



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101084002 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 21

(21) 申请号 200580038189. 2

(22) 申请日 2005. 09. 02

(30) 优先权数据

60/606, 506 2004. 09. 02 US

60/606, 507 2004. 09. 02 US

60/608, 148 2004. 09. 09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2007. 05. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2005/031431 2005. 09. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02006/029028 EN 2006. 03. 16

(73) 专利权人 克格诺西有限公司

地址 美国北卡罗来纳

(72) 发明人 迈克尔·P·维特克

苏珊·E·麦克纳

克里斯托弗·R·塞尔夫

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

(51) Int. Cl.

A61K 38/00 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 20030077641 A1, 2003. 04. 24, 摘要, 说明书第 9 页, 权利要求 1 — 4, 14.

WO 03026479A A1, 2003. 04. 03, 全文.

AONO M 等. Protective effect of apolipoprotein E-mimetic peptides on N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in primary rat neuronal-glial cell cultures. 《Neuroscience》. 2003, 第 116 卷 (第 2 期), 437-445.

LYNCH JOHN R 等. APOE genotype and an ApoE-mimetic peptide modify the systemic and central nervous system inflammatory response. 《The Journal of Biological Chemistry》. 2003, 第 278 卷 (第 49 期), 48529-48533.

审查员 黄磊

权利要求书2页 说明书77页 附图24页

(54) 发明名称

改进的 APO E 类似物及其使用方法

(57) 摘要

本发明公开了新的 Apo E 肽衍生物和 Apo E- 蛋白转导结构域缀合物, 它们可用于治疗包括 CNS 炎症、创伤性脑损伤、炎症性肠病 (也称为节段性肠炎或溃疡性结肠炎)、脑缺血、动脉粥样硬化、败血症、多发性硬化和关节炎性疾病、阿尔茨海默氏症和其他脑部疾病在内的疾病。本发明包括通过施用 Apo E 或至少一种 Apo E 模拟肽而保护进行照射或放疗的对象的方法。

1. 一种 ApoE 片段 COG133 (SEQ ID NO. 1) 的 α 螺旋肽衍生物, 其由序列 Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-KRLL-NH₂ (SEQ ID NO. 7) 组成, 其中 Aib 是氨基异丁酸以及 Ac 是乙酰化的氨基端, 且其中所述 α 螺旋肽衍生物与一具有 SEQ ID NO. 1 序列的肽相比, 在更宽的治疗窗内对创伤性脑损伤 (TBI) 的小鼠模型有效。

2. 权利要求 1 的 α 螺旋肽衍生物, 其中所述肽衍生物与 COG133 相比也表现出治疗指数增加。

3. 一种药物组合物, 其包含权利要求 1 的 α 螺旋肽衍生物。

4. 权利要求 1 的一种 α 螺旋肽衍生物在制备药物组合物中的用途, 所述药物组合物用于在一对象中降低神经胶质细胞活化、小胶质细胞活化或神经元细胞死亡。

5. 权利要求 1 的一种 α 螺旋肽衍生物在制备药物组合物中的用途, 所述药物组合物用于治疗或者改善一对象中与 CNS 炎症、CNS 创伤、脑缺血或脑水肿相关的症状。

6. 权利要求 5 的用途, 其中所述 CNS 炎症、CNS 创伤、脑缺血或脑水肿伴有颅内出血。

7. 权利要求 4 的用途, 其中所述神经元细胞死亡与谷氨酸兴奋性毒性或暴露于 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 相关。

8. 权利要求 1 的一种 α 螺旋肽衍生物在制备药物组合物中的用途, 所述药物组合物用于在一对象中治疗动脉粥样硬化或降低动脉粥样硬化斑块形成。

9. 权利要求 1 的一种 α 螺旋肽衍生物在制备药物组合物中的用途, 所述药物组合物用于在一对象中治疗、预防或改善细菌性败血症的症状。

10. 权利要求 1 的一种 α 螺旋肽衍生物在制备药物组合物中的用途, 所述药物组合物用于在一对象中治疗、预防或改善多发性硬化的症状。

11. 权利要求 1 的一种 α 螺旋肽衍生物在制备药物组合物中的用途, 所述药物组合物用于在一对象中治疗、预防或改善类风湿性关节炎、牛皮癣关节炎、强直性脊柱炎或累及多关节的青少年类风湿性关节炎的症状。

12. 权利要求 1 的一种 α 螺旋肽衍生物在制备药物组合物中的用途, 所述药物组合物用于在一对象中治疗、预防或改善炎症性肠病 (IBD)、节段性肠炎、或溃疡性结肠炎的症状。

13. 一种组合物, 其包含与蛋白转导结构域 (PTD) 缀合的权利要求 1 的 α 螺旋肽衍生物。

14. 权利要求 13 的组合物, 其中所述 PTD 选自 antennapedia、TAT、SynB1、SynB3、SynB5 和聚精氨酸。

15. 权利要求 1 的一种 α 螺旋肽衍生物在制备药物组合物中的用途, 所述药物组合物用于保护有此需要的对象来抵抗放射的至少一种效应。

16. 权利要求 15 的用途, 其中所述放射是全身照射。

17. 权利要求 15 的用途, 其中所述对象已经经历了移植过程。

18. 权利要求 17 的用途, 其中所述移植过程是血液或骨髓移植。

19. 权利要求 15 的用途, 其中所述放射是放疗。

20. 权利要求 19 的用途, 其中所述放疗用于治疗癌症。

21. 权利要求 20 的用途, 其中所述癌症选自脑部肿瘤、头颈部癌症、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、皮肤癌、直肠癌、宫颈癌和子宫癌、淋巴瘤、和肉瘤。

22. 权利要求 21 的用途, 其中所述组合物阻断或降低放射诱导的至少一种细胞因子的

产生。

23. 权利要求 22 的用途,其中所述至少一种细胞因子选自肿瘤坏死因子 α (TNF α)、白细胞介素-1 α (IL1 α)、白细胞介素-1 β (IL1 β) 和白细胞介素-6 (IL6)。

24. 权利要求 15 的用途,其中所述组合物阻断或降低放射诱导的神经毒性、晚期迟发性放射诱导性脑坏死、放射诱导的软组织损伤或血管损伤、或放射诱导的口腔干燥。

25. 权利要求 14 的组合物,其中所述 PTD 与所述肽衍生物的氨基端缀合。

26. 权利要求 25 的组合物,其中所述 PTD 为 RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO. 51) 或 RRMKWKK (SEQ ID NO. 52)。

27. 权利要求 25 的组合物,其中所述 PTD 为 GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO. 50)。

28. 权利要求 25 的组合物,其中所述 PTD 为 RGGRLSYSRRRFSTSTGR (SEQ ID NO. 53)。

29. 权利要求 25 的组合物,其中所述 PTD 为 RRLSYSRRRF (SEQ ID NO. 54)。

30. 权利要求 25 的组合物,其中所述 PTD 为 RGGRLAYLRRRWAVLGR (SEQ ID NO. 55)。

31. 权利要求 25 的组合物,其中所述 PTD 为 RRRRRRRR (SEQ ID NO. 56)。

32. 权利要求 1 的一种 α 螺旋肽衍生物在制备药物组合物中的用途,所述药物组合物用于在一对象中治疗、预防或改善创伤性脑损伤。

33. 权利要求 32 的用途,其中所述创伤性脑损伤在所述对象引起神经系统缺陷。

34. 权利要求 32 的用途,其中所述治疗包含神经系统恢复。

35. 权利要求 32 的用途,其中所述治疗是认知功能改善。

36. 权利要求 32 的用途,其中所述创伤性脑损伤是 CNS 炎症或 CNS 水肿。

37. 权利要求 1 的一种 α 螺旋肽衍生物在制备药物组合物中的用途,所述药物组合物用于在一对象中降低巨噬细胞活化。

38. 权利要求 37 的用途,其中所述巨噬细胞活化与动脉粥样硬化斑块的形成相关。

39. 权利要求 1 的 α 螺旋肽衍生物在制备药物组合物中的用途,所述药物组合物用于在对象中治疗、预防或改善阿尔茨海默氏症的症状。

40. 权利要求 1 的 α 螺旋肽衍生物在制备药物组合物中的用途,所述药物组合物用于在对象中治疗、预防或改善中风的症状。

改进的 APO E 类似物及其使用方法

[0001] 1. 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2004 年 9 月 2 日提交的临时申请 60/606, 506、2004 年 9 月 9 日提交的临时申请 60/608, 148、和 2004 年 9 月 2 日提交的临时申请 60/606, 507 的优先权, 在此通过引用将上述申请的全部内容并入本申请。本申请还涉及 1999 年 3 月 1 日提交的申请 09/260, 430、2001 年 9 月 21 日提交的申请 09/957, 909、2002 年 9 月 23 日提交的申请 10/252, 120、和 2005 年 3 月 29 日提交的申请 11/091, 336, 在此通过引用将上述申请的全部内容并入本申请。

2. 技术领域

[0003] 本发明涉及用于治疗创伤性脑损伤、炎症性肠病 (IBD)、节段性肠炎 (Crohn's Disease)、溃疡性结肠炎、关节炎、多发性硬化、动脉粥样硬化、和败血症的化合物和方法。本发明还涉及保护对象抵抗放射 (包括全身照射和局部放疗) 的效应的方法, 并涉及移植、癌症治疗和与意外或者有意暴露于电离辐射的急症医疗等领域。

3. 背景技术

[0004] 多种证据集中表明, ApoE (载脂蛋白 -E) 在改变急、慢性神经系统疾病的临床转归方面具有重要的作用。这些基于患者 ApoE 基因型的临床研究结果与中风和创伤性脑损伤 (TBI) 的小鼠模型的结果是一致的, 在所述小鼠模型中发现, ApoE 具有神经保护性作用 (Laskowitz et al. 1997, Sheng et al. 1998, 1999, Lynch et al., 见下文)。

[0005] ApoE 是具有 299 个氨基酸的蛋白质, 具有多种生物学功能。最初发现的是 ApoE 在胆固醇和甘油三酯的转运和代谢中的作用, 其中 ApoE 是低密度脂蛋白 (LDL) 受体、LDL-受体相关蛋白 (LRP) 和极低密度脂蛋白 (VLDL) 受体的配体 (Weisgraber 1994)。除了在胆固醇代谢中的作用之外, 最近的引人注目的临床研究提示 ApoE 在急、慢性人类疾病的神经生物学方面也具有重要的作用。存在三种常见的人类同工型, 称为 ApoE2、ApoE3、和 ApoE4, 它们的区别在于在残基 112 和 158 处的单个氨基酸置换 (Weisgraber 1994)。已经发现 APOE4 等位基因的存在与发生晚期发病的家族性和散发性阿尔茨海默氏症 (AD) 的易感性增高有关。最近的临床研究还高度提示 APOE4 等位基因的存在与急性脑损伤之后预后不良有关 (见 Laskowitz et al. 1998a, 1998b, Crawford et al. 2002)。

[0006] 已经发现, ApoE 影响晚期发病和家族性 AD 的发生。这一效应十分强烈并具有剂量依赖性, 以至于相对最常见的 APOE3/3 基因型纯合子的患者来说, 具有 APOE4/4 基因型的纯合子个体发生 AD 的风险要高出大约 20 倍, 而具有 APOE3/4 基因型的杂合子个体的风险高出 4 倍 (Strittmatter et al., 1993; Corder et al., 1993; 综述见 Laskowitz et al., 1998a)。这一发现重新激起了对 ApoE 在哺乳动物中枢神经系统 (CNS) 中的功能的兴趣。由于其与 AD 相关, 多个实验室已经研究 ApoE 与被认为在 AD 的发病机制中具有特殊作用的蛋白质之间的相互作用。因此, 一些实验室已经描述了 ApoE 和 A β 、或 ApoE 和 τ 之间的同工型特异性相互作用 (Strittmatter et al. 1994; Gallo et al. 1994; Fleming et al. 1996;

综述见 Laskowitz et al., 1998a)。不过, ApoE 在 CNS 中的作用仍然是不明确的, 且并不清楚这些相互作用中究竟哪些与人类神经退行性疾病有关。

[0007] 在美国, 创伤性脑损伤 (TBI) 是在儿童、青年人和老年人中造成创伤相关性死亡和残疾的首要原因。流行病学研究表明 TBI 给社会造成了严重的社会经济学负担, 估计单就住院医疗费用而言便超过每年 10 亿美元。估计在 5 至 14 岁之间, TBI 的发病率成倍升高, 且男性和女性均在成年早期达到高峰, 大约 250 人 / 100,000 人。由于中度至重度 TBI 的大多数幸存者均出现慢性、终身的神经系统残疾, 伴有不同程度的依赖性, 因此对于生存期越长的个体来说, 他们所遭受的痛苦、家庭的负担、以及给社会造成的财政负担也越重。因此需要改进对 TBI 的治疗。

[0008] 2002 年 9 月 23 日提交的美国专利申请 No. 10/252, 120 公开了使用 ApoE 类似物, 包括 COG133, 来治疗或改善脑缺血或脑的炎症的神经系统效应。COG133 是小的、截短的肽, 由完整 ApoE 蛋白的第 133-149 位残基组成。尽管在动物研究中发现 COG133 是有用的, 但其必须在十分有限的治疗窗中施用。因此仍然需要改进对 TBI 的治疗。

[0009] 除了 TBI 以外, 化疗和放疗的毒性也可对患者的短期和长期生活质量产生不良影响, 限制治疗的剂量和持续时间, 威胁生命, 并可引起医疗性和非医疗性的费用。癌症治疗造成的不良后果导致开发出了用于改善或减轻某些化疗和放疗毒性特异性药物。理想的化疗和放疗保护药物应该能够预防所有毒性, 包括非威胁生命的不良反应 (脱发) 到不可逆的疾病 (听力丧失和神经毒性) 直至可能致命的事件 (严重的心肌病、严重的血小板减少症), 而不会对癌症治疗的抗肿瘤效力造成不良影响, 并应该便于施用, 且其本身应该是相对无毒的。不过, 迄今开发的大多数药物均仅具有较窄的抗毒性的范围 (Hensley et al., 1999)。

[0010] 口腔干燥和粘膜炎症是与放疗有关的主要毒性反应。发生这些并发症的风险涉及进行放射的区域、放疗的剂量和方案、放疗是否与化疗结合进行、以及一些不完全了解的宿主 - 疾病相关因素 (Mossman, 1994)。尽管这些毒性反应很少导致死亡, 但其病情对于患者而言可能十分严重, 造成急性和长期的后果。口腔干燥是对头颈部进行标准分次放疗的最常见的毒性反应。放射引起的急性口腔干燥的原因是炎症反应, 但晚期口腔干燥, 包括放射之后 1 年出现的口腔干燥, 代表唾液腺的纤维化, 且因此通常是永久性的。口腔干燥引起口干的症状, 这会影响患者进食和讲话的能力。此外, 患有口腔干燥的患者更易于出现龋齿、口腔感染和骨坏死。

[0011] 放疗是患有脑部癌症的患者的首要治疗。无论放射以何种方式作用于脑部 (医学治疗、核攻击或核事故), 脑的反应通常是缓慢的, 严重的临床症状表明脑细胞死亡 (Fike et al., 1988)。这些问题会在数个月的过程中变得严重并可导致死亡, 但在放疗后的数天至数周中, 一些不太严重的急性症状也会造成患者虚弱 (Mandell et al., 1990)。

[0012] 脑细胞死亡和 / 或功能障碍的原因还不完全清楚, 但被认为是因放射后的多种反应所导致的。电离辐射通过与辐射的能量有关的一系列分子事件导致活组织损伤。急性放射损伤的原因在于水自由基, 后者通过放射作用于水而产生。由水的辐解作用产生的主要自由基有 $\text{OH}\cdot$ 、 $\text{H}\cdot$ 、 HO_2 、 H_3O^+ 、等等 (Scholes, 1983; Pradhan et al., 1973; Dragaric and Dragaric, 1971)。这些自由基与细胞大分子例如 DNA、RNA、蛋白质和膜反应, 引起细胞功能障碍, 最终导致死亡。多种因素可加强或减轻对细胞的放射损伤, 例如存在氧、巯基化合

物以及细胞周围的其他分子 (Pradhan et al., 1973 ;Bacq1965)。当存在氧时,水合的电子和 H 原子与分子氧反应产生自由基,例如 HO_2 、 O_2^- 、及其他水自由基 (Baraboi et al., 1994 ; Biakov and Stepanov, 1997)。

[0013] 除了放射产生自由基的直接作用以外,一些文献报道了放射治疗后脑部释放细胞因子 (例如, Girinsky et al., 1994 ;Hong et al., 1995 ;Chiang et al., 1997)。特别是 Hong et al. (1995) 报道,在接受单剂 25Gray (Gy) 脑部照射剂量的小鼠的脑中,肿瘤坏死因子 α (TNF α)、白细胞介素 1 α 和 1 β (IL1 α 和 IL1 β) 的 mRNA 显著升高,该剂量造成不足 10% 的死亡。此外,白细胞介素 6 (IL6) 有较低程度的降低,且随着放射剂量的增加呈剂量依赖的方式。全身照射也类似地诱导产生细胞因子,但诱导的水平明显低于脑部专门照射。这些照射后细胞因子水平的改变同与典型的先天性免疫应答相关的星形细胞增生和小胶质细胞增生是一致的,所述典型的先天性免疫应答见于脑在应答于疾病和 / 或病原体入侵时所发起的应答。如我们最近的文章 (Lynch et al. 2003) 所报道的,以脂多糖 (LPS) 进行外周处理也可诱导脑部炎症应答,包括星形细胞增生、小胶质细胞增生和细胞因子释放,这类似于上述作者以放射处理所看到的结果。

[0014] 以下三种药物已经被美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准用于化疗和 / 或放疗的保护:右雷佐生 (Dexrazoxane)、美司钠 (Mesna)、和氨磷汀 (Amifostine)。不过,这些获得批准的药物各自具有的问题限制了其功效。右雷佐生和美司钠各自具有相对窄谱的毒性保护作用,分别限于心脏和尿路上皮,而氨磷汀具有较宽的潜在的细胞保护谱。有利的消息是这些药物 (可能美司钠是例外) 能够全身起作用,并不明显针对的是一种特殊的细胞类型,而是可能起到保护大多数细胞类型的作用。不同于骨髓抑制或急性恶心 / 呕吐,与此类药物有关的毒性进行测量以便在临床试验中可重复性地评估将更加困难或耗费人力,这是因为结果的主观性 (神经毒性)、疾病起病隐匿 (心肌病)、或临床的相关性不明确 (无症状性血清肌酐升高、显微镜下的血尿、或无症状性心脏射血分数下降) (Hensley et al., 1999)。

[0015] 氨磷汀过去称为 WR-2721,其活性代谢产物是氨基硫醇 (aminothiols),其能够通过清除来源于的氧的自由基而保护细胞免于损伤。该药来自于受到美国陆军资助的机密核战争计划,其是在经筛选的超过 4,400 种化学品最终选定的,具有出色的放射性保护特性和安全谱 (Schucter and Glick, 1993)。随后对氨磷汀在降低放疗和改变 DNA 结构和功能的化疗剂例如烷化剂和铂制剂的毒性方面的潜在作用进行了评价。经评价,不同于保护作用针对的是特定器官的右雷佐生和美司钠,氨磷汀是广谱的细胞保护剂。临床前期的研究结果表明,氨磷汀能够选择性保护绝大多数正常组织免于遭受放疗的细胞毒性作用,但不保护中枢神经系统 (CNS) 和肿瘤组织 (Schucter and Glick, 1993 ;Coleman et al., 1988)。因此,对于降低放射和放疗的作用,特别是降低其在脑和 CNS 中的作用的有效治疗方法,仍然存在明显的需求。

[0016] 大约一百万美国人患有炎症性肠病 (IBD),也称为节段性肠炎或溃疡性结肠炎,表现为肠道炎症、腹痛、肠道痉挛和腹泻。这些症状的严重程度不同,但通常都会造成患者一定程度的虚弱,以至于影响其生活质量。在现有的多种治疗方法中,几乎所有患者均需要根据疾病的严重程度进行组合方案的治疗。不过,这些治疗通常昂贵,例如需要使用 infliximab (抗 TNF 单克隆抗体),且通常出现明显的不良反应,例如见于使用皮质激素类和免疫抑制剂,这些药物可引起感染或恶性肿瘤、糖尿病、胰腺炎以及严重的骨质疏松。除

了这些问题,IBD 患者所面临的严重病痛显然促使进一步努力开发新的有效的治疗手段。尽管 ApoE 对于先天性免疫具有有益的作用,这已经由 ApoE 缺陷小鼠对全身感染缺乏先天性免疫力且导致败血症和严重加重这一事实得到证实,但 ApoE 在肠道炎症中的作用仍然没有完全阐明。

4. 发明内容

[0017] 本发明提供 COG133 的类似物和衍生物,COG133 是由 ApoE 的第 133-149 位残基组成的截短的肽。这一截短的 ApoE 肽称为 COG133(LRVRLASHLRKLRKRL (SEQ ID NO. 1)),其被证明可用于治疗或减轻脑缺血或脑的炎症。2002 年 9 月 23 日提交的美国专利申请 No. 10/252,120,在此通过引用将其全部内容并入本申请。不过,在动物模型中,当在 TBI 之后立即施用时,COG133 是最为有效的。本发明的化合物为治疗和预防创伤性脑损伤的神经系统效应提供了更宽的治疗窗。治疗窗指的是在 TBI 之后本发明的化合物可以有效施用的一段时间。通过增大治疗窗,可在 TBI 之后更长的时间间隔内施用本发明的化合物并有效地治疗或预防 TBI 对神经系统的效应,减轻脑的炎症或缺血,或提高 TBI 之后的认知功能。此外,本发明的化合物为治疗和预防创伤性脑损伤的神经系统效应提供了增强的功效、更高的治疗指数和更长的治疗窗。

[0018] 本发明还提供使用上述化合物的方法。例如,本发明的化合物可用于治疗中枢神经系统 (CNS) 疾病和损伤,包括创伤性脑损伤、阿尔茨海默氏症、脑缺血、脑水肿或降低神经胶质细胞或小胶质细胞的活化。本发明还提供用于改善与 CNS 创伤、炎症或脑缺血相关的症状的方法。在一个实施方式中,本发明提供用于减少神经元细胞死亡或抑制巨噬细胞活化的方法。

[0019] 对于治疗 CNS 疾病和损伤,血脑屏障 (BBB) 严重限制了极性分子例如肽向脑内的转运。体内的初步研究提示,通过与蛋白转导结构域 (PTD) 相缀合,COG133 和其他 ApoE 肽模拟物的功效可得到显著的增强。PTD 是短的碱性肽,其促进运载物向细胞内的输送,否则运载物将不能或者只能极少穿过细胞膜。不过,PTD 转运运载物进入细胞内的能力并不保证其能够转运通过 BBB,后者是明显更为复杂的过程,而且已经就转运运载物穿过 BBB 进行过体内测试的 PTD 的数量一直相对很少。因此,对合适的用于 BBB 转运的 PTD 需要经验性地确定和 / 或需要通过对已知的 PTD 加以改变而产生。本发明提供的化合物包含 ApoE 类似物和衍生物的 PTD 缀合物,包括 COG133 及其衍生物和类似物的 PTD 缀合物。

[0020] 本发明还提供使用上述化合物来治疗、预防或改善中枢神经系统 (CNS) 以及外周组织如关节炎的关节、肺和心脏的损伤和疾病等的方法。在一个实施方式中,本发明还提供用于减少神经元细胞死亡或抑制巨噬细胞活化的方法。在另一个实施方式中,本发明提供用于治疗动脉粥样硬化或减轻动脉粥样硬化斑块的方法。在另一个实施方式中,本发明提供用于治疗、预防或改善细菌性败血症的症状的方法。

[0021] 本发明的一个方面提供用于在体外或者在哺乳动物对象体内抑制神经胶质细胞或小胶质细胞活化的方法,其包括施用至少一种上述 ApoE 类似物。在一个实施方式中,所述方法中所施用的化合物的量可降低神经胶质细胞或小胶质细胞活化。

[0022] 本发明的一个方面提供用于治疗或改善与 CNS 创伤、CNS 炎症、脑缺血或脑水肿相关的症状的方法,包括施用至少一种上述化合物。与不存在所述化合物时的情况相比,所施

用的所述至少一种化合物的量可减轻 CNS 创伤、CNS 炎症、脑缺血或脑水肿。在某些实施方式中,本发明的方法减轻创伤性脑损伤后的 CNS 损伤、CNS 炎症、脑缺血或脑水肿。在某些实施方式中,所述方法促进创伤性脑损伤之后的康复。在某些实施方式中,所述方法改善创伤性脑损伤后的功能恢复或认知功能。

[0023] 在一个实施方式中,本发明提供用于减少哺乳动物对象中与谷氨酸兴奋性毒性或暴露于 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 有关的神经元细胞死亡的方法,包括给所述对象施用至少一种本发明的化合物。与不存在所述化合物时的情况相比,所施用的所述至少一种化合物的量可减少与谷氨酸毒性有关的神经元细胞死亡。

[0024] 在另一个实施方式中,本发明提供抑制哺乳动物对象的巨噬细胞活化的方法,包括施用至少一种在此所述的化合物。与不存在所述化合物时的情况相比,所施用的所述至少一种化合物的量可抑制巨噬细胞活化。

[0025] 在一个实施方式中,本发明提供用于治疗或改善关节炎或风湿性疾病的症状的方法。在某些实施方式中,所述方法用于治疗或改善类风湿性关节炎、牛皮癣关节炎、强直性脊柱炎等的症状。

[0026] 在一个实施方式中,本发明提供用于治疗或改善多发性硬化 (MS) 的症状的方法。在某些实施方式中,所述方法用于治疗或改善复发性 / 再发性 MS、继发进展性 MS、进展复发性 MS 或原发进展性 MS 的症状,包括施用至少一种在此所述的化合物。

[0027] 在一个实施方式中,本发明提供在冠状动脉旁路移植 (CABG) 手术过程中或者与之同时施用所述化合物的方法。

[0028] 在另一个实施方式中,本发明提供用于治疗动脉粥样硬化的方法或用于减轻动脉粥样硬化斑块形成的方法,包括施用至少一种在此所述的化合物。与不存在所述化合物时的情况相比,所施用的所述至少一种化合物的量了减轻动脉粥样硬化斑块的形成。在某些实施方式中,所述方法用于预防动脉粥样硬化斑块的形成,包括施用至少一种在此所述的化合物。

[0029] 在另一个实施方式中,本发明提供用于治疗、预防或改善细菌性败血症的症状的方法,包括施用至少一种在此所述的化合物。与不存在所述化合物时的情况相比,所施用的所述至少一种化合物的量可减轻败血症相关性炎症。

[0030] 在某些实施方式中,本发明提供药物组合物,其包含至少一种在此所述的化合物。在某些实施方式中,本发明提供药物组合物,其包含至少一种在此所述的化合物连同另一种用于治疗、预防或改善 CNS 或神经系统损伤、风湿性疾病、多发性硬化、CABG 手术、动脉粥样硬化或细菌性败血症的药物。本发明的药物组合物的形式便于施用于有此需求的对象,包括例如通过静脉、肌肉内、皮下或者经皮而施用。参见 Remingtons Pharmaceutical Sciences, 19th ed. Remington and Gennaro, eds. Mack Publishing Co., Easton, PA, 通过引用将其并入本申请。本发明的方法进一步提供各种给药方案、施用时间、间隔、和持续时间,以治疗、预防或改善在此所述的疾病。本发明还包括在此所公开的化合物的功能性变体以及通过本发明公开的分析方法所鉴定的变体,其中此类化合物介导在此所述的功能性效应。与此一致的是,本发明还包括所公开的化合物及其功能性变体在制备用于治疗在此所讨论的各种疾病和病症的药物的方法中的用途。

[0031] 本发明还提供用于保护对象以抵抗放射和放疗的一或多种效应的新的疗法,包括

给有此需要的对象施用 ApoE 蛋白或一或多种 ApoE 模拟肽。本发明的方法可用于治疗进行全身照射 (TBI) 的对象,例如作为血液或骨髓移植过程的一部分。所述方法也可用于治疗进行放疗的对象,例如用于治疗癌症或用于预防或治疗暴露于环境辐射的个体。

[0032] 本发明还提供用于炎症性肠病 (IBD)、节段性肠炎或溃疡性结肠炎的新的疗法,包括给有此需要的对象施用 ApoE 蛋白或一或多种 ApoE 模拟肽,与不存在所述化合物时的情况相比,所施用的量可减轻 IBD、节段性肠炎或溃疡性结肠炎的症状。

5. 附图说明

[0033] 图 1 给出了 COG133 肽的螺旋轮 (helical wheel) 视图;

[0034] 图 2 给出了示例性的模拟物;

[0035] 图 3 给出了作为螺旋模拟物的三环支架;

[0036] 图 4 给出的图表说明创伤性脑损伤之后小鼠的旋转棒平衡表现;

[0037] 图 5 给出了用于鼠闭合性头颅损伤模型的气动冲击装置的图片;和

[0038] 图 6(A)、(B) 和 (C) 给出了气动冲击之前对小鼠进行处理的图片;

[0039] 图 7 给出的图表说明以 LPS 处理的 BV2 小胶质细胞中一氧化氮 (A) 和 TNF α (B) 的释放被抑制。COG1410 相对于 COG133 显示出明显更强的效力。

[0040] 图 8 给出了旋转棒测试结果的图表,与盐水相比,在 TBI 之后 120 分钟施用 COG1410 显示出神经保护作用, $p < 0.05$; COG133 与盐水相比没有显著差异, $p > 0.05$ 。

[0041] 图 9 给出了 COG133 的血浆浓度随时间变化的图表。

[0042] 图 10 给出的图表显示鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎的小鼠模型中 COG133 与对照肽相比的平均临床积分。

[0043] 图 11 给出的图表显示 MOG 肽诱导巨噬细胞产生 NO (A) 和 TNF α (B), 而 LPS/IFN- γ 处理诱导巨噬细胞产生 NO (C)、TNF α (D) 和 IL-6 (E)。

[0044] 图 12 给出的图表显示 COG133 以浓度依赖性方式抑制 MOG 介导的 NO (A) 和 TNF α (B) 的产生。

[0045] 图 13 给出的图表显示 COG133 以浓度依赖性方式抑制 LPS/IFN- γ 诱导的 NO (A)、TNF α (B) 和 IL-6 (C) 的产生。

[0046] 图 14 给出的图表显示 COG134 (含有 Antennapedia-COG133 嵌合体) 以浓度依赖性方式抑制 MOG 介导的 NO (A) 的产生以及 LPS/IFN- γ 诱导的 NO (B)、TNF α (C) 和 IL-6 (D) 的产生, 而前缀肽 (prefix peptide) 单独处理 (P) 没有显示出活性。

[0047] 图 15A 和 15B 给出了在创伤性脑损伤之后处理的小鼠上得到的旋转棒测试和 Morris 水迷宫测试结果;

[0048] 图 16 给出了 COG133 抑制亚硝酸根释放的图表;

[0049] 图 17 给出了 TAT-COG133 抑制亚硝酸根释放的图表;

[0050] 图 18 给出了穿透蛋白 (Penetratin)-COG133 抑制亚硝酸根释放的图表。

[0051] 图 19 给出的图表显示 PTDCOG133 缀合物抑制 LPS 介导的一氧化氮产生。

[0052] 图 20 给出了 TBI 之后 90 分钟以 COG133 或穿透蛋白 -COG133 处理的小鼠的旋转棒等待时间 (rotorod latency) 的图表。

[0053] 图 21 给出了 TBI 之后 2 小时以 synB3-COG133 处理的小鼠的旋转棒等待时间的图

表。

[0054] 图 22 给出了比较含有 ApoE 的动物与 ApoE 敲除的动物对放射诱导的死亡的抵抗性的图表。一组 10 只野生型动物暴露于 7Gy 的 TBI,照射后 30 天 100%存活。抑制 10 只 ApoE 敲除的动物暴露于 7Gy 的 TBI,照射后 30 天 80%存活。一组 10 只野生型动物暴露于 8Gy 的 TBI,照射后 36 天 40%存活。一组 10 只 ApoE 敲除的动物暴露于 8Gy 的 TBI,照射后 13 天 0%存活 (Y 轴=百分比存活率;X 轴=全身照射后的天数)。

[0055] 图 23 给出的图表显示了在存在或不存在 cog133(一种载脂蛋白-e 的肽模拟物)的情况下,经 10gray 的全身照射之后含有载脂蛋白-e 的野生型小鼠的存活率。Tbi 后 1 分钟腹腔内施用 cog133(4mg/kg,于 100 μ l 盐水载体中)改善了存活率,与盐水载体对照相比。Tbi 后 1 小时、1 天、2 天、和 3 天腹腔内施用 4 剂 cog133(每剂为 4mg/kg,于 100 μ l 盐水中)显著改善了存活率,与对照相比, $p < 0.01$,通过重复测定 anova。

[0056] 图 24A 给出的图表显示注射 LPS 后 3 小时进行 COG133 处理显著降低了血浆 TNFa 水平,对单纯 LPS 对照相比 ($p < 0.05$)。0、3 和 24 小时的 TNFa 水平与背景对照无区别。来自 Lynch et al. 2003。

[0057] 图 24B 给出的图表显示注射 LPS 后 1 和 3 小时进行 COG133 处理显著降低了血浆 IL-6 水平,对单纯 LPS 对照相比 ($p < 0.05$)。0 和 24 小时的 IL-6 水平与背景对照无区别。来自 Lynch et al. 2003。

[0058] 图 25 的图像显示 COG133 抑制 MOG 诱导的 EAE 小鼠的脊髓脱髓鞘。在 dpi30 处死动物,取出完整脊髓,并自颈 (A, D)、胸 (B, E) 和腰 (C, F) 段制备 5mm 厚切片。以罗克沙尔固蓝 (Luxol fast blue) 对经 COG133 处理的动物 (D, E, F, H) 和经普通盐水处理的对照 (A, B, C, G) 进行染色(髓磷脂被染为蓝色)然后以曙红进行复染(显示外周的浸润,为紫红色)。图片 G 是 A 的放大插入图,而图片 H 是 D 的放大插入图。

[0059] 图 26 给出的图表显示 COG 化合物以剂量依赖性的方式抑制以 LPS 刺激 40 小时的小鼠 BV2 小胶质细胞释放一氧化氮。根据这些数据,COG133 的 IC50 约为 2 微摩尔,COG1410 的 IC50 约为 2 微摩尔,COG4502 的 IC50 约为 10nM。每个数据点是 3 次重复实验的平均值。给出了标准误差线,但其小于用于绘制结果的符号。

[0060] 图 27 给出的图表显示 COG4502 以剂量依赖性的方式抑制在培养基中以 γ 干扰素和 LPS 刺激 24 小时的小鼠腹腔巨噬细胞释放 TNFa 或 IL6。以一个星号代表 $p < 0.05$ 的显著性,以两个星号代表 $p < 0.01$ 的显著性,与对照相比。

[0061] 图 28 给出的图表显示啮齿柠檬酸杆菌 (*C. rodentium*) 感染 14 天后诱导的结肠精氨酸酶和 iNOS。A, RT-PCR 检测的精氨酸酶 I、精氨酸酶 II、和 iNOS 的 mRNA 水平。B, 精氨酸酶 I 和 II 的 Western 印迹。在 A 和 B 中,各个泳道是来自不同小鼠的组织。

[0062] 图 29 给出了精氨酸酶 I (A-C, H) 和 iNOS (D-F, I) 的免疫组化检测结果图像。A, 未感染的小鼠 (200X)。B-C, 感染啮齿柠檬酸杆菌的小鼠 (B, 200X; C, 400X), 对精氨酸酶 I 进行染色; D-F 相同的组织对 iNOS 进行染色。G, B 和 E 的连续切片,其中兔 IgG 替代初级 Ab, 没有显示染色。H 和 I, 不同的结肠炎小鼠 (200X), 分别对精氨酸酶 I 和 iNOS 进行染色。

[0063] 图 30 给出的图表显示对照 (Ctrl) 或感染啮齿柠檬酸杆菌的 (*C. rod*) 小鼠中的结肠精氨酸酶活性 (A)、血清 NO 浓度 (B)、和血清 L-Arg 浓度 (C)。Ctrl 为 $n = 3$, 啮齿柠檬酸杆菌为 $n = 6$ 。* $p < 0.05$ 、*** $p < 0.001$ 。

[0064] 图 31 给出的图表显示了感染啮齿柠檬酸杆菌的 WT 和 $iNOS^{-/-}$ 小鼠的存活率 (A)、体重 (B) 和结肠重量 (C) 的变化。自感染后第 1 天开始给小鼠 L-Arg 或仅给水。感染啮齿柠檬酸杆菌 (v) 的 WT 的 $n = 31$, 以 L-Arg 处理的 WT 感染小鼠 (□) 的 $n = 32$, 感染的 $iNOS^{-/-}$ 小鼠 (σ) 的 $n = 23$, 而以 L-Arg (○) 处理的感染的 $iNOS^{-/-}$ 小鼠的 $n = 20$ 。对于 A-C: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, 与第 0 天相比; § $p < 0.05$, § § $p < 0.01$, § § § $p < 0.001$, 与 WT 水相比; # $p < 0.05$, 与无 L-Arg 的 $iNOS^{-/-}$ 相比。

[0065] 图 32 给出的图显示了感染啮齿柠檬酸杆菌的小鼠的结肠 HE 染色组织学检查结果。A, 未感染的 WT, 正常组织。B, 感染的 WT, 具有严重的结肠炎。C, 在 $iNOS^{-/-}$ 小鼠中出现组织学改善。D, 在 L-Arg 处理的 $iNOS^{-/-}$ 小鼠中出现进一步的改善。E, 啮齿柠檬酸杆菌结肠炎的组织学积分 (0-12 级)。WT, $n = 19$; WT-L-Arg, $n = 17$; $iNOS^{-/-}$, $n = 12$, 而 $iNOS^{-/-}$ -L-Arg, $n = 11$ 。** $p < 0.01$, 与 WT 相比; § $p < 0.05$, 与 $iNOS^{-/-}$ 相比。所有小鼠均接种等量的啮齿柠檬酸杆菌 (5×10^8 CFU/小鼠) 并在第 12-14 天处死; 排除了提前死亡的小鼠。

[0066] 图 33 给出的图表显示感染啮齿柠檬酸杆菌的小鼠中 IFN- γ (A)、TNF- α (B)、和 IL-1 (C) 等细胞因子 mRNA 水平, 与未感染的 WT 对照相比。通过实时 PCR 测定 mRNA 水平。各组 $n = 3-5$ 。** $p < 0.01$, 与 WT 未感染的对照相比; § $p < 0.05$, § § $p < 0.01$, 与 WT 啮齿柠檬酸杆菌相比。

[0067] 图 34 给出的图表显示了感染啮齿柠檬酸杆菌的 WT 小鼠的结肠 ODC 活性 (A) 和多胺浓度 (B)。对照组 $n = 4$, 啮齿柠檬酸杆菌组 $n = 7$, 啮齿柠檬酸杆菌 + L-Arg 组 $n = 5$ 。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 与对照相比; § § $p < 0.01$, 与啮齿柠檬酸杆菌相比。

[0068] 图 35 给出的图表显示, 给小鼠饮用含 4% DSS 的水 6 天, 在第 10 天收集组织。A, 精氨酸酶 I 和 II 以及 $iNOS$ 的 mRNA 水平, RT-PCR 测定。B, 蛋白质水平, Western 印迹测定。

[0069] 图 36 给出的图表显示了 DSS 结肠炎对精氨酸酶 I 蛋白质表达的影响。处死后以福尔马林组织, 并通过免疫过氧化物酶技术进行免疫组化, 使用抗精氨酸酶 I 多克隆抗体 (1:400 稀释; Research Diagnostics, Inc.)。注意上皮细胞的染色, 特别是在隐窝处, 以及溃疡区域炎症细胞的染色。

[0070] 图 37 给出的图表显示了 L-Arg (1%)、或 $iNOS$ 敲除给 DSS 结肠炎带来的改善。A, 存活率; B, 体重; C, 结肠重量。在 A 中, * $p < 0.05$, 与 0 时间相比; § $p < 0.05$, 与 WT 相比。在 B 和 C 中, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 与 WT 相比; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, 与 $iNOS^{-/-}$ 相比。 $n = 12-21$ 。

[0071] 图 38 给出的图表显示来自有 DSS 结肠炎的小鼠的 HE 染色切片的组织学检查结果。A, 具有严重结肠炎的 WT 小鼠; B, L-Arg 使 WT 小鼠改善; C, $iNOS^{-/-}$ +L-Arg 造成进一步改善; D, 组织学积分 (0-40 级)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 对 WT 相比, $n = 10$ 。

[0072] 图 39 给出的图表显示经实时 PCR 测定的 DSS 结肠炎组织中 IFN- γ (A)、TNF- α (B)、和 IL-1 (C) 等细胞因子的 mRNA 水平, 与 WT 对照相比, 各组 $n = 3-6$ 。** $p < 0.01$, 与 WT 对照相比; § $p < 0.05$, § § $p < 0.01$, 与 WT DSS 相比; # $p < 0.05$, 与 $iNOS^{-/-}$ 相比。

[0073] 图 40 显示了 DSS 结肠炎的结肠的多胺水平。* $p < 0.01$, ** $p < 0.01$, 与对照小鼠相比。

[0074] 图 41 显示了人 IBD 组织中精氨酸酶 I、II、和 ODC 的 mRNA 水平, RT-PCR 测定。

[0075] 图 42 给出的图表显示 COG 肽在鼠巨噬细胞中抑制啮齿柠檬酸杆菌诱导的 $iNOS$ 。以感染复数为 100 的啮齿柠檬酸杆菌的法式加压 (French-pressed) 裂解物刺激 RAW264.7 细胞。A, 通过测定 NO_2^- 水平而测定 NO 的产生。** $p < 0.01$, 与对照相比; § § $p < 0.01$, 与单独

啮齿柠檬酸杆菌相比。B, iNOS 的 RT-PCR。

[0076] 6. 发明详述

[0077] 本发明提供用于治疗包括脑水肿、脑缺血和阿尔茨海默氏症在内的中枢神经系统 (CNS) 疾病以及风湿性疾病、多发性硬化、CABG 手术、动脉粥样硬化、败血症、结肠炎和用于辐射防护的化合物、组合物和方法。本发明的化合物、组合物和方法可改善与 CNS 疾病相关的症状并提高认知功能。

[0078] 化合物

[0079] 无意于受任何理论的限制,有证据支持 ApoE 在受损的脑中的作用至少有两种不同的机制:神经胶质调节作用和神经保护作用。脑对急性和慢性损伤的应答储备能力有限。神经胶质细胞活化并随后释放活性氧分子 (ROS)、谷氨酸、蛋白酶、和炎性细胞因子被认为是促成神经退行性过程(例如见于阿尔茨海默氏症 (AD) 的情况)和急性脑损伤中神经元损伤的因素。申请人最近证实,在脂多糖 (LPS) 刺激后的混合神经胶质细胞培养物和纯化的神经胶质细胞培养物中,ApoE 下调神经胶质细胞的活化、一氧化氮 (NO) 的释放和炎性细胞因子的释放(见 Laskowitz et al. 1997)。这些体外结果似乎是具有生物学意义的,因为与匹配的表型小鼠 ApoE 蛋白的对照组相比,ApoE 缺陷型小鼠在注射 LPS 或进行闭合性头颅损伤后,其脑部的炎症基因的表达显著上调 (Lynch et al. 2001)。鉴于最近的报道提示 ApoE 在巨噬细胞中诱导信号应答,而巨噬细胞与称为神经胶质细胞的脑特异性巨噬细胞关系密切 (Misra et al. 2001),因此 ApoE 与调节神经胶质细胞活化和炎性细胞因子释放之间的关联尤为引人注目。ApoE/神经胶质细胞活化之间相关联的进一步证据来自临床研究结果,即多发性硬化中能力丧失的进展情况似乎依赖于患者表达的具体的 ApoE 同工型 (Chapman et al. 1999)。

[0080] ApoE 作用于神经系统疾病的另一个机制是施加直接的神经保护性作用。越来越多的证据表明,在促进神经突生长 (Nathan et al., 1994; Bellosa et al., 1995; Holtzman et al., 1995)、氧化应激防护 (Hayek et al., 1994; Miyata and Smith, 1996; Matthews and Beal, 1996)、和与生长因子相互作用 (Gutman et al., 1997) 以促进神经元存活方面,ApoE 具有同工型特异性作用。申请人最近证实,在谷氨酸诱导的兴奋性毒性和氧化应激生物分析中,ApoE 对原代神经元培养物施加神经保护性作用,这与在局部缺血和全部缺血的鼠模型中所见的 ApoE 的保护作用是一致的 (Sheng et al., 1998a & 1999b)。Misra et al. 2001 以及其他作者最近证实 ApoE 在神经元内启动钙依赖性信号级联。因此,一种可能性是这些神经保护性作用与 ApoE 在神经元内诱导信号级联的能力相关 (Muller et al., 1998; Misra et al. 2001)。

