



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102406648 A

(43) 申请公布日 2012. 04. 11

(21) 申请号 201010290096. 1

A61P 25/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 09. 21

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 袁增强 陈冬梅 胡鹏 马钧

吴荣

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

A61K 31/506 (2006. 01)

A61P 25/16 (2006. 01)

A61P 25/28 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

序列表 4 页 附图 10 页

(54) 发明名称

甲磺酸伊马替尼在制备抗帕金森病药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种甲磺酸伊马替尼在制备抗帕金森病药物中的应用。甲磺酸伊马替尼 (STI571) 在制备治疗神经退行性疾病的药物中的应用属于本发明的保护范围之内, 该神经退行性疾病可以是帕金森病。实验证明: STI571 连续给药可显著改善 MPTP 诱导的运动功能障碍; 可改善鼠的认知功能障碍。STI571 可显著改善 MPTP 诱导的多巴胺神经元的丧失、STI571 抑制鱼藤酮诱导的大鼠 CA1 和 DG 区神经细胞凋亡反应以及 STI571 可显著抑制鱼藤酮诱导的原代黑质神经元凋亡及 Lewy 小体蛋白表达, 抑制 PKC 和 Akt 的磷酸化激活。STI571 作为 c-Ab1 的特异性抑制剂, 可对抗 PD 形成, 改善 PD 时的行为学异常及认知功能障碍, 可作为抗帕金森病等神经退行性疾病的候选新药, 具有良好的应用前景, 极大程度拓展了 STI571 的临床适应症。

1. 甲磺酸伊马替尼在制备治疗神经退行性疾病的药物中的应用。
2. 如权利要求 1 所述的应用,其特征在于:所述神经退行性疾病是帕金森病。
3. 甲磺酸伊马替尼在制备运动功能障碍和 / 或认知功能障碍的产品中的应用。
4. 甲磺酸伊马替尼在制备抑制神经细胞凋亡反应的制剂中的应用。
5. 如权利要求 4 所述的应用,其特征在于:所述抑制神经细胞凋亡反应是通过抑制神经元 MST1 蛋白 T183 位点的磷酸化来实现的;所述神经元 MST1 蛋白的氨基酸序列如序列表中序列 1 所示。
6. 如权利要求 4 或 5 中所述的应用,其特征在于:所述神经细胞凋亡反应是 1- 甲基 -4- 苯基 -1,2,3,6- 四氢吡啶或鱼藤酮诱导形成的症状。
7. 甲磺酸伊马替尼在制备改善多巴胺神经元丧失的药物中的应用。
8. 如权利要求 7 中所述的应用,其特征在于:所述多巴胺神经元丧失是 1- 甲基 -4- 苯基 -1,2,3,6- 四氢吡啶或鱼藤酮诱导形成的症状。

甲磺酸伊马替尼在制备抗帕金森病药物中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及甲磺酸伊马替尼在制备治疗帕金森病的药物中的应用。

背景技术

[0002] 甲磺酸伊马替尼 (STI571), 化学名是 4-(4-甲基-1-哌嗪) 甲基-N-4-甲基-3-4-(3-吡啶)-2-嘧啶氨基苯基-苯胺甲磺酸盐, 目前国外主要将其用于慢性骨髓性白血病的治疗, STI571 能明显抑制白血病细胞增殖, 细胞阻滞于 G0/G1 期, 且具有明显的诱导凋亡作用, 可使普遍存在的 Abelson 酪氨酸激酶 (Ab1) 失活。

[0003] 目前针对甲磺酸伊马替尼的其它功能还没有文献报道。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供甲磺酸伊马替尼 (STI571) 在制备治疗神经退行性疾病的药物中的应用。

[0005] 本发明提供的甲磺酸伊马替尼在制备治疗神经退行性疾病的药物中的应用中, 上述神经退行性疾病可以具体是帕金森病。

[0006] 上述帕金森病可以是线粒体电子传递链抑制剂诱导的实验性帕金森病。

[0007] 进一步, 上述线粒体电子传递链抑制剂是 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (MPTP) 或鱼藤酮。

[0008] 甲磺酸伊马替尼在制备运动功能障碍和 / 或认知功能障碍的产品中的应用也属于本发明的保护范围之内。

[0009] 甲磺酸伊马替尼在制备抑制神经细胞凋亡反应的制剂中的应用也属于本发明的保护范围之内。

[0010] 进一步, 上述抑制神经细胞凋亡反应可通过抑制神经元 MST1 蛋白 T183 位点的磷酸化来实现的; 所述神经元 MST1 蛋白的氨基酸序列如序列表中序列 1 所示。

[0011] 具体地讲, 上述神经细胞是鼠的 CA1 和 / 或 DG 区的神经细胞。

[0012] 上述神经细胞凋亡反应是 MPTP 或鱼藤酮诱导形成的症状。

[0013] 甲磺酸伊马替尼在制备改善多巴胺神经元丧失的药物中的应用也属于本发明的保护范围之内。

[0014] 上述多巴胺神经元丧失是 MPTP 或鱼藤酮诱导形成的症状。

[0015] 实验证明: STI571 连续给药一周、两周, 可显著改善 MPTP 诱导的运动功能障碍, 表现为显著延长转杆时间; STI571 还可显著改善 MPTP 诱导的自发活动降低, 与 MPTP 模型组相比, 自发活动距离和平均速度均显著增加, 从而改善 MPTP 诱导的运动功能障碍。因此 STI571 可改善鼠的运动功能障碍。通过定位航行试验、空间探索试验发现 STI571 可改善鼠的认知功能障碍。进一步机理分析表明: STI571 可显著改善 MPTP 诱导的多巴胺神经元的丧失、STI571 抑制鱼藤酮诱导的大鼠 CA1 和 DG 区神经细胞凋亡反应以及 STI571 可显著抑制鱼藤酮诱导的原代黑质神经元凋亡及 Lewy 小体蛋白表达, 抑制 PKC 和 Akt 的磷酸化激活。

因此,STI571 作为 c-Ab1 的特异性抑制剂,可有效对抗 PD 形成,改善 PD 时的行为学异常及认知功能障碍,可能作为抗帕金森病等神经退行性疾病的候选新药,具有良好的应用前景,极大程度拓展了 STI571 的临床适应症。

附图说明

[0016] 图 1 为 STI571 对鱼藤酮 (rotenone) 立体定位给药 (3h-3d) 大鼠 CA1 区及 DG 区神经元 p-MST1-T183 蛋白表达的影响,A、B 分别是 3、6、12、24、48、72 小时对大鼠 CA1 和 DG 区的染色结果;C 是神经元 p-MST1-T183 蛋白的平均光密度,是 B 图 DG 区定量的结果;是 3、6、12、24、48、72 小时的结果。

[0017] 图 2 为 STI571 对抑制鱼藤酮 (rotenone) 立体定位给药 (24-72h) 大鼠 CA1 区及 DG 区神经细胞的凋亡反应的影响,A 是细胞凋亡百分率是 DG 区 24h,48h,72h 三个时间点统计的结果;B 是 24、48、72 小时对大鼠 CA1 区的 TUNEL 染色结果;C 是 DG 区的 TUNEL 染色结果。

[0018] 图 3 为转杆实验,A、B 和 C 分别是 STI571 连续给药三天、一周和两周的试验结果; ** $p < 0.01$ vs control, ## $p < 0.01$ vs MPTP。

[0019] 图 4 为自动运动实验,A 中的两个图从左往右分别为自发活动的距离和平均速度结果,B 为代表性的自发活动轨迹; * $p < 0.01$ vs control, ## $p < 0.01$ vs MPTP。

[0020] 图 5 为隐匿平台实验,A 是潜逃潜伏期;B 是找到隐匿平台航行距离;C 是平均游泳速度,D 是在平台所在象限游泳距离,E 是停留时间; * $p < 0.01$ vs control, ## $p < 0.01$ vs MPTP。

[0021] 图 6 为空间探索实验,A 是跨越平台的次数;B 是找到原平台所在位置所需时间、C 是找到原平台所在位置所需航行距离;D 是在平台所在象限游泳距离、E 是停留时间; * $p < 0.01$ vs control, ## $p < 0.01$ vs MPTP。

[0022] 图 7 为可视平台实验,A 是找到平台的潜伏期、B 是游泳距离、C 是小鼠游泳的平均速度、D 是平台所在象限游泳距离及 E 是停留时间, * $p < 0.05$ vs control, ## $p < 0.01$ vs MPTP。

[0023] 图 8 为定向航行实验、空间探索实验及可视平台实验中代表性游泳轨迹,A 是定向航行实验第一次实验的游泳轨迹;B 是定向航行实验最后一次实验的游泳轨迹;C 是空间探索实验的游泳轨迹;D 可视平台实验的游泳轨迹。

