



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105745219 B

(45)授权公告日 2020.10.09

(21)申请号 201480053169.1

(22)申请日 2014.09.23

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105745219 A

(43)申请公布日 2016.07.06

(30)优先权数据

102013016002.2 2013.09.26 DE

102014003262.0 2014.03.12 DE

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.03.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/DE2014/000477 2014.09.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/043567 DE 2015.04.02

(73)专利权人 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

(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 林森

(51)Int.Cl.

C07K 7/08(2006.01)

C07K 7/64(2006.01)

C07K 14/00(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

A61K 38/10(2006.01)

A61K 38/16(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

(56)对比文件

US 7384910 B2,2008.06.10

US 7384910 B2,2008.06.10

CN 1437442 A,2003.08.20

WO 02081505 A2,2002.10.17

审查员 冯晓亮

权利要求书1页 说明书16页

序列表4页 附图7页

(54)发明名称

结合 $\beta$ 淀粉状蛋白的肽及其用于治疗 and 诊断阿尔茨海默痴呆症的用途

(57)摘要

本发明涉及结合 $\beta$ 淀粉状蛋白的肽及其用于治疗 and 诊断阿尔茨海默痴呆症的用途。

1. 肽,其由至少一种与β淀粉状蛋白物类结合的氨基酸序列组成,且其中通过修饰除去通常存在于游离C端的羧基的负电荷,从而在那里不存在电荷或出现正电荷,其中在游离C端处存在酸酰胺基团(CONH<sub>2</sub>基团)代替羧基,并且其基本上由D-对映异构体氨基酸组成,

其特征在于,其由与β淀粉状蛋白物类结合的两个单体构成的二聚体组成,并且该二聚体选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7。

2. 根据权利要求1的肽,其用于医药中。

3. 根据权利要求1的肽,其用于治疗阿尔茨海默症。

4. 根据权利要求1的肽,其用于抑制β淀粉状蛋白-肽形成原纤维。

5. 根据权利要求1的肽,其用于与聚集的β淀粉状蛋白-肽结合。

6. 根据权利要求1的肽,其特征在于,其相比于具有相同氨基酸序列且未通过修饰除去通常存在于游离C端的羧基的负电荷的肽而言具有更高的与β淀粉状蛋白物类的结合亲和性。

7. 根据权利要求1的肽,其特征在于,其相比于具有相同氨基酸序列且未通过修饰除去通常存在于游离C端的羧基的负电荷的肽而言,在阻止形成β淀粉状蛋白寡聚物和/或将其去毒化和/或消除时具有更高的有效性。

8. 根据权利要求1的肽,其特征在于,在环化肽的情况下,其相比于可衍生出其的肽而言具有更高的与β淀粉状蛋白物类的结合亲和性和/或在阻止形成β淀粉状蛋白寡聚物和/或将其去毒化和/或消除时更高的有效性。

9. 制备根据权利要求1至8任一项的肽的方法,其特征在于,所述肽通过肽合成制备。

10. 试剂盒,其含有根据权利要求1至8任一项的肽。

11. 用于阻止毒性A-β寡聚物或用于破坏由其形成的聚合物或原纤维的组合物,其含有根据权利要求1至8任一项的肽。

12. 根据权利要求1至8任一项的肽用于制备用于识别、定量和/或定性测定β淀粉状蛋白原纤维、β淀粉状蛋白初原纤维和/或β淀粉状蛋白寡聚物的探针的用途。

13. 根据权利要求1至8任一项的肽用于制备用于阻止形成β淀粉状蛋白原纤维、β淀粉状蛋白初原纤维、β淀粉状蛋白寡聚物和/或β淀粉状蛋白-肽聚集物的药物的用途。

14. 根据权利要求1至8任一项的肽用于制备用于将毒性β淀粉状蛋白原纤维、β淀粉状蛋白初原纤维、β淀粉状蛋白寡聚物和/或-聚集物消除和/或去毒化的药物的用途。

15. 根据权利要求14的用途,

其特征在于,β淀粉状蛋白寡聚物和/或-聚集物与根据权利要求1至8任一项的肽形成无定形的非毒性聚集物。

16. 根据权利要求1至8任一项的肽用于制备作为治疗剂和用于预防阿尔茨海默症的药物的用途。

## 结合 $\beta$ 淀粉状蛋白的肽及其用于治疗 and 诊断阿尔茨海默痴呆症 症的用途

[0001] 本发明涉及结合 $\beta$ 淀粉状蛋白的肽及其用于治疗 and 诊断阿尔茨海默痴呆症的用途。

### 现有技术

[0002] 由公开文献W02013/150127 A2已知结合 $\beta$ 淀粉状蛋白的多价聚物质,其由多个本身已具有结合 $\beta$ 淀粉状蛋白的性能的相互结合的物质构成,以及已知这些物质特别在医药中的用途。

[0003] 基于在未来数十年中的人口统计学发展,遭受由于年龄所致的疾病的人口数量增加。在此,可特别提及所谓的阿尔茨海默疾病(AD,阿尔茨海默痴呆症,拉丁语= Morbus Alzheimer)。

[0004] 迄今不存在对抗AD起因的活性物质或药物。迄今使用和允许的要去缓和在阿尔茨海默痴呆症中出现的某些病症。但是,它们不能够减缓疾病进展或导致治愈。存在某些物质,其在动物试验中在预防方面获得成功,但是并不(一定)在治疗AD方面。对抗神经变性疾病活性物质由DE 10 2006 015 140 A1已知。

[0005] 阿尔茨海默疾病的特征是 $\beta$ 淀粉状蛋白-肽(A- $\beta$ 肽、A $\beta$ 或A $\beta$ 肽)的细胞外沉积物。通常在AD患者的脑中死后发现斑块式A- $\beta$ 肽的沉积。因此各种形式的A- $\beta$ 肽例如原纤维(Fibrillen)导致该疾病的产生和进展。此外,多年来将可自由扩散的小的A- $\beta$ 寡聚物视为AD产生和进展的主要原因。

[0006] 由现有技术已知的物质以各种不同方式减小A- $\beta$ 单体和/或寡聚物的浓度。例如已知 $\gamma$ 分泌酶调谐子,其在动物试验中用于预防。

[0007] 由W0 02/081505 A2 已知结合A- $\beta$ 肽的D-氨基酸的各种序列。D-氨基酸的这些序列以4  $\mu$ M的解离常数( $K_D$ 值)与 $\beta$ 淀粉状蛋白-肽结合。

[0008] 由W0 2011/147797 A2已知由氨基吡唑和肽构成的杂化化合物,其阻止A- $\beta$ 寡聚。

[0009] 与A- $\beta$ 肽相互作用的化合物由DE 10 2008 037 564 A1、DE 696 21 607 T2或DE 10 2010 019 336 A1已知。多价聚合物与两个结合配对物的结合描述在W0 2008/116293 A1中。

[0010] 对于在动物试验中展现出积极结果的多种物质,不能够在人的临床研究中证实这些作用。在阶段II和III的临床研究中,仅能够治疗明确诊断为AD的人。在此,A- $\beta$ 单体浓度的少许减小不再足以阻止由已存在的A- $\beta$ 寡聚物例如通过类似于朊病毒的机理而形成还更多的寡聚物。但是,A- $\beta$ 寡聚物的增多或还更好地破坏它们或使其无害是绝对必需的,以对疾病进程产生影响。

[0011] 迄今主要通过神经心理测试通过对看出痴呆病症的人的实验来诊断阿尔茨海默痴呆症。但是已知A- $\beta$ 寡聚物和时间上此后形成的原纤维和斑块在出现症状之前最多20年就在患者脑中产生并可能已造成不可逆损伤。然而,迄今还不存在在病症爆发之前确诊阿尔茨海默痴呆症的可能方式。

[0012] 因此,此外存在对非常特异性和以高亲和性与A- $\beta$ 寡聚物结合并因此阻止其增多的新型化合物(活性物质)的需求。这些化合物不应显示具有不希望的副作用的效果,特别是不引起免疫反应。这些化合物此外应识别毒性A- $\beta$ 寡聚物,并因此还识别甚至小浓度的可自由扩散的小的寡聚物,将其完全消灭和/或阻止其(类似于朊病毒的)增多。

[0013] 此外,还存在对可用作识别和标记A- $\beta$ 寡聚物的探针的新型化合物的需求,特别是当这些寡聚物仅以小浓度出现时。

[0014] 发明目的

[0015] 本发明的目的因此是提供用于以下用途的化合物:

[0016] A) 通过这些化合物阻止形成毒性A- $\beta$ 寡聚物、原纤维或聚集物或消除已存在的寡聚物、原纤维或聚集物或将其去毒化,对阿尔茨海默症进行病因治疗,

[0017] B) 通过可将这些化合物用作体内成像的探针,能够诊断阿尔茨海默痴呆症。

[0018] 对此,包括其它目的,如这些化合物在医药中的用途。

[0019] 本发明的目的此外是提供新型肽,优选D-对映异构体的D肽D3的衍生物,其相比于D3具有更有效的性能。所述性能尤其包括更高的对于A- $\beta$ 物类的结合亲和性和结合特异性、A- $\beta$ 原纤维形成的抑制、A- $\beta$ 细胞毒性的抑制、A- $\beta$ 寡聚物、原纤维和其它聚集物的消除或去毒化、A- $\beta$ 淀粉状蛋白-原纤维、-初原纤维(Protofibrillen)或-寡聚物至非毒性的非淀粉状蛋白物类的转化。

