

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038404**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.23

(21) Номер заявки
201990953

(22) Дата подачи заявки
2017.11.23

(51) Int. Cl. **G01N 33/50** (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)
C12N 5/0793 (2010.01)
A61K 31/519 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ТРАМЕТИНИБА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗВАННОГО УТРАТОЙ ИЛИ ПОВРЕЖДЕНИЕМ НЕЙРОНОВ

(31) 10-2016-0158739; 10-2017-0036268

(32) 2016.11.25; 2017.03.22

(33) KR

(43) 2019.12.30

(86) PCT/KR2017/013444

(87) WO 2018/097628 2018.05.31

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖЕНУВ ИНК. (KR)

(72) Изобретатель:
Чой Кан-Ёль, Ким Ми-Ён, Хан Сонхо (KR)

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В. (RU)**

(56) KONG, Liang et al., "The Coumarin Derivative Osthole Stimulates Adult Neural Stem Cells, Promotes Neurogenesis in the Hippocampus, and Ameliorates Cognitive Impairment in APP/PS1 Transgenic Mice", Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2015, vol. 38, pages 1290-1301, See abstract; pages 1293-1295, 1299; figures 3-6

YAHATA, Naoki et al., "Anti-amyloid Beta Drug Screening Platform Using Human IPS Cell-derived Neurons for the Treatment of Alzheimer's Disease", PloS One, 2011, vol. 6, no. 9, thesis no. e25788 (inner pages 1-11), See abstract; pages 3-5

US-A1-20120122728

KR-A-1020090046576

KR-A-1020090047532

(57) Изобретение относится к применению траметиниба для лечения нейродегенеративного заболевания, вызванного утратой или повреждением нейронов. В частности, согласно изобретению нейродегенеративное заболевание лечат за счет дифференцировки нервных стволовых клеток в нейроны, защиты нервных стволовых клеток и нейронов от цитотоксического влияния бета-амилоидов или того и другого.

B1

038404

038404

B1

Область техники

Данное изобретение относится к способу индуцирования нейрорегенерации, включающему введение ингибитора МЕК 1/2 пациенту, нуждающемуся в этом, и к композиции, содержащей ингибитор МЕК 1/2, для применения в вышеуказанном способе. В данном изобретении ингибитор МЕК 1/2 индуцирует нейрорегенерацию путем дифференцировки нервных стволовых клеток в нейроны, защиты нервных стволовых клеток и нейронов от цитотоксического эффекта бета-амилоидов или того и другого. Данное изобретение также относится к способу защиты нейронов от утраты или повреждения, включающему введение ингибитора МЕК 1/2, и к композиции, содержащей ингибитор МЕК 1/2, для применения в вышеуказанном способе. Кроме того, данное изобретение относится к способу предупреждения или лечения нейродегенеративного заболевания вследствие утраты или повреждения нейронов у пациента, нуждающегося в этом, включающему введение ингибитора МЕК 1/2, и к композиции, содержащей ингибитор МЕК 1/2, для применения в вышеуказанном способе.

Предшествующий уровень техники

Нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Паркинсона (БП), распространены среди лиц преклонного возраста, и количество пациентов увеличивается экспоненциально со старением населения. Кроме того, сообщения о видах нейродегенеративных заболеваний с ранним началом, возникающих в молодом возрасте, не являются редкостью. Таким образом, большой интерес вызывает разработка лечения, которое поможет остановить прогрессирование заболевания или восстановить поврежденные ткани мозга.

Точные причины таких нейродегенеративных заболеваний до сих пор не установлены. На данный момент известно, что повреждение нервных клеток в определенных областях головного мозга (например, гиппокампе или черном веществе) приводит к уменьшению количества нервных клеток, появлению дефектов нейронной сети, в результате чего развиваются различные симптомы нейродегенеративных заболеваний.

Исследования, направленные на поиск лечения, ведутся в различных направлениях. В настоящее время лекарственные средства, предназначенные для облегчения симптомов, включают мемантин (антагонист рецепторов NMDA), L-DOPA (лекарственный аналог дофамина) и др. Другие лекарственные средства обладают краткосрочным действием, или при их продолжительном применении наблюдались побочные эффекты, поэтому затруднительно ожидать от них лечебного эффекта, кроме временного облегчения симптомов. Таким образом, существует большая потребность в основном лечении, направленном на причину возникновения нейродегенеративного заболевания.

Нервные стволовые клетки (НСК) и нервные прогениторные клетки (НПК), клетки, способные дифференцироваться в нервные клетки, присутствуют во взрослом мозге. Нервные стволовые клетки присутствуют в субвентрикулярной зоне латерального желудочка и зубчатой извилины гиппокампа, и именно в этой области нейрогенез протекает на протяжении всей жизни животного посредством дифференцировки и пролиферации нервных стволовых клеток (Zhao et al. (2008), Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. Cell, 132:645-660).

Поскольку при нейродегенеративных заболеваниях происходит повреждение и утрата нервных клеток головного мозга, замена поврежденных или утраченных нейронов нормально функционирующими нейронами за счет стимуляции НСК и НПК могут быть основным лечением нейродегенеративных заболеваний. Этот способ лечения включает способ лечения стволовыми клетками, при котором НСК и НПК выделяют из организма пациента, стимулируют к дифференцировке в нейроны *in vitro* и затем пересаживают обратно пациентам. Однако существуют трудности в выделении НСК и НПК у пациентов и их обратной пересадке пациентам. Кроме того, трансплантированные НСК и НПК быстро теряют свою активность в головном мозге, что требует повторных пересадок. В качестве альтернативы пересадке нервных стволовых клеток пациентам недавно был предложен способ образования нейронов в головном мозге пациента путем стимуляции НСК и НПК к дифференцировке с применением лекарственных средств (Davies et al. (2015), Stemistry: The Control of Stem Cells in Situ Using Chemistry. J. Med. Chem. 58:2863-2894).

Бета-амилоид (Аβ) представляет собой пептид из 36-43 аминокислот, который образуется в результате расщепления белка-предшественника амилоида (APP), интегрального мембранного белка 1 типа, под воздействием β-секретазы и γ-секретазы. Агрегаты бета-амилоида (Аβ) в виде растворимых олигомеров бета-амилоида (Аβ), а затем протофибрилл образуют нерастворимые фибриллы Аβ, которые впоследствии образуют в головном мозге скопления в виде амилоидных бляшек. Отложение Аβ в головном мозге связано с повреждением синапсов, повреждением нейронов и атрофией головного мозга и в конце концов приводит к нарушению памяти и когнитивных функций, двум очень характерным симптомам болезни Альцгеймера (БА). Среди различных форм Аβ растворимые олигомеры Аβ, в частности тримеры и тетрамеры, считают наиболее токсичными формами Аβ, ассоциированными с дисфункцией нейронов и повреждением синапсов (Murakami, (2014), Conformation-specific antibodies to target amyloid β oligomers and their application to immunotherapy for Alzheimer's disease. Biosci. Biotechnol. Biochem. 78(8):1293-1305; Jana et al. (2016), Membrane-bound tetramer and trimer Аβ oligomeric species correlate with toxicity towards

cultured neurons. *J. Neurochem.* 136(3):594-608).

Поэтому защита нейронов от Аβ, особенно от олигомерных форм Аβ, считается возможной мишенью для лечения БА. Однако пациенты с БА уже имеют серьезное повреждение нейронов, поэтому для основного лечения БА, помимо защиты нейронов, необходима регенерация нейронов за счет дифференцировки эндогенных нервных стволовых клеток.

МЕК (киназа митоген-активируемой протеинкиназы; также известная как MAP2K или MAPKK) является участником сигнального пути MAP киназы (митоген-активируемой протеинкиназы; MAPK) (в данном документе обозначаемого как "путь MAPK/ERK"), представляющего собой цепь реакций, катализируемых ферментами Ras-Raf-MEK-ERK. При связывании различных сигнальных молекул, таких как факторы роста, гормоны, цитокины и т.д., с рецепторами клеточной мембраны и активации рецепторной тирозинкиназы происходит активация ГТФазы Ras, в результате чего цитоплазматический белок Raf рекрутируется к клеточной мембране. Активированный Raf последовательно фосфорилирует и активирует MEK и ERK, а активированная киназа ERK, в свою очередь, транслоцируется в ядро и активирует различные транскрипционные факторы. Затем эти транскрипционные факторы связываются с промоторами различных генов, регулируя клеточную пролиферацию, дифференцировку и выживаемость. Поскольку в опухолевых клетках происходит гиперактивация сигнального пути MAPK/ERK, киназы считают важными мишенями для подавления прогрессирования рака и других пролиферативных заболеваний.

В семействе MEK известно 7 белков (MEK1-MEK7), из которых только MEK1 и MEK2 задействованы в пути передачи сигнала Ras-Raf-MEK-ERK. Хотя MEK1 и MEK2 кодируются разными генами, они обладают высокой гомологией (80%) как в области С-концевого каталитического киназного домена, так и в большей части N-концевой регуляторной области. Несмотря на то, что онкогенные формы MEK1 и MEK2 при раковых заболеваниях человека не были обнаружены, известно, что конститутивная активация MEK приводит к трансформации клеток. Кроме того, MEK также может активироваться другими онкогенами. Поэтому ингибирование MEK1 и MEK2 исследовали в качестве мишени при разработке противоопухолевых лекарственных средств. При этом неясно, какую роль играют MEK1 и MEK2 и путь MAPK/ERK в пролиферации и дифференцировке взрослых нервных стволовых клеток.

Кроме того, имеются результаты исследований, которые указывают на существование связи между путем MAPK/ERK и Аβ или белками тау в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера (БА). К сожалению, неясно, требует ли лечение БА активации или ингибирования этого сигнального пути можно ли связать регуляцию данного сигнального пути с лечением БА.

Опубликованы данные о повышенном уровне экспрессии белков пути MAPK/ERK у пациентов с очень ранней стадией болезни Альцгеймера (Arendt et al. (1995), Increased Expression and Subcellular Translocation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase and Mitogen-Activated Protein Kinase in Alzheimer's Disease. *Neuroscience* 68(1):5-18; Gartner et al. (1999), Elevated Expression of p21ras is an Early Event in Alzheimer's Disease and Precedes Neurofibrillary Degeneration. *Neuroscience* 91(1): 1-5), или ассоциации между ERK1/2 и MEK1/2 с гиперфосфорилированием белка тау в головном мозге пациента с болезнью Альцгеймера (Pei et al. (2002), Up-Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinases ERK1/2 and MEK1/2 is Associated with the Progression of Neurofibrillary Degeneration in Alzheimer's Disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 109(1-2):45-55) и повышенной экспрессии Ras и активации ERK1/2 в клетках B103 (клетки нейробластомы мыши), экспрессирующих белок-предшественник амилоида (APP) (Chaput et al. (2012), SILAC-based Proteomic Analysis to Investigate the Impact of Amyloid Precursor Protein Expression in Neuronal-Like B103 Cells. *Electrophoresis* 33(24):3728-3737).

При этом другие исследования показали, что при активации ERK1/2 происходит подавление апоптоза, индуцированного Аβ, и уменьшается накопление Аβ (Guerra et al. (2004), Plasma Membrane Oestrogen Receptor Mediates Neuroprotection Against β-Amyloid Toxicity Through Activation of Raf-1/MEK/ERK Cascade in Septal-Derived Cholinergic SN56 Cells. *J. Neurochem.* 91:99-109; Watson et al. (2005), Macrophage Inflammatory Protein 2 Inhibits β-Amyloid Peptide (1-42)-Mediated Hippocampal Neuronal Apoptosis through Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathways. *Molecular Pharmacology* 67(3):757-765; Mills et al. (1997) Regulation of Amyloid Precursor Protein Catabolism Involves the Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway. *J. Neurosci.* 17:9415-9422). Кроме того, опубликованы данные, что ERK1/2 снижает активность γ-секретазы, которая вызывает образование Аβ из APP и снижает экспрессию и активность BACE1 (β-секретазы 1) в условиях окислительного стресса (Tamagno et al. (2009), JNK and ERK1/2 Pathways Have a Dual Opposite Effect on the Expression of BACE1. *Neurobiology of Aging*, 30:1563-1573).

Таким образом, необходимо прояснить, какую роль играет регуляция пути MAPK/ERK и ингибирование MEK в нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, поскольку на этот счет существуют противоречивые мнения.

Сущность изобретения

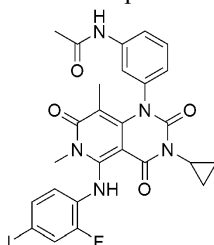
Техническая задача.

Авторам данного изобретения необходимо предложить способ индуцирования нейрогенерации посредством дифференцировки нервных стволовых клеток в нейроны и защиты нервных стволовых кле-

ток и нейронов от Аβ при помощи соединения, ингибирующего MEK1 и MEK2. Кроме того, авторам изобретения необходимо предложить способ защиты нейронов от утраты или повреждения и способ предупреждения или лечения нейродегенеративного заболевания вследствие утраты или повреждения нейронов с использованием соединения, ингибирующего MEK 1 и MEK2.

Решение задачи.

Авторы данного изобретения обнаружили, что соединение, ингибирующее MEK 1 и MEK2 (в данном описании обозначаемое "ингибитор MEK 1/2"), в частности соединение, представленное формулой 1, может эффективно индуцировать дифференцировку нервных стволовых клеток в нейроны; более конкретно, оно защищает нервные стволовые клетки и нейроны от бета-амилоида и в то же время индуцирует дифференцировку нервных стволовых клеток в нейроны.



Формула 1

Один аспект данного изобретения относится к композиции, индуцирующей дифференцировку нервных стволовых клеток, содержащей соединение формулы 1. Композиция не вызывает у нервных стволовых клеток опухолеподобного роста.

Композиция, индуцирующая дифференцировку нервных стволовых клеток, индуцирует дифференцировку нервных стволовых клеток в нейроны, даже в присутствии бета-амилоида.

Индукция дифференцировки в нейроны под влиянием композиции, индуцирующей дифференцировку нервных стволовых клеток, может быть результатом ингибирования MEK 1 и MEK2.

Данная композиция может включать конкретный ингибитор MEK 1/2, отличный от соединения формулы 1. Данная композиция индуцирует дифференцировку нервных стволовых клеток в нейроны даже в присутствии бета-амилоида.

Другой аспект данного изобретения относится к способу дифференцировки нервных стволовых клеток в нейроны с применением композиции, индуцирующей дифференцировку нервных стволовых клеток.

Способ дифференцировки может представлять собой обработку нервных стволовых клеток композицией, индуцирующей дифференцировку нервных стволовых клеток, и прохождение от 1 до 7 суток для завершения дифференцировки.

Другой аспект данного изобретения относится к соединению формулы 1 для применения в индуцировании дифференцировки нервных стволовых клеток, в частности для применения в защите нервных стволовых клеток и нейронов и дифференцировке нервных стволовых клеток в нейроны даже в присутствии бета-амилоида. Еще один аспект данного изобретения относится к конкретному ингибитору MEK 1/2 для применения в индуцировании дифференцировки нервных стволовых клеток, в частности для применения в защите нервных стволовых клеток и нейронов и дифференцировке нервных стволовых клеток в нейроны даже в присутствии бета-амилоида.

Другой аспект данного изобретения относится к набору для применения в индуцировании дифференцировки нервных стволовых клеток в нейроны *in vitro*. Данный набор может включать композицию, индуцирующую дифференцировку нервных стволовых клеток, культуральную среду, планшеты, растворы для покрытия и добавки, необходимые для культивирования клеток, такие как факторы роста и т.д.

Другой аспект данного изобретения относится к способу индуцирования нейрорегенерации, включающему введение конкретного ингибитора MEK 1/2 пациенту, нуждающемуся в этом. В данном изобретении ингибитор MEK 1/2 индуцирует нейрорегенерацию посредством дифференцировки нервных стволовых клеток в нейроны, защиты нервных стволовых клеток и нейронов от цитотоксического эффекта бета-амилоидов или того и другого. Наиболее предпочтительным ингибитором MEK 1/2 для данного способа является соединение формулы 1. Дополнительный аспект данного изобретения относится к конкретному ингибитору MEK 1/2, в частности соединению формулы 1, для применения в нейрорегенерации.

Другой аспект данного изобретения относится к способу защиты нейронов от утраты или повреждения, включающему введение конкретного ингибитора MEK 1/2 пациенту, нуждающемуся в этом. Наиболее предпочтительным ингибитором MEK 1/2 для данного способа является соединение формулы 1. Дополнительный аспект данного изобретения относится к конкретному ингибитору MEK 1/2, в частности соединению формулы 1 для применения в защите нейронов от утраты или повреждения.

Другой аспект данного изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы 1 в качестве активного ингредиента, для предупреждения или лечения нейродегене-

ративных заболеваний или к способу предупреждения или лечения нейродегенеративных заболеваний с использованием соединения формулы 1.

Нейродегенеративные заболевания относятся к функциональным нарушениям в различных системах, таких как регуляция моторики, когнитивная функция, функция восприятия, сенсорная функция и автономная нервная система, вследствие утраты или снижения функции нейронов. Примеры нейродегенеративных заболеваний включают деменцию, болезнь Альцгеймера (БА), сосудистую деменцию,сенильную деменцию, лобно-височную деменцию (ЛВД), деменцию с тельцами Леви (ДТЛ), болезнь Паркинсона (БП), множественную системную атрофию (МСА), кортикобазальную дегенерацию (КБД), прогрессирующий супрануклеарный паралич (ПСП), болезнь Хантингтона (БХ), боковой амиотрофический склероз (БАС, болезнь Лу Герига), первичный латеральный склероз (ПЛС), спинальную мышечную атрофию, прогрессирующий бульбарный паралич (ПБП), прогрессирующую мышечную атрофию (ПМА), псевдобульбарный паралич, наследственную спастическую параплегию (НСП), мозжечковую атаксию, болезнь Крейтцфельда-Якоба (БКЯ), рассеянный склероз (РС), синдром Гийена-Барре (СГБ) и т.д.

Другой конкретный ингибитор MEK1/2, отличный от соединения формулы 1, может входить в фармацевтическую композицию может или использоваться в способе.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к соединению формулы 1 для применения в предупреждении и лечении нейродегенеративного заболевания. Кроме того, он относится к конкретному ингибитору MEK 1/2 для применения в предупреждении и лечении нейродегенеративного заболевания.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу скрининга соединений, которые индуцируют дифференцировку нервных стволовых клеток в нейроны и защищают их в условиях, имитирующих условия, существующие при нейродегенеративном заболевании, таком как болезнь Альцгеймера.

Способ скрининга по данному изобретению включает стадии:

1) обработка нервных стволовых клеток, выделенных у взрослой мыши, веществами, вызывающими повреждение нейронов, такими как бета-амилоид (особенно в его олигомерной форме), МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин), ротенон, оксидофамин, глутамат, LPS (липополисахарид), S100B (S100 кальций-связывающий белок B);

2) добавление исследуемого вещества к нервным стволовым клеткам, обработанным указанными выше веществами, вызывающими повреждение нейронов; и

3) изучение дифференцировки или гибели нервных стволовых клеток путем анализа морфологии.

Далее будут подробно описаны различные аспекты и воплощения данного изобретения.

В данном описании термин "нервные стволовые клетки" относится к способности непрерывно пролиферировать в недифференцированном состоянии (самообновление) и способности к дифференцировке в различные нейроны и глию из одной стволовой клетки (мультипотентность). Нервная стволовая клетка имеет животное происхождение.

Термин "животное" относится не только к человеку и приматам, но также охватывает таких животных, как коровы, свиньи, овцы, лошади, мыши, крысы, кошки и т.д., и предпочтительно людей. В случаях, когда используется термин "нервная стволовая клетка", он охватывает "нервную прогениторную клетку".

В данном изобретении термин "дифференцировка" относится к развитию клетки в специализированную клетку. Более конкретно, он относится к процессу, при котором структура или функция клетки становится специализированной в результате клеточного деления, пролиферации и роста клетки, и к изменениям структуры (морфологии) или функции клеток и тканей для выполнения присущих им функций. Дифференцировке нервных стволовых клеток предшествует асимметричное деление материнской клетки на две клетки, которые обладают различными свойствами. Одна из дочерних клеток является такой же, как материнская клетка, оставаясь стволовой клеткой, а другая дифференцируется в специализированную клетку. Тот факт, что процесс такого асимметричного деления сопровождается дифференцировкой нервной стволовой клетки означает, что "дифференцировка нервной стволовой клетки" включает значение "пролиферация".

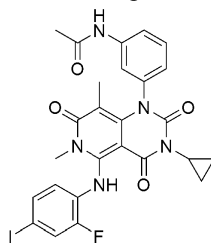
В данном изобретении термин "пролиферация" относится к феномену, при котором клетка делится и пролиферирует. Это, в частности, относится к увеличению числа клеток того же типа за счет клеточного деления, увеличению количества клеток за счет воспроизводства той же самой формы клеток.

В данном изобретении термин "защита" относится к предупреждению повреждения клеток под воздействием повреждающих внешних стимулов, так что нервные стволовые клетки могут пролиферировать или дифференцироваться без возникновения клеточной гибели, а дифференцированные нейроны могут выживать в присутствии цитотоксических факторов, в частности бета-амилоида. Применительно к БА термин "защита" в данном изобретении включает защиту нервных стволовых клеток и нейронов от повреждения, вызванного бета-амилоидом, за счет уменьшения соотношения $A\beta_{(1-42)}/A\beta_{(1-40)}$ в головном мозге (Majid et al. (2015), Pharmacologic Treatment with Histone Deacetylase 6 Inhibitor (ACY-738) Recovers Alzheimer's Disease Phenotype in Amyloid Precursor Protein/Presenilin 1 (APP/PS1) Mice. *Alzheimers Dement.* 170-181; Borchelt et al. (1996), Familial Alzheimer's Disease-Linked Presenilin 1 Variants

Elevate A β_{1-42} /1-40 Ratio In Vitro and In Vivo. Neuron. 17:1005-1013).

В данном документе термин "предупреждение" относится ко всем действиям, которые подавляют или замедляют прогрессирование нейродегенеративных заболеваний благодаря введению фармацевтической композиции по данному изобретению. "Лечение" относится ко всем действиям, которые облегчают симптомы или улучшают патологическое состояние у пациентов, у которых подозревают или диагностировали нейродегенеративное заболевание.

