(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202391811 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.12.13

(22) Дата подачи заявки
2022.01.05

(51) Int. Cl. ***A61K 38/17*** (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(54) БЕЛОК ЛЕКТИН ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(31) **202121000832**
(32) **2021.01.07**
(33) **IN**
(86) **PCT/IB2022/050056**
(87) **WO 2022/149068 2022.07.14**

(71) Заявитель:
ЮНИЧЕМ ЛАБОРАТОРИЕС ЛТД (IN)

(72) Изобретатель:
Ияппан Сарванакумар, Павар Дилип, Сазе Дхананджай (IN)

(74) Представитель:
Сагитов В.Р. (RU)

(57) Изобретение относится к белку лектину для лечения и профилактики нейродегенеративных заболеваний. Изобретение также относится к рекомбинантному лектиновому белку, полученному из лектина Sclerotium rolfsii, имеющему аминокислотную последовательность, на 60% гомологичную с последовательностью с идентификационным номером 4, для лечения и профилактики нейродегенеративных заболеваний. Изобретение конкретно относится к лектиновому белку и его вариантам, полученным из лектина Sclerotium rolfsii, имеющего последовательность, на 60% гомологичную с последовательностью с идентификационным номером 4, для лечения, профилактики болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, деменции и симптомов деменции.

202391811 A1

202391811 A1

БЕЛОК ЛЕКТИН ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Область техники

Настоящее изобретение относится к белку для лечения и профилактики нейродегенеративных заболеваний.

Уровень техники

Под нейродегенеративным заболеванием понимают состояние, вызывающее прогрессирующее необратимое повреждение нервной системы. Как следствие, нейродегенеративное заболевание приводит к атаксии или деменции. Патогенез нейродегенеративных заболеваний характеризуется внеклеточным и межклеточным отложением бета-амилоидов (Aβ) и гиперфосфорилированием тау-белка, приводящим к образованию бляшек и нейрофибриллярных клубков соответственно, а также к окислительному стрессу и воспалению нервной системы; посттрансляционная модификация α-синуклеина, такая как фосфорилирование, убиквитинирование и нитрование, широко вовлечена в процесс агрегации α-синуклеина, что приводит к образованию телец Леви и гибели дофаминовых нейронов. Кроме того, любая аномалия любого из путей, в том числе: внутриклеточный механизм (например, апоптоз, аутофагия, митохондриальная дисфункция, окислительное повреждение и восстановление ДНК, убиквитин-протеасомная система); локальная тканевая среда (в частности, клеточная адгезия, эндоцитоз, нейротрансмиссия, прионы и передаваемые факторы); системная среда (воспаление и иммунная дисфункция, липид, метаболические эндокринные факторы, сосудистые изменения), развитие и старение (например, эпигенетические изменения, нейротрофические факторы, теломеры) и т.д., вызывает нейродегенеративное заболевание.

Деменцию определяют как когнитивное расстройство более чем в одной когнитивной области, характеризующееся потерей интеллектуальной способности в степени, достаточной для препятствования профессиональной деятельности, обычной социальной активности или межличностным отношениям при отсутствии выраженного помутнения состояния или с вовлечением моторки (Шанна и Сингх с соавт., 2010 г. Индийский фармакологический журнал, том: 42, выпуск: 3; стр. 164- 167). К вовлеченным в деменцию когнитивным областям относится речь (афазия), моторика (апраксия), агнозия (нарушение процесса узнавания) и управляющие функции (способность к

абстрактному мышлению, суждению и планированию) (Паррис М. Кидд; Альтернативная медицина, 2008, том 13 выпуск 2, стр. 85-I 15. 31 с.).

Существует множество типов деменции, в том числе болезнь Альцгеймера, сосудистая деменция и деменция с тельцами Леви, лобно-височная деменция и деменция, обусловленная болезнью Паркинсона, болезнь Хантингтона, деменция, обусловленная гидроцефалией, синдром Вернике-Корсакова и деменция при болезни Крейтцфельда-Якоба (Хазбенд А. и Уорсли А., 2006, Фармацевтический журнал, 277 (7426). стр. 579-582).

Наше стареющее общество сталкивается со значительным увеличением числа случаев возрастных нейродегенеративных заболеваний (Разалан с соавт. 2013; Гены и Геномика, том 35, стр. 425-440). Терапевтические и нетерапевтические подходы, в частности, изменение или вмешательства в образ жизни или правильное питание (Гурцит с соавт., 2019 Фронтальная нейробиология старения, 2019; 11: 369) являются доступными средствами для лечения нейродегенеративных заболеваний. В терапевтических подходах к лечению и профилактике нейродегенеративных заболеваний широко используются и одобрены такие терапевтические агенты, как ингибиторы холинэстеразы (галантамин, донепезил, ривастигмин), мембранин, истрадефиллин, агонисты допамина (прамипексол, апоморфин), леводопа/карбидопа, моноклональные антитела, например, даклизумаб , натализумаб, алемтузумаб и иммуномодуляторы, такие как терифлуномид. Эти лекарственные средства вызывают тяжелые побочные эффекты, в частности, судороги, тошноту, головокружение, брадикардию и падение, в том числе с летальным исходом.

Таким образом, существует необходимость в разработке новых сильнодействующих терапевтических средств, способных устранять нарушения обучения и памяти и восстанавливать нормальный уровень экспрессии фактора роста нервов (NGF) и ацетилхолинэстеразы (AChE) для защиты головного мозга от таких заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркинсона.

Лектины представляют собой углеводсвязывающий белок, широко распространенный в растениях, животных и микроорганизмах. Благодаря своим агглютинирующим свойствам лектины широко применяются в перспективных медицинских исследованиях. Терапевтический потенциал лектина при нейродегенеративных заболеваниях также хорошо изучен.

В патентной заявке США 20200017578 раскрыто применение лектина со специфичностью связывания по отношению к сиаловой кислоте, например агглютинина

Umax flavus (LFA), агглютинина Limulus polyphemus (LPA), агглютинина Paecilomyes japonica (PJA), агглютинина I омара или лектина Penaeus monodin, для лечения нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера.

В патенте США № 8916387 раскрыт способ профилактики, лечения и диагностики болезни Альцгеймера, основанный на профиле гликозилирования бета-амилоидов в биологических жидкостях и тканях. Лектины из омелы, *Maacka amurensis* и *Agrocybe cylindracea,* раскрыты как лекарственные или диагностические агенты для профилактики и лечения атрофии коры, потери нейронов, регион-специфичных отложений амилоида, нейритических бляшек и нейрофибриллярных клубков. Кроме того, раскрыто использование лектинов для лечения или профилактики заболевания, связанного с отложением бета-амилоидных бляшек, в частности, церебральной амилоидной ангиопатии и болезни Альцгеймера или ВИЧ-ассоциированных нейрокогнитивных заболеваний.

Тетранектин представляет собой человеческий гомотримерный белок 21 KD, относящийся к семейству лектинов С-типа. Обнаружилось, что уровень тетранектина в цереброспинальной жидкости резко снизился у пациентов с болезнью Паркинсона по сравнению со здоровыми участниками контрольной группы, и что тетранектин действует как нейропротекторный агент, ингибируя апоптоз и аутофагию при L-метил-4-фенилпиридин-индуцированной нейротоксичности (Цян Се с соавт. 2018 Всемирная нейрохирургия, том 122, стр. e375-e382).

Лечение нейродегенеративного заболевания с применением таких агентов, как синтетические препараты или пептиды, хорошо известно на уровне техники, причем в качестве мембранного агента связывания или доставки используют лектин. Информация о применении лектинов в качестве терапевтического агента для лечения и профилактики нейродегенеративных заболеваний очень ограничена. В основном в вышеуказанных исследованиях для лечения или профилактики неврологических заболеваний были изучены следующие лектины: лектины растительного происхождения, в частности, *maackia amurensis*, лектины животного происхождения, в частности, *Penaeus monodin-Limax flavus* (слизень садовый); *Limulus polyphemus*, а также грибковый лектин *Agrocybe cylindracea*.

Использование некоторых собственных лектинов в качестве агента связывания или доставки для активных фармацевтических ингредиентов известно, в том числе, для лечения нейродегенеративных заболеваний (например, US20070243132). Тем не менее, потенциал лектина как терапевтического агента для лечения или профилактики

нейродегенеративных заболеваний детально не изучен. Таким образом, существует необходимость в исследовании и идентификации сильнодействующего лектина, который устраняет когнитивные расстройства головного мозга и восстанавливает уровень экспрессии нейротрофических факторов и холинэстеразы, а также обеспечивает высокую терапевтическую эффективность в отношении нейродегенеративного заболевания.

Лектин *Sclerotiurn rolfsii* (SRL) представляет собой лектин, выделенный из склероциальных телец передающегося через почву фитопатогенного грибка *S. roulfsii*. SRL обладает специфичностью к антигену Томсена-Фриденрайха (TF) и антигену Tn. Антиген TF представляет собой дисахарид (GalβI → 3GalNAc-α-Ser/Thr), сверхэкспрессируемый на поверхности различных опухолевых клеток человека. Антиген Tn представляет собой моносахарид (GalNAc-α- Ser/Thr). В патентной заявке WO 2010/095143 раскрыты рекомбинантные варианты лектина Rec-2 и Rec-3, полученные из нативной SRL-последовательности путем замещения 3 или 5 аминокислот соответственно. Кристаллическая структура этих вариантов описана (Пеппа с соавт. Молекулы, 12 июня 2015 (20)6: 10848-65). В патентной заявке WO 2014/203261 раскрыт рекомбинантный вариант лектина, полученный из нативной SRL-последовательности путем замещения 12 аминокислот.

Цель изобретения

Задачей настоящего изобретения является разработка нового способа профилактики и лечения нейродегенеративного заболевания. Под новым способом понимают способ, предусматривающий применение нового терапевтически эффективного агента для профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний. Соответственно, задачей изобретения является разработка способа применения нового терапевтического агента в способе лечения и профилактики нейродегенеративных заболеваний, в котором новый терапевтический агент представляет собой рекомбинантный лектин.

Другой задачей изобретения является разработка рекомбинантного лектина для лечения и профилактики нейродегенеративного заболевания. Соответственно, задачей является разработка рекомбинантного лектина для лечения и профилактики вызывающих деменцию заболеваний.

Кроме того, задачей изобретения является разработка рекомбинантного лектина для лечения и профилактики заболеваний Альцгеймера и Паркинсона.

Также задачей изобретения является разработка композиции, содержащей рекомбинантный лектин, для лечения и профилактики нейродегенеративного заболевания. Использование композиции, содержащей рекомбинантный лектин, для лечения и профилактики нейродегенеративного заболевания также является задачей настоящего изобретения.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к рекомбинантному лектину, предназначенному для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания, причем рекомбинантный лектин получен из лектина *Sclerotium rolfsii*.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания, содержащей терапевтически эффективное количество рекомбинантного лектина, полученного из лектина *Sclerotium rolfsii*, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания, предусматривающему введение субъекту эффективного количества рекомбинантного лектина, полученного из лектина *Sclerotium rolfsii*.

Настоящее изобретение относится к использованию рекомбинантного лектина, полученного из лектина *Sclerotium rolfsii*, для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному лектину, предназначенному для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта, причем рекомбинантный лектин получен из лектина *Sclerotium rolfsii*, и причем нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство или связанные с деменцией симптомы.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному лектину, предназначенному для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта, причем рекомбинантный лектин получен из лектина *Sclerotium rolfsii*, и причем нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Хантингтона, прионные заболевания, такие как болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменцию с тельцами Леви, болезнь диффузных телец Леви, полиглутаминовые (polyQ) заболевания с экспансией повторов, дегенеративные заболевания головного мозга, спинальную и бульбарную

мышечную атрофию, атаксию, болезнь Пика, первичную прогрессирующую афазию, множественную системную атрофию, пантотенаткиназа-ассоциированную нейродегенерацию, дегенеративные заболевания спинного мозга/двигательных нейронов, склероз гиппокампа, кортикобазальную дегенерацию, болезнь Баттена.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному лектину для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта, причем рекомбинантный лектин получен из лектина *Sclerotium rolfsii*, и причем нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь двигательных нейронов, например боковой амиотрофический склероз (также называемый болезнью Лу Герига), первичный боковой склероз, прогрессирующий бульбарный паралич, вариант бокового амиотрофического склероза, псевдобульбарный паралич или наследственную спастическую параплегию.

В другом аспекте настоящим изобретением предложен способ лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта, предусматривающий введение субъекту эффективного количества рекомбинантного лектина, полученного из лектина *Sclerotium rolfsii*, и причем нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство или связанные с деменцией симптомы.

В следующем аспекте настоящим изобретением предложен способ лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта, предусматривающий введение субъекту эффективного количества рекомбинантного лектина, полученного из лектина *Sclerotium rolfsii*, причем нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Хантингтона, прионные заболевания, такие как болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменцию с тельцами Леви, болезнь диффузных телец Леви, полиглутаминовые (polyQ) заболевания с экспансией повторов, дегенеративные заболевания головного мозга, спинальную и бульбарную мышечную атрофию, атаксию, болезнь Пика, первичную прогрессирующую афазию, множественную системную атрофию, пантотенаткиназа-ассоциированную нейродегенерацию, дегенеративные заболевания спинного мозга/двигательных нейронов, склероз гиппокампа, кортикобазальную дегенерацию, болезнь Баттена.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта, причем способ предусматривает введение субъекту эффективного количества рекомбинантного лектина, полученного из лектина *Sclerotium rolfsii*, и причем нейродегенеративное заболевание представляет

собой болезнь двигательных нейронов, например боковой амиотрофический склероз (также называемый болезнью Лу Герига), первичный боковой склероз, прогрессирующий бульбарный паралич, вариант бокового амиотрофического склероза, псевдобульбарный паралич или наследственную спастическую параплегию.

В другом аспекте настоящим изобретением предложена фармацевтическая композиция для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания, содержащая терапевтически эффективное количество рекомбинантного лектина, полученного из лектина *Sclerotium rolfsii*, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, причем нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство или связанные с деменцией симптомы.

