(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104704371 B
(45)授权公告日 2017.11.07

(21)申请号 201380047981.9

(22)申请日 2013.09.13

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104704371 A

(43)申请公布日 2015.06.10

(30)优先权数据
102012108598.6 2012.09.14 DE

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.03.13

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2013/068992 2013.09.13

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/041115 DE 2014.03.20

(73)专利权人 于利希研究中心有限公司
地址 德国于利希

(72)发明人 D·威尔伯德 O·布兰恩尔
S·A·方克 L·内格尔斯特格尔
D·巴尔蒂尼克 A·N·克勒恩

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 殷骏

(51)Int.Cl.
G01N 33/68(2006.01)
C07K 7/04(2006.01)
C07K 7/08(2006.01)

(56)对比文件
WO 02081505 A2,2002.10.17,
Thomas van Groen et. al..Reduction of Alzheimer s disease amyloid plaque load in transgenic mice by D3, a D-enantiomeric peptide identified by mirror image phage display..《ChemMedChem》.2008,第3卷
Dirk Bartnik et. al..Differently selected D-enantionmeric peptides act on different Aβ species..《Rejuvenation Research》.2010,第13卷
Thomas van Groen et. al..In vitro and in vivo staining characteristics of small fluorescent, Aβ42-binding D-enantiomeric peptides in transgenic AD mouse models..《ChemMedChem》.2009,第4卷
Susanne Aileen Funke et. al..Oral treatment with the D-enantiomeric peptide D3 improves the pathology and behavior of Alzheimers disease transgenic mice..《ACS Chem Neurosci》.2010,第1卷
Guobao Zhang et.al..Multiple-peptide conjugates for binding β-amyloid plaques of Alzheimers disease..《Bioconjugate Chem》.2003,第14卷

审查员 毕秀华

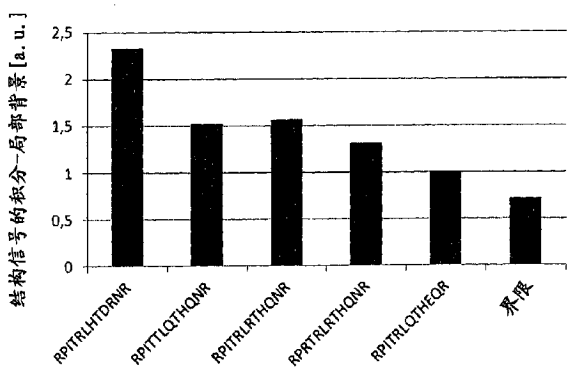
权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

新的由D3衍生的D-对映体肽及其用途

(57)摘要

本发明涉及新的D-对映体A-β-寡聚体-结合肽,它们的同源体、片段、部分和多聚物,及其用途。



CN 104704371 B

1.肽，其由至少一种氨基酸序列组成，所述氨基酸序列包含至少50％D-对映体氨基酸，所述氨基酸序列选自：

(a) SEQ ID NO:2(RD2:ptlhthnrrrrr)；

(b)与(a)具有至少83％一致性的氨基酸序列；以及

(c) (a)和/或(b)的多聚物。

2.根据权利要求1的肽，其特征在于，所述肽与其它物质相连接。

3.根据前述权利要求之一的肽，其在医药中使用。

4.根据权利要求1或2的肽，其用于治疗阿尔茨海默病。

5.根据权利要求1或2的肽，其特征在于，所述肽由D-氨基酸组成。

6.根据权利要求1或2的肽，其用于抑制淀粉状蛋白β肽的原纤维形成。

7.根据权利要求1或2的肽，其用于结合聚集的淀粉状蛋白β肽。

8.用于制备根据权利要求1-7之一的肽的方法，其特征在于，所述肽通过肽合成或诱变制备。

9.试剂盒，其包含根据权利要求1-7之一的肽。

10.组合物，其包含根据权利要求1-7之一的肽。

11.根据权利要求1-7之一的肽的用途，其作为探针用于淀粉状蛋白β原纤维和/或淀粉状蛋白β寡聚体的鉴定、定量测定和/或定性测定。

12.根据权利要求1-7之一的肽的用途，其用于防止淀粉状蛋白β寡聚体和/或淀粉状蛋白β肽聚集体。

13.根据权利要求1-7之一的肽的用途，其用于毒性淀粉状蛋白β寡聚体和/或聚集体的去毒化。

14.根据权利要求13的用途，其特征在于，所述淀粉状蛋白β寡聚体和/或聚集体与根据权利要求1-7之一的肽一起形成无定形、非毒性聚集体。

15.根据权利要求1-7之一的肽在制备用于预防阿尔茨海默病的治疗剂中的用途。

新的由D3衍生的D-对映体肽及其用途

[0001] 本发明涉及新的由D3衍生的D-对映体的A-β-寡聚体-结合肽及其特别是在医药中的用途。

[0002] 由于近几十年来的人口发展，患有因年老而引起的疾病的人数在增加。在此特别提到的是所谓的阿尔茨海默病(AD,阿尔茨海默痴呆,拉丁文＝Morbus Alzheimer)。

