

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580005194.3

[51] Int. Cl.

C07K 14/72 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 2 月 28 日

[11] 公开号 CN 1922205A

[22] 申请日 2005.1.18

[21] 申请号 200580005194.3

[30] 优先权

[32] 2004.2.17 [33] GB [31] 0403509.3

[86] 国际申请 PCT/GB2005/000188 2005.1.18

[87] 国际公布 WO2005/080427 英 2005.9.1

[85] 进入国家阶段日期 2006.8.17

[71] 申请人 神经靶有限公司

地址 英国萨里

[72] 发明人 D·温尼克

[74] 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

代理人 张广育 姜建成

权利要求书 8 页 说明书 21 页 附图 4 页

[54] 发明名称

甘丙肽受体与脑部损伤

[57] 摘要

在此提供 GALR2 特异性激动剂在制备用于预防或治疗脑部损伤、损害或疾病的药剂中的用途，其中的脑部损伤或损害可由下述之一的原因引起：栓塞性、血栓性或出血性中风；对脑部或脊髓的直接或间接创伤或手术；在心肺旁路手术或肾透析过程中的脑部缺血性或栓塞性损害；心肌梗塞后的再灌注脑部损害；脑部疾病；由过量饮酒或给予肿瘤治疗的化疗药剂引起的化学损害；辐射损害；或由细菌或病毒感染引起的免疫学损害。脑部疾病可能是阿尔茨海默病、帕金森病、多发性硬化或可变型克雅病中的一种。

1. GALR2 特异性激动剂在用于预防或治疗脑部损伤、损害或疾病的药剂的制备中的用途。

2. 根据权利要求1的用途，其中所述脑部损伤或损害由下列之一的原因引起：栓塞性、血栓性或出血性中风；对脑部或脊髓的直接或间接创伤或手术；在心肺旁路手术或肾透析过程中的脑部缺血性或栓塞性损害；心肌梗塞后的再灌注脑部损害；脑部疾病；免疫学损害、化学损害或辐射损害。

3. 根据权利要求2的用途，其中所述免疫学损害是由细菌或病毒感染引起。

4. 根据权利要求2的用途，其中所述化学损害是由过量饮酒或给予肿瘤治疗的化疗药剂引起。

5. 根据权利要求2的用途，其中所述辐射损害是由放疗引起。

6. 根据权利要求1或2的用途，其中所述脑部疾病为阿尔茨海默病、帕金森病、多发性硬化或可变量克雅病中的一种。

7. 根据前述权利要求任一项的用途，其中所述 GALR2 特异性激动剂为包括一部分甘丙肽氨基酸序列的多肽。

8. 根据权利要求7的用途，其中所述 GALR2 特异性激动剂为 AR-M1896。

9. 根据权利要求1-6任一项的用途，其中所述 GALR2 特异性激动剂为非肽类的小分子化学个体。

10. 根据前述权利要求任一项的用途，其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力为 0 至 100 μ M，并且对 GALR2 的结合特异性比对 GALR1 的结合特异性强 30 倍以上。

11. 根据前述权利要求任一项的用途，其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力为 0 至 100 μ M，并且对 GALR2 的结合特异性比对 GALR1 的结合特异性强 50 倍以上。

12. 根据前述权利要求任一项的用途，其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力为 0 至 100 μ M，并且对 GALR2 的结合特异性比对 GALR1 的结合特异性强 100 倍以上。

13. 根据权利要求10-12任一项的用途，其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合特异性比对 GALR3 的结合特异性强 30 倍以上。

14. 根据权利要求 10-12 任一项的用途, 其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合特异性比对 GALR3 的结合特异性强 50 倍以上。

15. 根据权利要求 10-12 任一项的用途, 其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合特异性比对 GALR3 的结合特异性强 100 倍以上。

16. 根据权利要求 10-15 任一项的用途, 其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力为 0 至 $1\ \mu\text{M}$ 。

17. 一种预防或治疗脑部损伤、损害或疾病的方法, 包括对需要这种预防或治疗的个体给予有效量的 GALR2 特异性激动剂。

18. 根据权利要求 17 的方法, 其中所述脑部损伤或损害由下列之一的原因引起: 栓塞性、血栓性或出血性中风; 对脑部或脊髓的直接或间接创伤或手术; 在心肺旁路手术或肾透析过程中的脑部缺血性或栓塞性损害; 心肌梗塞后的再灌注脑部损害; 脑部疾病; 免疫学损害、化学损害或辐射损害。

19. 根据权利要求 18 的方法, 其中所述免疫学损害是由细菌或病毒感染引起。

20. 根据权利要求 18 的方法, 其中所述化学损害是由过量饮酒或给予肿瘤治疗的化疗药剂引起。

21. 根据权利要求 18 的方法, 其中所述辐射损害是由放疗引起。

22. 根据权利要求 17 或 18 的方法, 其中所述脑部疾病为阿尔茨海默病、帕金森病、多发性硬化或可变型克雅病中的一种。

23. 根据权利要求 17-22 任一项的方法, 其中所述 GALR2 特异性激动剂为包括一部分甘丙肽氨基酸序列的多肽。

24. 根据权利要求 23 的方法, 其中所述 GALR2 特异性激动剂为 AR-M1896。

25. 根据权利要求 17-22 任一项的方法, 其中所述 GALR2 特异性激动剂为非肽类的小分子化学个体。

26. 根据权利要求 17-25 任一项的方法, 其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力为 0 至 $100\ \mu\text{M}$, 并且对 GALR2 的结合亲和力比对 GALR1 的结合亲和力强 30 倍以上。

27. 根据权利要求 17-26 任一项的方法, 其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力为 0 至 $100\ \mu\text{M}$, 并且对 GALR2 的结合亲和力比对 GALR1 的结合亲和力强 50 倍以上。

28. 根据权利要求 17-27 任一项的方法, 其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力为 0 至 100 μM , 并且对 GALR2 的结合亲和力比对 GALR1 的结合亲和力强 100 倍以上。

29. 根据权利要求 26-28 任一项的方法, 其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力比对 GALR3 的结合亲和力强 30 倍以上。

30. 根据权利要求 26-29 任一项的方法, 其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力比对 GALR3 的结合亲和力强 50 倍以上。

31. 根据权利要求 26-30 任一项的方法, 其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力比对 GALR3 的结合亲和力强 100 倍以上。

32. 根据权利要求 26-31 任一项的方法, 其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力为 0 至 1 μM 。

33. 一种筛选修复预防或治疗脑部损伤或损害的候选化合物的方法, 包括测定至少一种待测化合物是否为 GALR2 特异性激动剂, 以及如果它是 GALR2 特异性激动剂, 则选择这至少一种待测化合物作为候选化合物。

34. 根据权利要求 33 的方法, 其中测得这至少一种待测化合物结合 GALR2 的结合亲和力为 0 至 100 μM , 并且该待测化合物对 GALR2 的特异性比对 GALR1 的特异性强 30 倍以上。

35. 根据权利要求 33 或 34 的方法, 其中测得这至少一种待测化合物结合 GALR2 的结合亲和力为 0 至 100 μM , 并且该待测化合物对 GALR2 的特异性比对 GALR1 的特异性强 50 倍以上。

36. 根据权利要求 33、34 或 35 的方法, 其中测得这至少一种待测化合物结合 GALR2 的结合亲和力为 0 至 100 μM , 并且该待测化合物对 GALR2 的特异性比对 GALR1 的特异性强 100 倍以上。

37. 根据权利要求 34-36 任一项的方法, 其中测得这至少一种待测化合物结合 GALR2 的特异性比对 GALR3 的特异性强 30 倍以上。

38. 根据权利要求 34-37 任一项的方法, 其中测得这至少一种待测化合物结合 GALR2 的特异性比对 GALR3 的特异性强 50 倍以上。

39. 根据权利要求 34-38 任一项的方法, 其中测得这至少一种待测化合物结合 GALR2 的特异性比对 GALR3 的特异性强 100 倍以上。

40. 根据权利要求 34-39 任一项的方法, 其中测得这至少一种待测化合物结合 GALR2 的结合亲和力为 0 至 1 μM 。

41. 根据权利要求 33-40 任一项的方法, 其中所述 GALR2 包括至少一部分的人类 GALR2。

42. 根据权利要求 41 的方法, 其中所述 GALR2 为全长的人类 GALR2。

43. 根据权利要求 33-40 任一项的方法, 其中所述 GALR2 包括至少一部分的非人类 GALR2。

44. 根据权利要求 43 的方法, 其中所述 GALR2 为大鼠或小鼠的 GALR2。

45. 根据权利要求 43 或 44 的方法, 其中所述 GALR2 为全长的 GALR2。

46. 根据权利要求 33-40 任一项的方法, 其中所述 GALR2 为嵌合受体构建体。

47. 根据权利要求 33-46 任一项的方法, 其中所述待测化合物的筛选是在高通量筛选分析中的筛选。

48. 一种用于预防或治疗脑部损伤、损害或疾病的药物组合物, 所述组合物包括:

- a) 有效量的至少一种 GALR2 特异性激动剂或其可药用的盐, 以及
- b) 药理学上合适的佐剂、载体或赋形剂。

49. 根据权利要求 48 的药物组合物, 其中所述脑部损伤或损害由下列之一的原因引起: 栓塞性、血栓性或出血性中风; 对脑部或脊髓的直接或间接创伤或手术; 在心肺旁路手术或肾透析过程中的脑部缺血性或栓塞性损害; 心肌梗塞后的再灌注脑部损害; 脑部疾病; 免疫学损害、化学损害或辐射损害。

50. 根据权利要求 49 的药物组合物, 其中所述免疫学损害是由细菌或病毒感染引起。

51. 根据权利要求 49 的药物组合物, 其中所述化学损害是由过量饮酒或给予肿瘤治疗的化疗药剂引起。

52. 根据权利要求 49 的药物组合物, 其中所述辐射损害是由放疗引起。

53. 根据权利要求 48 或 49 的药物组合物, 其中所述脑部疾病为阿尔茨海默病、帕金森病、多发性硬化或可变量克雅病中的一种。

54. 根据权利要求 48-53 任一项的药物组合物, 其中所述 GALR2 特异性激动剂为包括一部分甘丙肽氨基酸序列的多肽。

55. 根据权利要求 54 的药物组合物, 其中所述 GALR2 特异性激动

剂为 AR-M1896。

56. 根据权利要求 48-53 任一项的药物组合物，其中所述 GALR2 特异性激动剂为非肽类的小分子化学个体。

57. 根据权利要求 48-56 任一项的药物组合物，其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力为 0 至 100 μM ，并且对 GALR2 的结合特异性比 GALR1 的结合特异性强 30 倍以上。

