(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年2月3日(03.02.2022)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2022/024693 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 7/06 (2006.01)　*A61P 25/28* (2006.01)
A61K 38/08 (2019.01)　*A61P 43/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)　*C07K 16/18* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)　*C12N 15/12* (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2021/025577

(22) 国際出願日：　2021年7月7日(07.07.2021)

(25) 国際出願の言語：　日本語

(26) 国際公開の言語：　日本語

(30) 優先権データ：
特願 2020-127958　2020年7月29日(29.07.2020)　JP

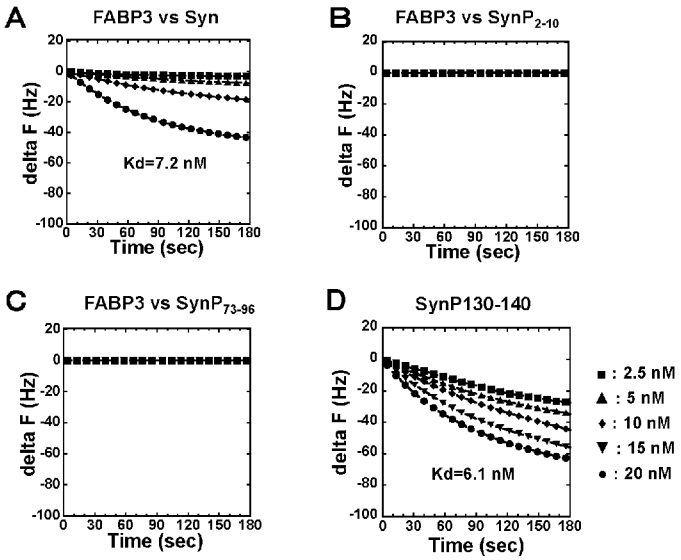
(71) 出願人: 国立大学法人東北大学 (**TOHOKU UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号 Miyagi (JP).

(72) 発明者: 福永　浩司 (**FUKUNAGA, Koji**); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 川畑 伊知郎 (**KAWAHATA, Ichiro**); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 河田 康志 (**KAWATA, Yasushi**); 〒6808550 鳥取県鳥取市湖山町南４丁目１０１番地 国立大学法人鳥取大学内 Tottori (JP). 溝端 知宏 (**MIZOBATA, Tomohiro**); 〒6808550 鳥取県鳥取市湖山町南４丁目１０１番地 国立大学法人鳥取大学内 Tottori (JP). 福井 直也 (**FUKUI, Naoya**); 〒6808550 鳥取県鳥取市湖山町南４丁目１０１番地 国立大学法人鳥取大学内 Tottori (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所 (**SAEGUSA & PARTNERS**); 〒5410045 大阪

(54) **Title:** PEPTIDE USED TO PREVENT OR TREAT SYNUCLEINOPATHY

(54) 発明の名称： シヌクレイノパチーを予防又は治療するために使用されるペプチド



(57) **Abstract:** A peptide represented by (i) or (ii): (i) a peptide having an amino acid sequence represented by EEG(X1)QD(X2)EPEA (in the formula, X1 and X2 are the same or different, and are Y, F, or W); (ii) a peptide having an amino acid sequence having one or more deletions, substitutions or additions at a position other than X1 and X2 in the amino acid sequence of (i), said peptide having a FABP3 protein binding activity.

(57) 要約：以下の（ｉ）又は（ii）で表されるペプチド：（ｉ）EEG(X1)QD(X2)EPEAで表されるアミノ酸配列を有するペプチド。（式中、X1及びX2は、同一又は異なって、Y、F又はWである）（ii）前記（ｉ）のアミノ酸配列のX1及びX2を除くアミノ酸部位において１若しくは数個が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつFABP3タンパク質と結合する活性を有するペプチド。

WO 2022/024693 A1

［続葉有］

府大阪市中央区道修町１－７－１　北浜コニシビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ：

シヌクレイノパチーを予防又は治療するために使用されるペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、シヌクレイノパチーを予防又は治療するために使用されるペプチドに関する。

背景技術

[0002] αシヌクレインはシノクレイノパチー（パーキンソン病、レビー小体型認知症、多系統萎縮症）の原因タンパク質と言われ、シノクレイノパチーは、神経細胞とグリア細胞におけるαシヌクレインの凝集により特徴付けられる。シヌクレイノパチーの神経病理学的試験において、神経細胞、神経線維またはグリア細胞にαシヌクレインの異常な凝集を含む特徴的な損傷が検出できる。αシヌクレインが神経細胞間あるいはグリア細胞間を伝播し、凝集・蓄積すると脳全体で神経細胞あるいはグリア細胞の壊死を起こし、運動機能障害、認知機能障害、睡眠障害、自律神経障害を起こすことが知られている。現在、αシヌクレインの抗体療法の開発が進められているが、副作用の問題から未だ根本的治療に至っていない。

[0003] 特許文献１は、ヒトαシヌクレインに特異的に結合する抗体、及びかかる抗体を含む細胞毒性を阻害する医薬的製剤について開示している。

[0004] 特許文献２は、αシヌクレインのエピトープのミモトープであると考えられるアミノ酸配列を含む、９個のアミノ酸からなるペプチドを含む、シヌクレイノパチーの予防および／ または治療用の医薬組成物について開示している。

[0005] 非特許文献１は、マウスの脳において、FABP3が、αシヌクレインのプレフォームドフィブリル（Pre-formed fibrils）の注射後のαシヌクレインの拡散を増強し、シヌクレオパチー状態におけるαシヌクレイン毒性を媒介すること、及び、FABP3リガンドであるMF1がαシヌクレイン症の魅力的な治療候

補であることについて開示している。

[0006] 非特許文献２は、αシヌクレインの切断と病気に関わる総説であり、αシヌクレインのN末端領域（1-60残基）、NAC領域（61-95残基）及びC末端領域（96-140残基）が定義されている。αシヌクレインのC末端側の切断が、切断されたαシヌクレインの凝集速度を増大させることが記載されている。

[0007] 非特許文献３は、αシヌクレインタンパク質の蓄積を抑制するアミド架橋核酸修飾アンチセンスオリゴヌクレオチド(amido-bridged nucleic acids-modified antisense oligonucleotide, AmNA-ASO)の開発と、動物モデルにおけるパーキンソン病の症状の改善について開示している。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開2020-73565

特許文献2：特許第5901714号

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Int J Mol Sci. 2020 Mar 23;21(6):2230

非特許文献2：JBC Papers in Press, on May 18, 2020 as Manuscript REV120.011743

非特許文献3：Scientific Reports (2019) 9:7567

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明が解決すべき課題は、シヌクレイノパチーの予防又は治療に使用されるペプチド、抗体、ペプチド又は抗体を含有するシヌクレイノパチーの予防又は治療のための予防又は治療剤、並びに、ペプチド又は抗体を含有するシヌクレイノパチーの予防又は治療のための医薬組成物を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、上記の課題解決のため鋭意検討した結果、本発明者らは、

αシヌクレインとFABP3とによる複合体形成に着目し、αシヌクレインのC末端領域に由来するペプチドを用いると、αシヌクレインの神経およびグリア細胞内への取り込み及び／又は神経およびグリア細胞間のαシヌクレイン伝播を抑制できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0012] 本発明は、以下に記載の実施形態を包含する。

[0013] 項１．以下の（ｉ）又は（ii）で表されるペプチド：

（ｉ）EEG(X1)QD(X2)EPEAで表されるアミノ酸配列を有するペプチド。

（式中、X1及びX2は、同一又は異なって、Y、F又はWである）

（ii）前記（ｉ）のアミノ酸配列のX1及びX2を除くアミノ酸部位において１若しくは数個が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつFABP3タンパク質と結合する活性を有するペプチド。

[0014] 項２．X1及びX2のアミノ酸のフェニル基と、天然型FABP3タンパク質のアミノ酸配列における第16番目のフェニルアラニンのフェニル基との相互作用を介してFABP3と結合する項１に記載のペプチド。

[0015] 項３．項１又は２に記載のペプチドに対する抗体。

[0016] 項４．項１又は２に記載のペプチド又は項３に記載の抗体を有効成分として含むシヌクレイノパチーの予防又は治療のための予防又は治療剤。

[0017] 項５．前記シヌクレイノパチーが、パーキンソン病、レビー小体病、及び多系統萎縮症からなる群から選択される項４に記載の予防又は治療剤。

[0018] 項６．シヌクレイノパチーの予防又は治療のための、項１又は２に記載のペプチド又は項３に記載の抗体を含む医薬組成物。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]αシヌクレインとFABP3の立体構造と結合部位。（Ａ）αシヌクレインとFABP3の相互作用を説明する模式図。（Ｂ）図１Ａの四角で囲んだ部分のαシヌクレインのC末端の拡大図。（Ｃ）天然変性構造のαシヌクレインとFABP3との結合様式の模式図。αシヌクレインの133番目および136番目のチロシン残基が関与し、特に133番目のチロシン残基がFABP3の脂肪酸結合ポケットに位置する第16番目のフェニルアラニンのフェニル基と強く相互作用してαシ

ヌクレインとFABP3の複合体を形成する。

[図2]αシヌクレインの二次構造と各ドメインの特性。（Ａ）αシヌクレインのN末端、NAC末端、及びC末端の構造を示す模式図。（Ｂ）図２（Ａ）の各領域のペプチドのアミノ酸配列。

