

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. März 2006 (23.03.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/029982 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
Nicht klassifiziert

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/054445

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. September 2005 (08.09.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
A 1531/2004 13. September 2004 (13.09.2004) AT

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **AFFIRIS FORSCHUNGS- UND ENTWICK-
LUNGS GMBH** [AT/AT]; Viehmarktgasse 2A, A-1030
Wien (AT).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **MATTNER, Frank**
[DE/AT]; Krottenbachstrasse 267, A-1190 Wien (AT).
SCHMIDT, Walter [DE/AT]; Steingasse 18/1/10, A-1030
Wien (AT).

(74) Anwalt: **Sonn & Partner Patentanwälte**; Riemergasse
14, A-1010 Wien (AT).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: TREATMENT OF ATHEROSCLEROSIS

(54) Bezeichnung: BEHANDLUNG VON ATHEROSKLEROSE

(57) Abstract: The invention relates to the use of a compound comprising the following amino acid sequence $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$, whereby X_1 is an amino acid other than C, X_2 is an amino acid other than C, X_3 is an amino acid other than C, X_4 is an amino acid other than C, X_5 is an amino acid other than C, X_6 is not present or is an amino acid other than C, X_7 is not present or is an amino acid other than C, X_8 is not present or is an amino acid other than C and $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ is not or does not comprise a 5-mer, 6-mer, 7-mer or 8-mer polypeptide fragment of cholesteryl ester transport protein (CETP) or a CETP epitope, whereby the compound has a binding for an antibody specific for the natural CETP glycoprotein, for the production of a means for the prevention and treatment of atherosclerosis, atherosclerosis risk diseases and atherosclerosis consequential diseases.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung bezieht sich auf die Verwendung einer Verbindung umfassend die folgende Aminosäuresequenz $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$, worin X_1 eine Aminosäure ausser C ist, X_2 eine Aminosäure ausser C ist, X_3 eine Aminosäure ausser C ist, X_4 eine Aminosäure ausser C ist, X_5 eine Aminosäure ausser C ist, X_6 nicht vorhanden oder eine Aminosäure ausser C ist, X_7 nicht vorhanden oder eine Aminosäure ausser C ist, X_8 nicht vorhanden oder eine Aminosäure ausser C ist, und worin $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ kein 5-mer, 6-mer, 7-mer oder 8-mer Polypeptid-Fragment des Cholesterinestertransport-Proteins (CETP) oder ein CETP-Epitop ist oder umfasst, wobei die Verbindung eine Bindungsfähigkeit an einen Antikörper hat, der für das natürliche CETP-Glykoprotein spezifisch ist, zur Herstellung eines Mittels zur Vorbeugung und Behandlung von Atherosklerose, Atherosklerose-Risikoerkrankungen und Atherosklerose-Folgeerkrankungen.

WO 2006/029982 A2

Behandlung von Atherosklerose

Die Erfindung betrifft die Vorbeugung und die Behandlung von Atherosklerose, Atherosklerose-Risikoerkrankungen und Atherosklerose-Folgeerkrankungen.

Atherosklerotische Folgeerkrankungen, wie die periphere arterielle Verschlusskrankheit, die koronare Herzkrankheit sowie der apoplektische Zerebralinsult, gehören weiterhin zu den Haupttodesursachen in den Vereinigten Staaten, Europa und weiten Teilen Asiens. Nach Virchows Auffassung waren die Lipidablagerungen in der arteriellen Wand von Blutlipiden herrührende Veränderungen, welche nach seiner Überlegung durch Transduktion der Lipide und Komplexbildung mit sauren Mukopolysacchariden entstehen. Durch diese „Verletzung“ der Arterien erklärte er die Akkumulation von Lipiden und die Entwicklung der atherosklerotischen Läsionen in der Intima und Media der Arterien. Den heutigen allgemein anerkannten Erkenntnisstand, stellt die von Ross 1973 entwickelte, und 1986 und 1993 modifizierte „response-to-injury“- Hypothese dar. Ross betrachtet die Entwicklung der Atherosklerose als eine chronisch progressive Entzündung der arteriellen Gefäßwand, die durch ein komplexes Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Zellinteraktion gekennzeichnet ist. Darüber hinaus stellt die Hypothese auch die Integration der Lipidhypothese Virchows mit der Inkrustationstheorie von Rokitsanskys dar. Die „Verletzung“ des Endothels stellt laut der „response-to-injury“- Hypothese das initiale Ereignis der Erkrankung dar, das zu einer endothelialen Dysfunktion führt, die eine Kette von zellulären Interaktionen triggert, welche in der Ausbildung der atherosklerotischen Läsionen kulminiert. Als Risikofaktoren, die eine solche „Verletzung“ begünstigen, bezeichnet man exogene und endogene Einflüsse, die statistisch signifikant mit der Atherosklerose korrelieren. Zu den wichtigsten dieser endothelschädigenden Faktoren gehören beispielsweise erhöhtes und modifiziertes LDL, Lp(a), arterielle Hypertonie, Diabetes Mellitus und Hyperhomocysteinämie. Da das Endothel keine starre, sondern vielmehr eine äußerst dynamische Barriere darstellt, kommt es im Verlauf der endothelialen Dysfunktion neben einer Permeabilitätserhöhung für Lipoproteine zu einer Vielzahl von molekularen Veränderungen, die das Zusammenspiel

von Monozyten, T- Lymphozyten und Endothelzellen maßgeblich beeinflussen. Durch die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle vom Typ der E-, L- und P-Selektine, Integrine, ICAM-1, VCAM-1 und platelet-endothelial-cell-adhesionmolecule-1, kommt es zum Anheften von Monozyten und T-Lymphozyten lumenseitig. Die anschließende Migration der Leukozyten über das Endothel wird durch MCP-1, Interleukin-8, PDGF, M-CSF und Osteopontin vermittelt. In der Intima ortsansässige Makrophagen und Monozyten sind in der Lage, über den sogenannten Scavenger-Rezeptor, die eingedrungenen LDL-Partikel aufzunehmen und sie als Vakuolen von Cholesterinestern im Zytoplasma abzulagern. Die auf diese Weise entstandenen Schaumzellen akkumulieren hauptsächlich in Gruppen im Bereich der Gefäßintima und bilden die bereits im Kindesalter auftretenden "fatty streak"-Läsionen. LDL sind Lipoproteine geringer Dichte und entstehen durch katabole Effekte lipolytischer Enzyme aus triglyceridreichen VLDL Partikeln. Neben den schädigenden Eigenschaften auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Media, wirkt LDL darüber hinaus chemotaktisch auf Monozyten und ist imstande die Expression von MCSF und MCP-1 der Endothelzellen über Gen-amplifikation zu erhöhen. HDL ist im Gegensatz zu LDL fähig, unter Bildung von sogenannten HDLc-Komplexen, Cholesterinester von beladenen Makrophagen unter Vermittlung von Apolipoprotein E wieder aufzunehmen. Diese mit Cholesterinestern beladenen Partikel, können durch Interaktion von SR-B1 Rezeptoren an Hepatozyten oder Nebennierenrindenzellen binden und Cholesterin für die Produktion von Gallensäuren beziehungsweise Steroiden abgeben. Dieser Mechanismus wird als "reverser Cholesterin Transport" bezeichnet und verdeutlicht die protektive Funktion des HDL. Aktivierete Makrophagen können über HLA-DR Antigene präsentieren und aktivieren dadurch CD4 und CD8 Lymphozyten, welche in Folge dessen zur Sekretion von Zytokinen, wie IFN-gamma und TNF-alpha angeregt werden und darüber zu einer Verstärkung der entzündlichen Reaktion beitragen. Im weiteren Verlauf der Erkrankung, kommt es zur Einsprossung glatter Muskelzellen der Media, in das entzündlich veränderte Gebiet der Intima. Dadurch entsteht in diesem Stadium die intermediäre Läsion. Ausgehend von der intermediären Läsion entwickelt sich im Verlauf die fortgeschrittene und komplizierte Läsion, die morphologisch durch einen Nekrosekern, Zelldetritus und eine lumen-seitige kollagenreiche fibrinöse Kappe charakterisiert ist.

