

Abschlussbericht Förderkennzeichen 16LW0045 Teil I

Titel:

Entwicklung von Wirkstoffkandidaten für eine kausale Therapie der Typ 2 Diabetes Mellitus

Akronym:

T2DM-Therapie

Das übergeordnete Ziel des hier vorgestellten Projektes ist die Entwicklung einer ursächlichen Therapie gegen Typ 2 Diabetes Mellitus, einer Volkskrankheit unter der mehrere hundert Millionen Menschen weltweit leiden. Für diesen Zweck wollen wir neue therapeutisch aktive D-Peptide (Wirkstoffe) entwickeln, die toxische IAPP-Oligomere als Zielstruktur haben, um diese so in ihre nicht-toxische Form auflösen zu können. IAPP (Insel-Amyloid-Polypeptid, auch Amylin genannt) ist ein Peptid, welches in der Bauchspeicheldrüse gebildet wird und wichtige physiologische Funktionen einnimmt. Unter bisher unbekanntem Umständen kann dieses Peptid aggregieren (verklumpen). Die entstehenden Aggregate sind dann als Ablagerungen in Bauchspeicheldrüsen betroffener Patienten zu finden. Einige Formen dieser Aggregate gelten als besonders toxisch, da sie einen Funktionsverlust und ein Absterben der Zellen verursachen. Eben jene Formen wollen wir in diesem Vorhaben gezielt angreifen und zerstören. Die Wirkstoffe wollten wir in diesem Projekt auf verschiedene Wege identifizieren. Zum einem wollten wir ein sog. Spiegelbild-Phagendisplay durchführen, um neue Peptidliganden zu erzeugen. Ebenfalls sollten Peptidliganden optimiert werden, die bereits existieren und zeigen, dass sie einen Einfluss auf die Zielstruktur (IAPP) nehmen. Um dies zu gewährleisten sind in der einjährigen Sondierungsphase drei Arbeitsziele definiert worden. 1.: Die Identifikation von potentiellen D-Peptiden, die im Vergleich zur Leitsubstanz deutlich effizienter sind. 2.: Bereitstellung aller notwendigen Experimente, um die D-Peptide auf ihre *in vitro* Wirksamkeit zu analysieren. 3.: Die Bereitstellung eines geeigneten *in vivo* Modelles, inklusive dessen Charakterisierung sowie aller notwendiger behördlicher Arbeiten. Spätestens nach Abschluss der Sondierungsphase sollten zumindest zwei Peptide vorliegen, die dann in *in vivo* Experimenten (Pharmakokinetik und Pharmakodynamik) evaluiert werden können.

In der einjährigen Sondierungsphase konnten wir verschiedene *in vitro* Experimente bereitstellen, um die selektierten D-Peptide ausgiebig untersuchen zu können. Zu diesen zählen Bindungsstudien, aber auch Experimente, die eine mögliche toxische Wirkung untersuchen. Darüber hinaus haben wir ein sog. Spiegelbild-Phagendisplay durchgeführt, um verschiedene D-Peptide selektieren zu können. Diese sind wiederum in den etablierten *in vitro* Experimenten ausgiebig untersucht worden. Ebenfalls konnten wir ein geeignetes *in vivo* Modell bereitstellen, in welchem die aussichtsreichsten D-Peptide, nach ihrer *in vitro* Charakterisierung, untersucht werden können.

Abschlussbericht Förderkennzeichen 16LW0045 Teil II

Titel:

Entwicklung von Wirkstoffkandidaten für eine kausale Therapie der Typ 2 Diabetes Mellitus

Akronym:

