



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102036665 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 27

(21) 申请号 200980118367. 0

代理人 张萍 刘健

(22) 申请日 2009. 03. 06

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61K 31/47(2006. 01)

P200800736 2008. 03. 13 ES

A61K 31/06(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61K 31/192(2006. 01)

2010. 11. 15

A61K 38/16(2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

A61K 38/43(2006. 01)

PCT/ES2009/000121 2009. 03. 06

A61K 45/06(2006. 01)

(87) PCT申请的公布数据

A61P 25/28(2006. 01)

W02009/112609 ES 2009. 09. 17

(71) 申请人 西马生物医学计划公司

地址 西班牙纳瓦拉省

(72) 发明人 D·S·弗雷奇拉曼索

A·M·加西亚奥斯塔

L·A·佩雷斯梅迪亚维利亚

A·L·里科巴拉萨阿瓦克罗

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

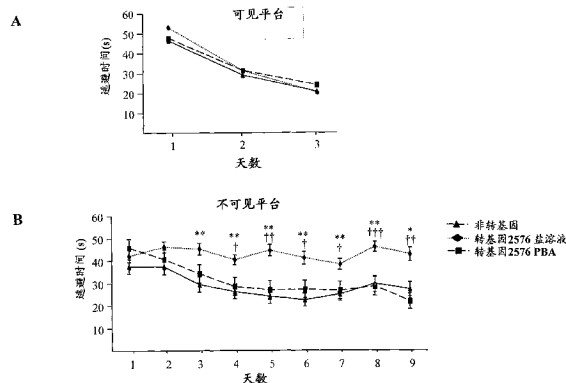
权利要求书 1 页 说明书 15 页 附图 6 页

(54) 发明名称

4- 苯基丁酸钠 (4PBA) 及其药学上可接受的盐的新颖用途

(57) 摘要

本文描述 4- 苯基丁酸钠 (4PBA) 在制备用于治疗 Tau 蛋白病伴有的痴呆中的认知障碍的药物中的用途。4PBA 治疗改善了伴有阿尔茨海默氏病 (AD) 病理学特征标记物 (如磷酸化 Tau 蛋白) 水平降低以及一些突触可塑性标记物蛋白 (如 GluR1 和 PSD95) 的合成水平增加的典型阿尔茨海默氏病 (AD) 鼠实验模型中的认知缺陷。作为治疗效果的介导机制,我们提议如通过增加 GRP78 蛋白所显示的内质网中的应激降低。另一方面,其对组蛋白脱乙酰的抑制效果及其在染色质重塑中的牵涉促进了蛋白合成过程,这改进了突触可塑性。



1. 4- 苯基丁酸 (4PBA) 或其药学上可接受的盐, 其用于预防和 / 或治疗阿尔茨海默氏病。

2. 4PBA 或其药学上可接受的盐在制备用于预防和 / 或治疗阿尔茨海默氏病的药物中的用途。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的 4PBA, 其中所述药学上可接受的盐是 4PBA 钠盐。

4. 药物组合物, 其包含 4PBA 钠盐和药学上可接受的载体, 所述药物组合物用于预防和 / 或治疗阿尔茨海默氏病。

5. 药物组合物, 其特征在于包含作为第一活性成分的 4PBA 或任一种其药学上可接受的盐、第二活性成分和药学上可接受的载体, 所述第二活性成分是用于清除脑 β -淀粉样蛋白沉积物的诱导剂或促进剂。

6. 根据权利要求 5 所述的组合, 其中它包含 4PBA 钠盐作为第一活性成分。

7. 根据权利要求 5 或 6 所述的组合, 其中所述脑 β -淀粉样蛋白沉积物清除诱导剂是金属螯合剂。

8. 根据权利要求 7 所述的组合, 其中所述金属螯合物剂是氯碘羟喹。

9. 根据权利要求 5 或 6 所述的组合, 其中所述脑 β -淀粉样蛋白沉积物清除诱导剂是分解代谢酶。

10. 根据权利要求 9 所述的组合, 其中所述诱导剂是 IDE 胰岛素降解酶或中性溶酶。

11. 根据权利要求 9 或 10 所述的组合, 其中所述脑 β -淀粉样蛋白沉积物清除诱导剂是脑活素。

12. 根据权利要求 9 或 10 所述的组合, 其中所述脑 β -淀粉样蛋白沉积物清除诱导剂是硝基苯酚。

13. 根据权利要求 12 所述的组合, 其中所述硝基苯酚是 2,4- 二硝基苯酚或 3- 硝基苯酚。

14. 根据权利要求 5-13 中任一项所述的药物组合, 其用于预防或治疗阿尔茨海默氏病。

15. 用于预防或治疗阿尔茨海默氏病的方法, 其包括将药学有效量的根据权利要求 5-13 中任一项所述的 4PBA 或其药学上可接受的盐给予需要所述预防或治疗的对象。

4- 苯基丁酸钠 (4PBA) 及其药学上可接受的盐的新颖用途

[0001] 本发明的技术领域

[0002] 本发明属于生物技术领域,其应用于医药领域,用于治疗 Tau 蛋白病 (tauopathies) 伴有的痴呆 (尤其阿尔茨海默氏病) 中的认知障碍。

[0003] 更具体地,本发明提供了以使用 4PBA 为基础的那些病症的新颖治疗。

[0004] 本发明的背景技术

[0005] 阿尔茨海默氏病 (AD) 是最常见的神经变性疾病,并且是痴呆的首要原因 (Cummings 和 Cole, 2002)。阿尔茨海默氏病 (AD) 的病理生理特征与聚集的蛋白沉积物有关:神经原纤维缠结中的细胞内磷酸化 Tau 蛋白聚集物和老年斑中的细胞外 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 聚集物。因此,阿尔茨海默氏病是与异常蛋白折叠有关的疾病的非常有代表性的实例 (Selkoe, 2004)。

[0006] 内质网 (ER) 是在蛋白相关加工的质量控制过程中发挥特别显著作用的部位,因为它调节体内蛋白的合成、折叠和循环。连续蛋白生成需要维持严格的质量控制过程,这发生在内质网中。内质网并非总是以适当的精确性发挥作用,不良折叠的蛋白可能在其内部积累。可能发生该状态,因为一些蛋白 (例如负责引起阿尔茨海默氏病的那些蛋白) 难以折叠,并且还因为蛋白合成的速度快于 ER 能够折叠蛋白的速度。这引起了 ER 的“应激”状态。当达到该状态时,传感器被活化,开始发送一系列信号,意在停止较大部分蛋白的合成,并且还调节折叠速度,使得有可能正确折叠所有蛋白,最终帮助 ER 从应激状态中恢复。

[0007] 内质网应激是触发和介导阿尔茨海默氏病中的神经元死亡的关键事件。几种类型的细胞应激可引起异常折叠的蛋白在 ER 腔中的积聚,该应激状态触发蛋白质量控制机制的活化,以便防止这种积聚的毒性作用 (或者所谓的“未折叠蛋白反应”或 UPR)。UPR 控制机制的活化导致蛋白质合成的总体减少、更大的蛋白降解和编码存在于 ER 中的分子伴侣 (molecular chaperons) (如葡萄糖调节蛋白 (GRPs) GRP78/Bip 和 GRP94) 以及蛋白质二硫键异构酶 (PDI) 的基因的转录增加,以便促进蛋白折叠过程 (Kozutsumi 等人, 1998)。照此, Katayama 等人 (1999) 证实,与来自对照组的相同年龄个体的脑中发现的 ER 存在分子伴侣 (ER-residing molecular chaperon) 的量相比,遭受阿尔茨海默氏病的患者的脑中具有较少的 ER 存在分子伴侣,如 GRP78 和 GRP94,这是一种在应激下可能导致内质网受损的状态。这些研究人员建议,GRP78 的表达发挥防止 ER 应激引起的神经元死亡的作用。因此,增强 GRP78 表达使得可能开发出对抗阿尔茨海默氏病 (AD) 的治疗策略。

[0008] 如果该 UPR 机制不能解决神经元细胞所经历的 ER 应激,则很可能疾病进展,触发神经元凋亡。这是最常见和破坏性的神经变性疾病的状态,所述神经变性疾病 (包括阿尔茨海默氏病、帕金森病和亨廷顿氏病) 全部以未折叠蛋白的积聚和聚集为特征。因此,不令人惊奇的是,许多研究人员已经发现了 UPR 机制在这些极端条件下也被活化的证据。然而在该情况下,该机制的活化结束了引起的伤害大于益处的 (情况),因为初始反应具有保护性,但最终反应具有破坏性。

[0009] 存在几种促进蛋白在脑中积聚的状态。衰老表示发展 AD 的最大风险因素。在细胞应激状态之前诱导伴侣分子表达的能力随年龄而降低。还已经证明,在年老动物中没有

适当地活化 UPR 机制。因此,年龄提高了 ER 对应激和蛋白积聚的毒性效应的敏感性。内质网应激可以由缺氧和 / 或低血糖发作来诱发,两者均是在自然衰老过程中的常见情形。另外,如果蛋白体活性随年龄而降低,则身体对异常蛋白聚集物的形成更敏感。

[0010] 随着年龄增长,在脑中可能产生一种情况 (scenario),其中与异常蛋白积聚有关的神经变性疾病具有高发生概率。

[0011] 中断内质网蛋白系统是包括在阿尔茨海默氏病、帕金森病和亨廷顿氏病等等的几种人类疾病中的一个因素 (Katayama 等人,2001 ;Nishitoh 等人,2002 ;Ryu 等人,2002)。存在称为“化学伴侣”的一系列化合物,如甘油、二甲亚砜 (DMSO) 和 4- 苯基丁酸钠或 4PBA,它们在蛋白折叠和定位 (localization) 期间中显示了异常过程的改善 (Sato 等人,1996 ;Chaudhuri 和 Paul,2006 ;Kubota 等人,2006),并且它们的给药抑制了帕金森氏病鼠模型中的神经元死亡 (Masatoshi I 等人,2007)。

