



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 60 2004 008 582 T2** 2008.05.21

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 594 469 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 008 582.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB2004/000423**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 711 429.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2004/071493**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.02.2004**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **26.08.2004**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.11.2005**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **29.08.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.05.2008**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 9/14** (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
03003551 **17.02.2003** **EP**

(73) Patentinhaber:
Burkhard, Peter, Allschwil, CH

(74) Vertreter:
TER MEER STEINMEISTER & Partner GbR
Patentanwälte, 81679 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR

(72) Erfinder:
Burkhard, Peter, 4123 Allschwil, CH

(54) Bezeichnung: **PEPTIDISCHE NANOTEILCHEN ALS ARZNEIMITTELABGABE- UND ANTIGEN-DISPLAY-SYSTEME**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Nanoteilchen. Im weiteren betrifft die Erfindung den gezielten Transport von Arzneimitteln zu bestimmten Stellen im Körper, Antigen-Darbietungs-Systeme und Strategien der Impfung.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Künstliche Systeme mit kleinen Einzelteilchen wie polymere Kügelchen und Liposomen finden eine Vielzahl von biomedizinischen Anwendungen bei der Verabreichung von Arzneimitteln, dem gezielten Transport von Arzneimitteln, Proteintrennung, Enzym-Immobilisierung und Blutzelt-Ersatz. Liposomen haben eine bewegliche, zellartige Lipid-Doppelschicht-Oberfläche, welche als Durchlässigkeitsbarriere wirkt, so dass Verbindungen in ihrem wässrigen Inneren eingeschlossen werden können. Liposomen können hingegen mechanisch instabil sein, und ihre Beladbarkeit ist durch die Wasserlöslichkeit des Ladematerials beschränkt. Andere Arten der Herstellung von Nanometer bis Mikrometer grossen kugeligen Polymerhülsen umfassen die Ablagerung von Polyelektrolyten Schicht für Schicht auf der Oberfläche eines geladenen Nanoteilchens gefolgt von der Auflösung des als Schablone dienenden Partikels oder die Selbstorganisation von amphiphilen Diblock-Kopolymeren zu Mizellen, selektive Kreuzreaktion ihrer hydrophilen Hülse und nachfolgender Abbau des hydrophoben Kerns. Die Herstellung solcher Nanokapseln erfordert ein ziemlich kompliziertes Verfahren. Polymeren Kügelchen fehlen ebenso viele der nützlichen Oberflächeneigenschaften einer Lipid-Doppelschicht-Hülse, obwohl sie mechanisch stabiler sind und eine grössere Ladekapazität aufweisen als Liposomen.

[0003] Systeme für den gezielten Transport von Arzneimitteln wurden in verschiedenen Patentschriften und wissenschaftlichen Berichten beschrieben. Spezifische Antikörper, die diagnostische und therapeutische Wirkstoffe gezielt an den Wirkungsort transportieren, der das entsprechende Antigen darbietet, werden häufig benutzt (Vyas S.P. et al., Crit Rev Ther Carrier Syst 2001, 18(1):1-76).

[0004] Nanoteilchen wurden als kleine Trägerteilchen in mehreren pharmazeutischen und medizinischen Gebieten ausgiebig untersucht (Sakuma S. et al., Adv Drug Del Rev 2001, 47:21-37). Es ist gut bekannt, dass die Bioverfügbarkeit von Peptiden und Proteinen als Arzneimittel nach oraler Gabe sehr niedrig ist, weil sie im gastrointestinalen (GI) System instabil sind und eine niedrige Durchdringbarkeit durch die intestinale Schleimhaut aufweisen. Es werden deshalb zur Zeit injizierbare Dosisformen verwendet, um therapeutische Wirkungen zu erreichen. Weil hingegen diese Verabreichungswege durch die Patienten schlecht akzeptiert werden, ist es unabdingbar, Alternativen zu entwickeln, wie nasale, buccale, rektale, vaginale, pulmonäre und transdermale Wege. Orale Verabreichung ist der bequemste Weg für die Verabreichung des Arzneimittels, und mehrere Verfahren wie chemische Modifizierung zur Veränderung der physikochemischen Eigenschaften eines peptidischen Arzneimittels, die Verwendung eines Absorptionsverstärkers, um die Aufnahme des Arzneimittels zu verbessern, und die Verwendung eines Proteasehemmers, um Arzneimittel gegen Abbau durch Enzyme zu schützen, wurden untersucht, um die orale Aufnahme von Peptiden zu erreichen. Nanoteilchen wurden als Träger für orale Arzneimittelabgabe untersucht. Die Ziele der Untersuchungen mit Nanoteilchen als orale Arzneimittelträger waren eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln mit schlechten Absorptions-Eigenschaften, Abgabe von Impfstoff-Antigenen an lymphoides Gewebe im Darm, Kontrolle der Freisetzung von Arzneimitteln, Reduktion der durch Arzneimittel verursachten Reizung der gastrointestinalen Schleimhaut und Sicherung der Stabilität von Arzneimitteln im gastrointestinalen Bereich.

[0005] Auch die Verweilzeit im Blut kann durch die Verabreichung von Arzneimitteln als kleine Einzelteilchen verändert werden. Der Bedarf für Umwälzung von therapeutischen Wirkstoffen im Körper, das heisst das Vermeiden von rascher Endozytose durch das rektendotheliale System und Vermeiden von schneller Ausfiltrierung durch die Niere, wurde erkannt, um eine genügende Konzentration am Zielort bereitzustellen und die nötige therapeutische Wirkung zu erzielen. Kleine Moleküle, wie Gadoliniumdiethylentriaminpentaessigsäure, zeigen eine Tendenz für beschränkte Umlaufzeiten wegen rascher Ausscheidung durch die Nieren, während die meisten Liposomen mit Durchmessern grösser als 800 nm schnell durch das retikuloendotheliale System entfernt werden.

[0006] Die traditionellen Methoden der Immunisierung umfassen Impfstoffe, die lebende abgeschwächte Organismen, inaktivierte Organismen, konventionelle ganze Proteine und, erst kürzlich, nackte DNS verwenden. Aus immunologischer Sicht, auf Grund eines breiten Bereichs von Immunantworten der Körperflüssigkeiten

und Zellen und der Erinnerung an Immunantworten, die sie auslösen, sind lebende abgeschwächte Impfstoffe immer noch die Impfstoffe der Wahl (BenMohammed L. et al., Lancet Infect Dis 2002, 2:425-431). Aus praktischer Sicht und aus Sicht der Sicherheit hingegen ergeben lebende abgeschwächte Impfstoffe offene Fragen bezüglich Herstellung and Sicherheit, die ihre weitverbreitete Anwendung ausschliessen können. Als Alternative wurden nun Impfstoffe auf Basis von Peptiden entwickelt und für die Impfung verwendet. Impfstoffe auf Basis von Peptiden bieten einige mögliche Vorteile gegenüber den konventionellen ganzen Proteinen (oder ganzen Genen im Fall der genetischen Immunisierung) in Bezug auf Reinheit und einer hohen Spezifität zur Auslösung von Immunantworten. Synthetische Proteine allein sind hingegen oft nicht genügend immunogen, und ein starkes Immuno-Adjuvans wird üblicherweise für ihre Vervollkommnung verwendet. Bedenken über toxische Adjuvanzen, die kritisch für die Immunogenizität von synthetischen Peptiden sind, verbleiben hingegen immer noch. Und möglicherweise noch kritischer ist das Problem der genetischen Vielfalt des Menschen, welche eine unterschiedliche Stärke der Immunantworten ergibt.

[0007] Eine mögliche Lösung zur Stabilisierung von Impfstoffen auf Basis von Peptiden ist die Darbietung von Epitopen eingebettet in eine spiralförmige (coiled-coil) Peptidzusammensetzung, wie in WO 01/00010 beschrieben.

[0008] Es besteht ein Bedarf an verbesserten Arten von mechanisch und chemisch stabilen Körperchen und Nanokapseln zur Verwendung für den gezielten Transport von Arzneimitteln und die Darbietung von Antigenen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Es ist ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung, eine neue Art von Nanoteilchen unter Verwendung des Prinzips der Selbstorganisation von fortlaufenden Peptidketten zur Bildung von peptidischen Nanoteilchen bereitzustellen. Insbesondere bestehen Nanoteilchen der Erfindung aus Aggregaten von fortlaufenden peptidischen Ketten umfassend zwei Oligomerisierungsbereiche verknüpft durch ein Verbindungsstück.

[0010] Es ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung, ein System für den zielgerichteten Transport von Arzneimitteln bereitzustellen, welches aus Aggregaten einer fortlaufenden peptidischen Kette mit einem damit verknüpften Liganden, der einen Rezeptor binden kann, und einem mit besagter peptidischer Kette verknüpftem Arzneimittel besteht.

[0011] Es ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung, funktionalisierte peptidische Nanoteilchen für die Verwendung in einem therapeutischen Verfahren zur Behandlung von Menschen mit erkrankten Organen oder Geweben und für die Verwendung in einem diagnostischen Verfahren zur Bestimmung, ob ein Mensch erkrankte Organe oder Gewebe hat, bereitzustellen.

[0012] Es ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung, ein System für die Darbietung von Antigenen zur Verwendung als wirkungsvolle Impfstoffe für Menschen und nichtmenschliche Tiere umfassend ein funktionalisiertes peptidisches Nanoteilchen, welches aus Aggregaten einer fortlaufenden peptidischen Kette mit einem damit verknüpften oder darin eingebetteten Antigen besteht, bereitzustellen.

[0013] Die Erfindung stellt ferner Verfahren zur Herstellung von peptidischen Nanoteilchen und funktionalisierten peptidischen Nanoteilchen gemäss der Erfindung und monomere Bausteine geeignet für die Bildung von Nanoteilchen der Erfindung bereit.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0014] **Fig. 1:** Schematische Zeichnung von "geraden Einheiten" für trimere und pentamere Oligomerisierungsbereiche [linke Seite, A)] beziehungsweise für trimere und tetramere Oligomerisierungsbereiche [rechte Seite, B)]. Die Anzahl Monomere (Bauteile) ist definiert durch das kleinste gemeinsame Vielfache (kgV) der Oligomerisierungszustände der beiden Oligomerisierungsbereiche D1 und D2 der Bauteile. In den geraden Einheiten werden die Verbindungsstücke aller Bauteile so nahe zueinander wie möglich angeordnet, d.h. so nahe am Zentrum des peptidischen Nanoteilchens wie möglich, und deshalb werden die geraden Einheiten ein kugeliges peptidisches Nanoteilchen bilden.

[0015] **Fig. 2:** Mögliche reguläre Polyeder aufgebaut aus 2-, 3- und 4-fachen Symmetrieelementen (A) und aus 2-, 3- und 5-fachen Symmetrieelementen (B). Die Symmetrieelemente sind mit schwarzen Symbolen bezeichnet. In A) haben der Würfel (links) und das Oktaeder (rechts) die gleichen Symmetrieelemente und sind

aus 24 identischen dreidimensionalen Bauteilen aufgebaut. In B) haben das Dodekaeder und das Ikosaeder ebenfalls die gleichen internen Symmetrieelemente und sind aus 60 identischen dreidimensionalen Bauteilen aufgebaut.

[0016] Fig. 3: Interne Symmetrieelemente des Dodekaeder/Ikosaeder. Die Rotations-Symmetrieachsen (2-fach, 3-fach und 5-fach) sind als Linien dargestellt und mit 2, 3 und 5 bezeichnet. In A) ist ein monomeres Bauteil zusammengesetzt aus Oligomerisierungsbereich D1 (links, spiralförmiger Bereich mit dreifacher Symmetrie), einem Verbindungsstück L und Oligomerisierungsbereich D2 (rechts, spiralförmiger Bereich mit fünf-facher Symmetrie) so dargestellt, dass die internen Symmetrieelemente der Oligomerisierungsbereiche D1 und D2 den Symmetrieelementen des Polyeders überlagert sind. In B) sind die vollständigen spiralförmigen (coiled-coil) Bereiche D1 und D2 dargestellt. Die zusätzlichen Symmetrieobjekte, die durch die 3-fachen und die 5-fachen Rotations-Symmetrieelemente des Polyeder entstehen, sind als Zylinder dargestellt, während das ursprüngliche Molekül als Helix wie in A) dargestellt ist.

[0017] Fig. 4: Elektronenmikroskop-Abbildung der peptidischen Nanoteilchen gebildet aus Peptiden mit der Sequenz SEQ ID NO:1. A) Unter reduzierenden Bedingungen gebildete peptidische Nanoteilchen (Beispiel 1, Herstellung 2); B) Unter denaturierenden Bedingungen gebildete peptidische Nanoteilchen (Beispiel 1, Herstellung 3). Die Abbildungen wurden durch negative Färbung mit 2% Uranylacetat hergestellt; die Konzentration des Peptides war 0,01 mg/ml. In A) beträgt der durchschnittliche Durchmesser der Partikel ungefähr 25 nm. Partikel Nr. 1 stellt vermutlich ein Dodekaeder dar, Partikel Nr. 2 einen Würfel, während Partikel Nr. 3 möglicherweise eine Mischung aus beiden, ein sogenanntes pentagonales Prisma, darstellt. In B) beträgt der durchschnittliche Durchmesser der Partikel ungefähr 15 nm.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0018] Peptidische Nanoteilchen, Verfahren zur Herstellung peptidischer Nanoteilchen und Verwendung dieser peptidischen Nanoteilchen in Diagnose und Therapie entsprechend der Erfindung werden jetzt nur beispielhaft mit Bezug auf die beigefügten [Fig. 1](#) bis 4 beschrieben.

