(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116375841 A
(43)申请公布日 2023.07.04

(21)申请号 202211484224.5

(22)申请日 2022.11.24

(30)优先权数据
10-2021-0192521 2021.12.30 KR
10-2022-0040355 2022.03.31 KR

(71)申请人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔

(72)发明人 金俊坤 林东俊

(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事务所(普通合伙) 11413
专利代理师 于作琛 王庆艳

(51)Int.Cl.
C07K 14/47(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A23L 33/17(2016.01)
A23K 20/147(2016.01)
C12N 5/079(2010.01)

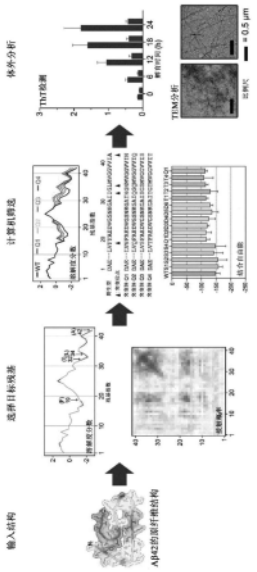
权利要求书1页 说明书12页
序列表（电子公布） 附图4页

(54)发明名称

新型蛋白质变体和使用其治疗神经系统变性疾病的组合物

(57)摘要

公开了用于控制β淀粉样蛋白纤维化的新型蛋白质变体和用于使用其治疗神经系统变性疾病的组合物。



CN 116375841 A

1.一种蛋白质变体,其中SEQ ID NO:1的N-末端19和32位的每个氨基酸均被另一种氨基酸取代。

2.根据权利要求1所述的蛋白质变体,其中与野生型蛋白质相比,蛋白质变体抑制了β淀粉样蛋白纤维化。

3.根据权利要求1所述的蛋白质变体,其中另一种氨基酸是极性且不带电荷的氨基酸。

4.根据权利要求3所述的蛋白质变体,其中另一种氨基酸是天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)或苏氨酸(T)。

5.根据权利要求4所述的蛋白质变体,其中另一种氨基酸是天冬酰胺(N)。

6.根据权利要求1所述的蛋白质变体,其中SEQ ID NO:1的N-末端34和42位上至少一个氨基酸还被另一种氨基酸取代。

7.根据权利要求1所述的蛋白质变体,其中蛋白质变体包括选自SEQ ID NO:2至8中所述序列的任一种。

8.一种多核苷酸,其编码根据权利要求1至7中任一项所述的蛋白质变体。

9.一种载体,其包含根据权利要求8所述的多核苷酸。

10.一种用于预防或治疗神经系统变性疾病的药物组合物,其包含根据权利要求1至7中任一项所述的蛋白质变体或根据权利要求9所述的载体。

11.根据权利要求10所述的药物组合物,其中神经系统变性疾病是阿尔茨海默病。

12.一种用于预防或治疗神经系统变性疾病的方法,其包括将根据权利要求10所述的药物组合物施用于人以外的对象。

13.一种用于预防或改善神经系统变性疾病的保健功能食品组合物,其包含根据权利要求1至7中任一项所述的蛋白质变体或根据权利要求9所述的载体。

14.一种用于预防或改善神经系统变性疾病的饲料组合物,其包含根据权利要求1至7中任一项所述的蛋白质变体或根据权利要求9所述的载体。

15.一种用于控制β淀粉样蛋白纤维化的组合物,其包含根据权利要求1至7中任一项所述的蛋白质变体或根据权利要求9所述的载体。

16.一种用于控制β淀粉样蛋白纤维化的方法,其包括用根据权利要求1至7中任一项所述的蛋白质变体或根据权利要求9所述的载体处理分离的细胞。

17.根据权利要求16所述的方法,其中细胞是成神经细胞。

新型蛋白质变体和使用其治疗神经系统变性疾病的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及新型蛋白质变体和使用该蛋白质变体治疗神经系统变性疾病的组合物。

背景技术

[0002] 本质上无序的β淀粉样蛋白通过自组装过程以β折叠结构布置，形成具有蛋白质四级结构的长原纤维。通过β淀粉样蛋白的自组装过程形成的原纤维是神经系统变性疾病阿尔茨海默病的主要病理标志物，并与疾病的发病机制有关。

[0003] 近年来，人们已经引入了针对阿尔茨海默病的主要标志物β淀粉样蛋白的抗体疗法，以克服常规阿尔茨海默病疗法的局限性。然而，β淀粉样蛋白本身是自组装过程的构建单元，并可以中间体和纤维的形式存在，其纤维化也由经历自组装的其他β淀粉样蛋白促进。因此，由于β淀粉样蛋白在体内以各种形式混合，大多数靶向和去除β淀粉样蛋白纤维的治疗剂表现不出预期的效果。

[0004] 因此，抑制淀粉样蛋白纤维化的方法而不是简单地去除特定状态下的淀粉样蛋白的方法可能是替代方法。最近报道了通过基因治疗来纠正淀粉样前体蛋白中的瑞典突变的尝试，该突变是已知的基于β淀粉样蛋白的产生增加导致阿尔茨海默病的原因。换言之，这是通过使用基因剪刀去除致病基因来进行基因治疗的方法。

[0005] 虽然这种方法是减少由于突变而增加的β淀粉样蛋白数量的良好尝试，但它的应用范围有限，因为即使当β淀粉样蛋白在正常水平表达时，也存在发展为阿尔茨海默病的风险。

[0006] 在此背景下，本发明人发现，在处理成神经细胞时，与野生型β淀粉样蛋白相比，β淀粉样蛋白特定位置的氨基酸被其他氨基酸取代的蛋白质变体抑制和调节β淀粉样蛋白原纤维的形成，并降低细胞毒性。本发明是在此基础上完成的。

发明内容

[0007] 因此，鉴于上述问题完成了本发明，本发明的一个目的是提供蛋白质变体，该蛋白质变体中SEQ ID NO:1的N-末端的19位和32位的氨基酸被其他氨基酸取代。

[0008] 本发明的另一个目的是提供编码该蛋白质变体的多核苷酸。

[0009] 本发明的另一个目的是提供包含多核苷酸的载体。

[0010] 本发明的另一个目的是提供用于预防或治疗神经系统变性疾病的含有该蛋白质变体或载体的药物组合物。

[0011] 本发明的另一个目的是提供用于预防或治疗神经系统变性疾病的方法，其包括将药物组合物施用于人以外的对象。

[0012] 本发明的另一个目的是提供用于预防或治疗神经系统变性疾病的蛋白质变体或载体。

[0013] 本发明的另一个目的是提供用于预防或改善神经系统变性疾病的含有蛋白质变

体或载体的保健功能食品组合物。

[0014] 本发明的另一个目的是提供用于预防或改善神经系统变性疾病的含有蛋白质变体或载体的饲料组合物。

[0015] 本发明的另一个目的是提供用于控制β淀粉样蛋白纤维化的含有蛋白质变体或载体的组合物。

[0016] 本发明的另一个目的是提供用于控制β淀粉样蛋白纤维化的方法,其包括用该蛋白质变体或载体处理分离的细胞。

[0017] 根据本发明,上述和其他目的可以通过提供蛋白质变体来实现,其中蛋白质变体中SEQ ID NO:1的N-末端19和32位的每个氨基酸均被另一种氨基酸取代。

附图说明

[0018] 从下面结合附图的详细描述中,将更清楚地理解本发明的上述和其他目的、特征和其他优点,其中:

[0019] 图1示出了基于β淀粉样蛋白(1-42)的结构和动力学特性选择能够抑制纤维化的点突变体的过程;