[0003] 阿尔茨海默病的特征是淀粉状蛋白β肽(A-β肽)的细胞外沉积。这种A-β肽的沉积以斑块形式典型地被确定在死后的AD患者的大脑中。因此，该疾病的产生和发展归咎于A-β肽的各种形式例如原纤维。另外，数年来小的、可自由扩散的A-β-寡聚体被看作是AD发生和发展的主要起因。

[0004] A-β-单体，作为A-β-寡聚体的基件，在人体中持续产生并且可能是本身无毒性的。可能的是其甚至具有神经保护性功能。取决于它们的浓度，A-β-单体可偶然地聚集在一起。所述浓度取决于它们在身体中形成和降解的速率。随着年龄的增长，在身体中出现升高的A-β-单体浓度，由此单体自发地聚集到一起形成A-β-寡聚体变得越来越可能。如此产生的A-β-寡聚体可类似于朊病毒地增生并最终导致阿尔茨海默病。

[0005] 至今没有针对AD起因的活性成分或药物。目前所使用并被批准的药物缓和在AD情况下出现的症状。但它们却不能够延缓疾病的进展或导致病愈。存在一些物质，在动物实验中显示出预防方面的成功，但没有(非必然地)显示出在AD治疗方面的成功。

[0006] AD的预防和治疗或甚至治愈之间的重要区别在于这样的事实，即预防有可能通过防止第一个A-β-寡聚体的形成就已经实现了。对于预防，一些、少量的对A-β-寡聚体不必具有高亲和性和选择性的A-β-配体是足够的。

[0007] 由许多单体形成A-β-寡聚体是高级数的反应并由此以高次方与A-β-单体浓度关联。因此，活性A-β-单体浓度的小幅降低就已经导致对形成第一个A-β-寡聚体的防止。至今在开发中的更可能是预防性的治疗配方和物质基于该机理。

[0008] 在AD的治疗中却是从完全改变了的境况出发。在此，存在A-β-寡聚体或可能的还甚至更大的多聚物或原纤维，它们通过类似朊病毒的机制增生。然而这种增生却是较低级数的反应并因此几乎不再依赖于A-β-单体浓度。

[0009] 由现有技术已知的物质以不同的方式和方法减少A-β-单体和/或寡聚体的浓度。对此，例如γ-分泌酶-调节剂是已知的，其在动物实验中用于预防。

[0010] 由WO 02/081505已知结合A-β肽的D-氨基酸的各种序列。这些由D-氨基酸构成的序列以4μmol的解离常数(K_D)结合淀粉状蛋白β肽。

[0011] 由WO 2011/147797已知的由氨基吡唑和肽组成的杂交化合物防止A-β-寡聚化。

[0012] 对于在动物实验中显示积极结果的许多物质，在对人的临床研究中不能证实这种效果。在II期和III期临床研究中只允许治疗被明确诊断为AD的人。在此，A-β-单体浓度的微小降低不再足以防止由已经存在的A-β-寡聚体再更多地形成，例如通过类似朊病毒的机制。为了影响疾病进程，A-β-寡聚体的增生或更好地是破坏它们或者使它们变得无害是完全必要的。

[0013] 目前，主要通过神经精神测试检查已经出现痴呆症状的人来诊断AD。然而已知的

是，A-β-寡聚体和随时间推移在疾病进程中随后的原纤维和斑块在出现症状的直至20年前在患者大脑中产生，并可能已经造成不可逆的损伤。然而，在实践中至今还没有可能在症状爆发前诊断AD。

[0014] 因此进一步存在对新化合物(活性物质)的需求，其非常特异地并以高亲和性与A-β-寡聚体结合，并因此防止它们的增生。这种化合物应当不表现有不希望的副作用，特别是不引起免疫反应。此外，所述化合物应当识别毒性A-β-寡聚体并因此还识别低浓度的小的、可自由扩散的寡聚体，完全清除和/或防止它们(朊病毒似的)增生。

[0015] 此外，还存在对新化合物的需求，其作为探针可用于A-β-寡聚体的识别和标记，特别是如果疾病还没有进一步发展且寡聚体仅以微小的量出现。

[0016] 本发明进一步的任务是提供这样的物质，其不仅如同绝大多数现有技术已知的化合物针对细胞外A-β肽，还靶向结合溶解性A-β-寡聚体。此外，所述新化合物应当抑制或防止A-β肽的原纤维形成。