В следующем аспекте настоящим изобретением предложена фармацевтическая композиция для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания, содержащая терапевтически эффективное количество рекомбинантного лектина, полученного из лектина *Sclerotium rolfsii*, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, причем нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Хантингтона, прионные заболевания, такие как болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменцию с тельцами Леви, болезнь диффузных телец Леви, полиглутаминовые (polyQ) заболевания с экспансией повторов, дегенеративные заболевания головного мозга, спинальную и бульбарную мышечную атрофию, атаксию, болезнь Пика, первичную прогрессирующую афазию, множественную системную атрофию, пантотенаткиназа-ассоциированную нейродегенерацию, дегенеративные заболевания спинного мозга/двигательных нейронов, склероз гиппокампа, кортикобазальную дегенерацию, болезнь Баттена.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания, содержащей терапевтически эффективное количество рекомбинантного лектина, полученного из лектина *Sclerotium rolfsii*, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, причем нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь двигательных нейронов, например боковой амиотрофический склероз (также называемый болезнью Лу Герига), первичный боковой склероз, прогрессирующий бульбарный паралич, вариант бокового амиотрофического склероза, псевдобульбарный паралич или наследственную спастическую параплегию.

В следующем аспекте настоящего изобретения предложено использование рекомбинантного лектина для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта, причем рекомбинантный лектин получен из лектина *Sclerotium rolfsii*, и причем нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство или связанные с деменцией симптомы.

В следующем аспекте предложено использование рекомбинантного лектина для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта, причем рекомбинантный лектин получен из лектина *Sclerotium rolfsii*, и причем нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Хантингтона, прионные заболевания, такие как болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменцию с тельцами Леви, болезнь диффузных телец Леви, полиглутаминовые (polyQ) заболевания с экспансией повторов, дегенеративные заболевания головного мозга, спинальную и бульбарную мышечную атрофию, атаксию, болезнь Пика, первичную прогрессирующую афазию, множественную системную атрофию, пантотенаткиназа-ассоциированную нейродегенерацию, дегенеративные заболевания спинного мозга/двигательных нейронов, склероз гиппокампа, кортикобазальную дегенерацию, болезнь Баттена.

В другом аспекте предложено использование рекомбинантного лектина для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта, причем рекомбинантный лектин получен из лектина *Sclerotium rolfsii*, и причем нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь двигательных нейронов, например боковой амиотрофический склероз (также называемый болезнью Лу Герига), первичный боковой склероз, прогрессирующий бульбарный паралич, вариант бокового амиотрофического склероза, псевдобульбарный паралич или наследственную спастическую параплегию.

Согласно одному из аспектов изобретения предложен способ индуцирования роста нейронов, предусматривающий введение субъекту эффективного количества рекомбинантного лектина, полученного из лектина *Sclerotium rolfsii*.

Согласно предыдущим аспектам изобретения, рекомбинантный лектин содержит одну из следующих аминокислотных последовательностей

i) с идентификационным номером 4 или

ii) аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 70% идентичностью с последовательностью с идентификационным номером 4.

Согласно предыдущим аспектам изобретения, рекомбинантный лектин содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 70%, 75%,80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичностью с последовательностью с идентификационным номером 4.

Согласно предыдущим аспектам изобретения, эффективное количество рекомбинантного лектина, вводимого для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания, составляет от 0,01 мг/кг до 1000 мг/кг массы тела субъекта.

Согласно определенному аспекту изобретения, предложен рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером: 1, идентификационным номером: 2, идентификационным номером: 3 или идентификационным номером: 4 для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания.

Согласно другому определенному аспекту изобретения предложен способ лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания, предусматривающий введение субъекту эффективного количества рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером: 1, идентификационным номером: 2, идентификационным номером: 3 или идентификационным номером: 4.

Согласно другому определенному аспекту изобретения предложена композиция для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта, причем композиция содержит терапевтически эффективное количество рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером: 1, идентификационным номером: 2, идентификационным номером: 3 или идентификационным номером: 4.

Согласно другому определенному аспекту настоящего изобретения предложено использование рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером: 1, идентификационным номером: 2, идентификационным номером: 3 или идентификационным номером: 4 для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта.

Согласно другому определенному аспекту настоящего изобретения предложено применение композиции, содержащей терапевтически эффективное количество рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером: 1, идентификационным номером: 2, идентификационным номером: 3 или

идентификационным номером: 4 для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта.

В определенном аспекте настоящего изобретения предложен рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером: 1, идентификационным номером: 2, идентификационным номером: 3 или идентификационным номером: 4 для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта, в котором нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство или связанные с деменцией симптомы.

В другом определенном аспекте изобретения предложен способ лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта, предусматривающий введение субъекту эффективного количества рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером: 1, идентификационным номером: 2, идентификационным номером: 3 или идентификационным номером: 4, причем нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство или связанные с деменцией симптомы.

В другом определенном аспекте изобретения предложена фармацевтическая композиция для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания, содержащая терапевтически эффективное количество рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером: 1, идентификационным номером: 2, идентификационным номером: 3 или идентификационным номером: 4, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, причем нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство или связанные с деменцией симптомы.

В другом определенном аспекте настоящего изобретения предложено использование рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером: 1, идентификационным номером: 2, идентификационным номером: 3 или идентификационным номером: 4 для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта, в котором нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство или связанные с деменцией симптомы.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ индуцирования роста нейронов, предусматривающий введение эффективного количества рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером: 1, идентификационным номером: 2, идентификационным номером: 3 или идентификационным номером: 4.

Определение

В настоящем документе под «лектином» понимают углеводсвязывающий белок.

В настоящем документе под «белком» понимают полимер аминокислотных остатков.

В настоящем документе под «аминокислотой» понимают природные и синтетические аминокислоты, а также аналоги и миметики аминокислот, выполняющие функции, аналогичные природным аминокислотам. Природные аминокислоты кодируются генетическим кодом и представляют собой протеиногенные аминокислоты. К природным аминокислотам также относятся аминокислоты, модифицированные после трансляции в клетках. К синтетическим аминокислотам относятся неканонические аминокислоты, в частности, селеноцистеин и пирролизин. Как правило, синтетические аминокислоты не относятся к протеиногенным аминокислотам.

Под «нейронными» или «нервными клетками» понимают клетки, находящиеся в головном мозге, центральной и периферийной нервной системе, в том числе, нервные клетки, глиальные клетки, олигодендроциты, клетки микроглии или нейральные стволовые клетки.

Термины «заболевание» или «расстройство» являются синонимами, если не указано иное. Под «заболеванием» понимают состояние здоровья животного, при котором оно не может поддерживать гомеостаз, и при котором, если течение заболевания не улучшается, состояние здоровья животного продолжает ухудшаться. Под «расстройством» у животного понимают состояние здоровья, при котором животное способно поддерживать гомеостаз, но это состояние менее благоприятно, чем оно было бы в отсутствие расстройства.

Термины «заболевание» или «расстройство» используются как синонимы и могут также относиться к любому изменению состояния организма или некоторых органов, прерывающему или нарушающему выполнение функций и/или вызывающему такие симптомы, как дискомфорт, дисфункция, стресс или даже летальный исход для больного или контактировавшего с ним человека. Заболевание или расстройство может также

относиться к плохому настроению, недомоганию, недугу, болезни, расстройству, болезни, патологии, жалобе, хвори или расположенности.

Под «нейродегенеративным заболеванием» понимают как нейродегенеративное заболевание, так и расстройство, и определяют его как постепенную и прогрессирующую потерю функции или структуры нервной ткани и/или функции нервной ткани. Это приводит к дальнейшему ухудшению состояния и даже гибели нервных клеток. Вероятными причинами этого заболевания или расстройства могут быть старение, генетические отклонения или воздействие токсинов, химических веществ или вирусов. Иногда причиной может быть патологическое состояние, например, алкоголизм, опухоль или инсульт. Обычно нейродегенеративные заболевания вызывают проблемы с активностью организма, в частности, движением (атаксия), умственной работой (деменция), равновесием, речью и дыханием. В определенных случаях они могут также влиять на работу сердца. Нейродегенеративное заболевание согласно изобретению может представлять собой, в частности, состояния, при которых происходит дисфункция и/или дегенерация нейронов. Неограничивающими примерами таких заболеваний являются болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, деменция или симптомы деменции, вызывающие более чем одно из перечисленных ниже нейродегенеративных заболеваний, лобно-височная деменция, в том числе вызванная мутациями програнулина или тау-белка (например, програнулин-дефицитная лобно-височная лобарная дегенерация), лобно-височная деменция с миопатией с тельцами включения (1BMPFD), лобно-височная деменция с болезнью двигательных нейронов, боковой амиотрофический склероз (также называемый болезнью Лу Герига), боковой амиотрофический склероз с деменцией, первичный боковой склероз, спинномозговая мышечная атрофия, рассеянный склероз, прионные заболевания, в частности, болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменцию с тельцами Леви, болезнь диффузных телец Леви, полиглутаминовые (polyQ) заболевания с экспансией повторов, болезни экспансии тринуклеотидных повторов, дегенеративные заболевания головного мозга, пресенильная деменция, возрастная деменция, паркинсонизм, связанный с хромосомой 17 (FTDP-17), прогрессирующий надъядерный паралич, прогрессирующий бульбарный паралич, псевдобульбарный паралич, спинальная и бульбарная мышечная атрофия, атаксия Фридрейха, мозжечковая атаксия, болезнь Пика, первичная прогрессирующая афазия, кортикобазальная деменция, ВИЧ-ассоциированная деменция, болезнь Паркинсона с деменцией, деменция с тельцами Леви, множественная системная атрофия, спинальная мышечная атрофия, например, болезнь Верднига-Гоффманна, болезнь Кугельберга-Веландера или врожденная спинальная

мышечная атрофия с артрогрипозом, прогрессирующая спинобульбарная мышечная атрофия типа болезни Кеннеди, спиноцеребеллярная атаксия, пантотенаткиназа-ассоциированная нейродегенерация, дегенеративное заболевание спинного мозга/двигательных нейронов, поражение верхнего двигательного нейрона, поражение нижнего двигательного нейрона, синдром Халлервордена-Шпатца, боковой амиотрофический склероз-паркинсонизм-деменция, деменция Гуама-Паркинсона, склероз гиппокампа, кортикобазальная дегенерация, болезнь Александера, болезнь Аплера, болезнь Краббе, нейроборрелиоз, нейросифилис, болезнь Сандхоффа, болезнь Шильдера, болезнь Баттена, синдром Коккейна, синдром Кернса-Сейра, синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, наследственный спастический парапарез, синдром Ли, демиелинизирующие заболевания, другие заболевания мозга, такие как биполярное расстройство, эпилепсия, шизофрения, депрессия, мания, аутизм, СДВГ, травмы мозга и инсульт.

Специалисту в данной области техники очевидно, что «нейродегенеративные заболевания», перечисленные выше, в очень широком смысле могут быть отнесены к категории «деменции», в которую входят, например, такие заболевания, как болезнь Альцгеймера, лобно-височная деменция (болезнь Пика), деменция с тельцами Леви, деменция с нейрофибриллярными клубками и связанные с деменцией симптомы, болезнь Крейтцфельда-Якоба (клинические проявления схожи с болезнью Альцгеймера), склероз гиппокампа, болезнь Шильдера, сосудистая (мультиинфарктная) деменция, болезнь Хантингтона, болезнь Паркинсона, связанная с болезнью Альцгеймера, болезнь диффузных телец Леви; болезнь Паркинсона и паркинсоноподобная болезнь, такая как прогрессирующий надъядерный паралич, множественная системная атрофия и кортикобазальная дегенерация; «заболевание двигательных нейронов» может включать заболевания, поражающие верхние/нижние зоны двигательных нейронов, такие как боковой амиотрофический склероз, первичный боковой склероз, а также прогрессирующий бульбарный паралич, вариант бокового амиотрофического склероза, псевдобульбарный паралич и наследственная спастическая параплегия. Эти категории могут быть основаны на причине или механизме заболевания, органе, части тела или функции организма, на которые влияет это заболевание, или взаимосвязи между двумя заболеваниями.

Термины «нейропротекторный» или «цитопротекторный» используются как синонимы и относятся к защите или предотвращению аномалий нервных клеток, вызванных старением, генетическими аномалиями и внешними факторами, такими как

нейротоксин, а также восстановлением правильного или нормального функционирования нейронов.

Выражения «терапевтический агент» или «терапевтически эффективный агент», используемые в настоящем документе как синонимы, означают агент, вводимый субъекту для уменьшения или устранения одного или нескольких симптомов заболевания или расстройства, причем агент согласно настоящему изобретению представляет собой рекомбинантный лектин, а заболевание или расстройство представляет собой нейродегенеративное заболевание.

«Рост нейронов» или «нейрит», используемые в данном документе как синонимы, означают выступ из тела клетки нейрона, содержащий, например, аксон или дендрит.

В настоящем документе под «модуляцией» понимают изменение или регулировку физиологических механизмов (например, мембранного потенциала) органеллы.

В настоящем документе под «терапевтически эффективным количеством» понимают количество, достаточное для получения желаемого терапевтического эффекта, причем терапевтический эффект подразумевает эффективность лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания или заболеваний. Эффект заключается в избавлении субъекта от заболевания или заболеваний либо в контроле или уменьшении симптомов заболевания или заболеваний, либо в задержке начала или прогрессирования заболевания или заболеваний. Терапевтически эффективное количество может быть введено за одно или несколько введений. В целях настоящего изобретения терапевтически эффективным количеством рекомбинантного белка считают количество, достаточное для временного облегчения, улучшения, стабилизации, регрессии, предотвращения, замедления или задержки прогрессирования заболевания.

Термины «гомология» или «гомологический», используемые в настоящем документе, относятся к двум или более указанным объектам, характеризующимся, по меньшей мере, частичной идентичностью в данной области или части. Области, зоны или домены гомологии или идентичности относятся к части двух или более упомянутых объектов, которые имеют гомогенную или одинаковую форму. Таким образом, если две последовательности идентичны в одной или нескольких зонах последовательности, они имеют общую идентичность в этих зонах.

По существу гомология относится к структурно или функционально сохраненной молекуле, которая имеет или вероятно будет иметь, по меньшей мере, частичную структуру или функцию одной или нескольких структур или функций (например,

биологической функции или активности) эталонной молекулы, или применимую/соответствующую зону или часть эталонной молекулы, с которой она имеет общую гомологию.

