



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 36 976 T2 2007.10.18

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 890 105 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 36 976.5

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/04966

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 919 932.0

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1997/037228

(86) PCT-Anmeldetag: 28.03.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 09.10.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 13.01.1999

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 22.11.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 18.10.2007

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/567 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/48 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

625765 29.03.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Trustees of Boston University, Boston, Mass., US

(72) Erfinder:

GILCHREST, A., Barbara, Boston, MA 02109, US;  
YAAR, Mina, Sharon, MA 02067, US

(74) Vertreter:

Busse & Busse, Patent- und Rechtsanwälte, 49084  
Osnabrück

(54) Bezeichnung: Mit Alzheimer Krankheit verknüpften Verfahren zur Diagnose, zur Herstellung von Medikamenten  
und zum Screenen von Substanzen sowie aus Beta-Amyloid abgeleiteten Peptiden

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****Hintergrund der Erfindung**

**[0001]** Demenz ist ein Zustand mentalen Zerfalls, der gekennzeichnet ist durch den Rückgang des intellektuellen Niveaus eines Individuums einschließlich eines Gedächtnisverlustes, eines verschlechterten Urteilsvermögens einer verschlechterten Sprache und Orientierung und oft mit emotionaler Apathie einhergeht. (Webster's Medical Desk Dictionary, Merriam-Webster, Inc., Springfield, MA, p169 (1986)).

**[0002]** Eine Hauptursache für Demenz ist die Alzheimer Krankheit, (AD), eine neurodegenerative Störung, die weltweit zwischen 17 bis 20 Millionen Menschen betrifft (Yamazaki, T., et al., J. Cell. Biol., 129: 431-442 (1995); Brinaga, M., Science, 269: 917-918 (1995); Lavy-Lahad, E., et al., Science, 269: 970-972 (1995); Lavy-Lahad, E., et al., Science, 269: 973-977 (1995)). AD ist gekennzeichnet durch fortschreitende Demenz in Verbindung mit neuropathologischen Befunden von „Altersflecken“ im Gehirn, die durch  $\beta$ -Amyloid Protein Ablagerungen umgeben von Clustern aus degenerierenden Neuronen, entstehen. Das  $\beta$ -Amyloid Protein bildet einen Bestandteil der 770 Aminosäuremembran, die an das  $\beta$ -Amyloid Präkursorprotein (APP) angrenzt, welches sowohl in neuronalen wie auch nicht-neuronalen Geweben vorliegt.

**[0003]** Um ein APP Substratsystem herzustellen, in dem APP spaltbar oder nicht spaltbar ist, so dass  $\beta$ -AP produzierende Enzyme und Hemmstoffe davon isoliert werden können, wurden APP-Muteine und  $\beta$ -APP-Muteine hergestellt (EP-A-0 584 452).

**[0004]** Die spezifische Ursache für die Alzheimer Krankheit konnte noch nicht bestimmt werden. Eine Mutation des  $\beta$ -APP Gens wurde in Familien mit einer Form autosomaler dominanter AD mit einer erhöhten  $\beta$ -Amyloidsynthese und Aggregation im Gehirn in Verbindung gebracht. Als ein Rezeptor für  $\beta$ -APP konnte das Low-Density-Lipoprotein rezeptorabhängige Protein, ApoE, identifiziert werden, und es wurde postuliert, dass dieses Rezeptorprotein, das Enzym, dass für die  $\beta$ -APP Spaltung in der Zellmembran,  $\beta$ -APP Produktion und/oder Produktion extrazellulärer Matrixmoleküle verantwortlich ist, in AD Patienten individuell oder kombiniert anormal ist und zu einer überschüssigen  $\beta$ -Amyloid Ablagerung und der beobachteten Neurotoxizität führt. Allerdings konnten die Mechanismen, durch die andere bekannte  $\beta$ -APP Genmutationen AD verursachen, sowie die Pathophysiologie nicht-familiärer AD, in denen  $\beta$ -APP Genmutationen nicht erkannt werden konnten, noch nicht abschließend erklärt werden.

**[0005]** Daher ist die Diagnose der Alzheimer Krankheit als Ursache für die Demenz eines Individuums sehr schwierig. Obwohl neue Berichte über die Ver-

wendung der Positronenemissionstomographie (PET) (Reiman, E.M., et al., New Eng. J. Med, 334: 752-758 (1996)) zur Bestimmung des Genotyps des ApoEs eines Individuums oder das Messen der  $\beta$ -Amyloid Protein Konzentration in der zerebralen Spinalflüssigkeit vielversprechend scheinen, wird die Diagnose der Alzheimer Krankheit derzeit nur über eine Autopsie zur Bestimmung der Anwesenheit  $\beta$ -Amyloid Altersflecken bestätigt.

**[0006]** In vitro Systeme zur Erforschung der Alzheimer Krankheit bestehen aus bösartigen oder transformierten Zellen, die nicht aus dem selben Neuralleistensprung stammen wie Neuronen oder neuronale Kulturen aus der unteren Wirbelsäule. Es wäre ein großer Vorteil, ein funktionierendes Modellsystem der Alzheimer Krankheit unter Verwendung normaler menschlicher Neuralzellen aus der Crista zu haben. Wie auch immer gibt es derzeit kein derartiges Modell.

**[0007]** Ferner haben neue Studien gezeigt, dass die Schädigung von CNS Neuronen durch die Alzheimer Krankheit schon Jahre vor den offensichtlichen klinischen Symptomen beginnen. (Reiman, E.M., et al., New Eng. J. MEd, 334: 752-758 (1996)). Es besteht ein großer Bedarf für eine akkurate und leicht durchzuführende Analyse zur Bewertung des Bildungsrisikos der Alzheimer Krankheit.

**Zusammenfassung der Erfindung**

**[0008]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Verfahren der Diagnose und Herstellung von Medikamenten zur Behandlung der Alzheimer Krankheit und anderen neurodegenerativen Krankheiten, die indirekt durch  $\beta$ -Amyloid Protein oder eine abweichende Aktivierung des unteren Affinitätsnervenwachstumsfaktorrezeptors auf der neuralen Zelloberfläche bewirkt werden. Zum Beispiel werden die Autoimmune Encephalomyelitis, Huntington Krankeit, Picksche Hirnatrophie, Corticobasaler Degeneration, Fortschreitender Supra-Nuklear Paralyse, Gerotman-Shaussleser Scheinker Syndrom, Niemann-Pick-Krankheit, fortschreitende Susupranuklear Paralyse von dieser Erfindung eingeschlossen. Wie hierin verwendet soll der Term  $\beta$ -Amyloid Protein das  $\beta$ -Amyloid Protein (ein 4,2 kD Polypeptid (Selkoe, D.J., Neuron, 6: 487-498 (1991); Glenner, G.G. and Wong, C.W., Biochem. Biophys. Res. Commun., 120: 885-890 (1993))),  $\beta$ -Amyloid Präkursorprotein ( $\beta$ -APP) und Fragmente des  $\beta$ -Amyloid Proteins und  $\beta$ -Amyloid Präkursorproteins, die hierin als  $\beta$ -Amyloid Peptide einschließlich  $\beta$ -Amyloid 1-40 Peptid,  $\beta$ -Amyloid 1-42 Peptid,  $\beta$ -Amyloid 25-36 Peptid oder  $\beta$ -Amyloid 28-30 Peptid verwendeten, bezeichnen.

**[0009]** Indirekt durch  $\beta$ -Amyloid Protein bewirkte neurodegenerative Krankheiten beinhalten Krankheiten, die von der Crista gewonnene neurale Zellen,

wie etwa Zentralnervensystem (ZNS) Neuronen betreffen und in denen  $\beta$ -Amyloid Protein,  $\beta$ -APP, oder  $\beta$ -Amyloid Peptide einen Prozess der Neuronendegeneration oder neuronalen Zelltod hervorrufen oder exazerbieren. Neurodegenerative Krankheiten, die durch eine abweichende Aktivierung des unteren Affinitätsnervenwachstumsfaktorrezeptors auf der neuronalen Zelloberfläche bewirkt werden, beinhalten Krankheiten, in denen der Affinitätsnervenwachstumsfaktor durch eine von dessen natürlich auftretenden Liganden Nervenwachstumsfaktor verschiedene Substanz aktiviert wird und im apoptotischen Zelltod mündet. Die neurodegenerativen Krankheiten werden im erkrankten Individuum durch fortschreitende Demenz charakterisiert. Im Wesentlichen wird die neurodegenerative Krankheit, Alzheimer Krankheit (AD), die durch die Ablagerung von  $\beta$ -Amyloid Peptiden in neuralem Gewebe, welche zur Neuronalzelldegeneration, Zelltod und fortschreitender Demenz führen, gekennzeichnet ist, eingeschlossen.

**[0010]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich speziell auf Verfahren zur Bewertung des Risikos eines Individuums, die Alzheimersche Krankheit zu bekommen, unter Verwendung eines *in vitro* Analysesystems, welches vom Individuum gewonnene epidermale Melanozyten einschließt, wie in den Ansprüchen 1, 6 und 9 festgelegt ist. Epidermale Melanozyten sind Melanzymen, die in der Epidermis (Haut) und Haarwurzeln von Wirbeltieren vorliegen. Die vorliegende Erfindung basiert auf den Ergebnissen der Anmelder, dass menschliche Melanozyten signifikante Ähnlichkeiten mit Neuronen des Zentralen Nervensystems aufweisen (die von der Alzheimer Krankheit überwiegend betroffenen Zellen), und dass Melanozyten dieselben Botenstoffe zur Bestimmung ihres Weiterlebens beziehungsweise programmierten Zelltods (Apoptose) verwenden wie Neuronen.

**[0011]** Zum Beispiel prägen neuronale Zellen einen Rezeptor hoher Affinität ( $p140^{trkA}$ ) und niedriger Affinität ( $p75^{NTR}$ ) für den Nervenwachstumsfaktor (NGF) aus. Wie hierin beschrieben zeigen die Ergebnisse der Anmelder, dass diese Nervenwachstumsfaktorrezeptoren ebenfalls auf Melanozyten ausgeprägt sind, und dass sich  $\beta$ -Amyloid an den auf der Oberfläche des Melanozyts ausgeprägten Nervenwachstumsfaktorrezeptor geringer Affinität,  $p75^{NTR}$  bindet. Die Anmelder stellen außerdem heraus, dass die Bindung des  $\beta$ -Amyloids an das  $p75^{NTR}$  den Rezeptor aktiviert, woraus sich ein apoptotischer Zelltod der Melanozyten ergibt. Die Anmelder zeigen darüber hinaus, dass die durch das  $\beta$ -Amyloid ausgelöste Apoptose durch Bereitstellung eines Nervenwachstumsfaktors oder eines biologischen aktivierten Fragments, Analogons oder Derivates konkurrierend unterdrückt werden kann. Der Nervenwachstumsfaktor ist ein physiologischer Ligand für  $p75^{NTR}$ , das eine höhere Rezeptoraffinität aufweist als das  $\beta$ -Amyloid.

**[0012]** Zusätzlich haben die Anmelder gezeigt, dass Melanozyten konstitutiv, und als Reaktion auf Trauma wie zum Beispiel UV Bestrahlung, in gesteigerten Mengen,  $\beta$ -Amyloid (in Form ihres Präkursorproteins) ausschütten. Demgemäß haben die Anmelder, basierend auf den hierin beschriebenen Ergebnissen, festgestellt, dass Melanozyten, die einfach mittels Biopsie der Haut gewonnen werden können, angemessene Modellzellen zur Erforschung und Diagnose der Alzheimerschen Krankheit darstellen.

