(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115667281 A
(43)申请公布日 2023.01.31

(21)申请号 202180036867.0

(22)申请日 2021.07.07

(30)优先权数据
2020-127958 2020.07.29 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.11.17

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2021/025577 2021.07.07

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/024693 JA 2022.02.03

(71)申请人 国立大学法人东北大学
地址 日本国宫城县

(72)发明人 福永浩司 川畑伊知郎 河田康志
沟端知宏 福井直也

(74)专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理有限公司 11444
专利代理师 龚敏 王刚

(51)Int.Cl.
C07K 7/06(2006.01)
A61K 38/08(2019.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 25/16(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)

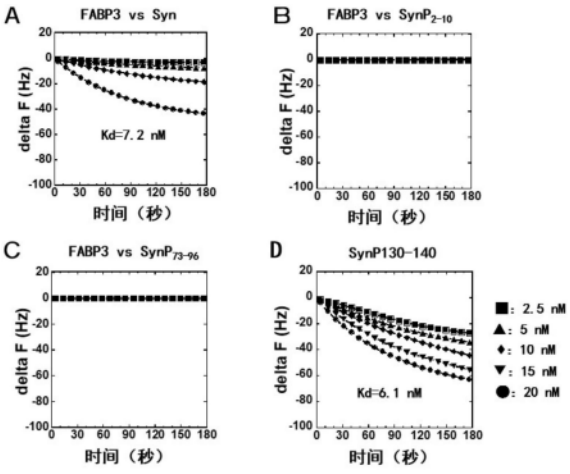
权利要求书1页 说明书10页
序列表3页 附图7页

(54)发明名称

用于预防或治疗共核蛋白病的肽

(57)摘要

本发明公开了一种下列(i)或(ii)所示的肽：(i)具有以EEG(X1)QD(X2)EPEA表示的氨基酸序列的肽。(式中，X1和X2相同或不同，是Y、F或W)(ii)在除了所述(i)的氨基酸序列X1和X2以外的氨基酸部位，具有缺失、取代或添加1个或多个氨基酸的氨基酸序列，且具有与FABP3蛋白质结合的活性的肽。



CN 115667281 A

1.一种下列(i)或(ii)所示的肽：

(i)具有以EEG(X1)QD(X2)EPEA表示的氨基酸序列的肽，

式中，X1和X2相同或不同，是Y、F或W；

(ii)在除了所述(i)的氨基酸序列X1和X2以外的氨基酸部位，具有缺失、取代或添加1个或多个氨基酸的氨基酸序列，且具有与FABP3蛋白质结合的活性的肽。

2.如权利要求1所述的肽，其特征在于，通过X1和X2的氨基酸的苯基与天然型FABP3蛋白质的氨基酸序列中第16位笨丙氨酸的苯基相互作用，与FABP3结合。

3.一种针对权利要求1或2所述的肽的抗体。

4.一种预防或治疗共核蛋白病的预防或治疗剂，其特征在于，含有权利要求1或2所述的肽或权利要求3所述的抗体作为有效成分。

5.如权利要求4所述的预防或治疗剂，其特征在于，所述共核蛋白病从由帕金森病、路易体痴呆及多系统萎缩所构成的组中选择。

6.一种预防或治疗共核蛋白病的药物组合物，其特征在于，含有权利要求1或2所述的肽或权利要求3所述的抗体。

用于预防或治疗共核蛋白病的肽

【技术领域】

[0001] 本发明涉及一种用于预防或治疗共核蛋白病的肽。

【背景技术】

[0002] α-突触核蛋白(α-Synuclein)被称为共核蛋白病(帕金森病、路易体痴呆、多系统萎缩)的致病蛋白质,共核蛋白病以神经细胞和神经胶质细胞中的α-突触核蛋白聚集为特征。在共核蛋白病的神经病理学试验中,可以检测出α-突触核蛋白在神经细胞、神经纤维或神经胶质细胞中异常聚集等特殊损伤。众所周知,α-突触核蛋白在神经细胞间或神经胶质细胞间传播、聚集和蓄积,会在整个脑部引起神经细胞或神经胶质细胞坏死,从而引起运动功能障碍、认知功能障碍、睡眠障碍、自律神经障碍。现在,α-突触核蛋白的抗体疗法开发正在进行,但因副作用问题,尚未达到根治的效果。

[0003] 专利文献1公开了一种与人α-突触核蛋白特异性结合的抗体以及含有这种抗体的阻碍细胞毒性的医用制剂。

[0004] 专利文献2公开了一种含有被视为α-突触核蛋白表位之模拟表位的氨基酸序列、含有由9个氨基酸组成的肽、预防和/或治疗共核蛋白病的药物组合物。

[0005] 非专利文献1公开了在小鼠脑中,注射α-突触核蛋白的前体原纤维(Pre-formed fibrils)后,FABP3会增强α-突触核蛋白的扩散,并传播共核蛋白病状态下的α-突触核蛋白毒性。也公开了FABP3配体MF1是很有吸引力的α-突触核蛋白症候选药物。

[0006] 非专利文献2是关于α-突触核蛋白的阻断和疾病相关的综述性论文,并定义了α-突触核蛋白的N末端区域(残基1-60)、NAC区域(残基61-95)及C末端区域(残基96-140)。其中记载了阻断α-突触核蛋白的C末端一侧,会让被阻断的α-突触核蛋白的聚集速度提高。

[0007] 非专利文献3公开了抑制α-突触核蛋白蛋白质蓄积的酰氨基桥接核酸修饰反义寡核苷酸(amido-bridged nucleic acids-modified antisense oligonucleotide,AmNA-ASO)的开发,以及在动物模型中帕金森病症状得到了改善。

【现有技术文献】

【专利文献】

[0008] 专利文献1:日本发明专利申请公布号2020-73565

专利文献2:日本发明专利授权公布号第5901714号

【非专利文献】

[0009] 非专利文献1:Int J Mol Sci.2020Mar 23;21(6):2230

非专利文献2:JBC Papers in Press,on May 18,2020as Manuscript REV120.011743

非专利文献3:Scientific Reports(2019)9:7567

【发明内容】

【发明要解决的技术问题】

[0010] 本发明要解决的问题,在于提供一种用于预防或治疗共核蛋白病的肽、一种抗体、一种含有肽或抗体的预防或治疗共核蛋白病的预防或治疗剂,以及一种含有肽或抗体的预防或治疗共核蛋白病的药物组合物。

【技术方案】

[0011] 发明人潜心研究上述问题的解决方案,着眼于形成α-突触核蛋白与FABP3的复合物,结果发现使用源于α-突触核蛋白的C末端区域的肽,可以抑制α-突触核蛋白向神经和神经胶质细胞内转运、和/或抑制α-突触核蛋白在神经和神经胶质细胞间传播,终于完成本发明。

[0012] 本发明包含下列实施方式。

[0013] 项1.一种下列(i)或(ii)所示的肽:

(i)具有以EEG(X1)QD(X2)EPEA表示的氨基酸序列的肽。

(式中,X1和X2相同或不同,是Y、F或W)

(ii)在除了所述(i)的氨基酸序列X1和X2以外的氨基酸部位,具有缺失、取代或添加1个或多个氨基酸的氨基酸序列,且具有与FABP3蛋白质结合的活性的肽。

[0014] 项2.如项1所述的肽,其特征在于通过X1和X2的氨基酸的苯基与天然型FABP3蛋白质的氨基酸序列中第16个苯丙氨酸的苯基相互作用,与FABP3结合。

[0015] 项3.一种针对项1或2所述的肽的抗体。

[0016] 项4.一种预防或治疗共核蛋白病的预防或治疗剂,其特征在于含有项1或2所述的肽或项3所述的抗体作为有效成分。

[0017] 项5.如项4所述的预防或治疗剂,其特征在于所述共核蛋白病从由帕金森病、路易体痴呆及多系统萎缩所构成的组中选择。

[0018] 项6.一种预防或治疗共核蛋白病的药物组合物,其特征在于含有项1或2所述的肽或项3所述的抗体。

【附图说明】

[0019] 【图1】α-突触核蛋白与FABP3的立体结构和结合部位。(A)说明α-突触核蛋白与FABP3之间相互作用的示意图。(B)图1中的A中用方框圈出部分的α-突触核蛋白C末端的放大图。(C)天然无序结构α-突触核蛋白与FABP3结合模式的示意图。α-突触核蛋白的第133和136位酪氨酸残基参与,特别是第133位酪氨酸残基与位于FABP3的脂肪酸结合口袋的第16位苯丙氨酸的苯基发生强相互作用,形成α-突触核蛋白与FABP3的复合物。

