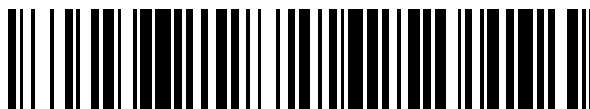


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 264**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 7/04 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2013 PCT/EP2013/068992**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2014 WO14041115**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2013 E 13776426 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2895867**

54 Título: **Nuevos péptidos D-enantioméricos derivados de D3 y su uso**

30 Prioridad:

14.09.2012 DE 102012108598

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
22.06.2020

73 Titular/es:

**FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH (100.0%)
52425 Jülich, DE**

72 Inventor/es:

**WILLBOLD, DIETER;
BRENER, OLEKSANDER;
FUNKE, SUSANNE AILEEN;
NAGEL-STEGER, LUITGARD;
BARTNIK, DIRK y
KLEIN, ANTONIA NICOLE**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 768 264 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevos péptidos D-enantioméricos derivados de D3 y su uso

- 5 La presente invención se refiere a nuevos péptidos de unión a oligómeros A-beta D-enantioméricos derivados de D3 y su uso, en particular en medicina.

Debido al desarrollo demográfico en las próximas décadas, aumentará el número de personas que padecen enfermedades relacionadas con la edad. Vale la pena mencionar aquí la llamada enfermedad de Alzheimer (EA).

- 10 Una característica de la enfermedad de Alzheimer son los depósitos extracelulares del péptido β -amiloide (péptido A β). Esta deposición del péptido A β en las placas generalmente se encuentra *post mortem* en los cerebros de los pacientes con EA. Por lo tanto, las distintas formas del péptido A β , como las fibrillas, son las responsables del inicio y la progresión de la enfermedad. Además, los pequeños oligómeros A β libremente difusibles han sido vistos como
- 15 la principal causa del desarrollo y progreso de la EA durante algunos años. Los monómeros A β , como componentes básicos de los oligómeros A β , se producen constantemente en el cuerpo humano y presumiblemente no son tóxicos *per se*. Incluso pueden tener una función neuroprotectora. Los monómeros A β pueden acumularse aleatoriamente según su concentración. La concentración depende de su velocidad de formación y descomposición en el cuerpo. Si la concentración de monómeros A β en el cuerpo aumenta con la edad, la acumulación conjunta espontánea de los
- 20 monómeros en oligómeros A β es cada vez más probable. Los oligómeros A β resultantes podrían multiplicarse de manera análoga a los priones y finalmente conducir a la enfermedad de Alzheimer.

- Hasta el momento, no existe un ingrediente activo o medicamento que actúe contra las causas de la EA. Los medicamentos utilizados y autorizados hasta ahora alivian algunos de los síntomas que ocurren en la EA. Sin embargo, no pueden retrasar el progreso de la enfermedad ni lograr una cura. Hay algunas sustancias que han demostrado tener éxito en las pruebas con animales en la prevención, pero no (necesariamente) en el tratamiento de la EA.

- 30 Una diferencia importante entre la prevención y el tratamiento o incluso la cura de la EA radica en el hecho de que la prevención puede lograrse evitando la formación de los primeros oligómeros A β . Algunos, pocos ligandos A β son suficientes para la prevención, que no son necesariamente muy afines y selectivos con respecto a los oligómeros A β .

- 35 La formación de los oligómeros A β a partir de muchos monómeros es una reacción de alto orden y, por lo tanto, altamente dependiente de la concentración de monómero A β . Por lo tanto, incluso una pequeña reducción en la concentración activa de monómero A β evita la formación de los primeros oligómeros A β . Los conceptos y sustancias de la terapia más bien preventiva actualmente en desarrollo se basan en este mecanismo. Sin embargo, se puede suponer una situación completamente distinta cuando se trata la EA. Aquí hay oligómeros A β o posiblemente
- 40 polímeros o fibrillas incluso más grandes que se multiplican a través de mecanismos similares a los priones. Sin embargo, este aumento es una reacción de bajo orden y, por lo tanto, apenas depende de la concentración de monómeros A β .

- Las sustancias conocidas de estado de la técnica reducen la concentración de monómeros y/u oligómeros A β en una amplia variedad de formas. Por ejemplo, se conocen moduladores de gamma-secretasa que se han utilizado en experimentos con animales para la prevención.

- 50 A partir del documento WO 02/081505 se conocen diversas secuencias de D-aminoácidos que se unen a péptidos A β . Estas secuencias de D-aminoácidos se unen a los péptidos β -amiloides con una constante de disociación (valor K_D) de 4 μ mol.

A partir del documento WO 2011/147797 se conocen compuestos híbridos que consisten en aminopirazoles y péptidos que evitan la oligomerización de A β .

- 55 Zhang G. et al. Bioconjugate Chemistry, 14(1), 2003 revela que la formación de placas β -amiloides en la enfermedad de Alzheimer se desencadena por el contacto intermolecular de la secuencia de 5 aminoácidos KLVFF en péptidos β -amiloides con un tamaño de 40 a 43 residuos.

- Wiesehahn et al, CHEMBIOCHEM, 4(8), 2003 describe un ensayo de presentación en fagos para identificar ligandos nuevos y altamente específicos para el péptido de Alzheimer A β (1-42).

- 60 Stains et al, CHEMMEDCHEM, 2(12) 2007 se relacionan con el conocimiento actual con respecto a las moléculas que han demostrado interactuar con formas oligoméricas o fibrilares del péptido β -amiloide.

