



(12) **Patentschrift**

(21) Aktenzeichen: **10 2022 105 061.0**  
(22) Anmeldetag: **03.03.2022**  
(43) Offenlegungstag: –  
(45) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: **01.06.2023**

(51) Int Cl.: **G01N 33/53 (2006.01)**  
**G01N 33/563 (2006.01)**  
**G01N 33/68 (2006.01)**  
**C07K 14/435 (2006.01)**  
**C07K 16/46 (2006.01)**  
**G01N 33/543 (2006.01)**  
**C07K 17/00 (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).

(73) Patentinhaber:  
**Wildburger, Norelle, 22307 Hamburg, DE**

(74) Vertreter:  
**Hansepatent Patentanwälte Andresen Scholz  
PartG mbB, 30171 Hannover, DE**

(72) Erfinder:  
**Erfinder gleich Patentinhaber**

(56) Ermittelter Stand der Technik:

**BUTLER, D.C. [u.a.]: Bifunctional Anti-Non-Amyloid Component  $\alpha$ -Synuclein Nanobodies Are Protective In Situ. PLoS One. (2016) 11 (11): e0165964, Druckseiten 1-15**

**GERDES, C. [u.a.]: A nanobody-based fluorescent reporter reveals human  $\alpha$ -synuclein in the cell cytosol. Nat. Commun. (2020) 11 (1):2729, Druckseiten 1-13**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zum Nachweis von multimeren, bevorzugt dimeren Peptiden unter Verwendung von Einzeldomänen-Antikörpern**

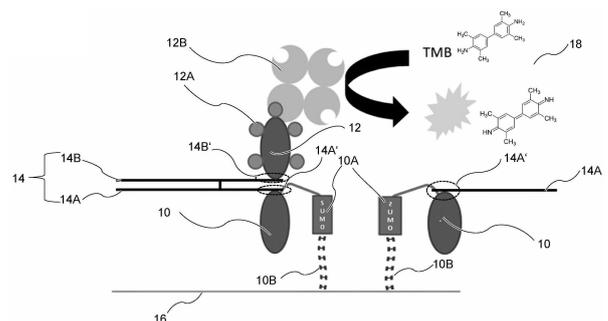
(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis eines multimeren, bevorzugt dimeren Peptids, enthaltend ein erstes und ein zweites Peptid-Monomer in einer Probe, umfassend die Verfahrensschritte:

A) Bereitstellen eines Trägermaterial-Antikörper-Konjugats, umfassend ein Trägermaterial, an dem ein für das erste Peptid-Monomer spezifischer Einzeldomänen-Trägerantikörper gebunden ist,

B) Inkontaktbringen der Probe mit dem Trägermaterial-Antikörper-Konjugat, wobei ein Komplex zwischen dem Trägermaterial-Antikörper-Konjugat und dem dimeren Peptid gebildet wird,

C) Inkontaktbringen des Komplexes mit einem für das zweite Peptid-Monomer spezifischen Einzeldomänen-Detektionsantikörper, der einen Detektionsmarker umfasst, wobei der Einzeldomänen-Detektionsantikörper an den Komplex bindet, wobei der Einzeldomänen-Trägerantikörper auf dem ersten Peptid-Monomer und der Einzeldomänen-Detektionsantikörper auf dem zweiten Peptid-Monomer das gleiche Epitop erkennen, und

D) Nachweis des dimeren Peptids mittels des Detektionsmarkers.  
Ein derartiges Verfahren erlaubt den gezielten Nachweis von multimeren oder dimeren Peptiden in einer Probe.



### Beschreibung

**[0001]** Bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise Alzheimer oder Parkinson können Proteinaggregate im Gehirn bzw. in Neuronen nachgewiesen werden. Viele dieser Proteinaggregate können nur schwer charakterisiert werden, wobei diese häufig aus schlecht definierten Multimeren, beispielsweise Dimeren oder Oligomeren von häufig zumindest teilweise ungefalteten Proteinen bestehen, was eine Detektion durch zum Beispiel Antikörper erschwert. Eine Detektion von neurodegenerativen Erkrankungen durch Antikörper wird auch durch heterophile Antikörper erschwert, die als unspezifische Antikörper mit Antigenen einer anderen Art kreuzreagieren und somit falsch positive Testergebnisse auslösen können. Immunoassays, bei denen ein Analyt durch Antikörper nachgewiesen wird, sind häufig empfindlich gegenüber kreuzreagierenden Substanzen, die falsche Testergebnisse liefern können. Ein weiteres Problem besteht darin, dass analytische Antikörper häufig sehr empfindlich sind, sodass bei fehlerhafter Handhabung eines Immunoassays falsche Testergebnisse geliefert werden.

**[0002]** Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Detektion von Multimeren, bevorzugt dimeren Peptiden bereitzustellen, das eine zuverlässigere Detektion von multimeren Peptiden erlaubt. Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zum Nachweis von Multimeren, bevorzugt dimeren Peptiden bereitzustellen, bei dem die Wahrscheinlichkeit von kreuzreagierenden, heterophilen Antikörpern verringert ist.

**[0003]** Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Detektion von multimeren Proteinen bereitzustellen, das bezüglich der oben genannten Nachteile verbessert ist. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zum Nachweis von Alpha-Synuclein, das ebenfalls bezüglich der oben genannten Nachteile verbessert ist. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin noch ein Kit zur Durchführung der Verfahren, Expressionskonstrukte zur Expression der spezifischen Antikörper, einer Positivkontrolle zur Durchführung der Verfahren, sowie bestimmte Trägermaterial-Antikörper-Konjugate die bei den Verfahren eingesetzt werden können.

**[0004]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis eines multimeren Peptids, bevorzugt eines dimeren Peptids, enthaltend ein erstes und ein zweites Peptid-Monomer in einer Probe, umfassend die Verfahrensschritte:

- A) Bereitstellen eines Trägermaterial-Antikörper-Konjugats, umfassend ein Trägermaterial an dem ein für das erste Peptid-Monomer spezifischer Einzeldomänen-Trägerantikörper gebunden ist,
- B) Inkontaktbringen der Probe mit dem Trägermaterial-Antikörper-Konjugat, wobei ein Komplex zwischen dem Trägermaterial-Antikörper-Konjugat und dem multimeren Peptid gebildet wird,
- C) Inkontaktbringen des Komplexes mit einem für das zweite Peptid-Monomer spezifischen Einzeldomänen-Detektionsantikörper, der einen Detektionsmarker umfasst, wobei der Einzeldomänen-Detektionsantikörper an den Komplex bindet, wobei der Einzeldomänen-Trägerantikörper auf dem ersten Peptid-Monomer und der Einzeldomänen-Detektionsantikörper auf dem zweiten Peptid-Monomer das gleiche Epitop erkennen, und
- D) Nachweis des multimeren Peptids mittels des Detektionsmarkers.

**[0005]** Im Gegensatz zu herkömmlichen Antikörpern verwendet das erfindungsgemäße Verfahren Einzeldomänen-Antikörper. Diese werden auch als „Nano-Antikörper“ oder „Nanobodies“ bezeichnet und sind einzelne, monomere Antikörperfragmente einer monomeren variablen Domäne eines Antikörpers. Diese Einzeldomänen-Antikörper können beispielsweise aus den monomeren variablen antigenbindenden Domänen von Schwere-Ketten-Antikörpern hergestellt werden, die von Knorpelfischen, wie Haien oder Kamelen produziert werden. Die Einzeldomänen-Antikörper sind somit antigenbindende Antikörperfragmente, die im Gegensatz zu herkömmlichen Antikörpern, die aus zwei schweren Ketten und zwei leichten Ketten aufgebaut sind, monomer sind. Diese Einzeldomänen-Antikörper sind häufig erheblich stabiler als herkömmliche Antikörper, sodass Verfahren zum Nachweis von Analyten, die auf Einzeldomänen-Antikörpern beruhen, zuverlässiger durchgeführt werden können. Weiterhin ist bei Verwendung von Einzeldomänen-Antikörpern das Auftreten von heterophilen, kreuzreagierenden Antikörpern gegenüber herkömmlichen Antikörpern deutlich reduziert. Somit sind auf Einzeldomänen-Antikörpern beruhende Nachweisverfahren deutlich zuverlässiger.

**[0006]** Das Trägermaterial-Antikörper-Konjugat erkennt dabei während des Verfahrensschrittes B) über den Einzeldomänen-Trägerantikörper das Epitop auf einem ersten Peptid-Monomer des multimeren Peptids und bindet über Komplexierung das multimer Peptid über das erste Peptid-Monomer an das Trägermaterial.

Das am Trägermaterial immobilisierte multimere Peptid kann dann mittels eines spezifischen Einzeldomänen-Detektionsantikörpers erkannt werden. Dabei wird ein Konjugat aus dem an das multimere Peptid gebundenen Einzeldomänen-Detektionsantikörper und dem an das Trägermaterial gebundenen multimeren Peptids, gebildet. Die Detektion des multimeren Peptids erfolgt dann über den Detektionsmarker, der mit dem Einzeldomänen-Detektionsantikörper verbunden ist.

**[0007]** Der Einzeldomänen-Trägerantikörper erkennt auf dem ersten Peptid-Monomer das gleiche Epitop wie der Einzeldomänen-Detektionsantikörper auf dem zweiten Peptid-Monomer. Da somit durch die Bindung des multimeren Peptids an den Einzeldomänen-Trägerantikörper das Epitop bereits besetzt ist, wird ein zweites Peptid-Monomer innerhalb des multimeren Peptids benötigt, um das gleiche Epitop für die Bindung an den Einzeldomänen-Trägerantikörper zur Verfügung zu stellen. Das erfindungsgemäße Verfahren ist somit in der Lage, innerhalb von multimeren Protein-Agglomeraten dimere Peptide zu detektieren. Das multimere Peptid kann dabei eine beliebige Anzahl von Monomeren aufweisen, beispielsweise kann es ein Trimer oder ein Tetramer mit drei oder vier monomeren Peptiden sein. Bevorzugt ist die Detektion eines dimeren Peptids bei dem erfindungsgemäßen Verfahren. Insbesondere bevorzugt kann das erfindungsgemäße Verfahren zum Nachweis eines Homo-Dimers verwendet werden, bei dem zwei gleiche Peptid-Monomere das Dimer bilden.

**[0008]** Im Verfahrensschritt B) bindet der Einzeldomänen-Trägerantikörper an das erste Peptid-Monomer, wobei das von dem Einzeldomänen-Detektionsantikörper auf dem ersten Peptid-Monomer erkannte Epitop blockiert wird. Der Einzeldomänen-Detektionsantikörper kann daher das Peptid lediglich auf dem zweiten Peptid-Monomer binden. Somit ist das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere zum Nachweis von dimeren Peptiden auch in Protein-Agglomeraten oder Protein-Oligomeren geeignet.

**[0009]** Bevorzugt kann das erfindungsgemäße Verfahren zum Nachweis von Dimeren ausgewählt aus: Beta Amyloid Peptid-Dimer, Tau-Dimer, phosphoryliertem Tau-Dimer oder Alpha-Synuclein-Dimer verwendet werden. Bevorzugt wird das Verfahren zur Detektion von Alpha-Synuclein-Dimer verwendet.

**[0010]** Insbesondere kann das erfindungsgemäße Verfahren zum Nachweis von Dimeren in multimeren Proteinaggregaten des Beta Amyloids, des Tau-Proteins oder des Alpha-Synucleins verwendet werden.

**[0011]** Beta Amyloid-Dimere, bzw. Aggregate des Beta-Amyloid entstehen durch Zerschneiden des Amyloid-Precursor-Proteins durch Enzyme wie Beta-Sekretase oder Gamma-Sekretase und werden in senilen Plaques bei Patienten mit beispielsweise Alzheimer gefunden. Ablagerungen des Tau-Proteins, die das Tau-Dimer enthalten können, werden beispielsweise ebenfalls bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie Alzheimer oder bei der chronisch traumatischen Enzephalopathie gefunden. Diese Erkrankungen werden auch als Tauopathien bezeichnet und sind unter anderem durch die Ansammlung von Aggregaten des Tau-Proteins im Gehirn von Patienten gekennzeichnet.

**[0012]** Alpha-Synuclein ist ein kleines lösliches Protein, das bei Wirbeltieren unter anderem die Dopamin-Ausschüttung kontrolliert. Bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie Parkinson oder der Lewvy-Körperchen-Demenz können Ablagerungen von Alpha-Synuclein-Aggregaten im Gehirn-Gewebe von Patienten nachgewiesen werden. Das erfindungsgemäße Verfahren kann somit auch zum Nachweis von Synucleinopathien verwendet werden, die durch die Ansammlung von Aggregaten des Alpha-Synucleins im Gehirn von Patienten gekennzeichnet sind.

**[0013]** Das vom Einzeldomänen-Trägerantikörper und vom Einzeldomänen-Detektionsantikörper erkannte Epitop auf dem ersten Peptid-Monomer und dem zweiten Peptid-Monomer kann beispielsweise eine Proteinsequenz einer Länge zwischen 10 bis 40 Aminosäuren, bevorzugt zwischen 15 bis 30 Aminosäuren sein, an die die Einzeldomänen-Antikörper binden.

**[0014]** Das multimere Peptid kann insbesondere ein dimeres Peptid sein. Das Dimere Peptid kann ein Monomer aufweisen, das eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 %, weiter bevorzugt identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 1 (humanes Alpha-Synuclein), oder der SEQ. ID Nr. 2 (humanes Tau-Protein) oder der SEQ. ID Nr. 3 (humanes Beta-Amyloid) ist.

**[0015]** Der Prozentsatz der Identität zweier Nukleinsäuresequenzen oder zweier Aminosäuresequenzen kann mit dem Algorithmus von Thompson et al. (CLUSTALW, 1994 Nucleic Acid Research 22: 4673-4, 680) bestimmt werden. Eine Nukleotidsequenz oder eine Aminosäuresequenz kann auch als so genannte „Abfragesequenz“ verwendet werden, um eine Suche in öffentlichen Nukleinsäure- oder Proteinsequenzdatenbanken durchzuführen, um z. B. weitere unbekannt homologe Sequenzen zu identifizieren, die auch in Ausführ-

rungsformen dieser Erfindung verwendet werden können. Solche Suchen können mit dem Algorithmus von Karlin und Altschul (1999 Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 87: 2.264 bis 2.268) durchgeführt werden, modifiziert wie in Karlin und Altschul (1993 Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 90: 5.873 bis 5.877). Ein solcher Algorithmus ist in den Programmen NBLAST und XBLAST von Altschul et al. (1999 Journal of Molecular Biology 215: 403 bis 410) enthalten. Auch das Programm BLAST kann verwendet werden (Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410). Wenn zwischen zwei Sequenzen Lücken bestehen, kann Gapped BLAST verwendet werden, wie in Altschul et al. (1997 Nucleic Acid Research, 25: 3.389 bis 3.402) beschrieben.

**[0016]** Einem Fachmann ist bekannt, dass große Plasmide nicht nur mit herkömmlichen Klonierungstechniken, sondern auch mit Hilfe von Techniken hergestellt werden können, wie sie in den US-Patenten US 6,472,184 B1 mit dem Titel „Method for Producing Nucleic Acid Polymers“ und US 5,750,380 mit dem Titel „DNA Polymerase Mediated Synthesis of Double Stranded Nucleic Acid Molecules“ beschrieben sind, die hiermit in vollem Umfang durch Bezugnahme aufgenommen werden. Diese Techniken erlauben die Synthese von großen Plasmiden mittels Festphasen-Synthese, ohne dass die Plasmide in Zellkulturen amplifiziert werden müssen.

