



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107428811 A

(43)申请公布日 2017. 12. 01

(21)申请号 201680016927.1

(22)申请日 2016.02.25

(30)优先权数据

102015003676.9 2015.03.20 DE

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.09.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/DE2016/000089 2016.02.25

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/150415 DE 2016.09.29

(71)申请人 于利奇研究中心有限公司

地址 德国于利奇

(72)发明人 D.维尔博尔德 J.库切

A.N.克莱因

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 刘维升 罗文锋

(51)Int.Cl.

G07K 14/47(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

权利要求书1页 说明书15页 附图6页

(54)发明名称

用于治疗 and/或诊断阿尔茨海默氏痴呆症的特异性结合A- β -物类的肽

(57)摘要

本发明涉及用于治疗 and/或诊断阿尔茨海默氏痴呆症的特异性结合A- β -物类的肽。

1. 特异性结合淀粉样蛋白- β -物类的肽,其包含至少一个选自下述的氨基酸序列:SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO. 10 和/或SEQ ID NO. 11和同源体、片段和部分,以及SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO. 10 和/或SEQ ID NO. 11的多聚体及其同源体、片段和部分。

2. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其用于医药中。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其用于治疗阿尔茨海默病。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其用于诊断阿尔茨海默病。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其特征在于,其基本上由D-氨基酸构成。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其用于抑制A- β -原纤维的形成。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的肽,其用于与聚集的淀粉样蛋白- β -物类结合。

8. 试剂盒,其包含根据权利要求1-7中任一项所述的肽。

9. 包含根据权利要求1-7中任一项所述的肽的组合物。

10. 根据权利要求1-7中任一项所述的肽作为用于特异性识别、定量和/或定性地测定淀粉样蛋白- β -单体、淀粉样蛋白- β -原纤维和/或淀粉样蛋白- β -寡聚体的探针的用途。

11. 根据权利要求1至7中任一项所述的肽用于防止淀粉样蛋白- β -寡聚体和/或淀粉样蛋白- β -肽聚集体的用途。

12. 根据权利要求1至7中任一项所述的肽用于使有毒的淀粉样蛋白- β -寡聚体和/或聚集体去毒的用途。

13. 根据权利要求12的用途,其特征不在于,淀粉样蛋白- β -寡聚体和/或聚集体与根据权利要求1至8中任一项所述的肽形成非晶的无毒聚集体。

14. 至少一个选自下述的氨基酸序列用于特异性结合A- β -单体的用途:SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO. 10 和/或SEQ ID NO. 11和同源体、片段和部分,以及SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO. 10 和/或SEQ ID NO. 11的多聚体及其同源体、片段和部分。

15. 根据权利要求1-7中任一项所述的肽作为治疗剂和用于预防阿尔茨海默病的用途。

用于治疗 and/或诊断阿尔茨海默氏痴呆症的特异性结合A- β - 物类的肽

[0001] 本发明涉及用于治疗 and/或诊断阿尔茨海默氏痴呆症的特异性结合A- β -物类的肽。

现有技术

[0002] 尚不存在得到批准的用于阿尔茨海默氏痴呆症(AD)的病因治疗的药物。通常,在AD患者的脑中在死后发现呈斑块状的所谓的 β -淀粉样蛋白-肽(AB)的沉积物。因此,长期以来认为各种形式的A- β (也称为AB),例如原纤维对阿尔茨海默氏痴呆症的发生和发展负有责任。

[0003] 近几年来,尤其认为小的可自由扩散的AB-寡聚体作为主要成因对阿尔茨海默氏痴呆症的发生和发展负有责任。

[0004] 在我们的体内持续产生AB-单体,并且据估计其本身是无毒的。

[0005] 推测AB-单体是否依据其最终由体内的形成速率和降解速率所得出的浓度而随机地并因此随着年龄的增长越来越可能自发地积聚在一起形成AB-寡聚体。一旦产生的AB-寡聚体然后通过类似朊病毒的机制增殖并最终导致疾病。

[0006] 基于这些考虑,病因治疗的目的应是,完全消除有毒的AB-寡聚体和/或阻止其类似朊病毒的增殖。

[0007] 然而,没有用于治疗阿尔茨海默氏痴呆症的对成因起作用的药物。根据现有技术使用的药物最多能够缓解一些症状,但不能减缓,更谈不上阻止疾病的发展。

[0008] 有许多物质能够在动物实验中在预防(不一定是治疗)阿尔茨海默氏痴呆症的方面取得一些成功。

[0009] 预防和治疗之间的一个重要区别在于下述考虑:为了防止形成第一个AB-寡聚体,亲和力和效力低的AB-配体可能已经足够。因为由多个AB-单体形成AB-寡聚体是非常高阶的反应,因此其以高乘方的形式依赖于AB-单体浓度。并且活性AB-单体浓度的少量降低也可以防止形成第一个AB-寡聚体。这是在预防时的情况。然而,如果已经产生了AB-寡聚体,它们可以类似于朊病毒增殖,这不是高阶反应,因此几乎不再取决于AB-单体浓度。这是治疗时的情况。因此,如果已经产生了AB-寡聚体,则治疗的目标必须是,通过对AB-寡聚体具有尽可能高的亲和力的物质来处理它们。为此,相应的解离常数必须在pM范围内或者甚至更低。

[0010] 目前存在一些物质,它们以各种方式,例如通过 γ 分泌酶调节剂、结合AB的配体等,降低AB-单体的浓度。这显然足以在动物实验中成功起到预防效果,其中大多数动物在疾病完全爆发之前受到了治疗。

[0011] 在人类临床试验(第二和第三期)中,这里仅允许对被明确诊断为阿尔茨海默氏痴呆症的人进行治疗,但是,迄今为止所有这些物质都已失败,这可能是因为这里在疾病发病之前,AB-单体浓度的少量或中等的减少不再足以防止产生越来越大量的AB-寡聚体。

[0012] 此外,迄今为止尚不存在在症状发作之前确诊阿尔茨海默氏痴呆症的可能性。阿

尔茨海默氏痴呆症现今主要通过对已经罹患痴呆症状的人的神经心理学测试来辨别。此外,可以通过不同的检查方法来排除其它疾病(创伤)。

[0013] 但是,已知的是,在症状出现高达20年之前,在患者的大脑中就产生A β -寡聚体和时间上随后的斑块并引起不可逆的损伤。可以借助成像方法使得对患者进行静脉内注射并在通过血脑屏障后与A β -寡聚体和斑块结合的分子探针可见,并因此能够更早诊断AD。

[0014] 由EP 1 379 546 B1已知一种名称为“D3”的D-对映体肽。通过对主要是单体的A β (1-42)的镜像噬菌体展示选择来识别该肽,计划是,使该单体A β 通过该结合而稳定化并防止其转化为有毒的A β -聚集体。根据目前的认识水平,D3优选将特别有毒的A β -寡聚体转化成无毒的非淀粉样蛋白型(nicht-amyloidogen)且ThT阴性的非晶聚集体。在动物模型中,甚至通过用饮用水口服给药D3也实现了经治疗的转基因AD小鼠具有明显更少的斑块并具有显著改善的认知能力。

[0015] 由出版物WO 2014/041115 A2已知衍生自D3的其它肽。

[0016] 现有的结合A β -寡聚体的物质的缺点是,亲和力不足以阻止A β -寡聚体的增殖。

[0017] 不利地,至今没有用于体内成像方法的探针,其以高亲和力特异性结合到A β -寡聚体上并使其可见。由于A β -寡聚体在疾病史上起着如此重要和早期的作用,因此这正是所期望的。

[0018] 发明目的

本发明的目的是提供肽,所述肽用于

A) 通过阻止有毒的淀粉样蛋白 β (A β)-寡聚体或聚集体的形成或使其去毒来对阿尔茨海默病进行病因治疗。

[0019] B) 通过使用D-肽作为体内成像的探针来诊断阿尔茨海默氏痴呆症。

[0020] 此外,目的还是提供新的肽,优选D-对映体D-肽D3的衍生物,其与D3相比具有更有效的性能。所述性能尤其包括对A- β 物类的结合亲和力和结合特异性、A- β -原纤维形成的抑制、A- β -细胞毒性的抑制、A- β -寡聚体、原纤维和其它聚集体的消除或去毒、将A- β -淀粉样蛋白-原纤维、-初原纤维或-寡聚体转化为无毒的非淀粉样蛋白型的物类。

[0021] 在下文中,术语“A-Beta”,“淀粉样蛋白-Beta”,“淀粉样蛋白- β ”和“A β ”彼此同义使用。

[0022] 所述目的的解决方案

本发明的目的通过根据权利要求1的肽、根据主要权利要求的试剂盒和组合物以及根据次要权利要求的方法和用途得以实现。对此的有利实施方案分别由引用它们的专利权利要求获悉。