[0012] 4PBA 是一种低分子量脂肪酸,已经批准其在遭受尿素循环障碍的儿童中作为氨螯合剂用于临床实践 (Maestri 等人,1996),并且由于其活化胚胎血红蛋白转录的能力,用于治疗镰状细胞贫血和地中海贫血 (Dover 等人,1994 ;Collins 等人,1995)。还有文献记载了其在脊髓性肌萎缩患者中具有有益效果 (Mercuri E. 等人,2004 ;Mercuri E. 等人,2007)。已经表明,4PBA 可担当逆转与人类疾病有关的异常蛋白定位和 / 或蛋白聚集的化学伴侣 (Rubenstein 和 Zeitlin,2000 ;Kubota 等人,2006)。另外,4PBA 可在与神经炎症反应有关的某些疾病 (如多发性硬化和缺血) 中发挥保护作用 (Dasgupta 等人,2003 ;Qi 等人,2004)。医学文献也列举了其对多谷胺酰胺毒性 (polyglutaminic toxicity) 的有益效果 (Steffan 等人,2001)。

[0013] 治疗 AD 和具有炎性成分的其他疾病的潜在益处,专利 W099/026657 保护化合物抑制可诱导的氧化氮合酶 (iNOS) 的用途。PBA 仅仅在抑制 iNOS 的化合物 (洛伐他汀、弗司扣林、美伐他汀等) 的列表的上下文中有有限地提到,然而,说明书部分不含有涉及显示 PBA 在 AD 对比模型中的有益效果的任何实验。

[0014] 也已经表明,在超负载或应激内质网的状态所共有的信号效应中,异常的 Tau (蛋白) 磷酸化发挥决定性作用,这是许多变性疾病所共有的 (Hernández 和 **Ávila**, 2007)。磷酸化 Tau (蛋白) 是游离的 (free),具有降低的对微管的亲合性,因此促进它们组装的能力极小。负责该 Tau (蛋白) 异常磷酸化的药剂是过度活化的糖原合酶激酶 3 α / β (GSK) (Kim 等人,2007)。磷酸 -Tau (蛋白) (phospho-tau) 聚集物是 AD 和其他 Tau 蛋白病的鉴定特征之一。用于抗 ER 超负载的细胞保护的适当策略能够直接抑制 GSK3 活性,因此降低了 Tau (蛋白) 磷酸化及其毒性。有可能的是,Tau 磷酸化是神经机制的整合成分 (integrated component),达到缺乏所述功能的调节导致在疾病 (如阿尔茨海默氏病) 的发展中的记忆力减退的程度 (Arendt 等人,2003 ;Ikeda 等人,2007)。

[0015] 与学习过程行为有关的另一个反应是组蛋白乙酰化。组蛋白乙酰化介导通过染色质修饰来调节基因转录的机制,因此最近 (发现) 其牵涉突触可塑性。已经证明,给予 4PBA 增加了表达肌萎缩侧索硬化的鼠模型中的组蛋白乙酰化 (Petri S 等人,2006)。因此,据推测,4PBA 可通过抑制组蛋白脱乙酰酶来诱导可能导致神经元可塑性基因活化的转录修饰。Andreassi 等人 (2004) 将 4PBA 给药直接与其损失造成脊髓性肌萎缩的基因的完全表达的增加相联系。

[0016] 然后可能的是,增加 H4 组蛋白乙酰化可调节相对特异性的转录程序。通过突触后膜的 AMPA 受体运输是快速传输和突触可塑性的迹象。

[0017] 基因转录要求活化转录因子,但也要求诱导进行基因表达的染色质的组织化发生动态改变。组蛋白高度乙酰化将组蛋白从其键 (bond) 释放到染色质中,随后对基因转录过程 (Lea 和 Randolph, 1998) 和蛋白合成产生影响。已经显示, RNA 合成和“从头”蛋白合成在各种脊椎动物和无脊椎动物物种的长期记忆产生过程中是必需的,并且它们还可能介导新突触连接的形成 (Tuilly 等人, 2003)。据信,长期记忆形成必然伴有基因表达的持久的效应,越来越多的证据表明,组蛋白修饰和 DNA 甲基化可能参与该过程 (Bailey 等人, 2004; Levenson 和 Sweatt, 2005)。Fischer 等人 (2007) 的工作表明,通过注射组蛋白脱乙酰酶抑制剂 (HDAC) 或通过使该环境富集,增加了组蛋白乙酰化;它促进了其中小鼠中发生神经变性疾病实验模型中的记忆功能。学习过程和记忆巩固的改进与转录的增加相关,且更直接地与突触可塑性标记物和树突标记物 (dendritic markers) 的调节增强相关,这建议了可能改进记忆功能的新机制。

[0018] 该组蛋白乙酰化过程控制记忆巩固和长时程突触增强 (LTP) 所必需的基因的转录 (Bailey 等人, 2004; Levenson 和 Sweatt, 2005; Fischer 等人, 2007)。组蛋白乙酰基转移酶 (HAT) 和组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 的异常活性还可以是有助于神经变性的神经系统疾病 (如中风、亨廷顿氏病、肌萎缩侧索硬化、弗里德赖希共济失调和阿尔茨海默氏病) 所共有的机制 (根据 Langley 等人在 2005 年出版的修订本)。一些研究表明,基因转录在一些与疾病进展有关的脑区域中失调,并且支持 RNA 转录破坏机制在一些变性疾病中存在的观念 (Anderson 等人, 2007)。

[0019] AMPA 受体中的 GluR1 亚基以及 PSD95 是突触形成和功能中的关键突触后标记物。在遭受阿尔茨海默氏病的患者的脑中以及 Tg2576 转基因小鼠的脑中发现的 PSD95 和 GluR1 突触后缺乏可能有助于突触功能障碍和认知功能的缺乏 (Almeida 等人, 2005)。基于该观念,研究人员观察到,在用 4PBA 处理的 Tg2576 转基因小鼠的 AMPA 受体处的 GluR1 亚基和海马中的 PSD95 的表达降低标记物的确显示了认知功能的改进。几个研究已经概括了在各种实验模型中防止神经毒性的 4PBA 改变基因的光谱 (Chang 和 Min, 2002; Kang 等人, 2002; Ryu 等人, 2005)。

[0020] 许多变性疾病 (如阿尔茨海默氏病) 的病理生理学以及神经保护可能包括很多的机制。在阿尔茨海默氏病的具体情况中,这些致病机制主要包括 A β 聚集和沉积以及斑块发展、Tau (蛋白) 过度磷酸化与缠结形成、神经血管功能障碍以及其他机制,如细胞周期异常、炎症过程、氧化应激和线粒体功能障碍。关于阿尔茨海默氏病因的中心假设是淀粉样蛋白级联 (amyloid cascade) 假设。

[0021] 据计算,在下一个 50 年里,受 AD 影响的人数将增至三倍,在 2050 年达到一千三百二十万。该增加归因于老年人群的持续增长。每 4 年,期望寿命增加 1 年,对于阿尔茨海默氏病患者也一样。这意味着,受该疾病影响的那些患者将活得更长 (这些患者的目前寿命期望率是在诊断之后 10-12 年之间)。就预防性治疗而言,疫苗研究由于对中枢神经系统的副作用而终止。

[0022] 这些考虑表明,阿尔茨海默氏病将是在下一个 50 年中的社会卫生计划的重大挑战。

[0023] 由于仍然没有阿尔茨海默氏病的有效治疗,因此本发明描述了 4PBA 凭借其多个机制恢复属于鼠模型阿尔茨海默氏病典型特征的学习过程和记忆功能减退的能力。

[0024] Kim 等人 (2004) 证明淀粉样蛋白前体蛋白 C 端片段 (APP-CT) 的表达诱导了组蛋白 3 和组蛋白 4 的乙酰化的增加,并且由 APP-CT 诱导的细胞毒性通过在 NGF 分化的 PC12 细胞和大鼠原代皮层神经元中用丁酸钠处理而显著地增加。总而言之,结果建议,APP-CT 通过转录依赖性机制而发挥神经毒性,并且这可能有助于 AD 的发病机理。

[0025] Fischer 等人 (2007) 显示,丁酸钠而非 4PBA 恢复神经变性小鼠模型 (即,双转基因 CK-p25 Tg 小鼠) 中的组蛋白乙酰化状态以及学习和记忆,其中 p25 (牵涉各种神经变性疾病的蛋白) 的表达是在 CamKII 启动子的控制之下,并且能够用多西环素饮食 (diet) 接通或关闭。然而,Fischer 等人 (2007) 所使用的动物模型不是阿尔茨海默氏病的典型模型,因为它没有再现与人淀粉样 β 蛋白或异常 Tau 磷酸化有关的致病机制。尤其,它仅仅包括蛋白 p25 (p35 的截短形式) 的受损表达,其为细胞周期蛋白依赖性激酶-5 (CDK5) 的调节亚基。

[0026] 相反,通过使用阿尔茨海默氏病的合法的共有转基因小鼠模型 (即,Tg2576 小鼠,其表达与阿尔茨海默氏病有关的人淀粉样 β 前体蛋白 (APP) 变体),本发明的发明人令人惊奇地发现,4-苯基丁酸钠有效治疗阿尔茨海默氏病。本发明人已能表明,改进了临床症状 (如记忆获取和保留),并且重要的是,也已证明,在给予 4PBA 之后,降低了 Tau 过度磷酸化水平。

[0027] 发明描述

[0028] 本发明描述了 4PBA 在阿尔茨海默氏病型健忘症中的潜在有益作用。我们发现,用 4PBA 治疗 16 月龄 Tg2576 转基因小鼠 5 周,的确逆转了空间记忆缺陷。所得结果建议,可能的是,一方面通过增加分子伴侣的水平和诱导 Tau (蛋白) 脱磷酸而赋予细胞对抗内质网应激的效应的保护来介导 4PBA 的效果,另一方面,通过增加 H4 组蛋白的乙酰化来介导 4PBA 的效果,这进而诱导了突触标记物的表达,所述表达进而导致恢复长期空间记忆。

