



(10) **DE 602 13 615 T3** 2017.11.23

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 420 815 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 13 615.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/DK02/00547**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 75 8181.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/015812**

(86) PCT-Anmeldetag: **20.08.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **27.02.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.05.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **02.08.2006**

(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: **09.08.2017**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.11.2017**

(51) Int Cl.: **A61K 39/00** (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert.

(30) Unionspriorität:

200101231	20.08.2001	DK
337543 P	22.10.2001	US
373027 P	16.04.2002	US
200200558	16.04.2002	DK

(73) Patentinhaber:

H. Lundbeck A/S, Valby, DK

(74) Vertreter:

Kraus & Weisert Patentanwälte PartGmbB, 80539 München, DE

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR

(72) Erfinder:

RASMUSSEN, Peter Birk Pharmexa A/S, DK-2970 Hoersholm, DK; JENSEN, Martin Roland Pharmexa A/S, DK-2970 Hoersholm, DK; NIELSEN, Klaus Gregorius Pharmexa A/S, DK-2970 Hoersholm, DK; KOEFOED, Peter Pharmexa A/S, DK-2970 Hoersholm, DK; DEGAN, Florence Dal Pharmexa A/S, DK-2970 Hoersholm, DK

(54) Bezeichnung: **BETA-AMYLOID-ANALOG - T-ZELL EPITOP IMPFSTOFF**

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verbesserungen bei der Therapie und Prävention der Alzheimer-Krankheit (AD) ("Alzheimer's disease") und anderer Krankheiten, die gekennzeichnet sind durch Ablagerung von Amyloid, z. B. gekennzeichnet sind durch Amyloidablagerungen in dem Zentralen Nervensystem (ZNS) ("central nervous system; CNS"). Spezifischer beabsichtigt die vorliegende Erfindung das Ermöglichen eines Verfahrens zur Herabregulierung (unerwünschter) Amyloidablagerungen durch das Ermöglichen der Produktion von Antikörpern gegen ein relevantes Protein (APP oder A β) oder Komponenten davon in Subjekten, die unter Krankheiten leiden oder Gefahr laufen, unter Krankheiten zu leiden, die eine Pathologie aufweisen, die Amyloidablagerung beinhaltet. Die Erfindung stellt außerdem die modifizierten Polypeptide als solche bereit. Außerdem von der vorliegenden Erfindung umfasst sind Nucleinsäurefragmente, codierend die modifizierten Polypeptide, sowie Vektoren, die diese Nucleinsäurefragmente inkorporieren, und Wirtszellen und Zelllinien, die damit transformiert sind. Schließlich stellt die vorliegende Erfindung außerdem einen neuen Typ an Konjugatpeptidimmunogen bereit.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Amyloidose ist die extrazelluläre Ablagerung unlöslicher Proteinfibrillen, die zu Gewebeschädigung und Krankheit führt (Pepys, 1996; Tan et al., 1995; Kelly, 1996). Die Fibrillen bilden sich, wenn normalerweise lösliche Proteine und Peptide auf anormale Weise selbstassoziiieren (Kelly, 1997).

[0003] Amyloid ist mit ernsthaften Krankheiten assoziiert, einschließlich systemischer Amyloidose, AD, Altersdiabetes, Parkinson'scher Krankheit, Huntington-Krankheit, frontotemporaler Demenz und der Prion-verwandten übertragbaren spongiformen Enzephalopathien (Kuru und Creutzfeldt-Jacob-Krankheit bei Menschen und Scrapie und BSE bei Schafen bzw. Vieh), und die Bildung von Amyloidplaques bei beispielsweise Alzheimer scheint eng mit dem Fortschreiten der menschlichen Krankheit assoziiert zu sein. In Tiermodellen wurden gezeigt, dass die Überexpression oder die Expression modifizierter Formen von Proteinen, die in Ablagerungen gefunden werden, wie beispielsweise das β -Amyloid-Protein, verschiedene Krankheitssymptome, z. B. Alzheimer-ähnliche Symptome, induziert. Es gibt keine spezifische Behandlung für Amyloidablagerung, und diese Krankheiten sind für gewöhnlich tödlich.

[0004] Die Untereinheiten von Amyloidfibrillen können Wildtyp-Proteine, Variantenproteine oder verkürzte Proteine sein, und in vitro können ähnliche Fibrillen aus Oligopeptiden und denaturierten Proteinen gebildet werden (Bradbury et al., 1960; Filshie et al., 1964; Burke & Rougvie, 1972). Die Art der Polypeptidkomponente der Fibrillen definiert den Charakter der Amyloidose. Trotz großer Unterschiede bei der Größe, Nativstruktur und Funktion von Amyloidproteinen sind alle Amyloidfibrillen von unbestimmter Länge, unverzweigt, von 70 bis 120 Å Durchmesser und zeigen charakteristische Färbung mit Kongo-Rot (Pepys, 1996). Sie sind charakteristisch für eine cross- β -Struktur (Pauling & Corey, 1951), bei welcher die Polypeptidkette in β -Faltblättern organisiert ist. Obwohl die Amyloidproteine stark unterschiedliche Vorläuferstrukturen aufweisen, können sie alle eine strukturelle Umwandlung, vielleicht entlang eines ähnlichen Wegs, zu einer fehlgefalteten Form durchlaufen, die der Baustein des β -Faltblatt-Helix-Protofilaments ist.

[0005] Dieses charakteristische Fasermuster führte zu Amyloidosen, die β -Fibrillosen genannt werden (Glenner, 1980a, b), und das Fibrillenprotein von AD wurde als β -Protein bezeichnet, bevor seine Sekundärstruktur bekannt war (Glenner & Wong, 1984). Die charakteristischen cross- β -Beugungsmuster, zusammen mit der Fibrillenerscheinung und Färbungseigenschaften sind nun die akzeptierten diagnostischen Kennzeichen von Amyloid und sie deuten darauf hin, dass die Fibrillen, obwohl sie von sehr unterschiedlichen Proteinvorläufern gebildet werden, einen Grad struktureller Ähnlichkeit teilen und unabhängig von der Art ihrer Vorläuferproteine eine strukturelle Superfamilie umfassen (Sunde M., Serpell L. C., Bartlam M., Fraser P. E., Pepys M. B., Blake C. C. F., J. Mol. Biol., 31. Oktober 1997; 273 (3): 729–739).

[0006] Eine der am weitesten verbreiteten und best bekannten Krankheiten, bei der vorgeschlagen wird, dass Amyloidablagerungen im zentralen Nervensystem eine zentrale Rolle beim Fortschreiten der Krankheit spielen, ist AD.

AD

[0007] Die Alzheimer-Krankheit (AD = Alzheimer's disease) ist eine irreversible progressive Gehirnstörung, die graduell auftritt und in Gedächtnisverlust, Verhaltens- und Persönlichkeitsänderungen und in einem Nachlassen der geistigen Fähigkeiten resultiert. Man bringt diese Verluste in Bezug zum Tod von Gehirnzellen und dem Abbrechen der Verbindungen zwischen ihnen. Der Verlauf dieser Krankheit variiert von Person zu Person, wie es auch die Rate des geistigen Verfalls tut. Im Durchschnitt leben AD-Patienten, nachdem bei ihnen AD diagnostiziert wurde, 8 bis 10 Jahre lang, obwohl die Krankheit bis zu 20 Jahre anhalten kann.

[0008] AD schreitet in Stufen fort, von früher, moderater Vergesslichkeit bis zu einem starken Verlust der Gehirnfunktion. Dieser Verlust ist als Demenz bekannt. Bei den meisten Personen mit AD treten Symptome erstmals nach dem Alter von 60 auf, aber frühere Ausbrüche sind nicht un häufig. Die frühesten Symptome beinhalten oft Kurzzeitgedächtnisverlust, fehlerhaftes Urteilsvermögen und Änderungen der Persönlichkeit. Menschen in den anfänglichen Stufen von AD denken oft weniger klar und vergessen die Namen bekannter Menschen und üblicher Objekte. Später im Krankheitsverlauf können sie vergessen wie selbst einfache Aufgaben zu tun sind. Schließlich verlieren Menschen mit AD das gesamte Urteilsvermögen und werden für ihre alltägliche Pflege von anderen Menschen abhängig. Letztlich verläuft die Krankheit so schwächend, dass die Patienten bettlägerig sind, und es wahrscheinlich ist, dass sie andere Krankheiten und Infektionen entwickeln. Am häufigsten sterben Menschen mit AD an Lungenentzündung.

[0009] Obwohl das Risiko, AD zu entwickeln, mit dem Alter zunimmt, sind AD- und Demenzsymptome nicht Teil des normalen Alters. AD und andere Demenz-erzeugende Störungen werden durch Krankheiten verursacht, die das Gehirn beeinträchtigen. Beim normalen Alter gehen Nervenzellen im Gehirn nicht in großen Anzahlen verloren. Im Gegensatz dazu unterbricht AD drei Schlüsselprozesse: Nervenzellenkommunikation, Metabolismus und Reparatur. Diese Unterbrechung verursacht letztlich, dass viele Nervenzellen aufhören zu funktionieren, Verbindungen mit anderen Nervenzellen verlieren und absterben.

[0010] Zunächst zerstört AD Neuronen in Teilen des Gehirns, die das Gedächtnis kontrollieren, insbesondere im Hippocampus und zugehörigen Strukturen. Sowie Nervenzellen im Hippocampus aufhören, korrekt zu funktionieren, versagt das Kurzzeitgedächtnis und oft beginnt die Fähigkeit einer Person, einfache und bekannte Aufgaben durchzuführen, abzunehmen. AD attackiert außerdem den zerebralen Cortex, insbesondere die Gebiete, die verantwortlich für Sprache und Urteilskraft sind. Schließlich sind viele andere Gebiete des Gehirns involviert. All diese Gehirnregionen atrophieren (schrumpfen), und der AD-Patient wird bettlägerig, inkontinent, vollständig hilflos und spricht auf die äußere Welt nicht an (Quelle: National Institute an Aging Progress Report an Alzheimer's Disease, 1999).

Die Bedeutung von AD

[0011] AD ist die häufigste Ursache von Demenz unter Menschen im Alter von 65 und älter. Wegen ihrem enormen Einfluss auf Individuen, Familien, das Gesundheitssystem und die Gesellschaft als ein Ganzes stellt sie ein bedeutendes Gesundheitsproblem dar. Wissenschaftler schätzen, dass bis zu 4 Millionen Menschen gegenwärtig unter der Krankheit leiden und die Prävalenz verdoppelt sich alle 5 Jahre jenseits des Alters von 65. Man schätzt außerdem, dass ungefähr 360.000 neue Fälle (Inzidenz) jedes Jahr auftreten werden, obwohl diese Anzahl zunehmen wird, sowie die Bevölkerung altert (Brookmeyer et al., 1998).

[0012] AD legt der Gesellschaft eine schwere ökonomische Last auf. Eine kürzlich durchgeführte Studie in den Vereinigten Staaten schätzte, dass die jährlichen Kosten des Sorgens für einen AD-Patienten 18.408 US Dollar für einen Patienten mit milder AD, 30.096 Dollar für einen Patienten mit moderater AD und 36.132 Dollar für einen Patienten mit schwerer AD sind. Die jährlichen nationalen Kosten zum Sorgen für AD-Patienten in den Vereinigten Staaten wird auf leicht über 50 Milliarden Dollar geschätzt (Leon et al., 1998).

[0013] Ungefähr 4 Millionen Amerikaner sind 85 oder älter, und in den meisten industrialisierten Ländern ist diese Altersgruppe eines der am schnellsten wachsenden Segmente der Bevölkerung. Man schätzt, dass sich diese Gruppe mit dem Jahr 2030 in den USA auf eine Anzahl von nahezu 8,5 Millionen belaufen wird; manche Experten, die Bevölkerungstrends studieren, schlagen vor, dass die Anzahl noch größer sein könnte. So wie mehr und mehr Menschen länger leben, wird die Anzahl an Menschen, die von Krankheiten des Alters, einschließlich AD beeinträchtigt sind, weiter wachsen. Beispielsweise zeigen manche Studien, dass nahezu die Hälfte aller Menschen im Alter von 85 und älter eine Form von Demenz aufweisen (National Institute an Aging Progress Report an Alzheimer's Disease, 1999).

Die Hauptcharakteristika von AD

[0014] Zwei anormale Strukturen im Gehirn sind die Kennzeichen von AD: Amyloidplaques und neurofibrilläre Knäuel bzw. Plaques (NFT) ("neurofibrillary tangles"). Plaques sind dichte, weitgehend unlösliche Ablagerungen von Protein und zellulärem Material außerhalb der Neuronen des Gehirns und um sie herum. Knäuel bzw. Plaques sind unlösliche verdrehte Fasern, die sich innerhalb von Neuronen aufbauen.

[0015] Es existieren zwei Typen von AD: familiäre AD (FAD), welche einem gewissen Vererbungsmuster folgt, und sporadische AD, wo kein offensichtliches Vererbungsmuster gesehen wird. Wegen der Unterschiede im Alter beim Ausbruch wird AD ferner als frühzeitig auftretend (was bei Menschen jünger als 65 vorkommt) und spät auftretend (was bei jenen im Alter von 65 und älter auftritt) beschrieben. Frühzeitig auftretende AD ist selten (etwa 10% der Fälle) und betrifft im Allgemeinen Menschen im Alter von 30 bis 60. Manche Formen von frühzeitig auftretender AD werden vererbt und verlaufen in Familien. Frühzeitig auftretende AD schreitet außerdem oft schneller fort als die üblichere, spät auftretende Form.

[0016] Alle bis jetzt bekannten FADs weisen einen früheren Beginn auf, und es ist bekannt, dass 50% der FAD-Fälle durch Defekte in drei Genen, die auf drei unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind, verursacht werden. Dieses sind Mutationen in dem APP-Gen auf Chromosom 21; Mutationen in einem Gen auf Chromosom 14, genannt Presenilin 1; und Mutationen in einem Gen auf Chromosom 1, genannt Presenilin 2. Bis jetzt gibt es jedoch keinen Beweis, dass irgendeine dieser Mutationen eine Hauptrolle in der stärker verbreiteten, sporadischen oder nicht-familiären Form von AD mit spätem Beginn spielen. (National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999)

Amyloidplaques

[0017] Bei AD entwickeln sich Amyloidplaques bzw. amyloide Plaques zuerst in Gebieten des Gehirns, die für Erinnerung und andere kognitive Funktionen verwendet werden. Sie bestehen aus größtenteils unlöslichen Ablagerungen von β -Amyloid (nachfolgend als A β bezeichnet) – ein Proteinfragment eines größeren Proteins, genannt Amyloidprecursorprotein bzw. Amyloidvorläuferprotein (APP, dessen Aminosäuresequenz in SEQ ID NO: 2 dargelegt ist) – vermischt mit Teilen von Neuronen und mit Nicht-Nervenzellen, wie beispielsweise Mikroglia und Astrozyten. Es ist nicht bekannt, ob amyloide Plaques selbst die Hauptursache von AD darstellen oder ob sie ein Nebenprodukt des AD-Prozesses sind. Gewiss können Änderungen in dem APP-Protein AD verursachen, wie in der vererbten Form von AD, verursacht durch Mutationen im APP-Gen, gezeigt, und A β -Plaquetbildung scheint eng mit dem Fortschreiten der menschlichen Krankheit assoziiert zu sein (Lippa C. F. et al., 1998).

APP

[0018] APP ist eines von vielen Proteinen, die mit Zellmembranen assoziiert sind. Nachdem es hergestellt ist, wird APP in die Nervenzellmembran eingebettet, teilweise innerhalb und teilweise außerhalb der Zelle. Vor kurzem durchgeführte Studien unter Verwendung transgener Mäuse zeigen, dass APP eine wichtige Rolle beim Wachstum und Überleben von Neuronen zu spielen scheint. Beispielsweise schützen gewisse Formen und Mengen von APP möglicherweise Neuronen gegen sowohl kurz- als auch langfristige Beschädigung und verleihen beschädigten Neuronen möglicherweise eine bessere Fähigkeit, sich selbst zu reparieren, und helfen Teilen von Neuronen nach Gehirnverletzung zu wachsen.

[0019] Während APP in die Zellmembran eingebettet ist, wirken Proteasen auf bestimmte Stellen in APP, wobei sie es in Proteinfragmente spalten. Eine Protease hilft dabei, APP zu spalten, um A β zu bilden, und eine andere Protease spaltet APP in der Mitte des Amyloidfragments, so dass A β nicht gebildet werden kann. Das gebildete A β ist von zwei unterschiedlichen Längen, ein kürzeres 40 (oder 41)-Aminosäuren-A β , das relativ löslich ist und langsam aggregiert, und ein geringfügig längeres, "klebriges" 42-Aminosäuren-A β , das rasch unlösliche Klumpen ausbildet. Es ist bis jetzt nicht genau bekannt, wie A β , während es gebildet wird, sich durch Nervenzellen oder um Nervenzellen herum bewegt. In den Endstufen dieses Prozesses aggregiert das "klebrige" A β in lange Filamente außerhalb der Zelle und bildet, zusammen mit Fragmenten toter und sterbender Neuronen und den Mikroglia und Astrozyten, die Plaques, die im Gehirngewebe charakteristisch für AD sind.

[0020] Es bestehen gewisse Hinweise darauf, dass die Mutationen in APP es wahrscheinlicher machen, dass A β aus dem APP-Vorläufer herausgeschnitten wird, wodurch folglich verursacht wird, dass entweder mehr Gesamt-A β oder relativ mehr von der "klebrigen" Form hergestellt wird. Es scheint außerdem, dass Mutationen

in den Presenilin-Genen möglicherweise zur Degenerierung von Neuronen auf wenigstens zwei Wegen beitragen: durch Modifizieren von A β -Produktion oder durch direkteres Auslösen des Todes von Zellen. Andere Forscher schlagen vor, dass mutierte Preseniline 1 und 2 möglicherweise beim Beschleunigen der Geschwindigkeit von Apoptose beteiligt sind.

[0021] Es ist zu erwarten, dass, sowie die Krankheit fortschreitet, mehr und mehr Plaques gebildet werden, was mehr und mehr des Gehirns füllt. Studien schlagen vor, dass es sein kann, dass das A β in einer Art dynamisches Gleichgewicht zur selben Zeit aggregiert und disaggregiert. Dies erweckt die Hoffnung, dass es möglich sein kann, die Plaques, sogar nachdem sie sich gebildet haben, abzubauen. (National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999).

[0022] Man glaubt, dass A β für Neuronen toxisch ist. In Gewebekulturstudien beobachteten Forscher eine Zunahme beim Tod von Hippocampus-Neuronenzellen, manipuliert, um mutierte Formen von Human-APP zu überexprimieren, im Vergleich zu Neuronen, die das normale Human-APP überexprimierten (Luo et al., 1999).

[0023] Ferner ist in Tiermodellen gezeigt worden, dass Überexpression oder die Expression modifizierter Formen des A β -Proteins Alzheimer-ähnliche Symptome induzierten (Hsiao K. et al., 1998).

[0024] Angesichts dieser erhöhten A β -Erzeugung, dessen Aggregation in Plaques und der resultierenden Neurotoxizität und der Tatsache, dass die resultierende Neurotoxizität zu AD führen kann, ist es von therapeutischem Interesse, Bedingungen zu untersuchen, unter welchen A β -Aggregation in Plaques verlangsamt oder sogar blockiert werden kann.

Preseniline

[0025] Mutationen in Presenilin-1 (5–180) sind für nahezu 50% aller Fälle von frühzeitig auftretender familiärer AD (FAD) verantwortlich. Um die 30 Mutationen, die AD verursachen, sind identifiziert worden. Der Ausbruch von AD variiert mit den Mutationen. Mutationen in Presenilin-2 sind für einen viel kleineren Anteil der FAD-Fälle verantwortlich, sind jedoch immer noch ein signifikanter Faktor. Es ist nicht bekannt, ob Preseniline bei sporadischer nicht-familiärer AD beteiligt sind. Die Funktion der Preseniline ist nicht bekannt, jedoch scheinen sie beim Prozessieren von APP, um A β -42 (die längere klebrige Form des Peptids, SEQ ID NO: 2, Reste 673–714) zu ergeben, involviert zu sein, weil AD-Patienten mit Presenilin-Mutationen erhöhte Level dieses Peptids aufweisen. Es ist unklar, ob die Preseniline außerdem eine Rolle beim Verursachen der Erzeugung von NFTs haben. Manche schlagen vor, dass Preseniline außerdem eine direktere Rolle bei der Degenerierung von Neuronen und Neuronentod spielen könnten. Presenilin-1 ist auf Chromosom 14 lokalisiert, während Presenilin-2 mit Chromosom 1 in Verbindung steht. Wenn eine Person eine mutierte Version nur eines dieser Gene trägt, ist nahezu sicher, dass er oder sie frühzeitig auftretende AD entwickelt.

[0026] Es besteht etwas Ungewissheit darüber, ob Presenilin-1 mit der hypothetischen γ -Secretase, beteiligt beim Prozessieren von APP, identisch ist (Naruse et al., 1998).

Apolipoprotein E

[0027] Apolipoprotein E ist für gewöhnlich mit Cholesterin assoziiert, es wird jedoch außerdem in Plaques und Knäueln von AD-Gehirnen gefunden. Während Allele 1–3 nicht bei AD beteiligt zu sein scheinen, besteht eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorhandensein des APOE-e4-Allels und der Entwicklung später AD (Strittmatter et al., 1993). Es ist jedoch ein Risikofaktor und nicht eine direkte Ursache, wie es für die Presenilin- und APP-Mutationen der Fall ist, und es ist nicht auf familiäre AD beschränkt.

[0028] Die Art und Weisen, auf welche das ApoE e4-Protein die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung von AD erhöht, sind nicht mit Gewissheit bekannt, jedoch ist eine mögliche Theorie, dass es A β -Aufbau erleichtert und dies dazu beiträgt, das Alter, in dem AD ausbricht, herabzusetzen, oder dass die Anwesenheit oder Abwesenheit bestimmter APOE-Allele die Art und Weise, auf welche Neuronen auf Verletzung reagieren, beeinträchtigen kann (Buttini et al., 1999).

[0029] Es ist gezeigt worden, dass auch Apo A1 amyloidogen ist. Intaktes apo A1 kann selbst Amyloid-ähnliche Fibrillen in vitro ausbilden, die Kongo-Rot-positiv sind (Am. J. Pathol. 147 (2): 238–244 (Aug. 1995), Wisniewski T., Golabek A. A., Kida E., Wisniewski K. E., Frangione B.).

[0030] Es scheint einige widersprüchliche Ergebnisse zu geben, die anzeigen, dass es, verglichen mit anderen Allelen, einen positiven Effekt des APOE-e4-Allels beim Verringern von Symptomen von Gedächtnisverlust gibt (Stern, Brandt, 1997, *Annals of Neurology* 41).

Neurofibrilläre Plaques

[0031] Dieses zweite Kennzeichen von AD besteht aus anormalen Sammlungen verdrehter Fäden, die innerhalb von Nervenzellen gefunden werden. Die Hauptkomponente der Plaques bzw. Knäuel ist eine Form eines Proteins, das tau (t) genannt wird. Im zentralen Nervensystem sind tau-Proteine am Besten für ihr Vermögen bekannt, Mikrotubuli zu binden und bei ihrer Stabilisation zu helfen. Mikrotubuli sind ein Bestandteil der internen Trägerstruktur oder des Skeletts der Zelle. Jedoch ist bei AD tau chemisch verändert, und dieses veränderte tau kann die Mikrotubuli nicht länger stabilisieren, was verursacht, dass diese zerfallen. Dieser Kollaps des Transportsystems kann zuerst in Fehlfunktionen bei der Kommunikation zwischen Nervenzellen resultieren und kann später zu Neuronentod führen.

[0032] In AD verdrillt sich chemisch verändertes tau in gepaarte helikale Filamente – zwei Fäden von tau, die um einander gewunden sind. Diese Filamente sind die Haupts substanz, die man in neurofibrillären Plaques findet. In einer kürzlich durchgeführten Studie fanden Forscher bei weniger als 6% der Neuronen in einem bestimmten Teil des Hippocampus in gesunden Gehirnen, bei mehr als 43% dieser Neuronen bei Menschen, die mit milder AD starben, und bei 71% dieser Neuronen bei Menschen, die mit schwerer AD starben, neurofibrilläre Veränderungen. Wenn der Neuronenverlust untersucht wurde, wurde eine ähnliche Steigerung gefunden. Hinweise dieser Art unterstützen die Idee, dass die Bildung von Plaques und der Verlust an Neuronen zusammen während des Verlaufs von AD fortschreiten. (National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999).

Tauopathien und Plaques bzw. Knäuel

[0033] Mehrere andere neurodegenerative Krankheiten ausser AD sind durch die Aggregation von tau in unlösliche Filamente in Neuronen und Glia, was zu Dysfunktion und Tod führt, gekennzeichnet. Vor sehr kurzer Zeit haben mehrere Gruppen von Forschern, die Familien mit einer Vielfalt vererbbarer Arten von Demenz ungleich AD untersuchten, die ersten Mutationen in dem tau-Gen auf Chromosom 17 gefunden (Clark et al., 1998; Hutton et al., 1998; Poorkaj et al., 1998; Spillantini et al., 1998). In diesen Familien verursachen Mutationen im tau-Gen Neuronen-Zelltod und Demenz. Diese Störungen, welche einige Charakteristika mit AD gemeinsam haben, sich jedoch in mehrerer wichtiger Hinsicht unterscheiden, werden kollektiv "fronto-temporale Demenz und Parkinsonismus, verknüpft mit Chromosom 17" (FTDP-17) genannt. Sie sind Krankheiten, wie beispielsweise die Parkinson-Krankheit, einige Formen amyotropher lateraler Sklerose (ALS), korticobasale Degeneration, progressive supranukleäre Lähmung und Pick'sche Krankheit, und sind alle durch anormale Aggregation von tau-Protein gekennzeichnet.

Andere AD-ähnliche neurologische Krankheiten

[0034] Es gibt wichtige Parallelen zwischen AD und anderen neurologischen Krankheiten, einschließlich Prionkrankheiten (wie beispielsweise Kuru, Creutzfeld-Jacob-Krankheit und BSE ("bovine spongiform encephalitis")), Parkinson-Krankheit, Huntington-Krankheit und fronto-temporaler Demenz. Alle involvieren Ablagerungen anormaler Proteine im Gehirn. AD und Prionkrankheiten verursachen Demenz und Tod, und beide sind mit der Bildung unlöslicher Amyloidfibrillen, jedoch aus Membranproteinen, die sich voneinander unterscheiden, assoziiert.

[0035] Wissenschaftler, die die Parkinson-Krankheit, die am zweit-meisten verbreitete neurodegenerative Störung nach AD, untersuchen, entdeckten das erste Gen, das mit dieser Krankheit verknüpft ist. Dieses Gen codiert für ein Protein, genannt Synuclein, welches verblüffenderweise auch in den Amyloidplaques der Gehirne von AD-Patienten gefunden wird (Lavedan C., 1998, *Genome Res.* 8(9): 871–80). Forscher haben außerdem entdeckt, dass genetische Defekte in der Huntington-Krankheit, einer anderen progressiven neurodegenerativen Störung, die Demenz verursacht, verursachen, dass sich das Huntington-Protein in unlösliche Fibrillen formt, die den Aβ-Fibrillen von AD und den Proteinfibrillen der Prionkrankheit sehr ähnlich sind (Scherzinger E. et al., 1999, *PNAS USA* 96(8): 4604–9).

[0036] Wissenschaftler haben außerdem ein neues Gen entdeckt, welches, wenn mutiert, für Familiäre Britische Demenz (FBD), eine selten vererbte Krankheit, die starke Bewegungsstörungen und progressive Demenz, ähnlich der, die in AD beobachtet wird, verursacht, verantwortlich ist. In einer biochemischen Analyse

der in den FBD-Plaques gefundenen Amyloidfibrillen wurde ein einzigartiges Peptid, genannt ABri, gefunden (Vidal et al., 1999). Eine Mutation an einem bestimmten Punkt entlang dieses Gens resultiert in der Produktion eines längeren Bri-Proteins als dem normalen. Das ABri-Peptid, welches aus dem mutierten Ende des Bri-Proteins geschnitten ist, wird als Amyloidfibrillen abgelagert. Man denkt, dass diese Plaques zu der neuronalen Dysfunktion und Demenz führen, die FBD kennzeichnen.

Immunisierung mit A β

[0037] Das Immunsystem wird normalerweise eine Rolle beim Beseitigen von Fremdprotein und proteinösen Partikeln im Organismus spielen, jedoch bestehen die Ablagerungen, die mit den oben genannten Krankheiten assoziiert sind, hauptsächlich aus Selbst-Proteinen, wodurch die Rolle des Immunsystems bei der Kontrolle dieser Krankheiten weniger offensichtlich wird. Ferner sind die Ablagerungen in einem Kompartiment (dem ZNS) lokalisiert, das normalerweise vom Immunsystem getrennt ist. Dabei legen beide Tatsachen nahe, dass eine beliebige Impfung oder immunotherapeutische Vorgehensweise nicht erfolgreich wäre.

[0038] Nichtsdestotrotz haben Wissenschaftler kürzlich versucht, Mäuse mit einer Impfung zu immunisieren, die aus heterologem Human-A β und einer Substanz, von der bekannt war, dass sie das Immunsystem anregt, zusammengesetzt war (Schenk et al., 1999 und WO 99/27944). Der Impfstoff wurde in einem partiellen transgenen Mausmodell von AD mit einem in die DNA der Maus eingefügten mutierten menschlichen Gen für APP getestet. Die Mäuse produzierten das modifizierte APP-Protein und entwickelten mit zunehmendem Alter amyloide Plaques. Dieses Mausmodell wurde verwendet, um zu testen, ob eine Impfung gegen das modifizierte transgene Human-APP einen Effekt auf den Plaque-Aufbau aufwies. In einem ersten Experiment wurden einer Gruppe transgener Mäuse monatliche Injektionen des Impfstoffs verabreicht, die bei einem Alter von 6 Wochen begannen und bei 11 Monaten endeten. Eine zweite Gruppe transgener Mäuse empfing keine Injektionen und diente als eine Kontrollgruppe. Im Alter von 13 Monaten wiesen die Mäuse in der Kontrollgruppe Plaques auf, die 2 bis 6% ihrer Gehirne bedeckten. Im Gegensatz dazu wiesen die immunisierten Mäuse praktisch keine Plaques auf.

[0039] In einem zweiten Experiment begannen die Forscher die Injektionen bei 11 Monaten, als sich einige Plaques bereits entwickelt hatten. Über einen 7-monatigen Zeitraum wiesen die transgenen Kontrollmäuse eine 17-fache Zunahme der Menge an Plaques in ihren Gehirnen auf, während jene, die den Impfstoff empfingen, eine 99%ige Abnahme im Vergleich zu den 18 Monate alten transgenen Kontrollmäusen aufwiesen. In einigen Mäusen schienen einige der zuvor existierenden Plaqueablagerungen durch die Behandlung entfernt worden zu sein. Man fand außerdem, dass weiterer Plaque-assoziiierter Schaden wie beispielsweise Entzündung und anormale Nervenzellprozesse als Ergebnis der Immunisierung abnahmen.

[0040] Das obige ist folglich eine vorläufige Studie an Mäusen und Wissenschaftler müssen beispielsweise herausfinden, ob geimpfte Mäuse in anderer Hinsicht gesund bleiben und ob das Gedächtnis jener geimpften Mäuse normal bleibt. Außerdem werden, weil das Mausmodell AD nicht vollständig repräsentiert (die Tiere entwickeln keine neurofibrillären Plaques, und es sterben auch nicht viele ihrer Neuronen), zusätzliche Studien notwendig sein, um zu bestimmen, ob Menschen eine ähnliche Reaktion wie Mäuse oder eine von den Mäusen unterschiedliche Reaktion aufweisen. Eine andere in Erwägung zu ziehende Fragestellung ist, dass das Verfahren möglicherweise Amyloidablagerung "heilt", jedoch dabei versagt, die Entwicklung von Demenz zu stoppen.