发明内容

[0023] 所述目的通过用于治疗阿尔茨海默氏痴呆症的特异性结合淀粉样蛋白- β -物类的肽得以实现。特异性,通常也称为选择性,在此表示,根据本发明的配体或根据本发明的肽原则上可以结合各种A- β -物类,例如,A- β -单体或A- β -寡聚体或A- β -原纤维。在1:1结合模型的假设下,给每个结合对(例如,配体与A- β -单体和配体与A- β -寡聚体和配体与A- β -原纤维)各自分配一个解离常数(K_D)或缔合常数($K_A = 1/K_D$)。 K_A 值越高,各自的结合越有亲和力。

[0024] 通过对A- β -单体和对A- β -寡聚体或A- β -原纤维的亲和力的尽可能大的商表明配

体相对于竞争剂的对诱饵的特异性。

[0025] 因此,根据本发明,为了确定特异性,形成配体对A- β -单体和对A- β -寡聚体(或A- β -原纤维)的 K_A 值的商。该商越大,特异性就越大。

[0026] 在本发明的意义上,当配体对物类A和配体对物类B的 K_A 值的商至少大于1,优选大于1.2或1.5,优选大于2、3、4、5、6、7、8、9,特别是10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99,特别是100时,存在相对的特异性,其中作为物类A和物类B,可以认为是各种A- β -物类:单体、寡聚体和原纤维。

[0027] 在此,不应将特异性或选择性与亲和力混淆,亲和力由配体与物类之一的结合强度产生。如果不同的配体竞争相同的靶分子,则较少特异性或选择性的配体可能具有更大的结合亲和力。根据本发明,应该确定尤其特异性结合一种物类如单体或寡聚体或原纤维的这类配体。该生物分子应适合作为治疗剂和药剂。以这种方式获得的配体或肽具有所希望的性能并实现本发明的目的。

[0028] 特别地,含有下述的氨基酸序列的下文中作为配体的肽实现了本发明的目的:SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10和SEQ ID NO: 11和/或同源体、片段和部分。

[0029] 所述目的也通过含有下述的氨基酸序列的多聚体和/或其同源体、片段和部分得以实现:SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 11。

[0030] 含有所述序列之一的肽特异性结合淀粉样蛋白- β -单体。

[0031] 此外,与A- β -单体的特异性结合意味着配体-单体与配体-寡聚体和/或配体-单体与配体-原纤维的结合信号的商大于1,例如1.8并且可具有大约至100的值,其中可具有每个中间值,例如2、3、4、5、6、7、8、9,特别是10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99,特别是100。

[0032] 与A- β -寡聚体的特异性结合意味着,配体-寡聚体与配体-单体和/或配体-寡聚体与配体-原纤维的结合信号的商大于1,例如1.2,并且可具有大约至100的值,其中可具有每个中间值,例如2、3、4、5、6、7、8、9,特别是10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99,特别是100。

[0033] 科学实践中常见的将非整数(ungerader Zahlenwerte)数值四舍五入产生上述数值。

[0034] 通过肽微阵列实验获得的肽充当起点。它们可以衍生自己知的肽“D3”。

[0035] 为了识别特异性结合淀粉样蛋白- β -单体或特异性结合淀粉样蛋白- β -寡聚体的肽并确定在本发明意义上的肽的结合特异性,因此可以采取以下措施。将具有不同的固定在表面上的肽的肽微阵列,例如D3的衍生物,分别与用荧光染料标记的A- β 的不同物类(例如,单体、寡聚体和原纤维)温育。作为对照,将一个肽微阵列仅与荧光染料温育。为了确保结果的可重复性,每个物类的肽微阵列的温育可以进行至少3次。通过荧光染料来检测经荧光标记的A- β 与固定住的肽的结合。A- β 与肽结合得越多,荧光信号越高。将测得的重复测试(Reproduktion)的荧光信号标准化(normiert),并减去对照的信号。由此防止经荧光标记的A- β 的结合是通过染料发生的。然后,取A- β 物类与肽的结合信号的平均值。为了确定结合特异性,算出应与所述肽特异性结合的物类与另一物类的商。

[0036] 实例:肽X与A- β -单体的结合特异性 = 肽X与单体的结合信号/肽X与寡聚体(或原纤维)的结合信号。以类似的方式,确定特异性结合A- β -寡聚体的肽。

[0037] 根据本发明的肽的片段和部分显示与根据本发明的肽相似或相同的效果。

[0038] 在本发明的一个方案中,确定和使用这样的肽,它们以最高500 μ M,优选250、100、50 μ M,特别优选25、10、6 μ M,特别是4、2、1 μ M或亚 μ M的K_D与A- β -单体或A- β -寡聚体或A- β -原纤维结合。

[0039] 在一个方案中,根据序列SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、和/或SEQ ID NO: 11及其同源体、片段和部分的肽基本上,优选至少60%、75%、80%,特别优选85%、90%、95%,尤其是96%、97%、98%、99%、100%由D-氨基酸构成。

[0040] 本发明意义上的多聚体由至少2个,或3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个选自下述的单体或单体单元构成:SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10和/或SEQ ID NO: 11和/或其同源体、片段或部分,它们自身已经结合A- β -单体或A- β -寡聚体或A- β 原纤维。

[0041] 根据本发明,所述多聚体由相同的单体单元构成,或由2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个不同的各种上述单体的组合构成,作为所谓的组合多聚体。所述单体也可以是部分相同的。组合多聚体中相同单体的数目是可自由选择的。

[0042] 在一个替代方案中,所述组合多聚体包含至少一种选自下述的单体:SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10和/或SEQ ID NO: 11及其同源体以及它们的部分或片段,并包含至少一种结合A- β -单体或A- β -寡聚体或A- β -原纤维的肽作为另外的单体,所述肽与选自下述的单体不同:SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10和/或SEQ ID NO: 11及其同源体以及它们的部分或片段。

[0043] 例如可以通过化学合成或肽合成来制备多聚体。

[0044] 在本发明的一个实施方案中,所述单体彼此共价连接。在本发明的另一个实施方案中,所述单体彼此非共价结合。

[0045] 如果该肽彼此头头、尾尾或头尾线性连接,而不在它们之间使用连接体(Linker)

或连接基团,则在本发明的意义上存在单体单元的共价结合或连接。

[0046] 如果单体经由生物素和链霉亲和素,特别是链霉亲和素四聚体彼此连接,则存在本发明意义上的非共价连接。

[0047] 在本发明的一个方案中,所述单体可以是彼此线性连接的,特别是如上所述。在另一个方案中,所述单体彼此支化连接成根据本发明的多聚体。

[0048] 根据本发明,支化多聚体可以是树状物,在该树状物中单体彼此共价或非共价连接。

[0049] 或者,所述单体还可以与平台分子(Plattform-Molekül)(例如PEG或糖)连接,从而形成支化多聚体。

[0050] 或者,这些选项的组合也是可行的。

[0051] 由本身结合A- β -单体或A- β -寡聚体或A- β -原纤维的根据本发明的肽根据本发明构建的多聚体在其对A- β -单体的选择性和亲和力方面表现出相对于单肽而言有利的协同效果。换句话说:根据本发明的多聚体优于构建它们的单肽。在本发明意义上,协同效果是对于A- β -单体或A- β -寡聚体或A- β -原纤维表现出相比于单个肽单元而言更高的选择性或特异性和/或亲和力的效果,特别是在与其结合A- β -单体或A- β -寡聚体或A- β -原纤维相关的K_D值方面。

[0052] 在本发明的另一个特别有利的实施方案中,所述多聚体,特别是二聚体在动物模型实验(体外或体内)中有利地比单个肽单元更有效。

[0053] 在本发明的一个方案中使用这样的肽或多聚体,它们以最高500 μ M,优选250、100、50 μ M,特别优选25、10、1 μ M的解离常数(K_D-值),特别优选以最高500 nM、250、100、50,特别优选25、10、1 nM、500pM、100、50、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 pM至亚pM的解离常数(K_D-值)与A- β -单体或A- β -寡聚体或A- β -原纤维结合,其中可采用每个中间值。

[0054] 在本发明的一个实施方案中,亲和力由解离常数(K_D-值)来定义。在本发明的一个实施方案中,根据本发明的肽的解离常数(K_D-值)降低。因而是更高的结合亲和力和更高的降解和/或阻止形成有毒的淀粉样蛋白- β -寡聚体的有效性。但这尤其地但不仅仅涉及在A- β -单体或A- β -寡聚体的高亲和力位点处的较低的K_D-值。

[0055] 片段和部分有利地表现出与根据本发明的肽类似或相同的效果。

[0056] 单体和多聚体在下文中被称为根据本发明的肽。

[0057] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明的肽在游离的C端处具有酸酰胺基。然后,根据本发明的肽,例如根据SEQ ID NO:1-11的肽在游离的C端处在位置12处酰胺化。二聚体由此类推在游离的C端处在位置24处酰胺化等等。

[0058] 在本发明的另一个实施方案中,根据本发明的肽,特别是根据SEQ ID NO:1-11的肽,在游离的C端处与游离的N端彼此共价结合,并因此相应地环化存在。通过环闭合也有利地导致在游离的C端处不再有羧基。