[0029] 还发现,GRP78 水平在 Tg2576 转基因小鼠的海马中较低;甚至进一步观察到,在用 4PBA 处理之后,在非转基因小鼠中的 GRP78 表达达到类似水平,这与 Katayama 的观察 (1999) 相一致。

[0030] 还观察到,Tg2576 转基因小鼠的大脑皮质中 H4 乙酰化的减少可能与致密填充的染色质结构有关,这对应于转录抑制。

[0031] 调查的结果提议以下假设:因为 4PBA 提高组蛋白 H4 的乙酰化,所以它也活化了促进神经元可塑性的蛋白 (AMPA 受体 GluR1 亚基和 PSD95) 以及内质网蛋白 (GRP78) 的转录和合成,这进而必然伴有海马的正确功能并导致恢复减退了的记忆功能。

[0032] 在用盐溶液处理的 Tg2576 转基因小鼠的海马中于 Ser202/Thr205 (AT8) 部位还观察到 Tau (蛋白) 磷酸化水平的增加,而用 4PBA 处理的转基因小鼠中的 Tau (蛋白) 磷酸化水平与非转基因小鼠的那些 Tau (蛋白) 磷酸化水平没有差别。本发明证明,降低磷酸化 Tau (蛋白) 的水平改善了转基因小鼠的认知功能。该发现与最近的观测相一致,这提示,Tau 降低在表达人淀粉样蛋白的蛋白前体的转基因小鼠中防止行为缺陷中具有有益效果,而不改变它们的 A β 水平 (Roberson 等人,2007)。

[0033] 因为 4PBA 的作用机制之一是减少 Tau (蛋白) 的过度磷酸化形式,所以这能假定,

它还有效用于除了阿尔茨海默氏病以外的 Tau 蛋白病伴有的其他痴呆（例如额颞痴呆、进行性核上麻痹 (PSP)、皮克病和路易体痴呆 (Lewy body dementia)）的认知治疗。

[0034] 本发明涉及用于预防和 / 或治疗阿尔茨海默氏病的 4PBA 或其药学上可接受的盐。换句话说, 本发明涉及 4PBA 或其药学上可接受的盐在制备用于预防和 / 或治疗阿尔茨海默氏病的药物中的用途。类似地, 本发明提供了用于预防或治疗阿尔茨海默氏病的方法, 其包括对需要所述预防或治疗的患者给予药学有效量的 4PBA 或其药学上可接受的盐。

[0035] 本文使用的术语“4PBA”还包括属于其在体内的新陈代谢的产物的那些代谢物或化合物。与该化合物的不同治疗用途有关的本发明的实施方案也包括其代谢物（即, 苯基乙酸酯 / 盐 (phenylacetate)）的用途。

[0036] 在一个实施方案中, 本发明涉及用于预防或治疗 Tau 蛋白病伴有的痴呆, 更尤其用于预防或治疗所述痴呆中的认知障碍的 4PBA 或任何一种其药学上可接受的盐, 或者包含 4PBA 或任何一种其药学上可接受的盐的组合物。

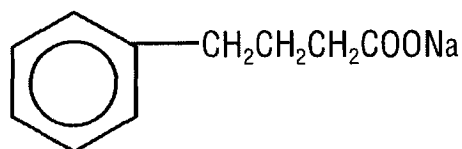
[0037] 本发明也涉及 4PBA 或任何一种其药学上可接受的盐或者包含 4PBA 或任何一种其药学上可接受的盐的组合物在制备预防或治疗 Tau 蛋白病伴有的痴呆, 尤其用于与所述痴呆有关的认知障碍的药物中的用途。

[0038] 本发明的一个实施方案中, 尤其涉及用于预防或治疗与 Tau 蛋白病伴有的痴呆相关的认知障碍的 4-PBA 钠盐。

[0039] 4PBA 是 4- 苯基丁酸 (4-phenylbutyrate), 其是可从诸如 SIGMA-ALDRICH (产品号 :P21005) 之类的公司获得的市售产品 ; 其 CAS 登记编号为 1821-12-1 ; 其化学式为 $C_6H_5(CH_2)_3COOH$ 。

[0040] 4PBA 钠盐也是可从例如 BIOMOL International L.P. 获得的市售产品 (Palatine House, Matford Court, Exeter EX2 8NL, UK ; 目录号 :EI320) ; CAS 登记编号为 1716-12-7 ; 其化学式为 $C_6H_5(CH_2)_3COONa$; 并且其结构式为 :

[0041]



[0042] 或者, 还可使用已知方法来获得该化合物。

[0043] Buphenyl[®] 和 Ammonaps[®] 是分别由 FDA 和 EMEA 批准的苯基丁酸钠组合物的商标, 用于治疗尿素循环障碍。它还可作为 TriButyrate[®] (Triple Crown America) 获得。

[0044] 术语“药学上可接受的”是指, 该化合物或化合物的组合必需与制剂的其余成分相容, 并且对于接受它的患者或对象无害。对于治疗用途, 4PBA 的盐是其中抗衡离子为药学上可接受的那些盐。

[0045] 本发明的一个实施方案中, 包含 4PBA 或一种其药学上可接受的盐的组合物是还包含载体或药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0046] 上文提到的药学上可接受的盐意图包括 4PBA 能够形成的治疗活性的无毒盐形式。可通过用此类适当的阳离子处理 4PBA 的酸形式便利地获得所述药学上可接受的盐。适当的碱式盐包括与有机阳离子（如苄星、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、葡甲胺、普鲁卡因）形成的那些盐 ; 以及与金属阳离子（如铝、钙、锂、镁、钾、钠和锌）形成的那些盐。

[0047] 相反地,可通过用适当的酸处理将所述盐形式转化为游离形式。

[0048] 术语“盐”还有意包括 4PBA 能够形成的水合物或溶剂合物,包括例如醇盐,例如甲醇盐或乙醇盐。术语“溶剂合物”是指包含化学计算量或非化学计算量的溶剂的那些 4PBA 晶形。因为水是溶剂,所以溶剂合物也包括水合物。术语“假多晶型物”是溶剂合物的同义词,因为它应用于在其晶格结构中并入溶剂分子的多晶形式。溶剂合物的实例是水合物和醇盐(如甲醇盐或乙醇盐)。

[0049] 术语“预防”是指“预防”的行动,理解为避免该术语应用的疾病、障碍或病症,或者与该疾病、障碍或病症有关的一个或几个症状的发作、存在,或者延迟它们的发作或复发。

[0050] 术语“治疗”是指“治疗”的行动,该术语也理解为逆转、减轻或抑制该术语应用的疾病、障碍或病症或者与该疾病、障碍或病症有关的一个或几个症状的进程。

[0051] “Tau 蛋白病伴有的痴呆”是指神经变性疾病,其中 Tau 蛋白代谢发生改变,且其中最相关的症状或后果之一是认知障碍的发作。尤其,4PBA 或其盐可用于预防或治疗与此类痴呆有关的认知障碍。

[0052] 本发明的一个特别实施方案涉及预防或治疗疾病,如阿尔茨海默氏病、额颞痴呆、进行性核上麻痹、皮质基底节变性(corticobasal degeneration)、皮克病、路易体痴呆、嗜银颗粒性痴呆(argyrophillic grain dementia)、C 型尼曼-皮克病或拳击员痴呆(pugilistic dementia)。

[0053] 本发明的一个更特别的实施方式涉及阿尔茨海默氏病(尤其与该疾病相关的认知障碍)的预防或治疗。

[0054] 本发明的更优选的实施方案是 4PBA 钠盐在制备用于治疗前述疾病的药物中的用途。

[0055] 本发明的另一个方面涉及包含 4PBA 或任何一种其药学上可接受的盐的组合物,其用于预防或治疗 Tau 蛋白病伴有的痴呆,尤其与这些疾病有关的认知障碍。一个特别实施方案中,该组合物包含 4PBA 钠盐。一个特别实施方案涉及包含 4PBA 钠盐和药学上可接受的载体的药物组合物,其用于预防和/或治疗阿尔茨海默氏病。

[0056] 先前的研究已经表明,改进学习过程和记忆功能并非总是与脑中的 A β 水平的可检测改变有关(Dodart 等人,2002 ;Gong 等人,2004)。如果将该信息与本发明中提供的信息一起考虑,则结果建议,转基因小鼠中观察到的脑中 A β 的可溶性浓度和不溶性浓度与记忆减退之间的关系是该任务所特有的关系,并且也是复杂的。另外,在广泛研究中,在 A β 的沉积形式(例如在斑块的情况下)与受阿尔茨海默氏病影响的患者的记忆减退之间没有发现明显的相关性(Hyman 等人,1984)。事实上,最近的报告建议,可溶性 A β 的水平可能与神经变性和记忆减退更相关(Lue 等人,1999 ;McLean 等人,1999 ;Lesné 等人,2007)。

[0057] 因此,有意加强其疗效的本发明的另一个实施方案是包含 4PBA 和/或任何一种其药学上可接受的盐作为第一活性成分以及第二活性成分药剂的组合,所述第二活性成分药剂是诱导或促进脑中 β -淀粉样蛋白沉积物清除的药剂。更优选的实施方案使用金属螯合剂、以可溶性形式的 β -淀粉样肽存在的分解代谢酶(catabolizing enzymes)、脑活素或硝基苯酚作为所述沉积物的清除剂。

[0058] 本发明的另一个实施方案提供药物组合,其包含 4PBA 或其药学上可接受的盐作为第一活性成分、第二活性成分药剂、以及药学上可接受的载体,所述第二活性成分药剂是

用于清除脑中的 β -淀粉样蛋白沉积物的诱导剂或促进剂。更优选的实施方案使用金属螯合剂、以可溶形式的 β -淀粉样肽存在的分解代谢酶、脑活素或硝基苯酚作为所述沉积物的清除剂。

