



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110945011 A

(43)申请公布日 2020.03.31

(21)申请号 201880036972.2

(74)专利代理机构 北京市中伦律师事务所
11410

(22)申请日 2018.06.05

代理人 刘烽

(30)优先权数据

62/515,272 2017.06.05 US

(51)Int.Cl.

G07K 7/06(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 38/46(2006.01)

2019.12.03

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/036116 2018.06.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/226735 EN 2018.12.13

(71)申请人 凯斯西储大学

地址 美国俄亥俄州

申请人 俄亥俄州立大学

(72)发明人 Y·沈 Y·顾 J·西尔维

B·T·朗

权利要求书2页 说明书30页

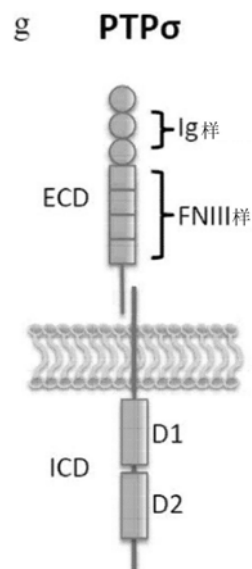
序列表6页 附图47页

(54)发明名称

用于治疗阿尔茨海默病的组合物和方法

(57)摘要

一种在有需要的受试者中抑制和/或减少β-淀粉样蛋白累积和/或Tau聚集的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗剂,所述治疗剂抑制LAR家族磷酸酶的催化活性、信号传导和功能中的一种或多种。



1. 一种在有需要的受试者中抑制和/或减少 β -淀粉样蛋白累积和/或Tau聚集的方法，所述方法包括：

向所述受试者施用治疗剂，所述治疗剂抑制LAR家族磷酸酶的催化活性、信号传导和功能中的一种或多种。

2. 根据权利要求1所述的方法，所述LAR家族磷酸酶是受体蛋白质酪氨酸磷酸酶 σ (PTP σ) 并且所述治疗剂包含治疗肽，所述治疗肽具有与PTP σ 的楔形结构域的约10至约20个连续氨基酸至少约85%相同的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的方法，所述LAR家族磷酸酶是受体蛋白质酪氨酸磷酸酶 σ (PTP σ) 并且所述治疗剂包含治疗肽，所述治疗肽具有与PTP σ 的楔形结构域的约10至约20个连续氨基酸至少约95%相同的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1所述的方法，所述治疗剂包含选自SEQ ID NO:9-13和16组成的组的治疗肽。

5. 根据权利要求1所述的方法，所述治疗剂包含由SEQ ID NO:16组成的治疗肽。

6. 根据权利要求1所述的方法，所述治疗剂包含与SEQ ID NO:16至少约65%相同的治疗肽并且包括SEQ ID NO:16的残基4、5、6、7、9、10、12、或13中的至少一个的氨基酸的保守取代。

7. 根据权利要求2-6中任一项所述的方法，其中所述治疗剂包括转运部分，所述转运部分连接到所述治疗肽并且促进所治疗的神经细胞对所述治疗肽的摄取。

8. 根据权利要求7所述的方法，其中所述转运部分是HIV Tat转运部分。

9. 根据权利要求1所述的方法，其中所述治疗剂经全身施用于所治疗的受试者。

10. 根据权利要求2-6中任一项所述的方法，其中所述治疗剂在所述细胞中表达。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法，其中所述受试者患有阿尔茨海默病。

12. 一种在有需要的受试者中治疗阿尔茨海默病的方法，所述方法包括：

向所述受试者施用治疗剂，所述治疗剂抑制LAR家族磷酸酶的催化活性、信号传导和功能中的一种或多种。

13. 根据权利要求12所述的方法，其中所述LAR家族磷酸酶是受体蛋白质酪氨酸磷酸酶 σ (PTP σ) 并且所述治疗剂包含治疗肽，所述治疗肽具有与PTP σ 的楔形结构域的约10至约20个连续氨基酸至少约85%相同的氨基酸序列。

14. 根据权利要求12所述的方法，其中所述LAR家族磷酸酶是受体蛋白质酪氨酸磷酸酶 σ (PTP σ) 并且所述治疗剂包含治疗肽，所述治疗肽具有与PTP σ 的楔形结构域的约10至约20个连续氨基酸至少约95%相同的氨基酸序列。

15. 根据权利要求12所述的方法，其中所述治疗剂包含选自SEQ ID NO:9-13和16组成的组的治疗肽。

16. 根据权利要求12所述的方法，所述治疗剂包含由SEQ ID NO:16组成的治疗肽。

17. 根据权利要求12所述的方法，其中所述治疗剂包含与SEQ ID NO:16至少约65%相同的治疗肽并且包括SEQ ID NO:16的残基4、5、6、7、9、10、12、或13中的至少一个的氨基酸的保守取代。

18. 根据权利要求3-17中任一项所述的方法，其中所述治疗剂包括转运部分，所述转运部分连接到所述治疗肽并且促进所治疗的神经细胞对所述治疗肽的摄取。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述转运部分是HIV Tat转运部分。
20. 根据权利要求12所述的方法,其中所述治疗剂经全身施用于所治疗的受试者。
21. 根据权利要求13-17中任一项所述的方法,其中所述治疗剂在所述细胞中表达。
22. 根据权利要求13-17中任一项所述的方法,其中所述治疗剂与分泌酶抑制剂组合施用。
23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述分泌酶抑制剂包含BACE1抑制剂或 γ -分泌酶抑制剂中的至少一种。

用于治疗阿尔茨海默病的组合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2017年6月5日提交的美国临时申请号62/515,272的优先权,所述临时申请的主题通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本申请涉及用于抑制或减少磷酸酶的白细胞共同抗原相关(LAR)家族的活性、信号传导、和/或功能的组合物和方法以及涉及用于抑制 β -淀粉样变性且治疗阿尔茨海默病的方法和组合物。

背景技术

[0004] 阿尔茨海默病(AD)的确定性病理学标志是脑部中 β -淀粉样蛋白(A β)肽的渐进性聚集,这个过程也称为 β -淀粉样变性,它常常伴随神经炎症和含有Tau(一种微管结合蛋白)的神经原纤维缠结的形成。

[0005] 尽管AD的病因学机制一直处于争论之中,但人类基因研究的具体证据显示,由于基因突变而导致的A β 过量产生不可避免地造成了大量细胞毒性事件,最终导致神经变性和脑功能衰退。A β 肽、尤其是呈其可溶形式的累积因此被认为是AD进展的关键元凶。在脑部中,A β 肽主要来源于 β -和 γ -分泌酶对神经元淀粉样前体蛋白(APP)的顺序裂解。然而,即使经过大量研究,对淀粉样蛋白生成分泌酶活性的分子调控仍知之甚少,从而妨碍了对特异性靶向APP淀粉样蛋白生成途径的治疗剂的设计。

[0006] 药理学抑制 β -和 γ -分泌酶活性尽管有效抑制了A β 产生,但干扰了分泌酶对其其它底物的生理功能。这类干预策略因此常常与不良的副作用有着内在的联系,这种不良的副作用在过去导致了数项临床试验失败。迄今为止,尚没有治疗方案可用于预防AD的发作或限制其进展。

发明内容

[0007] 本文所述的实施方式涉及抑制和/或减少有需要的受试者中的 β -淀粉样蛋白累积和/或Tau聚集的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗剂,所述治疗剂抑制LAR家族磷酸酶的催化活性、信号传导和功能中的一种或多种。

[0008] 在一些实施方式中,LAR家族磷酸酶是受体蛋白质酪氨酸磷酸酶 σ (PTP σ),并且所述治疗剂包括治疗肽,所述治疗肽具有与PTP σ 的楔形结构域的约10至约20个连续氨基酸至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、或至少约95%相同的氨基酸序列。例如,治疗剂可以包括选自SEQ ID NO:9-13和16组成的组的治疗肽。

[0009] 在其它实施方式中,LAR家族磷酸酶是受体蛋白质酪氨酸磷酸酶 σ (PTP σ),并且所述治疗剂可以包括与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、或至少约95%相同的治疗肽。治疗肽可以包括例如SEQ ID NO:16的残基4、5、6、7、9、10、12、或13中的至少一个、两个、三个、或四个的氨基酸的保守

取代。

[0010] 在一些实施方式中,治疗剂经全身或局部施用于受试者或施用于神经细胞、神经胶质细胞、神经胶质祖细胞或神经祖细胞。

[0011] 在其它实施方式中,治疗剂包括转运部分,所述转运部分连接到治疗肽并且促进细胞对治疗肽的摄取。例如,转运部分可以是HIV Tat转运部分。

[0012] 在仍其它实施方式中,细胞在所治疗的受试者中,并且治疗剂经局部或全身施用于所治疗的受试者。

[0013] 在又其它实施方式中,治疗肽由受试者的细胞表达。

[0014] 本文的实施方式还涉及治疗有需要的受试者中与 β -淀粉样蛋白累积和/或Tau聚集相关的疾病、病症、和/或病状的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗剂,所述治疗剂抑制LAR家族磷酸酶的催化活性、信号传导和功能中的一种或多种。

[0015] 在一些实施方式中,所述疾病、病症、和/或病状包括神经系统的疾病、病症、和/或病状中的至少一种。

[0016] 在其它实施方式中,神经系统的疾病、病症、和/或病状包括以下中的至少一种:神经障碍、神经精神障碍、神经损伤、神经毒性障碍、神经性疼痛、和神经退行性病症。

[0017] 例如,神经障碍可以包括阿尔茨海默病或与阿尔茨海默病相关的痴呆中的至少一种。

附图说明

[0018] 图1(A-I)展示了显示PTP σ 是脑部中的APP结合配偶体的图像和免疫印迹。A-F:成年大鼠的海马CA1神经元中PTP σ (A)和APP(B)的共定位通过共焦成像显示。CA1神经元的核用DAPI染色(C)。D:三个通道的合并。比例尺,50 μ m。E:D中胞体层的放大图像。箭头:顶端树突的初始片段中PTP σ 和APP的密集共定位;箭头头部:核周区中共定位的点(punctates)。比例尺,20 μ m。F:D中轴突区室中非常细小的粒状点的放大图像。箭头指向垂直于焦平面突出的轴突中PTP σ 和APP的共定位。比例尺,10 μ m。G:PTP σ 在细胞表面上表达为两亚基络合物的示意图。PTP σ 被翻译后加工成胞外结构域(ECD)和跨膜胞内结构域(ICD)。这两个亚基通过非共价键彼此缔合。Ig样:免疫球蛋白样结构域;FNIII样:纤粘蛋白III样结构域;D1和D2:两个磷酸酶结构域。H、I:来自小鼠前脑裂解产物的PTP σ 和APP的共同免疫沉淀(co-IP)。左图:小鼠前脑中PTP σ 和APP的表达。右图:使用对APP的C端(C-term)具有特异性的抗体进行的IP。全长APP(APP FL)通过抗APP C-term抗体检测。H:来自野生型但非PTP σ 缺陷型小鼠(Balb/c背景)的前脑裂解产物的PTP σ 与APP的co-IP,其通过针对PTP σ -ECD的抗体检测。I:来自野生型但非APP基因敲除小鼠(B6背景)的前脑裂解产物的PTP σ 与APP的co-IP,其通过对PTP σ -ICD的抗体检测。I中的虚线指示同一免疫印迹暴露上彼此邻近移动的泳道。所示图像代表了至少三次独立实验。

[0019] 图2(A-I)展示了显示PTP σ 的遗传损耗减少了APP的 β -淀粉样蛋白生成产物的示意图、免疫印迹和图。A:显示 β -和 γ -分泌酶对APP的淀粉样蛋白生成加工的示意图。全长APP(APP FL)由 β -分泌酶裂解成可溶性N端(sAPP β)和C端(CTF β)片段。APP CTF β 可以被 γ -分泌酶进一步加工成C端胞内结构域(AICD)和A β 肽。A β 的聚集是AD的确定性病理标志。B:PTP σ 缺乏在约15KD下降低了小鼠前脑裂解产物中的APP CTF水平,而不影响APP FL的表达。针对

APP的C端的抗体识别小鼠和人来源的APP FL和CTF。C和D:使用一对如图(A)中标记的抗体,通过免疫沉淀(IP)然后进行免疫印迹分析将15KD APP CTF鉴定为CTF β 。针对A β 的氨基酸1-16的抗体(抗A β 1-16)检测CTF β 但不检测CTF α ,因为CTF α 中不存在表位。C:在PTP σ 缺陷型小鼠脑部中,小鼠内源性CTF β 水平降低。通过密度测定对4次重复实验定量。D:在携带人APP-SwDI转基因的PTP σ 缺陷型小鼠脑部中,人转基因CTF β 水平降低。通过密度测定对6次重复实验定量。在C和D两者中的每次实验内,将来自PTP σ 缺陷型样品的值相对于具有野生型PTP σ 的样品的值标准化。E和F:如通过ELISA测定所测量,PTP σ 缺乏降低了TgAPP-SwDI小鼠中A β 40(E)和A β 42(F)的水平。对于每个组n=12。将来自PTP σ 缺陷型样品的平均值相对于具有野生型PTP σ 的样品的平均值标准化。G和H:10月龄TgAPP-SwDI小鼠的海马中的A β 沉积。A β (绿色)通过免疫荧光染色、使用抗A β 抗体克隆6E10(G)和克隆4G8(H)来检测。显示了DAPI染色。PTP σ 缺乏显著降低了TgAPP-SwDI小鼠脑部中的A β 负荷。H:上图:背侧下托(DS)与CA1之间的始层(也用G中的箭头显示);中间图:CA1与CA2之间的多形层(oriens layer);下图:齿状回(DG,也用g中的箭头头部显示)的门。左列:无一级抗体(无1 $^{\circ}$ Ab)的对照染色。在非转基因小鼠中未检测到A β 信号(数据未显示)。比例尺,在G中是500 μ m且在h中是100 μ m。所显示的图像是5对年龄和性别相匹配的9至11月龄小鼠之中的代表对。I:PTP σ 的遗传损耗抑制了TgAPP-SwDI小鼠中A β 病理的进展。来自9月和16月龄TgAPP-SwDI小鼠的DG门中A β 免疫荧光染色(使用6E10)的ImageJ定量。对于每个组n=3。将DG门中A β 的总集成密度相对于门的面积大小标准化以获得如条形图中所示的平均强度。将每组的平均值相对于表达野生型PTP σ 的16月龄TgAPP-SwDI小鼠的平均值标准化。所有p值,学生t检验,2尾。误差条,SEM。

[0020] 图3(A-C)展示了显示在PTP σ 缺陷型脑部中BACE1与APP之间的较低亲和力的免疫印迹、图、和曲线。A:共同免疫沉淀实验显示在温和去污剂条件(1%NP40)下,在野生型和PTP σ 缺陷型小鼠脑部中接近相等的BACE1-APP缔合。然而,在PTP σ 缺陷型脑部中,通过共同免疫沉淀检测到的BACE1-APP缔合与野生型脑部中的BACE1-APP缔合相比更易受到增加的去污剂严格性(detergent stringency)影响。印迹图显示用来自小鼠前脑裂解产物的抗BACE1抗体牵引的全长APP(APP FL)。NP40:Nonidet P-40,非离子去污剂。SDS:十二烷基硫酸钠,离子去污剂。B:在具有1%NP40和0.3%SDS的缓冲液条件下的共同免疫沉淀,如A的中间图所示,重复三次。每个实验通过密度测定定量,并且将来自PTP σ 缺陷型样品的值计算为来自野生型样品的值的百分比(也示为C中的橙色点)。误差条,SEM。p值,学生t检验,2尾。C:在每种去污剂条件下重复共同免疫沉淀实验。使用与B中方法相同的方法推导点中示出的百分比值。条表示平均值。严格性逐渐增加的缓冲液条件表明在PTP σ 缺陷型脑部中较低的BACE1-APP亲和力。p值和R²,线性回归。

[0021] 图4(A-F)展示了显示PTP σ 不一般性地调节 β 和 γ 分泌酶的免疫印迹。分泌酶的表达水平或分泌酶对其它主要底物的活性都不受PTP σ 损耗影响。通过免疫印迹分析含或不含PTP σ 的小鼠前脑裂解产物。A和B:PTP σ 缺乏不改变BACE1(A)或 γ -分泌酶亚基(B)的表达水平。早老蛋白1和2(PS1/2)是 γ -分泌酶的催化亚基,这些亚基以其成熟形式被加工成N端和C端片段(NTF和CTF)。呆蛋白、早老蛋白增强子2(PEN2)、和APH1是 γ -分泌酶的其它必需亚基。C:PTP σ 缺乏不改变BACE1的C端裂解产物-神经调节蛋白1(NGR1)CTF β 的水平。NRG1 FL:全长神经调节蛋白1。D: γ -分泌酶的Notch裂解产物的水平不受PTP σ 缺乏影响。TMIC:Notch跨膜/胞内片段,它可以被 γ -分泌酶裂解成C端胞内结构域NICD(在上图中由针对Notch C

端的抗体检测;并且在下图中由针对 γ -分泌酶裂解的NICD具有特异性的抗体检测)。E:对于A和C的肌动蛋白负载对照。F:对于B和D的肌动蛋白负载对照。所示的所有图像代表至少三次独立实验。所示的所有图像代表了至少三次独立实验。

[0022] 图5(A-I)展示了显示PTP σ 缺乏减轻APP转基因小鼠中的反应性星形胶质细胞增生的图像和图。GFAP(一种反应性星形胶质细胞的标记)的表达水平在TgAPP-SwDI小鼠的脑部中受到PTP σ 损耗的抑制。代表性图像显示出在9月龄TgAPP-SwDI小鼠的脑部中核的GFAP和DAPI染色。A-D:海马的齿状回(DG);比例尺,100 μ m。E-H:初级躯体感觉皮质;比例尺,200 μ m。I:来自年龄在9至11个月之间的TgAPP-SwDI小鼠的DG门中GFAP水平的ImageJ定量。APP-SwDI(-)PTP σ (+/+)、非转基因野生型同窝仔畜(表达PTP σ 但不表达人APP转基因)。将DG门中GFAP的总集成密度相对于门的面积大小标准化以获得如条形图中所示的平均强度。将每个组的平均值相对于APP-SwDI(-)PTP σ (+/+)小鼠的平均值标准化(图像未显示)。APP-SwDI(-)PTP σ (+/+), n=4; APPSwDI(+)PTP σ (+/+), n=4; APP-SwDI(+)PTP σ (-/-), n=6。所有p值, 学生t检验, 2尾。误差条, SEM。

[0023] 图6(A-G)展示了显示PTP σ 缺乏保护APP转基因小鼠免于突触丢失的图像和图。代表性图像显示了在CA3区的苔藓纤维末端区中的突触前标记突触素的免疫荧光染色。A-F:突触素, 红色; DAPI, 蓝色。比例尺, 100 μ m。G:来自年龄在9至11个月之间的小鼠的CA3苔藓纤维末端区中的突触素表达水平的ImageJ定量。将CA3苔藓纤维末端区中突触素的总集成密度相对于面积大小标准化以获得如条形图中所示的平均强度。将每个组的平均值相对于野生型APP-SwDI(-)PTP σ (+/+)小鼠的平均值标准化。APPSwDI(-)PTP σ (+/+), n=4; APP-SwDI(+)PTP σ (+/+), n=6; APP-SwDI(+)PTP σ (-/-), n=6。所有p值, 学生t检验, 2尾。误差条, SEM。

[0024] 图7(A-H)展示了显示PTP σ 缺乏缓解TgAPP-SwDI小鼠中的Tau病理的示意图、图像和图。A:描绘了在9至11月龄TgAPP-SwDI转基因小鼠的脑部中, 通过免疫荧光染色、使用抗Tau抗体检测到的Tau聚集的分布模式的示意图。在APPSwDI(+)PTP σ (+/+)小鼠中, 发现聚集的Tau最主要在梨状皮质和内嗅皮质的分子层中, 且偶尔在海马区中。B:PTP σ 缺乏减少Tau聚集。条形图显示, 在来自4对年龄和性别相匹配的9至11月龄的APP-SwDI(+)PTP σ (+/+)和APP-SwDI(+)PTP σ (-/-)小鼠的冠状脑切片中Tau聚集的定量。对于每一对, 将APP-SwDI(+)PTP σ (-/-)样品的值相对于APP-SwDI(+)PTP σ (+/+)样品的值标准化。p值, 学生t检验, 2尾。误差条, SEM。C、D:APP-SwDI(+)PTP σ (+/+)脑部中许多具有Tau聚集的区域的代表性图像。F、G:年龄匹配的APPSwDI(+)PTP σ (-/-)脑部中一些具有Tau聚集的区域的代表性图像。C和F:海马区。D-H:梨状皮质。E:邻近d但不含一级抗体(无1 $^{\circ}$ Ab)的切片的染色。H:在年龄匹配的非转基因野生型同窝仔畜(表达PTP σ 但不表达人APP转基因)中未检测到Tau聚集体。箭头指向Tau聚集体。比例尺, 50 μ m。

[0025] 图8(A-C)展示了显示PTP σ 缺乏援救了TgAPP-SwDI小鼠中的行为缺陷的图。A:在Y型迷宫测定中, 空间导航的表现是通过总臂进入(arm entries)中自发交替的百分比来评分的。将值相对于群落内非转基因野生型APP-SwDI(-)PTP σ (+/+)小鼠的值标准化。与非转基因野生型小鼠相比, APP-SwDI(+)PTP σ (+/+)小鼠显示出短期空间记忆的缺陷, 该缺陷通过APP-SwDI(+)PTP σ (-/-)小鼠中PTP σ 的遗传损耗来援救。APP-SwDI(-)PTP σ (+/+), n=23(18只雌性和5只雄性); APP-SwDI(+)PTP σ (+/+), n=52(30只雌性和22只雄性); APP-SwDI(+)PTP σ (-/-), n=35(22只雌性和13只雄性)。所有基因型组的年龄都在4个月与11个月之

间类似地分布。B、C: 新颖物体测试。NO: 新颖物体。FO: 熟悉物体。对NO的注意力通过关于探索时间(B)和访问频率(C), NO探索与总对象探索(NO+FO)的比值来测量。将值相对于非转基因野生型小鼠的值标准化。APP-SwDI (+) PTP σ (+/+) 小鼠与野生型APPSwDI (-) PTP σ (+/+) 小鼠相比显示出对NO的兴趣降低。通过APP-SwDI (+) PTP σ (-/-) 小鼠中的PTP σ 损耗逆转了该缺陷。APPSwDI (-) PTP σ (+/+) , n=28 (19只雌性和9只雄性); APP-SwDI (+) PTP σ (+/+) , n=46 (32只雌性和14只雄性); APP-SwDI (+) PTP σ (-/-) , n=29 (21只雌性和8只雄性)。所有组的年龄都在4个月与11个月之间类似地分布。所有p值, 学生t检验, 2尾。误差条, SEM。

[0026] 图9展示了显示PTP σ 缺乏恢复了TgAPP-SwDI小鼠中的短期空间记忆的图。在Y型迷宫测定中, 空间导航的表现是通过总臂进入中自发交替的百分比来评分的。此处显示的原始值是在图6A中的标准化之前。与非转基因野生型APP-SwDI (-) PTP σ (+/+) 小鼠相比, APP-SwDI (+) PTP σ (+/+) 小鼠显示出短期空间记忆的缺陷, 该缺陷通过PTP σ 的遗传损耗来援救。APPSwDI (-) PTP σ (+/+) , n=23 (18只雌性和5只雄性); APP-SwDI (+) PTP σ (+/+) , n=52 (30只雌性和22只雄性); APP-SwDI (+) PTP σ (-/-) , n=35 (22只雌性和13只雄性)。所有基因型组的年龄都在4个月与11个月之间类似地分布。所有p值, 学生t检验, 2尾。误差条, SEM。

[0027] 图10(A-D)展示了显示PTP σ 缺乏增强了TgAPP-SwDI小鼠对新颖物探索的图。NO: 新颖物体。FO: 熟悉物体。A和B: 在新颖物体测试中, NO偏爱通过NO与FO探索之间的比值来测量, 其中NO/FO>1指示对NO偏爱。C和D: 对NO的注意力另外通过鉴别指数NO/(NO+FO) NO, 即NO探索与总物体探索(NO+FO)的比值来测量。此处c和d中显示的原始值是在图6B和6C中的标准化之前。此群落的小鼠显示出NO/(NO+FO)鉴别指数的低基线, 这可能遗传自它们的亲本Balb/c系。对于非转基因野生型APP-SwDI (-) PTP σ (+/+) 小鼠, 鉴别指数略高于0.5 (机会值), 这类似于先前针对Balb/c野生型小鼠报导的结果27。因此, 鉴别指数的单独测量可能无法如同NO/FO比值一样揭示对NO偏爱。尽管在测量物体偏爱时不那么敏感, 但NO/(NO+FO)指数最常使用, 因为它提供了NO探索相对于总物体探索活动的标准化。尽管各自有其自身的优点和缺点, 但NO/FO和NO/NO+FO测量都一致地显示, TgAPP-SwDI基因的表达导致对NO注意力的缺陷, 而PTP σ 的遗传损耗将新颖物探索的恢复到接近非转基因野生型小鼠的水平。A和C: 关于探索时间的测量。B和D: 关于访问频率的测量。APP-SwDI (-) PTP σ (+/+) , n=28 (19只雌性和9只雄性); APP-SwDI (+) PTP σ (+/+) , n=46 (32只雌性和14只雄性); APP-SwDI (+) PTP σ (-/-) , n=29 (21只雌性和8只雄性)。所有组的年龄都在4个月与11个月之间类似地分布。所有p值, 学生t检验, 2尾。误差条, SEM。

[0028] 图11(A-C)展示了PTP σ 缺乏改善了TgAPP-SwInd小鼠的行为表现。A: 空间导航的表现是通过在Y迷宫测定中总臂进入中自发交替的百分比来评分的。与APPSwInd (+) PTP σ (+/+) 小鼠相比, APPSwInd (+) PTP σ (-/-) 小鼠显示了改善的短期空间记忆。APPSwInd (+) PTP σ (+/+) , n=40 (20只雌性和20只雄性); APP-SwInd (+) PTP σ (-/-) , n=18 (9只雌性和9只雄性)。两个基因型组的年龄都在4个月与11个月之间类似地分布。B、C: 新颖物体测试。NO: 新颖物体。FO: 熟悉物体。NO偏爱是通过NO探索时间与总物体探索时间的比值(B)和NO探索时间与FO探索时间(C)的比值来测量。PTP σ 损耗显著改善了这些转基因小鼠的新颖物偏爱。APPSwInd (+) PTP σ (+/+) , n=43 (21只雌性和22只雄性); APP-SwInd (+) PTP σ (-/-) , n=24 (10只雌性和14只雄性)。两个组的年龄都在5个月与15个月之间类似地分布。所有p值, 学生t检验, 2尾。误差条, SEM。

[0029] 图12展示了免疫印迹,该免疫印迹显示出与单独施用的 γ 分泌酶抑制剂或与 γ 分泌酶抑制剂组合施用的BACE1抑制剂相比,ISP与 γ 分泌酶抑制剂的组合对APP加工的影响。

具体实施方式

[0030] 本文所述的实施方式不限于特定方法、方案、和试剂等,并且因此可以变化。本文使用的术语仅用于描述特定实施方式的目的,而不打算限制仅由权利要求限定的本发明的范围。除在操作实施例中外,或当另外指明时,本文使用的表示成分的量或反应条件的所有数值都应被理解为在所有情况下都由术语“约”修饰。

[0031] 指出的所有专利和其它出版物都出于描述和公开例如这类出版物中所述的可能结合本发明使用的方法的目的通过引用明确并入本文。这些出版物仅因它们的公开内容在本申请的提交日期之前而加以提供。就此而言,任何事物都不应解释为认可由于先前发明或因为任何其它原因而使发明者无权先于所述公开内容。所有关于日期的陈述或关于这些文档的内容的表述都是基于可为申请人所用的信息且不构成关于这些文档的日期或内容的正确性的任何认可。

[0032] 除非另外定义,否则本文使用的科学和技术术语将具有由本领域普通技术人员通常所理解的含义。另外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数并且复数术语应包括单数。总体而言,与本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、以及蛋白质和寡核苷酸和多核苷酸化学及杂交学结合使用的命名法是本领域中众所周知并且常用的那些。

[0033] 如本文所用,“a、b、和c中的一个或多个”意指a、b、c、ab、ac、bc、或abc。本文中“或”的使用是包括性的“或”。

[0034] 如本文所用,术语向患者“施用”包括通过任何合适的途径将药物配制物中的活性化合物分配、递送或应用到受试者以便将活性化合物递送到受试者中的所需位置(例如,进而接触所需细胞,诸如所需神经元),其包括施用到脑脊液中或穿过血-脑屏障、通过肠胃外或口服途径、肌肉注射、皮下或皮内注射、静脉注射、颊面施用、透皮递送、以及通过直肠、结肠、阴道、鼻内或呼吸道途径来施用。药剂可以例如经由静脉注射施用到昏迷、麻醉或瘫痪的受试者或者可以经静脉内施用到怀孕受试者以刺激胎儿的轴突生长。具体施用途径可以包括局部施用(诸如待置于眼睑下的通过眼药水、乳霜或易受侵蚀配制物)、眼内注射到房水或玻璃状液中、注射到眼睛的外层中(诸如经由结膜下注射或筋膜下(subtenon)注射)、肠胃外施用或经由口服途径。

[0035] 如本文所用,术语“抗体”包括人和动物mAb,以及多克隆抗体、合成抗体(包括重组抗体(抗血清))、嵌合抗体(包括人源化抗体)、抗独特型抗体以及其衍生物的制剂。抗体的部分或片段是指保留其与指定表位结合的能力(结合特异性和亲和力)的至少一部分的抗体区域。术语“表位”或“抗原决定子”是指抗原上与抗体互补位结合的位点。由连续氨基酸形成的表位一般在暴露于变性溶剂时被保留,而因三级折叠形成的表位用变性溶剂处理时一般丧失。表位通常包括至少3、至少5、或8至10、或约13至15个处于独特空间构象的氨基酸。确定表位的空间构象的方法包括例如x射线结晶学和2维核磁共振。参见例如66EPITOPE MAPPING PROTOCOLS IN METS. IN MOLECULAR BIO. (Morris编,1996);Burke等人,170J. Inf. Dis. 1110-19(1994);Tigges等人,156J. Immunol. 3901-10)。

[0036] 如本文所用,术语“中枢神经系统(CNS)神经元”包括脑部、脑神经和脊髓的神经

元。

[0037] 如本文所用,“嵌合蛋白”或“融合蛋白”是编码多肽的第一氨基酸序列与限定对于第一多肽的结构域是外源的并且与第一多肽的结构域基本上不同源的结构域(例如多肽部分)的第二氨基酸序列的融合。嵌合蛋白可能具有外源结构域,该外源结构域是在生物体中发现的(尽管在不同的蛋白质中),它也表达第一蛋白,或者它可以是由不同种类的生物体表达的蛋白质结构的“种间”、“基因间”等融合。

[0038] 如本文所用,术语“接触神经元”或“治疗神经元”是指药剂递送或“施用”到细胞或整个生物体的任何模式,其中该药剂能够在神经元中表现其药理作用。“接触神经元”包括使本发明的药剂进入神经元近端的体内和体外方法。适合的施用方式可以由本领域技术人员确定并且这类施用模式可以在药剂之间变化。

[0039] 如本文所用,药剂或治疗肽的“有效量”是足以实现所希望的治疗或药理效果的量,例如能够抑制Tau聚集的 β -淀粉样蛋白累积的量。如本文所定义的药剂的有效量可以根据诸如受试者的疾病状态、年龄和体重以及药剂在受试者中引发所希望应答的能力的因素而变化。可以调整给药方案以提供最佳的治疗应答。有效量还是其中治疗上有益的效果超过活性化合物的任何毒性或有害效果的量。

[0040] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指在所需剂量和持续时间段内有效实现所希望结果的量。治疗结果可以是例如减轻症状、延长生存期、改善活动性等等。治疗结果不需要是“治愈”。

[0041] 如本文所用,术语“表达”是指核酸被翻译成肽或被转录成RNA,所述RNA例如可以被翻译成肽、多肽或蛋白质的过程。如果核酸来源于基因组DNA,则如果选择合适的真核宿主细胞或生物体,表达可以包括mRNA的剪接。为了使异源核酸在宿主细胞中表达,必须首先将其递送到细胞中,并且然后一旦进入细胞中,最终就驻留在细胞核中。

[0042] 如本文所用,术语“基因疗法”涉及将异源DNA转移至患有寻求疗法或诊断的病症或病状的哺乳动物、特别是人的细胞。以使得表达异源DNA并且产生进而编码的治疗产物的方式将DNA引入所选靶细胞。可选地,异源DNA可能以某种方式调节编码治疗产物的DNA的表达;它可能编码以某种方式直接或间接地调节治疗产物的表达的产物,诸如肽或RNA。基因疗法还可以用于递送编码基因产物的核酸,以置换缺陷基因或补充由引入该核酸的哺乳动物或细胞产生的基因产物。所引入的核酸可以编码通常不在哺乳动物宿主中产生或不以治疗有效量或在治疗有用时间下产生的治疗化合物。编码治疗产物的异源DNA可以在引入患病宿主的细胞之前被修饰,以便增强或改变产物或其表达。