[図3]FABP3とドメイン別αシヌクレインの結合解析。（Ａ）FABP3と全長αシヌクレインの経時的な結合。（Ｂ）FABP3と$SynP_{2-10}$の経時的な結合。（Ｃ）FABP3と$SynP_{73-96}$の経時的な結合。（Ｄ）FABP3と$SynP_{130-140}$の経時的な結合。

[図4]ABP3と各種変異型αシヌクレインの結合解析。（Ａ）$SynP_{130-140}$の133番目のチロシンをフェニルアラニンに置換したペプチド（Y133F）。（Ｂ）$SynP_{130-140}$の136番目のチロシンをフェニルアラニンに置換したペプチド（Y136F）。（Ｃ）$SynP_{130-140}$の136番目のチロシンをトリプトファンに置換したペプチド（Y136W）。（Ｄ）$SynP_{130-140}$の133番目及び136番目のチロシンをフェニルアラニンに置換したペプチド（Y133F/Y136F）。（Ｅ）$SynP_{130-140}$の133番目のチロシンをフェニルアラニンに、136番目のチロシンをトリプトファンに置換したペプチド（Y133F/Y136W）。（Ｆ）$SynP_{130-140}$の133番目及び136番目のチロシンをトリプトファンに置換したペプチド（Y133W/Y136W）。

[図5]FABP3とC末欠損・変異型αシヌクレインの結合解析および電子顕微鏡画像。（Ａ）αシヌクレインに、当モルのFABP3と$SynP_{130-140}$又はその変異ペプチドとを同時に添加した場合のシヌクレイン凝集の形成。◆：Y133F/Y136F添加、■： Y133F添加、●：Syn全長、□：Y136W添加、△：Y133F/Y136W添加、◇：Y133W/Y136W添加、○：Y136F添加、×：$SynP_{130-140}$添加、（Ｂ）各$SynP_{130-140}$変異ペプチドを添加した場合のシヌクレイン凝集を示す顕微鏡写真。

[図6]αシヌクレインC末ペプチドによるシヌクレイン・FABP3結合拮抗作用とその電子顕微鏡画像。（Ａ）αシヌクレインに、当モルのFABP3と、1当量、0.5当量、又は0.1当量の$SynP_{130-140}$の変異ペプチドY133Fとを同時に添加した場合のシヌクレイン凝集の形成（Ｂ）各Y133F濃度（▲1等量、■0.5等量、◆0.1等量、●0等量）におけるシヌクレイン凝集を示す顕微鏡写真。

[図7]αシヌクレインC末ペプチドによるシヌクレイン・FABP3の時間依存的拮

抗作用と電子顕微鏡画像。（Ａ）αシヌクレインに、当モルのFABP3を添加してSyn-FABP3の複合体を形成した後、$SynP_{130-140}$ペプチドを添加した場合のシヌクレイン凝集の形成。（Ｂ）図７（Ａ）に三角（▼）で示した、FABP3の添加から0分（●）、180分（■）、480分（◆）及び1440分後（▲）のシヌクレイン凝集を示す顕微鏡写真。

[図8]αシヌクレインのC末端領域ペプチドによる、FABP発現神経細胞へのαシヌクレインモノマーの取り込み阻害。（Ａ）左列：対照（αシヌクレインモノマーの添加）、中央列：αシヌクレインのC末端領域の20アミノ酸からなるペプチド(20aa)の添加、右列：αシヌクレインのC末端領域の10アミノ酸からなるペプチド(10aa)の添加、上行：ドパミンの律速酵素であるチロシン水酸化酵素（緑）、中央行：ATTO-550によるαシヌクレインモノマーの蛍光標識（赤）、下行：上行と中央行の合成、（Ｂ）control、20aaペプチド添加、10aaペプチド添加のそれぞれの場合のATTO蛍光強度のグラフ。****はp<0.0001を示す。（Ｃ）20aaペプチド及び10aaペプチドのαシヌクレインC末端領域における位置を示す模式図。

[図9]αシヌクレインのC末端欠損ペプチドによる、FABP発現神経細胞へのαシヌクレインモノマーの取り込み抑制。（Ａ）αS（WT）：野生型αシヌクレインモノマー、αS（Δ130-140）：野生型αシヌクレイン配列の130-140番目のアミノ酸が欠損したペプチド。上行：チロシン水酸化酵素（緑）、中央行：ATTO-550による蛍光標識、下行：上行と中央行の合成、（Ｂ）control（αS（WT））、αS（Δ130-140）のそれぞれの場合のATTO蛍光強度のグラフ。****はp<0.0001を示す。（Ｃ）αS（Δ130-140）ペプチドの配列を示す模式図。

[図10]FABP3と各種変異・欠損αシヌクレインまたはペプチドの一覧とその解離定数。FABP3タンパク質と各種αシヌクレインペプチドの結合実験におけるKd、k_{on}、及びk_{off}値。AA：アラキドン酸。FABP3 F16S：野生型FABP3の16番目のフェニルアラニンをセリンに置換したタンパク質。

発明を実施するための形態

[0020] αシヌクレインは脳内でモノマーからオリゴマー、そしてプロトファイブリル等の多量体に繊維化、凝集していくが、最近の研究によると、αシヌクレインのオリゴマー形成が神経細胞間或いはグリア細胞との伝播に関与して、細胞の毒性を発揮すると考えられている。本願発明者は最近、αシヌクレインがオリゴマーを形成するときに、脂肪酸結合タンパク質3（FABP3）もαシヌクレインとオリゴマーを生成することを報告した（Kawahata, I. et al.,Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, (21)）。疾患が進行すると、オリゴマー化したαシヌクレインが神経細胞間を伝播し、伝播した先で神経細胞に取り込まれ、細胞死を引き起こす。この神経およびグリア細胞内へのαシヌクレインの取り込みにFABP3が関与する。つまり、FABP3とαシヌクレインによるオリゴマー形成は、αシヌクレインの伝播と取り込みの両方に関与すると考えられ、FABP3とαシヌクレインの相互作用を阻害又は抑制することができれば、シヌクレイノパチーの予防又は治療に有用である。

[0021] そこで、本願発明者らは、ヒトαシヌクレインタンパク質（140個アミノ酸、配列番号１、UniPlot: P37840）をN末端領域(N末端から2～10番目のアミノ酸からなる領域、配列番号２)、NAC領域（73～96番目のアミノ酸からなる領域、配列番号３）及びC末端領域（130～140番目のアミノ酸からなる領域、配列番号４）に対応する各ペプチドを作製し、αシヌクレインのどの領域がFABP3との相互作用に関与しているのかを検討した。

[0022] その結果、驚くべきことに、N末端領域でもNAC領域でもなく、C末端領域がFABP3との相互作用に大きく関与していることを見出した。

[0023] 図１Ａ－Ｃは、αシヌクレインとFABP3 の1:1の複合体形成の模式図である。一本の曲線で示したαシヌクレインのC末端領域は、FABP3の脂肪酸結合部位に結合する。結合には、FABP3の16番目のPheと、αシヌクレインのC末端領域の133番目のTyrが大きく関与している。また、αシヌクレインのペプチドの133番目をPheにするとより強い結合となる。αシヌクレインのC末端以外はFABP3の表面に電荷等を介して結合していると考えられる。

[0024] 本発明の第１態様によれば、以下の（ｉ）又は（ii）で表されるペプチド

が提供される：

（ｉ）EEG(X1)QD(X2)EPEA（配列番号５）で表されるアミノ酸配列を有するペプチド。

（式中、X1及びX2は、同一又は異なって、チロシン（Y）、フェニルアラニン（F）又はトリプトファン（W）である）

（ii）前記（ｉ）のアミノ酸配列のX1及びX2を除くアミノ酸部位において１若しくは数個が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつFABP3タンパク質と結合する活性を有するペプチド。

[0025] 本明細書中のアミノ酸記号は、IUPACのアミノ酸略語（Amino Acid Abbreviations）に従う。

以下、１文字コード、３文字コード、及びアミノ酸を表す。

A, Ala アラニン	M, Met メチオニン
C, Cys システイン	N, Asn アスパラギン
D, Asp アスパラギン酸	P, Pro プロリン
E, Glu グルタミン酸	Q, Gln グルタミン
F, Phe フェニルアラニン	R, Arg アルギニン
G, Gly グリシン	S, Ser セリン
H, His ヒスチジン	T, Thr トレオニン
I, Ile イソロイシン	V, Val バリン
K, Lys リジン	W, Trp トリプトファン
L, Leu ロイシン	Y, Tyr チロシン

[0026] 本発明の第１態様のペプチドは、各アミノ酸が非修飾である（ｉ）又は（ii）で表されるペプチドのみならず、アミノ酸の種類を維持したまま１又は複数のアミノ酸が修飾されている、（ｉ）又は（ii）で表されるペプチドも含まれる。そのような修飾には、酸素原子の結合による酸化、リン酸化、Ｎ－アセチル化、Ｓ－システイン化等が含まれる。

本発明のペプチドは、X1及びX2のアミノ酸のフェニル基と、天然型FABP3タンパク質のアミノ酸配列における第16番目のフェニルアラニンのフェニル基

との相互作用を介して、FABP3と結合する。

[0027] 一実施形態において、本発明のペプチドは、上記（ｉ）で表されるペプチドであり、X1がチロシンであり、X2がチロシン、フェニルアラニン、又はトリプトファンである。

別の実施形態において、本発明のペプチドは、上記（ｉ）で表されるペプチドであり、X1がフェニルアラニンであり、X2がチロシン、フェニルアラニン、又はトリプトファンである。X1がフェニルアラニンの場合、X1がチロシンの場合に比べてFABP3タンパク質との結合親和性が増大する。

