



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114903990 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 16

(21) 申请号 202110921599.2	A61P 25/16 (2006.01)
(22) 申请日 2021.08.11	A61P 25/00 (2006.01)
(30) 优先权数据	A61P 9/10 (2006.01)
17/170,790 2021.02.08 US	A61P 3/10 (2006.01)

(71) 申请人 创新生物肽有限公司
地址 美国马里兰州

(72) 发明人 迈克尔·R·鲁夫 吉拉·罗斯纳

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 王玮玮 郑霞

(51) Int. Cl.
A61K 45/00 (2006.01)
A61K 38/08 (2019.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/14 (2006.01)

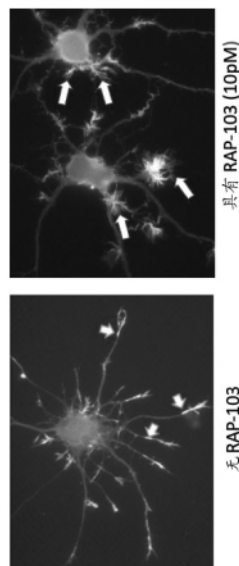
权利要求书2页 说明书10页
序列表2页 附图6页

(54) 发明名称

用于逆转突触和树突棘损失的多种趋化因子受体的口服肽拮抗剂

(57) 摘要

本发明广义地涉及通过将神经元从突触和树突棘损失的状态或状况转变为突触和树突棘形成/再生的状态或状况的方法来改善认知。一种新的机制表现为通过使突触和树突棘的动力学重新平衡来促进它们的形成,从而控制神经元的应激反应并改善记忆和学习。公开了增强功能性突触和树突棘数量的方法,这有望改善总体认知功能。



1. 一种改善人的认知功能的方法,所述方法通过增强突触和树突棘的形成来改善人的认知功能,所述方法包括:

施用包含药学上可接受的载体中的D肽多趋化因子受体拮抗剂的组合物,

进一步地,所述D肽包含以下一般结构:A-B-C-D-E-F-G-H,其中:

A是Ala或不存在,

B是Ser、Thr或不存在,

C是Ser、Thr或不存在,

D是Ser、Thr、Asn、Glu、Arg、Ile、Leu,

E是Ser、Thr、Asp、Asn,

F是Thr、Ser、Asn、Arg、Gln、Lys、Trp,

G是Tyr,并且

H是Thr、Ser、Arg、Gly,

其中所述D肽还包含所有氨基酸都处于D立体异构构型的情况,Gly存在并且Gly是非手性时的情况除外,并且其中所述施用包括以治疗有效剂量向所述人施用所述组合物,其中所述组合物用于阻止肌动蛋白/丝切蛋白棒的形成,这增强突触和树突棘的形成,并从而改善所述人的认知功能。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述人还包括经历突触和树突棘损失症状的人。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述突触和树突棘损失症状选自由以下组成的组:衰老相关的认知功能丧失、轻度认知障碍、痴呆相关的认知功能丧失、脑创伤相关的认知功能丧失、神经病。

4. 根据权利要求2所述的方法,其中所述突触和树突棘损失症状选自由以下组成的组:阿尔茨海默病、前额痴呆、亨廷顿病、突触核蛋白病、帕金森病、路易体病、神经-AIDS/HAND、脱髓鞘疾病、HTLV-1相关脊髓病(HAM)、多发性硬化(MS)、肌萎缩性侧索硬化、糖尿病认知衰退、正常衰老,或者在脑损伤、中风、糖尿病、神经病、脑病和病毒性脑病后出现的病理性神经症状和表现。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中向所述患者施用所述组合物选自由以下施用组成的组:口服、含服、胃肠外、局部、直肠、阴道、通过鼻内吸入喷雾、通过肺内吸入。

6. 根据权利要求1所述的方法,所述方法还包括,

所述D肽的长度为至多二十(20)个D氨基酸残基的情况,Gly存在并且Gly是非手性时的情况除外,并且包含具有选自由以下组成的组的序列的五个连续D氨基酸残基:

Thr Thr Asn Tyr Thr, (SEQ ID NO:1)

Ser Ser Thr Tyr Arg, (SEQ ID NO:2)

Thr Thr Ser Tyr Thr, (SEQ ID NO:3)

Asn Thr Arg Tyr Arg, (SEQ ID NO:4)

Ile Asp Asn Tyr Thr, (SEQ ID NO:5)

Asn Thr Ser Tyr Arg, (SEQ ID NO:6)

Ile Asn Asn Tyr Thr, (SEQ ID NO:7)

Asn Thr Ser Tyr Gly, (SEQ ID NO:8) 和

Glu Thr Trp Tyr Ser. (SEQ ID NO:9)。

7. 根据权利要求6所述的方法,所述方法还包括,所述D肽的衍生物的长度为至多十二(12)个D氨基酸残基。
8. 根据权利要求6所述的方法,所述方法还包括,所述D肽的衍生物的长度为至多八(8)个D氨基酸残基。
9. 根据权利要求6所述的方法,所述方法还包括,所述D肽的长度为五(5)个D氨基酸残基。
10. 一种治疗经历一种或更多种突触和树突棘损失症状的人的突触和树突棘损失的方法,所述方法包括以下步骤:
 - 施用包含肽类似物和药学上可接受的载体的组合物,所述肽类似物是[D-Ala1]-Ser-Thr-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr-NH₂
 - 其中第一个氨基酸是D立体异构体,并且其余氨基酸是L立体异构体,并且N末端氨基酸是酰胺,并且
 - 其中所述施用包括向所述患者施用治疗有效剂量的所述肽类似物,其中所述组合物发挥作用以治疗所述患者的突触和树突棘损失。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中突触和树突棘损失症状选自由以下组成的组:阿尔茨海默病、亨廷顿病、突触核蛋白病、帕金森病、脱髓鞘疾病、HTLV-1相关脊髓病(HAM)、多发性硬化(MS)、肌萎缩性侧索硬化,在损伤或创伤、脑病和病毒性脑病后的病理性神经症状。

用于逆转突触和树突棘损失的多种趋化因子受体的口服肽拮抗剂

[0001] 本发明广义地涉及进入中枢神经系统以与神经元趋化因子受体接合 (engage) 来促进神经元重塑以及突触和树突棘的形成的组合物和化合物。特别地, 已经发现趋化因子受体拮抗剂促进正常动物的记忆和学习, 并且在脑损伤的状况中促进突触和树突棘的形成以恢复认知和运动能力。本发明促进突触和树突棘的形成, 并有望增强正常个体和那些经历突触损失的个体的记忆和学习, 所述突触损失例如由于衰老而引起或者由于疾病状况而引起, 其中突触和树突棘的损失被加速, 导致认知或运动功能损伤。

[0002] 背景

[0003] 改善的认知和心理功能是一个普遍追求的目标。对蛋白质翻译、蛋白质降解、细胞骨架动力学、细胞外基质相互作用、第二信使信号传导以及神经递质受体运输和功能的调节全部都是对认知而言所必需的突触重塑的组成部分。选择性靶向这些过程中的特定组成部分可以用作治疗认知缺陷的有效策略。

