

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges

Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum

27. Juni 2013 (27.06.2013)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 2013/092952 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:

C07K 16/18 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2012/076552

(22) Internationales Anmeldedatum:

21. Dezember 2012 (21.12.2012)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 201 1 057 021.7

23. Dezember 2011 (23.12.2011)

DE

(71) Anmelder: FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH
GMBH [DE/DE]; 52425 Jülich (DE).

(72) Erfinder: WILLBOLD, Dieter; Theodor-Heuss-Str. 179,
52425 Jülich (DE). FUNKE, Susanne Aileen; Denkmalstr.
14, 52445 Titz (DE). WANG-DIETRICH, Lei; Grünstr.
12, 52428 Jülich (DE). BIRKMANN, Eva; Novalisstr. 7,
Korschenbroich 41352 (DE). BANNACH, Oliver; Elsa-
Brandström-Str. 34, 40595 Düsseldorf (DE).

(74) Anwalt: FITZNER, Uwe; Hauser Ring 10, 40878
Ratingen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts (Regel 48 Absatz
2 Buchstabe g)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5
Absatz 2 Buchstabe a)

(54) Title: METHOD FOR SELECTIVELY QUANTIFYING A-BETA AGGREGATES

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR SELEKTIVEN QUANTIFIZIERUNG VON A-BETA-AGGREGATEN

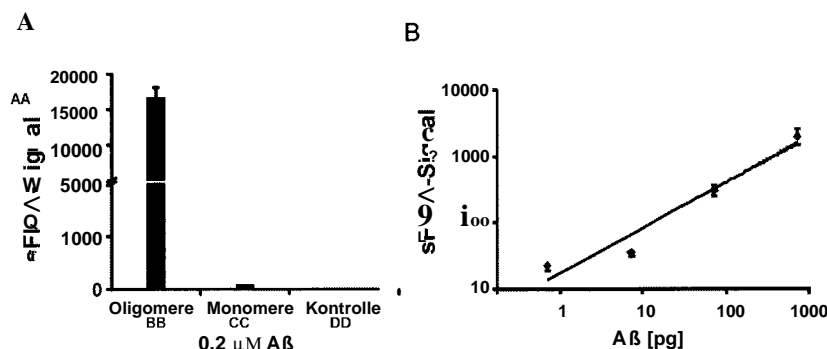


Fig. 5

FIG 5
AA sFIDA signal
BB Oligomers
CC Monomers
DD Contr.

(57) Abstract: The invention relates to methods for selectively quantifying a-beta aggregates, comprising the immobilization of anti a-beta antibodies on a Substrate, the application of the sample to be examined on the Substrate, the addition of probes marked for detection, which mark said probes by specific binding to a-beta aggregates, and the detection of the marked aggregates.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur selektiven Quantifizierung von A-Beta-Aggregaten, umfassend die Immobilisierung von Anti-A-Beta-Antikörpern auf einem Substrat, Auftragen der zu untersuchenden Probe auf das Substrat, Hinzufügen von für die Detektion gekennzeichneten Sonden, die diese durch spezifische Bindung an A-Beta-Aggregate markieren und Detektion der markierten Aggregate.



WO 2013/092952 A2

Verfahren zur selektiven Quantifizierung von A-Beta-Aggregaten

- Die Erfindung betrifft Verfahren zur selektiven Quantifizierung von A-Beta-Aggregaten
- 5 umfassend die Immobilisierung von A-Beta-Fängermolekülen auf einem Substrat, Auftragen der zu untersuchenden Probe auf das Substrat, Hinzufügen von für die Detektion gekennzeichneten Sonden, die durch spezifische Bindung an A-Beta-Aggregate diese markieren und Detektion der markierten Aggregate.
- 10 A-Beta-Aggregate treten bei der Alzheimer-Krankheit (AD, Alzheimersche Demenz, lateinisch = Morbus Alzheimer) auf. Diese gehört neben Morbus Parkinson z.B. zu einer heterogenen Gruppe klinischer Zustände, deren gemeinsames Kriterium in vielen Fällen (aber nicht ausschließlich) extrazelluläre, systemische oder lokale Ablagerungen eines jeweils spezifischen Proteins ist, meist in der geordneten
- 15 Konformation von Beta-Faltblattstruktur. Die altersbedingte Demenz stellt in der heutigen Gesellschaft ein immer größeres Problem dar, da durch die gestiegene Lebenserwartung immer mehr Menschen davon betroffen sind und sich die Krankheit somit auf die sozialen Sicherungssysteme und deren Finanzierbarkeit auswirkt.
- 20 Pathologische Aggregate aus körpereigenen Proteinen, wie z.B. Oligomere oder Fibrillen, treten in vielen neurodegenerativen Erkrankungen auf. Bei der Alzheimerschen Demenz findet man z.B. im Gehirn Amyloid-Beta-Peptid-Ablagerungen (A-Beta-Peptid-Ablagerungen) und bei Morbus Parkinson Synuclein-Ablagerungen. Die Amyloid-Beta-Peptid-Ablagerungen (oder Peptid-Fibrillen) stellen
- 25 allerdings lediglich das Endstadium eines Prozesses dar, der mit der Abspaltung von monomeren Amyloid-Beta-Peptiden aus APP (Amyloid Precursor Protein) beginnt, anschließend neurotoxische Amyloid-Beta-Peptid-Oligomere ausbildet und schließlich oder alternativ mit Amyloid-Beta-Peptid-Fibrillen, abgelagert in Plaques, endet. Pathologische Hauptmerkmale der AD sind die Bildung von senilen oder
- 30 amyloiden Plaques, bestehend aus dem A-Beta-Peptid, und zusätzlichen neurofibrillären Ablagerungen aus dem Tau-Protein. Das Vorläufer-Protein des A-

Beta-Peptides, APP, ist in der Zellwand von Neuronen lokalisiert. Durch proteolytischen Abbau und nachträgliche Modifikation entstehen daraus A-Beta-Fragmente unterschiedlicher Länge und Art, wie z.B. A-Beta 1-40, A-Beta 1-42 oder pGluA-Beta 3-42. Monomere A-Beta-Peptide entstehen während des gesamten Lebens auch im gesunden Organismus.

Gemäß der Amyloid-Kaskaden-Hypothese aus den 1990er Jahren sind die A-Beta-Ablagerungen in Form von Plaques die Auslöser der Krankheitssymptome. In den letzten Jahren weisen jedoch unterschiedliche Studien darauf hin, dass besonders die kleinen, frei diffundierenden A-Beta-Oligomere die größte Toxizität unter allen A-Beta-Spezies besitzen und für die Entstehung und den Fortschritt der AD verantwortlich sind. Somit sind Aggregate des A-Beta-Peptides unmittelbar mit der AD-Pathogenese verknüpft.

Eine sichere Diagnose der AD ist heutzutage erst nach Auftreten von auffälligen, klinischen Symptomen möglich, man geht dabei von einer Zuverlässigkeit von maximal 90 % aus. Einzige bisher sichere Diagnosemöglichkeit besteht z.Z. erst nach dem Tod des Patienten durch histologischen Nachweis unterschiedlicher Veränderungen im Gehirn.

Demgemäß besteht ein Bedarf an Verfahren zur Identifizierung und quantitativer Erfassung von A-Beta-Aggregaten, insbesondere von kleinen, frei diffundierenden A-Beta-Oligomeren bzw. -Aggregaten.

Bis heute sind nur wenige Methoden zur Charakterisierung und Quantifizierung von pathogenen Aggregaten oder Oligomeren in Geweben und Körperflüssigkeiten beschrieben worden.

Verbindungen, die an Abeta binden und dessen Aggregation inhibieren, sind zum Beispiel aus *Chafekar et al.* (ChemBioChem 2007, 8, 1857 - 1864) bekannt. Diese Substanzen bestehen aus Teilen des Abeta-Peptides (KLVFF-Sequenz) und dienen therapeutischen Absichten, eine Charakterisierung und Quantifizierung von pathogenen Aggregaten oder Oligomeren in Geweben und Körperflüssigkeiten wird

damit nicht durchgeführt.

Zurzeit gibt es noch keine allgemein anerkannten Kriterien und/oder Nachweise, sog. Biomarker, für AD. Ein Ansatzpunkt für solche Biomarker war bisher die Verwendung von PET-Radio-Tracern für bildgebende Verfahren, der auf der Annahme beruht, dass die radioaktiv markierten Substanzen Amyloidplaques binden und somit nach Detektion ein Maß für die Plaqueablagerung sein könnten. Trotz eines offensichtlichen Zusammenhangs zwischen PET-Signal und Erkrankung konnte bisher noch nicht gezeigt werden, dass dadurch eine sichere Diagnose möglich ist, da auch viele nicht-demente Personen eine hohe Tracerretention zeigen. Nachteilig für dieses Verfahren sind auch die hohen Kosten sowie der notwendige technische Aufwand an Geräten, die nicht überall verfügbar sind.

Als weiterer Ansatzpunkt werden z.Z. die Mengen verschiedener Substanzen im Blut oder Liquor (CSF) von Patienten untersucht und deren Nutzen als Biomarker analysiert. Eine von diesen Substanzen ist das A-Beta-Peptid. Bisher erscheint am zuverlässigsten die Bestimmung des Gehalts an monomerem Abeta im Liquor von Patienten zu sein, evtl. kombiniert mit der Bestimmung der Tau-Konzentration. Es gibt allerdings eine so hohe Variation der Werte, dass für ein Individuum keine zuverlässige Diagnose mittels solcher Biomarker gestellt werden kann. Der Einsatz eines solchen Verfahrens ist aus der DE 69533623 T2 bekannt. Trotz dieser unterschiedlichen Ansätze konnte sich bisher noch kein zuverlässiger Biomarker durchsetzen.

Erschwerend kommt hinzu, dass für die spezifische Quantifizierung von A-Beta-Aggregaten in Abgrenzung zu A-Beta-Monomeren und/oder des A-Beta-Gesamtgehalts bisher nur wenige Nachweissysteme verfügbar sind. Als ein mögliches Nachweissystem werden bisher ELISAS eingesetzt, in denen die A-Beta-Oligomere durch Antikörper detektiert werden. Die darin eingesetzten Antikörper erkennen entweder nur ganz bestimmte Arten von A-Beta-Oligomeren, oder unspezifisch andere Oligomere, die nicht aus A-Beta-Peptiden bestehen, sondern aus ganz anderen Proteinen, was sich auf die Auswertung nachteilig auswirkt.

Der Einsatz von ELISA-gestützten Verfahren mittels Konformer-spezifischer Antikörper ist zum Beispiel aus der WO2005/01 8424 A2. bekannt.

Als weiteres Nachweisverfahren dienen Sandwich-ELISA-Messungen. Hier werden A-Beta-spezifische Antikörper eingesetzt, um A-Beta-Moleküle zu immobilisieren. Die gleichen Antikörper werden anschließend auch zur Detektion eingesetzt. Monomere führen nach diesem Verfahren zu keinem Signal, da die Antikörper-Bindungsstelle schon durch die Fängermoleküle besetzt ist. Spezifische Signale werden somit nur von Dimeren oder größeren Oligomeren erzeugt. In der Auswertung ermöglicht ein solches Verfahren allerdings nur die Quantifizierung der Summe aller in einer Probe vorhandenen Aggregate und nicht die Charakterisierung von Einzelaggregaten. Um einzelne A-Beta-Aggregate sicher nachzuweisen und zu quantifizieren, fehlt den ELISA-gestützten Verfahren auch die dazu notwendige Empfindlichkeit. Der Einsatz eines solchen Sandwich-ELISA-Verfahrens ist aus der WO2008/070229 A2 bekannt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, einen Biomarker für Proteinaggregationserkrankungen, insbesondere AD, sowie ein ultraempfindliches Verfahren zur Quantifizierung und Charakterisierung von A-Beta-Aggregaten zur Verfügung zu stellen. Durch Charakterisierung des Biomarkers, also Bestimmung der Anzahl, Menge und/oder Größe dieser Substanz (Biomarker) in einer körpereigenen Flüssigkeit oder Gewebe soll eine genaue Diagnose der Krankheit und/oder Informationen über den Verlauf der Krankheit und den Zustand des Patienten ermöglicht werden.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein Verfahren zur selektiven Quantifizierung von pathogenen Aggregaten, die eine Proteinaggregationserkrankung hervorrufen und/oder kennzeichnen, insbesondere von A-Beta-Aggregaten jeglicher Größe und Zusammensetzung, A-Beta-Oligomeren und gleichzeitig auch kleinen, frei diffundierenden A-Beta-Oligomeren zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird erfüllt durch ein Verfahren zur selektiven Quantifizierung und/oder Charakterisierung von A-Beta-Aggregaten umfassend folgende Schritte:

- a) Auftragen der zu untersuchenden Probe auf das Substrat,
- b) Hinzufügen von für die Detektion gekennzeichneten Sonden, die durch spezifische Bindung an A-Beta-Aggregate diese markieren

und

- c) Detektion der markierten Aggregate, wobei Schritt b) vor Schritt a) durchgeführt werden kann.