[0059] 甚至更优选的实施方案是使用氯碘羟喹、脑活素或 2,4-二硝基苯酚或 3-硝基酚作为沉积物清除诱导剂。

[0060] 甚至更优选的实施方案是使用氯碘羟喹、脑活素、IDE 胰岛素降解酶或中性溶酶 (neprilysin) 或 2,4-二硝基苯酚或 3-硝基酚作为沉积物清除诱导剂。

[0061] 因此本发明的另一个实施方案是作为同时使用来预防和/或治疗 Tau 蛋白病伴有的痴呆中的认知障碍的联合制剂的产品的用途,所述产品含有 4PBA 和/或任何一种其药学上可接受的盐作为第一活性成分、以及第二活性成分,所述第二活性成分为清除脑淀粉样蛋白沉积物的诱导剂或促进剂。另一个实施方案的特征在于相同联合制剂,其设计用于分开使用两种活性成分,而又一个实施方案将其设计用于按序使用。

[0062] 照此,本发明药物组合中的两种组分或活性成分可以是同一单位 (unitary) 药物制剂的一部分;或者是作为同一治疗方案的一部分的用于共同给予该两种组分或活性成分的分开的药物制剂的一部分。当在分开的药物制剂中给予该两种组分时,不必需将它们同时给药,尽管需要时可以这样做。

[0063] 一个另外的方面中,本发明涉及产品或试剂盒,其包含药物组合,该药物组合包含本文规定的实施方案中的任一个中的 4PBA 和/或任何一种其药学上可接受的盐以及用于清除脑中的 β -淀粉样蛋白沉积物的诱导剂或促进剂。

[0064] 另一个方面中,本发明涉及所述药物组合或试剂盒,所述试剂盒包含用于预防或治疗 Tau 蛋白病伴有的痴呆 (尤其相关的认知障碍) 的所述药物组合。所述组合或试剂盒有用于制备药物,所述药物用于预防所述痴呆,尤其前文规定的那些痴呆中的任何一种,更尤其阿尔茨海默氏病。

[0065] 本发明的其他方面还涉及预防或治疗 Tau 蛋白病伴有的痴呆 (尤其相关的认知障碍) 的方法,该方法包括对需要所述预防和/或治疗的对象给予药学有效量的 4PBA 或任何一种其药学上可接受的盐、或者包含 4PBA 和/或任何一种其药学上可接受的盐的组合物、或者包含 4PBA 和/或任何一种其药学上可接受的盐,以及用于清除脑中形成的 β -淀粉样蛋白沉积物的诱导剂或促进剂的药物组合。

[0066] 术语“药学有效量”是指一定量的化合物或活性化合物的组合,其有效治疗疾病;改善、减轻或消除该疾病的一个或几个症状;或者预防或延迟该疾病的一个或多个症状发作。

[0067] 待给予的本发明的活性物质 (即,4PBA 和/或其药学上可接受的盐) 的剂量取决于个体病例,按照惯例,应适应于个体病例的状况,以获得最佳效果。因此所述剂量当然取决于给药频率以及在各病例中使用的该化合物用于治疗或预防的功效和作用持续时间,而且取决于疾病和症状的性质和严重程度,并取决于待治疗的人或动物的性别、年龄、体重、共同给药和个体反应性,以及取决于该治疗是急性治疗还是预防性治疗。

[0068] 4PBA 和/或其药学上可接受的盐的治疗有效量可以为 1mg 到 200g/日、2mg 到 150g/日、5mg 到 100g/日、10mg 到 75g/日、20mg 到 75g/日、50mg 到 75g/日、0.1g 到 75g/日、0.2g 到 75g/日、0.5g 到 75g/日、1g 到 50g/日、5g 到 50g/日。

[0069] 术语“对象 (subject)”是指动物, 尤其哺乳动物, 如灵长类、狗、猫、牛科动物、马、绵羊和人。该术语尤其应用于两种性别的人。

[0070] 用于如上所述用途的含有 4PBA 的制备药物的优选给药模式是含有其钠盐的片剂形式。药物制剂的这些片剂可以包含赋形剂, 如微晶纤维素、硬脂酸镁或胶体二氧化硅。

[0071] 另一种优选的给药形式是粉末, 其含有 4PBA 钠盐和使之可溶于水的赋形剂。该粉末的药物制剂可包含赋形剂, 如硬脂酸钙或胶体二氧化硅。

[0072] 附图简述

[0073] 图 1A : 与非转基因小鼠所经历的等待时间相比, 在可见平台期期间用 Morris 试验测量各水平时, 在不同的天数, 用 4PBA 和盐溶液处理的转基因小鼠所经历的等待时间 (latency time)。

[0074] 图 1B : 与非转基因小鼠所经历的等待时间相比, 在不可见的平台期期间用 Morris 试验测量各水平时, 在不同的天数, 用 4PBA 和盐溶液处理的转基因小鼠所经历的等待时间。

[0075] 图 1C : 与非转基因小鼠的所述时间相比, 在 Morris 试验期间测量各水平时, 在不同的天数, 用 4PBA 和盐溶液处理的转基因小鼠保持在正确的象限 (quadrant) 中的时间。

[0076] 图 2A : 在用 4PBA 和盐溶液处理的转基因小鼠的脑皮质提取物中发现的源自 A β 42 和 A β 40 肽的水平。

[0077] 图 2B : 与非转基因小鼠的相比, 用 4PBA 和盐溶液处理的转基因小鼠脑中由 A β 肽积聚所形成的斑块的标记方案 (marking scheme)。

[0078] 图 3A : 与非转基因小鼠的相比, 用 4PBA 和盐溶液处理的转基因小鼠中磷酸化 Tau (蛋白) 水平与正常蛋白之间的关系。

[0079] 图 3B : 与非转基因小鼠的相比, 用 4PBA 和盐溶液处理的转基因小鼠中磷酸化 GSK3 (无活性形式) 水平与非磷酸化蛋白 (活性形式) 之间的关系。

[0080] 图 4 : 与非转基因小鼠的相比, 用 4PBA 和盐溶液处理的转基因小鼠的海马提取物中 GRP78 表达的水平。

[0081] 图 5 : 与非转基因小鼠的相比, 用 4PBA 和盐溶液处理的转基因小鼠的皮质提取物中乙酰化的组蛋白 4 (ACh4) 和组蛋白 3 (ACh3) 水平。

[0082] 图 6 : 与非转基因小鼠的相比, 从用 4PBA 和盐溶液处理的转基因小鼠的海马中获得的膜富集的蛋白 (membrane-enriched protein) 提取物中的 GluR1、PSD95 和 MAP-2 蛋白的表达水平。

[0083] 发明的实施方式

[0084] 另外通过以下实施例来说明本发明, 所述实施例与前文描述的附图一起举例说明用于其开发的实验方法。应理解, 本领域技术人员能够理解可在本发明的范围内实施的修改、变型和变化。

[0085] 实施例

[0086] 实施例 1. 鼠动物实验模型及其治疗

[0087] 我们使用表达 695-aa 人 APP 同工型的患有阿尔茨海默氏病的 Tg2576 转基因小鼠, 所述同工型含有由冷冻仓鼠启动子触发的双重 APP_{swe} 瑞典型突变 (double APP_{swe} Swedish mutation) [(APP695)Lys670 $\rightarrow$ Asn, Met671 $\rightarrow$ Leu]。在用于实验鼠模型的遭受阿

尔茨海默氏病的 Tg2576 转基因小鼠中,在其生命的第 7 个月至第 12 个月,A β 肽含量在脑中按指数级积聚。当如此处理的小鼠达到 12-15 个月的年龄,并对其进行 Morris 水迷宫试验时,它们显示记忆功能减退。因此,在 5 周期间,用 200mg/kg 4PBA 或其载体对 16 月龄雌性 Tg2576 转基因小鼠进行腹腔内处理,每天处理一次。为了进行该处理,制备 4PBA 溶液,在 pH7.4 下滴定等分子量的 4-苯基丁酸 (Sigma) 和氢氧化钠。使用相似品系和年龄的没有基因改变的一组正常小鼠作为对照组。按照欧洲和西班牙法规 (86/609/CEE ;RD1201/2005) 进行所有临床试验程序。

[0088] 实施例 2. Morris 水迷宫 (MWM)

[0089] 在用 4PBA 处理的 Tg2576 转基因小鼠中,使用如以前在文献 (Ribe 等人,2005) 中所述的 Morris 水迷宫来评价操作性记忆功能和参考记忆功能。当它们达到 16 月龄时,使用 Morris 水迷宫,对经 4PBA (n = 6)、载体 (n = 7) 处理的 Tg2576 雌性小鼠组和以及同一窝非转基因小鼠 (non-transgenic litter siblings) (n = 10) 组进行空间学习和记忆试验。迷宫由充满 20°C 水的圆形池构成。在具有可见平台的池中在 3 个连续日期间,小鼠接受预先训练 (8 次试验 / 日),以能够游向升高到超过水平面的平台。使用隐藏平台的训练进行 9 个连续日 (4 次试验 / 日),在此期间,允许所有小鼠有 60 秒钟来发现浸没在水面以下 1cm 的平台。将不能发现平台的那些小鼠引导至该平台。允许所有小鼠在平台上有 20 秒休息期,然后从平台上提起小鼠,送回到它们的笼子中。在试验的第 4 天、第 7 天和最后一天的开始时,进行预先试验,在此期间,从池中移除平台,使小鼠在 60 秒期间寻找该平台。用 VHS 照相机和 Watermaze 软件监控所有试验,以分析逃避等待期和预先试验期间各池象限的占据时间的百分率 (使用 Ethovision 软件,Wageningen,荷兰)。将没学会定位可见平台的小鼠或者表现出异常游泳模式或持久漂浮的小鼠从分析中排除。

