



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106170491 B

(45)授权公告日 2020.07.24

(21)申请号 201480071971.3

(22)申请日 2014.10.30

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106170491 A

(43)申请公布日 2016.11.30

(30)优先权数据
2013904197 2013.10.30 AU
2014902319 2014.06.17 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.06.30

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2014/050326 2014.10.30

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/061856 EN 2015.05.07

(73)专利权人 阿尔杰妮卡治疗学有限公司
地址 澳大利亚西澳大利亚州

(72)发明人 B·梅洛尼

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205
代理人 黄琳娟

(51)Int.Cl.

C07K 7/08(2006.01)
C07K 7/06(2006.01)
C07K 14/00(2006.01)
C07K 14/46(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)
C12N 15/49(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)
C12N 15/64(2006.01)
A61K 38/10(2006.01)
A61K 38/08(2019.01)
A61K 38/16(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 25/16(2006.01)

(56)对比文件

W0 2011063320 A2,2011.05.26,
W0 2013158739 A1,2013.10.24,
CN 1692126 A,2005.11.02,

审查员 袁一方

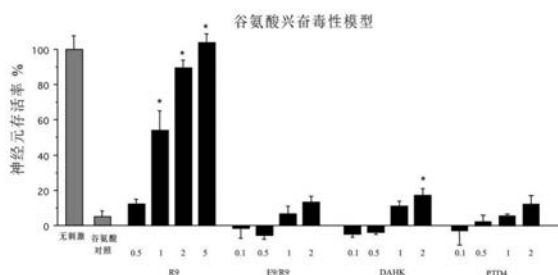
权利要求书1页 说明书38页
序列表8页 附图20页

(54)发明名称

神经保护肽

(57)摘要

本发明涉及长度为10-32个氨基酸残基的分离的肽用于治疗神经损伤的应用,其中所述分离的肽包含至少10-22个精氨酸残基。该肽可以是聚精氨酸序列或富含精氨酸的肽。



1. 长度为12至18个氨基酸残基的分离的肽用于制造治疗或预防神经损伤的药物的应用,其中所述分离的肽是聚精氨酸多肽。

2. 根据权利要求1所述的应用,其中所述分离的肽包含任意一种或多种选自由SEQ.ID.NOS 9、10、11、12、13组成的组的肽。

3. 根据权利要求1所述的应用,其中所述药物通过一种或多种以下机制治疗或预防神经损伤的分离的肽:促进神经元存活;抑制神经元细胞死亡;影响细胞的内吞过程;影响细胞表面受体的功能使得细胞钙内流减少;与线粒体外膜相互作用和/或稳定线粒体外膜以保持线粒体的功能;或抑制、下调或影响钙依赖性前蛋白转化酶弗林蛋白酶。

4. 根据权利要求1所述的应用,其中,在谷氨酸模型、红藻氨酸模型或缺血模型中,所述分离的肽在小于10 μ M的IC50水平上表现出神经保护活性。

5. 根据权利要求1所述的应用,其中所述分离的肽由D-精氨酸残基构成。

6. 根据权利要求1所述的应用,其中所述分离的肽由L-精氨酸残基构成。

7. 一种分离的多核苷酸用于制造治疗或预防神经损伤的药物的应用,其中所述的分离的多核苷酸编码如权利要求1所述分离的聚精氨酸多肽,其中所述分离的多核苷酸序列是非天然存在的多核苷酸。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的应用,其中所述神经损伤选自:局部缺血、围产期缺氧缺血、阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、多发性硬化症、帕金森氏症、肌萎缩性侧索硬化、中风、外周神经病、脊髓损伤、癫痫、青光眼或神经性疼痛。

9. 根据权利要求1-7中任一项所述的应用,其中药物包含药学上可接受的载体、辅助剂或媒介物。

10. 根据权利要求1-7中任一项所述的应用,其中所述药物包含一定量的分离肽,提供从0.001mg/kg至50mg/kg的剂量。

11. 一种试剂盒,其包括权利要求1-7中任一项所述的药物,所述药物在一个或多个容器中,以及包括关于用法说明的使用说明书或信息手册和/或关于药物组合物使用的信息,其用于治疗或预防神经损伤。

神经保护肽

技术领域

[0001] 本发明涉及具有神经保护活性的肽,所述肽用于治疗中风和其他神经损伤或紊乱。本发明进一步涉及使用本发明的肽治疗神经损伤或紊乱的方法。

背景技术

[0002] 细胞穿膜肽(CPPs)是小分子肽,用于促进正常不可渗透物质(比如其它肽、蛋白质、核酸或进入细胞的药物)的传递。

[0003] 细胞穿膜肽(CPPs)的发展,也称为肽转导域蛋白(PTDs),自从在人类免疫缺陷病毒1型反式激活转录激活剂((Frankel和Pabo,1988;Green和Loewenstein,1988),通常被称为TAT))中首次发现PTD,其作为治疗药物输送的促进剂已经具有显著进展。此后,这种序列的活性输送部被分离出来(TAT₄₈₋₅₈:称为TAT肽),并且已经发现和合成超过100个新的CPPs(Milletti,2012)。

[0004] 融合CPPs的潜在疗法已经在神经培养物系统和动物模型中进行了评估,模拟在各种紊乱中的神经损伤机制,包括脑缺血、癫痫、帕金森病和阿尔茨海默病(Lai等,2005;Liu等,2006;Arthur等,2007;Colombo等,2007;Nagel等,2008;Meade等,2009)。CPPs用于神经系统疾病是特别吸引人的,因为其具有穿过血脑屏障运输物质,然后进入脑实质内的神经细胞的能力(Aarts等,2002;Zhang等,2013)。已经进入临床试验的CPP融合神经保护肽的两个例子是JNK抑制剂肽(JNKI-1D-TAT或XG-102;ARAMIS,2012)和NMDA受体/突触后密集区-95抑制肽(TAT-NR2B9c或NA-1;Dolgin,2012)。这两种肽融合到TAT。

[0005] 任何CPP的一个重要特征是临床相关剂量的限制性毒性,并且非常需要限制性毒性的CPPs。同样地,当治疗神经损伤时非常需要神经保护性的肽。CPPs的结构和氨基酸含量差异很大,最近研究发现,在神经保护试验中使用最广泛的CPP—TAT肽也表现出具有本征的神经保护性能。最近的研究(Xu等,2008;Vaslin等,2009;Meade等,2010a,b;Craig等,2011)已经报道在体外的兴奋性毒性和糖氧剥夺,和在体内的脑室内注射后P12大鼠的脑局部缺血,TAT肽显示了神经保护功效。虽然TAT的神经保护功效的确切机制尚不完全清楚,但有人猜测它干扰NMDA受体激活(Xu等,2008;Vaslin等,2009),尽管一项研究未发现相互作用(Li等,2008)。此外,在使用CPP递送构建体的RNAi研究中,在气管内给药后TAT和渗透肽两者都单独地显示出下调肺内的MAP激酶mRNA(Moschos等,2007)。

[0006] 神经元或神经损伤或紊乱(比如偏头痛、中风、创伤性脑损伤、脊髓损伤、癫痫)和神经变性疾病(包括亨廷顿氏病(HD)、帕金森氏病(PD)、阿尔茨海默氏病(AD)和肌萎缩性侧索硬化症(ALS))是长期脑或脊髓损伤引起的发病和伤残的主要原因。脑损伤通常涉及一系列细胞死亡过程,包括细胞凋亡、细胞自噬、坏死性凋亡和坏死,并且影响神经元星形胶质细胞、少突胶质细胞、小神经胶质细胞和血管内皮细胞(统称为神经血管单元;NVU)。与神经损伤有关的破坏性触发涉及包括谷氨酸兴奋毒性钙超载、氧化应激、蛋白水解酶和线粒体紊乱的多样化途径。

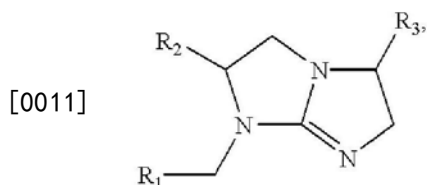
[0007] 如本文使用的术语“中风”包括任何影响大脑或脊髓的缺血性疾病,例如,脑或脊

髓动脉的血栓闭塞、严重低血压、围产期缺氧缺血、心肌梗死、缺氧、脑出血、血管痉挛、外周血管病症、静脉血栓形成、肺栓塞、短暂性脑缺血发作、肺缺血、不稳定型心绞痛、可逆性缺血性神经功能缺损、辅助溶栓活性、过度凝血条件、脑再灌注损伤、镰状细胞性贫血、中风紊乱或医源性引起的缺血期，如血管成形术或脑缺血。

[0008] 通过由兴奋性毒性引起的急性和延迟破坏处理，神经递质谷氨酸的细胞外水平的增加可导致神经细胞死亡。细胞外谷氨酸的积累过度刺激NMDA和AMPA受体，导致细胞外钙离子和钠离子内流，以及蛋白结合钙从细胞内储存库释放。NMDA受体的过度激活还会触发破坏分子（例如，一氧化氮、CLCA1；钙激活的氯离子通道调节剂1、钙蛋白酶、SREBP1：固醇调节元件结合蛋白-1）和信号通路（例如DAPK；死亡相关的蛋白激酶，CamKII：钙-钙调蛋白依赖性蛋白激酶II）的产生。此外，谷氨酸诱导的神经元去极化和兴奋性毒性通过电压依赖性钙通道（VGCC，例如CaV2.2，CaV3.3）、钠钙交换器（NCX）、酸敏感离子通道（ASIC）、瞬时受体电位阳离子通道2和7（TRPM2/7）和代谢型谷氨酸受体（mGluR），可以进一步触发细胞内钙离子流入。

[0009] 细胞内钙离子的增加启动一系列细胞损害事件，包括磷脂酶、蛋白酶、磷酸酶、激酶、NADPH氧化酶和一氧化氮合酶，并且启动触发细胞死亡的通路（即细胞凋亡、细胞自噬、程序性坏死（necroptosis）和坏死（necrosis））的激活。

[0010] 用于治疗大脑局部缺血的神经退行性影响的化合物的例子，包括美国专利5,559,095，其描述了使用 ω -芋螺毒素肽和结合并阻止电压门控性钙通道的相关的肽治疗与神经元损伤有关的局部缺血的方法，和美国专利4,684,624，其描述了使用某些阿片肽的治疗。进一步的例子包括美国专利申请公开2009/0281036，公开了连接其他肽的融合肽的使用，通过抑制NMDA受体与NMDAR相互作用蛋白的相互作用，以减少对哺乳动物细胞损伤的破坏性影响。同样，US 2012/0027781公开了连接靶向肽和其他肽的使用，以提供神经保护功能。US 6,251,854公开了一种提供对抗兴奋毒性的神经元损伤的保护的化合物，其选自结合结构式1化合物的短富含精氨酸的寡肽：



[0012] 许多潜在的神经保护剂也在低至中剂量时表现出毒性。许多CPPs也在低至中剂量表现出毒性。因此，需要神经保护肽，其在低剂量有效，具有低细胞毒性并且其能提供对抗超过一种类型的神经损伤的保护。

[0013] 这里讨论的背景技术旨在便于对本发明的理解。并非意图承认或认可提及的任何材料是或曾是本申请优先权日的公知常识的一部分。

发明内容

[0014] 根据本发明的一个方面，提供一种分离的、碱性（即阳离子）富含氨基酸的肽作为神经保护剂的应用。这种分离的肽可以是CPP。

[0015] 因此，本发明延伸至具有神经保护活性的分离的、阳离子富含氨基酸的肽。本发明延伸至具有神经保护活性的肽的功能性片段。

[0016] 在pH值为7时,所述肽的净电荷可以是8或更高,优选地,在pH值为7时,净电荷是10或更高的,更优选地在pH值为7时,净电荷是11或更高。

[0017] 所述肽可以是非天然存在的肽。因此,本发明的肽可以是人造肽。

[0018] 形成的肽的一部分的阳离子(即碱性)氨基酸残基可以是精氨酸或赖氨酸。因此,所述肽可以富含精氨酸。作为替换,或另外的,所述肽可以富含赖氨酸,和/或富含色氨酸。

[0019] 所述肽的长度可以在10个氨基酸和100个氨基酸之间,优选地在10个氨基酸和32个氨基酸之间。

[0020] 所述肽可以具有序列:

[0021] $X^{(K)}-Z^{(N)}-X^{(K)}-Z^{(N)}-X^{(K)}$

[0022] 其中X可以是任何天然存在或合成的氨基酸,包括阳离子(即碱性)氨基酸残基;

[0023] K是1和5之间的整数;

[0024] Z是碱性(即阳离子)氨基酸残基;和

[0025] N是1和30之间的整数。

[0026] 氨基酸取代“X”位置,优选不会降低神经保护肽的神经保护功效的氨基酸。在一个实施例中,Z可以是精氨酸。在另一个实施例中,Z可以是赖氨酸。这种肽可以包含至少一个连续的富含精氨酸片段。在其他实施例中,该肽可以包含非连续的富含精氨酸片段。

[0027] 所包含的碱性(即阳离子)氨基酸残基的比例为占肽或片段的至少30%,优选地,至少40%,优选地,至少50%,更优选地,至少60%,在某些情况下高达肽或片段的100%。所述肽含有精氨酸的含量可以超过肽中氨基酸含量的20%,优选超过30%、超过40%、超过50%、超过60%、超过70%、超过80%、超过90%、超过95%、超过99%,或更优选100%。在本发明的某些实施例中,肽可以含有联合的精氨酸和赖氨酸的含量超过40%、超过50%、超过60%、超过70%、超过80%、超过90%、超过95%、超过99%,或更优选100%。

[0028] 所述肽可以包括多个单阳离子氨基酸残基,比如精氨酸残基,被其他氨基酸残基穿插,尤其是,可以被碱性(即阳离子)氨基酸残基穿插,如赖氨酸,和/或色氨酸。所述肽可以包括在相邻位置上精氨酸残基的重复序列,如RR,或RRR,或RRRRR,或更高阶的重复,和可以穿插在其他氨基酸之间或氨基酸的区段之间。

[0029] 因此,所述肽可以完全由阳离子氨基酸组成。在一个实施例中,该肽完全由精氨酸残基组成。

[0030] 根据本发明的一个方面,提供了一种长度为10至32个氨基酸残基的分离的肽用于治疗神经损伤的应用,其中该分离的肽包括至少10至22个残基。

[0031] 在本发明的优选实施例中,该肽可以是用于治疗神经损伤的长度为10至32个氨基酸残基的分离的肽,其中该分离的肽包含至少10至22个的精氨酸残基。

[0032] 所述分离的肽具有的精氨酸残基含量为至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%,或至少99%。

[0033] 所述分离的肽可以是包含10至18个精氨酸残基的聚精氨酸肽。在优选的实施例中,该分离的肽是R12、R15或R18,更优选R15。

[0034] 具体来说,所述分离的肽可包含任何一种或多种选自由序列号(SEQ.ID.NOS.)为SEQ.ID.NOS.7、8、9、10、11、12、13、16、30、31、32、33、34、35、36、37以及它们的具有神经保护活性的功能性片段和其类似物组成的组中的肽。

[0035] 所述分离的肽可包括至少一个包括至少4个连续的精氨酸残基的聚精氨酸片段,优选至少两个聚精氨酸段,更优选地三个聚精氨酸段。

[0036] 所述分离的多肽可以是穿膜肽 (SEQ. ID. NO. 22)。

[0037] 所述分离的肽可以包含鱼精蛋白衍生物的混合物。鱼精蛋白衍生物的混合物可包含硫酸鱼精蛋白。

[0038] 所述分离的肽可以影响细胞的内吞过程;影响细胞表面受体的功能,实现减少细胞钙内流;与线粒体外膜相互作用和/或稳定线粒体外膜以维持线粒体的功能;或抑制、下调或影响钙依赖性前蛋白转化酶弗林蛋白酶。

[0039] 所述分离的肽可以是合成肽或人造肽。该分离的肽可以被包括在或融合到其他多肽中。该分离的多肽可以与至少一个接头序列彼此融合。

[0040] 所述分离的肽可以在小于50 μ M的IC50水平上表现出神经保护活性,优选小于20 μ M,更优选小于10 μ M。

[0041] 本发明延伸到分离的肽制备用于治疗或预防神经损伤的药物组合物或药物中的应用,所述分离的肽包含任何一种或多种序列号 (SEQ. ID. NOS.) 为SEQ. ID. NOS. 7、8、9、10、11、12、13、16、30、31、32、33、34、35、36、37,以及它们的具有神经保护活性的功能性片段及其类似物。

[0042] 所述药物组合物或药物可以用于治疗或预防神经损伤,该药物组合物或药物包括本发明的分离的肽或本发明的多核苷酸序列。

[0043] 所述药物组合物或药物可以用于治疗或者预防局部缺血、围产期缺氧缺血、阿尔茨海默氏病、亨廷顿氏病、多发性硬化症、帕金森氏症、肌萎缩性侧索硬化、中风、外周神经病、脊髓损伤或癫痫。

[0044] 所述药物组合物或药物可以包含药学上可接受的载体、辅助剂或媒介物。

[0045] 根据本发明的另一个方面,提供了一种治疗神经损伤或促进神经元存活的方法,该方法包括给有需要的患者施用药学上可接受的和/或药学有效量的本发明的肽或本发明的药物组合物或药物的步骤。

[0046] 根据本发明的又一个方面,提供了一种抑制受试者的神经元细胞死亡的方法,包括给需要这种治疗的受试者施用药学上可接受的和/或药学有效量的本发明的肽或者本发明的药物组合物或药物。

[0047] 给药剂量可以从0.001mg/kg至50mg/kg。

[0048] 本发明延伸到试剂盒,其包括在一个或多个容器中的本发明的药物组合物或药物以及关于用法说明的使用说明书或信息手册和/或关于药物组合物的使用的信息。

[0049] 更具体来说,所述肽可以是任何一种或多种具有序列号 (SEQ. ID. NOS.) 为SEQ. ID. NOS. 7、8、9、10、11、12、13、16、30、31、32、33、34、35、36、37的序列的肽,或者可以包括具有与所述肽至少60%、优选70%、更优选80%、较优选90%、更优选99%或更高的序列同一性的序列,这些肽具有神经保护活性。

[0050] 所述肽可以包含在R8和R22之间任何长度的聚精氨酸肽,或其重复序列。在一个实施例中,所述肽选自包含R8、R9、R10、R11、R12、R13、R14、R15、R16、R17、和R18的组。在一个优选的实施例中,肽是R10。在另一个优选的实施例中,肽是R12。在又一个优选的实施例中,所述肽为R15。在另一个优选的实施方案中,肽是R18。

[0051] 在神经损伤的治疗或预防中,肽的应用可以包括任何两种或多种本发明的肽的混合物的应用,特别是SEQ.ID.NOs 32至36。

[0052] 在另一个实施例中,所述应用可以包括在神经损伤的治疗或预防中,使用SEQ.ID.NO.37的肽,或者SEQ.ID.NO.37与任意SEQ.ID.NOs 32至36的肽一起使用。

[0053] 在本发明的另一个方面,提供SEQ.ID.NOs 32至37的分离肽,包括与所述肽具有至少60%、70%、80%、90%、甚至99%的序列或更高的序列同一性的序列,这些肽具有神经保护活性。

[0054] 所述肽可以是市售的从鲑鱼精分离的精蛋白肽混合物。

[0055] 因此,所述肽可以是以包括硫酸鱼精蛋白的混合物的形式,如欧洲药品管理局(European Medicines Agency)所描述的“Assessment Report for Protamine containing medicinal products”(含有药品的鱼精蛋白评估报告),在2012年11月15日公布的编号为EMA/H/A-5(3)/1341,其内容仅以参考方式并入本文。

[0056] 表1显示了不同形式的鲑鱼精子鱼精蛋白的概述。鱼精蛋白肽序列(鲑鱼)存在于用于临床使用的硫酸鱼精蛋白中或来自SwissProt数据库。如本说明书中所使用的,术语“鱼精蛋白”指的是市售的可注射形式或硫酸鱼精蛋白,其包括SEQ.ID.NOs32至35的肽的混合物。

[0057] 所述肽可以以如下百分比存在于肽的混合物中:

[0058]	SEQ.ID.NO	标识符	百分比
	32	Ptm1	15-25
	33	Ptm2	27-37
	34	Ptm3	20-30
	35	Ptm4	15-25

[0059] 在优选的实施例中,肽是以如下百分比存在于肽的混合物中:

[0060]	SEQ.ID.NO	标识符	百分比
	32	Ptm1	18-22
	33	Ptm2	30-35
	34	Ptm3	21.5-28
	35	Ptm4	19-23

[0061] 在更优选的实施例中,肽是以如下百分比存在于肽的混合物中:

[0062]	SEQ.ID.NO	标识符	百分比
	32	Ptm1	20.1
	33	Ptm2	33.5
	34	Ptm3	25.1
	35	Ptm4	21.3

[0063] 更具体地,所述肽的混合物可以是SEQ.ID.NOs 32、33、34和35的肽的混合物,市售可得的是硫酸鱼精蛋白(鲑鱼),如Sanofi Aventis生产的。

[0064] 因此,肽的混合物可以与氯化钠、盐酸、氢氧化钠和水混合。

[0065] 肽的混合物可以在可注射或静脉给药的输送制剂中。

[0066] 肽存在于输送制剂中的浓度范围可以为0.1mg/mL至100mg/mL,优选1mg/mL至20mg/mL,更优选10mg/mL。

[0067] 在使用中,当为可注射或静脉注射的制剂的形式时,输送制剂可以通过在1至30分钟的时间内缓慢静脉注射给药,优选5至20分钟,更优选超过10分钟的时间。

[0068] 所述肽可以具有细胞穿透活性。因此,所述肽可以是CPP。

[0069] 所述肽可以包括在相邻位置上重复的精氨酸残基,例如RR,或RRR,或RRRR,或更高阶的重复,并且可能穿插在其他氨基酸之间,或氨基酸的区段之间。

[0070] 根据本发明的另一方面,提供本发明的肽在制备用于治疗神经损伤的药物组合物或药物中应用。本发明延伸到本发明的肽混合物在制备用于治疗神经损伤的药物中应用。

[0071] 根据本发明的再一个方面,提供了使用本发明的肽或药物组合物影响与钙离子内流相关联,更具体地说与NMDA、AMPA、VGCCs、NCX、TRMP2/7、ASIC和mGlu受体相互作用,更具体地说还使得能够减少细胞外钙离子内流相关联,的细胞表面受体的功能。在本发明的另一实施例中,提供了使用本发明的肽或药物组合物与线粒体外膜相互作用和/或稳定线粒体外膜,从而有助于保持线粒体功能。根据本发明的又一个方面,提供了使用本发明的肽或药物组合物,用于抑制、下调或影响钙依赖性前蛋白转化酶弗林蛋白酶。

[0072] 根据本发明的另一个方面,提供了用于治疗神经损伤的药物组合物或药物,所述药物组合物或药物包括本发明的分离的肽,或任意一种或多种本发明的分离的肽。

[0073] 药物组合物或药物可以包括药学上可接受的载体、辅助剂或媒介物。

[0074] 根据本发明的另一个方面,提供了一种治疗神经损伤的方法,该方法包括给有需要的患者施用药学上可接受的和/或药物有效量的本发明的肽的步骤。患者可以施用生理学上可接受量的本发明的肽。

[0075] 根据本发明的再一个方面,提供了一种抑制受试者神经元细胞死亡的方法,该方法包括给需要这种治疗的受试者施用有效量的神经保护性肽,以抑制受试者的神经元细胞死亡,所述神经保护性肽是任何一种或多种本发明的肽。

[0076] 患者可以施用生理学上可接受量的任何一种或多种本发明的肽的混合物。

[0077] 更具体地,患者可以施用一种或多种选自由SEQ.ID.NOs 32、33、34、35、36或37组成的组中的肽的混合物。在本发明的一个特定方面,患者可以施用包含SEQ.ID.NOs 32、33、34和35的混合物。在其它组合中,患者可以施用选自由SEQ.ID.NOs 32、33、34和35组成组中的肽与SEQ.ID.NO.36的肽的任意组合。在一个具体的实施例中,患者可以施用SEQ.ID.NO.35。

[0078] 本发明的肽可以提供抗神经递质受体拮抗剂的神经保护活性。神经递质受体可以是受NMDA、谷氨酸盐、红藻氨酸或缺血性过程约束、相互作用或影响的受体。本发明的肽可以包括在其他多肽中或可以融合到其他多肽中。本发明的肽可连接或融合在这些其他多肽的N-或C-末端。本发明的肽可连接或融合到这些其他多肽,以使本发明的肽存在于适于治疗神经损伤的构型中。

[0079] 作为替换,或者另外的,一种或多种本发明的肽可以与接头序列相互融合。所述接头序列可以包括任何氨基酸序列,包括但并不是限于碱性/阳离子富含氨基酸的接头序列。作为替换,或者另外的,所述接头序列可以是可裂解的接头序列。在一个实施例中,所述接头可以是一个或多个MMP型接头、钙蛋白酶、半胱天冬蛋白酶或tPA接头。MMP型接头被定义为

通过基质金属蛋白酶 (MMPs) 识别和裂解的肽序列。同样地, 钙蛋白酶、半胱天冬蛋白酶或 tPA 接头是被这些蛋白酶 (即分别是钙蛋白酶、半胱天冬蛋白酶或 tPA) 的识别和裂解的肽序列。本发明的肽也可以融合到其他肽, 被运送到神经损伤的位点或经细胞内运输进入神经细胞或在神经细胞内。

