

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: A 416/2010
(22) Anmeldetag: 12.06.2008
(43) Veröffentlicht am: 15.10.2011

(51) Int. Cl. : **A61K 38/00** (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

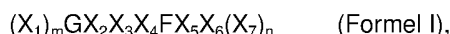
(56) Entgegenhaltungen:
US 2004067535 A1

SHI, YUAN et al. Quantitative determination of the topological propensities of amyloidogenic peptides. Biophysical Chemistry (2006), 120(1), 55-61

(73) Patentanmelder:
AFFIRIS FORSCHUNGS- UND
ENTWICKLUNGS GMBH
A-1030 WIEN (AT)

(54) **VAKZIN**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von mindestens einer Verbindung mit der Aminosäuresequenz



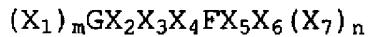
worin

- X₁ Serin (S), Alanin (A) oder Cystein (C) ist,
 - X₂ Serin (S), Threonin (T), Glutaminsäure (E), Asparaginsäure (D), Glutamin (Q) oder Methionin (M) ist,
 - X₃ Isoleucin (I), Tyrosin (Y), Methionin (M) oder Leucin (L) ist,
 - X₄ Leucin (L), Arginin (R), Glutamin (Q), Tryptophan (W), Valin (V), Histidin (H), Tyrosin (Y), Isoleucin (I), Lysin (K) Methionin (M) oder Phenylalanin (F) ist,
 - X₅ Alanin (A), Phenylalanin (F), Histidin (H), Asparagin (N), Arginin (R), Glutaminsäure (E), Isoleucin (I), Glutamin (Q), Asparaginsäure (D), Prolin (P) oder Tryptophan (W), Glycin (G) ist,
 - X₆ jeder Aminosäurerest ist,
 - X₇ Cystein (C) ist,
- m und n unabhängig voneinander 0 oder 1 sind,

welche Verbindung eine Bindungskapazität an einen Antikörper aufweist, der spezifisch für ein Epitop des Amyloid-beta-Peptids (Aβ) umfassend die Aminosäuresequenz HQKLVF, insbesondere HQKLVFFAED, ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Prävention und/oder Behandlung von Alzheimer-Krankheit.

Zusammenfassung:

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von mindestens einer Verbindung mit der Aminosäuresequenz



(Formel I),

worin

- X_1 Serin (S), Alanin (A) oder Cystein (C) ist,
 X_2 Serin (S), Threonin (T), Glutaminsäure (E), Asparaginsäure (D), Glutamin (Q) oder Methionin (M) ist,
 X_3 Isoleucin (I), Tyrosin (Y), Methionin (M) oder Leucin (L) ist,
 X_4 Leucin (L), Arginin (R), Glutamin (Q), Tryptophan (W), Valin (V), Histidin (H), Tyrosin (Y), Isoleucin (I), Lysin (K) Methionin (M) oder Phenylalanin (F) ist,
 X_5 Alanin (A), Phenylalanin (F), Histidin (H), Asparagin (N), Arginin (R), Glutaminsäure (E), Isoleucin (I), Glutamin (Q), Asparaginsäure (D), Prolin (P) oder Tryptophan (W), Glycin (G) ist,
 X_6 jeder Aminosäurerest ist,
 X_7 Cystein (C) ist,
 m und n unabhängig voneinander 0 oder 1 sind,

welche Verbindung eine Bindungskapazität an einen Antikörper aufweist, der spezifisch für ein Epitop des Amyloid-beta-Peptids (A β) umfassend die Aminosäuresequenz HQKLVF, insbesondere HQKLVFFAED, ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Prävention und/oder Behandlung von Alzheimer-Krankheit.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Prävention, Behandlung und Diagnose von mit β -Amyloid-Bildung und/oder -Anhäufung (β -Amyloidosen) assoziierten Erkrankungen. Genauer gesagt schafft die vorliegende Erfindung neue Mimotope, die eine gegen β -Amyloid und N-terminal trunkierte und/oder posttranslatorisch modifizierte β -Amyloid-Fragmente gerichtete Immunantwort auslösen, und neue Antikörper, die diese Mimotope erkennen, sowie A β -Peptide zur Verwendung bei der Prävention, Behandlung und Diagnose von mit β -Amyloid-Bildung und/oder -Anhäufung assoziierten Erkrankungen.

Verschiedene degenerative Erkrankungen sind durch die aberrante Polymerisation und Akkumulation bestimmter Proteine, so genannte Proteopathien, gekennzeichnet. Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Prävention, Behandlung und Diagnose von mit β -Amyloid-Proteinen assoziierten Proteopathien, die unter der Bezeichnung β -Amyloidosen zusammengefasst sind. Die prominenteste Form von β -Amyloidose ist Alzheimer-Krankheit (AD). Weitere Beispiele inkludieren Demenz mit Levy-Körperchen und Demenz bei Down-Syndrom, sind aber nicht darauf beschränkt.

AD ist die häufigste Form von Demenz beim Menschen. Bisher gibt es keine wirksame Behandlung, um die progressive Neurodegeneration und den damit verbundenen kognitiven Verfall bei Humanpatienten zu stoppen. AD ist durch die abnorme Akkumulation von extrazellulären Amyloidplaques gekennzeichnet - was in engem Zusammenhang mit extensiver Astrozytose und Mikrogliose sowie dystrophen Neuronen und Neuronenverlust steht. Diese Amyloidplaques bestehen zum Großteil aus den Amyloid- β -Peptiden A β 40 und A β 42 (A β ; abgeleitet von APP (gi:112927), die sich vom Amyloid-Vorläuferprotein (APP) herleiten, welches von verschiedenen Zelltypen im Nervensystem exprimiert wird. Man glaubt, dass A β -Peptide direkt an der Pathogenese und Progression von AD beteiligt sind. Daher ist bei einer Reduktion der A β -Last im Gehirn eine Verzögerung oder ein Halt der Krankheitsprogression zu erwarten, und sie könnte auch den kognitiven Verfall bei AD-Patienten stoppen.

APP wird normalerweise mit Hilfe von zwei Spaltungsschritten zur Bildung der derzeit bekannten Formen von Abeta x-40/42/43 verarbeitet. Die erste Spaltung erfolgt durch die so genannten beta-Stellen-APP-Spaltenzyme 1 und 2 (BACE1 und BACE2); der zweite proteolytische Schritt wird mit Hilfe des gamma-Sekretase-Komplexes durchgeführt.

BACE-Enzyme erkennen zwei Stellen im N-terminalen Teil des präsumptiven A β -Peptids, und die proteolytische Aktivität von BACE führt zur Bildung von Abeta 1-X bzw. 11-X. So wird durch BACE-vermittelte APP-Verarbeitung eine Vielzahl von verschiedenen A β -Spezies, mit Abeta 1-40/42 als Hauptbestandteil geschaffen. Gamma-Sekretase-Aktivität führt zur Produktion von 3 Hauptfragmenten: A β 1-40/42/43. Sobald diese Peptide produziert sind, werden sie von Aminopeptidasen weiter verarbeitet, was in ihrem anschließenden schrittweisen Abbau resultiert. Diese weiteren Schritte führen zur Bildung von anderen Formen wie beispielsweise A β 3-40/42.

Die dritte Familie von proteolytischen Enzymen, die an der APP-Verarbeitung beteiligt ist, ist die so genannte alpha-Sekretase-Familie (ADAM ('eine Disintegrin- und Metalloprotease')-Familie). Alpha-Sekretasen spalten das Amyloid-Vorläuferprotein (APP) in seiner transmembranen Region (zwischen aa16 und aa17 der A β -Peptidsequenz) und schließen daher die Bildung von A β -Peptiden aus. Somit ist die alpha-Sekretase-Spaltung der entscheidende Schritt für nicht-amyloidogene APP-Verarbeitung. Im Speziellen resultiert die alpha-Sekretase-Spaltung in der Freisetzung einer sekretierten Form, genannt sAPP-alpha. Man glaubt, dass sAPP-alpha ausreicht, um die meisten physiologischen Funktionen von APP zu vermitteln, und es kann als Signalmolekül dienen. Anzeichen legen nahe, dass die sezernierte Ektodomäne eine Rolle beim Wachstum von kultivierten Fibroblasten spielt. Es wurde gefunden, dass sAPP neuroprotektiv für kultivierte primäre Neuronen ist, wobei es durch Glukoseentzug verursachte Erhöhungen der intrazellulären Ca²⁺-Level verhindert und die exzitotoxische Schwelle von Glutamat erhöht sowie axonales und dendritisches Wachstum vermittelt.

Beim Menschen besteht durchschnittlich 60-85% des Amyloidplaquematerials aus A β 40/42-Derivaten, die N-terminal trunkiert und häufig modifiziert sind. Die relativen Mengen von N-terminal trunkierten A β -Spezies sind hinsichtlich A β -Level, Mutationen und BACE-Aktivität variabel. Die am häufigsten auftretenden trunkierten Formen von A β sind A β 3-40/42 und A β 11-40/42, von denen man glaubt, dass sie bis zu 50% aller trunkierten Formen ausmachen. Das bedeutet, dass diese Isoformen 24-50% aller Amyloid-Peptide in AD-Gehirnen bilden. Beide Peptide enthalten einen N-terminalen Glutamatrest, der häufig enzymatisch zu Pyro-

glutamat modifiziert wird, was zur Bildung von A β 3(pE)-40/42 bzw. A β 11(pE)-40/42 führt. Weil der Aminoterminus von Abeta-3(pE)- und -11(pE)-Peptiden durch internes Laktam blockiert wird, ist er vor der proteolytischen Wirkung von anderen Amino-peptidasen als Pyroglutamat-spezifischen geschützt und kann somit in Geweben stabil bleiben. Darüber hinaus können N-terminal trunkierte Amyloid-Varianten beginnend an Position 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 oder 10 von beta-Amyloid bei AD-Patienten nachgewiesen werden. Diese Formen sind häufig posttranslatorisch modifiziert, z.B. durch Methylierung.

Schon früher wurde gezeigt, dass trunkierte und modifizierte Peptide in Nervengewebe stabiler sind als A β voller Länge. Darüber hinaus sind N-terminal trunkierte Formen von A β amyloidogener als nicht modifizierte A β -Peptide, weshalb die Plaquebildungsrate erhöht ist, und sie zeigen auch neurotoxische Aktivität bei der Applikation auf kultivierten Neuronen sowie bei in-vivo-Versuchen. Trunkierte Formen von A β können bereits in diffusen Ansammlungen von A β in frühen Stadien von AD nachgewiesen werden und könnten an früher Plaquebildung beteiligt sein, da sie in vivo als Einzelkeime agieren. Aufgrund dieser Wirkungen wird vermutet, dass A β -x-40/42-Peptide Plaquebildung auslösen und/oder beschleunigen können, vielleicht indem sie als Zentren wirken, die die anschließende Ablagerung von relativ weniger amyloidogenen, aber offensichtlich häufigeren A β -Peptiden voller Länge fördern. Weiters gibt es zwingende Beweise dafür, dass das Auftreten von N-terminal trunkierten A β -Spezies mit einer erhöhten Schwere und einem frühen Einsetzen von Neurodegeneration bei sporadischer und familiärer Alzheimer-Krankheit sowie bei Down-Syndrom-Patienten korreliert. Daten von solchen Patienten implizieren eine Verbindung zwischen der frühen Bildung von trunkierten A β -Spezies und dem Einsetzen sowie der Progression der Krankheit. In Summe deuten diese Erkenntnisse darauf hin, dass die N-terminale Heterogenität von A β -Peptiden, von der nachgewiesen wurde, dass sie sowohl in vitro als auch im AD-Gehirn auftritt, die A β -Ablagerung in Plaques beschleunigen kann. Somit können proteolytische Ereignisse, die zur Spaltung von APP innerhalb der N-terminalen Domäne von A β beitragen, von erheblicher Signifikanz bei der Pathogenese von AD und verwandten Störungen sein.

