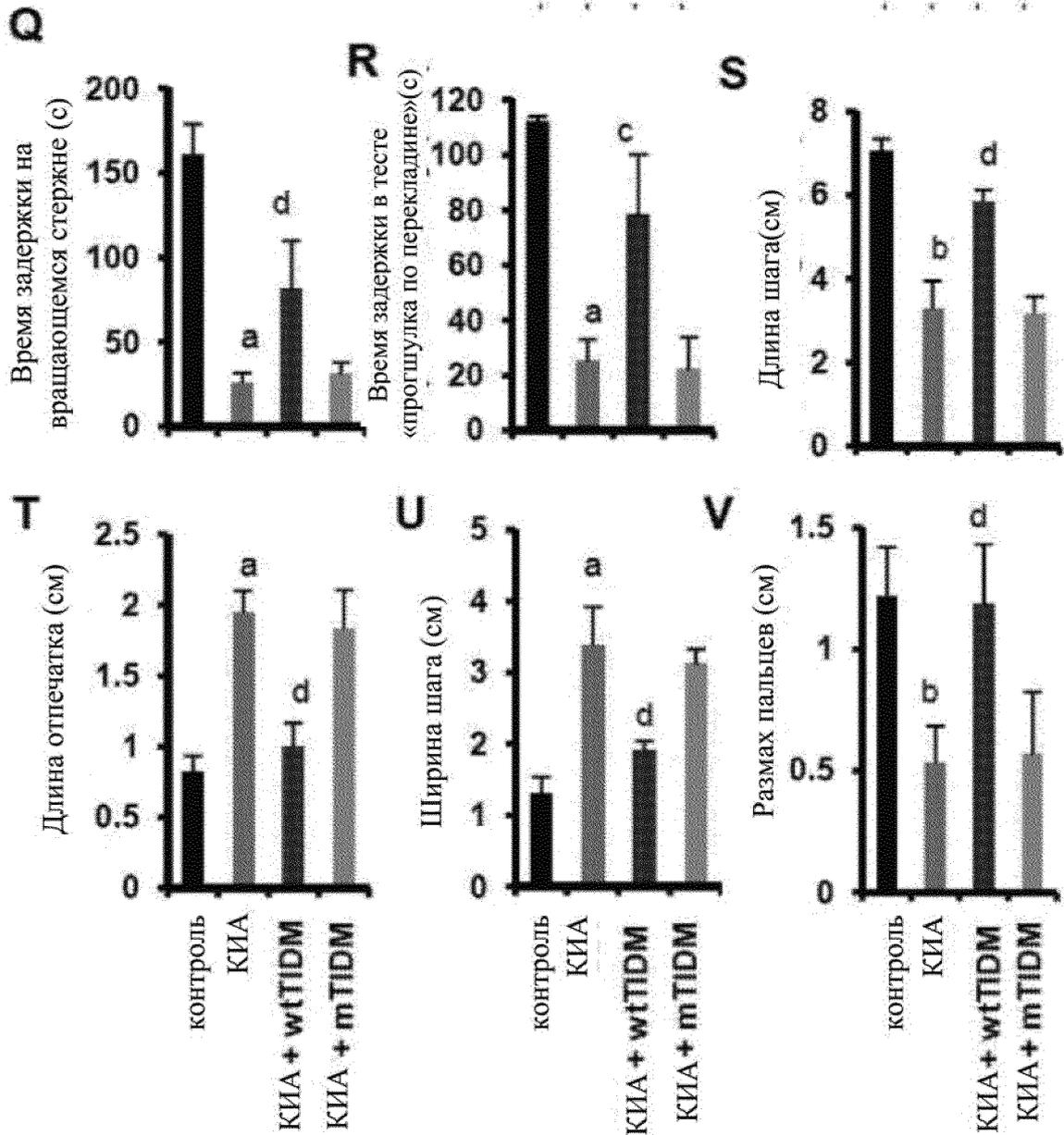
Фиг. 7 (А-Е)



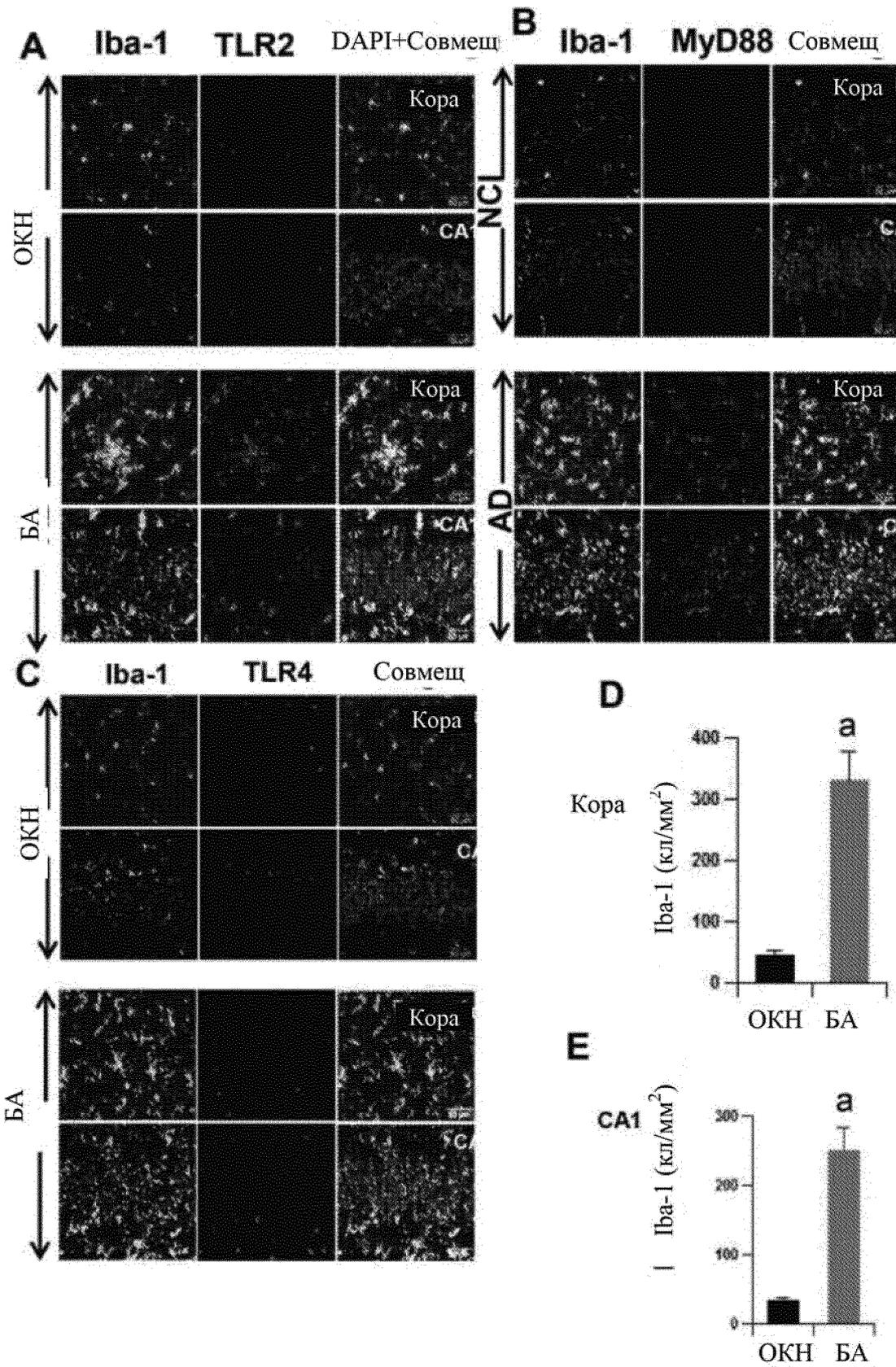
Фиг. 7 (F-K)



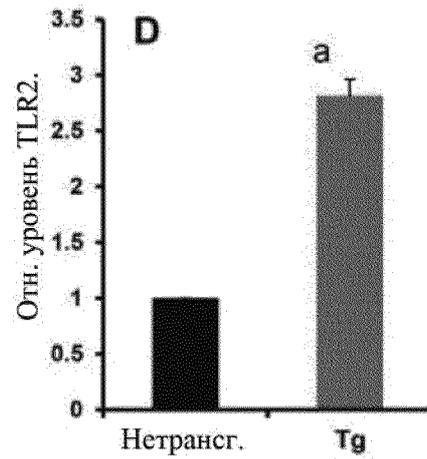
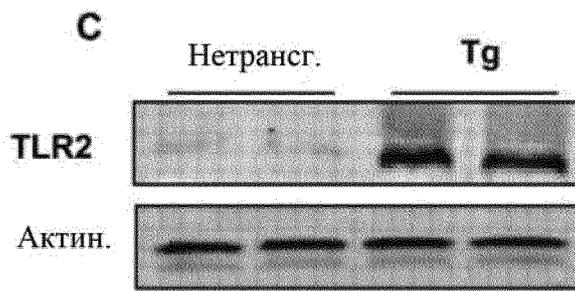
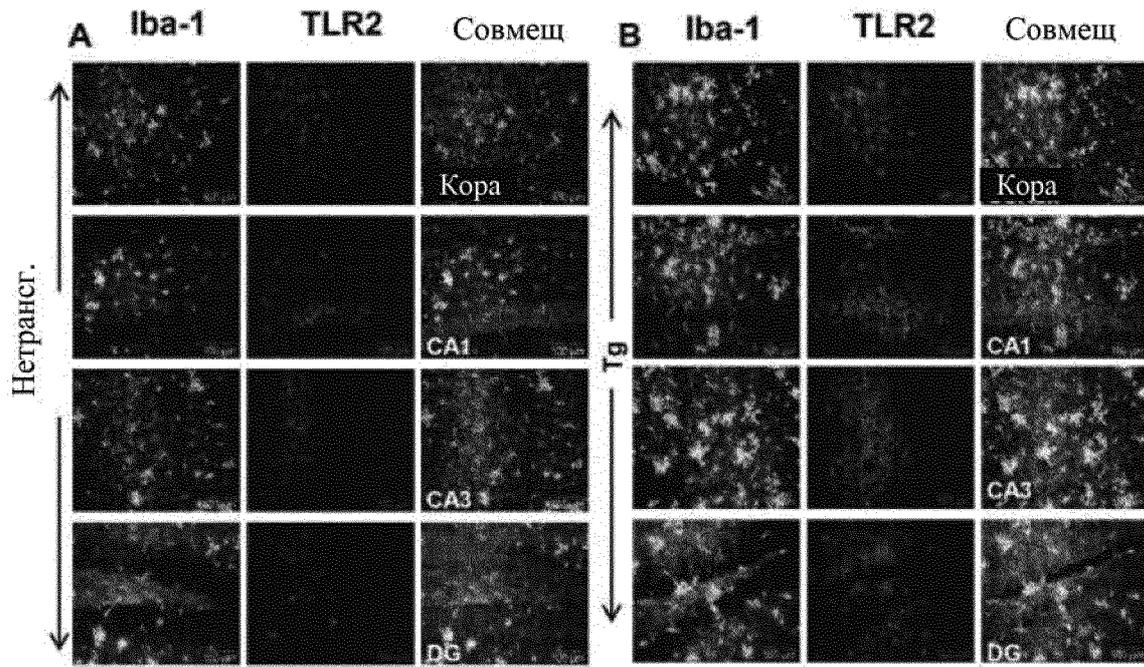
Фиг. 7 (L-P)



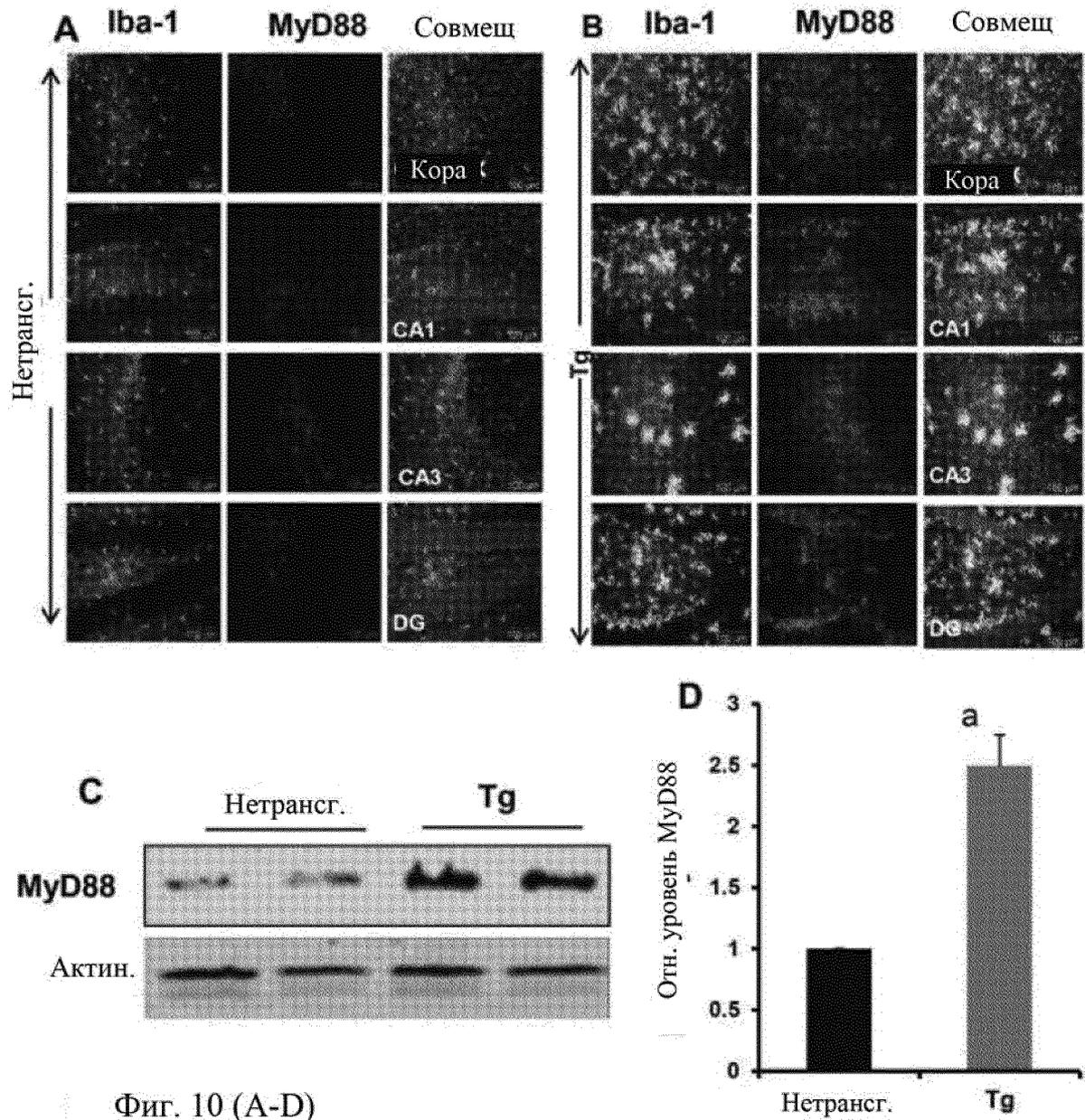
Фиг. 7 (Q-V)