[0080] 本发明的肽也可以连接到辅助肽, 所述辅助肽可以与对神经功能有害的酶结合或者相互作用, 由此辅助肽可以作为跨过细胞膜运输后酶的竞争性抑制剂。辅助肽可以选自 tPA、钙蛋白酶和基质金属蛋白酶, 并且可以是使用可切割接头 (比如半胱天冬蛋白酶序列) 连接到本发明的肽, 使得 tPA、钙蛋白酶或基质金属蛋白酶可以从本发明的肽中释放出来, 然后可以作为对神经功能有害的酶的细胞内竞争性抑制剂。

[0081] 因此, 本发明延伸至连接到半胱天冬蛋白酶裂解位点的本发明的肽, 它本身又与钙蛋白酶、tPA 或基质金属蛋白酶连接。

[0082] 本发明的肽可以在小于 10 μ M 的 IC₅₀ 水平表现出神经保护活性, 优选小于 5 μ M, 优选小于 1 μ M, 在某些情况下低至或低于 0.2 μ M, 甚至低至 0.1 μ M。

[0083] 如上文提到的, 所述肽可以包括本发明肽序列的重复序列, 或其功能性片段, 即表现出神经保护活性的片段。

[0084] 因此, 本发明的一个方面提供了一种分离的多肽, 具有包含在其中的表现出神经保护功效的肽段, 所述肽段的长度为 8 至 100 个之间氨基酸残基, 其中该神经保护肽选自具有碱性/阳离子氨基酸含量超过所述肽段长度 20% 的肽段, 优选超过 30%、超过 40%、超过 50%、超过 60%、超过 70%、超过 80% 以上、超过 90%、超过 95%、超过 99% 或更优选地 100%。

[0085] 根据本发明的另一个方面, 提供了编码本发明的肽的分离的多核苷酸序列, 与分离的多核苷酸序列互补的序列, 以及与所述分离的多核苷酸序列具有至少 60%、70%、80%、90%、95%、99% 或者 100% 的同源性的序列。多核苷酸序列可以是一种或多种的分离序列并且可以是在严格条件下与本发明的多核苷酸序列杂交的序列。所述多核苷酸序列可以是非天然存在的多核苷酸序列或 DNA。因此, 它们可以包括人造的、人工构建体, 比如 cDNA。本发明中包括载体, 比如表达载体, 其包括分离的上述分离核酸以及用这些载体或 DNA 序列转化的细胞。多核苷酸序列可以编码鱼精蛋白。多核苷酸序列可以是 SEQ. ID. NO. 38 的序列。

[0086] 在本发明的另一个方面, 提供了选自由 SEQ. ID. NOS. 7、8、9、10、11、12、13、16、30、31、32、33、34、35、36 和 37 组成的组中的分离的肽, 其包括与所述肽具有至少 60%、优选地 70%、更优选地 80%、甚至更优选地 90%、更更优选地 99% 或更高的序列同一性的序列, 所述的肽具有神经保护活性。

[0087] 也提供了在药物制剂或药物的制备中所述分离的核酸、载体或细胞的应用。

[0088] 此外, 本发明提供了试剂盒, 其包括在上述制剂的至少一种中 (在一个或多个容器中) 的上述药物组合物和关于用法说明的使用说明书或信息手册和/或关于所述药物组合物的使用的信息。

[0089] 在一个实施例中, 药物组合物包括如上所限定的本发明的肽, 其用于治疗局部缺血、阿尔茨海默氏病、帕金森氏症、肌萎缩性侧索硬化、中风、外周神经病、脊髓损伤或癫痫。

[0090] 在另一个实施例中, 本发明提供了一种促进神经元的存活的方法, 该方法包括将

本发明的肽或其组合物与神经元接触的步骤。优选地,该方法在体外进行。在其另一个方面,本发明提供了一种保护血脑屏障的内皮细胞免受OGD或局部缺血的方法和组合物。

[0091] 这些发现证明本发明的肽具有用于抑制或改善与兴奋性中毒和缺血性损伤相关的神经损伤事件/途径的能力,或者可以在用于抑制或改善与兴奋性中毒和缺血性损伤相关的神经损伤事件/途径的方法中使用。另外,如本文所包含的在预刺激暴露试验(pre-insult exposure trial)中鱼精蛋白和鱼精蛋白衍生物的作用所示,一个新的重要发现是,神经元在暴露于谷氨酸或OGD前的1至4小时采用鱼精蛋白治疗,可以通过减少细胞死亡引发神经保护反应。这点很重要,因为在许多脑血管(例如颈动脉内膜切除术)和心血管(如冠状动脉旁路移植)的外科手术中,患者有遭受脑缺血或中风导致脑损伤的风险。

[0092] 因此,本发明的方法延伸到在这些手术前的0.25小时至4小时,优选0.5至3小时,更优选1至2小时的时间窗口施用至少一种本发明的肽、药物或药物组合物,以保护大脑免受任何此类脑缺血事件。

[0093] 因此,本发明延伸到使用至少一种本发明的肽用于治疗或预防神经损伤、脑血管损害或损伤、心血管损害或损伤,或用于病人可能有患有脑缺血或中风的风险的外科手术中。

[0094] 本文所公开的本发明的序列的初级氨基酸序列的微小修饰都可能导致蛋白质具有实质上相同或增强的活性。这些修饰可以是特意的,如通过定向诱变,或者可以是偶然的,例如通过生产鱼精蛋白或LMWP的生物体的宿主突变。所有这些修饰都包括在本发明的范围内,只要保有神经保护活性。

附图说明

[0095] 本发明的进一步特征通过以下几个仅用于举例说明本发明的目的的非限制性实施例进行全面的描述。以下的描述不是对如上所述的本发明的概括性总结、公开内容或描述的限制,并且参照附图,以下的描述中的术语“鱼精蛋白”或“Ptm”指的是市售的硫酸鱼精蛋白(由几个制造商制造,包括Sanofi Aventis,尤其指定Hoffman,1990年),而“Ptm1”到“Ptm”5分别指SEQ.ID.NOs 32、33、34、35和36,并且其中:

[0096] 图1a显示了谷氨酸兴奋毒性模型的结果;肽的浓度以 μM 表示。A:神经元暴露于谷氨酸并采用CPPs、阳性对照肽(JNKI-1D-TAT/PYC36L-TAT)和谷氨酸受体阻滞剂(Blkrs;5 μM :MK801/5 μM :CNQX)处理后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SEM;n=4-6;*P<0.05)。

[0097] 图1b显示了谷氨酸兴奋毒性模型的进一步结果;肽的浓度以 μM 表示。神经元暴露于谷氨酸并采用TAT-L和TAT-D肽处理后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SEM;n=4-6;*p<0.05)。

[0098] 图1c显示了谷氨酸兴奋毒性模型的进一步结果。具体地说,当在谷氨酸刺激之前冲净肽时肽的功效;肽的浓度以 μM 表示。当在刺激之前冲净CPPs时,神经元暴露于谷氨酸后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SEM;n=4-6;*P<0.05)。

[0099] 图1d显示了谷氨酸兴奋毒性模型的进一步结果。当在谷氨酸刺激后添加肽时肽的功效。当在刺激后第0或15分钟添加Arg-9和Arg-12肽以及对照肽JNKI-1D-TAT和NR29c时,

神经元暴露于谷氨酸后24小时的神经元存活率;在这个实验中,暴露于谷氨酸的对照组中导致的细胞死亡少于其它实验组(60%对95%)。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SEM;n=4-6;*P<0.05)。

[0100] 图1e显示了谷氨酸兴奋毒性模型的进一步结果;肽的浓度以μM表示。A:神经元暴露于谷氨酸和用R9、R12、R15、R18和R9/tPA/R9处理后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SEM;n=4;*P<0.05)。

[0101] 图1f显示了谷氨酸兴奋毒性模型的进一步结果;肽的浓度以μM表示。神经元暴露于谷氨酸和用R9、E9/R9、DAHK和PTD4处理后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SEM;n=4;*P<0.05)。

[0102] 图1g显示了谷氨酸兴奋毒性模型的进一步结果;肽的浓度以μM表示。神经元暴露于谷氨酸和用R9和NR29c和对照肽PCY36(PYC36L-TAT)处理后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SEM;n=4;*P<0.05)。

[0103] 图1h显示了谷氨酸兴奋毒性模型的进一步结果:温和刺激;肽的浓度以μM表示。神经元暴露于谷氨酸和用R9、R12和NR29c和对照肽JNK(JNKI-1-TAT)处理后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SEM;n=4;*P<0.05)。

[0104] 图1i显示了谷氨酸兴奋毒性模型的进一步结果:温和刺激;肽的浓度以μM表示。神经元暴露于谷氨酸和用R1、R3、R6、R9、R12和NR29c对照肽处理后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SEM;n=4;*P<0.05)。

[0105] 图1j显示了谷氨酸兴奋毒性模型的进一步结果;肽浓度=5μM。神经元暴露于谷氨酸和用R1、R3、旧R9(迈拓)、新R9(中肽生化有限公司)、R12处理后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SEM;n=4;*P<0.05)。

[0106] 图2显示了红藻氨酸兴奋毒性模型的结果;肽的浓度以μM表示。神经元暴露于红藻氨酸和用CPPs、阳性对照肽(JNKI-1D-TAT/PYC36L-TAT)和谷氨酸受体阻滞剂(Blkrs;5μM:MK801/5μM:CNQX)处理后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SEM;n=4;*P<0.05)。

[0107] 图3a显示了体外局部缺血模型的结果。肽出现在体外局部缺血期间且在局部缺血后为50%剂量;肽的浓度以μM表示。在体外局部缺血和用CPPs、阳性对照肽(PYC36L-TAT)和谷氨酸受体阻滞剂(Blkrs;5μM:MK801/5μM:CNQX)处理后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SEM;n=4;*P<0.05)。

[0108] 图3b显示了体外局部缺血模型的进一步结果。肽出现在体外局部缺血后;肽的浓度以μM表示。在体外局部缺血和用R9、R12、R15和R18处理后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SEM;n=4;*P<0.05)。

[0109] 图3c显示了体外局部缺血模型的进一步结果。R9肽出现在体外局部缺血期间且在局部缺血后为50%剂量:bEND3细胞的肽剂量在体外局部缺血期间为10 μ M/在体外局部缺血后为5 μ M。SH-5YSY细胞的肽剂量在体外局部缺血期间为5 μ M/在体外局部缺血后为2.5 μ M。体外局部缺血后24小时的细胞存活率(MTS数据均值 $\pm$ SEM;n=4;*P<0.05)。

[0110] 图4显示了培养物暴露于不同肽浓度后的神经元存活率。肽浓度以 μ M表示。暴露于R3、R6、R9、R12、R15、R18、JNK (JNKI-1D-TAT) 和NR29c肽后24小时的神经元存活率。细胞存活率数据表示为490nm处的MTS吸光度(均值 $\pm$ SEM;n=4)。图5显示了初始动物模型预试验的结果,显示了R9D肽在大鼠永久中脑动脉阻塞(MCAO)中风模型中的功效。R9D肽在MCAO后30分钟静脉注射给药。梗死体积(脑损伤)在MCAO后24小时测量(均值 $\pm$ SD)。

[0111] 图6显示了在谷氨酸盐模型中使用R9、R10、R11、R12、R13和R14的剂量响应研究。均值 $\pm$ SEM:N=4;*P<0.05。(肽浓度以 μ M表示)。

[0112] 图7显示了在谷氨酸盐模型中使用R9D、R13、R14和R15的剂量响应研究。均值 $\pm$ SEM:N=4;*P<0.05。(肽浓度以 μ M表示)。

[0113] 图8显示了在谷氨酸盐模型中使用R6、R7、R8和R9的剂量响应研究。均值 $\pm$ SEM:N=4;*P<0.05。(肽浓度以 μ M表示)。

[0114] 图9显示了谷氨酸兴奋毒性模型的结果;鱼精蛋白浓度以 μ M表示。在暴露于谷氨酸(100 μ M)前采用鱼精蛋白处理神经元培养物15分钟,然后在37 $^{\circ}$ C下暴露于谷氨酸(100 μ M)5分钟。暴露于谷氨酸和用不同鱼精蛋白浓度处理或不处理(谷氨酸对照)后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0115] 图10显示了谷氨酸兴奋毒性模型的结果;鱼精蛋白浓度以 μ M表示。在暴露于谷氨酸(100 μ M)前和暴露于谷氨酸的过程中,采用鱼精蛋白处理神经元培养物15分钟,然后在37 $^{\circ}$ C下暴露于谷氨酸5分钟。暴露于谷氨酸和用不同鱼精蛋白浓度处理或不处理(谷氨酸对照)后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0116] 图11显示了谷氨酸兴奋毒性模型的结果;鱼精蛋白浓度以 μ M表示。神经元培养物暴露于谷氨酸(100 μ M)(在37 $^{\circ}$ C下进行5分钟),仅在此之前采用鱼精蛋白处理神经元培养物5或10分钟。暴露于谷氨酸和用不同鱼精蛋白浓度处理或不处理(谷氨酸)后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0117] 图12显示了谷氨酸兴奋毒性模型的结果;鱼精蛋白和低分子量鱼精蛋白(LMWP)的浓度以 μ M表示。神经元培养物暴露于谷氨酸(100 μ M)在37 $^{\circ}$ C下进行5分钟,在此之前及其期间采用鱼精蛋白或LMWP处理神经元培养物15分钟。暴露于谷氨酸和用不同鱼精蛋白或LMWP浓度处理或不处理(谷氨酸对照)后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0118] 图13显示了谷氨酸兴奋毒性模型的结果;鱼精蛋白和低分子量鱼精蛋白(LMWP)的浓度以 μ M表示。神经元培养物暴露于谷氨酸(100 μ M)在37 $^{\circ}$ C下进行5分钟,在此之前及其期间采用鱼精蛋白或LMWP处理神经元培养物15分钟。暴露于谷氨酸和用不同鱼精蛋白或LMWP浓度处理或不处理(谷氨酸对照)后24小时的神经元存活率。MTS数据表示在以没有刺激对

照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0119] 图14显示了谷氨酸兴奋毒性模型的结果;鱼精蛋白和LMWP浓度以 μ M表示。神经元培养物暴露于谷氨酸(100 μ M;在37℃下进行5分钟),仅在此之前立即或在此之前1或2小时,用鱼精蛋白处理神经元培养物10分钟。在暴露于谷氨酸和用不同鱼精蛋白或LMWP浓度处理或不处理(谷氨酸对照)后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0120] 图15显示了谷氨酸兴奋毒性模型的结果;鱼精蛋白和鱼精蛋白肽1至5("P_{tm} 1至5")的浓度以 μ M表示。神经元培养物暴露于谷氨酸(100 μ M)在37℃下进行5分钟,在此之前用鱼精蛋白和鱼精蛋白肽处理神经元培养物15分钟。暴露于谷氨酸和用不同鱼精蛋白和鱼精蛋白肽浓度处理或不处理(谷氨酸对照)后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0121] 图16显示了氧糖剥夺(OGD)模型的结果;鱼精蛋白浓度以 μ M表示。鱼精蛋白处理神经元培养物在氧糖剥夺(OGD)进行50分钟后立即进行并直到试验结束(24小时)。OGD和用不同鱼精蛋白浓度处理或不处理(OGD)后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有OGD对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0122] 图17显示了氧糖剥夺(OGD)模型的结果;鱼精蛋白浓度以 μ M表示。采用鱼精蛋白处理神经元培养物在OGD进行50分钟后立即进行并直到试验结束(24小时)。OGD和用不同鱼精蛋白浓度处理或不处理(OGD)后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有OGD对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0123] 图18显示了氧糖剥夺(OGD)模型的结果;鱼精蛋白和LMWP浓度以 μ M表示。在OGD进行50分钟前1小时,用鱼精蛋白或LMWP处理神经元培养物10分钟。OGD和用不同的鱼精蛋白浓度预处理或不处理(OGD)后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有OGD对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0124] 图19显示了氧糖剥夺(OGD)模型的结果;鱼精蛋白浓度以 μ M表示。在OGD进行50分钟后,采用鱼精蛋白处理神经元培养物15或30分钟。OGD和用不同鱼精蛋白浓度后处理或不处理(OGD)后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有OGD对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0125] 图20显示了氧糖剥夺(OGD)模型的结果;鱼精蛋白和LMWP的浓度以 μ M表示。在OGD进行50分钟后,采用鱼精蛋白或LMWP处理神经元培养物15分钟。OGD和用不同鱼精蛋白或LMWP浓度后处理或不处理(OGD)后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有OGD对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0126] 图21显示了氧糖剥夺(OGD)模型的结果;鱼精蛋白和鱼精蛋白肽的浓度以 μ M(5 μ M)表示。在OGD进行45分钟后,采用鱼精蛋白处理神经元培养物15分钟。OGD和用不同鱼精蛋白或鱼精蛋白肽浓度后处理或不处理(OGD)后24小时的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有OGD对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=5;*P<0.05)。

[0127] 图22显示了氧糖剥夺(OGD)模型的结果;鱼精蛋白、鱼精蛋白和低分子量鱼精蛋白(LMWP)肽的浓度以 μ M(5 μ M)表示。在OGD进行45分钟后,采用鱼精蛋白处理神经元培养物15分钟。OGD和用不同鱼精蛋白或鱼精蛋白肽浓度后处理或不处理(OGD)后24小时的神经元存

活率。MTS数据表示为在以没有OGD对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0128] 图23显示了使用脑内皮细胞(bEND 3细胞)的氧糖剥夺(OGD)模型的结果;鱼精蛋白的浓度以 μ M表示。就在3个不同OGD期间(2h15min、2h30min和2h45min)之前且直到试验结束(24h),采用鱼精蛋白处理bEND3培养物15分钟。测定OGD后24小时的细胞存活率。MTS数据表示为在以没有OGD对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0129] 图24显示了鱼精蛋白肽暴露于脑内皮细胞(bEND3细胞)的结果;鱼精蛋白浓度为1 μ M。就在OGD(2h30min的持续时间)前,将鱼精蛋白肽1-5(Ptm1-Ptm5)、硫酸鱼精蛋白(Ptm)和低分子量鱼精蛋白(LMWP)添加到bEND3细胞培养物中15分钟。通过MTS法评估OGD后24小时的细胞存活率。MTS数据表示为在490nm处的吸光度值(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0130] 图25显示了鱼精蛋白暴露于脑内皮细胞(bEND3细胞)的结果;鱼精蛋白的浓度以 μ M表示。采用鱼精蛋白处理bEND3培养物0.5、1或2小时。细胞暴露于鱼精蛋白或不处理(对照)后2小时的细胞存活率。MTS数据表示为在490nm处的吸光度值(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0131] 图26显示了鱼精蛋白暴露于脑内皮细胞(bEND3细胞)的结果;鱼精蛋白的浓度以 μ M表示。采用鱼精蛋白处理bEND3培养物2小时。细胞暴露于鱼精蛋白或不处理(对照)后2小时的细胞存活率。MTS数据表示为在490nm处的吸光度值(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0132] 图27显示了在永久中脑动脉阻塞(MCAO)中风模型中,闭塞后30分钟静脉注射R12、R15、R18和鱼精蛋白(Ptm)肽的神经保护功效。肽剂量为1 μ mol/kg(600 μ l:IV)且MCAO后24小时进行梗死评估(均值 $\pm$ SE;n=8-10;*P<0.05)。动物处理是随机的且所有的步骤都采用盲法进行。

[0133] 图28显示了当仅在暴露于谷氨酸的5分钟期间肽存在于神经元培养物中时,R9、R12、R15和R18在谷氨酸兴奋毒性模型中的神经保护功效。测定暴露于谷氨酸后20-24小时的神经元存活率。肽浓度以 μ M表示。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=4;*P<0.05)。

[0134] 图29显示了肽仅在暴露于谷氨酸前存在于神经元培养物中10分钟时,R9、R12、R15和R18在谷氨酸模型中的神经保护功效。谷氨酸后20-24小时测定神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=4;*P<0.05)。

[0135] 图30显示了仅在暴露于谷氨酸前1-5h时肽存在于神经元培养物中10分钟时,R12和R15在谷氨酸模型中的神经保护功效。谷氨酸后20-24小时测定神经元存活率。肽浓度以 μ M表示。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;N=4;*P<0.05)。

[0136] 图31显示了在糖氧剥夺(OGD)模型中,当肽在OGD后立刻添加到神经元培养物中并且在15分钟后移除时,R9、R12、R15和R18的神经保护功效。OGD后20-24小时测定的神经元存活率。肽浓度以 μ M表示。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0137] 图32中显示了当在OGD前1-3h肽存在于神经元培养物中仅10分钟时,R9、R12、R15

和R18在糖氧剥夺中的神经保护功效。OGD后20-24小时测量的神经元存活率。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SD;n=4-6;*P<0.05)。

[0138] 图33显示了在暴露于谷氨酸前和暴露于谷氨酸5分钟期间,肽存在于神经元培养物中15分钟时,PTD4、E9/R9和R9在谷氨酸兴奋毒性模型中的神经保护功效。暴露于谷氨酸后20-24小时测定的神经元存活率。肽浓度以μM表示。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SD;n=4;*P<0.05)。

[0139] 图34显示了在暴露于谷氨酸前和暴露于谷氨酸5分钟期间,肽存在于神经元培养物15分钟时,XIP和PYC36-TAT在谷氨酸兴奋毒性模型中的神经保护功效。暴露于谷氨酸后20-24小时测定的神经元存活率。肽浓度以μM表示。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SD;n=4;*P<0.05)。

[0140] 图35显示了在暴露于谷氨酸前和暴露于谷氨酸5分钟期间,肽存在于神经元培养物中15分钟,NCXBP3在谷氨酸兴奋毒性模型中的神经保护功效。暴露于谷氨酸后20-24小时测定的神经元存活率。肽浓度以μM表示。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SD;n=4;*P<0.05)。图36显示了在暴露于谷氨酸前和暴露于谷氨酸5分钟期间,肽存在于神经元培养物中15分钟,K10、R10和TAT-NR2B9c在谷氨酸兴奋毒性模型中的神经保护功效。暴露于谷氨酸后20-24小时测定的神经元存活率。肽浓度以μM表示。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SD;n=4;*P<0.05)。

[0141] 图37显示了在暴露于NMDA前和暴露于NMDA经过5分钟期间,肽存在于神经元培养物中15分钟时,R15和TAT-NR2B9c在NMDA兴奋毒性模型中的神经保护功效。暴露于谷氨酸后20-24小时测定的神经元存活率。肽浓度以μM表示。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SD;n=4;*P<0.05)。

[0142] 图38显示了在暴露于谷氨酸前和暴露于谷氨酸5分钟期间,肽存在于神经元培养物中15分钟,R8和Ca1/R9在谷氨酸兴奋毒性模型中的神经保护功效。谷氨酸后20-24小时测定的神经元存活率。肽浓度以μM表示。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SD;n=4;*P<0.05)。

[0143] 图39显示了仅在暴露于谷氨酸前,R9D、R12、R15和PYC36-TAT肽添加到神经元培养物中10分钟前,R9D、R12、R15和PYC36-TAT肽用±肝素(20IU/ml)在室温下培养5分钟后其神经保护功效。谷氨酸后20-24小时测定的神经元存活率。肽浓度以μM表示。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SD;n=4;*P<0.05)。

[0144] 图40显示了在暴露于谷氨酸前,神经元培养物以±肝素(40IU/ml)在37℃下培养5分钟,然后添加肽仅在37℃下培养10分钟然后移除时,R9D、R12、R15和谷氨酸受体阻滞剂(B1ks:5μM MK801/5μM CNQX)的神经保护功效。暴露于谷氨酸后20-24小时测定的神经元存活率。肽浓度以μM表示。MTS数据表示为在以没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值±SD;n=4;*P<0.05)。

[0145] 图41显示了在暴露于谷氨酸前和暴露于谷氨酸5分钟期间,肽存在于神经元培养物中15分钟,kFGF、kFGF-JNKI-1、TAT-JNKI-1和JNKI--1TATD在谷氨酸兴奋毒性模型中的神

经保护功效。谷氨酸后20-24小时测定的神经元存活率。肽浓度以 μM 表示。MTS数据表示为在在没有刺激对照作为100%存活率的情况下神经元存活的百分比(均值 $\pm$ SD; $n=4$; $*P<0.05$)。

[0146] 图42显示了在氧糖剥夺前,硫酸鱼精蛋白(Ptm)和R18肽预暴露原代鼠星形胶质细胞15分钟的结果。肽浓度为 $2\mu\text{M}$ 。通过MTS法评价OGD后24小时的细胞存活率。MTS数据表示为在490nm处的吸光度值(均值 $\pm$ SD; $n=4-6$; $*P<0.05$)。图43显示了原代大鼠星形胶质细胞暴露于鱼精蛋白肽1-5(Ptm1-Ptm5)、硫酸鱼精蛋白(Ptm)和低分子量鱼精蛋白(LMWP)的结果;鱼精蛋白的浓度以 μM 表示。用鱼精蛋白处理星形胶质细胞24小时。暴露于鱼精蛋白或不处理(对照)后24小时的细胞存活率。MTS数据表示为在490nm处的吸光度值($n=4$)。