[0004] 通过药物干预进行的认知增强是常见的, 并且自我施用精神兴奋剂诸如咖啡因、尼古丁和安非他明可以改善认知表现。然而, 这些兴奋剂的使用可能不是最佳的, 它们有副作用和风险, 并且它们不能改善所有的认知、记忆和学习问题。需要更有效和特异性的策略。尽管导致认知、记忆和学习问题的原因很多, 但增强认知表现的一个策略是靶向可能对认知功能具有积极影响的关键机制, 诸如促进突触和树突棘的结构、功能、形成和再生。

[0005] 在突触环境中, 肌动蛋白细胞骨架是突触重塑过程中的关键要素, 并维持由突触活动驱动的树突棘和神经元生长锥结构 (architecture)。事实上, 神经元生长锥和树突棘的形状和突触强度受到精确控制, 以将突触强度的短期变化转化为由稳定的结构改变引起的长期变化。这些功能和结构的改变被认为是记忆和学习的生物学基础。突触重塑涉及许多可能被认为是认知疗法的潜在靶的过程。这些过程受到信号转导机制和蛋白质磷酸化/去磷酸化的高度调节, 诸如细胞结构 (cytoarchitecture) 的丝切蛋白-肌动蛋白调节。这些复杂过程的协调是优化认知功能的关键。

[0006] 细胞应激介质 (炎症、自由基、兴奋毒性水平的谷氨酸、线粒体抑制剂 (例如抗霉素 A)、过氧化物、NO、A β (淀粉样) 肽和促炎细胞因子) 损害脑的主要功能单位—突触, 并对突触存储记忆和处理信息的能力产生负面影响。这些结果促使人们认为, 在正常情况下, 认知的改善可通过促进突触的形成来实现。记忆丧失、学习和信息处理速度受损以及损伤后运动功能丧失的状况主要是突触失败的状况, 即“突触病 (synaptopathy)”。不同的应激介质, 甚至饮食或表观遗传变化, 无论是否明显, 都可以诱导神经元轴突和树突中含有肌动蛋白-解聚因子 (ADF) / 丝切蛋白和肌动蛋白的瞬时或持续存在的棒状包涵体 (rod-like inclusions) 的快速形成, 导致突触损失。这一发现的意义在于, 因为棒的形成与皮质突触的损失相关, 所以棒的形成为促进突触的干预提供了一个靶, 皮质突触的损失是 Mini-精神状态认知检查评分较低的原因, 随着时间的推移, 评分较低变得更加明显。一般来说, 由其他原因引起的认知障碍为自然或疾病相关的, 诸如脑损伤或中风后, 或神经病, 也是突触失败和无法建立功能性神经元连接的状况。由于肌动蛋白动力学调节在突触功能和重塑中的

许多种作用,肌动蛋白动力学调节是记忆增强策略的一个有吸引力的靶。

[0007] 突触退化的三个基本因素是:激活的丝切蛋白水平升高、ADP-肌动蛋白水平升高和高度氧化的环境。积极应激的神经元通常满足全部三个要求,而这三个要求并不是特别地疾病相关的。磷酸化肌动蛋白/丝切蛋白棒的形成是由许多种原因诱导的早期神经元病理。当丝切蛋白激活持续存在时,导致神经变性前的突触损失。在培养的神经元中,在丝切蛋白形成棒后几天内出现死亡。功能性突触可以恢复的水平和程度在很大程度上是未知的。突触损失的途径与突触逆转的关系如何也不清楚。我们发现了特定的肽,这些肽通过选择趋化因子受体而起作用,并且表现为控制突触损失和突触再生之间的平衡。这些肽调节控制神经元细胞结构的细胞蛋白质的激活,神经元细胞结构产生对功能性突触有贡献的生长锥结构。逆转突触损失以恢复功能是本发明优于精神兴奋剂的一个明显优势,可以增强表现或仅仅减缓或阻止突触损失,因为这种损失可能进展几十年都不被注意到。功能性神经元的损失被认为是不可恢复的,尽管这种观念似乎正在慢慢改变。为了患者的利益,促进突触形成以改善认知或克服任何突触损失是更期望的效果。

[0008] 最近的进展已经开始阐明一种通过支持突触形成来改善认知的新方法。如下文详细解释的,最近的发现为神经元生长和再生机制提供了新的见解,这表明现在可以通过调节存在于神经元上的先天免疫系统的受体直接促进那些神经元中的神经再生来治疗突触损失的状况。该方法提供了从实际上为支持记忆巩固的突触解构和构建的正常过程(有时称为“修剪(pruning)”),但当过度或慢性时有害的过程重新平衡为再生的手段(means),这是有益的。

[0009] 再生治疗比精神兴奋剂或单纯的突触损失预防药更有优势。首先,精神兴奋剂不会带来持久的益处,而预防性治疗只能表明在预防功能丧失的进展中的有效性。可以合理地预期再生方法可以改善正常的认知,并在突触损失的情况下,诸如在脑损伤、神经病或痴呆后,增强认知、记忆和学习。

[0010] 神经炎症涉及神经元和先天免疫系统组分(如细胞因子、趋化因子和小胶质细胞活性)之间的相互作用,已成为许多临床前和临床研究的目标,随后的临床试验在很大程度上未能增强认知。一个原因是损伤机制的复杂性和多样性,需要联合疗法或靶向早期共有的致病机制。炎症之外的许多作用控制着突触损失和形成之间的平衡。阻断炎症本身看起来不足以带来临床益处的希望。在许多状况中,突触的损失发生在早期,不一定是炎性的,当不受阻碍时,最终会表现为认知障碍。目前,早期干预寻求在功能(认知或运动为实例)丧失(显著损害人的生活质量)之前阻止疾病进展和恶化的有限目标。出于这个原因,我们试图重新集中精力提供治疗,以改善正常日常生活中的认知,以及突触病和随之而来的疾病或状况,以通过促进功能性突触的形成来增强认知或功能从而为患者带来更大的益处。

[0011] 由于认知障碍在早期通常不明显,导致突触损失的正常过程和病理过程两者可能会持续数年甚至数十年不减弱,直到它们变得明显。当认知障碍显现时,目前的技术水平表明,有效干预可能为时已晚,导致永久性功能丧失。目前还没有治疗来逆转突触损失,尽管这样的再生有望克服和逆转现有的认知缺陷并且使人更接近正常功能。因此,虽然通过阻断炎症或中断导致突触损失的致病性丝切蛋白棒形成来预防突触损失会带来疾病进展缓慢或中断的益处,但一个不同且更具挑战性的治疗目标是逆转突触损伤或者初期或已经进展的损失。

[0012] 本发明有望提供高度难以达到且长期寻求的改善记忆、学习、认知和功能的益处,这在突触损失的许多状况中表现出来,特别是在海马中表现出来,海马是学习和记忆形成的部位。除了减缓或停止认知或功能衰退之外,这样的结果有望对经历突触、树突棘的损失和树突树状结构(dendritic arborization)减少的人有益。本发明涉及突触、树突和神经突的恢复,以改善认知和记忆,以及恢复痴呆中的认知功能和中风中的运动功能,或逆转由损伤、手术、糖尿病或化疗药物引起的慢性疼痛状况的神经病中的沃勒变性。本发明的肽通过逆转功能衰退提供了改善的益处,所述功能衰退是初期的且不是很明显的,和已经变得严重到足以在日常生活中被检测到。