58. 根据权利要求 48-57 任一项的药物组合物，其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力为 0 至 100 μM ，并且对 GALR2 的结合特异性比对 GALR1 的结合特异性强 50 倍以上。

59. 根据权利要求 48-58 任一项的药物组合物，其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力为 0 至 100 μM ，并且对 GALR2 的结合特异性比对 GALR1 的结合特异性强 100 倍以上。

60. 根据权利要求 57-59 任一项的药物组合物，其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合特异性比对 GALR3 的结合特异性强 30 倍以上。

61. 根据权利要求 57-60 任一项的药物组合物，其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合特异性比对 GALR3 的结合特异性强 50 倍以上。

62. 根据权利要求 57-61 任一项的药物组合物，其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合特异性比对 GALR3 的结合特异性强 100 倍以上。

63. 根据权利要求 57-62 任一项的药物组合物，其中所述 GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力为 0 至 1 μM 。

64. 根据权利要求 48-63 任一项的药物组合物，其中所述药物学上合适的佐剂、载体或赋形剂可以选自：离子交换剂，氧化铝，硬脂酸铝，磷脂酰胆碱，诸如人血清白蛋白的血清蛋白，诸如磷酸盐的缓冲物质，甘氨酸，山梨酸，山梨酸钾，饱和植物脂肪酸的不完全甘油酯混合物，水，盐或电解质，例如鱼精蛋白硫酸盐，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，基于纤维素的物质，聚乙二醇，羧甲基纤维素钠，聚丙烯酸酯，蜡类，聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物，聚乙二醇和羊毛脂。

65. 根据权利要求 48-64 任一项的药物组合物，所述药物组合物

通过口服给药或肠胃外给药。

66. 根据权利要求 65 的药物组合物，所述药物组合物通过口服给药。

67. 根据权利要求 66 的药物组合物，所述药物组合物为胶囊或药片形式。

68. 根据权利要求 67 的药物组合物，所述药物组合物包括乳糖和/或玉米淀粉。

69. 根据权利要求 68 的药物组合物，所述药物组合物进一步包括润滑剂。

70. 根据权利要求 69 的药物组合物，其中所述润滑剂为硬脂酸镁。

71. 根据权利要求 66 的药物组合物，所述药物组合物为水性悬液或水性溶液形式。

72. 根据权利要求 71 的药物组合物，所述药物组合物包括乳化剂和/或助悬剂。

73. 根据权利要求 66-72 任一项的药物组合物，所述药物组合物包括甜味剂、香味剂和/或着色剂。

74. 根据权利要求 65 的药物组合物，所述药物组合物通过下述方式给药：注射、使用无针装置、吸入喷雾剂、局部给药、直肠给药、鼻部给药、口颊给药、阴道给药或通过植入的容器给药。

75. 根据权利要求 74 的药物组合物，所述药物组合物通过注射给药。

76. 根据权利要求 75 的药物组合物，所述药物组合物为无菌的可注射制剂形式。

77. 根据权利要求 76 的药物组合物，其中所述无菌的可注射制剂为水性或油性悬液，或是存在于无毒的适于肠胃外给药的稀释剂或溶剂中的悬液。

78. 根据权利要求 74 的药物组合物，所述药物组合物通过无针装置给药。

79. 根据权利要求 78 的药物组合物，所述药物组合物为适合通过无针装置给药的形式。

80. 根据权利要求 79 的药物组合物，其中所述适合通过无针装置给药的形式为水性或油性悬液，或是存在于无毒的适于肠胃外给药的

稀释剂或溶剂中的悬液。

81. 根据权利要求 77 至 80 任一项的药物组合物，其中所述水性悬液在甘露醇、水、林格氏液或等渗氯化钠溶液中制备。

82. 根据权利要求 77 至 80 任一项的药物组合物，其中所述油性悬液在合成单酰甘油、合成二酰甘油、脂肪酸或天然的可药用的油中制备。

83. 根据权利要求 82 的药物组合物，其中所述脂肪酸为油酸或油酸甘油酯衍生物。

84. 根据权利要求 82 的药物组合物，其中所述天然的可药用的油为橄榄油、蓖麻油，或聚氧乙烯化的橄榄油或蓖麻油。

85. 根据权利要求 82、83 或 84 的药物组合物，其中所述油性悬液包括长链醇类稀释剂或分散剂。

86. 根据权利要求 85 的药物组合物，其中所述长链醇类稀释剂或分散剂为 Ph. Helv。

87. 根据权利要求 74 的药物组合物，所述药物组合物通过直肠给药。

88. 根据权利要求 87 的药物组合物，所述药物组合物为直肠给药的栓剂形式。

89. 根据权利要求 88 的药物组合物，其中所述栓剂包含在室温下为固体而在直肠温度下为液体的非刺激性赋形剂。

90. 根据权利要求 89 的药物组合物，其中所述非刺激性赋形剂为可可脂、蜂蜡或聚乙二醇中的一种。

91. 根据权利要求 74 的药物组合物，所述药物组合物通过局部方式给药。

92. 根据权利要求 91 的药物组合物，所述药物组合物为包括选自下列载体的软膏剂：矿物油、液体石蜡、白矿脂、丙二醇、聚氧乙烯-聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。

93. 根据权利要求 91 的药物组合物，所述药物组合物为包括选自下列载体的洗剂或霜剂：矿物油、失水山梨醇单硬脂酸酯、聚山梨醇酯 60、十六烷基酯蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二烷醇、苯甲醇和水。

94. 根据权利要求 74 的药物组合物，所述药物组合物通过鼻部给药。

95. 根据权利要求 94 的药物组合物, 所述药物组合物通过鼻部气雾剂和/或吸入剂给药。

96. 一种抑制细胞死亡的方法, 包括使细胞与有效抑制该细胞死亡的量的 GALR2 特异性激动剂接触。

97. 根据权利要求 96 的方法, 其中所述细胞为神经元。

98. 根据权利要求 96 或 97 的方法, 其中所述细胞为中枢神经系统的神经元。

99. 根据权利要求 96、97 或 98 的方法, 其中所述细胞为海马或皮层神经元。

100. 根据权利要求 96 至 99 任一项的方法, 其中所述细胞为人类细胞。

甘丙肽受体与脑部损伤

技术领域

本发明涉及保护中枢神经系统免受损伤、损害或疾病的领域。

本发明特别涉及但不限于保护或治疗脑部免于下列的不良影响：

(a) 栓塞性、血栓性或出血性中风；(b) 对脑部或脊髓的直接或间接创伤；(c) 对脑部或脊髓的手术；(d) 由心肺旁路手术、肾透析引起的脑部缺血性或栓塞性损害和心肌梗塞后的再灌注脑部损害；(e) 包含神经损害和/或细胞死亡的脑部疾病，例如阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease)、帕金森病 (Parkinson's Disease)、多发性硬化 (Multiple Sclerosis)、vCJD (可变量克雅病，variant Creutzfeldt Jacob Disease)；(f) 对脑部的免疫学、化学或辐射损害，例如由细菌或病毒感染、酒精、肿瘤化疗和肿瘤放疗引起的损害。

具体而言，本发明涉及第二甘丙肽受体亚型 (GALR2) 的配基在脑部损伤、损害或疾病的预防或治疗中的用途。GALR2 特异性激动剂可以有利地用于防护或治疗一系列的中枢神经系统疾病，并且最小化或避免因 GALR3 和/或 GALR1 的激活而产生的潜在副作用。本发明还涉及确定用于预防或治疗脑部损伤、损害或疾病的候选药物的药物开发方法，本发明还涉及用于预防或治疗脑部损伤、损害或疾病的药物组合物。

背景技术

中风

中风被定义为一种心血管意外伤害，包括栓塞性、血栓性或出血性发作，这种发作可引起大面积脑部缺氧，导致永久性脑损害并关联功能性神经损伤。尽管中风是西方世界的第三大死亡原因，但是目前对这种神经学影响仍然没有令人满意的治疗手段。大量的在老年人群中所见的身体残疾都是由中风造成的，并且多达 30% 的中风患者在日常生活中需要长期的帮助。在美国每年估计有超过 70 万人发生中风，在英国任一时刻都有 50 万人在他们的一生中某个时刻发生过中风。为了将中风的

影响减到最小开发了多种神经保护药剂,但是到目前为止它们在实践中
的效果令人失望,并且没有广泛的或常规的应用于临床。这些药剂包括
但不限于:钙通道拮抗剂——Fujisawa 公司的尼伐地平(nilvadipine)
(Nivadil[®])和 Bayer 公司的尼莫地平(nimodipine)(Nimotop[®]);
抗氧化剂——Pharmacia & Upjohn 公司的替拉扎特(tirilazad)
(Freedox[®])和 Interneuron 公司的胞磷胆碱(citicoline)
(CerAxon[®]);和蛋白质激酶抑制剂——Asahi 公司的法舒地尔
(fasudil)(Eril[™])。除钙通道拮抗剂和自由基清除剂外,开发中的
神经保护药剂包括 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)拮抗剂, α -氨基-3-羟
基-5-甲基-4-异噁唑丙酸盐(AMPA)拮抗剂,以及其他设计为抑制例如
谷氨酸和甘氨酸激动剂的有毒神经递质的释放的化合物。

创伤或外科脑损伤的形式

除中风以外还存在很多可能发生脑损害的状况,这些状况包括对脑
部或脊髓的直接或间接创伤或手术、涉及心肺旁路的手术、肾透析和心
肌梗塞后的再灌注。最常见的状况发生于冠状动脉旁路搭桥术(CABG)
的过程中或术后。每年在美国要进行 60 万例 CABG 手术,并且在所有心
肺旁路患者中有 25%在术后 3 个月内显示出神经学缺陷。