**[0017]** Bei dem Verfahren kann ein Trägermaterial-Antikörper-Konjugat verwendet werden, bei dem der Einzeldomänen-Trägerantikörper über einen Peptid-Linker an das Trägermaterial gebunden ist. Der Peptid-Linker weist eine Länge von zumindest 20 Aminosäuren auf und umfasst einen alpha-helikalen Bereich. Ein derartiger Peptid-Linker ist besonders dazu geeignet den Einzeldomänen-Trägerantikörper an das Trägermaterial zu binden, ohne dessen biologische Aktivität zu beeinträchtigen. Bevorzugt weist der Peptid-Linker eine Länge zwischen 30 bis 130 Aminosäuren, weiter bevorzugt eine Länge zwischen 50 bis 120 Aminosäuren auf. Derartige Längen sind besonders geeignet, den Einzeldomänen-Trägerantikörper ohne nennenswerte Beeinträchtigung der biologischen Aktivität an das Trägermaterial zu ihm mobilisieren. Der Peptid-Linker kann bei der vorliegenden Erfindung z.B. eine Aminosäuresequenz aufweisen, die eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 %, besonders bevorzugt zumindest 98%, weiter besonders bevorzugt zumindest 99% zu der Aminosäuresequenz eines SUMO-Proteins, wie z.B. einem humanen SUMO-Protein und/oder einem Maus-SUMO-Protein und/oder einem Hefe-SUMO-Protein, wie z.B. dem Hefe-SUMO-Protein Ubiquitin-like protein SMT3, dessen Aminosäuresequenz unter der Identifikationsnummer Q12306 (SMT3\_YEAST) in der UniProt protein knowledgebase (UniProtKB) beschrieben ist, aufweisen. Insbesondere sind z.B. auch die unter den folgenden Identifikationsnummern in der UniProt protein knowledgebase hinterlegten Proteine „SUMO-Proteine“ im Sinne der vorliegenden Erfindung: P63165 (SUMO1\_HUMAN), P61956 (SUMO2\_HUMAN), P55854 (SUMO3\_HUMAN), Q6EEV6 (SUMO4\_HUMAN), G2XKQ0 (SUMO5\_HUMAN), P63166 (SUMO1\_MOUSE), P61957 (SUMO2\_MOUSE), Q9Z172 (SUMO3\_MOUSE) sowie O14399 (UBL1\_SCHPO).

**[0018]** Bevorzugt weist der Peptid-Linker einen alpha-helikalen Bereich auf, der ausgewählt ist aus dem alpha-helikalen Bereich eines SUMO-Peptids (small ubiquitin-like modifier peptide) oder eines Fc-Bereichs eines Antikörpers. Bevorzugt weist der Peptid-Linker eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 % zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 4 (humanes SUMO1), SEQ ID Nr. 5 (mouse SUMO), SEQ ID Nr. 6 (humanes SUMO2), SEQ ID Nr. 7 (humanes SUMO3), SEQ ID Nr. 8 (Hefe SUMO), oder SEQ ID Nr. 9 (Fc-Bereich eines humanen Antikörpers) auf. Dabei handelt es sich um Fragmente der humanen SUMO Sequenzen 1 bis 3, einem Fragment einer SUMO Sequenz der Maus sowie um ein Fragment einer SUMO-Sequenz aus der Hefe. Die Erfinder des vorliegenden Verfahrens haben festgestellt, dass diese SUMO-Fragmente sowie der Fc-Bereich eines humanen Antikörpers besonders dazu geeignet sind Einzeldomänen-Antikörper an ein Trägermaterial ohne Verlust der biologischen Aktivität zu immobilisieren.

**[0019]** Der Peptid-Linker kann über eine Tag-Sequenz an das Trägermaterial gebunden sein. Eine derartige Tag-Sequenz ermöglicht besonders zuverlässig die Anbindung des Einzeldomänen-Träger Antikörpers an das Trägermaterial über den Peptid-Linker. Die Tag-Sequenz ist bevorzugt eine His-Tag-Sequenz, die weiterhin bevorzugt eine Länge zwischen drei und 20 Histidinen aufweist. Beispielsweise kann eine Tag-Sequenz mit sechs Histidinen oder eine Tag-Sequenz mit 14 Histidinen zur Anbindung an das Trägermaterial verwendet werden. Weiterhin ist es auch möglich einen GST-Tag zu verwenden, der eine Glutathione-S-transferase ist. Ein derartiger GST-Tag kann ebenfalls gut an Trägermaterialien anbinden und somit die Bindung des Einzeldomänen-Trägerantikörpers über den Peptid-Linker an das Trägermaterial ermöglichen. Die Tag-Sequenz mit dem Peptid-Linker kann über den N-Terminus oder den C-Terminus des Einzeldomänen-Träger Antikörpers gebunden sein. Bevorzugt findet die Bindung der Tag-Sequenz und des Peptid-Linker an den N-Terminus des Einzeldomänen-Träger Antikörpers statt. Eine Bindung über den N-Terminus des Einzeldomänen-

Trägerantikörpers ermöglicht besonders gut eine Immobilisierung des Einzeldomänen-Antikörpers an das Trägermaterial ohne Verlust der biologischen Aktivität. Die Tag-Sequenz kann weiterhin eine korrekte Orientierung des Einzeldomänen-Trägerantikörpers auf dem Trägermaterial bedingen. Dies ermöglicht es insbesondere sicherzustellen, dass der Einzeldomänen-Trägerantikörper einerseits an das Trägermaterial immobilisiert wird, aber andererseits noch in der Lage ist das Epitop des ersten Peptid-Monomers zu binden.

**[0020]** Gemäß einer weiteren Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Verfahrens kann der Einzeldomänen-Trägerantikörper und der Einzeldomänen-Detektionsantikörper der gleiche Einzeldomänen-Antikörper sein. Dies ermöglicht besonders einfach die Detektion des gleichen Epitops auf dem ersten Peptid-Monomer und dem zweiten Peptid-Monomers des multimeren Peptids.

**[0021]** Gemäß einer weiteren Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens sind der Einzeldomänen-Trägerantikörper und der Einzeldomänen-Detektionsantikörper spezifisch für alpha-Synuclein. Bevorzugt haben der Einzeldomänen-Trägerantikörper und der Einzeldomänen-Detektionsantikörper eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 % zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 (Einzeldomänen-Antikörper NbSyn2), oder zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 11 (Einzeldomänen-Antikörper NbSyn87), besonders bevorzugt sind sie identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 (Einzeldomänen-Antikörper NbSyn2), oder zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 11 (Einzeldomänen-Antikörper NbSyn87). Der Einzeldomänen-Antikörper mit der SEQ. ID. Nr. 10, der Einzeldomänen-Antikörper „NbSyn2“ kann insbesondere am C-Terminus von Alpha-Synuclein binden, der zwischen alpha-Synuclein von verschiedenen Spezies besonders konserviert ist. Dabei kann „NbSyn2“ alpha-Synuclein von verschiedensten Spezies, unter anderem Homo Sapiens, oder der Maus (*mus musculus*) erkennen. Im Gegensatz dazu ist der Einzeldomänen-Antikörper mit der SEQ. ID. Nr. 11, bekannt als „Nbsyn87“. Dieser Einzeldomänen-Antikörper bindet an eine weniger konservierte Region des humanen Alpha-Synucleins, und ist somit zur Detektion von primär humanem alpha-Synuclein geeignet.

**[0022]** Das Epitop auf dem ersten Peptid-Monomer und das Epitop auf dem zweiten Peptid-Monomer können ausgewählt sein aus einer Aminosäuresequenz mit der SEQ. ID. Nr. 12 (Aminosäuren 118-131 von Alpha-Synuclein erkannt von NbSyn87) oder SEQ. ID. Nr. 13 (Aminosäuren 137-140 von Alpha-Synuclein erkannt von NbSyn2). Das Epitop mit der SEQ. ID. Nr. 13 stellt ein hoch konserviertes Epitop von Alpha-Synuclein von verschiedensten Spezies dar und kann somit zur Detektion von Alpha-Synuclein aus verschiedensten Quellen verwendet werden. Im Gegensatz dazu ist das Epitop mit der SEQ. ID. Nr. 12 primär zur Detektion von humanem alpha-Synuclein geeignet.

**[0023]** Im Verfahrensschritt A) kann ein Trägermaterial-Antikörper-Konjugat bereitgestellt werden, dessen Trägermaterial einen Kunststoff umfasst. Bevorzugt ist der Kunststoff ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus: Polyolefin, Polystyrol, Polyamid, Polyurethan, Polyvinylchlorid, phenolische Polymere, Nitrocellulose, Latex, Polysaccharid, Kompositmaterial, Keramik, Siliziumdioxid, Graphen und Metall. Siliziumdioxid kann Silizium Wafer, Siliziumnitrid oder Glas als Materialien umfassen.

**[0024]** Das Trägermaterial umfasst bevorzugt eine Mikrotiterplatte, Mikrokugeln, ein mikrofluidisches System (Lab-on-a-Chip-System), oder ein Mikronadel-Pflaster, das eine der oben genannten Materialien aufweist. Mikrotiterplatten, Mikrokugeln oder ein Mikronadel-Pflaster sind besonders gut geeignet den Einzeldomänen-Trägerantikörper zu immobilisieren und eine anschließende Bindung mit dem Einzeldomänen-Detektionsantikörper im Verfahrensschritt C) und den nachfolgenden Nachweis im Verfahrensschritt D) durchzuführen. Das Material der Mikrotiterplatten, Mikrokugeln oder des Mikronadel-Pflasters sind bevorzugt Kunststoffe, ausgewählt aus der Gruppe aus: Polyolefin, Polystyrol, Polyvinylchlorid, Polyamid, besonders bevorzugt Polystyrol oder Polyvinylchlorid. Weitere bevorzugte Materialien sind Graphen oder Siliziumdioxid.

**[0025]** Beispielsweise kann eine Mikrotiterplatte-Platte mit voneinander isolierten Nöpfchen (engl. wells) verwendet werden. Insbesondere kann eine Mikrotiterplatte-Platte mit 96 Nöpfchen verwendet werden. Eine derartige Mikrotiterplatte-Platte kann für einen Immunoassay gemäß eines erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet werden, bei dem Einzeldomänen-Antikörper verwendet werden.

**[0026]** Im Verfahrensschritt B) eines erfindungsgemäßen Verfahrens kann der Einzeldomänen-Trägerantikörper des Trägermaterial-Antikörper-Konjugats in einer Lösung aufweisend einen pH zwischen 6,9 bis 8, bevorzugt einem pH zwischen 7,2 bis 7,6 und einer Alkalimetallsalzkonzentration zwischen 120 mM und 140 mM und einer Phosphat-Ionen-Konzentration zwischen 10 mM und 15 mM an das dimere Peptid binden.

**[0027]** Im Verfahrensschritt C) eines erfindungsgemäßen Verfahrens kann der Einzeldomänen-Detektionsantikörper in einer Lösung aufweisend einen pH zwischen 6,9 bis 8, bevorzugt einem pH zwischen 7,2 bis 7,6 und einer Alkalimetallsalzkonzentration zwischen 120 mM und 140 mM und einer Phosphat-Ionen-Konzentration zwischen 10 mM und 15 mM an das dimere Peptid binden.

**[0028]** Diese Bedingungen entsprechen physiologischen Bedingungen und ermöglichen besonders gut eine Bindung sowohl des Einzeldomänen-Trägerantikörpers als auch des Einzeldomänen-Detektionsantikörpers an die Epitope des dimeren Peptids. Besonders gut zur Durchführung der Verfahrensschritte B) und C) ist eine phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS = phosphate buffered saline) geeignet. Die Lösung enthält 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid als Alkalimetall-Salze und 12 mM Gesamt-Phosphat (in Form von  $\text{HPO}_4^{2-}$  und  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ). Der pH-Wert der eingestellten Pufferlösung ist 7,4. Die Phosphat-gepufferter Salzlösung entspricht dem osmotischen Druck des menschlichen Organismus.

**[0029]** Bei einer Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Verfahrens kann im Verfahrensschritt C) ein Einzeldomänen-Detektionsantikörper verwendet werden, der einen Detektionsmarker umfasst, der ausgewählt ist aus einer Gruppe bestehend aus: Biotin, biotinylierbare Peptidsequenz, bevorzugt Avitag, Chemilumineszenz Marker, und Fluoreszenz-Marker.

**[0030]** Biotin als Detektionsmarker bindet stark an Streptavidin und Avidin. Diese Moleküle können mit Enzymen, beispielsweise der Meerrettich-Oxidase, der alkalischen Phosphatase oder der Glucose-Peroxidase gekoppelt werden, die mittels einer Farbreaktion einen Nachweis des multimeren Peptids, insbesondere des dimeren Peptids erlauben. Die alkalische Phosphatase kann beispielsweise als Farbstoff-Substrat farbloses p-Nitrophenylphosphat umsetzen, das in das schwachgelbe p-Nitrophenol umgewandelt wird. Bei der Peroxidase wird als Farbstoff-Substrat o-Phenylendiamin eingesetzt.

**[0031]** Anstelle von Farbstoff-Reaktionen können auch Chemilumineszenz-Reaktionen zur Detektion des multimeren Peptids eingesetzt werden. Beispielsweise kann bei der MSD-Reaktion (Meso Scale Discovery) ein Einzeldomänen-Detektionsantikörper verwendet werden, der an ein Metall, wie beispielsweise Ruthenium gekoppelt ist. Die Mikrotiterplatte weist am Boden der Näpfcchen eine Elektrode auf. Die Bindung des an Ruthenium gekoppelten Einzeldomänen-Detektionsantikörpers ermöglicht eine Redox-Reaktion mit der Elektrode in den Näpfcchen, die Licht produziert, das von einer CCD-Kamera detektiert werden kann. Ein derartiges MSD-Nachweisverfahren kann empfindlicher sein als eine Farbreaktion. Möglich ist auch der Einsatz von Einzeldomänen-Detektionsantikörpern, die an fluoreszierende Moleküle als Detektionsmarker gebunden sind, wobei die Detektion mittels eines Lasers besonders empfindlich erfolgt, wobei auch die Detektion von einzelnen Molekülen möglich ist (Single Molecule Counting (SMC<sup>TM</sup>) Immunoassay Technologie).

**[0032]** Alternativ kann auch ein Einzeldomänen-Detektionsantikörper verwendet werden, der am C-Terminus einen Avi-Tag aufweist, eine Sequenz, die mittels des Enzyms Biotin-Ligase (BirA) spezifisch mit Biotin als Marker versehen werden kann.