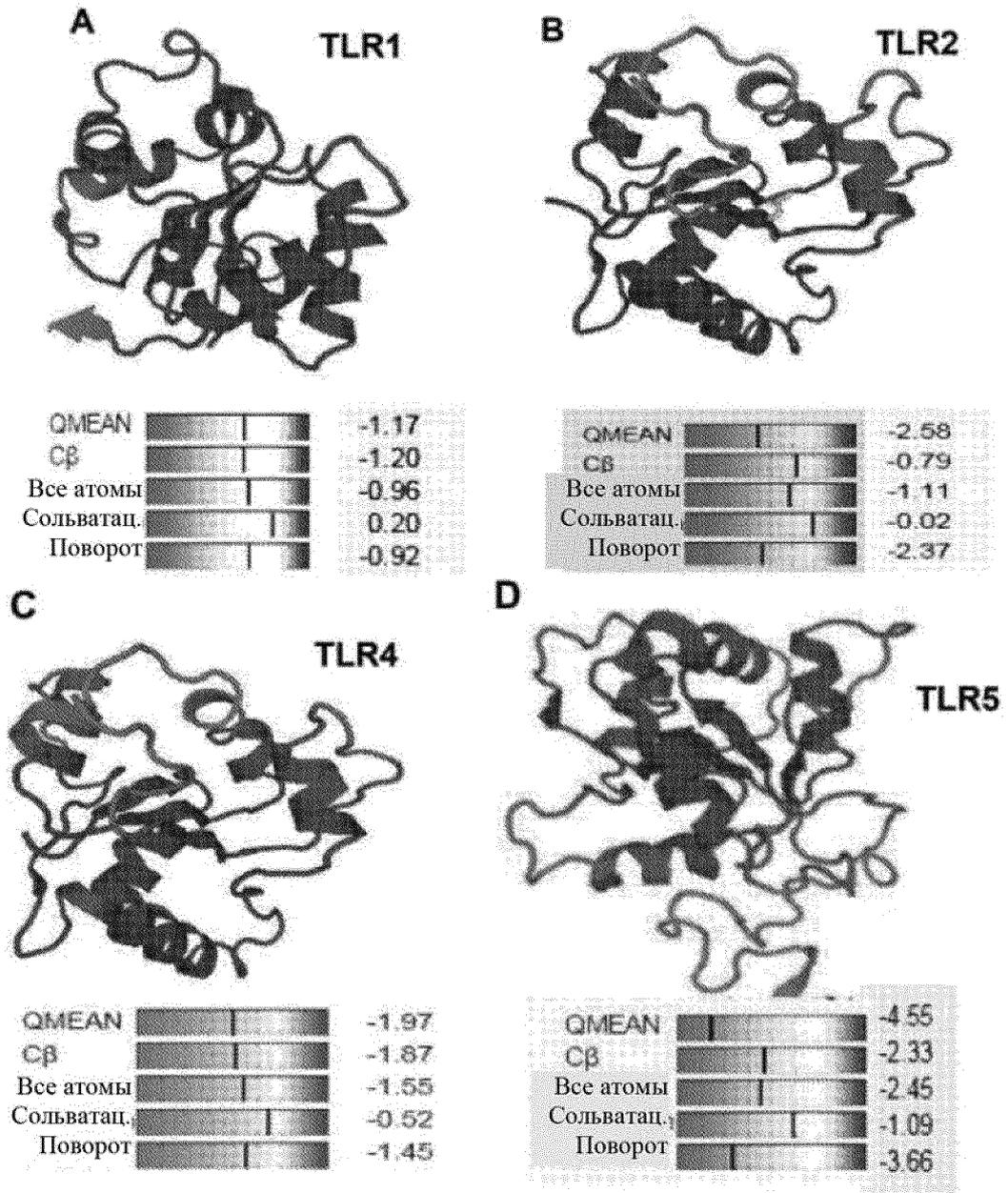
Фиг. 8 (А-Д)



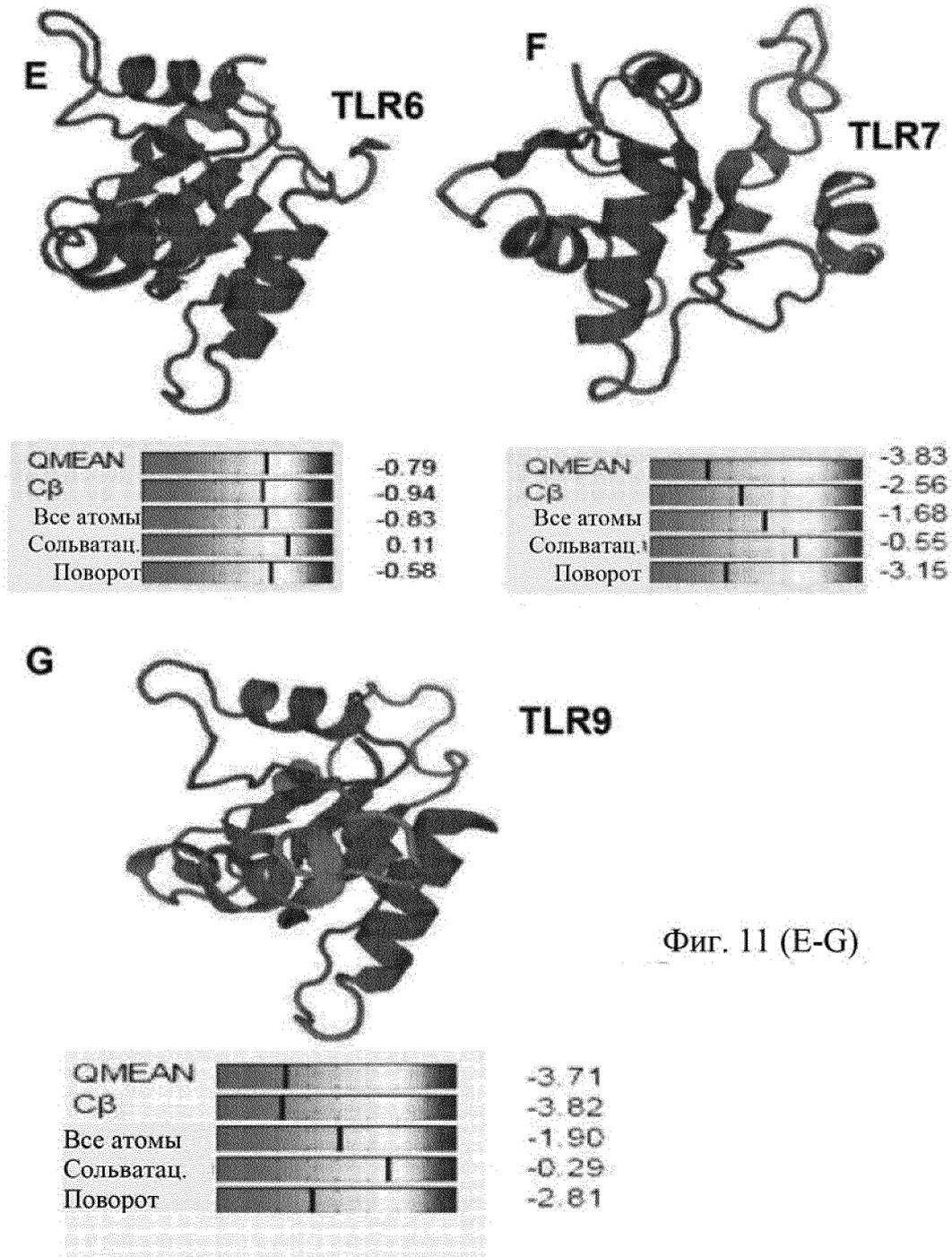
Фиг. 9 (A-D)



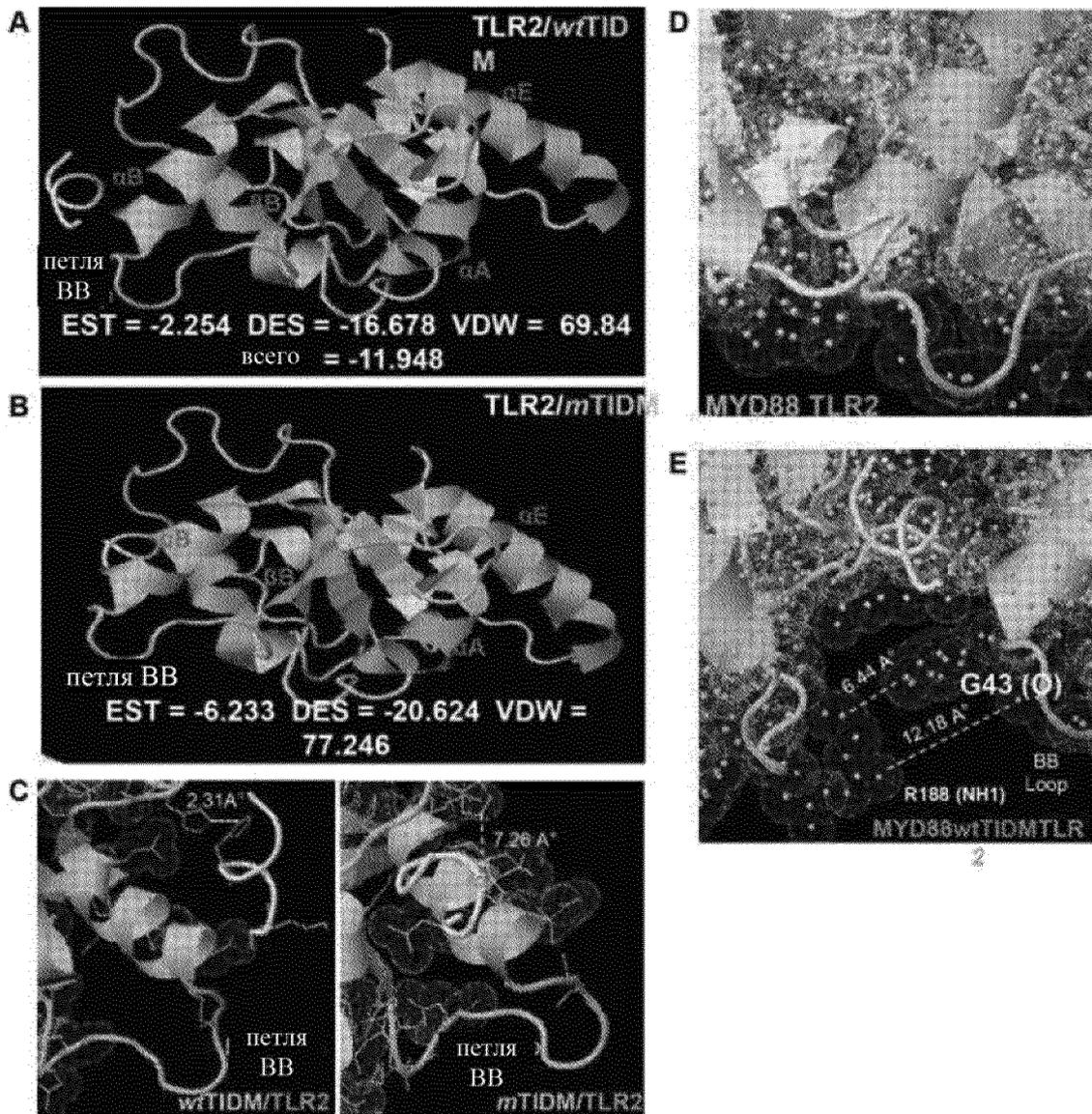
Фиг. 10 (A-D)



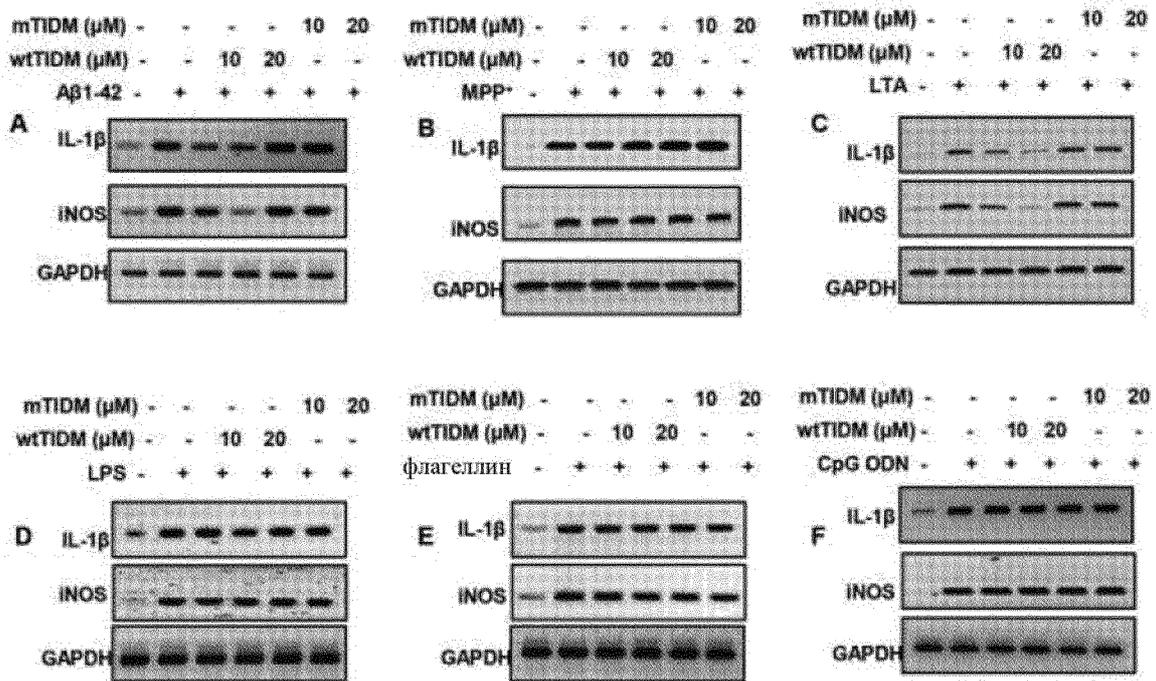
Фиг. 11 (А-Д)