[0020] 在下文中,术语“A- $\beta$ ”、“Beta淀粉状蛋白”、“ $\beta$ 淀粉状蛋白”和“A $\beta$ ”相互同义使用。

[0021] 目的的实现方式

[0022] 所述目的通过根据主要权利要求的肽、试剂盒和组合物以及根据次要权利要求的方法和用途实现。对此的有利的实施方案分别显现在基于其的权利要求中。

[0023] 发明描述

[0024] 本发明的肽是含有至少一种氨基酸序列的肽,该氨基酸序列与 $\beta$ 淀粉状蛋白物类结合,且所述性能保持或增强,且其中的游离C端,即C端的羧基是修饰的,以使该C端不带有负电荷,而替代地是中性的或具有一个或多个正电荷。

[0025] 本发明的肽还包括这样的肽,其包含至少一种与 $\beta$ 淀粉状蛋白物类结合的肽,其中该肽具有使其能够与A- $\beta$ 结合的线性氨基酸序列,并且通过使该肽经由其两个末端的共价键合以环化形式存在,所述性能保持或增强。

[0026] 通过本发明的肽,特别有利地还实现提供在C端不含负电荷的肽的目的。由此有利地导致,其可以以相比于在游离C端具有羧基的肽而言更高的亲和性与目标分子结合。具有未修饰的游离羧基的肽在生理学状态下在其末端具有负电荷。

[0027] 在本发明的一个实施方案中,本发明的肽在生理学状态下,特别在pH 6-8,特别是6.5-7.5,特别在pH 6.0、pH 6.1、pH 6.2、pH 6.3、pH 6.4、pH 6.5、pH 6.6、pH 6.7、pH 6.8、pH 6.9、pH 7.0、pH 7.1、pH 7.2、pH 7.3、pH 7.4、pH 7.5、pH 7.6、pH 7.7、pH 7.8、pH 7.9或pH 8.0下是如此修饰的,以使C端不带有负电荷,而替代地是中性的或具有一个或多个正电荷。

[0028] 在本发明的一个实施方案中,所述肽的特征在于,在有利C端存在酸酰胺基团代替羧基。代替羧基(-COOH-基团),在C端设有酸酰胺基团(-CONH<sub>2</sub>-基团)。

[0029] 因此,该肽特别有利地在游离C端是酰胺化的。

[0030] 由此,特别有利地实现另一目的,即存在不含过量负电荷的肽,其可更亲和性地与目标分子结合并能以简单的方式获得。

[0031] 在本发明的另一个实施方案中,存在下列其它基团代替羧基:COH、COC1、C0Br、CONH-烷基-残基、CONH-烷基-胺-残基(正净电荷)等,其中只要遵循主要权利要求的技术教导,则不局限于此。

[0032] 该目的特别地通过含有根据如下的氨基酸序列的肽实现:SEQ ID NO:1 (RD2)、SEQ ID NO:2 (D3)、SEQ ID NO:3 (DB3)、SEQ ID NO:9 (D3r)、SEQ ID NO:10 (D3p)、SEQ ID NO:11 (D3a)和/或SEQ ID NO:12 (D3p2k)和/或其同源物、片段和部分。这些肽是与β淀粉粉状蛋白物类结合的物质单元(以下通常称为“单体”)。

[0033] 在本发明的一个变型中,使用以最高500 μM,优选250、100、50 μM,特别优选25、10、6 μM,特别是4、2、1 μM或亚-μM的解离常数( $K_D$ 值)与A-β单体和/或A-β寡聚物和/或A-β肽的原纤维结合的这类单体。

[0034] 该目的特别地还通过由上述单体中两个或更多个或本发明的肽构成的聚合物,特别是以下序列的二聚体:SEQ ID NO:4 (RD2D3)、SEQ ID NO:5 (D3RD2)、SEQ ID NO:6 (D3D3)、SEQ ID NO:7 (RD2RD2)和/或SEQ ID NO:8 (DB3DB3)和/或其同源物。这些二聚体由两个分别与β淀粉粉状蛋白物类结合的单体单元构成。

[0035] 根据本发明由本身与A-β寡聚物结合的单体构成的聚合物展现出在其对于A-β寡聚物的选择性和亲和性方面相比于这些单体而言的明显的协同效果。换句话说:本发明的聚合物,特别是选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和/或SEQ ID NO:8的二聚体超越构成它们的单体。在本发明中的协同效果是展现出相比于单个单体单元而言对于相关A-β物类,特别是在涉及与A-β物类结合的 $K_D$ 值方面的更高的选择性和/或亲和性的效果。

[0036] 在本发明的另一个特别有利的实施方案中,所述聚合物,特别是二聚体在动物模型试验(体外和/或体内)中相比于单体而言有利地起更有效的作用。

[0037] 在本发明的一个变型中,使用以最高500 μM,优选250、100、50 μM,特别优选25、10、1 μM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(其中可取各个中间值)的解离常数( $K_D$ 值)与A-β单体和/或A-β寡聚物和/或A-β肽的原纤维结合的这类聚合物。

[0038] 在本发明的一个实施方案中,所述亲和性通过解离常数( $K_D$ 值)定义。

[0039] 在本发明的一个有利的实施方案中,本发明的肽的解离常数( $K_D$ 值)在此相比于其中游离C端,即C端羧基具有负电荷的结合性的线性肽而言有利地减低。与此相关的是本发明肽的改进的性能,如更高的结合亲和性和在降解和/或阻止形成毒性β淀粉粉状蛋白物类方面的更高的有效性。但是特别地,这不仅仅涉及在所述A-β(单体、寡聚物和原纤维)的高亲和位点的较低 $K_D$ 值。

[0040] 片段和部分有利地表现出与本发明的肽类似或相同的效果。

[0041] 在本发明的一个变型中,本发明的肽,特别是根据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、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和/或SEQ ID NO:12的肽及其同源物、片段或部分,基本上,优选至少50%、60%、75%、80%,特别优选85%、90%、95%,特别是96%、97%、98%、99%、100%由D-

对映异构体氨基酸构成。

[0042] 在本发明中的聚合物由2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个本身与β淀粉状蛋白物类,特别是与寡聚物结合的单体形成。

[0043] 该聚合物特别由选自如下的单体形成:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和/或SEQ ID NO:12。

[0044] 该聚合物可以在本发明的一个实施方案中选自SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和/或SEQ ID NO:8及其本身已与β淀粉状蛋白物类结合的同源物。

[0045] 根据SEQ ID NO:1-12的肽在本发明的一个实施方案中由D-对映异构体氨基酸构成。

[0046] 根据SEQ ID NO:1-12的肽在本发明的一个实施方案中在游离C端具有酸酰胺基团。单体,例如根据SEQ ID NO:1-3的D3、DB3或RD2,或根据SEQ ID NO:9-12的D3r、Drp、D3a或D3 (p2k) 则在位置12上在游离C端是酰胺化的。聚合物,例如RD2D3、D3RD2、D3D3、RD2RD2或DB3DB3在位置24上在游离C端是酰胺化的。

[0047] 根据SEQ ID NO:1-12的肽在本发明的另一个实施方案中在游离C端与游离N端彼此共价键合,并相应地环化存在。通过闭环也有利地导致不再存在游离C端的羧基。

[0048] 本发明的肽有利地具有氨基酸序列,其中线性分子例如通过缩合反应例如通过第一与最后氨基酸的共价键合而环化。当然,存在其它环化可能方式,例如通过其它氨基酸相互键合。仅示例性地提及第二氨基酸与最后氨基酸的键合。每种可能的键合同样可设想。

[0049] 在所述肽的第一和最后氨基酸相互键合的情况下,有利地导致在肽链(氨基酸序列)中不存在开放末端。

[0050] 该措施此外导致,具有线性氨基酸序列且其在环化之后得到不再可区分的相同氨基酸次序的所有肽就此相同。

[0051] 实例:已知肽D3的线性氨基酸序列是rprtrlhthrnrr。通过N端氨基和C端羧基之间的酰胺键键合的相应的环化肽“cD3”不再能与环状肽prtrlhthrnrr、rtrlhthrnrrp、trlhthrnrrpr、rlhthrnrrprt、lhthrnrrprtr、hthrnrrprtrtl、thrnrrprtrlh、hrnrrprtrlht、rnrrprtrlhth、nrrprtrlhthr或rrprtrlhthrn区分。此外还可以由这些序列的每个衍生出cD3。

[0052] 相比于一种,优选甚至每种结合性的线性肽(其可衍生出环化或另外修饰的本发明肽)而言,此外出现根据本发明所要保护的更高亲和性和有效性的效果。

[0053] 环化肽的制备此外是现有技术,并可以例如根据如DE 102005049537 A1中所述的方法来进行。

[0054] 通过肽的第一和最后氨基酸的环化有利地导致,不再存在肽链的“开放”末端,其通常是细胞、动物或人中例如经由氨肽酶和羧肽酶的肽降解活性的攻击点。

[0055] 借助本发明的环化单体例如cD3、cRD2等或环化聚合物例如cRD2D3、cD3D3、cDB3DB3等,此外有利地导致这些本发明的环化肽具有副作用,即在某些情况下也不易降解,虽然该作用不是决定性的。此外如已表明,这仅适用于线性肽的相应两个末端相互键合的头尾或尾头环化的情况。