[0020] 图2示出了在β淀粉样蛋白(1-42)的纤维化期间,每个野生型蛋白质和本发明的蛋白质变体的淀粉样纤维形状和长度的变化;

[0021] 图3示出了在β淀粉样蛋白(1-42)的纤维化期间,当将野生型蛋白质和成功抑制纤维形成的本发明的蛋白质变体混合时,原纤维形状、长度和细胞毒性的变化取决于蛋白质变体的比例;和

[0022] 图4示出了其中苯丙氨酸19、异亮氨酸32、亮氨酸34和丙氨酸42全部被天冬酰胺取代的变体的细胞毒性降低。

具体实施方式

[0023] 本发明中公开的每个说明和实施方案都可以应用于其他说明和实施方案。也就是说,本文公开的各种要素的所有组合都在本发明的范围内。此外,下文的详细描述不应被解释为限制本发明的范围。

[0024] 此外,本领域技术人员将通过常规实验认识或理解本文公开的本发明具体实施方案的许多等同方案。此外,这些等同方案旨在落入本发明的范围内。

[0025] 还应理解,术语,诸如“包括”,当在本说明书中使用时,指定所述要素的存在,但是不排除一个或多于一个要素的存在或添加,除非另有说明。

[0026] 下面,将详细描述本发明。

[0027] 本发明提供了蛋白质变体,其中SEQ ID NO:1的N-末端19和32位的每个氨基酸均被另一种氨基酸取代。

[0028] SEQ ID NO:1的蛋白质是β淀粉样蛋白,其可被称为天然或野生型β淀粉样蛋白,并且可衍生自淀粉样前体蛋白质,但不限于此。

[0029] 如本文所用,术语“β淀粉样蛋白”是指含有36至43个氨基酸的肽,是在阿尔茨海默病患者脑中发现的淀粉样斑的主要成分,其主要与阿尔茨海默病有关。本文中,β淀粉样蛋白可以是β淀粉样蛋白42。

[0030] 在本发明中，虽然SEQ ID NO:1的蛋白质被指定为β淀粉样蛋白的代表性实例，但是对于本领域技术人员明显的是，SEQ ID NO:1的蛋白质不排除在SEQ ID NO:1的氨基酸之前和之后的无意义的序列添加、自然发生的突变或其沉默突变，以及任何与该蛋白质具有同等或相应活性的蛋白质，包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列，都与本发明的蛋白质相对应。

[0031] 具体地，例如，本发明的β淀粉样蛋白可以是包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与其具有至少80％、90％、95％或97％同源性或一致性的氨基酸序列的蛋白质。此外，即使具有部分被缺失、修饰、取代或添加的氨基酸序列的蛋白质也属于适用于本发明突变的蛋白质的范围，只要该氨基酸序列具有这种同源性或一致性并表现出与该蛋白质相应的效力。

[0032] 也就是说，显而易见的是，表达“具有以特定序列号SEQ ID NO列出的氨基酸序列的蛋白质或多肽”或“包括以特定序列号SEQ ID NO列出的氨基酸序列的蛋白质或多肽”意指蛋白质即使具有部分被缺失、修饰、取代或添加的氨基酸序列，也可以在本发明中使用，只要其具有与包括相应序列号SEQ ID NO的氨基酸序列的多肽相同或相应的活性。例如，显而易见的是，“包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽”可以属于“包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽”的范围，只要它具有与之相同或相应的活性。

[0033] 如本文所用，术语“变体”是指在保守取代和/或修饰中具有与所述序列不同的一个或多于一个氨基酸，但保持其功能或性质的蛋白质。这种变体通常通过经修饰的蛋白质氨基酸序列中的一个或多于一个氨基酸，然后评估经修饰的蛋白质的性质来鉴定。也就是说，与野生型蛋白质相比，变体的能力可以增加、保持或降低。此外，一些变体可包括其中一个或多于一个部分如N-末端前导序列或跨膜结构域已被去除的变体。其他变体可以包括从成熟蛋白质的N-末端和/或C-末端去除了部分的变体。术语“变体”可以与诸如“修饰”、“经修饰的蛋白质”、“经修饰的多肽”、“突变体”、“突变蛋白”和“趋异进化”等术语互换使用。任何术语都可以不受特别限制地使用，只要它包括“变化”的概念。

[0034] 如本文所用，术语“保守取代”是指至少一种氨基酸被具有相似结构和/或化学性质的另一种氨基酸取代。该变体可以具有例如一个或多于一个的保守取代，同时保留一个或多于一个生物活性。这种氨基酸取代通常可以基于残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性的相似性而发生。例如，在带电荷的氨基酸中，带正电的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸，带负电的(酸性)氨基酸包括谷氨酸和天冬氨酸，而在具有不带电荷的氨基酸中，非极性氨基酸包括甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和脯氨酸，极性或亲水性氨基酸包括丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺，芳香氨基酸包括苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。

[0035] 此外，变体可以包括对多肽的二级结构和性质影响最小的氨基酸的缺失或添加。例如，多肽可以与蛋白质N-末端的信号(或前导)序列结合，该序列与蛋白质的共翻译或翻译后转移有关。多肽也可以与其他序列或连接物结合，以鉴定、纯化或合成该多肽。

[0036] 与野生型蛋白质相比，该蛋白质变体可能抑制了β淀粉样蛋白纤维化。

[0037] 如本文所用，术语“抑制β淀粉样蛋白纤维化”指的是抑制β淀粉样蛋白的聚集，并且可以与“纤维化抑制”、“聚集抑制”、“纤维化控制”或“聚集控制”互换使用。

[0038] 只要使用与取代前的氨基酸不同的氨基酸，就不限制用另一种氨基酸进行的取代。具体地，只要SEQ ID NO:1的氨基酸序列的N-末端19和32位的氨基酸被其他氨基酸残基取代，就不限制用另一种氨基酸进行的取代。

[0039] 此外,蛋白质变体的特征在于34和42位上的至少一个氨基酸被另一种氨基酸取代。

[0040] 同时,显而易见的是,本文所用的表述“特定的氨基酸被取代”是指该氨基酸被与取代前的氨基酸不同的氨基酸取代,即使没有具体描述它被另一种氨基酸取代。

[0041] 蛋白质变体可以是其中SEQ ID NO:1的氨基酸序列中的氨基酸19和32中的至少一个被极性和不带电荷的氨基酸取代的蛋白质变体,特别是天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)或苏氨酸(T),更具体地说,天冬酰胺(N)。

[0042] 其中SEQ ID NO:1的N-末端19和32位的氨基酸被其他氨基酸取代的本发明的蛋白质变体,也可以包括19和32位氨基酸以外的氨基酸被取代的蛋白质变体。具体地,34和42位的至少一个氨基酸可以被至少一种其他氨基酸取代,其他氨基酸即天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)或苏氨酸(T),并且还可以包括某一位置的氨基酸被另一种氨基酸取代。

[0043] 这两个氨基酸可以是SEQ ID NO:1的N末端第19位的苯丙氨酸(Phe,F)和第32位的异亮氨酸(Ile,I)。而且,显而易见的是,具有部分被缺失、修饰、取代或添加的氨基酸序列的蛋白质也属于适用于该蛋白质的范围,只要该氨基酸序列表现出与该蛋白质变体相应的效力。