[0147] 图44显示了神经元培养物暴露于谷氨酸后,谷氨酸受体阻滞剂(MK801/CNQX以 $5\mu\text{M}/5\mu\text{M}$)、R9D、R15、PYC36-TAT、TAT、TAT-NR2B9c JNKI-1-TATD、TAT-JNKI-1、kFGF-JNKI-1和kFGF的细胞内钙离子内流动力学。Fura-2 AM用于细胞内钙评估。代表荧光Fura-2 AM示踪剂;添加(箭头)谷氨酸($100\mu\text{M}$ 终浓度)前30秒和添加(箭头)谷氨酸($100\mu\text{M}$ 终浓度)后的神经元培养物的荧光强度(FI)。肽或谷氨酸受体阻滞剂添加到神经元培养物反应10分钟并且在谷氨酸前移除。数值是均值 $\pm$ SE; $n=3$ 。肽浓度是 $5\mu\text{M}$ 。

[0148] 图45富含精氨酸的CPP诱导的神经元细胞表面结构的细胞内吞作用的建议模型的示意图。注:模型适用于神经元突触和外突触质膜和潜在的星形胶质细胞、周细胞、脑内皮细胞、少突胶质细胞和小胶质细胞的质膜。NMDA:N-甲基-D-天冬氨酸受体;AMPA: α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体;NCX:钠钙交换体;VGCC:电压门控性钙通道(例如CaV2.2、CaV3.3);ASIC:酸敏感离子通道;TRPM2/7:瞬时受体电位阳离子通道2和7;mGluR:代谢型谷氨酸受体;VR1:香草酸受体1或瞬时受体电位阳离子通道亚科V成员1;TNFR:肿瘤坏死因子受体;EAAT:兴奋性氨基酸转运体;AQP4:水通道蛋白4;Trk:原肌球蛋白-受体-激酶受体。

[0149] 图46和47是本说明书中所描述和使用的序列的参考表。

具体实施方式

[0150] 在本说明书全文中,除非上下文另有所指,词语“包括(comprise)”或其它变化形式,如“包括(comprises)”或“包括(comprising)”或“包含(include)”或“包含(including)”,将被理解为暗示含有陈述的整体或整体的组,但不是排除任何其他整体或整体的组。

[0151] 本发明涉及分离的肽和包含分离的肽的组合物,及它们的用途。所述分离的肽其特征在于,在神经损伤或者缺血性事件前或后施用所述分离的肽可以减少神经损伤或脑血管缺血性事件(例如以及特别地,中风)的神经退行性效应。因此,施用本发明的组合物降低神经损伤或脑血管缺血性事件之后神经元细胞的损失。令人惊讶的是,申请人现在已经发现,某些CPPs形式的多肽以及具有连续碱性/阳离子氨基酸片段(特别是精氨酸残基,但也包括赖氨酸和色氨酸残基)的多肽表现出神经活性或神经保护活性,并且其本身可作为神经保护剂(即用于治疗神经损伤),即无需与其他神经保护剂或肽融合。因此,本发明涉及长度为10至32个氨基酸的多肽,其中10至22个氨基酸是阳离子氨基酸残基(通常是精氨酸残基),这种多肽通常具有精氨酸,其含量为30%或更高,这种肽在已建立的神经损伤模型中

表现出神经保护活性。这包括聚精氨酸肽、硫酸鱼精蛋白(如从鲑鱼精子得到的鱼精蛋白肽的混合物),及其这些肽的各种版本、类似物、变体或片段,包括鱼精蛋白和低分子量鱼精蛋白(LMWP)及其混合物。

[0152] 本文中使用的术语“氨基酸”或“残基”包括二十种天然存在的氨基酸中的任意一种、任意一种天然存在的氨基酸、非天然存在的氨基酸及其衍生物、类似物和模拟物的D型。任何氨基酸,包括天然存在的氨基酸,可以是市售的或通过本领域中已知的方法合成的。非天然存在的氨基酸的例子包括正亮氨酸(“Nle”)、正缬氨酸(“Nva”)、 β -丙氨酸、L-或D-萘基丙氨酸(naphthalanine)、鸟氨酸(“Orn”)、高精氨酸(homoArg)和其他肽领域公知的其他非天然存在的氨基酸,包括那些描述在M.Bodanzsky的“Principles of Peptide Synthesis,”1st and 2nd revised ed.,Springer-Verlag,New York,N.Y.,1984and 1993(《肽合成原理》,第一和第二修订版,施普林格,纽约市,纽约州,1984和1993)以及Stewart和Young的“Solid Phase Peptide Synthesis,”2nd ed.,Pierce Chemical Co.,Rockford,Ill.,1984(《固相肽合成》,第二版,皮尔斯化学公司,罗克福德,伊利诺伊州,1984),二者通过引用并入本文。

[0153] 常见的氨基酸可以通过它们的全名,标准的单字母表示法(IUPAC),或者标准的三字母表示法表示,例如:A、Ala、丙氨酸;C、Cys、半胱氨酸;D、Asp、天冬氨酸;E、Glu、谷氨酸;F、Phe、苯丙氨酸;G、Gly、甘氨酸;H、His、组氨酸;I、Ile、异亮氨酸;K、Lys、赖氨酸;L、Leu、亮氨酸;M、Met、蛋氨酸;N、Asn、天门冬酰胺;P、Pro、脯氨酸;Q、Gln、谷氨酰胺;R、Arg、精氨酸;S、Ser、丝氨酸;T、Thr、苏氨酸;V、Val、缬氨酸;W、Trp、色氨酸;X、Hyp、羟脯氨酸;Y、Tyr、酪氨酸。本文的组合中任何和所有的氨基酸可以是天然存在的、合成的和其衍生物或模拟物。

[0154] 如本文所用到的“分离的”是指本文所描述的肽不是处于自然状态(例如,它是从天然存在或通常相关的较大的蛋白质分子或细胞碎片中分离),或者是天然存在的蛋白质的非天然存在的片段(例如,所述肽包含少于25%,优选小于10%和更优选小于5%的天然存在的蛋白质)。分离的还可以表示肽的氨基酸序列不是自然生成的,例如,因为该序列是从天然存在的序列改性的(例如通过改变某些氨基酸,包括碱性(即阳离子)氨基酸,例如精氨酸、色氨酸或赖氨酸,或者是因为该序列不包含天然存在的侧翼氨基酸。术语“分离的”可以表示所述肽或氨基酸序列是人造序列或多肽,并且可以是非天然存在的。

[0155] 同样地,“分离的”用于连接编码上述所有肽的核酸,例如,分离的核酸是从与它们本质上相关的邻近的核苷酸中分离,并且可以重组、合成产生,通过纯化生物提取物等产生。分离的核酸可以包含编码上述肽中的一种的一部分以及编码另一种肽或蛋白质的另一部分。分离的核酸也可被标记。所述核酸包含优选用于动物、细菌、植物或真菌用途的密码子。在某些实施例中,分离的核酸是载体,如表达载体,其包括编码上述分离的肽中的一种的核酸。在,例如,Brown J.等,(1979),Methods in Enzymology(酶学方法),68:109; Sambrook J,Maniatis T(1989)(见上文)中提供了一种用于构建任何所需的DNA序列的通用方法。

[0156] 也考虑了肽的非肽类似物,例如,那些提供稳定结构或减少生物降解的肽的非肽类似物。肽模拟类似物可以根据选定的肽用非肽部分替换一个或多个残基来制备。优选地,所述非肽部分允许肽保留它的天然结构,或稳定优选的(例如)生物活性结构。一种从肽制备成非肽模拟类似物的方法公开在Nachman等,Regul.Pept.57:359-370,(1995)。本文所用

的术语“肽”包括上述所有肽。

[0157] 如上所述,本发明的肽可以由天然存在的氨基酸(即L-氨基酸组成)或由D-氨基酸组成(即氨基酸序列包括相对于天然序列的逆向-反向(retro-inverso)顺序的D-氨基酸)。术语“逆向-反向”(“retro-inverso”)是指线性肽的同分异构体,其中序列的方向是反转的并且每个氨基酸残基的手性是颠倒的。因此,本文的任何序列,以L-型存在的本质上作为D-对映体(逆向-反向)肽序列公开了。根据本发明的D-对映体(逆向-反向)肽序列是可以构建的,例如,通过合成相应的天然L-氨基酸序列的反向氨基酸序列。在D-逆向-反面对映体肽中,例如,分离的肽的一组分,交换每个单酰胺键的羰基和氨基的位置,而保留每一个 α 碳的侧链基团的位置。

[0158] 制备上述限定的具有D-对映体氨基酸的本发明的分离的肽组分,可以通过化学合成相应的天然存在的L-型氨基酸序列的逆向氨基酸序列或由本领域技术人员公知的任何其它合适的方法得到。或者,肽或其组分的D-逆向-反面对映体形式可以通过使用上述利用肽或其组分的L-型作为化学合成D-逆向-反面对映体形式的基质的化学合成方法制备。

[0159] 富含阳离子氨基酸的多肽(其也可以称为阳离子氨基酸的聚合物或共聚物)可以包括长度为10至32个氨基酸的多肽或低聚物。这样,“富含阳离子”是指任何肽,寡肽,或多肽,它们通常情况下包含或包括超过30%,超过50%或甚至超过60%的阳离子残基。在某些实施例中,可能需要多肽包括90%阳离子残基,或甚至100%,例如,优选地精氨酸残基。因此,富含精氨酸的多肽(其也可以称为精氨酸的聚合物或共聚物)可以包括长度为10至32个氨基酸的多肽或低聚物。同样地,“富含精氨酸”是指任何肽、寡肽或多肽,其包含或包括10个或更多的精氨酸残基,或超过30%,超过50%或甚至超过60%的精氨酸残基。因此,某些实施例包含多肽,其中100%的氨基酸是精氨酸残基,当在R10至R18和药学上有效的剂量的范围内使用时具有适当的功效和较低的毒性,而在其他情况下,指其多肽具有精氨酸残基的间歇片段(例如包括鱼精蛋白和LMWP的CPPs)。通常,精氨酸残基的片段包括连续的/相连的4至5个精氨酸残基,被其他的氨基酸残基穿插。在优选的实施例中,穿插的氨基酸是赖氨酸(K)残基,因为这些残基通常也具有阳离子电荷。

[0160] 在某些实施例中,精氨酸的聚合物或共聚物包括至少11个连续的精氨酸残基,更优选至少12个连续的精氨酸残基,更优选至少13个连续的精氨酸残基,更优选至少14个连续的精氨酸残基,更优选至少15个连续的精氨酸残基,更优选至少16个连续的精氨酸残基,更优选至少17个连续的精氨酸残基和更优选至少18个连续的精氨酸残基。然而,在某些实施例中,4至5个精氨酸残基的连续序列有可能被其他的非精氨酸残基穿插,例如本文以鱼精蛋白、LMWP和它们的具有神经保护活性或用于治疗神经损伤的功能性变体作为举例的那些。在优选的实施例中,使用的是R15。

[0161] 连续的精氨酸残基可以在多肽的C-端,多肽的N-端,多肽的中心(例如,被非-精氨酸氨基酸残基包围),或在多肽中的任意位置。非-精氨酸残基优选不显著降低聚合物进入细胞的膜转运速率的氨基酸、氨基酸衍生物或氨基酸模拟物,包括(例如)甘氨酸、丙氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、苏氨酸、 α -氨基- β -胍基丙酸、 α -氨基- γ -胍基丁酸和 α -氨基- ϵ -胍基己酸盐。

[0162] 可以进行各种各样的改变,包括以不影响肽功能的方式或有利于肽功能的方式添加不同的侧基。这种改变可能涉及添加或减去电荷组,取代氨基酸,添加亲油基团,其不会

影响结合但是会影响促进跨过血脑屏障转移的分子的整体电荷特性,等。对于每种改变,仅需要常规实验以测试分子是否如本发明所述起作用。人们能简单地作出所需的改变或选择所需的肽,并按照实施例中详细描述地方式应用。例如,如果肽(改性的或未改性的)在对抗红藻氨酸的保护测试中是活跃的,或者,如果这种肽在神经递质功能的测试中与母神经递质竞争,则该肽是一种功能性神经递质肽。

[0163] 本发明还包括所述分离的肽的功能性变体。如本文所用,分离的肽的“功能性变体”或“变体”是一种肽,其包含对分离的肽的原始氨基酸序列的一种或多种改性,并保留本文公开的性质。可作出产生分离的肽的功能性变体的改性,例如,1) 加强分离的肽的性能,如在表达系统中的肽稳定性;2) 为分离的肽提供新的活性或性质,如加入抗原表位或加入可检测部分;或3) 提供产生相同或相似的肽性质的不同氨基酸序列。对分离的肽改性可以制成编码肽的核酸,并且可以包括删除、点突变、截短、氨基酸取代和氨基酸添加。或者,可以直接对肽改性,例如通过切割、添加连接分子(优选可切割的接头,例如MMP、钙蛋白酶、tPA)、添加可检测的部分(如生物素)、添加脂肪酸、一种氨基酸取代为另一种,等等。改性还包括融合蛋白,其包括全部或部分所述分离的肽的氨基酸序列。在一个实施例中,接头选自一个或多个MMP型接头、钙蛋白酶、半胱天冬酶或tPA接头。MMP型接头定义为由基质金属蛋白酶(MMPs)识别和裂解的肽序列。同样地,钙蛋白酶、半胱天冬酶或tPA接头是由这些蛋白酶识别和裂解的肽序列。在某些实施例中,本发明的多肽还融合到其他多肽,这些其他多肽被转运到神经损伤的位点或在神经细胞内转运。同样的,本发明的多肽也可以连接到辅助肽,该辅助肽可以与对神经功能有害的酶结合或者相互作用,所以所述辅助肽可以作为以下通过本发明的肽跨过细胞膜转运的酶的竞争性抑制剂。辅助肽是tPA、钙蛋白酶和MMP,和使用可裂解的接头(如半胱天冬酶序列)连接到本发明的肽,因此tPA、钙蛋白酶或MMP从本发明的肽中释放出来,然后作为对神经功能有害的酶的细胞内竞争性抑制剂。

[0164] 同样的,本发明延伸到一种本发明的肽,如R10-R18或Ptm1-5或LMWP或它们的变体,连接于半胱天冬酶裂解位点,其本身又与钙蛋白酶、tPA或MMP连接。

[0165] 本文所定义的术语“序列同一性”意味着序列进行如下比较。为了确定两个氨基酸序列的同一性百分比,为了最佳比较目的对序列比对(例如,可以在第一氨基酸序列的序列中引入间隙)。然后比较在相应的氨基酸位置的氨基酸。当第一序列中的一个位置被第二序列中相应位置的相同氨基酸占据时,则该分子在该位置是相同的。两个序列之间的同一性的百分比是序列共有的相同位置的数目的函数。例如,据说一个特定的肽相对于具有明确长度的参比多肽具有具体的同一性百分比,所述同一性百分比是相对于参比肽。因而,一种肽与长度为100个氨基酸的参比多肽有50%相同,可以是多肽的50个氨基酸与参比多肽的长度为50个氨基酸的部分完全相同。它也可能是一个长度为100个氨基酸的多肽,它的整个长度有50%与参比多肽相同。这样两个序列的同一性百分比的测定可以使用数学算法来完成。优选的,一种用于比较两序列的数学算法的非限制性例子是Karlin等的算法,(1993),PNAS USA,90:5873-5877。这样的算法并入NBLAST程序,可以用来确定与本发明的氨基酸序列具有所需要的同一性的序列。为了比较目的得到缺口对齐,可以使用缺口BLAST如Altschul等,(1997),Nucleic Acids Res,25:3389-3402中所描述的。当使用BLAST和缺口BLAST程序时,可使用各自程序(例如,NBLAST)的缺省参数。该序列可以利用Genetic Computing Group's(遗传计算组)的GAP(global alignment program(全局比准程序))第9

版进一步对齐,使用缺省(BLOSUM62)矩阵(值-4至+11)与-12的缺口开放罚分(对缺口的第一空缺)和-4的缺口延伸罚分(在缺口中每一个额外的连续的空缺)。对齐后,同一性百分比是通过表达匹配的数目作为所要求保护的序列中的氨基酸数目的百分率来计算。所描述的测定两个氨基酸序列的同一性百分比的方法可以相应地适用于核酸序列。

[0166] 本发明的肽可以直接连接或通过接头连接。在本上下文中的“接头”通常是肽、寡肽或多肽,并可以用于将多个多肽彼此连接。选择彼此连接的本发明的多肽可以是相同的序列,或选自本发明的任何多肽。接头可以有1-10个氨基酸的长度,更优选1至5个氨基酸的长度,最优选1至3个氨基酸的长度。在某些实施例中,接头不需要任何有二级结构形成性能,即不需要 α 螺旋或 β 片状结构形成倾向,例如,接头是由至少35%的甘氨酸残基组成。正如上文所述的,接头可以是可裂解的肽,例如MMP肽通过正常细胞过程可以在细胞内裂解,有效提高预先连接肽的细胞内的剂量,同时保持细胞外剂量足够低,低至不被认为是有毒的。使用一种细胞内/内源性可裂解的肽、寡肽或多肽序列作为接头,允许多肽在递送到目标细胞后彼此分离。在这种情况下可裂解的寡肽或多肽序列还包括蛋白酶可裂解的寡肽或多肽序列,其中通常选择蛋白酶裂解位点是依赖于经处理的细胞内源性表达蛋白酶。如上定义的接头,如果以低聚或多肽序列存在,可以由D-氨基酸或天然存在的氨基酸(即L-氨基酸)组成。作为上述的替代物,多肽的偶联或融合可以通过耦合剂或连接剂(例如交联剂)来完成。可以使用几种分子间的交联剂,例如,Means和Feeney, *Chemical Modification of Proteins* (蛋白质的化学改性), Holden-Day, 1974, 第39-43页。这些试剂是,例如, N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯(SPDP)或N,N'-(1,3-亚苯基)双马来酰亚胺; N,N'-乙烯-双-(碘乙酰胺)或其他这种具有6至11个碳亚甲基桥的试剂; 和1,5-二氟-2,4-二硝基苯。用于此目的其他试剂包括: p,p'-二氟-m,m'-二硝基联苯砒; 二甲基己二亚酰胺化物; 酚-1,4-二磺酰氯; 六亚甲基二异氰酸酯或二异硫氰酸酯,或偶氮苯基-p-二异氰酸酯; 戊二醛和二重氮联苯胺。交联试剂可以是同型双功能,即具有进行相同的反应的两个官能团。优选的同型双功能交联是二马来酰亚胺己烷(BMH)。BMH含有两个马来酰亚胺官能团,其在温和条件下(pH值6.5-7.7)与含巯基的化合物特异性地反应。两个马来酰亚胺基团是通过烃链连接的。因此,BMH对包含半胱氨酸残基的蛋白质(或多肽)的不可逆交联有用。交联剂也可以是异型双功能。异型双功能交联剂有两个不同的官能团,例如胺反应基和硫醇反应基,将分别与具有游离胺和硫醇的两种蛋白质交联。异型双功能交联剂的例子是琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)、m-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯(MBS)和琥珀酰亚胺4-(p-马来酰亚胺苯基)丁酸酯(SMPB、MBS的扩链类似物。这些交联试剂的琥珀酰亚胺基具有伯胺以及硫醇反应的马来酰亚胺,与半胱氨酸残基的硫醇形成共价键。因为交联试剂通常在水中的溶解度低,将亲水性部分如磺酸盐基团添加到交联剂中,以提高其水溶性。硫代MBS和硫代SMCC是交联剂水溶性改性的例子。许多交联试剂产生共轭,在细胞条件下基本上是不可裂解的。因此,一些交联试剂含有共价键,如二硫键,其在细胞条件下可裂解。例如, Traut's 试剂、二硫基(丙酸琥珀酰亚胺)(DSP)和N-琥珀酰亚胺3-(2-吡啶基二硫)丙酸(SPDP)是公知可裂解的交联剂。可裂解的交联试剂的使用允许多肽在递送到靶细胞后分离,必要时,提供的细胞能够裂解交联剂的特定序列。为此目的,直接的二硫键连接也可能是有用的。化学交联还可包括使用间隔臂。间隔臂提供了分子内的灵活性或调整共轭基团之间的分子内距离,从而可能有助于保护生物活性。间隔臂可以以包含间

隔氨基酸的蛋白质(或多肽)的一部分的形式,例如:脯氨酸。或者,间隔臂可能是交联剂的一部分,如在“长链SPDP”(Pierce Chem.Co.,Rockford,Ill.,cat.No.21651H)。许多交联剂,包括上面讨论的,是市售的。它们使用的详细说明很容易从商业供应商获得。蛋白质交联和共轭制备的一般参照:Wong,Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking,CRC Press(1991)。

[0167] 本发明的多肽也可以包含“衍生物”、“变体”或“功能性片段”,即一种肽的序列来自上文定义本发明的肽的天然存在(L-氨基酸)的序列,作为氨基酸序列的一个或多个位点上的一个或多个氨基酸的取代,作为在天然存在序列的任何位点上的一个或多个氨基酸的删除,和/或作为在天然存在的肽的序列的一个或多个位点上的一个或多个氨基酸的插入。如果用作本发明的多肽,“衍生物”应保留其生物活性,例如,任何本发明的多肽衍生物,应保留其神经保护活性。在本发明的上下文中的衍生物也可以以上文限定的它们的L-或D-氨基酸序列的形式存在,或两者共存。

[0168] 如果氨基酸的取代是用于制备本发明的多肽的衍生物,优选保守(氨基酸)取代。保守(氨基酸)取代通常包括以下组中的取代:甘氨酸和丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨酸和谷氨酸;天冬酰胺和谷氨酰胺;丝氨酸和苏氨酸;赖氨酸和精氨酸;苯丙氨酸和酪氨酸。因此,优选的保守取代组是天冬氨酸-谷氨酸;天冬酰胺-谷氨酰胺;缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸;丙氨酸-缬氨酸;和苯丙氨酸-酪氨酸。通过这种突变例如肽的稳定性和/或有效性可能会提高。如果肽中引入突变,肽保持(功能上)一致,例如在序列上,在功能上,和在抗原特性上或其他功能。这种肽的突变部分可以拥有改变了的性能,相对本发明的多肽的非改变序列在某些应用上(例如增加最优pH值、增加温度稳定性等)可能更具优势。

[0169] 本发明的肽的衍生物被认为与本发明的肽的未改性序列具有实质同一性。特别优选的氨基酸序列相对于天然存在的类似物具有至少30%序列同一性,优选至少50%序列同一性,甚至优选至少60%序列同一性,甚至优选至少75%序列同一性,甚至更优选至少80%同一性,但更优选90%同一性和更优选至少95%或甚至99%序列同一性。上文描述了本发明的多肽的功能衍生物的合成或分离的适当方法,以及用于确定两个氨基酸序列的同一性百分比的方法。此外,上述公开的肽衍生物的生产方法是公知的,以及可以根据以下本领域技术人员公知的标准方法进行(例如,参见Sambrook J,Maniatis T(1989))。

[0170] 作为进一步的实施例,本发明提供了包含本文所限定的肽的药物组合物或药物。在某些实施例中,这种药物组合物或药物包含本文所限定的肽以及任意的接头。此外,这种药物组合物或药物可以包括药学上可接受的载体、助剂或媒介物。根据本发明“药学上可接受的载体、助剂或媒介物”指无毒的载体、助剂或媒介物,配制时不会破坏肽的药理活性或生理靶向性。可用于本发明的药物组合物的药学上可接受的载体、助剂或媒介物包括但不限于那些可用于头颅或头颅内,或可以穿过血脑屏障(BBB)的载体、助剂或媒介物。不过,本发明的药物组合物可以包括,离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(如人血清白蛋白)、缓冲物质(如磷酸盐)、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物油脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质(如磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐)、硅胶、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。

[0171] 本发明组合物可口服给药、肠道外给药、通过雾化吸入、局部给药、直肠给药、鼻腔

给药、口腔给药、阴道给药、脑给药或通过植入储库给药。

[0172] 本文中的术语“肠道外”包括皮下、静脉、肌肉、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内、病灶内以及颅内注射或输注技术。该药物组合物通过口服给药、腹膜内给药或静脉给药。本发明的药物组合物的无菌可注射形式可以是水性或油性悬浮液。这些悬浮剂可根据本领域公知技术,使用适当的分散剂或湿润剂和悬浮剂进行配制。无菌可注射的制剂还可以是在无毒的肠道外给药可接受的稀释液或溶剂中的无菌可注射剂溶液或悬浮液,例如,在1,3-丁二醇中的溶液。可接受的媒介物和溶剂可以是水、Ringer's溶液和等渗氯化钠溶液。此外,无菌的固定油通常作为溶剂或悬浮介质。

[0173] 同样地,可以使用任何温和的不挥发油,包括合成的单或双甘油酯。脂肪酸例如油酸及它的甘油酯衍生物在可注射制剂的配制中是有用的,因为它们是天然的药学上可接受的油,如是橄榄油或蓖麻油,尤其以它们的聚氧乙烯化的形式。这些油溶液或悬浮液还可以包含长链醇稀释剂或分散剂,例如羧甲基纤维素或类似的分散剂,其通常用于药学上可接受的剂型,包括乳剂和混悬剂制剂。另外常用的表面活性剂,例如吐温、司盘和其他乳化剂或生物利用度增强剂,它们通常用于如常用于制造药学上可接受的固体、液体或也可用于本发明的配制其他剂型。

[0174] 本文中药学上可接受的组合物可以以任何口服可接受的剂型通过口服给药,包括但不限于,胶囊、片剂、水性悬液或溶液。口服使用片剂的情况下,常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常还加入润滑剂,如硬脂酸镁。以胶囊形式口服给药,有用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当需要口服水性悬液时,活性成分与乳化剂和悬浮剂结合。必要时,还可加入某些甜味剂、调味剂或着色剂。