[0024] 图 9 为定向航行实验中 MPTP (20mg. kg⁻¹, i. p, 2 weeks) 模型组及 STI571 (30mg. kg⁻¹, i. p, 2 weeks) 治疗组的代表性寻找平台轨迹类别 (A) 及比例 (B)。

[0025] 图 10 为酪氨酸羟化酶 (TH) 阳性神经元的丢失 (A, 其中左图是黑质部位 TH 免疫组化结果、右图是 TH 阳性神经元的平均光密度);增加黑质纹状体部位 TH 蛋白的表达 (B), 图中 Hippo 为海马、Cortex 为皮层、Striatum 为纹状体,N 为 normal;M 为 MPTP;S 为 STI571。

[0026] 图 11 分别为 cleavage-caspase 3 的蛋白表达;抑制 α -synuclein 的蛋白表达;抑制 p-PKC 及 p-Akt 的蛋白表达;ctrl, 5nM Rotenone, 5nM Rotenone+5uMSTI571 分别为 SD 孕鼠原代黑质神经元 PD 样细胞模型实验中的正常对照组、鱼藤酮模型组和 STI571 治疗组。

[0027] 其中:图 1 和图 2 中的 DMSO、Rotenone 和 STI571+Rotenone 分别为 STI571 抑制鱼藤酮诱导的大鼠 CA1 和 DG 区神经细胞凋亡反应实验中的正常对照组、鱼藤酮模型组和

STI571 治疗组。图 3- 图 10 中, control、MPTP 和 STI571 为 MPTP 诱导 c57BL/6J 小鼠慢性 PD 模型相关实验中的正常对照组、鱼藤酮模型组和 STI571 治疗组。

具体实施方式

[0028] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明, 但本发明并不限于以下实施例。

[0029] 下述实施例中, 如无特殊说明, 均为常规方法。

[0030] 实施例 1、甲磺酸伊马替尼 (STI571) 治疗帕金森病

[0031] 一、STI571 可显著改善 MPTP 诱导的小鼠慢性帕金森病运动功能障碍

[0032] 帕金森病主要是因位于中脑黑质中的细胞发生病理性改变后, 多巴胺合成减少, 乙酰胆碱的兴奋作用相对增强, 两者失衡的结果便出现了“震颤麻痹”。发病率在老年神经变性疾病中占第 1 位。其主要的行为学表现为动作缓慢与缺失, 肌肉僵直, 静止性震颤和姿势不稳。

[0033] 1、造模

[0034] 将 8 周大小的 c57BL/6J 小鼠随机的分为 3 组, 每组 10 只, 按以下方式腹腔给药, 每天给药一次, 连续给药两周。[1]control 组: 生理盐水; [2]MPTP 组: MPTP (20mg/kg, 溶于生理盐水); [3]STI571+MPTP 组: STI571 (30mg/kg, 溶于生理盐水) 腹腔注射一小时后, 再接着给 MPTP (20mg/kg, 溶于生理盐水); (Hayato Kuroiwa, Hironori Yokoyama, Hiroki Kimoto, Hiroyuki Kato, Tsutomu Araki (2010) Biochemical alterations of the striatum in an MPTP-treated mouse model of Parkinson's disease Metab Brain Dis 25:177-183)。

[0035] 按照以上的方法对 c57BL/6J 小鼠 (购自维通利华公司) 用 MPTP (1- 甲基 -4- 苯基 -1,2,3,6- 四氢吡啶) 诱导慢性帕金森病 (parkinson's disease, PD) 模型。

[0036] 2、分组

[0037] 将以下三组 c57BL/6J 小鼠进行转杆实验和自发运动实验:

[0038] 正常对照组: 每日腹腔注射生理盐水 (0.1ml/10g);

[0039] MPTP 模型组: 按照 20mg/kg 体重的剂量, 将 MPTP 针对小鼠腹腔注射, 连续 14 天;

[0040] STI571 治疗组: 按照 30mg/kg 体重的剂量, 将 STI571 腹腔注射进小鼠, 一小时后, 按照 20mg/kg 体重的剂量, 将 MPTP 针对小鼠腹腔注射, 同时连续 14 天。

[0041] 3、转杆实验 (Rotorod)

[0042] 转杆实验: 小鼠在转杆上开始爬行后自动记时, 从转杆跌落时可以被红外装置所监测, 自动停止记时并显示小鼠在转杆上运动的时间。该实验在给予 STI571 或 MPTP 的 14 天期间的三天、一周及两周后进行。实验采用转速为每分钟 40 转。

[0043] 结果如图 3 所示, STI571 连续给药一周、两周, 可显著改善 MPTP 诱导的运动功能障碍, 表现为显著延长转杆时间。

[0044] 4、自发运动实验 (Locomotor activity test)

[0045] 自发运动实验: 将小鼠置于自发运动监测仪 (圆形, 直径 50cm) 中央部, 保持环境安静。在自发运动监测仪内有多束红外线穿过, 动物活动时阻隔红外线束, 即可被检测并计数。预适应 2min 后, 记录小鼠 10min 内自发运动次数。该实验在给予 STI571 两周后进行。

[0046] 结果如图 4 所示, 在 MPTP 诱导的 c57BL/6J 小鼠慢性 PD 模型上, STI571 还可显著

改善 MPTP 诱导的自发活动降低,与 MPTP 模型组相比,自发活动距离和平均速度均显著增加,从而改善 MPTP 诱导的运动功能障碍。

[0047] 二、STI571 可显著改善 MPTP 诱导的小鼠慢性帕金森病认知功能障碍

[0048] Morris 水迷宫由英国心理学家 Morris 于 20 世纪 80 年代初设计并应用于学习记忆脑机制的研究,是目前最可靠有效的检验动物行为记忆功能的方法。这种装置可观察并记录动物入水后搜索目标所需的时间、采用的策略和它们游泳的轨迹,有助于分析和推断单位的学习、记忆、空间定向和认知功能等方面的能力。目前广泛运用在神经生物学领域的基础和应用研究中。Morris 水迷宫包括一个盛水的圆形水池、隐藏在水下面的平台以及一套图像自动采集和处理系统(摄像机、显示器和分析软件等)。较为经典的 Morris 水迷宫测试程序主要包括定位航行试验(place navigation)和空间探索试验(Spatial probe trail)两个部分。

[0049] 1、定位航行试验(隐匿平台实验)

[0050] 实验步骤:历时 7 天,每天将鼠(步骤一中的正常对照组、MPTP 模型组和 STI571 治疗组)面向池壁分别从 3 个入水点放入水中若干次,记录其寻找到隐藏在水面下平台的时间,即逃避潜伏期(escape latency, EL)。所检测的是小鼠在多次的训练中,学会寻找固定位置的隐藏平台,形成稳定的空间认知,这种空间认知是加工空间信息形成的。平台的位置与鼠所处的位置 and 状态无关,是一种以异我为参考点的参考认知,所形成的记忆是一种空间参考记忆。

[0051] 结果如图 5 所示,在 MPTP 诱导的 c57BL/6J 小鼠慢性 PD 模型上,在隐匿平台实验中,MPTP 诱导小鼠空间学习能力显著降低,表现为潜逃潜伏期(图 5A)显著延长;找到隐匿平台航行距离(图 5B)显著延长;平均游泳速度(图 5C)显著降低;在平台所在象限游泳距离(图 5D)及停留时间(图 5E)显著缩短。STI571 连续给药两周后可显著改善上述空间学习记忆障碍。

[0052] 2、空间探索试验

[0053] 实验步骤:在上述的定位导航试验后去除平台,然后任选一个入水点将小鼠(正常对照组、MPTP 模型组和 STI571 治疗组)放入水池中,记录其在一定时间内的游泳轨迹,考察小鼠对原平台的空间位置记忆的保持能力。试验可供分析的参数较多,包括各象限游泳距离、原平台象限游泳距离与总距离之比、跨平台次数、以及中外环游泳距离的百分比等。

[0054] 结果如图 6 所示,在 MPTP 诱导的 c57BL/6J 小鼠慢性 PD 模型上,在空间探索实验中,MPTP 诱导小鼠空间记忆能力显著降低,表现为跨越平台的次数(图 6A)显著减少;找到原平台所在位置所需航行距离(图 6B, 6C)显著延长;在平台所在象限游泳距离(图 6D)及停留时间(图 6E)显著缩短。STI571 连续给药两周后可显著改善上述空间记忆障碍。

[0055] 3、可视平台实验

[0056] 实验步骤:与隐匿平台实验相比,只是将水面下的平台转移到水面上,其余步骤完全相同。

[0057] 结果如图 7 所示,在 MPTP 诱导的 c57BL/6J 小鼠慢性 PD 模型上,在可视平台实验中,MPTP 及 STI571 治疗组小鼠在找到平台的潜伏期(图 7A)、游泳距离(图 7B)及平台所在象限游泳距离(图 7D)及停留时间(图 7E)上均无显著差异,仅表现为 MPTP 诱导平均游泳速度降低,STI571 缓解之(图 7C)。