[0043] 如本文所用,术语“基因”或“重组基因”是指包含编码多肽的开放阅读框的核酸,其包括外显子和(任选地)内含子序列。

[0044] 如本文所用,术语“异源核酸序列”通常是以下DNA:它编码通常不被其中表达该DNA的细胞体内产生的RNA和蛋白质,或者介导或编码通过影响转录、翻译或其它可调控的生物化学过程而改变内源DNA表达的介体。异源核酸序列还可以称为外源DNA。本领域技术人员将认为或视为对于其中表达它的细胞为异源或外源的任何DNA在本文中均被异源DNA涵盖。异源DNA的实例包括但不限于:编码可追踪标记蛋白(诸如赋予抗药性的蛋白质)的DNA、编码治疗有效物质的DNA、以及编码其它类型的蛋白质(诸如抗体)的DNA。由异源DNA编码的抗体可以在已引入异源DNA的细胞的表面上分泌或表达。

[0045] 如本文所用,术语“同源性”和“同一性”在全文中同义使用,并且是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。可以通过比较在每个序列中可以用于比较目的比对的位置确定同源性。当比较序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,那么这些分子在该位置是同源或相同的。序列之间的同源或同一度是序列共有的匹配或同源位置数目的函数。

[0046] 如本文所用,术语“神经障碍”包括直接或间接影响受试者神经系统的正常功能或解剖的疾病、病症或病状。

[0047] 如本文所用,如本文所用的短语“肠胃外施用”和“经肠胃外施用”意指除肠内和局部施用以外的施用模式,通常通过注射来施用,并且包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、心室内、囊内、眶内、心脏内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和输注。

[0048] 如本文所用,如本文所用的短语“全身施用”、“经全身施用”、“外周施用”和“经外周施用”意指化合物、药物或其它材料除直接进入靶组织(例如,中枢神经系统)之外的施用,使得它进入动物的系统,并且因此进行新陈代谢和其它类似过程,例如皮下施用。

[0049] 如本文所用,术语“患者”或“受试者”或“动物”或“宿主”是指任何哺乳动物。受试者可以是人,但也可以是需兽医治疗的动物,例如家畜(例如,狗、猫等等)、农场动物(例如,牛、羊、鸡、猪、马等等)和实验室动物(例如,大鼠、小鼠、豚鼠等等)。

[0050] 如本文所用,术语“周围神经系统(PNS)神经元”包括位于CNS或延伸到CNS外部的神经元。PNS旨在包括通常被理解为分类在周围神经系统中的神经元,包括感觉神经元和运动神经元。

[0051] 如本文所用,术语“多核苷酸序列”和“核苷酸序列”在本文中也可互换使用。

[0052] 如本文所用,术语“肽”或“多肽”在本文中可互换使用,并且是指由约2至约90个氨基酸残基(包括端值)组成的化合物,其中一个氨基酸的氨基基团通过肽键连接到另一个氨基酸的羧基基团。肽可以例如通过酶裂解或化学裂解来源于天然蛋白或从天然蛋白中移出,或可以使用常规的肽合成技术(例如固相合成)或分子生物技术(参见Sambrook等人, MOLECULAR CLONING: LAB. MANUAL (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989))来制备。“肽”可以包含任何适合的L-和/或D-氨基酸,例如常见的 α -氨基酸(例如丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸);非 α -氨基酸(例如P-丙氨酸、4-氨基丁酸、6-氨基己酸、肌氨酸、抑胃酶氨酸);和非常见氨基酸(例如瓜氨酸、高瓜氨酸、高丝氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、鸟氨酸)。肽上的氨基、羧基和/或其它官能团可以是游离的(例如未经修饰的)或用适合的保护基保护。氨基和羧基基团的适合保护基,以及用于添加或去除保护基的方法是本领域已知的。参见例如Green&Wuts, PROTECTING GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (John Wiley & Sons, 1991)。肽的官能团还可以使用领域已知方法衍生(例如烷基化)。

[0053] 可以将肽合成并组装成包含一些至许多离散分子物种的库。这类库可以使用熟知的组合化学方法来制备,并且可以如本文所述或使用其它适合的方法筛选以确定该库是否包含可以拮抗CSPG-PTP σ 相互作用的肽。这类肽拮抗剂然后可以通过合适方式分离。

[0054] 如本文所用,术语“拟肽”是指设计为模拟肽的蛋白样分子。拟肽通常通过修饰现有肽,或通过设计模拟肽的类似系统(诸如类肽和 β 肽)而产生。不管哪种方法,改变的化学结构都被设计成有利地调整分子特性,例如稳定性或生物活性。这些修饰涉及对于肽的不

是自然发生的改变(诸如改变的骨架和非天然氨基酸的掺入)。

[0055] 如本文所用,术语“祖细胞”是在干细胞分化期间产生的细胞,这些细胞具有其终末分化后代的一些但不是全部特征。所定义的祖细胞(诸如“神经祖细胞”)属于一个谱系,而不属于特定或终末分化的细胞类型。

[0056] 如本文所用,术语“干细胞”是指可以经历自我更新(即具有相同分化潜能的后代)并且还产生分化潜能受到更多限制的后代细胞的细胞。在本发明的上下文中,干细胞也将涵盖更加分化的细胞,该更加分化的细胞已经例如通过核转移、与更原始的干细胞融合、引入特定转录因子、或通过特定条件下培养而去分化。参见例如,Wilmut等人,Nature,385:810-813(1997);Ying等人,Nature,416:545-548(2002);Guan等人,Nature,440:1199-1203(2006);Takahashi等人,Cell,126:663-676(2006);Okita等人,Nature,448:313-317(2007);以及Takahashi等人,Cell,131:861-872(2007)。

[0057] 当表达控制序列控制和调控多核苷酸序列(DNA、RNA)的转录和翻译时,该多核苷酸序列“可操作地连接到”该表达控制序列。术语“可操作地连接”包括在待表达的多核苷酸序列前面具有合适的起始信号(例如ATG),并且保持正确的阅读框以允许在表达控制序列的控制下表达多核苷酸序列,以及产生由多核苷酸序列编码的所希望多肽。

[0058] 如本文所用,如本文所用的术语“重组”是指蛋白质来源于原核或真核表达系统。

[0059] 如本文所用,术语“组织特异性启动子”意指充当启动子,即调控可操作地连接到启动子的所选核酸序列的表达,并且影响组织的特定细胞(诸如上皮细胞的细胞)中所选核酸序列的表达的核酸序列。该术语也涵盖所谓的“泄漏”启动子,这些启动子主要调控一种组织中所选核酸的表达,但也引起其它组织中的表达。术语“转染”用于指细胞对外源DNA的摄取。当将外生DNA引入细胞膜内部时,该细胞已被“转染”。许多转染技术一般在本领域中是已知的。参见例如,Graham等人,Virology 52:456(1973);Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(1989);Davis等人,Basic Methods in Molecular Biology(1986);Chu等人,Gene 13:197(1981)。这类技术可以用于将一个或多个外生DNA部分,诸如核苷酸整合载体和其它核酸分子引入适合的宿主细胞中。该术语涵盖化学、电和病毒介导的转染程序。

[0060] 如本文所用,术语“转录调控序列”是在整个说明书中用于指诱导或控制与其可操作地连接的蛋白质编码序列的转录的核酸序列(诸如起始信号、增强子和启动子)的通用术语。在一些实例中,重组基因的转录在启动子序列(或其它转录调控序列)的控制下,该启动子序列控制重组基因在预期表达的细胞类型中的表达。还应该理解,重组基因可以在与那些控制蛋白质天然存在形式的转录的序列相同或不同的转录调控序列的控制下。

[0061] 如本文所用,术语“载体”是指能够转运已经与其连接的另一核酸的核酸分子。优选的载体是能够自主复制和表达与其连接的核酸的一种或多种的那些载体。能够引导与其可操作地连接的基因的表达的载体在本文中称为“表达载体”。

[0062] 如本文所用,术语“野生型”是指天然存在的多核苷酸序列,其通常在体内正常存在时分别编码蛋白质或其部分、蛋白质序列或其部分。如本文所用,术语“核酸”是指多核苷酸,诸如脱氧核糖核酸(DNA)和合适时的核糖核酸(RNA)。该术语还应当理解为包括由核苷酸类似物制得的RNA或DNA的类似物,以及(在适用于所述的实施方式时)单链(诸如正义或反义)和双链多核苷酸作为等效物。

[0063] 在本文所述方法中使用的药剂、化合物、组合物、抗体等在其使用之前可以考虑进行纯化和/或分离。纯化的材料通常是“基本上纯的”，意指核酸、多肽或其片段或其它分子已经与天然伴随它的组分分离。通常，当多肽至少60重量%、70重量%、80重量%、90重量%、95重量%、或甚至99重量%不含与它天然缔合的蛋白质和其它有机分子时，该多肽是基本上纯的。例如，基本上纯的多肽可以通过从天然来源提取、通过在通常不表达该蛋白质的细胞中表达重组核酸、或通过化学合成来获得。“分离材料”已经从其天然位置和环境移出。就分离或纯化的结构域或蛋白质片段而言，该结构域或片段基本上不含在天然存在的序列中侧接蛋白质的氨基酸序列。术语“分离DNA”意指DNA已经基本上不含天然存在的基因组中侧接给定DNA的基因。因此，术语“分离DNA”涵盖例如cDNA、克隆基因组DNA和合成DNA。

[0064] 如本文所用，当提及本发明的多肽时，术语“部分”、“片段”、“变体”、“衍生物”和“类似物”包括保留至少一些本文提及的生物活性（例如，抑制相互作用，诸如结合）的任何多肽。如本文所述的多肽可以包括但不限于部分、片段、变体或衍生物分子，只要该多肽仍发挥其功能即可。本发明的多肽或其部分可以包括蛋白水解片段、缺失片段，以及尤其是或当被递送至动物时更容易到达作用位点的片段。

[0065] 本文所述的实施方式涉及抑制和/或减少有需要的受试者中的 β -淀粉样蛋白累积和/或Tau聚集的方法。 β -淀粉样蛋白累积和Tau聚集是阿尔茨海默病的标志，但它们的潜在分子机制仍不清楚。我们发现神经元受体PTP σ 在两种小鼠模型中介导 β -淀粉样蛋白和Tau发病机制二者。在脑部中，PTP σ 与 β -淀粉样前体蛋白（APP）结合。PTP σ 的损耗降低APP与 β -分泌酶之间的亲和力，通过 β -和 γ -裂解减少APP蛋白水解产物，而不会影响分泌酶的其他主要底物，表明 β -淀粉样蛋白生成调控的特异性。在衰老期间的人APP转基因小鼠中， β -淀粉样变性、Tau聚集、神经炎症、突触丢失以及行为缺陷的进展都显示出对PTP σ 表达的确切依赖。另外，发现内源性Tau的聚集体的分布模式与阿尔茨海默脑部中早期阶段神经原纤维缠结的分布模式类似。

[0066] 进一步发现，使用PTP σ 的胞内催化结构域的楔形状的结构域（即楔形结构域）的小肽模拟物（例如，具有SEQ ID NO:9的ISP）阻断PTP σ 活性或功能可以抑制BACE1的APP淀粉样蛋白生成加工至与PTP σ 损耗类似的程度。有利地，PTP σ 的楔形结构域的肽模拟物在递送到有需要的受试者时可以抑制 β -淀粉样蛋白和Tau发病机制二者，与被动淀粉样蛋白免疫疗法相比主动抑制 β -淀粉样蛋白，并且调控APP加工而不影响分泌酶的其他底物，因此提供比分泌酶抑制剂更安全的疗法。

[0067] 因此，在本文所述的一些实施方式中，可以向有需要的受试者施用抑制LAR家族磷酸酶（诸如PTP σ ）的催化活性、信号传导和功能中的一种或多种的治疗剂，以抑制和/或减少有需要的受试者中的 β -淀粉样蛋白累积和/或Tau聚集和/或治疗阿尔茨海默病和/或与阿尔茨海默病有关的痴呆。

[0068] LAR家族磷酸酶（诸如PTP σ ）的活性、信号传导和/或功能可以以几种方式被压制、抑制和/或阻断，这些方式包括：直接抑制LAR家族磷酸酶的胞内结构域的活性（例如，通过使用小分子、拟肽或显性负性多肽）；激活抑制LAR家族磷酸酶的胞内结构域的活性、信号传导和/或功能中的一种或多种的基因和/或蛋白质（例如，通过增加基因和/或蛋白质的表达或活性）；抑制作为LAR家族磷酸酶的下游介体的基因和/或蛋白质（例如，通过阻断介体基

因和/或蛋白质的表达和/或活性);引入负调控LAR家族磷酸酶的活性、信号传导和/或功能中的一种或多种的基因和/或蛋白质(例如,通过使用重组基因表达载体、重组病毒载体或重组多肽);或用例如LAR家族磷酸酶的亚效突变体进行基因置换(例如,通过同源重组、使用重组基因表达或病毒载体的过表达、或诱变)。

[0069] 抑制或降低LAR家族磷酸酶(诸如PTP σ)的活性、信号传导和/或功能中的一种或多种的治疗剂可以包括降低和/或抑制LAR家族磷酸酶的活性、信号传导和/或功能而不会抑制与LAR家族磷酸酶的结合或蛋白聚糖(诸如CSPG)对LAR家族磷酸酶的激活的药剂。这类药剂可以经细胞内或细胞外递送,并且一旦被递送就产生神经有益作用。

[0070] 神经有益作用可以包括对神经元、神经系统的一部分、或整体神经系统的健康或功能有利的应答或结果。这类作用的实例包括神经元或神经系统的部分抵抗损伤,再生,维持所希望功能,生长或存活的能力的改进。神经有益作用可以包括在神经系统的组分内产生或实现这种功能或恢复力的应答或改进。产生神经有益作用的实例包括在神经元损伤之后刺激轴突突出生长;使神经元对细胞凋亡具有抗性;使神经元对有毒化合物(诸如 β -淀粉样蛋白、氨或其它神经毒素)具有抗性;逆转年龄相关的神经元萎缩或功能丧失;逆转年龄相关的胆碱能神经支配的丧失;逆转和/或减少顶死、和/或促进神经发芽。

[0071] 调控、调节和/或抑制LAR家族的磷酸酶的一种潜在机制涉及LAR磷酸酶家族的胞内部分的二聚化。与作为二聚体有活性而作为单体无活性的受体酪氨酸激酶相反,几种蛋白质酪氨酸磷酸酶(PTP)在二聚状态下是无活性的并且作为单体有活性。这些包括PTP α 、PTP1B和CD45。这些分子中的每一种均可以以其活性单体形式和非活性二聚体形式结晶。另外,LAR和CD45展示在特定氧化条件下同嗜性结合,而PTP σ 应答于配体结合而二聚。这表明LAR家族的磷酸酶的配体可以引导LAR家族的磷酸酶(诸如LAR和PTP σ)的激活状态。因此,用胞内靶向疗法模拟二聚化可以直接使LAR家族的磷酸酶失活,而不会改变胞外基质或其它配体。

[0072] 在一个实施方式中,抑制或降低LAR家族磷酸酶(诸如PTP σ)的活性、信号传导和/或功能中的一种或多种的治疗剂可以包括与至少一种LAR家族磷酸酶的胞内结构域结合和/或络合以抑制LAR家族磷酸酶的活性、信号传导和/或功能的治疗肽或小分子。因此,与神经细胞的至少一种LAR家族磷酸酶的胞内结构域结合和/或络合的治疗肽或小分子可以用于抑制 β -淀粉样蛋白累积或Tau聚集。

[0073] 在一些实施方式中,治疗剂可以是LAR家族磷酸酶的胞内催化结构域的楔形状的结构域(即楔形结构域)的肽模拟物。结构和序列分析已经揭示,LAR家族的所有成员在第一胞内催化结构域中都含有保守的24氨基酸楔形螺旋-环-螺旋基序,该基序可能会介导同嗜性/异嗜性受体相互作用。表1列出了含有楔形结构域的LAR家族磷酸酶成员的胞内部分的氨基酸序列。通过下划线鉴别LAR家族磷酸酶的这些胞内部分的24氨基酸楔形结构域。尽管楔形结构域的特定结构在大多数LAR家族楔形结构域中都是保守的,但构成楔形结构域的确切氨基酸在各个蛋白质和亚族之间有所不同。

[0074] 表1

[0075]

LAR 楔形结构域比对

[0076]

小鼠	1338	<u>PIPITDLADNIERLKANDGKLFSQEYESI</u> DPGQ	1370	SEQ ID NO: 1
大鼠	1338	<u>PIPITDLADNIERLKANDGKLFSQEYESI</u> DPGQ	1370	SEQ ID NO: 2
人	1347	<u>PIPITDLADNIERLKANDGKLFSQEYESI</u> DPGQ	1379	SEQ ID NO: 3
PTPσ 楔形结构域比对				
小鼠	1347	<u>PIPITDMAEHMERLKANDSLKLSQEYES</u> IDPGQ	1379	SEQ ID NO: 4
大鼠	1303	<u>PIPITDMAEHMERLKANDSLKLSQEYES</u> IDPGQ	1335	SEQ ID NO: 5
人	1368	<u>PIPIADMAEHTERLKANDSLKLSQEYESI</u> DPGQ	1400	SEQ ID NO: 6
PTPδ 楔形结构域比对				
小鼠	1326	<u>PIPILELADHIERLKANDNLKFSQEYESI</u> DPGQ	1379	SEQ ID NO: 7
人	1335	<u>PIPILELADHIERLKANDNLKFSQEYESI</u> DPGQ	1367	SEQ ID NO: 8

[0077] 发现特定LAR家族成员的楔形结构域参与与其特定LAR家族成员的同嗜性相互作用或结合。例如,在下拉测定 (pull-down assay) 中,LAR的楔形结构域能够与全长LAR特异性相互作用,而不能与其它家族成员 (诸如PTP σ) 相互作用。另外,体外结合测定显示,PTP μ 和LAR的楔形结构域肽 (楔形结构域+HIV-TAT) 特异性地同嗜性聚集而非彼此混杂地结合。特别令人感兴趣的是,LAR的楔形结构域不能与 σ 结合,即使在相似的家族成员之间也显示出特异性。

[0078] 在一些实施方式中,治疗剂可以是PTP σ 的胞内催化结构域的楔形的结构域 (即楔形结构域) 的肽模拟物,诸如例如通过引用整体并入本文的W0 2013/155103A1中所述。PTP σ 的楔形结构域的肽模拟物在细胞 (例如神经细胞) 中表达或与胞内转运部分缀合时可以用于消除神经细胞中的PTP σ 信号传导并且抑制 β -淀粉样蛋白累积和Tau聚集。这些治疗肽与PTP σ 完整楔形结构域的结合可以潜在地: (i) 干扰PTP σ 与靶蛋白 (诸如磷酸酶靶标) 相互作用的能力; (ii) 干扰促进PTP σ 与PTP σ 中含有的另一个结构域 (诸如催化失活的第二磷酸酶结构域D2) 之间的分子间相互作用的活性;防止蛋白质接进入活性磷酸酶位点; (iii) 胜过楔形结构域的正常相互作用体;和/或 (iv) 在空间上抑制磷酸酶活性。

[0079] 在一些实施方式中,肽模拟物 (即治疗肽) 可以包括约10至约20个氨基酸、基本上由其组成和/或由其组成,并且具有与LAR家族磷酸酶 (诸如PTP σ) 的楔形结构域的氨基酸序列的约10至约20个连续氨基酸部分至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、或约100%相同的氨基酸序列。

[0080] 在一些实施方式中,治疗肽可以包括约10至约20个氨基酸、基本上由其组成和/或由其组成,并且具有与PTP σ 的楔形结构域的约10至约20个连续氨基酸至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、或约100%相同的氨基酸序列。

[0081] 特定LAR家族成员的楔形结构域序列示于表2中。

[0082] 表2

楔形结构域比对																									
0										1										2					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4		
D	M	A	E	H	T	E	R	L	K	A	N	D	S	L	K	L	S	Q	E	Y	E	S	I	人 PTP σ	SEQ ID NO: 9
D	L	A	D	N	I	E	R	L	K	A	N	D	G	L	K	F	S	Q	E	Y	E	S	I	LAR (Lar 家族)	SEQ ID NO: 10
E	L	A	D	H	I	E	R	L	K	A	N	D	N	L	K	F	S	Q	E	Y	E	S	I	δ (Lar 家族)	SEQ ID NO: 11
K	L	E	E	E	I	N	R	R	M	A	D	D	N	K	I	F	R	E	E	F	N	A	L	ptp α	SEQ ID NO: 12

[0084] PTP σ 的楔形结构域的第一 α 螺旋包括氨基酸1-10,转角区包括氨基酸11-14,并且第二 α 螺旋包括氨基酸15-24。例如,人PTP σ 的楔形结构域的第一 α 螺旋具有氨基酸序列DMAEHTERLK (SEQ ID NO:13),转角具有氨基酸序列ANDS (SEQ ID NO:14),并且第二 α 螺旋具有氨基酸序列LKLSQEYESI (SEQ ID NO:15)。

[0085] 楔形结构域还与LAR家族的其它成员LAR和PTP δ 共有序列同源性。有可能这些氨基酸对于楔形结构域的整体结构是必需的。保守氨基酸包括在位置13处的丙氨酸,该丙氨酸标志着第一 α 螺旋的终止和转角的起点,从而使得它对于总体楔形大小和结构而言是必需的。

[0086] 因为楔形结构域的总体二级和三级结构在大多数受体PTP中保持一致,所以可以对靶向PTP σ 楔形结构域的治疗肽进行几个保守取代以获得类似的结果。保守取代的实例包括一个非极性(疏水)残基(诸如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸)被另一个取代;一个极性(亲水)残基被另一个取代,诸如精氨酸与赖氨酸之间、谷氨酰胺与天冬酰胺之间、甘氨酸与丝氨酸之间;一个碱性残基(诸如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)被另一个取代;和/或一个酸性残基(诸如天冬氨酸或谷氨酸)被另一个取代。

[0087] 这些保守取代可以发生在 α 螺旋或转角的非独特结构域中,具体地第一 α 螺旋中的位置1-3和7-10;转角中的12和13;以及第二 α 螺旋中的15、16、18-24。这些氨基酸对于楔形结构域的整体结构可能是必需的,但对于楔形结构与PTP σ 结合的特异性不是必需的。

[0088] 已发现对于PTP σ 的独特氨基酸,特别是在PTP σ 与LAR中差异表达的氨基酸对于楔形结构域结合的特异性是必需的。这些包括在第一 α 螺旋位置4和5中的EH结构域,之后是位置

6处的苏氨酸或甲硫氨酸(大鼠和小鼠取代)。在转角中,在所有高等哺乳动物的位置14处都存在独特的丝氨酸。最后,在第二 α 螺旋中的位置17处存在独特的亮氨酸。这些独特氨基酸的潜在作用将在下文讨论。

[0089] 转角中位置14处的丝氨酸残基由于它位于楔形结构域中而受到特别关注。此位于 α 螺旋之间的转角中的氨基酸从PTP σ 的总体二级和三级结构中略微延伸出来,使其可用于结合相互作用。另外,已知丝氨酸由于其羟基基团和其所含的极性促进了几种同嗜性和异嗜性结合事件,诸如相邻丝氨酸之间的氢结合。还已知丝氨酸经历各种修饰,诸如磷酸化,使得其对特异性的必需性的可能性很高。聚集于楔形结构域中的转角且包括保守丝氨酸的较小肽可能会提供更大的稳定性,同时具有类似的功能。这类肽可以合成为环,其中半胱氨酸位于任一端上以形成二硫键。

[0090] 第一 α 螺旋中的独特氨基酸包括位置4处的谷氨酸、位置5处的组氨酸和位置6处的苏氨酸或甲硫氨酸。尽管组氨酸与共有楔形结构域有关,但在LAR、PTP δ 、PTP μ 或CD45中未发现。因为所有这三种氨基酸都是带电荷的或极性的,所以此序列或其组分中的一种可能对于PTP σ 楔形特异性是必需的。

[0091] 另外,第二 α 螺旋含有位置17处的独特的亮氨酸。亮氨酸已被认为是亮氨酸拉链的三维结构的关键粘连分子。在结构上类似于楔形结构域的这些分子中,相对的 α 螺旋的以大约7个间隔定位的亮氨酸与相对的 α 螺旋的疏水区相互作用。因为在第一 α 螺旋中位于位置9处也存在亮氨酸,所以认为此独特的亮氨酸对于PTP σ 楔形的整体三维结构完整性是必需的。

[0092] 因此,在其它实施方式中,治疗肽可以包括约14至约20个氨基酸、基本上由其组成或由其组成,并且包括氨基酸序列EHX₁ERLKANDSLKL (SEQ ID NO:16),其中X₁是T或M。包括SEQ ID NO:16的治疗肽可以包括至少一个、至少两个、至少三个、至少四个、或至少五个保守取代,使得该治疗肽具有与SEQ ID NO:16至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、或至少约95%同源的氨基酸序列。

[0093] 在一些实施方式中,保守取代可以具有SEQ ID NO:16的氨基酸残基4E、5R、6L、7K、9N、10D、12L、或13K。举例而言,氨基酸残基4E可以被D或Q取代,氨基酸残基5R可以被H、L或K取代,氨基酸残基6L可以被I、V或M取代,氨基酸残基7K可以被R或H取代,氨基酸残基9N可以被E或D取代,氨基酸残基10D可以被E或N取代,氨基酸残基12L可以被I、V或M取代,和/或氨基酸残基13K可以被R或H取代。

[0094] 本文所述的治疗肽可以经历其它各种变化、取代、插入和缺失,其中这类变化为其使用提供某些优势。就此而言,与LAR家族磷酸酶的楔形结构域结合和/或络合的治疗肽可以对应于所叙述的多肽的序列,或与其基本上同源,而非相同,其中对该序列进行一个或多个改变并且它保留抑制或降低LAR家族磷酸酶功能的活性、信号传导和/或功能中的一种或多种的能力。

[0095] 治疗多肽可以是多种形式的多肽衍生物中的任一种,所述多肽衍生物包括酰胺、与蛋白质的缀合物、环化多肽、聚合多肽、类似物、片段、化学修饰的多肽等等衍生物。

[0096] 应当了解,保守取代还可以包括使用化学衍生化的残基代替非衍生化的残基,条件是这种肽表现出必要的结合活性。

[0097] “化学衍生物”是指具有一个或多个通过官能侧基的反应化学衍生的残基的主题

多肽。这类衍生化分子包括例如其中游离氨基已被衍生化以形成胺盐酸盐、对甲苯磺酰基基团、苄氧羰基基团、叔丁氧基羰基、氯乙酰基基团或甲酰基基团的那些分子。游离羧基基团可以被衍生化以形成盐、甲酯和乙酯或其它类型的酯或酰肼。游离羟基基团可以被衍生化以形成O-酰基或O-烷基衍生物。组氨酸的咪唑氮可以被衍生化以形成N-im-苄基组氨酸。还包括作为化学衍生物的是含有二十个标准氨基酸的一种或多种天然存在的氨基酸衍生物的那些多肽。例如：4-羟基脯氨酸可以取代脯氨酸；5-羟基赖氨酸可以取代赖氨酸；3-甲基组氨酸可以取代组氨酸；高丝氨酸可以取代丝氨酸；并且鸟氨酸可以取代赖氨酸。本文所述的多肽还包括相对于其序列在本文示出的多肽的序列具有一个或多个添加物和/或缺失物或残基的任何多肽，只要保持必需的活性即可。

[0098] 本文所述的治疗肽中的一种或多种肽还可以通过本领域已知的天然方法，诸如翻译后加工和/或通过化学修饰技术来修饰。修饰可以发生于肽中，包括肽骨架、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。应当了解，相同类型的修饰可以相同或不同程度存在于给定肽的几个位点。修饰包含例如但不限于：乙酰化、酰化、乙酰氨基甲基 (Acm) 基团的添加、ADP-核糖基化、酰胺化、与黄素的共价连接、与血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、 γ -羧化、糖基化、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊烯化、外消旋、硒化、硫酸化、转移-RNA介导的氨基酸向蛋白质的添加 (诸如精氨酸化和泛素化) (出于参考参见Protein-structure and molecular properties, 第2版, T.E.Creighton, W.H.Freeman and Company, New-York, 1993)。

[0099] 本文所述的肽和/或蛋白质还可以包括例如生物活性突变体、变体、片段、嵌合体和类似物；片段涵盖具有一个或多个氨基酸截短 (truncation) 的氨基酸序列，其中该截短可以源自氨基末端 (N末端)、羧基末端 (C末端) 或蛋白质内部。本发明的类似物涉及一个或多个氨基酸的插入或取代。变体、突变体、片段、嵌合体和类似物可以用作LAR家族磷酸酶的抑制剂 (不限于本实例)。

[0100] 本文所述的治疗多肽可以通过本领域技术人员已知的方法制备。可以使用重组DNA制备肽和/或蛋白质。例如，一种制备可以包括在提供细胞内肽和/或蛋白质表达的条件下培养宿主细胞 (细菌的或真核的)。

[0101] 多肽的纯化可以通过亲和方法、离子交换色谱法、尺寸排阻色谱法、疏水性或通常用于蛋白质纯化的其它纯化技术来进行。纯化步骤可以在非变性条件下进行。另一方面，如果需要变性步骤，则可以使用本领域已知的技术使蛋白质复性。

[0102] 在一些实施方式中，本文所述的治疗肽可以包括可以在多肽的任一末端添加以便提供“接头”的额外残基，通过该接头可将多肽方便地连接和/或固定到其它多肽、蛋白质、可检测部分、标记、固体基质或载体。

[0103] 氨基酸残基接头通常是至少一个残基，并且可以是40个或更多个残基，更经常是1至10个残基。用于连接的典型氨基酸残基是甘氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酸和天冬氨酸等等。另外，主题多肽可以通过以下方式不同：通过末端-NH₂酰化 (例如，乙酰化或巯基乙酸酰胺化)，通过末端-羧基酰胺化 (例如，用氨、甲胺等) 等末端修饰来修饰序列。如所熟知，末端修饰可用于降低蛋白酶消化的易感性，并且因此用以延长多肽在溶液 (特别是可

能存在蛋白酶的生物流体)中的半衰期。就此而言,多肽环化也是有用的末端修饰,并且由于通过环化形成的稳定结构并且考虑到针对如本文所述的这类环肽观察到的生物活性,也是特别优选的。

[0104] 在一些实施方式中,接头可以是柔性肽接头,该柔性肽接头将治疗肽与其它多肽、蛋白质和/或分子(诸如可检测部分、标记、固体基质或载体)连接。柔性肽接头的长度可以是约20个或更少的氨基酸。例如,肽接头可以含有约12个或更少,例如3、4、5、6、7、8、9、10、11和12个氨基酸残基。在一些情况下,肽接头包含以下氨基酸中的两种或多种:甘氨酸、丝氨酸、丙氨酸和苏氨酸。

[0105] 在一些实施方式中,包含本文所述的治疗肽的治疗剂以缀合蛋白或药物递送构建体的形式提供,所述治疗剂包括与治疗肽连接的至少一个或多个转运子结构域或部分(即转运部分)。转运部分可以促进治疗多肽摄入哺乳动物(即人或动物)组织或细胞(例如神经细胞)中。转运部分可以共价连接到治疗肽。共价连接可以包括肽键或不稳定键(例如在内部靶细胞环境中可易于裂解或易发生化学变化的键)。另外,转运部分可以与治疗多肽交联(例如,化学交联、UV交联)。转运部分也可以利用本文所述的连接多肽连接到治疗肽。

[0106] 转运部分可以在治疗剂中重复超过一次。转运部分的重复可能影响(例如增加)所希望细胞对肽和/或蛋白质的摄取。转运部分也可以位于治疗肽的氨基末端区或其羧基末端区或两个区域。

[0107] 在一个实施方式中,转运部分可以包括至少一个转运肽序列,该序列使得治疗肽一旦连接到转运部分就通过非受体依赖性机制渗透到细胞中。在一个实例中,转运肽是合成肽,其含有Tat介导的蛋白质递送序列和SEQ ID NO:9-13和16中的至少一个。这些肽可以分别具有SEQ ID NO:17-22的氨基酸序列。

[0108] 已知的转运部分、子结构域等等的其它实例在例如加拿大专利文献号2,301,157(含有触角足的同源异形域的缀合物)以及美国专利号5,652,122、5,670,617、5,674,980、5,747,641和5,804,604中描述,所述专利的全部内容通过引用整体并入本文(含有Tat HIV蛋白的氨基酸的缀合物;单纯疱疹病毒-1DNA结合蛋白VP22(一种长度在4至30个组氨酸重复序列范围内的组氨酸标签),或其能够通过受体非依赖性过程促进活性货物部分(active cargo moiety)的摄取的变型衍生物或同源物)。

[0109] 也已经证实触角足同源异形域的第三 α -螺旋的16氨基酸区域使蛋白质(被制成融合蛋白)能够穿过细胞膜(PCT国际公布号W0 99/11809和加拿大申请号:2,301,157)。类似地,证实了HIV Tat蛋白能够穿过细胞膜。