[0059] 根据本发明的肽有利地具有这样的氨基酸序列,在该序列中,线性分子的环化,例如通过第一个氨基酸与最后一个氨基酸的共价结合,例如通过缩合反应进行。当然,存在着另外的环化可能性,例如通过将其它氨基酸彼此连接。仅示例性地可提及第二个氨基酸与最后一个氨基酸的连接。同样可以想到的是每种可能的其它连接。

[0060] 在将肽的第一个和最后一个氨基酸彼此连接的情况中,有利地造成在肽链(氨基

酸序列)中没有开放末端。

[0061] 该措施还造成,所有具有线性氨基酸序列且在环化后得到相同的不再可区分的氨基酸顺序的肽在这个意义上是相同的。

[0062] 实例:已知的肽D3的线性氨基酸序列为rprtrlhthrn。通过N端的氨基和C-端的羧基之间的酰胺形成而连接的相应的环化肽“cD3”不再能与下述环化肽区分开: prtrlhthrnrr、rtrlhthrnrrp、trlhthrnrrpr、rlhthrnrrprt、lhthrnrrprtr、hthrnrrprtrl、thrnrrprtrlh、hrnrrprtrlht、rnrrprtrlhth、nrrprtrlhthr或rrprtrlhthrn。此外,由这些序列的每一个也可衍生出cD3。

[0063] 此外,相对于一种,优选甚至每一种起结合作用的线性肽——该起结合作用的线性肽可衍生出环化或另外修饰的根据本发明的肽——产生根据本发明要求保护的更高亲和力、特异性和有效性的效果。

[0064] 此外,环化肽的制备是现有技术,并且可以例如根据DE 102005049537 A1中所述的方法进行。

[0065] 有利地,经由肽的第一个和最后一个氨基酸的环化,导致不再存在肽链的“开放”末端,所述“开放”末端通常是在细胞、动物或人类中例如通过氨肽酶和羧肽酶对于肽降解活动的进攻位点。

[0066] 借助根据本发明的环化肽,例如根据SEQ ID NO:1的ANK6,作为次要效果另外有利地造成根据本发明的环化肽或的多聚体在某些情况下也不易被降解,尽管该效果不是决定性的。此外,如已经显示的,该效果也仅适用于头尾-或尾头-环化的情况,其中将线性肽的两端相应地彼此连接。

[0067] 在本发明的一个方案中,指的是具有下述的氨基酸序列的肽:SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10和/或SEQ ID NO: 11,和/或其具有至少50%的同一性的同源体。

[0068] 在本发明的意义上,“同源序列”或“同源体”意味着,一个氨基酸序列具有与所述单体的上述氨基酸序列之一的至少50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99的同一性。代替术语“同一性”,在本说明书中同义地使用术语“同源的”或“同源性”。两个核酸序列或多肽序列之间的同一性借助基于Smith, T.F. 和Waterman, M.S (Adv. Appl. Math. 2:482-489 (1981)) 的算法的BESTFIT程序通过对比进行计算,其中设定如下的氨基酸参数:空位产生罚分:8和空位扩展罚分:2;和如下的核酸参数:空位产生罚分:50和空位扩展罚分:3。优选地,在两个核酸序列或多肽序列之间的同一性通过核酸序列/多肽序列在各自整个序列长度上的同一性来定义,如它们借助基于Needleman, S.B. 和Wunsch, C.D. (J. Mol. Biol. 48:443-453) 的算法的GAP程序通过对比进行计算,其中设定如下的氨基酸参数:空位产生罚分:8和空位扩展罚分:2;和如下的核酸参数:空位产生罚分:50和空位扩展罚分:3。

[0069] 如果两个氨基酸序列具有同样的氨基酸序列,则在本发明的意义中,它们是同一的。

[0070] 在一个方案中,可将同源体理解为是指上述单体的相应的逆反(retro-invers)序

列。根据本发明,术语“逆反序列”指由对映体形式的氨基酸组成(反: α -C原子的手性相反)并且其中序列顺序此外相对于原本的氨基酸序列颠倒(逆=逆向)的氨基酸序列。

[0071] 在另一个方案中,根据本发明的肽与淀粉样蛋白- β -肽的一部分结合。

[0072] 在另一个方案中,根据本发明的肽具有与所示序列最多三个氨基酸不同的序列。

[0073] 此外,还使用包含上述序列的序列作为肽。

[0074] 在另一个方案中,所述肽具有上述序列的片段或具有相对于上述序列的同源序列。

[0075] 根据本发明,这涉及在药学中使用的肽,优选用于治疗或诊断阿尔茨海默病。

[0076] 在本发明的一个实施方式中,所述肽基本上由D-氨基酸组成。

[0077] 在本发明的意义中,术语“基本上由D-氨基酸组成”表示,根据本发明使用的单体至少50%、55%、60%、65%、70%,优选75%、80%,特别优选85%、90%、95%,特别是96%、97%、98%、99%或100%由D-氨基酸构成。

[0078] 在本发明的一个实施方式中,根据本发明的肽是D-对映体的D-肽D3的衍生物。在本发明的意义中的衍生物是由D3衍生的肽序列,其按照下述三个方法之一来获得:

a) 改变D3中的氨基酸基础单元的顺序和/或数量。在此,仅使用在D3序列中存在的氨基酸。

[0079] b) 删除D3序列的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个氨基酸。

[0080] c) 用其它氨基酸,优选D-对映体置换1、2、3、4、5或6个氨基酸。

[0081] 在另一个方案中涉及用于抑制淀粉样蛋白- β -肽的原纤维形成的根据本发明的肽。根据本发明的肽和/或多聚体使A- β -寡聚体或由其形成的多聚体以及原纤维去毒,这通过例如将其与A- β -寡聚体结合并因此转变为无毒的化合物。因此,本发明的主题也是用于使A- β -寡聚体以及由其形成的多聚体或原纤维去毒的方法。

[0082] 在一个实施方式中,本发明的主题也是与其它物质连接的根据本发明的肽。

[0083] 在本发明的意义中,所述连接是化学结合,如Römpf Chemie Lexikon,第9版,第1卷,第650页及其以后几页,Georg Thieme Verlag Stuttgart中定义的,优选是主价键(Hauptvalenz)结合,特别是共价结合。

[0084] 在一个方案中,所述物质是根据2012年9月实施的药物法§2或§4(19)定义的药物或活性物质。在一个替代方案中,活性物质是治疗活性物质,其用作医药有效物质。优选使用消炎剂。

[0085] 在另一个方案中,所述物质是增强所述肽的效用的化合物。

[0086] 在一个替代方案中,这种化合物是氨基吡唑和/或氨基吡唑衍生物。在本发明意义中的氨基吡唑衍生物是3-氨基吡唑-5-羧酸或3-硝基吡唑-5-羧酸以及其中杂环CH-基团被-CR-或-N-或-O-或-S-替换的所有衍生物,以及所有由其衍生的肽二聚体、三聚体或四聚体,优选氨基吡唑三聚体。

[0087] 在另一个替代方案中涉及改善所述肽的溶解性和/或通过血脑屏障的化合物。

[0088] 在一个替代方案中,根据本发明,所述肽具有上述方案、实施方案和/或替代方案的至少两个或更多个特征的每种任意组合。

[0089] 在本发明的范围内,还已经认识到,相比于其中游离C端,即C端的羧基未经修饰并且相应地携带负电荷的起结合作用的线性肽,经酰胺化和/或环化的肽以更高的亲和力与

A- β -单体结合。这意味着,在经修饰的肽的情况中, K_D -值低于在其中游离C端,即C端的羧基未经修饰且相应地携带负电荷的线性肽的情况。

[0090] 因此,在本发明的另一个优选的实施方案中,与在C端具有负电荷但其余相同的氨基酸序列的线性肽相比,根据本发明修饰的在C端没有负电荷的肽的结合亲和力提高了1%、2、3、4、5、6、7、8、9,特别是10%、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99,特别是100%、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199,特别是200 %、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299,特别是300%、301、302、303、304、305、306、307、308、309、310、311、312、313、314、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、384、385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、396、397、398、399,特别是400%、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、426、427、428、429、430、431、432、433、434、435、436、437、438、439、440、441、442、443、444、445、446、447、448、449、450、451、452、453、454、455、456、457、458、459、460、461、462、463、464、465、466、467、468、469、470、471、472、473、474、475、476、477、478、479、480、481、482、483、484、485、486、487、488、489、490、491、492、493、494、495、496、497、498、499,有利地甚至500%、501、502、503、504、505、506、507、508、509、510、511、512、513、514、515、516、517、518、519、520、521、522、523、524、525、526、527、528、529、530、531、532、533、534、535、536、537、538、539、540、541、542、543、544、545、546、547、548、549、550、551、552、553、554、555、556、557、558、559、560、561、562、563、564、565、566、567、568、569、570、571、572、573、574、575、576、577、578、579、580、581、582、583、584、585、586、587、588、589、590、591、592、593、594、595、596、597、598、599,特别有利地600%、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610、611、612、613、614、615、616、617、618、619、620、621、622、623、624、625、626、627、628、629、630、631、632、633、634、635、636、637、638、639、640、641、642、643、644、645、646、647、648、649、650、651、652、653、654、655、656、657、658、659、660、661、662、663、664、665、666、667、668、669、670、671、672、673、674、675、676、677、