[0175] 或者,本文所定义的药物组合物可以栓剂的形式用于直肠给药。这种栓剂可以通过药物与适当的无刺激性的辅料混合配制,该辅料在室温下是固体但在直肠温度下为液体,因此,将在直肠中融化以释放药物。这类材料包括,可可油、蜂蜡和聚乙二醇。

[0176] 如本文所定义的药物组合物也可以通过局部给药,尤其当治疗目标包括区域或器官更容易通过局部施用,包括脑、其它颅内组织、眼或皮肤疾病。能够容易地制备适当的制剂用于这些区域或器官中的每个。

[0177] 对于局部施用,本文所定义的药物组合物可制备成合适的药膏,所述药膏包含本文所限定的肽、悬浮或溶解在一种或多种载体中。肽的局部给药的载体包括但不限于,矿物油、液态石蜡、白凡士林、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。或者,本文限定的药物组合物可制备成合适的洗剂或面霜,其包含悬浮或溶解在一种或多种药学上可接受的载体中的肽。合适的载体包括但不限于,矿物油、山梨醇酐单硬脂酸酯、聚山梨醇酯60、十六醇酯蜡、棕榈醇、2-辛基十二醇、苧醇和水。

[0178] 本文限定的药物组合物还可通过鼻腔气雾剂或吸入剂给药。这种组合物可以根据药物剂型领域中公知的技术配制,并且可配制在生理盐水中的溶液,采用苧醇或其他合适的防腐剂、提高生物利用度的吸收促进剂、碳氟化合物和/或其他常见的增溶剂或分散剂。本文中药学上可接受的组合物或药物被配制用于口服或肠胃外给药,例如通过注射。

[0179] 为了治疗的目的,无毒、减少损伤、有效量的肽可用于制备上述限定的药物组合物。因此,一些肽可以与载体材料结合以制备如上所限定的组合物。该药物组合物通常制备成单(或多)剂量的形式,这将根据所治疗的宿主和给药的特定模式而变化。通常,药物组合

物按下述配制,使施用给接受药物组合物的患者的剂量范围为每剂量0.0001至100毫克/公斤体重/天的肽。优选的剂量范围为每剂量0.01毫克/公斤体重/天至50毫克/公斤体重/天,甚至进一步优选的剂量范围为每剂量从0.1毫克/公斤体重/天至10毫克/公斤体重/天。然而,上述的剂量范围和治疗方案可以适宜于任何特定患者,取决于各种因素包括使用具体的肽的活性、年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、给药时间、排泄率、药物组合、治疗医师的诊断和被治疗的特定疾病的严重程度。在这种情况下,可以在初始剂量范围内给药,剂量可以随着治疗时间而变化,例如,在如前所述的范围内增加或减少初始剂量范围。或者,可以通过施用具体的剂量范围以连续的方式给药,从而在整个治疗时间保持初始剂量范围。二者的给药形式可进一步组合,例如,假如剂量范围适应(增加或减少)治疗的不同时期,但单个时期内保持恒定,以便不同时期的剂量范围彼此不同。

[0180] 本发明的药物组合物和/或肽可以用于治疗、改善或预防与损伤细胞的损伤效应相关的疾病,特别是哺乳动物细胞,如本文所公开的,尤其是用于神经损伤的治疗,包括脑中风或脊髓损伤、癫痫、围产期缺氧缺血、脑或脊髓的缺血性或创伤性损伤和中枢神经系统(CNS)中的神经元损害包括但不限于,急性CNS损伤、脑缺血性中风或脊髓脊髓损伤以及缺氧、缺血、机械损伤、神经性疼痛、兴奋性毒性以及相关的损伤。此外,本发明的药物组合物和多肽可用于提供神经活性或神经保护,对抗或者治疗兴奋性毒性和缺血性损伤、兴奋性中毒、缺乏神经营养支持、神经元断裂、神经元损伤,包括例如癫痫、慢性神经退行性病症和类似疾病。在上下文中,兴奋性毒性可以尤其涉及中风、创伤性脑损伤和中枢神经系统(CNS)的神经变性疾病,如多发性硬化(MS)、阿尔茨海默氏病(AD)、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、神经性疼痛、纤维肌痛、帕金森氏病(PD)、围产期缺氧缺血和亨廷顿氏病,本发明均可以治疗。引起神经元周围过多的谷氨酸浓度以及本发明可治疗的其他常见症状是低血糖、脑血管痉挛、苯并二氮杂戒断和癫痫持续状态、视网膜神经节细胞的青光眼/退化,等等。

[0181] 以上限定的与损伤哺乳动物细胞的损伤效应相关的疾病以及本文中提到的进一步的疾病或者紊乱的治疗、改善或预防,通常是在本发明所描述的剂量范围内施用本发明的药物组合物或肽或肽混合物。所述药物组合物或肽可以在兴奋性中毒和/或(缺血性)脑损伤即损伤哺乳动物细胞的损伤效应发作之前施用,或其同时或随后进行;例如,施用药物组合物或肽可以在脑中风或脊髓损伤、脑或脊髓的缺血性或创伤性损伤,通常,中枢神经系统(CNS)神经元损伤后的(长达)1小时(0-1小时)、长达2小时、长达3-5小时或长达24小时或更长时间内进行。在慢性神经退行性疾病(AD、PD、ALS、MS等)治疗可能需要终身每日治疗。

[0182] 本发明的化合物用于治疗时,施用治疗有效量。通常,治疗有效量是指延迟疾病发作,抑制疾病进展,或治愈所治疗的全部特定症状所需要的剂量。治疗有效量具体是指那些理想地能影响中风或其他脑缺血性损伤后的神经元的存活的剂量。通常,治疗有效量将随着受试者的年龄和身体状况以及受试者疾病的性质和程度而变化,所有这些可以由本领域的普通技术人员决定。剂量可由个体医生进行调整,特别是在正在经历任何并发症的情况下。

[0183] 如上所述,本发明的一个方面涉及编码分离的肽或其变体的核酸序列以及它们的衍生物,以及在严格条件下与由上述描述的核苷酸序列组成的核酸分子杂交的其他核苷酸序列。本文所用的术语“严格条件”,是指与本领域所熟悉的参数。核酸杂交参数在汇编这些

方法的参考文献中可以找到,例如:Molecular Cloning:A Laboratory Manual, J.Sambrook,et al.,eds.,Second Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,N.Y.,1989,(分子克隆:实验指南,J.Sambrook等,第二版,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,1989年)或者Current Protocols in Molecular Biology, F.M.Ausubel,et al.,eds.,John Wiley&Sons,Inc.,New York(分子生物学现代方法, F.M.Ausubel等,John Wiley&Sons公司,纽约)。更具体的说,本发明中所用到的严格条件,是指在65℃下,在杂交缓冲液(3.5×SSC,0.02%聚蔗糖,0.02%聚乙烯吡咯烷酮,0.02%牛血清白蛋白,25mM NaH₂PO₄ (pH7),0.5%SDS,2mM EDTA)中杂交。SSC是0.15M氯化钠/0.15M柠檬酸钠,PH=7;SDS是十二烷基硫酸钠;EDTA是乙二胺四乙酸。杂交后,转移了DNA的膜在室温下用2×SSC清洗,然后在65℃下用0.1×SSC/0.1×SDS清洗。

[0184] 此外本发明还提供了试剂盒,其包括至少一种以上所述剂型中的上述药物组合物(在一个或多个容器)和关于用法说明的使用说明书或信息手册和/或关于药物组合物应用的信息。

[0185] 在本说明书中,除非特别说明或者上下文另有规定,提到单步骤、物质组分、步骤的组或物质组分的组应包括那些步骤、物质组分、步骤的组或物质组分的组中的一个和数个(即一个或多个)。

[0186] 本领域的技术人员将理解本文所述的本发明易受变体和改性的影响,不同于其他领域所描述的。需要了解的是本发明包括所有这些功能的变化和改性。本发明也包括本说明书中分别或共同地涉及或指出的所有步骤、特征、组合物和化合物,以及任何和所有的组合或任何两个或两个以上的所述的步骤或特征。本发明并不受本文中具体实施例所描述的范围的限制,具体实施例只是为了例证。如本文所述,等效功能的产品,组合物和方法显然是在本发明的范围内。而且,除非另有指示,本发明不需要过度的使用分子生物学、微生物学、神经生物学、病毒学、DNA重组技术、溶液中的肽合成、固相肽合成、免疫学的常规技术,或者本文所引用的技术进行实验。

[0187] 出乎意料的是,申请人发现某些CPPs,尤其是富含精氨酸的肽显示出神经保护功效,而不需要常规地将其融合到预先鉴定的神经保护肽。这些CPPs中的某些也显示出低毒性并且在低剂量或低浓度是有效的。这些CPPs包括穿膜肽和Pep-1。然而,更出乎意料的是,申请人还发现长链型碱性(如阳离子)氨基酸,例如长度为10至20个(含)残基的聚精氨酸肽,优选长度为10至18个(含)残基的聚精氨酸肽,和某些包含超过10个精氨酸残基的肽,例如鱼精蛋白或LMWP,与这些CPPs相比时,以及尤其与相似浓度的较短的富含精氨酸序列(如R1到R8)相比,显示出能极大地增强神经保护活性。特别是,与上述的CPPs相比,在谷氨酸以及或体外局部缺血损伤模型中试验时,R12、R15、R18均可提高神经保护功效。这两种不同的神经元损伤模型可能激活不同的损伤细胞通路,因此将进一步了解到神经保护范围和本发明的肽的可能作用方式。

[0188] 在本说明书中,缩写词“Arg”后的整数表示肽中精氨酸重复序列的数量。因此,Arg-15(缩写为R15,根据IUPAC命名是精氨酸单字母缩写)指在一个肽结构中连续的精氨酸残基。然而,只要是可行的,本说明将采用单字母氨基酸代码表示,即,R15,例如用于代替Arg-15。

[0189] 涉及神经元细胞死亡的神经障碍

[0190] 神经障碍,比如偏头疼、中风、外伤性脑损伤、脊椎损伤癫痫、围产期低氧-局部缺血和神经退行性疾病,包括亨廷顿氏病(HD)、帕金森氏病(PD)、阿尔茨海默氏病(AD)和肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS),是由长期的脑损伤引起的发病和伤残的主要原因。通常来说,脑损伤涉及一系列的细胞死亡过程,包括细胞凋亡、自噬、坏死性凋亡和细胞坏死,以及影响神经元星形胶质细胞、少突细胞、小胶质细胞和血管内皮细胞(统一被称为神经与血管单元;NVU)。涉及神经损伤的破坏性的触发涉及多种途径,包括谷氨酸盐兴奋中毒、钙过量、氧化应激、蛋白水解酶和线粒体失调。本文所使用的术语“中风”包括任何影响脑或脊髓的缺血性紊乱,如脑或脊髓动脉中血栓栓塞性闭塞、严重的低血压、围产期低氧-局部贫血、心肌梗死、低氧、脑出血、血管痉挛、周围血管病症、静脉血栓、肺栓、短暂性脑缺血发作、肺部缺血、不稳定心绞痛、可逆性缺血性神经损伤、附属溶栓作用、过度凝血条件、脑再灌注损伤、镰状细胞性贫血、中风障碍或医源性引发的缺血期,如血管成形术或脑部缺血。

[0191] 增加神经递质谷氨酸盐的细胞外水平经由兴奋中毒引起的急性和延迟破坏性过程可引起神经元细胞死亡。细胞外谷氨酸盐的积累过度刺激NMDA和AMPA受体,以及随后的VGCCs、NCX、TRMP2/7、ASIC和mGlu受体导致细胞体外的钙离子和钠离子内流,并从细胞储存库中释放结合钙。NMDA受体的过度激活也会触发破坏性分子(如氧化氮、CLCA1;活化钙氯离子通道调节器1、钙蛋白酶, SREBP1:结合蛋白质-1的胆固醇调节器)的生成以及信号通路(如: DAPK;与死亡有关的蛋白激酶, CamKII:钙离子-钙调蛋白-依赖的蛋白激酶II)。细胞内钙的增加引发一系列细胞破坏性事件,包括磷脂酶、蛋白酶、碳酸酶、激酶和一氧化氮合成酶,以及触发细胞死亡通路(如细胞凋亡、自噬、坏死性凋亡和细胞坏死)的激活。

[0192] 因为本文所示的本发明的多肽保护神经元避免死亡,在W02009133247和EP1969003中公开了本发明的肽还能用于治疗 and/或预防阿尔茨海默氏病(AD)、帕金森氏病(PD)、肌萎缩性脊髓侧索硬化、中风、外周神经病或癫痫,还有相应的本文所述的其他相关病理学。因此,本发明针对于治疗帕金森氏病、阿尔茨海默氏病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症、中风、外周神经病、癫痫、脊椎损伤、糖尿病或药物成瘾的方法,其中本发明的药学有效量的任意一种或多种本发明的肽施用给患者。换句话说,根据本发明的肽可用于治疗与局部缺血相关的损伤,还有阿尔茨海默氏病(AD)、亨廷顿氏病(HD)、帕金森氏病(PD)、多发性硬化症(MS)、急性播散性脑脊髓膜炎(ADEM)和肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)、中风,外周神经病、癫痫、脊椎损伤和其他本文所述的相关病理学。

[0193] 在药物应用上,肽也可以包埋在微胶囊中,例如通过共堆积技术或界面聚合(例如分别为羟基甲基纤维素或明胶微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊),在胶体药物释放系统中(例如,胶质体白蛋白微球、微乳液、纳米微粒和纳米胶囊),或粗乳中。这类技术公开在雷明顿的药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)中。也可利用缓释制剂完成。缓释制剂的适当例子包括含有肽的固体疏水性聚合物的半渗透基质,该基质是以成型制品的形式,例如膜或微胶囊。缓释基质的例子包括在Langer等的J.Biomed.Mater.Res.,15:167-277(1981)以及Langer,Chem.Tech.,12:98-105(1982)中描述的多元酯、水凝胶,或者聚乙烯醇、聚乳酸(美国专利号3,773,919、EP 58,481),或不可降解的乙烯-醋酸乙烯酯。

[0194] 在一个实施例中,药物组合物包括如上所述的本发明的肽,用于治疗缺血性损伤、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)、中风、外周神经病或癫痫。在另一个实施例中,本发明提供了促进神经元存活的方法,该方法包括将本发明的肽或其

组合物与神经元接触的步骤。如本文所示该方法可在体外完成。

[0195] 本文中所述的出版物以及其他材料用于阐明本发明的背景,特别是提供与实践相关的其他细节,均是通过引用包含在本文中。本发明在以下例子中进一步描述,但并不限制本发明的范围。

[0196] 实例(下表1、2和5的聚精氨酸和富含精氨酸和富含精氨酸的鱼精蛋白肽)

[0197] 硫酸鱼精蛋白、鱼精蛋白肽和其他肽

[0198] 表5中列出的肽,硫酸鱼精蛋白(鱼精蛋白;Ptm)得自Sanofi Aventis。小分子量鱼精蛋白(LMWP)是由Mimotopes Pty Ltd(迈拓公司)(澳大利亚)合成的。鱼精蛋白肽1-5(Ptm1、Ptm2、Ptm3、Ptm4、Ptm5)由Pepmic Co Ltd(中国)合成。所述肽由HPLC纯化,纯度大于90-98%。所有的肽制备成在生理盐水中的100X储存液(500 μ M),并且根据损伤模型在浓度范围为0.1-10 μ M中进行评估。

[0199] 需要注意的是硫酸鱼精蛋白(鱼精蛋白;Ptm)是Ptm1-Ptm4¹的混合物。鱼精蛋白肽(Ptm、Ptm1-5、LMWP)富含精氨酸。

[0200] 方法(聚精氨酸和富含精氨酸的肽)

[0201] 原代神经元皮质培养

[0202] 皮质培养的建立如现有技术所描述(Melon等,2001)。简而言之,来自E18-E19Sprague-Dawley大鼠的皮质组织是在添加有1.3mM L-半胱氨酸,0.9mM NaHCO₃, 10units/mL木瓜蛋白酶(Sigma,美国)和50units/mL脱氧核糖核酸酶(Sigma)的良伊格尔培养基(DMEM;Invitrogen,澳大利亚)中分离,用冷DMEM/10%马血清冲洗。神经元重悬在含2%B27补充物(B27;Invitrogen)的Neurobasal(Invitrogen)(神经基础培养基(Invitrogen))中。在接种前,96-孔型玻璃管孔(直径6mm,ProTech,澳大利亚)或96-孔塑料板(ProSciTech,澳大利亚)表面涂覆有聚-D-赖氨酸过夜(50ml/孔:50mg/mL;70-150K, Sigma)。然后去除过量的聚-D-赖氨酸,并用Neurobasal(含2%B27;4%胎牛血清;1%马血清;62.5mM谷氨酸盐;25mM2-巯基乙醇;和30mg/mL链霉素和30mg/mL盘尼西林)替换。体外培养第11-12天,神经元铺板,每个孔有约10000个活的神经元。神经元保持在37°C的CO₂培养箱(5%CO₂,95%大气平衡,98%湿度)中,在体外培养第4天,移除1/3的培养基,并用含有丝分裂抑制剂和胞嘧啶阿拉伯呋喃糖苷(1mM终浓度;Sigma)的新鲜的Neurobasal/2%B27替换。在体外培养第8天,将一半的培养基用Neurobasal/2%B27替换。在体外培养第11或12天之后,培养物通常由>97%神经元和1-3%星形胶质细胞组成(Meloni等,2001)。

[0203] 使用的其他细胞系

[0204] 脑内皮细胞系(bEND3)和神经母细胞瘤细胞系(SH-SY5Y)也可用于某些实验中。使用标准技术在DMEM中加入5或15%的胎牛血清培养bEND3和SH-SY5Y细胞。小鼠原代星形胶质细胞的获得和培养,如培养皮层神经元所描述的,除了使用DMEM+10%胎牛血清代替Neurobasal/2%B27外,不使用有丝分裂抑制剂、胞嘧啶阿拉伯呋喃糖苷。

[0205] 细胞穿膜肽和对照肽

[0206] 表1中列出的肽通过Mimotopes Pty Ltd(迈拓公司)(澳大利亚)合成,除了TAT-L(其是由Pepscan Presto(派普斯坎公司)(荷兰)合成)以及R9/tPA/R9、NCXBP3和R9/X7/R9(它们由China Peptide Co.,Ltd(中肽生化有限公司)合成)。列于表2中的肽由China Peptides(中肽生化有限公司)(中国)合成。所述肽由HPLC纯化到纯度大于88-96%。TAT-L、

穿膜肽、R9和Pep-1合成为抗蛋白酶D-逆向-反向形式的L-同种型、TAT-D和Arg9-D,是从D-氨基酸的逆次序合成的(下文中称为D-同种型)(Brugidou等,1995)(表1)。采用D-同种型的融合TAT的JNK抑制肽(JNKI-1D-TAT)以及L-同种型的融合TAT的AP-1抑制肽(PYC36L-TAT)作为阳性对照(表1;Borsello等,2003;Meade等,2010b)。所有的肽制备成在生理盐水中的100X储存液(500μM),并依据损伤模型来在浓度范围0.1-15μM进行评估。TAT-L肽仅用于谷氨酸兴奋中毒模型中。

[0207] 表1:各肽的氨基酸序列、分子量和电荷

[0208]

肽	SEQ. ID. NO.	序列	氨基酸号/精氨酸残基号:分子量(Da)	在 pH 7 时的净电荷	理化性质
R1: Arg-1	1	H-R-OH	1/1:174	1	阳离子
R3: Arg-3	2	H-RRR-OH	3/3:487	3	阳离子
R6: Arg-6	3	H-RRRRR-OH	6/6:955	6	阳离子
R7: Arg-7	4	H-RRRRRR-OH	7/7:1,111	7	阳离子
R8: Arg-8	5	H-RRRRRRR-OH	8/8:1,267	8	阳离子
R9: Arg-9	6	H-RRRRRRRR-OH	9/9:1,424	9	阳离子
R10: Arg-10	7	H-RRRRRRRRR-OH	10/10:1,580	10	阳离子
R11: Arg-11	8	H-RRRRRRRRRR-OH	11/11:1,736	11	阳离子
R12: Arg-12	9	H-RRRRRRRRRRR-OH	12/12:1,892	12	阳离子
R13: Arg-13	10	H-RRRRRRRRRRRR-OH	13/13:2,048	13	阳离子
R14: Arg-14	11	H-RRRRRRRRRRRRR-OH	14/14:2,204	14	阳离子
R15: Arg-15	12	H-RRRRRRRRRRRRRR-OH	15/15:2,360	15	阳离子
R18: Arg-18	13	H-RRRRRRRRRRRRRRR-OH	18/18:2,829	18	阳离子
PTD-4 ^a	14	H-YARAAARQARA-OH	11/3:1,204	3	阳离子
E9/R9 (R9/E9)	15	H-EEEEEEEE-RRRRRRRR-OH	18/9:2,586	0	中性
R9/iPA/R9 或 R9/X7/R9	16	H-RRRRRRRRR-PGRVVG-RRRRRRRRR-OH	25/19:3,452	19	阳离子
DAHK	17	H-DAHK-OH	4/0:469.5	0.1	N/A
NR2B9c-TAT ^b	18	H-GRKKRRQRRR-KLSSIESDV-NH ₂	19/6:2,355		阳离子
D-R9	19	H-rrrrrrr-NH ₂	9/9:1423.73	10	阳离子
TAT-D	20	H-GrrrqrkrG-NH ₂	10/6:1,453	9	阳离子
TAT-L	21	Ac-GRKKRRQRRRG-NH ₂	10/6:1,494	8	阳离子
穿膜肽	22	H-RQIKIWFQNRRMKWKK-NH ₂	16/3:2,246	7	阳离子

[0209]

Pep-1	23	H-KETWWETWWTEWSQPK KKRKV-NH ₂	21/1:2, 847	4	两亲性
PYC36L-TAT ^c	24	H-GRKKRRQRRR-GGLQGRRRQGY QSIKP-NH ₂	26/10:3, 180	13	阳离子
JNKI-1D-TAT ^d	25	H-tdqsrpvqpflnltprkprpp-rrrqrkrG-N H ₂	32/:3, 925	12	阳离子
TAT-JNKI-1 ^d	26	H-GRKKRRQRRR-PPRPKRPTTLNLF PQVPRSQDT-OH	32/9:3, 924. 6	11	阳离子
kFGF-JNKI-1	27	H-AAVALLPAVLLALLAP-PPRPKRPT TLNLFQVPRSQDT-OH	38/3:4, 043. 9	3	疏水性
kFGF	28	H-AAVALLPAVLLALLAP-OH	16/0:1515. 96	0	疏水性
XIP ^e	29	H-RRLLFYKYVYKRYRAGKQ RG-OH	20/5:2621. 14	8	阳离子
NCXBP3 ^f	30	H-RRERRRRSCAGCSRARGS CRSCRR-NH ₂	24/11:2881. 3 4	10. 8	阳离子
Cal/R9	31	Ac-PLFAE-RRRRRRRRR-NH ₂	15/9:2022. 41	8	阳离子

[0210] 在N-端上,H代表游离胺,和Ac代表乙酰基。在C-端上,OH代表游离酸,NH₂代表酰胺。AA=氨基酸。小写字母代码指代氨基酸的D-同种型。^a肽在Ho et al (2001) (Ho等(2001))中有描述,^bNR2B9c-TAT也已知为NA-1 (Aarts等,2002;Hill等,2012),^c肽在Meade等,2010ab中有描述并由Phylogical Ltd进行了分离,^d肽在Borsello等,2003中有描述,^eXIP由He等,1997进行了描述,^f肽是Jane Cross/Bruno Meloni从phylomer肽库(Phylogica Pty Ltd)分离得到。谷氨酸和红藻氨酸和NMDA兴奋性中毒模型和肽的培养

[0211] 在暴露于谷氨酸或红藻氨酸前15分钟,通过去除培养基并添加50μl含有CPPs、对照肽或MK801/CNQX的Neurobasal/2%B27,将肽加到培养孔(96-孔板式)。为诱导兴奋性中毒,将50μl含有谷氨酸(200μM)或红藻氨酸(400μM)或NMDA(200μM)的Neurobasal/2%B27加入到培养孔中(100μM谷氨酸、200μM红藻氨酸和NMDA 100μM终浓度)。培养物在37℃、CO₂培养箱中进行培养,对于谷氨酸暴露来说,培养5分钟,对于红藻氨酸暴露来说,培养45分钟,对于NMDA暴露来说,培养10分钟,该段时间之后,用100μl的50%Neurobasal/2%N2补充物(Invitrogen)和50%平衡盐溶液(BSS;见下文)替换培养基。将培养物在37℃的CO₂培养箱中进一步培养24小时。采用或未采用谷氨酸或红藻氨酸处理的未处理对照接受相同的清洗步骤并添加相同培养基。

[0212] 在一个实施例中,在15分钟CPP培养(5或10μM)后,去除孔中培养基并立刻用300μl BSS清洗,然后添加含谷氨酸(100μM/100μl)的Neurobasal/2%B27。之后,按照之前所述的方法处理培养物。接受或未接受谷氨酸暴露的未处理对照组接受相同的清洗步骤并添加相同的培养基。另外,进行R9肽和JNKI-1D-TAT对照肽的谷氨酸暴露后CPP处理(5μM)实验(post-glutamic acid exposure CPP treatment(5μM) experiment)。在这个实验中,如上所述,神经元暴露于包含在100μl Neurobasal/2%B27中的谷氨酸(100μM)5分钟,该段时间之后去除培养基,并用50μl Neurobasal/2%N2补充物代替,然后,暴露于谷氨酸的第0分钟和第15分钟,加入肽(在BSS中10μM/50μl)。