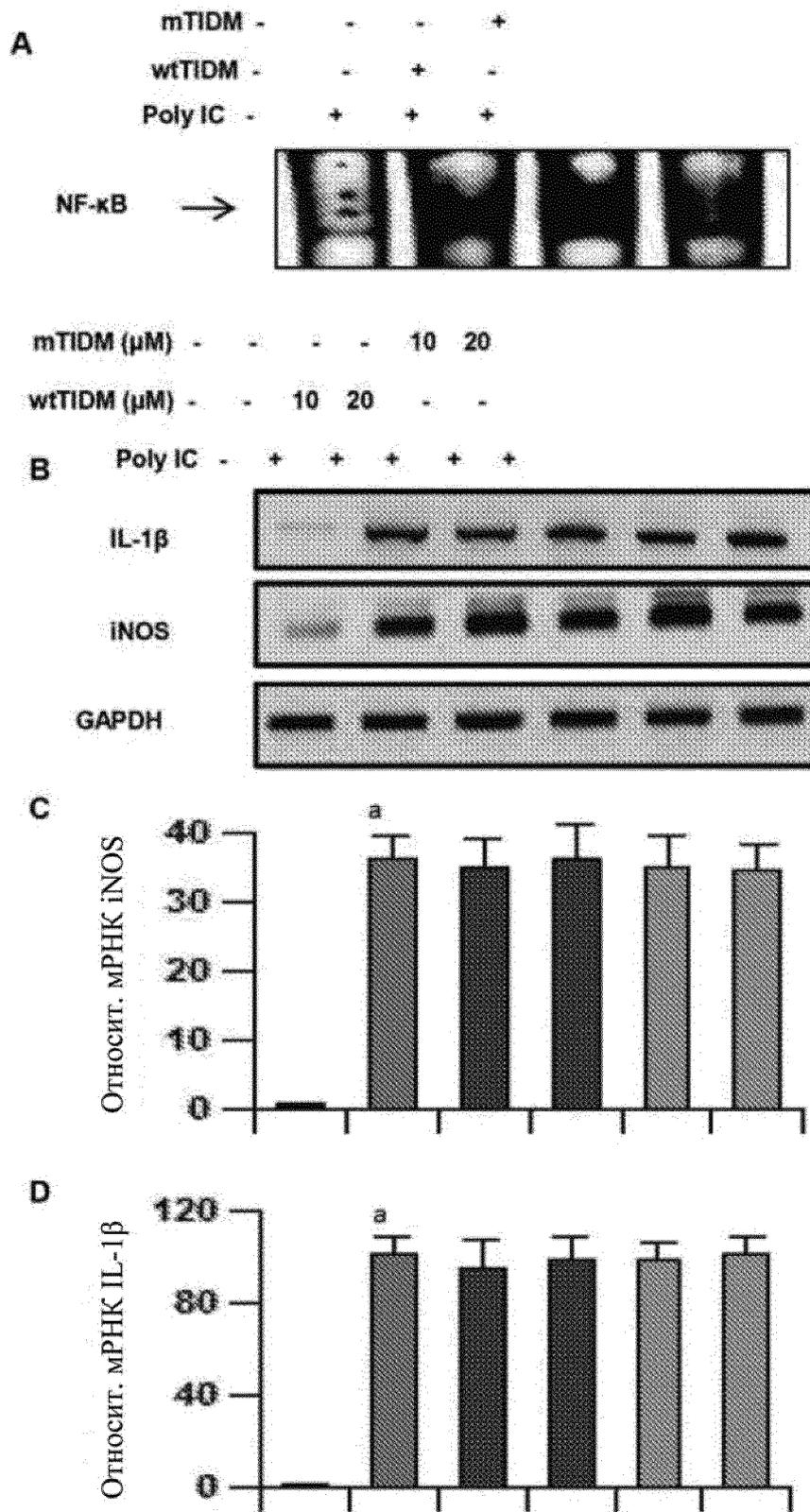
Фиг. 11 (E-G)



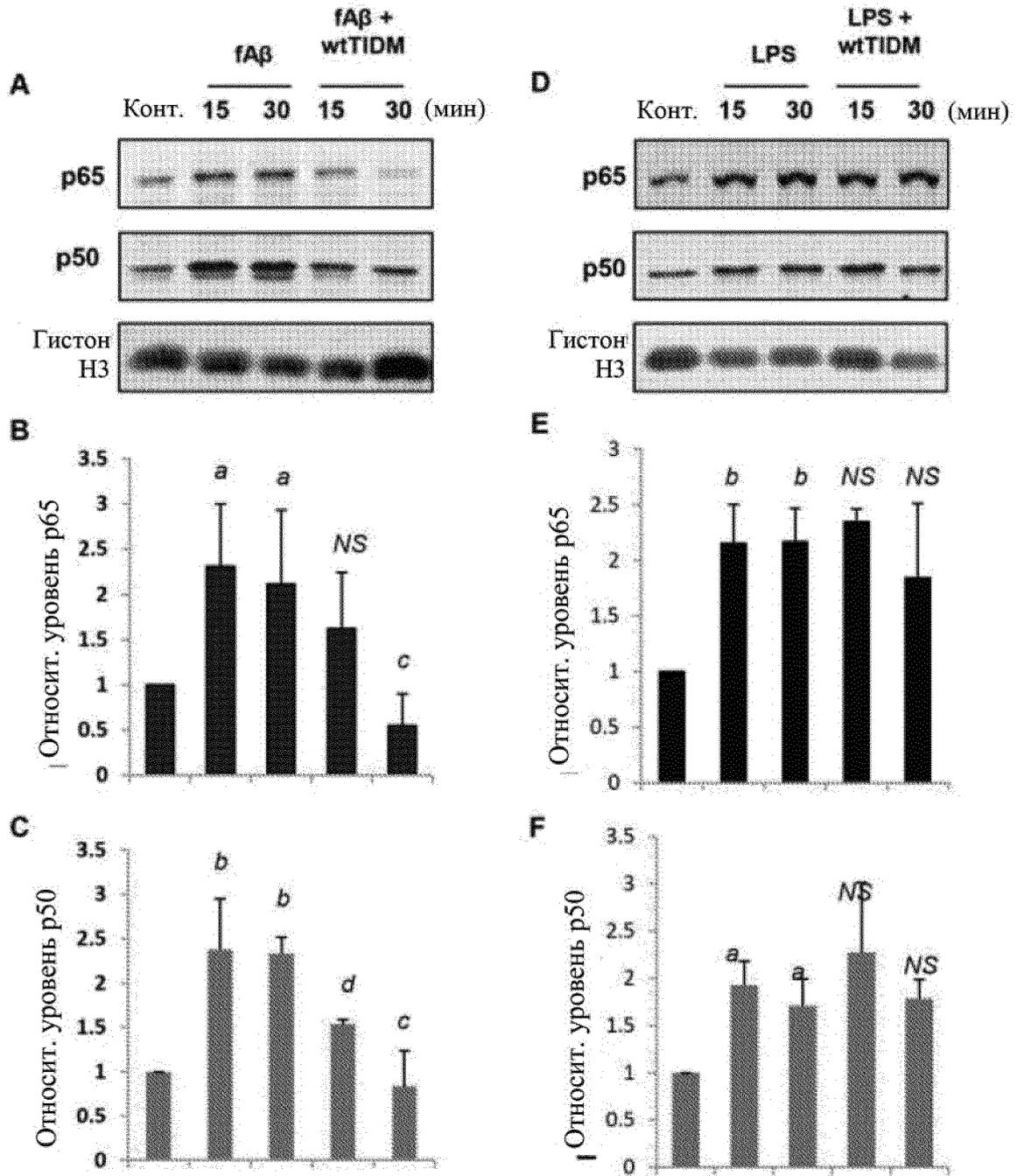
Фиг. 12 (А-Е)



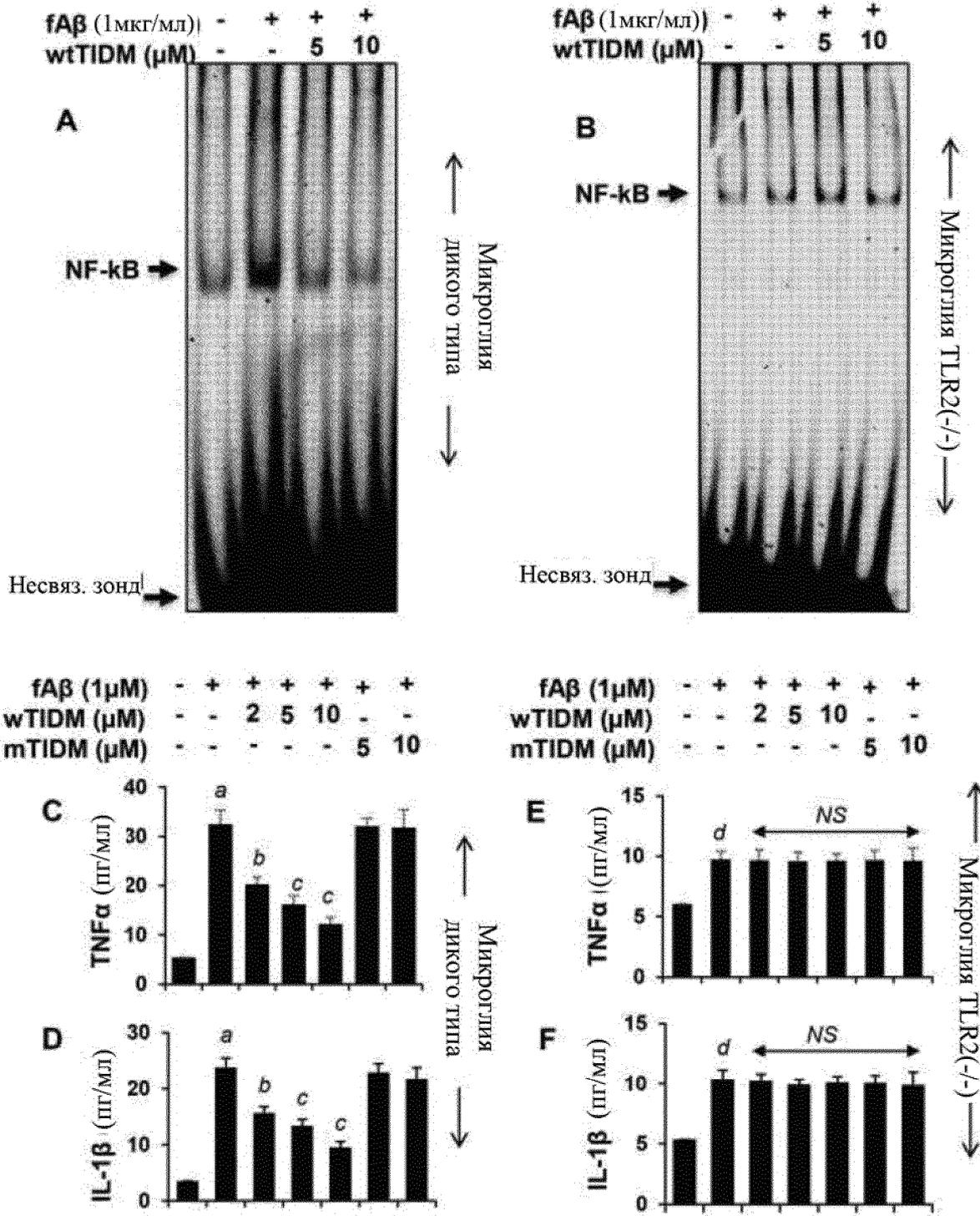
Фиг. 13 (А-Ф)



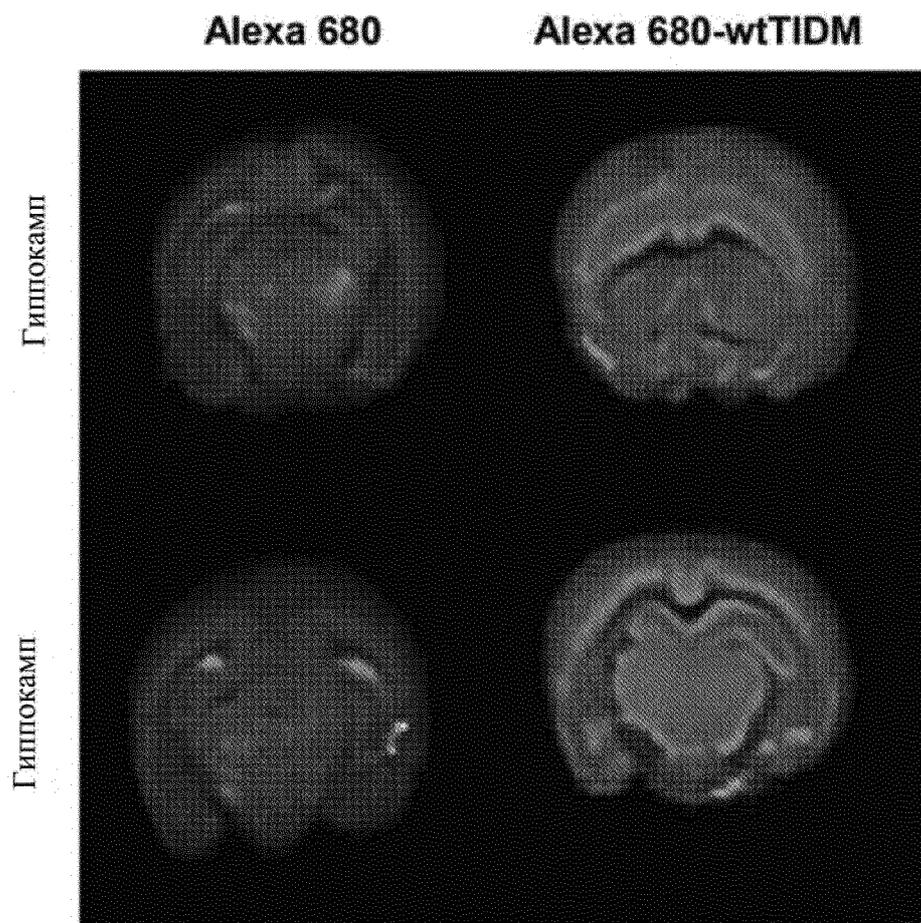
Фиг. 14 (A-D)



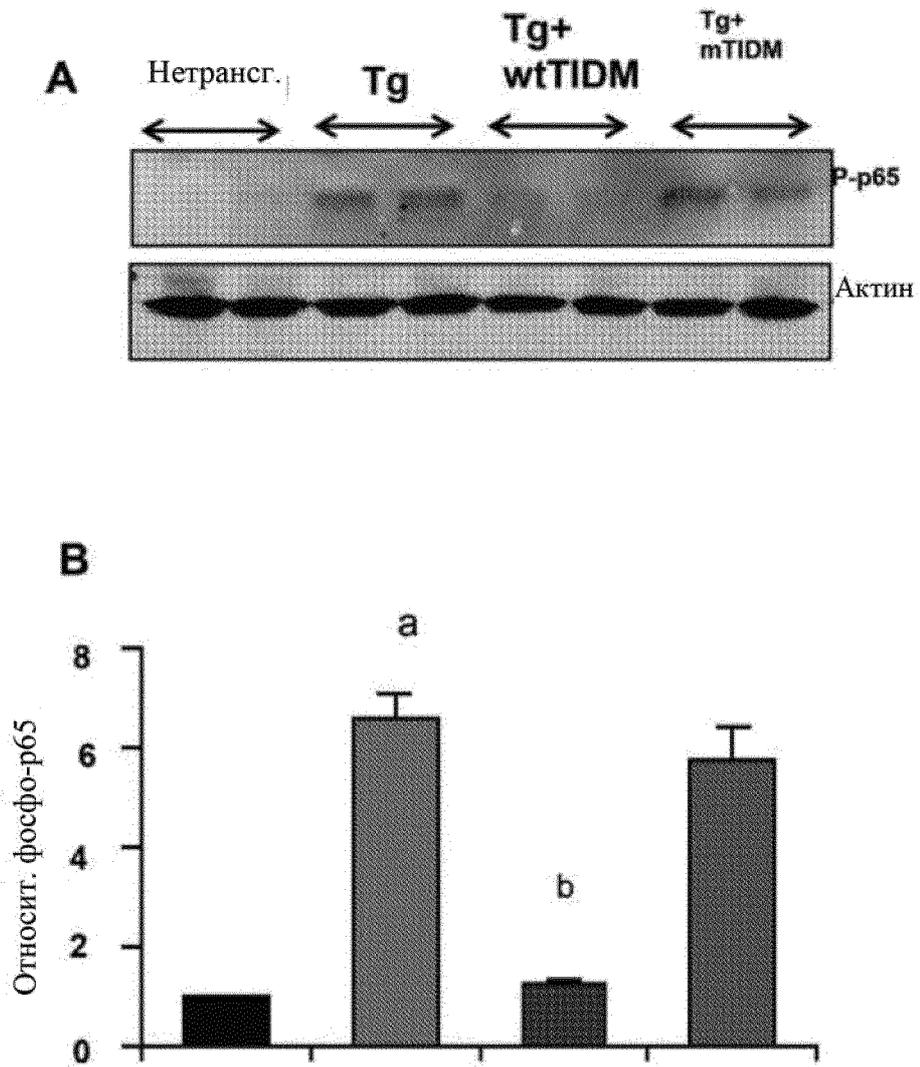
Фиг. 15 (A-F)