**[0033]** Bei einer weiteren Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Verfahrens kann eine positive Kontroll-Reaktion durchgeführt werden, wobei als dimeres Peptid für die positive Kontroll-Reaktion ein Homodimer verwendet wird, dessen Monomer eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 90 % mit der Aminosäuresequenz der SEQ. 10. Nr. 14 (Aminosäuresequenz von Ser87-Cys) aufweist, mit der Maßgabe dass die Aminosäure Cystein an Position 87 der SEQ. ID. Nr. 14 unverändert bleibt. Ein derartiges Homodimer weist aufgrund der Aminosäure Cystein an Position 87 eine Disulfid-Brücke auf, die das Homodimer stabilisiert. Ein derartiges stabilisiertes Homodimer ist besonders als Positiv-Kontrolle für eine erfindungsgemäße Nachweisreaktion geeignet.

**[0034]** Im Verfahrensschritt B) des erfindungsgemäßen Verfahrens kann eine Probe einer Hirnflüssigkeit, Rückenmarksflüssigkeit, Blut, Serum, Plasma, einer Speichelprobe, einer Gewebe-Biopsie, Rachenabstrich, Nasenabstrich, Urin, Exosomen-Diagnostik eines Patienten verwendet werden. Derartige Proben sind besonders gut geeignet ein dimeres Protein, insbesondere Alpha-Synuclein nachzuweisen.

**[0035]** Das erfindungsgemäße Verfahren kann insbesondere dazu eingesetzt werden zu bestimmen, ob ein symptomfreier Patient ein Risiko trägt, an Parkinsonkrankheit zu erkranken. Dabei wird insbesondere Alpha-Synuclein-Dimer in polymorphen Peptid-Oligomeren nachgewiesen. Die polymorphen Peptid-Oligomere können eine Vielzahl von schlecht charakterisierten Proteinaggregaten, beispielsweise Dimere, Trimere, Tetramere oder Multimere aufweisen.

**[0036]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zum Nachweis von Alpha-Synuclein in einer Probe eines Patienten, umfassend die Verfahrensschritte:

- A) Bereitstellen eines Trägermaterial-Antikörper-Konjugats, umfassend ein Trägermaterial, an dem ein für Alpha-Synuclein spezifischer Einzeldomänen-Trägerantikörper gebunden ist,
- B) Inkontaktbringen der Probe umfassend Alpha-Synuclein mit dem Trägermaterial-Antikörper-Konjugat wobei ein Komplex zwischen dem Trägermaterial-Antikörper-Konjugat und dem Alpha-Synuclein gebildet wird,
- C) Inkontaktbringen des Komplexes mit einem für Alpha-Synuclein spezifischen Einzeldomänen-Detektionsantikörper, der einen Detektionsmarker umfasst, wobei der Einzeldomänen-Detektionsantikörper an den Komplex bindet und
- D) Nachweis des Alpha-Synuclein mittels des Detektionsmarkers.

**[0037]** Ein derartiges Verfahren ermöglicht aufgrund der Einzeldomänen-Trägerantikörper und der Einzeldomänen-Detektionsantikörper einen besonders zuverlässigen Nachweis von Alpha-Synuclein.

**[0038]** Bei einem derartigen Verfahren können insbesondere auch Monomere des Alpha-Synuclein nachgewiesen werden. Dabei können verschiedene Einzeldomänen-Antikörper als Einzeldomänen-Trägerantikörper und als Einzeldomänen-Detektionsantikörper verwendet werden, die unterschiedliche Epitope von Alpha-Synuclein erkennen.

**[0039]** Ein derartiges Verfahren ermöglicht es besonders einfach Monomere des Alpha-Synuclein nachzuweisen, da unterschiedliche Epitope auf einem monomeren Alpha-Synuclein erkannt werden. Derartige Verfahren können dazu dienen in Kombination mit Verfahren zum Nachweis von dimeren Alpha-Synuclein in Alpha-Synuclein-Agglomeraten ein Verhältnis von dimeren Alpha-Synuclein zu monomeren Alpha-Synuclein zu bestimmen. Bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise Alzheimer ist eine Zunahme des Verhältnisses von dimeren Alpha-Synuclein zu monomeren Alpha-Synuclein zu erwarten.

**[0040]** Gemäß einer weiteren Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Verfahrens dient das Verfahren zum Nachweis von Parkinson im Menschen oder zur Bestimmung ob ein symptomfreier menschlicher Patient ein Risiko trägt, an Parkinson zu erkranken. Als Einzeldomänen-Trägerantikörper wird ein Einzeldomänen-Antikörper verwendet, der eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 % zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 11 (NbSyn87) aufweist. Besonders bevorzugt kann der Einzeldomänen-Trägerantikörper identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 11 sein. Der Einzeldomänen-Antikörper „NbSyn87“ kann, wie oben bereits dargelegt, spezifisch ein C-terminale Ende des humanen Alpha-Synuclein detektieren und ist somit besonders zur Bestimmung von Parkinson im Menschen geeignet.

**[0041]** Eine weitere Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Verfahrens dient zum Nachweis von Alpha-Synuclein in Wirbeltieren ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus: Mensch, Maus, Affe, wobei als Einzeldomänen-Trägerantikörper ein Einzeldomänen-Antikörper verwendet wird, der eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 % zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 (NbSyn2) aufweist. Besonders bevorzugt kann der Einzeldomänen-Trägerantikörper identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 sein. Wie bereits oben beschrieben kann der Antikörper „NbSyn2“ Alpha-Synuclein von verschiedenen Spezies, umfassend Mensch, Maus und Affe detektieren.

**[0042]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Kit zur Durchführung eines Verfahrens wie oben beschrieben, wobei innerhalb eines Protein-Agglomerats ein multimeres Peptid, enthaltend ein erstes und ein zweites Peptid-Monomer in einer Probe nachgewiesen werden kann. Das Kit umfasst die folgenden Bestandteile:

- ein Trägermaterial-Antikörper-Konjugat, umfassend ein Trägermaterial, an dem ein für das erste Peptid Monomer spezifischer Einzeldomänen-Trägerantikörper gebunden ist
- ein für das zweite Peptid-Monomer spezifischer Einzeldomänen-Detektionsantikörper, der einen Detektionsmarker umfasst,
- Reagenzien zum Nachweis des multimeren Peptids unter Verwendung des Detektionsmarkers.

**[0043]** Ein derartiges Kit kann zum Nachweis von multimeren Peptiden, enthaltend ein erstes und ein zweites Peptid-Monomer verwendet werden. Insbesondere ist das Kit zum Nachweis von dimeren Peptiden ent-

haltend ein erstes und ein zweites Peptid-Monomer geeignet. Dabei können in dem Kit die oben genannten Reagenzien, insbesondere die Trägermaterial-Antikörper-Konjugate, die Einzeldomänen-Detektionsantikörper mit dem Detektionsmarker und geeignete Nachweisreagenzien, wie oben beschrieben, enthalten sein.

**[0044]** Das Kit kann weiterhin auch Instruktionen zur Durchführung der hier beschriebenen Verfahren enthalten. Insbesondere können die Instruktionen eine Schritt-für-Schritt-Anleitung zur Durchführung eines Verfahrens zur Detektion eines multimeren Peptids mit den Verfahrensschritten A) bis D), wie oben beschrieben, umfassen.

**[0045]** In dem Kit können der Einzeldomänen-Detektionsantikörper und der Einzeldomänen-Trägerantikörper in lagerstabiler Form, beispielsweise in lyophilisierter Form vorhanden sein. Weiterhin können noch Puffer-Lösungen zur Durchführung des Verfahrens, beispielsweise eine PBS-Lösung im Kit vorhanden sein. Ebenso kann eine Waschlösung zum Abwaschen von nicht gebundenen Probenbestandteilen vorhanden sein, die die Entfernung von nicht gebundenen Bestandteilen einer Probe ermöglicht, nachdem der Komplex zwischen dem Trägermaterial-Antikörper-Konjugat und dem multimeren, bevorzugt dimeren Peptid gebildet wurde. Ebenso kann das Trägermaterial, das geeignet ist zur Anbindung des Einzeldomänen-Trägerantikörpers im Kit bereits vorhanden sein. Dies können insbesondere Mikrotiterplatten, Mikrokugeln oder ein Mikronadel-Pflaster sein.

**[0046]** Der Einzeldomänen-Trägerantikörper und/oder der Einzeldomänen-Detektionsantikörper des Kits können eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 % zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 (NbSyn2) oder der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 11 (NbSyn87) aufweisen. Besonders bevorzugt können der Einzeldomänen-Trägerantikörper und/oder der Einzeldomänen-Detektionsantikörper identisch zu den Aminosäuresequenzen der SEQ. ID. Nr. 11 oder der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 sein.

**[0047]** Das Kit kann weiterhin zum Nachweis eines Alpha-Synuclein-Dimers dienen und als Standard für eine positive Kontroll-Reaktion ein Homodimer von Alpha-Synuclein umfassen, wobei das Monomer eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 90 % mit der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 14 (Alpha-Synuclein Ser87Cys) aufweist, mit der Maßgabe dass die Aminosäure Cystein an Position 87 der SEQ. ID. Nr. 14 unverändert bleibt. Ein derartiges Homodimer weist aufgrund der Aminosäure Cystein an Position 87 eine Disulfid-Brücke auf, die das Homodimer stabilisiert. Daher ist dieses Protein besonders gut als Standard geeignet.

**[0048]** Alternativ oder zusätzlich kann das Kit auch zum Nachweis eines Alpha-Synuclein in der Probe eines Patienten dienen, wobei dann bevorzugt monomeres Alpha-Synuclein als Standard im Kit verwendet werden kann.

**[0049]** Insbesondere kann das Kit zum Nachweis von Alpha-Synuclein in einer Probe geeignet sein, sodass es weiterhin umfasst:

- ein Trägermaterial-Antikörper-Konjugat, umfassend ein Trägermaterial, an dem ein für Alpha-Synuclein spezifische Einzeldomänen-Trägerantikörper gebunden ist,
- einen für Alpha-Synuclein spezifischen Einzeldomänen-Detektionsantikörper, der einen Detektionsmarker umfasst, und
- Reagenzien zum Nachweis von Alpha-Synuclein unter Verwendung des Detektionsmarkers.

**[0050]** Das Kit kann weiterhin auch Instruktionen zur Durchführung eines Verfahrens zum Nachweis von Alpha-Synuclein in einer Probe eines Patienten enthalten. Dies betrifft insbesondere die Verfahrensschritte A) bis D), wie weiter oben zum Nachweis von Alpha-Synuclein beschrieben.

**[0051]** Das Kit kann auch zum Nachweis von Alpha-Synuclein eingesetzt werden, wobei der Einzeldomänen-Trägerantikörper und der Einzeldomänen-Detektionsantikörper unterschiedliche Einzeldomänen-Antikörper sind, die unterschiedliche Epitope des Alpha-Synuclein zu erkennen. Mithilfe eines derartigen Kits kann beispielsweise ein Einzeldomänen-Trägerantikörper der an einem Trägermaterial immobilisiert ist ein erstes Epitop von Alpha-Synuclein im Verfahrensschritt B) erkennen, wobei dann im anschließend im Verfahrensschritt C) der Einzeldomänen-Detektionsantikörper ein zweites Epitop von Alpha-Synuclein an dem gebundenen Alpha-Synuclein erkennt, das vom ersten Epitop unterschiedlich ist. Ein derartiger Kit kann damit Alpha-Synuclein generell nachweisen, unabhängig von dessen Aggregationszustand. Das Alpha-Synuclein kann dabei als Monomer, Dimer oder Multimer vorliegen.

**[0052]** Dabei kann insbesondere einer der Einzeldomänen-Antikörper eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 % zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 aufweisen. Bevorzugt kann einer der Einzeldomänen-Antikörper identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 sein. Der andere Einzeldomänen-Antikörper kann in diesem Fall eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 % zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 11 aufweisen. Bevorzugt kann der andere Einzeldomänen-Antikörper identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 11 sein.

**[0053]** Zum Nachweis von humanem Alpha-Synuclein wird bevorzugt ein Einzeldomänen-Trägerantikörper eingesetzt, der eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 % zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 11 aufweist. Bevorzugt ist der Einzeldomänen-Trägerantikörper identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 11. Als Einzeldomänen-Detektionsantikörper wird dann ein Einzeldomänen-Antikörper verwendet, der bevorzugt eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 % zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 aufweist. Bevorzugt kann der Einzeldomänen-Detektionsantikörper identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 sein.

**[0054]** Der Einzeldomänen-Antikörper „NbSyn87“ erkennt, wie bereits oben dargelegt, eine zwischen verschiedenen Alpha-Synuclein-Proteinen wenig konservierte Region des humanen Alpha-Synuclein und ist somit für humanes Alpha-Synuclein spezifisch. Im Gegensatz dazu erkennt der Einzeldomänen-Antikörper „NbSyn2“ eine zwischen verschiedenen Alpha-Synuclein-Proteinen von verschiedenen Spezies konservierte Region und erlaubt somit eine Erkennung von Alpha-Synuclein-Proteinen aus verschiedensten Spezies, beispielsweise Homo Sapiens oder der Maus (*mus musculus*).

**[0055]** „NbSyn87“ als Einzeldomänen-Trägerantikörper erlaubt somit lediglich die Bindung von humanem Alpha-Synuclein, das im darauffolgenden Verfahrensschritt C) vom Einzeldomänen-Detektionsantikörper „NbSyn2“ gebunden und im Verfahrensschritt D) nachgewiesen werden kann, so dass ein derartiges Kit einen für humanen Alpha-Synuclein spezifischen Nachweis erlaubt.

**[0056]** Zum Nachweis von Alpha-Synuclein von verschiedensten Spezies wird bevorzugt ein Einzeldomänen-Trägerantikörper eingesetzt, der eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 % zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 (NbSyn2) aufweist. Bevorzugt ist der Einzeldomänen-Trägerantikörper identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10. Als Einzeldomänen-Detektionsantikörper wird dann der gleiche Einzeldomänen-Antikörper verwendet, der bevorzugt eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 % zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 (NbSyn2) aufweist. Bevorzugt kann einer der Einzeldomänen-Detektionsantikörper identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 sein.

**[0057]** Der Einzeldomänen-Trägerantikörper, der eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 % zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 aufweist, kann zum Nachweis von Alpha-Synuclein von Spezies, wie zum Beispiel Homo sapiens (Mensch), *Mus musculus* (Maus), *Rattus norvegicus* (Ratte), *Gorilla gorilla gorilla* (westlicher Flachland Gorilla), *Macaca fascicularis* (Javaneraffen), *Pan paniscus* (Bonobo), *Pan troglodytes* (Schimpanse), *Bos taurus* (Rind), *Serinus canaria* (Kanaren-Buchfink), *Macaca mulatta* (Rhesusmakaken), *Sus scrofa* (Schwein), *Pongo abelii* (Sumatra-Orang-Utan) (*Pongo pygmaeus abelii*), *Ateles geoffroyi* (Geoffroy-Klammeraffe), *Erythrocebus patas* (rote Meerkatzen) (*Cercopithecus patas*), *Lagothrix lagotricha* (brauner Wollaffe) (Humboldt's Wollaffe), *Saguinus labiatus* (Rotbauch Tamarin) und *Xenopus laevis* (afrikanischer Klauenfrosch) dienen.

**[0058]** Ein Kit mit einem derartigen Einzeldomänen-Trägerantikörper und Einzeldomänen-Detektionsantikörper erlaubt die Bindung von Alpha-Synuclein von verschiedensten Spezies an den Einzeldomänen-Trägerantikörper und erlaubt somit die Detektion von verschiedensten Alpha-Synuclein-Proteinen.