[0028] 別の実施形態において、本発明のペプチドは、上記（ｉ）で表されるペプチドであり、X1がトリプトファンであり、X2がチロシン、フェニルアラニン、又はトリプトファンである。

[0029] 一つの実施形態において、本発明のペプチドは、上記（ｉｉ）で表されるペプチドであり、アミノ酸部位において１又は２個が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつFABP3タンパク質と結合する活性を有するペプチドである。

アミノ酸部位において１又は２個が置換若しくは付加されている場合、そのような置換されたアミノ酸もしくは付加されたアミノ酸は、天然アミノ酸であってもよいし、非天然型アミノ酸（ 即ち20種類の古典的アミノ酸でない） アミノ酸であってもよい。

[0030] 別の実施形態において、本発明のペプチドは、上記（ｉｉ）で表されるペプチドであって、アミノ酸部位において１個が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつFABP3タンパク質と結合する活性を有するペプチドである。

[0031] 別の実施形態において、本発明のペプチドは、上記（ｉｉ）で表されるペプチドであって、アミノ酸部位において１個が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつFABP3タンパク質と結合する活性を有するペプチドであり、X1がチロシンであり、かつX2がチロシン、フェニルアラニン、又はトリプトファンであるか、X1がフェニルアラニンであり、かつX2がチロシ

ン、フェニルアラニン、又はトリプトファンであるか、X1がトリプトファンであり、かつX2がチロシン、フェニルアラニン、又はトリプトファンである。

[0032] 一つの実施形態において、本発明のペプチドは、上記（ｉ）又は（ii）で表されるペプチドであって、アミノ酸の長さが７～３０であり、好ましくは８～２０、より好ましくは９～２０、さらにより好ましくは１０～２０、例えば９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、又は１６である。

[0033] 本発明の第１態様のペプチドはFABP3と結合することができるため、αシヌクレインと競合し、FABP3とαシヌクレインの相互作用を阻害又は抑制することができる。本発明の第１態様のペプチドによるαシヌクレインとFABP3の相互作用を阻害又は抑制効果は、インビトロ阻害アッセイにより確認することができる。αシヌクレインとFABP3の相互作用が阻害又は抑制されると、αシヌクレインとFABP3によるオリゴマー形成が阻害されるため、αシヌクレインオリゴマーの神経細胞間の伝播と、FABP3発現神経細胞内へのαシヌクレインの取り込みが抑制される。このため、本発明の第１態様のペプチドは、シヌクレイノパチーの予防又は治療にも有用であると考えられる。

[0034] 本発明の第１態様のペプチドは当業者に周知の化学的合成方法により単離されたペプチドとして製造することもできるし、他のペプチドの一部として製造することもできる。

[0035] 本発明の第２態様によれば、本発明の第１態様のペプチドに対する抗体が提供される。かかる抗体は、第１態様のペプチドに対して特異的であり、本発明の第１態様のペプチドの一部又は全部をエピトープとして認識するため、αシヌクレインとFABP3の相互作用を阻害又は抑制する。このため、本発明の第２態様の抗体も、シヌクレイノパチーの予防又は治療にも有用であると考えられる。

[0036] 本発明の第２態様の抗体は、本発明の第１態様のペプチドを当業者に周知の化学的合成方法により製造し、当該ペプチドを抗原として、周知の免疫学的手法により作製することができる。本発明の第２態様の抗体は、ポリクロ

ーナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれであってもよい。また、該抗体は完全抗体分子だけでなくそのフラグメントをも包含し、例えば、Fab、F(ab')2、ScFv等であってもよい。

[0037] 本発明の第１態様のペプチドはαシヌクレインの部分配列に由来するため、本発明の第１態様のペプチド及び第２態様の抗体は、FABP3発現神経細胞内へのαシヌクレインの取り込みを阻害することができるが、副作用を回避することができる。また、生体内で安定で脳内移行性の良いペプチド及び抗体を設計することができる。

[0038] 本発明の第３態様によれば、αシヌクレインを本発明の第１態様のペプチド又は第２態様の抗体に露出することを含む、αシヌクレインとFABP3の相互作用の阻害方法が提供される。

[0039] 上記阻害方法は、インビボにおける方法であってもよいし、インビトロにおける方法であってもよい。

[0040] 本発明の第４態様によれば、αシヌクレインを本発明の第１態様のペプチド又は第２態様の抗体に露出することを含む、FABP3発現細胞へのαシヌクレインの取り込みの阻害方法が提供される。

[0041] 上記阻害方法は、インビボにおける方法であってもよいし、インビトロにおける方法であってもよい。FABP3発現細胞としては、例えばドパミン作動性神経細胞、グリア細胞が挙げられるがこれらに限定されない。

[0042] 本発明の第５態様によれば、本発明の第１態様のペプチド又は第２態様の抗体を備えた、αシヌクレインとFABP3の相互作用の阻害用キットが提供される。

[0043] 上記キットは、遊離αシヌクレイン又はαシヌクレインとFABPの凝集を測定するためのその他の試薬及び／又は器具、発現量測定の陰性コントロールや陽性コントロールなどが含まれていてもよい。

[0044] 本発明の第６態様によれば、第１態様のペプチド又は第２態様の抗体を有効成分として含むシヌクレイノパチーの予防又は治療のための予防又は治療剤が提供される。

[0045] 本発明の第７態様によれば、シヌクレイノパチーの予防又は治療のための、第１態様のペプチド又は第２態様の抗体を含む医薬組成物が提供される。

[0046] シヌクレイノパチーは、パーキンソン病（PD）、レビー小体病（LBD）、及び多系統萎縮症（MSA）からなる群から選択され得る。レビー小体病（LBD）には、パーキンソン病には、認知症を伴うパーキンソン病(PDD)が含まれ、レビー小体病には、レビー小体病を伴う認知症(DLB）が含まれる。

[0047] 上記第６態様の予防又は治療剤及び第７態様の医薬組成物は、各種の投与形態を採用可能でき、例えば、注射剤、経口剤、経鼻剤等のいずれでもよく、好ましくは、注射剤（静脈内、皮下、皮内、脊髄腔内等）が採用される。これらの投与形態は、各々当業者に公知慣用の製剤方法により製造できる。

[0048] 上記第６態様の予防又は治療剤及び第７態様の医薬組成物の投与対象は、哺乳動物であり、好ましくはマウス、ラット、ハムスター、フェレット、イヌ、ネコ、サル又はヒトであり、より好ましくはヒトである。

[0049] 上記第６態様の予防又は治療剤及び第７態様の医薬組成物には、必要に応じて薬学的担体を配合することができる。薬学的担体としては、製剤素材として慣用の各種有機或いは無機担体物質が用いられ、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、コーティング剤、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、ｐＨ調整剤、緩衝剤、ミセル剤等が挙げられる。また、上記第６態様の予防又は治療剤及び第７態様の医薬組成物には、必要に応じて防腐剤、抗酸化剤、着色剤、矯味・矯臭剤、安定化剤等の製剤添加物を用いることもできる。

[0050] 上記の各投与単位形態中に配合されるべき第１態様のペプチドの量は、これを適用すべき患者の症状により、或いはその剤形等により一定ではないが、一般に投与単位形態あたり、０．１ｎｇ～１０００ｍｇ、好ましくは１０ｎｇ～１０ｍｇである。

[0051] 上記投与形態を有する第１態様のペプチドの１日あたりの投与量は、患者の症状、体重、年齢、性別等によって異なり一概には決定できないが、通常成人（体重５０ｋｇ）１日あたり０．１ｎｇ～１０００ｍｇ、好ましくは１０ｎｇ～１０ｍｇを１日１回又は２～３回程度に分けて、１週間単位、隔週

単位、４週間（１月）単位、又は隔月単位で投与するのが好ましい。

[0052] 上記の各投与単位形態中に配合されるべき第２態様の抗体の量は、これを適用すべき患者の症状により、或いはその剤形等により一定ではないが、一般に投与単位形態あたり、０．１ｎｇ～１０００ｍｇ、好ましくは１０ｎｇ～１０ｍｇである。

[0053] 上記投与形態を有する第２態様の抗体の１日あたりの投与量は、患者の症状、体重、年齢、性別等によって異なり一概には決定できないが、通常成人（体重５０ｋｇ）１日あたり０．１ｎｇ～１０００ｍｇ、好ましくは１０ｎｇ～１０ｍｇを１日１回又は２～３回程度に分けて、１週間単位、隔週単位、４週間（１月）単位、又は隔月単位で投与するのが好ましい。

[0054] 本明細書中に引用されているすべての特許出願および文献の開示は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれるものとする。

[0055] 以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

実施例

[0056] 実施例１　FABP3とαシヌクレイン全長又は部分ペプチドとの相互作用

（方法）

まず、図２Ａ及びＢは、天然タンパク質であるαシヌクレインの構造に対応する領域の説明であり、図２Ａは本実施例で使用したペプチド(SynP2-10, SynP73-96, 及びSynP130-140)の領域部位を示し、図２Ｂはそれらペプチドのアミノ酸配列(配列番号２、配列番号３、配列番号４)である。

[0057] 水晶振動子マイクロバランス(QCM測定装置(AffinixQNμ、Initium)法を用いてFABP3と野生型αシヌクレイン（Syn）又は野生型αシヌクレイン のアミノ酸配列の一部を有するペプチド(SynP2-10,SynP73-96, 及びSynP130-140)との相互作用の測定を行った。水晶基板へのFABP3の固定化にはNi-NTA法を利用した。具体的には、１％ SDSとピランハ溶液(H_2SO_4：H_2O_2＝3:1)で洗浄した後、100 μlの0.5 mM 3,3'-dithiobis[N-(5-amino-5-carboxypentyl)propionamide-N',N'-diacetic acid]dihydrochloride(C_2-NTA、Dojindo) 溶液を添加し、