- 65 El documento WO 2007/047967 A2 se refiere a un dispositivo que se coloca dentro de un paciente con enfermedad de Alzheimer (EA) para extraer péptidos β -amiloides neurotóxicos (nt- β AP) de fluidos corporales.

El documento WO 02/42462 A2 se refiere a agentes terapéuticos que son adecuados para el tratamiento de un trastorno amiloidogénico.

Funke et al. CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, 18(6) 2012 describe los péptidos que se han desarrollado para el diagnóstico y la terapia de la EA y sus ventajas y desventajas de los fármacos peptídicos.

Funke et al. MOLECULAR BIOSYSTEMS, 5(8), 2009 describe un ensayo de presentación de fagos para la identificación de nuevos péptidos D-enantioméricos potencialmente terapéuticamente activos.

El documento WO 2010/062570 A2 describe una composición para el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Alzheimer.

Sundaram et al. INTERNATIONAL JOURNAL OF PEPTIDE RESEARCH, 18(2) 2012 se refiere al péptido retroinverso fflvk, que une fibrillas artificiales de A β con afinidad moderada.

El documento WO 2011/147797 A2 se refiere a un compuesto híbrido basado en derivados y péptidos de aminopirazol para su uso como agente terapéutico en el tratamiento de enfermedades.

Müller-Schiffmann et al. ANGEW. CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, 49(46), 2010 describe compuestos híbridos que consisten en una parte orgánica de resolución de la lámina β D-enantiomérica y una parte peptídica que reconoce los A β D-enantioméricos.

Bartinek et al. REJUVENANT RESEARCH, 13(2-3), 2010 describe péptidos de unión a A β D-enantioméricos.

Para muchas sustancias que han mostrado resultados positivos en experimentos con animales, este efecto no pudo confirmarse en estudios clínicos en humanos. En los estudios clínicos de fase II y III, solo las personas que han sido diagnosticadas claramente con ED pueden ser tratadas. Aquí, una ligera reducción en la concentración de monómero A β ya no es suficiente para evitar que los oligómeros A β existentes se formen aún más, p. ej., a través de un mecanismo similar a un prión. La multiplicación de los oligómeros A β o incluso mejor su destrucción o volverlos inofensivos es absolutamente necesaria para influir en el curso de la enfermedad.

Hasta ahora, la EA se ha diagnosticado principalmente mediante pruebas neuropsicológicas, exámenes en personas que ya han tenido síntomas de demencia. Sin embargo, se sabe que los oligómeros A β y las fibrillas y las placas que siguen en el curso de la enfermedad se desarrollan hasta 20 años antes de que aparezcan los síntomas en el cerebro del paciente y ya pueden haber causado un daño irreversible. Sin embargo, en la práctica todavía no hay forma de diagnosticar la EA antes del inicio de los síntomas.

Por lo tanto, todavía existe la necesidad de nuevos compuestos (ingredientes activos) que se unan de manera muy específica y con alta afinidad a los oligómeros A β y eviten así su multiplicación. Estos compuestos no deberán mostrar efectos secundarios indeseables, en particular no deberán causar una respuesta inmunitaria. Los compuestos también deberán reconocer los oligómeros A β tóxicos y, por lo tanto, también los pequeños oligómeros de libre difusión en pequeñas concentraciones, destruirlos por completo y/o evitar su multiplicación (similar a un prión).

Además, también existe la necesidad de nuevos compuestos que puedan usarse como sondas para la detección y el marcado de oligómeros A β , en particular si la enfermedad aún no está muy avanzada y los oligómeros solo aparecen en bajas concentraciones.

Otro objeto de la presente invención era proporcionar sustancias que no solo se centren en péptidos A β extracelulares, como la mayoría de los compuestos conocidos del estado de la técnica, sino que también se unan específicamente a oligómeros A β solubles. También se dice que los nuevos compuestos inhiben o previenen la formación de fibrillas de péptidos A β .

El objeto también era proporcionar nuevos péptidos, preferiblemente derivados del D-péptido D-enantiomérico D3 (SEQ ID NO: 11), que tengan propiedades más eficientes en comparación con D3. Las propiedades incluyen afinidad y especificidad de unión para especies A β , inhibición de la formación de fibrillas A β , inhibición de la citotoxicidad A β , precipitación de oligómeros A β , conversión de fibrillas A β en especies no amiloidogénicas no tóxicas.

Este objeto se logra mediante un péptido que contiene al menos una secuencia de aminoácidos D-enantioméricos según la SEQ ID NO: 1 (D3-Delta-HTH) o polímeros de la SEQ ID NO:1 o polímeros de la SEQ ID NO: 1.

También se describen péptidos que contienen una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 (RD2), SEQ ID NO: 3 (RD 1), SEQ ID NO: 4 (RD3), SEQ ID NO: 5 (DB3), SEQ ID NO: 6 (NT-D3), SEQ ID NO: 7 (DB1), SEQ ID NO: 8 (DB2), SEQ ID NO: 9 (DB4) y/o SEQ ID NO. 10 (DB5) y/u homólogos, fragmentos y partes de los mismos.

También se describen polímeros de la SEQ ID NO: 2 (RD2), SEQ ID NO: 3 (RD 1), SEQ ID NO: 4 (RD3), SEQ ID NO: 5 (DB3), SEQ ID NO: 6 (NT-D3), SEQ ID NO: 7 (DB1), SEQ ID NO: 8 (DB2), SEQ ID NO: 9 (DB4) y/o SEQ ID NO: 10 (DB5) y/o sus homólogos.