**[0059]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Alpha-Synuclein-Homodimer, wobei die Monomere eine Sequenzidentität von zumindest 95 %, weiter bevorzugt identisch zu der Aminosäuresequenz mit der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 14 sind, mit der Maßgabe, dass die Aminosäure Cystein an Position 87 der SEQ. ID. Nr. 14 unverändert bleibt.

**[0060]** Ein derartiges Alpha-Synuclein-Homodimer ist aufgrund der Disulfid-Brücke zwischen den Cysteinen von zwei Monomeren besonders stabil und ist daher auch besonders gut als positiv-Kontrolle für die erfindungsgemäßen Verfahren geeignet.

**[0061]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Expressionskonstrukt, aufweisend ein Gen, das für ein Alpha-Synuclein-Polypeptid codiert, wobei das Alpha-Synuclein-Polypeptid eine Sequenzidentität von zumindest 95 %, weiter bevorzugt identisch zu der Aminosäuresequenz mit der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 14, mit der Maßgabe dass die Aminosäure Cystein an Position 87 der SEQ. ID. Nr. 14 unverändert bleibt. Das Expressionskonstrukt kann beispielsweise das Expressionsplasmid „pSumo1“ des gemeinnützigen Plasmid-Archivs „Addgene“ umfassen, in das das Gen eingefügt wurde, dass für das oben genannte Alpha-Synuclein-Polypeptid codiert. Die Nukleotidsequenz von pSUMO1 ist die Nukleotidsequenz mit der SEQ ID Nr. 15.

**[0062]** Das Expressionskonstrukt kann anschließend in expressionskompetente Wirtszellen, beispielsweise E. coli Zellen wie Rosetta™ 2 (pLysS) von Novagen, eingebracht werden.

**[0063]** Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Expressionskonstrukt, aufweisend ein Gen, das für einen für ein Peptid Monomer spezifischen Einzeldomänen-Antikörper mit einem an den Einzeldomänen-Antikörper gebundenen Peptid-Linker codiert, wobei der Peptid-Linker eine Länge von zumindest 20 Aminosäuren aufweist und einen alpha-helikalen Bereich umfasst.

**[0064]** Der von dem Expressionskonstrukt codierte Einzeldomänen-Antikörper kann spezifisch für Alpha-Synuclein, das Tau-Protein oder für Beta Amyloid sein. Der von dem Gen codierte spezifische Einzeldomänen-Antikörper kann spezifisch sein für ein Peptid-Monomer, das eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt 95 % zu einer Aminosäuresequenz der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 1 (Alpha-Synuclein) aufweist. Der Einzeldomänen-Antikörper kann auch spezifisch für Beta Amyloid sein. Derartige Einzeldomänen-Antikörper sind in der Publikation Drews, A. et al. Sci. Rep. 6, 31910, beschrieben. Der Einzeldomänen-Antikörper kann auch spezifisch für das Tau-Protein sein. Derartige Einzeldomänen-Antikörper sind in der Publikation Li et al. Journal of Controlled Release, 243, 2016, Seiten 1-10 beschrieben.

**[0065]** Der von dem Expressionskonstrukt codierte Einzeldomänen-Antikörper kann eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 % zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 (NbSyn2) oder der SEQ. ID. Nr.11 (NbSyn87) aufweisen.

**[0066]** Besonders bevorzugt kann der Einzeldomänen-Antikörper identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 (NbSyn2) oder der SEQ. ID. Nr. 11 (NbSyn87) sein.

**[0067]** Das Expressionskonstrukt kann für einen Peptid-Linker codieren, der einen alpha-helikalen Bereich aufweist, der ausgewählt ist aus dem alpha-helikalen Bereich eines SUMO-Peptids (small ubiquitin modifier peptide) oder eines Fe-Bereichs eines Antikörpers. Bevorzugt weist der Peptid-Linker eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 % zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr.4, 5, 6, 7, 8, oder 9 auf.

**[0068]** Das Expressionskonstrukt kann insbesondere ein Expressionsplasmid aufweisen, das ein Gen enthält, das für den Einzeldomänen-Antikörper codiert. Insbesondere kommt das Plasmid „pSUMO1“ als Expressionsplasmid in Betracht (SEQ. ID. Nr. 15), das die Expression des Einzeldomänen-Antikörpers mit einem 6 His-SUMO Tag am N-Terminus des Einzeldomänen-Antikörpers erlaubt.

**[0069]** Gegenstand der Erfindung ist auch ein Trägermaterial-Antikörper-Konjugat, umfassend ein Trägermaterial, an dem ein Einzeldomänen-Trägerantikörper gebunden ist, wobei der Einzeldomänen-Trägerantikörper über einen Peptid-Linker an das Trägermaterial gebunden ist. Dabei weist der Peptid-Linker eine Länge von zumindest 20 Aminosäuren auf und umfasst einen alpha-helikalen Bereich. Der Peptid-Linker hat bevorzugt eine Länge zwischen 30 bis 130 Aminosäuren, weiter bevorzugt zwischen 50 bis 120 Aminosäuren.

**[0070]** Der Peptid-Linker im Trägermaterial-Antikörper-Konjugat kann eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 % zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 4, 5, 6, 7, 8, oder 9 aufweisen.

**[0071]** In dem Trägermaterial-Antikörper-Konjugat kann der Einzeldomänen-Trägerantikörper eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90 %, weiter bevorzugt zumindest 95 % zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 oder der SEQ. ID. Nr. 11 aufweisen. Bevorzugt ist der Einzeldomänen-Trägerantikörper identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID. Nr. 10 oder der SEQ. ID. Nr. 11.

**[0072]** Der Einzeldomänen-Trägerantikörper kann über einen Tag, bevorzugt über einen His-Tag oder einen GST-Tag an das Trägermaterial gebunden sein. Bevorzugt weist der Einzeldomänen-Trägerantikörper einen His-Tag auf.

**[0073]** Das Trägermaterial des Trägermaterial-Antikörper-Konjugats kann bevorzugt eine Mikrotiterplatte, Mikrokugeln oder ein Mikronadel-Pflaster sein. Aufgrund des Peptid-Linkers und des Tags kann der Einzeldomänen-Trägerantikörper in korrekter Orientierung an das Trägermaterial immobilisiert sein, die eine Bindung an das multimere Peptid, insbesondere an das dimere Alpha-Synuclein erlaubt.

**[0074]** Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein für ein Peptidmonomer spezifischer Einzeldomänen-Antikörper mit einem an den Einzeldomänen-Antikörper gebundenen Peptid-Linker, wobei der Peptid-Linker eine Länge von zumindest 20 Aminosäuren aufweist und einen alpha-helikalen Bereich umfasst.

**[0075]** Der Einzeldomänen-Antikörper kann eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95%, weiter bevorzugt identisch zu der der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 11 sein. Der Einzeldomänen-Antikörper kann eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95%, weiter bevorzugt identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 10 sein.

**[0076]** Der Peptid-Linker in dem Einzeldomänen-Antikörper kann eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95% zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr.4, 5, 6, 7, 8, oder Nr. 9 aufweisen.

**[0077]** Die Erläuterungen und Offenbarungen in Bezug auf einen erfindungsgemäßen Gegenstand gelten sinngemäß auch für alle weiteren erfindungsgemäßen Gegenstände, sofern diese nicht im Widerspruch zu den speziellen Erläuterungen und Offenbarungen der weiteren erfindungsgemäßen Gegenstände stehen. Beispielsweise gelten die Erläuterungen und Offenbarungen in Bezug auf das erfindungsgemäße Verfahren sinngemäß auch für das erfindungsgemäße Expressionskonstrukt, das erfindungsgemäße Trägermaterial-Antikörper-Konjugat, das erfindungsgemäße Kit, den erfindungsgemäßen Alpha-Synuclein-Homodimer, das erfindungsgemäße Peptidmonomer sowie den erfindungsgemäßen Einzeldomänen-Antikörper und umgekehrt, sofern diese nicht im Widerspruch zu den in Bezug auf die jeweiligen erfindungsgemäßen Gegenstände gemachten speziellen Erläuterungen und Offenbarungen stehen. Beispielsweise gelten die im Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Verfahren offenbarten speziellen Ausgestaltungen für den Peptid-Linker auch im Hinblick auf die übrigen erfindungsgemäßen Gegenstände, sofern diese Erläuterungen und Offenbarungen nicht im Widerspruch zu den in Bezug auf diese erfindungsgemäßen Gegenstände gemachten speziellen Erläuterungen und Offenbarungen stehen.

**[0078]** Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden speziellen Beschreibung und den Zeichnungen.

**[0079]** Gleiche Bezugszeichen in den Figuren deuten auf gleiche oder analoge Elemente hin.

**[0080]** Natürlich stellen die in der speziellen Beschreibung diskutierten und in den Figuren gezeigten Ausführungsformen nur illustrative Ausführungsbeispiele der vorliegenden Erfindung dar. Dem Fachmann ist im Lichte der hiesigen Offenbarung ein breites Spektrum von Variationsmöglichkeiten an die Hand gegeben.

**[0081]** Es zeigen:

**Fig. 1** eine schematische Darstellung eines Verfahrens zum Nachweis eines multimeren Peptids, insbesondere eines dimeren Peptids mittels spezifischer Einzeldomänen-Antikörper;

**Fig. 2** eine Plasmid-Karte, eines Plasmids, das eine Sequenz aufweist, die für den Einzeldomänen-Trägerantikörper „NbSyn2“ codiert, der an einen Peptid-Linker angebunden ist, der eine humane Sumo-Sequenz aufweist;

**Fig. 3** die Nukleinsäure Sequenz des Einzeldomänen-Trägerantikörpers „NbSyn2“, der am N-Terminus eine humane Sumo-Sequenz sowie einen His 6-Tag aufweist (SEQ ID. No. 16);

**Fig. 4** die Aminosäuresequenz des Einzeldomänen-Trägerantikörpers „NbSyn2“ dessen Nukleinsäure-Sequenz in **Fig. 3** gezeigt ist (SEQ ID. No. 17);

**Fig. 5** eine Plasmid-Karte eines Plasmids, dass eine Sequenz aufweist die für den Einzeldomänen-Trägerantikörper „NbSyn87“ codiert, der an einen Peptid-Linker angebunden ist, der eine Hefe-Sumo-Sequenz aufweist;

**Fig. 6** eine Nukleinsäure-Sequenz des Einzeldomänen-Trägerantikörpers „NbSyn87“ der am N-Terminus eine Hefe-Sumo-Sequenz sowie eine Z-Domäne und einen His 14-Tag aufweist (SEQ ID. No. 18);

**Fig. 7** die entsprechende Aminosäuresequenz des Einzeldomänen-Trägerantikörpers „NbSyn87“ dessen Nukleinsäure-Sequenz in **Fig. 6** gezeigt ist (SEQ ID. No. 19);

**Fig. 8** die Lumineszenz bei einer Wellenlänge von 650 nm in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen der Probe eines Gehirn-Lysats bei einer Konzentration eines Einzeldomänen-Trägerantikörpers von 0,1 µg/ml;

**Fig. 9** eine Plasmid-Karte des Plasmids „aSynS87C“, dessen Nukleotidsequenz in der SEQ ID. Nr. 21 beschrieben ist.

#### Ausführungsbeispiele

**[0082] Fig. 1** zeigt eine schematische Darstellung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zum Nachweis eines multimeren Peptids, insbesondere eines dimeren Peptids mittels Einzeldomänen-Antikörpern. Auf ein Trägermaterial 16 ist mittels eines His-Tags 10B ein Einzeldomänen-Trägerantikörper 10 über einen Peptid-Linker 10A immobilisiert. Dieser Einzeldomänen-Trägerantikörper 10 erkennt ein Epitop 14A' auf einem ersten Peptid-Monomer des multimeren Peptids. Das multimerere Peptid kann dabei ein dimeres Peptid 14 aufweisen, das ein erstes Peptid-Monomer 14A und ein zweites Peptid-Monomer 14B enthält. Das erste Peptid-Monomer 14A und das zweite Peptid-Monomer 14B können insbesondere identisch sein, so dass das dimere Peptid 14 ein Homodimer ist. Ein Einzeldomänen-Detektionsantikörper 12 erkennt auf dem zweiten Peptid-Monomer 14B das Epitop 14B'. Das Epitop 14B' des zweiten Peptid-Monomers 14B ist dabei das gleiche Epitop wie das Epitop 14A' des ersten Peptid-Monomers 14A. Der Einzeldomänen-Detektionsantikörper 12 kann somit nur dann an das dimere Peptid 14 binden, wenn das dimere Peptid zwei gleiche Epitope 14A' und 14B' aufweist. Der Einzeldomänen-Detektionsantikörper 12 weist einen Detektionsmarker 12A auf, der von einem Reporterenzym 12B gebunden werden kann. Das Reporterenzym ermöglicht anschließend den Nachweis des Komplexes zwischen dem Trägermaterial-Antikörper-Konjugat und dem dimeren Peptid über eine Farbreaktion 18. Die linke Seite der schematischen Darstellung der **Fig. 1** zeigt dabei den Nachweis des dimeren Peptids 14, während die rechte Seite der schematischen Darstellung der **Fig. 1** zeigt, wie das Trägermaterial-Antikörper-Konjugat ein erstes Peptid-Monomer 14A bindet. Da dieses erste Peptid-Monomer 14A lediglich ein Epitop 14A' aufweist, aber kein weiteres Epitop 14B' kann der Einzeldomänen-Detektionsantikörper nicht an das Peptid-Monomer 14A binden, da dessen Epitop bereits vom Einzeldomänen-Detektionsantikörper 10 gebunden und somit blockiert ist. Daher kann kein Nachweis des Peptid-Monomers erfolgen, wenn lediglich Peptid-Monomere in der zu analysierenden Probe vorhanden sind. Das erfindungsgemäße Verfahren ist somit geeignet, dimere Peptide auch innerhalb von multimeren Proteinen-Aggregaten nachzuweisen ohne die entsprechenden monomeren Peptide zu detektieren.

**[0083] Fig. 2** zeigt eine Plasmid-Karte des pSumo1-Plasmids, das eine Gen-Sequenz aufweist, die für den Einzeldomänen-Antikörper „NbSyn2“, benannt als „Syn2“, codiert. Die Plasmid-Karte zeigt, dass am N-Terminus des Einzeldomänen-Antikörpers die Sumo-Sequenz als Peptid-Linker vorhanden ist. Am N-Terminus der Sumo-Sequenz befindet sich ein 6His-Tag, der zur Anbindung des Einzeldomänen-Antikörpers „Syn2“ über den Peptid-Linker an ein Trägermaterial, beispielsweise eine ELISA-Platte, dient. Dieses Plasmid kann zur Expression des Einzeldomänen-Trägerantikörpers „Syn2“ in beispielsweise E. coli verwendet werden. Die Nukleinsäure-Sequenz des pSumo1-Plasmids ist in der SEQ ID. Nr. 15 beschrieben.