[0056] 在本发明的另一个实施方案中,所述聚合物由相同单体,例如D3、RD2或DB3构成,或由上述单体中2、3、4、5、6、7、8、9、10个各种不同单体的组合构成产生所谓的组合聚合物。

这些单体还可以部分相同。在所述组合聚合物中的相同单体的数目可自由选择。

[0057] 聚合物可以例如通过化学合成或肽合成制备。

[0058] 在本发明的一个实施方案中,所述单体彼此共价键合。在另一个实施方案中,这些单体彼此非共价键合。

[0059] 如果肽通过或不通过其之间添加的连接物或连接物基团并头头、尾尾或头头彼此线性键合,在本发明的意义上存在单体单元的共价结合或键合。

[0060] 如果单体例如通过生物素和链霉亲和素,特别是链霉亲和素四聚体彼此键合,在本发明的意义上存在非共价的键合。

[0061] 在本发明的一个变型中,单体可以彼此线性键合,特别是如上所述那样。在另一个变型中,单体彼此支化地键合成为本发明的聚合物。

[0062] 根据本发明,支化的聚合物可以是树状大分子,其中单体彼此共价或非共价键合。

[0063] 替代地,单体还可以与平台分子(例如PEG或糖)键合,并因此形成支化的聚合物。

[0064] 替代地,这些选项的组合也可行。

[0065] 以下将单体和聚合物称为本发明的肽。

[0066] 在本发明的一个变型中,指的是具有根据如下的氨基酸序列的肽: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、SEQ ID NO:11和/或SEQ ID NO:12和/或其具有50%同一性的同源物。

[0067] “同源序列”或者“同源物”在本发明中表示,氨基酸序列与所述单体的上述氨基酸序列之一具有至少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、100 %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”或者“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程序的比较来计算,其中通过设定以下氨基酸参数:空位产生罚分:8和空位扩展罚分:2;和以下核酸参数:空位产生罚分:50和空位扩展罚分:3。优选地,两个核酸序列或多肽序列之间的同一性通过各自情况下整个序列长度上的核酸序列/多肽序列的同一性来定义,如通过借助基于Needleman, S.B.和Wunsch, C.D.(J. Mol.Biol.48:443-453)的算法的GAP程序的比较来计算,其中通过设定以下氨基酸参数:空位产生罚分:8和空位扩展罚分:2;和以下核酸参数:空位产生罚分:50和空位扩展罚分:3。

[0068] 两个氨基酸序列当它们具有相同的氨基酸序列时,在本发明中则是相同的。

[0069] 在一个变型中,同源物理解为上述单体的相应的逆反序列。术语“逆反序列”根据本发明表示这样的氨基酸序列,其由对映异构体形式的氨基酸组成(反: $\alpha$ -C原子的手性相反)且其中原始氨基酸序列的序列次序还是相反的(逆=向后)。

[0070] 在另一个变型中,本发明的肽与 $\beta$ 淀粉状蛋白-肽的部分结合。

[0071] 在另一个变型中,本发明的肽具有与所示序列相差最多三个氨基酸的序列。

[0072] 此外,还使用含有上述序列的序列作为肽。

[0073] 在另一个变型中,所述肽具有上述序列的片段,或具有与上述序列同源的序列。

[0074] 根据本发明,指的是用于医药中,特别用于治疗阿尔茨海默症的肽。

[0075] 在本发明的一个实施方案中,所述肽基本上由D-氨基酸构成。

[0076] 在本发明中,术语“基本上由D-对映异构体氨基酸构成”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%、100%由D-对映异构体氨基酸构成。

[0077] 在本发明的一个实施方案中,本发明的单体肽是D-对映异构体的D-肽D3的衍生物。在本发明中的衍生物是衍生自D3的肽序列,其根据下列方法之一获得:

[0078] a) 改变D3中氨基酸基础单元的次序和/或数目。在此仅使用存在于D3序列中的氨基酸。

[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-对映异构体替换1、2、3、4、5或6个氨基酸。

[0081] 在另一个实施方案中,指的是用于抑制 $\beta$ 淀粉状蛋白寡聚物形成原纤维的本发明的肽。本发明的肽通过结合A- $\beta$ 寡聚物或由其形成的聚合物以及原纤维并因此转变为非毒性化合物,将其去毒化。因此,本发明的主题还是用于将A- $\beta$ 寡聚物、由其形成的聚合物或原纤维去毒化的方法。

[0082] 在一个实施方案中,本发明的主题还是与另一物质键合的本发明的肽。

[0083] 在本发明中,键合是化学键合,如Römpf Chemie Lexikon, 第9版, 第1卷, 第650页及以下页, Georg Thieme Verlag Stuttgart中所定义,优选是主价键合,特别是共价键合。

[0084] 在一个变型中,所述物质是药剂或活性物质,其根据药剂法规§2或§4 (19), 2012年9月定义。在一个可选方案中,活性物质是治疗活性物质,其用作药用有效物质。优选地使用消炎剂。

[0085] 在另一个变型中,所述物质是增强肽的作用的化合物。

[0086] 在一个可选方案中,此类化合物是氨基吡唑和/或氨基吡唑衍生物。本发明中的氨基吡唑衍生物是3-氨基吡唑-5-甲酸或3-硝基吡唑-5-甲酸以及其中将杂环的CH-基团替换为-CR-或-N-或-O-或-S-的所有衍生物,以及所有由其衍生出的肽类二聚体、三聚体或四聚体,优选氨基吡唑三聚体。

[0087] 在另一个可选方案中,指的是改进所述肽的溶解度和/或改进穿过血脑障壁的化合物。

[0088] 在一个可选方案中,所述肽根据本发明具有上述变型、实施方案和/或可选方案中至少两个或更多个特征的各种任意组合。

[0089] 在本发明中此外认识到,相比于其中游离C端,即C端羧基不经修饰且相应带有负电荷的结合性的线性肽而言,根据本发明修饰的肽以更高亲和性与AB物类结合,更确切地说还尤其与特别毒性的 $\beta$ 淀粉状蛋白寡聚物结合。也就是说,相比于其中游离C端,即C端羧基不经修饰且相应带有负电荷的线性肽的情况而言,在本发明的肽的情况下 $K_D$ 值更低。

[0090] 因此在本发明的另一个优选的实施方案中,在C端不含负电荷的根据本发明修饰的肽的结合亲和性相比于在C端具有负电荷但另外具有相同氨基酸序列的线性肽而言提高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%或甚至最多100000%或1000000%,其中可取各个中间值。但是特别地,这不仅仅涉及在所述A- $\beta$ (单体、寡聚物、原纤维等)的高亲和位点的提高的亲合性。

[0091] 这通过相应降低的 $K_D$ 值表现。作为根据本发明修饰的肽与 $\beta$ 淀粉状蛋白物类和特别与 $\beta$ 淀粉状蛋白寡聚物的结合亲和性的量度的 $K_D$ 值相比于在游离C端具有负电荷的结合性的线性肽而言降低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%,其中可取各个中间值。

[0092] 但是,这些更低的 $K_D$ 值有利地特别是不仅仅涉及A- $\beta$ 物类(单体、寡聚物、原纤维等)的高亲和位点。

[0093] 根据本发明修饰的肽因此可以相比于在游离C端具有负电荷的结合性的线性肽而言更有效地,特别是相比于其具有相同氨基酸序列的线性肽对等物而言还更有效地用作诊断目的的探针。

[0094] 但是特别地,它们还可以相比于在游离C端具有负电荷的结合性的线性肽而言更有效地,特别是相比于其具有相同氨基酸序列的线性肽对等物而言还更有效地用作治疗剂。

[0095] 在根据本发明修饰的肽与在C端具有负电荷的肽的直接比较中,本发明的肽在亲和性和有效性方面获得更好效果。

[0096] 在本发明中,因此还认识到,根据本发明修饰的肽相比于在游离C端具有负电荷的肽,但是特别是相比于其具有相同氨基酸序列的肽对等物而言还额外地导致以更高的有效性或效率阻止形成特别毒性的 $\beta$ 淀粉状蛋白寡聚物或将其破坏和/或去毒化。该有效性特别地提高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100%。

[0097] 对此,将具有各种A $\beta$ -构象异构体(Konformer)的样品测试性地在最简单的情况中

例如分级(fraktioniert)。在每种级分中,根据分级步骤使各种构象异构体如单体、寡聚物、原纤维或更高级的聚集物富集,然后可以精确测定。

[0098] 术语“精确测定”包括在分级时通过已知类型和性质的分子进行校准步骤。在分级之后,在每种级分中仅存在特定类型的A $\beta$ 构象异构体,例如单体、寡聚物或原纤维等。

[0099] 例如,这些构象异构体在作为分级步骤的密度梯度离心时根据其s值或沉降系数分离。不同大小的分子可以具有相同的流体动力学半径,但仍具有不同的s值并据此分离。通过用已知s值的分子进行校准,将借助密度梯度离心所获的A $\beta$ 构象异构体根据其s值精确测定。