Angeichts dieser Erkenntnisse scheint es wichtig, die Menge

dieser Peptidspezies bei AD-Patienten zu verringern, um die Progression der Krankheit zu verändern und die Toxizität sowie den einhergehenden kognitiven Verfall zu reduzieren. Eine optimale AD-Vakzine sollte daher eine Immunantwort auslösen, die in der Lage ist, die prominentesten Formen von A β -Peptiden anzuvisieren, die im Gehirn von AD-Patienten vorhanden sind, nämlich A β 1-40/42, A β 3-40/42 sowie A β 3(p)E-40/42 und A β 11-40/42 sowie A β 11(p)E-40/42, ohne dabei physiologische Funktionen der APP-Signalisierung, insbesondere die Funktionen von sAPP-alpha, zu stören.

Eine immunotheapeutische Behandlung unter Verwendung von aktiven und passiven Immunisierungsstrategien zur Abzielung auf A β voller Länge führte zu einer Reduktion von A β -Plaques und zeigte günstige Auswirkungen auf die Progression der Krankheit in AD-Tiermodellen. Alle in Mausmodellen getesteten aktiven Vakzinationsansätze verwendeten A β 40/42 voller Länge oder Fragmente, die die native Sequenz von A β enthielten.

Der klinische erste-Phase-IIa-Impftestlauf bei AD-Patienten unter Verwendung von A β 42 voller Länge als Antigen musste jedoch aufgrund schwerer neuroentzündlicher Nebenwirkungen einschließlich der Infiltration von autoreaktiven T-Zellen in das Gehirn abgebrochen werden (Nicoll, J.A. et al. 2003 Nat Med 9:448-452; Bayer, A.J., et al. 2005 Neurology 64:94-101). Nichtsdestotrotz zeigten Studien, die die klinischen Wirkungen bei mit AN-1792 behandelten Patienten untersuchten, dass Patienten, die eine Antikörperantwort gegen A β 42 entwickelten, aber nicht an Meningoenzephalitis litten, bei kognitiven Tests besser abschnitten als nicht ansprechende Patienten, was darauf hinweist, dass die Immuntherapie ein sehr nützlicher Behandlungsansatz bei AD sein könnte.

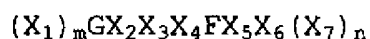
Was aber am wichtigsten ist, so zeigten aktuelle Ergebnisse aus Autopsiefällen zur Untersuchung von Patienten, die eine AN1792-Impfung erhielten, dass das Gehirn von A β -Spezies voller Länge frei wurde, N-terminal trunkierte A β -Formen aber bestehen blieben (Nicoll, J.A., et al. 2006 J Neuropathol Exp Neurol 65:1040-1048). Das unterstreicht die Notwendigkeit der Erfindung von neuen Vakzinen, die sowohl auf das A β voller Länge als auch auf N-terminal trunkierte und modifizierte Formen dieses Moleküls abzielen.

Die Induktion einer Immunantwort gegen A β 40/42-Peptide beim

Menschen kann zwar in den kognitiven Verfall von AD-Patienten eingreifen, eine sichere Alzheimer-Vakzine muss jedoch die Bildung von autoreaktiven T-Zellen vermeiden. Eine Vakzination unter Verwendung von nativen A β 40/42-Peptiden oder Fragmenten davon leidet am inhärenten Risiko der Induktion einer Autoimmunerkrankung bei den Patienten, da die Immunantwort nicht ausschließlich auf A β abgezielt werden kann.

Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Verbindungen und Medikamente zur Verfügung zu stellen, die zur Behandlung und/oder Prävention von Alzheimer-Krankheit verwendet werden können. Diese Verbindungen sollten bei Verabreichung an ein Individuum kein oder ein signifikant reduziertes Risiko der Induktion von Autoimmunerkrankungen aufweisen. Gemäß einem weiteren Ziel der vorliegenden Erfindung kann diese Verbindung die in-vivo-Bildung von Antikörpern in einem Individuum induzieren, die gegen trunkierte und/oder stabilisierte Formen von A β gerichtet sind, welche üblicherweise die Hauptbestandteile von Amyloidablagerungen sind.

Daher betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von mindestens einer Verbindung mit der Aminosäuresequenz



(Formel I),

worin

- X₁ Serin (S), Alanin (A) oder Cystein (C) ist,
X₂ Serin (S), Threonin (T), Glutaminsäure (E),
Asparaginsäure (D), Glutamin (Q) oder Methionin (M) ist,
X₃ Isoleucin (I), Tyrosin (Y), Methionin (M) oder Leucin (L) ist,
X₄ Leucin (L), Arginin (R), Glutamin (Q), Tryptophan (W),
Valin (V), Histidin (H), Tyrosin (Y), Isoleucin (I), Lysin (K) Methionin (M) oder Phenylalanin (F) ist,
X₅ Alanin (A), Phenylalanin (F), Histidin (H), Asparagin (N), Arginin (R), Glutaminsäure (E), Isoleucin (I), Glutamin (Q), Asparaginsäure (D), Prolin (P) oder Tryptophan (W),
Glycin (G) ist,
X₆ jeder Aminosäurerest ist,
X₇ Cystein (C) ist,
m und n unabhängig voneinander 0 oder 1 sind,

welche Verbindung eine Bindungskapazität an einen Antikörper aufweist, der spezifisch für ein Epitop des Amyloid-beta-Peptids (A β) umfassend die Aminosäuresequenz HQKLVF, insbesondere HQKLVFFAED, ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Prävention und/oder Behandlung von Alzheimer-Krankheit.

Die hierin präsentierte Erfindung bezieht sich auf Antigene, die keine Sequenzen des nativen A β -Peptids enthalten, sondern vielmehr die Struktur von Neoepitopen von A β nachahmen, welche nicht durch Mimotope nachgewiesen werden können, wie sie in der WO 2004/062556 beschrieben sind. Eine derartige Mimotop-basierte AD-Vakzine induziert daher Antikörperantworten, die ausschließlich mit den oben genannten pathologischen A β -Molekülen, nicht aber mit parentalen Strukturen reagieren. Was wichtig ist: die von diesen Mimotopen induzierte Immunantwort interagiert nicht mit APP voller Länge und mit sekretiertem APP-alpha (sAPP-alpha), und somit erhält die Vakzine die normalen physiologischen Funktionen beider Moleküle. Weiters enthalten Mimotope keine potentiellen T-Zellen-Selbstepitope und vermeiden die Induktion von schädlichen autoreaktiven T-Zellen.

Es hat sich überraschend gezeigt, dass eine Verbindung mit einer Aminosäuresequenz der Formel I die in-vivo-Bildung von Antikörpern induzieren kann, die gegen die nicht trunkierten A β -Formen A β 1-40/42 und N-terminal trunkierte Formen wie A β 3-40/42, A β (pE)3-40/42, nicht modifiziertes A β 11-40/42, modifiziertes A β p(E)11-40/42 bzw. A β 14-40/42 und auch gegen weitere N-terminal trunkierte und posttranslatorisch modifizierte Amyloidvarianten beginnend in Position 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 oder 10 von A β gerichtet sind. Zudem induzieren diese Mimotope keine Kreuzreaktivität mit den in sAPP-alpha nach der Abspaltung von APP vorhandenen Neoepitopen und stören daher das normale sAPP-alpha-Signaling nicht.

Die durch die Vakzination der erfindungsgemäßen Moleküle (Mimotope) gebildeten Antikörper können an die oben angeführten A β -Fragmente binden, was zu einem Zerfall von A β -Plaques führt.

Formel I und alle anderen hierin offenbarten Peptidmoleküle ahmen die natürlich vorkommenden A β -Peptide und die Varianten A β -40/42, A β pE3-40/42, A β 3-40/42 und A β 11-40/42, A β pE11-40/42 und A β 14-40/42 nach, so dass Verbindungen mit den hierin offenbarten Aminosäuresequenzen die Bildung von entsprechenden

Antikörpern induzieren können. Darüber hinaus können N-terminal trunkierte und posttranslatorisch modifizierte Amyloidvarianten beginnend in Position 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 oder 10 von A β ebenso gut von solchen Antikörpern nachgewiesen werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst die Verbindung ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SGEYVFH(C), SGQLKFP(C), SGQIWFR(C), SGEIHFN(C), GQIWFIS(C), GQIIFQS(C), GQIRFDH(C), GEMWFAL(C), GELQFPP(C), GELWFP(C), GEMQFFI(C), GELYFRA(C), GEIRFAL(C), GMIVFPH(C), GEIWFEG(C), GDLKFPL(C), GQILFPV(C), GELFFPK(C), GQIMEPR(C), GSLFFWP(C), GEILFGM(C), GQLKFPP(C), GTIFFRD(C), GQIKFAQ(C), GTLIFHH(C), GEIRFGS(C), GQIQFPL(C), GEIKFDH(C), GEIQFGA(C), GELFFEK(C), GEIRFEL(C), GEIYFER(C), SGEIYFER(C), AGEIYFER(C) und (C)GEIYFER.

Besonders bevorzugte Verbindungen der vorliegenden Erfindung umfassen die bzw. bestehen aus den oben identifizierten Aminosäuresequenzen, wobei der C-Terminus des Peptids gegebenenfalls einen Cysteinrest (angezeigt durch Klammern) enthalten kann, so dass die erhaltene Verbindung z.B. an ein Trägermolekül gekoppelt werden kann. Es ist jedoch auch möglich, einen Cysteinrest an den N-Terminus des Peptids anzuhängen.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus GELWFP(C), GEIWFEG(C), GEIYFER(C), GEILFGM(C), GEIKFDH(C), GEIQFGA(C) (von denen alle kompetitierende Peptide sind) und

GEIKFDH(C), GEIRFGS(C), SGQLKFP(C), SGQIWFR(C), SGEIHFN(C), GELWFP(C), GEIWFEG(C), GEIYFER(C), GEIQFGA(C), SGEYVFH(C) (von denen alle in vivo die Bildung von Antikörpern induzieren können, die gegen die oben angeführten A β -Peptide gerichtet sind).

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung von mindestens einer Verbindung mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus AIPLFVM(C), KLPLFVM(C), QLPLFVL(C) und NDAKIVF(C) zur Herstellung eines Medikaments zur Prävention und/oder Behandlung von Alzheimer-Krankheit.

Jede der erfindungsgemäßen Verbindungen kann die in-vivo-Bildung von Antikörpern induzieren, die gegen Peptide, welche von A β 40/42 einschließlich A β 1-40/42 abgeleitet sind, und N-

terminal trunkierte Formen wie A β 3-40/42, A β (pE)3-40/42, nicht modifiziertes A β 11-40/42, modifiziertes A β p(E)11-40/42 bzw. A β 14-40/42 gerichtet sind. Da die erfindungsgemäßen Verbindungen durch einen gegen die Aminosäurereste 14 bis 19 von A β gerichteten Antikörper isoliert werden, können die erfindungsgemäßen Verbindungen die Bildung von Antikörpern induzieren, die an Trunkationen des A β -Peptids, beginnend mit der Aminosäureposition 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 oder 14 der A β -Peptide, binden können. Daher eignen sich diese Verbindungen besonders gut zur Behandlung und/oder Prävention von AD, weil die Verabreichung von zumindest einer dieser Verbindungen zur Bildung von Antikörpern führt, die die wichtigsten A β -Formen, nämlich A β 1-40/42, A β pE3-40/42 und A β 3-40/42, erkennen können. Diese Mimotope versagen weiters bei der Induktion einer Kreuzreaktivität mit den in sAPP-alpha nach der Abspaltung von APP vorhanden Neoepitopen und stören somit nicht das normale sAPP-alpha-Signaling.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen, insbesondere die erfindungsgemäßen Peptide, können an ihrem N-Terminus durch eine Acylierungs- und/oder eine Acetylierungsreaktion weiter modifiziert werden. Beispielsweise umfasst eine besonders bevorzugte Verbindung die Aminosäuresequenz AC-GEIYFER(C).