Один аспект данного изобретения относится к композиции, индуцирующей дифференцировку нервных стволовых клеток, содержащей соединение, представленное формулой 1



Формула 1

Общепринятым наименованием соединения, представленного выше формулой 1, является траметиниб, а его химическим наименованием является N-(3-{3-циклопропил-5-[(2-фтор-4-иодофенил)амино]-6,8-диметил-2,4,7-триоксо-3,4,6,7-тетрагидропиридо[4,3-d]пиримидин-1(2H)-ил}фенил)ацетамид. Оно раскрыто в примере 4-1 заявки WO2005/121142, где заявителем является Japan Tobacco Inc. Соединение формулы 1 ингибирует MEK1 и MEK2, компоненты сигнального пути MAPK/ERK (митоген-активируемой протеинкиназы/киназы, регулируемой внеклеточными сигналами), предшествующие ERK. Данное соединение используют в качестве противоопухолевого средства при меланоме и немелкоклеточном раке. В настоящем изобретении его используют в форме свободного основания или фармацевтически приемлемой соли или сольвата. Примерами возможных сольватов являются гидраты, диметилсульфоксид, уксусная кислота, этанол, нитрометан, хлорбензол, 1-пентанол, изопропиловый спирт, этиленгликоль, 3-метил-1-бутанол и т.д.

В частности, один аспект данного изобретения относится к композиции, содержащей соединение формулы 1, которая как защищает нервные стволовые клетки и нейроны, так и индуцирует дифференцировку нервных стволовых клеток в нейроны. Отложения бета-амилоида в головном мозге в виде амилоидных бляшек связаны с повреждением синапсов, повреждением нейронов и атрофией головного мозга и, как известно, в конечном итоге вызывают характерные симптомы болезни Альцгеймера, нарушение памяти и когнитивных функций. Таким образом, защита нервных стволовых клеток и нейронов от бета-амилоида при регенерации нейронов в результате дифференцировки эндогенных нервных стволовых клеток может стать основным лечением болезни Альцгеймера.

A $\beta_{(1-42)}$, состоящий из 42 аминокислот, имеет более высокую тенденцию образовывать агрегаты по сравнению с A $\beta_{(1-40)}$ и более высокую тенденцию образовывать более токсичные тримеры или тетрамеры и поэтому считается тесно связанным с патологическими изменениями при болезни Альцгеймера. Таким образом, предпочтительной является композиция, которая может защищать нервные стволовые клетки и вызывать их дифференцировку даже в присутствии A $\beta_{(1-42)}$, особенно олигомеров A $\beta_{(1-42)}$.

С целью обнаружения композиции, которая вызывает дифференцировку нервных стволовых клеток мыши в нейроны, авторы изобретения экспериментально подтвердили, как показано в Примерах, что соединение формулы 1 очень эффективно в индуцировании дифференцировки в нейроны нервных стволовых клеток, выделенных из головного мозга мышинных эмбрионов или взрослых мышей.

Нервные стволовые клетки обладают способностью дифференцироваться в различные нейроны или в клетки глии, такие как олигодендроциты, астроциты и микроглия. Соединение формулы 1 вызывает дифференцировку нервных стволовых клеток преимущественно в нейроны и ограничивает дифференцировку в клетки глии. Таким образом, соединение формулы 1 может эффективно индуцировать образование нейронов (нейрогенез), тем самым позволяя замещать этими "новыми" нейронами поврежденные нейроны в головном мозге пациентов, страдающих нейродегенеративным заболеванием, сопровождающимся повреждением нейронов, и может применяться в качестве лекарственного средства, которое способствует нейральной регенерации, или нейрорегенерации.

Как показано на конкретных примерах в данном изобретении, авторы изобретения установили в экспериментах *in vitro* с применением олигомерного A β , имитирующих условия в головном мозге пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера, что соединение формулы 1 защищает нервные стволовые клетки или нейроны от гибели и индуцирует дифференцировку нервных стволовых клеток в нейроны (фиг. 2).

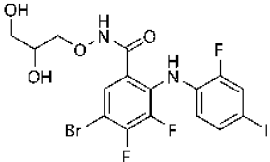
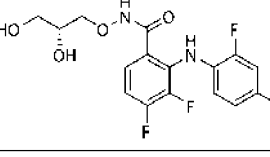
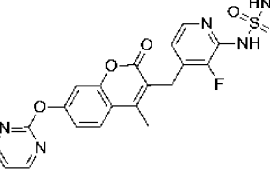
Кроме того, один аспект данного изобретения относится к композиции, индуцирующей дифференцировку нервных стволовых клеток, содержащей конкретное соединение, ингибирующее MEK1 и MEK2.

В данном изобретении соединение, которое ингибирует MEK1 и MEK2, также обозначается "ингибитор MEK 1/2". "Ингибитор MEK 1/2" предпочтительно имеет значение IC_{50} , находящееся в наномолярном диапазоне, и значения IC_{50} для MEK1 и MEK2, различающиеся менее чем в 10 раз, предпочтительно, менее чем в 5 раз. Значения IC_{50} для MEK1 и 2 можно измерять способами, описанными в публикациях, таких как [Yamaguchi et al. (2011) International Journal of Oncology 39:23-31]. Ингибитор MEK 1/2, который может использоваться в данном изобретении, представляет собой соединение, которое индуцирует дифференцировку нервных стволовых клеток в нейроны, при этом защищая нервные стволовые клетки и нейроны от токсических веществ, таких как Аβ. Примеры ингибиторов MEK 1/2, которые могут использоваться в данном изобретении, являются следующими: траметиниб, пимасертиб (AS703026), AZD8330, биниметиниб (MEK162, ARRY-162, ARRY-438162), рефаметиниб (RDEA119, Bay 86-9766), PD318088, PD0325901, RO5126766.

Химическая структура предпочтительных ингибиторов MEK 1/2 и значения их IC_{50} , а также публикации, где описаны способы измерения значений IC_{50} , приведены в табл. 1.

Таблица 1

Наименование	Химическая структура	Значение IC_{50} для MEK 1, MEK2 (ссылка на способ определения значений IC_{50})
Траметиниб		0,92 ~ 3,4 nM (International Journal of Oncology 2011;39:23-31)
Пимасертиб (AS703026)		≤ 1 мкМ (US 2009/0093462, Таблица I, Пример 115)
AZD8330		7 nM (AACR Annual Meeting, 2009, Abst 3696)
Биниметиниб (ARRY-162, ARRY-438162)		12 nM (American College of Rheumatology, 2006 Annual Scientific Meeting, Abst 794)
Рефаметиниб (RDEA119, Bay 86-9766)		MEK1: 19 nM, MEK2: 47 nM (Cancer Res. 2009;69(17):6839-47)

PD318088		1,4 nM (WO 02/06213, Пример 40)
PD0325901		3,6 ~24 nM (Oncotarget 2012;3:1533-1545)
RO5126766 (CH5126766)		160 nM (Cancer Res. 2013;73(13): 4050-4060)

Кроме того, один аспект данного изобретения относится к композиции, содержащей ингибитор MEK 1/2, для дифференцировки нервных стволовых клеток в нейроны при защите нервных стволовых клеток и нейронов от бета-амилоида, особенно олигомерной формы $A\beta_{(1-42)}$.

Применение селективного ингибитора либо MEK1, либо MEK2, а не ингибитора MEK 1/2, который ингибирует MEK1 и MEK2, нежелательно, поскольку его индуцирующая дифференцировку нервных стволовых клеток активность является слабой. Например, кобиметиниб представляет собой MEK1-селективный ингибитор, селективность которого в отношении MEK1 в 100 или более раз выше, чем в отношении MEK2 (MEK1 IC_{50} =0,95 nM, MEK2 IC_{50} =199 nM; Molecules 2017;22:1551). В отличие от ингибитора MEK 1/2, кобиметиниб не индуцирует дифференцировку взрослых нервных стволовых клеток мыши даже в высокой концентрации 10 мкМ, независимо от воздействия бета-амилоида (пример 7).

Тот факт, что ингибирование обоих MEK1 и MEK2 вовлечено в индукцию дифференцировки НСК в нейроны и защиту НСК и нейронов, был также подтвержден экспериментально в примере 5. В этих экспериментах использовали shRNA (короткую шпилечную РНК) для ингибирования экспрессии MEK1 и MEK2 и использовали плазмиды с конститутивно активной MEK1 (CAMEK1) и конститутивно активной MEK2 (CAMEK2) для активации экспрессии MEK1 и MEK2 (пример 5).

Однако не все ингибиторы MEK 1/2 демонстрируют такой же эффект. Например, ингибиторы MEK 1/2 U0126, PD184352 и BI847325 демонстрировали слабо выраженный индуцирующий дифференцировку нервных стволовых клеток (НСК) в нейроны эффект или вызывали цитотоксичность, что делало их непригодными для применения в качестве индуцирующей дифференцировку нервных стволовых клеток композиции по данному изобретению (фиг. 10а и 10с). Таким образом, индуцирующая дифференцировку НСК активность или защищающая НСК и нейрон активность может различаться в зависимости от уникальных свойств, которыми обладает соединение помимо его ингибирующей MEK 1/2 активности. В данном изобретении ингибиторами MEK 1/2, которые демонстрировали индуцирующую дифференцировку НСК в нейроны активность или защищающую НСК и нейрон активность, являются траметиниб, пимасертиниб (AS703026), AZD8330, биниметиниб, рефаметиниб, PD318088, PD0325901 и RO5126766.

В частности, соединение формулы 1 (траметиниб) демонстрировал существенно превосходящую способность вызывать дифференцировку и защищать от $A\beta$ даже при сравнении с другими ингибиторами MEK 1/2, которые можно использовать в данном изобретении. Например, соединение формулы 1 демонстрировало более выраженную способность вызывать дифференцировку и защищать от $A\beta$ по сравнению с AS703026 в концентрации, которая была в 100 или более раз ниже. Данный эффект соединения формулы 1 существенно превосходит эффект, который можно предсказать исключительно по его ингибирующей MEK1/2 активности.

Соединение формулы 1 никогда не применяли в целях индукции дифференцировки нервных стволовых клеток в нейроны, и оно было известно только в качестве ингибитора MEK 1/2, подавляющего активность MEK1 и MEK2 за счет неконкурентного ингибирования связывания АТФ, и в качестве лекарственного средства для лечения меланомы и немелкоклеточного рака.

Другой аспект данного изобретения относится к способу индукции дифференцировки НСК в нейроны с применением соединения формулы 1 или других ингибиторов MEK1/2.

Что касается способа, раскрытого в данном изобретении, нервные стволовые клетки можно выделять из мозга эмбрионов или взрослых особей известными способами. В альтернативном варианте нервные стволовые клетки можно приобретать из коммерческих источников или можно культивировать любым стандартным способом, известным в области техники. В этом нет каких-либо конкретных ограничений. В приведенном ниже разделе "Примеры" использовали нервные стволовые клетки, выделенные из

лобных долей 14,5-суточных мышинных эмбрионов и субвентрикулярной зоны мышей в возрасте 8 недель.

Перед дифференцировкой нервные стволовые клетки можно вносить в культуральную среду и культивировать при 37°C. Культуральная среда может быть любой бессывороточной средой с добавлением факторов роста, без каких-либо конкретных ограничений. Например, среда может представлять собой смесь среды Игла в модификации Дульбекко и питательной среды F12 (DMEM/F12) (1:1) с добавлением одного или более компонентов, выбранных из группы, состоящей из 90-110 мкМ путресцина, 20-40 нМ селенита, 10-30 нМ прогестерона, 1,0-2,0 мг/мл d-(+) глюкозы, 20-30 мкг/мл инсулина, 0,05-0,2 мг/мл апо-трансферрина, 0,3-0,6 мМ глутамакса, 50-150 МЕ/мл пенициллина и 50-150 мкг/мл стрептомицина и дополнительно с добавлением факторов роста, выбранных из группы, состоящей из 10-30 нг/мл bFGF, 10-30 нг/мл EGF или их смесей.

Для получения недифференцированных нервных стволовых клеток нервные стволовые клетки можно культивировать в среде N2 с добавлением факторов роста [среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM)/F12 (1:1), с добавлением 100 мкМ путресцина, 30 нМ селенита, 20 нМ прогестерона, 1,55 мг/мл d-(+)-глюкозы, 25 мкг/мл инсулина, 0,1 мг/мл апо-трансферрина, 0,5 мМ глутамакса, 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина].

Дифференцировка культивируемых нервных стволовых клеток в нейроны включает воздействие на нервные стволовые клетки композиции, индуцирующей дифференцировку, содержащей соединение формулы 1, и затем обеспечение дифференцировки в соответствии со способом, известным в области техники. Например, в среду, содержащую культивируемые нервные стволовые клетки, добавляют композицию, индуцирующую дифференцировку нервных стволовых клеток, по данному изобретению и индуцируют дифференцировку при 37°C.

Процесс дифференцировки нервных стволовых клеток в нейроны протекает в различных условиях культивирования, указанных выше (см., например, содержание и количество компонентов среды и сроки культивирования). Условия культивирования не ограничены конкретными условиями, указанными выше. Предпочтительно, температура культивирования, при которой может быть индуцирована дифференцировка нервных стволовых клеток, составляет от 35 до 40°C. Если температура культивирования ниже 35 или превышает 40°C, нервные стволовые клетки погибают, прежде чем дифференцируются в нейроны.

Перед добавлением композиции, индуцирующей дифференцировку нервных стволовых клеток, содержащей соединение формулы 1, предпочтительно обеспечить достаточную концентрацию клеток в культуре нервных стволовых клеток. Кроме того, для наблюдения за изменениями в культуре, такими как пролиферация клеток, дифференцировка или гибель, предпочтительно воздействовать на нервные стволовые клетки композицией, индуцирующей дифференцировку нервных стволовых клеток, содержащей соединение формулы 1, согласно способу, описанному выше, в течение периода культивирования 7 суток или менее. Для этого период культивирования нервных стволовых клеток предпочтительно составляет по меньшей мере от 1 суток до максимум 7 суток для обеспечения достаточной концентрации клеток.

Что касается концентрации соединения формулы 1, предпочтительно добавлять его к нервным стволовым клеткам в концентрации от 1 нМ до 20 мкМ. Если концентрация составляет менее 1 нМ, способность индуцировать дифференцировку нервных стволовых клеток снижается, если она превышает 20 мкМ, начинают возникать проблемы с цитотоксичностью. Для добавления соединения нервные стволовые клетки обычно высевают в лунки планшета, чтобы они покрывали до 70-80% площади лунки. Например, в 12-луночные планшеты высевают 1×10^5 клеток/лунку, в 6-луночные планшеты высевают 5×10^5 клеток/лунку.

Кроме того, как подробно описано в разделе "Примеры", предпочтительно применять соединение формулы 1 в концентрации от 10 нМ до 10 мкМ, более предпочтительно от 10 до 100 нМ. Если концентрация составляет менее 10 нМ, увеличивается время индукции дифференцировки, что является неэкономичным. Однако, если она превышает 10 мкМ, соединение формулы 1 оказывается в избытке как активный ингредиент и при последующем введении *in vivo* ингибирование MEK1 и MEK2 может оказаться очень сильным, может повлиять на многие внутриклеточные сигнальные пути и в результате может вызвать множество нежелательных реакций.

С момента добавления к культуре нервных стволовых клеток композиции, индуцирующей дифференцировку нервных стволовых клеток, содержащей соединение формулы 1, которое является ингибитором MEK1 и MEK2, до завершения процесса дифференцировки проходит от 1 до 7 суток, предпочтительно от 3 до 5 суток.

Преимущества изобретения

Когда композицию, индуцирующую дифференцировку нервных стволовых клеток, по данному изобретению применяют у пациентов с нейродегенеративным заболеванием, она индуцирует дифференцировку нервных стволовых клеток в головном мозге пациента в нейроны и позволяет заменить поврежденные или утраченные нейроны "новообразованными" нейронами. Это означает, что композиция по данному изобретению индуцирует нейральную регенерацию или нейрорегенерацию благодаря нейроге-

незу из нервных стволовых клеток. Таким образом, композицию можно применять для предупреждения или лечения нейродегенеративных заболеваний. В данном изобретении "нейрогенез" означает образование нейронов из нервных стволовых клеток, а "нейральная регенерация" или "нейрорегенерация" означает восстановление путем нейрогенеза организации и функций нервной системы, дегенерация которых произошла вследствие гибели нервных клеток. Кроме того, композиция по данному изобретению может оказывать лечебное или профилактическое влияние путем защиты нервных стволовых клеток или нейронов от олигомеров бета-амилоида.

Кроме того, данное изобретение может широко применяться для исследования эффектов лекарственных средств или в различных исследованиях в разработке новых лекарственных средств для нейродегенеративных заболеваний.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлен анализ морфологии в примере 1, где дифференцировку эмбриональных нервных стволовых клеток мыши в нейроны при воздействии траметинибом и пимасертибом (AS703026) в различных концентрациях оценивали при помощи фазово-контрастного микроскопа. НД и Д обозначены недифференцированные эмбриональные нервные стволовые клетки мыши, полученные в примере 1 на стадии 1А, и дифференцированные эмбриональные нервные стволовые клетки мыши, полученные на стадии 1В, соответственно не подвергавшиеся воздействию какого-либо исследуемого вещества.

На фиг. 2 представлен анализ морфологии в примере 2, где в нижнем ряду представлены результаты, полученные при воздействии 10 мкМ олигомерного бета-амилоида ($A\beta_{1-42}$) на взрослые нервные стволовые клетки мыши, а в верхнем ряду показаны нервные стволовые клетки, не подвергавшиеся воздействию бета-амилоида. НД и Д обозначены недифференцированные взрослые нервные стволовые клетки мыши, полученные в примере 2 на стадии 1А, и дифференцированные взрослые нервные стволовые клетки мыши, полученные на стадии 1В, соответственно не подвергавшиеся воздействию какого-либо исследуемого вещества. Представлены результаты, полученные на недифференцированных взрослых стволовых клетках мыши, полученных в примере 2 на стадии 1А, при воздействии соответствующего исследуемого вещества в соответствующих концентрациях: траметиниб (10 нМ), траметиниб (100 нМ), мемантин (5 мкМ), мемантин (10 мкМ) и AS703026 (10 мкМ).

На фиг. 3 приведено сравнение клеточной морфологии нервных стволовых клеток 14,5-суточных мышинных эмбрионов, которые подвергались (нижний ряд) или не подвергались (верхний ряд) воздействию олигомерного бета-амилоида (10 мкМ), как описано в приведенном для сравнения примере 1. НД (недифференцированные) и Д (дифференцированные) обозначены недифференцированные и дифференцированные эмбриональные нервные стволовые клетки мыши, полученные в приведенном для сравнения примере 1 на стадии 1, соответственно не подвергавшиеся воздействию какого-либо исследуемого вещества. Представлены результаты, полученные на недифференцированных эмбриональных стволовых клетках мыши, полученные в приведенном для сравнения примере 1 на стадии 1, при воздействии соответствующего исследуемого вещества в соответствующих концентрациях: траметиниб (100 нМ), мемантин (10 мкМ) и AS703026 (10 мкМ).

На фиг. 4 представлены изображения, полученные в примере 3 с помощью флуоресцентного микроскопа. В первом ряду НД и Д обозначены недифференцированные и дифференцированные эмбриональные нервные стволовые клетки, соответственно не подвергавшиеся воздействию какого-либо исследуемого вещества. Во втором и третьем ряду представлены изображения клеток, не подвергавшиеся воздействию соответствующих концентраций траметиниба и AS703026. Синие точки соответствуют клеточным ядрам, окрашенным DAPI, а клетки с тонкими удлиненными ветвями красного цвета соответствуют нейронам, окрашенным на Tuj1 конъюгатом родамина.

На фиг. 5 показаны результаты, полученные в примере 4-1, демонстрирующие относительные уровни экспрессии мРНК нейрон-специфического маркера Tuj1 (фиг. 5а) и маркера дофаминергических нейронов TH (фиг. 5б) в эмбриональных нервных стволовых клетках мыши при воздействии различных концентраций траметиниба и AS703026.

На фиг. 6 представлена часть результатов, полученных в примере 4-2, демонстрирующих относительные уровни экспрессии мРНК маркера дофаминергических нейронов TH (фиг. 6а), маркера холинергических нейронов ChAT (фиг. 6б), маркера двигательных нейронов Isl1 (фиг. 6с) и маркера ГАМК-ергических нейронов Gad1 (фиг. 6д) в эмбриональных нервных стволовых клетках мыши при воздействии различных концентраций траметиниба.

На фиг. 7 представлена часть результатов примера 4-2, где показаны относительные уровни экспрессии мРНК маркера нейронов Tuj 1 (фиг. 7а), маркера холинергических нейронов ChAT (фиг. 7б) и маркера дофаминергических нейронов TH (фиг. 7с) во взрослых нервных стволовых клетках мыши при воздействии 10 нМ траметиниба (Tга) и 10 мкМ AS703026 (AS).

На фиг. 8а представлены результаты примера 5-1, подтверждающие наличие или отсутствие экспрессии маркера дофаминергических нейронов TH, которую определяли при помощи RT-PCR для анализа способности дифференцироваться в нейроны у эмбриональных нервных стволовых клеток мыши, в которых подавляли экспрессию MEK1 или MEK1 и MEK2.

На фиг. 8б представлена часть результатов, полученных в примере 5-1, где показаны относительные

уровни экспрессии *Tuj1* и ТН в эмбриональных нервных стволовых клетках мыши, в которых подавляли экспрессию MEK1 или MEK2 или MEK1 и MEK2 при помощи shMEK1 и shMEK2, и подтверждается наличие или отсутствие белков *Tuj1* и ТН при помощи вестерн-блоттинга.

На фиг. 8с представлена часть результатов, полученных в примере 5-2, где показаны относительные уровни экспрессии мРНК *Tuj1* и ТН в эмбриональных нервных стволовых клетках мыши, в которых активировали экспрессию MEK1 или MEK2 или MEK1 и MEK2 при помощи CAMEK1 и CAMEK2, и подтверждается наличие или отсутствие белков *Tuj1* и ТН при помощи вестерн-блоттинга.