[0041] Technische Probleme stellen außerdem grundsätzliche Herausforderungen dar. Beispielsweise ist es unwahrscheinlich, dass es unter Verwendung dieser Technologie überhaupt möglich ist, einen Impfstoff zu erzeugen, welcher Menschen ermöglicht, Antikörper gegen ihre eigenen Proteine zu erzeugen. Folglich werden zahlreiche Probleme in Sachen Sicherheit und Effektivität gelöst werden müssen, bevor irgendwelche Tests an Menschen in Erwägung gezogen werden können.

[0042] Die Arbeit von Schenk et al. zeigt folglich, dass, wenn es möglich wäre, eine starke Immunreaktion gegen Selbst-Proteine in proteinösen Ablagerungen im zentralen Nervensystem, wie beispielsweise den in AD gebildeten Plaques, zu erzeugen, es möglich ist, sowohl die Bildung der Ablagerungen zu verhindern und möglicherweise außerdem bereits gebildete Plaques zu beseitigen.

[0043] Vor kurzem wurden klinische Versuche unter Verwendung der oben diskutierten A β -Impfstoffe aufgrund nachteiliger Wirkungen beendet: eine Anzahl der geimpften Subjekte entwickelte chronische Enzephalitis, die durch eine unkontrollierte Autoimmunität gegen A β im ZNS bedingt sein kann.

AUFGABE DER ERFINDUNG

[0044] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist, neue Therapien gegen Zustände, die durch Amyloidablagerungen gekennzeichnet sind, wie z. B. AD, bereitzustellen. Eine weitere Aufgabe ist, eine Autovakzine bzw. einen Eigenimpfstoff gegen Amyloid zu entwickeln, um eine neue Behandlung für AD und für andere pathologische Störungen, die Amyloidablagerung involvieren, zu erhalten.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0045] Hierin beschrieben ist die Verwendung einer Autovakzinationstechnologie für das Erzeugen starker Immunreaktionen gegen ansonsten nicht-immunogenes APP und A β . Hierin beschrieben ist außerdem die Zubereitung solcher Impfstoffe zur Prävention, etwaigen Heilung oder Linderung der Symptome solcher Krankheiten, assoziiert mit Amyloidablagerungen.

[0046] Folglich betrifft die Erfindung in deren breitem und allgemeinstem Umfang die Verwendung eines Immunogens, das:

- a) eine Polyamino-säure ist, die die gesamte Tertiärstruktur von APP oder A β konserviert, so dass die Polyamino-säure in dem gleichen Ausmaß reagiert, wie es APP oder A β mit einem polyklonalen Serum tut, erzeugt gegen APP oder A β , und die in das gleiche Molekül mindestens ein fremdes T-Helfer-Epitop (T_H-Epitop) einschließt und die das mindestens eine fremde T_H-Epitop und eine unterbrochene APP- oder A β -Sequenz enthält, so dass die Polyamino-säure keine Subsequenz bzw. Teilsequenz von SEQ ID NO: 2 einschließt, die produktiv an MHC-Moleküle der Klasse II bindet, die eine T-Zell-Antwort initiieren; oder
- b) ein Konjugat ist, umfassend ein Polyhydroxypolymer-Rückgrat, an das separat eine Polyamino-säure, die wie in a) definiert ist, gekoppelt ist; oder
- c) ein Konjugat ist, umfassend ein Polyhydroxypolymer-Rückgrat, an das separat 1) das zumindest eine fremde T_H-Epitop und 2) eine unterbrochene Sequenz von APP oder A β , die wie in a) definiert ist, gekoppelt ist; oder
- d) eine Nucleinsäure ist, die die Polyamino-säure, die wie in a) definiert ist, codiert; oder
- e) ein nicht-pathogener/s Mikroorganismus oder Virus ist, der/das ein Nucleinsäurefragment trägt, das die Polyamino-säure, die wie in a) definiert ist, codiert und exprimiert,

bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, enthaltend das Immunogen für die Behandlung, Prävention bzw. Vorbeugung oder Linderung der Alzheimer-Krankheit oder anderer Krankheiten, die durch Amyloidablagerung gekennzeichnet sind.

[0047] Der vorliegende Anmelder hat zuvor eine Internationale Patentanmeldung eingereicht, die auf sichere Vakzinationsstrategien gegen amyloidogene Polypeptide wie z. B. APP und A β gerichtet ist, vgl. WO 01/62284. Diese Anmeldung enthält keine Details betreffend die oben genannten nützlichen Analoga von APP und A β .

[0048] Die Erfindung betrifft außerdem Analoga des APP und A β sowie Nucleinsäurefragmente, die eine Untergruppe von diesen codieren. Auch immunogene Zusammensetzungen, umfassend die Analoga oder die Nucleinsäurefragmente, sind Teil der Erfindung.

LEGENDE ZU DEN FIGUREN

[0049] Fig. 1: Schematische Darstellung von Autovac-Varianten, abgeleitet von dem Amyloidprecursorprotein mit dem Zweck, Antikörperreaktionen gegen das A β P-Protein A β -43 (oder C-100) zu erzeugen. Das APP ist schematisch am oberen Ende der Figur gezeigt und die verbleibenden schematischen Konstrukte zeigen, dass die Modellepitope P2 und P30 substituiert sind oder eingefügt sind in verschiedene Verkürzungen von APP. In der Figur zeigt das schwarze Muster die APP-Signalsequenz an, ist die Zickzackschraffur der extrazelluläre Teil von APP, ist die dunkle vertikale Schraffur die Transmembrandomäne von APP, ist die helle vertikale Schraffur die intrazelluläre Domäne von APP, zeigt die grobe Schrägschraffur das P30-Epitop an und zeigt die dünne Schrägschraffur das P2-Epitop an. Der Kasten mit vollständiger Linie zeigt A β -42/43 und der Kasten mit der vollständigen Linie und der Kasten mit der gepunkteten Linie zusammen zeigen C-100 an. "Abeta" bedeutet A β .

[0050] Fig. 2: Schematische Darstellung einer Ausführungsform der Synthese von allgemein anwendbaren immunogenen Konjugaten. Peptid A (eine beliebige Antigensequenz, z. B. eine A β -Sequenz, die hierin beschrieben ist) und Peptid B (eine Aminosäuresequenz, die ein fremdes T-Helfer-Epitop einschließt), werden synthetisiert und gemischt. Danach werden sie in Kontakt gebracht mit einem geeigneten aktivierten Polyhy-

droxypolymer, werden Peptide A und B über die Aktivierungsgruppe in einer Ration befestigt, die dem anfänglichen Verhältnis zwischen diesen zwei Substanzen in dem Peptidgemisch entspricht. Vgl. Beispiel 4 für Details.

DETAILLIERTE OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

Definitionen

[0051] Im Folgenden wird eine Anzahl von Ausdrücken, die in der vorliegenden Beschreibung und in den vorliegenden Ansprüchen verwendet werden, definiert und im Detail erklärt werden, um die Grenzen der Erfindung klar zu stellen.

[0052] Die Ausdrücke "Amyloid" und "Amyloidprotein", welche hierin austauschbar verwendet werden, bezeichnen eine Klasse proteinöser, unverzweigter Fibrillen unbestimmter Länge. Amyloidfibrillen zeigen eine charakteristische Färbung mit Kongo-Rot und teilen eine cross- β -Struktur, bei welcher die Polypeptidkette in β -Faltblättern organisiert ist. Amyloid stammt im Allgemeinen von amyloidogenen Proteinen, welche stark unterschiedliche Vorläuferstrukturen aufweisen, welche jedoch alle eine strukturelle Umwandlung zu einer fehlgefalteten Form durchlaufen können, die der Baustein des β -Faltblatt-Helix-Protofilaments ist. Normalerweise variiert der Durchmesser der Amyloidfibrillen zwischen etwa 70 und etwa 120 Å.

[0053] Der Ausdruck "amyloidogenes Protein" soll ein Polypeptid bezeichnen, welches an der Bildung von Amyloidablagerungen, entweder dadurch, dass es als solches Teil der Ablagerungen ist, oder dadurch, dass es Teil des biosynthetischen Wegs ist, der zur Bildung der Ablagerungen führt, beteiligt ist. Folglich sind Beispiele amyloidogener Proteine APP und A β , jedoch können auch Proteine, die am Stoffwechsel von diesen beteiligt sind, amyloidogene Proteine sein.

[0054] Ein "Amyloidpolypeptid" bzw. "amyloides Polypeptid" soll hierin Polypeptide bezeichnen, umfassend die Aminosäuresequenz der oben diskutierten amyloidogenen Proteine, abgeleitet von Menschen oder anderen Säugern (oder Verkürzungen davon, die eine wesentliche Menge an B-Zellepitopen mit einem intakten amyloidogenen Protein gemeinsam haben) – ein amyloidogenes Polypeptid kann deshalb z. B. wesentliche Teile eines Vorläufers für das amyloidogene Polypeptid umfassen (im Fall von A β könnte ein mögliches Amyloidpolypeptid APP-abgeleitet sein). Auch nicht-glycosylierte Formen amyloidogener Polypeptide, welche im prokaryotischen System hergestellt werden, sind innerhalb der Grenzen des Ausdrucks eingeschlossen, wie es auch Formen sind, die variierende Glycosylierungsmuster aufgrund der Verwendung von z. B. Hefen oder anderen eukaryotischen Nicht-Säuger-Expressionssystemen aufweisen. Es sollte jedoch angemerkt werden, dass, wenn der Ausdruck "ein amyloidogenes Polypeptid" verwendet wird, es beabsichtigt ist, dass das zur Debatte stehende Polypeptid normalerweise nicht-immunogen ist, wenn es dem zu behandelnden Tier präsentiert wird. In anderen Worten ist das amyloidogene Polypeptid ein Selbst-Protein bzw. Eigen-Protein oder ist ein Analogon eines solchen Selbst-Proteins, welches normalerweise keine Immunreaktion gegen das Amyloidogene des zur Debatte stehenden Tiers hervorrufen wird.

[0055] Ein "Analogon" ist ein von APP oder A β abgeleitetes Molekül, welches eine oder mehrere Änderungen in seiner Molekularstruktur einbezieht. Solch eine Änderung kann z. B. in der Form einer Fusion von APP- oder A β -Polyaminosäuren an einen geeigneten Fusionspartner sein (d. h. eine Änderung in der Primärstruktur, die exklusiv C- und/oder N-terminale Additionen an Aminosäureresten beinhaltet) und/oder sie kann in der Form von Insertionen und/oder Deletionen und/oder Substitutionen in der Aminosäuresequenz des Polypeptids sein. Auch von dem Ausdruck umfasst sind derivatisierte(s) APP- oder A β -abgeleitete Moleküle, vgl. die unten stehende Diskussion von Modifikationen von APP oder A β . In manchen Fällen kann das Analogon so konstruiert sein, dass es weniger in der Lage ist oder sogar unfähig ist, Antikörper gegen das normale Vorläuferprotein/die normalen Vorläuferproteine des Amyloids auszulesen, wodurch man unerwünschte Interferenz mit der (physiologisch normalen) nicht-aggregierten Form des Polypeptids, die ein Vorläufer des Amyloidproteins ist, vermeidet.

[0056] Es sollte angemerkt werden, dass man sich vorstellen kann, dass die Verwendung eines Xeno-Analogons (z. B. eines Hunde- oder Schweine-Analogons) eines menschlichen amyloidogenen Polypeptids als ein Impfstoff in einem Menschen die gewünschte Immunität gegen das amyloidogene Polypeptid produziert. Eine solche Verwendung eines Xeno-Analogons zur Immunisierung wird auch als Teil der Erfindung angesehen.

[0057] Der Ausdruck "Polypeptid" soll im vorliegenden Kontext sowohl kurze Peptide von 2 bis 10 Aminosäureresten, Oligopeptide von 11 bis 100 Aminosäureresten und Polypeptide von mehr als 100 Aminosäureresten bedeuten. Weiterhin soll der Ausdruck außerdem Proteine einschließen, d. h. funktionelle Biomoleküle, um-

fassend wenigstens ein Polypeptid; wenn sie wenigstens zwei Polypeptide umfassen, können diese Komplexe bilden, kovalent verknüpft sein, oder sie können nicht-kovalent verknüpft sein. Das Polypeptid/die Polypeptide in einem Protein kann/können glycosyliert sein und/oder mit Lipid versehen ("lipidated") sein und/oder prosthetische Gruppen umfassen. Außerdem ist der Ausdruck "Polyaminosäure" ein Äquivalent zu dem Ausdruck "Polypeptid".

[0058] Die Ausdrücke "T-Lymphozyt" und "T-Zelle" werden austauschbar für Lymphozyten mit Thymusursprung verwendet werden, welche verantwortlich sind für verschiedene zellvermittelte Immunreaktionen sowie für Helferaktivität bei der humoralen Immunantwort. Auf ähnliche Weise werden die Ausdrücke "B-Lymphozyt" und "B-Zelle" austauschbar für Antikörper-produzierende Lymphozyten verwendet werden.

[0059] Der Ausdruck "Untersequenz" bzw. "Subsequenz" bedeutet irgendeinen zusammenhängenden Abschnitt ("stretch") von wenigstens drei Aminosäuren oder, wenn zutreffend, von wenigstens drei Nucleotiden, direkt abgeleitet von einer natürlich vorkommenden Amyloidaminosäuresequenz bzw. -nucleinsäuresequenz.

[0060] Der Ausdruck "Tier" soll im vorliegenden Kontext im Allgemeinen eine Tierart (vorzugsweise Säugetierart) bezeichnen, wie beispielsweise Homo sapiens, Canis domesticus etc., und nicht nur ein einzelnes Tier. Jedoch bezeichnet der Ausdruck außerdem eine Population solch einer Tierart, da es wichtig ist, dass die Individuen, die gemäß dem Verfahren der Erfindung immunisiert sind, alle im Wesentlichen das gleiche APP oder A β beherbergen, was die Immunisierung der Tiere mit dem gleichen Immunogen/den gleichen Immunogenen erlaubt. Dem Fachmann wird klar sein, dass ein Tier im vorliegenden Kontext ein Lebewesen ist, welches ein Immunsystem aufweist. Es ist bevorzugt, dass das Tier ein Vertebrat, wie beispielsweise ein Säuger, ist.

[0061] Mit dem Ausdruck "in vivo-Herabregulierung von APP oder A β " ist hierin Reduktion der Gesamtmenge von abgelagertem Amyloidprotein (oder Amyloid als solchem) des relevanten Typs im lebenden Organismus gemeint. Die Herabregulation kann mittels verschiedener Mechanismen erhalten werden: Von diesen ist einfache Interferenz mit Amyloid durch Antikörper-Binden, um Fehlagggregation zu verhindern, die einfachste. Jedoch ist es auch innerhalb des Bereichs der vorliegenden Erfindung, dass das Antikörper-Binden im Entfernen von Amyloid durch Phagozyten ("scavenger cells") (wie beispielsweise Makrophagen und andere phagozytische Zellen) resultiert, und dass die Antikörper mit anderen amyloidogenen Polypeptiden, welche zur Amyloidbildung führen, interferieren. Eine weitere Möglichkeit ist, dass Antikörper A β außerhalb des ZNS binden und dadurch effektiv A β aus dem ZNS über ein einfaches Massenwirkungsprinzip entfernen.

[0062] Der Ausdruck "Präsentation ... gegenüber dem Immunsystem bewirken" soll bezeichnen, dass das Immunsystem des Tiers auf eine kontrollierte Weise einer immunogenen Herausforderung unterzogen wird. Wie aus der unten stehenden Offenbarung sichtbar wird, kann eine solche Herausforderung des Immunsystems auf eine Anzahl von Wegen bewirkt werden, von welchen die wichtigste Impfung mit Polypeptid-enthaltenden "Pharmakzinen" ("pharmaccines") (d. h. ein Impfstoff, welcher verabreicht wird, um eine laufende Krankheit zu behandeln oder zu lindern) oder Nucleinsäure-"Pharmakzine"-Impfung sind. Das wichtige zu erreichende Ergebnis ist, dass immunkompetente Zellen in dem Tier mit dem Antigen auf eine immunologisch wirksame Weise konfrontiert werden, wohingegen die präzise Art dieses Ergebnis zu erreichen von geringerer Wichtigkeit für die Erfindungsidee, die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegt, ist.

[0063] Der Ausdruck "immunogen wirksame Menge" hat seine gewöhnliche Bedeutung im Fachgebiet, d. h. eine Menge eines Immunogens, welche in der Lage ist, eine Immunreaktion zu induzieren, die wesentlich pathogene Mittel einsetzt, die immunologische Eigenschaften mit dem Immunogen gemeinsam haben.

[0064] Wenn der Ausdruck verwendet wird, dass das APP oder A β "modifiziert" worden ist, ist hierin gemeint, dass eine chemische Modifikation des Polypeptids an APP oder A β durchgeführt worden ist. Solch eine Modifikation kann z. B. Derivatisierung (z. B. Alkylierung) gewisser Aminosäurereste in der Sequenz sein, jedoch umfassen, wie von der unten stehenden Offenbarung erkannt werden wird, die bevorzugten Modifikationen Änderungen der Primärstruktur der Aminosäuresequenz.

[0065] Wenn "Autotoleranz gegenüber APP oder A β " diskutiert wird, versteht es sich, dass, weil das Polypeptid ein Selbst-Protein in der zu impfenden Population ist, normale Individuen in der Population keine Immunreaktion gegen das Polypeptid einrichten; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass gelegentlich Individuen einer Tierpopulation in der Lage sein könnten, Antikörper gegen das native Polypeptid, z. B. als Teil einer Autoimmunstörung, zu produzieren. Jedenfalls wird ein Tier normalerweise nur autotolerant gegenüber seinem eigenen APP oder A β sein, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Analoga, abgeleitet

von anderen Tierarten oder von einer Population, die einen unterschiedlichen Phänotyp aufweist, von dem Tier auch toleriert würden.

[0066] Ein "fremdes T-Zell-Epitop" (oder: "fremdes T-Lymphozyt-Epitop") ist ein Peptid, welches in der Lage ist, an ein MHC-Molekül zu binden, und welches T-Zellen in einer Tierart stimuliert. Bevorzugte fremde T-Zell-Epitope in der Erfindung sind "promiskuitive" Epitope, d. h. Epitope, welche an eine wesentliche Fraktion einer bestimmten Klasse von MHC-Molekülen in einer Tierart oder -population binden. Nur eine sehr begrenzte Anzahl solcher promiskuitiver T-Zell-Epitope sind bekannt, und sie werden im Detail unten diskutiert werden. Promiskuitive T-Zell-Epitope werden auch als "universelle" T-Zell-Epitope bezeichnet. Es sollte angemerkt werden, dass, damit die Immunogene, welche gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden, in einer so großen Fraktion einer Tierpopulation wie möglich wirksam sind, es notwendig sein kann 1) mehrere fremde T-Zell-Epitope in das gleiche Analogon zu insertieren oder 2) mehrere Analoga herzustellen, wobei jedes Analogon ein unterschiedliches promiskuitives Epitop eingefügt hat. Es sollte außerdem angemerkt werden, dass das Konzept fremder T-Zell-Epitope außerdem die Verwendung kryptischer T-Zell-Epitope, d. h. Epitope, welche von einem Selbst-Protein abgeleitet sind und welche nur immunogenes Verhalten ausüben, wenn sie in isolierter Form existieren ohne Teil des zur Debatte stehenden Selbst-Proteins zu sein, umfasst.

[0067] Ein "fremdes T-Helfer-Lymphozyt-Epitop" (ein fremdes T_H-Epitop) ist ein fremdes T-Zell-Epitop, welches ein MHC-Klasse II-Molekül bindet und auf der Oberfläche einer Antigen präsentierenden Zelle (APC), gebunden an das MHC-Klasse II-Molekül, präsentiert werden kann.

[0068] Ein "funktioneller Teil" eines (Bio)moleküls soll im vorliegenden Kontext den Teil des Moleküls bedeuten, welcher verantwortlich ist für wenigstens eine der biochemischen oder physiologischen Wirkungen, die von dem Molekül ausgeübt werden. Es ist im Fachgebiet gut bekannt, dass viele Enzyme und andere Effektormoleküle ein aktives Zentrum aufweisen, welches verantwortlich ist für die Effekte, die von dem zur Frage stehenden Molekül ausgeübt werden. Andere Teile des Moleküls können einem stabilisierenden oder Löslichkeits-fördernden Zweck dienen und können deshalb ausgelassen werden, wenn diese Zwecke im Kontext einer gewissen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung nicht von Relevanz sind. Beispielsweise ist es möglich, gewisse Cytokine als eine modifizierende Gruppierung bei APP oder A β zu verwenden (vgl. die detaillierte Diskussion unten), und in solch einem Fall kann das Stabilitätsproblem irrelevant sein, weil das Koppeln an das APP oder A β die notwendige Stabilität bereitstellen kann.

[0069] Der Ausdruck "Adjuvans" hat seine gewöhnliche Bedeutung im Fachgebiet von Impfstofftechnologie, d. h. eine Substanz oder eine Zusammensetzung, welche 1) nicht an sich fähig ist, eine spezifische Immunreaktion gegen das Immunogen des Impfstoffs einzurichten, welche jedoch 2) nichtsdestotrotz fähig ist, die Immunreaktion gegen das Immunogen zu verstärken. Oder, in anderen Worten, liefert eine Impfung mit dem Adjuvans alleine keine Immunreaktion gegen das Immunogen, kann Impfung mit dem Immunogen eine Immunreaktion gegen das Immunogen hervorrufen oder nicht, jedoch induziert die kombinierte Impfung mit Immunogen und Adjuvans eine Immunreaktion gegen das Immunogen, welche stärker als die ist, die von dem Immunogen alleine induziert wird.

[0070] "Targetieren" bzw. "Targeting" eines Moleküls soll im vorliegenden Zusammenhang die Situation bezeichnen, wo ein Molekül beim Einführen in das Tier bevorzugt in einem gewissen Gewebe/in gewissen Geweben auftreten wird oder bevorzugt mit gewissen Zellen oder Zellarten assoziiert sein wird. Der Effekt kann auf eine Anzahl von Wegen, einschließlich der Formulierung des Moleküls in einer Zusammensetzung, die das Targetieren ermöglicht, oder durch Einführen von Gruppen in das Molekül, welche das Targetieren ermöglichen, erreicht werden. Diese Themen werden im Detail unten diskutiert werden.

[0071] "Stimulation des Immunsystems" bedeutet, dass eine Substanz oder Zusammensetzung einen allgemeinen, nicht-spezifischen immunstimulatorischen Effekt aufweist. Eine Anzahl von Adjuvanzen und mutmaßlichen Adjuvanzen (wie z. B. gewisse Cytokine) haben die Fähigkeit gemeinsam, das Immunsystem zu stimulieren. Das Ergebnis des Verwendens eines immunstimulierenden Mittels ist eine gesteigerte "Aufmerksamkeit" des Immunsystems, was bedeutet, dass gleichzeitige oder nachfolgende Immunisierung mit einem Immunogen eine signifikant effektivere Immunreaktion, verglichen mit der isolierten Verwendung des Immunogens, induziert.

[0072] "Produktives Binden" bedeutet Binden eines Peptids an das MHC-Molekül (Klasse I oder II), um in der Lage zu sein, T-Zellen zu stimulieren, die eine Zelle in Anspruch nehmen, die das an das MHC-Molekül gebundene Peptid präsentiert. Beispielsweise sagt man, dass ein an ein MHC-Klasse II-Molekül auf der Oberfläche

einer APC gebundenes Peptid produktiv gebunden ist, wenn diese APC eine T_H-Zelle stimulieren wird, die an den präsentierten Peptid-MHC-Klasse II-Komplex bindet.

Bevorzugte Ausführungsformen von Amyloid-Herabregulierung

[0073] Das in der erfindungsgemäßen Verwendung als ein Immunogen verwendete Analogon ist ein modifiziertes APP- oder A β -Molekül, wobei wenigstens eine Änderung in der Aminosäuresequenz des APP oder A β vorhanden ist, weil die Chancen, das überaus wichtige Brechen bzw. der Abbau von Autotoleranz auf diese Weise stark erleichtert wird – dies ist z. B. aus den Ergebnissen, die hierin in Vergleichsbeispiel 2 dargestellt sind, ersichtlich, wo Immunisierung mit Wildtyp A β mit Immunisierung mit einem varianten A β -Molekül verglichen wird. Es ist gezeigt worden (in Dalum I. et al., 1996, J. Immunol. 157: 4796–4804), dass potenziell selbst-reaktive B-Lymphozyten, die Selbst-Proteine erkennen, in normalen Individuen physiologisch vorhanden sind. Jedoch ist Unterstützung von Cytokin-produzierenden T-Helfer-Lymphozyten (T_H-Zellen oder T_H-Lymphozyten) erforderlich, damit diese B-Lymphozyten induziert werden, tatsächlich Antikörper zu produzieren, die mit den relevanten Selbst-Proteinen reaktiv sind. Normalerweise wird diese Hilfe nicht bereitgestellt, weil T-Lymphozyten im Allgemeinen keine T-Zell-Epitope erkennen, die von Selbst-Proteinen abgeleitet sind, wenn sie von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) präsentiert werden. Jedoch werden durch Bereitstellen eines Elements an "Fremdheit" in einem Selbstprotein (d. h. durch Einführen einer immunologisch signifikanten Modifikation) T-Zellen, die das fremde Element erkennen, beim Erkennen des fremden Epitops auf einer APC (wie z. B. ursprünglich einer mononukleären Zelle) aktiviert. Polyklonale B-Lymphozyten (welche auch APCs sind), die in der Lage sind, Selbst-Epitope auf dem modifizierten Selbst-Protein zu erkennen, internalisieren außerdem das Antigen und präsentieren nachfolgend das fremde T-Zell-Epitop/die fremden T-Zell-Epitope davon, und die aktivierten T-Lymphozyten liefern nachfolgend Cytokin-Hilfe für diese selbst-reaktiven polyklonalen B-Lymphozyten. Da die Antikörper, die von diesen polyklonalen B-Lymphozyten produziert werden, reaktiv mit unterschiedlichen Epitopen auf dem modifizierten Polypeptid, einschließlich jener, welche auch in dem nativen Polypeptid vorhanden sind, sind, wird ein Antikörper induziert, der kreuz-reaktiv mit dem nicht-modifizierten Selbst-Protein ist. Als Schlussfolgerung können die T-Lymphozyten dazu gebracht werden, sich so zu verhalten, wie wenn die Population polyklonaler B-Lymphozyten ein gänzlich fremdes Antigen erkannt haben, wohingegen tatsächlich nur das eingeführte Epitop/die eingeführten Epitope für den Wirt fremd ist/sind. Auf diese Weise werden Antikörper induziert, die fähig sind, mit den nicht-modifizierten Selbst-Antigenen kreuz-zu-reagieren.

[0074] Im Fachgebiet sind mehrere Wege bekannt, ein Peptid-Selbst-Antigen zu modifizieren, um Abbau bzw. das Brechen von Autotoleranz zu erhalten. Nichtsdestotrotz ist bevorzugt, dass das erfindungsgemäße Analogon beinhaltet, dass

- wenigstens eine erste Gruppierung eingeführt ist, welche Targeting des modifizierten Moleküls zu einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) bewirkt, und/oder
- wenigstens eine zweite Gruppierung eingeführt ist, welche das Immunsystem stimuliert, und/oder
- wenigstens eine dritte Gruppierung eingeführt ist, welche die Präsentation des Analogons gegenüber dem Immunsystem optimiert.

[0075] Jedoch sollten all diese Modifikationen durchgeführt werden, während eine wesentliche Fraktion der ursprünglichen B-Lymphozyten-Epitope in dem APP oder A β aufrechterhalten werden, weil die B-Lymphozyten-Erkennung des nativen Moleküls dadurch verstärkt wird.

[0076] In einer bevorzugten Ausführungsform sind Seitengruppen (in der Form fremder T-Zell-Epitope oder der oben erwähnten ersten, zweiten und dritten Gruppierungen) kovalent oder nicht-kovalent eingeführt. Dies soll bedeuten, dass Abschnitte von Aminosäureresten, die abgeleitet sind von dem APP oder A β , derivatisiert sind, ohne die primäre Aminosäuresequenz zu verändern oder wenigstens ohne Änderungen in den Peptidbindungen zwischen den einzelnen Aminosäuren in der Kette einzuführen.

[0077] Eine alternative und bevorzugte Ausführungsform verwendet Aminosäuresubstitution und/oder -deletion und/oder -insertion und/oder -addition (welche durch rekombinante Mittel bewirkt werden kann oder durch Mittel von Peptidsynthese; Modifikationen, welche längere Aminosäureabschnitte involvieren, können Fusionspolypeptide zur Folge haben). Eine besonders bevorzugte Version dieser Ausführungsform ist die in WO 95/05849 beschriebene Technik, welche ein Verfahren für das Herabregulieren von Selbst-Proteinen durch Immunisieren mit Analoga der Selbst-Proteine offenbart, wobei eine Anzahl von Aminosäuresequenz(en) substituiert worden ist mit einer entsprechenden Anzahl von Aminosäuresequenz(en), welche jeweils ein fremdes immundominantes T-Zell-Epitop umfassen, während zur gleichen Zeit die Gesamttertiärstruktur des Selbst-Proteins in dem Analogon aufrechterhalten wird. Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung ist es jedoch

ausreichend, wenn die Modifikation (sei es eine Insertion, Addition, Deletion oder Substitution) ein fremdes T-Zell-Epitop bewirkt und zur gleichen Zeit eine wesentliche Anzahl der B-Zell-Epitope in dem APP oder A β aufrechterhält. Jedoch ist es, um maximale Wirksamkeit der induzierten Immunreaktion zu erhalten, bevorzugt, dass die Gesamttertiärstruktur des APP oder A β in dem modifizierten Molekül beibehalten wird.

[0078] In manchen Fällen ist es bevorzugt, dass das APP oder A β oder Fragmente davon mutiert sind. Insbesondere bevorzugt sind Substitutionsvarianten, wo das Methionin in Position 35 in A β -43 substituiert worden ist, vorzugsweise mit Leucin oder Isoleucin, oder einfach deletiert ist. Insbesondere bevorzugte Analoga enthalten ein einzelnes Methionin, das im C-Terminus lokalisiert ist, entweder weil es in dem amyloidogenen Polypeptid oder fremden T_H-Epitop natürlich auftritt, oder weil es insertiert oder addiert worden ist. Folglich ist außerdem bevorzugt, dass der Teil des Analogons, der das fremde T_H-Epitop beinhaltet, mit Ausnahme der möglichen C-terminalen Lage eines Methionins, frei von Methionin ist.

[0079] Der Hauptgrund für das Entfernen aller Methionine bis auf eines ist, dass es möglich wird, multimere Analoga rekombinant herzustellen, die nachfolgend mit Cyanogenbromid gespalten werden können, um die einzelnen Analoga zurückzulassen. Der Vorteil ist, dass rekombinante Produktion auf diese Weise erleichtert wird.

[0080] Tatsächlich ist es im Allgemeinen bevorzugt, dass alle Analoga von APP oder A β , die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden, die charakteristische Eigenschaft gemeinsam haben, dass sie nur ein einzelnes Methionin beinhalten, das als die C-terminale Aminosäure in dem Analogon positioniert ist, und dass andere Methionine entweder in dem amyloidogenen Polypeptid oder dem fremden T_H-Epitop deletiert sind oder mit anderen Aminosäuren substituiert sind.

[0081] Eine weitere interessante Mutation ist eine Deletion oder Substitution des Phenylalanins in Position 19 in A β -43, und es ist insbesondere bevorzugt, dass die Mutation eine Substitution dieses Phenylalaninrestes mit einem Prolin ist.