损害脑部的疾病

阿尔茨海默病(AD)是西方世界的一大健康难题。AD 是在老年人
群中最常见的痴呆形式,目前估计全世界有 2000 万人患有此病。由于
老年人口数量的增加,预计 AD 的发病率在未来的 25 年内将提高一倍。
在英国每年 AD 患者的护理费用超过 55 亿英镑。目前此病还没有发现治
愈的病例,能够显著延缓该病进程的治疗手段也很少(除乙酰胆碱酯酶
抑制剂以外)。

多发性硬化(MS)是年轻成人中最常见的失能性神经疾病,在英国
约有 8 万 5 千人患病,在西方世界任一时刻有超过 50 万人患病。MS 最
常确诊于 20 岁至 40 岁之间的人群中,并且女性的发病率大约是男性的
两倍。该病似乎优先以北欧人的后代为目标。MS 是一种自身免疫病,
其特征为神经元周围髓磷脂鞘的缺失导致进行性神经功能障碍和神经
细胞缺失。患者会面临很多问题,这些问题可能包括:视觉障碍和失明、
运动和/或感觉功能丧失以及肠和泌尿功能的问题。

其他已知会引起神经损害和/或细胞死亡的疾病包括帕金森病和可

变型克雅病。

其他形式的脑部损伤包括免疫学、化学或辐射损害，例如由细菌或病毒感染、酒精、肿瘤化疗和肿瘤放疗引起的损害。

甘丙肽

甘丙肽为 29 个氨基酸的神经肽(Tatemoto *et al.* (1983) FEBS Lett. 164: 124-128)，它广泛表达于中枢和周围神经系统中，并且通过减少多种典型神经递质的释放从而具有对突触传导的强烈抑制作用(Fisone *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7339-7343; Misane *et al.* (1998) Eur. J. Neurosci. 10: 1230-1240; Pieribone *et al.* (1995) Neurosci. 64: 861-876; Hokfelt *et al.* (1998) Ann. N. Y. Acad. Sci. 863: 252-263; Kinney *et al.* (1998) J. Neurosci. 18: 3489-3500; Zini *et al.* (1993) Eur. J. Pharmacol. 245: 1-7)。上述抑制作用产生了各种神经学影响，包括：

a) 工作记忆(Mastropalo *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9841-9845)和长时程增强效应(LTP, 被认为是记忆的电生理学关联)(Sakurai *et al.* (1996) Neurosci. Lett. 212: 21-24)的损害；

b) 海马兴奋性下降与对发作活性的易感性下降(Mazarati *et al.* (1992) Brain Res. 589: 164-166)；以及

c) 在无损伤的动物中及神经损伤之后，伤害反应的明显抑制(Wiesenfeld *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3334-3337)。

甘丙肽的这些神经调制作用长期以来被认为是该肽在神经系统中的主要作用。然而，现在有相当多的证据表明对很多上述神经系统的损伤都显著地诱导甘丙肽在 mRNA 和肽水平的表达。这种损伤研究的实例包括甘丙肽在下列组织中的上调：

a) 周围神经切断后的背根神经节(DRG)(Hokfelt *et al.* (1987) Neurosci. Lett. 83: 217-220)，

b) 垂体摘除术后的下丘脑大细胞分泌神经元(Villar *et al.* (1990) Neurosci. 36: 181-199)，

c) 额顶皮质摘除(皮质剥除术)后的背缝(dorsal raphe)和丘脑(Cortes *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7742-7746)，

d) 内嗅皮质损伤后的海马分子层 (Harrison & Henderson (1999) *Neurosci. Lett.* 266: 41-44), 以及

e) 穹窿-海马伞束 (fimbria fornix bundle) 横切后的内侧隔核 (Medial septum, MS) 和斜角带核垂直支 (vertical limb diagonal-band, vdB) (Brecht *et al.* (1997) *Brain Res.* 48: 7-16)。

这些研究使很多的研究者推测甘丙肽可能除了其典型的神经调制作用之外还有促进细胞存活或生长的作用。

为验证上述假设, 培育了在甘丙肽基因上有丧失或增强功能的突变的转基因动物 (Bacon *et al.* (2002) *Neuroreport* 13: 2129-2132; Holmes *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11563-11568; Steiner *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4184-4189; Blakeman *et al.* (2001) *Neuroreport* 12: 423-425)。甘丙肽基因敲除动物的表型分析意外地证实, 这个肽在发育中的周围和中枢神经系统作为神经元亚群的存活因子 (Holmes, 2000; O'Meara *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11569-11574)。最近又证实了这种神经存活作用也与成熟的 DRG 有关。感觉神经元在损伤后依赖甘丙肽进行神经突延伸, 这是由 PKC 依赖方式激活第二甘丙肽受体亚型介导的 (Mahoney *et al.* (2003) *J. Neurosci.* 23: 416-421)。因此推测甘丙肽可能也以类似的方式在中枢神经系统中起作用, 减少脑部损伤、损害或疾病的动物模型的细胞死亡。

W092/12997 申请中公开了人类甘丙肽的序列。其他学者的研究的讨论中提及给予大鼠甘丙肽或其 N 端片段以增强吗啡的效果。上述申请说明甘丙肽预计有止痛效果, 所以可以单独给予或与其他镇痛剂一起给予。该申请要求保护甘丙肽或其类似物治疗疼痛的用途和甘丙肽拮抗剂治疗某些其他病症的用途。

W092/20709 申请中公开了许多假定的甘丙肽拮抗剂。所描述的拮抗剂都是以甘丙肽的前 12 个氨基酸为基础, 并连有其他肽的部分序列, 即为嵌合肽。根据受体亚型, 它们中一些可能为激动剂, 一些可能为拮抗剂, 还有一些可能既是激动剂又是拮抗剂。该申请公开该拮抗剂可以用于下列病症的治疗: 与胰岛素、生长激素、乙酰胆碱、多巴胺、P 物质、促生长素抑制素和去甲肾上腺素相关的病症, 包括阿尔茨海默性痴呆和肠疾病, 以及内分泌、食物摄入、神经学和精神病学领域的病症。

这些拮抗剂可用作镇痛剂。该申请公开了将其中描述的一些拮抗剂用于各种作用的研究结果,所述的各种作用例如甘丙肽对葡萄糖刺激胰岛素释放的抑制、甘丙肽诱导的对莨菪胺诱导乙酰胆碱(ACh)海马释放的抑制、甘丙肽诱导的对屈肌反射的促进、在膜结合研究中结合碘化甘丙肽的取代。该申请说明了拮抗剂有可能用作镇痛剂,但是该申请中没有公开这一作用的结果。关于甘丙肽激动剂的用途没有积极或有益的权利要求。

Ukai *et al.* (1995) *Peptides* 16: 1283-1286 中描述了甘丙肽在小鼠体内对记忆过程的作用的研究。研究结果说明甘丙肽损害记忆及其他认知功能,并且中等剂量的甘丙肽就能特异性引发失忆。关于甘丙肽激动剂的用途没有做出积极或有益的权利要求。

JP-A-6172387 公开了一种有效的抑制甘丙肽抑制胰岛素分泌作用的合成多肽及衍生物,希望可以作为甘丙肽拮抗物质而用于阿尔茨海默病的预防和治疗。

Bartfai *et al.* (1992) *TIPS* 13: 312-317 是一篇总结当时关于甘丙肽作用的知识的综述文献,它描述了一系列的高亲和力的甘丙肽拮抗剂。该综述说明甘丙肽拮抗剂可用于阿尔茨海默病的治疗。

Wynick *et al.* (1993) *Nature* 364: 529-532 讨论了甘丙肽参与基准水平的和雌激素刺激下的泌乳细胞的功能和催乳素激素的释放。

W092/15681 公开了具有人类甘丙肽氨基酸序列的肽以及编码这个肽的 DNA 克隆。该申请说明甘丙肽可能在胰腺活动中起作用,并且该申请要求保护调节胰腺活动或刺激生长激素产生的方法,所述方法涉及所公开的肽的使用。

W092/15015 公开了编码人类甘丙肽的 DNA 和鉴定甘丙肽的拮抗剂的方法。

W097/26853、US2003/0129702、US2003/0215823 和 US6,586,191 中公开了编码 GALR2 (第二甘丙肽受体亚型) 的 GALR2 cDNA 的分离和鉴定特异性结合 GALR2 的化合物的方法。在上述文献中提及 GALR2 拮抗剂可能在阿尔茨海默病的治疗中有效果。但在上述文献中没有公开基于化合物是否为 GALR2 激动剂而筛选可用于脑部损伤预防或治疗的化合物的方法。

Crawley (1996) *Life Sci.* 58: 2185-2199 是一篇总结当时甘丙

肽作用的知识的综述文献。它表明在大鼠体内中枢给药的甘丙肽会造成学习和记忆能力降低,并且甘丙肽拮抗剂的使用可能在阿尔茨海默病的治疗中有效。该文献没有提及甘丙肽激动剂在治疗阿尔茨海默病中的用途。

Liu *et al.* (1994) *J. Neurotrauma* 11: 73-82 中描述了在大鼠心室内注射甘丙肽对其中枢液压冲击引起的创伤性脑损伤(TBI)程度的影响,并且发现经甘丙肽处理的大鼠在各种感觉运动能力上明显增强。该文献把这些影响归结为甘丙肽的神经调制作用,该神经调制作用减少例如谷氨酸的兴奋性氨基酸的释放。然而,在甘丙肽处理组和未处理组的大鼠之间进行的记忆测试(Morris 水迷宫测试)并没有发现二者有差异。

Luo *et al.* (1995) *Neuropeptide* 28: 161-166 的研究检验了锐器切割(acute section)坐骨神经对大脑切除小鼠、仅存脊髓小鼠(spinalised)、未麻醉小鼠的屈肌反射兴奋性的影响,并以此作为慢性疼痛状态发展的量度。它发现甘丙肽可用于抑制疼痛反应。在该文献中没有提及使用 GALR2 激动剂来预防或治疗脑部损伤、损害或疾病。

EP-A-0918455 公开了在缺乏甘丙肽基因小鼠体内,挤压伤的康复(坐骨神经感觉轴突再生能力的指标)、发育中的神经存活和长时程增强效应(LTP)都比野生型小鼠要弱。由这些结果推断甘丙肽激动剂可能适用于修复神经损害的药剂的制备。该文献还提及甘丙肽激动剂可用于阿尔茨海默病及相关记忆丧失的治疗。但是没有提及甘丙肽受体亚型介导这些效果,也没有提及甘丙肽激动剂在保护中枢神经系统免于除阿尔茨海默病之外的损伤、损害或疾病方面的效果。