5 Los fragmentos y las partes muestran un efecto similar o idéntico al de los péptidos según la invención.

En una variante, los péptidos según la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y/o SEQ ID NO: 10 y sus homólogos esencialmente, preferiblemente al menos 60 %, 75 %, 80 %, particularmente preferiblemente 85 %, 90 %, 95 %, en particular 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % de D-aminoácidos.

Un polímero en el sentido de la invención se forma a partir de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más monómeros seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y/o SEQ ID NO: 10.

Según la invención, los polímeros se construyen a partir de monómeros idénticos o de una combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 monómeros distintos de los mencionados anteriormente, como los llamados polímeros combinados. Los monómeros también pueden ser parcialmente idénticos. El número de monómeros idénticos en los polímeros combinados se puede seleccionar libremente.

Como alternativa, los polímeros combinados contienen al menos un monómero seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y/o SEQ ID NO: 11.

25 También se describen sus homólogos, así como partes o fragmentos de los mismos y al menos un péptido que se une al oligómero Aβ y que se selecciona de los monómeros del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y/o SEQ ID NO: 11 y sus homólogos, así como sus partes o fragmentos, que consisten esencialmente en D-enantiómeros, distinguidos como un monómero adicional.

30 Los polímeros se pueden producir, por ejemplo, mediante síntesis química o síntesis de péptidos.

En una realización de la invención, los monómeros están unidos covalentemente entre sí. En una realización adicional, los monómeros no están unidos covalentemente entre sí.

35 Para los fines de la invención, está presente una conexión o enlace covalente de las unidades de monómero si los péptidos están unidos linealmente entre sí cabeza a cabeza, cola a cola o cabeza a cabeza, sin el uso de enlaces o grupos de enlaces en el medio.

40 Un enlace no covalente en el sentido de la invención está presente si los monómeros están unidos entre sí a través de biotina y estreptavidina, en particular tetrámero de estreptavidina.

En una variante de la presente invención, los monómeros pueden estar unidos linealmente entre sí, en particular como se describió anteriormente. En otra variante, los monómeros están unidos entre sí para formar el polímero según la invención.

45 Según la invención, un polímero ramificado puede ser un dendrímero en el que los monómeros están unidos entre sí de forma covalente o no covalente.

50 Alternativamente, los monómeros también se pueden unir a una molécula de plataforma (como PEG o azúcar) y así formar un polímero ramificado.

Alternativamente, son posibles combinaciones de estas opciones.

55 Los monómeros y polímeros se denominan a continuación péptidos según la invención.

También se describen los péptidos con la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y/o SEQ ID NO: 10 y/u homólogos de las mismas con una identidad del 50 %.

60 Para los fines de la invención, «secuencias homólogas» u «homólogos» significa que una secuencia de aminoácidos tiene una identidad con una de las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente de los monómeros de al menos un 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 %, En lugar del término «identidad», los términos «homólogo» u «homología» se usan indistintamente en la presente descripción. La identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o secuencias de polipéptidos se determina mediante comparación usando el programa BESTFIT basado en el algoritmo de Smith,

T.F. y Waterman, M.S (Adv. Appl. Math. 2: 482-489 (1981)) calculado con los siguientes parámetros para aminoácidos: Penalización de creación de espacio: 8 y penalización por extensión de espacio: 2; y los siguientes parámetros para ácidos nucleicos: Penalización de creación de espacio: 50 y penalización por extensión de espacio: 3. La identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o secuencias de polipéptidos se define preferiblemente por la identidad de la secuencia de ácido nucleico/secuencia de polipéptidos sobre la longitud de secuencia total respectiva, como se determina mediante comparación usando el programa GAP basado en el algoritmo de Needleman, S.B. Y Wunsch, C.D. (J. Mol. Biol. 48: 443-453) calculado utilizando los siguientes parámetros para aminoácidos: Penalización de creación de espacio: 8 y penalización por extensión de espacio: 2; y los siguientes parámetros para la penalización por creación de espacio de ácidos nucleicos: 50 y penalización por extensión de espacio: 3.

Para los fines de la presente invención, dos secuencias de aminoácidos son idénticas si tienen la misma secuencia de aminoácidos.

En una variante, se entiende que los homólogos significan las secuencias retroinversas correspondientes de los monómeros mencionados anteriormente. Según la invención, el término «secuencia retroinversa» denota una secuencia de aminoácidos que está compuesta de aminoácidos en forma enantiomérica (inversa: quiralidad del átomo alfa-C invertido) y donde el orden de la secuencia también se invirtió a la secuencia de aminoácidos original (retro = hacia atrás).

En otra variante, los péptidos según la invención se unen a partes del péptido β -amiloide.

En otra variante, los péptidos tienen secuencias que difieren de las secuencias especificadas en hasta tres aminoácidos.

Además, las secuencias que contienen las secuencias mencionadas anteriormente también pueden usarse como péptidos.

También se describen péptidos que comprenden fragmentos de las secuencias mencionadas anteriormente o que comprenden secuencias homólogas a las secuencias mencionadas anteriormente.

Según la invención, es un péptido para uso en medicina, preferiblemente para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

El péptido de la presente invención consiste en D-aminoácidos.