Peptidische Nanoteilchen

Monomere Bauteile

[0019] Peptidische Nanoteilchen werden aufgebaut aus einer Vielzahl von monomeren Bauteilen der Formel (I) bestehend aus einer fortlaufenden Kette umfassend einen peptidischen Oligomerisierungsbereich D1, ein Verbindungsstück L und einen Oligomerisierungsbereich D2

D1-L-D2 (I),

worin D1 ein synthetisches oder natürliches Peptid mit einer Tendenz zur Bildung von Oligomeren $(D1)_m$ aus m Untereinheiten D1 ist, D2 ein synthetisches oder natürliches Peptid mit einer Tendenz zur Bildung von Oligomeren $(D2)_n$ aus n Untereinheiten D2 ist, m und n je eine Zahl zwischen 2 und 10 ist, mit der Einschränkung, dass m nicht gleich n und kein Vielfaches von n und n nicht ein Vielfaches von m ist, L eine Bindung oder ein kurzes Verbindungsstück ausgewählt aus gewünschtenfalls substituierten Kohlenstoffatomen, gewünschtenfalls substituierten Stickstoffatomen, Sauerstoffatomen und Schwefelatomen ist, und worin D1, D2 und L gewünschtenfalls weiter substituiert sind. Besondere in dieser Erfindung in Betracht gezogene Werte von m und n sind jene, die Nanoteilchen ergeben, wie unten in Tabelle 2 weiter ausgeführt.

[0020] Ein Peptid (oder Polypeptid) ist eine Kette oder Sequenz kovalent durch Amidbindungen verknüpfter Aminosäuren. Der Ausdruck Aminosäure umfasst sowohl natürlich vorkommende Aminosäuren ausgewählt aus den 20 essentiellen natürlichen α -L-Aminosäuren, synthetischen Aminosäuren, wie α -D-Aminosäuren, 6-Aminohexansäure, Norleucin, Homocystein oder ähnlichen, als auch natürlich vorkommenden Aminosäuren, die modifiziert wurden, um gewisse Eigenschaften wie die Ladung zu verändern, wie Phosphoserin oder Phosphotyrosin oder ähnlichen. In Aminosäure-Derivaten ist die Aminogruppe, die die Amidbindung bildet, alkyliert, oder eine Amino-, Hydroxy- oder Thio-Funktion in der Seitenkette alkyliert oder eine Carboxyfunktion in der Seitenkette amidiert oder verestert.

[0021] Ein kurzes Verbindungsstück L wird ausgewählt aus gewünschtenfalls substituierten Kohlenstoffatomen, gewünschtenfalls substituierten Stickstoffatomen, Sauerstoffatomen oder Schwefelatomen mit vorzugsweise 1 bis 60 Atomen, insbesondere 1 bis 20 Atomen in der Kette. Ein solches kurzes Verbindungsstück ist

z.B. eine Polyethylenoxy-Kette, eine Zuckerkette oder vorzugsweise eine Peptidkette, z.B. eine Peptidkette bestehend aus 1 bis 20 Aminosäuren, insbesondere 1 bis 6 Aminosäuren.

[0022] Mögliche Substituenten von D1, D2 und L sind z.B. Zieleinheiten, Arzneimittel und Antigene, wie weiter unten beschrieben.

[0023] Eine Tendenz, Oligomere zu bilden, bedeutet, dass solche Peptide abhängig von den Bedingungen Oligomere bilden können, z.B. unter denaturierenden Bedingungen Monomere sind, während sie unter physiologischen Bedingungen beispielsweise Trimere bilden können. Ihr Oligomerisierungszustand kann bei einer Veränderung der Bedingungen verändert werden, z.B. von Dimeren zu Trimeren bei Erhöhung der Salz-Konzentration (Burkhard P. et al., Protein Science 2000, 9:2294-2301) oder von Pentameren zu Monomeren bei Erniedrigung des pH. Unter vorgegebenen Bedingungen nehmen sie hingegen einen einzigen Oligomerisierungszustand ein, welcher für die Bildung von Nanoteilchen nötig ist.

[0024] Die Architektur eines Bauteils gemäß Formel (I) ist klar verschieden von viralen Capsid-Proteinen. Virale Capside sind entweder aus einem einzelnen Protein, welches 60er-Oligomere oder ein Mehrfaches davon bildet, wie z.B. dem Hepatitis-Virus B-Partikel (EP 1 262 555, EP 201416), oder aus mehr als einem Protein, welche sich zu einer viralen Capsid-Struktur vereinen, die abhängig von der Art des Virus auch andere Geometrien neben Ikosaeder annehmen können, zusammengesetzt (Fender P. et al., Nature Biotechnology 1997, 15:52-56). Peptidische Nanoteilchen der vorliegenden Erfindung sind ebenfalls klar verschieden von virusartigen Partikeln, weil sie (a) aus anderen als viralen Capsid-Proteinen aufgebaut sind und (b) der Hohlraum in der Mitte des Nanoteilchens zu klein ist, um DNS/RNS eines ganzen viralen Genoms aufzunehmen.

[0025] Peptidische Oligomerisierungsbereiche sind wohlbekannt (Burkhard P. et al., Trends Cell Biol 2001, 11:82-88). Der einfachste Oligomerisierungsbereich ist wahrscheinlich das spiralförmige (coiled-coil) Faltungsmotiv. Von diesem Oligomerisierungsmotiv wurde gezeigt, dass es als ein Dimeres, Trimeres, Tetrameres und Pentameres vorliegen kann. Einige Beispiele sind GCN4 Leucin Zipper, Fibritin, Tetrabrachion und COMP, die jeweils dimere, trimere, tetramere und pentamere Spiralen (coiled-coil) darstellen (Burkhard P. et al., loc. cit.).

[0026] In einer bevorzugten Ausgestaltung sind die Oligomerisierungsbereiche D1 und D2 unabhängig voneinander spiralförmige (coiled-coil) Bereiche. Eine coiled-coil Spirale ist eine Peptidsequenz mit einem fortlaufenden Muster von vorwiegend hydrophoben Resten, die 3 bis 4 Reste auseinander angeordnet sind, gewöhnlich in einer Sequenz von sieben Aminosäuren (Heptade) oder elf Aminosäuren (Undekade), die sich zu einem mehrfachen Bündel von Helices anordnen (falteten). Coiled-coil Spiralen mit Sequenzen, die auch etwas unregelmäßige Verteilung der Abstände der 3 oder 4 Reste umfassen, werden ebenfalls in Betracht gezogen. Hydrophobe Reste sind insbesondere die hydrophoben Aminosäuren Val, Ile, Leu, Met, Tyr, Phe und Trp. Vorwiegend hydrophobe Reste bedeutet, dass mindestens 50% der Reste aus den erwähnten hydrophoben Aminosäuren ausgewählt werden müssen.

[0027] In einem bevorzugten monomeren Bauteil der Formel (I) ist beispielsweise D1 und/oder D2 ein Peptid der Formel

$[aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)]_x$ (II),

worin aa eine Aminosäure oder ein Derivat davon bedeutet, aa(a), aa(b), aa(c), aa(d), aa(e), aa(f) und aa(g) die gleiche oder eine verschiedene Aminosäure oder ein Derivat davon ist, aa(a) und aa(d) vorzugsweise die gleiche oder verschiedene hydrophobe Aminosäuren oder Derivate davon sind; und X eine Zahl zwischen 2 und 20, vorzugsweise 3, 4, 5 oder 6 ist.

[0028] Hydrophobe Aminosäuren sind Val, Ile, Leu, Met, Tyr, Phe und Trp.

[0029] Eine Heptade ist ein Heptapeptid der Formel aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g).

[0030] Bevorzugt sind monomere Bauteile der Formel (I), worin ein oder beide peptidische Oligomerisierungsbereiche D1 und D2

(1) ein Peptid der Formel (II) sind, worin X 3 ist und aa(a) und aa(d) ausgewählt aus den 20 natürlichen α -L-Aminosäuren sind, so dass die Summe der Werte von Tabelle 1 für diese 6 Aminosäuren mindestens 14 ist und solche Peptide bis zu 17 weitere Heptaden enthalten; oder

[0031]

Tabelle 1: Werte der Aminosäuren für die Bestimmung der Bevorzugung

Aminosäure	Position aa(a)	Position aa(d)
L (Leu)	3.5	3.8
M (Met)	3.4	3.2
I (Ile)	3.9	3.0
Y (Tyr)	2.1	1.4
F (Phe)	3.0	1.2
V (Val)	4.1	1.1
Q (Gln)	-0.1	0.5
A (Ala)	0.0	0.0
W (Trp)	0.8	-0.1
N (Asn)	0.9	-0.6
H (His)	-1.2	-0.8
T (Thr)	0.2	-1.2
K (Lys)	-0.4	-1.8
S (Ser)	-1.3	-1.8
D (Asp)	-2.5	-1.8
E (Glu)	-2.0	-2.7
R (Arg)	-0.8	-2.9
G (Gly)	-2.5	-3.6
P (Pro)	-3.0	-3.0
C (Cys)	0.2	-1.2

(2) ein Peptid der Formel (II) sind, worin X 3 ist und aa(a) und aa(d) ausgewählt aus den 20 natürlichen α -L-Aminosäuren sind, so dass die Summe der Werte von Tabelle 1 für diese 6 Aminosäuren mindestens 12 ist, mit der Einschränkung, dass eine Aminosäure aa(a) eine geladene Aminosäure ist, die eine inter-helikale Salzbrücke zu einer Aminosäure aa(d) oder aa(g) einer benachbarten Heptade bilden kann oder eine Aminosäure aa(d) eine geladene Aminosäure ist, die eine inter-helikale Salzbrücke zu einer Aminosäure aa(a) oder aa(e) einer benachbarten Heptade bilden kann, und solche Peptide bis zu zwei weitere Heptaden enthalten. Eine geladene Aminosäure, die eine inter-helikale Salzbrücke zu einer Aminosäure einer benachbarten Heptade bilden kann, ist beispielsweise Asp oder Glu, wenn die andere Aminosäure Lys, Arg oder His ist, oder vice versa.

[0032] Ebenso bevorzugt sind monomere Bauteile der Formel (I), worin ein oder beide peptidische Oligomerisierungsbereiche D1 und D2 aus den folgenden bevorzugten Peptiden ausgewählt werden:

(11) Peptide der Formel (II), worin aa(a) aus Val, Ile, Leu und Met und einem Derivat davon ausgewählt ist, und aa(d) aus Leu, Met und Ile und einem Derivat davon ausgewählt ist.

(12) Peptide der Formel (11), worin ein aa(a) Asn und das andere aa(a) ausgewählt aus Asn, Ile und Leu ist, und aa(d) Leu ist. Solch ein Peptid ist gewöhnlich ein Dimerisierungsbereich (m oder n = 2).

(13) Peptide der Formel (11), worin aa(a) und aa(d) beide Leu oder beide Ile sind. Solch ein Peptid ist gewöhnlich ein Trimerisierungsbereich (m oder n = 3).

(14) Peptide der Formel (11), worin aa(a) entweder Leu oder Ile und ein aa(d) Gln und das andere aa(d) ausgewählt aus Gln, Leu und Met ist. Solch ein Peptid hat die Möglichkeit, ein Pentamerisierungsbereich zu werden (m oder n = 5).

Andere bevorzugte Peptide sind Peptide (1), (2), (11), (12), (13) und (14), wie oben definiert, worin weiter (21) mindestens ein aa(g) ausgewählt aus Asp und Glu und aa(e) in einer folgenden Heptade Lys, Arg oder His ist; und/oder

(22) mindestens ein aa(g) ausgewählt aus Lys, Arg und His und aa(e) in einer folgenden Heptade Asp oder Glu ist; und/oder

(23) mindestens ein aa(a bis g) ausgewählt aus Lys, Arg und His und ein aa(a bis g) 3 oder 4 Aminosäuren davon entfernt in der Sequenz Asp oder Glu ist. Solche Paare von Aminosäuren aa(a bis g) sind beispielsweise aa(b) und aa(e) oder aa(f).

[0033] In einer anderen bevorzugten Ausgestaltung ist ein Oligomerisierungsbereich D1 oder D2 der Pentamerisierungsbereich (m oder $n = 5$) von COMP (Malashkevich V.N. et al., Science 1996, 274:761-765) oder ein Derivat davon. Dieser Pentamerisierungsbereich hat die Sequenz LAPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQV-KQITFLKNTVMECDACG (SEQ ID NO:7). Kleine Veränderungen dieses Bereiches werden ebenfalls in Betracht gezogen. Solche Veränderungen können z.B. die Substitution von Aminosäuren aussen auf dem Pentamer, bevorzugt in Position (f), durch Cys für den Zweck der Bildung einer Disulfid-Brücke zwischen angrenzenden Bereichen sein. Andere Veränderungen von Aminosäuren auf der Oberfläche dieses Bereiches können Substitutionen von Aminosäuren zur Verbesserung der Wechselwirkungen zwischen angrenzenden Oligomerisierungsbereichen sein, wie hydrophobe, hydrophile oder ionische Wechselwirkungen oder kovalente Bindungen wie Disulfid-Brücken. Auch kürzere Ausgestaltungen dieses Bereiches, z.B. ohne das C-terminale Motiv CDACG, in dem die Cysteine eine intramolekulare Disulfid-Brücke am C-Terminus dieses Pentamerisierungsbereiches bilden, werden auch in Betracht gezogen. Veränderungen von Aminosäuren, die den Oligomerisierungszustand dieses Bereiches beeinflussen, werden ebenfalls in Betracht gezogen, z.B. solche, die einen Übergang vom Pentameren zum Tetrameren ergeben. Noch andere Veränderungen von Aminosäuren auf der Oberfläche dieses Bereiches können Substitutionen von Aminosäuren (z.B. durch Cystein oder Lysin) für die Erzeugung von Anknüpfungspunkten für funktionelle Gruppen einschliessen.