В одном из вариантов осуществления изобретения процент «гомологии» между двумя последовательностями определяют с помощью алгоритма BLASTP с параметрами по умолчанию (Альтшуль с соавт. Обзор нуклеиновых кислот, 1 сентября 1997; 25(17):3389-402). В частности, алгоритм BLAST можно найти по следующему адресу: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. В альтернативном варианте осуществления изобретения для глобального выравнивания последовательностей процент гомологии между двумя последовательностями определяют с помощью алгоритма EMBOSS Needle с параметрами по умолчанию. В частности, алгоритм EMBOSS Needle можно найти по следующему адресу: https://www.ebi.ac.uk/'i'ools/psa/emboss_needle/.

Если не указано иное, термин «гомология» в настоящем описании используется как синоним термина «идентичность последовательностей».

Описание чертежей и таблиц

Фиг. 1. Графическое изображение влияния последовательности с идентификационным номером: 1 на образование нейритов в нервных клетках (pc 12) в базовой модели

Фиг. 2. Графическое изображение влияния последовательности с идентификационным номером: 1 на образование нейритов в нервных клетках (pc12) в отношении индуцированного MPP+ поражения

Фиг. 3: Гистопатологические изображения (окрашивание гематоксилином и эозином; 100X)

Таблица 1. Цитопротекторное действие последовательности с идентификационным номером 1 на нервные клетки (SH-SY5Y) в отношении индуцированного нейротоксином (MPP+) поражения

Таблица 2. Антиапоптотическое действие последовательности с идентификационным номером 1 на нервные клетки (SH-SY5Y) посредством восстановления трансмембранного потенциала митохондрий в отношении поражения MPP+ йодидом

Таблица 3. Антиапоптотическое действие последовательности с идентификационным номером 1 на нервные клетки (SH-SY5Y) посредством уменьшения аннексин-положительной популяции клеток в отношении поражения MPP+ йодидом

Таблица 4. Антиапоптотическое действие последовательности с идентификационным номером 1 на нервные клетки (SH-SY5Y) посредством уменьшения популяции вспомогательных (G0/G1) клеток в отношении индуцированного MPP+ поражения

Таблица 5. Влияние последовательности с идентификационным номером 1 на образование нейритов в нервных клетках (pc 12) в базовой модели

Таблица 6. Защитное действие последовательности с идентификационным номером 1 на образование нейритов в нервных клетках (pc 12) в отношении индуцированного MPP+ поражения

Таблица 7. Действие последовательности с идентификационным номером 1 на экспрессию биомаркеров, связанных с болезнью Альцгеймера, в линии нервных клеток (SH-SY5Y)

Таблица 8. Действие последовательности с идентификационным номером 1 на экспрессию биомаркеров, связанных с болезнью Паркинсона, в линии нервных клеток (SH-SY5Y)

Таблица 9. Распределение животных

Таблица 10. Среднее время задержки передачи (сек)

Таблица 11. Действие последовательности с идентификационным номером 1 на фактор роста нервов головного мозга (пг/мл)

Таблица 12. Действие последовательности с идентификационным номером 1 на ацетилхолинэстеразу головного мозга (мЕд/мл)

Таблица 13. Действие последовательности с идентификационным номером 1 на ФНО-альфа головного мозга (пг/мл)

Таблица 14. Гистопатология (средний балл)

Представление последовательности:

последовательность с идентификационным номером 4 представляет собой нативную аминокислотную последовательность лектина *S. rolfsii* (последовательность с идентификационным номером 1 в WO2010/095143) следующего вида:

TYKITVRVYQTNPNAFFHPVEK TV WKYANGGTWTIIDDQHVLTMGGSG TSGTLRFHADNGESFTATFGVFINYKRWCDIVTNLAADETGMVINQQYYS QKNREEARF,RQI.SNYEVKNAKGRNFEIVYTEAEGNDLHANLIIGs

последовательность с идентификационным номером 1 представляет собой вариант аминокислотной последовательности лектина *S. rolfsii* (Rec-2 в WO2010/095143) следующего вида:

YKITVRVYQTNPDAFFFIPVEKTVWKYANGG'I'WTITDDQHVLTMGGSG
TSGTLRFHADNGESFTATFGVHNYKRWCDIVTNLAADETGMVINQQYYS
QKNREEARERQLSNYQVKNAKGRNFQIVYTEAEGNDLHANLIIG

Последовательность с идентификационным номером 2 представляет собой вариант аминокислотной последовательности лектина *S. rolfsii* (Rec-3 в WO 2010/095143) следующего вида:

VYKITVRVYQTNPDAF.FHPVEKTVWKYANGGTWSTTDQHVLTMGGSG
TSGTLRFHADNGESFTATFGVFFNYKRWCDIVTNLAADETGMVINQQYYS
QKNREEARERQLSNYQVKNAKGRNFQIVYTEAEGNDLHANHJIG

Последовательность с идентификационным номером 3 представляет собой вариант аминокислотной последовательности лектина *S. rolfsii* (согласно WO 2014/203261) следующего вида:

VYKTTVRVYQINPDAFFHFVEKTWKYADGGTWSTTDDQHVLTMGGSGTSGTLRFHADNGESFTATFGV
HDYKRWCDIVTDAADETGMVINQEYYSEKDREEARERQNSNYEVKDAKGRNFEIVYTEAEGNDLHADL
IIG

Подробное раскрытие настоящего изобретения

В первом аспекте настоящим изобретением предложен рекомбинантный лектин, предназначенный для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания, причем рекомбинантный лектин получен из лектина *sclerotium rolfsii (S. rolfsii)*.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения лектин получен из группы, в которую входят, в частности, грибки и растения. В некоторых вариантах осуществления изобретения лектин получают из передающегося через почву фитопатогенного грибка, например, *S. rolfsii*.

Под «производным от» понимают, что лектин может быть выделен из своей нативной среды или может содержать аминокислотную последовательность, идентичную или подобную нативной последовательности.

Лектин может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с нативной последовательностью. Нативный лектин может быть выделен из *S. rolfsii*.

Лектин может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% гомологию с последовательностью с идентификационным номером: 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения лектин может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 60% гомологию с последовательностью с идентификационным номером: 1, 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с последовательностью с идентификационным номером: 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с последовательностью с идентификационным номером 1, 2 или 3.

Последовательность с идентификационным номером 1 имеет 98% гомологию с последовательностью с идентификационным номером 4. Последовательность с идентификационным номером 2 имеет 96% гомологию с последовательностью с идентификационным номером 4. Последовательность с идентификационным номером 3 имеет 91 % гомологию с последовательностью с идентификационным номером: 4.

Согласно любому из предыдущих аспектов, рекомбинантный лектин представляет собой модифицированный лектин (т.е. рекомбинантный лектин, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную модификацию в молекуле, предпочтительно в сайтах связывания углеводов), как определено в патентной заявке W02020/044296, содержание которой включено в настоящую заявку путем отсылки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения лектин содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы последовательностей с идентификационными номерами 1, 2 и 3.

Согласно определенному аспекту настоящего изобретения лектин согласно настоящему изобретению, предпочтительно, синтезируют с применением рекомбинантной технологии. Способы получения рекомбинантных белков хорошо известны специалистам в данной области техники. В одном из вариантов осуществления изобретения клонированные нуклеотидные последовательности кодируют модифицированные лектины, близкие к аминокислотной последовательности нативных лектинов, но обладающие альтернативными свойствами. В альтернативном варианте нуклеотидные последовательности, кодирующие рекомбинантный лектин, могут быть синтезированы с помощью химических или рекомбинантных средств и экспрессированы в подходящем хозяине с получением рекомбинантных белков. К подходящим клеткам-хозяевам

относятся прокариотические клетки, причем как низшие, так и высшие эукариотические клетки. Введение рекомбинантной молекулы в клетки-хозяева можно осуществлять способами, известными в данной области техники. В примерном варианте осуществления настоящего изобретения подходящим хозяином является микробная клетка. В предпочтительном варианте осуществления изобретения микробная клетка представляет собой, в частности, клетку дрожжей, кишечной палочки, линию клеток насекомого или линию клеток млекопитающего. Кроме того, рекомбинантные белки могут быть получены путем изоляции в качестве продукта экспрессии из рекомбинантного хозяина. В одном из вариантов осуществления изобретения рекомбинантные белки согласно настоящему изобретению очищают обычными способами, обычно хроматографическими способами. Например, рекомбинантный лектин согласно настоящему изобретению может быть получен способами, раскрытыми в предыдущей заявке WO/2020/074977 заявителя.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения молекулярная масса рекомбинантных лектинов, определенная методами SDS-PAGE и масс-спектрометрии, составляет примерно 16000 дальтон.

В одном из вариантов осуществления изобретения предложен рекомбинантный лектин для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания, причем лечение предусматривает уменьшение, устранение, ослабление или облегчение признаков и симптомов нейродегенеративного заболевания, а профилактика предусматривает подавление, контроль или задержку развития или начала нейродегенеративного заболевания или связанных с заболеванием симптомов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нейродегенеративное заболевание представляет собой заболевание или расстройство, вызванное дегенерацией нейронов или нервных клеток в головном мозге или центральной нервной системе и вокруг них.

Нейродегенеративное заболевание может быть обусловлено повышением или снижением уровня таких биомаркеров, как ICAM-1/CD54, дофамин, серотонин, SI00b, Park7/DJ-I, Calbiudin D, B-NGF, RAGE, MPO, Fan, GDNF, α-синуклеин, бета-амилоид, ацетилин-холинэстераза, периостин, ангиостатинпревращающий фермент, тромбоспорин-1, бета-амилоид плазмы, VE-кадхерин, LGALS3BP (растворимый 3-связывающий белок, связывающий галактозид лектина), ФНО-α (фактор некроза опухоли - альфа). Повышение или снижение нормальных уровней этих биомаркеров может свидетельствовать о начале или наличии нейродегенеративного заболевания в исследуемом организме.

Например, S100b – это кальций-связывающий белок, который играет существенную роль в патогенезе болезни Паркинсона. Нормальный уровень S100b у здорового человека без болезни Паркинсона составляет от 10 до 150 пг/мл, в то время как у человека, страдающего болезнью Паркинсона, его количество составляет от 200 пг/мл и выше. Таким образом, человек, страдающий болезнью Паркинсона, будет иметь повышенный уровень S100b.

Согласно одному из аспектов изобретения, рекомбинантный лектин способен снижать уровни S100b.

Аналогичным образом, согласно одному из аспектов, рекомбинантный лектин согласно настоящему изобретению способен модулировать уровни биомаркеров в соответствии с требованиями клеток организма и, тем самым, лечить или предотвращать прогрессирование заболевания.

В одном из аспектов изобретения перечисленные выше маркеры могут быть причиной одного или нескольких нейродегенеративных заболеваний. Рекомбинантный лектин согласно настоящему изобретению способен модулировать уровни этих биомаркеров и, таким образом, будет эффективен в контроле прогрессирования или начала одного или нескольких заболеваний.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером 1, способствует нормализации уровня биомаркеров допамина и серотонина в клетках, поврежденных нейротоксином, восстанавливая тем самым когнитивный потенциал головного мозга. Как допамин, так и серотонин способны передавать сигналы нервным клеткам и отвечают за поддержание цикла сна, мышечного сокращения, функций настроения, моторных, вегетативных функций. Под когнитивным потенциалом понимают состояние здоровья головного мозга, тканей и кровоснабжения в целом, а также их способность к надлежащему функционированию в различных условиях. Хороший когнитивный потенциал необходим головному мозгу для осуществления всех психических процессов, совместно известных как познание, включая, в частности, обучение, интуицию, суждения, речь, внимание, бдительность, концентрацию и память (как долгосрочную, так и краткосрочную). Плохой когнитивный потенциал, обусловленный старением, заболеваниями и/или другими когнитивными нарушениями, снижает способность головного мозга к правильному функционированию, что приводит к значительному снижению когнитивной функции и эффективности. Некоторые из когнитивных расстройств представляют собой паническое расстройство, обсессивно-компульсивное

расстройство, синдром дефицита внимания с гиперактивностью, сезонное аффективное расстройство, нарушение сна, потерю или ослабление памяти, стресс и подавленное состояние. В процессе патогенеза болезни Паркинсона нормальный синтез серотонина и дофамина существенно нарушается, что приводит к когнитивным расстройствам.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания, предусматривающий введение субъекту эффективного количества рекомбинантного лектина, полученного из лектина *Sclerotium rolfsii.*

Субъект может представлять собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект является человеком. В частности, субъект может представлять собой человека, страдающего нейродегенеративным заболеванием или нуждающегося в профилактике такого заболевания.

В одном из вариантов осуществления изобретения способ лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания предусматривает введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного лектина, полученного из лектина *Sclerotium rolfsii*, причем терапевтически эффективное количество лектина может составлять от 0,01 до 1000 мг/кг массы субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения диапазон доз может составлять от 0,1 до 500 мг/кг, или от 0,5 до 100 мг/кг, или от 1 до 50 мг/кг. Специалист в данной области техники сможет определить количество вводимого лектина в соответствии с характером подлежащего лечению состояния и субъекта.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рекомбинантный лектин согласно настоящему изобретению можно вводить как есть или в форме фармацевтической композиции.

Таким образом, настоящим изобретением также предложена фармацевтическая композиция для лечения или профилактики нейродегенеративных заболеваний, содержащая рекомбинантный лектин, полученный из лектина *sclerotium rolfsii*, и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества. В качестве примеров вспомогательных веществ можно назвать стерилизованную воду, физиологический раствор и/или фармацевтически приемлемый буфер.

Композиция может дополнительно содержать стабилизирующие белок агенты, полимеры, сжижающие агенты, криопротекторы, лиопротекторы, объёмообразующие агенты, разбавители или их смеси. Композиция может содержать вспомогательные

вещества, перечисленные в также находящейся на рассмотрении патентной заявке 201921027358 заявителя, содержание которой полностью включено в настоящую заявку путем отсылки.

