



(12) **Patentschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2012 108 599.4**
(22) Anmeldetag: **14.09.2012**
(43) Offenlegungstag: **20.03.2014**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **01.06.2023**

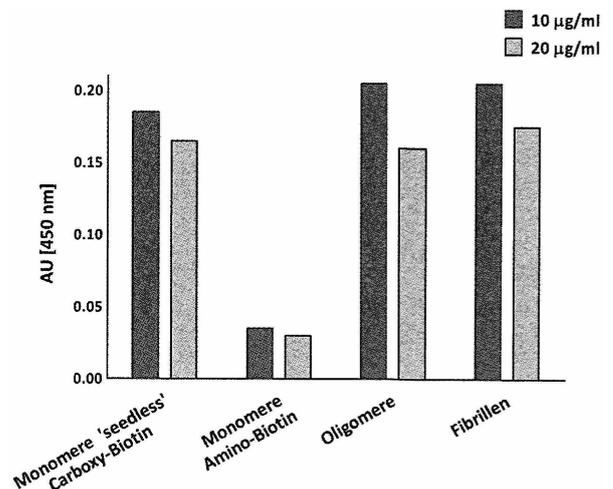
(51) Int Cl.: **C07K 7/08 (2006.01)**
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/03 (2006.01)
C07K 4/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

<p>(73) Patentinhaber: Priavoid GmbH, 40225 Düsseldorf, DE</p> <p>(74) Vertreter: Meissner Bolte Patentanwälte Rechtsanwälte Partnerschaft mbB, 40474 Düsseldorf, DE</p> <p>(72) Erfinder: Funke, Susanne Aileen, Prof., 96242 Sonnefeld, DE; Cinar, Yeliz, Dr., 65203 Wiesbaden, DE; Willbold, Dieter, Prof. Dr., 52428 Jülich, DE; Bartnik, Dirk, Dr., 51105 Köln, DE</p>	<p>(56) Ermittelter Stand der Technik:</p> <p>WO 02/ 081 505 A2</p> <p>Accession Nummer XP_505335 Sequenzvergleich der Sequenz SEQ NO:2 mit XP_505335</p>
--	--

(54) Bezeichnung: **A-Beta-Oligomer-bindende Peptide und deren Verwendung**

(57) Hauptanspruch: Peptid, enthaltend mindestens eine Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 und Homologe mit einer Identität von mindestens 70% davon und Polymere der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 und deren Homologe mit einer Identität von mindestens 70%.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue A-Beta-Oligomer-bindende Peptide und deren Verwendung, insbesondere in der Medizin.

[0002] Aufgrund der demographischen Entwicklung in den nächsten Jahrzehnten wird sich die Zahl der Personen, die an altersbedingten Erkrankungen leiden, erhöhen. Hier ist insbesondere die sog. Alzheimer-Krankheit (AD, Alzheimersche Demenz, lateinisch = Morbus Alzheimer) zu nennen.

[0003] Ein Merkmal der Alzheimer-Erkrankung sind extrazelluläre Ablagerungen des Amyloid-Beta-Peptids (A-Beta-Peptid). Diese Ablagerung des A-Beta-Peptids in Plaques ist typischerweise in den Gehirnen von AD-Patienten post mortem festzustellen. Deshalb werden verschiedene Formen des A-Beta-Peptids - wie z.B. Fibrillen - für die Entstehung und das Fortschreiten der Krankheit verantwortlich gemacht. Zusätzlich werden seit einigen Jahren die kleinen, frei diffundierbaren A-Beta-Oligomere als hauptsächliche Verursacher der Entstehung und des Fortschritts der AD gesehen.

[0004] A-Beta-Monomere, als Bausteine der A-Beta-Oligomere, entstehen im menschlichen Körper ständig und sind vermutlich per se nicht toxisch. Möglicherweise haben sie sogar eine neuroprotektive Funktion. A-Beta-Monomere können sich in Abhängigkeit von ihrer Konzentration zufällig zusammen lagern. Die Konzentration ist abhängig von ihrer Bildungs- und Abbaurate im Körper. Findet mit zunehmendem Alter eine Erhöhung der Konzentration an A-Beta-Monomeren im Körper statt, so ist eine spontane Zusammenlagerung der Monomere zu A-Beta-Oligomeren immer wahrscheinlicher. Die so entstandenen A-Beta-Oligomere könnten sich analog zu den Prionen vermehren und letztendlich zur Morbus Alzheimer-Krankheit führen.

[0005] Bisher existiert kein Wirkstoff oder Medikament, das gegen die Ursachen von AD wirkt. Die bisher eingesetzten und zugelassenen Medikamente mildern einige der bei der AD auftretenden Symptome. Sie sind aber nicht in der Lage, den Krankheitsfortschritt zu verlangsamen oder eine Heilung herbeizuführen. Es existieren einige Substanzen, die im Tierversuch Erfolge bei der Prävention, aber nicht (unbedingt) bei der Behandlung von AD gezeigt haben.

[0006] Ein wichtiger Unterschied zwischen Prävention und Behandlung oder gar Heilung der AD liegt in der Tatsache, dass eine Prävention möglicherweise schon durch die Verhinderung der Bildung der ersten A-Beta-Oligomere erreicht werden kann. Zur Prävention sind einige, wenige A-Beta-Liganden ausrei-

chend, die nicht notwendigerweise hochaffin und selektiv bezüglich der A-Beta-Oligomere sind.

[0007] Die Bildung der A-Beta-Oligomere aus vielen Monomeren ist eine Reaktion hoher Ordnung und damit in hoher Potenz von der A-Beta-Monomer-Konzentration abhängig. Somit führt schon eine kleine Verringerung der aktiven A-Beta-Monomer-Konzentration zu einer Verhinderung der Bildung der ersten A-Beta-Oligomere. Auf diesem Mechanismus basieren die bisher sich in der Entwicklung befindlichen eher präventiven Therapiekonzepte und Substanzen. Bei der Behandlung von AD ist jedoch von einer völlig veränderten Situation auszugehen. Hier liegen A-Beta-Oligomere oder evtl. auch schon größere Polymere oder Fibrillen vor, die sich durch Prion-ähnliche Mechanismen vermehren. Diese Vermehrung ist jedoch eine Reaktion niedriger Ordnung und ist somit kaum noch von der A-Beta-Monomer-Konzentration abhängig.