[0013] 本发明的小肽趋化因子拮抗剂化合物通过靶向控制突触形成至破坏的平衡的特定趋化因子受体,为需要突触再生或经历突触病的人提供了新的治疗突触损失的机会,并且因此可用于逆转轻度认知障碍和更广泛的认知障碍状况两者中的突触损失。

[0014] 大量研究表明,轻度认知障碍(MCI)(也可能是AD的前驱期)和早期AD的主要特征是突触和连接性的损失。MCI的突触损失发生在神经元广泛损失之前,神经元广泛损失是AD中晚期的特征。可能对神经AIDS(HAND)、COVID19或其他CNS感染有帮助,事实上,对由突触损失引起的任何神经退行性状况以及甚至非病理性状况,诸如正常衰老的突触损失,都可能有所帮助。目前还没有开发出医学疗法来促进由突触损失(突触病)联系在一起的许多种不同状况的恢复。

[0015] Hill等人(1)几十年前的研究暗示了趋化因子拮抗剂作为能够逆转突触病的干预措施的价值,该研究显示了在HIV认知衰退的动物模型中,本发明的肽的非口服类似物肽Dala 1-肽T-酰胺("DAPTA")对树突棘形态的保护、树突树状结构的扩展和功能缺陷的逆转。由于尚未发现趋化因子受体,这一发现在当时还没有被很好地理解。DAPTA能够在HIV相关神经认知疾病(HAND) 2期人体试验和脑扫描中逆转认知缺陷,并且其作用后来被理解为由一组HIV进入趋化因子受体(CCR2/CCR5/CCR8/CXCR4)介导,这些受体是DAPTA作用的靶。对CCR5作为皮质可塑性和海马记忆和学习的抑制因子的作用的进一步关注来自Zhou, 2016(2)的研究,该研究表明,在正常小鼠中CCR5的过表达导致记忆缺陷,这可以通过CCR5的“敲除”或缺失来预防。在2019年Joy等人(3)意外发现CCR5是中风和创伤性脑损伤后的恢复的治疗靶。敲低CCR5,或用拮抗剂马拉韦罗(maraviroc)进行药物阻断,与保留树突棘和新的神经突皮质投射模式有关。HIV趋化因子进入受体CXCR4也被鉴定为对创伤性脑损伤后的恢复有负面影响,因为其拮抗剂AMD3100改善了恢复。

[0016] 来自成年啮齿动物脑的长期海马切片培养物和来自小鼠的分离神经元培养物都显示出,CXCR4和CCR5是两种重要的趋化因子受体,在被激活时会导致突触损失和认知障碍。其他结果隐含CCR2和CCR8与记忆障碍有关,鉴定出被本发明的肽靶向作为治疗靶的一组HIV进入受体。

[0017] 总的来说,这些研究鼓励我们研究多趋化因子受体拮抗剂肽(multi-chemokine receptor antagonist peptide)通过促进神经元生长锥的形成来逆转突触损失的益处,神经元生长锥是产生功能性突触的神经元的组织结构。由于多种趋化因子途径的激活隐含地与脑损伤的恢复改善有关,因此一般可以通过拮抗多种趋化因子受体来逆转突触和树突棘的损失来预期更好的结果。

[0018] 附图简述

[0019] 图1A图示了一类四种代表性肽阻断趋化因子受体2 (CCR2) 的活性。

[0020] 图1B图示了若干全D五肽阻断趋化因子受体2 (CCR2) 的活性。

[0021] 图2A图示了HIV包膜蛋白gp120对趋化因子受体CXCR4或CCR5的直接神经元激活，HIV包膜蛋白gp120通过丝切蛋白棒形成导致突触损失。

[0022] 图2B图示了丝切蛋白棒形成(导致突触损失的早期病理)是由AD相关肽 β -淀粉样蛋白($A\beta$ -三聚体/二聚体)引起的,并且可以通过用特异性拮抗剂马拉韦罗阻断神经元CCR5来防止。

[0023] 图3图示了多趋化因子受体拮抗剂肽(RAP-103(全-D-TTNYT)或RAP-310(全-D-ASTTTNYT)防止 $A\beta$ -三聚体/二聚体病理(导致突触损失)的剂量响应。

[0024] 图4图示了多趋化因子受体拮抗剂RAP-103(R103)阻断由淀粉样蛋白 β ($A\beta$)和 α -突触核蛋白的预形成的原纤维(PPF)引起的突触损伤作用。

[0025] 图5图示了淀粉样蛋白 β ($A\beta$)三聚体引起导致突触损失的病理(棒形成)(左,箭头)的能力。添加RAP-103(R103)抑制丝切蛋白激活成棒,并转变为形成生长锥以进行突触再生。

[0026] 在特定的实施方案中,本发明涉及各种突触病及它们相关的神经退行性状况的治疗,所述神经退行性状况包括衰老、阿尔茨海默氏病、亨廷顿病和其他状况,诸如帕金森病、2型糖尿病、HIV相关的神经认知障碍(HAND),以及损伤、中风或创伤后的功能缺陷,或病毒性脑病和与突触损失相关的其他脑病。本发明还涉及可用于这样的治疗和/或逆转突触和树突棘的损失的药物组合物,以及涉及某些口服活性肽本身。

[0027] 神经元持续暴露于可溶性 β -淀粉样蛋白肽二聚体/三聚体($A\beta$ d/t)(AD)、 α 突触核蛋白原纤维(PPF)、HIV包膜gp120蛋白(HAND)或促炎细胞因子(TNF α 、IL-1 β 、IL-6)会破坏突触功能并导致突触损失。突触损失,无论是由神经炎症、氧化应激和能量应激、损伤、创伤、细菌/病毒或其他感染因子、细胞毒性药物疗法还是放射疗法引起的,都是本发明的肽可以逆转的许多神经退行性状况的基础。

[0028] 我们的治疗方法寻求促进突触的形成,这有利于通过阻断神经元趋化因子受体的激活来逆转突触的损失,这是主题肽的先前未鉴定的活性。用本发明的肽靶向神经元趋化因子受体以促进突触和生长锥的形成,从而改善记忆和认知,这是一种以前未知的和意想不到的治疗进步并且与现有技术不同,现有技术的治疗重点是经由小胶质细胞及其分泌的细胞因子阻断先天免疫炎症,以防止杀伤神经元,或者正好在神经元死亡前破坏导致突触损失的丝切蛋白棒的形成。为了区分趋化因子受体阻断的不同效应,我们在不存在免疫细胞或细胞因子的情况下,对神经元的纯培养物进行了实验,与脑组织切片或整个动物进行了比较。与在完整动物或CNS组织切片中显示通过NKkB途径的小胶质细胞和细胞因子激活的趋化因子阻断的报道不同,我们的结果指出了以前未被认识到的阻断神经元趋化因子受体的直接作用。我们观察到趋化因子受体阻断是这样的一种手段:该手段使神经元转变远离导致突触损失的应激反应,并通过生长锥形成刺激其再生,生长锥形成驱动神经突延伸,恢复突触、其连接性和在罹患突触损失的患者中的功能。

