

(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
26. Mai 2011 (26.05.2011)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2011/060950 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C07K 14/47 (2006.01) **G01N 33/50** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2010/007043

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. November 2010 (19.11.2010)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2009 054 057.1
20. November 2009 (20.11.2009) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **FREIE UNIVERSITÄT BERLIN** [DE/DE]; Kaiserswerther Str. 16-18, 14195 Berlin (DE). **CHARITÉ-UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN** [DE/DE]; Charitéplatz 1, 10117 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HUBER, Otmar** [DE/DE]; Dahlemer Weg 83A, 14167 Berlin (DE). **MULT-HAUP, Gerd** [DE/DE]; Grasweg 46, 14532 Kleinmachnow (DE). **BARUCKER, Christian** [DE/DE]; Eisenacher Str. 107, 10781 Berlin (DE). **HARMEIER, Anja** [DE/CH]; Gempenstr. 46, CH-4053 Basel (CH).

(74) Anwalt: **SCHÜBLER, Andrea**; Huber & Schüssler, Truderinger Str. 246, 81825 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

(54) Title: SCREENING METHOD FOR ACTIVE SUBSTANCES USED FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

(54) Bezeichnung : SCREENING-VERFAHREN FÜR WIRKSTOFFE FÜR DIE PROPHYLAXE UND THERAPIE NEURODEGENERATIVER ERKRANKUNGEN

(57) Abstract: A screening method for active substances used for preventing and treating neurodegenerative diseases, preferably Alzheimer's disease, is described, said active substances inhibiting Aβ42 transport into the cell, preferably the cell core. Diagnostic and therapeutic applications based on said method are also described.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Screening-Verfahren nach Wirkstoffen für die Prophylaxe und Therapie neurodegenerativer Erkrankungen, vorzugsweise der Alzheimer Krankheit, wobei die Wirkstoffe den Transport von Aβ42 in die Zelle, vorzugsweise den Zellkern, hemmen. Beschrieben werden auch darauf basierende diagnostische und therapeutische Anwendungen.



WO 2011/060950 A1

Screening-Verfahren für Wirkstoffe für die Prophylaxe und Therapie neurodegenerativer Erkrankungen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Screening-Verfahren für Wirkstoffe für die Prophylaxe und Therapie neurodegenerativer Erkrankungen, vorzugsweise der Alzheimer Krankheit, wobei die Wirkstoffe den Transport von A β 42 in die Zelle, vorzugsweise den Zellkern, hemmen.

Die Alzheimer Krankheit (AD) ist eine neurodegenerative Erkrankung und stellt die häufigste Form der Demenzerkrankungen dar. Als wichtigstes pathologisches Merkmal für die Alzheimer Krankheit sind die amyloiden Plaques anzusehen (De Groot et al., FEBS J. 273 (2006), S. 658-668). Die amyloiden Plaques bestehen aus extrazellulären Aggregaten des Amyloid- β -Peptids (A β), welches ein Spaltprodukt des Amyloid Vorläuferproteins (APP) ist. Lösliche A β Peptide stellen ein spezifisches Merkmal der AD dar. Die löslichen Formen können oligomerisieren und sind dann als Dimere, Tetramere und bis zu Dodecameren und höheren Aggregaten nachweisbar und können dann weiter zu Fibrillen aggregieren. Diese Fibrillen finden sich z.B. in den amyloiden Plaques im Gehirn von Patienten.

Stand der Forschung ist, dass vor allem die löslichen Formen des A β mit einer Länge von 42 Resten (A β 42) und hier vor allem die A β 42 Dimere, Trimere und Tetramere, für den Neuronenverlust und damit den kognitiven Leistungsverlust verantwortlich sind, nicht jedoch Fibrillen oder Plaques. Ein Bezug zu den pathologischen Merkmalen (Plaques und Neurofibrillenbündel) auf molekularer Ebene konnte nicht direkt gezeigt werden. In einem Review-Artikel von Shaw et al. (Shaw et al., Nature Reviews, Vol. 6, April 2007, S. 295-303) werden mögliche Mechanismen und Biomarker für Alzheimer diskutiert.

Trotz zahlreicher *in vitro*-Studien ist bis heute der molekulare Mechanismus der Entstehung der Toxizität unentdeckt geblieben. Die Toxizität der oligomeren Formen wird als Zelltod und Inhibition der "Long-Term-Potentiation (LTP)" in Zellkultursystemen und Tiermodellen gemessen. Die daraus entwickelten Hypothesen nehmen an, dass (a) A β Oligomere über hydrophobe Wechselwirkung mit Lipiden in Zellmembranen sog. Poren bilden, die die Membranen zerstören und den Ionenhaushalt aus dem Gleichgewicht bringen, bzw. (b) über einen Rezeptor-vermittelten Mechanismus den Zelltod verursachen (Walsh et al. (2007), J. Neurochem. 101, S.1172-1184)

Münter et al. (Münter et al. (2007), EMBO J. 26, S. 1702-1712) konnten zeigen, dass APP drei konsekutiv aufeinanderfolgende GxxxG (Glycin, drei beliebige Aminosäuren außer Prolin, Glycin) Dimerisierungsmotive enthält, wobei besonders die Motive an den A β Positionen G29 und G33 eine essentielle Rolle in der Prozessierung des APP spielt. Es konnte gezeigt werden, dass durch Punktmutation der Glycine zu einem Alanin nicht mehr vornehmlich A β 42 gebildet wird, sondern es zu einem sequentiellen Weiterschneidens des Peptides kommt, wobei kürzere A β Spezies wie A β 1-38 und A β 1-34 entstehen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dieser toxische Effekt aufgehoben werden kann, wenn das Glycin an A β Position 33 zu einem Alanin oder Isoleucin mutiert wird. Diese Erkenntnisse bieten gute Ansätze für die Entwicklung von Strategien zur Prophylaxe bzw. Therapie der Alzheimer Krankheit. Aufgrund der Dringlichkeit der Möglichkeit der effizienten Behandlung/Prophylaxe der Alzheimer Krankheit ist es jedoch wichtig, nach weiteren therapeutischenn Konzepten Ausschau zu halten.

Somit liegt der vorliegenden Erfindung das technische Problem zugrunde, Verfahren zur Identifizierung von Wirkstoffen bereitzustellen, die für eine Prophylaxe bzw. Therapie der Alzheimer Krankheit bzw. anderer neurogenerativer Erkrankungen geeignet sind.

Die Lösung dieses technischen Problems wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erzielt.

Von den Erfindern wurde gefunden, dass A β Peptide in die Zelle aufgenommen werden können und dort ihre toxische Wirkung ausüben. In den zu der vorliegenden Erfindung führenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl A β 42 als auch A β 42G33A nicht nur von den Zellen aufgenommen werden, sondern unmittelbar in den Zellkern transportiert werden. Mit Hilfe konfokaler Laser Scanning Mikroskopie und elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnten die Erfinder A β 42 sowohl im Zellkern, als auch im Cytoplasma, nachweisen. Die experimentellen Daten belegen, dass das toxische Peptid A β 42 im Zellkern humaner Neuroblastoma Zellen akkumuliert und eine transkriptions-regulatorische Funktion ausüben kann. An den untersuchten Beispielen konnte nachgewiesen werden, dass A β 42 spezifisch supprimierend auf die Transkription von LRP1 und KAI1, aber aktivierend auf die Transkription von APP wirkt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass das nicht toxische Peptid A β 42G33A keinen Einfluss auf die Expression der mRNA-Spiegel der untersuchten Gene hat. Aus den untersuchten familiären Fällen der AD ist bekannt, dass eine vermehrte Produktion von A β 42 und ein verändertes Verhältnis der A β -Spezies A β 40 und A β 42 für die AD ursächlich sein können. Ungeklärt ist, warum A β 42 eine Schlüsselrolle beim Neuronenverlust einnimmt und daraus kognitive Defizite entstehen. Es wird davon ausgegangen, dass A β 42 auch andere als die gezeigten Gene beeinflussen kann, die für das Lernen

und das Gedächtnis eine entscheidende Rolle spielen und damit therapeutische Ziele darstellen. Aufgrund des neuen Befundes, dass A β 42 im Zellkern eine regulatorische Funktion einnimmt, werden neue Ansätze zur Diagnostik bzw. Therapie der Alzheimer Krankheit möglich.

