

(12)

Patentschrift

(21) Anmeldenummer: A 1964/2009
(22) Anmeldetag: 12.06.2008
(45) Veröffentlicht am: 15.12.2011

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

(62) Ausscheidung aus A 00951/2008

(56) Entgegenhaltungen:
WO 2004/062556A2
WO 2008/002893A2

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

(54) **VAKZIN ZUR BEHANDLUNG VON ALZHEIMER KRANKHEIT**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von mindestens einer Verbindung mit der Aminosäuresequenz
 $EX_1WHX_2X_3(X_4)_n(X_5)_m$ (Formel II),
worin
X₁ Valin (V), Arginin (R) oder Leucin (L) ist,
X₂ Arginin (R) oder Glutaminsäure (E) ist,
X₃ Alanin (A), Histidin (H), Lysin (K), Leucin (L), Tyrosin (Y) oder Glycin (G) ist,
X₄ Prolin (P), Histidin (H), Phenylalanin (F), Glutamin (Q) oder Cystein (C) ist,
X₅ Cystein (C) ist,
n und m unabhängig voneinander 0 oder 1 sind,
welche Verbindung eine Bindungskapazität an einen Antikörper aufweist, der spezifisch für ein Epitop des Amyloid-beta-Peptids (Aβ) umfassend die Aminosäuresequenz EVHHQKL ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Prävention und/oder Behandlung von Alzheimer-Krankheit.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Mimotopen zur Prävention, Behandlung und Diagnose von mit β -Amyloid-Bildung und/oder -Anhäufung (β -Amyloidosen) assoziierten Erkrankungen.

[0002] Verschiedene degenerative Erkrankungen sind durch die aberrante Polymerisation und Akkumulation bestimmter Proteine gekennzeichnet. Zu diesen so genannten Proteopathien gehören neurologische Störungen wie Alzheimer-Krankheit, Parkinson-Krankheit und Huntington-Krankheit sowie diverse systemische Störungen einschließlich Amyloidosen. Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Prävention, Behandlung und Diagnose von mit β -Amyloid-Proteinen assoziierten Proteopathien, die unter der Bezeichnung β -Amyloidosen zusammengefasst sind. Die prominenteste Form von β -Amyloidose ist Alzheimer-Krankheit (AD). Weitere Beispiele inkludieren Demenz mit Lewy-Körperchen und Demenz bei Down-Syndrom, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0003] AD ist durch die abnorme Akkumulation von extrazellulären Amyloidplaques gekennzeichnet - was in engem Zusammenhang mit extensiver Astrozytose und Mikrogliose sowie dystrophen Neuronen und Neuronenverlust steht. Diese Amyloidplaques bestehen zum Großteil aus den Amyloid- β (A β)-Peptiden A β 40 und A β 42, die sich vom Amyloid-Vorläuferprotein (APP) herleiten, welches bei verschiedenen Zelltypen im Nervensystem exprimiert wird. Man glaubt, dass A β -Peptide direkt an der Pathogenese und Progression von AD teilhaben.

[0004] APP wird normalerweise mit Hilfe von zwei Spaltungsschritten zur Bildung der derzeit bekannten Formen von Abeta x-40/42/43 verarbeitet. Die erste Spaltung erfolgt durch die so genannten beta-Stellen-APP-Spaltenzyme 1 und 2 (BACE1 und BACE2); der zweite proteolytische Schritt wird mit Hilfe des gamma-Sekretase-Komplexes durchgeführt (besprochen in De Strooper et al., J Cell Sci 113 (2000): 1847-1870).

[0005] BACE-Enzyme erkennen zwei Stellen im N-terminalen Teil des präsumptiven A β -Peptids: die erste Wechselwirkung von BACE mit APP führt zu einem Schnitt an der DAEFR-Sequenz (Pos. 1 in A β) und zur Bildung von Abeta 1-X. Alternativ kann BACE auch an der künftigen Position 11 innerhalb von A β schneiden, was ein Fragment 11-X ergibt. So wird durch BACE-vermittelte APP-Verarbeitung eine Vielzahl von verschiedenen A β -Spezies mit Abeta 1-40/42 voller Länge als Hauptbeteiligten geschaffen.

[0006] Gamma-Sekretase-Aktivität führt zur Produktion von drei Hauptfragmenten: A β 1-40/42/43. Sobald diese Peptide produziert sind, werden sie mit Aminopeptidasen weiter verarbeitet, was in ihrem anschließenden schrittweisen Abbau resultiert. Diese weiteren Schritte führen zur Bildung von anderen Formen wie beispielsweise A β 3-40/42. Beim Menschen entsteht durchschnittlich 60-85 % des Amyloidplaquematerials durch A β 40/42-Derivate, die N-terminal trunziert und häufig modifiziert sind. Die relativen Mengen, von N-terminal trunkierten A β -Spezies sind hinsichtlich A β -Level, Mutationen und BACE-Aktivität variabel.

[0007] Die am häufigsten auftretenden trunkierten Formen von A β sind: A β 3-40/42 und A β 11-40/42. Beide Peptide enthalten einen N-terminalen Glutamatrest, der häufig enzymatisch zu Pyroglutamat modifiziert wird, was zur Bildung von A β 3(pE)-40/42 bzw. A β 11(pE)-40/42 führt. Weil der Aminoterminus von Abeta-3(pE)-und -11(pE)-Peptiden durch internes Laktam blockiert wird, ist er vor der proteolytischen Wirkung von anderen Aminopeptidasen als Pyroglutamat-spezifischen geschützt und kann somit in Geweben stabil bleiben.

[0008] Die prominenteste Form von N-terminal trunkiertem, modifiziertem Amyloid wird durch das Peptid 3(pE)-40/42 gebildet, von dem man glaubt, dass es bis zu 50 % aller trunkierten Formen darstellt. Das bedeutet, dass diese Isoformen 25-40 % aller Amyloidpeptide in AD-Gehirnen darstellen. Eine andere prominente Form von trunkierten A β -Peptiden ist A β 11-40/42: Naslund et al. und Huse et al. konnten nachweisen, dass ein signifikanter Gehalt an diesen trunkierten Spezies in menschlichen Gehirnen von AD-Patienten sowie bei infraklinischen AD-Patienten nachweisbar ist. Außerdem machen diese Peptide eine intramolekulare Dehydratisie-

rung durch und bilden dabei stabile (pE) Formen mit ähnlichen Konsequenzen wie für 3(pE)-40/42 beschrieben.

[0009] Schon früher wurde gezeigt, dass trunkierte und modifizierte Peptide in Nervengewebe stabiler sind als A β voller Länge. Darüber hinaus sind N-terminal trunkierte Formen von A β amyloidogener als nicht modifizierte A β -Peptide, weshalb die Plaquebildungsrate erhöht ist, und sie zeigen auch neurotoxische Aktivität bei der Applikation auf kultivierte Neuronen sowie bei in-vivo-Versuchen. Trunkierte Formen von A β können bereits in diffusen Ansammlungen von A β in frühen Stadien von AD nachgewiesen werden und könnten an früher Plaquebildung beteiligt sein, da sie in vivo als Einzelkeime agieren.

[0010] Es gibt zwingende Beweise, dass das Auftreten von N-terminal trunkierten A β -Spezies mit erhöhter Schwere und früherem Einsetzen von Neurodegeneration bei sporadischer und familiärer Alzheimer-Krankheit sowie bei Down-Syndrom-Patienten korreliert. Die Aggregationswirkung in Verbindung mit der erhöhten Stabilität dieser Peptide macht sie zu potentiell gefährlichen Akteuren bei der Entstehung von AD. Eine Analyse bei infraklinischen Patienten, die an familiärer AD oder Down-Syndrom leiden, hat eindeutig ergeben, dass A β 3(pE)-42 während der ganz frühen Stadien der Krankheit, auch „Keim“-Stadien genannt, nachgewiesen werden kann. Zu dieser Zeit können keine oder nur geringe neurologische Symptome nachgewiesen werden, auch wenn Plaques bereits beginnen sich anzusammeln, welche die A β -3(pE)-42-Peptid-Spezies tragen. Somit weisen Daten von solchen Patienten auf eine Verbindung zwischen der frühen Bildung von trunkierten A β -Spezies und dem Einsetzen sowie der Progression der Krankheit hin.

[0011] Angesichts dieser Erkenntnisse scheint es wichtig, die Menge dieser Peptidspezies bei AD-Patienten zu verringern, um die Progression der Krankheit zu verändern und die Toxizität sowie den einhergehenden kognitiven Verfall zu reduzieren. Eine optimale AD-Vakzine sollte daher eine Immunantwort auslösen, die in der Lage ist, die prominentesten Formen von A β -Peptiden anzuvisieren, die im Gehirn von AD-Patienten vorhanden sind.