室温で10 分静置した。精製水で洗浄した後、500 μlのNi溶液(20 mM HEPES-NaOH buffer,pH7.5,150 mM NaCl,50 mM EDTA,10 mM $NiSO_4$)を添加し、室温で10分静置した。精製水で洗浄した後、50 mM Tris-HCl pH7.4 にて希釈したN末端にHis-Tag を融合したFABP3 100 nMを水晶センサーに添加し、1 分間固定化を行った。そこに50 mM Tris-HCl pH7.4 で希釈した野生型αシヌクレイン及び３種ペプチド（SynP2-10, SynP73-96, 及びSynP130-140）の各々を2.5 nM,5 nM,10 nM,15 nM,20 nM 添加し、QCM装置で測定を行った。測定は500 μlの液中にて，25 ℃，1000 rpm の条件において3分間実行した。測定後は、AQUA2.0 ソフトウェア（Initium）によりKd,kon,koff をそれぞれ算出した。

[0058]（結果）

図３Ａ－Ｄは、それぞれFABP3とαシヌクレイン全長（Syn）（Ａ），SynP2-10ペプチド(Ｂ)，SynP73-96ペプチド(Ｃ)，SynP130-140ペプチド(Ｄ)との相互作用を示すグラフである。図３Ａに示すように、αシヌクレイン全長(Syn)はFABP3に容量依存性に結合した。図３Ｂ及びＣに示すように、αシヌクレインのN末端領域のSynP2-10ペプチド及びNAC領域のSynP73-96ペプチドはFABP3とほとんど結合せず、驚くべきことに、図３Ｄに示すように、C末端領域のSynP130-140ペプチドがFABP3に容量依存性に結合した。SynP130-140ペプチドはαシヌクレインのC末端領域(100-140)のまさにC末端部に相当するペプチドである。

[0059] 実施例２　FABP3とSynP130-140の各種変異体との相互作用

（方法）

SynP130-140ペプチドに対し、133位のチロシンをフェニルアラニンに変えた変異体(Y133F)、136位のチロシンをフェニルアラニンに変えた変異体(Y136F)、133位のチロシンをトリプトファンに変えた変異体(Y133W)、133位のチロシンと136位のチロシンをいずれもフェニルアラニンに変えた変異体(Y133F/ Y136F)、133位のチロシンをフェニルアラニンに変え、かつ136位のチロシンをトリプトファンに変えた変異体(Y133F/ Y136W)、133位のチロシンと136位のチロシンをいずれもトリプトファンに変えた変異体(Y136F/ Y136W)を作製

した。

FABP3とペプチドSynP130-140の各種変異体との相互作用を実施例1と同様の方法で行った。測定は固定化したFABP3に対し、各ペプチドを任意の濃度に添加して測定を行った。

[0060] （結果）

図４Ａに示すように、133位のチロシンをフェニルアラニンに変えると２倍結合親和性が強くなった。図４Ｂ及びＣに示すように、136位のチロシンをフェニルアラニン又はトリプトファンに変えても親和性は強くはならず、チロシン（Y）と同程度のFABP3との親和性が維持された。図４Ｄに示すように、２箇所のチロシンをフェニルアラニンに変えても一カ所の変異(Y133F)と同程度のFABP3との親和性つまり，天然配列の２倍の結合親和性であった。これらの結果から、133位のチロシンがフェニルアラニンになっていることが重要であると考えられる。図４Ｅに示すように、133位のチロシンからフェニルアラニンへの変異に加えて136位をトリプトファンに変化させても、136位の変異の分だけ強くはならなかった。図４Ｆに示すように、２箇所のチロシン（Y）をトリプトファン(W)に変えても天然配列の場合と比べて変化はなかった。トリプトファンへの変異により親和性は維持されることが分かるが，必ずしも強くなりはしない。

[0061] 実施例３　αシヌクレインへのFABP3添加によるアミロイド線維形成の抑制と、ペプチド添加による凝集促進

（方法）

FABP3：αシヌクレイン(Syn)：SynP130-140変異体ペプチド各種を1:1:1モル比で共存させて、αシヌクレインのアミロイド線維形成をチオフラビンT(Thio-T)で蛍光観察、又はそれらの最終時点でのアミロイド線維の形態を電子顕微鏡(TEM)で測定した。Synの線維形成過程における振とう及び経時的な蛍光値の測定にはARVO X4 (Perkin Elmer)を使用した。測定には96ウエルプレート（8×12 ウエルプレート；Greiner,Kremsmuenster,Austria)にサンプル150 μl/well となるように添加し、37℃で振盪を継続しながら15 min毎に蛍

光(Ex:440 nm,Em:486 nm)の測定を実施した。測定サンプルは50 mM Tris-HCl pH7.4,150 mM NaCl,20 μM Thio-T 500 μl中にαシヌクレイン，FABP3，ペプチド(SynP130-140,SynP130-140 Y133F,Y136F,Y136W,Y133F/Y136F,Y133F/Y136W,Y133W/Y136W)はそれぞれ69 μMとなるように添加した。測定後に得られた1800分後のサンプルは透過型電子顕微鏡(TEM)(JEOL JEM-1400Plus)による測定を行った。サンプルは、10 μlをコロジオン膜(400メッシュ；Nisshin EM,Tokyo,Japan)に添加し、2分間室温で静置した後、精製水5 μlで洗浄し、5 μlの10% EM stain溶液で1分間染色した後、5 μlの精製水で洗浄を行った。これを一晩風乾した後に測定を実行した。

[0062] （結果）

図５Ａはアミロイド線維形成の経時的な蛍光観察であり、図５Ｂは実施例２で用いたのと同じ変異ペプチドを用いた場合のシヌクレイン凝集を示す顕微鏡写真である。αシヌクレインに当モルのFABP3を添加すると完全にシヌクレインの凝集は抑制された（グラフの●）。しかし，αシヌクレインに当モルのFABP3とP130-140のペプチド（グラフの×）や133位をFに変異させたペプチド（グラフの◆、■）とを同時に添加すると，αシヌクレイン(全長、Kd=0.4nM）よりもペプチドの方がFABP3との結合が強い(Kd=0.2-0.1nM)ので，ペプチドが先にFABP3と結合し，結合できなかったαシヌクレインはアミロイド線維凝集を形成する。

[0063] 実施例４　アミロイド線維凝集形成におけるSynP130-140 Y133Fペプチドの濃度依存性

FABP3：αシヌクレイン(Syn)：SynP130-140の133位のチロシンをフェニルアラニンに変異させた変異体ペプチド（SynP130-140 Y133F）を1:1:1モル比で共存させて、αシヌクレインのアミロイド線維形成をチオフラビンT(Thio-T)で蛍光観察、又はその最終時点でのアミロイド線維の形態を電子顕微鏡(TEM)で測定した。Thio-T測定及びTEMの測定は、実施例3と同様の方法で実施した。Thio-T測定において、αシヌクレイン69 μM、FABP3 69 μMに対してSynP130-140 Y133Fは0.1 等量(6.9 μM)、0.5 等量(34.5 μM)、1 等量(69 μM)

となるように添加することで測定を行った。

[0064] （結果）

図６Ａはアミロイド線維形成の経時的な蛍光観察であり、図６Ｂは各種濃度におけるSynP130-140 Y133Fペプチドを用いた場合のシヌクレイン凝集を示す顕微鏡写真である。αシヌクレインに当モルのFABP3を添加すると完全にαシヌクレインのアミロイド線維凝集は抑制された。そこに同時にY133Fペプチド(Kd=0.1nM)を0.1等量，0.5等量，1等量と加えておくと、Y133Fペプチドは容量依存的にFABP3に優先的に結合し，結合できなかったαシヌクレインがアミロイド凝集を形成する。黒丸の0等量のグラフはFABP3とαシヌクレインのみが存在するときのアミロイド線維凝集形成。

[0065] 実施例５　アミロイド線維凝集形成に対するSynP130-140ペプチドの添加時間の影響

αシヌクレインとFABP3との複合体にSynP130-140ペプチドを後から遅れて添加した時の、遊離したαシヌクレインのアミロイド線維形成の様子を蛍光観察、又はその最終時間でTEM観察した。Thio-T測定及びTEMの測定は、実施例3と同様の方法で実施した。Thio-T測定において、SynP130-140 は始めから添加したもの(0 時間)、3 時間、8時間、24時間後に添加して測定を行った。

[0066] （結果）

図７Ａは各添加時間のアミロイド線維形成の経時的な蛍光観察であり、図６Ｂは各添加時間にSynP130-140 Y133Fペプチドを添加した場合のシヌクレイン凝集を示す顕微鏡写真である。αシヌクレイン(Syn)に当モルのFABP3を添加すると1:1のSyn-FABP3の複合体が形成される。そこに後からC末端ペプチド(P130-140) を矢印の時間に遅れて当モル加えると，P130-140の方がFABP3との親和性が強いので，SynをFABP3から解離させ，SynP130-140がFABP3と結合する。FABP3から解離したSynはアミロイド線維凝集を形成することが確認された。