[0090] 为了研究 4PBA 对认知功能的影响,分析 5 周的 4PBA 处理是否会减轻 16 月龄 Tg2576 转基因小鼠在 Morris 水迷宫试验期间所表现出的学习缺陷。在处理结束时,用载体处理的 16 月龄转基因小鼠所显示的熟练性低于相同年龄的无基因改变的小鼠所显示的熟练性。相反地,用 4PBA 处理的转基因小鼠所显示的熟练性与相同年龄的对照组中的小鼠所显示的熟练性没有差别 (图 1B)。

[0091] 在 12、24 和 32 次试验之后,对所有小鼠进行预先试验,在此期间,将它们放入已经移除平台的池中游泳 15 秒时间。记忆保留测量是在训练期期间在平台过去所在的象限中游泳 15 秒钟的百分率 (目标象限)。用载体处理的转基因小鼠在目标象限中度过的时间百分率显著低于来自对照组的小鼠在所述象限中度过的时间。4PBA 处理过的转基因小鼠在所述象限中度过的时间量与来自对照组的相同年龄小鼠在所述象限中度过的时间量没有差别 (图 1C)。虽然所述差别在不可见平台试验中变得明显,但在其中使用可见平台的第一训练试验期间逃避等待 (时间) 没有显著差别 (图 1A)。这些数据建议,4PBA 的慢性给药改善了 Tg2576 转基因小鼠相对于水迷宫试验的记忆功能。

[0092] 实施例 3. 测定 A β 水平的方法

[0093] 因为 4PBA 处理清楚显示对记忆获得和保留过程有益,所以下一个方面将探究 Tg2576 转基因小鼠中的 A β 水平的影响和 Tau 蛋白病。在 Morris 水迷宫中进行最后一次试验之后 24 小时处死小鼠。将皮质和海马切片,用于进行生化分析。然后,通过夹心型 ELISA 试验分析大脑皮质中的 A β 40 和 A β 42 的水平。

[0094] 在含有 5M 胍 HCl 和 50mM Tris HCl (pH = 8)、蛋白酶抑制剂 (Roche's Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (罗氏的 Complete™ 蛋白酶抑制剂鸡尾酒)) 和磷酸酶抑制剂 (0.1mM Na_3VO_4 , 1mM NaF) 的缓冲液中将大脑皮质匀浆。将如此获得的匀浆声处理 2 分钟, 以 $100,000 \times g$ 旋转 1 小时。将上清液等分试样在 -80°C 下冷冻干燥, 使用 Bradford 方法, 用 Bio-Rad 试剂盒测定蛋白浓度。用来自 Biosource (Camarillo, Ca, USA) 的非常灵敏的夹心型 ELISA 试剂盒测定 A β 42 水平。为了进行该测定, 按照制造商的说明, 将 300 μg 的总上清蛋白一式二份直接沉积到 ELISA 板上。

[0095] 从图 2A 可以看出, 与用 4PBA 处理的转基因小鼠相比, 用载体处理的 Tg2576 转基因小鼠中的 A β 40 或 A β 42 水平没有观察到差别。在同一窝非转基因小鼠中没有检测到 A β 。当测量 A β 水平和 A β 免疫反应性面积的百分率以便计算海马中的斑块负荷时, 获得了类似的结果 (图 2B)。

[0096] 实施例 4. 蛋白提取物的产生和蛋白质印迹型免疫学分析

[0097] 通过颈脱位处死小鼠, 从脑中迅速切取它们的海马。通过以下方式获得总体匀浆: 在 4°C 下, 以 $14,000 \times g$ 旋转 20 分钟, 将海马组织在冰冷的 RIPA 缓冲溶液 (50mM Tris-HCl, pH = 7.4, 0.25% DOC, 1% Nonidet P-40, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 亮肽素, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抑肽酶, 1mM Na_3VO_4 , 1mM NaF) 中匀浆, 然后将得自上清液的等分试样在 -80°C 下冷冻干燥。使用标准方法来获得膜的富集蛋白级分 (P2 膜蛋白)。将海马组织在含有 320mM 蔗糖和前述蛋白酶和磷酸酶抑制剂的冰冷的 Tris-EDTA 缓冲溶液 (10mM Tris-HCl 和 5mM EDTA, pH = 7.4) 中匀浆。将该匀浆组织以 $700 \times g$ 旋转 10 分钟。将所得上清液再次以 $37,000 \times g$, 在 40°C 下旋转 40 分钟。最后, 将沉淀 (pellet) (P2) 再悬浮于含有如上所述的酶抑制剂混合物的 10mM 的 Tris-HCl 缓冲溶液 (pH = 7.4) 中。在两种情况下测定蛋白浓度 (使用购自 Bio-Rad 的 Bradford 试验), 将等分试样在 -80°C 下贮存, 直到进一步使用为止。对于蛋白质印迹型分析, 在添加 0.1 体积的 10% 脱氧胆酸钠的变性条件下, 使 P2 膜级分溶解在 500mM Tris-HCl 缓冲溶液 (pH = 9) 中。将样品在 36°C 下孵育 30 分钟, 并通过添加 0.1 体积的 500mM Tris-HCl (pH = 9)/1% Triton X-100 进行稀释。以 $37,000 \times g$, 在 4°C 下将样本离心 10 分钟之后, 将所得上清液在 -80°C 下贮存。

[0098] 为了分析组蛋白, 获取来自小鼠的额叶大脑皮质的提取物, 并在含有蛋白酶抑制剂的冷的裂解缓冲液 (0.2M NaCl, 0.1M HEPES, 10% 甘油, 200mM NaF, 2mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 5mM EDTA, 1mM EGTA, 2mM DTT, 0.5mM PMSF, 1mM Na_3VO_4 , 1mM 苯甲脒 (benzamide), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 亮肽素, 400U/ml 抑肽酶) 中进行匀浆, 然后以 $14000 \times g$, 在 4°C 下离心 20 分钟。将得自上清液的等分试样在 -80°C 下贮存。用来自 Bio-Rad Bradford (BioRad laboratories, Hercules, California) 的 Bradford 试验获得总蛋白浓度。

[0099] 为了进行蛋白质印迹分析, 将蛋白样本在具有相同体积 (2 $\times$ Laemmli) 的缓冲液中混合, 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中解析, 并转移到硝酸纤维素膜上。然后将膜在 PBS 或 TBS 封闭溶液中的 5% 牛奶、0.05% 吐温-20 中封闭, 随后用下列抗体在相应缓冲溶液中孵育, 持续整个晚上: 小鼠单克隆抗-磷酸 Tau (蛋白) AT8 (Pierce)、兔多克隆抗-pGSK3-Ser9 (Cell Signalling)、兔多克隆抗-GSK3、山羊多克隆抗 GRP78 (Santa Cruz)、兔多克隆抗乙酰化组蛋白 4 和 3 (Upstate)、兔多克隆抗 GluR1 (Chemicon)、小鼠单克隆抗 PSD95 (Chemicon)、兔多克隆抗 MAP2 (Chemicon, Temecula, CA)、小鼠单克隆抗肌动蛋白、以

及小鼠单克隆抗微管蛋白 (Sigma)。所有抗体以 1 : 1000 稀释度使用,除了小鼠单克隆抗肌动蛋白和小鼠单克隆抗微管蛋白以 1 : 10000 的稀释度使用。在 PBS/ 吐温 -20 或 TBS/ 吐温 20 中洗涤两次并在 PBS 或 TBS 中洗涤一次之后,先后使用抗兔或抗小鼠 HRP 缀合物 (Santa Cruz, 1 : 5000 稀释度) 以及化学发光系统 (ECLAmersham Biosciences) 和对 HyperfilmTMECL (Amersham Biosciences) 的自动射线照相曝光来检测免疫标记蛋白带。使用 Scion Image 程序 (Scion Corporation) 来定量所述信号。

[0100] 实施例 5. 阿尔茨海默氏病的病理标记物

[0101] 为了调查能够解释处理之后的转基因小鼠的学习能力中观察到的差别的变化,使用 AT8 (能够分辨 Ser-202/Thr-205 中的异常过度磷酸化表位的磷酸特异性抗体) 来分析从小鼠中提取的海马中的 Tau (蛋白) 磷酸化水平。已经发现,相比于非转基因小鼠,16 月龄 Tg2576 转基因小鼠的海马中的 Tau (蛋白) 磷酸化增加,而 Tau (蛋白) 的总体水平没有改变。一个有趣的发现是,用 4PBA 处理的转基因小鼠的 AT8 部位处的磷酸化 Tau (蛋白) 与非转基因小鼠中的相同功能相比未发现差别 (图 3A)。

[0102] 通过几种激酶和磷酸酶蛋白来调节 Tau (蛋白) 磷酸化功能。已经表明,GSK3b 参与病理 Tau (蛋白) 磷酸化。测定在 Ser9 上磷酸化的无活性 GSK3b 的水平,观察到 4PBA 处理的转基因小鼠的海马中的所述水平高于用载体处理的那些小鼠,这解释了在经处理的小鼠中观察到的磷酸化 Tau (蛋白) 形式的减少 (图 3B)。

[0103] 实施例 6. 内质网应激标记物

[0104] 研究的下一步是要分析转基因小鼠和对照组的同一窝小鼠 (litter siblings) 的海马中的内质网 GRP78 中存在的分子伴侣的水平。发现 16 月龄转基因小鼠的海马中的 GRP78 水平低于相同年龄的小鼠的 GRP78 水平。对于比较,4PBA 处理的转基因小鼠的 GRP78 水平与非转基因小鼠中发现的 GRP78 水平没有差别,这提示 4PBA 处理的效果可能部分归因于 GRP78 表达水平的增加 (图 4)。

[0105] 实施例 7. 突触可塑性标记物

[0106] 与来自对照组的相同年龄的小鼠的 H4 乙酰化水平相比,16 月龄 Tg2576 转基因小鼠显示了极低的 H4 乙酰化水平。因此,在已经用 4PBA 处理的转基因小鼠中发现诱导了皮质组蛋白 4 (H4) 的乙酰化 (图 5)。