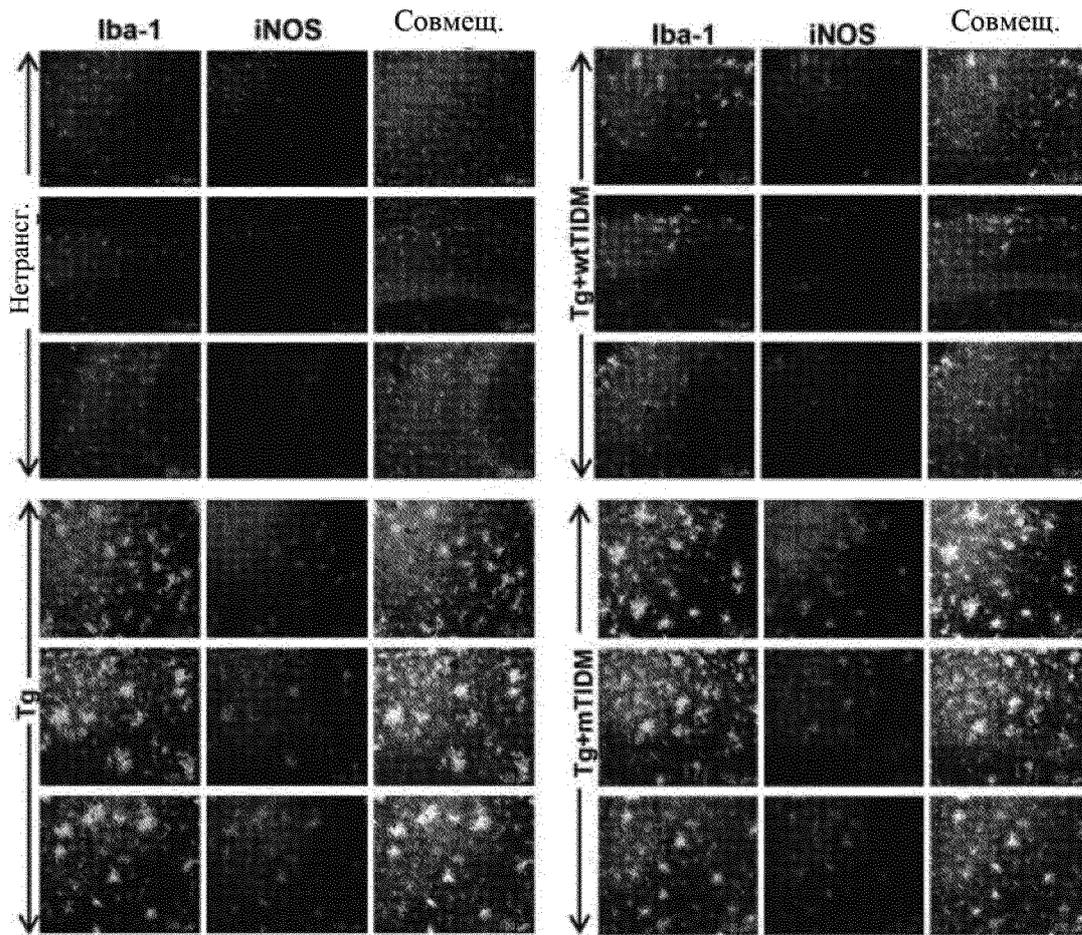
Фиг. 16 (A-F)



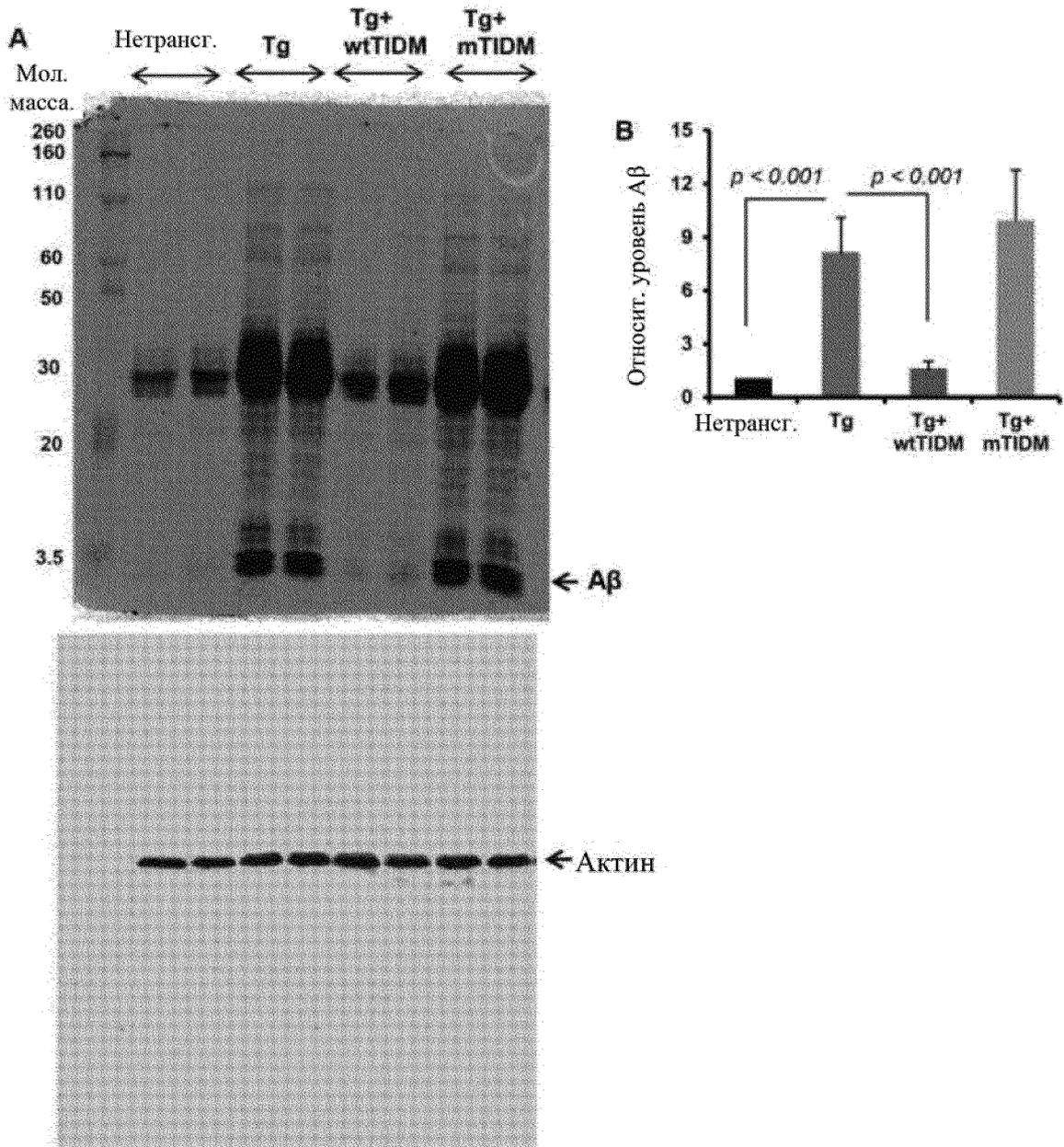
Фиг. 17



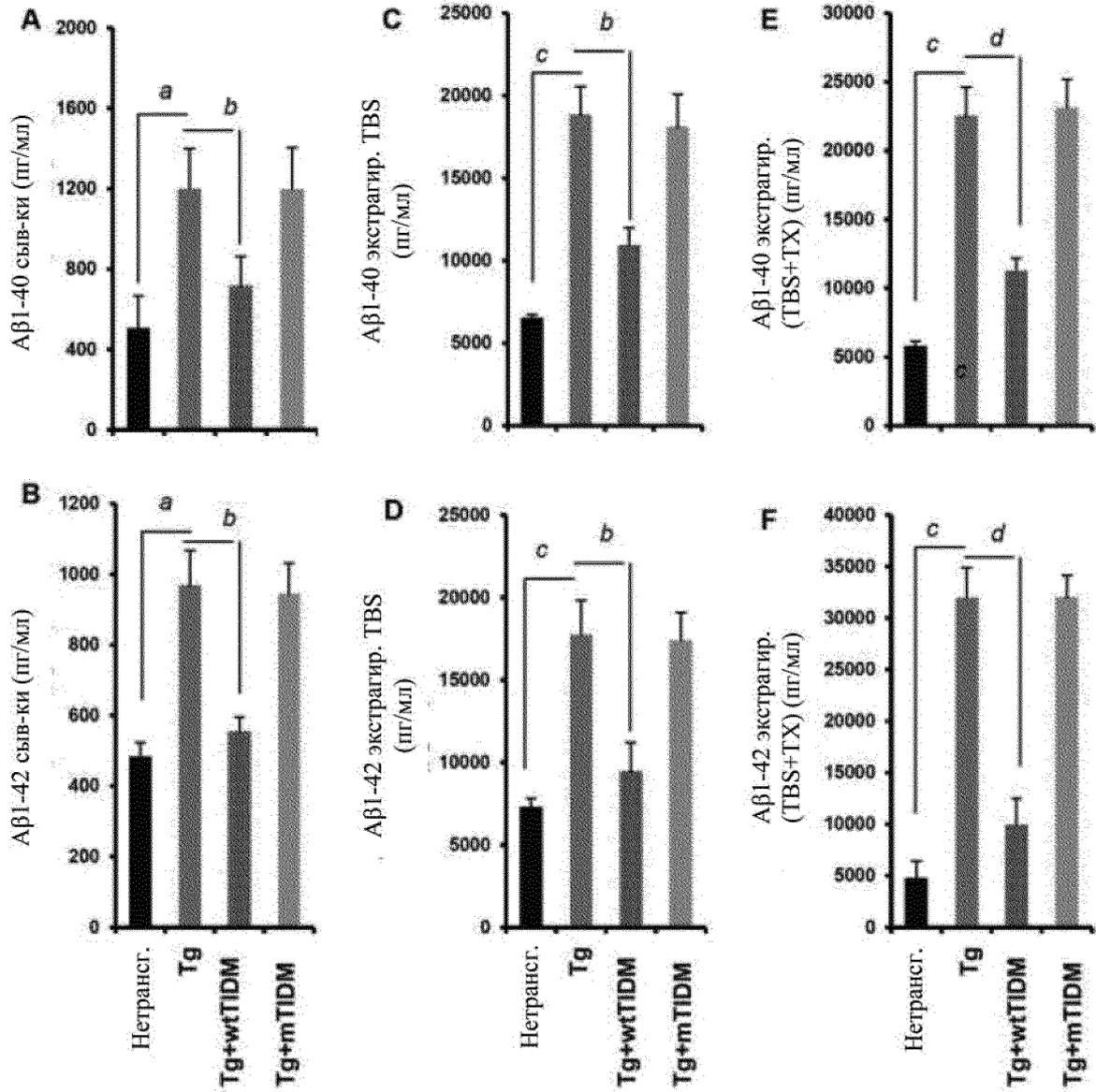
Фиг. 18 (А-В)