[0044] 具体地,本发明蛋白质变体的氨基酸序列可以选自SEQ ID NO:2至8中所述的氨基酸序列,具体地,本发明蛋白质变体的氨基酸序列可以选自SEQ ID NO:2至5中所述的氨基酸序列,更具体地,本发明蛋白质变体的氨基酸序列可以选自SEQ ID NO:2至4中所述的氨基酸序列。此外,本发明的蛋白质变体可以包括与氨基酸序列具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同源性或一致性的多肽。此外,显而易见的是,具有部分被缺失、修饰、取代或添加的氨基酸序列的蛋白质也属于该蛋白质的范围,只要该氨基酸序列表现出与该蛋白质变体相应的效力。

[0045] 如本文所用,术语“同源性”或“一致性”指的是两个给定的氨基酸序列或碱基序列彼此相关的程度,并且可以用百分比来表示。术语“同源性”或“一致性”通常可以互换使用。

[0046] 保守的多核苷酸或多肽的序列同源性或一致性由标准比对算法和由可与其结合使用的程序建立的默认空位罚分来确定。基本上同源或一致的序列通常在中等或高度严格的条件下与完整或全长序列的至少50%、60%、70%、80%或90%杂交。考虑到含有简并密码子代替多核苷酸中的密码子的多核苷酸也进行杂交。

[0047] 两个多核苷酸或多肽序列是否彼此具有同源性、相似性或一致性可以通过,例如,使用Pearson等人(1988)[Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85]:2444公开的已知计算机算法如“FASTA”程序使用默认参数来确定。此外,它们可以使用如EMBOSS软件包(The European Molecular Biology Open Software Suite,Rice等人,2000,Trends Genet.16:276-277)(版本5.0.0或更高版本)(包括GCG程序包(Devereux,J.等人,Nucleic Acids Research 12:387(1984))的NeedleMann程序中执行的Needleman-Wunsch算法(Needleman和Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443-453)、BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschul,[S.][F.,][ET AL,J MOLEC BIOL215)]:403(1990);Guide to Huge Computers,Martin J.Bishop,[ED.,]Academic Press,San Diego,1994,和[CARILLO ETA/.](1988)SIAM J Applied Math 48:1073.)来确定。例如,可以使用美国国家生物技术信息中心的BLAST或ClustalW来确定同源性、相似性或一致性。

[0048] 多核苷酸或多肽的同源性、相似性或一致性可以使用如Smith和Waterman，Adv.Appl.Math(1981)2:482中公开的GAP计算机程序(例如,Needleman等人(1970),J Mol Biol 48:443)通过比较序列信息来确定。简而言之,GAP程序将同源性、相似性或一致性定义为相似的比对符号(即核苷酸或氨基酸)的数量除以两个序列中较短序列的符号总数。GAP程序的默认参数可能包括:(1)如Schwartz和Dayhoff编辑的Atlas Of Protein Sequence And Structure,National Biomedical Research Foundation,pp.353-358(1979)中公开的Gribskov等人,(1986)Nucl.Acids Res.14:6745的一元比较矩阵(一致性的值为1,非一致性的值为0)和加权比较矩阵(或EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版本)替换矩阵);(2)对于每个空位罚分3.0,对于每个空位中的每个符号罚分0.10(或者空位开放罚分10,空位扩展罚分0.5);以及(3)端部空位没有罚分。

[0049] 此外,两个多核苷酸或多肽序列是否彼此具有同源性、相似性或一致性可以通过在限定的严格条件下使用Southern杂交实验比较序列来确定,并且适当限定的杂交条件属于技术范围并可以通过本领域技术人员公知的方法来确定(例如,J.Sambrook等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,2nd Edition,Cold Spring Harbor Laboratory press,Cold Spring Harbor,New York,1989;F.M.Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,Inc.,New York)。

[0050] 在本发明的一个实施方案中,基于抑制β淀粉样蛋白纤维化的结构,通过用另一种降低疏水性的氨基酸如天冬酰胺取代β淀粉样蛋白第19和32位的氨基酸,并进一步用另一种氨基酸取代它的34和42位的至少一个氨基酸,产生了蛋白质变体。确定是否可以使用蛋白质变体来控制β淀粉样蛋白纤维化。结果表明,蛋白质变体降低了作为野生型β淀粉样蛋白的特征的原纤维形成率,也降低了在淀粉样蛋白纤维化过程中发生的细胞毒性。此外,发现不同于抑制淀粉样蛋白纤维化的常规方法,淀粉样蛋白原纤维的形成率和长度可以通过β淀粉样蛋白的点突变来控制,而不是通过如抗体和纳米颗粒等外部添加剂来控制。

[0051] 本发明还提供了编码蛋白质变体的多核苷酸和包含多核苷酸的载体。

[0052] 如本文所用,术语“多核苷酸”是指核苷酸单元通过共价键以长链形式连接的核苷酸聚合物,通常指具有一定长度或更长的DNA或RNA链,并指编码本发明中的蛋白质变体的多核苷酸片段。

[0053] 如本文所用,术语“载体”指用于克隆和/或转移碱基至宿主细胞的任何介质。载体可以是能够引起与其结合的DNA片段复制的复制子。术语“复制子”是指在体内作为DNA复制的独立单位的任何遗传单位(例如,质粒、噬菌体、黏粒、染色体或病毒),即能够通过自身调节进行复制的任何遗传单位。术语“载体”包括病毒和非病毒介质,用于在体外、离体或体内将碱基引入宿主细胞,其还可以包括微球形DNA。例如,载体可以是不含细菌DNA序列的质粒。去除了CpG区域中富集的细菌DNA序列,以减少转基因表达沉默,并引起质粒DNA载体更持续的表达(例如,Ehrhardt,A.等人(2003)HumGene Ther 10:215-25;Yet,N.S.(2002)MoI Ther 5:731-38;Chen,Z.Y.等人(2004)Gene Ther 11:856-64)。此外,载体可以包括转座子(Annu Rev Genet.2003;37:3-29.)或者人工染色体。优选地,载体可以是pACYC177、pACYC184、pCL1920、pECCG117、pUC19、pBR322或pMW118载体,但不限于此。

[0054] 本发明还提供用于预防或治疗神经系统变性疾病的药物组合物,其含有该蛋白质变体或载体。

[0055] 如本文所用,术语“蛋白质变体”和“载体”如上定义。

[0056] 本文所使用,术语“神经系统变性疾病”广义上包括以神经细胞变性为特征的所有疾病,但一般不包括神经系统细胞以外的病因,如脑血管疾病、创伤和代谢异常。具体地,神经系统变性疾病可以包括痴呆、阿尔茨海默病、帕金森病,更具体地,是阿尔茨海默病,但不限于此。

[0057] 阿尔茨海默病是导致痴呆的最常见的神经系统变性性脑部疾病,其特征是起病缓慢以及认知功能逐渐恶化。它表现为认知障碍的症状,如记忆力丧失、语言能力退化、时空理解能力退化、判断能力和日常生活能力退化、步态障碍和运动障碍。

[0058] 如本文所用,术语“预防”指通过施用蛋白质变体或载体来抑制或延迟神经系统变性疾病发作的任何行为。

[0059] 如本文所用,术语“治疗”指通过施用蛋白质变体或载体可以改善或有益地改变神经系统变性疾病症状的任何行为。

[0060] 基于组合物的总重量,本发明的药物组合物可以包含0.01重量%至80重量%,具体地0.01重量%至70重量%,更具体地0.01重量%至60重量%的蛋白质变体或载体,但药物组合物的含量不限于此,只要可以获得对神经系统变性疾病的预防或治疗效果。

[0061] 此外,药物组合物还可以包含通常用于制备药物组合物的药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂,并且载体可以包括非天然存在的载体。载剂、赋形剂和稀释剂的具体实例包括但不限于乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、海藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁或矿物油。