[0017] 此外，任务是提供新的肽，优选D-对映体的D-肽D3(SEQ ID NO:11)的衍生物，其相比于D3具有高效的特性。所述特性尤其是对A-β品种的结合亲和性和结合特异性、A-β原纤维形成的抑制、A-β细胞毒性的抑制、A-β-寡聚体的沉淀、将A-β-原纤维转变为非毒性非淀粉样蛋白形成状态的(amyloidogene)品种。

[0018] 通过包含根据SEQ ID NO:1(D3-Delta-HTH)，SEQ ID NO:2(RD2)，SEQ ID NO:3(RD1)，SEQ ID NO:4(RD3)，SEQ ID NO:5(DB3)，SEQ ID NO:6(NT-D3)，SEQ ID NO:7(DB1)，SEQ ID NO:8(DB2)，SEQ ID NO:9(DB4)和/或SEQ ID NO.10(DB5)的氨基酸序列和/或它们的同源体、片段和部分的肽解决这些任务。还通过SEQ ID NO:1(D3-Delta-HTH)，SEQ ID NO:2(RD2)，SEQ ID NO:3(RD 1)，SEQ ID NO:4(RD3)，SEQ ID NO:5(DB3)，SEQ ID NO:6(NT-D3)，SEQ ID NO:7(DB1)，SEQ ID NO:8(DB2)，SEQ ID NO:9(DB4)和/或SEQ ID NO.10(DB5)和/或其同源体的多聚物解决这些任务。

[0019] 片段和部分如同根据本发明的肽显示相似或一致的效果。

[0020] 在一变化方式中，根据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和/或SEQ ID NO.10的肽及其同源体基本上优选至少60％，75％，80％，特别优选85％，90％，95％，特别是96％，97％，98％，99％，100％由D-氨基酸组成。

[0021] 在本发明意义中的多聚物由2，3，4，5，6，7，8，9，10，11，12，13，14，15，16，17，18，19，20或更多选自下组的单体形成：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和/或SEQ ID NO.10及其同源体，其本身已经是A-β-寡聚体了。根据本发明，多聚物由相同的单体构造或者由2，3，4，5，6，7，8，9或10种不同的、各种上述单体的组合构成，作为所谓的组合多聚物。所述单体也可以是部分相同的。在组合多聚物中相同单体的数目可自由选定。

[0022] 在一备选方式中，所述组合多聚物包含至少一种选自下组的单体：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且至少一种

[0023] 结合A-β-寡聚体的肽，其不同于选自下组的单体：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,优选选自基本上的D-对映体作为其它单体。

[0024] 多聚物可以例如通过化学合成或肽合成来制备。

[0025] 在本发明的一个实施方式中,所述单体彼此共价键连接。在另一个实施方式中,所述单体彼此非共价地结合。

[0026] 在本发明的意义中,单体单元共价键结合或连接是指如果肽头接头、尾接尾或头接头彼此线性连接,而不在之间使用连接子或连接基团。

[0027] 在本发明的意义中非共价连接是指如果所述单体通过生物素和链霉抗生素(特别是链霉抗生素四聚体)彼此连接。

[0028] 在本发明的一个变化方式中,所述单体可以线性地彼此连接,特别是如上所述。在另一个变化方式中,所述单体彼此分支地连接到根据本发明的多聚物上。

[0029] 在分支多聚物的情况下,根据本发明可涉及树状聚物,其中单体共价键地或非共价地彼此连接。

[0030] 备选地,所述单体还可以与平台分子(如PEG或糖)连接并因此形成分支的多聚物。

[0031] 备选地,这些选择的组合也是可能的。

[0032] 单体和多聚物在下文中被描述为根据本发明的肽。

[0033] 在本发明的一个变化方式中,涉及具有根据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和/或SEQ ID NO.10的氨基酸序列和/或它们的具有50%一致性的同源体的肽。

[0034] “同源序列”或“同源体”在本发明的意义中表示,与上述单体的氨基酸序列具有至少50,55,60,65,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99或100%的一致性的氨基酸序列。代替术语“一致性”,在本说明书中术语“同源”或“同源性”同义使用。两个核酸序列或多肽序列之间的一致性借助基于Smith,T.F.和Waterman,M.S(Adv.Appl.Math.2:482-489(1981))的算法的程序BESTFIT在对氨基酸设定的以下参数:间隙产生罚分:8和间隙扩展罚分:2;和对核酸设定的以下参数:间隙产生罚分:50和间隙扩展罚分:3,通过对比进行计算。优选在两个核酸序列或多肽序列之间的一致性通过基于各自序列全长的核酸序列/多肽序列的一致性来定义,如它们借助基于Needleman,S.B.和Wunsch,C.D.(J.Mol.Biol.48:443-453)的算法的程序GAP在对氨基酸设定的以下参数:间隙产生罚分:8和间隙扩展罚分:2;和对核酸设定的以下参数:间隙产生罚分:50和间隙扩展罚分:3,通过对比进行计算。