Введение лектина или композиции может быть осуществлено любым подходящим путем, известным специалисту в данной области техники, включая, в частности, инъекцию (в том числе внутривенную (болюс или инфузия), внутриартериальную, внутрибрюшинную, подкожную (болюс или инфузия), внутрижелудочковую, внутримышечную или субарахноидальную), пероральный прием (например, в виде таблетки, геля, пастилки или жидкости), ингаляцию, местное введение, через слизистую оболочку (например, слизистую оболочку полости рта, носа или прямой кишки), спрея , таблетки, трансдермального пластыря, подкожного импланта или суппозитория.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лектин (например, лектин, содержащий аминокислотную последовательность с идентификационным номером 1, 2, 3 или 4), или фармацевтическую композицию, раскрытую в настоящей заявке, вводят субъекту энтерально, парентерально или местно. Лектин или фармацевтическую композицию можно вводить в виде твердой лекарственной формы (например, таблетки или капсулы), лиофилизированного порошка, жидкости (например, раствора или суспензии), мягкой или любой иной формы, известной специалисту в данной области техники. Лектин или фармацевтическую композицию можно вводить субъекту путем введения раствора или суспензии внутривенно, внутримышечно, внутрибрюшинно, подкожно или внутрикожно, путем депо-инъекции, интратекально, трансдермально, сублингвально, перорально, местно или ингаляционно.

Как очевидно специалисту в данной области техники, подходящая форма композиции может определяться путем введения композиции. Поэтому подходящая форма композиции может представлять собой, в частности, инъекцию для внутривенного (болюс или инфузия), внутриартериального, внутрибрюшинного, подкожного (болюс или инфузия), внутрижелудочкового, внутримышечного или субарахноидального пути введения; таблетку, капсулу, гель, пастилку или жидкость для перорального приема; раствор, суспензию или аэрозоль в виде спреев для ингаляции; гель, спрей или крем для местного применения; трансмукозальную композицию для введения через слизистую оболочку полости рта, носа или прямой кишки; трансдермальный пластырь, подкожный имплант или суппозиторий. Лектин также может быть включен в состав ректальных композиций, таких как суппозитории или микроклизмы с удержанием. Для трансбуккального введения композиции могут иметь форму таблеток или пастилок.

Композиция может представлять собой везикулярную систему доставки лекарственного препарата, в частности, билосомы, липосомы, ниосомы, транспортосомы, этосомы, сфингосомы, фармакосомы, многослойные везикулы, микросферы и т.д.

Композиция согласно настоящему изобретению может быть составлена в соответствии с пониманием и знаниями специалиста в данной области техники.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предложено использование рекомбинантного лектина, полученного из лектина *Sclerotium rolfsii*, для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания.

В одном из вариантов осуществления изобретения рекомбинантный лектин можно использовать как есть или в форме композиции, содержащей лектин и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предложен способ индуцирования роста нейронов путем введения эффективного количества рекомбинантного лектина, полученного из лектина *Sclerotium rolfsii*.

Согласно настоящему изобретению под индуцированием роста нейронов понимают индукцию роста нейритов, причем нейриты представляют собой выступы тела клетки нейрона. Лектины согласно настоящему изобретению способствуют росту нейритов в нейронах при введении субъекту, который в этом нуждается.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения рекомбинантный лектин может представлять собой лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером 1, 2, 3 или 4.

В одном из вариантов осуществления изобретения нейродегенеративные заболевания, в отношении которых применяют лечение или профилактику согласно настоящему изобретению, перечислены выше.

В одном из вариантов осуществления нейродегенеративные заболевания могут представлять собой, в частности, деменцию, в частности, болезнь Альцгеймера, лобно-височную деменцию (болезнь Пика), деменцию с тельцами Леви, деменцию с нейрофибриллярными клубками, а также связанные с деменцией симптомы, болезнь Крейцфельда-Якоба (имеющую сходные клинические проявления с болезнью Альцгеймера), склероз гиппокампа, болезнь Шильдера; болезнь Паркинсона, паркинсоноподобное заболевание, в частности, прогрессирующий надъядерный паралич, множественную системную атрофию и кортикобазальную дегенерацию; атаксию, когнитивное расстройство, заболевание двигательных нейронов, такое как

боковой амиотрофический склероз, первичный боковой склероз, прогрессирующий бульбарный паралич, вариант бокового амиотрофического склероза, псевдобульбарный паралич и наследственную спастическую параплегию; аневризму, эпилепсию и болезнь Хантингтона, пантотенаткиназа-ассоциированную нейродегенерацию, болезнь Баттена, синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, церебральную аутосомно-доминантную артериопатию с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией, гипоплазию мозжечка, церебральный артериосклероз, церебральную гипоксию, хорею, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, кольпоцефалию, глобулярные глиальные таупатии, первичную возрастную таупатию, хроническую травматическую энцефалопатию, возрастную тау-астроглиопатию, синдром Ли, деменцию с тельцами Леви, например, болезнь диффузных телец Леви, генетические заболевания, вызывающие нейронные состояния/потери, такие как спинальная мышечная атрофия, генетические болезни экспансии тринуклеотидных повторов, врожденная спинальная мышечная атрофия с артрогрипозом как редкая форма спинальной мышечной атрофии, спинально-бульбарная мышечная атрофия, полиглутаминовые (polyQ) заболевания с экспансией повторов, первичную прогрессирующую афазию, болезнь Александера, болезнь Аплера, болезнь Краббе, болезнь Сандхоффа, синдром Халлервордена-Шпатца и болезнь Кугельберга-Веландера.

В одном из вариантов осуществления нейродегенеративное заболевание может представлять собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство и связанные с деменцией симптомы, боковой амиотрофический склероз, болезни с тельцами Леви, спинальную мышечную атрофию или болезнь Хантингтона.

В другом очень специфическом варианте осуществления изобретения нейродегенеративное заболевание может представлять собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство или связанные с деменцией симптомы.

Настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания с использованием рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 4, или его гомогенов. Исследования *in vitro* рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, показали значительное положительное влияние на линии нервных клеток в присутствии нейротоксина. Рекомбинантный лектин защищал нервные клетки от нейротоксина. Аналогичным образом, изучение влияния рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным

номером 1, на биомаркеры, связанные с нейродегенеративным заболеванием, показало, что биомаркер, модулированный лектином, находится в нормальном диапазоне по сравнению с аномальным диапазоном в состоянии заболевания.

В частности, были проведены исследования *in vitro* на нескольких клеточных линиях для болезни Паркинсона и Альцгеймера или деменции.

Цитопротекторный эффект рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, выявлен путем определения жизнеспособности клеток в линии нервных клеток человека SH-SY5Y в присутствии нейротоксина 1-метил-4-фенилпиридин йодида (MPP + йодид). Жизнеспособность клеток и восстановление жизнеспособности клеток определяли в условиях цитотоксичности, индуцированной нейротоксином. Последовательность с идентификационным номером 1 с концентрацией от 0,001 до 50 мкг/мл показала цитопротекторное действие от 40 до 86% по сравнению с положительным контролем с депренилом в концентрации от 1 до 100 мкМ, показавшим цитопротекторное действие от 41 до 76%.

Цитопротекторное действие изучили путем начальной обработки клеточных линий SH-SY5Y нецитотоксичными концентрациями рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, после чего клеточные линии подвергали воздействию нейротоксина MPP+ йодида. В качестве положительного контроля использовали депренил. Увеличение жизнеспособности клеток в диапазоне 78,8% - 94,9% рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, которым обработаны пораженные болезнью Паркинсона клетки SH-SY5Y, наблюдали по сравнению с положительным контролем с депренилом, который показал жизнеспособность клеток 79,3% - 91,3%.

Действие последовательности с идентификационным номером 1 оценивали для изучения антиапоптотического действия на клеточную линию нервных клеток человека (SH-SY5Y). 1-метил-4-фенилпиридин йодид (MPP + йодид) использовали в качестве нейротоксина для индуцирования болезни Паркинсона в клеточных линиях SH-SY5Y. Антиапоптотическое действие *in vitro* рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, определено с использованием трех различных исследований., методика окрашивания аннексином V, Sub G0/01 - окрашивание PI.

Антиапоптотическое действие рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, оценивали по восстановлению трансмембранного потенциала митохондрий клеток SH-SY5Y в отношении

индуцированного MPP+ йодидом поражения. Рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером 1, проявлял антиапоптотическое действие с увеличением трансмембранного потенциала митохондрий на 22,7%-115,9% в диапазоне концентраций от 1 до 50 мкг/мл.

Положительный контроль показал увеличение трансмембранного потенциала митохондрий от 40 до 95% при концентрациях от 1 до 100 мкМ.

Определено дальнейшее снижение апоптозных клеток с помощью позитивного окрашивания аннексином в отношении нейротоксина MPP+ йодида. Рекомбинантный лектин показал уменьшение апоптозных клеток по популяции с 23,5%-70,4% в концентрации от 0,001 до 1 мкг/мл по сравнению с клетками, не обрабатывавшимися лектином и обработанными нейротоксином. Положительный контроль с депренилом показал уменьшение популяции с 27,2% до 38,3% в концентрации от 10 до 100 мкМ.

Антиапоптотическое действие последовательности с идентификационным номером 1 дополнительно подтверждено при оценке популяции клеток Sub (G0/G1) на линии нервных клеток человека (SH-SY5Y) в отношении нейротоксина MPP+ йодида. Исследование показало снижение апоптоза в популяции клеток Sub (G0/G1) с 19% до 35% в концентрациях от 0,001 до 1 мкг/мл по сравнению с клетками, не обрабатывавшимися лектином и обработанными нейротоксином. Положительный контроль с депренилом показал уменьшение популяции с 13% до 42% при концентрации от 10 до 100 мкМ. Нейропротекторное действие рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, дополнительно подтвердили путем оценки когнитивного потенциала с помощью анализа роста нейритов с использованием нервных клеток PC 12 (клеток феохромоцитомы крысы). Клетки обработали фактором роста нервов, рекомбинантным лектином, содержащим последовательность с идентификационным номером 1, и MPP+ йодидом, и испытали на нейропротекторное действие. Исследование показало, что рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером 1, обладает высокими нейропротекторными свойствами, так как способствует восстановлению роста нейритов на 7,3% - 78,2% при поражении клеток, индуцированном MPP+ йодидом, в концентрации от 0,0001 до 5 мкг/мл. Напротив, клетки, которые были обработаны только NGE и MPP + йодидом, показали 0% защиты в отношении образования нейритов.

Из вышеописанного следует, что рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером 1, обладает цитопротекторным действием, защищающим нервные клетки от воздействия нейротоксинов и значительно

снижающим апоптоз в клетках. Таким образом, рекомбинантный лектин согласно настоящему изобретению предотвращает возникновение заболевания в клетках и, следовательно, в организме, повышая жизнеспособность нервных клеток в условиях воздействия нейротоксина.

Дальнейшие исследования выполнены для оценки влияния рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, на рост нейритов. Клетки PC12 обработаны рекомбинантным лектином, содержащим последовательность с идентификационным номером 1, в диапазонах концентраций от 0,001 до 5 мкг/мл. В лектине количество невритов увеличилось с 19% до 55% по сравнению с необработанными клетками. Рекомбинантный лектин согласно настоящему изобретению показал значительный рост нейритов и может быть использован для указанной цели у субъекта, нуждающегося в таком лечении.

Механизм действия рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, при болезни Паркинсона определяли методом мультиплексного анализа и ИФА с оценкой уровней экспрессии биомаркеров. Образцы для испытаний получили путем обработки нервных клеток человека (SH-SY5Y) различной концентрацией рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером: 1, от 0,001 до 1 мкг/мл в течение 24 часов, и дальнейшей обработки нейротоксином MPP + йодид с целью индуцирования поражения нейронов.

Исследование показало, что рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером 1, восстанавливает нервные клетки, пораженные болезнью Паркинсона, путем активации нейротрансмиттеров, белков нейропротекторного сигнального катализатора, таких как допамин, содержание которого увеличилось с 22,9% - 82,5%; серотонин, содержание которого увеличилось с 5,1% до 23,5%, и кальбиндин D, содержание которого увеличилось с 1,7% до 9,7% по сравнению с клетками, обработанными MPP+ йодидом. С другой стороны, рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером 1, также обладает выраженным ингибирующим действием в отношении воспалительных белков клеточной адгезии, таких как ICAM-1/CD54, уровень которых снизился на 6,2 - 41,3%, и кальций-связывающего белка S100b, уровень которого снизился на 6,5-11,4% по сравнению с клетками, обработанными MPP+ йодидом. Тем не менее, в случае α-синуклеина не наблюдалось значительной модуляции.

Механизм действия рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, при болезни Альцгеймера выявлен мультиплексным анализом. К биомаркерам, оцениваемым для определения механизма действия, относятся b-NGF, RAGE, MPO, тау. Механизм действия болезни Альцгеймера определили путем обработки нервных клеток человека (SH-SY5Y) концентрацией рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, от 0,01 до 25 мкг/мл в течение 24 часов, и дальнейшей обработки нейротоксином скополамином с целью индуцирования поражения нейронов.

Эффективность рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, в подавлении болезни Альцгеймера оценивали по активации и ингибированию определенных биомаркеров, таких как b-NGF, биомаркер фактора роста нейронов, уровни которого увеличились с 41% до 89% по сравнению с клетками, обработанными скополамином; MPO (металлопероксидаза) и RAGE (рецептор конечных продуктов гликирования) были ингибированы последовательностью с идентификационным номером 1, с последующим снижением их уровня с 46% до 64% и 3%-19% соответственно. Ингибирование MPO (металлопероксидазы) и RAGE (рецептора конечных продуктов гликирования) демонстрирует значимость терапевтического эффекта рекомбинантного лектина в отношении болезни Альцгеймера. RAGE имеет решающее значение в прогнозе болезни Альцгеймера, поскольку представляет собой полилигандную поверхностную молекулу суперсемейства иммуноглобулинов, служащую рецептором для бета-амилоида. Повышение экспрессии RAGE вследствие генетической аберрации приводит к воспалению нейронов с генерацией активных форм кислорода, что приводит к окислительному стрессу. MPO представляет собой иммунорегулирующий белок, который играет ключевую роль в индукции цитокинов и в значительной степени катализирует преобразование перекиси водорода в хлорноватистую кислоту в присутствии хлорида, что приводит к образованию аддуктов окисления при реакции с биологическими веществами. Нарушение в гене MPO приводит к сверхэкспрессии MPO в области лобной коры головного мозга, с последующей регенерацией.