此外,上述专利申请和 EP-A-1342410 都描述了例如缺乏甘丙肽基因的基因工程哺乳动物,尤其是小鼠。

W002/096934 公开了可用于治疗例如发生于癫痫的抽搐发作的一系列甘丙肽激动剂化合物。该文献提及这些化合物可用于 CNS 损伤或在心脏直视手术中防止缺氧损害。然而却没有证据支持这一结论,因为 W002/096934 中包括的所有试验结果都是关于抽搐发作治疗的。该申请的发明人的研究小组随后部分发表了关于这些化合物中的一个的信息,该化合物命名为“galnon”(Wu *et al.* (2003) *Eur. J. Pharmacol.* 482: 133-137)。galnon 激活 GALR1 和 GALR2,并对它们具有相等的激

活活性。此外,最近的研究显示这一化合物还可以激活包括神经降压肽受体的许多其他 GPCR 受体 (abstract Wang *et al.*, Functional activity of galanin peptide analogues. Program No. 960.4 2004 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington DC: Society for Neuroscience, 2004. Online. (<http://sfn.scholarone.com/itin2004/index.html>)). 因此 galnon 在甘丙肽受体的激活方面并不是特异性的,也不是 GALR2 特异性激动剂。该专利申请 W002/096934 要求保护 galnon 在疼痛、癫痫的治疗中的用途,但是关于这类化合物在脑部损伤、创伤或疾病的治疗中的用途方面并没有要求保护。

Saar *et al.* (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 7136-7141、Zachariou *et al.* (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 9028-9033 和 Abramov *et al.* (2003) Neuropeptides 38: 55-61 分别讨论了 galnon 在癫痫、鸦片成瘾和服用研究中的用途。

甘丙肽受体

鉴定了三种 G 蛋白偶联的甘丙肽受体亚型: GALR1、GALR2 和 GALR3 (Habert-Ortoli *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9780-9783; Burgevin *et al.* (1995) J. Mol. Neurosci. 6: 33-41; Howard *et al.* (1997) FEBS Letts. 405: 285-290; Smith *et al.* (1997) J. Biol. Chem. 272: 24612-24616; Wang *et al.* (1997a) Mol. Pharmacol. 52: 337-343; Wang *et al.* (1997b) J. Biol. Chem. 272: 31949-31953; Ahmad *et al.* (1998) Ann. N.Y. Acad. Sci. 863: 108-119; Bloomquist *et al.* (1998) Biophys. Res. Commun. 243: 474-479; Kolakowski *et al.* (1998) J. Neurochem. 71: 2239-2251; Smith *et al.* (1998) J. Biol. Chem. 273: 23321-23326)。甘丙肽与 GALR1 和 GALR3 的结合表明通过与抑制性的 G_i 蛋白偶联而抑制腺苷酸环化酶 (Wang, 1998; Habert-Ortoli, 1994; Smith, 1998)。相反地, GALR2 的激活通过与 $G_{q/11}$ 偶联而刺激磷脂酶 C 和蛋白激酶 C 的活性 (Fathi, 1997; Howard, 1997; Wang, 1997a; Wittau *et al.* (2000) Oncogene 19: 4199-4209), 由此激活细胞外信号调节激酶 (ERK) 级联反应。GALR1 和 GALR3 与腺苷酸环化酶的消极偶联预计可对神经损伤或疾病后的神经功能起抑制作用。所以,这预计会在行为上有消极的和有害的影响,

并且抑制或延缓损伤或疾病后的恢复。而且, GALR1 和 GALR3 在心脏和消化道中均有表达, GALR1 还表达于肺和膀胱。

由于受体亚型特异性抗血清的缺乏和受体亚型特异性甘丙肽配体资料的缺乏, 所以每个受体的功能作用的分析仍然受到阻碍。这一领域一个主要的进展是发现了甘丙肽 2-11 肽(命名为 AR-M1896)优先结合 GALR2 的特异性比结合 GALR1 高 500 倍, 并且它几乎完全丧失了对 GALR1 的激活活性(Liu *et al.* (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9960-9964; Berger *et al.* (2004) *Endocrinology* 145: 500-507)。没有发表过 AR-M1896 是否结合或激活 GALR3 的数据。AR-M1896 以前被用于证实了 GALR2 的激活似乎是甘丙肽刺激神经突从周围神经系统的成熟感觉神经元向外生长的主要机制(Mahoney, 2003)。甘丙肽 1-15 肽和甘丙肽 1-16 肽也已知是可以激活甘丙肽受体的全长甘丙肽神经肽中的一部分。

在通篇说明书中使用的术语“GALR”表示受体 GALR1、GALR2 和 GALR3 中的一个受体。该受体包括但不限于人、大鼠和小鼠的受体。所述受体也可以是嵌合型的(即包括来源于不同种的 GALR 序列)、截短型的(即比天然 GALR 序列短)或延长型的(即包括了天然 GALR 序列以外的附加序列)。受体的激活可以通过例如细胞外钙水平的提高来鉴定。

在通篇说明书中使用的术语“GALR2 特异性激动剂”表示一种能够激活 GALR2 而导致在细胞中引发反应的物质, 但是该物质不激活(或以较低的活性激活)GALR1 和/或 GALR3。鉴定一种化合物是否为甘丙肽受体激动剂的方法为本领域所熟知, 例如可参见于 Botella *et al.* (1995) *Gastroenterology* 108: 3-11 和 Barblivien *et al.* (1995) *Neuroreport* 6: 1849-1852。与结合和激活 GALR1 相比, GALR2 特异性激动剂优先结合和激活 GALR2 的选择性至少为 30 倍以上, 优选地选择性较 GALR1 高 50 倍以上, 更优选地选择性较 GALR1 高 100 倍以上。与结合和激活 GALR3 相比, GALR2 特异性激动剂优先结合和激活 GALR2 的选择性也至少为 30 倍以上, 优选地选择性较 GALR3 高 50 倍以上, 更优选地选择性较 GALR3 高 100 倍以上。

发明内容

根据本发明的第一方面,提供 GALR2 特异性激动剂在制备用于预防或治疗脑部损害、损伤或疾病的药剂中的用途。

使用 GALR2 特异性激动剂可以有利地预防脑部损害、损伤或疾病,或者改善受上述脑部损害、损伤或疾病侵害的个体的状况,这是由于甘丙肽和甘丙肽激动剂能够减少在上述情况下的细胞死亡。甘丙肽还可作为海马的内源性神经保护因子。由于三种 GALR 受体每一个利用不同的信号级联反应,所以不激活 GALR1 和/或 GALR3 的 GALR2 特异性激动剂有利于治疗脑部损伤或疾病,同时使因激活 GALR1 或 GALR3 而产生有害的周围副作用最小化。

脑部损伤或损害可由下述之一的原因引发:栓塞性、血栓性或出血性中风;对脑部或脊髓的直接或间接创伤或手术;在心肺旁路手术或肾透析过程中的脑部缺血性或栓塞性损害;心肌梗塞后的再灌注脑部损害;脑部疾病;免疫学损害、化学损害或辐射损害。免疫学损害可能是由细菌或病毒感染引起。化学损害可能是由过量饮酒或给予肿瘤治疗的化疗药剂引起。辐射损害可能是由肿瘤治疗的放疗引起。

脑部疾病优选为阿尔茨海默病、帕金森病、多发性硬化或可变量克雅病。

GALR2 特异性激动剂可以是包括一部分甘丙肽氨基酸序列的多肽,并且优选为 AR-M1896。

或者, GALR2 特异性激动剂可以是非肽类的小分子化学个体。

GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力为 0 至 100 μM , 优选 0 至 1 μM , 并且对 GALR2 的结合特异性比对 GALR1 的结合特异性强 30 倍以上, 优选强 50 倍以上, 最优选强 100 倍以上。同样, GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合特异性比对 GALR3 的结合特异性强 30 倍以上, 优选强 50 倍以上, 最优选强 100 倍以上。

根据本发明的第二方面,提供一种预防或治疗脑部损伤、损害或疾病的方法,所述方法包括对需要这种预防或治疗的个体给予有效量的 GALR2 特异性激动剂,优选的个体为人类个体。

脑部损伤或损害可由下述之一的原因引发:栓塞性、血栓性或出血性中风;对脑部或脊髓的直接或间接创伤或手术;在心肺旁路手术或肾透析过程中的脑部缺血性或栓塞性损害;心肌梗塞后的再灌注脑部损害;脑部疾病;免疫学损害、化学损害或辐射损害。免疫学损害可能是

由细菌或病毒感染引起。化学损害可能是由过量饮酒或给予肿瘤治疗的化疗药剂引起。辐射损害可能是由肿瘤治疗的放疗引起。

脑部疾病优选为阿尔茨海默病、帕金森病、多发性硬化或可变量克雅病。

GALR2 特异性激动剂可以是包括一部分甘丙肽氨基酸序列的多肽，并且优选为 AR-M1896。

或者，GALR2 特异性激动剂可以是非肽类的小分子化学个体。

GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力为 0 至 100 μM ，优选 0 至 1 μM ，并且对 GALR2 的结合特异性比对 GALR1 的结合特异性强 30 倍以上，优选强 50 倍以上，最优选强 100 倍以上。同样，GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合特异性比对 GALR3 的结合特异性强 30 倍以上，优选强 50 倍以上，最优选强 100 倍以上。

根据本发明的第三方面，提供一种筛选修复预防或治疗脑部损伤或损害的候选化合物的方法，所述方法包括测定至少一种待测化合物是否为 GALR2 特异性激动剂，以及如果它是 GALR2 特异性激动剂，则选择这至少一种待测化合物作为候选化合物。

测定发现这至少一种待测化合物可以 0 至 100 μM (优选 0 至 1 μM) 的结合亲和力结合 GALR2。待测化合物结合 GALR2 的选择性比它对 GALR1 的选择性强 30 倍以上，优选强 50 倍以上，最优选强 100 倍以上。优选地，该待测化合物结合 GALR2 的选择性比它对 GALR3 的选择性强 30 倍以上，优选强 50 倍以上，最优选强 100 倍以上。