[0034] In noch einer anderen bevorzugten Ausgestaltung ist ein Oligomerisierungsbereich D1 oder D2 der Trimerisierungsbereich (Foldon) des Bakteriophagen T4 Proteins Fibrin (Tao, Y. et al., Structure 1997, 5:789-798) oder ein Derivat davon. Dieser Trimerisierungsbereich (m oder $n = 3$) hat die Sequenz GYIPEAPRD-GQAYVRKDGWVLLSTFL (SEQ ID NO:8). Kleine Veränderungen dieses Bereiches werden ebenfalls in Betracht gezogen. Solche Veränderungen können die Substitution von Asp 9 durch Cys für den Zweck der Bildung einer Disulfid-Brücke zwischen angrenzenden Bereichen sein. Andere Veränderungen von Aminosäuren auf der Oberfläche dieses Bereiches können Substitutionen von Resten zur Verbesserung der Wechselwirkungen zwischen angrenzenden Oligomerisierungsbereichen sein, wie hydrophobe, hydrophile oder ionische Wechselwirkungen oder kovalente Bindungen wie Disulfid-Brücken. Noch andere Veränderungen von Aminosäuren auf der Oberfläche dieses Bereiches können Substitutionen von Aminosäuren (z.B. durch Cystein oder Lysin) für die Erzeugung von Anknüpfungspunkten für funktionelle Gruppen einschliessen.

[0035] Ganz besonders bevorzugt sind die in den Beispielen beschriebenen monomeren Bauteile.

Peptidische Nanoteilchen: Gerade Einheiten

[0036] Peptidische Nanoteilchen werden aus monomeren Bauteilen der Formel (I) gebildet. Wenn sich solche Bauteile zusammenfügen, bilden sie sogenannte "gerade Einheiten". Die Zahl der monomeren Bauteile, welche sich in solch eine gerade Einheit zusammenfügen, wird durch das kleinste gemeinsame Vielfache (kgV) bestimmt. Wenn beispielsweise die Oligomerisierungsbereiche des monomeren Bauteils ein Trimer ($(D1)_3$ ($m = 3$) und ein Pentamer ($(D2)_5$ ($n = 5$) bilden, werden folglich 15 Monomere eine gerade Einheit bilden (**Fig. 1A**, Beispiel 5). Wenn das Verbindungsstück L die passende Länge hat, kann sich diese gerade Einheit in die Form eines kugeligen peptidischen Nanoteilchens zusammenfügen. Wenn ähnlich die Oligomerisierungsbereiche D1 und D2 des monomeren Bauteils ein Trimer ($(D1)_3$ ($m = 3$) und ein Tetramer ($(D2)_4$ ($n = 4$) bilden, beträgt die Zahl der benötigten Monomere für die Bildung einer geraden Einheit 12 (**Fig. 1B**).

[0037] Da m und n nicht gleich oder ein Vielfaches voneinander sein können, ist das kleinste gemeinsame Vielfache (kgV) immer grösser als m und n .

[0038] Peptidische Nanoteilchen können durch die Zusammenfügung von nur einer oder von mehr als einer geraden Einheit gebildet werden (Tabelle 2). Solche Peptidische Nanoteilchen stellen topologisch geschlossene Strukturen dar.

Tabelle 2: Mögliche Kombinationen von Oligomerisierungszuständen

ID No.	m	n	Art des Polyeders	LCM	Anzahl gerader Einheiten	Anzahl Bauteile
1	5	2	Dodekaeder/Ikosaeder	10	6	60
2	5	3	Dodekaeder/Ikosaeder	15	4	60
3	4	3	Würfel/Oktaeder	12	2	24
4	3	4	Würfel/Oktaeder	12	2	24
5	3	5	Dodekaeder/Ikosaeder	15	4	60
6	2	5	Dodekaeder/Ikosaeder	10	6	60
7	5	4	irregulär	20	1	20
8	4	5	irregulär	20	1	20

Reguläre Polyeder

[0039] Es gibt fünf reguläre Polyeder, das Tetraeder, der Würfel, das Oktaeder, das Dodekaeder und das Ikosaeder. Diese haben verschiedene interne Rotations-Symmetrieelemente.

[0040] Das Tetraeder hat eine 2-fache und zwei 3-fache Achsen, der Würfel und das Oktaeder haben eine 2-fache, eine 3-fache und eine 4-fache Rotations-Symmetrieachse (**Fig. 2A**) und das Dodekaeder und das Ikosaeder haben eine 2-fache, eine 3-fache und eine 5-fache Rotations-Symmetrieachse (**Fig. 2B**). Im Würfel ist die räumliche Anordnung dieser Achsen genau die gleiche wie im Oktaeder, und auch im Dodekaeder und im Ikosaeder ist die räumliche Anordnung dieser Achsen im Verhältnis zueinander genau die gleiche. Folglich können für den Zweck der peptidischen Nanoteilchen der Erfindung der Würfel und das Oktaeder und gleichermaßen das Dodekaeder und das Ikosaeder als übereinstimmend angesehen werden. Der Würfel/Oktaeder ist aus 24 gleichen dreidimensionalen Bauteilen aufgebaut, während das Dodekaeder/Ikosaeder aus 60 gleichen dreidimensionalen Bauteilen aufgebaut ist (Tabelle 2). Diese Bauteile sind die unsymmetrischen Einheiten (μE) des Polyeders. Sie sind tripyramidal und jede der Ecken der Pyramide entspricht einer der Rotations-Symmetrieachsen, folglich tragen diese μE an ihren Ecken 2-fache, 3-fache und 4-fache oder 5-fache Symmetrieelemente abhängig von der Art des Polyeders. Wenn diese Symmetrieelemente aus peptischen Oligomerisierungsbereichen gebildet werden, werden solche μE aus monomeren Bauteilen wie oben beschrieben aufgebaut. Es genügt, die beiden Oligomerisierungsbereiche D1 und D2 längs zwei der Symmetrieachsen der μE anzuordnen (**Fig. 3**). Wenn diese beiden Oligomerisierungsbereiche stabile Oligomere bilden, wird die Symmetrie-Grenzfläche längs der dritten Symmetrieachse automatisch aufgebaut, und sie kann durch verbesserte Wechselwirkungen längs dieser Grenzfläche stabilisiert werden, z.B. durch hydrophobe, hydrophile oder ionische Wechselwirkungen, oder kovalente Bindungen wie Disulfid-Brücken (siehe z.B. Beispiel 5).

Zusammenfügung von peptidischen Nanoteilchen mit regulärer polyedrischer Symmetrie

[0041] Um peptidische Nanoteilchen mit regulärer Symmetrie (Dodekaeder, Würfel) aufzubauen, wird mehr als eine gerade Einheit benötigt. Um z.B. ein Dodekaeder aus einem Monomer enthaltend trimere und pentamere Oligomerisierungsbereiche aufzubauen, werden 4 gerade Einheiten benötigt, jede zusammengesetzt aus 15 monomeren Bauteilen, d.h. das peptidische Nanoteilchen mit regulärer Geometrie wird aus 60 monomeren Bauteilen zusammengesetzt sein. Die benötigten Kombinationen der Oligomerisierungszustände der beiden Oligomerisierungsbereiche und die Anzahl der geraden Einheiten für die Bildung irgend eines regulären Polyeders sind in Tabelle 2 aufgeführt.

[0042] Ob sich die geraden Einheiten zu regulären Polyedern aufgebaut aus mehr als einer geraden Einheit zusammenfügen, hängt von der geometrischen Anordnung der beiden Oligomerisierungsbereiche D1 und D2 zueinander ab, insbesondere vom Winkel zwischen den Rotations-Symmetrieachsen der beiden Oligomerisierungsbereiche. Dies wird bestimmt durch i) die Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen benachbarten Bereichen in einem Nanoteilchen, ii) die Länge des Verbindungsstückes L, iii) die Form der einzelnen Oligomerisierungsbereiche. Dieser Winkel ist in den geraden Einheiten grösser im Vergleich zur Anordnung in einem regulären Polyeder. Auch ist dieser Winkel in den monomeren Bauteilen nicht gleich wie in den regulären Polyedern. Wenn dieser Winkel auf die kleineren Werte des regulären Polyeders beschränkt wird (durch hydro-

phobe, hydrophile oder ionische Wechselwirkungen oder eine kovalente Disulfid-Brücke) und das Verbindungsstück L kurz genug ist, wird sich eine gegebene Anzahl topologisch geschlossener gerader Einheiten, die jede eine vorgegebene Zahl monomerer Bauteile enthält, weiter anordnen und ein reguläres Polyeder bilden (Tabelle 2) oder mehr monomere Bauteile miteinschliessen und Nanoteilchen bilden, denen die strenge interne Symmetrie der Polyeder fehlt ([Fig. 4A](#), siehe z.B. Beispiel 1, Herstellung 4).

[0043] Die Grösse der peptidischen Nanoteilchen wird dann hauptsächlich von zwei Parametern abhängen: i) der Form (Durchmesser und Länge) der Oligomerisierungsbereiche D1 und D2 und ii) der Länge des Verbindungsstückes L. Spiralförmige (coiled-coil) Oligomerisierungsbereiche sind dünn und ihr Durchmesser quer zur Symmetrieachse ist folglich klein. Deshalb können sie um die Symmetrieachsen des Polyeders ziemlich nahe am Zentrum des Polyeders angeordnet werden. Oligomerisierungsbereiche mit einem grösseren Durchmesser können nur weiter weg vom Zentrum des Polyeders um die Symmetrieachsen angeordnet werden, um eine Überlappung untereinander zu vermeiden. Die Grösse der Teilchen wird zunehmen, wenn z.B. der Foldon Bereich von T4 als Oligomerisierungsbereich verwendet wird.

[0044] Während die Grösse des Oligomerisierungsbereiches für nächstmögliche Anordnung der Bereiche bezüglich des Zentrums des Teilchens beschränkend wirkt, wird die Länge des Verbindungsstückes L die grösstmögliche Distanz zwischen Oligomerisierungsbereichen und dem Zentrum des Polyeders beschränken. Wenn das Verbindungsstück L lang ist, können die Oligomerisierungsbereiche immer noch um die Symmetrieachse angeordnet werden, während sie weiter voneinander weg sind. In einer solchen Anordnung werden die Teilchen hingegen relativ lose gepackt sein, weil die Oligomerisierungsbereiche nicht nahe zueinander gerückt sind. Ein kürzeres Verbindungsstück wird die Oligomerisierungsbereiche näher zueinander bringen, und die Wechselwirkung zwischen den Oligomerisierungsbereichen wird wichtiger und die Packung der Teilchen dichter und beschränkter sein. Aber falls die Oligomerisierungsbereiche nicht die Form eines Kegels haben, kann die Wechselwirkung zwischen den Bereichen immer noch ziemlich klein sein. Im Fall des spiralförmigen (coiled-coil) Faltungsmotivs ist die Wechselwirkung zwischen den Bereichen auf etwa zwei helikale Umdrehungen beschränkt ([Fig. 3A](#)). Dies ist verhältnismässig wenig im Vergleich zur Länge der Wechselwirkungen innerhalb der Oligomerisierungsbereiche selbst längs ihrer Symmetrieachse. Im Falle des spiralförmigen (coiled-coil) Faltungsmotivs von 5 Heptaden entspricht dies 10 helikalen Umdrehungen, weshalb die Wechselwirkung zwischen den beiden verschiedenen Oligomerisierungsbereichen wesentlich weniger bedeutend ist als die Wechselwirkung zwischen den Helices eines einzelnen Oligomerisierungsbereiches. Dies bedeutet, dass das Teilchen sogar gebildet werden kann, wenn die nicht-bindenden Wechselwirkungen zwischen den beiden Oligomerisierungsbereichen innerhalb des Nanoteilchens nicht sehr günstig sind. Durch Optimierung dieser Wechselwirkungen kann die Packung und Stabilität des Teilchens hingegen bedeutend verbessert werden. Dies kann durch Optimierung der hydrophoben und der ionischen Wechselwirkungen zwischen den beiden Oligomerisierungsbereichen oder durch chemische Verknüpfung der beiden Bereiche mit z.B. einer Disulfid-Brücke zwischen den Bereichen erreicht werden. Wenn die beiden Oligomerisierungsbereiche spiralförmig (coiled-coil) sind, kann dies durch ein Cystein Rest auf der Aussenseite jeder der Helices erreicht werden, bevorzugt in den Positionen aa(f) der Heptaden. Diese Cysteine können dann eine Disulfid-Brücke bilden und die beiden Oligomerisierungsbereiche chemisch miteinander verknüpfen.

[0045] Das Verbindungsstück L darf nicht zu kurz sein, um ein Aufbrechen der Proteinfaltung der Oligomerisierungsbereiche zu vermeiden. Falls es zu kurz ist, wird entweder die richtige Faltung der einzelnen Oligomerisierungsbereiche in der dichten Packung des peptidischen Nanoteilchens aufgebrochen oder das peptidische Nanoteilchen kann gar nicht gebildet werden, wenn die Faltung der Oligomerisierungsbereiche zu stabil ist, um die zusätzlich benötigte Beweglichkeit der Verbindung zu berücksichtigen.

[0046] Es sei festgestellt, dass solche peptidische Nanoteilchen aus D-Aminosäuren mit den gleichen Oligomerisierungseigenschaften wie aus L-Aminosäuren aufgebaut werden können. Die peptidischen Nanoteilchen werden dann einfach die enantiomeren Formen der aus L-Aminosäuren gebildeten Teilchen sein. Solche Teilchen werden den Vorteil haben, dass sie wegen der verminderten Empfindlichkeit auf Proteolyse viel weniger leicht bioabbaubar sind und folglich ihre Lebensdauer im Körper wesentlich verlängert sein wird. Dies ist besonders vorteilhaft für die orale Verabreichung von peptidischen Nanoteilchen oder beim Hervorrufen einer starken Immunantwort im Fall, dass die peptidischen Nanoteilchen als Antigen-Darreichungssysteme für die Impfung verwendet werden sollen.