Vergrößert sich die Zellzahl und der Anteil der Lipide stetig, kommt es zu endothelialen Einrissen und Freilegung von Oberflächen mit thrombotischen Eigenschaften. Durch die Anheftung und Aktivierung von Thrombozyten an diesen Einrissen kommt es zu einer Freisetzung von Granula, welche Zytokine, Wachstumsfaktoren und Thrombin enthalten. Proteolytische Enzyme der Makrophagen sind für die Ausdünnung der fibrinösen Kappe verantwortlich, die letztendlich zu einer Rupturierung des Plaques mit konsekutiver Thrombose und Stenosierung des Gefäßes, und akuter Ischämie der Endstrombahn führt.

Für die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen werden verschiedenste Risikofaktoren verantwortlich gemacht. Besondere Bedeutung kommt dabei der Hyperlipoproteinämie, der arteriellen Hypertonie und dem Nikotinabusus zu. Eine Erkrankung welche mit einer exzessiven Erhöhung des Gesamt- und LDL-Cholesterins einhergeht ist die familiäre Hypercholesterinämie. Sie zählt zu den häufigsten monogenetisch vererbten Stoffwechselkrankheiten. Die moderate heterozygote Form tritt mit einer Häufigkeit von 1:500 auf, die homozygote Form mit 1:1 Mio. deutlich seltener. Ursachen der familiäre Hypercholesterinämie sind Mutationen im LDL-Rezeptorgen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 19. Diese Mutationen können Deletionen, Insertionen oder Punktmutationen sein. Der charakteristische Befund der Lipoproteine bei der familiären Hypercholesterinämie ist eine Erhöhung des Gesamt- und LDL-Cholesterins bei meist normalen Triglycerid- und VLDL-Konzentrationen. Das HDL ist oft erniedrigt. Phänotypisch liegt eine Hyperlipoproteinämie Typ IIa nach Fredrikson vor. Das Gesamtcholesterin ist bei der heterozygoten Form um das zwei bis dreifache, bei der homozygoten Form um das fünf- bis sechsfache der Norm erhöht. Klinisch manifestiert sich die familiäre Hypercholesterinämie durch frühzeitige Koronarsklerose. In der Regel treten bei heterozygoten Männern die ersten Symptome einer KHK zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr auf, bei Frauen im Durchschnitt erst 10 Jahre später. 50% der betroffenen Männer versterben vor dem 50. Lebensjahr an den Folgen ihrer Koronarsklerose. Für das rasche Fortschreiten der Atherosklerose sind neben den massiv erhöhten LDL-Spiegeln auch erniedrigte HDL-Konzentrationen verantwortlich. Auch an extrakardialen Gefäßen, wie der Aorta, den Karotiden und peripheren Arterien, können

sich atherosklerotische Veränderungen manifestieren. Bei der homozygoten Form der Erkrankung entwickelt sich die Koronarsklerose schon im frühen Kindesalter. Der erste Myokardinfarkt ereignet sich oft vor dem 10. Lebensjahr und die Betroffenen versterben meist noch vor dem 20. Lebensjahr. Die Entwicklung von Xanthomen ist abhängig von der Höhe des Serumcholesterins und der Erkrankungsdauer. Etwa 75% der über 20jährigen heterozygot Betroffenen haben tendinöse Xanthome. Homozygote haben in nahezu 100% Haut- und Sehnenxanthome. Auch am Augenlid und in der Kornea können Lipidablagerungen auftreten (Xanthelasmen; Arcus lipoides). Sie sind jedoch kein spezifisches Zeichen einer Hypercholesterinämie, da sie auch bei normalen Cholesterinwerten gefunden werden. Ferner treten bei der FH gehäuft akute Arthritiden und Tendosynovitiden auf. Die einzelnen Lipoproteine unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Größe und Dichte, da sie unterschiedlich große Anteile an Lipiden und Proteinen, sogenannte Apoproteine, enthalten. Die Dichte steigt mit zunehmendem Protein- und abnehmendem Lipidanteil. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte können sie durch Ultrazentrifugation in verschiedene Fraktionen aufgetrennt werden. Hierauf beruht die Einteilung der Lipoproteine in die Hauptgruppen: Chylomikronen, Very-Low-Density Lipoproteine (VLDL), Intermediate-Density Lipoproteine (IDL), Low-Density Lipoproteine (LDL), High-Density Lipoproteine (HDL), Lipoprotein (a) (Lp(a)). Zu den Lipoproteinen mit einem hohem atherogenem Potential, gehören vor allem das LDL, das Lp(a) und das VLDL. LDL besitzen eine Dichte von etwa $d=1,006-1,063$ g/ml. Den Kern bilden veresterte Cholesterinmoleküle. Dieser stark hydrophobe Kern ist von einer Hülle aus Phospholipiden, unverestertem Cholesterin und einem einzigen Apo B100-Molekül umgeben. Daneben findet sich auf der Oberfläche der LDL-Partikel Apoprotein E. Die Funktion von LDL besteht darin, Cholesterin zu peripheren Geweben zu transportieren, wo es, durch das Apoprotein B-100 vermittelt, über den LDL-Rezeptor in die Zellen aufgenommen wird. In großen epidemiologischen Studien wie der Framingham Study, dem Multiple Risk Factor Intervention Trial und der Withehall Study konnte eine positive Korrelation zwischen der Höhe des Serumcholesterins und dem Auftreten einer koronaren Herzerkrankung aufgezeigt werden. LDL-Cholesterinwerte über 160 mg/dl stellen ein hohes kardiovaskuläres Risiko dar. Neben der Höhe des LDL-Cholesterins spielt bei der Einschätzung