[0008] Die aus dem Stand der Technik bekannten Substanzen verringern die Konzentration von A-Beta-Monomeren und/oder Oligomeren auf verschiedenste Art und Weise. So sind z.B. Gamma-Sekretase-Modulatoren bekannt, die im Tierversuch zur Prävention eingesetzt wurden.

[0009] Aus der WO 02/081505 sind verschiedene Sequenzen von D-Aminosäuren bekannt, die an A-Beta-Peptide binden. Diese Sequenzen aus D-Aminosäuren binden mit einer Dissoziationskonstante (K_D -Wert) von 4 μmol an Amyloid-Beta-Peptide.

[0010] Aus der WO 2011/147797 sind Hybridverbindungen bekannt, bestehend aus Aminopyrazolen und Peptiden, die A-Beta-Oligomerisation verhindern.

[0011] Bei vielen Substanzen, die im Tierversuch positive Ergebnisse gezeigt haben, konnte diese Wirkung in klinischen Studien am Menschen nicht bestätigt werden. In klinischen Studien der Phase II und III dürfen nur Menschen behandelt werden, die eindeutig mit AD diagnostiziert wurden. Hier reicht eine geringe Verringerung der A-Beta-Monomerkonzentration nicht mehr aus, um zu verhindern, dass sich aus den bereits vorhandenen A-Beta-Oligomeren noch mehr bilden, z.B. durch einen Prion-ähnlichen Mechanismus. Die Vermehrung der A-Beta-Oligomere oder noch besser ihre Zerstörung oder Unschädlichmachung ist aber unbedingt erforderlich, um Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu nehmen.

[0012] Bisher wird die AD hauptsächlich durch neuropsychologische Tests diagnostiziert, durch Untersuchungen an Personen, bei denen bereits Demenzsymptome aufgetreten sind. Es ist jedoch bekannt, dass A-Beta-Oligomere und die zeitlich im Krankheitsverlauf darauf folgenden Fibrillen und Plaques

bis zu 20 Jahre vor dem Auftreten der Symptome im Gehirn der Patienten entstehen, und schon irreversible Schäden verursacht haben können. Allerdings gibt es bisher in der Praxis noch keine Möglichkeit, die AD vor dem Ausbruch der Symptome zu diagnostizieren.

[0013] Es besteht somit weiterhin ein Bedarf an neuen Verbindungen (Wirkstoffen), die sehr spezifisch und mit hoher Affinität an A-Beta-Oligomere binden, und so deren Vermehrung verhindern. Diese Verbindungen sollten keine unerwünschten Nebenwirkungen zeigen, insbesondere keine Immunreaktion hervorrufen. Die Verbindungen sollen außerdem toxische A-Beta-Oligomere und damit auch die kleinen frei diffundierbaren Oligomere in kleinen Konzentrationen erkennen, vollständig vernichten und/oder deren (Prionenähnliche) Vermehrung verhindern.

[0014] Des Weiteren besteht auch ein Bedarf an neuen Verbindungen, die als Sonden für die Erkennung und Markierung von A-Beta-Oligomeren einsetzbar sind, insbesondere, wenn die Krankheit noch nicht weit fortgeschritten ist und die Oligomere erst in geringen Konzentrationen auftreten.

[0015] Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, Substanzen zur Verfügung zu stellen, die nicht nur auf extrazelluläre A-Beta-Peptide fokussieren, wie die meisten aus dem Stand der Technik bekannten Verbindungen, sondern gezielt lösliche A-Beta-Oligomere binden. Ferner sollen die neuen Verbindungen die Fibrillenbildung von A-Beta-Peptiden hemmen oder verhindern.

[0016] Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Peptid enthaltend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 (DO 3), SEQ ID NO: 2 und/oder SEQ ID NO: 3 und/oder Homologe, Fragmente und Teile davon. Gelöst wird diese Aufgabe auch durch Polymere der SEQ ID NO: 1 (DO 3), SEQ ID NO: 2 und/oder SEQ ID NO: 3 und/oder deren Homologe.

[0017] Fragmente und Teile zeigen eine ähnliche beziehungsweise identische Wirkung wie die erfindungsgemäßen Peptide.

[0018] In einer Variante bestehen die Peptide gemäß SEQ ID NO: 1 (DO 3), SEQ ID NO: 2 und/oder SEQ ID NO: 3 und deren Homologe im Wesentlichen, bevorzugt mindestens 60%, 75%, 80%, besonders bevorzugt 85%, 90%, 95%, insbesondere 96%, 97%, 98%, 99%, 100% aus D-Aminosäuren.

[0019] Ein Polymer im Sinne der Erfindung ist gebildet aus 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 oder mehr Monomeren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 1 (DO 3), SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 und deren Homo-

loge, die für sich bereits A-Beta-Oligomer. Erfindungsgemäß sind die Polymere aus einem Monomer aufgebaut oder aus einer Kombination von 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 unterschiedlichen oben genannten Monomeren. Monomere und Polymere werden im Folgenden als erfindungsgemäße Peptide bezeichnet.