[0047] Andererseits kann zur Verringerung der Immunogenizität des peptidischen Nanoteilchens die Sequenz der monomeren Bauteile so entworfen werden, dass sie auf Proteasen empfindliche Stellen einschliesst. Dies wird die Verweilzeit der peptidischen Nanoteilchen verringern. Falls die Hauptmenge der Teilchen als Folge einer wirkungsvollen Bindung an die Zieleinheit wegen der gegenseitig fördernden Bindungswirkung seiner Zie-

leinheiten, wenn als Mehrfach-Kopien auf der Oberfläche des peptidischen Nanoteilchens dargeboten, schnell aus dem Blutstrom entfernt wird, wird eine verringerte Lebensdauer zur Vermeidung von Nebenwirkungen als Folge einer starken Immunantwort vorteilhaft sein.

Funktionalisierte peptidische Nanoteilchen

Zieleinheit

[0048] Um funktionalisierte peptidische Nanoteilchen herzustellen, werden die monomeren Bauteile D1-L-D2 verändert, damit sie an einem der Enden der Peptidsequenz eine Zieleinheit einschliessen. Beim Zusammenfügen zu einem peptidischen Nanoteilchen wird dann diese Zieleinheit in mehrfachen Kopien auf der Oberfläche des peptidischen Nanoteilchens dargeboten. Zieleinheit ist irgend ein Molekül, welches spezifisch für sein entsprechendes Rezeptor-Molekül ist, z.B. ein Ligand, welcher an einen Rezeptor binden kann.

[0049] Zieleinheiten sind beispielsweise ein Peptid wie Somatostatin oder ein Analoges davon. Somatostatin ist ein zyklisches Tetradekapeptid-Hormon spezifisch für den Somatostatin-Rezeptor. Synthetische Somatostatin-Analoga sind z.B. Octreotid, ein Oktapeptid mit einer Disulfid-Brücke, oder SOM230. Andere als Zieleinheiten nützliche peptidische Hormone umfassen das Gastrin releasing Peptid/Bombesin (GRP), das alpha-Melanozyten stimulierende Hormon (α -MSH), vasoactives intestinales Peptid (VIP), Neurotensin, Cholecystokinin, Substanz P, Glucagon-ähnliches Peptid und andere. Internationale Patentanmeldungen WO 98/10795 und WO 99/13329 beschreiben auf Tumoren zielende Moleküle, welche als Zieleinheiten für Tumore verwendet werden können. Arap et al. (Science 1998, 279:377-80) beschreiben die Wahl von Peptiden, welche auf Tumor Blutgefäße zielen. Gleichermassen können Antikörper- und Antigen-Bindungsgebiete als Zieleinheiten verwendet werden.

[0050] Als Zieleinheiten nützliche nicht-peptidische Biomoleküle sind beispielsweise Zuckereinheiten, wie Zuckereinheiten, die selektiv an den Asialoglycoprotein-Rezeptor und damit an die Leber binden. Durch Verwendung eines Rezeptor-spezifischen Biomoleküls als Zieleinheit kann irgend ein auf eine Zellart spezifischer Rezeptor als Ziel dienen. Internationale Patentanmeldung WO 93/18793 und US Patente 5,762,918 und 5,474,765 beschreiben an polyanionische Polymere gebundene Steroide, welche an vaskuläre endotheliale Zellen binden. Andere in Betracht gezogene Zieleinheiten sind die V3 Schlaufe von gp120 von HIV (Bindung mit CD4, für die Behandlung von HIV), Transferrin (Bindung an den Transferrin-Rezeptor), oder die LDLs (Bindung an die LDL-Rezeptoren).

[0051] Die Darbietung dieser Zieleinheiten als Mehrfach-Kopien auf der Oberfläche des peptidischen Nanoteilchens verstärkt ihre Bindung an das Rezeptor-Molekül wegen der gegenseitig fördernden Wirkung bedeutend. Wenn mehr als ein Rezeptor-Molekül auf der Oberfläche einer Ziel-Zelle exprimiert wird, wird die gegenseitig fördernde Bindung des peptidischen Nanoteilchens seine Spezifität der Bindung an die Ziel-Zelle verstärken, ähnlich wie die Bindung von Galactose- oder N-Acetylgalactosamin-Resten, wenn sie auf drei- oder vierarmigem N-gebundenem Glycan dem Asialoglycoprotein-Rezeptor dargeboten werden.

[0052] Wenn weiter die Dichte eines Rezeptor-Moleküls auf einer spezifischen Ziel-Zelle vergrößert wird, wie das häufig bei Krebszellen vorkommt, wird die Spezifität des funktionalisierten peptidischen Nanoteilchens für die Krebszelle im Vergleich zu anderen Zellen (mit niedriger Dichte des gleichen Rezeptor-Moleküls) wegen der gegenseitig fördernden Bindung des peptidischen Nanoteilchens an die Rezeptoren verstärkt. Deshalb sind von den möglichen Biomolekülen die regulatorischen Peptide von speziellem Interesse als Zieleinheiten, weil ihre Rezeptoren auf verschiedenen bösartigen Zellen hoch exprimiert werden.

[0053] Die peptidischen Nanoteilchen der Erfindung umfassen auch Zieleinheiten mit der gleichen oder verschiedenen Spezifitäten, um an den gleichen oder verschiedene Akzeptoren zu binden. Es wird sehr einfach sein, solche hybride peptidische Nanoteilchen herzustellen, indem man monomere Bauteile mit den gleichen Kernbereichen (den beiden verknüpften Oligomerisierungsbereichen D1 und D2) aber mit verschiedenen Zieleinheiten zusammenfügt. Eine Zieleinheit kann z.B. Octreotid sein, um das peptidische Nanoteilchen zur Krebszelle zu transportieren, die andere Zieleinheit die RGD-Sequenz als Bindungspartner für Integrine.

Arzneimittelabgabe

[0054] Peptidische Nanoteilchen können weiter funktionalisiert werden, um als Trägerkörperchen für Arzneimittel zu dienen. Ein Arzneimittelmolekül wird entweder an eines der Enden oder in die Peptidsequenz hinein befestigt, vorzugsweise an jenem Ende, welches noch nicht durch eine Zieleinheit verändert ist. Die peptidi-

schen Nanoteilchen der Erfindung können auch mit verschiedenen Arzneimitteln verbundene Einheiten umfassen, um als Abgabesystem für mehrere Arzneimittel zu dienen.

[0055] Im Allgemeinen werden zwei Klassen von Arzneimitteln für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen: Moleküle mit biologischer Wirkung und diagnostische Moleküle.

[0056] Moleküle mit biologischer Wirkung sind irgendwelche, die Zell- und Körper-Funktionen beeinflussen, entweder positiv oder negativ. Diese Klasse umfasst Toxine, Zytotoxine, Zytostatika, Hormone, Neurotransmitter, biologisch aktive Peptide, Radionuklide, Antibiotika, Antipyretika, Schmerzmittel und entzündungshemmende Arzneimittel, Expektoranzien, Beruhigungsmittel, Muskelrelaxanzien, Antiepileptika, Antiulkusmittel, Antidepressiva, antiallergische Arzneimittel, herzstärkende Arzneimittel, Antiarrhythmika, Vasodilatoren, Blutdrucksenker, Antikoagulanzen, haemostatische Mittel und dergleichen.

[0057] Geeignete Toxine gemäss der Erfindung umfassen Ricin, Abrin, Diphtheria-Toxin, Modecin, Tetanus-Toxin, Mycotoxine, Mellitin, α -Amanitin, Pokeweed antivirales Protein, Ribosome inhibierendes Protein, besonders jene aus Weizen, Gerste, Mais und Roggen, Gelonin und Maytansinoid, sind aber nicht darauf beschränkt. Geeignete zytotoxische Verbindungen gemäss der Erfindung umfassen alkyliernede Verbindungen wie Chlorambucil, Cyclophosphamid, Melphalan, Cyclopropan; Anthracyclin-Antitumor-Antibiotika wie Doxorubicin, Daunomycin, Adriamycin, Mitomycin C, 2-(Hydroxymethyl)-anthrachinon; Antimetaboliten wie Methotrexat, Dichloromethotrexat, Cisplatin, Carboplatin und Metallpeptide enthaltend Platin, Kupfer, Vanadium, Eisen, Kobalt, Gold, Kadmium, Zink und Nickel, sind aber nicht darauf beschränkt. Andere Verbindungen umfassen DON, Thymidin, Pentamethylmelamin, Dianhydrogalactitol, 5-Methyl-THF, Anguidin, Maytansin, Neocarzinostatin, Chlorozotocin, AZQ, 2'-Deoxycoformycin, PALA, AD-32, m-AMSA und Misonidazol.

[0058] Ein Kompendium der Arzneimittel, die verwendet werden können, kann in Gilman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacologic Basis of Therapeutics, MacMillan, New York, 10. Ausgabe 2001, gefunden werden.

[0059] Diagnostische Moleküle sind jene, die im Körper nachgewiesen werden können, ohne dass Rückgriff auf invasive Methoden wie Chirurgie genommen werden muss. Solche Moleküle umfassen fluoreszierende Verbindungen, radiomarkierte Verbindungen, Röntgen-Kontrastfarbstoffe, ferromagnetische Verbindungen und dergleichen.

[0060] Das N- oder C-Ende der monomeren Bauteile kann leicht verändert werden, z.B. durch Einführung von peptidischen Liganden wie ein zytotoxisches Endstück oder ein Histidin-Endstück, um verschiedene toxische Arzneimittel zu chelatisieren. Freisetzung von Schwermetall im Blutkreislauf sollte auf diese Weise minimal sein, während Freisetzung in saurer Umgebung stattfinden würde, zum Beispiel in gewissen Teilen einer Zelle in den Lysosomen, wo der pH um 5,5 ist.

[0061] In einer bevorzugten Ausgestaltung dieser Erfindung ist das Molekül mit biologischer Wirkung ein Radionuklid, welches an das peptidische Nanoteilchen über einen Chelator gebunden ist. Geeignete Chelatoren für die Bindung von Radionukliden umfassen gemäss der Erfindung Diethylentriamin-pentaessigsäure (DTPA), Isothiocyanatodiethylentriamin n-pentaessigsäure (ITC-DTPA), Ethylendinitril-tetraessigsäure (EDTA), Tetraazocyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA), Cyclohexan-1,2-diamino-N,N'-diacetat (CHTA) und 2-(4-Isothiocyanatobenzyl)-6-methyl-diethylentriamin-pentaessigsäure (MX-DTPA), sind aber nicht darauf beschränkt. Als therapeutische Einheiten geeignete Radioisotope sind in Kairemo et al. (Acta Oncol. 1996, 35:343-55) beschrieben und umfassen Y-90, I-123, I-125, I-131, Bi-213, At-211, Cu-67, Sc-47, Ga-67, Rh-105, Pr-142, Nd-147, Pm-151, Sm-153, Ho-166, Gd-159, Tb-161, Eu-152, Er-171, Re-186 und Re-188.

Verknüpfung von Zieleinheit und Arzneimitteln mit dem Oligomerisierungsbereich

[0062] Die Zieleinheit so wie die Moleküle mit biologischer Wirkung, z.B. Arzneimittel, diagnostisches Molekül oder Chelator, kann durch chemische Verknüpfung an das peptidische Nanoteilchen gebunden werden. In einer bevorzugten Ausgestaltung dieser Erfindung können die einzelnen Einheiten über eine Peptidbindung oder ein peptisches Verbindungsstück gebunden sein. Andere chemische Verknüpfungsmittel umfassen Disulfid-Bindungen, z.B. spontan gebildete oder über ein oder mehrere verbindende Moleküle. Solche verbindenden Moleküle sind Moleküle, die zwei oder mehr reaktive Gruppen wie -SH, -N₃, -COOH, -COBr, -COCl, -NH₂ oder -CHO tragen.

[0063] Es wird festgestellt, dass die typische Anordnung, die in solchen Systemen verwendet wird, eine Ver-

bindung der Zieleinheit oder des biologisch wirksamen Moleküls mit dem peptidischen Nanoteilchen über eine einfache Bindung oder über ein verhältnismässig kurzes chemisches Verbindungsstück erfolgt. Beispiele solcher Verbindungsstücke umfassen Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylate (SMCC) oder die Verbindungsstücke, die in US Patent Nr. 4,880,935 beschrieben sind, und Oligopeptide als Abstandshalter.

[0064] Beispiele sind N-5-Azido-2-nitrobenzoyloxysuccinimid, p-Azidophenacylbromid, p-Azidophenylglyoxal, N-4-(Azidophenylthio)phthalimid, Bis(sulfosuccinimidyl)suberat, Bismaleimidohexan, Bis[2-(succinimidooxycarbonyloxy)ethyl]sulfon, 1,5-Difluoro-2,4-dinitrobenzol, 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-disulfonato-stilben, Dimethyladipimidat, Dimethylpimelimidat, Dimethylsuberimidat, Dithiobis(succinimidylpropionat), Disuccinimidylsuberat, Disuccinimidyltartrat, Dimethyl-3,3'-dithiobispropionimidat, 4,4'-Dithiobisphenylazid, 3,3'-Dithiobis(succinimidylpropionat), Ethyl-4-azidophenyl-1,4-dithiobutyrimidat, 1-Azido-4-fluoro-3-nitrobenzol, N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidobenzoat, Methyl-4-azidobenzoimidat, m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester, N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylicsäure, p-Nitrophenyl-2-diazo-3,3,3-trifluoropropionat, N-Succinimidyl(4-azidophenyl)-1,3'-dithiopropionat, Sulfosuccinimidyl-2-(m-azido-o-nitrobenzamido)-ethyl-1,3'-dithiopropionat, N-Succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoat, Sulfosuccinimidyl-2-(p-azidosalicylamido)ethyl-1,3'-dithiopropionat, N-Succinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoat, Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat, Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrat, N-Succinimidyl-3-(2-pyridyl-dithio)propionat, Bis[2-(sulfosuccinimidooxy-carbonyloxy)ethyl]sulfon, Disulfosuccinimidyltartrat, Ethylenglycolbis(sulfosuccinimidylsuccinat), m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinat, Sulfosuccinimidyl(4-azidophenyl)dithio)propionat, Sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoat, Sulfosuccinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoat, Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat, Sulfosuccinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrat und 2-Iminothiolan.