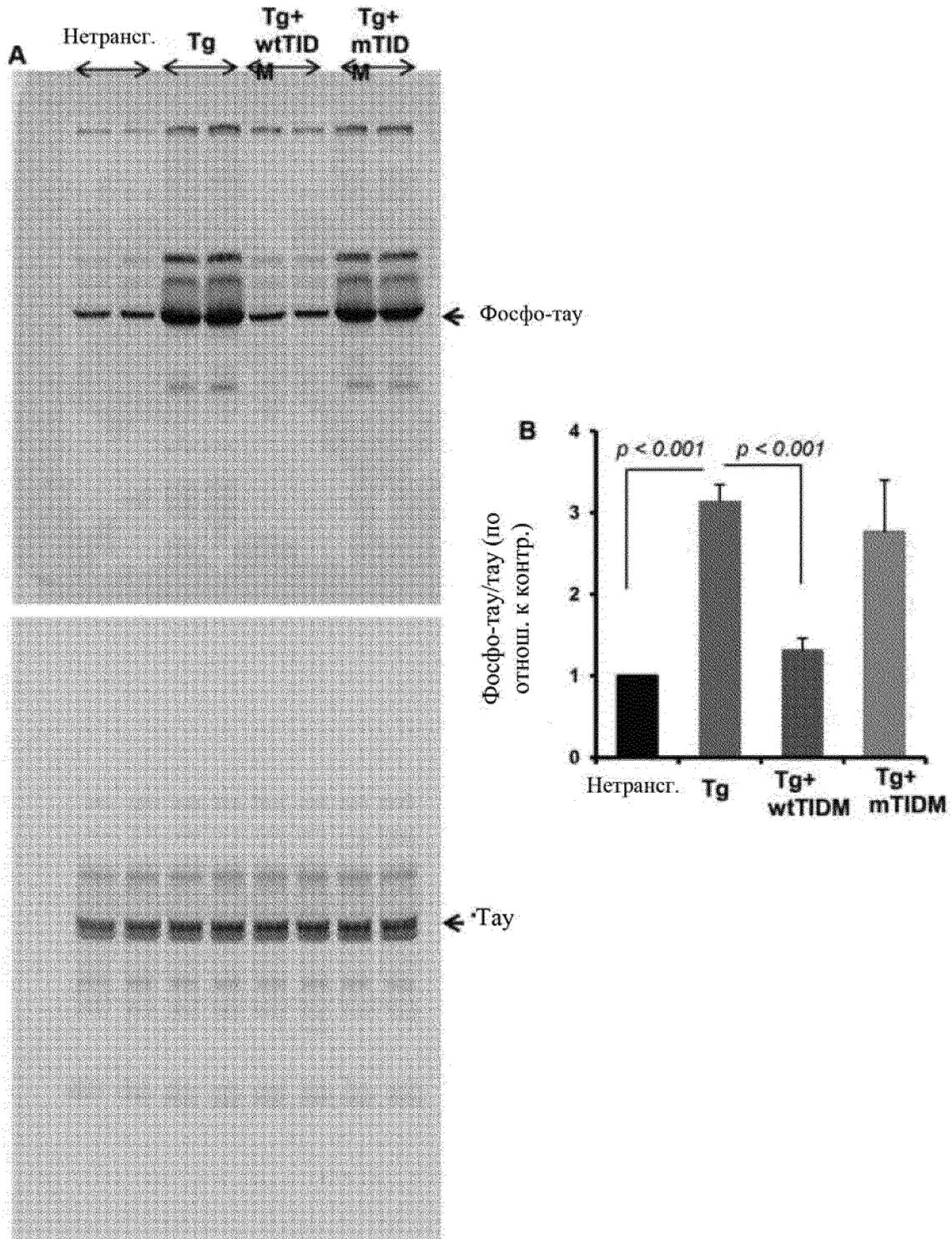
Фиг. 19



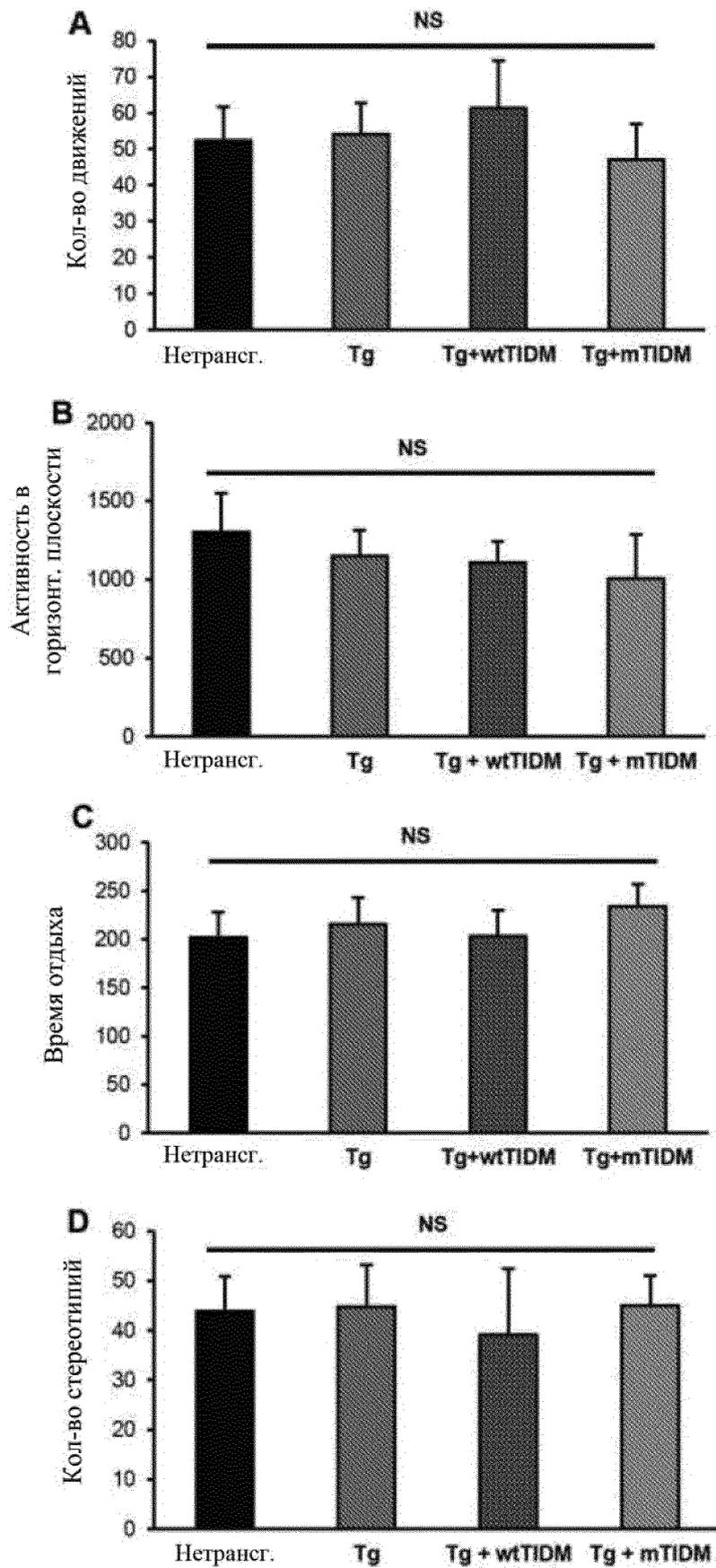
Фиг. 20 (А-В)



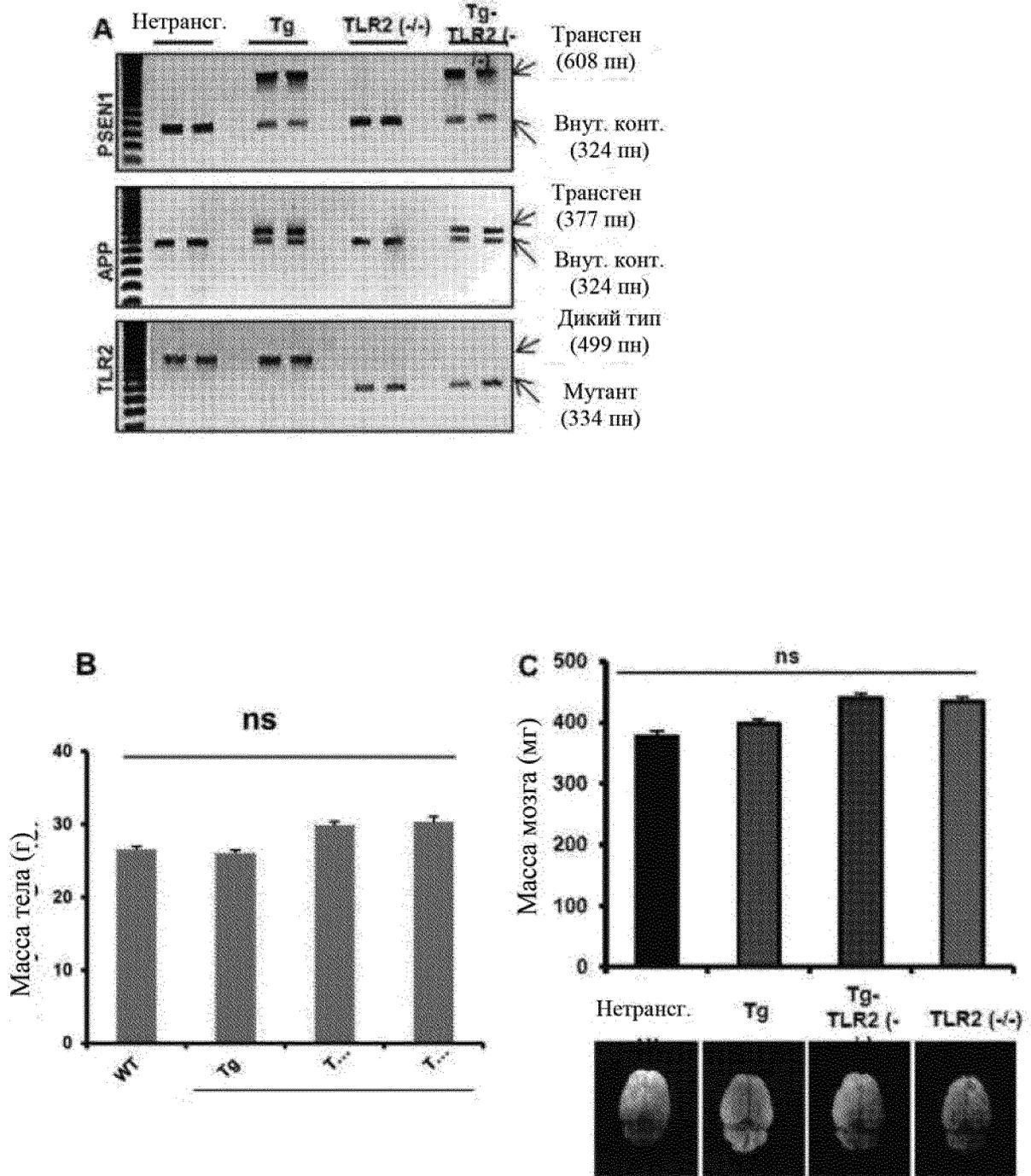
Фиг. 21 (A-F)



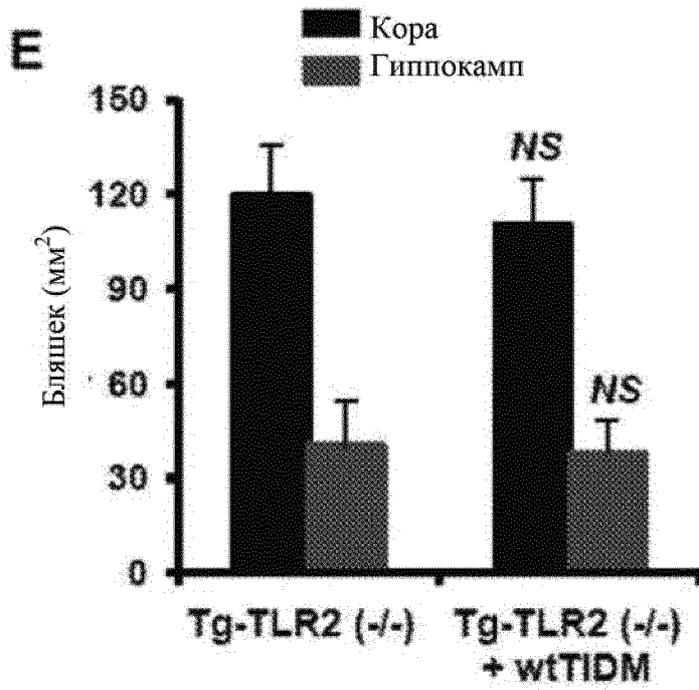
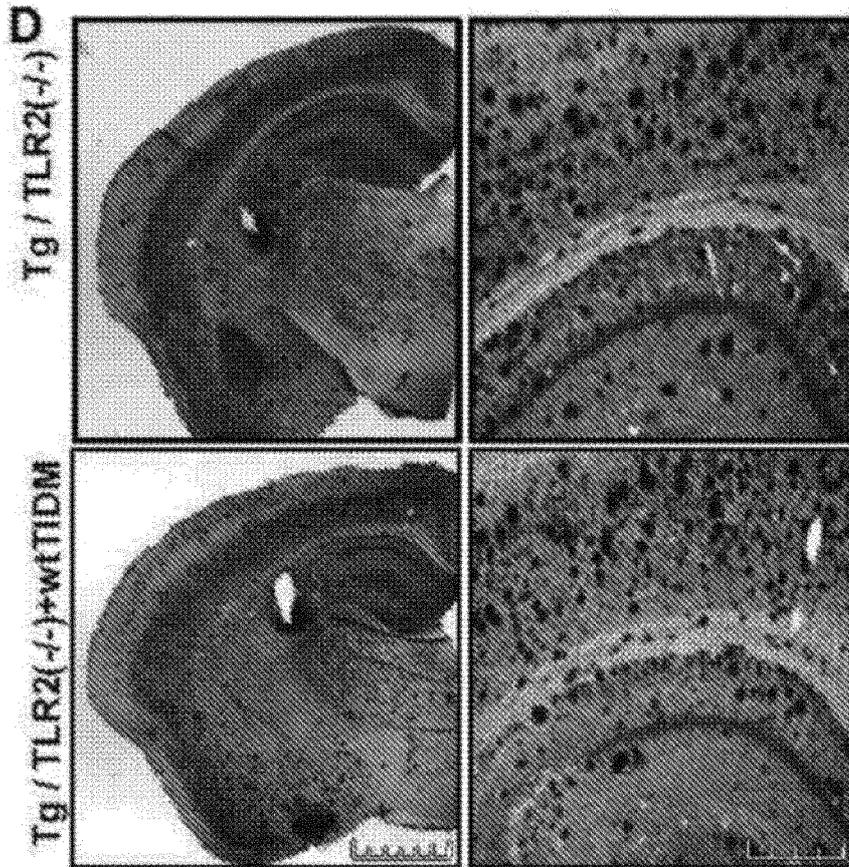
Фиг. 22 (А-В)



Фиг. 23 (A-D)

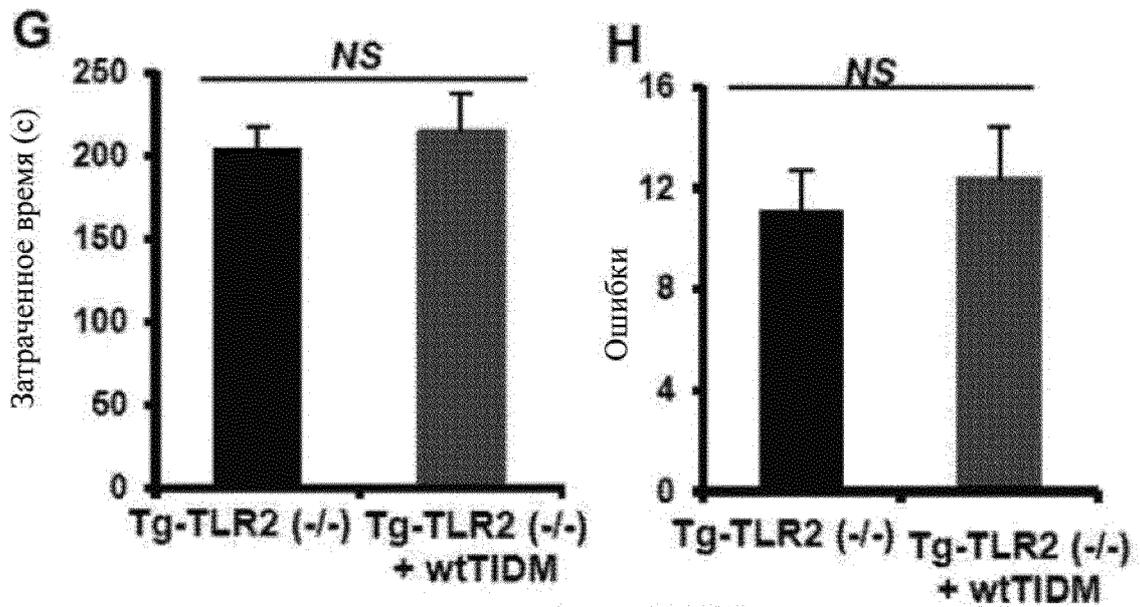
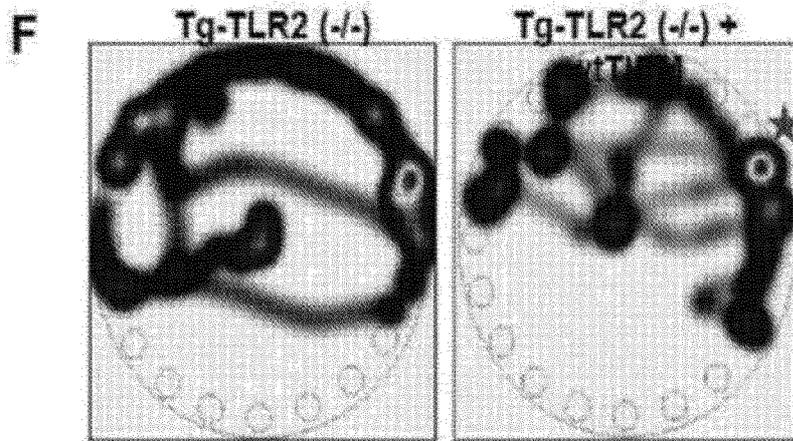


Фиг. 24 (А-С)