GALR2 可包括至少一部分人类 GALR2，或可为全长的人类 GALR2。

GALR2 可包括至少一部分非人类 GALR2，优选大鼠或小鼠的 GALR2，或可为全长的 GALR2。

GALR2 可为嵌合受体构建体。

使用根据本发明的这一方面的方法，待测化合物的筛选可在高通量筛选分析中筛选。

根据本发明的第四方面，提供用于预防或治疗脑部损伤、损害或疾病的药物组合物，所述组合物包括：

- a) 有效量的至少一种 GALR2 特异性激动剂或其可药用的盐，以及
- b) 药学上合适的佐剂、载体或赋形剂。

脑部损伤或损害可由下述之一的原因引发：栓塞性、血栓性或出血

性中风；对脑部或脊髓的直接或间接创伤或手术；在心肺旁路手术或肾透析过程中的脑部缺血性或栓塞性损害；心肌梗塞后的再灌注脑部损害；脑部疾病；免疫学损害、化学损害或辐射损害。免疫学损害可能是由细菌或病毒感染引起。化学损害可能是由过量饮酒或给予肿瘤治疗的化疗药剂引起。辐射损害可能是由肿瘤治疗的放疗引起。

脑部疾病优选为阿尔茨海默病、帕金森病、多发性硬化或可变型克雅病。

GALR2 特异性激动剂可以是包括一部分甘丙肽氨基酸序列的多肽，并且优选为 AR-M1896。

或者，GALR2 特异性激动剂可以是非肽类的小分子化学个体。

GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合亲和力为 0 至 100 μM ，优选 0 至 1 μM ，并且对 GALR2 的结合特异性比对 GALR1 的结合特异性强 30 倍以上，优选强 50 倍以上，最优选强 100 倍以上。同样，GALR2 特异性激动剂对 GALR2 的结合特异性比对 GALR3 的结合特异性强 30 倍以上，优选强 50 倍以上，最优选强 100 倍以上。

药物学上合适的佐剂、载体或赋形剂可以选自：离子交换剂，氧化铝，硬脂酸铝，磷脂酰胆碱，诸如人血清白蛋白的血清蛋白，诸如磷酸盐的缓冲物质，甘氨酸，山梨酸，山梨酸钾，饱和植物脂肪酸的不完全甘油酯混合物，水，盐或电解质，例如鱼精蛋白硫酸盐，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，基于纤维素的物质，聚乙二醇，羧甲基纤维素钠，聚丙烯酸酯，蜡类，聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物，聚乙二醇和羊毛脂。

该药物组合物可以口服或肠胃外给药，优选以口服给药。

当该药物组合物以口服给药时，它可以为胶囊或药片形式，并可以优选包括乳糖和/或玉米淀粉。该药物组合物还可包括润滑剂，优选硬脂酸镁。该药物组合物可以为水悬液或水溶液形式，还可以进一步包括乳化剂和/或助悬剂。该药物组合物可以包括甜味剂、香味剂和/或着色剂。

该药物组合物也可以通过下述方式给药：注射、使用无针装置、吸入喷雾剂、局部给药、直肠给药、鼻部给药、口颊给药、阴道给药或通过植入的容器给药。

当该药物组合物以注射或无针装置给药时，它可以为无菌的可注射

制剂形式或适合通过无针装置给药的形式。该无菌的可注射制剂或适合通过无针装置给药的形式可以是水性或油性悬液,或是存在于无毒的适于肠胃外给药的稀释剂或溶剂中的悬液。水性悬液可以在甘露醇、水、林格氏液或等渗氯化钠溶液中制备。油性悬液可以在合成单酰甘油、合成二酰甘油、脂肪酸或天然的可药用的油中制备。脂肪酸可以是油酸或油酸甘油酯衍生物。天然的可药用的油可以是橄榄油、蓖麻油,或是聚氧乙烯化的橄榄油或蓖麻油。油性悬液可以包括长链醇类稀释剂或分散剂,优选 Ph. Helv.

当该药物组合物经直肠给药时,它可以是直肠给药的栓剂形式。该栓剂可以包含在室温下为固体而在直肠温度下为液体的非刺激性赋形剂。该非刺激性赋形剂可为可可脂、蜂蜡或聚乙二醇中的一种。

当该药物组合物以局部方式给药时,它可以是包括选自下列的载体的软膏剂:矿物油、液体石蜡(Liquid petroleum)、白矿脂(white petroleum)、丙二醇、聚氧乙烯-聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。或者它可以是包括选自下列载体的洗剂或霜剂:矿物油、失水山梨醇单硬脂酸酯、聚山梨醇酯 60、十六烷基酯蜡、鲸蜡硬脂醇(cetearyl alcohol)、2-辛基十二烷醇、苯甲醇和水。

当该药物组合物为鼻部给药时,它可以以鼻部气雾剂和/或吸入剂的方式给药。

根据本发明的第五方面,提供一种抑制细胞死亡的方法,所述方法包括使细胞与有效抑制该细胞死亡的量的 GALR2 特异性激动剂接触。该细胞可以是神经元,优选中枢神经系统的神经元,优选海马或皮层神经元。优选地,该细胞为人类细胞。在本方法中,细胞的死亡因存在于细胞内的 GALR2 的激活而被抑制。如果细胞死亡发生的概率降低和/或细胞的寿命延长,即为细胞的死亡被抑制。

附图说明

本发明的实施方案以实施例的方式描述,并以附图 1-4 为参考,其中:

图 1 显示的是腹膜内给予 20mg/kg 红藻氨酸盐对体内海马细胞死亡的影响;

图 2 显示的是与 10nM-1 μ M 的十字孢碱 (staurosporine, St) 共培养之后甘丙肽基因敲除的、甘丙肽过表达的和野生型的海马细胞体外培养物的反应;

图 3 显示的是共同给予十字孢碱或谷氨酸与甘丙肽或 AR-M1896 对甘丙肽野生型海马细胞体外培养物的影响; 以及

图 4 显示的是甘丙肽基因敲除的、甘丙肽过表达的和野生型的动物在 MS 的实验性自身免疫性脑脊髓炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE) 模型中的体内反应。

具体实施方式

方法

动物

所有动物任意地喂食标准饲料和水。动物的照料和手续按照英国内政部 (United Kingdom Home Office) 的规定和指引进行。

甘丙肽基因敲除小鼠

有关品系和繁育过程的细节已有前人发表 (Wynick *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 12671-12676)。简而言之, 使用 E14 细胞系产生了在甘丙肽基因中靶向突变的小鼠纯合体。用一个反向的 PGK-Neo 盒替换了外显子 1-5, 并将突变体繁育至纯合体, 并保持在 12901aHsd 品系内同系繁殖。在所有实验中均使用年龄和性别相当的野生型同胞动物作为对照。

甘丙肽过表达小鼠

有关品种和繁育过程的细节已有前人发表 (Bacon *et al.* (2002) Neuroreport 13: 2129-2132)。简而言之, 甘丙肽过表达小鼠在 CBA/B6 F1 杂交背景下产生。筛选小鼠 129sv 粘端质粒基因组文库, 并亚克隆了含有完整鼠类甘丙肽编码区域和 ~20kb 的上游序列的 ~25kb 区域。转基因通过限制性消化切除后被微注射至受精卵中, 使其终浓度为 5ng/ μ l。按照前面描述的方法 (Bacon *et al.* (2002) Neuroreport 13: 2129-2132) 产生了四个甘丙肽过表达的转基因品系并用免疫细胞化学方法测定了在海马中的甘丙肽的表达 (见下文)。发现品系 46 与其他三个品系及野生型对照相比, 在海马的 CA1 和 CA3 区域和齿状回中的甘

丙肽表达量最高。所以在以后的所有实验中均使用品系 46。

器官型海马培养物

按前人描述的方法 (Elliott-Hunt *et al.* (2002) *J. Neurochem.* 80: 416-425; Stoppini *et al.* (1991) *J. Neurosci. Methods* 37: 173-182) 制备了器官型培养物。简而言之, 在解剖显微镜下迅速取出 5-6 日龄的小狗 (pup) 的海马, 并用 McIlwain 组织切片机 (Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd., Gomshall, UK) 以 400 μ m 横向切片。将切片置于微孔跨膜 Biopore 膜 (Millipore, Poole, UK) 上, 在 6 孔培养板中、95% 空气和 5% CO₂、37°C 条件下培养, 培养基为 50% 的含厄尔氏盐 (Earle's Salts) (Gibco BRL)、不含 L-谷氨酰胺的基本必须培养基、50% 的汉克平衡盐液 (Gibco BRL)、25% 的马血清 (热灭活; Harlan Serum Labs, Loughborough, UK)、5mg/ml 葡萄糖 (Sigma Chemical Co., Poole, UK) 和 1ml 谷氨酰胺 (Sigma)。

原代神经元培养物的制备

分离 2-3 日龄的小狗的海马, 并置于 4°C 采集缓冲液中, 采集缓冲液由在下述溶液中添加 0.5% (v/v) 牛血清白蛋白 (BSA, ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA) 制备得到, 所述溶液 100ml 中含有汉克平衡盐液 (无钙、镁) (Gibco BRL, Paisley, UK), 10% (v/v) N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸 (HEPES) (ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA)、50U/ml 青霉素 (Britannia Pharmaceuticals Ltd., Redhill, Surrey, UK)、0.05mg/ml 链霉素 (Sigma Biomedical Company, Poole, Dorset, UK)。海马神经元的酶消化、分离和培养按前人描述的方法进行 (McManus & Brewer (1997) *Neurosci. Lett.* 224: 193-196)。细胞计数后以 4×10^4 细胞/孔将细胞接种到 D-L-多鸟氨酸包被的 96 孔板中。在 24 小时后加入 10 μ g/ml 的 5'氟 2'脱氧尿嘧啶 (Sigma; 抗有丝分裂试剂)。实验前在环境氧气、5% CO₂、37°C 的条件下培养 9 天。第三天后更换培养基, 然后每四天更换一次。

免疫组织化学

在小鼠心内灌注含 4% 多聚甲醛/磷酸盐缓冲液 (PBS)。将脑取出并在室温下后固定 4 小时。将脑在 20% 蔗糖中 4°C 平衡过夜, 并包埋于最适切割温度 (Optimal Cutting Temperature, OCT) 化合封固剂 (Tissue Tek Ltd., Eastbourne, UK) 中, 在干冰上冷冻并恒冷切片 (30 μ m 切