**[0013]** In dem vorgeschlagenen Diagnoseverfahren wird die vereinfachte Herbeiführung der *in vitro* Melanozytapoptose und darauf folgende Exposition gegenüber  $\beta$ -Amyloid Protein und/oder Unterdrücken der Apoptose durch Zugabe des Nervenwachstumsfaktors (NGF) mit der Prädisposition der Spenderzelle zur Ausbildung der Alzheimer Krankheit korreliert. Mittels Biopsie von der Haut eines Patienten kultivierte Melanozyten werden mit standardisierten Kontrollzelllinien verglichen. Das  $\beta$ -Amyloid Protein oder Peptid wird in die Zellkulturen eingeführt und die sich aus der Bindung des  $\beta$ -Amyloid Proteins an den  $p75^{NTR}$  ergebende Melanozytapoptose wird ermittelt. Die Aktivierung des  $p75^{NTR}$  mittels Bindung des  $p75^{NTR}$  durch das  $\beta$ -Amyloid Protein oder Peptid resultiert im apoptotischen Zelltod der Melanozyten. Folglich besteht die Bestimmung der Aktivierung des  $p75^{NTR}$  durch  $\beta$ -Amyloid typischerweise aus der Bestimmung des apoptotischen Zelltods der gezüchteten Melanozyten. Der apoptotische Zelltod kann leicht durch irgendeinen Standardparameter, wie etwa Propidiumjodeinlagerung in Kernbruchstücke, Markieren der DNA Kettenbrüche unter Verwendung mit Fluoreszein markierter dUTP unter Anwesenheit terminaler Desoxynukleotidyltransferase (TUNEL Reaktion) oder Veranschaulichung der fragmentierten DNA (einer DANN Leiter) bewertet werden. Die Aktivierung des auf den von einem Individuum gewonnenen, Melanozyten liegenden  $p75^{NTR}$  wird dann mit der Aktivierung des auf Kontrollmelanozyten liegenden  $p75^{NTR}$  verglichen. Wenn die Aktivierung des auf den, von einem Individuum gewonnenen Melanozyten liegenden  $p75^{NTR}$  größer ist als die Aktivierung des  $p75^{NTR}$  auf den Kontrollmelanozyten, deutet dies auf das erhöhte Risiko eines Individuums hin, die Alzheimer Krankheit zu bekommen.

**[0014]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich außerdem auf Verfahren zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung oder Verringerung des Risikos zur Entwicklung der Alzheimerschen Krankheit oder anderer neurodegenerativer Krankheiten, die mit dem  $\beta$ -Amyloid Protein oder der Aktivierung des  $p75^{NTR}$  und daraus resultierendem apoptotischen Neuralzelltod in Verbindung stehen, wie in Anspruch 10 definiert. In der vorgelegten Therapie für die Alzheimer Krankheit wird ein Peptid mit einer Länge von 5 bis 10 Aminosäureketten, welches das Drei-Peptid Lysin-Glycin-Alanin oder ein ähnliches Peptid mit an-

erkannter Affinität zum p75<sup>NTR</sup> beinhaltet, auf angemessenem Weg zu Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) gebracht, die dem Risiko eines durch  $\beta$ -Amyloid herbeigeführten apoptotischen Zelltods ausgesetzt sind, um die  $\beta$ -Amyloid Bindung and den p75<sup>NTR</sup> zu unterbinden. Der Nervenwachstumsfaktor (NGF), biologisch aktivierte Fragmente, Analogone oder Derivate des NGF (wobei biologische Aktivität hierin als die Fähigkeit des Fragmentes, Analogons oder Derivates definiert wird, sich an den auf neural gewonnenen Zellen wie etwa Neuronen oder Melanozyten, liegenden p75<sup>NTR</sup> zu binden) und/oder andere Neurotropine könnten ebenfalls verabreicht werden, um die  $\beta$ -Amyloid Bindung an den p75<sup>NTR</sup> weiter zu unterdrücken sowie das Zellüberlebensprogramm in beschädigten Neuronen, zum Beispiel durch Aufregulierung des Apoptosehemmenden Proteins Bcl-2, zu aktivieren. Das therapeutische Peptid ist derart ausgelegt, dass deren Rezeptoraffinität mit  $\beta$ -Amyloid vergleichbar oder größer, aber kleiner als die des NGF und anderer Neurotropine ist.

**[0015]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich ferner auf in vitro Verfahren zum Aussieben von Substanzen und Identifizieren der Substanzen, die durch  $\beta$ -Amyloid ausgelöste Apoptose neuronaler Zellen oder Aktivierung des p75<sup>NTR</sup> hemmen oder verringern, und auf Substanzen, die durch diese Verfahren identifiziert werden.

**[0016]** Die Alzheimer Krankheit ist eine verheerende und letzten Endes tödliche Erkrankung. Eine Früherkennung der Alzheimerschen Krankheit würde ein frühes Eingreifen zur Verhütung oder zur wesentlichen Verringerung der Neurondegeneration oder Neurontod ermöglichen. Zurzeit gibt es quasi keine Therapie zur Behandlung der Alzheimer Krankheit. Wenn effektive Behandlungen greifbar werden, würde dies eine rationelle Therapie schon zu einem frühen Zeitpunkt des Krankheitsverlaufs ermöglichen, zu dem eine Diagnose mit herkömmlichen klinischen Mitteln nur schwerlich möglich wäre. Die Verfügbarkeit einer therapeutischen Substanz, welche den Fortschritt der Alzheimerschen Krankheit oder anderer Neurodegenerativer Krankheiten in erkrankten Patienten verlangsamen könnte, wäre ein großer Segen für diese Individuen.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0017]** Fig. 1 ist ein Graph experimenteller Ergebnisse, der den Wettbewerb des Peptids und  $\beta$ -Amyloids zur Bindung mit dem p75<sup>NTR</sup> darstellt.

**[0018]** Fig. 2 ist ein Graph experimenteller Ergebnisse, der den Einfluss von Peptid auf das Überleben einer Zelle in Anwesenheit von  $\beta$ -Amyloid zeigt.

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

**[0019]** Die vorliegende Erfindung basiert auf den Ergebnissen der Anmelder, dass Melanozyten aus der Crista gewonnene Neuralzellen darstellen, die viele Signalleitungswege mit Zellen des zentralen Nervensystems, wie auch die Rezeptoren hoher und geringer Affinität für den Nervenwachstumsfaktor (Peacocke, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5282-5286 (1988); Yaar, M., et al., J. Cell. Biol., 115: 821-828 (1991); Yaar, M., et al., J. Clin. Invest., 94: 1550-1562 (1994) sowie den grundlegenden Fibroblastwachstumsfaktor (Halaban, R., et al., J. Immunol., 12: 154-161 (1992) teilen. Basierend auf diese signifikanten Ähnlichkeiten mit Neuronen wird hierin gezeigt, dass gezüchtete menschliche Melanozyten ein Modellsystem zur Erforschung der Alzheimer Krankheit stellen.

**[0020]** Genauer gesagt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein in vitro Verfahren zur Bewertung des Risikos eines Individuums, die indirekt durch das  $\beta$ -Amyloid Protein ausgelöste Alzheimersche Krankheit zu bekommen, das vom Individuum gewonnene und gezüchtete epidermale Melanozyten beinhaltet, wie in den Ansprüchen 1, 6 und 9 definiert. Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf die Verwendung des gezüchteten Melanozytzellmodell zur Bewertung von therapeutischen Präparaten zur effektiven Behandlung der Alzheimer Krankheit und anderen neurodegenerativen Krankheiten, die indirekt durch  $\beta$ -Amyloid Protein verursacht werden. Wie nachfolgend beschrieben basieren diese Verfahren auf dem Ergebnis der Anmelder, dass sich das  $\beta$ -Amyloid Protein bindet an den 75 kilodalton (kD) Neurotrophinrezeptor (p75<sup>NTR</sup>) (der hierin ebenfalls als der Nervenwachstumsfaktorrezeptor geringer Affinität oder p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptor bezeichnet wird), welcher auf der Oberfläche der Melanozyten und Neuronen des zentralen Nervensystems liegt, und daß, sobald der p75<sup>NTR</sup> mit dem  $\beta$ -Amyloid in Verbindung steht, ein Stoffwechselweg aktiviert wird, der zum Zelltod (Apoptose) führt.

Melanozyten stellen ein Modellsystem für die Alzheimer Krankheit

**[0021]** In vitro Studien haben gezeigt, dass das  $\beta$ -Amyloid Protein eine zentrale Rolle bei der Alzheimer Krankheit spielt. Versuche, die Pathophysiologie der Alzheimer Krankheit unter Verwendung bösartiger Zelllinien (Boland, K., et al., J. Biol. Chem., 270: 28022-28028 (1995)) oder neuronaler Zellkulturen von Wirbeltieren (Mark, R.J., et al., J. Neuosci., 15: 6239-6249 (1995)) zu verstehen, haben gezeigt, dass die Zugabe von  $\beta$ -Amyloid Peptiden aus Aminozellresiduen 1 bis 40 oder 25 bis 35 des  $\beta$ -Amyloid Proteins zu einer Nervenschädigung und zum Zelltod führt. Insbesondere führen die Aminozellresiduen 1 bis 42 oder noch genauer die Aminozellresiduen 25

bis 35 des  $\beta$ -Amyloid Peptids aus den Aminozellresiduen 1 bis 40 des  $\beta$ -Amyloid Proteins zu einer Nervenschädigung und zum Zelltod. Jüngste Studien haben ebenfalls gezeigt, dass die durch  $\beta$ -Amyloid ausgelöste Nervenschädigung klassische Merkmale einer Apoptose zeigen. Das  $\beta$ -Amyloid Präkursorprotein (hierin auch als  $\beta$ APP bezeichnet) ist in neuralen und nicht-neuralen Säugetiergewebe weit verbreitet.  $\beta$ APP ist im Gehirn und in den Nieren am höchsten konzentriert, wobei Neuronen im Gehirn besonders hohe  $\beta$ APP Werte aufweisen.

**[0022]** Die Anmelder haben gezeigt, dass menschliche Melanozyten und Zellen melanozytischer Herkunft auch konstitutiv  $\beta$ APP aufbauen und absondern. Nach Zelltraumata wie etwa einer Ultraviolett Bestrahlung tritt eine erhöhte  $\beta$ APP Absonderung auf, wodurch die  $\beta$ APP Konzentration in der Umgebung der gezüchteten Zellen zunimmt. (Andersen, W., et al., J. Invest. Dermatol., 104: 585 Abst. 182 (April 1995)).

**[0023]** Die Anmelder haben hierin demonstriert, dass das Zuführen normaler menschlicher Melanozyten mit  $\beta$ -Amyloid 1 bis 40 Peptid bei geringen Konzentrationen ( $\leq 1 \mu\text{M}$ ) zu extensivem Auswuchs von Dendriten führt, wobei die Melanozytzen dement sprechend Neuriten zu Neuronen umformt, ohne die Zellausbeute zu verringern. Bei höheren  $\beta$ -Amyloid Peptid Konzentrationen nimmt die Zellausbeute progressiv ab und die restlichen Zellen bleiben ungesund zurück. Zusätzlich tritt in diesen Kulturen eine fokale Entwicklung Plaque ähnlicher Strukturen auf, die aus angehäuften sterbenden Melanozyten, ähnlich den bei Patienten mit AD in vivo beobachteten „Altersflecken“, bestehen.