Исследования *in vitro* показали безопасность и терапевтическую эффективность рекомбинантного лектина в отношении нейродегенеративных заболеваний. Терапевтический эффект рекомбинантного лектина был впоследствии подтвержден путем определения его активности в отношении деменции *in-vivo* на примере индуцированной скополамином деменции у мышей-альбиносов, измерения времени задержки передачи в тесте пассивного избегания, изменения уровней биомаркеров головного мозга и гистопатологии гиппокампа головного мозга.

Действие рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, усиливающее когнитивный потенциал в отношении индуцированных скополамином нарушений памяти у мышей определяли с помощью теста пассивного избегания.

Среди животных, которым вводили скополамин, группа G2 показала значительное уменьшение ($p<0,001$) времени задержки передачи (то есть 56,93 ± 5,12 с) по сравнению с контрольной группой здоровых особей G1 (то есть 135,70 ± 5,11 с), что указывает на краткосрочные нарушения памяти у мышей. У животных, получавших донепезил (G3, 2,5 мг/кг), обнаружилось значительное увеличение ($p<0,001$) времени задержки передачи (т.е. 110,61 ± 7,02 с) по сравнению с G2, что указывает на индуцированный скополамином краткосрочный дефицит памяти, восстановленный до нормального уровня ингибитором холинэстеразы донепезилом. Животные получали рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером 1, в дозах трех уровней. Группа G4 (0,5 мг/кг) показала значительное увеличение ($p<0,05$) (85,26 ± 6,52). G5 (0,25 мг/кг) показала увеличение на 80,58 ± 9,08 с, G6 (0,125 мг/кг) показала улучшение 75,81 ± 7,75 с памяти по сравнению с G2.

Процентное увеличение времени задержки передачи составило 48,5% для животных, получавших донепезил, по сравнению с группой с отсутствием лечения. У животных, получавших рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером 1, G4, G5 и G6 в различных дозах, время задержки передачи увеличилось на 33,2%, 29,4% и 24,9% соответственно по сравнению с G2.

Кроме того, методом ИФА были оценены уровни биомаркеров головного мозга, таких как фактор роста нервов, ФНО-альфа и ацетилхолинэстеразы (AChE).

NGF (фактор роста нервов) имеет ключевое значение для пластичности нейронов и нейрогенеза посредством ингибирования фосфорилирования цАМФ-ответного элемента активирующего белка (CREB, где цАМФ – циклический аденозинмонофосфат)6. Нарушение фосфорилирования CREB является известным патологическим фактором нейродегенеративных заболеваний, вызывающим гибель нейронов в гиппокампе и коре посредством проапоптотического процесса. Ингибирование CREB ухудшает поведенческие характеристики в различных тестах памяти. Напротив, сверхэкспрессия CREB способствует выживанию нейронов и компенсирует когнитивные нарушения посредством холинергической системы. Обработка нейротоксином скополамином значительно ($p<0,001$) снижает экспрессию NGF в головном мозге по сравнению с уровнями, наблюдаемыми в контрольной группе. Тем не менее, группы, получавшие

рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером 1, в различных дозах 0,5 мг/кг и 0,25 мг/кг, показали существенно ($p<0,001$) повышенный уровень NGF (71,6 пг/мл и 62 пг/мл соответственно) по сравнению с группой с деменцией, получавшей скополамин (34,5 пг/мл).

Группа, получавшая донепензил (положительный контроль), показала увеличение на 57 пг/мл. Результаты исследования показывают, что рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером 1, предотвращает или снижает нарушение способности к обучению и памяти путем активации нейротрофических факторов и предотвращения апоптоза нейронов. Далее оценивали активность AChE головного мозга в исследуемой группе. Исследование показало, что в группе, получавшей скополамин, значительно ($p<0,001$) повысилась активность AChE в головном мозге, что позволяет предположить, что наблюдаемые когнитивные нарушения были индуцированы холинергической дисфункцией. Тем не менее, предварительное введение рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, в дозе 0,5 мг/кг значимо ($p<0,001$) ослабляло эти индуцированные скополамином нарушения. AChE - это хорошо известный фермент, играющий ключевую роль в обучении и памяти. Холинацетилтрансфераза (ChAT) является критическим холинергическим маркером, участвующим в синтезе ацетилхолина (Ach). Поддержание уровня Ach необходимо для нормального функционирования, в то время как чрезмерная активность AChE приводит к нарушениям уровней Ach в головном мозге. Передача сигналов ацетилхолина в конечном итоге приводит к фосфорилированию цАМФ-ответного элемента активирующего белка (циклического аденозинмонофосфата) (CREB), который затем транслоцируется в ядро, чтобы регулировать транскрипцию генов-мишеней. Хорошо известно, что CREB играет решающую роль в росте, пролиферации, дифференциации и выживании нейронов. Многочисленные исследования также подтвердили взаимосвязь между транскрипционной активностью CREB и гиппокамп-зависимым формированием памяти.

В исследуемой группе животных, получавших нейротоксин скополамин, уровень AChE составил 6,74 мЕд/мл, в то время как в положительной контрольной группе, то есть в исследуемой группе, получавшей скополамин и донепезил, уровень AChE составил 4,39 мЕд/мл. Исследуемая группа, получавшая как скополамин, так и последовательность с идентификационным номером 1, показала уровень AChE 4,47 мЕд/мл при 0,5 мг/кг, 6,27 мЕд/мл при 0,25±0,5 мг/кг и 6,59 мЕд/мл при 0,125 мг/кг. В группе, не получавшей препарата, уровень AChE составил 4,19 мЕд/мл.

В следующем исследовании индуцированная скополамином деменция повысила уровень TNF-α головного мозга, что указывает на нейровоспаление легкой и средней степени. Группа скополамина показала значительное (p<0,01] увеличение уровня TNF-α в головном мозге (144 пг/мл); в то время как рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером 1, в уровнях доз 0,5 мг/кг (121,7 пг/мл), 0,25 мг/кг (67,65 пг/мл) и 0,125 мг/кг (79,53 пг/мл) значительно снижал содержание ФНО-α в головном мозге, что свидетельствует о его противовоспалительной активности. В контрольной группе, не получавшей скополамин, уровень ФНО-α составил 61,02 пг/мл, а в группе положительного контроля, получавшей донепезил и скополамин, уровень ФНО-α составил 156 пг/мл.

Подробное гистологическое исследование было выполнено на окрашенных гематоксилином и эозином тканях головного мозга в областях коры головного мозга и гиппокампа (CAI, Ca3 и DG). Результаты показали отсутствие значительных изменений во всех группах лечения, а также в группе, которой вводили скополамин, в коре головного мозга и области гиппокампа, за исключением области CA3. Значимое (p<0,01) поражение обнаружено в области CA3 гиппокампа в группе G2, т.е. в группе, получавшей скополамин, которая показала среднее значение 2,0 по сравнению с нормальной контрольной группой (0). Незначительное снижение на 1,33 наблюдалось в G3, получавшей донепезил, по сравнению с G2. Кроме того, группа G5, получавшая рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером 1, в дозе 0,25 мг/кг, показал значимое (p<0,05] снижение, т.е. 0,60, а группы G4 (0,5 мг/кг последовательности с идентификационным номером 1) и G6 (0,125 мг/кг последовательности с идентификационным номером 1) показали снижение среднего балла, то есть 0,67 и 1,00, соответственно. Специалисту в данной области техники хорошо известно, что гиппокамп является ключевой областью головного мозга, отвечающей за обучение и память. Нейрогенез гиппокампа взрослых важен для формирования памяти; поэтому нарушение нейрогенеза и интеграции нейронов считаются патологическими признаками нейродегенеративных расстройств. Таким образом, введение рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, привело к заметному регрессу индуцированного скополамином ингибирования нейрогенеза в структуре гиппокампа в GA3. Известно, что такой нейрогенез зависит от активности как нейротрофинов, так и их рецепторов.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения рекомбинантный лектин, полученный из лектина *Sclerotium rolfsii* и содержащий последовательность с идентификационным номером 1, предотвращает апоптоз нейронов, обусловленный

экзитотоксичностью, и восстанавливает функцию нейронов путем роста нейронов в животных моделях с индуцированным заболеванием.

Экзитотоксичность может возникать под действием токсических веществ эндогенного или экзогенного происхождения, что является ключевым механизмом нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, боковой амиотрофический склероз, деменция и т.д. Экзитоксичность представляет собой избыточную активацию нейротрансмиттеров, вызывающую в первую очередь тяжелые повреждения нервных клеток, влияя на функции митохондрий, что, в свою очередь, приводит к окислительному стрессу. Избыточный приток ионов кальция также может быть одним из механизмов гибели нейронов. В результате нервные клетки теряют свои функции и дегенерируют в результате апоптоза. Таким образом, рекомбинантный лектин, полученный из лектина *Sclerotium rolfsii* и содержащий последовательность с идентификационным номером 1, обладает терапевтическим потенциалом для лечения или профилактики нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, бокового амиотрофического склероза, деменции, причем он предотвращает апоптоз нервных клеток путем восстановления трансмембранных потенциалов митохондрий; регулирования уровня экспрессии определенных биомаркеров, которые играют ключевую роль в функционировании нейронов, а также способствует росту нейронов.

В следующем аспекте варианта осуществления настоящего изобретения лектин, полученный из лектина *sclerotium rolfsii*, проявлял терапевтическую эффективность и был эффективен в профилактике и лечении нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и деменция, или связанные с деменцией симптомы. Кроме того, лектин показал эффективность в отношении роста нейритов и восстановления когнитивных функций в индуцированных заболеванием моделях.

Примеры:

Следующие примеры приведены для демонстрации наилучшего варианта осуществления изобретения. Примеры никоим образом не ограничивают защищаемый объем изобретения.

Клетки SH-SY5Y получены из субклонированной клеточной линии клеток нейробластомы человека SK-N-SH. Это модель нейродегенеративного расстройства, так как клетка может быть модифицирована до различных типов функциональных нейронов путем добавления определенных соединений. Таким образом, это свойство клеточных линий SH-SY5Y делает их подходящей моделью для экспериментальных неврологических

исследований, включая анализ нейронной дифференциации, метаболизма и функций, связанных с нейродегенеративными процессами, нейротоксичностью и нейропротекцией.

Линия нервных клеток человека SH-SY5Y получена в Национальном центре клеточных исследований (NCCS), Пуне.

Линию клеток SH-SY5Y выдерживали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла: Хэма F12 (1:1) + 10% ФБС в условиях роста 5% CO_2, 37°C и влажности 95%. Клеточную линию субкультивировали путем разделения суспензии клеток по колбам со свежими культурами и добавления свежей культуральной среды.

Клетки PC-12 Клеточная линия феохромоцитомы надпочечников (PC12) была первоначально выделена из мозгового вещества надпочечников крысы. Способность клеток PC12 синтезировать и хранить допамин, а также сходство с нейронами симпатического ганглия при дифференцировании с фактором роста нервов (NGF) делает их подходящей моделью для исследования болезни Паркинсона. Клетки феохромоцитомы крыс PC 12 были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC), США.

Линию клеток PC 12 выдерживали в питательной среде Хэма F12 + 10% ФБС в условиях роста 5% CO2, 37°C и влажности 95%. Клеточную линию субкультивировали путем трипсинизации и разделения суспензии клеток по колбам со свежими культурами и добавления свежей культуральной среды.

Получен водный раствор рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1. Исходный раствор разбавили в бессывороточной среде для получения конечных концентраций.

Пример 1: Оценка цитопротекторного действия последовательности с идентификационным номером 1 на нервные клетки для улучшения состояния при болезни Паркинсона

Цитопротекторное действие последовательности с идентификационным номером 1 на нервные клетки SH-SY5Y исследовали с помощью следующего анализа.

Нервные клетки человека SH-SY5Y подсчитали с помощью гемоцитометра и поместили в 96-луночный планшет с плотностью 25 000 клеток/лунка, после чего инкубировали при температуре 37°C в течение 24 часов. После инкубации клетки обработали рекомбинантным лектином, содержащим последовательность с идентификационным номером 1, в концентрациях от 0,001 до 50 мкг/мл в течение 24 часов. После 24 часов

обработки клетки подвергли воздействию нейротоксина (MPP + йодид, 1 мМ) в течение 24 часов.