- 5 Charakterisierung der A-Beta-Aggregate beziehungsweise A-Beta-Oligomere bedeutet Bestimmung der Form, Größe und/oder Zusammensetzung.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung bezeichnet der Begriff A-Beta-Monomer ein Peptid-Molekül, das ein Teil des Amyloidvorläuferproteins APP ist, der unter dem
10 Namen A-Beta bekannt ist. Je nach Herkunftsspezies (Mensch und/oder Tier) und Prozessierung kann die genaue Aminosäuresequenz eines A-Beta-Monomeres in Länge und Art variieren.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung bezeichnet der Begriff A-Beta-Oligomere sowohl A-Beta-Aggregate als auch A-Beta-Oligomere und auch kleine, frei
15 diffundierende A-Beta-Oligomere. Oligomer im Sinne der Erfindung ist ein Polymer gebildet aus 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 oder 20 Monomeren oder Vielfachen davon. Dabei können, es müssen aber nicht, alle A-Beta-Monomere in einem A-Beta-Oligomer identisch zueinander sein.

Somit sind unter A-Beta-Aggregaten sowohl A-Beta-Oligomere als auch kleine, frei
20 diffundierende A-Beta-Oligomere zu verstehen. Dies schließt auch Aggregate ein, wie zum Beispiel Bruchstücke von Fibrillen, „Protofibrillen“, „ADDLs“, p56* bezeichnet werden. Wesentlich für die vorliegende Erfindung ist, dass es sich bei den A-beta-Aggregaten bzgl. der Größe um Aggregate bzw. Polymere handelt, die sich im Körper bewegen können und nicht aufgrund ihrer Größe in Form von Amyloid-Beta-
25 Peptid-Plaques-Ablagerungen im Körper immobilisiert sind.

Als Substrat wird erfindungsgemäß ein Material gewählt, das eine möglichst geringe, unspezifische Bindungskapazität, insbesondere bezüglich A-Beta-Oligomeren, besitzt.

30 In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung wird ein Substrat aus Glas gewählt. Das Substrat kann mit hydrophilen Stoffen, bevorzugt Poly-D-Lysin, Polyethylenglykol (PEG) oder Dextran beschichtet werden.

In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung wird die Glasoberfläche hydroxyliert und anschließend mit Aminogruppen aktiviert.

Zur Vorbereitung des Substrats auf die Beschichtung werden ein oder mehrere der folgenden Schritte durchgeführt:

- 5 Waschen eines Substrats aus Glas bzw. eines Glaträgers im Ultraschallbad oder Plasma-cleaner, alternativ dazu in 5 M NaOH mindestens 3 Stunden inkubieren,
Spülen mit Wasser und anschließendem Trocknen unter Stickstoff,
- 10 Eintauchen in eine Lösung aus konzentrierter Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid im Verhältnis 3:1 für die Aktivierung der Hydroxylgruppen,
Spülen mit Wasser bis zu einer neutralen pH, anschließend mit Ethanol und Trocknen unter Stickstoffatmosphäre,
- 15 Eintauchen in eine Lösung mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) (1 - 7 %) in trockenem Toluol oder einer Lösung von Ethanolamin,
Spülen mit Aceton oder DMSO und Wasser und Trocknen unter Stickstoffatmosphäre.

Für die Beschichtung mit Dextran, bevorzugt Carboxymethyl-Dextran (CMD), wird das Substrat mit einer wässrigen Lösung von CMD (in einer Konzentration von 10
20 mg/ml oder 20 mg/ml) und gegebenenfalls N-Ethyl-N-(3-Dimethylaminpropyl) Carbodiimid (EDC), (200 mM) und N-Hydroxysukzinimid (NHS), (50 mM) inkubiert und anschließend gewaschen.

Das Carboxymethyl-Dextran ist in einer Variante kovalent an die Glasoberfläche
25 gebunden, die zunächst hydroxyliert und anschließend mit Aminogruppen aktiviert wurde, wie oben beschrieben.

Als Substrat können auch Mikrotiterplatten, bevorzugt mit Glasboden, eingesetzt werden. Da bei der Verwendung von Polystyrolrahmen der Einsatz von
30 konzentrierter Schwefelsäure nicht möglich ist, erfolgt die Aktivierung der Glasoberfläche in einer Ausführungsvariante der Erfindung analog *Janissen et al.* (Colloids Surf B Biointerfaces, 2009, 71(2), 200-207).

In einer Alternative der vorliegenden Erfindung werden auf dem Substrat Fängermoleküle immobilisiert, um die A-Beta-Aggregate zu fangen und fixieren.

Bevorzugt werden als Fängermoleküle Anti-A-Beta-Antikörper eingesetzt.

In einer Alternative sind die Fängermoleküle kovalent an das Substrat gebunden.

- 5 In einer weiteren Alternative sind die Fängermoleküle kovalent mit der Beschichtung, bevorzugt Dextranschicht verbunden.

Die Anti-A-Beta-Antikörper binden spezifisch ein Epitop der A-Beta-Aggregate. In einer Alternative der vorliegenden Erfindung hat das Epitop eine Aminosäuresequenz

- 10 des aminoterminalen Teils des A-Beta-Peptids, ausgewählt aus den Teilbereichen A-Beta 1 - 8 (SEQ ID NO: 2), A-Beta 1 - 11 (SEQ ID NO: 3), A-Beta 1 - 16 (SEQ ID NO: 4), A-Beta 3-11 (SEQ ID NO: 5) und pyroGluA-Beta 3-11 (SEQ ID NO: 6), A-Beta 11 - 16 (SEQ ID NO: 7) und pyroGluA-Beta 11-16 (SEQ ID NO: 8), zum Beispiel des humanen N-terminale Epitops (mit folgender Sequenz: DAEFRHDSGYE (1-11, SEQ
15 ID NO: 3).

In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung werden die Fängermoleküle (Antikörper), gegebenenfalls nach einer Aktivierung des mit CMD beschichteten Trägers durch eine Mischung aus EDC/NHS (200 bzw. 50 mM), auf dem Substrat
20 immobilisiert.

Verbleibende Carboxylat-Endgruppen, an die keine Fängermoleküle gebunden wurden, können deaktiviert werden.

- Zur Deaktivierung dieser Carboxylat-Endgruppen auf dem CMD-Spacer wird Ethanolamin in DMSO verwendet. Vor dem Auftrag der Proben werden die Substrate
25 bzw. Träger mit PBS gespült.

Die zu vermessende Probe wird auf dem so präparierten Substrat inkubiert.

- In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung erfolgt das Auftragen der Probe
30 unmittelbar auf dem Substrat (nichtbeschichteten Substrat), gegebenenfalls durch kovalente Bindung auf der gegebenenfalls aktivierten Oberfläche des Substrats.

In einer Variante der vorliegenden Erfindung erfolgt eine Vorbehandlung der Probe nach einem oder mehreren der folgenden Verfahren:

- Erhitzen (auf eine Temperatur bis zum Siedepunkt der Probe)
- Ein oder mehrere Gefrierauftauzyklen,
- Verdünnen mit Wasser oder Puffer,
- Behandlung mit Enzymen, zum Beispiel Proteasen, Nuklease, Lipasen,
- 5 - Zentrifugieren,
- Präzipitation,
- Konkurrenz mit Sonden, um eventuell vorhandene Anti-A-beta-Antikörper zu verdrängen.

10 In einem weiteren Schritt werden A-Beta-Aggregate von Sonden markiert, die für eine spätere Detektion gekennzeichnet sind.

In einer Variante der vorliegenden Erfindung werden als Sonden Anti-A-Beta-Antikörper eingesetzt. Fängermoleküle und Sonden können identisch sein.

15 In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung unterscheiden sich Fängermoleküle und Sonden. So können z.B. unterschiedliche Anti-A-Beta-Antikörper als Fängermoleküle und Sonden eingesetzt werden. In einer weiteren Ausführung der vorliegenden Erfindung werden Fängermoleküle und Sonden eingesetzt, die mit Ausnahme der eventuellen Farbstoffmarkierung identisch zueinander sind. In einer
20 Alternative der vorliegenden Erfindung werden verschiedene Sonden eingesetzt, die mit Ausnahme der eventuellen Farbstoffmarkierung identisch zueinander sind. In weiteren Alternative der vorliegenden Erfindung werden mindestens 2 oder mehrere unterschiedliche Fängermoleküle und/oder Sonden eingesetzt, die aus unterschiedlichen Anti-A-Beta-Antikörper sind und gegebenenfalls auch
25 unterschiedliche Farbstoffmarkierung haben.

Als Fängermoleküle können aber auch unterschiedliche Moleküle eingesetzt werden, wie z.B. unterschiedliche Anti-A-Beta-Antikörper. Fängermoleküle können spezifische Aminosäuresequenzen des A-Beta-Peptids sein, zum Beispiel A-Beta 1-40/42, pyroGlu 3-40/42 oder pyroGlu 11-40/42.

30 Ebenso können als Sonden mehrere, unterschiedliche Moleküle eingesetzt werden, wie z.B. unterschiedliche Anti-A-Beta-Antikörper.

Zur späteren Qualitätskontrolle der Oberfläche, zum Beispiel Gleichmäßigkeit der

Beschichtung mit Fängermolekülen, können Fängermoleküle, gekennzeichnet mit Fluoreszenzfarbstoffen, eingesetzt werden. Hierzu wird bevorzugt ein Farbstoff verwendet, der nicht mit der Detektion interferiert. Dadurch wird eine nachträgliche Kontrolle des Aufbaus möglich sowie eine Normierung der Messergebnisse.

5

In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung werden als Sonden Anti-A-Beta-Antikörper eingesetzt, die spezifisch an das N-terminale Epitop des A-Beta-Peptids binden.

10 Zur Detektion sind die Sonden so gekennzeichnet, dass sie ein optisch detektierbares Signal aussenden, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Fluoreszenz-, Biolumineszenz- und Chemolumineszenz-Emission sowie Absorption. In einer Alternative sind die Sonden mit Farbstoffen gekennzeichnet. Bevorzugt handelt es sich hierbei um Fluoreszenzfarbstoffe.

15

In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung werden mindestens 2, 3, 4, 5, 6 oder mehr unterschiedliche Sonden eingesetzt. Die Sonden können sich sowohl bezüglich ihrer spezifischen Bindung an die A-Beta-Aggregate als auch bezüglich ihrer unterschiedlichen Kennzeichnung, z.B. durch Fluoreszenzfarbstoffe, unterscheiden.

20 Es können auch Sonden miteinander kombiniert werden, die geeignet sind FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) als Detektion zu verwenden.

Der Einsatz mehrerer, unterschiedlicher Sonden, die durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gekennzeichnet sind, erhöht die Spezifität des bei der
25 Messung erhaltenen Korrelationssignals. Zusätzlich wird dadurch auch das Ausblenden von A-Beta-Monomeren möglich. Die Detektion von A-Beta-Monomeren kann insbesondere ausgeschlossen werden, falls Sonde und Fängermolekül identisch sind, oder beide ein überlappendes Epitop erkennen.

30 In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung werden Sonden eingesetzt, die spezifisch für eine bestimmte A-Beta-Aggregatspezies sind, wie z.B. A-Beta (x - 40), A-Beta (x - 42) oder Pyro-Glutamat-A-Beta (3 - x), Pyro-Glutamat-A-Beta (11 - x). X ist eine ganze, natürliche Zahl zwischen 1 und 40 beziehungsweise 42, wobei der

Fachmann auf Grundlage seiner Kenntnis der Sequenz des A-Beta-Peptids die Länge zu verwendenden Sequenz bestimmt. In einer weiteren Alternative können Sonden verwendet werden, die spezifisch für bestimmte A-Beta-Aggregat-Formen sind, wie z.B. die im Handel erhältlichen Antikörper „A-11“ oder „1-1 1“.