[0020] In einer Variante der Erfindung handelt es sich um ein Peptid mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 und/oder SEQ ID NO: 3 und/oder Homologe davon mit einer Identität von 50%. „Homologe Sequenzen“ oder „Homologe“ bedeutet im Sinne der Erfindung, dass eine Aminosäuresequenz eine Identität mit einer der oben genannten Aminosäuresequenz der Monomere von mindestens 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 % aufweist. Anstelle des Begriffs „Identität“ werden in der vorliegenden Beschreibung die Begriffe „homolog“ oder „Homologie“ gleichbedeutend verwendet. Die Identität zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen oder Polypeptidsequenzen wird durch Vergleich mit Hilfe des Programms BESTFIT basierend auf dem Algorithmus von Smith, T.F. und Waterman, M.S. (Adv. Appl. Math. 2: 482-489 (1981)) berechnet unter Einstellung folgender Parameter für Aminosäuren: Gap creation penalty: 8 und Gap extension penalty: 2; und folgender Parameter für Nukleinsäuren: Gap creation penalty: 50 und Gap extension penalty: 3. Bevorzugt wird die Identität zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen oder Polypeptidsequenzen durch die Identität der Nukleinsäuresequenz / Polypeptidsequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge definiert, wie sie durch Vergleich mit Hilfe des Programms GAP basierend auf dem Algorithmus von Needleman, S.B. und Wunsch, C.D. (J. Mol. Biol. 48: 443-453) unter Einstellung folgender Parameter für Aminosäuren berechnet wird: Gap creation penalty: 8 und Gap extension penalty: 2; und die folgenden Parameter für Nukleinsäuren Gap creation penalty: 50 und Gap extension penalty: 3.

[0021] Zwei Aminosäuresequenzen sind im Sinne der vorliegenden Erfindung identisch wenn sie die selbe Aminosäuresequenz besitzen.

[0022] Unter Homologe sind in einer Variante die entsprechenden retro-inversen Sequenzen der oben genannten Monomere zu verstehen. Mit dem Begriff „retro-inverse Sequenz“ wird erfindungsgemäß eine Aminosäuresequenz bezeichnet, die sich aus Aminosäuren in der enantiomeren Form zusammensetzt (invers: Chiralität des alpha-C-Atoms invertiert) und bei der zusätzlich die Sequenzreihenfolge zur ursprünglichen Aminosäuresequenz umgekehrt wurde (retro = rückwärts).

[0023] In einer weiteren Variante binden die erfindungsgemäßen Peptide an Teile des Amyloid beta-Peptids.

[0024] In einer weiteren Variante weisen die erfindungsgemäßen Peptide Sequenzen auf, die sich von den angegebenen Sequenzen um bis zu drei Aminosäuren unterscheiden.

[0025] Ferner werden als Peptide auch Sequenzen eingesetzt, die die oben genannten Sequenzen enthalten.

[0026] In einer weiteren Variante weisen die Peptide Fragmente der oben genannten Sequenzen auf oder weisen homologe Sequenzen zu den oben genannten Sequenzen auf.

[0027] Erfindungsgemäß handelt es sich um ein Peptid zur Verwendung in der Medizin, bevorzugt zur Behandlung der Morbus Alzheimer.

[0028] In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung besteht das Peptid im Wesentlichen aus D-Aminosäuren.

[0029] Im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet der Begriff „im Wesentlichen aus D-Aminosäuren“, dass die einzusetzenden Monomere mindestens 60%, bevorzugt 75%, 80%, besonders bevorzugt 85%, 90%, 95%, insbesondere 96%, 97%, 98%, 99%, 100% aus D-Aminosäuren aufgebaut sind.

[0030] In einer weiteren Variante handelt es sich um ein erfindungsgemäßes Peptid zur Hemmung der Fibrillenbildung von Amyloid-Beta-Peptiden. Die erfindungsgemäßen Polymere enttoxifizieren die A-Beta-Oligomere oder daraus gebildete Polymere, sowie Fibrillen, indem sie daran binden und so in nicht toxische Verbindungen überführen. Demgemäß ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung auch ein Verfahren zur Enttoxifizierung der A-Beta-Oligomeren, daraus gebildeten Polymeren oder Fibrillen.

[0031] Gegenstand der Erfindung sind in einer Ausführung auch erfindungsgemäße Peptide die mit einer weiteren Substanz verknüpft sind.

[0032] Bei der Verknüpfung handelt es sich im Sinne der Erfindung um eine chemische Bindung wie sie in Römpf Chemie Lexikon, 9. Auflage, Band 1, Seite 650 ff, Georg Thieme Verlag Stuttgart definiert ist, bevorzugt um eine Hauptvalenz Bindung, insbesondere eine kovalente Bindung.

[0033] Bei den Substanzen handelt es sich in einer Variante um Arzneimittel oder Wirkstoffe, definiert gemäß Arzneimittelgesetz §2 beziehungsweise §4 (19), Stand September 2012. In einer Alternative

sind Wirkstoffe therapeutisch aktive Stoffe die als arzneilich wirksame Stoffe verwendet werden. Bevorzugt werden Entzündungshemmer eingesetzt.

[0034] Bei den Substanzen handelt es sich in einer weiteren Variante um Verbindungen die die Wirkung der Peptide verstärken.

[0035] In einer Alternative sind solche Verbindungen Aminopyrazol und/oder Aminopyrazolderivate. Aminopyrazolderivate im Sinne der Erfindung ist 3-Aminopyrazol-5-carbonsäure oder 3-Nitropyrazol-5-carbonsäure sowie alle Abkömmlinge, in denen die heterocyclische CH-Gruppe gegen -CR- oder -N- oder -O- oder -S- ausgetauscht wurde, sowie alle daraus abgeleiteten peptidischen Dimere, Trimere oder -Tetramere, bevorzugt Aminopyrazol-Trimer.

[0036] In einer weiteren Alternative handelt es sich um Verbindungen die die Löslichkeit der Peptide und/oder die Passage der Blut-Hirn-Schranke verbessern.

[0037] In einer Alternative haben die Peptide erfindungsgemäß jede beliebige Kombination von mindestens zwei oder mehr Merkmalen der oben beschriebenen Varianten, Ausführungen und/oder Alternativen.

[0038] Gegenstand der Erfindung ist auch ein erfindungsgemäßes Peptid zur Bindung an aggregierte A-Beta-Peptide.

[0039] Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Peptids durch Peptidsynthese, wie zum Beispiel dem Fachmann bekannt, organische Synthesemethoden für beliebige Verbindungen mit geringem Molekulargewicht (low-molecular weight compounds) und/oder Mutagenese und rekombinante Herstellung.

[0040] Die Erfindung betrifft ferner auch eine Zusammensetzung enthaltend das erfindungsgemäße Peptid, insbesondere zur Behandlung von Morbus Alzheimer.