des Risikoprofils für kardiovaskuläre Erkrankungen auch die Höhe des gefäßschützenden HDL-Cholesterins eine große Rolle. Werte unter 35 mg/dl gehen mit erhöhtem Risiko einher. VLDL sind Lipoproteine mit geringer Dichte ($d=0,94-1,006$ g/ml) und einem hohen Triglyceridanteil. Im Wesentlichen enthalten VLDL Apoprotein C, in geringeren Anteilen die Apoproteine B-100 und E. Im Unterschied zu Chylomikronen bestehen VLDL nicht aus Nahrungslipiden, sondern werden aus endogen entstandenen Triglyceriden in der Leber synthetisiert und in den Kreislauf sezerniert. Wie bei den Chylomikronen werden die Triglyceride von der durch Apoprotein C-II aktivierten Lipoproteinlipase hydrolysiert und die freien Fettsäuren dem Muskel- und Fettgewebe zugeführt. Die verbleibenden cholesterinreichen „VLDL-Remnants“ werden wegen der höheren Dichte Intermediate Density Lipoproteine genannt. Das Lipoprotein(a) (Lp(a)) besitzt eine Dichte von 1.05-1.12 g/ml und ähnelt in seiner Zusammensetzung dem LDL. Der Proteinanteil besteht neben dem Apoprotein B-100 aus dem für das Lp(a) charakteristischen Apoprotein(a). Über die Physiologie und Funktion des Lp(a) weiß man bis heute sehr wenig. Da das Apoprotein(a)-Molekül eine hohe Sequenzhomologie zu Plasminogen aufweist, vermutet man, dass das Lp(a) sowohl die Bildung von Thromben an atherosklerotischen Plaques fördert als auch einen atherogenen Effekt hat. Lp(a) ist zusammen mit Apoprotein B in atherosklerotischen Läsionen zu finden. Retrospektive Studien haben einen Zusammenhang zwischen erhöhtem Lp(a) und einer KHK gezeigt. Ebenso ergab die Metaanalyse zahlreicher prospektiver Studien, dass Lp(a) ein unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten einer KHK ist. Als normal gelten Werte zwischen 15 - 35 mg/dl. Lp(a) lässt sich bis jetzt weder diätetisch noch medikamentös beeinflussen. Therapiemaßnahmen beschränken sich daher auf die Reduktion weiterer Risikofaktoren. Insbesondere eine Senkung des LDL-Cholesterins scheint das kardiovaskuläre Risiko des Lp(a) zu senken. Erhebliche pathophysiologische Bedeutung bei der Pathogenese der Atherosklerose besitzen darüber hinaus Gerinnungsfaktoren. Epidemiologische Befunde weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Fibrinogenkonzentration im Plasma und der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit und vor allem eines Myokardinfarktes hin. Erhöhte Fibrinogenspiegel (>300 mg/dl) erwiesen sich in diesem Zusammenhang als eigenständiger Indikator und Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Aber auch

hohe Konzentrationen des Gewebefibrinogenaktivator-Inhibitors tPA-I sind mit Auftreten von KHK assoziiert. Die Beziehung zwischen Hypertriglyceridämie und koronarem Risiko ist je nach Ursache der Blutfetterhöhung unterschiedlich ausgeprägt. Trotz der Diskussion, ob Triglyceride als unabhängiger Risikofaktor zu gelten haben, ist es unbestritten, dass sie eine wichtige Rolle in der Pathogenese der koronaren Herzkrankheiten spielen. Die Krankheitsinzidenz ist bei den Patienten am größten, die ein hohes LDL-Cholesterin und einen hohen Triglyceridspiegel aufweisen.

Das Cholinestertransfer-Protein (CETP) ist ein stabiles Plasmaglykoprotein, das für den Transfer neutraler Lipide und Phospholipide zwischen Lipoproteinen zuständig ist und das die Plasmakonzentration von HDL herunterreguliert. Die Inhibition der CETP-Lipidtransferaktivität ist bereits als therapeutischer Ansatz zur Erhöhung der HDL-Plasmaspiegel vorgeschlagen worden. Es gibt eine Vielzahl von Gründen, die nahe legen, dass die Abwesenheit von CETP-Aktivität im Plasma zum Anstieg der HDL-Spiegel führen sollte. So erniedrigt CETP die HDL-Konzentration durch den Transfer von Cholesterinestern von HDL zu LDL und VLDL. Transiente Inhibition von CETP mit anti-CETP monoclonalen Antikörper, antisense Oligonukleotiden oder CETP-Inhibitoren, führte im Tierexperiment bei Kaninchen und Hamstern zum Anstieg der HDL-Werte. Dauerhafte CETP-Inhibition mit antisense Oligonukleotiden steigerte die HDL-Spiegel und führte so zu einer Reduktion der atherosklerotischen Schädigungen in einem Kaninchen-Tiermodell für Atherosklerose. Patienten mit familiäre Hypercholesterinämie haben beim heterozygoten Gendefekt doppelt so hohe CETP-Plasmawerte wie gesunde Menschen, beim homozygoten Gendefekt sind die Werte sogar dreifach erhöht.

In der US 5 512 548 und der WO 93/011782 werden Polypeptide und deren Analoga beschrieben, die in der Lage sind CETP, welches den Transfer von Cholesterinestern von HDL auf VLDL und LDL katalysiert, zu inhibieren und daher anti-atherosklerotische Wirkung aufweisen, wenn sie einem Patienten verabreicht werden. Gemäß diesen Dokumenten wird ein derartiger CETP-Polypeptidinhibitor aus Apolipoprotein C-I verschiedener Quellen hergeleitet, wobei im speziellen N-terminale Fragmente bis zu Aminosäure 36

als CETP-Inhibitoren identifiziert wurden.

Auch in der US 5 880 095 A wird ein an CETP bindendes Peptid geoffenbart, welches in der Lage ist, die Aktivität von CETP in einem Individuum zu inhibieren. Das CETP-inhibitorische Protein umfasst dabei ein N-terminales Fragment des porcinen Apolipoproteins C-III.

In der US 2004/0087481 und US 6 410 022 B1 werden Peptide offenbart, die durch die Induktion einer CETP spezifischen Immunantwort zur Behandlung und Vorbeugung von kardiovaskulären Erkrankungen, wie z.B. Atherosklerose, verwendet werden können. Diese Peptide umfassen ein T-Helferzell-Epitop, welches nicht von CETP abgeleitet ist, und mindestens einem B-Zell-Epitop, welches von CETP stammt und direkt von diesem abgeleitet werden kann, aufweisen. Das T-Helferzell-Epitop ist dabei vorzugsweise vom Tetanustoxoid abgeleitet und wird kovalent an mindestens ein B-Zell-Epitop von CETP gebunden. Durch die Verwendung eines für den Organismus fremden T-Helferzell-Epitops wird es ermöglicht im Körper eines Individuums Antikörper zu induzieren, die gegen jenen Peptidteil gerichtet sind, der aus mindestens einem CETP-B-Zell-Epitop besteht.

In der jüngsten Vergangenheit hat es bereits Vorschläge für einen Vakzineansatz CETP betreffend gegeben. So sind beispielsweise Kaninchen mit einem Impfstoff behandelt worden, der als Antigen das für den Cholesterinester-Transfer verantwortliche Peptid von CETP beinhaltete. Die immunisierten Kaninchen hatten erniedrigte CETP-Aktivität und veränderte Lipoprotein-Spiegel mit erhöhten HDL- und verringerten LDL-Werten. Darüber hinaus zeigten die behandelten Versuchstiere des Atherosklerose-Modells außerdem im Vergleich zu Kontrolltieren verringerte atherosklerotische Läsionen.