[0107] AMPA 受体 GluR1 亚基 (PSD95) 和 MAP-2 是在突触形成和功能中至关重要的可塑性标记物。AD 患者和 Tg2576 小鼠的脑中所述的 PSD95、GluR1 和 MAP-2 的突触后缺乏可能促进突触功能障碍,导致学习功能受损。下一步是调查这些突触标记物的表达水平在用 4PBA 处理之后是否发生改进,并且相比于用载体处理的小鼠中发现的表达水平 ($81.18 \pm 9.5\%$) 以及相比于无基因改变小鼠组中发现的水平 ($100.0 \pm 6.5\%$),在已经用 4PBA 处理的转基因小鼠组的海马的膜富集蛋白提取物中发现的 AMPA 受体的 GluR1 亚基的表达水平 ($161.37 \pm 27.5\%$) 有稳健的提高。4PBA 处理还显著诱导了相同提取物中 PSD95 的表达水平 (图 6)。

[0108] 微管相关蛋白 -2 (MAP-2) 是主要定位于神经元树突中的蛋白。MAP-2 表达与树突长出、分支和损害后的树突重塑一致,这提示该蛋白在可塑性中发挥关键的作用 (Johnson 和 Jope, 1992)。我们进行定量蛋白质印迹分析来测定 MAP-2,并且我们发现 Tg2576 小鼠中的 MAP-2 表达水平 (54.9 ± 10.7) 与非转基因小鼠 (100.0 ± 14.9) 相比显著降低,并且在

4PBA 处理之后部分恢复 (77.7 ± 11.6) (图 6)。

[0109] 参考文献

[0110] -Almeida CG, Tampellini D, Takahashi RH, Greengard P, Lin MT, Snyder EM, Gouras GK(2005).Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses.Neurobiol Dis 20 :187-198.

[0111] -Anderson AN, Roncaroli F, Hodges A, Deprez M, Turkheimer FE(2007) Chromosomal profiles of gene expression in Huntington' s disease.Brain.

[0112] -Andreasi C, Angelozzi C, Tiziano FD, Vitali T, De Vicenzi E, Boninsegna A,et al., (2004).Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro :relevance for treatment of spinal muscular atrophy.Neuromuscul Disord 14(2) :130-135.

[0113] -Arendt T, Stieler J, Strijkstra AM, Hut RA, Rudiger J, Van der Zee EA, Harkany T, Holzer M, Hartig W(2003).Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals, J.Neurosci.,23 :6972-6981.

[0114] -Bailey CH, Kandel ER, Si K(2004).The persistence of long-term memory : a molecular approach to self-sustaining changes in learning-induced synaptic growth.Neuron 44 :49-57.

[0115] -Cummings JL, Cole G(2002).Alzheimer disease.JAMA 287 :2335-2338.

[0116] -Chang KT,Min KT. (2002).Regulation of lifespan by histone deacetylase. Ageing Res Rev 1 :313-326.

[0117] -Chaudhuri TK, Paul S(2006).Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches.FEBS J 273 :1331-1349.

[0118] -Collins AF, Pearson HA, Giardina P, McDonagh KT, Brusilow Sw, Dover GJ(1995).Oral sodium phenylbutyrate therapy in homozygous beta thalassemia :a clinical trial.Blood 85 :43-49.

[0119] -Dasgupta S,Zhou Y, Jana M, Banik NL, Pahan K(2003).Sodium phenylacetate inhibits adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice at multiple steps. J Immunol 170 :3874-3882.

[0120] -Dodart JC, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM, Paul SM. (2002)Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer' s disease model.Nat Neurosci 5 :452-457.

[0121] -Dover GJ, Brusilow S, Charache S(1994).Induction of fetal hemoglobin production in subjects with sickle cell anemia by oral sodium phenylbutyrate. Blood 84(1) :339-343.

[0122] -Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai LH(2007).Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling.Nature 447, 178-182.

[0123] -Gong B, Vitolo OV, Trinchese F, Liu S, Shelanski M, Arancio O(2004).

Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment. *J Clin Invest* 114:1624-1634.

[0124] -Hernández F, Ávila J(2007). Tauopathies. *Cell Mol Life Sci* 64:2219-2233.

[0125] -Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL(1984). Alzheimer ' s disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 225:1168-1170.

[0126] -Ikeda Y, Ishiguro K, Fujita SC(2007). Ether stress-induced Alzheimer-like tau phosphorylation in the normal mouse brain. *FEBS Lett* 581:891-897.

[0127] -Kang HL, Benzer S, Min KT(2002). Life extension in *Drosophila* by feeding a drug. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:838-843.

[0128] -Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Miyoshi K, Kudo T, Hitomi J, Morihara T, Yoneda T, Gomi F, Mori Y, Nakano Y, Takeda J, Tsuda T, Itoyama Y, Murayama O, Takashima A, St George-Hyslop P, Takeda M, Tohyama M. (1999). Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response, *Nat Cell Biol* 1,479-485.

[0129] -Katayama T, Imaizumi K, Honda A, Yoneda T, Kudo T, Takeda M, Mori K, Rozmahel R, Fraser P, George-Hyslop PS, Tohyama M(2001). Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer ' s disease-linked presenilin-1 mutations. *J Biol Chem* 276:43446-43454.

[0130] -Katayama T, Imaizumi K, Manabe T, Hitomi J, Kudo T, Tohyama M(2004). Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer ' s disease. *J Chem Neuroanat* 28:67-78.

[0131] -Kim HS, Kim EM, Kim NJ, Chang KA, Choi Y, Ahn KW, Lee JH, Kim S, Park CH, Suh YH(2004). Inhibition of histone deacetylation enhances the neurotoxicity induced by the C-terminal fragments of amyloid precursor protein. *J Neurosci Res* 75:117-124.

[0132] -Kim HJ, Rowe M, Ren M, Hong JS, Chen PS, Chuang DM(2007). Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *J Pharmacol Exp Ther* 321:892-901.

[0133] -Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J (1998). The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332:462-464.

[0134] -Kubota K, Niinuma Y, Kaneko M, Okuma Y, Sugai M, Omura T, Uesugi M, Uehara T, Hosoi T, Nomura Y(2006). Suppressive effects of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress. *J Neurochem* 97:1259-1268.

[0135] -Langley B, Gensert JM, Beal MF, Ratan RR *Curr Drug Targets CNS*(2005).

Remodelling chromatin and stress resistance in the central nervous system: histone deacetylase inhibitors as novel and broadly effective neuroprotective agents. *Neurol Disord* 4:41-50.

[0136] -Lea MA, Randolph VM(1998). Induction of reporter gene expression by inhibitors of histone deacetylase. *Anticancer Res* 18:2717-2722.

[0137] -Lesné S, Kotilinek L, Ashe KH(2007). Plaque-bearing mice with reduced levels of oligomeric amyloid-beta assemblies have intact memory function. *Neuroscience* Epub ahead of print.

[0138] -Levenson JM, Sweatt JD(2005) Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci* 6:108-118.

[0139] -Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J(1999). Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155:853-862.

[0140] -Maestri NE, Brusilow SW, Clissold DB, Bassett SS(1996). Long-term treatment of girls with ornithine transcarbamylase deficiency. *N Engl J Med* 335:855-859.

[0141] -Masatoshi I, Yoshihisa K, Hiroki T, Takashi Y, Kazuyuki T, Yuka K, Takashi T, Kanji Y, Masahiko K, Yasunobu O, Takahiro T, Hiroyoshi A, Shun S(2007). Neurodegeneration of mouse nigrostriatal dopaminergic system induced by repeated oral administration of rotenone is prevented by 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone, *Jour of Neurochem* 101:1491-1504.

[0142] -McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AL, Masters CL(1999). Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46:860-866.

[0143] -Mercuri E, Bertini E, Messina S, Pelliccioni M, D' Amico A, Colitto F, et al., (2004). Pilot trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 14(2):130-135.

[0144] -Mercuri E, Bertini E, Messina S, Solari A, D' Amico A, Angelozzi C, et al., (2007). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy. *Neurol* 68(1):51-55.

[0145] -Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H(2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* 16:1345-55.

[0146] -Petri s, Kiaci M, Kipani K, Chen J, Calingasan NY, Crow JP, et al., (2006). Additive neuroprotective effects of a histone deacetylase inhibitor and a catalytic antioxidant in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Dis* 22(1):40-49.

[0147] -Qi X, Hosoi T, Okuma Y, Kaneko M, Nomura Y(2004). Sodium 4-phenylbutyrate

protects against cerebral ischemic injury. *Mol Pharmacol* 66 :899-8908.

[0148] -Ribé EM, Pérez M, Puig B, Gich Y, Lim F, Cuadrado M, Sesma T, Catena S, Sánchez B, Nieto M, Gómez-Ramos P, Morán MA, Cabodevilla F, Samaranch L, Ortiz L, Pérez A, Ferrer I, Avila J, Gómez-Isla T (2005). Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice. *Neurobiol Dis* 20 :814-822.

[0149] -Roberson ED, Scearce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316 :750-754.

[0150] -Rubenstein RC, Zeitlin PL (2000). Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70 : implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol* 278 :259-267.

[0151] -Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, Vitolo OV, Ron D, Greene L (2002). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 22 :10690-10698.

[0152] -Ryu H, Smith K, Camelo SI, Carreras I, Lee J, Iglesias AH, Dangond F, Cormier KA, Cudkowicz ME, Brown RH Jr, Ferrante RJ (2005). Sodium phenylbutyrate prolongs survival and regulates expression of anti-apoptotic genes in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurochem* 93 :1087-1098.

[0153] -Sato S, Ward CL, Krouse ME, Winc JJ, Kopito RR (1996) Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J Biol Chem* 271 :635-638.

[0154] -Selkoe DJ (2004). Cell biology of protein misfolding : the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol* 6 :1054-1061.

[0155] -Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu YZ, Greenwald M, Kurokawa R, Housman DE, Jackson GR, Marsh JL, Thompson LM (2001). Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413 :739-743.