[0081] 此前已经产生了 ApoE130-150 肽的大量类似物,并在基于细胞水平的抑制炎性细胞因子和自由基释放的分析中以及受体结合分析中测试了它们的活性。Lynch et al., 2003, J. Biol. Chem. 278(4), 48529-33 和美国专利申请 10/252, 120 (申请日 2002 年 9 月 23 日)、09/957, 909 (申请日 2001 年 9 月 21 日) 和 09/260, 430 (申请日 1999 年 3 月 1 日), 现已放弃,其要求每个临时申请 No. 60, 077, 551 (申请日 1998 年 3 月 11 日) 的优先权,在此通过引用将各个出版物的全部内容并入本申请。

[0082] 本发明提供 COG133 的类似物和衍生物,COG133 是抑制小肽,由 ApoE 的第 133-149 位残基组成。这一 ApoE 肽称为 COG133 (LRVRLASHLRKLRKRL (SEQ ID NO. 1)),其被证明可

用于治疗或减轻脑缺血或脑的炎症。美国专利申请 No. 10/252, 120, 申请日 2002 年 9 月 23 日, 在此通过引用将其全部内容并入本申请。不过, 在动物模型中, 在 TBI 之后 30 分钟内立即施用 COG133 才是最有效的。本发明提供 COG133 的类似物和衍生物, 包括氨基酸取代衍生物、肽模拟物和融合蛋白缀合物, 它们为治疗和预防创伤性脑损伤的神经系统效应提供了更宽的治疗窗和更宽的治疗指数。

[0083] 治疗窗指的是在 TBI 之后本发明的化合物可以有效施用的一段时间。通过增大治疗窗, 可在 TBI 之后更长的时间间隔内施用本发明的化合物并有效地治疗或预防 TBI 对神经系统的效应, 减轻脑的炎症或缺血, 或提高 TBI 之后的认知功能。本发明的化合物、其类似物和衍生物还提供了比 COG133 更宽的治疗指数。治疗指数指的是动物不出现死亡时的最大耐受剂量除以最小有效剂量, 接受最小有效剂量的动物的损伤后表现明显好过盐水对照。本发明的化合物具有增强的 CNS 穿透性或或增大用于治疗 and 预防创伤性脑损伤的神经系统效应的治疗窗。CNS 穿透性指的是包括肽在内的化合物穿过血脑屏障并进入中枢神经系统 (CNS) 的能力。

[0084] 无意于受任何理论的限制, 推测 PTD 能够增强包括 ApoE 类似物肽在内的化合物的 CNS 穿透性。通过提高 CNS 穿透性, 在此所述的 PTD-ApoE 类似物缀合化合物能够增强 ApoE 类似物的效力并延长治疗窗, 即介于脑损伤和有效施用包括 COG133 在内的 ApoE 类似物之间的时间长度。初步的数据表明 COG133 最长在 TBI 之后 30 分钟时施用具有神经保护性, 而 PTD-COG133 缀合物最长在 TBI 之后 150 分钟时施用也同样有效。这代表治疗窗明显增大, 这样能够显著增加可从本发明的新的治疗性化合物中获益的患者的数量。此外, 增强包括 COG133 在内的 ApoE 类似物的 BBB 穿透性能够使得这些化合物可用于治疗、预防或改善众多基于炎症的神经退行性疾病, 而无论 BBB 是否受损。

[0085] 本发明的 PTD 缀合物还提供了额外的益处, 即由于特异性靶向脑, 因此可降低需要施用的药物 (COG133) 的量。这使得缀合化合物具有更好的治疗指数, 其指的是不出现死亡时的化合物的最大耐受剂量除以要产生所需保护作用所需要施用的化合物的最低有效剂量。指数越大, 化合物越安全, 因为在为了产生所需保护作用而需要施用的浓度时, 不良反应谱应该是降低的。可制备不同的 PTD, 以根据待治疗的疾病而优先靶向其他特异性组织和 / 或器官。

[0086] 在一个实施方式中, 本发明提供用于如下方法的化合物。在一个方面, 本发明提供的化合物是 ApoE 类似物。在一个方面, 本发明提供的化合物是 α 螺旋肽。在优选的实施方式中, 所述化合物是 COG133 的类似物和衍生物。COG133 是具有序列 LRVRLASHLRKLRKRL (SEQ ID NO. 1) 的肽。在更加优选的实施方式中, 本发明提供含有选自如下一组的序列的肽化合物:

[0087] LRVRLASH-(NMe)-L-RKLRKRL-NH₂ (SEQ ID NO. 2)

[0088] Ac-ASH-Aib-RKLRKRL-NH₂ (SEQ ID NO. 3)

[0089] Ac-AS-Aib-LRKLRKRL-NH₂ (SEQ ID NO. 4)

[0090] Ac-DS-Aib-LRKLRKRL-NH₂ (SEQ ID NO. 5)

[0091] Ac-ASHLRKL-Aib-KRL-NH₂ (SEQ ID NO. 6)

[0092] Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-KRL-NH₂ (SEQ ID NO. 7)

[0093] Ac-DR-Aib-ASHLRKLKR-Aib-L-NH₂ (SEQ ID NO. 8)

[0094]	Ac-DS-Aib-LRKLRKR-Aib-L-NH ₂	(SEQ ID NO. 9)
[0095]	Ac-DR-Aib-ASHLRKL-Aib-KRLL-NH ₂	(SEQ ID NO. 10)
[0096]	Ac-DS-Aib-LRKL-Aib-KRLL-NH ₂	(SEQ ID NO. 11)
[0097]	Ac-DR-Aib-AS-Aib-LRKLRKRL-NH ₂	(SEQ ID NO. 12)
[0098]	Ac-DR-Aib-ASHLRKLKRL-NH ₂	(SEQ ID NO. 13)
[0099]	Ac-CAS-Aib-LRKL-Aib-KRLL-NH ₂	(SEQ ID NO. 14)
[0100]	Ac-DS-Aib-LRKL-Aib-KRLL-NH ₂	(SEQ ID NO. 15)
[0101]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-KRLV-NH ₂	(SEQ ID NO. 16)
[0102]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-KRLM-NH ₂	(SEQ ID NO. 17)
[0103]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-KRLI-NH ₂	(SEQ ID NO. 18)
[0104]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-KRLA-NH ₂	(SEQ ID NO. 19)
[0105]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-KALL-NH ₂	(SEQ ID NO. 20)
[0106]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-K(orn)LL-NH ₂	(SEQ ID NO. 21)
[0107]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-K(narg)LL-NH ₂	(SEQ ID NO. 22)
[0108]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-K(harg)LL-NH ₂	(SEQ ID NO. 23)
[0109]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-K(dmarg)LL-NH ₂	(SEQ ID NO. 24)
[0110]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-ARLL-NH ₂	(SEQ ID NO. 25)
[0111]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-(aclys)RLL-NH ₂	(SEQ ID NO. 26)
[0112]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-(azlys)RLL-NH ₂	(SEQ ID NO. 27)
[0113]	Ac-ASH-Aib-RKL-Aib-KRLL-NH ₂	(SEQ ID NO. 28)
[0114]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-KRL-(NLe)-NH ₂	(SEQ ID NO. 29)
[0115]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-KR-(NLe)-L-NH ₂	(SEQ ID NO. 30)
[0116]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-KR-(NLe)-(NLe)-NH ₂	(SEQ ID NO. 31)
[0117]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-K(orn)L-(NLe)-NH ₂	(SEQ ID NO. 32)
[0118]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-K(orn)-(NLe)-L-NH ₂	(SEQ ID NO. 33)
[0119]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-K(orn)-(NLe)-(NLe)-NH ₂	(SEQ ID NO. 34)
[0120]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-K(harg)L-(NLe)-NH ₂	(SEQ ID NO. 35)
[0121]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-K(harg)-(NLe)-L-NH ₂	(SEQ ID NO. 36)
[0122]	Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-K(harg)-(NLe)-(NLe)-NH ₂	(SEQ ID NO. 37)
[0123]	Ac-AS-Aib-L(orn)KL-Aib-KRLL-NH ₂	(SEQ ID NO. 38)
[0124]	Ac-AS-Aib-L(orn)KL-Aib-K(orn)LL-NH ₂	(SEQ ID NO. 39)
[0125]	Ac-AS-Aib-L(orn)KL-Aib-KRL-(NLe)-NH ₂	(SEQ ID NO. 40)
[0126]	Ac-AS-Aib-L(orn)KL-Aib-KRL-(NLe)-(NLe)-NH ₂	(SEQ ID NO. 41)
[0127]	Ac-AS-Aib-L(orn)KL-Aib-K(orn)L-(NLe)-NH ₂	(SEQ ID NO. 42)
[0128]	Ac-AS-Aib-L(orn)KL-Aib-K(orn)-(NLe)-(NLe)-NH ₂	(SEQ ID NO. 43)
[0129]	Ac-ASHLRKLKRL-NH ₂ (apoe138-149)	(SEQ ID NO. 44)
[0130]	Ac-ASHCRKLCKRL-NH ₂	(SEQ ID NO. 45)
[0131]	Ac-ASCLRKLCKRL-NH ₂	(SEQ ID NO. 46)
[0132]	Ac-CSHLRKLCKRL-NH ₂	(SEQ ID NO. 47)

[0133] Ac-ASHLRKCRKRCL-NH₂ (SEQ ID NO. 48)

[0134] Ac-ASHCRKLRKRCL-NH₂ (SEQ ID NO. 49),

[0135] 其中 (NMe)-L 是 N-甲基化的亮氨酸, Aib 氨基异丁酸, (orn) 是鸟氨酸, (narg) 是硝基精氨酸, (NLe) 是 Neurleucine, (harg) 是高精氨酸, (dmarg) 是二甲基精氨酸, (aclys) 是乙酰赖氨酸, (azlys) 是 Azalysine 以及 Ac 是乙酰化的羧基端。氨基酸残基的单字母缩写是本领域普通技术人员所熟知的。

[0136] 本发明提供与 ApoE 类似物相缀合的蛋白转导结构域 (PTD)。PTD 的大小各异, 且缺乏序列同源性, 不过绝大多数都具有正电荷并且是两性分子。本发明的 PTD 是那些有助于穿透 CNS 或有助于细胞内转运的 PTD。在某些实施方式中, PTD 可以是抗微生物肽例如 Protegrin-1、Bactenecin-7、Buforin、和 Maginin; 一些富含精氨酸的 RNA 结合肽和 DNA 结合肽 (例如, HIV-1 转激活蛋白 (TAT) 和果蝇同源结构域转录因子 Antennapedia (a. k. a. 穿透蛋白); 嵌合型 PTD 例如运送子 (Transportan); 来自噬菌体展示文库的富含赖氨酸的肽和富含精氨酸的肽; 聚精氨酸; 以及最近, β -高赖氨酸寡聚体 (见 Fisher et al., 2001; Lindsay, 2002; Tung et al., 2003; Leifert et al., 2003; Bogoyevitch et al., 2002; Garcia-Echeverria 2003, 在此通过引用将它们的全部内容并入本申请)。在某些实施方式中, PTD 是许多在此所述的 PTD 的添加 (addition)、反转 (reverso-)、逆向反转 (retro-inverso)、和对映 (enantio-) 等形式。

[0137] 在优选的实施方式中, 本发明的 PTD 缀合物选自:

[0138] GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO. 50)

[0139] RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO. 51)

[0140] RRMKWKK (SEQ ID NO. 52)

[0141] RGGRLSYSRRRFSTSTGR (SEQ ID NO. 53)

[0142] RRLSYSRRRF (SEQ ID NO. 54)

[0143] RGGRLAYLRRRWAVLGR (SEQ ID NO. 55)

[0144] RRRRRRRR (SEQ ID NO. 56)。

[0145] 在某些实施方式中, PTD 缀合物是 RGGRLAYLRRRWAVLGR (SEQ ID NO. 55), 称为 SynB5; 或是 RRLSYSRRRF (SEQ ID NO. 54), 称为 SynB3。本发明的 PTD-ApoE 缀合化合物包括, 例如, SynB5-COG133、SynB3-COG133、或在此所述的任何 COG133 类似物的 SynB5 和 SynB3 缀合物。因此, PTD 转运最初被表征为受体依赖性和能量依赖性的、非内吞性的 (nonendocytic), 并缺乏细胞特异性。不过, 这些数据是通过对固定的细胞进行荧光显微镜检查或流式细胞术、通过细胞摄取分析而获得的。一些研究小组最近证实, 以这种方式收集的数据会受到细胞固定中人为现象的影响 (Futaki, 2002; Vivès et al., 2003; Suzuki, 2001; Richard et al., 2003; Lundberg et al., 2002; Thoren, et al., 2003, 在此通过引用将它们的全部内容并入本申请)。越来越清楚的是, 许多此类 PTD, 例如, 穿透蛋白 TAT、聚精氨酸, 是通过细胞内吞作用而摄取的 (Drin et al., 2003; Thoren et al., 2003, 在此通过引用将它们的全部内容并入本申请)。同样的方法也被用于分析 PTD 的构效相关性。因此, 这些研究结果的可靠性以及同样也是自固定细胞获得的细胞特异性研究结果受到了怀疑。例如, 最近证实活细胞对穿透蛋白的摄取是细胞内吞作用。此外, 置换以往被认为对于转胞吞作用至关重要的两个色氨酸残基并没有改变穿透蛋白的摄取 (Thoren et al., 2003,

在此通过引用将其全部内容并入本申请)。除了有关转运机制的问题,还有许多关于 PTD 所携带的运载物的生物学效应的报道,所述运载物包括肽、蛋白质、肽核酸、寡核苷酸、脂质体、和磁性纳米颗粒,证实了它们具有转运的能力 (Schwarze et al.,2000 ;Bogoyevitch et al.,2002 ;Tung et al.,2003 ;Vivès et al.,2003,在此通过引用将它们的全部内容并入本申请)。越来越清楚的是,我们关于 PTD 的知识需要被重新评价,且转运机制很可能在 PTD 之间是不同的,这可能是因为它们的初级结构也是不同的。

[0146] 比较研究发现 PTD 之间并不是可以互换的;它们在摄取速度、转运所需的浓度、毒性和细胞环境等方面有区别 (Thoren et al.,2003 ;Suzuki et al.,2002 ;Mai, et al.,2002,在此通过引用将它们的全部内容并入本申请)。使用活细胞的研究报道,依细胞环境的不同,PTD 可具有多种不同的转运模式 (Drin et al.,2003 ;Futaki,2002 ;Leifert et al.,2003,在此通过引用将它们的全部内容并入本申请)。最近的结果提示,PTD 呈现出细胞特异性,其根据是 PTD 优先与特定的细胞表面粘多糖发生相互作用 (Mai et al.,2002 ;Console et al.,2003 ;Koppelhus et al.,2002,在此通过引用将它们的全部内容并入本申请)。这一效应的证据在于研究发现右旋糖苷硫酸盐抑制 TAT 的摄取但不抑制穿透蛋白复合物的摄取,而肝素可以不同程度抑制 TAT 和穿透蛋白复合物的内化 (Console et al.,2003,在此通过引用将它们的全部内容并入本申请)。这些数据提示,通过优化导向特定细胞表面表达的粘多糖的 PTD,有可能实现选择性导向组织。显然,并不存在用于将运载物输送穿过“甲板”的最佳的 PTD。PTD、运载物、和靶组织都必须加以考虑。

[0147] 在一个方面,所述化合物是 ApoE 蛋白的类似物或肽模拟物。在另一个优选的实施方式中,肽是 AcASHLRKLAibKRLL (SEQ ID NO.6) (COG432)。在另一个优选的实施方式中,肽是 Ac-AS-Aib-LRKL-Aib-KRLL-NH₂ (SEQ ID NO.7) (COG1410)。尤其是 COG1410,其与 COG133 相比,治疗窗增加 4 倍,治疗指数增加 7.4 倍。在某些实施方式中,本发明提供模拟所述活性肽的功能的肽模拟物及其制备方法,详见下文。

[0148] 制备化合物

[0149] 可通过现有技术已知的标准技术产生本发明的肽。本领域普通技术人员能够容易地对在此所述的肽进行修饰以增强与这些肽有关的功能活性。例如,可化学合成本发明的方法所使用的肽或将其缀合于其他分子以增强例如溶解性、血清稳定性等参数,而同时保留功能活性。具体而言,本发明的肽可进行 N 末端乙酰化和 / 或 C 末端酰胺化,或缀合于、复合于或融合于增强血清稳定性的分子,其包括但不限于白蛋白、免疫球蛋白及其片段、转铁蛋白、脂蛋白、脂质体、 α -2- 巨球蛋白和 α -1- 糖蛋白、PEG 和右旋糖苷。此类分子详述于 US6,762,169,在此通过引用将其全部内容并入本申请。

[0150] 可使用将缀合物靶向特定细胞或组织的小分子。已知存在生物素 - 抗生物素蛋白复合物可增加此类修饰的肽摄取穿过内皮细胞。将肽连接于糖类部分,例如,通过所述肽上的丝氨酸残基连接于 β - 葡糖苷以形成 β -O 连接的葡糖苷,可增强通过葡萄糖转运蛋白的葡糖苷衍生物的转运 (Polt, R. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :7144-7118 (1994) ;Oh et al. Drug Transport and targeting, In Membrane Transporters as Drug Targets, Amidon, G. L. and Sadee, W. eds., pg59-88, Plenum Press, New York, 1999)。

[0151] 所述肽可连接用于检测和示踪的各种标记部分,例如放射性标记物和荧光标记物。荧光标记物包括但不限于,荧光素、曙红、AlexaFluor、俄勒冈绿 (Oregon Green)、罗

丹明绿、四甲基罗丹明、罗丹明红、德克萨斯红、香豆素 (coumarin) 和 NBD 荧光团、QSY7、Dabcyl 和 Dabsyl 发色团、BODIPY、Cy5, 等等。

[0152] 在另一方面, 可将其他天然存在的或合成的肽和蛋白质用作载体免疫原, 用于产生抗本发明的肽的抗体, 其中将所述抗体用作试剂, 用于检测免疫调节性肽, 或用于鉴定其他具有类似构象的肽。用于产生抗体的合适的载体包括, 除其他之外, 血蓝蛋白 (例如, 钥孔血蓝蛋白 (Keyhole Limpet hemocyanin) --KLH); 白蛋白 (例如, 牛血清白蛋白、卵清蛋白、人血清白蛋白, 等等); 免疫球蛋白; 甲状腺球蛋白 (例如, 牛甲状腺球蛋白); 毒素 (例如, 白喉类毒素、破伤风类毒素); 和多肽例如聚赖氨酸或聚甘氨酸-赖氨酸。尽管蛋白质是优选的载体, 不过也可使用其他载体, 优选高分子化合物, 包括糖类、多糖、脂多糖、核酸和类似的具有足够大小和免疫原性的化合物。此外, 得到的抗体可用于制备抗独特型抗体, 其可与本发明的肽竞争结合靶位点。这些抗独特型抗体可用于鉴定本发明的肽所结合的蛋白质。

[0153] 本发明的治疗性肽的另一种变化是在所述治疗性肽的 N 端或 C 端氨基酸连接 1 至 15 个氨基酸或类似物。也可通过在活性肽的 N 端或 C 端、或 N 端和 C 端同时添加 1 至 15 个额外的氨基酸而制备本发明的肽的类似物, 其中此类氨基酸的添加不会负面影响肽与本发明的肽所结合的受体位点相结合的能力。

[0154] 本发明的肽还包括在此所述的肽的保守性变体。在此, 保守性变体指的是氨基酸序列的变化不会负面影响肽的生物学功能。如果因取代、插入或缺失而改变后的序列妨碍或破坏了与肽有关的生物学功能, 则认为所述取代、插入或缺失对肽造成了负面影响。例如, 可以改变肽的总体的电荷、结构或疏水 / 亲水特性而不负面影响其生物学活性。因此, 可改变氨基酸序列, 例如使得肽更加疏水或亲水, 而不负面影响肽的生物学活性。

[0155] 通常, 肽的保守性取代变体、类似物和衍生物将与 SEQ ID NO: 1-56 所公开的序列具有至少大约 55%、至少大约 65%、至少大约 75%、至少大约 80%、至少大约 85%、至少大约 90%、至少大约 95%、或至少大约 96% 至 99% 的氨基酸序列相同性。至于此类序列的相同性或同源性, 其在此定义为, 经序列对齐并在必要时引入缺口以达到最大百分比同源性后, 候选序列中与已知肽相同的氨基酸残基的百分数, 且不将任何保守性取代视为序列相同性的部分。N 端、C 端或内部的延伸、缺失、或插入肽序列内不应被视为影响同源性。

[0156] 因此, 本发明的肽包括具有 SEQ ID NO. 1-56 中所示的氨基酸序列的分子; 其片段, 所述片段具有所述治疗性肽的至少大约 3、4、5、6、10、15、或更多个氨基酸残基的连续的序列; 此类肽的氨基酸序列变体, 其中在所公开的肽的 N 端或 C 端、或内部插入了氨基酸残基; 以及所公开的序列的氨基酸序列变体或它们的如上所定义的片段, 它们具有不同残基的取代。保护本发明的肽序列的肽化合物可具有 15、20、25、30、35、40、45、50 或更多个氨基酸。本发明所预期的变体还包括那些含有通过例如同源重组、定点诱变或 PCR 诱变产生的预先确定的突变, 以及其他动物的相应的肽, 所述其他动物包括但不限于兔、大鼠、猪、牛、绵羊、马和非人类灵长类动物, 以及其中所述肽经共价修饰的衍生物, 所述共价修饰例如通过以不同于天然存在的氨基酸的一个部分 (例如一种可检测部分如酶或放射性同位素) 进行取代、化学性、酶性或其他合适的修饰方式而实现。

[0157] 本发明的治疗性肽可以是游离形式的或盐的形式, 其中所述盐是药用可接受的。这些包括钠、钾、锂、铵、钙、镁、铁、锌、铜、锰, 等等。也可利用有机酸制备肽的各种有机酸

盐,所述有机酸包括但不限于,乙酸、丙酸、丙酮酸、苹果酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸(benzoic acid)、肉桂酸、水杨酸,等等。

[0158] 方法

[0159] 此前发现 COG133 肽显著抑制神经元细胞死亡和与 N- 甲基 -D- 天冬氨酸暴露有关的钙内流。美国专利申请 10/252, 120, 在此通过引用将其全部内容并入本申请。因此,本发明的肽为改进用于治疗与 NMDA 兴奋性毒性有关的疾病的治疗性组合物提供了基础。例如,NMDA 兴奋性毒性被认为与 HIV 痴呆和脑病有关 (Perez et al., 2001 ;Haughey et al., 2001 ;Doble, 1999)。

[0160] 除了阿尔茨海默氏症 (Bi et al., 2002 ;Bi and Sze, 2002) 和创伤性脑损伤 (Rao et al., 2001 ;Regner et al., 2001 ;Xu and Luo, 2001) 之外, NMDA 兴奋性毒性还被认为与以下疾病有关:山黧豆中毒 (neurolathyrism)、肌萎缩性侧索硬化 (ALS) (Doble, 1999 ;Nguimfack, 2002)、精神分裂症、Huntington 舞蹈病、帕金森病 (Nguimfack, 2002 ;Mytilineou et al., 1997 ;Klopman and Sedykh, 2002 ;Le and Lipton, 2001)、双向性精神障碍 (Farber et al. 2002)、人类和实验性自身免疫性脑炎 (EAE) 动物模型中的多发性硬化 (Paul and Bolton, 2002)、抑郁症、中风 (Le and Lipton, 2001)、癫痫和遗传性神经代谢性疾病 d-2- 羟基戊二酸尿症 (d-2-hydroxyglutaric aciduria) (Kolker et al., 2002)。NMDA 拮抗剂还在临床上用于麻醉 (Farber et al., 2002), 并已经发现其可抑制慢性疼痛 (McKenna and Melzack, 2001 ;Le and Lipton, 2001)、药物耐受 (Cady, 2001), 并在动物模型上抑制酒精依赖性 (Kotlinska, 2001)。

[0161] 因此,本发明包括将所述肽和肽模拟物用于治疗任何上述疾病或病症的方法和药物制品中的用途,并包括用于含有其他已知可用于治疗各种疾病的化合物的组合型治疗性组合物中的用途。例如,本发明的肽和其他化合物可与任何已知的 HIV 药物相组合,包括与 HIV 逆转录酶和蛋白酶抑制剂相组合,用于进一步抑制病毒复制和预防或治疗 HIV 痴呆的治疗方案中,或可单独施用或与辅助制剂中的其他 NMDA 拮抗剂组合施用。一位作者最近报道,即便对 CNS 进行抗逆转录病毒治疗对于改善表现为 AIDS 痴呆综合症症状的患者的功能和预后而言是必需的,但仍然有必要长期提供额外的神经保护作用,并阻断神经毒性的继发机制,因为有很大一部分毒性作用似乎是由在抗逆转录病毒治疗中仍然持续存在的一些间接机制所介导的 (Clifford, 2002)。

[0162] 在一个实施方式中,所述的肽可与抗动脉粥样硬化药物相组合,所述药物包括 HMG-CoA 还原酶抑制剂,也称为他汀类药物。用于本发明的方法的合适的他汀类药物包括,例如,洛伐他汀 (lovastatin) (**MEVACOR®**, Merck)、辛伐他汀 (**ZOCOR®**, Merck)、普伐他汀 (pravastatin) (**PRAVACHOL®**, Bristol Myers Squibb)、罗苏伐他汀 (rosuvastatin) (**CRESTOR®**, AstraZeneca)、氟伐他汀 (fluvastatin) (**LESCOL®**, Novartis) 和阿托伐他汀 (**LIPITOR®**, Warner-Lambert)。

[0163] Riluzole (**RILUTEK®**, Rhone-Poulenc) 是具有谷氨酸拮抗特性的物质,用于对肌萎缩性侧索硬化进行神经保护性治疗,且目前正在进行治疗 Huntington 舞蹈病和帕金森病的临床试验 (Schiefer et al., 2002 ;Doble, 1999)。Schiefer 等最近证实 riluzole 延长 Huntington 舞蹈病转基因小鼠模型的存活时间并改变其核包涵体的形成。因此,鉴于本发明的肽和化合物的 NMDA 拮抗作用,所述肽和化合物可用于药物制品中用于

治疗 ALS、Huntington 舞蹈病和帕金森病,无论是单独施用或是与其他谷氨酸拮抗剂例如 riluzole 组合施用。

[0164] 丙炔苯丙胺 (L-deprenyl) 是单胺氧化酶 (MAO)-B 抑制剂,其延缓帕金森病出现能力丧失并延缓帕金森病的体征和症状的进展,并预期其对谷氨酸受体活化后出现的事件具有保护性作用 (Mytilineou et al.,1997)。MAO-B 抑制剂、多巴胺受体拮抗剂例如左旋多巴和 NMDA 受体拮抗剂均显示出抗帕金森病作用,且多药组合显示出这些药物的抗帕金森病作用的协同增强 (Klopman and Sedykh,2002)。因此,鉴于本发明的肽和化合物的 NMDA 拮抗作用,所述肽和化合物可用于药物制品中用于治疗帕金森病,无论是单独施用或是与其他 NMDA 受体拮抗剂、MAO-B 抑制剂如丙炔苯丙胺和多巴胺受体拮抗剂如左旋多巴组合施用。

[0165] 作为谷氨酸兴奋性毒性的结果而产生的自由基可能参与精神分裂症的发病 (Nguimfack,2002)。因此,研究者已经在尝试使用那些用于其他神经系统疾病如 ALS、帕金森病和 Huntington 舞蹈病中的抗氧化物质来治疗精神分裂症。鉴于本发明的 NMDA 受体拮抗肽和化合物可用于抑制作为谷氨酸兴奋性毒性的结果的自由基产生,所述肽和化合物可用于药物制品中用于治疗精神分裂症,无论是单独施用或是与其他抗氧化物质组合施用。

[0166] 已经发现抑制 NMDA 受体功能不良的抗惊厥药、抗癫痫药在临床上可用于双向性精神障碍 (Farber et al.,2002)。此类药物包括苯妥英 (**DILANTIN®**, Pfizer)、卡马西平 (**TEGRETOL®**, Novartis)、丙戊酸 (**DEPAKOTE®**, Abbott)、拉莫三嗪 (**LAMICTAL®**, GlaxoSmithKline)、利鲁唑 (Riluzole) (**RILUTEK®**, Rhone-Poulenc)、河豚毒素、非氨酯 (felbamate) (**FELBATOL®**, Wallace)、加巴喷丁 (gabapentin) (**NEURONTIN®**, Pfizer) 和乙琥胺 (**ZARONTIN®**, Pfizer)。鉴于本发明的肽和化合物也抑制 NMDA 受体相关性神经毒性,因此本发明的肽和化合物可单独或与其他 NMDA 受体拮抗剂或 NMDA 受体功能不良的抑制剂相组合用于治疗双向性精神障碍或癫痫的药物和方法中。

[0167] 多发性硬化 (MS) 是免疫学介导的疾病,其证据为观察到该疾病对免疫治疗有反应以及存在实验性自身免疫性脑炎 (EAE) 这一动物模型。见例如, Mix et al.,2004, J.Neuroimmunol. 151(1-2) :158-70、Anderson, et al.,2004、Ann.Neurol. 55(5) :654-9 和 Ni et al.,2004, Mult.Scler. 10(2) :158-64。目前用于复发性或再发性 MS 的治疗,即干扰素 (IFN) β -1b、IFN β -1a、和 Glatiramer acetate (**COPAXONE®**, Teva),其作用机制针对的是 MS 的免疫病理生理学 (Dhib-Jalbut,2002)。例如,干扰素结合细胞表面特异性受体,启动信号途径级联并最终导致分泌抗病毒、抗增殖、和免疫调节性基因产物。Glatiramer acetate 是一种合成分子,其抑制髓磷脂碱蛋白反应性 T 细胞的活化并诱导具有抗炎作用的 T 细胞。现在正在评估一些最近投入市场的治疗方法,包括 IV 免疫球蛋白 (**GAMAGARD®**, Baxter)、甲氨蝶呤 (**RHEUMATREX®**, American Cyanamid)、和硫唑嘌呤 (**IMURAN®**, GlaxoSmithKline),与已经批准的治疗方法相组合用于治疗复发性-再发性多发性硬化的效果 (Calabresi,2002)。鉴于发现 NMDA 受体拮抗剂美金刚 (**NAMENDA®**, Merz) 可防止血脑屏障破坏并使之恢复且可在体内减轻与 EAE 的发病相关的症状 (Paul and Bolton,2002),因此,可单独使用本发明的肽和化合物或将其与其他 NMDA 受体拮抗剂相组合或与干扰素或 Glatiramer acetate 一起用于治疗人的 MS。

[0168] 利用人类持续疼痛的动物模型, McKenna 和 Melzack 最近发现以 NMDA 受体拮抗剂 AP5 治疗明显减轻疼痛行为 (McKenna and Melzack, 2001)。类似地 Von Bergen 等最近证实鞘内施用竞争性非 N- 甲基 -D- 天冬氨酸兴奋性氨基酸受体拮抗剂 LY293558 在 180 分钟内阻断大鼠的感觉和运动应答, 而第二天即可完全恢复。LY293558 的效应较 bupivacaine 更为显著而持久, 这使得该作者认为类似 LY293558 的那些阻断谷氨酸受体的药物也可作为局部麻醉剂用于脊髓麻醉 (Von Bergen et al., 2002)。因此, 可单独使用本发明的肽和化合物或将其与其他 NMDA 受体拮抗剂相组合或与其他麻醉化合物一起作为局部麻醉剂用于人和动物。

[0169] NMDA 受体也被认为在物质应用的病理生理学中发挥重要作用 (Kotlinska, 2001; Soyka et al., 2000)。例如, Kotlinska 发现, 在施用酒精之前给予 NMDA 受体拮抗剂美金刚阻断大鼠产生酒精依赖性。Jones 等证实, 以 NMDA 受体拮抗剂 LY235959 进行预处理减轻了大鼠幼仔吗啡戒断综合征的强度。经 LY235959 预处理的幼仔中, 例如头部活动、手爪运动、翻滚和行走等戒断行为减少, 且发声情况完全消除 (Jones et al., 2002)。根据最近的综述, 针对成瘾性的基本机制的策略所依赖的前提在于成瘾性是由中枢神经系统的适应性改变导致的, 且作为复发的主要原因的渴望依赖于多巴胺能机制并要求过高的总体兴奋性。因此, 药理学的方法使用的是通过电压控制的通道 (如尼莫地平) 和 NMDA 受体 (如美金刚) 抑制钙进入神经元而降低神经元适应性的药物, 以及那些刺激抑制性 GABA 能系统 (γ -乙基 -GABA、巴氯芬) 的药物。因此, 可单独将本发明的肽和化合物、或将其与其他 NMDA 受体拮抗剂如美金刚相组合、或与其他其他神经元适应性化合物如尼莫地平、 γ -乙基 -GABA 和巴氯芬一起, 用于预防和治疗人的酒精和药物成瘾的组合物和方法中。

[0170] Rao et al. 报道了美金刚在大鼠发生创伤性脑损伤后的神经保护作用 (Rao et al., 2001)。其他作者最近认为 NMDA 受体的过度活化可能是诱导继发性脑损害的最重要因素之一, 而 NMDA 受体拮抗剂例如 AP5 可保护脑免于在脑损伤之后发生水肿。因此, 可单独将本发明的肽和化合物或将其与其他 NMDA 受体拮抗剂相组合用于治疗人和动物的脑损伤以及相关的继发性脑损害的组合物和方法中。

[0171] 已经发现他汀类可有效治疗患有头部创伤和患者并可有效减轻与创伤和阿尔茨海默氏症有关的炎症。例如, McGirt et al., 2002, Stroke, Dec., 2002 报道, 在蛛网膜下腔出血 (SAH) 鼠模型中, 辛伐他汀治疗可减轻血管痉挛并改善功能性预后。进一步研究发现以阿托伐他汀进行预处理具有类似的保护性作用, 提示他汀类药物作为一类药物在有效改善 SAH 和闭合性头颅损伤预后方面的作用。因此, 本发明的肽和化合物可与一或多种他汀类药物相组合用于治疗人和动物的脑损伤以及相关的继发性脑损害的组合物和方法中, 所述他汀类药物包括辛伐他汀和 / 或阿托伐他汀。

[0172] 用于关节炎的新的疗法包括可与肿瘤坏死因子相结合的肽和蛋白质。依那西普 (Etanercept) (ENBREL®, Amgen) 是一种二聚体融合蛋白, 其由与人 IgG1 的 Fc 部分相连接的人 75kd 肿瘤坏死因子受体的细胞外配体结合部分组成。Adalimumab (HUMIRA®, Abbott) 是重组的人 IgG1 单克隆抗体。肿瘤坏死因子结合蛋白在减慢类风湿性关节炎和其他风湿性疾病的进展以及减轻其症状方面显示出出色的效果。因此, 本发明的肽和化合物可单独或与其他药物相组合用于治疗风湿性疾病, 包括, 例如, 类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、累及多关节的青少年类风湿性关节炎和牛皮癣关节炎。

[0173] 本发明的方法和化合物可用于预防、治疗或改善与急性 CNS 损伤有关的神经系统体征和症状。在此,急性 CNS 损伤包括但不限于中风(由血栓、栓塞或血管收缩导致)、闭合性头颅损伤、全脑缺血(例如,由任何原因的全身性低血压引起的缺血,包括心梗、心率失常、失血性休克、和冠状动脉旁路移植后脑损伤)、局部缺血和颅内出血。中枢神经系统的缺血性损伤可由整体或局灶缺血情况导致。整体缺血出现于整个脑部血流减少达一段时间的情况下,例如在心脏骤停的过程中。局灶缺血出现于脑的一部分缺乏正常血流的情况下,例如在脑血管发生血栓栓塞性阻塞、头部创伤、水肿和脑部肿瘤的过程中。脑缺血造成的许多 CNS 损害出现于缺血情况发生后的数小时或者甚至是数天之后,且继发于损伤组织所释放的细胞毒性产物。

[0174] 在某些实施方式中,本发明的方法在冠状动脉旁路移植(CABG)手术之前、过程中或者与之同时使用所述化合物。根据 Duke 大学发表于 New England Journal of Medicine, February, 2001 的一项研究,相当比例的冠状动脉搭桥手术后患者经历过可检测得到的智力损害,称为“泵脑”现象。根据该研究,手术后,42%的受试患者出现测试积分至少 20% 的下降。此外,认知能力的下降持续达 5 年。

[0175] 本发明的方法和化合物也用于预防、治疗或改善与慢性神经系统疾病相关的神经系统体征和症状,所述慢性神经系统疾病包括但不限于阿尔茨海默氏症(AD)和 HIV 相关性脑病。本发明人发现 ApoE 肽可用于抑制神经胶质细胞活化,这支持本发明的肽和化合物可用于治疗任何涉及小胶质细胞活化的神经系统疾病。例如,在 AD 中,小胶质细胞表达活化标志物,提示 AD 中至关重要的炎症事件涉及小胶质细胞。这些活化的小胶质细胞在淀粉样斑块附近聚集成群(Griffin et al., 1995)。小胶质细胞在癫痫中也发生活化(Sheng et al., 1994)。

[0176] 最近发现, NMDA 受体拮抗剂阻断了淀粉样 β 肽的摄取和致病作用(Bi et al., 2002)。其他研究指出,抗炎药可延缓 AD 的起病或进展(Breitner et al., 1995; Rogers et al., 1993)。因此,本发明的肽和化合物可单独使用或与其他 NMDA 受体拮抗剂或其他已知用于治疗 AD 的药物且特别是抗炎药相组合,用于治疗人类 AD 的组合物和方法中。

[0177] 本发明的方法和化合物还可用于预防、治疗或改善与累及包括 CNS 在内的神经系统的炎性疾病相关的神经系统体征和症状,所述炎性疾病包括但不限于多发性硬化、血管炎、急性播散性脑脊髓炎和 Guillain-Barre 综合征。就此而言,本发明的 ApoE 肽和其他化合物可单独应用或与其他已知的抗炎药或细胞因子相组合用于配制治疗 CNS 炎性疾病的药物组合物。

[0178] 本发明的方法和化合物可用于预防、抑制或降低作为急性或慢性 CNS 疾病的一部分而出现的 CNS 内神经胶质的活化。可在细胞或组织水平(例如,通过组织学或形态学)、或通过评估对象的神经系统状态而评估本发明的方法和化合物的效果。可通过多种方法评估神经胶质细胞活化的抑制或降低,这对本领域人员来说是显然的;此类方法之一是测量一些化合物的产生或出现,所述化合物已知可通过活化的神经胶质产生,并将此类测量值与对照情况中相同化合物的水平进行比较。或者,可通过比较治疗组和对照组对象中 CNS 疾病的体征和/或症状而评估本发明的方法和化合物在抑制、降低或预防小胶质细胞活化方面的效果,其中此类体征和/或症状与小胶质细胞活化相关联或继发于小胶质细胞活化。

[0179] 还发现 ApoE 受体结合肽能够在败血症的体内动物模型中防止 LPS 诱导的细胞因

子的产生。美国专利申请 10/252, 120, 在此通过引用将其全部内容并入本申请。因此, 本发明的肽和化合物可单独使用或与其他已知的抗炎性细胞因子和抗体相组合用于治疗败血症的组合物和方法中。

[0180] 在本文中, 术语“治疗”和“改善”并不一定意味着接受治疗的患者所患的 CNS 或败血症的根本疾病过程被逆转或停止。此类术语指的是, 与没有治疗的情况相比, 与被治疗的疾病相关的体征和 / 或症状得以减弱或减轻, 或进展的速度降低。对疾病体征或症状的改变的评估可以在对象的水平上进行 (例如, 评估对象的功能或状况)、或在组织或细胞水平上进行 (例如, 神经胶质细胞或巨噬细胞活化标志物的产生减少或降低)。当使用本发明的方法治疗慢性 CNS 疾病 (例如阿尔茨海默氏症) 时, 所述方法可减慢或延缓症状例如痴呆的出现, 但不一定影响或逆转根本的疾病过程。

[0181] 已知炎症过程介导了动脉粥样硬化过程的一个方面。见例如, Hansson(1994); Berliner et al. (1995); Watanabe et al. (1997)。已知 ApoE 是由血管壁局部的巨噬细胞分泌的 (不过, 体内由巨噬细胞分泌的量相对于由肝脏产生的 ApoE 的量是微不足道的)。在动脉粥样硬化的经典模型中, ApoE 的功能是自血流中清除胆固醇并将其输送至巨噬细胞或输送至肝脏。不过, 已经清楚地了解到由巨噬细胞在血管壁分泌的 ApoE 降低动脉粥样硬化斑块的形成, 而这与任何脂质代谢效应无关。例如, ApoE 缺陷型小鼠被认为是高胆固醇血症和动脉粥样硬化疾病的模型。给此类小鼠提供分泌 ApoE 的巨噬细胞显著降低了动脉粥样硬化斑块的形成。Linton et al. (1995)。反过来, 将野生型小鼠的巨噬细胞替换为 ApoE 缺陷型巨噬细胞则加速动脉粥样硬化改变, 即便该动物继续自肝脏产生 ApoE。Fazio et al. (1997)。

[0182] 在动脉粥样硬化过程中, 推测 ApoE 通过受体介导的事件下调血管壁附近的巨噬细胞活化。巨噬细胞活化被下调打断或干扰了与动脉粥样硬化斑块形成有关的级联事件, 由此减轻或减慢了动脉粥样硬化病灶的形成。已知与动脉粥样硬化有关的级联事件包括平滑肌细胞和内皮细胞增殖和形成泡沫细胞。有证据显示 ApoE 下调这些过程中的每一个。因此, ApoE 在体内影响动脉粥样硬化的出现和进展, 而这与其对脂质的影响无关。可通过测量动脉粥样硬化斑块的数量或大小、或血管被动脉粥样硬化病灶阻塞的百分数、或此类斑块生长的速度, 来评价动脉粥样硬化的进展情况。

[0183] 已经发现 ApoE 在巨噬细胞内转导钙介导的信号 (Ca^{2+} /三磷酸肌醇信号转导), 说明 ApoE 通过下调巨噬细胞的活化而改变巨噬细胞的功能, 且因此下调炎症。因此, 在此所述的与小胶质细胞和 CNS 疾病有关的肽、化合物、方法和药物制品可用于抑制巨噬细胞的活化以抑制、预防或减慢动脉粥样硬化的方法中。

[0184] 动脉粥样硬化指的是动脉内膜增厚和脂质在粥样硬化斑块聚集。可以采用在此所述的任何方式以及现有技术中已知的其他合适的方法施用本发明的化合物来治疗或预防动脉粥样硬化。如果使用本发明的化合物来预防、减缓或治疗动脉粥样硬化病变, 显然不需要将其配制为能够穿过血脑屏障。可以使用本发明的方法治疗的疾病包括冠状动脉粥样硬化; 供应中枢神经系统的动脉, 例如颈动脉; 外周循环或内脏循环的动脉; 和肾动脉疾病。施用方式, 例如胃肠外施用, 可以是部位特异性的或者进入全身血流。

[0185] 本发明的方法和化合物还可用于保护对象抵抗放射的损害效应。照射后脑部炎症增加这一情况提示本发明人, 抗炎治疗策略可保护脑组织免于发生照射后损害。据报道,

ApoE 缺陷型动物在注射 LPS 后出现增强的全身炎症应答和更高的死亡率,而施用外源性 ApoE 通过下调 / 抑制炎症级联而改善了死亡率 (Van Oosten et al., 1991)。因此,本发明涵盖施用 ApoE 且特别是 ApoE 模拟肽来保护对象抵抗放射的损害效应。

[0186] 具体而言,本发明涵盖保护有此需要的对象以抵抗至少一种放射效应的方法,包括给所述对象施用保护量的 ApoE 或至少一种 ApoE 模拟肽。优选的 ApoE 模拟肽包括在此所述的 COG133,即具有序列 LRVRLASHLRKLRKRL (SEQ ID NO. 1) 的肽,以及 COG133 的衍生物。

[0187] 可使用本发明的方法来解决的放射暴露的类型包括全身照射 (TBI),例如其中所述对象进行了移植过程或更具体而言进行了血液或骨髓移植;在治疗癌症的过程中对例如一或多种特定器官的放疗;和环境放射性暴露,即意外性的或者有意的,例如遭遇核设施或核废料、战争、恐怖主义活动和实验室或其他暴露于放射的工作。本发明的方法可以在放射暴露之前、之后或者与之同时进行。

[0188] 如果放射暴露是对癌症的放疗,此类癌症包括任何对放疗的癌症,包括但不限于脑部肿瘤、头颈部癌症、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、皮肤癌、直肠癌、宫颈癌和子宫癌、淋巴瘤、和肉瘤。放疗可以通过外部束状照射 (external beam irradiation) 或短距离放射治疗而进行。本发明的方法可以在放疗之前、之后或者与之同时进行。