【图2】α-突触核蛋白的二级结构与各区域的特性。(A)显示α-突触核蛋白的N末端、NAC末端及C末端结构的示意图。(B)图2中的(A)各区域肽的氨基酸序列。

【图3】FABP3与各区域α-突触核蛋白的结合分析。(A)FABP3与全长α-突触核蛋白的时程性结合。(B)FABP3与$SynP_{2-10}$的时程性结合。(C)FABP3与$SynP_{73-96}$的时程性结合。(D)FABP3与$SynP_{130-140}$的时程性结合。

【图4】ABP3与各种突变型α-突触核蛋白的结合分析。(A)将$SynP_{130-140}$的第133位酪氨酸换成苯丙氨酸后的肽(Y133F)。(B)将$SynP_{130-140}$的第136位酪氨酸换成苯丙氨酸后的肽(Y136F)。(C)将$SynP_{130-140}$的第136位酪氨酸换成色氨酸后的肽(Y136W)。(D)将$SynP_{130-140}$的第133和136位酪氨酸换成苯丙氨酸后的肽(Y133F/Y136F)。(E)将$SynP_{130-140}$的第133位酪氨

酸换成苯丙氨酸、第136位酪氨酸换成色氨酸后的肽(Y133F/Y136W)。(F)将$SynP_{130-140}$的第133和136位酪氨酸换成色氨酸后的肽(Y133W/Y136W)。

【图5】FABP3与C末端缺失和突变型α-突触核蛋白的结合分析与电子显微镜图像。(A)在α-突触核蛋白中同时添加等摩尔的FABP3和$SynP_{130-140}$或其突变肽时突触核蛋白聚集的形成。显示◆:添加Y133F/Y136F、■:添加Y133F、●:Syn全长、□:添加Y136W、△:添加Y133F/Y136W、◇:添加Y133W/Y136W、○:添加Y136F、×:添加$SynP_{130-140}$、(B)添加各种$SynP_{130-140}$突变肽时突触核蛋白聚集的显微镜照片。

【图6】α-突触核蛋白C末端肽对突触核蛋白和FABP3结合的拮抗作用及其电子显微镜图像。(A)在α-突触核蛋白中同时添加等摩尔的FABP3和1倍、0.5倍或0.1倍$SynP_{130-140}$的突变肽Y133F时突触核蛋白聚集的形成(B)显示在各种Y133F浓度(▲1倍、■0.5倍、◆0.1倍、●0倍)下突触核蛋白聚集的显微镜照片。

【图7】α-突触核蛋白C末端肽对突触核蛋白和FABP3的时间依存性拮抗作用与电子显微镜图像。(A)在α-突触核蛋白中添加等摩尔的FABP3,形成Syn-FABP3复合物后,添加$SynP_{130-140}$肽时突触核蛋白聚集的形成。(B)显示在图7(A)中以三角(▼)表示的添加FABP3之后经过0分钟(●)、180分钟(■)、480分钟(◆)及1440分钟(▲)时突触核蛋白聚集的显微镜照片。

【图8】α-突触核蛋白的C末端肽阻碍α-突触核蛋白单体向FABP表达神经细胞内转运。(A)左列:对照组(添加α-突触核蛋白单体),中央列:添加由α-突触核蛋白C末端区域的20个氨基酸组成的肽(20aa),右列:由α-突触核蛋白C末端区域的10个氨基酸组成的肽(10aa),上行:多巴胺合成的限速酶"酪氨酸羟化酶"(绿色),中央行:由ATTO-550荧光染色(红色)的α-突触核蛋白单体,下行:上行与中央行的叠加重合图,(B)分别在对照组、添加20aa肽、添加10aa时的ATTO荧光强度图表。****表示$p<0.0001$。(C)20aa肽和10aa肽的α-突触核蛋白C末端区域位置示意图。

【图9】α-突触核蛋白的C末端缺失肽抑制α-突触核蛋白单体向FABP表达神经细胞内转运。(A)αS(WT):野生型α-突触核蛋白单体,αS(Δ130-140):野生型α-突触核蛋白序列的第130-140位氨基酸缺失的肽。上行:酪氨酸羟化酶(绿色),中央行:ATTO-550荧光标记,下行:上行与中央行的叠加重合图,(B)分别在对照组(αS(WT))、αS(Δ130-140)时的ATTO荧光强度图表。****表示$p<0.0001$。(C)αS(Δ130-140)肽序列示意图。

【图10】FABP3与各种突变和缺失α-突触核蛋白或肽的列表及其离解常数。FABP3蛋白质与各种α-突触核蛋白肽的结合实验中的Kd、k_{on}及k_{off}值。AA:花生四稀酸。FABP3 F16S:将野生型FABP3的第16位苯丙氨酸换成丝氨酸后的蛋白质。

【具体实施方式】

[0020] α-突触核蛋白会在大脑内纤维化,从单体变成寡聚体以及原细纤维等多聚体,并聚集起来,但是根据最近的研究,α-突触核蛋白的寡聚体形成,可能会参与神经细胞间或与神经胶质细胞的传播,并发挥细胞毒性。本申请发明人最近报告,当α-突触核蛋白形成寡聚体时,心型脂肪酸结合蛋白(FABP3)也会生成α-突触核蛋白和寡聚体(Kawahata,I.et al.,Int.J.Mol.Sci.2019,20,(21))。疾病一旦恶化,寡聚体化的α-突触核蛋白就会在神经细胞间传播,并在所传播的部位向神经细胞内转运,引起细胞死亡。FABP3会参与到α-突触核蛋

白向神经和神经胶质细胞内转运中。也就是说,FABP3与α-突触核蛋白的寡聚体形成,可能会参与到α-突触核蛋白的传播和转运两个方面,若能阻碍或抑制FABP3与α-突触核蛋白的相互作用,会对预防或治疗共核蛋白病有效。

[0021] 因此,本申请发明人制备了与人α-突触核蛋白(140个氨基酸,序列号1,UniPlot:P37840)的N末端区域(从N末端由第2～10个氨基酸组成的区域,序列号2)、NAC区域(由第73～96个氨基酸组成的区域,序列号3)及C末端区域(由第130～140个氨基酸组成的区域,序列号4)对应的各种肽,探讨了α-突触核蛋白的哪个区域参与到与FABP3的相互作用中。

[0022] 结果,本申请发明人吃惊地发现,既不是N末端区域也不是NAC区域,而是C末端区域密切参与到与FABP3的相互作用中。

[0023] 图1中的A-C是α-突触核蛋白与FABP3形成1:1复合物的示意图。以一条曲线表示的α-突触核蛋白C末端区域,与FABP3的脂肪酸结合部位结合。FABP3的第16位Phe与α-突触核蛋白C末端区域的第133位Tyr密切参与到结合中。而且,若将α-突触核蛋白肽的第133位变成Phe,结合会更强。α-突触核蛋白C末端以外,可能是在FABP3表面通过电荷等结合的。

[0024] 根据本发明的第一种实施方式,提供一种下列(i)或(ii)所示的肽:

(i)具有以EEG(X1)QD(X2)EPEA(序列号5)表示的氨基酸序列的肽。

(式中,X1和X2相同或不同,是酪氨酸(Y)、苯丙氨酸(F)或色氨酸(W))

(ii)在除了所述(i)的氨基酸序列X1和X2以外的氨基酸部位,具有缺失、取代或添加1个或多个氨基酸的氨基酸序列,且具有与FABP3蛋白质结合的活性的肽。

[0025] 本说明书中的氨基酸简写符号以IUPAC的氨基酸缩写(Amino Acid Abbreviations)为准。

单字母代码、三字母代码及氨基酸如下所示:

A, Ala 丙氨酸	M, Met 甲硫氨酸
C, Cys 半胱氨酸	N, Asn 天冬酰胺
D, Asp 天冬氨酸	P, Pro 脯氨酸
E, Glu 谷氨酸	Q, Gln 谷氨酰胺
F, Phe 苯丙氨酸	R, Arg 精氨酸
G, Gly 甘氨酸	S, Ser 丝氨酸
H, His 组氨酸	T, Thr 苏氨酸
I, ILe 异亮氨酸	V, Val 缬氨酸
K, Lys 赖氨酸	W, Trp 色氨酸
L, Leu 亮氨酸	Y, Tyr 酪氨酸

[0026] 本发明的第一种实施方式的肽,各种氨基酸不仅是非修饰的(i)或(ii)所示的肽,而且包括在保持氨基酸种类的状态下1个或多个氨基酸被修饰的(i)或(ii)所示的肽。这种修饰包括氧原子结合引起的氧化、磷酸化、N-乙酰化、S-半胱氨酸化等。

本发明的肽,通过X1和X2的氨基酸苯基与天然型FABP3蛋白质的氨基酸序列中的第16位苯丙氨酸苯基产生相互作用,与FABP3结合。

[0027] 在一种实施方式中,本发明的肽是上述(i)所示的肽,X1是酪氨酸,X2是酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸。

在另外一种实施方式中,本发明的肽是上述(i)所示的肽,X1是苯丙氨酸,X2是酪

氨酸、苯丙氨酸或色氨酸。X1是苯丙氨酸时，与X1是酪氨酸时相比，该肽与FABP3蛋白质的结合亲和力会增大。

[0028] 在另外一种实施方式中，本发明的肽是上述(i)所示的肽，X1是色氨酸，X2是酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸。

[0029] 在一种实施方式中，本发明的肽是上述(ii)所示的肽，是在氨基酸部位具有缺失、取代或添加1个或2个氨基酸的氨基酸序列，且具有与FABP3蛋白质结合的活性的肽。

在氨基酸部位，1个或2个氨基酸被取代或被添加时，被取代或被添加的氨基酸，既可以是天然氨基酸，也可以是非天然型氨基酸(即20种常见氨基酸以外的氨基酸)。

[0030] 在另外一种实施方式中，本发明的肽是上述(ii)所示的肽，是在氨基酸部位具有1个氨基酸缺失、被取代或被添加的氨基酸序列，且具有与FABP3蛋白质结合的活性的肽。

[0031] 在另外一种实施方式中，本发明的肽是上述(ii)所示的肽，是在氨基酸部位具有1个氨基酸缺失、被取代或被添加的氨基酸序列，且具有与FABP3蛋白质结合的活性的肽，X1是酪氨酸，且X2是酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸，或者X1是苯丙氨酸，且X2是酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸，亦或X1是色氨酸，且X2是酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸。

[0032] 在一种实施方式中，本发明的肽是上述(i)或(ii)所示的肽，氨基酸的长度为7～30，宜为8～20，更宜为9～20，最好是10～20，例如长度为9、10、11、12、13、14、15或16。

[0033] 本发明第一种实施方式的肽能够与FABP3结合，因此能够与α-突触核蛋白竞争，阻碍或抑制FABP3与α-突触核蛋白的相互作用。本发明第一种实施方式的肽对α-突触核蛋白与FABP3之间相互作用的阻碍或抑制效果，可以通过体外阻碍分析来确认。α-突触核蛋白与FABP3的相互作用一旦被阻碍或抑制，α-突触核蛋白与FABP3形成寡聚体即被抑制，因此α-突触核蛋白寡聚体的神经细胞间传播与α-突触核蛋白向FABP3表达神经细胞内转运会被抑制。所以，本发明第一种实施方式的肽，可能也对预防或治疗共核蛋白病有效。

[0034] 本发明第一种实施方式的肽，即可采用本领域技术人员公知的化学合成方法制备成分离的肽，也能制备成其他肽的一部分。

[0035] 根据本发明的第二种实施方式，提供一种针对本发明第一种实施方式的肽的抗体。这种抗体对第一种实施方式的肽是特异性的，将本发明第一种实施方式的肽的一部分或全部识别为表位，因此会阻碍或抑制α-突触核蛋白与FABP3的相互作用。所以，本发明第二种实施方式的抗体，可能也对预防或治疗共核蛋白病有效。

[0036] 本发明第二种实施方式的抗体，可以采用本领域技术人员公知的化学合成方法制备本发明第一种实施方式的肽，以该肽为抗原，采用公知的免疫学方法制备。本发明第二种实施方式的抗体，多克隆抗体或单克隆抗体均可。而且，该抗体不仅包含完全抗体分子，还包含其片段，例如也可以是Fab、F(ab')2、ScFv等。

[0037] 本发明第一种实施方式的肽源于α-突触核蛋白的部分序列，因此本发明第一种实施方式的肽和第二种实施方式的抗体，虽然可以抑制α-突触核蛋白向FABP3表达神经细胞内转运，但是能够避免副作用。此外，还能设计在生物体内保持稳定且脑内转移性良好的肽和抗体。

[0038] 根据本发明的第三种实施方式，提供一种阻碍α-突触核蛋白与FABP3之间相互作用的方法，该方法包括将α-突触核蛋白暴露在本发明第一种实施方式的肽或第二种实施方式的抗体中。

[0039] 上述阻碍方法,既可用于体内亦可用于体外。

[0040] 根据本发明的第四种实施方式,提供一种阻碍α-突触核蛋白向FABP3表达细胞内转运的方法,该方法包括将α-突触核蛋白暴露在本发明第一种实施方式的肽或第二种实施方式的抗体中。

[0041] 上述阻碍方法,既可用于体内亦可用于体外。FABP3表达细胞,可以列举多巴胺作动性神经细胞、神经胶质细胞,但不限于此。

[0042] 根据本发明的第五种实施方式,提供一种阻碍α-突触核蛋白与FABP3之间相互作用的试剂盒,该试剂盒具备本发明第一种实施方式的肽或第二种实施方式的抗体。

[0043] 上述试剂盒,可以包括测定游离α-突触核蛋白或α-突触核蛋白和FABP的聚集所需的其他试剂和/或器具、表达量测定的阴性控制和阳性控制等。

[0044] 根据本发明的第六种实施方式,提供一种预防或治疗共核蛋白病的预防或治疗剂,该预防或治疗剂含有第一种实施方式的肽或第二种实施方式的抗体作为有效成分。

[0045] 根据本发明的第七种实施方式,提供一种预防或治疗共核蛋白病的药物组合物,该药物组合物含有第一种实施方式的肽或第二种实施方式的抗体。

[0046] 共核蛋白病可从由帕金森病(PD)、路易体痴呆(LBD)及多系统萎缩(MSA)所构成的组中选择。帕金森病中包括伴随认知症的帕金森病(PDD),路易体痴呆中包括伴随路易体痴呆的认知症(DLB)。

[0047] 上述第六种实施方式的预防或治疗剂和第七种实施方式的药物组合物,可以采用各种给药剂型,例如注射剂、经口剂、经鼻剂等均可,宜采用注射剂(静脉内、皮下、皮内、脊髓腔内等)。此类给药剂型可以采用本领域技术人员公知常用的制剂方法制备。

[0048] 上述第六种实施方式的预防或治疗剂和第七种实施方式的药物组合物的给药对象是哺乳动物,宜为小鼠、大鼠、仓鼠、雪貂、狗、猫、猴或人,更宜为人。

[0049] 上述第六种实施方式的预防或治疗剂和第七种实施方式的药物组合物,必要时可以掺合医用载体。医用载体使用作为常用制剂材料的各种有机或无机载体物质,可以列举赋形剂、结合剂、崩解剂、润滑剂、涂层剂、溶剂、增溶剂、悬浮化剂、张度剂、pH调节剂、缓冲剂、胶束剂等。而且,上述第六种实施方式的预防或治疗剂和第七种实施方式的药物组合物,必要时还能使用防腐剂、抗氧化剂、着色剂、矫味剂、矫臭剂、稳定剂等制剂添加物。

[0050] 应当在上述各种给药剂型中每次掺合的第一种实施方式的肽的剂量,取决于应当适用该肽的患者的症状,或者取决于其剂形等,并未固定,一般来说,每次掺合的剂量为0.1ng～1000mg,宜为10ng～10mg。