[0082] Andere interessante bei den Analoga zu verwendende Polyaminosäuren sind trunkierte bzw. verkürzte Teile des A β -43-Proteins. Diese können außerdem in immunogenen Analoga gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden. Insbesondere bevorzugt sind die Trunkierungen A β (1–42), A β (1–40), A β (1–39), A β (1–35), A β (1–34), A β (1–34), A β (1–28), A β (1–12), A β (1–5), A β (13–28), A β (13–35), A β (17–28), A β (25–35), A β (35–40), A β (36–42) und A β (35–42) (wobei die Zahlen in den Klammern die Aminosäureabschnitte von A β -43 anzeigen, die das relevante Fragment darstellen – A β (35–40) ist z. B. identisch mit Aminosäuren 706–711 in SEQ ID NO: 2). All diese Varianten mit trunkierten Teilen von A β -43 können mit den hierin beschriebenen A β -Fragmenten, insbesondere mit Varianten 9, 10, 11, 12 und 13, erwähnt in Beispiel 1, gemacht werden.

[0083] Die folgende Formel beschreibt die generell von der Erfindung abgedeckten molekularen Konstrukte:

$$(\text{MOD}_1)_{s1}(\text{Amyloid}_{e1})_{n1}(\text{MOD}_2)_{s2}(\text{Amyloid}_{e2})_{n2} \dots (\text{MOD}_x)_{sx}(\text{Amyloid}_{ex})_{nx} \quad (\text{I})$$

– wobei Amyloid_{e1}-Amyloid_{ex} × B-Zellepitope sind, die Teilsequenzen von APP oder A β enthalten, welche unabhängig voneinander identisch oder nicht-identisch sind, und welche fremde Seitengruppen enthalten können oder nicht, x eine ganze Zahl ≥ 3 ist, n₁–n_x × ganze Zahlen ≥ 0 sind (wenigstens eines ist ≥ 1), MOD₁–MOD_x × Modifikationen sind, eingeführt zwischen den konservierten B-Zell-Epitopen, und s₁–s_x × ganze Zahlen ≥ 0 sind (wenigstens eines ist ≥ 1 , wenn in den Amyloid_{ex}-Sequenzen keine Seitengruppen eingeführt sind). Folglich erlaubt, angesichts der allgemeinen funktionellen Zwänge der Immunogenität der Konstrukte, die Erfindung alle Arten von Permutationen der ursprünglichen Sequenz des APP oder A β , und alle Arten von Modifikationen darin. Folglich sind in der Erfindung modifiziertes APP oder A β , erhalten durch Weglassen von Teilen der Sequenz, welche z. B. nachteilige Effekte in vivo aufweisen, oder Weglassen von Teilen, welche normalerweise intrazellulär sind und folglich unerwünschte immunologische Reaktionen hervorrufen könnten, eingeschlossen.

[0084] Eine bevorzugte Version der oben umrissenen Konstrukte sind, wenn anwendbar, jene, bei denen die T-Zell-Epitop-enthaltende Untersequenz eines Amyloidproteins nicht im Vorläuferpolypeptid, von welchem das Amyloid abgeleitet ist, extrazellulär exponiert ist. Durch Vornehmen einer solchen Auswahl der Epitope wird sichergestellt, dass keine Antikörper erzeugt werden, welche mit den Zellen reaktiv wären, die den Vorläufer produzieren, und dadurch wird die Immunreaktion, welche erzeugt wird, auf eine Immunreaktion gegen die unerwünschten Amyloidablagerungen limitiert. In diesem Fall wird es z. B. möglich sein, Immunität gegen

Epitope von APP oder A β zu induzieren, welche nur der extrazellulären Phase gegenüber exponiert sind, wenn sie frei von jeglichem Koppeln an die Zellen, von welchen sie produziert werden, sind.

[0085] Das Aufrechterhalten eines wesentlichen Anteils von B-Zell-Epitopen oder sogar der Gesamttertiärstruktur eines Proteins, welches wie hierin beschrieben einer Modifikation unterzogen wird, kann auf verschiedene Weisen erreicht werden. Eine ist, einfach ein polyklonales Antiserum herzustellen, das gegen das zur Frage stehende Polypeptid gerichtet ist (z. B. ein Antiserum, hergestellt in einem Kaninchen), und dieses Antiserum danach als ein Testreagens (z. B. in einem kompetitiven ELISA) gegen die modifizierten Proteine, welche hergestellt werden, zu verwenden. Modifizierte Versionen (Analoge), welche in dem gleichen Ausmaß mit dem Antiserum reagieren, wie dies APP oder A β tun, müssen erachtet werden als solche, die die gleiche Gesamttertiärstruktur wie APP oder A β aufweisen, wohingegen Analoga, die eine begrenzte (jedoch nach wie vor signifikante und spezifische) Reaktivität mit solch einem Antiserum aufweisen als solche angesehen werden, die eine wesentliche Fraktion der ursprünglichen B-Zell-Epitope beibehalten haben.

[0086] Alternativ kann eine Auswahl monoklonaler Antikörper, reaktiv mit bestimmten Epitopen auf dem APP oder A β , hergestellt werden und als ein Testformat verwendet werden. Diese Herangehensweise hat den Vorteil, dass sie 1) eine Epitopkartierung des APP oder A β erlaubt und 2) ein Kartieren der Epitope erlaubt, welche in den hergestellten Analoga beibehalten sind.

[0087] Natürlich wäre eine dritte Herangehensweise, die dreidimensionale Struktur des APP oder A β oder einer biologisch aktiven Trunkierung davon (vgl. oben) aufzulösen und diese mit der aufgelösten dreidimensionalen Struktur des hergestellten Analogons zu vergleichen. Dreidimensionale Struktur kann mit Hilfe von Röntgenstrahlenbeugungsstudien und NMR-Spektroskopie aufgelöst werden. Weitere Information betreffend die Tertiärstruktur kann in gewissem Ausmaß aus Zirkulardichroismus-Studien erhalten werden, welche den Vorteil haben, dass sie lediglich das Polypeptid in reiner Form erfordern (wohingegen Röntgenstrahlenbeugung die Bereitstellung von kristallisiertem Polypeptid erfordert und NMR die Bereitstellung von Isotopen-Varianten des Polypeptids erfordert), um nützliche Informationen über die Tertiärstruktur eines gegebenen Moleküls zu liefern. Jedoch sind letztendlich Röntgenstrahlenbeugung und/oder NMR notwendig, um schlüssige Daten zu erhalten, weil Zirkulardichroismus nur indirekte Hinweise einer korrekten dreidimensionalen Struktur über Informationen der Sekundärstrukturelemente liefern kann.

[0088] Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung verwendet mehrfache Präsentationen von B-Lymphozyt-Epitopen von APP oder A β (d. h. Formel I, wobei wenigstens ein B-Zell-Epitop in zwei Positionen vorhanden ist). Dieser Effekt kann auf verschiedene Weisen erreicht werden, z. B. durch das einfache Herstellen von Fusionspolypeptiden, umfassend die Struktur (APP- oder A β -abgeleitetes Polypeptid)_m, wobei m eine ganze Zahl ≥ 2 ist, und das nachfolgende Einführen der hierin diskutierten Modifikationen in wenigstens eine der APP- oder A β -Sequenzen. Es ist bevorzugt, dass die eingeführten Modifikationen wenigstens eine Duplikation eines B-Lymphozyt-Epitops und/oder die Einführung eines Haptens einschließen. Diese Ausführungsformen einschließlich Mehrfachpräsentationen ausgewählter Epitope, sind insbesondere in Situationen bevorzugt, wo nur kleine Teile des APP oder A β als Bestandteile in einem Impfstoff-Mittel verwendbar sind.

[0089] Wie oben erwähnt, kann das Einführen eines fremden T-Zell-Epitops durch Einführen wenigstens einer Aminosäureinsertion, -addition, -deletion oder -substitution erreicht werden. Natürlich wird die normale Situation das Einführen von mehr als einer Änderung in der Aminosäuresequenz sein (z. B. Insertion eines vollständigen T-Zell-Epitops oder Substitution durch ein vollständiges T-Zell-Epitop), jedoch ist das wichtige zu erreichende Ziel, dass das Analogon, wenn es von einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) prozessiert wird, solch ein fremdes immundominantes T-Zell-Epitop erzeugen wird, das im Zusammenhang eines MCH-Klasse II-Moleküls auf der Oberfläche der APC präsentiert wird. Folglich kann, wenn die Aminosäuresequenz des APP oder A β in geeigneten Positionen eine Anzahl von Aminosäureresten umfasst, welche auch in einem fremden T_H-Epitop gefunden werden können, das Einführen eines fremden T_H-Epitops dann auch erreicht werden, indem man die verbleibenden Aminosäuren des fremden Epitops durch die Hilfe von Aminosäureinsertion, -addition, -deletion und -substitution bereitstellt. In anderen Worten ist es nicht notwendig, ein vollständiges T_H-Epitop mittels Insertion oder Substitution einzuführen, um den Zweck der vorliegenden Erfindung zu erfüllen.

[0090] Es ist bevorzugt, dass die Anzahl an Aminosäureinsertionen, -deletionen, -substitutionen oder -additionen wenigstens 2, wie beispielsweise 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 und 25 Insertionen, Substitutionen, Additionen oder Deletionen, ist. Es ist weiterhin bevorzugt, dass die Anzahl an Aminosäureinsertionen, -substitutionen, -additionen oder -deletionen nicht über 150 liegt, wie beispielsweise höchstens 100, höchstens 90, höchstens 80 und höchstens 70. Es ist insbesondere bevorzugt, dass die Anzahl an Substitutionen, Insertionen, Deletionen oder Additionen 60 nicht übersteigt, und insbesondere sollte

die Anzahl 50 oder sogar 40 nicht überschreiten. Am stärksten bevorzugt ist eine Anzahl von nicht mehr als 30. Hinsichtlich der Aminosäureadditionen sollte angemerkt werden, dass diese, wenn das resultierende Konstrukt in der Form eines Fusionspolypeptids ist, oft erheblich höher als 150 ist.

[0091] Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung schließen Modifikation durch Einführen wenigstens eines fremden immundominanten T-Zell-Epitops ein. Es wird verstanden werden, dass die Frage der Immundominanz eines T-Zell-Epitops von der zur Frage stehenden Tierart abhängt. Wie hierin verwendet, bezieht sich der Ausdruck "Immundominanz" einfach auf Epitope, welche in dem geimpften Individuum/der geimpften Population eine signifikante Immunreaktion herbeiführen, jedoch ist es auch eine gut bekannte Tatsache, dass ein T-Zell-Epitop, welches in einem Individuum/einer Population immundominant ist, nicht notwendigerweise in einem anderen Individuum der gleichen Art immundominant ist, obwohl es in der Lage sein kann, MHC-II-Moleküle in letzterem Individuum zu binden. Folglich ist für die Zwecke der vorliegenden Erfindung ein immundominantes T-Zell-Epitop ein T-Zell-Epitop, welches beim Bereitstellen von T-Zell-Hilfe wirksam sein wird, wenn es in einem Antigen vorhanden ist. Typischerweise haben immundominante T-Zell-Epitope als eine inhärente Eigenschaft, dass sie nahezu immer gebunden an ein MHC-Klasse II-Molekül präsentiert werden, unabhängig von dem Polypeptid, in dem sie auftreten.

[0092] Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Frage der MHC-Restriktion von T-Zell-Epitopen. Im Allgemeinen sind natürlich vorkommende T-Zell-Epitope MHC-beschränkt, d. h., gewisse Peptide, die ein T-Zell-Epitop darstellen, werden nur an eine Untergruppe von MHC-Klasse II-Molekülen effektiv binden. Dies hat wiederum den Effekt, dass in den meisten Fällen die Verwendung eines spezifischen T-Zell-Epitops in einer Impfstoff-Komponente resultieren wird, welche nur in einem Teil der Population wirksam ist, und abhängig von der Größe dieser Fraktion kann es notwendig sein, mehr T-Zell-Epitope in dem gleichen Molekül einzuschließen, oder alternativ einen Multi-Komponenten-Impfstoff herzustellen, wobei die Komponenten Varianten von APP oder Aß sind, welche sich voneinander durch die Art des eingeführten T-Zell-Epitops unterscheiden.

[0093] Wenn die MHC-Restriktion der verwendeten T-Zellen vollständig unbekannt ist (beispielsweise in einer Situation, wo das geimpfte Tier eine schlecht definierte MHC-Zusammensetzung aufweist), kann der Bruchteil der von einer speziellen Impfstoffzusammensetzung abgedeckten Population mittels der folgenden Formel bestimmt werden:

$$f_{\text{population}} = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - p_i) \quad (\text{II})$$

– wobei p_i die Häufigkeit von Ansprechenden ("responders") auf das i-te fremde T-Zell-Epitop, das in der Impfstoffzusammensetzung vorhanden ist, ist, und n die Gesamtzahl fremder T-Zell-Epitope in der Impfstoffzusammensetzung ist. Folglich würde eine Impfstoffzusammensetzung, die drei fremde T-Zell-Epitope enthält, die Ansprechhäufigkeiten in der Population von 0,8, 0,7 bzw. 0,6 aufweisen, ergeben:

$$1 - 0,2 \times 0,3 \times 0,4 = 0,976$$

– d. h. 97,6% der Population werden statistisch eine MHC-II-vermittelte Reaktion auf den Impfstoff einrichten.

[0094] Die obige Formel trifft nicht auf Situationen zu, wo ein mehr oder weniger präzises MHC-Restriktionsmuster der verwendeten Peptide bekannt ist. Wenn beispielsweise ein gewisses Peptid nur die von HLA-DR-Allelen DR1, DR3, DR5 und DR7 codierten menschlichen MHC-II-Moleküle bindet, dann wird die Verwendung dieses Peptids zusammen mit einem weiteren Peptid, welches die verbleibenden MHC-II-Moleküle, codiert von HLA-DR-Allelen bindet, eine 100%ige Abdeckung in der zur Debatte stehenden Population erreichen. Ähnlich wird, wenn das zweite Peptid nur DR3 und DR5 bindet, die Addition dieses Peptids die Abdeckung überhaupt nicht erhöhen. Wenn man die Berechnung der Populationsreaktion rein auf MHC-Restriktion von T-Zell-Epitopen in dem Impfstoff basiert, kann der Bruchteil der Population, der von einer spezifischen Impfstoffzusammensetzung abgedeckt ist, mittels der folgenden Formel bestimmt werden:

$$f_{\text{population}} = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - \varphi_j)^2 \quad (\text{III})$$

– wobei φ_j die Summe der Häufigkeiten in der Population von Allel-Haplotypen, codierend MHC-Moleküle, ist, welche irgendeines der T-Zell-Epitope in dem Impfstoff binden und welche zu dem j-ten der drei bekannten HLA-Loci (DP, DR und DQ) gehören; in der Praxis wird zuerst bestimmt, welche MHC-Moleküle jedes T-Zell-Epitop in dem Impfstoff erkennen werden, und danach werden diese nach Typ (DP, DR und DQ) aufgelistet – dann werden die einzelnen Häufigkeiten der unterschiedlichen aufgelisteten Allel-Haplotypen für jeden Typ summiert, wodurch $\varphi_1, \varphi_2, \varphi_3$ erhalten werden.

[0095] Es kann vorkommen, dass der Wert p_i in Formel II den entsprechenden theoretischen Wert p_i übertrifft:

$$\pi_i = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - \nu_j)^2 \quad (\text{IV})$$

– wobei ν_j die Summe von Häufigkeiten in der Population des Allel-Haplotyps, codierend MHC-Moleküle, welche das i-te T-Zell-Epitop in dem Impfstoff binden, und welche zu dem j-ten der drei bekannten HLA-Loci (DP, DR und DQ) gehören, ist. Dies bedeutet, dass in $1 - p_i$ der Population eine Häufigkeit von Ansprechenden von $f_{\text{residual}_i} = (p_i - p_i)/(1 - p_i)$ besteht. Deshalb kann Formel III angepasst werden, um Formel V zu ergeben:

$$f_{\text{population}} = 1 - \prod_{j=1}^3 (1 - \varphi_j)^2 + \left(1 - \prod_{i=1}^n (1 - f_{\text{residual}_i}) \right) \quad (\text{V})$$

– wobei der Ausdruck $1 - \varphi_{\text{residual}_i}$ auf Null gesetzt wird, falls er negativ ist. Es sollte angemerkt werden, dass Formel V erfordert, dass alle Epitope gegen identische Sätze an Haplotypen Haplotypen-kartiert worden sind.

[0096] Folglich ist es, wenn man in das Analogon einzuführende T-Zell-Epitope auswählt, wichtig, das gesamte Wissen über die Epitope, welches verfügbar ist, einzuschließen: 1) Die Häufigkeit von Ansprechenden in der Population für jedes Epitop, 2) MHC-Restriktions-Daten und 3) die Häufigkeit in der Population der relevanten Haplotypen.

[0097] Es gibt eine Anzahl natürlich vorkommender "promiskuitiver" T-Zell-Epitope, welche in einem großen Anteil von Individuen einer Tierart oder einer Tierpopulation aktiv sind, und diese werden vorzugsweise in den Impfstoff eingeführt, wodurch das Bedürfnis für eine sehr große Anzahl unterschiedlicher Analoga in dem gleichen Impfstoff reduziert wird. Das promiskuitive Epitop kann erfindungsgemäß ein natürlich vorkommendes menschliches T-Zell-Epitop sein, wie beispielsweise Epitope von Tetanustoxoid (z. B. die P2- und P30-Epitope), Diphtherietoxoid, Influenzavirus Hämagglutinin (HA) und P. falciparum-CS-Antigen.

[0098] Im Lauf der Jahre sind eine Anzahl anderer promiskuitiver T-Zell-Epitope identifiziert worden. Insbesondere Peptide, die fähig sind, einen großen Anteil von HLA-DR-Molekülen, codiert von den unterschiedlichen HLA-DR-Allelen, zu binden, sind identifiziert worden und diese sind alle mögliche T-Zell-Epitope, einzuführen in die Analoga, die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Vergleiche außerdem die Epitope, die in den folgenden Referenzen diskutiert werden: WO 98/23635 (Frazer I. H. et al., der University of Queensland zugeschrieben); Southwood S. et al., J. Immunol. 160: 3363–3373; Sinigaglia F. et al., 1988, Nature 336: 778–780; Chicz R. M. et al., 1993, J. Exp. Med. 178: 27–47; Hammer J. et al., 1993, Cell 74: 197–203; und Falk K. et al., 1994, Immunogenetics 39: 230–242. Die letztere Referenz beschäftigt sich auch mit HLA-DQ- und -DP-Liganden. Alle in diesen fünf Referenzen aufgelisteten Epitope sind als natürliche Epitop-Kandidaten zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung relevant, wie es auch Epitope sind, welche gemeinsame Motive mit diesen teilen.

[0099] Alternativ kann das Epitop irgendein künstliches T-Zell-Epitop sein, welches in der Lage ist, einen großen Anteil von MHC-Klasse II-Molekülen zu binden. In diesem Kontext sind die "pan DR-Epitop-Peptide" ("PAD-RE"), beschrieben in WO 95/07707 und in dem entsprechenden Dokumenten Alexander J. et al., 1994, Immunity 1: 751–761, interessante Kandidaten für Epitope zur erfindungsgemäßen Verwendung. Es sollte angemerkt werden, dass die effektivsten PADRE-Peptide, die in diesen Dokumenten offenbart sind, D-Aminosäuren in den C- und N-Termini tragen, um die Stabilität bei der Verabreichung zu verbessern. Jedoch zielt die vorliegende Erfindung vorwiegend darauf ab, die relevanten Epitope als Teil des Analogons zu inkorporieren, welches dann nachfolgend innerhalb des lysosomalen Kompartiments von APCs enzymatisch abgebaut werden sollte, um eine nachfolgende Präsentation im Kontext eines MHC-II-Moleküls zu erlauben, und deshalb ist es nicht angebracht, D-Aminosäuren in die in der vorliegenden Erfindung verwendeten Epitope zu inkorporieren.

[0100] Ein besonders bevorzugtes PADRE-Peptid ist eines, das die Aminosäuresequenz AKFVAAWTLKAAA (SEQ ID NO: 17) oder eine immunologisch effektive Untersequenz davon aufweist. Dieses und andere Epitope, die das gleiche Fehlen an MHC-Restriktion aufweisen, sind bevorzugte T-Zell-Epitope, welche in den Analoga, die in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden, vorhanden sein sollten. Solche super-promis-kuitiven Epitope werden die einfachsten Ausführungsformen der Erfindung erlauben, wobei nur ein einzelnes Analogon gegenüber dem Immunsystem eines geimpften Tiers präsentiert wird.

[0101] Wie oben erwähnt, kann die Modifikation des APP oder A β auch das Einführen einer ersten Gruppierung einschließen, welche das modifizierte amyloidogene Polypeptid zu einer APC oder zu einem B-Lymphozyt targetiert. Beispielsweise kann die erste Gruppierung ein spezifischer Bindungspartner für ein B-Lymphozyten-spezifisches Oberflächenantigen oder für ein APC-spezifisches Oberflächenantigen sein. Im Fachgebiet sind viele solche spezifischen Oberflächenantigene bekannt. Beispielsweise kann die Gruppierung ein Kohlenhydrat, für das es einen Rezeptor auf dem B-Lymphozyt oder der APC gibt, sein (z. B. Mannan oder Manno-se). Alternativ kann die zweite Gruppierung ein Hapten sein. Auch ein Antikörperfragment, welches ein Oberflächenmolekül auf APCs oder Lymphozyten spezifisch erkennt, kann als eine erste Gruppierung verwendet werden (das Oberflächenmolekül kann z. B. ein FC γ -Rezeptor von Makrophagen und Monozyten sein, wie z. B. FC γ RI, oder, alternativ, irgendein anderer spezifischer Oberflächenmarker, wie beispielsweise CD40 oder CTLA-4). Es sollte angemerkt werden, dass all diese exemplarischen Targeting-Moleküle auch als Teil eines Adjuvans verwendet werden können, vgl. unten.

[0102] Als eine Alternative oder Ergänzung für das Targeting des Analogons zu einem gewissen Zelltyp, um eine verstärkte Immunreaktion zu erreichen, ist es möglich, den Grad des Ansprechens des Immunsystems zu erhöhen, indem die oben genannte zweite Gruppierung eingeschlossen wird, welche das Immunsystem stimuliert. Typische Beispiele solcher zweiten Gruppierungen sind Cytokine und Hitzeschockproteine oder molekulare Chaperone, sowie effektive Teile davon.

[0103] Geeignete Cytokine zur erfindungsgemäßen Verwendung sind jene, welche normalerweise auch als Adjuvantien in einer Impfstoffzusammensetzung dienen werden, d. h. beispielsweise Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-13 (IL-13), Interleukin-15 (IL-15) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) ; alternativ kann der funktionelle Teil des Cytokinmoleküls als die zweite Gruppierung ausreichen. Hinsichtlich der Verwendung solcher Cytokine als Adjuvans-Substanzen, vgl. die unten stehende Diskussion.

[0104] Gemäß der Erfindung können geeignete als die zweite Gruppierung verwendete Hitzeschockproteine oder molekulare Chaperone HSP70, HSP90, HSC70, GRP94 (auch als gp96 bekannt, vgl. Wearsch P. A. et al., 1998, Biochemistry 37: 5709–19) und CRT (Calreticulin) sein.

[0105] Alternativ kann die zweite Gruppierung ein Toxin, wie z. B. Listeriolysin (LLO), Lipid A und hitzelabiles Enterotoxin sein. Auch eine Anzahl mycobakterieller Derivate, wie z. B. MDP (Muramyl-dipeptid), CFA (vollständiges Freund'sches Adjuvans) und die Trehalosediester TDM und TDE, sind interessante Möglichkeiten.

[0106] Auch die Möglichkeit des Einführens einer dritten Gruppierung, welche die Präsentation des Analogons gegenüber dem Immunsystem verstärkt, ist eine wichtige Ausführungsform der Erfindung. Das Fachgebiet hat mehrere Beispiele dieses Prinzips gezeigt. Beispielsweise ist es bekannt, dass der Palmitoyl-Lipidierungsanker in dem *Borrelia burgdorferi*-Protein OspA verwendet werden kann, um selbst-adjuvierende Polypeptide bereitzustellen (vgl. z. B. WO 96/40718) – es scheint, dass die lipidierten Proteine Mizellen-ähnliche Strukturen mit einem Kern, bestehend aus den Lipidierungsankerteilen der Polypeptide, und wobei die verbleibenden Teile des Moleküls daraus hervorragen, ausbilden, was in Mehrfachpräsentationen der antigenen Determinanten resultiert. Folglich sind die Verwendung dieser und verwandter Vorgehensweisen unter Verwendung unterschiedlicher Lipidierungsanker bzw. Lipidanker (z. B. einer Myristylgruppe, einer Myristylgruppe, einer Farnesylgruppe, einer Geranyl-Geranyl-Gruppe, eines GPI-Ankers und einer N-Acyldiglyceridgruppe) bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung, insbesondere da die Bereitstellung solch eines Lipidankers in einem rekombinant hergestellten Protein relativ einfach ist und lediglich die Verwendung z. B. einer natürlich vorkommenden Signalsequenz als Fusionspartner für das Analogon erfordert. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung des C3d-Fragments von Komplementfaktor C3 oder C3 selbst (vgl. Dempsey et al., 1996, Science 271, 348–350 und Lou & Kohler, 1998, Nature Biotechnology 16, 458–462).

[0107] Eine alternative Ausführungsform der Erfindung, welche auch in der bevorzugten Präsentation multipler (z. B. von wenigstens zwei) Kopien der wichtigen Epitop-Regionen von APP oder A β gegenüber dem Immunsystem resultiert, ist das kovalente Koppeln des Analogons an gewisse Moleküle, d. h. Varianten d und

e, die oben erwähnt sind. Beispielsweise können Polymere verwendet werden, z. B. Kohlenhydrate wie z. B. Dextran, vgl. z. B. Lees A. et al., 1994, Vaccine 12: 1160–1166; Lees A. et al., 1990, J. Immunol. 145: 3594–3600, jedoch sind auch Mannose und Mannan verwendbare Alternativen. Integrale Membranproteine von z. B. E. coli und anderen Bakterien sind auch nützliche Konjugationspartner. Die traditionellen Trägermoleküle wie beispielsweise keyhole limpet-Hämocyanin (KLH), Tetanustoxoid, Diphtherietoxoid und Rinderserumalbumin (BSA) sind auch bevorzugte und nützliche Konjugationspartner.

[0108] Bevorzugte Ausführungsformen des kovalenten Koppelns des APP- oder A β -abgeleiteten Materials an Polyhydroxypolymere wie z. B. Kohlenhydrate beinhalten die Verwendung wenigstens eines APP- oder A β -abgeleiteten Peptids und wenigstens eines fremden T-Helfer-Epitops, welche separat an das Polyhydroxypolymer gekoppelt sind (d. h. das fremde T-Helfer-Epitop und die APP- oder A β -abgeleitete Aminosäuresequenz werden nicht aneinander fusioniert, sondern stattdessen an das Polyhydroxypolymer gebunden, welches dann als Trägerrückgrat dient). Wiederum ist solch eine Ausführungsform am stärksten bevorzugt, wenn die geeigneten B-Zell-Epitop-tragenden Regionen der APP- oder A β -abgeleiteten Peptide von kurzen Peptidabschnitten gebildet werden – deswegen, weil diese Herangehensweise eine sehr bequeme Weise ist, um multiple Präsentationen ausgewählter Epitope in dem resultierenden immunogenen Mittel zu erreichen. Es ist jedoch auch möglich, Analoga, die hierin bereits beschrieben sind, einfach an das Polyhydroxypolymerrückgrat zu koppeln, d. h., dass das APP- oder A β -abgeleitete Material nicht separat von den fremden T_H-Epitopen an dem Rückgrat befestigt wird.

[0109] Es ist insbesondere bevorzugt, dass das Koppeln des fremden T-Helfer-Epitops und des APP- oder A β -abgeleiteten (Poly)peptids mittels einer Amidbindung ist, welche von einer Peptidase gespalten werden kann. Diese Strategie hat den Effekt, dass APCs in der Lage sein werden, das Konjugat aufzunehmen und zur gleichen Zeit in der Lage sein werden, das Konjugat zu prozessieren und nachfolgend das fremde T-Zell-Epitop in einem MHC-Klasse II-Kontext zu präsentieren.

[0110] Eine Weise, das Koppeln von Peptiden (sowohl des APP- oder A β -abgeleiteten Peptids von Interesse, sowie des fremden Epitops) zu erreichen, ist, ein geeignetes Polyhydroxypolymer mit Tresyl(Trifluorethylsulfonyl)-Gruppen oder anderen geeigneten Aktivierungsgruppen, wie z. B. Maleimido, p-Nitrophenylchlorformiat (für Aktivierung von OH-Gruppen und Bildung einer Peptidbindung zwischen Peptid und Polyhydroxypolymer) und Tosyl (p-Toluolsulfonyl) zu aktivieren. Es ist z. B. möglich, aktivierte Polysaccharide wie in WO 00/05316 und US 5,874,469 beschrieben herzustellen und diese an APP- oder A β -abgeleitete Peptide oder -Polyamino-säuren sowie an T-Zell-Epitope, hergestellt mittels konventioneller Fest- oder Flüssigphasenpeptidsynthese-Techniken, zu koppeln. Das resultierende Produkt besteht aus einem Polyhydroxypolymerrückgrat (z. B. einem Dextranrückgrat), das, daran mittels ihrer N-Termini oder mittels anderer verfügbarer Stickstoffgruppierungen befestigt, Polyamino-säuren aufweist, die abgeleitet sind von APP oder A β und von fremden T-Zell-Epitopen. Wenn gewünscht, ist es möglich, die APP- oder A β -Peptide zu synthetisieren, um alle verfügbaren Amino-gruppen bis auf die eine am N-Terminus zu schützen, nachfolgend die resultierenden geschützten Peptide an die tresylierte Dextran-gruppierung zu koppeln und schließlich das resultierende Konjugat zu entschützen. Ein spezifisches Beispiel dieser Vorgehensweise ist in den Beispielen unten beschrieben.

[0111] Anstelle der Verwendung der wasserlöslichen Polysaccharid-Moleküle wie in WO 00/05316 und US 5,874,469 gelehrt, ist es gleichermaßen möglich, quervernetzte Polysaccharid-Moleküle einzusetzen, dadurch ein partikuläres Konjugat zwischen Polypeptiden und Polysaccharid zu erhalten – man glaubt, dass dies zu einer verbesserten Präsentation der Polypeptide gegenüber dem Immunsystem führt, weil zwei Ziele erreicht werden, nämlich das Erhalten eines lokalen Ablagerungseffekts, wenn das Konjugat injiziert wird, und das Erhalten von Partikeln, welche attraktive Ziele für APCs sind. Die Herangehensweise des Verwendens solcher partikulärer Systeme ist auch in den Beispielen detailliert.

[0112] Überlegungen, die den ausgewählten Gebieten des Einführens von Modifikationen in APP oder A β zugrundeliegen, sind a) Präservation bzw. Erhalt bekannter und vorhergesagter B-Zell-Epitope, b) Präservation bzw. Erhalt von Tertiärstruktur, c) Vermeiden von B-Zell-Epitopen, die auf "Produziererzellen" vorhanden sind, etc. Auf jeden Fall ist es, wie oben diskutiert, relativ einfach, einen Satz von Analoga zu durchmustern, welche alle der Einführung eines T-Zell-Epitops an unterschiedlichen Stellen unterzogen worden sind.