[0189] 例如,一般来说,本发明的方法可以在放射暴露后数分钟至数小时内、或在放射暴露后约 1、2、3、4、5、6、7、10 天或约 2 至 3 周至一个月内进行。一般来说, ApoE 和肽应该在放射暴露后尽快施用以取得最佳的效果。如果进行本发明的方法的目的是预防或减轻放射暴露对将要被暴露于放射或者处于暴露于放射之危险的对象效应,则可在暴露之前大约 10、7、6、5、4、3、2 或 1 天、或者在即将暴露之前 (例如,暴露前数小时至数分钟之内) 施用本发明的化合物。然后,如前所述可在暴露之后继续施用。

[0190] 如前所述,本发明的方法保护有此需要的对象抵抗至少一种放射的效应,如果是在出现放射暴露的症状或效应之后施用,本发明的方法可用于治疗或减轻至少一种放射的效应。在本文中,术语“保护”、“治疗”和“减轻”并不一定意味着伴随放射暴露的疾病过程或由其引起的疾病过程的逆转或停止。此类术语指的是,与没有治疗时可能出现的情况相比,与被治疗的放射暴露相关的损害体征和 / 或症状得以减弱或减轻,或进展的速度降低。对疾病体征或症状的改变的评估可以在对象的水平上进行 (例如,评估对象的功能或状况)、或在组织或细胞水平上进行 (例如,神经胶质细胞或巨噬细胞活化标志物的产生减少或降低)。当使用本发明的方法治疗放射暴露时,本发明的方法可减慢或延缓放射毒性症状的出现,但不一定影响或逆转根本的疾病过程。

[0191] 根据本发明,放射暴露或 TBI 或放疗的效应包括但不限于放射诱导产生至少一种细胞因子。细胞因子包括,除其他之外,选自肿瘤坏死因子 α (TNF α)、转化生长因子 β (TGF- β)、,白细胞介素 -1 α (IL1 α)、白细胞介素 -1 β (IL1 β)、白细胞介素 -6 (IL6) 和白细胞介素 -12 (IL12) 的细胞因子。也包括白细胞活化的酶标记物的改变 (例如,髓过氧化物酶、COX-2 表达、iNOS 表达,等等) 和细胞凋亡 (例如, DNA 片段化、caspase 激活,等等)。放射诱导的效应还包括但不限于行为效应、包括急性和迟发型口腔干燥在内的口腔干燥、放射诱导的神经毒性、晚期迟发性放射诱导性脑坏死、放射诱导的软组织或血管损伤 (包括,除其他之外,选自皮肤萎缩、放射性膀胱炎 (膀胱的炎症)、直肠炎 (直肠和肛门的炎症) 和

喉部损伤的损伤)、白细胞减少、紫癜、出血、脱发、腹泻、发热、电解质紊乱、抽搐、运动失调、震颤和嗜睡 (lethargy)。放射诱导的皮肤损伤统称放射性皮肤综合征,可包括急性皮肤反应(包括肿胀、脱皮、溃疡)和晚期的皮肤纤维化(瘰管形成)。

[0192] 本发明还提供治疗炎症性肠病 (IBD); 节段性肠炎或溃疡性结肠炎的方法, 包括给有此需要的对象施用 ApoE 蛋白或一或多种 ApoE 模拟肽, 施用的量可使得 IBD、节段性肠炎或溃疡性结肠炎的症状与不存在所述蛋白质时可能出现的情况相比是减轻的。在实施本发明的方法时, 所述治疗性肽和 / 或其衍生物可单独使用或与其他活性成分组合使用。如果需要, 可使用通常用于治疗炎症性肠病的一或多种药物作为所述治疗性肽的替代品或者与所述治疗性肽一起用于本发明的方法和组合物。此类药物包括生物制剂 (例如, Inflixamab、Adelimumab、和 CDP-870)、小分子免疫调变剂 (例如, VX702、SCI0469、Doramapimod、R030201195、SCI0323、DPC333、Pranalcasan、霉酚酸酯 (mycophenolate)、和 Merimepodib)、非甾体类免疫亲和素依赖性 (non-steroidal immunophilin-dependent) 免疫抑制剂 (例如, 环孢霉素、他克莫司 (Tacrolimus)、吡美莫司 (pimecrolimus)、和 ISAtx247)、5-氨基水杨酸 (例如, 美沙拉明 (mesalamine)、柳氮磺胺吡啶、巴柳氮二钠 (balsalazidedisodium) 和奥沙拉嗪钠 (olsalazine sodium))、DMARD (例如, 甲氨蝶呤和硫唑嘌呤) 和阿洛司琼 (alosetron)。因此, 在一个实施方式中, 本发明提供包含 SEQ ID NO:1-56 中的肽化合物与任何上述药物的组合以及使用它们治疗炎症性肠病的方法。

[0193] 可从本发明的方法中获益的合适的对象包括雄性和雌性对象, 包括人、非人灵长类动物、和非灵长类哺乳动物。对象还包括兽医学 (宠物) 对象, 以及牲畜和外来物种。

[0194] 组合物

[0195] 本发明的化合物和治疗性肽可以是游离形式的或盐的形式, 其中所述盐是药用可接受的。

[0196] 在本文中, 术语“施用于对象的脑部”指的是所采用的施用途径, 如本领域人员所熟知的, 将化合物提供给被治疗对象的中枢神经系统组织, 且特别是脑。

[0197] 优选地, 本发明的化合物与药用可接受的载体组合使用。本发明因此还提供适合施用于对象药物组合物。此类组合物包含有效量的本发明的化合物连同药用可接受的载体。载体可以是液体, 这样的话所述组合物适于胃肠外施用, 或者可以是固体, 即配制为用于口服施用的片剂药丸或。此外, 载体可以是可气雾化的液体或固体形式, 这样的话所述组合物适于吸入。如果是胃肠外施用, 组合物应该是无致热原的且存在于可接受的胃肠外载体中。或者, 可采用已知的方法将活性化合物包囊化于脂质体中。此外, 现有技术中还知道通过鼻内施用肽来治疗 CNS 疾病 (见例如, 美国专利 No. 5, 567, 682, 在此通过引用 Pert 将其并入本申请, 其涉及鼻内施用肽 T 来治疗 AD)。可采用现有技术中已知的技术制备用于鼻内施用的本发明的化合物。

[0198] 免疫调节性肽可单独使用或与其他治疗剂组合使用, 所述治疗剂例如是, 氧自由基清除剂例如超氧化物歧化酶, 或抗炎剂例如皮质激素类, 氢化可的松、强的松等等; 抗腹泻剂例如洛哌丁胺 (loperamide) 等等, 抗菌药例如青霉素、头孢菌素、枯草杆菌素等等; 抗寄生虫剂例如奎那克林 (quinacrine)、氯喹等等; 抗真菌剂例如制霉菌素、庆大霉素等等; 抗病毒剂例如阿昔洛韦、更昔洛韦、利巴韦林、干扰素等等; 止痛剂例如水杨酸、醋氨酚、布洛芬、氟比洛芬、吗啡等等; 局麻药例如利多卡因、布比卡因、苯坐卡因等等; 生

长因子例如集落刺激因子、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子等等；抗组胺剂例如苯海拉明、Chlorpheniramine 等等；抗呕吐药、营养添加剂例如甲酰四氢叶酸 (leukovorin)，及其他类似药物。用于对经历放射暴露的对象进行治疗的营养增补剂可参见美国专利申请 20030105027，在此通过引用将其全部内容并入本申请。

[0199] 本发明还可与抗炎性细胞因子、生长因子、或白细胞迁移抑制化合物组合使用。有用的细胞因子包括但不限于，IL-4、IL-10、IL-11、和 IL-13，特别是 IL-4 和 IL-10，已知它们可抑制炎症细胞因子的产生并参与重建免疫系统。生长因子包括 GM-CSF 等等。细胞因子和生长因子可以天然来源或重组来源的纯化蛋白质的形式施用，或者以表达此类多肽特别是其融合蛋白形式的核酸的形式而施用。

[0200] 本发明的化合物的药物制剂可任选地包括药用可接受的稀释剂或赋形剂。

[0201] 本发明的化合物的有效量是指，与不存在所述化合物时可能出现的情况相比，所述的量降低了小胶质细胞的活化；换言之，与不存在所述化合物时可能出现的情况相比，所述的量使得小胶质细胞产生的神经毒性和神经调节性化合物减少。神经调节性指的是神经元功能的非致死性改变。有效量（及施用的方式）应基于个体的情况而确定，且应该基于所使用的具体的治疗性分子并考虑对象的情况（体积、年龄、一般健康情况）、所治疗的疾病（AD、急性头颅损伤、脑的炎症，等等）、待治疗的症状的严重程度、所期望的结果、具体使用的载体或药物制品、施用途径以及其他因素，这些对本领域普通技术人员而言是显而易见的。本领域普通技术人员利用本领域已知的方法能够确定所述有效量。在此所述的本发明的化合物的治疗有效量可通过体外测试、动物模型或其他量-效研究而确定，这是现有技术中已知的。

[0202] 本发明的化合物可紧急施用（即在导致脑部炎症或缺血的事件出现的过程中或其后短时间内）、或可以预防性施用（例如，在安排好的手术之前或在出现神经系统体征或症状之前）、或在退行性疾病的病程中施用，以减轻或者改善如其不然则可能出现的症状的进展。施用的时间和间隔根据对象的症状不同而变化，且可以数小时至数天为间隔、在数小时、数天或者更长的时程至施用，这是本领域人员能够确定的。

[0203] 典型的每日方案可以是起始剂量为大约 $0.01 \mu\text{g/kg}$ 体重/天，大约 1mg/kg 体重/天，大约 10mg/kg 体重/天，大约 100mg/kg 体重/天，大约 $1,000\text{mg/kg}$ 体重/天。优选的剂量为大约 $0.01 \mu\text{g/kg}$ /天至大约 10mg/kg 体重/天，这取决于所使用的化合物，且更加优选的是大约 1mg/kg /天至大约 10mg/kg 体重/天。

[0204] 血脑屏障是物质从血流中被动扩散进入 CNS 不同区域的屏障。不过，已知某些物质可通过主动运输穿过血脑屏障从一侧到达另一侧。对于那些难以从血液达到脑内的物质，可将其直接注射至脑脊液中。已知脑缺血和炎症同样可以改变血脑屏障并导致更多的物质自血流到达脑。

[0205] 将化合物直接施用至脑部的做法是本领域已知的。鞘内注射可将药物直接施用于脑室和脑脊液内。已经有外科植入式输液泵可持续将药物施用于脑脊液内。通过腰穿将药用化合物注射至脑脊液内（脊椎注射）的做法是已知的，且适用于施用本发明的化合物。使用本发明所提到的 PTD 结构域或者其他本领域已知的肽或非肽部分也可促进转运通过血脑屏障。

[0206] 本领域还已知通过基于药理学的方法来克服血脑屏障，包括将亲水化合物转换为

脂溶性药物。可将活性药物包裹化于直至载体或者脂质体中。

[0207] 本领域已知可通过动脉内输注高渗性物质以瞬间打开血脑屏障并使得亲水性药物得以通过进入脑部。Kozarich et al. 的美国专利 5,686,416 公开了将受体介导的通透剂 (RMP) 肽与待输送的化合物共同施用至脑的间质液体腔室 (interstitial fluid compartment of the brain), 以提高血脑屏障的通透性并将增加输送至脑部的化合物。

[0208] 转运活性药物通过血脑屏障的一种方法是将活性药物偶联或缀合于一第二分子 (一种“载体”), 其是筛选出来的能够穿透血脑屏障并将活性药物转运通过血脑屏障的肽或非蛋白质部分。合适的载体的实例包括吡啶盐、脂肪酸、肌醇、胆固醇、和葡萄糖衍生物并加上维生素 C。载体可以通过特定转运系统进入脑内皮细胞的化合物。适合于通过受体介导的转胞吞作用穿过血脑屏障将神经药剂输送至脑内的嵌合型肽见 Pardridge et al 的美国专利 No. 4,902,505。这些嵌合型肽包含缀合于能够通过转胞吞作用穿过血脑屏障的可转运型肽的药剂。Pardridge et al. 公开了具体的可转运型肽, 包括组蛋白、胰岛素、转铁蛋白等等。用于穿透血脑屏障的化合物与载体分子的缀合物公开于 Poduslo et al 的美国专利 No. 5,604,198。所公开的具体的载体分子包括血红蛋白、溶菌酶、细胞色素 C、血浆铜蓝蛋白、钙调素、遍在蛋白和 P 物质。也可参见 Bodor 的美国专利 No. 5,017,566。

[0209] 另一种施用本发明的肽的方法是给对象施用一种载体, 其携带编码所述肽的核酸序列, 其中所述载体能够进入脑细胞, 以便肽能够表达并分泌, 从而达到小胶质细胞。合适的载体典型地是病毒载体, 包括 DNA 病毒、RNA 病毒和逆转录病毒。本领域已知利用载体输送系统和进行基因治疗的技术。疱疹病毒载体是一种具体的载体类型, 可用于施用本发明的化合物。

[0210] 以下实施例仅用于举例说明本发明, 而不应被视为是对本发明的限制。

[0211] 7. 实施例

[0212] 实施例 1: 设计并表征改进的肽类似物

[0213] 逆向反转肽 (Retro Inverso Peptide)

[0214] 制备包含具有以 D-氨基酸取代 L-氨基酸的取代的肽类似物来研究 ApoE130-150 活性的立体特异性。申请人将全 L-氨基酸肽与全 D-氨基酸肽进行了比较, 以测试 ApoE130-150 的逆向反转类似物是否具有活性。逆向反转类似物是相反的序列 (即 ApoE150-130), 其仅由 D-氨基酸构成 (全 D ApoE150-130)。不同于 Pescarolo et al. (2001) 的报道, 本申请人发现逆向反转肽在高于 0.01 微摩尔的任何浓度均具有令人难以置信的毒性。因此, 所观察到的 BV-2 小胶质细胞的一氧化氮产生显著降低的现象是一种人为的假象, 因为所测试的这些细胞已经因这种逆向反转肽而被杀死。此外, ApoE130-150 的全 D 氨基酸类似物不具有抑制脂多糖 (LPS) 处理的 BV2 小胶质细胞释放一氧化氮 (NO) 的活性。这一化合物例如可以在需要杀光巨噬细胞以及其他或许可被逆向反转 ApoE133-149 杀死的细胞的情况下具有潜在的用途, 如可潜在用于免疫抑制治疗, 在治疗癌症的骨髓移植中作为前期药物。全 L 氨基酸 ApoE130-150 肽具有抑制经 LPS 处理的 BV2 细胞释放 NO 和 TNF α 的活性而 ApoE130-150 的全 D-氨基酸类似物缺乏这一活性, 这一点是与全 L 氨基酸肽能够立体特异性结合适当的细胞受体相一致的。基于这些结果, 需要继续追踪逆向反转方法以便将来将其扩展至免疫抑制领域的研究中。

[0215] 定点取代

[0216] 申请人于是系统性地以丙氨酸取代 ApoE133-149(COG133) 中的各个氨基酸,任何测定各个 ApoE 肽类似物的活性。用于这些置换的简要命名法是本领域人员已知的,例如, L149A 是指 ApoE133-149 肽 (133-LRVRLASHLRKLRKRL-149) (SEQ ID NO. 1) 中第 149 位的亮氨酸 (L) 被丙氨酸 (A) 取代,产生 L149A 类似物 (133-LRVRLASHLRKLRKRLA-149) (SEQ ID NO. 14)。

[0217] 如表 1 所示,丙氨酸扫描式取代发现,当丙氨酸出现在第 139、143、144、146、147 和 149 位时,结合和 / 或抑制炎症活性方面的能力降低。与在 L144A 中所见的降低相似,L144M 置换发现,与 ApoE133-149 受体结合和抑制炎症活性相比,L144M 的能力降低。这个发现很有趣,因为亮氨酸是具有短分支碳侧链的疏水残基,而甲硫氨酸也是疏水残基,不过具有略微长些的、具有硫原子的侧链。这提示一种可能性,即侧链的大小很重要,因为活性的降低可归因于更大的侧链,而其原因要么是由于更长的侧链,要么是由于硫原子相对于碳原子具有更大的体积,或两者兼有。

[0218] 还在 R142E 置换中发现活性降低, R142E 中碱性精氨酸被酸性谷氨酸残基取代,这提示电荷在该位置的重要性。在 L148N 置换中也观察到活性降低, L148N 中疏水亮氨酸被天冬酰胺取代,后者侧链具有相似的碳主链结构,不过在该相似的碳主链的末端有氧和氨基,这提示大小和 / 或反应性在该位置具有重要作用。所测试的其余的置换相对于 ApoE130-150 本体肽或 COG133 (ApoE133-149 肽) 而言均没有显示出任何明显的活性改变。

[0219] 表 1:来自单个氨基酸置换的 COG133 肽的构效,其中上标 (˘) 表明肽的活性降低 (EC50 高于 3.5 微摩尔)。

[0220]

序列	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149
COG133 SEQ ID NO. 1	L	R	V	R	L	A	S	H	L	R	K	L	R	K	R	L	L
活性降低˘							A˘				A˘	A˘		A˘	A˘		A˘
										E˘		M˘				N˘	
中性								A	A	A			A			A	
													E	E	E		M N

[0221] 基于被提议的 299 个氨基酸的完整 ApoE 蛋白 (holo-ApoE) 的结晶结构,其中的第 130-150 位的区域形成 α 螺旋,其含有与 ApoE 蛋白配体的受体相结合所必需的区域。根据本申请人已经发表的结果,通过圆二色谱 (circular dichroism spectra) 测定到的溶液中的 ApoE130-150 肽呈现出 α 螺旋构象 (Laskowitz et al. 2001)。典型的 α 螺旋每一 360 度的完整一圈含有 3.6 个氨基酸残基,或者说每完整的 10 圈是 36 个残基。基于这些信息以及该肽的螺旋轮图像,我们的研究似乎说明这种螺旋结构的一个侧边 / 面与肽的活性相关 (图 1,螺旋轮)。这一信息十分重要,因为这为那些对于 ApoE130-150 的活性具有重要意义的残基提供了最初的图谱。

[0222] 为了获得表 1 的结果,对每一种肽类似物进行了多种研究。在抑制炎症方面,测试了每一种肽类似物在 0.1、0.5、1、3、5、10 和 25 μ M 的终浓度对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞

释放 NO 和 / 或 TNF α 的影响。特定残基位置上发生的活性降低以上标 $\bar{}$ 符号示出,其代表 EC50 的浓度高于 3.5 μ M 这一 COG133 的 EC50 (其定义为在至少 2 个不同的测试日观察到 NO 或 TNF α 的释放降低了 50% 时的浓度)。对受体结合的研究使用的是经改进的已发表的方法 (Misra et al. 2001), 且该已发表的方法实际上得到了相同的结果。改进在于在 ApoE 肽上使用生物素标记 (生物素-LRVRLASHLRKLRKRL-酰胺), 可通过 125 I-链霉抗生物素蛋白 (ISA, Amersham) 对其进行检测。此外, 申请人使用 6 孔板 (Nunc) 中每孔 250,000 个细胞在 4°C 进行结合, 这有助于提供一致性更高的且数量更大的肽特异性结合的计数。作为这一方法的实例, 申请人测定到未标记的 ApoE133-149 对生物素酰化的 ApoE133-149 的结合达到 50% 抑制时的浓度为 4 μ M (IC50 = 4 μ M), 该数值与 3.5 μ M 的 ApoE133-149 抑制炎症活性的 EC50 具有很好的一致性。一般来说, 不同的肽类似物的 EC50 数值和 IC50 数值在结合分析法与生物学活性分析法之间是一致的。

[0223] 截短的衍生物

[0224] 为了使得 ApoE130-150 最小化而同时保留其最大活性, 将肽自氨基末端和自羧基末端逐渐地截短。从羧基末端开始, ApoE130-149 保持了 ApoE130-150 本体肽的活性。相反, ApoE130-148 和 ApoE130-147 在 25 μ M 均未显示活性。从氨基末端开始, ApoE133-149 保持了 ApoE130-150 本体肽的活性。ApoE139-149 即便在 25 μ M 仍未能显示活性。在剩下的干扰肽中, ApoE134-149 最具活性, 但比 ApoE130-150 的功效低 2.5 倍。ApoE135-149 和 ApoE136-149 的功效比 ApoE130-150 低 5 倍和 8 倍, 而 ApoE137-149 和 ApoE138-149 即便在 25 μ M 仍未能显示活性。根据这些活性测定, ApoE133-149 (COG133) 是保留了 ApoE130-150 本体肽全部活性的最短的 ApoE 肽。申请人基于 ApoE133-149 (COG133) 开发了新的肽类似物, 以进一步推敲那些对 ApoE 肽的药理学活性至关重要的残基的构效关系。

[0225] 表征构效关系

[0226] 肽模拟物领域包括将选定的肽化合物转化为具有药物样药用特性的小分子 (Olson et al. 1993, 1995; Smith et al. 1997, 1998, 2000; Hirschmann et al. 1996, Liu et al. 2000)。肽模拟物涵盖多种技术, 包括肽类似物 (主链中具有非天然氨基酸)、肽替代物 (将肽的酰胺键取代为烯烃或其他等排体)、以及小分子模拟物, 其中以合理的方式以使用非肽模板设计的小分子对肽进行取代。在模拟物中加入新的特征, 这些特征能够将模拟物的用途扩展至许多潜在的受体靶, 并通过产生一些不可能通过自然过程或遗传工程方法而产生的新的构件 (building blocks)、结构模板和组装方式, 极大地增加其多样性。将这些肽模拟物加入到独特、专有的支架中, 使得高效的生物学活性与增强的生物利用度相结合, 并产生新的、专利意义上的新的化学实体。例如参见图 2-5。基于 Pyrrolinone 类化合物 (Provid Pharmaceuticals, Piscataway, NJ) 设计出了适合用于酶抑制的模板。其他系统基于碳水化合物作为肽的非肽模拟物的专用模板, 这一领域已经产生了蛋白质-蛋白质相互作用的抑制剂以及 G 蛋白偶联受体的抑制剂。非肽模拟物例如 HIV-蛋白酶抑制剂和基于 RGD 的整合蛋白受体阻断剂是这一技术在临床上和商业上的成功范例。一些实例包括沙奎那维 (saquinavir) (**INVIRASE®**, Roche)、茚地那韦 (indinavir) (**CRIXIVAN®**, Merck)、利托那韦 (ritonavir) (**NORVIR®**, Abbott)、奈非那韦 (nelfinavir) (**VIRACEPT®**, Agouron/Pfizer)、安普那韦 (amprenavir) (**AGENERASE®**, Vertex/Glaxo), 这些均为在医学中用于将 HIV/AIDS 转化为一种可治疗的慢性疾病的已经商品化

的成功的药物（整体的销售量超过 10 亿美元）。

[0227] 举例而言,Provid 的非肽模拟物化学研究已经鉴定出了一些用于在临床上改善自身免疫病的领先的化合物,其基于对与该疾病有关的 MHC II 类分子特别是 HLA-DR2 分子的抗原呈递作用的抑制。当 Provid 的高级研究人员合并入 Hoffmann-LaRoche 后,他们对 HLA-DR1 和 HLA-DR4 抑制剂的有关研究已经发表 (Bolin et al.2000)。

[0228] 在设计阻断活化的内皮细胞上的血管细胞粘附分子 (VCAM-1) 与循环的淋巴细胞上的整联蛋白极晚期抗原 -4 (VLA-4) 受体相互作用的抑制剂中,阐述了将肽转变为非肽化合物的一种方法。在该实例中,出发点是一种肽拮抗剂,其中采用如下所述的方法对其进行建模并转化为有效的非肽分子 (Fotouhi et al.2000, Chen et al.2002)。这一方法的例证是将环肽转化为小分子,但这种方法学适用于有机化合物以及肽。

[0229] 螺旋模拟物是非肽模拟物极似乎应用的特定领域 (Olson et al.1993)。在螺旋肽参与了受体相互作用的情况下,肽主链酰胺基全部通过分子内氢键而结合,形成螺旋的结构支架 (Ernst et al.2002, Orner et al.2001)。在这种情况下,侧链官能团是显性药效团,而螺旋可以被看做一种可替代的模板。申请人对 COG133 的初步研究支持如下提议,即受体对螺旋结构的识别对生物学活性具有重要意义,且受体结合中的螺旋型双极结构对于生物学活性例如抑制炎症应答也具有重要意义。

[0230] 为进一步阐明 ApoE 类似物的构效关系的作用,申请人合成了如下新的 COG133 类似物:(a) 类似物,其添加了螺旋中断物 (helix breakers) 或 α 螺旋稳定物,以证实 α 螺旋特征是否必需,(b) 类似物,其在对活性至关重要的位点掺入新的氨基酸,以确定重要位点的相对大小和组成,和 (c) 类似物,其中氨基酸主链被有机模板所替代。

[0231] COG13317 体肽是采用单个氨基酸置换和截短研究所开发出的典型的活性序列;表 1 概括了其结果活性数据 (见上)。分析这些数据发现了影响生物学活性的关键残基 S139、R142、K143、L144、K146、R147 和 L149。在 ApoE 蛋白中,这一节段是一个四螺旋束的螺旋之一的一部分,这些残基在该螺旋的一个面上聚集或邻近,如果 COG133 是作为一种螺旋肽而发挥其所观察到的生物学作用,那么这些残基可能代表了一种类似的表位 (图 1)。已经通过圆二色谱测定了 20 个残基的 ApoE (130-149) 肽和两个截短的 17 体肽 [(130-146) 和 (133-149)],它们在性质上均与螺旋和无规卷曲结构的混合物相一致 (Laskowitz et al., 2001)。

[0232] 为了验证 ApoE133-149 肽必须采取螺旋构象才能具有生物学活性这一假设,申请人测试了一些掺入已知能够抑制折叠成螺旋结构的氨基酸残基例如 D-脯氨酸的类似物 (Balaram et al.,1994;Mitchell et al2003)。申请人合成了 COG133 的两个类似物,它们在位点 L141 和 R145 上含有螺旋中断性氨基酸残基 D-脯氨酸 (p)。25 μ M 的 COG133 的 L141p 和 R145p 类似物在抑制炎症细胞因子 (TNF α) 释放的测试中或在抑制自由基 (一氧化氮) 释放的测试中均没有显示出任何活性。因此,这支持申请人的假设,即 COG133 和 COG133 的活性类似物在其展示出生物学活性时 (例如在抑制炎症的测试中),可能采取螺旋构象。

[0233] 表 2:对含有螺旋中断物 D-脯氨酸的 COG133 肽的类似物的构效的初步数据

[0234]

133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	螺旋性	生物活性
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

L	R	V	R	L	A	S	H	L	R	K	L	R	K	R	L	L	是	是
L	R	V	R	L	A	S	H	D Pro	R	K	L	R	K	R	L	L	破坏	否
L	R	V	R	L	A	S	H	L	R	K		D pro	K	R	L	L	破坏	否
					A	S	Aib	L	R	K	L	Aib	K	R	L	L	增强	>5x COG133

[0235] 最初的肽类似物设计和合成同时探明了生物学活性所需的结构条件和药效团元件（侧链功能性）。将天然或者非天然氨基酸构件掺入 COG133 序列（采用标准的 FMOC 固相合成方法），既有单个置换也有多个置换，以便为该肽建立一种药效团模型。这将有助于更好地理解哪些官能团是生物学活性所必需的以及它们的空间表现 / 关系的性质。将研究带正电荷的侧链的重要性以及所述侧链的相对位置和构象灵活性。表 3 说明了可以合成的修饰物的范围，以及基于邻近基团间潜在的相互作用（这种相互作用要么增强结构特性要么使得结构特性变得不稳定）而选定的各种组合 (Karle, 2001 ; Vijayalakshmi et al., 2000 ; Karle et al, 1990)。

[0236] 表 3 : 用于建立药效团模型而合成的最初的类似物，其中疏水残基以下划线标出，带正电荷的氨基酸以符号 (+) 标出，带负电荷的氨基酸以符号 (-) 标出，极性 / 不带电荷的氨基酸以 (*) 标出，Orn 是鸟氨酸。

[0237]

主要是无规卷曲结构仅有少许螺旋成分是一致的),不过在存在受体的情况下它们可经诱导而折叠成此类结构单元。特别是鉴于以螺旋中断剂得到的新的初步数据(表2,见上),可以预期的是,通过预先组织(pre-organization)而稳定该肽的螺旋形式应该倾向促进受体结合且增强与受体结合的亲和力。与形成螺旋相关的分子内氢键作用也降低极性酰胺主链的暴露,并增强膜通透性和抗蛋白酶消化作用的稳定性。

[0239] 基于这些认识,申请人计划通过掺入螺旋稳定性氨基酸和螺旋去稳定性氨基酸来测试 COG133 的螺旋性(见表4)。已经发现一些残基,例如 D-脯氨酸(Balaram et al., 1994, Mitchell et al. 2003),是有效的螺旋去稳定剂。反之,发现 α 双取代甘氨酸,例如 Aib(二甲基甘氨酸等),可极大增强肽序列(即使短到仅有7个残基)的螺旋倾向(Karle, 2001, Vijayalakshmi et al., 2000, Karle et al., 1990)。其他增强螺旋性的方法包括氨基和羧基末端加帽(Doig et al., 2002, 1994, 1993),以及形成分子内的侧链与侧链的共价键,后者可限制肽的构象。可用于这种情况中的共价连接是二硫键、内酰胺键和衍生自烯烃易位化学作用(olefin metathesis chemistry)的碳-碳连键(Grubbs et al. 2001, Verdine et al. 2000)。

[0240] 表4:螺旋倾向性的变化

[0241]

133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	螺旋性
L	R	V	R	L	A	S	H	L	R	K	L	R	K	R	L	L	
L	R	V	R	L	A	S	H	Dpro	R	K	L	R	K	R	L	L	破坏
L	R	V	R	L	A	S	H	L	R	K	L	Dpro	K	R	L	L	破坏
L	R	V	R	L	A	S	H	NmeL	R	K	L	R	K	R	L	L	破坏
L	R	V	R	Aib	A	S	H	L	R	K	L	R	K	R	L	L	增强
	Ac	D	R	Aib	A	S	H	L	R	K	L	R	K	R	L	L	增强
				Ac	A	S	Aib	L	R	K	L	R	K	R	L	L	增强
				Ac	A	S	H	Aib	R	K	L	R	K	R	L	L	增强
				Ac	A	S	H	L	R	K	L	Aib	K	R	L	L	增强
				Ac	A	S	Aib	L	R	K	L	Aib	K	R	L	L	增强
				Ac	D	S	Aib	L	R	K	L	R	K	R	L	L	增强
				Ac	D	S	Aib	L	R	K	L	R	K	R	L	L	增强
				Ac	D	S	H	X	R	K	L	X	K	R	L	L	增强
				Ac	D	S	H	L	R	K	X	R	K	R	X	L	增强
				Ac	D	S	H	L	R	K	L	X	K	R	X	L	增强

[0242] 一旦获得保留了生物学活性所需分子功能性的正确空间排列的最小长度的序列,即可去除不需要的肽特征(酰胺NH/连键),而非肽支架或模板上存在的所需功能性固有地具有许多作为药剂的优越特性(例如稳定性,等等)。

[0243] 构效关系数据可用于指导合成新一代的类似物、选择合适的模拟物、以及选择合适的支架/模板以替代那些非活性所必需的肽节段。根据 GlaxoSmithKline 的研究小组报道了被确定为对生物利用度具有重要意义的分子特征,因此这些构件的特性将被选择为与所述分子特征相一致(Veber et al., 2002)。

[0244] 对于螺旋模拟物,已经报道成功模拟2至4圈 α 螺旋(约7至14个氨基酸残基)的非肽支架。这一类型的模拟物是低分子量的有机化合物,例如三联苯类,发现它们与参与涉及螺旋识别的蛋白质-蛋白质相互作用相竞争(Hamilton et al., 2003; 2002; 2001)。

[0245] 可将自 SAR 研究和/或药效团模型中所鉴定的特定侧链功能性呈递在模板/支架

上(如三联苯构架,见图2),以模拟所需的肽所具有的功能性(图3给出了作为螺旋模拟物的三环支架)。建模研究鉴定到了额外的分子构架,它们可用作支架以提供所需的功能性,还为两类三环支架:咔唑和吩噻嗪,开发了可变的合成途径。可合成三联苯、咔唑和吩噻嗪的一系列功能化的类似物,以便在支架的X、Y和Z位置掺入所需的功能性(如通过上述药效团建模而确定的)。然后可在基于细胞和基于动物的模型上评价这些化合物的生物学活性,例如,可在减轻炎症的细胞水平测定法、受体结合测定法、以及在TBI小鼠模型中对表现进行纵向行为测定中测试各种类似物的活性。

[0246] 体外炎症抑制测定

[0247] 对于炎症抑制测定,可采用已发表的、炎症抑制的细胞水平模型,其中使用以脂多糖(LPS)刺激的BV-2小鼠小胶质细胞系,实验在存在或不存在剂量逐步增加的COG133或COG133类似物的条件下进行(Laskowitz et al. 2001)。总体而言,将BV-2细胞置于96孔板中的完全培养基中,次日将培养基更换为无血清培养基或低血清(1%)培养基。加入LPS或加入LPS和不同浓度的阳性对照COG133以刺激细胞。还向分离的孔中加入LPS和不同浓度的COG133类似物。还向分离的孔中加入不同浓度的COG133类似物作为肽单独使用时的活性对照(不使用LPS)。将各个浓度的肽(标准起始浓度为0.1、0.5、1、3、10和25 μ M)加入到至少6个孔的细胞中(如6个孔内加入0.1 μ M的肽,6个孔内加入0.5 μ M的肽,等等),数据为所有6孔的平均值。孵育24小时后,使用ELISA和Griess测定法(Laskowitz et al. (2001))测定条件培养基中的TNF α 和亚硝酸根水平。以MTT法(Laskowitz et al. 2001)测定细胞活力。可将各个测试肽的EC50与COG133的EC50相比以评价生物学活性,使用t-检验和/或ANOVA, $p < 0.05$ 被认为具有显著性。

[0248] 受体结合测定

[0249] 可根据改进的已知方法测试受体结合(Misra et al. 2001)。申请人的改进在于在ApoE肽上使用生物素标记,合成了生物素-LRVRLASHLRKLRKRL-酰胺,其可通过¹²⁵I-链霉抗生物素蛋白(ISA, Amersham)进行检测。此外,申请人使用6孔板(Nunc)中每孔250,000个细胞在4℃进行结合,这有助于提供一致性更高的且数量更大的肽特异性结合的计数。¹²⁵I-链霉抗生物素蛋白可更换为链霉抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶缀合物、或更换为链霉抗生物素蛋白-碱性磷酸酶缀合物,使用CDPStar(Roche Applied Science)作为检测试剂。

[0250] 毒性测定

[0251] 然后在我们的创伤性脑损伤的闭合性颅脑损伤模型中,通过在损伤后30分钟静脉给药,来筛查候选化合物。以其最大耐受剂量(0.5xMTD)的一半作为起始剂量测试新化合物。最大耐受剂量(MTD)是尾静脉注射时不引起小鼠死亡的肽的剂量。死亡的定义是在10分钟或者更长的时间内完全没有呼吸且对外部刺激例如挤压尾巴和/或挤压脚趾完全无反应。给动物施用初始剂量为1mg/kg的肽类似物或非肽模拟物,并持续观察15分钟,然后每隔15分钟观察一次直至2小时,然后每隔1小时观察一次直至4小时以上。注射后24小时再次观察动物。

[0252] 最大耐受剂量指的是在上述观察时间点没有任何动物死亡时的最大剂量。举例而言,MTD可按照如下步骤经验性地确定,开始时给予一组3只小鼠1mg/kg的剂量。如果该剂量可耐受,则给予另一组3只小鼠3mg/kg的剂量。如果该剂量可耐受,则给予另一组3

小鼠 9mg/kg 的剂量,等等。如果,例如,9mg/kg 是不能耐受的,即 1 或多只动物死亡,那么则研究 3mg/kg 至 9mg/kg 之间的剂量,直至找到 MTD。一旦经验性确定了 MTD,则在另一组 7 只小鼠中进行确认,即总共以 MTD 测试 10 只小鼠,且必须所有小鼠均不死亡,才能确定其是 MTD。虽然不免有些武断,但这一方法已经被证明是在动物整体水平上研究新药毒性的快速而有效的方法。

[0253] 创伤性脑损伤体内模型

[0254] TBI 实验模型在评价和理解与 TBI 有关的复杂的生理学、行为学和组织学改变的过程中具有重要作用。为了进一步研究这一相互作用的网络,设计出了现在的 TBI 临床前期模型,以近似地模拟人类 TBI 的临床后果。应用最为广泛的产生 TBI 的实验技术采用硬质撞击器以产生撞击动物头颅的机械能,在实施撞击过程中动物一般处于受限状态。目前,产生此类损伤的最为流行的方法使用的加压空气作为驱动钢制尖端撞击器撞向头颅的机械能来源,这称为创伤性脑损伤,具体如下。这种气动装置适用于多种物种,包括小鼠 (Smith et al. 1995),由于能够对气动装置的损伤参数(撞击的时间、速度和深度)进行控制且不存在反弹损伤的危险 (Lighthall 1988),这使得这种创伤性脑损伤 (TBI) 模型优于由自由落体、导引重物等重力驱动的装置 (Feeney et al., 1981; Dail et al., 1981)。

[0255] 已经产生了几种不同的临床前期示例以模仿闭合性头颅损伤。通常,这些头部损伤模型中很多是在啮齿动物中进行的,其中进行了开颅手术,并直接对脑实质施加可再现的损伤,例如液体冲击或可控式皮质撞击 (Rinder, 1969)。这种类型的模型的优势在于能够产生可重复性的、精确限定部位的组织损伤。不过,这种模型产生的损伤不一定具有临床意义,因为由快速加速-减速力(例如交通事故)造成的人的闭合性头颅损伤产生更加混杂的伤害,通常还有扭转力的成分(弥漫性轴突损伤)、皮质挫伤和出血、硬膜下和硬膜外血肿。为克服这些局限性,因此开发出了重力下落模型 (weight-drop model) 以对闭合头颅施加更加类似生理学的撞击。这产生了更具临床意义的损伤,造成短期的神经学障碍和长期的认知障碍 (Zohar et al., 2003)。不过,这些早期模型的一个缺点是因不完善的生理学监测以及由重力下落造成的机械损伤的可变性而导致的缺乏实验对照和重复性。为克服这些局限性并利用现今的转基因鼠技术的优势,将这一模型用于小鼠,对小鼠的头颅进行标准化的气动冲击,其中对小鼠进行机械通气以便监测有关的生理学参数(体核温度和颅骨膜温度、平均动脉压、血糖、血气,等等)(图 5)。

[0256] 闭合性头颅损伤模型的技术方法

[0257] 实验中使用 C57B1/6J 雄性小鼠 (The Jackson Laboratory, ME), 12-16 周龄,体重 24-32g。以 30% O₂/余为 N₂ 中的异氟烷诱导麻醉。气管插管,使用 1.6% 异氟烷 /30% O₂/余为 N₂ 进行肺部机械通气。以直肠探头监测体温并以烤灯维持在 36.5℃。右侧颈内静脉插入硅胶 (silicone) 导管。损伤模型是对以前已经公开的用于大鼠的闭合头颅创伤模型 (Marmarou et al., 1994) 的改进,如前所述 (Lynch et al., 2002)。然后将插管的动物俯卧放置于浇铸的丙烯酸模具中(图 6A)。将动物放置于丙烯酸模具中有助于稳定动物并防止撞击过程中出现运动,产生更加相似的伤害。切开头皮,暴露颅骨。将凹陷 3mm 的金属圆片用粘合剂固定于颅骨表面(凹面与颅骨相邻)。在形成模型期间,发现放置这一圆片有助于减少颅骨骨折的发生率,并产生更加弥散的脑损伤。圆片被直接放置于自尾部至前囟的正中线(图 6B)。同样,这种中线损伤被确定为是更加具有临床意义的弥漫性轴突损伤

模型。通过 FluoroJade (HistoChem, Inc.) 染色发现,这种伤害与具有程度相当的功能性障碍的单侧伤害相比,对两侧海马的损伤相对较轻。将小鼠固定在立体定位架上。尽管立体定位架有助于稳定动物并精确校准撞击的竖直位移 (3mm),但不使用耳固定杆,因其引起明显更高的颅骨骨折发生率 (或者如果撞击过程中头部绕耳固定杆的轴旋转可引起脑干损伤)。活塞以 $6.8 \pm 0.2 \text{ m/s}$ 的速度释放,由此撞击丙烯酸模具轴的颅骨使之移动最多大约 3mm (图 6C)。撞击后立即将吸入的异氟烷减少至 0.7%。头皮浸润注射利多卡因并以缝线缝合。眼部施用眼膏以保护眼睛。颅骨骨折率很低 (大约 10%),这是因为金属圆片有助于分散撞击,且没有耳固定杆固定可以使得整个头部发生位移。出现凹陷性颅骨骨折 (发生率约 10%) 的小鼠被排除。让动物自然苏醒,然后撤除通气插管。在涉及长期结果的实验中需要使用替代生理性对照组。测定生理学参数需要留置动脉插管;其他留置可损害股神经丛并产生运动障碍。其他留置使得涉及运动技能的行为学测试 (包括在 Morris 水迷宫中游泳) 变得无法解释。在这些小鼠中,记录动脉血压、血气和葡萄糖的基线测定值、损伤后立即测定值、以及损伤后 15 分钟测定值,在恢复过程中进行监测。

[0258] 组织学结果

[0259] 通过 FluoroJade 染色观察到中线闭合性头颅损伤导致海马的 CA3 区出现可再现的病理学表现。不过,不同于单侧液体冲击模型的是,这种示例导致更加弥漫的损伤,且与行为障碍相比,导致相应较少的海马神经元损伤。申请人还证实这种中线损伤导致 X 线可见的脑水肿以及炎性细胞因子上调。这支持如下观点,即这是一种具有临床意义的弥漫性轴突损伤模型。

[0260] 行为学结果

[0261] 这一示例被设计为一种轻-中度闭合性头颅损伤的存活模型。小鼠最初将具有运动和小脑功能障碍,这将通过下文所述的旋转棒测试和神经学严重程度积分在损伤后 1 至 5 天作出评估。为模拟头部损伤幸存者常见的、更加微妙的长期神经系统障碍,采用 Morris 水迷宫在损伤后 21 至 25 天评估记忆力。具体而言,这测试的是动物在 90 秒内在直径为 105cm 的池中找到一个直径为 7.5cm 的隐藏平台的能力。

[0262] 旋转棒测试

[0263] 按照如上所述和已公开的方法 (Lynch et al. 2002 and Lynch et al. submitted) 进行创伤性脑损伤 (TBI)、静脉施用肽以及行为学表现。简言之,在给小鼠插管、切开头皮皮肤和以气动冲击或者中线撞击实施的受控式皮质撞击之前,确定小鼠在旋转棒上的基线表现。以外科手术闭合皮肤,持续监测动物直至自麻醉中苏醒,然后在随后的 4 个小时内每小时进行观察。撞击后 30 分钟,通过尾静脉注射施用盐水载体或测试物 (COG133、COG133 的类似物或 COG133 的非肽类似物)。撞击后 24 小时测试旋转棒上的表现,然后每日测试连续 5 日,给出所记录的数据。各组 12 小鼠用于各种化合物,浓度为 $0.5 \times \text{MTD}$ 。阴性对照组仅接受盐水载体,而阳性对照组接受 4 mg/kg 的 COG133,溶于 100 微升盐水,尾静脉注射。新肽和非肽类似物也通过尾静脉注射施用。

[0264] 作为肽单独使用的活性的对照,可准备假处理的动物并以如上所述的剂量给予测试物,不同之处在于没有进行皮质撞击。如上所述测定旋转棒上的行为表现,并与通过尾静脉注射 4 mg/kg 的 COG133 的假处理动物的表现相比较 (总共 12 组,每组 12 只动物,共计 144 只动物)。将使用 Prism 和 / 或 Instat 计算机程序通过反复测定 ANOVA 以便确定 COG133

与新化合物之间的显著性。

[0265] 使用每日旋转棒 (RR) 测试来评价头部损伤后的短期运动和小脑功能障碍 (Hamm et al., 1994)。捉住小鼠尾巴将它们置于 RR 上, 面朝墙壁, 使用轻柔的摇摆动作, 同时以稳速模式进行。一旦所有小鼠就位, 则以加速模式摇摆 RR, 并记录直至出现自棒上坠落或者旋转两圈 (720 度) 的等待时间。每日报告 3 次测试的平均等待时间。

[0266] 损伤后体内模型

[0267] 可在创伤性脑损伤之后的 60、90 和 180 分钟使用我们的小鼠 TBI 模型进一步测试类似物。在这一更为严格的延迟测试中, 可在产生可重复的创伤性脑损伤 (TBI) 的上述标准闭合性头颅损伤之后 60 分钟, 将新化合物的效力与通过尾静脉注射施用的 COG133 进行比较。如果经反复测定 ANOVA 分析旋转棒平衡表现, 确定在 TBI 后 60 分钟时, 测试化合物明显优于 COG133, 则在 TBI 后 90 分钟进行测定。如果经反复测定 ANOVA 分析旋转棒平衡表现, 确定在 TBI 后 90 分钟时, 测试化合物明显优于 COG133, 则在 TBI 后 180 分钟进行测定。