[0065] Wenn die Verbindung zwischen den biologisch wirksamen Molekülen und dem peptidischen Nanoteilchen kovalent ist, muss die Verbindung in vivo spaltbar sein, wenn das Arzneimittel vom peptidischen Nanoteilchen freigesetzt werden muss, um voll biologisch aktiv zu sein. Die Verbindung kann so ausgewählt werden, dass das Arzneimittel vom Träger in der gewünschten Zielgegend abgespalten werden kann. Die Spaltung kann eine hydrolytische Spaltung sein, welche bei saurem pH, nicht aber bei neutralem oder leicht basischem pH stattfindet. Die Spaltung des Konjugats im Blutkreislauf sollte deshalb minimal sein, während die Spaltung stattfinden sollte, wenn das Konjugat in saurer Umgebung ist, zum Beispiel in gewissen Teilen einer Zelle in den Lysosomen, wo der pH um 5,5 ist.

[0066] Vorzugsweise wird hingegen die Verbindung so ausgewählt, dass sie enzymatisch gespalten werden kann, vorzugsweise durch Enzyme, die nur in ausgewählten Zellen oder ausgewählten Teilen von Zellen vorhanden sind. Besonders geeignete Peptid-Verbindungsstücke sind jene, die als spezifische Substrate für Thiol-Proteinasen oder andere Proteasen wirken, von denen man weiss, dass sie in Lysosomen vorhanden sind, wie Cathepsine B und L. Solche Peptidsequenzen können Ala-Leu-Ala-Leu, Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Phe-Ala-Leu oder verschiedene Di-, Tri- und Tetrapeptide enthaltend Ala und Leu sein, oder Peptidsequenzen enthaltend eine basische Aminosäure an der Stelle P1 und eine hydrophobe Aminosäure an der Stelle P2.

[0067] Als eine Alternative kann das Arzneimittel an das peptidische Nanoteilchen durch andere Mittel als eine kovalente Bindung verknüpft sein, falls das monomere Bauteil ein Polylysin (Sequenz, die die Befestigung eines Arzneimittels ermöglicht, besonders, wenn es eine Nukleinsäure ist), ein Polyarginin oder einen Transferrin/Poly-L-Lysin-Komplex enthält, welcher mit den besagten Nukleinsäuresequenzen oder mit den besagten Proteinen ein Konjugat bildet.

[0068] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden zwei oder mehr identische monomere Bauteile der Formel (I), von denen jedes einen verschiedenen Substituenten trägt, z.B. eines eine Zieleinheit und ein anderes ein Arzneimittel, zu multifunktionellen Nanoteilchen zusammengefügt. Dies ist ein besonders einfacher Weg, um nicht-kovalent ein Arzneimittel an eine Zieleinheit zu knüpfen.

Therapeutische und diagnostische Verfahren

[0069] Die Erfindung betrifft die Verwendung von funktionalisierten peptidischen Nanoteilchen in einem therapeutischen Verfahren zur Behandlung eines Menschen mit einem erkrankten Organ oder Gewebe, insbesondere die Verwendung des zielgerichteten Transportsystems für Arzneimittel basierend auf peptidischen Nanoteilchen gemäss der vorliegenden Erfindung, um den Metabolismus der Zellen zu beeinflussen, die einen Rezeptor für die Zieleinheit an ihrer Oberfläche oder auf nahegelegenen Zellen exprimieren, wobei diese Zel-

len zu jenen des erkrankten Organs oder Gewebes gehören. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung von funktionalisierten peptidischen Nanoteilchen, die mit einem Arzneimittel substituiert sind, in einem Verfahren zur Behandlung einer Krankheit, welche auf das besagte Arzneimittel anspricht.

[0070] Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von funktionalisierten peptidischen Nanoteilchen in einem diagnostischen Verfahren zur Bestimmung, ob eine Mensch ein erkranktes Organ oder Gewebe hat, insbesondere die Verwendung des zielgerichteten Transportsystems für Arzneimittel basierend auf peptidischen Nanoteilchen, d.h. für ein Arzneimittel, das ein diagnostische Molekül ist, in einem Verfahren zum nicht-invasiven Nachweis der örtlichen Lage des besagten Arzneimittels.

Impfung

[0071] Um funktionalisierte Peptidische Nanoteilchen herzustellen, werden die monomeren Bauteile D1-L-D2 verändert, damit sie an einem oder beiden Enden der fortlaufenden Kette ein Antigen, vorzugsweise ein peptidisches Antigen, einschliessen. Beim Zusammenfügen zu einem peptidischen Nanoteilchen wird dann das Antigen in vielfachen Kopien auf der Oberfläche des peptidischen Nanoteilchens dargeboten und stellt damit eine geordnete und sich wiederholende Anordnung der Antigene oder antigenen Determinanten dar, welche als ein Antigen-Darreichungssystem verwendet werden kann. Eine solche starre, sich wiederholende Darreichung von Antigenen ruft hohe Titer von serospezifischen neutralisierenden Antikörpern hervor, weil B-Zellen gegen sich vielfach wiederholende, starr geordnete antigene Determinanten mit kurzlebigen IgM-Immunitäten sogar ohne Notwendigkeit von T-Helferzellen reagieren (TI-1 Immunantwort). Zusätzlich wird die teilchenförmige Struktur diese Antigene zu Antigen präsentierenden Zellen leiten und CD4 vermehrende Antworten und zytotoxische T-Lymphozyten hervorrufen und damit ein immunologisches Langzeit-Gedächtnis hervorrufen.

[0072] Peptidische Antigene der Erfindung können aus der Gruppe bestehend aus (a) Proteinen, die geeignet sind, eine Immunantwort gegen Krebszellen hervorzurufen; (b) Proteinen, die geeignet sind, eine Immunantwort gegen Infektionskrankheiten hervorzurufen; und (c) Proteinen, die geeignet sind, eine Immunantwort gegen Allergene hervorzurufen; ausgewählt werden. Peptidische Nanoteilchen umfassend solche Proteine oder deren Peptidfragmente können geeignet sein, eine Immunantwort im Menschen oder auch in Nutztieren hervorzurufen. Kombinationen von einem oder mehreren B-Zell- oder T-Zellepitopen innerhalb eines Nanoteilchens können auch hergestellt werden, um eine multispezifische Immunantwort hervorzurufen.

[0073] In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist das Antigen oder die antigene Determinante eine, die für die Verhinderung von Infektionskrankheiten nützlich ist. Eine solche Behandlung wird nützlich sein, um eine breite Auswahl von Infektionskrankheiten zu verhindern, die eine breite Reihe von Wirtsorganismen befällt, z.B. Menschen oder nicht-menschliche Tiere, wie Kühe, Schafe, Schweine, Hunde, Katzen, andere Säugetierarten oder auch Nicht-Säugetierarten. Behandelbare Infektionskrankheiten sind dem Fachmann wohlbekannt. Beispiele umfassen Infektionen mit viraler Ursache, wie HIV, Grippe, Herpes, virale Hepatitis, Epstein Bar, Kinderlähmung, virale Hirnhautentzündung, Masern, Windpocken und dergleichen, oder Infektionen mit bakterieller Ursache, wie Lungenentzündung, Tuberkulose, Syphilis und dergleichen, oder Infektionen mit parasitärer Ursache, wie Malaria, Trypanosomiasis, Leishmaniasis, Trichomoniasis, Amoebiasis und dergleichen. Besondere Beispiele von Antigenen und antigenen Determinanten umfassen das HIV-Antigen gp 41 und gp 120, die Influenza-Antigene Hemagglutinin und Neuraminidase, Hepatitis-B-Oberflächenantigen und das Circumsporoziten-Protein der Malaria.

[0074] In einer anderen speziellen Ausgestaltung sind die Zusammensetzungen der Erfindung Immunotherapeutika, die für die Behandlung von Allergien oder Krebs verwendet werden können. Die Auswahl der Antigene oder antigenen Determinanten für die Zusammensetzung und die Behandlungsverfahren für Allergien sind den Fachleuten auf dem medizinischen Gebiet der Behandlung solcher Funktionsstörungen bekannt Repräsentative Beispiele dieser Art von Antigenen oder antigenen Determinanten umfassen Bienengift-Phospholipase A2, Bet v I (Birkenpollen-Allergen), 5 Dol m V (weissköpfiges Hornissengift-Allergen), und Der p I (Hausstaubmilbe-Allergen).

[0075] In einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung wird eine Zusammensetzung für die Verhinderung und Behandlung von Malaria in Betracht gezogen. Der Lebenszyklus des Malaria-Parasiten bietet mehrere Phasen an, bei denen ein Eingriff zu einer Beendigung des infektiösen Prozesses führen könnte. Im Lebenszyklus des Malaria-Parasiten wird der Mensch durch den Stich einer weiblichen Anopheles-Mücke mit Malaria infiziert. Die Mücke führt eine Probe in den Wirt ein und spritzt dabei die Sporozitenform von Plasmodium falciparum ein, die im Speichel der Mücke vorhanden ist. Über die Jahre ist es zunehmend klar geworden, dass

ein Malaria-Impfstoff verschiedene antigene Abschnitte einer Vielzahl von Zelloberflächenproteinen des Parasiten enthalten sollte, was ein Vielkomponenten- und Vielphasen-Impfstoff ergibt. Mögliche für den Aufbau eines Peptid-Impfstoffes geeignete Proteine und Peptidsequenzen können Sequenzen der folgenden Plasmodium falciparum Proteine enthalten: MSP-1 (ein grosses polymorphes Protein, das auf der Parasiten-Zelloberfläche exprimiert wird), MSA1 (hauptsächliches Merozoiten-Oberflächenantigen 1), CS Protein (natürliches Circumsporozoit), 35KD Protein oder 55KD Protein oder 195KD Protein gemäss US Patent 4,735,799, oder AMA-1 (apicales Membranantigen 1).

[0076] In einer anderen bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung wird eine Zusammensetzung für die Verhinderung und Behandlung von HIV in Betracht gezogen. Für die Herstellung eines anti-HIV-Impfstoffes kann ein synthetisches Peptid verwendet werden, das HIV-spezifische Antikörper hervorruft, wobei besagtes synthetisches Peptid eine Aminosäuresequenz eines funktionalen T-Zellepitops oder B-Zellepitops eines Envelope oder gag Proteins oder gp 120 oder gp 41 von HIV-1 aufweist, um eine Immunantwort zu ergeben. Von besonderem Interesse sind Sequenzen innerhalb gp41, welche konformationspezifische, neutralisierende Antikörper hervorrufen, die in den Fusionsprozess eingreifen, wie der bekannte Antikörper 2F5. Solche Sequenzen sind hauptsächlich in und um das HR1 und HR2 and das Cluster I und Cluster II -Gebiet angeordnet. Antikörper, die z.B. an das spiralförmige Trimer von gp41 binden und durch peptidische Nanoteilchen umfassend dieses spiralförmige (coiled-coil) Trimer gemäss der Erfindung hervorgerufen werden, werden die Bildung eines Hairpin und folglich die virale Fusion verhindern. Gleichermassen werden Antikörper, die gegen die trimere Spirale (coiled-coil) von Ebola oder eines anderen Virus mit ähnlichem Fusionsprozess hervorgerufen werden, den viralen Eintritt dieser Viren verhindern.

[0077] Die Auswahl der Antigene oder antigenen Determinanten für die Zusammensetzung und die Behandlungsverfahren für Krebs sind den Fachleuten auf dem medizinischen Gebiet der Behandlung solcher Funktionsstörungen bekannt. Repräsentative Beispiele dieser Art von Antigenen oder antigenen Determinanten umfassen die folgenden: HER2/neu (Brustkrebs), GD2 (Neuroblastoma), EGF-R (bösartige Glioblastoma), CEA (medullärer Schilddrüsenkrebs), CD52 (Leukämie), MUC1 (exprimiert in hematologischen bösartigen Tumoren), gp100 Protein, oder das Produkt des Tumor-Suppressor-Gens WT1.

[0078] Die Verwendung von Nanoteilchen der Erfindung als Adjuvantien wird ebenfalls in Betracht gezogen.

[0079] Die Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung eines funktionalisierten peptidischen Nanoteilchens substituiert mit einem Antigen wie vorstehend beschrieben in einer Methode der Impfung.

Pharmazeutische Zusammensetzungen

[0080] Die vorliegende Erfindung betrifft auch pharmazeutische Zusammensetzungen umfassend peptidische Nanoteilchen der Erfindung, insbesondere Nanoteilchen, die eine Zieleinheit und ein Arzneimittel tragen, oder Nanoteilchen, die ein Antigen tragen. Zusammensetzungen für enterale Verabreichung, wie nasale, buccale, rektale oder orale Verabreichung, auch Vernebelungsgeräte und Augentropfen umfassend, und für parenterale Verabreichung, wie intravenöse, intramuskuläre oder subkutane Verabreichung, an Warmblüter, insbesondere Menschen, sind bevorzugt. Besonders bevorzugt sind Zusammensetzungen für parenterale Verabreichung. Weitere in Betracht gezogene Zusammensetzungen sind jene, die für chirurgische Implantate geeignet sind. Die Zusammensetzungen umfassen die peptidischen Nanoteilchen allein oder vorzugsweise zusammen mit einem pharmazeutisch verwendbaren Trägerstoff. Die Dosierung des aktiven Inhaltsstoffes hängt von der zu behandelnden Krankheit und von der Spezies, seinem Alter, Gewicht und individuellem Zustand, den individuellen pharmakokinetischen Daten und der Art der Verabreichung ab.

