

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C07K 1/00



[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 14/00 C07K 16/00
G01N 33/00 G01N 33/20

[21] 申请号 01812433. X

[43] 公开日 2003 年 9 月 3 日

[11] 公开号 CN 1440420A

[22] 申请日 2001.7.6 [21] 申请号 01812433. X
[30] 优先权
[32] 2000. 7. 7 [33] US [31] 60/217,319
[32] 2001. 3. 28 [33] US [31] 60/279,199
[86] 国际申请 PCT/US01/21379 2001.7.6
[87] 国际公布 WO02/04482 英 2002.1.17
[85] 进入国家阶段日期 2003.1.7
[71] 申请人 万能药制药公司
地址 美国马里兰州
[72] 发明人 本亚明·沃洛申
纳塔莉·奥斯特列托瓦-戈尔茨
迈克尔·S·勒博威驰

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司
代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 6 页 说明书 28 页 序列表 3 页
附图 6 页

[54] 发明名称 预防神经组织损伤和治疗 α -共核
蛋白疾病的方法

[57] 摘要

本发明提供测定 α -共核蛋白的聚集的方法，
它们是路易体病如帕金森氏病的标记。本发明还公
开聚集的抑制剂，包括镁和 α -共核蛋白结合肽。
这些抑制剂用于治疗路易体病。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种测定药剂是否能抑制 α -共核蛋白聚集的方法，其包括：

5 (a) 在外源铁或铜存在下将所述药剂加入到含有 α -共核蛋白的样品中，并使 α -共核蛋白聚集；

(b) 如果有聚集的 α -共核蛋白存在，测定聚集的 α -共核蛋白的量；以及

(c) 将来自步骤 (b) 的量与其中没有所述药剂的对照样品中所测定的量比较，

10 其中聚集的 α -共核蛋白量的降低显示该药剂能够抑制 α -共核蛋白的聚集。

2. 权利要求 1 所述的方法，其中将一种或几种自由基发生剂加入到步骤 (a) 的样品中以便促进 α -共核蛋白的聚集。

15 3. 权利要求 1 所述的方法，其中在步骤 (a) 中加入外源铁。

4. 权利要求 2 所述的方法，其中所述自由基发生剂是多巴胺或过氧化氢。

20 5. 权利要求 1 所述的方法，其中所述样品由过表达 α -共核蛋白的细胞组成。

6. 权利要求 5 所述的方法，其中所述细胞属于神经元起源。

25 7. 权利要求 1 所述的方法，其中所述聚集的量由蛋白分离测定，由此聚集的物质比未聚集的 α -共核蛋白显示更高的分子量。

8. 权利要求 7 所述的方法，其中所述蛋白分离由凝胶电泳来完成。

9. 权利要求 1 所述的方法，其中所述聚集的量通过加入标记的抗- α -共核蛋白抗体和测定结合的标记来测定。

5 10. 权利要求 9 所述的方法，其中所述标记是过氧化物酶。

11. 权利要求 1 所述的方法，其中所述聚集的量通过与硫磺素-S 结合来测定。

10 12. 一种测试物质对 α -共核蛋白聚集影响的试剂盒，其包括冻干的 α -共核蛋白、铁或铜盐以及缓冲液。

13. 权利要求 12 所述的试剂盒，其包括氯化铁。

15 14. 权利要求 12 所述的试剂盒，其进一步包括自由基发生剂。

15. 权利要求 14 所述的试剂盒，其中所述自由基发生剂是过氧化氢。

20 16. 一种治疗涉及形成路易体的神经变性疾病的方法，其包括给需要的患者施用一种或多种抑制形成 α -共核蛋白聚合体的药剂，由此呈现的路易体维持原状或减少。

17. 权利要求 16 所述的方法，其中所述药剂是 Mg^{2+} 。

25 18. 权利要求 17 所述的方法，其中所述药剂是 $MgSO_4$ 。

19. 权利要求 16 所述的方法，其中所述药剂是与 α -共核蛋白结合并抑制其聚集的肽。

30

20. 权利要求 19 所述的方法，其中所述肽与 α -共核蛋白的 C-末端第 113-140 位氨基酸或 NAC（非-淀粉状- β 蛋白成分）部分的任意部分结合。

5 21. 权利要求 20 所述的方法，其中所述肽选自 WRQTRKD、HYAKNPI、ATINKSL、RRRGMAI、THRLPSR、TKHGPRK、SLKRLPK、RLRGRNQ、WPFHHHR、HLYHHKT、THIHHPS 以及 MMMMMRL。

10 22. 权利要求 21 所述的方法，其中所述肽选自 THRLPSR、SLKRLPK、THIHHPS 以及 MMMMMRL。

23. 权利要求 22 所述的方法，其中所述肽是 SLKRLPK。

15 24. 权利要求 16 所述的方法，其中所述药剂是含有 Mg^{2+} 与肽组合的组合物。

20 25. 权利要求 24 所述的方法，其中所述药剂选自 WRQTRKD、HYAKNPI、ATINKSL、RRRGMAI、THRLPSR、TKHGPRK、SLKRLPK、RLRGRNQ、WPFHHHR、HLYHHKT、THIHHPS 以及 MMMMMRL。

26. 权利要求 25 所述的方法，其中所述药剂选自 THRLPSR、SLKRLPK、THIHHPS 以及 MMMMMRL。

25 27. 权利要求 26 所述的方法，其中所述肽是 SLKRLPK。

28. 权利要求 16 所述的方法，其中所述神经变性疾病是帕金森氏病、阿尔茨海默氏病弥漫性路易体病、混合的 AD-PD、多系统萎缩和哈-施二氏病（Hallervorden-Spatz 病）。

30 29. 权利要求 28 所述的方法，其中神经变性疾病是帕金森氏病。

30. 一种抑制形成 α -共核蛋白聚合体的方法，其包括用含有 Mg^{2+} 的物质处理 α -共核蛋白。

5 31. 一种抑制形成 α -共核蛋白聚合体的方法，其包括用与 α -共核蛋白结合并抑制其聚集的肽处理 α -共核蛋白。

32. 权利要求 30 所述的方法，其中所述物质进一步包括至少一种与 α -共核蛋白结合并抑制其聚集的肽。

10

33. 一种组合物，其包括 Mg^{2+} 和至少一种与 α -共核蛋白结合并抑制其聚集的肽。

15

34. 权利要求 33 所述的组合物，其中所述肽与 α -共核蛋白的 C-末端或 NAC 部分结合。

20

35. 权利要求 34 所述的组合物，其中所述肽选自 WRQTRKD、HYAKNPI、ATINKSL、RRRGMAI、THRLPSR、TKHGPRK、SLKRLPK、RLRGRNQ、WPFHHHR、HLYHHKT、THIHHPS 以及 MMMMMRL。

36. 权利要求 35 所述的组合物，其中所述肽选自 THRLPSR、SLKRLPK、THIHHPS 以及 MMMMMRL。

25

37. 权利要求 36 所述的组合物，其中所述肽是 SLKRLPK。

38. 权利要求 33 所述的组合物，其中所述 Mg^{2+} 是 $MgSO_4$ 。

39. 一种肽，其会与 α -共核蛋白结合并抑制其聚集。

30

40. 权利要求 39 所述的肽，其中所述肽包括选自 WRQTRKD、

HYAKNPI、ATINKSL、RRRGMAI、THRLPSR、TKHGPRK、SLKRLPK、RLRGRNQ、WPFHHHR、HLYHHKT、THIHHPS 以及 MMMMMRL 的序列。

5 41. 权利要求 40 所述的肽，其中所述肽包括选自 THRLPSR、SLKRLPK、THIHHPS 以及 MMMMMRL 的序列。

42. 权利要求 41 所述的肽，其包括序列 SLKRLPK。

10 43. 一种组合物，其包括权利要求 39 所述的肽以及可药用载体。

44. 权利要求 43 所述的组合物，其包括含有序列的肽，所述序列选自 WRQTRKD、HYAKNPI、ATINKSL、RRRGMAI、THRLPSR、TKHGPRK、SLKRLPK、RLRGRNQ、WPFHHHR、HLYHHKT、THIHHPS
15 以及 MMMMMRL。

45. 权利要求 44 所述的组合物，其包括含有序列的肽，所述序列选自 THRLPSR、SLKRLPK、THIHHPS 以及 MMMMMRL。

20 46. 权利要求 45 所述的组合物，其包括含有序列 SLKRLPK 的肽。

47. 一种鉴定肽的方法，所述肽对抑制 α -共核蛋白的聚集是有用的，所述方法包括：

- 25 (a) 将 α -共核蛋白 C-末端或 NAC 部分肽与固相底物结合；
 (b) 加入随机肽的噬菌体展示文库，并使其与 α -共核蛋白发生结合；
 (c) 检测任何结合的噬菌体；以及
 (d) 测定哪个肽显示在结合的噬菌体上，
由此这样的肽对抑制 α -共核蛋白的聚集是有用的。

30

48. 权利要求 47 所述的方法，其中所述 α -共核蛋白肽含有 α -共核蛋白第 121-131 位的氨基酸。

5 49. 权利要求 47 所述的方法，其中所述 α -共核蛋白肽含有 α -共核蛋白第 61-87 位的氨基酸。

50. 权利要求 47 所述的方法，其中所述噬菌体展示文库的肽长度是 7 个氨基酸。

10 51. 一种测定药剂是否能够抑制 α -共核蛋白的聚集的方法，其包括：

(a) 用荧光标记标记 α -共核蛋白，在含有怀疑是抑制 α -共核蛋白聚集的药剂的溶液中混合标记和未标记的 α -共核蛋白，并使 α -共核蛋白聚集；

15 (b) 通过观测溶液的极化变化来监控溶液各向异性的变化，如果有聚集的 α -共核蛋白存在，测定 α -共核蛋白聚集的量；以及

(c) 将来自步骤 (b) 的量与其中没有所述药剂的对照样品所测定的量比较，

20 其中极化变化显示聚集已发生，以及其中在药剂存在下所观测的聚集量的降低显示该药剂能够抑制 α -共核蛋白的聚集。

预防神经组织损伤和治疗 α -共核蛋白疾病的方法

5 本申请的基础是 2000 年 7 月 7 日提交的临时申请 60/217,319 和 2001 年 3 月 28 日提交的临时申请 60/279,199, 以其全文在此引作参考。

发明领域

10 本发明涉及药物筛选方法以及预防由 α -共核蛋白 (α -synuclein) 聚集导致的神经组织损伤的方法。这些方法特别用于路易体病 (lewy body disease) 和其他 synucleinopathies 的抑制剂的设计和开发, 并且还用于治疗如神经变性疾病尤其是帕金森氏病中。

15 发明背景

 帕金森氏病 (PD) 是常见的神经变性失调, 首先由 James Parkinson 于 1817 年描述。该病的四个主要诊断症状是静止颤动、运动过慢、肌肉僵硬以及姿势不稳。这些运动缺陷的症状是由黑质纹状体系统中多巴胺能神经元的丧失产生的[Gibb, W.等, J. Neurol. Neurosurg. and Psych., 51:745-52 (1988)]。

 PD 的特征是路易体的形成和多巴胺能神经元的死亡。[Adams D. 等, Principles of Neurology, 874-880, 第 3 版, McGraw-Hill, NY, (1985)]。PD 的神经病理学的检验标记是路易体。路易体是变性神经元中出现的胞质内的内含物, 所述变性神经元由丝状和粒状物质的密集核组成, 所述丝状和粒状物质的周围是直径具有 10-20nm 的基本导向的丝[Goedert, 20 M.等, Curr. Op. Neurobio. 8:619-32 (1999)]。总之, 引起 PD 的原因是未知的, 并且对遗传和环境因素的相对作用一直存在激烈的争论[Tanner, C.等, JAMA, 281:341-6 (1999)]。与锰的接触促
25 使了矿工中的帕金森氏病综合症, 这些矿工还包括精神分裂症形式的
30