**[0024]** Die Anmelder haben hierin ferner gezeigt, dass das Beibehalten von Melanozytkulturen bei  $\geq 25 \mu\text{M}$   $\beta$ -Amyloid 1 bis 40 im Vergleich zu Kontrollkulturen den Anteil an apoptotischen Zellen deutlich erhöht und die Verteilung des Bax Proteins ungefähr verdreifacht. Jüngste in vivo und in vitro Daten legen nahe, dass der durch  $\beta$ -Amyloid ausgelöste Neurozentertod klassische Charakteristika des programmierten Zelltods oder Apoptose zeigen (Cotman, C.W. and Anderson, A.J., Mol. Neurobiol., 10:19-45 (1995); Su, J.H., et al., Neuroreport, 5: 2529-2533 (1994)). Die molekularen Leitungen, die die Apoptose in Neuronen regulieren sind teilweise entschlüsselt.

**[0025]** Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Produkt der Proto-Onkogenese Bcl-2 den Beginn der Apoptose in Neuronen, die bezüglich ihres Überlebens von neurotrophischen Faktoren abhängen, verzögern (Allsopp, T.E., et al., Cell, 73: 295-307 (1993); Garcia, I., et al., Science, 258: 302-304 (1992)). Gegenteilig beschleunigt ein Überausdruck mit einem 21 kD Bcl-2 assoziierten Proteins, Bax, den

apoptotischen Zelltod (Oltvai, Z.N., et al., Cell, 74: 609-619 (1993)).

**[0026]** Melanozyten drücken sowohl die Rezeptoren p75<sup>NTR</sup>, geringer Affinität, und 140 kD trk A (p140<sup>trk A</sup>), hoher Affinität, für den NGF aus, wobei das Bereitstellen des NGF für die Melanozyten, wahrscheinlich durch koordiniertes Verbinden des p140<sup>trk A</sup> mit mehreren p75<sup>NTR</sup> Molekülen, was bei Neuronen, die dem NGF ausgesetzt sind, Voraussetzung ist, in der Aktivierung der p140<sup>trk A</sup> Nervenleitung mündet, wodurch dann wiederum ein intrazellulärer Signalübertragungsweg aktiviert wird, der zu einer gesteigerten Ausschüttung an Bcl-2 und gesteigertem Zellüberleben führt.

**[0027]** Die Anmelder zeigen überdies hierin, dass sich das  $\beta$ -Amyloid konkurrierend an das p75<sup>NTR</sup> bindet. Frühere Untersuchungen legen nahe, dass die spezifische Verbindungsstelle für das p75<sup>NTR</sup> die Aminosäuren 29 bis 36 des sich ergebenden NGF Proteins sind (Ulrich, A. et al., Nature, 303: 821-825 (1983)) und dass bei einer Veränderung der Sequenz Lysin-Glycin-Lysin (Residuen 32 bis 34 des NGF) zu Lysin-Glycin-Alanin das Peptid eine ungefähr halb so hohe Affinität für den Rezeptor aufweist wie der ursprüngliche NGF. Die Aminosäureresiduen 28 bis 30 des  $\beta$ -Amyloid Proteins sind Lysin-Glycin-Alanin. Des Weiteren offenbart die Computer-Struktur-Analyse des  $\beta$ -Amyloid, dass diese Aminosäuren eine höhere Wahrscheinlichkeit aufweisen, in einer Schlaufe des Proteins zu liegen, was vermuten lässt, dass diese  $\beta$ -Amyloid Peptidsequenz eine Rolle in der Rezeptorbindung spielen.

**[0028]** Daher wurde ein zyklisches Decapeptid synthetisch durch Aneinanderreihen zweier Cysteinresiduen an den Anfang und das Ende des aus den Aminosäuren 24 bis 31 bestehenden  $\beta$ -Amyloid Fragments hergestellt: VGSNKKGAI (Seq ID NO: 1). Das kalte Peptid unterdrückt konkurrierend die  $^{125}\text{I}$ - $\beta$ -Amyloid Bindung mit einer 50%igen Unterdrückung bei 25 nM. Des Weiteren reduzierte das  $\beta$ -Amyloid 200 nM die Zellausbeute um  $\approx 60\%$  ( $p < 2$ ), wobei dieser Zellverlust durch das Peptid (200 nM) geblockt wurde. Das Peptid für sich allein hat keinen Effekt auf die Zellausbeute. Diese Ergebnisse zeigen an, dass die Neuroenapoptose bei der Alzheimer Krankheit von der Interaktion des  $\beta$ -Amyloid mit dem p75<sup>NTR</sup> zusammenhängt. Die Daten legen überdies nahe, dass das durch  $\beta$ -Amyloid ausgelöste Neuroensterben durch Zugabe eines synthetischen Peptids, welches die  $\beta$ -Amyloid Verbindungsstelle blockiert, verhindert werden kann.

**[0029]** In diesem Maße können, basierend auf den zuvor beschriebenen Ergebnissen über die bedeutende Ähnlichkeit zwischen ZNS Neuronen und epidermalen Melanozyten, diese in der Diagnoseerprobung und Studien zur Medikamentenentwicklung für die

Alzheimersche Krankheit zur Geltung kommen.

#### In Vitro Analyse der Alzheimer Krankheit

**[0030]** Das hierin beschriebene Melanozytmodellsystem kann zur Früherkennung von Individuen, die dem Risiko der Erkrankung mit der Alzheimer Krankheit ausgesetzt sind, genutzt werden. Zurzeit gibt es drei bekannte beziehungsweise vermutete Mechanismen für die Erkrankung an der Alzheimer Krankheit: 1.) Erhöhte Produktion und/oder Ausscheidung von  $\beta$ -Amyloid durch Neuronen des ZNS, eine bekannte Funktionsstörung bei Patienten mit familiär Alzheimer Krankheit, die durch eine der anerkannten  $\beta$ APP Mutationen ausgelöst wird; 2.) Erhöhte Sensitivität gegenüber physiologischer  $\beta$ -Amyloid Konzentration durch bisher noch ungeklärte, extensive lokale Anhäufung des  $\beta$ -Amyloid Peptids, wobei vermutet wird, dass dies durch milde Strukturveränderungen im abgesonderten  $\beta$ -Amyloid oder milde Missbildungen der extrazellulären Matrix im ZNS hervorgerufen wird; und 3.) Verringelter Ausdruck oder Funktion des Lipoprotein-Rezeptorbezogenen-Proteins geringer Dichte auf der Oberfläche von Neuronen, welches bekanntermaßen  $\beta$ APP bindet, internalisiert und abbaut und dessen Funktionsausfall erhöhte Mengen extrazellulären  $\beta$ -Amyloids hervorbringen würde.

**[0031]** Melanozyten werden über eine Hautbiopsie vom zu untersuchenden Individuum, zum Beispiel als Testmelanozyte, isoliert. Hautbiopsien werden unter Verwendung herkömmlicher dermatologischer Techniken durchgeführt. Typischerweise wird nach Verabreichung eines lokalen Anästhetikums eine 3 bis 4 mm Stanzbiopsie von der Haut des Individuums gewonnen. Für die Biopsie kann jede geeignete Stelle der Haut gewählt werden. Von der Haut isolierte Melanozyten werden hierin auch als epidermale Melanozyten bezeichnet.

**[0032]** Die vom Individuum gewonnenen Melanozyten werden, wie hierin beschrieben, unter Standartlaborbedingungen, typischerweise unter Verwendung eines Serum freien Mediums, gezüchtet. Melanozytkontrollkulturen werden ebenfalls unter ähnlichen Bedingungen gewonnen. Kontrollmelanozyten können von einem Individuum, welches bekanntermaßen krankheitsfrei ist, neonatalen Präputien oder von verfügbaren Melanozytzelllinien gewonnen werden. (Vergleiche zum Beispiel, Park, H-Y., et al., J. Biol. Chem., 268: 11742-11749 (1993)). Alle Melanozyten drücken die  $p75^{NTR}$  und  $p140^{trkA}$  Rezeptorproteine aus. Die Kulturen werden zur Garantierung stabiler und lebensfähiger Melanozytkulturen für ungefähr zwei Tage unter diesen Bedingungen gehalten. Die Kulturen können für längere Perioden, eben so lange wie die Melanozytkulturen lebensfähig bleiben, gehalten werden.

**[0033]** Nach der Stabilisierung der Kultur wird das

$\beta$ -Amyloid Protein oder  $\beta$ -Amyloid Peptid in die Kulturen eingeführt. Wie hierin definiert beinhaltet das  $\beta$ -Amyloid Protein sowohl das Präkursorprotein wie auch das  $\beta$ -Amyloid Protein. Das  $\beta$ -Amyloid Peptid beinhaltet das  $\beta$ -Amyloid 25-36 Peptid und das  $\beta$ -Amyloid 28-30 Peptid. Die  $\beta$ -Amyloid Proteine und Peptide sind kommerziell von verschiedenen Quellen, zum Beispiel Bachem California, Torrance, CA, USA, verfügbar. Die  $\beta$ -Amyloid Proteine und Peptide können auch chemisch synthetisch oder rekombiniert unter Verwendung eigener Labortechniken hergestellt werden. Das der Kultur zugegebene  $\beta$ -Amyloid Protein oder Peptid wird meist in einem mit dem Zellkulturmedium kompatiblen Puffer gelöst. Die Konzentration des der Kultur zugegebenen  $\beta$ -Amyloid Protein oder Peptids kann zwischen 0  $\mu$ M bis 100  $\mu$ M, herkömmlich zwischen 1  $\mu$ M und 50  $\mu$ M, variieren. Eine typische Einzeldosis an  $\beta$ -Amyloid Protein oder Peptid liegt bei ungefähr 25  $\mu$ M. Die zugeführte Konzentration des  $\beta$ -Amyloid Proteins oder Peptids ist ausreichend um sich an den  $p75^{NTR}$  zu binden und diesen zu aktivieren.

**[0034]** Wie hierin definiert, meint die Aktivierung des  $p75^{NTR}$  durch das  $\beta$ -Amyloid Protein oder Peptid die Initialisierung oder Aktivierung der Nervenleitung für den apoptotischen Zelltod im Melanozyt. Wie ferner hierin definiert, meint die Aktivierung des  $p75^{NTR}$  des weiteren die Zugabe des Bax Proteins oder Initialisierung der Sphingomyelinhydrolyse.

**[0035]** Die Melanozytkulturen werden solange in der Gegenwart des  $\beta$ -Amyloid Proteins oder Peptids gehalten, bis eine bestimmbarre Aktivierung des  $p75^{NTR}$  stattgefunden hat, typischerweise ungefähr drei Tage. Wie auch immer kann die Dauer nur so kurz wie ein Tag oder so lang wie 8 Tage sein. Die Aktivierung des  $p75^{NTR}$  des Testmelanozyts wird mit der Dauer für die Aktivierung des  $p75^{NTR}$  des Kontrollmelanozyts verglichen.

**[0036]** Die Aktivierung  $p75^{NTR}$  durch  $\beta$ -Amyloid resultiert in apoptotischem Zelltod der Melanozyten. Die Apoptose wird unter Verwendung herkömmlicher Labortechniken bestimmt. Wie hierin in Beispiel 1 beschrieben, wurde ein Analyseverfahren zur Bestimmung der Melanozytzellausbeute zur Bestimmung der Apoptose benutzt. Die Zellausbeute wird bestimmt, indem die Anzahl lebensfähiger Zellen etwa mit einem elektronischen Zählinstrument (zum Beispiel einem Coulter<sup>TM</sup> Zellzähler) oder durch manuelle Zellzählung mittels Hemocytometer ermittelt wird.

**[0037]** Des weiteren können, wie in Beispiel 1 beschrieben, die Kulturen mikroskopisch auf die Gegenwart Plaqueähnlicher Strukturen mit sterbenden und/oder toten Melanozyten untersucht werden. Diese Plaques beinhalten auch  $\beta$ -Amyloid Ablagerungen.