- 5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch die Nutzung oder Verwendung A-Beta-Aggregat-spezifischer, bzw. A-Beta-Oligomer-spezifischer Sonden. Diese binden spezifisch an ein bestimmtes A-Beta-Aggregat, bzw. A-Beta-Oligomer, bevorzugt für die oben genannten Spezies. Durch die spezifische Bindung an ein bestimmtes A-Beta-Aggregat, bzw. A-Beta-Oligomer kann die Art und/oder
- 10 Größe sowie der Aufbau der A-Beta-Aggregat, bzw. A-Beta-Oligomer bestimmt werden.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit auch A-Beta-Aggregat-spezifische, bzw. A-Beta-Oligomer-spezifische Sonden.

- 15 In einer weiteren Alternative können als Sonden A-Beta-Peptide, gekennzeichnet mit Fluoreszenzfarbstoffen, verwendet werden.

- Als zu untersuchende Probe können körpereigene Flüssigkeiten oder Gewebe eingesetzt werden. In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung wird die Probe
- 20 ausgewählt aus Liquor (CSF), Blut, Plasma und Urin. Die Proben können unterschiedliche, dem Fachmann bekannte, Aufbereitungsschritte durchlaufen.

Vorteil der vorliegenden Erfindung ist die Möglichkeit der Bestimmung von A-Beta-Aggregaten in unbehandelten Proben, bevorzugt CSF.

- 25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch ein Verfahren zur Bestimmung der Zusammensetzung, Größe und/oder Form von A-Beta-Aggregaten. Hierbei werden die oben genannten und beschriebenen Verfahrensschritte eingesetzt.

- 30 Die Detektion der markierten Aggregate erfolgt durch Scannen oder andere Arten der Oberflächenabbildung. Die Detektion erfolgt bevorzugt mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie, Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS), insbesondere in Kombination mit Kreuzkorrelation und Single-Particle-Immunosolvent

Laserscanning-Assay und/oder Laser-Scanning-Mikroskop (LSM).

Die Detektion wird in einer Alternative der vorliegenden Erfindung mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop durchgeführt.

- 5 In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung wird ein Laserfokus, wie er z.B. in der Laser-Scanning-Mikroskopie verwendet wird, oder ein FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy System), dazu eingesetzt, sowie die entsprechenden supraauflösenden Varianten wie zum Beispiel STED oder SIM. Alternativ dazu kann die Detektion durch ein TIRF-Mikroskop erfolgen, sowie die entsprechenden
10 supraauflösenden Varianten davon, wie zum Beispiel STORM, dSTORM. Demgemäß sind in der Ausführung der Erfindung Verfahren, die auf einem nicht-orts aufgelöstem Signal beruhen, wie ELISA oder Sandwich-ELISA, ausgeschlossen.

- Bei der Detektion ist eine hohe Ortsauflösung vorteilhaft. In einer Ausführung des
15 erfindungsgemäßen Verfahrens werden dabei so viele Datenpunkte gesammelt, dass die Detektion eines Aggregates vor einem Hintergrundsignal, welches z.B. durch gerätespezifisches Rauschen, andere unspezifische Signale oder unspezifisch gebundene Sonden verursacht wird, ermöglicht. Auf diese Weise werden so viele Werte ausgelesen (Readout-Werte), wie orts-aufgelöste Ereignisse, wie z.B. Pixel,
20 vorhanden sind. Durch die Ortsauflösung wird jedes Ereignis vor dem jeweiligen Hintergrund bestimmt und stellt so einen Vorteil gegenüber ELISA-Verfahren ohne orts aufgelöstem Signal dar.

- In einer Alternative werden in dem erfindungsgemäßen Verfahren mehrere
25 unterschiedliche Sonden eingesetzt. Dadurch wird die Information, d.h. die ausgelesenen Werte vervielfacht, da für jeden Punkt, für jedes Aggregat oder für jedes Detektionseignis eine separate Information erhalten wird in Abhängigkeit der jeweiligen Sonde, die das Signal liefert. So wird für jedes Ereignis die Spezifität des Signals erhöht. Dadurch kann für jedes detektierte Aggregat auch seine
30 Zusammensetzung bestimmt werden, d.h. die Art des Aggregats, also die Zusammensetzung aus Abeta-Spezies, wie z.B. A-Beta (1 - 40), A-Beta (1 - 42), Pyro-Glutamat-A-Beta (3 - 40/42, 11-40/42) oder Mischungen daraus.

Die Zahl der unterschiedlichen Sonden wird dabei nur durch die Interferenz der zu

verwendenden Fluoreszenzfarbstoffen begrenzt. So könne 1, 2, 3, 4 oder mehrere unterschiedliche Sonden-Farbstoff-Kombinationen verwendet werden.

5 Wesentlich für die Auswertung gemäß dem oben beschriebenen Verfahren sind orts-
aufgelöste Informationen. Dabei kann es sich z.B. um die Art und/oder Intensität der
Fluoreszenz handeln. Bei Auswertung dieser Daten für alle eingesetzten und
detektierten Sonden wird erfindungsgemäß die Anzahl der Aggregate, deren Form,
Größe und/oder deren Zusammensetzung bestimmt. Dabei können Informationen
10 über die Größe der Oligomere direkt oder indirekt erhalten werden, abhängig davon,
ob die Partikel kleiner oder größer als die Ortsauflösung der verwendeten
Abbildungsverfahren sind, in einer Ausführung können Algorithmen zur
Hintergrundminimierung eingesetzt werden und/oder Intensität-Schwellenwerte
angewendet werden.

15 Als Fluoreszenzfarbstoff können die dem Fachmann bekannten Farbstoffe eingesetzt
werden. Alternativ können GFP (Green Fluorescence Protein), Konjugate und/oder
Fusionsproteine davon, sowie Quantendots verwendet werden.

20 Durch die Verwendung von internen oder externen Standards sind Testergebnisse
objektiv miteinander vergleichbar und damit aussagekräftig.

In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung werden ein interner oder externer
Standard zur Quantifizierung von A-Beta-Aggregaten eingesetzt.

25 In Anlehnung an die Analyse der Verteilung der Fluoreszenzintensität (FIDA-
Fluoreszenz-Intensity-Distribution-Analysis) handelt es sich bei dem
erfindungsgemäßen Verfahren um ein sog. Oberflächen-FIDA (Surface-FIDA).

30 Durch Wahl der Fänger - und Sonden-Moleküle lässt sich bestimmen, welche Größe
die Oligomere besitzen müssen, um zur Detektion (Signal) beitragen zu können.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist zusätzlich auch die genaue Analyse der
kleinen, frei diffundierbaren A-Beta-Aggregate möglich. Aufgrund ihrer Größe, die
unterhalb ihrer Auflösung für Lichtmikroskope liegt, konnten diese kleinen A-Beta-

Oligomere schwer von der Hintergrundfluoreszenz (verursacht z.B. durch nicht gebundene Antikörper) unterschieden werden.

5 Neben der extrem hohen Sensitivität zeigt das erfindungsgemäße Verfahren auch eine Linearität in Bezug auf die Anzahl der A-Beta-Aggregate über einen großen Bereich.

10 Weiterer Gegenstand der vorläufigen Erfindung ist die Verwendung der kleinen, frei diffundierbaren A-Beta-Aggregate als Biomarker zum Nachweis und für die Erkennung von Proteinaggregationserkrankungen, insbesondere AD. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Erkennung und/oder Nachweis von Proteinaggregationserkrankungen, insbesondere AD, dadurch gekennzeichnet, dass eine Probe einer Körperflüssigkeit eines Patienten, bevorzugt CSF, mit dem erfindungsgemäßen, oben beschriebenen Verfahren analysiert wird.

15 In einer Variante der vorliegenden Erfindung werden interne oder externe Standards eingesetzt.

20 Solche Standards zur Quantifizierung von Oligomeren oder pathogenen Aggregaten, die eine Proteinaggregationserkrankung oder eine amyloide Degeneration oder Proteinefehlfaltungserkrankung kennzeichnen, sind dadurch gekennzeichnet, dass ein Polymer aus Polypeptidsequenzen aufgebaut wird, die bezüglich ihrer Sequenz identisch im entsprechenden Teilbereich mit den körpereigenen Proteinen sind oder eine Homologie von mindestens 50 % über den entsprechenden Teilbereich mit den körpereigenen Proteinen aufweisen, die eine Proteinaggregationserkrankung oder
25 eine amyloide Degeneration oder Proteinefehlfaltungserkrankung kennzeichnen, wobei die Polymere nicht aggregieren.

30 Als Standard im Sinne der vorliegenden Erfindung wird eine allgemein gültige und akzeptierte, feststehende Bezugsgröße bezeichnet, die zum Vergleichen und Bestimmen von Eigenschaften und/oder Menge dient, insbesondere zur Bestimmung der Größe und Menge von pathogenen Aggregaten aus körpereigenen Proteinen. Der Standard im Sinne der vorliegenden Erfindung kann zum Kalibrieren von Geräten und/oder Messungen verwendet werden.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung können unter dem Begriff „Proteinaggregationserkrankung“ auch amyloide Degenerationen und Proteinfehlfaltungserkrankungen zusammengefasst werden. Beispiele solcher

5 Krankheiten und die damit verbundenen körpereigenen Proteine sind: A-Beta- und Tau-Protein für AD, alpha-Synuclein für Parkinson oder Prion-Protein für Phosphor-Erkrankungen, zum Beispiel wie die humane Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD), die Schafskrankheit Scrapie und die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE).

10 „Homologe Sequenzen“ bedeutet im Sinne der Erfindung, dass eine Aminosäuresequenz eine Identität mit einer Aminosäuresequenz aus einem körpereigenem pathogenen Aggregat oder Oligomeren, das eine Proteinaggregationserkrankung hervorruft, von mindestens 50, 55, 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94,

15 95, 96, 97, 98, 99, 100 % aufweist. Anstelle des Begriffs "Identität" werden in der vorliegenden Beschreibung die Begriffe "homolog" oder "Homologie" gleichbedeutend verwendet. Die Identität zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen oder Polypeptidsequenzen wird durch Vergleich mit Hilfe des Programms BESTFIT basierend auf dem Algorithmus von Smith, T.F. und Waterman, M.S (Adv. Appl. Math. 2: 482-

20 489 (1981)) berechnet unter Einstellung folgender Parameter für Aminosäuren: Gap creation penalty: 8 und Gap extension penalty: 2; und folgender Parameter für Nukleinsäuren: Gap creation penalty: 50 und Gap extension penalty: 3. Bevorzugt wird die Identität zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen oder Polypeptidsequenzen durch die Identität der Nukleinsäuresequenz / Polypeptidsequenz über die jeweils

25 gesamte Sequenzlänge definiert, wie sie durch Vergleich mit Hilfe des Programms GAP basierend auf dem Algorithmus von Needleman, S.B. und Wunsch, CD. (J. Mol. Biol. 48: 443-453) unter Einstellung folgender Parameter für Aminosäuren berechnet wird: Gap creation penalty: 8 und Gap extension penalty: 2; und die folgenden Parameter für Nukleinsäuren Gap creation penalty: 50 und Gap extension

30 penalty: 3.

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

Unter dem Begriff „entsprechender Teilbereich“ körpereigener Proteine ist jene Peptidsequenz zu verstehen, die gemäß den erfindungsgemäßen Definitionen eine identische oder mit der angegebenen Prozentzahl homologe Peptidsequenz eines Monomers, aus dem die erfindungsgemäßen Standards aufgebaut werden, aufweist.

Wesentlich für die erfindungsgemäßen Standards ist, dass die Standards nicht aggregieren, bevorzugt durch die Verwendung von monomeren -Sequenzen, die nicht aggregieren, da der „entsprechender Teilbereich“ körpereigener Proteine für die Aggregation nicht verantwortlich ist, oder die durch Blockierung der für die Aggregation verantwortlichen Gruppen nicht aggregieren.

Aggregate im Sinne der vorliegenden Erfindung sind

- Partikel die aus mehreren, bevorzugt gleichen Bausteinen bestehen, die nicht kovalent miteinander verbunden sind und/oder
- nicht-kovalente Zusammenlagerungen mehrerer Monomere.

In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung besitzen die Standards eine genau definierte Anzahl von Epitopen, die kovalent miteinander verknüpft sind (unmittelbar oder über Aminosäuren, Spacer und/oder funktionelle Gruppen) für die Bindung der entsprechenden Sonden.

Sonden im Sinne der Erfindung werden ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: Antikörper, Nanobody und Affibody. Sonden sind darüber hinaus alle Moleküle, die eine hinreichende Bindspezifität für das zu detektierende Aggregat besitzen, z.B. Farbstoffe (ThioflavinT, Kongorot, etc.).