[0156] -Tully T, Bourchouladze A, Scott R, Tallman J (2003). Targeting the CREB pathway for memory enhancers. *Nat Rev Drug Discov* 2 :267-277.

[0157] -WO/1999/026657. Inderjit, S. (1999). Inhibitors of nitric oxide synthase.

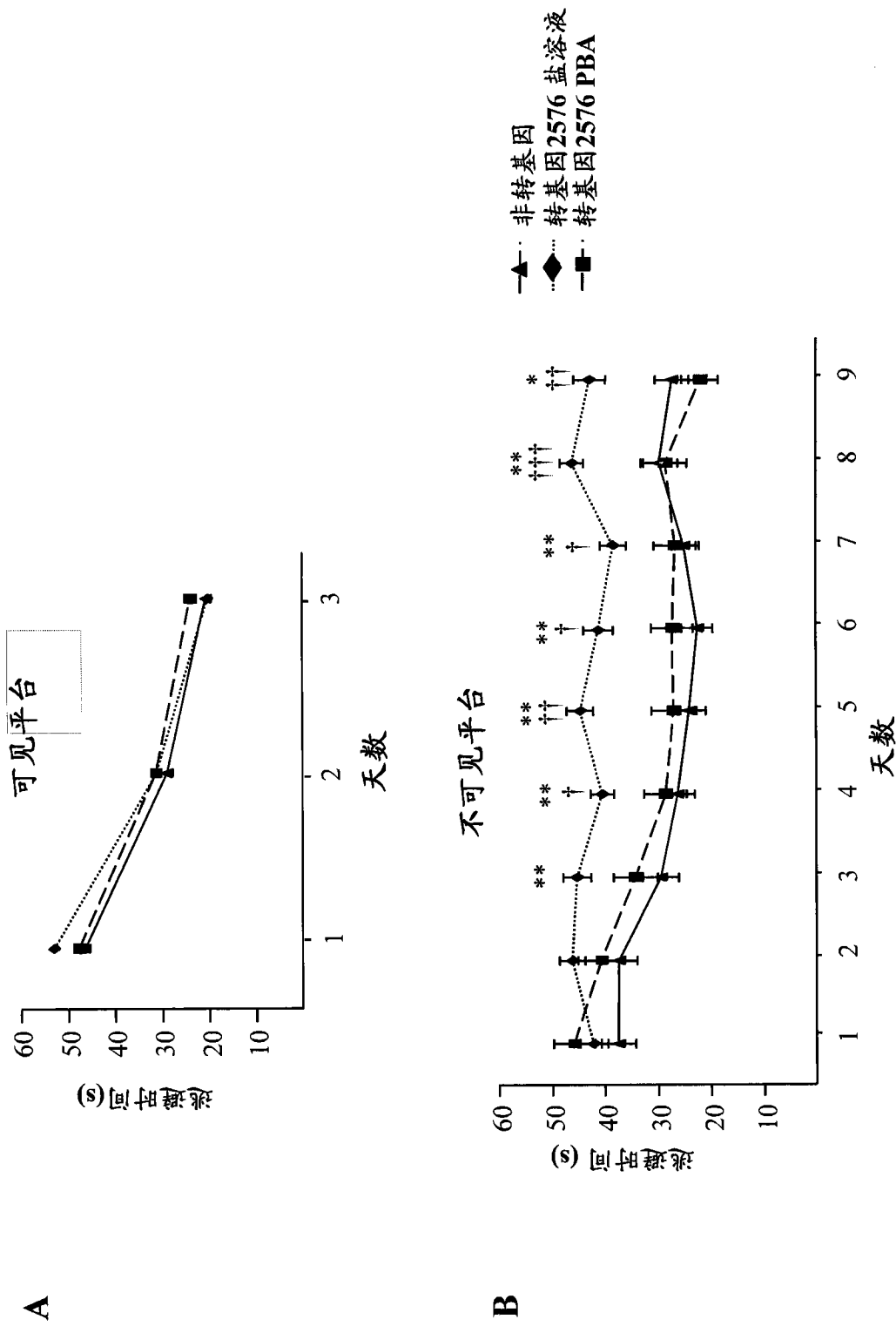


