

First in Class

阿尔茨海默病(AD)治疗新药
蛋白磷酸酶激动剂 CRM-2102

The Protein Phosphatase Agonist CRM-2102, A New Drug for The
Treatment of Alzheimer's Disease

PCT/CN2022/117987



<http://www.chinrilymedica.cn>

南京中瑞药业有限公司

Nanjing ChinRily Medica Co. LTD

2023 年 11 月

蛋白磷酸酶激动剂 CRM-2102

一、项目概况

1、项目简介

阿尔茨海默病（AD）的发生和发展与患者脑部蛋白磷酸酶（PP）功能下降密切相关。PP 活性降低，蛋白不能去磷酸化失活，突触后膜持续接受前膜释放的神经递质，信号通道不能及时关闭，因而导致神经传导延迟和记忆宕机。

CRM-2102 作为蛋白磷酸酶 2A 激动剂（PP2A Agonist），对活性受损的 PP2A 有很强的兴奋作用，通过提高 PP2A 生物活性，及时催化蛋白去磷酸化以维持正常的神经活动。另外，CRM-2102 通过提高 PP2A 活性促进 Tau 蛋白（P-tau）去磷酸化，从而避免因 Tau 蛋白过度磷酸化所介导的神经毒性和神经细胞死亡。因此，PP2A 激动剂 CRM-2102 的开发研究可能为 AD 患者的康复带来希望。

2、项目知识产权

专利申请号：PCT/CN2022/117987。

二、立项依据

2.1、AD 治疗药物国内外市场现状

AD 是一种由中枢神经系统慢性退行性病变引起的，以记忆、认知、语言和行为障碍为特征的神经系统疾病。

由上海瑞金医院牵头发布的《中国阿尔茨海默病报告 2021》统计显示，2019 年中国现存的 AD 及其他痴呆患病人数为 13243950 例。患病率、死亡率略高于全球平均水平，且在女性中的相关数据高于男性，其中女性患病率（1188.9/10 万）、死亡率（30.8/10 万）分别高于男性的患病率（669.3/10

万)、死亡率(14.6/10万)。

关于 AD 发病机制至今尚不清楚,目前临床治疗 AD 使用较多的有两类药物,胆碱酯酶抑制剂如多奈哌齐和 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂如美金刚。多奈哌齐是通过抑制乙酰胆碱酯酶作用,维持或提高乙酰胆碱的一定水平,从而达到增加胆碱能神经信号的作用,以改善患者的认知功能;美金刚则通过抑制 NMDA 受体活性而降低兴奋性氨基酸对神经毒性作用,改善认知功能。但这些药物都只是对症治疗,能够一定程度上改善认知和记忆障碍,但还没有一种药物能够阻止或者延缓 AD 病情的发展进程。

过去近二十年,辉瑞、礼来、罗氏和强生等国际制药巨头累计投入超过六千亿美元致力于 AD 新药开发,已有超过上百个化合物进入临床研究,大多数以失败告终。

2019 年国家药品监督管理局(NMPA)有条件地批准甘露特钠(GV-971)上市。据称 GV-971 是通过重塑肠道菌群平衡,抑制肠道菌群特定代谢产物的异常增多,减少外周及中枢炎症,降低 β 淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)沉积和 Tau 蛋白过度磷酸化,从而改善认知功能障碍。NMPA 要求申请人在上市后继续其药理机制,以及临床安全性和有效性方面进行研究,并按时向 NMPA 提交有关试验数据。

2020 年 FDA 在相隔十八年后,在争议中批准了渤健(Biogen)的单抗药物 Aduhelm 上市,Aduhelm 可以中和 A β ,能有效降低患者大脑中 A β 。FDA 要求渤健继续验证 Aduhelm 的临床有效性。

2.2、本项目技术创新性和可行性分析

2.2.1 AD 患者的病理机制—A β 和 Tau 蛋白是目前公认的 AD 标志物。

兰德大学临床记忆研究所 Oskar Hansson 等人在对比人类以及 AD 动物模型中 A β 病理和脑脊液 Tau (CSF tau) 的研究发现, A β 病理变化可能会诱导人可溶性 Tau 蛋白的释放和过磷酸化及逐年聚积, 使神经元发生不可逆性病变, 主导 AD 病情发展进程。