Die Zahl der Epitope wird dadurch bestimmt, dass eine Polypeptid-Sequenz verwendet wird, die bezüglich ihrer Sequenz identisch mit jenem Teilbereich der körpereigenen Proteine ist, die ein Epitop bildet bzw. eine Homologie von mindestens 50 % mit diesem Teilbereich aufweist, und dabei die biologische Aktivität des Epitopes besitzt. Eine so ausgewählte Polypeptid-Sequenz wird in der gewünschten Anzahl bei dem Aufbau der erfindungsgemäßen Standards eingebaut und/oder

miteinander erfindungsgemäß verknüpft.

Die erfindungsgemäßen Standards sind Polymere, die aus den oben beschriebenen Polypeptid-Sequenzen, bevorzugt Epitope aufgebaut sind, gegebenenfalls
5 enthaltend weitere Elemente.

In einer weiteren Ausführung der vorliegenden Erfindung stellen oben beschriebenen Polypeptid-Sequenzen, bevorzugt Epitope, und/oder deren Homologe mit der biologischen Aktivität des entsprechenden Epitops, die gleiche oder größte Anzahl an Monomeren bezogen auf die Anzahl jeweils einer der restlichen Monomer-Arten des
10 Standards und/oder bezogen auf die Anzahl aller anderen Monomere.

In einer weiteren Ausführung der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den Epitopen um Epitope des A-Beta-Peptids ausgewählt aus den Teilbereichen A-Beta 1 - 8 (SEQ ID NO: 2), A-Beta 1 - 11 (SEQ ID NO: 3), A-Beta 1 - 16 (SEQ ID NO: 4), A-
15 Beta 3-11 (SEQ ID NO: 5) und pyroGluA-Beta 3-11 (SEQ ID NO: 6), A-Beta 11 - 16 (SEQ ID NO: 7) und pyroGluA-Beta 11-16 (SEQ ID NO: 8), zum Beispiel des humanen N-terminale Epitops (mit folgender Sequenz: DAEFRHDSGYE (1-11 ; entspricht SEQ ID NO: 3).

PyroGlu ist die Abkürzung für ein Pyroglutamat, welches sich an Position 3 und/oder
20 11 des A-beta-Peptids befindet, bevorzugt auf einer Cyclisierung des N-terminalen Glutamats beruht.

Das erfindungsgemäße Standardmolekül ist ein Polymer aus den oben definierten Polypeptid-Sequenzen. Oligomer im Sinne der Erfindung ist ein Polymer gebildet aus
25 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 oder 20 Monomeren (unter Monomer ist die o.g. Polypeptid-Sequenz zu verstehen), oder Vielfachen davon, bevorzugt 2 - 16, 4-16, 8-16, besonders bevorzugt 8 oder 16, oder Vielfachen davon. Bei den erfindungsgemäßen Standards handelt es sich also um erfindungsgemäße Oligomere beziehungsweise Polymere.

30 In einer Alternative der vorliegenden Erfindung sind die Standards wasserlöslich.

In einer Alternative der vorliegenden Erfindung sind die erfindungsgemäßen

Standard aus gleichen Polypeptid-Sequenzen aufgebaut.

In einer Alternative der vorliegenden Erfindung sind die erfindungsgemäßen Standard aus unterschiedlichen Polypeptid-Sequenzen aufgebaut.

5 In einer Alternative der vorliegenden Erfindung werden solche oben definierte Polypeptid-Sequenzen in einer linearen-Konformation aneinandergereiht.

In einer Alternative der vorliegenden Erfindung werden solche oben definierte Polypeptid-Sequenzen zu einem verzweigten, erfindungsgemäßen Oligomer aneinandergereiht.

10 In einer Alternative der vorliegenden Erfindung werden solche oben definierte Polypeptid-Sequenzen zu einem cross-linked, erfindungsgemäßen Oligomer aneinandergereiht.

Verzweigte oder cross-linked, erfindungsgemäße Oligomere können durch Verknüpfung einzelner Bausteine mittels Lysin oder mittels Click-Chemie hergestellt
15 werden.

Wie oben beschrieben, können die erfindungsgemäßen Standards, also die erfindungsgemäßen Oligomere beziehungsweise Polymere, zusätzlich zu den in genau definierter Anzahl vorliegenden Polypeptid-Sequenzen, bevorzugt Epitopen, noch zusätzliche Aminosäuren, Spacer und/oder funktionelle Gruppen enthalten,
20 über welche die Polypeptid-Sequenzen, bevorzugt Epitope, kovalent miteinander verknüpft sind.

In einer Alternative ist die unmittelbare Verknüpfung der Polypeptid-Sequenzen, bevorzugt Epitope mit Cystein, insbesondere mittels Disulfid-Verbrückung durch Cysteine ausgeschlossen (um zu vermeiden, dass reduzierende Agenzien die
25 Verbrückung lösen). Ebenso ist in einer weiteren Variante eine unmittelbare Verknüpfung der Spacer mit der Polypeptid-Sequenz einerseits und mit Cystein andererseits ausgeschlossen.

Die Erfindung betrifft in einer Alternative ein Standardmolekül, enthaltend oder
30 aufgebaut aus Kopien des aminoterminalen Teils des A-Beta-Peptids, ausgewählt aus den Teilbereichen A-Beta 1 - 8 (SEQ ID NO: 2), A-Beta 1 - 11 (SEQ ID NO: 3), A-Beta 1 - 16 (SEQ ID NO: 4), A-Beta 3-11 (SEQ ID NO: 5) und pyroGluA-Beta 3-11 (SEQ ID NO: 6), A-Beta 11 - 16 (SEQ ID NO: 7) und pyroGluA-Beta 11-16 (SEQ ID

NO: 8), zum Beispiel des humanen N-terminale Epitops (mit folgender Sequenz: DAEFRHDSGYE (1-11).

Die Vervielfältigung der Epitope durch funktionelle Gruppen kann vor oder nach der
5 Synthese der einzelnen Bausteine durchgeführt werden. Charakteristisch für die erfindungsgemäßen Standards ist die kovalente Verknüpfung der Polypeptid-Sequenzen.

Die erfindungsgemäß einzusetzenden Polypeptid-Sequenzen können identisch mit
10 der Sequenz des A-Beta-Volllängen-Peptids sein oder zeigen eine Homologie von 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 % mit der Sequenz des A-Beta-Volllängen-Peptid.

15 Alternativ werden auch zum Aufbau der erfindungsgemäßen Standard-Moleküle Polypeptid-Sequenzen eingesetzt, die identisch mit einem Teilbereich des A-Beta-Volllängen-Peptids sind, bzw. eine Homologie von 50, 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 % mit einem Teilbereich des A-Beta-Volllängen-Peptids zeigen.

20 Wesentlich für die erfindungsgemäß eingesetzten Sequenzen ist ihre Eigenschaft nicht (oder nur gemäß den Bedingungen kontrolliert) zu aggregieren und/oder ihre die Aktivität als Epitop.

In einer weiteren Ausführung der vorliegenden Erfindung sind die Standards als
25 Dendrimere aufgebaut. Die erfindungsgemäßen Dendrimere sind aus den oben beschriebenen erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptid-Sequenzen aufgebaut und können ein zentrales Gerüstmolekül enthalten. Bevorzugt ist das Gerüstmolekül ein Streptavidin-Monomer, besonders bevorzugt ein Polymer, insbesondere Tetramer.

30 Die erfindungsgemäßen Dendrimere enthalten in einer Variante Polypeptid-Sequenzen, die eine Sequenz besitzen, die identisch mit einem Teilbereich des A-Beta-Peptids ist, oder eine mindestens 50 %ige Homologie zu dem entsprechenden

Teilbereich zeigt.

Erfindungsgemäß ist unter dem Begriff mindestens 50 %ige Homologie auch eine höhere Homologie zu verstehen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 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 % zu verstehen.

Standards, vorteilhaft mit höherer Löslichkeit im Wässrigen als pathogene Aggregate oder Oligomere aus körpereigenen Proteinen, sind in einer Ausführung der Erfindung aus Polypeptid-Sequenzen gebildet, die identisch mit dem N-terminalen Bereich des A-Beta-Peptids sind oder mindestens 50 %ige Homologie dazu aufweisen. Erfindungsgemäß ist unter dem N-terminalen Bereich von einem A-Beta-Polypeptid die Aminosäuresequenz A-Beta 1 - 8 (SEQ ID NO: 2), A-Beta 1 - 11 (SEQ ID NO: 3), A-Beta 1 - 16 (SEQ ID NO: 4), A-Beta 3-11 (SEQ ID NO: 5) und pyroGluA-Beta 3-11 (SEQ ID NO: 6), A-Beta 11 - 16 (SEQ ID NO: 7) und pyroGluA-Beta 11-16 (SEQ ID NO: 8) zu verstehen.

Ein erfindungsgemäßes Standardmolekül kann Epitope für mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder mehr verschiedene Sonden enthalten.

Epitope charakteristisch für verschiedene Sonden können in die erfindungsgemäßen Standards dadurch eingebaut werden, dass Polypeptid-Sequenzen verwendet werden, die identisch mit unterschiedlichen Bereichen des A-Beta-Peptids sind, bzw. mindestens eine 50 %ige Homologie dazu aufweisen, aber die Aktivität des entsprechenden Epitops besitzen.

In einer Ausführung werden hierzu Polypeptidsequenzen eingesetzt, die identisch oder eine 50 %ige Homologie mit dem N-terminalen Bereich des A-Beta-Polypeptids aufweisen, sowie Polypeptid-Sequenzen, die identisch bzw. mindestens eine 50 %ige Homologie mit dem C-Terminus des A-Beta-Polypeptids aufweisen.

In einer Ausführung der vorliegenden Erfindung enthalten die Standardmoleküle sog. Spacer.

Unter einem Spacer ist ein Molekül zu verstehen, das über kovalente Bindungen in

das Standardmolekül eingebaut ist, und bestimmte physikalische und/oder chemische Eigenschaften besitzt, durch welche die Eigenschaften des Standardmoleküls verändert werden. In einer Ausführung der erfindungsgemäßen Standards werden hydrophile oder hydrophobe, bevorzugt hydrophile Spacer, eingesetzt. Hydrophile Spacer werden ausgewählt aus der Gruppe der Moleküle, gebildet aus Polyethylenglycol, Zucker, Glycerin, Poly-L-Lysin oder beta-Alanin.

Die erfindungsgemäßen Standards enthalten in einer Alternative der vorliegenden Erfindung (weitere) funktionelle Gruppen.

Unter funktionellen Gruppen sind Moleküle zu verstehen, die kovalent an die Standardmoleküle gebunden sind. In einer Variante enthalten die funktionellen Gruppen Biotin-Gruppen. Dadurch wird eine starke kovalente Bindung an Streptavidin ermöglicht. Standardmoleküle enthaltend Biotin-Gruppen können so an Moleküle, enthaltend Streptavidin-Gruppen, gebunden werden. Falls die erfindungsgemäßen Standardmoleküle Biotin und/oder Streptavidin-Gruppen enthalten, können so größere Standards zusammengebaut werden oder mehrere, ggf. unterschiedliche Standardmoleküle, an ein Gerüst gebunden werden.

In einer weiteren Alternative der vorliegenden Erfindung enthalten die Standardmoleküle Farbstoffe zur spektralphotometrischen Bestimmung und/oder aromatische Aminosäuren. Aromatische Aminosäuren sind z.B. Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin oder Histidin, bzw. ausgewählt aus dieser Gruppe. Durch den Einbau von Tryptophan wird eine spektralphotometrische Bestimmung der Konzentration von Standards in Lösung ermöglicht.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Dendrimere enthaltend Polypeptide, die bezüglich ihrer Sequenz identisch im entsprechenden Teilbereich mit den körpereigenen Proteinen sind oder eine Homologie von mindestens 50 % über den entsprechenden Teilbereich mit den körpereigenen Proteinen aufweisen, die eine Proteinaggregationserkrankung kennzeichnen.

Die erfindungsgemäßen Dendrimere können jede der oben beschriebenen Merkmale der Standards oder jede beliebige Kombination davon enthalten.

In einer Alternative der vorliegenden Erfindung handelt es sich um:

Dendrimere enthaltend eine genau definierte Anzahl von Epitopen für die kovalente Bindung von Sonden,

5 Dendrimer enthaltend Epitope des A-beta-Peptids,

Dendrimer dadurch gekennzeichnet, dass er eine höhere Löslichkeit im Wässrigen besitzt, als die pathogenen Aggregate aus körpereigenen Proteinen, die eine Proteinaggregationserkrankung kennzeichnen,

Dendrimer enthaltend funktionelle Gruppen,

10 Dendrimer enthaltend mindestens ein Spacer-Molekül und/oder

Dendrimer enthaltend Farbstoffe zur spektralphotometrischen Bestimmung und/oder aromatische Aminosäuren.