So wird von den Erfindern gezeigt, dass A β 42 an bestimmte Regionen der DNA, an Promotoren, bindet. Dabei kommt es zur Rekrutierung der Histon-Acetyltransferase Tip60 und des Adapterproteins Fe65 und vermutlich zur Komplexbildung mit diesen Proteinen und der DNA (Figur 4). Die Interaktion von A β 42 an den Promotoren von LRP1 und KAI1 wurde als ein spezifisches Ereignis identifiziert, da am Hes1 Promotor keine Interaktion mit A β 42 nachgewiesen werden konnte.

Nach einer Illumina-Studie mit einem HT12-v3 Chip konnte gezeigt werden, dass noch weitere Gene durch das neurotoxische A β 42 beeinflusst werden. Unter anderem konnten Gene zweier Genfamilien und ein Transkriptionsfaktor identifiziert werden (ID 1-3; IGFBP 3/5 und LMO4), die durch den Einfluss von A β 42 nach 8h Inkubation signifikant hochreguliert wurden (Figur 5).

Die in der vorliegenden Erfindung gewonnenen Erkenntnisse finden unter anderem die folgenden Anwendungsmöglichkeiten:

- (1) Screening nach Genen, die für das Lernen und das Gedächtnis unerlässlich sind und die durch A β 42 oder andere in den Kern importierte A β -Formen reguliert werden.
- (2) Screening nach zytoplasmatischen Transportmolekülen, die den späteren Kernimport von A β 42 oder andere in den Kern importierte A β -Formen ermöglichen.
- (3) Identifizierung von Inhibitoren für den Kernimport von A β 42, um die Gen-regulatorische Wirkung von A β 42 oder andere in den Kern importierter A β -Formen zu verhindern.

Kürzlich konnte für die autosomal-dominant vererbte Polyglutamin-Erkrankung, bei der sich Polyglutaminaggregate im

Kern bilden, gezeigt werden, dass Aggregate im Zellkern weitaus toxischer sind als Aggregate, die im Zytosol lokalisiert sind (Iwata et al. (2009), Journal Biol. Chem. 284, S. 9796-9803). Am Abbau der Aggregate im Kern sind Ubiquitin- Ligasen wie Sanlp und UHRF-2 beteiligt, die die Poly-Q induzierte Toxizität wieder aufheben. Analog dazu ergibt sich für die vorliegende Erfindung:

(4) Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems, das am Abbau von amyloiden Aggregaten von A β 42 analog zu pQ Aggregaten im Kern beteiligt ist.

Die vorliegenden Erkenntnisse sind auch von Nutzen für:

- (a) Diagnose (Nachweis der Akkumulation von A β 42 im Zellkern (z.B. über Biopsien)); und
- (b) Therapie (Verhinderung der Aufnahme von A β 42 (oder anderen Gen-regulatorischen Formen von A β) in die Zelle, bzw. den Kern, Verhinderung bzw. gezielte Beeinflussung der Gen-regulatorischen Wirkungen von A β 42 (oder anderen Gen-regulatorischen Formen von A β), Aktivierung von Abbaumechanismen im Zellkern, die auf A β 42 wirksam sind).

Kurze Beschreibung der Figuren

Figur 1: Zeitabhängige Akkumulation von A) A β 42 und B) A β 42G33A im Zellkern humaner Neuroblastoma Zellen

Die Quantifizierung erfolgte mittels ELISA als relative Menge gegenüber dem Wert bei 0 Stunden angenommen als 1.0, d.h. ohne Zugabe von synthetischem Peptid.

Figur 2: mRNA Expression nach Inkubation mit A β 42

Mittels RT-PCR wurde cDNA aus isolierter mRNA generiert. mRNA-Expression von LRP1 und KAI1 zeigte eine signifikante Abnahme nach 4 und 6 h Inkubation der Zellen mit A β 42. Nach 8 h

Inkubation kam es zu einer signifikanten Zunahme von APP. Die mRNA-Spiegel von BACE1 und Hes1 wurden nicht beeinflusst.

Figur 3: mRNA Expression nach Inkubation mit A β 42G33A

Mittels RT-PCR wurde cDNA aus isolierter mRNA generiert. A β 42G33A hat keinen Einfluss auf die mRNA Expression von LRP1, KAI1, Hes1, APP und BACE1.

Figur 4: Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) von DNA-Fragmenten der Promotoren von LRP, KAI1 und Hes1

Input: eingesetzte DNA. Kontrollen: α IgG, α p50.

(A) Hes1 Promotor: es konnte zu keiner Zeit eine Interaktion von A β und dem Promotor nachgewiesen werden.

(B) LRP1 Promotor: nach 0,5 h Inkubation mit A β 42 konnte A β 42 an dem Promotor detektiert werden. Nach 1 h wurden Tip60 und Fe65 detektiert. Nach 8 h Inkubation mit A β 42 konnten Tip60 und Fe65 nicht mehr auf dem Promotor detektiert werden, A β 42 verbleibt auf dem Promotor.

(C) KAI1 Promotor: nach 1h Inkubation mit A β 42 wurde dieses auf dem Promotor detektiert. Der Co-Repressor N-CoR wurde nicht mehr detektiert. Nach 2 h Inkubation wurden Tip60 und Fe65 detektiert. Nach 6 h Inkubation konnten Tip60 und Fe65 nicht mehr auf dem Promotor detektiert werden, der Co-Repressor N-CoR wurde nicht detektiert, A β 42 verbleibt auf dem Promotor.

Figur 5: mRNA Expression nach Inkubation mit Ab40, Ab42 und A β 42G33A.

Aus isolierter mRNA wurde mittels RT-PCR cDNA generiert und diese mittels qRT-PCR analysiert. Ab42 führt zu einer signifikanten Zunahme der mRNA von ID1-3, IGFBP3/ 5 und LMO4 nach 8h Inkubation, wogegen Ab40 und A β 42G33A keinen Einfluss auf die mRNA Expression haben.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Screenen von Wirkstoffen zur Prophylaxe und/oder Therapie einer neurodegenerativen Erkrankung, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:

(a) Inkontaktbringen von Zellen in Gegenwart von (i) A β 42 und (ii) eines Wirkstoffkandidaten unter Bedingungen, die deren Aufnahme durch die Zellen erlauben; und

(b) Bestimmung der zellulären oder subzellulären Lokalisation von A β 42 in den Zellen;

wobei eine verringerte zelluläre oder subzelluläre Lokalisation von A β 42 im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Wirkstoffkandidaten darauf hinweist, dass der Wirkstoffkandidat für die Prophylaxe/Therapie einer neurodegenerativen Erkrankung geeignet ist.

Die optimalen Zeiten zwischen den Schritten (a) und (b) können vom Fachmann durch Routine-Experimente bestimmt werden und liegen in der Regel zwischen 20 min und mehreren Stunden (Aufnahme in die Zelle) bzw der Nachweis über Zellfraktionierung (Stunden bis zu einem Tag, Zentrifugation und anschl ELISA bzw Western blot, ca. 1 Tag). Hier handelt es sich um Arbeitsabläufe, die im Labor standardisiert sind und nicht nur für die hier beschriebenen Experimente gelten.

Bei dem erfindungsgemäßen Screening-Verfahren können A β 42 und der Wirkstoffkandidat gleichzeitig oder nacheinander (mit zeitlicher Verzögerung) verabreicht werden, z.B. der Wirkstoffkandidat vor A β 42.

Der hier verwendete Begriff „neurodegenerative Erkrankung“ umfasst jede Form neurodegenerativer Erkrankungen oder Demenzerkrankungen, beispielsweise Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington, Amyotrophe Lateralsklerose, Lewy-Körperchen-Demenz, Morbus Pick (Frontotemporale Demenz),

Progressive supranukleäre Blickparese, Kortikobasale Degeneration, und Multiple Sklerose (MS).

Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Zellen können aus verschiedenen Quellen stammen, z.B. Säuger (z.B. Nagetiere, Menschen, Primaten usw.) Hühner etc. Vorzugsweise handelt es sich bei den in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Zellen um Säugerzellen, wobei humane Zellen bevorzugt sind.

Besonders bevorzugt sind neuronale Zellen, wobei Neuroblastoma-Zellen am meisten bevorzugt sind. Ein Beispiel für eine besonders bevorzugte Neuroblastoma-Zelle ist eine SH-SY5Y-Zelle. Weitere geeignete Zelllinien sind alle im Labor gebräuchlichen Zelllinien, z.B. CHO, HEK293, COS7, Fibroblasten oder N2a.

Die in dem erfindungsgemäßen Screening-Verfahren Verwendung findenden Zellen können Bestandteil eines nicht-menschlichen Organismus sein (Tiermodell), eines Gewebes oder in Zellkultur vorliegen. Bei nicht-neuronalen Zellen kann es sich um primäre Zellkulturen handeln oder Zell-Linien, die davon abgeleitet sind. Die nicht-neuronalen Zellen und die neuronalen Zellen können autolog, allogon oder xenogen sein.