[0041] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine Zusammensetzung enthaltend das erfindungsgemäße Peptid, insbesondere zur Verhinderung von toxischen A-Beta-Oligomeren, oder zur Zerstörung von daraus gebildeten Polymeren oder Fibrillen.

[0042] Die erfindungsgemäße „Zusammensetzung“ kann z. B. ein Impfstoff, ein Medikament (z. B. in Tablettenform), eine Injektionslösung, ein Nahrungs- oder Nahrungsergänzungsmittel sein, enthaltend das erfindungsgemäße Peptid in einer aufgrund des Fachwissens herzustellenden Formulierung.

[0043] Die Erfindung betrifft ferner auch ein KIT enthaltend das erfindungsgemäße Peptid.

[0044] In einem solchen KIT können die erfindungsgemäßen Peptide in Behältern ggf. mit/in Puffern oder Lösungen verpackt sein. Alle Komponenten des KITs können in demselben Behälter oder getrennt voneinander verpackt sein. Ferner kann das KIT Anweisungen für dessen Gebrauch enthalten. Ein solches KIT kann beispielsweise die erfindungsgemäßen in einer Injektionsflasche mit Stopfen und/oder Septum enthalten. Ferner kann darin beispielsweise auch eine Einmal-Spritze enthalten sein.

[0045] Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Peptids als Sonde zur Identifizierung, qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung von Amyloid-Beta-Oligomeren oder Fibrillen. Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch eine Sonde, enthaltend das erfindungsgemäße Peptid zur Identifizierung, qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung von Amyloid-Beta-Oligomeren.

[0046] Solche Sonden sind von großer Bedeutung, da damit eine frühe Diagnose der AD möglich wird. Mit der Frühdiagnose kann der Krankheit schon in einem sehr frühen Stadium entgegengewirkt werden.

[0047] Solche molekularen Sonden enthalten das erfindungsgemäße Polymer und gegebenenfalls Farbstoffe, Fluoreszenzfarbstoffe, radioaktive Isotope, (PET etc.), Gadolinium (MRI), sowie alternative Stoffe geeignet für die Bildgebung der Sonden und können den Patienten z.B. intravenös injiziert werden. Nach Passage über die Bluthirnschranke können die Sonden an A-Beta-Oligomere und/oder Plaques binden. Die so markierten A-Beta-Oligomere und/oder Plaques können mittels bildgebender Verfahren wie z.B. SPECT, PET, CT, MRT, Protonen-MR-Spektroskopie usw. sichtbar gemacht werden.

[0048] Ferner betrifft die Erfindung auch die Verwendung des Peptids zur Verhinderung von Amyloid-Beta-Oligomeren und/oder Amyloid-Beta-Peptid-Aggregaten und/oder Amyloid-Beta-Fibrillen.

[0049] Das erfindungsgemäße Peptid wird auch zur Enttoxifizierung von toxischen Amyloid-Beta-Oligomeren und/oder Aggregaten verwendet. insbesondere wird es verwendet, um an Amyloid-Beta-Oligomere und/oder Aggregate zu binden und so amorphe, nicht toxische Aggregate zu bilden.

[0050] Weiterer Gegenstand ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Peptids als Therapeutikum von Morbus Alzheimer.

[0051] Die erfindungsgemäßen Peptide binden besonders gut an A-Beta-Oligomere, insbesondere an lösliche A-Beta-Oligomere. In einer Ausführung der Erfindung besitzen die Peptide gemäß SEQ ID NO: 2 und/oder SEQ ID NO: 3 durch die angefügten Sequenzen (und Arginine) eine erhöhte Bluthirnschrankengängigkeit und/oder Löslichkeit als das Peptid laut SEQ ID NO. 1.

[0052] Eine besonders starke Bindung der erfindungsgemäßen Peptide an die Zielmoleküle wird durch eine hohe Spezifität und/oder Affinität zu dem Zielmolekül der erfindungsgemäßen Peptide hervorgerufen. Die gebildeten Komplexe haben eine geringe Dissoziationskonstante (KD-Wert).

[0053] Komplexe gebildet aus A-Beta-Monomeren und den erfindungsgemäßen Peptiden haben eine KD-Wert von höchstens 3 μM , 2 μM , bevorzugt 1 μM , besonders bevorzugt 0,5 μM , insbesondere 0,4 μM , 0,3 μM .

[0054] Komplexe gebildet aus A-Beta-Oligomeren und den erfindungsgemäßen Peptiden haben eine KD-Wert von höchstens 3 μM , 2 μM , 1 μM , bevorzugt 0,5 μM , 0,4 μM , 0,3 μM , besonders bevorzugt 0,2 μM , 0,1 μM , insbesondere 0,05 μM , 0,04 μM .

[0055] Komplexe gebildet aus A-Beta-Fibrillen und den erfindungsgemäßen Peptiden haben eine KD-Wert von höchstens 3 μM , 2 μM , 1 μM , bevorzugt 0,8 μM , besonders bevorzugt 0,5 μM , 0,4 μM , 0,3 μM , insbesondere 0,2 μM .

[0056] Die erfindungsgemäßen Sequenzen, insbesondere SEQ ID NO: 1, binden bevorzugt an aggregierte (oligomere) Formen des A-Beta-Peptids. Die Bindung ist stärker als die der aus dem Stand der Technik bekannten D1- und D3-Peptide.

[0057] Die erfindungsgemäßen Peptide, insbesondere SEQ ID NO: 1, hemmt die Fibrillenbildung von A-Beta-Peptiden sehr effizient.

[0058] Ferner binden die erfindungsgemäßen Peptide, insbesondere SEQ ID NO: 1, an A-Beta-Oligomere, wodurch amorphe Aggregate gebildet werden - wie durch dynamische Lichtstreuung bewiesen - die im ThT-Test negativ sind.

[0059] Weiterer Gegenstand ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Peptide in einem Verfahren zur Behandlung (in vitro, ex vivo) von Blut, Blutprodukten und/oder Organen, dadurch gekennzeichnet, dass das Blut, die Blutprodukte und/oder Organe dem menschlichen oder tierischen Körper entnommen werden und A-Beta-Oligomere entfernt und/oder enttoxifiziert werden.