行为。一些流行病学的研究已发现工业上接触铁与 PD 发病率之间的关系[Corell J.M 等, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 80:467-72,(1985)]、PD 发病率和血汞浓度之间的关系[Ngim C. H.等, *Neuroepi.*, 8(3):128-141 (1989)]以及 PD 的死亡率和接近铁相关的工业加工有关系[Rybicki A. 等, *Mov Disord.*, 8(1):87-92 (1993)]。

α -共核蛋白最初鉴定为斑马雀鸣鸟学唱歌的关键时期中向上调节与神经元分支相关的蛋白[George M.等, *Neuron*, 15:361 (1995)]。 α -共核蛋白是遍在蛋白, 其与伴侣蛋白 14-3-3 共享显著的物理的和功能的同源性, 并且在大脑中特别丰富[Ostrerova N.等, *J. Neurosci.*, 19:5782 (1990); Clayton D.等, *TINS* 21:249 (1998)]。 α -共核蛋白通常在第 87 和 129 位的丝氨酸上是磷酸化的[Okochi M.等, *J. Biol. Chem.*, 275:390 (2000)]。近期的研究表明 α -共核蛋白的突变可导致家族式 PD 以及 α -共核蛋白在路易体中积累。这些发现暗示 α -共核蛋白参与了 PD 的病理生理学[Spillantini M.等, *Nature*, 388:839 (1997); Spillantini M. 等, *PNAS USA*, 95:6469 (1998); Jenner P.等, *Ann. Neurol.*, 44:S72 (1998)]。迄今为止只鉴定与家族 PD 相关的突变是 α -共核蛋白基因中的 A53T 和 A30P 的突变[Goedert, M.等, *Curr. Op. Neurobio.*, 8:619-32 (1999); Papadimitriou, A.等, *Neurology*, 52:651-4 (1999); Polymeropoulos, M.等, *Science*, 276:1197-9 (1997)]。然而, 有许多环境证据牵涉到疾病的病原学中的氧化性应激反应[Jenner, P.等, *Annual Neurol.*, 44:S72-84 (1998)]。

多种试验证据暗示路易体与 α -共核蛋白相互作用。例如, 免疫组织化学的研究表明路易体对 α -共核蛋白和遍在蛋白有强的着色力[Jener, P.等, *Annual Neurol.*, 44:S72-84 (1998); Markopoulou, K.等, *Annual. Neurol.*, 46:374-81 (1999); Spillantini, M.等, *Nature*, 388:839-40 (1997); 和 Spillantini, M.等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:6469-73 (1998)]。利用重组蛋白的体外试验提示与野生型 α -共核蛋白比较, 在 A53T 和 A30P 突变增加 α -共核蛋白聚集[Conway, K.等, *Nature Med.*,

4:1318-20 (1998); Giasson, B.等, J. Biol. Chem., 274:7619-22 (1999); Hashimoto, M.等, Brain Res., 25 799:301-6 (1998)]。

5 关于 α -共核蛋白聚集和路易体形成的重要问题之一是这些过程是否伤害细胞。路易体可能是对自由基损伤反应出现的惰性基石标记, 或者它们可能是损伤细胞的毒剂。两种情形的例子存在于文献中。聚集的淀粉状蛋白- β ($A\beta$) 有毒于神经元, 而脂褐素似乎对细胞无害 [Behl, C.等, Cell 77:817-27 (1994)]。亨廷顿蛋白 (Huntington's Protein) 呈现一个中间位置, 其中与亨廷顿相关的毒性似乎在聚集之前, 并且亨廷顿蛋白的聚集甚至可以是保护性的 [Saudou, F.等, Cell 10 95:55-66 (1998)]。我们自己以前的研究显示短暂的 α -共核蛋白过表达对多种细胞是有毒的, 包括两个神经元细胞系 SK-N-SH 和 PC12 [Ostrerova, N.等, Neurosci., 19:5782-91 (1999)]。与此观测相一致, 最近, Masliah 及其同事已证明小鼠过表达 α -共核蛋白显示多巴胺能末梢丧失和运动损害, 与年龄相关, 这可能是毒性的指征 [Masliah, E. 15 等, Science, 287:1265-1269 (2000)]。这些发现暗示 α -共核蛋白聚集速率的增加可有助于对 PD 和其他路易体病中神经的机制的探讨。

对转基因动物的最新研究还暗示 α -共核蛋白的聚集对神经元是 20 有害的。近来有报道多巴胺能功能障碍发生在表达野生型人 α -共核蛋白的转基因小鼠中 [Masliah, E.等, Science, 287:1265-1269 (2000)]。进一步, 有报道果蝇过表达 α -共核蛋白, 表现出多巴胺能功能障碍和多巴胺能神经元死亡与 α -共核蛋白聚合体的发展有关 [Feany, MB.等, Nature, 404:394-8 (2000)]。证据提示神经元具有多巴胺形成 α -共核蛋白聚合体以及随着这些聚合体的发展而变性。 25

近来, 由铁和过氧化氢所产生的氧化性应激反应已显示诱导 α -共核蛋白在体外形成淀粉样聚集 [Hashimoto, M.等, NeuroReport, 10:717-21 (1999); Paik, S.等, Biochem. J., 340:821-8 (1990)]。据认为 30 氧化性应激有助于 PD, 因为多巴胺是强的自由基发生剂, 是黑质中

神经递质的要素[Chiueh, C.等, Adv. Neurol., 60:251-8 (1993); Jenner, P.等, Ann. Neurol., 25 44:S72-84 (1998)]。此外, 铁也刺激自由基生成, 随着年龄的增长铁积累在黑质中[Jenner, P.等, Ann. Neurol., 44:S72-84 (1998)]。铁作为血铁黄素颗粒沉积在胞质中, 以及充满铁蛋白颗粒的线粒体已在 ventrolateral 丘脑、尾状核和豆状核的神经元和神经胶质细胞以及帕金森氏病人大脑的黑质中观测到。[Earle M.等, J. Neuropathol. Exper. Neurol., 27(1):1-14, (1968); Asenjo A.等, Rev. Neurologique, 121(6):581-92, (1969); Riederer P.等, J. Neurochem., 52(2):515-20, (1989)]。因此, 存在于黑质中的氧化性条件可促进 α -共核蛋白聚集。然而, 在现有技术中, 这些氧化性条件是否真正促进活神经元中 α -共核蛋白聚集是未知的。

所以, 需要存在抑制路易体形成的物质, 该物质可用于治疗如 PD 疾病。同时, 通过筛选分析寻找这些物质的途径也是本领域需要的。美国专利号 6,184,351 公开共核蛋白聚集可通过以高浓度连续振荡 α -共核蛋白很长一段时间来诱导。然而, 所需的高浓度和连续振荡既不是生理的也不利于筛选分析的开发。此外, ‘351 专利中所述的分析不直接测定 α -共核蛋白聚集; 但对可溶未聚集的蛋白进行测定。另外, ‘351 分析只是直接检测影响成核的药剂, 而不检测由于其他机制会抑制聚集的药剂。所以, 筛选用于抑制路易体形成的药物的更好方法将对本领域有益。

发明概述

本发明涉及鉴定导致抑制体外或活的神经元中的 α -共核蛋白聚集的因素。

本发明的目的是提供鉴定、筛选和模拟能抑制 α -共核蛋白的聚集途径的药剂。因此药剂例如是阳离子、小分子、肽、肽模拟化合物、核酸、合成糖, 如肝素类似物, 或它们的组合。

本发明的另一目的是设计、制备和使用抗 α -共核蛋白聚集药物，用于治疗神经变性症状，如 PD，阿尔茨海默氏病、弥漫性路易体病、混合 AD-PD、多种系统萎缩症以及哈-斯二氏病。

5 附图简述

图 1: α -共核蛋白增加铁依赖性毒性。

A & B) BE-M17 细胞过表达野生型 A53T 或 A30P α -共核蛋白，用不同剂量的 FeCl_2 处理 48 小时，并利用 MTT 测定 (A) 或 LDH 分析 (B) 测定生存力。

10 C) BE-M17 细胞过表达野生型 A53T 或 A30P α -共核蛋白，用不同剂量的 H_2O_2 处理 48 小时，并利用 MTT 测定测定生存力。*ANOVA 分析 $p < 0.001$, +, $p < 0.01$ 。

图 2: 铁与 α -共核蛋白结合:

15 A) FeCl_2 由 α -共核蛋白中的酪氨酸猝灭荧光发射光谱 ($\lambda_{\text{ex}} = 280\text{nm}$)。高剂量的铁 ($>10\text{mM}$) 会猝灭酪氨酸荧光，然而，结合铁的蛋白表现出在较低剂量时猝灭 (推测是因为通过蛋白结合使铁放置于靠近酪氨酸的位置)。酪氨酸具有荧光发射光谱，所述光谱在 280nm 处受激发时，发射峰为 310nm。

20 B) 铁与野生型和 ΔC_{1-113} α -共核蛋白结合的剂量反应曲线以荧光发射为基础。缺失构建体缺少 α -共核蛋白的最后 27 个氨基酸，并分析这种构建体的结合。 α -共核蛋白 ΔC_{1-113} 的 C-末端缺失构建体显示与铁结合减少超过 4 倍， $\text{IC}_{50} = 726\mu\text{M}$ ($p < 0.001$) (图 2B)。

图 3: 镁保护共核蛋白聚集。

A) 镁将 α -共核蛋白转化成抗聚集的构象。

25 B) 镁抑制 α -共核蛋白聚集。a) 镁 (0.1mM) 抑制铁诱导的重组野生型 α -共核蛋白的聚集 ($4\mu\text{M}$, 24 小时温育)。b) 镁还诱导初级神经元中 α -共核蛋白的聚集。需要较高的剂量，这是因为细胞膜给离子通道造成障碍。相似的结果见于 BE-M17 细胞过表达 α -共核蛋白。

30

发明详述

如许多参与神经变性疾病的其他蛋白一样， α -共核蛋白具有高度的寡聚/聚集倾向，形成大蛋白丝状体。沉积在路易体中 α -共核蛋白在体外倾向于聚集3天以上的周期。该速率在 α -共核蛋白的突变形
5 A53T 和 A30P 中增加 2-3 倍。金属离子、氧化性应激和其他环境因素也可增加聚集的速率（参见下文）。本发明针对能抑制 α -共核蛋白寡聚并由此抑制路易体形成和神经变性的治疗剂的开发。容易鉴定这些药剂的方法也是本发明所考虑的。

10 因此，本发明的一个方面涉及测定药剂在缓解神经疾病症状中是否是有用的方法，作为途径的部分其包括 α -共核蛋白聚集，所述方法测定药剂预防 α -共核蛋白聚集的能力。一种这样的方法测定药剂是否能够抑制 α -共核蛋白的聚集途径，以及包括在外源铁存在下将药剂加入到含有 α -共核蛋白的样品中，以及使 α -共核蛋白聚集，如果有聚
15 集的 α -共核蛋白存在，则测定 α -共核蛋白聚集的量，然后将此量与没有药剂的对照样品所测定的量进行对比。聚集量的减少说明药剂能够抑制 α -共核蛋白聚集，并由此显示该药剂在治疗疾病中将是有益的。外源铁的加入诱导聚集形成。铁浓度的范围是约 0.1-1mM，优选 0.1-1mM。

20 以上分析可在体外用 α -共核蛋白来进行，或在细胞培养体系或动物模型中进行。对于体外分析，向 α -共核蛋白的溶液中加入会加速聚集的成分，如外源铁或铜（例如，盐或金属蛋白质），和/或自由基发生剂，例如多巴胺和过氧化氢。也可使用具有加速寡聚倾向的突变
25 α -共核蛋白（A30P 或 A53T）。同时，加入待测药剂，以及允许有足够时间进行聚集。尽管需要较长一段时间方可观察到聚集，但通常约 12 小时。