Die Zellen können in allgemein bekannten Wachstumsmedien kultiviert werden. Säugerzellen können beispielsweise in einer in-vitro-Kultur in verschiedenen Nährmedien, die für Säugetierzellen geeignet sind, gehalten werden, beispielsweise Neurobasal- oder L15-Medien (Life Technologies, Rockville, Maryland), die durch verschiedene Verbindungen ergänzt werden können, z.B. Antibiotika, Vitamine, trophische Faktoren, fetales Serum usw.. Vorzugsweise werden die Zellen in Neurobasalmedium, ergänzt durch Nährstoffe und Wachstumsfaktoren, kultiviert. Die Zellen können mehrere Tage

oder Wochen erhalten werden, ohne ihre Eigenschaften zu verlieren. Vorzugsweise werden sie kurz nach ihrer Herstellung verwendet, d.h. vorzugsweise innerhalb einer Woche nach der Herstellung.

Im Allgemeinen werden die Zellen der/den Kandidaten-Verbindung(en) zwischen 1 nM und 1 mM ausgesetzt, für A β 42 gelten Konzentration im Bereich nano- bis mikromolarer Konzentrationen, die für die jeweilige Zelllinie unterhalb der LD Konzentration liegt (abhängig vom jeweiligen Labor zB bei SY5Y Zellen bei etwa 10 μ M). Weiterhin kann jede Verbindung parallel bei verschiedenen Konzentrationen getestet werden. Es können auch, falls erforderlich, verschiedene Zusätze und/oder Vektoren und/oder Produkte, die den Verbindungen helfen, in die Zellen einzudringen, hinzugefügt werden, z.B. Liposome, kationische Lipide oder Polymere, Penetratin, Tat PDT, Peptide von Adenoviren (z.B. Penton) oder anderen Viren usw.

Das Inkontaktbringen kann in bekannten Trägern durchgeführt werden, z.B. Platten, Rohre, Kolben und dergleichen. Im Allgemeinen erfolgt das Inkontaktbringen in Platten mit zahlreichen Löchern, die es ermöglichen, parallel zahlreiche Versuche durchzuführen. Typische Träger sind. z.B. Mikrotiterplatten, insbesondere das 384-Löcher-Mikrotiterplatten-Format, das leicht zu handhaben ist.

Der hier verwendete Ausdruck „Inkontaktbringen von Zellen“ bezieht sich auf das Inkontaktbringen von Zellen, die als Organismus, d.h. als nicht-humaner Organismus, vorzugsweise Säuger vorliegen oder beispielsweise als Zellkultur, die unter Bedingungen gehalten bzw. gezüchtet wird, die die Aufnahme des Wirkstoffkandidaten (und A β 42) in die Zellen erlauben.

Der hier verwendete Ausdruck „in Gegenwart von A β 42 unter Bedingungen, die dessen Aufnahme durch die Zellen erlauben“

beinhaltet auch die Aufnahme von A β 42 in den Zellkern, wobei hier (a) A β 42 von außen, beispielsweise über das Kulturmedium zugeführt werden kann, oder (b) im Cytoplasma nach Expression einer heterologen Nukleinsäure anwesend ist, die für A β 42 kodiert, mit der die Zelle vorher transformiert wurde.

Die Bestimmung der zellulären oder subzellulären Lokalisation von A β 42 in den Zellen kann durch Routineverfahren erfolgen, z.B. anhand spezifisch an A β 42 bindender Liganden, vorzugsweise Antikörper, nach vorangegangener Zellfraktionierung, z.B. durch ELISA, Western blot oder durch mikroskopische Techniken über Fluoreszenzmarkierung zusammen etwa mit den entsprechenden Markern wie kernspezifische Proteine oder DNA, sowie weiterer, nachstehend noch näherer beschriebener Verfahren. Hinsichtlich der vorstehend erwähnten Verfahren sowie noch nachfolgend genannten Verfahren, die allesamt Routineverfahren sind, wird auf Standardwerke der Labortechnik verwiesen, z.B. „Molecular Biomehtods Handbook“, Edit.: J. Walker, Ralph Rapley, Humana Press, 2nd. Edition, 2008, oder Janeway „Immunologie“, Spektrum Verlag, 7. Auflage, 2009.

Der hier verwendete Ausdruck „Wirkstoffkandidat“ betrifft bisher bekannte oder unbekannte Substanzen, wobei die zu untersuchenden Substanzen in keiner Weise beschränkt sind, d.h., es kann sich um sehr unterschiedliche Testverbindungen handeln. Dabei kann es sich um natürlich vorkommende und synthetische, organische oder anorganische Verbindungen sowie um Polymere (z.B. Oligopeptide, Polypeptide, Oligonucleotide und Polynukleotide), kleine Moleküle, Antikörper, Zucker, Fettsäuren, Nucleotide und Nukleotid-Analoga, Analoga natürlich vorkommender Strukturen (z.B. Peptid-„Imitatoren“, Nukleinsäure-Analoga etc.) und weitere Verbindungen handeln.

Als Ausgangsmaterial für möglicherweise nützliche Testverbindungen können auch Extrakte natürlicher Produkte Verwendung finden. Solche Extrakte können aus verschiedenen Quellen stammen, z.B. Pilzen, Actinomyceten, Algen, Insekten, Protozoen, Pflanzen und Bakterien. Aktivität aufweisende Extrakte können dann zur Isolation des aktiven Wirkstoffs weiter analysiert werden.

Bei der Testverbindung kann es sich um eine einzelne Verbindung oder ein Gemisch handeln. Somit können die Testverbindungen auch im großen Maßstab gescreent werden. Somit sind in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Screening-Verfahrens die Testverbindungen Bestandteil einer Substanzbibliothek. Dabei können, je nach Ausgestaltung des Verfahrens, die Testverbindungen zu einem Kulturmedium gegeben werden, in eine Zelle injiziert werden, etc.

Wenn eine Probe mit einer nützlichen Testverbindung oder einem Gemisch im erfindungsgemäßen Screening-Verfahren identifiziert wurde, kann daraus entweder die fragliche Testverbindung isoliert werden oder die ursprüngliche Probe kann - falls sie ein Gemisch unterschiedlicher Verbindungen enthält - fraktioniert werden, um so die Anzahl unterschiedlicher Verbindungen pro Probe zu reduzieren. Das erfindungsgemäße Verfahren wird dann mit den einzelnen Fraktionen wiederholt.

Assayformate zur Identifizierung positiver Testverbindungen sind allgemein bekannt und können - falls erforderlich - vom Fachmann nach Bedarf modifiziert werden.

Die mittels des erfindungsgemäßen Screening-Verfahrens isolierten Verbindungen sind als therapeutische Wirkstoffe für die Behandlung, Prävention, Kontrolle oder Linderung einer neurologischen Erkrankung, vorzugsweise AD, geeignet oder