T2DM-Therapie

Ziel und Ergebnisse der einjährigen Sondierungsphase

Das übergeordnete Ziel der einjährigen GO-Bio initial Sondierungsphase des Projektes mit dem Titel „Entwicklung von Wirkstoffkandidaten für eine kausale Therapie der Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM-Therapie)“ ist die Entwicklung einer kausalen Therapie gegen die Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM). Weltweit leiden mehrere Millionen Menschen an einer T2DM, bisher können therapeutisch nur die Symptome gelindert werden, jedoch bleibt die Erkrankung, trotz größter Forschungsbemühungen, weiterhin unheilbar. Mit gravierenden persönlichen und ökonomischen Folgeschäden. Ein pathologisches Hauptcharakteristikum der T2DM sind amyloide Ablagerungen in den Langerhans-Inseln des Pankreas. Die Hauptkomponente dieser Ablagerungen besteht aus dem Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP, auch Amylin). IAPP ist ein aus 37 Aminosäuren bestehendes Peptid, welches von den β -Zellen sekretiert wird. Unter physiologischen Bedingungen liegt IAPP als lösliches, monomeres Peptid vor und kontrolliert u.a. die Nahrungsaufnahme, gastrische Entleerung und die Glukosehomöostase. Unter bisher unbekanntem Umständen aggregiert das nativ vorkommende monomere IAPP zu Amyliodablagerungen. Während dieses Prozesses bilden sich zytotoxische Zwischenprodukte, sogenannte Oligomere. In diesem Versuchsvorhaben planen wir Substanzen zu entwickeln, die eben jene toxischen IAPP Oligomere gezielt eliminieren sollen.

Die Ziele der im September 2022 finalisierten Sondierungsphase waren die Bereitstellung geeigneter *in vitro* Experimente, initiale Selektion erster Peptidliganden, die Bereitstellung eines geeigneten Modelles für *in vivo* Analysen sowie eine initiale FtO-Analyse.

Etablierung *in vitro* Tests

In diesem Projekt haben wir uns dazu entschieden, die Bindungsaffinitäten (K_D , Dissoziationskonstante) mittels zweier Wege zu bestimmen. Beide Verfahren untersuchen die Wechselwirkungen zwischen Analyten und Liganden. Während unserer Vorexperimente sowie während der Testung der ersten Peptidliganden stellte sich heraus, dass vermutlich das experimentelle Design auf jeden Peptidliganden angepasst werden muss. Um zu ermitteln, ob die selektierten D-Peptide die IAPP-Fibrillenbildung inhibieren und toxische Oligomere eliminieren wurden zwei Versuche etabliert. Zum einen der sog. ThT-assay und zum anderen der sog. QIAD-assay. Die Etablierungsarbeiten dieser beiden Assays wurden in der Sondierungsphase abgeschlossen. Darüber hinaus wurde ein *in vitro* Zytotoxizitäts-Assay etabliert mit dem ermittelt werden soll, ob die D-Peptide eine eigene Toxizität *in vitro* aufweisen und ob die selektierten D-Peptide in der Lage sind, die IAPP-induzierte Toxizität herabzusetzen.

Selektion D-Peptide und *in vitro* Charakterisierung

Darüber hinaus wurde mittels Spiegelbild-Phagendisplay D-Peptide selektiert, die als mögliche Leitstruktur dienen könnten. Basierend auf der Analyse der Ergebnisse kristallisierten sich vier D-Peptide (T2DM1 bis 4) heraus, die intensiv auf ihre *in vitro* Eigenschaften analysiert worden sind. Neben diesen vier D-Peptiden wurden zwei D-Peptide, resultierenden aus den vier D-Peptide des Spiegelbild-Phagendisplay, rational hergestellt (T2DM5 und 6). Da die Sequenzen noch nicht veröffentlicht und geschützt sind, wird zum derzeitigen Zeitpunkt darauf verzichtet, diese hier offenzulegen. Die *in vitro* Charakterisierung der Peptide ergab, dass diese Bindungsaffinitäten im nanomolaren bis mikromolaren Bereich an IAPP zeigen (Tabelle 1).

D-Peptid	K _D (μM)
T2DM1	0,5 ± 0,1
T2DM2	19,1 ± 3,2
T2DM3	10,2 ± 7,9
T3DM4	28,0 ± 7,5
T2DM5	28,0 ± 7,6
T2DM6	0,01 ± 0,0005

Tabelle 1: Bindungsaffinitäten der D-Peptide T2DM1 bis T2DM6.