Beispiele

[0060] Mittels Spiegelbild-Phagendisplay wurden Peptidsequenzen selektiert, die sich durch die Eigenschaft auszeichnen, spezifisch A-Beta-1-42 Oligomere zu binden. Momentan wird angenommen, dass frei diffundierende Oligomere für die Zellen am schädlichsten wirken. Für die Selektion wurden Oligomere von D-enantiomerem A-Beta-Monomeren mittels Gelfiltrationschromatographie präpariert und als Zielmoleküle im Spiegelbild-Phagendisplay eingesetzt. Im Verlauf der Phagendisplay wurde das Peptid mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 1 als selektierter Ligand identifiziert.

[0061] Die D-enantiomere Form dieses Peptids, mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 1, das DO3 genannt wurde, wurde bezüglich seiner in vitro-Bindung an verschiedene A-Beta-Konformere (Monomere, -Oligomere, -Fibrillen) im ELISA getestet. Für DO3 wurden relativ hohe Affinitäten für sämtliche Konformere im ELISA nachgewiesen (**Fig. 1**). Die Bindung an am Amino-Terminus biotinylierte Monomere war relativ schwach, während die „seediess“-Monomere (aggregationskeimfrei) mit der Carboxy-terminalen Biotinylierung stärker gebunden wurden. Dies kann als potentieller Hinweis auf eine am Amino-Terminus lokalisierte Bindeepitopstelle des Dodekamers interpretiert werden.

[0062] Weiterhin wurde DO3 im Thioflavin T (ThT)-Aggregationstest eingesetzt. ThT ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an beta-Faltblatt-reiche Strukturen verschiedener amyloider Proteine bindet und nach der Anregung bei 440 nm fluoresziert. Die Emission kann auf diese Weise mit dem relativen Fibrillengehalt in der Probe korreliert werden. ThT-Tests werden zur Messung der Fibrillation von A-Beta-Monomeren genutzt und vor allem bei Liganden verwendet, um eine mögliche inhibitorische Wirkung dieser auf die A-Beta-Aggregation nachzuweisen. DO3 wurde in verschiedenen molaren Verhältnissen mit einer 10 μM A-Beta-Monomer-Lösung eingesetzt. Fünfzehn Stunden später, nach Erreichen der Sättigungsphase in der A-Beta-Kontrolle ohne Zusatz von Liganden, wurde die ThT-Fluoreszenz der Koinkubation von D-Peptiden und A-Beta-Monomeren ausgewertet und prozentual in Abhängigkeit von der A-Beta-Kontrollinkubation dargestellt. Dabei zeigt sich, dass DO3 die A-Beta-Fibrillenbildung deutlich reduziert (**Fig. 2**).

[0063] Da für DO3 eine starke Inhibition der Fibrillation von A-Beta-1-42 beobachtet wurde, erfolgten zusätzliche Messungen mit dynamischer Lichtstreuung, um die Aggregatbildung im Allgemeinen, unabhängig von der Sekundärstruktur der Partikel, zu verfolgen. Hierfür wurden 5 μM A-Beta-1-42-Monomere und DO3 ebenfalls im Verhältnis 10:1, 2:1 sowie 1:1 untersucht. Es zeigte sich, dass eine Aggregatbildung in Anwesenheit von D β 3 stattgefunden

den hat (**Fig. 3**). Die Tatsache, dass bei den gleichen Konzentrationsverhältnissen im ThT-Test keine ThT-positiven Fibrillen detektiert werden konnten, deutet darauf hin, dass es sich bei den DO3-induzierten Partikeln nicht um fibrilläre Aggregate handelte, sondern um amorphe und wahrscheinlich nicht-toxische Aggregate. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits für das Peptid D3 gezeigt, dass toxische A β -Oligomere in nicht-toxische, amorphe Aggregate umwandelt. Somit ist DO3 sehr interessant im Hinblick auf die Therapie der AD.

[0064] Messungen mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie weisen eine Bindung von DO3 an N-terminal biotinylierte A-Beta-Monomere, A-Beta-Oligomere und A-Beta-Fibrillen (letztere bestehend aus 10 % N-terminal biotinyliertem A-Beta-Monomeren und 90 % nicht-biotinyliertem A-Beta-Monomeren nach (**Fig. 4**).

[0065] DO3 bindet an alle getesteten A-Beta-Konformere sehr affin (siehe **Fig. 4**). Im Falle der Bindung von DO3 an Monomere war es möglich, die erhaltenen Sensogramme mit Hilfe eines heterogenen Modells, bestehend aus zwei Teilreaktionen, zu beschreiben (KD1: 0,77 μM , KD2: 0,28 μM). Die Bindung an Oligomere lässt sich ausschließlich durch ein Modell, bestehend aus drei Teilreaktionen, beschreiben (KD1: 7,7 μM , KD2: 0,186 μM , KD3: 0,04 μM). Kongruent verhält sich die Bindung an Fibrillen, die sich ebenfalls durch drei Teilreaktionen beschreiben lässt (KD1: 12 μM , KD2: 0,76 μM , KD3: 0,119 μM). Momentan deutet sich demnach an, dass DO3 Monomere und besonders Oligomere sehr affin bindet.

Figurenliste

Fig. 1: ELISA zur relativen Quantifizierung der Bindung von DO3-FITC an verschiedene A β 1-42-Konformere. Seediess-Monomere aus Carboxy-terminal biotinyliertem A β , Monomere und Oligomere aus Aminoterminal biotinyliertem A β und Fibrillen, die aus 10% aminoterminal biotinyliertem A β und 90% nichtbiotinyliertem A β bestehen, wurden zu je 5 $\mu\text{g/ml}$ immobilisiert und das D-Peptid in einer Konzentration von 10 und 20 $\mu\text{g/ml}$ appliziert. Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Bindung der Peptide in einer zweifachen Bestimmung als Absorption (AU = absorption unit) bei 450 nm nach Abzug der Hintergrundabsorption.