Para los fines de la presente invención, el término «esencialmente a partir de D-aminoácidos» significa que los monómeros a usar según la invención están al menos en un 50 %, 60 %, preferiblemente 75 %, 80 %, particularmente preferiblemente 85 %, 90 %, 95 %, en particular 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % formados por D-aminoácidos.

En una realización adicional no según la invención, los péptidos son derivados del D-péptido D-enantiomérico D3. Los derivados en el sentido de la invención son secuencias peptídicas derivadas de D3 que se logran mediante uno de los siguientes tres procedimientos:

a) Cambio del orden y/o el número de unidades de aminoácidos en D3. Solo se usan los aminoácidos que están presentes en la secuencia D3.

b) Supresión de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 aminoácidos de la secuencia D3.

c) Intercambio de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos con otros aminoácidos, preferiblemente D-enantiómeros.

En una variante adicional, es un péptido según la invención para inhibir la formación de fibrillas de péptidos beta amiloides. Los polímeros según la invención desintoxican los oligómeros o polímeros A β formados a partir de ellos, así como las fibrillas, uniéndolos y convirtiéndolos en compuestos no tóxicos. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un procedimiento para la desintoxicación de los oligómeros A β , polímeros o fibrillas formados a partir de los mismos.

En una realización, la invención también se refiere a péptidos según la invención que están unidos a una sustancia adicional.

En el contexto de la invención, el enlace es un enlace químico como se define en Römpp Chemie Lexikon, 9. Auflage, Band 1, Seite 650 ff, Georg Thieme Verlag Stuttgart, preferiblemente un enlace de valencia principal, en particular un enlace covalente.

En una variante, las sustancias son medicamentos o principios activos, definidos de conformidad con la Ley de

medicamentos §2 o §4 (19), a partir de septiembre de 2012. En una alternativa, los principios activos son sustancias terapéuticamente activas que se usan como principios activos. Se prefieren los antiinflamatorios.

En otra variante, las sustancias son compuestos que potencian la acción de los péptidos.

En una alternativa, tales compuestos son aminopirazol y/o derivados del aminopirazol. Los derivados de aminopirazol en el sentido de la invención son ácido 3-aminopirazol-5-carboxílico o ácido 3-nitropirazol-5-carboxílico y todos los descendientes en los que el grupo CH heterocíclico ha sido reemplazado por -CR- o -N- u -O- o -S-, y todos los dímeros peptídicos, trímeros o tetrameros derivados de los mismos, preferiblemente trímeros de aminopirazol.

En una alternativa adicional, estos son compuestos que mejoran la solubilidad de los péptidos y/o el paso a través de la barrera hematoencefálica.

En una alternativa, los péptidos según la invención tienen cualquier combinación de al menos dos o más características de las variantes, diseños y/o alternativas descritas anteriormente.

La invención también se refiere a un péptido según la invención para unirse a péptidos Aβ agregados.

También se describe un procedimiento para producir el péptido según la invención mediante síntesis de péptidos, como es conocido por el experto en la materia, por ejemplo, procedimientos de síntesis orgánica para cualquier compuesto de bajo peso molecular y/o mutagénesis y producción recombinante.

La invención también se refiere a una composición que contiene el péptido según la invención, en particular para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

La presente invención se refiere además a una composición que comprende el péptido según la invención, en particular para prevenir oligómeros Aβ tóxicos, o para destruir polímeros o fibrillas formadas a partir de los mismos.

La «composición» según la invención puede ser, p. ej., una vacuna, un medicamento (p. ej., en forma de comprimido), una solución inyectable, un alimento o suplemento alimenticio, que contiene el péptido según la invención en una formulación que se preparará en base al conocimiento especializado.

También se describe un kit que contiene el péptido según la invención.

En dicho kit, los péptidos pueden empaquetarse en contenedores con/en tampones o soluciones. Todos los componentes del kit pueden envasarse en el mismo envase o por separado. El kit también puede contener instrucciones para su uso. Tal kit puede, por ejemplo, contener los péptidos en una ampolla para inyección con un tapón y/o tabique. También puede contener una jeringa desechable, por ejemplo.

Otro objeto de la presente invención es el uso del péptido según la invención como una sonda para la identificación, determinación cualitativa y/o cuantitativa de oligómeros beta amiloides o fibrillas.

También se describe una sonda que contiene el péptido según la invención para la identificación, determinación cualitativa y/o cuantitativa de oligómeros beta amiloides.

Tales sondas son de gran importancia porque permiten el diagnóstico precoz de la EA. Con un diagnóstico temprano, la enfermedad se puede contrarrestar en una etapa muy temprana.

Dichas sondas moleculares contienen el polímero según la invención y opcionalmente colorantes, colorantes fluorescentes, isótopos radiactivos (PET, etc.), gadolinio (MRI), así como sustancias alternativas adecuadas para obtener imágenes de las sondas y pueden, p. ej., inyectarse por vía intravenosa al paciente. Después de pasar a través de la barrera hematoencefálica, las sondas pueden unirse a oligómeros y/o placas Aβ. Los oligómeros y/o placas Aβ marcadas de esta manera pueden hacerse visibles mediante procedimientos de formación de imágenes tales como, p. ej., SPECT, TEP, TAC, RMN, espectroscopía de RM de protones.

Además, la invención también se refiere al uso del péptido para prevenir los oligómeros beta amiloides y/o los agregados de péptidos beta amiloides y/o las fibrillas beta amiloides.

El péptido según la invención también se usa para la desintoxicación de oligómeros y/o agregados beta amiloides tóxicos. En particular, se usa para unirse a los oligómeros y/o agregados beta amiloides y, por lo tanto, para formar agregados amorfos no tóxicos.