На фиг. 9 представлены результаты, полученные в примере 5-3, где показана морфология клеток при наблюдении с помощью фазово-контрастного микроскопа (фиг. 9а) и анализ относительных уровней экспрессии мРНК маркера нейронов *Tuj1* (фиг. 9б) во взрослых нервных стволовых клетках мыши, подвергавшихся или не подвергавшихся воздействию Аβ, где экспрессию MEK1 или MEK2 или MEK1 и MEK2 подавляли при помощи shMEK1 и shMEK2.

На фиг. 10 представлены результаты, полученные в примере 6, где показана морфология клеток при наблюдении с помощью фазово-контрастного микроскопа (фиг. 10а) и анализ относительного уровня экспрессии мРНК *Tuj1* (фиг. 10б) в эмбриональных нервных стволовых клетках мыши при воздействии траметиниба, AZD8330, PD184352, рефаметиниба, PD318088, биниметиниба и AS703026 в концентрациях 0,1, 1, 10 и 10 мкМ. На фиг. 10с показаны результаты наблюдений с помощью фазово-контрастного микроскопа взрослых нервных стволовых клеток мыши при воздействии PD0325901, RO5126766, BI847325 и U0126 (фиг. 10с).

На фиг. 11 представлены результаты, полученные при помощи фазово-контрастной микроскопии в примере 7, где показана морфология взрослых нервных стволовых клеток мыши при воздействии Аβ или без, с последующим воздействием ингибиторов MEK1/2 траметиниба (0,1 мкМ), AS703026 (10 мкМ), AZD8330 (1 мкМ), PD318088 (1 мкМ), биниметиниба (10 мкМ), рефаметиниба (1 мкМ), PD0325901 (10 мкМ), RO5126766 (10 мкМ) и кобиметиниба (10 мкМ), известного как ингибитор, обладающий селективностью по отношению к MEK1 по сравнению с MEK2. Ряды, отмеченные "-", соответствуют клеткам, не подвергавшимся воздействию бета-амилоида, а ряды, обозначенные "Aβ₁₋₄₂", соответствуют клеткам, подвергавшимся воздействию 10 мкМ бета-амилоида.

На фиг. 12 представлена часть результатов, полученных в примере 8, где показано иммуногистохимическое окрашивание на NeuN срезов соматосенсорной коры у мышей 5XFAD, получавших траметиниб (фиг. 12а). На фиг. 12б показано количественное соотношение числа клеток, окрашенных на NeuN у мышей, получавших траметиниб, по сравнению с контролями, которые получали только плацебо (фиг. 12б).

На фиг. 13 представлена часть результатов, полученных в примере 8, где показано иммуногистохимическое окрашивание на NeuN срезов двигательной зоны коры у мышей 5XFAD, получавших траметиниб (фиг. 13а). На фиг. 13б показано количественное соотношение числа клеток, окрашенных на NeuN у мышей, получавших траметиниб, по сравнению с контролями, которые получали только плацебо (фиг. 13б).

На фиг. 14 представлена часть результатов, полученных в примере 8, где показано иммуногистохимическое окрашивание на NeuN срезов основания гиппокампа у мышей 5XFAD, получавших траметиниб (фиг. 14а). На фиг. 14б показано количественное соотношение числа клеток, окрашенных на NeuN у мышей, получавших траметиниб, по сравнению с контролями, которые получали только плацебо (фиг. 14б).

На фиг. 15 представлены результаты, полученные в примере 9-1, где показано иммуногистохимическое окрашивание на *Tuj1* срезов соматосенсорной коры у мышей 5XFAD, получавших траметиниб. В участках изображений, отмеченных стрелками (→), показаны клетки, окрашенные на *Tuj1*, а в участках, отмеченных треугольниками (▼), показаны бляшки, образованные агрегатами бета-амилоида.

На фиг. 16 представлены результаты, полученные в примерах 9-2 и 9-3, где показано окрашивание по Нисслю, окрашивание на NeuN, Dcx и окрашивание с использованием BrdU срезов зубчатой извилины гиппокампа у мышей 5XFAD, получавших траметиниб (фиг. 16а) и количественное определение клеток, меченных BrdU (фиг. 16б). На фиг. 16а в участках, отмеченных стрелками (→), показаны клетки, окрашенные на Dcx, а в участках, отмеченных треугольниками (▼), показаны клетки, меченные BrdU.

На фиг. 17 представлены результаты, полученные в примере 10, где показано окрашивание с помощью метода TUNEL (мечение дУТФ концов ДНК при помощи терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы), индикатора апоптоза, срезов основания гиппокампа и соматосенсорной коры у мышей 5XFAD, получавших траметиниб. Клетки в основании гиппокампа, подвергшиеся апоптозу и окрашенные зеленым флуоресцентным красителем, указаны стрелками (→).

На фиг. 18 представлены результаты, полученные в примере 11, где показано окрашивание на *Tuj1* и кальбиндин клеток Пуркинье в срезах мозжечка мышей 5XFAD, получавших траметиниб. Для каждой группы приведены изображения двух (окрашивание на *Tuj1*) или трех (окрашивание на кальбиндин) срезов.

На фиг. 19 представлены результаты, полученные в примере 12, подтверждающие наличие или отсутствие белка pERK в полушариях головного мозга мышей 5XFAD, получавших траметиниб, при ана-

лизе методом вестерн-блоттинг (фиг. 19a); на фиг. 19b представлены результаты количественного определения белка pERK (фиг. 19b).

На фиг. 20 представлены результаты, полученные в примере 13, где показано количественное определение A β 40 и A β 42 и соотношение (A β 42/A β 40) по результатам ELISA (иммуноферментного анализа) с использованием полушарий головного мозга мышей 5xFAD, получавших траметиниб.

Звездочкой (*) на изображениях отмечены следующие результаты статистического анализа, полученные с использованием t-критерия: *: P<0,05, **: P<0,01, ***: P<0,005.

Предпочтительные варианты осуществления изобретения

Когда нервные стволовые клетки обрабатывали соединением формулы 1 по данному изобретению, авторы наблюдали увеличение уровня экспрессии маркера нейронов Tuj1, а также увеличение уровней экспрессии всего из перечисленного: маркера дофаминергических нейронов TH, маркера ГАМК-ергических нейронов Gad1, маркера двигательных нейронов Isl1 и маркера холинергических нейронов ChAT (пример 4). Это означает, что соединение формулы 1 может вызывать дифференцировку нервных стволовых клеток в различные типы нейронов, такие как дофаминергические нейроны, ГАМК-ергические нейроны, холинергические нейроны и двигательные нейроны. Соответственно, соединение формулы 1 можно применять в лечении различных нейродегенеративных заболеваний, которые вызваны утратой или повреждением различных нейронов. Например, болезнь Паркинсона обычно связана с утратой дофаминергических нейронов, заболевания двигательных нейронов, такие как болезнь Лу Герига/БАС, прогрессирующий бульбарный паралич (ПБП), прогрессирующая мышечная атрофия (ПМА), первичный латеральный склероз (ПЛС), псевдобульбарный паралич (ПБП) и наследственная спастическая параплегия (НСП), ассоциированы с утратой двигательных нейронов, а деменция, как при болезни Альцгеймера, сосудистая деменция и сенильная деменция обычно ассоциированы с утратой холинергических нейронов. Кроме того, болезнь Хантингтона обычно ассоциирована с утратой ГАМК-ергических средних шипиковых нейронов в полосатом теле базальных ганглиев.

В частности, поскольку соединение формулы 1 позволяет дифференцироваться нервным стволовым клеткам в нейроны, при этом защищая их от A β , основной невропатологической характеристики болезни Альцгеймера, его можно применять в лечении болезни Альцгеймера.

Авторы данного изобретения подтвердили, что соединение формулы 1 увеличивает количество нейронов в области основания гиппокампа и 5 слое коры головного мозга на модели болезни Альцгеймера у мышей (5xFAD), экспрессирующих гены, встречающиеся у людей с болезнью Альцгеймера (пример 8). Мыши 5xFAD несут мутации генов, кодирующих APP (белок-предшественник амилоида) и пресенилин (PSEN1), которые, как известно, вызывают у человека наследственную болезнь Альцгеймера, и у них происходит отложение больших количеств амилоида в основании гиппокампа и 5 слое коры головного мозга с одновременной утратой нейронов в этих областях. Наблюдение, что соединение формулы 1 увеличивало количество нейронов на мышинной модели 5xFAD, подтверждает тот факт, что соединение формулы 1 индуцирует дифференцировку нервных стволовых клеток в нейроны *in vivo* с увеличением количества нейронов и/или защищает нейроны от бета-амилоида.

Соединение формулы 1 также увеличивало количество нейронов в различных отделах коры головного мозга мышей 5xFAD, особенно в двигательной зоне коры и соматосенсорной зоне коры, при сравнении с контролями (пример 8, фиг. 12, 13). Это свидетельствует о том, что соединение формулы 1 можно применять для лечения заболевания двигательных нейронов, такого как БАС, вызванного утратой нейронов в этой зоне.

Соединение формулы 1 также увеличивало ветвление аксонов или сохраняло структуру аксонов клеток Пуркинье в мозжечке мышей 5xFAD при сравнении с контролями (пример 11, фиг. 18). Это свидетельствует о том, что соединение формулы 1 можно применять для лечения мозжечковой атаксии, вызванной утратой или повреждением клеток Пуркинье мозжечка.

Соединение формулы 1 вызывает образование новых нейронов (нейрогенез), защищает нейроны или осуществляет и то, и другое и тем самым индуцирует нейральную регенерацию или нейрорегенерацию. Как показывают результаты, полученные в примере 9, соединение формулы 1 увеличивало экспрессию маркера нейронов Tuj1 (маркера нейронов в процессе нейрогенеза) в соматосенсорной зоне коры на модели болезни Альцгеймера у мышей (5xFAD), увеличивало количество клеток, имеющих форму 2 или 3 типа (появление которых специфично для нейрогенеза), в субгранулярной зоне (SGZ) зубчатой извилины (результаты окрашивания по Нисслию и окрашивания на NeuN на фиг. 16) и увеличивало количество незрелых нервных клеток, экспрессирующих DCX, и делящихся клеток, окрашенных BrdU (фиг. 16). Эти результаты подтверждают, что траметиниб индуцирует нейрогенез в коре головного мозга и зубчатой извилине гиппокампа мышей.

Кроме того, соединение формулы 1 снижало количество погибающих клеток, о чем свидетельствовали результаты TUNEL-анализа у мышей 5xFAD (пример 10, фиг. 17, увеличивало ветвление аксонов или сохраняло структуру аксонов клеток Пуркинье мозжечка (пример 11, фиг. 18) и снижало соотношение A β ₍₁₋₄₂₎/A β ₍₁₋₄₀₎ в ткани головного мозга мышей 5xFAD (пример 13, фиг. 20). Это показывает, что соединение формулы 1 может играть роль в нейрорегенерации, защищая нейроны и улучшая их состояние

или активность в условиях, при которых возникает повреждение и утрата нейронов.

Соответственно, другой аспект данного изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы 1 в качестве активного ингредиента, для предупреждения и лечения нейродегенеративного заболевания, к способу предупреждения и лечения нейродегенеративного заболевания с применением соединения формулы 1 и к соединению формулы 1 для применения в предупреждении и лечении нейродегенеративного заболевания. Вместо соединения формулы 1 в данном изобретении можно применять другие ингибиторы MEK1/2, которые вызывают дифференцировку НСК в нейроны, при этом защищая их от токсических веществ, таких как Аβ, но наиболее предпочтительно применять соединение формулы 1.

Как упоминалось выше, нейродегенеративное заболевание означает дегенерацию умственных и физических функций, вызванную постепенной утратой структуры и функции нейронов. В частности, оно включает заболевания, выбранные из деменции, болезни Альцгеймера, сосудистой деменции, сенильной деменции, лобно-височной деменции, деменции с тельцами Леви, болезни Паркинсона, множественной системной атрофии, кортикобазальной дегенерации, прогрессирующего супрануклеарного паралича, болезни Хантингтона, болезни Лу Герига/БАС, первичного латерального склероза, спинальной мышечной атрофии, прогрессирующего бульбарного паралича (ПБП), прогрессирующей мышечной атрофии (ПМА), превдобульбарного паралича, наследственной спастической параплегии (НСП), мозжечковой атаксии, болезни Крейтцфельдта-Якоба, рассеянного склероза, синдрома Гийена-Барре и т.д.

В частности, поскольку соединение формулы 1 демонстрирует существенное индуцирующее дифференцировку влияние и нейропротективный эффект, даже в более низких концентрациях, чем концентрации, в которых его применяли ранее благодаря его противоопухолевой активности, его можно безопасно вводить в более низкой дозе по сравнению с дозами, в которых его применяют для лечения рака. При применении соединения формулы 1 в качестве противоопухолевого средства его рекомендуемая доза составляет 2 мг один раз в сутки, а если из-за побочных эффектов требуется уменьшение дозы, дозу снижают до 1,5 мг один раз в сутки и затем до 1 мг один раз в сутки. В данном изобретении в экспериментах на мышах 5xFAD подтвердили, что соединение формулы 1 демонстрирует индуцирующую дифференцировку стволовых клеток активность уже в дозе 0,1 мг/кг/сутки. Если перевести эту дозу на человека весом 60 кг, она будет соответствовать 0,48 мг/сутки (Journal of Basic and Clinical Pharmacy, 7(2), 27-31, 2016).

В данном документе термин "содержащий в качестве активного ингредиента" означает включение ингредиента в количестве, достаточном для подавления нейродегенеративного заболевания, ассоциированного с данным изобретением.

Профилактическая или терапевтическая композиция по данному изобретению может быть изготовлена в виде лекарственных форм, обычно используемых в области техники, например пероральных препаратов или парентеральных препаратов, таких как инъекционные препараты.

Фармацевтическая композиция по данному изобретению может включать подходящие носители, эксципиенты и разбавители, обычно используемые в фармацевтических препаратах, и может быть изготовлена в форме составов для перорального применения, таких как порошки, гранулы, таблетки, капсулы, суспензии, эмульсии, сиропы, аэрозоли и т.д., или препаратов для местного применения, суппозиторов, пластырей и стерильных растворов для инъекций.

Носители, эксципиенты и разбавители, которые могут входить в состав композиции по данному изобретению, представляют собой лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, крахмал, гуммиарабик, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, кроскармеллозу натрия, гидроксипропилметилцеллюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenzoат, пропилгидроксibenzoат, тальк, стеарат магния, лаурилсульфат натрия, коллоидный диоксид кремния, кроскармеллозу натрия, минеральное масло и т.д.

В фармацевтических композициях применяют стандартные разбавители и эксципиенты, такие как наполнители, увеличивающие объем вещества, связывающие вещества, смачивающие вещества, разрыхлители и поверхностно-активные вещества. Твердые композиции для перорального применения включают таблетки, пилюли, порошки, гранулы, капсулы и т.д. Твердую композицию получают путем добавления к композиции по данному изобретению по меньшей мере одного эксципиента, такого как крахмал, карбонат кальция, сахароза, лактоза или желатин. Дополнительно к простым эксципиентам также можно применять смазывающие вещества, такие как стеарат магния и тальк. Жидкие композиции для перорального введения включают суспензии, жидкости для приема внутрь, эмульсии, сиропы и т.д. и дополнительно к стандартным простым разбавителям, таким как вода и жидкий парафин, они могут включать различные эксципиенты, такие как смачивающие вещества, подсластители, корригенты, консерванты и т.д. Композиции для парентерального введения включают стерильные водные растворы, неводные растворы, суспензии, эмульсии, лиофилизированные композиции, суппозитории и пластыри. В неводных растворах и суспензиях можно использовать пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и эфиры для инъекций, такие как этилолеат. В качестве основы для суппозиторов можно использовать витепсол, макрогол, твин 61, масло какао, лауриновое масло, глицерожелатин и т.д.

Композицию по данному изобретению можно вводить либо перорально, либо парентерально, и введение может быть либо системным, либо местным.

Рекомендуемая доза терапевтической композиции по данному изобретению может варьировать в зависимости от состояния пациента, массы тела пациента, тяжести заболевания, лекарственной формы, способа введения, продолжительности лечения и т.д. и может быть установлена соответствующим образом специалистом в области техники. Например, композицию по данному изобретению можно вводить ежедневно в дозе от 0,0001 до 10 г/кг, предпочтительно от 0,001 до 8 мг/кг. Дозу можно вводить один раз в сутки или делить на несколько приемов в течение суток. Предпочтительно соединение формулы 1 можно вводить в суточной дозе, варьирующей от 0,1 до 10 мг, от 0,1 до 5 мг, от 0,1 до 2 мг, от 0,1 до 1 мг, от 0,1 до 0,5 мг, от 0,25 до 2 мг, от 0,25 до 1 мг, от 0,25 до 0,5 мг, от 0,5 до 2 мг, от 0,5 до 1 мг. Например, соединение формулы 1 можно вводить в суточной дозе 0,1, 0,125, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 или 2 мг.

В другом аспекте данного изобретения раскрыт способ скрининга веществ, которые индуцируют дифференцировку нервных стволовых клеток в нейроны, при этом защищая НСК и нейроны в условиях имитирующих нейродегенеративное заболевание, такое как болезнь Альцгеймера. В способе скрининга применяют вещества, вызывающие повреждение нейронов, такие как бета-амилоид, МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин), ротенон, оксидофамин, глутамат, LPS (липолисахарид) и S100B (S100 кальций-связывающий белок В) и нервные стволовые клетки, полученные у мыши, способ включает стадии:

1) обработка нервных стволовых клеток, выделенных у взрослой мыши, веществами, вызывающими повреждение нейронов, такими как бета-амилоид, особенно в его олигомерной форме, МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин), ротенон, оксидофамин, глутамат, LPS (липолисахарид) и S100B (S100 кальций-связывающий белок В);

2) добавление исследуемого вещества к нервным стволовым клеткам, обработанным указанными выше веществами, вызывающими повреждение нейронов, и

3) изучение дифференцировки или гибели нервных стволовых клеток путем анализа морфологии.

В способе скрининга предпочтительно использовать нервные стволовые клетки мышинного происхождения. Использование нервных стволовых клеток, полученных от таких животных, как мышь, имеет преимущества по сравнению с человеческими нервными стволовыми клетками, поскольку способы их культивирования более простые, и вопросы этического характера вызывают меньше дискуссий. Культивирование человеческих нервных стволовых клеток требует более частой замены культуральной среды и дорогостоящих факторов роста, тогда как культуры мышинных нервных стволовых клеток этого не требуют. При культивировании человеческих нервных стволовых клеток процессы размножения и дифференцировки клеток занимают по 7 суток, тогда как при культивировании мышинных нервных стволовых клеток размножение занимает 3-4 дня, а для дифференцировки требуется всего лишь короткий период времени, что позволяет ускорить скрининг.

Нервные стволовые клетки можно выделять из мозга взрослых мышей и культивировать для применения. Взрослые нервные стволовые клетки мыши выделяют у мышей в возрасте от 8 до 12 недель, например из субвентрикулярной зоны мышей в возрасте 8 недель. Стандартным является выделение нервных стволовых клеток мыши из лобных долей мышинных эмбрионов на 12-16 сутки гестации. По сравнению со взрослыми нервными стволовыми клетками мыши эмбриональные нервные стволовые клетки мыши обладают большей стволовостью, что должно делать их более стойкими к токсическим условиям. Однако авторы данного изобретения заметили, что, когда эмбриональные нервные стволовые клетки мыши подвергали воздействию бета-амилоида, независимо от добавления исследуемого вещества, все клетки погибали и наблюдать за дифференцировкой нейронов было невозможно (приведенный для сравнения пример 1, фиг. 3). Напротив, взрослые нервные стволовые клетки, выделенные из головного мозга взрослых мышей, демонстрировали большую устойчивость к бета-амилоиду и поэтому считались более подходящими для скрининга веществ, индуцирующих дифференцировку в условиях, имитирующих БА. Таким образом, в способах по изобретению применяли нервные стволовые клетки взрослых мышей.

Нервные стволовые клетки, выделенные у взрослой мыши, можно вносить в культуральную среду в недифференцированном состоянии и культивировать при 37°C. Культуральная среда для нервных стволовых клеток может быть любой бессывороточной средой с добавлением факторов роста, но предпочтительно представляет собой среду IPM с добавлением факторов роста при первоначальном выделении и культивировании нервных стволовых клеток взрослой мыши, а затем среду N2 при выделении и культивировании одиночных клеток после образования нейросфер. Среда IPM представляет собой нейробазальную среду, которая может включать 1-4% добавки B27, 0,5-2% глутамакс, 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Среда N2 представляет собой смесь среды Игла в модификации Дульбекко и питательной среды F12 (DMEM/F12) (1:1), которая может дополнительно содержать один или более чем один компонент, выбранный из группы, состоящей из 90-110 мкМ путресцина, 20-40 нМ селенита, 10-30 нМ прогестерона, 1,0-2,0 мг/мл d-(+) глюкозы, 20-30 мкг/мл инсулина, 0,05-0,2 мг/мл апо-трансферрина, 0,3-0,6 мМ глутамакса, 50-150 МЕ/мл пенициллина и 50-150 мкг/мл стрептомицина. В

среду N2 можно добавлять факторы роста, выбранные из группы, состоящей из 10-30 нг/мл bFGF, 10-30 нг/мл EGF и их смесей. Факторы роста важны для поддержания нервных стволовых клеток в недифференцированном состоянии. Для точного определения индуцирующей дифференцировку нервных стволовых клеток активности исследуемого вещества следует добавлять исследуемое вещество к нервным стволовым клеткам, которые поддерживаются в недифференцированном состоянии благодаря добавлению факторов роста, подавляющих дифференцировку.