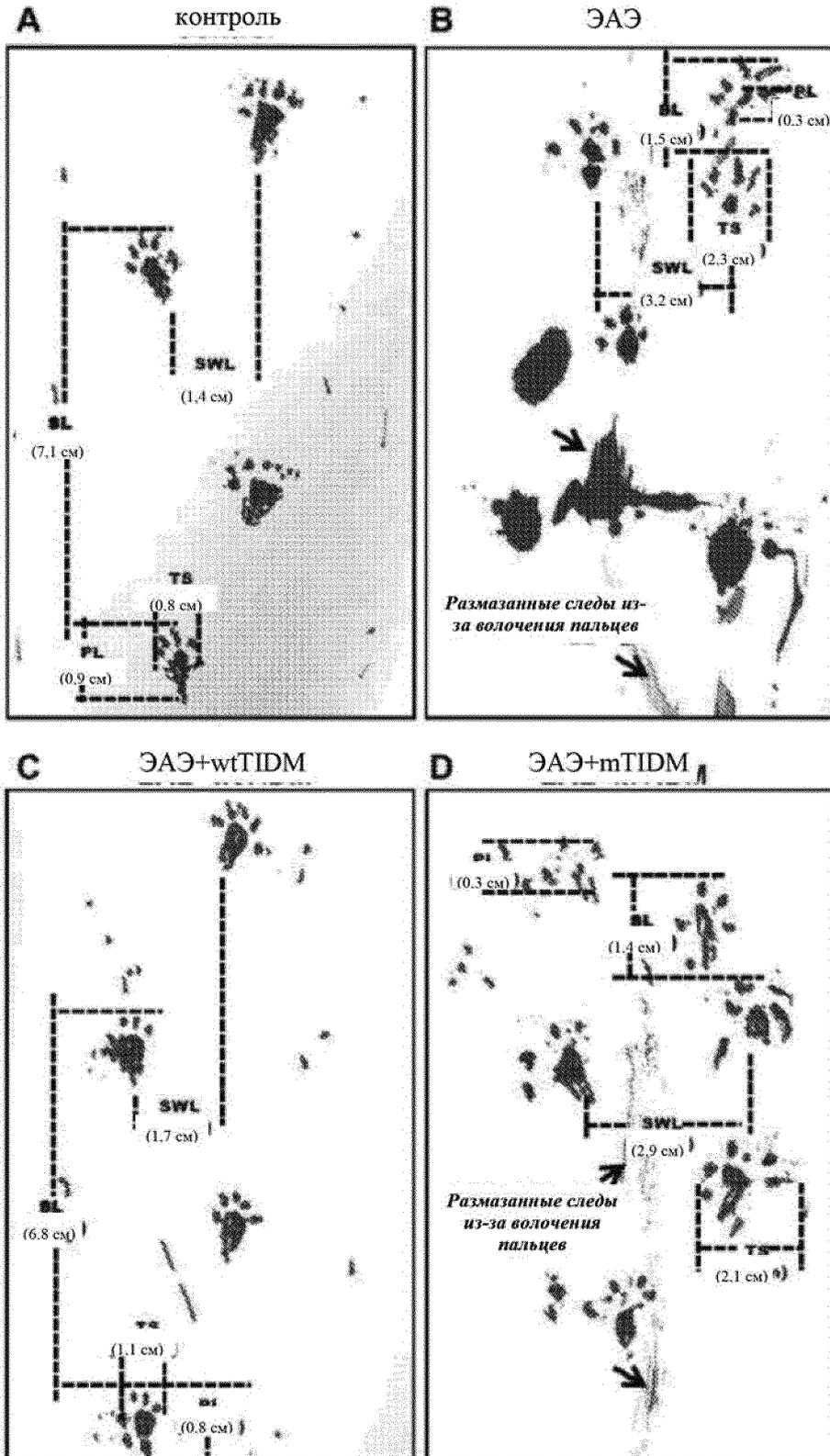


Фиг. 24 (D-E)

★ Целевая камера

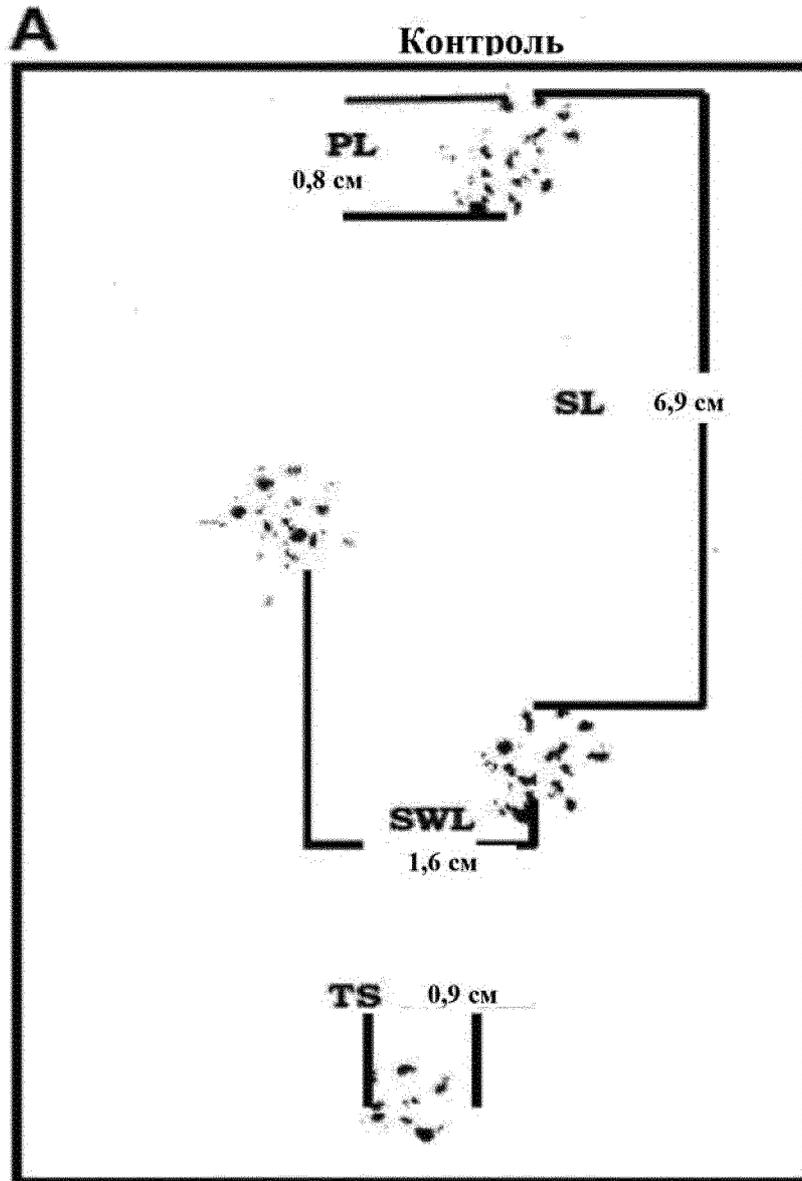


Фиг. 24 (F-H)



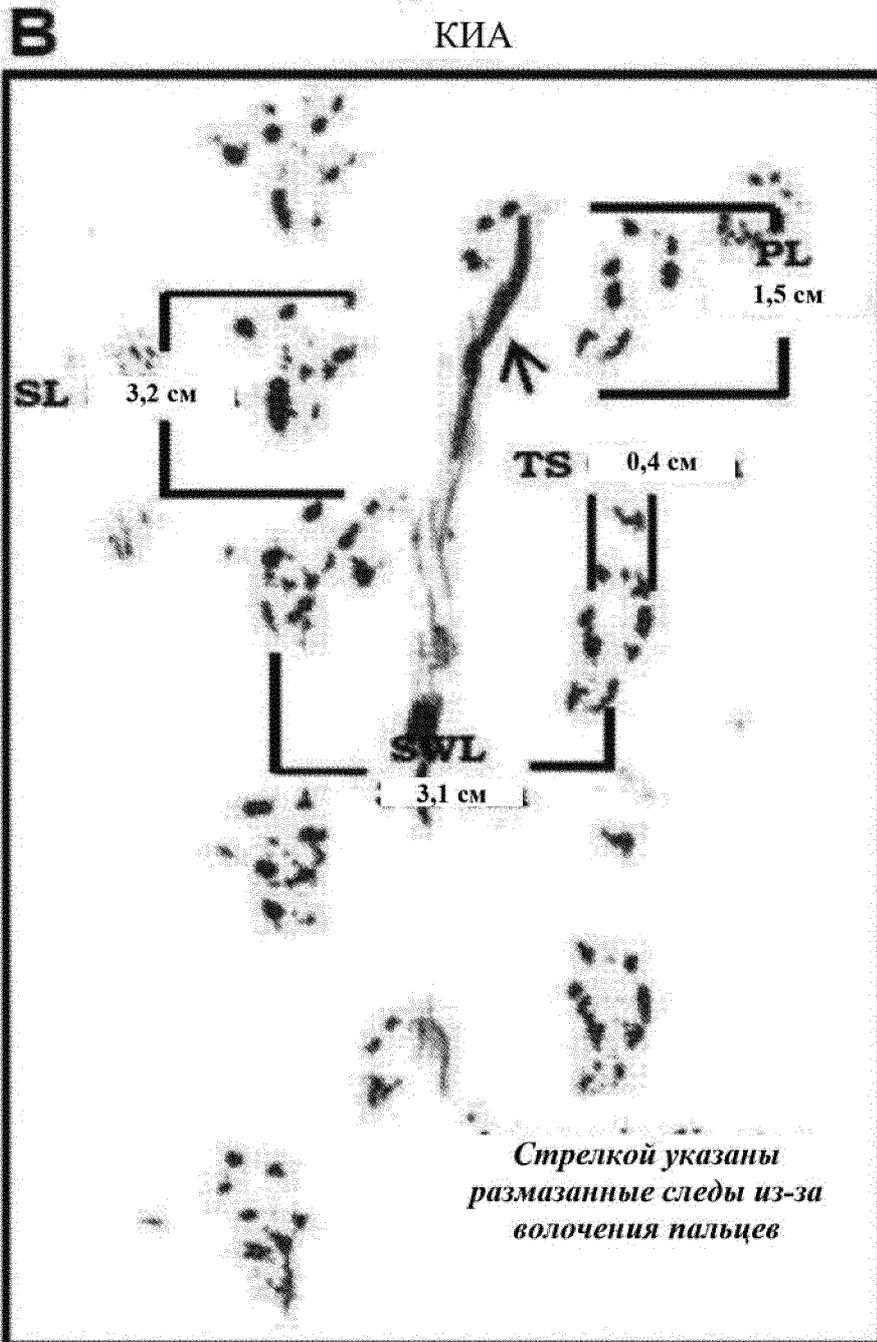
SL – длина шага, SWL – ширина шага, PL – длина отпечатка, TS – размах пальцев

Фиг. 25 (A-D)