[0113] Weil die am stärksten bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung die Herabregulierung von menschlichem A β einbeziehen, ist es konsequenterweise bevorzugt, dass das oben diskutierte APP- oder A β -Polypeptid ein menschliches A β -Polypeptid ist. In dieser Ausführungsform ist es insbesondere bevorzugt, dass das APP- oder A β -Polypeptid durch Substituieren wenigstens einer Aminosäuresequenz in SEQ ID NO: 2 mit wenigstens einer Aminosäuresequenz gleicher oder unterschiedlicher Länge und enthaltend ein

fremdes T_H-Epitop modifiziert worden ist. Beispiele von modifiziertem amyloidogenen APP und Aβ sind schematisch in **Fig. 1** unter Verwendung der P2- und P30-Epitope als Beispiele gezeigt. Die Überlegung hinter solchen Konstrukten ist im Detail in den Beispielen diskutiert.

[0114] Spezifischer kann eine T_H-enthaltende (oder vervollständigende) Aminosäuresequenz, welche in SEQ ID NO: 2 eingeführt wird, an einer beliebigen Aminosäure in SEQ ID NO: 2 eingeführt werden. Das heißt, das Einführen ist möglich nach einer beliebigen der Aminosäuren 1–770, jedoch vorzuziehen nach einer der Aminosäuren 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713 und 714 in SEQ ID NO: 2. Dies kann kombiniert werden mit Deletion beliebiger oder aller Aminosäuren 1–671 oder beliebiger aller Aminosäuren 715–770. Weiterhin kann, wenn die Technik der Substitution eingesetzt wird, jede beliebige der Aminosäuren 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713 und 714 in SEQ ID NO: 2 in Kombination mit der Einführung deletiert werden.

[0115] Gemäß der Erfindung enthalten die Analoga keine Untersequenz von SEQ ID NO: 2, die produktiv an MHC-Klasse II-Moleküle bindet, die eine T-Zell-Reaktion initiieren.

[0116] Die Überlegung hinter solch einer Strategie für das Design des Immunogens, das das Immunsystem dazu bringt, z. B. eine Anti-Aβ-Immunreaktion zu induzieren, ist die folgende: Es ist angemerkt worden, dass, wenn mit reichlich vorhandenen autologen Proteinen, wie z. B. Aβ, formuliert in einem Adjuvans, welches ausreichend stark ist, die Toleranz des Körpers gegenüber dem autologen Protein zu brechen, immunisiert wird, die Gefahr besteht, dass in manchen geimpften Individuen die induzierte Immunreaktion nicht einfach durch das Unterbrechen der Immunisierung unterbrochen werden kann. Dies ist, weil die induzierte Immunreaktion in solchen Individuen höchstwahrscheinlich von einem nativen T_H-Epitop des autologen Proteins angetrieben wird, und dies hat den nachteiligen Effekt, dass das eigene Protein des geimpften Individuums in der Lage sein wird, als ein immunisierendes Mittel eigenständig zu funktionieren: Folglich ist ein Autoimmunzustand etabliert worden.

[0117] Nach bestem Wissen der Erfinder wurde nie beobachtet, dass die Verwendung fremder T_H-Epitope diesen Effekt produziert, weil die Anti-Eigenimmunreaktion von einem fremden T_H-Epitop angetrieben wird, und von den Erfindern ist wiederholt demonstriert worden, dass die induzierte Immunreaktion, hervorgerufen durch bevorzugte Technologie, tatsächlich nach Absetzen der Immunisierungen abnimmt. Jedoch könnte es theoretisch in ein paar Individuen tatsächlich passieren, dass die Immunreaktion auch von einem autologen T_H-Epitop des relevanten Selbst-Proteins, gegen das man immunisiert, angetrieben wird) – dies ist insbesondere relevant, wenn man Eigenproteine in Erwägung zieht, die relativ reichlich vorhanden sind, wie z. B. Aβ, wohingegen andere therapeutisch relevante Eigenproteine nur lokal oder in so geringen Mengen in dem Körper vorhanden sind, dass ein "Selbst-Immunisierungseffekt" keine Möglichkeit darstellt. Eine sehr einfache Weise dies zu vermeiden ist folglich, das Einschließen von Peptidsequenzen in dem Immunogen gänzlich zu vermeiden, die als T_H-Epitope dienen könnten (und weil Peptide kürzer als etwa 9 Aminosäuren nicht als T_H-Epitope dienen können, ist die Verwendung kürzerer Fragmente eine einfache und durchführbare Vorgehensweise). Deshalb dient diese Ausführungsform der Erfindung auch dazu sicherzustellen, dass das Immunogen keine Peptidsequenzen des Ziel-APP oder -Aβ einschließt, die als "selbst-stimulierende T_H-Epitope" dienen könnten, einschließlich Sequenzen, die lediglich konservative Substitutionen in einer Sequenz des Zielproteins enthalten, die ansonsten als ein T_H-Epitop funktionieren könnten.

[0118] Bevorzugte Ausführungsformen der Immunsystempräsentation der Analoga des APP oder Aβ beinhalten die Verwendung eines chimären Peptids, umfassend wenigstens ein APP- oder Aβ-abgeleitetes Peptid, welches nicht produktiv an MHC-Klasse II-Moleküle bindet, und wenigstens ein fremdes T-Helfer-Epitop. Es ist besonders vorteilhaft, wenn das immunogene Analogon eines ist, bei welchem die Aminosäuresequenzen, umfassend ein oder mehrere B-Zell-Epitope, entweder als kontinuierliche Sequenz oder als eine Sequenz, die Inserts einschließt, dargestellt sind, wobei die Inserts fremde T-Helfer-Epitope umfassen.

[0119] Wiederum ist solch eine Ausführungsform am stärksten bevorzugt, wenn die geeigneten B-Zell-Epitop-tragenden Regionen des APP oder Aβ von kurzen Peptidabschnitten gebildet werden, die in keiner Weise in der Lage wären, produktiv an MHC-Klasse II-Moleküle zu binden. Das ausgewählte B-Zell-Epitop oder die ausgewählten B-Zell-Epitope des amyloidogenen Polypeptids sollten deshalb wenigstens neun aufeinanderfolgende Aminosäuren von SEQ ID NO: 2 umfassen. Kürzere Peptide sind bevorzugt, wie jene, die wenigstens

8, 7, 6, 5, 4 oder 3 aufeinanderfolgende Aminosäuren der Aminosäuresequenz des amyloidogenen Polypeptids aufweisen.

[0120] Es ist bevorzugt, dass das Analogon wenigstens eine Untersequenz von SEQ ID NO: 2 umfasst, so dass jede wenigstens eine Untersequenz unabhängig aus Aminosäureabschnitten von dem APP oder A β , ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus neun aufeinanderfolgenden Aminosäuren, acht aufeinanderfolgenden Aminosäuren, sieben aufeinanderfolgenden Aminosäuren, sechs aufeinanderfolgenden Aminosäuren, fünf aufeinanderfolgenden Aminosäuren, vier aufeinanderfolgenden Aminosäuren und drei aufeinanderfolgenden Aminosäuren besteht.

[0121] Es ist insbesondere bevorzugt, dass die aufeinanderfolgenden Aminosäuren an einem Aminosäurerest, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Rest 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713 und 714 von SEQ ID NO: 2, beginnt.

Protein-/Peptidimpfung; Formulierung und Verabreichung der Analoga

[0122] Wenn die Präsentation des amyloidogenen Polypeptids oder des modifizierten amyloidogenen Polypeptids gegenüber dem Immunsystem eines Tiers mittels dessen Verabreichung an das Tier bewirkt wird, folgt die Formulierung des Polypeptids den allgemein im Fachgebiet anerkannten Prinzipien.

[0123] Die Zubereitung von Impfstoffen, welche Peptidsequenzen als aktive Bestandteile enthalten, wird im Allgemeinen im Fachgebiet gut verstanden, wie durch US-Patente 4,608,251; 4,601,903; 4,599,231; 4,599,230; 4,596,792; und 4,578,770 exemplifiziert. Typischerweise werden solche Impfstoffe als Injektionsmittel, entweder als flüssige Lösungen oder Suspensionen hergestellt; auch feste Formen, geeignet zur Lösung in oder Suspension in einer Flüssigkeit vor der Verabreichung können zubereitet werden. Die Zubereitung kann auch emulgiert werden. Der aktive immunogene Bestandteil wird oft mit Exzipienzien vermischt, welche pharmazeutisch annehmbar und kompatibel mit dem aktiven Bestandteil sind. Geeignete Exzipienzien sind beispielsweise Wasser, Salzlösung, Dextrose, Glycerin, Ethanol oder dergleichen, und Kombinationen davon. Zusätzlich kann der Impfstoff, falls erwünscht, geringe Mengen von Hilfsstoffen, wie beispielsweise Benetzungsmitteln oder Emulgatoren, pH-Puffer-Mitteln, oder Adjuvantien, welche die Effektivität der Impfstoffe steigern, enthalten; vgl. die detaillierte Diskussion von Adjuvantien unten.

[0124] Die Impfstoffe werden konventionell parenteral, mittels Injektion, beispielsweise entweder subkutan, intrakutan, intradermal, subdermal oder intramuskulär, verabreicht. Zusätzliche Formulierungen, welche für andere Arten der Verabreichung geeignet sind, schließen Suppositorien und in manchen Fällen orale, bukkale, sublinguale, intraperitoneale, intravaginale, anale, epidurale, spinale und intrakranielle Formulierungen ein. Suppositorien können traditionelle Binder und Träger beispielsweise Polyalkylenglykole oder Triglyceride einschließen. Solche Suppositorien können aus Gemischen geformt werden, die den aktiven Bestandteil im Bereich von 0,5% bis 10%, vorzugsweise 1 bis 2%, enthalten. Orale Formulierungen schließen derartige normalerweise eingesetzte Exzipienzien ein, wie beispielsweise pharmazeutische Grade von Mannit, Lactose, Stärke, Magnesiumstearat, Natriumsaccharin, Cellulose, Magnesiumcarbonat und dergleichen. Diese Zusammensetzungen nehmen die Form von Lösungen, Suspensionen, Tabletten, Pillen, Kapseln, Formulierungen mit verzögerter Freigabe oder Pulvern ein und enthalten 10 bis 95% des aktiven Bestandteils, vorzugsweise 25 bis 70%. Für orale Formulierungen ist Cholera-toxin ein interessanter Formulierungspartner (und außerdem ein möglicher Konjugationspartner).

[0125] Die Polypeptide können in den Impfstoff als neutrale oder Salzformen formuliert werden. Pharmazeutisch annehmbare Salze schließen Säureadditionssalze (gebildet mit den freien Aminogruppen des Peptids) und welche mit anorganischen Säuren, wie beispielsweise Salz- oder Phosphorsäuren, oder derartigen organischen Säuren, wie Essigsäure, Oxalsäure, Weinsäure, Mandelsäure und dergleichen, gebildet sind, ein. Salze, gebildet mit freien Carboxylgruppen, können außerdem abgeleitet sein von anorganischen Basen, wie beispielsweise Natrium-, Kalium-, Ammonium-, Calcium- oder Eisen(III)-hydroxiden, und solchen organischen Basen, wie Isopropylamin, Trimethylamin, 2-Ethylaminoethanol, Histidin, Procain und dergleichen.

[0126] Die Impfstoffe werden auf mit der Dosierungsformulierung kompatible Weise und in einer solchen Menge, wie sie therapeutisch wirksam und immunogen sein wird, verabreicht. Die zu verabreichende Menge hängt von dem zu behandelnden Subjekt ab, einschließlich z. B. der Kapazität des Immunsystems des Individuums, eine Immunreaktion aufzustellen, und dem gewünschten Grad an Schutz. Geeignete Dosierungsbereiche sind in der Größenordnung von mehreren 100 μ g aktiver Bestandteil pro Impfung mit einem bevorzugten Bereich

von etwa 0,1 µg bis 2.000 µg (obwohl höhere Mengen im Bereich von 1–10 mg erwägt werden), wie beispielsweise in dem Bereich von etwa 0,5 µg bis 1.000 µg, vorzugsweise im Bereich von 1 µg bis 500 µg und insbesondere im Bereich von etwa 10 µg bis 100 µg. Geeignete Schemata zur anfänglichen Verabreichung und für Booster-Einspritzungen sind auch variabel, jedoch werden sie durch eine anfängliche Verabreichung, gefolgt von nachfolgenden Impfungen oder anderen Verabreichungen typifiziert.

[0127] Die Verabreichungsweise kann breit variiert werden. Beliebige der konventionellen Verfahren zur Verabreichung eines Impfstoffs sind anwendbar. Diese schließen orale Verabreichung auf einer festen physiologisch annehmbaren Basis oder in einer physiologisch annehmbaren Dispersion, parenteral, durch Injektion oder dergleichen, ein. Die Dosierung des Impfstoffs wird von der Verabreichungsrouten abhängen und wird gemäß dem Alter der zu impfenden Person und der Formulierung des Antigens variieren.

[0128] Einige der Polypeptide des Impfstoffs sind in einem Impfstoff hinreichend immunogen, aber für manche der anderen wird die Immunreaktion verstärkt sein, wenn der Impfstoff ferner eine Adjuvans-Substanz umfasst.

[0129] Verschiedene Verfahren zum Erreichen eines Adjuvans-Effekts des Impfstoffs sind bekannt. Allgemeine Prinzipien und Verfahren sind detailliert in "The Theory and Practical Application of Adjuvants", 1995, Duncan E. S. Stewart-Tull (Herausg.), John Wiley & Sons Ltd., ISBN 0-471-95170-6, und außerdem in "Vaccines: New Generation Immunological Adjuvants", 1995, Gregoriadis G. et al. (Herausg.), Plenum Press, New York, ISBN 0-306-45283-9, beschrieben.

[0130] Es ist insbesondere bevorzugt, ein Adjuvans zu verwenden, von welchem gezeigt werden kann, dass es das Brechen der Autotoleranz gegenüber Autoantigenen erleichtert bzw. ermöglicht; tatsächlich ist dies essentiell in Fällen, wo unmodifiziertes amyloidogenes Polypeptid als der aktive Bestandteil in der Autoimpfung verwendet wird. Nicht beschränkende Beispiele geeigneter Adjuvanzen sind ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Immun-Targeting-Adjuvans, einem immun-modulierenden Adjuvans, wie beispielsweise einem Toxin, einem Cytokin und einem mycobakteriellen Derivat; einer Ölformulierung; einem Polymer; einem Micellen-bildenden Adjuvans; einem Saponin; einer immunstimulierenden Komplex-Matrix (ISCOM-Matrix); einem Partikel; DDA; Aluminiumadjuvanzen; DNA-Adjuvanzen; γ -Inulin; und einem Verkapselungsadjuvans. Im Allgemeinen sollte angemerkt werden, dass die obigen Offenbarungen, welche sich auf Verbindungen und Mittel beziehen, die in den Analoga als erste, zweite und dritte Gruppierungen verwendbar sind, sich außerdem mutatis mutandis auf ihre Verwendung in dem Adjuvans eines erfindungsgemäßen Impfstoffs beziehen.

[0131] Die Applikation von Adjuvanzen beinhaltet die Verwendung von Mitteln wie beispielsweise Aluminiumhydroxid oder -phosphat (Alaun), gewöhnlich als 0,05 bis 0,1%ige Lösung in gepufferter Salzlösung verwendet, Vermischen mit synthetischen Polymeren von Zuckern (z. B. Carbopol®), verwendet als 0,25%ige Lösung, Aggregation des Proteins in dem Impfstoff durch Hitzebehandlung mit Temperaturen im Bereich von 70° bis 101°C in Zeiträumen von 30 Sekunden bis 2 Minuten entsprechend, und auch Aggregation mittels Quervernetzungsmitteln sind möglich. Aggregation durch Reaktivierung mit Pepsin-behandelten Antikörpern (Fab-Fragmenten) gegen Albumin, Mischung mit bakteriellen Zellen, wie beispielsweise *C. parvum*, oder Endotoxinen oder Lipopolysaccharidbestandteilen Gramnegativer Bakterien, Emulsion in physiologisch annehmbaren Ölhikeln, wie beispielsweise Mannidmonooleat (Aracel A) oder Emulsion mit einer 20%igen Lösung eines Perfluorkohlenstoffs (Fluosol-DA), verwendet als ein Blutersatz ("block substitute"), können auch eingesetzt werden. Auch das Vermischen mit Ölen, wie beispielsweise Squalen und IFA, ist bevorzugt.

[0132] Gemäß der Erfindung ist DDA (Dimethyldioctadecylammoniumbromid) ein interessanter Kandidat für ein Adjuvans, wie es auch DNA und γ -Inulin ist, jedoch sind außerdem Freund'sches vollständiges und unvollständiges Adjuvans sowie quillaja-Saponine, wie z. B. QuilA und QS21, interessant, sowie es auch RIBI ist. Weitere Möglichkeiten sind Monophosphoryl-Lipid A (MPL), die oben genannten C3 und C3d und Muramyldipeptid (MDP).

[0133] Liposomenformulierungen sind auch dafür bekannt, Adjuvans-Effekte zu verleihen, und deshalb sind Liposomenadjuvanzen gemäß der Erfindung bevorzugt.

[0134] Auch Adjuvanzen vom immunstimulierenden Komplex-Matrix-Typ (ISCOM®-Matrix) sind bevorzugte Auswahlen gemäß der Erfindung, insbesondere weil es gezeigt worden ist, dass diese Art Adjuvanzen in der Lage ist, MHC Klasse II-Expression durch APCs heraufzuregulieren. Eine ISCOM®-Matrix besteht aus (gegebenenfalls fraktionierten) Saponinen (Triterpenoiden) von Quillaja saponaria, Cholesterin und Phospholipid. Wenn vermischt mit dem immunogenen Protein, ist die resultierende partikuläre Formulierung, was als ein ISCOM-Partikel bekannt ist, wobei das Saponin 60–70% Gew./Gew., das Cholesterin und Phospholipid 10–

15% Gew./Gew., und das Protein 10–15% Gew./Gew. darstellen. Details betreffend die Zusammensetzung und Verwendung immunstimulierender Komplexe können z. B. in den oben genannten Lehrbüchern gefunden werden, die sich mit Adjuvantien befassen, jedoch liefern auch Morein B. et al., 1995, Clin. Immunother. 3: 461–475 sowie Barr I. G. und Mitchell G. F., 1996, Immunol. And Cell Biol. 74: 8–25 nützliche Instruktionen zur Herstellung kompletter immunstimulierender Komplexe.

[0135] Eine andere hoch interessante (und folglich bevorzugte) Möglichkeit, einen Adjuvans-Effekt zu erzielen, ist es, die in Gosselin et al., 1992 beschriebene Technik einzusetzen. Kurz erwähnt kann die Präsentation eines relevanten Antigens, wie z. B. eines Antigens der vorliegenden Erfindung, durch Konjugieren des Antigens an Antikörper (oder Antigen-bindende Antikörperfragmente) gegen die Fcγ-Rezeptoren auf Monozyten/Makrophagen verstärkt werden. Insbesondere ist gezeigt worden, dass Konjugate zwischen Antigen und Anti-FcγRI Immunogenität für die Zwecke einer Impfung verstärken.

[0136] Andere Möglichkeiten betreffen die Verwendung der Targeting- und Immunmodulationssubstanzen (u. a. Cytokine), die oben als Kandidaten für die ersten und zweiten Gruppierungen bei den modifizierten Versionen amyloidogener Polypeptide erwähnt wurden. In diesem Zusammenhang sind auch synthetische Inducer von Cytokinen, wie Poly-I:C, Möglichkeiten.

[0137] Geeignete mycobakterielle Derivate sind ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Muramyl-dipeptid, vollständigem Freund'schen Adjuvans, RIBI und ein Trehalose-Diester, wie z. B. TDM und TDE.

[0138] Geeignete Immuntargetingadjuvantien sind ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus CD40-Ligand und CD40-Antikörpern oder spezifisch bindenden Fragmenten davon (vgl. die obige Diskussion), Mannose, einem Fab-Fragment und CTLA-4.

[0139] Geeignete Polymeradjuvantien sind ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Kohlenhydrat, wie z. B. Dextran, PEG, Stärke, Mannan und Mannose; z. B. einem Kunststoffpolymer; und Latex, wie z. B. Latexkügelchen.

[0140] Eine noch weitere interessante Weise, eine Immunreaktion zu modulieren, ist es, das Immunogen (gegebenenfalls zusammen mit Adjuvantien und pharmazeutisch annehmbaren Trägern und Vehikeln) in einen "virtuellen Lymphknoten" (VLN, "virtual lymph node") einzuschließen (ein von ImmunoTherapy, Inc., 360 Lexington Avenue, New York, NY 10017-6501 entwickeltes geschütztes medizinisches Gerät). Der VLN (ein dünnes röhrenförmiges Gerät) ahmt die Struktur und Funktion eines Lymphknotens nach. Das Einfügen eines VLN unter die Haut erzeugt eine Stelle steriler Entzündung mit einer Aufwallung von Cytokinen und Chemokinen. T- und B-Zellen sowie APCs reagieren rasch auf die Gefahrensignale, richten sich auf die entzündete Stelle und akkumulieren innerhalb der porösen Matrix des VLN. Es ist gezeigt worden, dass die notwendige Antigendosis, erforderlich, eine Immunreaktion gegen ein Antigen aufzustellen, reduziert ist, wenn der VLN verwendet wird, und dass Immunschutz, verliehen durch Impfung unter Verwendung eines VLN, konventionelle Immunisierung unter Verwendung von Ribi als Adjuvans übertraf. Die Technologie ist u. a. kurz in Gelber C. et al., 1998, "Elicitation of Robust Cellular and Humoral Immune Responses to Small Amounts of Immunogens Using a Novel Medical Device Designated the Virtual Lymph Node", in: "From the Laboratory to the Clinic, Book of Abstracts, October 12th–15th 1998, Seascape Resort, Aptos, California" beschrieben.

[0141] In vielen Fällen ist gezeigt worden, dass Mikropartikelformulierung von Impfstoffen die Immunogenität von Proteinantigenen erhöht, und folglich ist dies eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung. Mikropartikel werden entweder als Co-Formulierungen von Antigen mit einem Polymer, einem Lipid, einem Kohlenhydrat oder anderen Molekülen, geeignet zur Herstellung der Partikel, hergestellt, oder die Mikropartikel können homogene Partikel sein, die nur aus dem Antigen selbst bestehen.

[0142] Beispiele Polymer-basierter Mikropartikel sind PLGA- und PVP-basierte Partikel (R. K. Gupta et al. 1998), wobei das Polymer und das Antigen in ein festes Partikel kondensiert sind. Lipid-basierte Partikel können als Micellen des Lipids (sogenannte Liposomen) hergestellt werden, die das Antigen innerhalb der Micelle einfangen (P. J. Pietrobon 1995). Kohlenhydrat-basierte Partikel werden typischerweise aus einem geeigneten abbaubaren Kohlenhydrat wie z. B. Stärke oder Chitosan hergestellt. Das Kohlenhydrat und das Antigen werden in einem Verfahren vermischt und in Partikel kondensiert, das ähnlich dem für Polymerpartikel verwendeten ist (H. S. Kas et al. 1997).

[0143] Partikel, die nur aus dem Antigen bestehen, können durch verschiedene Sprüh- und Gefriertrocknungstechniken hergestellt werden. Insbesondere geeignet für die Zwecke der vorliegenden Erfindung ist die super-

kritische Flüssigkeitstechnologie, die verwendet wird, um sehr gleichmäßige Partikel kontrollierter Größe herzustellen (P. York 1999 & B. Shekunov et al. 1999).

[0144] Es wird erwartet, dass der Impfstoff 1- bis 6-mal pro Jahr an ein Individuum, das dessen Bedarf, wie beispielsweise 1-, 2-, 3-, 4-, 5- oder 6-mal im Jahr, verabreicht werden sollte. Es ist zuvor gezeigt worden, dass die durch die Verwendung der bevorzugten Autovakzinen gemäß der Erfindung induzierte Gedächtnisimmunität nicht permanent ist, und deshalb muss das Immunsystem periodisch mit dem amyloidogenen Polypeptid oder den modifizierten amyloidogenen Polypeptiden herausgefordert werden.

[0145] Aufgrund genetischer Variation können unterschiedliche Individuen mit Immunreaktionen variierender Stärke auf das gleiche Polypeptid reagieren. Deshalb kann der erfindungsgemäße Impfstoff verschiedene unterschiedliche Polypeptide umfassen, um die Immunreaktion zu erhöhen, vgl. auch die oben stehende Diskussion betreffend die Auswahl fremder T-Zell-Epitop-Einführungen. Der Impfstoff kann zwei oder mehrere Polypeptide umfassen, wobei alle Polypeptide wie oben definiert sind.

[0146] Der Impfstoff kann folglich 3–20 unterschiedliche modifizierte oder nicht-modifizierte Polypeptide, wie z. B. 3–10 unterschiedliche Polypeptide, umfassen.

Nucleinsäureimpfung

[0147] Als eine Alternative zur klassischen Verabreichung eines Peptid-basierten Impfstoffs bietet die Technologie der Nucleinsäureimpfung (auch als "Nucleinsäureimmunisierung", "genetische Immunisierung", und "Gen-Immunisierung" bekannt) eine Anzahl attraktiver Eigenschaften.

[0148] Erstens erfordert Nucleinsäureimpfung im Gegensatz zu der traditionellen Impfstoffvorgehensweise keine Ressourcen-verbrauchende Produktion des immunogenen Mittels in großem Maßstab (z. B. in der Form der Fermentation von Mikroorganismen, die modifizierte amyloidogene Polypeptide produzieren in industriellem Maßstab). Weiterhin besteht kein Bedarf an Gerätereinigung ("device purification") und Rückfaltungsschemata für das Immunogen. Und schließlich erwartet man, weil sich Nucleinsäureimpfung auf den biochemischen Apparat des geimpften Individuums verlässt, um das Expressionsprodukt der eingeführten Nucleinsäure zu produzieren; dass das optimale posttranslationale Prozessieren des Expressionsprodukts auftritt; dies ist insbesondere wichtig im Fall der Autoimpfung, weil, wie oben erwähnt, ein signifikanter Anteil der ursprünglichen B-Zell-Epitope in dem modifizierten Molekül enthalten sein sollte, und weil B-Zell-Epitope im Prinzip durch Teile eines beliebigen (Bio)moleküls (z. B. Kohlenhydrat, Lipid, Protein etc.) dargestellt werden können. Deshalb können native Glycosylierungs- und Lipidierungsmuster des Immunogens sehr wohl von Bedeutung für die Gesamtimmunogenität sein, und dies wird am Besten sichergestellt, indem man den Wirt das Immunogen herstellen lässt.

[0149] Folglich ermöglicht eine bevorzugte Verwendung der Erfindung die Präsentation des Analogons gegenüber dem Immunsystem durch Einführen von Nucleinsäure(n), codierend das Analogon, in die Zellen des Tiers und dadurch Erhalten von in vivo-Expression der eingefügten Nucleinsäure(n) durch die Zellen.

[0150] In dieser Ausführungsform ist die eingeführte Nucleinsäure vorzugsweise DNA, welche in der Form von nackter DNA, DNA, die mit geladenen oder ungeladenen Lipiden formuliert ist, DNA, die in Liposomen formuliert ist, DNA, die in einem viralen Vektor enthalten ist, DNA, die mit einem Transfektion-erleichternden Protein oder Polypeptid formuliert ist, DNA, die mit einem Targeting-Protein oder -Polypeptid formuliert ist, DNA, die mit Calciumpräzipitationsmitteln formuliert ist, DNA, die an ein inertes Trägermolekül gekoppelt ist, DNA, die in ein Polymer eingekapselt ist, z. B. in PLGA (vgl. die Mikroverkapselungstechnologie, beschrieben in WO 98/31398) oder in Chitin oder Chitosan, und DNA, die mit einem Adjuvans formuliert ist, sein kann. In diesem Zusammenhang wird angemerkt, dass praktisch alle Überlegungen betreffend die Verwendung von Adjuvantien in traditioneller Impfstoffformulierung für die Formulierung von DNA-Impfstoffen gelten. Folglich gelten alle Offenbarungen hierin, welche sich auf die Verwendung von Adjuvantien im Zusammenhang Polypeptid-basierter Impfstoffe beziehen, mutatis mutandis für ihre Verwendung in Nucleinsäure-Impfungstechnologie.

[0151] Was Verabreichungsrouten und Verabreichungsschemata Polypeptid-basierter Impfstoffe angeht, welche oben im Detail beschrieben worden sind, so sind diese auch für die Nucleinsäure-Impfstoffe der Erfindung anwendbar, und alle obigen Diskussionen betreffend Verabreichungsrouten und Verabreichungsschemata für Polypeptide gelten mutatis mutandis für Nucleinsäuren. Dem sollte hinzugefügt werden, dass Nucleinsäureimpfstoffe geeignet intravenös und intraarteriell verabreicht werden können. Ferner ist im Fachgebiet gut bekannt, dass Nucleinsäureimpfstoffe durch Verwendung einer sogenannten Genkanone verabreicht werden

können, und folglich werden auch diese und äquivalente Verabreichungsarten als Teil der vorliegenden Erfindung angesehen. Schließlich ist berichtet worden, dass auch die Verwendung eines VLN bei der Verabreichung von Nucleinsäuren gute Ergebnisse erzielt, und folglich ist diese spezielle Verabreichungsart insbesondere bevorzugt.

[0152] Ferner kann/können die Nucleinsäure(n), die als ein Immunisierungsmittel verwendet wird/werden, Regionen, codierend die ersten, zweiten und/oder dritten Gruppierungen, z. B. in der Form der oben beschriebenen immunmodulierenden Substanzen, wie beispielsweise die als verwendbare Adjuvantien diskutierten Cytokine, enthalten. Eine bevorzugte Version dieser Ausführungsform umfasst, dass man die codierende Region für das Analogon und die codierende Region für den Immunmodulator in unterschiedlichen Leserahmen oder wenigstens unter der Kontrolle unterschiedlicher Promotoren hat. Dadurch wird vermieden, dass das Analogon oder Epitop als ein Fusionspartner zu dem Immunmodulator produziert wird. Alternativ können zwei verschiedene Nucleotidfragmente verwendet werden, jedoch ist dies, wegen des Vorteils gesicherter Co-Expression, wenn man beide codierenden Regionen in dem selben Molekül eingeschlossen hat, weniger bevorzugt.

[0153] Dementsprechend betrifft die Erfindung außerdem eine Zusammensetzung für das Induzieren der Produktion von Antikörpern gegen APP oder A β , wobei die Zusammensetzung umfasst:

- ein Nucleinsäurefragment oder einen Vektor der Erfindung (vgl. die Diskussion von Vektoren unten), und
- ein pharmazeutisch und immunologisch annehmbares Vehikel und/oder einen pharmazeutisch und immunologisch annehmbaren Träger und/oder ein pharmazeutisch und immunologisch annehmbares Adjuvans, wie oben diskutiert.

[0154] Unter normalen Umständen wird die Varianten-codierende Nucleinsäure in der Form eines Vektors eingeführt, wobei die Expression unter der Kontrolle eines viralen Promotors ist. Für detailliertere Diskussionen von erfindungsgemäßen Vektoren, vgl. die Diskussion unten. Außerdem sind detaillierte Offenbarungen betreffend die Formulierung und Verwendung von Nucleinsäure-Impfstoffen verfügbar, vgl. Donnelly J. J. et al., 1997, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 617–648 und Donnelly J. J. et al., 1997, *Life Sciences* 60: 163–172.

Lebendimpfstoffe

[0155] Eine dritte Alternative für das Bewirken von Präsentation der Analoga gegenüber dem Immunsystem ist die Verwendung von Lebendimpfstoff-Technologie. Bei der Lebendimpfung wird Präsentation gegenüber dem Immunsystem durch Verabreichen eines nicht-pathogenen Mikroorganismus, welcher mit einem Nucleinsäurefragment, codierend ein Analogon, oder mit einem Vektor, der solch ein Nucleinsäurefragment einschließt, transformiert worden ist, an das Tier bewirkt. Der nicht-pathogene Mikroorganismus kann ein beliebiger geeigneter abgeschwächter Bakterienstamm sein (abgeschwächt mittels Passagieren oder mittels des Entfernens pathogener Expressionsprodukte durch rekombinante DNA-Technologie), z. B. *Mycobacterium bovis* BCG., nicht-pathogene *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp., *Vibrio cholerae*, *Shigella*, etc. Übersichtsartikel, die sich mit der Herstellung von Standard-Technik-Lebendimpfstoffen befassen, können z. B. in Saliou P., 1995, *Rev. Prat.* 45: 1492–1496 und Walker P. D., 1992, *Vaccine* 10: 977–990 gefunden werden. Für Details über die in solchen Lebendimpfstoffen verwendeten Nucleinsäurefragmente und Vektoren vgl. die Diskussion unten.