diese können als sog. „Leitstrukturen“ zur Entwicklung analoger Verbindungen dienen, d.h., Wirkstoffen, die zusätzliche gewünschte Eigenschaften aufweisen, z.B. die Blut/Hirn-Schranke gut passieren können, bzw. bestimmte unerwünschte Nebenwirkungen verlieren oder eine höhere Halbwertszeit (Clearing-Rate) aufweisen.. Außerdem können solche optimierten Verbindungen eine stabilisierte Elektronenkonfiguration und molekulare Konformation aufweisen, wobei die funktionellen Schlüsselgruppen im Wesentlichen wie bei der Ausgangsverbindung präsentiert werden können. Vorzugsweise haben die analogen Verbindungen räumliche elektronische Eigenschaften, die mit der Bindungsregion der Ausgangsverbindung vergleichbar sind, sind jedoch kleiner, weisen z.B. nur noch ein Molekulargewicht unter 2 kD, vorzugsweise unter 1 kD auf. Die Herstellung/Identifizierung solcher analoger Verbindungen kann durch übliche Verfahren erfolgen, z.B. SCF-Analyse oder CI-Analyse. Die pharmakologischen Eigenschaften dieser analogen Verbindungen können ebenfalls mittels bekannter Verfahren bestimmt werden. Solche Wirkstoffe können z.B. den Import von A β 42 in die Zelle, vorzugsweise den Zellkern hemmen, um so z.B. die Genregulatorische Wirkung von A β 42 oder andere in den Kern importierter A β -Formen zu verhindern.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Lokalisation von A β 42 im Zellkern bestimmt. Dies kann durch gängige Nachweisverfahren erfolgen, z.B. ELISA, Western Blot, Fluoreszenz-Cytometrie. Vorzugsweise erfolgt die Bestimmung der Lokalisation nachdem vor Verfahrensschritt (b) die Zellen subzellulär fraktioniert wurden und die einzelnen Zellfraktionen, z.B. die Zellkerne enthaltende Fraktion, getrennt auf Anwesenheit von A β 42 getestet werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens basiert der Nachweis von A β 42 auf der Bindung eines spezifischen Liganden, der vorzugsweise mit einem nachweisbaren Marker versehen ist. Am meisten bevorzugt ist ein immunologisches Verfahren. So kann die Anwesenheit/Konzentration von A β 42 dadurch bestimmt werden, dass man die Probe mit einem anti-A β 42-Antikörper oder einem Fragment davon in Berührung bringt und sodann die Bindung des anti-A β 42-Antikörpers oder des Fragments davon an A β 42 bestimmt. Bei den dafür geeigneten Antikörpern kann es sich um monoklonale, polyklonale oder synthetische Antikörper oder Fragmente davon handeln. In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff „Fragment“ alle Teile des monoklonalen Antikörpers (z.B. Fab-, Fv- oder „single chain Fv“-Fragmente), welche die gleiche Epitopspezifität wie der vollständige Antikörper aufweisen. Die Herstellung solcher Fragmente ist dem Fachmann bekannt. Vorzugsweise handelt es sich bei den Antikörpern um monoklonale Antikörper. Die Antikörper können gemäß Standardverfahren hergestellt werden, wobei vorzugsweise A β 42 oder ein synthetisches Fragment davon als Immunogen dienen. Dieses Polypeptid oder Peptid bzw. das Fragment davon können z.B. durch Gewinnung des entsprechenden Gens, Klonierung und rekombinante Expression erzeugt werden. Verfahren zur Gewinnung monoklonaler Antikörper sind dem Fachmann bekannt.

In einer noch mehr bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die A β 42-Konzentration über einen primären monoklonalen anti-A β 42-Antikörper und einen im Handel erhältlichen sekundären Biotin-konjugierten Antikörper und Streptavidin-Peroxidase bestimmt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Zellprobe immobilisiert. Die Zellprobe kann auch an die Wand einer Plastikschiene über übliche Verfahren so absorbiert sein, dass A β 42 seine

Bindungsspezifität, etwa für einen spezifischen Antikörper, nicht verliert.

In einer weiteren bevorzugten, alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind der anti-A β 42-Antikörper oder das Fragment davon immobilisiert, d.h., dass er z.B. an der Wand einer Plastikschiene absorbiert ist ohne seine Bindungsspezifität für A β 42 zu verlieren.

Der Nachweis der Bindung des Antikörpers oder des Fragments davon kann über übliche Verfahren erfolgen, z.B. Western-Blot, ELISA, Radioimmunassay (RIA) etc., wobei RIA und ELISA bevorzugt sind.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die (verringerte) Lokalisation von A β 42 im Zellkern indirekt durch dessen Gen-regulatorische Wirkungen bestimmt wird, wobei vorzugsweise die Gen-regulatorische Wirkung (a) eine Hemmung der Expression von LRP1 und/oder KAI1 ist, und/oder (b) eine Erhöhung der Expression von APP ist. Die Veränderung der Expression kann durch gängige Verfahren bestimmt werden, beispielsweise auf mRNA-Ebene. Dabei kann die RNA-Konzentration unter Verwendung spezifischer Sonden/Primer mittels Northern-Blot, RT-PCR etc. gemessen werden. Andererseits kann die Veränderung der Expression auch auf Protein-Ebene gemessen werden, wobei Nachweisverfahren angewendet werden wie sie beispielsweise vorstehend für den Nachweis von A β 42 beschrieben wurden.

Die vorliegende Erfindung betrifft schließlich auch die Verwendung eines spezifisch an A β 42 bindenden Liganden, vorzugsweise eines wie vorstehend beschriebenen Antikörpers oder eines Fragments davon zur Herstellung eines Diagnosemittels zur Bestimmung des Vorliegens einer neurodegenerativen Erkrankung oder zur Bestimmung des Risikos

eine neurodegenerativen Erkrankung zu entwickeln. Dabei wird die Konzentration von A β 42 in einer Patientenzelle, vorzugsweise im Zellkern, bestimmt und mit einer Kontrolle, die von einem gesunden Patienten stammt, vorzugsweise einem Kollektiv gesunder Patienten aus dem ein Mittelwert bestimmt wurde, verglichen. Die Probe kann über gängige Verfahren von dem Patienten entnommen werden, beispielsweise über eine Biopsie oder aus Liquor und/ oder Blut.

Da in den zu der vorliegenden Erfindung führenden Experimenten gezeigt werden konnte, dass davon auszugehen ist, dass A β 42 seine schädlichen Wirkungen durch (a) Verringerung der Genexpression von LRP1 und/oder KAI1 und/oder (b) Erhöhung der Genexpression von APP entfaltet, betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung einer die Genexpression von LRP1 und/oder KAI1 erhöhenden und/oder die Genexpression von APP hemmenden Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe und/oder Therapie einer neurodegenerativen Erkrankung. Geeignete Wirkstoffe zur Modulation dieser Gene, deren Sequenz bekannt ist, kann der Fachmann durch Routineverfahren identifizieren. Die Hemmung der Genexpression kann beispielsweise über siRNA, antisense-RNA, Ribozyme etc. erfolgen. Andererseits können auch die Genprodukte inaktiviert werden, z.B. über neutralisierende Antikörper.

Für eine Therapie liegen solche, die Genexpression modulierenden Wirkstoffe vorzugsweise in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger vor. Zu geeigneten Trägern zählen beispielsweise Phosphat-gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, Netzmittel, sterile Lösungen etc.. Die Verabreichung kann oral oder, vorzugsweise, parenteral erfolgen. Zu den Verfahren für die parenterale Verabreichung gehören die topische, intra-arterielle, intramuskuläre, subkutane, intramedulläre, intrathekale, intraventrikuläre, intravenöse, intraperitoneale

oder intranasale Verabreichung. Die geeignete Dosierung wird von dem behandelnden Arzt bestimmt und hängt von verschiedenen Faktoren ab, beispielsweise von dem Alter, dem Geschlecht, dem Gewicht des Patienten, dem Stadium der neurogenerativen Erkrankung, der Art der Verabreichung etc..

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Sowohl das toxische A β 42 als auch die nicht toxische Form A β 42G33A werden im Zellkern humaner Neuroblastoma Zellen akkumuliert.

Ausgehend von der Hypothese, dass A β Peptide in die Zelle aufgenommen werden können und dort ihre toxische Wirkung ausüben, konnte gezeigt werden, dass sowohl A β 42 als auch A β 42G33A nicht nur von den Zellen aufgenommen werden, sondern unmittelbar in den Zellkern transportiert werden. Des Weiteren werden auch kürzere A β Spezies, wie A β 38 und A β 40 aber auch die längere Form A β 43 in den Zellkern transportiert. Es handelt sich um einen aktiven Transportprozess, der bei 4°C inhibiert werden kann. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sowohl das toxische A β 42 als auch die nicht-toxische Form A β 42G33A im Zellkern humaner Neuroblastoma Zellen akkumulieren. Mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) wurden A β 42 und A β 42G33A im Zellkern nachgewiesen (Figur 1). Der grafischen Darstellung ist zu entnehmen, dass beide Peptide zeitabhängig im Zellkern von SH-SY5Y-Zellen akkumulieren.

Beispiel 2

A β 42 übt im Zellkern eine transkriptions-regulatorische Funktion aus

Aufgrund des neuen Befunds, dass sowohl A β 42 als auch A β 42G33A im Zellkern nachzuweisen sind und dort zeitabhängig akkumulieren, wurde untersucht, ob A β 42 und A β 42G33A eine Genregulatorische Wirkung haben. Deshalb wurde mRNA aus SH-SY5Y-Zellen isoliert und mittels RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerase Ketten Reaktion) cDNA aus dieser mRNA generiert und mit der *real-time* PCR Methode in mehreren Zyklen amplifiziert. Bei dieser speziellen Methode der PCR wird ein Fluorophor benutzt, dessen Intensität proportional zur Menge des entstandenen Reaktionsprodukts ist, um so das Amplifikat direkt während der Reaktion zu messen und zu bestimmen. Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der Zellen mit dem toxischen Peptid A β 42 zu einer signifikanten Abnahme der mRNA zweier bestimmter Gene führte, LRP1 und KAI1, und es zu einem signifikanten Anstieg der mRNA des APPs kam. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass A β 42 keinen Einfluss auf den mRNA Expressionsspiegel von BACE1 hat. Als Kontrolle wurde der Expressionsspiegel der mRNA von Hes1 gemessen, der durch A β 42 nicht beeinflusst wurde (Figur 2).