Fig. 2: ThT-Aggregationstest von A-Beta-1-42 zur Quantifizierung des relativen Fibrillengehalts in Gegenwart von DO3. Die Konzentration von A-Beta-Monomer betrug 10 μM , DO3 wurde im Verhältnis von 10:1, 2:1 und 1:1 (A-Beta-Monomere:DO3) sowie als Kontrolle einzeln in einer 1, 5 und 10 μM Konzentration gemessen. Die Fluoreszenz von 10 μM A-Beta-Monomer

wurde als 100 % gesetzt und die Werte und Standardabweichungen der übrigen Inkubationen sind als prozentuale Anteile dieses Maximalwerts angegeben. RFU: relative Fluoreszenzeinheiten

Fig. 3: Zeitabhängige Messung der dynamischen Lichtstreuung von A β 1-42 in Gegenwart von DO3. Dargestellt ist der hydrodynamische Radius der Partikel in Abhängigkeit von der Zeit. Rechts angegeben sind molare Verhältnisse von A β 1-42 und DO3.

Fig. 4: Messung der Bindung von DO3 an A-Beta-Monomere (**Fig. 4a**), Oligomere (**Fig. 4b**) und Fibrillen (**Fig. 4c**). Auf verschiedenen Flusszellen wurden jeweils N-terminal biotinylierte A-Beta-1-42-Monomere und Oligomere/Fibrillen (bestehend aus 10 % N-terminal biotinyliertem A-Beta-Monomeren und 90 % nicht-biotinyliertem A-Beta-Monomeren) immobilisiert.

[0066] Die Messung erfolgte unter nativen Pufferbedingungen und bei 25 °C bei einer Flussrate von 30 μ l/min.

Es folgt ein Sequenzprotokoll als elektronisches Dokument. Dieses kann sowohl in DEPATISnet als auch im DPMAregister aufgerufen werden.

Patentansprüche

1. Peptid, enthaltend mindestens eine Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 und Homologe mit einer Identität von mindestens 70% davon und Polymere der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 und deren Homologe mit einer Identität von mindestens 70%.

2. Peptide nach Anspruch 1 **dadurch gekennzeichnet**, dass diese mit einer weiteren Substanz verknüpft sind.

3. Peptid nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Verwendung in der Medizin.

4. Peptid nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Behandlung der Morbus Alzheimer.

5. Peptid nach einem der vorangehenden Ansprüche **dadurch gekennzeichnet**, dass es im Wesentlichen aus D-Aminosäuren besteht.

6. Peptid nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Hemmung der Fibrillenbildung von Amyloid-Beta-Peptiden.

7. Peptid nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Bindung an aggregierte Amyloid-Beta-Peptide.

8. Verfahren zur Herstellung eines Peptids nach einem Ansprüche 1-7, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Peptid durch Peptid-Synthese oder Mutagenese hergestellt wird.

9. KIT, enthaltend ein Peptid nach einem der Ansprüche 1-7.

10. Zusammensetzung enthaltend ein Peptid nach einem der Ansprüche 1

11. Verwendung eines Peptids nach einem der Ansprüche 1-7 als Sonde zur Identifizierung, quantitativen und/oder qualitativen Bestimmung von Amyloid-Beta-Fibrillen und/oder Amyloid-Beta-Oligomeren.

12. Verwendung eines Peptids nach einem der Ansprüche 1-7 zur Verhinderung von Amyloid-Beta-Oligomeren und/oder Amyloid-Beta-Peptidaggregaten.

13. Verwendung eines Peptids nach einem der Ansprüche 1-7 zur Enttoxifizierung von toxischen Amyloid-Beta-Oligomeren und/oder Aggregaten.

14. Verwendung nach Anspruch 13 **dadurch gekennzeichnet**, dass Amyloid-Beta- Oligomere und/oder Aggregate mit dem Peptid nach einem der Ansprüche 1-7 amorphe, nicht toxische Aggregate bilden.