Gemäß der vorliegenden Erfindung bezieht sich der Ausdruck „Mimotop“ auf ein Molekül, das eine Konformation mit einer Topologie äquivalent zu dem Epitop aufweist, von dem es eine Mimikry ist. Das Mimitop bindet an dieselbe Antigen-bindende Region eines Antikörpers, der immunspezifisch an ein gewünschtes Antigen bindet. Das Mimotop ruft eine immunologische Antwort in einem Wirt hervor, die auf das Antigen reagiert, von dem es eine Mimikry ist. Bei in-vitro-Inhibitionsassays (z.B. ELISA-Inhibitionsassays), bei denen das Epitop und ein an dieses Epitop bindender Antikörper involviert sind, kann das Mimotop auch als Konkurrent für das Epitop fungieren, von dem es eine Mimikry ist. Ein erfindungsgemäßes Mimotop muss aber nicht unbedingt die Bindung des Epitops, von dem es eine Mimikry ist, in einem in-vitro-Inhibitionsassay verhindern bzw. mit diesem konkurrieren, auch wenn es bei Verabreichung an einen Säuger eine spezifische Immunantwort induzieren kann.

Wie hierin verwendet, bezieht sich der Ausdruck „Epitop“ auf eine immunogene Region eines Antigens, das von einem bestimmten

Antikörpermolekül erkannt wird. Im allgemeinen besitzt ein Antigen ein oder mehr Epitope, von denen jedes einen Antikörper binden kann, der das bestimmte Epitop erkennt.

Die Mimotope der vorliegenden Erfindung können mit Hilfe von chemischen Syntheseverfahren synthetisch hergestellt werden, die auf dem Gebiet gut bekannt sind, u.zw. entweder als isoliertes Peptid oder als Teil eines anderen Peptids oder Polypeptids. Alternativ kann das Peptidmimotop in einem Mikroorganismus produziert werden, der das Peptidmimotop produziert, das dann isoliert und gewünschtenfalls weiter gereinigt wird. Das Peptidmimotop kann in Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen oder Pilzen, in eukaryotischen Zellen wie einer Säuger- oder einer Insektenzelle, oder in einem rekombinanten Virusvektor wie Adenovirus, Pockenvirus, Herpesvirus, Simliki-Forest-Virus, Baculovirus, Bakteriophage, Sindbis-Virus oder Sendai-Virus hergestellt werden. Geeignete Bakterien zur Herstellung des Peptidmimotops inkludieren E.coli, B.subtilis oder jedes andere Bakterium, das Peptide wie das Peptidmimotop exprimieren kann. Geeignete Hefearten zur Expression des Peptidmimotops inkludieren Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Candida, Pichia pastoris oder jede andere Hefe, die Peptide exprimieren kann. Entsprechende Verfahren sind auf dem Gebiet gut bekannt. Auch Verfahren zum Isolieren und Reinigen von rekombinant hergestellten Peptiden sind auf dem Gebiet gut bekannt und inkludieren z.B. Gelfiltration, Affinitätschromatografie, Ionenaustauschchromatografie etc..

Um die Isolierung des Peptidmimotops zu erleichtern, kann ein Fusionspolypeptid erzeugt werden, wobei das Peptidmimotop translatorisch mit einem heterologen Polypeptid verschmolzen (kovalent gekoppelt) wird, das die Isolierung mittels Affinitätschromatografie ermöglicht. Typische heterologe Polypeptide sind His-Tag (z.B. His₆; 6-Histidinreste), GST-Tag (Glutathion-S-Transferase) etc.. Das Fusionspolypeptid erleichtert nicht nur die Reinigung der Mimotope, sondern kann auch verhindern, dass das Mimotoppolypeptid während der Reinigung abgebaut wird. Wird eine Entfernung des heterologen Polypeptids nach der Reinigung gewünscht, kann das Fusionspolypeptid eine Spaltstelle an der Verbindung zwischen dem Peptidmimotop und dem heterologen Polypeptid aufweisen. Die Spaltstelle besteht aus einer Aminosäuresequenz, die mit einem

für die Aminosäuresequenz an dieser Stelle spezifischen Enzym (z.B. Proteasen) gespalten wird.

Die erfindungsgemäßen Mimotope können auch an oder nahe ihres N- und/oder C-Terminus modifiziert werden, so dass in diesen Positionen ein Cysteinrest daran gebunden wird. In einer bevorzugten Ausführungsform werden terminal positionierte (am N- und C-Terminus des Peptids befindliche) Cysteinreste zur Zyklisierung der Peptide durch eine Disulfidbindung verwendet.

Die erfindungsgemäßen Mimotope können auch in verschiedenen Tests und Sets, insbesondere immunologischen Tests und Sets, verwendet werden. Daher wird besonders bevorzugt, dass das Mimotop Teil eines anderen Peptids oder Polypeptids, insbesondere eines Enzyms, sein kann, welches als Reporter in immunologischen Tests verwendet wird. Solche Reporterenzyme inkludieren z.B. Alkaliphosphatase oder Meerrettich-Peroxidase.

Die erfindungsgemäßen Mimotope sind vorzugsweise antigene Polypeptide, die sich in ihrer Aminosäuresequenz von der Aminosäuresequenz von A β oder von A β -Fragmenten unterscheiden. Diesbezüglich können die erfindungsgemäßen Mimotope nicht nur Aminosäuresubstitutionen eines oder mehrerer natürlich vorkommender Aminosäurereste, sondern auch eine oder mehr nicht natürliche Aminosäuren (d.h. nicht von den 20 „klassischen“ Aminosäuren) aufweisen, oder sie können zur Gänze aus solchen nicht natürlichen Aminosäuren zusammengesetzt sein. Außerdem können die erfindungsgemäßen Antigene, die Antikörper induzieren, welche gegen 1-40/42, A β pE3-40/42, A β 3-40/42, A β 11-40/42, A β pE11-40/42 und A β 14-40/42 (und andere N-terminal trunkierte Formen von A β beginnend von den Aminosäurepositionen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 und 13) gerichtet sind und an diese binden, aus D- oder L-Aminosäuren oder DL-Aminosäure-Kombinationen zusammengesetzt und gegebenenfalls durch weitere Modifikationen, Ringschließungen oder Derivatisierungen verändert worden sein. Geeignete Antikörper induzierende Antigene können von handelsüblichen Peptidbibliotheken zur Verfügung gestellt werden. Vorzugsweise sind diese Peptide mindestens 7 Aminosäuren lang, und bevorzugte Längen können bis zu 16, vorzugsweise bis zu 14 oder 20 Aminosäuren (z.B. 5 bis 16 Aminosäurereste) aufweisen. Erfindungsgemäß können jedoch auch längere Peptide sehr gut als Antikörper induzierende Antigene eingesetzt werden. Weiters können die erfindungsgemäßen Mimotope

auch Teil eines Polypeptids sein und in der Folge an ihrem N- und/oder C-Terminus mindestens einen weiteren Aminosäurerest aufweisen.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Mimotope (d.h. der hierin offenbarten Antikörper induzierenden Antigene) sind natürlich auch Phagenbibliotheken, Peptidbibliotheken geeignet, die beispielsweise mittels kombinatorischer Chemie erzeugt oder mit Hilfe von Hochdurchsatz-Screening-Methoden für die unterschiedlichsten Strukturen erhalten werden (Display: A Laboratory Manual by Carlos F. Barbas (Editor), et al.; Willats WG Phage display: practicalities and prospects. Plant Mol. Biol. 2002 Dec.; 50(6):837-54).

Weiters können erfindungsgemäß auch anti-A β 1-40/42-, -A β pE3-40/42-, -A β 3-40/42-, -A β 11-40/42-, -A β pE11-40/42- und -A β 14-40/42-Antikörper induzierende Antigene basierend auf Nukleinsäuren („Aptamere“) verwendet werden, und auch diese sind in den verschiedensten (Oligonukleotid-) Bibliotheken (z.B. mit 2-180 Nukleinsäureresten) zu finden (z.B. Burgstaller et al., Curr. Opin. Drug Discov. Dev. 5(5) (2002), 690-700; Famulok et al., Acc. Chem. Res. 33 (2000), 591-599; Mayer et al., PNAS 98 (2001), 4961-4965, etc.). Bei Antikörper induzierenden Antigenen basierend auf Nukleinsäuren kann das Nukleinsäure-Grundgerüst z.B. durch die natürlichen Phosphordiester-Verbindungen oder auch durch Phosphorthioate oder Kombinationen oder chemische Variationen (z.B. als PNA) zur Verfügung gestellt werden, wobei erfindungsgemäß als Basen in erster Linie U, T, A, C, G, H und mC eingesetzt werden können. Die 2'-Reste der Nukleotide, die erfindungsgemäß verwendet werden können, sind vorzugsweise H, OH, F, Cl, NH₂, O-Methyl, O-Ethyl, O-Propyl oder O-Butyl, wobei die Nukleinsäuren auch unterschiedlich modifiziert sein können, d.h. mit Schutzgruppen, wie sie üblicherweise bei der Oligonukleotid-Synthese verwendet werden. Somit sind Aptamer-basierte Antikörper induzierende Antigene auch bevorzugte Antikörper induzierende Antigene im Rahmen der vorliegenden Erfindung.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Verbindung an einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, vorzugsweise KLH (Keyhole-Limpet-Hemocyanin), Tetanustoxoid, Albumin bindendes Protein, Rinderserumalbumin, ein Dendrimer (MAP; Biol. Chem. 358: 581), Peptidlinker (oder

flankierende Regionen) sowie die Adjuvanzien, die in Singh et al., Nat. Biotech. 17 (1999), 1075-1081 (insbesondere in Tabelle 1 dieses Dokuments) und in O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9) (2003), 727-735 (insbesondere die darin beschriebenen endogenen immunpotenzierenden Verbindungen und Abgabesysteme) beschrieben sind, oder Mischungen davon gekoppelt. Die Konjugationschemie (z.B. über heterobifunktionelle Verbindungen wie GMBS und natürlich auch andere wie in „Bioconjugate Techniques“, Greg T. Hermanson, beschrieben) kann dabei aus dem Fachmann bekannten Reaktionen ausgewählt werden. Außerdem kann die Vakzinezusammensetzung mit einem Adjuvans, vorzugsweise einer leicht löslichen Aluminiumzusammensetzung, insbesondere Aluminiumhydroxid, formuliert werden. Selbstverständlich können auch Adjuvanzien wie MF59 Aluminiumphosphat, Calciumphosphat, Zytokine (z.B. IL-2, IL-12, GM-CSF), Saponine (z.B. QS21), MDP-Derivate, CpG-Oligos, LPS, MPL, Polyphosphazene, Emulsionen (z.B. Freund's, SAF), Liposome, Virosome, Iscome, Cochleate, PLG-Mikroteilchen, Poloxamerteilchen, virusartige Teilchen, hitzelabiles Enterotoxin (LT), Cholera toxin (CT), mutante Toxine (z.B. LTK63 und LTR72), Mikroteilchen und/oder polymerisierte Liposome verwendet werden.

Die erfindungsgemäße Verbindung ist vorzugsweise über einen Linker ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus NHS-Poly (Ethylenoxid) (PEO) (z.B. NHS-PEO_n-Maleimid) an den Träger bzw. das Adjuvans gebunden.