Untersuchungen der mRNA Expressionsspiegel von Neuroblastoma Zellen, die mit dem nicht toxischen Peptid A β 42G33A behandelt wurden, ergaben, dass es zu keiner Varianz der mRNA Expression kam (Figur 3). Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass sowohl die kürzeren A β -Spezies, wie A β 38 und A β 40, als auch die längere Form A β 43 ebenfalls keinen Einfluss auf die mRNA Expression der untersuchten Gene zeigten.

Dieses Ergebnis führt zu dem Schluss, dass A β 42 im Zellkern eine transkriptions-regulatorische Funktion ausüben kann, wie anhand der Beispiele LRP1, KAI1 und APP gezeigt werden konnte.

Mit Chromatinimmunopräzipitations-Experimenten (ChIP) konnte gezeigt werden, dass A β 42 an bestimmte Regionen der DNA, an

Promotoren, bindet. Dabei kommt es zur Rekrutierung der Histon-Acetyltransferase Tip60 und des Adapterproteins Fe65 und vermutlich zur Komplexbildung mit diesen Proteinen und der DNA (Figur 4). Die Interaktion von A β 42 an den Promotoren von LRP1 und KAI1 wurde als ein spezifisches Ereignis identifiziert, da am Hes1 Promotor keine Interaktion mit A β 42 nachgewiesen werden konnte.

Nach einer Illumina-Studie mit einem HT12-v3 Chip konnte gezeigt werden, dass noch weitere Gene durch das neurotoxische A β 42 beeinflusst werden. Unter anderem konnten Gene zweier Genfamilien und ein Transkriptionsfaktor identifiziert werden (ID 1-3; IGFBP 3/5 und LMO4), die durch den Einfluss von A β 42 nach 8h Inkubation signifikant hochreguliert wurden (Figur 5). In dieser Studie wurden die nicht toxischen Peptide Ab40 und Ab42G33A als Kontrollpeptide verwendet und die Daten miteinander verglichen. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die nicht toxischen Ab-Peptide keinen Einfluss auf die Genregulation haben.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Screenen von Wirkstoffen zur Prophylaxe und/oder Therapie einer neurodegenerativen Erkrankung, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfaßt:

- (a) Inkontaktbringen von Zellen in Gegenwart von (i) A β 42 und (ii) eines Wirkstoffkandidaten unter Bedingungen, die deren Aufnahme durch die Zellen erlauben; und
- (b) Bestimmung der zellulären oder subzellulären Lokalisation von A β 42 in den Zellen;

wobei eine verringerte zelluläre oder subzelluläre Lokalisation von A β 42 im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Wirkstoffkandidaten darauf hinweist, dass der Wirkstoffkandidat für die Prophylaxe/Therapie einer neurodegenerativen Erkrankung geeignet ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zellen neuronale Zellen sind.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Zellen Neuroblastoma-Zellen sind.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Neuroblastoma-Zellen SH-SY5Y-Zellen sind.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Lokalisation von A β 42 im Zellkern bestimmt wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei vor Schritt (b) die Zellen subzellulär fraktioniert werden und der Nachweis von A β 42 in der Zellkernfraktion erfolgt.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der Nachweis ein immunologischer Nachweis ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, wobei die verringerte Lokalisation von A β 42 im Zellkern indirekt durch dessen Gen-regulatorische Wirkungen bestimmt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Gen-regulatorische Wirkung (a) eine Hemmung der Expression von LRP1 und/oder KAI1 ist, und/oder (b) eine Erhöhung der Expression von APP ist.

10. Verwendung eines spezifisch an A β 42 bindenden Liganden zur Herstellung eines Diagnosemittels zur Bestimmung einer neurodegenerativen Erkrankung oder zur Bestimmung des Risikos eine neurodegenerativen Erkrankung zu entwickeln.

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei der Ligand ein Antikörper ist.

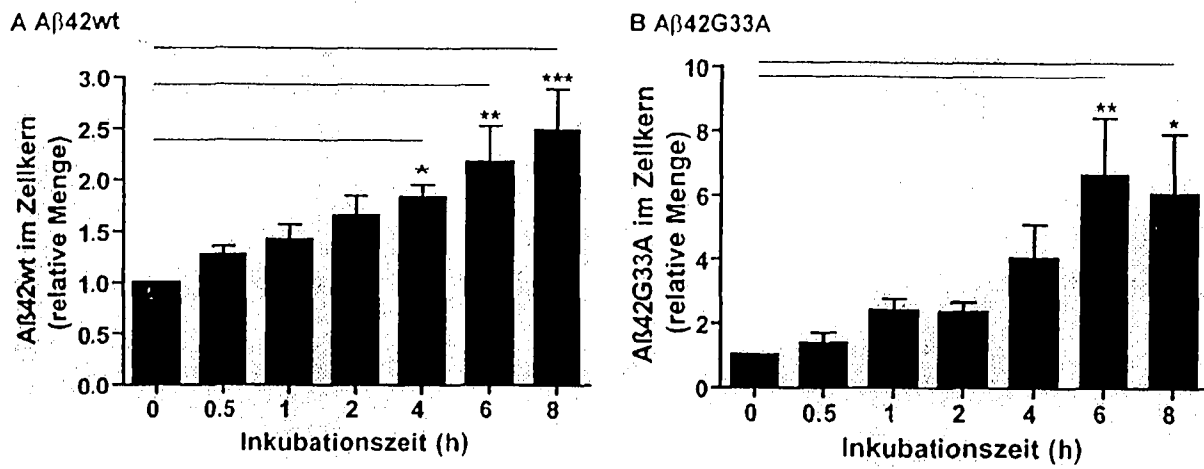
12. Ligand nach Anspruch 10 oder 11 zur Anwendung in einem Verfahren zur Diagnose einer neurodegenerativen Erkrankung.

13. Verwendung einer die Genexpression von LRP1 und/oder KAI1 erhöhenden und/oder die Genexpression von APP hemmenden Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe und/oder Therapie einer neurodegenerativen Erkrankung.

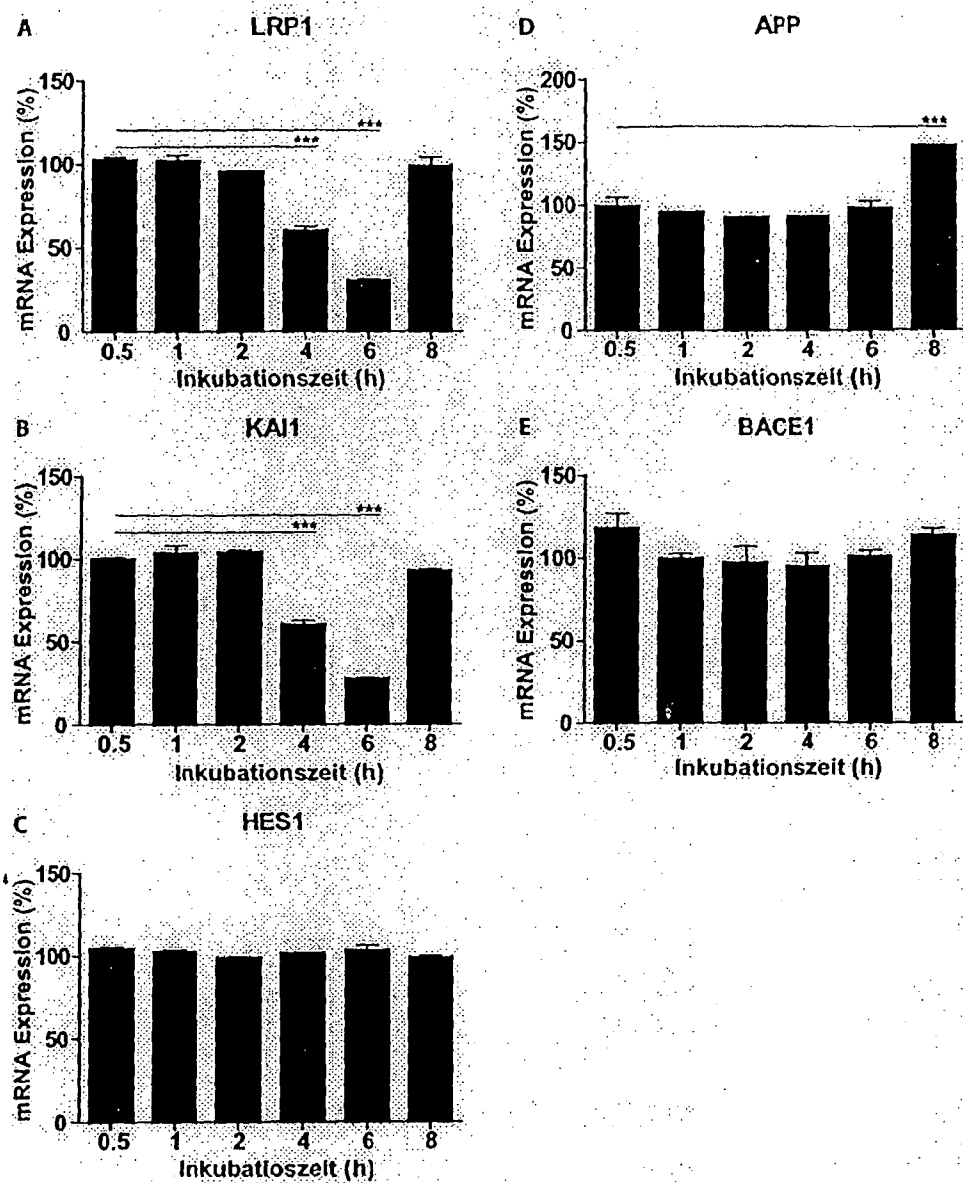
14. Die Genexpression von LRP1 und/oder KAI1 erhöhende und/oder die Genexpression von APP hemmende Verbindung zur Anwendung in einem Verfahren zur Prävention und/oder Therapie einer neurodegenerativen Erkrankung.