[0268] 运动障碍的行为学测试以及长期的记忆力测试

[0269] 认知和学习方面的异常是临床上常见的 TBI 的长期后遗症。为了使得我们的模型具有最大的敏感性和临床意义, 可对神经系统功能中的学习力、记忆力和行为学障碍进行评估。为此, 可研究在 Morris 水迷宫任务中表现的变化 (Morris, 1984)。这一任务利用了啮齿动物天生会游泳的优势并测定动物将视觉空间线索整合为起作用的参考记忆的能力。这一任务中的表现与临床人群中所见的神经精神障碍相关联。理论上, 小鼠通过无目标地游泳能够逃离这一任务, 或者留在整个池中无序的路径中; 不过, 如果记忆力完好无损, 则它们可运用来自测试室固定物体的远处线索, 来学习该平台的相对位置。因此, 找到平台所需的等待时间作为练习的函数应下降, 并可用作学习能力的指标。

[0270] 蛋白酶裂解分析

[0271] 一些肽能够被胰蛋白酶样蛋白酶裂解。可使用胰蛋白酶和脑组织匀浆在液相色谱-电喷雾离子化质谱 (Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry (LC/MS)) 方法测定肽的裂解。简言之, 将连接于琼脂糖珠 (Pierce) 的胰蛋白酶以 0.1M 碳酸氢铵 (pH8.0) 洗涤 2 次, 随后以无钙、镁和磷酸缓冲盐水 (pH8.0 (PBS-8)) 洗涤 2 次。将树脂重悬于含有 20 微克 /ml 肽底物的 PBS-8, 37°C 消化 0、0.1、1、5、和 20 小时。每个时间点测定 3 份样品。将样品简单离心, 以 ATI (乙腈, TFA, 内部标准品) 提取无树脂上清液, 处理并在如下条件下进行 LC/MS 定量:

[0272] LC 条件:

[0273] 柱: Agilent Zorbax300SBC₁₈2.1x75mm x5um 颗粒 300A 孔径

[0274] 梯度: 5% B 至 65% B, 4.5 分钟内

[0275] A = 5% 乙腈 / 95% 水 (0.025% TFA)

[0276] B = 95% 乙腈 / 5% 水 (0.025% TFA)

[0277] 流速: 0.5mL/min

[0278] 注入体积: 10uL

[0279] 分析时间: 4.5min, 其中 3.5min 为平衡时间

[0280] MS 条件:

[0281] 运行模式: 在 Agilent1100MSD 系统上进行阳离子电喷雾

[0282] 扫描范围:SIM,对于 COG133,在 m/z 724.1 测定 $[M+3H]^{+3}$ 离子,对于 IS-11,在 m/z 695.7 测定 $[M+3H]^{+3}$ 离子

[0283] 暂停时间:每种离子 49ms

[0284] 毛细管出口电压 (Capillary exit voltage):200V

[0285] 干燥气体:9.5L/min,350°C

[0286] 雾化压力:50psi

[0287] 类似地,可将全小鼠脑组织匀浆用作降解肽的细胞内和细胞外蛋白酶的来源。为此,将新鲜的小鼠脑以 100mg 湿重 /ml PBS (pH7.4) 进行匀浆。将肽底物以 40 微克 /ml PBS (pH7.4) 的浓度与等体积的脑匀浆物混合,并在 37°C 孵育 0、0.1、1、5、和 20 小时,然后以 ATI 抽提,如上所述进行处理并使用 LC/MS 对降解产物进行定量,以我们的内部标准品肽为参照。在各个时间点测定一式三份的样品。在各实验中,测定各个时间点的完整的未降解肽的摩尔数和主要代谢物(达到完整的未降解肽的摩尔数的至少 20% 的片段)的摩尔数。也可使用 LC/MS 方法利用匀浆脑组织来测定摄取入脑内的肽。

[0288] 也可使用 LC/MS 方法,通过将各种肽衍生物暴露于小鼠血浆并在一段时间后测定器回收率,与标准对照相比,来测定肽的血浆半寿期。

[0289] 实施例 2:表征 COG432

[0290] 图 4 给出了 TBI 后以 4mg/kg 或 1mg/kg 的 COG432, (COG432: Ac-ASHLRKLAibKRLL (SEQ ID NO.6)) 或对照(盐水)处理后的旋转棒测试结果。纵轴是旋转棒平衡表现(100%是 TBI 之前的旋转棒平衡表现)。创伤性脑损伤后 2 小时开始以 COG432 4mg/kg 或盐水处理,在 TBI 后第 1 天开始对动物进行测试,且在其后的 5 天内每日测试。TBI 后第 5 天,经旋转棒测试测定,以 4mg/kg 的 COG432 肽处理的动物的功能恢复至大约 80%。单纯以盐水载体处理的对照小鼠的功能恢复不足 50%。

[0291] 实施例 3:表征 COG1410

[0292] 合成了 COG1410,该类似物在位置 L140 和 R145 含有两个氨基丁酸 (Aib) 取代。Aib 是非天然氨基酸,已经发现其形成螺旋构象,并与肽中的氨基酸是何种类型无关 (Marshall et al. 1990)。此外,Aib 增加结合亲和力,因为相对于其他氨基酸,其结合后呈现出构象熵损失降低 (Ratnaparkhi et al. 2000)。

[0293] 细胞水平分析

[0294] 如图 7 所示,在抑制一氧化氮 (9A) 和 TNF α (9B) 释放的细胞水平测试中,我们发现 COG1410 的效力明显强于 COG133。此外,初步的体内筛查提示,在 TBI 后 120 分钟施用,COG1410 具有神经保护性,相反,COG133 在该时间点不具有神经保护活性(图 8)。

[0295] 量效研究

[0296] 初步的量效研究提示 COG1410 的最低有效剂量 (MED:于载体处理的对照相比,能够使表现产生具有统计学显著意义的改善的最小剂量) 大约与 COG133 相同,分别为 0.3mg/Kg 与 0.4mg/Kg。不过,COG1410 的最大耐受剂量 (MTD;24 小时内不引起任何小鼠死亡的最大剂量) 是 8mg/Kg,而 COG133 的 MTD 是 1.4mg/Kg。COG1410 的治疗指数 (TI;MTD 与 MED 之比) 是 26,显著优于的 COG133 TI,3.5。TI 越高的药物被认为越安全。COG1410 的高 TI 说明其引起毒性反应的剂量可能远高于其产生有益的所需保护性作用的剂量。

[0297] 药代动力学参数分析

[0298] 在诸多需要考虑的药代动力学参数中,血浆半寿期和抗蛋白酶降解的抗性是肽的两种可以通过液相色谱-电喷雾离子化质谱(LC/MS)方法进行精确测定的特性。借助于LCMS-LLC,我们建立了LC/MS方法来测定血浆和小鼠脑组织提取物中的肽的量和肽片段。

[0299] 简言之,通过向小鼠血浆内加入0、0.005、0.025、0.1、1.0、5、10、或25微克/ml的COG133而建立校准曲线。将同样浓度的COG133加入到PBS(磷酸缓冲盐溶液,pH7.4)中。向含有COG133的血浆或PBS中加入1体积的PBS和1体积的ATI(ATI=0.6%三氟乙酸和3微克/ml的内部标准品肽[LAVLLASHLRKLRKRL],溶于乙腈)进行抽提,振荡后15,000x g离心10分钟,然后收集上方的有机相层作为抽提样品。按如上所述的条件(实施例1)对抽提样品进行LC/MS定量并产生线性浓度/信号曲线(数据未显示, $R^2=0.9984$),曲线表明信号的增强与样品中COG133的量的增加呈线性比例。

[0300] 与我们的内部标准品肽(LAVLLASHLRKLRKRL)相比,我们在各个血浆样品中稳定地回收到80%以上的COG133,产生的分析结果见下表。

[0301] 表5:分析结果:

[0302]

精确度:	正确性:	线性:	LOQ
%偏差	%偏差	R^2	$\mu\text{g/ml}$
<10%	<15%	0.9984	0.05 $\mu\text{g/ml}$

[0303] 为进行我们的半寿期实验,将COG133(0.4mg/Kg)注射入雄性C57B1/6小鼠的尾静脉,在指定的时间通过心脏穿刺收集1ml血液,如上所述处理血浆。血浆浓度-时间图显示COG133在小鼠血浆中的半寿期为8分钟(图9)。利用这一方法和内部标准品,我们计算出完整的未降解的COG1410在小鼠血浆中的半寿期为2分钟(数据未显示)。

[0304] 我们采用了相似的LC/MS方法来测定脑中完整的未降解的COG1410。简言之,我们通过尾静脉注射在0时间施用4mg/Kg的COG1410,注射后5分钟通过心脏穿刺给小鼠灌注等渗盐水,以便自脑血管中去除血液,然后在注射后10分钟时取出灌注的脑。将脑组织在每0.1g脑组织湿重加1ml含有混合蛋白酶抑制剂(Roche Diagnostics,10mg/ml)的PBS中匀浆。将匀浆物与等体积的ATI混合,振荡,离心,并将样品进行如上所述的LC/MS。采用这种方法,我们在4.90分钟时在“3d COG1410”和“2d COG1410”脑组织中发现峰值,对COG1410的 $[M+2H]^+$ 离子具有705这一合适的m/z比。这一初步实验说明,COG1410在本实验的5分钟的进入期内进入脑部达到可检测的量,并在随后5分钟的灌注期内滞留于脑部。这与我们的药理学结果是一致的,即COG1410可使得TBI后的行为测试的表现明显改善(数据未显示)。

[0305] 我们已经采用相似的LC/MS方法来鉴定可能通过降解过程而产生的COG1410片段。简言之,使用来自接受了COG1410的小鼠的血浆,以这种LC/MS方法鉴定到一些较小的肽片段,这些肽片段不存在于未处理的小鼠中(数据未显示)。使用质谱仪的MS/MS部分获得了这些肽的部分序列,似乎这些主要代谢物中的至少一种可能是乙酰基-AS-Aib-LRKL-Aib-KR,用胰蛋白酶样蛋白酶或羧基肽酶活性消化完整的COG1410时,可得到一种它的片段。该片段的存在提示,COG1410对胰蛋白酶样蛋白酶和/或羧基肽酶活性的易感性可能是其半寿期较短的一个原因。

[0306] 结论

[0307] COG1410的这些结果提示,可以产生具有更高稳定性、更高的效力和BBB通透性、

更低毒性、更高治疗指数以及更宽治疗窗的化合物来治疗 TBI。利用上述技术指导,通过合成有限数量的衍生物,可得到具有更佳药用特性的其他的类似物,例如对降解具有更强的抗性的化合物。

[0308] 实施 4 :进一步优化 COG1410

[0309] 从多个标准来看,COG1410 对 COG133 均是明显的改进。我们初步的数据显示, α 螺旋结构非常重要,而 COG1410 是这种螺旋结构增强之后的产物。我们最初要引入促进螺旋构象的氨基酸样 Aib 这一策略将被扩展至 2 个新的位点,根据丙氨酸扫描工作的结果(见实施例 1)认为这些位点应该是可行的。通过对螺旋中似乎不直接参与肽的生物活性的面上的氨基酸的侧链进行衍生化,可进一步增强 COG1410 的螺旋特性。这些衍生物的总体特性将是在选定的可能限制其柔性的氨基酸和增加保持螺旋结构之倾向的氨基酸之间引入烯烃键。

[0310] 我们初步的数据还显示,COG1410 的蛋白酶水解可以是其缺乏稳定性的一个原因。此外,我们的丙氨酸扫描数据显示,羧基端亮氨酸对于活性而言是至关重要的,这提示蛋白水解去除这一残基可能导致丧失生物学活性。对蛋白水解片段进行更加确切的定义,随后进行选定氨基酸的取代和 / 或选定氨基酸的衍生化,这将增强对蛋白水解作用的抗性,同时又保留生物学活性。

[0311] 因此,可通过 3 种途径进一步对 COG1410 进行衍生化以增加其螺旋性:1) 通过在选定位点掺入 Aib 残基增加螺旋性;2) 通过氨基末端加帽增加螺旋性(Doig et al., 2002, 1994, 1993);和 3) 通过形成能够限制肽的构象的分子内侧链 - 侧链共价键而增加螺旋性。可用于这一方面的共价键衍生自烯烃易位化学作用,并能够通过含烯烃的桥而跨越 i 至 $i+4$ 位或 i 至 $i+7$ 位(Grubbs et al 2001, Schafmeister et al 2000)。

[0312] 侧链交联

[0313] 使用环闭合易位 (ring closing metathesis, RCM) 策略,可掺入烯烃侧链以便在序列 ASHLRKLKRL 中的选定残基上使侧链共价连接于侧链。COG1410 似乎形成一种两性 α 螺旋,其中所有带电荷残基位于螺旋的一个面上,而所有疏水残基位于螺旋另一侧的面上。由于丙氨酸取代大多数带电残基使得抗炎活性明显降低(表 1),因此带电残基不是用于侧链交联方法的候选物(R145 是例外,其中 Aib 取代增强生物学活性)。这使得可以通过侧链交联方法对绝大多数疏水残基进行修饰。因此,可以合成以下的交联的分子,其中以 X 和 Z 表示的氨基酸可以是任何含有可被连接于交联烯烃键的侧链的氨基酸:ASHXRKLZKRL、XSHLRKLZKRL、ASXLRKLKZLL 和 ASHXRLKRZL。

[0314] 简言之, X 和 Z 是在常规固相合成方法中掺入肽链的 α -甲基、 α -烯基双取代的氨基酸(两个丁烯基用于 $i:i+4$ 交联;一个丁烯基和一个戊烯基用于 $i:i+7$ 交联)。当仍然位于固相支持物上且处于加帽状态时,肽与 1,2-二氯乙烷中的 Grubbs 催化剂(双(三环己基膦)苯亚甲基氯化钌(IV) (Bis(tricyclohexylphosphine)benzylidene ruthenium(IV) dichloride)) 反应。通过洗涤树脂去除催化剂,并使用三氟乙酸将变位的肽自树脂上裂解下来,在 C18 反相 HPLC 柱上纯化,并通过电喷雾质谱加以确认。除了可能增强螺旋结构之外,该键的存在还可通过烯烃侧链对肽与蛋白酶的结合的物理学阻碍作用而增强抗蛋白水解作用的抗性(Verdine et al. 2000)。

[0315] 增强蛋白酶敏感位点的抗性

[0316] 我们使用 LC/MS 得到的初步结果鉴定出乙酰基 -AS-Aib-LRKL-Aib-KR 是 COG1410 的潜在的重要代谢物。可以通过胰蛋白酶样蛋白酶的內切蛋白酶裂解和 / 或羧基肽酶的外切蛋白酶裂解而产生所述片段。对于內切蛋白酶这种可能性,可合成 COG1410 衍生物,其中通过标准的 Fmoc 化学方法,使用自动化肽合成仪,以鸟氨酸、硝基精氨酸、高精氨酸或二甲基精氨酸取代 147 位的精氨酸。对于外切蛋白酶这种可能性,可合成 COG1410 衍生物,其中仪缬氨酸、甲硫氨酸或异亮氨酸取代 149 位的亮氨酸。

[0317] 实施例 5 :ApoE 模拟肽在实验性自身免疫性脑脊髓炎鼠模型中的保护作用

[0318] 作为多发性硬化 (MS) 的一种可靠动物模型,实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE) 是一种炎性疾病,引起严重的中枢神经系统 (CNS) 脱髓鞘 (Pender & Wolfe2002)。EAE 和 MS 具有相同的组织学特征,包括小胶质细胞活化和 CNS 内炎症细胞的明显浸润,这些炎症细胞主要由 T 淋巴细胞和巨噬细胞组成 (Heber-Katz1993) (Hemmer,Archelos,et al. 2002)。这些活化效应细胞释放一连串的促炎性细胞因子,例如 $TNF\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IFN\gamma$ 、和淋巴毒素。这些因子反过来进一步加剧与炎症和组织损害有关的浸润细胞的聚集 (Eng,Ghirnikar,et al. 1996) (Benveniste1997) (Wiemann, Van, et al. 1998)。

[0319] 通过对多发性硬化基因的染色体定位进行筛查,发现 MS 基因与定位在 19q13.3 区域的标记物连接,而该区域也是载脂蛋白 E (ApoE) 基因定位的区域 (Lucotte2002)。这一发现连同有关具有 APOE4 的患者更易发生重度 MS 的报道 (Chapman,Vinokurov,et al. 2001) (Fazekas, Strasser-Fuchs, et al. 2001) (Schmidt, Barcellos, et al. 2002) (Maternan, Zhang, et al. 2002), 提示 APOE 可能参与了多发性硬化的发生 (Weatherby, Mann, e al. 2000) (Weatherby, Mann, et al. 2000)。

[0320] 材料和方法

[0321] 小鼠

[0322] 雌性 C57BL/6J 小鼠 (12 周龄) 购自 Jackson Laboratories 并饲养在 Duke 大学实验动物所。动物的照料和实验过程符合 Duke 大学动物管理和使用委员会的规章。

[0323] 试剂

[0324] 髓磷脂少突胶质细胞糖蛋白 (MOG) 肽衍生自小鼠 MOG 蛋白的 35-55 位残基 (MOG35-55, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK), 而 ApoE 模拟肽 (COG133) 衍生自人载脂蛋白 -E 的 133 至 149 位残基,具有序列乙酰基 -LRVRLASHLRKLRKLL- 酰胺。在此将 ApoE 反向肽 (reversepeptide) (称为 COG-149) 用作 COG133 的错义对照 (scrambled control)。Antennapedia 连接的肽 (称为 COG134, aka COG4502) 组合了 Antennapedia 前缀肽 (prefix peptide) 和 COG133。所有的肽均由 UNC 的 Peptide Synthesis Facility 使用 FMOC 试剂通过 Merrifield 固相化学方法合成,并经过 RP-HPLC 纯化。以下试剂购自 Sigma :百日咳毒素、LPS 和 $IFN-\gamma$ 。 $TNF\alpha$ 和 $IL-6$ 的定量 ELISA 试剂盒来自 Biosource。

[0325] 以 MOG 肽诱导 EAE

[0326] 按照 Feinstein et al. (Feinstein, Galea, et al. 2002) 的如下方法在小鼠中诱导 EAE :1) 在第 0 天,在后肢两侧各皮下注射 $300\mu g$ MOG35-55 肽,该肽溶于 0.1ml PBS 中并以等体积的 CFA 乳化,CFA 含有 5mg/ml 的结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) H37RA (Difco, St. Louis, MO) ;2) 首次注射 MOG 后立即腹腔注射百日咳毒素并在 48 小时后再次注射百日咳毒素 (每只小鼠 200ng,溶于 0.1ml PBS) ;3) 在第 7 天以相同的乳剂、施

用途和部位进行加强免疫。

[0327] 以 ApoE 肽治疗

[0328] 首次 MOG 注射后 (Day0), 将小鼠随机分为 3 组, 每组 15 只小鼠, 作为: 对照组、ApoE133-149 (COG133) 治疗组和 ApoE 反向肽治疗组。在第 6、7、8、10、12、14、16、18、20 和 22 天给各处理组静脉注射 COG133/ 盐水、反向肽 / 盐水、或生理盐水, 剂量为 1mg/kg, 体积为 100 μ l, 共 10 剂。

[0329] 临床评价 EAE

[0330] 致脑炎性攻击之后, 每日监测小鼠并通过如下临床积分 (C. S.) 对神经系统损害进行评价: 0 分, 无 EAE 的临床征象; 1 分, 尾部柔软; 2 分, 尾部无力且步态异常 (运动失调和 / 或后肢麻痹); 3 分, 重度后肢麻痹; 4 分, 后半身完全瘫痪; 以及 5 分, 濒死或死亡。

[0331] 腹腔巨噬细胞的制备、培养和处理

[0332] 为此, 在免疫后 30 天 (30dpi), 取 3 只临床积分为 0 分的小鼠和 3 只临床积分为 4 分的小鼠用于制备腹腔巨噬细胞培养物。以 3ml 含有肝素 (10U/ml) 的 PBS 进行腹腔灌洗, 然后收集巨噬细胞, 接种在 96 孔微培养板上, 每孔密度为 1×10^5 个细胞, 培养基为 Dulbecco's MEM, 含有 10% 胎牛血清、2mM L- 谷氨酰胺、1% HEPES 以及 100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素, 培养在 37°C、5% CO₂、湿化孵箱内进行。24 小时后, 去除含血清培养基, 将细胞以无血清培养基洗涤一次。为确定巨噬细胞对免疫刺激物的区别应答 (differentiated response), 将来自临床积分为 0 分或 4 分的小鼠的巨噬细胞暴露于一系列浓度的 IFN- γ / LPS 或 MOG35-55 肽。为研究 COG133 或 COG134 肽对 IFN- γ / LPS 或 MOG 诱导的细胞因子产生的影响, 在用 IFN- γ / LPS 或 MOG 处理之前 30 分钟先施加指定浓度的这些肽。在 45 小时或 72 小时收集培养基, 并通过 ELISA 分析 TNF- γ 和 IL-6 或分析一氧化氮 (NO), 如下所述。

[0333] 测定亚硝酸根和总蛋白

[0334] 亚硝酸根是一氧化氮释放的稳定终产物, 因此通过将 50 μ l 培养基样品注入 Sievers280NOA 分析仪 (Boulder, CO, USA) 来确定条件培养基中的亚硝酸根的水平。按照生产商的说明采用 BCA 方法 (Pierce, Rockford, IL, USA), 以 BSA 为标准测定总蛋白 (μ g/孔)。使用 MolecularDevices Thermomax Microplate Reader (Menlo Park, CA, USA) 测定 OD562 的 BCA 值。一氧化氮水平表示为 μ M NO₂⁻/mg 蛋白质。

[0335] 通过 ELISA 测定 TNF- γ 和 IL-6

[0336] 为测定细胞因子, 在 TNF- γ / LPS 或 MOG 处理后 45 小时收集上清液, 并使用选定的单克隆抗体对 (根据生产商 Biosource 的推荐) 进行定量 ELISA, 以定量细胞因子 TNF- α 和 IL-6。对于 TNF- α ELISA, 预先以针对 TNF- α 的兔抗小鼠多克隆抗体作为捕获抗体包被 96 孔 ELISA 板, 在 2-8°C 包被 18 小时, 然后室温封闭 2 小时。在孔中加入样品或小鼠 TNF- α 标准品。室温孵育 2 小时, 然后洗涤孔, 然后加入仓鼠抗小鼠 TNF- α 的生物素酰化的二抗和辣根过氧化物酶缀合物。然后加入四甲基联苯胺 (TMB) 溶液, 并通过加入 2N H₂SO₄ 进行酸化而终止过氧化物酶催化的颜色改变。在 450nm 波长处扫描板并记录吸光度。结果表示为平均浓度 (pg/ml) \pm SEM。

[0337] 为进行 IL-6 ELISA, 使用针对 IL-6 的大鼠抗小鼠单克隆抗体作为捕获抗体, 以生物素酰化的针对 IL-6 的大鼠抗小鼠单克隆抗体作为检测抗体。测定过程与 TNF- α ELISA

相同。

[0338] 常规组织学

[0339] 将小鼠麻醉、放血、并以 25ml PBS 和 25ml4%多聚甲醛（溶于缓冲 PBS）进行灌注。在免疫后第 30 天切取临床积分为 0 分的 3 只小鼠和临床积分为 4 分的另外 3 只小鼠的脑组织和脊髓。将组织后固定于 4%多聚甲醛中达 24 小时，然后储存于 1×PBS 中，其中含有 0.1%叠氮钠。将固定的组织包埋于石蜡中，自脑、脑干和脊髓的 3 个不同平面（颈、胸和腰）切取 5 μm 厚的切片。以苏木精 / 曙红对切片进行染色以显示炎症的证据和罗克沙尔固蓝（对于脱髓鞘）。采用以下标准来评价炎症的强度：0 分，无炎症；1 分，仅在血管周围区域和脑膜存在细胞浸润；2 分，实质中仅存在轻度细胞浸润（1-10 个细胞 / 切片）；3 分，实质中存在中度细胞浸润（11-100 个 / 切片）；4 分，实质中存在明显的浸润（>100 个细胞 / 切片）。

[0340] 统计学分析

[0341] 对旋转棒结果、细胞因子和亚硝酸根浓度进行 ANOVA 分析随后进行 Dunnet's 比较。以 Mann-Whitney 检验分析疾病积分。

[0342] 结果

[0343] COG133 减轻活动性 EAE 的进展

[0344] 为研究 COG133 的推定的保护作用，自第 6 天开始至第 22 天结束，通过尾静脉注射方式给予静脉施用 10 个剂量的 1mg/kg COG133、或反向肽、或生理盐水。每日检查临床征象，隔日检查旋转棒表现。COG133 处理组的平均最大临床积分显著低于盐水处理组或错义肽处理组 ($P<0.05$) (图 10)。这一结果与大体上观察到的以 COG133 处理的动物其疾病临床表现看起来较轻的情况是吻合的。

[0345] 以临床积分为 5 分的死亡作为终点，盐水处理组的 15 只小鼠中有 4 只小鼠死于疾病，而 COG133 处理组的 15 只动物中无一死亡，且处理组的最高临床积分为 3 分（见表 6）。COG133 处理组的平均起病时间似乎比对照组略有延迟，不过差异没有统计学上显著性。此外，COG133 处理明显促进了自疾病中的恢复，数据显示，在第 30 天，COG133 组的平均临床积分明显低于对照组。

[0346] 每隔两天测试各小鼠在旋转棒上的表现。测定值表示为第 0 天测定值的百分数。在疾病的进展期，旋转棒结果没有出现显著性差异，而在恢复期，COG133 处理组的值明显高于对照组 ($P<0.05$)（数据未显示）。

[0347] 表 6 :COG133 改善 EAE

[0348]

	处理		
	CTRL	COG133	反向肽
起病日	18.5±1.06	18.8±1.24	17.3±1.12
发生率	11/15	8/15	10/10
平均最大积分	2.53±0.6	1.6±0.45	3.9±0.31
死亡率	4/15	0/15	3/10

[0349] 数据表示为平均值 \pm SEM

[0350] MOG 或 LPS/IFN- γ 处理以临床积分依赖性方式诱导巨噬细胞产生 NO、TNF- α 和 IL-6

[0351] 为研究细胞因子例如 TNF- α 和 IL-6 以及自由基、一氧化氮或 NO 在 EAE 的发病中的作用,自具有不同临床严重程度的小鼠 (C. S. 0 分和 4 分) 收集巨噬细胞,然后以不同的免疫刺激物进行攻击,即 LPS 和 IFN- γ 或 MOG 肽。尽管 MOG 肽相对于 LPS+IFN- γ 是相对温和的免疫刺激物,但仍然在来自 EAE 小鼠的巨噬细胞中观察到 NO 的强烈产生,且表现为浓度依赖性的方式 (图 11A)。以高浓度 MOG (20 μ g/ml, 相当于 7.75 μ M) 处理来自 C. S. 为 4 分的重度受损小鼠的巨噬细胞所诱发的一氧化氮释放明显高于 MOG 处理的来自 C. S. 为 0 分的未受损小鼠的巨噬细胞,这提示 NO 的产生可明显归因于损害性疾病的进展。

[0352] MOG 处理诱导分泌 TNF α , 其模式不同于 NO 释放的模式。C. S. 为 0 分的 TNF- α 基线水平明显高于 C. S. 为 4 分者 (图 11B), 这提示 TNF- α 在引发疾病中的作用。此外,本研究未检测到 MOG 诱导的 IL-6 分泌。

[0353] 在来自 C. S. 为 4 分的小鼠的巨噬细胞中, LPS+IFN- γ 刺激产生的 NO、TNF- γ 和 IL-6 要明显高于以 LPS+IFN- γ 刺激的来自 C. S. 为 0 分小鼠的巨噬细胞 (图 11C、D、E)。

[0354] COG133 抑制 MOG 诱导的 NO 和 TNF α 产生

[0355] 为了研究 COG133 对 EAE 发展的有益作用的机制,在暴露于 MOG (20 μ g/ml, 7.75 μ M) 后 72 小时测定了来自 C. S. 为 4 分的小鼠的巨噬细胞的培养基中 NO 和 TNF α 的水平。COG133 以浓度依赖性方式抑制 NO 和 TNF α 的产生 (分别见图 12A 和 B), 而反向肽未显示出此抑制作用。

[0356] COG133 抑制 LPS/IFN- γ 诱导的 NO、TNF α 和 IL-6 的产生

[0357] 以 LPS 和 IFN- γ 处理巨噬细胞诱导强烈产生 NO、TNF α 和 IL-6 (图 13)。较低浓度的 (1 μ M) COG133, 而不是较高浓度的 (5 μ M) COG133, 明显抑制 NO (A)、TNF α (B) 和 IL-6 (C) 的产生 ($P < 0.05$)。同样, 反向肽未能抑制这种产生。

[0358] COG134 (Antennapedia-COG133 嵌合体, aka COG4502) 有效抑制由 MOG 或由 LPS/IFN- γ 处理所诱导的细胞因子产生

[0359] 相对于 COG133, 由 Antennapedia 及其后的 ApoE133-149 所组成的嵌合型肽 (aka COG134 或 COG4502) 明显更强地抑制由 MOG 或由 LPS/IFN- γ 诱导的细胞因子产生 (图 14)。COG134 (COG4502) 在 5 μ M 完全抑制了 NO、TNF α 和 IL-6 的产生, 表现为所有细胞因子的水平平均回至基础水平。COG134 还表现出剂量依赖性抑制细胞因子和自由基释放的能力。作为 COG134 的对照, 合成了用作 COG133 的前缀的 Antennapedia 部分并在这一系统中进行了测试, Antennapedia 前缀肽在我们的系统中没有显示出活性。

[0360] COG133 在细胞和体内系统中抑制细胞因子释放

[0361] 我们此前已经发现, COG133 保留了完整的 ApoE 全蛋白质在抑制小胶质细胞 (脑内巨噬细胞) 活化 (Laskowitz et al. 2001) 和在培养的细胞内启动细胞内信号级联 (Misra et al. 2001) 的能力方面的生物学活性。为了研究 ApoE 发挥其免疫调节作用的机制, 我们检测了 COG133 在 C57BL6 小鼠体内抑制全身炎症应答的作用。通过测定两种熟知的促炎性细胞因子, 即肿瘤坏死因子 α (TNF α) 和白细胞介素 -6 (IL-6), 在外周循环和脑内的短暂分泌和表达谱, 来监测对 LPS 的炎症应答。通过尾静脉给小鼠注射 LPS, 在指定时间获得血清

样品,通过 ELISA 测定 TNF α 和 IL-6 的水平。当于 LPS 共施用,COG133 在 1 小时内显著降低血清 TNF α 水平,并在 1 和 3 小时降低 IL-6 水平(图 15)。注射后 24 小时在任一组均未检测到 TNF α 或 IL-6 蛋白。这些结果提示 COG133 可在整体动物模型中抑制 LPS 诱导的炎症,且似乎在抑制 TNF α 和 IL6 释放方面特别有效(Lynch et al.,2003)。

[0362] 除了在外周抑制细胞因子释放,我们还研究了 COG133 抑制尾静脉施用 LPS 所诱导的 CNS 炎症应答的能力。为了防止脑组织样品被血液或其他细胞污染,在这些实验中对小鼠进行盐水灌注,即将血液自微血管中冲刷掉,且因此仅将脑组织内的细胞因子留在样品中。以 COG133 处理的动物脑内 TNF α 水平在注射 LPS 后 1 和 3 小时明显低于接受载体的动物($p<0.05$;图 16A)。类似地,以 COG133 处理的动物脑内 IL6 水平在注射 LPS 后 3 小时明显低于接受载体的动物($p<0.05$;图 16B)。注射后 24 小时在任一组均未检测到 TNF α 或 IL-6。这些结果清楚地说明静脉施用 COG133 明显抑制了脑实质内 LPS 诱导的炎症(Lynch et al.,2003)。脑内水平的降低不可能是外周合成并穿过血脑屏障的细胞因子变化造成的结果,因为在处死小鼠前进行了灌注。此外,据 Lynch et al. (2003) 报道,与单独以 LPS 处理的动物相比,以 LPS 加 COG133 处理的动物脑内这些细胞因子的 mRNA 水平是降低的。这些结果证实,在完好的整体动物体内,通过尾静脉施用的 COG133 能够控制脑实质的炎症,而脑实质是通过血脑屏障(BBB)而与血液相隔离的部分。

[0363] 讨论

[0364] 在本研究中,我们证实 ApoE 模拟肽,即 COG133,具有显著改善实验诱导的过敏性脑脊髓炎(EAE)的行为结果的能力,而 EAE 模拟了人类的多发性硬化的绝大部分特征。MS 是中枢神经系统的慢性炎症性疾病,其特征为广泛的炎症、局灶性脱髓鞘、以及程度不等轴突丧失(Kornek,Storch,et al.2000)。巨噬细胞和 T- 淋巴细胞的大量浸润是遍布全脑的炎症的显著表现,尤其是在脊髓(Raine1994)。浸润并活化的巨噬细胞和 T- 淋巴细胞释放的促炎性细胞因子是 EAE 的 CNS 病理学的关键介质。实际上,脱髓鞘斑块中存在大量 TNF- α 、IFN- α 、和 IL-1 β (Brosnan, Cannella, et al.1995)。此外,浸润的免疫活性细胞直接地,或通过释放毒性细胞因子而间接地,活化被认为是 CNS 中的巨噬细胞的星型胶质细胞和小胶质细胞,且由此导致继发性炎症应答级联(Prineas, Kwon, et al.2001)。然后在病情恶化的过程中,脊髓的炎症愈发突出,并导致运动的明显损害,且在某些情况下导致小鼠个体死亡。因此,作为预防疾病恶化进程的一种有前途的策略,抗炎干预已经吸引了相当大的注意力(Rieckmann & Maurer2002)。

[0365] 本研究所发现的 ApoE 模拟肽的有益作用包括延缓 EAE 症状的出现、减轻疾病严重程度并促进恢复。采用标准方案以 MOG 肽进行免疫或以 LPS/IFN- γ 处理,观察到了一种导致严重丧失能力的疾病。以这种免疫方案处理且随后尾静脉注射盐水载体或反向肽(即 ApoE149-133)的动物,其疾病的临床症状与注射 COG133 的动物相比明显恶化。因此,本研究说明 COG133 可用于对 MS 进行治疗性干预,同时还提示改进的肽衍生物例如 COG432 和 COG1410(它们具有更宽的治疗窗和更高的治疗指数)也可用于进行治疗性干预。有趣的是,我们实验室先前的工作发现 COG133 发挥抗炎作用(Lynch,Tang,et al.2003)。COG133 在原代神经胶质培养物以及 BV2 细胞(鼠小胶质细胞系)中均明显抑制 LPS 诱导的 NO 和 TNF- α 的产生(Laskowitz,Thekdi,et al.2001)。现在,本研究表明 COG133 显著改善 EAE 的症状,这为 ApoE 肽在体内发挥抗炎作用这一认识提供了新的证据。

[0366] 实施例 6 :ApoE 模拟肽在胶原诱导的类风湿性关节炎小鼠模型中的抗炎活性

[0367] 有关自身免疫病模型 EAE 和 EAN 中缺乏 ApoE 的不同体内研究已经指出, ApoE 通过抑制以下两方面而保护小鼠免于出现更加严重的疾病程度和死亡 :1) 炎症应答的程度 ; 和 2) 由慢性、Th1 介导的自身免疫应答所加重的组织破坏的量。因此, 可以研究 ApoE 模拟肽在胶原诱导的类风湿性关节炎模型中的疗效。

[0368] 按照 Moore (2003) 的方案在 DBA/1 小鼠中产生胶原诱导的关节炎。这一方案类似于 Chondrex Inc 所推荐的使用 II 型胶原在小鼠中产生 CIA 的方法。采用该方法可常规达到 80-100% 的发病率。我们将在疾病出现的第 1 天开始治疗小鼠病进一步处理 14 天, 达到小鼠致敏后大约 40 天。

[0369] 通过以下方案使小鼠对 II 型胶原致敏。可将 0.01M 乙酸溶液加入鸡 II 型胶原使浓度达到 4mg/ml (Chondrex Inc., Redmond WA)。将胶原溶解过夜并将悬液在滚筒上混合, 4℃。将加入等体积冰冷的弗氏完全佐剂对溶解的胶原进行乳化。弗氏完全佐剂的组成将是弗氏不完全佐剂加上热灭活的结核分枝杆菌 (H37Ra 株), 其浓度为 4mg/ml (Difeo Laboratories, Detroit MI)。各小鼠可在尾根部皮内注射 100 μ l。将在致敏后 21 天腹腔内注射 100 μ l 加强注射剂, 其含有溶于 0.01 乙酸的、1mg/ml 的牛 II 型胶原。采用这一方案, 一般会在致敏后大约 25 天开始出现症状。不过, 将直至小鼠出现关节炎症状的第 1 天才开始为期 14 天的治疗。我们预期处死动物的平均时间是在致敏后的第 40 天。当其他各组进行致敏和加强时, 假关节炎组将不注射抗原。在 3 个独立的实验以及 2 个验证疾病模型的预实验中, 总共将使用 270 只 10-12 周龄的雄性 DBA/ 小鼠 (Jackson Laboratory, Bar Harbour, Maine)。

[0370] 将小鼠随机分配至各处理组。每组将为 15 只小鼠。将测试阴性对照, 其仅由载体 (PBS) 组成 ; 反向肽对照 (2.7mg/kg) ; 阳性对照, 由地塞米松 (1.0mg/kg) 组成 ; 以及以下 3 种剂量的 COG133 或其他 ApoE 肽, 稀释于无菌盐水 : 0.3、0.9 和 2.7mg/kg。剂量基于初步结果部分所给出的体外和体内实验数据。将通过腹腔内注射的方式每日施用 ApoE 肽、载体或地塞米松, 方案如下 : 第 0 天, 致敏 ; 第 21 天, 加强 ; 大约第 21-25 天, 对活动性疾病进行 14 天的治疗 ; 大约第 40 天, 出现疾病后 14 天处死。在整个实验中将每日分析小鼠的疾病严重程度和爪的肿胀情况直至处死小鼠。在疾病的第 14 天, 将通过 CO₂ 窒息处死小鼠, 称重, 评价炎症和疾病严重程度。将切取各髌骨, 干燥并称重。

[0371] 还将评价 COG133 对炎症和健康小鼠骨质丢失的治疗作用。假处理组的小鼠在对其他小鼠造成胶原诱导的关节炎的时间点并不进行致敏和加强。这些小鼠将接受高剂量的 COG133 治疗 (2.7mg/kg) 或 COG1410 治疗 (0.6mg/Kg) 达 14 天。开始研究前, 我们将使用一组未处理的小鼠, 通过组织学和生化手段验证 CIA 模型。10 只 DBA/1 雄性小鼠将按照如上所述进行致敏和加强, 但不治疗, 通过测量爪的体积监测炎症参数, 疾病 14 天后将小鼠处死, 称重, 并将收集血液以测定抗 II 型胶原 IgG。5 只小鼠将被切取骨关节用于组织学分析, 以确定 CIA 的存在及其一致性, 另外 5 只小鼠将切取各髌骨, 干燥并称重以确定骨质丢失的可测定性和可重复性。另外 5 只健康的年龄匹配对照小鼠将被处死以获得组织学和髌骨骨量的基线值。这一实验将重复一遍以确定我们有关疾病严重程度结果的一致性和可重复性。在处死动物时, 将涉及外周血 ; 分离血浆, 然后使用 ELISA 分析其中抗胶原抗体的量。将使用商品化检测试剂盒, 即 ArthroGen-CIA[®] 小鼠 IgG 抗 II 型胶原 ELISA 试剂盒, 以确定 II

型胶原致敏和加强的一致性 (Chondrex)。

[0372] 通过组织学手段验证 CIA :将切除踝关节和腕关节并固定于 10% 的缓冲福尔马林中,然后在 10% 甲酸溶液中脱钙 3 天 (Kawabata et al. 2003)。将组织送至 Duke 大学医学中心病理科或合适的商业卖主以便进行石蜡包埋,切成 6 微米切片并在玻璃载片上封片。以三种不同方式对载片进行染色以便对以下疾病标记物进行评价:骨关节中存在的胶原量的改变 (Masson 三色法),软骨的减少 (番红 O),和形成血管翳组织、关节间隙变窄以及炎症细胞浸润 (苏木精和曙红)。将采用半定量方式评价组织切片 (van Meurs et al. 1999; Beehler et al. 2003; Kawabata et al. 2004)。

[0373] 通过爪体积定量炎症应答:疾病严重程度 / 临床积分将按照 Moore (2003) 所述进行评价。每一显示出受累迹象的指趾的积分为 1 分,任何后肢或前肢的炎症的积分为 1 分 / 肢体,足垫、踝或腕的肿胀,每一处均为临床积分增加 1 分。还要记录炎症肢体的总数 / 小鼠。将使用数字式体积测量仪 (plethysmometer) (爪体积测量仪, Stoelting Co. Wood Dale, IL) 来测量爪的肿胀程度随时间的改变,并将其表示为平均值 \pm 标准误 (SEM) / 实验组。为确保对爪体积改变进行测量的一致性,在实验开始前 2 周将给小鼠在致敏前的肘关节和膝关节处纹上一条线,这样便能够对各只小鼠的爪的量进行一致的测量。通过计算研究过程中各只动物的曲线下面积而确定总的爪肿胀程度。将来自各实验组的数据表示为总的爪肿胀的平均值 \pm S. E. M。

[0374] 骨质丢失的量化:在处死小鼠时,将切除各个髌骨。将各个髌骨在 70°C 干燥过夜并再次称重。将髌骨的重量表示为相对于类似年龄和体重的健康小鼠的百分数。同样,实验组的髌骨的干重将表示为平均值 \pm S. E. M。

[0375] 统计学:将通过方差分析 (ANOVA) 来确定实验组之间的差别,而各组对之间的差别将通过 Mann-Whitney U- 检验而确定。P 值 ≤ 0.05 将被认为具有显著性。

[0376] 我们预期正常小鼠对上述推荐的治疗剂量和时间条件下的 COG133、COG1410 和其他 ApoE 模拟肽能够良好耐受。使用 COG133 在具有 EAE 的小鼠中的初步数据已经表明该肽能够被良好耐受。此外,预期这种治疗能够在疾病后 14 天对 CIA 的严重程度以及炎症和骨质丢失的测量值产生剂量依赖性的抑制。我们预期 COG133 不会专门作用于炎症过程或骨质丢失,而是以同等的程度减轻疾病的这两个方面。

[0377] 实施例 7 :ApoE 模拟肽在经刺激的兔滑膜成纤维细胞中的抗炎活性

[0378] 血管翳组织由在患有类风湿性关节炎的患者和患有 CIA 的小鼠的骨关节内发生过度增殖的滑膜细胞组成。由于其产生细胞因子、MMP 和一氧化氮 (Pillinger et al. 2000),因此这种组织是造成软骨和骨破坏的主要因素。利用在生理学上与该疾病过程相关的细胞来测试 RA 的候选治疗方法将有助于确定该治疗在体内可能产生的潜在的有益作用。

[0379] 将 HIG-82 细胞 (美国典型培养物保藏中心, Manassas, VA) 培养于 Ham's F-12 培养基中,补充了 10% 体积的胎牛血清, 50 微克 /ml 的青霉素和链霉素,以及 1mM L- 谷氨酰胺 (Invitrogen)。细胞生长于 150mm 通风培养瓶 (vented-flasks) (Nunc) 中并于湿化环境中培养, 37°C, 5% CO₂。首先以 10ml 的无 Ca⁺²/Mg⁺² 的 D-PBS 洗涤 2 次,随后加入 5ml 的 1/5000 稀释的 Versene 储存液 (Invitrogen),将 HIG-82 细胞自培养瓶底部脱离下来。通过离心 (200xg, 7 分钟) 并轻柔地重悬于培养基中而洗涤经 Versene 处理的细胞。

[0380] 测定来自 HIG-82 细胞培养物的上清液中的 MMP 和 NO 的实验方案基于 Panagakos et al. (2000) 以及 Kolomyikin et al. (2002) 所公开的方法。简言之,将 2×10^5 细胞加入 12 孔板 (Nunc) 的各孔中并生长至汇合。当细胞汇合后,培养基将被自孔中吸出并加入 1ml 的无血清培养基。24 小时后,将以炎症介质存在或不存在浓度逐渐增加的 COG133 的情况下处理滑膜成纤维细胞。再 24 小时后,收集上清液并分析一氧化氮、TNF- α 以及 MMP-1、3-9 和 13。

[0381] 为了测试 COG133 或 COG1410 是否抑制滑膜成纤维细胞产生 TNF- α , 将以 LPS (0.001、0.01 和 0.1 微克 /ml) 在存在或不存在 COG133 或 COG1410 (0.1、0.5、1、3、10 和 25 微摩尔) 的情况下活化 HIG-82 细胞。将收集上清液并以商品化的兔 TNF- α ELISA 试剂盒 (BD Biosciences) 进行分析。如在 MMP 和 NO 实验中那样,在测试 COG133 或 COG1410 之前,将进行时间过程研究来确定 TNF- α 产生的峰值时间。