[0051] 具有上述给药方式的第一种实施方式的肽的每日给药剂量,取决于患者的症状、体重、年龄、性别等,不能一概而论,通常成人(体重50kg)每日0.1ng～1000mg,宜为10ng～10mg,分成每日1次或2～3次,宜每周、隔周、每4周(1个月)或隔月给药。

[0052] 应当在上述各种给药剂型中每次掺合的第二种实施方式的抗体的剂量,取决于应当适用该抗体的患者的症状,或者取决于其剂形等,并未固定,一般来说,每次掺合的剂量为0.1ng～1000mg,宜为10ng～10mg。

[0053] 具有上述给药剂型的第二种实施方式的抗体的每日给药剂量,取决于患者的症状、体重、年龄、性别等,不能一概而论,通常成人(体重50kg)每日0.1ng～1000mg,宜为10ng～10mg,分成每日1次或2～3次,宜每周、隔周、每4周(1个月)或隔月给药。

[0054] 在本说明书中引用的所有专利申请和文献,其公开内容通过引用整体并入本说明书。

[0055] 下面列举实施例更加具体地说明本发明,但本发明的实施方式不限于此。

【实施例】

[0056] 实施例1FABP3与α-突触核蛋白全长或部分肽的相互作用

(方法)

首先,图2中的A和B说明与天然蛋白质“α-突触核蛋白”的结构对应的区域,图2中的A显示本实施例所使用的肽(SynP2-10、SynP73-96及SynP130-140)的区域部位,图2中的B为此类肽的氨基酸序列(序列号2、序列号3、序列号4)。

[0057] 采用石英晶体微天平(QCM测定装置(AffinixQNμ,Initium公司)法测定了FABP3与野生型α-突触核蛋白(Syn)或具有一部分野生型α-突触核蛋白氨基酸序列的肽(SynP2-10、SynP73-96及SynP130-140)的相互作用。采用Ni-NTA法将FABP3固定化到石英基片上。具体而言,用1%的SDS和食人鱼溶液(H_2SO_4:H_2O_2=3:1)清洗后,添加100μL的0.5mM 3,3'-dithiobis[N-(5-amino-5-carboxypentyl)propionamide-N',N'-diacetic acid] dihydrochloride(C_2-NTA、Dojindo)溶液,在室温下静置10分钟。用蒸馏水清洗后,添加500μL的Ni溶液(20mM HEPES-NaOH buffer,pH7.5、150mM NaCl、50mM EDTA、10mM $NiSO_4$),在室温下静置10分钟。用蒸馏水清洗后,将用50mM Tris-HCl pH7.4稀释过的在N末端融合了His-Tag的100nM FABP3添加到石英传感器中,进行1分钟的固定化。分别在其中添加2.5nM、5nM、10nM、15nM、20nM用50mM Tris-HCl pH7.4稀释过的野生型α-突触核蛋白和3种肽(SynP2-10、SynP73-96及SynP130-140),用QCM装置进行测定。在500μL液体中,在25℃、1000rpm的条件下测定3分钟。测定后,利用AQUA2.0软件(Initium)分别算出Kd、kon、koff。

[0058] (结果)

图3中的A-D分别为显示FABP3与α-突触核蛋白全长(Syn)(A)、SynP2-10肽(B)、SynP73-96肽(C)、SynP130-140肽(D)的相互作用的图表。如图3中的A所示,α-突触核蛋白全长(Syn)呈剂量依存性地与FABP3结合。如图3中的B和C所示,α-突触核蛋白N末端区域的SynP2-10肽和NAC区域的SynP73-96肽几乎不与FABP3结合,令人惊讶的是,如图3中的D所示,C末端区域的SynP130-140肽呈剂量依存性地与FABP3结合。SynP130-140肽正好是相当于α-突触核蛋白C末端区域(100-140)的C末端部的肽。

[0059] 实施例2FABP3与SynP130-140的各种突变体的相互作用

(方法)

针对SynP130-140肽,制备了将第133位酪氨酸变为苯丙氨酸的突变体(Y133F)、将第136位酪氨酸变为苯丙氨酸的突变体(Y136F)、将第133位酪氨酸变为色氨酸的突变体(Y133W)、将第133位酪氨酸和第136位酪氨酸均变为苯丙氨酸的突变体(Y133F/Y136F)、将第133位酪氨酸变为苯丙氨酸且将136位酪氨酸变为色氨酸的突变体(Y133F/Y136W)、将第133位酪氨酸和第136位酪氨酸均变为色氨酸的突变体(Y136F/Y136W)。

按照与实施例1同样的方法进行了FABP3与肽SynP130-140的各种突变体的相互作用。对固定化后的FABP3,以任意浓度添加各种肽,进行了测定。

[0060] (结果)

如图4中的A所示,将第133位酪氨酸变为苯丙氨酸,结合亲和力会增强2倍。如图4

中的B和C所示，将第136位酪氨酸变为苯丙氨酸或色氨酸，亲和性并不会增强，而是保持与酪氨酸(Y)同样程度的与FABP3的亲和性。如图4中的D所示，即使将两处酪氨酸都变为苯丙氨酸，与FABP3的亲和性也与一处突变(Y133F)的程度相同，也就是说，结合亲和力是天然序列的2倍。从此类结果来看，可能第133位酪氨酸变成苯丙氨酸很重要。如图4中的E所示，除了让第133位酪氨酸突变为苯丙氨酸之外，即使让第136位变为色氨酸，亲和性并未与第136位的突变相应地增强。如图4中的F所示，即使将两处酪氨酸(Y)都变为色氨酸(W)，与天然序列的情况相比也并无变化。尽管已知亲和性可以通过让酪氨酸突变为色氨酸来保持，但是亲和性未必会增强。

[0061] 实施例3通过在α-突触核蛋白中添加FABP3来抑制淀粉样蛋白纤维形成并通过添加肽来促进聚集

(方法)

使FABP3、α-突触核蛋白(Syn)与各种SynP130-140突变体肽按照摩尔比1:1:1共存，用硫黄素T(Thio-T)对α-突触核蛋白的淀粉样蛋白纤维形成进行荧光观察，或者在其最后时刻用电子显微镜(TEM)测定淀粉样蛋白纤维的形态。使用ARVO X4(Perkin Elmer)测定在Syn的纤维形成过程中的摇动和时程性荧光值。测定时，在96孔板(8×12微孔板；Greiner,Kremsmuenster,Austria)中添加样本至150μL/well，在37℃下持续振荡，同时每隔15min测定一次荧光(Ex:440nm,Em:486nm)。在50mM Tris-HCl pH7.4,150mM NaCl,20μM Thio-T 500μL中添加测定样本，使α-突触核蛋白、FA BP3、肽(SynP130-140,SynP130-140 Y133F,Y136F,Y136W,Y133F/Y136F,Y133F/Y136W,Y133W/Y136W)分别为69μM。用透射电子显微镜(TEM)(JEOL JEM-1400Plus)对测定后得到的1800分钟后的样本进行测定。在火棉胶膜(400目;Nisshin EM,Tokyo,Japan)中添加10μL样本，在室温下静置2分钟后，用5μL蒸馏水清洗，并用5μL的10％ EM stain溶液染色1分钟后，用5μL蒸馏水清洗。将其风干一夜后进行测定。

[0062] (结果)

图5中的A是淀粉样蛋白纤维形成的时程性荧光观察，图5中的B是显示使用与实施例2相同的突变肽时突触核蛋白聚集的显微镜照片。在α-突触核蛋白中添加等摩尔的FABP3，突触核蛋白聚集会被完全抑制(图表的●)。然而，若在α-突触核蛋白中同时添加等摩尔的FABP3与P130-140的肽(图表的×)、让第133位酪氨酸突变为F的肽(图表的◆、■)，与α-突触核蛋白(全长，Kd＝0.4nM)相比，肽与FABP3的结合更强(Kd＝0.2-0.1nM)，因此肽先与FABP3结合，未能结合的α-突触核蛋白则形成淀粉样蛋白纤维聚集。