[0067] 実施例６　ドパミン神経細胞におけるαシヌクレインの取込みとC末ペプチドによる取込み拮抗作用

（方法）

培養ドパミン神経は既出の方法（Kawahata et al. 2019）に従い調製した。具体的には、妊娠15.5日目のC57BL6Nマウスからイソフルラン深麻酔下にて腹部正中切開により無菌的に子宮を摘出し、実体顕微鏡下において氷冷ハンクス平衡塩溶液(HBSS）中、胎仔の中脳を摘出後、37℃の神経細胞分散液（住友ベークライト） 30分間処置により組織を分散させ、1000 rpmで5分間遠心分離した後上清を廃棄、細胞ペレットを分散後、除去液（住友ベークライト）を加えて900rpmで5分間遠心分離した後、上清を除去し、ペレットをEagle's minimal essential medium (EMEM) 中で懸濁、ポリ－L－リジンでコーティングしたチャンバープレート（イワキ）に播種した。培養１０日目に、αシヌクレインの可視化解析のため、1 μM ATTO-550標識αシヌクレインモノマーを培地に添加し、合成したαシヌクレインC末２０残基DNEAYEMPSEEGYQDYEPEA（１μM）（配列番号６）、または１０残基EGYQDYEPEA（１μM）（配列番号６）のペプチド共存下、または非共存下において４８時間処置を行った。ペプチドによるαシヌクレインのドパミン神経への取込み拮抗作用は、ATTO-550標識αシヌクレインの細胞内蛍光強度の定量解析により評価を行った（NIH Image Jソフトウェア）。数値は平均±SEM（n>20）、全ての群についてone-way ANOVA with Tukey testを行った。合成したαシヌクレインのペプチド概念図についてはCに示す。

[0068] （結果）

培養ドパミン神経は、ATTO-550標識αシヌクレインを細胞内に取り込んだが（図８Ａ，control，赤）、シヌクレインC末ペプチド２０残基、または１０残基の同時処置により、蛍光標識αシヌクレインの細胞内取込みが阻害された（図８Ａ，20aa，10aa，図８Ｂ）。****は、コントロール群（control）と比較し、p < 0.0001である（図８Ｂ）。シヌクレインC末ペプチド２０残基及び１０残基の間では、シヌクレイン取込みの阻害作用において、有意な差は認められなかった（図８Ｂ）。これらのペプチドはシヌクレインC末酸性領域に属する（図８Ｃ）。

[0069] 実施例７　ドパミン神経細胞における野生型αシヌクレインおよびC末欠損変異体の細胞内取込み特性

（方法）

培養ドパミン神経は前出（実施例６）と同様に調製を行った。培養１０日目に、αシヌクレインの可視化解析のため、1 μM ATTO-550標識αシヌクレインモノマー、または実施例６とは逆に、シヌクレインC末130-140残基を欠損したATTO-550標識αシヌクレインモノマーを培地に添加し、それらの神経細胞内への取込みを検討した。野生型αシヌクレインまたはC末130-140残基欠損αシヌクレインのドパミン神経への取込み量は、ATTO-550標識αシヌクレインの細胞内蛍光強度の定量解析により評価を行った（NIH Image Jソフトウェア）。数値は平均±SEM（n ＞ 20）、 Student's T-testによる２群間比較を行った。合成したC末130-140残基欠損αシヌクレインの概念図について図９Ｃに示す。

[0070] （結果）

培養ドパミン神経は、ATTO-550標識αシヌクレインを細胞内に取り込んだが（αS, WT）、C末130-140残基欠損αシヌクレイン（αS, Δ130-140）は神経細胞内に取り込まれなかった（図９Ａ，赤，B）。****は、コンロトール群（control）と比較し、p ＜ 0.0001である（図９Ｂ）。

[0071] 実施例８　FABPとαシヌクレインペプチドとの結合実験

（方法）

FABP3と様々なペプチド又はαシヌクレインとの相互作用の親和性をQCM測定装置を用いて定量的な値を求めた。詳細な実験方法は実施例１の方法に記した通りである。

[0072] （結果）

FABP3と各種ペプチドの結合結果は図１０に示す通りである。FABP3とαシヌクレインとの結合にはαシヌクレインのC末端130-140残基が関与し、また、FABP3の変異とαシヌクレインC末端ペプチドの変異の結果から、FABP3タンパク質のアミノ酸配列における第16番目のフェニルアラニンのフェニル基と

、αシヌクレインの133位のフェニル基、チロシン、若しくはトリプトファン及び／又は136位のフェニル基、チロシン、若しくはトリプトファンとが相互作用することが示された。

請求の範囲

[請求項1] 以下の（ｉ）又は（ii）で表されるペプチド：

（ｉ）EEG(X1)QD(X2)EPEAで表されるアミノ酸配列を有するペプチド。

（式中、X1及びX2は、同一又は異なって、Y、F又はWである）

（ii）前記（ｉ）のアミノ酸配列のX1及びX2を除くアミノ酸部位において１若しくは数個が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつFABP3タンパク質と結合する活性を有するペプチド。

[請求項2] X1及びX2のアミノ酸のフェニル基と、天然型FABP3タンパク質のアミノ酸配列における第16番目のフェニルアラニンのフェニル基との相互作用を介してFABP3と結合する請求項１に記載のペプチド。

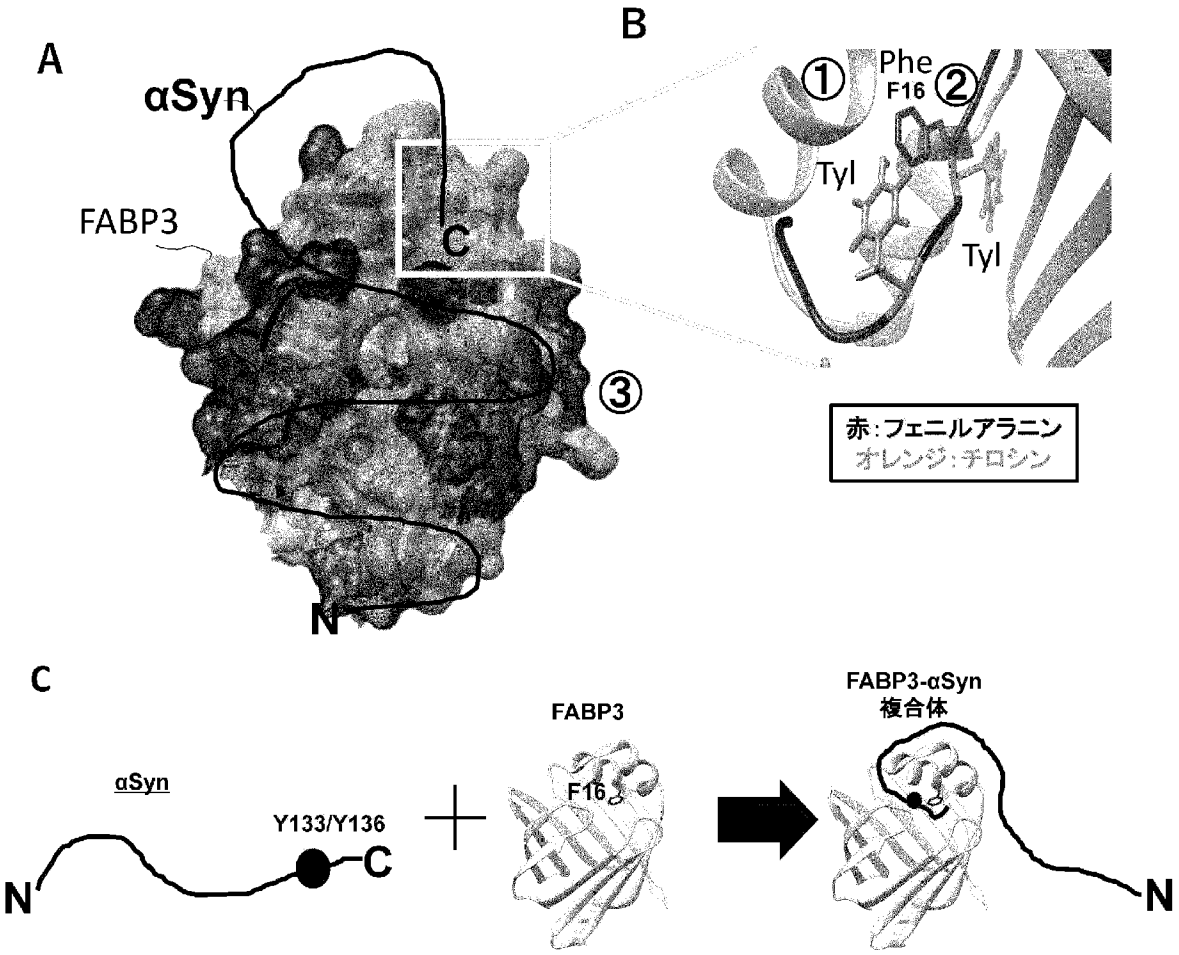
[請求項3] 請求項１又は２に記載のペプチドに対する抗体。

[請求項4] 請求項１又は２に記載のペプチド又は請求項３に記載の抗体を有効成分として含むシヌクレイノパチーの予防又は治療のための予防又は治療剤。

[請求項5] 前記シヌクレイノパチーが、パーキンソン病、レビー小体病、及び多系統萎縮症からなる群から選択される請求項４に記載の予防又は治療剤。

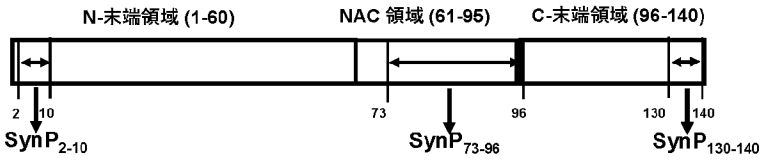
[請求項6] シヌクレイノパチーの予防又は治療のための、請求項１又は２に記載のペプチド又は請求項３に記載の抗体を含む医薬組成物。