Otro tema es el uso del péptido según la invención como agente terapéutico para la enfermedad de Alzheimer.

Los péptidos según la invención se unen particularmente bien a los oligómeros Aβ, en particular a los oligómeros Aβ

solubles.

Una unión particularmente fuerte de los péptidos según la invención a las moléculas objetivo se produce por una alta especificidad y/o afinidad por la molécula objetivo de los péptidos según la invención. Los complejos formados tienen una constante de disociación baja (valor K_D).

Usando la prueba de tioflavina T fue posible demostrar que los péptidos según la invención inhiben de manera muy eficiente la formación de fibrillas de péptidos A β , en particular de la SEQ ID NO: 1 - 5, especialmente SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 5.

Además, se describe el uso de los péptidos según la invención en un procedimiento para el tratamiento (*in vitro*, *ex vivo*) de sangre, productos sanguíneos y/u órganos, caracterizado porque se toman sangre, productos sanguíneos y/u órganos del cuerpo humano o animal y los oligómeros beta A(amiloides) β se eliminan y/o desintoxican.

Ejemplos

1.

Las variantes D3 enumeradas en la Tabla 1 se sintetizaron químicamente.

Tabla 1: Lista de derivados D3 evaluados

Nombre del péptido (con explicación)	Secuencia de aminoácidos (D-enantiómero)
D3 (SEQ ID NO: 11)*	rprrlthnrr
NT-D3 (D3-N-terminal) (SEQ ID NO: 6)*	rprrl
RD1 (racional D3) (SEQ ID NO: 3)*	pnhhrrrrrttl
RD2 (racional D3) (SEQ ID NO: 2)*	ptlthnrrrrr
RD3 (racional D3) (SEQ ID NO: 4)*	rrptlrhthnrr
D3 Δ hth (D3 con delección hth) (SEQ ID NO: 1)	rprrlrrr
*no según la invención	

Los efectos de los péptidos descritos en la tabla sobre la agregación A β se investigaron mediante centrifugación en gradiente de densidad. A β se mezcló con el péptido respectivo y las partículas resultantes se separaron según su tamaño. La muestra a examinar se colocó en la superficie del tubo de centrifuga, en el que se presentó un gradiente de densidad, que en este ejemplo consistió en capas de distintas concentraciones de yodixanol. Durante la separación, que dura varias horas, las moléculas se sedimentan en el solvente a diferentes velocidades, y cuanto más rápidas sean, más grandes son las partículas. Si la centrifugación finaliza en un momento adecuado, se obtienen distintos componentes de la muestra en las distintas capas, que se analizan por electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecilsulfato sódico). A β sirvió como control sin la adición de péptido. La evaluación de las bandas de A β y A β con RD2 se muestra como un ejemplo en la figura 1.

Como se puede ver en la figura 1, A β se puede detectar en todas las fracciones en la muestra de A β . Esto cambia después de agregar RD2. Aquí las fracciones 3-9 (fracción de oligómero A β) muestran menos oligómeros A β . Se forman grandes agregados que se pueden detectar en las fracciones 10-15. A la concentración de péptido de 20 μ M utilizada, D3 no tuvo efecto. Estudios anteriores encontraron que D3 precipitó oligómeros A β en concentraciones más altas y los convirtió en agregados grandes, amorfos y no tóxicos (Funke et al., ACS Chem. Neurosci. 2010). Todos los péptidos D-enantioméricos caracterizados por A β usando el procedimiento anterior se marcaron con isotiocianato de fluoresceína. La cantidad del colorante detectable en la fracción 12 se usó para estimar la fuerza de unión del derivado D3 respectivo al oligómero A β o su efecto precipitante de oligómero *in vitro*. Los resultados para todos los péptidos se muestran en la Tabla 2. Se demostró que especialmente el péptido RD2 en comparación con D3 tiene un efecto más claro sobre la agregación A β .

Tabla 2: Compilación de los resultados de la modulación del comportamiento de agregación A β 1-42 de varios derivados D3

Péptido	Péptido unido en la fracción 12 [%]
Control A β sin péptido	0
D3*	4
NT-D3*	0
RD1*	3

RD2*	20
RD3*	4
D3Δhth	2
* no según la invención	

2.

Los péptidos también se probaron para determinar su unión *in vitro* a varios conformadores Aβ (monómeros Aβ, oligómeros, fibrillas) en un ELISA. Todos los péptidos mostraron una unión débil a los monómeros Aβ, pero afinidades relativamente altas a oligómeros y fibrillas (figura 2). Curiosamente, los monómeros biotinilados no se detectaron en el extremo amino terminal, mientras que los monómeros «sin semillas» (preparados sin gérmenes de agregación) se unieron débilmente con la biotinilación carboxiterminal. Esto puede interpretarse como una indicación potencial de un sitio de epítipo de unión de los derivados D3 ubicados en el extremo amino.

3.