**[0084] Fig. 3** zeigt die Nukleinsäure-Sequenz des Einzeldomänen-Trägerantikörpers „NbSyn2“, wobei an dessen N-Terminus eine humane Sumo-Peptidsequenz als Peptid-Linker vorhanden ist (in **Fig. 3** unterstrichen gezeigt). Die humane SUMO-Peptidsequenz ist in diesem Fall eine Peptidsequenz des humanen SUMO1-Proteins (Small ubiquitinrelated modifier 1), das z.B. in der UniProt protein knowledgebase (UniProtKB) unter der Identifikationsnummer P63165 geführt ist. An diesen Peptid-Linker ist ein 6His-Tag vorhanden (His-Tag in Kleinbuchstaben gezeigt). Am C-Terminus des Einzeldomänen-Trägerantikörpers, dessen Nukleinsäure-Sequenz unterstrichen gezeigt ist, befindet sich noch eine zusätzliche Sequenz die durch die Klonierung in den Einzeldomänen-Trägerantikörper „NbSyn2“ eingeführt wurde, die aber keine Auswirkung auf dessen Aktivität hat.

**[0085] Fig. 4** zeigt die Aminosäure-Sequenz des Einzeldomänen-Trägerantikörpers „NbSyn2“, dessen Nukleinsäure-Sequenz in **Fig. 3** gezeigt ist. Die Aminosäure-Sequenz des Peptid-Linkers Sumo ist fett gedruckt gezeigt. Die Aminosäure-Sequenz des Einzeldomänen-Trägerantikörpers „NbSyn2“ weist 5 Lysine auf, die als Detektionsmarker zur Biotinylierung verwendet werden können. Die Biotine können von Streptavidin-markierten Reporter-Enzymen erkannt werden und zum Nachweis des multimeren Peptids mittels einer Farb-

reaktion verwendet werden. Zudem sind in **Fig. 4** auch 10 Aminosäuren der zusätzlichen Sequenz am C-Terminus des Einzeldomänen-Trägerantikörpers dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist diese Sequenz in **Fig. 4** verkürzt dargestellt.

**[0086]** **Fig. 5** zeigt die Plasmid-Karte des Plasmids „K63 GGGG SynNb87 cys“, das einen Abschnitt aufweist, der für den Einzeldomänen-Antikörper „NbSyn87“ codiert. Am 5'-Ende ist dieser Abschnitt mit einem Genabschnitt verbunden, der für einen Teil einer Hefe-Sumo-Peptidsequenz codiert. Die Hefe-SUMO-Peptidsequenz (scSUMO) ist in diesem Fall eine Peptidsequenz des Hefe-SUMO-Proteins Ubiquitin-like-protein SMT3, das z.B. in der UniProt protein knowledgebase (UniProtKB) unter der Identifikationsnummer Q12306 geführt ist. Weiterhin sind noch die Z-Domänen 1 und 2 vorhanden, sowie ein 14 His-Tag für die Anbindung des Einzeldomänen-Trägerantikörpers an ein Trägermaterial. Dieses Plasmid kann ebenfalls zur Expression des Einzeldomänen-Trägerantikörpers „NbSyn87“ in *E. coli* verwendet werden. Die Nukleinsäure-Sequenz des Plasmids „K63 GGGG SynNb87 cys“ ist in der SEQ ID. Nr. 20 beschrieben.

**[0087]** **Fig. 6** zeigt die Nukleinsäure-Sequenz des Einzeldomänen-Trägerantikörpers „NbSyn87“ (fettgedruckte Sequenz „NbSyn87“) an dessen 5'-Ende die SMT3-Sumo-Peptid-Sequenz vorhanden ist (unterstrichene Sequenz), gefolgt von den Z-Domänen 1 und 2 (fett gedruckte Sequenz). Weiterhin ist zur Anbindung an dem Trägermaterial noch ein 14His-Tag vorhanden (in Kleinbuchstaben in **Fig. 6** gezeigt).

**[0088]** Die **Fig. 7** zeigt die Aminosäure-Sequenz der in **Fig. 6** gezeigten Nukleinsäure-Sequenz. Die fett gedruckte Aminosäure-Sequenz von „NbSyn87“ enthält 5 Lysine zur Biotinylierung als Detektionsmarker. Die SMT3-Sumo-Peptid-Sequenz ist unterstrichen und der 14His-Tag kursiv dargestellt.

#### Einführung einer Punktmutation Ser87Cvs in alpha-Synuclein

**[0089]** Die Erfinder haben eine Punktmutation in das menschliche alpha-Synuclein eingeführt, damit unter Redox-Bedingungen kein Gemisch von Oligomeren höherer Ordnung, sondern reine Homo-Dimere hergestellt werden können. Alpha-Synuclein hat 4 Serine: Serin 9, 42, 87 und 129. Serin129 wurde als mögliche Mutationsstelle ausgeschlossen, da es in vivo eine wichtige Funktion als Phosphorylierungsstelle hat. Serin 9 und 42 befinden sich beide in der N-terminalen Region von alpha-Synuclein und würden daher höchstwahrscheinlich keine stabilen synthetischen Homodimere bilden. Daher haben die Erfinder eine Punktmutation von Serin87Cystein eingeführt. Die Messung von alpha-Synuclein als Einheiten von „Dimer-Äquivalenten“ mit diesen stöchiometrischen, gut charakterisierten aSynSer87Cys-Dimeren als Assay-Standard wird eine reproduzierbare Messung ermöglichen.

**[0090]** Zur Expression der Punktmutation von Alpha-Synuclein *E. coli* wurde das Plasmid „aSynS87C“ verwendet. **Fig. 9** zeigt die Plasmid-Karte des Plasmids „aSynS87C“, das durch Klonierung eines Inserts, das für die Punktmutante von alpha-Synuclein S87C codiert in den Vektor pSUMO1 im Bereich, der in der Plasmid-Karte als „customer insert“ beschrieben wird, erhalten wurde. Am N-Terminus der Punktmutante wurde ein His-Tag und die SLIMO1 Sequenz angebinden.

#### Herstellung von synthetischen Dimer-Standards

**[0091]** Gereinigtes rekombinantes monomeres aSyn mit der Punktmutation S87C wurde nach einem von O'Nuallian et al., 2010, adaptierten Protokoll dimerisiert (O'Nuallian et al., *J Neurosci* 30(43), 2010, 14411-14419). Kurz gesagt: 40 uM aSynS87C wurden 1:1 mit 20 mM Ammoniumbicarbonat (pH 8,2) verdünnt und fünf Tage lang bei 25°C und 300 U/min in einem Thermomixer inkubiert. Größere Aggregate wurden durch Lyophilisieren der Dimer-Reaktion und Resuspendieren in 50 mM Tris-HCl mit 5 M Guanidin (pH 8,0) über Nacht aufgelöst. Am nächsten Tag wurden die Proben einer Größenausschlusschromatographie unterzogen. Dasselbe Verfahren wurde für humanes Beta-Synuclein S72C, humanes Gamma-Synuclein S92C und aSynS42C der Maus wiederholt, außer dass sie zunächst mit dem he2D Clean-Up Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ) ausgefällt wurden, wie zuvor beschrieben (Wildburger et al., 2015, *Mol Cell Proteomics* 14(5), 1288-1300), um überschüssiges Imidazol zu entfernen.

#### Expression des alpha-Synuclein1-140Ser87Cvs-Dimers oder des monomeren alpha-Synucleins

**[0092]** Alle benötigten Synucleine wurden in Rosetta TM 2(DE3)plysS Competent Cells (Novagen) exprimiert. Dieser von BL21 abgeleitete *E. coli*-Stamm ermöglicht eine verbesserte Expression von eukaryotischen Proteinen durch ein, eine Chloramphenicol-Resistenz (CamR) enthaltendes Plasmid das die tRNAs für seltene Codons liefert. Seltene Codons sind Codons, die häufiger bei der Transkription menschlicher

Gene häufiger vorkommen als bei bakteriellen Genen und können daher zu Problemen bei der Transkription von Proteinen menschlichen Ursprungs in anderen E. coli führen. Das CamR-Gen ermöglicht das Wachstum in Gegenwart von 34 µg/ml Chloramphenicol (CAMP).

**[0093]** Die Transformation erfolgte durch einen Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C. Zur Erzielung einer besseren Transformationseffizienz wurden 10 µg des jeweiligen subklonierten Plasmids zu einem 20 µL Aliquot des E. coli 30 min vor dem Hitzeschock zugegeben, danach wurde SOC-Medium (Novagen) zugegeben. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C wurden die E. coli auf eine LB-Agaroseplatte mit 34 µg/ml CAMP und 0,025 mg/ml Strep plattiert, um einen Selektionsdruck für Klone zu erzeugen, die das seltene Codon-Plasmid und das transformierte Plasmid enthalten. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C bebrütet, um die Koloniebildung zu ermöglichen. Einzelne Kolonien wurden für die Beimpfung einer flüssigen LB-Kultur mit denselben Konzentrationen von CAMP und Strep ausgewählt und ebenfalls über Nacht inkubiert. Glycerinbestände wurden durch Zugabe von 700 µL der flüssigen Kultur zu 300 µL Glycerin hergestellt und bei -80°C gelagert. Die Flüssigkultur wurde 3 Stunden lang mit 1 mM IPTG induziert und durch 20-minütige Zentrifugation bei 5500 x g geerntet. Der Überstand wurde vor dem Einfrieren bei -20°C entfernt.

#### Expression der Einzeldomänen-Antikörper:

**[0094]** Das NbSyn2 wurde in Rosetta-gami™ B(DE3)plysS Competent Cells (Novagen) exprimiert. Diese Zelllinie hat gegenüber der für die Synucleine verwendeten Rosetta-Linie den Vorteil, dass sie zusätzlich für Proteine kodiert, die die Bildung von Disulfidbindungen fördern. Der Hitzeschock wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Induktion mit IPTG erfolgte bei 30°C mit 0,5 mM IPTG über Nacht und die Zellen wurden durch Zentrifugation für 20 min bei 5500 xg geerntet. Der Überstand wurde entfernt vor dem Einfrieren bei -20°C entfernt. Die Induktion für NbSyn87 wurde auf die gleiche Weise durchgeführt.

#### Reinigung der alpha-Synucleine und der Einzeldomänen-Antikörper

**[0095]** Die Lyse der E. coli Zellen erfolgte auf Eis durch Beschallung nach Resuspension in 5 ml Puffer pro Gramm E. coli; Hochsalzpuffer mit 20 mM Imidazol. Es wurden 10 µL DNase1 und PI im Verhältnis 1:100 verwendet. Die Beschallung erfolgte in 10-Sekunden-Pulsen mit 30-Sekunden-Pausen. Das Ganzzell-Lysat wurde durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge vorgeeignet.

**[0096]** Zur Aufreinigung des His-markierten Proteins aus dem vorgereinigten Zelllysate (PCL) wurde eine His GraviTrap (GE Healthcare) verwendet. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit nativem Hochsalzpuffer mit 20 mM Imidazol wurde die Probe zugegeben. Das Waschen der Säule mit einem Volumen nativen Hochsalzpuffers mit 20 mM Imidazol entfernte nichtionische Wechselwirkungen. Um das Salz zu entfernen, wurde ein Waschvorgang mit nativem Puffer mit niedrigem Salzgehalt durchgeführt. Um eine optimale Elution zu erreichen, wurde eine Imidazol-Serie (50, 100, 150, 200, 300, 500 mM) in salzarmem Puffer verwendet. Es wurden nur die Fraktionen gesammelt, die das gewünschte Protein enthielten (siehe untenstehende Tabelle, in der gesammelte Fraktionen mit einem „X“ gekennzeichnet sind).

	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM	300 mM	500 mM
Humanes Alpha-Synuclein (αSyn hu)			X	X	X	X
αSyn hu S87C			X	X	X	X
Nanobody Syn87					X	X
Nanobody Syn2			X	X	X	X

**[0097]** Zur Reinigung der Säule nach der Verwendung wurden 10 ml Denaturierungspuffer hinzugefügt. Nach zweimaligem Waschen mit Hochsalzpuffer mit 20 mM Imidazol wurde die Säule in 20 %igem Ethanol aufbewahrt. Die gesicherten Fraktionen wurden in einem 3 kDa Amicon (regenerierte Cellulose) Molekulargewichts-Cutoff-Filter vereinigt und mit 20 ml Puffer mit niedrigem Salzgehalt und 20 mM Imidazol ausgetauscht. Der Filter wurde in PBS mit 0,02 % Natriumazid aufbewahrt.

## Entfernung des Tags bei den alpha-Synucleinen und den Einzeldomänen-Detektionsantikörpern

**[0098]** Die mit Puffer ausgetauschte Probe wurde auf 1 ml aufgefüllt und 40 U His-tagged SUMO-Protease (SAE0067, Sigma/Merck) wurden zusammen mit 1 mM DTT zugegeben. Um die SUMO-Spaltung bei den Alpha-Synucleinen und den Einzeldomänen-Detektionsantikörpern zu ermöglichen, wurde die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei der Spaltung durch die SUMO-Protease wurde der jeweilige His-SUMO-Tag abgespalten. Nach der Spaltung wurde die Probe erneut auf die His-GraviTrap aufgetragen, um den abgespaltenen HIS-SUMO-Tag und die His-tagged SUMO-Protease zu entfernen. Daraufhin wurde die Säule erneut äquilibriert und der Durchfluss mit dem nun tag-losen alpha-Synucleinen bzw. Einzeldomänen-Detektionsantikörpern gesammelt.

## Biotinylierung der aufgereinigten Einzeldomänen-Detektionsantikörper

**[0099]** Zur Biotinylierung der Einzeldomänen-Detektionsantikörper wurde EZ-Link™ NHS-Biotin (ThermoFisher) in einem 20-fachen molaren Überschuss verwendet. Die Biotin-Stammlösung wurde durch Auflösen von 2 mg Biotin in 590 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Die erforderliche Biotinmenge wurde nach dem Herstellerprotokoll berechnet und der Einzeldomänen-Detektionsantikörper zugesetzt. Sie wurde 30 Minuten lang übereinander inkubiert und anschließend in einem 3 kDa Amicon (regenerierte Cellulose) Molekulargewichts-Cutoff-Filter mit 20 ml PBS (NbSyn2) gepuffert oder einer Größenausschlusschromatographie (SEC) auf einem Superdex™ 10/300 GL (GE Healthcare) (NbSyn87) unterzogen, um überschüssiges Biotin loszuwerden.

**[0100]** Biotinylierte Einzeldomänen-Detektionsantikörper können besonders einfach mittels Enzymen nachgewiesen werden, die an Streptavidin gekoppelt sind, wie beispielsweise Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase.