片)。将切片用含 10%正常山羊血清、0.2%Triton X-100 的 PBS (PBST) 在室温封闭和透化 1 小时。将切片与在 PBST 中 1:1000 稀释的抗甘丙肽兔多克隆抗体在室温下孵育过夜,用 PBS 洗涤三次,每次 10 分钟,然后与 1:800 稀释的异硫氰酸荧光素(FITC)-山羊抗兔抗体(The Jackson Laboratory, Westgrove, PA, USA) 在室温下孵育 3 小时。洗涤后用 Vectashield™ (Vector Laboratories Inc., Burlington, CA, USA) 封片。图像的采集使用 Leica 荧光显微镜 (Leica Microsystems, Milton Keynes, UK) 和 RT Color Spot 照相机及 Spot Advance 图像捕获系统软件 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA)。

还对分散型海马神经元和器官型培养物进行了甘丙肽免疫组织化学分析,将上述分散海马神经元和器官型培养物在 4%多聚甲醛中固定,用 Triton X-100 透化,然后按上述步骤进行分析。

十字孢碱和谷氨酸诱导的海马损害

将 14 天的器官型海马培养物置于 0.1%BSA 的无血清培养基中培养 16 小时,然后再与不同浓度的谷氨酸培养 3 小时或与不同浓度的十字孢碱培养 9 小时。十字孢碱和谷氨酸都已知会引起这类细胞培养物的兴奋性中毒损害 (Prehn *et al.* (1997) J. Neurochem. 68: 1679-1685; Ohmori *et al.* (1996) Brain Res. 743: 109-115)。将培养物用无血清培养基洗涤,并在成像前再培养 24 小时。通过碘化丙锭存在条件下进行的实验观察到在器官型培养物中有区域性神经元损伤。在膜损伤后,染料进入细胞,与核酸结合并累积,使细胞有明亮的荧光 (Vornov *et al.* (1994) Stroke 25: 457-465)。在明视野图像中可以清楚地看到 CA1 神经元子区域。包含 CA1 区域的部分的神经元损害使用 NIH Image 软件 (Scion Image, MD, USA) 中的密度 Slice 函数进行分析,从而确定高于背景的信号。测量了表现出不含染料碘化丙锭的子区域的面积,并用其所占明视野图像测定的子区域的总面积的百分比表示。此外,使用密度 Slice 函数时为保持精密设置参数的一致性,阈值是针对暴露于 10 mM 谷氨酸的培养物的阳性对照系列而设置。

将 9 天的原代海马培养物暴露于十字孢碱 24 小时。使用存活/死亡试剂盒 (Molecular Probes, Lieden, Netherlands), 通过对存活和死亡的神经元进行人工计数测量了神经元的存活力。

处理

将器官型和分散型原代海马培养物培养不同的时间,培养中加入或不加入下列药品:十字孢碱(Sigma)、L-谷氨酸(Sigma)、甘丙肽(Bachem, Merseyside, UK)、高亲和力 GALR2 特异性激动剂 AR-M1896 [Gal (2-11)-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-NH₂] (AstraZeneca, Montreal, Quebec, Canada)、淀粉状蛋白- β (1-42) (A β (1-42)) 和反向 A β (42-1) 肽 (American Peptide Company, Sunnyvale, CA93906)。在用于以下的实验之前,通过在培养基中预培养以诱导 A β 形成纤维。具体而言,将 0.45mg 的 A β 肽溶于 20 μ l 的二甲亚砷 (DMSO-Sigma) 中,在培养基中稀释为 100 μ M 的储存液,然后在缓慢振荡条件下室温培养 24 小时。

红藻氨酸盐诱导的海马损伤

向 8 周龄的雌性小鼠腹腔内 (i. p.) 注射红藻氨酸 (20mg/kg) (Tocris Cookson, Bristol, UK) 或赋形剂 (PBS, 1ml/kg)。如前所述,红藻氨酸已知可引起海马损害 (Beer et al. (1998) Brain Res. 794: 255-256; Mazarati et al. (2000) J. Neurosci. 16: 6276-6281)。通过末端脱氧核苷酸转移酶介导荧光素-dUTP 缺口末端标记 (TUNEL) 方法测量海马细胞的死亡。在注射红藻氨酸或赋形剂后 72 小时处死动物。在小鼠心内灌注含 4%多聚甲醛的 PBS,将脑迅速取出后室温下后固定 4 小时。将脑在 20%蔗糖中 4℃平衡过夜,并包埋于 OCT 封固剂中,在干冰上冷冻。在恒冷切片机上切片 (16 μ m),在明胶包被的载玻片上解冻封片,置于-80℃储存备用。使用原位细胞检测试剂盒

(Boehringer, Berkshire, UK) 评估了细胞凋亡。将每六张切片置于一个湿盒中,用甲醇封闭, Triton (0.1%) 和柠檬酸钠 (0.1%) 透化,然后用荧光素 dUTP 在 37℃标记 1 小时。然后使切片与辣根过氧化物酶结合,用二氨基联苯胺 (DAB) 染色,用 haematoxylin 复染。除了标记时不用荧光素 dUTP 以外,对照样本也用同样方法处理。洗涤后用 Vectashield™ 封片。细胞的可视化使用 Leica 荧光显微镜和 RT Color Spot 照相机及 Spot Advance 图像捕获系统软件 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA)。

EAE 模型

MS 的标准 EAE 模型按照前人的方法 (Radu et al. (2000) Int.

Immunol. 12: 1553-60) 使用。在小鼠的一只后腿使用总量为 200 μ g 的 MBP1-9 (AcASQKRPSQR, 由 Abimed, Langenfeld, Germany 合成) 进行皮下免疫, MBP1-9 用完全弗氏佐剂 (Sigma) 乳化, 还添加了 4mg/ml 的结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 菌株 H37RA (Difco, Detroit, MI)。结核分枝杆菌纯化蛋白衍生物从英国中央兽医实验室 (UK Central Veterinary Laboratory) (Weybridge, UK) 获得。按照下述指标对小鼠的 EAE 症状进行分级: 0: 无症状; 1: 尾部无力; 2: 局部后肢麻痹和/或翻正反射受损; 3: 全部后肢麻痹; 4: 后肢加前肢麻痹; 5: 垂死或死亡。

统计学分析

数据表示为平均值+SEM。使用 Student's t 检验分析了组内十字孢碱浓度的差异。因此适当地使用 ANOVA 或非参数曼-惠特尼 U 事后检验来分析基因型和不同配体之间和/或十字孢碱和谷氨酸之间的数据点的差异。小于 0.05 的 P 值被认为是显著的。

候选化合物筛选方法

经转染并稳定表达编码人类 GALR1、GALR2 或 GALR3 的 cDNA 的 CHO 细胞从 Euroscreen (Brussels, Belgium) 获得。细胞在 Nutrient Mix (HAMS) F12 (Gibco BRL, Paisley, UK) 培养基中培养, 培养基中添加 10% 胎牛血清 (Gibco BRL) 和 0.4mg/ml 的 G418 (Sigma), 将细胞置于 3 层培养瓶中于 37°C、5%CO₂/95%空气条件下培养。细胞生长至 80% 会合时在含 0.02%EDTA 的 D-PBS 中在 37°C 分离 10 分钟。在实验当天将细胞以 1000rpm 离心 5 分钟收集, 然后在培养基中重悬至所需密度。使用 FLIPR384 (Molecular Devices Ltd, Wokingham, UK) 来测量加入不同化合物后的细胞反应。将细胞以密度 2×10^4 细胞/30 μ l 重悬于培养基中, 并转移至 384 孔黑色/透明 Greiner 培养板中 (30 μ l/孔), 于 37°C、5%CO₂/95%潮湿空气条件下培养 2 小时。每孔加入 30 μ l Fluo-4-AM (在分析缓冲液中浓度为 4 μ M, 含 0.8%多聚醇 F-127 和 1% FBS) 对细胞染色, 并于 37°C、5%CO₂/95%潮湿空气条件下培养 1 小时。将细胞用 EMBLA 培养板洗涤器洗涤 (4 x 80 μ l), 洗涤液为 FLIPR 分析缓冲液 (无钙、镁的 HBSS, 添加 20mM Hepes、1mM MgCl₂、2mM CaCl₂、2.5mM 4-(二丙基氨磺酰基) 苯甲酸和 0.1%BSA), 这样在洗涤后每孔中剩余 45 μ l。

使用 FLIPR384 来测量细胞对化合物的反应。在加入化合物 ($5 \mu\text{l}$; 终浓度 $10 \mu\text{M}$) 之前 10 秒钟每秒钟记录一次基础荧光, 加入化合物后每秒钟记录一次荧光, 记录 60 次, 然后每 6 秒记录一次, 记录 20 次。数据按照相对荧光单位 (relative fluorescence units, RFU) 记录, 并对 3 分钟内输出的统计记录的最大 RFU 进行分析。数据分析使用 XLFit3.0。所有数据在丢弃之前都使用相关质量控制程序进行处理。计算了每种化合物对每种 GALR 表达细胞系的 EC_{50} , 并从这些数据中鉴定了 GALR2 特异性激动剂。

结果

实验 1

如前人所述 (Beer, 1998; Mazarati, 2000; Tooyama *et al.* (2002) *Epilepsia* 43 Suppl 9: 39-43) 用腹腔内注射 20mg/kg 的红藻氨酸诱导兴奋性毒性海马损害。三天之后取脑并通过 TUNEL 阳性细胞计数来评估海马细胞死亡。结果显示于图 1。甘丙肽基因敲除的动物 (KO) 与相应品系的野生型 (WT) 对照相比, 在 CA1 和 CA3 区域的凋亡神经元的数量显著提高 (图 1), 分别提高了 62.9% 和 44.8% ($^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$)。相反地, 甘丙肽过表达的动物 (OE) 与相应品系的野生型 (WT) 对照相比, 在 CA1 和 CA3 区域的细胞死亡的程度显著降低 (图 1), 分别降低了 55.6% 和 50.4% ($p < 0.05$)。