Erfindungsgemäß haben die Dendrimere eine radiale Symmetrie.

In einer Variante erfolgt die Verzweigung der ersten Generation des Dendrimers über

15 Lysin, insbesondere drei Lysin-Aminosäuren.

In einer weiteren Alternative der vorliegenden Erfindung sind in den Standards, insbesondere Dendrimeren, die Polypeptid-Sequenzen, bevorzugt Epitope, nicht über eine Bindung zu einem Schwefelatom, nicht über eine Thioether-Bindung
20 und/oder nicht über Cystein (gegebenenfalls mittels Disulfid-Verbrückung durch Cystein) miteinander oder mit anderen Elementen der Standards wie Aminosäuren, Spacer und/oder funktionelle Gruppen und/oder andere oben beschriebenen Elementen verknüpft, insbesondere kovalent gebunden. Ebenso sind in einer weiteren Variante die Polypeptid-Sequenzen, bevorzugt Epitope, und ein daran
25 gebundener Spacer am Spacer nicht über eine Bindung zu einem Schwefelatom, nicht über eine Thioether-Bindung und/oder nicht über Cystein miteinander oder mit anderen Elementen der Standards wie Aminosäuren, weitere Spacer und/oder funktionelle Gruppen und/oder andere oben beschriebenen Elementen verknüpft, insbesondere kovalent gebunden.

30 Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung eines Standards, wie oben beschrieben.

In einer Ausführung wird der erfindungsgemäße Standard mittels Peptidsynthese

oder rekombinater Verfahren hergestellt, die dem Fachmann bekannt sind

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines oben beschriebenen Standards oder eines oben beschriebenen Dendrimers zur Quantifizierung von pathogenen Aggregaten oder Oligomeren aus körpereigenen Proteinen, die eine Proteinaggregationserkrankung kennzeichnen.

In einer Ausführung der Erfindung wird der Standard verwendet um A-beta-Oligomere zu quantifizieren.

Erfindungsgemäß werden die erfindungsgemäßen Oligomere beziehungsweise Polymere als Standard in einem Verfahren zur Quantifizierung von pathogenen Aggregaten oder Oligomeren aus körpereigenen Proteinen, die eine Proteinaggregationserkrankung oder eine amyloide Degeneration oder Proteinfehlfaltungserkrankung kennzeichnen eingesetzt.

Die erfindungsgemäßen Standards werden in einer Ausführung der vorliegenden Erfindung für die Kalibrierung bei der Surface-FIDA-Methode, Elisa (Sandwich-Elisa) oder FACS eingesetzt.

In einer anderen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Kit, welches erfindungsgemäßen Standard umfasst. Die Verbindungen und/oder Komponenten des Kits der vorliegenden Erfindung können in Behältern gegebenenfalls mit/in Puffern und/oder Lösung, verpackt sein. Alternativ können einige Komponenten in demselben Behälter verpackt sein. Zusätzlich dazu oder alternativ dazu könnten eine oder mehrere der Komponenten an einem festen Träger, wie z.B. einer Glasplatte, einem Chip oder einer Nylonmembran oder an die Vertiefung einer Mikrotiterplatte, absorbiert sein. Ferner kann das Kit Anweisungen für den Gebrauch des Kits für eine Beliebige der Ausführungsformen enthalten.

In einer Alternative der vorliegenden Erfindung werden die Standards zur Quantifizierung von pathogenen Aggregaten oder Oligomeren aus körpereigenen Proteinen verwendet indem:

in einem ersten Schritt die Standards oder die Dendrimere mit Sonden markiert werden und die Anzahl der an die Standards oder Dendrimere gebundenen Sonde bestimmt wird,

in einem zweiten Schritt pathogene Aggregaten oder Oligomere aus körpereigenen Proteinen, die eine Proteinaggregationserkrankung kennzeichnen, mit Sonden markiert werden, die Zahl der an jeweils ein pathogenes Aggregat oder Oligomer bindende Sonden bestimmt wird,

in einem dritten Schritt die Zahl der an jeweils ein Standard oder Dendrimer bindende Sonden aus Schritt 1 mit der aus Schritt 2 verglichen wird, und

in einem vierten Schritt dadurch die Zahl und die Größe der Oligomere aus der Körperflüssigkeit bestimmt wird.

In einer Variante der vorliegenden Erfindung werden die erfindungsgemäßen Standards, bevorzugt Dendrimere, für die Kalibrierung der Surface-FIDA-Methode eingesetzt. In einem ersten Schritt werden körpereigene pathogene Aggregate aus Körperflüssigkeiten, z.B. A-beta-Aggregate durch ein Sonde auf eine Glasfläche immobilisiert. Im Falle von A-beta-Aggregaten kann hierzu ein N-terminaler Capture-Sonde eingesetzt werden. Nach der Immobilisierung werden die Aggregate durch zwei unterschiedliche Sonden markiert. Im Falle von A-beta-Aggregaten werden z.B. A-beta-Antikörper eingesetzt, die beide über ein N-terminalen Bindeepitope gebunden werden. Die Detektionssonden sind mit, bevorzugt unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dadurch werden sie im Mikroskop, z.B. Laserscanningmikroskop sichtbar.

Erfindungsgemäß wird eine Monomer-Detektion von körpereigenen Polypeptiden ausgeschlossen indem im Testsystem drei unterschiedliche bzw. drei unterschiedlich markierte Sonde eingesetzt werden, die an einem ähnlichen bzw. gleichen Epitop binden. Alternativ oder zusätzlich kann die Detektion von Monomeren ausgeschlossen werden indem Signale mit einer niedrigeren Intensität durch ein Intensität-cut-off nicht gewertet werden. Da größere Aggregate mehrere Bindungsstellen für die beiden mit unterschiedlichen markierten Farbstoffen Sonde besitzen, kann eine Monomer-Detektion alternativ oder zusätzlich durch Kreuzkorelation dieser Signale ausgeschlossen werden.

Die erfindungsgemäßen Standards können als interne oder externe Standards bei der Messung verwendet werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Kit zur selektiven Quantifizierung von A-Beta-Aggregaten gemäß dem oben beschriebenen Verfahren. Ein solches Kit kann ein oder mehrere der folgenden Komponenten enthalten:,

- Substrat aus Glas, das mit einem hydrophoben Stoff beschichtet ist, bevorzugt Dextran, bevorzugt Carboxymethyl-Dextran;
- Standard;
- Fängermolekül;
- Sonde;
- Substrat mit Fängermolekül.

Die Verbindungen und/oder Komponenten des Kits der vorliegenden Erfindung können in Behältern gegebenenfalls mit/in Puffern und/oder Lösung, verpackt sein. Alternativ können einige Komponenten in demselben Behälter verpackt sein. Zusätzlich dazu oder alternativ dazu könnten eine oder mehrere der Komponenten an einem festen Träger, wie z.B. einer Glasplatte, einem Chip oder einer Nylonmembran oder an die Vertiefung einer Mikrotiterplatte, absorbiert sein. Ferner kann das Kit Anweisungen für den Gebrauch des Kits für eine Beliebige der Ausführungsformen enthalten.

In einer weiteren Variante des Kits sind auf dem Substrat die oben beschriebenen Fängermoleküle immobilisiert. Zusätzlich kann das KIT Lösungen und/oder Puffer enthalten. Zum Schutz der Dextranoberfläche und/oder der darauf immobilisierten Fängermoleküle können diese mit einer Lösung oder einem Puffer überschichtet werden.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose, Frühdiagnose und/oder Prognose von AD.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Überwachung von Therapien der AD sowie zur

Überwachung und/oder Überprüfung der Wirksamkeit von Wirkstoffen und/oder Heilverfahren. Dies kann bei klinischen Tests, Studien als auch beim Therapie-Monitoring eingesetzt werden. Hierzu werden Proben gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren vermessen und die Ergebnisse verglichen.

5

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung erfindungsgemäßen Verfahrens und der Biomarker zur Entscheidung, ob eine Person in klinische Studie aufgenommen wird. Hierzu werden Proben gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren vermessen und in Bezug auf einen Grenzwert die Entscheidung getroffen.

10

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit von Wirkstoffen und/oder Heilverfahren mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens, bei dem die Ergebnisse von Proben miteinander verglichen werden. Bei den Proben handelt es sich um Körperflüssigkeiten, entnommen vor beziehungsweise nach, oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Gabe der Wirkstoffe beziehungsweise Durchführung des Heilverfahrens. Anhand der Ergebnisse werden Wirkstoffe und/oder Heilverfahren ausgewählt, durch die eine Verringerung der A-Beta-Aggregate erfolgte. Erfindungsgemäß werden die Ergebnisse mit einer Kontrolle verglichen, die nicht dem Wirkstoff und/oder Heilverfahren unterworfen wurde.

15

20

Beispiele:

25

I. Bestimmung A-beta-Oligomere (A-beta-Aggregate) in CSF

1. Vorbereitung Substrat

Träger aus Glas wurden in einem Ultraschallbad über 15 Minuten gereinigt. Die Oberfläche wurde dreimal mit Wasser gespült und in einem Stickstoff-Gasstrom getrocknet. Die gereinigten Träger wurden in eine Mischung von konzentrierter Schwefelsäure und Wasserstoffperoxid von 3:1 (VA/) für mindestens 30 Minuten

30

eingetaucht, um die Hydroxylgruppen zu aktivieren. Anschließend wurde solange mit Wasser gespült, bis das Spülwasser einen neutralen pH-Wert hatte. In einem zweiten Spülschritt wurde 99%-iger Ethanol verwendet und anschließend die Träger im Stickstoff-Gasstrom getrocknet. Die Glasträger wurden in einer Lösung von 1 - 7 %
5 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) in trockenem Toluol für 1 bis 4 Stunden eingetaucht. Gute Ergebnisse wurden mit 5% iger APTES-Lösung und Inkubationszeit von 2 Stunden erreicht. Anschließend wurden die Objektträger mit Aceton und Wasser gespült und in einem Stickstoff-Gasstrom getrocknet.

10 Für die Beschichtung mit Dextran wurde die Glasoberfläche hydroxyliert und anschließend mit Aminogruppen aktiviert. Carboxymethyl-Dextran (CMD) wurde in Wasser in einer Konzentration von 10 mg auf ml gelöst und mit N-Ethyl-N-(3-Dimethylaminpropyl) Carbodiimid (EDC), (200 mM) und N-Hydroxysukzinimid (NHS), (50 mM) gemischt. Nach einer Vorinkubation von 10 Minuten wurde die Lösung für
15 weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Glasträger mit Wasser gewaschen.

2. Immobilisierung von Antikörper als Fängermoleküle auf dem beschichteten
20 Substrat.

Eine zweite Aktivierung der Oberfläche erfolgte mit einer Lösung von EDC/NHS (200 bzw. 50 mM) für 5 Minuten. Die Lösung der Antikörper wurde hinzu gegeben und für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Dadurch wurden die Antikörper kovalent an die mit CMD
25 beschichtete Glasoberfläche gebunden. Um anschließend verbleibende aktive Carboxyl-Endgruppen auf dem CMD-Spacer zu deaktivieren, wurde mit 1 M-Ethanolamin in DMSO für 15 Minuten inkubiert. Das Substrat wurde anschließend dreimal mit PBS gewaschen.

30

3. Immobilisierung von A-Beta-Aggregaten auf dem vorbehandelten Substrat

Die zu vermessende Probe wurde 1 Stunde auf dem Substrat inkubiert, dieses wurde

anschließend zweimal mit TBST (0,1 %) (W/W), Tween-20 in TBS-Puffer, TBS: 50 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,4) gewaschen.

5 4. Verknüpfung der Sonden mit Fluoreszenzfarbstoff zu ihrer Kennzeichnung

Nab 228, Antimouse-Alexa 633 und 6E10-Alexa 488-Antikörper wurden eingesetzt. Die Nab 228-Antikörper wurden mit einem KIT (Fluoreszenzlabelling-KIT Alexa-647, Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers gekennzeichnet. Die gekennzeichneten Antikörper wurden in PBS mit 2 mM Natriumazid bei 4° Grad im Dunkeln gelagert.

15 5. Markierung der Aggregate mit den Sonden

Die Menge der verwendeten Antikörper war abhängig von dem gewünschten Grad an Markierung. Die Sonden wurden hinzugefügt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend fünfmal mit TBST und zweimal mit TBS gewaschen.