Ende letzten Jahres wurden die Ergebnisse einer klinischen Studie der Phase II veröffentlicht, die die amerikanische Biotechnologiefirma Avant mit dem Impfstoff CETi-1 durchgeführt hat (BioCentury Extra For Wednesday, October 22, 2003). In dieser Phase II Studie wurde ebenso wie in der vorausgegangenen Phase I Studie ein sehr gutes Sicherheitsprofil ohne irgendwelche be-

denklich stimmenden Nebenwirkungen nachgewiesen, was die Schlussfolgerung zulässt, dass von einem anti-CETP-Impfansatz grundsätzlich keine Nebenwirkungen zu erwarten sind. Bezüglich Wirksamkeit hingegen enttäuschte der Avant-Impfstoff, da er nicht zu erhöhten HDL-Werten führte, die signifikant besser waren als diejenigen, die mit einer Placebobehandlung erreicht wurden.

Das Problem, das der CETi-1 Impfstoff hat, ist, dass er ein körpereigenes Antigen verwendet. Das humane Immunsystem ist tolerant gegen körpereigene Strukturen, da es bei den allermeisten körpereigenen Molekülen, anders als bei CETP, überlebenswichtig ist, dass keine Autoantikörper gebildet werden. Somit war es die Aufgabe des CETi-1 Impfstoffes, die körpereigene Toleranz zu brechen, was ihm offensichtlich nicht in ausreichendem Maß gelungen ist.

Somit ist es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Antigen für einen anti-CETP Impfstoff bereitzustellen, das so ausgewählt ist, dass es vom Immunsystem als fremd eingestuft wird und deshalb keine Selbsttoleranz brechen muss.

Die vorliegende Erfindung stellt daher ein CETP-Mimotop für diese Zwecke zur Verfügung. Die CETP-Mimotope gemäß der vorliegenden Erfindung sind bevorzugter Weise antigene Polypeptide, die in ihrer Aminosäuresequenz von der Aminosäuresequenz von CETP oder Fragmenten von CETP völlig verschieden sind. Dabei kann das erfindungsgemäße Mimotop ein oder mehrere nicht-natürliche Aminosäuren (also nicht aus den 20 „klassischen“ Aminosäuren) aufweisen oder ganz aus solchen nicht-natürlich vorkommenden Aminosäuren zusammengesetzt sein. Des Weiteren können die erfindungsgemäßen anti-CETP-Antikörper induzierenden Antigene aus D- oder L-Aminosäuren oder Kombinationen von DL-Aminosäuren zusammengesetzt sein, und gegebenenfalls durch weitere Modifizierungen, Ringschlüsse oder Derivatisierungen verändert worden sein. Geeignete anti-CETP-Antikörper induzierende Antigene können aus Peptidbibliotheken zur Verfügung gestellt werden, die kommerziell erhältlich sind. Vorzugsweise sind diese Peptide zumindest 5 Aminosäuren lang, insbesondere mindestens 8 Aminosäuren, wobei bevorzugte Längen sich bis zu

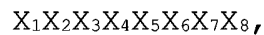
11, vorzugsweise bis zu 14 oder 20 Aminosäuren erstrecken können. Erfindungsgemäß können jedoch auch längere Peptide ohne weiteres als anti-CETP-Antikörper induzierende Antigene herangezogen werden.

Zur Herstellung derartiger CETP-Mimotope (also anti-CETP-Antikörper induzierende Antigene) sind selbstverständlich auch Phagen-Bibliotheken, Peptid-Bibliotheken, z.B. mittels kombinatorischer Chemie erzeugt oder mittels high throughput screening-Techniken für verschiedenste Strukturen erhalten Display : A Laboratory Manual by Carlos F. Barbas (Editor), et al; Willats WG, Phage display: practicalities and prospects. Plant Mol Biol. 2002 Dec; 50(6):837-54 geeignet (<http://www.microcollections.de/showpublications.php#>).

Weiters können erfindungsgemäß auch anti-CETP-Antikörper induzierende Antigene auf Basis von Nukleinsäuren („Aptamere“) eingesetzt werden, wobei auch diese mit verschiedensten (Oligonukleotid-) Bibliotheken (z.B. mit 2-180 Nukleinsäureresten) aufgefunden werden können (z.B. Burgstaller et al., Curr. Opin. Drug Discov. Dev. 5 (5) (2002), 690-700; Famulok et al., Acc. Chem. Res. 33 (2000), 591-599; Mayer et al., PNAS 98 (2001), 4961-4965, uvm.). Das Nukleinsäurerückgrat kann bei anti-CETP-Antikörper induzierenden Antigene auf Nukleinsäurebasis beispielsweise durch die natürlichen Phosphordiester-Verbindungen aber auch durch Phosphorothioate oder Kombinationen oder chemische Variationen (z.B. als PNA) zur Verfügung gestellt werden, wobei als Basen erfindungsgemäß vor allem U, T, A, C, G, H und mC eingesetzt werden können. Die 2'-Reste der Nukleotide, die gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können, sind vorzugsweise H, OH, F, Cl, NH₂, O-Methyl, O-Ethyl, O-Propyl oder O-Buthyl, wobei die Nukleinsäuren auch noch anders modifiziert werden können, also beispielsweise mit Schutzgruppen, wie sie üblicherweise in der Oligonukleotidsynthese angewendet werden, versehen werden. Anti-CETP-Antikörper induzierende Antigene auf der Basis von Aptameren sind daher ebenfalls bevorzugte anti-CETP-Antikörper induzierende Antigene im Rahmen der vorliegenden Erfindung.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung

die Verwendung einer Verbindung umfassend die folgende Aminosäuresequenz



worin

X_1 eine Aminosäure außer C ist,

X_2 eine Aminosäure außer C ist,

X_3 eine Aminosäure außer C ist,

X_4 eine Aminosäure außer C ist,

X_5 eine Aminosäure außer C ist,

X_6 nicht vorhanden oder eine Aminosäure außer C ist,

X_7 nicht vorhanden oder eine Aminosäure außer C ist,

X_8 nicht vorhanden oder eine Aminosäure außer C ist,

und worin $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ kein 5-mer, 6-mer, 7-mer oder 8-mer Polypeptid-Fragment des Cholesterinestertransport-Proteins (CETP) oder ein CETP-Epitop ist oder umfasst, wobei die Verbindung eine Bindungsfähigkeit an einen Antikörper hat, der für das natürliche CETP-Glykoprotein spezifisch ist, zur Herstellung eines Mittels zur Vorbeugung und Behandlung von Atherosklerose, Atherosklerose-Risikoerkrankungen und Atherosklerose-Folgeerkrankungen.

Besonders bevorzugte Verbindungen sind spezifische Mimotope für die an sich bekannten CETP-Epitope, insbesondere für die Epitope, die durch die Aminosäuren 131 - 142, 451 - 476, 184 - 260, 261 - 331, 332 - 366, 367 - 409 und 410 - 450 der CETP-Aminosäuresequenz definiert werden, insbesondere FGFPEHLLVDFLQSLS oder CDSGRVRTDAPD.