[0062] 此外,药物组合物的剂型根据常规的方法可以选自片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、混悬剂、口服液和口服溶液、乳剂、糖浆剂、灭菌水溶液、非水溶剂、混悬剂、乳剂、冻干剂和栓剂,并且可以是各种口服或胃肠外制剂中的任何一种。在制剂方面,药物组合物的制备可以使用稀释剂或赋形剂,例如常用的填充剂、膨胀剂、黏合剂、润湿剂、崩解剂或表面活性剂。用于口服施用的固体制剂可以包括片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂等,并且可以通过混合至少一种赋形剂,例如淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖、明胶等来制备。除了简单的赋形剂外,还使用硬脂酸镁和滑石粉等润滑剂。口服液体制剂可以是混悬液、口服液和口服溶液、乳剂、糖浆剂等,并且除了通常使用的简单稀释剂水和液体石蜡之外,还可以含有各种赋形剂,如润湿剂、甜味剂、芳香剂、防腐剂等。肠胃外施用的制剂可以包括灭菌水溶液、非水溶液、混悬剂、乳剂、冻干剂和栓剂。非水溶剂和混悬剂的实例包含丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油、可注射的酯如油酸乙酯等。栓剂基质的实例包括但不限于合成脂肪酸酯(Witepsol)、聚乙二醇(macrogol)、吐温61、可可脂、甘油三月桂酸酯(laurin butter)、甘油明胶等。本发明也提供用于预防或治疗神经系统变性疾病的方法,其包括将药物组合物施用于人以外的对象。

[0063] 如本文所用,术语“蛋白质变体”、“载体”、“神经系统变性疾病”、“预防”和“治疗”如上定义。

[0064] 如本文所用,术语“施用”指使用适当的方法将药物组合物引入对象。

[0065] 如本文所用,术语“对象”指具有或可能发展为神经系统变性疾病的任何动物,例如大鼠、小鼠和家畜,包括人。具体地,例如,对象是包括人在内的哺乳动物。

[0066] 本发明的药物组合物可以药物有效量施用。

[0067] 术语“药物有效量”是指足以以适用于所有医疗治疗的合理效益/风险比治疗疾病的量，并且有效剂量水平可以根据多种因素而变化，包括疾病的严重程度、药物的活性、患者的年龄、体重、健康状况和性别、患者对药物的敏感性、施用时间、施用途径和根据本发明的组合物的排泄率、治疗周期、与其组合使用的药物、以及在药学领域中众所周知的其他因素。

[0068] 药物组合物可以作为单一治疗剂或与其他治疗剂组合施用，并且可以与常规治疗剂相继或同时施用。此外，可以单次或多次施用。考虑到这些因素，施用足以达到最大疗效而不产生副作用的最小量尤为重要。本领域技术人员可以很容易地确定这点。

[0069] 此外，药物组合物可以根据所需的方法口服或胃肠外施用(例如，静脉皮下、腹膜内或局部施用)，并且剂量可以根据患者的病情和体重、疾病的程度、药物形式、给药途径和时间而变化，但可以由本领域的技术人员适当地选择。例如，药物组合物可以以约0.001mg/kg至1000mg/kg，更具体地0.05mg/kg至200mg/kg，最具体地0.1mg/kg至100mg/kg的量在4周内以单剂量或分多次剂量施用。本领域技术人员可以根据对象的病情和体重、疾病的程度、药物形式以及施用途径和时间来适当地选择优选剂量。

[0070] 本发明还提供用于预防或治疗神经系统变性疾病的保健功能食品组合物，其包含蛋白质变体或载体。

[0071] 本发明还提供用于预防或改善神经系统变性疾病的饲料组合物，其含有该蛋白质变体或载体。

[0072] 如本文所用，术语“蛋白质变体”、“载体”、“神经系统变性疾病”和“预防”如上定义。

[0073] 如本文所用，术语“改善”指至少降低与通过施用蛋白质或载体治疗的病症相关的参数，例如症状的严重性的任何行为。

[0074] 如本文所用，术语“保健功能食品”是指根据第6727号的保健功能食品法，使用对人体具有有用功能的原料或成分生产和加工的食品，术语“功能”是指对健康的有益效果，如适合调节人体结构和功能或生理效应的营养物。同时，术语“保健食品”是指与普通食品相比具有维持或者改善健康功能的食品，术语“保健补充剂”是指改善健康的食品。在一些情况下，术语“保健功能食品”、“保健食品”和“保健补充剂”可以互换使用。

[0075] 新型蛋白质变体或编码其的多核苷酸可单独使用或与其他食品或食品添加剂结合使用，并可根据常规方法适当地使用。

[0076] 本发明的保健功能食品组合物可以根据本领域中常用的方法制备。该保健功能食品组合物可以通过添加本领域中通常添加的原料和成分来制备。具体地，该保健功能食品组合物还可以包含生理学上可接受的载剂，载剂的类型不受特别限制，并且可以使用本领域中常用的任何载剂。

[0077] 此外，保健功能食品组合物可以包含食品添加剂，例如防腐剂、消毒剂、抗氧化剂、着色剂、固色剂、漂白剂、调味品、甜味剂、调味剂、膨胀剂、增强剂、乳化剂、增稠剂、包衣剂、胶基、消泡剂、溶剂、改良剂等。可以根据食品的类型选择添加剂，并以适当的量使用。

[0078] 此外，只要细胞学上可以接受，任何制剂都可以无限制地用于保健功能食品。本发明的保健功能食品组合物可以制备为各种类型的制剂，并且本发明的食品具有避免在长期

施用药物期间可能发生的副作用的优点，因为其以食品为原料，并且与普通药物不同，具有良好的便携性。因此，该食品可作为佐剂摄入，以增强预防或改善神经系统变性疾病的效果。

[0079] 本发明的新型蛋白质变体或包括编码其多核苷酸的载体可以任何的各种重量％存在于保健功能食品组合物中中，只要它能够表现出预防或改善神经系统变性疾病的效果。具体地，基于保健功能食品组合物的总重量，蛋白质变体或载体可以0.00001重量％至100重量％或0.01重量％至80重量％的量存在，但不限于此。在出于健康和卫生的目的或出于健康管理的目的而长期摄入的情况下，该量可以在以上定义的范围内，并且活性成分可以以超过以上范围的量使用，因为它在安全性方面没有问题。

[0080] 如本文所用，术语“饲料”是指旨在用于或适于动物食用、摄取和消化的任何天然或人工的膳食、餐食或类似物，或餐食的成分。

[0081] 饲料的类型没有特别限制，可以使用本领域通用的饲料。饲料的非限制性实例包括植物饲料，如谷类、根类、食品加工副产品、藻类、原纤维类、药物副产品、油脂类、淀粉类、瓜类或谷类副产品，以及动物饲料，如蛋白质、无机物质、油脂类、矿物类、单细胞蛋白质、浮游动物或食品。这些可以单独使用或两种或多于两种组合使用。

[0082] 本发明的饲料组合物可以以本领域已知的各种形式制备。此外，该组合物还可以包含具有多种功效的物质，如补充营养、防止体重减轻、改善饲料中纤维的消化、改善油脂品质、防止生殖障碍、提高生育率和防止夏季高温应激的物质，例如，矿物如碳酸氢钠、膨润土、氧化镁和复合矿物，微量矿物如锌、铜、钴和硒，维生素如胡萝卜素、维生素E、维生素A、D和E，烟酸和维生素B复合物、保护性氨基酸如蛋氨酸和赖氨酸、保护性脂肪酸如脂肪酸钙、细菌和酵母如益生菌(乳酸菌)、酵母培养物和霉菌发酵产品。