[0029] 本发明的趋化因子拮抗剂肽可以在pM剂量阻断多种神经元趋化因子受体,这是优于单受体拮抗剂的优势,尤其是在多种趋化因子受体看起来与突触恢复相关时的优势。它们通过口服和肠胃外施用途径有效且快速地进入大脑,并且由于它们被保护免于蛋白水

解,以治疗剂量在CNS中持续存在足够长的时间段以建立益处。所有这些不同的特征结合在一起,提供了这样的一种结果:使治疗能够用于突触损失的状况,即突触病,恢复突触连接性以逆转缺陷并促进功能恢复。本发明涉及可用于这样的治疗和/或逆转突触损失和神经变性的药物组合物,以及涉及某些活性肽本身。

[0030] 肽可用于药物组合物和物质组合物中,用于治疗 and 预防由有机体、化合物或免疫功能障碍引起的任何疾病或状况,所述有机体、化合物或免疫功能障碍导致与突触损失相关的持续或病理性丝切蛋白-肌动蛋白棒形成。

[0031] 肽可以口服、含服、胃肠外、局部、直肠、阴道、通过鼻内吸入喷雾、通过肺内吸入或以其他方式施用。特别地,根据本发明的肽可以被配制用于口服使用、用于以喷雾或粉末吸入、用于注射(例如皮下注射、肌肉内注射、静脉内注射、关节内注射或脑池内注射)或用于输注,并且可以单位剂量形式呈现于安瓿或片剂中,或者呈现于多剂量小瓶或添加有防腐剂的其它容器中。

[0032] 组合物可以采取诸如悬浮液、溶液或乳液的形式,并且可以包含配制剂诸如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。可选地,活性成分可以是粉末和/或冻干形式,用于直接施用或在使用前用合适的媒介物(例如无菌、无热原的水、生理盐水或5%右旋糖)构建。含有一种或更多种肽的药物组合物还可以包含其他活性成分,诸如抗菌剂或防腐剂。

[0033] 组合物可以包含0.001%-99%(w/v,或优选地w/w)的活性物质。优选的施用是口服丸剂或胶囊剂。组合物以治疗或预防有效剂量施用,即0.1mg肽/天至500mg肽/天,特别是5-50mg/天。可以使用甚至更大的剂量,因为根据本发明的肽是无毒的。然而,通常这不是必需的。

[0034] 对于通过注射或输注组合物进行的施用,用于治疗约70kg体重的成人的日剂量的范围通常为0.2mg至20mg活性物质,可以以每天1剂至4剂的形式施用。本发明可用于预防或治疗疾病或医学状况,特别是涉及突触损失的那些疾病或医学状况,诸如轻度认知障碍、痴呆、前额痴呆、路易体病、阿尔茨海默病、帕金森病、HAND、中风恢复或正常衰老。

[0035] 根据本发明的第一方面,提供了通式1的线性肽的用途,其中所有氨基酸都是D-立体异构构型,Gly存在并且Gly是非手性时的情况除外:

[0036] A-B-C-D-E-F-G-H.通式1)

[0037] 其中

[0038] A是Ala或不存在,

[0039] B是Ser、Thr或不存在,

[0040] C是Ser、Thr或不存在,

[0041] D是Ser、Thr、Asn、Glu、Arg、Ile、Leu,

[0042] E是Ser、Thr、Asp、Asn,

[0043] F是Thr、Ser、Asn、Arg、Gln、Lys、Trp,

[0044] G是Tyr,

[0045] H是Thr、Ser、Arg、Gly。

[0046] 通式1中提到的所有氨基酸都是D-立体异构构型,并且H的候选物可以是酯化或酰胺化的。肽包含至少5个氨基酸。在以前的研究中,通式1的线性肽的全-L氨基酸形式被称为肽T,并且其修饰类似物被称为DAPTA。

[0047] 优选的D肽是(Gly存在并且Gly是非手性时的情况除外)：

[0048] Thr Thr Asn Tyr Thr, (SEQ ID NO:1)

[0049] Ser Ser Thr Tyr Arg, (SEQ ID NO:2)

[0050] Thr Thr Ser Tyr Thr, (SEQ ID NO:3)

[0051] Asn Thr Arg Tyr Arg, (SEQ ID NO:4)

[0052] Ile Asp Asn Tyr Thr, (SEQ ID NO:5)

[0053] Asn Thr Ser Tyr Arg, (SEQ ID NO:6)

[0054] Ile Asn Asn Tyr Thr, (SEQ ID NO:7)

[0055] Asn Thr Ser Tyr Gly, (SEQ ID NO:8) 和

[0056] Glu Thr Trp Tyr Ser. (SEQ ID NO:9)。

[0057] 方法

[0058] 从培养的7PA2细胞的培养基分离Aβd/t, 7PA2细胞是表达在家族性AD中发现的一种形式的人类APP的CHO细胞系。Aβd/t的量通过用合成的Aβ单体的标准物进行蛋白质印迹来定量。神经元培养、固定、透化、封闭和免疫染色通过广泛使用的普通方法以E16.5小鼠海马神经元开始来进行。对7个和21个DIV培养物进行测定, 在6或20个DIV用或不用药物进行处理(10^{-14} M至 10^{-10} M的肽RAP-103和RAP-310以及 10^{-11} M至 10^{-7} M的马拉韦罗/AMD3100, 有或没有~1nM的Aβd/t)。GP120蛋白从CCR5嗜性株CM、CXCR4嗜性株MN和双嗜性株MN获得。处理后, 细胞被固定, 如发表的对丝切蛋白和用2G13抗体对生长锥进行免疫染色, 并且用DAPI复染, 并且三个盖玻片也对神经元核抗原NeuN进行染色。分析得出总核(DAPI)中的神经元(NeuN)百分比, 以获得棒/神经元。

[0059] 对跨越整个盖玻片捕获的丝切蛋白、生长锥和核进行免疫染色的经固定的神经元的图像导出至ImageJ。应用宏函数为丝切蛋白和生长锥抗体二者设置局部阈值和形状/大小分割(segmentation)。去除不在神经突起内的丝切蛋白染色的物质。结果报告为棒/核、棒数量/面积、棒占总面积的百分比, 或者, 如果NeuN被染色或经形态学鉴定, 则报告为棒/神经元。

[0060] 本发明现在将通过以下非限制性实施例来说明。实施例参考了附图。

[0061] 实施例1

[0062] 图1A图示了与式I的主要为L-形式的肽相比, 全-D形式的肽的活性。表明了, 具有相同一级序列或共同具有部分序列的仅在对映体形式上有差异的通式I的三种相关肽, 阻断了CCL2趋化性。所述肽作为CCR2和CCR5二者的趋化因子受体拮抗剂发挥功能(4)。图1B显示了该发现的一般性质, 其中八种另外的全-D-氨基酸五肽也阻断了CCL1/CCR2的相互作用。