Neben diesen Bindungsstudien wurde mit allen D-Peptiden ein ThT-Assay durchgeführt um zu analysieren, ob diese die IAPP-Fibrillenbildung inhibieren. Nur T2DM3 war in diesem durchgeführten Assay in der Lage, die IAPP-Fibrillenbildung effektiv zu inhibieren. Aufgrund dessen wurde mit diesem D-Peptide untersucht, ob es die IAPP-Fibrillenbildung dosis-abhängig inhibieren kann. Wir konnten demonstrieren, dass T2DM3 die IAPP-Fibrillenbildung dosis-abhängig inhibiert. Darüber konnte gezeigt werden, dass T2DM3 die Lag-Phase verschiebt. Ebenfalls eine wichtige Eigenschaft eines potentiellen Wirkstoffes. Während der Sondierungsphase konnte ermittelt werden, ob die Kandidaten T2DM1 bis T2DM6 einen Einfluss auf die Zellviabilität nehmen. In diesen Experimenten konnte demonstriert werden, dass keines der sechs D-Peptide einen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität nimmt. Ausgehend von den generierten Daten der D-Peptide T2DM1 bis 6 erzielten T2DM3 und T2DM6 die vielversprechendsten Ergebnisse (T2DM3: Reduktion der IAPP-Fibrillenbildung, Verschiebung der Lag-Phase und keinen Einfluss auf die Zellviabilität, T2DM6 höchste Affinität an IAPP, keinen Einfluss auf die Zellviabilität). Aufgrund dessen wurde von diesen weitere Modifikationen (rationales Design) vorgenommen. Zum einen haben wir die Sequenzen willkürlich geändert um zu überprüfen, ob die aus dem Spiegelbild-Phagendisplay resultierenden Sequenzen spezifisch sind. Darüber hinaus haben wir an die Sequenzen spezielle Aminosäuren angefügt, durch die wir uns eine erhöhte Membrangängigkeit versprechen. Die Bindungsdaten der willkürlich geänderten Sequenz von T2DM3 zeigte keine Bindung an IAPP und die willkürlich geänderte Sequenz von T2DM6 eine Bindung im dreistelligen Mikromolaren Bereich. Diese Daten lassen vermuten, dass die aus dem Spiegelbild-Phagendisplay resultierenden Sequenzen eine hohe spezifische Bindung an IAPP aufweisen. Das

Anfügen der speziellen Aminosäuren resultierte für T2DM3 in einem ähnlichen K_D wie jener der Originalsequenz, der von T2DM6 stieg von einem zweistelligen nanomolaren K_D auf einen dreistelligen mikromolaren K_D .

Abschließend, nach Erstellung des *in vitro* Profils der D-Peptide T2DM1 bis T2DM6 wurde von der Kanzlei Meißner und Bolte (Düsseldorf) eine initiale FtO-Analyse erstellt. Diese ergab, dass eine Anmeldung zum Patent der D-Peptide möglich ist.

Jedoch haben wir uns gegen Ende der Sondierungsphase, basierend auf den erhobenen Daten, dazu entschlossen, zunächst nicht weiter mit den oben genannten D-Peptiden zu arbeiten, bzw. zunächst für diese keine Schutzrechte anzumelden. Aufgrund dessen führten wir neue (Spiegelbild)-Phagendisplay-Selektionen durch. Die Ergebnisse der Analysen dieser waren kein Bestandteil der Sondierungsphase.

Darüber hinaus haben wir ein geeignetes Model für mögliche *in vivo* Analysen identifiziert. Das Modell zeichnet sich dadurch aus, dass es zuverlässig einen diabetischen Phänotyp ausprägt und zudem ausgeprägte IAPP-Ablagerungen in den β -Zellen des Pankreas zeigt. Neben der Bereitstellung des Modells wurden alle behördlichen Angelegenheiten abgeschlossen, sodass Ende 2022/Anfang 2023 die interne Charakterisierung, um die optimalen Bedingungen für die *in vivo* Charakterisierung der selektierten Peptide zu gewährleisten.

Änderungen zu den geplanten Arbeitspaketen

Arbeitspaket 1: Lead-Optimierung

Ursprünglich war für die einjährige Sondierungsphase zudem geplant, eine Lead-Optimierung, ausgehend von einem bereits bekannten Wirkstoff durchzuführen. Diese sollten quantitative und kinetische Analysen von zwei Generationen von Peptid-Array-Varianten beinhalten. Wir haben uns jedoch dazu entschieden, uns zunächst lediglich auf die Selektion neuer D-Peptide zu beschränken, um möglichst losgelöste Schutzrechte zu generieren.