## Verfahren zur Detektion von dimeren Alpha-Synuclein:

**[0101]** His6-SUMO-NbSyn87 (Oligomer-Assay, Mensch) oder His6-SUMO-NbSyn2 (Gesamt, Pan-Assay) wurde zur Beschichtung von schwarzen 384-Well-Nunc MaxiSorp-Platten (#460518, Nalge Nunc, Rochester, NY) mit 20 µg/ml in einem Carbonatpuffer (35 mM Natriumbicarbonat, 16 mM Natriumcarbonat, 3 mM Natriumazid, pH 9,6) mit 20 µl/Well über Nacht bei 4 °C verwendet. Die Platten wurden zwischen den Schritten 5x mit PBS mit 0,005% Tween-20 in einem BioTek EXL405 Plattenwaschgerät (BioTek, Winooski, VT) gewaschen. Die Probenplatten wurden mit 0,2 µm gefiltertem 4%iger BSA (Bovines Serumalbumin) (#7030, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Die Proben oder der Dimer-Standard bzw. das alpha-Synuclein-Monomer (für den Gesamtassay) wurden entweder pur analysiert oder in Standardverdünnung (0,2 µm gefiltertes 0,25 % BSA, 0,005 % Tween-20, 3 mM Natriumazid, 2 µg/mL Aprotinin (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ), 1 µg/mL Leupeptin (EMD Chemicals), in PBS) auf 20 µL Endvolumen verdünnt und jeweils auf die mit His6-SUMO-NbSyn87 bzw. His6-SUMO-NbSyn2 beschichteten Platten geladen. Als Proben wurden Gehirn-Lysate von 9 Wochen alten oder 6 Monate alten Mäusen des Thy1 Mausmodells verwendet (Chesselet et al., Neurotherapeutics. 2012 Apr; 9(2): 297-314). Transgene Mäuse dieses Modells exprimieren das humane Alpha-Synuclein unter der Kontrolle eines Thy-1 Promotors. Eine 9-Punkte-Standardkurve wurde unter Verwendung von 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56 und 0 pg/ml alpha-Synuclein1-140Ser87Cys-Dimer oder monomerem alpha-Synuclein (ohne Mutationen) erstellt und bei allen Experimenten in dreifacher Ausführung geladen. Alle Proben und der Standard wurden während der Verarbeitung auf Eis gelagert. Die Platten wurden kurz nach dem Einfüllen der Proben und Standards bei 1000xg zentrifugiert, um sicherzustellen, dass die Flüssigkeit ordnungsgemäß am Boden jeder Vertiefung saß und um Luftblasen zu entfernen. Die Proben und Standards wurden über Nacht bei 4 °C auf den Platten mit den daran gebundenen Einzeldomänen-Trägerantikörper äquilibriert. Nach einem weiteren Waschschrift zur Entfernung ungebundener gelöster Stoffe wurden alpha-Synuclein-Oligomere oder das gesamte alpha-Synuclein jeweils mit markiertem (biotinyliertem) NbSyn87 als Einzeldomänen-Detektionsantikörper in einer Konzentration von 100 ng/ml in PBS mit 0,2 µm gefilterter 0,1 mg/ml fettfreier Trockenmilch plus 0,005 % Tween-20 nachgewiesen. Die Bindung der Einzeldomänen-Detektionsantikörper an exponierte alpha-Synuclein-Oligomere oder an das gesamte alpha-Synuclein wurde 1 Stunde lang bei Raumtemperatur zugelassen. Poly-Streptavidin HRP-20 (65R-S103PHRP, Fitzgerald, Acton, MA) wurde dann bei 30 ng/mL in PBS mit 0,2 µm gefilterter 0,5 % BSA plus 0,005 % Tween-20 eine Stunde lang bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren inkubiert. Nach einem letzten Waschgang wurde der Test durch Zugabe von SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (34094, ThermoFisher) entwickelt und die Lumineszenz auf einem Tecan Infinite M Plex Plattenlesegerät abgelesen. Die Standardkurve wurde dann verwendet, um die

Konzentration von dimeren alpha-Synuclein in den Proben in Einheiten von „Dimer-Äquivalenten“ für den Oligomer-Assay zu berechnen.

**[0102] Fig. 8** zeigt die Lumineszenz bei 650 nm eines erfindungsgemäßen Verfahrens zum Nachweis von dimeren Alpha-Synuclein bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml eines Einzeldomänen-Trägerantikörpers His6-SUMO-NbSyn2 bei verschiedenen, auf der x-Achse aufgetragenen Konzentrationen eines Einzeldomänen-Detektionsantikörpers NbSyn2. Bei allen Konzentrationen des Einzeldomänen-Detektionsantikörpers wurden entweder 10 µg Gehirn-Lysat (mit 20 bezeichnete Balken), 2 ng Gehirn-Lysat (mit 22 bezeichnete Balken) oder keine Probe, Negativ-Kontrolle (mit 24 bezeichnete Balken) verwendet. Deutlich ist zu erkennen, dass bei allen Konzentrationen des Einzeldomänen-Detektionsantikörpers die Probe mit 10 µg Gehirn-Lysat die höchste Lumineszenz aufweist, während die Lumineszenz der Probe mit einem geringen Anteil des Gehirn Lysats und keinem Gehirn- Lysat etwa die gleiche Lumineszenz aufweist. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können daher das in den Gehirn-Lysaten enthaltene dimere humane Alpha-Synuclein mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden. Die vergleichbare Lumineszenz bei den Proben mit einem geringen Anteil des Gehirn Lysats und der Negativ-Kontrolle ist zum Teil auf eine unspezifische Bindung des Detektion Einzeldomänen-Detektionsantikörper am Trägermaterial zurückzuführen.

Verfahren zur Detektion von dimeren tau-Protein:

**[0103]** Dimeres Tau-Protein kann auf die gleiche Weise, wie bereits oben für dimeres Alpha-Synuclein beschrieben, mittels der oben erwähnten Tau-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Als Einzeldomänen-Trägerantikörper und Einzeldomänen-Detektionsantikörper können dabei jeweils der gleiche Tau-spezifische Antikörper verwendet werden, sodass ein Signal vom Einzeldomänen-Detektionsantikörper nur dann erzeugt werden kann, wenn Dimere Tau-Proteine oder multimeres Tau-Proteine in der Probe vorhanden sind, die zwei gleiche Epitope zur Bindung sowohl des Einzeldomänen-Trägerantikörpers als auch des Einzeldomänen-Detektionsantikörpers aufweisen.

Verfahren zur Detektion von dimeren Beta-Amyloid:

**[0104]** Dimeres beta-Amyloid kann analog zum dimeren Tau-Protein bestimmt werden.

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

### Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis eines multimeren, bevorzugt dimeren Peptids, enthaltend ein erstes und ein zweites Peptid-Monomer in einer Probe, umfassend die Verfahrensschritte:

- A) Bereitstellen eines Trägermaterial-Antikörper-Konjugats, umfassend ein Trägermaterial, an dem ein für das erste Peptid-Monomer spezifischer Einzeldomänen-Trägerantikörper gebunden ist,
- B) Inkontaktbringen der Probe mit dem Trägermaterial-Antikörper-Konjugat, wobei ein Komplex zwischen dem Trägermaterial-Antikörper-Konjugat und dem dimeren Peptid gebildet wird,
- C) Inkontaktbringen des Komplexes mit einem für das zweite Peptid-Monomer spezifischen Einzeldomänen-Detektionsantikörper, der einen Detektionsmarker umfasst, wobei der Einzeldomänen-Detektionsantikörper an den Komplex bindet, wobei der Einzeldomänen-Trägerantikörper auf dem ersten Peptid-Monomer und der Einzeldomänen-Detektionsantikörper auf dem zweiten Peptid-Monomer das gleiche Epitop erkennen, und
- D) Nachweis des dimeren Peptids mittels des Detektionsmarkers.

2. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei ein Trägermaterial-Antikörper-Konjugat verwendet wird, bei dem der Einzeldomänen-Trägerantikörper über einen Peptid-Linker an das Trägermaterial gebunden ist, wobei der Peptid-Linker eine Länge von zumindest 20 Aminosäuren aufweist und einen alpha-helikalen Bereich umfasst, bevorzugt wobei die Länge zwischen 30 bis 130 Aminosäuren, weiter bevorzugt zwischen 50 bis 120 Aminosäuren liegt.

3. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei der Peptid-Linker einem alpha-helikalen Bereich eines SUMO-Peptids (small ubiquitin-like modifier peptid) aufweist, weiter bevorzugt wobei der Peptid-Linker eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95% zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 4, 5, 6, 7, 8 oder 9, bevorzugt SEQ. ID. Nr. 4 aufweist.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 2 oder 3, wobei der Peptid-Linker über eine Tag-Sequenz an das Trägermaterial gebunden ist, bevorzugt, wobei die Tag-Sequenz ausgewählt ist aus einer Gruppe bestehend aus: einem His-Tag, bevorzugt einem His-tag der zwischen 3 bis 20 Histidine aufweist, oder GST-Tag, weiter bevorzugt wobei der Peptid-Linker mit der Tag-Sequenz an den N-Terminus des Einzeldomänen-Trägerantikörpers gebunden ist.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Einzeldomänen-Trägerantikörper und der Einzeldomänen-Detektionsantikörper der gleiche Einzeldomänen-Antikörper sind.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das dimere Peptid ein dimeres Oligo- oder Polypeptid, bevorzugt wobei das dimere Peptid ein Homodimer umfasst oder ist.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zum Nachweis von neurodegenerativen Krankheiten, wie Parkinson, wobei das dimere Peptid ausgewählt ist aus; Beta Amyloid Peptid-Dimer, Tau-Dimer, phosphoryliertem Tau-Dimer, oder Alpha-Synuclein-Dimer, bevorzugt Alpha-Synuclein-Dimer.

8. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch zum Nachweis der Parkinson-Krankheit, wobei das dimere Peptid ein Monomer aufweist, das eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95%, weiter bevorzugt identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 1 oder Tau-Protein oder Beta-Amyloid Protein ist.

9. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch zum Nachweis der Parkinson-Krankheit, wobei der Einzeldomänen-Trägerantikörper und der Einzeldomänen-Detektionsantikörper spezifisch für Alpha-Synuclein sind, bevorzugt, wobei der Einzeldomänen-Trägerantikörper und der Einzeldomänen-Detektionsantikörper eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95%, weiter bevorzugt identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 10 oder zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 11 sind.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei im Verfahrensschritt B) der Einzeldomänen-Trägerantikörper an das erste Peptid-Monomer bindet, wobei das vom dem Einzeldomänen-Detektionsantikörper auf dem ersten Peptid-Monomer erkannte Epitop blockiert wird.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zusätzlich eine positive Kontroll-Reaktion durchgeführt wird, wobei als dimeres Peptid für die positive Kontroll-Reaktion ein Homodimer verwendet wird, dessen Monomer eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95%, weiter bevorzugt identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 14 ist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäure Cystein an Position 87 der SEQ. ID Nr. 14 unverändert bleibt.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei im Verfahrensschritt B) eine Probe ausgewählt aus: einer Hirn- oder Rückenmarksflüssigkeit, Blut, Serum, Blutplasma, Speichel, Gewebebiopsie, Rachenabstrich, Nasenabstrich, Urin, Exosomen-Diagnostik eines Patienten verwendet wird.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Bestimmung ob ein symptomfreier Patient ein Risiko trägt, an Parkinson-Krankheit zu erkranken, wobei Alpha-Synuclein-Dimer als dimeres Peptid nachgewiesen wird.

14. Verfahren zum Nachweis von Alpha-Synuclein in einer Probe eines Patienten, umfassend die Verfahrensschritte:

A) Bereitstellen eines Trägermaterial-Antikörper-Konjugats, umfassend ein Trägermaterial, an dem ein für Alpha-Synuclein spezifischer Einzeldomänen-Trägerantikörper gebunden ist,

B) Inkontaktbringen der Probe umfassend Alpha-Synuclein mit dem Trägermaterial-Antikörper-Konjugat, wobei ein Komplex zwischen dem Trägermaterial-Antikörper-Konjugat und dem Alpha-Synuclein gebildet wird,

C) Inkontaktbringen des Komplexes mit einem für Alpha-Synuclein spezifischen Einzeldomänen-Detektionsantikörper, der einen Detektionsmarker umfasst, wobei der Einzeldomänen-Detektionsantikörper an den Komplex bindet, und

D) Nachweis des Alpha-Synucleins mittels des Detektionsmarkers.

15. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch zum Nachweis von monomeren Alpha-Synuclein, wobei verschiedene Einzeldomänen-Antikörper als Einzeldomänen-Trägerantikörper und als Einzeldomänen-Detektionsantikörper verwendet werden, die unterschiedliche Epitope von Alpha-Synuclein erkennen.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 14 oder 15 zum Nachweis von Parkinson im Menschen oder zur Bestimmung ob ein symptomfreier menschlicher Patient ein Risiko trägt an Parkinson zu erkranken, wobei als Einzeldomänen-Trägerantikörper ein Einzeldomänen-Antikörper verwendet wird, der eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95%, weiter bevorzugt identisch zu der der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 11 ist.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 14 oder 15 zum Nachweis von Alpha-Synuclein in Wirbeltieren ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus: Mensch, Maus, Ratte, Gorilla, Rind, wobei als Einzeldomänen-Trägerantikörper ein Einzeldomänen-Antikörper verwendet wird, der eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95%, weiter bevorzugt identisch zu der der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 10 ist.

18. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 13 zum Nachweis eines dimeren Peptids, enthaltend ein erstes und ein zweites Peptid-Monomer in einer Probe, umfassend:

- ein Trägermaterial-Antikörper-Konjugat, umfassend ein Trägermaterial, an dem ein für das erste Peptid-Monomer spezifischer Einzeldomänen-Trägerantikörper gebunden ist
- einen für das zweite Peptid-Monomer spezifischen Einzeldomänen-Detektionsantikörper, der einen Detektionsmarker umfasst,
- Reagenzien zum Nachweis des dimeren Peptids unter Verwendung des Detektionsmarkers.

19. Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, weiterhin aufweisend Instruktionen zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 13.

20. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche 14 bis 17 zum Nachweis von Alpha-Synuclein in einer Probe, umfassend:

- ein Trägermaterial-Antikörper-Konjugat, umfassend ein Trägermaterial, an dem ein für Alpha-Synuclein spezifischer Einzeldomänen-Trägerantikörper gebunden ist
- einen für Alpha-Synuclein spezifischen Einzeldomänen-Detektionsantikörper, der einen Detektionsmarker umfasst,
- Reagenzien zum Nachweis des Alpha-Synucleins unter Verwendung des Detektionsmarkers.

21. Kit nach dem vorhergehenden Anspruch, weiterhin aufweisend Instruktionen zur Durchführung des Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche 14 bis 17.

22. Alpha-Synuclein-Homodimer, wobei die Monomere eine Sequenzidentität von zumindest 95%, weiter bevorzugt identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 14 sind, mit der Maßgabe, dass die Aminosäure Cystein an Position 87 der SEQ. ID Nr. 14 unverändert bleibt.

23. Expressionskonstrukt, aufweisend ein Gen, das für ein Alpha-Synuclein-Polypeptid codiert, wobei das Alpha-Synuclein-Polypeptid eine Sequenzidentität von zumindest 95%, weiter bevorzugt identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 14 ist, mit der Maßgabe, dass die Aminosäure Cystein an Position 87 der SEQ. ID Nr. 14 unverändert bleibt.

24. Expressionskonstrukt, aufweisend ein Gen, das für einen für ein Peptidmonomer spezifischen Einzeldomänen-Antikörper mit einem an den Einzeldomänen-Antikörper gebundenen Peptid-Linker codiert, wobei der Peptid-Linker eine Länge von zumindest 20 Aminosäuren aufweist und einen alpha-helikalen Bereich umfasst.

25. Expressionskonstrukt nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei das Peptid-Monomer eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95%, weiter bevorzugt identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 1 ist.

26. Expressionskonstrukt nach einem der vorhergehenden Ansprüche 24 oder 25, wobei der Einzeldomänen-Antikörper eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95%, weiter bevorzugt identisch zu der der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 11 ist, oder wobei der

Einzeldomänen-Antikörper eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95%, weiter bevorzugt identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 10 ist.