[0058] 4、STI571 对 PD 小鼠定向航行、空间探索及可视平台实验中运动轨迹的影响

[0059] 上述定位航行试验中,在 MPTP 诱导的 c57BL/6J 小鼠慢性 PD 模型上,定向航行实验 MPTP 模型组小鼠游泳路线明显增多,STI571 两周治疗后可显著减少到达平台的游泳路线(图 8A);经训练 7 天后的小鼠与训练第二天小鼠相比,各组游泳路线均有明显改善(图 8B)。

[0060] 上述空间探索和可视平台实验中,各组游泳轨迹与定向航行实验规律类似(图 8C,8D)。

[0061] 5、STI571 在定向航行实验中的运动轨迹类别分析

[0062] 上述定向航行实验中,在 MPTP 诱导的 c57BL/6J 小鼠慢性 PD 模型上,定向航行实验中 MPTPMPTP 模型组及 STI571 治疗组的代表性寻找平台轨迹类别(图 9A)及比例(图 9B)。MPTPMPTP 模型组小鼠以随机型(Random)游泳轨迹为主,正常对照组以直线型(Beeline)游泳轨迹为主,而 STI571 治疗组则以趋向型(Tropism)游泳轨迹为主。

[0063] 综上所述,STI571 可有效改善 PD 时的运动及认知功能障碍。

[0064] 实施例 2、机理研究

[0065] 一、STI571 可显著改善 MPTP 诱导的多巴胺神经元的丧失

[0066] 实验步骤:上述正常对照组、MPTP 模型组和 STI571 治疗组小鼠各取两只首先用 4%多聚甲醛灌流固定,灌流完成后将小鼠大脑取出,放入 4%多聚甲醛中继续固定 3 天,固定完成后,针对黑质区制作冰冻切片。做好的冰冻切片使用 TH 抗体(1:100, sigma, T1299)免疫染色,针对染色结果利用 image pro plus 软件统计 TH 阳性神经元的平均光密度。其余的小鼠断颈处死后,取海马,皮层,纹状体蛋白, RIPA(5ul/1g 蛋白)冰上裂解 30min,超声 9s/9s 三次后离心 45min,取上清裂解液 -80℃保存。随后组织 western blot 实验中,使用 TH 抗体(1:5000, sigma, T1299)和二抗(anti-mouse IgG;(1:10000), GE healthcare, Lot386066)检测组织样品中 TH 的表达。

[0067] 结果如图 10 所示,在 MPTP 诱导的 c57BL/6J 小鼠慢性 PD 模型上,STI571 可显著抑制 MPTP 诱导的酪氨酸羟化酶(TH)阳性神经元的丢失,即抑制 PD 时 DA 能神经元的损伤,改善 PD 症状(图 10A);STI571 还可改善 MPTP 诱导的黑质纹状体部位脑组织 TH 蛋白表达的降低(图 10B)。

[0068] 二、STI571 抑制鱼藤酮诱导的大鼠 CA1 和 DG 区神经细胞凋亡反应

[0069] 1、造模

[0070] 取 180-200g 大小的 SD 大鼠分为三组,用脑立体定位注射的方法于大鼠 DG 区按以下方式给药,给药后 3h,6h,12h,24h,48h,72h 后处死,取脑组织灌流固定制作海马区石蜡切片。[1]control 组:DMSO 4ul;[2]鱼藤酮组:Rotenone 4ul(2.5ug/ul,溶于 DMSO);[3]STI571+MPTP 组:STI571 4ul(20mM,溶于生理盐水)+Rotenone 4ul(2.5ug/ul,溶于 DMSO)(Gonzalo I. Cancino¹, Enrique M. Toledo, Nancy R. Leall, Diego E. Hernandez¹, L. Fernanda Yévenes¹, Nibaldo C(2008) STI571 prevents apoptosis, tau phosphorylation and behavioural impairments induced by Alzheimer's beta-amyloid deposits Brain¹³¹:2425-42)。

[0071] 按照以上的方法对 SD 大鼠(可购自维通利华公司)用鱼藤酮诱导的大鼠 CA1 和 DG 区神经细胞凋亡反应。

[0072] 2、分组

[0073] 正常对照组 :DMSO 4ul

[0074] MPTP 模型组 :Rotenone 4ul (2.5ug/ul, 溶于 DMSO)

[0075] STI571 治疗组 :STI571 4ul (20mM, 溶于生理盐水) + Rotenone 4ul (2.5ug/ul,
[0076] 溶于 DMSO)

[0077] 1、p-MST1-T183 蛋白的表达

[0078] SD 大鼠脑 CA1 和 DG 区立体定位, 以微量进样泵给予鱼藤酮 (rotenone, 10 μ g, 3-72h), 同时给予 STI571 (42mg, 3-72h), 用 p-Mst1-T183 抗体 (1 : 100, Cell Signal technology), 和二抗 (anti-Rabbit IgG ; (1 : 200), GE healthcare) 进行 DAB (中衫金桥) 免疫组织化学染色, 观察 CA1 和 DG 区神经元 p-MST1-T183 蛋白表达的改变。针对染色的结果, 利用 image pro plus 软件进行平均光密度定量分析。结果表明, STI571 对鱼藤酮处理 6h-3d 诱导的 CA1 和 DG 区神经元损伤均有显著抑制作用, 抑制 p-MST1-T183 的蛋白表达, 也即抑制神经元 MST1 蛋白 T183 位点的磷酸化, 从而抑制神经细胞凋亡反应 (图 1)。

[0079] 2、细胞形态学观察

[0080] 在上述立体定位给药 24h、48h、72h 时, TUNEL 染色 (ApopTag Flurescein In Situ Apoptosis Detection Kit S7110, CHEMICON) 观察神经细胞凋亡反应。

[0081] 利用 image pro plus 软件统计 Hoechst 着色 (蓝色) 细胞的数目和 TUNEL 试剂盒着色 (绿色) 细胞的数目, 后者与前者比值即为细胞凋亡的百分比。结果如图 2 所示, STI571 可显著抑制鱼藤酮处理 24h 诱导的 CA1 区神经细胞凋亡反应; 抑制鱼藤酮处理 24-72h 诱导的 DG 区神经细胞凋亡反应 (图 2)。

[0082] 三、STI571 可显著抑制鱼藤酮诱导的原代黑质神经元凋亡及 Lewy 小体蛋白表达, 抑制 PKC 和 Akt 的磷酸化激活

[0083] 1、实验步骤

[0084] 取 12 天 SD 胎鼠的黑质神经元原代培养 (Thomas Fathl, Yazı D Ke2, Peter Gunningl, Ju ``rgen Go ``tz2 & Lars M Ittner (2009) Primary support cultures of hippocampal and substantia nigra neurons NATURE PROTOCOLS 4 : 78-85), 分化 3 天后, 分为三组, 分别按以下方法药物处理。[1] control 组 : 无药物处理 [2] 鱼藤酮组 : Rotenone (终浓度 5uM) 处理 30min ; [3] STI571+MPTP 组 : STI571 (终浓度 5uM) 预处理一小時后, 加入 Rotenone (终浓度 5uM) 处理 30min ; 收集细胞, 用 RIPA 裂解, 离心后去上清保存。

[0085] 在鱼藤酮 (Rotenone) 诱导的 SD 孕鼠原代黑质神经元 PD 样细胞模型上, STI571 可显著抑制鱼藤酮诱导的凋亡反应蛋白 cleavage-capase 3 的表达; 抑制 Lewy 小体蛋白 α -synuclein 的表达; 抑制 p-PKC 及 p-Akt 的蛋白表达, 所涉及到的抗体分别为 anti-cleavage-capase3 (cell signal), anti- α -synuclein (ABCOM), anti-p-PKC (santa), anti-p-Akt (cell signal) 以及二抗 anti-mouse 和 anti-Rabbit IgG (GEhealth) (图 11)。

[0086] 因此, STI571 作为 c-Ab1 的特异性抑制剂, 可有效对抗 PD 形成, 改善 PD 时的行为学异常及认知功能障碍, 可能作为抗帕金森病等神经退行性疾病的候选新药, 具有良好的应用前景, 极大程度拓展了 STI571 的临床适应症。

[0001]

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 甲磺酸伊马替尼在制备抗帕金森病药物中的应用

<130> 1

<160> 1

<210> 1

<211> 487

<212> PRT

<213> 鼠 (Rattus norvegicus)

<400> 1

Met Glu Thr Val Gln Leu Arg Asn Pro Pro Arg Arg Gln Leu Lys Lys

1 5 10 15

Leu Asp Glu Asp Ser Leu Thr Lys Gln Pro Glu Glu Val Phe Asp Val

20 25 30

Leu Glu Lys Leu Gly Glu Gly Ser Tyr Gly Ser Val Tyr Lys Ala Ile

35 40 45

His Lys Glu Thr Gly Gln Ile Val Ala Ile Lys Gln Val Pro Val Glu

[0002]