[0081] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen umfassen von etwa 1% bis etwa 95% des aktive Inhaltsstoffes. Einheits-Dosisformen für parenterale Verabreichung sind beispielsweise Ampullen oder Phiolen, z.B. Phiolen enthaltend von etwa 0,01 mg bis etwa 1,0 g peptidische Nanoteilchen. Weitere in Betracht gezogene Dosisformen sind beispielsweise Salben, Cremes, Pasten, Schäume, Tinkturen, Dispersionen und dergleichen.

[0082] Bevorzugt wird die Verwendung von Lösungen der peptidischen Nanoteilchen, und auch von Suspensionen oder Dispersionen, besonders isotonischen wässrigen Lösungen, Dispersionen und Suspensionen, welche beispielsweise im Fall von lyophilisierten Zusammensetzungen enthaltend den aktiven Inhaltsstoff allein oder zusammen mit einem Trägermaterial, beispielsweise Mannit, kurz vor der Verwendung zubereitet werden können. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können sterilisiert sein und/oder Zusatzstoffe umfassen, beispielsweise Konservierungsmittel, Stabilisatoren, Netzmittel und/oder Emulgatoren, Lösungs-

vermittler, Salze zur Regulierung des osmotischen Drucks und/oder Puffer, und werden auf an sich bekannte Weise hergestellt, beispielsweise mittels konventioneller Löse- und Lyophilisierungs-Verfahren. Die besagten Lösungen oder Suspensionen können Viskosität-regulierende Stoffe enthalten.

[0083] Für parenterale Verabreichung sind besonders wässrige Lösungen der peptidischen Nanoteilchen oder wässrige Injektionssuspensionen, die Viskosität-regulierende Substanzen und gewünschtenfalls Stabilisatoren enthalten, geeignet. Die peptidischen Nanoteilchen, gewünschtenfalls zusammen mit Zusatzstoffen, können ebenso als Lyophilisat vorliegen und vor der parenteralen Verabreichung durch Zugabe von geeigneten Lösungsmitteln in Lösung gebracht werden.

[0084] Die vorliegende Erfindung betrifft auch pharmazeutische Verfahren und die Verwendung von peptidischen Nanoteilchen für die Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen, welche peptidische Nanoteilchen gemäss der Erfindung umfassen, insbesondere als aktive Inhaltsstoffe Nanoteilchen, die eine Zieleinheit und ein Arzneimittel tragen, oder Nanoteilchen, die ein Antigen tragen. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung werden auf an sich bekannte Weise hergestellt, beispielsweise mittels konventioneller Misch-, Granulier-, Überzieh-, Löse- oder Lyophilisier-Verfahren.

Monomere Bauteile und Herstellung von peptidischen Nanoteilchen und funktionalisierten peptidischen Nanoteilchen

[0085] Die Erfindung betrifft ebenso die monomeren Bauteile der Formel (I) wie oben beschrieben, und solche monomere Bauteile, die gegebenenfalls eine Zieleinheit und ein Arzneimittel oder ein Antigen enthalten.

[0086] Monomere Bauteile gemäss der Erfindung können durch chemische Synthese oder Expression in genetisch modifizierten Organismen erhalten werden. Wegen der vergleichsweise kurzen Länge der monomeren Peptidketten ist die chemische Synthese bevorzugt. Verfahren der Synthese von Polypeptiden sind wohlbekannt und können leicht angepasst werden, um monomere Bauteile der Erfindung herzustellen. Bevorzugt ist Standard-Peptidchemie, die die Peptidsynthese vom C-Ende her beginnt. Liganden am N-Ende können unter Standardbedingungen der Peptidsynthese angefügt werden. Als Alternative können die monomeren Bauteile direkt in genetisch veränderten multizellulären Organismen mit etablierten Systemen der Transkription und Translation exprimiert werden.

[0087] Peptidische Nanoteilchen werden durch Äquilibration der monomeren Bauteile in wässriger Lösung, vorzugsweise in ungefähr neutralen wässrigen Pufferlösungen, z.B. in Natriumchloridlösung enthaltend Tris-Puffer, erhalten. Peptide enthaltend Cystein-Reste können durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) behandelt werden, welches auf einigen Stufen der Äquilibration zugegeben werden kann, um Disulfid-Brücken zu reduzieren und die Neubildung von Disulfid-Brücken zu ermöglichen. Für die richtige Faltung der peptidischen Nanoteilchen, besonders von jenen enthaltend Disulfid-Brücken, kann die erneute Faltung des Nanoteilchens von denaturierenden Bedingungen aus begonnen werden (8 M Harnstoff) und dann unter natürlichen Bedingungen (z.B. 150 mM NaCl, pH 7.5) entweder unter reduzierenden oder oxidierenden Bedingungen dialysiert werden.

Beispiele

[0088] Die nachfolgenden Beispiele sind nützlich, um die Erfindung weiter zu erklären, stellen aber keine Einschränkung für den Anwendungsbereich der Erfindung dar.

Beispiel 1: Ac-COMP - trimer(de novo)-NH₂

[0089] Ein Peptid der folgenden Sequenz (SEQ ID NO:1) wird durch Standard-Festphasen-Peptidsynthese (Merrifield R.B., Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 1969, 32:221-296) mit Synthese-Beginn am C-Ende hergestellt.

1 10 20 30 40 50 60

Ac-DEMLRELQETNAALQDVRELLRQQVKQITFLKCLLMGGRLLCRLEELERRLEELERRLEELERR-NH₂

[0090] Dies entspricht 30 Aminosäuren des Pentamerisierungsbereichs von COMP (Knorpel-Oligomerisierung-Matrix-Protein), dem die Disulfid-Brücken am C-Ende fehlen, mit verbesserten N- und C-Enden für stabile intra- und inter-helikale Wechselwirkungen, zwei Glycin-Resten als Verbindungsstück und 26 Aminosäuren als de novo entworfener spiralförmiger (coiled-coil) Trimerisierungsbereich. Am N-Ende ist die positiv ge-

ladene Aminogruppe durch eine Acetylaminogruppe ersetzt, am C-Ende die negativ geladene Carboxygruppe durch ein Carboxamid. Reste 33 und 42 sind Cystein-Reste an den Positionen aa(f) der entsprechenden coiled-coil Spiralen; sie bilden möglicherweise eine inter-helikale Disulfid-Brücke zwischen den zwei Helices.

[0091] Vier verschiedene Reaktionsbedingungen wurden für den Zusammenbau von Nanoteilchen aus den monomeren Bauteilen der SEQ ID NO:1 geprüft, um optimale Faltungsbedingungen dieses Peptids, das intramolekulare Disulfid-Brücken bilden kann, zu bestimmen.

Lösen:

[0092] Herstellung 1 (oxidierende Bedingungen): 1 mg/ml Peptid wird direkt in 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5 gelöst.

[0093] Herstellung 2 (reduzierende Bedingungen): 1 mg/ml Peptid wird direkt in 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5; 2 mM DTT gelöst.

[0094] Herstellung 3 (denaturierende Bedingungen): 0,07 mg/ml Peptid wird direkt in 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5; 2 mM DTT, 8 M Harnstoff gelöst. Die Lösung wird schrittweise von 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5; 8 M Harnstoff/4 M Harnstoff/2 M Harnstoff zu kein Harnstoff dialysiert. Die Lösung wird auf 1 mg/ml in 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5 aufkonzentriert.

[0095] Herstellung 4 (denaturierende, reduzierende Bedingungen): 0,07 mg/ml Peptid wird in 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5; 8 M Harnstoff, 2 mM DTT gelöst. Die Lösung wird schrittweise von 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5; 8 M Harnstoff und 2 mM DTT/4 M Harnstoff und 2 mM DTT/2 M Harnstoff und 2 mM DTT/kein Harnstoff und 2 mM DTT zu kein Harnstoff und kein DTT dialysiert. Die Lösung wird auf 1 mg/ml in 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5 aufkonzentriert.

Analytische Ultrazentrifugation (AUZ):

[0096] Aus Herstellung 1: Die AUZ deckt drei bedeutendere Bestandteile von ungefähr gleicher Grösse der Anteile auf, mit einem Molekulargewicht (MG) von 383, 997 beziehungsweise 2210 kDa, die Nanoteilchen enthaltend 48,5, 126,4 und 280,1 Monomeren entsprechen.

[0097] Aus Herstellung 2: Der Hauptanteil (80%) dieser AUZ-Messung ist ein Bestandteil mit MG 168 und zwei kleinere Anteile mit einem MG 330 beziehungsweise 131 kDa, die peptidischen Nanoteilchen enthaltend 21,3, 41,8 und 16,6 Monomeren entsprechen. Das letztere entspricht peptidischen Nanoteilchen als geraden Einheiten zusammengesetzt aus 15 monomeren Bauteilen mit einem theoretischen MG von 118,3 kDa.

[0098] Aus Herstellung 3: Das gemessene MG ist leicht konzentrationsabhängig. Bei niedrigen Konzentrationen (0,15 mg/ml und 0,3 mg/ml) ist das peptidische Nanoteilchen aus 3 geraden Einheiten zusammengesetzt, bei höheren Konzentrationen (0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml und 0,8 mg/ml) aus 4 geraden Einheiten. Dieses peptidische Nanoteilchen mit 4 geraden Einheiten hat das Molekulargewicht eines regulären Polyeders mit Dodekaeder-Symmetrie, welches aus 60 monomeren Bauteilen zusammengesetzt ist.

Konzentration	MG kDa	Anzahl Monomere	Anzahl gerader Einheiten
0,15 mg/ml	347	43,9	2,9
0,3 mg/ml	356	45,1	3,0
0,4 mg/ml	461	58,4	3,9
0,6 mg/ml	437	55,3	3,7
0,8 mg/ml	489	61,9	4,1

[0099] Aus Herstellung 4: Das gemessene MG ist konzentrationsabhängig, und bei höheren Konzentrationen enthält das peptidische Nanoteilchen bis zu 121 monomeren Bauteilen.

Konzentration MG kDa	Anzahl Monomere	Anzahl gerader Einheiten
0,15 mg/ml 633	80,1	5,3
0,25 mg/ml 718	90,9	6,1
0,8 mg/ml 960	121,5	8,1

Elektronenmikroskopie (EM):

[0100] Aus Herstellung 1: Wie nach EM-Bildern beurteilt werden kann, bilden die Peptide nicht peptidische Nanoteilchen, sondern vielmehr unregelmässige Aggregate.

[0101] Aus Herstellung 2: Die Peptide bilden peptidische Nanoteilchen verschiedener Grösse, und auch die Form ist nicht immer völlig kugelig. Die durchschnittliche Grösse der peptidischen Nanoteilchen ist 25 nm ([Fig. 4A](#)).

[0102] Aus Herstellung 3: Die Peptide bilden peptidische Nanoteilchen von gleicher Grösse mit kugeligem Erscheinungsbild. Der Durchmesser der peptidischen Nanoteilchen ist 15 nm und entspricht dem aus molekularen Modellen vorausgesagten Wert für ein reguläres Polyeder mit Dodekaeder-Symmetrie ([Fig. 4B](#)).

[0103] Aus Herstellung 4: Die Peptide bilden peptidische Nanoteilchen von beinahe gleicher Grösse mit vorwiegend kugeligem Erscheinungsbild. Der Durchmesser der peptidischen Nanoteilchen ist 15 nm und entspricht dem aus molekularen Modellen vorausgesagten Wert für ein reguläres Polyeder mit Dodekaeder-Symmetrie.

Beispiel 2: COMP - trimer(de novo) (kein Cys)

[0104] Ein Peptid der folgenden Sequenz (SEQ ID NO:2) wird in einem E. coli Standard-Expressionssystem rekombinant exprimiert, unter Verwendung eines Reinigungsschemas mit His-Gruppen-Affinitätsreinigung kombiniert mit Thrombin-Spaltung.

10 20 30 40 50 60

GSDEMLRELQETNAALQDVRELLRQQVKQIRRLKRLLRGGRLLAEELELRERLEELERRLEELERR

[0105] Diese ist verwandt mit der Sequenz von Beispiel 1 (SEQ ID NO:1), enthält aber verbesserte intramolekulare ionische Wechselwirkungen zwischen zwei Helices des Nanoteilchens (Reste 31, 32, 35, 38, 45, 50, 51) und keine intramolekularen Disulfid-Brücken zwischen Resten 33 und 42 von Beispiel 1 (Ersatz von Cystein durch Arginin beziehungsweise Alanin), und beginnt mit zwei zusätzlichen Resten (Glycin und Serin) aus dem Thrombin-Spaltungsteil des Expressionssystems.

[0106] Eine Reaktionsbedingung wurde für den Zusammenbau der Nanoteilchen aus monomeren Bauteilen SEQ ID NO:2 geprüft: 1 mg/ml Peptid wird in 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,0 gelöst. Das gemessene MG entspricht Nanoteilchen zusammengesetzt aus 148 Monomeren, einem Nanoteilchen mit mehr Monomeren als für ein reguläres Polyeder mit 60 unsymmetrischen Einheiten benötigt wird. Die beiden Helices der beiden Oligomerisierungsbereiche sind nicht durch Disulfid-Brücken in ihrer relativen Ausrichtung zueinander festgehalten.

Konzentration	MG kDa	Anzahl Monomere
0,3 mg/ml	1192	148

Beispiel 3: Trimer(foldon) - COMP

[0107] Ein Peptid der folgenden Sequenz (SEQ ID NO:3) wird in einem E. coli Standard-Expressionssystem rekombinant exprimiert, unter Verwendung eines Reinigungsschemas mit His-Gruppen-Affinitätsreinigung kombiniert mit Thrombin-Spaltung.