27. Expressionskonstrukt nach einem der vorhergehenden Ansprüche 24 bis 26, wobei der Peptid-Linker einem alpha-helikalen Bereich eines SUMO-Peptids (small ubiquitin-like modifier peptid) aufweist, weiter bevorzugt wobei der Peptid-Linker eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95% zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 4, 5, 6, 7, 8 oder 9, bevorzugt SEQ. ID. Nr. 4 aufweist.

28. Trägermaterial-Antikörper-Konjugat, umfassend ein Trägermaterial, an dem ein Einzeldomänen-Trägerantikörper gebunden ist, wobei der Einzeldomänen-Trägerantikörper über einen Peptid-Linker an das Trägermaterial gebunden ist, wobei der Peptid-Linker eine Länge von zumindest 20 Aminosäuren aufweist und einen alpha-helikalen Bereich umfasst, bevorzugt wobei die Länge zwischen 30 bis 130 Aminosäuren, weiter bevorzugt zwischen 50 bis 120 Aminosäuren liegt.

29. Trägermaterial-Antikörper-Konjugat nach dem vorhergehenden Anspruch wobei der Peptid-Linker eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95% zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 4, 5, 6, 7, 8 oder 9, bevorzugt SEQ. ID. Nr. 4 aufweist.

30. Trägermaterial-Antikörper-Konjugat nach einem der vorhergehenden Ansprüche 28 oder 29, wobei der Einzeldomänen-Trägerantikörper eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95%, weiter bevorzugt identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 10 oder zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 11 ist.

31. Für ein Peptidmonomer spezifischer Einzeldomänen-Antikörper mit einem an den Einzeldomänen-Antikörper gebundenen Peptid-Linker, wobei der Peptid-Linker eine Länge von zumindest 20 Aminosäuren aufweist und einen alpha-helikalen Bereich umfasst.

32. Einzeldomänen-Antikörper nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei der Einzeldomänen-Antikörper eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95%, weiter bevorzugt identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 11 ist, oder wobei der Einzeldomänen-Antikörper eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95%, weiter bevorzugt identisch zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr. 10 ist.

33. Einzeldomänen-Antikörper nach einem der vorhergehenden Ansprüche 31 oder 32, wobei der Peptid-Linker eine Sequenzidentität von zumindest 80 %, bevorzugt 90%, weiter bevorzugt zumindest 95% zu der Aminosäuresequenz der SEQ. ID Nr.4, 5, 6, 7, 8 oder 9, bevorzugt SEQ. ID. Nr. 4 aufweist.

Es folgen 9 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

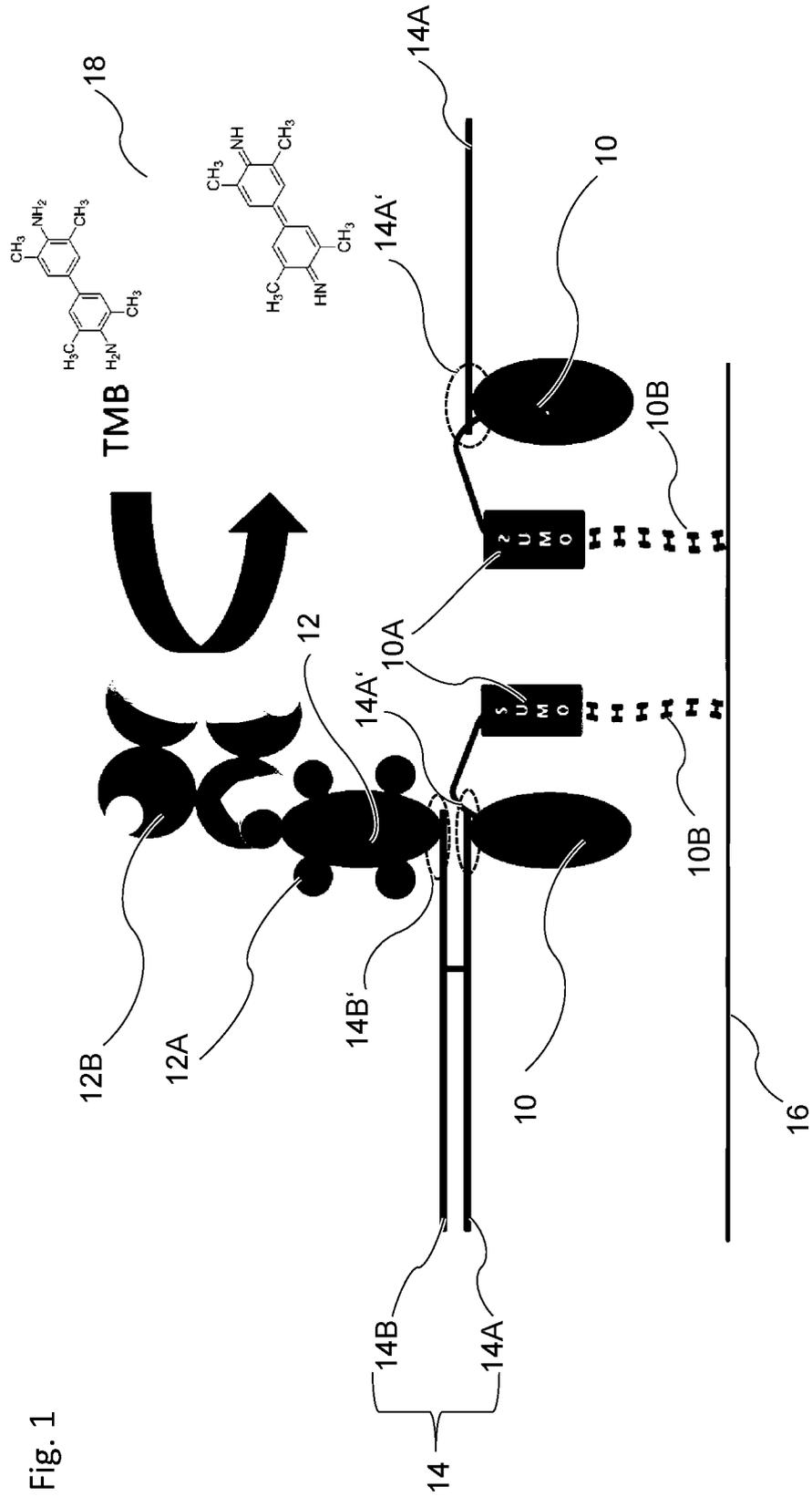


Fig. 1

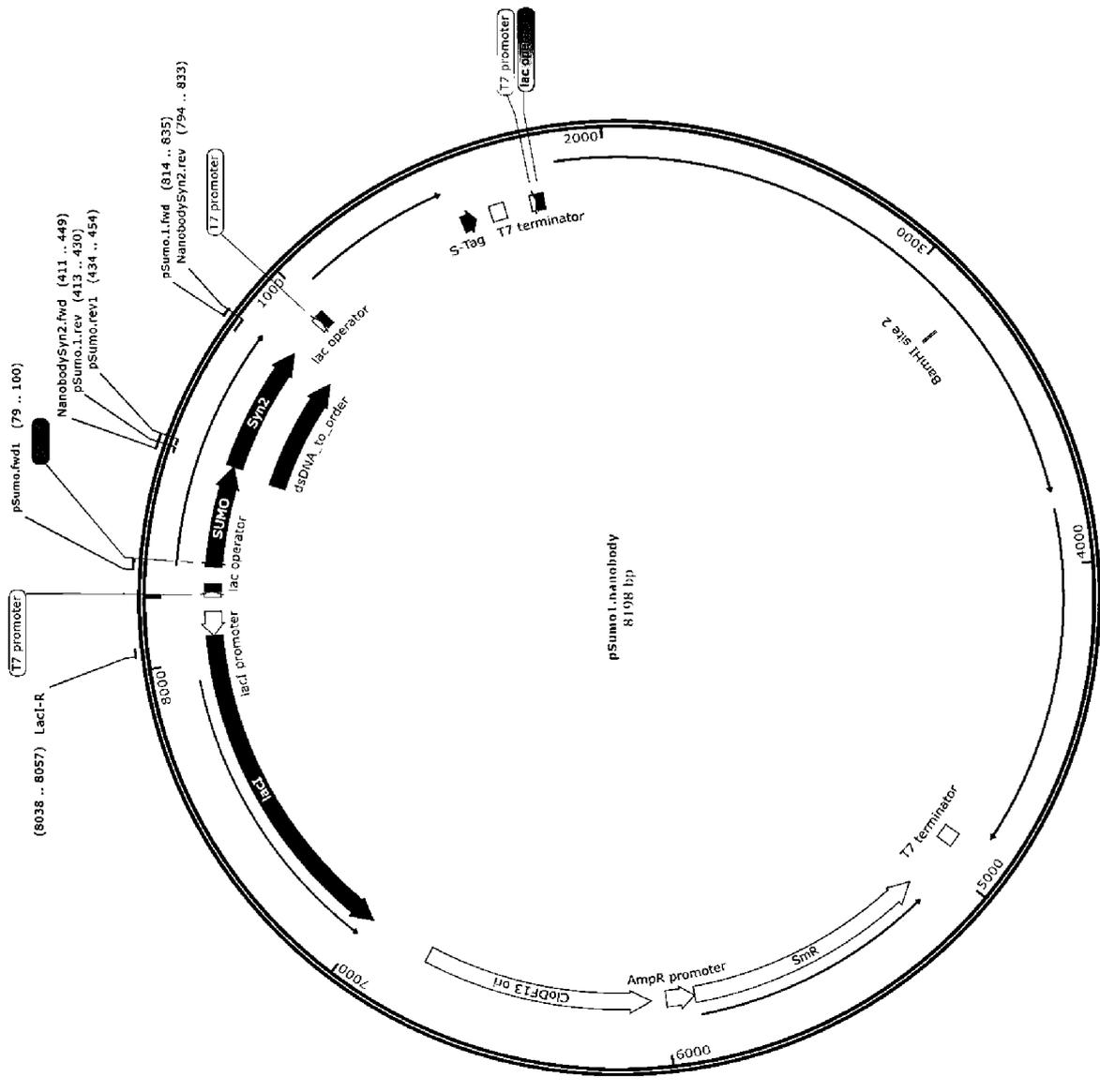
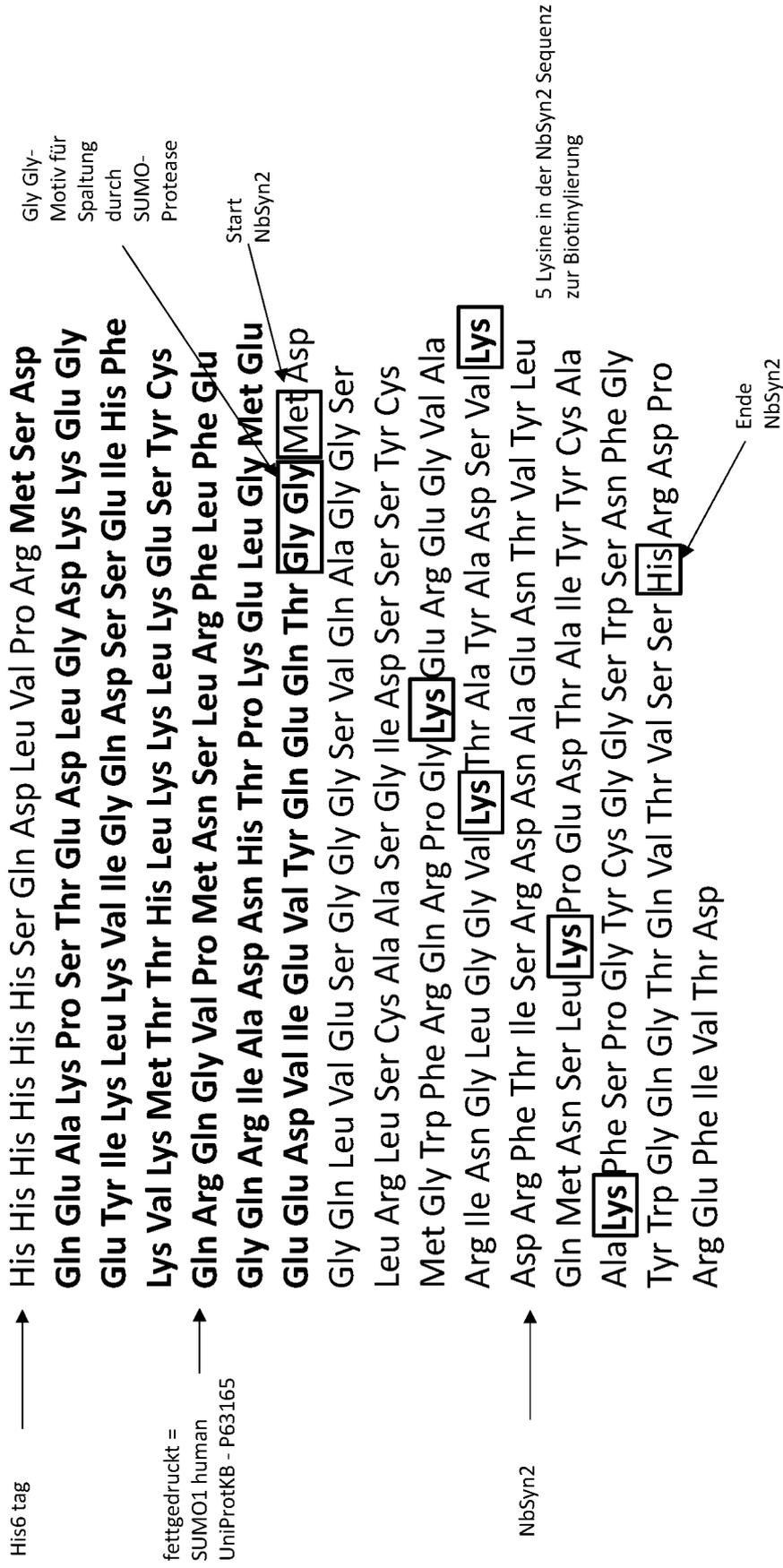