有若干种检测任意聚集的 α -共核蛋白的途径，因此本发明不仅
30 限于此。本文举例的一种方法采用 SDS-PAGE 和免疫印迹。 α -共核

蛋白寡聚体已显示对 SDS 是稳定的，因此，寡聚体结合的模式可在印迹上鉴定。测定寡聚程度的第二种方法是用硫黄素-S (thioflavine-S) 染色寡聚体并通过荧光显微镜观察丝状体的显现。硫黄素-S 与寡聚后形成的 β -折叠相结合。

5

对 α -共核蛋白寡聚作用，人们还可使用新型荧光各向异性分析，其在较高通量的药物筛选中大有用途，并且这也是本发明的目的。荧光各向异性是测定溶液中荧光团的旋转扩散。小分子比大复合体旋转得更快，由此随着 α -共核蛋白寡聚，相关荧光团的荧光各向异性预期会增加。 α -共核蛋白可用胺活性荧光团在中性 pH 下特异标记在 N-末端，这些活性荧光团例如可选自荧光素、芘和丹磺酰衍生物。通过监控各向异性的变化，人们可容易地测定能抑制聚集的化合物，这是因为它们预期会阻断各向异性的增加。参见 Lakowicz, Joseph R., Principles of Florescence Spectroscopy, 第 5 章，第 111-153 页，Plenum Press (NY) (1986)，在此引作参考。

10
15

对于细胞培养分析，可使用成神经细胞瘤细胞，如 BE-M17 细胞，其可从 ATCC 中公开获得。为了诱导细胞中的 α -共核蛋白聚合体，将细胞用表达 α -共核蛋白的载体或其一种突变体 (A30P 或 A53T) 转染，由此向上调节 α -共核蛋白的生产。该上调作用具有诱导聚集的效应，否则其将不发生。如采用以上的体外分析，将具有或没有自由基发生剂的 Fe^{2+} (如过氧化氢和多巴胺) 加入到细胞培养物，并对细胞内寡聚作用监控 12-96 小时的周期。聚集的检测例如可通过使用硫磺素-S 或标记抗- α -共核蛋白的抗体进行组织化学染色。或者，可收集细胞，使细胞溶解，在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上分离，并用标记抗- α -共核蛋白抗体免疫印迹。检测聚集的 α -共核蛋白的另一途径是使用电子显微镜。

20
25

优选的是将一种或多种自由基发生剂如多巴胺和过氧化氢与铁 (Fe^{2+}) 一起加入到细胞培养分析中。最优选的是仅有 Fe^{2+} 和过氧化

30

氢作为聚集的诱导剂加入（但对于具有 A53T 突变的细胞，不需要自由基）。

5 术语“标记的”意思是用此类生化分析中通常所用的任何物质标记，并且包括例如放射性、酶、化学发光和荧光的标记。优选地，标记是酶，最优选地，标记是过氧化物酶。

10 在利用人 BE-M17 成神经细胞瘤细胞的细胞培养分析中，所述人 BE-M17 成神经细胞瘤细胞过表达野生型、A53T 突变或 A30P 突变的 α -共核蛋白，细胞中发生的聚集量依赖于所表达的 α -共核蛋白的量和类型， α -共核蛋白聚集的量按序排为 A53T>A30P>野生型>未转化。除刺激聚集形成外， α -共核蛋白还似乎诱导毒性。BE-M17 成神经细胞瘤细胞过量表达 α -共核蛋白对由铁诱导的毒性易损性显示高达 4 倍的增加。易损性的排序与聚集相同。这些数据暗示 α -共核蛋白起着与铁和多巴胺一致作用，以便诱导 PD 中路易体病理学的形成和 PD 中的细胞死亡。

20 本发明的另一方面是抑制 α -共核蛋白聚合体形成的方法。更具体而言，该方法是治疗路易体疾病，如帕金森氏病，由此路易体形成通过抑制 α -共核蛋白聚集受到控制（或减少）。即，本发明设想用于治疗包括路易体形成的神经变性疾病的方法，其包括给需要的患者施用一种或多种抑制 α -共核蛋白聚合体形成的药剂，由此路易体保持原状，或更优选的是减少。这种治疗的细节依赖于所涉及的治疗剂、特定的疾病及其发展阶段以及其他因素如生物有效度等，这些是专业技术人员确定剂量、施用途径和治疗周期时可考虑的所有因素，并且 25 本发明不受此限制。

30 本发明的另一方面是用于治疗路易体病的治疗剂，它们已被本发明人发现。尤其是本发明人发现 Mg^{2+} 抑制 α -共核蛋白的聚集。更具体而言，本发明人发现铁和镁与 α -共核蛋白结合，但是对 α -共核蛋

白聚集行使相反的作用。铁增加 α -共核蛋白聚合体，而镁抑制 α -共核蛋白聚合体。除了降低细胞培养物中的野生型 α -共核蛋白聚集以外，镁还降低可见神经元内含物的形成以及防止神经毒性。这些数据是镁在治疗路易体病如 PD 中治疗作用的指征，其中疾病的进程至少可减慢并可能逆转。

已知 PD 患者的大脑中铁水平增加，而镁水平下降，但是这些金属在 PD 病理生理学中所起的作用从来未被阐述。参见例如，Durlach 等，*Magnes. Res.* 11:25-42 (1998)。现有技术没有暗示调节大脑中铁和镁的平衡会对如路易体形成或疾病的发展具有影响。Glick 的美国专利号 4,985,256; 4,837,164 和 5,004,615 公开施用镁来提高痴呆的记忆，其中提到了 ALS-PD（“肌萎缩外侧硬化和帕金森氏病复合体”）。该病由 Guam 识别，并涉及那些受影响的大脑细胞中高水平的铝和低水平的镁。然而，症状不同于帕金森氏病，尤其是有关路易体的形成，其没有 ALS-PD。此外，为此目的，Glick 暗示补充镁是使丘脑中的镁升高至正常水平，而非干扰 α -共核蛋白聚集。直至本发明才显示镁对 α -共核蛋白聚集具有影响。

所以，作为优选的实施方案，将 Mg^{2+} 给需要治疗路易体病的哺乳动物施用。 Mg^{2+} 可以任何非毒性可药用形式。优选施用的镁如硫酸镁、磷酸镁、葡萄糖酸镁、氧化镁、氢氧化镁、氯化镁、碳酸镁或其组合施用。对于肠胃外施用，最优选的是硫酸镁。

如本文所用的术语“施用”是指把药物应用或传递到哺乳动物。该术语意在包括完成药物应用或传递的任何施用方法，但优选的是那些将镁靶向所涉及的大脑组织中的施用方法。该术语还旨在包括任何对完成这些施用所必需的方法，如糖装载程序以便使药物跨越血脑屏障，如果需要。

镁的剂量由专业技术人员例如通过参照用镁盐治疗其他症状的治

疗方案来确定。镁的施用不应达到毒性水平。本发明人通过实验已发现体外抑制 α -共核蛋白聚集所要求的镁是临床方案中使用镁的通常所采用的范围内（例如妊娠惊厥），即 0.5-2mM MgSO_4 。正常成人中血浆水平是每升 1.5-2 mEq，其中约三分之一与蛋白结合。在高镁血症中，其主要是由于肾不足，过量的镁导致中枢神经系统和周围神经肌肉连接的降低。当血浆水平开始超过每升 4mEq 时，深度腱反射变得降低或缺乏，在此点呼吸瘫痪是危险的。所以，根据本发明在用镁盐治疗时，对镁水平应进行适当的监控。

镁盐治疗性地用于人中已有多年。例如，许多抗酸剂由镁盐组成，具体是柠檬酸盐和硫酸盐。因此，如果通过胃肠道施用镁，预计这些盐是有用的。对于肠胃外（肌内或静脉内）施用，这在本发明中是优选的，因为可达到较高的全身性水平，所选择的盐是硫酸镁。这种施用已在治疗与妊娠惊厥相关的发作中采用多年，其中依据体重给定起始和维持剂量。对于妊娠血毒症的剂量计划，参见 Flowers 等，Obstet. Gyn., 19:315-327 (1962)，其内容在此引作参考。根据本发明，这个方案还适用于治疗路易体病，其血浆浓度也在 3-6mg.% 的范围内。然而，在进行性神经变性路易体病如 PD 的情况下，该方案可持续余下的生命。

本发明人还发现其他用于治疗路易体病和共核蛋白病（Synucleinopathies）（该病有 α -共核蛋白参与它们途径，但不必是路易体）的药剂是肽或其衍生物，所述肽或其衍生物与 α -共核蛋白结合并抑制其聚集。这些肽单独或其组合物可用于治疗具有神经变性疾病的个体，该神经变性疾病显示路易体病理学。当不被任何特定的理论所束缚时，据信肽与 α -共核蛋白的结合以某种方式防止 α -共核蛋白的聚集，也许是通过 Fe^{2+} 的作用来干扰聚集。

例如利用噬菌体展示来筛选那些噬菌体在其表面上表达与 α -共核蛋白结合的肽，可发现这些肽，并确定是什么肽。通过利用如那些

在此公开或如美国专利号 6,184,351 中公开的分析, 在此引作参考, 由此而言也可测试该肽或任意肽的抑制效果从而确定其作为药剂治疗路易体病或共核蛋白病的有效性。根据这些肽与 α -共核蛋白的 C-末端 (大约氨基酸第 113-140 位) 和 NAC 部分 (大约氨基酸第 61-87 位) 结合的能力来筛选它们, 这是因为该区域被认为参与了聚集过程。若干种与 C-末端部分结合的肽如下 (所有肽以 5'-3' 顺序给出): (1) WRQTRKD; (2) HYAKNPI; (3) ATINKSL; (4) RRRGMAI; (5) THRLPSR; 以及 (6) TKHGPRK。若干种与 NAC 部分结合的肽是: (1) SLKRLPK; (2) RLRGRNQ; (3) WPFHHHR; (4) HLYHHKT; (5) THIHHP; 以及 (6) MMMMMRL。选择 NAC 部分是因为已发现该段蛋白聚集在阿尔茨海默氏病的淀粉样噬菌体中。由于更强的结合特性, 特别优选的是 THRLPSR; SLKRLPK; THIHHP 和 MMMMMRL。最优选的是肽 SLKRLPK。

肽的制备采用肽合成技术领域中所众所周知的方法进行, 而且变体或类似物的制备也依据已建立的方法进行。例如, 人们可期望增加肽的治疗功效, 改变疏水性/亲水性或减少不需要的副作用。通过添加功能基团如将化合物靶向到受到特定路易体病影响的神经组织, 可改变肽的结构。同样可制备肽的一种或多种氨基酸的替换, 并且这些替换通常会涉及保守替换, 即保持原始氨基酸如电荷等特性的替换。这些保守替换的例子是在 (1) M、I、L 和 V; (2) F、Y 和 W; (3) K、R 和 H; (4) A 和 G; (5) S 和 T; (6) Q 和 N; 以及 (7) E 和 D 之间进行。肽的变化不需是保守的; 通过前述分析, 总是测试对聚集抑制中的功效变更的肽。

优选的是肽抗蛋白水解消化。通过存在 D-氨基酸或通过用非可水解的键取代敏感的肽键, 这些肽可制备成蛋白酶抗性的。许多这样的键以及如何导入它们是本领域已知的。它们包括 $-\text{psi}[\text{CH}_2\text{NH}]--$ (还原的酰胺肽键); $--\text{psi}[\text{COCH}_2]--$ (酮亚甲基肽键); $--\text{psi}[\text{CH}(\text{CN})\text{NH}]--$ (氰亚甲基氨基肽键); $--\text{psi}[\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})]--$ (羟基乙烯基肽键);

--psi[CH₂O]--（肽键）；--psi[CH₂S]--（硫亚甲基肽键）。采用末端修饰也可构建这些肽，如 C-末端的酰胺或 N-末端的乙酰基团，这将使它们对蛋白水解的消化产生抗性。

5 非肽（肽模拟物）类似物是其中肽的一个或多个残基被非肽部分取代的化合物。非肽部分应该使肽保持其天然或更多生物活性的构象。对于非肽模拟化合物的制备方法，参见 Nachman 等，Regul. Pept. 57:359-370 (1995)。