**[0038]** Wie in Beispiel 2 beschrieben, kann die Aktivierung des p75<sup>NTR</sup> ebenso unter Verwendung eines Analyseverfahrens zur Bestimmung der Produktion an Bax Proteinausschüttung festgestellt werden. Bax ist das Bcl-2 verwandte Protein, welches in der Nervenleitung während des apoptotischen Zelltodes impliziert wird. Eine Erhöhung der Baxausschüttung ist ein Anzeichen für Apoptose. Die Messung der Bax Proteinausschüttung kann durch die Bestimmung der erhöhten Bax mRNA, ausgedrückt in Zellen unter Verwendung von Standardlabortechniken zur Bestimmung der RNA in Zellen, vollzogen werden. Die Baxproduktion kann auch durch anti-Bax Antikörper in der Western Blot Analyse gemessen werden.

**[0039]** Die Apoptose kann ebenfalls durch Messung der Propidium-Iodin Resorption in Nuklearfragmente, der TUNEL Reaktion oder Demonstration der fragmentierten DNA bestimmt werden.

**[0040]** Wenn die Aktivierung des p75<sup>NTR</sup> des Testmelanozyts größer ist als die Aktivierung des p75<sup>NTR</sup> im Kontrollmelanozyt ist dies ein Indikator dafür, dass das Individuum, von dem die Testmelanozyten gewonnen wurden, neurale Cristazellen aufweist, die gegenüber  $\beta$ -Amyloid empfindlicher sind als Standardkontrollzelllinien. Wenn die neuralen Cristazellen eines Individuums gegenüber  $\beta$ -Amyloid empfindlicher sind, ist es angemessen vorherzusagen, dass das Individuum ein Risiko aufweist, die Alzheimer Krankheit zu bekommen.

**[0041]** Bei Individuen, dessen Melanozyten eine unnormale Sensitivität gegenüber  $\beta$ -Amyloid aufweisen, kann des weiteren eine Charakterisierung der Synthese und Ablagerung extrazellulärer Matrixmoleküle unter Verwendung der Methode zur Melanozytzüchtung zur Bestimmung der Wechselwirkung dieser extrazellulären Moleküle mit dem  $\beta$ -Amyloid Peptid durchgeführt werden.

**[0042]** Das hierin beschriebene Analyseverfahren gezüchter Melanozyten kann auch bei der Bewertung der Funktionalität des Lipoprotein Rezeptorbezogenen Proteins geringer Dichte auf den neuralen Cristazellen eines Patienten zur Anwendung kommen.

**[0043]** Neuronen sondern konstituierend das  $\beta$ -Amyloid Präkursorprotein ab. Da das  $\beta$ -Amyloid ein Hauptbestandteil der bei Patienten mit der Alzheimer Krankheit zu findenden, kennzeichnenden Altersflecken sind, ist die Gegenwart erhöhter Werte an  $\beta$ -Amyloid Protein und/oder Peptid um Neuronen angemessen mit der Gegenwart der Alzheimer Krankheit korreliert. Durch das hierin beschriebene Analyseverfahren der Melanozytzüchtung kann bestimmt werden, ob die neuralen Cristazellen eines Patienten erhöhte  $\beta$ -Amyloid Pegel, konstituierend oder als Reaktion auf ein Trauma, in größeren Mengen als bei

Standardkontrollzelllinien aufbauen und/oder absondern. Wenn die Ausscheidung an  $\beta$ -Amyloid Protein oder Peptid in der Testkultur größer ist als in der Kontrollmelanozytkultur ist dies eine Indikation dafür, dass das Individuum ein erhöhtes Risiko aufweist die Alzheimersehe Krankheit zu bekommen.

**[0044]** Wie zuvor beschrieben, sind eine Reihe an die Alzheimersehe Krankheit auslösenden, pathologischen Mechanismen bekannt oder verdächtigt. Wie hierin beschrieben, zeigen die Anmelder, dass die finale Leitung auf die alle zuvor genannten Mechanismen konvergieren, allein die Aktivierung des p75<sup>NTR</sup> ist, eine welche anstelle zu einer vorteilhaften Aktivierung eines Rezeptorkomplexes aus NGF, p75<sup>NTR</sup> und p140<sup>trk A</sup> zu Apoptose führt. Daher kann das Risiko eines Individuums, die Alzheimer Krankheit zu bekommen, durch Messen der Konzentration an p75<sup>NTR</sup> gegen p140<sup>trk A</sup> ausgedrückt auf der Oberfläche der Melanozyten eines Individuums bestimmt werden. Individuen mit einem hohen Verhältnis an p75<sup>NTR</sup> zu p140<sup>trk A</sup> wären diejenigen, die ein hohes Risiko aufweisen, die Alzheimer Krankheit zu entwickeln.

**[0045]** Daher ist es angemessen, mit der hierin beschriebenen Methode der Melanozytzüchtung vorherzusagen, ob ein Individuum das Risiko aufweist, die Alzheimer Krankheit zu bekommen. Überdies ist es außerdem angemessen mit dem Verfahren der Melanozytzüchtung vorherzusagen, durch welche Mechanismen bestimmte Individuen die Krankheit wahrscheinlich entwickeln, zum Beispiel unnormale Empfindlichkeit gegenüber  $\beta$ -Amyloid, erhöhte Absonderung an  $\beta$ -Amyloid Protein oder ein anormales Verhältnis an ausgedrücktem p75<sup>NTR</sup> zu p140<sup>trk A</sup>, und darauf gründend den Behandlungsweg einschlagen zu können, der spezifisch auf die vorliegende Abnormalität abzielt. Ferner sind die Verfahren der Melanozytzüchtung der vorliegenden Erfindung, wie nachfolgend beschrieben, geeignet, die Effektivität von therapeutischen Substanzen in einem Individuum zu bestimmen. So kann ein Individuum mit entweder einer bekannten Anlage für die Alzheimerkrankheit oder einer nach konventionellem klinischem Maßstab erfolgte Diagnose der Alzheimer Krankheit, mit einer Substanz mit in vitro gezeigten Wirkung behandelt werden und somit mit erhöhter Wahrscheinlichkeit die Krankheitssymptome zu lindern.

Bewertung effektiver Behandlungstherapien der Alzheimersehe Krankheit

**[0046]** NGF bindet zwei Rezeptoren: das Proteinprodukt des trkA Proto-Onkogens, p140<sup>trk A</sup>, einen Transmembranen Tyrosinkinaserezeptor und einen 75 Transmembranrezeptor geringer Affinität für mehrere Neurotrophine, p75<sup>NTR</sup>. Es wurde berichtet, dass der p140<sup>trk A</sup> in Abwesenheit des p75<sup>NTR</sup> NGF induzierte Effekte hervorruft (Verdi, J.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 3949-3953 (1994)). Ebenfalls

wurde herausgefunden, dass der p75<sup>NTR</sup> in der Abwesenheit von trkA eine Apoptose zur Entwicklung von Neuronen hervorruft und die Modulation des p75<sup>NGF</sup> Rezeptors das Überleben von Neuronen verbessern kann (Catharina, F. E., Science, 1725: 1729-1732 (6. Dezember 1996)). Wie auch immer ist die Bedeutung des p75<sup>NTR</sup> für die NGF Signalübertragung immer noch umstritten. Es wurde berichtet, dass das gemeinsame Ausdrücken des p75<sup>NTR</sup> und p140<sup>trk A</sup> ein funktionales Binden hoher Affinität des NGF produziert (Battleman, D.S., et al., J. Neurosci., 13: 941-951 (1993)). Wie auch immer wurde ebenfalls bekannt gemacht, dass die Aktivierung des p75<sup>NTR</sup> in Zellen, welche den p140<sup>trk A</sup> nicht ausdrücken, durch Aktivierung des Sphingomyelin Signalleitungsweg eine Apoptose auslöst. Daher ist es möglich, dass das p75<sup>NTR</sup> eine doppelte Rolle annimmt. In Verbindung mit p140<sup>trk A</sup> kann dieser durch eine Tyrosin Kinase-abhängige Nervenbahn zum Überleben führende Signale senden (Dobrowsky, T.T., et al., Science, 265: 1596 (1994)), aber bei Aktivierung allein über den Sphingomyelin Nervenleiter zur Apoptose führende Signale senden.

**[0047]** Die Bindung des NGF an den p75<sup>NTR</sup> wird durch die Aminosäureresiduen 29-36, TDIKGKEV (SEQ ID NO: 2), welche Teil der β-Harnadelschleife des NGF sind, vermittelt (Ibáñez, C. F., et al., Cell, 69:329-341 (1992)). Sollte Lysin (K) an der Stelle 34 durch Alanin (A) ersetzt werden, bindet das sich ergebende mutierte NGF Molekül den p75<sup>NTR</sup> immer noch, aber mit einer 50% geringeren Affinität.

**[0048]** Interessanterweise sind in β-Amyloid die Aminosäureresiduen 28-30, welche sowohl im 1-40 als auch im 25-35 β-Amyloid Peptid vorliegen, KGA, eine Sequenz die scheinbar die p75<sup>NTR</sup> Bindung durch das β-Amyloid erlaubt. Die Computerunterstützte Strukturanalyse des β-Amyloids legt nahe, dass die KGA Residuen eine hohe Wahrscheinlichkeit (>60%) aufweisen, in einer Kehre zu liegen, was die höchste Wahrscheinlichkeit eines jeden Bestandteils dieses 40 Aminosäure Peptids ist, wodurch suggeriert wird, dass diese Sequenz eine Bindungsstelle für p75<sup>NTR</sup> bildet. Ferner wurde berichtet, dass der Ausdruck des p75<sup>NTR</sup> den giftigen Effekt des β-Amyloids auf Zellen möglicherweise durch Bindung und Aktivierung des Rezeptors noch verstärkt.

**[0049]** Basierend auf den zuvor genannten Daten ist es angemessen anzunehmen, dass die spezifischen drei Aminosäuresequenzen Lysin-Glycin-Alanin (KGA) im β-Amyloid Protein den 75 kD Transmembran Neurotrophinrezeptor an ZNS Neuronen binden und teilweise, durch eine Erhöhung der intrazellulären Baxkonzentration ausgelöst, die Nervenbahn für den programmierten Zelltod aktiviert. Es ist des weiteren angemessen anzunehmen, dass die konkurrierende Unterdrückung der Bindung des β-Amyloid Peptids diese aberrierende Rezeptoraktivierung und

die sich daraus ergebende Apoptose verhindert. Zum Beispiel führt die Zugabe eines durchgehenden NGFs oder eines biologisch aktiven Fragments, Analogons, Derivativs, einer Variante oder Mutation davon, anstelle dessen zu einer bevorzugten koordinierten Bindung des p75<sup>NTR</sup> mit dem p140<sup>trk A</sup>, wodurch ein zweiter Signalübertragungsweg aktiviert wird, und die neuronale Zelle überlebt.

**[0050]** Der Begriff „biologisch aktiv“ für den NGF oder ein Fragment, Analogon, Derivativs, Variante oder mutierten NGF wird hierin als die Aktivität des NGF definiert, sich spezifisch an den p75<sup>NGF</sup> Rezeptor zu binden. Eine derartige Aktivität kann durch hierin beschriebene Verfahren oder durch irgendeine andere, aus dem Stand der Technik bekannte Art gemessen werden. Eine andere biologische Aktivität eines NGF Fragments, Analogons, Derivativs, Variante oder Mutation bildet die antigene Eigenschaft durch Induzieren einer spezifischen immunologischen Reaktion, die durch gut bekannte Labortechniken bestimmt werden kann. Zum Beispiel kann ein biologisch aktives NGF Fragment eine immunologische Reaktion auslösen, die auf den NGF spezialisierte Antikörper produziert (Anti-NGF Antikörper). Ein „Analogon“ wird hierin dahingehend definiert, dass es eine Aminosäuresequenz meint, die eine ausreichende Gleichheit zur Aminosäuresequenz des endogenen NGF aufweist, um die biologische Aktivität des Proteins zu besitzen. Zum Beispiel kann ein Analogon eines Polypeptids in die Aminosäuresequenz des Polypeptids „stille“ Änderungen aufweisen, in denen sich eine oder mehrere Aminosäureresiduen von den Aminosäureresiduen des NGF unterscheiden, aber immer noch die p75<sup>NTR</sup> Bindeeigenschaft besitzen. Beispiele für derartige Differenzen beinhalten Zusetzen, Löschen oder Ersetzen von Residuen. Von der vorliegenden Erfindung werden ebenfalls Proteine eingeschlossen, die eine geringere oder erhöhte biologische Aktivität des NGF auslösen.