20 6. Detektion der Aggregate und Vermessung der Proben

Die Messung erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Das Mikroskop war ausgestattet mit einem Argon-Ionen-Laser und drei Helium-Neonlaser. Die Laserstrahlen wurden auf einen diffraktionsbeschränkten Spot von einem Volumen von 0,25 Femtoliter fokussiert. Es wurde die Fluoreszenzintensität einer Fläche von 1000 x 1000 Pixel bestimmt. Da unterschiedliche Sonden eingesetzt wurden, wurde eine Kollationsanalyse durchgeführt. Um repräsentative Werte zu erhalten, wurde diese Fläche an mehreren Stellen des Trägers vermessen.

Die Messung erfolgte mittels ZEN 2008 Software von Carl Zeiss, Jena, Deutschland.

7. Analyse von CSF-Proben

26 Proben von CSF von unterschiedlichen Patienten wurden mit dem
5 erfindungsgemäßen Verfahren analysiert. Die Proben stammen jeweils von 14 AD-
Patienten und 12 Kontrollpatienten (gesund bezüglich
Proteinaggregationserkrankungen, unterschiedlichen Alters). Die Ergebnisse sind in
Fig. 1 zusammengefasst. Die Ergebnisse beweisen, dass eine deutliche
10 Unterscheidung zwischen den Gruppen möglich ist. Der Durchschnitt an A-Beta-
Oligomeren bei der AD-Gruppe war signifikant höher als bei der Kontrollgruppe.

8. Korrelation mit MMSE

15 Die Ergebnisse der erfindungsgemäßen Analyse wurden in Bezug zu einer MMSE
(Mini-Mental-Status-Test) der Spendepersonen gesetzt. Diese Ergebnisse sind in
Fig. 2 zusammengefasst. Daraus wird deutlich die Korrelation zwischen der Wertung
des MMSE-Tests und der Auswertung der erfindungsgemäßen Analyse.

20

II. Detektion von Aggregatstandards

1. Herstellung von Aggregatstandards

25 In einem Ausführungsbeispiel wurde ein A-beta-Oligomerstandard konstruiert, der 16
Epitope für N-terminal-bindende A-beta-Antikörper (Epitop entspricht A-beta-(1-11),
Sequenz: DAEFRHDSGYE) aufwies.

Zunächst wurde ein Multipel-Antigen-Peptid (MAP) synthetisiert, das aus vier N-
terminalen A-beta-Epitopen A-beta1-11 bestand. Diese waren entsprechend Figur 3 A
30 an einen dreifach-Lysin-Kern gekoppelt, welcher zur genauen Bestimmung der MAP-
Konzentration mittels UVA/IS-Spektroskopie zwei Tryptophane enthielt. Zusätzlich
war N-terminal ein Biotin-Tag angefügt. Dieses diente der Kopplung von jeweils vier
4-MAP-Einheiten an ein Streptavidin-Tetramer, in Figur 3 unter B dargestellt. Nach

Inkubation von 4-MAP und Streptavidin wurde 16-MAP gebildet, wie in Figur 3 unter C dargestellt. 16-MAP wurde durch Größenausschlusschromatographie von anderen Bestandteilen des Inkubationsansatzes getrennt.

- 5 Anschließend wurde MAP-16 seriell in PBS verdünnt und in den sFIDA-Test zur Detektion von A-beta-Oligomeren eingesetzt.

Z.Vorbereitung Glasplatte

- 10 Mikrotiterplatten aus Glas wurden in einem Ultraschallbad über 15 Minuten gereinigt und anschließend mit einem Plasma-Cleaner für 10 min behandelt. Für die Aktivierung der Glasoberfläche wurden die Wells in 5 M NaOH mindestens 3 Stunden inkubiert, mit Wasser gespült und dann im Stickstoff-Gasstrom getrocknet. Für die
- 15 Beschichtung mit Dextran wurde die Glasoberfläche hydroxyliert und anschließend mit Aminogruppen aktiviert. Hierzu wurde die Glasplatten in einer Lösung von 5 M Ethanolamin in DMSO über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Glasplatten mit Wasser gespült und in einem Stickstoff-Gasstrom getrocknet. Carboxymethyl-
- 20 Dextran (CMD) wurde in Wasser in einer Konzentration von 20 mg auf ml gelöst und mit N-Ethyl-N-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid (EDC), (200 mM) und N-Hydroxysuccinimid (NHS), (50 mM) gemischt. Nach einer Vorinkubation von 10 Minuten wurde die Lösung für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Glasplatten mit Wasser gewaschen.

- 25 3. Immobilisierung von Antikörpern als Fängermoleküle auf dem beschichteten Glas
- Eine zweite Aktivierung erfolgte mit einer Lösung von EDC/NHS (200 bzw. 50 mM) für 5 Minuten. Die Lösung der Antikörper wurde hinzu gegeben und für 2 Stunden bei
- 30 4°C inkubiert. Dadurch wurden die Antikörper kovalent an die mit CMD aktivierte Glasoberfläche gebunden. Um anschließend verbleibende aktive Carboxyl-Endgruppen auf dem CMD-Spacer zu deaktivieren, wurde mit 1 M-Ethanolamin in DMSO für 5 Minuten inkubiert. Das Glas wurde anschließend dreimal mit PBS

gewaschen.

4. Immobilisierung von MAP-16 auf dem vorbehandelten Glas

5

Die zu vermessende MAP-16-enhaltende Probe wurde 1 Stunde auf dem Glas inkubiert, anschließend dreimal mit TBST (0,1 %) (W/W), Tween-20 in TBS-Puffer, TBS: 50 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,4) gewaschen.

10

5. Kennzeichnung der Sonden mit Fluoreszenzfarbstoff

15

Es wurden 6E10-Alexa-488-Antikörper und IC-16 Antikörper eingesetzt. Die IC16Antikörper wurden mit einem Kit (Fluoreszenzlabelling-KIT Alexa-647, Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers markiert. Die gekennzeichneten Antikörper wurden in PBS mit 2 mM Natriumazid bei 4°C im Dunkeln gelagert.

20

6. Markierung der Aggregate mit den Sonden

Die Sonden wurden hinzugefügt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend fünfmal mit TBST und zweimal mit Wasser gewaschen.

25

7. Detektion des Aggregatstandards

30

Die Messung erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710 (Carl Zeiss, Jena, Germany). Das Mikroskop war mit einem Argon-Ionen-Laser und drei Helium-Neonlaser ausgestattet. Die Messungen erfolgten im Tile-Scan-Modus, bei dem benachbarte Flächen in einem Well gemessen und zu einem Bild zusammengesetzt werden. Jeder Tile-Scan enthielt 3 x 2 Einzelbilder, jedes Bild hatte eine Fläche von $213 \times 213 \mu\text{m}^2$.

Alternativ erfolgten die Messungen an einem TIRF-Mikroskop (TIRF = total internal reflexion), bestehend aus einem invertierten Mikroskop DMI 6000, einer Laserbox und einer Hamamatsu-EM-CCD C91 00-Kamera. Im Tile-Scan-Modus wurden 3 x 3 Einzelbilder mit einer jeweiligen Größe von 109,9 x 109,9 μm .

Die Auswertung erfolgte mit der Software „Image J“ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Durch den Einsatz von unterschiedlichen Sonden konnte eine Kolokalisationsanalyse durchgeführt werden. Hierzu wurde zunächst ein cut-off -Wert, definiert durch eine Negativkontrolle ohne MAP-16, von den Intensitätswerten der einzelnen Pixel abgezogen. Anschließend wurde die Anzahl der kolokalisierten Pixel, deren Intensität größer als Null war, addiert.

Figur 4 zeigt die Ergebnisse der Messungen. Es ist deutlich zu erkennen, dass das sFIDA-Signal, d.h. die Menge der kolokalisierten Pixel, mit der Konzentration der MAP-16-Moleküle korreliert.

III. Vergleich A-beta-Aggregate (A-beta-Oligomere) vs A-beta-Monomere

1. Bestimmung mittels sFIDA

Um ausschließen zu können, dass mittels sFIDA auch A-beta-Monomere detektiert werden und so das Signal der A-beta-Oligomere verfälscht wird, wurden A-beta-Monomere und Oligomere, bestehend aus synthetischem A-beta, nach einem Protokoll von Johansson et al., FEBS J. 2006, 273, Seiten 2618-2630, präpariert und mit dem System getestet. Zusätzlich wurden die A-beta-Oligomere seriell in PBS verdünnt und in einer Konzentrationsreihe wurde die Linearität des Tests überprüft. Die Messungen wurden wie bereits oben beschrieben durchgeführt, für die Detektion wurde ein Zeiss LSM 710-Mikroskop benutzt und es wurden 2 x 25 Bilder mit je einer Größe von 213 x 213 μm und 1024 x 1024 Pixeln aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Figur 5 dargestellt. A-beta-Oligomere führten zu einem deutlichen sFIDA-Signal,

dies war bei A-beta-Monomeren jedoch nicht der Fall. Anhand Figur 5 B ist zu erkennen, dass das sFIDA-Signal mit der Konzentration der A-beta-Oligomere korrelierte und zudem eine sehr geringe A-beta-Oligomerkonzentration nötig war, um zu einem positiven Signal zu führen.

5

2. FRET-Messung

Um festzustellen, ob für sFIDA auch ein anderes Signal generiert werden kann als die bisher gewählte Anzahl der kreuzkorrelierten Pixel, wurden FRET-Messungen durchgeführt. FRET bedeutet Förster-Resonanzenergietransfer. Bei FRET wird die Energie eines angeregten Fluorochroms auf ein zweites Fluorochrom übertragen. Die FRET-Intensität hängt unter anderem vom Abstand von Donor und Akzeptor ab und kann im Bereich von bis zu 10 nm beobachtet werden. Somit sollte FRET in sFIDA genutzt werden können, um A-beta-Monomere von A-beta-Oligomeren zu unterscheiden. Binden ein mit einem Donor-Farbstoff gekoppelter anti-A-beta-Antikörper (z.B. 6E10-Alexa488) und ein mit einem dazu passenden Akzeptor-Farbstoff gekoppelter anti-A-beta-Antikörper (z.B. IC-16-Alexa647) in unmittelbarer Nähe zueinander an ein A-beta-Oligomer, wird durch die räumliche Nähe FRET möglich. Es sollte statistisch eher unwahrscheinlich sein, dass 6E10-Alexa-488 und IC-16-Alexa647 an zwei A-beta-Monomere binden, die zufällig in einem Abstand von weniger als 10 nm voneinander immobilisiert wurden. Diese Wahrscheinlichkeit kann auf null reduziert werden, wenn für die Detektion Antikörper verwendet werden, die ein mit dem Capture-Antikörper überlappendes Epitop besitzen. Für den Versuch wurden A-beta-Monomere und A-beta-Oligomere mittels Größenausschlusschromatographie präpariert und für die sFIDA-Messungen immobilisiert, wie oben beschrieben. Bei den anschließenden Messungen an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica wurden die Fluorochrome mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die FRET-Emission bei einer Wellenlänge von 705 nm detektiert. Als Kontrollen wurden auch zwei Proben vermessen, bei denen jeweils nur ein Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper zugegeben war.

Wie in Figur 6 ersichtlich, führten die Messungen nur bei A-beta-Oligomeren, nicht aber bei A-beta-Monomeren oder Kontrollen zu einem FRET-Signal.

5 IV. Bestimmung von A-beta-Aggregaten im Liquor von Alzheimer-Mausmodellen

In weiteren Messungen wurde untersucht, ob sFIDA auch geeignet ist, A-beta-Aggregate im Liquor von Alzheimer-Mausmodellen zu detektieren und wenn ja, in welcher Verdünnung. Für die Versuchsdurchführung wurde der Liquor von APP/Ps1 - Mäusen und nicht-transgenen Kontrolltieren 1:10, 1:50 und 1:250 in PBS-Puffer
10 verdünnt und mittels sFIDA vermessen.

Die Versuchsdurchführung entspricht der oben beschriebenen, die Messungen wurden allerdings an einem LSM der Firma Leica durchgeführt. Es zeigte sich, dass in einer der zwei Proben transgener Mäuse selbst in 250-facher Verdünnung noch ein deutlich höheres sFIDA-Signal detektiert werden konnte, als bei den Proben nicht
15 transgener Kontrolltiere. Pro Well wurden 25 Flächen (je 246 μm^2) mit 1024 x 4024 Pixeln, also 16 % der Wellfläche vermessen.