Fig. 2

Fig. 3

Kleinbuchstaben = → **catcaccatcaccacAGCCAGGATCTGGTTCGGGTATGTCTGACCAGGAGGCCAAACCTTCAACTGAG**  
 His6 tag **GACTTGGGGATAAGAAAGGAGGTAATATAATAAACTCAAAGTCAATGGACAGGATAGCAGTGAGAT**  
 unterstrichen = → **ICACTTCAAAGTGAAAATGACAACACATCTCAAGAAACTCAAAGAATCATACTGTCAAAGACAGGGTG**  
 SUMO1 human **TTCCAATGAATTCACCTCAGGTTTCICTTTGAGGGTCAGAGAATTGCTGATAATCATACTCCAAAAGAAGAACT**  
**GGAAATGGAGGAAGAAGATGTGATTGAAGTTATCAGGAACAACGGGGGTATGGATGGCCAGCT**  
**GTTGAAAGCGGTGGTAGCGTTACAGGCAGCGGTAGCCTGCGTCTGAGCTGTGCAGCAAGCG**  
**GTATTGATAGCAGCAGCTATTGTATGGTTGGTTTCGTACGGTCCGGTAAAGAACGTGAAGGT**  
 fettgedruckt = → **GTTGCACGTATTAATGGTCTGGGTGTTAAACCGCATATGCAGATAGCGTTAAAGATCGCTTT**  
**ACCATTAGCCGTGATAATGCCGAAAATACCCTTACCTGCAGATGAATAGCCTGAAAACCCGGAAGA**  
**TACCGCAATCTATTATTGTGCAGCCAAATTTAGTCCGGTTATTGCGGTGGTAGCTGGTCAAATTT**  
**TGGTTATTGGGTGAGGGCACCCAGGTTACCGTTAGCAGCCATAGGGATCCCCGGGAATTCATCGT**  
 GACTGACTGACGCTGCAGGTCGACAAAGCTTGGGCCGCATAATGCTTAACCCCTTGGGGCCTCTA  
 AACGGTCTTGAGGGTTTTTTGTCATGCATCGTATTGTACACGGCCGCATAATCGAAATTAATACG  
 ACTCACTATAGGGGAATTGTAGCGGATAACAATTCGCCATCTTAGTATATTAGTTAAGTATAAGA  
 AGGAGATATACATATGTCGGGGATCGCCCTCAGCAGACTCGCCAGGAGAGGAAAGCATGGAGGAAA  
 GACCACCCATTTGGTTTCGTGGCTGTCCCAACAAAATAATCCCGATGGCACGATGAACCTCAT  
 GAACTGGGAGTGCGCCATTCCGGGAAAGAAGGGACTCCGTGGGAAGGAGGCTTGTTTAAACTAC  
 GGATGCTTTTCAAAGATGATTATCCATCTTCGCACCACCAAAATGTAATTCGAACCCACCATTTTCA  
 CCGGAA

Fig. 4



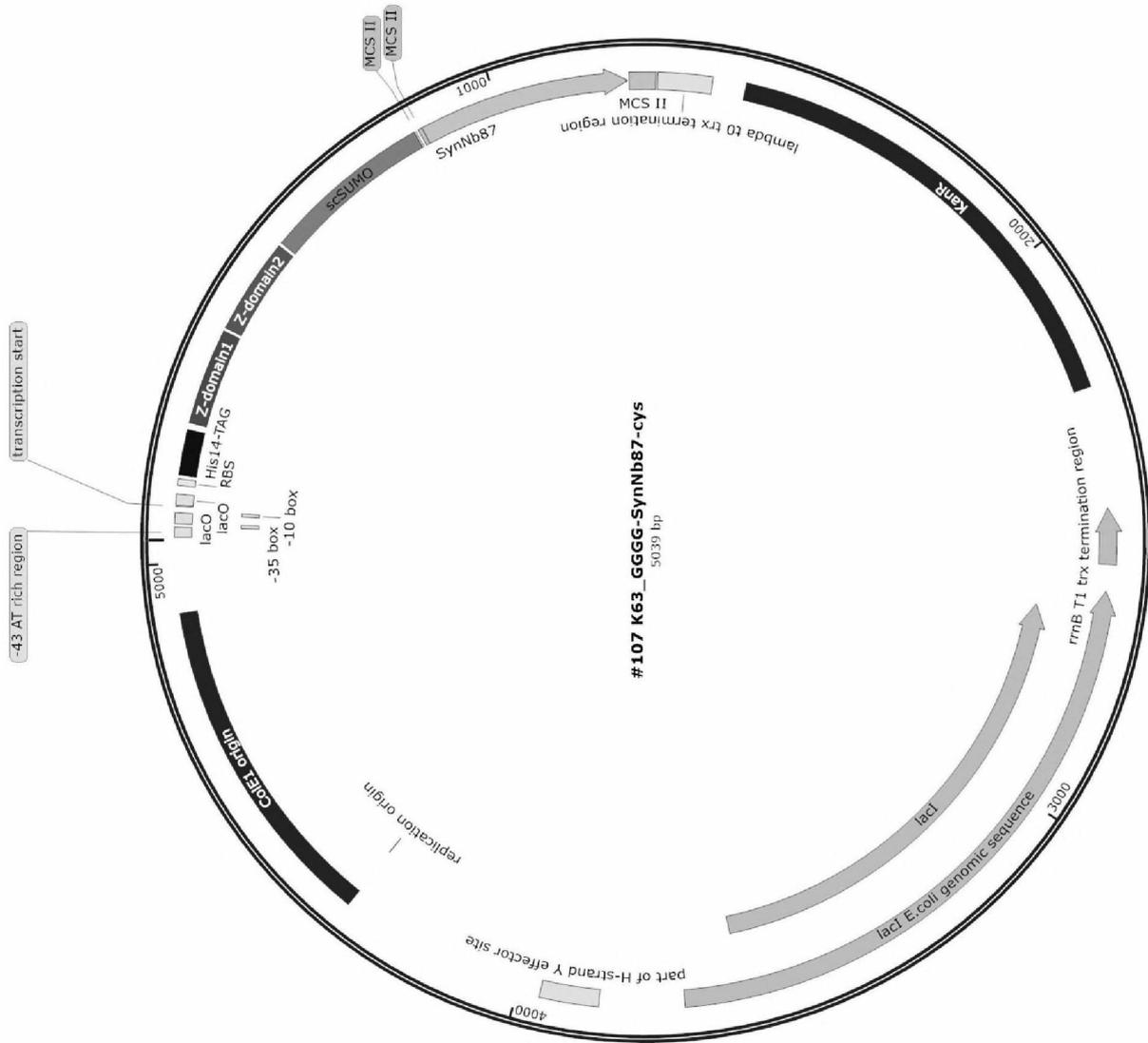
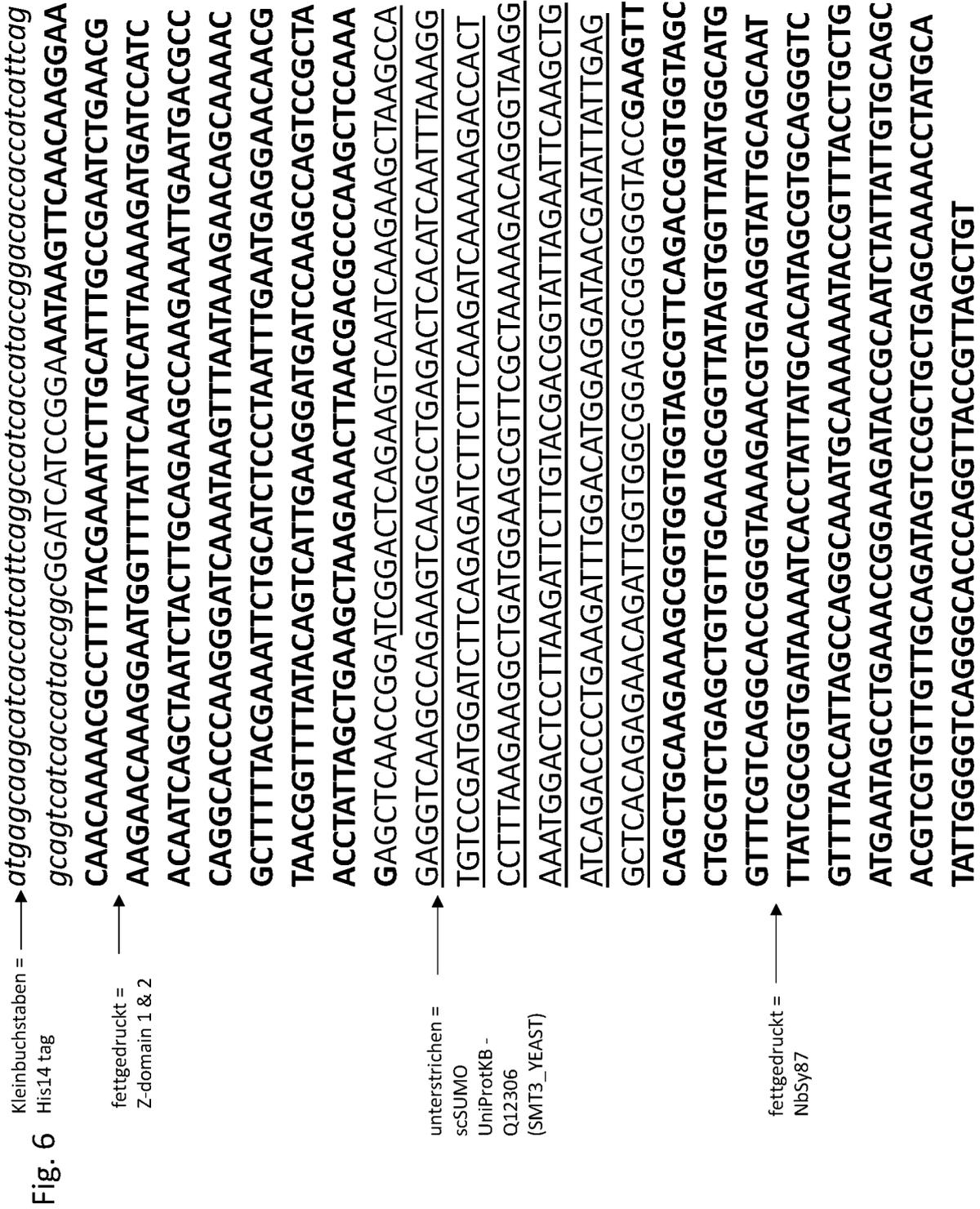
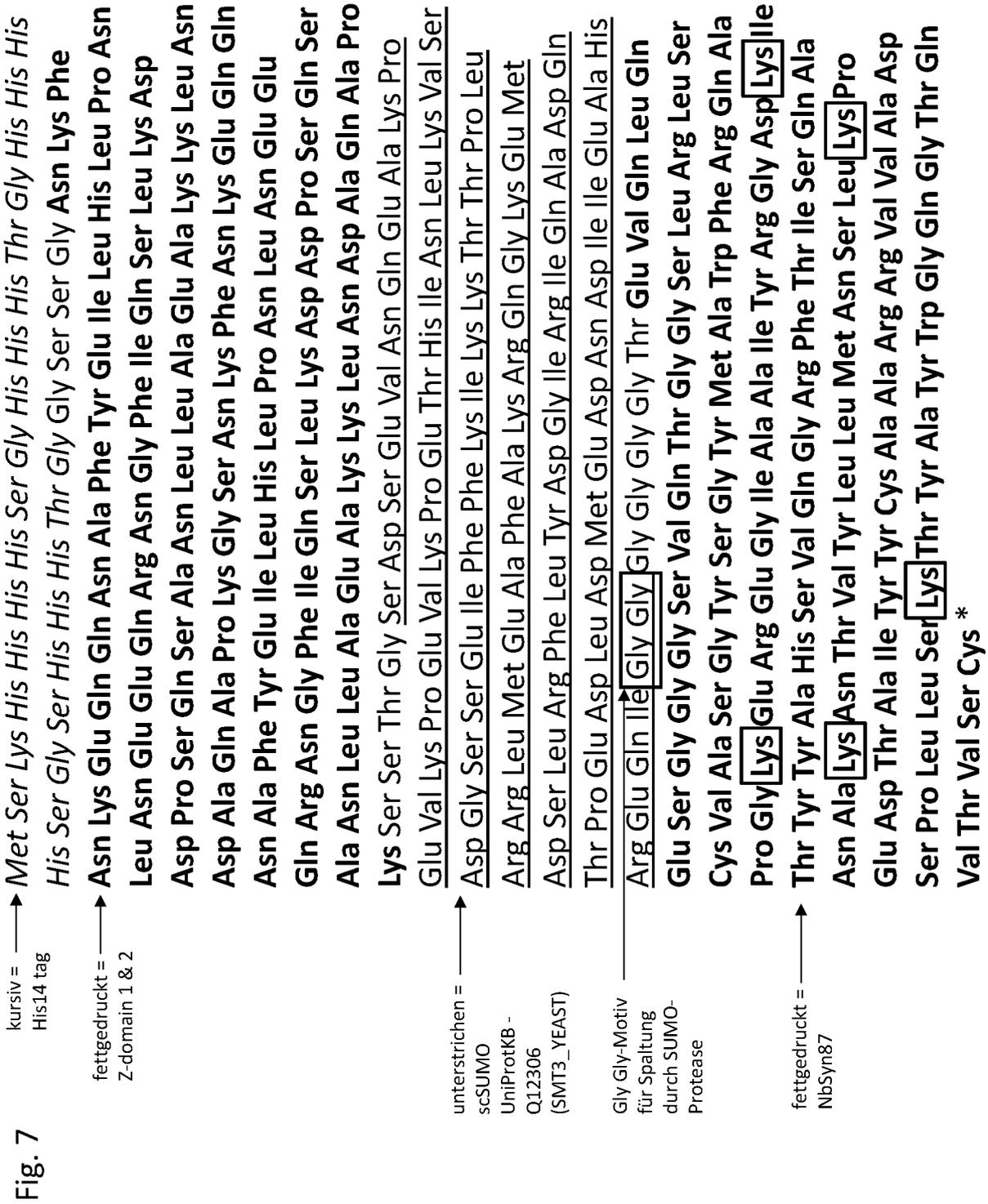


Fig. 5





5 Lysine in der NbSyn87 Sequenz zur Biotinylierung

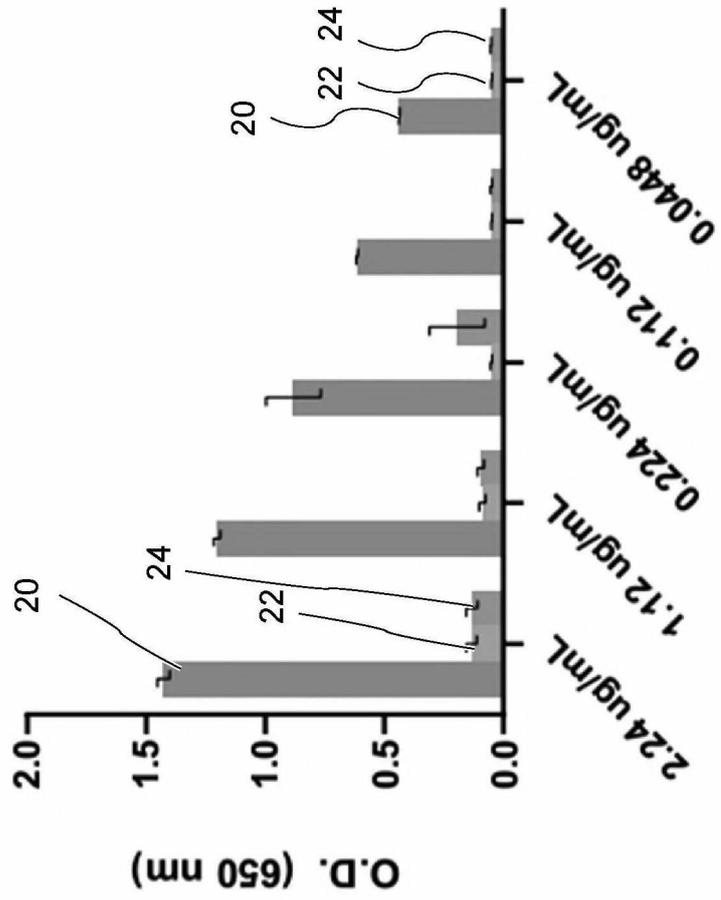


Fig. 8