В способе скрининга по данному изобретению можно применять имеющийся в продаже бета-амилоид, например, предоставляемый компанией Gibco (Waltham, MA). Предпочтительно использовать бета-амилоид человеческого происхождения. Наиболее распространенными формами бета-амиоида являются $A\beta_{(1-40)}$, состоящий из 40 аминокислот, и $A\beta_{(1-42)}$, состоящий из 42 аминокислот. Из этих двух форм $A\beta_{(1-42)}$ имеет более сильную тенденцию образовывать агрегаты, особенно высоко токсичные тримеры и тетрамеры, и поэтому считается теснее связанным с патологическими изменениями при болезни Альцгеймера (Dahlgren et al. (2002), Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid- β Peptides Differentially Affect Neuronal Viability, J. Biol. Chem. 277(35):32046-32053; K. Murakami (2014), Conformation-Specific Antibodies to Target Amyloid- β Oligomers and Their Application to Immunotherapy for Alzheimer's Disease, Biosci. Biotechnol. Biochem. 78(8): 1293-1305). Таким образом, в способе скрининга по данному изобретению предпочтительно применять $A\beta_{(1-42)}$, в частности олигомерную форму $A\beta_{(1-42)}$.

В способе скрининга по данному изобретению олигомерная форма бета-амиоида должна быть представлена олигомерами менее чем из 24, предпочтительно из 12 или менее мономеров бета-амиоида, более предпочтительно смесью, в основном состоящей из тетрамеров и тримеров бета-амиоида, по существу при отсутствии протофибрилл или фибрилл бета-амиоида. Олигомерная форма $A\beta_{(1-42)}$ в данном изобретении может быть получена способом, описанным в документе [Dahlgren et al. (2002), Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid- β Peptides Differentially Affect Neuronal Viability, J. Biol. Chem. 277(35):32046-32053]. В частности, $A\beta_{(1-42)}$ растворяют в гексафторизопропанол (HFIP), высушивают в вакууме и затем высушенный пептид ресуспендируют в DMSO в концентрации 5 мМ. Добавляют DMEM/F12 (без фенолового красного) и доводят концентрацию пептида до 100 мкМ, после чего инкубируют его при 4°C в течение 24 ч.

В способе скрининга по данному изобретению MPTP представляет собой пролекарство для нейротоксина MPP⁺ (1-метил-4-фенилпиридина). MPP⁺ вызывает перманентные симптомы болезни Паркинсона (БП) за счет деструкции дофаминергических нейронов в черном веществе головного мозга.

Известно, что ротенон, вещество, вызывающее дегенерацию дофаминергических нейронов в черном веществе за счет ингибирования в клетках активности митохондриального комплекса 1, вызывает патологические признаки БП.

Оксидафамин, также обозначаемый 6-гидроксидофамином (6-OHDA) или 2,4,5-тригидрокси-фенэтиламином, представляет собой нейротоксичное соединение, которые авторы изобретения использовали для избирательного разрушения дофаминергических и норадренергических нейронов в головном мозге. Считается, что оксидафамин проникает в нейрон через транспортеры, осуществляющие обратный захват дофамина и норадреналина. Для избирательного повреждения дофаминергических нейронов также применяют селективные ингибиторы обратного захвата норадреналина, такие как дезипрамин.

Глутамат действует как основной возбуждающий нейромедиатор в центральной нервной системе (ЦНС), но известно, что в высоких концентрациях он повреждает нейроны и вызывает клеточную гибель. Глутаматная эксайтотоксичность ассоциирована не только с острым повреждением ЦНС, таким как ишемическое или травматическое повреждение головного мозга, но также и с хроническим нейродегенеративным заболеванием, таким как БАС, рассеянный склероз, БП и т.д.

LPS (липополисахарид) является компонентом клеточной поверхности грамотрицательных бактерий, и может применяться, например, LPS, выделенный из *Salmonella typhimurium* (Sigma, St. Louis, MO). LPS вызывает у животных выраженный иммунный ответ, а также вызывает воспалительный ответ за счет активации микроглии в нервной системе. Секреция провоспалительных веществ вследствие сверхактивации микроглии может нарушать гомеостаз в иммунной системе и вызывать связанное с аутоиммунным заболеванием нейродегенеративное заболевание ЦНС, такое как рассеянный склероз, БА и БП.

S100B представляет собой кальций-связывающий белок, экспрессируемый и секретируемый астроцитами. Он обладает нейротрофической активностью при развитии и поддержании нейронов и влияет на нормальные когнитивные функции головного мозга. Однако аномально высокие уровни S100B будут активировать глию и вызывать нейровоспалительные ответы, которые повреждают нейроны.

В способе скрининга по данному изобретению перед добавлением исследуемого вещества нервные стволовые клетки подвергают воздействию веществ, вызывающих повреждение нейронов, таких как бета-амилоид. В ранее опубликованных экспериментах, чтобы зарегистрировать нейропротективное влияние исследуемого вещества, нервные стволовые клетки вначале подвергали воздействию исследуемых веществ в течение некоторого времени, а затем добавляли бета-амилоид (J. Korean Neural. Assoc. 21(2):174-182, 2003). Такой способ не отражает реальной ситуации, имеющей место при лечении, когда лекарственное средство вводят пациентам с болезнью Альцгеймера, у которых бета-амилоид уже при-

сутствует в головном мозге. Для более точной имитации условий в головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера на момент начала лечения, нервные стволовые клетки вначале следует подвергать воздействию бета-амилоида, а после этого добавлять исследуемое вещество, как делали в данном изобретении.

Исследуемое вещество добавляют к нервным стволовым клеткам после воздействия на них бета-амилоида и затем культивируют, ежедневно добавляя факторы роста. После воздействия на нервные стволовые клетки исследуемого вещества можно установить, обладает ли исследуемое вещество индуцирующей дифференцировку нервных стволовых клеток активностью, анализируя морфологию самое меньшее через 12 ч и самое большее через 48-72 ч после воздействия.

При анализе морфологии используют фазово-контрастный микроскоп для наблюдения и определения морфологии клетки. Как можно заметить в верхней части фиг. 2, дифференцированные (Д) нервные стволовые клетки четко отличаются от недифференцированных (НД). У недифференцированных клеток клеточное тело крупное, форма отростков, таких как аксоны и дендриты, трудно различима, а общее количество клеток является высоким, поскольку клетки постоянно делятся. У дифференцированных клеток клеточное тело небольшое и округлое, тогда как отростки тонкие и вытянутые.

Нервные стволовые клетки, использованные в способе скрининга по данному изобретению, являются относительно хрупкими по сравнению с нормальными или опухолевыми клеточными линиями и чувствительны к токсическому воздействию исследуемого вещества. Если исследуемое вещество демонстрирует клеточную токсичность, в микроскоп можно увидеть погибшие клетки, что позволяет обнаружить клеточную токсичность одновременно с определением индуцирующей дифференцировку активности.

Согласно способу скрининга по данному изобретению можно проводить скрининг веществ, обладающих индуцирующей дифференцировку нервных стволовых клеток активностью, в условиях, имитирующих условия в головном мозге пациента с болезнью Альцгеймера, в частности в условиях, где присутствуют олигомерные формы бета-амилоида, которые, как известно, тесно коррелируют с утратой нейронов. Это делает способ скрининга по данному изобретению подходящим для скрининга веществ-кандидатов, которые можно применять для основного лечения болезни Альцгеймера. Кроме того, способ скрининга удобен тем, что он позволяет определить по клеточной морфологии, дифференцировались ли клетки, не требуя проведения дополнительных экспериментов. Кроме того, когда нервным стволовым клеткам позволяют дифференцироваться естественным образом в среде без факторов роста, это занимает по меньшей мере 48 ч, после чего наблюдается изменение клеточной морфологии. В случае воздействия на клетки веществ, которые обладают высокой индуцирующей дифференцировку активностью, их эффект может наблюдаться уже через 12 ч после воздействия и самое позднее, через 48-72 ч после воздействия, несмотря на присутствие в среде культивирования клеток факторов роста для подавления дифференцировки. Таким образом, способ скрининга является быстрым и эффективным, поскольку токсичность исследуемого вещества можно обнаружить одновременно с определением индуцирующего дифференцировку влияния.

Кроме того, данное изобретение относится к набору, который можно применять для осуществления указанного выше способа скрининга. Данный набор может включать нервные стволовые клетки, полученные от взрослой мыши, вещества, вызывающие повреждение нейронов, такие как бета-амилоид, МРТР, ротенон, оксидофамин, глутамат, LPS или S100B, факторы роста, культуральную среду, добавки для клеточных культур и планшеты для культивирования клеток (покрытые или с отдельными растворами для иммобилизации на поверхности планшетов).

Далее данное изобретение будет описано более подробно с отсылкой к следующим примерам. При этом эти примеры не следует считать ограничивающими объем изобретения и его изложение. Следует понимать, что на основании сведений, изложенных в данном изобретении, включая примеры, специалист в области техники может осуществить другие воплощения данного изобретения, практические результаты которых не представлены в явном виде. Такие модификации и варианты входят в объем прилагающейся формулы изобретения.

Примеры

Пример 1. Способность соединения формулы 1 индуцировать дифференцировку НСК в эмбриональных нервных стволовых клетках мыши.

Стадия 1. Культивирование эмбриональных нервных стволовых клеток мыши.

Стадия 1. Культивирование эмбриональных нервных стволовых клеток мыши в недифференцированном состоянии.

Нервные стволовые клетки выделяли из головного мозга 14,5-суточного мышинного эмбриона обрабатывали 10 нг/мл человеческого основного фактора роста фибробластов (bFGF) (Peprotech, Princeton, NJ, кат. номер 100-18B) и 20 нг/мл человеческого эпидермального фактора роста (EGF) (Peprotech, кат. номер AF-100-15) в культуральной среде N2 и культивировали в суспензии в 25 см² флаконах (Nunc, Pittsburgh, PA) в течение 4 суток. Образование нейросфер наблюдали через 2 суток.

Для выделения одиночных клеток готовили накануне 6-луночные планшеты, обрабатывая лунки раствором поли-L-орнитина (Sigma, St. Louis, MO, кат. номер P2533) в концентрации 15 мкг/мл и инку-

бируя в течение ночи при 37°C для иммобилизации. В сутки, когда проводили выделение одиночных клеток, раствор поли-L-орнитина удаляли, планшеты промывали три раза фосфатно-солевым буфером PBS и добавляли раствор фибронектина с концентрацией 10 мкг/мл (Gibco, Waltham, MA, кат. номер 33016015) и инкубировали при 37°C в течение 2 ч для иммобилизации. После завершения подготовки планшетов нейросферы обрабатывали TryPLE (Gibco кат. номер 12604013), разделяли на одиночные клетки, подсчитывали и разводили до концентрации $4 \sim 5 \times 10^5$ клеток на 200-300 мкл раствора для культивирования (культуральная среда N2 с добавлением 10 нг/мл bFGF и 20 нг/мл EGF). Непосредственно перед посевом иммобилизирующий раствор отсасывали и, не давая планшету высохнуть, производили посев одиночных клеток, равномерно распределяя их в лунках планшета. Клеткам давали прикрепиться к поверхности планшета приблизительно в течение 1 мин и, после того как клетки достаточно прикреплялись, к клеткам добавляли еще 1,5 мл культуральной среды (культуральная среда N2 с добавлением 10 нг/мл bFGF и 20 нг/мл EGF) и культивировали в инкубаторе с температурой 37°C.

Состав культуральной среды N2 был следующим.

Среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM)/F12 (1:1) (Gibco, кат. номер 11320033), 100 мкМ путресцин (Sigma, кат. номер 51799), 30 нМ селенит (Sigma кат. номер S5261), 20 нМ прогестерон (Sigma кат. номер P0130), 1,55 мг/мл d-(+)-глюкоза (Sigma, кат. номер G8270), 25 мкг/мл инсулин (Gibco, кат. номер 12585014), 0,1 мг/мл апо-трансферрин (Sigma кат. номер T1147), 0,5 мМ глутамакс (Gibco, кат. номер A1286001), 100 МЕ/мл пенициллин (Gibco, кат. номер 15140122), 100 мкг/мл стрептомицин (Gibco, кат. номер 15140122).

Стадия 1В. Культивирование нервных стволовых клеток без ингибирования дифференцировки.

Эмбриональные нервные стволовые клетки мыши культивировали, как описано для стадии 1А, за исключением добавления bFGF и EGF при разделении нервных стволовых клеток на одиночные клетки и посева.

Стадия 2. Добавление исследуемого вещества.

Соединение формулы 1 (далее обозначаемое траметиниб) (Medchem express, Monmouth Junction, NJ, кат. номер в различных концентрациях HY-10999A) и AS703026 (пимасертиб) (Selleckchem, Houston, TX, кат. номер S1475) добавляли ежедневно к эмбриональным нервным клеткам мыши, культивируемым, как описано на стадии 1А, и культивировали в течение 4 суток.

Стадия 3. Анализ морфологии.

Морфологию клеток изучали под фазово-контрастным микроскопом через четыре дня культивирования, результаты приведены на фиг. 1.

На фиг. 1 аббревиатура НД (недифференцированные) обозначает недифференцированные эмбриональные НСК мыши, полученные на стадии 1А, где клетки не подвергали воздействию какого-либо исследуемого вещества. Д (дифференцированные) обозначает дифференцированные эмбриональные НСК мыши, полученные на стадии 1В, где клетки не подвергали воздействию какого-либо исследуемого вещества. Недифференцированные НСК в группе НД имеют крупное тело, форма отростков трудно различима, а общее количество клеток выше по сравнению с группой Д вследствие непрерывного деления клеток. Дифференцированные клетки группы Д имеют более мелкие округлые тела с длинными тонкими отростками, что позволяет их легко отличить от клеток группы НД.

Как показано на фиг. 1, соединение формулы 1 (траметиниб) в низких концентрациях 10, 25 и 100 нМ (0,1 мкМ) легко индуцировало дифференцировку НСК в нейроны. Концентрация AS703026, необходимая для начала нейрональной дифференцировки, составляла 1,0 мкМ и в 100 раз превышала такую траметиниба.

Вместе взятые, эти результаты указывают, что соединение формулы 1 (траметиниб) индуцирует дифференцировку НСК в нейроны и данный эффект наблюдается уже при очень низких концентрациях (10 нМ и выше). Это позволяет предположить, что соединение формулы 1 можно применять в композициях и способах дифференцировки для индукции дифференцировки НСК в нейроны и для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Пример 2. Способность соединения формулы 1 индуцировать дифференцировку НСК у взрослых НСК мышей (способ скрининга веществ, способных индуцировать дифференцировку НСК в нейроны при одновременной их защите).

Стадия 1. Культивирование взрослых НСК мышей.

Стадия 1А. Культивирование взрослых НСК мышей в недифференцированном состоянии.

НСК выделяли из субвентрикулярной области головного мозга мышей в возрасте 8 недель, подвергали воздействию 20 нг/мл человеческого основного фактора роста фибробластов (bFGF) и 20 нг/мл человеческого эпидермального фактора роста (EGF) в среде IPM и культивировали в суспензии в 24-луночных планшетах в течение 7 суток. Образование нейросфер наблюдали через 4 суток.

За 2 суток до выделения одиночных клеток готовили 6-луночные планшеты, обрабатывая лунки раствором поли-L-орнитина в концентрации 10 мкг/мл и инкубируя в течение ночи при комнатной температуре для иммобилизации. На следующие сутки раствор поли-L-орнитина удаляли и промывали планшеты 3 раза стерильной трехкратно дистиллированной водой. Затем добавляли раствор ламинина с концентрацией 0,5 мг/мл (Roche, Upper Bavaria, Germany, кат. номер 11243217001) и инкубировали при

37°C в течение ночи для иммобилизации. После завершения подготовки планшетов нейросферы обрабатывали 0,025% раствором Трипсина-ЭДТА, разделяли на одиночные клетки, подсчитывали и разводили до концентрации $4-5 \times 10^5$ клеток на 200–300 мкл раствора для культивирования. Раствор для культивирования представлял собой культуральную среду N2 (с добавлением 20 нг/мл bFGF и 20 нг/мл EGF). Непосредственно перед посевом иммобилизующий раствор отсасывали и, не давая планшету высохнуть, производили посев одиночных клеток, равномерно распределяя их в лунках планшета. Клеткам давали прикрепиться к планшету приблизительно в течение 1 мин и, после того как клетки прикреплялись, к клеткам добавляли еще 1,5 мл культуральной среды (культуральная среда N2 с добавлением 20 нг/мл bFGF и 20 нг/мл EGF) и культивировали в инкубаторе с температурой 37°C в течение 24 ч.

Состав IPM и культуральной среды N2 был следующим.

Среда IPM: Нейробазальная среда (Gibco, кат. номер 21103049), добавка B27 (Gibco, кат. номер A3582801), глутамакс, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина.

Среда N2: Среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM)/F12 (1:1), 100 мкМ путресцина, 30 нМ селенита, 20 нМ прогестерона, 1,55 мг/мл d-(+)-глюкозы, 25 мкг/мл инсулина, 0,1 мг/мл апо-трансферрина, 0,5 мМ глутамакс, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина.

Стадия 1В. Культивирование нервных стволовых клеток без ингибирования дифференцировки.

Взрослые нервные стволовые клетки мыши культивировали, как описано для стадии 1А, за исключением добавления bFGF и EGF при разделении нервных стволовых клеток на одиночные клетки и посева.

Стадия 2. Внесение бета-амилоида.

После замены среды в культуре НСК на стадии 1 в каждую лунку вносили 10 мкМ бета-амилоида (A β) (Gibco, кат. номер 03112). Лунки, в которые не вносили бета-амилоид, использовали в качестве отрицательных контролей.

Человеческий A β ₍₁₋₄₂₎ приобретали в компании Gibco's (Waltham, MA) для применения в качестве бета-амилоида (A β) и для образования олигомеров использовали следующий способ. Сначала бета-амилоид растворяли в 100% HFIP (1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанол) (Sigma, кат. номер 105228) до концентрации 1 мг/мл и перемешивали на вортексе при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем его сушили в течение 10 мин с использованием speed Vac, после чего добавляли DMSO (Sigma, кат. номер D2650) для доведения концентрации до 5 мМ и затем слегка перемешивали на вортексе при комнатной температуре в течение 10 мин. DMEM/F12 (без фенолового красного) (Gibco, кат. номер 21041025) добавляли до конечной концентрации 100 мкМ. Раствор инкубировали при 4°C в течение 24 ч и затем добавляли к культивируемым клеткам.

Стадия 3. Добавление исследуемого вещества.

Немедленно после внесения бета-амилоида к культурам клеток добавляли 10, 100 нМ траметиниба, 5, 10 мкМ мемантина (Sigma, кат. номер M9292) и 10 мкМ AS703026 (пимасертиба). НСК культивировали в течение 4 суток с ежесуточным добавлением EGF, bFGF, бета-амилоида и исследуемых веществ.

Стадия 4. Анализ морфологии.

Через четыре дня культивирования изучали морфологию клеток при помощи фазово-контрастного микроскопа, результаты приведены на фиг. 2.

На фиг. 2 в верхнем ряду показаны взрослые НСК мыши, которые не подвергали воздействию бета-амилоида, а в нижнем ряду - НСК, которые подвергали воздействию бета-амилоида в концентрации 10 мкМ. НД (недифференцированные) обозначает недифференцированные взрослые НСК мыши, полученные на стадии 1А, где клетки не подвергали воздействию какого-либо исследуемого вещества. Д (дифференцированные) обозначает дифференцированные взрослые НСК мыши, полученные на стадии 1В, где клетки не подвергали воздействию какого-либо исследуемого вещества. Недифференцированные НСК в группе НД верхнего ряда, не подвергавшиеся воздействию A β , имеют крупное тело, форма отростков трудно различима, а общее количество клеток выше по сравнению с группой Д вследствие непрерывного деления клеток. Дифференцированные клетки группы Д имеют более мелкие округлые тела с удлинёнными тонкими отростками, что позволяет их легко отличить от клеток группы НД.

Траметиниб в низких концентрациях 10 и 100 нМ легко индуцировал дифференцировку НСК в нейроны, независимо от воздействия бета-амилоида. Для нейрональной дифференцировки AS703026 требовался в гораздо более высокой концентрации по сравнению с траметинибом, 10 мкМ, независимо от воздействия бета-амилоида. Оба вещества в указанных концентрациях не оказывали токсического влияния на клетки, что подтверждало, что они являются подходящими кандидатами при болезни Альцгеймера (БА).

Кроме того, в группе, где использовали мемантин, лекарство, используемое в настоящее время для облегчения симптомов БА, дифференцировку НСК в нейроны не наблюдали, скорее наоборот, наблюдали гибель нервных стволовых клеток. Мемантин представляет собой антагонист рецепторов NMDA, задействованных в передаче сигнала, запускаемого глутаматом, и способствует нормализации передачи сигнала нейронами у пациентов с БА. Такой механизм действия не обеспечивает основного лечения БА за счет восстановления поврежденных нейронов. Тот факт, что мемантин не индуцирует дифференци-

ровку НСК, а скорее вызывает гибель клеток, подтверждает, что его невозможно применять для основного лечения деменции.

Сравнительный пример 1. Влияние бета-амилоида на эмбриональные нервные стволовые клетки мышц.

Стадия 1. Культивирование эмбриональных НСК мышц.

Клетки культивировали, как описано в примере 1, на стадиях 1А и 1В.

Стадия 2. Внесение бета-амилоида.

Эмбриональные НСК мышц культивировали, как описано выше на стадии 1, подвергали воздействию бета-амилоида так же, как описано в примере 2 на стадии 2.

Стадия 3. Добавление исследуемого вещества.

Непосредственно после внесения бета-амилоида в культуру клеток добавляли 100 нМ траметиниба, 10 мкМ мемантина и 10 мкМ AS703026 (пимасертиба). НСК культивировали в течение 4 суток с ежедневным добавлением EGF, bFGF, бета-амилоида и исследуемых веществ.

Стадия 4. Анализ морфологии.

Через 4 суток культивирования изучали морфологию клеток при помощи фазово-контрастного микроскопа, результаты приведены на фиг. 3.

На фиг. 3 в верхнем ряду показаны эмбриональные НСК мышц, не обработанные бета-амилоидом, а в нижнем ряду - НСК, обработанные бета-амилоидом. НД (недифференцированные) обозначает недифференцированные эмбриональные НСК мышц (не обработанные каким-либо исследуемым веществом), а Д (дифференцированные) обозначает дифференцированные эмбриональные НСК мышц (не обработанные каким-либо исследуемым веществом). В группе, где вносили Аβ, все клетки погибли, независимо от внесения исследуемого вещества, и, следовательно, оценить влияние исследуемых веществ было невозможно.