[0035] 在本发明的意义中,两个氨基酸序列一致,则它们具有相同的氨基酸序列。

[0036] 在一变化方式中,对于同源体的理解是上述单体的相应反-倒位(retro-inversen)序列。根据本发明,术语“反-倒位序列”描述由对映体形式组成的氨基酸(invers:α-碳原子的手性被倒向的)并且另外其中序列顺序相对于原本的氨基酸序列是反向的(retro=逆向)。

[0037] 在另一个变化方式中,根据本发明的肽结合淀粉状蛋白β肽的部分。

[0038] 在另一个变化方式中,根据本发明的肽具有与给定序列直至三个氨基酸不同的序列。

[0039] 此外，作为肽还使用包含上述序列的序列。

[0040] 在另一个变化方式中，所述肽具有上述序列的片段或具有上述序列的同源序列。

[0041] 根据本发明涉及在医药中使用的肽，优选用于治疗阿尔茨海默病。

[0042] 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。

[0043] 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％，60％，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。

[0044] 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，衍生物是按照一个或三个下述方法由D3衍生肽序列实现的：

[0045] a)改变D3中氨基酸单位的顺序和/或个数。在此，仅使用在D3序列中存在的氨基酸。

[0046] b)删除1,2,3,4,5,6,7,8,9,10或11个D3序列的氨基酸。

[0047] c)用其它氨基酸优选D-对映体替换1,2,3,4,5或6个氨基酸。

[0048] 在另一个变化方式中，本发明涉及用于抑制淀粉状蛋白β肽的原纤维形成的肽。根据本发明的多聚物通过结合到A-β-寡聚体或由A-β-寡聚体形成的多聚物以及原纤维上并因此转变为无毒的化合物的方式来使之去毒化。据此，本发明的主题还有用于使A-β-寡聚体、由A-β-寡聚体形成的多聚物或原纤维去毒化的方法。

[0049] 在一实施方式中，本发明的主题还有与其它物质连接的根据本发明的肽。

[0050] 在本发明的意义中，连接涉及如**Römpp** Chemie Lexikon，第9版，第1卷，第650页ff，Georg Thieme Verlag Stuttgart中定义的化学键合，优选涉及主要化合价的键合，特别是共价键合。

[0051] 在一变化方式中，所述物质涉及根据2012年9月实施的药物法(Arzneimittelgesetz)§2或§4(19)定义的药物或活性物质。在一备选实施方式中，活性成分是治疗活性物质，其作为药品有效物质使用。优选使用消炎剂。

[0052] 在另一个的变化方式中，所述物质是增强所述肽的效果的化合物。

[0053] 在一备选方式中，这种化合物是氨基吡唑和/或氨基吡唑衍生物。在本发明的意义中，氨基吡唑衍生物是3-氨基吡唑-5-羧酸或3-氰基吡唑-5-羧酸以及它们的所有其中杂环CH-基团被-CR-或-N-或-O-或-S-替换的衍生物，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。

[0054] 在另一个备选方式中涉及改善所述肽的溶解度和/或血脑屏障的通过的化合物。

[0055] 在一备选方式中，所述肽根据本发明具有上述变化方式、实施方式和/或备选方式的至少两种或更多种特征的每种任意组合。

[0056] 本发明的主题还有用于结合到聚集的A-β肽上的根据本发明的肽。

[0057] 本发明的另一个主题是用于制备本发明的肽的方法，其通过肽合成，例如本领域技术人员已知的，用于具有微小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。

[0058] 本发明还涉及包含根据本发明的肽的组合物，特别是用于治疗阿尔茨海默病。

[0059] 本发明还涉及包含根据本发明的肽的组合物，特别是用于防止毒性A-β-寡聚体，或用于破坏由A-β-寡聚体形成的多聚物或原纤维。

[0060] 根据本发明的“组合物”可以是在基于专业知识制备的配制剂中包含根据本发明的肽的例如疫苗、药物(例如以片剂形式)、注射溶液、食品或食品增补剂。

[0061] 本发明还涉及包含根据本发明的肽的试剂盒。

[0062] 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。此外可包含对其适用的试剂盒说明书。这种试剂盒可例如在具有瓶塞和/或隔膜的注射瓶中包含根据本发明肽。此外,其中可例如还包含一次性针头。