[0110] 另外,一个或多个转运部分可以包括具有共价连接到活性剂部分的碱性氨基酸富集区的多肽(例如,含有胞内结构域的片段抑制剂肽)。如本文所用,术语“富含碱性氨基酸的区域”涉及具有高含量的碱性氨基酸(诸如精氨酸、组氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸)的蛋白质区域。“富含碱性氨基酸的区域”可以具有例如15%或更多的碱性氨基酸。在某种情况下,“富含碱性氨基酸的区域”可以具有少于15%的碱性氨基酸,并且仍然充当转运剂区域。在其它情况下,碱性氨基酸区域将具有30%或更多的碱性氨基酸。

[0111] 一个或多个转运部分可以进一步包括富含脯氨酸的区域。如本文所用,术语富含脯氨酸的区域是指在其序列中具有5%或更多(至多100%)的脯氨酸的多肽区域。在某种情况下,富含脯氨酸的区域可能具有在5%与15%之间的脯氨酸。另外,富含脯氨酸的区域是

指含有比天然存在的蛋白质(例如,由人基因组编码的蛋白质)中通常观察到的脯氨酸更多的脯氨酸的多肽区域。本申请的富含脯氨酸的区域可以充当转运剂区域。

[0112] 在一个实施方式中,本文所述的治疗肽可以非共价连接到转导剂。非共价连接的多肽转导剂的一个实例是Chariot蛋白递送系统(参见美国专利号6,841,535;J Biol Chem 274(35):24941-24946;和Nature Biotech. 19:1173-1176,其均通过引用整体并入本文)。

[0113] 在其它实施方式中,治疗肽可以在使用基因疗法抑制LAR家族信号转导来治疗的细胞中表达。基因疗法可以使用包括编码治疗肽的核苷酸的载体。“载体”(有时称为基因递送或基因转移“载体”)是指包含待递送到细胞的多核苷酸的分子的大分子或络合物。待递送的多核苷酸可以包含基因疗法中感兴趣的编码序列。载体包括例如病毒载体(诸如腺病毒(Ad)、腺相关病毒(AAV)和逆转录病毒)、脂质体和其它含脂质的络合物,以及能够介导多核苷酸向靶细胞递送的其它大分子络合物。

[0114] 载体还可以包含其它组分或功能,这些组分或功能进一步调节基因递送和/或基因表达,或以其它方式为靶细胞提供有益特性。这类其它组分包括例如影响与细胞结合或靶向细胞的组分(包括介导细胞类型或组织特异性结合的组分);影响细胞对载体核酸摄取的组分;摄取之后影响细胞内多核苷酸定位的组分(诸如介导核定位的试剂);和影响多核苷酸表达的组分。这类组分还可以包括标记,诸如可以用于检测或选择已经摄取且表达由载体递送的核酸的细胞的可检测和/或可选择标记。这类组分可以作为载体的天然特征提供(例如使用某些具有介导结合和摄取的组分或功能的病毒载体),或可以修饰载体以提供这类功能。

[0115] 可选择标记可以是阳性、阴性或双功能的。阳性可选择标记允许选择携带标记的细胞,而阴性可选择标记允许携带标记的细胞被选择性消除。已经描述了多种这类标记基因,包括双功能(即阳性/阴性)标记(参见例如1992年5月29日公布的Lupton, S., WO 92/08796;和1994年12月8日公布的Lupton, S., WO 94/28143)。这类标记基因可以提供额外的控制措施,这在基因治疗的背景下可能是有利的。多种这类载体是本领域已知的,并且通常是可获得的。

[0116] 用于本文的载体包括病毒载体、基于脂质的载体和其它能够将编码本文所述的治疗肽的核苷酸递送到靶细胞的非病毒载体。载体可以是靶向载体,尤其是优先与神经元结合的靶向载体。用于本申请的病毒载体可以包括对靶细胞表现出低毒性并且以细胞特异性方式诱导产生治疗有用量的治疗肽的那些。

[0117] 病毒载体的实例是来源于腺病毒(Ad)或腺相关病毒(AAV)的那些。人和非人病毒载体均可使用,并且重组病毒载体在人中可能是复制缺陷的。在载体是腺病毒的情况下,载体可以包含具有可操纵地连接到编码治疗肽的基因的启动子的多核苷酸,并且在人中是复制缺陷的。

[0118] 可以在本文中使用的其它病毒载体包括基于单纯疱疹病毒(HSV)的载体。删除一个或多个即早期基因(IE)的HSV载体是有利的,因为它们通常是无细胞毒性的,以类似于在靶细胞中潜伏的状态持续存在,并且提供有效的靶细胞转导。重组HSV载体可以掺入大约30kb的异源核酸。

[0119] 逆转录病毒,诸如C型逆转录病毒和慢病毒也可以用于本申请中。例如,逆转录病

毒载体可以基于鼠白血病毒 (MLV)。参见例如Hu和Pathak, *Pharmacol. Rev.* 52:493-511, 2000和Fong等人, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 17:1-60, 2000。基于MLV的载体可以含有至多8kb的异源 (治疗) DNA来代替病毒基因。异源DNA可以包括组织特异性启动子和编码治疗肽的核酸。在递送到神经细胞的方法中, 它还可以编码组织特异性受体的配体。

[0120] 可以使用的其它逆转录病毒载体是基于复制缺陷型慢病毒的载体, 包括基于人免疫缺陷 (HIV) 的载体。参见例如, Vigna和Naldini, *J. Gene Med.* 5:308-316, 2000和Miyoshi等人, *J. Virol.* 72:8150-8157, 1998。慢病毒载体的优势在于它们能够感染主动分裂和非分裂细胞二者。

[0121] 用于本申请的慢病毒载体可以来源于人和非人 (包括SIV) 慢病毒。慢病毒载体的实例包括载体繁殖所需的核酸序列, 以及可操作地连接到编码治疗肽的核酸的组织特异性启动子。这些前者可以包括病毒LTR、引物结合位点、聚嘌呤区、att位点和衣壳化位点。

[0122] 在一些方面, 可以采用慢病毒载体。已经证明慢病毒能够转导不同类型的CNS神经元 (Azzouz等人, (2002) *J. Neurosci.* 22:10302-12), 并且由于它们的大克隆能力而可用于一些实施方式中。

[0123] 慢病毒载体可以包装到任何慢病毒衣壳中。一种颗粒蛋白被来自不同病毒中的另一种颗粒蛋白取代称为“假型化”。载体衣壳可以含有来自其它病毒的病毒包膜蛋白, 这些病毒包括鼠白血病毒 (MLV) 或水泡性口炎病毒 (VSV)。VSV G蛋白的使用产生高的载体效价, 并且导致载体病毒颗粒更大的稳定性。

[0124] 基于 α 病毒的载体, 诸如由塞姆利基森林病毒 (SFV) 和辛德毕斯病毒 (SIN) 制成的载体也可以用于本申请中。 α 病毒的使用在Lundstrom, K., *Intervirology* 43:247-257, 2000和Perri等人, *Journal of Virology* 74:9802-9807, 2000中描述。

[0125] 重组的复制缺陷型 α 病毒载体是有利的, 因为它们能够进行高水平异源 (治疗) 基因表达, 并且可以感染广泛的靶细胞范围。 α 病毒复制子可以通过在其病毒粒子表面呈现功能性异源配体或结合结构域来靶向特定细胞类型, 该功能性异源配体或结合结构域将允许与表达同源结合配偶体的靶细胞选择性结合。 α 病毒复制子可能建立潜伏, 并且因此在靶细胞中长期异源核酸表达。复制子还可能在靶细胞中表现出瞬时异源核酸表达。

[0126] 在许多与本申请方法相容的病毒载体中, 载体中可以包括超过一种启动子以允许该载体表达超过一种异源基因。此外, 载体可以包含编码信号肽或其它部分的序列, 这促进治疗肽从靶细胞的表达。

[0127] 为了组合两个病毒载体系统的有利特性, 可以使用杂交病毒载体将编码治疗肽的核酸递送至靶神经元、细胞或组织。用于构建杂交载体的标准技术为本领域技术人员所熟知。这类技术可以见于例如Sambrook等人, *In Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y. 或论述重组DNA技术的任何数目的实验室手册。腺病毒衣壳中含有AAV和腺病毒ITR组合的双链AAV基因组可以用于转导细胞。在另一种变型中, 可以将AAV载体置于“无肠”、“辅助病毒依赖性”或“高容量”腺病毒载体中。腺病毒/AAV杂交载体在Lieber等人, *J. Virol.* 73:9314-9324, 1999中论述。逆转录病毒/腺病毒杂交载体在Zheng等人, *Nature Biotechnol.* 18:176-186, 2000中论述。腺病毒内含有的逆转录病毒基因组可以整合到靶细胞基因组内并且实现稳定的基因表达。

[0128] 进一步涵盖促进治疗肽表达和载体克隆的其它核苷酸序列元件。例如, 在启动子

上游存在增强子或在编码区下游存在终止子例如可以促进表达。

[0129] 根据另一个实施方式,可以使组织特异性启动子与编码本文所述的治疗肽的核苷酸融合。通过将这种组织特异性启动子融合在腺病毒构建体内,将转基因表达限于特定组织。由组织特异性启动子提供的基因表达的功​​效和特异性程度可以使用本申请的重组腺病毒系统确定。神经元特异性启动子,诸如血小板源性生长因子 β 链(PDGF- β)启动子和载体是本领域熟知的。

[0130] 除了基于病毒载体的方法,非病毒方法也可以用于将编码治疗肽的核酸引入靶细胞中。基因递送的非病毒方法的回顾在Nishikawa和Huang,Human Gene Ther.12:861-870,2001中提供。根据本申请的非病毒基因递送方法的实例采用质粒DNA将编码治疗肽的核酸引入细胞中。基于质粒的基因递送方法一般是本领域已知的。

[0131] 合成基因转移分子可以设计成与质粒DNA形成多分子聚集体。这些聚集体可以设计成与靶细胞结合。阳离子两亲体(包括脂多胺和阳离子脂质)可以用于提供将核酸非受体依赖性转移到靶细胞中。

[0132] 另外,可以使预先形成的阳离子脂质体或阳离子脂质与质粒DNA混合以产生细胞转染络合物。涉及阳离子脂质配制的方法在Felgner等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.772:126-139,1995与Lasic和Templeton,Adv.Drug Delivery Rev.20:221-266,1996中回顾。为用于基因递送,也可以使DNA与两亲性阳离子肽偶联(Fominaya等人,J.Gene Med.2:455-464,2000)。

[0133] 可以根据本申请使用涉及基于病毒和基于非病毒二者的组分的方法。例如,在Cui等人,Gene Therapy 8:1508-1513,2001中描述了用于治疗基因递送的基于EB病毒(EBV)的质粒。另外,在Curiel,D.T.,Nat.Immun.13:141-164,1994中描述了涉及与腺病毒偶联的DNA/配体/聚阳离子助剂的方法。

[0134] 另外,可以通过使用电穿孔技术转染靶细胞来将编码治疗肽的核酸引入靶细胞中。电穿孔技术是熟知的并且可以用于促进使用质粒DNA转染细胞。

[0135] 编码治疗肽表达的载体可以根据需要以含有药学上可接受的载体(诸如盐水)的可注射制剂的形式体内递送到靶细胞。其它药学载体、配制物和剂量也可以根据本申请使用。

[0136] 在靶细胞包括待治疗的神经元(诸如静止或休眠神经元)的情况下,载体可以通过直接注射以足以使治疗肽表达达到允许高效疗法的程度的量来递送。通过将载体直接注射到神经元的周围中或周围附近,可以相当有效地靶向载体转染,并且使重组载体的损失降到最低。这种类型的注射能够局部转染所希望数量的细胞,尤其是在CNS损伤部位转染,从而使基因转移的治疗功效最大化,并且将对病毒蛋白的炎症应答的可能性降到最低。可以使用向靶细胞施用载体的其它方法,并且这将取决于所采用的特定载体。

[0137] 治疗肽可以在靶细胞内表达任何适合的时间长度,包括瞬时表达和稳定的长期表达。在本申请的一个方面,编码治疗肽的核酸将以治疗量表达有效诱导转染细胞的活性和生长的限定的时间长度。在本申请的另一方面,编码治疗肽的核酸将以治疗量表达有效抑制和/或减少有需要的受试者中 β -淀粉样蛋白累积和/或Tau聚集的限定的时间长度。

[0138] 治疗量是能够在治疗的动物或人中产生医学上希望的结果的量。如在医学领域中熟知的,任何一个动物或人的剂量取决于许多因素,包括受试者的体型、体表面积、年龄、待

施用的特定化合物、性别、施用时间和途径、一般健康状况和同时施用的其它药物。蛋白质和核酸的具体剂量可以由本领域技术人员使用下文所述实验方法容易地确定。

[0139] 本文所述的治疗剂可以进一步被修饰(例如化学修饰)。这种修饰可以设计成促进分子的操作或纯化、增加分子的溶解度、促进施用从而靶向所希望的位置、增加或减少半衰期。许多这类修饰在本领域中是已知的,并且可以由熟练从业者应用。

[0140] 在一些实施方式中,可将本文所述的治疗剂和包含治疗剂的药物组合物可以递送到CNS和/或PNS的神经元。这类神经元可以是受损或患病的。这类神经元可以可选地是健康的未受损神经元。这类神经元可以位于损伤部位,或易发生损伤的部位。本文所述的药剂和组合物的治疗施用、递送/接触的靶向神经元将是认为证明神经元突出生长对受试者有益的神经元。仅通过常规实验进行这种确定在熟练从业者的能力之内。

[0141] 本文所述的治疗剂和治疗性药物组合物也可以递送到CNS和/或PNS的非神经元细胞,诸如递送到为神经细胞提供支持的非神经元细胞。这类细胞包括但不限于神经胶质细胞(例如,CNS中的星形胶质细胞、少突胶质细胞、室管膜细胞、放射状胶质细胞;以及PNS中的施万细胞、卫星神经胶质细胞、肠神经胶质细胞)。

[0142] 在一个实施方式中,施用是专门针对受试者的神经系统内的一个或多个特定位置。优选的施用模式可以根据所选的特定药剂和特定靶标而变化。

[0143] 在将治疗剂递送到受试者时,它们可以通过任何适合的途径施用,该途径包括例如口服(例如以胶囊、悬浮液或片剂形式)、经全身、或通过肠胃外施用。肠胃外施用可以包括例如肌肉内、静脉内、关节内、动脉内、鞘内、皮下或腹膜内施用。药剂也可以口服、经皮、局部、通过吸入(例如支气管内、鼻内、口腔吸入或鼻内滴剂)或经直肠施用。施用按照指示可以是局部的或全身的。

[0144] 局部和全身施用二者都涵盖在本文中。局部施用的所希望特征包括实现治疗剂的有效局部浓度以及避免全身施用引起的不良副作用。在一个实施方式中,治疗剂可以通过引入受试者的脑脊髓液中来施用。在某些方面,可以将治疗剂引入脑室、腰椎区域或小脑延髓池中。在另一方面,可将治疗剂局部引入,例如引入神经或脊髓损伤部位、引入疼痛或神经变性部位,或眼内引入以接触神经视网膜细胞。

[0145] 可将药学上可接受的配制物悬浮在水性载体中,并且通过常规的皮下注射针器或使用输液泵引入。

[0146] 在另一个实施方式中,治疗剂可以经鞘内施用到受试者中。如本文所用,术语“鞘内施用”旨在包括通过包括通过颅骨钻孔或脑池或腰椎穿刺等等的侧脑室注射的技术将治疗剂直接递送到受试者的脑脊髓液中(在Lazorthes等人,1991,和Ommaya,1984中描述,其内容通过引用并入本文)。术语“腰区”旨在包括第三和第四腰椎(下背部)椎骨之间的区域。术语“小脑延髓池”旨在包括在头部后方颅骨结束和脊髓开始的区域。术语“脑室”旨在包括脑部中与脊髓中央管连续的腔室。将治疗剂施用于上文提及的任何部位可以通过直接注射治疗剂或通过使用输液泵来实现。可以使用植入式或外部泵和导管。

[0147] 对于注射,可以将治疗剂配制在液体溶液中,通常配制在生理相容的缓冲液中,诸如汉克氏溶液或林格氏溶液中。另外,治疗剂可以以固体形式配制并且在使用前立即重新溶解或悬浮。也包括冻干形式。注射可以呈例如治疗剂的弹丸式注射或连续输注(例如使用输注泵)形式。

[0148] 在一个实施方式中,治疗剂可以通过侧脑室注射到受试者的脑部中来施用。注射可以例如通过在受试者颅骨中进行颅骨钻孔来进行。在另一个实施方式中,治疗剂可以通过手术插入到受试者的脑室中的分流器来施用。例如,可以注射到较大的侧脑室中,即使注射到较小的第三和第四脑室中也可以。在又一实施方式中,治疗剂可以通过注射到受试者的小脑延髓池、或腰椎区域中来施用。

[0149] 向颅内组织的额外施用方式包括施用到嗅上皮,随后穿透到嗅球并且转运到大脑的更近端。这种施用可以通过雾化或气雾化制剂进行。

[0150] 在另一个实施方式中,可以将治疗剂施用到受试者的损伤部位或全身施用于受试者。

[0151] 在一些实施方式中,可以将治疗剂施用于受试者持续延长的时间段。与活性化合物的持续接触可以例如通过在一段时间(诸如一周、几周、一个月或更长时间)内重复施用一种或多种活性化合物来实现。用于施用一种或多种治疗剂的药学上可接受的配制物还可以配制成提供活性化合物向受试者的持续递送。例如,在向受试者初次施用后,该配制物可以将活性化合物递送至少一周、二周、三周或四周(包括端值)。例如,待根据本发明治疗的受试者用活性化合物治疗至少30天(通过重复施用或通过使用持续递送系统,或两者)。

[0152] 治疗剂的持续递送可以通过例如治疗剂随着时间的持续治疗效果来证明。可选地,治疗剂的持续递送可以通过检测随着时间的体内治疗剂的存在来证明。

[0153] 用于持续递送的方法包括使用聚合物胶囊、用于递送配制物的微型泵、可生物降解的植入物或植入的转基因自体细胞(参见美国专利号6,214,622)。可植入的输液泵系统(例如INFUSAID泵(Towanda,PA);参见例如Zierski等人,1988;Kanoff,1994)和渗透泵(由Alza公司出售)是可商购的并且另外是本领域已知的。另一种施用模式是经由可植入的外部可编程输液泵。输液泵系统和贮库系统也在例如美国专利号5,368,562和4,731,058中描述。

[0154] 编码治疗肽的载体通常可以以小于其它类型的治疗剂的频率施用。例如,这种载体的有效量可以在约0.01mg/kg至约5或10mg/kg的范围内(包括端值);经每日一次、每周一次、两周一次、每月一次或更小的频率施用。

[0155] 递送或表达治疗肽的能力允许许多不同细胞类型中的细胞活性调节。治疗肽可以在例如受退行性疾病(诸如阿尔茨海默病)影响的神经细胞或脑部区域中表达。

[0156] 在一些实施方式中,治疗剂可以用于治疗有需要的受试者中与 β -淀粉样蛋白累积和/或Tau聚集相关的疾病、病症、和/或病状。

[0157] 在一些实施方式中,所述疾病、病症、和/或病状包括神经系统的疾病、病症、和/或病状中的至少一种。

[0158] 在其它实施方式中,神经系统的疾病、病症、和/或病状包括以下中的至少一种:神经障碍、神经精神障碍、神经损伤、神经毒性障碍、神经性疼痛、和神经退行性病症。

[0159] 例如,神经障碍可以包括阿尔茨海默病或与阿尔茨海默病相关的痴呆中的至少一种。

[0160] 在其它实施方式中,本文所述的治疗剂可以与抗阿尔茨海默病药剂组合施用。如本文采用的术语“抗阿尔茨海默病药剂(anti-Alzheimer's agent/anti-Alzheimer agent)”是指可以用于治疗阿尔茨海默病和其它痴呆的任何化合物;诸如但不限于N-甲基-

D-天冬氨酸受体 (NMDA) 受体拮抗剂、乙酰胆碱酯酶抑制剂、乙酰胆碱合成调节剂、乙酰胆碱储存调节剂、乙酰胆碱释放调节剂、A β 抑制剂、A β 斑块去除剂、A β 斑块形成的抑制剂、淀粉样前体蛋白加工酶的抑制剂、 β -淀粉样蛋白转化酶抑制剂、 β -分泌酶抑制剂、 γ -分泌酶调节剂、神经生长因子激动剂、激素受体阻滞剂、神经传递调节剂和其组合。在一个实施方式中，抗阿尔茨海默病药剂是NMDA受体拮抗剂。在一个实施方式中，NMDA受体拮抗剂包括但不限于美金刚、金刚烷胺、奈拉米松 (1,3,3,5,5-五甲基环己-1-胺)、氯胺酮、金刚乙胺、依利罗地、艾芬地尔、地佐环平、瑞马西胺、利鲁唑、阿替加奈、苯环己哌啶、氟吡汀、赛弗特乐 (celfotel)、非氨酯、精胺、亚精胺、左依莫帕米和/或其组合。在另一个实施方式中，本发明中采用的NMDA受体拮抗剂是抗阿尔茨海默病药剂。在一个实施方式中，抗阿尔茨海默病药剂是胆碱脂酶的抑制剂。在一个实施方式中，乙酰胆碱酯酶抑制剂包括但不限于：多奈哌齐、他克林、卡巴拉汀、加兰他敏、毒扁豆碱、新斯的明、石杉碱甲、艾考哌齐 (CP-118954, 5,7-二氢-3-[2-[1-(苯甲基)-4-哌啶基]乙基]-6H-吡咯并-[4,5-f]-1,2-苯并异噻唑-6-酮马来酸酯)、ER-127528 (4-[(5,6-二甲氧基-2-氟-1-茛酮)-2-基]甲基-1-(3-氟苄基)哌啶盐酸盐)、扎那哌齐 (zanapexil) (TAK-147; 3-[1-(苯甲基)哌啶-4-基]-1-(2,3,4,5-四氢-1H-1-苯并氮杂--8-基)-1-丙烷富马酸酯)、美曲磷酯 (T-588;-) (--R- α -[[2-(二甲基氨基)乙氧基]甲基]苯并[b]噻吩-5-亚甲基桥-1盐酸盐)、FK-960 (N-(4-乙酰基-1-哌嗪基)-对氟苯甲酰胺-水合物)、TCH-346 (N-甲基-N-2-吡啶基二苯并[b,f]氧杂萘-10-甲胺)、SDZ-220-581 ((S)- α -氨基-5-(膦羧基甲基)-[1,1'-联苯]-3-丙酸) 和其组合。

[0161] 在另一个实施方式中，抗阿尔茨海默病药剂是A β 抑制剂、A β 斑块去除剂、A β 斑块形成的抑制剂、淀粉样前体蛋白加工酶的抑制剂、 β -淀粉样蛋白转化酶抑制剂、 β -分泌酶抑制剂、 γ -分泌酶调节剂。

[0162] 在另一个实施方式中，A β 抑制剂包括但不限于他仑氟比 (tarenflurbil)、高牛磺酸、氯碘羟喹、PBT-2和其它8-羟基喹啉衍生物、A β 斑块去除剂、A β 斑块形成的抑制剂、淀粉样前体蛋白加工酶的抑制剂、 β -淀粉样蛋白转化酶抑制剂、 β -分泌酶抑制剂、 α -分泌酶调节剂 (LY450139; N-[N-(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酰基]-S-苯基甘氨酸叔丁酯) 和其组合。

[0163] 在另一个实施方式中，抗阿尔茨海默病药剂是神经生长因子激动剂。神经生长因子激动剂是但不限于扎利罗登或脑部源性神经营养因子或神经生长因子。

[0164] 在另一个实施方式中，抗阿尔茨海默病药剂是激素受体阻滞剂。激素受体阻滞剂是但不限于亮丙瑞林 (leuproelide) 或其衍生物。

[0165] 在另一个实施方式中，抗阿尔茨海默病药剂是神经传递调节剂。神经传递调节剂是但不限于异丙克兰。

[0166] 通过以下实施例进一步说明本发明，所述实施例并非旨在限制权利要求的范围。

[0167] 实施例1

[0168] 磷酸酶的白细胞共同抗原相关 (LAR) 家族由三种成员组成：LAR自身、受体蛋白质酪氨酸磷酸酶 σ (RPTP σ) 和受体蛋白质酪氨酸磷酸酶 δ (RPTP δ)。结构和序列分析已经揭示，LAR家族的所有成员在第一胞内催化结构域中都含有楔形螺旋-环-螺旋基序，该基序介导同嗜性/异嗜性受体相互作用。使用标记到细胞质定位TAT序列的此楔形结构域的肽模拟物，成功地消除了神经营养蛋白信号传导范式中的LAR活性。我们利用NIH BLAST来鉴定RPTP σ 和RPTP δ 中的直系同源序列，并且为每个靶标设计了楔形结构域肽。这些肽被创造为

胞内LAR阻断肽 (ILP)、胞内 σ 阻断肽 (ISP) 和胞内 δ 阻断肽 (IDP)。有趣的是,此结构域在高等脊椎动物中高度保守,表明其是功能上重要的区域。将这些肽标记为与HIV-TAT偶联,以创建功能阻断肽:

[0169] $\text{NH}_2\text{GRKKRRQRRRCDMAEHTMERLKDLSLKLSQEYESI-NH}_2$ PTP σ 人 (SEQ ID NO:17) (ISP)。

[0170] $\text{NH}_2\text{GRKKRRQRRRCDLADNIERLKANDGLKFSQEYESI-NH}_2$ LAR (SEQ ID NO:18) (ILP)。

[0171] $\text{NH}_2\text{GRKKRRQRRRCDELADHIERLKANDNLKFSQEYESI-NH}_2$ PTP δ (SEQ ID NO:19) (IDP)。

[0172] 实施例2

[0173] 此实施例显示了,抑制神经元受体PTP σ (蛋白质酪氨酸磷酸酶 σ) 控制了 β -淀粉样蛋白 (A β) 发病机制和Tau的聚集。PTP σ 的遗传损耗降低了 β -分泌酶对APP的亲合力,并且以一般不会抑制 β -和 γ -分泌酶活性的特异性方式压制A β 累积。PTP σ 的遗传损耗还抑制Tau的聚集。

[0174] 在本文所述的两种小鼠模型中,一系列AD神经病理学和行为缺陷都说明对PTP σ 的明显依赖性,从而表明此神经元受体是AD发病机制中的关键上游因素。

[0175] 数据表明,靶向PTP σ 是一种潜在的治疗方法,可以克服这类主要的遗传驱动力以缩减AD进展。此靶向策略的优势在于,它压制了A β 的累积,而不广泛影响 β -和 γ -分泌酶的其它主要底物,因此预测与临床试验中通常抑制这些分泌酶的那些策略相比具有更大的翻译潜力。

[0176] 材料与方法

[0177] 小鼠品系:

[0178] 将小鼠维持在机构动物护理和使用委员会 (Institutional Animal Care and Use Committee) 批准的标准条件下。Balb/c背景的野生型和PTP σ 缺陷型小鼠由Dr. Michel L. Tremblay提供。纯合TgAPP-SwDI小鼠, C57BL/6-Tg (Thy1-APP^{SwDutIowa}) BWevⁿ/Mmjax, 库存编号007027来自Jackson Laboratory。这些小鼠表达具有瑞士、荷兰和爱荷华突变的人APP转基因,并且与对于PTP σ 基因是杂合的Balb/c小鼠一起繁殖以产生对于TgAPP-SwDI和PTP σ 基因二者是杂合的双基因小鼠,这些双基因小鼠是50% C57BL/6J和50% Balb/c遗传背景的杂交体。使这些小鼠进一步与对于PTP σ 基因是杂合的Balb/c小鼠一起繁殖。将此交配的后代用于实验,这些后代包括具有以下基因型的同窝仔畜: TgAPP-SwDI (+/-) PTP σ (+/+), 具有野生型PTP σ 的对于TgAPP-SwDI转基因是杂合的小鼠; TgAPP-SwDI (+/-) PTP σ (-/-), 具有PTP σ 的遗传损耗的对于TgAPP-SwDI转基因是杂合的小鼠; TgAPP-SwDI (-/-) PTP σ (+/+), 具有野生型PTP σ 的不含TgAPP-SwDI转基因的小鼠。TgAPP-SwDI (-/-) PTP σ (+/+) 和Balb/c PTP σ (+/+) 二者都是野生型小鼠但具有不同的遗传背景。异源TgAPP-SwInd (J20) 小鼠, 6.Cg-Tg (PDGFB-APP^{SwInd}) 20Lms/2Mmjax由Dr. Lennart Mucke提供。这些小鼠表达具有瑞士和印第安纳突变的人APP转基因,并且用如上所述的相同策略进行繁殖,以获得具有TgAPP-SwInd (+/-) PTP σ (+/+) 和TgAPP-SwInd (+/-) PTP σ (-/-) 基因型的小鼠。

[0179] 免疫组织化学

[0180] 给成年大鼠和小鼠心内灌注新鲜制备的含4%多聚甲醛的冷磷酸盐缓冲液 (PBS)。收集脑部且在4℃下后固定2天。收集10 μ m厚的石蜡包埋切片进行免疫染色。将切片脱石蜡并且随后再水化。在Tris-EDTA缓冲液 (pH 9.0) 中于100℃下进行抗原修复持续50min。随后用蒸馏水和PBS洗涤切片,在封闭缓冲液 (PBS, 具有5%正常驴血清、5%正常山羊血清和

0.2% Triton X-100) 中于室温下孵育1小时。将一级抗体在4℃下于加湿室中孵育过夜。在具有0.2% Triton X-100的PBS中洗涤3次之后,将切片与二级抗体和三级抗体的混合物一起在室温下孵育2小时。将所有抗体在具有制造商建议的浓度的封闭缓冲液中稀释。小鼠一级抗体通过山羊抗小鼠Alexa488与驴抗山羊Alexa488抗体一起检测;兔一级抗体通过鸡抗兔CF568和驴抗鸡Cy3抗体检测;鸡抗体用驴抗鸡Cy3抗体检测。仅用二级抗体和三级抗体(无一级抗体)染色的切片用作阴性对照。最后,将DAPI (Invitrogen, 300nm) 施加在切片上进行核染色。将切片洗涤5次,然后安装在Fluoromount (SouthernBiotech) 中。

[0181] 分别使用Zeiss Axio Imager M2和LSM780捕获广角和共焦图像。使用Zen 2Pro软件和ImageJ量化图像。

[0182] 蛋白质提取、免疫沉淀和免疫印迹分析

[0183] 为了APP和PTPσ的共同免疫沉淀,使用RIPA缓冲液(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% 脱氧胆酸钠)。为了APP和BACE1的共同免疫沉淀,使用不含或含有浓度为0.1%、0.3%和0.4% SDS的NP40缓冲液(50mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1% NP40)。为了CTFβ的总蛋白质提取和免疫纯化,将RIPA缓冲液中的SDS浓度调整到1%以确保从脂筏中提取蛋白质。在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Thermo Scientific)的匀浆缓冲液(如上文所提及)中,将小鼠或大鼠前脑在冰上充分均匀化。对于每一半前脑,针对小鼠使用至少5ml的缓冲液体积且针对大鼠使用8ml的缓冲液体积以确保足够的清洁剂/组织比。将匀浆在轻缓混合下于4℃下孵育1小时,在超声波破碎仪(Fisher Scientific型号120,输出脉冲50%,1秒打开和1秒关闭)中在冰上超声处理2分钟,然后在4℃下再轻缓混合一小时。所有样品均新鲜使用,没有冻结和解冻。

[0184] 为了共同免疫沉淀和免疫纯化,然后将匀浆在4℃下以85,000x g离心1小时,并且收集上清液。使用BCA蛋白质测定试剂盒(Thermo Scientific)测量蛋白质浓度。将脑匀浆的0.5mg总蛋白质与5μg指定抗体和30μl蛋白-A琼浆糖珠(50%浆液, Roche)一起孵育,用RIPA缓冲液调节总体积为1ml。将样品在4℃下轻缓混合过夜。随后,将珠粒用冷免疫沉淀缓冲液洗涤5次。然后将样品在含有100mM DTT的Laemmli缓冲液中于75℃下孵育20分钟,并且进行免疫印迹分析。

[0185] 为了蛋白质表达水平的分析,将匀浆在4℃下以23,000x g离心30min,并且收集上清液。使用BCA蛋白质测定试剂盒(Thermo Scientific)测量蛋白质浓度。使30μg总蛋白质进行免疫印迹分析。

[0186] 使用4-12%Bis-Tris Bolt Plus凝胶和Novex Sharp预染色蛋白质标准品进行蛋白质样品的电泳,所述凝胶具有MOPS或MES缓冲液(均来自Invitrogen)。将蛋白质转移到硝酸纤维素膜(孔径为0.2μm, Bio-Rad),并且使用制造商建议的浓度下的所选抗体(参见上表)进行印迹。将一级抗体在SuperBlock TBS封闭缓冲液(Thermo Scientific)中稀释并且与硝酸纤维素膜一起在4℃下孵育过夜;将二级抗体在具有5%脱脂牛奶和0.2% Tween20的PBS中稀释并且在室温下孵育2小时。将一级抗体与二级抗体之间的膜在具有0.2% Tween20的PBS中洗涤4次,并且然后用SuperSignal West Pico化学发光底物(Thermo Scientific)进行化学发光检测。