[0063] 实施例2

[0064] 说明了神经元表达控制突触再生的CCR5和CXCR4受体。图2A显示了在没有添加免疫细胞、小胶质细胞、细胞因子或其他炎症介质的经培养的小鼠海马神经元中, 趋化因子受体CXCR4或CCR5被HIV包膜蛋白gp120激活, 确认了直接神经元趋化因子受体与突触损失和认知障碍的相关性。HIV gp120的这些趋化因子受体介导的效应通过突触的损失导致神经-AIDS (HAND) 的认知表现(由Hi11等人(1)所示的), 因此其可以通过特异性趋化因子受体拮抗剂马拉韦罗(Mar, CCR5)或AMD3100(AMD, CXC4)逆转。

[0065] 图2A还显示,通过CXCR4或CCR5受体,用gp120处理的神经元形成丝切蛋白棒,这是向突触破坏的早期转变,因为不同的gp120嗜性(CCR5vs CXCR4)形式被它们的受体特异性拮抗剂马拉韦罗(CCR5)和AMD3100(CXCR4)抑制。

[0066] 图2B显示,由AD相关肽 β -淀粉样蛋白($A\beta$ -三聚体/二聚体)诱导的突触损失的早期病理可以被逆转,并且通过用马拉韦罗阻断神经元CCR5实现突触再生途径表明,神经元趋化因子受体在需要突触再生的不同(图2A的HIV与图2B的AD相比)条件下是重要的。

[0067] 实施例3

[0068] 说明了多趋化因子受体(CCR2/CCR5/CCR8/CXCR4)拮抗剂RAP-103(全-D-TTNYT)和RAP-310(全-D-ASTTNYT)在pM和更低浓度阻断突触破坏的早期病理 $A\beta$ 和TNF(未示出)、经培养的小鼠海马神经元中丝切蛋白棒的形成的能力。突触再生不能在激活的丝切蛋白-肌动蛋白棒的情况下发生,并且结果表明多趋化因子受体拮抗肽通过减少表达丝切蛋白棒的神经元的百分比,使神经元状态向再生转变。因此,用本发明的肽阻断趋化因子受体CCR2/CCR5/CCR8或CXCR4是阻断早期AD病理和逆转突触损失的特异性方法。阻断隐含地与突触损失有关的多种趋化因子受体是本发明目前的全D肽的意想不到的优势,因为它们可以比靶向单一趋化因子受体提供更好的保护。

[0069] 实施例4

[0070] 说明了多趋化因子受体拮抗剂RAP-103阻断早期神经元病理的能力,该病理导致阿尔茨海默病和帕金森病中分别由淀粉样蛋白 β ($A\beta$)和 α -突触核蛋白的预形成的原纤维(PPF),即突触损失的介质引起的突触损伤或损失。RAP-103的作用是通过减少丝切蛋白棒占据的神经元内的面积,使神经元状态转变为突触再生。

[0071] 实施例5

[0072] 以下实验说明了RAP-103促进生长锥形成的能力,生长锥形成是一种突触再生作用。将淀粉样蛋白 β ($A\beta$)三聚体加入小鼠海马神经元的纯培养物(缺乏免疫细胞、小胶质细胞及它们分泌的炎性介质)中,以评价肌动蛋白动力学和丝切蛋白棒的形成。在图5的左图中,(无RAP-103)突触病理(箭头表示经免疫染色的棒)展示了AD相关系统。几乎所有的树突,尤其是其延伸部分,显示出棒形成。这些神经元会在第3天死亡。相关的是,棒病理导致与痴呆相关的人中的突触损失。本实施例进一步显示了(图5,右)RAP-103使神经元从突触退化状态(棒)转变为突触再生状态(没有棒,但现在表达生长锥,用2G13抗体染色)的意外效果。注意在图5的右图中,树突末端的丝切蛋白棒状结构被消除,并且取而代之的是作为显性表型的沿着树突柄(dendritic arbor)的整个长度分布的繁多的生长锥状结构。RAP-103使神经元从突触崩溃(synapse collapse)和损失的状态转变为生长锥扩张和突触再生。

[0073] 相关的是,生长锥包括寻找并形成突触接触的轴突的生长尖端,并且这样的结构是树突棘形成的一个方面,即突触形成的位点。阻断趋化因子受体看起来控制了肌动蛋白-丝切蛋白动力学中从突触破坏和损失到突触保存、重建和再生的一系列复杂途径的分叉。该结果与关于CCR5阻断作为促进突触形成的手段的其他报道(3)是一致的。重要的是,突触损失是所有神经退化的基础,并且导致许多状况和疾病,这些状况和疾病很少或没有治疗方法。本发明提供了一种新的、重要的和独特的治疗干预,用于广泛的用途,包括突触病的非病理状况,如正常衰老。虽然发明人并不声称确切地知晓作用机制,但我们提供了我们当

前的模型来帮助解释我们的数据,该数据显示了由本发明的肽引起的两种效应。第一种是阻断丝切蛋白棒形成,该效应具有刺激生长锥形成的另外的相称效应。这两种特征都优于单独的任何一种,并且可能代表一种独特的神经元再生表型。

[0074] 本文公开了各种组合物和方法。这些组合物和方法的具体示例性实施方案在下文公开:

[0075] 实施方案1.包含药学上可接受的载体中的D肽多趋化因子受体拮抗剂的组合物,所述组合物用于在改善人的认知功能的方法中使用,所述方法通过增强突触和树突棘的形成来改善人的认知功能,其中进一步地,所述D肽包含以下一般结构:A-B-C-D-E-F-G-H,其中:

[0076] A是Ala或不存在,

[0077] B是Ser、Thr或不存在,

[0078] C是Ser、Thr或不存在,

[0079] D是Ser、Thr、Asn、Glu、Arg、Ile、Leu,

[0080] E是Ser、Thr、Asp、Asn,

[0081] F是Thr、Ser、Asn、Arg、Gln、Lys、Trp,

[0082] G是Tyr,并且

[0083] H是Thr、Ser、Arg、Gly,

[0084] 其中所述D肽还包含所有氨基酸都处于D立体异构构型的情况,Gly存在并且Gly是非手性时的情况除外,并且其中

[0085] 所述组合物用于阻止肌动蛋白/丝切蛋白棒的形成,这增强突触和树突棘的形成,并从而改善所述人的认知功能。

[0086] 实施方案2.根据实施方案1所述的用于使用的组合物,其中所述人经历突触和树突棘损失症状。

[0087] 实施方案3.根据实施方案2所述的用于使用的组合物,其中所述突触和树突棘损失症状选自自由以下组成的组:衰老相关的认知功能丧失、轻度认知障碍、痴呆相关的认知功能丧失、脑创伤相关的认知功能丧失、神经病。

[0088] 实施方案4.根据实施方案2所述的用于使用的组合物,其中所述突触和树突棘损失症状选自自由以下组成的组:阿尔茨海默病、前额痴呆、亨廷顿病、突触核蛋白病、帕金森病、路易体病、神经-AIDS/HAND、脱髓鞘疾病、HTLV-1相关脊髓病(HAM)、多发性硬化(MS)、肌萎缩性侧索硬化、糖尿病认知衰退、正常衰老,或者在脑损伤、中风、糖尿病、神经病、脑病和病毒性脑病后出现的病理性神经症状和表现。