[0083] 本发明还提供用于控制β淀粉样蛋白纤维化的组合物，其含有蛋白质变体或载体。

[0084] 本发明还提供用于控制β淀粉样蛋白纤维化的方法，其包括用该蛋白质变体或载体处理分离的细胞。

[0085] 如本文所用，术语“蛋白质变体”、“载体”、“β淀粉样蛋白”和“纤维化”如上定义。

[0086] 在本发明的具体实施方案中，基于野生型β淀粉样蛋白特征的引起淀粉样蛋白纤维化的β淀粉样蛋白(1-42)结构，发现本发明蛋白质变体降低了纤维形成率，并降低了淀粉样蛋白纤维化过程中的细胞毒性。此外，不同于用于抑制淀粉样蛋白纤维化的常规方法，淀粉样蛋白原纤维的形成率和长度通过β淀粉样蛋白的点突变来控制，而不是通过如抗体和纳米颗粒等外部添加剂来控制。

[0087] 在下文中，将参考以下实施例更详细地描述本发明。提供这些实施例仅仅是为了更好地理解本发明，而不应被解释为限制本发明的范围。

[0088] 实验实施例

[0089] 实验实施例1:基于计算机模拟计算和结构的蛋白质变体选择

[0090] 为了确定点突变对蛋白质溶解度的影响，使用Camsol网络服务器(http://www-vendruscolo.ch.cam.ac.uk/camsolmethod.html)计算了中性pH下取代前后的溶解度分数。

[0091] 采用GROMACS 2020.4和GROMACS 4.5.5进行分子动力学模拟计算。此外，还使用CHARMM36m力场(Huang,J.;Rauscher,S.;Nawrocki,G.;Ran,T.;Reig,M.;de Groot,B.L.;

Grubmuller,H.;MacKerell,A.D.Nature Methods 2017,14(1),71-73.)进行了模拟。

[0092] 用已发布的PDB结构(PDB代码:50QV)确定β淀粉样蛋白的初始结构。在400K至500K的温度下进行了副本交换分子动力学计算机模拟,以增强结构采样。通过20ns的计算,从5个副本中获得了总共10000个结构,然后选择了与系综优化方法(EOM)的溶液相X射线小角散射结果相关的极有可能存在于溶液中的50个结构。

[0093] 通过在50个选定结构中具有回转半径的扩展结构的基础上复制一式两份的结构来计算机模拟二聚体的动力学。对48个副本进行了400ns的计算,总共计算了19.2μs,并观察了达到平衡态的二聚体的结构。

[0094] 在pH值为7的条件下生成了TIP3P立方体水盒子,并在其中添加了浓度为20mM的钠和氯离子。使用GROMACS 2020.4程序的SHAKE算法以2fs的间隔进行计算。静电相互作用的计算采用粒子网格Ewald方法(PME),该方法的截止值为1.2nm,范德瓦耳斯互作用截止值为1.2nm。在该情况下,使用了速度可调的温控器。此外,在48个副本中,在300K至400K的温度下进行了REMD。此时,每2ps进行交换,平均交换概率为0.3。

[0095] 实验实施例2:材料

[0096] 本文未提及的所有实验材料均从可商购获得的产品中获得。

[0097] 合成的野生型和点突变体(纯度95%或超过95%)β淀粉样蛋白42购自Anygen(韩国光州)。用紫外-可见(UV-Vis)分光光度计(ε280nm=1490$M^{-1}cm^{-1}$)测定蛋白质浓度。三(羟甲基)氨甲基盐酸盐标准溶液(1M,pH7.4)购自Biosesang(韩国大田)。本文使用的溶剂是HPLC级水(JT Baker,美国新泽西州菲利普斯堡)。

[0098] 实验实施例3:细胞培养

[0099] SH-SY-5Y神经母细胞瘤细胞购自韩国细胞系库(韩国首尔),并在补充有10%胎牛血清(FBS;德国开普尼克科学股份有限公司,德国Ebsdorfergrund)和1%抗生素(10000U/mL青霉素G,10000μg/mL链霉素和25μg/mL两性霉素B;HyClone,美国犹他州洛根市)的以1:1混合的DMEM培养基/F-12营养物混合物培养基(DMEM/F-12;WelGENE)中孵育。抗生素在使用前经0.2μm过滤器过滤除菌,细胞在37℃、5%CO_2的潮湿条件下孵育。

[0100] 实验实施例4:β-淀粉样蛋白纤维化实验

[0101] 用ThT荧光分析法检测野生型β淀粉样蛋白及其蛋白质变体的纤维化率。

[0102] 具体地,在37℃下,在20uM的三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐溶液(pH7.4)和5uM ThT的情况下,诱导10uM的每个样品的纤维化。

[0103] 具体地,将样品接种在康宁96孔黑色聚苯乙烯微孔板(康宁3603,美国纽约州康宁市)上,然后用EASYseal™密封膜(格瑞纳生物科技有限公司)密封。然后,用Synergy H1微孔板检测仪(美国伯腾仪器有限公司,美国佛蒙特州威努斯基市)测量荧光强度。此时,激发波长和发射波长分别为446nm和482nm。

[0104] 实验实施例5:用透射电子显微镜(TEM)对原纤维进行形态分析

[0105] 用醋酸铀酰进行阴性染色,以显示β淀粉样蛋白的纤维化。

[0106] 具体地,由HPLC级水制备0.5%重量/体积乙酸铀酰储备溶液,并通过0.22μm一次性针头过滤器过滤。将总共10μM Aβ肽孵育24小时,并转移至400目碳支持膜Cu(II)格网(美国电子显微镜科学公司,美国宾夕法尼亚州哈特菲尔德)。在20℃下,将孵育的原纤维样品(5μL)点在Cu(II)格网上3分钟。在取出样品后立即用0.5%重量/体积醋酸铀酰溶液清洗格

网两次，每个样品用5μL醋酸铀酰溶液染色1分钟。然后，去除染液，然后在20℃下干燥4h。

[0107] 为了测量β淀粉样蛋白的纤维长度，使用Able Image Analyzer v3.6对图像进行了分析。本文，通过测量从可检测的纤维末端到其相对末端的距离来定义纤维长度。

[0108] 使用JEM-F200(TFEG)(日本电子株式会社，日本)场发射透射电子显微镜(国家大学间研究设施中心(NCIRF)，韩国首尔国立大学)观察TEM图像。

[0109] 实验实施例6：细胞活力试验

[0110] MTT法检测细胞活力。

[0111] 具体地，在96孔板的每一孔中培养15000个细胞，并孵育24小时。用β淀粉样蛋白单体及其原纤维处理SH-SY-5Y细胞，然后培养2天。然后，将MTT溶液加入到培养基中，并在37℃孵育3小时以形成MTT-甲臜产物。以在540nm波长处的吸收程度表示产物的量。

[0112] 每项测试同时对三个样品进行，整个试验重复三次，以确保重现性。

[0113] 实施例

[0114] 实施例1：基于β淀粉样蛋白(1-42)的结构和动力学特性选择能够抑制纤维化的点突变体

[0115] 由于β淀粉样蛋白(1-42)链之间的疏水相互作用在β淀粉样蛋白(1-42)的纤维化阶段起着重要作用，因此发现了主要发生疏水相互作用以有效抑制纤维化的区域。