Пример 3. Иммуноцитохимический анализ.

Для подтверждения дифференцировки НСК в нейроны в примере 1 выполняли иммуноцитохимическое окрашивание с использованием маркеров Tuj1 и DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндола). Tuj1 (нейрон-специфический бета-тубулин класса III) представляет собой нейрон-специфический маркерный белок, который был конъюгирован с родамином и имеет красную флуоресценцию, а DAPI представляет собой флуоресцентный краситель, который связывается с ДНК клеток и окрашивает ядра клеток в синий цвет.

Эмбриональные НСК, которые культивировали, как описано в примере 1, высевали в 24-луночные планшеты с покровными стеклами и вносили траметиниб и AS703026 в соответствующих концентрациях и инкубировали в течение 4 суток. Удаляли среду и отмывали клетки один раз при помощи PBS. После фиксации 10% формальдегидом (Sigma кат. номер HT501128) в течение 10 мин при комнатной температуре их вновь промывали PBS. Пермеабиллизацию осуществляли при помощи 0,2% раствора Triton X-100 (Sigma, кат. номер 93443) при комнатной температуре в течение 15 мин, промывали PBS и инкубировали с 10% BCA (Sigma, кат. номер A2153) + 1% нормальной козьей сыворотки (Vector lab, Burlingame, CA, кат. номер S1000) при комнатной температуре в течение 1 ч. Антитело к Tuj 1 (Cell signaling, Danvers, MA, кат. номер 4466) разводили в 1% BCA + 1% нормальной козьей сыворотки в соотношении 1:200 и добавляли к клеткам и инкубировали в течение ночи при 4°C. Раствор удаляли, промывали PBS и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со вторичным антителом (конъюгированным с родамином), разведенным в 1% BCA + 1% нормальной козьей сыворотки в соотношении 1:200. Затем клетки промывали PBS, инкубировали с 5 мкг/мл DAPI (Sigma, кат. номер D9542) в течение 5 мин, вновь промывали PBS и помещали на предметное стекло для анализа при помощи флуоресцентного микроскопа. Результаты показаны на фиг. 4. Как следует из фиг. 4, в группе, где вносили 1,0 мкМ AS703026, видны изображения тонких удлинённых отростков, окрашенных в красный цвет, что указывает, что при такой концентрации происходит нейрональная дифференцировка, хотя и в пограничной степени. При более низких концентрациях (0,1 мкМ) дифференцировки не наблюдалось.

Напротив, в группе, где вносили траметиниб, даже при очень низкой концентрации 10 нМ наблюдали дифференцировку, дифференцирующая активность увеличивалась вместе с концентрацией. Что касается морфологии клеток, возрастающее количество нейронов с удлинёнными отростками, наблюдали в случае воздействия на клетки траметиниба в концентрации 10 нМ.

Пример 4. Анализ относительных уровней экспрессии мРНК.

Пример 4-1. Анализ экспрессии мРНК Tuj1 и TH, индуцированной соединением формулы 1 в эмбриональных НСК мышц.

Для определения, в какой тип клеток дифференцировались НСК в примере 1, анализировали экспрессию мРНК нейрон-специфического маркера Tuj1 и маркера дофаминергических нейронов TH (тирозин-гидроксилазы) при помощи количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (qRT-PCR).

Стадия 1. Выделение РНК.

После завершения анализа морфологии в примере 1 удаляли среду у клеток каждой группы воздействия и добавляли в планшет TRIzol® (Invitrogen, Waltham, MA) и инкубировали в течение 5 мин при

комнатной температуре для лизиса клеток. Лизаты клеток вместе с реагентом TRIzol переносили в пробирку, тщательно перемешивали с хлороформом (Sigma, кат. номер 366919), центрифугировали и переносили надосадочную жидкость в новую пробирку. Добавляли изопропанол (Ducsan, GyunggiDo, Korea, кат. номер 67-63-0) и перемешивали для выделения РНК, затем снова центрифугировали для удаления надосадочной жидкости и получения осадка. Осадок РНК ресуспендировали в 75% этаноле (Ducsan, кат. номер 64-17-15), центрифугировали и удаляли надосадочную жидкость. Затем ресуспендировали осадок в стерильной трижды дистиллированной воде для получения мРНК, инкубировали в течение 10 мин при 55°C и хранили при -80°C.

Стадия 2. Обратная транскрипция.

После измерения концентрации РНК доводили количество РНК в каждой группе до 2 мкг и проводили эксперимент с использованием набора для обратной транскрипции (Invitrogen, кат. номер 28025013). К РНК добавляли стерильную трижды дистиллированную воду, 1 пМ олигонуклеотида дезокситимидина (dT) и 1 мМ dNTP и инкубировали в течение 5 мин при 65°C. После этого добавляли 5X буфер для синтеза первой цепи, 10 мМ DTT и обратную транскриптазу М-MLV и инкубировали при 42°C в течение 1 ч, затем при 72°C в течение 15 мин и при 4°C в течение 30 мин. Синтезированную ДНК хранили при -20°C.

Стадия 3. qRT-PCR.

ПЦР проводили путем смешивания 1 мкл кДНК (синтезированной, как описано выше), 1 пМ праймеров, трижды дистиллированной воды и реагента Rotor-Gene SYBR® Green (Qiagen, Venlo, Netherlands, кат. номер 204074) и использовали прибор Rotor-Gene Q (Qiagen). Праймеры (Bioneer, Daejeon, Korea), использованные в эксперименте, приведены в табл. 2.

Таблица 2

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
GAPDH	5'- CGTGCCGCCTGGAGAAACC-3'	5'- TGGAAGAGTGGGAGTTGCTGTTG-3'
Tuj1	5'- GGTCTGGCGCCTTTGGA-3'	5'- CACCACTCTGACCAAAGATAAAGTTG-3'
TH	5'-AGGTATACGCCACGCTGAAG-3'	5'-CTCGGGTGAGTGCATAGGTG-3'

Результаты показаны на фиг. 5. На фиг. 5а, 5б приведены средние значения относительных уровней экспрессии мРНК в каждой группе после 3 раундов экспериментов. Термин "относительный уровень экспрессии мРНК" означает, что для нормализации общего уровня РНК в каждой группе уровень экспрессии мРНК каждого маркера дифференцировки делят на уровень экспрессии GAPDH, уровень экспрессии которого в клетках достаточно постоянен, а затем значения для каждого исследуемого вещества сравнивают с таковыми для контролей (недифференцированные НСК) в каждой группе.

Как показано на фиг. 5, под воздействием траметиниба в концентрациях 10, 25 и 100 нМ наблюдали высокие уровни экспрессии нейрон-специфического маркера Tuj 1 и маркера дофаминергических нейронов TH. Данные результаты указывают, что траметиниб эффективно индуцирует дифференцировку НСК в нейроны, в частности в дофаминергические нейроны. Кроме того, траметиниб оказывал индуцирующее дифференцировку влияние в очень низкой концентрации 1 нМ. Это позволяет предположить, что композицию по данному изобретению можно применять для лечения нейродегенеративного заболевания.

AS703026 в концентрации 10 мкМ (10000 нМ) приводил к результатам, сопоставимым с таковыми траметиниба в концентрации 25 нМ, что указывает, что траметиниб индуцирует дифференцировку НСК в нейроны в концентрации в 400 раз (или более) ниже по сравнению с AS703026.

Пример 4-2. Анализ экспрессии мРНК TH, ChAT, Isl1 и Gad1, индуцированной соединением формулы 1, в эмбриональных и взрослых НСК мыши.

Чтобы установить, индуцирует ли соединение формулы 1 дифференцировку НСК в клетки иных типов, нежели дофаминергические нейроны, определяли экспрессию мРНК маркера холинергических нейронов ChAT (холин-ацетилтрансферазы), маркера двигательных нейронов Isl1 (Islet1) и маркера ГАМК-ергических нейронов Gad1 (глутаматдекарбоксилазы 1) при помощи qRT-PCR.

Нервные стволовые клетки культивировали, как описано в примере 1 и через 2 дня после добавления 1, 10, 25 и 100 нМ траметиниба выделяли РНК и исследовали маркеры дифференцировки. Экспрессию мРНК определяли тем же способом, как и в примере 4-1, использованные праймеры приведены в табл. 3.

Результаты показаны на фиг. 6.

Таблица 3

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
GAPDH	5'- CGTGCCGCCTGGAGAAACC-3'	5'- TGGAAGAGTGGGAGTTGCTGTTG-3'
Tuj1	5'- GGTCTGGCGCCTTTGGA-3'	5'- CACCACTCTGACCAAAGATAAAGTTG-3'
TH	5'-AGGTATACGCCACGCTGAAG-3'	5'-CTCGGGTGAGTGCATAGGTG-3'
ChAT	5'-CCTGCCAGTCAACTCTAGCC-3'	5'-TACAGAGAGGCTGCCCTGAG-3'
Gad1	5'-TCATGTTATGGAAATCTTGCTTCAG-3'	5'-CGAGTCACAGAGATTGGTCATATACTACT-3'
Isl1	5'-CGGAGAGACATGATGGTGGT-3'	5'-GGCTGATCTATGTCGCTTTGC-3'

Как показано на фиг. 6, экспрессия всех исследованных маркеров нейронов, маркера дофаминерги-

ческих нейронов TH, маркера холинергических нейронов ChAT, маркера двигательных нейронов Isl1 и маркера ГАМК-ергических нейронов Gad1, увеличивалась с увеличением концентрации добавленного траметиниба. Это позволяет предположить, что траметиниб можно применять для лечения нейродегенеративного заболевания, вызванного повреждением нейронов различных типов.

Чтобы установить, имеет ли место этот эффект во взрослых НСК мыши, 10 нМ траметиниба и 10 мкМ AS703026 отдельно добавляли на 2 дня к взрослым НСК мыши, которые культивировали, как описано в примере 2, на стадии 1А, и анализировали уровни экспрессии мРНК маркера нейронов Tuj1, маркера дофаминергических нейронов TH и маркера холинергических нейронов ChAT методом qRT-PCR.

Результаты показаны на фиг. 7. Траметиниб повышал экспрессию Tuj1, TH и ChAT во взрослых НСК мыши, как и в эмбриональных НСК. Следует отметить, что траметиниб вызывал более выраженную дифференцировку НСК в нейроны при концентрациях в 1000 раз ниже, чем AS703026.

Пример 5. Исследование способности индуцировать дифференцировку НСК посредством регуляции экспрессии MEK1 и MEK2 в нервных стволовых клетках.

Пример 5-1. Ингибирование экспрессии MEK1 и MEK2 в эмбриональных нервных стволовых клетках мыши.

Исследовали способность индуцировать дифференцировку НСК в нейроны в зависимости от уровня экспрессии MEK1 и MEK2. Для получения клеток, где экспрессия MEK1 и MEK2 регулируется, использовали следующий способ.

Сначала для получения НСК, в которых экспрессия MEK1 и MEK2 подавлена, использовали соответствующие shRNAs, подавляющие экспрессию MEK1 и MEK2. В частности, эмбриональные НСК мыши культивировали, как описано в примере 1, на стадии 1А, высевали в планшеты и культивировали в течение 24 ч. Затем клетки трансфицировали 1 мкг/мл shRNA-MEK1 (CCGGGCCATCCAACATTC-TAGTGAACGAGTTCAGTACAGTGTGGATG GCTTTT) или shRNA-MEK2 (CCGGCCTCCGAGAGAAGCACCAGATCTCGAGATCTGGTGCTTCTCTCGGA GGTTTTTG) с использованием липофектамина (Invitrogen, кат. номер 18324010) для получения НСК, в которых подавлена экспрессия MEK1 или MEK2, или обоих.

Через 4 ч среду, в которой находились эти трансфицированные клетки, заменяли культуральной средой N2, культивировали еще в течение 4 суток, а затем выделяли РНК способом, описанным в примере 4-1. Способность индуцировать дифференцировку НСК в нейроны анализировали при помощи ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR). В частности, РНК конвертировали в кДНК при помощи обратной транскрипции, а затем добавляли ДНК-полимеразу EX-Taq (SG Bio, Kyunggi Do, Korea) и праймер для проведения ПЦР в термоциклере T100™ (Bio-rad, Hercules, CA). ПЦР проводили посредством инкубации при 95°C в течение 5 мин, затем повторяли 25-35 циклов реакции, в которой 1 цикл состоял из инкубации при 95°C в течение 30 с, при 55-62°C в течение 30 с и при 72°C в течение 30 с. Результаты ПЦР исследовали при помощи электрофореза в 2% агарозном геле, который затем анализировали при помощи анализатора изображений LAS-3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan).

Праймеры, использованные для RT-PCR и qRT-PCR в данном примере, а также в примерах 5-2 и 5-3, приведены в табл. 4.

Таблица 4

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
GAPDH	5'-CGTGCCGCTGGAGAAACC-3'	5'-TGGAAGAGTGGGAGTTGCTGTTG-3'
Tuj1	5'-GGTCTGGCGCCTTTGGA-3'	5'-CACCACCTCTGACCAAAGATAAAGTTG-3'
TH	5'-AGGTATACGCCACGCTGAAG-3'	5'-CTCGGGTGAGTGCATAGGTG-3'
MEK1	5'-CGGCGGTTAACGGGACCA-34'	5'-GGATTGCGGGTTTGATCTCCA-3'
MEK2	5'-CCTGGATGAGCAGCAAAGGA-3'	5'-CAGTGAGCCACCATCCATGT-3'

Результаты показаны на фиг. 8а. Как показано на фиг. 8а, в НСК, в которых экспрессия как MEK1, так и MEK2 была подавлена в результате трансфекции shMEK1 и shMEK2 (shMEK1+, shMEK2+), экспрессия маркера дофаминовых нейронов TH существенно повышалась по сравнению с НСК, в которых была подавлена только экспрессия MEK2 (shMEK1-, shMEK2+).

Чтобы еще раз проверить, как подавление только MEK1 или MEK2 или подавление и MEK1, и MEK2 влияет на дифференцировку НСК в нейроны, проводили qRT-PCR и вестерн-блоттинг. НСК, в которых подавляли только MEK1 или MEK2, и НСК, в которых подавляли и MEK1, и MEK2, получали указанными выше способами. Через 4 ч среду, в которой находились трансфицированные клетки, заменяли культуральной средой N2, культивировали еще в течение 4 суток, а затем проводили qRT-PCR способом, описанным в примере 4-1. Результаты представлены на графике на фиг. 8б. Как показано на графике на фиг. 8б, экспрессия маркеров нейронов Tuj1 и TH существенно повышалась при подавлении экспрессии MEK1 и MEK2 по сравнению с подавлением экспрессии только MEK1 или только MEK2.

Чтобы установить, наблюдается ли индукция дифференцировки НСК в нейроны при подавлении экспрессии MEK1 и MEK2 не только на уровне мРНК, но также и на уровне белка, проводили вестерн-блоттинг.

Вестерн-блоттинг в каждой группе клеток проводили следующим образом. После культивирования НСК, в которых подавляли экспрессию MEK1 и MEK2, в течение 4 суток среду удаляли и в планшеты,

находящиеся на льду, добавляли буфер RIPA (0,05 M Tris HCl pH 7,4 (Sigma, кат. номер T3253), 0,15 M NaCl (Ducsan, кат. номер 7647-14-5), 0,25% дезоксихолевую кислоту (Sigma, кат. номер D6750), 1% NP-40 (USB, Waltham, MA, кат. номер 19628), 1 mM EDTA (Sigma, кат. номер EDS), 1 mM PMSF (Acros organics, Geel, Belgium, кат. номер 215740050), 1 mM ортованадата натрия (Bio labs, Ipswich, MA, кат. номер P0758L), 1 mM фторида натрия (Sigma, кат. номер S7920), ингибиторы протеаз (Sigma, кат. номер P83430)) и собирали клетки при помощи скребка. После инкубации на льду в течение 10 мин надосадочную жидкость собирали путем центрифугирования при 13000 об/мин при 4°C. Определяли концентрацию белка, добавляли буфер для нанесения образцов (0,25 M Tris-HCl pH6,8, 0,05% SDS (Amersco, Solon, OH, кат. номер 227), 50% глицерин (Ducsan, кат. номер 56-81-5), 0,25 M DTT (Invitrogen, кат. номер 0861), 0,5 мг/мл BPB (Bio-rad, Hercules, CA, кат. номер 161-0404) и кипятили образец при 100°C в течение 10 мин, а затем хранили при -20°C.

Образцы, содержащие 10-20 мкг белка, загружали в 8-12% SDS-PAGE гель, разделяли, переносили на нитроцеллюлозную мембрану, которую затем блокировали 5% обезжиренным молоком при комнатной температуре в течение 1 ч. Антитела к Tuj1, TH (Cell signaling, кат. номер 2792), MEK1/2 (Santa Cruz, Dallas, TX, кат. номер Sc-292838) и ERK (Santa Cruz, кат. номер Sc-135900) готовили в ТРИС-буферизированном физиологическом растворе (TBS) с добавлением 0,1% Tween 20 (Sigma, кат. номер P1379) и инкубировали с мембраной при комнатной температуре в течение 2 ч или при 4°C в течение ночи, после чего ее инкубировали со вторичным антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена, при комнатной температуре в течение 1 ч. Определяли экспрессию белка при помощи фоточувствительного оборудования, результаты приведены в нижней части фиг. 8b. Как показано на фиг. 8b, уровни экспрессии маркера нейронов Tuj1 и маркера дофаминовых нейронов TH на уровне мРНК и на уровне белка существенно повышались в НСК, в которых была подавлена экспрессия как MEK1, так и MEK2, за счет использования shMEK1 и shMEK2 (shMEK1, shMEK2+).

Напротив, в НСК, в которых была подавлена экспрессия только MEK1 или только MEK2, наблюдался более низкий уровень экспрессии Tuj1 и TH по сравнению с НСК, в которых подавляли как MEK1, так и MEK2.

Пример 5-2. Индукция экспрессии CAMEK1 и CAMEK2 в эмбриональных нервных стволовых клетках мыши

Для исследования индукции дифференцировки НСК в нейроны в зависимости от активации MEK1 и MEK2, в экспериментах использовали плазмиду с конститутивно активной MEK1 (CAMEK1) и плазмиду с конститутивно активной MEK2 (CAMEK2), имеющие мутации для конститутивной экспрессии MEK1 и MEK2. В частности, эмбриональные НСК мыши, которые культивировали, как описано в примере 1, на стадии 1А, высевали в планшеты и инкубировали в течение 24 ч. Затем клетки трансфицировали 1 мкг/мл CAMEK1 и CAMEK2 с использованием липофектамина для получения НСК, экспрессирующих CAMEK1 или CAMEK2 или обе. Через 4 ч среду, в которой находились эти трансфицированные клетки, заменяли культуральной средой N2, не содержащей EGF или bFGF, культивировали еще в течение 4 суток, а затем выделяли РНК и белок и проводили количественную RT-PCR (qRT-PCR) и вестерн-блоттинг. В этих экспериментах изучали влияние активации MEK1 и MEK2 на индукцию дифференцировки НСК в нейроны, результаты показаны на фиг. 8с.

В отличие от фиг. 8b, на фиг. 8с показано, что при активации MEK1 и MEK2 в условиях, индуцирующих дифференцировку, дифференцировка НСК подавляется. Как показали qRT-PCR и вестерн-блоттинг, экспрессия маркера нейронов Tuj1 и маркера дофаминергических нейронов TH на уровне мРНК и белка подавлялась. Экспрессия Tuj1 и TH была существенно ниже в случае активации как MEK1, так и MEK2 по сравнению с активацией только одной из них.

Пример 5-3. Ингибирование MEK1 и MEK2 во взрослых нервных стволовых клетках мыши.

Чтобы установить, индуцирует ли ингибирование MEK1 и MEK2 дифференцировку НСК во взрослых НСК мыши и является ли эффект таким же в присутствии бета-амилоида, проводили следующие эксперименты.

Взрослые НСК мыши культивировали, как описано в примере 2, на стадии 1А, высевали в планшеты и культивировали в течение 24 ч. Затем клетки трансфицировали 1 мкг/мл shRNA-MEK1

(CCGGGCCATCCAACATTCTAGTGAACCTCGAGTTCACCTAGAATGTTGGATG GCTTTT) или shRNA-

MEK2 (CCGGCCTCCGAGAGAAGCACCAGATCTCGAGATCTGGTGCTTCTCTCGGA GGTTTT)

с использованием липофектамина (Invitrogen) для получения НСК, в которых подавлена либо экспрессия MEK1, либо экспрессия MEK2, либо обе.

Через 4 ч среду, в которой находились эти трансфицированные клетки, заменяли культуральной средой N2 или культуральной средой N2 с 10 мкМ бета-амилоида, культивировали еще в течение 2 суток, а затем исследовали морфологию клеток при помощи микроскопа. Выделяли РНК тем же способом, как и в примере 4, проводили qRT-PCR и анализировали индукцию дифференцировки НСК в нейроны.

Результаты показаны на фиг. 9.

Как показано на фиг. 9а, дифференцировка легче индуцировалась в НСК, в которых была подавлена экспрессия как MEK1, так и MEK2, за счет трансфекции shMEK1 и shMEK2, по сравнению с НСК,

трансфицированных только одной из shMEK1 и shMEK2.

В случае, когда на клетки воздействовал Аβ, клетки погибали в группе, где ни MEK1, ни MEK2 не ингибировали, однако в группе, где ингибировали либо MEK1, либо MEK2, либо MEK1 и MEK2, клеточной гибели не наблюдалось, но имела место индукция дифференцировки.

Кроме того, как показано на фиг. 9b, экспрессия маркера нейронов Tuj1 существенно повышалась в НСК, в которых была подавлена экспрессия как MEK1, так и MEK2 под воздействием shMEK1 и shMEK2 (shMEK1+, shMEK2+). Напротив, в НСК, в которых была подавлена либо экспрессия MEK1, либо MEK2 (shMEK1, shMEK2), экспрессия маркера нейронов Tuj1 была низкой, как и индукция дифференцировки НСК в нейроны, по сравнению с ингибированием и MEK1, и MEK2. В случае воздействия на клетки Аβ, наблюдался некоторый защитный и индуцирующий дифференцировку эффект в отношении НСК, в которых были подавлены либо MEK1, либо MEK2, но в случае НСК, в которых была подавлена экспрессия и MEK1, и MEK2, защитный и индуцирующий дифференцировку эффект был существенно выше.

