

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 938 773**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2013** E 17172220 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2023** EP 3346273

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:

14.04.2023

73 Titular/es:

**PRIAVOID GMBH (100.0%)
Merowinger Platz 1a
40225 Düsseldorf, DE**

72 Inventor/es:

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

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 2 938 773 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 un péptido, que contiene al menos una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 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 la principal causa del desarrollo y progreso de la EA durante algunos años.

15

- 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 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.

20

- 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 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 .

40

- 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.

- 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 -amiloide con una constante de disociación (valor K_D) de 4 μ mol.

50

- 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

- 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.

60

- 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

65

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 una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 (RD2).

También se describen los péptidos SEQ ID NO: 1 (D3-Delta-HTH), 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. Este objetivo también se logra mediante polímeros de la SEQ ID NO: 2 (RD2).

Además, también se describen polímeros de la SEQ ID NO: 1 (D3-Delta-HTH), 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.

Los fragmentos y las partes pueden mostrar un efecto similar o idéntico al de los péptidos.

Los péptidos 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 sus homólogos consisten al 100 % de D-aminoácidos.

Un polímero en el sentido de la presente revelación 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 y sus homólogos, que en sí mismos ya son oligómeros A β .

Según la invención, los polímeros se pueden construir 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.

En una alternativa, los polímeros combinados contienen junto a un péptido de la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 al menos un monómero del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, 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.

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.

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.

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
5 según la invención.

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.

10 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.

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

En una variante no según la invención se trata de un péptido 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 %.

20 «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
25 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
30 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:
35 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.

40 En una variante no según la invención, 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
45 a la secuencia de aminoácidos original (retro = hacia atrás).

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

En otra variante no según la invención, los péptidos tienen secuencias que difieren de las secuencias
50 especificadas en hasta tres aminoácidos

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

55 En otra variante no según la invención, los péptidos presentan fragmentos de las secuencias mencionadas anteriormente o presentan 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.

60 Según la presente invención, el péptido consiste en D-aminoácidos.

En una variante adicional, es un péptido según la invención para el uso *in vivo* para inhibir la formación de fibrillas de péptidos beta amiloides. Los polímeros según la invención desintoxican los oligómeros o polímeros A β
65 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 péptido para el uso *in vivo* 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.

5

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.

10 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.

15

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 tetrámeros derivados de los mismos, preferiblemente

20 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.

25 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.

El objeto de la invención también se refiere a un péptido según la invención para el uso *in vivo* para la formación de péptidos A β agregados.

30

También se describe un procedimiento no según la invención 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.

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

El objeto de la presente invención se refiere además a una composición que comprende el péptido según la invención, para el uso *in vivo* para prevenir oligómeros A β tóxicos, o para destruir polímeros o fibrillas formadas a

40 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.

45

Además, la invención también se refiere a un kit que contiene el péptido según la invención.

En dicho kit, los péptidos según la invención 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

50

puede contener instrucciones para su uso. Tal kit puede, por ejemplo, contener los según la invención 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 *in vivo* según la invención como una sonda para la identificación, determinación cualitativa y/o cuantitativa de oligómeros beta amiloides o fibrillas.

55

También se describe una sonda no según la invención 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

60

temprano, la enfermedad se puede contrarrestar en una etapa muy temprana.

Dichas sondas moleculares pueden contener 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.

65

Después de pasar a través de la barrera hematoencefálica, las sondas pueden unirse a oligómeros y/o placas A β . Los oligómeros y/o placas A β 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.

5

El péptido según la invención también se usa en 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.

10 Los péptidos según la invención se unen particularmente bien a los oligómeros A β , en particular a los oligómeros A β 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
15 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.

20

Ejemplos

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

25

Tabla 1: Lista de derivados D3 evaluados

Nombre del péptido (con explicación)	Secuencia de aminoácidos (D-enantiómero)
D3 (SEQ ID NO: 11)*	rprtrlhthnr
NT-D3 (D3-N-terminal) (SEQ ID NO: 6)*	rprtrl
RD1 (racional D3) (SEQ ID NO: 3)*	pnhhrrrrttl
RD2 (racional D3) (SEQ ID NO: 2)	ptlhthnrrrr
RD3 (racional D3) (SEQ ID NO: 4)*	rrptlrhthnr
D3 Δ hth (D3 con delección hth) (SEQ ID NO: 1)*	rprtrlnr
* ejemplos de comparación 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.
30 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 poliacrilamida con dodecilsulfato sódico. A β sirvió como control sin la adición de péptido.
35 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
45 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 Aβ sin péptido	0
D3*	4
NT-D3*	0
RD1*	3
RD2	20
RD3*	4
D3Δhth*	2
* ejemplos de comparación 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 biotilación 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 coincubación 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.