[0063] 实施例4SynP130-140 Y133F肽在淀粉样蛋白纤维聚集形成中的浓度依存性

使FABP3、α-突触核蛋白(Syn)与让SynP130-140的第133位酪氨酸突变为苯丙氨酸的突变体肽(SynP130-140 Y133F)按照摩尔比1:1:1共存，用硫黄素T(Thio-T)对α-突触核蛋白的淀粉样蛋白纤维形成进行荧光观察，或者在其最后时刻用电子显微镜(TEM)测定淀粉样蛋白纤维的形态。采用与实施例3同样的方法进行Thio-T测定和TEM测定。在Thio-T测定中，相对于69μM的α-突触核蛋白、69μM的FABP3，分别添加0.1倍(6.9μM)、0.5倍(34.5μM)、1倍(69μM)的SynP130-140Y133F进行测定。

[0064] (结果)

图6A是淀粉样蛋白纤维形成的时程性荧光观察，图6B是显示在各种浓度下使用

SynP130-140 Y133F肽时突触核蛋白聚集的显微镜照片。在α-突触核蛋白中添加等摩尔的FABP3时，α-突触核蛋白的淀粉样蛋白纤维聚集会被完全抑制。如果同时在其中加入0.1倍、0.5倍、1倍的Y133F肽(Kd＝0.1nM)，Y133F肽会呈剂量依存性地优先与FABP3结合，未能结合的α-突触核蛋白则形成淀粉样蛋白纤维聚集。●的0倍图表显示只存在FABP3和α-突触核蛋白时的淀粉样蛋白纤维聚集形成。

[0065] 实施例5SynP130-140肽的添加时间对淀粉样蛋白纤维聚集形成的影响

对于在α-突触核蛋白与FABP3的复合物中后来晚加了SynP130-140肽时游离的α-突触核蛋白形成淀粉样蛋白纤维的情况进行荧光观察，或者在其最后时刻进行TEM观察。采用与实施例3同样的方法进行Thio-T测定和TEM测定。对于刚添加SynP130-140(0小时)的试剂，以及添加SynP130-140之后3小时、8小时、24小时的试剂，进行了Thio-T测定。

[0066] (结果)

图7A是各个添加时间的淀粉样蛋白纤维形成的时程性荧光观察，图6B是显示在各个添加时间添加了SynP130-140 Y133F肽时突触核蛋白聚集的显微镜照片。在α-突触核蛋白(Syn)中添加等摩尔的FABP3，会形成1:1的Syn-FABP3的复合物。后来晚于箭头时间在其中加入等摩尔的C末端肽(P130-140)，P130-140与FABP3的亲和性较强，因此使Syn从FABP3中离解，SynP130-140与FABP3结合。经确认，从FABP3中离解的Syn会形成淀粉样蛋白纤维聚集。

[0067] 实施例6α-突触核蛋白向多巴胺神经细胞内转运与C末端肽对转运的拮抗作用

(方法)

培养多巴胺神经按照现有方法(Kawahata et al.2019)调制。具体而言，在异氟烷深度麻醉下，通过切开腹部正中，从怀孕第15.5天的C57BL6N小鼠体内无菌摘除子宫，在体视显微镜下，在冰冷Han k's平衡盐溶液(HBSS)中摘除胚胎中脑后，用37℃的神经细胞分散液(住友电木)处理30分钟，让组织分散，以1000rpm离心分离5分钟后废弃上清，并分散细胞Pellet后，加入去垢剂(住友电木)，以900rpm离心分离5分钟后，去除上清，使Pellet在Eagle's minimal essential medium(EMEM)中悬浮，播撒在用多聚-L-赖氨酸涂敷过的反应室板(IWAKI)上。培养第10天，为了进行α-突触核蛋白的可视化分析，在培养基中添加1μM ATTO-550标记α-突触核蛋白低聚物，在所合成的α-突触核蛋白C末端20残基DNEAYEMPSEEGYQDYEPEA(1μM)(序列号6)或10残基EGYQDYEPEA(1μM)(序列号6)的肽共存下或非共存下，进行48小时处理。通过ATTO-550标记α-突触核蛋白的细胞内荧光强度定量分析，评估了肽对α-突触核蛋白向多巴胺神经内转运的拮抗作用(NIH Image J软件)。数值为平均土SEM(n>20)，对所有的组都进行了one-way ANOVA with Tukey test。C显示所合成的α-突触核蛋白的肽示意图。

[0068] (结果)

培养多巴胺神经虽将ATTO-550标记α-突触核蛋白转运到细胞内(图8A，对照组，红色)，但是通过同时处理突触核蛋白C末端肽20残基或10残基，荧光标记α-突触核蛋白的细胞内转运被抑制(图8A，20aa，10aa，图8B)。****与对照组相比，p<0.0001(图8B)。在突触核蛋白C末端肽20残基和10残基之间，未发现突触核蛋白转运的抑制作用有显著性差异(图8B)。此类肽属于突触核蛋白C末端酸性区域(图8C)。

[0069] 实施例7野生型α-突触核蛋白和C末端缺失突变体在多巴胺神经细胞中的细胞内

转运特性

(方法)

与实施例6同样调制培养多巴胺神经。培养第10天,为了进行α-突触核蛋白的可视化分析,将1μM ATTO-550标记α-突触核蛋白低聚物添加到培养基中,或者与实施例6相反,将缺失了突触核蛋白C末端130-140残基的ATTO-550标记α-突触核蛋白低聚物添加到培养基中,研究了这些低聚物向神经细胞内转运的情况。对于野生型α-突触核蛋白或C末端130-140残基缺失α-突触核蛋白向多巴胺神经转运的数量,通过ATTO-550标记α-突触核蛋白的细胞内荧光强度定量分析进行了评估(NIH Im age J软件)。数值为平均±SEM(n>20),通过Student's T-test进行了2组间对比。图9C显示所合成的C末端130-140残基缺失α-突触核蛋白的示意图。

[0070] (结果)

培养多巴胺神经虽将ATTO-550标记α-突触核蛋白转运到细胞内(αS,WT),但是C末端130-140残基缺失α-突触核蛋白(αS,Δ130-140)未被转运到神经细胞内(图9A,红色,B)。****与对照组对比,p<0.0001(图9B)。

[0071] 实施例8FABP与α-突触核蛋白肽的结合实验

(方法)

对于FABP3与各种肽或α-突触核蛋白之间相互作用的亲和性,使用QCM测定装置算出了定量值。具体实验方法与实施例1相同。

[0072] (结果)

FABP3与各种肽的结合结果如图10所示。α-突触核蛋白的C末端130-140残基参与FABP3与α-突触核蛋白的结合,而且FABP3突变与α-突触核蛋白C末端肽突变的结果显示,FABP3蛋白质的氨基酸序列中的第16位苯丙氨酸的苯基与α-突触核蛋白的第133位苯基、酪氨酸或色氨酸和/或第136位苯基、酪氨酸或色氨酸发生相互作用。

【序列表】

序列表

<110> 国立大学法人东北大学

国立大学法人鸟取大学

<120> 用于预防或治疗共核蛋白病的肽

<130> P20200032

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> 人类

<400> 1

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
1 5 10 15
Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys
20 25 30
Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
35 40 45
Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
50 55 60
Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
65 70 75 80
Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
85 90 95
Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
100 105 110
Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro
115 120 125
Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
130 135 140

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> α-突触核蛋白的部分肽

<400> 2

Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala
1 5 10

<210> 3
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> α-突触核蛋白的部分肽
<400> 3

Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile
1 5 10 15
Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
20

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> α-突触核蛋白的部分肽
<400> 4

Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> Tyr, Phe, or Trp
<222> 4
<223> 变异体
<220>
<221> Tyr, Phe, or Trp
<222> 4
<223> 变异体
<400> 5

Glu Glu Gly Xaa Gln Asp Xaa Glu Pro Glu Ala
1 5 10

<210> 6
<211> 20

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> C末端20个氨基酸的肽
<400> 6

Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr
1 5 10 15
Glu Pro Glu Ala
20