50	55	60	
Ser Asp Leu Gln Glu Ile Ile Lys Glu Ile Ser Ile Met Gln Gln Cys			
65	70	75	80
Asp Ser Pro His Val Val Lys Tyr Tyr Gly Ser Tyr Phe Lys Asn Thr			
	85	90	95
Asp Leu Trp Ile Val Met Glu Tyr Cys Gly Ala Gly Ser Val Ser Asp			
	100	105	110
Ile Ile Arg Leu Arg Asn Lys Thr Leu Thr Glu Asp Glu Ile Ala Thr			
	115	120	125
Ile Leu Gln Ser Thr Leu Lys Gly Leu Glu Tyr Leu His Phe Met Arg			
	130	135	140
Lys Ile His Arg Asp Ile Lys Ala Gly Asn Ile Leu Leu Asn Thr Glu			
145	150	155	160
Gly His Ala Lys Leu Ala Asp Phe Gly Val Ala Gly Gln Leu Thr Asp			
	165	170	175
Thr Met Ala Lys Arg Asn Thr Val Ile Gly Thr Pro Phe Trp Met Ala			
	180	185	190
Pro Glu Val Ile Gln Glu Ile Gly Tyr Asn Cys Val Ala Asp Ile Trp			
	195	200	205
Ser Leu Gly Ile Thr Ala Ile Glu Met Ala Glu Gly Lys Pro Pro Tyr			
	210	215	220
Ala Asp Ile His Pro Met Arg Ala Ile Phe Met Ile Pro Thr Asn Pro			
225	230	235	240

[0003]

Pro	Pro	Thr	Phe	Arg	Lys	Pro	Glu	Leu	Trp	Ser	Asp	Asn	Phe	Met	Asp	
245					250					255						
Phe	Val	Lys	Gln	Cys	Leu	Val	Lys	Ser	Pro	Glu	Gln	Arg	Ala	Thr	Ala	
260					265					270						
Thr	Gln	Leu	Leu	Gln	His	Pro	Phe	Val	Lys	Ser	Ala	Lys	Gly	Val	Ser	
275					280					285						
Ile	Leu	Arg	Asp	Leu	Ile	Asn	Glu	Ala	Met	Asp	Val	Lys	Leu	Lys	Arg	
290					295					300						
Gln	Glu	Ala	Gln	Gln	Arg	Glu	Val	Asp	Gln	Asp	Asp	Glu	Glu	Asn	Ser	
305					310					315					320	
Glu	Glu	Asp	Glu	Met	Asp	Ser	Gly	Thr	Met	Val	Arg	Ala	Ala	Gly	Asp	
325					330					335						
Glu	Met	Gly	Thr	Val	Arg	Val	Ala	Ser	Thr	Met	Ser	Gly	Gly	Ala	Asn	
340					345					350						
Thr	Met	Ile	Glu	His	Gly	Asp	Thr	Leu	Pro	Ser	Gln	Leu	Gly	Thr	Met	
355					360					365						
Val	Ile	Asn	Thr	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Thr	Met	Lys	Arg	Arg	
370					375					380						
Asp	Glu	Thr	Met	Gln	Pro	Ala	Lys	Pro	Ser	Phe	Leu	Glu	Tyr	Phe	Glu	
385					390					395					400	
Gln	Lys	Glu	Lys	Glu	Asn	Gln	Ile	Asn	Ser	Phe	Gly	Lys	Asn	Val	Ser	
405					410					415						
Gly	Ser	Leu	Lys	Asn	Ser	Ser	Asp	Trp	Lys	Ile	Pro	Gln	Asp	Gly	Asp	

420	425	430
Tyr Glu Phe Leu Lys Ser Trp Thr Val Glu Asp Leu Gln Lys Arg Leu		
435	440	445
Leu Ala Leu Asp Pro Met Met Glu Gln Glu Met Glu Glu Ile Arg Gln		
450	455	460
Lys Tyr Arg Ser Lys Arg Gln Pro Ile Leu Asp Ala Ile Glu Ala Lys		
465	470	475
Lys Arg Arg Gln Gln Asn Phe		
485		

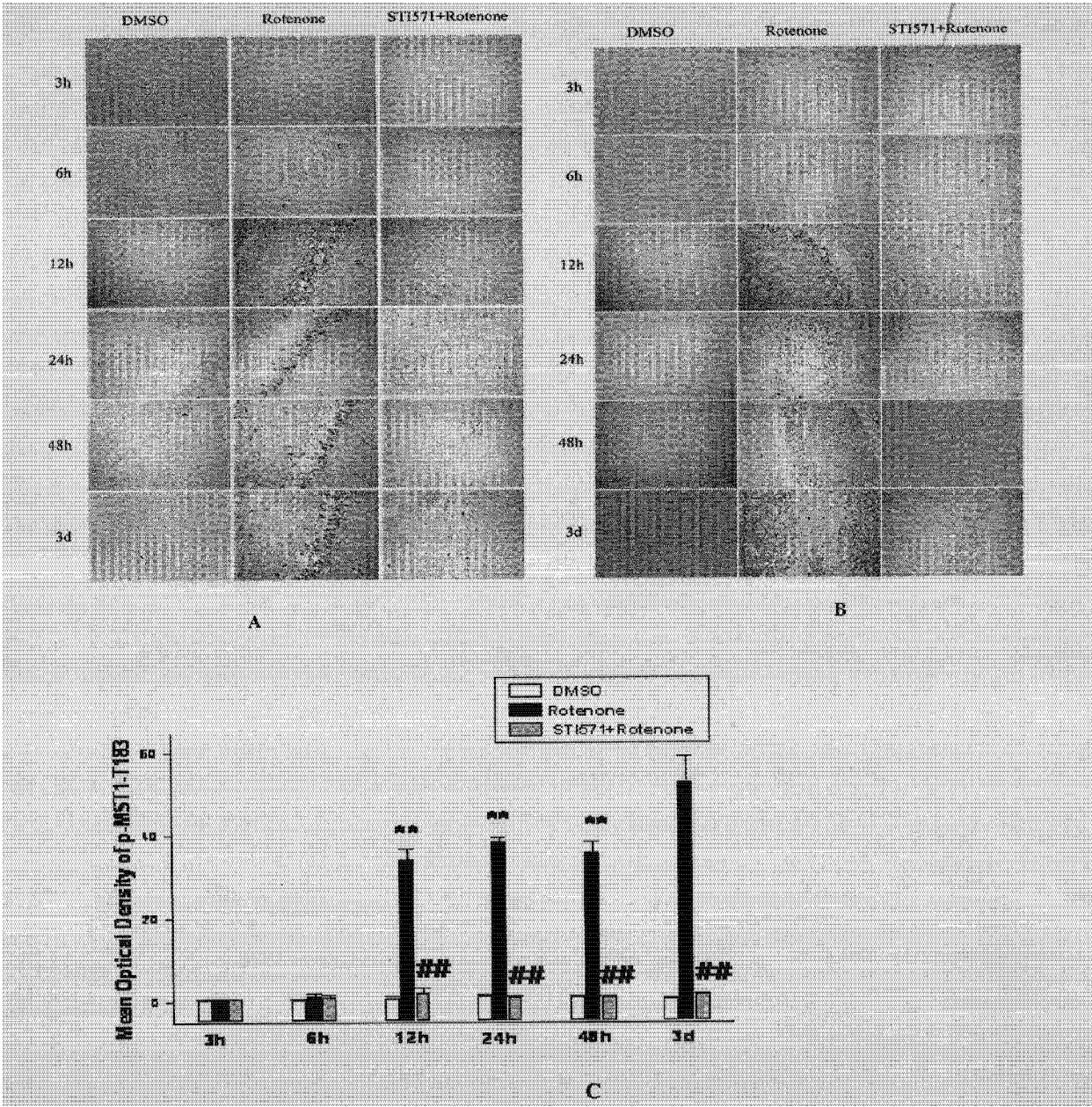


图 1.