10 肽的修饰可使它们与化合物共轭来进行，所述化合物有助于它们的转运跨越血脑屏障。这些化合物例如可选自在 WO 00/09073 中公开的脂肪酸、阳离子化的抗体或白蛋白以及两性药物寡聚体共轭物，在此引作参考。或者，肽可与一种或多种化合物一起施用，所述一种或多种化合物有助于转运跨越血脑屏障，但它或它们不与肽共轭。对于
15 这些化合物的例子，参见美国专利号 5,112,596 和 5,268,164，两者皆在此引作参考。

术语“肽”意指任一种外源肽及其衍生物，并且不限制氨基酸的数目。因此，“肽”可包括多肽。

20 组合物尤其是药物组合物包括一种或多种肽，也形成本发明的部分。根据施用途径，治疗有效量的肽（一种会缓解疾病发展的肽）可与任意可药用和/或生理可接受的载体组合，如水溶液、盐、缓冲液、稳定剂、增溶剂、填充剂、稀释剂以及其他已知物质。组合物的制备
25 可以适合于所需的施用方式采取任意种形式进行。例如，药物组合物的制备形式可以是片剂、粉剂、锭剂、酏剂、悬浮液、乳液、溶液、糖浆、气雾剂（如固体或在液体介质中）、软凝胶和硬凝胶胶囊、栓剂、无菌可注射液、无菌包装粉等。同样，载体或稀释剂可包括本领域中时间延迟或时间缓释的物质，如甘油单硬脂酸酯或单独的或与蜡
30 状物、乙基纤维素、羟基丙基甲基纤维素、甲基丙烯酸甲酯等组合的

甘油二硬脂酸酯。对于注射，本发明的药剂也可制成水溶液，优选在生理相容的缓冲液中，如 Hank 溶液、Ringer 溶液或生理盐水缓冲液。对于跨粘膜施用，适用于穿透障碍的渗透剂用于制剂中。这些渗透剂是本领域已知的。对于口服，通过将活性化合物与本领域已知的可药用载体组合，可容易地将化合物制成制剂。肽可被制成通过注射如通过大丸剂注射或连续灌输用于肠胃外施用的制剂。注射制剂与加入的防腐剂可以单位剂量形式例如安瓿或以多剂量容器呈现。组合物可采取如油状或水载体中的悬浮液、溶液或乳液的形式，并且可含有制剂介质如悬浮、稳定和/或分散介质。对于制剂的详尽表，参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Mack Publishing Co. (1990), 在此以其全文引作参考。

根据专业人员各自采用和确定的常规方式，可将一种或多种肽给需要治疗路易体病的哺乳动物施用。优选地，肽的施用是注射或逐渐灌输一段时间。可使用的其他途径是口服、静脉内、颅内、腹膜内、肌肉内、腔内、呼吸道内、皮下、经皮或脂质体介导的传递。利用靶向传递方法也可完成特异针对受影响的神经元细胞的传递，这些传递方法包括与分子的共轭，所述分子选择性地与细胞或脂质体中的包膜结合，其含有会与受影响细胞结合的靶向分子。这些靶向方法是本领域众所周知的，例如美国专利号 5,391,723，在此引作参考。此外，一些脂质体可从市场上获得。

在优选的实施方案中，预见的是将肽与如上所述的镁疗法同时施用。组合疗法可能会加速恢复，并达到更完全水平的恢复。一旦恢复已达到缺乏进一步临床功能丧失的阶段，则共施用镁可允许较低剂量的肽以用来维持。

治疗处理的受试对象可以是人或动物，如啮齿类、狗、猫、果蝇和 *C. elegans*。这些动物可以是有用的人模型系统。

最后，本发明还设想了用于实施分析以测试各种物质对 α -共核蛋白聚集影响的试剂盒。该测试包含最少的冷冻 α -共核蛋白、铁或铜盐和缓冲液，如 PBS 或 Tris 缓冲液（生理 pH 下）。该试剂盒还可包含自由基发生剂，如多巴胺或过氧化氢。优选的是该试剂盒包含氯化铁。对于自由基发生剂，过氧化氢是优选的。

本发明以下列实施例来说明。这些实施例的提出意在帮助理解本发明，而不是意在和不应解释成以任何方式限制本发明，如附加的权利要求所述。

下列物质和方法用于本文的实施例中。

α -共核蛋白的克隆、过表达和纯化

将 α -共核蛋白（野生型、A53T 和 A30P）克隆到 pcDNA3 的 NotI 位点中。各个构建体的序列由 DNA 测序得到确认。对于生产重组蛋白，将 α -共核蛋白插入到 Pro-Ex His 6 载体（GIBCO/BRL）的 NcoI/NotI 位点中。为了生成重组 α -共核蛋白，采用 BPer（Pierce）试剂使重组 α -共核蛋白从 IPTG-诱导的细菌裂解物中溶解出来，然后依据厂商的说明（GIBCO/BRL）将它们过镍琼脂糖亲和柱、冲洗并用咪唑洗脱。纯化后，将 His-6 标记用 TEV 蛋白酶切割，并过镍琼脂糖柱除去。所用抗体包括：多克隆抗- α -共核蛋白抗体（SC1，1:2000 用于免疫印迹和 1:500 用于抗人 α -共核蛋白的免疫细胞化学，残基第 116-131，序列=MPVDPDNEAYEMPSEE），单克隆抗- α -共核蛋白-1 抗体（1:1000，Transduction Labs）、多克隆兔抗遍在蛋白（1:1000 用于免疫印迹和 1:500 用于免疫细胞化学，Dako）。

噬菌体展示：温育噬菌体文库，所述噬菌体文库除 7 个氨基酸的序列以外全部相同，这 7 个氨基酸存在于外壳上并在噬菌体与噬菌体之间随机区别。将表达与 α -共核蛋白特异性结合的序列的噬菌体分离、克隆，并进行 DNA 测序以确定氨基酸序列。然后合成 7 个氨基

酸肽并直接测试。

细胞培养：把细胞生长在 OPTIMEM (Gibco/BRL) 中，如需要，所述 OPTIMEM 补充有 10%FBS、非必需氨基酸、丙酮酸钠和 500 μ g/ml 的 G418。将 G418 用于筛选。

免疫印迹：用 SDS 溶解液 (2%SDS、10mM Tris、pH7.4、2mM β -磷酸甘油、1 μ M AEBSF) 收集细胞。采用 BCA 分析 (Pierce) 测定蛋白量，每泳道 5-30mg 在 14%SDS 聚丙烯酰胺凝胶上跑胶，并转移到硝酸纤维素 (200 mÅmp, 12 小时) 上。然后，将硝酸纤维素在 5%牛奶/PBS 中温育 1 小时，冲洗，在 1° 抗体中温育过夜，冲洗，然后在过氧化酶偶联的 2° 抗体中温育 3 小时，并用化学发光试剂 (NEN) 显影。

细胞分级分离：对于细胞分级分离，将细胞收集在缓冲液中，其含有 20mM Tris、pH7.4、2mM EDTA、0.25M 蔗糖以及 20 μ g/ml 蛋白酶抑制剂鸡尾酒 (Sigma)。将细胞裂解液超声并在 4°C 下以 100,000 $\times$ g 离心 1 小时。

MTT 和 LDH 毒性分析：以 5000 细胞/孔 100 μ l 生长培养基将细胞铺在 96 孔碟中。对于 MTT 测定，药物处理 48 小时后，通过加入 0.5mg/ml MTT (MTT, 3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-二苯基四唑溴化物) 并在 37°C 下温育 3 小时，对生存力进行分析。然后加入溶解缓冲液 (100 μ l 的 50%N,N-二甲基甲酰胺中的 20%SDS)，24 小时后，将板在 540nm 处读数。对于乳酸脱氢酶 (LDH) 分析，药物处理 24 后，根据厂商说明，利用 MTS 试剂和 Cyttox 96 试剂盒 (Promega) 对生存力进行分析。

硫磺素-S 组织化学：把细胞在 4%低聚甲醛中固定 30 分钟。用 PBS 两次洗涤后，将细胞用 0.5%硫磺素-S 温育 8 分钟，以 80%乙醇洗涤

三次，以 H₂O 洗涤一次，然后封固。

5 电子显微镜：将细胞用刮刀分离开，朝下转动以及 4℃下在 2% 戊二醛中固定 2 小时，然后 4℃下在 1%四氧化锇中固定 1 小时。将样品脱水，包埋在环氧树脂(Electron Microscopy Science, Fort Washington, PA)中，并切成 70nm 的切片用于显微镜。接着用 5%乙酸双氧铀以及雷诺柠檬酸铅进行后染色。样品用 Hitachi H-600 透射电子显微镜在 75kV 下观测。

10 铁染色：将细胞在 4%低聚甲醛中固定 30 分钟，随后用 PBS 洗涤两次，根据厂商说明书 (Sigma) 利用 Accustain®铁染剂染色。

15 免疫组织化学：对于光学显微镜术，将细胞用 4%低聚甲醛固定，洗涤，通过用 0.2%Triton-X 100 温育 30 分钟透化，用 5%干牛奶/1%山羊血清/PBS 封闭，洗涤，接着在 1° 抗体 (1:500) 中温育过夜。根据厂商说明书 (Vector, Burlingame, CA) 用 ABC 试剂盒和 3',3'-二氨基联苯胺显影。

实施例

20 实施例 1 铁和自由基刺激 α -共核蛋白聚集

25 为了测试 α -共核蛋白中的 A53T 和 A30P 突变是否增加 α -共核蛋白在神经元中聚集的倾向，在用野生型、A53T 或 A30P α -共核蛋白稳定转染的人 BE-M17 成神经细胞瘤细胞中对 α -共核蛋白聚集进行测定。各细胞系用新鲜制备的 FeCl₂ (1 或 10mM) 处理 48 小时，然后收集，匀浆并分级分离到膜和胞质成分。膜 (5 μg/泳道) 和胞质 (20 μg/泳道) 成分用单克隆抗-α -共核蛋白抗体免疫印迹。

30 α -共核蛋白的聚合体在膜部分是明显的，而在胞质部分中不明显。用 FeCl₂ 处理 A53T-表达细胞系，诱导剂量依赖的形成异源高分子量 α -共核蛋白聚合体，其迁移在堆积胶中。大量的抗-α -共核蛋白

免疫反应性在分离胶的上部也是明显的，范围在 45-200kDa 之间。因为这些条带显著地大于单聚 α -共核蛋白，其分子量为 19kDa，这些条带也可代表 α -共核蛋白多聚体和聚合体。例如，38 和 57kDa 处条带的大小与 α -共核蛋白的二聚体和三聚体一致。利用不同抗体、多克隆抗- α -共核蛋白抗体的免疫印迹在相同条件下也显示了聚集产生。其他细胞系的处理（未转染、野生型和 A30P）在所检查的 48 小时时限内不诱导 α -共核蛋白聚合体。

为了测定在较低剂量的铁下增加与铁的接触期限对 α -共核蛋白聚集的影响，将过表达 A53T 或野生型 α -共核蛋白的 BE-M17 细胞与 FeCl_2 接触 4 天。在这些条件下，在表达 A53T α -共核蛋白的细胞中当剂量低至 $0.3\mu\text{M}$ 的 FeCl_2 产生可检测的 α -共核蛋白聚集。有趣的是这些接触更长的条件也诱导野生型 α -共核蛋白的聚集。相反，未观测到肌动蛋白的聚集，这暗示聚集对 α -共核蛋白是选择性的。