[0100] 此外,使用或不用活性物质处理所获级分并例如通过RP-HPLC测定。以此方式能够测定所述活性物质的有效性。

[0101] 以下介绍另一种方法。为了定量分析活性物质,可以使用所谓的QIAD测试(A $\beta$  聚集物尺寸分布干涉的定量测定)。样品中的活性物质对淀粉状肽和/或蛋白的颗粒尺寸分布的影响的定量分析方法在此具有以下步骤。首先使A- $\beta$ 在受控条件下聚集,以产生各种不同的A- $\beta$ 聚集物。这样选择该条件,以形成特别多的特别细胞毒性的小的A- $\beta$ 寡聚物。然后,将待检验的物质例如本发明环化肽之一加入到样品中。该活性物质改变样品中的颗粒尺寸分布。定量确定该变化。该变化是减少或甚至完全消除特定颗粒尺寸的特定毒性物类的量度。通过QIAD法测量特定颗粒尺寸的A- $\beta$ 聚集物的增加或减少。虽然某些具有特定尺寸的A- $\beta$ 聚集物一开始就存在于样品中,它们在活性物质的影响下减少或甚至完全消除。其它颗粒尺寸在活性物质的影响下增加或保持恒定。由A- $\beta$ 形成的颗粒优选根据其流体动力学颗粒半径彼此分离。以此方式有利地导致从样品中获得多个级分。具有特定聚集物尺寸的淀粉状肽和/或蛋白的颗粒富集在这些级分中。颗粒分离可以通过密度梯度离心进行。这些级分例如通过吸移在空间上彼此分离。随后,在各个级分中的A- $\beta$ 浓度通过A- $\beta$ 物类的完全变性在紧随所述分级之后进行的反相(RP-)HPLC过程中测定。聚集物变性可以例如用30%乙腈和0.1%三氟乙酸在80℃的柱温度下完全地进行,并在C8柱上根据疏水性分离。洗脱的A- $\beta$ 借助UV吸收在215 nm下检测。峰面积可以通过Agilent Chemstation软件进行积分。由此产生的数值用之前实施的校准进行计算,由此可以计算存在于各个级分中的A- $\beta$ 的浓度。对每个级分可以计算来自多个例如六个彼此独立进行的实验的平均值与所得的标准偏差。HPLC分析的优点在于,能够不依赖于聚集物状态和溶剂而非常敏感地检测(例如大约20 nM或1.8 ng A $\beta$ 1-42)并可可靠定量。该方法的决定性优点是密度梯度离心和反向HPLC的联用,其还实现A $\beta$ 寡聚物的可靠定量。

[0102]  $\beta$ 淀粉状蛋白物类和特别是 $\beta$ 淀粉状蛋白寡聚物的提高的消除(或形成)有效性的本发明效果可以用该方法实现,但不仅是用该方法。

[0103] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,所述提高的亲和性和消除、去毒化(或形成)有效性的效果甚至出现在体外和/或体内。

[0104] 本发明的主题还是用于与聚集的A- $\beta$ 肽结合的本发明的肽。

[0105] 本发明的另一主题是通过例如本领域技术人员已知的肽合成、用于具有小分子量的任意化合物的有机合成法和/或诱变和重组制备来制备本发明的肽的方法。

[0106] 本发明还涉及含有本发明的肽的组合物,其特别用于治疗阿尔茨海默症。

[0107] 本发明的主题还是含有本发明的肽的组合物,其特别用于阻止毒性A- $\beta$ 寡聚物或

用于破坏由其形成的聚合物或原纤维。

[0108] 本发明的“组合物”可以例如是疫苗、药物(例如以片剂形式)、注射溶液、食品或食品添加剂,其在可基于专业知识制备的制剂中含有本发明的肽。

[0109] 本发明此外还涉及含有本发明的肽的试剂盒。

[0110] 在此类试剂盒中,本发明的肽可以在容器中任选与缓冲剂或溶剂一起包装或包装在其中。该试剂盒的所有组分可以在相同容器中或分别分开包装。此外,该试剂盒可以含有其使用说明。此类试剂盒例如可以在具有塞子和/或隔膜的注射瓶中包含本发明的。此外,其中还例如含有一次性注射器。

[0111] 本发明的另一主题是本发明的肽作为用于识别、定性和/或定量测定 $\beta$ 淀粉状蛋白寡聚物或原纤维的探针。

[0112] 本发明的主题还是含有本发明的肽的探针,其用于识别、定性和/或定量测定 $\beta$ 淀粉状蛋白寡聚物。

[0113] 此类探针特别重要,因为由此使早期诊断AD成为可能。通过早期诊断,可以在非常早的阶段就对抗该疾病。

[0114] 此类分子探针含有本发明的聚合物和任选的染料、荧光染料、放射性同位素、(PET等)、钆(MRI)以及适用于探针成像的替代性物质,并可对患者例如静脉内注射。在穿过血脑障壁之后,该探针可以与A- $\beta$ 寡聚物和/或斑块结合。如此标记的A- $\beta$ 寡聚物和/或斑块可借助成像法例如SPECT、PET、CT、MRT、质子-MR-波谱等可见。

[0115] 此外,本发明还涉及所述肽用于阻止 $\beta$ 淀粉状蛋白寡聚物和/或 $\beta$ 淀粉状蛋白-肽聚集物和/或 $\beta$ 淀粉状蛋白原纤维的用途。

[0116] 本发明的肽还用于将毒性 $\beta$ 淀粉状蛋白寡聚物和/或聚集物去毒化。特别地使用其,以与 $\beta$ 淀粉状蛋白寡聚物和/或聚集物结合并因此形成无定形的非毒性聚集物。

[0117] 已认识到,当已存在A- $\beta$ 时,治疗目标必须是将其通过具有尽可能最高的与A- $\beta$ 的亲亲和性的物质来解决。实际上,该亲和性可能完全不够大,本发明的肽的相应的解离常数则位于亚 $\mu$ M范围,还更好pM范围中或还更低。

[0118] 在本发明中已认识到,不断地在人体中产生A- $\beta$ 单体作为A- $\beta$ 寡聚物的基础单元,且其本身推测为非毒性。甚至存在这样的可能性,即单体具有积极作用。A- $\beta$ 单体可以根据其浓度随机集合到一起。该浓度取决于其在体内的形成和降解速率。如果随着年龄增大,体内的A- $\beta$ 单体浓度提高,单体越来越可能自发集合到一起形成A- $\beta$ 寡聚物。如此产生的A- $\beta$ 寡聚物可以与朊病毒类似地增多并最终导致阿尔茨海默症疾病。

[0119] 此外认识到,AD的预防和治疗或甚至治愈之间的重要区别事实上在于,预防可能可以通过阻止形成最初的A- $\beta$ 寡聚物就已实现。对此,对于A- $\beta$ 寡聚物而言少许亲和性和选择性的少量的某些A- $\beta$ 配体是足够的。

[0120] 由多个单体形成A- $\beta$ 寡聚物是高阶的反应并因此极高度地依赖于A- $\beta$ 单体的浓度。因此,活性A- $\beta$ 单体浓度的少许降低就导致阻止形成最初的A- $\beta$ 寡聚物。迄今处于研发中的确切来说预防性的治疗概念和物质大抵基于该机理。

[0121] 但是在治疗AD时,以完全改变的情况为出发点。在此,存在A- $\beta$ 寡聚物或可能甚至已更大的聚合物或原纤维,其通过类似于朊病毒的机理增多。但是,该增多是低阶的反应并几乎不再依赖于A- $\beta$ 单体浓度。

[0122] 因此如果已产生A- $\beta$ 寡聚物,治疗目标必须是将其通过具有尽可能最高的与A- $\beta$ 寡聚物的亲和性和/或特别有效地消除它们和/或特别有效地阻止其形成或将其去毒化的物质来解决。相应的解离常数对此必须位于亚- $\mu$ M、nM或pM范围中或甚至更低。

[0123] 通过提供本发明的肽来满足在阿尔茨海默痴呆症的诊断(探针)和治疗方面的要求。本发明的肽在诊断和/或治疗时以相应低的解离常数结合 $\beta$ 淀粉状蛋白物类和尤其A- $\beta$ 寡聚物。相应地,本发明的另一主题是本发明的肽作为阿尔茨海默症的治疗剂的用途。

[0124] 本发明的肽特别好地与A- $\beta$ 寡聚物,特别是与可溶性A- $\beta$ 寡聚物结合。

[0125] 由本发明的肽对于目标分子的高的特异性和/或亲和性导致本发明的肽与目标分子的特别强的结合。形成的复合体因此具有小的解离常数(KD值)。

[0126] 借助硫磺素T测试可以证实,本发明的肽,特别是具有如下序列的肽非常有效地抑制A- $\beta$ 肽形成原纤维:SEQ ID NO:1-12,特别是SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和/或SEQ ID NO:8。

[0127] 本发明的另一主题是本发明的肽在用于处理(体外、离体)血、血产品和/或器官的方法中的用途,其特征在于,该血、血产品和/或器官取自人体或动物体,且除去 $\beta$ -A(淀粉状蛋白)寡聚物和/或将其去毒化。

## 实施例

[0128] 以下借助实施例和所附附图进一步阐述本发明,而不应由此限制本发明。

[0129] 图1展示了物体识别测试

[0130] 图2展示了转棒

[0131] 图3展示了SHIRPA

[0132] 图4展示了Morris水迷宫

[0133] 图5展示了物体识别

[0134] 图6展示了对于 $\beta$ 淀粉状蛋白单体的KD值(动力学)

[0135] 图7展示了对于 $\beta$ 淀粉状蛋白寡聚物的KD值(动力学)