678、679、680、681、682、683、684、685、686、687、688、689、690、691、692、693、694、695、696、697、698、699,特别有利地700%、701、702、703、704、705、706、707、708、709、710、711、712、713、714、715、716、717、718、719、720、721、722、723、724、725、726、727、728、729、730、731、732、733、734、735、736、737、738、739、740、741、742、743、744、745、746、747、748、749、750、751、752、753、754、755、756、757、758、759、760、761、762、763、764、765、766、767、768、769、770、771、772、773、774、775、776、777、778、779、780、781、782、783、784、785、786、787、788、789、790、791、792、793、794、795、796、797、798、799,同样特别有利地800%、801、802、803、804、805、806、807、808、809、810、811、812、813、814、815、816、817、818、819、820、821、822、823、824、825、826、827、828、829、830、831、832、833、834、835、836、837、838、839、840、841、842、843、844、845、846、847、848、849、850、851、852、853、854、855、856、857、858、859、860、861、862、863、864、865、866、867、868、869、870、871、872、873、874、875、876、877、878、879、880、881、882、883、884、885、886、887、888、889、890、891、892、893、894、895、896、897、898、899,同样特别有利地900%、901、902、903、904、905、906、907、908、909、910、911、912、913、914、915、916、917、918、919、920、921、922、923、924、925、926、927、928、929、930、931、932、933、934、935、936、937、938、939、940、941、942、943、944、945、946、947、948、949、950、951、952、953、954、955、956、957、958、959、960、961、962、963、964、965、966、967、968、969、970、971、972、973、974、975、976、977、978、979、980、981、982、983、984、985、986、987、988、989、990、991、992、993、994、995、996、997、998、999,或甚至1000 %,或甚至10000%,或甚至最高100000%或1000000%,其中可以采用每个中间值。这尤其涉及对A- β -单体或A- β -寡聚体的高亲和力位点的提高的亲和力。

[0091] 这通过相应降低的 K_D -值来表明。与在游离C端具有负电荷的起结合作用的线性肽相比,作为经修饰的,特别是环化的肽对淀粉样蛋白- β -单体或A- β -寡聚体的结合亲和力的量度的 K_D -值降低了1%、2、3、4、5、6、7、8、9,特别是10%、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99,特别是99.1、99.2、99.3、99.4、99.5%、99.6、99.7、99.8、99.9直至99.99或甚至99.999%,其中可以采用每个中间值。

[0092] 这些较低的 K_D -值尤其有利地但不仅仅涉及与A- β -单体或A- β -寡聚体的高亲和力位点。

[0093] 因此,经修饰的肽可以比在游离C端具有负电荷的起结合作用的线性肽更有效地作用于诊断目的的探针,特别是比其具有相同氨基酸序列的线性肽-对应物(Pendant)更有效。

[0094] 然而,它们尤其也可以比在游离C端具有负电荷的起结合作用的线性肽更有效地用作治疗剂,特别是比其具有相同氨基酸序列的线性肽-对应物更有效。

[0095] 在本发明的范围内,此外已经认识到,与在游离C端具有负电荷的肽相比,但特别是与其具有相同氨基酸序列的肽-对应物相比,这种经修饰的肽另外还以更高的有效性或功效阻止形成特别有毒的淀粉样- β -寡聚体或导致其破坏和/或去毒化(Endtoxifizierung)。这种功效尤其提高了1%、2、3、4、5、6、7、8、9,特别是10%、11、12、13、

14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.9,特别有利地甚至提高了100%。

[0096] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,也在体外和/或体内产生对A- β -单体或A- β -寡聚体或A- β -原纤维的提高了的亲合力的效果和同时与此相关联的消除、去毒化A- β -寡聚体(或形成)的有效性。

[0097] 本发明的主题也是根据本发明的肽,其用于与聚集的A- β -肽结合。

[0098] 本发明的另一主题是通过肽合成,例如本领域技术人员已知的,用于具有低分子量的任意化合物(低分子量化合物)的有机合成方法和/或诱变和重组制备来制备根据本发明的肽的方法。

[0099] 本发明此外还涉及包含根据本发明的肽的组合物,其尤其用于治疗 and 诊断阿尔茨海默病。

[0100] 本发明的主题还是包含根据本发明的肽的组合物,其特别是用于防止有毒的A- β -寡聚体,或用于破坏由其形成的多聚体或原纤维。

[0101] 根据本发明的“组合物”可以例如是在根据专业知识制备的制剂中含有根据本发明的肽的疫苗、药物(例如以片剂形式)、注射液、食品、食品补充剂。

[0102] 本发明此外还涉及含有根据本发明的肽的试剂盒。

[0103] 在这种试剂盒中,根据本发明的肽可被包装在容器中,任选地与缓冲液或溶液一起或在缓冲液或溶液中。试剂盒的所有组分可以包装在同一个容器中或彼此分开地包装。此外,该试剂盒可包含其使用说明书。这种试剂盒可包含例如在具有瓶塞和/或隔膜的注射瓶中的根据本发明的肽。此外,其中还可包含例如一次性注射器。

[0104] 本发明的另一个主题是根据本发明的肽作为用于识别、定性和/或定量测定淀粉样蛋白- β -单体、淀粉样蛋白- β -寡聚体或淀粉样蛋白- β -原纤维的探针的用途。

[0105] 本发明的主题也是包含根据本发明的肽的探针,其用于识别、定性和/或定量测定淀粉样蛋白- β -单体或淀粉样蛋白- β -寡聚体。

[0106] 这种探针是很重要的,因为其使得早期诊断阿尔茨海默氏痴呆症变成可能。通过早期诊断可以在很早的阶段就对抗该疾病。

[0107] 这种分子探针包含根据本发明的多聚体和任选的染料、荧光染料、放射性同位素、(PET等)、钆(MRI)以及适用于探针的成像并可例如静脉内注射给患者的替代性物质。在通过血脑屏障后,所述探针可与A- β -单体、A- β -寡聚体和/或斑块结合。这样标记的A- β -寡聚体和/或斑块可借助成像方法例如SPECT、PET、CT、MRT、质子-MR-波谱法等使其可见。

[0108] 此外,本发明还涉及所述肽用于防止淀粉样蛋白- β -寡聚体和/或淀粉样蛋白- β -肽-聚集体和/或淀粉样蛋白- β -原纤维的用途。

[0109] 根据本发明的肽还用于使有毒的淀粉样蛋白- β -寡聚体和/或聚集体去毒。所述肽特别用于与淀粉样蛋白- β -寡聚体和/或聚集体结合并因此形成非晶的无毒聚集体。

[0110] 已经认识到,如果A β -寡聚体已经存在,则治疗的目的必须是通过A- β -单体具有尽可能高的亲合力的物质来处理它们。事实上,对A- β -单体的亲合力可能根本不够大,并且根据本发明的肽的相应的解离常数此时在亚 μ M范围或pM范围内甚至更低。

[0111] 在本发明的范围内已经认识到,作为A- β -寡聚体的基础单元的A- β -单体在人体内不断形成,并且估计其本身是无毒的。甚至存在这样的可能性,单体具有有益的功能。取决于它们的浓度,A- β -单体可随机地簇集到一起。该浓度取决于它们在体内的形成速率和降解速率。如果在体内的A- β -单体的浓度随着年龄的增长而增加,那么单体自发簇集成A- β -寡聚体的可能性就越来越大。如此产生的A- β -寡聚体可类似于朊病毒那样增殖并最终导致阿尔茨海默病。

[0112] 此外已经认识到,事实上,在预防和治疗或甚至治愈阿尔茨海默氏痴呆症之间的一个重要区别在于,预防可能可以通过阻止第一个A- β -寡聚体的形成就实现。为此,一些少量的高亲和力的A- β -单体配体是足够的,所述配体对A- β -寡聚体是同时很少亲和力和选择性(或特异性)的。

[0113] 通过提供根据本发明的肽,满足了在诊断(探针)和治疗阿尔茨海默氏痴呆症方面的要求。根据本发明的肽在诊断和/或治疗的意义上以具有相应低的解离常数结合A- β -单体或A- β -寡聚体。因此,相应的另一主题是根据本发明的肽作为阿尔茨海默病的治疗剂的用途。

[0114] 根据本发明的肽与靶分子的特别强的结合是由根据本发明的肽对靶分子的高特异性和/或亲和力引起的。所形成的复合体具有低的解离常数(K_D -值)。

[0115] 借助硫黄素T实验可以表明,根据本发明的肽非常有效地抑制了A- β -肽的原纤维形成。

[0116] 另一主题是根据本发明的肽在处理(体外,离体)血液、血液制品和/或器官的方法中的用途,其特征不在于,将所述血液、血液制品和/或器官从人体或动物体中取出并去除A-(淀粉样蛋白)- β -寡聚体和/或使其去毒。