[0012] Eine immunotherapeutische Behandlung unter Verwendung von aktiven und passiven Immunisierungsstrategien zur Abzielung auf A β voller Länge führte nämlich zu einer Reduktion von A β -Plaques und zeigte günstige Auswirkungen auf die Progression der Krankheit in AD-Tiermodellen. Passive Impfversuche in AD-Mausmodellen zeigten deutlich, dass spezifisch gegen die N- und C-Termini von A β 40/42 gerichtete Antikörper die Belastung durch Plaques im Gehirn verringern und auch die kognitiven Funktionen bei den behandelten Tieren verbessern konnten, wie aus Verhaltensanalysen hervorgeht. Ähnliche Beobachtungen wurden bei aktiven Impfversuchen unter Verwendung verschiedener Ansätze zur Induktion von Immunantworten gegen A β 40/42 bei Mäusen gemacht. Alle diese Ansätze verwendeten A β 40/42 voller Länge oder Fragmente, die die native Sequenz von A β enthielten, und die meisten davon reduzierten die Amyloid-Belastung in transgenen Mausmodellen. Zudem zeigten diese Tiere auch verbesserte kognitive Funktionen. Auf beeindruckende Weise konnten Lemere et al. (Am J. Pathol 165 (2004):283-297) diese Ergebnisse bei Primaten reproduzieren, wobei sich eine deutliche Reduktion der Plaqueablagerung und damit verbundenen Pathologie als Reaktion auf die aktive Impfung mit A β voller Länge zeigte. Der erste klinische Phase-IIa-Impftestlauf bei AD-Patienten unter Verwendung von A β 42 voller Länge als Antigen musste jedoch aufgrund schwerer neuroentzündlicher Nebenwirkungen einschließlich der Infiltration von autoreaktiven T-Zellen in das Gehirn abgebrochen werden. Nichtsdestotrotz zeigten Studien, die die klinischen Wirkungen bei mit AN-1792 behandelten Patienten untersuchten, dass Patienten, die eine Antikörperantwort gegen A β 42 entwickelten, aber nicht an Meningoenzephalitis litten, bei kognitiven Tests besser abschnitten als nicht ansprechende Patienten, was darauf hinweist, dass die Immuntherapie ein sehr nützlicher Behandlungsansatz bei AD sein könnte.

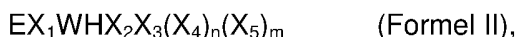
[0013] Was aber am wichtigsten ist, so zeigten aktuelle Ergebnisse aus Autopsiefällen zur Untersuchung von Patienten, die eine AN1792-Impfung erhielten, dass das Gehirn von A β -Spezies voller Länge frei wurde, N-terminal trunkierte A β -Formen aber bestehen blieben. Das unterstreicht die Notwendigkeit der Erfindung von neuen Vakzinen, die sowohl auf das A β voller

Länge als auch auf N-terminal trunkierte und modifizierte Formen dieses Moleküls abzielen.

[0014] Die Induktion einer Immunantwort gegen A β 40/42-Peptide beim Menschen kann zwar in den kognitiven Verfall von AD-Patienten eingreifen, eine sichere Alzheimer-Vakzine muss jedoch die Bildung von autoreaktiven T-Zellen vermeiden. Eine Vakzinierung unter Verwendung von nativen A β 40/42-Peptiden oder Fragmenten davon leidet am inhärenten Risiko der Induktion einer Autoimmunerkrankung bei den Patienten, da die Immunantwort nicht ausschließlich auf A β abgezielt werden kann.

[0015] Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Verbindungen und Medikamente zur Verfügung zu stellen, die zur Behandlung und/oder Prävention von β -Amyloidosen einschließlich Alzheimer-Krankheit verwendet werden können. Diese Verbindungen sollten bei Verabreichung an ein Individuum kein oder ein signifikant reduziertes Risiko der Induktion von Autoimmunerkrankungen aufweisen. Gemäß einem weiteren Ziel der vorliegenden Erfindung kann diese Verbindung die in-vivo-Bildung von Antikörpern in einem Individuum induzieren, die gegen trunkierte und/oder stabilisierte Formen von A β gerichtet sind, welche üblicherweise die Hauptbestandteile von Amyloidablagerungen sind.

[0016] Daher betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von mindestens einer Verbindung mit der Aminosäuresequenz



[0017] worin

[0018] X₁ Valin (V), Arginin (R) oder Leucin (L) ist,

[0019] X₂ Arginin (R) oder Glutaminsäure (E) ist,

[0020] X₃ Alanin (A), Histidin (H), Lysin (K), Leucin (L), Tyrosin (Y) oder Glycin (G) ist,

[0021] X₄ Prolin (P), Histidin (H), Phenylalanin (F), Glutamin (Q) oder Cystein (C) ist,

[0022] X₅ Cystein (C) ist,

[0023] n und m unabhängig voneinander 0 oder 1 sind,

[0024] welche Verbindung eine Bindungskapazität an einen Antikörper aufweist, der spezifisch für ein Epitop des Amyloid-beta-Peptids (A β) umfassend die Aminosäuresequenz EVHHQKL ist, zur Herstellung eines Medikaments zur Prävention und/oder Behandlung von Alzheimer-Krankheit.

[0025] Es hat sich überraschend gezeigt, dass eine Verbindung mit einer Aminosäuresequenz der Formel II die in-vivo-Bildung von Antikörpern induzieren kann, die gegen die trunkierten A β -Formen A β 11-40/42 gerichtet sind. Die gebildeten Antikörper können an die A β -Fragmente binden, was zu einem Zerfall von A β -Plaques führt.

[0026] Formel II und alle anderen hierin offenbarten Peptidmoleküle ahmen die natürlich vorkommenden A β -Peptide und die Variante A β 11-40/42 nach, so dass Verbindungen mit der hierin offenbarten Aminosäuresequenz die Bildung von entsprechenden Antikörpern induzieren können.

[0027] Die hierin präsentierte Erfindung bezieht sich auf Antigene, die keine Sequenzen des nativen A β -Peptids enthalten und die Struktur von Neoepitopen nachahmen, welche nicht durch Mimotope, wie sie in WO 2004/062556 beschrieben sind, nachgewiesen werden können. Eine derartige Mimotop-basierte AD-Vakzine würde daher Antikörperantworten induzieren, die ausschließlich mit den hierin genannten pathologischen A β -Molekülen, nicht aber mit parentalen Strukturen wie APP reagieren. Weiters enthalten Mimotope keine potentiellen T-Zellen-Selbstepitope und vermeiden die Induktion von schädlichen autoreaktiven T-Zellen.

[0028] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst die Verbindung ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus EVWHRHQ(C), ERWHEKH(C), EVWHRLQ(C), ELWHRYP(C), ELWHRAF(C),

ELWHRA(C), EVWHRG(C), EVWHRH(C) und ERWHEK(C), vorzugsweise EVWHRHQ(C), ERWHEKH(C), EVWHRLQ(C), ELWHRYP(C) und ELWHRAF(C).

[0029] Besonders bevorzugte Verbindungen der vorliegenden Erfindung umfassen die bzw. bestehen aus den oben identifizierten Aminosäuresequenzen, wobei der C-Terminus des Peptids gegebenenfalls einen Cysteinrest (angezeigt durch Klammern) enthalten kann, so dass die erhaltene Verbindung z.B. an ein Trägermolekül gekoppelt werden kann. Es ist jedoch auch möglich, einen Cysteinrest an den N-Terminus des Peptids anzuhängen.

[0030] Die hierin offenbarten Aminosäuresequenzen werden als Mimotope der Epitope von A β umfassend die Aminosäuresequenz EFRHDSGY, pEFRHDSGY oder EVHHQKL angesehen. Gemäß der vorliegenden Erfindung bezieht sich der Ausdruck „Mimotop“ auf ein Molekül, das eine Konformation mit einer Topologie äquivalent zu dem Epitop aufweist, von dem es eine Mimikry ist. Das Mimotop bindet an dieselbe Antigen-bindende Region eines Antikörpers, der immunspezifisch an ein gewünschtes Antigen bindet. Das Mimotop ruft eine immunologische Antwort in einem Wirt hervor, die auf das Antigen reagiert, für die es eine Mimikry ist. In in-vitro-Inhibitionsassays (z.B. ELISA-Inhibitionsassays), bei denen das Epitop und ein an dieses Epitop bindender Antikörper involviert sind, kann das Mimotop auch als Konkurrent für das Epitop fungieren, von dem es eine Mimikry ist. Ein erfindungsgemäßes Mimotop muss aber nicht unbedingt die Bindung des Epitops, von dem es eine Mimikry ist, in einem in-vitro-Inhibitionsassay verhindern bzw. mit diesem konkurrieren, auch wenn es bei Verabreichung an einen Säuger eine spezifische Immunantwort induzieren kann.

[0031] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Ausdruck „Epitop“ auf eine immunogene Region eines Antigens, das von einem bestimmten Antikörpermolekül erkannt wird. Im allgemeinen besitzt ein Antigen ein oder mehr Epitope, von denen jedes einen Antikörper binden kann, der das bestimmte Epitop erkennt.