**[0051]** Biologisch aktive Fragmente des NGF werden hierin beschrieben. Derartige Fragmente beinhalten nur einen Teil der durchgehenden Aminosäuresequenz des NGF, weisen aber dennoch eine biologische Aktivität auf. Der Begriff „biologisch aktives Fragment“ meint hierin ein Fragment des NGF, dass einen biologischen oder physiologischen Effekt des durchgehenden Proteins ausübt, oder ein biologisches Merkmal wie zum Beispiel Antigenizität des durchgehenden Proteins aufweist. Derartige Aktivitäten und Charakteristiken werden hierin beschrieben. Solche Fragmente können durch Amino und Carboxyl Terminallösung sowie innere Lösung hergestellt werden. Des weiteren werden aktive Fragmente des Proteins, zum Beispiel durch enzymatischen Abbau produziert. Derartige Peptidfragmente können auf ihre biologische Aktivität getestet werden.

**[0052]** „Derivative“ und „Varianten“ des NGF bilden

einen modifizierten NGF. Dies beinhaltet den NGF, der durch Veränderung in der mit dem p75<sup>NTR</sup> in Verbindung stehenden Aminosäuresequenz hergestellt wird. Dies beinhaltet außerdem abgeschnittene und hybride Formen des NGF, ist aber nicht darauf festgelegt. „Abgeschnittene“ Formen sind verkürzte Versionen des NGF, zum Beispiel derart modifiziert, dass die C-Terminalregion entfernt wird. „Hybride“ Formen beinhalten den aus Teilen zweier oder mehrerer Proteine zusammengesetzten NGF, zum Beispiel aus einem Fusionsproteins mit NGF und einem anderen Protein.

**[0053]** Varianten können durch Methoden hergestellt werden, die aus dem Stand der Technik bekannt sind. Das NGF Gen kann in Vitro oder in Vivo unter Verwendung von in dem Bereich bekannten Techniken, zum Beispiel regiospezifischer Mutagenese und oligonukleotide Mutagenese, mutiert werden. Manipulationen der NGF Sequenz können auch auf Proteinebene vorgenommen werden. Irgendeine Vielzahl von chemischen Veränderungen können durch bekannte Techniken vollzogen werden, die, nicht limitierend, die eine spezifische chemische Zellteilung durch Cyanogen Bromid, Trypsin und Papain beinhaltet. Es kann auch strukturell modifiziert oder denaturiert werden, zum Beispiel durch Hitze oder durch Immobilisation auf einer festen Oberfläche.

**[0054]** Die Aminosäuresequenzen des NGF Fragmente, Analogons, Derivativs, Varianten und Mutationen können durch in der Technik bekannte Verfahren durch Einführen angemessener Nukleotidveränderungen in der ursprünglichen oder variierten DANN, die den NGF verschlüsselt, oder eine in Vitro Synthese des gewünschten NGFs verändert werden, um die Bindung des NGF an den p75<sup>NTR</sup> zu optimieren.

**[0055]** Es ist angemessen anzunehmen, dass der NGF eine höhere Affinität gegenüber dem p75<sup>NTR</sup> aufweist als  $\beta$ -Amyloid und dass in der Gegenwart vom NGF in der Zellumwelt dieses Neurotrophin bevorzugterweise den p75<sup>NTR</sup> koordiniert mit dem p140<sup>trk A</sup> Rezeptor bindet, den p140<sup>trk A</sup> aktiviert und zum Überleben der Zelle führt. Wie auch immer kann unter Bedingungen, aus denen ein erhöhter Oberflächenausdruck an p75<sup>NTR</sup> oder eine erhöhte Konzentration an  $\beta$ -Amyloid im extrazellulären Raum resultiert, unter Abwesenheit gesättigten Mengen an NGF, der apoptotische Zelltod durch Bindung des  $\beta$ -Amyloid an den p75<sup>NTR</sup> und daraus folgender Aktivierung der Sphingomyelin Leitung resultiert. Im ZNS kann eine derartige Situation in älteren Individuen, besonders bei jenen mit einer genetisch vorbestimmten exzessiven Produktion an  $\beta$ -Amyloid Fragmenten mit der für die Bindung des p75<sup>NTR</sup> notwendigen Aminosäuresequenz, auftreten. Normale menschliche Melanozyten scheinen auf Umweltsignale auf gleiche Weise zu reagieren wie Neuronen des ZNS und bilden daher ein

angemessenes Modellsystem zur Erforschung potentieller Behandlungen für die Alzheimer Krankheit.

**[0056]** Folglich umfasst die vorliegende Erfindung ebenfalls Methoden, die das gezüchtete Melanozyt-modellsystem zur Entwicklung und Bewertung von Substanzen zur Steigerung des Zellüberlebens und Blockieren des, durch  $\beta$ -Amyloid ausgelösten, apoptotischen Zelltods. Im speziellen können die Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um Substanzen zur Behandlung der Alzheimer Krankheit zu erkennen und zu bewerten. Zum Beispiel kann das Melanozytkulturmodell verwendet werden, um Substanzen zu identifizieren die die Bindung des p75<sup>NTR</sup> durch das  $\beta$ -Amyloid, und somit die durch  $\beta$ -Amyloid ausgelöste Neuronalapoptose blockieren. Wie zuvor beschrieben bildet das Dreipeptid Lysin-Glycin-Alanin eine mögliche Substanz zur Verwendung als Therapie zur Symptommilderung der Alzheimerschen Krankheit. Das Melanozyt Kultur Modellsystem kann verwendet werden, um andere Peptide, inklusive der KGA Sequenz oder verschiedenen Analgonen des KGA Dreipeptids, zu identifizieren und zu bewerten, um eine optimale Zusammensetzung zu bestimmen, welche die p75<sup>NTR</sup> Bindung blockiert und somit die Bindung des Apoptose induzierenden  $\beta$ -Amyloid Liganden verhindert, ohne mit der vorteilhaften Bindung des NGF zu interferieren. Da die Bewertung einer möglichen Substanz mit von einem Individuum mit Risiko oder fester Diagnose an AD zu erkranken, gewonnenen Melanozyten durchgeführt werden kann, ist die Möglichkeit, eine mögliche Substanz zu identifizieren, sehr hoch.

**[0057]** Sobald die möglichen Substanzen erkannt sind, kann die Höhe der Dosis, die an das ZNS geliefert werden muss, durch die Verwendung von in Vitro Melanozytkulturen von einem jedem Individuum genau bestimmt werden. Eine Titration der Konzentration einer möglichen Substanz kann unter Verwendung des hierin beschriebenen Melanozytkulturmodellsystem durchgeführt werden.

**[0058]** Im Speziellen werden Verfahren zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Individuen mit Symptomen von Demenz, bedingt durch  $\beta$ -Amyloid ausgelöste Apoptose und daraus resultierendem Degenerieren und Absterben von Neuronen, eingeschlossen. Die durch  $\beta$ -Amyloid vermittelte Apoptose ist ein Kennzeichen der Alzheimerschen Krankheit und es werden daher Individuen mit der Alzheimer Krankheit speziell mit eingeschlossen. Therapieverfahren beinhalten das Verabreichen einer Substanz an das Individuum, zum Beispiel Peptide aus -10 Aminosäuren, die das Dreipeptid KGA oder ein Analogon davon umschließen, auf eine Weise, die der Substanz den Kontakt mit Neuronen des ZNS erlaubt. Zum Beispiel kann das Pentapeptid CK-GAC (SEQ ID NO: 3) oder ein Analogon davon durch Verfahren, die jemandem aus dem Stand der Technik

bekannt sind, chemisch synthetisiert werden. Die Cysteinresiduen, welche die Enden des Pentapeptids umgeben, können zum Beispiel durch eine Disulfidverbindung verbunden werden, um die Anordnung, die zur Bindung des Peptids mit dem p75<sup>NTR</sup> benötigt wird, zu behalten, wodurch eine Apoptose gehemmt oder verhindert wird. Die Länge des Peptids kann größer als die eines Pentapeptids sein, solange das KGA oder Analogpeptid in einer für die Verbindungsaktivität geeigneten Konfiguration gehalten werden. Zum Beispiel wurden, wie hierin beschrieben, zyklische Peptide aus Aminosäuresequenzen und CVBSNKGAIC (SEQ ID NO: 4) hergestellt, wobei dieses Peptid mit dem β-Amyloid Peptid um die Bindung mit dem p75<sup>NTR</sup> in Wettbewerb steht.

**[0059]** Die Verabreichung oder Bereitstellung des Peptids oder anderer Substanzen kann auf ähnliche Weise erfolgen, wie bei in der Genübertragung und -behandlung verwendeten Verfahren. Zum Beispiel kann eine effektive Konzentration der das Peptid verschlüsselnden DNA in eine Anordnung zur Virenübertragung, welche die Neuronen im ZNS anvisiert, eingebettet werden. Die DNA Einbettung beinhaltet außerdem die Sequenzen, welche benötigt werden, um die DNA in den anvisierten Zellen auszudrücken. Besonders nützlich ist hier der Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) Überträger, der von Geller, A. I., und Breakefield, X. O., Science 241: 1667-1669 (1988) und US Patent 5, 288, 641 (Roizman 1994) beschrieben wird. Genkanonen können ebenfalls zum Einsatz kommen. Überdies kann auch eine intrakraniale Verabreichung vollzogen werden.

**[0060]** Ferner kann unter Verwendung eines in der Technik anerkannten Mausmodells, wie etwa der in WO 96/40895 beschriebenen transgenen Maus, eine in Vivo Analyse durchgeführt werden. Eine derartige Analyse ist denjenigen aus dem Stand der Technik gut bekannt.

**[0061]** Die nachfolgenden Beispiele illustrieren die Erfindung genauer und sollen auf keine Art und Weise begrenzend wirken.

Beispiel 1: Der Effekt des β-Amyloids auf normale menschliche Melanozyten

**[0062]** Um den Effekt von β-Amyloid auf normale menschliche Melanozyten zu bestimmen, wurden die Kulturen mit steigenden Konzentrationen (0,025 bis 50 µM) an den Aminosäuren 1-40 entsprechenden HPLC-gereinigten β-Amyloid Fragmenten angereichert. Ein Peptid mit den ersten, in umgekehrter Reihenfolge (40-1) synthetisierten 40 Aminosäuren wurde als Negativkontrolle benutzt.