[0213] 对于谷氨酸暴露前实验(pre-glutamic acid exposure experiment),神经元暴露于肽10分钟,紧接在暴露于谷氨酸前或者暴露于谷氨酸前的1小时、2小时、3小时、4小时或5小时。这一步可通过去除培养物和加入50μl含肽的Neurobasal/2%B27培养基完成。在37℃的CO₂培养箱中10分钟后,去除培养基并用100μL的Neurobasal/2%B27代替(对于含谷氨酸的直接暴露于谷氨酸的培养基,100μM)。在相关肽的预处理期间,去除培养基,用100μl含谷氨酸(100μM)的Neurobasal/2%B27培养基替换。暴露于谷氨酸5分钟后,神经元培养孔按上述方法进行处理。对于所有试验,采用或未采用谷氨酸处理的未处理对照都经过相同的培养步骤并添加相同的培养基。

[0214] 肝素实验

[0215] 肝素(注射)从Pfizer(1000IU/ml)获得。进行两种不同的肝素实验:1.肽与肝素(20IU/ml)在Neurobasal/B27中室温下培养5分钟,在添加到培养孔(50μl)前,在37℃的CO₂培养箱中培养15分钟。培养后,去除孔中的培养基,并用100μl的含谷氨酸(100μM)的Neurobasal/2%B27替换,随后的处理如上所述;2.孔中的培养基用含肝素(50μl;40IU/ml)的Neurobasal/2%B27替换,并在37℃的CO₂培养箱中培养5分钟。培养后,将含有肽或谷氨酸受体阻碍剂(MK801/CNQX)的Neurobasal/2%B27添加到培养孔中,在37℃的CO₂培养箱中进一步培养10min。培养后,去除孔中的培养基并用100μl含谷氨酸(100μM)的Neurobasal/2%B27培养基替换,随后的处理如上所述。对于所有的实验,采用谷氨酸处理的无肝素处理肽对照经过相同的培养步骤并采用相同的培养基添加物。

[0216] 体外局部缺血/OGD模型和肽培养

[0217] 用于原代皮质神经元培养的体外局部缺血模型的建立如现有技术所描述(Meloni等,2011)。简单的说,去除孔中(玻璃96-孔板式)的培养基,并用315μl无葡萄糖平衡盐溶液(BSS;116mM NaCl、5.4mM KCl、1.8mM CaCl₂、0.8mM MgSO₄、1mM NaH₂PO₄;pH 6.9)冲洗,然后添加60μl的含穿膜肽或对照肽(见表1)的BSS。还包括由谷氨酸受体阻滞剂(5μM MK801/5μM 6-氰基-7-硝基喹啉:MK801/CNQX)组成的非肽阳性对照。体外缺血是通过将孔板置于37℃的厌氧培养箱(Don Whitely Scientific,英国;5%CO₂、10%H₂和85%氩气的气氛,98%的湿度)中培养55分钟而引发的。从厌氧培养箱取出后,将60μl的Neurobasal/2%N₂补充物添加到孔中,培养物进一步在37℃、CO₂培养箱中孵化培养24h。在37℃的CO₂培养箱中培养前,对照培养物采用同样的BSS清洗步骤并采用相同的培养基添加物作为缺血性治疗培养物。

[0218] 对于OGD暴露前实验,其步骤与在谷氨酸模型中所描述的一样,除了10分钟肽预处理是利用100μl Neurobasal/2%B27培养基进行的。对照培养物经历同样的BSS清洗步骤并采用相同的培养基添加物作为OGD治疗培养物。

[0219] 体外缺血模型也可用于bEND3细胞、SH-SY5Y细胞和星形胶质细胞。对于bEND3细胞,厌氧培养延长至2-3小时,从厌氧培养箱中移出后,紧接着将60μl DMEM/2%FCS加入到孔中。对于SH-SY5Y细胞,省去第一次BSS清洗步骤(315μl),厌氧培养延长到2-5小时。从厌氧培养箱中移出后,紧接着将60μl的DMEM/2%FCS培养液加入到孔中。对于星形胶质细胞,厌氧培养延长到1:15至2:00小时,从厌氧培养箱移出后,紧接着将60μl的DMEM/2%FCS培养液加入到孔中。

[0220] 体外神经元、bEND3和星形胶质细胞毒性模型和肽培养。

[0221] 对于神经元培养物,通过移除培养基和添加100 μ l的50%Neurobasal/2%N2补充物和含CPPs、JNKI-1D-TAT或TAT-NR2B9c的50%BSS,将肽加入到培养孔(96孔板式)。对照培养物仅加入50%Neurobasal/2%N2补充物和50%BSS培养基。培养物在37℃的CO₂培养箱中培养20小时,然后使用MTS法评估细胞存活率。对于bEND3培养物,通过移除培养基和添加100 μ l含肽的DMEM/2%FCS,将肽加入到培养孔中。对照培养物只添加100 μ l的DMEM/2%FCS。在37℃的CO₂培养箱中培养0.5、1或2小时,然后使用MTS法评估细胞存活率。对于星形胶质细胞培养物,通过移除培养基和加入100 μ l含肽的DMEM/2%FCS,将肽加入到培养孔(96孔板式)中。对照培养物只添加100 μ l的DMEM/2%FCS。在37℃的CO₂培养箱中培养24小时,然后使用MTS法评估细胞存活率。

[0222] 细胞存活率评估和统计分析

[0223] 在刺激后的24小时,通过光显微镜检测神经元培养物,定性评估神经细胞存活率。通过3-(4,5,二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧甲氧基-苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑盐(MTS)法(Promega,澳大利亚)定量检测神经细胞存活率。MTS法测量四唑盐的细胞转化为水溶性的棕色甲瓚盐,并在490nm下进行分光光度法检测。MTS吸光度值可转换成与未处理和已处理对照有关的细胞存活率比例,未处理对照作为100%存活率,并作为平均 $\pm$ SEM。对于使用星形胶质细胞、bEND3和SH-Y5Y细胞的研究,原始的MTS值用于作图。通过ANOVA分析存活率数据,然后进行post-hoc Fischer's PLSD检验, $P < 0.05$ 认为有统计学显著性。所有的试验中使用到4-6孔。

[0224] 大鼠永久局灶性脑缺血模型-实验组和治疗

[0225] 所有治疗采用随机的并采用盲法方式给药。在MCAO后30分钟施用肽(DR9:rrrrrrrrrr-NH₂;R12、R15、R18、硫酸鱼精蛋白;鱼精蛋白)或媒介物(盐水:0.9%氯化钠)处理溶液。包含DR9盐水的肽治疗经由右颈内静脉注射5-6分钟提供1 μ mol/kg或1000nmol/kg的静脉负荷剂量。

[0226] 大鼠永久性局灶性脑缺血模型

[0227] 这项研究是经西澳大利亚大学动物伦理委员会(Animal Ethics Committee of the University of Western Australia)批准的。体重为270克到350克的雄性Sprague Dawley大鼠,在12小时光照-黑暗周期循环的可控居住环境下,自由进食和饮水。实验动物禁食过夜,并遭受永久大脑动脉阻塞(MCAO),如下所示。

[0228] 通过4%异氟醚以及N₂O和O₂按2:1混合掩面引发麻醉。麻醉维持在1.7-2%异氟醚。采用激光多普勒血流仪连续监控(血流量计,AD仪器,澳大利亚悉尼)脑血流量(CBF)。探针位于前囟的1毫米尾侧和4毫米外侧(右)。插管插入右股动脉中以连续监测血压并提供血糖和血液气体读数样本。采用血糖仪(MediSense Products, Abbott Laboratories, Bedford, MA, 美国)测定血糖,并采用血气分析仪(ABL5, Radiometer, 丹麦哥本哈根)测定血气。血压保持在80-100毫米汞柱。在手术过程中,直肠温度保持在37 $\pm$ 0.5℃,必要时用暖风机加热。对于静脉输注,将含肝素的生理盐水泵入PVC管中,并固定在右颈内静脉合适的位置,然后通过背中期肩胛骨切口外化到系绳/旋转系统(Insteck Laboratories, 美国费城),设计该系统允许自由移动。

[0229] 右侧颈总动脉(CCA)经腹颈部切口暴露。经甲状腺上动脉和枕动脉电疗后,分离出颈外动脉(ECA)。结扎和电疗ECA的分离部分以形成残枝。移除颈动脉体并结扎翼腭动脉。具

有0.39毫米直径硅接点的4-0尼龙单丝 (Doccol, Redlands, CA, USA) 通过ECA残枝插入到CCA中, 平卧进入颈内动脉 (ICA) 直到激光多普勒血流仪记录脑血流量的基线下降>30%。在剩下的实验中, 单丝固定在两个地方 (ECA残枝的底部和ICA上)。在动物的头部和腿部切口处给予由哌替啶 (肌肉注射3mg/kg) 和布比卡因术后镇痛 (皮下注射1.5mg/kg) 组成的术后止痛剂。

[0230] 手术后动物置入气候控制室进行恢复, 必要时, 通过冷/热风扇3-4小时, 监测并维持它们的核心体温在 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。

[0231] 组织处理与梗死体积测量

[0232] 在MCAO后24h通过腹腔内注射戊巴比妥钠 (900mg/kg) 处死动物。安乐死后, 移除大脑并放置在0.9%氯化钠的无菌容器中, 然后放置在 -80°C 冰箱中7分钟。然后从大脑与小脑交界处到12毫米喙点冠状切除2毫米厚的切片。切片立即用1%的2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC, Sigma, 圣路易, MO, USA) 在 37°C 下染色20分钟, 然后在室温下用4%福尔马林固色至少18-24小时, 测量脑梗死体积。扫描切片以及操作者无视治疗状况使用ImageJ第3版 (NIH, USA) 分析图像。总的脑梗死体积是由在2毫米切片的两边增加梗塞组织区域决定的。这些测量的区域乘以切片厚度的一半 (1毫米), 通过乘以影响正常半球面积的比来影响正脑水肿。

[0233] 统计分析

[0234] 对于脑梗死体积测量, 通过t-检验 (R9D试验) 或方差分析 (ANOVA) 比较肽治疗组和载体对照组, 然后进行post-hoc Fischer's PLSD检验 (R12、R15、R18和Ptm试验)。

[0235] 实验例1

[0236] 暴露于谷氨酸后神经保护功效

[0237] CPPs TAT-D、R9和穿膜肽以剂量响应方式提供重要神经保护功效 (图1a, 表3)。目测评估损伤后培养物也证实神经保护功效, 其神经元存活率范围从未经谷氨酸暴露处理的培养物的约5%到R9处理的培养物的100%存活。R9是最有效的肽, 具有 $0.78\mu\text{M}$ 的 IC_{50} 值, 其次是穿膜肽 ($\text{IC}_{50}: 3.4\mu\text{M}$) 和TAT-D ($\text{IC}_{50}: 13.9\mu\text{M}$)。Pep-1肽是无效的。谷氨酸受体阻滞剂和对照肽 (JNKI-1D-TAT、PYC36L-TAT) 在这个模型中 (图1a) 中也是高效的。

[0238] 此外, TAT-D肽显示与TAT-L-肽相似水平的神经保护功效 (图1b)。暴露于谷氨酸前, 将CPPs洗净, 只有R9 (在这个实验中) 显示出高水平的神经保护功效 (图1c)。

[0239] 在暴露于谷氨酸后立即加入R9和R12肽, R9和R12肽也是高效的, 在刺激后15分钟加入R9, 是中度有效的。相反, 暴露于谷氨酸后立即加入或15分钟后加入JNKI-1D-TAT和NR29c (也称为TAT-NR2B9c) 肽, 没有显著增加神经元的存活。

[0240] 图1e-j显示肽R1、R3、R6、R9、R12、R15、R18、R9/E9 (也称为E9/R9)、R9/tPA/R9 (也称为R9/X7/R9) 以及对照肽JNKI-1D-TAT和NR29c在谷氨酸模型中具有额外功效的数据。

[0241] 在谷氨酸模型中使用R1、R3、R6、R7、R8、R9、R12、R15和R18的剂量响应研究中显示: i) R1、R3、R6和R7显示出没有至微小的神经保护功效; ii) $5\mu\text{M}$ 的R8显示出神经保护功效, iii) 其他肽的效价顺序是 $\text{R15} > \text{R18} > \text{R12} > \text{R9}$; iv) R15和R18的神经保护功效在高浓度 ($5\mu\text{M}$) 降低; 见表4, 图1e、1i、1j、6、7和8。

[0242] 在剂量响应研究中, 在谷氨酸模型中使用R9、DAHK (白蛋白的最后四个以N-端氨基酸结尾) PTD4 (具有增加33倍的细胞穿透能力的改性TAT肽) (Ho等, 2001年), R9/E9 (Arg-9/Glu-9; 中性肽) 和R9/tPA/R9 (R9位于组织纤溶酶原激活剂酶肽切割位点的侧面) 表明: i)

PTD4和R9/E9显示出没有至微小的神经保护功效;DAHk具有低水平的神经保护功效;和ii) R9/tPA/R9具有R12和R18之间的效力。并且TAT-NR29C肽(C-端NR2B NMDRA受体亚基肽;阻断NMDRA受体和PSD 95蛋白质的通信以阻断NO(一氧化二氮)生产;Aarts等,2002)是无效的。见表4和图1d、g、h。

[0243] 在谷氨酸模型中,肽R12比R9更有效(根据0.625 μ M浓度的神经保护功效),与PCY 36-TAT相比,肽R12和R9都更有效,而NR29c是无效的(图1g)。肽R12比R9更有效(根据浓度在0.5 μ M和1 μ M的神经保护功效),而R1、R3、R6和NR29c是无效的(图1i)。两个不同的公司合成的肽R9在谷氨酸模型中也有相类似的效力(图1j)。

[0244] 肽R9、R12、R15和R18在谷氨酸刺激仅5min时加入到神经元培养物中(图28);或肽R9、R12、R15和R18在神经元培养物预暴露于谷氨酸10min后在刺激前从培养中移出(图29),肽R9、R12、R15和R18是有效的。

[0245] 在谷氨酸刺激前,肽R12和R15加入到神经元培养10分钟、1到4小时,肽R12和R15是有效(图30)。

[0246] 在谷氨酸模型中,肽PTD4显示低水平的神经保护功效,肽E9/R9显示无保护作用(图33),而富含精氨酸的肽XIP和NCXBP3表现出高水平的保护作用(图34、35)。聚赖氨酸-10肽(K10)和TAT-NR2B9c肽分别在谷氨酸模型(图36)和NMDA模型(图37)中显示低水平的神经保护功效。在谷氨酸模型中,R8和R9融合到钙蛋白酶切割位点(Cal/R9)显示中等到高水平的神经保护功效(图38)。图39和40显示在谷氨酸模型中负电荷分子肝素阻断R9D、R12、R15和PYC36-TAT的神经保护功效,但不影响谷氨酸受体拮抗剂(5 μ M K801/5 μ M CNQX)。图41显示在谷氨酸模型中,当JNKI-1肽融合到(非精氨酸)kFGF CPP,JNKI-1肽不依赖于内吞作用摄取,不具有神经保护功效,kFGF肽也是无效的。相反,TAT-JNKI-1和JNKI-1-TATD具有神经保护功效。图44显示谷氨酸处理后,在神经元培养物中,肽R9D、R12、R15和PYC36-TAT、TAT、TAT-NR2B9c、TAT-JNKI-1和JNKI-1-TATD和谷氨酸受体阻滞剂(5 μ M K801/5 μ M CNQX)不同程度的减少钙内流。

[0247] 实验例2

[0248] 红藻氨酸暴露后的神经保护功效

[0249] 暴露于红藻氨酸后,TAT-D、R9和穿膜肽具有神经保护功效,但比在谷氨酸模型中的效力差,并且不总是显示出典型的剂量响应模式(图2,表2)。Pep-1是无效的。R9是最有效力的肽,神经元存活从约20%增加到最大值约80%。R9、穿膜肽和TAT-D的IC₅₀值分别为0.81、2.0及6.2 μ M。在这个模型中,谷氨酸受体阻滞剂、JNKI-1D-TAT和PYC36L-TAT也是有效的(图2)。

[0250] 实验例3

[0251] 体外局部缺血/氧糖剥夺(OGD)后的神经保护功效

[0252] 以下体外缺血后,四个CPPs都显示出神经保护功效(图3,表2)。Arg-9(IC₅₀:6.0 μ M)和TAT-D(IC₅₀:7.1 μ M)的神经保护功效相似;剂量响应模式后的效力和神经元存活率从约10%增至40-50%。随着穿膜肽浓度($\geq 5\mu$ M)的增加,神经保护功效消失,而Pep-1是唯一在较低浓度(1-5 μ M)具有神经保护功效。在此模型中,谷氨酸受体阻滞剂和PYC36L-TAT也是有效的(图3a)。

[0253] 此外,当体外局部缺血后,加入R9、R12、R15和R18显示神经保护功效,但较高浓度

的R15和R18功效降低(图3b)。

[0254] 当暴露于体外局部缺血中时,R9也减少了bEND3和SH-5YSY细胞死亡(图3c)。当暴露体局部缺血时,R18也减少了星形胶质细胞死亡(图42)。

[0255] 图6显示在谷氨酸模型中,使用R9、R10、R11、R12、R13和R14的剂量响应研究,表明所有肽的浓度在1和5 μ M之间具有明显的神经保护功效,除了R11,其在浓度2和5 μ M具有明显的神经保护功效。均值 $\pm$ SEM:N=4;*P<0.05。

[0256] (肽浓度以 μ M表示)。

[0257] 图7显示在谷氨酸模型中,使用R9D、R13、R14和R15的剂量响应研究,表明了所有肽在浓度为1至5 μ M之间具有神经保护功效。均值 $\pm$ SEM:N=4;*P<0.05。

[0258] (肽浓度以 μ M表示)。

[0259] 如图8所示,在谷氨酸模型中,使用R6、R7和R8、R9的剂量响应研究表明,肽R8和R9分别在浓度5 μ M和1 μ M和5 μ M显示出明显的神经保护功效,而R6和R7没有显示明显的神经保护功效。均值 $\pm$ SEM:N=4;*P<0.05。(肽浓度以 μ M表示)。图31显示使用R9、R12、R15和R18的剂量响应研究,在OGD后加入肽培养15min。R12、R15和R18在浓度为1 μ M和5 μ M时具有神经保护功效,但R9在1 μ M和5 μ M没有神经保护功效。

[0260] 在OGD之前,肽R12和R18加入到神经元培养物中10分钟、1至3小时,肽R12和R18是有效的(图32)。

[0261] 表3:三个损伤模型中细胞穿膜肽和对照肽的IC50值

[0262]

肽	SEQ. ID. NO.	IC50: 谷氨酸模型 (μ M)	IC50: 红藻氨酸模型 (μ M)	IC50: 体外局部缺血模型 (μ M)
Arg-9 (R9)	6	0.78	0.81	6.0
TAT-D	20	13.9	6.2	7.1
穿膜肽	22	3.4	2.0	N/A
Pep-1	23	N/A	N/A	>15
PYC36L-TAT#	24	1.5	-	-
JNKI-1D-TAT#	25	2.1	6.5	-

[0263] *图1a、图2和图3a示出了基于剂量的响应图。#JNKI-1D-TAT和PYC36L-TAT肽的IC50值来自Meade等,(2010a,b)。N/A=不适用,因为肽在较高剂量是无效的或增加了细胞死亡。-=未获得数据。

[0264] 表4:谷氨酸模型*中聚精氨酸肽的IC50值

[0265]	肽	SEQ. ID. NO.	IC50: 谷氨酸模型 (μM)	95%置信区间 (μM)
	Arg-1 (R1)	1	>5 μM	N/A
	Arg-3 (R3)	2	>5 μM	N/A
	Arg-6 (R6)	3	>5 μM	N/A
	Arg-9 (R9)	6	0.83	0.16 - 4.1
	Arg-12 (R12)	9	0.44	0.16 - 1.2
[0266]	Arg-15 (R15)	12	0.19	0.06 - 0.6
	Arg-18 (R18)	13	0.24	0.08 - 0.75
	R9/tPA/R9	16	0.29	0.06 - 1.4

[0267] *图1e示出了基于剂量响应图。N/A=不适用,因为肽在最高浓度(5 μM)实验中无效或效果很小。

[0268] 实验例4

[0269] 动物试验

[0270] 在已经进行的初期动物试验中,表明Arg-9 (R9)、R18和鱼精蛋白(Ptm)在体内具有神经保护活性。这些试验表明在大鼠永久大脑中动脉阻塞(MCAO)中风模型中R9D肽的功效。R9D肽是在MCAO后30分钟进行静脉注射施用。测量MCAO后24h脑梗死体积(脑损伤)(均值 $\pm$ SEM)。从图5和图27可以看出,(Ns=每组8-12只动物)经R9D、R18、鱼精蛋白(Ptm)治疗减少MCAO中风后脑梗死体积(脑损伤)约20%,表明具有统计学显著性的神经保护功效。

[0271] 一般性意见和讨论

[0272] 申请人对皮层神经元培养物暴露于谷氨酸、红藻氨酸或体外局部缺血(氧糖剥夺)后,作为已知的神经保护功效例子的TAT以及其他3种CPPs(穿膜肽、R9和Pep-1)的神经保护性能进行评价。

[0273] 此外,在使用体外缺血模型在星形胶质细胞、脑内皮细胞系(bEND3)和/或神经母细胞瘤细胞系(SH-SY5Y)中对聚精氨酸肽(R9、R12、R15、R18)和/或富含精氨酸的鱼精蛋白肽进行评价。

[0274] R9、穿膜肽和TAT-D在谷氨酸(IC50:0.78、3.4、13.9 μM)损伤模型和红藻氨酸(IC50:0.81、2.0、6.2 μM)损伤模型中显示出一致的和高水平的神经保护活性,而Pep-1是无效的。

[0275] 在谷氨酸模型中TAT-D同种型与TAT-L同种型具有相似的功效。在神经元暴露于谷氨酸前洗净,R9表现出功效。然而,R9比起之前已经被证明具有神经保护功效的肽,具有更为明显的功效,即TAT-D、TAT-L、PYC36L-TAT和JNKI-1D-TAT。

[0276] 在体外局部缺血后神经保护功效是更多变的。所有肽提供某种程度的神经保护功效(IC50;R9:6.0 μM ,TAT-D:7.1 μM ,穿膜肽/Pep-1:>10 μM)。阳性对照肽JNKI-1D-TAT(JNK抑制肽)和/或PYC36L-TAT(AP-1抑制肽)在所有模型中具有神经保护功效。

[0277] 在谷氨酸治疗实验后,在刺激后立即加入R9是高效的,在刺激后15分钟加入R9是中度有效的,而在刺激后加入JNKI-1D-TAT对照肽是无效的。

[0278] 在已进行的初期动物试验中,表明R9、R12、R18和鱼精蛋白在体内具有神经保护活性。

[0279] 在谷氨酸模型中,使用R1、R3、R6、R9、R12、R15和R18的剂量反应研究表明:i) R1、R3、R6、R7显示出神经保护功效;ii) 其他肽的效价顺序是R15>R18>R12>R9;和iii) R15和R18在高浓度(5 μ M)测试时神经保护功效降低。

[0280] 在谷氨酸模型中,使用R9、DAHK(白蛋白的最后四个以N-端氨基酸结尾)PTD4(具有增加33倍的细胞穿透能力的改性TAT肽;Ho等,2001年),R9/E9(Arg-9/Glu-9;中性肽)和R9/tPA/R9(R9位于组织纤溶酶原激活剂酶肽切割位点的侧面)剂量响应研究表明:i) PTD4和R9/E9显示出神经保护功效;DAHK具有低水平的神经保护功效;和ii) R9/tPA/R9具有R12和R18之间的效力。并且TAT-NR2B9C肽(C-端NR2B NMDRA受体亚基肽阻断NMDRA受体和PSD 95蛋白质的通信,以阻断NO(一氧化二氮)生产;Aarts等2002)。聚精氨酸和富精氨酸的(鱼精蛋白)肽也能降低体外局部缺血后星形胶质细胞、bEND3和SH-SY5Y细胞的死亡。

[0281] 这些研究结果表明,本发明的肽具有抑制与兴奋性和缺血性损伤有关的神经破坏事件/途径的能力。具有 ≥ 9 个精氨酸氨基酸残基的聚精氨酸肽尤其具有神经保护功效。

[0282] 本发明的肽的细胞保护性质表明它们是损伤后递送神经保护药物到CNS的理想分子载体和/或它们本身作为潜在的神经保护剂。

[0283] 因此本发明的肽在不同体外损伤模型中表现出神经保护性质,已经表明所述体外损伤模型能够转换成体内模型。在进行的初始动物试验中神经保护功效进一步加强。R9优越的神经保护功能是意想不到的;在谷氨酸模型和红藻氨酸模型中R9的IC₅₀值分别比TAT-9强17倍和7倍,是唯一一种甚至在神经元暴露于谷氨酸前洗净仍有神经保护功效的肽。这一发现表明增加精氨酸残基和/或略高的R9净电荷(10vs 9,pH=7)是兴奋性毒性后的神经保护功效的重要因素。此外,在神经元暴露于谷氨酸前冲洗,除了R9,TAT和穿膜肽的效力损失的确切原因还不清楚,这可能和R9胞内吸收速度有关,而不是胞外机制。这得到以下发现的支持,暴露于谷氨酸后加入R9是有效的,而JNKI-1D-TAT肽是无效的。