[図1]



[図2]

A

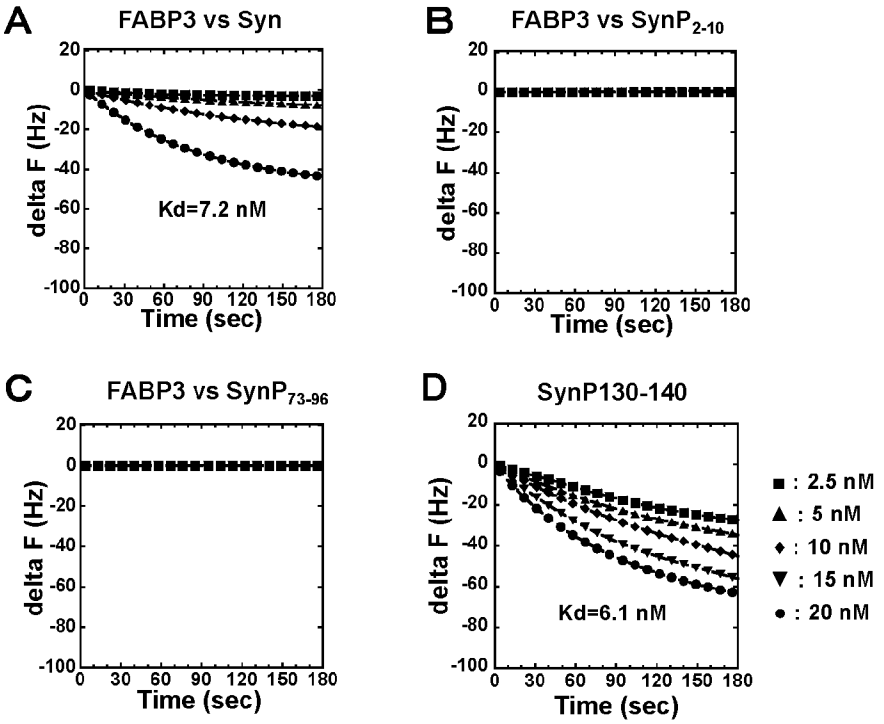


B

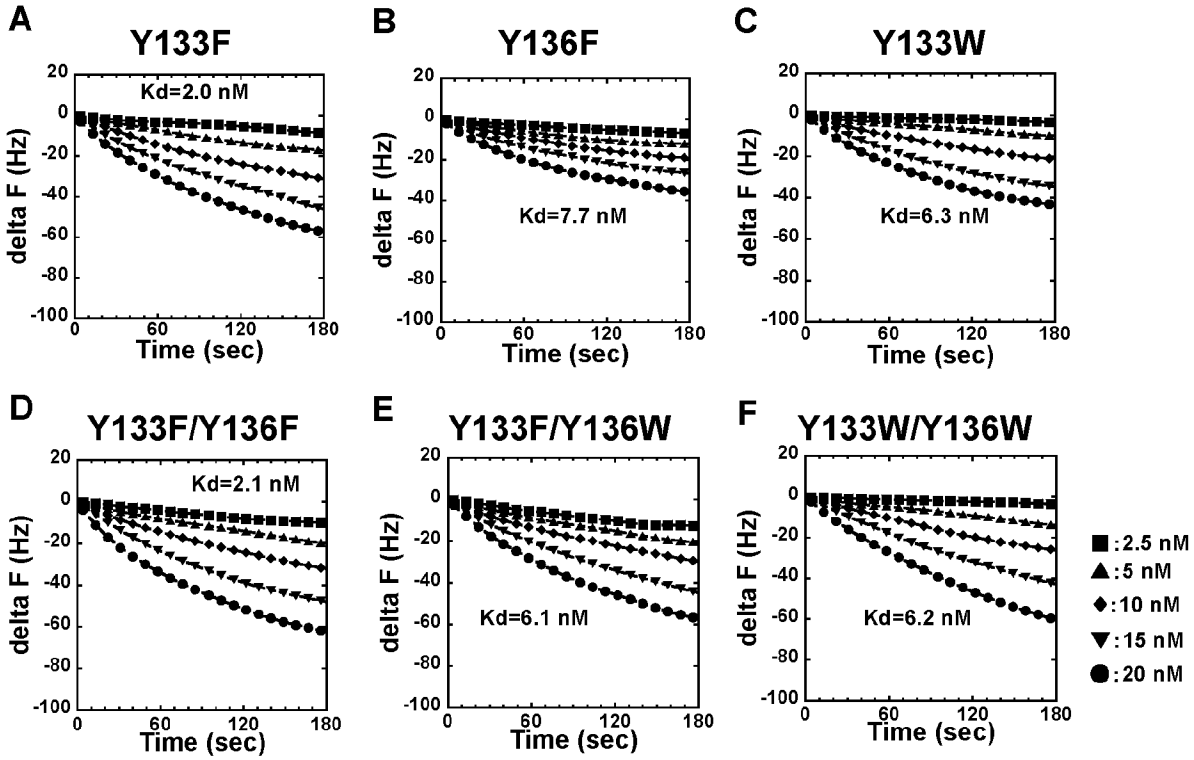
ペプチドのアミノ酸配列

SynP2-10	2 DVFMKGLSKA 10
SynP73-96	73 GVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVK 96
SynP130-140	130 EEGYQDYEPEA 140

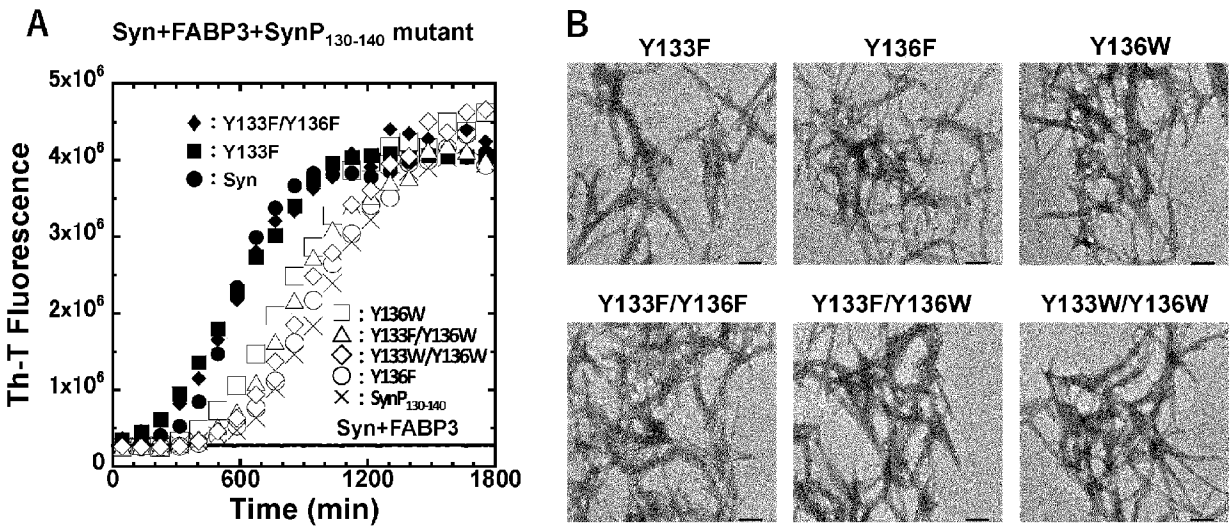
[図3]


A
FABP3 vs Syn
Kd=7.2 nM
B
FABP3 vs SynP2-10
C
FABP3 vs SynP73-96
D
SynP130-140
Kd=6.1 nM
delta F (Hz)
Time (sec)
■ : 2.5 nM
▲ : 5 nM
◆ : 10 nM
▼ : 15 nM
● : 20 nM

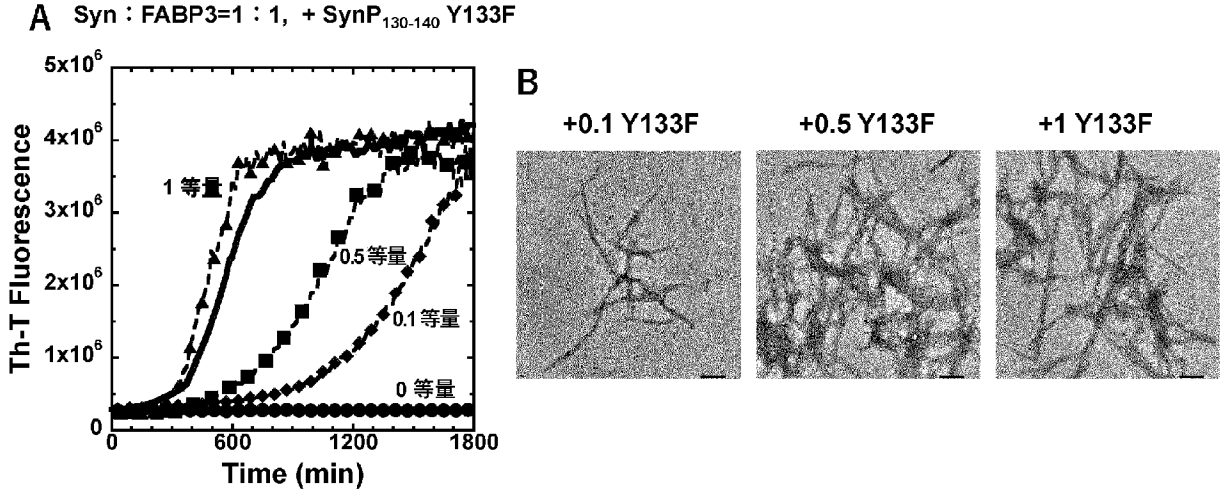
[図4]