15. Verfahren oder Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die neurodegenerative Erkrankung die Alzheimer Krankheit ist.

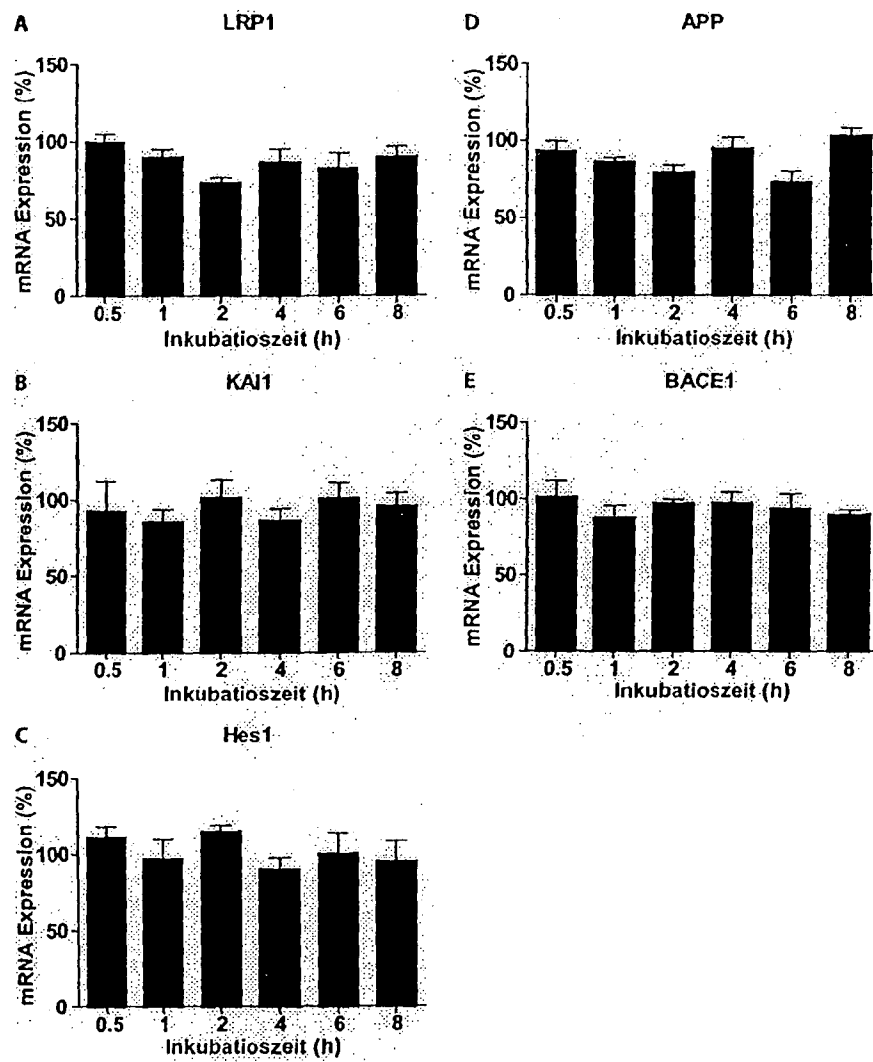
Figur 1



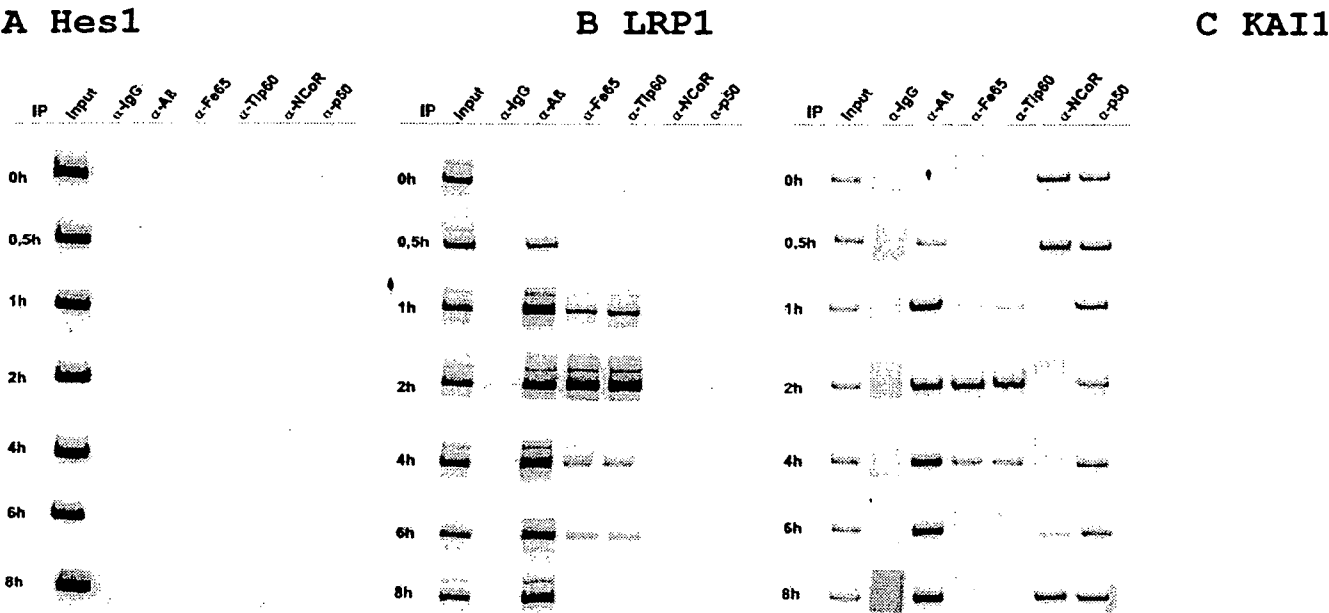
Figur 2



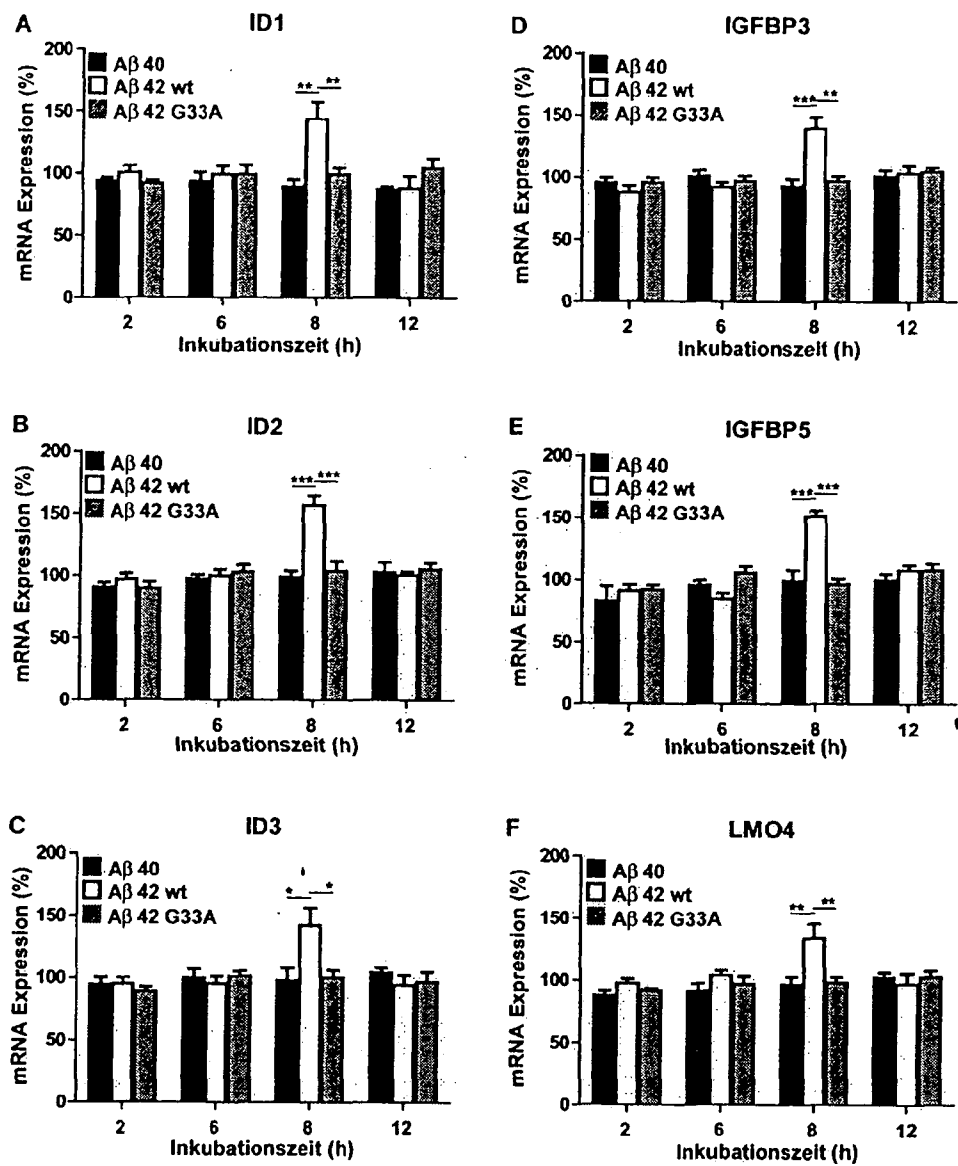
Figur 3



Figur 4



Figur 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2010/007043

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 13, 14
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see attached sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/007043

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/47 G01N33/68 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 865 326 A1 (FU BERLIN [DE]) 12 December 2007 (2007-12-12) page 5, paragraph 0024; claim 15 -----	10-12,15
X	EP 1 881 008 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES]) 23 January 2008 (2008-01-23) page 10, paragraph 0048; claim 31 ----- -/--	10-12,15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 März 2011

Date of mailing of the international search report

04/04/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wiesner, Martina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/007043

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHAFEKAR S M ET AL: "Oligomer-specific Abeta toxicity in cell models is mediated by selective uptake" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR BASIS OF DISEASE, vol. 1782, no. 9, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 523-531, XP023905948 AMSTERDAM, NL ISSN: 0925-4439 DOI: 10.1016/J.BBADIS.2008.06.003 [retrieved on 2008-06-13]	1-3
Y	page 524, left-hand column, paragraph 1 page 527, right-hand column, paragraph 4 page 529, left-hand column, paragraph 1 - page 530, left-hand column, paragraph 2 -----	4-9
Y	Barucker, C.: "The amyloid Abeta peptide in processes of learning an memory: a possible role in the nucleus"[Online] 26 February 2009 (2009-02-26), page 13, XP002627388 Charité Universitätsmedizin Berlin - DFG Berichtskolloquium Retrieved from the Internet: URL: http://www.charite.de/GRK1123/Abstract-Booklet%20Final%20%2823.02.09%29.pdf [retrieved on 2011-03-07] abstract -----	4-9
Y	BARRANTES ALEJANDRO ET AL: "Interaction between Alzheimer's Abeta1-42 peptide and DNA detected by surface plasmon resonance" JOURNAL OF ALZHEIMER'S DISEASE, vol. 12, no. 4, 1 December 2007 (2007-12-01), pages 345-355, XP008134099 IOS PRESS, AMSTERDAM, NL ISSN: 1387-2877 the whole document -----	5-8
Y	JOHNSTONE ET AL: "Nuclear and Cytoplasmic Localization of the beta-Amyloid Peptide (1-43) in Transfected 293 Cells" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 220, no. 3, 27 March 1996 (1996-03-27), pages 710-718, XP005176771 ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US ISSN: 0006-291X DOI: 10.1006/BBRC.1996.0469 page 351, right-hand column, paragraph 3 - page 353, right-hand column, paragraph 1 ----- -/--	5-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/007043

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FIALA MILAN ET AL: "Ineffective phagocytosis of amyloid-beta by macrophages of Alzheimer's disease patients" JOURNAL OF ALZHEIMER'S DISEASE, vol. 7, no. 3, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 221-232, XP008105495 IOS PRESS, AMSTERDAM, NL ISSN: 1387-2877 the whole document	1-9