[0032] Die Mimotope der vorliegenden Erfindung können mit Hilfe von chemischen Syntheseverfahren synthetisch hergestellt werden, die auf dem Gebiet gut bekannt sind, u.zw. entweder als isoliertes Peptid oder als Teil eines anderen Peptids oder Polypeptids. Alternativ kann das Peptidmimotop in einem Mikroorganismus produziert werden, der das Peptidmimotop produziert, das dann isoliert und gewünschtenfalls weiter gereinigt wird. Das Peptidmimotop kann in Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen oder Pilzen, in eukaryotischen Zellen wie einer Säuger- oder einer Insektenzelle, oder in einem rekombinanten Virusvektor wie Adenovirus, Pockenvirus, Herpesvirus, Simliki-Forest-Virus, Baculovirus, Bakteriophage, Sindbis-Virus oder Sendai-Virus hergestellt werden. Geeignete Bakterien zur Herstellung des Peptidmimotops inkludieren *E. coli*, *B. subtilis* oder jedes andere Bakterium, das Peptide wie das Peptidmimotop exprimieren kann. Geeignete Hefearten zur Expression des Peptidmimotops inkludieren *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida*, *Pichia pastoris* oder jede andere Hefe, die Peptide exprimieren kann. Entsprechende Verfahren sind auf dem Gebiet gut bekannt. Auch Verfahren zum Isolieren und Reinigen von rekombinant hergestellten Peptiden sind auf dem Gebiet gut bekannt und inkludieren z.B. Gelfiltration, Affinitätschromatografie, Ionenaustauschchromatografie etc.

[0033] Um die Isolierung des Peptidmimotops zu erleichtern, kann ein Fusionspolypeptid erzeugt werden, wobei das Peptidmimotop translatorisch mit einem heterologen Polypeptid verschmolzen (kovalent gekoppelt) wird, das die Isolierung mittels Affinitätschromatografie ermöglicht. Typische heterologe Polypeptide sind His-Tag (z.B. His₆; 6-Histidinreste), GST-Tag (Glutathion-S-Transferase) etc. Das Fusionspolypeptid erleichtert nicht nur die Reinigung der Mimotope, sondern kann auch verhindern, dass das Mimotoppolypeptid während der Reinigung abgebaut wird. Wird eine Entfernung des heterologen Polypeptids nach der Reinigung gewünscht, kann das Fusionspolypeptid eine Spaltstelle an der Verbindung zwischen dem Peptidmimotop und dem heterologen Polypeptid aufweisen. Die Spaltstelle besteht aus einer Aminosäuresequenz, die mit einem für die Aminosäuresequenz an dieser Stelle spezifischen Enzym (z.B. Proteasen) gespalten wird.

[0034] Die erfindungsgemäßen Mimotope können auch an oder nahe ihres N- und/oder

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

[0035] Die erfindungsgemäßen Mimotope können auch in verschiedenen Tests und Sets, insbesondere immunologischen Tests und Sets, verwendet werden. Daher wird besonders bevorzugt, dass das Mimotop Teil eines anderen Peptids oder Polypeptids, insbesondere eines Enzyms, sein kann, welches als Reporter in immunologischen Tests verwendet wird. Solche Reporterenzyme inkludieren z.B. Alkaliphosphatase oder Meerrettich-Peroxidase.

[0036] Die erfindungsgemäßen Mimotope sind vorzugsweise antigene Polypeptide, die sich in ihrer Aminosäuresequenz von der Aminosäuresequenz von A β oder von A β -Fragmenten unterscheiden. Diesbezüglich können die erfindungsgemäßen Mimotope nicht nur Aminosäuresubstitutionen eines oder mehrerer natürlich vorkommender Aminosäurereste, sondern auch eine oder mehr nicht natürliche Aminosäuren (d.h. nicht von den 20 „klassischen“ Aminosäuren) aufweisen, oder sie können zur Gänze aus solchen nicht natürlichen Aminosäuren zusammengesetzt sein. Außerdem können die erfindungsgemäßen Antigenen, die Antikörper induzieren, welche gegen A β 1-40/42, A β pE3-40/42, A β 3-40/42 und A β 11-40/42 gerichtet sind und an diese binden, aus D- oder L-Aminosäuren oder DL-Aminosäure-Kombinationen zusammengesetzt und gegebenenfalls durch weitere Modifikationen, Ringschließungen oder Derivatisierungen verändert worden sein. Geeignete Antikörper induzierende Antigene können von handelsüblichen Peptidbibliotheken zur Verfügung gestellt werden. Vorzugsweise sind diese Peptide mindestens 7 Aminosäuren lang, und bevorzugte Längen können bis zu 16, vorzugsweise bis zu 14 oder 20 Aminosäuren (z.B. 5 bis 16 Aminosäurereste) aufweisen. Erfindungsgemäß können jedoch auch längere Peptide sehr gut als Antikörper induzierende Antigene eingesetzt werden. Weiters können die erfindungsgemäßen Mimotope auch Teil eines Polypeptids sein und in der Folge an ihrem N- und/oder C-Terminus mindestens einen weiteren Aminosäurerest aufweisen.

[0037] Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Mimotope (d.h. der hierin offenbarten Antikörper induzierenden Antigene) sind natürlich auch Phagenbibliotheken, Peptidbibliotheken geeignet, die beispielsweise mittels kombinatorischer Chemie erzeugt oder mit Hilfe von Hochdurchsatz-Screening-Methoden für die unterschiedlichsten Strukturen erhalten werden (Display: A Laboratory Manual by Carlos F. Barbas (Editor), et al.; Willats WG Phage display: practicalities and prospects. Plant Mol. Biol. 2002 Dec; 50(6) :837-54).

[0038] Weiters können erfindungsgemäß auch anti-A β 1-40/42-, -A β pE3-40/42-, -A β 3-40/42- und -A β 11-40/42-Antikörper induzierende Antigene basierend auf Nukleinsäuren („Aptamere“) verwendet werden, und auch diese sind in den verschiedensten (Oligonukleotid-) Bibliotheken (z.B. mit 2-180 Nukleinsäureresten) zu finden (z.B. Burgstaller et al., Curr. Opin. Drug Discov. Dev. 5(5) (2002), 690-700; Famulok et al., Acc. Chem. Res. 33 (2000), 591-599; Mayer et al., PNAS 98 (2001), 4961-4965, etc.). Bei Antikörper induzierenden Antigenen basierend auf Nukleinsäuren kann das Nukleinsäure-Grundgerüst z.B. durch die natürlichen Phosphordiester-Verbindungen oder auch durch Phosphorthioate oder Kombinationen oder chemische Variationen (z.B. als PNA) zur Verfügung gestellt werden, wobei erfindungsgemäß als Basen in erster Linie U, T, A, C, G, H und mC eingesetzt werden können. Die 2'-Reste der Nukleotide, die erfindungsgemäß verwendet werden können, sind vorzugsweise H, OH, F, Cl, NH₂, O-Methyl, O-Ethyl, O-Propyl oder O-Butyl, wobei die Nukleinsäuren auch unterschiedlich modifiziert sein können, d.h. mit Schutzgruppen, wie sie üblicherweise bei der Oligo-nukleotid-Synthese verwendet werden. Somit sind Aptamer-basierte Antikörper induzierende Antigene auch bevorzugte Antikörper induzierende Antigene im Rahmen der vorliegenden Erfindung.

[0039] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Verbindung an einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, vorzugsweise KLH (Keyhole-Limpet-Hemocyanin), Tetanus-toxoid, Albumin bindendes Protein, Rinderserumalbumin, ein Dendrimer (MAP; Biol. Chem. 358: 581), Peptidlinker (oder flankierende Regionen) sowie die Adjuvantien, die in Singh et al., Nat. Biotech. 17 (1999), 1075-1081 (insbesondere in Tabelle 1 dieses Do-

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

[0040] Die erfindungsgemäße Verbindung ist vorzugsweise über einen Linker ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus NHS-Poly (Ethylenoxid) (PEO) (z.B. NHS-PEO₄-Maleimid) an den Träger bzw. das Adjuvans gebunden.

[0041] Eine die vorliegende Verbindung (Mimotop) und den pharmazeutisch akzeptable Träger umfassende Vakzine kann mittels jeder geeigneten Applikationsmethode, z.B. i.d., i.v., i.p., i.m., intranasal, oral, subkutan etc. und in jeder geeigneten Abgabevorrichtung (O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9), (2003), 727-735) verabreicht werden. Die erfindungsgemäße Verbindung ist vorzugsweise für intravenöse, subkutane, intradermale oder intramuskuläre Verabreichung formuliert (siehe z.B. "Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations", Sarfaraz Niazi, CRC Press Inc, 2004).

[0042] Das erfindungsgemäße Medikament (die erfindungsgemäße Vakzine) enthält die erfindungsgemäße Verbindung in einer Menge von 0,1 ng bis 10 mg, vorzugsweise 10 ng bis 1 mg, insbesondere 100 ng bis 100 µg, oder alternativ z.B. 100 fmol bis 10 µmol, vorzugsweise 10 pmol bis 1 µmol, insbesondere 100 pmol bis 100 nmol. Typischerweise kann die Vakzine auch Hilfsstoffe, z.B. Puffer, Stabilisatoren etc. enthalten.