[0136] 图8展示了对于 $\beta$ 淀粉状蛋白原纤维的KD值(动力学)。

[0137] 为了定量分析活性物质,使用QIAD测试(A $\beta$  聚集物尺寸分布干涉的定量测定)。样品中的活性物质对淀粉状蛋白-肽和/或蛋白的颗粒尺寸分布的影响的定量分析方法在此具有以下步骤:首先使A- $\beta$ 在受控条件下聚集,以产生各种不同的A- $\beta$ 聚集物。对于在表1中汇总的结果,如此选择条件以使形成特别多的小的特别细胞毒性的A- $\beta$ 寡聚物。然后,将待分析的物质,例如上述D对映异构体肽的之一加入到样品中。活性物质改变样品中的颗粒尺寸分布。定量确定该变化。该变化是特定颗粒尺寸的特定毒性物类的减少或甚至完全消除的量度。因此,通过QIAD法测量特定颗粒尺寸的A- $\beta$ 聚集物的增加或减少。虽然某些具有特定尺寸的A- $\beta$ 聚集物一开始就存在于样品中,它们在活性物质的影响下减少或甚至完全消除。其它颗粒尺寸在活性物质的影响下增加或保持恒定。由A- $\beta$ 形成的颗粒优选根据其流体动力学颗粒半径彼此分离。以此方式有利地导致从样品中获得多个级分。在这些级分中,具有特定聚集物尺寸的淀粉状蛋白-肽和/或蛋白的颗粒富集。颗粒分离可以通过密度梯度离心进行。这些级分例如通过吸移在空间上彼此分离。随后,在各个级分中的A- $\beta$  浓度通过A- $\beta$ 物类的完全变性在紧随所述分级之后进行的反相(RP-)HPLC过程中测定。聚集物变性可以

例如用30 %乙腈和0.1 %三氟乙酸在80℃的柱温度下完全地进行,并在C8柱上根据疏水性分离。洗脱的A-β借助UV吸收在215 nm下检测。峰面积积分可以通过Agilent Chemstation软件进行。由此产生的数值用之前实施的校准进行计算,由此可以计算存在于各个级分中的A-β的浓度。对每个级分应计算来自多个例如六个彼此独立进行的实验的平均值与所得的标准偏差。HPLC分析的优点在于,能够不依赖于聚集物状态和溶剂而非常敏感地检测(例如大约20 nM或1.8 ng Aβ1-42)并可可靠定量。该方法的决定性优点是密度梯度离心和反向HPLC的联用,其还实现Aβ寡聚物的可靠定量。

[0138] 结果汇总在表1中。它们表明,所述物质特别有效地消除寡聚物。

[0139] 表1:

[0140]	物质/肽	QIAD:寡聚物的减少,以%为单位
1	D3, 酰胺化	56
2	RD2, 酰胺化	78
3	D3D3, 酰胺化	98
4	RD2RD2, 酰胺化	97
5	RD2D3, 酰胺化	100
6	D3RD2, 酰胺化	88

[0141] 分别以32 μg/ml的浓度使用这些物质。

[0142] 该结果此外表明,相比于在相同计量下的所用单体而言,测试的本发明二聚体具有协同效果。

[0143] 此外展示了对于所用肽的某些体内数据,其证明本发明聚合物,特别是二聚体,特别是本发明的根据SEQ ID NO:4-8的二聚体的效用。

[0144] 在对各种转基因小鼠模型的动物试验(表2)中表明,所有迄今测试的酰胺化的肽在体内是活性的:

[0145] 图1:在此,看到所谓的“物体识别测试”(ORT)的结果。在此,用D3D3(酰胺化)治疗的动物(详见表2中)和用安慰剂治疗的动物单个和彼此分开地置于盒中,在该盒中存在两个物体。在动物有时间侦查出两个物体之后,再次从盒中取出动物并24小时之后才再次放入。但是,之前用不同的新物体替换一个物体。具有记忆力的动物如今优选侦查出新物体。没有之前在盒中度过24小时的记忆力的动物对于侦查出旧物体和新物体花费相同时间。以秒为单位测量动物对于旧物体(白条)和新物体(黑条)花费的时间。可明显看出,用安慰剂治疗的动物对于新和旧物体花费相同时间。但是,用D3D3治疗的动物对于新物体花费明显更多时间。因此,只有用D3D3治疗的动物在该测试中表现出起作用的记忆力。

[0146] 图2:在所谓的“转棒”试验中,测量动物在其落下之前能够在旋转的棒上平衡多久。由此可以测量动物的神经运动性能。如果动物可以平衡越久,其神经运动神经元越不严重地遭受神经退化性疾病表型。在治疗之前和之后(治疗详见表2中)进行该测量。以秒为单位绘制在治疗之前和之后之间的差异。对照组(黑条)的正值表示,未治疗的动物在治疗之前相比于用安慰剂治疗之后表现出更少的退化。因此,该退化如预期那样进展了。但是,用D3(酰胺化)和D3D3(酰胺化)治疗的动物不表现出神经运动症状变差。因此在这两种情况中,治疗导致神经退化的减缓或甚至停止。

[0147] 图3:SHIRPA测试是其中测试一系列性能,尤其条件反射的测试。与其它性能分开

地评估各种性能并分别给分。如果分越高,表型,即神经损伤的进展越大。在治疗之前(黑条)和之后(白条)(治疗详见表2中)测量SHIRPA测试。可以看出,用D3D3(酰胺化)治疗的动物不展现出SHIRPA值的明显变差。但是,用D3(酰胺化)和用安慰剂治疗的动物表现出SHIRPA值的或多或少严重的变差。因此,D3D3比D3的作用更有效。

[0148] 图4:用所谓的“Morris水迷宫”测量动物的空间记忆力。在此,以秒为单位测量动物为了再次找到水桶中紧靠着水表面下隐藏的平台所需要的时间。这在连续几天的每天多个实验中测量。然后统计学评估得出,经治疗的动物相比于对照组是否更好学习了再次找到平台。以秒为单位绘制连续五天的寻找时间。用RD2D3(酰胺化)治疗的动物明显学习了。

[0149] 图5:在此,看到所谓的“物体识别测试”(ORT)的结果。在此,用RD2D3(酰胺化)治疗的动物(详见表2中)和用安慰剂治疗的动物单个和彼此分开地置于盒中,在该盒中存在两个物体。在动物有时间侦查出两个物体之后,再次从盒中取出动物并24小时之后才再次放入。但是,之前用不同的新物体替换一个物体。具有记忆力的动物如今优选侦查出新物体。没有之前在盒中度过24小时的记忆力的动物对于侦查出旧物体和新物体花费相同时间。以秒为单位测量动物对于旧物体(黑条)和新物体(白条)花费的时间。可明显看出,用安慰剂治疗的动物对于新和旧物体花费相同多的时间。但是,用RD2D3治疗的动物对于新物体花费明显更多时间。因此,只有用RD2D3治疗的动物在该测试中表现出起作用的记忆力。

[0150] D3和D3D3的酰胺化形式能够在TBA-2.1-小鼠中在4周的治疗时间过程中使表型进展停止(也参见图2)。

[0151] 可以特别地证实,双肽D3D3(酰胺化)相比于单肽D3(酰胺化)而言在SHIRPA测试中并同样在TBA-2.1-动物模型中的作用更有效(图3)。D3D3可以在SweDI-小鼠模型中表明,其相比于未治疗的小鼠而言明显改进识别(在“物体识别测试”中,图1)。RD2D3(酰胺化)同样能够改进SweDI-小鼠的识别,这既表现在Morris水迷宫(图4)也表现在物体识别测试(图5)中。

[0152] 另外的实施例:

[0153] 下列步骤涉及亲和性研究以及对特别毒性的 $\beta$ 淀粉状蛋白寡聚物降解的研究。

[0154] 制备A $\beta$ 单体、寡聚物和原纤维

[0155] 将1 mg冻干的A $\beta$ 1-42和N端生物素化的A $\beta$ 1-42分别溶解在1 ml 100%六氟异丙醇(HFIP)中并在室温下溶解过夜。对于寡聚物和原细胞制备,以1:10的比例使用非生物素化的A $\beta$ 与N端生物素化的A $\beta$ 并使HFIP蒸发(Eppendorf的浓缩器5301)。产生的A $\beta$ 薄膜以80  $\mu$ M的最终浓度吸收在磷酸钠缓冲液(10 mM, pH 7.4)中并温育(RT, 600 rpm)。在寡聚物制备中的温育时间为3 h,在原纤维制备中为24 h。为了制备单体,使用不温育的100% N端生物素化的A $\beta$ 1-42。

[0156] 密度梯度离心

[0157] 在A $\beta$ 制备之后进行密度梯度离心,以将各种A $\beta$ 物类根据其尺寸提纯。为此,使用10 mM磷酸钠缓冲液pH 7.4中的碘克沙醇梯度,其具有碘克沙醇的从50%至5%体积/体积的增大的浓度。施涂100  $\mu$ l的A $\beta$ 样品并借助超离心分离(3 h, 4 $^{\circ}$ C, 259000 g)。然后,梯度分级为14个各140  $\mu$ l的级分。单体A $\beta$ 位于上部开始的两个级分,A $\beta$ 寡聚物在级分4至6中,A $\beta$ 原纤维在级分11至13中。