[0116] 为此，该计算考虑了野生型β淀粉样蛋白(1-42)纤维结构的特征。结果，可以得到各氨基酸的溶解度分数。根据这些结果从图1可以看出，从亮氨酸17到苯丙氨酸19的区域和从异亮氨酸32到丙氨酸42的区域被识别为具有特别低的溶解度分数的两个区域，即，溶解度分数低于-1(图1)。

[0117] 纤维化的另一个必不可少的过程是初始相互作用。因此，作为后续步骤，使用分子动力学计算机模拟进行了足够长时间的计算，确定了达到平衡的两个β淀粉样蛋白(1-42)链彼此相互作用。

[0118] 结果，从图1可以看出，与其他区域相比，基于先前氨基酸的溶解度分数通过链内和链间接触概率图识别的两个区域具有更高的接触概率(图1)。以这种方式，由于疏水相互作用在淀粉样蛋白纤维化的初始阶段起着关键作用，因此认为两种(即初级和次级)计算机模拟方法显示出彼此的相关性并产生相同的结果。

[0119] 然后，通过计算机模拟的方法，在确定的两个区域中选择苯丙氨酸19、异亮氨酸32、亮氨酸34和丙氨酸42四个疏水氨基酸作为点突变的靶点。此外，所选择的四种蛋白质变体分别是用天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸和/或苏氨酸这四种极性且不带电荷的氨基酸来取代的，并且计算这四种蛋白质变体的溶解度分数。结果，从图1可以看出，在四种氨基酸中，用天冬酰胺取代增加溶解度分数最多，用其他氨基酸取代也增加了溶解度分数。此外，使用分子动力学计算机模拟方法的结合自由能计算结果显示，需要具有至少两个氨基酸取代的蛋白质变体来有效干扰纤维化(图1)。

[0120] 实施例2：天然(野生型)蛋白质和本发明蛋白质变体中β淀粉样蛋白(1-42)纤维化期间淀粉样原纤维形状和长度变化的测定

[0121] 用各10uM的天然(野生型)β淀粉样蛋白(1-42)和本发明中制备的蛋白质变体在37℃下诱导纤维化1天。然后，将成纤溶液转移到沉积有泡沫棒的铜网格板上，然后用醋酸铀酰进行阴性染色(图2D)。

[0122] 在实验条件下,当每分钟旋转205次时,野生型β淀粉样蛋白原纤维的平均长度为334.5纳米(nm),标准偏差为218.2nm(图2E)。

[0123] 然后,在与实施例1相同的实验条件下,通过计算机模拟选择的四个疏水氨基酸被天冬酰胺取代的蛋白质变体的原纤维的平均长度为766.0nm,标准偏差为551.1nm,与野生型β淀粉样蛋白相比明显增加(图2E)。

[0124] 有趣的是,其中三个疏水氨基酸被天冬酰胺取代的蛋白质变体的平均纤维长度略有增加,而被苯丙氨酸19、亮氨酸34和丙氨酸42取代的蛋白质变体以及被异亮氨酸32、亮氨酸34和丙氨酸42取代的蛋白质变体的平均纤维长度分别为254.4nm和199.3nm,与野生型β淀粉样原纤维的平均长度相比有所下降。

[0125] 特别是,发现了只有苯丙氨酸19和异亮氨酸32被天冬酰胺取代的蛋白质变体也保持了被工程设计的平均纤维长度为819.4nm的纤维化率特征,其中苯丙氨酸19和异亮氨酸32在具有增加的平均纤维长度的两个蛋白质变体中是常见的。

[0126] 此外,形成的原纤维的平均长度增加,并使用硫代黄素T基于荧光强度测量纤维形成率。结果表明,通过计算机模拟设计的突变体可以在动力学上抑制β淀粉样蛋白的纤维化(图2A至图2C)。

[0127] 此外,苯丙氨酸19和异亮氨酸32都被取代的蛋白质变体,以及亮氨酸34和丙氨酸42进一步被天冬酰胺取代的蛋白质变体也降低了细胞毒性并抑制了纤维化(图2A和图4)。

[0128] 同时,两种蛋白质变体,其中只有苯丙氨酸19和异亮氨酸32中的一种被天冬酰胺取代,不同于两种氨基酸被取代的情况,没有延缓纤维化的作用。这意味着,为了有效延缓β淀粉样蛋白的纤维化,应取代与上述实施例1中进行的模拟方法结果一致的氨基酸中的至少两个氨基酸。

[0129] 实施例3:测定β淀粉样蛋白(1-42)纤维化过程中原纤维形态、长度和细胞毒性的变化与野生型和成功抑制纤维化的蛋白质变体组合中蛋白质变体的比例的关系

[0130] 依次确定突变(变化)对纤维形成率的影响以及本发明的蛋白质变体和野生型β淀粉样蛋白的组合的效果。从抑制肝纤维化的蛋白质变体中筛选出F19N/I32N、F19N/I32N/L34N和F19N/I32N/A42N三种蛋白质变体,以最大限度地减少突变的数量,并对组合的动力学行为进行了24小时的观察。

[0131] 结果表明,三种蛋白质变体均能抑制野生型β淀粉样蛋白的纤维化,其抑制作用与野生型和变体蛋白的比例有关。具体地,当F19N/I32N蛋白变体分别存在20%、50%和100%时,与纯野生型突变体100%时相比,ThT荧光强度降低了67%、52%和15%。

[0132] 结果表明在TEM图像上原纤维减少,并且当蛋白质变体比例分别为20%、50%和100%时,平均纤维长度分别为386.3nm、495.5nm和742.7nm。这表明野生型β淀粉样蛋白的纤维长度为334.5nm,而本发明的蛋白质变体具有增加的原纤维长度,并具有从短原纤维到非常长的原纤维的混合分布。基于此,可以预测纤维成核受到干扰,并且该蛋白质变体与野生型β淀粉样蛋白相互作用以延缓纤维成核。

[0133] 然后,比较形成的淀粉样原纤维的细胞毒性,以确定β淀粉样蛋白(1-42)的细胞毒性的变化。具体地,向15000个培养的神经母细胞瘤中分别加入1uM的单体蛋白质和1uM的纤维状蛋白质,并孵育2天,然后使用MTT试剂测量细胞毒性的变化。

[0134] 结果,从图3可以看出,用野生型β淀粉样蛋白(1-42)原纤维处理的细胞的活力为

63％，而野生型β淀粉样蛋白原纤维与20％本发明蛋白质变体的组合的细胞活力提高到72％，特别是当蛋白质变体的比例提高到50％时，细胞活力提高到76％(图3)。

[0135] 这高于野生型β淀粉样蛋白浓度降至80％时的细胞活力。这一结果表明，细胞活力的提高是由于蛋白质变体与野生型蛋白质之间的相互作用，这超过了简单地降低野生型β淀粉样蛋白的浓度的效果。

[0136] 这些结果表明，本发明的蛋白质变体可以通过与野生型β淀粉样蛋白相互作用提高成神经细胞的活力来预防和/或治疗例如阿尔茨海默病的神经系统变性疾病。

[0137] 总体而言，从上述实施例可以看出，引起淀粉样纤维化的β淀粉样蛋白(1-42)的基于结构的蛋白质变体延缓纤维化，并且也可以降低淀粉样纤维化过程中发生的细胞毒性，纤维化是野生型β淀粉样蛋白的特征。

[0138] 此外，可以看出，不同于抑制淀粉样蛋白纤维化的常规方法，根据本发明，淀粉样蛋白原纤维的形成率和长度可以通过β淀粉样蛋白的点突变来控制，而不是通过使用如抗体和纳米颗粒等外部添加剂来控制。