[0156] Als eine Alternative zu bakteriellen Lebendimpfstoffen kann das erfindungsgemäße Nucleinsäurefragment in einen nicht-virulenten viralen Impfstoffvektor, wie z. B. einen Vaccinia-Stamm oder irgendein anderes geeignetes Pocken-Virus, inkorporiert werden.

[0157] Normalerweise wird der nicht-pathogene Mikroorganismus oder das nicht-pathogene Virus dem Tier nur einmal verabreicht, in gewissen Fällen kann es jedoch notwendig sein, den Mikroorganismus mehr als einmal in der Lebenszeit zu verabreichen, um schützende Immunität aufrechtzuerhalten. Es wird sogar erwägt, dass Immunisierungs-Schemata, wie jene, die oben für Polypeptidimpfung im Detail beschrieben wurden, beim Verwenden von Lebend- oder Virus-Impfstoffen verwendbar sein werden.

[0158] Alternativ wird Lebend- oder Virusimpfung mit vorangehender oder nachfolgender Polypeptid- und/oder Nucleinsäureimpfung kombiniert. Beispielsweise ist es möglich, Primärimmunisierung mit einem Lebend- oder Virus-Impfstoff zu erreichen, gefolgt von nachfolgenden Booster-Immunisierungen unter Verwendung der Polypeptid- oder Nucleinsäureherangehensweise.

[0159] Der Mikroorganismus oder das Virus kann mit Nucleinsäure(n), enthaltend Regionen, die die 1., 2. und/oder 3. Gruppierungen codieren, z. B. in der Form der immunmodulierenden Substanzen, die oben beschrie-

ben sind, wie beispielsweise der als verwendbare Adjuvanzen diskutierten Cytokine, transformiert werden. Eine bevorzugte Version dieser Ausführungsform umfasst, dass man die codierende Region für das Analogon und die codierende Region für den Immunmodulator in unterschiedlichen Leserahmen oder wenigstens unter der Kontrolle unterschiedlicher Promotoren hat. Dadurch vermeidet man, dass das Analogon oder die Epitope als Fusionspartner an dem Immunmodulator produziert werden. Alternativ können zwei unterschiedliche Nucleotidfragmente als transformierende Mittel verwendet werden. Natürlich kann, wenn man die ersten und/oder zweiten und/oder dritten Gruppierungen in dem gleichen Leserahmen hat, dies als ein Expressionsprodukt ein erfindungsgemäßes Analogon bereitstellen, und eine solche Ausführungsform ist gemäß der vorliegenden Erfindung besonders bevorzugt.

Verwendung der Erfindung bei Krankheitsbehandlung

[0160] Wie anhand der oben stehenden Diskussionen gewürdigt werden wird, erlaubt das Bereitstellen der Erfindung die Kontrolle von Krankheiten, gekennzeichnet durch Amyloidablagerungen. In diesem Zusammenhang ist AD das Schlüsselziel für das erfindungsgemäße Verfahren, jedoch sind auch andere Krankheiten, gekennzeichnet durch A β -enthaltende Amyloidablagerungen, mögliche Ziele. Folglich ist ein wichtiges Ziel der Erfindung das Behandeln und/oder die Prävention und/oder das Lindern von AD oder von anderen Krankheiten, die durch Amyloidablagerung gekennzeichnet sind, umfassend Herabregulation von APP oder A β in solch einem Ausmaß, dass die Menge an Amyloid signifikant verringert wird.

[0161] Es ist besonders bevorzugt, dass die Reduktion an Amyloid in einer Umkehr des Gleichgewichts zwischen Amyloidbildung und Amyloidabbau/-entfernen resultiert, d. h. dass die Rate von Amyloidabbau/-entfernen dazu gebracht wird, die Rate der Amyloidbildung zu übertreffen. Durch vorsichtiges Kontrollieren der Anzahl und des immunologischen Einflusses der Immunisierungen des Individuums, das derer bedarf, wird es möglich sein, eine Balance über die Zeit zu erhalten, welche in einer Netto-Reduktion von Amyloidablagerungen resultiert, ohne übermäßige nachteilige Effekte aufzuweisen.

[0162] Alternativ ermöglicht die Erfindung, wenn es in einem Individuum nicht möglich ist, existierende Amyloidablagerungen zu entfernen oder reduzieren, eine klinisch signifikante Reduktion bei der Bildung neuen Amyloids, wodurch die Zeit, in der der Krankheitszustand nicht-schwächend ist, signifikant verlängert wird. Es sollte möglich sein, die Rate an Amyloidablagerung entweder durch das Messen der Serumkonzentration von Amyloid (von welcher man annimmt, dass sie im Gleichgewicht mit dem abgelagerten Material ist) oder durch Verwendung von Positron-Emissionstomographie(PET)-Scanning, vgl. Small G. W. et al., 1996, Ann. N. Y. Acad. Sci. 802: 70–78, zu verfolgen.

[0163] Andere Krankheiten und Zustände, wo die vorliegenden Mittel und Verwendungen bei der Behandlung oder Linderung auf analoge Weise verwendet werden können, sind oben im "Hintergrund der Erfindung" erwähnt worden oder sind unten im Abschnitt mit der Überschrift "Andere Amyloidkrankheiten und damit assoziierte Proteine" aufgelistet.

Peptide, Polypeptide und Zusammensetzungen der Erfindung

[0164] Wie von dem Obigen ersichtlich sein wird, basiert die vorliegende Erfindung auf dem Konzept des Immunisierens von Individuen gegen das APP- oder A β -Antigen, um eine reduzierte Menge Pathologie-bedingter Amyloidablagerungen zu erhalten. Die bevorzugte Weise, so eine Immunisierung zu erhalten, ist, die hierin beschriebenen Analoga zu verwenden, wodurch Moleküle bereitgestellt werden, welche zuvor im Fachgebiet noch nicht offenbart worden sind.

[0165] Man glaubt, dass die hierin diskutierten Analoga eigenständig erfinderisch sind, und folglich betrifft ein wichtiger Teil der Erfindung ein oben beschriebenes Analogon. Folglich ist jegliche hierin präsentierte Offenbarung, betreffend modifiziertes APP oder A β , zum Zwecke des Beschreibens der amyloidogenen Analoga der Erfindung relevant, und jede solche Offenbarung trifft mutatis mutandis auf die Beschreibung dieser Analoga zu.

[0166] Es sollte angemerkt werden, dass bevorzugte modifizierte APP- oder A β -Moleküle Modifikationen umfassen, welche in einem Polypeptid resultieren, das eine Sequenzidentität von wenigstens 70% mit APP oder A β oder mit einer Untersequenz davon von wenigstens 10 Aminosäuren-Länge aufweist. Höhere Sequenzidentitäten sind bevorzugt, z. B. wenigstens 75% oder sogar wenigstens 80, 85, 90 oder 95%. Die Sequenzidentität für Proteine und Nucleinsäuren kann als $(N_{\text{ref}} - N_{\text{dif}}) \cdot 100 / N_{\text{ref}}$ berechnet werden, wobei N_{dif} die Gesamtanzahl der nicht-identischen Reste in den beiden Sequenzen, wenn sie vergleichend angeordnet sind, ist,

und wobei N_{ref} die Anzahl an Resten in einer der Sequenzen ist. Folglich wird die DNA-Sequenz AGTCAGTC eine Sequenzidentität von 75% mit der Sequenz AATCAATC haben ($N_{\text{diff}} = 2$ und $N_{\text{ref}} = 8$).

[0167] Die Erfindung betrifft außerdem Zusammensetzungen, verwendbar beim Ausüben des erfindungsgemäßen Verfahrens.

[0168] Folglich bezieht sich die Erfindung außerdem auf eine immunogene Zusammensetzung, umfassend eine immunogen wirksame Menge eines Analogons, wie oben beschrieben, wobei die Zusammensetzung weiterhin ein pharmazeutisch und immunologisch annehmbares Verdünnungsmittel und/oder Vehikel und/oder einen pharmazeutisch und immunologisch annehmbaren Träger und/oder ein pharmazeutisch und immunologisch annehmbares Exziptions und gegebenenfalls ein Adjuvans umfasst. Mit anderen Worten betrifft dieser Teil der Erfindung Formulierungen von Analoga, im Wesentlichen wie oben beschrieben. Die Auswahl von Adjuvantien, Trägern und Vehikeln ist demgemäß in Übereinstimmung mit dem, was oben diskutiert wurde, wenn Bezug genommen wurde auf Formulierung von modifiziertem und unmodifiziertem amyloidogen Polypeptid zur Verwendung in dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herabregulation von APP oder A β .

[0169] Die Polypeptide werden gemäß im Fachgebiet gut bekannter Verfahren hergestellt. Längere Polypeptide werden normalerweise mittels rekombinanter Gentechnik hergestellt, einschließlich des Einführens einer Nucleinsäuresequenz, codierend das Analogon, in einen geeigneten Vektor, Transformation einer geeigneten Wirtszelle mit dem Vektor, Expression der Nucleinsäuresequenz von der Wirtszelle, (Rück-)Gewinnung des Expressionsprodukts von den Wirtszellen oder von ihrem Kulturüberstand und nachfolgende Reinigung und optionale weitere Modifikation, z. B. Rückfaltung oder Derivatisierung.

[0170] Kürzere Peptide werden vorzugsweise durch die gut bekannten Techniken der Fest- oder Flüssigphasenpeptidsynthese hergestellt. Jedoch haben kürzliche Fortschritte in dieser Technologie die Produktion von Vollängenpolypeptiden und -proteinen mit diesen Mitteln möglich gemacht, und folglich liegt es auch innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung, die langen Konstrukte mit synthetischen Mitteln herzustellen.

Nucleinsäurefragmente und Vektoren der Erfindung

[0171] Von der obigen Offenbarung wird man zu würdigen wissen, dass Polyaminosäureanaloge mittels rekombinanter Gentechnologie, jedoch auch mittels chemischer Synthese oder Semisynthese hergestellt werden können; die letzteren zwei Optionen sind insbesondere relevant, wenn die Modifikation im Koppeln an Proteinträger (wie z. B. KLH, Diphtherietoxoid, Tetanustoxoid und BSA) und nicht-proteinöse Moleküle, wie z. B. Kohlenhydratpolymere, besteht, und natürlich außerdem, wenn die Modifikation Addition von Seitenketten oder Seitengruppen an eine APP- oder A β -abgeleitete Peptidkette umfasst.

[0172] Für den Zweck rekombinanter Gentechnologie und natürlich außerdem für den Zweck von Nucleinsäureimmunisierung sind Nucleinsäurefragmente, die Analoga codieren, wichtige chemische Produkte. Folglich betrifft ein wichtiger Teil der Erfindung ein Nucleinsäurefragment, welches ein Analogon der Erfindung codiert, d. h. ein APP- oder A β -abgeleitetes Polypeptid, welches entweder die natürliche Sequenz umfasst, an welche ein Fusionspartner addiert oder in welcher ein Fusionspartner inseriert worden ist, oder vorzugsweise ein APP- oder A β -abgeleitetes Polypeptid, worin ein fremdes T-Zell-Epitop mittels Insertion und/oder Addition eingeführt worden ist, vorzugsweise mittels Substitution und/oder Deletion. Die Nucleinsäurefragmente der Erfindung sind entweder DNA- oder RNA-Fragmente.

[0173] Die erfindungsgemäßen Nucleinsäurefragmente werden normalerweise in geeignete Vektoren inseriert, um Klonierungs- oder Expressionsvektoren zu bilden, die die erfindungsgemäßen Nucleinsäurefragmente tragen; solche neuen Vektoren sind auch Teil der Erfindung. Details betreffend die Konstruktion dieser Vektoren der Erfindung werden im Zusammenhang mit transformierten Zellen und Mikroorganismen unten diskutiert werden. Die Vektoren können, abhängig vom Zweck und Typ der Anwendung, in der Form von Plasmiden, Phagen, Cosmiden, Mini-Chromosomen oder Viren sein, jedoch ist auch nackte DNA, welche nur transient in gewissen Zellen exprimiert wird, ein wichtiger Vektor. Bevorzugte Klonierungs- und Expressionsvektoren der Erfindung sind fähig zur autonomen Replikation, wodurch hohe Kopienanzahlen für die Zwecke der Expression auf hohem Level oder Replikation auf hohem Level für nachfolgendes Klonieren ermöglicht werden.

[0174] Die allgemeinen Grundzüge eines erfindungsgemäßen Vektors umfassen die folgenden Eigenschaften in der 5'→3'-Richtung und in funktioneller Verknüpfung: einen Promotor für das Steuern von Expression des erfindungsgemäßen Nucleinsäurefragments, optional eine Nucleinsäuresequenz, codierend ein Leader-Peptid, das Sekretion des Polypeptidfragments (zur extrazellulären Phase oder, wo anwendbar, in das Periplasma)

oder Integration des Polypeptidfragments in die Membran ermöglicht, das erfindungsgemäße Nucleinsäurefragment und gegebenenfalls eine Nucleinsäuresequenz, codierend einen Terminator. Wenn man mit Expressionsvektoren in Produzierer-Stämmen oder -Zelllinien arbeitet, ist es für die Zwecke der genetischen Stabilität der transformierten Zelle bevorzugt, dass der Vektor, wenn er in eine Wirtszelle eingeführt ist, in das Wirtszellgenom integriert wird. Im Gegensatz dazu ist es, wenn man mit Vektoren arbeitet, die für das Bewirken von in vivo-Expression in einem Tier verwendet werden sollen (d. h., wenn der Vektor bei DNA-Impfung verwendet wird), aus Sicherheitsgründen bevorzugt, dass der Vektor nicht dazu fähig ist, in das Wirtszellgenom integriert zu werden; typischerweise wird nackte DNA oder werden nicht-integrierende virale Vektoren verwendet, deren Auswahl dem Fachmann im Gebiet gut bekannt sind.

[0175] Die erfindungsgemäßen Vektoren werden verwendet, um Wirtszellen zu transformieren, um das erfindungsgemäße Analogon zu produzieren. Solche transformierten Zellen, welche auch Teil der Erfindung sind, können kultivierte Zellen sein oder Zelllinien, verwendet zur Propagierung der erfindungsgemäßen Nucleinsäurefragmente und erfindungsgemäßen Vektoren, oder verwendet zur rekombinanten Produktion der erfindungsgemäßen Analoga. Alternativ können die transformierten Zellen geeignete Lebendimpfstoff-Stämme sein, worin das Nucleinsäurefragment (eine einzelne Kopie oder multiple Kopien) inseriert worden sind, um Sekretion des Analogons oder Integration des Analogons in die bakterielle Membran oder Zellwand zu bewirken.

[0176] Bevorzugte transformierte Zellen der Erfindung sind Mikroorganismen, wie z. B. Bakterien (wie beispielsweise die Arten *Escherichia* [z. B. *E. coli*], *Bacillus* [z. B. *Bacillus subtilis*], *Salmonella* oder *Mycobacterium* [vorzugsweise nicht-pathogen, z. B. *M. bovis* BCG]), Hefen (wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae*) und Protozoen. Alternativ sind die transformierten Zellen abgeleitet von einem multizellulären Organismus, wie z. B. einem Pilz, einer Insektenzelle, einer Pflanzenzelle oder einer Säugerzelle. Am stärksten bevorzugt sind Zellen, die von einem Menschen abgeleitet sind, vgl. die Diskussion von Zelllinien und Vektoren unten. Kürzlich erhaltene Ergebnisse waren sehr vielversprechend hinsichtlich der Verwendung einer kommerziell erhältlichen *Drosophila melanogaster*-Zelllinie (die Schneider 2(S₂)-Zelllinie und das Schneider 2-Vektorsystem, erhältlich von Invitrogen) für die rekombinante Produktion von Polypeptiden im Labor der Anmelder, und deshalb ist dieses Expressionssystem besonders bevorzugt.

[0177] Für die Zwecke der Klonierung und/oder optimierten Expression ist es bevorzugt, dass die transformierte Zelle in der Lage ist, das erfindungsgemäße Nucleinsäurefragment zu replizieren. Zellen, die das Nucleinfragment exprimieren, sind bevorzugte verwendbare Ausführungsformen der Erfindung; sie können zur Herstellung des erfindungsgemäßen Analogons in kleinem Maßstab oder großem Maßstab verwendet werden, oder, im Fall nicht-pathogener Bakterien, als Impfstoff-Bestandteile in einem Lebendimpfstoff verwendet werden.

[0178] Wenn man die erfindungsgemäßen Analoga mittels transformierter Zellen produziert, ist es praktisch, jedoch weit entfernt von essentiell, dass das Expressionsprodukt entweder in das Kulturmedium hinaus exportiert wird oder auf der Oberfläche der transformierten Zelle getragen wird.

[0179] Wenn eine effektive Produzierer-Zelle identifiziert worden ist, ist es bevorzugt, auf deren Basis eine stabile Zelllinie zu etablieren, welche den erfindungsgemäßen Vektor trägt und welche das Nucleinsäurefragment, codierend das modifizierte amyloidogene Polypeptid, exprimiert. Vorzugsweise sezerniert diese stabile Zelllinie das Analogon der Erfindung oder trägt das Analogon der Erfindung, wodurch dessen Reinigung ermöglicht wird.

[0180] Im Allgemeinen werden Plasmidvektoren, enthaltend Replikon- und Kontrollsequenzen, welche von Arten stammen, die mit der Wirtszelle kompatibel sind, in Verbindung mit den Wirten verwendet. Der Vektor trägt für gewöhnlich eine Replikationsstelle sowie markierende Sequenzen, welche in der Lage sind, phänotypische Selektion in transformierten Zellen bereitzustellen. Beispielsweise wird *E. coli* typischerweise unter Verwendung von pBR322, einem Plasmid, abgeleitet von einer *E. coli*-Art (siehe z. B. Bolivar et al., 1977), transformiert. Das pBR322-Plasmid enthält Gene für Ampicillin und Tetracyclinresistenz und liefert folglich einfache Mittel zum Identifizieren transformierter Zellen. Das pBR-Plasmid oder ein anderes mikrobielles Plasmid oder ein Phage müssen außerdem Promotoren enthalten, welche von dem prokaryotischen Mikroorganismus zur Expression verwendet werden können, oder es/er muss modifiziert sein, diese zu enthalten.

[0181] Jene Promotoren, die am gebräuchlichsten bei der rekombinanten DNA-Konstruktion verwendet werden, schließen die B-Lactamase (Penicillinase)- und Lactose-Promotorsysteme (Chang et al., 1978; Itakura et al., 1977; Goeddel et al., 1979) und ein Tryptophan(trp)-Promotorsystem (Goeddel et al., 1979; EP-A-0 036 776) ein. Während diese am weit verbreitetsten verwendet werden, sind andere mikrobielle Pro-

motoren entdeckt und verwendet worden, und Details betreffend ihre Nucleotidsequenzen sind publiziert worden, was einen Fachmann befähigt, sie funktionell mit Plasmidvektoren zu ligieren (Siebwenlist et al., 1980). Gewisse Gene von Prokaryoten können in *E. coli* effizient von ihren eigenen Promotorsequenzen exprimiert werden, was das Bedürfnis nach der Addition eines anderen Promotors mit künstlichen Mitteln ausschließt.

[0182] Zusätzlich zu Prokaryoten können außerdem eukaryotische Mikroben, wie z. B. Hefekulturen, verwendet werden, und hier sollte der Promotor in der Lage sein, die Expression zu steuern. *Saccharomyces cerevisiae*, oder gewöhnliche Bäckerhefe, ist unter eukaryotischen Mikroorganismen der am häufigsten verwendete, obwohl eine Anzahl anderer Stämme allgemein erhältlich ist. Für Expression in *Saccharomyces* wird beispielsweise das Plasmid YRp7 allgemein verwendet (Stinchcomb et al., 1979; Kingsman et al., 1979; Tschemper et al., 1980). Dieses Plasmid enthält bereits das *trp1*-Gen, welches einen Selektionsmarker für einen Mutantenstamm von Hefe liefert, dem das Vermögen fehlt, in Tryptophan zu wachsen, z. B. ATCC Nr. 44076 oder PEP4-1 (Jones, 1977). Die Gegenwart der *trp1*-Läsion als Charakteristikum des Hefewirtszellgenoms liefert dann eine effektive Umgebung zur Detektion von Transformation durch Wachstum in Abwesenheit von Tryptophan.

[0183] Geeignete Promotorsequenzen in Hefevektoren schließen die Promotoren für 3-Phosphoglyceratkinase (Hitzman et al., 1980) oder andere Glycolyseenzyme (Ness et al., 1968; Holland et al., 1978), wie z. B. Enolase, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase, Pyruvatdecarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-phosphatisomerase, 3-Phosphoglyceratmutase, Pyruvatkinase, Triosephosphatisomerase, Phosphoglucoseisomerase und Glucokinase ein. Beim Konstruieren geeigneter Expressionsplasmide werden die Terminationssequenzen, assoziiert mit diesen Genen, auch in den Expressionsvektor ligiert, 3' von der gewünschten, zu exprimierenden Sequenz, um für Polyadenylierung der mRNA und Termination zu sorgen.

[0184] Andere Promotoren, welche den zusätzlichen Vorteil haben, dass Transkription von Wachstumsbedingungen kontrolliert wird, sind die Promotorregion für Alkoholdehydrogenase-2, Isocytochrom-C, saure Phosphatase, abbauende Enzyme, assoziiert mit dem Stickstoffstoffwechsel, und die zuvor genannte Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, und Enzyme, verantwortlich für Maltose- und Galactoseverwendung. Jeder Plasmidvektor, enthaltend einen Hefe-kompatiblen Promotor, Replikationsursprung und Hefe-kompatible Terminationssequenzen, ist geeignet.

[0185] Zusätzlich zu Mikroorganismen können Kulturen von Zellen, abgeleitet von multizellulären Organismen, auch als Wirte verwendet werden. Im Prinzip ist jede solche Zellkultur zu gebrauchen, ob von Vertebraten- oder Invertebratenkultur. Jedoch ist das Interesse an Vertebratenzellen am größten gewesen und die Propagierung von Vertebraten in Kultur (Gewebekultur) ist in den letzten Jahren eine Routinevorgehensweise geworden (tissue culture, 1973). Beispiele solcher verwendbaren Wirtszelllinien sind VERO- und HeLa-Zellen, Eizelllinien vom Chinesischen Hamster (CHO) ("Chinese hamster ovary"), und W138, BHK, COS-7 293, *Spodoptera frugiperda*(SF)-Zellen (kommerziell erhältlich als komplette Expressionssysteme von u. a. Protein Sciences, 1000 Research Parkway, Meriden, CT 06450, USA, und von Invitrogen) und MDCK-Zelllinien. In der vorliegenden Erfindung ist eine besonders bevorzugte Zelllinie S₂, erhältlich von Invitrogen, Postfach 2312, 9704 CH Groningen, Niederlande.

[0186] Expressionsvektoren für solche Zellen beinhalten gewöhnlicherweise (falls notwendig) einen Replikationsursprung, einen Promotor, lokalisiert vor dem zu exprimierenden Gen, zusammen mit irgendwelchen notwendigen Ribosomenbindungsstellen, RNA-Spleißstellen, Polyadenylierungsstelle und Transkriptionsterminatorsequenzen.

[0187] Zur Verwendung in Säugerzellen werden die Kontrollfunktionen auf den Expressionsvektoren oft durch virales Material bereitgestellt. Beispielsweise stammen allgemein verwendete Promotoren von Polyoma, Adenovirus 2 und am häufigsten Affenvirus 40 (SV40; "Simian Virus 40"). Die früheren und späteren Promotoren des SV40-Virus sind insbesondere verwendbar, weil beide leicht aus dem Virus als ein Fragment, welches außerdem den viralen SV40-Replikationsursprung (Fiers et al., 1978) enthält, erhalten werden. Kleinere oder größere SV40-Fragmente können auch verwendet werden, vorausgesetzt dass die ungefähr 250 Basenpaare lange Sequenz, die sich von der HindIII-Stelle zu der BglI-Stelle, lokalisiert im viralen Replikationsursprung, erstreckt, dort eingeschlossen ist. Ferner ist es auch möglich, und oft wünschenswert, Promotor- oder Kontrollsequenzen zu verwenden, die normalerweise mit der gewünschten Gensequenz assoziiert sind, vorausgesetzt solche Kontrollsequenzen sind mit den Wirtszellsystemen kompatibel.

[0188] Ein Replikationsursprung kann entweder durch Konstruktion des Vektors, damit dieser einen exogenen Ursprung einschließt, wie er z. B. vom SV40- oder einem anderen Virus (z. B. Polyoma, Adeno, VSV, BPV) abgeleitet werden kann, bereitgestellt werden, oder kann von dem chromosomalen Wirtszell-Replikationsme-

chanismus bereitgestellt werden. Wenn der Vektor in das Wirtszellchromosom integriert wird, ist letzteres oft ausreichend.

Identifikation verwendbarer Analoga

[0189] Es wird dem Fachmann klar sein, dass nicht alle möglichen Varianten oder Modifikationen von natürlich vorkommendem APP oder A β die Fähigkeit haben werden, Antikörper in einem Tier hervorzurufen, welche mit der natürlichen Form kreuz-reaktiv sind. Es ist jedoch nicht schwierig, einen effektiven Standard-Screen für modifizierte amyloidogene Moleküle aufzustellen, welche die Minimalanforderungen für hierin diskutierte immunologische Reaktivität erfüllen. Folglich ist es möglich, ein Verfahren für die Identifikation eines modifizierten amyloidogenen Polypeptids einzusetzen, welches in der Lage ist, Antikörper gegen nicht-modifiziertes amyloidogenes Polypeptid in einer Tierart zu erzeugen, wobei das nicht-modifizierte amyloidogene Polypeptid ein (nicht-immunogenes) Selbst-Protein ist, wobei das Verfahren umfasst:

- Herstellen, mittels Peptidsynthese oder Gentechnik, eines Satzes gegenseitig unterschiedlicher modifizierter erfindungsgemäßer Analoga, wobei Aminosäuren in die Aminosäuresequenz eines APP oder A β der Tierart addiert worden sind, darin insertiert worden sind, davon deletiert worden sind oder darin substituiert worden sind, und dadurch Aminosäuresequenzen in dem Satz erzeugen, welche T-Zell-Epitope umfassen, welche für die Tierart fremd sind, oder Herstellen eines Satzes von Nucleinsäurefragmenten, die den Satz an gegenseitig verschiedenen Analoga codieren,
- Testen von Mitgliedern des Satzes an Analoga oder Nucleinsäurefragmenten auf ihre Fähigkeit, Produktion von Antikörpern durch die Tierart gegen das unmodifizierte APP oder A β zu induzieren, und
- Identifizieren und gegebenenfalls Isolieren des Mitglieds/der Mitglieder des Satzes an Analoga, welche(s) signifikant Antikörperproduktion gegen nicht-modifiziertes APP oder A β in der Art induziert/induzieren, oder Identifizieren und gegebenenfalls Isolieren der Polypeptidexpressionsprodukte, codiert von Mitgliedern des Satzes von Nucleinsäurefragmenten, welche Antikörperproduktion gegen nicht-modifiziertes APP oder A β in der Tierart signifikant induzieren.

[0190] In diesem Kontext ist der "Satz gegenseitig unterschiedlicher modifizierter amyloidogener Polypeptide" eine Sammlung nicht-identischer Analoga, welche z. B. ausgewählt worden sind auf der Basis der oben diskutierten Kriterien (z. B. in Kombination mit Studien von Zirkulardichroismus, NMR-Spektren und/oder Röntgenstrahlenbeugungsmustern). Der Satz kann aus nur wenigen Mitgliedern bestehen, es wird jedoch erwägt, dass der Satz einige hundert Mitglieder enthalten kann.

[0191] Der Test von Mitgliedern des Satzes kann letztlich in vivo durchgeführt werden, aber eine Anzahl von in vitro-Tests kann angewendet werden, welche die Anzahl modifizierter Moleküle, welche dem Zwecke der Erfindung dienen werden, einengen.

[0192] Weil es das Ziel des Einführen der fremden T-Zell-Epitope ist, die B-Zell-Antwort durch T-Zell-Hilfe zu unterstützen, ist eine Voraussetzung, dass T-Zell-Proliferation durch das Analogon induziert wird. T-Zell-Proliferation kann in vitro durch standardisierte Proliferationsassays getestet werden. In Kürze wird eine Probe, die an T-Zellen angereichert ist, von einem Subjekt erhalten und nachfolgend in Kultur gehalten. Die kultivierten T-Zellen werden mit APCs des Subjekts, welche zuvor das modifizierte Molekül aufgenommen haben und es prozessiert haben, um seine T-Zell-Epitope zu präsentieren, in Kontakt gebracht. Die Proliferation von T-Zellen wird überwacht und mit einer geeigneten Kontrolle (z. B. T-Zellen in Kultur, kontaktiert mit APCs, welche intaktes, natives amyloidogenes Polypeptid prozessiert haben) verglichen. Alternativ kann Proliferation durch Bestimmen der Konzentration relevanter Cytokine, freigesetzt von den T-Zellen in Reaktion auf ihr Erkennen fremder T-Zellen, gemessen werden.

[0193] Nachdem es hoch wahrscheinlich geworden ist, dass wenigstens ein Analogon von einem Typ Satz in der Lage ist, Antikörperproduktion gegen APP oder A β zu induzieren, ist es möglich, eine immunogene Zusammensetzung herzustellen, die wenigstens ein Analogon umfasst, welches in der Lage ist, Antikörper gegen unmodifiziertes APP oder A β in einer Tierart zu induzieren, wo das unmodifizierte APP oder A β ein Selbst-Protein ist, wobei das Verfahren das Vermischen des Mitglieds/der Mitglieder des Satzes, welcher signifikant Produktion von Antikörpern in der Tierart induziert, welche reaktiv sind mit dem APP oder A β , mit einem pharmazeutisch und immunologisch annehmbaren Träger und/oder Vehikel und/oder Verdünnungsmittel und/oder Exzipiens, optional in Kombination mit wenigstens einem pharmazeutisch und immunologisch annehmbaren Adjuvans, umfasst.

[0194] Die oben beschriebenen Tests von Polypeptidsätzen werden zweckmäßig durch ursprüngliches Herstellen einer Anzahl gegenseitig verschiedener Nucleinsäuresequenzen oder Vektoren der Erfindung, deren

Insertion in geeignete Expressionsvektoren, das Transformieren geeigneter Wirtszellen (oder Wirtstiere) mit den Vektoren, und das Bewirken von Expression der Nucleinsäuresequenzen der Erfindung durchgeführt. Diesen Stufen kann Isolation des Expressionsprodukts folgen. Es ist bevorzugt, dass die Nucleinsäuresequenzen und/oder Vektoren durch Verfahren, die das Ausüben einer molekularen Amplifikationstechnik, wie z. B. PCR, umfassen oder mittels Nucleinsäuresynthese hergestellt werden.