[0382] 我们的目的是在以最适于各种测试法的浓度和孵育时间的条件下,以多种剂量的各促炎性介质刺激后,测试以载体、反向肽、COG1410 或 COG133 (或其他 ApoE 模拟肽) 处理的滑膜成纤维细胞的 TNF- α 、MMP 和 NO 的产生情况。初步的实验将建立以 LPS (E. coli 055 : B5, Sigma)、IL-1 β (R&D Systems) 或 TNF- α (R&D Systems) 处理培养物以及以 IL-1 β 和 TNF- α 对培养物进行共处理来活化 HIG-82 细胞的最佳浓度和孵育时间。

[0383] Pillinger et al. (2000) 在分析 MMP (MMP-1 和 13) 和 NO 时使用了 20ng/ml 的重组人 IL-1 β 或 TNF- α 来活化 HIG-82 细胞。据报道,HIG-82 细胞产生 MMP 的最佳时间的范围在 14-48 小时。用于刺激出峰值 MMP 产生的人 IL-1 β 的浓度也是不同的 (0.001-20ng/ml) (Panagakos et al. 2000 ;Kolomytkin et al. 2002 ;Pillinger et al. 2004)。一旦用于产生 TNF- α 、NO 和 MMP1、3、9 和 13 的最佳条件得以建立,将至少进行 3 次独立的、一式 4 份的实验,如表 3 所示。将测试各介质的次最佳剂量、最佳剂量和高剂量。将使用 ANOVA 继以 Dunnetts t- 检验来确定统计学的显著性。

[0384] 基质金属蛋白 (MMP) 活性测定 :我们建议使用 Cognosci :多酶 / 多试剂测定系统 (MEMRAS ;Rasmussen et al. 2004) 中建立的方法测量 MMP1、3、9 和 13。MEMRAS 能够在单一样品中测量多种 MMP 的活性。数据将表示为在各实验组中检测到的平均浓度 \pm S. E. M。

[0385] 测定 NO :使用 Greiss 试剂系统 (Promega, Madison WI) 来测定来自细胞培养实验中的上清液,以测量一氧化氮、亚硝酸根 (NO₂⁻) 的稳定的、非挥发性的降解产物。数据表示为相对于阳性对照 (细胞加 LPS 或细胞因子) 的平均百分数 \pm S. E. M。

[0386] 测定兔的 TNF- α :用于捕获并检测兔 TNF- α 的抗体对以及兔 TNF- α (标准品) 是商品化的 (BD Biosciences),将根据生产商的说明使用以确定由 HIG-82 细胞所产生的 TNF- α 的量。数据将表示为相对于阳性对照 (细胞加 LPS 或细胞因子) 的平均百分数 \pm S. E. M。

[0387] 为了确保我们所观察到的 MMP、NO 或 TNF- α 的量的任何降低都不是由于细胞死亡导致的,将在所有推荐的实验条件下进行 HIG-82 细胞的活力分析,使用的是 MTT 测定法 (Promega, Madison WI)。

[0388] 实施例 8 :穿透蛋白 -COG133 缀合物

[0389] ApoE 模拟物在 TBI 的鼠模型中具有神经保护性

[0390] TBI 后 30 分钟,以 406 μ g/kg COG133 或盐水载体处理小鼠。损伤后 24 小时,以盐

水处理的动物在旋转棒测试法（图 15A）测定中出现运动协调性和平衡性的严重缺陷。这种运动缺陷与体重下降相关（数据未显示）。以 COG133 处理的小鼠在各天的表现均明显优于其相应的盐水处理对照， $p < 0.01$ (Lynch et al., 2001)。这种功能上的恢复与 COG133 处理的小鼠相对于盐水处理的小鼠而言其海马中的神经元死亡的减少有关联， $p < 0.05$ ；数据未显示。这些结果强烈提示静脉施用 COG133 改善了旋转棒上的表现并预防了与头部损伤相关的神经元死亡。

[0391] 除了以旋转棒对神经系统功能的急性期恢复进行大体测试之外，申请人还在 TBI 后 20 天测试了慢性期恢复情况，这是通过研究动物在 Morris 水迷宫任务 (Morris, 1984) 中表现的改变而进行的。这一任务测试的是动物将视觉 - 空间线索整合为有效的参照记忆的能力。在这一任务中的表现与临床上头部损伤人群中所见的神经精神障碍相关联 (Skelton et al., 2000)。如图 15B 所示，头部损伤的小鼠经静脉施用 COG133 处理后在第 23 和 24 天的表现明显优于接受静脉施用盐水载体的对照组受损动物， $p < 0.01$ (Lynch et al., 2001)。这一系列的实验已经在原理求证 (proof of principle) 方面证实小鼠 TBI 之后 30 分钟时静脉施用 COG133 是具有神经保护性的。这种保护性作用一直延伸至神经运动、神经认知以及神经病理学的终点。

[0392] 穿透蛋白 -COG133 在 BV-2 细胞中的活性

[0393] 在先前的工作中，申请人证实 COG133 对 BV2 鼠小胶质细胞中的由 LPS 刺激引起的亚硝酸根分泌具有剂量依赖性的抑制作用。如图 16 所示，剂量大约为 $3 \mu\text{M}$ 的 COG133 达到了 50% 的抑制。在申请人的初步工作中，使用了两种最为常见的 PTD，即 TAT 和穿透蛋白。如图 17 所示，TAT-COG133 缀合物在 25-1000nM 范围内无效。高于 1000nM 的剂量导致超过 90% 的细胞死亡（数据未显示）。图 18 显示穿透蛋白 -COG133 缀合物明显较 COG133 更为有效。穿透蛋白 -COG133 (COG4502) 在大约 30nM 造成了 50% 的抑制。而在本实验所采用的剂量范围内，单独使用 COG133 均未能达到 50% 的抑制。图 18 的数据与图 16（其中在 $3 \mu\text{M}$ 达到了 50% 的抑制）的数据之间的对比说明，当缀合于穿透蛋白后 (COG4502)，COG133 的效力提高了大约 100 倍。这些初步的结果说明，TAT-COG133 具有细胞毒性，而穿透蛋白 -COG133 (COG4502) 显著提高了 COG133 在 BV2 小胶质细胞中的效力。

[0394] 为了进一步确定 PTD 缀合的 COG133 的效力，以不同浓度的 PTD-COG133 (PTD 和 COG133 的序列见表 7) 处理 BV2 细胞，测定 NO 的产生并且基于细胞活力进行标准化。如图 19 所示，COG133 与所有测试的 PTD 进行缀合均不同程度地增强了 COG133 的效力。确定了各化合物的 IC₅₀，即 PTD-COG133 缀合物相对于未处理的对照对 NO 产生造成的抑制达到 50% 的浓度。如图 19 所示且更详细地如表 7 所示，COG133 在所测试的最高浓度即 $25 \mu\text{M}$ 几乎不能将 NO 的产生降低至未处理对照的 50%，而 antpCOG133 在 $0.7 \mu\text{M}$ 的剂量即可做到，并在 $25 \mu\text{M}$ 时达到 100% 的抑制。有趣的是，截短的 antp PTD，即 antp(52-58)，虽然曾有其他的体外研究 (Fisher et al. 2000) 报道其与全长 antp 同样有效，却呈现出明显降低的效力，IC₅₀ 为 $11 \mu\text{M}$ 。SynB3、SynB5、和 8R 以类似的程度增强 COG133 的活性，IC₅₀ 分别为 $5.9 \mu\text{M}$ 、 $3.2 \mu\text{M}$ 、和 $4 \mu\text{M}$ 。AntpCOG133 是最有效的缀合物，相对于 COG133 而言其效力提高了 40 倍。

[0395]

表 7. PTDCOG133 的特征	体外	体内
--------------------	----	----

PTD	序列	IC50NO	IC50TNF α	LD50	治疗窗时间增宽?
Antp	RQIKIWFQNRRMKWKK	0.7	1.1	7.0	是 ; 以 4X 测试
antp (52-58)	RRMKWKK	11	未测定	20	未测定
SynB3R	RLSYSRRRF	5.9	5.1	9.5	是 ; 以 4X 测试
SynB5	RGGRLAYLRRRWAVLGR	3.2	4.2	7.7	否 ; 以 6X 测试
polyArg (8R)	RRRRRRRR	4.0	4.2	5.3	未测定
COG133	LRVLASHLRKLRKRL	25	15	20	

[0396] 为了确定在体内是否会出现相似的结果,申请人在 TBI 之后的不同时间给小鼠施用了 TAT-COG133 和穿透蛋白 -COG133 (COG4502) 缀合物。

[0397] 穿透蛋白 -COG133 (COG4502) 在体内的活性

[0398] 在 TBI 之后的不同时间给小鼠施用了 COG133、TAT-COG133、或穿透蛋白 -COG133 (COG4502), 并通过在旋转棒任务中的表现来分析效果。图 20 所示的结果提示 COG133 与穿透蛋白相缀合可增加 COG133 的治疗窗, 而以 TAT-COG133 处理则无效且与盐水相似 (数据未显示)。这些结果与在 BV2 细胞中筛查 COG 缀合物的活性所得到的结果相一致, 从而确立了 BV2 细胞用作 COG 活性的首要筛查手段的正确性。

[0399] 申请人已经在体外和体内证实了 COG133 具有抗炎和神经保护性的特性。尽管转运的机制有可能是通过一或多种已知的 ApoE 受体, 但清楚的是 PTD 例如穿透蛋白具有将运载物转运穿过细胞膜的能力, 且在某些情况中具有转运穿过 BBB 的能力。基于来自 BV2 细胞的以及体内的初步结果所形成的可靠基石, 申请人提议检验这一假设, 即 COG133 与不同 PTD 相缀合能够增强 COG133 的效力和治疗窗。当前还没有一种确定有效的神经保护性药物可用于治疗 TBI。这是开发作为平台输送载体的新的 PTD 的策略中的第一步。利用新的 PTD 类似物来增强输送通过 BBB 将拓展能够以 COG133 进行治疗的神经系统疾病的范围, 使之囊括那些缺乏在 TBI 中所见的明显 BBB 突破口的疾病。此外, COG133 穿过细胞 (transcytose) 的能力将增强其全身的活性, 有可能使得 COG133 作为抗炎治疗药物而获得广泛的用途。

[0400] 实施例 9 : 鉴定促进 COG133 在 BV2 (鼠小胶质细胞) 细胞中的细胞内输送和功能的 PTD

[0401] 实验设计 : 采用随机化设计, 其中自变量是 PTD 而因变量将是培养基中的一氧化氮水平。

[0402] 合成 PTD-COG133 缀合物 : 肽由 New England Peptides 或其他合适的商家合成, 纯度达 95%, 以无菌等渗 PBS 重新配制。将各 PTD 连接于 COG133 的 N 端, COG133 序列为 LRVLASHLRKLRKRL (SEQID NO. 1)。注意 COG133 具有 5 个精氨酸。有报道认为精氨酸对于 PTD 的转胞吞作用是至关重要的, 因此精氨酸的存在提示 COG133 自身可具有 PTD 的特征和 / 或可促进 PTD 转运。

[0403]

PTD 序列	
TAT (48-60)	GRKKRRQRRRPPQ
穿透蛋白 (aka Antp43-58)	RQIKIWFQNRRMKWKK
Antp (52-58)	RRMKWKK
SynB1	RGGRLSYSRRRFSTSTGR
SynB3	RRLSYSRRRF
SynB5	RGGRLAYLRRRWAVLGR
polyArg (8)	RRRRRRRR

[0404] 细胞培养 : BV-2 是一种熟知的鼠小胶质细胞系 (Bochin, 1992), 将其培养于高

糖含量的 DMEM 中,其中添加了 1%的青霉素 / 链霉素,10%的胎牛血清,1%的非必需氨基酸,和 1%的丙酮酸钠。细胞生长直至汇合;胰蛋白酶消化;离心;重悬于无血清 OptiMEM,其含有 1% N2 补充物,1%的青霉素 / 链霉素,1%的非必需氨基酸,和 1%的丙酮酸钠;并以 20,000 个细胞 / 孔的浓度接种,以去除任何非粘附的细胞和血清。

[0405] LPS 刺激细胞并以 PTD-COG133 处理:以 OptiMEM 洗涤 BV2 细胞以确保去除血清,以 200 μ l 的新鲜 OptiMEM 覆盖,然后以一定浓度范围的 PTD-COG133(或以适当稀释的碳酸氢铵载体对照溶液)以及 100ng/ml 来自大肠杆菌的 LPS(Catalog No. L8274, Sigma) 进行处理。LPS 刺激后 24 和 / 或 48 小时收集上清液并用于测定亚硝酸根。

[0406] 定量一氧化氮(NO):通过比色 Griess 试剂系统(Promega)测定培养基中累积的亚硝酸根(NO 产生的稳定终产物);在 540nm 确定吸光度。

[0407] 细胞活力测定:使用非放射性细胞活力分析法测定细胞活力(CellTiter96AQ, Promega)。该方法检测的是活细胞将 MTS(3-(4,5-二甲基噻唑-2)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑(3-(4,5-dimethylthiazole-2)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)) 生物还原为 Formazan 的过程。在 λ 490nm 测定比色法的吸光度。测定细胞活力并以其对亚硝酸根结果进行标准化。

[0408] 数据收集和统计学分析:实验在针对最少 3 个不同培养组的每一实验条件最少分析 6 个孔的基础上进行。数值可表示为平均值 \pm SEM。将采用非配对学生 t 检验或 ANOVA 来确定显著性。

[0409] 实施例 10:评价候选 PTD-COG133 缀合物增强 COG133 的效力和 / 或扩展 COG133 的治疗窗的能力,使用的是已经建立的小鼠创伤性脑损伤的恢复模型

[0410] 实验设计:采用随机化设计,两个自变量为:a) 损伤与治疗之间过去的时间(即 30、60、90、和 180 分钟);和 b) 根据在 BV-2 细胞中的表现而确定的前三种 PTD-COG133 缀合物。因变量将是旋转棒积分和体重。

[0411] 可控气动冲击装置的头部损伤模型:在氧气中加入 4.3%的异氟烷,以 50%的 FiO₂ 在麻醉诱导盒中诱导 90 秒,将小鼠麻醉。气管插管,肺部机械通气,并以含 1.4%异氟烷的 50% O₂ 和 50% N₂ 进行麻醉。通过体表加热 / 冷却将体温维持于 37°C。将各小鼠放置于立体定位装置上。暴露颅骨的顶部以确定解剖学标志。给动物进行可控式颅骨撞击,使用的是气动冲击(Air-Power, High Point, NC) 或者是具有可控速率(6.0 \pm 0.2m/sec) 和垂直位移(3.0mm) 的 2.0mm 钢制尖端撞针(impounder)。将让动物恢复自主通气,然后撤除插管。恢复后的小鼠将可自由摄取食物和水(Lynch, et al., 2001a, b)。

[0412] 药物施用:在 TBI 后 30、60、90、或 180 分钟,给小鼠静脉注射 100 μ l 的无菌磷酸缓冲盐载体、剂量为 1mg/kg 的 COG133、或剂量为 1

[0413] mg/kg 的各种 PTD-COG133 缀合物。基于以前的经验,每个实验处理组将使用 20 只动物,以获得足以进行统计学显著性比较所需的数据。

[0414] 旋转棒测试:在实验性 TBI 之前 2 小时进行旋转棒测试。简言之,捉住尾巴提起各小鼠并将其轻轻放置在旋转棒上,旋转棒以慢而稳定的速度旋转。5 至 10 秒钟后,将旋转棒切换至加速模式并启动计时器。当小鼠自旋转棒上坠落时或当小鼠抓住棒并旋转两圈(旋转 720 度)时停下计时器。休息 5 分钟后,将同一只小鼠再次放置在旋转棒上,开始第二轮测试,再次测定“等待时间”或在旋转棒上停留的时间。再次休息 5 分钟后,进行第三轮测

试,并将再次测定各小鼠的等待时间。在 TBI 之后的那天(大约在撞击后 20 至 24 小时)以及随后的 5 天内的每天,各小鼠在旋转棒上进行 3 次测试,如下所述,这样可使得各小鼠能够成为其自身的对照。进行数据分析时,将一组小鼠中的各小鼠的 3 个等待时间平均并计算标准差。选择这一测试模式的原因在于我们此前对 TBI 的研究发现该模式具备检测出存在创伤后功能障碍以及随后的恢复情况的敏感性(Lynch et al.,2001a, b)。所有测试均由对分组情况不知情的研究者进行。

[0415] 数据收集和统计学分析:数值可表示为平均值 \pm SEM。将采用非配对学生 t 检验或 ANOVA 来确定显著性。

[0416] SynB3-COG133 的结果:图 23 所示结果提示,创伤性脑损伤后 2 小时尾静脉注射单剂 SynB3-COG133 缀合物即可显著改善小鼠头部创伤的结果(通过测定旋转棒等待时间)。

[0417] 实施例 11:COG133 的抗炎特性

[0418] 为了测试衍生自 ApoE 全蛋白的肽是否具有与 ApoE 全蛋白相同的抗炎活性,我们最初发现,加入 COG133(aka. ApoE133-149) 或 ApoE130-149 以剂量依赖性方式抑制经脂多糖(LPS)刺激的 BV2 小胶质细胞系释放 TNF α (Laskowitz et al.2001)。相反,以错义肽处理的细胞未能抑制 TNF α 的释放。类似地,COG133 和 ApoE130-149 显著降低以 LPS 处理的 BV2 细胞释放一氧化氮,而错义肽处理未能抑制一氧化氮的释放。这些结果证实,当存在 COG133 时,巨噬细胞经 LPS 刺激后所释放的细胞因子(TNF α)和自由基(NO)明显减少,这提示 COG133 可起到抗炎剂的作用。见美国专利申请 No. 10/252,120,在此通过引用将其全部内容并入本申请。

[0419] 我们接下来研究 COG133(ApoE133-149)在整体动物水平(Lynch et al.2003)抑制炎症应答的方式是否与其在细胞模型中的方式相同(Laskowitz et al.2001)。当与 LPS 共施用,COG133ApoE-模拟肽明显降低血清 TNF α 和血清 IL-6 水平。除了在外周抑制细胞因子释放,我们还研究了尾静脉注射 LPS 加 COG133 对野生型小鼠脑内细胞因子 mRNA 水平的影响(Lynch et al.2003)。相对于 LPS 加盐水,给动物注射 LPS 加 COG133 后 3 小时,动物的 TNF α 和 IL6mRNA 水平明显降低,这提示施用 COG133(一种 ApoE 模拟肽)可明显抑制 LPS 在整体动物模型中所诱导的炎症。

[0420] 实施例 12:内源性 ApoE 蛋白的放射防护作用

[0421] 为了证实 ApoE 的抗炎作用可用于保护正经受 TBI 和放疗的对象,我们对 7Gy 和 8Gy 的 TBI 对表达小鼠 ApoE 蛋白的野生型 C57B1/6 小鼠的影响与 7Gy 和 8Gy 的 TBI 对 ApoE 敲除小鼠(Jackson Labs, BarHarbor, ME)的影响进行了比较。在 0 时对各组的 10 只小鼠进行照射并在随后的 36 天内随诊它们的存活率。如图 22 所示,暴露于 7Gy 的野生型小鼠在 30 天的时间过程中无一死亡,而 10 只 ApoE 敲除小鼠中有 2 只在照射后第 13 天死亡(20%的死亡率/80%的存活率),其他小鼠在 30 天的时间过程中无死亡。当一组 10 只野生型小鼠暴露于 8Gy 的 TBI 时,在照射后第 21 天有 4 只死亡,还有 2 只在第 23 天死亡,其他小鼠直至第 36 天未再出现死亡。当一组 10 只 ApoE 敲除小鼠暴露于 8Gy 的 TBI 时,在照射后第 10 天有 6 只死亡,还有 2 只在第 11 天死亡,最后 2 只在第 12 天死亡。

[0422] 有若干种方式来概括上述 8Gy TBI 的结果:最高达 100%的 ApoE 敲除小鼠在照射后第 12 天死亡相对于最高达 60%的野生型小鼠在照射后第 23 天死亡。或者,60%的 ApoE 敲除小鼠在照射后第 10 天死亡相对于 60%的野生型小鼠在照射后第 23 天死亡。无论是哪

一种结果表述方式,显然的是,APOE 敲除小鼠缺乏 ApoE 蛋白与早期死亡相关,并与相对于含有 ApoE 的野生型动物而言 APOE 敲除的动物中有更高百分比的动物死于给定剂量的 TBI 这一点相关。这一发现提示本发明人,ApoE 蛋白具有保护作用,其提高整体动物在 TBI 后的存活,并与以前的一些实验相一致,那些实验提示 ApoE 缺陷可加重暴露于高电荷、高能 (HZE) 粒子时的行为毒性 (Higuchi et al. 2002)。

[0423] 全身照射与全身炎症明显增加有关。我们和其他一些研究者已经发现,暴露于 TBI 的小鼠血液中的细胞因子水平显著升高 (Budagov 2004 和待发表结果)。Budagov 和 Ul'ianova (2004) 最近发现,给接受 7.5Gy 的 TBI 加 10% 体表全层烧伤 (full-thickness burn) 的小鼠施用抗 IL6 单克隆抗体,结果使得损伤后第 30 天的存活率明显提升至 60% 的水平,而暴露于相同损伤但没有接受抗 IL6 单克隆抗体的小鼠的死亡率为 100%。Van der Meeren et al. (2002) 的报道显示,小鼠暴露于 8Gy 的 TBI,2 小时之后每天接受 rIL11 共 5 天,这些小鼠明显受到保护而免于死亡。具体而言,在 TBI 后第 30 天,rIL11 处理组的存活率为 74%,而安慰剂处理的对照组的存活率为 11% ($p < 0.001$)。这些研究强烈支持这一观点,即调节机体的免疫应答在提高暴露于全身照射的个体的存活方面具有明显的积极作用。

[0424] 基于 ApoE 在炎症中的作用,我们研制了 COG133,这是一种具有全 ApoE 的组织保护活性的小肽 (图 22) (Laskowitz et al. 2001, Lynch et al. 2003, Lynch et al. 2005)。利用脂多糖 (LPS) 在野生型小鼠中诱导的炎症,与 LPS 和盐水载体处理的野生型小鼠对照相比,以 COG133 治疗显著降低了血液和脑内肿瘤坏死因子 α (TNF α) 和白细胞介素 -6 (IL6) 的释放。在实验性施加创伤性脑损伤后诱导炎症的另一野生型小鼠模型中,我们报道了当创伤性脑损伤后 30 分钟施用 COG133 时,其能够有效地预防死亡并恢复行为功能 (Lynch et al. 2005)。在更近的研究中,我们发现腹腔途径施用 COG133 同样可有效降低给小鼠注射 LPS 后引起的炎症 (数据未显示)。我们的结果指出,在存在内源性水平的天然 ApoE 蛋白时 COG133 可有效减轻炎症,且即便 COG133 是在炎症刺激之后才施用的,COG133 也依然具有上述作用。

[0425] 实施例 13:在存在和不存在 COG133 的情况下正经受 TBI 的小鼠的存活

[0426] 考虑到 TBI 刺激炎症而 cog133 (一种 ApoE 模拟物) 可在整体动物中调节炎症,我们测试了 cog133 改善暴露于全身照射的野生型小鼠的存活的能力。

[0427] 根据我们已经进行的独立研究,COG133 的最大耐受剂量是 14mg/Kg (数据未显示)。该最大耐受剂量是指以该剂量的 COG133 进行尾静脉注射时,注射后 24 小时之内无动物死亡。我们也已经报道,共施用 COG133 使得 LPS 介导的 TNF α 和 IL6 水平显著降低 (Lynch et al. 2003)。因此,我们将给接受 0 至 12Gy 的全身照射 (TBI) 的小鼠施用 COG133,施用的 COG133 的量 (剂量) 在 0 至半数最大耐受剂量 (0 至 0.5x MTD) 的范围内。这样便可以比较单独 TBI 的作用、单独 COG133 的作用、以及 TBI 加 COG133 的作用。

[0428] 最初要测试的放射剂量的范围 (0 至 12Gy) 将覆盖中等剂量和低剂量照射 (Hall, 2000)。在中等剂量放射 (5 至 12Gy) 的情况下,预期数天内出现死亡,且伴有腹泻和胃肠道粘膜破坏 (称为胃肠道综合征)。在低剂量放射 (大约 2.5 至 5Gy) 的情况下,死亡出现在暴露后的数周,且原因在于造血器官 (称为骨髓性死亡或造血综合征)。因此,可以预见到较高剂量组中会出现早期胃肠道综合征,而在较低剂量组中会出现迟发的造血综合征。

[0429] 如图 23 所示,表达 ApoE 蛋白的野生型小鼠当暴露于 10Gy 的 TBI 时出现 LD_{100/12} (即暴露于 TBI 的小鼠 100% 在照射后第 12 天死亡)。相反, TBI (10Gy) 后 1 分钟接受腹腔内注射单剂 COG133 (4mg/Kg 溶于盐水) 的小鼠具有更好的存活率 LD_{100/13}, 优于以盐水处理的对照。如果我们给小鼠 10Gy 的 TBI, 然后 1 小时后首次施用 COG133 (4mg/Kg), 继以在 TBI 后第 1、2、和 3 天施用 COG133, 存活率进一步改善为 LD_{100/16}, 这明显优于以盐水处理的对照 ($p < 0.01$)。这些初步实验以及有关在 TBI 中使用免疫调节剂的文献报道 (见上), 驱使我们进一步测试 COG133 的能力, 看它是否能够达到在 TBI 后 30 天明显提高存活率这一放射生物学标准。

[0430] 这些结果表明, 在 C57B16 小鼠暴露于 TBI 后施用 COG133 使得其寿命相对于接受放射和盐水载体但缺乏 COG133 而言得以延长。尽管这些动物均未存活至 30 天, 但我们还是使用了 10Gy 这一更高剂量, 这使得盐水处理的小鼠在照射后 12 天 100% 死亡 (LD_{100/12})。尽管接受 10Gy 照射继以 COG133 处理的动物也全部死亡, 但它们是在第 14 天和第 16 天死亡的, 这些存活时间显然与施用 COG133 的方式有关。接受 4 个剂量的 COG133 的动物在照射后存活的时间明显长于盐水载体处理组, 以 ANOVA 进行分析 ($p < 0.05$)。也可以说, 暴露于 10Gy 的各组的 LD50 为: 盐水对照, LD50/10; 照射后 1 分钟施用 COG133, LD50/12; 而照射后 1 小时加照射后第 1、2、和 3 天施用 COG133 (共 4 个剂量的 COG133, 每剂 1mg/Kg), LD50/14。尽管我们希望将这一结果作为剂量降低系数 (dose reduction factor) 或 DRF 的方式给出, 但由于这组数据是以单一放射剂量而获得的, 因此这是无法做到的。将需要在一个实验中施用不同剂量的放射以便在存在和不存在 COG133 的情况下经验性测定 LD50/30, 然后才可能计算出 DRF。对于一给定的致死率, 剂量降低系数等于存在 COG133 时的放射剂量除以不存在 COG133 时的放射剂量。利用这一计算方法, Hall (2000) 报道, 当在照射事件即将发生之前施用氨磷汀 (amifostene) 时, 氨磷汀在照射后第 30 天的剂量降低系数为 2.7。尽管计算出的最大剂量降低系数在 2.5 至 3 之间 (Hall 2000), 但我们关注的是当在 TBI 事件之后施用 COG133 时, COG133 处理延长小鼠存活时间的能力。因此, 我们的目标是证实 COG133 能够保护组织, 且因此能够延长接受 TBI 之后再接受 COG133 的动物的存活时间。

[0431] 我们还将在表达小鼠 ApoE 蛋白的野生型 C57B1/6 小鼠上进行这些实验。我们将测试给这些野生型的、具有 ApoE 的小鼠添加 COG133 是否会改善其存活率。我们认为这一点十分重要, 因为可能会给人施用辐射防护治疗例如 COG133, 而人已经具有 ApoE 蛋白。我们考虑过使用 COG133 在 APOE 敲除小鼠中进行实验, 但觉得这是一个比较低的门槛, 且可能无法达到作为可能施用于已经表达其自身内源性 ApoE 蛋白的人类的治疗方法所需的长期标准。

[0432] 合成肽: 通过 Multiple Peptide Systems (San Diego) 合成肽, 经质谱确认其纯度达 95%, 并自其三氟乙酸盐重新配制肽。COG133 的序列为: LRVRLASHLRKLRKRL (SEQ ID No. 1) 而反向 -COG133 的序列为: LLRKRLKRLHSALRVRL (SEQ ID No. 57)。

[0433] 处理条件: 一般来说, 各处理组将有 12 只 12 至 16 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠。我们将施用的 COG133 的剂量相当于 0x MTD (即盐水载体)、0.1x MTD、0.2x MTD、和 0.5x MTD (0.2.6、5.2、和 13mg/Kg, 总共 50mg 用于本实验) (表 8)。首次腹腔内施用 COG133 将在全身照射后 1 小时 (即 TBI 后 1 小时) 进行, 且随后每日注射总共 30 天或直至动物死亡。基于文献和我们关于 TBI 的初步实验结果, 我们将使用 0、4、5、6、7、8、9、和 10Gy 的全身电离照

射以及上述各个不同剂量的 COG133。因此,4 个剂量的 COG133 乘以 8 个不同剂量的放射得出 32 种不同的处理条件。32 种不同的条件乘以每种条件 12 只小鼠总共需要 384 只小鼠。为进行全身照射 (TBI),将小鼠放置于校准的辐照器上并暴露一段时间以产生所需剂量的电离辐射,按照前面初步结果部分所述进行。将在 TBI 后 60 分钟通过腹腔注射施用溶于无菌生理盐水载体中的单纯盐水以及所有化合物,然后在随后的 30 天内每天进行 (QD 剂量的 COG133)。

[0434]

表 8: 用于本研究的小鼠的总体情况				
放射剂量	盐水对照	0.1 x MTD COG133	0.2 x MTD COG133	0.5 x MTD COG133
0 Gy	12	12	12	12
4 Gy	12	12	12	12
5 Gy	12	12	12	12
6 Gy	12	12	12	12
7 Gy	12	12	12	12
8 Gy	12	12	12	12
9 Gy	12	12	12	12
10 Gy	12	12	12	12
小鼠总数	96	96	96	96

[0435] 动物评估:将采用多种方式来确定动物的存活率。死亡是丧失存活,我们将其定义为在 10 分钟或者更长的时间内完全没有呼吸且对外部刺激例如挤压尾巴和 / 或挤压脚趾完全无反应性。将在暴露于 TBI 之后的 30 天内的每一天逐日评估各动物的存活情况。将使用电子秤在进行 TBI 之前 3 天内的每一天以及 TBI 之后 30 天内的每一天称量动物体重。

[0436] 临床征象是与动物的 CNS 活性有关的观测结果 (运动活性、运动失调、翻正反射、和抽搐),这些征象是毒性或病态的早期指标。这些观测结果可用于评价动物在 TBI 之后的活动表现能力以及 COG133 是否能够改善这些表现。我们将使用 Dr. Laskowitz (我们的合作者) 所描述的改良的神经系统严重程度积分系统 (Neuro-Severity Scoring system) 来得出概括性神经系统严重程度积分 (NSS) (Sheng et al. 1999)。将在 TBI 之前的 3 天内的每一天以及 TBI 之后的 30 天内的每一天对动物进行评估。进行评估的人是受过训练的观测者,其并不清楚动物的分组情况。积分为 0 分意味着神经系统检查正常,而积分为 10 分意味着最严重的神经系统缺陷。将数值概括为“概括性 NSS 积分”,具体如下:1 = 正常 (0 分);2 = 中等缺陷 (1-6 分);3 = 严重缺陷 (7-10 分);4 = 死亡。在评估期间,动物将返回其笼中并允许自由获得食物和水。将采用 MannWhitney U 统计方法比较神经系统严重程度积分。

[0437] 对那些看起来表现出过度危重的动物将立即按照供人类使用和护理的动物的

IACUC 指南实施安乐死。将按照实施例 4 所述对非致死性病态进行评估。通过比较处理的和未经处理的动物的生存曲线来分析死亡率数据,其中采用对数级检验和 / 或 Fisher 精确检验 (双侧)。将使用 Prism 计算机程序来比较所有组之间存活数据的统计学分析结果。将采用非配对学生 t 检验或 ANOVA 来确定显著性, $p < 0.05$ 时认为具有统计学显著性。

[0438] 剂量降低系数 :Hall (2000) 将 DRF 定义为 :取得相同水平的效果时存在药物 (例如 COG133) 时的放射剂量与不存在药物 (例如 COG133) 时的放射剂量之比 (例如 $LD_{50/30}$)。因此, $DRF = \text{产生 } 50\% \text{ 的致死率水平 (} = 50\% \text{ 存活率) 时存在 COG133 时的放射剂量} / \text{不存在 COG133 时的放射剂量}$ 。利用自上述研究获得的数据,我们将绘制存活 - 暴露曲线,从中可内推得到造成 TBI 后第 30 天的存活率为 50% 的全身照射剂量 (Henschke and Morton 1957)。利用来自盐水对照动物的 $LD_{50/30}$, 以及 0.1x MTD 的 COG133、0.2x MTD 的 COG133 和 0.5x MTD 的 COG133 的 $LD_{50/30}$, 我们将计算各个量的 COG133 的 DRF。如果 DRF 大于 1, 则该结果提示在 TBI 后以 COG133 处理动物对暴露于 TBI 之后的动物的存活具有保护作用。如果 DRF 是 1, 则 COG133 处理没有产生保护作用。如果 DRF 小于 1, 则 COG133 的作用可能是使动物对 TBI 更敏感。基于我们的初步研究, 见图 3, 我们预期 COG133 将起到辐射防护剂的作用, 其显著提高暴露于 TBI 的小鼠的存活率, 并将产生大于 1 的 DRF。

[0439] 小鼠是用于这一原理求证实验的合适的动物选择, 其原因在于小鼠对 TBI 的反应一致, 其足够小因此能够方便地放置在辐照器上, 并且由于体积小可节省用于测试方案中的 COG133。为了精确测定 COG133 在随后的任务中的作用, 我们必须给每一处理条件产生一个完整的放射剂量对存活率的曲线。对于小鼠, 暴露于 4Gy 以下的 TBI 通常对存活不会产生可检测到的影响, 因此, 在我们推荐的方案中, 我们没有将宝贵的动物资源扩展用于那些低剂量的实验中。不过, 可以将来自低剂量照射研究的不同结局作为将来研究的课题。另一方面, 高于 10Gy 的 TBI 暴露通常导致存活率低于 10% (超过 90% 的死亡)。尽管从军事和民用两方面考虑, 动物对高于 10Gy 的反应情况都很重要, 但我们还是选择集中研究与动物死亡明显相关的暴露范围。如果我们的治疗干预能够显著改善低剂量至中等剂量 TBI 处理的动物的存活, 那么将来的研究将集中在更高剂量 TBI (例如高于 10Gy 的 TBI) 后对动物存活的潜在保护作用上。

[0440] 实验进度表 :将在为期一年的课题中大约每 6 周对一组 48 只动物进行测试。因此, 建议采用如下进度表 :

[0441]

0-6 周	7-12 周	13-18 周	19-24 周	25-30 周	31-36 周	37-42 周	43-48 周
0Gy							
	4Gy						
		5Gy					
			6Gy				
				7Gy			
					8Gy		
						9Gy	
							10Gy

[0442] 实施例 14 :用或不用 COG133 处理的 TBI 动物在金属丝悬挂 (wirehang) / 旋转棒上的行为表现

[0443] 总体而言, 将在金属丝悬挂测试中测试小鼠的肢体力量。如果它们有力量, 然后

将在旋转棒上对其进行测试,旋转棒测试是一种对运动力量和协调性的行为表现的整合测试。那些在未施加任何应激之前便不能通过这些测试的动物将不被用于我们随后的研究中。如果接受 TBI 加 COG133 的动物的表现明显优于那些仅接受 TBI 的动物,那么这将说明 COG133 可能不仅改善死亡率,而且还可能改善病情。

[0444] 金属丝悬挂测试:为了评估抓紧反射和总体运动力量,将采用金属丝悬挂测试。在我们所进行的这一测试中,捉住小鼠尾巴将它们提起并置于标准鞋盒笼的金属丝盖子上(其包括覆盖于 20cm x30cm 的鞋盒的整个上方的间隔为大约 1cm 的平行不锈钢钢丝,钢丝直径大约 2mm)。小鼠通常抓住盖子上的金属丝,整个盖子由于小鼠保持在上面而倒垂在放置于工作台上的泡沫橡胶垫上方大约 20 至 30cm 处。允许小鼠抓住盖子保持 30 秒。如果小鼠不能抓住盖子并在 30 秒前坠落,记录自倒垂至坠落的时间,这便是等待时间。不坠落的小鼠其等待时间为 30 秒。在 TBI 之前的 3 天内每天给每只小鼠进行 3 次测试。各测试之间间隔至少 5 分钟,作为休息时间。每天计算各组的等待时间平均值和标准差。在 TBI 之后仍以同样方式每天进行金属丝悬挂测试。如果在进行 TBI 之前的 3 天中的每一天的每一测试中,动物不能成功进行金属丝悬挂测试且不能在整个 30 秒中保持在金属丝盖子上,则将它们排除在 TBI 和进一步的研究之外。根据我们的经验,所有健康的野生型 C57B1/6 小鼠均能容易地通过这一测试。

[0445] 旋转棒测试:每日进行旋转棒(RR)测试来评估全身照射(Hamm et al. 1994)之后的短期运动和小脑障碍。将在 TBI 之前的 3 天内的每一天以及 TBI 之后的 30 天内的每一天进行旋转棒测试。简言之,捉住尾巴提起各小鼠并将其轻轻放置在旋转棒上,旋转棒以慢而稳定的速度旋转。5 至 10 秒钟后,将旋转棒切换至加速模式并启动计时器。当小鼠自旋转棒上坠落时或当小鼠抓住棒并旋转两圈(旋转 720 度)时停下计时器。休息 5 分钟后,将同一只小鼠再次放置在旋转棒上,开始第二轮测试,并再次测定“等待时间”或在旋转棒上停留的时间。再次休息 5 分钟后,进行第三轮测试,并将再次测定各小鼠的等待时间。

[0446] 每天,各小鼠在旋转棒上进行 3 次测试,如上所述,这样可使得各小鼠能够成为其自身的对照。进行数据分析时,将一组小鼠中的各小鼠的 3 个等待时间平均并计算标准差。这一测试模式是根据我们以前对行为表现的经验而选择的,我们以前的经验证实旋转棒测试具备检测出存在创伤后功能障碍以及随后的恢复情况的敏感性。所有测试均由对分组情况不知情的研究者进行。我们将使用 Prism 统计学分析程序反复测定 ANOVA 来计算接受实验性化合物的各组小鼠与接受盐水对照的小鼠之间的差异的显著性, $p < 0.05$ 时认为具有显著性。如果在进行 TBI 之前的 3 天中的每一天的每一测试中,动物不能成功完成旋转棒测试(对于该年龄的健康小鼠而言等待时间通常为大约 200 秒),它们将被排除于 TBI 和进一步的研究之外。

[0447] 统计学分析:通过反复测定方差分析对行为后果进行统计学分析,采用 Dunnet's post-hoc 方法对相对于对照组的多重比较进行校正。 $p < 0.05$ 时认为具有显著性。所有数值表示为平均值 \pm 标准差。

[0448] 实施例 15:COG133——一种具有抗炎特性的 ApoE 模拟肽

[0449] 基于 ApoE 蛋白的抗炎特性,我们研发了 COG133,其是一种衍生自具有 299 个氨基酸的 ApoE 全蛋白(Laskowitz DT et al., 2001)中位于受体结合区内的氨基酸残基(133-149)的肽。利用培养的巨噬细胞(Laskowitz DT et al., 2001)和 C57B1/6 小鼠

(Lynch J. R. et al., 2003), 我们已经证实, COG133 保留了 ApoE 全蛋白的抗炎特性。通过 LPS 注射 \pm COG133 在未进行过实验的小鼠(naïve mice) 中引发炎症, 并在注射后 0、1、3 和 24 小时收集血清(图 24A 和 B)。使用细胞因子 ELISA 试剂盒(Pierce) 发现, 相对于对照而言, COG133 处理的动物具有明显更低的血清 TNF- α 和明显更低的血清 IL-6(Lynch J. R. et al., 2003)。在 Lynch et al. 的文章中, 我们还报道了通过在蛋白质水平或者 mRNA 水平(定量 RT-PCR) 测定发现, 相对于盐水对照而言, COG133 处理的动物的脑内的 TNF- α 和 IL-6 水平明显更低。以 LPS 刺激新鲜人血 \pm COG133 也发现, 相对于盐水处理的对照, COG133 明显降低了一氧化氮和 TNF- α 水平(数据未显示)。这些结果说明, COG133 在体外、体内以及离体降低炎症; 这支持我们的如下认识, 即 COG133 可有效地降低人类疾病中的炎症。

[0450] 实施例 16 :COG133 降低 EAE 小鼠的疾病严重程度

[0451] MOG 诱导的小鼠实验性过敏性脑脊髓炎(Experimental Allergic Encephalomyelitis, EAE) 是最常使用的多发性硬化(MS) 相关性炎症的鼠模型之一, MS 与 EAE 在临床特点和组织学特点的许多关键方面上被认为十分相似。这些方面包括临床表现、遍布 CNS 的多灶性病变、脱髓鞘斑块、血管周围炎、并涉及炎症细胞侵入, 这些细胞释放炎症原(inflammogens), 例如 TNF- α 、IL-6、和 NO(Ransohoff R. M., 1999)。因此, 我们选择使用这一模型来检验我们的假设, 即 COG133 能够通过其抗炎特性而改善 MS 的损害。

[0452] 简言之, 以 MOG 肽(pMOG₃₅₋₅₅, MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) 对 C57BL/6 雌性小鼠进行免疫, 并在免疫后第 6 天开始至第 24 天期间隔日通过尾静脉推注而施用 1mg/kg 的 COG133 或反向 COG133、或相同体积的生理盐水, 总共给予 10 个剂量的肽。我们发现 COG133 明显改善 EAE 的严重程度, 表现为 COG133 处理组动物的最高临床积分平均值明显低于盐水对照组动物(图 10)。COG133 处理还将死亡率由盐水对照组的 4/15 以及反向肽组的 5/15 旋转降低至 COG133 处理组的 0/15 ($p < 0.05$)。疾病的进展模式揭示出 COG133 处理组的小鼠自免疫后第 23 天开始恢复, 而对照组的疾病严重程度仍然处于高水平(图 2)。反向 COG133 在体外对 BV2 细胞系缺乏生物学活性因此其没有改善 EAE 的行为综合征(图 10)。反向肽组与生理盐水组之间不存在具有统计学显著性的差异 ($p > 0.05$), 但 COG133 组与任何一个对照组相比均有具有统计学显著性的改善 ($p < 0.05$)。尽管没有公开结果, 不过以腹腔内途径施用(以 i. p. 替代 i. v.) 得到了高度相似的结果, 其中 COG133 处理组动物相对于盐水对照组具有显著的改善 ($p < 0.05$)。这些结果提示 COG133 可显著降低与 EAE 有关的炎症并有助于个体自疾病中恢复。

[0453] 为了显示出病理学改变, 包括炎症细胞的侵入, 将动物在第 30 天处死, 取出 COG133 处理组动物和盐水处理组动物的完整脊髓并自脊髓的颈、胸和腰段制备 5 μ m 厚的切片。以罗克沙尔固蓝对这些切片进行染色(髓磷脂被染为蓝色) 然后以曙红进行复染(显示外周的浸润, 为紫红色)。如图 25-A、B、和 C 所示, 在对照组动物整个脊髓的白质中可观察到大片脱髓鞘(缺失蓝色染色) 和浸润增加(紫红色颗粒)。与行为学改变一致, COG133 减轻了经 MOG 处理的动物的脱髓鞘病变并减轻其炎性浸润(图 25-D, E, F, H)。

[0454] 实施例 16 :COG133 类似物还具有抗炎活性

[0455] 以 COG133 作为模板, 我们继而产生了具有增强的所需药物活性的新的类似物。如图 26 所示, COG1410 是一种含有非天然氨基酸的类似物, 并能够比 COG133 本体化合物更

好地抑制由 LPS 刺激的 BV2 小胶质细胞释放 NO。类似地, COG4502 是另一种类似物, 其在 COG133 序列之前含有额外的氨基酸前缀, 并抑制该体系释放 NO 比 COG133 本体要好得多。为了进一步验证 COG4502 在更类似生理学的体系中的用途, 我们分离了小鼠腹腔巨噬细胞, 并在存在或不存在 COG4502 的条件下以 LPS 对其进行刺激。如图 27 所示, COG4502 以剂量依赖性的方式抑制 TNF α 释放, 并以剂量依赖性的方式抑制 IL6 释放。这些结果强烈提示 COG 化合物在细胞系、腹腔巨噬细胞和整体动物中是有效的抗炎分子 (如上所述)。