[0043] Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf ein Peptid mit oder bestehend aus einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus EVWHRHQ(C), ERWHEKH(C), EVWHRLQ.(C), ELWHRYP(C), ELWHRAF (C), ELWHRA (C), EVWHRG(C), EVWHRH(C) und ERWHEK(C). Wie durch die Verwendung der Klammern angedeutet, können die erfindungsgemäßen Peptide gegebenenfalls den Cysteinrest am C- oder N-Terminus aufweisen. Daher umfasst die vorliegende Erfindung auch die folgenden Aminosäuresequenzen: EVWHRHQ, ERWHEKH, EVWHRLQ, ELWHRYP, ELWHRAF, ELWHRA, EVWHRG, EVWHRH und ERWHEK.

[0044] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist das Peptid an einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, vorzugsweise KLH (Keyhole-Limpet-Hemocyanin) gekoppelt.

[0045] Ein noch anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf eine pharmazeutische Formulierung, vorzugsweise eine Vakzine, die mindestens ein erfindungsgemäßes Peptid umfasst. Diese pharmazeutische Formulierung kann zur Behandlung von an β -Amyloidosen einschließlich Alzheimer-Krankheit leidenden Individuen oder zur Verhinderung der Bildung von A β -Plaques in einem Individuum zwecks Hintanhaltens der Bildung von β -Amyloidosen einschließlich Alzheimer-Krankheit verwendet werden.

[0046] Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Figuren und Beispiele näher veranschaulicht, ohne jedoch darauf eingeschränkt zu sein.

[0047] Fig. 1 zeigt die Bindung des monoklonalen Antikörpers MV-001 an bestimmte Peptide und rekombinante Proteine;

[0048] Fig. 2 zeigt die Bindung des monoklonalen Antikörpers MV-003 an bestimmte Peptide und rekombinante Proteine;

- [0049] Fig. 3 zeigt die Bindung des monoklonalen Antikörpers MV-004 an bestimmte Peptide und rekombinante Proteine;
- [0050] Fig. 4 zeigt typische Bindungsassays mit Mimotopen für β -Amyloid und N-terminal trunkierte und/oder posttranslatorisch modifizierte β -Amyloid-Fragmente;
- [0051] Fig. 5 zeigt typische Inhibitionsassays mit Mimotopen für β -Amyloid und N-terminal trunkierte und/oder posttranslatorisch modifizierte β -Amyloid-Fragmente;
- [0052] Fig. 6 zeigt Beispiele für in-vivo-Charakterisierungen der durch Mimotop-Vakzinierung (injiziertes Peptid/irrelevantes Peptid) hervorgerufenen Immunantwort;
- [0053] Fig. 7 zeigt Beispiele für die in-vivo-Charakterisierung der durch Mimotop-Vakzinierung gegen Amyloid-beta-Fragmente hervorgerufenen Immunantwort;
- [0054] Fig. 8 zeigt Beispiele für die in-vivo-Charakterisierung der durch Mimotop-Vakzinierung gegen A β 40/42 voller Länge hervorgerufenen Immunantwort.

BEISPIELE

VERFAHREN

[0055] Die zur Identifizierung der Mimotope gemäß der vorliegenden Erfindung verwendeten Antikörper weisen von humanem A β abgeleitete Aminosäuresequenzen nach, binden aber nicht an humanes APP voller Länge. Zu den nachgewiesenen Sequenzen gehören EFRHDS (= Originalepitop aa3-8 von A β), p(E)FRHDS (= Originalepitop des modifizierten aa3-8 von A β), EVH-HQK (= Originalepitop aa11-16 von A β). Der Antikörper kann eine monoklonale oder polyklonale Antikörperpräparation oder jeder Antikörperteil oder jedes Derivat davon sein, mit der einzigen Maßgabe, dass das Antikörpermolekül mindestens eines der oben genannten (von humanem A β abgeleiteten) Epitope spezifisch erkennt, nicht aber an humanes APP voller Länge bindet.

[0056] Die Mimotope werden mit solchen monoklonalen Antikörpern und Peptidbibliotheken identifiziert und weiter charakterisiert.

BEISPIEL 1 HERSTELLUNG VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN FÜR DEN SPEZIFISCHEN NACHWEIS VON β -AMYLOID UND N-TERMINAL TRUNKIERTEN UND/ODER POSTTRANSLATORISCH MODIFIZIERTEN β -AMYLOID-FRAGMENTEN.

[0057] Beispiel 1a: Herstellung des monoklonalen Antikörpers MV-001

[0058] Es wurde ein monoklonaler Antikörper, abgeleitet aus der Fusion von Versuch Alz-5, hergestellt: Im Versuch Alz-5 wurden C57/B16-Mäuse mit dem Original-A β -Epitop DAEFRHDSGYC, gekoppelt an KLH (Keyhole-Limpet-Hemocyanin) und Alum (Aluminiumhydroxid) als Adjuvans, wiederholt immunisiert. p4371-Peptid-spezifische, Antikörper produzierende Hybridome wurden mittels ELISA nachgewiesen (mit p1253- und p4371-Peptid beschichtete ELISA-Platten): Humanes A β 40/42 (rekombinantes Protein) wurde als positives Kontrollpeptid verwendet: Hybridome, die das auf ELISA-Platten immobilisierte rekombinante Protein erkennen, wurden mit eingeschlossen, weil sie sowohl das Peptid als auch das A β voller Länge spezifisch binden. P1454 (humanes A β 33-40) wurde als negatives Kontrollpeptid verwendet. Weiters wurden Hybridome gegen p4373 getestet. Nur Hybridome mit keiner oder eingeschränkter p4374-Bindung wurden für eine weitere Antikörperentwicklung verwendet.

[0059] Der Hybridomklon (MV-001) (interner Name 824; IgG1) wurde gereinigt und für den spezifischen Nachweis von p1253, p4371, p4373, p1454 bzw. A β analysiert. MV-001 erkannte das injizierte Epitop (p1253) sowie das spezifische Epitop (p4371) und das A β -Protein voller Länge (rekombinantes Protein; erhalten von Bachem Antigen, Bubendorf, Schweiz) im ELISA. Es wies jedoch nicht p1454 im ELISA nach. Weiters versagten die MV-001-Antikörper prinzipiell beim Nachweis des für die Pyroglutamatversion von A β 3-10 codierenden Peptids p4373 (30-mal geringerer Titer als die Originalepitope).

[0060] Beispiel 1b: Herstellung des monoklonalen Antikörpers MV-003

[0061] Es wurde ein monoklonaler Antikörper, abgeleitet aus der Fusion von Versuch Alz-16, hergestellt: Im Versuch Alz-16 wurden BalbC-Mäuse mit dem Epitop p(E)FRHDSC (p4373), gekoppelt an KLH (Keyhole-Limpet-Hemocyanin) und Alum (Aluminiumhydroxid) als Adjuvans, wiederholt immunisiert. p4373-Peptid-spezifische, Antikörper produzierende Hybridome wurden mittels ELISA nachgewiesen (mit p4373-Peptid beschichtete ELISA-Platten). p1253, p1454 und A β 40/42 wurden als negative Kontrollpeptide verwendet. Weiters wurden Hybridome gegen p4371 getestet. Nur Hybridome mit keiner oder eingeschränkter p4371-Bindung wurden für eine weitere Antikörperentwicklung verwendet, um eine Pyroglutamat-Spezifität zu garantieren.

[0062] Der Hybridomklon (MV-003) (interner Name D129; IgG1) wurde gereinigt und für den spezifischen Nachweis von p1253, p4371, p4373, p1454 bzw. A β analysiert. MV-003 erkannte das injizierte Epitop (p4373), versagte jedoch beim Nachweis von p1454, p1253 oder dem A β -Protein voller Länge (rekombinantes Protein; erhalten von Bachem Antigen, Bubendorf, Schweiz) im ELISA. Weiters waren die MV-003-Antikörper nicht in der Lage, das für die normale Version von A β 3-10 codierende Peptid p4371 nachzuweisen (15-mal geringerer Titer als das Originalepitop).

[0063] Beispiel 1c: Herstellung des monoklonalen Antikörpers MV-004

[0064] Es wurde ein monoklonaler Antikörper, abgeleitet aus der Fusion von Versuch Alz-15, hergestellt: Im Versuch Alz-15 wurden BalbC-Mäuse mit dem Epitop EVHHQKC (p4372), gekoppelt an KLH (Keyhole-Limpet-Hemocyanin) und Alum (Aluminiumhydroxid) als Adjuvans, wiederholt immunisiert. p4372-Peptid-spezifische, Antikörper produzierende Hybridome wurden mittels ELISA nachgewiesen (mit p4372-Peptid beschichtete ELISA-Platten). p4376, p4378, p1454 und A β 40/42 wurden als negative Kontrollpeptide verwendet. Nur Hybridome mit keiner oder eingeschränkter p4376- und p4378-Bindung wurden für eine weitere Antikörperentwicklung verwendet, um eine Spezifität gegen den freien N-Terminus in Position aa11 zu garantieren.