A
Y133F
Kd=2.0 nM
B
Y136F
Kd=7.7 nM
C
Y133W
Kd=6.3 nM
D
Y133F/Y136F
Kd=2.1 nM
E
Y133F/Y136W
Kd=6.1 nM
F
Y133W/Y136W
Kd=6.2 nM
delta F (Hz)
Time (sec)
■ :2.5 nM
▲ :5 nM
◆ :10 nM
▼ :15 nM
● :20 nM

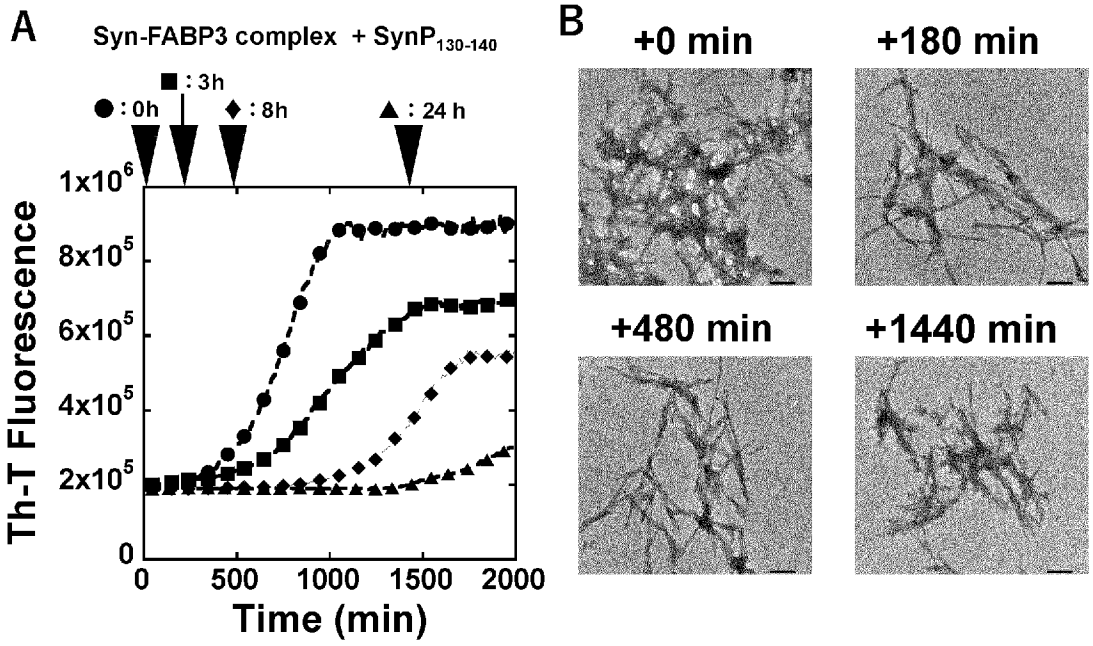
[図5]


A
Syn+FABP3+SynP130-140 mutant
Th-T Fluorescence
Time (min)
◆ : Y133F/Y136F
■ : Y133F
● : Syn
□ : Y136W
△ : Y133F/Y136W
◇ : Y133W/Y136W
○ : Y136F
× : SynP130-140
Syn+FABP3
B
Y133F
Y136F
Y136W
Y133F/Y136F
Y133F/Y136W
Y133W/Y136W

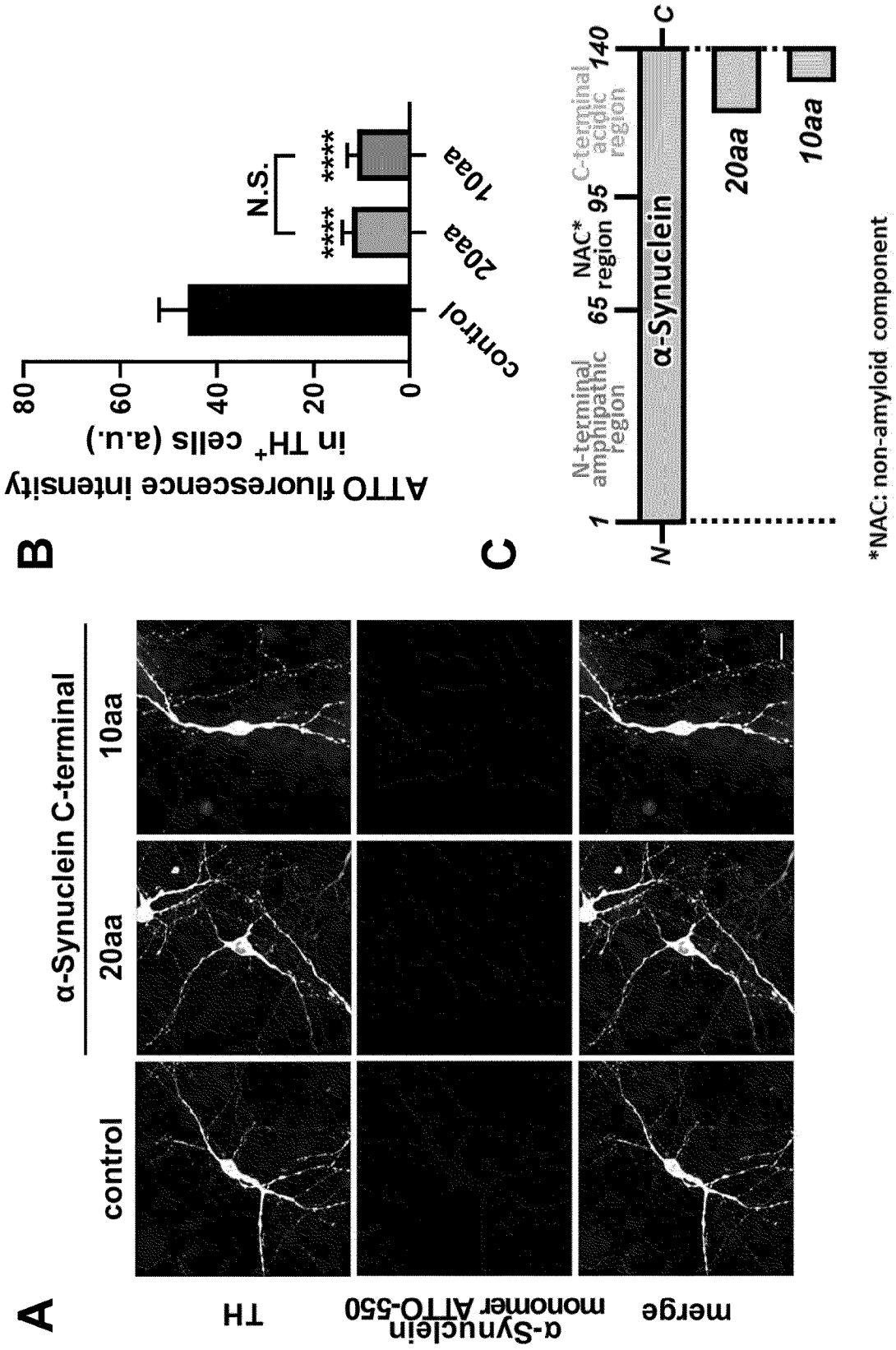
[図6]


A
Syn：FABP3=1：1, + SynP130-140 Y133F
Th-T Fluorescence
Time (min)
1 等量
0.5 等量
0.1 等量
0 等量
B
+0.1 Y133F
+0.5 Y133F
+1 Y133F

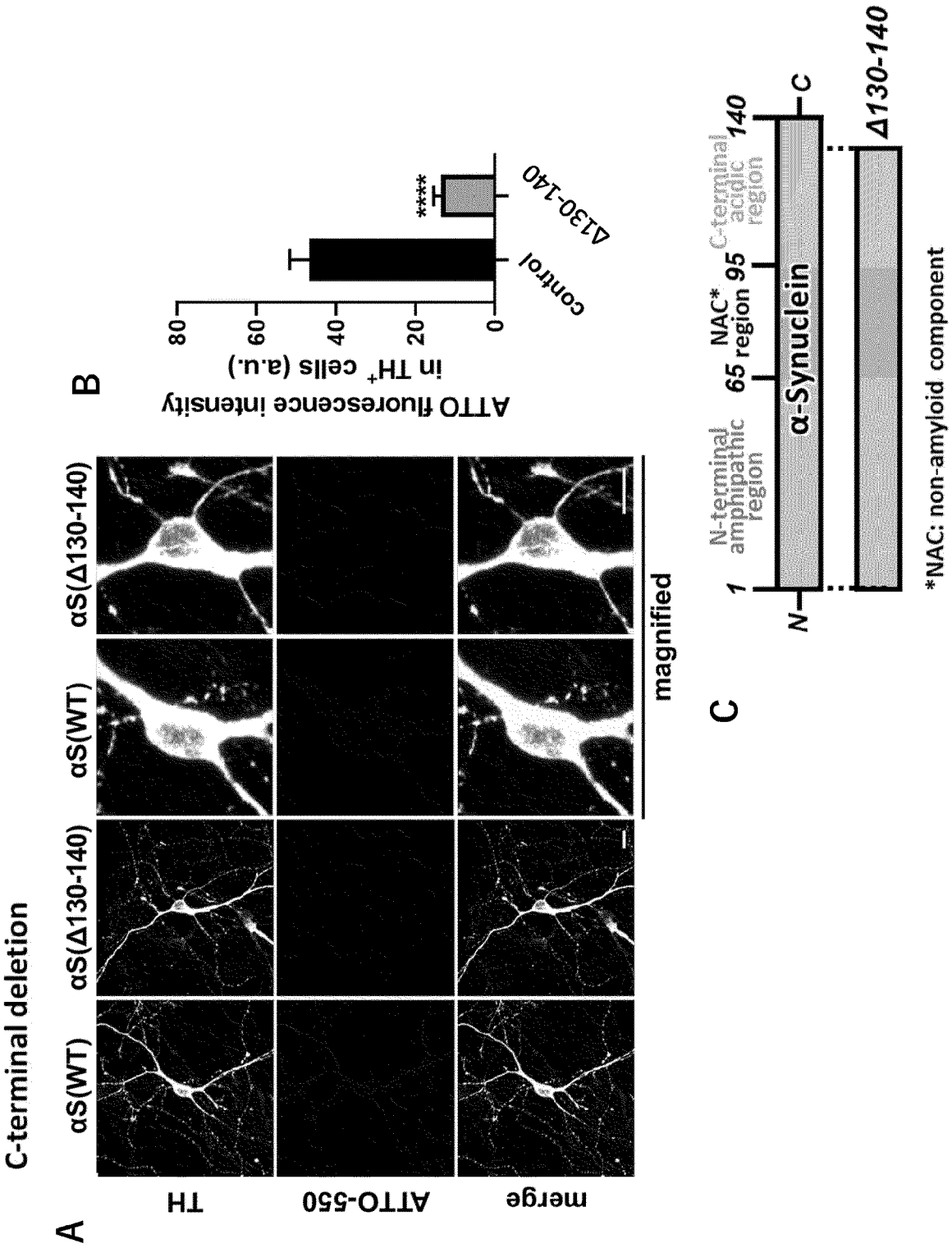
[図7]