5 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.

10 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
RPRTLRLRTHQNR (SEQ ID NO: 9)	DB4
RPITRLQTHEQR (SEQ ID NO: 10)	DB5

Descripción de las figuras

15 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 .

25 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.

30 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). 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 .

35 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 afin 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.

REIVINDICACIONES

1. Péptido que contiene al menos una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2 (RD2:ptlhthnrrrrr).
5
2. Péptido según la reivindicación 1, **caracterizado porque** este está unido 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: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID
10 NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y/o SEQ ID NO. 10.
4. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para el uso *in vivo* para la formación de péptidos beta amiloides agregados.
- 15 5. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso *in vivo* para inhibir la formación de fibrillas de péptidos beta amiloides.
6. 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.
20
7. 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.
8. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso en la medicina.
25
9. Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Alzheimer.
10. Composición que contiene un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
30
11. Kit que contiene un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 eventualmente con/en tampones o soluciones.
12. Uso de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 *in vitro* como sonda para la
35 identificación, determinación cuantitativa y/o cualitativa de fibrillas beta amiloides y/u oligómeros beta amiloides.

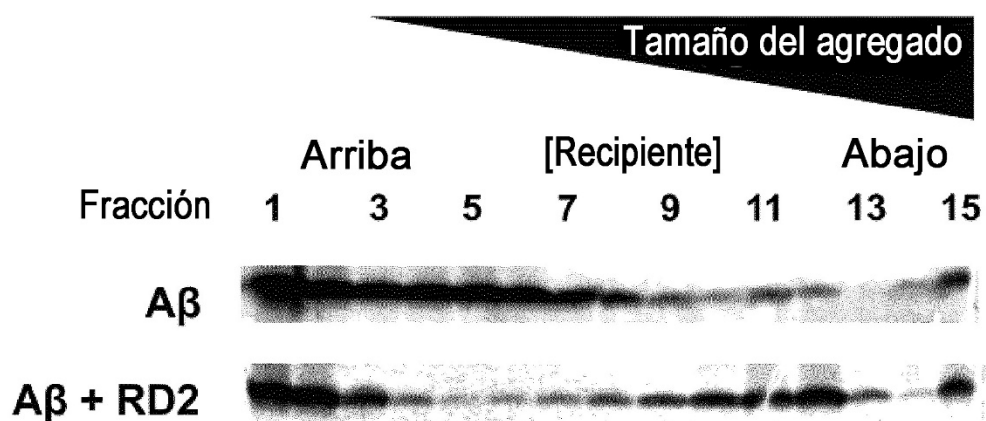


Fig. 1

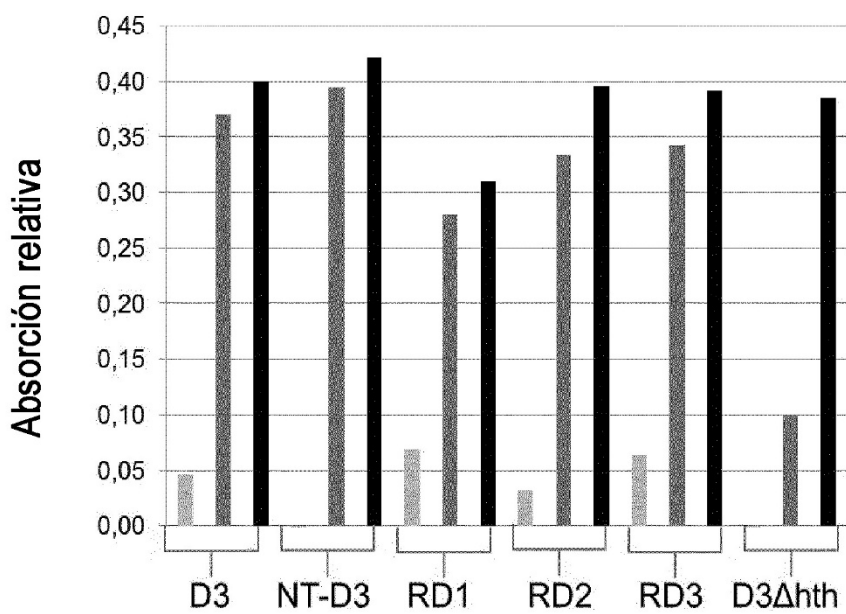


Fig. 2

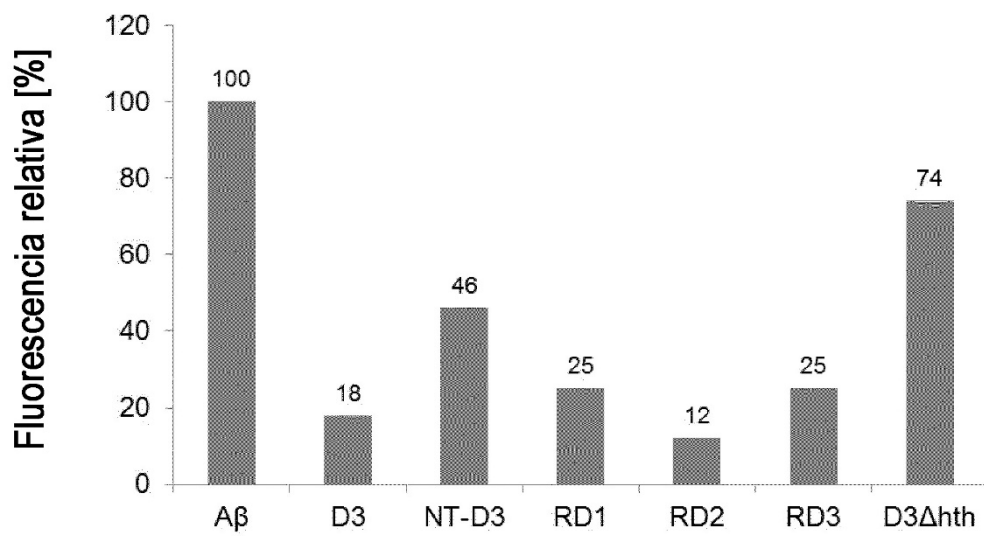


Fig. 3

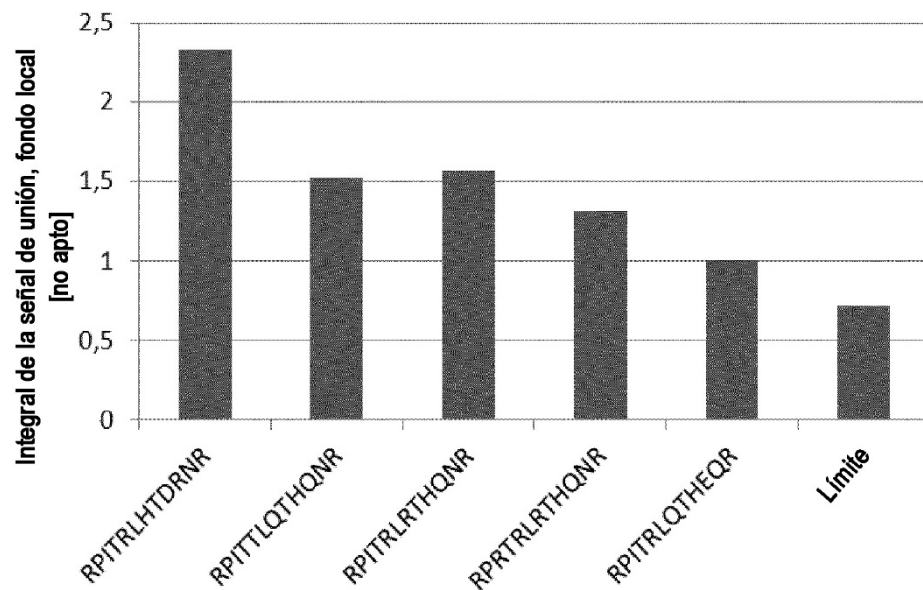


Fig. 4