为了测定 BE-M17 细胞中 α -共核蛋白聚集的模式如何与发生在人脑中的模式比较，体外进行了人脑皮层匀浆（来自神经学正常的供体）中的 α -共核蛋白对铁接触的反应。用 $500\mu\text{M}$ 多巴胺、 10mM FeCl_2 和蛋白酶抑制剂（多巴胺作为氧化剂加入，如下文所述）处理 24 小时后，脑皮层匀浆的膜部分中 α -共核蛋白聚集模式与 BE-M17 细胞中见到的相似。这提示 BE-M17 细胞和人脑中的 α -共核蛋白对铁的反应表现出相似的聚集模式，两者都具有聚集的强烈倾向。另外，观测到较高分子量 α -共核蛋白免疫反应偶尔出现在 α -共核蛋白细胞裂解液的免疫印迹的分离胶中，该 α -共核蛋白细胞裂解液来自在基本条件下生长的细胞。然而，在堆积胶中迁移的聚合体仅发生在用铁处理之后，并在基本条件下从未在任一种细胞系中观测到。这支持了以前利用体外重组 α -共核蛋白的工作，其显示 α -共核蛋白的突变形式具有强烈的寡聚倾向[Conway, KA.等, PNAS USA, 97:571-576 (2000)]。然而，堆积胶中聚合体的迁移比分离胶中的迁移可以有更严格的测试聚集形成。

研究表明通过 Fenton 反应增加自由基形成，铁可促进蛋白聚集 [Wolozin, B.等, Arch. Neurol., 57:793-796 (2000)]。如果这样，添加自由基发生剂如过氧化氢或多巴胺，与铁一起可增加 α -共核蛋白聚集的量。为了进一步测定氧化作用增强铁诱导的 α -共核蛋白的聚集，将过表达 A30P 或野生型 α -共核蛋白的 BE-M17 细胞用 10mM FeCl₂ 以及不同浓度的多巴胺（0.5、50 和 500 μ M）处理 48 小时。把细胞用于表达 A30P 或野生型 α -共核蛋白 48 小时以上，这是因为与过表达 A53T α -共核蛋白的细胞不同，在这些条件下，它们不形成聚合体。正如所料，过表达 A30P 或野生型 α -共核蛋白的 BE-M17 细胞用 10mM FeCl₂ 单独处理不诱导任何聚集。同样，用 5、50 或 500 μ M 多巴胺单独处理不诱导形成大的迁移在堆积胶中的 α -共核蛋白聚合体。然而，将 10mM FeCl₂ 和 50 或 500 μ M 多巴胺组合诱导形成大的 α -共核蛋白聚合体。这些数据显示氧化剂和铁的组合对 α -共核蛋白聚集起增强的效应。

两个单独实验说明所观测的聚集是 α -共核蛋白的普遍特性，而非由使用克隆细胞系产生的人为的现象。BE-M17 细胞用 A53T α -共核蛋白 cDNA 短暂转染，然后用 10mM FeCl₂ 和 100 μ M 的 H₂O₂ 处理 72 小时，形成了与稳定过表达 α -共核蛋白的 BE-M17 细胞系中所见的那些相似的聚合体。此外，初级大鼠皮层神经元也显示了形成聚合体的强烈倾向，仅要求用 0.1mM FeCl₂ 和 50 μ M 多巴胺处理 60 小时以诱导聚合体的形成。因此，聚集是 α -共核蛋白的生物物理特性的结果，而非是特异于特定克隆细胞系的人为现象。

25

实施例 2. A53T 和 A30P α -共核蛋白聚合体含有遍在蛋白

在 PD 中，路易体也已显示含有大量的遍在蛋白 [Dickson, D.等, Brain Path., 9:721-32 (19990); Gibb, W.等, J. Neurol. Neurosurg. and Psych., 51:745-52 (1988)]。为了测定遍在蛋白的聚集是否也与 α -共核蛋白聚集一起发生，把裂解液（膜部分）从表达 A30P α -共核蛋白的

30

BE-M17 细胞中取出, 所述 BE-M17 细胞已用 FeCl_2 和多巴胺处理 (参见实施例 1, 处理 48 小时), 并用抗遍在蛋白抗体免疫印迹。在这些条件下积累的遍在蛋白聚合体对遍在蛋白强烈染色。在单独用 FeCl_2 、或用 FeCl_2 加过氧化氢或 FeCl_2 加多巴胺处理之后, 表达 A53T α -共核蛋白或野生型 α -共核蛋白的细胞中积累的聚合体也包含遍在蛋白。聚集的遍在蛋白的量一般平行于 α -共核蛋白的量。聚合体中遍在蛋白的存在似乎不从增加的遍在蛋白表达中产生, 因为总裂解液的免疫印迹显示遍在蛋白和肌动蛋白的总量在过表达 α -共核蛋白的细胞系和对照细胞之间没有显著的区别。这些数据显示对铁处理起反应在神经元中形成的 α -共核蛋白聚合体是遍在蛋白化作用。

实施例 3. α -共核蛋白聚合体形成凭借硫磺素-S 组织化学和电子显微镜可见的明显的内含物

硫磺素-S 组织化学和电子显微镜用于检查在针对铁和过氧化氢处理的反应中形成的聚合体。将来自各个细胞系的细胞 (BE-M17: 未转染、野生型、A30P 和 A53T α -共核蛋白) 用 10mM FeCl_2 或 10mM FeCl_2 加 100 μM H_2O_2 处理 72 小时, 以诱导形成 α -共核蛋白阳性内含物。观测所形成的聚合体与硫磺素-S 结合, 这表明存在 β -折叠结构。硫磺素-S 阳性聚合体的大小和数目与免疫印迹中所见的结果相吻合。在用 10mM FeCl_2 和 100 μM H_2O_2 处理 72 小时之后, 野生型、A30P 和 A53T α -共核蛋白细胞各显示显著的蛋白聚合体的积累。相反, 未转染的细胞系显示没有积累硫磺素-S 阳性聚合体。当仅用 10mM FeCl_2 处理细胞时, 只在 A53T α -共核蛋白表达的细胞中观测到硫磺素-S 阳性内含物。采用电子显微镜检查聚合体。将表达 A53T α -共核蛋白或表达空载体的细胞用 10mM FeCl_2 和 100 μM H_2O_2 处理 72 小时, 然后制备用于电子显微镜。胞质内含物在 A53T 表达的细胞中是明显的, 但在载体转染的细胞中不明显。内含物含有纤丝状和无定形物质的混合物。纤丝的直径大约 10nm 和长度达 10 μm 。尽管用 10mM FeCl_2 和 100 μM H_2O_2 处理对许多细胞是毒性的, 但一些含有聚合体的细胞它有纤丝沉积物和完整的细胞器官, 这提示聚集可发生在活的细胞中。聚合体中

纤丝状和无定形物质的存在已在过表达 α -共核蛋白的转基因动物中存在的聚合物中观测到[Feany, MB.等, *Nature*, 404:394-8 (2000); Masliah, E.等, *Science*, 287:1265-1269 (2000)]。

5 实施例 4. α -共核蛋白聚合物形成凭借免疫组织化学可见的明显的内含物

通过免疫细胞化学测试内含物形成。将表达 A53T α -共核蛋白的细胞用 10mM FeCl_2 和 100 μM H_2O_2 处理 72 小时, 固定, 然后采用过氧化物酶免疫组织化学, 以针对遍在蛋白的抗体和 α -共核蛋白进行检查。使用过氧化物酶染色, 这是因为由于铁处理, 荧光生色剂如 FITC 或若丹明表现出强烈的与细胞的非特异结合。利用抗- α -共核蛋白和抗-遍在蛋白抗体的免疫组织化学通过细胞的胞质在基本条件下显示出均匀的染色。在用 10mM FeCl_2 加 100 μM H_2O_2 处理 72 小时之后, 染色变得不均匀。用抗- α -共核蛋白抗体染色的各个细胞中经常展示若干大的暗染色的反应病灶和多种小的斑点病灶。用遍在蛋白染色也是存在的, 但是每个细胞显示较少的病灶。用免疫前的兔血清替代初级抗体进行的免疫细胞化学显示在基本条件或处理条件下没有反应性。

20 实施例 5. α -共核蛋白聚集出现在活细胞中

为了确定 FeCl_2 对细胞的毒性作用, 在存在高和低浓度的 FeCl_2 下, 实施了 α -共核蛋白聚集和细胞死亡、聚合物形成和细胞生存力之间的关系。如上所述(实施例 3 和 4), 用 10mM FeCl_2 加 100 μM H_2O_2 处理 72 小时, 在大多数非转染的细胞中诱导了 α -共核蛋白聚合体的形成。因此, 这些条件也杀死了大多数的细胞(>90%的细胞死亡)。

25 相反, A53T-表达的 BE-M17 细胞用 0.3mM FeCl_2 加 100 μM H_2O_2 处理 96 小时后, 表现出更少的毒性, 但仍形成了 α -共核蛋白聚合物。将平行组的细胞与针对 α -共核蛋白(SC1)和遍在蛋白的抗体进行免疫细胞化学处理, 或利用台盼蓝排阻分析来测定生存力。未处理的细胞显示几乎没有毒性, 对台盼蓝有 $3.7 \pm 1.0\%$ 可渗透性。有少量的细

胞死亡也许是由用于移出细胞的胰蛋白酶消化/研磨步骤所导致的。用 0.3mM FeCl₂ 和 100μM H₂O₂ 处理杀死一些细胞 (12.1±2.3%台盼蓝阳性), 但大多数细胞 (87.9%) 保持存活。采用抗-α-共核蛋白抗体的免疫细胞化学显示 21.0±3.5%的细胞具有可见的聚合体。采用抗-遍在蛋白抗体的免疫细胞化学提示聚合体可包含遍在蛋白, 以及提示聚合体包含具有用硫磺素-S 染色的 β-折叠结构的物质。有趣的是, 弥漫的硫磺素-S 反应在这些细胞中也是明显的, 暗示分散的 α-共核蛋白的“微聚合体”在温和条件下也可形成。

因此, 在温和条件下所形成的 α-共核蛋白聚合体与同样的抗体反应, 并如在更严厉条件下所形成的聚合体染色。此外, 表现 α-共核蛋白聚合体的细胞的百分数比表现死亡证据的细胞的百分数更大, 这一观测提示许多形成 α-共核蛋白聚合体的细胞是存活的。

α-共核蛋白的聚集可出现在存活细胞中, 这个观测也暗示 α-共核蛋白聚集发生在细胞死亡之前。

实施例 6. α-共核蛋白的过表达增加自由基介导的毒性

虽然 α-共核蛋白聚合体可在活的细胞中形成的事实存在, α-共核蛋白聚集在毒性诱导中可出现在起始步骤是可能的。以前的结果显示 α-共核蛋白对一些短暂过量表达的细胞是毒性的 [Ostrerova, N.等, J. Neurosci., 19:5782-91 (1999)]。然而, α-共核蛋白并非对所有细胞都是急性毒性的, 如 BE-M17 细胞。α-共核蛋白的良好耐受性足以允许在转基因动物中过表达 [Feany, MB 等, Nature, 404:394-8 (2000); Masliah, E.等, Science, 287:1265-1269 (2000)]。尽管 α-共核蛋白在基本条件下对 BE-M17 细胞不是急性毒性的, 但 α-共核蛋白在其他条件下如与聚合体形成相连接的条件可能是毒性的。

为了确定生产 α-共核蛋白聚集的条件是否也产生毒性, 测定了各个细胞系对铁和/或过氧化氢介导的毒性的易损性。各个细胞系 (未

转染、野生型、A53T 和 A30P α -共核蛋白)用不同剂量的 FeCl_2 、 H_2O_2 或 $\text{FeCl}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ 处理,并通过 MTT 测定确定毒性的量。BE-M17 细胞过表达所有形式的 α -共核蛋白显示对铁介导的毒性增加易损性(图 1A)。A53T α -共核蛋白的过表达对毒性具有最大的作用,降低 FeCl_2 的 LD_{50} 75%以上(图 1A)。虽然在 A30P 表达的细胞对低水平铁反应中所见的毒性量一般大于用野生型 α -共核蛋白所见的毒性,但是 A30P 或野生型 α -共核蛋白构建体的过表达降低了 LD_{50} 值约 50%(图 1A)。为了确认 α -共核蛋白的过表达增加了成神经细胞瘤细胞对铁的易损性,利用 LDH 分析对铁诱导的毒性进行了测试(图 1B)。LDH 分析确认了 α -共核蛋白构建体的过表达增加铁诱导的毒性(图 1B)。