AD 患者神经元中存在大量神经元纤维缠结 (NFTs), 导致神经元轴突转运障碍。NINCDS-ADRDA 痴呆诊断标准指出, AD 患者脑内 NFTs 的数量与其临床痴呆程度呈正相关; 缠结从内嗅皮质向海马及大脑皮层的传播发展与患者的临床表现相一致。

2.2.2 针对 AD 标志物药物的临床试验结果令人失望

AD 被认为是一种非常复杂的疾病, 大量的临床研究表明, 以锁定 AD 生物标志物 A β 或者 Tau 蛋白为靶标, 在啮齿类动物模型中有效性并没有反映出 AD 患者的临床有效性。近临床发现大脑中有 A β 沉积的老人并没有出现失智症状, 且靶向 A β 药物在临床试验中均没有获得满意疗效, 使得全球各主要制药公司基本上都在靶向 A β 的开发上栽了跟头, 于是研究人员越来越重视靶向 Tau 蛋白药物的研究。然而, 一项发表于《柳叶刀》杂志的试验结果表明 tau 蛋白抑制剂并不能显著的改善轻中度 AD 的认知功能损害。一项采用双样本 Mendelian 随机设计评估 A β 和 Tau 蛋白对 AD 的影响研究, 有 314278 样本来自英国生物样本库 GWAS (AD 家族史), 还有来自国际 AD 基因组学项目 (IGAP) 的临床诊断 AD 的 GWAS 中 21982 样本, 以及 41944 对照例。通过 MR-Egger、加权中值和 MR-PRESSO 等逆方差加权分析, 结果表明 A β 种类、脑脊液总 Tau 蛋白和磷酸化 Tau181 与 AD 无关联。这

项研究有助于解释 A β 和 Tau 蛋白类药物临床试验为何失败了。

2.2.3 AD 患者的临床特征—记忆和认知功能障碍

人记忆和认知功能的实现是以神经递质的释放和离子通道的开闭为基础，伴随着众多的蛋白磷酸化和去磷酸化生化过程，是神经细胞信息传递的重要环节。在三磷酸腺苷（ATP）和蛋白磷酸化酶（蛋白激酶，PK）共同作用下，催化蛋白磷酸化，蛋白发生结构变化变成活性蛋白，被激活蛋白继续激活下游的靶蛋白，进而激活整个级联反应，完成细胞信号传导。在 PP 催化下蛋白去磷酸化失活，则信号通路关闭，为下一次神经细胞活动提供基础。

AD 患者记忆和认知功能障碍与神经细胞信号传导功能受阻密切相关。

2.2.4 AD 患者的病理特征—NFTs

NFTs 形成与 Tau 蛋白过度磷酸化关系密切，Tau 蛋白主要分布在海马和内嗅区的神经元轴突中，以磷酸化依赖性的方式结合并稳定微管、控制轴突向外生长和维持神经元极性。

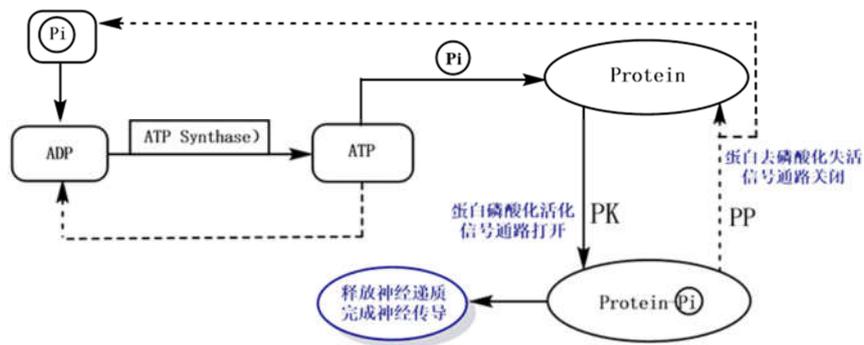
Tau 过度磷酸化使微管解聚，与 A β 寡聚体相互作用形成 NFTs，并沉积在神经元中，造成神经元不可逆损伤。