A	----- BURDICK DEBRA ET AL: "Preferential adsorption, internalization and resistance to degradation of the major isoform of the Alzheimer's amyloid peptide, A beta-1-42, in differentiated PC12 cells" BRAIN RESEARCH, vol. 746, no. 1-2, 1997, pages 275-284, XP002627389 ISSN: 0006-8993 page 282, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2 -----	1-9
A	BI X ET AL: "Uptake and pathogenic effects of amyloid beta peptide 1-42 are enhanced by integrin antagonists and blocked by NMDA receptor antagonists" NEUROSCIENCE, vol. 112, no. 4, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 827-840, XP002340460 NEW YORK, NY, US ISSN: 0306-4522 DOI: 10.1016/S0306-4522(02)00132-X the whole document -----	1-9
A	OHYAGI YASUMASA ET AL: "Intracellular Abeta42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease." THE FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, vol. 19, no. 2, February 2005 (2005-02), pages 255-257, XP002627390 ISSN: 1530-6860 the whole document ----- -/--	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/007043

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAN ZHANG ET AL: "Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide 1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 156, no. 3, 4 February 2002 (2002-02-04), pages 519-529, XP008125564 ISSN: 0021-9525 the whole document -----	1-9
A	KIM J Y ET AL: "Amyloid beta peptide (Abeta42) activates PLC-delta1 promoter through the NF-kappaB binding site" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 310, no. 3, 24 October 2003 (2003-10-24), pages 904-909, XP004461181 ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US ISSN: 0006-291X DOI: 10.1016/J.BBRC.2003.09.100 the whole document -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/007043

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1865326	A1	12-12-2007	CN 101460853 A 17-06-2009
			EP 2032990 A2 11-03-2009
			WO 2007140843 A2 13-12-2007
			US 2010221759 A1 02-09-2010

EP 1881008	A1	23-01-2008	BR PI0609168 A2 23-02-2010
			CA 2601550 A1 14-09-2006
			CN 101137670 A 05-03-2008
			ES 2259270 A1 16-09-2006
			WO 2006095041 A1 14-09-2006
			JP 2008532984 T 21-08-2008
			US 2009023159 A1 22-01-2009

Continuation of Box II.2

Claims 13, 14

The current claims 10, 12, 13 and 14 relate to compounds having a specific desired property or effect, namely binding specifically to A β 42, increasing the gene expression of LRP1 and/or KAI1 and/or inhibiting the gene expression of APP. The current claims therefore do not meet the requirement regarding clarity (PCT Article 6). The definition of the claimed subject matter by a result that is to be achieved does not allow determining the scope of protection of the claim. The fact that each individual substance could be subjected to a screening method cannot overcome this objection because a person skilled in the art has no advance knowledge whether the substance would fall under the claimed scope of protection. It would require an unreasonable effort in order to subject randomly selected substances to a screening method.

Moreover, the description does not provide any support or disclosure (PCT Articles 6 and 5) for compounds having these properties, and a person skilled in the art has no access to general technical knowledge of this kind. The failure to meet the relevant requirements is so serious that it was taken into consideration in determining the scope of protection of the claims (PCT Guidelines 9.19 and 9.20).