[0117] 在本发明的意义上,术语结合亲和力是在蛋白质-配体-相互作用的情况下结合配偶体之间的结合强度的量度,并且对A- β -单体的结合特异性表明仅存在与A- β -单体的结合,而没有与其它A- β -物类的结合或仅存在弱结合。作为特异性的值,示出A- β -单体与A- β -寡聚体或A- β -单体与A- β -原纤维或等同于A- β -寡聚体的结合信号的商。特异性结合意味着该商大于1。

[0118] 与此类似地,对A- β -寡聚体的结合特异性意味着,仅与A- β -寡聚体结合,而没有与其它A- β -物类的结合或仅存在弱结合。作为特异性的值,示出A- β -寡聚体与A- β -单体或A- β -寡聚体与A- β -原纤维或等同于A- β -单体的结合信号的商。特异性结合意味着该商大于1。

[0119] 如果已经存在A- β -寡聚体,则治疗的目的应该是,通过对A- β -单体具有尽可能高的亲和力和特异性的物质来处理它们,以消除A- β -寡聚体。这通过根据本发明的肽来实现。

[0120] 通过优化已经已知的肽D3,应相似或相同地保持作用机制,但物质应具有更有效的性质。此外,这些性质尤其是对A- β -单体或寡聚体的结合亲和力和-特异性、A- β -原纤维形成的抑制、A- β -细胞毒性的抑制、A- β -寡聚体的沉淀、A- β -原纤维成为无毒的非淀粉样物类的转化。

[0121] 通过置换初始的D3肽的4、5、6或7个氨基酸和删除来实现优化。

[0122] 借助肽微阵列来优化D3。为此,在第一步中,将12聚体(12mer)肽的每个氨基酸置换成D-对映体形式的19种天然氨基酸和13种另外的氨基酸。在第二步中,将估计最有效的置换彼此组合。在此,置换原始D3肽的4、5、6或7个氨基酸。此外,删除1个氨基酸。由于肽的

结合应特异性地针对A- β 的物类(单体、寡聚体或原纤维),因此该微阵列用各种物类来处理,并在计算上排除可能存在于温育批次中的其它物类的结合。

[0123] 确定了对A- β -单体特异性和高亲和力地结合的11种肽。这些是根据SEQ ID NO:1-11被称为ANK1-7以及ANK 15-18的肽。高亲和力在此意味着其具有的 K_D -值比D3低2倍至10倍。

[0124] D3 (现有技术):rprtrIhthrn

- a) "ANK1" (游离的N端, 酰胺化的C端):rkrirlvyhinr
- b) "ANK2" (游离的N端, 酰胺化的C端):rkrirl06yhinr
- c) "ANK3" (游离的N端, 酰胺化的C端):rkrirl06yhwnr
- d) "ANK4" (游离的N端, 酰胺化的C端):rkrirlvyhwnr
- e) "ANK5" (游离的N端, 酰胺化的C端):rkrvrlvyhkkr
- f) "ANK6" (游离的N端, 酰胺化的C端):rkrirlvtkkkr
- g) "ANK7" (游离的N端, 酰胺化的C端):rkrvrl02thikr
- h) „ANK15“ (游离的N端, 酰胺化的C端):rprvrl06yhwnr
- i) „ANK16“ (游离的N端, 酰胺化的C端):rkr07rlvtkrnr
- j) „ANK17“ (游离的N端, 酰胺化的C端):rkrirl06yhikr
- k) „ANK18“ (游离的N端, 酰胺化的C端):rpr07rlhtkkkr

其中

02: 4-氟-苯基丙氨酸 (D)

06: 苯基甘氨酸 (D)

07: D-高精氨酸。

[0125] 根据本发明,所有肽也作为双肽和/或以环化形式来使用。由此可以进一步提高肽的有效性。

[0126] 肽ANK1-7以及ANK15-18可以通过与A- β -单体结合用作对抗阿尔茨海默氏痴呆症的药物。寡聚的特异性肽也可以由于其与A- β -寡聚体的特异性结合而额外用作诊断用的探针。

实施例

[0127] 在下文中,借助实施例和附图更详细地解释本发明,而不应借此限制本发明。

[0128] 其中:

图1示出: a) 根据本发明的肽与A- β -单体、A- β -寡聚体和A- β -原纤维的结合信号。

[0129] b) 根据本发明的肽的结合特异性。

[0130] 图2示出: 通过根据本发明的肽减少淀粉样蛋白- β -寡聚体。

[0131] 图3示出: a) 根据本发明的肽的THT测定, b) 在饱和点下关于淀粉样蛋白- β 的用THT荧光评估的THT测定。

[0132] 图4示出: a) 无A- β 共温育的SH-SY5细胞的MTT-测定。

[0133] b) 具有A- β 共温育的SH-SY5细胞的MTT-检测。

[0134] 对于具有D3衍生物的肽微阵列,其经由C端在载玻片上如下所示共价连接。

[0135] o 第1代:用19种天然氨基酸和用13种非天然氨基酸各置换1次的D3。

- [0136] ○ 第2代:将导致肽与A- β 更有效结合的置换彼此组合。
- [0137] - 肽微阵列载玻片的预处理:
- 3次短暂浸入乙醇(96%)中并随后用H₂O洗涤(30 min),
 - 短暂干燥离心。
- [0138] - 制备单体和寡聚体:
- 根据Johansson等人2006年的尺寸排阻色谱法(Johansson, A.-S. 等人 Physiochemical characterization of the Alzheimer's disease-related peptides A β 1-42Arctic and A β 1-42wt. FEBS Journal 273, 2618-2630 (2006))。
- [0139] ○ 将寡聚体在8-9ml时分级,单体在16-17ml时分级。
- [0140] - 制备原纤维:
- 经3天温育A- β ,离心,弃去上清液并再悬浮于缓冲液中(3次重复)。
- [0141] - 进行肽微阵列:
- 在室温下,用FITC-A- β -单体、-寡聚体、-原纤维和FITC温育1小时。
- [0142] ○ 洗涤:TBS-T 3次短暂(仅更换 TBS-T-缓冲液),3次10 min在Falcon中,3次H₂O, 3次10 min。
- [0143] ○ 通过离心进行干燥。
- [0144] - 经荧光标记的A- β 与固定住的肽的结合通过荧光染料用Fuji Film的微阵列读取器FLA800检测。A- β 与肽结合得越多,荧光信号越高。
- [0145] ○ 载体设置模式(Set Mode):载玻片
- 分辨率: 10 μ m
 - 扫描模式: 高灵敏度(慢):在200 mm/s下的扫描像素
 - 激光: 473 nm
 - 滤波器: 530 DF 20
 - 光电倍增管(PMT) HV (%): 100
 - 图像保存为.tif文件。
- [0146] 用Raytest的AIDA Metrix软件进行荧光信号的评估:

栅格定义第一级	
行	1
列	1
第2级	
行	12
列	4
X 间距	0
Y 间距	0
第3级	
行	9
列	9
直径	80 μ m
背景定义	

局部点环(Local Dot Rings)	
膨胀点(Inflate Dots)	150 μm
环宽度	30 μm
按面积	平均值
对齐默认值(参数)	
直径	100 %
移动性	受限
	对齐栅格, 对齐点
对齐默认值(过程)	
Bkg 偏差	
阈值	2.0*StdDev

[0147] 为了确保结果的可重复性,每个物类的肽微阵列的温育进行至少3次。

[0148] 用基于中值的标准化将测得的重复测试的荧光信号标准化,并从信号中减去对照值。由此防止发生经荧光标记的A- β 通过染料结合。

[0149] 取A- β 物类与肽的结合信号平均值。

[0150] 为了测定结合特异性,算出肽应特异性结合的物类与另一物类的商。

[0151] 实例:肽X与A- β -单体的结合特异性 = 肽X与单体的结合信号/肽X与寡聚体的结合信号。

[0152] 根据本发明的肽 ANK1-7以及ANK 15-18导致抑制A- β -原纤维化、抑制A- β -细胞毒性、消除A- β -寡聚体以及使A- β -原纤维转化为无毒的非淀粉样物类。在此给出了对A- β -单体的结合亲和力和特异性。

[0153] 在此,结合亲和力是在蛋白质-配体-相互作用的情况下在结合配偶体之间的结合强度的量度,并且结合特异性表明,仅存在与A- β -单体的结合,而没有与其它A- β 物类的结合或仅存在弱结合。作为特异性的值,这里示出A- β -单体与A- β -寡聚体或A- β -单体与A- β -原纤维或等同于A- β -寡聚体的结合信号的商。特异性结合意味着该商大于1。

[0154] 详细算出了以下数据:

	与A- β -单体的结合信号	与A- β -寡聚体的结合信号	与A- β -原纤维的结合信号	单体相对于寡聚体的结合特异性	单体相对于原纤维的结合特异性
ANK1	6.6	1.9	1.3	3.5	5.1
ANK2	5.6	1.6	0.8	3.4	7.1
ANK3	3.6	0.6	0.2	6.5	21.9
ANK4	4.4	1.3	1.0	3.3	4.3
ANK5	4.3	0.7	2.0	5.9	2.2
ANK6	4.9	1.2	2.5	4.1	1.9
ANK7	2.1	0.3	0.3	6.4	6.8
ANK15	1.3	0.6	0.1	2.2	12.2
ANK16	11.9	1.4	1.5	8.6	8.1
ANK17	4.7	1.0	1.9	4.8	2.5
ANK18	1.2	0.2	0.1	7.0	9.4
D3	0.5	0.6	0.8	0.8	0.6

[0155] 图1a显示了与D3相比较,ANK1-ANK7和ANK15-18与A- β -单体、-寡聚体和-原纤维的结合信号。这些肽与A- β -单体的结合比与A- β -寡聚体和与A- β -原纤维的结合明显更有效,这可通过结合信号中的明显差异来识别。明显差异意味着A- β -单体与A- β -寡聚体和/或A- β -原纤维的结合信号之间的差异至少为1.5 rfu。

[0156] 图1b显示了ANK1-7和ANK 15-18的结合特异性。显然,在根据本发明的所有肽的情况下,对A- β -单体的结合特异性大于1。相反,D3具有小于1的对A- β -单体的结合特异性。

[0157] 借助用于定量表征样品中的淀粉样肽和/或蛋白的QIAD方法可以量化物质的性质。将预先温育的A- β 与肽共温育。借助密度梯度离心法分离不同的A- β 物类,并借助RP-HPLC在各个级分中量化。分析级分4-6中A- β -寡聚体的消除。

[0158] 已表明,尤其是ANK5、ANK6和ANK7比D3更有效地消除了A- β -寡聚体,参见图2。一方面,与单体的特异性结合可以阻止寡聚体的形成,而不同时导致A- β -单体浓度的降低;另一方面,已经存在的A- β -寡聚体可以通过用使A- β -单体稳定化的活性物质处理根据勒夏特利原理从不同聚集体物类的动态平衡中除去,从而导致A- β -寡聚体降解成A- β -单体。

[0159] 在ThT测定中表明,在与受试物质共温育后ThT阳性A- β -原纤维明显减少(图3a和3b)。这表明聚集被抑制或形成了非晶聚集体。

[0160] 在本领域技术人员已知的对SH-SY5Y细胞进行的MTT测定中得出,在治疗相关的浓度下未能发现根据本发明的肽的明显毒性(图4)。相反,可表明,由A- β 引起的毒性被物质ANK4、ANK5、ANK6和ANK7降低。根据目前的知识水平,A- β -寡聚体是有毒物类。由于通过所述肽消除了A- β -寡聚体,A- β 诱导的毒性也被降低。

[0161] 具体地:

图2显示,在A- β 与肽的比例为8:1的情况下,肽ANK5、ANK6和ANK7比D3明显更有效地减少A- β -寡聚体。其它肽在该浓度下与D3效果相当。D3将A- β -寡聚体消除了 $50 \pm 10\%$,将ANK1消除了 $51 \pm 6\%$,将ANK2消除了 $54 \pm 7\%$,将ANK3消除了 $62 \pm 10\%$,将ANK4消除了 $59 \pm 16\%$,将ANK5消除了 $72 \pm 2\%$,将ANK6消除了 $81 \pm 3\%$,将ANK7消除了 $73 \pm 1\%$ 。

[0162] 因此,根据本发明的肽显示出相比于D3而言提高为最多1.6倍的A- β -寡聚体的减少。

[0163] 图3显示,ANK1-7明显减少了ThT阳性A- β -原纤维的形成。在整个测量期间(48小时),对于肽ANK1、ANK2和ANK3而言,ThT荧光保持在第一个测量值的水平,相反,对于肽ANK4、ANK6和ANK7而言可看出略微增加(48小时后相当于AB的ThT荧光的13-21%),对于ANK5而言上升到1029 rfu,这相当于48小时后A- β 对照的ThT荧光的53%。

[0164] 图4a显示,ANK4、ANK5、ANK6和ANK7单独对细胞没有毒性作用。A- β 与不同浓度的ANK4、ANK5、ANK6和ANK7的共温育可实现A- β 毒性的降低,参见图4b。用物质ANK4和ANK6比用D3更有效降低。显著性基于各自具有D3的浓度(* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; n. s. 不显著)。