Se usaron algunos péptidos en la prueba de agregación de tioflavina T (ThT). ThT es un colorante fluorescente que se une a estructuras ricas en láminas β de diversas proteínas amiloides y fluoresce después de la excitación a 440 nm. De esta manera, la emisión puede correlacionarse con el contenido relativo de fibrillas en la muestra. Las pruebas ThT se usan para medir la fibrilación de Aβ y se usan principalmente para que los ligandos demuestren un posible efecto inhibitorio sobre la agregación de Aβ. Los péptidos se usaron en una proporción de 1:10 (A-Beta: péptido) con una solución Aβ de 10 μM. Quince horas después, después de alcanzar la fase de saturación en el control Aβ sin la adición de ligandos, se evaluó la fluorescencia ThT de la incubación de péptidos D y Aβ y se mostró como un porcentaje en función del control de incubación Aβ. Se puede ver que todos los péptidos utilizados reducen considerablemente la formación de fibrillas Aβ (figura 3).

4.

Además, se identificaron variantes de D3 que, en comparación con D3, tenían una mayor fuerza de unión para Aβ, en particular para oligómeros Aβ, con al menos el mismo efecto sobre su agregación. Un vínculo más fuerte sugiere un efecto terapéutico más eficiente.

Un análisis de PepSpot con una membrana de JPT (Berlín), donde se inmovilizaron más de 300 variantes D3, intentó identificar variantes que unen oligómeros con más afinidad a Aβ(1-42). D3, variantes D3 con secuencias de aminoácidos variables (llamada mutagénesis de saturación, cada aminoácido fue reemplazado por los otros 19 aminoácidos naturales en su forma D-enantiomérica) y los controles se inmovilizaron carboxiterminalmente en una membrana de trioxa. Después de la incubación con 5 μM de oligómeros Aβ(1-42) durante 5 minutos y los pasos de lavado, las señales de Aβ unida fueron detectadas por un anticuerpo anti-Aβ (6E10). Las señales de unión se evaluaron como intensidad de señal/área. Durante el análisis, la intensidad de la señal del original D3 (media) se comparó con la de los derivados. Los intercambios de aminoácidos que condujeron a una unión más fuerte de los oligómeros Aβ se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: La secuencia de D-aminoácidos de D3 se muestra en negrita en la primera línea. En las líneas a continuación, se enumeran el tipo y la ubicación de los intercambios de aminoácidos, lo que condujo a un aumento en la fuerza de unión a los oligómeros Aβ.

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

5.

Para confirmar los resultados y obtener nuevas variantes con una afinidad aún más fuerte por Aβ mediante la combinación de los intercambios de aminoácidos descritos en la Tabla 4, otras variantes D3 se acoplaron a chips Pepchip de Pepscan y se examinaron para determinar su fuerza de unión a Aβ. Al seleccionar las variantes, se utilizaron los resultados de la evaluación de la membrana Pepspot descrita anteriormente. En 6 experimentos independientes, la unión de Aβ a los derivados D3 se detectó a través de un marcador de isotiocianato de fluoresceína acoplada. Se usaron 5 μM de isotiocianato de fluoresceína Aβ. La detección se realizó en un analizador de microchips tipo FLA8000 de Fujifilm, las señales de unión se midieron con el software AIDA Array Metrix y se

evaluaron con la ayuda de Matlab versión 7.10.0.449. La figura 4 muestra las señales de enlace de un Pepchip seleccionado como ejemplo.

Cinco de los péptidos inmovilizados en los Pepchip excedieron el valor límite en al menos cuatro de seis experimentos y, por lo tanto, mostraron una afinidad de unión considerablemente mayor por A β en comparación con D3. Las secuencias de estos péptidos se resumen en la Tabla 4. Entre ellos se encuentran secuencias con intercambios combinados de la Tabla 3.

Tabla 4: Secuencias de los D-péptidos que mostraron una mayor fuerza de unión al monómero A β en comparación con D3 en forma inmovilizada

Secuencia	Nombre
RPITRLHTDRNR (SEQ ID NO: 7)*	DB1
RPITTLQTHQNR (SEQ ID NO: 8)*	DB2
RPITRLRTHQNR (SEQ ID NO: 5)*	DB3
RPRTLRLTHQNR (SEQ ID NO: 9)*	DB4
RPITRLQTHEQR (SEQ ID NO: 10)*	DB5
* no según la invención	

Descripción de las figuras

Figura 1: Modulación del comportamiento de agregación A β 1-42 por RD2, analizado utilizando un gradiente de densidad de yodixanol. El gradiente de yodixanol se superpuso con 100 μ l de una solución de 80 μ M de A β 1-42 y 100 μ l de una mezcla de 80 μ M de A β y 20 μ M de RD2. La mezcla se centrifugó luego durante 3 horas a 4 °C a 259.000 xg. Las 15 fracciones (la 15.ª fracción es el sedimento hervido con el tampón de aplicación) se cosecharon manualmente inmediatamente después de la centrifugación y se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con tris-tricin-dodecilsulfato sódico con tinción posterior con plata. Si la ejecución se realizó en las mismas condiciones con 20 μ M de D3, no hubo cambios en comparación con la ejecución solamente con A β .

Figura 2: ELISA para la cuantificación relativa de la unión de los péptidos a distintos conformadores A β 1-42. Se inmovilizaron monómeros sin semillas de A β biotinilado carboxiterminal (barras de color gris claro) y oligómeros (barras de color gris oscuro) y fibrillas (barras negras) de monómeros A β biotinilados aminoterminales a 5 μ g/ml cada uno y el D-péptido en una concentración de 10 μ g/ml aplicado. La cuantificación relativa de la unión de los péptidos se muestra en una doble determinación como absorción a 450 nm después de la deducción de la absorción de fondo.