[0139] 根据本发明，可以通过基于对蛋白质的结构和动力学的理解设计的点突变体，在动力学上延缓β淀粉样蛋白(1-42)的原纤维形成来抑制纤维化，并且可以通过点突变体与野生型β淀粉样蛋白(1-42)的相互作用来延缓纤维化并降低原纤维的细胞毒性。

[0140] 尽管已经详细描述了本发明的具体配置，但是本领域的技术人员将理解，该详细描述是作为用于说明目的的优选实施方案提供的，并且不应被解释为限制本发明的范围。因此，本发明的实质范围是由所附的权利要求及其等同方案来限定的，而不是由本发明的详细描述来限定。

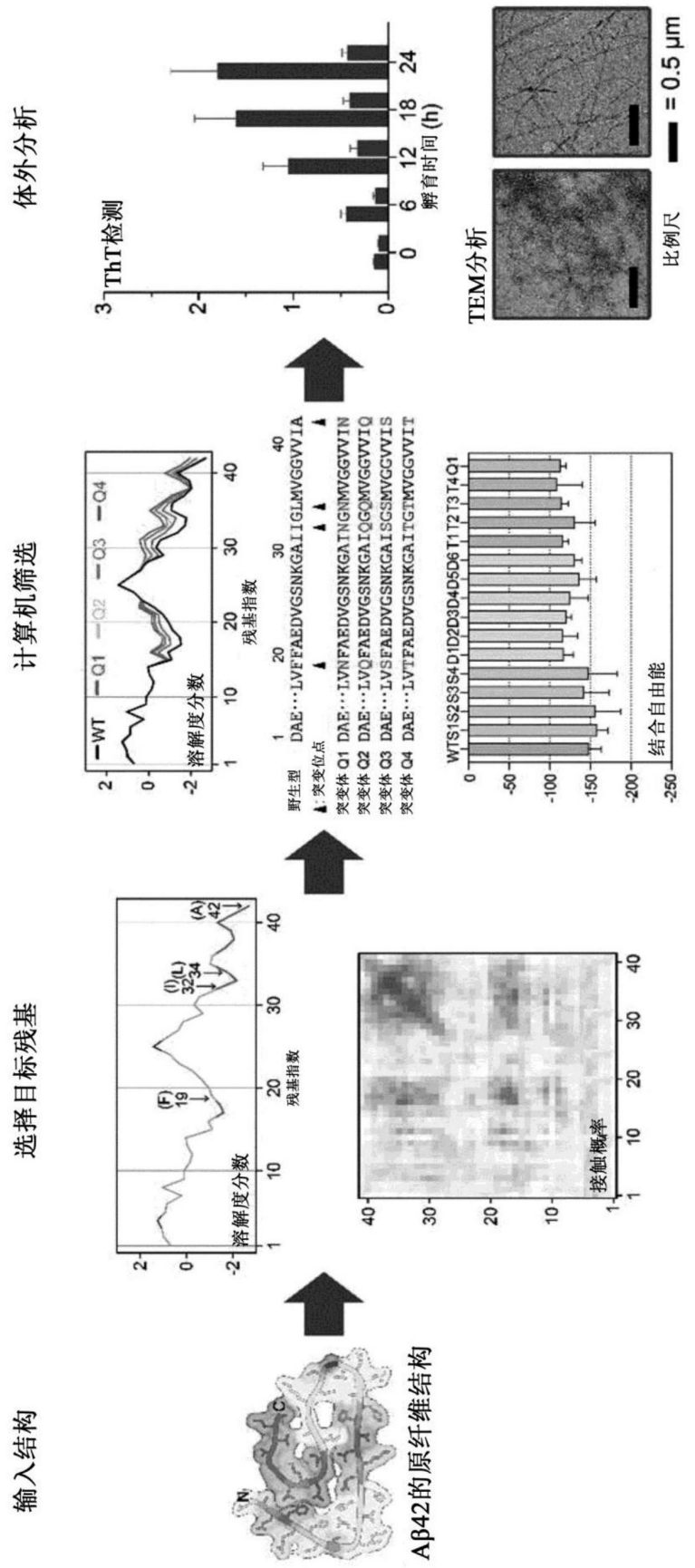

输入结构
选择目标残基
计算机筛选
体外分析
Aβ42的原纤维结构
溶解度分数
残基指数
接触概率
WT
Q1
Q2
Q3
Q4
野生型 DAE···LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
突变体 Q1 DAE···LVNFAEDVGSNKGAINGNMVGGVVIN
突变体 Q2 DAE···LVQFAEDVGSNKGAIQGQMVGGVVIQ
突变体 Q3 DAE···LVSFAEDVGSNKGAISGSMVGGVVIS
突变体 Q4 DAE···LVTFAEDVGSNKGAITGTMVGGVVIT
结合自由能
ThT检测
孵育时间 (h)
TEM分析
比例尺
= 0.5 μm