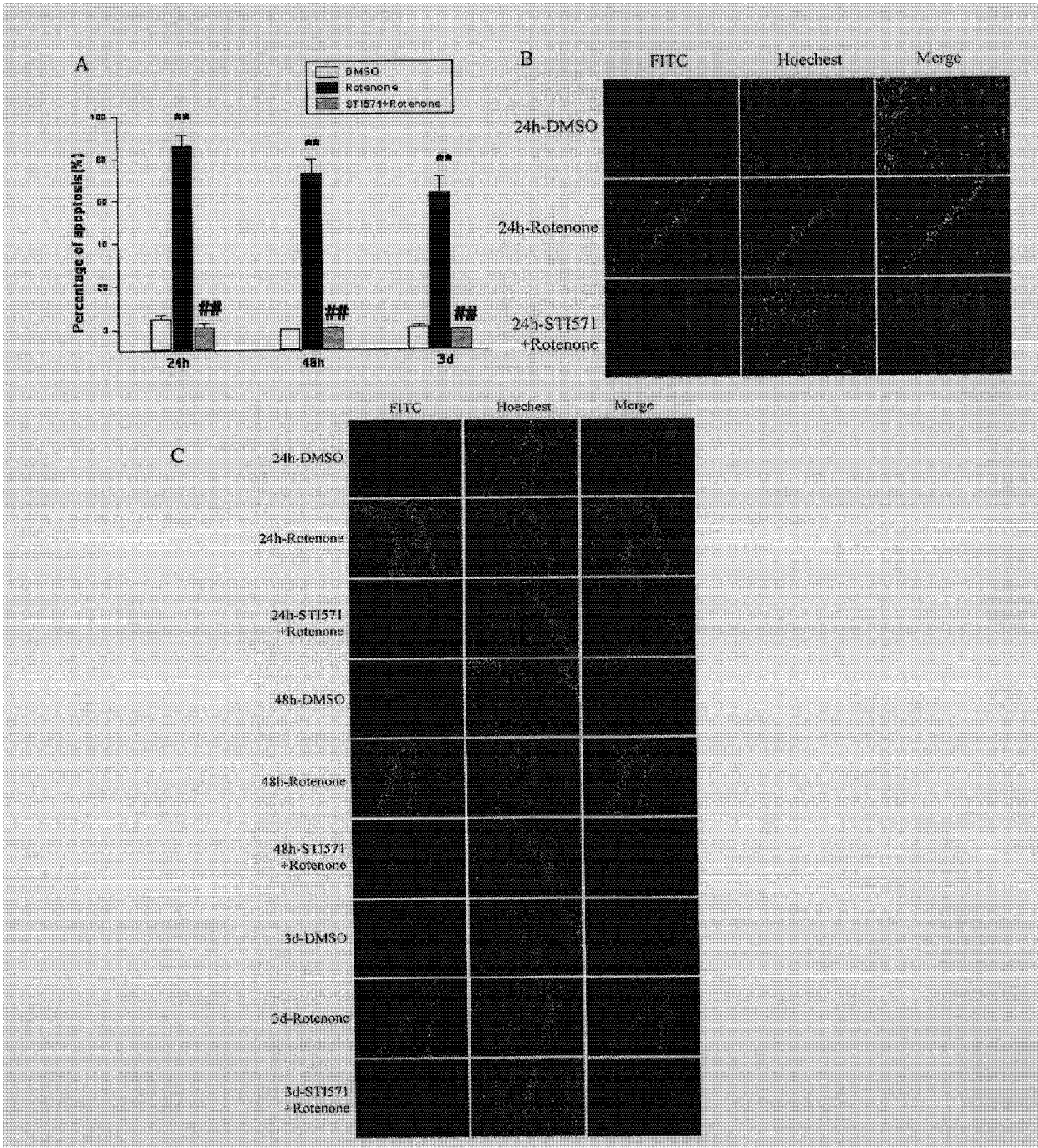


图 2

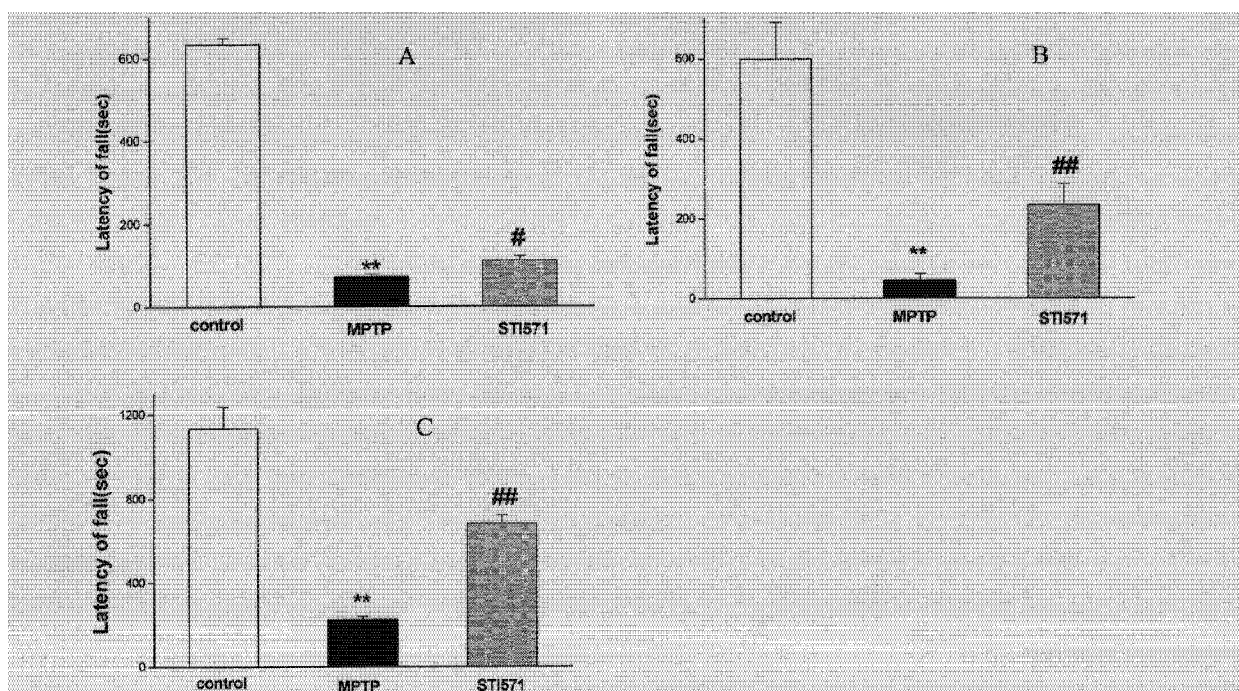


图 3

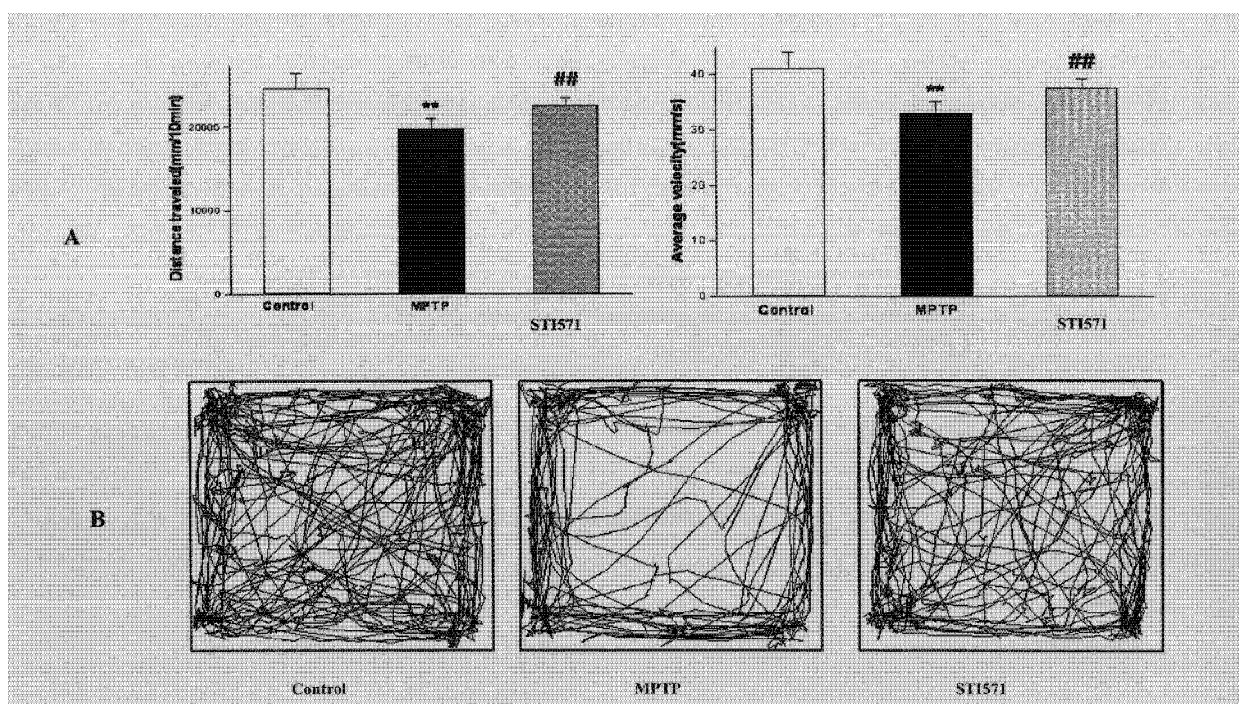
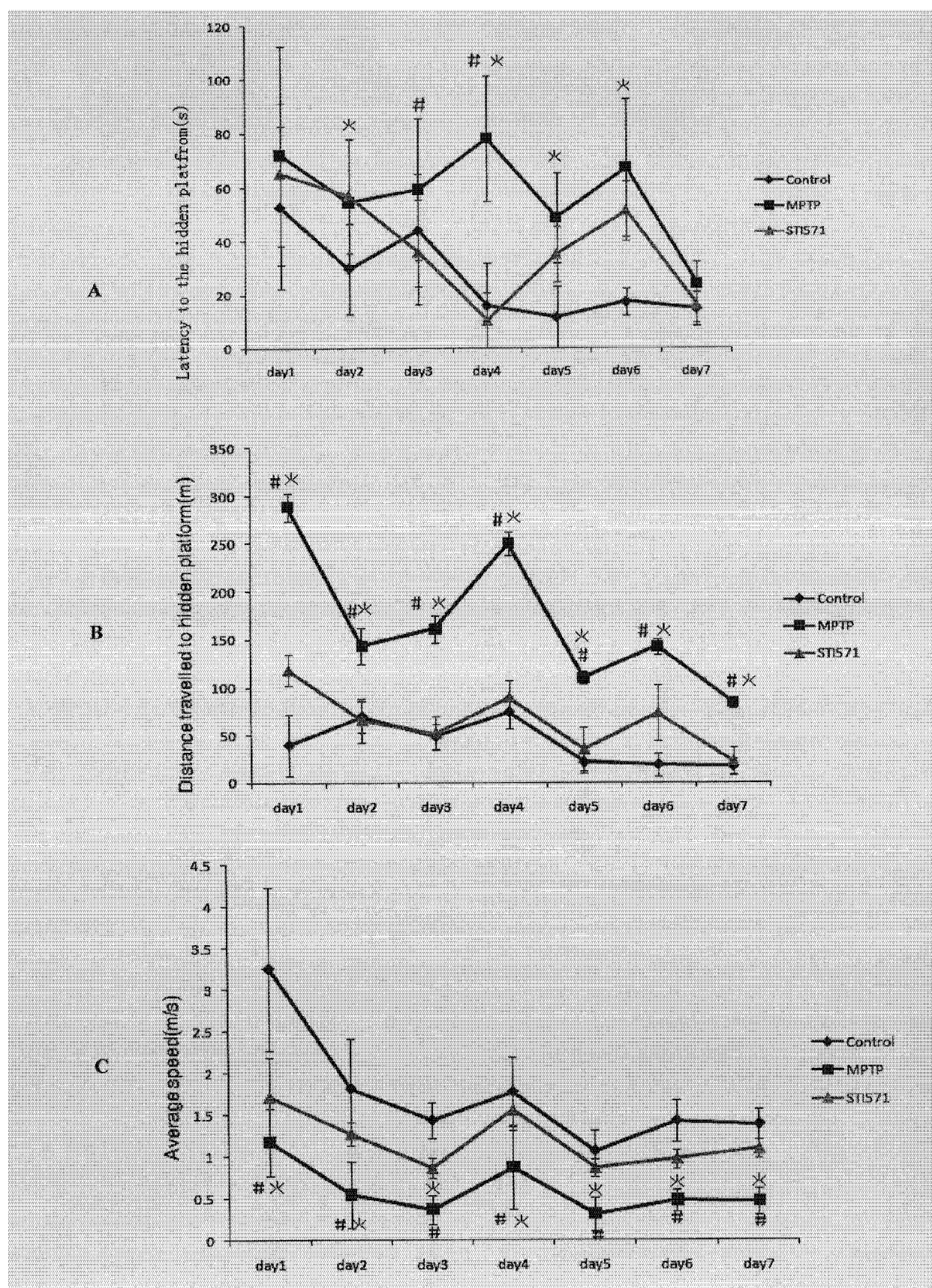