[0065] Der Hybridomklon (MV-004) (interner Name B204; IgG1) wurde gereinigt und für den spezifischen Nachweis von p4372, p4376, p4378, p1454 bzw. A β analysiert. MV-004 erkannte das injizierte Epitop (p4372), versagte jedoch beim Nachweis von p1454, p4376 und p4378 sowie dem A β -Protein voller Länge (rekombinantes Protein; erhalten von Bachem Antigen, Bubendorf, Schweiz) im ELISA. Das Versagen beim Nachweis von p4376, p4378 beweist die Spezifität für den freien N-Terminus in Position aa11 im trunkierten A β .

BEISPIEL 2: PHAGEN-DISPLAY, IN-VITRO-BINDUNG UND INHIBITIONS-ELISA

[0066] Die in diesem Beispiel verwendeten Phagen-Display-Bibliotheken waren: Ph.D. 7: New England BioLabs E8102L (lineare 7mer-Bibliothek). Das Phagen-Display erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (www.neb.com).

[0067] Nach 2 oder 3 aufeinander folgenden Panning-Runden wurden einzelne Phagenklone gepickt und die Phagenüberstände einem ELISA auf Platten unterzogen, die mit dem Antikörper beschichtet waren, der für das Panning-Verfahren verwendet wurde. Phagenklone, die in diesem ELISA positiv waren (starkes Signal für das Target, aber kein Signal für unspezifische Kontrolle), wurden sequenziert. Aus DNA-Sequenzen wurden Peptidsequenzen abgeleitet. Diese Peptide wurden synthetisiert und im Bindungs- und Inhibitions-ELISA charakterisiert. Darüber hinaus wurden einige neue Mimotope geschaffen, indem im Screen identifizierte Sequenzinformationen von Mimotopen zur Unterstützung der Identifizierung einer Konsensussequenz für eine Mimotop-Vakzinierung kombiniert wurden.

[0068] 1. In-vitro-Bindungsassay (ELISA)

[0069] Vom Phagen-Display abgeleitete Peptide sowie Varianten davon wurden an BSA gekoppelt und an ELISA-Platten gebunden (1 μ M; wie in den entsprechenden Figuren angegeben) und anschließend mit dem monoklonalen Antikörper inkubiert, der für den Screening-Vorgang verwendet wurde, um die Bindungskapazität von identifizierten Peptiden zu analysieren.

[0070] 2. In-vitro-Inhibitionsassay (ELISA)

[0071] Vom Phagen-Display abgeleitete, unterschiedliche Peptidmengen (Konzentrationen von 10 µg bis 0,08 µg; Serienverdünnungen) wurden mit dem monoklonalen Antikörper inkubiert, der für den Screening-Vorgang verwendet wurde. Peptide, die die anschließende Bindung des Antikörpers an das auf ELISA-Platten beschichtete Originalepitop verringerten, wurden in diesem Assay als inhibierend angesehen.

BEISPIEL 3: IN-VIVO-UNTERSUCHUNG VON MIMOTOPEN: ANALYSE DER IMMUNOGENITÄT UND KREUZREAKTIVITÄT**[0072]** 1. In-vivo-Untersuchung von Mimotopen

[0073] Inhibierende und nicht inhibierende Peptide wurden an KLH gekoppelt und Mäusen injiziert (Wildtyp C57/B16-Mäuse; subkutane Injektion in die Flanke), zusammen mit einem geeigneten Adjuvans (Aluminiumhydroxid). Die Tiere wurden 3- bis 6-mal in zweiwöchigen Intervallen geimpft, und Seren wurden ebenfalls zweiwöchentlich genommen. Die Titer zu den injizierten Peptiden sowie zu einem irrelevanten Peptid wurden bei jedem Serum bestimmt. Weiters wurden Titer gegen das rekombinante humane Aβ-Protein bzw. gegen Originalpeptide bestimmt. Im allgemeinen wurden die Seren durch Reaktion mit an Rinderserumalbumin (BSA) gekoppelten Peptiden und auf ELISA-Platten immobilisierten rekombinanten Proteinen voller Länge analysiert. Die Titer wurden unter Verwendung von anti-Maus-IgG-spezifischen Antikörpern bestimmt. Für detaillierte Ergebnisse siehe Fig. 6, 7 bzw. 8.

[0074] 2. Ergebnisse

[0075] 2.1. Identifizierung von spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAB), die gegen n-terminal trunkierte und modifizierte Formen von Aβ gerichtet sind:

[0076] Fig. 1 zeigt die Charakterisierung des vom Versuch Alz-5 stammenden monoklonalen Antikörpers MV-001 (interner Name 824; IgG1) und zeigt die Spezifität für Aβ voller Länge und in Position E3 trunkiertes Aβ.

[0077] Fig. 2 zeigt die Charakterisierung des vom Versuch Alz-16 stammenden monoklonalen Antikörpers MV-003 (interner Name D129; IgG1) und zeigt die Spezifität für trunkiertes und in Position p(E)3 posttranslatorisch modifiziertes Aβ.

[0078] Fig. 3 zeigt die Charakterisierung des vom Versuch Alz-15 stammenden monoklonalen Antikörpers MV-004 (interner Name B204; IgG1) und zeigt die Spezifität für in Position E11 trunkiertes Aβ.

[0079] 2.2. Screening mit spezifischen mABs, die gegen n-terminal trunkierte und modifizierte Formen von Aβ gerichtet sind:

[0080] 2.2.1. Phagen-Display-Bibliothek Ph.D. 7**[0081]** 2.2.1.1. Screening mit gegen p4373 gerichtetem monoklonalem Antikörper

[0082] Durch Screenen von PhD-7-Phagenbibliotheken wurden 8 Sequenzen in diesem Screen identifiziert: Tabelle 1A fasst die identifizierten Peptide und ihre Bindungskapazität im Vergleich zum Originalepitop zusammen.

[0083] 2.2.1.2. Screening mit gegen p4372 gerichtetem monoklonalem Antikörper

[0084] Durch Screenen von PhD-7-Phagenbibliotheken wurden 9 Sequenzen in diesem Screen identifiziert: Tabelle 1B fasst die identifizierten Peptide und ihre Bindungskapazität im Vergleich zum Originalepitop zusammen.

[0085] 2.2.1.3. Screening mit gegen p4371 gerichtetem monoklonalem Antikörper

[0086] Durch Screenen von PhD-7- und PhD12-Phagenbibliotheken wurden 71 Sequenzen in diesem Screen identifiziert: Tabelle 1C fasst die identifizierten Peptide und ihre Bindungskapazität im Vergleich zum Originalepitop zusammen.

[0087] Tabelle 1A: Mimotope, die an den parentalen Antikörper MV-003 binden

Interne Peptid-nummer	SEQ ID No.	Sequenz	Bindungs-kapazität
p4395	1	IRWDTPC	2
p4396	2	VRWDVYPC	1
p4397	3	IRYDAPLC	1
p4399	4	IRYDMAGC	1
p4728	5	IRWDTSLC	3
p4756	6	IRWDQPC	3
p4792	7	IRWDGC	1
p4793	8	IRWDGGC	2

[0088] Legende zu Tabelle 1A: die Bindungskapazität ist durch den folgenden Bindungscode codiert: 1:X beschreibt den Verdünnungsfaktor des parentalen AB.

Bindungscode		OD halbmax 1:X
0	keine Bindung	:0
1	schwache Bindung	:<16000
2	mittlere Bindung	:16-60000
3	starke Bindung	:>60000

[0089] Tabelle 1B: Mimotope, die an den parentalen Antikörper MV-004 binden

Interne Peptid-nummer	SEQ ID No.	Sequenz	Bindungs-kapazität
p4417	9	EVWHRHQC	2
p4418	10	ERWHEKHC	3
p4419	11	EVWHLRLQC	3
p4420	12	ELWHRYPC	2
p4665	13	ELWHRAFC	2
p4786	14	ELWHRAC	1
p4788	15	EVWHRGC	1
p4789	16	EVWHRHC	1
p4790	17	ERWHEKC	1

[0090] Legende zu Tabelle 1B: die Bindungskapazität ist durch den folgenden Bindungscode codiert: 1:X beschreibt den Verdünnungsfaktor des parentalen AB.