Arbeitspaket 2: Phagendisplay

Abgeschlossen; mit Einschränkungen. Während des Endes der Sondierungsphase kristallisierte sich heraus, dass die selektierten D-Peptide nicht die gewünschten Eigenschaften aufweisen, bzw. diese eventuell zu gering sind, um mit diesen weiterarbeiten zu können. Aufgrund dessen haben wir gegen Ende der

Sondierungshase neue Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser fließen nicht mit in die Sondierungsphase ein.

Arbeitspaket 3: Etablierung *in vitro* Tests

Abgeschlossen.

Arbeitspaket 4: Etablierung *in vivo* Experimente

In Teilen abgeschlossen. Wir konnten das Modell bereitstellen sowie alle behördlichen Arbeiten erledigen. Die Genehmigung der Anträge verzögerte sich, sodass wir erst im Sommer 2022 mit Vorarbeiten beginnen konnten und die interne Charakterisierung erst im Frühjahr 2023 stattfinden wird.

Arbeitspaket 5: *In vitro* Wirksamkeit

Abgeschlossen.

Somit sind alle beschriebenen Meilensteine erfüllt worden.

Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Verwertbarkeit der Ergebnisse hat sich, im Vergleich zu den beschriebenen im Ursprungsantrag, nicht geändert. Die in der Sondierungsphase generierten Daten unterstützen die im Originalantrag gemachten Angaben. Das Proof of Principle konnte mit Hilfe der einjährigen Sondierungsphase erbracht werden, nämlich die Phase der Grundlagenforschung, welche die Target-Wirkstoff-Interaktion der identifizierten D-Peptide bewies sowie eine erfolgreiche funktionelle Analyse.

Die Sondierung der Schutzrechte mittels einer initialen FtO-Analyse (durchgeführt durch die Kanzlei Meissner und Bolte) ergab, dass eine Patentanmeldung der generierten Peptide möglich sei. Im Anschluss an die erfolgreich absolvierte Proof of Principle Phase erfolgt die Proof of Concept Phase, die Erprobung der *in vivo* Eigenschaften (pharmakokinetische und pharmakodynamische Analysen) sowie die präklinische Analyse der D-Peptide als mittelfristige Erfolgsaussicht. Für diese Studien/Analysen wurden weitere Mittel, über die Machbarkeitsphase von GO-Bio initial, eingeworben. Nach Abschluss der präklinischen Forschung könnte eine identifizierte Substanz Interesse (großer) Unternehmen im Pharmabereich wecken. Zu diesen zäten unter anderem Novo Nordisk. Sollte sich herausstellen, dass die identifizierten D-Peptide die präklinische Entwicklung erfolgreich absolviert, wird als

langfristiger Erfolg die klinische Erprobung des D-Peptides angesehen. Das finale Ziel dieses Projektes wäre im allerbesten Fall die Entwicklung eines Wirkstoffes, der die T2DM heilen und verhindern kann und somit die Lebensqualität von mehreren 100 Millionen Menschen weltweit enorm verbessern und den Gesundheitssystemen hohe Kosten erspart. Allein in Deutschland leiden 10 % der Bevölkerung an T2DM. Dadurch entstanden dem deutschen Gesundheitssystem Kosten in Höhe von ca. 7 Milliarden Euro (nicht unterschieden zwischen Typ1 und Typ 2 Diabetes Mellitus). Somit besteht, neben dem persönlichen Interesse aller betroffenen Patienten, auch ein hohes volkswirtschaftliches Interesse, die T2DM zu heilen. Ein Medikament würde aufgrund der regulatorischen Vorgaben frühestens in zehn Jahren zur Verfügung stehen. Würde aber weltweit Patienten mit T2DM einen Nutzen bringen.

Veröffentlichung der Ergebnisse

Teile der in der Sondierungsphase erhobenen Ergebnisse werden im Zuge der Konferenz „International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases and related neurological disorders (ADPD 2023)“ unter dem Titel „Development of drug candidates for a causal therapy of type 2 diabetes mellitus“ vorgestellt. Eine anderweitige Veröffentlichung der Ergebnisse ist zum Zeitpunkt des Endes der einjährigen Sondierungsphase nicht geplant.