[0187] 免疫印迹带强度通过密度测定法定量。

[0188] Aβ ELISA测定

[0189] 将小鼠前脑在含有蛋白酶抑制剂混合物 (Roche) 的组织匀浆缓冲液 (2mM Tris pH 7.4, 250mM 蔗糖、0.5mM EDTA、0.5mM EGTA) 中彻底均匀化, 然后以 135,000x g (33,500RPM, 使用 SW50.1 转子) 在 4℃ 下离心 1 小时。用甲酸 (FA) 提取团粒中的蛋白质, 并且以 109,000x g (30,100RPM, 使用 SW50.1 转子) 在 4℃ 下离心 1 小时。收集上清液并且将其在中和缓冲液 (1M Tris 碱、0.5M Na_2HPO_4 、0.05% NaN_3) 中以 1:20 稀释, 并且随后在 ELISA 缓冲液 (具有 0.05% Tween-20、1% BSA 和 1mM AEBSF 的 PBS) 中以 1:3 稀释。将稀释的样品装载到预先涂有 6E10 抗体 (Biolegend) 的 ELISA 板上以捕获 A β 肽。装载合成的人 A β 1-40 或 1-42 (American Peptide) 的连续稀释液以确定标准曲线。使用 HRP 标记的抗体针对 A β 1-40 或 1-42 检测 A β (参见上表)。使用 TMB 底物 (Thermo Scientific) 开展 ELISA, 并且用 1N HCl 终止反应。在 450nm 下读取板并且使用标准曲线确定样品中 A β 的浓度。

[0190] 行为测定

[0191] Y 迷宫测定

[0192] 将小鼠放置在 Y 迷宫的中央并且允许其自由移动穿过每个臂。持续 5 分钟记录它们的探索活动。臂进入定义为当四肢全部在臂内时。对于每只小鼠, 三联体 (triad) 的次数被计为“自发交替”, 然后将其除以总的臂进入的次数, 得出分数百分比。新颖物体测试: 在第 1 天, 将小鼠暴露在墙壁变黑的空笼子 (45cm x 24cm x 22cm) 中以允许探索和适应活动领域。在第 2 天到第 4 天期间, 将小鼠放回同一笼子中, 其中以相等的距离放置两个相同的物体。在每一天, 在当天大约同一时间使小鼠返回笼子并且让其探索 10 分钟。每只动物之间用 70% 的乙醇清洁笼子和物体。随后, 在第 4 天在熟悉阶段之后 2 小时, 将小鼠放回同一笼子中, 在笼子中用一个新颖物体代替一个熟悉物体 (随机选择), 并且让其探索 5 分钟。使用 Observer 软件 (Noldus) 对小鼠探索任一物体的持续时间和访问频率进行评分。物体探索定义为面对物体且主动嗅探或触摸物体, 而不对任何攀爬行为进行评分。反映对新颖物体兴趣的鉴别指数表示为新颖物体探索与总物体探索的比值 ($\text{NO}/(\text{NO}+\text{FO})$) 或新颖物体探索与熟悉物体探索的比值 (NO/FO)。所有测试和数据分析均以双盲方式进行。

[0193] 将 2 尾学生 t 检验用于两组比较。使用线性回归分析两个变量 (SDS 浓度和 APP-BACE1 缔合, 如图 3 中) 之间的关系。所有误差条均显示平均值的标准误差 (SEM)。

[0194] PTP σ 是脑部中的 APP 结合配偶体

[0195] PTP σ 先前被鉴定为胞外蛋白聚糖的神经元受体, 它在整个成人神经系统中表达, 最主要有在海马中表达, 海马是 AD 中受影响最早的大脑区域之一。使用免疫组织化学和共聚焦成像, 我们发现 PTP σ 和 APP (A β 的前体) 共定位于成年大鼠脑部的海马锥体神经元中, 最集中于顶端树突的初始区段, 以及具有点状图案的核周区和轴突区 (图 1A-F)。为了评估此共定位是否反映了这两种分子之间的结合相互作用, 我们测试了它们来自脑匀浆的共同免疫沉淀。在具有不同遗传背景的大鼠和小鼠的脑部中, 使用 APP 和 PTP σ 的各种抗体, 我们一致检测到了一部分与 APP 共同免疫沉淀的 PTP σ , 从而为这两种跨膜蛋白之间的分子络合提供了证据 (图 1H、I)。

[0196] PTP σ 的遗传损耗减少了 APP 的 β -淀粉样蛋白生成产物

[0197] PTP σ 与 APP 之间的分子相互作用促使我们研究 PTP σ 在 APP 的淀粉样蛋白生成加工中是否起作用。在神经元中, APP 主要通过 α -或 β -分泌酶的交替裂解来加工。这些分泌酶从其膜栓系 C 末端片段 (分别为 CTF α 或 CTF β) 释放 APP 的 N 末端部分, 该 N 末端部分可以由 γ 分泌

酶进一步加工。 β -和 γ -分泌酶对APP的顺序裂解被认为是淀粉样蛋白生成加工,因为它产生A β 肽。当过量产生时,A β 肽可以形成可溶性寡聚物,这些可溶性寡聚物触发细胞毒性级联的分支,而A β 的渐进性聚集最终导致AD患者脑部中形成老年斑块(图2a)。为了测试PTP σ 在此淀粉样蛋白生成加工中的作用,我们分析了具有或不具有PTP σ 的小鼠脑部中APP β -和 γ -裂解产物的水平。

[0198] 用来自小鼠脑部的蛋白质提取物进行的免疫印迹分析显示,PTP σ 的遗传损耗不影响全长APP的表达水平(图2B)。然而,针对APP C末端的抗体在与CTF β 一致的分子量处检测到条带,与年龄、性别匹配的野生型同窝仔畜相比,该条带在PTP σ 缺陷型小鼠中减少(图2B)。此外,在两个表达具有淀粉样蛋白生成突变的人APP基因的AD小鼠模型中,我们观察到PTP σ 损耗后APP CTF的类似的减少(图2B)。将各自在 β 裂解位点附近表达具有瑞士突变的人APP转基因的TgAPP-SwDI和TgAPP-SwInd小鼠与PTP σ 品系杂交,以产生具有或不具有PTP σ 的对于其相应APP转基因杂合的后代。因为这些APP转基因携带的瑞士突变易于发生 β 裂解,所以预测这些转基因小鼠中APP CTF的主要形式为CTF β 。因此,PTP σ 缺陷型APP转基因小鼠中APP CTF的减少可能表明PTP σ 对CTF β 水平的调控作用。然而,因为这些实验中使用的APP C末端抗体可以识别CTF α 和CTF β 两者,以及这些CTF的磷酸化物种(免疫印迹的较长时间暴露显示多个CTF条带),所以仅通过其分子量判断减少的CTF的身份可能不足。我们因此使用识别CTF β 但不识别CTF α 的抗体进行了CTF β 免疫纯化以及随后的免疫印迹检测(图2C、D)。利用此确定性方法,我们证实了PTP σ 损耗降低源自小鼠内源性和人转基因APP二者的CTF β 的水平。

[0199] 因为CTF β 是 β -和 γ -裂解之间的中间蛋白水解产物,所以其稳态水平降低可能是由于 β 裂解引起的产量减少或随后的 γ 分泌酶裂解引起的降解增加所致(图2A)。为了区分这两种可能性,我们测量了A β 肽的水平,A β 肽是 γ 裂解引起的CTF β 降解的下游产物。使用利用来自TgAPP-SwDI小鼠的脑匀浆的ELISA分析,我们发现PTP σ 损耗将A β 肽的水平降低到与CTF β 类似的水平(图2E、F)。一致地,随着在转基因小鼠衰老期间A β 肽逐渐聚集成斑块,我们观察到,与年龄匹配的野生型PTP σ 的APP转基因同窝仔畜相比,APP转基因PTP σ 缺陷型小鼠的大脑A β 沉积显著减少(图2G、H)。因此, β 和 γ 裂解产物的同时减少反驳 γ 分泌酶活性增加,但是却表明APP的 β 分泌酶裂解减少,这不仅抑制了CTF β 的水平,而且抑制了PTP σ 缺陷型脑部中的下游A β 产生。

[0200] 在不存在PTP σ 下 β -淀粉样变性的缩减进展

[0201] 渐进性大脑A β 聚集(β -淀粉样变性)被视为AD进展的基准。为了研究PTP σ 对此病理进展的影响,我们监测了9月龄(中年)和16月龄(老年)TgAPP-SwDI小鼠脑部中的A β 沉积。在9到11月龄时,A β 沉积物主要在海马中发现,尤其是在齿状回(DG)的门中(图2G、H)。到16个月时,病理广泛扩散到整个脑部中。然而,A β 沉积的蔓延受到PTP σ 遗传损耗的限制,如使用DG门作为代表区域所定量的(图2I)。在9月龄与16月龄之间,A β 负荷在表达野生型PTP σ [APP-SwDI (+) PTP σ (+/+)]的TgAPP-SwDI小鼠中增加超过一倍,但在缺乏功能性PTP σ [APP-SwDI (+) PTP σ (-/-)]的转基因小鼠中仅显示略微增加。同时,在9月龄APP-SwDI (+) PTP σ (+/+)小鼠中测量的A β 负荷与16月龄APP-SwDI (+) PTP σ (-/-)小鼠的A β 负荷类似($p=0.95$),表明PTP σ 损耗限制了疾病进展(图2I)。

[0202] 在PTP σ 缺陷型脑部中降低的BACE1-APP亲和力

[0203] 与表明PTP σ 在APP β 裂解中起促进作用的这些观察一致,我们的数据进一步揭示,PTP σ 损耗弱化了脑部中APP与 β -分泌酶BACE1的相互作用。为了测试BACE1与APP之间的体内亲和力,我们在去污剂严格度连续增加的缓冲液中进行了来自小鼠脑匀浆的酶和底物的共同免疫沉淀。尽管在温和的缓冲液条件下,野生型和PTP σ 缺陷型脑部中的BACE1-APP缔合几乎相等,但缓冲液中增加的去污剂严格度揭示,分子络合物更容易在没有PTP σ 的脑部中解离(图3)。因此,PTP σ 缺陷型脑部中较低的BACE1-APP亲和力可能是CTF β 及其衍生物A β 水平降低的潜在机制。

[0204] 尽管不能排除某种替代性未表征的途径可能会促使PTP σ 缺陷型脑部中CTF β 和A β 的同时减少,但这些数据一贯支持以下观念:PTP σ 可能经由促进BACE1对APP的活性来调控A β 淀粉样蛋白生成加工(A β 产生的初始加工)。

[0205] PTP σ 对 β -淀粉样蛋白生成调控的特异性

[0206] PTP σ 对APP淀粉样蛋白生成产物的限制作用使我们进一步疑问此观察结果是反映了APP代谢的特异性调控,亦或对 β -和 γ -分泌酶的一般调控。我们首先评估了这些分泌酶在具有或不具有PTP σ 的小鼠脑部中的表达水平,并且发现BACE1或 γ -分泌酶的必需亚基没有变化(图4A、B)。另外,我们通过检查 β -和 γ -分泌酶的其他底物的蛋白水解加工,测试了PTP σ 是否广泛调控 β -和 γ -分泌酶活性。除APP之外,神经调节蛋白1(NRG1)和Notch分别是BACE1和 γ -分泌酶的主要体内底物。NRG1的BACE1裂解和Notch的 γ -分泌酶裂解均不受PTP σ 缺乏的影响(图4C、D)。综上所述,这些数据排除了 β -和 γ -分泌酶的一般调控,而表明了PTP σ 对APP淀粉样蛋白生成调控的特异性。

[0207] PTP σ 损耗缓解APP转基因小鼠的神经炎症和突触损伤

[0208] 早期研究的大量证据已经确定,脑部中A β 的过量产生引发多重下游病理事件,包括神经胶质的慢性炎症应答,诸如持续性星形胶质细胞增生。反应性(炎症性)神经胶质然后将与神经元串扰,引起恶性反馈回路,该恶性反馈回路加剧疾病进展期间的神经变性。

[0209] TgAPP-SwDI模型是许多现有AD小鼠模型中最早出现神经退行性病变和行为缺陷的模型之一。我们因此选择了这些小鼠以进一步检查PTP σ 在神经毒性A β 下游的AD病理中的作用。

[0210] 表达TgAPP-SwDI转基因和野生型PTP σ 的APP-SwDI(+) PTP σ (+/+)小鼠到9月龄时就已经出现了严重的神经炎症,如通过GFAP(胶质细胞原纤维酸性蛋白)(星形胶质细胞增生的标记)的水平所测量(图5)。在DG门中,例如,APP-SwDI(+) PTP σ (+/+)小鼠中的GFAP表达水平是年龄匹配的非转基因同窝仔畜[APP-SwDI(-) PTP σ (+/+)]的超过十倍。然而,PTP σ 缺乏有效地减轻了由淀粉样蛋白生成转基因诱导的星形胶质细胞增生。在APP-SwDI(+) PTP σ (-/-)脑部中,PTP σ 的损耗使DG门中的GFAP表达恢复到接近非转基因野生型同窝仔畜的水平(图5k)。

[0211] 在所有脑部区域中,受TgAPP-SwDI转基因表达影响最大的似乎是DG的门,其中发现A β 沉积和星形胶质细胞增生均最严重(图2G、H;图5)。我们因此疑问此区域中的病理是否对DG锥体神经元的苔藓纤维轴突产生影响,所述锥体轴突突起穿过门进入CA3区域,在该区域它们与CA3树突形成突触。在检查CA3苔藓纤维末端区中的突触前标记后,我们发现与其年龄匹配的非转基因同窝仔畜相比,APP-SwDI(+) PTP σ (+/+)小鼠中突触素和突触蛋白-1的水平降低(图6,突触蛋白-1的数据未示出)。这种突触损伤显然是由APP转基因的表达和可

能地A β 过量产生引起的,该突触损伤通过APP-SwDI (+) PTP σ (-/-) 小鼠中PTP σ 的遗传损耗来逆转(图6)。

[0212] 有趣的是,我们注意到APP-SwDI (+) PTP σ (-/-) 小鼠有时在CA3末端区中表达突触前标记的水平比在其年龄匹配的非转基因野生型同窝仔畜中更高(图6g)。此观察结果尽管在我们的定量分析中没有统计学意义,但可能表明与APP转基因无关的PTP σ 的额外突触效应,如先前研究中所观察到的。

[0213] 衰老AD小鼠脑部中的Tau病理取决于PTP σ

[0214] 通常在AD脑部中发现由过度磷酸化和聚集的Tau构成的神经原纤维缠结。这些缠结倾向于以分级模式出现,首先出现在内嗅皮质中,然后扩散到其它脑部区域。然而,对缠结形成的确切机制知之甚少。Tau缠结和A β 沉积物可以在死后脑部的不同位置发现,这一事实引发了疑问:AD中的Tau病理是否与A β 累积无关。另外,尽管在许多APP转基因小鼠模型中有严重的大脑 β -淀粉样变性,但尚未报导Tau缠结,进一步对体内A β 与Tau病理之间的关系产生疑问。

[0215] 尽管如此,一些研究的确证实了在APP转基因小鼠品系的A β 斑块周围的营养不良性神经突中Tau的非缠结状组装体,表明A β 可能是Tau失调的病因,尽管人与小鼠之间Tau病理的确切性质可能不同。在我们使用针对Tau的富含脯氨酸的结构域的抗体的组织学分析中,我们观察到了在衰老过程期间(对于APP-SwDI (+) PTP σ (+/+) 小鼠是大约9个月且对于APP-SwInd (+) PTP σ (+/+) 小鼠是大约15个月) TgAPP-SwDI和TgAPP-SwInd小鼠脑部中的Tau聚集(图7)。在年龄匹配的非转基因同窝仔畜中未观察到这种聚集(图7h),表明它是淀粉样蛋白生成APP转基因表达下游的病理事件,可能是A β 细胞毒性的结果。降低A β 水平的PTP σ 的遗传损耗在TgAPP-SwDI和TgAPP-SwInd小鼠中都抑制了Tau聚集(图7)。

[0216] 在TgAPP-SwDI和TgAPP-SwInd小鼠中,Tau聚集体主要在梨状皮质和内嗅皮质的分子层中发现,并且偶尔在海马区中发现(图7),表明AD脑部中的早期缠结位置。在更近距离检查后,发现Tau聚集体通常呈点状,很可能是在来自退化的细胞体和神经突的碎片中,散布在无核染色的区域中。很少地,有一些在原纤维结构中,可能是在分解之前的退化细胞中。为了证实这些发现,我们使用了额外的识别Tau C末端的抗体并且检测到相同的形态和分布模式(图7A)。

[0217] 与死后AD脑部中的发现一致,TgAPP-SwDI脑部中Tau聚集体的分布模式与A β 沉积的分布模式无关,这在海马体中是明显的,但在9月龄时仅零星分散在梨状皮质或内嗅皮质中(图2G、H)。鉴于这些小鼠中Tau病理的原因可能与过量产生的A β 有关,A β 和Tau沉积的主要区域的分离可能表明细胞毒性源自可溶性A β 而非沉积的淀粉样蛋白。还明显的是,不同脑部区域中的神经元容易出现Tau病理的程度不同。

[0218] 我们接着检验了APP转基因的表达或PTP σ 的遗传损耗是否通过改变其表达水平和/或磷酸化状态来调控Tau聚集。对脑匀浆的免疫印迹分析显示,Tau蛋白表达不受APP转基因或PTP σ 的影响,表明该聚集可能是由Tau的局部错折叠而不是该蛋白的过表达引起的。这些利用脑匀浆的实验还揭示,显然造成Tau聚集的TgAPP-SwDI或TgAPP-SwInd转基因不会增强Tau残基(包括丝氨酸191、苏氨酸194和苏氨酸220(数据未示出))的磷酸化,它们在人Tau中的同源物(丝氨酸202、苏氨酸205和苏氨酸231)通常在神经原纤维缠结中被过度磷酸化。这些发现与最近的定量研究一致,该定量研究显示在野生型和TgAPP-SwInd小鼠中Tau

的类似翻译后修饰。此外,与先前报导的不同,我们无法在Tau聚集体中检测到这些磷酸化的残基,这表明表位缺失(残基未被磷酸化或裂解)或包埋在错折叠中。鉴于Tau翻译后修饰的复杂性,我们不能排除该聚集可能是由Tau的一些未鉴定的修饰介导的。还可能的是,其它因素(诸如与Tau结合的分子)可能使聚集沉淀。

[0219] 尽管潜在机制仍不清楚,但我们在这些小鼠中发现Tau病理在淀粉样蛋白生成APP转基因的表达与Tau组装失调之间建立了因果关系。我们的数据还表明PTP σ 损耗可能通过减少APP的淀粉样蛋白生成产物而抑制Tau聚集的可能性。

[0220] Tau的功能失常被广泛认为是神经退行性标志,因为它表明微管退化。PTP σ 的遗传损耗对Tau聚集的限制作用因此为此受体作为神经元完整性的关键调控因子的作用提供了额外证据。

[0221] PTP σ 缺乏援救AD小鼠模型中的行为缺陷

[0222] 我们接着评估了通过PTP σ 损耗缓解神经病理学是否伴随着对AD相关行为缺陷的援救。AD的最常见症状包括最早的短期记忆丧失和冷漠,之后是随着痴呆进展,许多认知功能受损而导致的空间定向障碍。使用Y迷宫和新颖物体测定作为替代模型,我们评价了TgAPP-SwDI和TgAPP-SwInd小鼠中的这些认知和精神病学特征。

[0223] 允许小鼠自由探索三个相同臂的Y迷宫测定测量它们的短期空间记忆。它是基于小鼠交替臂探索而不重复的天然倾向性。表现通过总臂进入中自发交替的百分比来评分,并且得分越高表明空间导航越好。与群落内的非转基因野生型小鼠相比,APP-SwDI (+) PTP σ (+/+) 小鼠显示出其表现的明显缺陷。然而,APP-SwDI (+) PTP σ (-/-) 小鼠中PTP σ 的遗传损耗明确地将认知表现恢复到非转基因野生型小鼠的水平(图8A、图9)。

[0224] 冷漠是患有AD的个体中最常见的神经精神症状,其特征在于动力丧失和对新颖性的注意力降低,并且已经被越来越多地用于临床前和早期前驱性AD的早期诊断中。许多处于早期阶段AD的患者丧失对其环境的新颖方面的注意力,尽管他们能够鉴定新颖刺激,这表明负责进一步处理新颖信息的电路存在潜在缺陷。作为冷漠的一个关键特征,这类对新颖性注意力的缺陷可以通过患者中的“好奇图形任务(curiosity figures task)”或“古怪任务(oddball task)”了解。这些基于视觉的新颖性编码任务非常类似于对啮齿类动物的新颖物体测定,该测定测量当动物同时暴露于预先熟悉的物体(F0)时它们对新颖物体(N0)的兴趣。我们因此使用此测定来测试APP转基因小鼠对新颖性的注意力。当预先训练小鼠以识别F0时,然后通过鉴别指数来测量它们对新颖性的注意力,该鉴别指数表示为N0探索与总物体探索的比值(N0+F0),或可选地N0探索与F0探索的比值。尽管两个比值都常用,但是这些评估的组合提供对动物行为更全面的评价。在此测试中,如两次测量所表明,与非转基因野生型小鼠相比,APP-SwDI (+) PTP σ (+/+) 小鼠中APP-SwDI转基因的表达导致N0探索显著减少(图8B、C;图10)。通过它们的N0/F0比值判断,很明显转基因和非转基因群组二者都能够识别和区分两个物体(图10A、B)。因此,APP-SwDI (+) PTP σ (+/+) 小鼠的N0探索减少可能反映出对N0缺乏兴趣或无法将注意力转移到N0。再次,此行为缺陷很大程度上被APP-SwDI (+) PTP σ (-/-) 小鼠中的PTP σ 缺乏逆转(图8B、C;图10),这与先前观察到在PTP σ 不存在下N0偏好增加一致。

[0225] 为了进一步验证PTP σ 对这些行为方面的影响,我们另外在两种测定中测试了TgAPP-SwInd小鼠并且观察到类似的结果,证实了在PTP σ 遗传损耗后短期空间记忆和对新

颖性的注意力的改进(图11)。

[0226] 图12展示了免疫印迹,该免疫印迹显示出与单独施用的 γ 分泌酶抑制剂或与BACE1抑制剂和 γ 分泌酶抑制剂的组合相比,ISP与 γ 分泌酶抑制剂的组合对APP加工的影响。如图中所指出,与单独施用的 γ 分泌酶抑制剂或与BACE1抑制剂和 γ 分泌酶抑制剂的组合相比,ISP与 γ 分泌酶抑制剂的组合显著抑制了APP加工。

[0227] 虽然已经具体显示并且参考其优选实施方式描述了本发明,但是本领域技术人员将理解可以在形式和细节中作多种改变而不脱离由附加的权利要求涵盖的本发明的范畴。前述说明书中提及的所有专利、出版物和参考文献均通过引用整体并入本文。

序列表

<110> 凯斯西储大学

俄亥俄州立大学

Lang, Bradley T.

<120> 用于抑制LAR家族磷酸酶活性的组合物和方法

<130> CWR-026709W0 ORD

<150> 62/515,272

<151> 2017-06-05

<160> 22

<170> PatentIn 3.5版本

<210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 1

Pro Ile Pro Ile Thr Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala

1 5 10 15

Asn Asp Gly Lys Leu Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly

20 25 30

Gln

<210> 2

<211> 33

<212> PRT

<213> 大鼠冠状病毒

<400> 2

Pro Ile Pro Ile Thr Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala

1 5 10 15

Asn Asp Gly Lys Leu Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly

20 25 30

Gln

<210> 3

<211> 33

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Pro Ile Pro Ile Thr Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala

1 5 10 15

Asn Asp Gly Lys Leu Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly

	20	25	30
Gln			
<210> 4			
<211> 33			
<212> PRT			
<213> 小家鼠			
<400> 4			
Pro Ile Pro Ile Thr Asp Met Ala Glu His Met Glu Arg Leu Lys Ala			
1 5 10 15			
Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly			
20 25 30			
Gln			
<210> 5			
<211> 33			
<212> PRT			
<213> 大鼠冠状病毒			
<400> 5			
Pro Ile Pro Ile Thr Asp Met Ala Glu His Met Glu Arg Leu Lys Ala			
1 5 10 15			
Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly			
20 25 30			
Gln			
<210> 6			
<211> 33			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 6			
Pro Ile Pro Ile Ala Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala			
1 5 10 15			
Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly			
20 25 30			
Gln			
<210> 7			
<211> 33			
<212> PRT			
<213> 小家鼠			
<400> 7			
Pro Ile Pro Ile Leu Glu Leu Ala Asp His Ile Glu Arg Leu Lys Ala			
1 5 10 15			

Asn Asp Asn Leu Lys Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly
 20 25 30

Gln

<210> 8

<211> 33

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

Pro Ile Pro Ile Leu Glu Leu Ala Asp His Ile Glu Arg Leu Lys Ala
 1 5 10 15

Asn Asp Asn Leu Lys Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile Asp Pro Gly
 20 25 30

Gln

<210> 9

<211> 24

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
 20

<210> 10

<211> 24

<212> PRT

<213> 黑鼠

<400> 10

Asp Leu Ala Asp Asn Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Gly Leu Lys
 1 5 10 15

Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile
 20

<210> 11

<211> 24

<212> PRT

<213> 黑鼠

<400> 11

Glu Leu Ala Asp His Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys
 1 5 10 15

Phe Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

20

<210> 12

<211> 24

<212> PRT

<213> 黑鼠

<400> 12

Lys Leu Glu Glu Glu Ile Asn Arg Arg Met Ala Asp Asp Asn Lys Ile

1

5

10

15

Phe Arg Glu Glu Phe Asn Ala Leu

20

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 13

Asp Met Ala Glu His Thr Glu Arg Leu Lys

1

5

10

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Ala Asn Asp Ser

1

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr Glu Ser Ile

1

5

10

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (3) .. (3)

<223> Xaa是Thr或Met

<400> 16

Glu His Xaa Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu

1 5 10

<210> 17

<211> 35

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu Ser Gln Glu Tyr

20 25 30

Glu Ser Ile

35

<210> 18

<211> 35

<212> PRT

<213> 智人

<400> 18

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Leu Ala Asp Asn

1 5 10 15

Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Gly Leu Lys Phe Ser Gln Glu Tyr

20 25 30

Glu Ser Ile

35

<210> 19

<211> 35

<212> PRT

<213> 智人

<400> 19

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Glu Leu Ala Asp His

1 5 10 15

Ile Glu Arg Leu Lys Ala Asn Asp Asn Leu Lys Phe Ser Gln Glu Tyr

20 25 30

Glu Ser Ile

35

<210> 20

<211> 35

<212> PRT

<213> 智人

<400> 20

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Lys Leu Glu Glu Glu

1 5 10 15

Ile Asn Arg Arg Met Ala Asp Asp Asn Lys Ile Phe Arg Glu Glu Phe

20 25 30

Asn Ala Leu

35

<210> 21

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<400> 21

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Asp Met Ala Glu His

1 5 10 15

Thr Glu Arg Leu Lys

20

<210> 22

<211> 25

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 尚未归类的特征

<222> (14) .. (14)