15. Verwendung des Peptids nach einem der Ansprüche 1-7 als Therapeutikum und zur Prävention von Morbus Alzheimer.

Es folgen 4 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

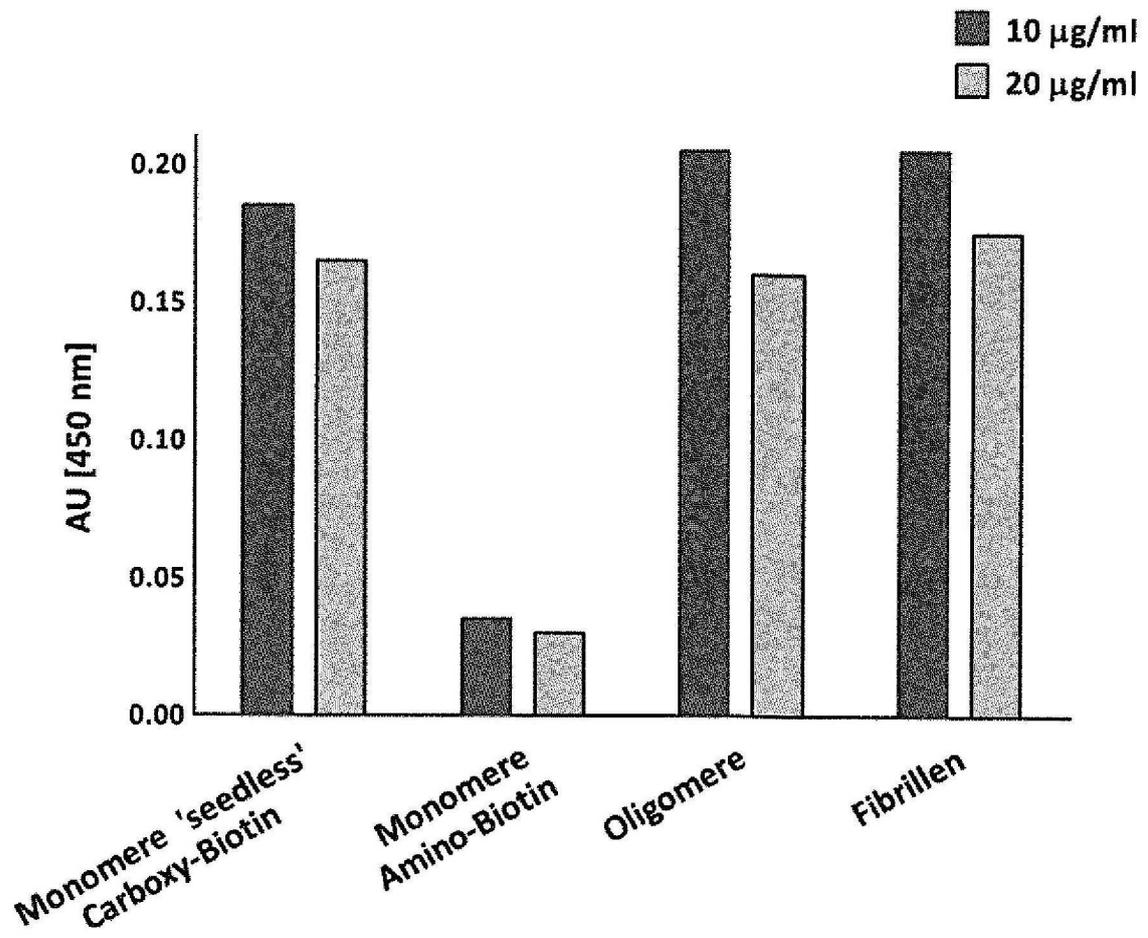


Fig. 1