[0284] 此外,当在谷氨酸损伤模型中对精氨酸和聚精氨酸肽R1、R3、R6、R9、R12、R15和R18进行评估,只有肽R9、R12、R15和R18在剂量测试中具有显著神经保护功效;R15看起来是最有效的肽。含tPA裂解连接位点的杂交R9肽(R9/tPA/R9)在谷氨酸模型中也是高效的。当在暴露于谷氨酸后加入,R9也比R12更有效。有趣的是,PTA4(具有增加33倍的细胞穿透能力的改性TAT肽,;Ho等,2001年),R9/E9混合物和NR29c(阻断NMDA/谷氨酸受体诱发NO生成的TAT融合肽)和DAHK(白蛋白最后四个以N-端氨基酸结尾),在暴露于谷氨酸后很大程度上无效。

[0285] 在体外缺血模型中,厌氧培养(即损伤再灌注阶段中)后加入肽R9、R12、R15和R18也是有效的。体外局部缺血后,R9也能够保护脑内皮细胞(bEND3细胞)和神经母细胞瘤细胞(SH-5YSY)。

[0286] 如上文所述,研究的结果证明,穿膜肽和Pep-1也具有神经保护性质。穿膜肽和Pep-1肽相互之间或与TAT/R9肽没有氨基酸序列相关性。有趣的是穿膜肽在兴奋毒性模型中具有高神经保护功效(IC₅₀s:3.4和2 μ M),但在体外缺血模型中效力降低,随着浓度的增加效力降低。Pep-1肽在兴奋性模型中通常无效并且在一些实验中,似乎会增加神经元死亡

(数据未显示),但在体外缺血后低浓度下表现出神经保护功效。有趣的是,在神经元培养物暴露于谷氨酸之前从神经元培养物中洗净穿膜肽,目测观察显示一些早期的神经保护功效(数据未显示)。因此,在损伤模型中,穿膜肽和Pep-1行为互相不同,并且和TAT/R9肽不同。

[0287] 在兴奋性和缺血性损伤模型中,四种CPPs不同的神经保护响应可能与多肽的理化性质有关,更具体地说是与它们的诱导内吞性质有关。此外,有可能的是,CPPs的神经保护功效是在细胞膜(如受体、离子通道)进行介导的。Xu等(2008)认为TAT可能改变细胞膜,从而影响了细胞表面受体的功能(比如NMDA受体),使得钙内流减少。

[0288] 然而,可以预见的是,本发明的肽或多种肽能够阻止NMDA受体作用和/或阻止、抑制或减慢钙的内流。替代机制是CPPs与外线粒体膜相互作用并稳定外线粒体膜,从而有助于保持线粒体功能。潜在的益处是维持ATP合成、减少活性氧产生和提高钙处理。为此,申请人已经观察到Arg-9可以提高正常神经元和损伤后MTS吸光度水平并超过基线水平(如图1A、15 μ M)。由于MTS对甲瓚产物的减少主要发生在线粒体中,Arg-9增强甲瓚水平的能力,有利于肽改善线粒体功能。尤其涉及R9和TAT的另一种潜在机制是这些富精氨酸肽抑制钙依赖性前蛋白转化酶弗林蛋白酶(Kacprzak等,2004),从而阻止潜在破坏性的蛋白质的激活。

[0289] 本发明证明富含阳离子氨基酸的CPP,尤其是富含精氨酸的CPPs或载体-肽(例如R12、R15、鱼精蛋白),相对于CPPs,大体上显示出高水平的神经保护功效。这就提出了一种可能性,融合到CPP的神经保护肽的作用机制很有可能的是,如果不是完全是,载体-肽的增强的神经保护功效的结果。此外,其中富含精氨酸的CPPs发挥它们神经保护功效的机制可能与细胞内吞作用(主要的载体肽细胞摄取路线)有关,而不是通过与具体的细胞质靶点相互作用。与此相反的是,融和到载体-肽的神经保护肽,通过内吞作用进入细胞,在神经肽可以与其细胞质靶点相互作用之前,必须首先逃脱核内体,这是一个众所周知的非常无效的过程(Al-Taei等,2006;El-Sayed等2009;Appelbaum等,2012;Qian等,2014),因此致使肽很可能不能通过与其预定目标作用而起作用。

[0290] 关于CPP细胞内进入,主要机制被认为是通过内吞作用(巨胞饮)(Palm-Apergi等,2012)。虽然与本发明不太相关,最近一份报告已证明运载货物(cargo)的性质也可通过某种CPPs促进直接进入细胞机制(Hirose等,2012)。然而,可能高度相关的是具体物体、肽或其他物质是如何通过加强其神经保护功效、提高转运效率和/或Cardozo等(2007)所证明的增加它们的毒性来影响CPPs。特别重要的是,因为如上文所述,运载货物本身具有神经保护,这使得识别CPP和运载货物之间的神经保护功效是非常困难的。例如,现有研究(Meade等,2010a),在谷氨酸模型中从PYC36肽到TAT-D肽(AM8D-TAT)添加三个氨基酸残基(Pro、Lys、Ile)导致IC₅₀值从TAT-D的>15 μ M降到AM8D-TAT的1.1 μ M。

[0291] TAT肽对照的正面效果并不总是可以观察到的。存在很多可能的解释以及处理这个问题:首先必须区分仅使用TAT肽(即GRKKRRQRRRG)的研究与使用融和到报导蛋白质或肽(例如透明质酸(HA)和/或6倍组氨酸标记,杂交肽)的TAT作为对照的研究(如绿色荧光蛋白(GFP)、 β -半乳糖)。关于使用TAT肽本身作为对照的研究,在使用的剂量下和/或损伤模型太严重不能显示TAT的神经保护功效,TAT有可能是无效的。例如,Boresello等,(2003年)在皮层神经元培养物暴露于100 μ M NMDA 12、24或48小时后,并未检测到TAT肽具有神经保护功效。与此相反,L-JNKI-1肽在12和24小时有效,而蛋白酶抵抗D-JNKI-1肽在所有的时间点均有效。考虑到JNKI-1肽与TAT肽相比,JNKI-1肽具有优越的功效,浓度测试时,TAT有可能无

神经保护功效或由于NMDA刺激严重性任何神经保护功效都被压制。Ashpole和Hudmon (2011年) 研究发现, 皮质神经元培养物暴露于谷氨酸后, 观察到TAT肽的适度保护作用。此外, 作者推断由于TAT肽几乎没有保护作用, 观察CAMKII抑制肽的神经保护功效并不是因为“导入序列”(即TAT)。不过, 也不排除CAMKII抑制肽增加TAT肽的效价。最后, TAT肽可能在具体的损伤模型和细胞类型中才具有神经保护性质。

[0292] 在使用融和到报导蛋白或对照肽的TAT研究中, 除了以上提出的几点, 对照蛋白/肽也有可能抑制或抵消TAT肽的神经保护性能。基于许多已经使用融合有蛋白质/多肽的TAT作为对照并显示不具有神经保护功效的研究, 情况似乎是这样的 (例如Kilic等, 2003; Doeppner等, 2009)。然而, 需要记住, 蛋白质是CPP是不争事实, 但并不意味着它将具有神经保护功效, 这可通过PTD-4肽 (具有比TAT本身好33倍的转导效率的改性TAT肽; Ho等, 2001年) 几乎不具有神经保护性能这一事实进行证明。

[0293] 表5: 不同的鱼精蛋白 (鲑鱼) 肽的氨基酸序列; 氨基酸残基/精氨酸残基和分子量。

SEQ ID NO.:	序列名	类型	其他信息	序列	丙氨酸/精氨酸残基	分子量 (da)
[0294]	–	鱼精蛋白硫酸盐混合物; Ptm	多肽混合物	可注射/IV 型	鱼精蛋白 1 – 鱼精蛋白 4 ¹	32/21 ≈4, 500
[0295]	32	鱼精蛋白 1; Ptm1	多肽	峰 1 HPLC ^a	PRRRRRSSSRPIRRRRRPRASRRRR RGRRRR	32/21 4, 236
	33	鱼精蛋白 2; Ptm2	多肽	峰 2 HPLC ^a	PRRRRSSRRPVRRRRRPRVSRRRRR GGRRRR	31/21 4, 163
	34	鱼精蛋白 3; Ptm3	多肽	峰 3 HPLC ^a	PRRRRSSRRPVRRRRRPRVSRRRRR GGRRRR	31/20 4, 094
	35	鱼精蛋白 4; Ptm4	多肽	峰 4 HPLC ^a	PRRRRASRRIRRRRRPRVSRRRRRG GRRRR	30/21 4, 064
	36	鱼精蛋白 5; Ptm5	多肽	SwissProt ^c	PRRRRSSRRPVRRRRRPRVSRRRRR RGRRRR	32/21 4, 250
	37	低分子量鱼精蛋白 (LMWP)	多肽	源自鱼精蛋白 ^b	VSRRRRRRRGRRRR	14/10 1, 880
	38	鱼精蛋白 5 核苷酸序列	Ptm 5, DNA 编码序列	SwissProt ^c	5' ATGCCAGAAAGACGCAGATCC TCCAGCCGACCTGTCCGAGGCG CCGCCGCCCTAGGGTGTCCCGAC GTCGTCGAGGAGAGGAGGCCGC AGGAGGCGT-3'	N/A N/A

[0296] (鱼精蛋白肽序列 (鲑鱼) 存在于硫酸鱼精蛋白中, 用于临床使用或者SwissProt数据库。[a = 硫酸鱼精蛋白¹的HPLC检测到的峰1-4; b = SwissProt数据库中的序列 (Swissprot:P14402)。(1) Hoffmann JA1, Chance RE, Johnson MG. 1990. Purification and analysis of the major components of chum salmon protamine contained in insulin formulations using high-performance liquid chromatography. (采用高效液相色谱法纯化与分析含有大麻哈鱼鱼精蛋白的胰岛素剂的主要成分), Protein Expr

Purif.1 (2):127-33. (2) Chang LC, Lee HF, Yang Z, Yang VC. 2001. Low molecular weight protamine (LMWP) as nontoxic heparin/low molecular weight heparin antidote (I): preparation and characterization (作为无毒肝素的低分子量鱼精蛋白 (LMWP) /低分子量肝素解毒剂). PharmSci. 3 (3):E17).

[0297] 实验例1

[0298] 暴露于谷氨酸后的神经保护功效

[0299] 具有硫酸鱼精蛋白 (鱼精蛋白; Ptm) 具有重要神经保护功效存在剂量响应关系 (图9、10、12、13、15)。损伤后培养的目测评估也证实硫酸鱼精蛋白的神经保护功效, 从未处理的暴露于谷氨酸的培养物约5%存活率到鱼精蛋白处理的培养物85-100%存活率之间。此外, 预暴露于鱼精蛋白5或10分钟也具有高神经保护功效, 使得100%神经元存活 (图11)。在剂量响应试验中, 低分子量鱼精蛋白 (LMWP)、鱼精蛋白1 (Ptm1)、鱼精蛋白2 (Ptm2)、鱼精蛋白3 (Ptm3)、鱼精蛋白4 (Ptm4)、鱼精蛋白5 (Ptm5)、肽均具有神经保护功效 (图12、13、15)。

[0300] 在预暴露于鱼精蛋白和LMWP的试验中, 当神经元在谷氨酸刺激前立即以及谷氨酸刺激前1或2小时暴露于鱼精蛋白中, 鱼精蛋白具有神经保护功效, 而仅在谷氨酸刺激前立即暴露于LMWP中, LMWP具有神经保护功效 (图14)。

[0301] 实验例2

[0302] 氧糖剥夺 (OGD) 后的神经保护功效

[0303] 在OGD模型中, 在OGD刺激前1小时 (图18) 或OGD刺激后 (图16、17), 用鱼精蛋白肽处理神经元, 鱼精蛋白具有神经保护功效。此外, OGD后加入鱼精蛋白15min或30min也具有神经保护功效 (图19、20、21、22)。神经元在OGD前1小时预暴露于LMWP, LMWP不具有神经保护功效, 但OGD后加入LMWP 15分钟, 具有神经保护功效。此外在OGD后加入鱼精蛋白肽 (Ptm1-Ptm5) 和LMWP15分钟, 肽Ptm2、Ptm4、Ptm5和LMWP均具有神经保护功效 (图22)。

[0304] 实验例3

[0305] 氧糖剥夺 (OGD) 后对bEND3细胞的保护

[0306] 在OGD模型中, 在OGD前15min用鱼精蛋白、鱼精蛋白4 (ptm4) 处理血脑屏障 (bEND3) 内皮细胞时, 上述肽对血脑屏障 (bEND3) 内皮细胞有保护作用 (图23、24)。此外, 根据MTS法检验, bEND3暴露于浓度范围从1.25-15 μ M的鱼精蛋白中0.5-2小时, 不会产生显著性的毒性 (图25、26)。图43显示暴露24小时后, 浓度从2.5到10 μ M的Ptm1-Ptm5和低分子量鱼精蛋白 (LMWP) 没有引起星形胶质细胞显著地死亡。

[0307] 一般意见和讨论

[0308] 申请人评估了在皮质神经元培养物暴露于谷氨酸后或体外局部脑缺血后, 富含精氨酸的硫酸鱼精蛋白 (鱼精蛋白; Ptm), 鱼精蛋白肽1-5 (Ptm1-Ptm5, SEQ. ID. NOs分别为32到36), 和低分子量鱼精蛋白 (LMWP, SEQ. ID. NO. 37) 对皮质神经元的神经保护性能。这两种损伤模型通常用于模仿缺血性脑中风的效果。

[0309] 申请人还评估了鱼精蛋白肽保护血脑屏障 (bEND3) 内皮细胞免于OGD的应用。

[0310] 鱼精蛋白在谷氨酸和OGD损伤模型中都显示出一致的和高水平的神经保护功效, 同时鱼精蛋白bEND3细胞中也提供保护。LMWP在神经元谷氨酸和OGD损伤模型中的效果略差 (根据剂量浓度以达到与鱼精蛋白等效的神经保护功效)。这最可能是由于LMWP肽几乎不含精氨酸残基。鱼精蛋白肽1-5 (Ptm 1-Ptm5) 在谷氨酸模型中也具有高效的神经保护功效, 而

Ptm2、Ptm4和Ptm5在OGD模型中具有神经保护功效。

[0311] 在使用bEND3细胞的OGD研究中,在不同的OGD期间后(2h:15min、2h:30min或2h:45min),bEND3细胞预暴露于鱼精蛋白15分钟,显著增加细胞存活率,从而起保护作用。此外,在OGD模型中,预暴露于Ptm4 15分钟,也可显著增加细胞存活率,从而起保护作用。

[0312] 在bEND3毒性研究中,使用不同浓度的鱼精蛋白,表明鱼精蛋白即使浓度高达15 μ M,其不具有毒性。

[0313] 这些研究结果表明,本发明的鱼精蛋白肽具有抑制与兴奋性和缺血性损伤有关的神经破坏事件/途径的能力。并且,由于在预曝光试验中鱼精蛋白的效果,一个新的重要发现是在神经元暴露于谷氨酸或OGD前1到2小时,鱼精蛋白处理神经元可以通过减少细胞死亡引起神经保护响应。这是重要的,因为有大量的脑血管(例如颈动脉内膜切除术)和心血管(如冠状动脉旁路移植术)手术中,患者有可能遭受缺血性脑损伤或中风的风险,造成的脑损伤。因此,在手术前的1-2小时施用鱼精蛋白肽以保护大脑不遭受任何此类脑缺血性事件。

[0314] 本发明的肽的细胞保护性能显示它们是治疗CNS损伤的理想神经保护药物。此外,它们还可能具有细胞穿透性能[鱼精蛋白是FDA批准用于基因治疗载体(DNA,病毒载体;Sorgi等,1997)和LMWP作为细胞穿膜肽使用;Park等,2005],它们是将神经保护药物运输到到损伤后的CNS的理想载体分子。

[0315] 本发明的肽的神经保护功效很可能与肽的理化性质有关。此外,富含精氨酸的鱼精蛋白肽的神经保护活动可能是在细胞膜(如受体、离子通道)介导的。研究表明,富含精氨酸的肽包括TAT(Xu等,2008)、R6(Ferrer-Montiel等,1988)和R9-CBD3(Feldman和Khanna 2013)和TAT-CBD3(Brustovetsky等,2014)可能会影响细胞表面受体和离子通道的功能(如NMDA受体),使得钙内流减少。然而,可以预期的是,本发明中肽或多种肽可以阻断NMDA受体功能和/或阻断、下调或减少钙内流。一种替代机制是鱼精蛋白肽与线粒体外膜相互作用和稳定线粒体外膜,从而有助保持线粒体功能。潜在的益处是维持ATP合成、减少活性氧产生和提高钙处理。为此目的,申请人已观察到,在正常神经细胞中以及损伤后,鱼精蛋白可以提高MTS吸光度水平高于基线水平(如图11,12;5 μ M)。由于MTS减少甲瓚产物主要发生在线粒体中,鱼精蛋白增加甲瓚水平的能力可以作为肽改善线粒体功能的支持。另一个潜在的机制是这些富含精氨酸多肽抑制钙依赖性前蛋白转化酶酶弗林蛋白酶(Kacprzak等,2004),并因此阻止激活潜在破坏蛋白质。

[0316] 对于鱼精蛋白肽的细胞内进入,富含精氨酸的肽的主要机制被认为是通过内吞作用(巨胞饮)(Palm-Apergi等,2012)。因此可能的是,跨质膜的过程中肽的内吞作用导致细胞表面结构的内含体内在化(见图46)。在建立神经元兴奋性毒性和局部缺血模型中,下调离子通道可能有利于降低正常的钙和其它离子的神经损害性内流。

[0317] 申请人认为他们已经发现一类或一组新的肽,可以作为CPPs,以及作为神经保护肽。申请人已发现聚精氨酸或富含精氨酸的肽,尤其是那些选自鱼精蛋白或低分子量鱼精蛋白(和混合物及其衍生物,尤其是以市售的鱼精蛋白硫酸盐的形式)具有独特的神经保护或神经活性的性能。有证据表明,本文中公开的肽作为本发明的一部分,在应用于体内(Vaslin等,2009)和用于治疗神经损伤,具有相同范围的神经保护或神经活性的性能。

[0318] 申请人因此发现,富含精氨酸的肽和与TAT无关的CPPs具有独特的神经保护性能,

尤其是聚精氨酸序列和长度为10和32个氨基酸的序列具有超过10个精氨酸残基(如鱼精蛋白、LMWP及其衍生物)的序列。证据显示,本发明的CPPs在应用于体内和用于治疗神经损伤时,具有相同范围神经保护性能。

序列表

<110> 西澳大学
<120> 神经保护肽
<130> P00066W0
<160> 38
<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> ARG-1

<400> 1

Arg
1

<210> 2
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> ARG-3

<400> 2

[0001] Arg Arg Arg
1

<210> 3
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> ARG-6

<400> 3

Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> ARG-7

<400> 4

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> ARG-8

[0002]

<400> 5

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> ARG-9

<400> 6

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> ARG-10

<400> 7

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> ARG-11

<400> 8

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> ARG-12

<400> 9

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> ARG-13

<400> 10

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> ARG-14

<400> 11

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> ARG-15

<400> 12

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

<210> 13
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> ARG-18

[0003]

<400> 13

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> PTD-4

<400> 14

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
1 5 10

<210> 15
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> E9/R9

<400> 15

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

Arg Arg

<210> 16
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> R9/tPA/R9

<400> 16

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Gly Arg Val Val Gly Gly
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
20 25

<210> 17
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> DAHK

<400> 17

Asp Ala His Lys
1

[0004]

<210> 18
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> NR2B9c-TAT

<400> 18

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Lys Leu Ser Ser Ile Glu
1 5 10 15

Ser Asp Val

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> D-R9

<400> 19

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> 人体免疫缺陷病毒

<400> 20

Gly Arg Arg Arg Gln Arg Arg Lys Lys Arg Gly
1 5 10

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> 人体免疫缺陷病毒

<400> 21

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly
1 5 10

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> 黑腹果蝇

<400> 22

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 23
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> PEP-1

<400> 23

[0005]

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
1 5 10 15

Lys Lys Arg Lys Val
20

<210> 24
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> PYC36L-TAT

<400> 24

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Leu Gln Gly Arg
1 5 10 15

Arg Arg Gln Gly Tyr Gln Ser Ile Lys Pro
20 25

<210> 25
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> JNKI-1D-TAT

<400> 25

Thr Asp Gln Ser Arg Pro Val Gln Pro Phe Leu Asn Leu Thr Thr Pro

1	5	10	15
Arg Lys Pro	Arg Pro Pro	Arg Arg Arg Gln Arg Arg	Lys Lys Arg Gly
	20	25	30

<210> 26
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> TAT-JNKI-1

<400> 26

Gly Arg Lys	Lys Arg Arg	Gln Arg Arg	Pro Pro Arg	Pro Lys Arg
1	5	10		15

Pro Thr Thr	Leu Asn Leu	Phe Pro Gln	Val Pro Arg	Ser Gln Asp	Thr
	20	25		30	

<210> 27
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> kFGF-JNKI

<400> 27

Ala Ala Val	Ala Leu Leu	Pro Ala Val	Leu Leu Ala	Leu Leu Ala	Pro
1	5	10		15	

[0006]

Pro Pro Arg	Pro Lys Arg	Pro Thr Thr	Leu Asn Leu	Phe Pro Gln	Val
	20	25		30	

Pro Arg Ser	Gln Asp Thr
35	

<210> 28
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> kFGF

<400> 28

Ala Ala Val	Ala Leu Leu	Pro Ala Val	Leu Leu Ala	Leu Leu Ala	Pro
1	5	10		15	

<210> 29
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工的

<220>
 <223> XIP

<400> 29

Arg Arg Leu	Leu Phe Tyr	Lys Tyr Val	Tyr Lys Arg	Tyr Arg Ala	Gly
1	5	10		15	

Lys Gln Arg Gly

20

<210> 30
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> NCXBP3

<400> 30

Arg Arg Glu Arg Arg Arg Arg Ser Cys Ala Gly Cys Ser Arg Ala Arg
1 5 10 15

Gly Ser Cys Arg Ser Cys Arg Arg
20

<210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> Cal/R9

<400> 31

Pro Leu Phe Ala Glu Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

[0007]

<210> 32
<211> 32
<212> PRT
<213> 大麻哈鱼

<400> 32

Pro Arg Arg Arg Arg Arg Ser Ser Ser Arg Pro Ile Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

Arg Pro Arg Ala Ser Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Arg
20 25 30

<210> 33
<211> 31
<212> PRT
<213> 大麻哈鱼

<400> 33

Pro Arg Arg Arg Arg Ser Ser Arg Arg Pro Val Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

Pro Arg Val Ser Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Arg
20 25 30

<210> 34
<211> 31
<212> PRT
<213> 大麻哈鱼

<400> 34

Pro Arg Arg Arg Arg Ser Ser Ser Arg Pro Val Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15

	Pro Arg Val Ser Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Arg	
	20 25 30	
	<210> 35	
	<211> 30	
	<212> PRT	
	<213> 大麻哈鱼	
	<400> 35	
	Pro Arg Arg Arg Arg Ala Ser Arg Arg Ile Arg Arg Arg Arg Arg Pro	
	1 5 10 15	
	Arg Val Ser Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Arg	
	20 25 30	
	<210> 36	
	<211> 32	
	<212> PRT	
	<213> 大麻哈鱼	
	<400> 36	
[0008]	Pro Arg Arg Arg Arg Ser Ser Ser Arg Pro Val Arg Arg Arg Arg Arg	
	1 5 10 15	
	Pro Arg Val Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Arg	
	20 25 30	
	<210> 37	
	<211> 14	
	<212> PRT	
	<213> LMWP	
	<400> 37	
	Val Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly Gly Arg Arg Arg Arg	
	1 5 10	
	<210> 38	
	<211> 99	
	<212> DNA	
	<213> 大麻哈鱼	
	<400> 38	
	atgccagaa gacgcagatc ctccagccga cctgtccgca ggcgccgccg ccctagggtg	60
	tcccgcagtc gtcgcaggag aggaggccgc aggaggcgt	99