[0089] 实施方案5.根据实施方案1所述的用于使用的组合物,其中向所述患者施用所述组合物选自自由以下施用组成的组:口服、含服、胃肠外、局部、直肠、阴道、通过鼻内吸入喷雾、通过肺内吸入。

[0090] 实施方案6.根据实施方案1所述的用于使用的组合物,所述组合物还包括,

[0091] 所述D肽的长度为至多二十(20)个D氨基酸残基,Gly存在并且Gly是非手性时的情况除外,并且包含具有选自自由以下组成的组的序列的五个连续D氨基酸残基:

[0092] Thr Thr Asn Tyr Thr, (SEQ ID NO:1)

[0093] Ser Ser Thr Tyr Arg, (SEQ ID NO:2)

- [0094] Thr Thr Ser Tyr Thr, (SEQ ID NO:3)
- [0095] Asn Thr Arg Tyr Arg, (SEQ ID NO:4)
- [0096] Ile Asp Asn Tyr Thr, (SEQ ID NO:5)
- [0097] Asn Thr Ser Tyr Arg, (SEQ ID NO:6)
- [0098] Ile Asn Asn Tyr Thr, (SEQ ID NO:7)
- [0099] Asn Thr Ser Tyr Gly, (SEQ ID NO:8) 和
- [0100] Glu Thr Trp Tyr Ser. (SEQ ID NO:9)。
- [0101] 实施方案7.根据实施方案6所述的用于使用的组合物,所述组合物还包含,
- [0102] 所述D肽的衍生物的长度为至多十二(12)个D氨基酸残基。
- [0103] 实施方案8.根据实施方案6所述的用于使用的组合物,所述组合物还包含,
- [0104] 所述D肽的衍生物的长度为至多八(8)个D氨基酸残基。
- [0105] 实施方案9.根据实施方案6所述的用于使用的组合物,所述组合物还包含,所述D肽的长度为五(5)个D氨基酸残基。
- [0106] 实施方案10.包含肽类似物和药学上可接受的载体的组合物,所述组合物用于在治疗经历一种或更多种突触和树突棘损失症状的人的突触和树突棘损失的方法中使用,其中
- [0107] 所述肽类似物是[D-Ala1]-Ser-Thr-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr-NH₂
- [0108] 其中第一个氨基酸是D立体异构体,并且其余氨基酸是L立体异构体,并且N末端氨基酸是酰胺,并且其中所述组合物发挥作用以治疗所述患者的突触和树突棘损失。
- [0109] 实施方案11.根据实施方案10所述的用于使用的组合物,其中突触和树突棘损失症状选自自由以下组成的组:阿尔茨海默病、亨廷顿病、突触核蛋白病、帕金森病、脱髓鞘疾病、HTLV-1相关脊髓病(HAM)、多发性硬化(MS)、肌萎缩性侧索硬化,在损伤或创伤、脑病和病毒性脑病后的病理性神经症状。
- [0110] 引用的文献
- [0111] 1.Hill J,Mervis R,Avidor R,Moody T,Brenneman D.HIV envelope protein-induced neuronal damage and retardation of behavioral development in rat neonates.Brain Res.1993;603(2):222-33.
- [0112] 2.Zhou M,Greenhill S,Huang S,Silva TK,Sano Y,Wu S,Cai Y,Nagaoka Y,Sehgal M,Cai DJ,Lee YS,Fox K,Silva AJ.CCR5 is a suppressor for cortical plasticity and hippocampal learning and memory.Elife.2016;5.Epub 2016/12/21.doi:10.7554/eLife.20985.PubMed PMID:27996938;PMCID:PMC5213777.
- [0113] 3.Joy MT,Ben Assayag E,Shabashov-Stone D,Liraz-Zaltsman S,Mazzitelli J,Arenas M,Abduljawad N,Klipper E,Korczy AD,Thareja NS,Kesner EL,Zhou M,Huang S,Silva TK,Katz N,Bornstein NM,Silva AJ,Shohami E,Carmichael ST.CCR5 Is a Therapeutic Target for Recovery after Stroke and Traumatic Brain Injury.Cell.2019;176(5):1143-57e13.Epub 2019/02/23.doi:10.1016/j.cell.2019.01.044.PubMed PMID:30794775.
- [0114] 4.Padi S,Shi X,Zhao Y,Ruff M,Baichoo N,Pert C,Zhang J.Attenuation of rodent neuropathic pain by an orally active peptide,RAP-103,which potently

blocks CCR2-and CCR5-mediated monocyte chemotaxis and inflammation.Pain.2012;
153 (1) :95-106.doi:S0304-3959 (11) 00579-3[pii]10.1016/j.pain.2011.09.022.PubMed
PMID:22033364;PMCID:22033364。