图 4



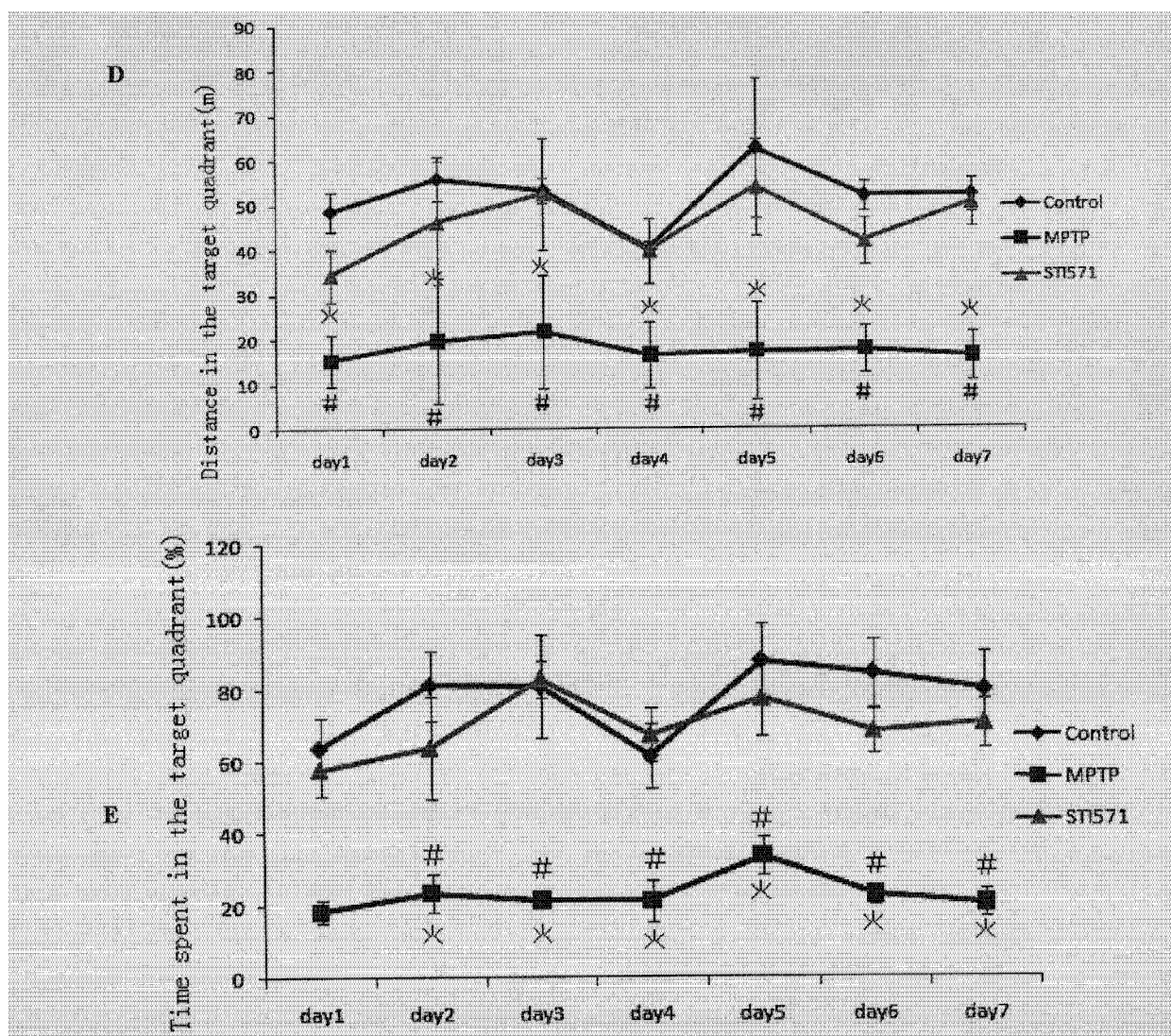


图 5

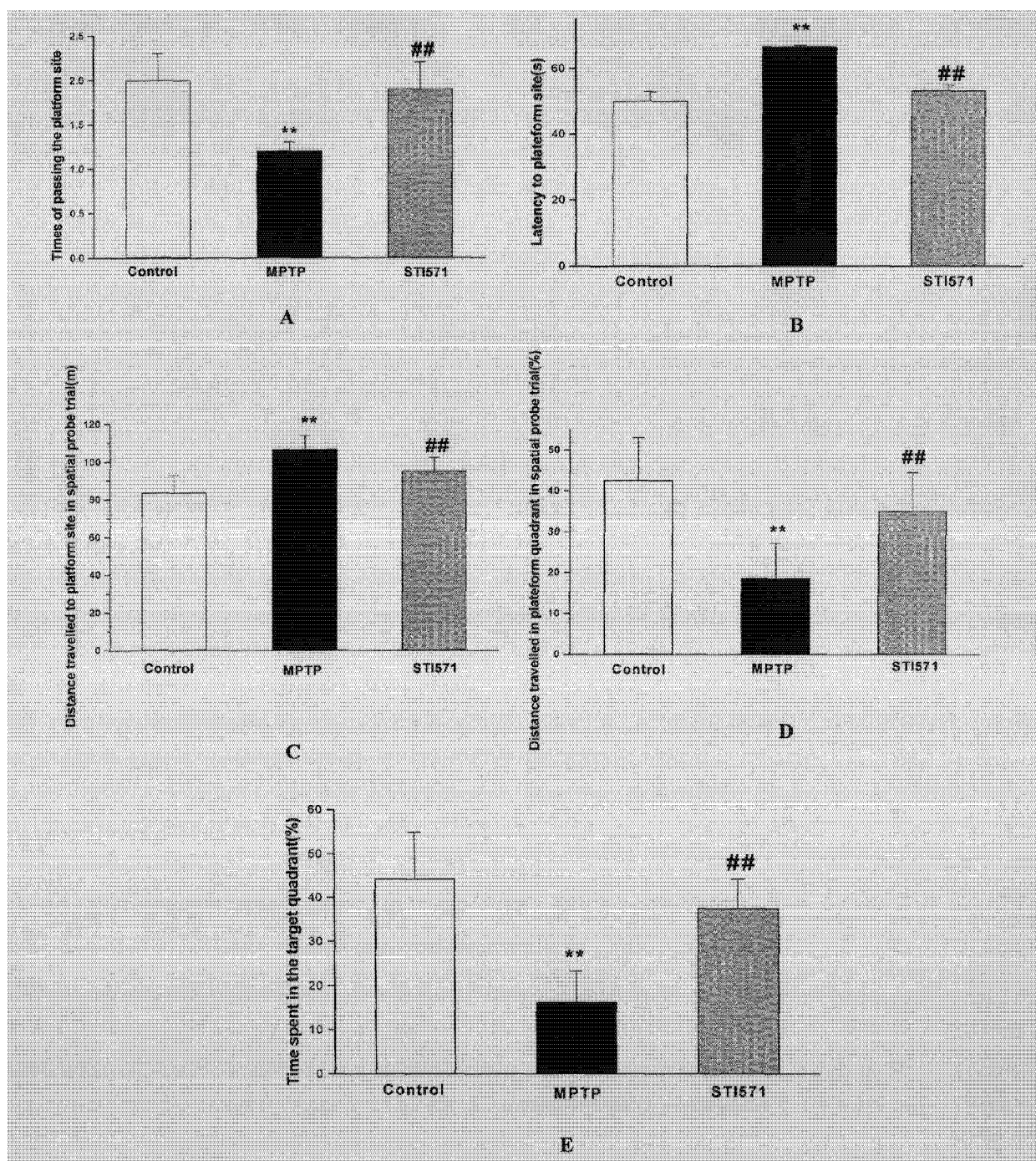


图 6