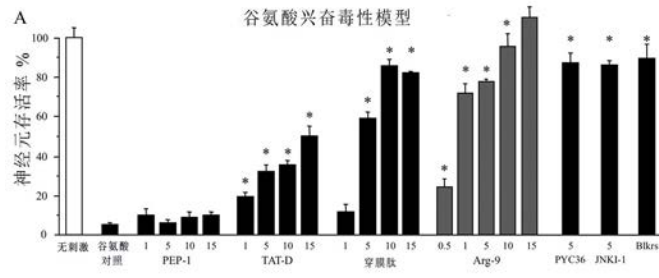


图1a

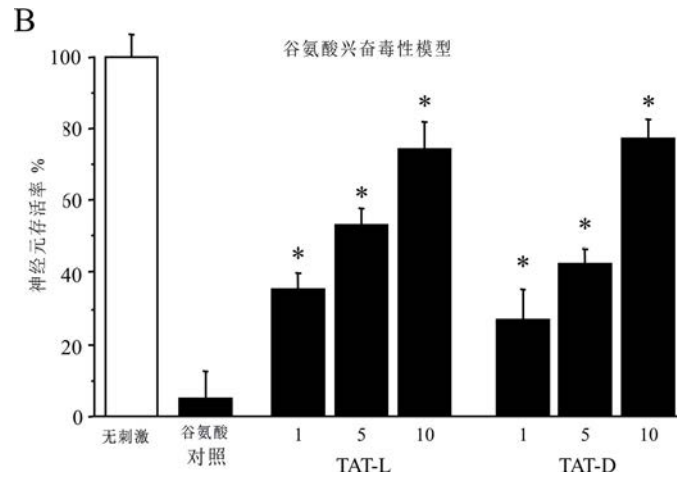


图1b

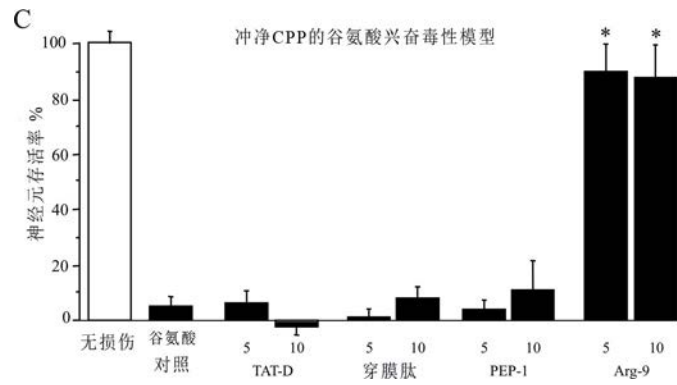


图1c

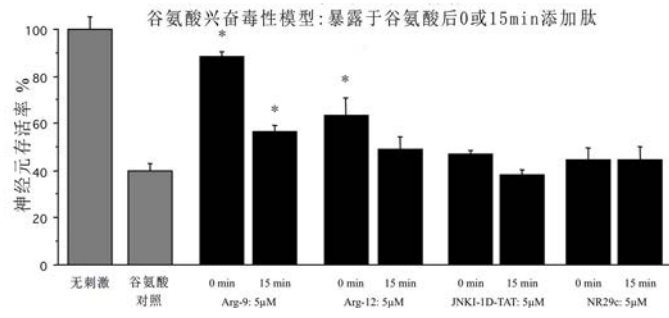


图1d

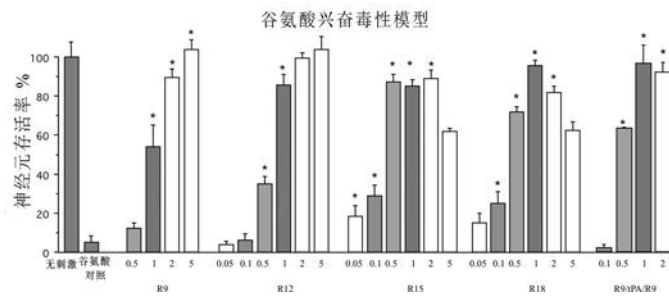


图1e

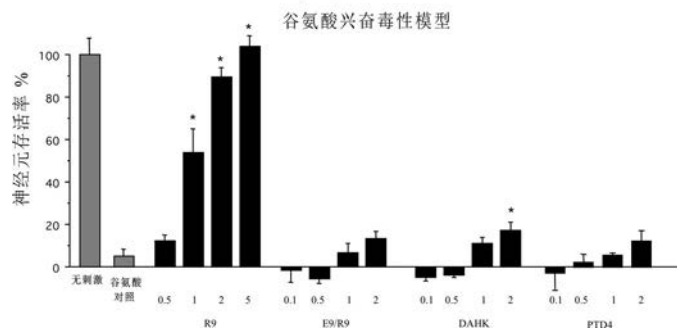


图1f

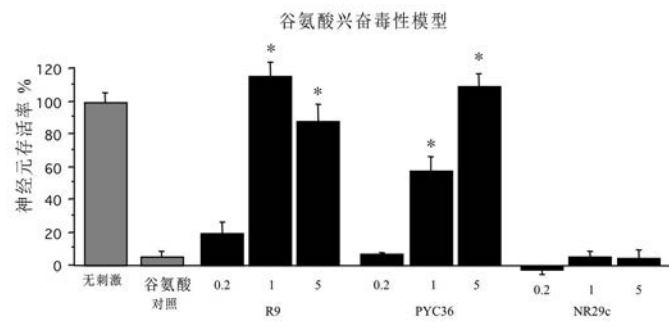


图1g

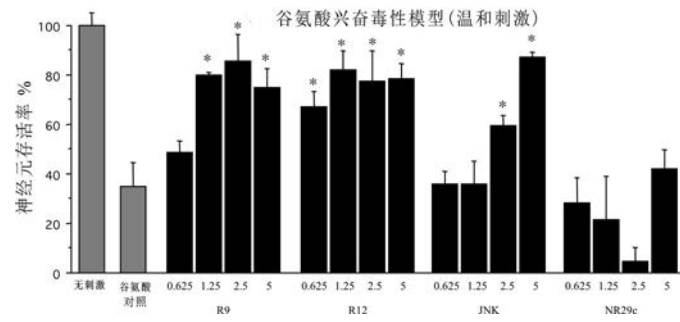


图1h

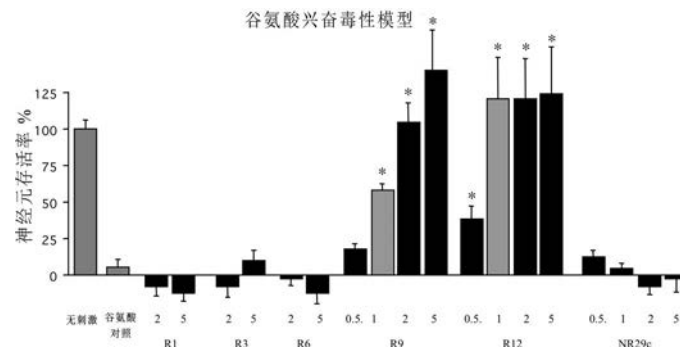


图1i

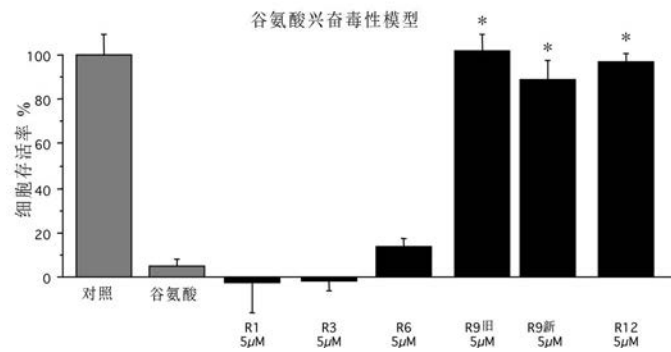


图1j

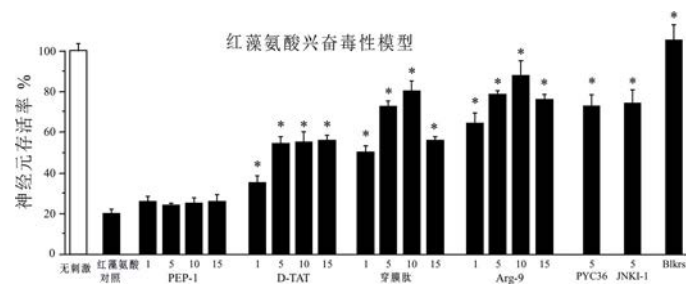


图2

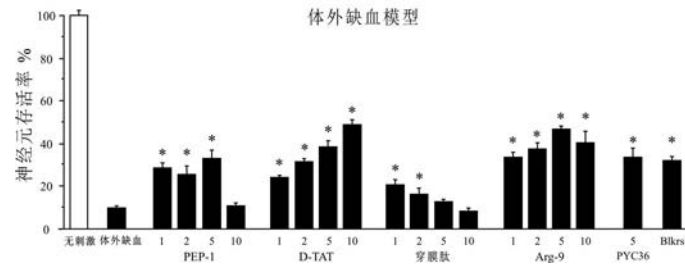


图3a

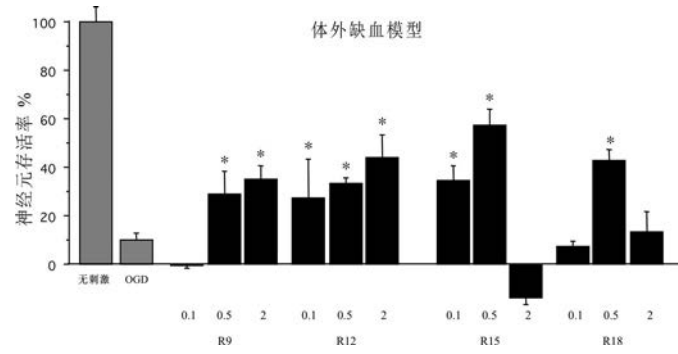


图3b

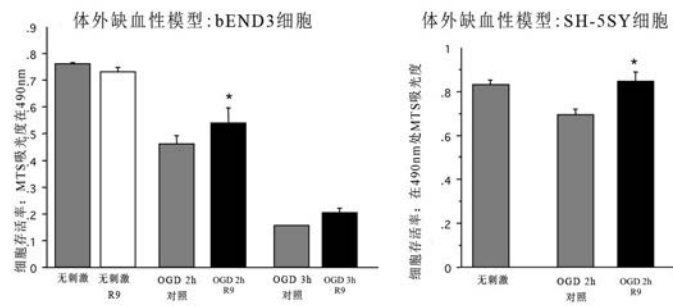


图3c

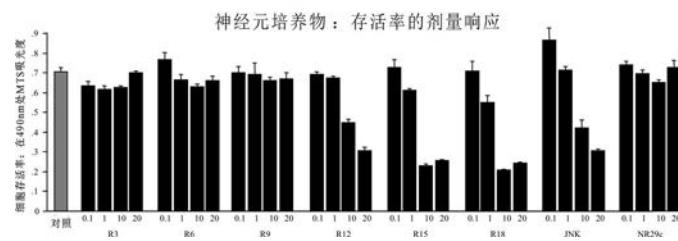


图4

pMCAO:MCAO后30min实施处理;终点24h

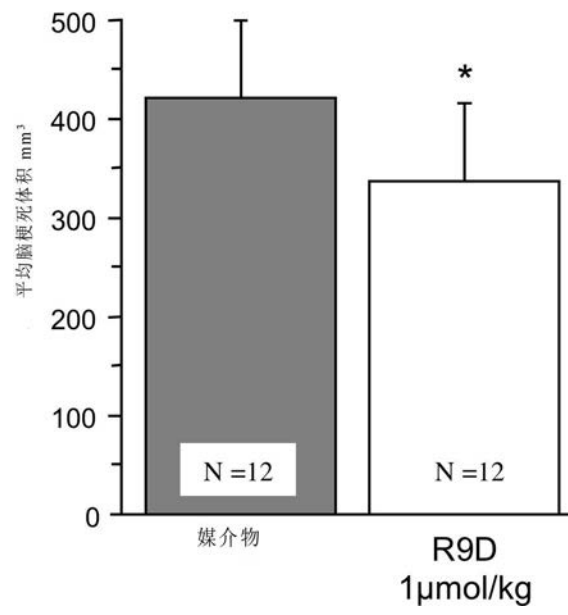


图5

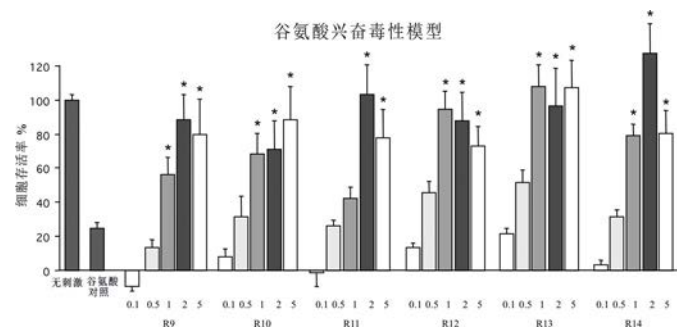


图6

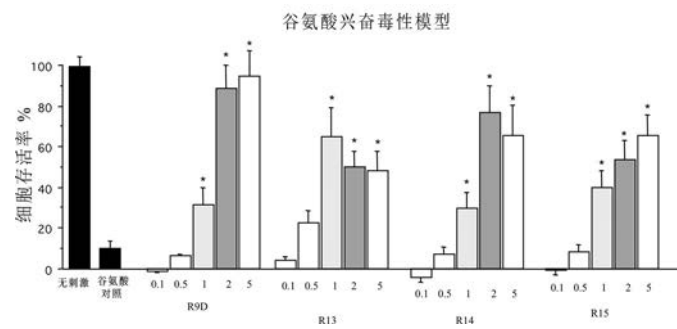


图7

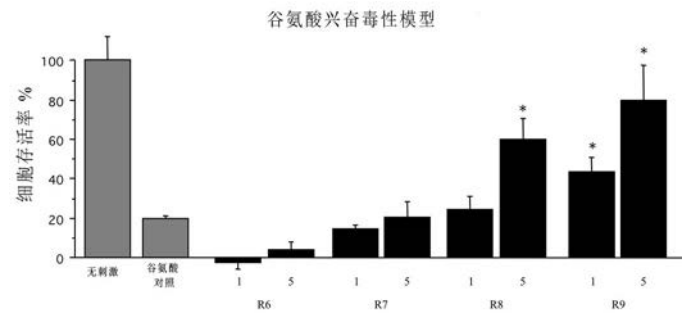


图8

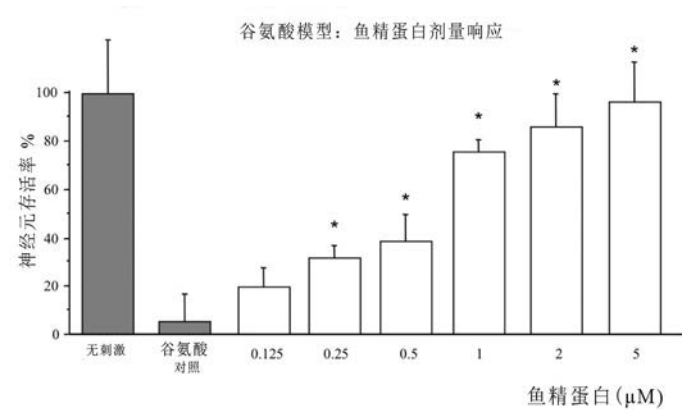


图9

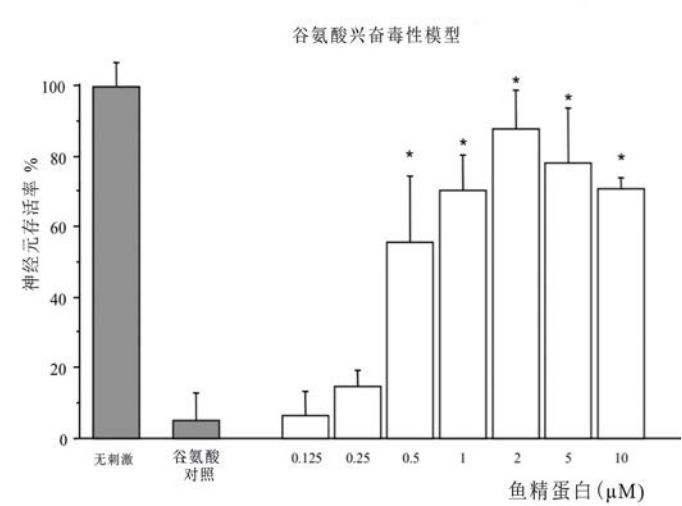


图10

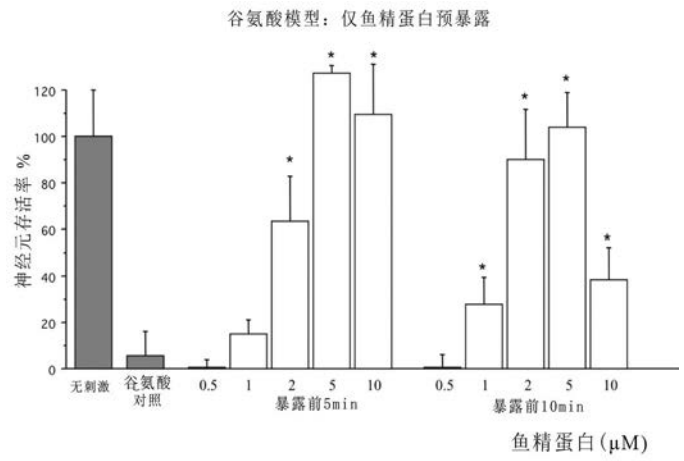


图11

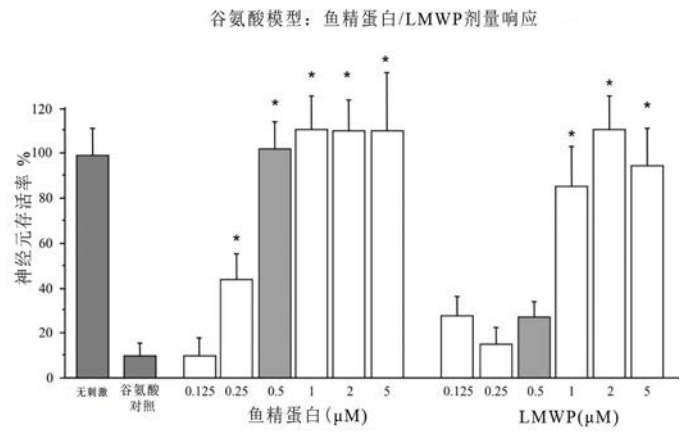


图12

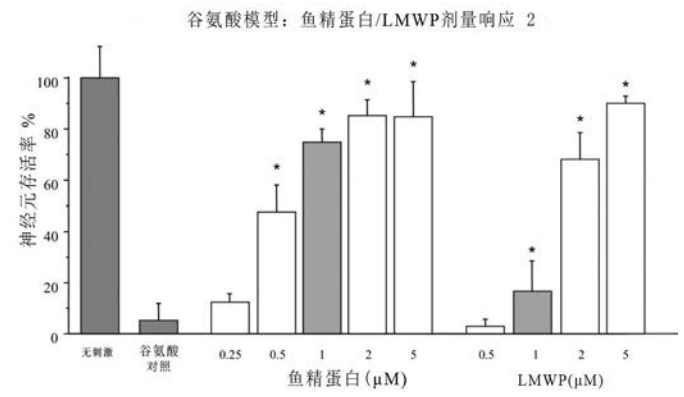


图13

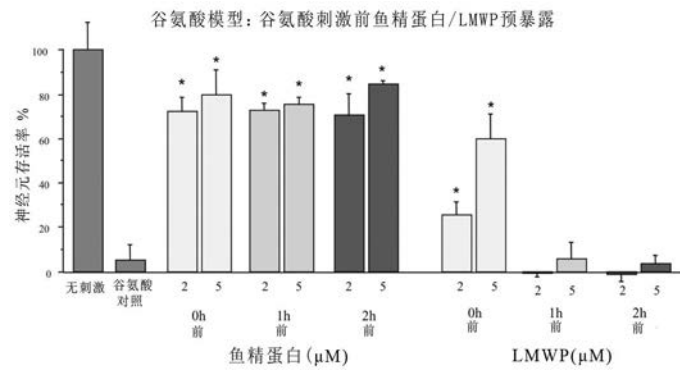


图14

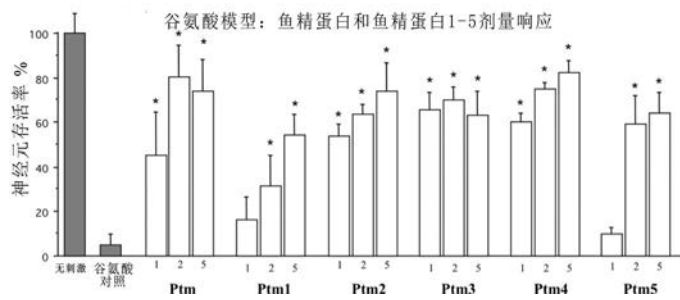


图15

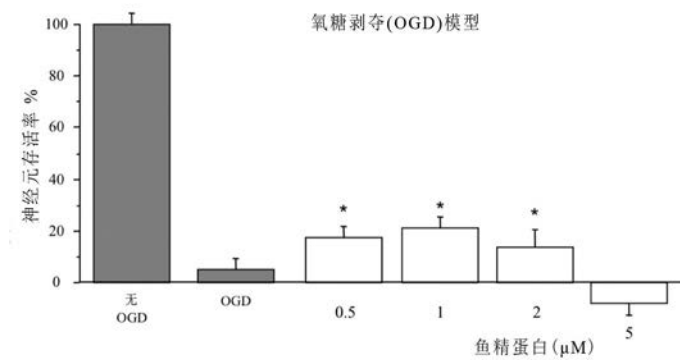


图16

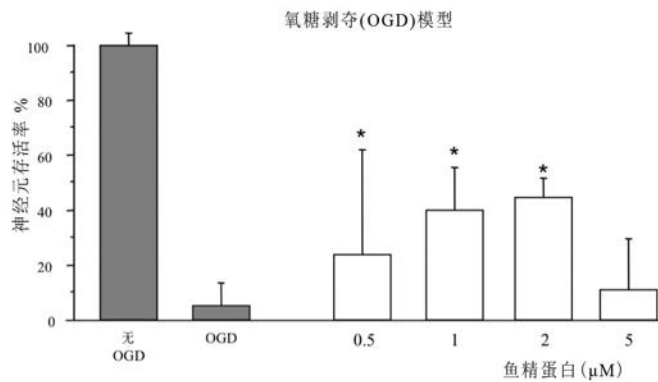


图17

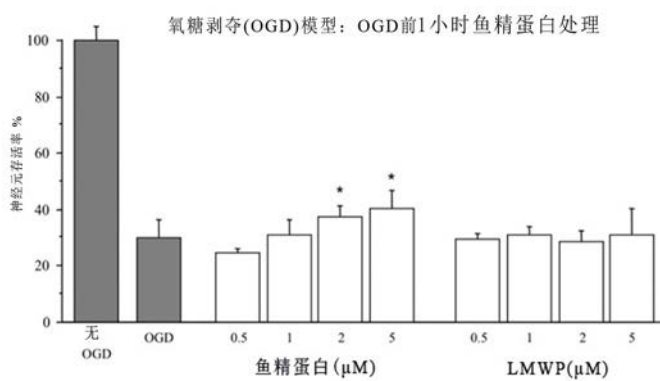


图18

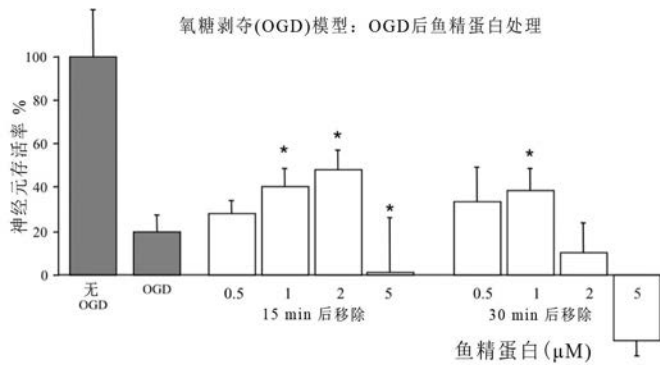


图19

氧糖剥夺(OGD)模型: OGD后立即鱼精蛋白/LMWP处理15min

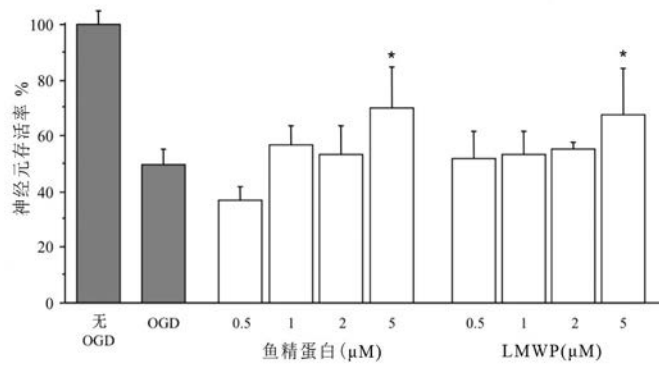


图20

氧糖剥夺(OGD)模型: OGD后鱼精蛋白和鱼精蛋白1-5处理15min

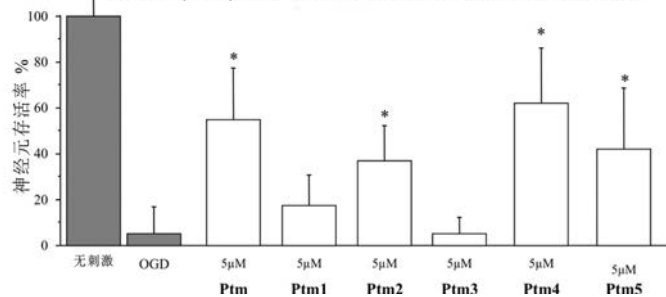


图21

氧糖剥夺(OGD)模型: OGD后鱼精蛋白、鱼精蛋白1-5和LMWP处理15min

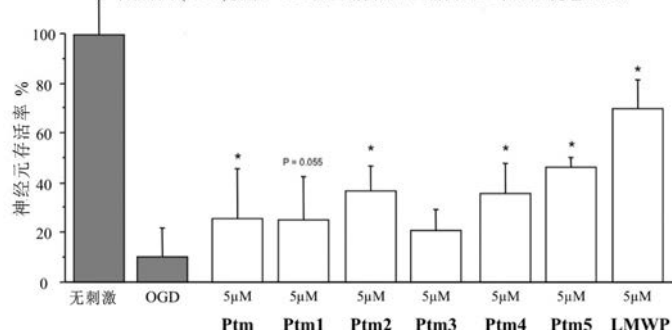


图22

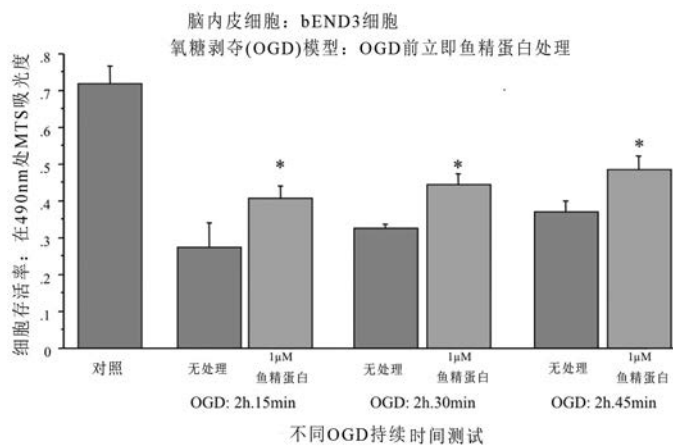


图23

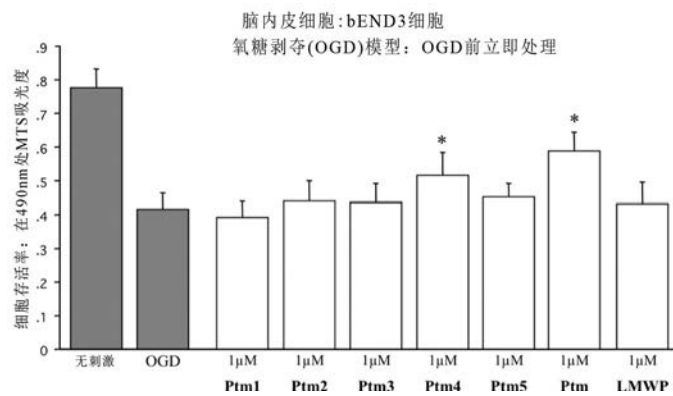


图24

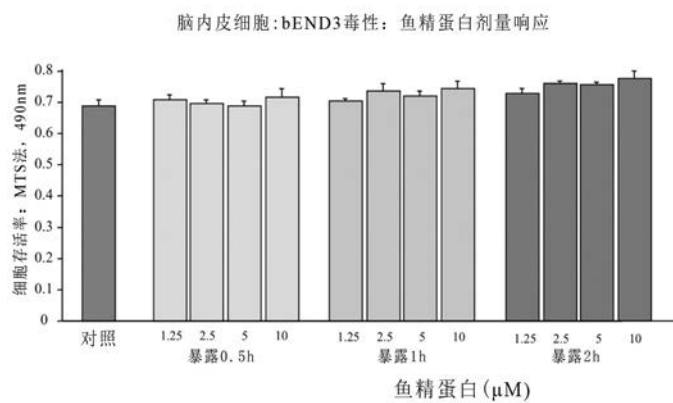


图25

脑内皮细胞:bEND3毒性:鱼精蛋白剂量响应

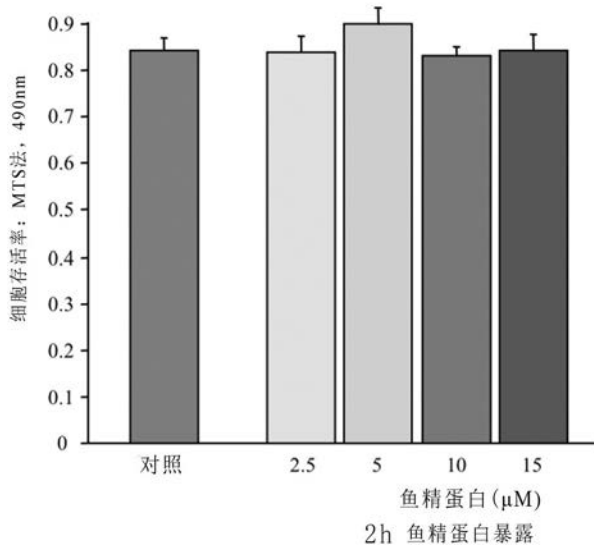


图26

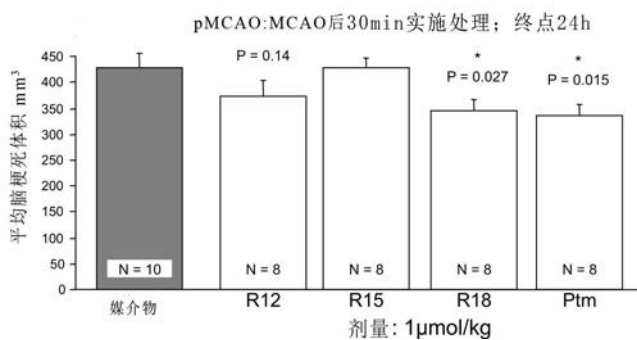


图27

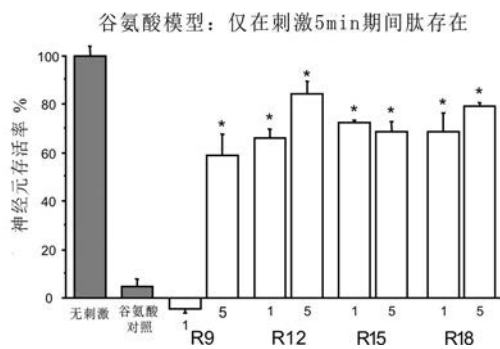


图28

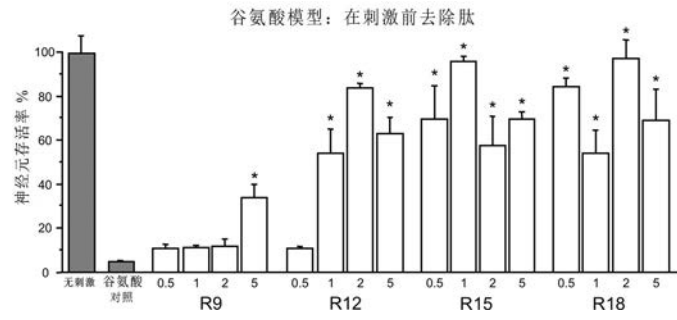


图29

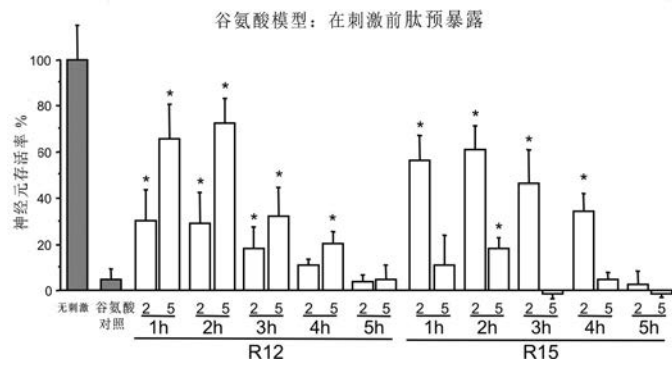


图30

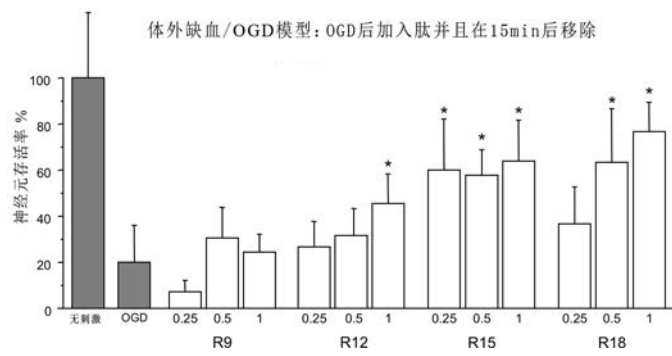


图31

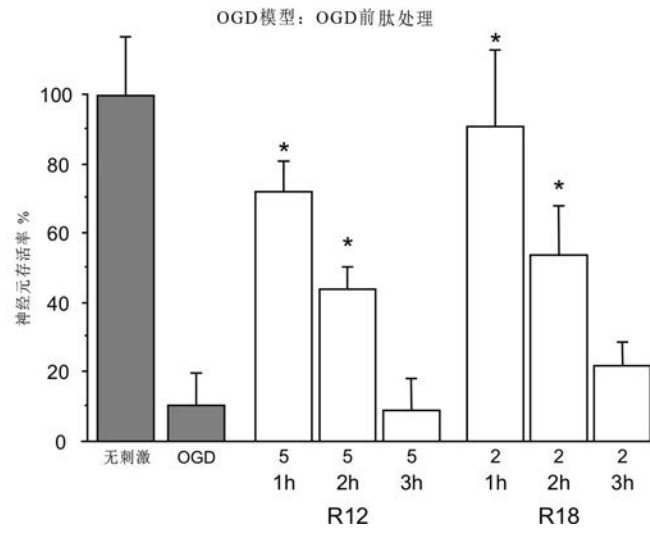


图32

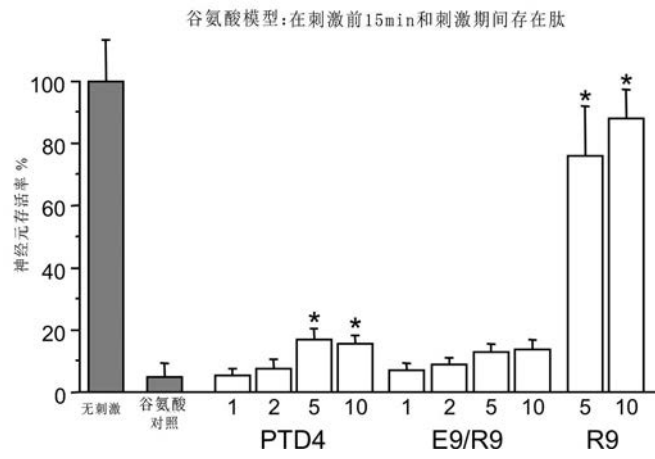


图33

谷氨酸模型：在刺激前15min和刺激期间存在肽

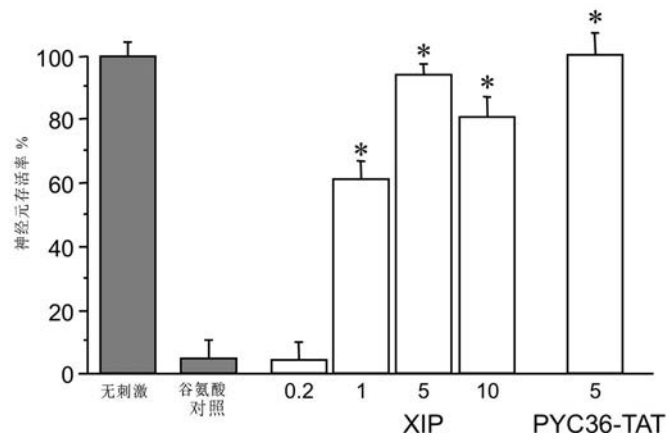


图34

谷氨酸兴奋毒性模型

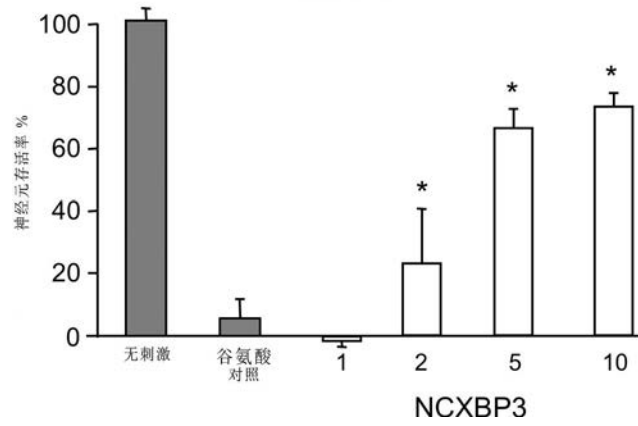


图35

谷氨酸模型：在刺激前15min和刺激期间存在肽

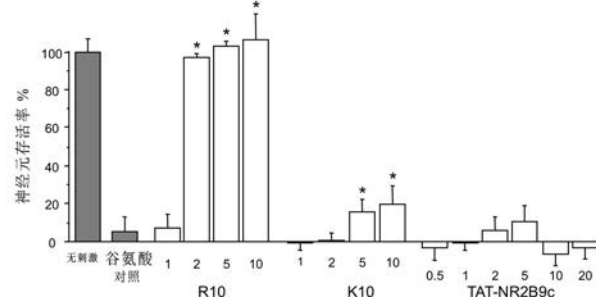


图36

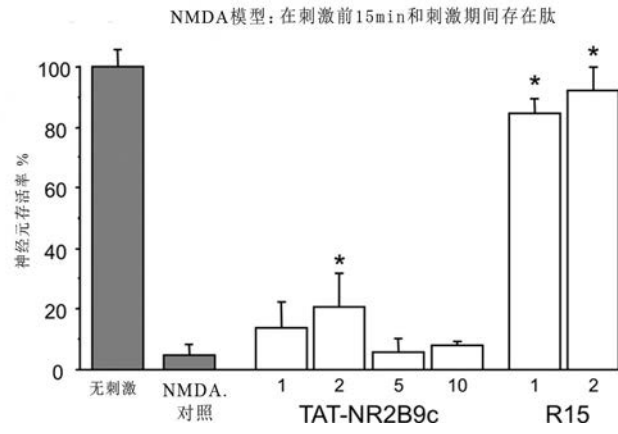


图37

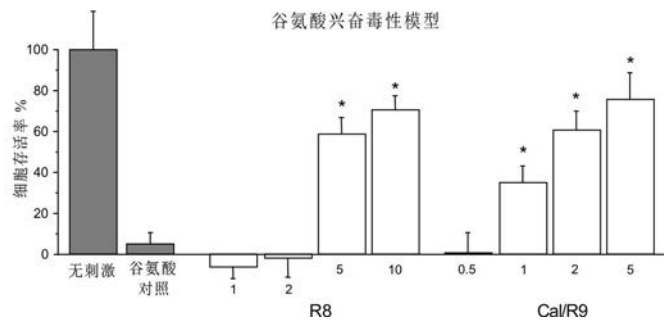


图38

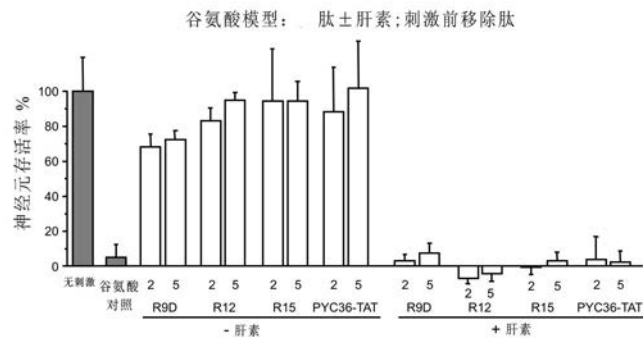


图39

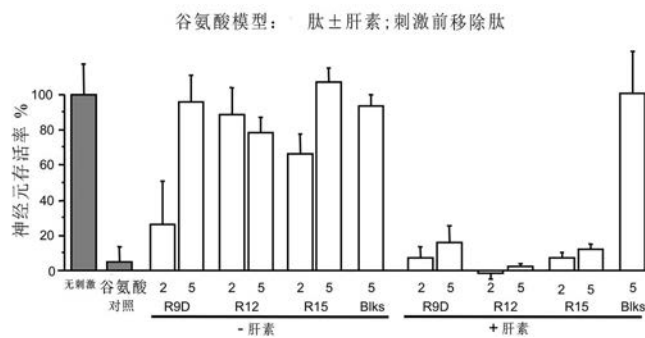


图40