[0456] 实施例 17 : 结肠炎小鼠模型 : 精氨酸酶和 ODC 的保护作用和 iNOS 的有害作用

[0457] 炎症是节段性肠炎和溃疡性结肠炎的进展和症状的基础 ; 在一些病例中可引起狭窄、瘘管、梗阻、和穿孔等并发症。IBD 中这种炎症应答的一部分是刺激释放 NO, 后者与疾病活动性的恶化具有广泛的关联。NO 由 NO 合酶 (NOS) 以精氨酸为底物而产生, 而该酶的诱导型形式 (iNOS) 是参与 IBD 的主要成分。而精氨酸也可以被另一种可选择的途径利用来产生多胺。这样, 这两条途径为利用有限的精氨酸底物便形成了一种竞争。

[0458] Wilson Lab 一直在研究 iNOS 途径和精氨酸酶 /ODC 途径在粘膜免疫学中的竞争活性 (Cross RK et al., 2003 ; Gobert AP et al., 2004 ; Chaturvedi R. et al., 2004 ; Xu H. et al., 2004, Bussiere FI et al., 2005, Gobert AP et al., 2001, 2002, Cheng Y. et al., 2005)。已经用结肠炎的小鼠模型发现, 该另一种可选择的精氨酸酶 - 鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 途径导致在结肠中产生多胺, 该途径在改善结肠炎方面具有重要作用 (Gobert et al., 2004)。已经发现给 iNOS 缺陷型小鼠 (缺乏产生高水平 NO 的酶) 或野生型小鼠施用补充的精氨酸 (来增加进入该可选择途径的精氨酸) 改善了由啮齿柠檬酸杆菌 (*Citrobacter rodentium*) 或右旋糖苷硫酸钠 (DSS) 诱导的结肠。此外, 以精氨酸处理 iNOS 缺陷型小鼠导致病情显著改善并逆转了促炎性细胞因子产生。相反, 以精氨酸酶抑制剂或 ODC 抑制剂处理小鼠使得结肠炎明显加重。这些结果提示在疾病部位存在精氨酸竞争, 其中精氨酸代谢产生 NO 使得情况加重, 而精氨酸代谢产生多胺使得病情改善。根据这一情况, 目的在于减少 NO 产生和 / 或增加多胺合成的治疗策略应该能够有效治疗炎症性肠病。

[0459] 啮齿柠檬酸杆菌结肠炎 : 在已有的两种小鼠模型 (Gobert AP et al., 2004 ; Cheng Y. et al., 2003) 选择使用啮齿柠檬酸杆菌模型, 这是因为其产生 Th1- 优势粘膜炎症, 后者的组织学改变类似于人的 IBD (Higgins LM et al., 1999)。在该模型中, 通过口饲啮齿柠檬酸杆菌感染小鼠 (Gobert AP et al., 2004), 该细菌是一种革兰氏阴性致病菌, 其在鼠中等于导致人类腹泻的肠道致病性大肠杆菌。

[0460] 诱导精氨酸酶 I 和 iNOS : 在研究精氨酸酶和 iNOS 酶在结肠炎组织中的表达情况时, 我们发现精氨酸酶 I mRNA 和蛋白质表达显著升高而精氨酸酶 II 没有被诱导 (图 28A 和 B)。这些结果得到实时 PCR 的证实, 其中我们发现精氨酸酶 I 升高了 9.7 ± 2.5 倍, 但精氨酸酶 II 没有升高。RT-PCR 还发现 iNOS mRNA 也一致性地升高 (图 28A), 并得到了实时 PCR 的证实。通过免疫组化, 我们发现感染小鼠的结肠组织中精氨酸酶 I 呈灶性强染色, 如图 29B-C 和 29H 所示。染色见于上皮细胞 (图 29B 和 C), 但在重度结肠炎见于整个粘膜 (图 29H), 其中浸润的炎症细胞被染色。在来自相同组织的连续切片中, iNOS 位于上皮、固有层 (lamina propria) 和粘膜下炎症细胞 (图 29E-F、和 29I)。使用抗精氨酸酶 I (图 29A) 或 iNOS (图 29D) 抗体在未感染的组织中未见染色, 或在以同型 Ig 对照温育的感染组织中未见染色 (图 29G)。来自 iNOS^{-/-} 小鼠的组织中完全没有 iNOS 染色 (数据未显示)。

[0461] 我们证实,与对照小鼠相比,感染小鼠的精氨酸酶活性升高了 2.4 倍(图 30A)。相对于对照小鼠,观察到感染小鼠血清中 NO 浓度显著升高(图 30B)。还观察到这伴随着感染小鼠血清中 L-Arg 浓度的明显降低(图 30C)。这些结果说明,在存在明显的肠道炎症的情况下,例如在啮齿柠檬酸杆菌模型中所见,全身的精氨酸几乎完全耗尽。

[0462] 对比 iNOS 和精氨酸酶的作用:通过补充 L-Arg 和缺失 iNOS 而改善临床参数

[0463] 由于精氨酸酶 I 和 iNOS 在结肠炎组织中均有丰富的表达,且 L-Arg 倍完全代谢,我们于是研究了施用含有 1% L-Arg 的饮用水的作用。在野生型(WT)小鼠中,啮齿柠檬酸杆菌结肠炎在感染后第 9 天开始造成高水平的死亡率(图 31A)。相对于仅接受水的小鼠,在以 L-Arg 处理的 WT 动物中,感染后第 12 和 14 天的死亡率分别被抑制了 42%和 62%(图 31A)。通过 Cox 回归分析,以 L-Arg 处理的 WT 小鼠相对于仅接受水的小鼠仅具有 31%的死亡风险($p < 0.0009$)。在 $iNOS^{-/-}$ 小鼠中,用或不用 L-Arg 均没有观察到死亡(图 31A)。在 WT 小鼠中,L-Arg 处理减轻了体重的下降,而施用 L-Arg 的 iNOS 缺陷型小鼠进一步改善,实际上其在存在感染的情况下体重甚至增加(图 31B)。要注意 WT 小鼠的体重下降是被低估的,因为只有那些仍然存活的动物才可能被记录体重。感染啮齿柠檬酸杆菌的 WT 小鼠的结肠重量明显增加超过 2 倍以上(图 31C),而在 WT-L-Arg 和 $iNOS^{-/-}$ 小鼠中分别降低了 28%和 38%。 $iNOS$ 缺失和施用 L-Arg 具有加和效应,结肠重量下降了 68%。 $iNOS$ 缺失或 L-Arg 处理均不影响未感染的对照小鼠的结肠重量。重要的是,这些改变均与结肠的组织学改变相平行(图 32)。

[0464] L-Arg 处理或 iNOS 缺失减弱结肠炎组织中促炎性细胞因子的产生

[0465] 由于啮齿柠檬酸杆菌结肠炎与 Th1 细胞因子 IFN- γ 以及有关的促炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-1 的活化密切相关(30,46),我们想确定通过这些免疫学参数所观察到的临床与组织学效应之间的关系。实时 PCR 分析证实,相对于正常组织,啮齿柠檬酸杆菌结肠炎组织中 IFN- γ (图 33A)、TNF- α (图 33B)、和 IL-1(图 33C)明显升高,而 $iNOS$ 缺失或 L-Arg 处理使得这些升高被明显削弱。

[0466] 感染啮齿柠檬酸杆菌的小鼠结肠内的 ODC 活性被诱导

[0467] 由于鸟氨酸,即精氨酸酶的产物,被 ODC 代谢形成多胺,我们研究了 ODC 在感染啮齿柠檬酸杆菌的 WT 小鼠结肠中的表达。通过实时 PCR 我们发现与对照小鼠($n = 4$;未显示)相比,感染小鼠($n = 13$)的 mRNA 水平升高了 2.5 ± 0.5 倍。不过,在感染的 WT 小鼠或以 L-Arg 处理的感染的 WT 小鼠的结肠中,测定到 ODC 活性升高了 40 倍(图 34A)。这种升高不太可能是由来自啮齿柠檬酸杆菌本身的 ODC 活性引起的,因为我们测定了细菌的 ODC 活性并确定其在组织中的总活性中仅占不超过 1%。感染啮齿柠檬酸杆菌的 WT 小鼠的结肠多胺升高了 1.8 ± 0.1 倍,而以 L-Arg 处理后进一步明显升高了 2.7 ± 0.2 倍(图 34B),说明精氨酸酶活性是多胺合成的重要决定因素。相对于 ODC 活性较大程度的升高,多胺较小的升高很可能反映了多胺被迅速乙酰化,导致其排出细胞外并被排泄掉(31)。

[0468] 抑制精氨酸酶或 ODC 加重啮齿柠檬酸杆菌结肠炎

[0469] 为了进一步证实精氨酸酶和形成多胺的有益作用,在饮用水中加入 S-(2-硼乙基)-L-半胱氨酸(BEC)或-二氟甲基鸟氨酸(DFMO)给小鼠施用,它们分别为精氨酸酶和 ODC 的抑制剂。在未感染的对照小鼠中,BEC 或 DFMO 没有作用(表 1)。但在以 BEC 或 DFMO 处理的感染啮齿柠檬酸杆菌的小鼠中存活率明显下降(表 9)。实际上,由于在感染后第 10

天的死亡和病情严重程度,实验不得不在该时间点提早终止。啮齿柠檬酸杆菌-BEC 组和啮齿柠檬酸杆菌-DFMO 组的结肠的重量和组织学损伤均较啮齿柠檬酸杆菌-水组显著增加(表 9)。

[0470]

表 9: 接种啮齿柠檬酸杆菌或 PBS 后 10 天, 0.1% BEC 或 2.5% DFMO 对野生型小鼠的影响		
体重 (% 总体重)	结肠重量 (% 总体重)	组织学积分
102.6 ± 1.6	0.51 ± 0.04	0.43 ± 0.05
110.1 ± 2.2	0.42 ± 0.04	0.67 ± 0.17
101.3 ± 2.6	0.61 ± 0.07	0.75 ± 0.25
98.7 ± 2.7	0.83 ± 0.08 ^a	3.82 ± 1.01 ^b
82.4 ± 5.2 ^{a,c}	1.25 ± 0.07 ^{b,d}	9.25 ± 0.69 ^{b,d}
78.6 ± 0.4 ^{b,c}	1.35 ± 0.12 ^{b,d}	9.54 ± 0.68 ^{b,d}

^a*p* < 0.05, ^b*p* < 0.01, 与对照相比; ^c*p* < 0.05, ^d*p* < 0.01, 与啮齿柠檬酸杆菌相比。wt, 重量

[0471] 与单纯以水处理的感染 WT 小鼠相比, BEC- 和 DFMO- 处理的小鼠的结肠均表现出明显的透壁性炎症和粘蛋白缺失 (Gobert AP et al., 2004)。BEC- 处理的小鼠出现明显的粘膜下脓肿形成, 而 DFMO- 处理的小鼠表现出粘膜和粘膜下出血, 均为重度急性炎症的表现。当给 iNOS^{-/-} 感染啮齿柠檬酸杆菌的小鼠施用 BEC 时, 结肠炎加重; 相对于单纯 iNOS^{-/-}, BEC 导致结肠组织损伤积分的显著恶化 (iNOS^{-/-}: 2.42 ± 0.46, n = 12; 相对于 iNOS^{-/-}+BEC: 6.44 ± 0.98, n = 8, *p* < 0.01) 以及结肠重量的显著恶化 (iNOS^{-/-}: 总体重的 0.36 ± 0.01%, 相对于 iNOS^{-/-}+BEC: 0.92 ± 0.20%, *p* < 0.05)。这些数据提供了进一步的证据, 其显示对 iNOS^{-/-} 小鼠形成保护的不仅是单纯防止 NO 的产生, 更要将 L-Arg 分流至精氨酸酶途径。

[0472] 实施例 18: 右旋糖苷硫酸钠 (DSS) 结肠炎模型

[0473] 选择这一模型是因为其已经被公认是结肠炎的小鼠模型, 且该模型十分实用, 因为其仅需在饮用水中加入 DSS (Moteau O. et al., 2000, Williams KL et al. 2001, Andres PG et al., 2000, Mahler M. et al., 1998, Tesser TG et al., 1998)。在最初的实验中, 我们测试了文献中已经报道的 2.5% 至 5% 这一范围中的多种剂量 (Moteau O. et al., 2000, Williams KL et al. 2001, Andres PG et al., 2000, Mahler M. et al., 1998, Tesser TG et al., 1998), 并发现以 4% 的 DSS 得到了最可靠的反应。此外, 我们发现在水中加入 DSS 6 天然后将其撤除可得到足够的存活的小鼠; 如果在更长的连续几天中将 DSS 留在水中, 则死亡率将过高以至于不能获得足够多的存活小鼠来对其进行可靠的分析。

[0474] 在 DSS 结肠炎中诱导精氨酸酶 I、iNOS、和 ODC

[0475] 当模型建立之后, 我们便在该模型上评估了小鼠在第 10 天的精氨酸酶和 iNOS 表达。如图 35A 所示, 与啮齿柠檬酸杆菌模型一样, 发现精氨酸酶 I 而非精氨酸酶 II 的 mRNA 表达上调, 且 iNOS 水平升高。我们通过 Western 印迹 (图 35B) 和免疫组化 (图 36) 证实了精氨酸酶 I 在蛋白水平的表达。

[0476] 与这些结果一致, 我们通过实时 PCR 检测到结肠炎组织中精氨酸酶 I mRNA 的平行升高, 且结肠炎组织中精氨酸酶的酶活性升高 (数据未显示)。类似地, ODC 的 mRNA 和酶活

性也升高（数据未显示）。

[0477] 通过补充精氨酸或缺失 iNOS 而改善 DSS 结肠炎

[0478] 与我们在啮齿柠檬酸杆菌模型中观察到的结果一致，通过 iNOS 缺失或施用 L-Arg 同样使得 DSS 模型的结肠炎的临床参数降低，且当给 iNOS^{-/-} 小鼠施用 L-Arg 时，存活率、体重和结肠重量均有进一步改善（图 37）。这些结果与结肠的组织病理学的改善是一致的（图 38）。

[0479] DSS 结肠炎组织中的促炎性细胞因子 IFN- γ 、TNF- α 、和 IL-1 的水平也被诱导（图 39），且与我们在啮齿柠檬酸杆菌模型中的发现类似，在结肠炎减轻的小鼠中水平下降，说明它们是疾病严重程度的有用的标记物。值得注意的是，iNOS^{-/-} 小鼠中的水平没有象以 L-Arg 处理的小鼠那样降低，这与第 10 天的体重、结肠重量和组织学等情况相一致，见图 37 和图 38。总之，这些发现说明，在 DSS 模型中补充通过精氨酸酶途径而起作用的精氨酸是有益的。

[0480] 通过 L-Arg 和缺失 iNOS 而提高多胺水平

[0481] 有趣的是，当评估多胺水平时，在临床上有改善的各组中均匀一致性的升高（图 40）。与啮齿柠檬酸杆菌模型中一样，添加 L-Arg 提高了多胺水平。不过，不同于啮齿柠檬酸杆菌的是，在未经 L-Arg 处理的 WT 小鼠中多胺没有升高；我们推测其原因在于诱导了多胺代谢酶，即精胺氧化酶和亚精胺 / 精胺 N¹- 乙酰基转移酶 (SSAT)，我们已经在这些组织中观察到了这一情况（数据未显示）。

[0482] 支持精氨酸酶 -ODC 途径在结肠炎中具有重要性的其他数据

[0483] 精氨酸酶在 DSS 模型中的保护作用相一致，当施用精氨酸酶抑制剂 BEC 时，我们在 WT 和 iNOS^{-/-} 小鼠中均观察到结肠炎的临床和组织学参数的加重（数据未显示）。最后，在来自溃疡性结肠炎和节段性肠炎的人类 IBD 组织中，我们观察到精氨酸酶 I 和 ODC mRNA 水平的升高（图 41）。不同于小鼠的是，精氨酸酶 II 也升高，提示在这些组织中，这种线粒体酶也被诱导。

[0484] 实施例 19 :Apo-E 模拟肽在啮齿柠檬酸杆菌刺激的巨噬细胞中抑制 iNOS

[0485] 未进行研究以验证 Apo-E 模拟物 COG 肽与 IBD 模型之间可能存在的相关性，我们在以啮齿柠檬酸杆菌刺激的鼠 RAW264.7 巨噬细胞中对其进行了测试。我们使用了细菌裂解物来更近似地模拟细菌产物，细菌产物可能是固有层巨噬细胞暴露于其中的细菌产物。实际上，我们已经观察到细菌在被感染的小鼠的上皮粘膜下有规律地聚集（见图 32，高倍视野）。

[0486] 令人兴奋的是，我们发现，所测试的两种肽，即 COG1410 和 COG4502 (Antennapedia 连接形式的 COG133)，均使得 NO 的产生被抑制，测定的是巨噬细胞上清液中的亚硝酸根 (NO₂⁻) 水平（图 42）。对于 COG1410，注意到浓度在 5 μ M 和更高时具有细胞毒性，所以仅显示了 2 μ M 的数据；对于 COG4502，通过 XTT 细胞活力分析发现毒性出现于 10 μ M，所以显示的是 0.1–5 μ M 范围内的数据，这一范围内未出现毒性。此外，当在 COG4502 处理后测定 mRNA 水平时，发现对 iNOS mRNA 的表达产生显著的、浓度依赖性的抑制。

[0487] 7. 参考文献

[0488] 所有在此提及的文献和专利均通过引用将它们的全部内容并入本申请，包括但不限于如下所列各项：

- [0489] Alberts, et al., 1995, ApoE genotype and survival from intracerebralhaemorrhage, Lancet 346 :575.
- [0490] Alberts, et al., 1996, Stroke 27 :183(abstract).
- [0491] Amador, et al., 1963, Serum lactate dehydrogenase activity: an analytical assessment of current assays, Clin. Chem. 9 :391-4.
- [0492] Aono M., Lee Y., Grant, E. R., Zivin, R. A., Pearlstein, R. D., Warner, D. S., Bennett, E. R., and Laskowitz, D. T. (2002). Apolipoprotein E protects against NMDA excitotoxicity. Neurobiol. Dis. 11 :214-20.
- [0493] Aono, M., Bennett, E. R., Kim, K. S., Lynch, J. R., Myers, J., Pearlstein, R. D., Warner, D. S., and Laskowitz, D. T. (2003). Protective effect of apolipoprotein E-mimetic peptides on N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in primary rat neuronal-glial cell cultures. Neuroscience, 116 :437-45.
- [0494] Asoh, S., Ohsawa, I., Mori, T., Katsura, K., Hiraide, T., Katayama, Y., Kimura, M., Ozaki, D., Yamagata, K., and Ohta, S (2002) Protection against ischemic brain injury by protein therapeutics. PNAS 99 :17107-17112.
- [0495] Avila, et al., 1982, J. Biol. Chem. 257 :5900.
- [0496] Bacq, Z. M. 1965. Chemical protection against ionizing radiation, Charles C Thomas, Springfield, IL.
- [0497] Balaram and Gurunath., 1994, Incorporation of a potentially helixbreaking D-Phe-Pro sequence into the center of a right handed 16 residue peptide helix, Biochem. Biophys. Res. Commun., 202(1), 241.
- [0498] Baraboi, V. A., Beloshiskii, P. V., Krasiuk, A. N. and Korkach, V. I. 1994. Oxygen dependent processes in the irradiated organisms. Fiziol. Zh. 40 :116-128
- [0499] Bart, et al., 1998, Regional cerebral blood flow in apolipoprotein E deficient mice and wildtype mice during focal cerebral ischemia, NeuroReport. 9 : 2615-2620.
- [0500] Bellosta, et al., 1995, Stable expression and secretion of apolipoproteins E3 and E4 in mouse neuroblastoma cells produces differential effects on neurite outgrowth, J. Biol. Chem. 270 :27063-27071.
- [0501] Ben-Nathan D, Padgett DA, Loria RM. 1999. Androstenediol and dehydroepiandrosterone protect mice against lethal bacterial infections and lipopolysaccharide toxicity. J Med Microbiol. 1999 May; 48(5) :425-31.
- [0502] Benveniste EN, 1997, Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis, J Mol Med. 75(3) :165-73.
- [0503] Bolin, et al., 2000, Peptide and peptide mimetic inhibitors of antigen presentation by HLA-DR class II MHC molecules. Design, structure-activity relationships, and X-ray crystal structures, J. Med. Chem. 43, 2135-48.
- [0504] Bacsikai, et al., 2000, The endocytic receptor protein LRP also

mediates neuronal calcium signaling via N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 :11551-11556.

[0505] Barger and Harmon, 1997, *Nature* 388 :878.

[0506] Bart, et al., 1998, Regional cerebral blood flow in apolipoprotein E deficient vs wildtype mice undergoing middle cerebral artery occlusion. *Neuroreport* 11 :2615-2620.

[0507] Bell, et al., 1994, Upregulation of the macrophage scavenger receptor in response to different forms of injury in the CNS, *J. Neurocytol.* 23(10) :605-13.

[0508] Berliner, et al., 1995, *Circulation* 91 :2488.

[0509] Bi, et al., 2002, Uptake and pathogenic effects of amyloid beta peptide 1-42 are enhanced by integrin antagonists and blocked by NMDA receptor antagonists, *Neuroscience* 112(4) :827-40.

[0510] Bi, et al., 2002, N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A and NR2B messenger RNA levels are altered in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease, *J. Neurol. Sci.* 200(1-2) :11-8.

[0511] Biakov, V. M. and Stepanov, S. V. 1997. Mechanism of primary radiobiologic action. *Radiat. Biol. Radioecol.* 37 :469-474.

[0512] Bocchini, V. R., Mazzolla, R., Barluzzi, E., Blasi, P., Sick, and H. Kettenmann (1992) An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *J. Neurosci. Res.* 31 :616-621.

[0513] Bogoyevitch, M. A., Kendrick, T. S., Ng, D. C. H. and Barr, R. K. (2002) Taking the cell by stealth or storm? Protein transduction domains (PTDs) as versatile vectors for delivery. *DNA and Cell Biology* 21 :879-894

[0514] Bolton, S. J., Jones, D. N. C., Darker, J. G., Eggleston, D. S., Hunter, J., and Walsh, F. S. (2000) Cellular uptake and spread of the cell-permeable peptide penetratin in adult rat brain. *European Journal of Neuroscience* 12 :2847-2855.

[0515] Brain Injury Association of America (2002) Brain Injury Fact Sheet. <http://www.biausa.org/word.files.to.pdf/good.pdfs/2002FactSheetBrainInjury.pdf>

[0516] Breitner, et al., 1995, *Neurobiol. Aging* 16 :523.

[0517] Broderick, et al., 2001, Apolipoprotein E phenotype and the efficacy of intravenous tissue plasminogen activator in acute ischemic stroke, *Ann. Neurol.* 49 :736-744.

[0518] Centers for Disease Control and Prevention. Traumatic brain injury in the United States. Unpublished data from the National Center for Injury Prevention and Control, May 1998.

[0519] Cao, G., W. Pei, H., Ge, Q., Liang, Y., Luo, F. R., Sharp, A., Lu, R., Ran, S. H., Graham, and Chen, J. (2002) In vivo delivery of a Bcl-xL fusion protein containing the TAT protein transduction domain protects against Ischemic Brain Injury and

Neuronal Apoptosis. Society of Neuroscience 22 :5423-5431.

[0520] Cady, 2001, Understanding opioid tolerance in cancer pain, *Oncol. Nurs. Forum* 28(10) :1561-8.

[0521] Calabresi, 2002, Considerations in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis, *Neurology* 58(8Suppl4) :S10-22.

[0522] Centers for Disease Control and Prevention. Report to Congress on Mild Traumatic Brain Injury in the United States: Steps to Prevent a Serious Public Health Problem, September 2003.

[0523] Chapman, et al., 1999, Preliminary observations on APOE epsilon4 allele and progression of disability in multiple sclerosis, *Arch. Neurol.* 56 :1484-1487.

[0524] Chapman J, Vinokurov S, Achiron A, Karussis DM, Mitosek-Szewczyk K, Birnbaum M, Michaelson DM, Korczyn AD, 2001, APOE genotype is a major predictor of long-term progression of disability in MS, *Neurology*. 56(3) :312-6.

[0525] Chen, et al., 1997, Motor and cognitive deficits in apolipoprotein-E deficient mice after closed head injury, *Neuroscience* 80 :1255-1262.

[0526] Chen, et al., 2002, N-acyl-L-phenylalanine derivatives as potent VLA-4 antagonists that mimic a cyclic peptide conformation, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 137-40.

[0527] Chesnut, et al., Rehabilitation for traumatic brain injury. Evidence report no. 2 (Contract 290-97-0018 to Oregon Health Sciences University). Rockville, MD : Agency for Health Care Policy and Research. February 1999.

[0528] Chensue et al., 1991, *Am. J. Pathol.* 138 :395-402.

[0529] Chiang CS, Hong JH, Stalder A, Sun JR, Withers HR, McBride WH. 1997. Delayed molecular responses to brain irradiation. *Int J Radiat Biol.* 1997 Jul ; 72(1) : 45-53.

[0530] Coleman N, Bump E, Kramer R : Chemical modifiers of cancer treatment. 1988. *J Clin Oncol* 6 :709-733.

[0531] Clifford, 2002, AIDS dementia, *Med. Clin. North Am.* 86(3) :537-50, vi.

[0532] Cohen, et al., 1992, Interaction of lactoferrin and lipopolysaccharide (LPS) : effects on the antioxidant property of lactoferrin and the ability of LPS to prime human neutrophils for enhanced superoxide formation, *J. Infect. Dis.* 166 :1375-1378.

[0533] Connolly, et al., 1996, *Stroke* 27 :174 (abstract).

[0534] Clodi, and Younes, 1997, Reed-Sternberg cells and the TNF family of receptors/ligands, *Leuk. Lymphoma* 27 :195-205.

[0535] Colton, C. A., Brown, C. M., Cook, D., Needham, L. K., Xu, Q., Czapiga, M., Saunders, A. M., Schmechel, D. E., Rasheed, K., and Vitek, M. P. (2002). APOE and the regulation of microglial nitric oxide production : a link between genetic risk and

oxidative stress. *Neurobiology of Aging* 23:777-85.

[0536] Console, S., Marty, C., García-Echeverría, C., Schwendener, R. and Ballmer-Hofer, R. (2003) Antennapedia and HIV TAT 'protein transduction domains' promote endocytosis of high Mr cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J Biol Chem*, in press.

[0537] Corder, et al., 1993, Gene doses of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families, *Science* 261:921-923.

[0538] Crawford FC, Vanderploeg RD, Freeman MJ, Singh S, Waisman M, Michaels L, Abdullah L, Warden D, Lipsky R, Salazar A, Mullan MJ, 2002, APOE genotype influences acquisition and recall following traumatic brain injury. *Neurology* 58(7):1115-8.

[0539] Crawley, 2000, What's wrong with my mouse: Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice. (John Wiley and Sons, New York).

[0540] Dail, et al., 1981, Responses to cortical injury: II. Widespread depression of the activity of an enzyme in cortex remote from a focal injury, *Brain Res.* 211:79-89.

[0541] Denicourt, C., and Dowdy, S.F. (2003). Protein transduction technology offers novel therapeutic approach for brain ischemia. *Trends in Pharmacological Sciences* 24:216-218.

[0542] Dietz, G.P.H, Kilic, E., and Bhr, M. (2002) Inhibition of neuronal apoptosis in vitro and in vivo Using TAT-mediated protein transduction. *Molecular and Cellular Neuroscience* 21:29-37.

[0543] de Bont N, Netea MG, Demacker PN, Verschueren I, Kullberg BJ, van Dijk KW, van der Meer JW, Stalenhoef AF. 1999. Apolipoprotein E knock-out mice are highly susceptible to endotoxemia and *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Lipid Res.* 1999 Apr; 40(4):680-5.

[0544] DiScala, et al., 1997, Children hospitalized for traumatic brain injury: transition to postacute care, *J. Head Trauma Rehabil.* 12(2):1-10.

[0545] Doig, 2002, Recent Advances in helix-coil theory, *Biophys. Chem.*, 101-102, 281.

[0546] Doig, et al., 1994, Determination of free energies of N-capping in alpha helices by modification of the Lifson-Roig helix-coil theory to include N- and C-capping, *Biochemistry* 33(11), 3396.

[0547] Doig and Baldwin, 1993, N- and C-capping preferences for all 20 amino acids in alpha-helical peptides, *Protein Sci.*, 4(7), 1325.

[0548] Dhib-Jalbut, 2002, Mechanisms of action of interferons and glatiramer acetate in multiple sclerosis, *Neurology* 58(8 Suppl 4):S3-9.

[0549] Doble, 1999, The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy, *Pharmacol. Ther.* 81(3):163-221.

[0550] Drin, G..S., Cottin, E. Blanc, A. R., Rees, and Temsamani. J. (2003) Studies on

the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. The Journal of Biological Chemistry. In press.

[0551] Dragaric, I.G. and Dragaric, Z.D. 1971. The radiation chemistry of water. pp. 256, Academic Press, New York.

[0552] Dunlop, et al., 1997, HIV dementia and apolipoprotein E, Acta Neurol. Scand. 95(5) :315-8.

[0553] Dyer, et al., 1991, J. Biol. Chem. 266 :15009.

[0554] Ernst, et al., 2002, Design of a protein surface antagonist based on alpha-helix mimicry: inhibition of gp41 assembly and viral fusion, Angew Chem. Int. Ed. Engl. 41, 278-81.

[0555] Edgington and Curtiss, 1981, Cancer Res. 41 :3786.

[0556] Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL, 1996, Inflammation in EAE: role of chemokine/cytokine expression by resident and infiltrating cells, Neurochem Res. 21(4) : 511-25.

[0557] Fazekas F, Strasser-Fuchs S, Kollegger H, Berger T, Kristoferitsch W, Schmidt H, Enzinger C, Schiefermeier M, Schwarz C, Kornek B, Reindl M, Huber K, Grass R, Wimmer G, Vass K, Pfeiffer KH, Hartung HP, Schmidt R, 2001, Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with rapid progression of multiple sclerosis, Neurology, 57(5) :853-7.

[0558] Feinstein DL, Galea E, Gavriluk V, Brosnan CF, Whitacre CC, Dumitrescu-Ozimek L, Landreth GE, Pershadsingh HA, Weinberg G, Heneka MT, 2002, Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists prevent experimental autoimmune encephalomyelitis, Ann Neurol. 51(6) :694-702.

[0559] Feeney, et al., 1981, Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat, Brain Res. 211 :67-77.

[0560] Fisher, P.M., E. Krausz., D.P. Lane. 2001. Cellular delivery of impermeable effector molecules in the form of conjugates with peptides capable of mediating membrane translocation. Bioconjugate Chemistry 12 :825-841.

[0561] Fike JR, Cann CE, Turowski K, Higgins RJ, Chan AS, Phillips TL, Davis RL. 1988. Radiation dose response of normal brain. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1988 Jan ;14(1) :63-70.

[0562] Flegel WA, Baumstark MW, Weinstock C, Berg A, Northoff H. 1993. Prevention of endotoxin-induced monokine release by human low- and high-density lipoproteins and by apolipoprotein A-I. Infect Immun. 1993 Dec ;61(12) :5140-6.

[0563] Fleming, et al., 1996, Differential binding of apolipoprotein E isoforms to tau and other cytoskeletal proteins, Exp. Neurol. 138 :252-260.

[0564] Friedman, et al., 1999, Apolipoprotein E-epsilon 4 genotype predicts a poor outcome in survivors of traumatic brain injury, Neurology 52 :244-248.

[0565] Fotouhi, et al., 2000, The design and synthesis of potent cyclic

peptideVCAM-VLA-4antagonists incorporating an achiral Asp-Pro mimetic, Bioorg. Med. Chem. Lett. 10,1171-3.

[0566] Futaki, S. (2002) Arginine-rich peptides: potential for intracellular delivery of macromolecules and the mystery of the translocation mechanisms. International Journal of Pharmaceutics 245:1-7.

[0567] Farber, et al., 2002, Antiepileptic drugs and agents that inhibit voltage-gated sodium channels prevent NMDA antagonist neurotoxicity, Mol. Psychiatry 7(7):726-33.

[0568] Fazio, et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94:4647.

[0569] Flaherty, et al., 1999, Regulation of tau phosphorylation in microtubule fractions by apolipoprotein E, J. Neurosci. Res. 56(3):271-4.

[0570] García-Echeverría, C., Jiang, L., Ramsey, T. M., Sharma, S. K., and Chen, Y.-N. P. (2001) A new Antennapedia-derived vector for intracellular delivery of exogenous compounds. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 11:1363-1366.

[0571] García-Echeverría, C., and Ruetz, S. (2003) β -Homolysine oligomers: a new class of Trojan carriers. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 13:247-251.

[0572] Gaffin SL, Wells M, Jordan JP. 1985. Anti-lipopolysaccharide toxin therapy for whole body X-irradiation overdose. Br J Radiol. 1985 Sep; 58(693):881-4.

[0573] Girinsky TA, M Pallardy, E Comoy, T Benassi, R Roger, G Ganem, JM Cosset, G Socie, and H Magdelenat. 1994. Peripheral blood corticotropin-releasing factor, adrenocorticotrophic hormone and cytokine (interleukin beta, interleukin 6, tumor necrosis factor alpha) levels after high- and low-dose total-body irradiation in humans. Radiat Res. 139:360-363.

[0574] Gallo, et al., 1994, Potential role of apolipoprotein-E in fibrillogenesis. Am. J. Pathol. 145:526-530.

[0575] Gotschall, et al., 1995, Comparison of three measures of injury severity in children with traumatic brain injury, J. Neurotrauma 12, 611-619.

[0576] Grubbs, et al., 2001, Ring-closing metathesis of olefinic peptides: Design, Synthesis, and Structural characterization of macrocyclic helical peptides, J. Org. Chem., 66, 5291.

[0577] Gutman, et al., 1997, Apolipoprotein E binds to and potentiates the biological activity of ciliary neurotrophic factor. J. Neurosci. 17:6114-6121.

[0578] Gehrmen, et al., 1995, Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain, Brain Res. Brain Res. Rev. 20(3):269-87.

[0579] Giulian, et al., 1996, J. Neuroscience, 16:3139.

[0580] Griffin, et al., 1995, J. Neuropath. Exp. Neurol. 54:276.

[0581] Grubbs R. H., Blackwell H. E., Sadowsky J. D., Howard R. J., Sampson J. N., Chao J. A., Steinmetz W. E., and O'Leary D. J., 2001, "Ring-closing metathesis of olefinic peptides: Design, Synthesis, and Structural characterization of macrocyclic

helical peptides ", J. Org. Chem. ,66,5291.

[0582] Hall, EJ. 2000. Radiobiology for the Radiologist. Lippincott Williams and Wilkins, 5th edition, p. 138.

[0583] Hamm, et al., 1994, The Rotarod Test :An Evaluation Of Its Effectiveness In Assessing Motor Deficits Following Traumatic Brain Injury, J. Neurotrauma 11, 187-196.

[0584] Hamilton, et al., 2003, Design and application of an alpha helix mimetics scaffold based on an Oligoamide-foldamer strategy :Antagonism of the BakBH3/Bcl-xL complex, Angew. Chem. Int. Ed. ,42(5), 535.

[0585] Hamilton, et al., 2002, Design of a protein surface antagonist based on alpha-helix mimicry :Inhibition of gp41 assembly and viral fusion, Angew. Chem. Int. Ed. ,41(2), 278.

[0586] Hamilton, et al., 2001, Towards proteomimetics :terphenyl derivatives as structural and functional mimics of extended regions of an alpha helix, J. Amer. Chem. Soc. ,123, 5382.

[0587] Hayek, et al., 1994, Increased plasma and lipoprotein lipid peroxidation in apo E-deficient mice, Biochem. Biophys. Res. Commun. 201 :1567-1574.

[0588] Heber-Katz E, 1993, The ups and downs of EAE, Int Rev Immunol. 9(4) : 277-85. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP, 2002, New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis, Nat Rev Neurosci. 3(4) :291-301.

[0589] Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. 1997. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease :the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. Blood. 1997 Oct 15 ;90(8) : 3204-13.

[0590] Hill RP, H-P Rodemann, JH Hendry, SA Roberts, and M. S. Anscher. 2001. Normal tissue radiobiology :From the laboratory to the clinic. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. ,49 :353-365.

[0591] Hong JH, Chiang CS, Campbell IL, Sun JR, Withers HR, McBride WH. 1995. Induction of acute phase gene expression by brain irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1995 Oct 15 ;33(3) :619-26.

[0592] Hirschmann, et al., 1996, Synthesis of Potent Cyclic Hexapeptide NK-1 Antagonists. Use of a Minilibrary in Transforming a Peptidic Somatostatin Receptor Ligand into an NK-1 Receptor Ligand via a Polyvalent Peptidomimetic, J. Med. Chem. ,39, 2441-2448.

[0593] Holtzman, et al., 1995, Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system-derived neuronal cell line, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 : 9480-9484.

[0594] Horsburgh, et al., 1999, Increased neuronal damage in apolipoprotein

E-deficient mice following global ischaemia, *Neuroreport* 10 :837-841.

[0595] Horsburgh, et al., 2000, Intraventricular infusion of apolipoprotein E ameliorates acute neuronal damage after global cerebral ischemia in mice, *J. Cerebral Blood Flow Metab.* 20 :458-462.

[0596] Horsburgh, et al., 1999, Increased neuronal damage in apolipoprotein E-deficient mice following global ischaemia, *Neuroreport* 10 :837-841.

[0597] Hansson, 1994, *Basic Res. Cardiol.*, 89(1) :41.

[0598] Harris, et al., 1998, *Hepatology* 27 :1341-48.

[0599] Harris, et al., 1993, *J. Clin. Invest.* 91 :1028-34.

[0600] Harris HW, Grunfeld C, Feingold KR, Rapp JH. 1990. Human very low density lipoproteins and chylomicrons can protect against endotoxin-induced death in mice. *J Clin Invest.* 1990 Sep ;86(3) :696-702.

[0601] Haughey, et al., 2001, HIV-1 Tat through phosphorylation of NMDA receptors potentiates glutamate excitotoxicity, *J. Neurochem.* 78(3) :457-67.

[0602] Henderson, et al., 1996, *Microbiol. Rev.* 60 :316-34.

[0603] Holtzman et al., Low density lipoprotein receptor-related protein mediates apolipoprotein E-dependent neurite outgrowth in a central nervous system-derived neuronal cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 :9480-9484 (1995).

[0604] Hensley, ML., LM Schuchter, C Lindley, NL Meropol, GI Cohen, G Broder, WJ Gradishar, DM Green, RJ Langdon, RB Mitchell, R Negrin, TP Szatrowski, JT Thigpen, D Von Hoff, TH Wasserman, EP Winer, DG Pfister for the American Society of Clinical Oncology. 1999. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guidelines for the Use of Chemotherapy and Radiotherapy Protectants., *J Clin. Oncol.* 17 :3333-3355.

[0605] Higuchi, Y, GA Nelson, M Vazquez, DT Laskowitz, JM Slater, and RD Pearlstein. 2002. Apolipoprotein E expression and behavioral toxicity of high charge, high energy (HZE) particle radiation. *J. Radiat. Res.* 43 :S219-S224/

[0606] Huang, et al., 2001, Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's Disease brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 :11183-11186.

[0607] Huettinger, et al., 1988, Characteristics of chylomicron remnant uptake into rat liver, *Clin. Biochem.* 21(2) :87-92.

[0608] Innerarity, et al., 1979, *J. Biol. Chem.* 254 :4186-4190.

[0609] Innerarity, et al., 1983, The receptor-binding domain of human apolipoprotein E: binding of apolipoprotein E fragments, *J. Biol. Chem.* 258 :12341-47.

[0610] Jordan, et al., 1997, Apolipoprotein E epsilon-4 associated with chronic traumatic brain injury in boxing, *J. Am. Med. Assoc.* 278 :136-140.

- [0611] Jones, et al., 2002, Attenuation of acute morphine withdrawal in the neonatal rat by the competitive NMDA receptor antagonist LY2359592, *Neuropsychopharmacology* 26(3) :301-10.
- [0612] Jordan et al., 1998, Isoform-specific effect of apolipoprotein E on cell survival and beta-amyloid-induced toxicity in rat hippocampal pyramidal neuronal cultures, *J. Neurosci.* 18 :195-204.
- [0613] Joseph, JA, S Erat, and BM Rabin. 1998. CNS effects of heavy particle irradiation in space: behavioral implications. *Adv. Space Res.* 22 : 209-216.
- [0614] Karle, 2001, Controls exerted by the Aib residue: Helix formation and Helix reversal, *Biopolymers*, 60(5), 351.
- [0615] Karle and Balaram, 1990, Structural characteristics of alpha helical peptide molecules containing Aib residues, *Biochemistry*, 29(29), 6747.
- [0616] Kilic, Ö., Kilic, E., Dietz, G. P. H., and Bähr, M. (2003) Intravenous TAT-GDNF is protective after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 34 :1304-1310.
- [0617] Knouff, et al., 1999, ApoE structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice, *J. Clin. Invest.* 103 :1579-86.
- [0618] Kraus, et al., 1990, Brain injuries among infants, children, adolescents and young adults, *AJDC* 144, 684-691.
- [0619] Kim, et al., 1996, Human apolipoprotein E receptor 2, *J. Biol. Chem.* 271, 8373-8380.
- [0620] Klopman and Sedykh, 2002, An MCASE approach to the search of a cure for Parkinson's Disease, *BMC Pharmacol.* 2(1) :8.
- [0621] Kolker, et al., 2002, NMDA receptor activation and respiratory chain complex V inhibition contribute to neurodegeneration in d-2-hydroxyglutaric aciduria, *Eur. J. Neurosci.* 16(1) :21-8.
- [0622] Koppelhus, U., Awasthi, S. K., Zachar, V., Holst H. U., Ebbsen, P., Nielson, P. E. (2002) Cell-dependent differential cellular uptake of PNA, peptides, and PNA-peptide conjugates. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 12 :51-63.
- [0623] Kotlinska, 2001, NMDA antagonists inhibit the development of ethanol dependence in rats, *Pol. J. Pharmacol.* 53(1) :47-50.
- [0624] Krieger and Herz, 1994, Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP), *Ann. Rev. Biochem.* 63 :601-37.
- [0625] Kudo, et al., 2001, Absence of direct antioxidant effects from volatile anesthetics in mixed neuronal-glial culture, *Anesthesiology* 94 :303-312.
- [0626] Laskowitz, et al., 2000, Altered immune responses in apolipoprotein E deficient mice. *J. Lipid Res.* 41 :613-620.
- [0627] Laskowitz, et al., 1998b, Apolipoprotein E and the CNS response to injury,

J. Cerebral Blood Flow Metab. 18 :465-471.

[0628] Laskowitz and Roses, 1998a, Apolipoprotein E: an expanding role in the neurobiology of disease, Alzheimer's Reports 1 :5-12.

[0629] Laskowitz, et al., 2001, Downregulation of microglia activation by apolipoprotein-E and apoE-mimetic peptides, Expt. Neurol. 167 :74-85.

[0630] Laskowitz, et al., 1997a, Apolipoprotein E deficient mice have increased susceptibility to focal cerebral ischemia, J. Cereb. Blood Flow Metab. 17 :753-758.

[0631] Laskowitz, et al., 1997c, Endogenous apolipoprotein E suppresses LPS-stimulated microglial nitric-oxide production, Neuroreport 9 :615-618.

[0632] Laskowitz, et al., 1997b, Apolipoprotein E suppresses glial cell secretion of $\text{TNF}\alpha$. J. Neuroimmunology 76 :70-74.

[0633] Liefert, J. A., and Whitton, J. L. (2003) "Translocatory proteins" and "protein transduction domains": a critical analysis of their biological effects and the underlying mechanisms. Molecular Therapy 8 :13-19.

[0634] Lindsay, M. A. (2002). Peptide-mediated cell delivery: application in protein target validation. Current Opinions in Pharmacology 2 :587-594.

[0635] Lo, E. H., Singhal, A. B., Torchlin, V. P., and Abbott, N. J. (2001) Drug delivery to damaged brain. Brain Research Reviews 38 :140-148.

[0636] Lomnitski, L., Chapman, S., Hochman, A., Kohen, R., Shohami, E., Chen, Y., Trembovler, V., and Michaelson, D. M. (1999). Antioxidant mechanisms in apolipoprotein E deficient mice prior to and following closed head injury. Biochim Biophys Acta, 1453 :359-68.

[0637] Lendon et al., No effect of apolipoprotein E on neuronal cell death due to excitotoxic and apoptotic agents in vitro and neonatal hypoxic ischaemia in vivo, Euro. J. Neurosci. 12 :2235-2242 (2000).

[0638] Lighthall, 1988, Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. J. Neurotrauma 5 :1-15.

[0639] Linton et al., Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation, J. Clin. Invest. 270-81 (1991).