Данные результаты свидетельствуют, что ингибирование MEK1 и MEK2 во взрослых НСК не только индуцирует дифференцировку НСК, но также оказывает защитный эффект против бета-амилоида.

Пример 6. Индуцирующее дифференцировку НСК влияние других ингибиторов MEK1/2

Для исследования, демонстрируют ли другие ингибиторы MEK 1/2, помимо траметиниба, индуцирующее дифференцировку НСК и защитное влияние, эмбриональные НСК мыши подвергали воздействию каждого из исследуемых веществ. В частности, эмбриональные НСК мыши культивировали, как описано в примере 1, на стадии 1А с соответствующими ингибиторами MEK1/2: AZD8330 (Selleckchem, кат. номер 2134), PD184352 (Selleckchem, кат. номер S1020), рефаметинибом (Selleckchem, кат. номер S1089), PD318088 (Selleckchem, кат. номер S1568), биниметинибом (Selleckchem, кат. номер S7007) и AS703026 в концентрациях 0,1, 1,0 и 10 мкМ и инкубировали. Для сравнения НСК также подвергали воздействию траметиниба в тех же концентрациях. На 2 день культивирования изучали морфологию клеток под фазово-контрастным микроскопом, результаты приведены на фиг. 10a. На фиг. 10b представлен анализ экспрессии мРНК Tuj1 в клетках каждой группы.

Как показано на фиг. 10a и 10b, AZD8330, рефаметиниб, PD318088, биниметиниб и AS703026 индуцировали дифференцировку, хотя и начиная от различных концентраций. Морфологически дифференцировка начиналась под воздействием 1 мкМ AZD8330, рефаметиниба и PD318088, и под воздействием 10 мкМ биниметиниба и AS703026. Изучение экспрессии маркера нейрональной дифференцировки Tuj1 методом RT-PCR также показало, что они индуцируют дифференцировку в таких же концентрациях. По сравнению с другими соединениями траметиниб демонстрировал превосходное индуцирующее дифференцировку НСК влияние даже в низкой концентрации 0,1 мкМ. Напротив, PD184352 демонстрировал лишь слабое индуцирующее дифференцировку НСК влияние в концентрации 0,1 мкМ, а при концентрациях 1,0 и 10 мкМ все клетки погибали.

Кроме того, взрослые НСК мыши, которые культивировали, как описано в примере 2, на стадии 1А, подвергали воздействию других ингибиторов MEK1/2: PD0325901 (Selleckchem, кат. номер S1036), RO5126766 (Selleckchem, кат. номер S7170), BI847325 (Selleckchem, кат. номер S7843) и U0126 (A.G. Scientific, San Diego, CA, кат. номер U-102) в различных концентрациях, и исследовали их индуцирующее дифференцировку НСК влияние. После воздействия исследуемых веществ изучали морфологию клеток под фазово-контрастным микроскопом на 2 день культивирования. Результаты показаны на фиг. 10c. Как показано на фиг. 10c, индуцирующее дифференцировку влияние PD0325901 проявлялось, начиная от 0,1 мкМ, а RO5126766 - от 1,0 мкМ. В частности, PD0325901 демонстрировал превосходное индуцирующее влияние, поскольку он индуцировал дифференцировку в широком диапазоне концентраций от 0,1 до 10 мкМ. Напротив, BI847325 демонстрировал лишь слабое индуцирующее дифференцировку влияние в концентрации 0,1 мкМ, а при концентрациях 1,0 и 10 мкМ все клетки погибали. При воздействии BI847325 в более низких концентрациях (1,0 и 10 нМ) пролиферация клеток в некоторой степени подавлялась, а индуцирующее дифференцировку влияние не наблюдалось. U0126 ингибировал пролиферацию клеток в концентрациях 0,1 и 1,0 мкМ, а в концентрации 10 мкМ оказывал цитотоксическое действие на клетки. Кроме того, U0126 не демонстрировал какое-либо отчетливое индуцирующее дифференцировку влияние в концентрации 2,5 мкМ и поэтому не был способен индуцировать дифференцировку НСК ни в одной из исследуемых концентраций.

Эти результаты свидетельствуют, что не все известные ингибиторы MEK1/2 эффективно индуцируют дифференцировку НСК. Очевидно, что ингибирование MEK1 и MEK2 задействовано в индуцировании дифференцировки НСК, о чем свидетельствуют результаты примера 5. Однако полагают, что индивидуальные свойства каждого ингибитора MEK 1/2 сказываются на его способности индуцировать дифференцировку НСК, в результате чего имеют место различия, наблюдавшиеся в примере 6.

Пример 7. Индуцирующее дифференцировку НСК влияние других ингибиторов MEK1/2 в присутствии цитотоксических факторов.

Взрослые НСК, культивируемые, как описано в примере 2, на стадии 1А, подвергали воздействию 10 мкМ бета-амилоида, как описано в примере 2, на стадии 2 для создания цитотоксических условий,

после чего добавляли ингибиторы MEK1/2: AS703026 (10 мкМ), AZD8330 (1 мкМ), PD318088 (1 мкМ), биниметиниб (10 мкМ), рефаметиниб (1 мкМ), PD0325901 (10 мкМ) и RO5126766 (10 мкМ) в концентрациях, вызывавших наиболее выраженную дифференцировку в примере 6, и культивировали. Для сравнения включали группу, которую подвергали воздействию 0,1 мкМ траметиниба, и группу, которую подвергали воздействию 10 мкМ кобиметиниба (известного как селективный ингибитор MEK1 в сравнении с MEK2), а также группы с каждым из исследуемых соединений, но без воздействия бета-амилоида. Морфологию клеток изучали под фазово-контрастным микроскопом на второй день культивирования, результаты приведены на фиг. 11.

На фиг. 11 ряд, отмеченный "-", соответствует группе взрослых НСК мыши без воздействия бета-амилоида, а ряд, отмеченный " $A\beta_{1-42}$ ", представляет группу с воздействием 10 мкМ бета-амилоида. В условиях, когда под воздействием 10 мкМ бета-амилоида развивалась цитотоксичность, показали, что добавление AS703026, AZD8330, PD318088, биниметиниба, рефаметиниба, PD0325901 и RO5126766, каждого в оптимальной концентрации, индуцирующей наиболее выраженную дифференцировку, обеспечивало защиту клеток и индуцировало дифференцировку НСК. Напротив, добавление кобиметиниба, ингибитора, обладающего большей селективностью в отношении MEK1, по сравнению с MEK2, не индуцировало дифференцировку взрослых НСК даже при высокой концентрации 10 мкМ, независимо от добавления бета-амилоида.

Пример 8. Обнаружение увеличения количества нейронов на модели болезни Альцгеймера у мышей.

Предыдущие эксперименты показали, что среди соединений, подавляющих как MEK1, так и MEK2, некоторые соединения индуцируют дифференцировку НСК в нейроны и защищают НСК и нейроны от бета-амилоида, в частности выраженный эффект демонстрировал траметиниб. Чтобы подтвердить эти результаты также и на модели нейродегенеративного заболевания у мышей, исследовали нейрорегенерирующий и терапевтический эффект траметиниба с использованием мышей 5XFAD, модели на животных, демонстрирующих симптомы БА, наиболее распространенной формы нейродегенеративного заболевания. У мышей 5XFAD наблюдается патология нейронов, дегенерация и клеточная гибель нейронов, в частности, в 5 слое соматосенсорной коры головного мозга и основании гиппокампа (Oakley et al. (2006) *Intraneuronal 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. 26(40):10129-10140).

Траметиниб вводили перорально мышам 5XFAD (B6SJL-Tg(APPswF1Lon,PSEN1* $M146L^*L286V$)6799Vas/Mmjax) (модель БА) в возрасте 12 месяцев ежедневно на протяжении 28 суток в дозе 0,1 и 1,0 мг/кг, а мышам контрольной группы вводили плацебо (4% DMSO+кукурузное масло) тем же способом (7 мышей/группу). Для последующего окрашивания BrdU добавляли 50 мг/кг BrdU (Sigma, кат. номер B5002) в ежесуточную дозу в течение последних 5 суток. Для выделения головного мозга мышам выполняли анестезию и перфузию PBS. Половину ткани головного мозга (полушария), выделенного у трех мышей каждой группы, немедленно помещали в морозильный аппарат для низкотемпературного замораживания для последующих исследований методом вестерн-блоттинга и ELISA. Другую половину полушарий и головной мозг, выделенный у 3 других мышей из каждой группы, помещали в 10% раствор формалина при 4°C на 1 сутки, после чего выполняли следующие стадии, чтобы обеспечить хорошее проникновение парафина в ткань мозга. Для дегидратации ткани мозга последовательно погружали на 1 ч в каждый из растворов 70, 80, 95, 100% спирта, затем 3 раза погружали в ксилол, каждый раз на 1 ч, для просветления и заключали в парафин, двукратно помещая в жидкий парафин, каждый раз на 1 ч. После этих процедур готовили срезы ткани мозга, заключенной в парафин (парафинового блока) толщиной 5 мкм, помещали на стекла и хранили при комнатной температуре. Перед иммуногистохимическим окрашиванием ткани на стеклах регидратировали, последовательно погружая в ксилол, 100, 90, 80, 70, 50% спирт и затем в воду, каждый раз на 5 мин. После помещения в натрий-цитратный буфер (10 мМ, pH 6) (Sigma, S4641) осуществляли процесс демаскировки антигена при 120°C в течение 15 мин, блокировали 10% БСА (бычьим сывороточным альбумином) и инкубировали с антителами к маркеру нейронов NeuN (Cell signaling, кат. номер 24307) при 4°C в течение 1 суток. На следующий день стекла инкубировали с антителами к иммуноглобулинам кролика (Vector lab, кат. номер PI-1000) при комнатной температуре в течение 1 ч и затем окрашивали диаминобензидином (DAB) для анализа распределения нейронов в головном мозге.

Поскольку у мышей 5XFAD имеет место обширное повреждение нейронов в 5 слое коры головного мозга и основании гиппокампа, эти отделы головного мозга исследовали в первую очередь.

На фиг. 12 показаны результаты исследования сагиттальных срезов соматосенсорной зоны коры головного мозга. Как показано на фиг. 12a, у мышей 5XFAD, получавших плацебо (4% DMSO + кукурузное масло) (контроль, первое изображение слева), количество окрашенных на NeuN (положительных) клеток снижалось вследствие значительного повреждения нейронов в 5 слое коры головного мозга. Для сравнения, у мышей 5XFAD, получавших 0,1 и 1,0 мг/кг траметиниба, наблюдалось существенное увеличение количества нейронов, окрашенных на NeuN. На фиг. 12b показано количество подсчитанных клеток, окрашенных на NeuN, выраженное в процентах от количества клеток на единицу площади в 5 слое соматосенсорной коры головного мозга. У каждой мыши брали образцы в 3 областях, у 3 мышей на

группу, таким образом, подсчет клеток проводили всего в 9 областях. Подсчитывали процентное содержание окрашенных на NeuN клеток в группе, получавшей траметиниб, по сравнению с группой, получавшей плацебо.

На фиг. 13 показаны результаты исследования фронтальных срезов двигательной зоны коры головного мозга мыши. Как показано на фиг. 13a, у мышей 5XFAD, получавших плацебо (контроль), наблюдали обширное повреждение нейронов в 5 слое двигательной зоны коры и сниженное количество нейронов, окрашенных на NeuN, тогда как в группе, получавшей траметиниб, вновь наблюдали существенное увеличение количества нейронов, как и в соматосенсорной коре. На фиг. 13b показано количество подсчитанных клеток, окрашенных на NeuN, выраженное в процентах от количества клеток на единицу площади в 5 слое двигательной зоны коры головного мозга. У каждой мыши брали образцы в 6 областях, у 3 мышей на группу, таким образом, подсчет клеток проводили всего в 18 областях.

Подсчитывали процентное содержание окрашенных на NeuN клеток в группе, получавшей траметиниб, по сравнению с группой, получавшей плацебо.

На фиг. 14 показаны результаты исследования сагиттальных срезов основания гиппокампа мыши. Как показано на фиг. 14a, у мышей 5XFAD, получавших плацебо (контроль), в основании гиппокампа наблюдали небольшое количество нейронов, окрашенных на маркер нейронов NeuN, тогда как в группе, получавшей траметиниб, вновь наблюдали существенное увеличение количества нейронов, как и в коре головного мозга. На фиг. 14b показано количество подсчитанных клеток, окрашенных на NeuN, выраженное в процентах от количества клеток на единицу площади в участке гиппокампа, обведенном пунктирной линией, изображенном на фиг. 14a. У каждой мыши брали образцы в 3 областях, у 3 мышей на группу, таким образом, подсчет клеток проводили всего в 9 областях. Подсчитывали процентное содержание окрашенных на NeuN клеток в группе, получавшей траметиниб, по сравнению с группой, получавшей плацебо. Приведенные выше эксперименты показали, что траметиниб вызывает увеличение количества нейронов в 5 слое коры головного мозга и основании гиппокампа мышей 5XFAD.

Пример 9. Обнаружение нейрогенеза на модели болезни Альцгеймера у мышей.

Чтобы установить, является ли увеличение количества нейронов в 5 слое коры головного мозга и основании гиппокампа у мышей 5XFAD, получавших траметиниб, показанное в примере 8, следствием нейрогенеза под воздействием траметиниба, проводили иммуногистохимический анализ с различными клеточными маркерами, которые возникают в процессе дифференцировки НСК в нейрон.

DCX (даблкортин), белок, экспрессирующийся в клетках-предшественниках нейронов, экспрессируется преимущественно в мигрирующих или дифференцирующихся нейронах и свидетельствует о том, что клетка представляет собой незрелый нейрон в процессе нейрогенеза. Tuj 1 (нейрон-специфический бета-тубулин класса III), белок, экспрессирующийся в активно делящихся клетках-предшественниках нейронов или в только что образованных незрелых постмитотических нейронах, свидетельствует о том, что клетка представляет собой нейрон в процессе нейрогенеза. Таким образом, определяя присутствие DCX или Tuj 1 при помощи иммуногистохимического окрашивания, можно установить, что нейрогенез имеет место в результате дифференцировки НСК в нейроны.

BrdU (5-бромдезоксифосфат), аналог нуклеотидного основания тимидина, замещает тимидин в ходе синтеза ДНК в делящихся клетках, позволяя обнаруживать делящиеся клетки в ходе нейрогенеза путем иммуногистохимического окрашивания.

Пример 9-1. Определение экспрессии Tuj1 в соматосенсорной коре головного мозга.

Антитела к Tuj 1 добавляли к препаратам ткани мозга мышей 5XFAD, полученным в примере 8, и инкубировали при 4°C в течение 1 суток, после чего ткань на стеклах окрашивали флуоресцентным красителем путем инкубации со вторичными антителами, меченными флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) (Invitrogen, кат. номер A21121) при комнатной температуре в течение 1 ч. Изображения соматосенсорной коры, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа, показаны на фиг. 15. На фиг. 15 в областях, отмеченных стрелками (→), показаны клетки, окрашенные на Tuj1, а в областях, отмеченных треугольниками (▼), показаны бляшки, образованные агрегатами бета-амилоида. Бляшки присутствуют как в группах, получавших плацебо, так и в группах, получавших траметиниб. Однако в группе, получавшей 0,1 мг/кг траметиниба, в частности, наблюдалось существенное снижение количества клеток, окрашенных на Tuj1, по сравнению с группой, получавшей плацебо, несмотря на одинаковое количество бляшек бета-амилоида, присутствующих в образцах.

Пример 9-2. Окрашивание по Нисслю и определение экспрессии NeuN и DCX в зубчатой извилине гиппокампа.

При активации нейрогенеза в субгранулярной зоне (SGZ) зубчатой извилины происходит асимметричное деление клеток, и в результате в самом начале образуются клетки 2 типа. Клетки 2 типа имеют малое тело с атипичным ядром, они короткие, ориентированы горизонтально и экспрессируют нестин или Dcx. Клетки 3 типа представляют собой клетки, которые прошли дальнейшую дифференцировку из клеток 2 типа и также обозначаются нейробластами. Клетки 3 типа представляют собой клетки на ранней стадии дифференцировки в нейрональном, но не глиальном направлении. Клетки 3 типа расположены ближе к гранулярному слою от субгранулярной зоны зубчатой извилины, и в отличие от клеток 2 типа они ориентированы не горизонтально, а вертикально. Присутствие клеток 2 и 3 типа в субгранулярной

зоне зубчатой извилины указывает на то, что имеет место нейрогенез.

Окрашивание по Нисслю, окрашивание телец Ниссля нейрона, является способом, демонстрирующим распределение и состояние нейронов в головном мозге. Ткани мозга на стеклах, полученные в примере 8, регидратировали путем последовательного погружения в ксилол, 100, 90, 80, 70, 50% спирт и затем в воду, каждый раз на 5 мин. После помещения в 0,1% раствор крезил-виолета (Sigma, кат. номер C5042) при комнатной температуре на 15 мин их дегидратировали путем последовательного погружения в 80, 90, 100% спирт и ксилол. На стекла накладывали покровные стекла и исследовали нейроны.

Окрашивание на NeuN выполняли способом, описанным в примере 8, окрашивание на DCX выполняли аналогично, но вместо антител к NeuN использовали антитела к DCX (Santa Cruz, кат. номер sc271390).

Результаты показаны на фиг. 16а. Окрашивание по Нисслю и окрашивание на NeuN у мышей 5XFAD, получавших траметиниб, показало, что число клеток, имеющих морфологию клеток 2 типа или 3 типа, появление которых специфично для процесса нейрогенеза, существенно увеличивалось в субгранулярной зоне (SGZ) и в области, расположенной ближе к гранулярной зоне, по сравнению с SGZ в зубчатой извилине. Кроме того, отмечали присутствие незрелых нейронов (отмечены стрелками (→) в колонке с обозначением "Dcx" на фиг. 16), также окрашенных на DCX, что подтверждало, что в зубчатой извилине гиппокампа у мышей, получавших траметиниб, протекал нейрогенез.

Пример 9-3. Окрашивание области зубчатой извилины гиппокампа BrdU.

Для возникновения нейрогенеза должно происходить асимметричное деление нервных стволовых клеток, и это исследовали в следующем эксперименте.

Срезы ткани мозга мышей 5XFAD, которым вводили BrdU (введение 50 мг/кг BrdU ежедневно на протяжении 5 последовательных суток перед эвтаназией, как описано в примере 8), регидратировали, помещали в 1,5 М HCl (соляную кислоту) и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Срезы блокировали раствором, содержащим 0,5% БСА (бычий сывороточный альбумин), 0,3% TritonX-100 и 10% нормальную козью сыворотку и инкубировали с антителом к BrdU (Cell signaling, кат. номер 5292) при 4°C в течение 1 суток. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили на следующий день, инкубируя срезы со вторичным антителом, конъюгированным с флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) при комнатной температуре в течение 1 ч, после чего исследовали окрашивание зоны зубчатой извилины гиппокампа при помощи флуоресцентного микроскопа.

Результаты показаны на фиг. 16а в колонке, обозначенной "BrdU". Клетки, помеченные треугольниками (▼), представляют собой клетки, меченные BrdU. При сравнении с группой, получавшей плацебо, у мышей 5XFAD, получавших траметиниб, в зубчатой извилине наблюдали увеличение количества клеток, окрашенных BrdU. На фиг. 16b показано количество меченных BrdU клеток, что вновь свидетельствует, что в группе, получавшей траметиниб, наблюдали увеличение количества клеток, окрашенных BrdU. На фиг. 16b показано среднее количество клеток, подсчет которых производили в 9 областях (3 мыши на группу и 3 области у каждой мыши).

Данные результаты свидетельствуют, что траметиниб индуцирует нейрогенез за счет дифференцировки НСК на модели БА у мышей. Это позволяет предположить, что траметиниб можно применять не только в качестве основного лечения БА, но также и для лечения и предупреждения заболеваний, вызванных повреждением или утратой нейронов в коре головного мозга, в частности в двигательной зоне коры.

Пример 10. Нейропротективная активность на модели БА у мышей.

Чтобы установить, обладает ли траметиниб нейропротективным влиянием на кору головного мозга и основание гиппокампа мышей 5XFAD, проводили иммуногистохимический анализ методом TUNEL (мечение дУТФ концов ДНК при помощи терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы) для выявления апоптоза клеток. Анализ методом TUNEL позволяет окрашивать 3'-гидроксиконец фрагментированной ДНК, что позволяет обнаруживать клетки, подвергающиеся апоптозу в ткани.

Сагиттальные срезы ткани головного мозга, полученные в примере 8, регидратировали и окрашивали с помощью набора для TUNEL-анализа (Promega, Wisconsin, USA, кат. номер G3250). В частности, срезы ткани головного мозга пермеабилizировали 20 мкг/мл раствора протеиназы К в течение 10 мин, инкубировали с уравнивающим буфером в течение 10 мин и затем инкубировали с раствором TdT при 37°C в течение 1 ч. Наблюдали окрашивание областей соматосенсорной коры и основания гиппокампа, областей, в которых, как известно, у мышей 5XFAD имеет место значительная гибель клеток. TUNEL-анализ также проводили на срезах ткани головного мозга нормальных взрослых мышей (контроль) для подтверждения того, что окрашивание было проведено надлежащим образом.

Результаты показаны на фиг. 17. Окрашивание зеленым флуоресцентным красителем у нормальных мышей (обозначены "нормальные мыши" на фиг. 17) не наблюдали, поскольку апоптоз отсутствовал. Однако зеленую флуоресценцию наблюдали во многих клетках в соматосенсорной коре (ряд, обозначенный "кора" на фиг. 17) и основании гиппокампа (ряд, обозначенный "основание гиппокампа" на фиг. 17) у мышей 5XFAD. На фиг. 17 окрашенные клетки в основании гиппокампа отмечены стрелками (→); в соматосенсорной коре специальных пометок не делали, поскольку окрашивалось много клеток. В случае

мышей 5XFAD, получавших траметиниб, количество клеток, окрашенных методом TUNEL в соматосенсорной коре и основании гиппокампа, было существенно ниже по сравнению с группой, получавшей плацебо.