**[0063]** Die Melanozyten wurden in einem Serumfreien Medium 199 (Gibco BRL Gaithersburg, MD, USA) gehalten und mit dem epidermalen Wachs-

tumsfaktor (10 ng/ml) (gemeinsame Forschung), Insulin (10 µg/ml) (Sigma), Triiodothyronin (10<sup>-9</sup> M) (gemeinsame Forschung), Transferrin (10 µg/ml) (Sigma), Hydrocortison (1,4 × 10<sup>-6</sup> M) (Calbiochem), Cholera Toxin (10<sup>-9</sup> M) (Calbiochem) und dem grundlegenden Fibroblastwachstumsfaktor (Grund FGF) (10 ng/ml) (gemeinsame Forschung) angereichert. Zwei Tage nach dem Galvanisieren wurden die Zellen mit ansteigenden Konzentrationen an β-Amyloid 1-40 oder dem Kontrollpeptid 40-1 (0 bis 50 µM) (Bachem California, Torrance, CA, USA) angereichert. Die drei Tage nach der Zugabe von β-Amyloid bestimmte Zellausbeute zeigt eine dosisabhängige Abnahme der Zellausbeute in Kulturen mit dem 1-40 Peptid. In den Kulturen mit dem Kontrollpeptid 40-1 wurde keine veränderte Zellausbeute entdeckt. Die in der Gegenwart von 25 bis 30 µM β-Amyloid 1-40 gehaltenen Melanozyten zeigten im Vergleich zur Zellausbeute vor der β-Amyloid Zugabe, die als 100% angenommen wird, eine 59% ±17% Abnahme in der Zellausbeute. Die Zellausbeute duplizierter Kulturen mit dem Kontrollpeptid 40-1 zeigte eine 8% ±32% Zunahme (p<0,02, paired t test).

**[0064]** In der Gegenwart von 40-1 Kontrollpeptid gehaltene Melanozyten weisen eine typisch bipolare bis polygonale Morphologie auf. Die Mehrheit der in der Gegenwart des 1-40 Peptids gehaltenen Melanozyten sind abgerundet und lösen sich von der Schalenoberfläche.

**[0065]** Die Regressionsanalyse zeigte eine bedeutsame Abnahme in der Zellausbeute bei steigenden Konzentrationen an β-Amyloid 1-40 ( $R^2 = 0,8475$ ,  $p < 0,0001$ ), aber keinen merklichen Effekt auf die Zellausbeute für das β-Amyloid 40-1 ( $R^2 = 0,06$ ,  $p = 0,44$ ). In einer Gesamtzahl von vier Versuchen verringerte das β-Amyloid 1-40 die Melanozytausbeute um >50% (p<0,02; paired t test), währenddessen das Kontrollpeptid 40-1 bei gleicher Konzentration keinen Einfluss auf die Zellausbeute zeigte.

Beispiel 2: Einfluss des β-Amyloid 1-40 auf die Plaquebildung beim Melanozyt

**[0066]** Die wie zuvor in Beispiel 1 beschrieben gezüchteten Melanozytkulturen wurden auch auf Plaquebildung untersucht. In manchen Kulturen wurde die Ausbildung plaqueähnlicher Strukturen aus einer zunehmend großen Ansammlung sterbender Melanozyten festgestellt, die an die in den Gehirnen von Patienten der Alzheimer Krankheit beschriebenen Altersflecken erinnern.

Beispiel 3: Effekt des β-Amyloid und NGF auf MElatozyten

**[0067]** In Neuronen verzögert das Proteinprodukt des Proto-Onkogens Bcl-2 den Ausbruch der Apoptose, die durch eine Vielzahl an Reizen ausgelöst

wird, währenddessen der übermäßige Ausdruck eines mit Bcl-2 verknüpften Proteins (Bax) diesen Zelltod beschleunigt.

**[0068]** Um die Mechanismen des durch  $\beta$ -Amyloid ausgelösten Melanozyttod zu untersuchen, wurden die Baxkonzentrationen in mit 25  $\mu$ M 1-40 oder 25-35  $\beta$ -Amyloid Peptiden behandelten Melanozyten näher betrachtet. In vier Behandlungstagen wurde Bax dreifach in mit entweder den  $\beta$ -Amyloid 1-40 oder 25-35 Fragmenten stimulierten Melanozyten im Vergleich zu mit dem 40-1 Kontrollfragment oder einem irrelevanten HPLC gereinigten Protein ähnlicher Größe induziert.

**[0069]** Die Melanozyten wurden wie zuvor gehalten. Vier Tage nach der Zugabe von 25  $\mu$ M an  $\beta$ -Amyloid Fragmenten 1-40, 40-1 oder 25-35; oder 25  $\mu$ M an HPLC gereinigtem Rinderhypophysen- und Hypothalamushormon (CRF) (Bachem California) (MW 4,7 kD) als zusätzliche Negativkontrolle wurden Zellen in einem RIPA Puffer (50 mM Tris-HCl [pH 8,0], 0,15 M NaCl, 0,5% Natrium Deoxycholat, 1 % Triton<sup>TM</sup> X-100) in Gegenwart von 1  $\mu$ g/ml Aprotinin und 75  $\mu$ g/ml Phenylmethylsulfonyl Fluorid (PMSF) extrahiert, für 1 bis 3 Sekunden beschallt und zentrifugiert. Pro Bahn wurden 40  $\mu$ g Protein auf 12% SDS/PAGE getrennt und auf Nitrozellulosepapier geblottet (über Nacht bei 25V). Um eine gleiche Ladung sicherzustellen, wurde ein duplizierter 13% SDS/PAGE durchgeführt und mit Coomasie Blue R250 Färbemittel gefärbt. Die Flecken wurden mit Anti-Bax Antikörpern (1:1000 Lösung) (Primärantikörper) und anschließend mit Meerrettichpeoxidase konjugierte Ziegen Anti-Hasen IgG (Sekundärantikörper) (1:500 Lösung) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) ausgebrütet. Gebundene Antikörper wurden unter Verwendung der erweiterten Chemilumineszenzausrüstung (Amersham Corp.) nachgewiesen. Autoradiogramme wurden in einen Macintosh II is Computer unter Nutzung des Ofto<sup>TM</sup> Programms (Light Source Computer Images, Inc.) eingescannt. Die Analyse mit gleitendem Zeitfenster wurde mit manueller Definition der Bänder unter Verwendung des San Analysis<sup>TM</sup> 68000 Programms (Biosoft, Cambridge, GB) durchgeführt.

**[0070]** Die  $\beta$ -Amyloid Peptide 1-40 und 25-35 haben die Baxkonzentration im Vergleich zum 40-1 Peptid erhöht (jeweils um 270% und 160%).

Beispiel 4: Einfluss des NGF auf den durch  $\beta$ -Amyloid ausgelösten Zelltod

**[0071]** Es wurde berichtet, dass der Nervenwachstumsfaktor (NGF) die kognitive Funktion verbessert und den Verlust an cholinergischen Neuronen in Tiermodellen und klinischen Behandlungsversuchen für die Alzheimer Krankheit dämpft (cto, A., et al., Behav. Brain. Res., 57: 255-261 (1993); Lapchak, P.A., Exp. Neurol., 124: 16-20 (1993); Olsen, L., et al., J. Neural.

Transm. Park. Dis. Dement. Sect, 4: 79-95 (1992)). Des weiteren wurde jüngst berichtet, dass der NGF die Melanozytaptose durch Hochregulieren der BCL-2 Konzentration verzögert (Zhai, S., et al. Exp. Cell. Res.). Es wurde untersucht, ob die NGF Anreicherung Melanozyten vor dem durch  $\beta$ -Amyloid ausgelösten Zelltod bewahrt. Eine Zugabe an NGF zu mit  $\beta$ -Amyloid angereicherten Melanozyten vermehrte die Zellausbeute binnen 3 bis 5 Tagen und verbesserte die Morphologie der überlebenden Zellen bei den meisten Spendern beträchtlich, obwohl der Grad an Schutz zwischen den Spendern variabel war. Vorläufige Ergebnisse legen nahe, dass die NGF Anreicherung die durch  $\beta$ -Amyloid ausgelöste Bax Hochregulierung verringert und die BCL-2 Konzentration in den Zellen erhöht, was suggeriert, dass der NGF mit der  $\beta$ -Amyloid vermittelten Signalübertragung interferiert.

**[0072]** Die Melanozyten wurden wie zuvor in einem hormonangereicherten Medium in Abwesenheit von Hydrocortison gehalten. Die Zellen wurden mit 25  $\mu$ M an  $\beta$ -Amyloid 1-40 in Gegenwart von 50 ng/ml NGS angereichert oder verdünnt.

**[0073]** Die repräsentativen Felder wurden fotografiert und die prozentuale Menge an lebenden Zellen (Verteilung) wurde 48 Stunden nach der Zugabe an  $\beta$ -Amyloid und NGF oder  $\beta$ -Amyloid und Verdünnungsmittel bestimmt. In Gegenwart des  $\beta$ -Amyloid und Verdünnungsmittel erschienen 77%  $\pm$ 8,5% im Gegensatz zu 96%  $\pm$ 1,4% bei mit  $\beta$ -Amyloid und NGF angereicherten Kulturen verteilt. Das nicht bereitgestellte  $\beta$ -Amyloid und Verdünnungsmittel sowie die immer noch auf der Schalenoberfläche verteilten Zellen waren in den Kulturen vakuolär und erschienen generell nicht so gesund wie Zellen in den mit NGF angereicherten Kulturen.

**[0074]** Melanozyten, die  $\beta$ -Amyloid in Abwesenheit des NGF ausgesetzt sind, sterben, währenddessen in Gegenwart des NGF die Zellen gesund und auf der Schalenoberfläche verteilt erscheinen. Es wurden zumindest 400 Zellen unter jeder Bedingung gezählt.

Beispiel 5:  $\beta$ -Amyloid bindet den p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptor

**[0075]** Um zu bestimmen, ob das  $\beta$ -Amyloid den p75<sup>NTR</sup> bindet, wurde <sup>125</sup>I 1-40  $\beta$ -Amyloid Peptid permanent transzierter gezüchteter Fibroblasten, die den p75<sup>NTR</sup> übermäßig ausdrücken, in Gegenwart von Dissuccinimidyl Suberat zugeführt, um eine Vernetzung naheverwandter Proteine herzustellen. Die Zellen wurden dann mit Anti-p75<sup>NTR</sup> Antikörpern oder einer irrelevanten Mäuse IgG immungefällt. Autoradiogramme haben nur bei mit Anti-p75<sup>NTR</sup> Antikörpern immungefällten Lysaten ein Proteinband einer Größe von 75-80 kD aufgezeigt. Die Wettbewerbsanalyse des <sup>125</sup>I 1-40  $\beta$ -Amyloid in Gegenwart von erhöhten

Konzentrationen unmarkierter NGF zeigte, dass das  $\beta$ -Amyloid durch den NGF verdrängt werden könnte. Wie auch immer legt die Bindung des verbleibenden  $^{125}\text{I}$  1-40 nahe, dass  $\beta$ -Amyloid einen zusätzlichen Zelloberflächenrezeptor, vielleicht den kürzlich entdeckten Serpinenzymkomplexrezeptor, aufweist.

**[0076]** Die Ergebnisse zeigen, dass  $\text{p75}^{\text{NTR}}$  ein Rezeptor für  $\beta$ -Amyloid ist, ein Peptid, von dem es heißt, dass es in hohen picomolaren bis geringen nanomolaren Konzentrationen in das Medium normaler Zellen abgesondert wird.

**[0077]** Zellen des  $\text{p75}^{\text{NTR}}$ -NIH 3T3 wurden in DMEM angereichert mit 10% FBS in Gegenwart von Penicillin (45 ng/ml), Streptomycin (68ng/ml) und Ihgromycin B (17,5 ng/ml) gehalten.