Eine die vorliegende Verbindung (Mimotop) und den pharmazeutisch akzeptablen Träger umfassende Vakzine kann mittels jeder geeigneten Applikationsmethode, z.B. i.d., i.p., i.m., intranasal, oral, subkutan etc. und in jeder geeigneten Abgabevorrichtung (O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9), (2003), 727-735) verabreicht werden. Die erfindungsgemäße Verbindung ist vorzugsweise für subkutane, intradermale oder intramuskuläre Verabreichung formuliert (siehe z.B. "Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations", Sarfaraz Niazi, CRC Press Inc, 2004).

Das erfindungsgemäße Medikament (die erfindungsgemäße Vakzine) enthält die erfindungsgemäße Verbindung in einer Menge von 0,1 ng bis 10 mg, vorzugsweise 10 ng bis 1 mg, insbesondere 100 ng bis 100 µg, oder alternativ z.B. 100 fmol bis 10 µmol,

vorzugsweise 10 pmol bis 1 µmol, insbesondere 100 pmol bis 100 nmol. Typischerweise kann die Vakzine auch Hilfsstoffe, z.B. Puffer, Stabilisatoren etc. enthalten.

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein Peptid mit oder bestehend aus einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SGEYVFH(C), SGQLKFP(C), SGQIWFR(C), SGEIHFN(C), GQIWFIS(C), NDAKIVF(C), GQIIFQS(C), GQIRFDH(C), GEMWFAL(C), GELQFPP(C), GELWFP(C), GEMQFFI(C), GELYFRA(C), GEIRFAL(C), GMIVFPH(C), GEIWFEG(C), GEIYFER(C), AIPLFVM(C), GDLKFPL(C), GQILEPV(C), GELFFPK(C), GQIMFPR(C), GSLFFWP(C), GEILFGM(C), GQLKFPP(C), KLPLFVM(C), GTIFFRD(C), GQIKFAQ(C), GTLIFHH(C), GEIRFGS(C), GQIQFPL(C), GEIKFDH(C), GEIQFGA(C), QLPLFVL(C), GELFFEK(C), GEIRFEL(C), AcGEIYFER(C), SGEIYFER(C), AGEIYFER(C) und (C)GEIYFER. Wie durch die Verwendung der Klammern angedeutet, können die erfindungsgemäßen Peptide gegebenenfalls den Cysteinrest am C- oder N-Terminus aufweisen. Daher umfasst die vorliegende Erfindung auch die folgenden Aminosäuresequenzen: SGEYVFH, SGQLKFP, SGQIWFR, SGEIHFN, GQIWFIS, NDAKIVF, GQIIFQS, GQIRFDH, GEMWFAL, GELQFPP, GELWFP, GEMQFFI, GELYFRA, GEIRFAL, GMIVFPH, GEIWFEG, GEIYFER, AIPLFVM, GDLKFPL, GQILEPV, GELFFPK, GQIMFPR, GSLFFWP, GEILFGM, GQLKFPP, KLPLFVM, GTIFFRD, GQIKFAQ, GTLIFHH, GEIRFGS, GQIQFPL, GEIKFDH, GEIQFGA, QLPLFVL, GELFFEK, GEIRFEL, SGEIYFER und AGEIYFER.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist das Peptid an einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, vorzugsweise KLH (Keyhole-Limpet-Hemocyanin) gekoppelt.

Ein noch anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf eine pharmazeutische Formulierung, vorzugsweise eine Vakzine, die mindestens ein erfindungsgemäßes Peptid umfasst. Diese pharmazeutische Formulierung kann zur Behandlung von an Alzheimer-Krankheit leidenden Individuen oder zur Verhinderung der Bildung von Aß-Plaques in einem Individuum zwecks Hintanhaltens der Bildung von Alzheimer-Krankheit verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Figuren und Beispiele näher veranschaulicht, ohne jedoch darauf eingeschränkt zu sein.

Fig. 1 zeigt die Bindung des monoklonalen Antikörpers MV-002 an bestimmte Peptide und rekombinante Proteine.

Fig. 2 zeigt typische Bindungsassays mit Mimotopen für β -Amyloid und N-terminal trunkierte und/oder posttranslatorisch modifizierte β -Amyloid-Fragmente.

Fig. 3 zeigt typische Inhibitionsassays mit Mimotopen für β -Amyloid und N-terminal trunkierte und/oder posttranslatorisch modifizierte β -Amyloid-Fragmente.

Fig. 4 zeigt Beispiele für in-vivo-Charakterisierungen der durch Mimotop-Vakzination (injiziertes Peptid/irrelevantes Peptid) hervorgerufenen Immunantwort.

Fig. 5 zeigt Beispiele für die in-vivo-Charakterisierung der durch Mimotop-Vakzination gegen Amyloid-beta-Fragmente und sAPP-alpha hervorgerufenen Immunantwort.

Fig. 6 zeigt Beispiele für die in-vivo-Charakterisierung der durch Mimotop-Vakzination gegen A β 40/42 voller Länge hervorgerufenen Immunantwort.

B E I S P I E L E :

Verfahren

Die zur Mimotop-Identifizierung gemäß der vorliegenden Erfindung verwendeten Antikörper weisen von humanem A β abgeleitete Aminosäuresequenzen nach, binden aber nicht an humanes APP voller Länge. Zu den nachgewiesenen Sequenzen gehören EVHHQKLFFAED (= Originalepitop aall-24 von A β) und p(E)VHHQKLVE (p4374 = Originalepitop aall-19 von A β mit einer Pyroglutamat-Modifikation am N-Terminus). Der Antikörper kann eine monoklonale oder polyclonale Antikörperpräparation oder jeder Antikörperteil oder jedes Derivat davon sein, mit der einzigen Maßgabe, dass das Antikörpermolekül mindestens eines der oben genannten (von humanem A β abgeleiteten) Epitope spezifisch erkennt, nicht aber an humanes APP voller Länge bindet.

Die Mimotope werden mit solchen monoklonalen Antikörpern und Peptidbibliotheken identifiziert und weiter charakterisiert.

Beispiel 1: Herstellung von monoklonalen Antikörpern für den spezifischen Nachweis von β -Amyloid und N-terminal trunkierten und/oder posttranslatorisch modifizierten β -Amyloid-Fragmenten.

Es wurde ein monoklonaler Antikörper, abgeleitet aus der Fusion von Versuch Alz-9, hergestellt: C57/B16-Mäuse wurden mit dem Original-A β -Epitop HQKLVEFC, gekoppelt an KLH (Keyhole-Limpet-Hemocyanin) und Alum (Aluminiumhydroxid) als Adjuvans, wiederholt immunisiert. p4377-Peptid-spezifische, Antikörper

produzierende Hybridome wurden mittels ELISA nachgewiesen (mit p4377-Peptid beschichtete ELISA-Platten). Humanes A β 40/42 (rekombinantes Protein) wurde als positives Kontrollpeptid verwendet: Hybridome, die das auf ELISA-Platten immobilisierte rekombinante Protein erkannten, wurden mit eingeschlossen, weil sie sowohl das Peptid als auch das A β voller Länge spezifisch banden. P1454 (humanes A β 33-40) wurde als negatives Kontrollpeptid verwendet. Weiters wurden Hybridome gegen p4374, p1323 und sAPP-alpha getestet. Nur Hybridome mit guter p4374- und p1323-Bindung und keiner sAPP-alpha-Bindung wurden für eine weitere Antikörperentwicklung verwendet.

Der Hybridomklon (MV-002) (interner Name A115; IgG2b) wurde gereinigt und für den spezifischen Nachweis von p1323, p4374, p4377, p1454, A β bzw. sAPP-alpha analysiert. MV-002 erkannte die Epitope p1323 sowie p4377 und das A β -Protein voller Länge (rekombinantes Protein; erhalten von Bachem Antigen, Bubendorf, Schweiz) im ELISA. Er wies jedoch nicht p1454 im ELISA nach. Weiters versagten die MV-002-Antikörper beim Nachweis von sAPP-alpha, banden aber spezifisch an das Peptid p4374, das für die Pyroglutamatversion von A β 11-19 codiert.

Beispiel 2: Phagen-Display, in-vitro-Bindung und Inhibitions-ELISA

Die in diesem Beispiel verwendeten Phagen-Display-Bibliotheken waren: Ph.D. 7: New England BioLabs E8102L (lineare 7mer-Bibliothek). Das Phagen-Display erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (www.neb.com).

Nach 2 oder 3 aufeinander folgenden Panning-Runden wurden einzelne Phagenklone gepickt und die Phagenüberstände einem ELISA auf Platten unterzogen, die mit dem Antikörper beschichtet waren, der für das Panning-Verfahren verwendet wurde. Phagenklone, die in diesem ELISA positiv waren (starkes Signal für das Target, aber kein Signal für unspezifische Kontrolle), wurden sequenziert. Aus DNA-Sequenzen wurden Peptidsequenzen abgeleitet. Diese Peptide wurden synthetisiert und im Bindungs- und Inhibitions-ELISA charakterisiert. Darüber hinaus wurden einige neue Mimotope geschaffen, indem im Screen identifizierte Sequenzinformationen von Mimotopen zur Unterstützung der Identifizierung einer Konsensussequenz für eine Mimotop-Vakzination kombiniert wurden.

1. In-vitro-Bindungsassay (ELISA)

Vom Phagen-Display abgeleitete Peptide sowie Varianten davon wurden an BSA gekoppelt und an ELISA-Platten gebunden (1 μ M; wie in den entsprechenden Figuren angegeben) und anschließend mit dem monoklonalen Antikörper inkubiert, der für den Screening-Vorgang verwendet wurde, um die Bindungskapazität von identifizierten Peptiden zu analysieren.

2. In-vitro-Inhibitionsassay (ELISA)

Vom Phagen-Display abgeleitete, unterschiedliche Peptidmengen (Konzentrationen von 5 μ g bis 0,03 μ g; Serienverdünnungen) wurden mit dem monoklonalen Antikörper inkubiert, der für den Screening-Vorgang verwendet wurde. Peptide, die die anschließende Bindung des Antikörpers an das auf ELISA-Platten beschichtete Originalepitop verringerten, wurden in diesem Assay als inhibierend angesehen.

Beispiel 3: In-vivo-Untersuchung von Mimotopen: Analyse der Immunogenität und Kreuzreaktivität

1. In-vivo-Untersuchung von Mimotopen

Inhibierende und nicht inhibierende Peptide wurden an KLH gekoppelt und Mäusen injiziert (Wildtyp C57/B16-Mäuse; subkutane Injektion in die Flanke), zusammen mit einem geeigneten Adjuvans (Aluminiumhydroxid). Die Tiere wurden 3- bis 6-mal in zweiwöchigen Intervallen geimpft, und Seren wurden ebenfalls zweiwöchentlich genommen. Die Titer zu den injizierten Peptiden sowie zu einem irrelevanten Peptid wurden bei jedem Serum bestimmt. Weiters wurden Titer gegen das rekombinante humane A β -Protein bzw. gegen Originalpeptide bestimmt. Im allgemeinen wurden die Seren durch Reaktion mit an Rinderserumalbumin (BSA) gekoppelten Peptiden und auf ELISA-Platten immobilisierten rekombinanten Proteinen voller Länge analysiert. Die Titer wurden unter Verwendung von anti-Maus-IgG-spezifischen Antikörpern bestimmt. Für detaillierte Ergebnisse siehe Fig. 4, 5 bzw. 6.

2. Ergebnisse

2.1. Identifizierung von spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAB), die gegen n-terminal trunkierte und modifizierte Formen von A β gerichtet sind:

Fig. 1 zeigt die Charakterisierung des vom Versuch Alz-9 stammenden monoklonalen Antikörpers MV-002 (interner Name A115; IgG2b) und zeigt die Spezifität für A β voller Länge und in Position E11 und H14 trunkierte bzw. in Position E11 bis pE11

modifizierte A β -Fragmente.