Клетки, обработанные только MPP+ йодидом, были включены в качестве отрицательного контроля. Необработанные клетки использовали в качестве контроля. Клетки, обработанные депренилом (1 - 100 мкМ), служили положительным контролем. После лечения цитопротекторное действие последовательности с идентификационным номером 1 на жизнеспособность клеток оценивали с применением анализа 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолин бромид (MTT): Планшет извлекли и во все лунки добавили 20 мкл 5 мг/мл раствора MTT 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолин бромид. Клетки SH-SY5Y инкубировали в течение 3 часов при температуре 37°C. Супернатант аспирировали и в каждую лунку добавляли 150 мкл диметилсульфоксида для растворения кристаллов формазана. Поглощение каждой лункой считывали при 540 нм с помощью микропланшетного ридера Synergy HT. Защитное действие последовательности с идентификационным номером 1 на выживаемость клеток SH-SY5Y по отношению к индуцированному MPP+ йодидом поражению определяли как: Жизнеспособность клеток определяли как:

% жизнеспособности клеток (100% цитотоксичность);

где процент цитотоксичности, соответствующий каждой обработке, рассчитывали следующим образом:

% цитотоксичности = [(RX)/R] *100

X = поглощение клеток, обработанных MPP + йодидом/рекомбинантным лектином, содержащим последовательность с идентификационным номером 1+ MPP+ йодид

R = поглощение контрольными клетками (без обработки) Защитное действие в процентах рассчитывали как:

[(Поглощение последовательности с идентификационным номером 1+ MPP+ йодид) - (поглощение MPP+- йодид)/(поглощение необработанного материала) - (поглощение только MPP+ йодида)] *100

Таблица 1. Цитопротекторное действие рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, на нервные клетки (SH-SY5Y) в отношении индуцированного нейротоксином (MPP+) поражения

Нейротоксин	**Образец**	**Концентрация**	**Процент цитотоксичности**	**Процент жизнеспособности (относительно контроля)**	**Процент защиты**
Без обработки			0	100	
MPP+ йодид (1 мМ)			35,4	64,6	0
MPP+ йодид (1 мМ)	**Депренил (мкМ)**	1	20,7	79,3	41,5
		10	18,1	81,9	49
		25	8,7	91,3	75,6
		50	9	91	74,7
		100	11,5	88,5	67,5
	Последовательность с идентификационным номером 1 (мкг/мл)	0,001	14,9	85,1	58,6
		0,01	13,7	86,3	61,8
		0,05	11,2	88,8	68,8
		0,1	17	83	52,6
		1	21,2	78,8	40,2
		5	17,9	82,1	49,6
		10	5,1	94,9	85,6
		25	7,6	92,4	78,6
		50	13,4	86,6	62,1

Пример 2: Оценка антиапоптотического действия рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, на нервные клетки с улучшением состояния при болезни Паркинсона

Антиапоптотическое действие рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1 на нервные клетки с улучшением состояния при болезни Паркинсона определяли с помощью следующего анализа

Пример 2a: Определение действия рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, на трансмембранный потенциал митохондрий

Клетки подсчитали с помощью гомоцитометра и посеяли в черные лунки 96-луночного планшета с плотностью 25 000 клеток/лунка полной среды роста. Посеянные клетки инкубировали в течение ночи в инкубаторе с 5% CO2 при температуре 37 °C. Через 24 часа клетки обрабатывали концентрациями рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, в диапазоне от 1 до 50 мкг/мл в течение 24 часов. После 24 часов обработки клетки подвергли воздействию (MPP +

йодид 1 мМ) в течение 24 часов. Клетки, обработанные только MPP+ йодидом, были включены в качестве отрицательного контроля. Необработанные клетки использовали в качестве контроля. Клетки, обработанные депренилом, служили положительным контролем. После воздействия MPP+ йодида защитное действие рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, на трансмембранный потенциал митохондрий оценивали с помощью анализа JC-1 следующим образом; после инкубации супернатанты отбрасывали и добавляли в каждую лунку 100 мкл раствора JC1-красителя (полученного разбавлением 1 мМ исходного диметилсульфоксида до 10 мкМ в однократном фосфатно-солевом буфере). Затем клетки инкубировали с красителем в CO_2-инкубаторе при температуре 37 °C в течение 15 мин.

После 15 мин инкубации супернатант удалили, а клетки дважды промыли однократным фосфатно-солевым буфером). В завершении в каждую лунку добавили 100 мкл однократного фосфатно-солевого буфера. Красную флуоресценцию (возбуждение 550 нм, испускание 600 нм) и зеленую флуоресценцию (возбуждение 485 нм, испускание 535 нм) измеряли с помощью планшетного ридера Biotek Synergy HT. Трансмембранный потенциал митохондрий ($\Delta\psi m$) рассчитали как отношение интенсивности красной флуоресценции к интенсивности зеленой флуоресценции, описанное следующим образом:

$\Delta\psi m$ = интенсивность красной флуоресценции/интенсивность зеленой флуоресценции

Процентное содержание/восстановление трансмембранного потенциала митохондрий в отношении повреждения MPP+ йодидом рассчитывали по формуле:

% увеличения = [(RX)/R) *100

где X = $\Delta\psi m$, соответствующий последовательности с идентификационным номером 1 + обработанные MPP+ йодидом клетки

R = $\Delta\psi m$, соответствующий контрольным клеткам (поражение только MPP + йодидом)

Таблица 2. Антиапоптотическое действие последовательности с идентификационным номером 1 на нервные клетки (SH-SY5Y) посредством восстановления трансмембранного потенциала митохондрий в отношении поражения MPP+ йодидом

Образец		**Концентрация**	**Трансмембранный потенциал митохондрий**	**% увеличения потенциала митохондрий (относительно контроля)**
Без обработки			3,1	
MPP+ йодид (1 мМ)			1,8	0
MPP+ йодид (1 мМ)	**Депренил (мкМ)**	1	2,9	58,2
		10	3,1	67,9
		25	3,6	95,3
		50	3,3	79,6
		100	2,6	39,9
	Последовательность с идентификационным номером: 1 (мкг/мл)	1	2,3	22,7
		5	3,4	86,6
		10	4	115,9
		25	3,4	84,7
		50	3,3	77,5

Пример 2b; Определение действия рекомбинантного лектина, содержащего последовательности с идентификационным номером 1 при окрашивании аннексином-V

После инкубации клетки обработали рекомбинантным лектином, содержащим последовательность с идентификационным номером 1, в концентрациях от 0,001 до 1 мкг/мл в течение 24 часов. После 24 часов обработки клетки подвергли воздействию (MPP + йодид 1 мМ) в течение 24 часов. Клетки, обработанные только MPP+ йодидом, были включены в качестве отрицательного контроля. Необработанные клетки использовали в качестве контроля. Клетки, обработанные депренилом, служили положительным контролем. После обработки клетки собирали трипсинизацией и обрабатывали для анализа аннексином V следующим образом: Клетки аккуратно собрали в предварительно маркированные стерильные пробирки для центрифуги и центрифугировали при 300 g в течение 5-7 минут. После 24 часов обработки клетки подвергали воздействию (MPP+ йодид 1 мМ) в течение 24 часов. Клетки, обработанные только MPP+ йодидом, были включены в качестве контроля. Необработанные клетки использовали в качестве отрицательного контроля. Клетки, обработанные депренилом, служили положительным контролем. После обработки клетки собирали трипсинизацией и обрабатывали для анализа аннексином V следующим образом: Клетки аккуратно собрали в предварительно маркированные стерильные пробирки для центрифуги и центрифугировали при 300 g в течение 5-7 минут. Супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в 200 мкл свежей культуральной среды. 100 мкл клеточной суспензии

перенесли в предварительно маркированные стерильные пробирки для центрифуги. В каждую пробирку добавили 100 мкл реагента аннексина-V и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре в темном месте. Клетки, окрашенные аннексином-V, затем перенесли в 96-луночные планшеты и собрали на проточном цитометре (Guava technologies). Определили процентное содержание аннексин-V положительных клеток.

Процент ингибирования в апоптозных клетках = [(% аннексин-положительные клетки только в MPP+ йодид) - (% аннексин-положительные клетки в рекомбинантном лектине, содержащем последовательность с идентификационным номером 1, + MPP+ йодид)/% аннексин-положительных клеток только в MPP+ йодид] *100

Таблица 3. Антиапоптотическое действие последовательности с идентификационным номером 1 на нервные клетки (SH-SY5Y) посредством уменьшения аннексин-положительной популяции клеток в отношении поражения MPP+ йодидом

Образец		**Концентрация**	**% апоптозных клеток (аннексин + V)**	**% снижения количества апоптозных клеток (относительно MPP+ йодида)**
Без обработки			0,9	
MPP+ йодид (1 мМ)			4,1	0
MPP+ йодид (1 мМ)	**Депренил (PC) (мкМ)**	10	3	27,2
		25	2,5	38,3
		100	2,9	28,4
	Последовательность с идентификационным номером: 1 (мкг/мл)	0,001	1,8	56,8
		0,01	1,2	70,4
		0,05	2,6	35,8
		0,1	3,1	23,5
		1	2,3	43,2

Пример 2c: Антиапоптотическое действие рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, на нервные клетки (SH-SY5Y) посредством уменьшения популяции Sub (G0/G1) клеток на фоне индуцированного MPP+ йодидом поражения

После инкубации, как в примерах 2a и 2b, клетки собрали путем трипсинизации и обработали для анализа клеточного цикла следующим образом: Реагент клеточного цикла содержит краситель PI, окрашивающий ДНК клеток на различных фазах клеточного цикла; Sub (G0/G1), G1, S, G2 и M. Клетки в фазе Sub (G0/GI) соответствуют апоптозным клеткам.

Клетки аккуратно собрали в предварительно помеченные пробирки для центрифуги и центрифугировали при 450 g в течение 5 минут при комнатной температуре (низкий уровень торможения). Супернатанты аккуратно удалили и отбросили. К осадку добавили 1 мл однократного фосфатно-солевого буфера и осторожно ресуспендировали для получения гомогенной суспензии. Клетки центрифугировали при 450 g в течение 5 мин при комнатной температуре (низкий уровень торможения). Супернатант аккуратно удалили, оставив примерно 100 мкл фосфатно-солевого буфера. Клетки осторожно, но тщательно ресуспендировали в остаточном фосфатно-солевом буфере. Клетки фиксировали путем капельного добавления охлажденного льдом 70% этанола (ТОО мкл) при встряхивании на низкой скорости. Клетки хранили при 4 °C в течение 24 часов до окрашивания.

Фиксированные этанолом клетки центрифугировали при 450 g в течение 5 минут при комнатной температуре (низкий уровень торможения), аккуратно удалили и отбросили супернатант (не соприкасаясь с осадком). К осадку добавили 1 мл однократного фосфатно-солевого буфера и осторожно ресуспендировали. Клетки инкубировали в течение 1 минуты при комнатной температуре. Клетки центрифугировали при 450 g в течение 5 минут при комнатной температуре (низкий уровень торможения) (этап промывки) Супернатант аккуратно удалили, оставив прим. 20-50 мкл фосфатно-солевого буфера. В каждую пробирку добавили 200 мкл реагента клеточного цикла. Клетки осторожно ресуспендировали и смешали. Клетки инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темном месте.

Очищенные образцы перенесли в 96-луночные планшеты и собрали на проточном цитометре (Guava technologies). Определили процентное содержание клеток в фазе Sub (G0/G1).

Процент ингибирования в апоптозных клетках = [(% Sub (G0/G1) клеток только в MPP+ йодид) - (% Sub (G0/G1) клеток в последовательности с идентификационным номером 1+ MPP+ йодид)/% Sub (G0/G1) в среде MPP+ йодид) *100

Таблица 4. Антиапоптотическое действие последовательности с идентификационным номером 1 на нервные клетки (SH-SY5Y) посредством уменьшения популяции вспомогательных (G0/G1) клеток в отношении индуцированного MPP+ поражения

Образец		**Концентрация**	**% апоптозных клеток (Sub G0/G1)**	**% снижения количества апоптозных клеток (относительно MPP+ йодида)**
Без обработки			1,9	
MPP+ йодид (2 мМ)			3,4	0
МПФ+ йодид+	**Депренил (PC) (мкМ)**	10	2,9	12,8
		25	2,4	28,3
		100	2	42
	Последовательность с идентификационным номером: 1 (мкг/мл)	0,001	2,7	18,8
		0,01	2,2	33,5
		0,05	2,4	29,9
		0,1	2,4	27,7
		1	2,2	35

Пример 3: Оценка влияния последовательности с идентификационным номером 1 на когнитивный потенциал при болезни Паркинсона с помощью анализа роста нейритов *in vitro*

Когнитивный потенциал при болезни Паркинсона с применением анализа роста нейритов изучали следующими методами;

Пример 3a: Влияние последовательности с идентификационным номером 1 на образование нейритов в нервных клетках (pc 12) в базовой модели

Клетки подсчитывали с помощью гемоцитометра и высевали в 24-луночные планшеты при плотности, соответствующей 1x104 клеток/лунка/500 мкл среды роста. Затем клетки инкубировали в течение 48 часов в инкубаторе с 5 % CO2 при температуре 37 °C. Действие рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, на образование нейритов оценивали как в базовой модели, так и в индуцированной поражением MPP+ модели.

Для базовой модели процентное увеличение образования нейритов определяли следующим образом

% увеличения = [(КОЛ-ВО нейритов в обработанных клетках - КОЛ-ВО нейритов в необработанных клетках)/КОЛ-ВО нейритов в необработанных клетках] X 100

Таблица 5: Действие рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, на образование нейритов в нервных клетках (PC12) в базовой модели

Образец	**Концентрация**	**Среднее количество нейритов**	**% защиты при образовании нейритов (относительно MPP+)**
Без обработки		18	0
Рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером 1 мкг/мл	0,001	27	54,7
	0,01	26	47,2
	0,1	21	18,9
	5	24	34

Пример 3b: Защитное действие последовательности с идентификационным номером 1 на образование нейритов в нервных клетках (Pc 12) в отношении индуцированного Mpp+ поражения

Процент защиты при образовании нейритов в отношении индуцированных MPP+ поражений определяли следующим образом:

{(A-B)/(C-B)}*100

где:

A Количество нейритов в клетках, обработанных NGF + последовательность с идентификационным номером: 1+ MPP+

B = Количество нейритов в клетках, обработанных NGF + MPP+

C = Количество клеток нейритов, обработанных только NGF

Таблица 6. Защитное действие рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, на образование нейритов в нервных клетках (PC12) в отношении индуцированного MPP+ поражения

Образец	**Концентрация**	**Среднее количество нейритов**	**% защиты при образовании нейритов (относительно MPP+)**
Без обработки		4	0
NGF (200 нг/мл)		38	100
NGF (200 нг/мл)+ MPP (100 мкМ)		20	0
Рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером 1 мкг/мл	0,001	21	7,3
	0,01	28	43,6
	0,1	34	76,4
	1	34	78,2
	5	30	58,2

Пример 4: Выяснение механизма действия рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, при болезни Паркинсона и Альцгеймера по мультиплексному анализу Культивирование и выдержка клеточной линии

А. Оценка маркеров методом мультиплексного анализа/ИФА

После инкубации в течение ночи, как в предыдущих примерах, клетки обрабатывали рекомбинантным лектином, содержащим последовательность с идентификационным номером 1, в различных концентрациях в диапазоне 0,001 - 1 мкг/мл в течение 24 часов для болезни Паркинсона и 0,01 - 25 мкг/мл в течение 24 часов для болезни Альцгеймера.

- Болезнь Паркинсона: После предварительной обработки в течение 24 часов рекомбинантным лектином, содержащим последовательность с идентификационным номером 1, клетки подвергали воздействию (MPP+) еще в течение 24 часов. Клетки, обработанные MPP + йодидом, включены в качестве контроля. Клетки, обработанные депренилом, включены в качестве положительного контроля,
- Болезнь Альцгеймера: После предварительной обработки в течение 24 часов рекомбинантным лектином, содержащим последовательность с идентификационным номером 1, клетки подвергали воздействию скополамина (4 мМ) в течение еще 24 часов. клетки, обработанные скополамином, включены в качестве контроля. Клетки, обработанные галантамином, включены в качестве положительного контроля.