<223> Xaa是Thr或Met

<400> 22

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Cys Glu His Xaa Glu Arg

1 5 10 15

Leu Lys Ala Asn Asp Ser Leu Lys Leu

20 25

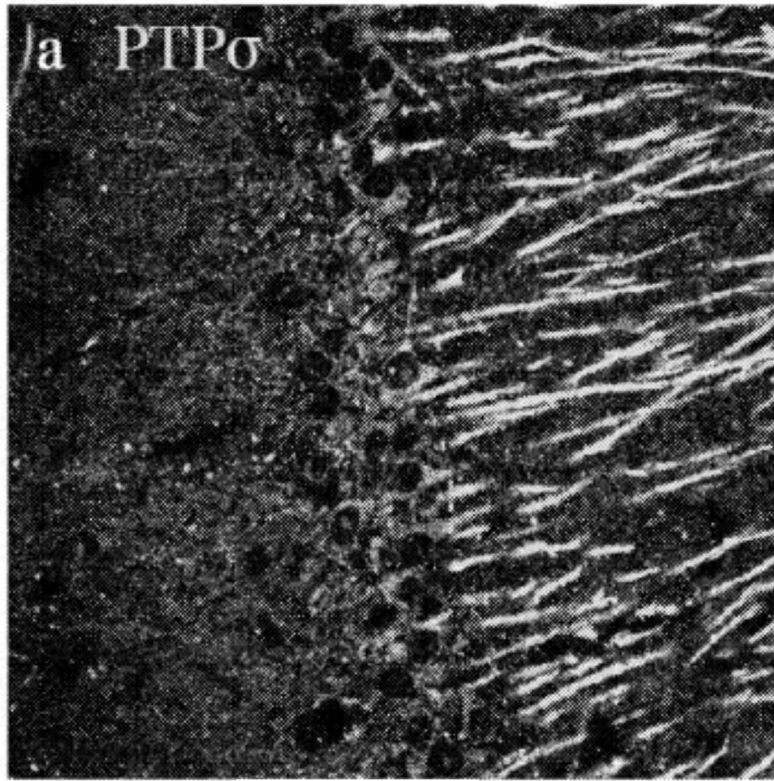


图1A

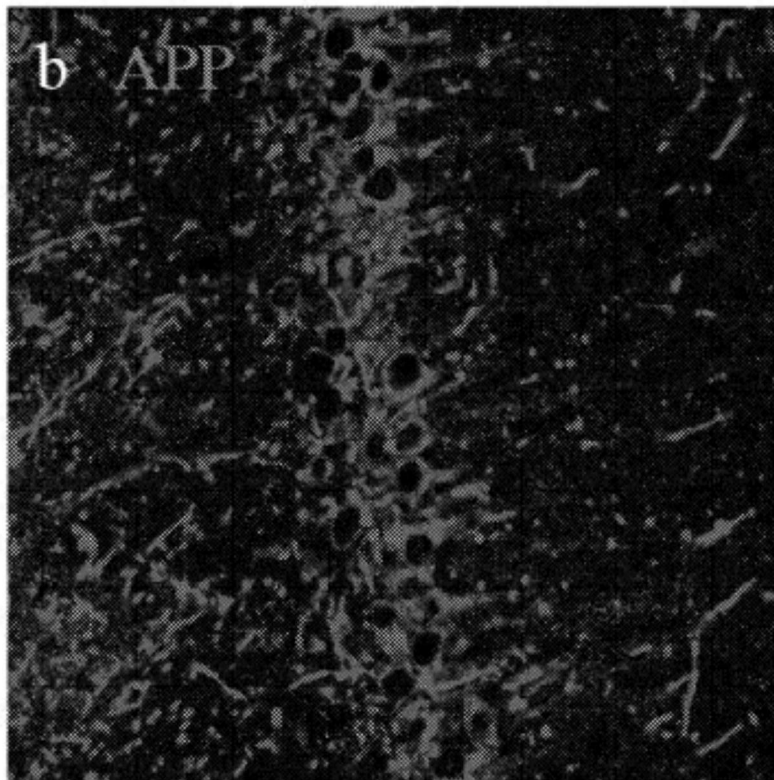


图1B

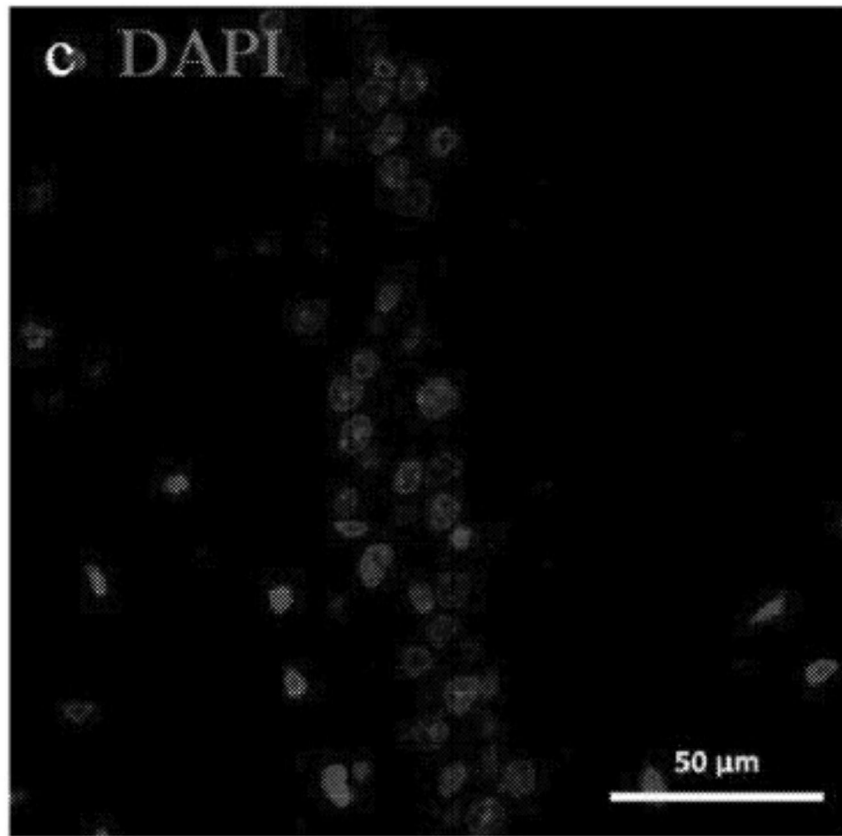


图1C

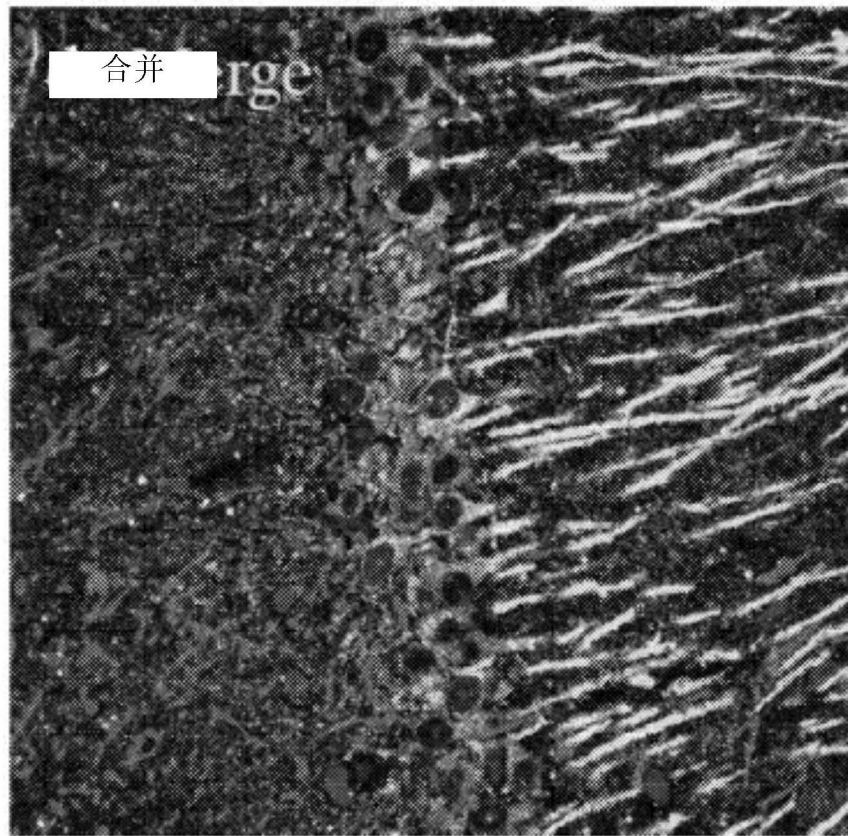


图1D

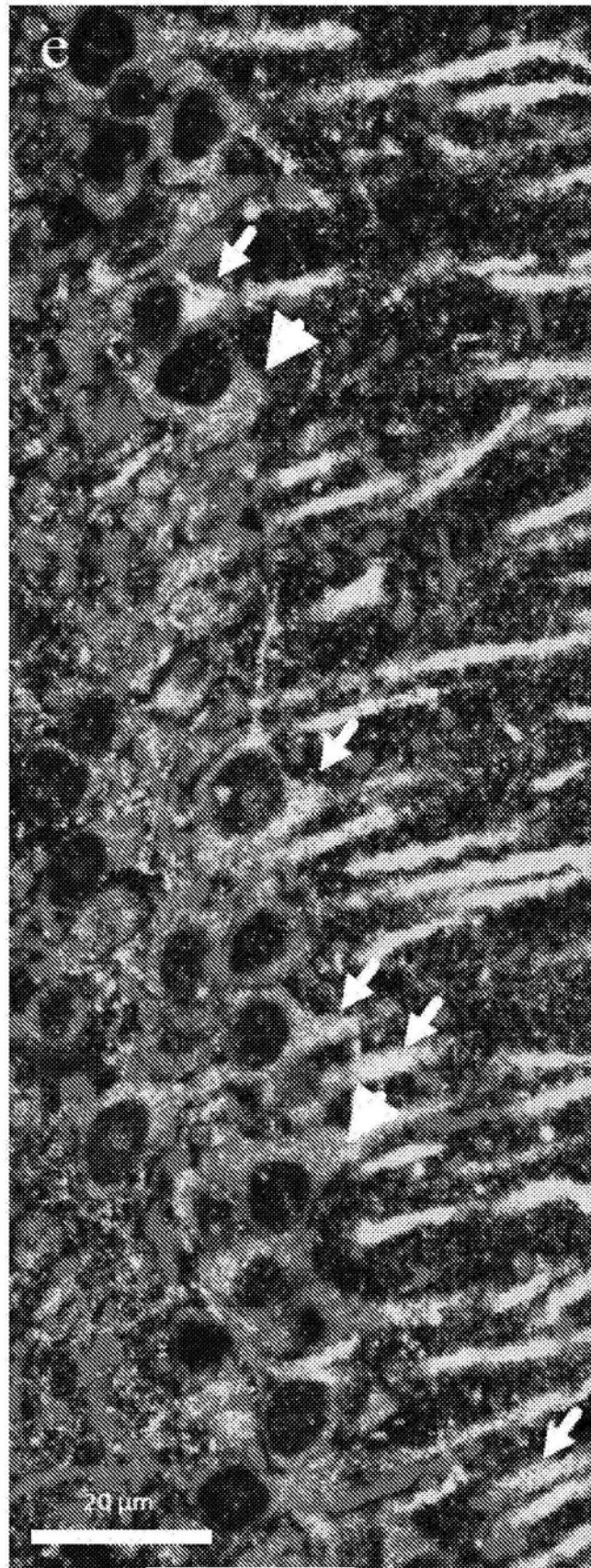


图1E

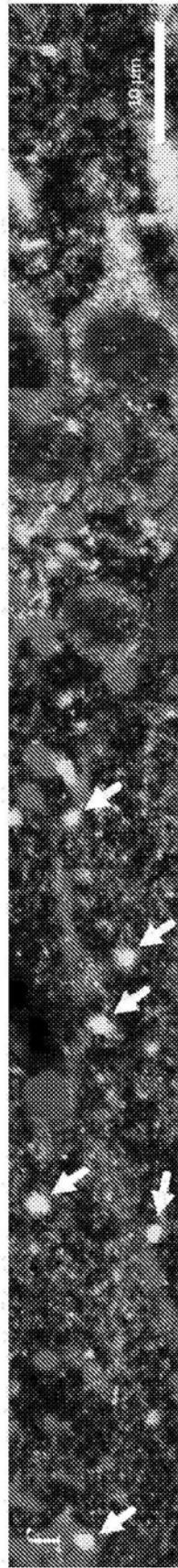


图1F

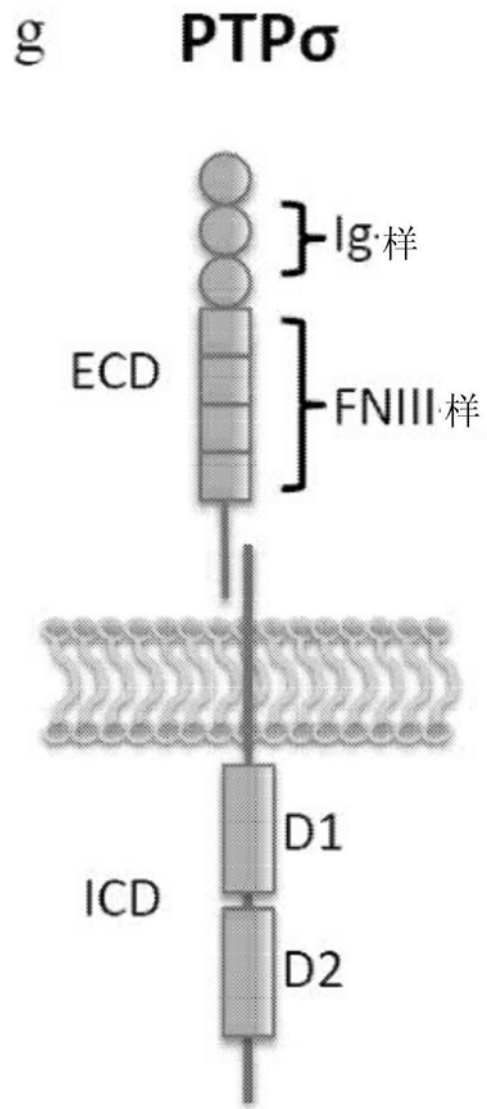


图1G

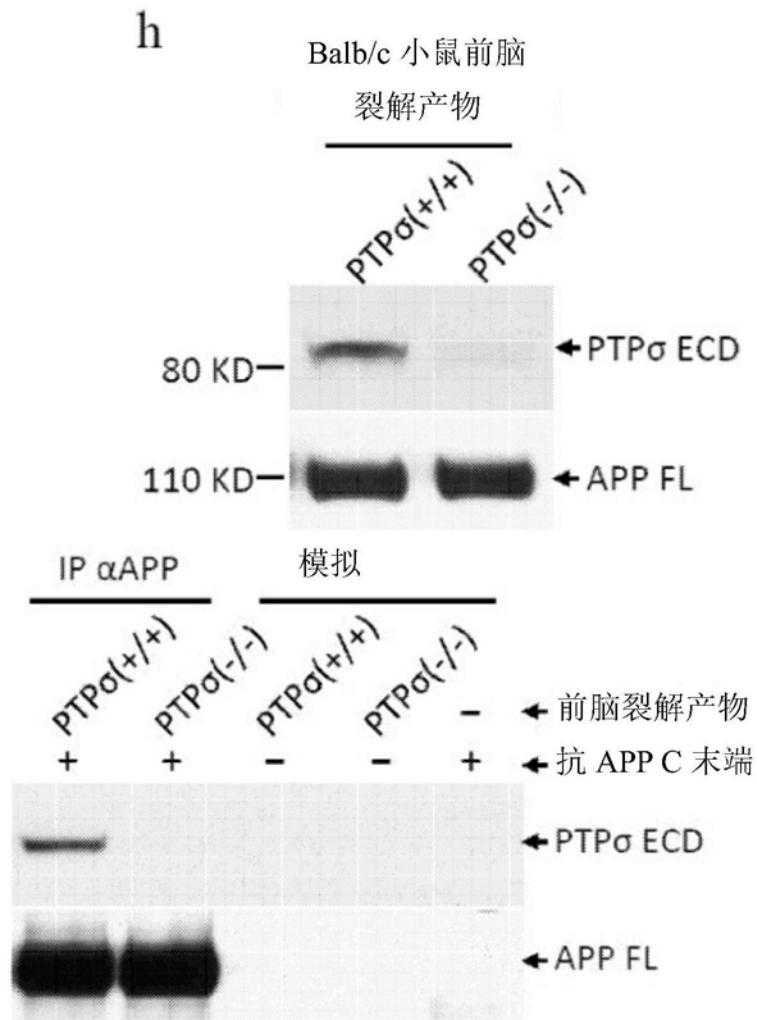


图1H

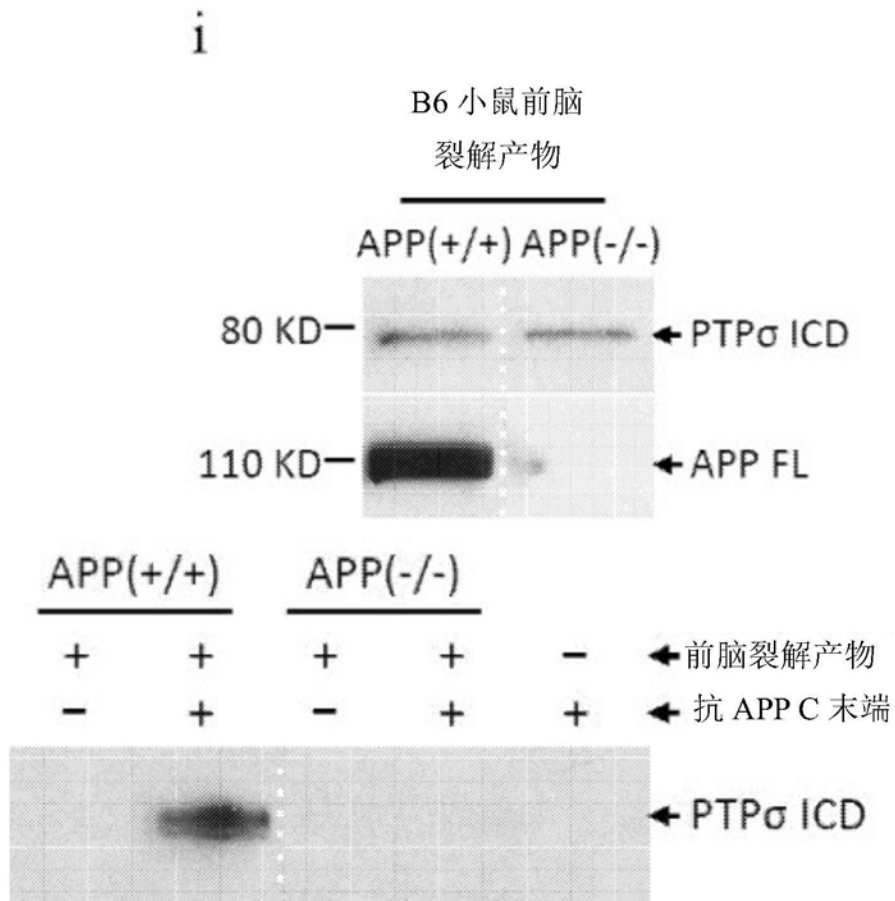


图1I

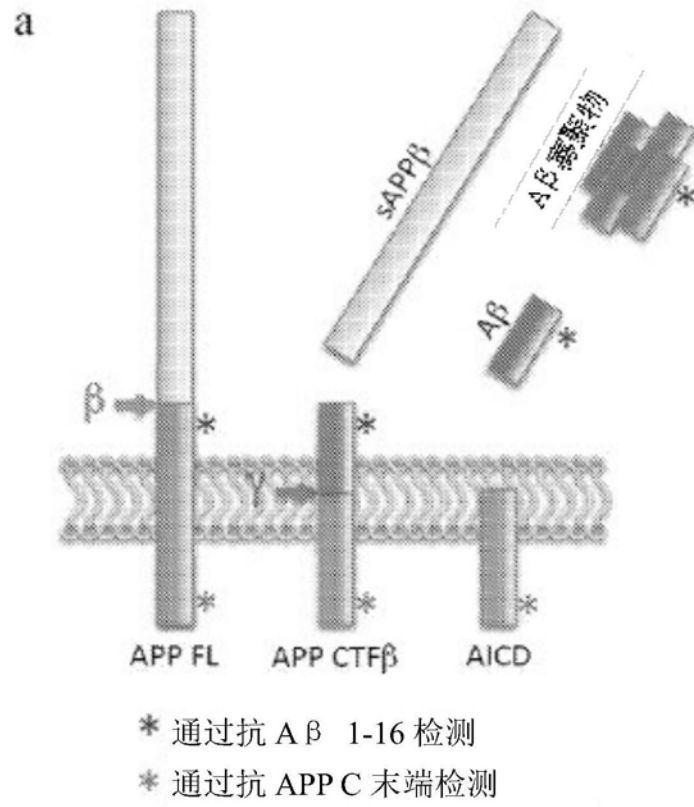


图2A

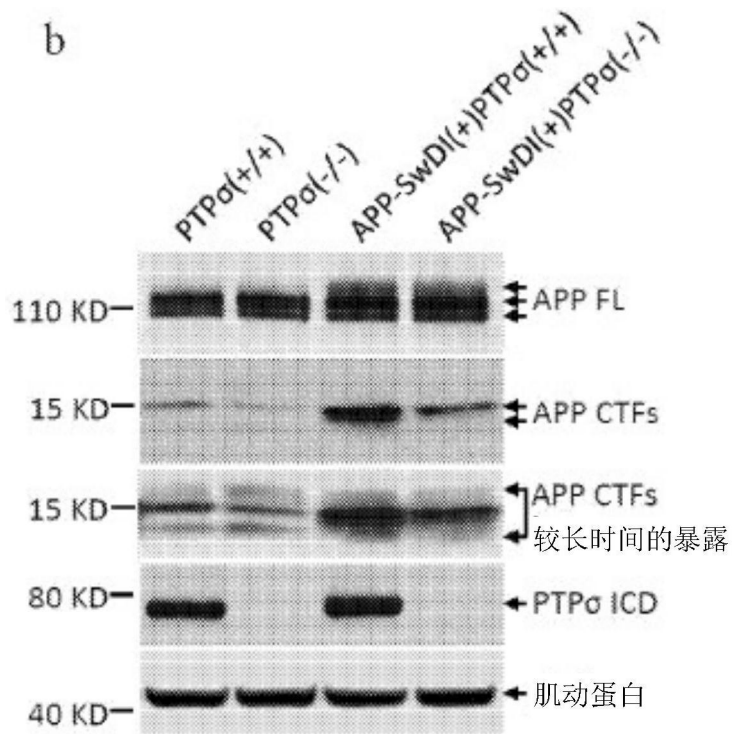


图2B

C IP: 抗小鼠 A β 1-16*, 印迹: 抗 APP C 末端*。

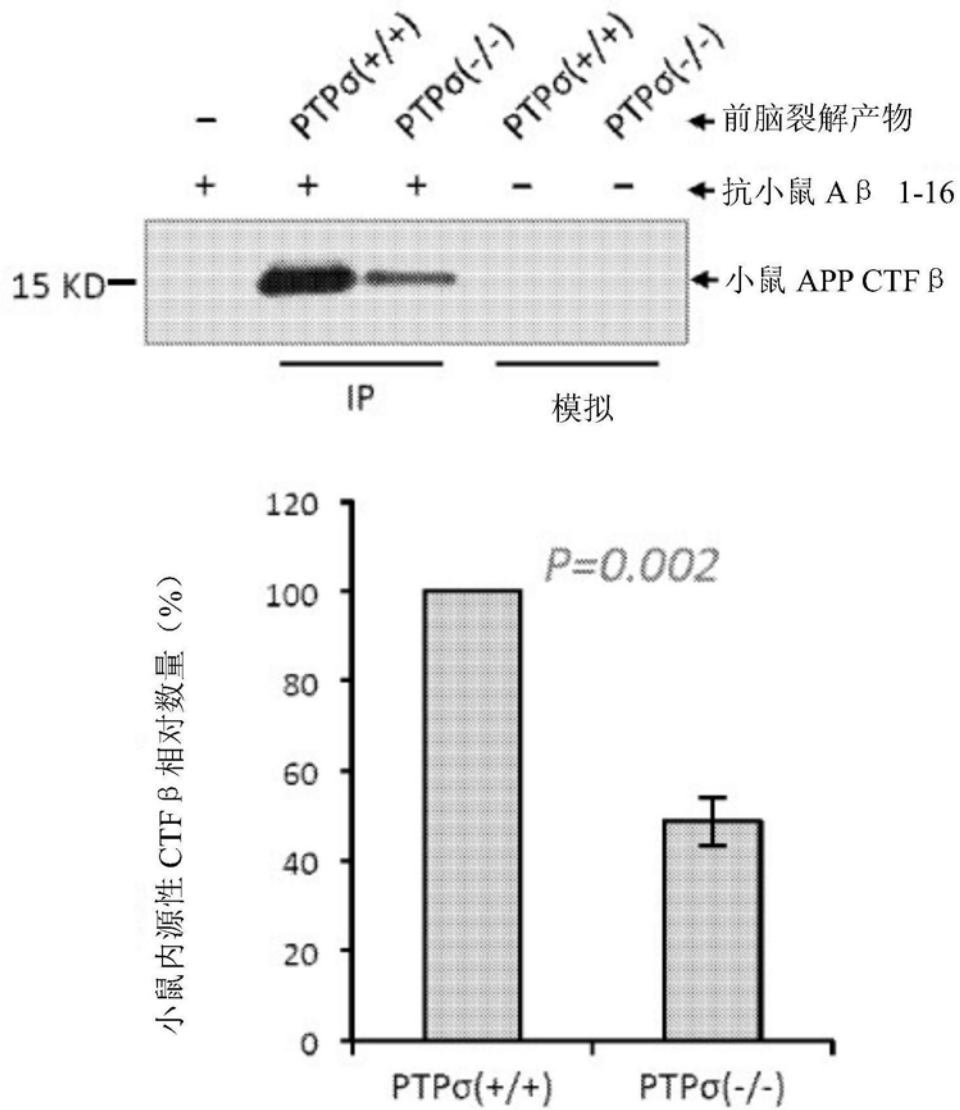


图2C

d IP: 抗小鼠 C 末端*, 印迹: 抗人 A β 1-16*

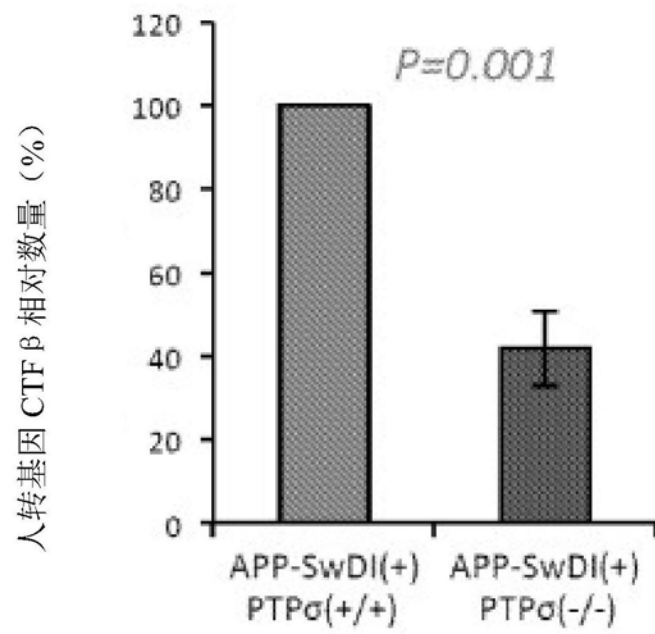
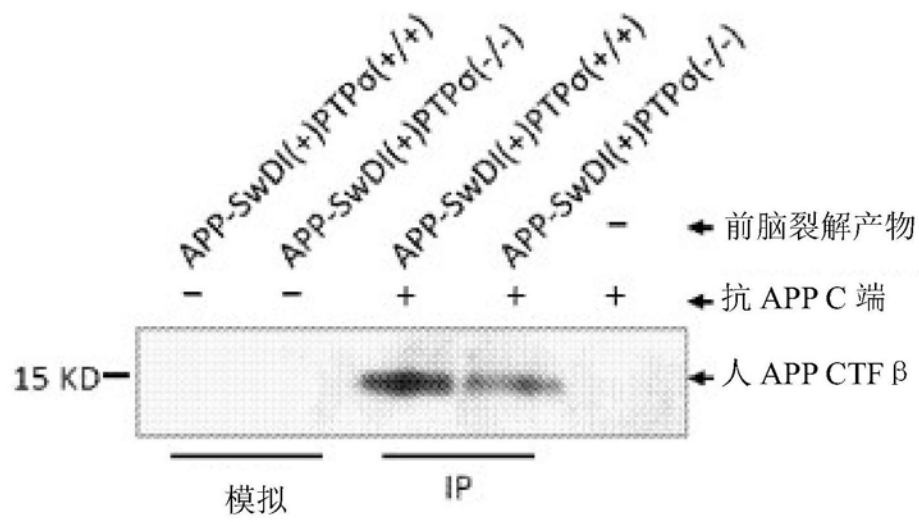


图2D

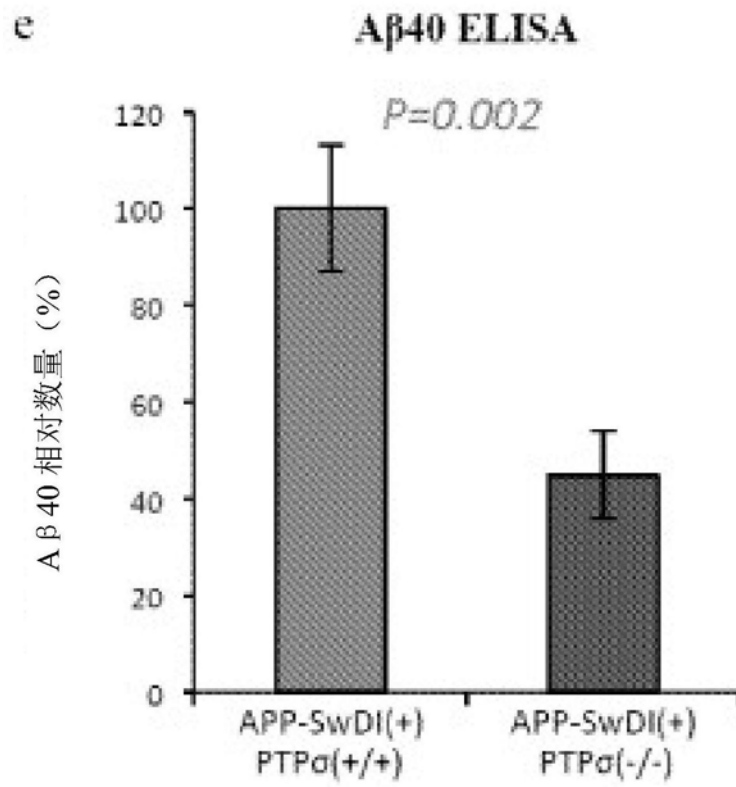


图2E

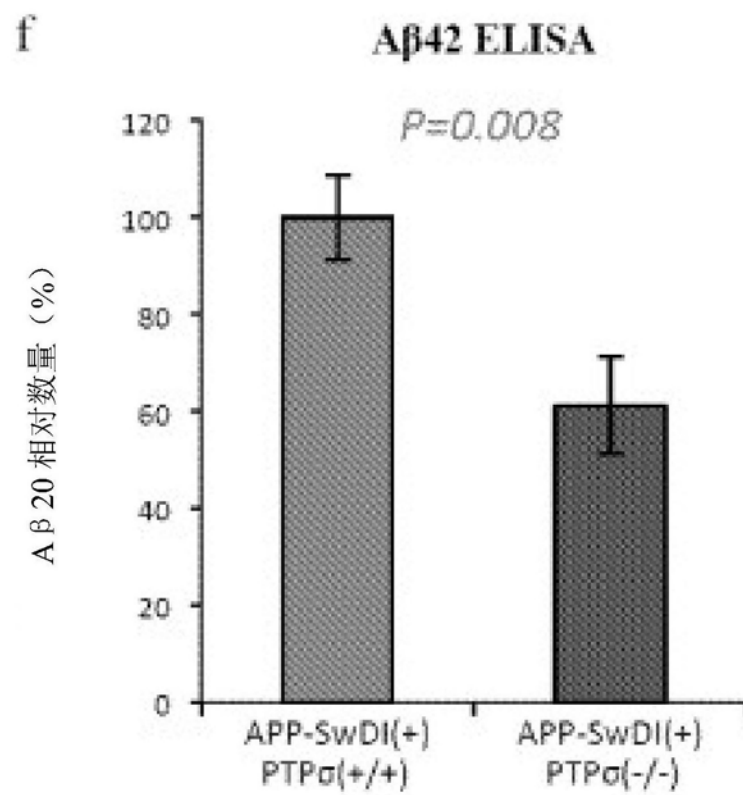


图2F

检测 A β 残基 1-16 的抗 A β 抗体 6E10

APP-SwDI(+/-)PTP σ (-/-)

APP-SwDI(+/-)PTP σ (+/+)