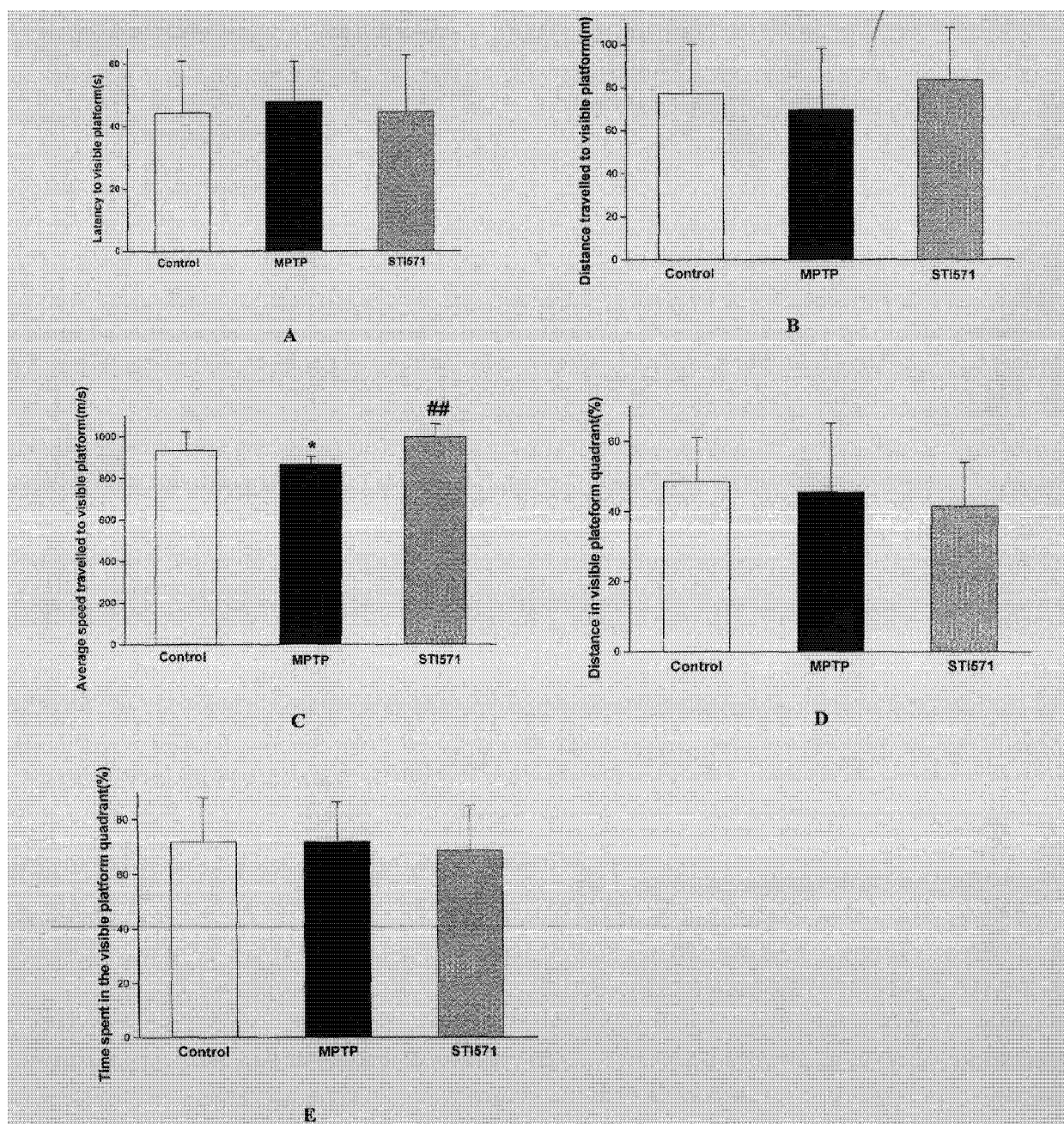


图 7

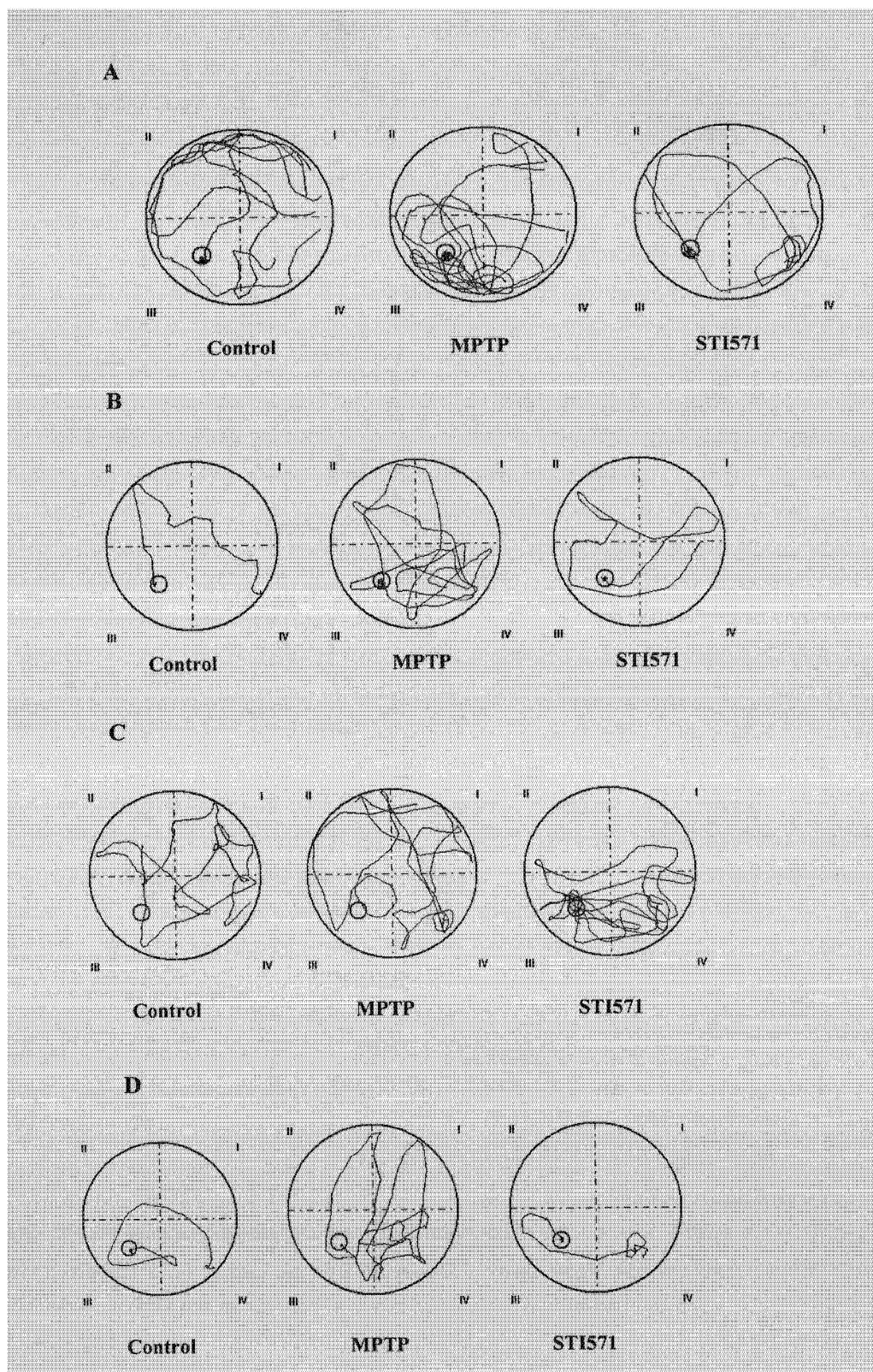


图 8

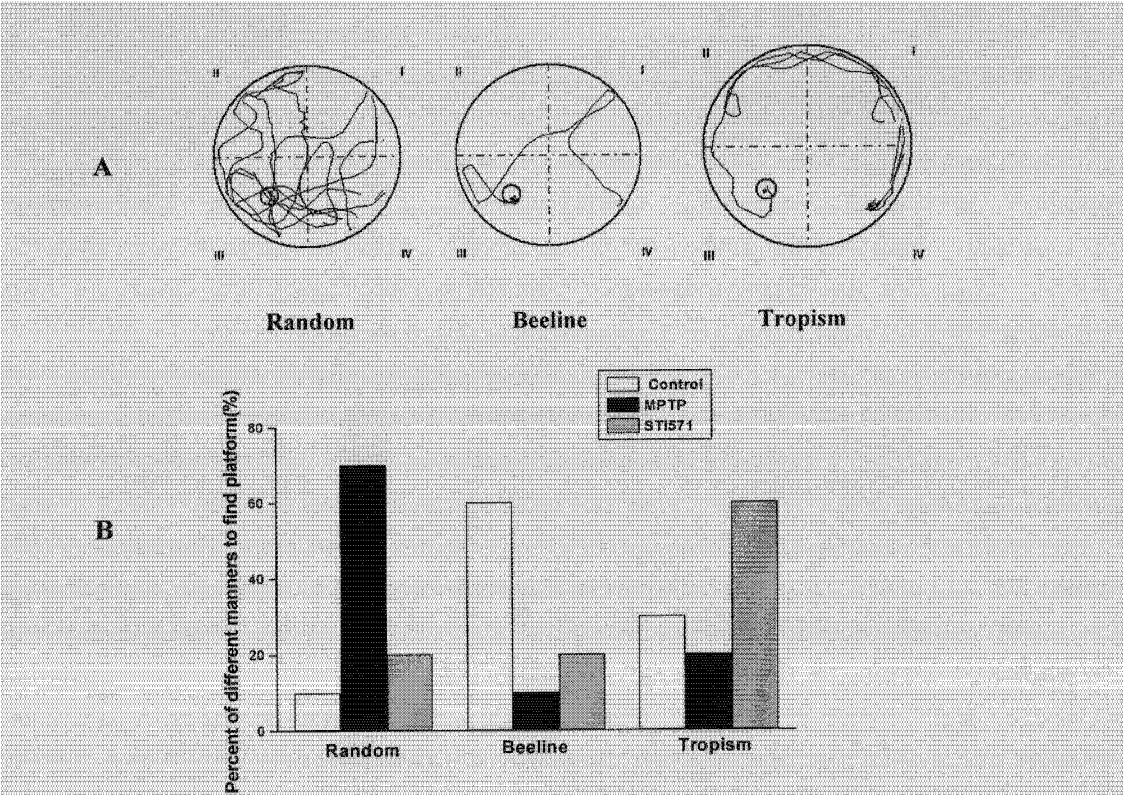