The failure to meet the relevant requirements is so serious that it was not possible to carry out a meaningful search in respect of the claims 13 and 14 (PCT Article 17(2)).

The search in respect of the claims 10 and 12 was thus restricted to A β 42-specific antibodies.

The applicant is advised that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subject matter that has not been searched. This also applies in cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II. However, after entry into the regional phase before the EPO an additional search may be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, C-VI, 8.5) if the deficiencies that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been corrected.

Feld Nr. II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein internationaler Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche diese Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 13, 14
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, dass eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe BEIBLATT PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefasst sind.

Feld Nr. III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Diese Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchegebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.
- ☐ Die zusätzlichen Recherchegebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.
- ☐ Die Zahlung der zusätzlichen Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. C07K14/47 G01N33/68 G01N33/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

C07K G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 1 865 326 A1 (FU BERLIN [DE]) 12. Dezember 2007 (2007-12-12) Seite 5, Absatz 0024; Anspruch 15 -----	10-12,15
X	EP 1 881 008 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES]) 23. Januar 2008 (2008-01-23) Seite 10, Absatz 0048; Anspruch 31 ----- -/-	10-12,15



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. März 2011

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/04/2011

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Wiesner, Martina

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHAFEKAR S M ET AL: "Oligomer-specific Abeta toxicity in cell models is mediated by selective uptake" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR BASIS OF DISEASE, Bd. 1782, Nr. 9, 1. September 2008 (2008-09-01), Seiten 523-531, XP023905948 AMSTERDAM, NL ISSN: 0925-4439 DOI: 10.1016/J.BBADIS.2008.06.003 [gefunden am 2008-06-13]	1-3
Y	Seite 524, linke Spalte, Absatz 1 Seite 527, rechte Spalte, Absatz 4 Seite 529, linke Spalte, Absatz 1 - Seite 530, linke Spalte, Absatz 2 -----	4-9
Y	Barucker, C.: "The amyloid Abeta peptide in processes of learning an memory: a possible role in the nucleus"[Online] 26. Februar 2009 (2009-02-26), Seite 13, XP002627388 Charité Universitätsmedizin Berlin - DFG Berichtskolloquium Gefunden im Internet: URL: http://www.charite.de/GRK1123/Abstract-Booklet%20Final%20%2823.02.09%29.pdf [gefunden am 2011-03-07] Zusammenfassung -----	4-9
Y	BARRANTES ALEJANDRO ET AL: "Interaction between Alzheimer's Abeta1-42 peptide and DNA detected by surface plasmon resonance" JOURNAL OF ALZHEIMER'S DISEASE, Bd. 12, Nr. 4, 1. Dezember 2007 (2007-12-01), Seiten 345-355, XP008134099 IOS PRESS, AMSTERDAM, NL ISSN: 1387-2877 das ganze Dokument -----	5-8
Y	JOHNSTONE ET AL: "Nuclear and Cytoplasmic Localization of the beta-Amyloid Peptide (1-43) in Transfected 293 Cells" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 220, Nr. 3, 27. März 1996 (1996-03-27), Seiten 710-718, XP005176771 ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US ISSN: 0006-291X DOI: 10.1006/BBRC.1996.0469 Seite 351, rechte Spalte, Absatz 3 - Seite 353, rechte Spalte, Absatz 1 ----- -/--	5-8

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	FIALA MILAN ET AL: "Ineffective phagocytosis of amyloid-beta by macrophages of Alzheimer's disease patients" JOURNAL OF ALZHEIMER'S DISEASE, Bd. 7, Nr. 3, 1. Juni 2005 (2005-06-01), Seiten 221-232, XP008105495 IOS PRESS, AMSTERDAM, NL ISSN: 1387-2877 das ganze Dokument -----	1-9
A	BURDICK DEBRA ET AL: "Preferential adsorption, internalization and resistance to degradation of the major isoform of the Alzheimer's amyloid peptide, A beta-1-42, in differentiated PC12 cells" BRAIN RESEARCH, Bd. 746, Nr. 1-2, 1997, Seiten 275-284, XP002627389 ISSN: 0006-8993 Seite 282, linke Spalte, Absatz 2 - rechte Spalte, Absatz 2 -----	1-9
A	BI X ET AL: "Uptake and pathogenic effects of amyloid beta peptide 1-42 are enhanced by integrin antagonists and blocked by NMDA receptor antagonists" NEUROSCIENCE, Bd. 112, Nr. 4, 1. Januar 2002 (2002-01-01), Seiten 827-840, XP002340460 NEW YORK, NY, US ISSN: 0306-4522 DOI: 10.1016/S0306-4522(02)00132-X das ganze Dokument -----	1-9
A	OHYAGI YASUMASA ET AL: "Intracellular Abeta42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease." THE FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, Bd. 19, Nr. 2, Februar 2005 (2005-02), Seiten 255-257, XP002627390 ISSN: 1530-6860 das ganze Dokument ----- -/--	1-7

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	YAN ZHANG ET AL: "Selective cytotoxicity of intracellular amyloid beta peptide 1-42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, Bd. 156, Nr. 3, 4. Februar 2002 (2002-02-04), Seiten 519-529, XP008125564 ISSN: 0021-9525 das ganze Dokument -----	1-9
A	KIM J Y ET AL: "Amyloid beta peptide (Abeta42) activates PLC-delta1 promoter through the NF-kappaB binding site" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 310, Nr. 3, 24. Oktober 2003 (2003-10-24), Seiten 904-909, XP004461181 ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US ISSN: 0006-291X DOI: 10.1016/J.BBRC.2003.09.100 das ganze Dokument -----	1-9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2010/007043

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1865326	A1	12-12-2007	CN 101460853 A 17-06-2009
			EP 2032990 A2 11-03-2009
			WO 2007140843 A2 13-12-2007
			US 2010221759 A1 02-09-2010

EP 1881008	A1	23-01-2008	BR PI0609168 A2 23-02-2010
			CA 2601550 A1 14-09-2006
			CN 101137670 A 05-03-2008
			ES 2259270 A1 16-09-2006
			WO 2006095041 A1 14-09-2006
			JP 2008532984 T 21-08-2008
			US 2009023159 A1 22-01-2009

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld II.2

Ansprüche Nr.: 13, 14

Die vorliegenden Ansprüche 10, 12, 13 und 14 beziehen sich auf Verbindungen mit einer bestimmten gewünschten Eigenschaft oder Wirkung, nämlich spezifisch an Abeta 42 bindend, die Genexpression von LRP1 und/oder KAI1 erhöhend und /oder die Genexpression von APP hemmend. Die vorliegenden Ansprüche verstoßen somit gegen das Erfordernis der Klarheit nach Artikel 6 PCT. Die Definition des beanspruchten Gegenstands durch ein zu erreichendes Ergebnis erlaubt es nicht, den Schutzbereich des Anspruchs zu bestimmen. Die Tatsache, dass jede einzelne Substanz einem Screening-Verfahren unterzogen werden könnte, kann diesen Einwand nicht ausräumen, da der Fachmann im Voraus nicht wüsste, ob die Substanz unter den beanspruchten Schutzbereich fällt. Es wäre ein unzumutbarer experimenteller Aufwand erforderlich, um willkürlich ausgewählte Substanzen einem Screening-Verfahren zu unterziehen.

Darüber hinaus enthält die Beschreibung keine Stützung und Offenbarung im Sinne der Artikel 6 und 5 PCT für Verbindungen mit diesen Eigenschaften, und dem Fachmann steht kein allgemeines Fachwissen solcher Art zur Verfügung. Die Verletzung der einschlägigen Erfordernisse ist so schwerwiegend, dass sie bei der Bestimmung des Recherchenumfangs für die Ansprüche berücksichtigt wurde (PCT-Richtlinien 9.19 und 9.20).

Die Verletzung der einschlägigen Erfordernisse ist so schwerwiegend, dass eine sinnvolle Recherche für die Ansprüche 13 und 14 nicht durchgeführt werden konnte (Artikel 17 (2) PCT).

Die Recherche zu den Ansprüchen 10 and 12 wurde deshalb auf Abeta42-spezifische Antikörper beschränkt.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, dass Patentansprüche auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, dass die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, dass der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäss Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt. Nach Eintritt in die regionale Phase vor dem EPA kann jedoch im Zuge der Prüfung eine weitere Recherche durchgeführt werden (Vgl. EPA-Richtlinien C-VI, 8.2), sollten die Mängel behoben sein, die zu der Erklärung gemäss Art. 17 (2) PCT geführt haben.