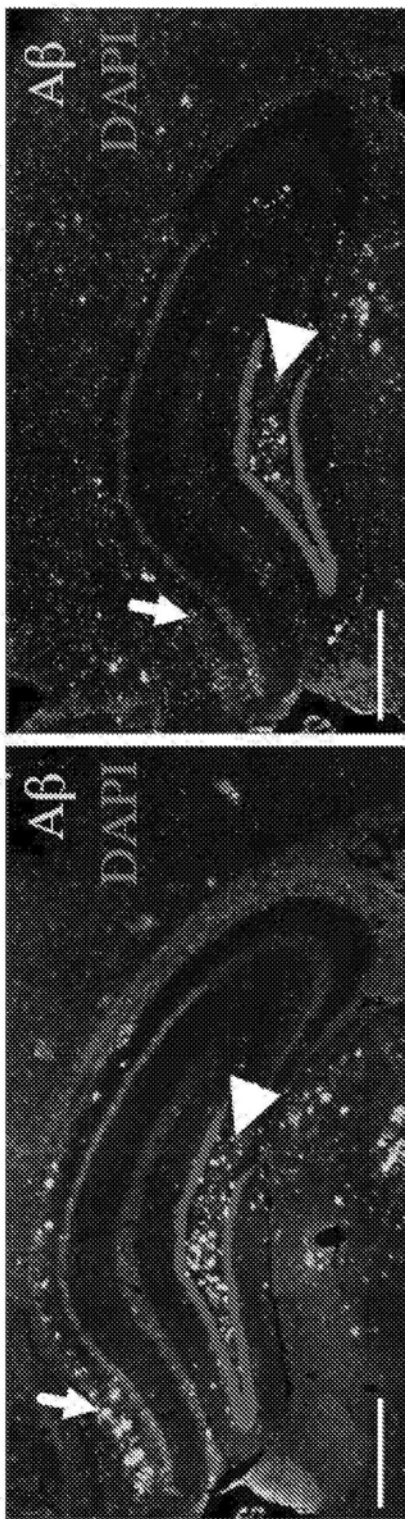


图2G

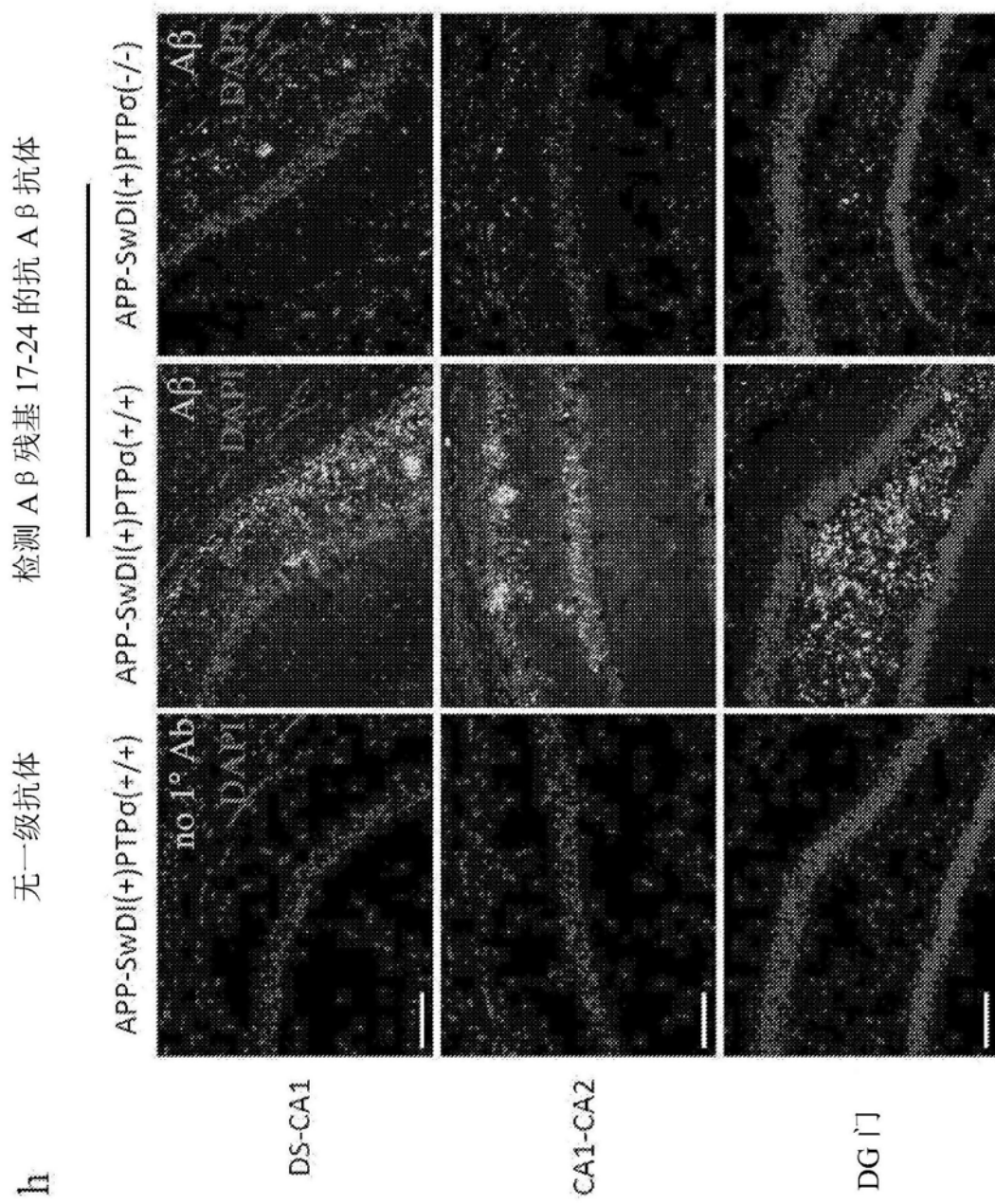


图2H

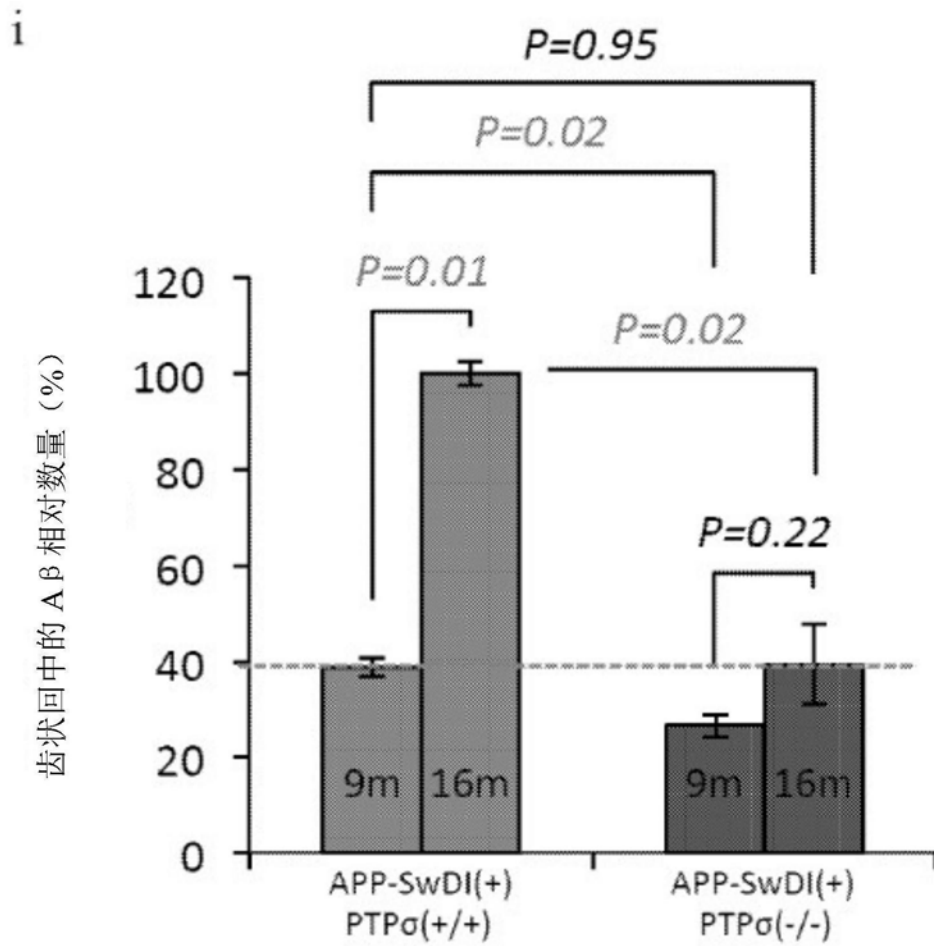


图2I

a

IP: 抗 BACE1, 印迹: 抗 APP C 末端

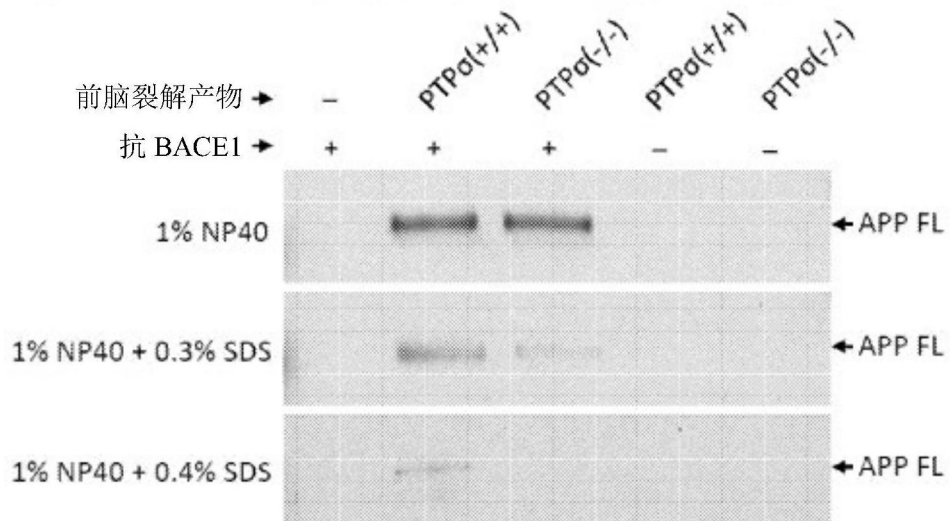


图3A

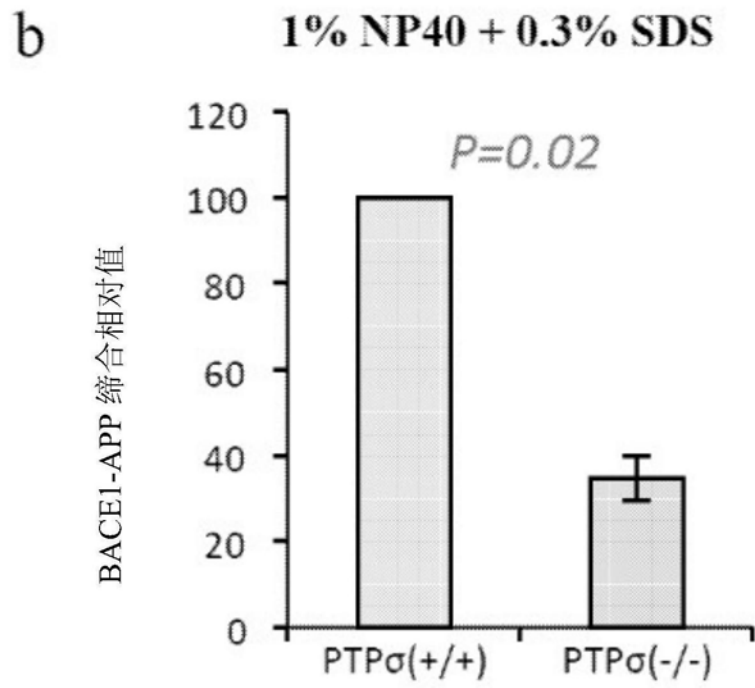


图3B

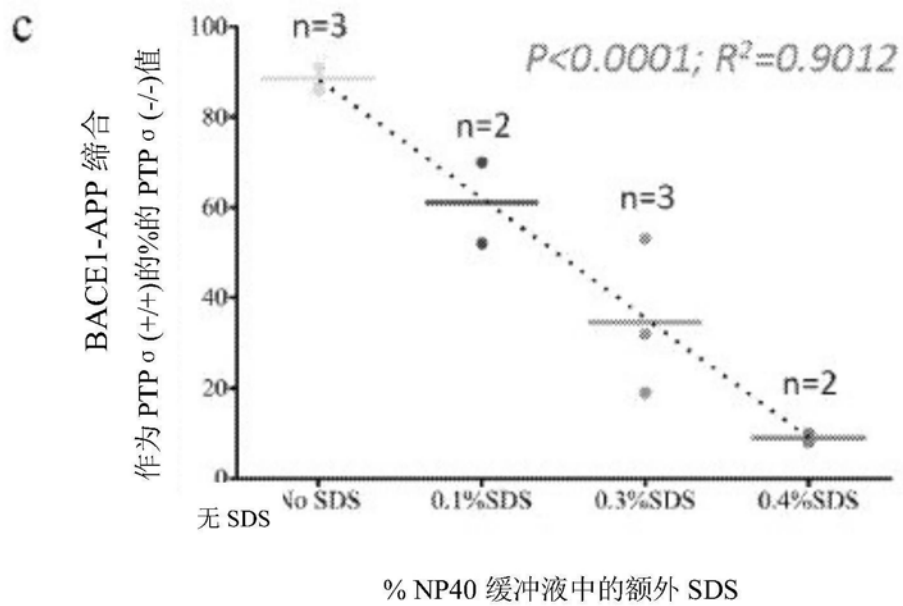


图3C

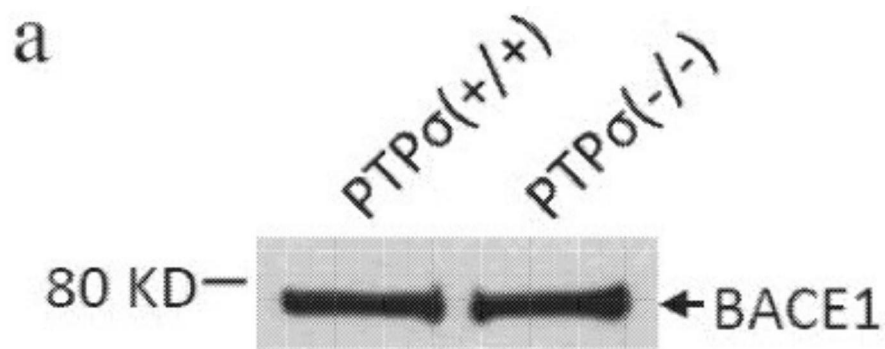


图4A

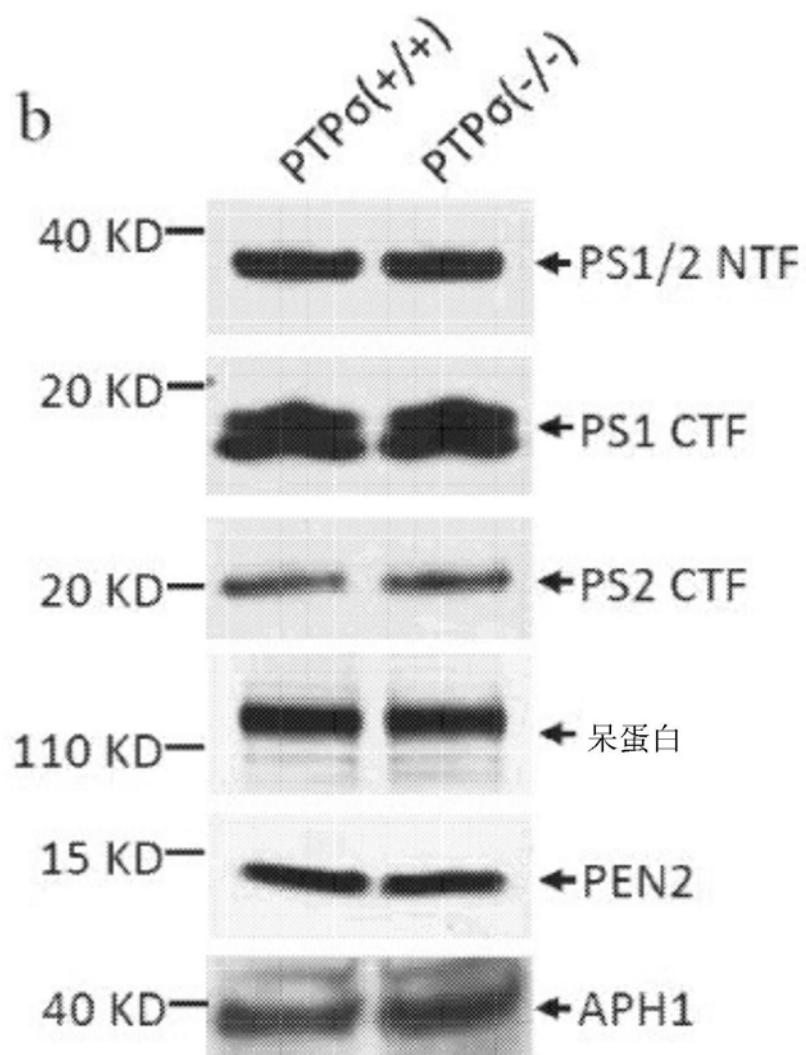


图4B

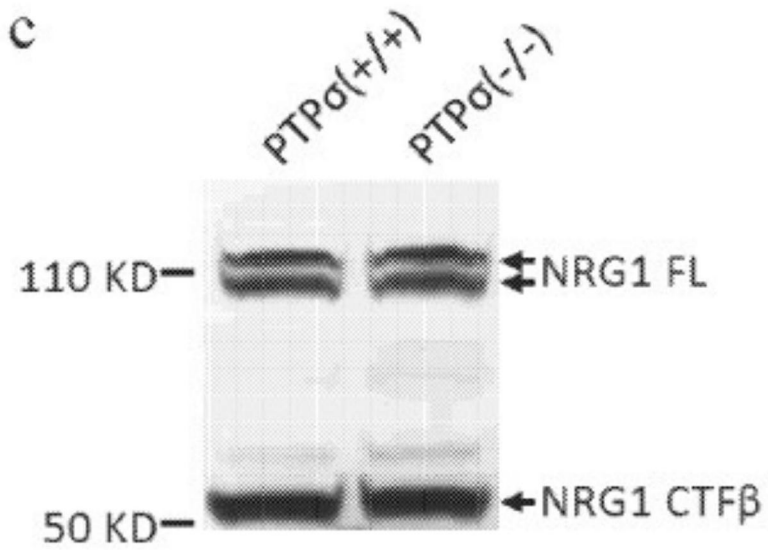


图4C

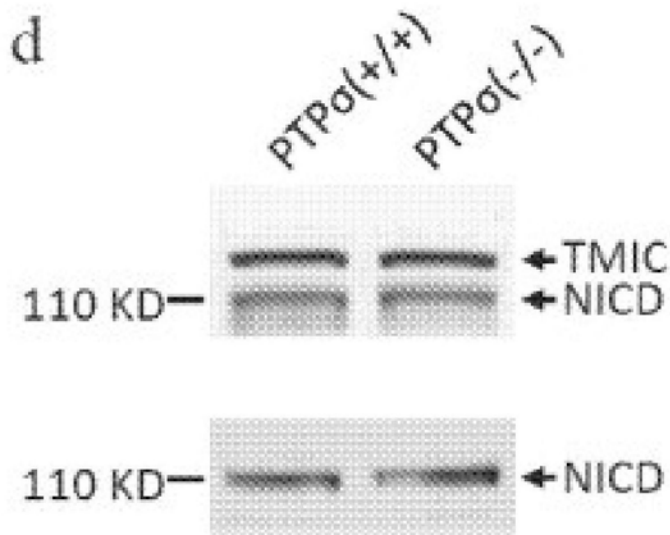


图4D

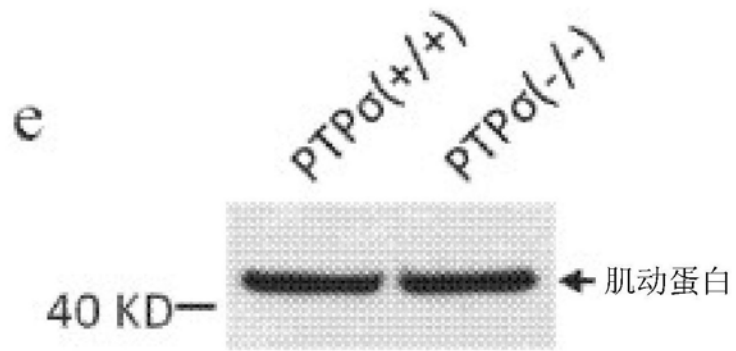


图4E

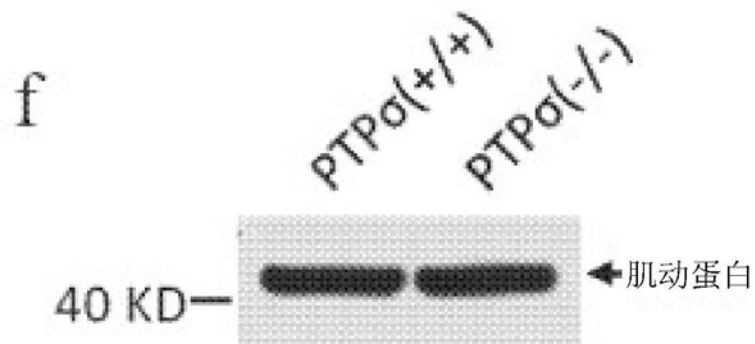


图4F

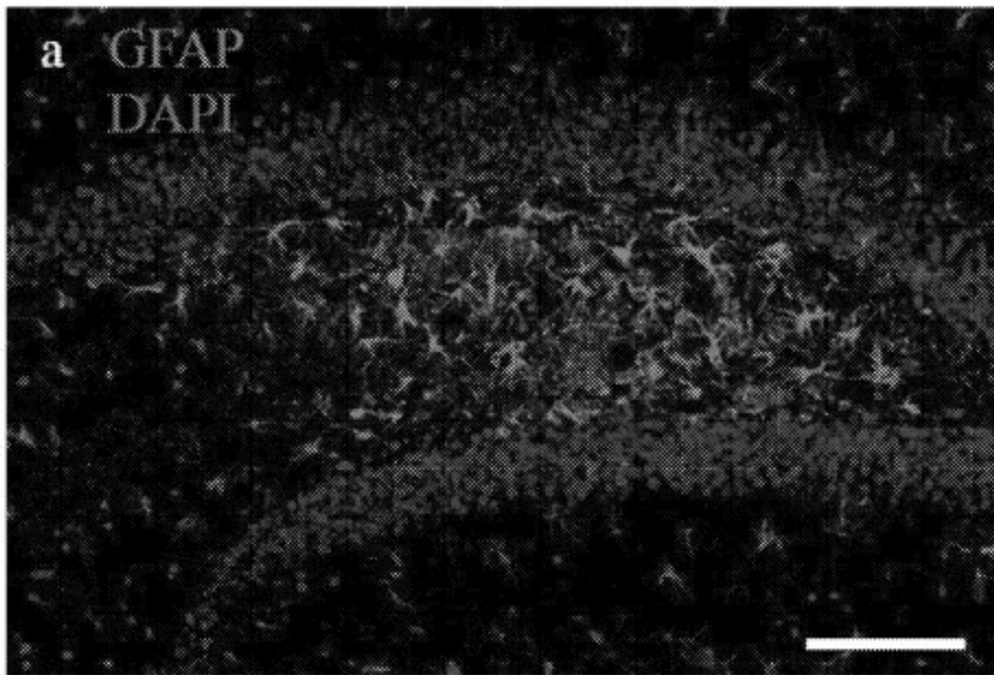
APP-SwDI(+) $PTP\sigma(+/+)$ 

图5A

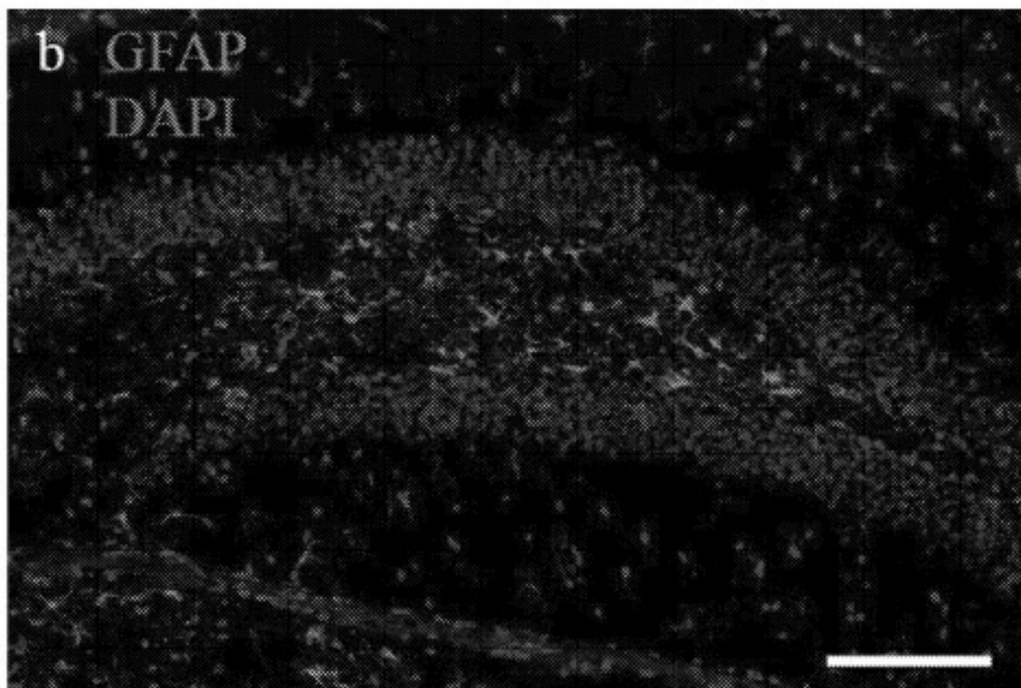
APP-SwDI(+) $PTP\sigma(-/-)$ 

图5B

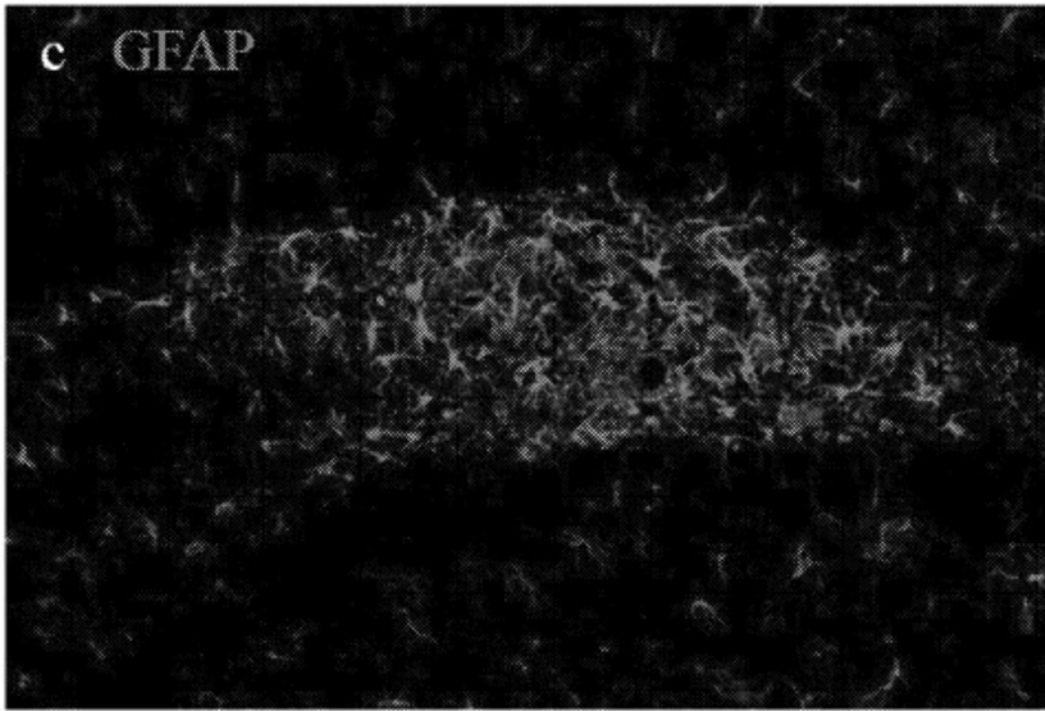


图5C

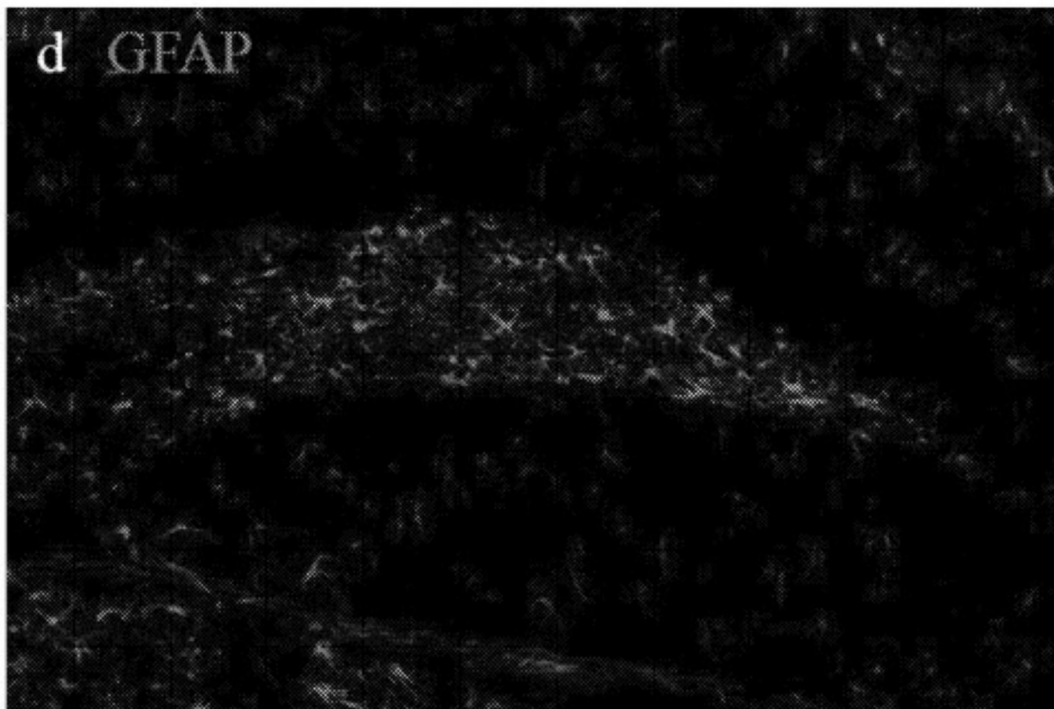


图5D

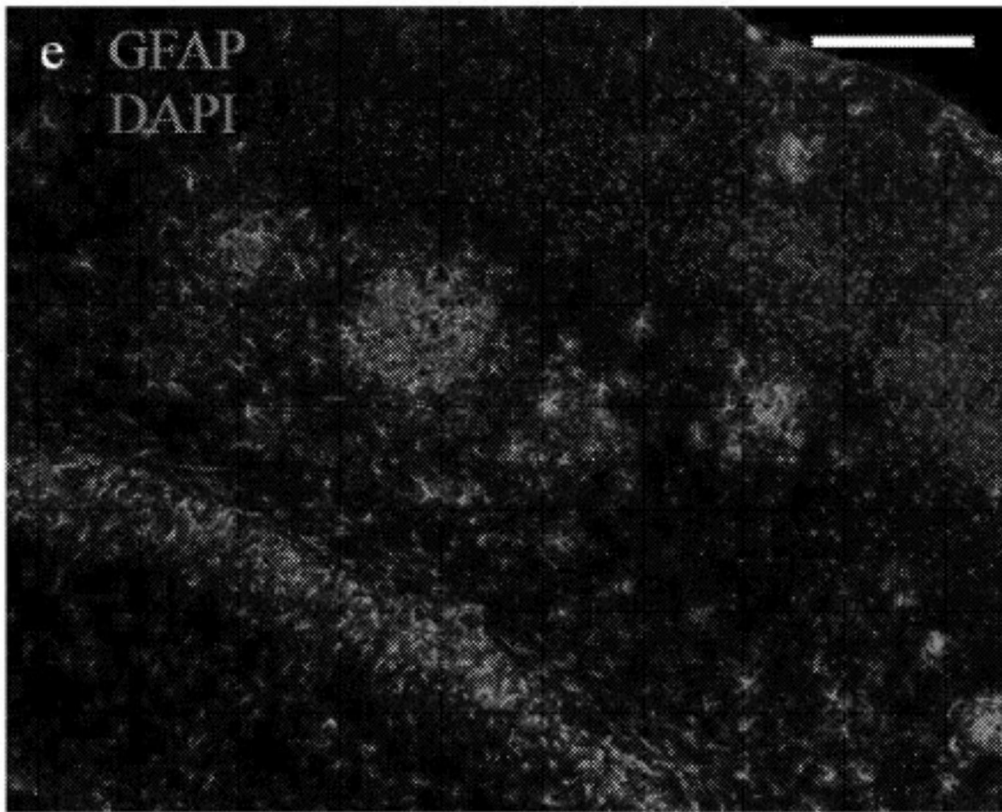


图5E

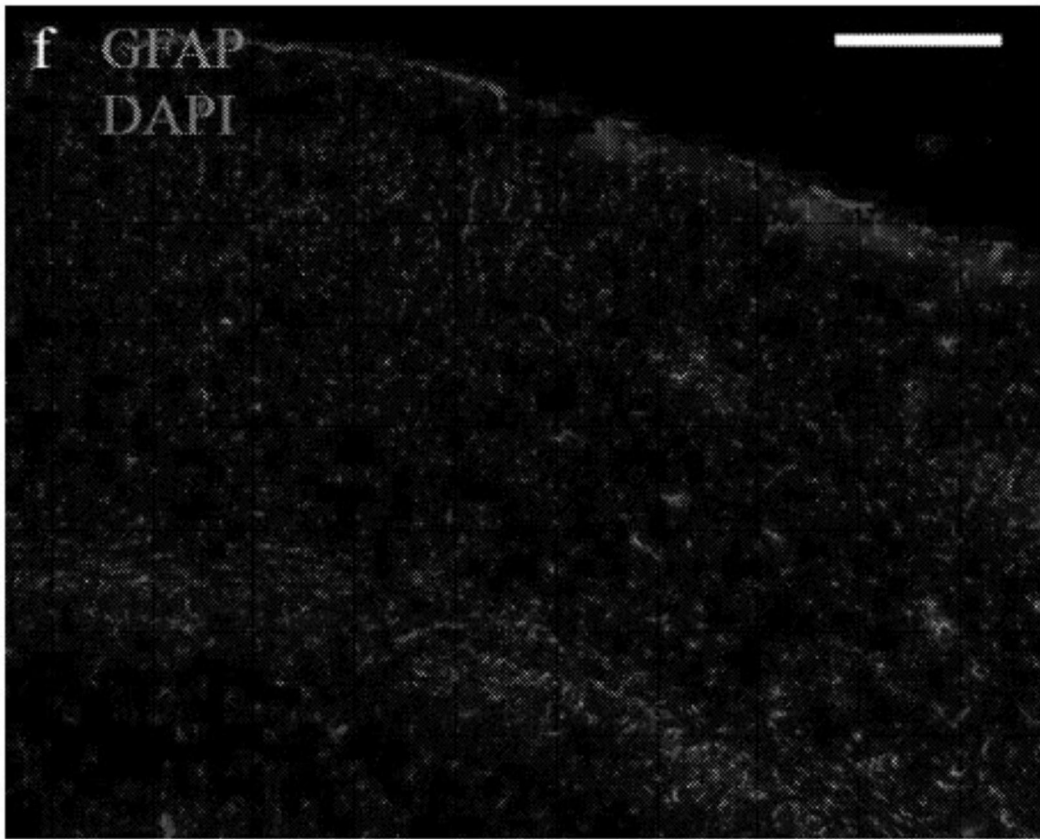


图5F

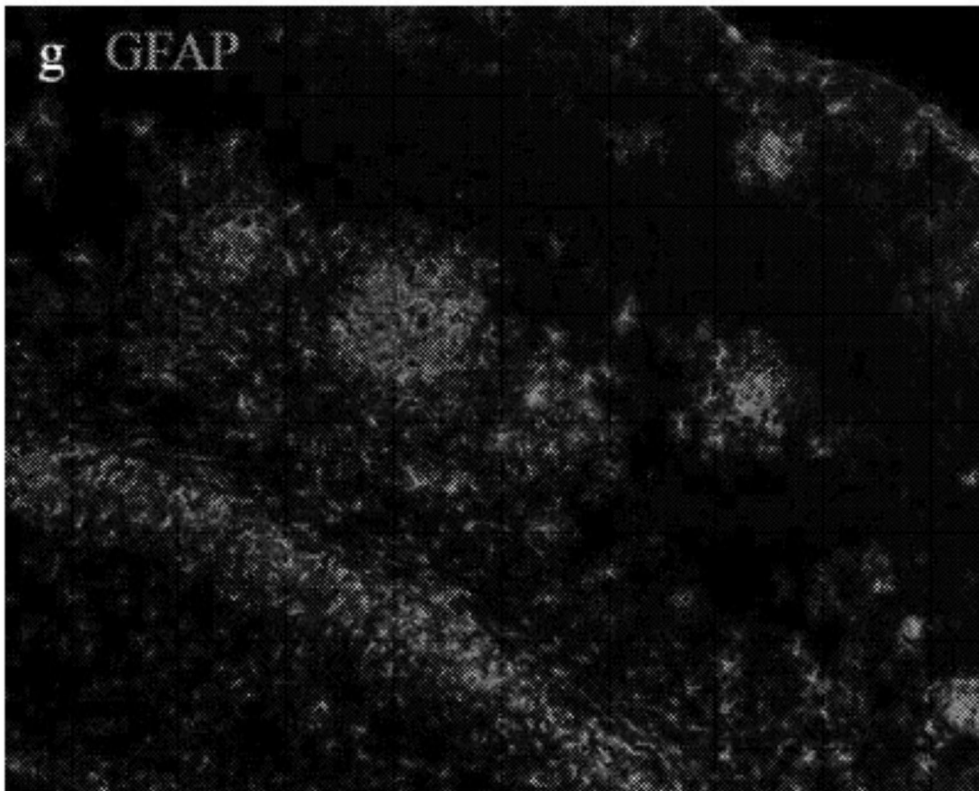


图5G

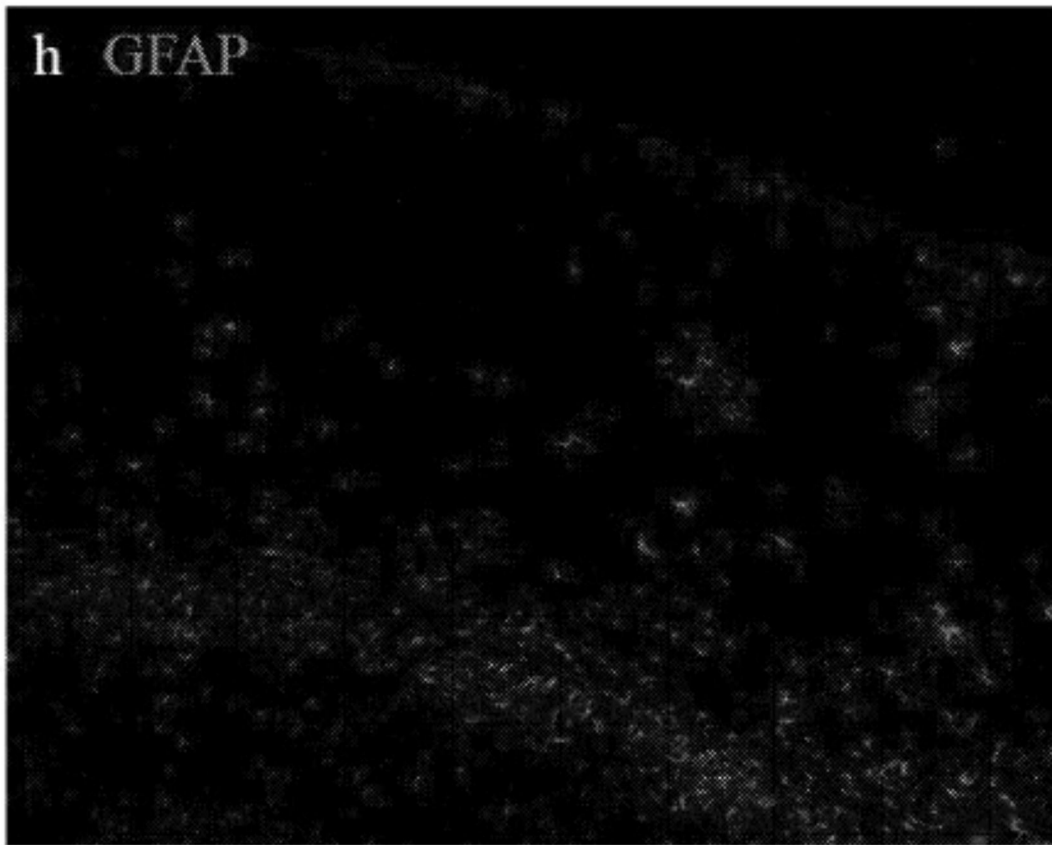


图5H

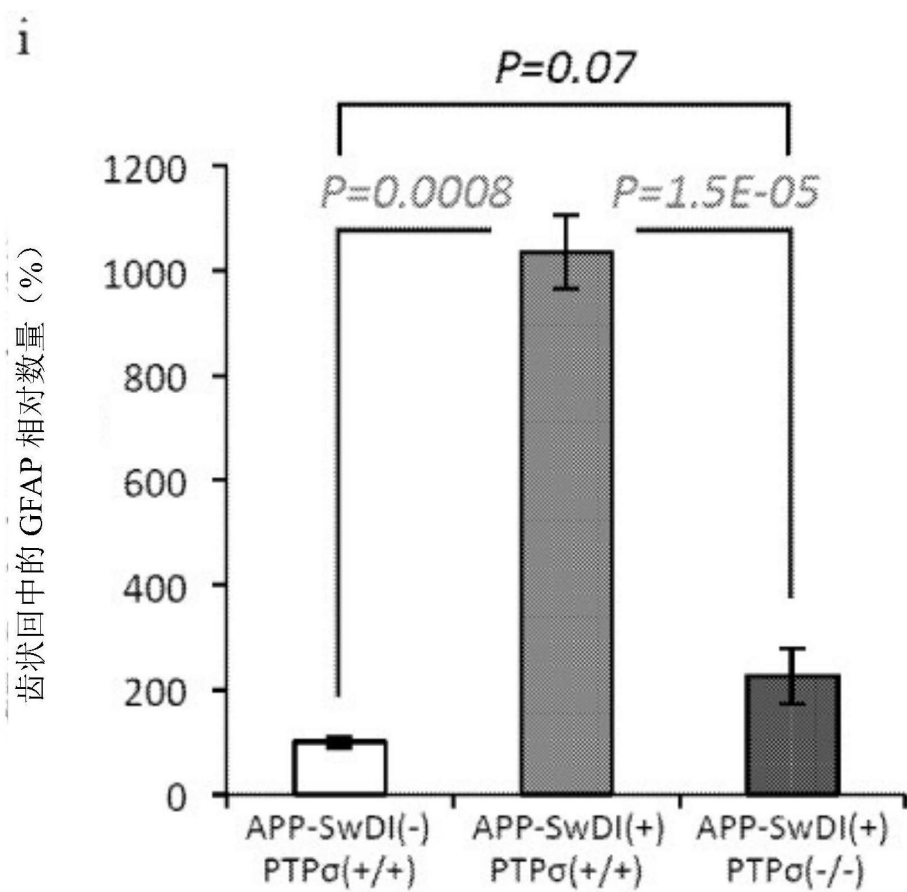


图5I

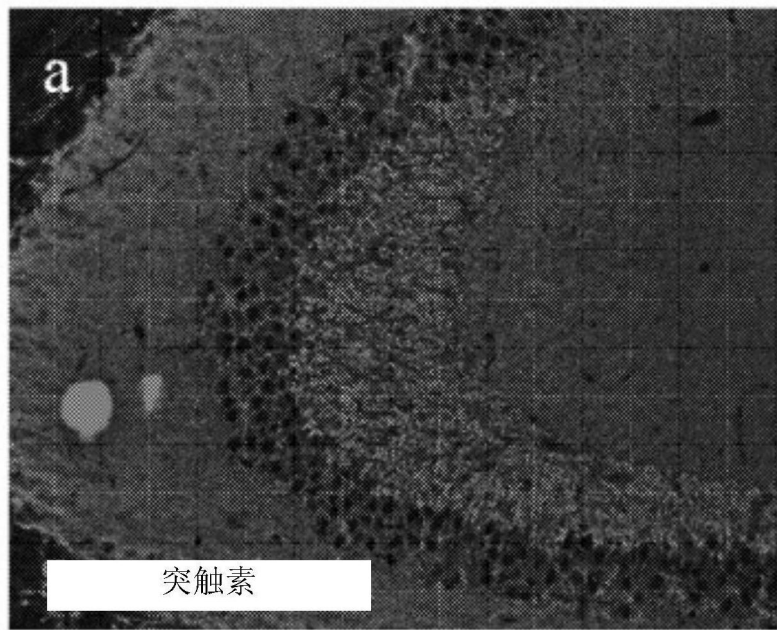
APP-SwDI(-)PTP σ (+/+)

图6A

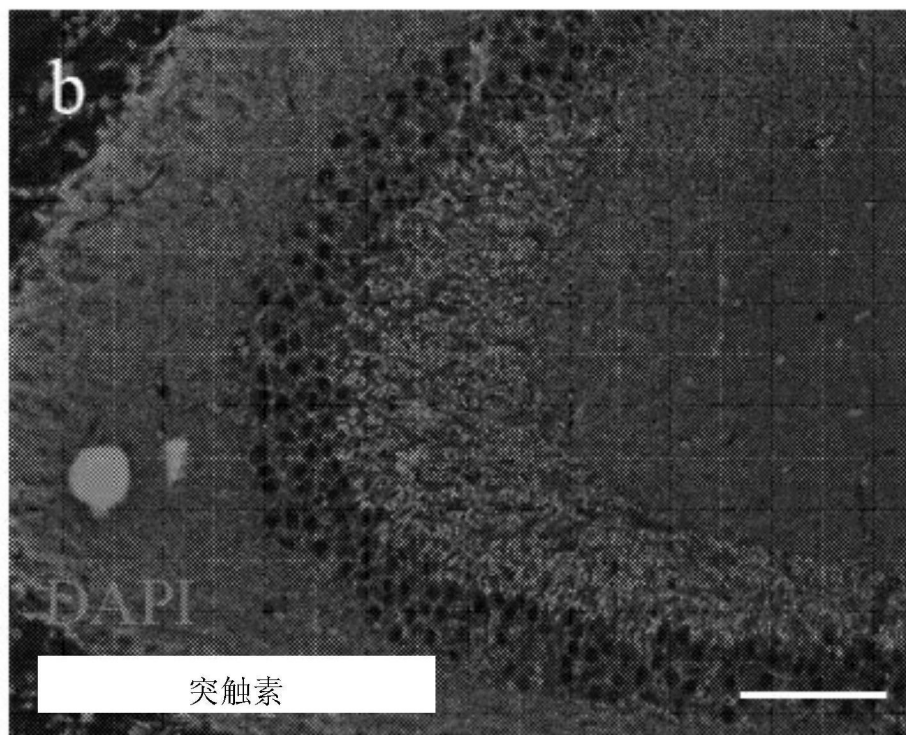


图6B

APP-SwDI(+)/PTPσ(+/+)