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> C末端10个氨基酸的肽
<400> 7

Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
1 5 10

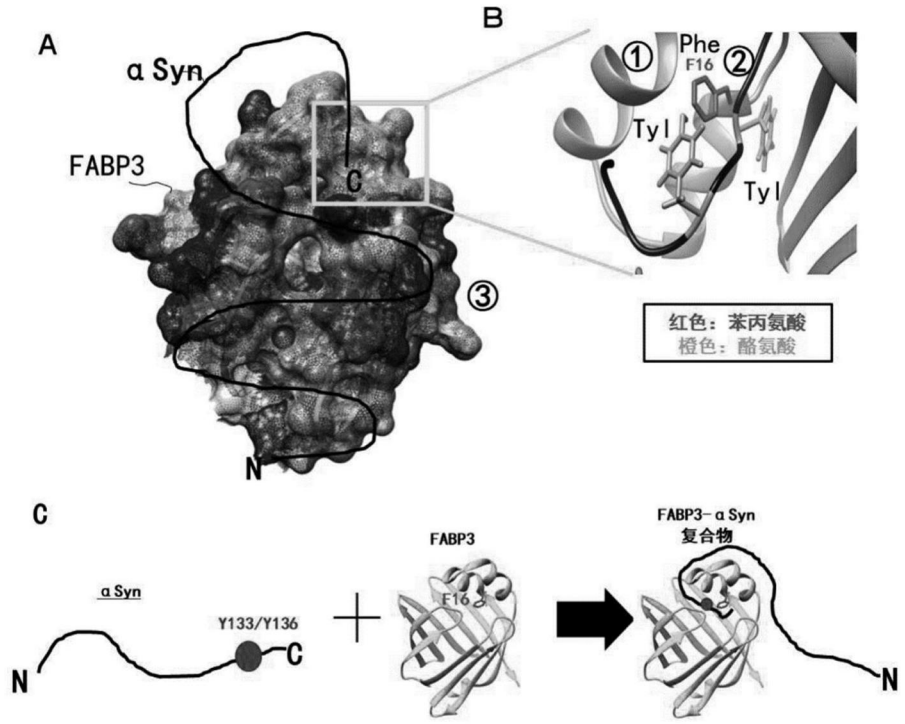
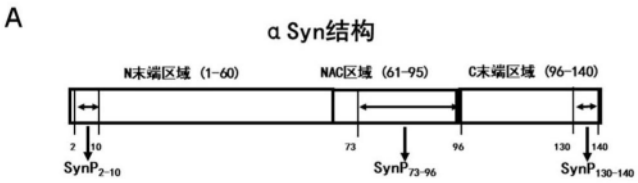


图1



B

肽的氨基酸序列	
SynP2-10	2 DVFMKGLSKA 10
SynP73-96	73 GVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVK 96
SynP130-140	130 EEGYQDYEPEA 140

图2

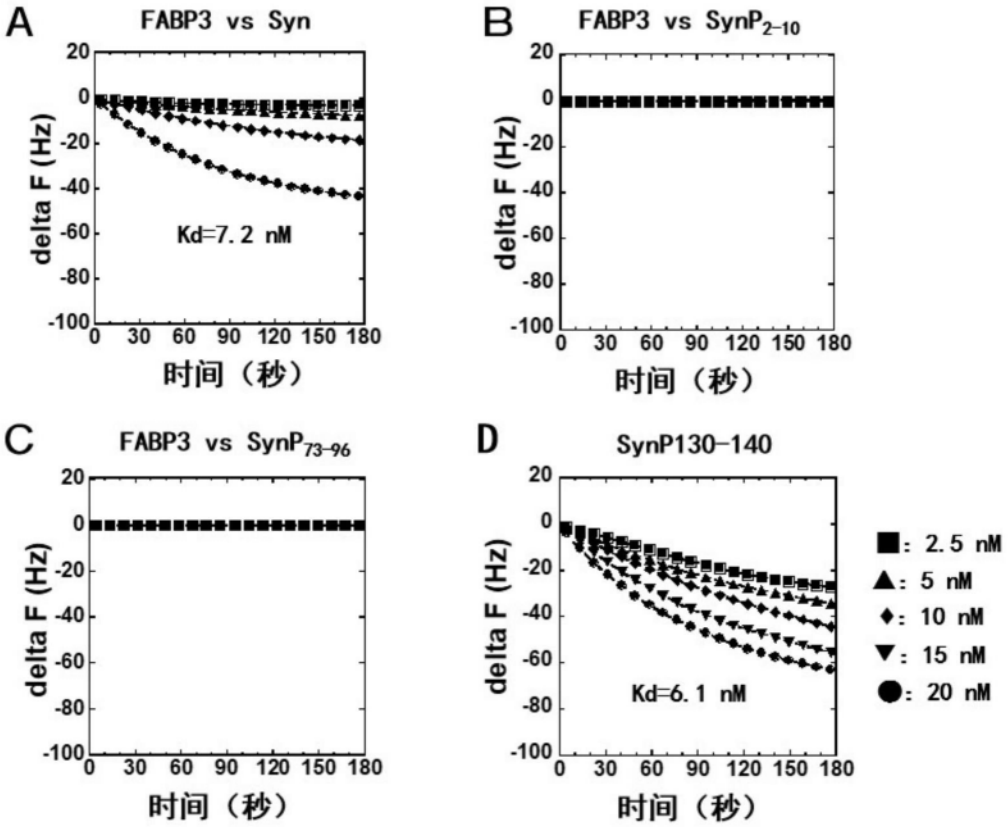

A
FABP3 vs Syn
delta F (Hz)
Kd=7.2 nM
时间（秒）
B
FABP3 vs SynP2-10
delta F (Hz)
时间（秒）
C
FABP3 vs SynP73-96
delta F (Hz)
时间（秒）
D
SynP130-140
delta F (Hz)
Kd=6.1 nM
时间（秒）
■: 2.5 nM
▲: 5 nM
♦: 10 nM
▼: 15 nM
●: 20 nM

图3

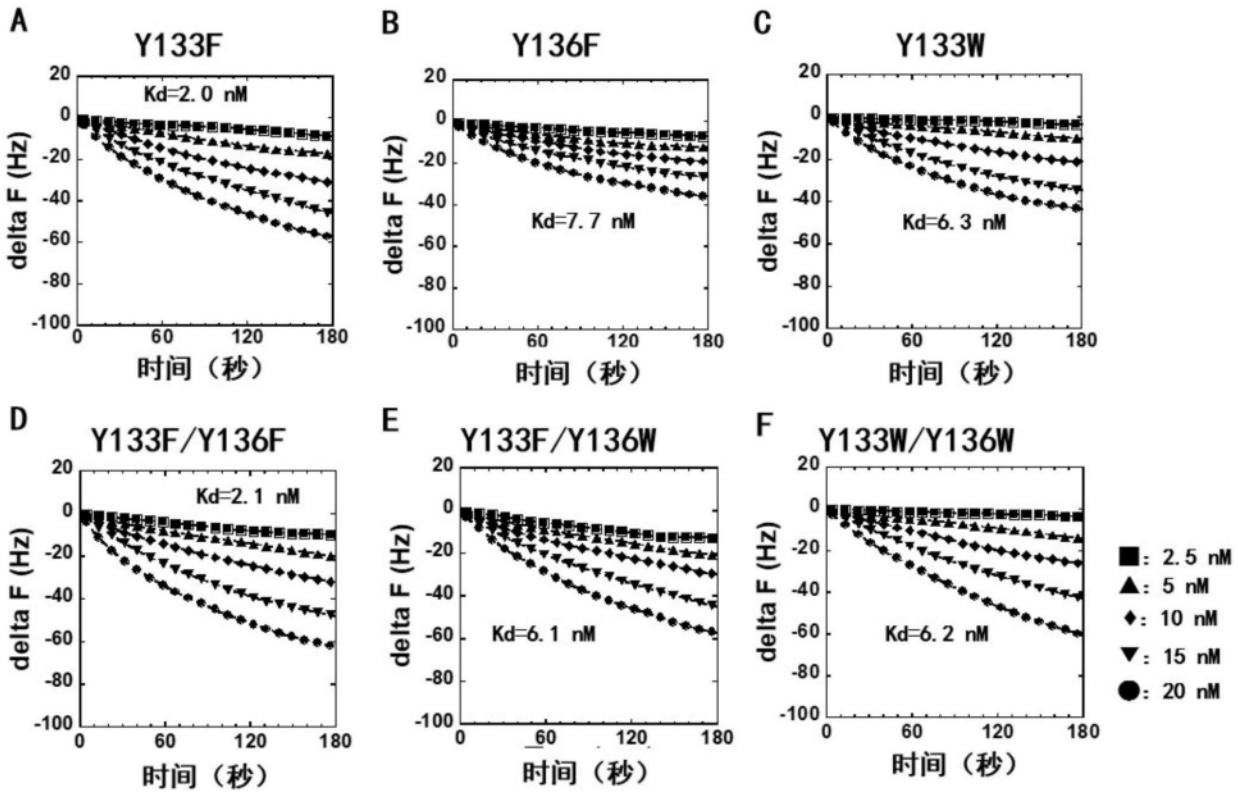

A
Y133F
Kd=2.0 nM
B
Y136F
Kd=7.7 nM
C
Y133W
Kd=6.3 nM
D
Y133F/Y136F
Kd=2.1 nM
E
Y133F/Y136W
Kd=6.1 nM
F
Y133W/Y136W
Kd=6.2 nM
delta F (Hz)
时间（秒）
■: 2.5 nM
▲: 5 nM
♦: 10 nM
▼: 15 nM
●: 20 nM