RAP:CCL2人类单核细胞 趋化性的抑制

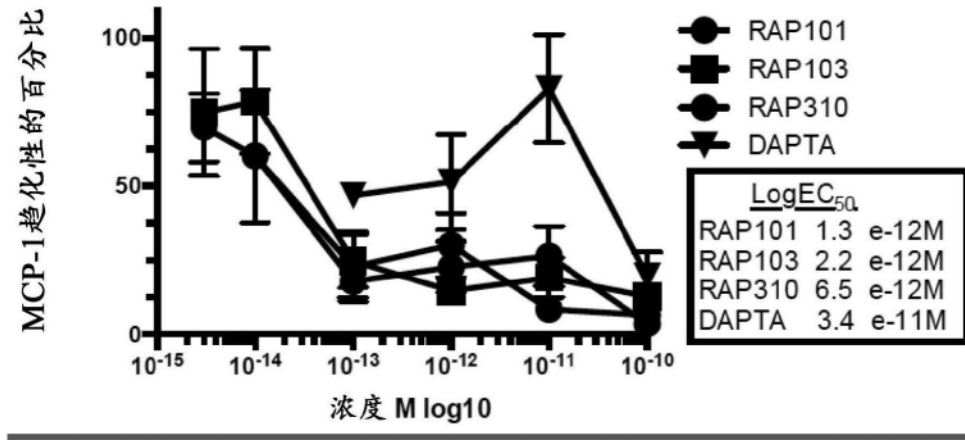


图1A

阻断MCP-1/CCR2趋化性的全-D五肽

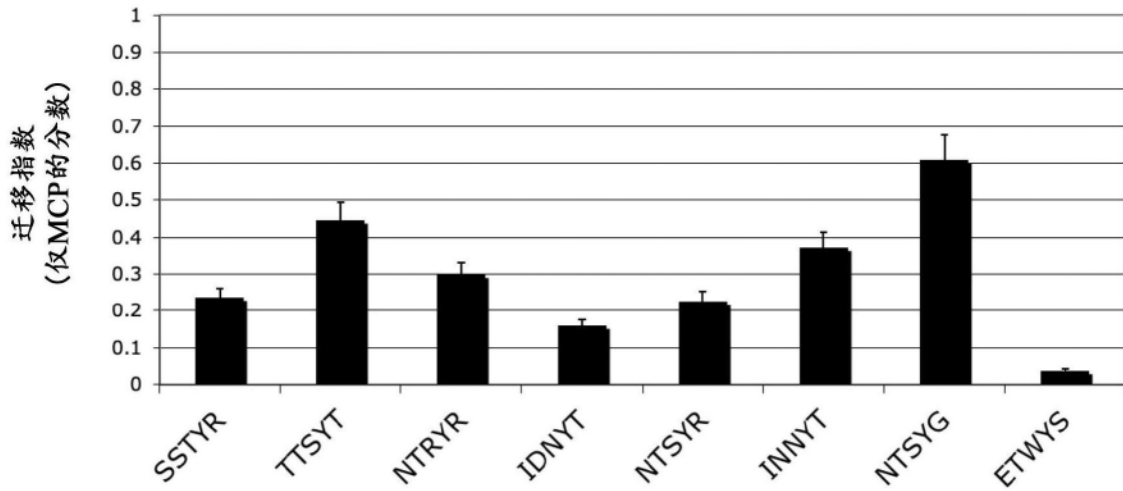


图1B

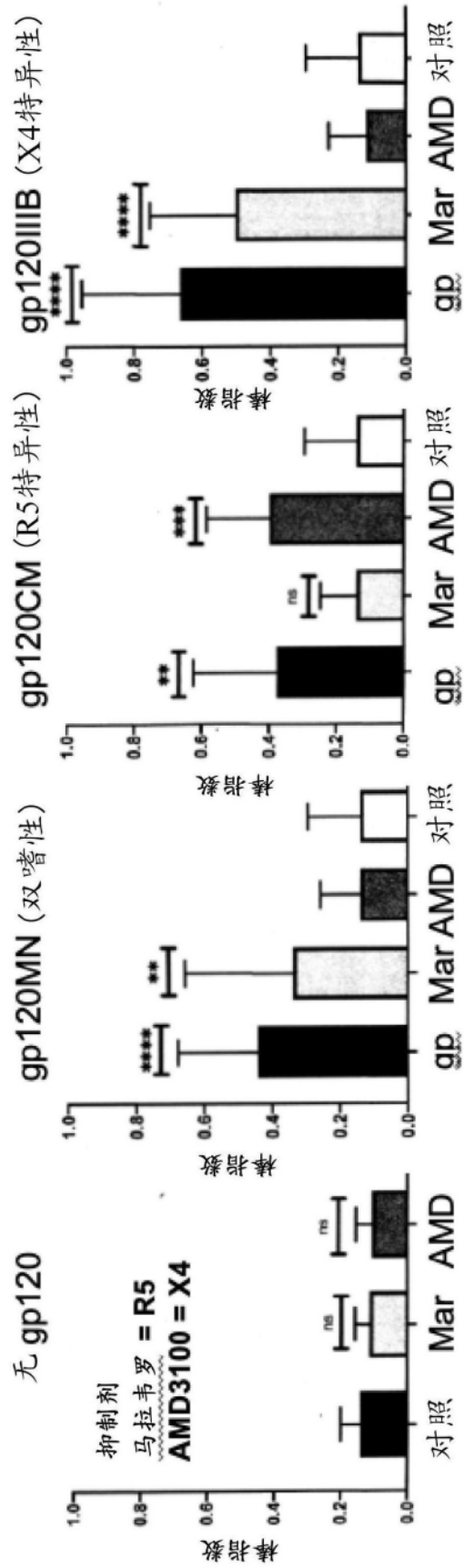


图2A

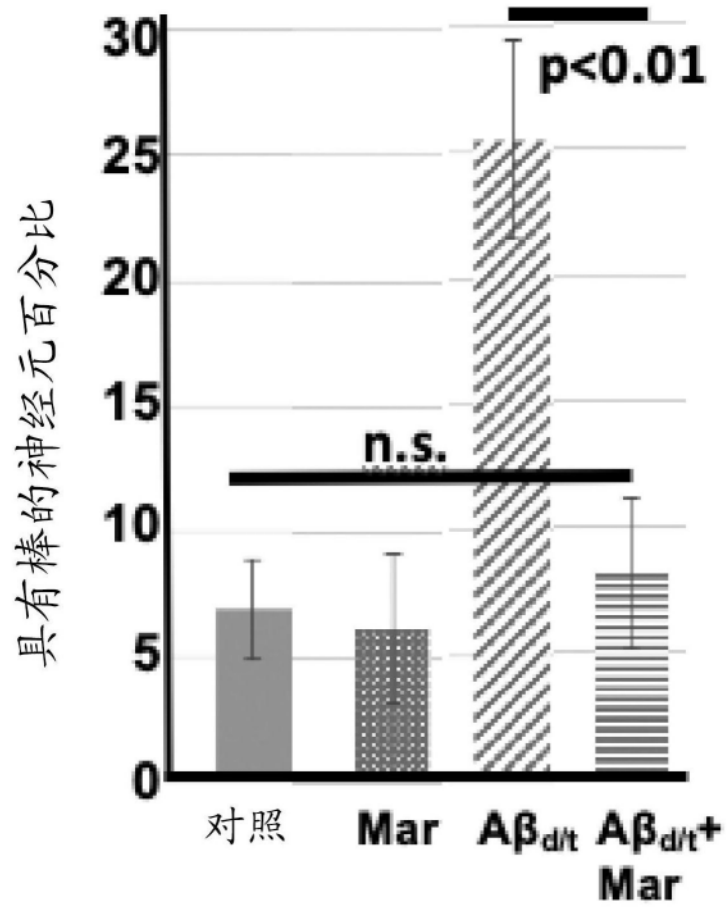