[0158] 用于SPR波谱(表面等离子共振)的固定

[0159] 对于SPR波谱使用Biacore (GE Healthcare)的T200。借助密度梯度离心提纯的A $\beta$ 物类直接借助生物素-链霉亲和素-偶联根据制造商说明固定在传感器芯片(系列S传感器芯片SA)上。1X PBS充当流动缓冲液。在25℃下和5  $\mu$ l/min的流速下进行负载。然后从流动池中在30  $\mu$ l/min的持续流动下过夜除去非特异性结合的配体。

[0160] 结合动力学

[0161] 结合动力学同样借助SPR波谱在Biacore (GE Healthcare)的T200仪上测量。标准条件为5℃和30  $\mu$ l/min的流速。D肽的各种冻干物吸收在流动缓冲液1X PBS中并连续缓冲。“单循环”动力学作为方法,其中将五个增大的分析物浓度泵送通过固定化的流动池。根据分析物选择接触时间90-120 s用于联合和解离以及1800-5400 s用于最终解离。传感器图借助非负载的流动池和所用流动缓冲液双重关联。借助动力学拟合模型(异相结合模型)使用Biacore T200评估软件(2.0版本)评估结合曲线。

[0162] 图6-8展示了本发明的肽的结合行为的结果(亲和性研究)。在这些图中的是各种受试物与 $\beta$ 淀粉状蛋白单体(图6)、 $\beta$ 淀粉状蛋白寡聚物(图7)、 $\beta$ 淀粉状蛋白原纤维(图8)的结合强度的动力学评估数据。所示分别为两个结合常数,其在异相结合模型拟合时产生,并分别绘制为白色条和黑色条。重要的是在此应看出对数标度,这表示条尺寸中的小差别是解离常数 $K_D$ 的大差别。白色条分别是低亲和位点,即低亲和性结合位点及其结合强度,黑色条显示高亲和性结合位点及其结合强度。

[0163] 表明了,仅在游离C端具有负电荷的线性肽D3的情况中,均相1:1结合模型足以拟合结合曲线。

[0164] 此外表明,在所用环化肽的几乎所有情况中,对于低亲和性结合位点的白色条相似地高。相反地,在黑色条显示的高亲和性结合位点中产生大的差别。

[0165] 此外明显的是,在单体的情况中,环化cD3r (SEQ ID NO:9)获得非常好的效果(图6),即具有特别高的亲和性。

[0166] 在特别令人感兴趣的寡聚物的情况中,cD3r的结合比本发明的其它环化肽强甚至2个数量级(图7)。

[0167] 在原纤维的情况中,cD3r相比于本发明的其它肽而言获得非常好的效果,其中在此特别的是本发明的肽cD3 (P2K) (SEQ ID NO:12)获得极好的效果并且甚至达到亚pM的结合范围中(图8)。

[0168] 此外表明,D3的酰胺化形式相比于D3的未酰胺化形式而言与 $\beta$ 淀粉状蛋白单体和 $\beta$ 淀粉状蛋白寡聚物更强地结合。这表现为对于低亲和位点的更低的 $K_{D1}$ 值以及存在具有亚 $\mu$ M范围的 $K_{D2}$ 的高亲和位点。

[0169] 在图6-8中的 $R_{\text{最大值}}$ 说明,各个 $K_D$ 如何强烈地贡献于总负载能力。例如对于寡聚物(图7),对于肽cD3z给出79/21%的 $R_{\text{最大值}}$ 。cD3z表示cD3零,即不具有其它氨基酸附着物的环化D3。白色条表明,低亲和位点可以产生RU总负载强度的总共79%, $K_{D2}$ 产生RU总共21%。这表示,对于这些肽存在结合位点的大约1:4的比例,即存在的低亲和性位点为高亲和性位点的大约4倍这么多。

[0170] 低亲和位点和高亲和位点之间的这类差别出现在本发明的肽中。

[0171] 在实验的结合数据的拟合时对于线性肽D3未出现高亲和位点的事实可以如下解释,即其未与高亲和位点结合,或对于高亲和位点和低亲和位点的亲和性不可区分。



[0172] 由这些数据显而易见,线性D3在β淀粉状蛋白寡聚物中仅结合低亲和位点,而不结合高亲和位点。

[0173]

表 2:

实验编号	肽	小鼠模型	剂量	水迷宫	物体识别	斑块病理	SHIRPA	转棒
1	D3, 酰胺化	TBA	0.1 mg/天	未进行	未进行	未进行		明显 (图 2)
2	D3D3, 酰胺化	TgSwDI	1 mg/4 周	明显, 第 5 天	明显 (图 1)	明显	未进行	未进行
3	D3D3, 酰胺化	TBA	0.1 mg/天	未进行	未进行	未进行	明显 (图 3)	明显 (图 2)
4	RD2D3, 酰胺化	TgSwDI	7 mg/4 周	明显, 第 5 天 (图 4)	明显 (图 5)		未进行	未进行

[0174] 分别腹膜内(微量泵)给药所述物质4周。

## 序列表

<110> Forschungszentrum Juelich GmbH  
<120> 结合  $\beta$  淀粉状蛋白的肽及其用于治疗 and 诊断阿尔茨海默痴呆症的用途  
<130> PT 1.2650 PCT  
<160> 12  
<170> PatentIn 3.5版  
<210> 1  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> D-肽, RD2  
  
<400> 1

Pro Thr Leu His Thr His Asn Arg Arg Arg Arg Arg  
1 5 10

[0001]  
<210> 2  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> D-肽, D3

<400> 2

Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg  
1 5 10

<210> 3  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> D-肽, DB3

<400> 3

Arg Pro Ile Thr Arg Leu Arg Thr His Gln Asn Arg  
1 5 10

<210> 4  
<211> 24

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> D-肽, RD2D3

<400> 4

Pro Thr Leu His Thr His Asn Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Arg Thr  
1 5 10 15

Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg  
20

<210> 5  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> D-肽, D3RD2

<400> 5

[0002] Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg Pro Thr Leu His  
1 5 10 15

Thr His Asn Arg Arg Arg Arg Arg  
20

<210> 6  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> D-肽, D3D3

<400> 6

Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg Arg Pro Arg Thr  
1 5 10 15

Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg  
20

<210> 7  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; D-肽, RD2RD2

&lt;400&gt; 7

Pro Thr Leu His Thr His Asn Arg Arg Arg Arg Arg Pro Thr Leu His  
1 5 10 15

Thr His Asn Arg Arg Arg Arg Arg  
20

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; D-肽, DB3DB3

&lt;400&gt; 8

Arg Pro Ile Thr Arg Leu Arg Thr His Gln Asn Arg Arg Pro Ile Thr  
1 5 10 15

[0003]

Arg Leu Arg Thr His Gln Asn Arg  
20

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; D-肽, D3r

&lt;400&gt; 9

Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg Arg  
1 5 10

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; D-肽, D3p

&lt;400&gt; 10

Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg Pro  
1 5 10

<210> 11  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> D-肽, D3a

<400> 11

[0004] Arg Pro Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg Ala  
1 5 10

<210> 12  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> D-肽, D3(p2k)