Spezifische amyloidogene Ziele

[0195] Zusätzlich zu den Proteinen, die am häufigsten mit Alzheimer-Krankheit, APP, ApoE4 und Tau assoziiert sind, besteht eine lange Liste anderer Proteine, die in irgendeiner Weise mit AD in Verbindung gebracht worden sind, entweder aufgrund ihrer direkten Anwesenheit in Plaques oder Knäueln von AD-Gehirnen oder aufgrund ihrer offensichtlichen genetischen Assoziation mit erhöhtem Risiko, AD zu entwickeln. Die meisten, wenn nicht alle, dieser Antigene sind zusammen mit dem oben diskutierten A β , APP, Presenilin und ApoE4, mutmaßliche Zielproteine in gewissen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung. Diese mutmaßlichen Ziele sind bereits gründlich in WO 01/62284 diskutiert. Folglich werden diese mutmaßlichen Ziele hier nur kurz erwähnt werden, wohingegen eine gründlichere Hintergrunddiskussion in WO 01/62282 gefunden werden kann:

Alpha1-Antichymotrypsin (ACT); Alpha2-Macroglobulin; ABAD (A β -Peptid-bindende Alkoholdehydrogenase); APLP1 und -2 (Amyloidvorläufer ähnliches Protein 1 und -2); AMY117; Bax; Bcl-2; Bleomycinhydrolase; BRI/ABRI; Chromogranin A; Clusterin/apoJ; CRF (Kortikotropin-freisetzender Faktor)-bindendes Protein; EDTF (Endothelabgeleiteter toxischer Faktor); Heparansulfatproteoglycane; Human-Collapsin-Reaktions-Vermittler-Protein-2; Huntingtin (Huntington'sche Krankheit-Protein); ICAM-I; IL-6; Lysosom-assoziiertes Antigen CD68; P21 ras; PLC-delta 1 (Phospholipase C Isoenzym delta 1); Serumamyloid-P-Komponente (SAP); Synaptophysin; Synuclein (α -Synuclein oder NACP); und TGF-b1 (transformierender Wachstumsfaktor b1).

[0196] Die gegenwärtig beschriebenen Mittel und Verfahren für das Herabregulieren von APP oder A β können kombiniert werden mit Therapien, z. B. aktive spezifische Immuntherapie, gegen beliebige dieser anderen amyloidogenen Polypeptide.

[0197] Abgesehen von Alzheimer-Krankheit ist auch cerebrale Amyloidangiopathie eine Krankheit, die ein geeignetes Ziel für die gegenwärtig offenbarte Technologie sein würde.

[0198] Es wird erwägt, dass die meisten Verfahren für das Immunisieren gegen APP oder A β auf Immunisierung, die Antikörper hervorruft, die kreuz-reaktiv mit dem nativen APP oder A β sind, beschränkt werden sollte. Nichtsdestotrotz wird es in manchen Fällen von Interesse sein, zelluläre Immunität in der Form von CTL-Reaktionen gegen Zellen zu induzieren, welche MHC-Klasse I-Epitope von den amyloidogenen Polypeptiden präsentieren – dies kann zweckmäßig sein in jenen Fällen, wobei Reduktion in der Anzahl der Zellen, die APP oder A β produzieren, keinen ernstesten nachteiligen Effekt darstellt. In solchen Fällen, in denen CTL-Reaktionen erwünscht sind, ist es bevorzugt, die Lehren der WO 00/20027 der Anmelderin einzusetzen.

IMMUNOGENTRÄGER

[0199] Moleküle, umfassend ein T-Helfer-Epitop und APP- oder A β -Peptide, die B-Zell-Epitope darstellen oder beinhalten, kovalent verknüpft mit einem nicht-immunogenen Polymermolekül, das als ein Vehikel wirkt, z. B. einem multivalenten aktivierten Polyhydroxypolymer, werden, wie oben erwähnt, als ein Impfstoff-Molekül funktionieren, das nur die immunologisch relevanten Teile enthält, können erhalten werden und sind interessante Ausführungsformen in Varianten d und e, die oben offenbart sind. Promiskuitive oder sogenannte universelle T-Helfer-Epitope können verwendet werden, wenn z. B. das Ziel des Impfstoffs ein Selbst-Antigen wie z. B. APP oder A β ist. Weiterhin könnten Elemente, die die immunologische Reaktion verstärken, auch an das Vehikel co-gekoppelt werden und dadurch als ein Adjuvans wirken. Solche Elemente können Mannose, Tuftsin, Muramylpeptid, CpG-Motive etc. sein. In diesem Fall könnte nachfolgende Adjuvans-Formulierung des Impfstoffprodukts nicht notwendig sein, und das Produkt könnte in reinem Wasser oder in reiner Salzlösung verabreicht werden.

[0200] Durch Koppeln cytotoxischer T-Zell(CTL)-Epitope zusammen mit den T-Helfer-Epitopen wird es außerdem möglich sein, CTLs zu erzeugen, die spezifisch für das Antigen sind, von welchem das CTL-Epitop abgeleitet wurde. Elemente, die die Aufnahme des Produkts in das Cytosol der APC, z. B. eines Makrophagen, fördern, wie z. B. Mannose, könnten auch zusammen mit dem CTL- und dem T-Helfer-Epitop an das Vehikel co-gekoppelt werden und die CTL-Reaktion verstärken.

[0201] Das Verhältnis von B-Zell-Epitopen und T-Helfer-Epitopen (P2 und P30) im Endprodukt kann variiert werden durch das Variieren der Konzentration dieser Peptide im Syntheseschritt. Wie oben erwähnt, kann das immunogene Molekül mit z. B. Mannose, Tuftsin, CpG-Motiven oder anderen immunstimulierenden Substanzen (die hierin beschrieben sind) markiert werden, indem diese, wenn notwendig durch Verwendung von z. B. aminierten Derivaten der Substanzen, zu dem Carbonatpuffer im Syntheseschritt zugegeben werden.

[0202] Wenn ein unlösliches aktiviertes Polyhydroxypolymer verwendet wird, um die Peptide, enthaltend das APP- oder A β -B-Zell-Epitop und die T-Helfer-Epitope zu kombinieren, kann es, wie oben erwähnt, als eine Festphasensynthese durchgeführt werden und das Endprodukt kann durch Waschen und Filtration erhalten und gereinigt werden. Die Elemente zur Kopplung an ein Tresyl-aktiviertes Polyhydroxypolymer (Peptide, Markierungen etc.) können zu dem Polyhydroxypolymer bei niedrigem pH, z. B. pH 4–5, zugegeben werden und ihnen kann erlaubt werden, in dem "Gel" mittels passiver Diffusion gleichmäßig verteilt zu werden. Nachfolgend kann der pH auf pH 9–10 angehoben werden, um die Reaktion der primären Aminogruppen auf den Peptiden und Markierungen an die Tresylgruppen auf dem Polyhydroxypolymer zu starten. Nach Koppeln von Peptiden und z. B. immunstimulierenden Elementen wird das Gel gemahlen, um Partikel geeigneter Größe für eine Immunisierung zu bilden.

[0203] Solch ein Immunogen davon umfasst:

- a) wenigstens eine erste Aminosäuresequenz, abgeleitet von APP oder A β , wie oben diskutiert, und
- b) wenigstens eine zweite Aminosäuresequenz, die ein fremdes T-Helfer-Zell-Epitop einschließt,

wobei jede der wenigstens ersten und wenigstens zweiten Aminosäuresequenzen an einen pharmazeutisch annehmbaren aktivierten Polyhydroxypolymer-Träger gekoppelt ist.

[0204] Damit die Aminosäuresequenzen an das Polyhydroxypolymer koppeln, ist es normalerweise notwendig, das Polyhydroxypolymer mit einer geeigneten reaktiven Gruppe zu "aktivieren", die die notwendige Verknüpfung mit den Aminosäuresequenzen ausbilden kann.

[0205] Der Ausdruck "Polyhydroxypolymer" soll die gleiche Bedeutung wie in WO 00/05316 haben, d. h. das Polyhydroxypolymer kann genau die gleichen Charakteristika aufweisen, wie es spezifisch in dieser Anmeldung gelehrt wird. Folglich kann das Polyhydroxypolymer wasserlöslich oder unlöslich sein (und erfordert folglich unterschiedliche Syntheseschritte während der Herstellung des Immunogens). Das Polyhydroxypolymer kann ausgewählt sein aus natürlich vorkommenden Polyhydroxyverbindungen und synthetischen Polyhydroxyverbindungen.

[0206] Spezifische und bevorzugte Polyhydroxypolymere sind Polysaccharide, ausgewählt aus Acetan, Amylopectin, Gummi Agar-Agar, Agarose, Alginaten, Gummi arabicum, Carregeenan, Cellulose, Cyclodextrinen, Dextran, Furcellaran, Galactomannan, Gelatine, Ghatti, Glucan, Glycogen, Guar, Karaya, Konjac/A, Johannisbrotgummi, Mannan, Pectin, Psyllium, Pullulan, Stärke, Tamarin, Tragacanth, Xanthan, Xylan und Xyloglucan. Dextran ist besonders bevorzugt.

[0207] Jedoch kann das Polyhydroxypolymer auch ausgewählt sein aus hoch verzweigtem Poly(ethylenimin) (PEI), Tetrathienylenvinyl, Kevlar (lange Kette von Polyparaphenylterephthalamid), Poly(urethanen), Poly(siloxanen), Polydimethylsiloxan, Silicon, Poly(methylmethacrylat) (PMMA), Poly(vinylalkohol), Poly(vinylpyrrolidon), Poly(2-hydroxyethylmethacrylat), Poly(N-vinylpyrrolidon), Poly(vinylalkohol), Poly(acrylsäure), Polytetrafluorethylen (PTFE), Polyacrylamid, Poly(ethylen-co-vinylacetat), Poly(ethylenglykol) und Derivaten, Poly(methacrylsäure), Polylactiden (PLA), Polyglycoliden (PGA), Poly(lactid-co-glycoliden) (PLGA), Polyanhydriden und Polyorthoestern.

[0208] Das (gewichts-)mittlere Molekulargewicht des zur Frage stehenden Polyhydroxypolymers (d. h. vor Aktivierung) ist typischerweise wenigstens 1.000, wie beispielsweise wenigstens 2.000, vorzugsweise im Bereich von 2.500–2.000.000, stärker bevorzugt im Bereich von 3.000–1.000.000, insbesondere im Bereich von 5.000–500.000. Es ist in den Beispielen gezeigt worden, dass Polyhydroxypolymere, die ein mittleres Molekulargewicht im Bereich von 10.000–200.000 aufweisen, besonders vorteilhaft sind.

[0209] Das Polyhydroxypolymer ist vorzugsweise wasserlöslich in einem Ausmaß von wenigstens 10 mg/ml, vorzugsweise wenigstens 25 mg/ml, wie z. B. wenigstens 50 mg/ml, insbesondere wenigstens 100 mg/ml, wie z. B. wenigstens 150 mg/ml, bei Raumtemperatur. Es ist bekannt, dass Dextran, selbst wenn, wie hierin beschrieben, aktiviert, die Erfordernisse hinsichtlich Wasserlöslichkeit erfüllt.

[0210] Für manche der interessantesten Polyhydroxypolymere ist das Verhältnis zwischen C (Kohlenstoffatomen) und OH-Gruppen (Hydroxygruppen) der unaktivierten Polyhydroxypolymere (d. h. das native Polyhydroxypolymer vor Aktivierung) im Bereich von 1,3 bis 2,5, wie z. B. 1,5–2,3, vorzugsweise 1,6–2,1, insbesondere 1,85–2,05. Ohne an irgendeine spezifische Theorie gebunden zu sein, wird angenommen, dass solch ein C/OH-Verhältnis des unaktivierten Polyhydroxypolymers einen hoch vorteilhaften Level an Hydrophilie darstellt. Polyvinylalkohol und Polysaccharide sind Beispiele von Polyhydroxypolymeren, welche dieses Erfordernis erfüllen. Es wird angenommen, dass das oben erwähnte Verhältnis ungefähr das gleiche für das aktivierte Polyhydroxypolymer sein sollte, weil das Aktivierungsverhältnis eher niedrig sein sollte.

[0211] Der Ausdruck "Polyhydroxypolymerträger" soll den Teil des Immungens bezeichnen, der die Aminosäuresequenzen trägt. Als eine allgemeine Regel hat der Polyhydroxypolymerträger seine äußeren Grenzen, wo die Aminosäuresequenzen mittels einer Peptidase abgespalten werden können, z. B. in einer Antigen-präsentierenden Zelle, die das Immungen prozessiert. Folglich kann der Polyhydroxypolymerträger ein Polyhydroxypolymer mit einer Aktivierungsgruppe sein, wo die Bindung zwischen der Aktivierungsgruppe und der Aminosäuresequenz spaltbar ist mittels einer Peptidase in einer APC, oder der Polyhydroxypolymerträger kann ein Polyhydroxypolymer mit Aktivierungsgruppe und z. B. einem Linker, wie z. B. einer einzelnen L-Aminosäure oder einer Anzahl von D-Aminosäuren, sein, wobei der letzte Teil des Linkers an die Aminosäuresequenzen binden kann und in einer APC von einer Peptidase gespalten werden kann.

[0212] Wie oben erwähnt, tragen die Polyhydroxypolymere funktionelle Gruppen (Aktivierungsgruppen), welche das Verankern der Peptide an dem Träger ermöglichen. Ein weiterer Bereich anwendbarer funktioneller Gruppen sind im Fachgebiet bekannt, z. B. Tresyl-(Trifluorethylsulfon), Maleimido-, p-Nitrophenylchlorformiat-, Cyanogenbromid-, Tosyl-(p-Toluolsulfon), Triflyl-(Trifluormethansulfon), Pentafluorbenzolsulfon- und Vinylsulfongruppen. Bevorzugte Beispiele funktioneller Gruppen innerhalb der vorliegenden Erfindung sind Tresyl-, Maleimido-, Tosyl-, Triflyl-, Pentafluorbenzolsulfon-, p-Nitrophenylchlorformiat- und Vinylsulfongruppen, unter welchen Tresyl-, Maleimido- und Tosylgruppen insbesondere relevant sind.

[0213] Tresyl-aktivierte Polyhydroxypolymere können unter Verwendung von Tresylchlorid, wie für Aktivierung von Dextran in Beispiel 1 in WO 00/05316 beschrieben oder wie in Gregorius et al., J. Immunol. Meth. 181 (1995) 65–73 beschrieben, hergestellt werden.

[0214] Maleimido-aktivierte Polyhydroxypolymere können unter Verwendung von p-Maleimidophenylisocyanat, wie für Aktivierung von Dextran in Beispiel 3 in WO 00/05316 beschrieben, hergestellt werden. Alternativ könnten Maleimidogruppen in ein Polyhydroxypolymer, wie z. B. Dextran, eingeführt werden durch Derivatisierung eines Tresyl-aktivierten Polyhydroxypolymers (wie z. B. Tresyl-aktiviertes Dextran (TAD)) mit einer Diaminverbindung (im Allgemeinen $H_2N-C_nH_{2n}-NH_2$, wobei n 1–20, vorzugsweise 1–8, ist), z. B. 1,3-Diaminopropan, im Überschuss, und nachfolgendes Umsetzen der eingeführten Aminogruppen in TAD mit Reagenzien, wie z. B. Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (SMCC), Sulfo-succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat (Sulfo-SMCC), Succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrat (SMPB), Sulfo-succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrat (Sulfo-SMPB), N-γ-Maleimidobutyryloxysuccinimidester (GMBS) oder N-γ-Maleimidobutyryloxy-sulfosuccinimidester. Obwohl die verschiedenen Reagenzien und Aktivierungsrouten formell in geringfügig unterschiedlichen Maleimid-aktivierten Produkten hinsichtlich der Verknüpfung zwischen der Maleimidfunktionalität und dem Rest der Eltern-Hydroxygruppe, an welche Aktivierung durchgeführt wird, resultieren, werden diese allesamt als "Maleimid-aktivierte Polyhydroxypolymere" erachtet.

[0215] Tosyl-aktivierte Polyhydroxypolymere können, wie für Aktivierung von Dextran in Beispiel 2 in WO 00/05316 beschrieben, unter Verwendung von Tosylchlorid hergestellt werden. Triflyl- und Pentafluorbenzolsulfon-aktivierte Polyhydroxypolymere werden wie die Tosyl- oder Tresyl-aktivierten Analoga, z. B. unter Verwendung der entsprechenden Säurechloride, hergestellt.

[0216] Cyanogenbromid-aktiviertes Polyhydroxypolymer kann hergestellt werden durch Umsetzen des Polyhydroxypolymers mit Cyanogenbromid unter Verwendung von konventionellen Verfahren. Die resultierenden funktionellen Gruppen sind normalerweise Cyanatester mit zwei Hydroxygruppen des Polyhydroxypolymers.

[0217] Der Grad an Aktivierung kann ausgedrückt werden als das Verhältnis zwischen den freien Hydroxygruppen und den Aktivierungsgruppen (d. h. funktionalisierten Hydroxygruppen). Man glaubt, dass ein Verhältnis zwischen den freien Hydroxygruppen des Polyhydroxypolymers und den Aktivierungsgruppen zwischen 250:1 und 4:1 sein sollte, um eine vorteilhafte Balance zwischen der Hydrophilie und der Reaktivität des Po-

lyhydroxypolymers zu erhalten. Vorzugsweise ist das Verhältnis zwischen 100:1 und 6:1, stärker bevorzugt zwischen 60:1 und 8:1, insbesondere zwischen 40:1 und 10:1.

[0218] Besonders interessante aktivierte Polyhydroxypolymere zur Verwendung in dem Verfahren zur Herstellung des allgemein anwendbaren Immunogens gemäß der Erfindung sind Tresyl-, Tosyl- und Maleimido-aktivierte Polysaccharide, insbesondere Tresyl-aktiviertes Dextran (TAD), Tosyl-aktiviertes Dextran (TosAD) und Maleimido-aktiviertes Dextran (MAD).

[0219] Es ist bevorzugt, dass die Bindung zwischen dem Polyhydroxypolymerträger und den daran befestigten Aminosäuresequenzen mittels einer Peptidase spaltbar sind, z. B. wie eine Peptidase, aktiv beim Prozessieren von Antigenen in einer APC. Es ist deshalb bevorzugt, dass die wenigstens erste und wenigstens zweite Aminosäuresequenz über eine Amidbindung oder eine Peptidbindung an den aktivierten Polyhydroxypolymerträger gekoppelt sind. Es ist insbesondere bevorzugt, dass die wenigstens erste und wenigstens zweite Aminosäuresequenz jeweils die Stickstoffgruppierung ihrer jeweiligen Amidbindung bereitstellt.

[0220] Der Polyhydroxypolymerträger kann im Wesentlichen frei von Aminosäureresten sein, was erfordert, dass die Aktivierungsgruppe einen Teil einer Peptidase-spaltbaren Bindung beisteuert, jedoch kann der Träger wie oben erwähnt auch einfach einen Spacer einschließen, der wenigstens eine L-Aminosäure einschließt. Nichtsdestotrotz sind die wenigstens erste und wenigstens zweite Aminosäuresequenz normalerweise über den Stickstoff am N-Terminus der Aminosäuresequenz an die aktivierte Version des Polyhydroxypolymers gebunden.

[0221] Das oben beschriebene allgemein anwendbare Immunogen der vorliegenden Erfindung kann in Immunisierungsverfahren, im Wesentlichen wie hierin für Polypeptidimpfstoffe beschrieben, verwendet werden. Das heißt, alle Offenbarungen betreffend Dosierungen, Verabreichungsart und Formulierung von Polypeptidimpfstoffen für die Herabregulation der hierin diskutierten amyloidogenen Polypeptide finden mutatis mutandis auf die allgemein anwendbaren Immunogene Anwendung.

ALLGEMEIN ANWENDBARE SICHERE IMPFTECHNOLOGIE

[0222] Wie oben diskutiert, bringt eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung die Verwendung von Varianten amyloidogener Polypeptide mit sich, die nicht in der Lage sind, selbst-abgeleitete T_H-Epitope bereitzustellen, die eine Immunreaktion gegen das amyloidogene Polypeptid steuern können.

[0223] Jedoch glauben die vorliegenden Erfinder, dass diese Strategie für das Entwerfen von Anti-Selbst-Impfstoffen und für das Bewirken von Anti-Selbst-Immunität eine allgemein anwendbare Technologie ist, die mit eigenem Recht erfinderisch ist. Sie sollte sich besonders geeignet in Fällen erweisen, wo das Selbst-Antigen, das herabzuregulieren versucht wird, in ausreichendem Überschuss im Körper vorliegt, so dass es möglich ist, dass Selbst-Stimulation einer Immunreaktion passieren könnte. Folglich finden alle obigen Offenbarungen dieser Ausführungsform, sofern sie sich auf die Bereitstellung einer Anti-Selbst-Immunreaktion gegen APP oder A β bezieht, mutatis mutandis auf Immunisierung gegen andere Selbst-Polypeptide Anwendung, insbesondere jene, die in ausreichenden Mengen vorhanden sind, dass sie die Immunreaktion in der Form eines unkontrollierten Autoimmunzustands aufrechterhalten können, weil autologe T_H-Epitope des relevanten Selbst-Polypeptids die Immunreaktion antreiben.

VERGLEICHBSPIEL 1

Die Autoimpfungs-Vorgehensweise zur Immunisierung gegen AD

[0224] Die Tatsache, dass A β -Protein-knock-out-Mäuse keine Anormalitäten oder nachteiligen Nebenwirkungen zeigen, legt nahe, dass Entfernen oder Verringerung der Mengen von A β sicher sein wird, Zheng H. (1996).

[0225] Publierte Experimente, bei denen transgene Tiere gegen das transgene humane A β -Protein immunisiert werden, deuten darauf hin, dass Herabregulierung von A β durch autoreaktive Antikörper erreicht werden könnte, wenn es möglich wäre, Selbst-Toleranz zu brechen. Diese Experimente deuten ferner darauf hin, dass eine solche Herabregulierung von A β potentiell sowohl die Bildung von Plaques verhindern würde, als auch selbst bereits gebildete A β -Plaques aus dem Gehirn beseitigen würde, vgl. Schenk et al. (1999). Herkömmlich ist es jedoch nicht möglich, Antikörper gegen Selbst-Proteine zu erzeugen.

[0226] Die publizierten Daten stellen folglich nicht die Mittel für das Brechen wahrer Selbst-Toleranz gegen wahre Selbst-Proteine bereit. Die Daten stellen auch keine Informationen bereit, wie man sicherstellt, dass die Immunreaktion allein oder vorwiegend gegen die A β -Ablagerungen gerichtet ist und nicht gegen das Zellmembran-gebundene A β -Vorläuferprotein (APP), falls dies als notwendig erwartet wird. Eine Immunreaktion, erzeugt unter Verwendung der existierenden Technologie, würde vermutlich eine Immunreaktion gegenüber Selbst-Proteinen auf eine nicht-regulierte Weise erzeugen, so dass unerwünschte und exzessive Autoreaktivität gegenüber Teilen des A β -Proteins erzeugt werden könnte. Folglich wird man unter Verwendung existierender Immunisierungsstrategien höchstwahrscheinlich nicht in der Lage sein, starke Immunreaktionen gegenüber Selbst-Proteinen zu erzeugen, und wird ferner, bedingt durch potenzielle starke Kreuz-Reaktivität gegenüber Membran-gebundenem APP, welches auf einer großen Anzahl von Zellen im ZNS vorhanden ist, unsicher sein.

[0227] Die vorliegende Erfindung stellt die Mittel bereit, effektiv eine starke regulierte Immunreaktion gegenüber wahren Selbst-Proteinen zu erzeugen, welche potentiell Plaques bilden könnten und eine ernsthafte Krankheit im ZNS oder in anderen Kompartimenten des Körpers verursachen könnten. Ein sicherer und wirksamer therapeutischer Human-A β -Protein-Impfstoff wird unter Verwendung dieser Technologie für die Behandlung von AD entwickelt werden.

[0228] Im Lichte davon ist es möglich anzunehmen, dass AD, eine Krankheit, von der vorhergesagt wird, dass sie das Gesundheitssystem im nächsten Jahrhundert lahm legen wird, geheilt werden könnte oder solche beschriebenen Impfstoffe wenigstens eine effektive therapeutische Herangehensweise zur Behandlung der Symptome und des Fortschreitens dieser Krankheit darstellen könnten.

[0229] Diese Technik stellt einen vollständig neuen immunologischen Ansatz zum Blockieren von Amyloidablagerung bei AD und auch anderen neurologischen Krankheiten dar.

[0230] In der folgenden Tabelle sind 35 erwägte Konstrukte angezeigt. Alle in der Tabelle angegebenen Positionen sind relativ zum Start-Methionin von APP (erste Aminosäure in SEQ ID NO: 2) und schließen sowohl die Start- als auch End-Aminosäure ein, z. B. schließt das 672–714-Fragment sowohl Aminosäure 672 als auch 714 ein. Die Start- und End-Positionen für P2 und P30 zeigen an, dass das Epitop einen Teil des APP-Fragments bei den angezeigten Positionen (beide Positionen in der Substitution eingeschlossen) substituiert – in den meisten Konstrukten substituieren die eingeführten Epitope ein Fragment von der Länge des Epitops. Die Sterne in der Tabelle haben die folgende Bedeutung:

*) Nur eine Position für P2 und P30 zeigt an, dass das Epitop in das APP-Derivat an der angezeigten Position insertiert worden ist (das Epitop beginnt bei der Aminosäure, C-terminal benachbart zu der gegebenen Position).

**) Konstruktion 34 enthält drei identische APP-Fragmente, getrennt von P30 bzw. P2.

***) Konstruktion 35 enthält neun identische APP-Fragmente, getrennt durch abwechselnde P30- und P2-Epitope.

APP-Auto Vac-Konstruktionen

Var. Nr.	Start von APP-Segment relativ zu AS ("aa") 1 von APP	Ende von APP-Segment relativ zu AS ("aa") 1 von APP	Position von P2-Epitop relativ zu AS ("aa") 1 von APP	Position von P30-Epitop relativ zu AS ("aa") 1 von APP	Molekul-länge
1	630	770	656 - 670	635 - 655	141
2	630	714	656 - 670	635 - 655	85
3	672	770	735 - 749	714 - 728	99
4	672	770		714 - 728	99
5	672	770	714 - 728		99
6	672	770	723*	723*	135
7	672	770	723*	723*	120
8	672	770		672*	114
9	672	714		714*	64
10	672	714			64
11	672	714	672*		58
12	672	714	714*		58
13	672	714	714*	672*	79
14	672	714	680 - 694		43
15	672	714	685 - 799		43
16	672	714	690 - 704		43
17	672	714	695 - 709		43
18	672	714		675 - 695	43
19	672	714		680 - 700	43
20	672	714		685 - 705	43
21	672	714		690 - 710	43
22	672	714	680*	680*	79
23	672	714	690*	690*	79
24	672	714	700*	700*	79
25	672	714	710*	710*	79
26	672	714		680*	64
27	672	714		690*	64
28	672	714		700*	64
29	672	714		710*	64
30	672	714	680*		58
31	672	714	690*		58
32	672	714	700*		58
33	672	714	710*		58
34	672	714	nach Wdh. ("rep.") 1**	nach Wdh. ("rep.") 2**	165
35	672	714	34 x 3*	34 x 3***	165

[0231] Der Teil von APP, gegen welchen es am interessantesten ist, eine Reaktion zu erzeugen, ist das 43 Aminosäure-A β -Core-Peptid (A β -43, entsprechend SEQ ID NO: 2, Reste 672–714), das der Hauptbestandteil von Amyloidplaques in AD-Gehirnen ist. Dieses APP-Fragment ist Teil aller oben aufgelisteten Konstruktionen.

[0232] Varianten 1 und 2 umfassen einen Anteil von APP stromaufwärts von A β -43, wo die Modellepitope P2 und P30 platziert worden sind. Varianten 1 und 3–8 umfassen alle das C-100-Fragment, von welchem gezeigt worden ist, dass es neurotoxisch ist – das C-100-Fragment entspricht den Aminosäureresten 714–770

von SEQ ID NO: 2. In Varianten 3–5 ersetzen die Epitope einen Teil des C-100-Fragments, während sie in Varianten 6–8 in C-100 insertiert worden sind.

[0233] Varianten 9–35 enthalten nur das Core-A β -43-Protein. In Varianten 9–13 sind P2 und P30 an eines der beiden Enden von A β -43 fusioniert; in 14–21 substituiert P2 und P30 einen Teil von A β -43; in 22–33 sind P2 und P30 in A β -43 insertiert; 34 enthält drei identische A β -43-Fragmente, getrennt ("spaced") von P30 bzw. P2; 35 enthält 9 A β -43-Wiederholungen, getrennt ("spaced") durch Alternieren der P2- und P30-Epitope.

[0234] Trunkierte Teile des oben diskutierten A β -43-Proteins können auch in immunogenen Analoga gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden. Insbesondere bevorzugt sind die Trunkierungen A β (1–42), A β (1–40), A β (1–39), A β (1–35), A β (1–34), A β (1–34), A β (1–28), A β (1–12), A β (1–5), A β (13–28), A β (13–35), A β (17–28), A β (25–35), A β (35–40), A β (36–42) und A β (35–42) (wobei die Zahlen in den Klammern die Aminosäureabschnitte von A β -43 anzeigen, die das relevante Fragment darstellen – A β (35–40) ist z. B. identisch mit Aminosäuren 706–711 in SEQ ID NO: 2). All diese Varianten mit trunkierten Teilen von A β -43 können mit den A β -Fragmenten, die hierin beschrieben sind, insbesondere mit Varianten 9, 10, 11, 12 und 13, hergestellt werden.

[0235] In manchen Fällen ist es bevorzugt, dass das A β -43 oder Fragmente davon mutiert sind. Insbesondere bevorzugt sind Substitutionsvarianten, wobei das Methionin in Position 35 in A β -43 substituiert worden ist, vorzugsweise mit Leucin oder Isoleucin, oder einfach deletiert ist. Insbesondere bevorzugte Analoga enthalten ein einzelnes Methionin, das im C-Terminus lokalisiert ist, entweder weil es in dem amyloidogenen Polypeptid oder fremden T_H-Epitop natürlich vorkommt, oder weil es insertiert oder addiert worden ist. Folglich ist außerdem bevorzugt, dass der Teil des Analogons, der das fremde T_H-Epitop einschließt, mit Ausnahme der möglichen C-terminalen Lokalisierung eines Methionins, frei von Methionin ist.

[0236] Tatsächlich ist im Allgemeinen bevorzugt, dass alle Analoga von APP oder A β , die gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden, das Charakteristikum gemeinsam haben, dass sie lediglich ein einzelnes Methionin beinhalten, das als die C-terminale Aminosäure im Analogon positioniert ist und dass andere Methionine entweder im amyloidogenen Polypeptid oder dem fremden T_H-Epitop deletiert sind oder mit einer anderen Aminosäure substituiert sind.

[0237] Eine weitere interessante Mutation ist eine Deletion oder Substitution des Phenylalanins in Position 19 in A β -43, und es ist besonders bevorzugt, dass die Mutation eine Substitution eines Phenylalaninrests mit einem Prolin ist.

[0238] Die folgende Tabelle legt eine Gruppe besonders bevorzugter Konstrukte dar, die mit Trunkierungen oder Mutationen von A β -43 arbeiten:

Variante Nr.	A β -Segment, verwendet im Molekül, relativ zu As 1 von A β (1–42/43)	Position von A β -Segment relativ zu As 1 des Moleküls	Position von P2-Epitop relativ zu As 1 des Moleküls	Position des P30-Epitops relativ zu As 1 des Moleküls	Gesamtlänge des Moleküls (As)
36	1–28	22–49	50–64	1–21	64
37	1–12 (a) + 13–28 (b)	1–12 (a) + 49–64 (b)	34–48	13–33	64
38	1–12 (\times 3)	1–12, 34–45, 61–72	46–60	13–33	72
39	13–28 (\times 3)	1–16, 38–53, 69–84	54–68	17–37	84
40	1–12 (a) + 13–35 (b) + 36–42 (c)	1–12 (a) + 34–56 (b) + 72–78 (c)	57–71	13–33	78
41	1–28 (\times 3)	1–28, 50–77, 93–120	78–92	29–49	120
42	1–43 (F19P/M35K)	1–43	65–79	44–64	79

[0239] In dieser Tabelle ist das A β -Segment, verwendet in dem Molekül, durch Aminosäurenummern relativ zu As 1 des A β (1–42/43)-Moleküls angezeigt, d. h. 1–28 bedeutet, dass Fragment 1–28 von A β (1–42/43) in dem Molekül verwendet wird. Wenn zwei oder mehrere unterschiedliche Segmente verwendet werden, sind beide in der Tabelle angezeigt, d. h. 1–12 (a) + 13–28 (b) bedeutet, dass sowohl Fragment 1–12 als auch Fragment 13–28 von A β (1–42/43) in dem Molekül verwendet werden.