Bindungscode		OD halbmax 1:X
0	Keine Bindung	:0
1	Schwache Bindung	:<24000
2	mittlere Bindung	:24-96000
3	starke Bindung	:>96000

[0091] Tabelle 1C: Mimotope, die an den parentalen Antikörper MV-001 binden

Interne Peptid-nummer	SEQ ID No.	Sequenz	Bindungskapazität
p4380	18	QDFRHYC	2
p4381	19	SEFKHGC	3
p4382	20	TSFRHGC	2
p4383	21	TSVFRHC	3
p4384	22	TPFRHTC	2
p4385	23	SQFRHYC	2
p4386	24	LMFRHNC	3
p4387	25	SAFRHHC	2
p4388	26	LPFRHGC	2
p4389	27	SHFRHGC	2
p4390	28	ILFRHGC	3
p4391	29	QFKHDL	2
p4392	30	NWFPHP	1
p4393	31	EEFKYSC	2
p4701	32	NELRHSTC	3
p4702	33	GEMRHQPC	3
p4703	34	DTYFPRSC	2
p4704	35	VELRHSRC	2
p4705	36	YSMRHDAC	2
p4706	37	AANYFPRC	2
p4707	38	SPNQFRHC	3
p4708	39	SSSFPRC	2
p4709	40	EDWFFWHC	1
p4710	41	SAGSFRHC	3
p4711	42	QVMRHHAC	2
p4712	43	SEFSHSSC	3
p4713	44	QPNLFYHC	1
p4714	45	ELFKHHLC	3
p4715	46	TLHEFRHC	3
p4716	47	ATFRHSPC	2
p4717	48	APMYFPHC	2
p4718	49	TYFSHSLC	2
p4719	50	HEPLFSHC	1
p4721	51	SLMRHSSC	2
p4722	52	EFLRHTLC	3
p4723	53	ATPLFRHC	3
p4724	54	QELKRYYC	1
p4725	55	THTDFRHC	3
p4726	56	LHIPFRHC	3
p4727	57	NELFKHFC	2
p4729	58	SQYFPRPC	2
p4730	59	DEHPFRHC	3
p4731	60	MLPFRHGC	2
p4732	61	SAMRHSLC	2
p4733	62	TPLMFWHC	1
p4734	63	LQFKHSTC	2
p4735	64	ATFRHSTC	2
p4736	65	TGLMFKHC	2
p4737	66	AEFSHWHC	2
p4738	67	QSEFKHWC	3

p4739	68	AEFMHSVC	2
p4740	69	ADHDFRHC	3
p4741	70	DGLLFKHC	3
p4742	71	IGFRHDSC	2
p4743	72	SNSEFRRRC	3
p4744	73	SELRHSTC	3
p4745	74	THMEFRRRC	3
p4746	75	EELRHSVC	3
p4747	76	QLFKHSPC	3
p4748	77	YEFRHAQC	3
p4749	78	SNFRHSVC	3
p4750	79	APIQFRHC	3
p4751	80	AYFPHTSC	2
p4752	81	NSSELRHC	3
p4753	82	TEFRHKAC	3
p4754	83	TSTEMWHC	1
p4755	84	SQSYFKHC	3
p4800	85	CSEFKH	3
p4801	86	SEFKHC	3
p4802	87	CHEFRH	3
p4803	88	HEFRHC	3

[0092] Legende zu Tabelle 1C: die Bindungskapazität ist durch den folgenden Bindungscode codiert: 1:X beschreibt den Verdünnungsfaktor des parentalen AB.

Bindungscode		OD halbmax 1:X
0	keine Bindung	:0
1	schwache Bindung	:<4000
2	mittlere Bindung	:4000-20000
3	starke Bindung	:>20000

[0093] 2.3. In-vitro-Charakterisierung von Mimotopen, die beim Screenen von Phagen-Display-Bibliotheken mit gegen n-terminal trunkierte und modifizierte Formen von A β gerichteten monoklonalen Antikörpern identifiziert wurden:

[0094] Die Fig. 4 und 5 zeigen repräsentative Beispiele für Bindungs- und Inhibitionsassays, die zur Charakterisierung von Mimotopen in vitro verwendet wurden. Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 1 bzw. 2 zusammengefasst.

[0095] MV-003-Mimotope: Von den dargestellten 8 Sequenzen hemmen 6 Sequenzen die Bindung des p(E)3-7A β -spezifischen monoklonalen Antikörpers bei in-vitro-Konkurrenzversuchen: weitere 2 Sequenzen wurden identifiziert, die die Bindung des monoklonalen Antikörpers bei in-vitro-Konkurrenzversuchen zwar nicht inhibieren, aber ihre Bindungskapazität an den parentalen Antikörper beibehalten (Tabelle 2A).

[0096] MV-004-Mimotope: Alle 9 dargestellten Sequenzen inhibieren die Bindung des den freien N-Terminus von in Position E11 trunkiertem A β spezifisch bindenden monoklonalen Antikörpers bei in-vitro-Konkurrenzversuchen: (Tabelle 2B).

[0097] MV-001-Mimotope: Von den 71 dargestellten Sequenzen hemmen 27 Sequenzen die Bindung des spezifisch gegen in Position E3 trunkiertes A β gerichteten monoklonalen Antikörpers bei in-vitro-Konkurrenzversuchen: weitere 44 Sequenzen wurden identifiziert, die die Bindung des monoklonalen Antikörpers bei in-vitro-Konkurrenzversuchen zwar nicht inhibieren,

aber ihre Bindungskapazität an den parentalen Antikörper beibehalten (Tabelle 2C).

[0098] Tabelle 2: In der vorliegenden Erfindung identifizierte Mimotope, die in Inhibitionsassays positive Ergebnisse bringen

[0099] Tabelle 2A: MV-003-Mimotope

Interne Peptidnummer	SEQ ID No.	Sequenzen	Inhibitionskapazität
p4395	1	IRWDTPC	1
p4397	3	IRYDAPLC	1
p4728	5	IRWDTS LC	2
p4756	6	IRWDQPC	1
p4792	7	IRWDGC	1
p4793	8	IRWDGGC	1

[00100] Legende zu Tabelle 2A: Die Inhibitionskapazität ist durch den folgenden Code codiert: Schwache Inhibition bedeutet, dass mehr Peptid als beim Originalepitop zur Verringerung der AB-Bindung erforderlich ist; starke Inhibition bedeutet, dass ähnliche Peptidmengen beim Mimotop und beim Originalepitop zur Verringerung der AB-Bindung erforderlich sind. Die Mimotope werden mit dem Originalpeptid als Standard verglichen. Die OD bei 10 µg Peptid wie im Assay verwendet wird zur Berechnung der Konkurrenzkapazität im Vergleich zum Originalpeptid verwendet.

Konkurrenzcode	
0	keine Inhibition (OD von 10 µg Peptid über 12-mal des Originalpeptids)
1	schwächer als Originalepitop (OD von 10 µg Peptid unter 12-mal des Originalpeptids)
2	starke Inhibition (wie beim Originalepitop; OD von 10 µg Peptid unter 5-mal des Originalpeptids)

[00101] Tabelle 2B: MV-004-Mimotope

Interne Peptidnummer	SEQ ID No.	Sequenz	Inhibitionskapazität
p4417	9	EVWHRHQC	1
p4418	10	ERWHEKHC	2
p4419	11	EVWHRLQC	2
p4420	12	ELWHRYPC	1
p4665	13	ELWHRAFC	2
p4786	14	ELWHRAC	1
p4788	15	EVWHRGC	1
p4789	16	EVWHEKC	1
p4790	17	ERWHEKC	2

[00102] Legende zu Tabelle 2B: Schwache Inhibition bedeutet, dass mehr Peptid als beim Originalepitop zur Verringerung der AB-Bindung erforderlich ist; starke Inhibition bedeutet, dass ähnliche Peptidmengen beim Mimotop und beim Originalepitop zur Verringerung der AB-Bindung erforderlich sind. Die Mimotope werden mit dem Originalpeptid als Standard verglichen. Die OD bei 10 µg wie im Assay verwendet wird zur Berechnung der Konkurrenzkapazität im Vergleich zum Originalpeptid verwendet.

Konkurrenzcode	
----------------	--

0	keine Inhibition (OD von 10 µg Peptid über 5-mal des Originalpeptids)
1	schwächer als Originalepitop (OD von 10 µg Peptid unter 5-mal des Originalpeptids)
2	starke Inhibition (wie beim Originalepitop; OD von 10 µg Peptid unter 2-mal des Originalpeptids)

[00103] Tabelle 2C: MV-001-Mimotope

Interne Peptid-nummer	SEQ ID No.	Sequenz	Inhibitions-kapazität
p4380	18	QDFRHYC	1
p4381	19	SEFKHGC	1
p4382	20	TSFRHGC	1
p4383	21	TSVFRHC	1
p4384	22	TPFRHTC	1
p4385	23	SQFRHYC	1
p4386	24	LMFRHNC	1
p4387	25	SAFRHHC	1
p4388	26	LPFRHGC	1
p4389	27	SHFRHGC	1
p4390	28	ILFRHGC	1
p4391	29	QFKHDL	1
p4392	30	NWFPHPC	1
p4393	31	EEFKYSC	1
p4707	38	SPNQFRHC	1
p4715	46	TLHEFRHC	2
p4725	55	THTDFRHC	1
p4730	59	DEHPFRHC	1
p4738	67	QSEFKHWC	1
p4740	69	ADHDFRHC	1
p4741	70	DGLLFKHC	1
p4746	75	EELRH SVC	1
p4753	82	TEFRHKAC	2
p4800	85	CSEFKH	2
p4801	86	SEFKHC	1
p4802	87	CHEFRH	2
p4803	88	HEFRHC	2

[00104] Legende zu Tabelle 2C: Schwache Inhibition bedeutet, dass mehr Peptid als beim Originalepitop zur Verringerung der AB-Bindung erforderlich ist; starke Inhibition bedeutet, dass ähnliche Peptidmengen beim Mimotop und beim Originalepitop zur Verringerung der AB-Bindung erforderlich sind. Die Mimotope werden mit dem Originalpeptid als Standard verglichen. Die OD bei 10 µg Peptid wie im Assay verwendet wird zur Berechnung der Konkurrenzkapazität im Vergleich zum Originalpeptid verwendet.