对过表达 α -共核蛋白细胞系(野生型、A53T 或 A30P)进行 MTT 测定,也揭示出用 $\text{FeCl}_2+\text{H}_2\text{O}_2$ 处理后毒性增加了(图 1C,深灰色棒)。有趣的是过表达 α -共核蛋白(野生型、A53T 或 A30P)没有增加对 H_2O_2 单独的易损性,并赋予成神经细胞瘤细胞适度的保护作用(图 1C)。这些数据证实不论是野生型还是突变 α -共核蛋白的水平的增加在选择性条件下对生长在细胞培养物中的神经元可以是毒性的。数据还提示 α -共核蛋白尤其使细胞对铁介导的毒性的易损性。对铁的选择性易损性可在 α -共核蛋白聚合物中产生 α -共核蛋白螯合铁的倾向。

未转染的或 A53T- α -共核蛋白表达的 BE-M17 细胞用 10mM FeCl_2 和 100 μM H_2O_2 处理 48 小时,然后固定并对铁染色。处理后,表达 A53T α -共核蛋白的细胞比未转染的细胞具有更高的铁含量。由于 α -共核蛋白,铁的螯合通过 Fenton 反应会增加自由基的产生,尤其在与自由基发生剂如过氧化氢或多巴胺接触的细胞中。然而,在没有铁的情况下,不发生 Fenton 反应,并且 α -共核蛋白是无害的。

实施例 7. 铁与 α -共核蛋白的结合

由于铁与其他形成聚合体的蛋白结合以及已知铁在帕金森氏病中积累,所以铁可直接与 α -共核蛋白结合。为确认这种假设,利用酪氨

酸荧光作为铁结合的指示剂来测试铁与 α -共核蛋白的相互作用。高剂量的铁 ($>10\text{mM}$) 会猝灭酪氨酸荧光, 然而与铁结合的蛋白在更低剂量表现出猝灭 (假设是因为蛋白结合的铁接近酪氨酸)。酪氨酸的荧光已用于监控金属与 β -淀粉状蛋白的结合[Garzon-Rodriguez W.等, Bioorg. Med. Chem. Lett., 9:2243-2248 (1999), 在此引作参考]。采取相似的方法来分析铁与 α -共核蛋白的结合。酪氨酸具有荧光发射光谱, 当其在 280nm 处受激发时, 峰发射为 310nm (图 2A)。观测到铁的结合减少了 α -共核蛋白中酪氨酸的荧光。结果证实其原因是与 α -共核蛋白的特异结合, 因为游离酪氨酸与相似剂量的 FeCl_2 温育不产生猝灭。利用 Prism 程序 (GraphPad, San Diego, CA) 来分析结合曲线, 我们观测到数据属于 S 曲线, $\text{IC}_{50}=173\text{ }\mu\text{M}$ 。Hill 系数是 1.0 ($R^2=1.0$, $P<0.0001$), 这说明铁的一个结合位点没有协同性 (图 2A 和 B)。对 α -共核蛋白与其他金属的结合也进行了测试, 包括 CuCl_2 、 ZnCl_2 和 MgCl_2 。由于 α -共核蛋白的 C-末端具有 7 个谷氨酸和 4 个天门冬氨酸的区域, 它们一起可螯合铁, 我们创建了缺失构建体, 其缺乏 α -共核蛋白最后 27 个氨基酸, 并分析这个构建体的结合。 α -共核蛋白 ΔC_{1-113} 的 C-末端缺失构建体在铁结合方面显示 4 倍以上的减少, $\text{IC}_{50}=726\text{ }\mu\text{M}$ ($P<0.001$) (图 2B)。这提示 α -共核蛋白与铁结合, 以及提示 C-末端有助于铁结合, 但对铁结合不是必须的。

20

实施例 8. 镁保护共核蛋白聚集

为了监控 Fe(II) 和 Mg(II) 与 α -共核蛋白的体外结合图, 我们采用了酪氨酸荧光的变化。酪氨酸荧光用作蛋白构象或金属结合变化的指示物。酪氨酸在 280nm 处的激发引发荧光, 其峰对单体酪氨酸为 310nm , 而对酪氨酸酯 (tyrosinate) 或二聚酪氨酸为 $350-400\text{nm}$ 。 α -共核蛋白的荧光产生的荧光峰在 310nm 和 400nm 。 400nm 处的峰由于 α -共核蛋白二聚产生的, 不能解释为二聚产生的酪氨酸的存在, 因为 α -共核蛋白二聚降低 400nm 处的荧光, 并且倾向于消除 400nm 的峰。此外, α -共核蛋白的凝胶电泳和质谱显示 α -共核蛋白是单体的。这时, 暗示 400nm 处的峰是由于酪氨酸酯产生, 其可产自从酚羟基到天

30

门冬氨酸或谷氨酸蛋白受体的质子转移。 α -共核蛋白与增加剂量的 Fe(II)的温育快速降低了 α -共核蛋白中的酪氨酸在 310nm 和 400nm 处荧光。对荧光猝灭作图表现出 S 曲线, $IC_{50}=173 \mu M$ 以及 Hill 系数是 1.0 ($R^2=1.0$, $P<0.0001$), 这说明一个结合位点或多种结合位点具有同样的亲和性和没有协同性。铁对 α -共核蛋白真正的亲和性可低于 173 μM , 这是因为酪氨酸荧光与绝对亲和性比较是更好的构象变化指示物。

镁对 α -共核蛋白的影响显著区别于铁的作用。镁增加了 400nm 处的荧光, 但不影响 310nm 处的荧光。镁与 α -共核蛋白的结合也是显著的, 因为酪氨酸荧光显示在镁的 60 和 80 μM 之间急剧的逐步的增加, 这说明镁有协同性结合。酪氨酸荧光具体在 400nm 处的协同性调节暗示镁导致 α -共核蛋白中的构象变化, 区别于由铁所诱导的构象变化。将镁与铁共温育不阻止铁诱导的 α -共核蛋白酪氨酸荧光的猝灭, 暗示铁和镁结合在 α -共核蛋白不同的位点上。

我们还检查了人 α -共核蛋白中的 A53T 突变是如何影响铁和镁的结合的。A53T 突变不改变铁对 α -共核蛋白表现的亲和性, 但的确完全破坏了镁和 α -共核蛋白之间的作用。以前的研究已显示 A53T 突变由于增加其螺旋含量而改变 α -共核蛋白构象的变化 (Polymeropoulos 等, Science, 276:2045-7 (1997))。这些构象的变化也可减少镁与 α -共核蛋白的结合。

了解了镁和铁诱导 α -共核蛋白酪氨酸荧光中相反的变化, 认为也许通过防止 β 折叠形成, 镁的结合可将 α -共核蛋白转变成抗聚集的构象。为了测试此现象, 将野生型重组 α -共核蛋白与 0-3mM $FeCl_2$ 和 0 或 100 μM $MgCl_2$ 37 $^{\circ}C$ 温育 24 小时, 然后对 α -共核蛋白进行免疫印迹以及通过视频光密度测定法对聚集进行定量分析。我们在除最高剂量的铁以外的所有剂量中观测到了显著减少形成高分子量的 α -共核蛋白聚合体 ($n=3$, $P<0.0001$)。利用硫磺素-S 测定重组 α -共核蛋白聚

集的分析也显示在相似条件下由铁诱导的 α -共核蛋白聚集及由镁诱导的抑制聚集。在独立的实验中，我们观测到了镁还抑制 α -共核蛋白的自发聚集。

5 由于利用酪氨酸荧光我们没有观测到镁和 A53T α -共核蛋白之间的相互作用，我们测试了重组 A53T α -共核蛋白的聚集对镁是否也是不灵敏的。我们将重组 A53T α -共核蛋白与 0-3mM FeCl_2 和 0 或 100 μM MgCl_2 温育 24 小时，然后对 α -共核蛋白进行免疫印迹以及通过视频光密度测定法对聚集进行定量分析。我们观测到了镁不能抑制铁诱导的 A53T α -共核蛋白的聚集。镁不能抑制 A53T α -共核蛋白的聚集与酪氨酸荧光数据是一致的，提示镁不与 A53T α -共核蛋白相互作用。

15 镁体外抑制野生型 α -共核蛋白聚集的能力提示镁在活的神经元中也能抑制聚集。为了测试此现象，本发明人检查了镁在细胞培养中生长的初级皮层神经元中抑制 α -共核蛋白聚集的能力。将初级皮层神经元用 1mM FeCl_2 加 0-1.5mM MgCl_2 处理 3 天，对 α -共核蛋白进行免疫印迹以及通过视频光密度测定法对聚合体的量进行测定。随着镁剂量从 0.2 到 1.5mM 增加进行处理，在分子量高的 α -共核蛋白聚合体形成中产生了剂量依赖而减少。镁剂量低至 0.5mM 在 α -共核蛋白形成阳性聚合体中产生了统计学上显著的减少。镁对过表达野生型 α -共核蛋白的 BE-M17 成神经细胞瘤细胞行使了相似的抑制聚集作用。相反，在表达人 53T α -共核蛋白 cDNA 的 BE-M17 细胞中，镁不能抑制聚合体的形成，这与镁通过与 α -共核蛋白的结合包括构象变化而抑制 α -共核蛋白聚集的假设一致。

25 本发明人利用针对遍在蛋白的抗体还检查了存在的聚合体的量。如前所述，高分子量遍在蛋白加合物的积累与 α -共核蛋白聚合体的形成相关。初级皮层神经元如上所述处理，聚合体用抗- α -共核蛋白抗体免疫沉淀，并用抗遍在蛋白抗体免疫印迹。在用 0.3mM 铁和 50 μM 多巴胺处理 3 天后，观测到了 α -共核蛋白的遍在蛋白化作用的增加。

然而，以剂量低至 0.5mM 的镁处理细胞在遍在蛋白免疫反应中产生了统计学上显著降低（ $n=3$, $P<0.0001$ ）。因此，在初级神经元中镁抑制遍在蛋白阳性 α -共核蛋白聚合体的形成。

5 接着，研究了镁是否还防止稳定过表达野生型 α -共核蛋白的 BE-M17 神经元中的 α -共核蛋白阳性内含物的形成。神经元用 1mM FeCl_2 加 50 μM 多巴胺加 0 或 1mM MgCl_2 处理 3 天，然后利用抗 α -共核蛋白和抗遍在蛋白的抗体通过免疫细胞化学检查。用铁和多巴胺处理的神经元显示丰度的 α -共核蛋白阳性内含物，而用铁、多巴胺和镁一起
10 处理的神经元显示几乎没有积累 α -共核蛋白阳性内含物。

镁诱导的抑制 α -共核蛋白聚集也与神经保护相关，如 MTT 测定所测定。将稳定转染有载体或野生型 α -共核蛋白的 BE-M17 成神经细胞瘤细胞用 FeCl_2 加多巴胺加 0 或 0.8mM MgCl_2 处理 2 天，然后通过
15 MTT 测定对生存力进行分析（选择剂量以使 MTT 测定时光密度最佳）。过表达野生型 α -共核蛋白的细胞系显示了对铁/多巴胺处理的反应中毒性增加，这与以上观测结果一致。在野生型细胞系中再用镁处理细胞存活增加了 2.4 倍，而在对照细胞系中仅增加了 1.3 倍（与单独用 Fe^{2+} /多巴胺处理的细胞中的存活细胞比较）。这提示具有更多
20 α -共核蛋白相关毒性的细胞系得到镁的对应的更多保护。

还检查了镁如何影响来自中枢神经系统的神经元。皮层神经元的初级培养物用 0.3mM FeCl_2 加 50 μM 多巴胺加 0-2mM MgCl_2 处理 3 天（采用相对低剂量的铁使得神经元突起能够进行定量）。为了对由
25 镁提供的神经保护的量进行定量分析，测定了突起长于 100 μm 的百分数作为细胞生存力的特征。用铁加多巴胺处理导致神经突起的钝化，减少 100 μm 以上的神经元突起数约 60%（ $n=5$, $P<0.001$ ）。在这些神经元中还形成内含物。然而，用铁、多巴胺和 1-2mM 镁处理的神经元显示突起仅有 20%的损失，并且不显示形成任何 α -共核蛋白
30 阳性内含物。这些结果与以前的研究一致，说明镁是有细胞保护作用