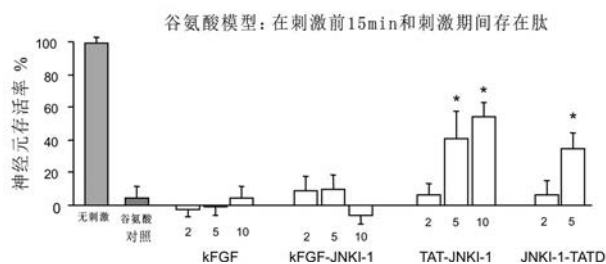


图41

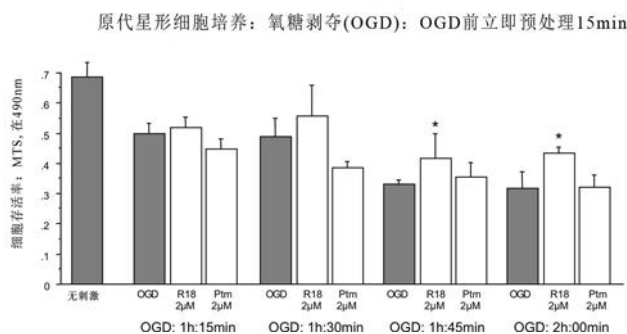


图42

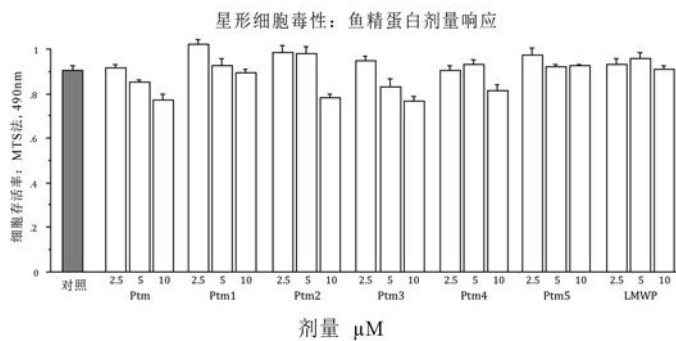


图43

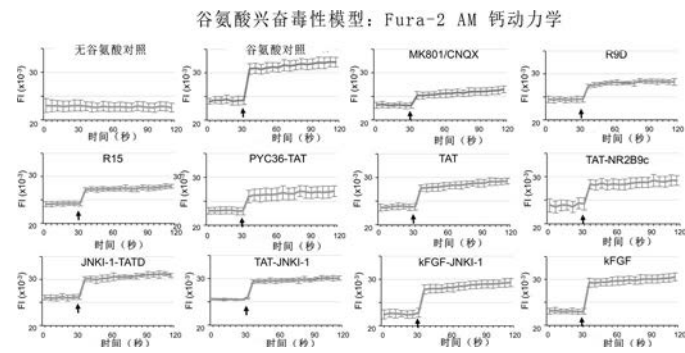


图44

富含精氨酸的CPP诱导的神经元细胞表面受体的细胞内吞作用的建议模型

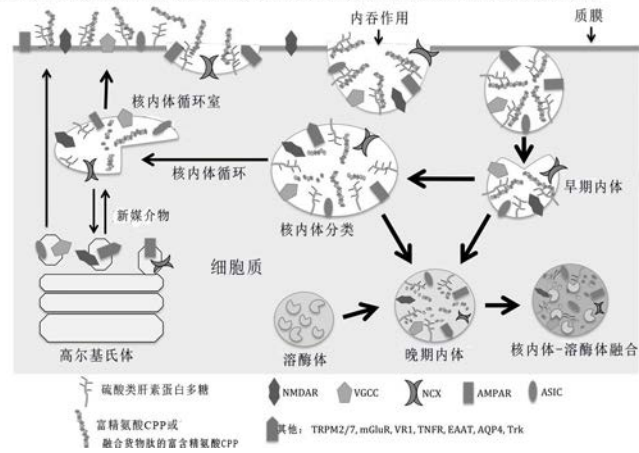


图45

肽	SEQ ID NO.	序列	氨基酸号/精氨酸残基号:分子量 (Da)	在pH 7时的净电荷	理化性质
R1: Arg-1	1	H-R-OH	1/1: 174	1	阳离子
R3: Arg-3	2	H-RRR-OH	3/3: 487	3	阳离子
R6: Arg-6	3	H-RRRRR-OH	6/6: 955	6	阳离子
R7: Arg-7	4	H-RRRRRR-OH	7/7: 1,111	7	阳离子
R8: Arg-8	5	H-RRRRRRR-OH	8/8: 1,267	8	阳离子
R9: Arg-9	6	H-RRRRRRRR-OH	9/9: 1,424	9	阳离子
R10: Arg-10	7	H-RRRRRRRRR-OH	10/10: 1,580	10	阳离子
R11: Arg-11	8	H-RRRRRRRRRR-OH	11/11: 1,736	11	阳离子
R12: Arg-12	9	H-RRRRRRRRRRR-OH	12/12: 1,892	12	阳离子
R13: Arg-13	10	H-RRRRRRRRRRRR-OH	13/13: 2,048	13	阳离子
R14: Arg-14	11	H-RRRRRRRRRRRRR-OH	14/14: 2,204	14	阳离子
R15: Arg-15	12	H-RRRRRRRRRRRRRR-OH	15/15: 2,360	15	阳离子
R18: Arg-18	13	H-RRRRRRRRRRRRRRR-OH	18/18: 2,829	18	阳离子
PTD-4 ^a	14	H-YARAAARQARA-OH	11/3: 1,204	3	阳离子
E9/R9 (R9/E9)	15	H-EEEEEEEE-RRRRRRRR-OH	18/9: 2,586	0	中性
R9/tPA/R9 或 R9/X7/R9	16	H-RRRRRRRRR-PGRVVG-RRRRRRRR-OH	25/19: 3,452	19	阳离子
DAHK	17	H-DAHK-OH	4/0: 469.5	0.1	N/A
NR2B9c-TAT ^b	18	H-GRKKRRQRRR-KLSSIESDV-NH2	19/6: 2,355		阳离子
D-R9	19	H-rrrrrrr-NH2	9/9: 1423.73	10	阳离子
TAT-D	20	H-GrrrrrrkrG-NH2	10/6: 1,453	9	阳离子
TAT-L	21	Ac-GRKKRRQRRRG-NH2	10/6: 1,494	8	阳离子
穿膜肽	22	H-ROIKIWFQNRMMKWK-NH2	16/3: 2,246	7	阳离子
Pep-1	23	H-KETWWETWWTEWSQPK-KRKV-NH2	21/1: 2,847	4	两亲性
PYC36L-TAT ^c	24	H-GRKKRRQRRR-GGLOGRRRQGYQSIKP-NH2	26/10: 3,180	13	阳离子
JNK1-1D-TAT ^d	25	H-Idqsrpvqpfllnltprkprpp-rrrrrrkrG-NH2	32/1: 3,925	12	阳离子
TAT-JNK1-1 ^d	26	H-GRKKRRQRRR-PPRPKRPTTLNLFQVPRSQDT-OH	32/9: 3,924.6	11	阳离子
kFGF-JNK1-1	27	H-AAVALLPAVLLALLAP-PPRPKRPTTLNLFQVPRSQDT-OH	38/3: 4,043.9	3	疏水性
kFGF	28	H-AAVALLPAVLLALLAP-OH	16/0: 1515.96	0	疏水性
XIP ^e	29	H-RRLLFYKYVYKRYRAGKQ-RG-OH	20/5: 2621.14	8	阳离子
NCXBP3 ^f	30	H-RRERRRRSCAGCSRAGS-CRSCRR-NH2	24/11: 2881.34	10.8	阳离子
Ca/R9	31	Ac-PLFAE-RRRRRRRR-NH2	15/9: 2022.41	8	阳离子

图46

不同的鱼精蛋白（鲑鱼）肽（和核酸）的总结

SEQ ID NO.:	序列名	类型	其他信息	序列	丙氨酸/精氨酸残基	分子量 (da)
-	鱼精蛋白硫酸盐混合物; Ptm	多肽混合物	可注射/IV型	鱼精蛋白1 - 鱼精蛋白 4 ¹	32/21	≈4,500
32	鱼精蛋白1; Ptm1	多肽	峰1 HPLC	PRRRRRSSSRPIRRRRR PRASRRRRRGGRRRR	32/21	4,236
33	鱼精蛋白2; Ptm2	多肽	峰2 HPLC	PRRRRSSRRPVRRRRR PRVSRRRRRGGRRRR	31/21	4,163
34	鱼精蛋白3; Ptm3	多肽	峰3 HPLC	PRRRRSSSRPVRRRRR PRVSRRRRRGGRRRR	31/20	4,094
35	鱼精蛋白4; Ptm4	多肽	峰4 HPLC	PRRRRASRRIRRRRRRPR VSRRRRRGGRRRR	30/21	4,064
36	鱼精蛋白5; Ptm5	多肽	SwissProt	PRRRRSSSRPVRRRRR PRVSRRRRRRRGGRRRR	32/21	4,250
37	低分子量鱼精蛋白 (LMWP)	多肽	源自鱼精蛋白	VSRRRRRRRGGRRRR	14/10	1,880
38	鱼精蛋白5核苷酸序列	Ptm 5, DNA编码序列	SwissProt	5'ATGCCCAAGAAGACGC AGATCCTCCAGCCGAC CTGTCCGCAGGCGCCG CCGCCCTAGGGTGTCC CGACGTCGTCGCAGGA GAGGAGGCCCGCAGGA GGCGT-3'	N/A	N/A

图47