Уровни маркеров были определены мультиплексным анализом как; Супернатанты клеточных культур разводили (1:2) раствором для разведения калибратора. На каждую лунку добавляли 50 мкл стандарта или образца. 50 мкл смеси микрочастиц добавили в каждую лунку микропланшета и накрыли пленкой для планшетов. Планшет инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре на горизонтально-орбитальном шейкере для микропланшетов. Планшет промывали с помощью магнитного устройства, предназначенного для размещения микропланшета.

Промывку выполняли путем приложения магнита ко дну микропланшета за 1 минуту до удаления жидкости, заполнения каждой лунки промывочным буфером (100 мкл) и выдержки в течение 1 минуты перед повторным удалением жидкости. В каждую лунку добавили 50 мкл разбавленного коктейля биотин-антитело. Планшет накрыли пленкой для планшетов и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на

шейкере. Повторили этап промывки. В каждую лунку добавили 50 мкл разведенного стрептавидина-PE. Планшет надежно покрыли пленкой для планшетов и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре на шейкере. Повторили этап промывки. Микрочастицы ресуспендировали путем добавления 100 мкл промывочного буфера в каждую лунку. Планшет инкубировали на шейкере в течение 2 минут и считывали в течение 90 минут с помощью мультиплексного устройства Magpix®. Уровни биомаркеров болезни Паркинсона и Альцгеймера оценивали с помощью мультиплексного устройства Magpix®.

Для болезни Паркинсона процент модуляции в каждом образце определяли следующим образом:

[(Концентрация биомаркеров (пг/мл) в последовательности с идентификационным номером 1 (обработанные MPP + йодидом клетки) - Концентрация биомаркеров (пг/мл) в контрольных клетках (MPP + йодид)}/концентрация биомаркеров (пг/мл) в контрольных клетках (MPP + йодид)] *100

Для болезни Альцгеймера процентную модуляцию в каждом образце определяли следующим образом:

% изменения [(концентрация биомаркера в контрольных клетках- концентрация биомаркера в

контрольных клетках)/конц. анализируемого вещества в контрольных клетках] X 100

Результаты:

Таблица 7: Действие рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, на экспрессию биомаркеров, **связанных с болезнью Альцгеймера, в линии нервных клеток (SH-SY5Y)**

% изменения биомаркеров (относительно контроля)					
Образец		**Концентрация**	**b-NGF**	**RAGE**	**MPO**
Скополамин (4 мМ)			0	0	0
Скополамин (4 мМ)	**Галантамин (мкМ)**	1 мкМ	9,1	0	-64
		10 мкМ	0	0	-31,2
		100 мкМ	-9	-38,7	-45,9
	Последовательность с идентификационным номером: 1 (мкг/мл)	0,01 мкг/мл	0	-19,3	1,7
		0,1 мкг/мл	0	0	-64
		1 мкг/мл	-9	-19,3	-45,9
		10 мкг/мл	41,1	16,3	0
		25 мкг/мл	88,9	-3	0

Таблица 8: Действие рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1 на экспрессию биомаркеров, связанных с болезнью Паркинсона, в линии нервных клеток (SH-SY5Y)

% изменения биомаркеров (относительно контроля)							
Образец	**Концентрация**	**Кальбиндин Д**	**Допамин**	**Серотонин**	**S100b**	**Park7/ DJ-1**	**ICAM1 /CD54**
MPP+ йодид (2 мМ)		0	0	0	0	0	0
MPP+ йодид, обработанный депренилом	10 мкМ	5	21,2	9,1	-6,7	-6,8	12,9
	50 мкМ	0	37,7	33	-6,5	-7,9	-23,7
	100 мкМ	3,3	-47,2	17,1	-6,5	-9,2	-37
MPP+ йодид, обработанный последовательностью с идентификационным номером 1 (мкг/мл)	0,001 мкг/мл	9,7	50,6	15,4	-11	-2,5	0
	0,01 мкг/мл	8,2	82,5	5,1	9	-3,6	-6,2
	0,05 мкг/мл	1,7	24,7	6,9	-6,7	-7,1	-28,1
	0,1 мкг/мл	6,6	28,9	7,9	-6,5	-10,4	-36,3
	1 мкг/мл	-1,6	22,9	23,5	-11,4	-12,6	-41,3

Исследования *in-vivo*:

Пример 5: Рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером 1

Необходимое количество рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, разбавляли в стерильном трис-буферизованном физиологическом растворе (TBS) для достижения требуемой конечной концентрации, т.е. 0,1 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,025 мг/мл, в дозах 0,5 мг/кг, 0,25 мг/кг и 0,125 мг/мл. кг соответственно. Композицию готовили каждый день.

Эталонный препарат - донепезила гидрохлорид суспендировали в 0,5% Na-CMC до получения конечной концентрации 0,25 мг/мл (доза: 2,5 мг/кг; Объем дозы: 1,0 мл/кг)

Буфер TBS и 0,5% CMC использовали в качестве среды для получения образца рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, и состава эталонного образца, соответственно

Самец Mus musculus (альбинос Swiss) в возрасте 8-10 недель, получен от компании GENTOX Bio services Pvt Ltd, Хайдарабад. Животных разделили на 6 групп и акклиматизировали в течение двух недель. Животных идентифицировали по маркировке клеток и хвоста и рандомизировали на основании массы тела.

Здоровый самец. Мыши-альбиносы Swiss (n=48) были отобраны и рандомизированы по массе тела (n=8 в группе) на 6 групп, как указано в таблице 1. Контрольная группа G1 получала носитель внутривенно ежедневно до завершения эксперимента. Группу G2 считали отрицательным контролем и обрабатывали носителем. Группе G3 вводили стандартное соединение донепезила гидрохлорид в дозе 2,5 мг/кг для перорального введения. Животным групп G4, G5 и G6 вводили исследуемый рекомбинантный лектин, содержащий последовательность с идентификационным номером 1, в дозе 0,5 мг/кг, 0,25 мг/кг и 0,125 мг/кг соответственно. Все исследуемые образцы вводили внутривенно (в/в) ежедневно в объеме дозы 5 мл/кг в течение 14 дней. Массу тела регистрировали ежедневно в течение всего периода эксперимента. Всех животных наблюдали на предмет клинических признаков на протяжении всего исследования. Через час после введения последней дозы исследуемых образцов (в день 14) всем животным, за исключением контрольной группы G1, ввели скополамина гидробромид в дозе 2,5 мг/кг внутрибрюшинно. Тест пассивного избегания был выполнен через 30 минут после инъекции скополамина.

Таблица 9. Распределение животных

Группы	Обработка	Доза и способ введения	Кол-во животных
G1	Контроль + носитель TBS	5 мл/кг, в/в, qdx14	8
G2	Скополамина гидробромид (S) + носитель - TBS	2,5мг/кг, в/б + 5 мл/кг, в/в qdx14	8
G3	Эталонное соединение S (донепезила гидрохлорид)	2,5мг/кг, в/б. + 2,5mpk: перорально,10мл/кг, qdx14	8
G4	S + последовательность с идентификационным номером 1	2,5 мг/кг, в/б + 0,5 мг/кг, в/в, qdx14	8
G5	S + последовательность с идентификационным номером 1	2,5 мг/кг, в/б + 0,25мг/кг, лев.жел., qdx14	8
G6	S + последовательность с идентификационным номером 1	2,5мг/кг, в/б. 4 0,125 мг/кг, в/в, qdx14	8

Пример 5а: Тест пассивного избегания

Этот тест на обучение и память проводился в двух камерах, в которых располагались квадратные ящики одинакового размера, как освещенные, так и темные. Над одной камерой для освещения помещали лампу. Каждое испытание включало два отдельных испытания, обучающее испытание и контрольное испытание.

Для обучающего испытания мышей сначала помещали в освещенную камеру. Когда мышей помещали в темную камеру, наносили удар электрическим током (0,5 мА) в

течение 3 секунд посредством стержней из нержавеющей стали. Время задержки после помещения мышей из светлого отсека в темный отсек регистрировали с помощью встроенного таймера. Контрольное испытание проводили через 24 часа после обучающего испытания, а время задержки повторного входа в темную камеру измеряли до 5 мин.

Таблица 10. Среднее время задержки передачи (сек)

Группы	**Средняя**	**РЭМ**	**% увеличения времени задержки передачи**
G1; контроль; носитель	135,7	5,11	NA
G2; скополамина гидробромид (S) + носитель	56,93	5,12	NA
G3; S + донепезила гидрохлорид	110,61	7,02	48,5
G4; S + последовательность с идентификационным номером 1; 0,5мг/кг	85,26	6,52	33,2
G5; S + последовательность с идентификационным номером 1; 0,25мг/кг	80,58	9,08	29,4
G6; S + последовательность с идентификационным номером 1; 0,125мг/кг	75,81	7,75	24,9

Пример 5b: Сбор образцов головного мозга и оценка биомаркеров головного мозга

После теста пассивного избегания, исследующего модели памяти, животных умерщвляли гуманным способом. Мозг аккуратно извлекали из черепа и взвешивали. Мозг разрезали на две части

Одна часть головного мозга:

10% масс./об. гомогената головного мозга (100 мг/мл) приготовили путем гомогенизации в охлажденном льдом фосфатном буфере. Впоследствии гомогенат центрифугировали в охлаждаемой центрифуге при 3000 об/мин в течение 10 минут, а супернатант отделяли и использовали для биохимических оценок.

Нижеследующие биомаркеры оценены с помощью набора для ИФА в соответствии с инструкцией производителя.

- Мозговой NGF (фактор роста нервов), CUSABIO, каталожный № CSB-E04684m
- Ацетилхолинэстераза, CUSABIO, каталожный № CSB-E17521m
- ФНО-альфа, CUSABIO, каталожный № CSB-E04741 m

Таблица 11. Действие последовательности с идентификационным номером 1 на фактор роста нервов головного мозга (NGF) (пг/мл)

Группы	Средняя	РЭМ
G1, контроль; носитель	74,22	3,29
G2; скополамина гидробромид (S) + носитель	34,49	2,38
G3: S + донепезила гидрохлорид	57	2,38
G4; S + последовательность с идентификационным номером 1; 0,5мг/кг	71,59	7,44
G5; S + последовательность с идентификационным номером 1; 0,25мг/кг	61,96	2,6
G6; S + последовательность с идентификационным номером 1; 0,125мг/кг	38,62	2,3

Таблица 12. Действие последовательности с идентификационным номером 1 на ацетилхолинэстеразу головного мозга (мЕд/мл)

Группы	Средняя	РЭМ
G1; контроль; носитель	4,19	0,29
G2; скополамина гидробромид (S) + носитель	6,74	0,36
G3; S + донепезила гидрохлорид	4,38	0,4
G4; S + последовательность с идентификационным номером 1; 0,5мг/кг	4,47	0,45
G5; S + последовательность с идентификационным номером 1; 0,25мг/кг	6,27	0,44
G6; S + последовательность с идентификационным номером 1; 0,125мг/кг	6,59	0,26

Таблица 13. Действие последовательности с идентификационным номером 1 на ФНО-альфа головного мозга (пг/мл)

Группы	Средняя	РЭМ
G1; контроль; носитель	61,02	6,72
G2; скополамина гидробромид (S) + носитель	143,99	25,05
G3; S + донепезила гидрохлорид	155,81	14,99
G4; S + последовательность с идентификационным номером 1; 0,5мг/кг	121,73	23,65
G5; S + последовательность с идентификационным номером 1; 0,25мг/кг	67,65	5,91
G6; S + последовательность с идентификационным номером 1; 0,125мг/кг	79,53	11,63

Пример 5с: Гистопатология

Мозг мышей собирали после гуманного умерщвления и фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине. Далее ткань головного мозга обрезали, обрабатывали и заливали парафином. Срезы 5 микрон приготовили на предметном стекле в качестве образца для окрашивания гематоксилин-эозином. Поражение гиппокампа оценивали микроскопически при 100-кратном увеличении.

Результат:

Выполнено подробное гистологическое исследование тканей головного мозга, окрашенных гематоксилином и эозином. Оценка выставлялась в соответствии с повреждением нейронов. Результаты гистопатологической оценки показали отсутствие значительных изменений во всех группах лечения, а также в группе, которой вводили скополамин, в коре головного мозга и области гиппокампа, за исключением области CA3. Критерии градации по гистопатологии были следующими: В норме или без поражения-0; редкое поражение нейронов (менее 5 кластеров) -1; случайное поражение нейронов (5-15 кластеров) 2; частые поражения нейронов (> 15 кластеров)™ 3; диффузное поражение нейронов 4.

Таблица 14: Гистопатология (средний балл)

Органы	**Результаты**	**G1**	**G2**	**G3**	**G4**	**G5**	**G6**
Кора головного мозга	Оболочки	0	0	0	0	0	0
	Кора	0	0	0	0	0	0
Гиппокамп	CA1	0	0	0	0	0	0
	CA3	0	2	1,33	0,67	0,6	1
	DG	0	0	0	0	0	0

Формула изобретения:

1. Рекомбинантный лектин, предназначенный для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания, в котором рекомбинантный лектин получен из лектина *Sclerotium rolfsii*.

2. Рекомбинантный лектин по п. 1, в котором рекомбинантный лектин содержит последовательность с идентификационным номером 1, 2, 3, или аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70% гомологию с последовательностью с идентификационным номером 4.

3. Рекомбинантный лектин по п. 2, в котором аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с последовательностью с идентификационным номером 4.

4. Рекомбинантный лектин по п. 1, в котором нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство или связанные с деменцией симптомы, болезнь Хантингтона, прионные заболевания, такие как болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменцию с тельцами Леви, болезнь диффузных телец Леви, полиглутаминовые (polyQ) заболевания с экспансией повторов, дегенеративные заболевания головного мозга, спинальную и бульбарную мышечную атрофию, атаксию, болезнь Пика, первичную прогрессирующую афазию, множественную системную атрофию, пантотенаткиназа-ассоциированную нейродегенерацию, дегенеративные заболевания спинного мозга/двигательных нейронов, склероз гиппокампа, кортикобазальную дегенерацию, болезнь Баттена, заболевание двигательных нейронов, такое как боковой амиотрофический склероз (также называемый болезнью Лу Герига), первичный боковой склероз, прогрессирующий бульбарный паралич, вариант бокового амиотрофического склероза, псевдобульбарный паралич и наследственную спастическую параплегию.