Die Ergebnisse sind in Figur 7 dargestellt. Sie zeigen, dass sFIDA nicht nur zur Frühdiagnose bei Menschen geeignet ist, sondern auch dazu geeignet ist, z.B. die Wirksamkeit einer Therapie in präklinischen Studien zu verfolgen.

20

Figurenbeschreibung:

25 Fig. 1

Bestimmung A-beta-Aggregate in CSF von Patienten

Fig. 2

Korrelation der Ergebnisse aus Fig. 1 mit MMSE

Figur 3:

- 5 Konstruktion eines A β -Oligomerstandards mit 16 Epitopen für N-terminal-bindende A β -Antikörper, die den ersten 11 Aminosäuren von A β entsprechen (Sequenz: DAEFRHDSGYE). A) 4-MAP wurde synthetisiert, bestehend aus 4 N-terminalen A β -Epitopen 1-11 gekoppelt an einen dreifach-Lysin-Kern, der zur Konzentrationsbestimmung mittels UVA/IS-Spektroskopie zwei Tryptophane enthielt.
- 10 B und C) Zur Herstellung von 16-MAP wurden jeweils vier 4-MAP über ein Streptavidin-Teramer gekoppelt. MAP-16 wurde mittels Größenausschlusschromatographie von anderen Bestandteilen des Inkubationsansatzes getrennt.

15 Figur 4:

sFIDA-Messungen von MAP-16 in verschiedenen Konzentrationen, verdünnt in PBS-Puffer. PBS-Puffer ohne MAP-16 diente als Negativkontrolle. A) Die Messungen wurden an einem Laserscanningmikroskop (Zeiss LSM 710) durchgeführt. B). Die Messungen wurden an einem TIRF-Mikroskop (Leica) durchgeführt.

20

Figur 5:

- A) sFIDA ist nicht-sensitiv gegenüber A β -Monomeren, aber B) detektiert A β -Oligomere konzentrationsabhängig linear und mit hoher Sensitivität. A β -Monomere und -Oligomere wurden aus synthetischem A β mittels
- 25 Größenausschlusschromatographie präpariert und in PBS-Puffer verdünnt.

Figur 6:

- sFIDA-Messungen mit FRET-Signal an A β -Monomeren und A β -Oligomeren. PBS diente als Negativkontrolle. Als weitere Kontrollen wurden Proben vermessen, bei
- 30 denen jeweils nur ein Farbstoff-gekoppelter Antikörper zugegeben war. Donor-Farbstoff war an A β -Antikörper 6E10 gekoppelter Alexa488, Akzeptor-Farbstoff war an A β -Antikörper IC-16 gekoppelter Alexa647.

Figur 7:

sFIDA-Detektion von A β -Oligomeren im Liquor transgener (Tg) Alzheimermnausnodelle (APP/PS1) und nicht-transgener Kontrolltiere (K). Als

5 Negativkontrolle wurde eine reine Pufferprobe verwendet.

Ansprüche:

- 5 1. Verfahren zur selektiven Quantifizierung und/oder Charakterisierung von A-Beta-Aggregaten umfassend folgende Schritte:
- 10 a) Auftragen der zu untersuchenden Probe auf das Substrat,
b) Hinzufügen von für die Detektion gekennzeichneten Sonden, die durch
spezifische Bindung an A-Beta-Aggregate diese markieren und
c) Detektion der markierten A-Beta-Aggregate, wobei
Schritt a) vor Schritt b) durchgeführt werden kann.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass vor Schritt a) eine Immobilisierung von Fängermolekülen auf dem Substrat erfolgt.
3. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass eine Vorbehandlung der Probe erfolgt.
- 20 4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass ein Substrat aus Glas verwendet wird.
5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat eine hydrophile Beschichtung besitzt.
- 25 6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet,, dass das Substrat mit Dextran beschichtet ist.
- 30 7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass die Fängermoleküle kovalent an das Substrat oder an die Beschichtung gebunden sind.

- 35
8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass die Fängermoleküle mit Fluoreszenzfarbstoffen gekennzeichnet sind.
9. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass die Fängermoleküle Anti-A-Beta-Antikörper sind.
- 40
10. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass die Anti-A-Beta-Antikörper spezifisch ein Epitop des A-Beta-Aggregats binden.
11. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass A-Beta-Peptid-spezifische Sonden eingesetzt werden.
- 45
12. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass die Sonden Fluoreszenzfarbstoff-gekennzeichnete Anti-A-Beta-Antikörper sind.
13. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass zwei oder mehr unterschiedliche Sonden eingesetzt werden.
- 50
14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass zwei oder mehr Sonden mit unterschiedlich gekennzeichneten Fluoreszenz-Farbstoffen eingesetzt werden.
- 55
15. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Sonde ein Anti-A-Beta-Antikörper ist, der spezifisch an ein N-terminales Epitop des A-Beta-Peptides bindet.
- 60
16. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion mittels ortsauflösender Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt wird.
17. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie, Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS), gegebenenfalls in Kombination mit

- 65 Kreuzkorrelation und Single-Particle-Immunosolvent Laserscanning-Assay, Laser-
Scanning-Mikroskopie (LSM), Wetfeld-Mikroskopie und/oder TIRF-Mikroskopie,
sowie die entsprechenden superauflösenden Varianten STED, SIM, STORM,
dSTORM durchgeführt wird.
- 70 18. Verfahren nach Anspruch 17 dadurch gekennzeichnet, dass bei der Detektion so
viele Datenpunkte gesammelt werden, dass die Detektion eines einzelnen
Aggregates vor dem Hintergrundsignal ermöglicht.
19. Verfahren nach Anspruch 18 dadurch gekennzeichnet, dass so viele Werte
75 ausgelesen werden, wie orts-aufgelöste Ereignisse vorhanden sind.
20. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass
als Messprobe Liquor (CSF, Cerebrospinale Flüssigkeit), Blut und/oder Urin
eingesetzt wird.
- 80 21. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass
ein interner oder externer Standard zur Quantifizierung von A-Beta- Aggregaten
eingesetzt wird.
- 85 22. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass
der Standard zur Quantifizierung von A-Beta-Aggregaten ein Polymer, aufgebaut aus
Polypeptidsequenzen, ist, die bezüglich ihrer Sequenz identisch im entsprechenden
Teilbereich mit den körpereigenen Proteinen sind oder eine Homologie von
mindestens 50 % über den entsprechenden Teilbereich mit jenen körpereigenen
90 Proteinen aufweisen, die eine Proteinaggregationserkrankung oder eine amyloide
Degeneration oder Proteinfehlfaltungserkrankung hervorrufen, wobei die Polymere
nicht aggregieren.
23. Kit zur selektiven Quantifizierung von A-Beta-Aggregaten nach einem der
95 vorangehenden Ansprüche enthaltend eine oder mehrere der folgenden
Komponenten:

- Substrat aus Glas, das mit einem hydrophoben Stoff beschichtet ist;
 - Standard;
 - Fängermolekül;
 - 100 - Sonde;
 - Substrat mit Fängermolekül;
 - Lösungen;
 - Puffer.
- 105 24. Verfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit von Wirkstoffen und/oder Heilverfahren zur Behandlung von AD dadurch gekennzeichnet, dass ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-22 durchgeführt wird und die Wirkstoffe und/oder Heilverfahren nach ihren Wirkung auf die A-Beta-Aggregat-Bildung miteinander verglichen werden, wobei jene Wirkstoffen und/oder Heilverfahren ausgewählt werden, die eine
- 110 geringere A-Beta-Aggregat-Bildung im Vergleich mit einer Kontrolle zeigen.
25. Verfahren zur Entscheidung der Aufnahme eines Individuums in eine klinische Studie oder Test, dadurch gekennzeichnet, dass Quantifizierung und/oder Charakterisierung von A-Beta-Aggregaten gemäß einem der Ansprüche 1-22 erfolgt und der
- 115 gemessene Wert mit einem Schwellenwert verglichen wird.
26. A-Beta-Aggregat-spezifische Sonden.
27. Verwendung A-Beta-Aggregat-spezifischer, bzw. A-Beta-Oligomer-spezifischer
- 120 Sonden zur spezifischen Bindung an ein bestimmtes A-Beta-Aggregat, bzw. A-Beta-Oligomer.