2.2.5 PP2A 在细胞信号传导中的作用

PP 是真核细胞内主要的丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酯酶，通过催化不同底物去磷酸化，参与细胞内信号转导途径，影响多种疾病的发生过程。

PP2A 作为蛋白磷酸酶家族中十分重要的一员，其催化亚基的催化结构域与该家族其他成员的催化结构域具有非常高的同源性。记忆和认知功能障碍与 PP2A 功能下降密切相关。PP2A 活性降低，蛋白不能去磷酸化失活，突触后膜持续接受前膜释放的神经递质，信号通道不能及时关闭，因而导

致神经传导延迟和记忆宕机。



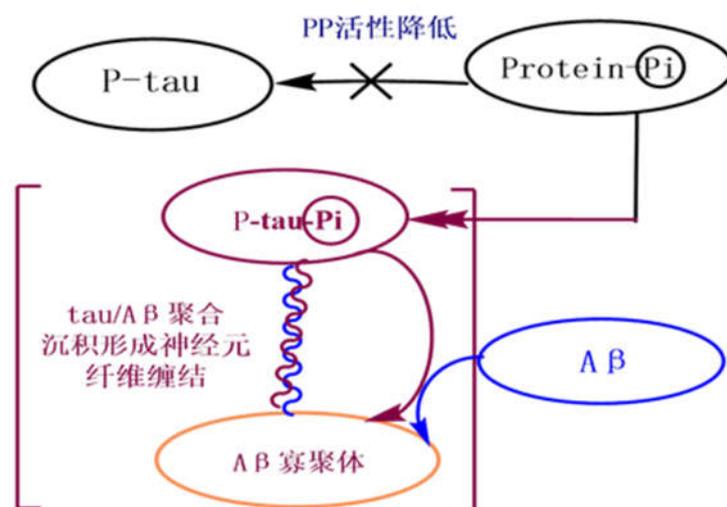
因此，PP2A 活性是保持细胞信号传导和维持正常神经活动的一个关键因素。

2.2.6 PP2A 与 NFTs 形成关系密切

PP2A 活性降低导致 Tau 不能及时去磷酸化，是 Tau 蛋白过磷酸化的直接原因。Tau 过度磷酸化使微管解聚，与 A β 寡聚体相互作用下形成 NFTs。

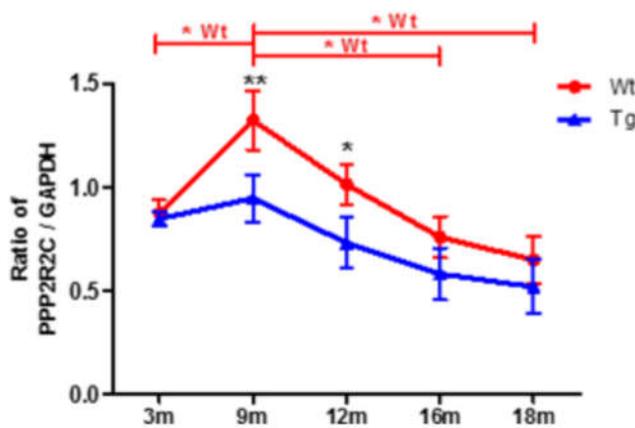
Tau 蛋白主要分布在海马和内嗅区的神经元轴突中，以磷酸化依赖性的方式结合并稳定微管、控制轴突向外生长和维持神经元极性，Tau 过度磷酸化使微管解聚形成 NFTs。

Tau 去磷酸化主要受糖原合酶激酶 3 β (GSK-3 β) 和 PP2A 的调节,PP2A 活性降低是 Tau 蛋白过磷酸化的直接原因。



2.2.7 小鼠衰老过程中的 PP2A 表达水平变化

考察不同月龄 Tg 小鼠和 Wt 小鼠大脑中 PP2A 亚基 PPP2R2C 的表达水平，结果表明，相同月龄的转基因小鼠的 PP2A 表达水平显著低于正常小鼠；随着鼠龄的增长，转基因小鼠和正常小鼠大脑 PP2A 表达水平均逐步下降，表明衰老与 PP2A 表达水平密切相关，随着鼠龄的增加其记忆、认知水平和行为能力也逐步下降。