2.2. Screening mit spezifischen mABs, die gegen n-terminal trunkierte und modifizierte Formen von A β gerichtet sind:

2.2.1. Phagen-Display-Bibliothek Ph.D. 7

2.2.1.1. Screening mit gegen p1323 gerichtetem monoklonalem Antikörper

Durch Screenen von PhD-7-Phagen-Display-Bibliotheken wurden 47 Sequenzen in diesem Screen identifiziert: Tabelle 1 fasst die identifizierten Peptide und ihre Bindungskapazität im Vergleich zum Originalepitop zusammen.

Tabelle 1: Mimotope, die an den parentalen Antikörper MV-002 binden

Interne Peptidnummer	SEQ ID No.	Sequenz	Bindungskapazität
p4403	1	SHTRLYFC	1
p4404	2	SGEYVFHC	1
p4413	3	SGQLKFPC	1
p4414	4	SGQIWERC	1
p4415	5	SGEIHENC	1
p4666	6	GQIWFISC	1
p4667	7	NDAKIVFC	3
p4668	8	GQIIFQSC	2
p4669	9	GQIRFDHC	3
p4670	10	HMRLFFNC	3
p4671	11	GEMWFALC	3
p4672	12	GELQFPFC	3
p4673	13	GELWFPC	3
p4674	14	SHQRLWFC	3
p4675	15	HQKMIFAC	3
p4676	16	GEMQFFIC	3
p4677	17	GELYFRAC	3
p4678	18	GEIRFALC	3
p4679	19	GMIVFPHC	3
p4680	20	GEIWFEGC	3
p4681	21	GEIYFERC	3
p4682	22	AIPLFVMC	1
p4683	23	GDLKFPLC	3
p4684	24	GQILFPVC	3

000655

Interne Peptidnummer	SEQ ID No.	Sequenz	Bindungskapazität
p4685	25	GELFFPKC	3
p4686	26	GQIMFPRC	3
p4687	27	HMRMYFEC	3
p4688	28	GSLFFWPC	2
p4689	29	GEILFGMC	3
p4690	30	GQLKFPEC	3
p4691	31	KLPLFVMC	1
p4692	32	GTIFFRDC	1
p4693	33	THQRLWFC	3
p4694	34	GQIKFAQC	3
p4695	35	GTLIFHHC	2
p4696	36	GEIRFGSC	3
p4697	37	GQIQFPLC	3
p4698	38	GEIKFDHC	3
p4699	39	GEIQFGAC	3
p4700	40	QLPLFVLC	1
p4794	41	HQKMIFC	2
p4795	42	GELFFEKC	2
p4796	43	GEIRFELC	2
p4804	44	Ac-GEIY- FERC	2
p4805	45	SGEIYFERC	1
p4806	46	AGEIYFERC	1
p4807	47	CGEIYFER	1

Legende zu Tabelle 1: die Bindungskapazität ist durch den folgenden Bindungscode codiert: 1:X beschreibt den Verdünnungsfaktor des parentalen AB. Ac-... bedeutet acetyliertes AA.

Bindungscode

OD halbmax

1:X

0	keine Bindung	:0
1	schwache Bindung	:<40000
2	mittlere Bindung	:
		40000-32000
		0
3	starke Bindung	:>320000

2.3. In-vitro-Charakterisierung von Mimotopen, die beim Screenen von Phagen-Display-Bibliotheken mit gegen n-terminal trunkierte und modifizierte Formen von A β gerichteten monoklonalen Antikörpern identifiziert wurden:

Die Fig. 2 und 3 zeigen repräsentative Beispiele für Bindungs- und Inhibitionsassays, die zur Charakterisierung von Mimotopen in vitro verwendet wurden. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 1 bzw. 2 zusammengefasst.

MV-002-Mimotope: Von den 47 dargestellten Sequenzen inhibierten 11 die Bindung des monoklonalen Antikörpers MV-002 bei in-vitro-Kompetitionsversuchen. Weitere 36 Sequenzen wurden identifiziert, die die Bindung des monoklonalen Antikörpers bei in-vitro-Kompetitionsversuchen zwar nicht inhibierten, aber ihre Bindungskapazität an den parentalen Antikörper beibehielten (Tabelle 2). Was wichtig ist, wie in den Fig. 4-6 beschrieben, die Fähigkeit, mit dem Originalepitop bei der Bindung an den parentalen Antikörper in vitro zu konkurrieren, war keine Voraussetzung, um spezifische Immunantworten zu zeigen, die mit bestimmten Peptiden in vivo kreuzreagieren. Somit können sowohl inhibierende als auch nicht inhibierende Peptide zur Induktion von Immunantworten verwendet werden, die Peptide in vivo nachweisen (Details siehe Fig. 4-6), welche zu einer Beseitigung von Amyloidpeptiden aus dem Gehirn führen können.

Tabelle 2: In der vorliegenden Erfindung identifizierte Mimotope, die in Inhibitionsassays positive Ergebnisse liefern; MV-002-Mimotope

Interne Peptidennummer	SEQ ID No.	Sequenz	Inhibitionskapazität
p4667	7	NDAKIVFC	1
p4670	10	HMRLFFNC	1
p4673	13	GELWFPC	1
p4674	14	SHQRLWFC	1
p4675	15	HQKMIFAC	2
p4680	20	GEIWFEGC	2
p4681	21	GEIYFERC	2
p4689	29	GEILFGMC	1
p4698	38	GEIKFDHC	2
p4699	39	GEIQFGAC	1

000555

p4794	41	HQKMIFC	1
-------	----	---------	---

Legende zu Tabelle 2: Die Inhibitionskapazität ist durch den folgenden Code codiert: Schwache Inhibition bedeutet, dass mehr Peptid als beim Originalepitop zur Verringerung der AB-Bindung erforderlich ist; starke Inhibition bedeutet, dass ähnliche Peptidmengen beim Mimotop und beim Originalepitop zur Verringerung der AB-Bindung erforderlich sind. Die Mimotope werden mit dem Originalpeptid als Standard verglichen. Die OD bei 5 µg Peptid wie im Assay verwendet wird zur Berechnung der Konkurrenzkapazität im Vergleich zum Originalpeptid verwendet.

Konkurrenzcode	
0	keine Inhibition (OD des Peptids über 4,6-mal des Originalpeptids)
1	schwächer als Originalepitop (OD des Peptids unter 4,6-mal des Originalpeptids)
2	starke Inhibition (wie beim Originalepitop; OD des Peptids unter 2,3-mal des Originalpeptids)

2.4. In-vivo-Charakterisierung von Mimotopen, die beim Screenen von Phagen-Display-Bibliotheken mit einem gegen Amyloid-beta gerichteten monoklonalen Antikörper identifiziert wurden:

Weibliche C57/bl6-Mäuse, 5-6 Mäuse pro Gruppe, wurden subkutan mit 30 µg an KLH gekoppeltem Peptid immunisiert. An Kontrollgruppen wurden jeweils Originalepitop-KLH-Konjugate verabreicht. Als Adjuvans wurde Alum verwendet (immer 1 mg pro Maus). Die verabreichten Peptide konnten alle spezifisch an monoklonale Antikörper binden, auch wenn manche Peptide die Bindung des Originalepitops an seinen parentalen Antikörper in vitro nicht inhibierten (in einem in-vitro-Inhibitionassay). Der in-vitro-ELISA zum Nachweis des Antikörpertiters wurde mit Seren von einzelnen Mäusen nach jeder Vakzination in einem zweiwöchigen Intervall durchgeführt. In sämtlichen gezeigten Figuren wurden die Titer als OD max/2 berechnet. Die Vertiefungen der ELISA-Platte wurden mit Mimotop-BSA-Konjugat und einem irrelevanten Peptid-BSA-Konjugat (negative Kontrolle) beschichtet. Die positive Kontrolle erfolgte durch Umsetzung des parentalen Antikörpers mit dem entsprechenden Mimotop-BSA-Konjugat. Der Nachweis erfolgte mittels anti-Maus-IgG. Darüber

hinaus wurden rekombinante Proteine auf ELISA-Platten immobilisiert, und die Seren reagierten dementsprechend. Die Fig. 4, 5 und 6 zeigen repräsentative Beispiele für Assays, die zur Charakterisierung von Mimotopen in vivo verwendet wurden. Die dargestellten Ergebnisse stammten von bei in-vitro-Inhibitionsassays aktiven Peptiden wie p4670, p4675, p4680 und p4681 bzw. einem Peptid ohne Inhibitionskapazität, nämlich p4403.

Fig. 4 zeigt Beispiele für in-vivo-Charakterisierungen der durch Mimotop-Vakzination hervorgerufenen Immunantwort durch Untersuchung der Immunantwort gegen injiziertes Peptid und ein irrelevantes Peptid, das eine nicht verwandte Sequenz enthält. In den gezeigten Beispielen riefen das Epitop p4377 und die Mimotope p4670, p4675, p4680, p4681 und p4403 Immunantworten gegen die injizierten Peptide hervor, versagten aber bei der Induktion einer relevanten unspezifischen Immunantwort gegen eine nicht verwandte Sequenz (p1454).

Fig. 5 zeigt Beispiele für in-vivo-Charakterisierungen der durch Mimotop-Vakzination hervorgerufenen Immunantwort gegen das entsprechende Originalepitop des parentalen Antikörpers (p4377) sowie gegen von trunkierten Spezies von A β (p1323 und p4374) abgeleitete Peptide und gegen sAPP-alpha.

p4377 und die Mimotope p4670, p4675, p4680, p4681 und p4403 zeigten nachweisbare Immunantworten gegen das Originalepitop p4377. Ein ähnliches Phänomen konnte bei der Untersuchung der Kreuzreaktivität gegen die modifizierte Form nachgewiesen werden, wie p4374 zeigte. Die Original-Epitop- und die Mimotop-Vakzinen zeigten interessanterweise relevante Titer gegen p4374, die modifizierte Form des Originalepitops. Überraschenderweise schien es, dass die Mimotope eine effizientere Immunantwort gegen p1323 induzieren konnten, aber nicht unbedingt induzierten, was auf ein Potential, eine breitere Immunreaktivität zu induzieren als das Original-A β -Fragment hindeutet. Darüber hinaus war keine Reaktivität gegen sAPP-alpha nachweisbar.

Fig. 6 zeigt Beispiele für in-vivo-Charakterisierungen der durch Mimotop-Vakzination hervorgerufenen Immunantwort gegen A β voller Länge. Überraschenderweise induzieren die unter Verwendung von MV-002 ausgewählten Mimotope eine Kreuzreaktion nicht nur mit den zur Herstellung der Antikörper verwendeten

trunkierten oder modifizierten, kurzen Epitopen, sondern induzieren auch eine ebenso gute Kreuzreaktivität gegen nicht modifizierte A β -Formen voller Länge wie die Originalsequenz oder sogar noch effizienter als p4377.

Interessanterweise konnten sowohl konkurrierende als auch nicht konkurrierende Peptide ähnliche Immunantworten induzieren, die spezifisch mit Peptiden wechselwirkten, welche Original-A β -Sequenzen enthielten. Die in der vorliegenden Erfindung präsentierten Mimotope stellen somit optimierte neue Vakzinekandidaten zur Abzielung auf ein breites Spektrum natürlich vorkommender Formen von A β -Peptiden dar, wie sie im Gehirn von AD-Patienten anzutreffen sind. Zu diesen Formen gehören, aber nicht ausschließlich, A β 1-40/42 sowie N-terminal trunkierte Formen wie A β 3-40/42, A β (pE)3-40/42, nicht modifiziertes A β 11-40/42, modifiziertes A β p(E)11-40/42 bzw. A β 14-40/42. Zudem induzierten die dargestellten Mimotope auch keine Kreuzreaktivität gegen die in sAPP-alpha nach der Spaltung von APP vorhandenen Neoepitope und beeinträchtigen somit nicht das normale sAPP-alpha-Signaling (Details siehe Fig. 5).