[0063] 本发明的另一个主题是根据本发明的肽作为探针的用途,其用于鉴定和量化和/或量化测定淀粉状蛋白β寡聚体或原纤维。

[0064] 本发明的主题还有包含根据本发明的肽的探针,其用于鉴定和量化和/或量化测定淀粉状蛋白β寡聚体。

[0065] 这种探针是很重要的,因为其使得早期诊断AD变成可能。早期诊断使得可以在很早的阶段就针对该疾病采取措施。

[0066] 这种分子探针包含根据本发明的多聚物和任选地染料、荧光染料、放射性同位素、(PET等)、钆(MRI),以及适用于使该探针成像并可例如静脉注射给患者的可替代的物质。在通过血脑屏障后,所述探针可结合到A-β-寡聚体和/或斑块上。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、量子-MR-光谱等可见。

[0067] 此外,本发明涉及所述肽的用途,其用于防止A-β-寡聚体和/或淀粉状蛋白β肽聚集体和/或淀粉状蛋白β原纤维。

[0068] 根据本发明的肽还用于毒性淀粉状蛋白β寡聚体和/或聚集体的去毒化。所述肽特别是用于结合到淀粉状蛋白β寡聚体和/或聚集体上并因此形成无定形、非毒性聚集体。

[0069] 进一步的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。

[0070] 根据本发明的肽特别有效地结合A-β-寡聚体,特别是结合可溶的A-β-寡聚体。

[0071] 通过针对根据本发明的肽的目标分子的高特异性和/或亲和性导致根据本发明的肽与目标分子特别强的结合。所形成的复合物具有很小的解离常数(KD值)。

[0072] 借助硫黄素T实验可显示根据本发明的肽很有效地抑制A-β肽的原纤维形成,特别是SEQ ID NO:1-5,特别是SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:5。

[0073] 进一步的主题是根据本发明的肽在用于治疗(体外、离体)血液、血液产品和/或器官中的用途,其特征在于,所述血液、血液产品和/或器官从人或动物体取出,并去除其中的A(淀粉样蛋白)-β寡聚体和/或使其去毒化。

实施例

[0074] 1.

[0075] 在表1中实施的D3衍生物由化学合成。

[0076] 表1:不同D3衍生物的列举

[0077]

肽的描述(带有注释)	氨基酸序列(D-对映体)
D3(SEQ ID NO:11)	rprtrlhthrnr
NT-D3(D3-N-末端)(SEQ ID NO:6)	rprtrl

RD1(合理的D3)(SEQ ID NO:3)	pnhhrrrrrttl
RD2(合理的D3)(SEQ ID NO:2)	ptlhthnrrrrr
RD3(合理的D3)(SEQ ID NO:4)	rrptlrhthnrr
D3Δhth(删除hth的D3)(SEQ ID NO:1)	rprtrlrnr

[0078] 在该表中描述的肽对A-β聚集体的效果借助密度梯度离心来研究。在此将分别用肽混合A-β并根据大小分离所产生的颗粒。将待研究的探针加载到离心小管的表面上，其中预置了密度梯度，其在这些实施例中由不同碘克沙醇浓度的层组成。在数小时的分离期间，分子在溶剂中以不同的速度沉淀，并且越大的颗粒越快。在适宜的时间点结束离心，得到在不同层中的探针的各组分，其借助SDS-PAGE进行分析。作为对照使用不加入肽的A-β。示范性地在图1中显示A-β和具有RD2的A-β的跑胶的估值。

[0079] 如在图1中所示，其中在所有A-β级份中检测到A-β探针。这在加入RD2后改变。在此，在级份3-9(A-β寡聚物级份)中检测到较少的A-β寡聚物。在级份10-15中可检测到所产生的大聚集体。在使用的肽浓度为20μM时，D3无效果显示。在较早的研究中提出，较高浓度的D3使A-β-寡聚体沉淀并转变为大的、无定形的且无毒的聚集体(Funke等人，ACS Chem.Neurosci.2010)。用上述方法表征的具有A-β的所有D-对映体肽是FITC标记的。在级份12中可检测的染料量被用于评估各D3衍生物体外结合A-β寡聚体的强度或其沉淀寡聚体的效果。所有肽的结果被示于表2。其显示特别是肽RD2相比D3对A-β-聚集具有明显的效果。

[0080] 表2:各种D3衍生物调节A-β1-42聚集行为的结果汇总

[0081]

肽	在级份12中结合的肽[%]
A-β对照，没有肽	0
D3	4
NT-D3	0
RD1	3
RD2	20
RD3	4
D3Δhth	2

[0082] 2.