Эти результаты демонстрируют, что траметиниб оказывает защитное действие, предохраняя нейроны от гибели на модели БА у мышей.

Пример 11. Защита клеток Пуркинье мозжечка на модели БА у мышей.

Срезы ткани мозга (мышей 5XFAD), описанные в примере 8, инкубировали с антителами к Tuj 1 и к кальбиндину (Cell signaling, кат. номер 13176) при 4°C в течение 1 суток и окрашивали для иммунофлуоресцентного анализа вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) или с родамином при комнатной температуре в течение 1 ч. Иммунофлуоресцентные изображения слоя клеток Пуркинье приведены на фиг. 18. Для каждой группы воздействия приведено два среза с окрашиванием на Tuj 1 и три среза с окрашиванием на кальбиндин.

Как показано на фиг. 18, клетки Пуркинье в группе, получавшей плацебо, имели тонкие выдающиеся аксоны, выглядевшие разрезанными посередине. Напротив, в группе, получавшей траметиниб, в частности, в группе, получавшей 0,1 мг/кг траметиниба, наблюдались клетки Пуркинье с усиленным ветвлением аксонов или по меньшей мере с сохранением структуры аксонов при сравнении с контрольной группой, получавшей плацебо.

Известно, что мозжечок играет важную роль в интеграции проприоцептивных ощущений с регуляцией и координацией движений. Наиболее удивительные клетки мозжечка, клетки Пуркинье, являются одними из самых крупных клеток в головном мозге, их сложно разветвленные аксоны образуют синапсы друг с другом и проникают глубоко в центр мозжечка для осуществления регуляции и контроля двигательной мускулатуры. Приведенные выше результаты экспериментов свидетельствуют, что траметиниб защищает клетки Пуркинье и увеличивает ветвление аксонов в мозжечке, возможно позволяя лечить заболевания, которые вызваны утратой или повреждением клеток Пуркинье мозжечка, такие как мозжечковая атаксия.

Пример 12. Ингибирование траметинибом активности MEK на модели БА у мышей.

Поскольку лекарственные средства для лечения нейродегенеративных заболеваний воздействуют на центральную нервную систему, важное значение имеет их способность пересекать гематоэнцефалический барьер. Среди ингибиторов MEK 1/2 такие соединения как AS703026 известны своей способностью эффективно пересекать ГЭБ и ингибировать MEK и снижать экспрессию фосфорилированной ERK в головном мозге мыши (Shaw et al. (2012), Evaluation of brain pharmacokinetics as a potential differentiation factor for the MEK inhibitors, MSC2015103 and pimasetib. Abstract LB-456, American Association for Cancer Research Annual Meeting, Chicago, IL). Чтобы подтвердить, что ингибитор MEK1/2 траметиниб проникает в головной мозг, и чтобы получить указанные выше результаты экспериментов при пероральном введении мышам 5XFAD, измеряли уровень экспрессии pERK в ткани головного мозга.

Полушария головного мозга мышей 5XFAD (3 мыши на группу) из примера 8, находившиеся в морозильном аппарате для низкотемпературного замораживания, помещали в жидкий азот и измельчали в ступке с жидким азотом. Порошок делили на 6 частей, помещали в новые пробирки и вновь помещали в морозильный аппарат для низкотемпературного замораживания. Вынимали одну из пробирок и использовали для вестерн-блоттинга, как описано в примере 5-2. Порошок осторожно суспендировали при помощи пипетки в буфере RIPA, инкубировали на льду в течение 10 мин, центрифугировали при 13000 об/мин при 4°C и собирали надосадочную жидкость. После измерения концентрации белка добавляли буфер для нанесения образцов (0,25 M Tris-HCl pH 6,8, 0,05% SDS, 50% глицерин, 0,25 M DTT, 0,5 мг/мл BPB), кипятили при 100°C в течение 10 мин и хранили при -20°C. В 10% полиакриламидный гель загружали образец, содержащий 10 мкг белка, проводили электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и блокировали 5% обезжиренным молоком при комнатной температуре в течение 1 ч. Для вестерн-блоттинга использовали антитела к pERK (Cell signaling, кат. номер 4370) и ERK в Трис-буферизированном физиологическом растворе (TBS) с 0,1% Tween 20, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч с последующей инкубацией со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, при комнатной температуре в течение 1 ч.

Полосы белков детектировали при помощи фоточувствительной системы регистрации изображений (фиг. 19a). Для количественного определения изменения экспрессии pERK определяли уровни экспрессии pERK и ERK при помощи денситометрии и нормализовали уровень экспрессии pERK относительно уровня экспрессии ERK. Нормализованный уровень экспрессии pERK в группе, получавшей траметиниб по сравнению с группой, получавшей плацебо, показан на фиг. 19b.

Как показано на фиг. 19, уровень белка pERK в головном мозге у мышей, получавших 0,1 и 1,0 мг/кг траметиниба, существенно ниже, чем в группе, получавшей плацебо.

Это указывает, что при пероральном введении траметиниба происходит поступление траметиниба в головной мозг с последующим ингибированием активности MEK и снижением экспрессии pERK, в результате обеспечивая нейрогенез и нейропротективный эффект.

Пример 13. Уменьшение отложения бета-амилоида на модели БА у мышей.

Поскольку основной патологической характеристикой БА является отложение $A\beta$, исследовали способность траметиниба уменьшать отложение $A\beta$. Используя измельченный порошок полушарий головного мозга мышей 5XFAD, полученный в примере 12, определяли количественное содержание $A\beta_{(1-40)}$ и $A\beta_{(1-42)}$ при помощи ELISA (иммуноферментный анализ). Исследование проводили с использованием набора ELISA (Invitrogen, МА, кат. номер КНВ3442) следующим образом: Сначала порошок головного мозга мыши осторожно суспендировали при помощи пипетки в 5 М растворе гуанидин-НСl, центрифугировали при 16000g (об/мин) при 4°C и собирали надосадочную жидкость. После измерения концентрации белка добавляли буфер для разведения для получения раствора, содержащего 30-50 мкг белка в 100 мкл. В 96-луночные планшеты добавляли 100 мкл каждого из антител к $A\beta_{(1-40)}$ и $A\beta_{(1-42)}$, инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч, затем удаляли и промывали 4 раза отмывочным буфером. Добавляли 100 мкл каждого из вторичных антител, конъюгированных с HRP, и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем раствор удаляли и вновь промывали 4 раза отмывочным буфером. В лунки добавляли 100 мкл белка, полученного из порошка головного мозга мыши, инкубировали в темноте в течение 30 мин и останавливали реакцию добавлением 100 мкл останавливающего раствора. Затем детектировали хемилюминесценцию при 450 нм при помощи считывающего устройства для планшетов ELISA. Переводили единицы поглощения в концентрацию, используя стандарт, и определяли концентрацию каждого белка. Рассчитывали количество $A\beta_{(1-40)}$ и $A\beta_{(1-42)}$ относительно общего количества белка (30~50 мкг) и затем рассчитывали количество $A\beta_{(1-42)}$ относительно количества $A\beta_{(1-40)}$. Полученные средние значения для 3 мышей в каждой группе показаны на фиг. 20. Как показано на фиг. 20, количество $A\beta_{(1-42)}/A\beta_{(1-40)}$ снижалось в группе, получавшей траметиниб, по сравнению с группой, получавшей плацебо.

Это указывает, что на модели БА у мышей траметиниб вызывает уменьшение количества $A\beta$, в частности формы $A\beta_{(1-42)}$, обладающей выраженной склонностью к образованию токсических олигомеров или агрегатов, и, таким образом, может обеспечивать защиту нейронов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение траметиниба для лечения нейродегенеративного заболевания, вызванного утратой или повреждением нейронов, где нейродегенеративное заболевание выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, бокового амиотрофического склероза (БАС, болезни Лу Герига), деменции, сосудистой деменции, лобно-височной деменции, деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии, кортикобазальной дегенерации, прогрессирующего супрануклеарного паралича, болезни Хантингтона, первичного латерального склероза, спинальной мышечной атрофии, прогрессирующего бульбарного паралича (ПБП), прогрессирующей мышечной атрофии (ПМА), псевдобульбарного паралича, наследственной спастической параплегии (НСП) и мозжечковой атаксии.

2. Применение по п.1, где нейродегенеративное заболевание лечат путем индуцирования нейрогенерации посредством дифференцировки нервных стволовых клеток в нейроны.

3. Применение по п.2, где нейродегенеративное заболевание лечат дополнительно посредством защиты нервных стволовых клеток и нейронов от цитотоксического влияния бета-амилоидов.

4. Применение по п.2, где нейроны, дифференцированные из нейральных стволовых клеток, представляют собой по меньшей мере нейрон, выбранный из дофаминергического нейрона, ГАМК-ергического нейрона, холинергического нейрона и двигательного нейрона.

5. Применение по п.1, где нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера.

6. Применение по п.1, где нейродегенеративное заболевание представляет собой сосудистую деменцию.

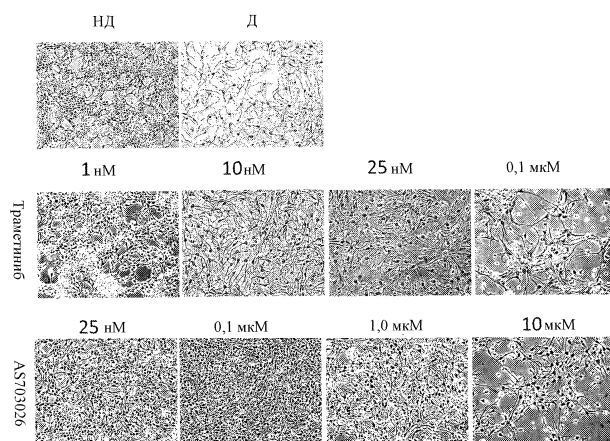
7. Применение по п.1, где нейродегенеративное заболевание представляет собой боковой амиотрофический склероз (БАС, болезнь Лу Герига).

8. Применение по п.1, где нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Хантингтона.

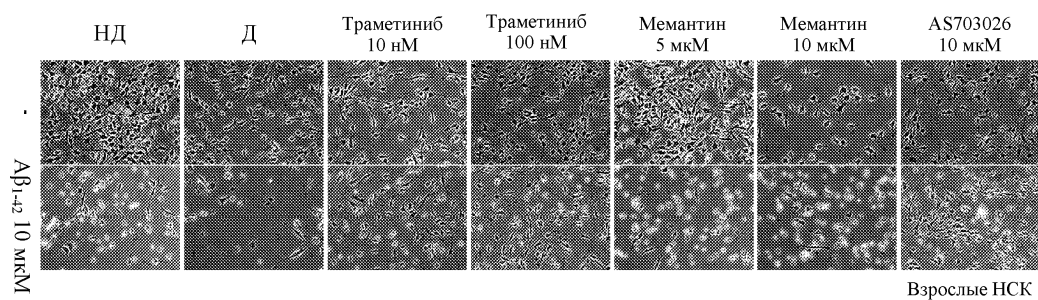
9. Применение по любому из пп.1-8, где траметиниб вводят в количестве от 0,1 до 2 мг один раз в сутки.

10. Применение по п.9, где траметиниб вводят в количестве от 0,1 до 1 мг один раз в сутки.

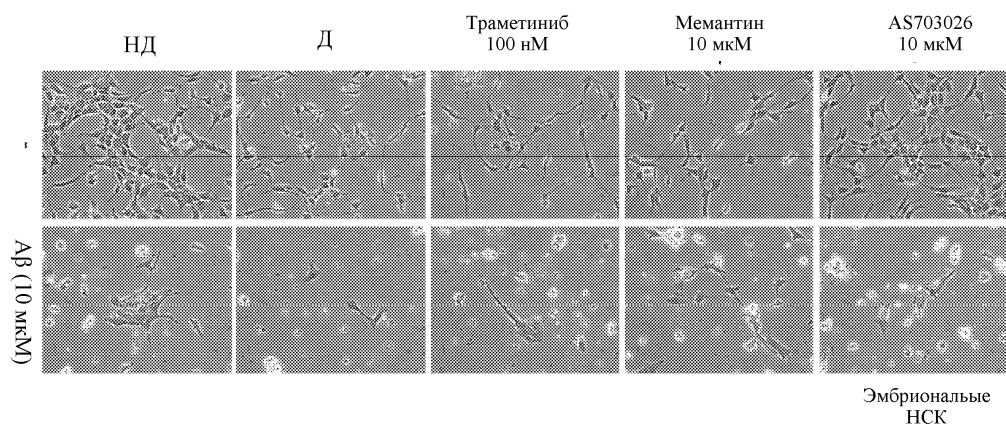
11. Применение по п.10, где траметиниб вводят в количестве от 0,1 до 0,5 мг один раз в сутки.



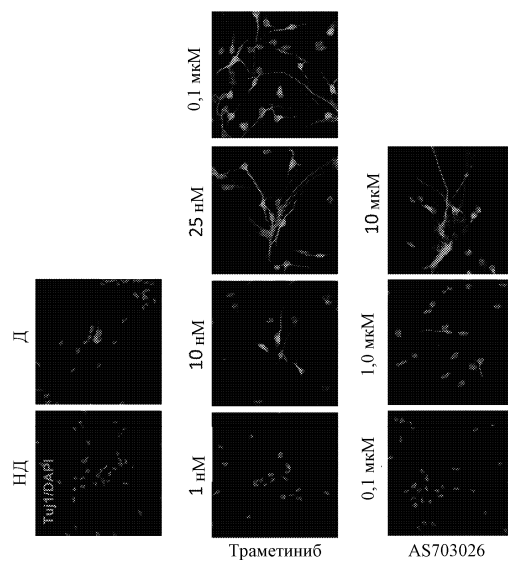
Фиг. 1



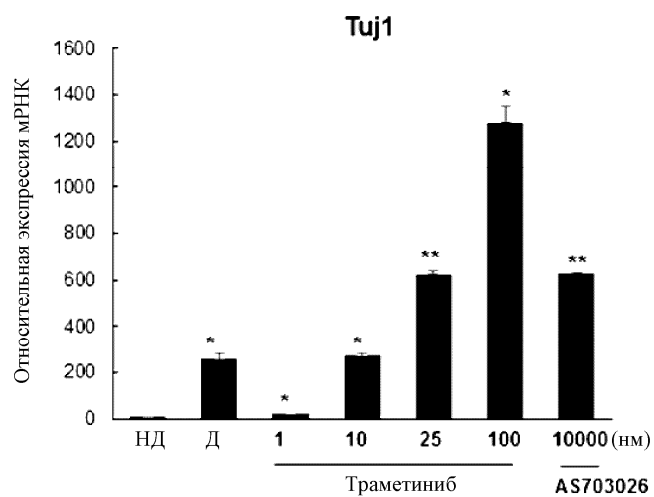
Фиг. 2



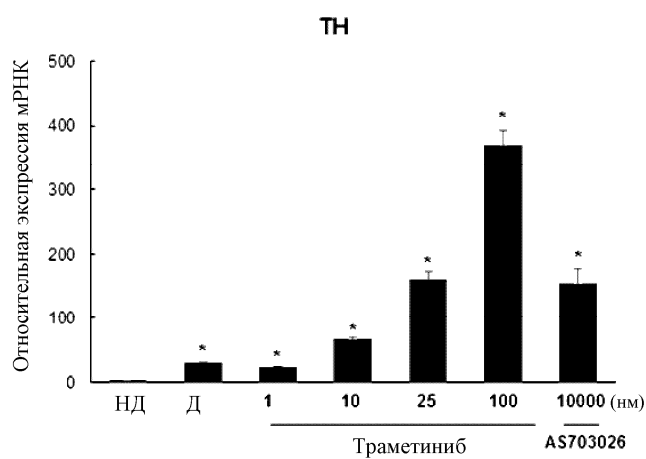
Фиг. 3



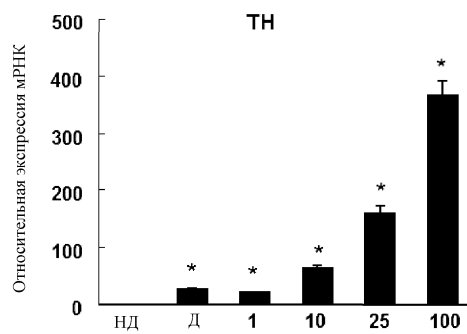
Фиг. 4



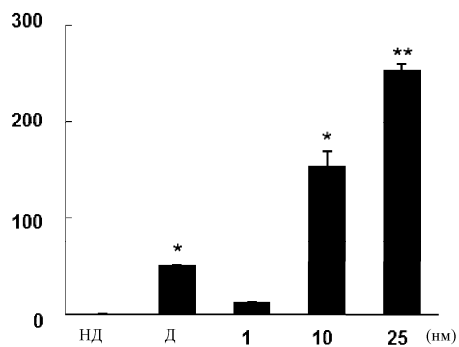
Фиг. 5a



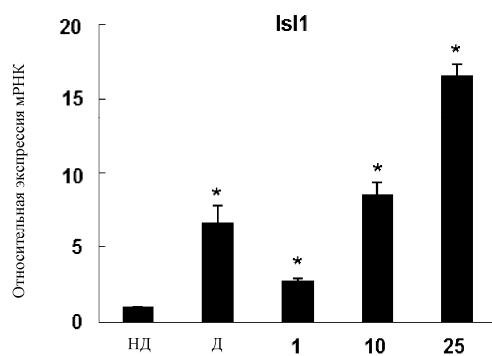
Фиг. 5b



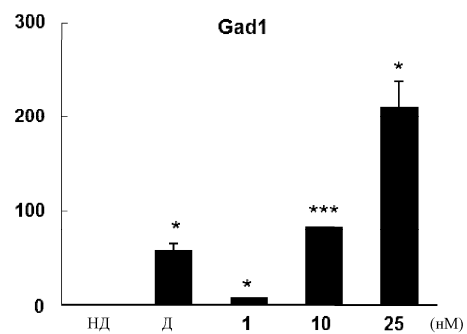
Фиг. 6а



Фиг. 6b

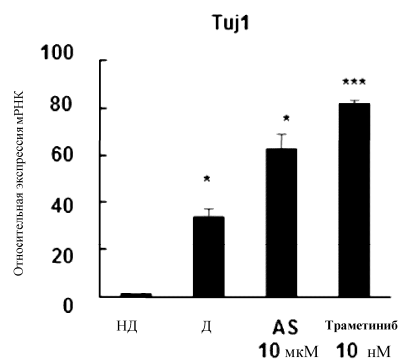


Фиг. 6с

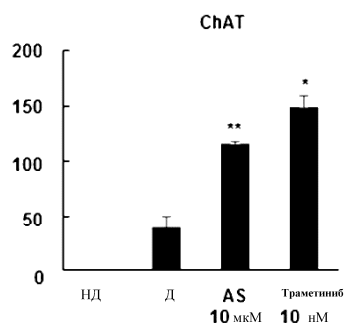


Фиг. 6d

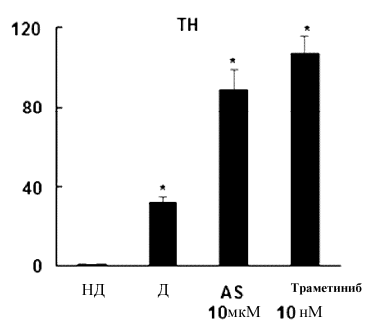
038404



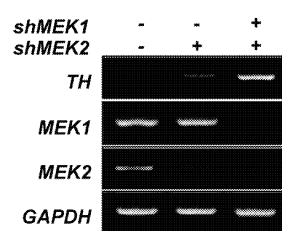
Фиг. 7а



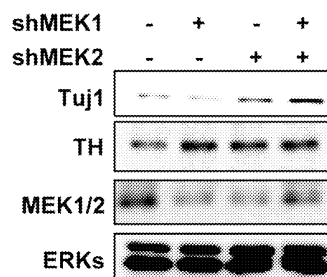
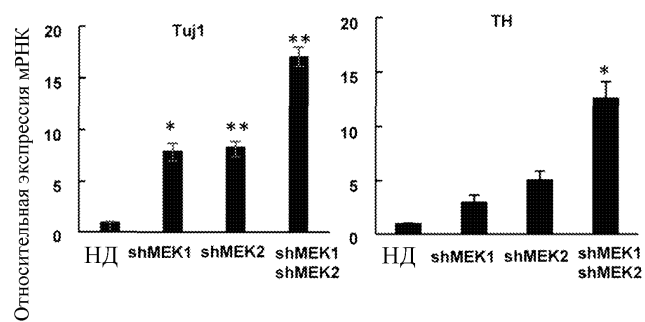
Фиг. 7б



Фиг. 7с

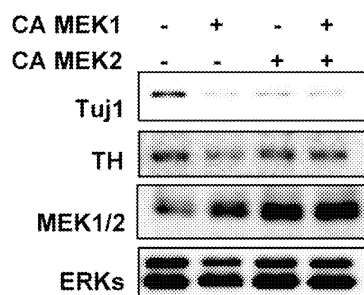
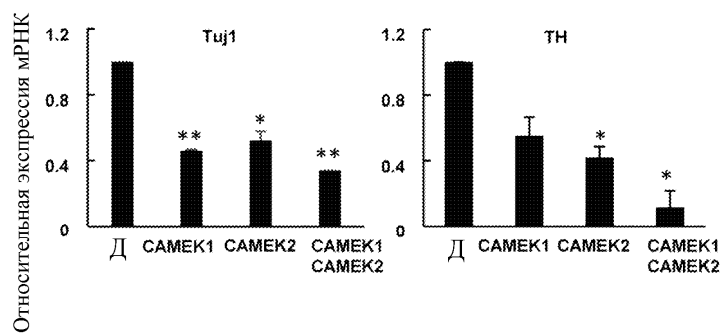