[0240] Außerdem ist es in der Tabelle angezeigt, wenn das gleiche Segment in mehr als einer Kopie in der Konstruktion vorhanden ist, d. h. 1–12 (\times 3) zeigt, dass Fragment 1–12 von A β (1–42/43) in der Konstruktion in drei Kopien vorhanden ist.

[0241] Weiterhin ist die Position des A β -Segments im Molekül durch Aminosäurepositionen relativ zur ersten Aminosäure des Moleküls gezeigt, d. h. 22–49 zeigt, dass das zur Frage stehende A β -Fragment von Aminosäure 22 bis Aminosäure 49 in dem Molekül positioniert ist, wobei beide Positionen eingeschlossen sind. Positionen des P2- und P30-Epitops sind äquivalent angezeigt. Wenn zwei oder mehr unterschiedliche A β -Fragmente in dem Molekül verwendet werden, sind all ihre Positionen gezeigt, d. h. 1–12 (a) + 49–64 (b) bedeutet, dass Fragment (a) von As 1–12 in dem Molekül positioniert ist und Fragment (b) von As 49–64.

[0242] Weiterhin sind, wenn mehr als eine Kopie des gleichen Fragments in dem Molekül vorhanden ist, Positionen für alle Kopien gezeigt, d. h. 1–12, 34–45, 61–72 zeigt, dass drei Kopien des A β -Fragments von Position 1–12, 34–45 bzw. 61–72 in dem Molekül platziert sind.

[0243] Schließlich beinhaltet die Gesamtlängenkennzeichnung jedes Moleküls sowohl das A β -Fragment/die A β -Fragmente und die P2- und P30-Epitope.

[0244] Variante 42 enthält zwei Aminosäuresubstitutionen bei Positionen 19 (Phe zu Pro) und 35 (Met zu Lys), wie es in der Säule angezeigt ist, die die A β -Fragmente anzeigt.

[0245] Siehe **Fig. 1** und die obigen Tabellen für Details bezüglich spezieller Punkte der Einführung der fremden T-Zell-Epitope.

[0246] Ein weiterer Konstrukttyp ist besonders bevorzugt. Nachdem es ein Ziel der vorliegenden Erfindung ist, Zerstörungen der Zellen, die APP produzieren, zu vermeiden, wohingegen Entfernen von A β erwünscht ist, scheint es möglich, Autoimpfstoff-Konstrukte herzustellen, die nur Teile von A β umfassen, welche nicht gegenüber der extrazellulären Phase ausgesetzt sind, wenn sie in APP vorhanden sind. Folglich müssten derartige Konstrukte wenigstens ein B-Zell-Epitop enthalten, das von dem Aminosäurefragment, definiert durch Aminosäuren 700–714 in SEQ ID NO: 2, abgeleitet ist. Da vorhergesagt wird, dass solch ein kurzes Polypeptidfragment nur schwach immunogen ist, ist es bevorzugt, dass solch ein Autoimpfstoff-Konstrukt aus mehreren Kopien des B-Zell-Epitops besteht, z. B. in der Form eines Konstrukts, das die in Formel I in der detaillierten Beschreibung der Erfindung gezeigte Struktur aufweist, vgl. oben. In dieser Version von Formel I sind die Ausdrücke Amyloid_{e1}-Amyloid_{ex} \times B-Zell-Epitope enthaltend Aminosäuresequenzen, abgeleitet von Aminosäuren 700–714 von SEQ ID NO: 2. Eine bevorzugte Alternative ist die oben im Detail beschriebene Möglichkeit des Koppelns des amyloidogenen (Poly)peptids und des ausgewählten fremden T-Helfer-Epitops zu über eine Amidbindung an ein Polysaccharid-Trägermolekül – auf diese Weise werden Mehrfachpräsentationen des "schwachen" Epitops, dargestellt durch die Aminosäuren 700–714 von SEQ ID NO: 2, möglich, und es wird außerdem möglich, ein optimales Verhältnis zwischen B-Zell- und T-Zell-Epitopen auszuwählen.

VERGLEICHBSPIEL 2

Immunisierung transgener Mäuse mit A β und modifizierten Proteinen

[0247] Konstruktion der hAB43+-34-codierenden DNA. Das hAB43+-34-Gen wurde in mehreren Stufen konstruiert. Zuerst wurde mit den Primern ME#801 (SEQ ID NO: 10) und ME#802 (SEQ ID NO: 11) unter Verwendung von Primer ME#800 (SEQ ID NO: 9) als Matrize ein PCR-Fragment erzeugt. ME#800 codiert das humane A β -43-Fragment mit E. coli-optimierten Codons. ME#801 und 802 addieren geeignete Restriktionsstellen zu dem Fragment.

[0248] Das PCR-Fragment wurde gereinigt, mit NcoI und HindIII verdaut, wiederum gereinigt und in einen NcoI-HindIII-verdauten und gereinigten pET28b+-E. coli-Expressionsvektor kloniert. Das resultierende Plasmid, codierend humanes Wildtyp-A β -43, wird pAB1 genannt.

[0249] Im nächsten Schritt wird das T-Helfer-Epitop, P2, zu dem C-Terminus des Moleküls addiert. Primer ME#806 (SEQ ID NO: 12) enthält die Sequenz, die das P2-Epitop codiert, was folglich eine Fusion von P2 und A β -43 mittels PCR-Reaktion erzeugt.

[0250] Das Klonieren wurde durchgeführt, indem ein PCR-Fragment mit den Primern ME#178 (SEQ ID NO: 8) und ME#806 unter Verwendung von pAB1 als Matrize hergestellt wurde. Das Fragment wurde gereinigt, mit NcoI und HindIII verdaut, wieder gereinigt und in einen NcoI-HindIII-verdauten und gereinigten pET28b+-Vektor kloniert. Das resultierende Plasmid wird pAB2 genannt.

[0251] Auf analoge Weise wurde ein anderes Plasmid hergestellt, das die A β -43-codierende Sequenz mit einem weiteren T-Helfer-Epitop, P30, addiert an den N-Terminus, beherbergt. Dies wurde durchgeführt, indem mit Primern ME#105 (SEQ ID NO: 7) und ME#807 (SEQ ID NO: 13) unter Verwendung von pAB1 als Matrize ein PCR-Fragment hergestellt wurde.

[0252] Das Fragment wurde gereinigt, mit NcoI und HindIII verdaut, wiederum gereinigt und in einen NcoI-HindIII-verdauten und gereinigten pET28b+-Vektor kloniert. Das resultierende Plasmid wird pAB3 genannt.

[0253] In dem dritten Schritt wird eine zweite A β -43-Wiederholung C-terminal an das P2-Epitop von Plasmid pAB2 mittels Primer ME#809 (SEQ ID NO: 14) addiert. ME#809 erzeugt zur gleichen Zeit eine BamHI-Stelle unmittelbar nach der A β -43-Wiederholung. Ein PCR-Fragment wurde mit Primern ME#178 und ME#809 unter Verwendung von pAB2 als Matrize hergestellt. Das Fragment wurde mit NcoI und HindIII verdaut, gereinigt und in einem NcoI-HindIII-verdauten und gereinigten pET28b+-Vektor kloniert. Dieses Plasmid wird pAB4 genannt.

[0254] Schließlich wurde die P30-Epitop-A β -43-Wiederholung-Sequenz von pAB3 in das pAB4-Plasmid kloniert. Dies wurde durchgeführt, indem ein PCR-Fragment mit Primern ME#811 (SEQ ID NO: 16) und ME#105 unter Verwendung von pAB3 als Matrize hergestellt wurde. Das Fragment wurde gereinigt und in einer nachfolgenden PCR mit ME#810 (SEQ ID NO: 15) unter Verwendung von pAB3 als Matrize als Primer verwendet. Das resultierende Fragment wurde gereinigt, mit BamHI und HindIII verdaut und in BamHI-HindIII-verdautes und gereinigtes pAB4-Plasmid kloniert. Das resultierende Plasmid, pAB5, codiert das hAB43+-34-Molekül.

[0255] Alle PCR- und Klonierungs-Vorgehensweisen wurden im Wesentlichen, wie von Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T., 1989, "Molecular cloning: a laboratory manual", zweite Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. beschrieben, durchgeführt.

[0256] Für alle Klonierungs-Vorgehensweisen wurden E. coli-K-12-Zellen, Stamm Top-10 F' (Stratagene, USA), verwendet. Der pET28b+-Vektor wurde von Novagen, USA, erworben. Alle Primer wurden bei DNA Technology, Dänemark, synthetisiert.

[0257] Expression und Reinigung von hAB43+-34. Das hAB43+-34-Protein, codiert von pAB5, wurde in BL 21-Gold(Novagen)-E. coli-Zellen wie von den Lieferanten des pET28b+-Systems (Novagen) beschrieben, exprimiert.

[0258] Das exprimierte hAB43+-34-Protein wurde zu mehr als 85% Reinheit durch Waschen von Einschlusskörpern ("inclusion bodies"), gefolgt von Kationenaustauschchromatographie unter Verwendung einer BioCad-Reinigungs-Arbeitsstation (PerSeptive Biosystems, USA) in Gegenwart von 6 M Harnstoff gereinigt. Der Harnstoff wurde nachfolgend durch schrittweise Dialyse gegen eine Lösung, enthaltend abnehmende Mengen an Harnstoff, entfernt. Der End-Puffer war 10 mM Tris, pH 8,5.

[0259] Immunisierungsstudie. Mäuse, transgen für humanes APP (Alzheimer-Vorläuferprotein), wurden für die Studie verwendet. Diese Mäuse, genannt TgRND8+, exprimieren eine mutierte Form von APP, die in einer hohen Konzentration von A β -40 und A β -42 in den Gehirnen der Mäuse resultiert (Janus, C. et al.).

[0260] Die Mäuse (8–10 Mäuse pro Gruppe) wurden entweder mit A β -42 (SEQ ID NO: 2, Reste 673–714, synthetisiert mittels einer Standard-Fmoc-Strategie) oder der hAB43+-34-Variante (Konstrukt 34 in der Tabelle in Beispiel 1, rekombinant produziert) viermal in Zwei-Wochen-Intervallen immunisiert. Dosen waren entweder 100 mg für A β oder 50 mg für hAB43+-34. Den Mäusen wurde am Tag 43 (nach drei Injektionen) und nach Tag 52 (nach vier Injektionen) Blut entnommen, und die Seren wurden verwendet, um den Level von Anti-A β -42-spezifischen Titern unter Verwendung eines direkten A β -42-ELISA zu bestimmen.

[0261] Die nachfolgende Tabelle zeigt die mittleren relativen anti-A β -42-Titer:

Immungen	Tag 43 (nach drei Immunisierungen)	Tag 52 (nach vier Immunisierungen)
A β -42 hAB43+-34	4000 16000	3000 23000

[0262] Wie klar sein wird, sind die Antikörper-Titer, die erhalten wurden, wenn mit der hAB43+-34-A β -Variante immunisiert wurde, nach drei bzw. vier Immunisierungen 4-mal bzw. 7,5-mal höher als die Titer, die erhalten wurden, wenn das unveränderte Wildtyp-A β -42 als ein Immungen eingesetzt wurde. Diese Tatsache wird weiter ins rechte Licht gerückt, wenn man die Tatsache bedenkt, dass die Menge an Variante, die für die Immunisierung verwendet wurde, nur 50% der Menge an Wildtyp-Sequenz, die zur Immunisierung verwendet wurde, betrug.

VERGLEICHBSBEISPIEL 3

Synthese eines A β -Peptid-Copolymer-Impfstoffs unter Verwendung von aktiviertem Polyhydroxypolymer als das Vernetzungsmittel

[0263] Einführung. Ein traditioneller Konjugat-Impfstoff besteht aus einem (Poly)peptid, das kovalent an ein Trägerprotein gekoppelt ist. Das Peptid enthält das B-Zell-Epitop/die B-Zell-Epitope, und das Träger-Protein stellt die T-Helfer-Epitope bereit. Jedoch wird das Meiste des Trägerproteins normalerweise als eine Quelle für T-Helfer-Epitope irrelevant sein, weil nur ein geringer Teil der gesamten Sequenz die relevanten T-Helfer-Epitope enthält. Solche Epitope können als Peptide von z. B. 12–15 Aminosäuren definiert und synthetisiert werden.

[0264] Wenn diese Peptide kovalent mit Peptiden verknüpft werden, die die B-Zell-Epitope enthalten, z. B. über ein multivalentes aktiviertes Polyhydroxypolymer, kann ein Impfstoff-Molekül erhalten werden, das nur die relevanten Teile enthält. Es ist weiterhin möglich, ein Impfstoff-Konjugat bereitzustellen, dass ein optimiertes Verhältnis zwischen B-Zell- und T-Zell-Epitopen enthält.

[0265] Synthese des aktivierten Polyhydroxypolymers. Polyhydroxypolymere wie z. B. Dextran, Stärke, Agarose etc. können mit 2,2,2-Trifluorethansulfonylchlorid (Tresylchlorid) entweder mittels einer homogenen Synthese (Dextran), aufgelöst in N-Methylpyrrolidinon (NMP), oder mittels einer heterogenen Synthese (Stärke, Agarose, quervernetztes Dextran) in z. B. Aceton aktiviert werden.

[0266] 225 ml trockenes N-Methylpyrrolidinon (NMP) werden unter trockenen Bedingungen in einem 500 ml-Rundkolben, ausgestattet mit einem Magneten zum Rühren, zu gefriergetrocknetem wasserlöslichen Dextran (4,5 g, 83 mmol, klinischer Grad, durchschnittliches Molekulargewicht 78000) gegeben. Der Kolben wird in einem 60°C-Ölbad mit magnetischem Rühren platziert. Die Temperatur wird über einen Zeitraum von 20 min auf 92°C erhöht. Wenn das Dextran aufgelöst ist, wird der Kolben unmittelbar von dem Ölbad entfernt, und die Temperatur im Bad wird auf 40°C erniedrigt. Der Kolben wird wiederum in dem Ölbad platziert, nach wie vor mit magnetischem Rühren, und Tresylchlorid (2,764 ml, 25 mmol) wird tropfenweise zugegeben. Nach 15 min wird trockenes Pyridin (wasserfrei, 2,020 ml, 25 mmol) tropfenweise zugegeben. Der Kolben wird von dem Ölbad entfernt und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt (Tresyl-aktiviertes Dextran, TAD) wird in 1200 ml kaltem Ethanol (99,9%) gefällt. Der Überstand wird abgegossen und das Präzipitat in 50 ml-Polypropylenröhrchen in einer Zentrifuge bei 2000 U/min gewonnen. Das Präzipitat wird in 50 ml 0,5% Essigsäure gelöst, 2 mal gegen 5000 ml 0,5% Essigsäure dialysiert und gefriergetrocknet. TAD kann als ein gefriergetrocknetes Pulver bei –20°C gelagert werden.

[0267] Ein unlösliches Polyhydroxypolymer, wie z. B. Agarose oder quervernetztes Dextran, kann Tresyl-aktiviert werden, indem eine Suspension des Polyhydroxypolymers in z. B. Aceton hergestellt wird und die Synthese als eine Festphasensynthese durchgeführt wird. Das aktivierte Polyhydroxypolymer kann mittels Filtration gewonnen werden. Geeignete Verfahren sind z. B. in K. Nilsson und K. Mosbach (1987), *Methods in Enzymology* 135, S. 67 und in G. T. Hermansson et al. (1992) in "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, Inc., S. 87 dargelegt.

[0268] Synthese der A β -Peptid-Copolymer-Impfstoffe. TAD (10 mg) wird gelöst in 100 μ l H₂O und 1000 μ l Carbonatpuffer, pH 9,6, enthaltend 5 mg A β -42 (SEQ ID NO: 2, Reste 673–714), 2,5 mg P2 (SEQ ID NO: 4) und 2,5 mg P30 (SEQ ID NO: 6), werden zugegeben. Die A β -42- und die P2- und P30-Peptide enthalten alle geschützte Lysingruppen. Diese sind in der Form von 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl (Dde)

-geschützten Lysingruppen. Die Peptide werden mittels einer Standard-Fmoc-Strategie hergestellt, wobei das konventionelle Fmoc-Lys(Boc)-OH substituiert worden ist mit Fmoc-Lys(Dde)-OH (erhalten von Novabiochem, Kat. Nr. 04-12-1121), d. h. die ϵ -Aminogruppe in Lysin wird mit Dde anstelle von Boc geschützt.

[0269] Der pH-Wert wird gemessen und unter Verwendung von 1 M HCl auf 9,6 eingestellt. Nach 2,5 Stunden bei Raumtemperatur wird Hydrazin von einer 80%igen Lösung zu einer End-Hydrazinkonzentration von 8% zugegeben und die Lösung wird weitere 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und unmittelbar danach gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Produkt wird in H_2O gelöst und vor dem endgültigen Gefriertrocknen extensiv gegen H_2O dialysiert.

[0270] Das Verhältnis zwischen B-Zell-Epitopen (A β) und T-Helfer-Epitopen (P2 und P30) im Endprodukt kann durch Verwendung verschiedener Konzentrationen dieser Peptide im Syntheseschritt variiert werden. Weiterhin kann das Endprodukt mit z. B. Mannose markiert werden (um das Konjugat zu APCs zu targetieren), indem dem Carbonatpuffer im Syntheseschritt aminierte Mannose zugesetzt wird.

[0271] Wenn ein unlösliches aktiviertes Polyhydroxypolymer verwendet wird, um die Peptide, enthaltend das B-Zell-Epitop und die T-Helfer-Epitope, zu kombinieren, kann das Koppeln an das Polymer als eine Festphasensynthese durchgeführt werden und wird das Endprodukt durch Waschen und Filtration gewonnen und gereinigt.

[0272] Wie in der allgemeinen Beschreibung erwähnt, kann die gegenwärtig beschriebene Vorgehensweise für das Herstellen eines Peptid-basierten Impfstoffs auf ein beliebiges weiteres Polypeptid-Antigen angewendet werden, wo es zweckdienlich wäre, einen rein synthetischen Peptidimpfstoff herzustellen und wo das zur Frage stehende Polypeptid-Antigen eine ausreichende Immunogenität in einem einzelnen Peptid liefert:

VERGLEICHSBEISPIEL 4

Synthesepeptid-Copolymer-Impfstoffe

[0273] TAD (10 mg) wird in 100 μ l H_2O gelöst und 1000 μ l Carbonatpuffer, pH 9,6, enthaltend 1–5 mg Peptid A (ein beliebiges immunogenes Peptid von Interesse!), 1–5 mg P2 (Diphtherietoxoid-P2-Epitop) und 1–5 mg P30 (Diphtherietoxoid-P30-Epitop), wird zugegeben. Der pH-Wert wird gemessen und unter Verwendung von 0,1 M HCl auf 9,6 eingestellt.

[0274] Nach 2,5 Stunden bei Raumtemperatur wird die Lösung unmittelbar danach gefriergetrocknet. Das gefriergetrocknete Produkt wird in H_2O gelöst und vor dem endgültigen Gefriertrocknen extensiv gegen H_2O dialysiert oder auf einer Gelfiltrationssäule entsalzt. Im Fall, dass die Peptide Lysin in der Sequenz aufweisen, sollte das ϵ -Amin in der Lysin-Seitenkette mittels Dde unter Verwendung des Fmoc-Lys(Dde)-OH-Derivats bei der Synthese geschützt werden (Gegorius und Theisen 2001, eingereicht). Nach Koppeln wird Hydrazin aus einer 80%igen Lösung zu einer endgültigen Hydrazinkonzentration zwischen 1–20% zugegeben, und die Lösung wird weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, unmittelbar danach gefriergetrocknet und vor dem endgültigen Gefriertrocknen extensiv gegen H_2O dialysiert oder auf einer Gelfiltrationssäule entsalzt. Das Prinzip ist in schematischer Form in **Fig. 2** dargelegt.

[0275] Solche Immunogene sind von den Erfindern mit einem kurzen C-terminalen Fragment des *Borrelia burgdorferi*-Proteins OspC als "Peptid A" und einem Diphtherietoxoid-Epitop (P2 oder P30) als ein "Peptid B" verwendet worden. Die Ergebnisse der Immunisierungsstudien mit diesem Antigen deckten auf, dass nur das erfindungsgemäße Immunogen, beinhaltend das OspC-Fragment und ein fremdes Diphtherie-Epitop, das zu dem MHC-Haplotyp der geimpften Mäuse passt, in der Lage waren, Antikörper, reaktiv mit OspC, in diesen Mäusen zu induzieren. Im Gegensatz dazu war ein Molekül, das nur das OspC-Peptid enthielt, nicht in der Lage Antikörperproduktion zu induzieren und das Gleiche galt für ein Gemisch von zwei Immunogenen, wobei eines das OspC enthielt und das andere das Epitop enthielt. Es wird deshalb gefolgert, dass das Einschließen in dem gleichen Polyhydroxypolymerträger überlegen, wenn nicht essentiell ist, um Antikörperproduktion gegen ein kurzes Peptid-Hapten wie OspC zu induzieren.

REFERENZLISTE

- Brookmeyer, R.; Gray, S.; Kavas, C. (1998), Projections of Alzheimer's Disease in the United States and the Public Health Impact of Delaying Disease Onset. *American Journal of Public Health*, 88(9), 1337–1342.
- Buttini, M.; Orth, M.; Bellosta, S.; Akeefe, H.; Pitas, R. E.; Wyss-Coray, T.; Mucke, L.; Mahley, R. W. (1999). Expression of Human Apolipoprotein E3 or E4 in the Brains of Apoe^{-/-}Mice: Isoform-Specific Effects on Neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, 19, 4867–4880.
- Clark, L. N.; Poorkaj, P.; Wszolek, Z.; Geschwind, D. H.; Nasreddine, Z. S.; Miller, B.; Li, D.; Payami, H.; Awert, F.; Markopoulou, K.; Andreadis, A.; D'Souza, I.; Lee, V. M.; Reed, L.; Trojanowski, J. Q.; Zhukareva, V.; Bird, T.; Schellenberg, G.; Wilhelmsen, K. C. (1998). Pathogenic Implications of Mutations in the Tau Gene in Pallido-Ponto-Nigral Degeneration and Related Neurodegenerative Disorders Linked to Chromosome 17. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.*, 95(22), 13103–13107.
- Gupta, R. K. et al. (1998), *Dev Biol Stand.* 92: 63–78.
- Hsiao K. et al. (1998) Transgenic mice expressing Alzheimer amyloid precursor proteins", *Exp. Gerontol.* 33(7–8), 883–889
- Hutton, M.; Lendon, C. L.; Rizzu, P.; Baker, M.; Froelich, S.; Houlden, H.; Pickering-Brown, S.; Chakraborty, S.; Isaacs, A.; Grover, A.; Hackett, J.; Adamson, J.; Lincoln, S.; Dickson, D.; Davies, P.; Petersen, R. C.; Stevens, M.; de Graaff, E.; Wauters, E.; van Baren, J.; Hillebrand, M.; Joosse, M.; Kwon, J. M.; Nowotny, P.; Che, L. K.; Norton, J.; Morris, J. C.; Reed, L. E.; Trojanowski, J.; Basun, H.; Lannfelt, L.; Neystat, M.; Fahn, S.; Dark, F.; Tannenberg, T.; Dodd, P.; Hayward, N.; Kwok, J. B. J.; Schofield, P. R.; Andreadis, A.; Snowden, J.; Craufurd, D.; Neary, D.; Owen, F.; Oostra, B. A.; Hardy, J.; Goate, A.; van Swieten, J.; Mann, D.; Lynch, T.; Heutink, P. (1998). Association of Missense and 5'-Splice-Site Mutations in Tau with the Inherited Dementia FTDP-17. *Nature*, 393, 702–705.
- Janus, C. et al. (2000), *Nature* 408: 979–982.
- Kas, H. S. (1997) *J Microencapsul* 14: 689–711
- Leon, J.; Cheng, C. K.; Neumann, P. J. (1998). Alzheimer's Disease Care: Costs and Potential Savings. *Health Affairs*, 17(6), 206–216.
- Lippa C. F. et al. (1998) Ab-42 deposition precedes other changes in PS-1 Alzheimer's disease. *Lancet* 352, 1117–1118
- Luo, J.-J.; Wallace, W.; Riccioni, T.; Ingram, D. K.; Roth, G. S.; Kusiak, J. W. (1999). Death of PC12 Cells and Hippocampal Neurons Induced by Adenoviral-Mediated FAD Human Amyloid Precursor Protein Gene Expression. *Journal of Neuroscience Research*, 55(5), 629–642.
- Naruse, S.; Thinakaran, G.; Luo, J.-J.; Kusiak, J. W.; Tomita, T.; Iwatsubo, T.; Qian, X.; Ginty, D. D.; Price, D. L.; Borchelt, D. R.; Wong, P. C.; Sisodia, S. S. (1998). Effects of PS1 Deficiency on Membrane Protein Trafficking in Neurons. *Neuron*, 21(5), 1213–1231.
- National Institute on Aging Progress Report on Alzheimer's Disease, 1999, NIH Publication No. 99-4664.
- Pietrobon, P. J. (1995), *Pharm Biotechnol.* 6: 347–61 Poorkaj, P.; Bird, T. D.; Wijsman, E.; Nemens, E.; Garruto, R. M.; Anderson, L.; Andreadis, A.; Wiederhold, W. C.; Raskind, M.; Schellenberg, G. D. (1998). Tau is a Candidate Gene for Chromosome 17 Frontotemporal Dementia. *Annals of Neurology*, 43, 815–825.
- Schenk, D.; Barbour, R.; Dunn, W.; Gordon, G.; Grajeda, H.; Guido, T.; Hu, K.; Huang, J.; Johnson-Wood, K.; Khan, K.; Kholodenko, D.; Lee, M.; Liao, Z.; Lieberburg, I.; Motter, R.; Mutter, L.; Soriano, F.; Shopp, G.; Vasquez, N.; Vandever, C.; Walker, S.; Wogulski, M.; Yednock, T.; Games, D.; Seubert, P. (1999). Immunization with A-beta Attenuates Alzheimer's Disease-Like Pathology in the PDAPP Mouse. *Nature*, 400(6740), 173–177.
- Shekunov, B. et al. (1999), *J. Crystal Growth* 198/199: 1345–1351.
- Spillantini, M. G.; Murrell, J. R.; Goedert, M.; Farlow, M. R.; Klug, A.; Ghetti, B. (1998). Mutation in the Tau Gene in Familial Multiple System Tauopathy with Presenile Dementia. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 95(13), 7737–7741.
- Strittmatter, W. J.; Saunders, A. M.; Schmechel, D.; Pericak-Vance, M.; Enghlid, J.; Salvesen, G. S.; Roses, A. D. (1993). Apolipoprotein E: High-Avidity Binding to A β and Increased Frequency of Type 4 Allele in Late-Onset Familial Alzheimer Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 90, 1977–1981.
- Vidal, R.; Frangione, B.; Rostagno, A.; Mead, S.; Revesz, T.; Plant, G.; Ghiso, J. (1999). A Stop-Codon Mutation in the BRI Gene Associated with Familial British Dementia. *Nature*, 399: 778–781.
- Zheng H. (1998) "Mice deficient for the amyloid precursor protein gene. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 777, 421–428.
- York, P. (1999), *PSTT* 11: 430–440

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Pharmexa A/S

<120> Neues Verfahren zur Herabregulation von Amyloid

<130> P1014PC1

<140>

<141>

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1

<211> 2313

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (2313)

<220>

<221> misc_feature

<222> (2098) .. (2169)

<223> Nucleotide, codierend Transmembranregion

<220>

<221> misc_feature

<222> (2014) .. (2313)

<223> Nucleotide, codierend C-100

<220>

<221> misc_feature

<222> (2016) .. (2144)

<223> Abeta 42/43

<220>

<221> misc_feature

<222> (2014) .. (2142)