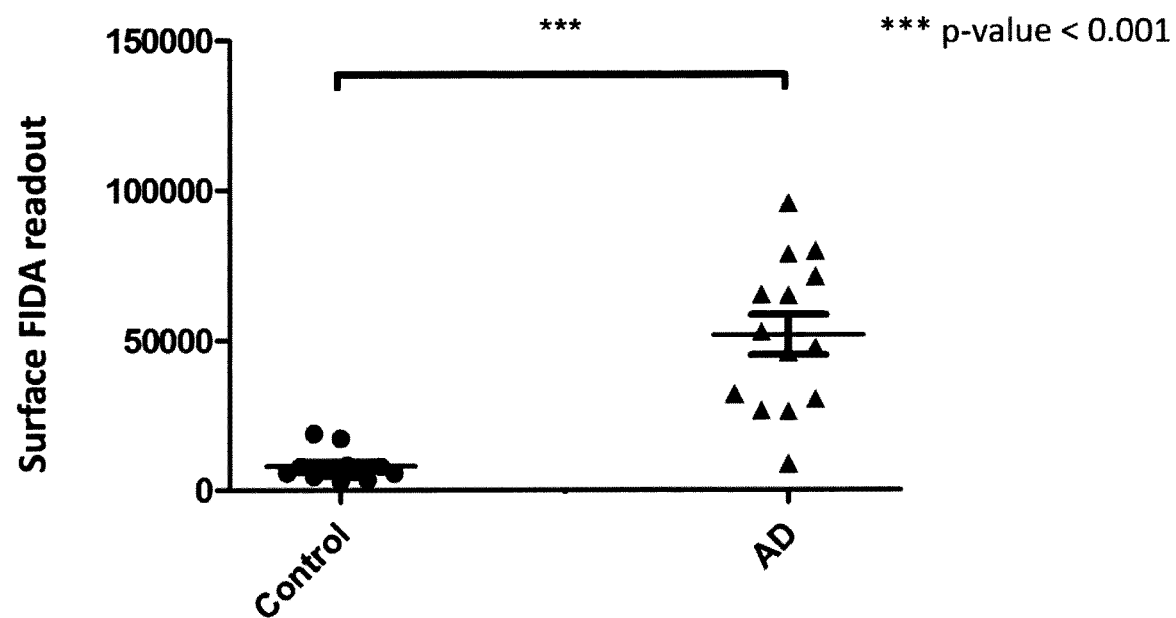


Fig. 1

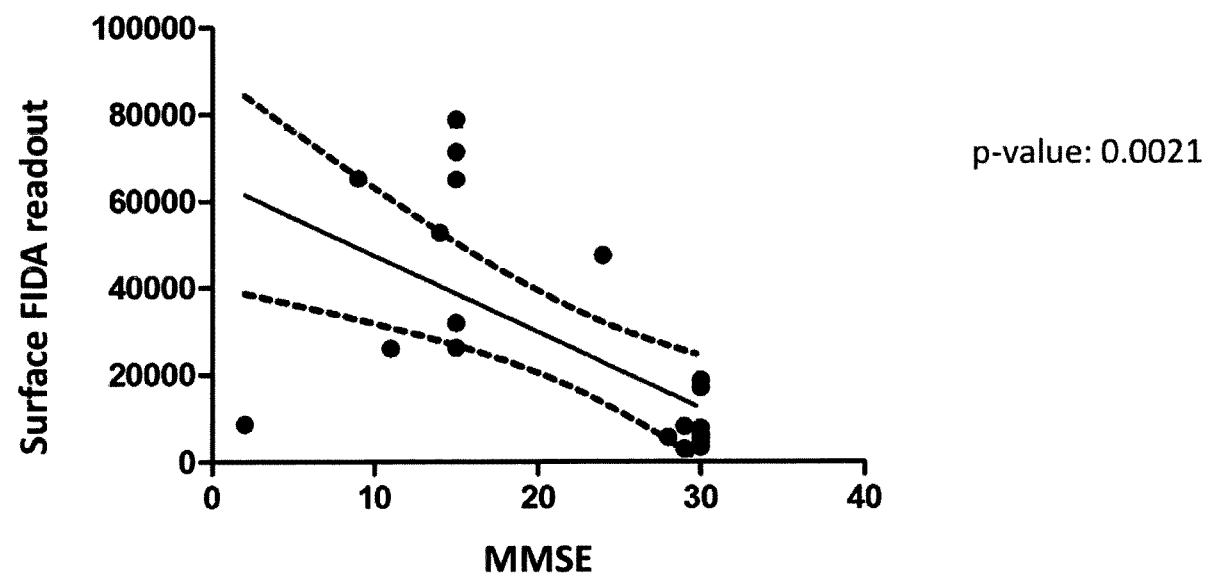


Fig. 2

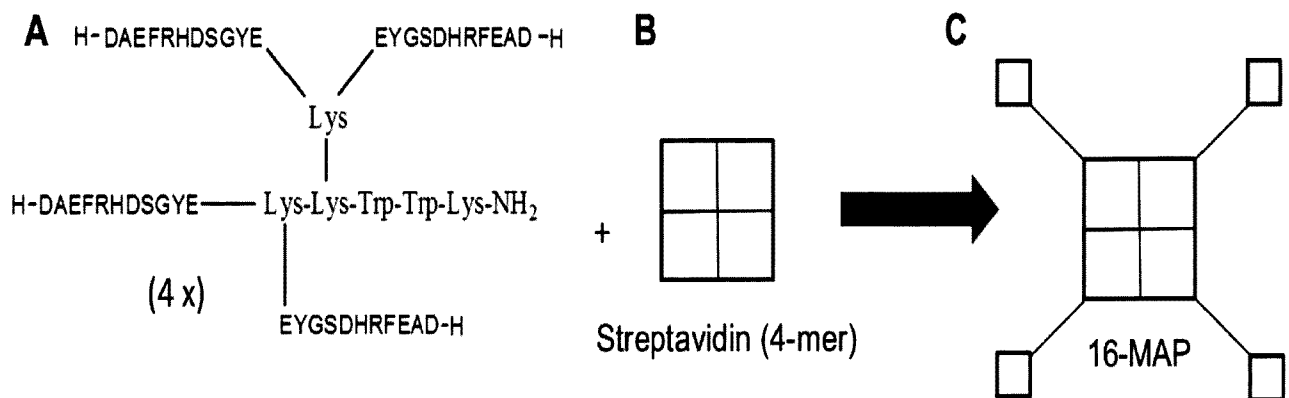


Fig. 3

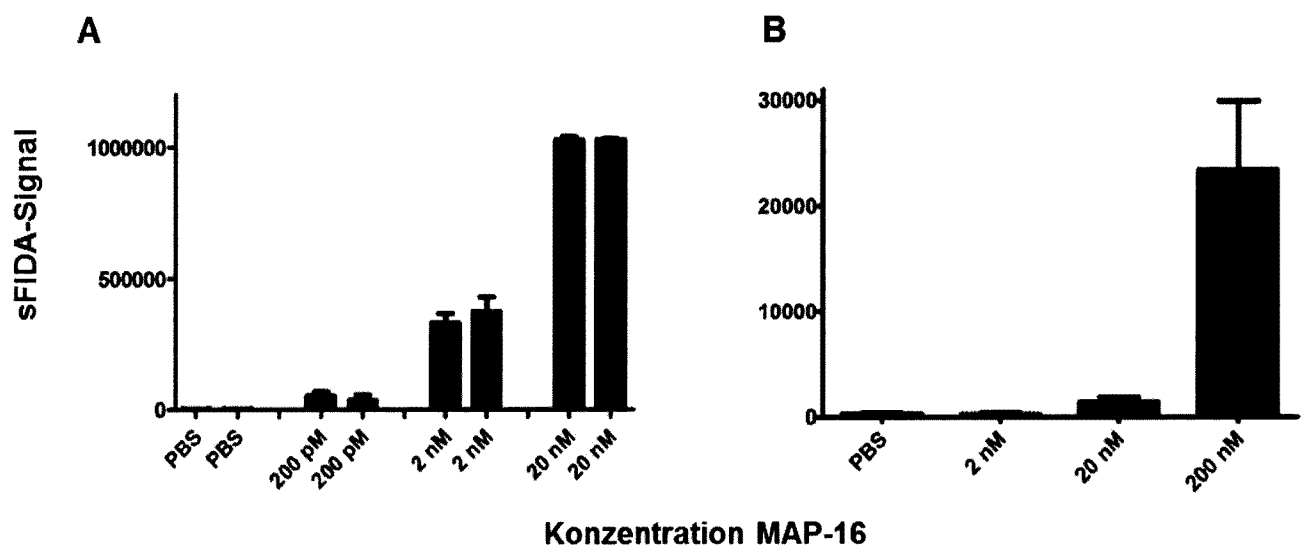


Fig.4

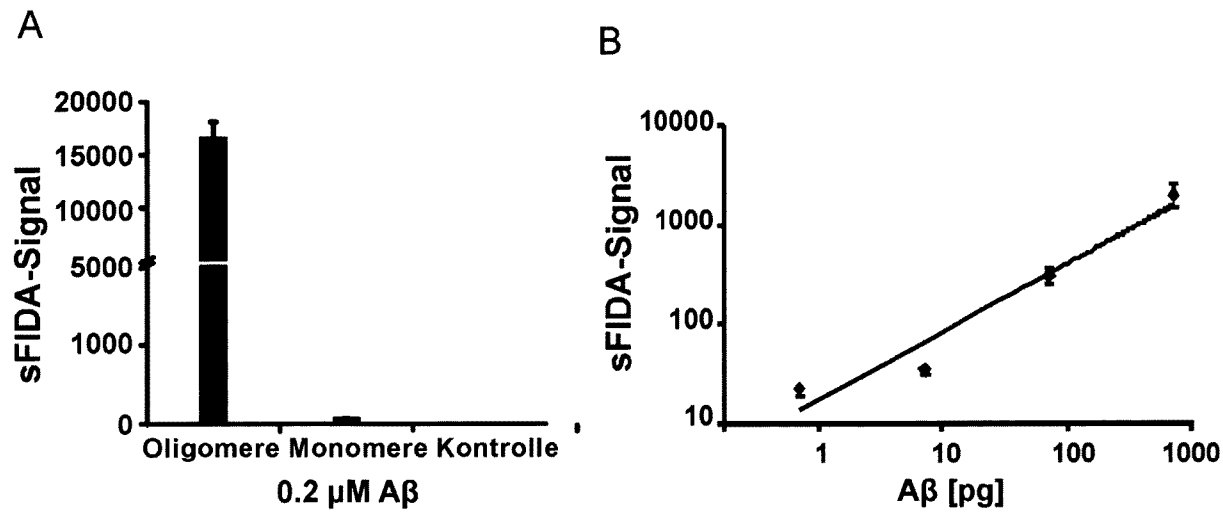


Fig. 5

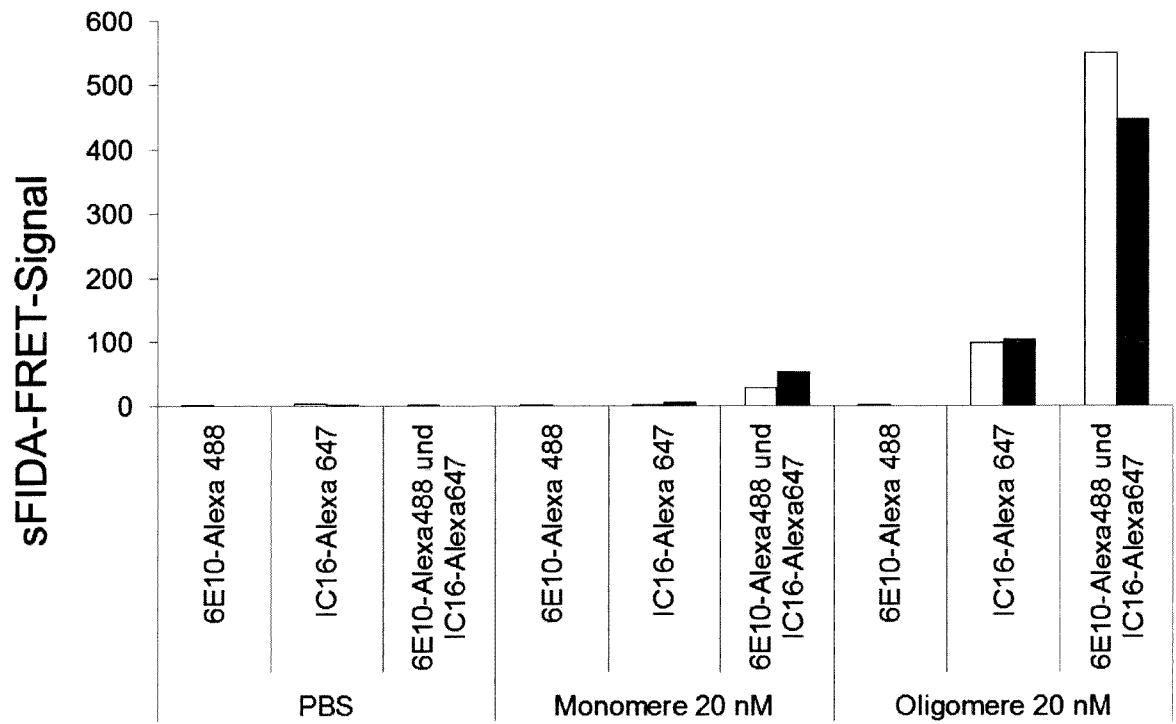


Fig. 6

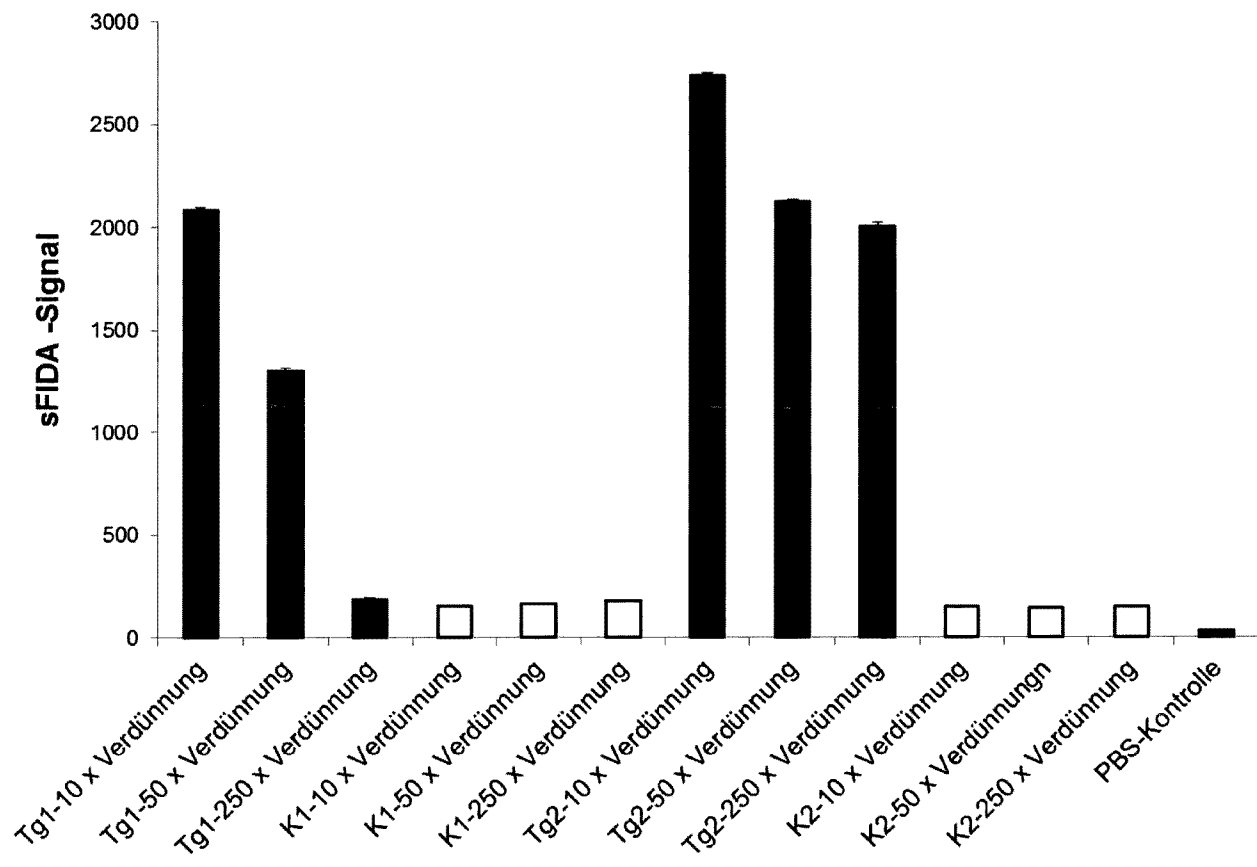


Fig. 7