Figura 3: Prueba de agregación ThT de A β 1 42 para cuantificar el contenido relativo de fibrillas en presencia de varios péptidos. La concentración de A β fue de 10 μ M, los péptidos se agregaron en una proporción de 1:10 (A β :péptido). La fluorescencia de 10 μ M de A β se estableció como 100 % y los valores y las desviaciones estándar de las otras incubaciones se dan como un porcentaje de este valor máximo. Ninguno de los péptidos mostró fluorescencia ThT considerable sin A β .

Figura 4: Resultados de un experimento con Pepchip. Se inmovilizaron varias variantes de D3 en el Pepchip. El Pepchip se incubó con A β marcado con isotiocianato de fluoresceína (5 μ M). La intensidad de fluorescencia del isotiocianato de fluoresceína se leyó como una medida de la fuerza de unión de los respectivos derivados D3. Para los controles D3, del mismo modo trazados en 11 posiciones distintas en el chip, el valor medio y la desviación estándar se calcularon a partir de los 11 valores obtenidos. Se agregaron la media y la desviación estándar y el resultado se definió como el límite que una derivada de D3 deberá alcanzar para ser claramente más afín a A β en comparación con D3. Se muestran las integrales de las señales de unión de todos los péptidos que excedieron este límite. Las barras individuales se basan en los valores medios de tres puntos peptídicos exactamente iguales. No aptas: unidades arbitrarias, unidades de fluorescencia relativa. Debido a la variación observada de los resultados, todo este experimento se llevó a cabo seis veces.

Lista de secuencias

<110> Centro de investigación J\2371ich

<120> Nuevos péptidos D-enantioméricos derivados de D3 y su uso

<130> FZJ 1202 PCT

<160> 11

<170> Versión 3.5 de la patente

<210> 1

5

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> D-péptido

15

<400> 1

Arg Pro Arg Thr Arg Leu Arg Asn Arg
1 5

20 <210> 2

<211> 12

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> D-péptido

<400> 2

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

35

<210> 3

<211> 12

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> D-péptido

<400> 3

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

50

<210> 4

<211> 12

55

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> D-péptido

<400> 4

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

5 <210> 5

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> D-péptido

<400> 5

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

20 <210> 6

<211> 6

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> D-péptido

<400> 6

Arg Pro Arg Thr Arg Leu
 1 5

35 <210> 7

<211> 12

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> D-péptido

<400> 7

50 Arg Pro Ile Thr Arg Leu His Thr Asp Arg Asn Arg
 1 5 10

<210> 8

55 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> D-péptido

$\langle 400 \rangle$ 8

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

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 $\langle 220 \rangle$

<223> D-péptido

<400> 9

20
Arg Pro Arg Thr Arg Leu Arg Thr His Gln Asn Arg
1 5 10

$\langle 210 \rangle$ 10

25 $\langle 211 \rangle$ 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30
<220>

<223> D-péptido

35 <400> 10

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

<210> 11

40 $\langle 211 \rangle$ 12

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> D-péptido

50
<400> 11

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

REIVINDICACIONES

1. Péptido que contiene al menos una secuencia de aminoácidos D-enantioméricos derivados de D3 según la SEQ ID NO: 1 o polímeros de la SEQ ID NO: 1.
- 5 2. Péptidos según la reivindicación 1, caracterizados porque están unidos a otra sustancia.
3. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que contiene un monómero seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, 15 SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, 10 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y/o SEQ ID NO: 11.
4. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el uso en medicina.
5. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el uso en el tratamiento de la enfermedad de 15 Alzheimer.
6. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el uso *in vivo* para inhibir la formación de fibrillas a partir de péptidos beta amiloides.
- 20 7. Kit que contiene un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
8. Composición que contiene un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
9. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 *in vitro* como sonda para la identificación, 25 determinación cuantitativa y/o cualitativa de fibrillas beta amiloides y/u oligómeros beta amiloides.
10. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso *in vivo* para evitar oligómeros beta amiloides y/o agregados de péptidos beta amiloides.
- 30 11. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso *in vivo* para la desintoxicación de oligómeros y/o agregados beta amiloides tóxicos.
12. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso en la prevención de la enfermedad de Alzheimer.