图2B

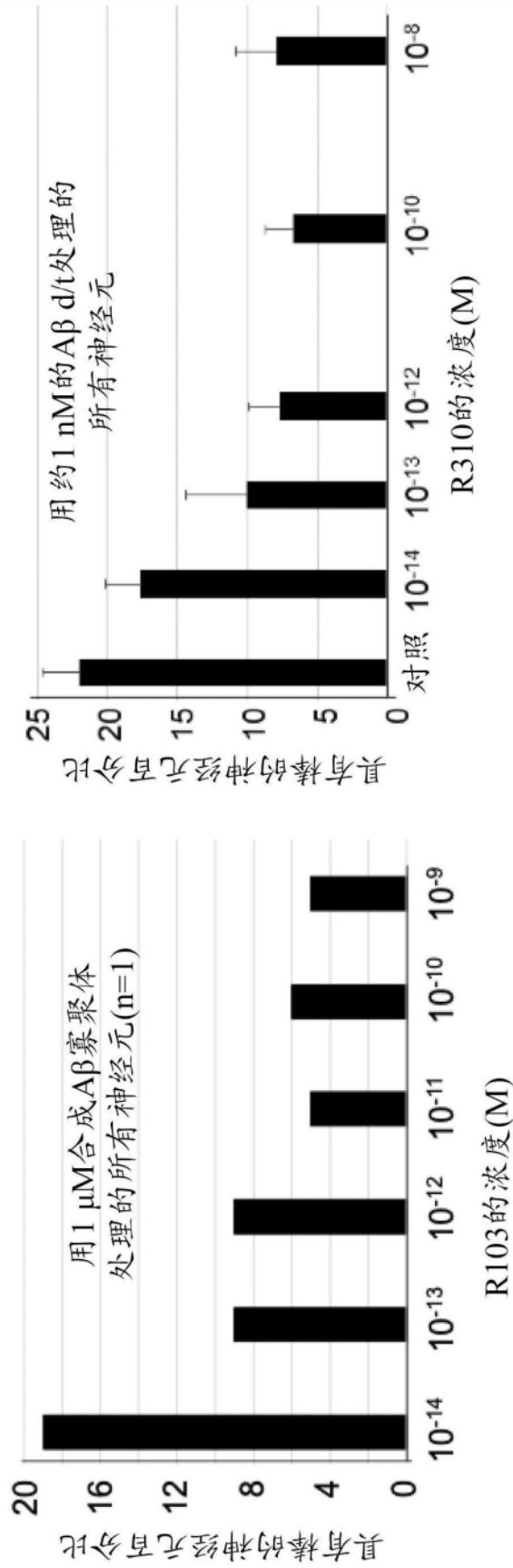


图3

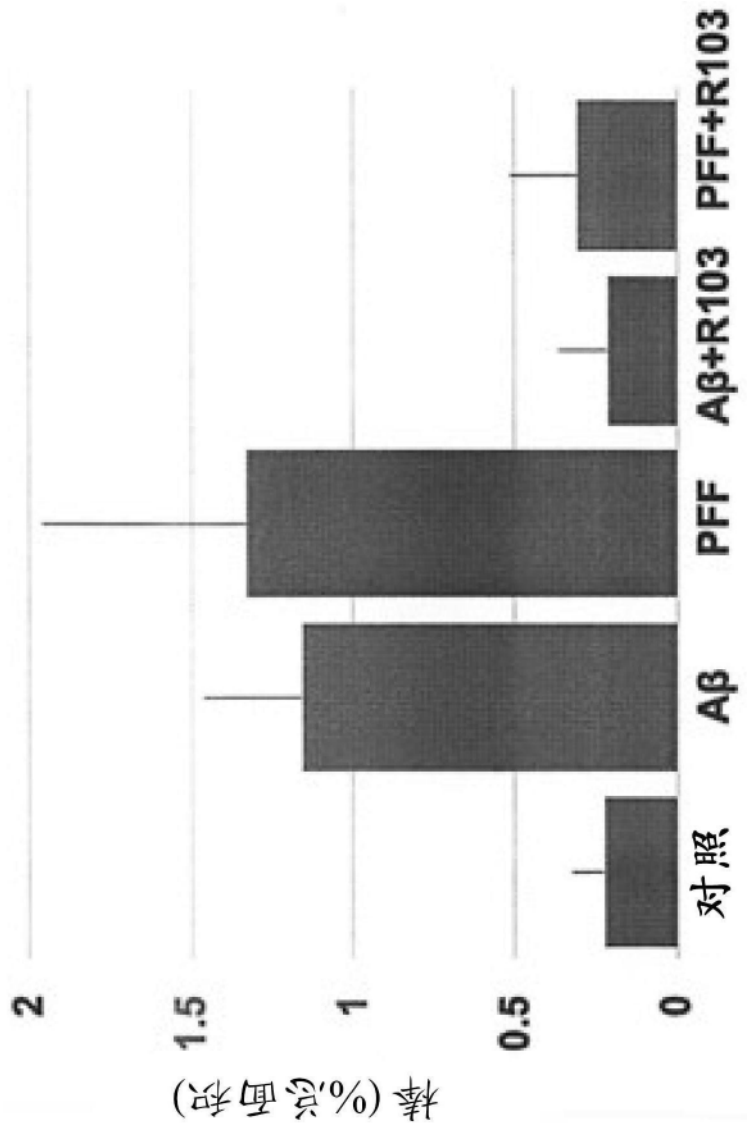
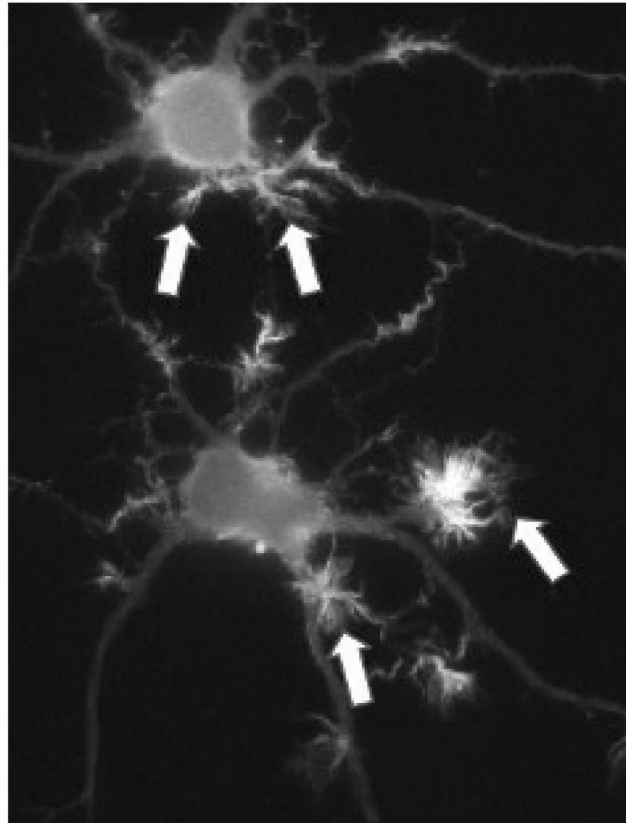
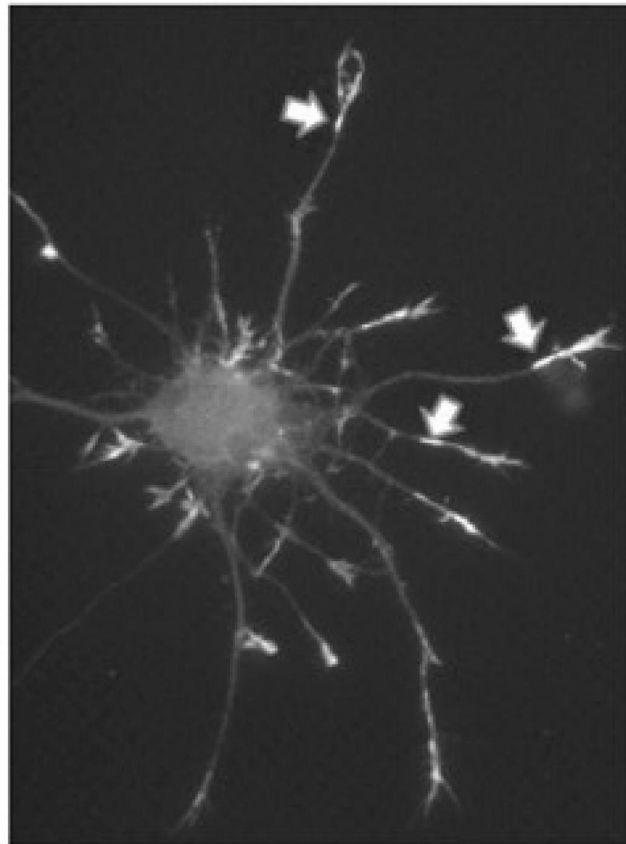


图4



具有 RAP-103 (10pM)



无 RAP-103

图5