CEPT-Gesamtsequenz (unprozessierter Precursor):

10	20	30	40	50	60
MLAATVLTILA	LLGNAHACSK	GTSHEAGIVC	RITKPALLVL	NHETAKVIQT	AFQRASYPDI
70	80	90	100	110	120
TGEKAMMLLG	QVKYGLHNIQ	ISHLSIASSQ	VELVEAKSID	VSIQNVSVVF	KGTLKYGYTT
130	140	150	160	170	180
AWWLGIDQSI	DFEIDSAIDL	QINTQLTCDS	GRVRTDAPDC	YLSFHKLLH	LQGEREPGWI
190	200	210	220	230	240
KQLFTNFISF	TLKLVLKGQI	CKEINVISNI	MADFVQTRAA	SILSDGDIGV	DISLTGDPVI
250	260	270	280	290	300
TASYLESHHK	GHFIYKNVSE	DLPLPTFSPT	LLGDSRMLYF	WFSERVFHSL	AKVAFQDGRL
310	320	330	340	350	360
MLSLMGDEFK	AVLETWGFNT	NQEIQEVVVG	GFPSQAQVTV	HCLKMPKISC	QNKGVVVNSS
370	380	390	400	410	420
VMVKFLFPRP	DQQHSVAYTF	EEDIVTTVQA	SYSKKKLFLS	LLDFQITPKT	VSNLTESSE
430	440	450	460	470	480
SIQSFLQSMI	TAVGIPEVMS	RLEVVF TALM	NSKGVSLFDI	INPEIITRDG	FLLQLMDFGF
490					
PEHLLVDFLQ	SLS				

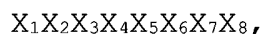
Die erfindungsgemäße Verbindung (Mimotop) hat eine bevorzugte Länge von 5 bis 15 Aminosäuren. Diese Verbindung kann im Impfstoff in isolierter (Peptid-)Form vorliegen oder kann an andere Moleküle gekoppelt oder komplexiert sein, wie pharmazeutische Trägersubstanzen oder Polypeptid-, Lipid- oder Kohlenhydratstrukturen. Vorzugsweise haben die erfindungsgemäßen Mimotope eine (Mindest-)Länge zwischen 5 und 15, 6 und 12 Aminosäureresten, spezifisch zwischen 9 und 11. Die Mimotope können jedoch (kovalent oder nicht kovalent) an unspezifische Linker oder Träger gekoppelt sein, insbesondere Peptidlinker oder Proteinträger. Weiters können die Peptidlinker oder Proteinträger aus T-Zellen-Helfer-Epitopen bestehen oder solche enthalten.

Vorzugsweise ist der pharmazeutisch annehmbare Träger KLH, Teta-

nustoxoid, Albumin bindendes Protein, bovines Serumalbumin, ein Dendrimer (MAP; Biol. Chem. 358: 581) sowie die Adjuvanssubstanzen, die in Singh et al., Nat. Biotech. 17 (1999), 1075-1081 (insbesondere jene in Tabelle 1 dieses Dokuments), und O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9) (2003), 727-735 (insbesondere die darin beschriebenen endogenen immunpotenzierenden Verbindungen und die Abgabesysteme) beschrieben sind, oder Mischungen davon. Außerdem kann die Impfstoffzusammensetzung Aluminiumhydroxid enthalten.

Ein Impfstoff, der die vorliegende Verbindung (Mimotop) und den pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst, kann auf jegliche geeignete Anwendungsweise, z.B. i.v., i.p., i.m., intranasal, oral, subkutan, etc. und in jeglicher geeigneten Abgabevorrichtung (O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9), (2003), 727-735) verabreicht werden. Typischerweise enthält der Impfstoff die erfindungsgemäße Verbindung in einer Menge von 0,1 ng bis 10 mg, vorzugsweise 10 ng bis 1 mg, insbesondere 100 ng bis 100 µg oder, alternativ dazu, z.B. 100 fMol bis 10 µMol, vorzugsweise 10 pMol bis 1 µMol, insbesondere 100 pMol bis 100 nMol. Der Impfstoff kann auch typische Hilfsstoffe, z.B. Puffer, Stabilisatoren, etc. enthalten.

Besonders zur erfindungsgemäßen Impfstoff-Zubereitung zur Vorbeugung und Behandlung von Atherosklerose, Atherosklerose-Risikorerkrankungen und Atherosklerose-Folgeerkrankungen, haben sich Moleküle herausgestellt, die ein Peptid beinhalten, das eine Bindungsfähigkeit an einen Antikörper hat, der für das natürliche CETP-Glykoprotein spezifisch ist, und unter die allgemeine Formel



worin

X₁ eine beliebige Aminosäure oder nicht vorhanden, vorzugsweise A, L, I oder nicht vorhanden, ist, mit der Maßgabe dass wenn X₁ nicht vorhanden ist, X₆ vorhanden ist,

X₂ D, G, A, N, L, V, Q oder I, insbesondere L, V, Q oder I, ist,

X₃ H, P, K oder R, insbesondere K oder R ist,

- 13 -

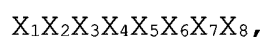
X₄ eine beliebige Aminosäure (außer C), insbesondere W, N, S, G, H, Y, D oder E ist,
 X₅ H, S, T, P, K oder R, insbesondere K oder R, ist,
 X₆ nicht vorhanden oder N, F, H, L, V oder I, insbesondere L, V oder I, ist,
 X₇ nicht vorhanden oder W, L, V, I, F, N, P oder G, insbesondere P oder G, ist,
 X₈ nicht vorhanden oder eine beliebige Aminosäure außer C ist,
 fällt. Diese Moleküle sind vorzugsweise Peptide, die die hier beschriebene allgemeine Peptidsequenz als Teil eines größeren Peptidmoleküls beinhalten oder aus diesem Molekül bestehen. Besonders bevorzugt sind dabei ein oder mehrere Peptide, ausgewählt aus der Gruppe ALKNKLP, ALKSKIP, AVKGKLP, ALKHKIP, ALKHKVP, ALKNKIP, ALKGKIP, ALKYKLP, ALKDKLP, ALKDKVP, AAQKDKVP, LKLHHGTPFQFN, SLPPDHWSLPVQ, QQQLGRDTFLHL oder TNHWPNIQDIGG.

In ebenfalls vorteilhaften Peptiden ist die obige Formel wie folgt definiert (stets natürlich mit der Maßgabe der spezifischen Bindungsfähigkeit an CETP/CETP-Fragment):

X₁ ist A, L oder I, insbesondere A,
 X₂ ist L, V, Q oder I,
 X₃ ist K oder R,
 X₄ ist eine beliebige Aminosäure (außer C), insbesondere N, S, G, H, Y, D oder E,
 X₅ ist K oder R,
 X₆ ist nicht vorhanden oder L, V oder I,
 X₇ ist nicht vorhanden oder P oder G,
 X₈ ist nicht vorhanden oder eine beliebige Aminosäure außer C.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Isolierung einer Verbindung, die an einen Antikörper bindet, der für das natürliche CETP oder ein CETP-Fragment spezifisch ist, umfassend die folgenden Schritte:

- Zur-Verfügung-Stellung einer Peptidverbindungsbibliothek, umfassend Peptide, die die folgende Aminosäuresequenz enthalten:



worin

X₁ eine Aminosäure außer C ist,

X₂ eine Aminosäure außer C ist,
X₃ eine Aminosäure außer C ist,
X₄ eine Aminosäure außer C ist,
X₅ eine Aminosäure außer C ist,
X₆ nicht vorhanden oder eine Aminosäure außer C ist,
X₇ nicht vorhanden oder eine Aminosäure außer C ist,
X₈ nicht vorhanden oder eine Aminosäure außer C ist,
und worin X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈ kein 5-mer, 6-mer, 7-mer oder 8-mer Polypeptid-Fragment des Cholesterinestertransport-Proteins (CETP) oder ein CETP-Epitop ist oder umfasst,
- In-Kontakt-Bringen dieser Peptidbibliothek mit diesem Antikörper, und
- Isolierung jener Mitglieder der Peptidbibliothek, die an diesen Antikörper binden.