Фиг. 8а



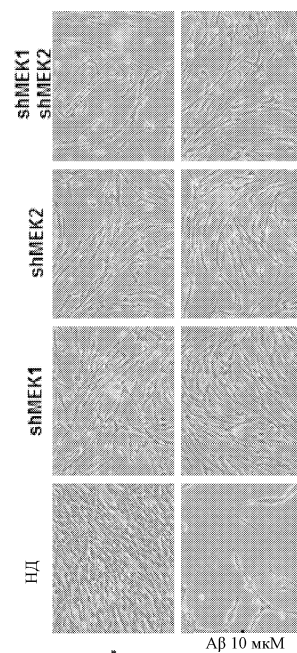
HD

Фиг. 8b

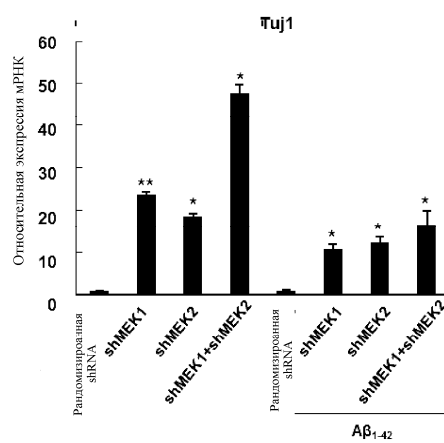


D

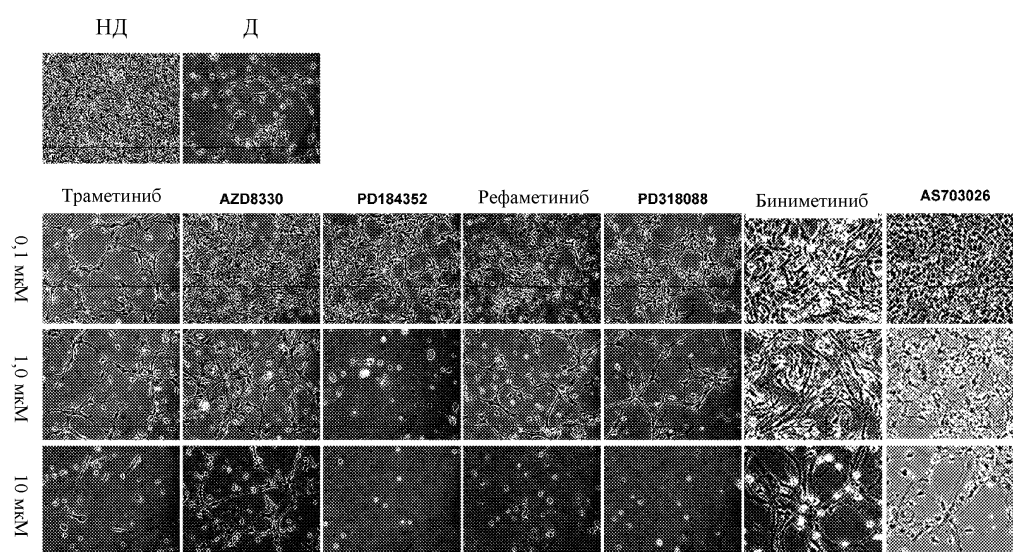
Фиг. 8c



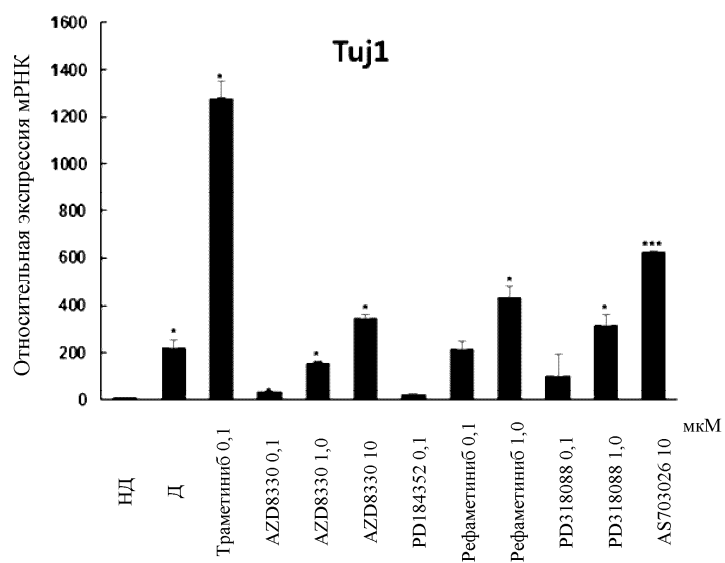
Фиг. 9a



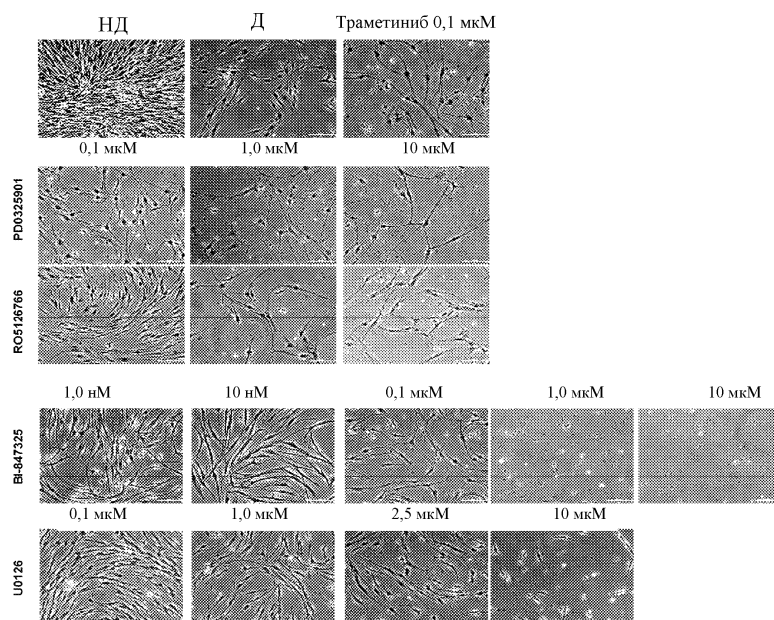
Фиг. 9b



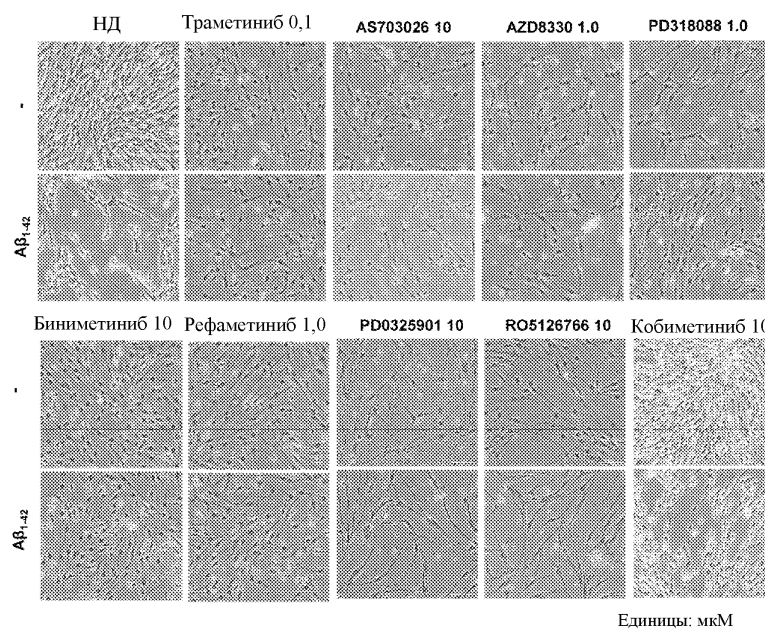
Фиг. 10a



Фиг. 10b

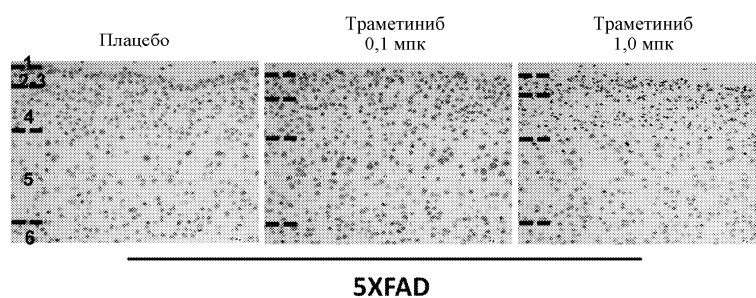


Фиг. 10с

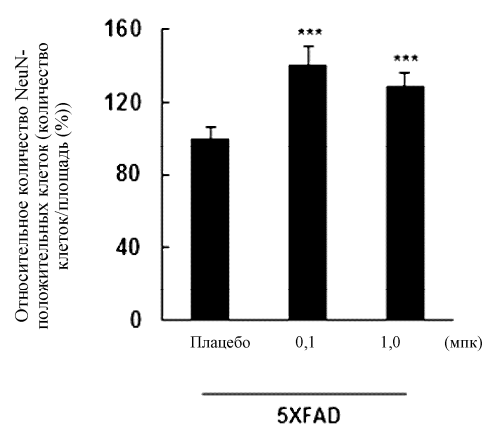


Фиг. 11

V слой нейронов соматосенсорной коры

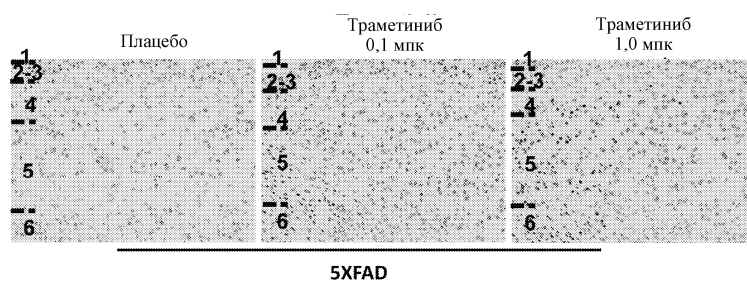


Фиг. 12a

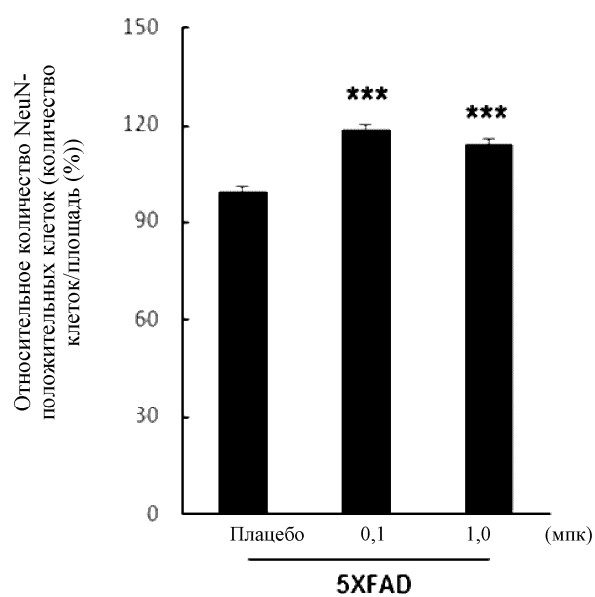


Фиг. 12b

V слой нейронов двигательной зоны коры

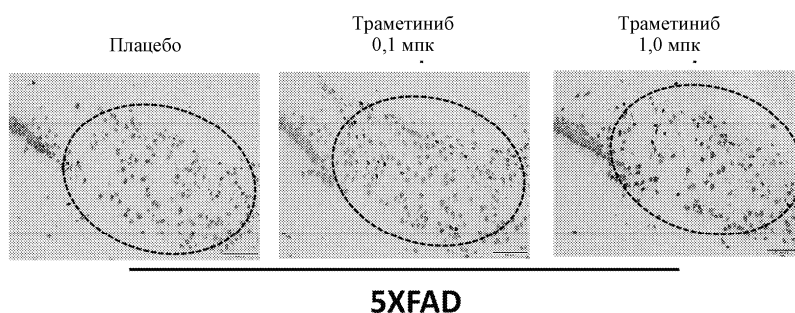


Фиг. 13а

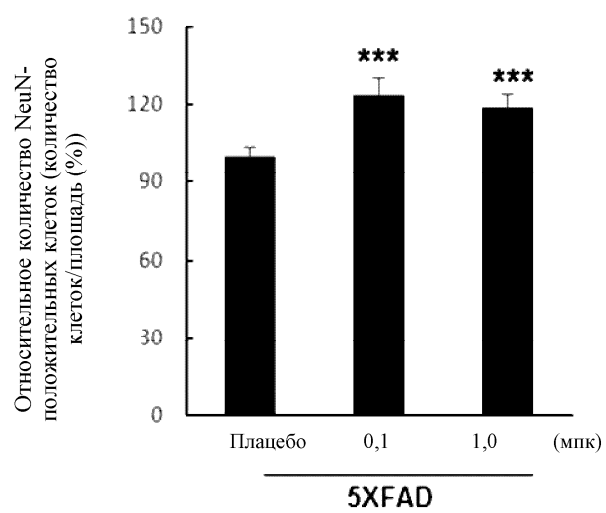


Фиг. 13b

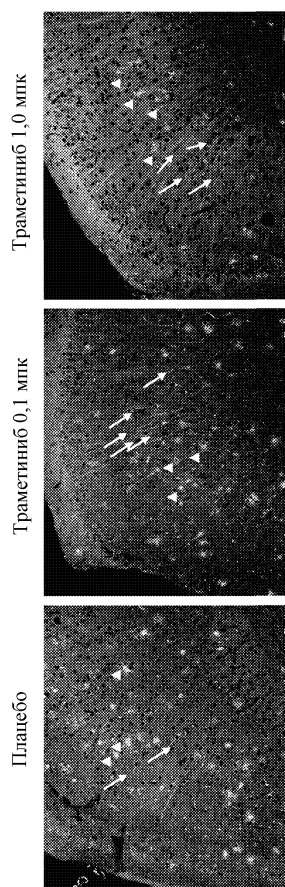
Нейроны основания гиппокампа



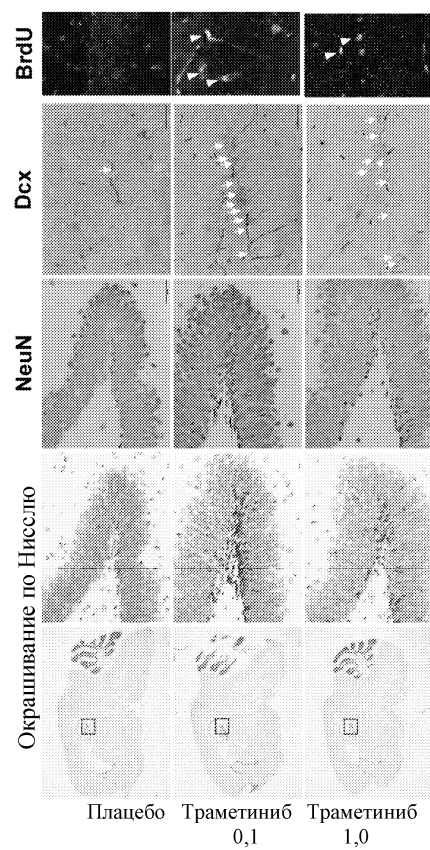
Фиг. 14а



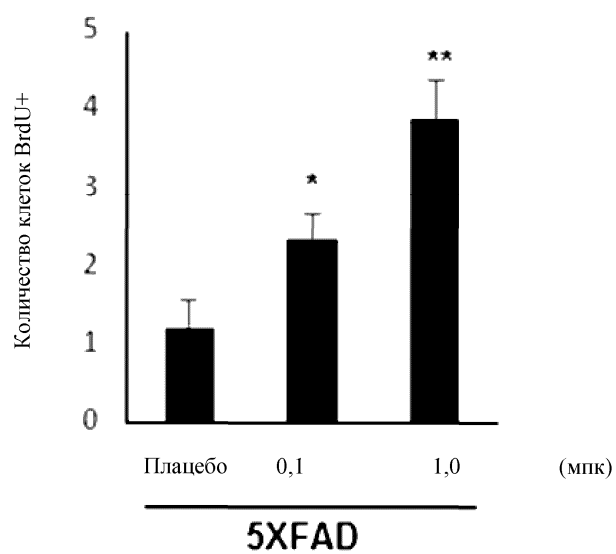
Фиг. 14b



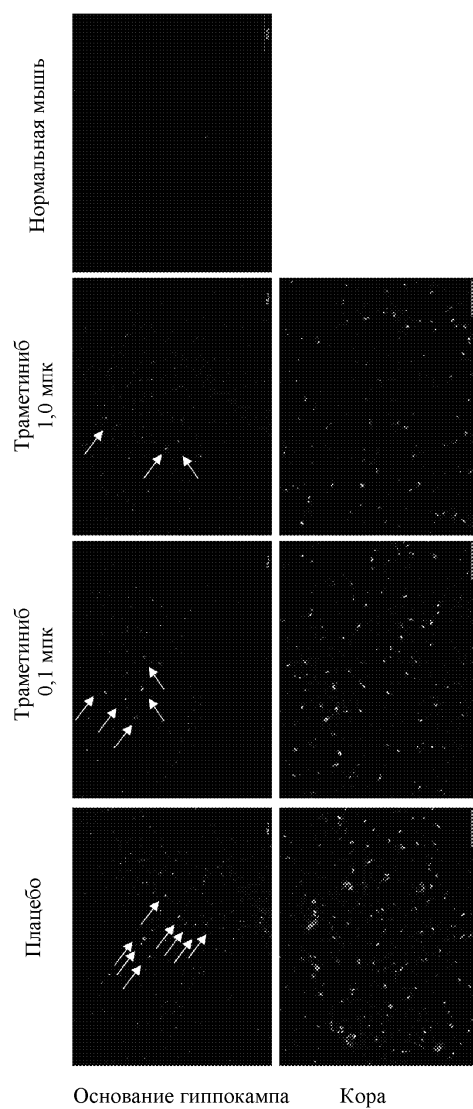
Фиг. 15



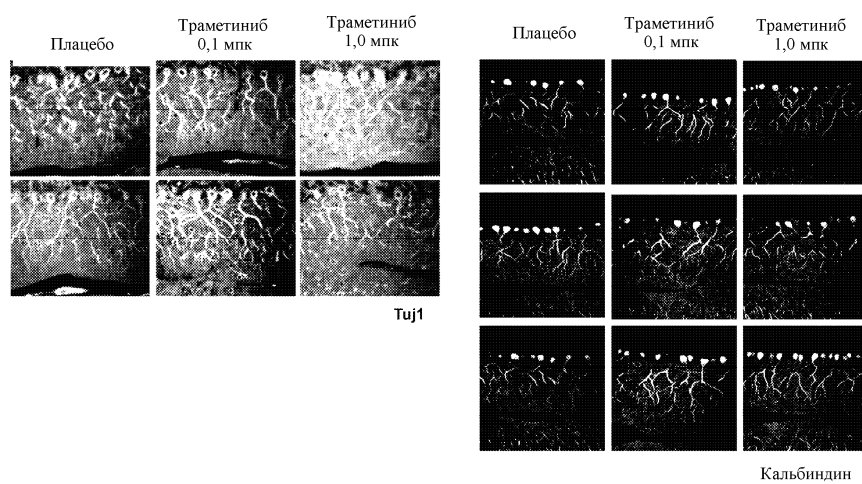
Фиг. 16a



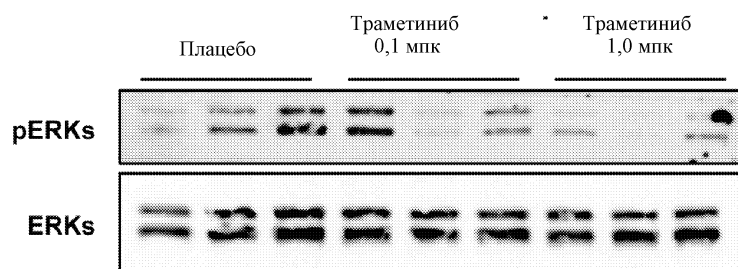
Фиг. 16b



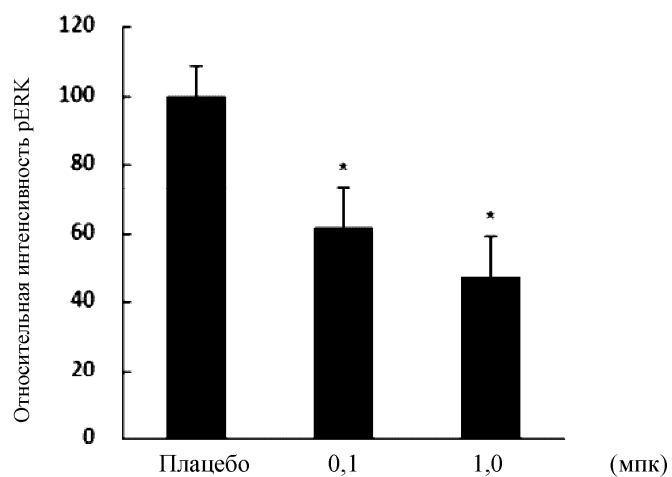
Фиг. 17



Фиг. 18

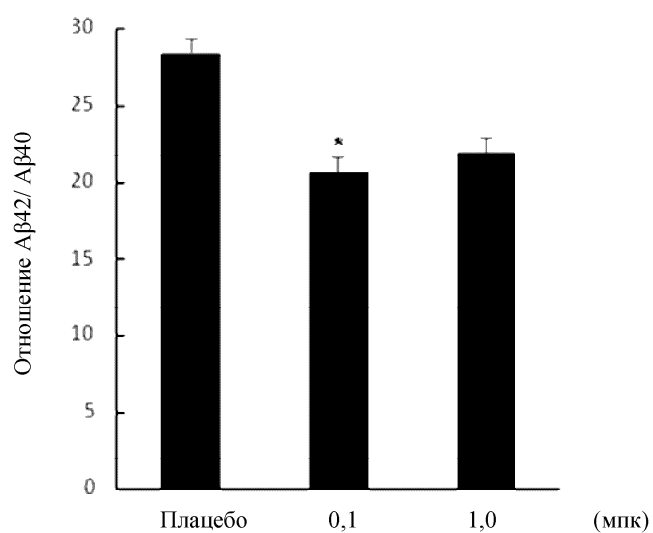


Фиг. 19а



5XFAD

Фиг. 19б



5XFAD

Фиг. 20