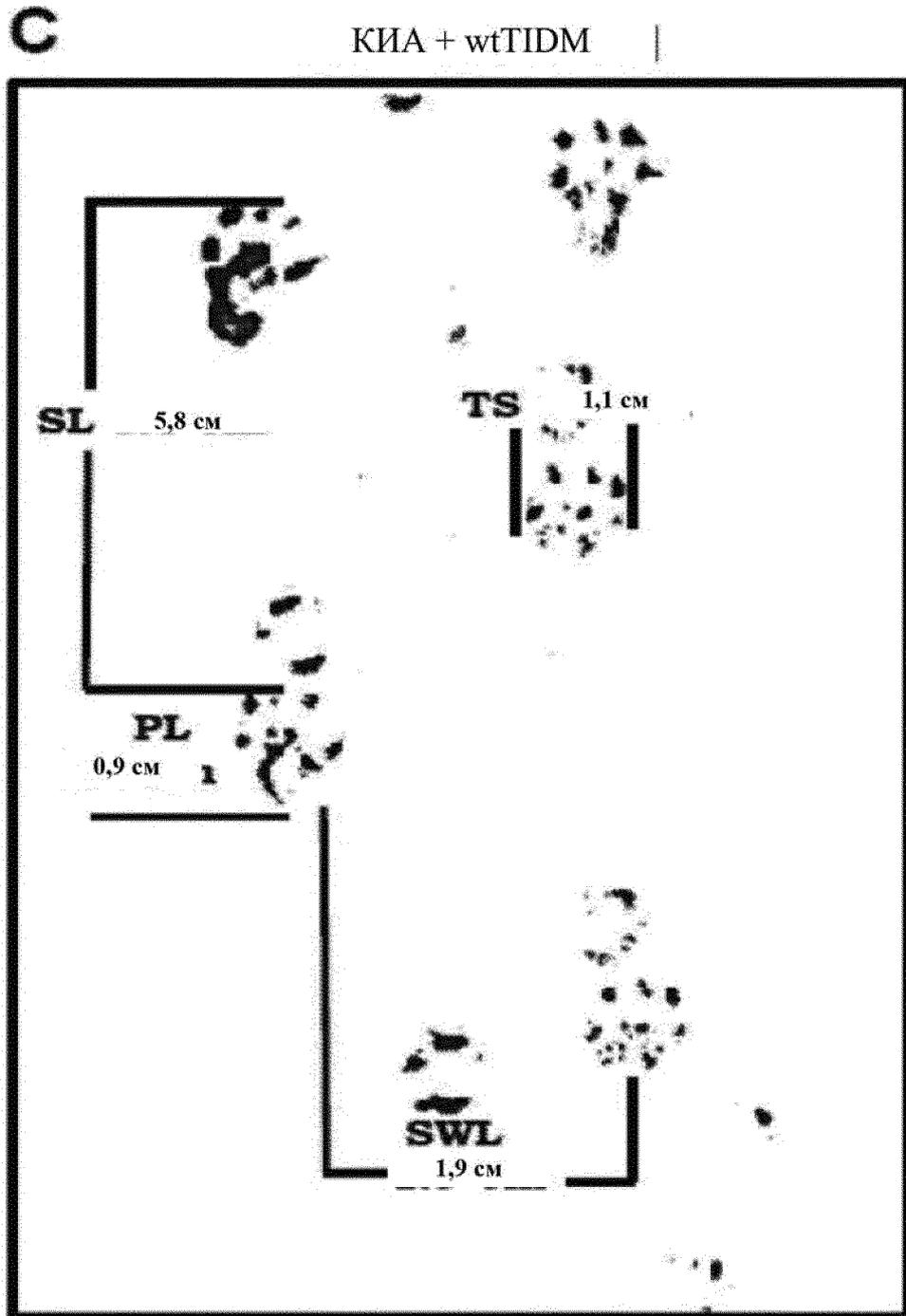


SL – длина шага, SWL – ширина шага, PL – длина отпечатка, TS – размах пальцев

Фиг. 26 А



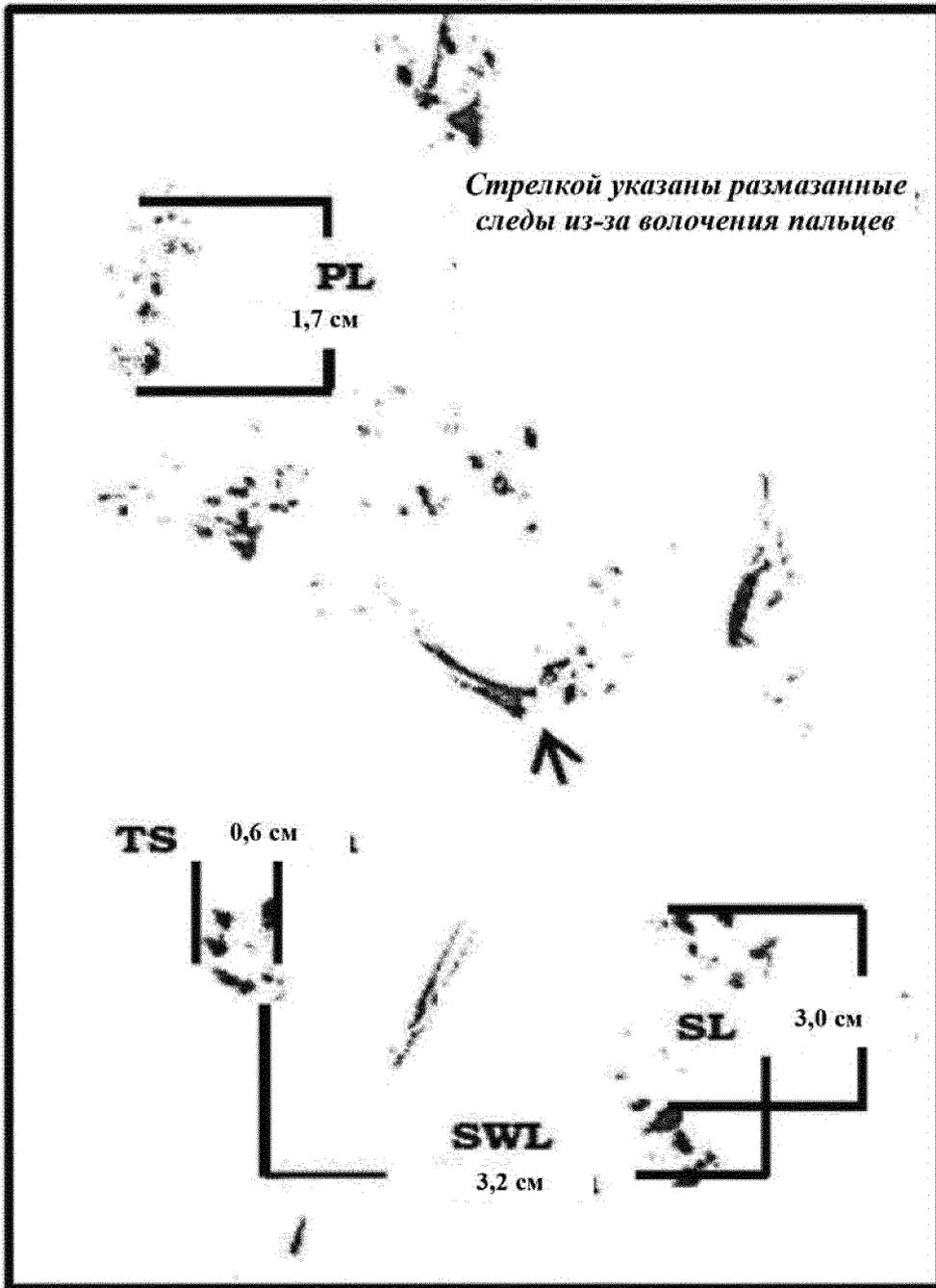
Фиг. 26 В



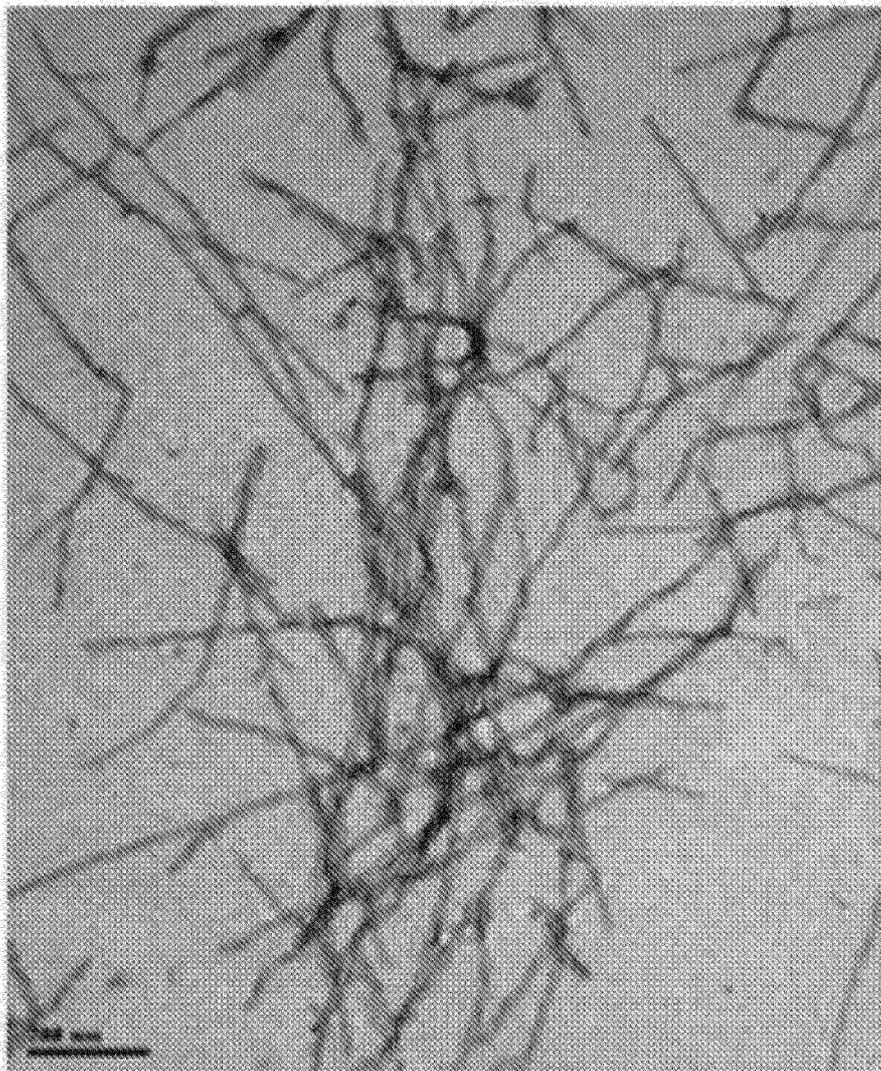
Фиг. 26 С

D

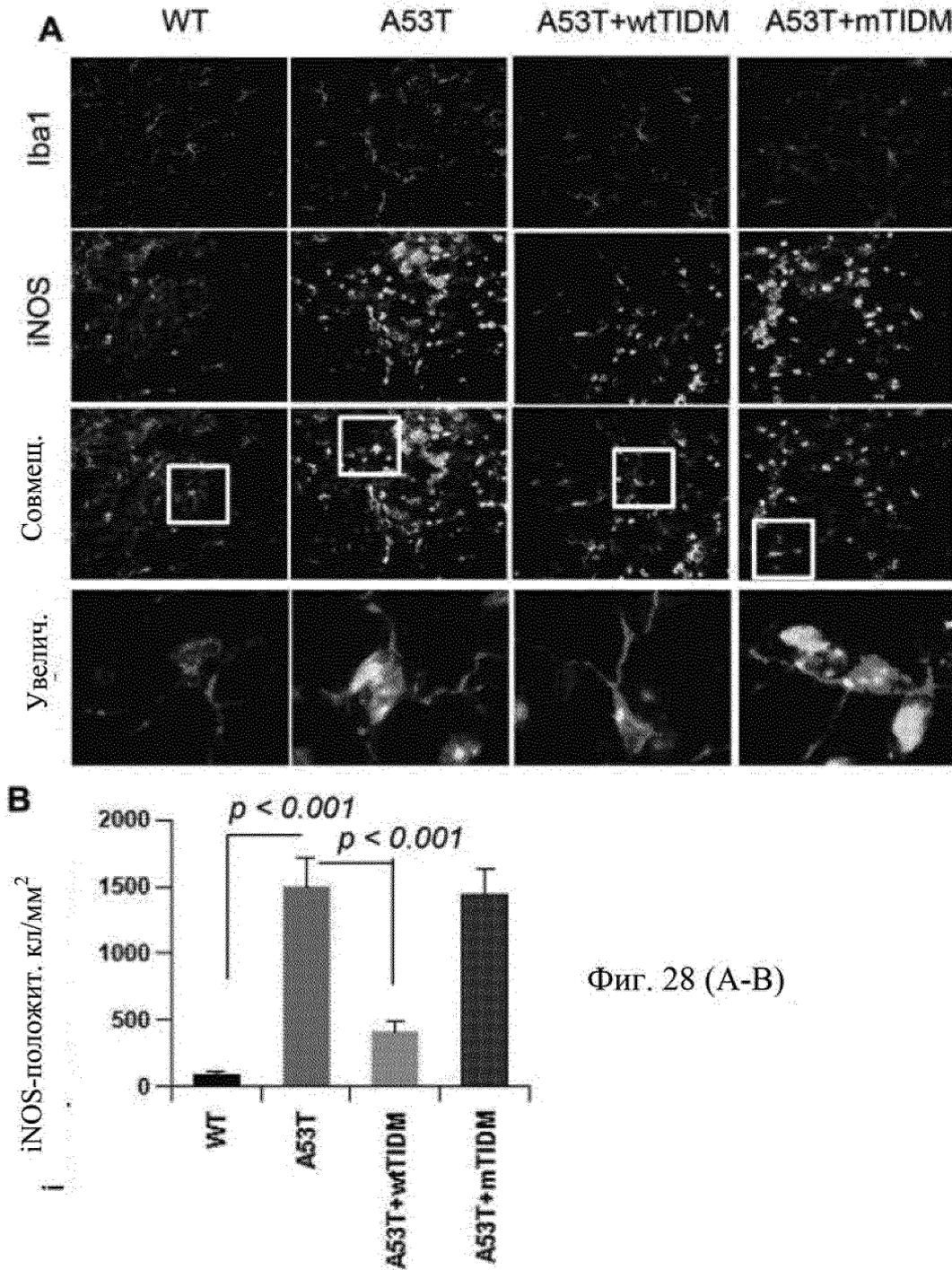
КИА + mTIDM |

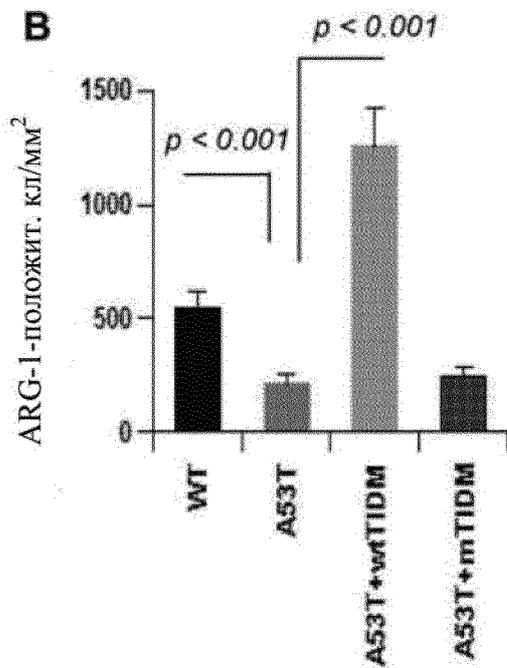
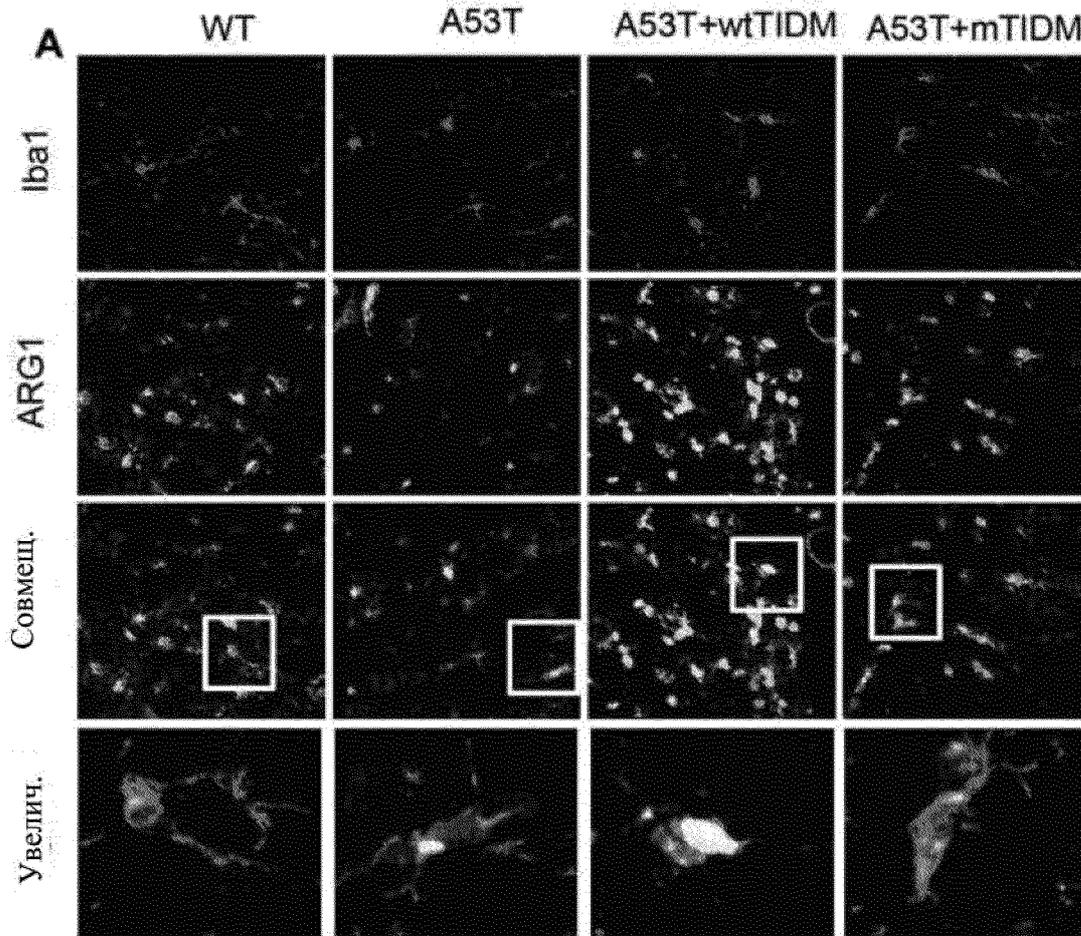