2.2.8 PP2A 激动剂 CRM-2102

PP2A 激动剂通过提高 PP 生物活性，以维持正常的神经活动。同时也可以避免因 Tau 过度磷酸化所介导 NFTs 引起的神经毒性和神经细胞死亡。

PP2A 作为蛋白磷酸酶家族中十分重要的一员，其催化亚基的催化结构域与该家族其他成员的催化结构域具有非常高的同源性。CRM-2102 作为激动剂对活性受损的 PP2A 有很强的兴奋作用，能够显著的增加 PP2A 生物活性。

CRM-2102 对正常细胞 PP2A 的活性没有影响，不会额外的提高正常细胞 PP2A 活性水平，这就不会产生基于靶位的毒副作用。

因此，PP2A 激动剂的开发研究可以为 AD 患者的康复带来希望！

三、药效学研究

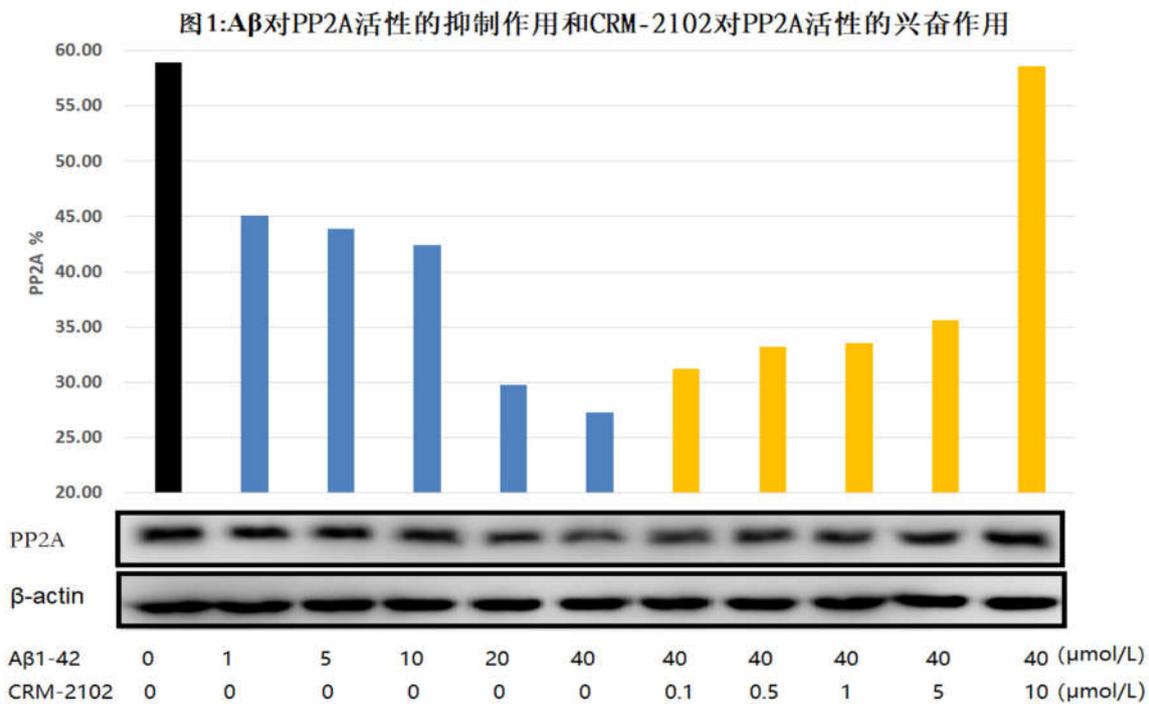
1、A β 对 PC12 细胞 PP2A 的抑制作用和 CRM-2102 对 PC12 细胞 PP2A 的兴奋作用

贴壁培养 PC12 细胞，分别加入 1、5、10、20 和 40 μ mol/L 的 A β ，孵育 24h，提取全蛋白。采用 Western blot 法检测 PP2A 活性。实验结果表明，10 μ mol/L 以下浓度 A β 对 PC12 细胞 PP2A 的表达影响不大；10 μ mol/L 以上浓度 A β 能够显著抑制 PC12 细胞 PP2A 表达水平，10、20 和 40 μ mol/L 三个浓度 A β 呈剂量依赖性抑制 PP2A 活性。