Konkurrenzcode	
0	keine Inhibition (OD von 10 µg Peptid über 3-mal des Originalpeptids)
1	schwächer als Originalepitop (OD von 10 µg Peptid unter 3-mal des Originalpeptids)
2	starke Inhibition (wie beim Originalepitop; OD von 10 µg Peptid unter 2-mal des Originalpeptids)

[00105] Tabelle 3: Nicht-mimotope Peptide

Interne Peptid-nummer	SEQ. ID No.	Sequenz
p1253	89	DAEFRHDSGYC
p4371	90	EFRHDS-C
p4372	91	EVHHQK-C
p4373	92	p(E)FRHDS-C
p4374	93	p(E)VHHQKLVFC
p4376	94	GYEVHHQKC
p4377	95	EVHHQKLVFC
p4378	96	C-EVHHQKLVFF
p1454	97	CGLMVGGVV
Aβ1-40	98	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV
Aβ1-42	99	DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVIA
sAPPalpha	100	alpha-Sekretase-induziertes Spaltprodukt, abgeleitet von humanem APP (gi:112927)

[00106] 2.4. In-vivo-Charakterisierung von Mimotopen, die beim Screenen von Phagen-Display-Bibliotheken mit einem gegen n-terminal trunkierte und modifizierte Formen von Aβ gerichteten monoklonalen Antikörper identifiziert wurden:

[00107] Weibliche C57/b16-Mäuse, 5-6 Mäuse pro Gruppe, wurden subkutan mit 30 µg an KLH gekoppeltem Peptid immunisiert. An Kontrollgruppen wurden jeweils Originalepitop-KLH-Konjugate verabreicht. Als Adjuvans wurde Alum verwendet (immer 1 mg pro Maus). Die verabreichten Peptide konnten alle spezifisch an monoklonale Antikörper binden, auch wenn manche Peptide die Bindung des Originalepitops an seinen parentalen Antikörper in vitro nicht inhibierten (in einem in-vitro-Inhibitionassay). Der in-vitro-ELISA zum Nachweis des Antikörpertiters wurde mit Seren von einzelnen Mäusen nach jeder Vakzinierung in einem zweiwöchigen Intervall durchgeführt (siehe Fig. 6 bzw. 7). Die Vertiefungen der ELISA-Platte wurden mit Mimotop-BSA-Konjugat und einem irrelevanten Peptid-BSA-Konjugat (negative Kontrolle) beschichtet. Die positive Kontrolle erfolgte durch Umsetzung des parentalen Antikörpers mit dem entsprechenden Mimotop-BSA-Konjugat. Der Nachweis erfolgte mittels anti-Maus-IgG. Darüber hinaus wurden rekombinante Proteine auf ELISA-Platten immobilisiert, und die Seren reagierten dementsprechend. Die Fig. 6, 7 und 8 zeigen repräsentative Beispiele für Assays, die zur Charakterisierung von Mimotopen in vivo verwendet wurden.

[00108] Fig. 6 zeigt Beispiele für in-vivo-Charakterisierungen der durch Mimotop-Vakzinierung hervorgerufenen Immunantwort durch Untersuchung der Immunantwort gegen injiziertes Peptid und ein irrelevantes Peptid, das eine nicht verwandte Sequenz enthält. Bei allen drei gezeigten Beispielen rufen die Originalepitope und die Mimotope Immunantworten gegen die injizierten Peptide hervor, versagen aber bei der Induktion einer relevanten Immunantwort gegen eine nicht verwandte Sequenz (p1454).

[00109] Als Beispiele für MV-003-Mimotope sind das Originalepitop p4373 und die Mimotope p4395, p4396, p4397 und p4399 in Fig. 6A gezeigt. Alle Vakzinen bewirken ähnliche Immunantworten gegen die jeweiligen Mimotope. Weder die mit der Original-Epitop-p4373-Vakzine behandelten noch die mit den Mimotop-p4395-, -p4396-, -p4397- oder -p4399-Vakzinen behandelten Tiere zeigen relevante Titer gegen das irrelevante Peptid p1454 (11x - 25x weniger als die injizierten Peptide).

[00110] Als Beispiele für MV-004-Mimotope sind das Originalepitop p4372 und die Mimotope p4417, p4418, p4419 und p4420 in Fig. 6B dargestellt. Alle Vakzinen zeigen ähnliche Immunantworten gegen die jeweiligen Mimotope. Weder die mit der Original-Epitop-p4372-Vakzine behandelten noch die mit den Mimotop-p4417-, -p4418-, -p4419- und -p4420-Vakzinen behan-

delten Tiere zeigen relevante Titer gegen das irrelevante Peptid p1454 (20x - 80x weniger als die injizierten Peptide).

[00111] Als Beispiele für MV-001-Mimotope sind das Originelepitop p4371 und die Mimotope p4381, p4382 und p4390 in Fig. 6C dargestellt. Alle Vakzinen zeigen ähnliche Immunantworten gegen die jeweiligen Mimotope. Weder die mit der Original-Epitop-p4371-Vakzine behandelten noch die mit den Mimotop-p4381-, -p4382- und -p4390-Vakzinen behandelten Tiere zeigen relevante Titer gegen das irrelevante Peptid p1454 (>10x weniger als die injizierten Peptide).

[00112] Fig. 7 zeigt Beispiele für in-vivo-Charakterisierungen der durch Mimotop-Vakzinierung hervorgerufenen Immunantwort gegen das entsprechende Originelepitop des parentalen Antikörpers sowie gegen von anderen Formen von trunkierten Spezies von A β abgeleitete Peptide.

[00113] Als Beispiele für MV-003-Mimotope sind das Originelepitop p4373 und die Mimotope p4395, p4396, p4397 und p4399 in Fig. 7A dargestellt. 3/4 der angeführten Mimotop-Vakzinen zeigen nachweisbare Immunantworten gegen das Originelepitop p4373. Ein ähnliches Phänomen lässt sich bei Untersuchung der Kreuzreaktivität gegen die nicht modifizierte Form nachweisen, wie p4371 zeigt. Die Original-Epitop-p4373-Vakzine und 2/4 Mimotop-Vakzinen zeigen relevante Titer gegen p4371. Überraschenderweise induzieren die Mimotope, die von MV-003 ausgewählt wurden, welches spezifisch an p4373 bindet, auch eine Immunreaktion, die mit der nicht modifizierten Form des Originelepitops kreuzreagiert.

[00114] Als Beispiele für MV-004-Mimotope sind das Originelepitop p4372 und die Mimotope p4417, p4418, p4419 und p4420 in Fig. 7B dargestellt. 3/4 Mimotop-Vakzinen zeigen nachweisbare Immunantworten gegen das Originelepitop p4372.

[00115] Als Beispiele für MV-001-Mimotope sind das Originelepitop p4371 und die Mimotope p4381, p4382 und p4390 in Fig. 7C dargestellt. Alle Mimotop-Vakzinen zeigen nachweisbare Immunantworten gegen das Originelepitop p4371. Ein ähnliches Phänomen wie für MV-003-abgeleitete Mimotope kann bei Untersuchung der Kreuzreaktivität gegen die Pyroglutamat-modifizierte Form nachgewiesen werden, wie durch p4373 gezeigt. Die Original-epitop-p4371-Vakzine und alle Mimotop-Vakzinen zeigen relevante Titer gegen p4373. Überraschenderweise induzieren die Mimotope, die von MV-001 ausgewählt wurden, welches spezifisch an p4371 bindet, eine Immunreaktion, die mit der modifizierten Form des Originelepitops besser kreuzreagiert als die durch das Originelepitop oder den parentalen Antikörper induzierte Immunreaktion. Somit könnten diese Mimotope überraschenderweise zur Induktion fähig sein, induzieren aber nicht unbedingt eine breitere Immunantwort als der parentale Antikörper und können für ein breiteres Abzielen auf A β -Formen verwendet werden.