图 9

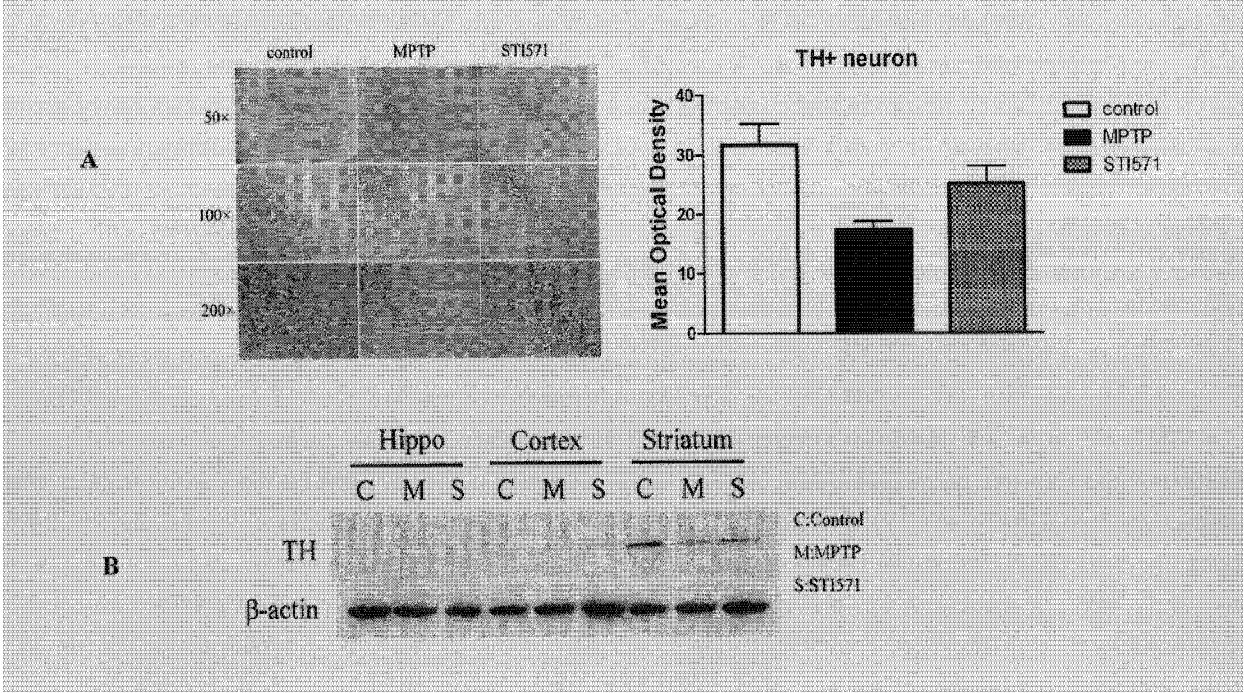


图 10

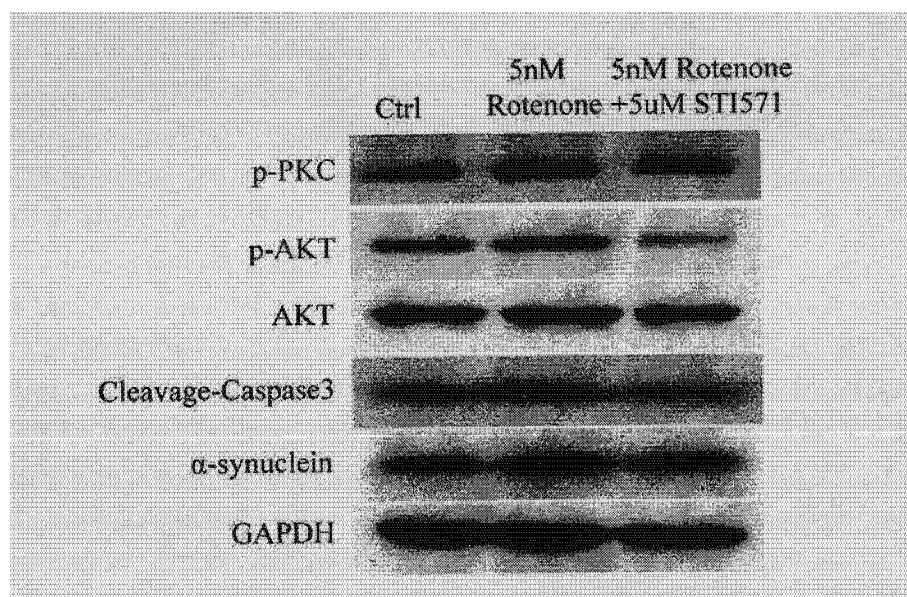


图 11