贴壁培养 PC12 细胞，分别加入 0.1、0.5、1、5 和 10 μ mol/L 五个剂量 CRM-2102，孵育 2h，再加入 40 μ mol/L 的 A β ，孵育 24h，提取全蛋白。采用 Western blot 法检测 PP2A 活性。实验结果表明，0.1、0.5、1 和 5 μ mol/L 四个剂量 CRM-2102 能提高由 A β 诱导抑制 PC12 细胞 PP2A 蛋白表达水平，并呈一定量效关系。10 μ mol/L 剂量 CRM-2102 能够极显著提高 PP2A 蛋白表达水平（58.59%），和正常细胞的 PP2A 表达水平（58.95%）几乎没有差别。

表 1：A β 和 CRM-2102 对 PC12 细胞 PP2A 蛋白表达水平的影响

样本	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A β 1-42(μ M)	0	1	5	10	20	40	40	40	40	40	40
CRM-2102(μ M)	0	0	0	0	0	0	0.1	0.5	1	5	10
蛋白 (μ g/ μ L)	3.15	2.89	2.67	2.91	2.78	2.80	3.06	2.60	2.84	2.62	2.73
PP2A	2069	1606.5	1628.1	1498.8	1018.9	914.16	1025.7	1129.7	1180.1	1284.7	2192.1
β -actin	3509.5	3563.5	3711.3	3533.8	3423.5	3354.1	3283.7	3404.8	3521.7	3607.8	3741.2
PP2A(%)	58.95	45.08	43.87	42.41	29.76	27.26	31.24	33.18	33.51	35.61	58.59



2、CRM-2102 对 PC12 细胞 PP2A 的兴奋作用

提取贴壁培养 PC12 细胞的全蛋白，采用 Western blot 法检测 PP2A 活性。实验结果表明 CRM-2102 能够显著增强受冈田酸（OA）抑制的 PP2A 活性，且呈现剂量依赖性提高 PP2A 活性。

表 2：不同浓度的 CRM-2102 对由 OA 诱导 PC12 细胞 PP2A 活性的影响

Group	Control	CRM-2102			
CRM-2102(μmol/L)	0	0	1	5	10
OA(nmol/L)	0	40	40	40	40
PP2A	1330.4	339.39	557.1	688.01	1130.4
β-actin	3616.5	4062.7	3933.6	3838.5	3874.6
PP2A (%)	37	8	14	18	29

图2: CRM-2102对PP2A的兴奋作用

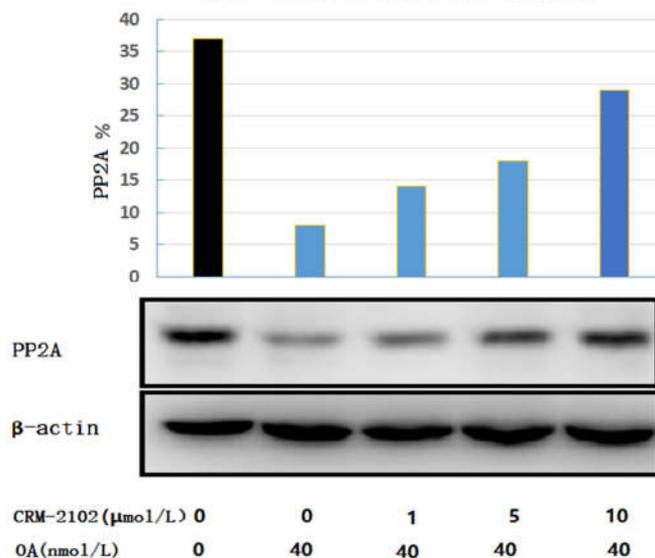
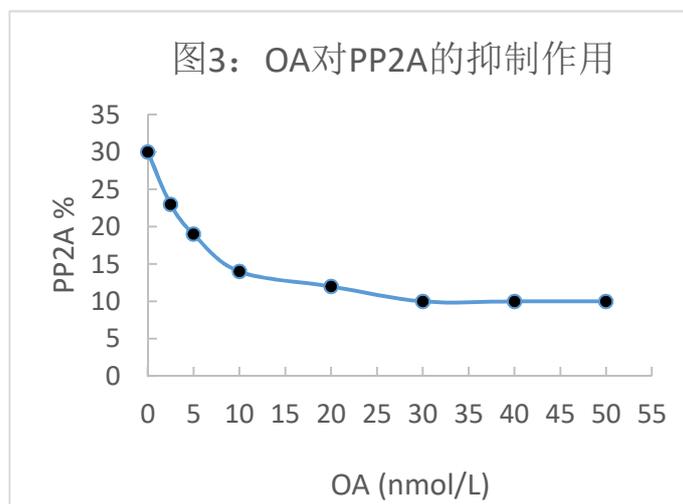