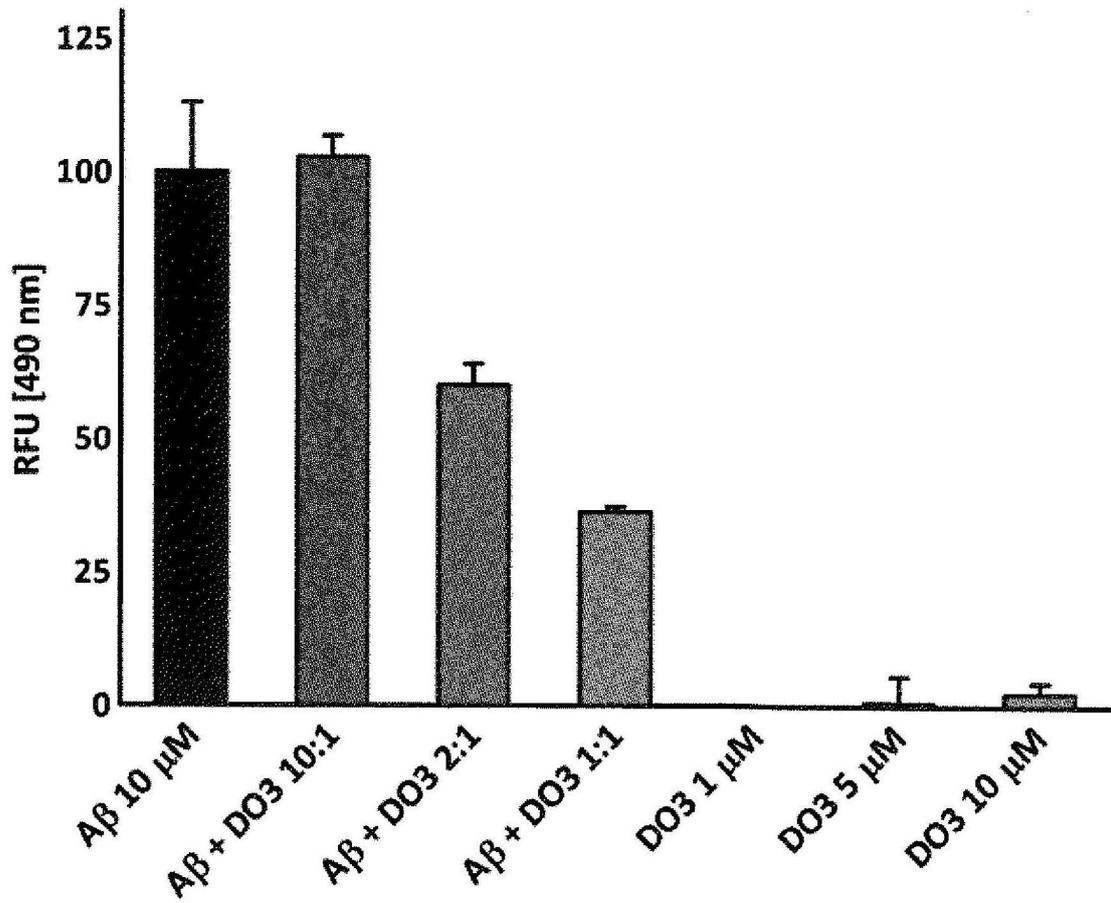


Fig. 2

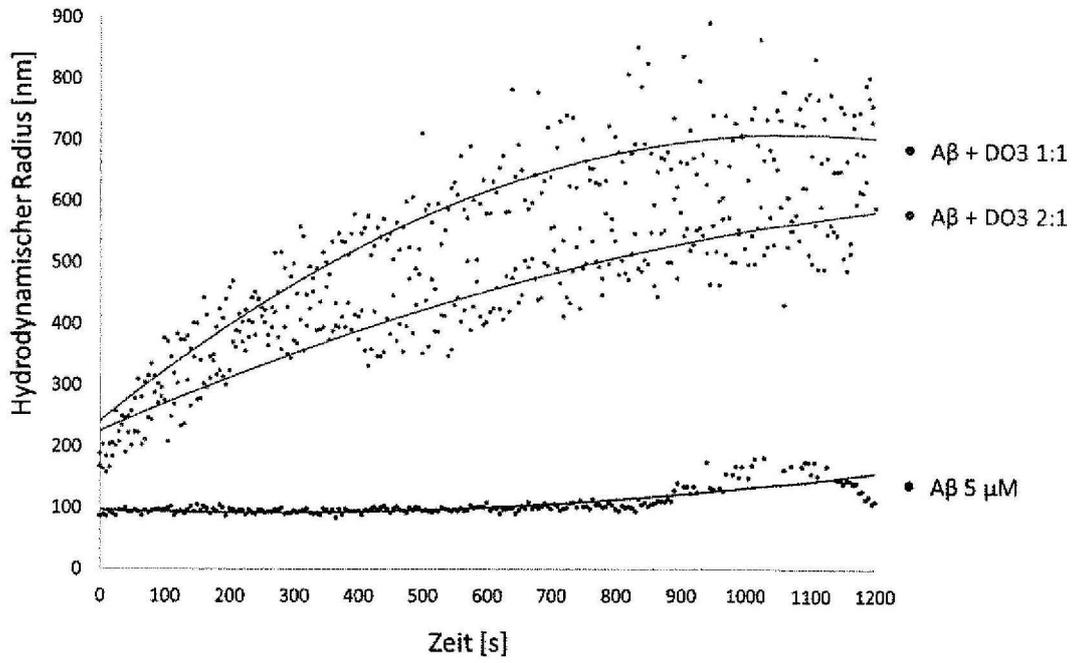


Fig. 3

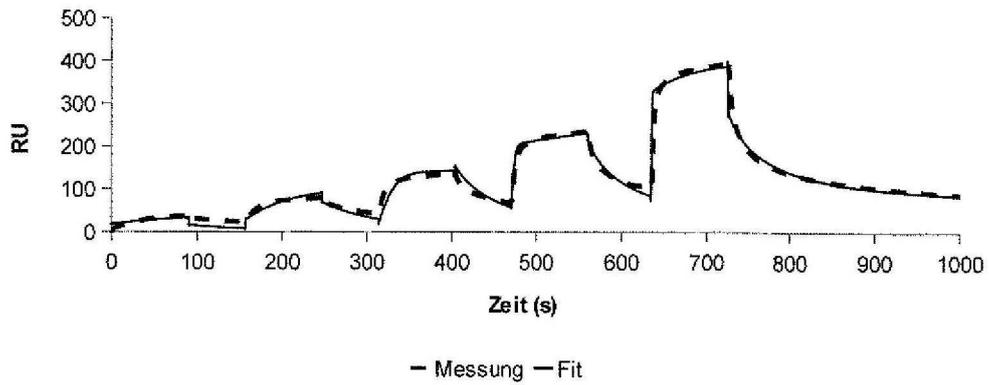


Fig. 4a

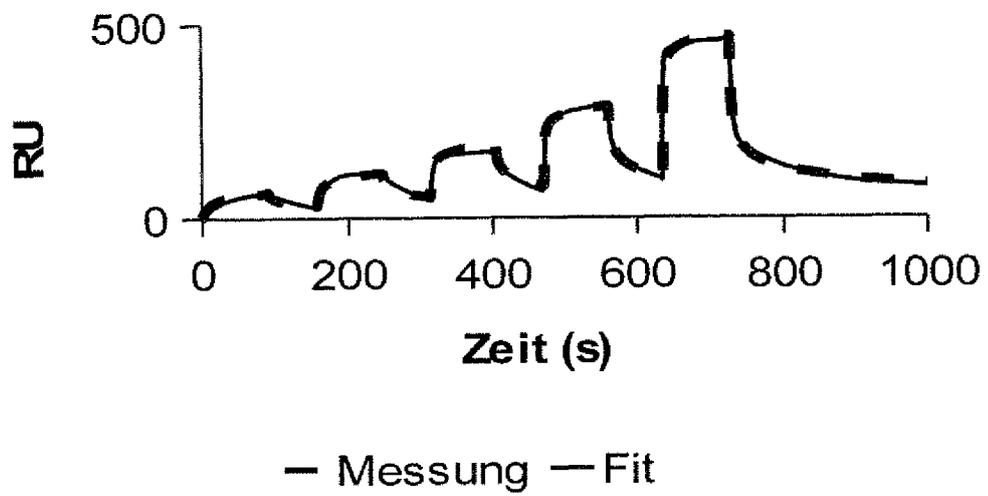


Fig. 4b

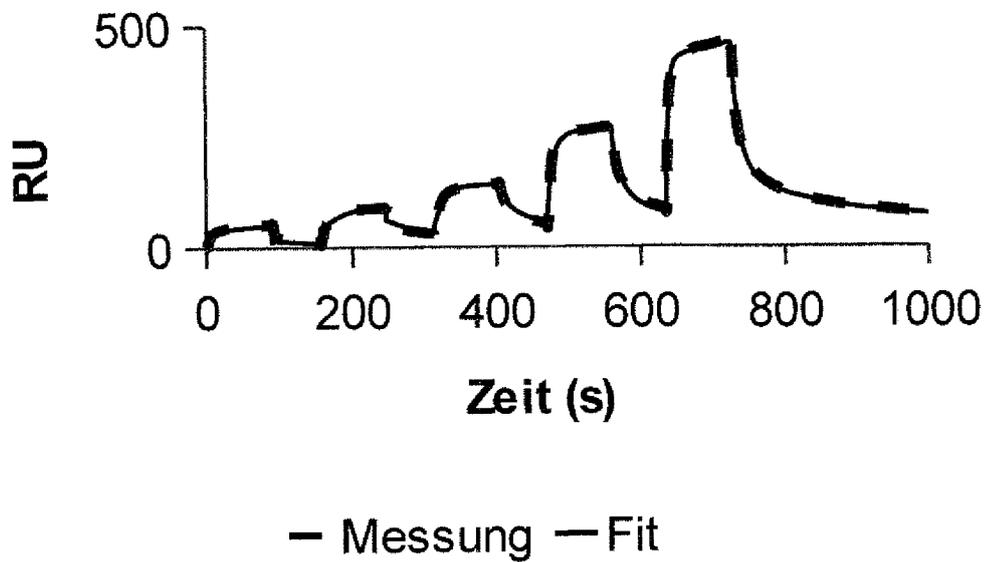


Fig. 4c