5. Рекомбинантный лектин по п. 4, в котором нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство или связанные с деменцией симптомы.

6. Рекомбинантный лектин по любому из предыдущих пунктов, в котором эффективное количество рекомбинантного лектина, вводимого для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания, составляет от 0,01 до 1000 мг/кг массы тела субъекта.

7. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания, содержащая терапевтически эффективное

количество рекомбинантного лектина, полученного из лектина *Sclerotium rolfsii*, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

8. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания по п. 7, в которой нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство или связанные с деменцией симптомы.

9. Способ лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта, содержащий этап введения субъекту рекомбинантного лектина, полученного из *Sclerotium rolfsii* и содержащего последовательность с идентификационным номером 1, 2 или 3, или фармацевтической композиции по п. 7.

10. Способ лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта по п. 11, в котором аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с последовательностью с идентификационным номером 4.

11. Способ лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта по п. 11, в котором нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство или связанные с деменцией симптомы, болезнь Хантингтона, прионные заболевания, в частности, болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменцию с тельцами Леви, болезнь диффузных телец Леви, полиглутаминовые (polyQ) заболевания с экспансией повторов, дегенеративные заболевания головного мозга, спинальную и бульбарную мышечную атрофию, атаксию, болезнь Пика, первичную прогрессирующую афазию, множественную системную атрофию, пантотенаткиназа-ассоциированную нейродегенерацию, дегенеративные заболевания спинного мозга/двигательных нейронов, склероз гиппокампа, кортикобазальную дегенерацию, болезнь Баттена, заболевание двигательных нейронов, такое как боковой амиотрофический склероз (также называемый болезнью Лу Герига), первичный боковой склероз, прогрессирующий бульбарный паралич, вариант бокового амиотрофического склероза, псевдобульбарный паралич и наследственную спастическую параплегию.

12. Способ лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания у субъекта по п. 11, в котором нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство или связанные с деменцией симптомы.

13. Способ лечения нейродегенеративного заболевания по п. 10, предусматривающий введение рекомбинантного лектина в дозе от 0,01 до 1000 мг/кг.

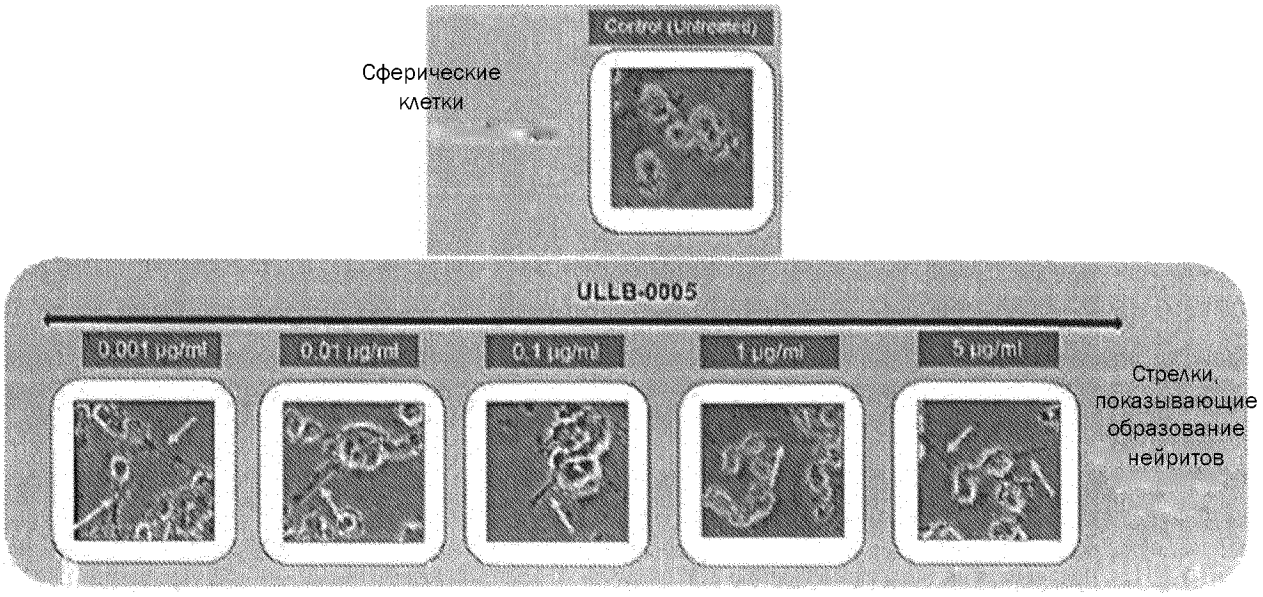
14. Использование рекомбинантного лектина в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики нейродегенеративного заболевания, причем рекомбинантный лектин получают из лектина *Sclerotium rolfsii*.

15. Рекомбинантный лектин для использования в лечении или профилактике нейродегенеративного заболевания по п. 20, в котором аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99 % гомологию с последовательностью с идентификационным номером 4.

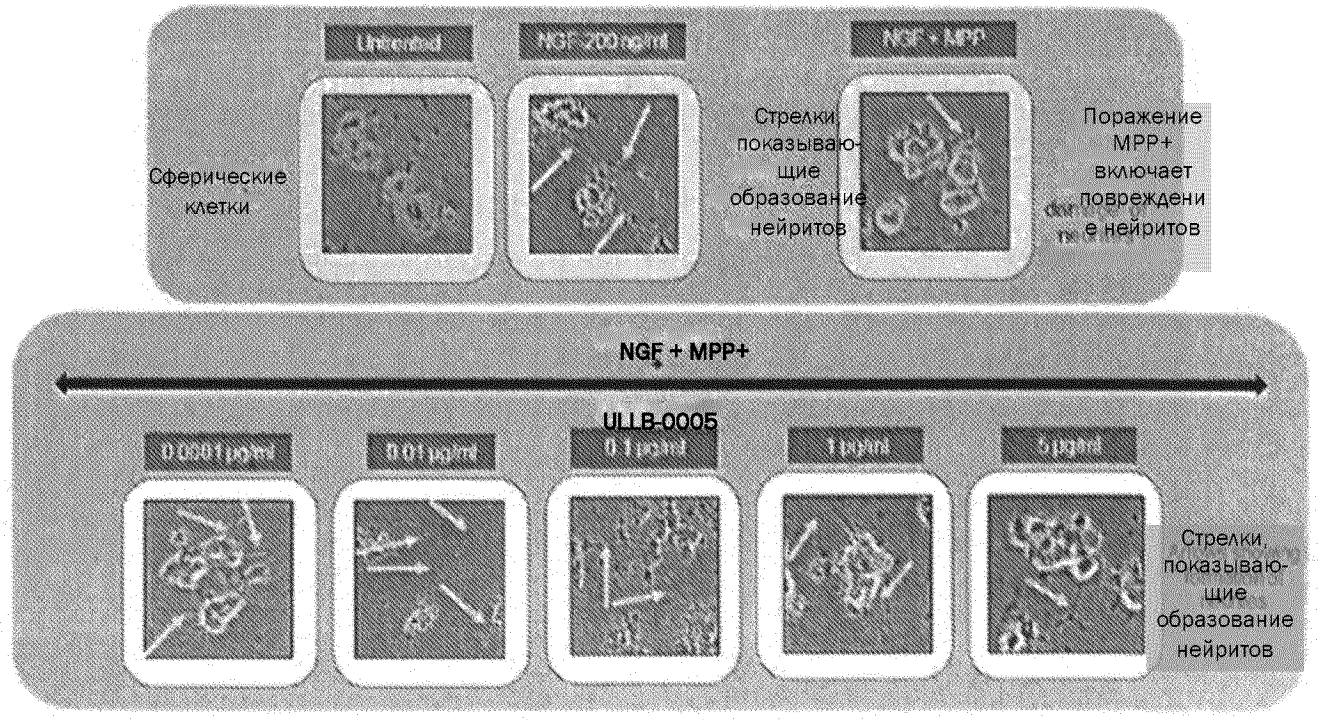
16. Рекомбинантный лектин для использования в лечении или профилактике нейродегенеративного заболевания по п. 20, в котором нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство или связанные с деменцией симптомы, болезнь Хантингтона, прионные заболевания, такие как болезнь Крейтцфельда-Якоба, деменцию с тельцами Леви, болезнь диффузных телец Леви, полиглутаминовые (polyQ) заболевания с экспансией повторов, дегенеративные заболевания головного мозга, спинальную и бульбарную мышечную атрофию, атаксию, болезнь Пика, первичную прогрессирующую афазию, множественную системную атрофию, пантотенаткиназа-ассоциированную нейродегенерацию, дегенеративные заболевания спинного мозга/двигательных нейронов, склероз гиппокампа, кортикобазальную дегенерацию, болезнь Баттена, заболевание двигательных нейронов, такое как боковой амиотрофический склероз (также называемый болезнью Лу Герига), первичный боковой склероз, прогрессирующий бульбарный паралич, вариант бокового амиотрофического склероза, псевдобульбарный паралич и наследственную спастическую параплегию.

17. Рекомбинантный лектин для использования в лечении или профилактике нейродегенеративного заболевания по п. 20, в котором нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство или связанные с деменцией симптомы

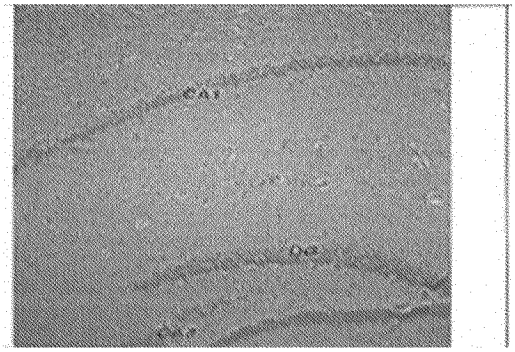
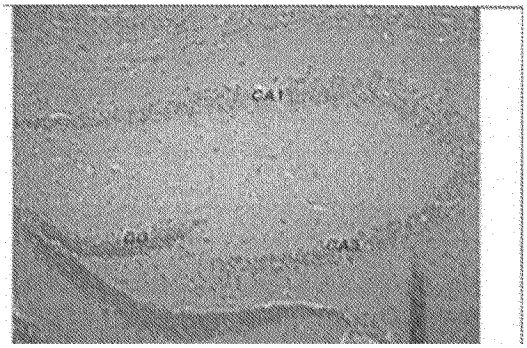
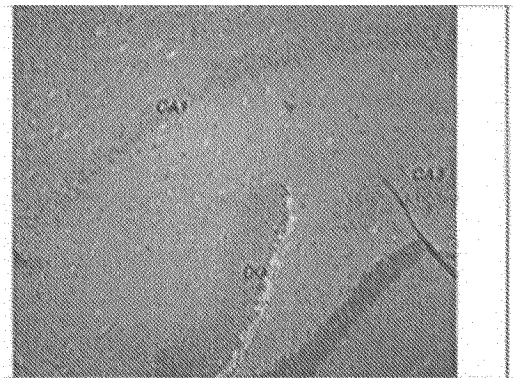
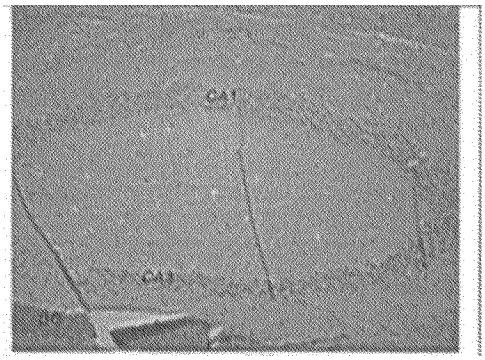
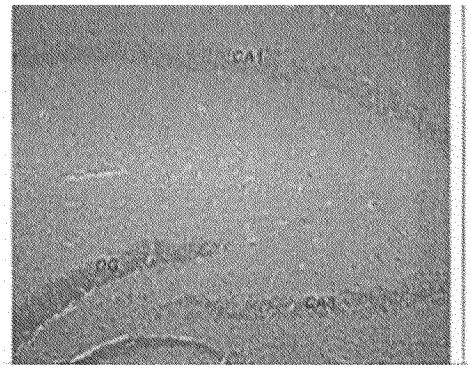
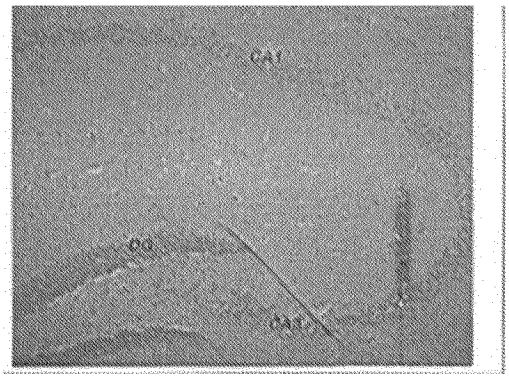
18. Способ индуцирования роста нейронов у субъекта, страдающего нейродегенеративным заболеванием, предусматривающий введение эффективного количества рекомбинантного лектина, содержащего последовательность с идентификационным номером 1, 2 или 3, причем нейродегенеративное заболевание представляет собой болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, деменцию, когнитивное расстройство или связанные с деменцией симптомы.


Сферические клетки
Control (Untreated)
ULLB-0005
0.001 μg/ml
0.01 μg/ml
0.1 μg/ml
1 μg/ml
5 μg/ml
Стрелки, показывающие образование нейритов

Фиг. 1


Untreated
NGF 200 ng/ml
NGF + MPP+
Сферические клетки
Стрелки показывающие образование нейритов
Поражение MPP+ включает повреждение нейритов
NGF + MPP+
ULLB-0005
0.0001 μg/ml
0.01 μg/ml
0.1 μg/ml
1 μg/ml
5 μg/ml
Стрелки, показывающие образование нейритов

Фиг. 2

	
Группа-1; контроль	G2; скополамин + носитель
	
G3; донепезила гидрохлорид	G4; последовательность с идентификационным номером 1, 0,5 мг/кг
	
G5; последовательность с идентификационным номером 1, 0,25 мг/кг	G6: последовательность с идентификационным номером 1, 0,125 мг/кг

Фиг. 3