图4

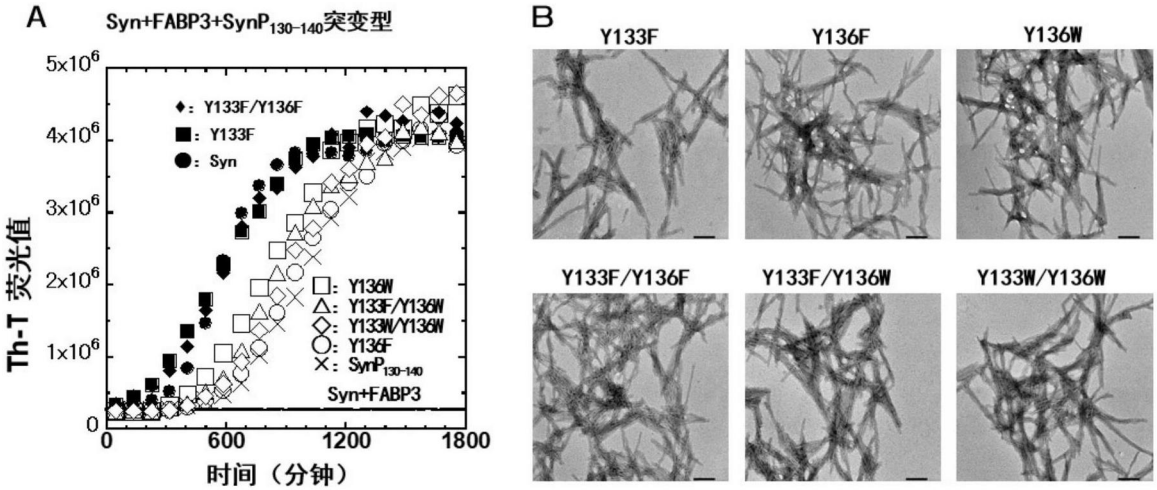

A
Syn+FABP3+SynP130-140突变型
Th-T 荧光值
时间（分钟）
♦: Y133F/Y136F
■: Y133F
●: Syn
□: Y136W
△: Y133F/Y136W
◇: Y133W/Y136W
○: Y136F
×: SynP130-140
Syn+FABP3
B
Y133F
Y136F
Y136W
Y133F/Y136F
Y133F/Y136W
Y133W/Y136W

图5

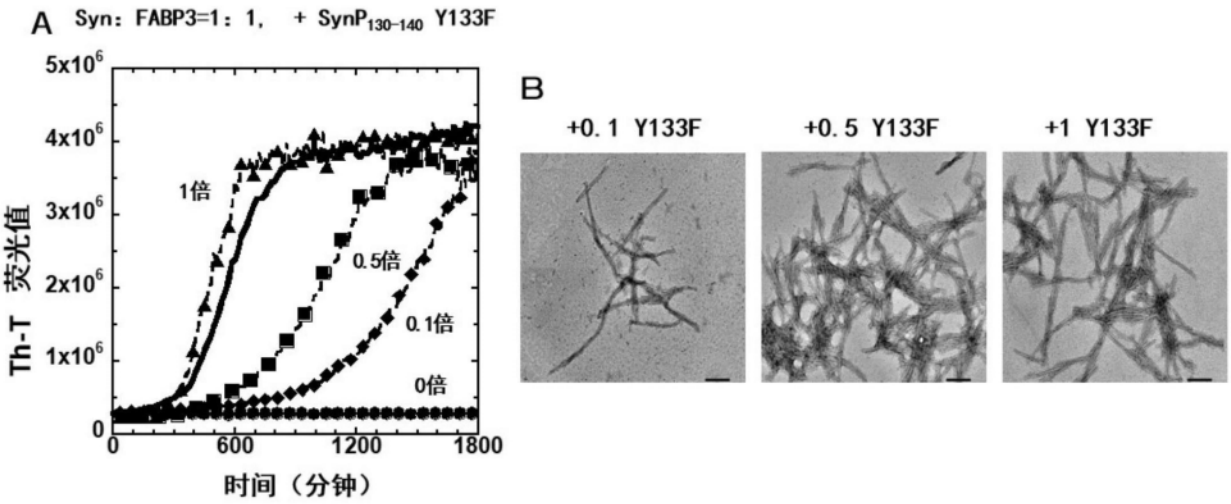

A
Syn：FABP3=1：1， + SynP130-140 Y133F
5x10^6
4x10^6
3x10^6
2x10^6
1x10^6
0
Th-T 荧光值
1倍
0.5倍
0.1倍
0倍
0
600
1200
1800
时间（分钟）
B
+0.1 Y133F
+0.5 Y133F
+1 Y133F

图6

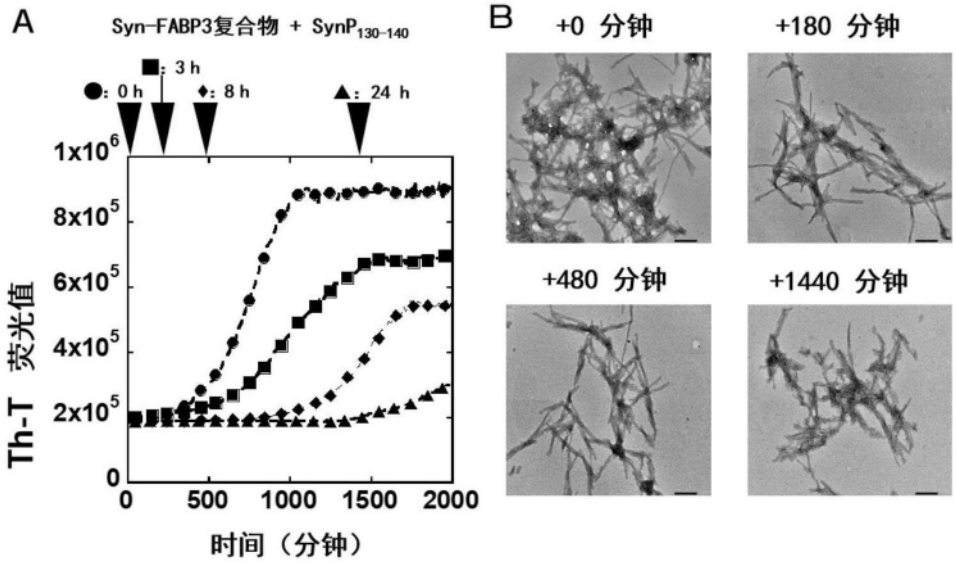

A
Syn-FABP3复合物 + SynP130-140
■：3 h
●：0 h
◆：8 h
▲：24 h
1x10^6
8x10^5
6x10^5
4x10^5
2x10^5
0
Th-T 荧光值
0
500
1000
1500
2000
时间（分钟）
B
+0 分钟
+180 分钟
+480 分钟
+1440 分钟