的 (Beal, M.F., Ann. Neurol. 31:119-30 (1992))。此外, 这些结果说明镁可预防中枢神经系统的神经元以及神经元细胞系中的 α -共核蛋白聚集。

5 总之, 镁既抑制了自发的聚集也抑制了铁诱导的聚集 (图 3)。这种现象的发生是因为镁与 α -共核蛋白的结合将 α -共核蛋白转变成抗聚集的构象 (图 3B)。

10 有趣的是, 镁抗聚集效应的剂量相似于用来治疗例如前惊厥的治疗剂量。镁的这些剂量是可作成治疗剂量。这种现象的发生是因为镁与 α -共核蛋白的结合将 α -共核蛋白转变成抗聚集的构象 (图 3B)。

实施例 9. 抗- α -共核蛋白肽的鉴定

15 利用噬菌体展示 (噬菌体展示试剂盒来自 New England Biolabs (Beverly, MA)) 来特异性地选择可抑制铁结合的肽。从文库中鉴定噬菌体, 该文库与 α -共核蛋白第 121-131 位的氨基酸和第 61-87 位的氨基酸结合并部分抑制铁诱导的 α -共核蛋白聚集。利用 α -共核蛋白第 121-131 和第 61-87 位的肽作为诱饵来选择肽。一种这样的肽具有序列 SLKRLPK。

20 为了证实肽 SLKRLPK 结合 α -共核蛋白, 将 α -共核蛋白吸附到塑料孔中, 以 1:10、1:100 和 1:1000 的稀释度加入噬菌体, 温育 1 小时并洗涤 5 次。通过加入过氧化物酶偶联的抗噬菌体抗体来检测结合的噬菌体, 温育 1 小时, 洗涤 5 次, 并采用过氧化物酶底物 ABTS 来
25 检测信号。结合的噬菌体产生暗绿色的信号, 其用分光光度法测定光密度。使用这些条件, 含有 SLKRLPK 肽的噬菌体在 1:10、1:100 和 1:1000 的稀释度处分别产生的 OD 为 0.882、0.844 和 0.480。相反, 另一不结合的噬菌体分别产生的 OD 为 0.019、-0.027 和 -0.554。

还对该肽体外抑制铁诱导的 α -共核蛋白聚集进行了测试。10 倍过量的肽能抑制 α -共核蛋白聚集 38%，如光密度测定法定量所测定。该抑制水平是极其显著的，假如将此转化到体内 38% 的减少，则其可减慢 PD 发展若干年。

5

该肽具有序列“SLKRLPK”，并对应于由噬菌体表达的序列，通过 ELISA 其显示特别强的与 α -共核蛋白的结合。该序列不含有酪氨酸或色氨酸，这些氨基酸可添加荧光并使分析复杂化。在我们理解铁对 α -共核蛋白生物化学的重要性之前该噬菌体就产生了（因此，对铁结合不是特异性地靶向结合位点）。即使如此，将 10 倍过量的肽与 α -共核蛋白温育减少铁诱导的 α -共核蛋白聚集 38%。

10

<110> 万能药制药公司 (Panacea Pharmaceuticals, Inc.)
本亚明·沃洛申 (Benjamin WOLOZIN)
纳塔莉·奥斯特列托瓦-戈尔茨 (Natalie OSTRETOVA-GOLTS)
迈克尔·勒博威驰 (Michael LEBOWITZ)

<120> 预防神经组织损伤和治疗 α -共核蛋白疾病的方法
(Methods for Preventing Neural Tissue Damage and
for the Treatment of Alpha-Synuclein Diseases)

<130> SCT022984-09

<140> US 60/279,199

<141> 2001-03-28

<150> US 60/279,199

<151> 2001-03-28

<150> US 60/217,319

<151> 2000-07-07

<160> 12

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

Trp Arg Gln Thr Arg Lys Asp
1 5

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

His Tyr Ala Lys Asn Pro Ile
1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

Ala Thr Ile Asn Lys Ser Leu
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

Arg Arg Arg Gly Met Ala Ile
1 5

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 5

Thr His Arg Leu Pro Ser Arg
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 6

Thr Lys His Gly Pro Arg Lys
1 5

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 7

Ser Leu Lys Arg Leu Pro Lys
1 5

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 8

Arg Leu Arg Gly Arg Asn Gln
1 5

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 9

Trp Pro Phe His His His Arg
1 5

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 10

His Leu Tyr His His Lys Thr
1 5

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 11

Thr His Ile His His Pro Ser
1 5

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 12

Met Met Met Met Met Arg Leu
1 5

图1A

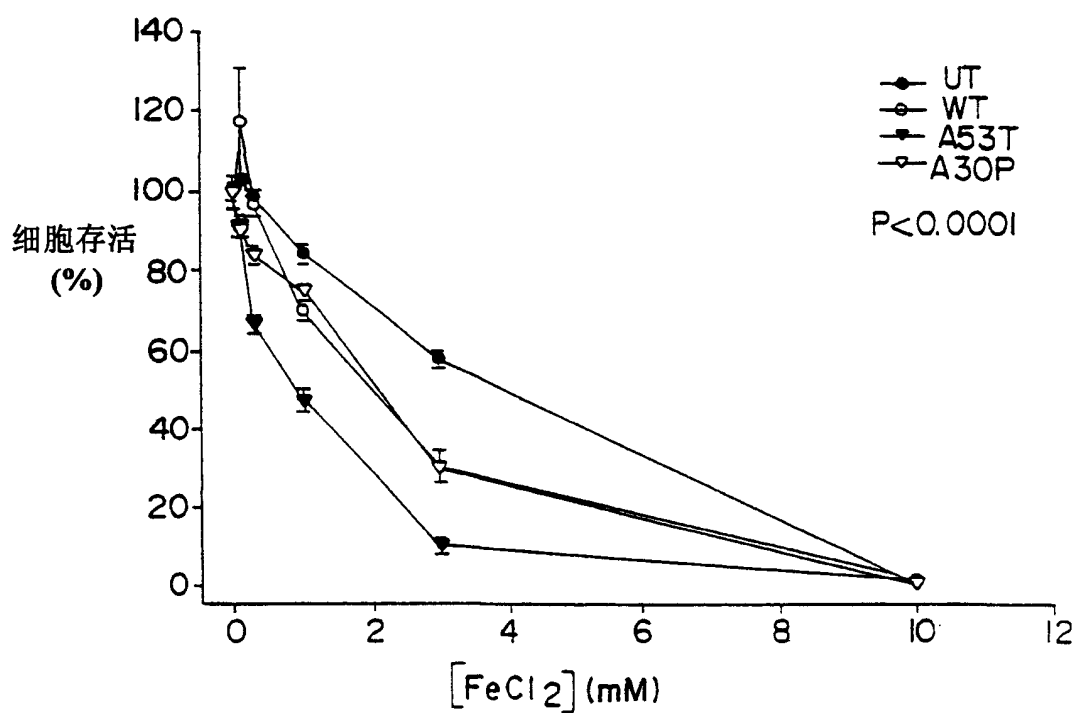
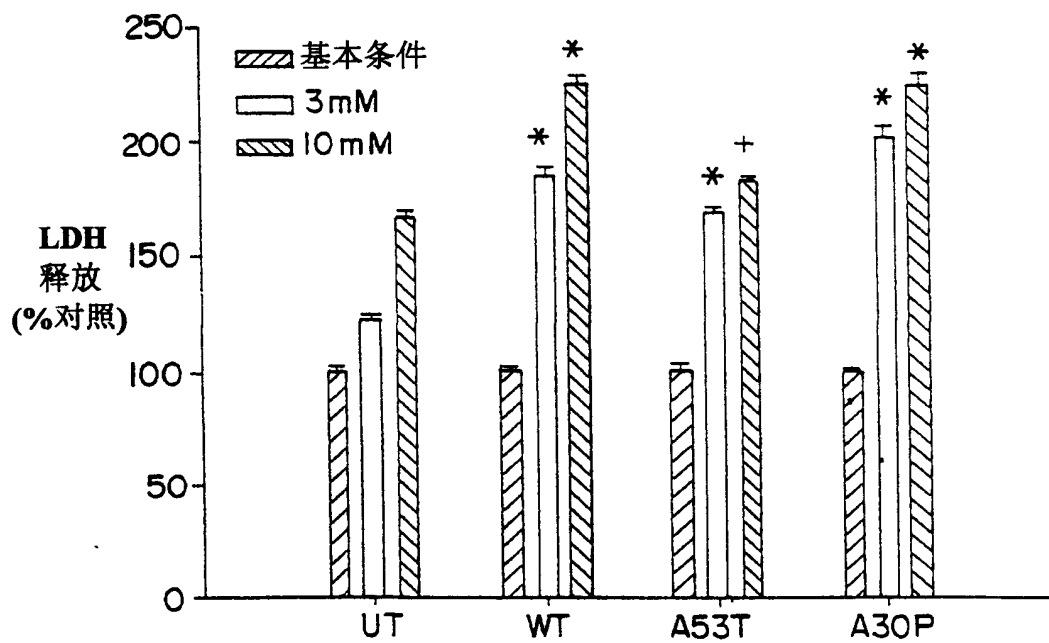