Tabelle 3: Verwendete nicht-mimotope Peptide

Interne Peptidnummer	SEQ ID No.	Sequenz
p1253	48	DAEFRHDSGYC
p1323	49	CHQKLFFFAED
p4374	50	p(E) VHHQKLVCFC
p4377	51	EVHHQKLVCFC
p1454	52	CGLMVGGVV
A β 1-40	53	DAEFRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAI-IGLMVGGVV; abgeleitet von Human-APP (gi:112927)
A β 1-42	54	DAEFRHDSGYEVHHQKLFFFAEDVGSNKGAI-IGLMVGGVVIA; abgeleitet von Human-APP (gi:112927)
sAPP-alpha	55	alpha-Sekretase-induziertes Spaltprodukt, abgeleitet von Human-APP (gi:112927)

00055

1
SEQUENCE LISTING

<110> Affiris Forschungs- und Entwicklungs GmbH

<120> Vakzin

<130> R 55171 (Ausscheidung aus R 52027)

<150> AT A 952/2008

<151> 2008-06-12

<160> 57

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Mimotop

<400> 1

Ser His Thr Arg Leu Tyr Phe Cys
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Mimotop

<400> 2

Ser Gly Glu Tyr Val Phe His Cys
1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Mimotop

<400> 3

Ser Gly Gln Leu Lys Phe Pro Cys
1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Mimotop

<400> 4

Ser Gly Gln Ile Trp Phe Arg Cys
1 5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 5

Ser Gly Glu Ile His Phe Asn Cys
1 5

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 6

Gly Gln Ile Trp Phe Ile Ser Cys
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 7

Asn Asp Ala Lys Ile Val Phe Cys
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 8

Gly Gln Ile Ile Phe Gln Ser Cys
1 5

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 9

Gly Gln Ile Arg Phe Asp His Cys
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 10

His Met Arg Leu Phe Phe Asn Cys
1 5

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 11

Gly Glu Met Trp Phe Ala Leu Cys
1 5

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 12

Gly Glu Leu Gln Phe Pro Pro Cys
1 5

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 13

Gly Glu Leu Trp Phe Pro Cys
1 5

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 14

Ser His Gln Arg Leu Trp Phe Cys
1 5

<210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 15

His Gln Lys Met Ile Phe Ala Cys
1 5

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 16

Gly Glu Met Gln Phe Phe Ile Cys
1 5

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 17

Gly Glu Leu Tyr Phe Arg Ala Cys
1 5

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 18

Gly Glu Ile Arg Phe Ala Leu Cys
1 5

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 19

Gly Met Ile Val Phe Pro His Cys
1 5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 20

Gly Glu Ile Trp Phe Glu Gly Cys
1 5

<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 21

Gly Glu Ile Tyr Phe Glu Arg Cys
1 5

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 22

Ala Ile Pro Leu Phe Val Met Cys
1 5

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 23

Gly Asp Leu Lys Phe Pro Leu Cys
1 5

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 24

Gly Gln Ile Leu Phe Pro Val Cys
1 5

<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 25

Gly Glu Leu Phe Phe Pro Lys Cys
1 5

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 26

Gly Gln Ile Met Phe Pro Arg Cys
1 5

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 27

His Met Arg Met Tyr Phe Glu Cys
1 5

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 28

Gly Ser Leu Phe Phe Trp Pro Cys
1 5

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 29

Gly Glu Ile Leu Phe Gly Met Cys
1 5

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 30

Gly Gln Leu Lys Phe Pro Phe Cys
1 5

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 31

Lys Leu Pro Leu Phe Val Met Cys
1 5

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 32

Gly Thr Ile Phe Phe Arg Asp Cys
1 5

<210> 33
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 33

Thr His Gln Arg Leu Trp Phe Cys
1 5

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 34

Gly Gln Ile Lys Phe Ala Gln Cys
1 5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 35

Gly Thr Leu Ile Phe His His Cys
1 5

<210> 36
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 36

Gly Glu Ile Arg Phe Gly Ser Cys
1 5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 37

Gly Gln Ile Gln Phe Pro Leu Cys
1 5

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 38

Gly Glu Ile Lys Phe Asp His Cys
1 5

<210> 39
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 39

Gly Glu Ile Gln Phe Gly Ala Cys
1 5

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 40

Gln Leu Pro Leu Phe Val Leu Cys
1 5

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 41

His Gln Lys Met Ile Phe Cys
1 5

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 42

Gly Glu Leu Phe Phe Glu Lys Cys
1 5

<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 43

Gly Glu Ile Arg Phe Glu Leu Cys
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Acetyl-Gruppe

<400> 44

Xaa Gly Glu Ile Tyr Phe Glu Arg Cys
1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Mimotop

<400> 45

Ser Gly Glu Ile Tyr Phe Glu Arg Cys
1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Mimotop

<400> 46

Ala Gly Glu Ile Tyr Phe Glu Arg Cys
1 5

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Mimotop

<400> 47

Cys Gly Glu Ile Tyr Phe Glu Arg
1 5

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Mimotop

<400> 48

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Cys
1 5 10

<210> 49

<211> 11

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Mimotop

<400> 49

Cys His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
 1 5 10

<210> 50
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa = pE, Pyroglutamat

<400> 50

Xaa Val His His Gln Lys Leu Val Phe Cys
 1 5 10

<210> 51
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 51

Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Cys
 1 5 10

<210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 52

Cys Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 1 5

<210> 53
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 53

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile

00055

20 25 12 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
35 40

<210> 54
<211> 42
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 54

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = S, A, C oder kein Aminosäure-Rest

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = S, T, E, D, Q oder M

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa = I, Y, M oder L

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = L, R, Q, W, V, H, Y, I, K, M oder F

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = A, F, H, N, R, E, I, Q, D, P, W oder G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = jeder Aminosäure-Rest

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa = Cystein oder kein Aminosäure-Rest

<400> 55

Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 56

<211> 6

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Amyloid-beta-Peptid Fragment

<400> 56

His Gln Lys Leu Val Phe
1 5

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Amyloid-beta-Peptid Fragment

<400> 57

His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5 10

Patentansprüche:

1. Verwendung von mindestens einer Verbindung mit der Aminosäuresequenz



worin

X_1 Serin (S), Alanin (A) oder Cystein (C) ist,
 X_2 Serin (S), Threonin (T), Glutaminsäure (E),
Asparaginsäure (D), Glutamin (Q) oder Methionin (M) ist,
 X_3 Isoleucin (I), Tyrosin (Y), Methionin (M) oder Leucin (L)
ist,
 X_4 Leucin (L), Arginin (R), Glutamin (Q), Tryptophan (W),
Valin (V), Histidin (H), Tyrosin (Y), Isoleucin (I), Lysin
(K) Methionin (M) oder Phenylalanin (F) ist,
 X_5 Alanin (A), Phenylalanin (F), Histidin (H), Asparagin
(N), Arginin (R), Glutaminsäure (E), Isoleucin (I), Glutamin
(Q), Asparaginsäure (D), Prolin (P) oder Tryptophan (W),
Glycin (G) ist,
 X_6 jeder Aminosäurerest ist,
 X_7 Cystein (C) ist,
m und n unabhängig voneinander 0 oder 1 sind,

welche Verbindung eine Bindungskapazität an einen Antikörper aufweist, der spezifisch für ein Epitop des Amyloid-beta-Peptids ($A\beta$) umfassend die Aminosäuresequenz HQKLVF, insbesondere HQKLVFFAED, ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Prävention und/oder Behandlung von Alzheimer-Krankheit.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SGEYVFH(C), SGQLKFP(C), SGQIWFR(C), SGEIHFN(C), GQIWFIS(C), GQIIFQS(C), GQIRFDH(C), GEMWFAL(C), GELQFPP(C), GELWFP(C), GEMQFFI(C), GELYFRA(C), GEIRFAL(C), GMIVFPH(C), GEIWFEG(C), GDLKFPL(C), GQILFPV(C), GELFFPK(C), GQIMFPR(C), GSLFFWP(C), GEILFGM(C), GQLKFPP(C), GTIFFRD(C), GQIKFAQ(C), GTLIFHH(C), GEIRFGS(C), GQIQFPL(C), GEIKFDH(C),

GEIQFGA(C), GELFFEK(C), GEIRFEL(C), GEIYFER(C), SGEIYFER(C), AGEIYFER(C) und (C)GEIYFER umfasst.

3. Verwendung von mindestens einer Verbindung mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus AIPLFVM(C), KLPLFVM(C), QLPLFVL(C) und NDAKIVF(C) zur Herstellung eines Medikaments zur Prävention und/oder Behandlung von β -Amyloidosen einschließlich Alzheimer-Krankheit.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung an einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, vorzugsweise KLH (Keyhole-Limpet-Hemocyanin), gekoppelt ist.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung für intravenöse, subkutane, intradermale oder intramuskuläre Verabreichung formuliert ist.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung mit einem Adjuvans, vorzugsweise Aluminiumhydroxid, formuliert ist.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung im Medikament in einer Menge von 0,1 ng bis 10 mg, vorzugsweise 10 ng bis 1 mg, insbesondere 100 ng bis 100 μ g enthalten ist.

8. Peptid mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SGEYVFH(C), SGQLKFP(C), SGQIWFR(C), SGEIHFN(C), GQIWFIS(C), NDAKIVF(C), GQIIFQS(C), GQIRFDH(C), GEMWFAL(C), GELQFPP(C), GELWFP(C), GEMQFFI(C), GELYFRA(C), GEIRFAL(C), GMIVFPH(C), GEIWFEG(C), GEIYFER(C), AIPLFVM(C), GDLKFPL(C), GQILFPV(C), GELFFPK(C), GQIMFPR(C), GSLFFWP(C), GEILFGM(C), GQLKFPP(C), KLPLFVM(C), GTIFFRD(C), GQIKFAQ(C), GTLIFHH(C), GEIRFGS(C), GQIQFPL(C), GEIKFDH(C), GEIQFGA(C), QLPLFVL(C), GELFFEK(C), GEIRFEL(C), AcGEIYFER(C), SGEIYFER(C), AGEIYFER(C) und (C)GEIYFER.

9. Peptid nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid an einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, vorzugsweise

000555

- 25 -

KLH (Keyhole-Limpet-Hemocyanin), gekoppelt ist.