10 20 30 40 50 60 70

GSGYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFLGGLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQVKQITFLKNTVMECDACG

[0108] Diese entspricht zwei zusätzlichen Resten (Glycin und Serin) aus dem Thrombin-Spaltungsteil des Ex-

pressionssysteme, 27 Aminosäuren des trimeren Foldon-Bereiches von Fibrin; zwei Glycin-Resten als Verbindungsstück, und 44 Aminosäuren aus dem Pentamerisierungsbereich von COMP einschliesslich der Disulfid-Brücken am C-Ende. Reste 71 und 74 können interhelikale Disulfid-Brücken bilden.

[0109] Zwei verschiedene Reaktionsbedingungen werden für den Zusammenbau der Nanoteilchen aus monomeren Bauteilen SEQ ID NO:3 geprüft.

[0110] Herstellung 1: 1 mg/ml Peptid wird in 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,0 gelöst.

[0111] Herstellung 2: 1 mg/ml Peptid wird in 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,0; 2 mM DTT, gelöst.

Analytische Ultrazentrifugation:

[0112] Aus Herstellung 1: Das gemessene MG ist konzentrationsabhängig mit zunehmender Nanoteilchen-Grösse bei zunehmender Konzentration.

Konzentration	MG kDa	Anzahl Monomere
0,3 mg/ml	78	9,3
0,4 mg/ml	82	9,9
0,6 mg/ml	91	10,9
1,2 mg/ml	93	11,2

[0113] Aus Herstellung 2: Das gemessene MG ist konzentrationsunabhängig und entspricht aus ungefähr 13 Monomeren zusammengesetzten Nanoteilchen.

Konzentration	MG kDa	Anzahl Monomere
0,3 mg/ml	113	13,6
0,4 mg/ml	102	12,3
0,6 mg/ml	102	12,3
1,2 mg/ml	103	12,4

Nativ-Gel:

[0114] Aus Herstellung 1: Das Nativ-Gel zeigt zwei bedeutendere Bestandteile entsprechend einem Molekulargewicht der peptidischen Nanoteilchen von ungefähr 66 kDa und 120 kDa, wobei das letztere einem peptidischen Nanoteilchen zusammengesetzt aus 15 monomeren Bauteilen entspricht, d.h. einer geraden Einheit.

Beispiel 4: Trimer(foldon)Cys11 - COMP

[0115] Ein Peptid der folgenden Sequenz (SEQ ID NO:4) wird in einem E. coli Standard-Expressionssystem rekombinant exprimiert, unter Verwendung eines Reinigungsschemas mit His-Gruppen-Affinitätsreinigung kombiniert mit Thrombin-Spaltung.

10 20 30 40 50 60 70

GSGYIPEAPRCGQAYVRKDGWVLLSTFLGGLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQVKQITFLKNTVMECDACG

[0116] Diese entspricht zwei zusätzlichen Resten (Glycin und Serin) aus dem Thrombin-Spaltungsteil des Expressionssystems, 27 Aminosäuren des trimeren Foldon-Bereiches von Fibrin; zwei Glycin-Resten als Verbindungsstück und 44 Aminosäuren aus dem Pentamerisierungsbereich von COMP einschliesslich der Disulfid-Brücken am C-Ende. Reste 71 und 74 können interhelikale Disulfid-Brücken bilden. Der Rest Asp 11 wird durch einen Cystein-Rest ersetzt, der eine Disulfid-Brücke mit dem gleichen Rest eines anderen monomeren Bauteils bilden kann, zu welchem es durch die zweifache Rotationsachse des Dodekaeders symmetrieverwandt ist.

[0117] Zwei verschiedene Reaktionsbedingungen werden für den Zusammenbau der Nanoteilchen aus monomeren Bauteilen SEQ ID NO:4 geprüft:

Herstellung 1: 1 mg/ml Peptid wird in 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,0 gelöst.

Herstellung 2: 1 mg/ml Peptid wird in 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,0; 2 mM DTT gelöst.

Analytische Ultrazentrifugation:

[0118] Aus Herstellung 1: Das gemessene MG entspricht aus 9,0 Monomeren zusammengesetzten Nanoteilchen.

Konzentration	MG kDa	Anzahl Monomere
0,2 mg/ml	75	9,0

[0119] Aus Herstellung 2: Das gemessene MG entspricht aus 11,2 Monomeren zusammengesetzten Nanoteilchen.

Konzentration	MG kDa	Anzahl Monomere
0,2 mg/ml	93	11,2

Beispiel 5: Trimer(foldon)Cys11 - Verbindungsstück - COMP

[0120] Ein Peptid der folgenden Sequenz (SEQ ID NO:5) wird in einem E. coli Standard-Expressionssystem rekombinant exprimiert, unter Verwendung eines Reinigungsschemas mit His-Gruppen-Affinitätsreinigung kombiniert mit Thrombin-Spaltung.

10 20 30 40 50 60 70

GSGYIPEAPRCGQAYVRKDGWVLLSTFLGGSLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQVKQITFLKNTVMECDACG

[0121] Diese entspricht der Sequenz aus Beispiel 4 (SEQ ID NO:4) mit zwei zusätzlichen Resten (Serin und Glycin) zwischen dem Foldon und COMP, um die Beweglichkeit der beiden Bereiche im Verhältnis zueinander zu vergrößern.

[0122] Zwei verschiedene Reaktionsbedingungen wurden für den Zusammenbau der Nanoteilchen aus monomeren Bauteilen SEQ ID NO:5 geprüft:

Herstellung 1: 1 mg/ml Peptid wird direkt in 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5; 2 mM DTT gelöst.

[0123] Herstellung 2: 0,07 mg/ml Peptid wird in 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5; 8 M Harnstoff gelöst. Die Lösung wird schrittweise von 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5; 8 M Harnstoff/4 M Harnstoff/2 M Harnstoff zu kein Harnstoff dialysiert. Die Lösung wird auf 1 mg/ml in 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5 aufkonzentriert.

Analytische Ultrazentrifugation:

[0124] Aus Herstellung 1: Das gemessene MG ist leicht konzentrationsabhängig, und die Lösung enthält eine Mischung von Nanoteilchen verschiedener Grösse.

Konzentration MG kDa	Anzahl Monomere
0,3 mg/ml 86	10,1
0,6 mg/ml 83	9,8
1,2 mg/ml 96	11,3

[0125] Aus Herstellung 2: Das gemessene MG ist konzentrationsunabhängig, und die Teilchen sind aus 15 Monomeren entsprechend einer geraden Einheit zusammengesetzt.

Konzentration	MG kDa	Anzahl Monomere
0,24 mg/ml	128	15,1
0,4 mg/ml	122	14,3
1,2 mg/ml	126	14,8

Beispiel 6: Trimer(foldon)Cys11 - Verbindungsstück 2 - COMP

[0126] Ein Peptid der folgenden Sequenz (SEQ ID NO:6) wird in einem E. coli Standard-Expressionssystem rekombinant exprimiert, unter Verwendung eines Reinigungsschemas mit His-Gruppen-Affinitätsreinigung kombiniert mit Thrombin-Spaltung.

10 20 30 40 50 60 70

GSgyIPEAPRCGQAYVRKdGEWVLLSTfLGGSGSLAPQMLRELQETNAALQDVRELLRQQVKQITfLKNTVMECDACG

[0127] Diese entspricht der Sequenz aus Beispiel 4 (SEQ ID NO:4) mit vier zusätzlichen Resten (Serin, Glycin, Serin und Glycin) zwischen dem Foldon und COMP, um die Beweglichkeit der beiden Bereiche im Verhältnis zueinander zu vergrößern. Eine Reaktionsbedingung wurde für den Zusammenbau der Nanoteilchen aus monomeren Bauteilen SEQ ID NO:6 geprüft:

1 mg/ml Peptid wird in 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,0 gelöst.

Analytische Ultrazentrifugation:

[0128] Das gemessene MG ist konzentrationsunabhängig, und das Molekulargewicht entspricht Nanoteilchen, die aus leicht weniger Bauteilen als für eine gerade Einheit benötigt zusammengesetzt sind.

Konzentration	MG kDa	Anzahl Monomere
0,4 mg/ml	108	12,5
0,8 mg/ml	116	13,5
1,2 mg/ml	111	12,9

Cys Leu Leu Met Gly Gly Arg Leu Leu Cys Arg Leu Glu Glu Leu Glu
 35 40 45

Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg
 50 55 60

<210> 2

<211> 66

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Glycin-Serin, 36 Aminosäuren aus dem Pentamerisierungs-
 bereich von Knorpel-Oligomerisierungs-Matrix-Protein, worin
 Cystein ersetzt ist, 2 Glycin-Reste als Verbindungsstück,
 26 Aminosäuren als de novo trimerer coiled-coil-Bereich

<400> 2

Gly Ser Asp Glu Met Leu Arg Glu Leu Gln Glu Thr Asn Ala Ala Leu
 1 5 10 15

Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val Lys Gln Ile Arg Arg
 20 25 30

Leu Lys Arg Leu Leu Arg Gly Gly Arg Leu Leu Ala Glu Leu Glu Glu
 35 40 45

Leu Arg Glu Arg Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Leu Glu Glu Leu Glu
 50 55 60

Gln Asp Val Arg Glu Leu Leu Arg Gln Gln Val Lys Gln Ile Thr Phe
 20 25 30

Leu Lys Asn Thr Val Met Glu Cys Asp Ala Cys Gly
 35 40

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> Bacteriophage T4

<400> 8

Gly Tyr Ile Pro Glu Ala Pro Arg Asp Gly Gln Ala Tyr Val Arg Lys
 1 5 10 15

Asp Gly Glu Trp Val Leu Leu Ser Thr Phe Leu
 20 25

Patentansprüche

1. Ein peptidisches Nanoteilchen bestehend aus Aggregaten einer Vielzahl von Bauteilen der Formel (I) bestehend aus einer fortlaufenden Kette umfassend einen peptidischen Oligomerisierungsbereich D1, ein Verbindungsstück L und einen Oligomerisierungsbereich D2

D1-L-D2 (I),

worin D1 ein synthetisches oder natürliches Peptid mit einer Tendenz zur Bildung von Oligomeren $(D1)_m$ aus m Untereinheiten D1 ist, D2 ein synthetisches oder natürliches Peptid mit einer Tendenz zur Bildung von Oligomeren $(D2)_n$ aus n Untereinheiten D2 ist, m 2 und n 5, oder m 3 und n 4 oder 5, oder m 4 und n 5 ist, L eine Bindung oder ein kurzes Verbindungsstück ist, und worin D1, D2 und L gewünschtenfalls weiter substituiert sind.

2. Ein peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 1, worin n 5 ist.

3. Ein peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 1, worin sich die fortlaufende Kette umfassend D1-L-D2 von viralen Capsid Proteinen unterscheidet.

4. Ein peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 1 oder 3, worin die Oligomerisierungsbereiche D1 und/oder D2 spiralförmige (coiled-coil) Peptid-Sequenzen sind.

5. Ein peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 1 oder 3, worin die Oligomerisierungsbereiche D1 und/oder D2 spiralförmige (coiled-coil) Peptid-Sequenzen mit einer fortlaufenden Anordnung von hauptsächlich hydrophoben Resten räumlich 3 oder 4 Reste auseinanderliegend in einer Sequenz von sieben und/oder elf Aminosäuren sind.

6. Ein peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 1 oder 3, worin die Oligomerisierungsbereiche D1 und/oder D2 ein Peptid der Formel (II)

$[aa(a)-aa(b)-aa(c)-aa(d)-aa(e)-aa(f)-aa(g)]_x$ (II)

sind, worin aa eine Aminosäure oder ein Derivat davon bedeutet, aa(b), aa(c), aa(e), aa(f) und aa(g) die gleiche oder verschiedene Aminosäuren oder Derivate davon sind, aa(a) und aa(d) die gleiche oder verschiedene hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren oder Derivate davon sind, und X zwischen 2 und 20 ist.

7. Ein peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 6, worin X zwischen 3 und 6 ist.

8. Ein peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 1, worin D2 der Pentamerisierungsbereich des oligomeren Knorpel Matrix Proteins (COMP) oder ein Derivat davon ist.

9. Ein peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 1, worin D1 der Trimerisierungsbereich (foldon) des Bakteriophagen T4 Proteins Fibrin oder ein Derivat davon ist.

10. Ein peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 1 oder 3, worin die fortlaufende Kette umfassend D1-L-D2 mit einer Zieleinheit verknüpft ist.

11. Ein peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 1, 3 oder 10, worin die fortlaufende Kette umfassend D1-L-D2 mit einem Arzneimittel verknüpft ist.

12. Ein peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 1 oder 3, worin die fortlaufende Kette umfassend D1-L-D2 mit einem Antigen verknüpft ist.

13. Ein peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 1 oder 3, an welches eine Zieleinheit, ein Arzneimittel oder Antigen mittels einer nicht-kovalenten Bindung befestigt ist.

14. Ein peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 1 oder 3 bestehend aus Aggregaten von identischen Bauteilen der Formel (I) verknüpft mit verschiedenen Zieleinheiten, Arzneimitteln und/oder Antigenen.

15. Ein peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 1 oder 3 bestehend aus Aggregaten von verschiedenen Bauteilen der Formel (I) verknüpft mit Zieleinheiten, Arzneimitteln oder Antigenen.

16. Eine pharmazeutische Zusammensetzung umfassend ein peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 10 bis 15.

17. Ein peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 10 bis 15 zur Verwendung in der therapeutischen oder diagnostischen Behandlung von Menschen mit erkrankten Organen oder Geweben.

18. Ein funktionalisiertes peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 1 substituiert mit einem Arzneimittel zur Verwendung als Medikament gegen eine Krankheit, die auf dieses Arzneimittel anspricht.

19. Ein funktionalisiertes peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 1 substituiert mit einem Arzneimittel, welches ein diagnostisches Molekül ist, zur Verwendung als Diagnosemittel zur Bestimmung, ob ein Mensch erkrankte Organe oder Gewebe hat.

20. Ein peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 12 bis 15 zur Verwendung in der Impfung von Menschen oder nicht-menschlichen Tieren.