图1B



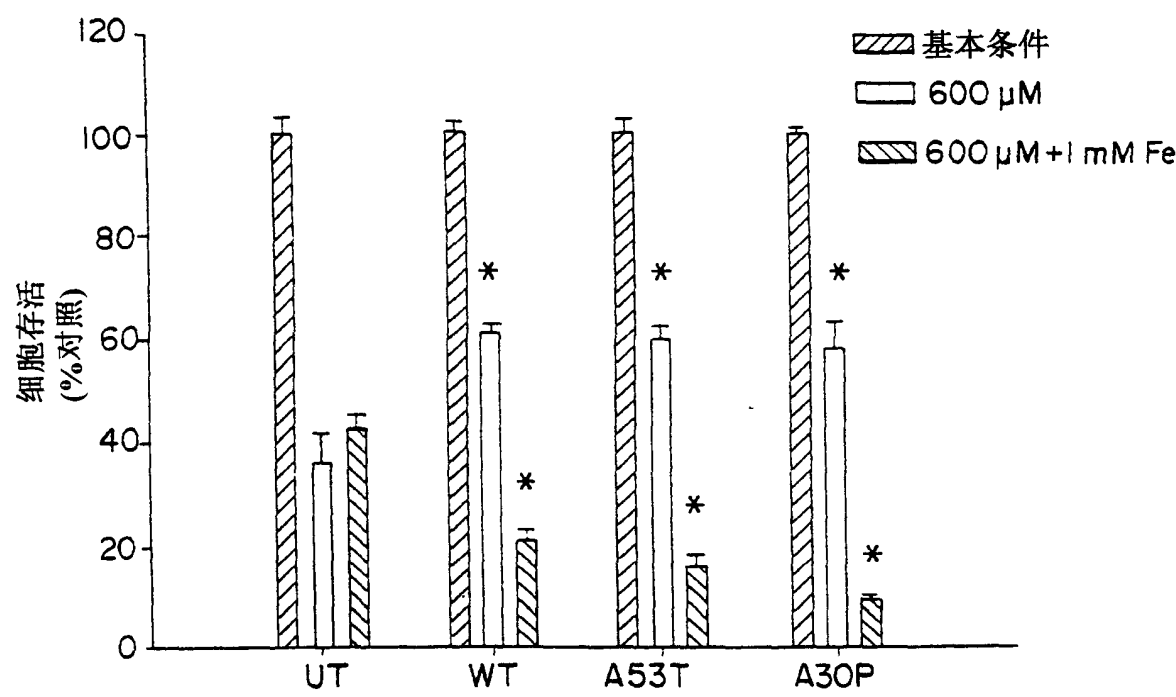


图1C

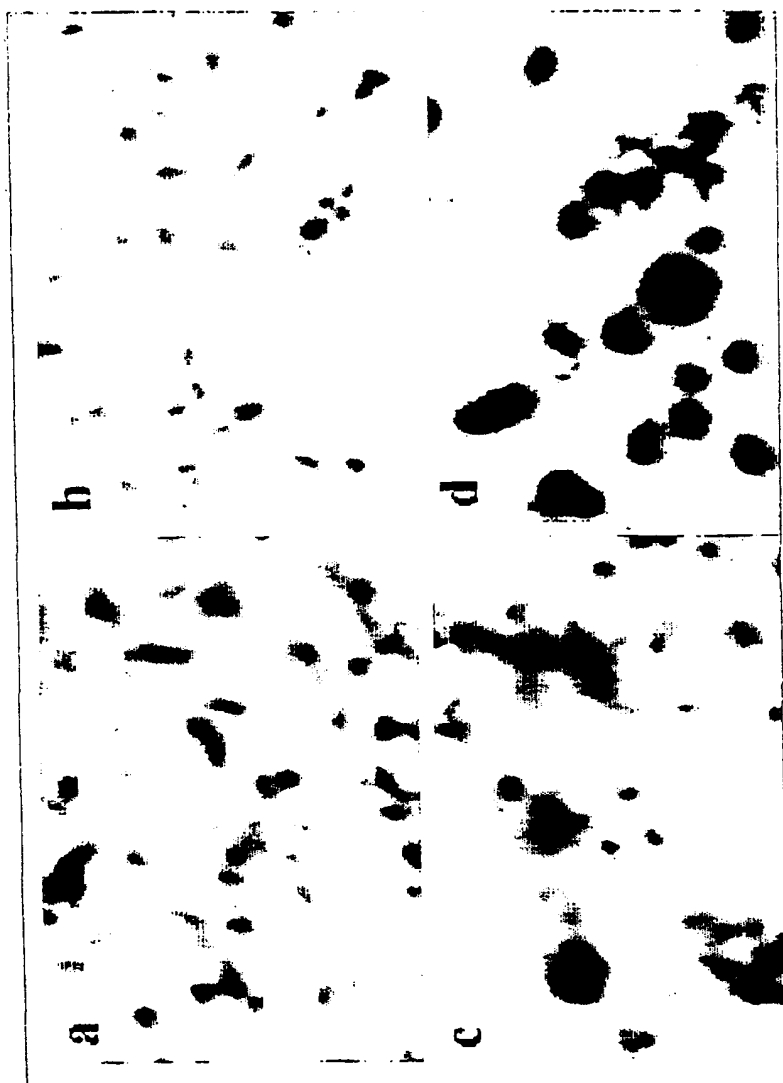


图1D

图2A

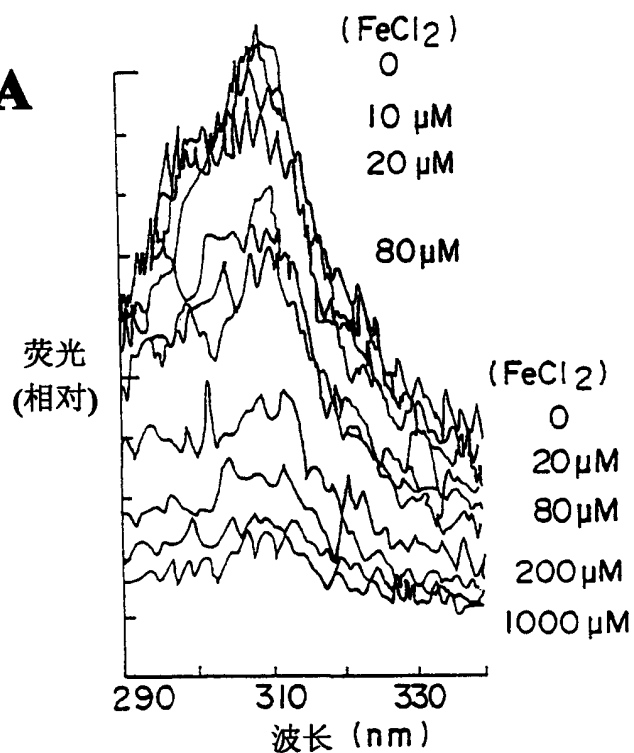
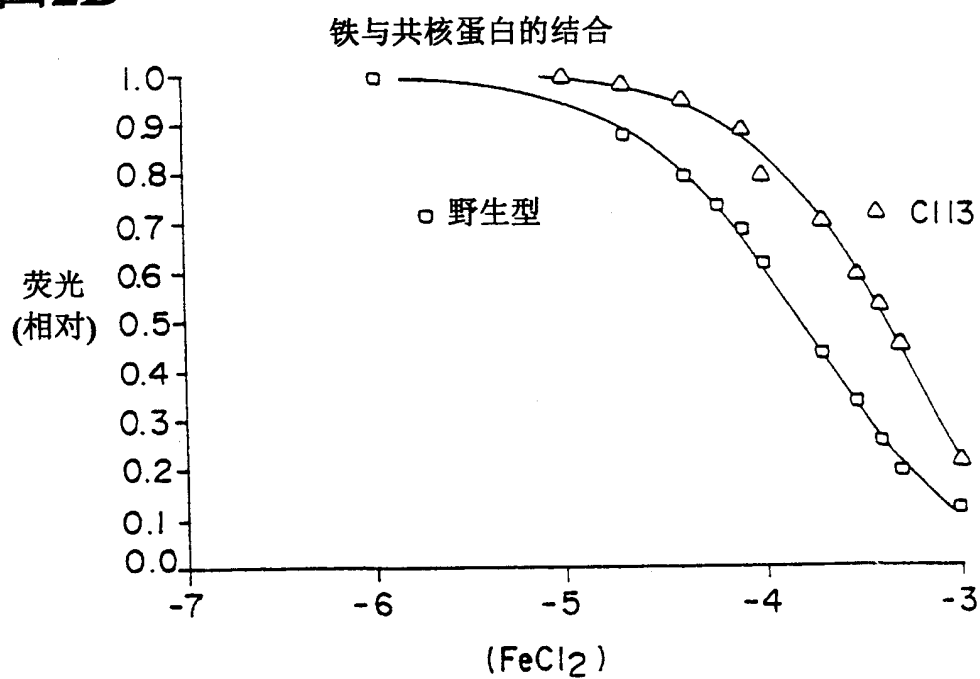


图2B



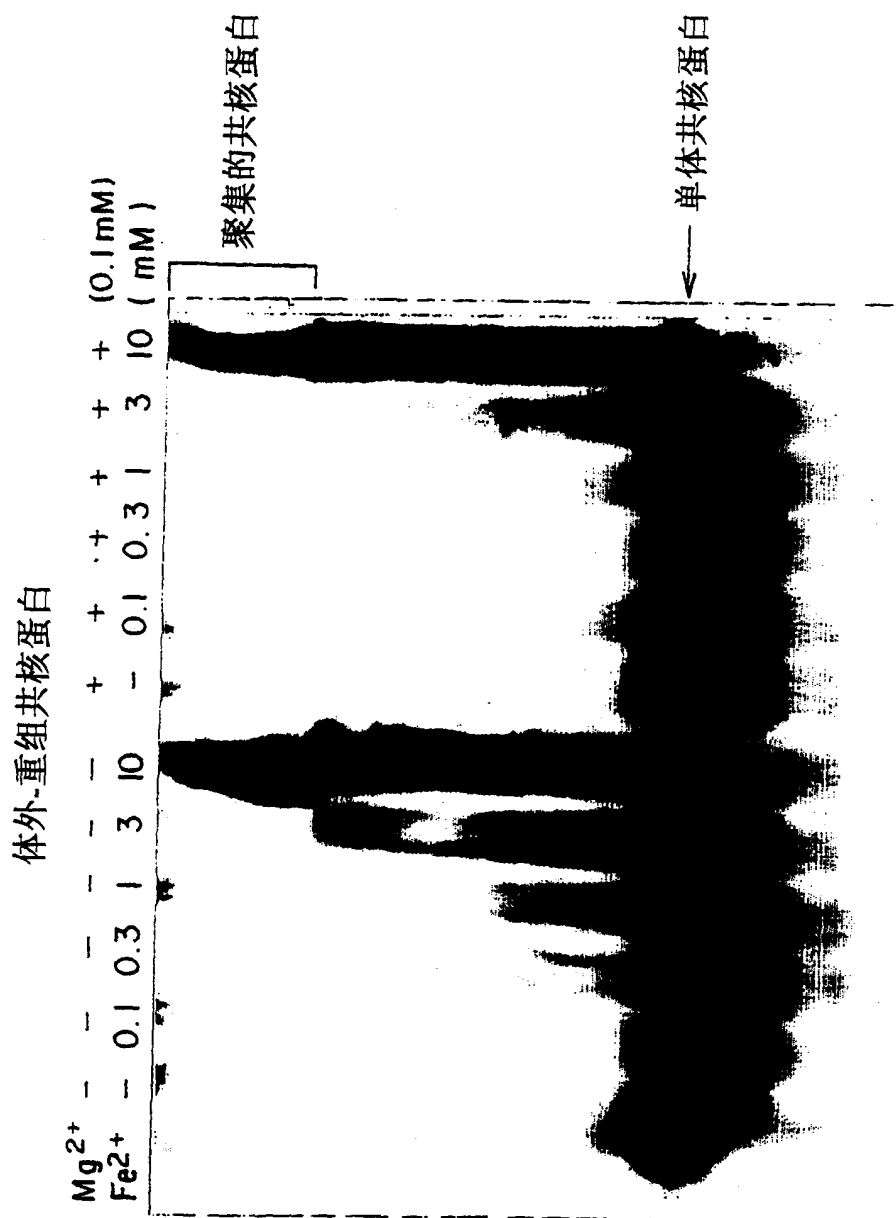


图 3A

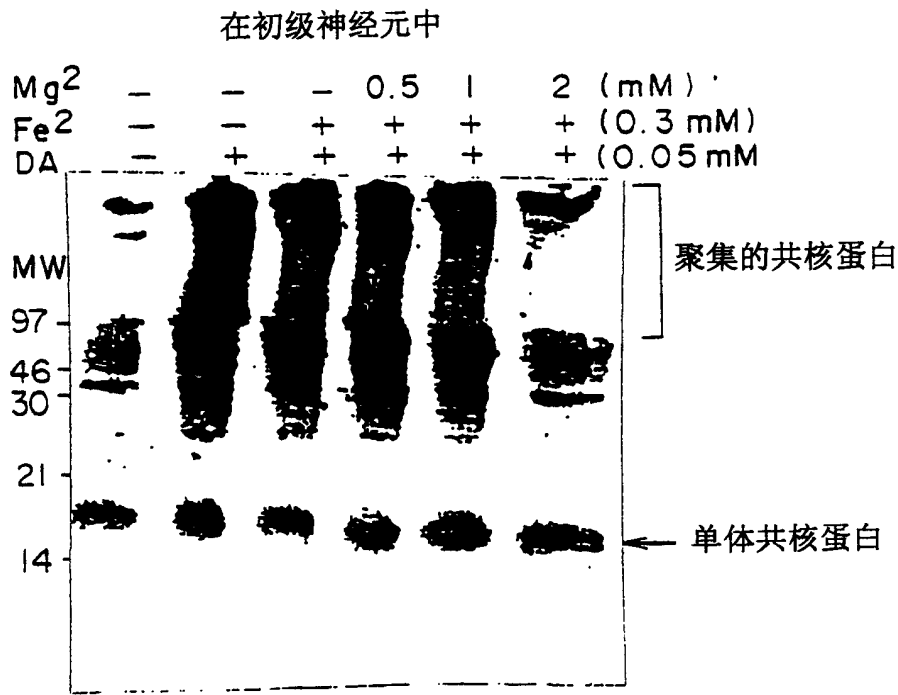


图3B