实验 2

为在一个更易于处理的体外系统中进一步分析甘丙肽的神经保护作用, 使用了原代分散型和器官型海马培养物 (Elliott-Hunt, 2002)。这两种技术是互为补充, 因为分散型海马培养物可以确保观察到的结果是神经元特异性的, 而器官型培养物保留了神经回路的突触和解剖学结构 (Elliott-Hunt, 2002), 还保留了很多在体内的功能性特征 (Adamschik, *et al.* (2000) *Brain Res. Prot.* 5: 153-158)。研究了十字孢碱及谷氨酸在海马培养物中对神经元细胞死亡的影响 (Prehn, 1997; Ohmori, 1996)。用碘化丙锭染色使细胞的死亡可视化。结果表示为表达荧光的面积占未处理的“对照组”培养物的百分比。 $1 \mu\text{M}$ 和 100nM 的十字孢碱在野生型 (WT) 和甘丙肽基因敲除 (KO) 的培养物中都造成了显著而稳定水平的神经毒性。如图 2A 所示, 甘丙肽基因敲除的动物在两种剂量时细胞死亡百分比均比野生型对照显著提

高($1\ \mu\text{M}$: $68 \pm 0.5\%$ 对 $38 \pm 8\%$; 100nM : $65 \pm 10\%$ 对 $40 \pm 26\%$; $n=4$, $p<0.05$)。类似地,也记录到甘丙肽基因敲除器官型培养物与野生型对照相比,在暴露于 4mM 谷氨酸 9 小时后,其细胞死亡明显和显著地超过野生型($85 \pm 8.6\%$ 对 $61 \pm 9.3\%$; $n=4$, $p<0.05$)。

为保证上述结果是神经元特异性的,还研究了十字孢碱对分散型原代海马神经元的影响。在 10nM – $1\ \mu\text{M}$ 的十字孢碱浓度范围内,同样观察到甘丙肽基因敲除培养物中的细胞死亡明显超过野生型对照($n=4$, $p<0.01$) (图 2B)。

实验 3

已证实甘丙肽的缺失提高了海马细胞死亡的敏感性,还进一步对甘丙肽过表达小鼠进行了研究。在暴露于 50nM 或 100nM 的十字孢碱后,在甘丙肽过表达动物(OE)中观察到的细胞死亡比相应品系的野生型对照(WT)显著降低(图 2C; $n=4$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$)。

实验 4

为测试外源性的甘丙肽是否能保护野生型海马神经元免受损害,将 100mM 甘丙肽与 100nM 十字孢碱共同给予野生型器官型培养物。这种共同给予对这些培养物提供了显著的神经保护($n=4$, $p<0.05$) (图 3A)。类似地,甘丙肽在以 10nM – $1\ \mu\text{M}$ 范围与 4mM 谷氨酸共同给予野生型器官型培养物时也具有保护性(图 3B)。与使用器官性培养物时的发现相一致, 100nM 甘丙肽也可以保护野生型分散原代海马神经元免受 10nM 十字孢碱诱导的损害(图 3C; $n=3$, $p<0.05$)。

实验 5

甘丙肽在海马中的神经保护效果似乎是由三种 G-蛋白偶联甘丙肽受体亚型(GALR1、GALR2 和 GALR3)中的一种或多种的激活而介导的。前人曾报道过 GALR2 的激活似乎是甘丙肽刺激神经突从成熟感觉神经元生长的主要机制(Mahoney, 2003)。因此也测试了 100nM 的 AR-M1896 (一种高亲和力 GALR2 特异性激动剂)与 100nM 十字孢碱共同给予野生型动物器官型培养物的效果。应该注意到尽管 AR-M1896 确实可以微弱地激活 GALR1,但在 100nM 的情况下也不太可能发生,因为 GALR1 的 IC_{50} 是 879nM 。AR-M1896 在野生型器官型培养物中显著地减少细胞死亡的数量,细胞死亡的减少量相当于等摩尔浓度的甘丙肽造成的效果($p<0.05$, 图 3A)。如同在野生型器官型培养物中观察到的一样,AR-M1896 的加

入在甘丙肽基因敲除培养物中也有效地减少十字孢碱诱导的细胞死亡（数据未示出）。还使用 AR-M1896 和十字孢碱处理分散型原代海马神经元，证实了该肽与全长甘丙肽有相近的保护效果（图 3C）。在没有十字孢碱的器官型或原代培养物中没有记录到甘丙肽或 AR-M1896 的明显效果。

实验 6

AD 的疾病进程与淀粉状蛋白 β 纤维在脑部沉积而形成老年斑有关，老年斑由被 α -分泌酶从淀粉状蛋白前体蛋白切割而产生的肽组成（Gamblin *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 10032-10037）。纤维状淀粉状蛋白 β 的沉积被认为是 AD 的神经病理学上的起因。为测试外源性甘丙肽是否能够对纤维状 A β 诱导的神经毒性起保护作用，从甘丙肽基因敲除、甘丙肽过表达和相应品系的野生型对照的转基因动物中取得 14 日龄的海马器官型培养物。这些培养物用 10 μ M 的纤维状 A β (1-42)、反向对照肽 A β (42-1) 处理最高达 72 小时，并设不加入肽的组。10 μ M 的纤维状 A β (1-42) 的使用如前人所述（Zheng *et al.* (2002) *Neuroscience* 115: 201-211）。实验分三份平行进行并如上述的方法使用碘化丙锭荧光（PIF）强度来测量细胞死亡。图象的捕获和分析使用 Scion Image 分析软件。结果证实甘丙肽基因敲除小鼠中纤维状 A β (1-42) 诱导的海马细胞死亡数量在统计学上高于野生型对照。相反地，记录到甘丙肽过表达小鼠中纤维状 A β (1-42) 诱导的海马细胞死亡数量显著低于野生型对照。

实验 7

使用上述如前人所述的 EAE 模型，在甘丙肽基因敲除、甘丙肽过表达和相应品系的野生型对照转基因动物中诱导了 MS 表型。图 4A 显示，甘丙肽基因敲除动物与相应品系的野生型对照相比，其疾病形式发展得更快和更严重（N=5，P<0.01）。相反地，甘丙肽过表达小鼠与相应品系的野生型对照明显相反，它们未表现出任何疾病症状（图 4B；N=5，P<0.01）。这些数据再一次证实甘丙肽在中枢神经系统神经损伤的炎症模型中起到保护作用。

总结

在许多体内和体外损伤模型中证实了甘丙肽作为海马的内源性保护因子。而且外源性甘丙肽和前述的高亲和力 GALR2 特异性激动剂都可

以减少细胞死亡。因此, GALR2 是介导上述保护性效果的主要受体亚型。上述数据说明 GALR2 特异性激动剂可以在不同类型的脑部损伤、损害或疾病的治疗或预防中具有治疗用途。