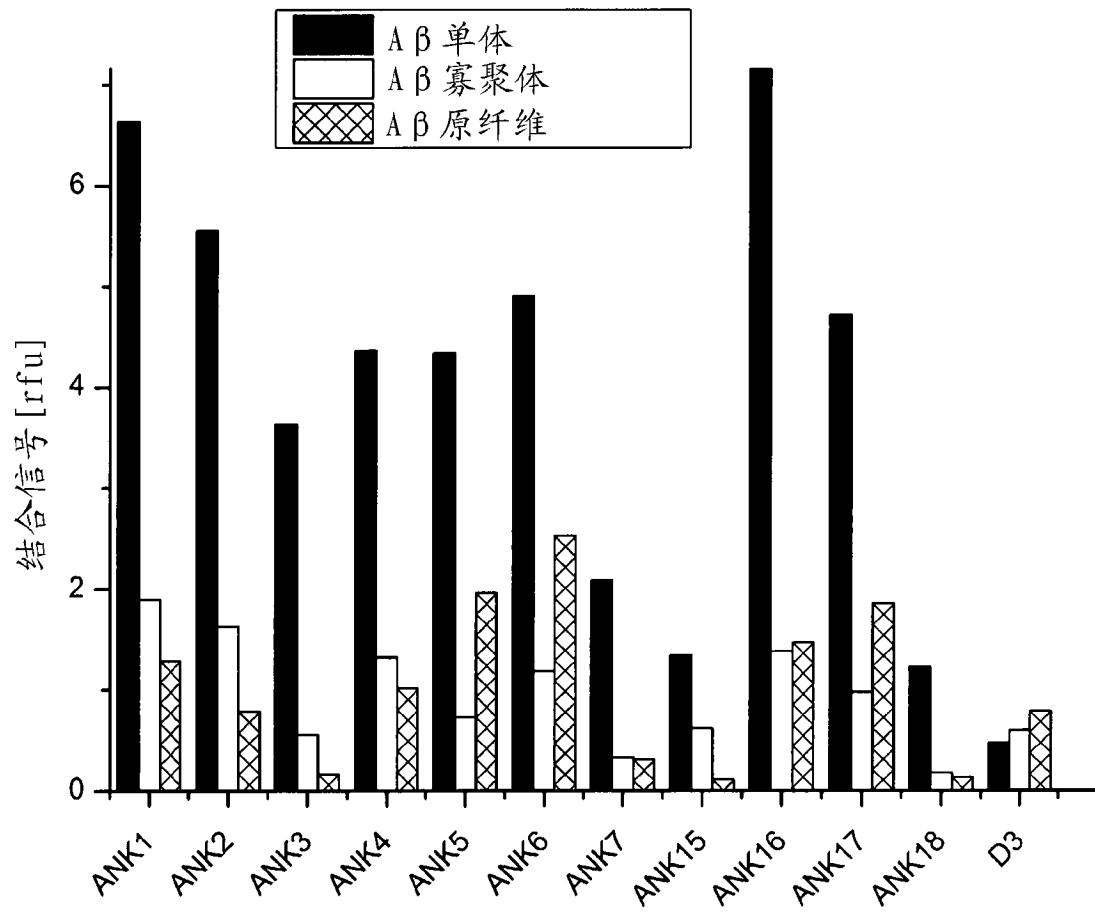


图 1a

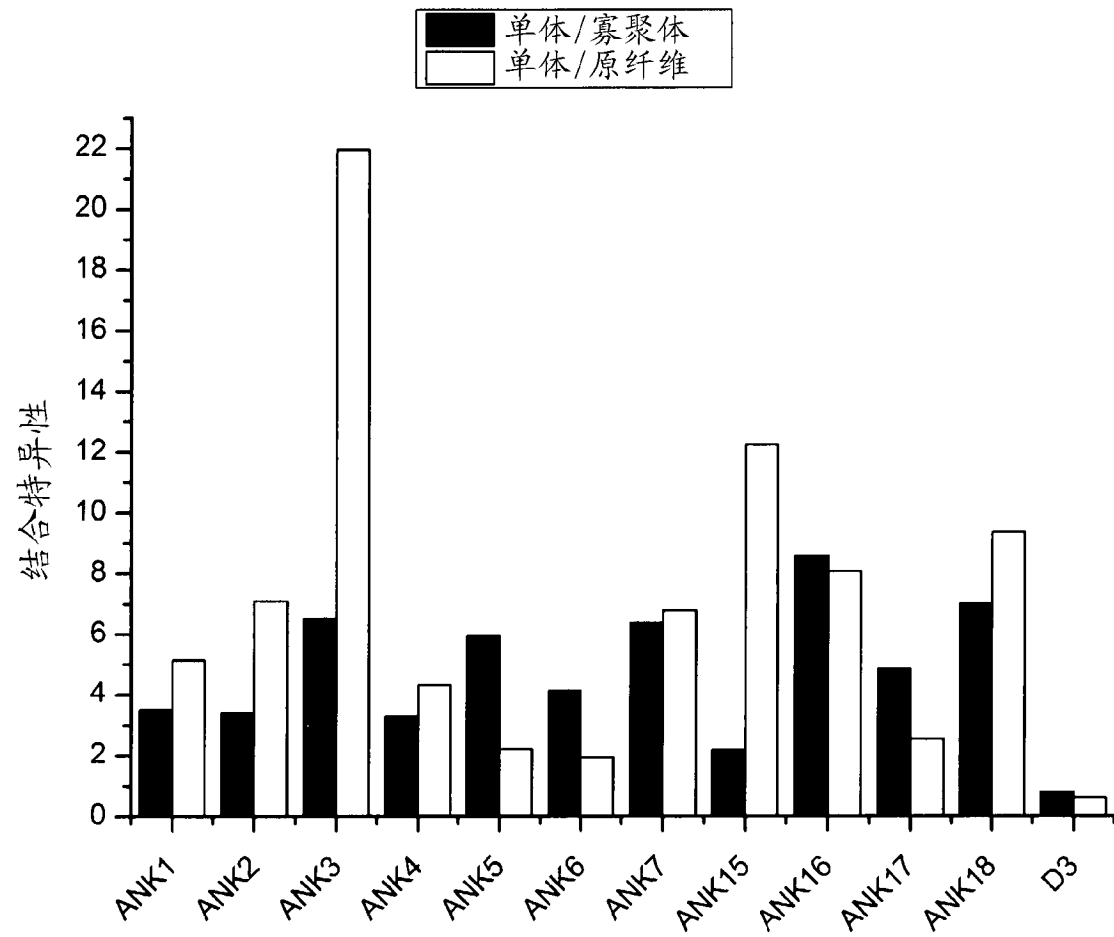


图 1b

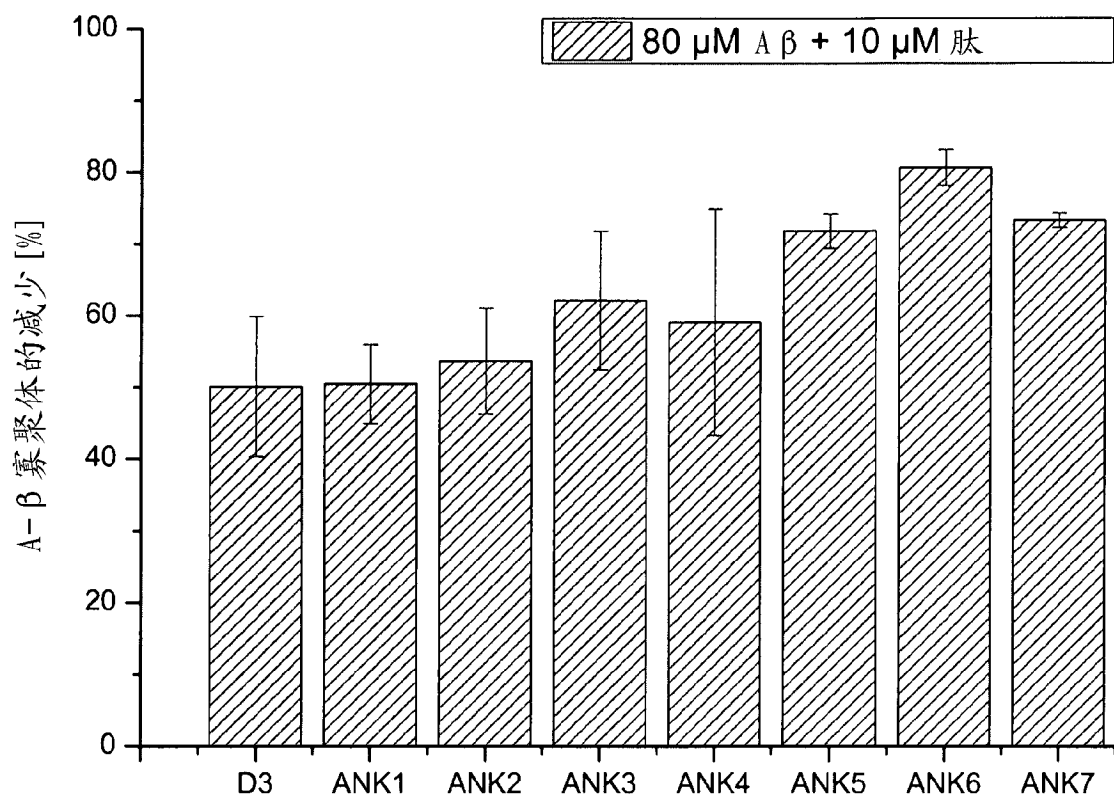


图 2

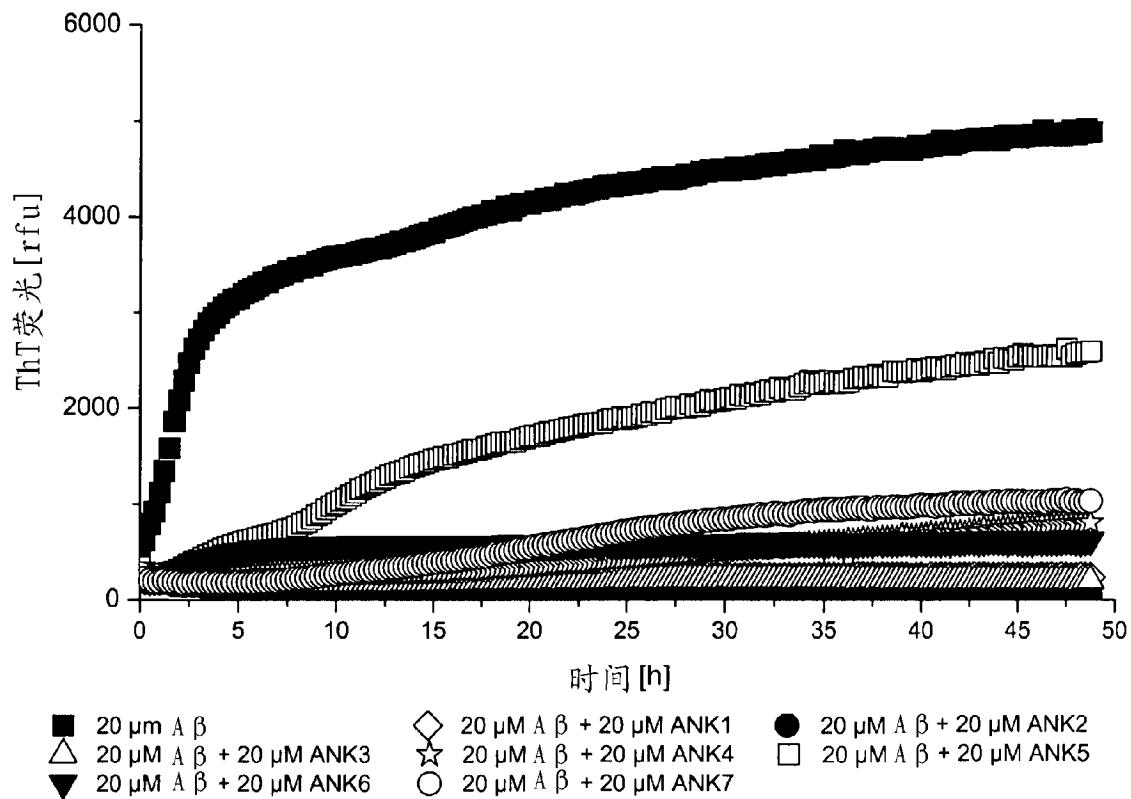