21. Ein funktionalisiertes peptidisches Nanoteilchen gemäss Anspruch 1 substituiert mit einem Antigen zur Verwendung als Impfstoff für einen Menschen oder ein nichtmenschliches Tier.

22. Ein Verfahren zur Herstellung von peptidischen Nanoteilchen gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass monomere Bauteile der Formel (I) bestehend aus einer fortlaufenden Kette umfassend einen peptidischen Oligomerisierungsbereich D1, ein Verbindungsstück L und einen Oligomerisierungsbereich D2

D1-L-D2 (I)

ins Gleichgewicht gebracht werden, um Aggregate zu bilden.

23. Ein Bauteil der Formel (I) bestehend aus einer fortlaufenden Kette umfassend einen peptidischen Oligomerisierungsbereich D1, ein Verbindungsstück L und einen Oligomerisierungsbereich D2

D1-L-D2 (I),

worin D1 ein synthetisches oder natürliches Peptid mit einer Tendenz zur Bildung von Oligomeren $(D1)_m$ aus m Untereinheiten D1 ist, D2 ein synthetisches oder natürliches Peptid mit einer Tendenz zur Bildung von Oligomeren $(D2)_n$ aus n Untereinheiten D2 ist, m 2 und n 5, oder m 3 und n 4 oder 5, oder m 4 und n 5 ist, L eine Bindung oder ein kurzes Verbindungsstück ist, und worin die fortlaufende Kette gewünschtenfalls eine Zieleinheit und ein Arzneimittel oder ein Antigen trägt.

24. Ein peptidisches Nanoteilchen bestehend aus Aggregaten einer Vielzahl von Bauteilen der Formel (I) bestehend aus einer fortlaufenden Kette umfassend einen peptidischen Oligomerisierungsbereich D1, ein Verbindungsstück L und einen Oligomerisierungsbereich D2

D1-L-D2 (I),

worin D1 ein synthetisches oder natürliches Peptid mit einer Tendenz zur Bildung von Oligomeren $(D1)_m$ aus m Untereinheiten D1 ist, D2 ein synthetisches oder natürliches Peptid mit einer Tendenz zur Bildung von Oligomeren $(D2)_n$ aus n Untereinheiten D2 ist, mit der Bedingung, dass mindestens ein Bereich D1 oder D2 ein synthetisches Peptid ist, m und n je eine Zahl zwischen 2 und 10 ist, mit der Bedingung, dass m ungleich n und nicht ein Vielfaches von n und n nicht ein Vielfaches von m ist, L eine Bindung oder ein kurzes Verbindungsstück ist, und worin D1, D2 und L gewünschtenfalls weiter substituiert sind.

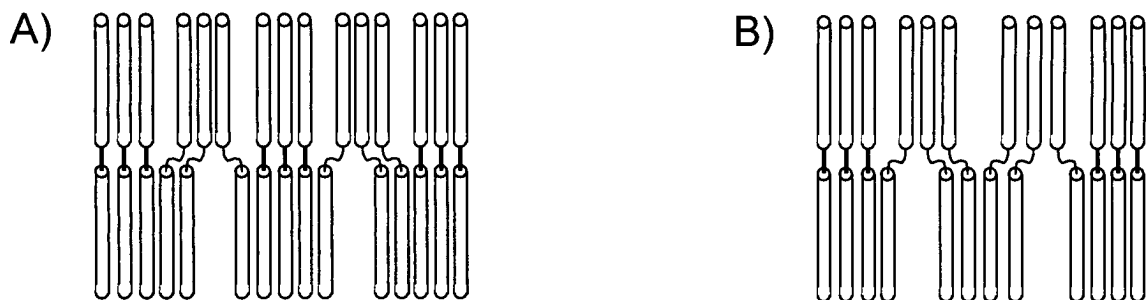
25. Ein peptidisches Nanoteilchen bestehend aus Aggregaten einer Vielzahl von Bauteilen der Formel (I) bestehend aus einer fortlaufenden Kette umfassend einen peptidischen Oligomerisierungsbereich D1, ein Verbindungsstück L und einen Oligomerisierungsbereich D2

D1-L-D2 (I),

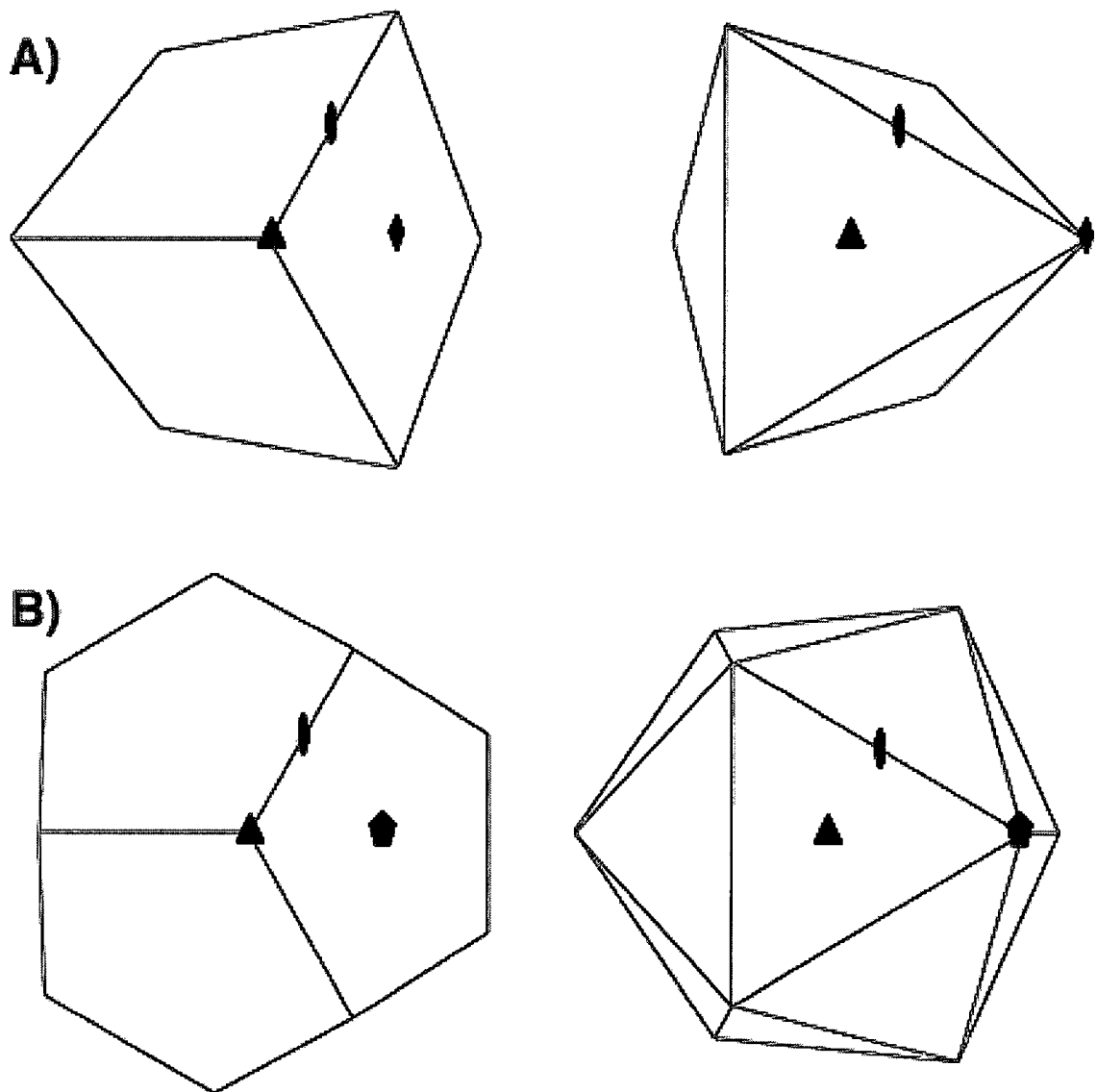
worin D1 ein synthetisches oder natürliches Peptid mit einer Tendenz zur Bildung von Oligomeren $(D1)_m$ aus m Untereinheiten D1 ist, D2 ein synthetisches oder natürliches Peptid mit einer Tendenz zur Bildung von Oligomeren $(D2)_n$ aus n Untereinheiten D2 ist, m und n je eine Zahl zwischen 2 und 10 ist, mit der Bedingung, dass m ungleich n und nicht ein Vielfaches von n und n nicht ein Vielfaches von m ist, L eine Bindung oder ein kurzes Verbindungsstück ist, und worin D1-L-D2 mit einer Zieleinheit, einem Arzneimittel oder einem Antigen verknüpft ist.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

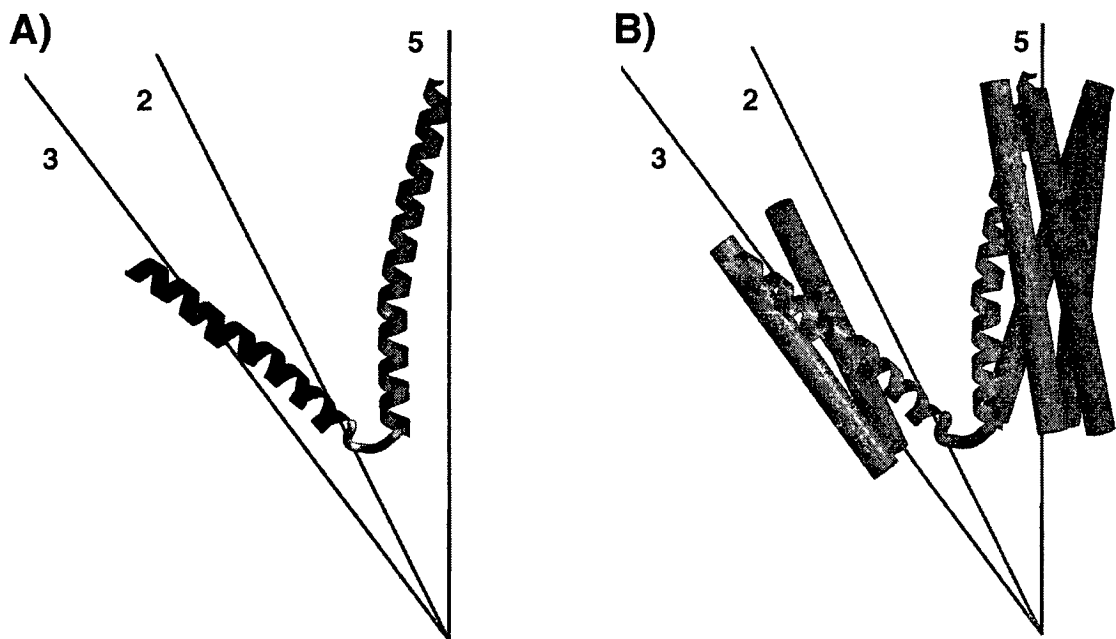
Figur 1



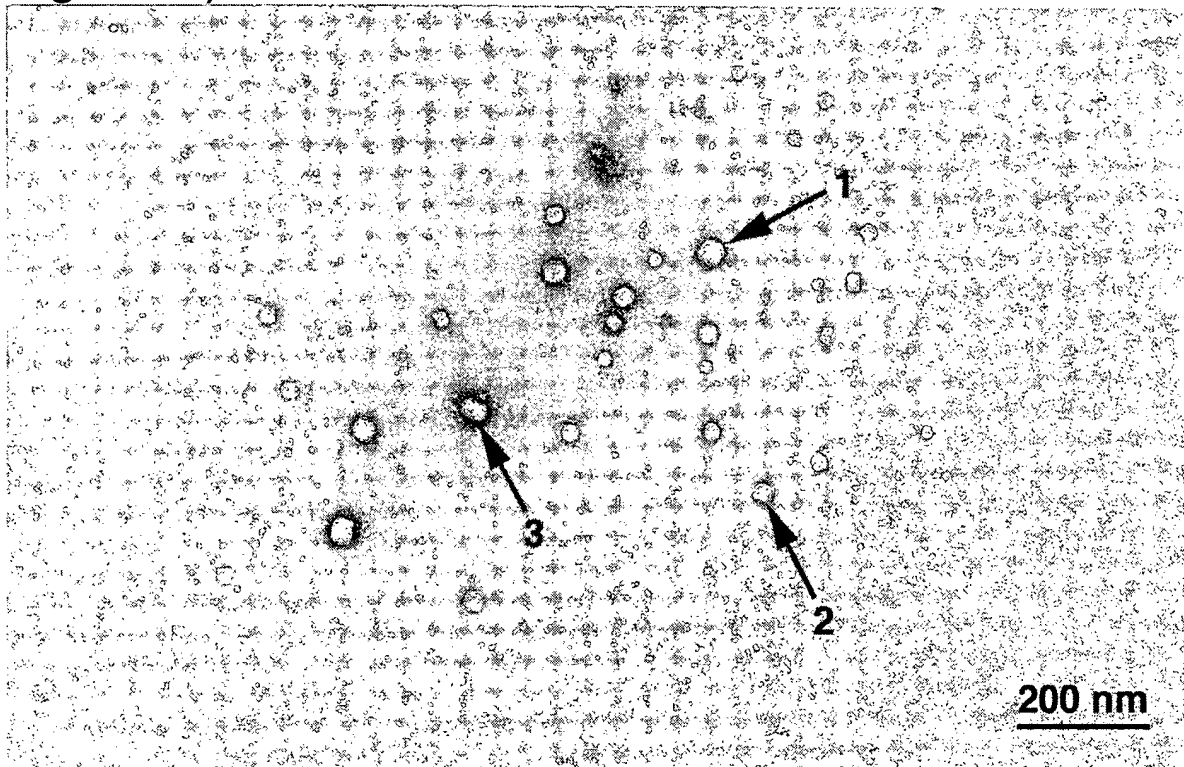
Figur 2



Figur 3



Figur 4A)



Figur 4B)