**[0078]** Bei einem 80% Zulauf wurden die Zellen mit EDTA aus der Schale gehoben und in einer Lösung mit 5 uCi  $^{125}\text{I}$   $\beta$ -Amyloid 1-40 bei 4 °C für eine Stunde DMEM ausgebrütet. Nach dem Ausbrüten wurde für 30 Minuten 1 mM Disuccinimidyl Suberat hinzugefügt. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen mit einem RIPA Puffer (50 mM Tris HCl, pH8,0, 0,15 M NaCl 0,5% Natrium Deoxycholat 4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton™ X-100, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), und 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Aprotinin) lysiert, für 1 bis 3 Sekunden beschallt und mit Anti- $\text{p75}^{\text{NTR}}$  Antikörper (Maus Monoclonal IgG1, Cedarlane Laboratories Ltd., Ontario, Kanada) oder Maus IgG als Kontrolle für 16 Stunden bei 40 °C in Gegenwart von 15  $\mu\text{l}$  des Protein G und Protein A Agarose und 1 M NaCl auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Nach mehreren Waschungen mit 20 mM Tris HCl, pH 8,0, 1 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2% Triton™ X-100 und 1 mM PMSF wurden die Immunofällungen über 8% PAGE getrennt und der Autoradiographie ausgesetzt. Ein Band mit einer ~ 0 kD Molmasse war nur in mit Anti- $\text{p75}^{\text{NTR}}$  Antikörpern immunogefällten Lysaten und nicht in mit irrelevanten Maus IgG immunogefällten Lysaten vorhanden.

**[0079]** Zellen mit  $\text{p75}^{\text{NTR}}$ -NIH 3T3 wurden für 2 Stunden bei 40 °C in einem Bindemedium (DMEM, 10 mM Hepes, 0,1 mg/ml Cytochrom C, 0,01% Tween™ 80, 1 mg/ml BSA) mit  $^{125}\text{I}$   $\beta$ -Amyloid 1-40 und steigenden NGF Konzentrationen (0 bis 100 ng/ml) ausgebrütet. Nach dem Ausspülen in PBS wurden die Zellen in 1 N NaOH lysiert und gleichen Mengen an Protein von den Zelllysaten wurden einer  $\gamma$  Zählung ausgesetzt. Es wurde eine konzentrationsabhängige Unterbindung der  $^{125}\text{I}$   $\beta$ -Amyloid Bindung durch den NGF mit einer maximalen Unterbindung von 38% bei NGF Konzentrationen von 100 ng/ml und einer statistisch vergleichbaren Bindung bei 25 ng/ml beobachtet.

Beispiel 6: Das zyklische Peptid verhindert konkurrierend die  $\beta$ -Amyloid Bindung an den  $\text{p75}^{\text{NTR}}$

**[0080]**  $\text{p75}^{\text{NTR}}$  3T3 Zellen wurden in einer Lösung bei 4 °C für vier Stunden mit 0,5 uCi  $^{125}\text{I}$   $\beta$ -Amyloid 1-40 und ansteigenden Konzentrationen (0 bis 400 nM) des zyklischen Peptids CVGSNKGAIC (SEQ ID NO: 4) ausgebrütet. Es wurden Lysate von  $1,5 \times 10^5$  Zellen ausgezählt. Wie in [Fig. 1](#) dargestellt wurde das konzentrationsabhängige Unterdrücken der Bindung des  $^{125}\text{I}$   $\beta$ -Amyloid durch das zyklische Peptid mit einer 50% Unterdrückung bei der erwarteten Konzentration von 25 nM zyklischen Peptids beobachtet. Dieses Experiment zeigt, dass das zyklische Peptid mit dem  $\beta$ -Amyloid 1-40 um die Bindung an den  $\text{p75}^{\text{NTR}}$  Rezeptor konkurriert.

Beispiel 7: Einfluss des Peptids auf das Überleben von Zellen

**[0081]**  $\text{p75}^{\text{NTR}}$  3T3 Zellen wurden in einem serumfreien Medium gehalten, welches mit 200 nM  $\beta$ -Amyloid 1-40, 200 nM zyklischen Peptids CVGSNKGAIC, (SEQ ID NO: 4), 20 nM  $\beta$ -Amyloid 1-40 und 200nM zyklischen Peptids oder Lösungsmittel allein angereichert ist. Die bis zu 120 Stunden nach der Zugabe an  $\beta$ -Amyloid bestimmte Zellausbeute zeigt, dass in Kulturen mit 200 nM  $\beta$ -Amyloid 1-40 im Vergleich zu allen anderen Kulturen eine hervorstechende Abnahme der Zellausbeute vorliegt (siehe [Fig. 2](#)).

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Bewertung des Risikos eines Individuums, die Alzheimersche Krankheit zu bekommen, verbunden mit der  $\beta$ -Amyloid Protein oder  $\beta$ -Amyloid Peptid Aktivierung des  $\text{p75}$  Nervenwachstumsfaktorrezeptors, das die folgenden Schritte beinhaltet:
  - a) Züchtung vom Individuum gewonnener, epidermaler Melanozyten zur Darstellung des  $\text{p75}$  Nervenwachstumsfaktorrezeptors;
  - b) Einführung von  $\beta$ -Amyloid Protein oder  $\beta$ -Amyloid Peptide in die Melanozytikultur aus Schritt a) in einer Konzentration, die ausreicht, um den  $\text{p75}$  Nervenwachstumsfaktorrezeptor durch das  $\beta$ -Amyloid Protein oder  $\beta$ -Amyloid Peptid zu aktivieren, zum Beispiel zwischen 1  $\mu\text{m}$  und 100  $\mu\text{m}$ ;
  - c) Bestimmen, ob der  $\text{p75}$  Nervenwachstumsfaktorrezeptor durch das  $\beta$ -Amyloid Protein oder  $\beta$ -Amyloid Peptid aktiviert wurde; und
  - d) Vergleich der Aktivierung des  $\text{p75}$  Nervenwachstumsfaktorrezeptors der Melanozytikultur aus Schritt b) mit der Aktivierung des  $\text{p75}$  Nervenwachstumsfaktorrezeptors eines ebenfalls in der Gegenwart von  $\beta$ -Amyloid Protein oder Peptid gezüchteten Kontrollmelanozyts, wobei im Vergleich zur Aktivierung des  $\text{p75}$  Nervenwachstumsfaktorrezeptors im Kontrollmelanozyt eine größere Aktivierung des  $\text{p75}$  Nervenwachstumsfaktorrezeptors des Melanozyts aus

Schritt b) einen Indikator für das erhöhte Risiko eines Individuums, die Alzheimersche Krankheit zu entwickeln, bildet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Bestimmung, ob der p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptor aktiviert ist, des weiteren ein aus der folgenden Gruppe ausgewähltes Analyseverfahren beinhaltet: Analyse zur Bestimmung des Melanozytzellwachstums, Analyse zur Bestimmung des Anreizes zur Bax Protein Expression; Analyse zur Bestimmung des Beginns der Melanocytapoptose oder Analyse zur Bestimmung der Anwesenheit von plaqueähnlichen Strukturen in der Melanozytkultur.

3. Verfahren nach Anspruch 2, worin die Analyse zur Bestimmung des Beginns der Melanocytapoptose Teil der Gruppe der folgenden Analyseverfahren ist: Messung der Propidiumjodeinlagerung in Kernbruchstücke, die TUNEL Reaktion oder Veranschaulichung der fragmentierten DNA.

4. Verfahren nach Anspruch 1, worin entweder (a) das  $\beta$ -Amyloid Peptid ein Peptid aus der Gruppe der:  $\beta$ -Amyloid 1-40 Peptide;  $\beta$ -Amyloid 1-42 Peptide;  $\beta$ -Amyloid 25-36 Peptide oder  $\beta$ -Amyloid 28-30 Peptide; oder (b) das  $\beta$ -Amyloid Protein ein  $\beta$ -Amyloid Präkursorprotein ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1, worin in Schritt a) eine Reihe von vielfältigen Kulturen des Melanocys erhalten wird; in Schritt b) einer jeden Kultur  $\beta$ -Amyloid Protein oder  $\beta$ -Amyloid Peptid zugeführt wird, so dass jede Kultur in der Reihe eine erhöhte Konzentration an  $\beta$ -Amyloid Protein oder  $\beta$ -Amyloid Peptid im Bereich zwischen 0  $\mu$ M und 100  $\mu$ M aufweist und in Schritt c) die Aktivierung des p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptors bestimmt und mit der Konzentration an zugesetztem  $\beta$ -Amyloid Protein und Peptid korreliert wird.

6. Verfahren zur Bewertung des Risikos eines Individuums, die Alzheimersche Krankheit zu bekommen, verbunden mit der  $\beta$ -Amyloid Protein oder  $\beta$ -Amyloid Peptid Aktivierung des p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptors, das die folgenden Schritte beinhaltet:

- a) Züchtung, vom Individuum gewonnener, epidermaler Melanozyten zur Darstellung des p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptors, wodurch eine Testkultur gewonnen wird, und Züchten einer Kontrollzelllinie epidermaler Melanozyten zur Darstellung des p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptors, wodurch eine Kontrollkultur gewonnen wird, unter Bedingungen, die für das Erhalten von Melanozytkulturen geeignet sind;
- b) Bestimmung der von der Testkultur und Kontrollkultur produzierten Menge an  $\beta$ -Amyloid Protein oder  $\beta$ -Amyloid Präkursorprotein;
- c) Vergleich der Menge an produzierten  $\beta$ -Amyloid

Präkursorprotein oder  $\beta$ -Amyloid Proteine, wobei ein Vergleich der Produktion, bei dem eine größere Menge  $\beta$ -Amyloid Präkursorprotein oder Protein in der Testkultur als in der Kontrollkultur angezeigt wird, einen Indikator für das erhöhte Risiko eines Individuums, die Alzheimersche Krankheit zu entwickeln, bildet.

7. Verfahren nach Anspruch 6, worin in Schritt a) die Kulturen UV Strahlung ausgesetzt werden.

8. Verfahren nach Anspruch 6, worin entweder (a) die Produktion an  $\beta$ -Amyloid Präkursorprotein oder  $\beta$ -Amyloid Protein mittels Norther Blot Analyse zur mengenmäßigen Bestimmung an  $\beta$ -Amyloid Präkursorprotein mRNA oder  $\beta$ -Amyloid Protein mRNA, ausgedrückt in Melanozyten bestimmt wird, oder (b) die Produktion an  $\beta$ -Amyloid Präkursorprotein oder  $\beta$ -Amyloid Protein mittels Western Blot Analyse unter Verwendung eines für  $\beta$ -Amyloid Präkursorprotein oder  $\beta$ -Amyloid Protein spezifischen Antikörpers bestimmt wird.

9. Verfahren zur Bewertung des Risikos eines Individuums, die Alzheimersche Krankheit zu bekommen verbunden mit der  $\beta$ -Amyloid Protein oder  $\beta$ -Amyloid Peptid Aktivierung des p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptors, das die folgenden Schritte beinhaltet:

- a) Züchtung vom Individuum gewonnener, epidermaler Melanozyten zur Darstellung des p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptors;
- b) Messung der Menge an p75 Nervenwachstumsfaktor und p140 Tyrosin-Kinase-A-Rezeptor in der Oberfläche der kultivierten Melanozyten; und
- c) Bestimmung des Verhältnisses der Menge des p75 Nervenwachstumsfaktors relativ zur Menge des p140 Tyrosin-Kinase-A.

10. Verwendung eines die die Aminosäuresequenz Lysin-Glycin-Alanin beinhaltenden Peptids, worin das Peptid eine Länge von 5 bis etwa 10 Aminosäuren auweist, was das Peptid durch die Drei-Peptid-Sequenz an den p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptor bindet und die Bindung von  $\beta$ -Amyloid Protein oder  $\beta$ -Amyloid Peptid an den p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptor auf einer neuronalen Zelle des zentralen Nervensystems hemmt, wodurch eine p75 abhängige Apoptose zur Herstellung eines Medikaments entweder (a) zur Behandlung der Alzheimerschen Krankheit eines Individuums, oder (b) anderen neurodegenerativen Krankheiten gehemmt wird.