[0083] 此外，在ELISA中就所述肽与各种A-β构象异构体(A-β-单体，-寡聚体，-原纤维)的体外结合进行测试。所有的肽均显示对A-β-单体的弱结合，但对寡聚体和原纤维具有相对高的亲和性(图2)。有趣的是，在氨基末端检测不到生物素化的单体，而“无核”单体(无核聚集地制备)与羧基末端的生物素化弱结合。这可以解释成是在氨基末端上集中了D3衍生物的结合表位的暗示。

[0084] 3.

[0085] 一些肽被用在硫黄素T(ThT)聚集测试中。ThT是一种荧光染料，其结合各种淀粉样蛋白的富有β折叠的结构并在440nm的激发下发荧光。可以以这种方式用相对原纤维含量在探针中校准发射。ThT测试被用于测量A-β的原纤维化并特别是在配体的情况下使用，从而检测其对A-β的聚集可能的抑制效果。所述肽以1:10(A-β:肽)的比例使用10μM的A-β溶液。十五小时后，在不加配体的A-β对照中达到饱和相之后，评估D-肽与A-β的共温育液的ThT荧

光并以依赖A-β对照温育液的百分比展示。在此显示，所有被使用的肽明显降低A-β的原纤维形成(图3)。

[0086] 4.

[0087] 此外，鉴定对A-β，特别是A-β寡聚体相比D3具有提高的结合强度的D3变体，且在对它们的聚集具有至少等同的作用的情况下。估计较强的结合具有更有效的治疗效果。

[0088] 在JPT公司(柏林)的膜上固定多于300个D3变体，通过PepSpot分析尝试鉴定更亲和地结合A-β(1-42)寡聚体的变体。D3，具有变化的氨基酸序列的D3变体(所谓的饱和诱变-每个氨基酸经所有19个其它天然存在的氨基酸以其D-对映体形式置换)和对照被羧基末端地固定在Trioxa-膜上。在用5μM A-β(1-42)寡聚体温育5分钟和洗涤步骤后，通过抗A-β抗体(6E10)检测结合的A-β的信号。所述结合信号以信号强度/面积估值。在分析中，将原始D3的信号强度(中值)与衍生物的信号强度对比。所述氨基酸置换导致A-β的较强结合，汇总于表3.

[0089] 表3：第一行展示的是D3的D-氨基酸序列。其下面的行显示导致与A-β-寡聚体结合强度增高的氨基酸置换的类型和位置。

[0090]

R	P	R	T	R	L	H	T	H	R	N	R
		I		T		P		D	Q	Q	
						Q			E	D	
						R					
						S					

[0091] 5.

[0092] 为了证实所述结果并通过表4中所述的氨基酸置换的组合获得对A-β具有更强亲和性的新变体，将其它D3变体耦合到Pepscan公司的Pepchip阵列上并检测它们的A-β结合强度。在变体的选择上，以Pepspot膜估值的已描述的结果为基础。在6个独立的实验中，通过耦合的FITC标记检测结合A-β的D3衍生物。在此使用5μM A-βFITC。检测在Fujifilm公司的FLA8000型微阵扫描仪中进行，用AIDA Array Metrix软件测量结合信号并借助Mathlab Version 7.10.0.449计算。图4显示一个经挑选的Pepchip的结合信号作为示例。

[0093] 五种在Pepchips上固定的肽，在六个实验的至少四个中超过了界限值并由此显示相对于D3明显较高的对A-β的结合亲和性。这些肽序列汇总于表4。其中有具有表3的组合置换的序列。

[0094] 表4：D-肽序列，相比以固定的形式的D3具有较强的A-β-单体结合强度

[0095]

序列	名称
RPITRLHTDRNR(SEQ ID NO:7)	DB1
RPITTLQTHQNR(SEQ ID NO:8)	DB2
RPITRLRTHQNR(SEQ ID NO:5)	DB3
RPRTRLRTHQNR(SEQ ID NO:9)	DB4
RPITRLQTHEQR(SEQ ID NO:10)	DB5

附图说明

[0096] 图1:通过RD2调节A-β1-42的聚集行为,借助碘克沙醇密度梯度进行分析。用100μl的80μMA-β1-42溶液和100μl的80μM A-β与20μM RD2的混合物加叠到碘克沙醇梯度上。随后于4℃以259 000x g离心3小时。直接在离心过程之后手工获取15个级份(级份15是用上载的缓冲液煮沸的片状沉淀物)并通过三麦黄酮(Tris-Tricin)-SDS-PAGE用随即的银染进行分析。如果该过程在相同的条件下用20μM的D3进行,与只用A-β的过程对比没有变化。