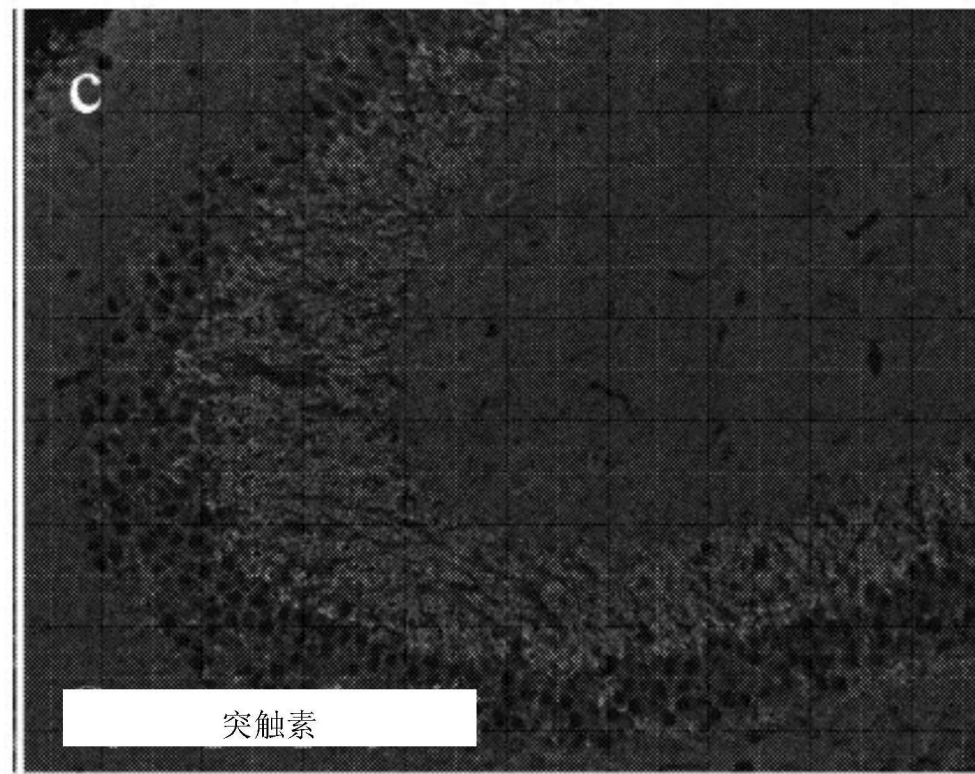


图6C

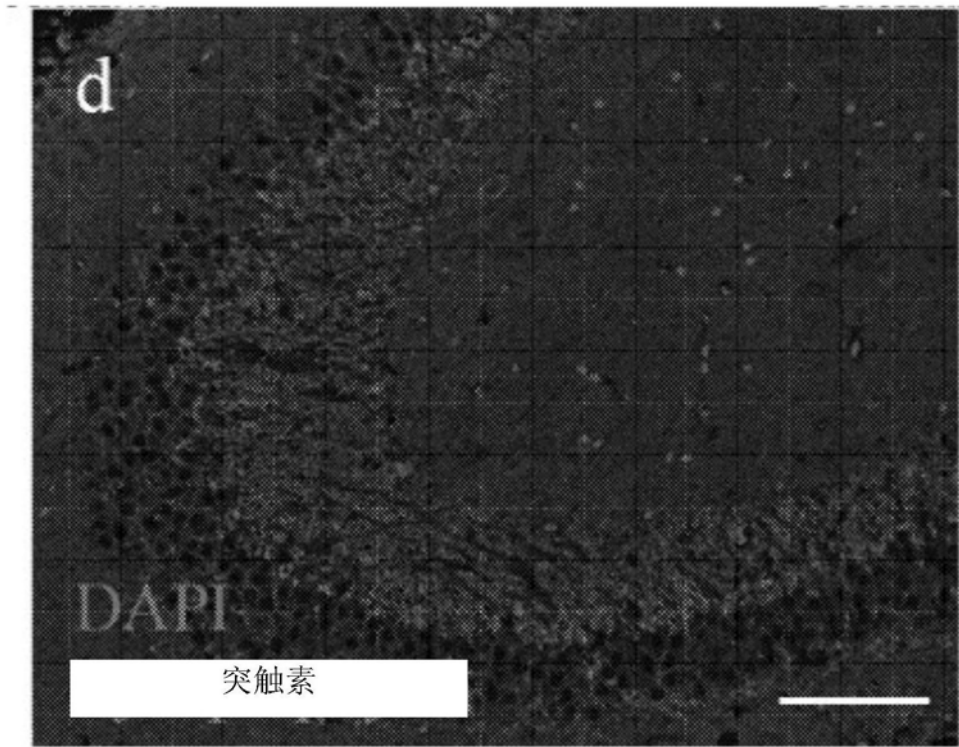


图6D

APP-SwDI(+) $PTP\sigma(-/-)$

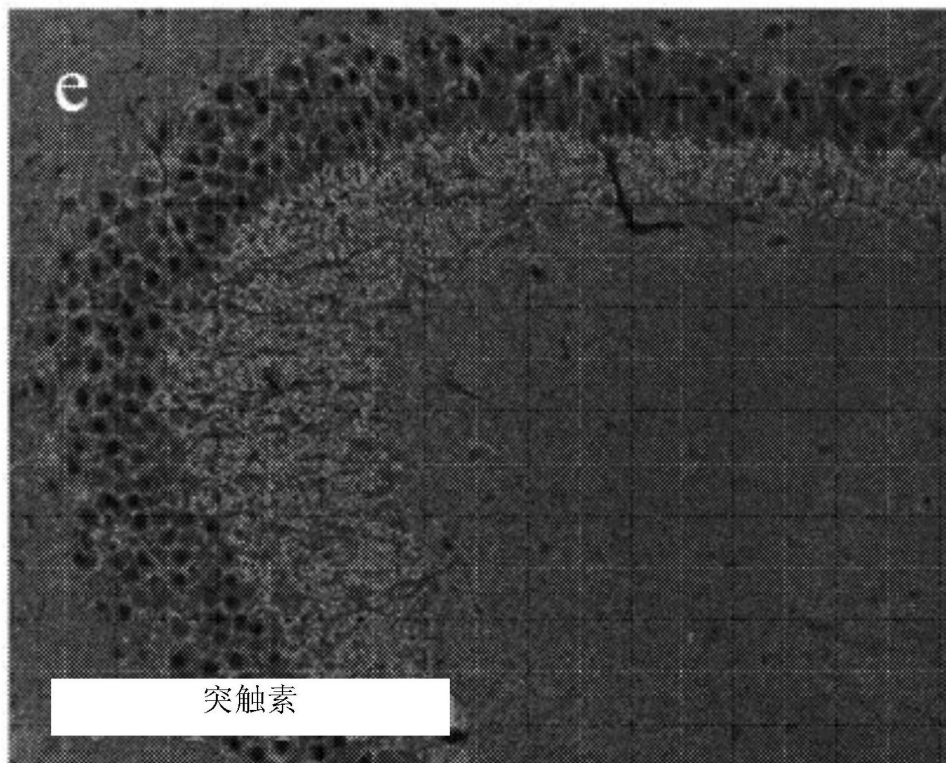


图6E

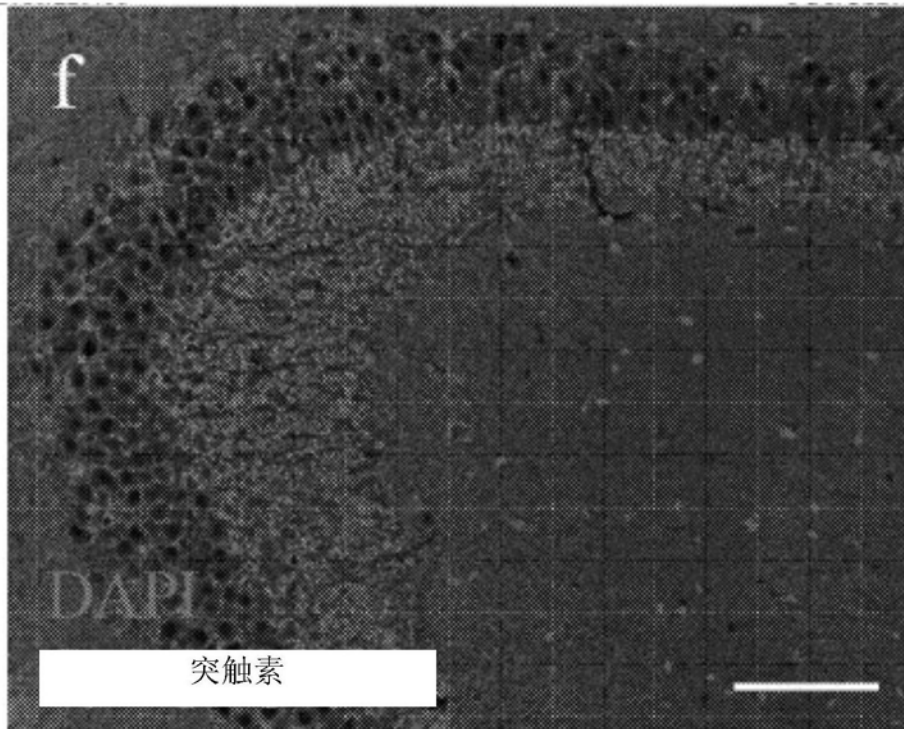


图6F

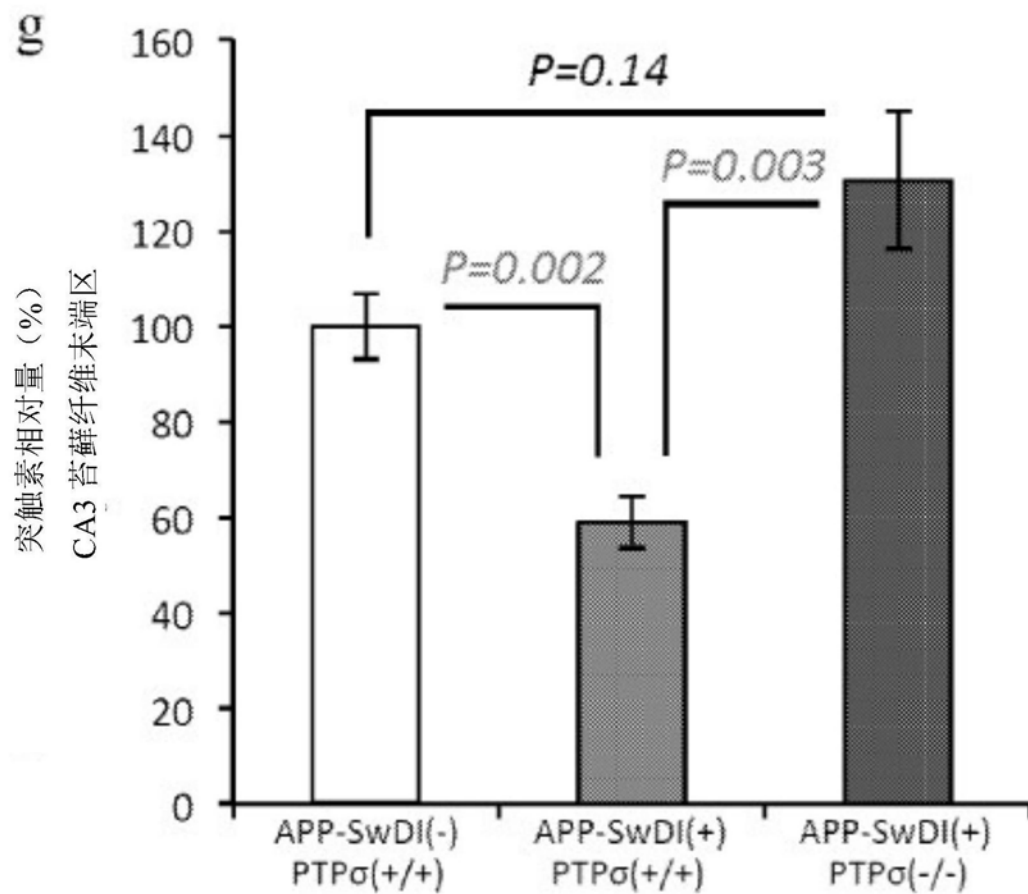


图6G

a

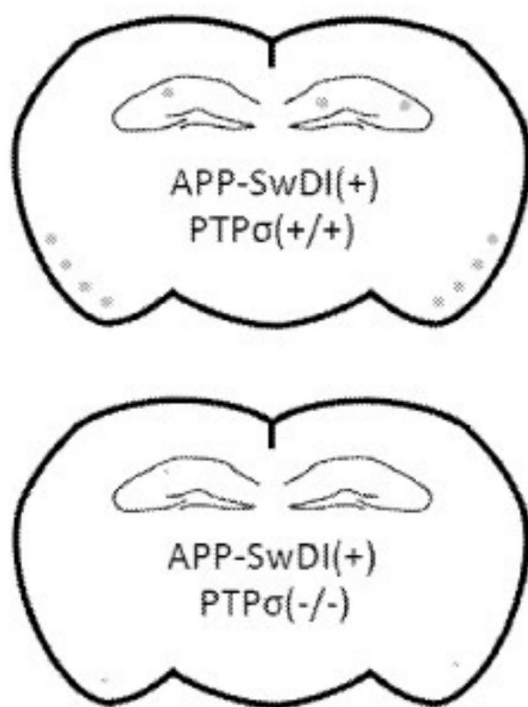


图7A

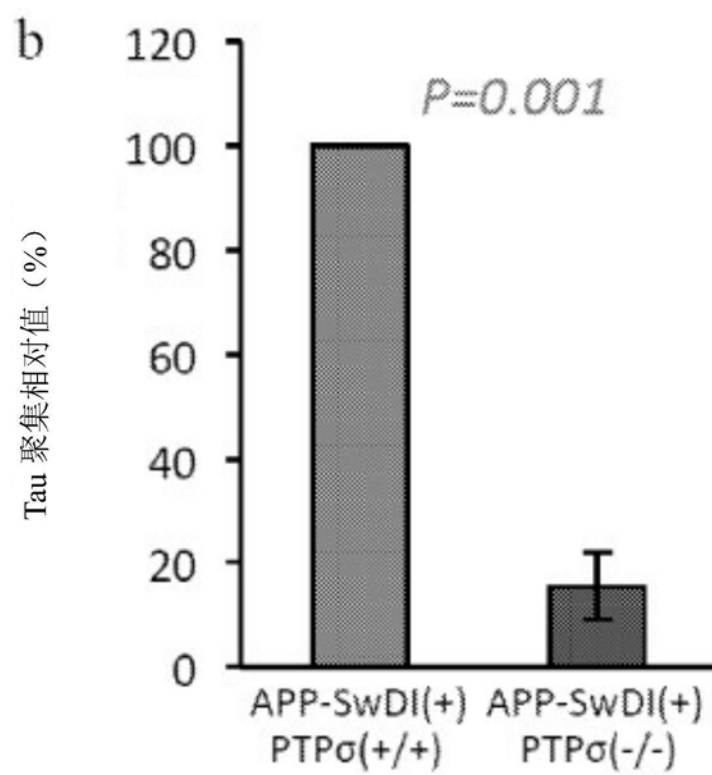


图7B

海马区

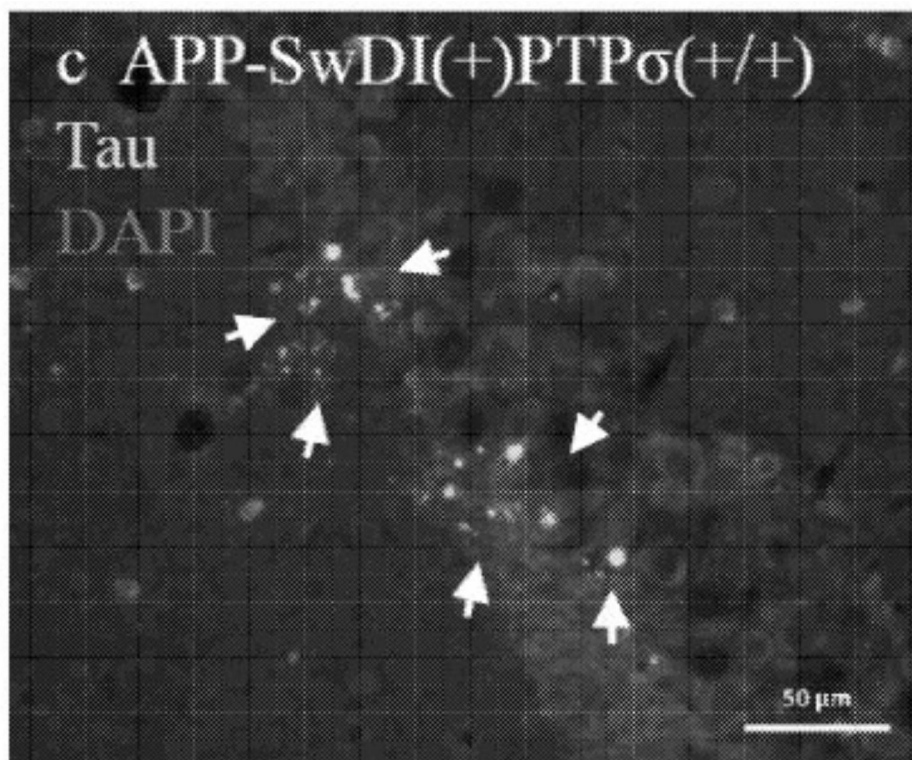


图7C

梨状皮质

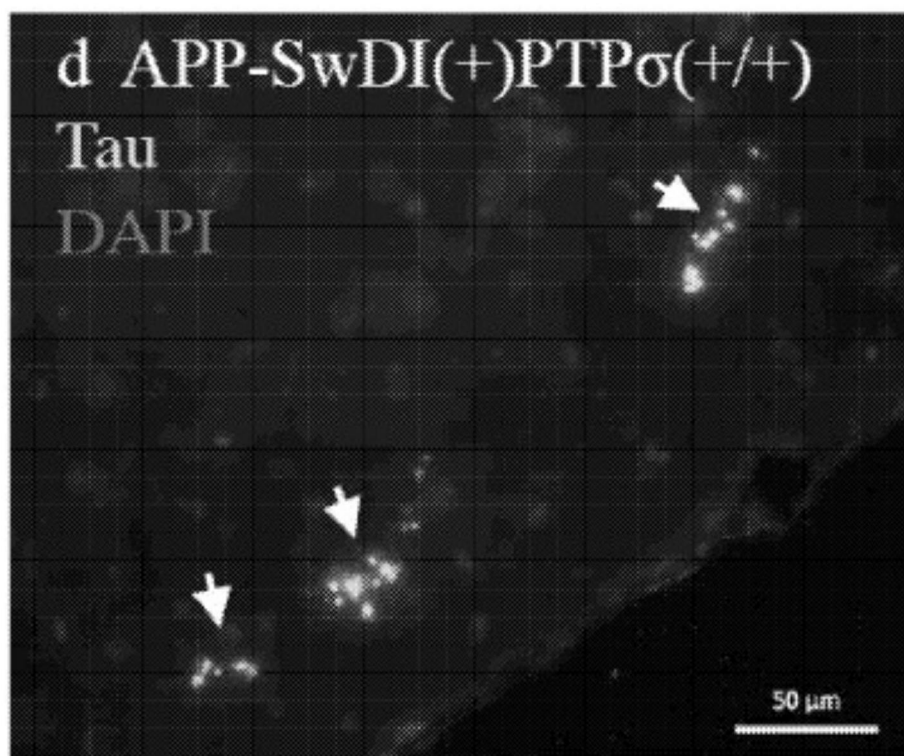


图7D

梨状皮质

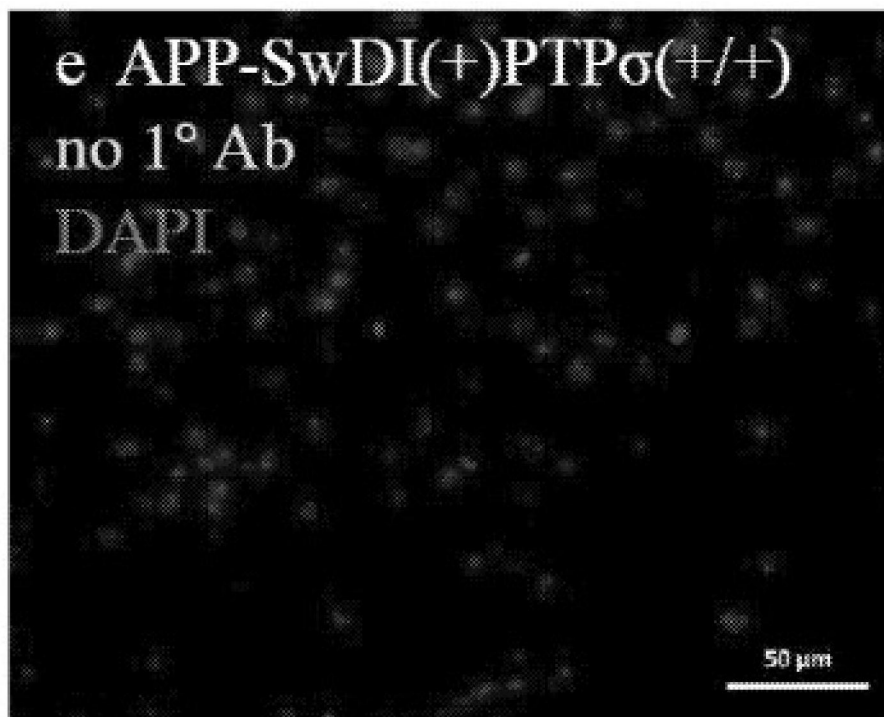


图7E

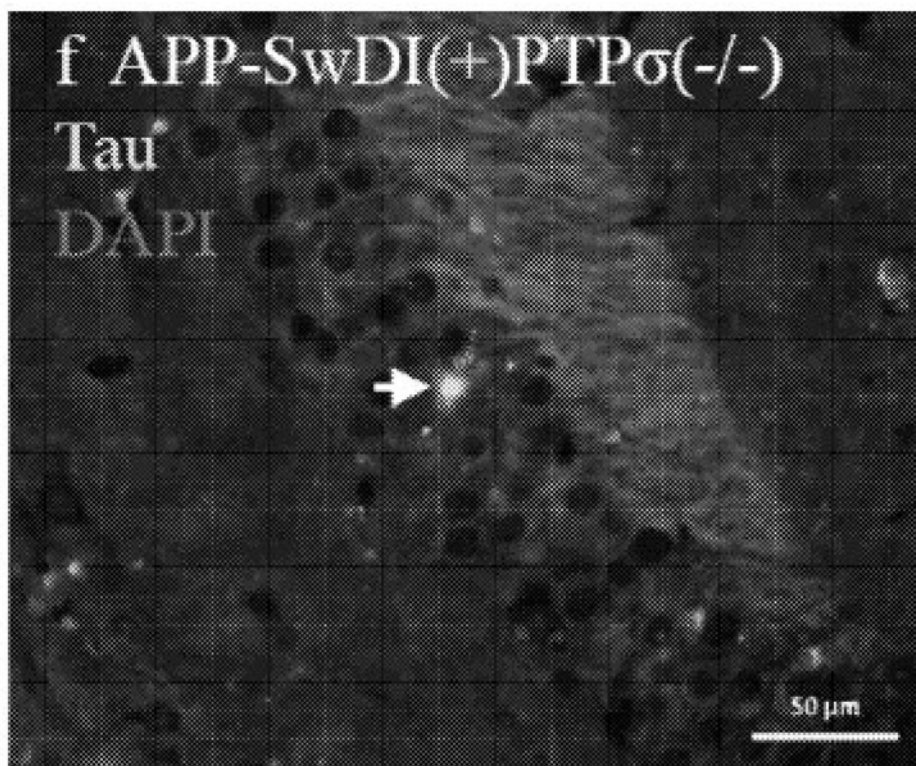


图7F

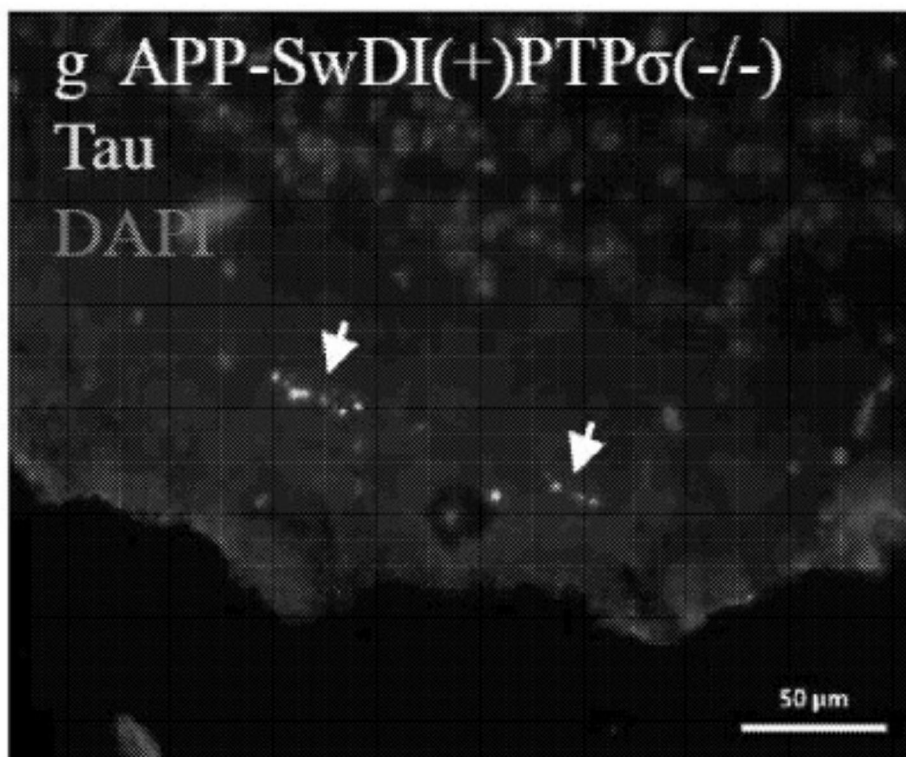


图7G