11. Verwendung von Anspruch 10, worin das Peptid die Sequenz der SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3 oder SEQ ID NO: 4 aufweist.

12. Peptid, das die Aminosäuresequenz Lysin-Glycin-Alanin beinhaltet, worin das Peptid eine

Länge von 5 bis 10 Aminosäuren aufweist, welches sich durch die Drei-Peptid-Sequenz an den p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptor bindet und dadurch eine p75 abhängige Apoptose zur Verwendung als Behandlung für die Alzheimersche Krankheit hemmt.

13. Verfahren zur Identifikation einer Substanz, die die  $\beta$ -Amyloid abhängige Apoptose oder Bindung von  $\beta$ -Amyloid Protein oder Peptide mit dem p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptor der Melanozyten oder Fibroblastzellen, die den p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptor ausdrücken, hemmen, das folgende Schritte umfasst:

- a) Züchtung von zum Ausdrücken des p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptors veränderten Fibroblastzellen oder Melanozyten zum Ausdrücken des p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptors;
- b) Einführung von  $\beta$ -Amyloid Protein oder  $\beta$ -Amyloid Peptid in einer zur Bindung und Aktivierung des p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptors ausreichenden Konzentration und der zu testenden Substanz in die Zellkultur aus Schritt a), wodurch eine Testkultur hergestellt wird;
- c) Erhaltung der Testkultur aus Schritt b) unter Bedingungen, die für die Bindung des  $\beta$ -Amyloid Proteins oder  $\beta$ -Amyloid Peptids oder der Testsubstanz mit dem auf der Zelle ausgedrückten p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptor ausreichen;
- d) Bestimmung der  $\beta$ -Amyloid Aktivierung des p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptors, und
- e) Vergleich der  $\beta$ -Amyloid Aktivierung des p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptors der in Schritt b) gezüchteten Zellen mit einer  $\beta$ -Amyloid Aktivierung des p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptors in einer Kontrollkultur, die in Abwesenheit der Testsubstanz gezüchtete Zellen beinhaltet, worin eine verringerte  $\beta$ -Amyloid Aktivierung des p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptors bei Zellen in der Testkultur im Vergleich zur  $\beta$ -Amyloid Aktivierung des p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptors für Zellen in der Kontrollkultur einen Indikator für eine  $\beta$ -Amyloid abhängige Apoptose hemmende Substanz darstellt.

14. Verfahren nach Anspruch 13, worin:

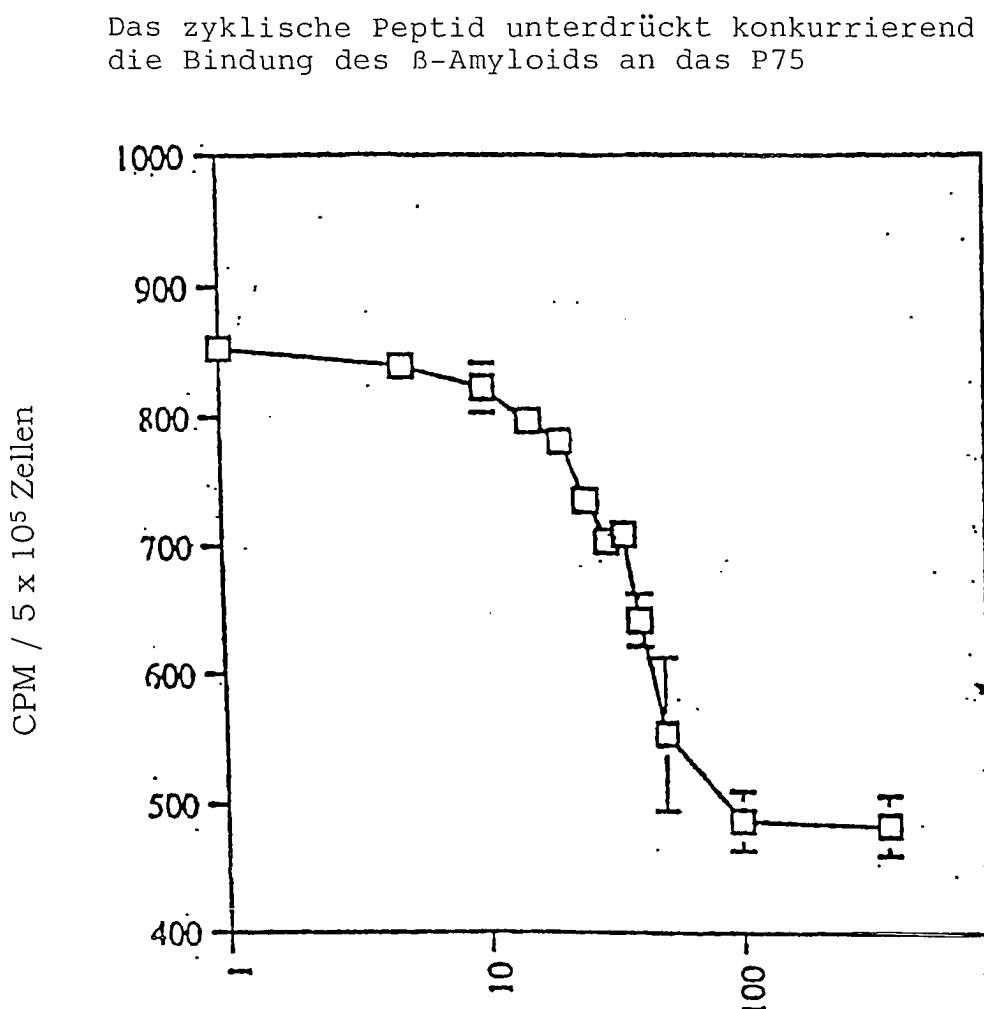
- i) Bestimmung der p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptoraktivierung des Weiteren ein Analyseverfahren aus der Gruppe der folgenden Verfahren beinhaltet: Analyse zur Bestimmung des Zellwachstums, Analyse zur Bestimmung des Anreizes zur Bax Protein Expression; Analyse zur Bestimmung des Beginns der Apoptose oder Analyse zur Bestimmung der Anwesenheit von plaqueähnlichen Strukturen in der Zellkultur; und/oder
- ii) die Analyse zur Bestimmung des Beginns der Apoptose Teil der Gruppe der folgenden Analyseverfahren ist: Messung der Propidiumjodeinlagerung in Kernbruchstücke, die TUNEL Reaktion oder Veranschaulichung der fragmentierten DNA; und/oder
- iii) das  $\beta$ -Amyloid Protein ein  $\beta$ -Amyloid Präkursorprotein ist; und/oder

- iv) die Konzentration an  $\beta$ -Amyloid Protein oder  $\beta$ -Amyloid Peptid in Schritt b) im Bereich von 0,025  $\mu$ M bis um 100  $\mu$ M liegt; und/oder
- v) in Schritt a) eine Reihe an vielfältigen Zellkulturen erhalten wird; in Schritt b) einer jeden Kultur eine Testsubstanz zugeführt wird, so dass jede Kultur in der Reihe eine erhöhte Konzentration einer Testsubstanz im Bereich zwischen 0  $\mu$ M und 100  $\mu$ M aufweist und in Schritt c) die Aktivierung des p75 Nervenwachstumsfaktorrezeptors bestimmt und mit der Konzentration an zugesetzter Testsubstanz korreliert wird; und/oder
- vi) die Melanozyten von einem Individuum mit Demenz erhaltene epidermale Melanozyten darstellen, zum Beispiel ist die Demenz die Alzheimersche Krankheit.

15. Verfahren nach Anspruch 13, worin das  $\beta$ -Amyloid Peptid ein Peptid aus der Gruppe der:  $\beta$ -Amyloid 1-40 Peptide;  $\beta$ -Amyloid 1-42 Peptide;  $\beta$ -Amyloid 25-36 Peptide oder  $\beta$ -Amyloid 28-30 Peptide ist.

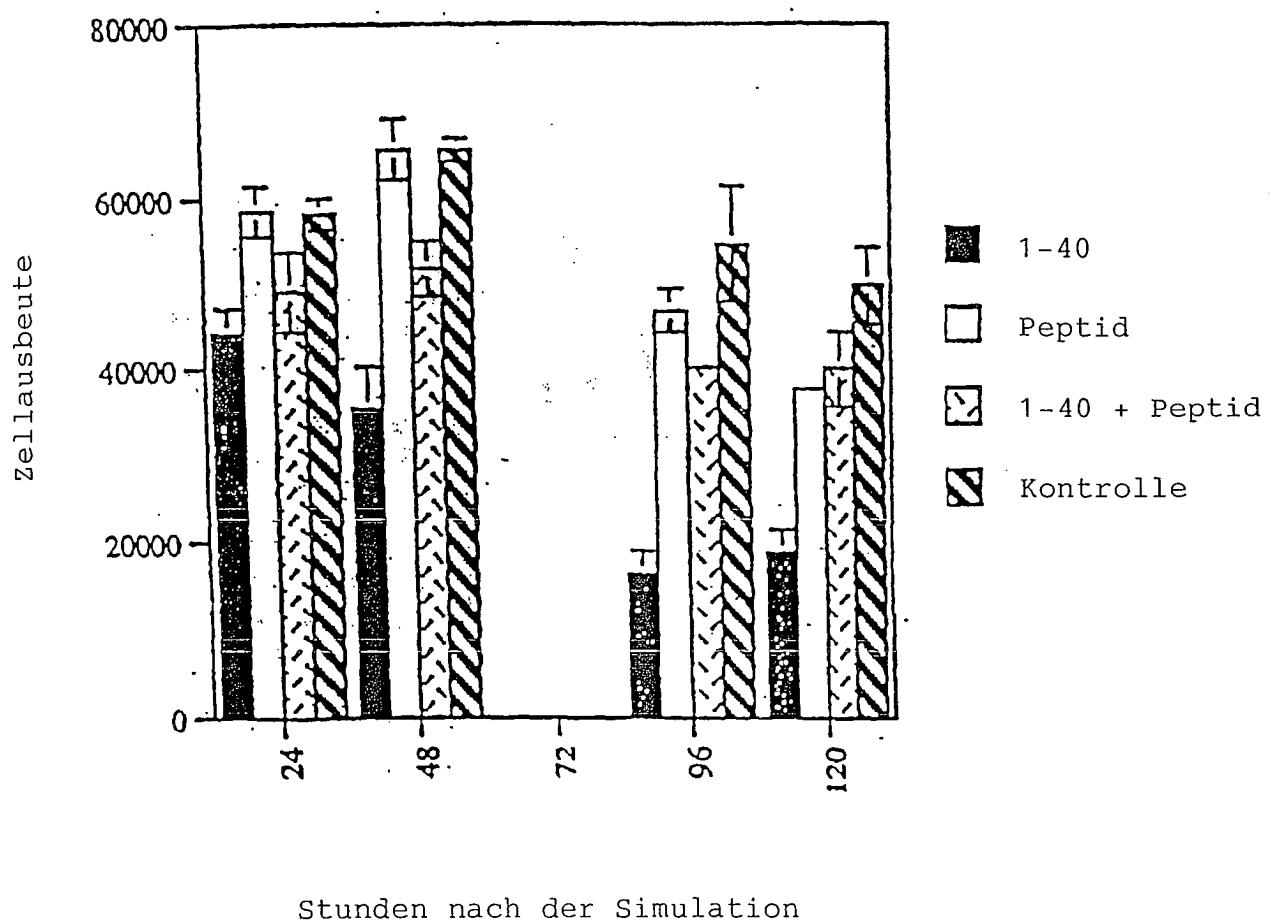
Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen



Figur 1

Einfluß des CVGSWNKGAI C auf das Überleben von P75 3T3 Zellen



Figur 2