图7

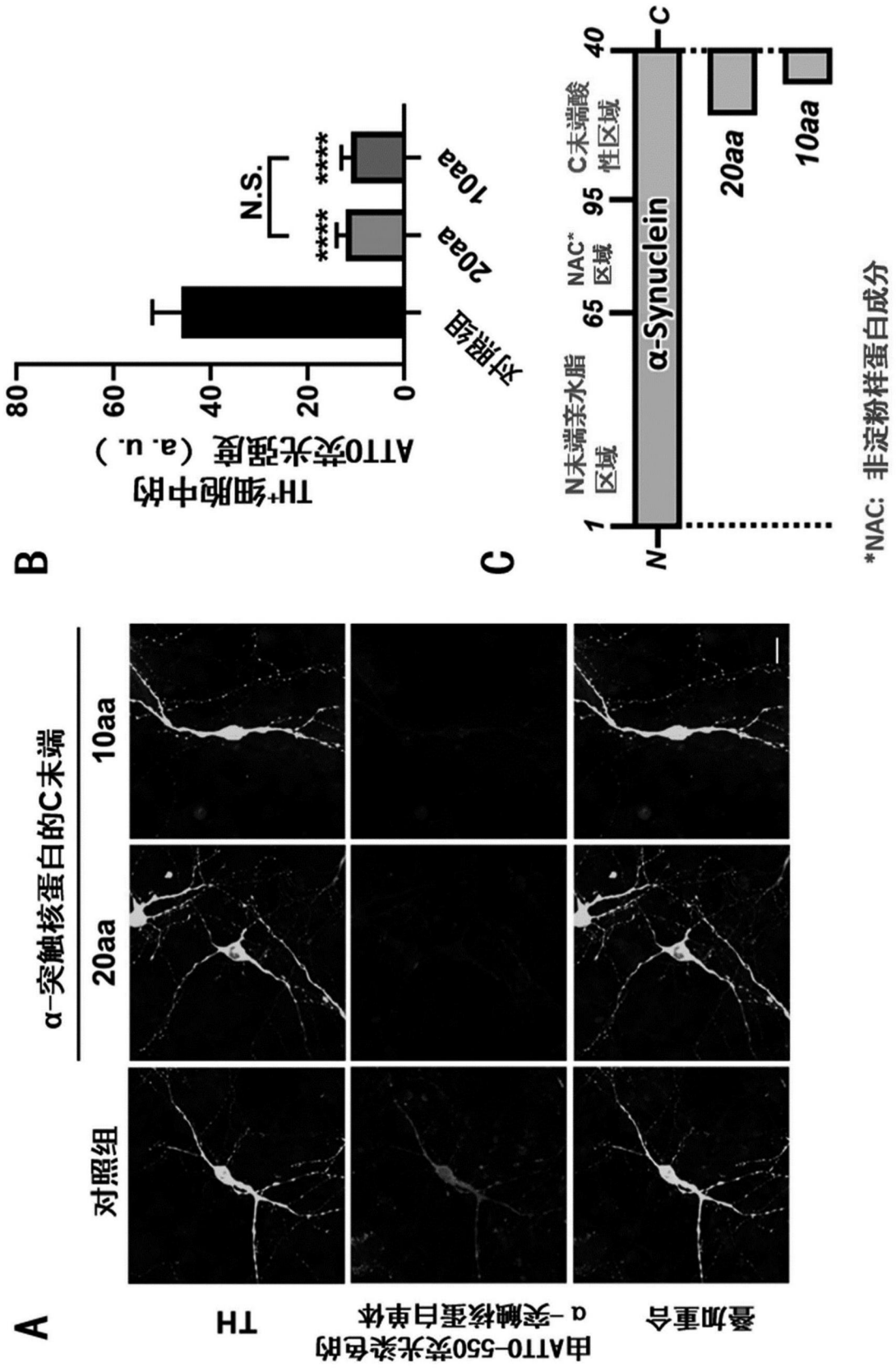

A
对照组
α-突触核蛋白的C末端
20aa
10aa
TH
由ATTO-550荧光染色的
α-突触核蛋白单体
叠加重合
B
TH+细胞中的
ATTO荧光强度 (a. u.)
80
60
40
20
0
对照组
20aa
10aa
N.S.
****
****
C
N末端亲水脂
区域
1
65
NAC*
区域
95
C末端酸
性区域
40
N
α-Synuclein
C
20aa
10aa
*NAC: 非淀粉样蛋白成分

图8

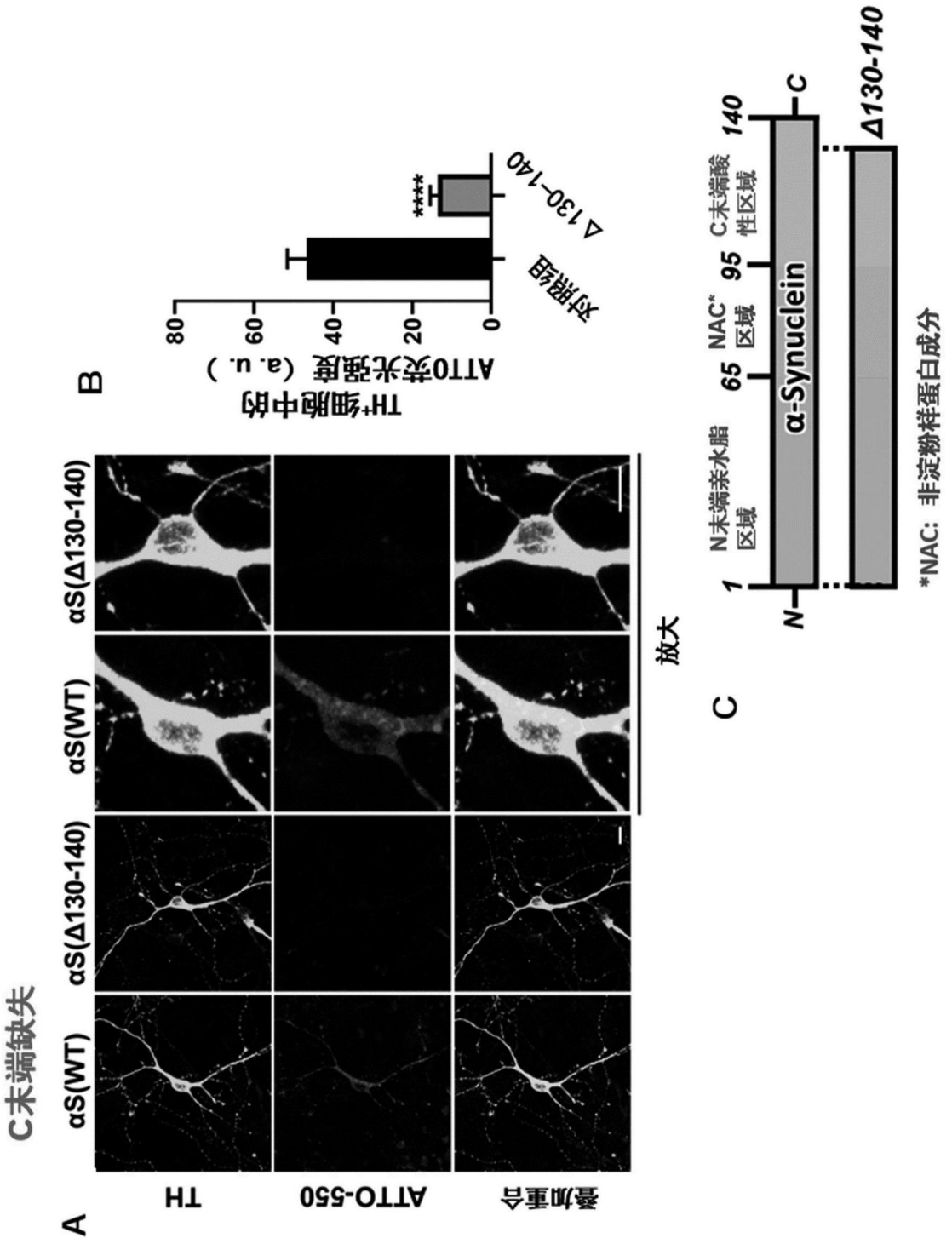

A
C末端缺失
αS(WT)
αS(Δ130-140)
αS(WT)
αS(Δ130-140)
TH
ATTO-550
叠加重合
放大
B
TH+细胞中的
ATTO荧光强度 (a. u.)
80
60
40
20
0
对照组
Δ 130-140
****
C
1
N
N末端亲水脂区域
65
NAC*区域
95
C末端酸性区域
140
C
α-Synuclein
Δ130-140
*NAC: 非淀粉样蛋白成分

图9

样本	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花生四稀酸 (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 $\alpha SynP_{2-10}$	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.：未确定

α Syn130-140CF：此α Syn的第130-140位残基的氨基酸是不带电荷的

图10