<223> Abeta 42/43

<400> 1

atg	ctg	ccc	ggt	ttg	gca	ctg	ctc	ctg	ctg	gcc	gcc	tgg	acg	gct	cgg	48
Met	Leu	Pro	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Trp	Thr	Ala	Arg	
1				5					10					15		

gcg	ctg	gag	gta	ccc	act	gat	ggt	aat	gct	ggc	ctg	ctg	gct	gaa	ccc	96
Ala	Leu	Glu	Val	Pro	Thr	Asp	Gly	Asn	Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Glu	Pro	
			20					25					30			

cag	att	gcc	atg	ttc	tgt	ggc	aga	ctg	aac	atg	cac	atg	aat	gtc	cag	144
Gln	Ile	Ala	Met	Phe	Cys	Gly	Arg	Leu	Asn	Met	His	Met	Asn	Val	Gln	
		35					40					45				

aat ggg aag tgg gat tca gat cca tca ggg acc aaa acc tgc att gat	192
Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp	
50 55 60	
acc aag gaa ggc atc ctg cag tat tgc caa gaa gtc tac cct gaa ctg	240
Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu	
65 70 75 80	
cag atc acc aat gtg gta gaa gcc aac caa cca gtg acc atc cag aac	288
Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn	
85 90 95	
tgg tgc aag cgg ggc cgc aag cag tgc aag acc cat ccc cac ttt gtg	336
Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val	
100 105 110	
att ccc tac cgc tgc tta gtt ggt gag ttt gta agt gat gcc ctt ctc	384
Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu	
115 120 125	
gtt cct gac aag tgc aaa ttc tta cac cag gag agg atg gat gtt tgc	432
Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys	
130 135 140	
gaa act cat ctt cac tgg cac acc gtc gcc aaa gag aca tgc agt gag	480
Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu	
145 150 155 160	
aag agt acc aac ttg cat gac tac ggc atg ttg ctg ccc tgc gga att	528
Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile	
165 170 175	
gac aag ttc cga ggg gta gag ttt gtg tgt tgc cca ctg gct gaa gaa	576
Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu	
180 185 190	
agt gac aat gtg gat tct gct gat gcg gag gag gat gac tcg gat gtc	624
Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val	
195 200 205	
tgg tgg ggc gga gca gac aca gac tat gca gat ggg agt gaa gac aaa	672
Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys	
210 215 220	
gta gta gaa gta gca gag gag gaa gaa gtg gct gag gtg gaa gaa gaa	720
Val Val Glu Val Ala Glu Glu Glu Glu Val Ala Glu Val Glu Glu Glu	
225 230 235 240	
gaa gcc gat gat gac gag gac gat gag gat ggt gat gag gta gag gaa	768
Glu Ala Asp Asp Asp Glu Asp Asp Glu Asp Gly Asp Glu Val Glu Glu	
245 250 255	
gag gct gag gaa ccc tac gaa gaa gcc aca gag aga acc acc agc att	816
Glu Ala Glu Glu Pro Tyr Glu Glu Ala Thr Glu Arg Thr Thr Ser Ile	
260 265 270	
gcc acc acc acc acc acc acc aca gag tct gtg gaa gag gtg gtt cga	864
Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Glu Ser Val Glu Glu Val Val Arg	
275 280 285	

gag gtg tgc tct gaa caa gcc gag acg ggg ccg tgc cga gca atg atc	912
Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile	
290 295 300	
tcc cgc tgg tac ttt gat gtg act gaa ggg aag tgt gcc cca ttc ttt	960
Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe	
305 310 315 320	
tac ggc gga tgt ggc ggc aac cgg aac aac ttt gac aca gaa gag tac	1008
Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr	
325 330 335	
tgc atg gcc gtg tgt ggc agc gcc atg tcc caa agt tta ctc aag act	1056
Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala Met Ser Gln Ser Leu Leu Lys Thr	
340 345 350	
acc cag gaa cct ctt gcc cga gat cct gtt aaa ctt cct aca aca gca	1104
Thr Gln Glu Pro Leu Ala Arg Asp Pro Val Lys Leu Pro Thr Thr Ala	
355 360 365	
gcc agt acc cct gat gcc gtt gac aag tat ctc gag aca cct ggg gat	1152
Ala Ser Thr Pro Asp Ala Val Asp Lys Tyr Leu Glu Thr Pro Gly Asp	
370 375 380	
gag aat gaa cat gcc cat ttc cag aaa gcc aaa gag agg ctt gag gcc	1200
Glu Asn Glu His Ala His Phe Gln Lys Ala Lys Glu Arg Leu Glu Ala	
385 390 395 400	
aag cac cga gag aga atg tcc cag gtc atg aga gaa tgg gaa gag gca	1248
Lys His Arg Glu Arg Met Ser Gln Val Met Arg Glu Trp Glu Glu Ala	
405 410 415	
gaa cgt caa gca aag aac ttg cct aaa gct gat aag aag gca gtt atc	1296
Glu Arg Gln Ala Lys Asn Leu Pro Lys Ala Asp Lys Lys Ala Val Ile	
420 425 430	
cag cat ttc cag gag aaa gtg gaa tct ttg gaa cag gaa gca gcc aac	1344
Gln His Phe Gln Glu Lys Val Glu Ser Leu Glu Gln Glu Ala Ala Asn	
435 440 445	
gag aga cag cag ctg gtg gag aca cac atg gcc aga gtg gaa gcc atg	1392
Glu Arg Gln Gln Leu Val Glu Thr His Met Ala Arg Val Glu Ala Met	
450 455 460	
ctc aat gac cgc cgc cgc ctg gcc ctg gag aac tac atc acc gct ctg	1440
Leu Asn Asp Arg Arg Arg Leu Ala Leu Glu Asn Tyr Ile Thr Ala Leu	
465 470 475 480	
cag gct gtt cct cct cgg cct cgt cac gtg ttc aat atg cta aag aag	1488
Gln Ala Val Pro Pro Arg Pro Arg His Val Phe Asn Met Leu Lys Lys	
485 490 495	
tat gtc cgc gca gaa cag aag gac aga cag cac acc cta aag cat ttc	1536
Tyr Val Arg Ala Glu Gln Lys Asp Arg Gln His Thr Leu Lys His Phe	
500 505 510	

gag cat gtg cgc atg gtg gat ccc aag aaa gcc gct cag atc cgg tcc	1584
Glu His Val Arg Met Val Asp Pro Lys Lys Ala Ala Gln Ile Arg Ser	
515 520 525	
cag gtt atg aca cac ctc cgt gtg att tat gag cgc atg aat cag tct	1632
Gln Val Met Thr His Leu Arg Val Ile Tyr Glu Arg Met Asn Gln Ser	
530 535 540	
ctc tcc ctg ctc tac aac gtg cct gca gtg gcc gag gag att cag gat	1680
Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp	
545 550 555 560	
gaa gtt gat gag ctg ctt cag aaa gag caa aac tat tca gat gac gtc	1728
Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val	
565 570 575	
ttg gcc aac atg att agt gaa cca agg atc agt tac gga aac gat gct	1776
Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala	
580 585 590	
ctc atg cca tct ttg acc gaa acg aaa acc acc gtg gag ctc ctt ccc	1824
Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro	
595 600 605	
gtg aat gga gag ttc agc ctg gac gat ctc cag ccg tgg cat tct ttt	1872
Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe	
610 615 620	
ggg gct gac tct gtg cca gcc aac aca gaa aac gaa gtt gag cct gtt	1920
Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val	
625 630 635 640	
gat gcc cgc cct gct gcc gac cga gga ctg acc act cga cca ggt tct	1968
Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser	
645 650 655	
ggg ttg aca aat atc aag acg gag gag atc tct gaa gtg aag atg gat	2016
Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp	
660 665 670	
gca gaa ttc cga cat gac tca gga tat gaa gtt cat cat caa aaa ttg	2064
Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu	
675 680 685	
gtg ttc ttt gca gaa gat gtg ggt tca aac aaa ggt gca atc att gga	2112
Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly	
690 695 700	
ctc atg gtg ggc ggt gtt gtc ata gcg aca gtg atc gtc atc acc ttg	2160
Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu	
705 710 715 720	
gtg atg ctg aag aag aaa cag tac aca tcc att cat cat ggt gtg gtg	2208
Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val	
725 730 735	
gag gtt gac gcc gct gtc acc cca gag gag cgc cac ctg tcc aag atg	2256
Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met	
740 745 750	

cag cag aac ggc tac gaa aat cca acc tac aag ttc ttt gag cag atg 2304
 Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
 755 760 765

cag aac tag 2313
 Gln Asn
 770

<210> 2
 <211> 770
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg
 1 5 10 15

Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro
 20 25 30

Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln
 35 40 45

Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp
 50 55 60

Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu
 65 70 75 80

Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn
 85 90 95

Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val
 100 105 110

Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu
 115 120 125

Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys
 130 135 140

Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu
 145 150 155 160

Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile
 165 170 175

Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu
 180 185 190

Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val
 195 200 205

Trp Trp Gly Gly Ala Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Gly Ser Glu Asp Lys
 210 215 220

Val	Val	Glu	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	225	230	235	240
Glu	Ala	Asp	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp	Gly	Asp	Glu	Val	Glu	Glu	245	250	255	
Glu	Ala	Glu	Glu	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Ser	Ile	260	265	270	
Ala	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Glu	Ser	Val	Glu	Glu	Val	Val	Arg	275	280	285	
Glu	Val	Cys	Ser	Glu	Gln	Ala	Glu	Thr	Gly	Pro	Cys	Arg	Ala	Met	Ile	290	295	300	
Ser	Arg	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Thr	Glu	Gly	Lys	Cys	Ala	Pro	Phe	Phe	305	310	315	320
Tyr	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Asn	Arg	Asn	Asn	Phe	Asp	Thr	Glu	Glu	Tyr	325	330	335	
Cys	Met	Ala	Val	Cys	Gly	Ser	Ala	Met	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	Lys	Thr	340	345	350	
Thr	Gln	Glu	Pro	Leu	Ala	Arg	Asp	Pro	Val	Lys	Leu	Pro	Thr	Thr	Ala	355	360	365	
Ala	Ser	Thr	Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Lys	Tyr	Leu	Glu	Thr	Pro	Gly	Asp	370	375	380	
Glu	Asn	Glu	His	Ala	His	Phe	Gln	Lys	Ala	Lys	Glu	Arg	Leu	Glu	Ala	385	390	395	400
Lys	His	Arg	Glu	Arg	Met	Ser	Gln	Val	Met	Arg	Glu	Trp	Glu	Glu	Ala	405	410	415	
Glu	Arg	Gln	Ala	Lys	Asn	Leu	Pro	Lys	Ala	Asp	Lys	Lys	Ala	Val	Ile	420	425	430	
Gln	His	Phe	Gln	Glu	Lys	Val	Glu	Ser	Leu	Glu	Gln	Glu	Ala	Ala	Asn	435	440	445	
Glu	Arg	Gln	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	His	Met	Ala	Arg	Val	Glu	Ala	Met	450	455	460	
Leu	Asn	Asp	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Leu	Glu	Asn	Tyr	Ile	Thr	Ala	Leu	465	470	475	480
Gln	Ala	Val	Pro	Pro	Arg	Pro	Arg	His	Val	Phe	Asn	Met	Leu	Lys	Lys	485	490	495	
Tyr	Val	Arg	Ala	Glu	Gln	Lys	Asp	Arg	Gln	His	Thr	Leu	Lys	His	Phe	500	505	510	
Glu	His	Val	Arg	Met	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Ala	Ala	Gln	Ile	Arg	Ser	515	520	525	
Gln	Val	Met	Thr	His	Leu	Arg	Val	Ile	Tyr	Glu	Arg	Met	Asn	Gln	Ser	530	535	540	

```

Leu Ser Leu Leu Tyr Asn Val Pro Ala Val Ala Glu Glu Ile Gln Asp
545                      550                      555                      560

Glu Val Asp Glu Leu Leu Gln Lys Glu Gln Asn Tyr Ser Asp Asp Val
                    565                      570                      575

Leu Ala Asn Met Ile Ser Glu Pro Arg Ile Ser Tyr Gly Asn Asp Ala
                    580                      585                      590

Leu Met Pro Ser Leu Thr Glu Thr Lys Thr Thr Val Glu Leu Leu Pro
                    595                      600                      605

Val Asn Gly Glu Phe Ser Leu Asp Asp Leu Gln Pro Trp His Ser Phe
610                      615                      620

Gly Ala Asp Ser Val Pro Ala Asn Thr Glu Asn Glu Val Glu Pro Val
625                      630                      635                      640

Asp Ala Arg Pro Ala Ala Asp Arg Gly Leu Thr Thr Arg Pro Gly Ser
                    645                      650                      655

Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu Val Lys Met Asp
660                      665                      670

Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu
675                      680                      685

Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly
690                      695                      700

Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr Val Ile Val Ile Thr Leu
705                      710                      715                      720

Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val Val
                    725                      730                      735

Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met
                    740                      745                      750

Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met
755                      760                      765

```

Gln Asn
770

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Clostridium tetani

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(45)

<223> DNA, codierend P2-Epitop

<400> 3
 cag tac atc aaa gct aac tcc aaa ttc atc ggt atc acc gag ctg 45
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Clostridium tetani

<400> 4
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Clostridium tetani

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(63)
 <223> DNA, codierend P30-Epitop

<400> 5
 ttc aac aac ttc acc gta agc ttc tgg ctg cgt gtt ccg aaa gtt agc 48
 Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 1 5 10 15

gct agc cac ctg gaa 63
 Ala Ser His Leu Glu
 20

<210> 6
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Clostridium tetani

<400> 6
 Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
 1 5 10 15

Ala Ser His Leu Glu
 20

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> synthetisch
 <223> synthetischer PCR-Primer

<400> 7
 caactcagct tcctttcggg c 21

<210> 8

<211> 21
 <212> DNA
 <213> synthetisch
 <223> synthetischer PCR-Primer

 <400> 8
 agatctcgat cccgcgaaat t 21

 <210> 9
 <211> 135
 <212> DNA
 <213> synthetisch
 <223> synthetischer PCR-Primer

 <400> 9
 atggatgcag aattccgtca cgactccggt tacgaagttc accaccagaa actgggttttc 60
 ttgcgagaag atgttggttc caacaaagggt gcaatcatcg gtctgatggt tggcgggtgtt 120
 gttatcgcga cctag 135

 <210> 10
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> synthetisch
 <223> synthetischer PCR-Primer

 <400> 10
 gccggccatg gatgcagaat tccgtcacga c 31

 <210> 11
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> synthetisch
 <223> synthetischer PCR-Primer

 <400> 11
 gccggaagct tctaggtcgc gataacaaca ccgccaacc 39

 <210> 12
 <211> 84
 <212> DNA
 <213> synthetisch
 <223> synthetischer PCR-Primer

 <400> 12
 ccggcaagct tctacagctc ggtgataccg atgaatttg agttagcttt gatgtactgg 60
 gtcgcgataa caacaccgcc aacc 84

 <210> 13
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> synthetisch
 <223> synthetischer PCR-Primer

 <400> 13
 gccggccatg gggttcaaca acttcaccgt tagcttctgg ctgcgtgttc cgaaagttag 60
 cgcgagccac ctggaagatg cagaattccg tcacgactcc g 101

 <210> 14

<211> 172
 <212> DNA
 <213> synthetisch
 <223> synthetischer PCR-Primer

<400> 14
 gggccaagct tggatccggt cgcgataaca acaccgcaa ccatcagacc gatgattgca 60
 cctttgttgg aaccaacatc ttctgcgaag aaaaccagtt tctggtggtg aacttcgtaa 120
 ccggagtcgt gacggaactc tgcattccagc tcggtgatac cgatgaattt gg 172

<210> 15
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> synthetisch
 <223> synthetischer PCR-Primer

<400> 15
 ctggaagatg cagagttccg tcacgactcc 30

<210> 16
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> synthetisch
 <223> synthetischer PCR-Primer

<400> 16
 gcgcgggatc cttcaacaac ttcaccgtta gcttc 35

<210> 17
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> synthetisch
 <223> synthetische HLA DR-Bindungssequenz

<400> 17
 Ala Lys Phe Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
 1 5 10

Patentansprüche

1. Verwendung eines Immunogens, das

- a) eine Polyamino-säure ist, die die gesamte Tertiärstruktur von APP oder A β konserviert, so dass die Polyamino-säure in dem gleichen Ausmaß reagiert, wie es APP oder A β mit einem polyklonalen Serum tut, erzeugt gegen APP oder A β , und die in das gleiche Molekül mindestens ein fremdes T-Helfer-Epitop (T_H-Epitop) einschließt und die das mindestens eine fremde T_H-Epitop und eine unterbrochene APP- oder A β -Sequenz enthält, so dass die Polyamino-säure keine Subsequenz von SEQ ID NO: 2 einschließt, die produktiv an MHC-Moleküle der Klasse II bindet, die eine T-Zell-Antwort initiieren; oder
 - b) ein Konjugat ist, umfassend ein Polyhydroxypolymer-Rückgrat, an das separat eine Polyamino-säure, die wie in a) definiert ist, gekoppelt ist; oder
 - c) ein Konjugat ist, umfassend ein Polyhydroxypolymer-Rückgrat, an das separat 1) das zumindest eine fremde T_H-Epitop und 2) eine unterbrochene Sequenz von APP oder A β , die wie in a) definiert ist, gekoppelt ist; oder
 - d) eine Nucleinsäure ist, die die Polyamino-säure, die wie in a) definiert ist, codiert; oder
 - e) ein nicht-pathogener/s Mikroorganismus oder Virus ist, der/das ein Nucleinsäurefragment trägt, das die Polyamino-säure, die wie in a) definiert ist, codiert und exprimiert,
- bei der Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, enthaltend das Immunogen für die Behandlung, Vorbeugung oder Linderung der Alzheimer-Krankheit oder anderer Krankheiten, die durch Amyloidablagerung gekennzeichnet sind, bei einem Tier.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die Polyamino-säure oder das Konjugat

- mindestens eine erste Gruppierung, die das Targeting der Polyamino-säure an eine Antigen-präsentierende Zelle (APC) oder einen B-Lymphozyten bewirkt, und/oder
- mindestens eine zweite Gruppierung, die das Immunsystem stimuliert, und/oder
- mindestens eine dritte Gruppierung, die die Präsentation der Polyamino-säure an das Immunsystem optimiert,

einschließt.

3. Verwendung gemäß Anspruch 2, wobei die erste und/oder die zweite und/oder die dritte Gruppierung als Seitengruppen durch kovalente oder nicht-kovalente Bindung an geeignete chemische Gruppen in der APP- oder A β -Sequenz gebunden ist/sind.

4. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Polyaminosäure oder das Konjugat ein Fusionspolypeptid umfasst.

5. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Polyaminosäure oder das Konjugat die Verdopplung von mindestens einem B-Zell-Epitop von APP oder A β und/oder eine Einführung eines Haptens einschließt.

6. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das fremde T-Zell-Epitop in dem Tier immundominant ist.

7. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das fremde T-Zell-Epitop promiskuitiv ist, wie ein fremdes T-Zell-Epitop, das aus einem natürlichen promiskuitiven T-Zell-Epitop und einer künstlichen MHC-II-Bindungspeptidsequenz ausgewählt ist.

8. Verwendung gemäß Anspruch 7, wobei das natürliche T-Zell-Epitop aus einem Tetanus-Toxoid-Epitop, wie P2 oder P30, einem Diphtherie-Toxoid-Epitop, einem Influenzavirus-Hämagglutinin-Epitop und einem P. falciparum-CS-Epitop ausgewählt ist.

9. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Polyaminosäure oder das Konjugat B-Zell-Epitope umfasst, die nicht der extrazellulären Phase ausgesetzt sind, wenn sie in einer zellgebundenen Form des Precursor-Polypeptids von A β vorhanden sind.

10. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Polyaminosäure oder dem Konjugat mindestens ein B-Zell-Epitop fehlt, das der extrazellulären Phase ausgesetzt ist, wenn es in einer zellgebundenen Form des Precursor-Polypeptids von A β vorhanden ist.

11. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Polyaminosäure oder das Konjugat höchstens 9 aufeinanderfolgende Aminosäuren von SEQ ID NO: 2 umfasst, wie höchstens 8, höchstens 7, höchstens 6, höchstens 5, höchstens 4 und höchstens 3 aufeinanderfolgende Aminosäuren.

12. Verwendung gemäß Anspruch 11, wobei die Polyaminosäure oder das Konjugat mindestens eine Subsequenz von SEQ ID NO: 2 umfasst, so dass jede dieser mindestens einen Subsequenz von SEQ ID NO: 2 unabhängig aus Aminosäureabschnitten besteht, die ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus 9 aufeinanderfolgenden Aminosäuren von SEQ ID NO: 2, 8 aufeinanderfolgenden Aminosäuren von SEQ ID NO: 2, 7 aufeinanderfolgenden Aminosäuren von SEQ ID NO: 2, 6 aufeinanderfolgenden Aminosäuren von SEQ ID NO: 2, 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren von SEQ ID NO: 2, 4 aufeinanderfolgenden Aminosäuren von SEQ ID NO: 2 und 3 aufeinanderfolgenden Aminosäuren von SEQ ID NO: 2.

13. Verwendung gemäß Anspruch 11 oder 12, wobei die aufeinanderfolgenden Aminosäuren an einem Aminosäurerest beginnen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Rest 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713 und 714.

14. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mindestens zwei Kopien der Polyaminosäure oder des Konjugates kovalent oder nicht-kovalent an ein Trägermolekül gebunden sind, das befähigt ist, die Präsentation von mehreren Kopien von antigenen Determinanten zu bewirken.

15. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, Varianten b) oder c), wobei die Polyaminosäure und das T_H-Epitop mittels einer Amidbindung an das Polyhydroxypolymer gebunden sind.

16. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, Varianten b) oder c), wobei das Polyhydroxypolymer ein Polysaccharid ist.

17. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Polyaminosäure oder das Konjugat mit einem Adjuvans formuliert worden ist, das das Brechen von Autotoleranz gegen Autoantigene erleichtert bzw. ermöglicht.

18. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Behandlung, Vorbeugung oder Linderung die Verabreichung einer wirksamen Menge der Polyaminosäure oder des Konjugates an das Tier über einen Weg, ausgewählt aus dem parenteralen Weg, wie den intrakutanen, den subkutanen und den intramuskulären Wegen, dem peritonealen Weg, dem oralen Weg, dem bukkalen Weg, dem sublingualen Weg, dem epiduralen Weg, dem spinalen Weg, dem analen Weg und dem intrakranialen Weg, mit sich bringt.

19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei die wirksame Menge Zwischen 0,5 µg und 2000 µg der Polyaminosäure oder des Konjugates ist.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–13, Variante d), wobei die Behandlung, Vorbeugung oder Linderung die Einführung von einer Nucleinsäure/Nucleinsäuren, die die Polyaminosäure oder das Konjugat codiert/codieren, in die Zellen des Tiers und dadurch das Erhalten einer in vivo-Expression der eingeführte(n) Nucleinsäure(n) durch die Zellen mit sich bringt.

21. Verwendung gemäß Anspruch 20, wobei die eingeführte(n) Nucleinsäure(n) ausgewählt ist/sind aus nackter DNA, DNA, die mit geladenen oder ungeladenen Lipiden formuliert ist, DNA, die in Liposomen formuliert ist, DNA, die in einen viralen Vektor eingeschlossen ist, DNA, die mit einem Transfektionserleichternden bzw. -ermöglichenden Protein oder Polypeptid formuliert ist, DNA, die mit einem Targeting-Protein oder -Polypeptid formuliert ist, DNA, die mit Calcium-präzipitierenden Mitteln formuliert ist, DNA, die an ein inertes Trägermolekül gekoppelt ist, DNA, die in Chitin oder Chitosan verkapselt ist, und DNA, die mit einem Adjuvans formuliert ist.

22. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 18–21, wobei die Behandlung, Vorbeugung oder Linderung mindestens eine Verabreichung/Einführung pro Jahr, wie mindestens 2, mindestens 3, mindestens 4, mindestens 6 und mindestens 12 Verabreichungen/Einführungen, mit sich bringt.

23. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Behandlung, Vorbeugung oder Linderung mit sich bringt, dass APP oder Aβ in einem solchen Ausmaß herunter reguliert wird, dass die Gesamtmenge an Amyloid verringert wird oder dass die Geschwindigkeit bzw. Rate der Amyloidbildung mit klinischer Signifikanz verringert wird.

24. Polyaminosäure oder Konjugat, die/das von einem Tier-APP oder -Aβ abgeleitet ist, wobei eine Modifikation eingeführt ist, die als ein Ergebnis hat, dass die Immunisierung des Tiers mit der Polyaminosäure oder dem Konjugat die Produktion von Antikörpern gegen das autologe APP oder Aβ des Tiers induziert, und wobei die Polyaminosäure oder das Konjugat wie in einem der Ansprüche 1–16 definiert ist.

25. Immunogene Zusammensetzung, umfassend eine immunogen wirksame Menge einer Polyaminosäure oder eines Konjugates gemäß Anspruch 24, wobei die Zusammensetzung weiterhin einen pharmazeutisch und immunologisch annehmbaren Träger und/oder ein pharmazeutisch und immunologisch annehmbares Vehikel und gegebenenfalls ein Adjuvans umfasst.

26. Nucleinsäurefragment, das eine Polyaminosäure oder ein Konjugat gemäß Anspruch 24 codiert.

27. Vektor, der das Nucleinsäurefragment gemäß Anspruch 26 trägt, wie ein Vektor, der zur autonomen Replikation befähigt ist.

28. Vektor gemäß Anspruch 27, der ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einem Plasmid, einem Phagen, einem Cosmid, einem Minichromosom und einem Virus.

29. Vektor gemäß Anspruch 27 oder 28, umfassend in der 5'→3'-Richtung und in funktioneller Verknüpfung einen Promotor zum Steuern der Expression des Nucleinsäurefragments gemäß Anspruch 26, gegebenenfalls eine Nucleinsäuresequenz, die ein Leitpeptid codiert, das die Sekretion des Polypeptidfragments oder dessen Integration in die Membran ermöglicht, das Nucleinsäurefragment gemäß Anspruch 26 und gegebenenfalls einen Terminator.

30. Vektor gemäß einem der Ansprüche 27–29, der, wenn er in eine Wirtszelle eingeführt ist, befähigt oder nicht befähigt ist, in das Wirtszellgenom integriert zu werden.

31. Vektor gemäß Anspruch 29 oder 30, wobei der Promotor die Expression in einer eukaryotischen Zelle und/oder in einer prokaryotischen Zelle steuert.

32. Transformierte Zelle, die den Vektor nach einem der Ansprüche 27–31 trägt, wie eine transformierte Zelle, die befähigt ist, das Nucleinsäurefragment nach Anspruch 26 zu replizieren.

33. Transformierte Zelle gemäß Anspruch 32, die ein Mikroorganismus ist, ausgewählt aus einem Bakterium, einer Hefe, einem Protozoon, oder eine Zelle, die von einem multizellulären Organismus abgeleitet ist, ausgewählt aus einem Pilz, eine(r) Insektenzelle, wie eine S₂- oder eine SF-Zelle, eine(r) Pflanzenzelle und eine(r) Säugetierzelle.

34. Transformierte Zelle gemäß Anspruch 32 oder 33, die das Nucleinsäurefragment gemäß Anspruch 27 exprimiert, wie eine transformierte Zelle, die auf ihrer Oberfläche die Polamino­säure oder das Konjugat gemäß Anspruch 24 sekretiert oder trägt.

35. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1–13, Variante e), wobei die Behandlung, Vorbeugung oder Linderung die Verabreichung eines nicht-pathogenen Mikroorganismus oder Virus mit sich bringt, der/das ein Nucleinsäurefragment trägt, das die Aminosäure oder das Konjugat codiert und exprimiert.

36. Zusammensetzung zum Induzieren der Produktion von Antikörpern gegen Amyloid, wobei die Zusammensetzung umfasst:

- ein Nucleinsäurefragment gemäß Anspruch 26 oder einen Vektor gemäß einem der Ansprüche 27–31 und
- einen pharmazeutisch und immunologisch annehmbaren Träger und/oder ein pharmazeutisch und immunologisch annehmbares Vehikel und/oder Adjuvans.

37. Stabile Zelllinie, die den Vektor gemäß einem der Ansprüche 27–31 trägt, und die das Nucleinsäurefragment gemäß Anspruch 26 exprimiert und die gegebenenfalls die Polyamino­säure oder das Konjugat gemäß Anspruch 24 auf ihrer Oberfläche sekretiert oder trägt.

Es folgen 2 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

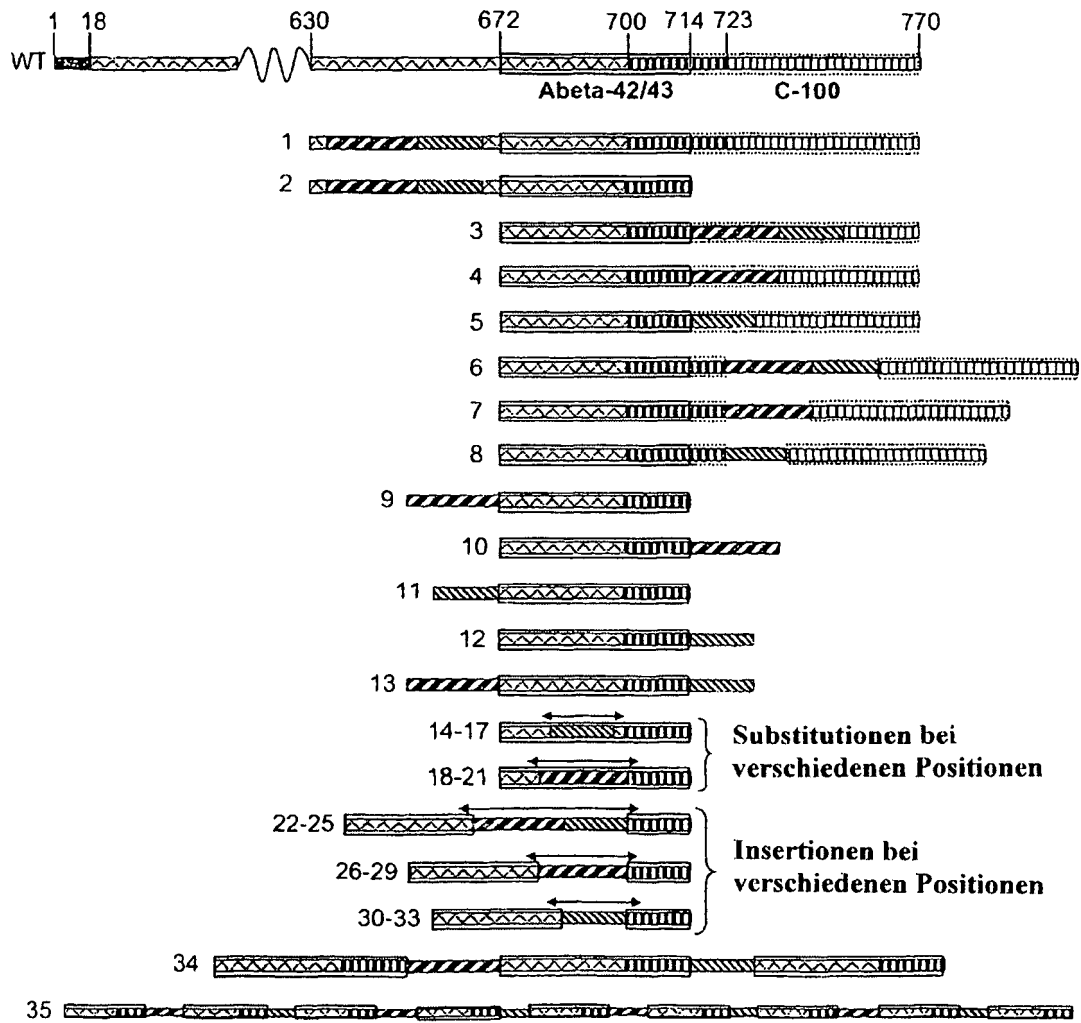


Fig. 1

PEP-CoV_{AC}-SYNTHESIS

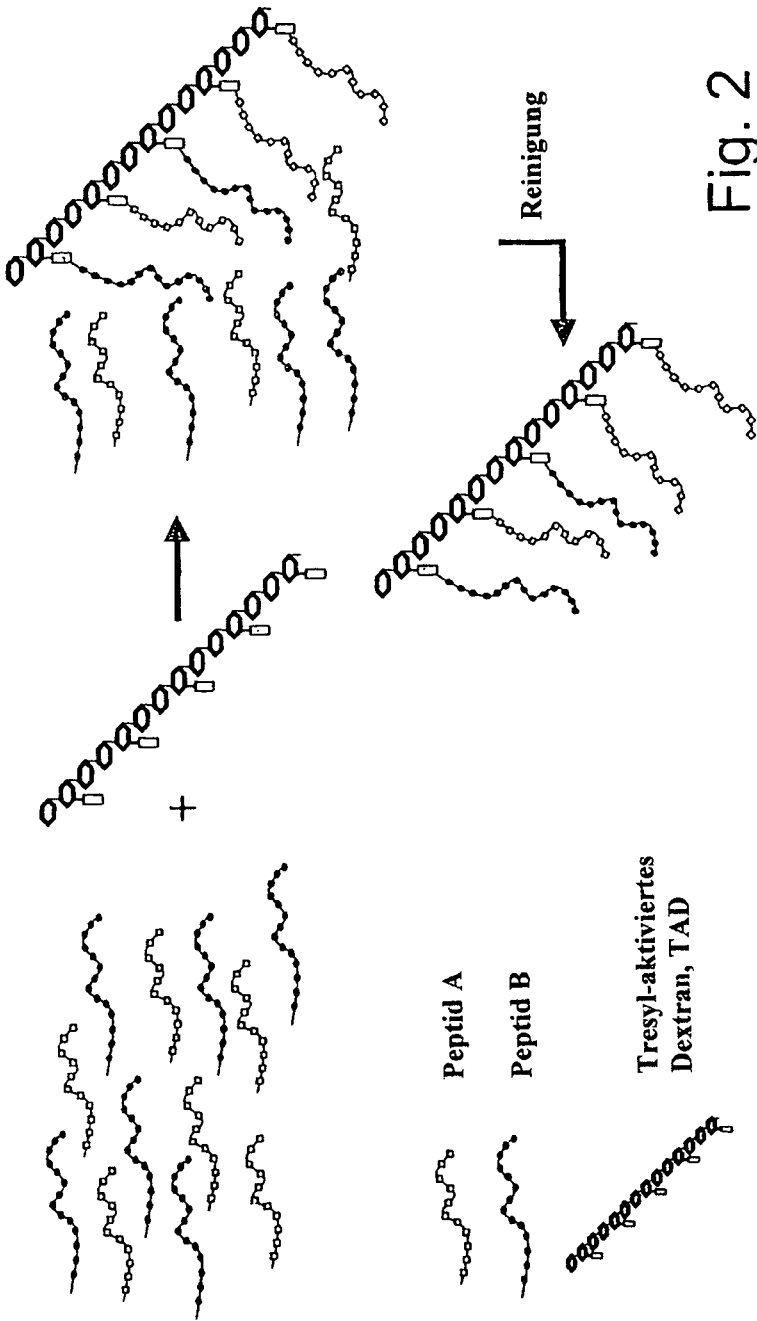


Fig. 2