A
Syn-FABP3 complex + SynP130-140
■ : 3h
● : 0h
◆ : 8h
▲ : 24 h
Th-T Fluorescence
Time (min)
B
+0 min
+180 min
+480 min
+1440 min

[図8]


A
control
α-Synuclein C-terminal
20aa
10aa
TH
α-Synuclein monomer ATTO-550
merge
B
ATTO fluorescence intensity in TH+ cells (a.u.)
0
20
40
60
80
control
20aa
10aa
****
****
N.S.
C
N
C
1
N-terminal amphipathic region
65
NAC* region
95
C-terminal acidic region
140
α-Synuclein
20aa
10aa
*NAC: non-amyloid component

[図9]


A
C-terminal deletion
αS(WT)
αS(Δ130-140)
αS(WT)
αS(Δ130-140)
magnified
TH
ATTO-550
merge
B
ATTO fluorescence intensity
in TH+ cells (a.u.)
0
20
40
60
80
****
control
Δ130-140
C
N
1
N-terminal amphipathic region
65
NAC* region
95
C-terminal acidic region
140
C
α-Synuclein
Δ130-140
*NAC: non-amyloid component

[図10]

Sample	K_d (nM)	k_{on} ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})
FABP3 vs αSyn	7.2	6.4×10^{5}	4.6×10^{-3}
FABP3 vs arachidonic acid	6.8	0.8×10^{5}	0.6×10^{-3}
FABP3 vs αSynΔ130-140	N.D.	N.D.	N.D.
FABP3 vs αSyn130–140CF	8.1	3.0×10^{5}	2.4×10^{-3}
FABP3 vs αSynY133A/Y136A	61.7	0.9×10^{5}	5.5×10^{-3}
FABP3 vs $\alpha SynP_{1-10}$	N.D.	N.D.	N.D.
FABP3 vs $\alpha SynP_{73-96}$	N.D.	N.D.	N.D.
FABP3 vs $\alpha SynP_{130-140}$	6.1	2.0×10^{5}	1.2×10^{-3}
FABP3 F16S vs αSyn	N.D.	N.D.	N.D.
FABP3 F16S vs $\alpha SynP_{130-140}$	N.D.	N.D.	N.D.
FABP3 F16S vs arachidonic acid	2090	0.02×10^{5}	4.7×10^{-3}
FABP3 vs $\alpha SynP_{130-140}$Y133F	2.0	7.5×10^{5}	1.5×10^{-3}
FABP3 vs $\alpha SynP_{130-140}$Y136F	7.7	4.8×10^{5}	3.7×10^{-3}
FABP3 vs $\alpha SynP_{130-140}$Y136W	6.3	3.8×10^{5}	2.4×10^{-3}
FABP3 vs $\alpha SynP_{130-140}$Y133F/Y136F	2.1	5.4×10^{5}	1.1×10^{-3}
FABP3 vs $\alpha SynP_{130-140}$Y133F/Y136W	6.1	3.2×10^{5}	1.9×10^{-3}
FABP3 vs $\alpha SynP_{130-140}$Y133W/Y136W	6.2	2.4×10^{5}	1.5×10^{-3}

N.D.: not determined
αSyn130-140CF: αSynの130-140残基のアミノ酸を無電荷にしたもの

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/025577

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. C07K7/06(2006.01)i, A61K38/08(2019.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P25/16(2006.01)i, A61P25/28(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N15/12(2006.01)i
FI: C07K7/06 ZNA, C07K16/18, A61P25/16, A61P25/28, A61P25/00, A61K38/08, A61K39/395 D, A61K39/395 N, A61P43/00 111, C12N15/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int. Cl. C07K1/00-19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021
Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII);CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN);PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2005-517389 A (ATGEN CO., LTD.) 16 June 2005 (2005-06-16), claims, paragraph [0022], entire text	1-2 3-6
X	US 2018/0134775 A1 (UNITED ARAB EMIRATES UNIVERSITY) 17 May 2018 (2018-05-17), claims, paragraphs [0008], [0009]	1-6
P, X P, A	FUKUI, N. et al. An a-synuclein decoy peptide prevents cytotoxic a-synuclein aggregation caused by fatty acid binding protein 3, J. Biol. Chem. 20 April 2021, vol. 296:100663, pp. 1-21, in particular, RESULTS, fig. 1-9, table 3, entire text	1-2, 4-6 3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30.08.2021	14.09.2021
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/025577

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2015-038078 A (AFFIRIS AG) 26 February 2015 (2015-02-26), entire text	1-6
A	IZAWA, Y. et al. Role of G-terminal negative charges and tyrosine residues in fibril formation of α— synuclein, Brain Behav., 2012, vol. 2(5), pp. 595-605, entire text	1-6
A	KAWAHATA, I. et al. Fatty Acid-Binding Protein 3 is Critical for a-Synuclein Uptake and MPP(+) - Induced Mitochondrial Dysfunction in Cultured Dopaminergic Neurons, Int. J. Mol. Sci., 2019, vol. 20:5358, pp. 1-13, entire text	1-6
A	SORRENTINO, Z. A. et al. The emerging role of a-synuclein truncation in aggregation and disease, J. Biol. Chem., 18 May 2020, vol. 295(30), pp. 10224-10244, entire text	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/025577

Patent Documents referred to in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2005-517389 A	16.06.2005	US 2003/0125522 A1 claims, paragraph [0052]	
US 2018/0134775 A1	17.05.2018	(Family: none)	
JP 2015-038078 A	26.02.2015	WO 2011/020133 A1 entire text	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/025577

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K 7/06(2006.01)i; A61K 38/08(2019.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 25/16(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07K 16/18(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i
FI: C07K7/06 ZNA; C07K16/18; A61P25/16; A61P25/28; A61P25/00; A61K38/08; A61K39/395 D; A61K39/395 N; A61P43/00 111; C12N15/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K1/00-19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2005-517389 A (アトゲン カンパニー リミティッド) 16.06.2005 (2005-06-16) 特許請求の範囲、段落0022	1-2
A	全文	3-6
X	US 2018/0134775 A1 (UNITED ARAB EMIRATES UNIVERSITY) 17.05.2018 (2018-05-17) 特許請求の範囲、段落0008-0009	1-6
P, X	FUKUI, N. et al., An α-synuclein decoy peptide prevents cytotoxic α-synuclein aggregation caused by fatty acid binding protein 3, J. Biol. Chem. , 2021.04.20, Vol. 296:100663, pp. 1-21 特に、RESULTSの項、図１－９，表３	1-2, 4-6
P, A	全文	3

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
30.08.2021	14.09.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
小田　浩代 4B 8377

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2015-038078 A (アフィリス・アクチェンゲゼルシャフト) 26.02.2015 (2015-02-26) 全文	1-6
A	IZAWA, Y. et al., Role of C-terminal negative charges and tyrosine residues in fibril formation of α-synuclein, Brain Behav., 2012, Vol. 2(5), pp. 595-605 全文	1-6
A	KAWAHATA, I. et al., Fatty Acid-Binding Protein 3 is Critical for α-Synuclein Uptake and MPP(+) -Induced Mitochondrial Dysfunction in Cultured Dopaminergic Neurons, Int. J. Mol. Sci., 2019, Vol. 20:5358, pp. 1-13 全文	1-6
A	SORRENTINO, Z. A. et al., The emerging role of α-synuclein truncation in aggregation and disease, J. Biol. Chem., 2020.05.18, Vol. 295(30), pp. 10224-10244 全文	1-6

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/025577

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/025577

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2005-517389 A	16.06.2005	US 2003/0125522 A1 特許請求の範囲、段落0052	
US 2018/0134775 A1	17.05.2018	（ファミリーなし）	
JP 2015-038078 A	26.02.2015	WO 2011/020133 A1 全文	