表 3: OA 对 PC12 细胞中 PP2A 活性的影响

OA(nmol/L)	0	2.5	5	10	20	30	40	50
蛋白浓度 (μg/μL)	1.9	1.87	1.94	1.89	1.95	1.89	1.9	1.93
PP2A	1096.1	822.36	711.31	527.03	434.01	393.47	389.63	367.89
β-actin	3655.9	3528.4	3835.6	3848.1	3760.3	3798.7	3768.3	3837.2
PP2A (%)	30	23	19	14	12	10	10	10

图3: OA对PP2A的抑制作用



3、CRM-2102 对人神经母瘤细胞(SH-SY5Y 细胞)tau 蛋白磷酸化的影响

通过含不同浓度 CRM-2102 培养基体外培养 SH-SY5Y 细胞 24 h, 再用 40 nmol/L OA 处理细胞 24 h。采用 Western Blot 测定 SH-SY5Y 细胞 p-tau^{Ser396} 水平。试验结果表明, CRM-2102 能够抑制冈田酸诱导的细胞 tau 蛋白磷酸

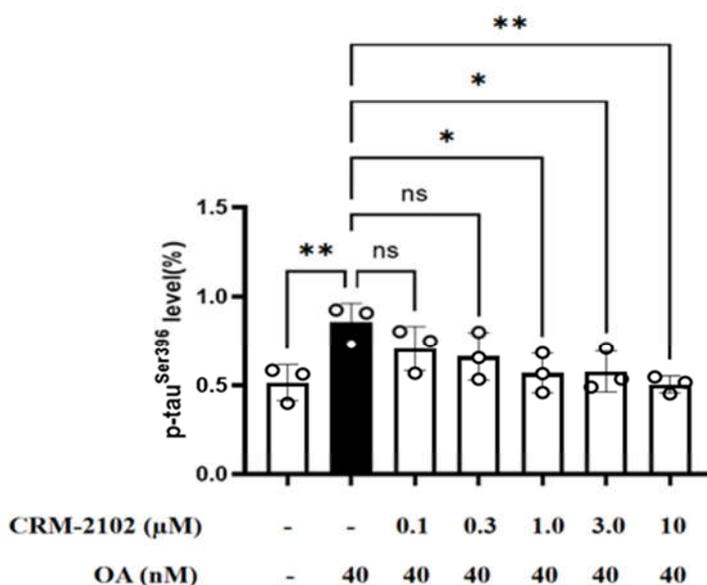
化，1、3 $\mu\text{mol/L}$ CRM-2102 剂量组细胞 p-tau^{Ser396} 水平与 OA 对照组相比有显著统计学差异 ($P<0.05$)；10 $\mu\text{mol/L}$ CRM-2102 剂量组细胞 p-tau^{Ser396} 水平与 OA 对照组相比有极显著统计学差异 ($P<0.01$)。

表4: CRM-2102对OA诱导的SH-SY5Y细胞p-tau^{Ser396}的影响($\bar{x}\pm\text{SEM}$, n=3)

Group		p-tau ^{Ser396} level(%)
正常对照组		0.450±0.021**
OA 模型组(阴性对照)		0.855±0.023
CRM-2102 ($\mu\text{mol/L}$)	0.1	0.761±0.008
	0.3	0.663±0.027
	1.0	0.557±0.013*
	3.0	0.578±0.025*
	10	0.522±0.016**