10. Pharmazeutische Formulierung, vorzugsweise Vakzine, umfassend mindestens ein Peptid nach Anspruch 8 oder 9.

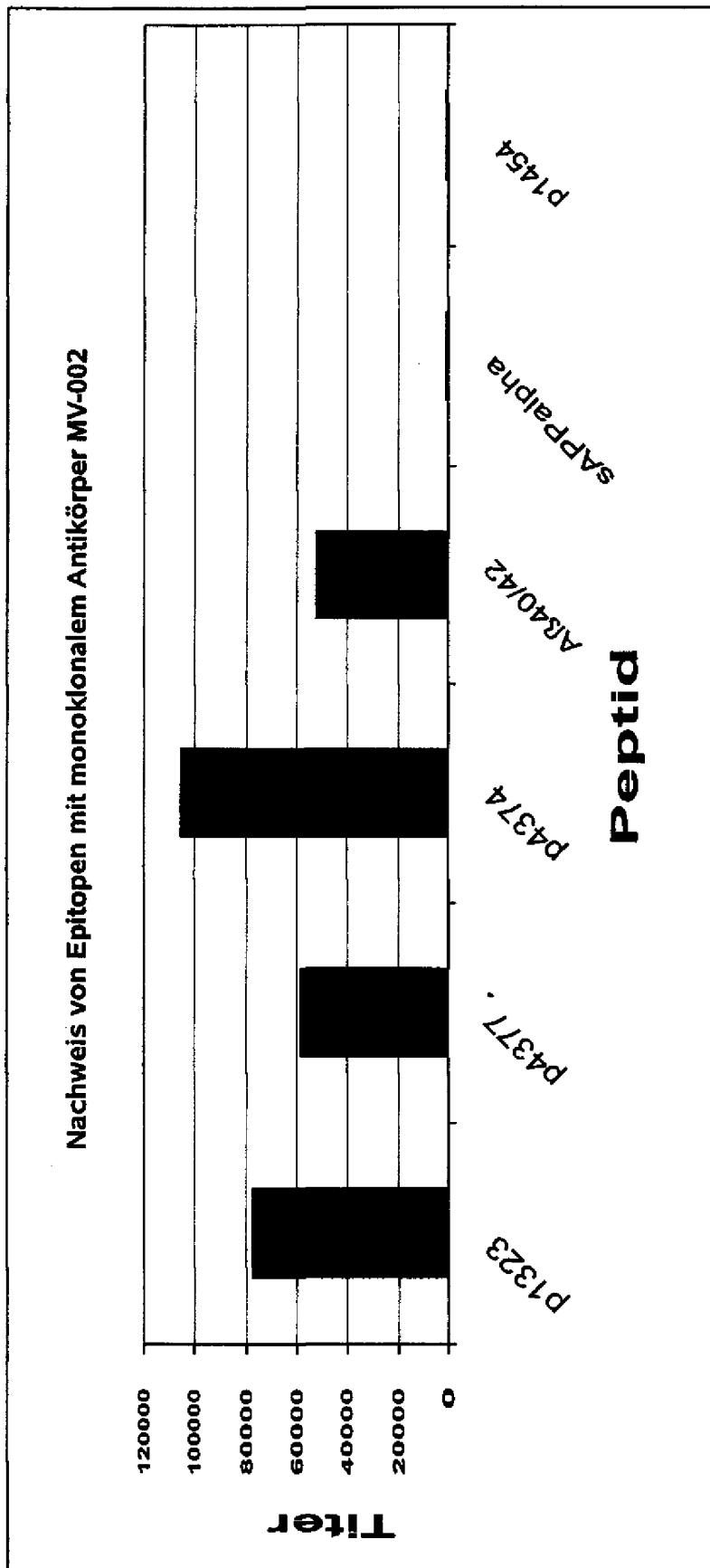


Fig. 1

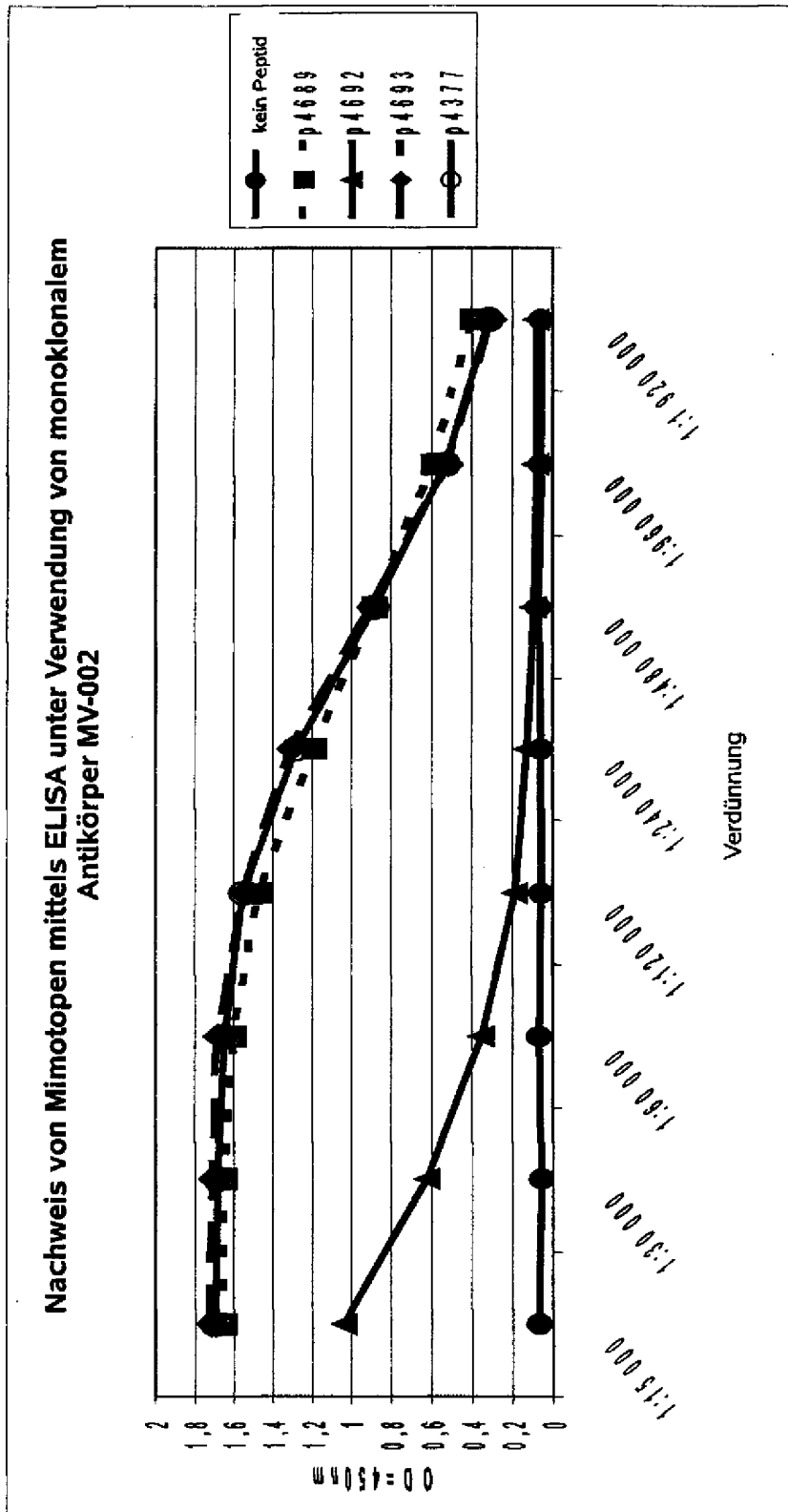


Fig. 2

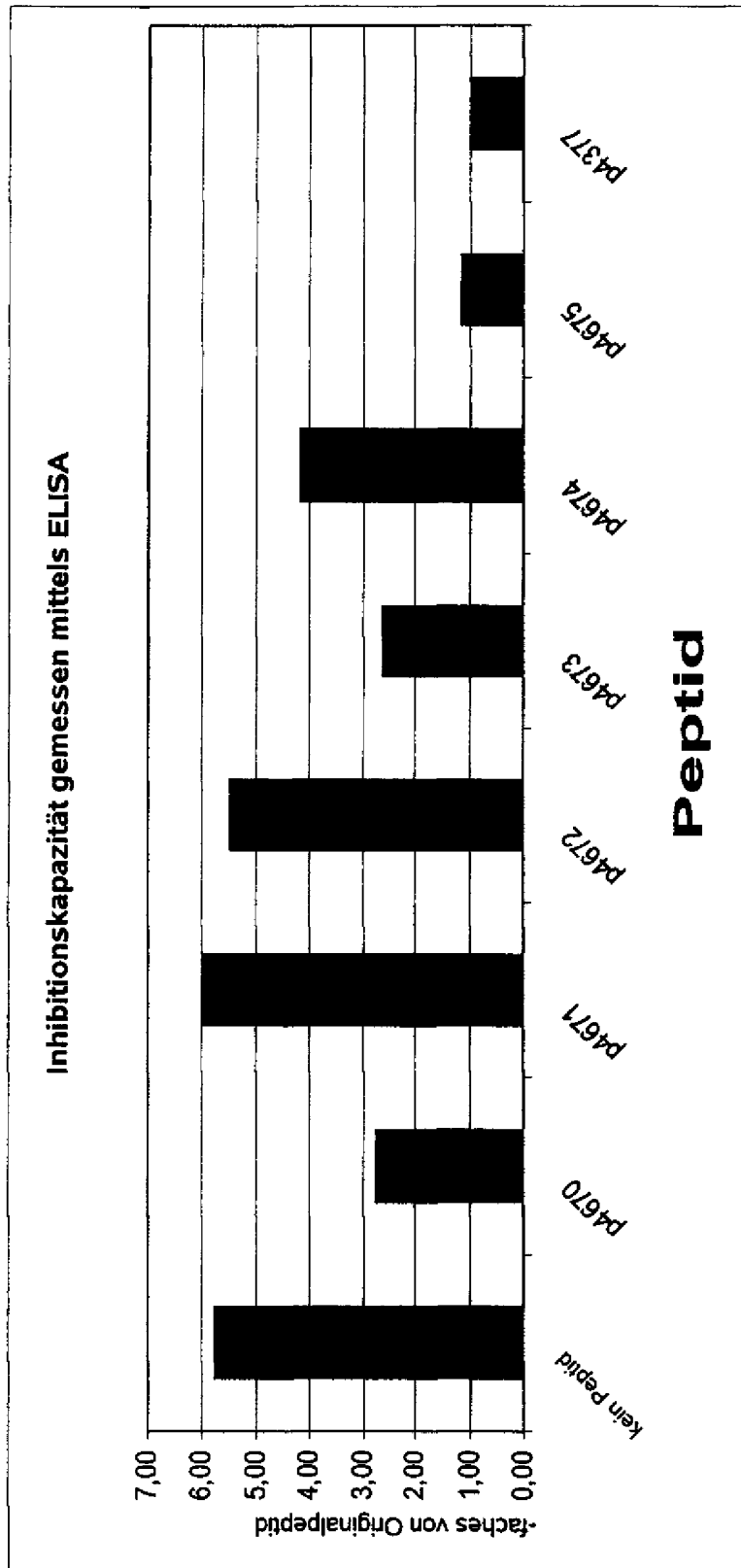


Fig. 3

4/6

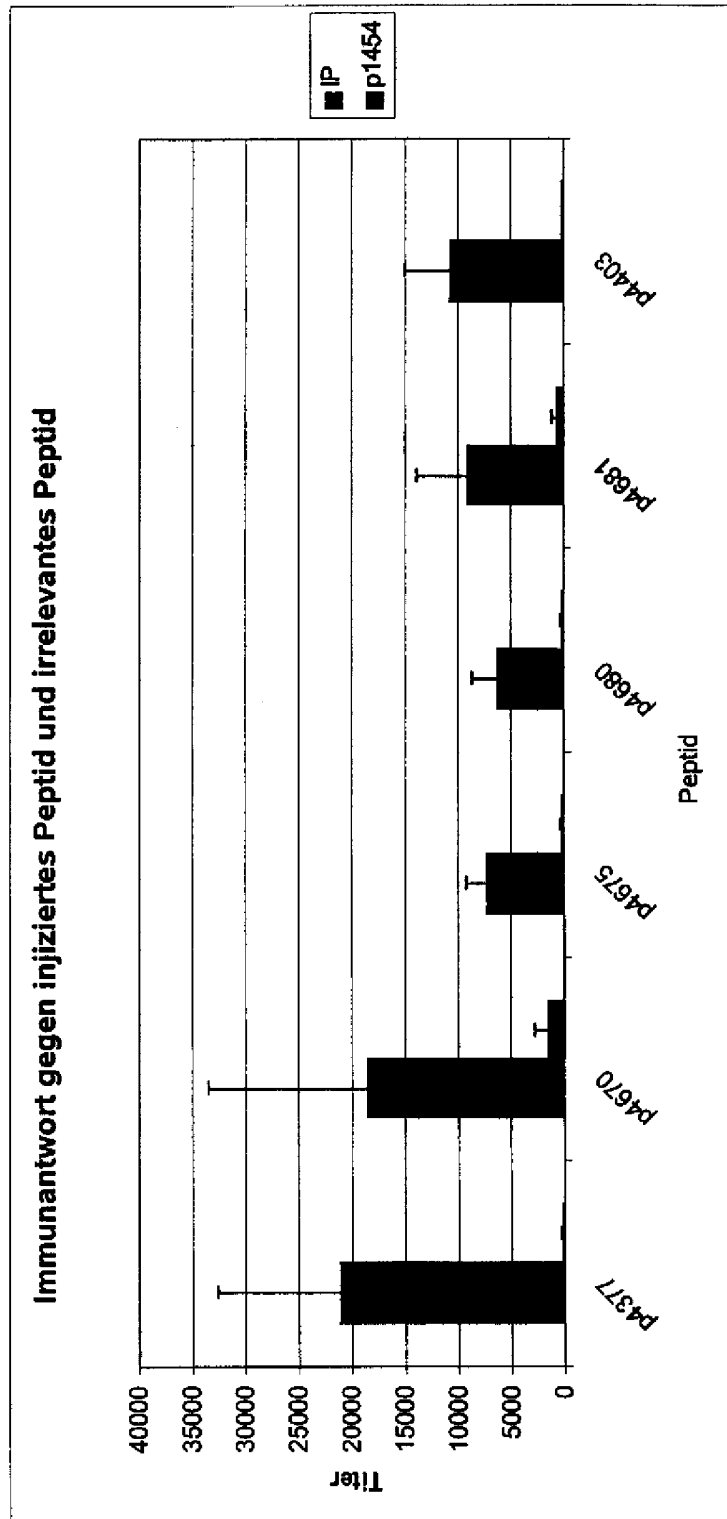


Fig. 4

5/6

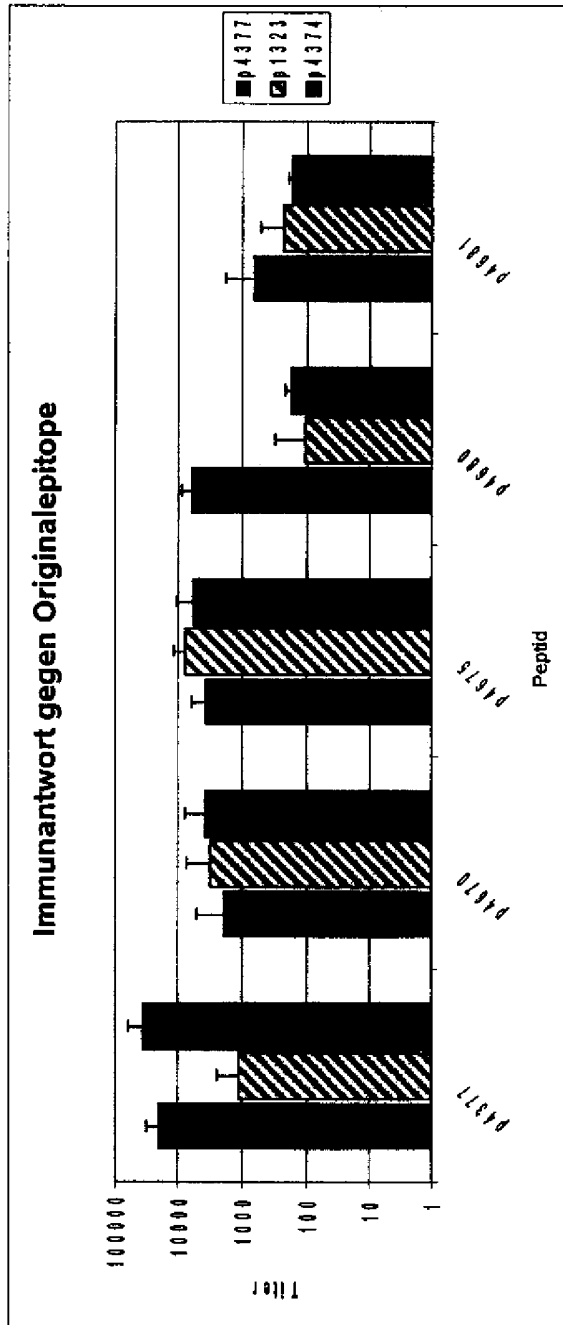
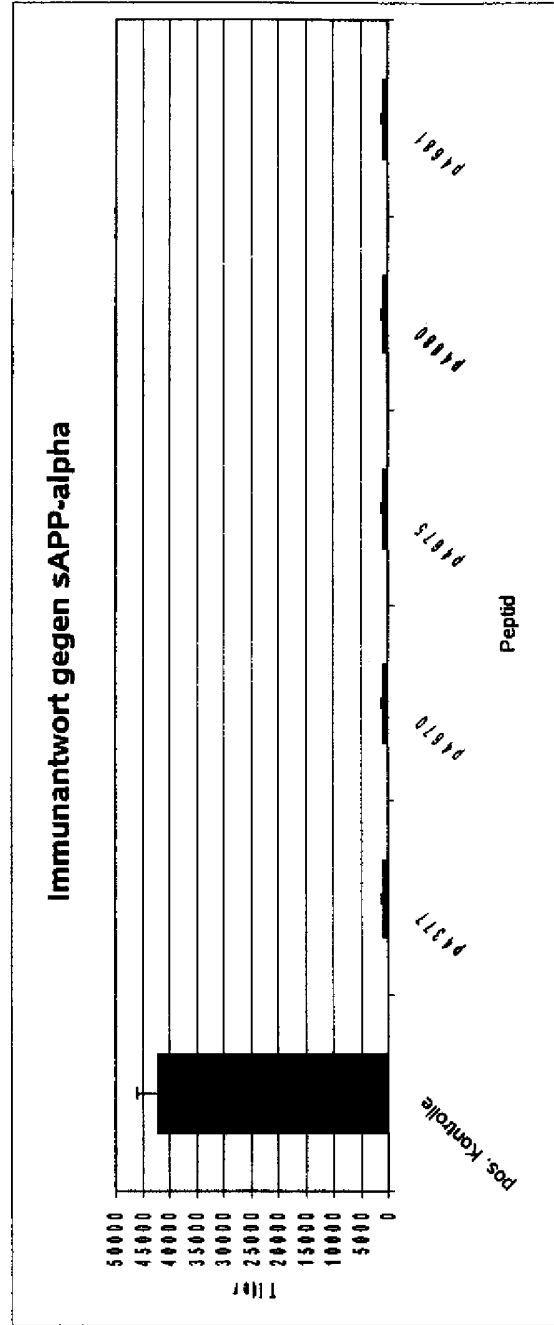


Fig. 5



6/6

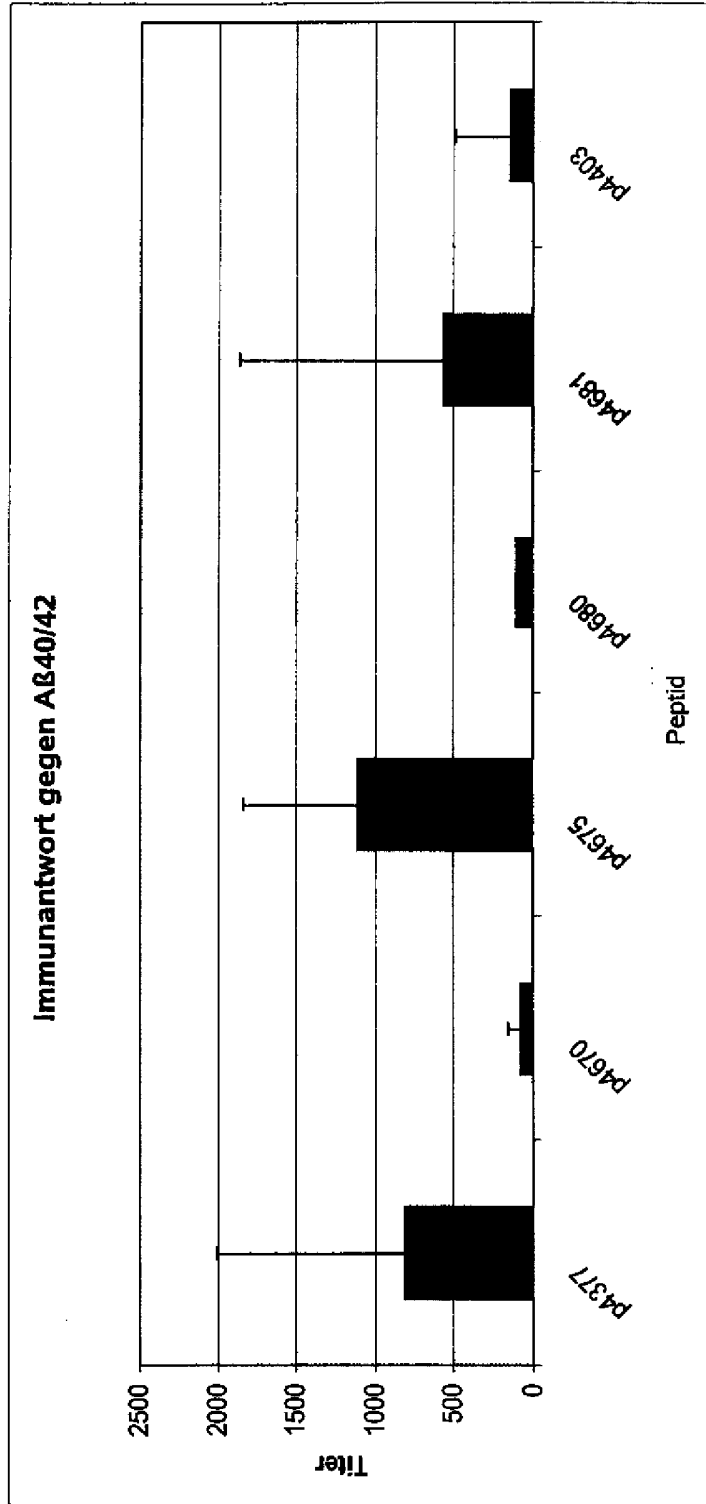


Fig. 6



Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC:
A61K 38/00 (2006.01); **A61P 25/28** (2006.01)

Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß ECLA:
A61K 38/00; A61P 25/28

Recherchierter Prüfstoß (Klassifikation):
A61K, A61P

Konsultierte Online-Datenbank:
STN-registry, CAS, WPI

Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 15. März 2010 eingereichten Ansprüchen 1-10 erstellt.

Kategorie ¹⁾	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
A	US 2004067535 A1 (KIM JAESEOB [KR], GALANT RON [US]) 08. April 2004 (08.04.2004) Ansprüche	1, 4-7
A	SHI, YUAN et al. Quantitative determination of the topological propensities of amyloidogenic peptides. Biophysical Chemistry (2006), 120(1), 55-61 CAS Zusammenfassung 145:308772	1, 4-7

Datum der Beendigung der Recherche:
08. Juli 2011 (08.07.2011)

☐ Fortsetzung siehe Folgeblatt

Prüfer(in):
MOSSER R.

¹⁾ Kategorien der angeführten Dokumente:

- X Veröffentlichung von **besonderer Bedeutung**: der Anmel-
gegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw.
auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden.
- Y Veröffentlichung von **Bedeutung**: der Anmel-
gegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn
die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren
Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und
diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist.

- A Veröffentlichung, die den **allgemeinen Stand der Technik** definiert.
- P Dokument, das **von Bedeutung** ist (Kategorien X oder Y), jedoch **nach dem Prioritätstag** der Anmeldung veröffentlicht wurde.
- E Dokument, das **von besonderer Bedeutung** ist (Kategorie X), aus dem ein **älteres Recht** hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen).
- & Veröffentlichung, die Mitglied der selben **Patentfamilie** ist.