<400> 12

Arg Lys Arg Thr Arg Leu His Thr His Arg Asn Arg  
1 5 10

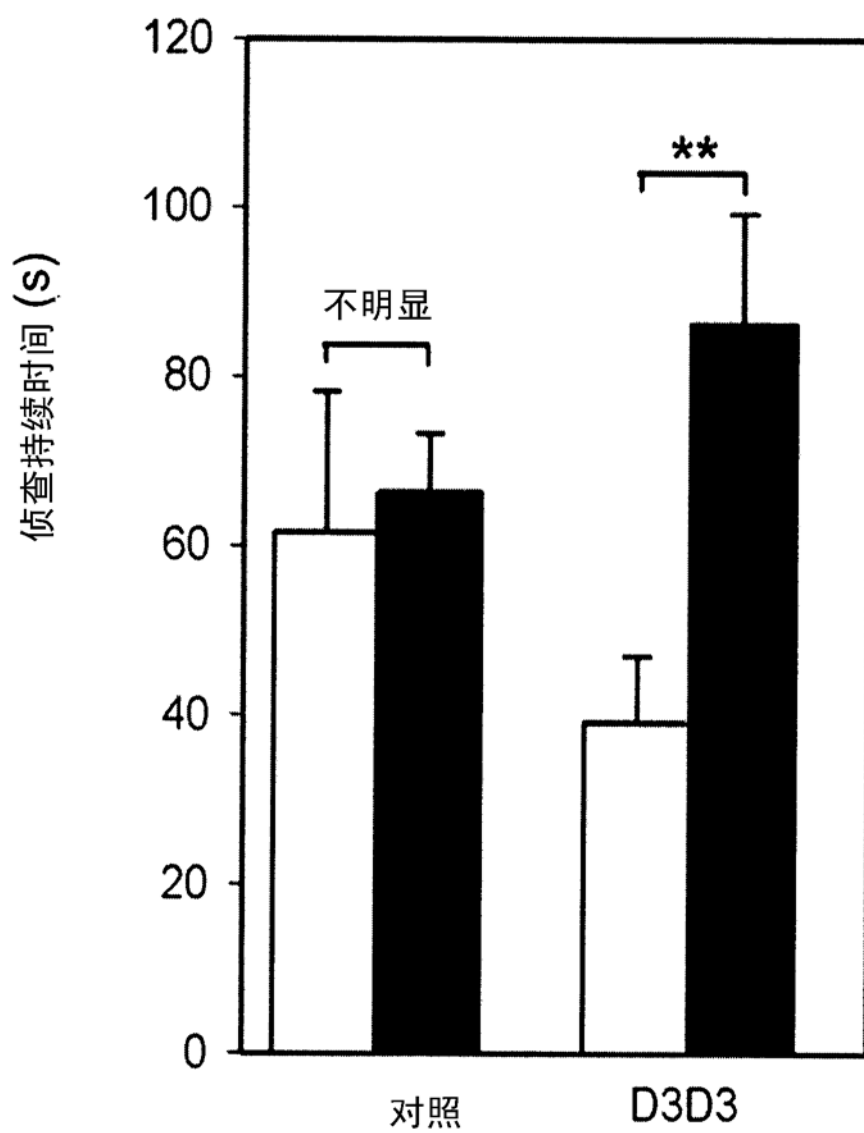


图 1

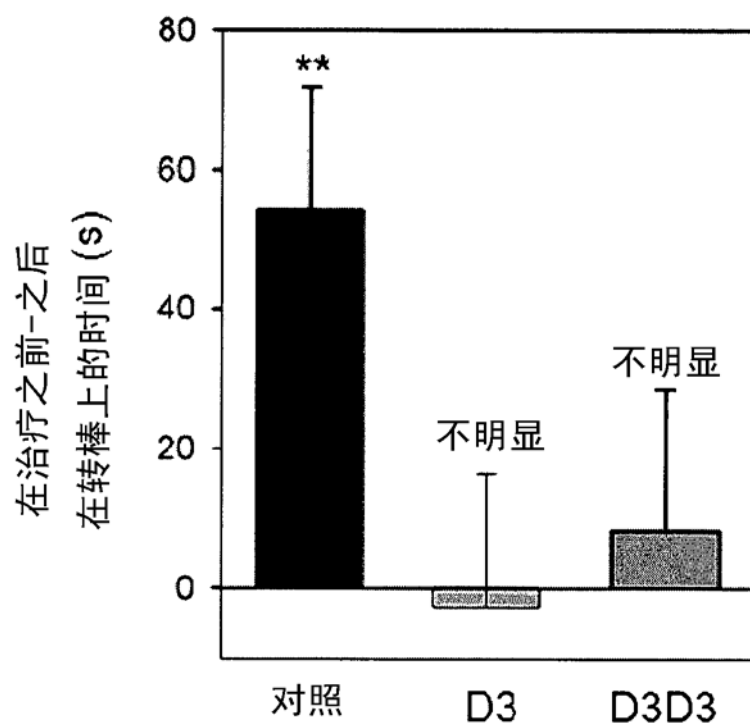


图 2



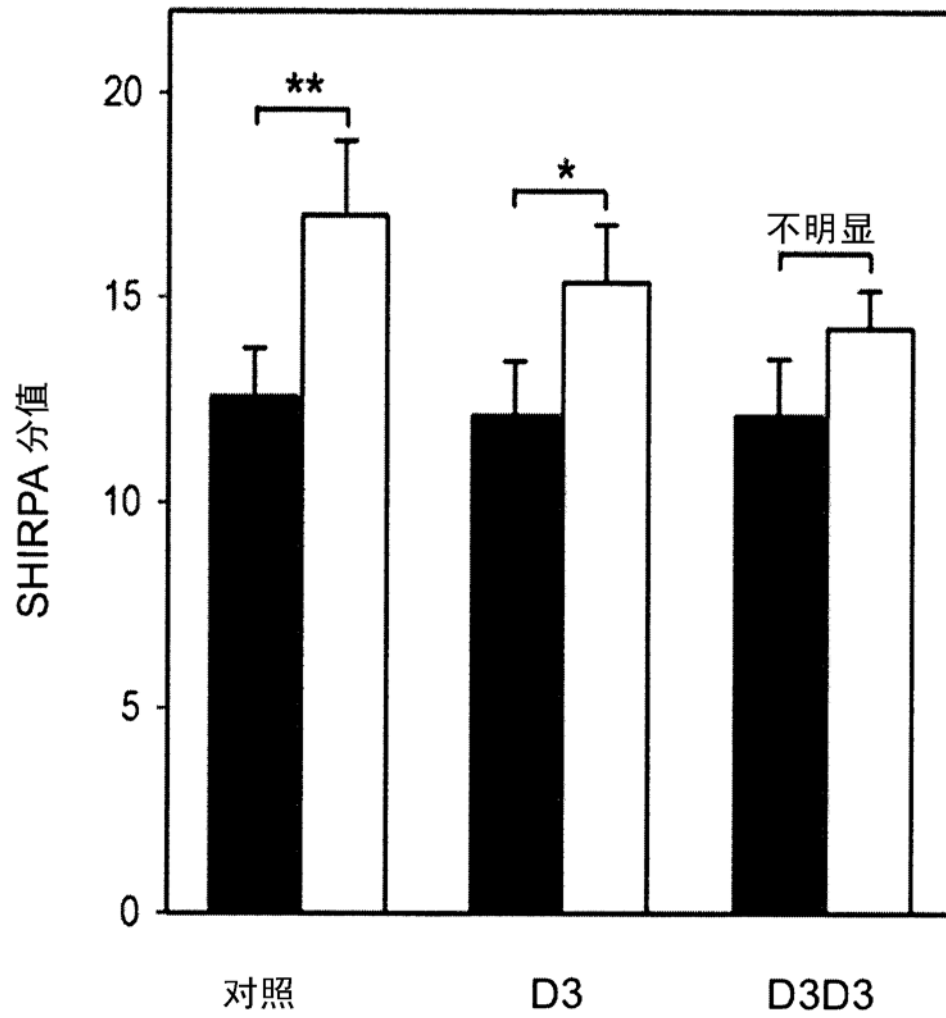


图 3

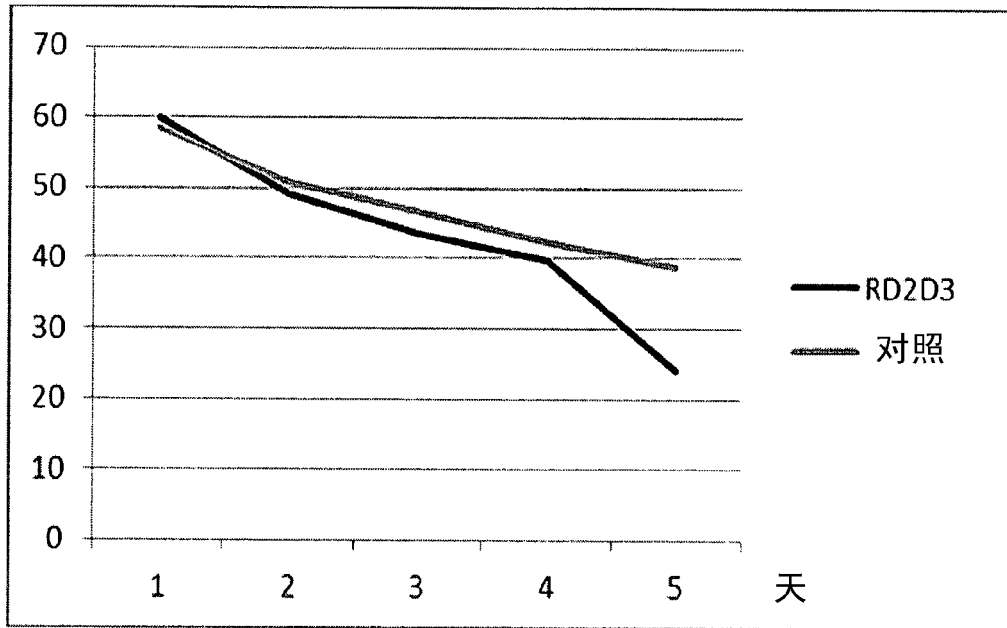