[0097] 图2:ELISA用于相对量化所述肽与各种A-β 1-42构象异构体的结合。羧基末端生物素化的A-β的无核单体(亮灰色柱)和寡聚体(深灰色柱)和氨基末端生物素化的A-β-单体的原纤维(黑色柱)各以5μg/ml固定,并且以10μg/ml的浓度施用所述D-肽。两次测定相对量化的所述肽的结合以去除背景吸收后的450nm的吸收显示。

[0098] 图3:A-β 1-42的ThT聚集测试用于量化在各种肽存在下原纤维的相对含量。A-β的浓度为10μM。所述肽以1∶10(A-β:肽)的比例加入。将10μM A-β的荧光设为100%并且其它温育样品的值和标准误差以最大值的百分数给出。没有一种无A-β的肽显示出显著的ThT荧光。

[0099] 图4:PepChip实验结果。在Pepchip上固定不同的D3变体。所述Pepchip用FITC标记的A-β(5μM)温育。FITC荧光强度作为各种D3衍生物的结合强度的标尺读取。对于在11个Chip上的不同位置同样加载D3对照从11个或缺的数值计算中值和标准误差。中值和标准误差被相加并且该结果被定义成为了相比D3明显与A-β更亲和的D3衍生物必须达到的界限值。所显示的是所有超出该界限的肽的结合信号的积分。各个柱是基于三次完全相同的肽斑点的中值。a.u.:任意单位,相对荧光单位。由于所观察到结果差异,整个实验被进行了六次。

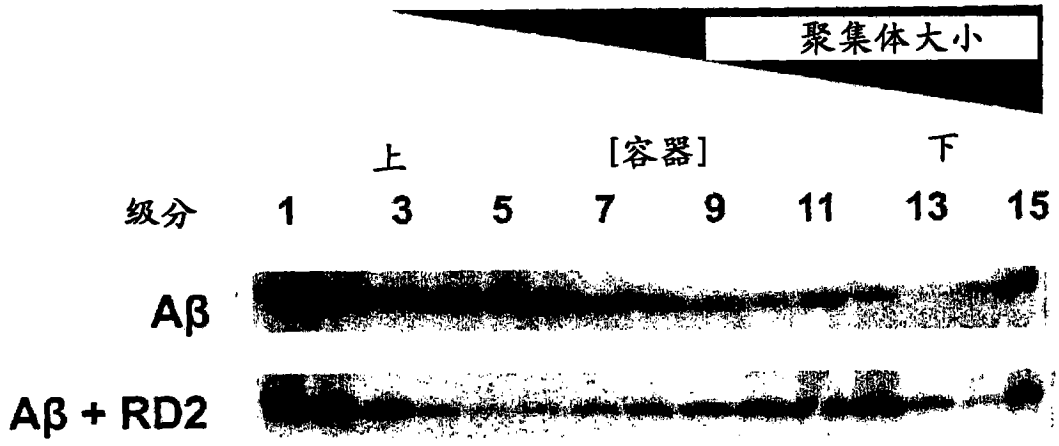

聚集体大小
上
[容器]
下
级分
1
3
5
7
9
11
13
15
Aβ
Aβ + RD2

图1

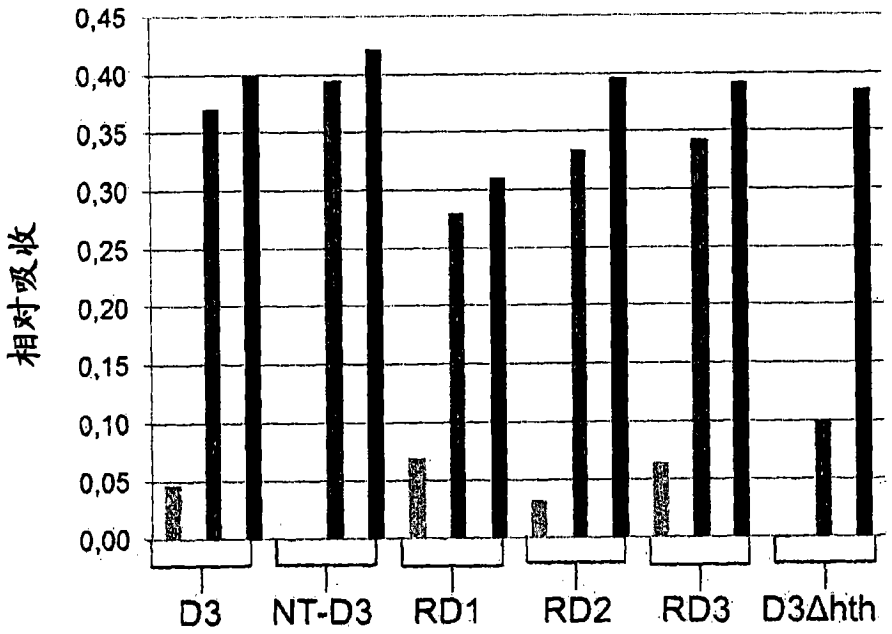

相对吸收
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
D3
NT-D3
RD1
RD2
RD3
D3Δhth