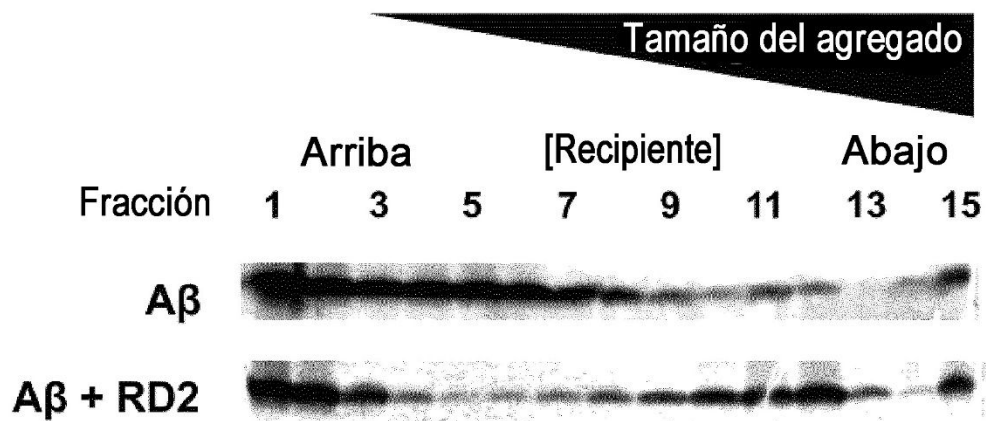


Fig. 1

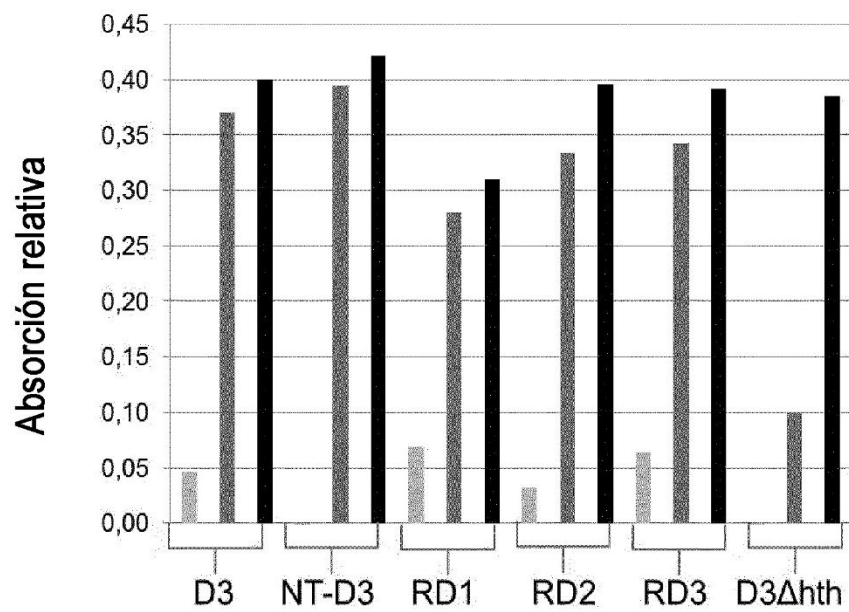


Fig. 2

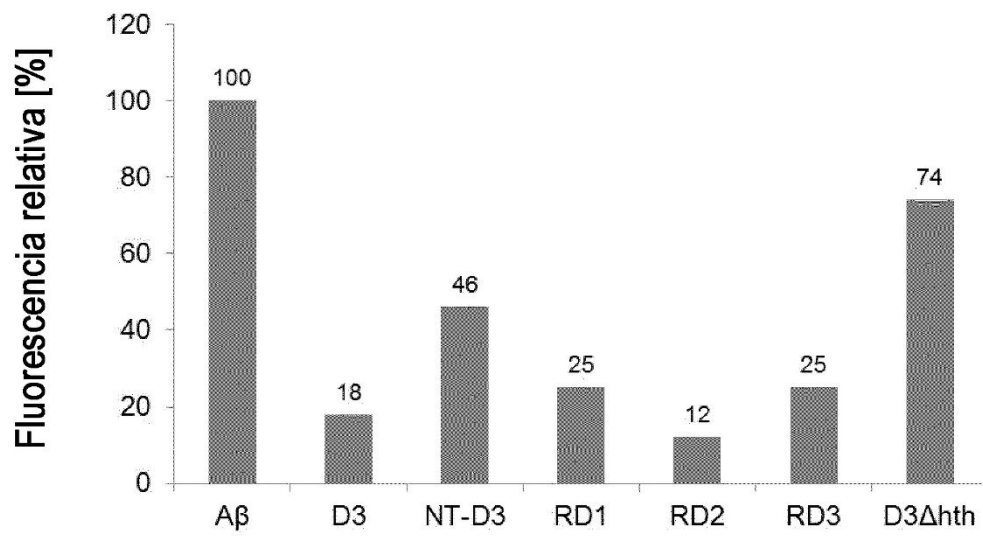


Fig. 3

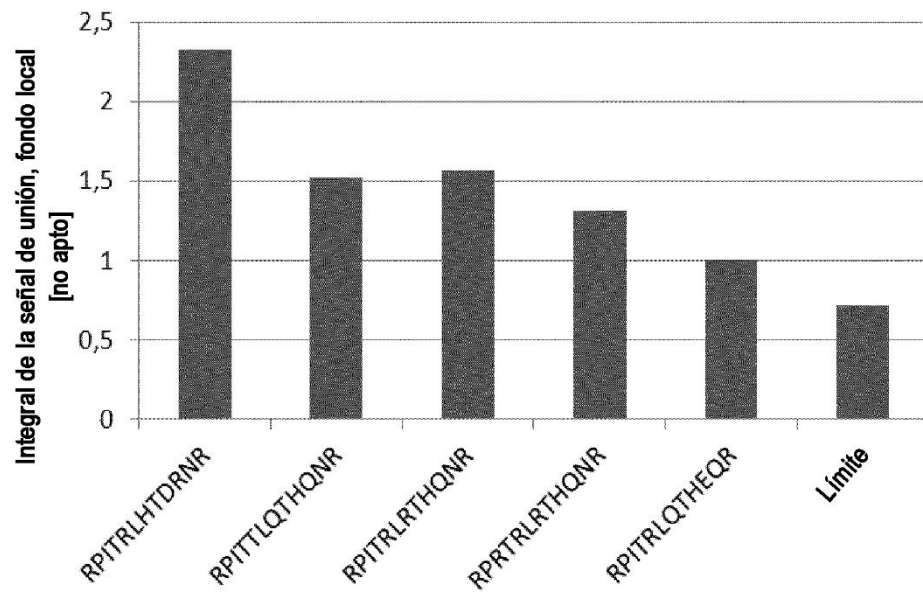


Fig. 4