Ein solches Verfahren hat sich zur Beschaffung der erfindungsgemäßen CETP-Mimotope als erfolgreich erwiesen. Antikörper, die für das natürliche CETP oder ein CETP-Fragment spezifisch sind, wurden ausführlich im Stand der Technik beschrieben bzw. kommerziell zur Verfügung gestellt (e.g. US 6,410,022 oder 6,555,113).

Vorzugsweise werden diese Peptide in der genannten Bibliothek in individualisierter d.h. in vereinzelter Form zur Verfügung gestellt, insbesondere immobilisiert auf einer festen Oberfläche, wie es z.B. mit der MULTIPIN™ Peptidtechnologie möglich ist. Die Bibliothek kann auch als Peptidmischung zur Verfügung gestellt sein, und die Antikörper-Peptid-Komplexe können nach der Antikörperbindung isoliert werden. Alternativ dazu kann der Antikörper immobilisiert sein, und die Peptidbibliothek (in Suspension oder Lösung) wird dann mit den immobilisierten Antikörpern in Kontakt gebracht.

Vorzugsweise umfassen die Screening-Antikörper (oder die Mitglieder der Peptidbibliothek) einen geeigneten Marker, der den Nachweis oder das Isolieren des Antikörpers oder des Antikörper:Peptid-Komplexes bei Bindung an ein Peptid der Bibliothek ermöglicht. Geeignete Markersysteme (u.a. Biotinylierung, Fluoreszenz, Radioaktivität, magnetische Marker, Farben entwickelnde Marker, sekundäre Antikörper) sind für den Fachmann leicht ver-

füßbar.

Die Bibliothek muss konstruiert werden, um die natürlich vorkommenden CETP-Sequenzen auszuschließen, da eine Impfung mit dieser Sequenz von dieser Erfindung eindeutig ausgeschlossen ist.

Eine weitere geeignete Technik zur Isolierung der Epitope gemäß der vorliegenden Erfindung ist das Screening in Phage-Peptid-Bibliotheken, wie z.B. in WO 03/020750 beschrieben.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf einen Impfstoff zur Vorbeugung und Behandlung von Atherosklerose, Atherosklerose-Risikoerkrankungen und Atherosklerose-Folgeerkrankungen, umfassend ein Antigen, das zumindest ein Peptid beinhaltet, ausgewählt aus der Gruppe ALKNKLP, ALKSKIP, AVKGKLP, ALKHKIP, ALKHKVP, ALKNKIP, ALKGKIP, ALKYKLP, ALKDKLP, ALKDKVP, AAQKDKVP, LKLHHGTPFQFN, SLPPDHWSLPVQ, QQQLGRDTFLHL oder TNHWPNIQDIGG. Diese Peptide sind neben den anderen mit der vorliegenden Erfindung zur Verfügung gestellten Peptiden spezifisch für die Verwendung zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, insbesondere für Atherosklerose-Impfstoffe, geeignet. Diese Sequenzen sind rein künstliche CETP-Mimotope. Die Peptide können - für Impfzwecke - (kovalent oder nicht kovalent) an geeignete Träger gekoppelt sein und können als Peptidverbindungen oder Komplexe zusammen mit anderen Verbindungen oder Moietäten, z.B. Adjuvantien, Peptiden oder Proteinträgern, etc. vorliegen und auf geeignete Weise verabreicht werden (wie z.B. in O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9) (2003), 727-735 beschrieben).

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung eines CETP-Mimotops zur Herstellung eines Mittels zur Vorbeugung und Behandlung von Atherosklerose, Atherosklerose-Risikoerkrankungen und Atherosklerose-Folgeerkrankungen. Dabei kann das erfindungsgemäße CETP-Mimotop eine Peptidstruktur (wie die erfindungsgemäß gescreeenten Library-Peptide) oder (z.B. als Aptamere) andere Strukturen aufweisen (z.B. auf Nukleinsäurebasis). Wesentlich ist dabei nur, dass sie eine Affinität zu Antikörpern gegen das natürliche CETP aufweisen, die etwa derjenigen

der natürlichen Sequenzen entspricht (zumindest 50 % der Bindungsaffinität), jedoch keine „Selbst-Strukturen“ beinhalten.

Die Erfindung wird anhand des nachfolgenden Beispiels näher erläutert, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein.

Beispiel:

Es besteht ein ausgeprägtes umgekehrtes Verhältnis zwischen der Plasma-Konzentration von Cholesterin bei High-Density-Lipoproteinen (HDLs) und der Entwicklung der Koronarerkrankung (coronary heart disease, CHD) (1). Somit ist das Risiko für CHD höher, wenn die HDLs weniger werden. Obwohl 33% der Patienten mit CHD geringe Plasma-Mengen an HDLs aufweisen, gibt es derzeit keine wirksame Therapie zur Erhöhung der Plasma-Konzentration von HDLs. Diät und moderater Ausgleichssport sind wirkungslos (2), Statine erreichen nur eine geringe, 5- bis 7% Steigerung des HDL (3), und Niacin hat Nebenwirkungen und Compliance-Profile, die seine Verwendung begrenzen (4).

Die Inhibition der CETP-Aktivität wurde als therapeutischer Ansatz zur Steigerung der Plasma-HDL-Spiegel vorgeschlagen (5). CETP ist ein Plasma-Glykoprotein, das den Transfer neutraler Lipide und Phospholipide zwischen Lipoproteinen erleichtert und die Konzentration des Plasma-HDL reguliert (6). Es wird erwartet, dass die Inhibition der CETP-Aktivität die Plasma-HDL-Konzentrationen aus mehreren Gründen erhöht. CETP senkt die HDL-Konzentrationen, indem es Cholesterylester von HDLs zu VLDLs und LDLs verschiebt (5). Die transiente Inhibition von CETP bei Kaninchen und Hamstern durch monoklonale Antikörper (7, 8), kleine Moleküle (9), oder antisense-Oligonukleotide (10) bewirkt eine HDL-Steigerung. Eine lang anhaltende CETP-Inhibition mit antisense-Nukleotiden erhöhte das Plasma-HDL und verringerte atherosklerotische Läsionen in einem Kaninchen-Atherosklerose-Modell (11). CETP-transgene Mäuse (12) und Ratten (13) zeigen verringertes Plasma-HDL. Menschen mit reduzierter CETP-Aktivität haben erhöhtes Plasma-HDL (14).