* $P<0.05$, 与阴性对照组相比; ** $P<0.01$, 与阴性对照组相比。

图4: CRM-2102对OA诱导的SH-SY5Y细胞p-tau^{Ser396}的影响



* $P<0.05$, 与阴性对照组相比; ** $P<0.01$, 与阴性对照组相比 (n=3)。

4、CRM-2102对OA和A β_{1-42} 诱导损伤PC12细胞成活率的影响

采用CCK8细胞增殖检测法，通过含不同浓度CRM-2102体外悬液孵育PC12细胞2h，再加入50nmol/L OA或者40 $\mu\text{mol/L}$ A β_{1-42} 孵育24h。实验

结果显示，CRM-2102 能够显著提高 OA 或者 $A\beta_{1-42}$ 诱导损伤的 PC12 细胞成活率，细胞成活率均呈现剂量依赖性的提高。

表 5: CRM-2102 对由 OA 诱导损伤模型 PC12 细胞成活率的影响

Group		Mean±SD	Survival rate
Negative control		1.326±0.021	
OA(50nmol/L)		0.669±0.025	50.45%
CRM-2102 ($\mu\text{mol/L}$)	10	1.04±0.017*	78.43%
	5	0.967±0.018*	72.93%
	1	0.787±0.028*	59.35%
	0.5	0.676±0.016	50.98%

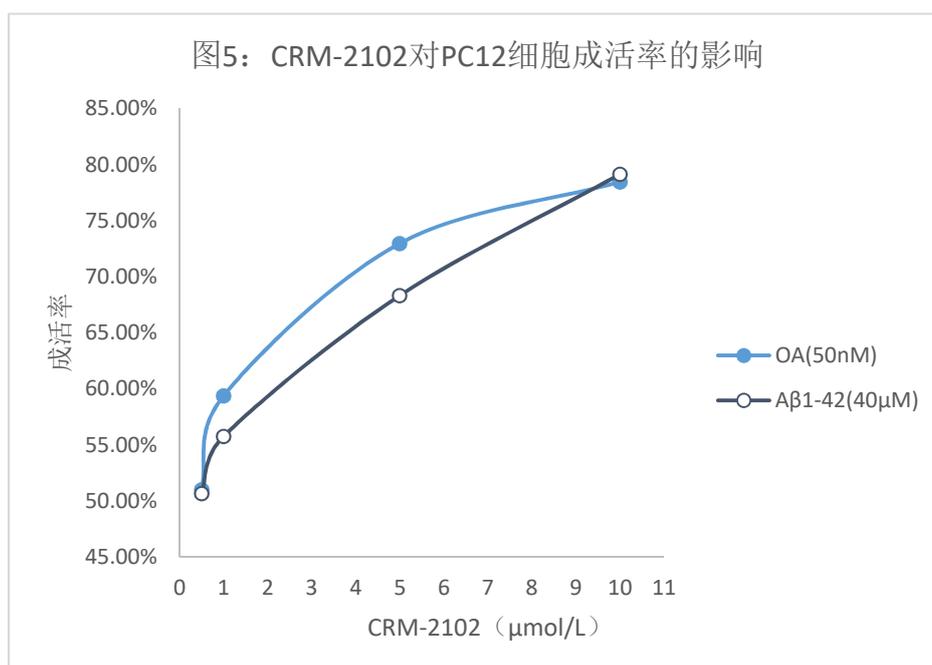
与 OA 相比: * $P < 0.01$

表 6: CRM-2102 对 $A\beta_{1-42}$ 诱导损伤模型 PC12 细胞成活率的影响

Group		Mean±SD	Survival rate
Negative control		1.378±0.017	
$A\beta_{1-42}$ (40 $\mu\text{mol/L}$)		0.709±0.023	51.45%
CRM-2102 ($\mu\text{mol/L}$)	10	1.09±0.026*	79.10%
	5	0.941±0.018*	68.29%
	1	0.768±0.015*	55.73%
	0.5	0.698±0.024	50.65%