图 1

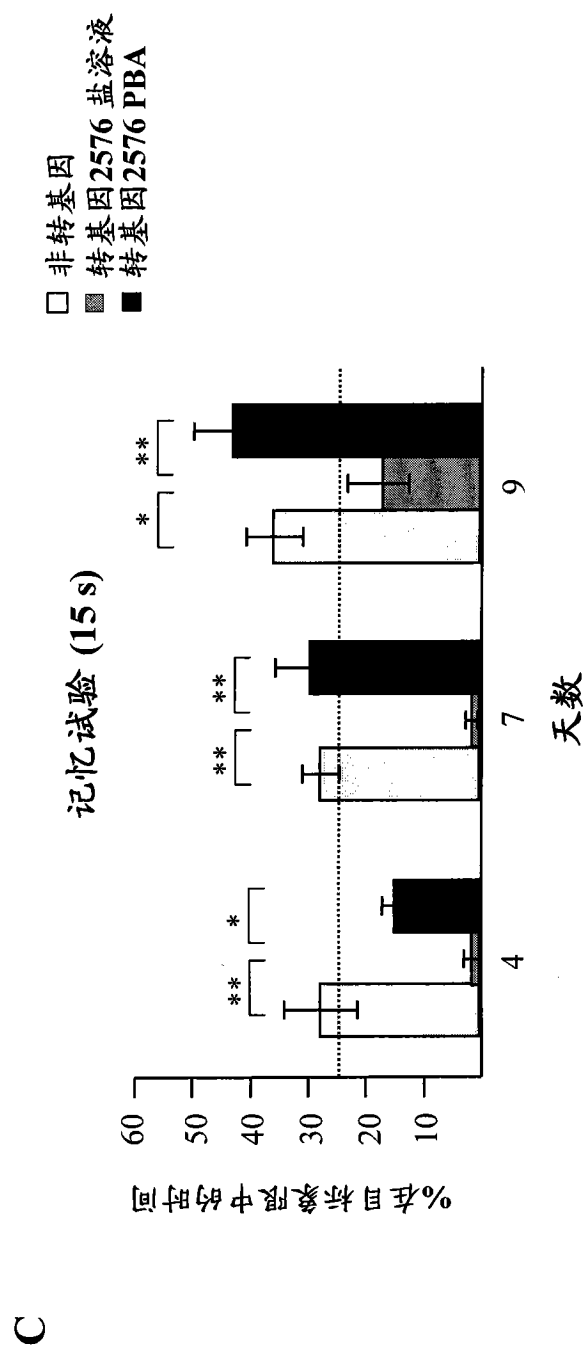


图 1C

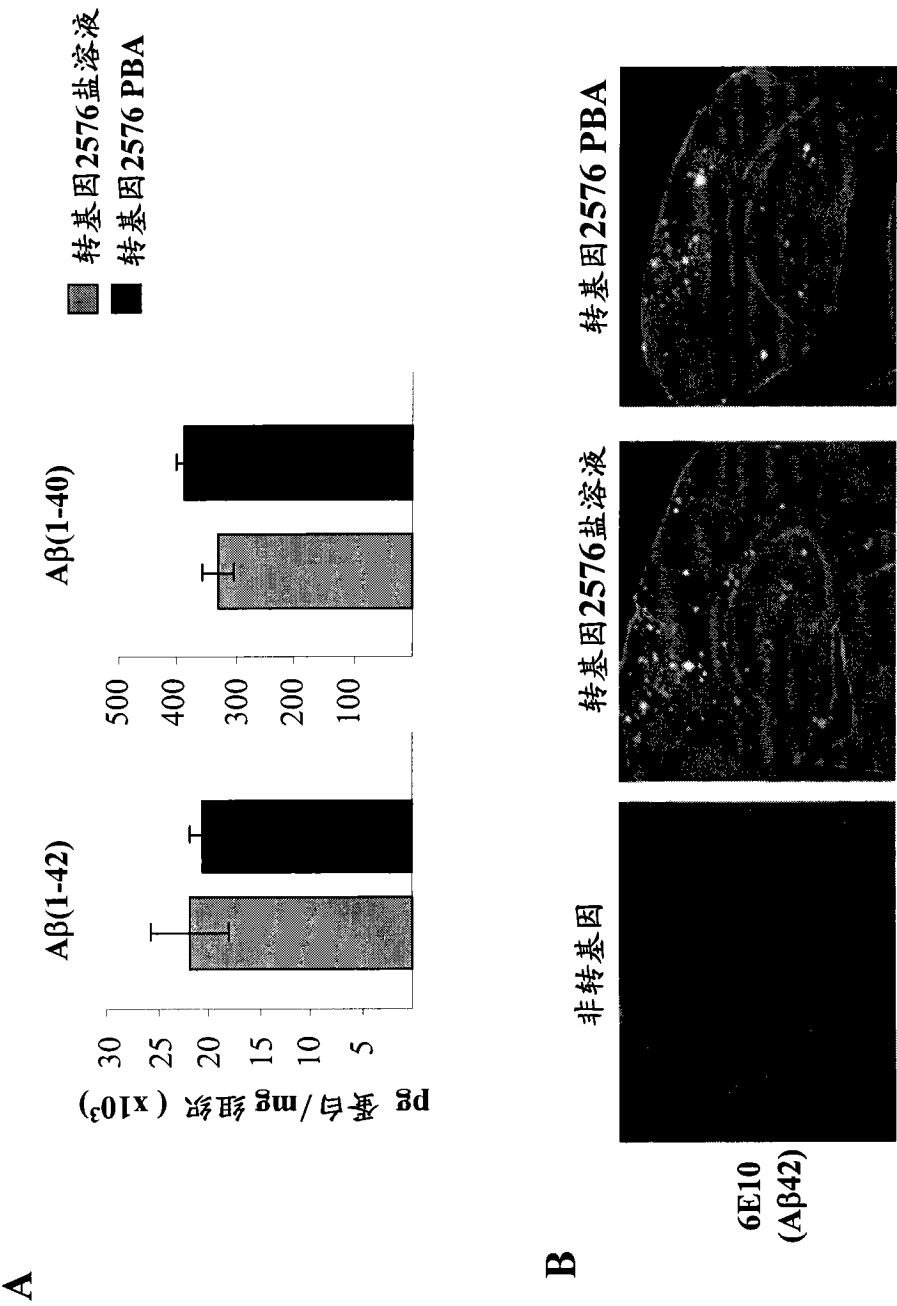
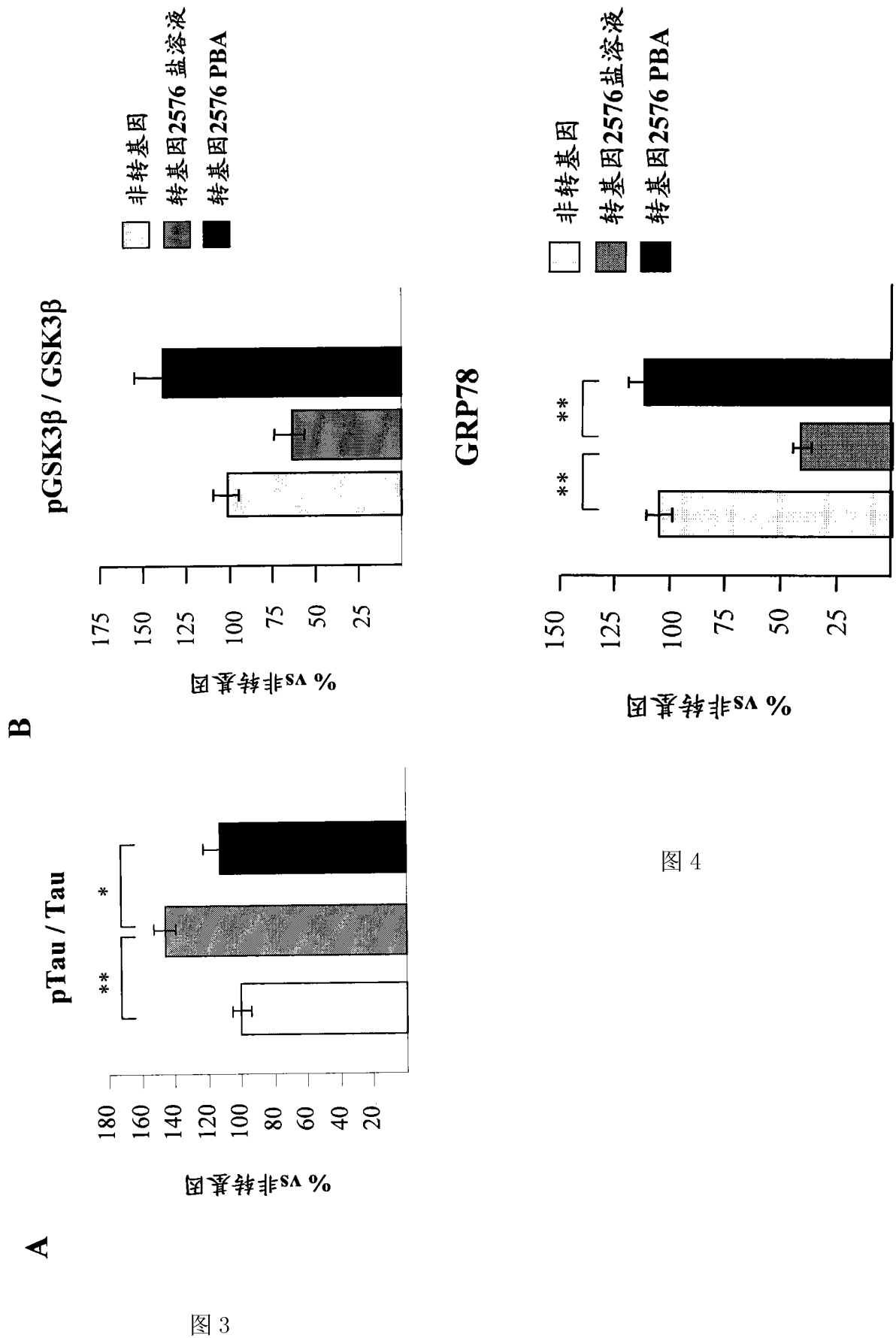


图 2



A

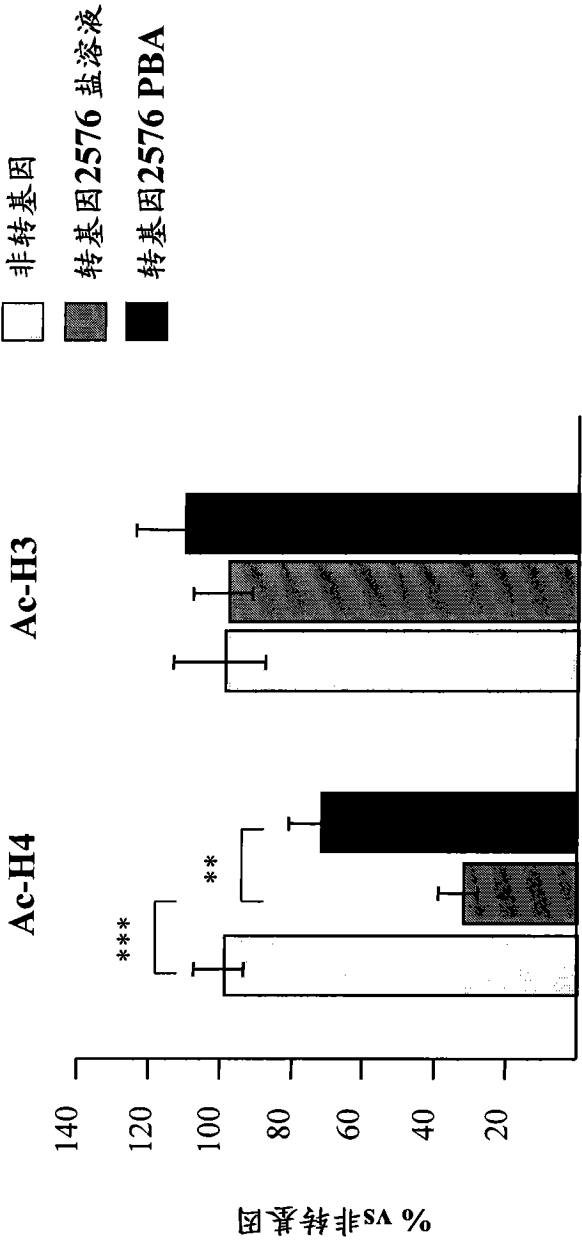


图 5

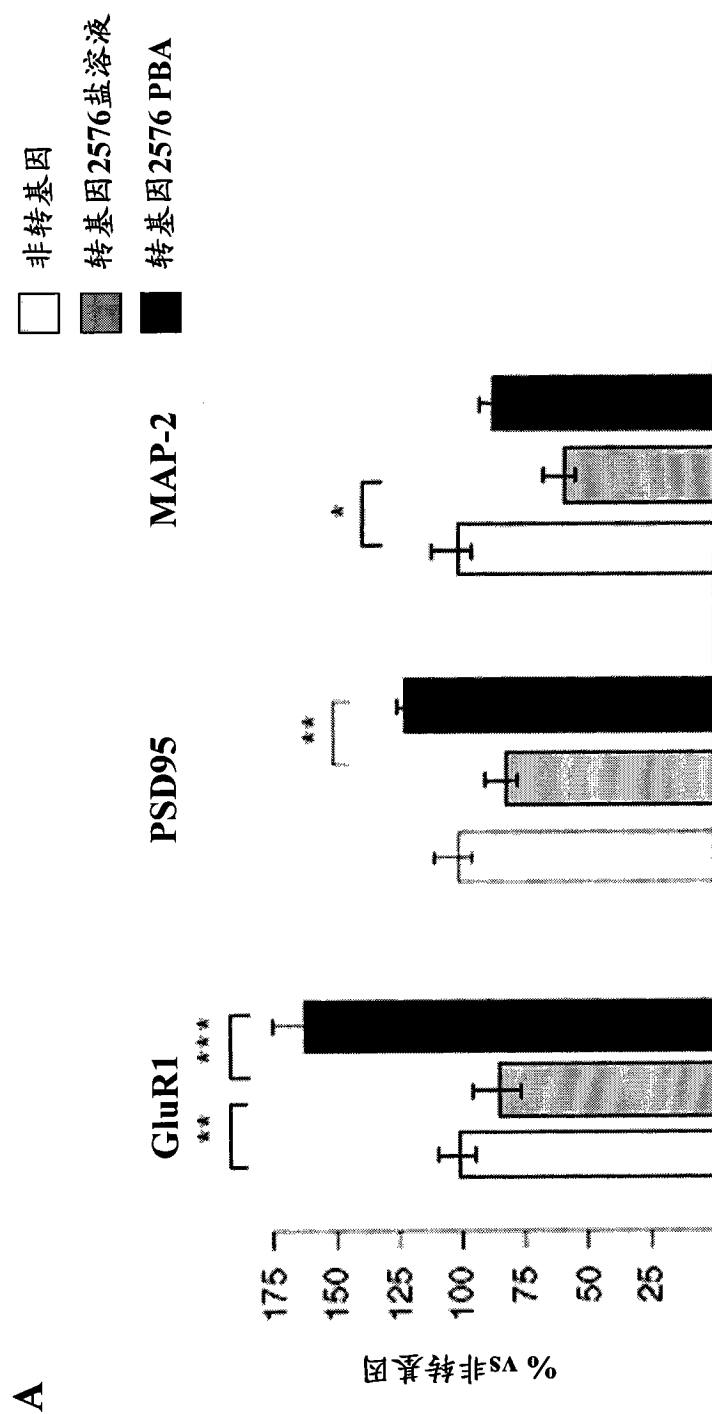


图 6