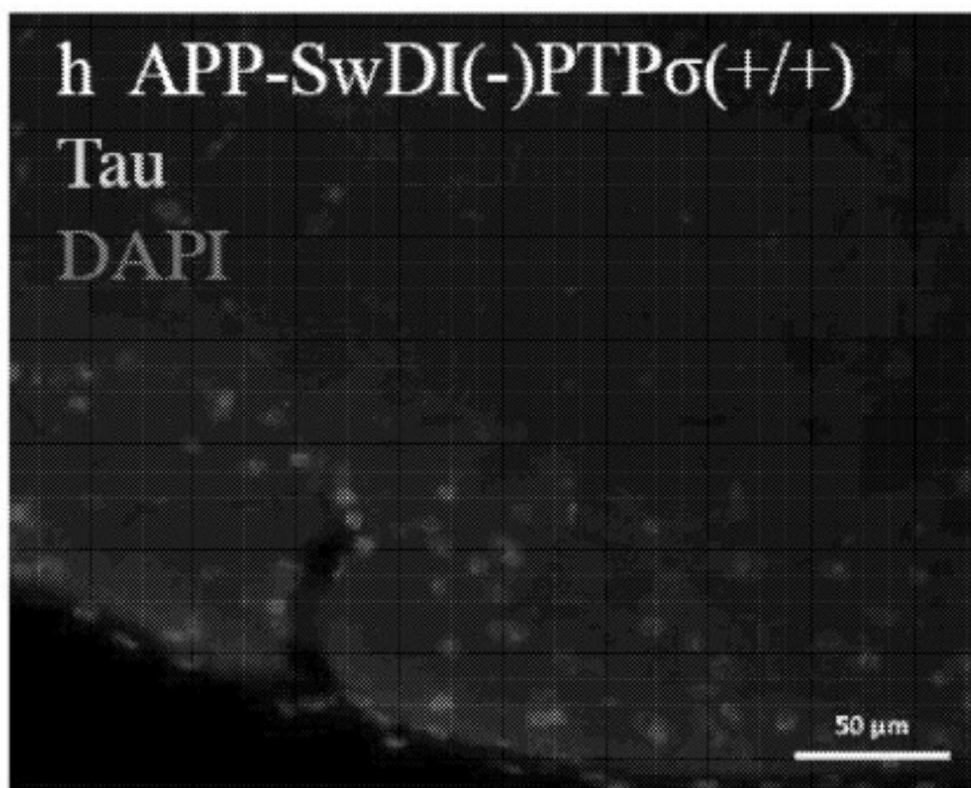


图7H

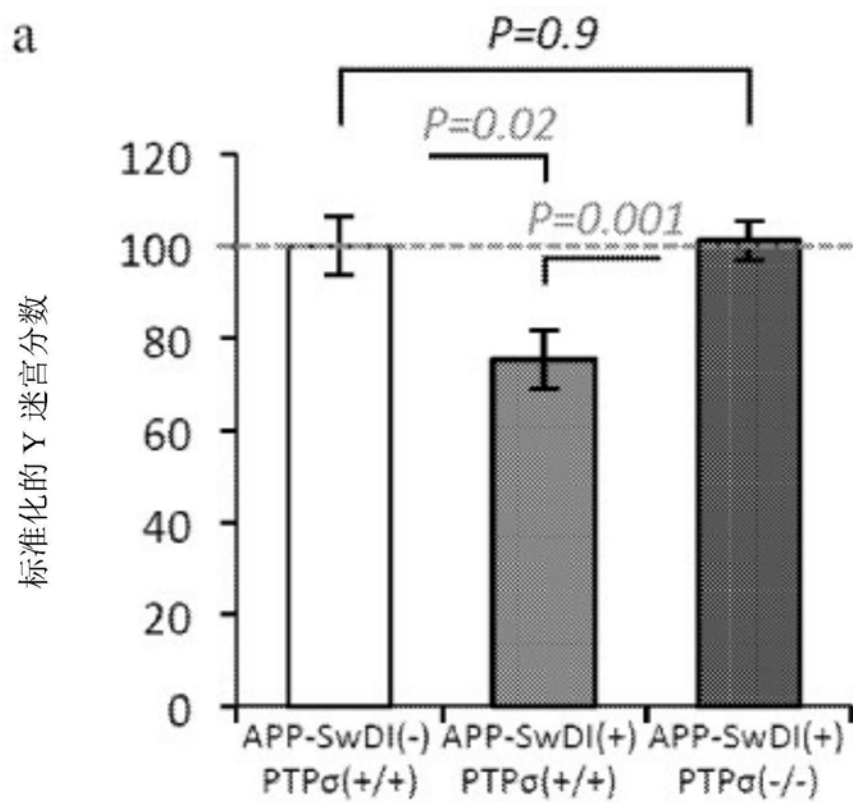


图8A

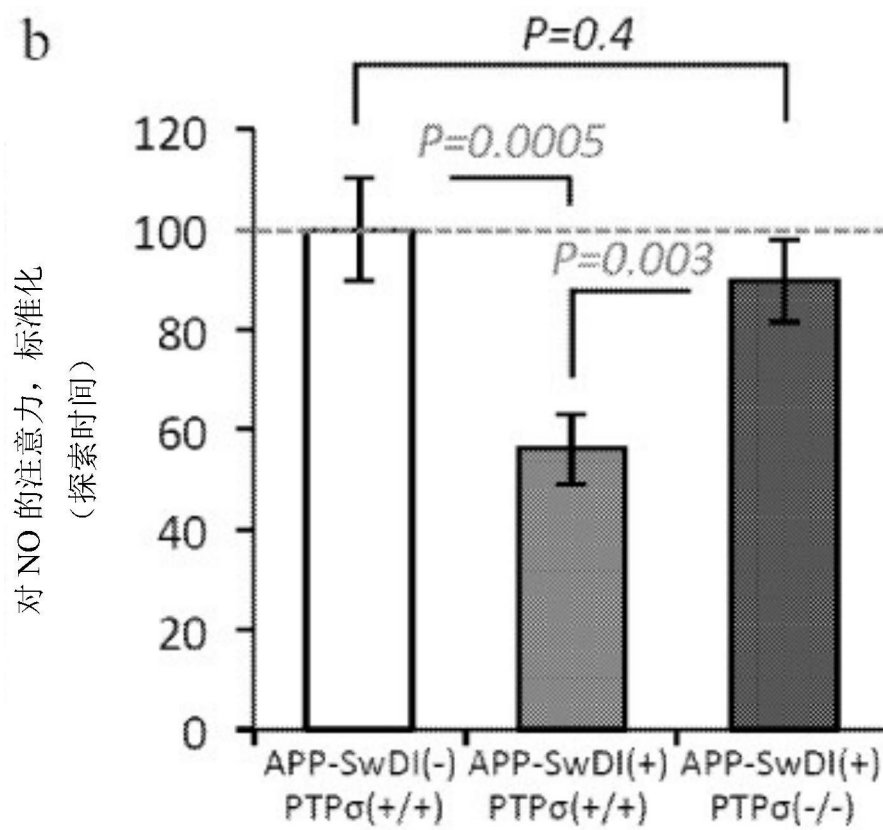


图8B

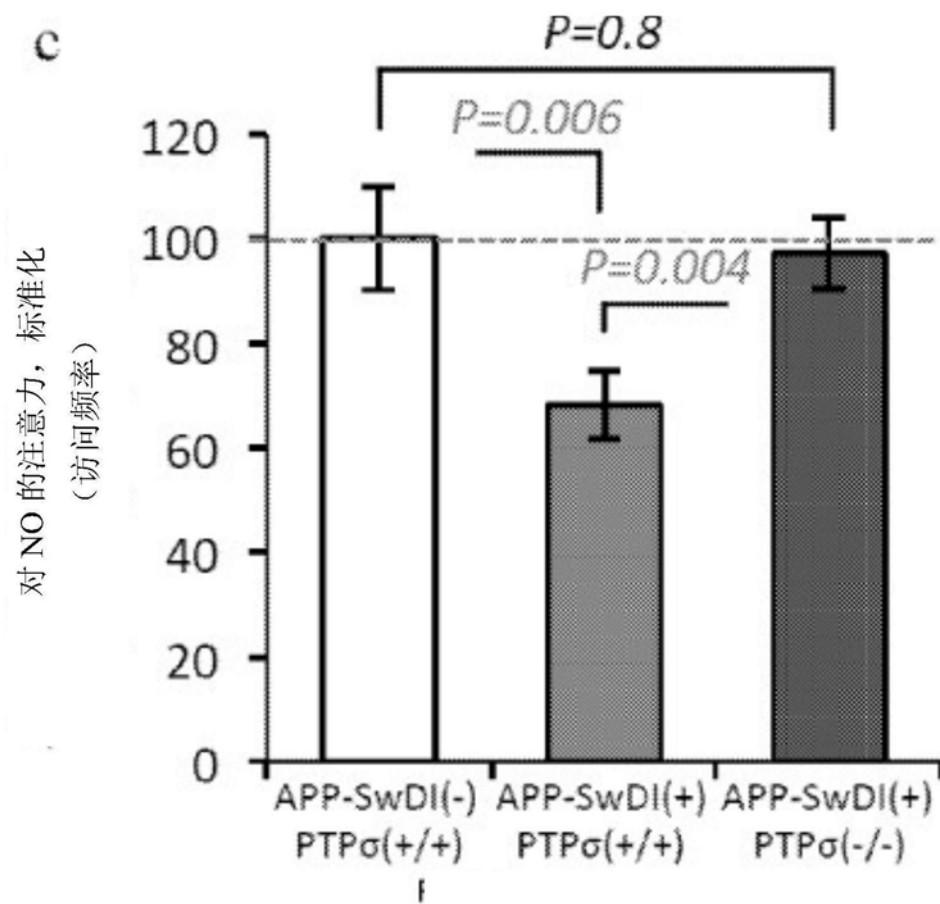


图8C

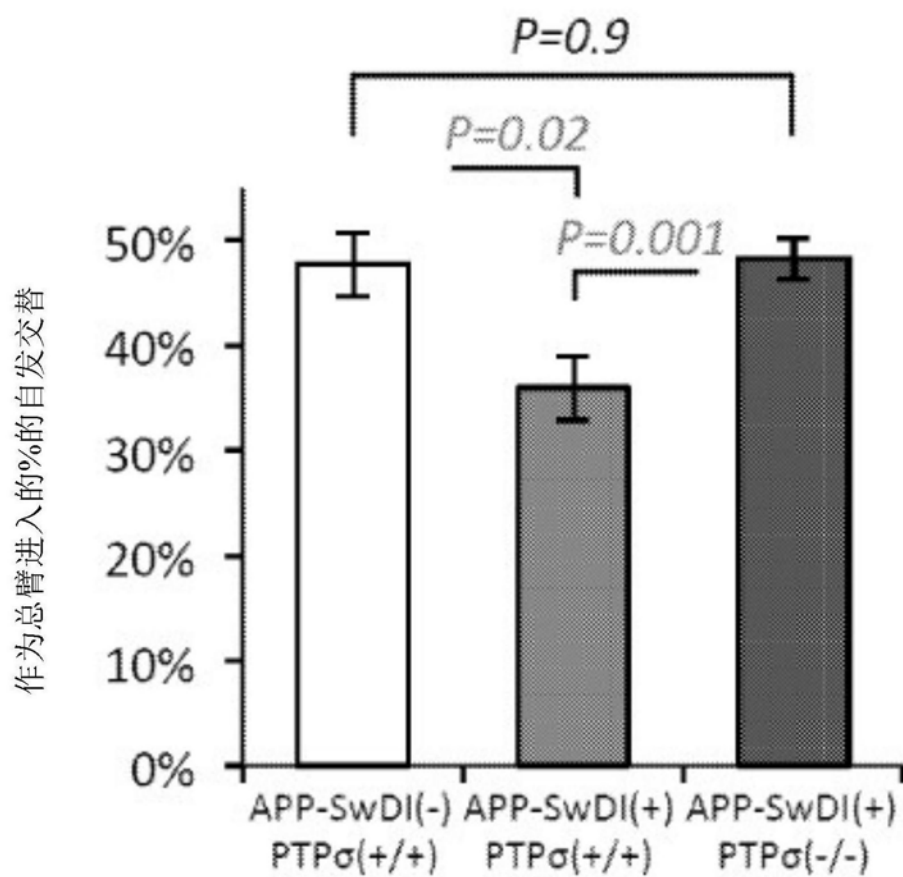


图9

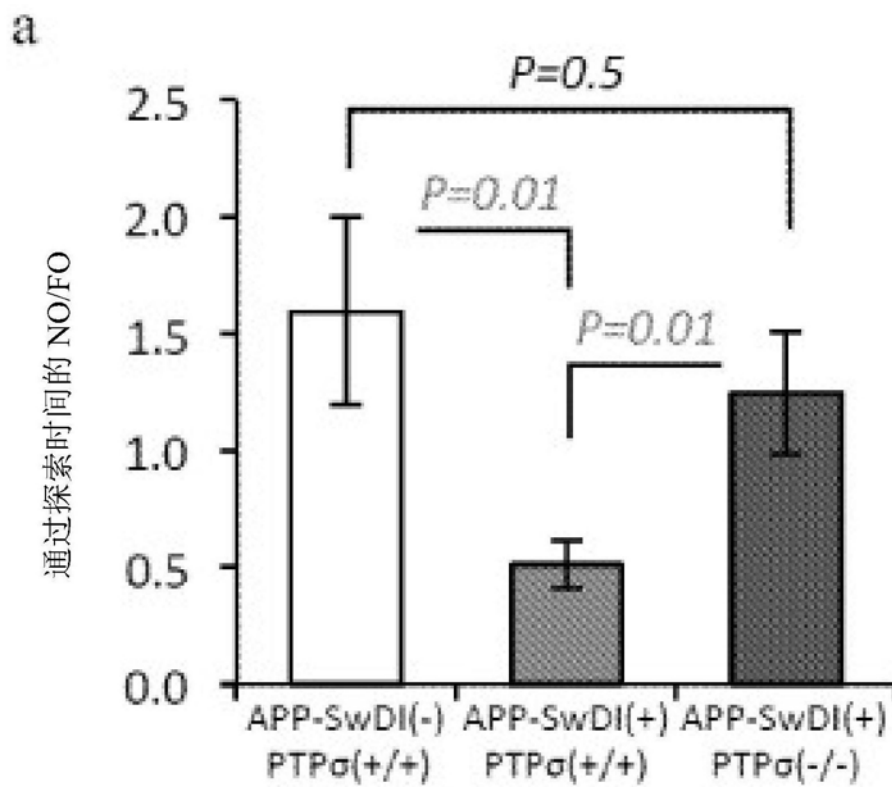


图10A

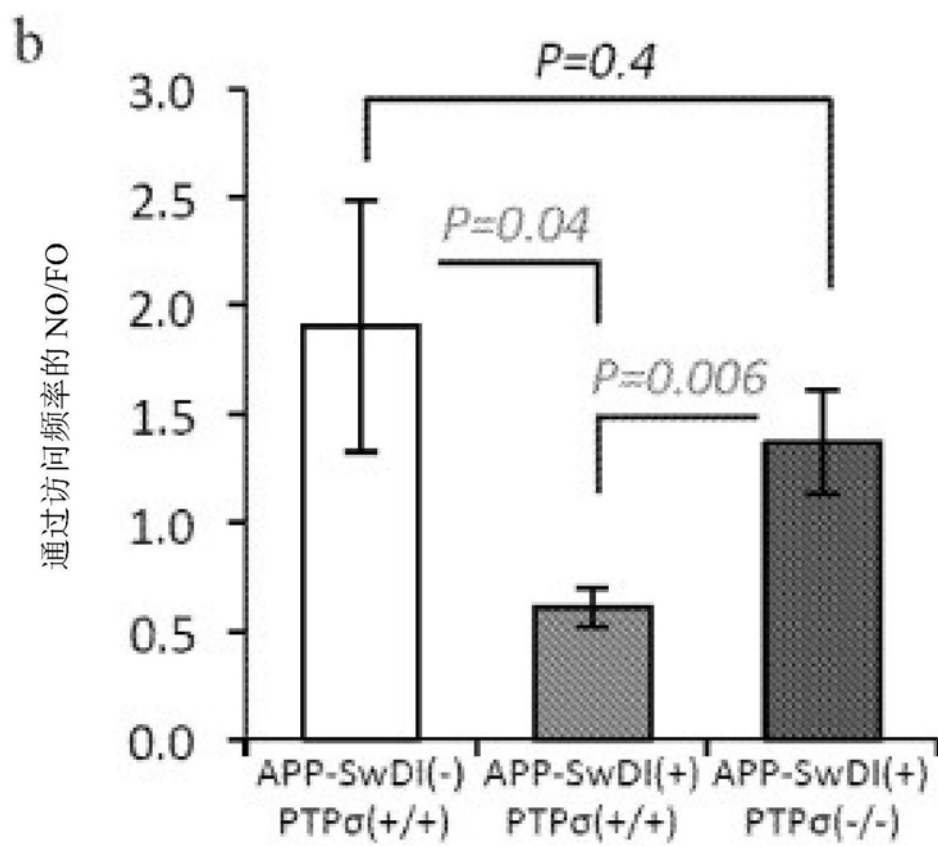


图10B

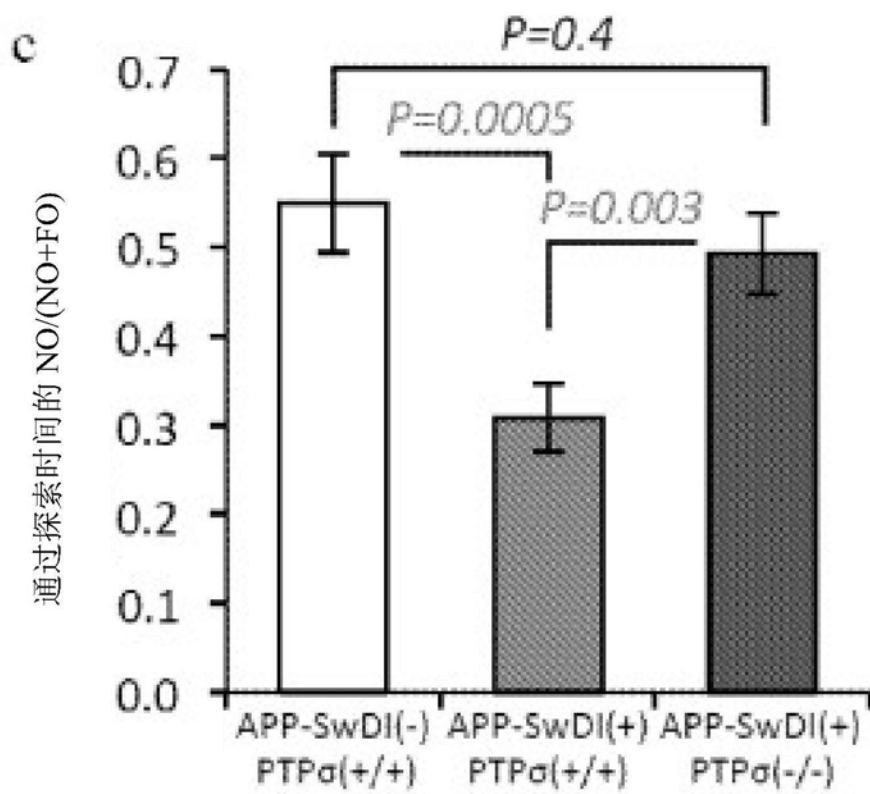


图10C

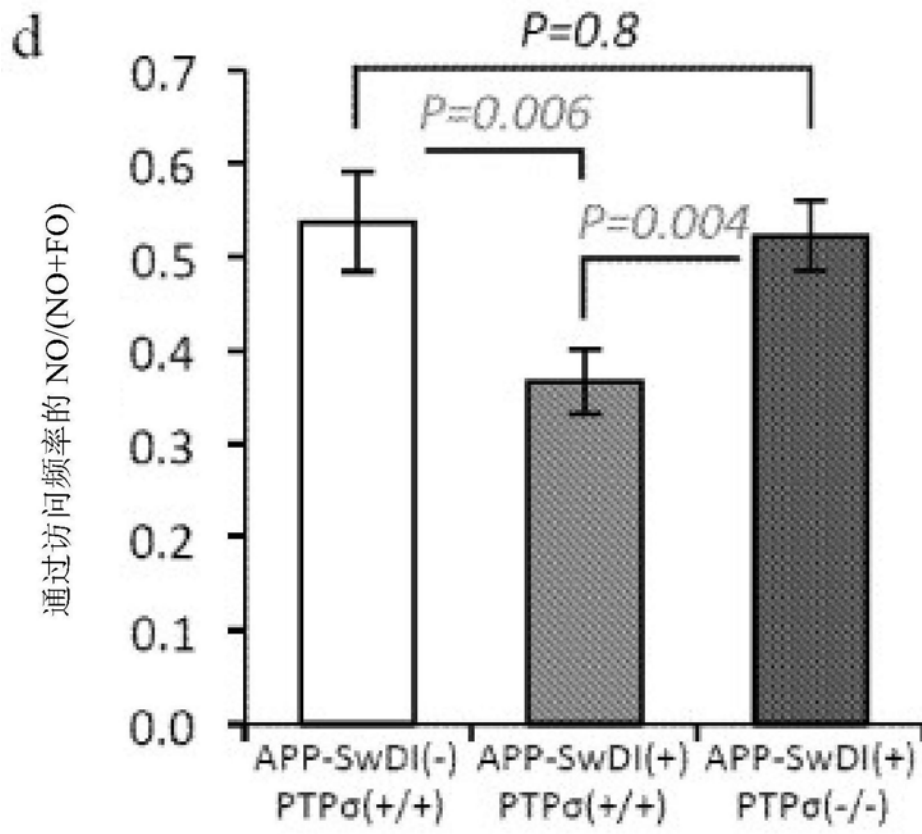


图10D

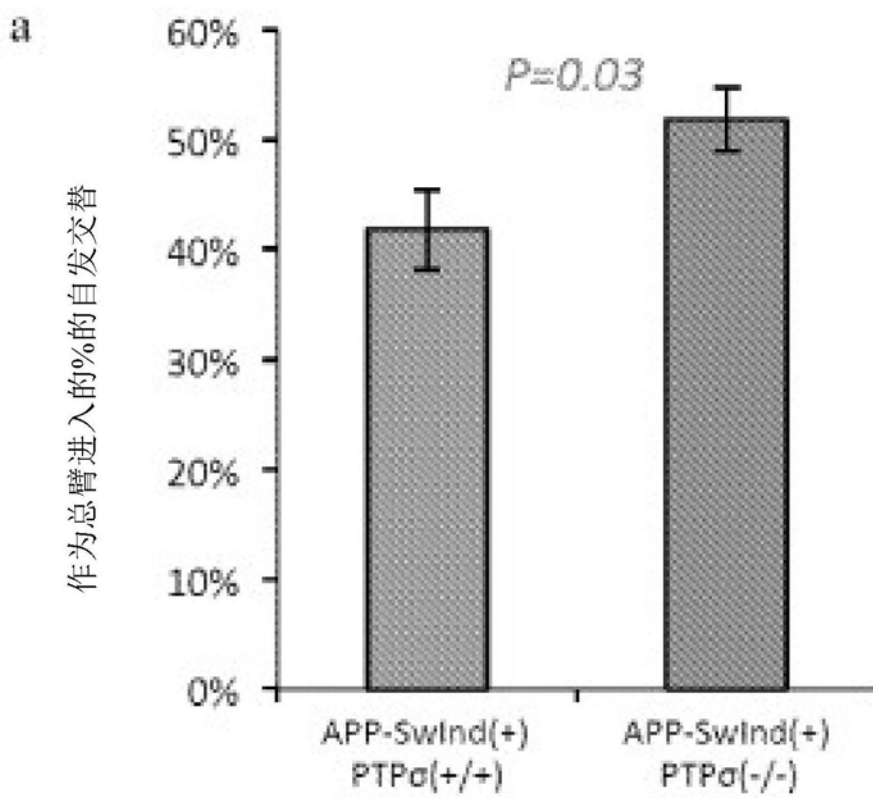


图11A

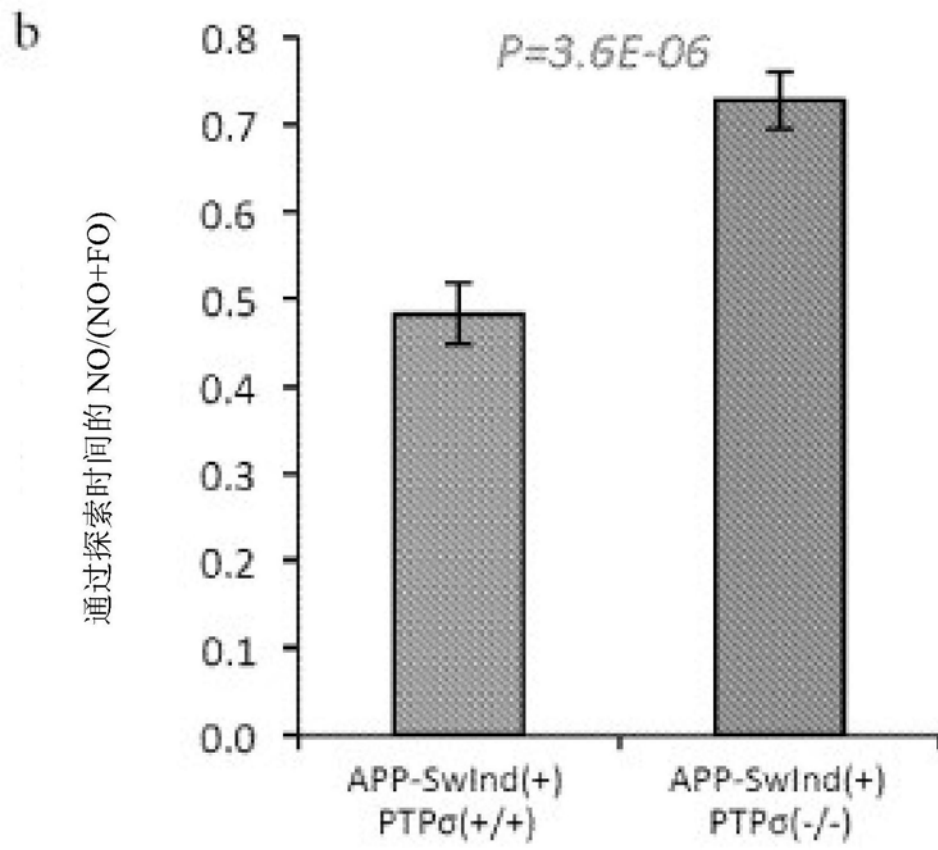


图11B

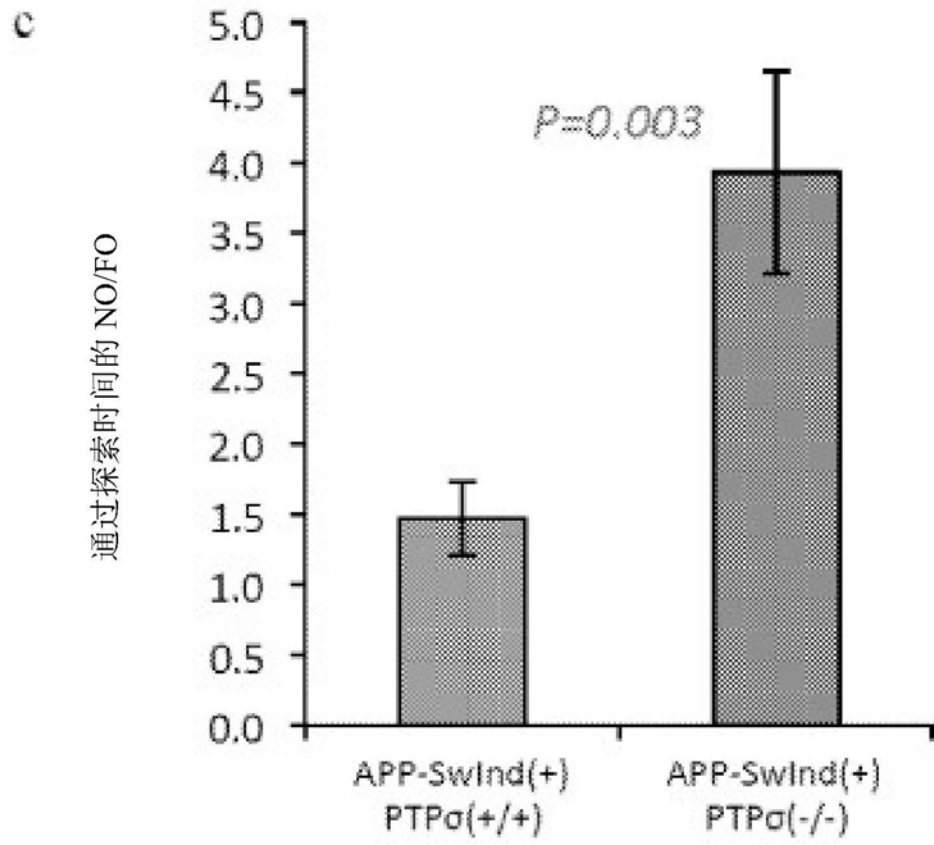


图11C

ISP 对 APP 加工的影响

野生型 Balb/c 小鼠的原始脑部匀浆

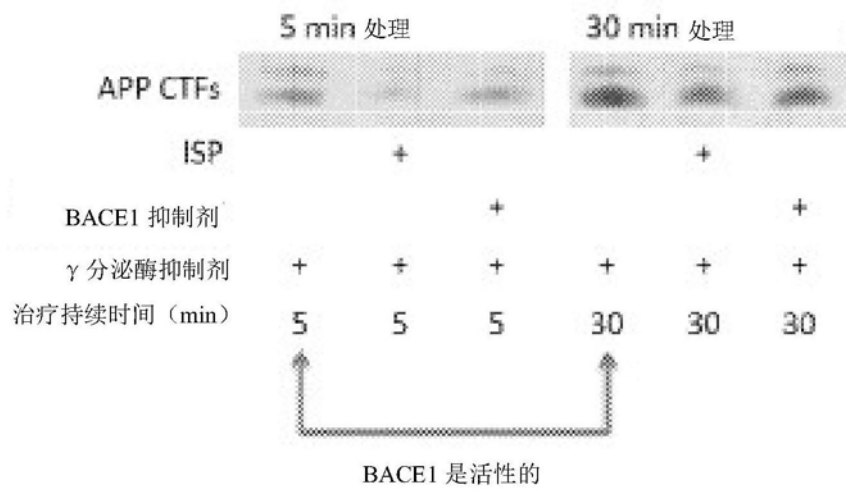


图12