Kürzlich wurde ein Vakzin-Ansatz vorgeschlagen (15). Kaninchen wurden mit einem von humanem CETP stammenden Peptid immunisiert, das eine CETP-Region enthielt, die für eine neutrale Lipidtrans-

fer-Funktion von entscheidender Bedeutung ist. Geimpfte Kaninchen wiesen eine reduzierte CETP-Aktivität und ein verändertes Lipoprotein-Profil mit einer niedrigeren LDL- und höheren HDL-Konzentration auf. Weiters zeigte es sich, dass mit CETP geimpfte Kaninchen kleinere atherosklerotische Läsionen aufwiesen als Kontrolltiere.

Das Problem des oben besprochenen anti-CETP-Vakzin-Ansatzes ist, dass die Vakzinformulierung ein Selbst-Peptid aufweist und daher die natürliche Toleranz gegen Selbst-Antigene durchbrechen muss. Die Erfindung beschreibt ein CETP-Mimotop, das für eine Impfung verwendet werden kann: Das Mimotop soll die Produktion von Antikörpern gegen CETP induzieren. Das CETP-Mimotop hat keine Selbst-Sequenz und braucht daher keine Toleranz zu durchbrechen. Somit wird die Induktion einer anti-CETP-Antikörper-Antwort sehr erleichtert. Das Mimotop wird mit einem monoklonalen Antikörper (mAb) und (im Handel erhältlichen) Peptid-Bibliotheken (z.B. gemäß 16) identifiziert. Eine monoklonaler anti-CETP-Antikörper wird verwendet, der die CETP-Aktivität neutralisiert (17). Dieser mAb detektiert eine Sequenz innerhalb der C-terminalen 26 Aminosäuren von CETP, die für die neutrale Lipidtransfer-Aktivität notwendig ist (18).

CETP ist ein Glykoprotein mit 476 Aminosäuren. Die folgenden Regionen innerhalb des Proteins wurden als immunogen beschrieben:

Aminosäuren	132 - 142	(19)
Aminosäuren	451 - 476	(20, 21)
Aminosäuren	184 - 260	(22)
Aminosäuren	261 - 331	(22)
Aminosäuren	332 - 366	(22)
Aminosäuren	367 - 409	(22)
Aminosäuren	410 - 450	(22)

Inhibitorische sowie nicht-inhibitorische Antikörper, die die oben aufgezählten Regionen innerhalb von CETP detektieren, können zur Detektion von Mimotopen verwendet werden.

Die Sequenzen

Ein monoklonaler Antikörper, der für die Mimotop-Identifizierung

verwendet wird, detektiert die von CETP stammende Aminosäure-Sequenz FGFPEHLLVDFLQSL S (= ursprüngliches Epitop).

Das Mimotop hat eine bevorzugte Länge von 5 bis 15 Aminosäuren. Zwei verschiedene Bibliotheken werden bei ELISA-Tests zur Definition der Mimotop-Sequenzen verwendet.

Bibliothek 1: Diese 7mere Bibliothek enthält Peptide mit den folgenden Sequenzen (Aminosäure-Positionen 1 bis 7):

Position 1: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)

Position 2: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)

Position 3: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)

Position 4: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)

Position 5: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)

Position 6: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)

Position 7: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)

Die 7meren Peptide ALKNKLP, ALKSKIP, AVKGKLP, ALKHKIP, ALKHKVP, ALKNKIP, ALKGKIP, ALKYKLP, ALKDKLP und ALKDKVP sind Beispiele für von einem monoklonalen Antikörper nachgewiesene Mimotope.

Bibliothek 2: diese 8mere Bibliothek enthält Peptide mit den folgenden Sequenzen (Aminosäure-Positionen 1 bis 8):

Position 1: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)

Position 2: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)

Position 3: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)

Position 4: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)

Position 5: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)

Position 6: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)

Position 7: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)

Position 8: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)

Das 8mere Peptid AAQKDKVP ist ein Beispiel für ein von einem monoklonalen Antikörper nachgewiesenes Mimotop.

Ein weiterer für die Mimotop-Identifizierung verwendeter monoklonaler Antikörper detektiert die von CETP stammende Aminosäure-Sequenz CDSGRVRTDAPD (= ursprüngliches Epitop).

Das für die Impfung verwendete Mimotop muss in immunogener Form, z.B. an einen Träger gekoppelt, verabreicht werden.

Literaturstellen

- (1) Gordon et al 1989: "High-density lipoprotein: the clinical implications of recent studies" N Engl J Med 321:1311
- (2) Stefanick et al 1998: "Effects of diets and exercise in men and postmenopausal women with low levels of HDL cholesterol and high levels of LDL cholesterol" N Engl J Med 339:12
- (3) Schonfeld et al 1998: "Role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors ("statins") in familial combined hyperlipidemia" Am J Cardiol 81:43B
- (4) King et al 1994: "Evaluation of effects of unmodified niacin on fasting and postprandial plasma lipids in normolipidemic men with hypoalphalipoproteinemia" Am J Med 97:323
- (5) Tall 1993: "Plasma cholesteryl ester transfer protein" J Lipid Res 34:1255
- (6) Barter et al 1994: "Cholesteryl ester transfer protein: its role in plasma lipid transport" Clin Exp Pharmacol Physiol 21:663
- (7) Whitlock et al 1989: "Monoclonal antibody inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity in the rabbit: effects on lipoprotein composition and high density lipoprotein cholesteryl ester metabolism" J Clin Invest 84:129
- (8) Gaynor et al 1994: "Inhibition of cholesteryl ester transfer protein activity in hamsters alters HDL lipid composition" Atherosclerosis 110:101
- (9) Kothari et al 1997: "Inhibition of cholesteryl ester transfer protein by CGS 25159 and changes in lipoproteins in hamsters" Atherosclerosis 128:59
- (10) Sugano et al 1996: "Changes in plasma lipoprotein cholesterol levels by antisense oligodeoxynucleotides against cholesteryl ester transfer protein in cholesterol-fed rabbits" J Biol Chem 271:19080
- (11) Sugano et al 1998: "Effect of antisense oligonucleotides against cholesteryl ester transfer protein on the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits" J Biol Chem 273:5033
- (12) Agellon et al 1991: "Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice" J Biol Chem 266:10796
- (13) Herrera et al 1999: "Spontaneous combined hyperlipidemia, coronary heart disease and decreased survival Dahl-salt sensit-

ive hypertensive rats transgenic for human cholesteryl ester transfer protein" Nat Med 5:1383

(14) Koizumi et al 1985: "Deficiency of serum cholesteryl-ester transfer protein activity in patients with familial hyperalphalipoproteinaemia" Atherosclerosis 58:175

(15) Rittershaus et al 2000: "Vaccine-induced antibodies inhibit CETP activity in vivo and reduce aortic lesions in a rabbit model of atherosclerosis" Arterioscler Thromb Vasc Biol 20:2106

(16) Reineke et al. 2002: "Identification of distinct antibody epitopes and mimotopes from a peptide array of 5520 randomly generated sequences" J Immunol Methods 267:37

(17) Swenson et al 1989: "Mechanism of cholesteryl ester transfer protein inhibition by a neutralizing monoclonal antibody and mapping of the monoclonal antibody epitope" J Biol Chem 264:14318