[0640] Linton et al., Science, 267 :1034 (1995).

[0641] Linton, et al., 1997, Phenotypes of apolipoprotein B and apolipoprotein E after liver transplantation. J. Clin. Invest., 270-281.

[0642] Liu, et al., 2000, Synthesis of a Substance P Antagonist with a Somatostatin Scaffold: Factors Affecting Agonism/Antagonism at GPCRs and the Role of Pseudosymmetry, J. Med. Chem., 43, 3827-3831.

[0643] Lucotte GL ; French MS Consortium, 2002, Confirmation of a gene for multiple sclerosis (MS) to chromosome region 19q13.3, Genet Couns. 13(2) :133-8.

[0644] Lynch, et al., 2001a, Apolipoprotein E mimetic peptide is neuroprotective in a murine head injury model, Soc. Neuroscience Abstracts.

- [0645] Lynch, et al., 2001b, Apolipoprotein E modulates glial activation and the endogenous central nervous system inflammatory response, *J. Neuroimmunology* 114:107-113.
- [0646] Lynch, et al., 2002, Apolipoprotein E affects the Central Nervous System Response to Injury and the Development of Cerebral Edema, *Ann. Neurol.* 51:113-7.
- [0647] Lynch, Tang, et al., 2003, ApoE genotype and an apoE-mimetic peptide modify the systemic and CNS inflammatory response, *J. Biol. Chem.*, epub ahead of print.
- [0648] Lalazar, et al., 1998, Site-specific mutagenesis of human apolipoprotein E. Receptor binding activity of variants with single amino acid substitutions, *J. Biol. Chem.* 263:3542-3545.
- [0649] Le and Lipton, 2001, Potential and current use of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists in diseases of aging, *Drugs Aging* 18(10):717-24.
- [0650] Lendon, et al., 2000, No effect of apolipoprotein E on neuronal cell death due to excitotoxic and apoptotic agents in vitro and neonatal hypoxic ischaemia in vivo, *Euro. J. Neurosci.* 12:2235-2242.
- [0651] Linton, et al., 1995, *Science*, 267:1034.
- [0652] Lynn, W. A., and J. Cohen. 1995. Adjunctive therapy for septic shock: a review of experimental approaches. *Clin. Infect. Dis.* 20:143-158.
- [0653] Lovestone, et al., 2001, Apolipoprotein E gene and Alzheimer's disease: is tau the link? *Biochem. Soc. Symp.* (67):111-20.
- [0654] Lurndberg, M and Johansson (2002). Positively charged DNA-binding proteins cause apparent cell membrane translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291:367-371.
- [0655] Mai, J. C., Shen, H., Watkins, S. C., Cheng, T., and Robbins, P. D. (2002). Efficiency of protein transduction is cell type-dependent and is enhanced by dextran sulfate. *The Journal of Biological Chemistry* 277:30208-30218.
- [0656] Mandell LR, Steinherz P, Fuks Z. 1990. Delayed central nervous system (CNS) radiation in childhood CNS acute lymphoblastic leukemia. Results of a pilot trial. *Cancer*. 1990 Aug 1;66(3):447-50.
- [0657] Masterman T, Zhang Z, Hellgren D, Salter H, Anvret M, Lilius L, Lannfelt L, Hillert J, 2002, APOE genotypes and disease severity in multiple sclerosis, *Mult Scler.* 8(2):98-103.
- [0658] Matthews and Beal, 1996, Increased 3-nitrotyrosine in brains of Apo E-deficient mice, *Brain Res.* 718:181-184.
- [0659] McArron, et al., 1998, The apolipoprotein E epsilon4 allele and outcome in cerebrovascular disease, *Stroke* 29:1882-1887.
- [0660] Misra, et al., 2001, Apolipoprotein E and mimetic peptide initiate a calcium-dependent signaling response in macrophages, *J. Leukocyte Biol.* 70:677-683.

- [0661] Mitchell and Smith, 2003, D-amino acid residues in peptide and proteins, *Proteins* 50(4), 563.
- [0662] Miyata and Smith, 1996, Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides, *Nat. Genet.* 14 :55-61.
- [0663] Morris, 1984, Developments of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat, *J. Neurosci. Methods* 11 :47-60.
- [0664] Mossman KL. Frequent short-term oral complications of head and neck radiotherapy. 1994. *Ear Nose Throat J.* 73 :316-320.
- [0665] Muller, et al., 1998, Apolipoprotein E isoforms increase intracellular Ca^{2+} differentially through a omega-agatoxin IVa-sensitive Ca^{2+} -channel, *Brain Pathology* 8 :641-653.
- [0666] Matsubara, et al., 2002, Monoclonal antibodies against inflammatory mediators for the treatment of patients with sepsis, *Nippon Rinsho* 60(3) :578-84.
- [0667] Mayeux, et al., 1995, *Neurology* 45 :555.
- [0668] McArron et al., The apolipoprotein E epsilon4 allele and outcome in cerebrovascular disease. *Stroke* 29 :1882-1887 (1998).
- [0669] McGeer, et al., 1993, *Glia* 7 :88.
- [0670] McKenna and Melzack, 2001, Blocking NMDA receptors in the hippocampal dentate gyrus with AP5 produces analgesia in the formalin pain test, *Exp. Neurol.* 172(1) :92-9.
- [0671] Meldrum, et al., 1990, Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease, *Trends Pharmacol. Sci.* 11 :379-387.
- [0672] Misra, et al. 1994, The relationship between low density lipoprotein-related protein/alpha2-macroglobulin(alpha2M) receptors and the newly described alpha2M signaling receptor, *J. Biol. Chem.* 269(28) :18303-6.
- [0673] Miyazawa, et al., 1991, Lactoferrin-lipopolysaccharide interactions. Effect of lactoferrin binding to monocyte/macrophage-differentiated HL-60 cells, *J. Immunol.* 146 :723-729.
- [0674] Moulder, et al. 1999, Analysis of a novel mechanism of neuronal toxicity produced by an apolipoprotein E-derived peptide. *J. Neurochem.* 72 :1069-1080.
- [0675] Myers, et al., 1997, Helix propensities are identical in proteins and peptides. *Biochemistry* 36 :10923-10929.
- [0676] Mytilineou, et al., 1997, L-deprenyl protects mesencephalic dopaminergic neurons from glutamate receptor-mediated toxicity in vitro, *J. Neurochem.* 68(1) :33-9.
- [0677] Nair CK, DK Parida, and TJ Nomura. 2001. Radioprotectors in radiotherapy.

Radiat Res(Tokyo). 42(1) :21-37.

[0678] Netea MG, de Bont N, Demacker PN, Kullberg BJ, Jacobs LE, Verver-Jansen TJ, Stalenhoef AF, Van der Meer JW. 1998. Lipoprotein(a) inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human mononuclear cells. Infect Immun. 1998 May; 66(5) :2365-7.

[0679] NIAID White Paper, NIAID Expert Panel Review on Radiobiological Research, 26 Feb 2003.

[0680] Nathan, et al., 1994, Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro, Science 264 :850-852.

[0681] NIH Consensus Statement: Rehabilitation of Persons with Traumatic Brain Injury, 1998.

[0682] NIH (1999) Report of the Consensus Development Conference on the REHABILITATION OF PERSONS WITH TRAUMATIC BRAIN INJURY http://www.nichd.nih.gov/publications/pubs/traumatic/NIH_Consensus_Statement.htm

[0683] Newman, et al., 1995, Ann. Thorac. Surg. 59 :1326.

[0684] Nguimfack, 2002, Do the glutamate excitotoxicity theory and potential free radicals implication in schizophrenia aetiopathogenesis provide a new enlightenment to links between: genome, environment and biology in the determinism of that disorder? Encephale 28(2) :147-53.

[0685] Nicoll, et al., 1995, Nat. Med. 1 :135.

[0686] Novak, et al., 1996, A new low density lipoprotein receptor homologue With 8 binding ligand repeats in brain of chicken and mouse. J. Biol. Chem. 271 : 11732-11736.

[0687] Olson, et al., 1993, Perspective: Concepts and Progress in the Development of Peptide Mimetics, J. Med. Chem. 36, 3039-3049.

[0688] Olson, et al., 1995, Peptide Mimetics of Thyrotropin Releasing Hormone Based on a Cyclohexane Framework: Design, Synthesis, and Cognition-Enhancing Properties, J. Med. Chem, 38, 2866-2879.

[0689] Orner, et al., 2001, Toward proteomimetics: terphenyl derivatives as structural and functional mimics of extended regions of an alpha-helix, J. Am. Chem. Soc. 123, 5382-3.

[0690] Paul and Bolton, 2002, Modulation of blood-brain barrier dysfunction and neurological deficits during acute experimental allergic encephalomyelitis by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist memantine, J. Pharmacol. Exp. Ther. 302(1) :50-7.

[0691] Pearlstein, et al., 1998, Neuroprotective effects of NMDA receptor glycine recognition site antagonism: dependence on glycine concentration. J. Neurochem. 70 :2012-2019.

[0692] Pender MP, Wolfe NP, 2002, Prevention of autoimmune attack and disease

progression in multiple sclerosis :current therapies and futureprospects, Intern MedJ. 32(11) :554-63.

[0693] Perez, et al.,2001, Evaluation of HIV-1Tat induced neurotoxicity in ratcortical cell culture, J.Neurovirol. 7(1) :1-10.

[0694] Pescarolo, et al.,2001, A retro-inverso peptide homologous to helixlofc-Myc is a potent and specific inhibitor of proliferation in different cellularsystems, FASEB J. 15 :31-3.

[0695] Parker TS, Levine DM, Chang JC, Laxer J, Coffin CC, Rubin AL.1995. Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacteriallipopolysaccharides in human whole blood. Infect Immun. 1995Jan ;63(1) : 253-8.

[0696] Poirier, J.1994. Apolipoprotein E in animal models of CNS injury andAlzheimer' s disease. Trends Neurosci. 17 :525-530.

[0697] Pradhan, D. S. , Nair, C. K. K. and Sreenivasan, A. 1973. Radiationinjury repair and sensitization of microorganisms. Proc. Ind. Natl. Sci. Acad. 39B :516-530.

[0698] Redlich CA, Gao X, Rockwell S, Kelley M, Elias JA.1996. IL-11enhances survival and decreases TNF production after radiation-inducedthoracic injury. J Immunol. 1996Aug15 ;157(4) :1705-10.

[0699] Rao, et al.,2001, Neuroprotection by memantine, a non-competitiveNMDA receptor antagonist after traumatic brain injury in rats, Brain Res. 911(1) : 96-100.

[0700] Regner, et al.,2001, Neurochemical characterization of traumatic braininjury in humans, J.Neurotrauma18(8) :783-92.

[0701] Rensen, et al.,1997, Human recombinant apolipoprotein E redirectslipopolysaccharide from Kupffer cells to liver parenchymal cells in rats invivo, J. Clin. Invest. 99(10) :2438-45.

[0702] Richard, J. P. , Melikov, K. , Vives, E. , Ramos, C. , Verbeure, B. , Gait, M. J. , Chernomordik, L. V. and Lebleu, B(2003). Cell-penetrating peptides. Areevaluation of the mechanism of cellular uptake. The Journal of BiologicalChemistry278 : 585-590.

[0703] Rousselle, C. , Clair, P. , Lefauconnier, J. , Kaczorek, M. , Scherrmann, J. , and Tamsamani, J(2000)New advances in the transport of doxorubicinthrough the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy. Molecular Pharmacology57 :679-686.

[0704] Rousselle, C. , Smirnova, M. , Clair, P. , Lefauconnier, J. , Chavanieu, A. , Calas, B. , Scherrmann, J. , and Tamsamani, J. (2001)Enhanced delivery ofdoxorubicin into the brain via a peptide-vector-mediated strategy :saturationkinetics and specificity. The Journal of Pharmacology and ExperimentalTherapeutics296 : 124-131.

- [0705] Rousselle, C., Clair, P., Smirnova, M., Kolesnikov, Y., Pasternak, G. W., Gac-Breton, S., Rees, A. R., Scherrmann, J., and Tamsamani, J. (2003) Improved brain uptake and pharmacological activity of dalargin using a peptide-vector-mediated strategy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 36 :371-376.
- [0706] Rogers, et al., 1993, *Neurology* 43 :1609.
- [0707] Rothwell and Relton, 1993, *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 5 :178.
- [0708] Roselaar SE, Daugherty A. 1998. Apolipoprotein E-deficient mice have impaired innate immune responses to *Listeria monocytogenes* in vivo. *J Lipid Res.* 1998 Sep ;39(9) :1740-3.
- [0709] Roses, AD and AM Saunders. 1998. ApoE, Alzheimer's disease, and recovery from brain stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 826 :200-212.
- [0710] Schmidt S, Barcellos LF, DeSombre K, Rimmler JB, Lincoln RR, Bucher P, Saunders AM, Lai E, Martin ER, Vance JM, Oksenberg JR, Hauser SL, Pericak-Vance MA, Haines JL ; Multiple Sclerosis Genetics Group, 2002, Association of polymorphisms in the apolipoprotein E region with susceptibility to and progression of multiple sclerosis, *Am J Hum Genet.* 70(3) :708-17.
- [0711] Sheng, et al., 1999a, Characterization of a recovery global ischemia model in the mouse, *J. Neurosci. Methods* 88 :103-109.
- [0712] Sheng, et al., 1999a, Characterization of a recovery global ischemia model in the mouse, *J. Neurosci. Methods* 88 :103-109.
- [0713] Sheng, et al., 1998, Apolipoprotein E isoform-specific differences in outcome from focal ischemia in transgenic mice, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18 :361-366.
- [0714] Sheng, et al., 1999b, Apolipoprotein E deficiency worsens outcome from global cerebral ischemia in the mouse, *Stroke* 30 :1118-1124.
- [0715] Scholes, G. 1983. Radiation effects on DNA : The Silvanus Thomson memorial lecture April 1982. *Br. J. Radiol.* 56 :221-231.
- [0716] Schuchter LM, Glick J : The Current status of WR-2721 (Amifostine) : A chemotherapy and radiation therapy protector. 1993. *Biologic Ther Cancer* 3:1-10. \
- [0717] Skelton, R. W., Bukach, C. M., Laurance, H. E., Thomas, K. G., and Jacobs, J. W. (2000). Humans with traumatic brain injuries show place-learning deficits in computer-generated virtual space. *J Clin Exp Neuropsychol*, 22 :157-75.
- [0718] Slioter, et al., 1997, Apolipoprotein E epsilon4 and the risk of dementia with stroke. A population-based investigation, *J. Am. Med. Assoc.* 277 :818-821.
- [0719] Smith, et al., 1995, A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse : cognitive and histopathologic effects, *J. Neurotrauma* 12 :169-78. Smith, et al., 1997, An Orally Bioavailable Pyrrolinone Inhibitor of

HIV-1Protease :Computational Analysis and X-Ray Structure ofthe EnzymeComplex, J. Med. Chem. 40,2440-2444.

[0720] Smith, et al.,1998, Design, Synthesis, and Evaluation of a Pyrrolinone-peptide Hybrid Ligand for the Class II MHC Protein HLA-DR1, J. Am. Chem. Soc. 120,12704-12705.

[0721] Smith, et al.,2000, Design, Synthesis and Evaluation of a Pyrrolinone-Based Matrix Metalloprotease Inhibitor, Org. Lett., 2 :3809-3812.

[0722] Strittmatter, et al.,1994, Isoform-specific interactions of apolipoproteinE with microtubule-associated protein tau:implications for Alzheimer disease, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91,11183-11186.

[0723] Strittmatter, et al.,1993, Apolipoprotein E :high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type4 allele in late-onset familialAlzheimer disease, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90 :1977-1981.

[0724] Schiefer, et al.,2002, Riluzole prolongs survival time and alters nuclearinclusion formation in a transgenic mouse model of Huntington ' s disease, Mov. Diso rd. 17(4) :748-57.

[0725] Schiefermeier, et al.,2000, Apolipoprotein E polymorphism. Survivaland neurological outcome after cardiopulmonary resuscitation, Stroke21 :2068-2071.

[0726] Schwarze, S. R. , Ho, A. , Vocero-Akbani, A. , and Dowdy, S. F. (1999) In vivo transduction :delivery of a biologically active protein into the mouse. Science285 :1569-1572.

[0727] Schwarze, S. R. , and Dowdy, S. F. (2000) In vivo protein transduction : intracellular delivery of biologically active proteins, compounds, and DNA. Trends Pharmacol Sci21 :45-48.

[0728] Seliger, et al.,1997, Neurology (Abstract) page A213.

[0729] Sheng, et al.,1994, J. Neurochem. 63 :1872.

[0730] Sheng et al.,1999, Apolipoprotein E deficiency worsens outcome from global ischemia in the mouse, Stroke30 :1118-1123.

[0731] Sheng, H. D. T. Laskowitz, E. Bennett, D. E. Schmechel, R. D. Bart, A. M. Saunders, R. D. Pearlstein, A. D. Roses and D. S. Warner. 1998. Apolipoprotein E isoform-specific differences in outcome from focalischemia in transgenic mice. J. Cereb. Blood Flow Metab. 18 :361-366.

[0732] Sheng H, DT Laskowitz, RD Pearlstein, and DS Warner. 1999a. Characterization of a recovery global ischemia model in the mouse. JNeurosci Methods88 :103-109.

[0733] Sheng, H. D. T. Laskowitz, G. B. Mackensen, M. Kudo, R. D. Pearlstein, and D. S. Warner. 1999b. Apolipoprotein E deficiency worsens outcome from global cerebral ischemia in the mouse. Stroke30 :1118-1124.

[0734] Shukitt-Hale, B, G Casadesus, JJ McEwen, BM Rabin, and JA Joseph. 2000.

Spatial learning and memory deficits induced by exposure to iron-56-particle radiation. *Radiat. Res.* 154 :28-33.

[0735] Sorbi, et al., 1996, *Neurology* 46 :A307 (abstract).

[0736] Sorbi, et al., 1995, ApoE as a prognostic factor for post-traumatic coma. *Nat. Med.* 1 :852.

[0737] Soyka, et al., 2000, NMDA receptor challenge with dextromethorphan-subjective response, neuroendocrinological findings and possible clinical implications, *J. Neural. Transm.* 107 (6) :701-14.

[0738] Stoll and Mueller, 1986, *Neurosci. Lett.* 72 :233.

[0739] Stoll, et al., 1989, *Glia* 2 :170.

[0740] Strittmatter, et al., 1993, Apolipoprotein-e-epsilon-4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 :1977-81.

[0741] Suzuki, T., Futaki, S., Niwa, M., Tanaka, S., Uedo, K., and Sugiura, Y. (2002). Possible existence of common internalization mechanisms among Arginine-rich peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 277 :2437-2443.

[0742] Takahashi, S., X-Z Sun, Y Kubota, N Takai, and K Nojima. 2002. Histological and elemental changes in rat brain after local irradiation with carbon ion beams. *J. Radiat. Res.* 43 :143-152.

[0743] Takeshima, K., Chikushi, A., Lee, K., Yonehara, S., and Matsuzaki, K. (2003) Translocation of analogues of the antimicrobial peptides magainin and buforin across human cell membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 278 :1310-1315.

[0744] Tardiff, et al., 1997, Preliminary report of a genetic basis for cognitive decline after cardiac operations. The Neurologic Outcome Research Group of the Duke Heart Center, *Ann. Thorac. Surg.* 64 :715-20.

[0745] Teasdale, et al., 1999, Challenges in translating the efficacy of neuroprotective agents in experimental models into knowledge of clinical benefits in head injured patients. *Acta Neurochir (Wien)* 73 :Suppl :111-6.

[0746] Teasdale, et al., 1997, Association of apolipoprotein E polymorphism with outcome after head injury, *Lancet* 350 :1069-1071.

[0747] Tesseur, et al., 2000, Expression of human apolipoprotein E4 in neurons causes hyperphosphorylation of protein tau in the brains of transgenic mice, *Am. J. Pathol.* 156 (3) :951-64.

[0748] Thorén, P. E. G., Persson, D., Isakson, P., Goksör, M., Önfelt, A., and Nordén, B. (2003) Uptake of analogs of penetratin, Tat (48-60) and oligoarginine in live cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307 :100-107.

[0749] Tolar, et al., 1999, Truncated apolipoprotein E (ApoE) causes increased intracellular calcium and may mediate apoE neurotoxicity. *J. Neurosci.* 19 :7100-7110.

- [0750] Tolar, et al., 1997, Neurotoxicity of the 22 kDa thrombin-cleavage fragment of apolipoprotein E and related synthetic peptides is receptor-mediated. *J. Neurosci.* 17 :5678-5686.
- [0751] Tung, C., and Weissleder, R. (2002) Arginine containing peptides as delivery vectors. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 :281-294.
- [0752] Van Lenten BJ, Fogelman AM, Haberland ME, Edwards PA. 1986. The role of lipoproteins and receptor-mediated endocytosis in the transport of bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986 Apr ;83(8) :2704-8.
- [0753] Van Oosten M, Rensen PC, Van Amersfoort ES, Van Eck M, Van Dam AM, Breve JJ, Vogel T, Panet A, Van Berkel TJ, Kuiper J. 2001. Apolipoprotein E protects against bacterial lipopolysaccharide-induced lethality. A new therapeutic approach to treat gram-negative sepsis. *J Biol Chem.* 2001 Mar 23 ;276(12) :8820-4.
- [0754] Veber, et al., 2002, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, *J. Med. Chem.* 45, 2615.
- [0755] Verdine, et al., 2000, An all hydrocarbon cross-linking system for enhancing the helicity and metabolic stability of peptides, *J. Amer. Chem. Soc.*, 122, 5891.
- [0756] Vijayalakshmi, et al., 2000, Comparison of Helix stabilizing effects of α , α -Dialkyl Glycines with Linear and Cycloalkyl Side Chains, *Biopolymers*, 53(1), 84.
- [0757] Vivès, E., Richard, J.-P., Rispal, C., and Lebleu, B. (2003) TAT peptide internalization: seeking the mechanism of entry. *Current Protein and Peptide Science* 4 :125-132.
- [0758] Van Oosten, et al., 2001, Apolipoprotein E protects against bacterial lipopolysaccharide-induced lethality, *J. Biol. Chem.* 276(12) :8820-24.
- [0759] Veinbergs, et al., 2001, Role of apolipoprotein E receptors in regulating the differential in vivo neurotrophic effects of apolipoprotein E, *Exp. Neurol.* 170(1) :15-2.
- [0760] Von Bergen, et al., 2002, Effect of intrathecal non-NMDA EAA receptor antagonist LY293558 in rats: a new class of drugs for spinal anesthesia, *Anesthesiology* 97(1) :177-82.
- [0761] Wellons, et al., 2000, A comparison of strain-related susceptibility in two murine recovery models of global cerebral ischemia, *Brain Res.* 868 :14-21.
- [0762] Waage, et al., 1987, *J. Exp. Med.* 169 :333-38.
- [0763] Wang, et al., 1998, Apolipoprotein E (ApoE) peptide regulates tau phosphorylation via two different signaling pathways. *J. Neurosci. Res.* 51 : 658-665.
- [0764] Wang, et al., 1997, Rapid elevation of neuronal cytoplasmic calcium by apolipoprotein E peptide. *J. Cell. Physiol.* 173 :73-83.

- [0765] Watanabe, et al., 1997, Int. J. Cardiol. 54 :551.
- [0766] Weisbarger et al., 1983, The receptor-binding domain of human apolipoprotein E: monoclonal antibody inhibition of binding, J. Biol. Chem. 258 :12348-54.
- [0767] Weisgraber, et al., 1982, Abnormal lipoprotein receptor-binding activity of the human E apoprotein due to cysteine-arginine interchange at a single site. J. Biol. Chem. 257 :2518-2521.
- [0768] Weisgraber, 1994, Apolipoprotein E: Structure-function relationships. Adv. Protein Chem. 45 :249-302.
- [0769] Wells MT, Gaffin SL, Jordaan JP. 1987. Radiation induced gram-negative bacteremia and endotoxemia in rabbits: modification by anti-lipopolysaccharide hyperimmune equine plasma. Life Sci. 1987 Jun 29; 40(26) :2543-50.
- [0770] Wells MT, Gaffin SL, Wessels BC, Brock-Utne JG, Jordaan JP, van den Ende J. 1990. Anti-LPS antibodies reduce endotoxemia in whole body ⁶⁰Co irradiated primates: a preliminary report. Aviat Space Environ Med. 1990 Sep; 61(9) :802-6.
- [0771] Wender, P. A., Mitchell, D. J., Pattabiraman, K., Pelkey, E. T., Steinman, L., and Rothbard, J. B. (2000) The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. Proc. Natl. Acad. Sci. 97 :13003-13008.
- [0772] Wettereau, et al., 1988, Human apolipoprotein E3 in aqueous solution. Evidence for two structural domains, J. Biol. Chem. 263 :6240-48.
- [0773] Wiemann B, Van GY, Danilenko DM, Yan Q, Matheson C, Munyakazi L, Ogenstad S, Starnes CO, 1998, Combined treatment of acute EAE in Lewis rats with TNF-binding protein and interleukin-1 receptor antagonist, Exp Neurol. 149(2) :455-63.
- [0774] Wisniewski, et al., 1992, Apolipoprotein E: a pathological chaperone in patients with cerebral and systemic amyloid. Neurosci. Lett. 135 :235-238.
- [0775] Wright, L. R., Rothbard, J. B. and Wender, P. A. (2003) Guanidinium rich peptide transporters and drug delivery. Current Protein and Peptide Science 4 :105-124.
- [0776] Xu and Luo, 2001, Relationship between changes of N-methyl-D-aspartate receptor activity and brain edema after brain injury in rats, Chin. J. Traumatol. 4(3) :135-8.
- [0777] Ye, D., Xu, D., Singer, A. U., and Juliano, R. L. (2002) Evaluation of strategies for the intracellular delivery of proteins. Pharmaceutical Research 19 :1302-1309.
- [0778] Zanotti, et al., 2002, Cytokine modulation in sepsis and septic shock, Expert Opin. Investig. Drugs 11(8) :1061-75.
- [0779] 尽管在前面已经结合实施例详细描述了本发明, 但应该理解可以作出各种不同的改动而不脱离本发明的精神。因此, 本发明的范围是如所附权利要求书所定义的范围。本申请中引用的所有专利、专利申请和出版物, 在此均通过引用将它们的全部内容并入本申请。



图 1 COG133 肽的螺旋轮视图；自螺旋轴线上方向下看，前景为羧基端。

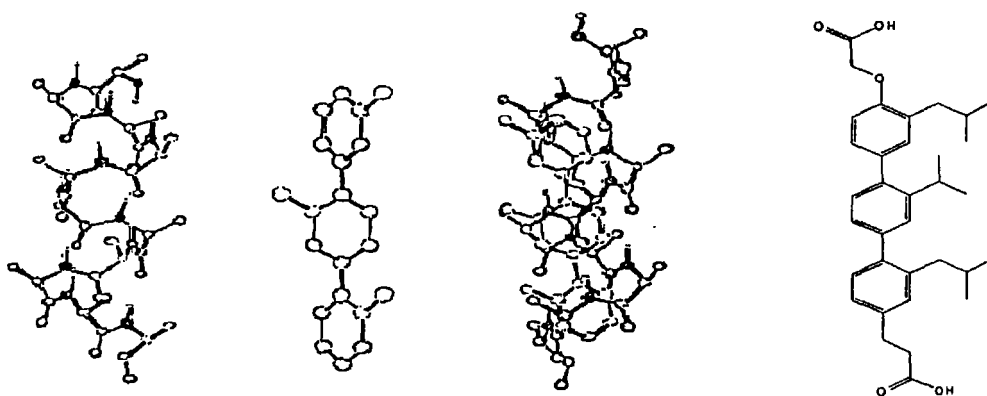


图 2 示例性模拟物如 tris 官能化的三联苯模拟沿 α 螺旋的一个面展现出的表面官能团。

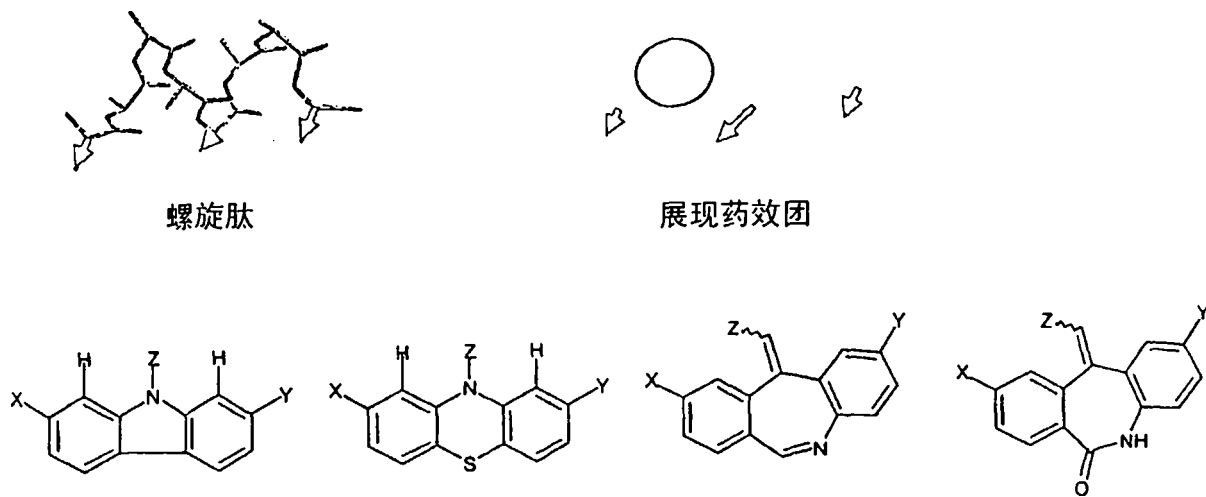


图 3 作为螺旋模拟物的三环支架

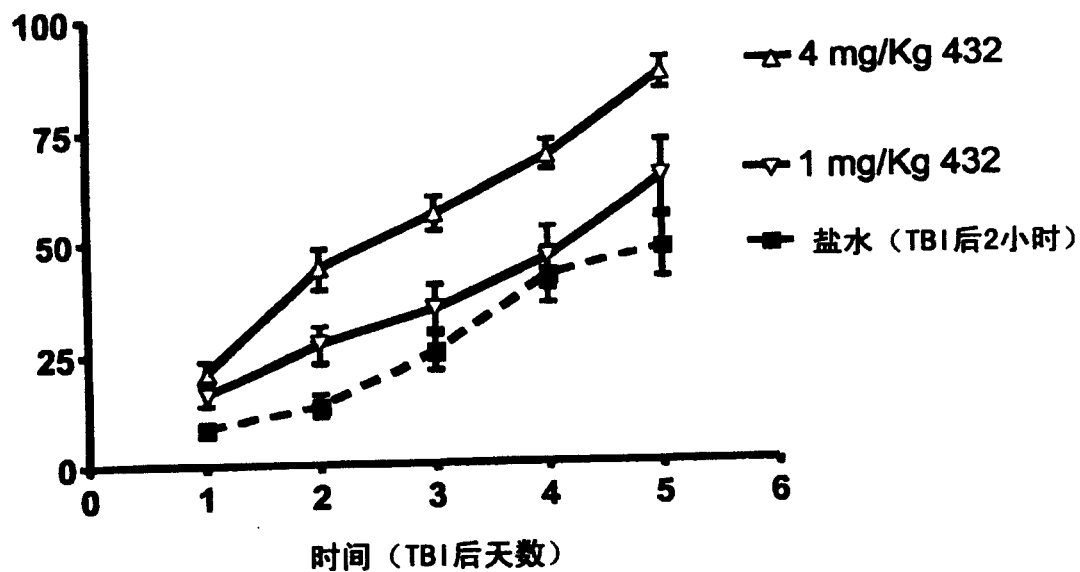


图4以4mg/ml和1mg/ml的肽432(AcASHLRKLAibKRLL(SEQ ID NO. 6))以及盐水处理时,创伤性脑损伤(TBI)之后小鼠的旋转棒表现随时间的改善。y-轴是旋转棒上的表现的百分数。TBI之前的旋转棒表现基线水平是100%。

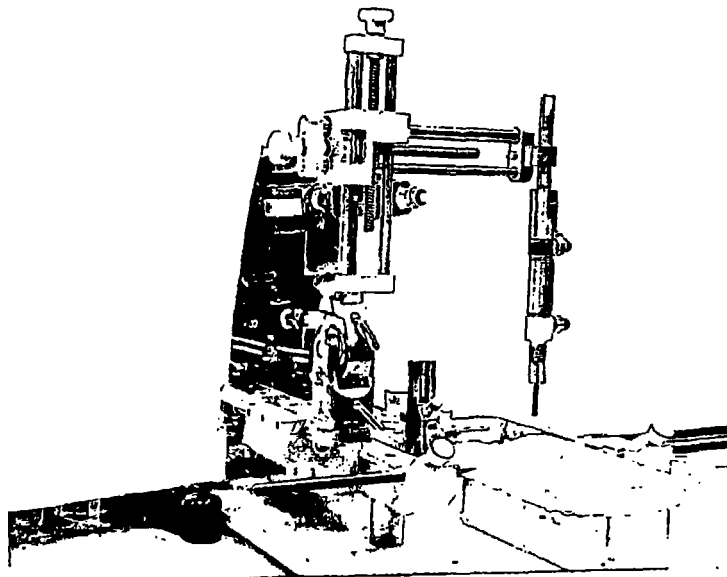
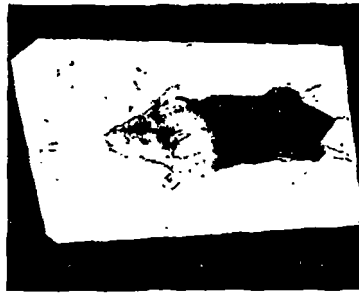
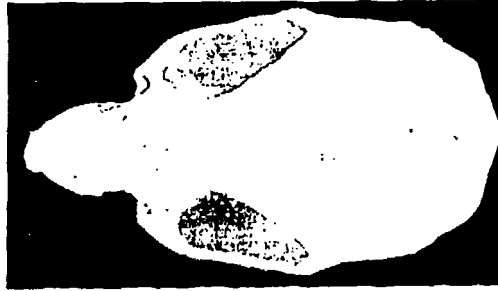


图5 使用立体定位导引式气动冲击装置实施闭合性头部损伤。

(A)



(B)



(C)



图6 给小鼠插管并置于丙烯酸模具上 (A)。切开头皮, 将 3mm 金属圆片放置于自尾部至前囟 (B), 然后气动冲击 (C)。

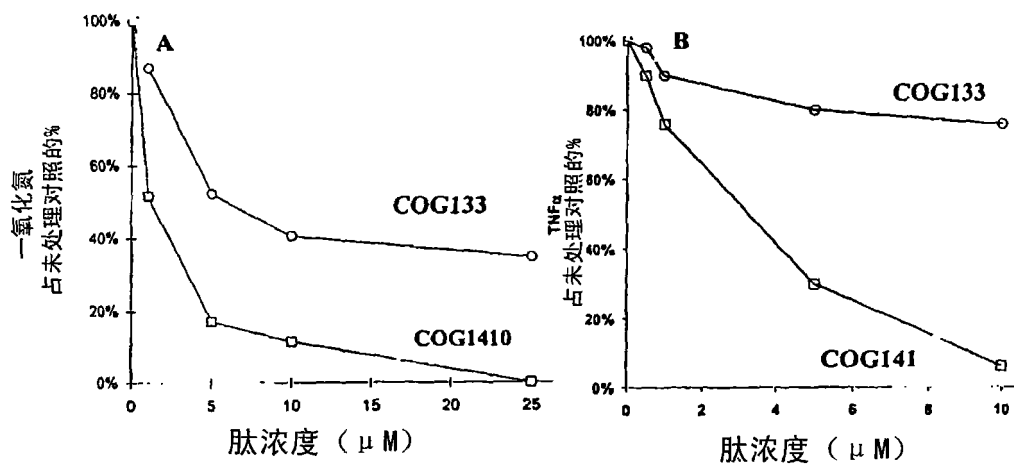


图7 以 LPS 处理的 BV2 小胶质细胞中一氧化氮 (A) 和 TNF α (B) 的释放被抑制。COG1410 相对于 COG133 显示出明显更强的效力。

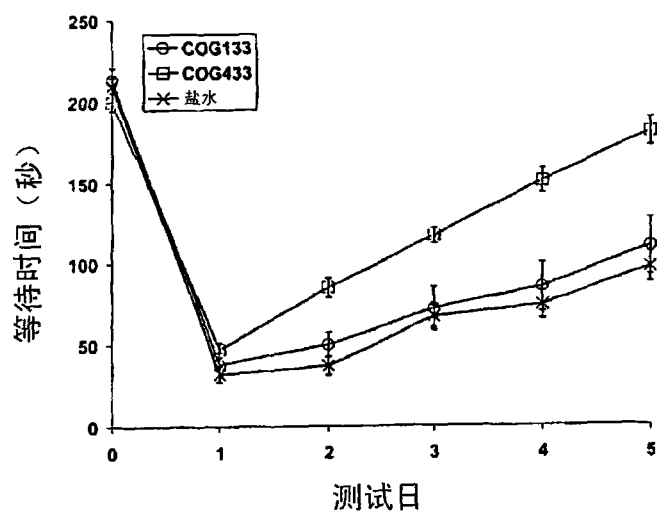


图 8 旋转棒测试表明,与盐水相比,在 TBI 之后 120 分钟施用 COG1410 具有神经保护作用, $p < 0.05$; COG133 与盐水相比没有显著差异, $p > 0.05$ 。

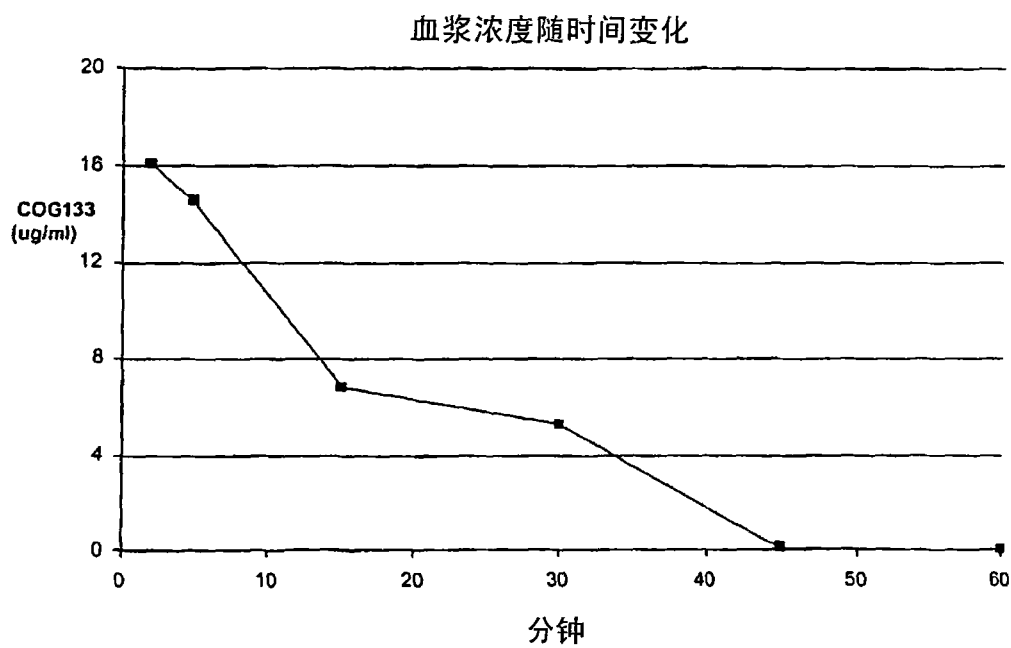


图 9

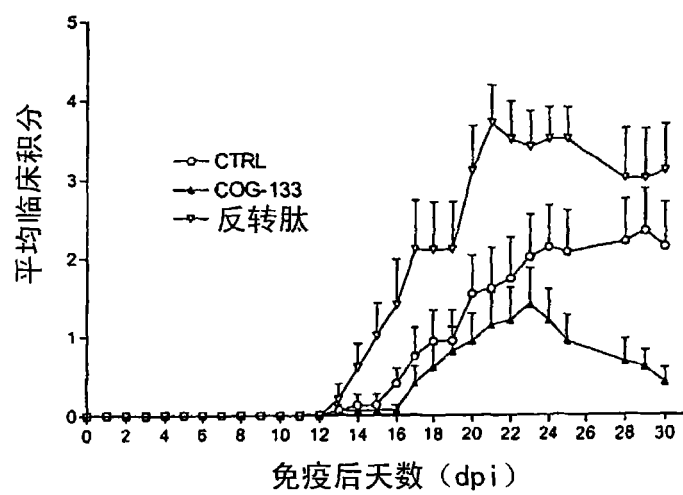


图 10

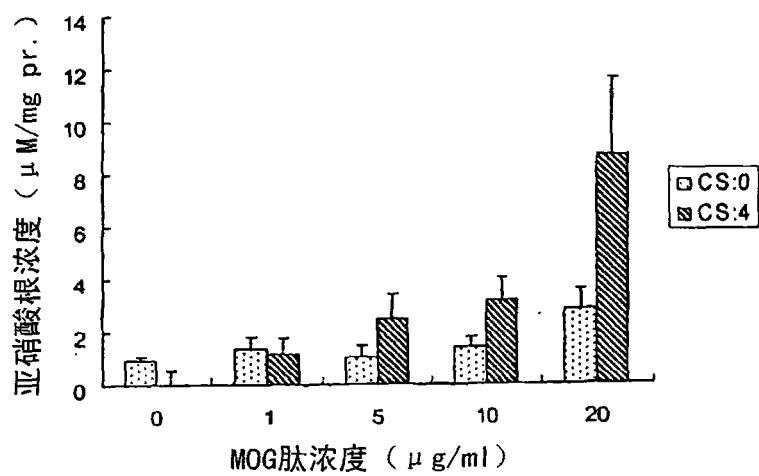
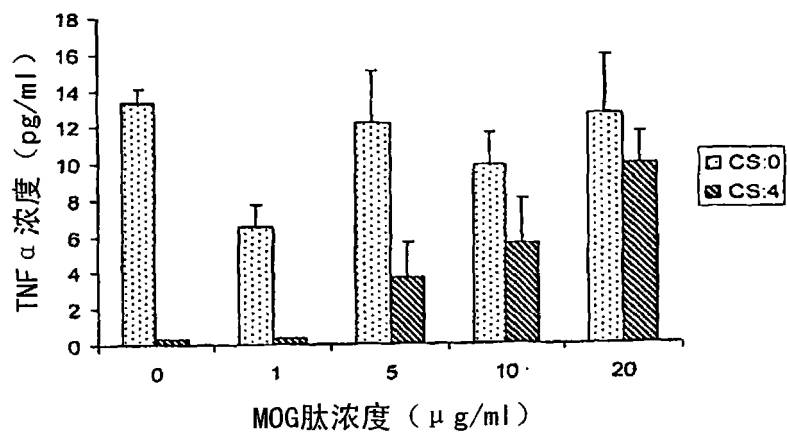
A**B**

图 11

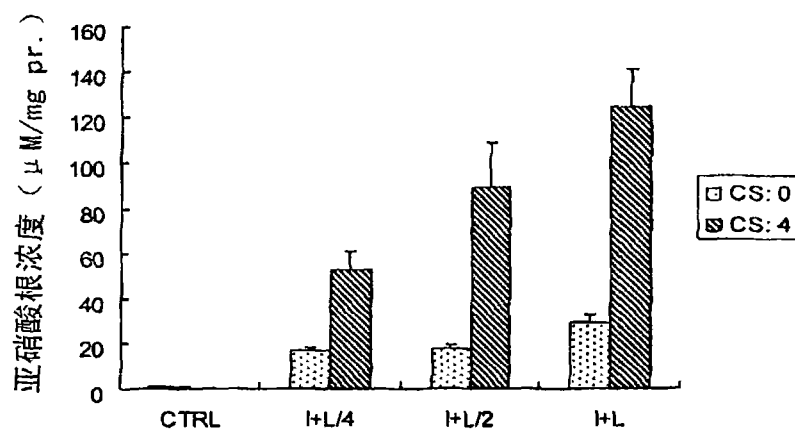
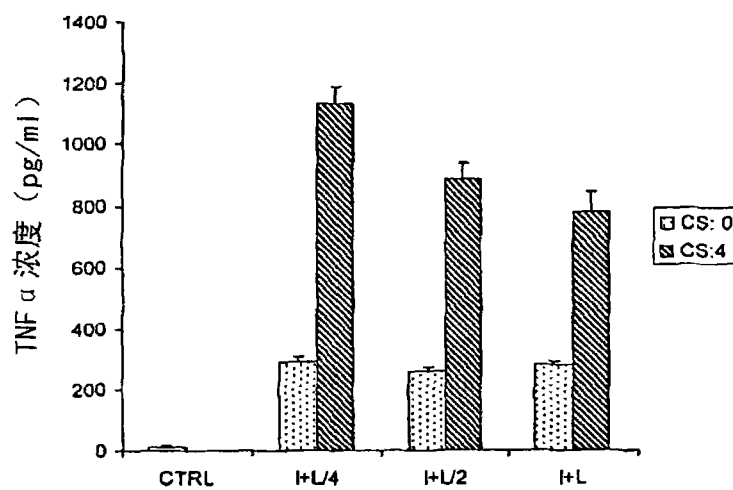
C**D**