图1

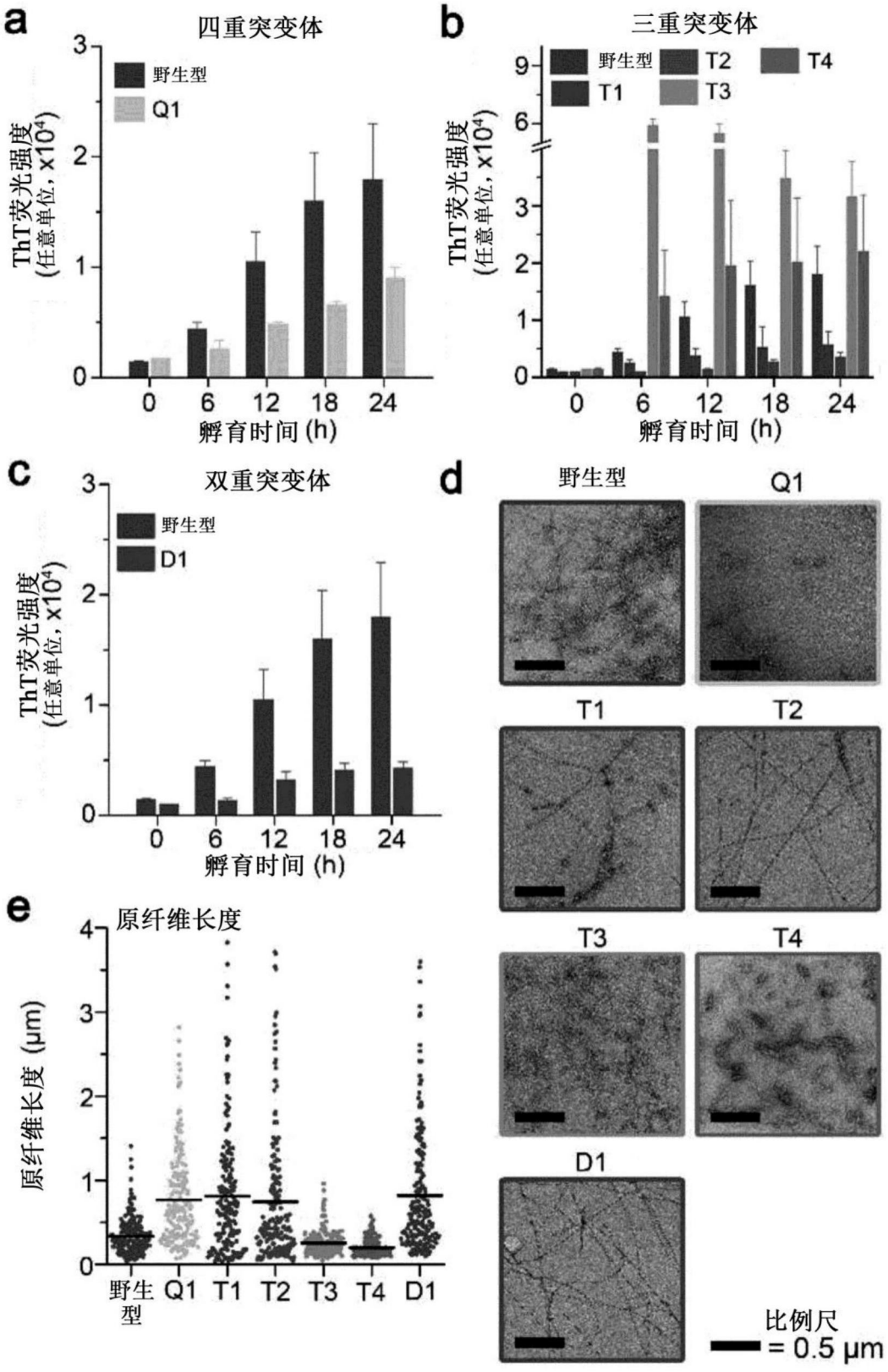

a
四重突变体
野生型
Q1
ThT荧光强度 (任意单位, x10⁴)
孵育时间 (h)
b
三重突变体
野生型
T1
T2
T3
T4
ThT荧光强度 (任意单位, x10⁴)
孵育时间 (h)
c
双重突变体
野生型
D1
ThT荧光强度 (任意单位, x10⁴)
孵育时间 (h)
d
野生型
Q1
T1
T2
T3
T4
D1
比例尺
= 0.5 μm
e
原纤维长度
原纤维长度 (μm)
野生型
Q1
T1
T2
T3
T4
D1

图2

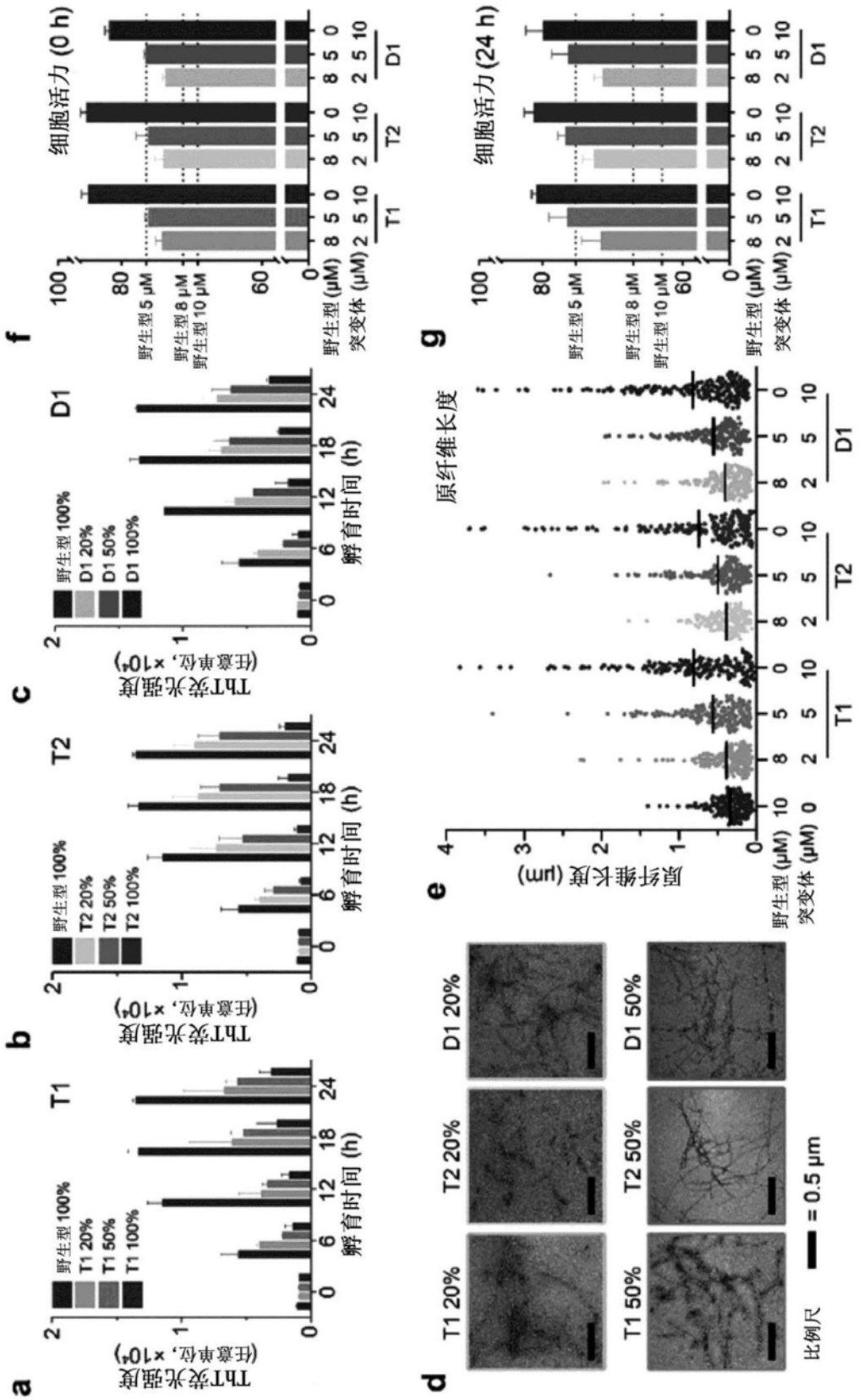

a
b
c
d
e
f
g
野生型 100%
T1 20%
T1 50%
T1 100%
T2 20%
T2 50%
T2 100%
D1 20%
D1 50%
D1 100%
ThT荧光强度 (任意单位, ×10⁴)
孵育时间 (h)
T1
T2
D1
T1 20%
T2 20%
D1 20%
T1 50%
T2 50%
D1 50%
比例尺 = 0.5 μm
原纤维长度 (μm)
原纤维长度
细胞活力 (0 h)
细胞活力 (24 h)
野生型 5 μM
野生型 8 μM
野生型 10 μM
野生型 (μM)
突变体 (μM)

图3

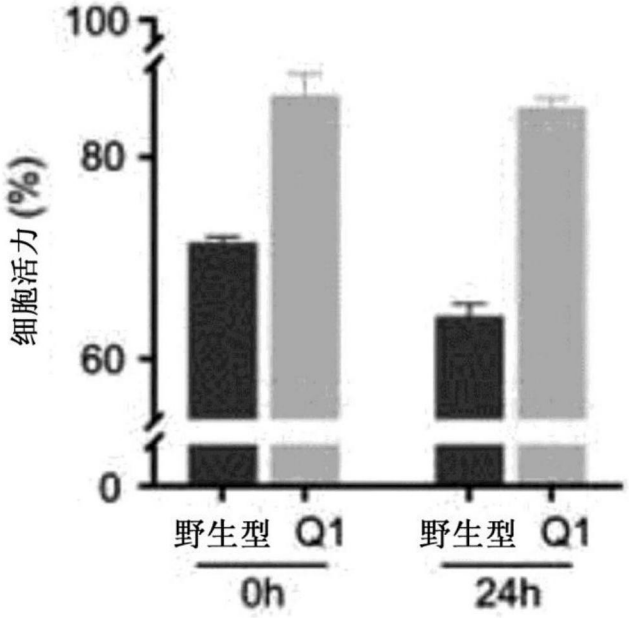


图4