(18) Wang et al 1992: "Identification of a sequence within the C-terminal 26 amino acids of cholesteryl ester transfer protein responsible for binding a neutralizing monoclonal antibody and necessary for neutral lipid transfer activity" J Biol Chem 267:17487

19) Thomas et al 1996: "Mouse monoclonal antipeptide antibodies specific for cholesteryl ester transfer protein (CETP)" Hybridoma 15(5):359

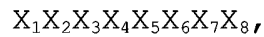
20) Hesler et al 1988: "Monoclonal antibodies to the Mr 74,000 cholesteryl ester transfer protein neutralize all of the cholesteryl ester and triglyceride transfer activities in human plasma J Biol Chem 258:11751

21) Swenson et al 1989: "Mechanism of cholesteryl ester transfer protein inhibition by a neutralizing monoclonal antibody and mapping of the monoclonal antibody epitope" J Biol Chem 264:14318

22) Roy et al 1996: "Structure-function relationships of human cholesteryl ester transfer protein: analysis using monoclonal antibodies" J Lipid Res 37:22

Patentansprüche:

1. Verwendung einer Verbindung, umfassend die folgende Aminosäuresequenz



worin

X_1 eine Aminosäure außer C ist,

X_2 eine Aminosäure außer C ist,

X_3 eine Aminosäure außer C ist,

X_4 eine Aminosäure außer C ist,

X_5 eine Aminosäure außer C ist,

X_6 nicht vorhanden oder eine Aminosäure außer C ist,

X_7 nicht vorhanden oder eine Aminosäure außer C ist,

X_8 nicht vorhanden oder eine Aminosäure außer C ist,

und worin $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ kein 5-mer, 6-mer, 7-mer oder 8-mer Polypeptid-Fragment des Cholesterinestertransport-Proteins (CETP) oder ein CETP-Epitop ist oder umfasst, wobei die Verbindung eine Bindungsfähigkeit an einen Antikörper hat, der für das natürliche CETP-Glykoprotein spezifisch ist, zur Herstellung eines Mittels zur Vorbeugung und Behandlung von Atherosklerose, Atherosklerose-Risikoerkrankungen und Atherosklerose-Folgeerkrankungen.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung ein CETP-Mimotop für ein CETP-Epitop ausgewählt aus den Epitopen definiert durch Aminosäuren 131 - 142, 451 - 476, 184 - 260, 261 - 331, 332 - 366, 367 - 409 oder 410 - 450 der CETP-Aminosäuresequenz, insbesondere FGFPEHLLVDFLQSLs oder CDSGRVRTDAPD, ist.

3. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung ein Polypeptid ist, das 5 bis 15 Aminosäurereste umfasst.

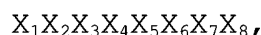
4. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung an einen pharmazeutisch annehmbaren Träger, vorzugsweise KLH, und gegebenenfalls Aluminiumhydroxid gekoppelt ist.

5. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung in einer Menge von 0,1 ng bis 10 mg enthalten ist, vorzugsweise 10 ng bis 1 mg, insbesondere 100 ng bis 100 µg.

6. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung die folgenden Peptide umfasst: ALKNKLP, ALKSKIP, AVKGKLP, ALKHKIP, ALKHKVP, ALKNKIP, ALKGKIP, ALKYKLP, ALKDKLP, ALKDKVP, AAQKDKVP, LKLHHGTPPFQFN, SLPPDHWSLPVQ, QQQLGRDTFLHL oder TNHWPNIQDIGG.

7. Verfahren zur Isolierung einer Verbindung, die an einen Antikörper bindet, der für das natürliche CETP oder ein CETP-Fragment spezifisch ist, umfassend die folgenden Schritte:

- Zur-Verfügung-Stellung einer Peptidverbindungsbibliothek, umfassend Peptide, die die folgende Aminosäuresequenz enthalten:



worin

X_1 eine Aminosäure außer C ist,

X_2 eine Aminosäure außer C ist,

X_3 eine Aminosäure außer C ist,

X_4 eine Aminosäure außer C ist,

X_5 eine Aminosäure außer C ist,

X_6 nicht vorhanden oder eine Aminosäure außer C ist,

X_7 nicht vorhanden oder eine Aminosäure außer C ist,

X_8 nicht vorhanden oder eine Aminosäure außer C ist,

und worin $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ kein 5-mer, 6-mer, 7-mer oder 8-mer Peptid-Fragment des Cholesterinestertransport-Proteins (CETP) oder ein CETP-Epitop ist oder umfasst,

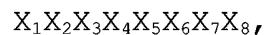
- In-Kontakt-Bringen dieser Peptidbibliothek mit diesem Antikörper, und

- Isolierung jener Mitglieder der Peptidbibliothek, die an diesen Antikörper binden.

8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass diese Peptide in der genannten Bibliothek in individualisierter Form zur Verfügung gestellt sind, insbesondere immobilisiert auf einer festen Oberfläche.

9. Verfahren gemäß Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass dieser Antikörper einen geeigneten Marker umfasst, der seinen Nachweis oder seine Isolierung bei Bindung an ein Peptid der Bibliothek ermöglicht.

10. Impfstoff zur Vorbeugung und Behandlung von Atherosklerose, Atherosklerose-Risikoerkrankungen und Atherosklerose-Folgeerkrankungen, umfassend ein Antigen, das zumindest ein Peptid beinhaltet, das eine Bindungsfähigkeit an einen Antikörper hat, der für das natürliche CETP-Glykoprotein spezifisch ist, und unter die allgemeine Formel



worin

X_1 eine beliebige Aminosäure oder nicht vorhanden, vorzugsweise A, L, I oder nicht vorhanden, ist, mit der Maßgabe dass wenn X_1 nicht vorhanden ist, X_6 vorhanden ist,

X_2 D, G, A, N, L, V, Q oder I, insbesondere L, V, Q oder I, ist, X_3 H, P, K oder R, insbesondere K oder R ist,

X_4 eine beliebige Aminosäure (außer C), insbesondere W, N, S, G, H, Y, D oder E ist,

X_5 H, S, T, P, K oder R, insbesondere K oder R, ist,

X_6 nicht vorhanden oder N, F, H, L, V oder I, insbesondere L, V oder I, ist,

X_7 nicht vorhanden oder W, L, V, I, F, N, P oder G, insbesondere P oder G, ist,

X_8 nicht vorhanden oder eine beliebige Aminosäure außer C ist, fällt, beinhaltet, insbesondere ein Peptid, ausgewählt aus der Gruppe ALKNKLP, ALKSKIP, AVKGKLP, ALKHKIP, ALKHKVP, ALKNKIP, ALKGKIP, ALKYKLP, ALKDKLP, ALKDKVP, AAQKDKVP, LKLHHGTPFQFN, SLPPDHWSLPVQ, QQQLGRDFTLHL oder TNHWPNIQDIGG.

11. Verwendung eines CETP-Mimotops zur Herstellung eines Mittels zur Vorbeugung und Behandlung von Atherosklerose, Atherosklerose-Risikoerkrankungen und Atherosklerose-Folgeerkrankungen.