图 11 续

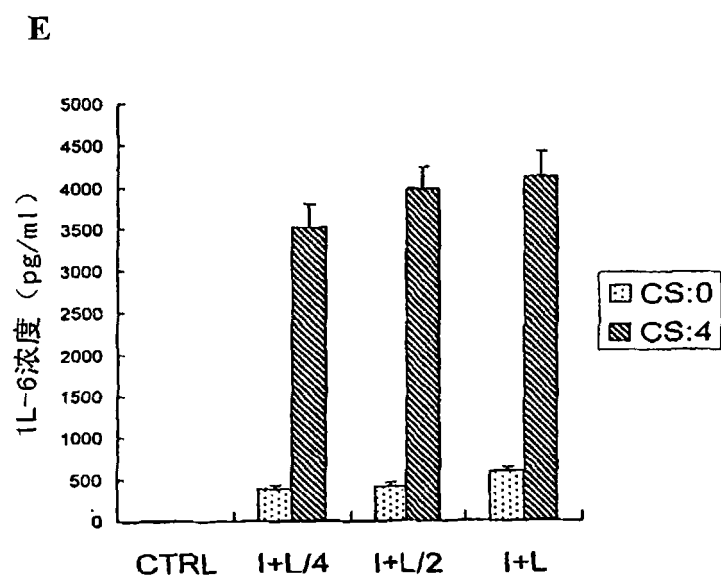
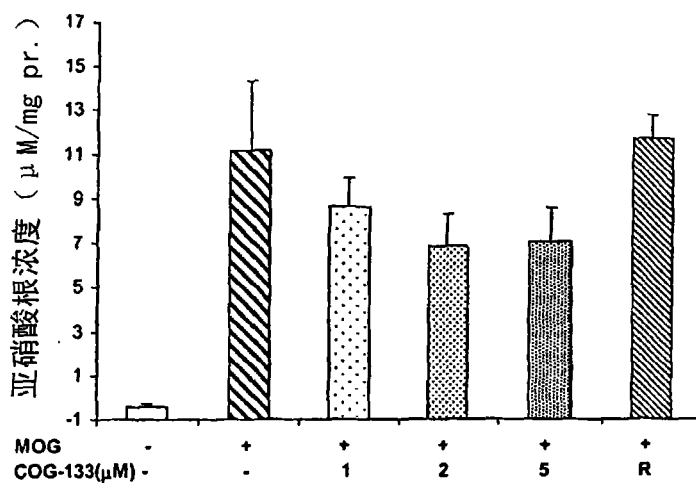


图 11 续

A



B

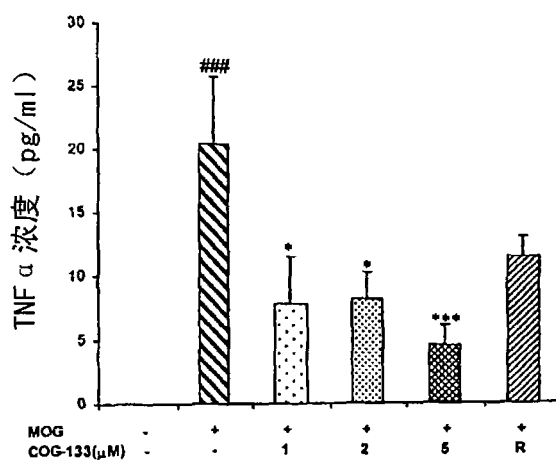
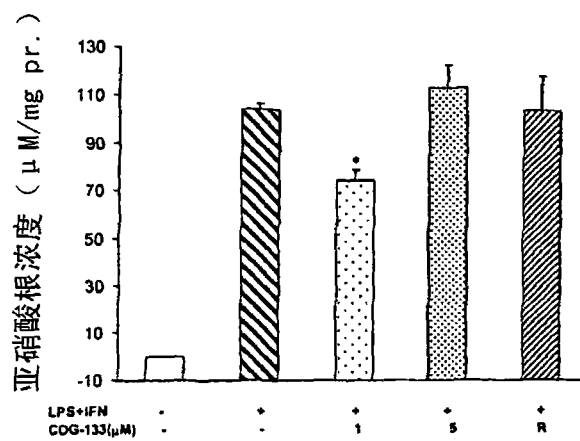


图 12

A



B

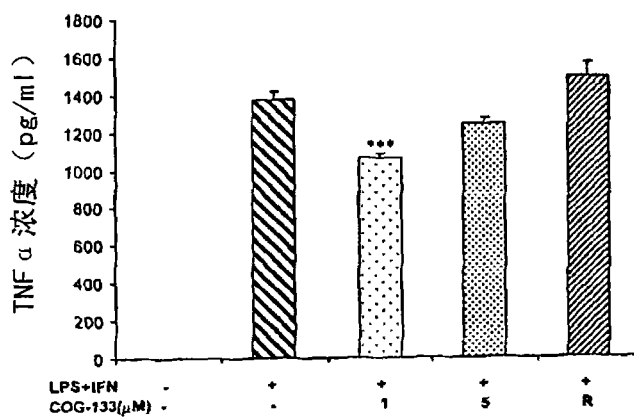


图13

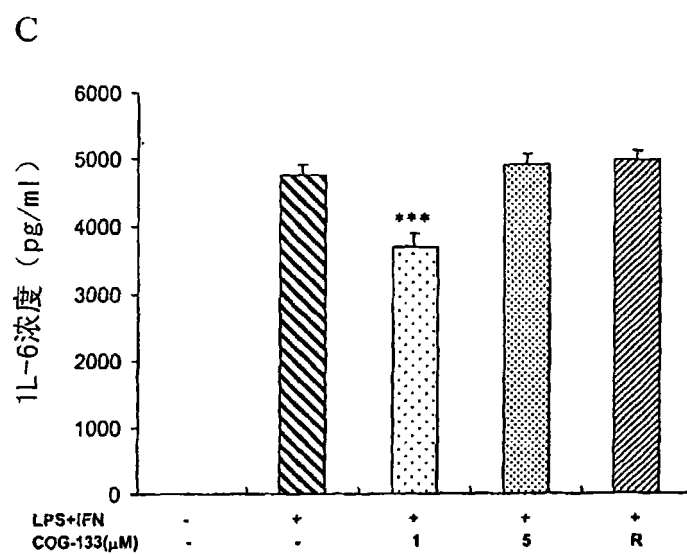
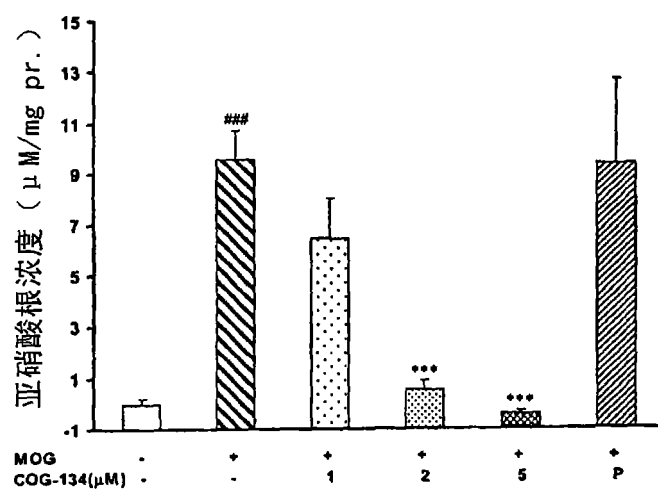


图 13 续

A



B

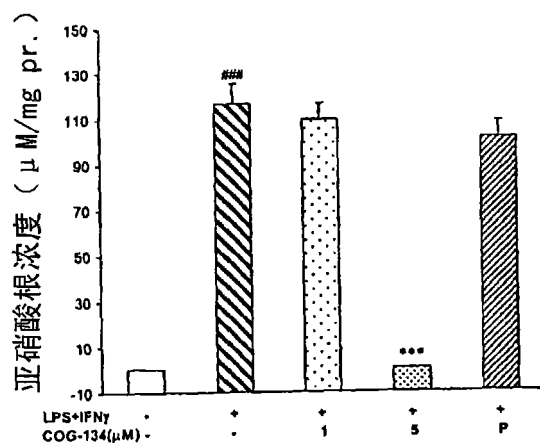
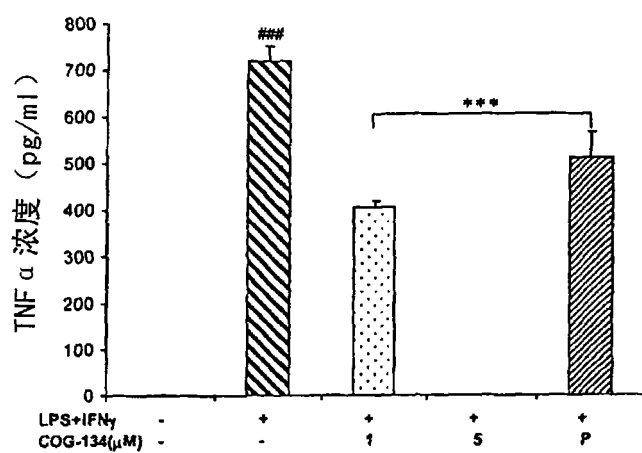


图 14

C



D

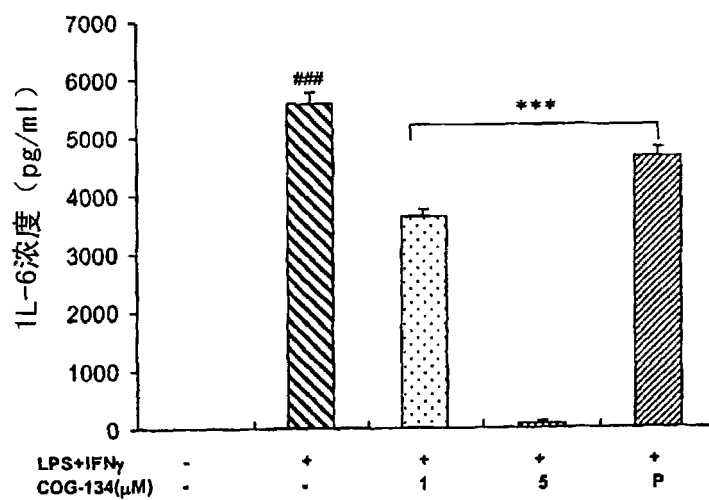


图 14 续

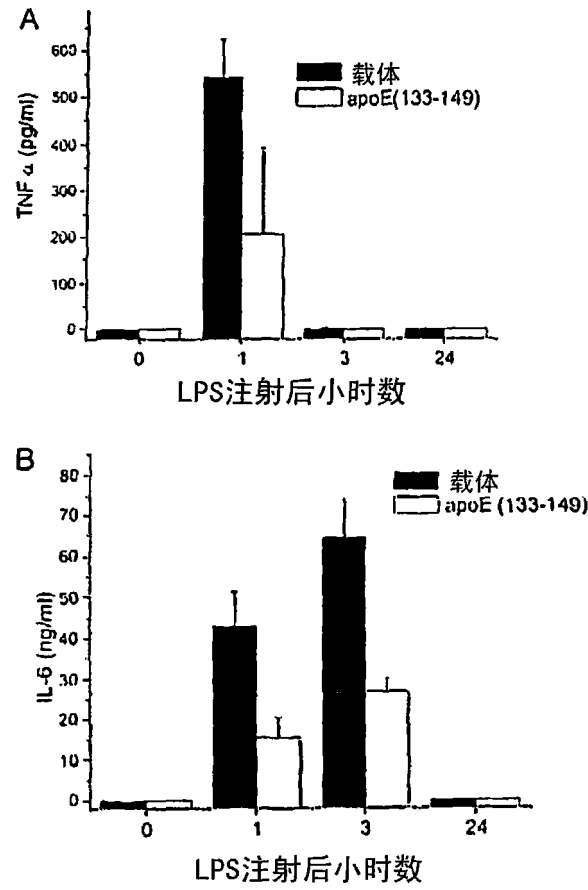


图 15

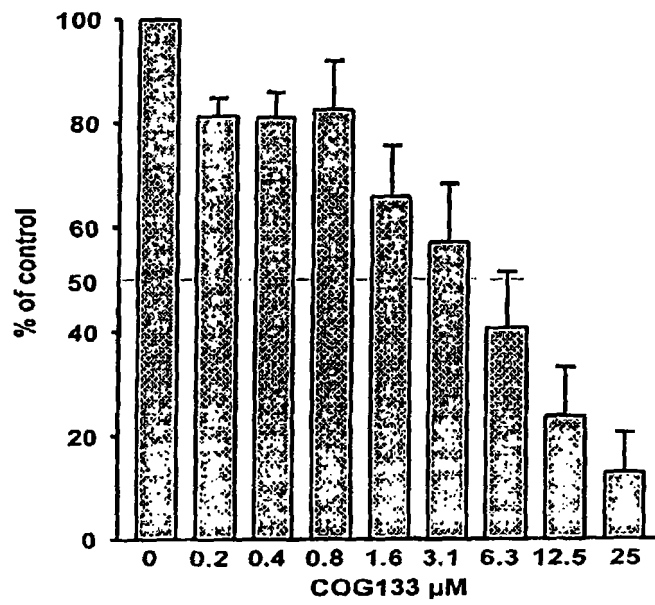


图 16 COG133 以剂量依赖性方式抑制 LPS 刺激的 BV2 小胶质细胞释放亚硝酸根。50%抑制出现于 3 微摩尔。

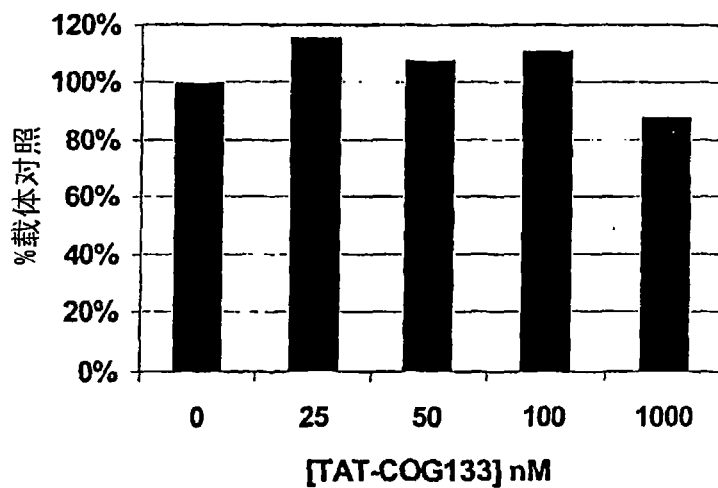


图 17 TAT-COG133 在 nM 范围内不抑制 LPS 刺激的 BV2 小胶质细胞释放亚硝酸根。更高的浓度产生毒性。

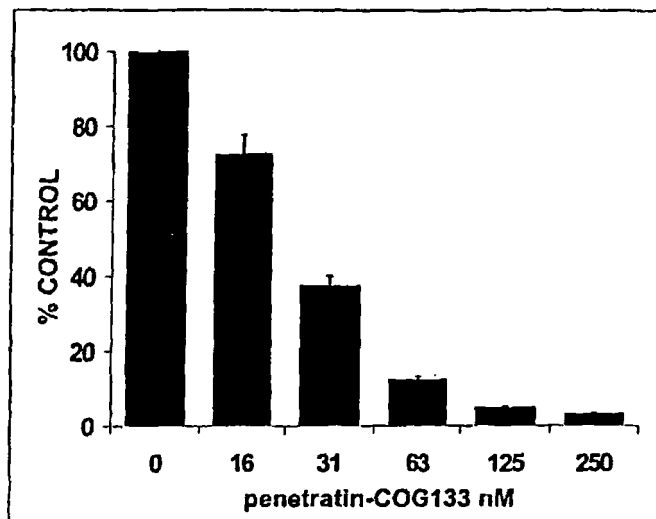


图 18 穿透蛋白 -COG133 以剂量依赖性方式抑制 LPS 刺激的 BV2 细胞释放亚硝酸根。50%抑制出现于 30nM。

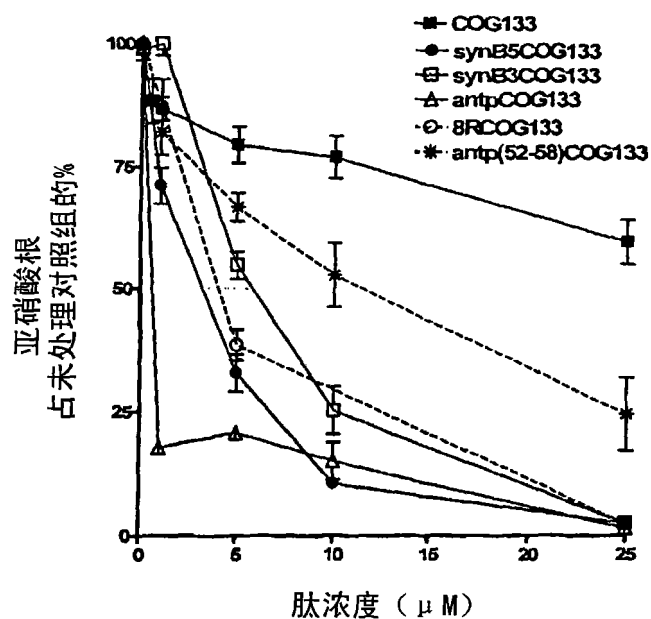


图 19 PTDCOG133 缀合物抑制 LPS 介导的一氧化氮产生。

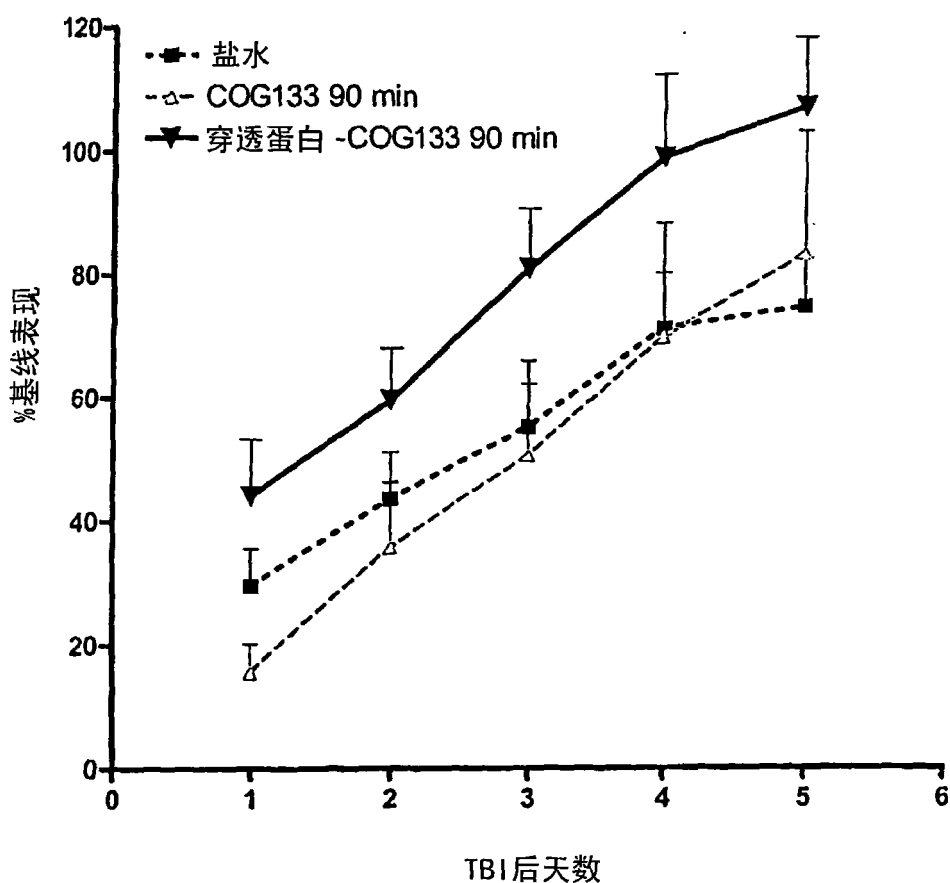


图 20 TBI 之后 90 分钟以 COG133 处理的小鼠与盐水处理的小鼠没有差别。但 TBI 之后 90 分钟以穿透蛋白 -COG133 处理的小鼠与盐水处理的小鼠相比等待时间明显增加。

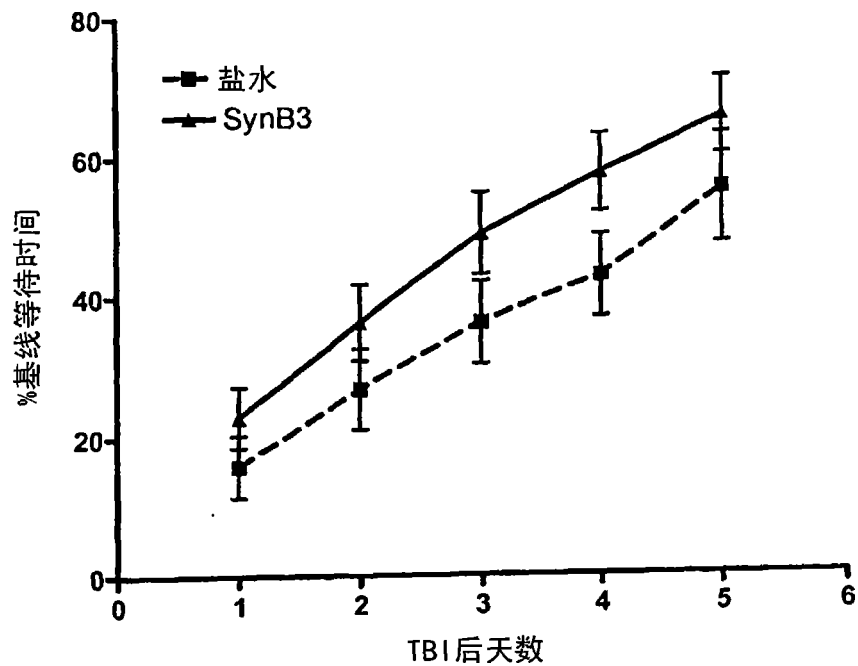


图 21 TBI 之后 2 小时以 synB3-COG133 处理的小鼠在旋转棒任务中的表现明显好于盐水处理的小鼠, $p < 0.01$ 。TBI 之后 2 小时以 COG133 处理无效 (数据未显示)。

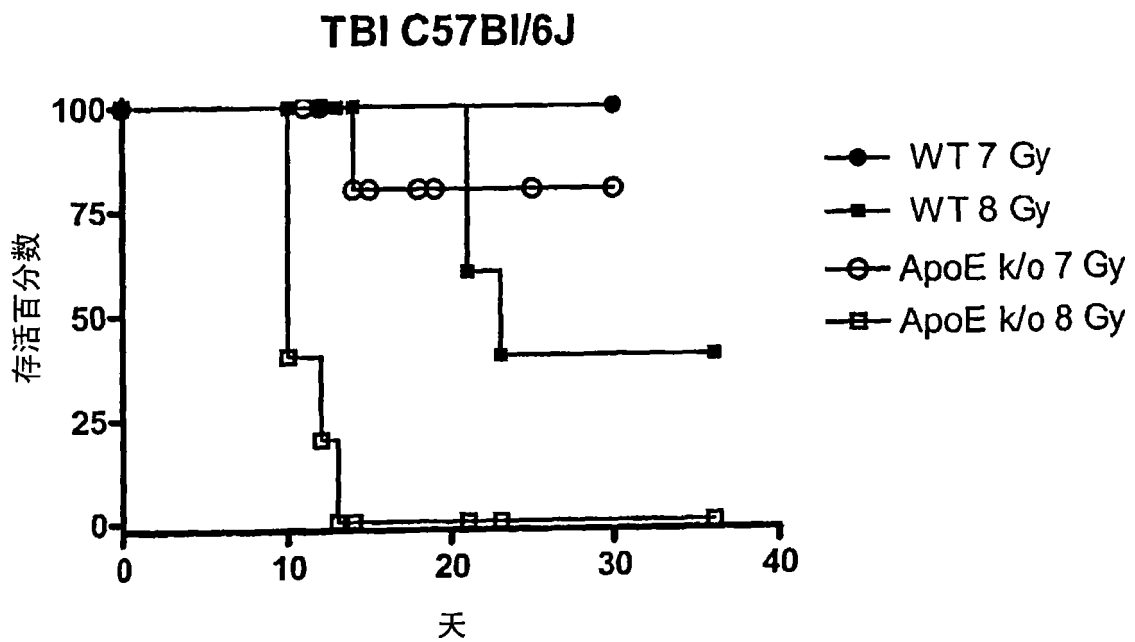


图 22

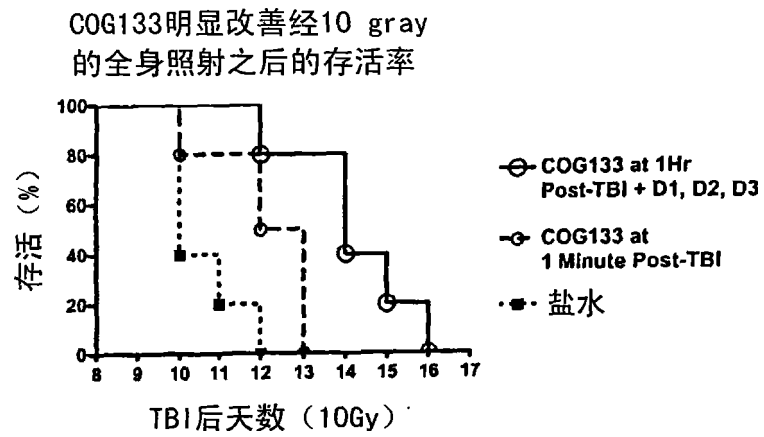


图 23

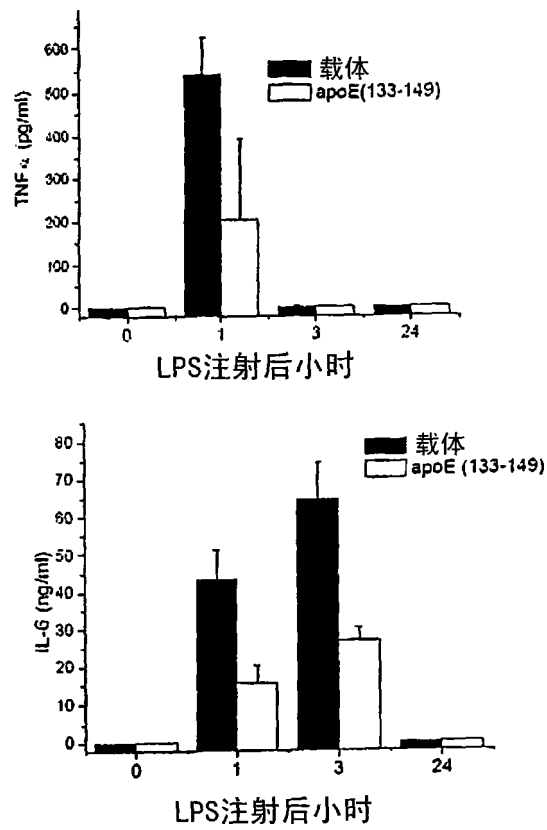


图 24

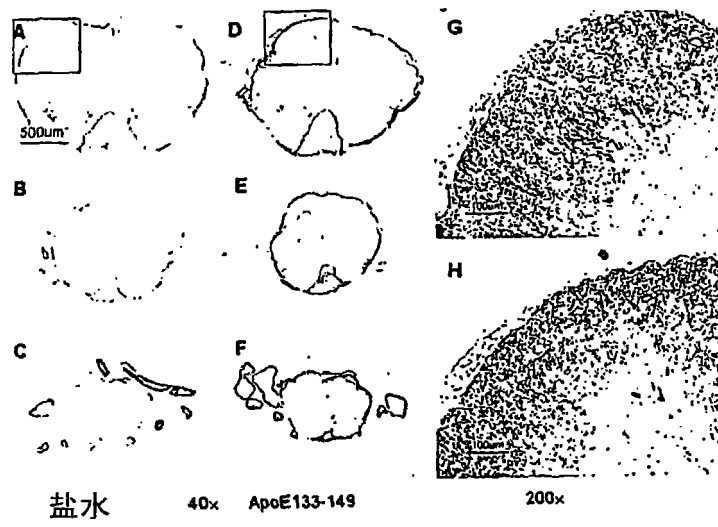


图 25

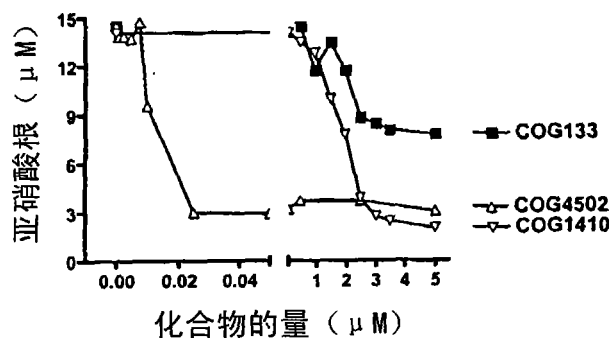


图 26

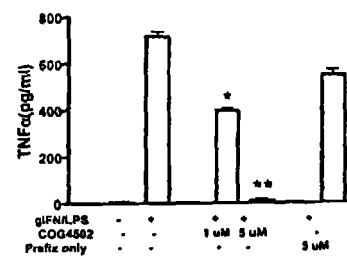
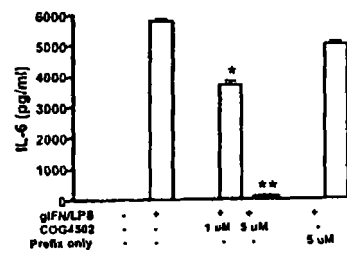


图 27



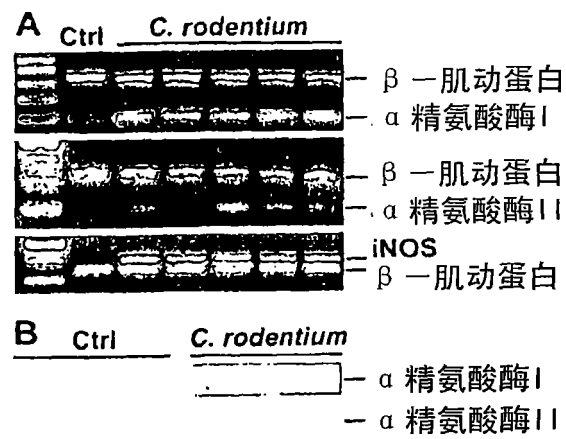


图 28

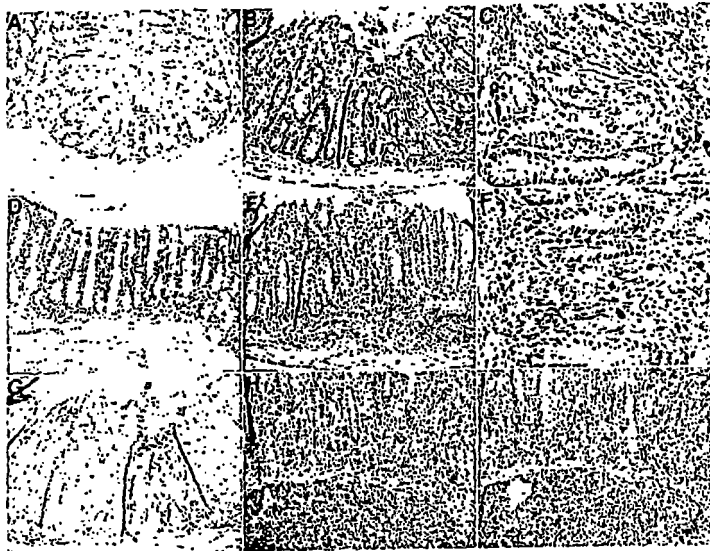


图 29

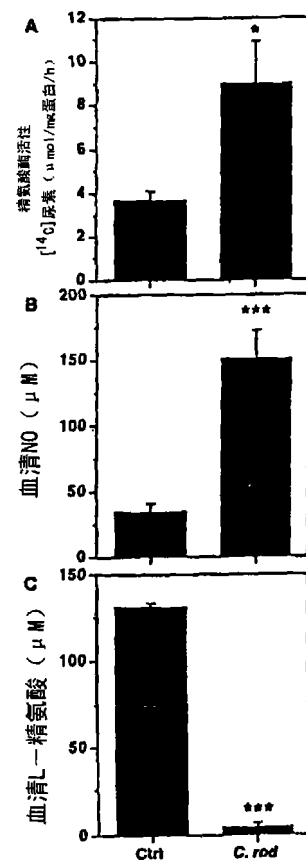


图 30

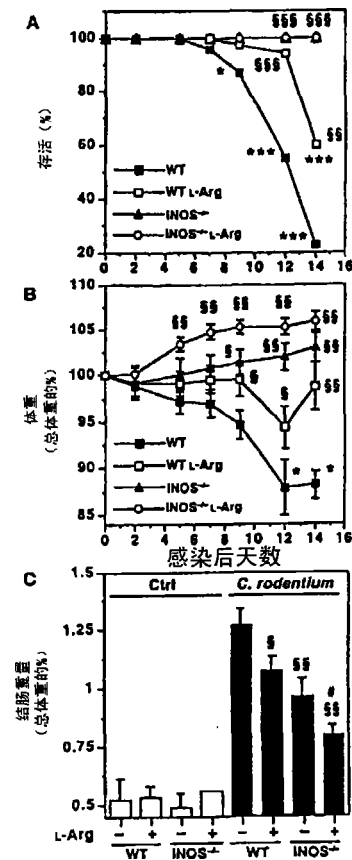


图 31

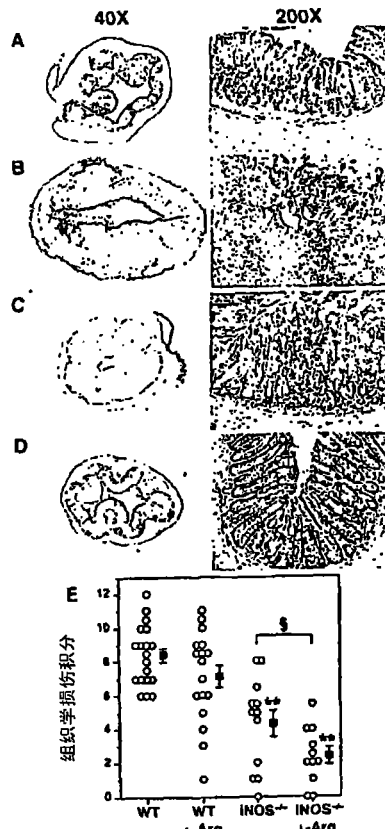


图 32

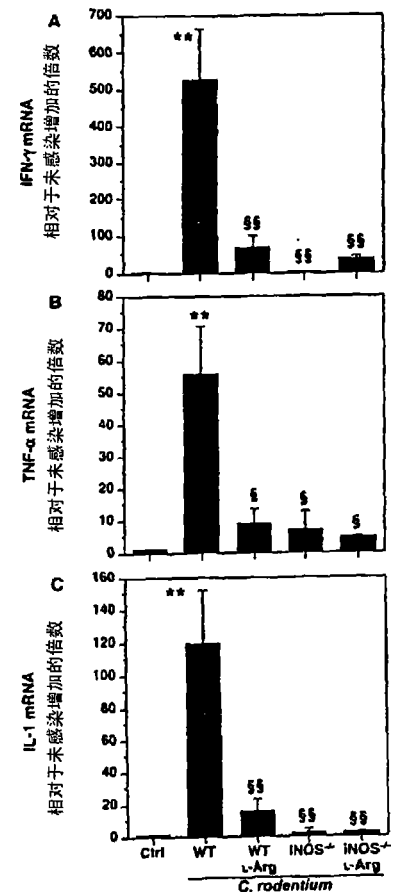


图 33

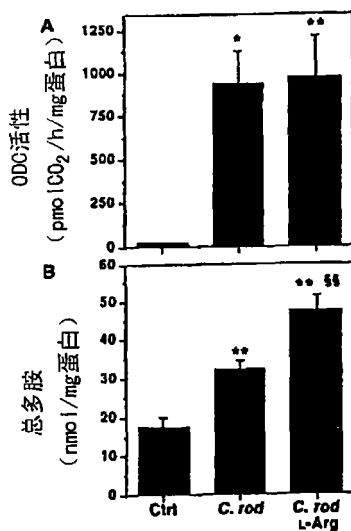


图 34

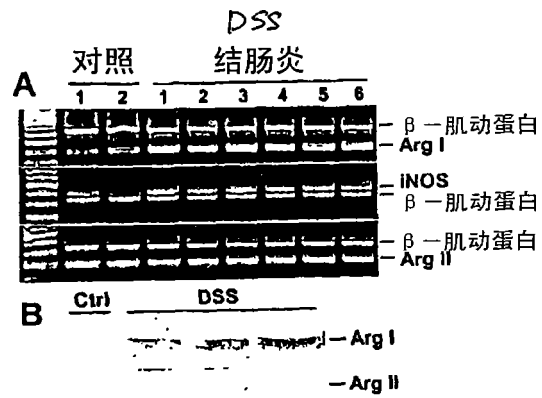


图 35

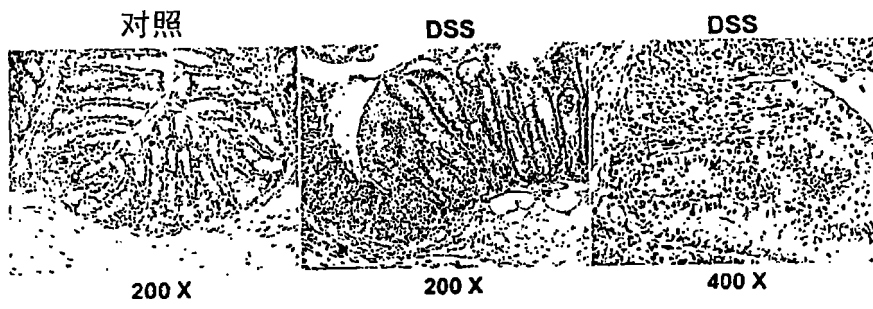


图 36

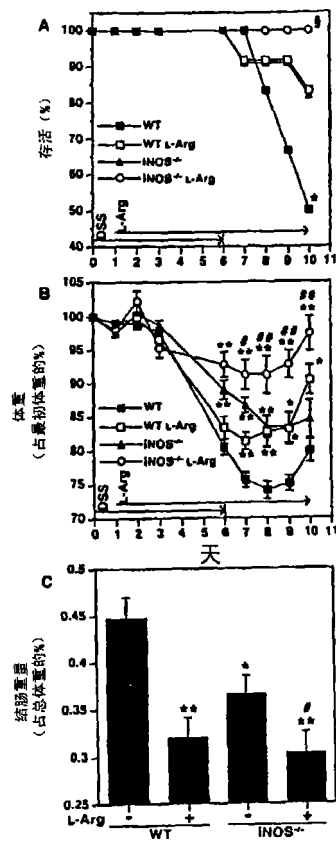


图 37

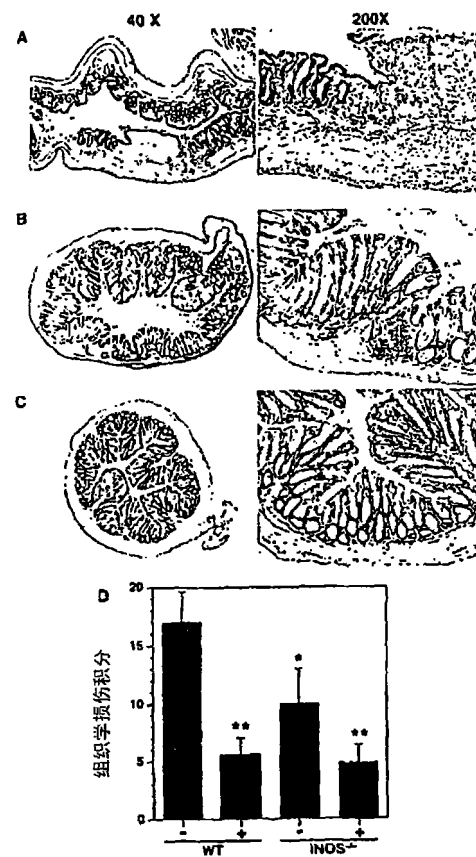


图 38

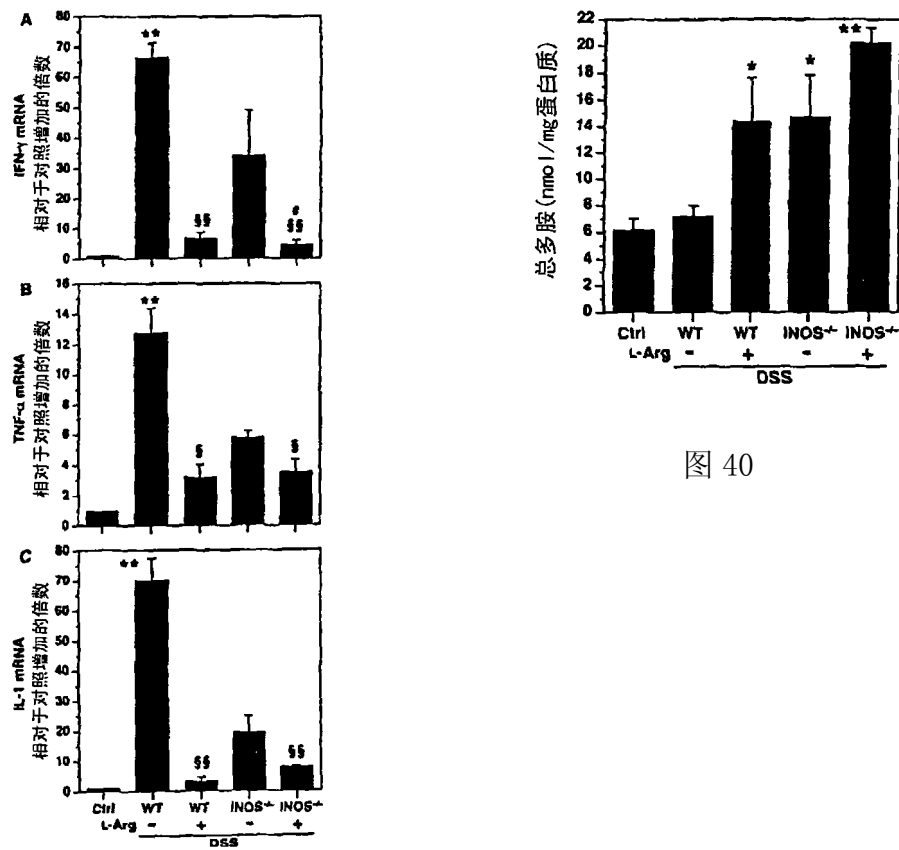


图 40

图 39

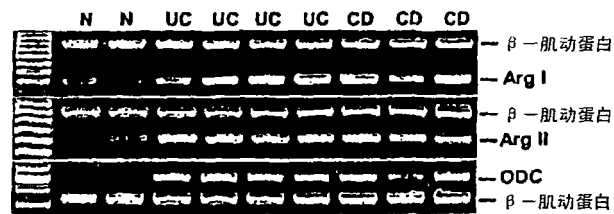


图 41

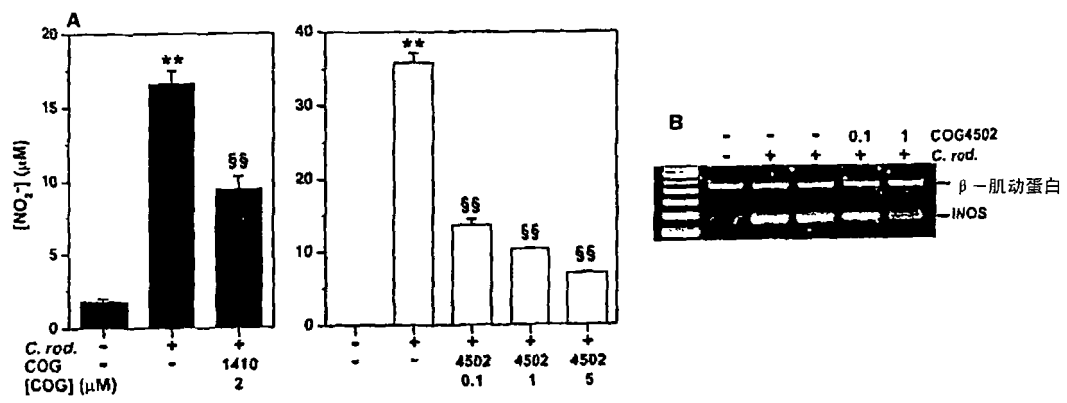


图 42