图2

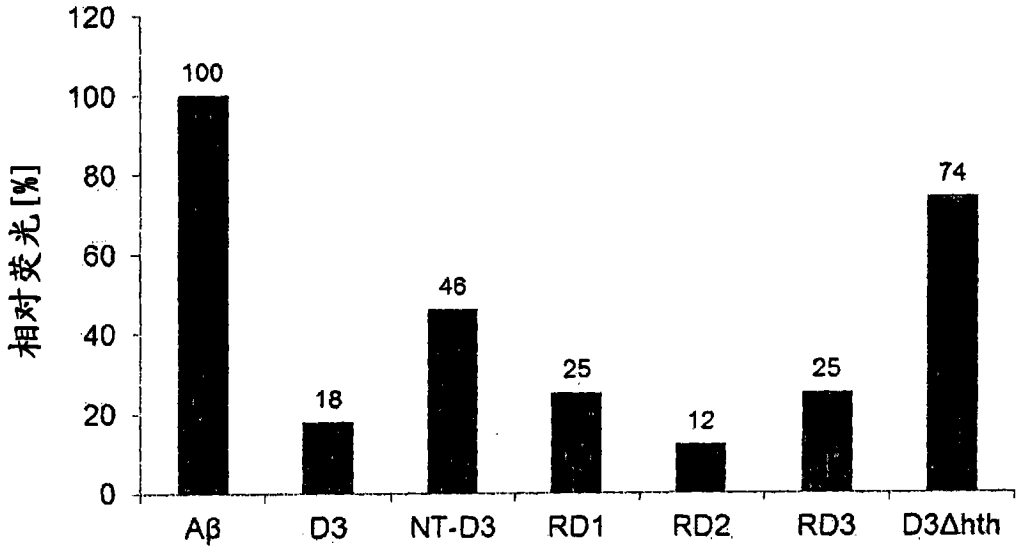

相对荧光[%]
120
100
80
60
40
20
0
100
18
46
25
12
25
74
Aβ
D3
NT-D3
RD1
RD2
RD3
D3Δhth

图3

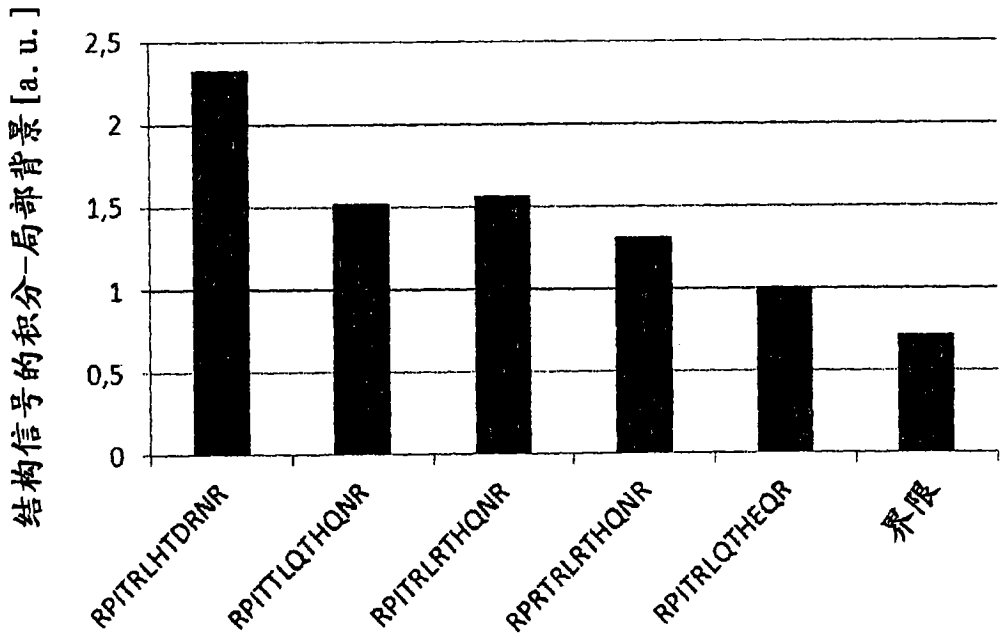

结构信号的积分-局部背景[a.u.]
2,5
2
1,5
1
0,5
0
RPITRLHTDRNR
RPITTLQTHQNR
RPITRLRTHQNR
RPRTRLRTHQNR
RPITRLQTHEQR
界限

图4