与 $A\beta_{1-42}$ 相比: * $P < 0.01$

图5: CRM-2102对PC12细胞成活率的影响



5、CRM-2102 对小鼠海马和皮层 PP2A 表达水平的影响

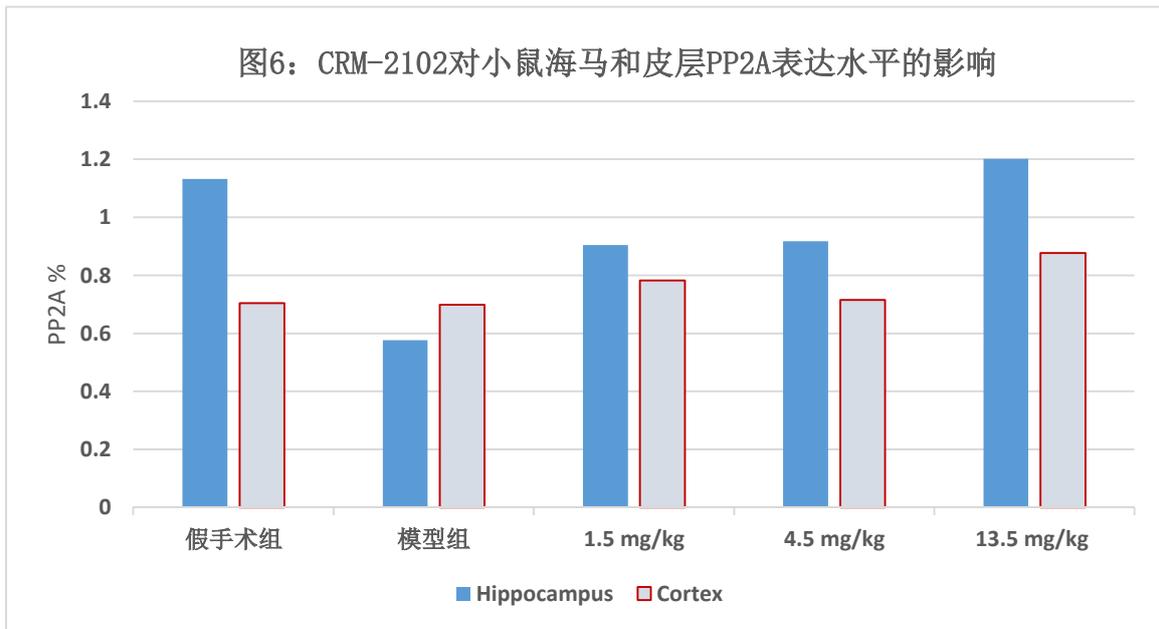
C57BL/6J 雄性小鼠侧脑室注射 $A\beta_{1-42}$ ($4\mu\text{g}$)，连续 14 天灌胃给予 CRM-2102 三个剂量 (1.5 mg/kg、4.5 mg/kg 和 13.5 mg/kg)，Western Blot 检测海马和皮层中 PP2A 表达水平。

试验结果表明，侧脑室注射 $A\beta$ 对各试验组小鼠皮层 PP2A 表达水平没有影响。对小鼠海马 PP2A 表达水平的影响，与模型组相比，13.5 mg/kg 剂量组 CRM-2102 海马中 PP2A 表达显著增加，具有统计学差异 ($P < 0.05$)，1.5 mg/kg 和 4.5 mg/kg 剂量组 CRM-2102 小鼠海马中 PP2A 表达有所增加，但无统计学差异 ($P > 0.05$)。

表7：小鼠海马和皮层中PP2A表达水平($\bar{x} \pm \text{SEM}$, n=5)

Groups		PP2A levels(%)	
		海马	皮层
假手术组		1.132±0.074*	0.704±0.058
模型组		0.576±0.045	0.699±0.085
CRM-2102 (mg/kg)	1.5	0.904±0.039	0.782±0.058
	4.5	0.918±0.054	0.715±0.047
	13.5	1.202±0.077*	0.877±0.057

* $P < 0.05$ ，与模型组相比



四、风险及风险管控

本项目作为“First in class”，可能存在诸多未知风险。这就需要加强项目实施过程管理和阶段性结果评估，尽可能的把风险降到最低。

1、虽然体外试验表明 CRM-2102 对正常细胞 PP2A 的活性没有影响，更不会额外的提高正常细胞 PP2A 活性水平，预测不会产生基于靶位的毒副作用。但在本项目安全性评估过程中还是应重点考察对基于靶位和靶外系统的毒副作用。

2、加强对试验方案、实施过程和试验结果的评估工作，及时科学地修正试验方案。