Фиг. 26 D

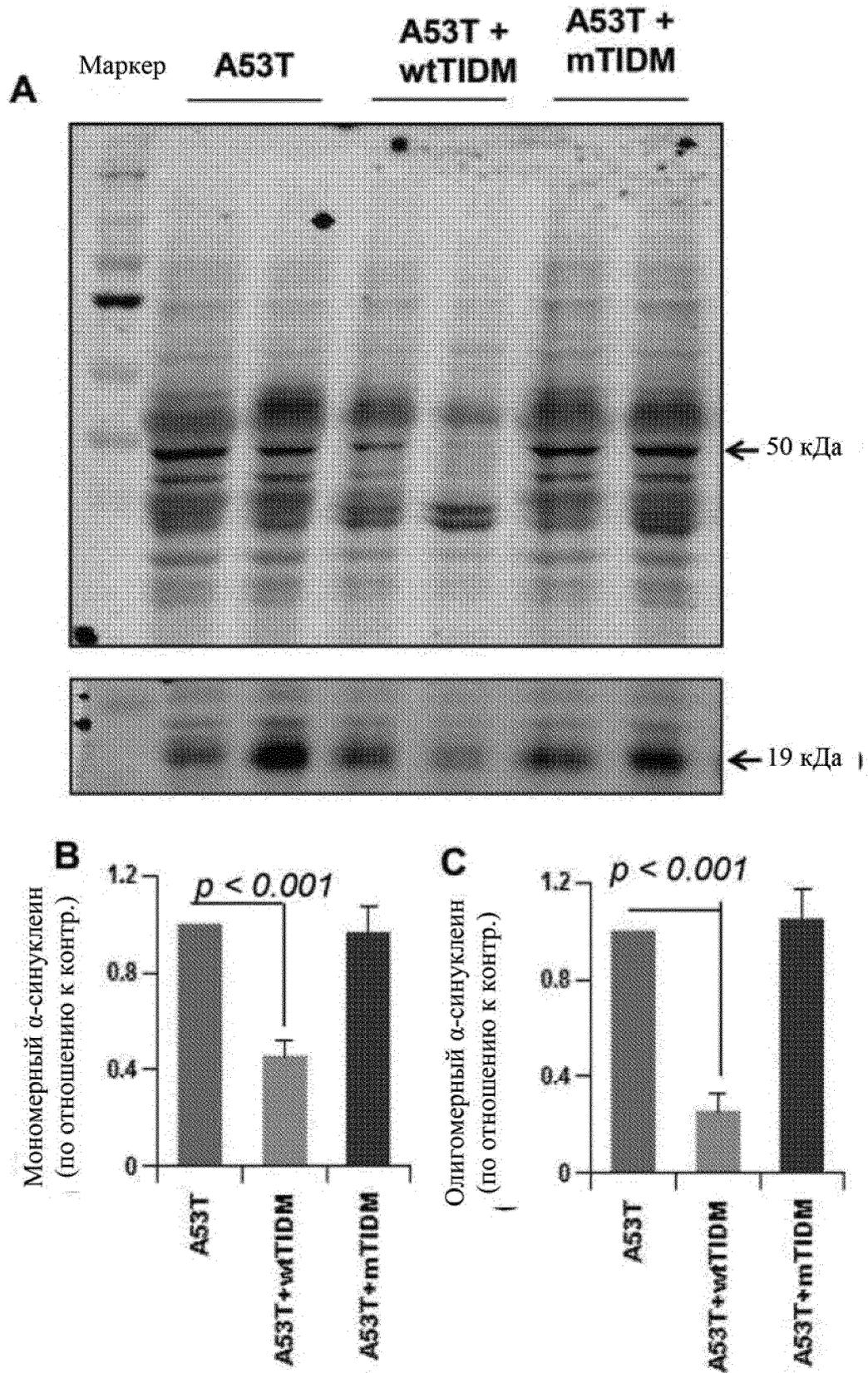


Фиг. 27

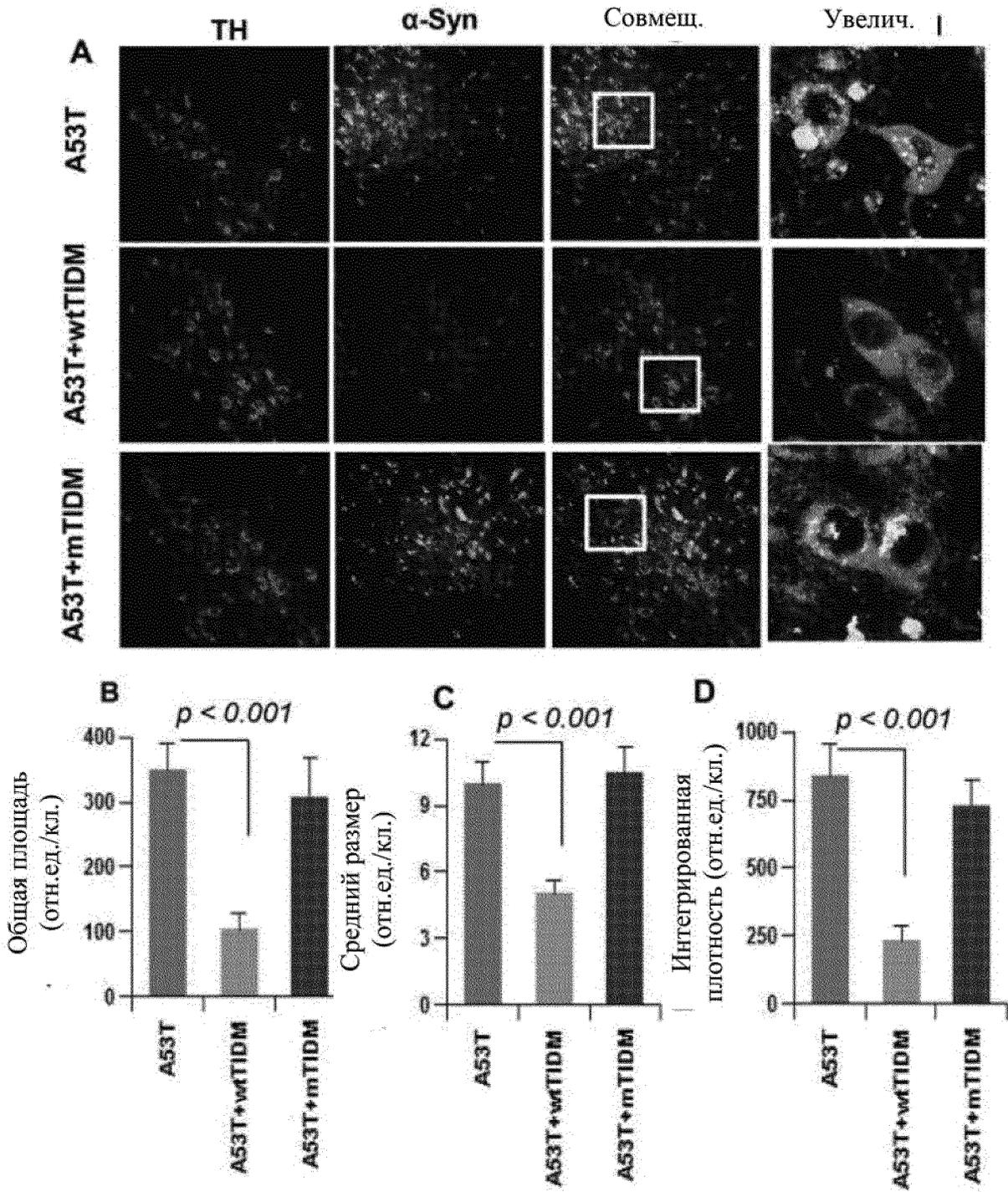




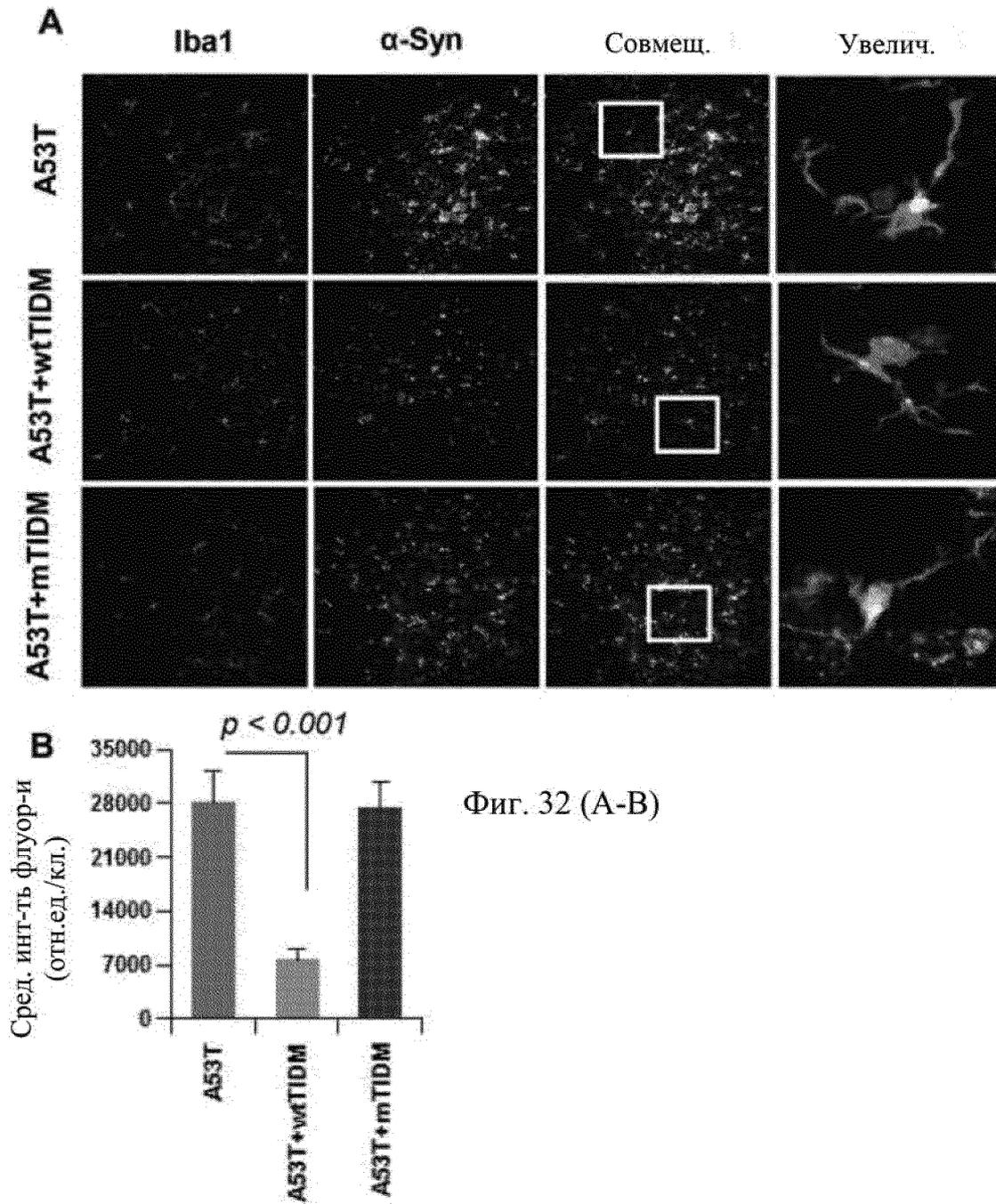
Фиг. 29 (А-В)

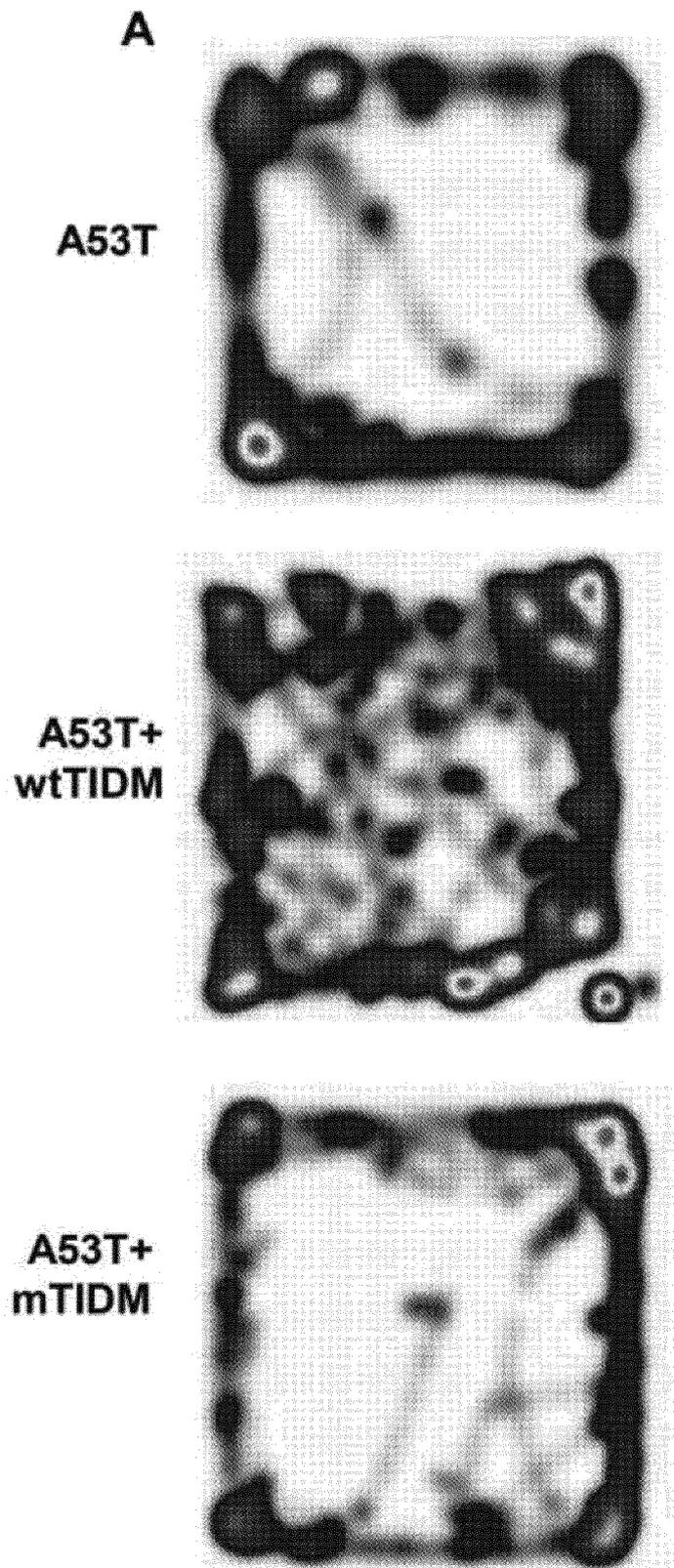


Фиг. 30 (А-С)

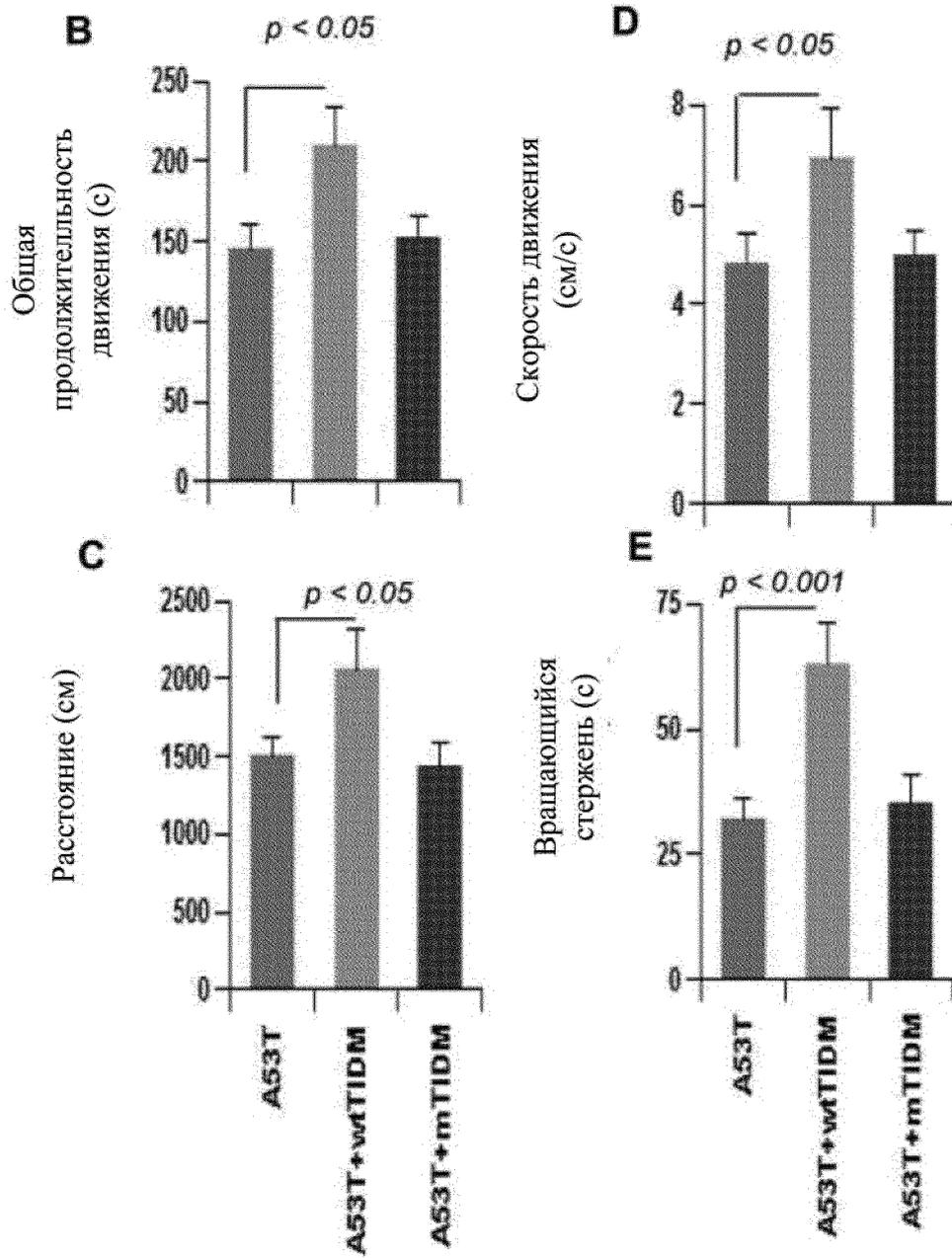


Фиг. 31 (A-D)





Фиг. 33 А



Фиг. 33 (B-D)