图 4

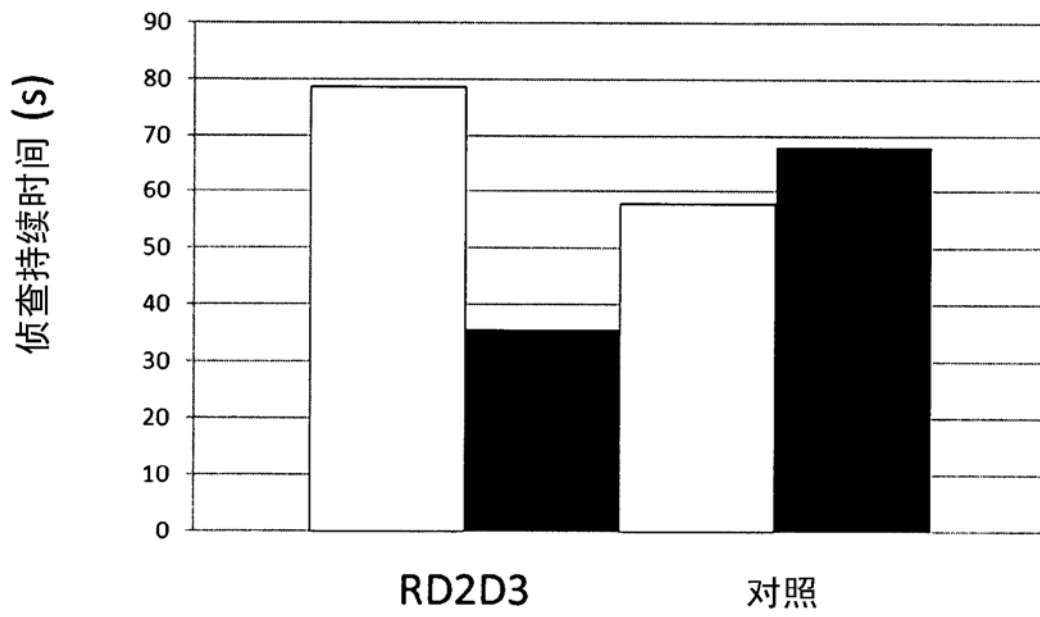


图 5

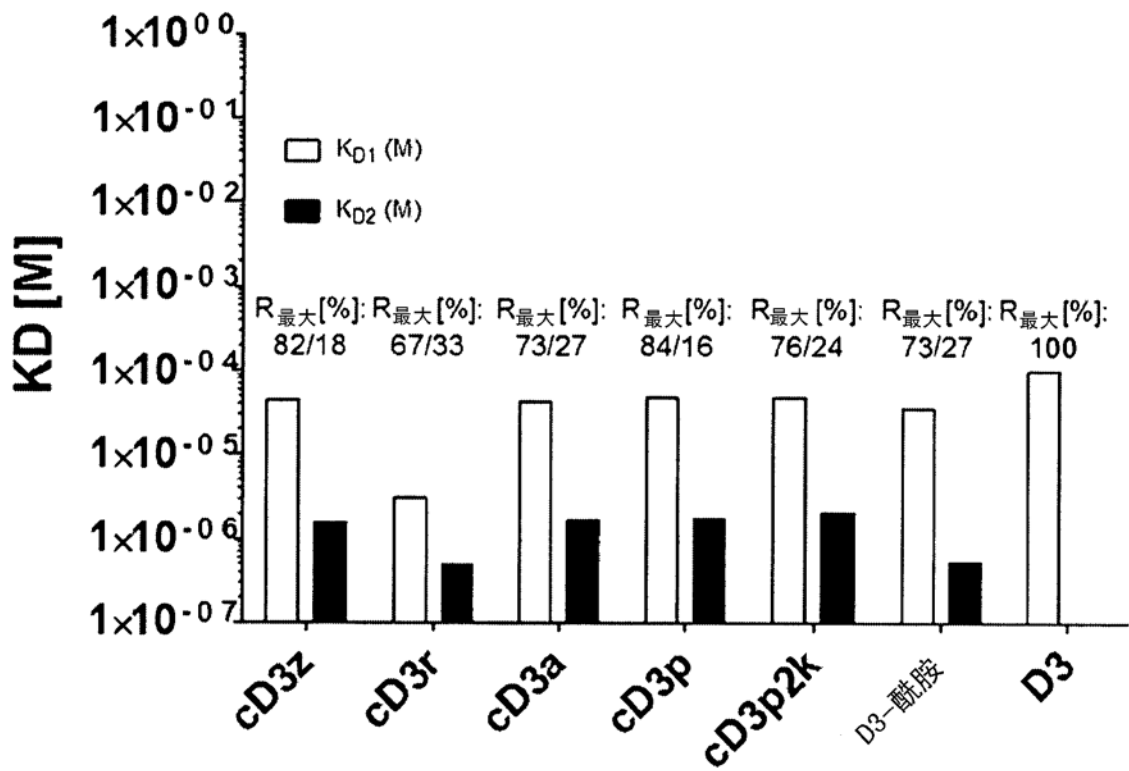
A- $\beta$  单体动力学

图 6

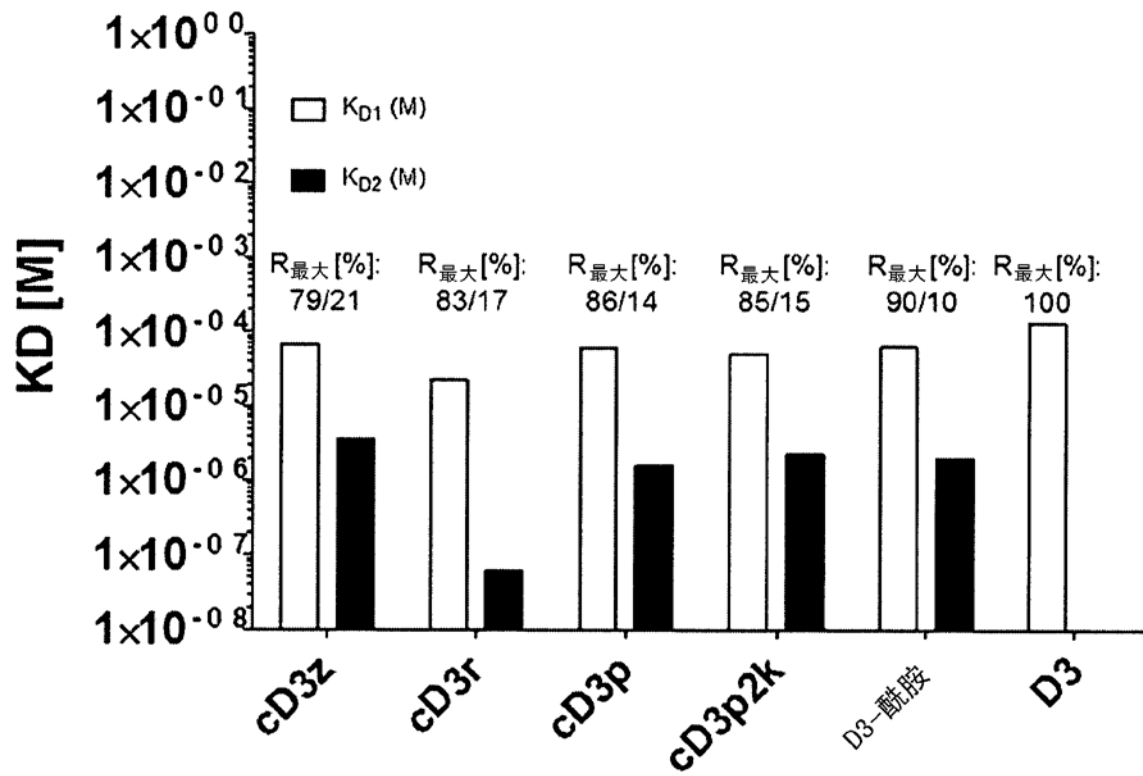
A- $\beta$  寡聚物动力学

图 7

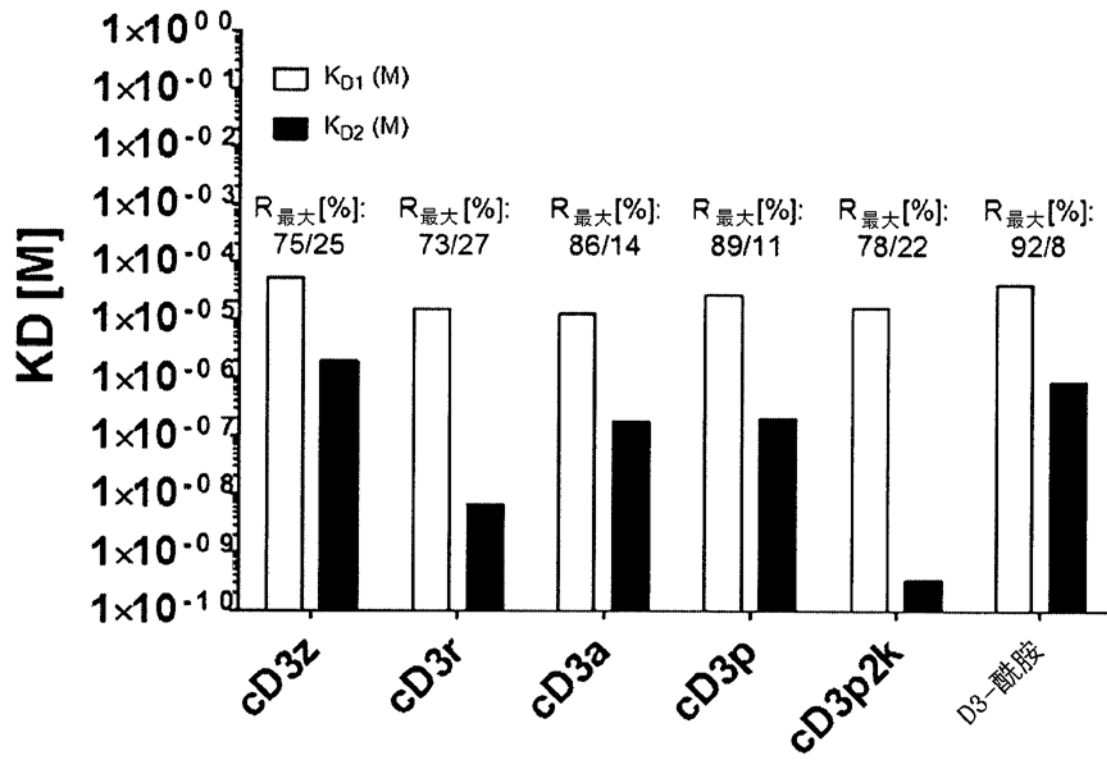
A- $\beta$  原纤维动力学

图 8