图 3a

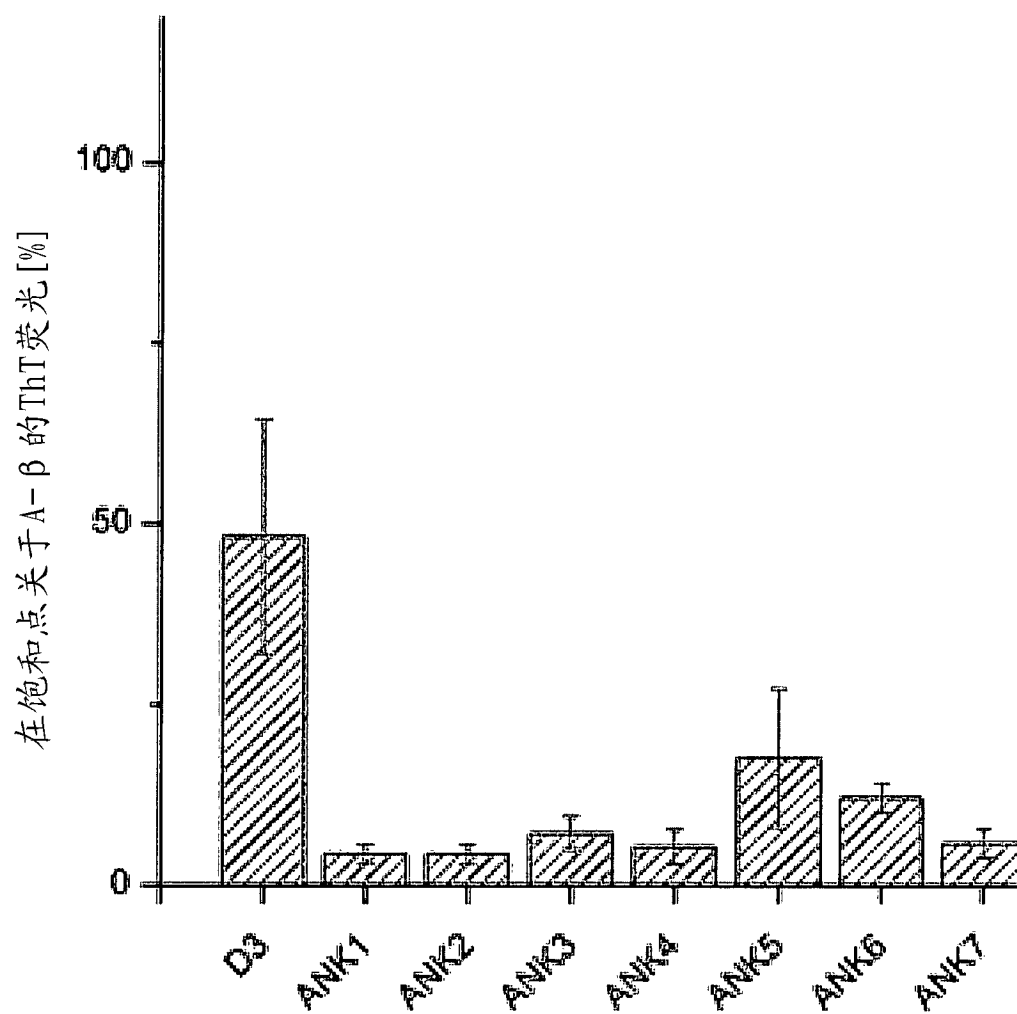


图 3b

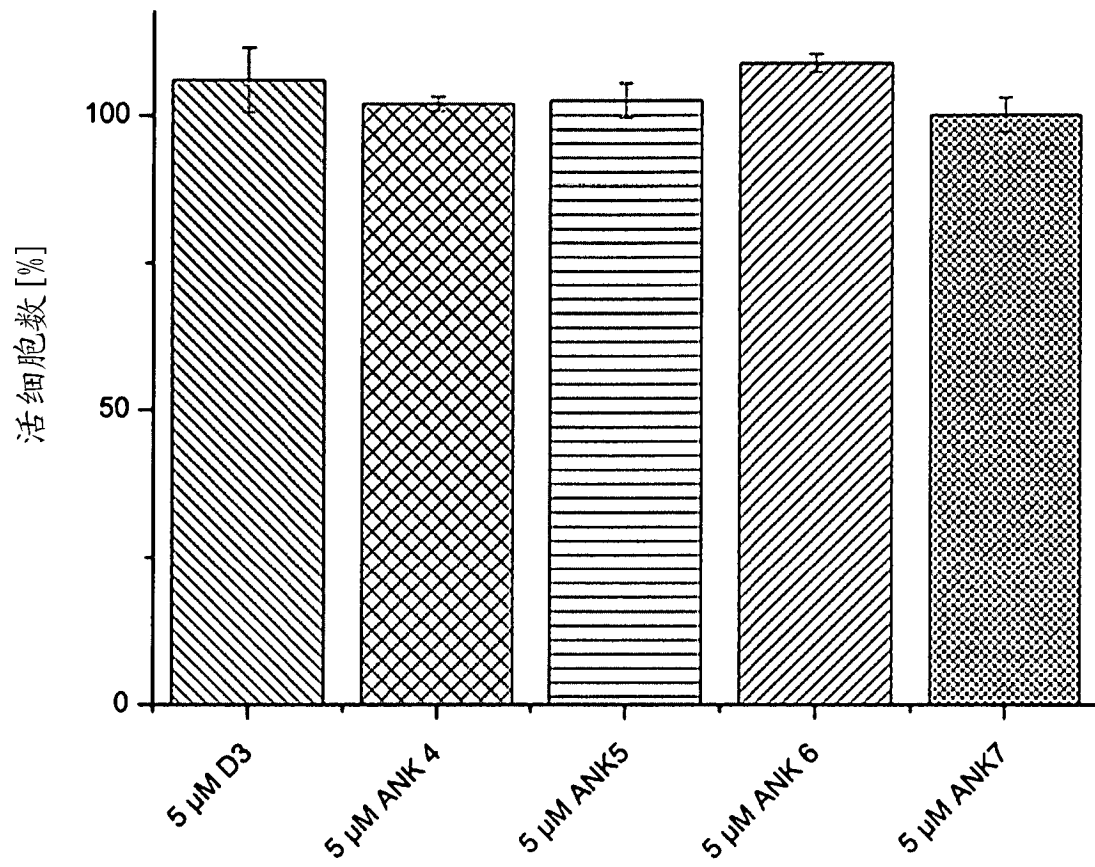


图 4a

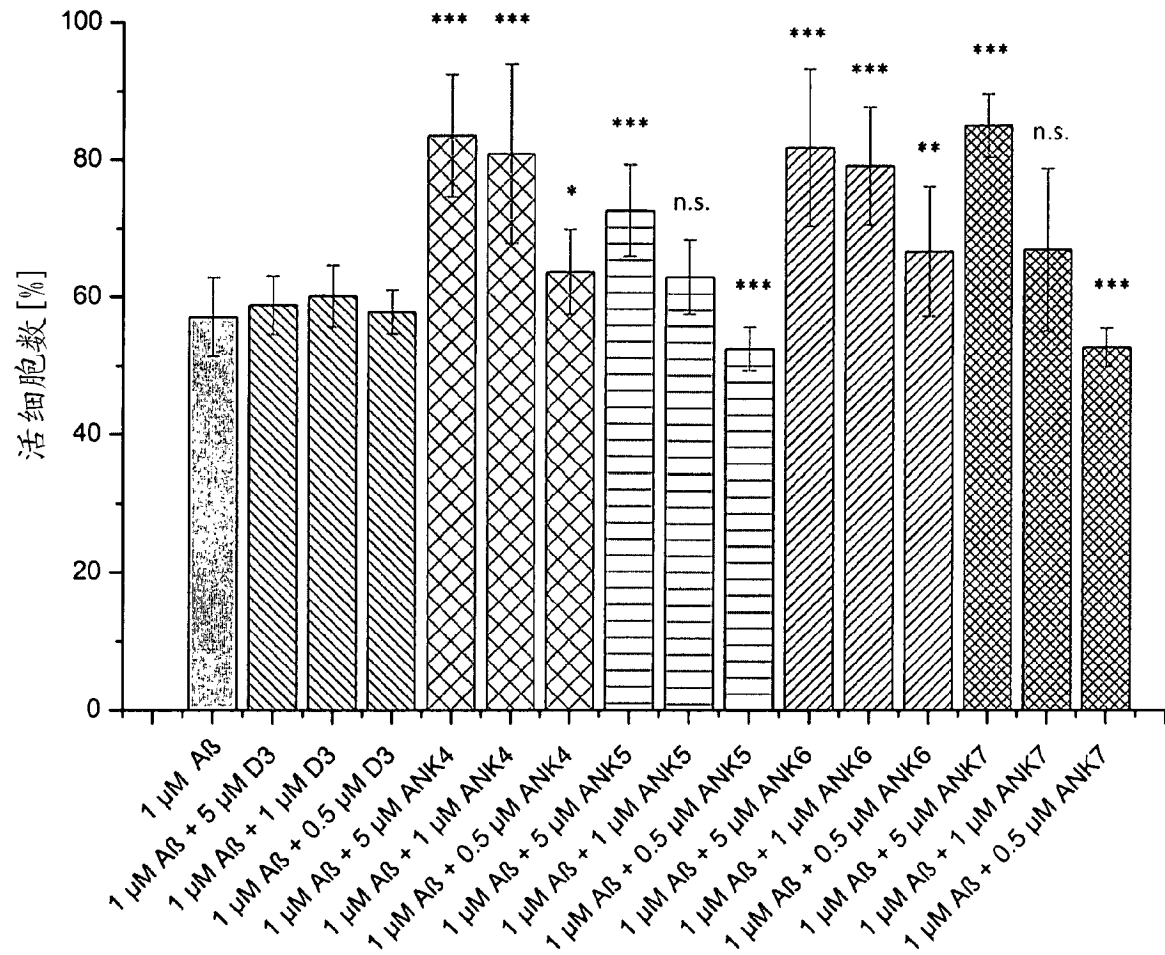


图 4b