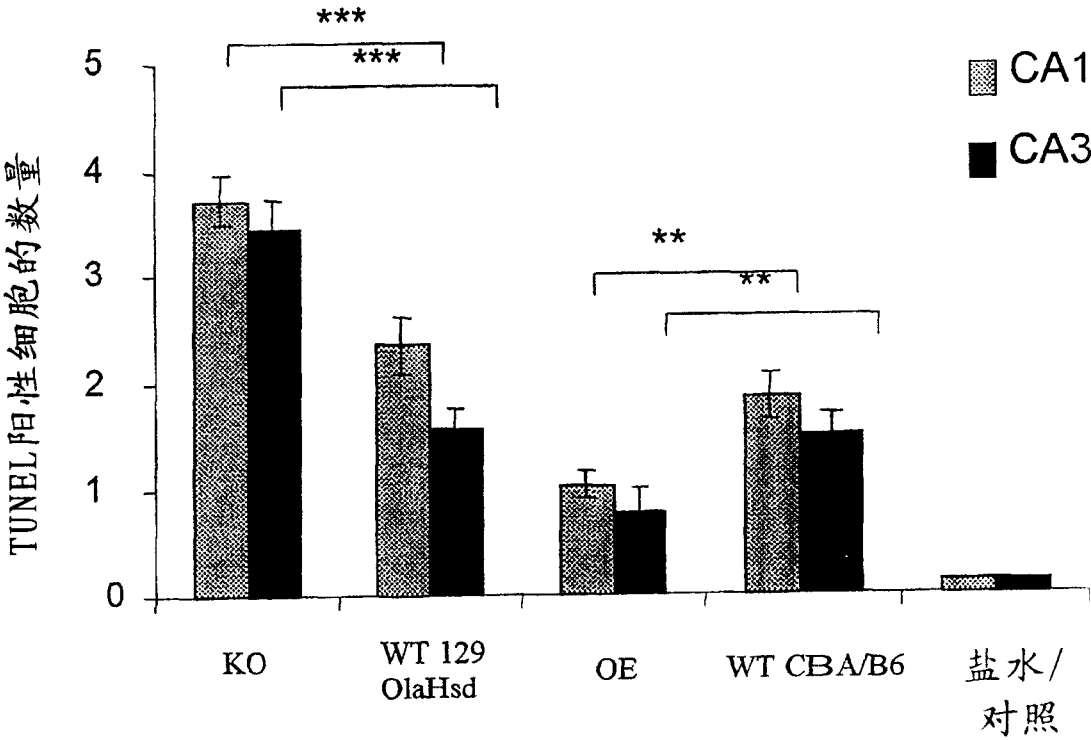


图 1

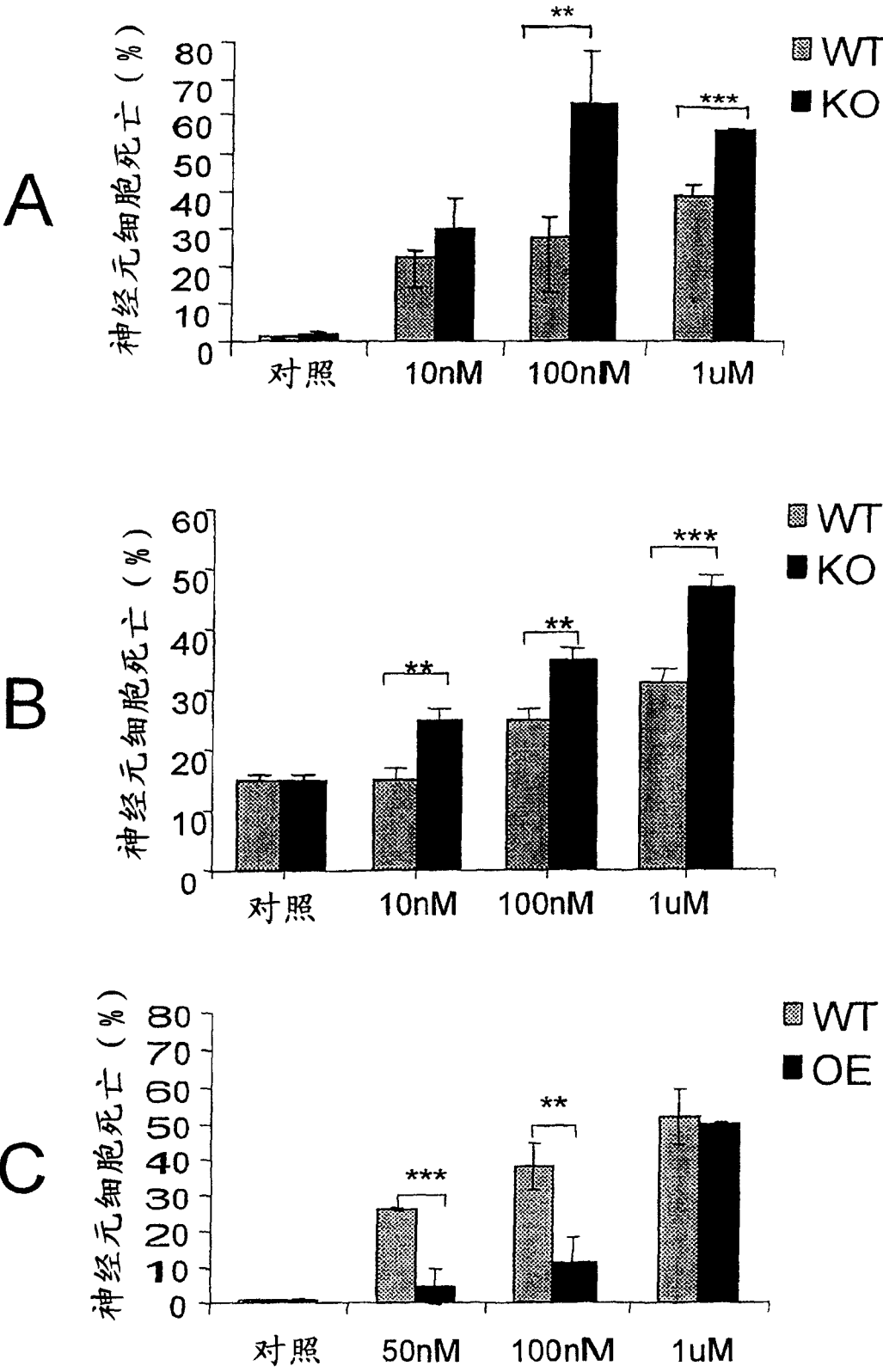


图 2

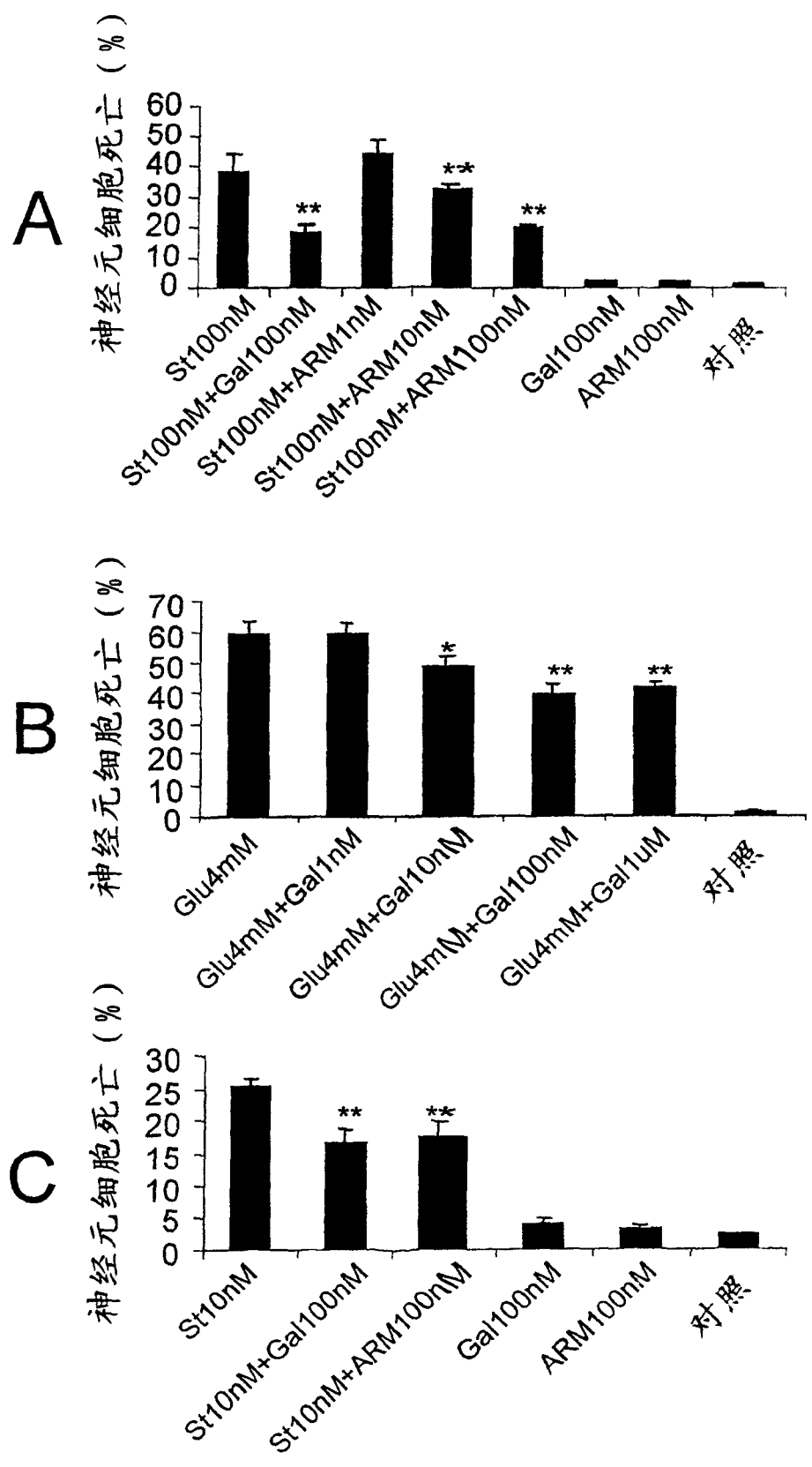


图 3

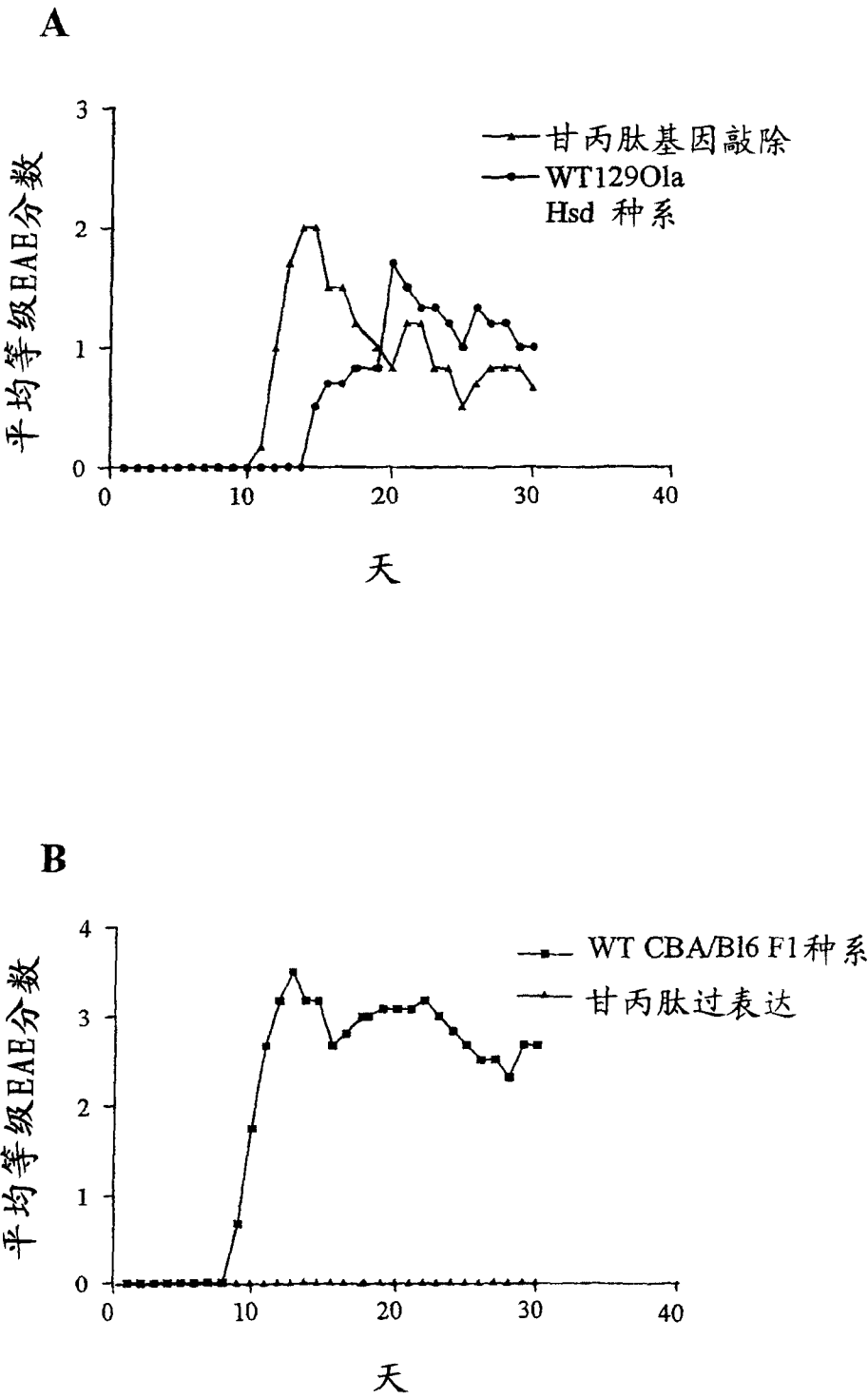


图 4