[00116] Fig. 8 zeigt Beispiele für in-vivo-Charakterisierungen der durch Mimotop-Vakzinierung hervorgerufenen Immunantwort gegen A β voller Länge. Überraschenderweise induzieren die unter Verwendung von MV-001 und MV-003 ausgewählten Mimotope eine Kreuzreaktion nicht nur mit den zur Herstellung der Antikörper verwendeten trunkierten oder modifizierten kurzen Epitopen, sondern induzieren auch eine ebenso gute Kreuzreaktivität gegen nicht modifizierte A β -Formen voller Länge wie die Originalsequenz oder sogar noch effizienter als p4371/p4373. Für das Originelepitop MV-002 sowie für die identifizierten Mimotope kann keine derartige Kreuzreaktivität nachgewiesen werden (keine Daten gezeigt), was eine Übertragung der Spezifität des Antikörpers an den freien N-Terminus von nicht modifiziertem A β 11-40/42 aufzeigt. Die in der vorliegenden Erfindung präsentierten Mimotope stellen somit optimierte Vakzinekandidaten zum Abzielen auf ein breites Spektrum natürlich vorkommender Formen von A β -Peptiden dar, wie sie Gehirn von AD-Patienten anzutreffen sind. Zu diesen Formen gehören, aber nicht ausschließlich A β 1-40/42 und N-terminal trunkierte Formen wie A β 3-40/42, A β (pE)3-40/42 bzw. nicht modifiziertes A β 11-40/42.

SEQUENZLISTE

<110> Affiris Forschungs- und Entwicklungs GmbH

<120> Vakzin zur Behandlung von Alzheimer-Krankheit

<130> R 55175

<150> AT A 951/2008

<151> 2008-06-12

<160> 104

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Mimotop

<400> 1

Ile Arg Trp Asp Thr Pro Cys
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Mimotop

<400> 2

Val Arg Trp Asp Val Tyr Pro Cys
1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Mimotop

<400> 3

Ile Arg Tyr Asp Ala Pro Leu Cys
1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Mimotop

<400> 4

Ile Arg Tyr Asp Met Ala Gly Cys
1 5

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 5

Ile Arg Trp Asp Thr Ser Leu Cys
1 5

<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 6

Ile Arg Trp Asp Gln Pro Cys
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 7

Ile Arg Trp Asp Gly Cys
1 5

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 8

Ile Arg Trp Asp Gly Gly Cys
1 5

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 9

Glu Val Trp His Arg His Gln Cys
1 5

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 10

Glu Arg Trp His Glu Lys His Cys
1 5

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 11

Glu Val Trp His Arg Leu Gln Cys
1 5

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 12

Glu Leu Trp His Arg Tyr Pro Cys
1 5

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 13

Glu Leu Trp His Arg Ala Phe Cys
1 5

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 14

Glu Leu Trp His Arg Ala Cys
1 5

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 15

Glu val Trp His Arg Gly Cys
 1 5

<210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 16

Glu val Trp His Arg His Cys
 1 5

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 17

Glu Arg Trp His Glu Lys Cys
 1 5

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 18

Gln Asp Phe Arg His Tyr Cys
 1 5

<210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 19

Ser Glu Phe Lys His Gly Cys
 1 5

<210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 20

Thr Ser Phe Arg His Gly Cys
 1 5

<210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 21

Thr Ser Val Phe Arg His Cys
 1 5

<210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 22

Thr Pro Phe Arg His Thr Cys
 1 5

<210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 23

Ser Gln Phe Arg His Tyr Cys
 1 5

<210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 24

Leu Met Phe Arg His Asn Cys
 1 5

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 25

Ser Ala Phe Arg His His Cys
1 5

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 26

Leu Pro Phe Arg His Gly Cys
1 5

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 27

Ser His Phe Arg His Gly Cys
1 5

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 28

Ile Leu Phe Arg His Gly Cys
1 5

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 29

Gln Phe Lys His Asp Leu Cys
1 5

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 30

Asn Trp Phe Pro His Pro Cys
1 5

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 31

Glu Glu Phe Lys Tyr Ser Cys
1 5

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 32

Asn Glu Leu Arg His Ser Thr Cys
1 5

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 33

Gly Glu Met Arg His Gln Pro Cys
1 5

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 34

Asp Thr Tyr Phe Pro Arg Ser Cys
1 5

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 35

Val Glu Leu Arg His Ser Arg Cys
1 5

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 36

Tyr Ser Met Arg His Asp Ala Cys
1 5

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 37

Ala Ala Asn Tyr Phe Pro Arg Cys
1 5

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 38

Ser Pro Asn Gln Phe Arg His Cys
1 5

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 39

Ser Ser Ser Phe Phe Pro Arg Cys
1 5

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 40

Glu Asp Trp Phe Phe Trp His Cys
1 5

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 41

Ser Ala Gly Ser Phe Arg His Cys
1 5

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 42

Gln Val Met Arg His His Ala Cys
1 5

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 43

Ser Glu Phe Ser His Ser Ser Cys
1 5

<210> 44
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 44

Gln Pro Asn Leu Phe Tyr His Cys
1 5

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 45

Glu Leu Phe Lys His His Leu Cys
1 5

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 46

Thr Leu His Glu Phe Arg His Cys
1 5

<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 47

Ala Thr Phe Arg His Ser Pro Cys
1 5

<210> 48
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 48

Ala Pro Met Tyr Phe Pro His Cys
1 5

<210> 49
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 49

Thr Tyr Phe Ser His Ser Leu Cys
1 5

<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 50

His Glu Pro Leu Phe Ser His Cys
1 5

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 51

Ser Leu Met Arg His Ser Ser Cys
1 5

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 52

Glu Phe Leu Arg His Thr Leu Cys
1 5

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 53

Ala Thr Pro Leu Phe Arg His Cys
1 5

<210> 54
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 54

Gln Glu Leu Lys Arg Tyr Tyr Cys
1 5

<210> 55
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 55

Thr His Thr Asp Phe Arg His Cys
1 5

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 56

Leu His Ile Pro Phe Arg His Cys
1 5

<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 57

Asn Glu Leu Phe Lys His Phe Cys
1 5

<210> 58
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 58

Ser Gln Tyr Phe Pro Arg Pro Cys
1 5

<210> 59
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 59

Asp Glu His Pro Phe Arg His Cys
1 5

<210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 60

Met Leu Pro Phe Arg His Gly Cys
1 5

<210> 61
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 61

Ser Ala Met Arg His Ser Leu Cys
1 5

<210> 62
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 62

Thr Pro Leu Met Phe Trp His Cys
1 5

<210> 63
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 63

Leu Gln Phe Lys His Ser Thr Cys
1 5

<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 64

Ala Thr Phe Arg His Ser Thr Cys
1 5

<210> 65
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 65

Thr Gly Leu Met Phe Lys His Cys
 1 5

<210> 66
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 66

Ala Glu Phe Ser His Trp His Cys
 1 5

<210> 67
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 67

Gln Ser Glu Phe Lys His Trp Cys
 1 5

<210> 68
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 68

Ala Glu Phe Met His Ser Val Cys
 1 5

<210> 69
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 69

Ala Asp His Asp Phe Arg His Cys
 1 5

<210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Mimotop
 <400> 70
 Asp Gly Leu Leu Phe Lys His Cys
 1 5

<210> 71
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Mimotop
 <400> 71
 Ile Gly Phe Arg His Asp Ser Cys
 1 5

<210> 72
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Mimotop
 <400> 72
 Ser Asn Ser Glu Phe Arg Arg Cys
 1 5

<210> 73
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Mimotop
 <400> 73
 Ser Glu Leu Arg His Ser Thr Cys
 1 5

<210> 74
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Mimotop
 <400> 74
 Thr His Met Glu Phe Arg Arg Cys
 1 5

<210> 75
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 75

Glu Glu Leu Arg His Ser Val Cys
1 5

<210> 76
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 76

Gln Leu Phe Lys His Ser Pro Cys
1 5

<210> 77
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 77

Tyr Glu Phe Arg His Ala Gln Cys
1 5

<210> 78
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 78

Ser Asn Phe Arg His Ser Val Cys
1 5

<210> 79
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 79

Ala Pro Ile Gln Phe Arg His Cys
1 5

<210> 80
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 80

Ala Tyr Phe Pro His Thr Ser Cys
1 5

<210> 81
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 81

Asn Ser Ser Glu Leu Arg His Cys
1 5

<210> 82
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 82

Thr Glu Phe Arg His Lys Ala Cys
1 5

<210> 83
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 83

Thr Ser Thr Glu Met Trp His Cys
1 5

<210> 84
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 84

Ser Gln Ser Tyr Phe Lys His Cys
1 5

<210> 85
<211> 6
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 85

Cys Ser Glu Phe Lys His
1 5

<210> 86
<211> 6
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 86

Ser Glu Phe Lys His Cys
1 5

<210> 87
<211> 6
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 87

Cys His Glu Phe Arg His
1 5

<210> 88
<211> 6
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 88

His Glu Phe Arg His Cys
1 5

<210> 89
<211> 11
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 89

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

<210> 90
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 90

Glu Phe Arg His Asp Ser Cys
 1 5

<210> 91
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<400> 91

Glu Val His His Gln Lys Cys
 1 5

<210> 92
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

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

<400> 92

Xaa Phe Arg His Asp Ser Cys
 1 5

<210> 93
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

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

<400> 93

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

<210> 94

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

<220>
<223> Mimotop

<400> 94

Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Cys
1 5

<210> 95
<211> 10
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 95

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

<210> 96
<211> 11
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 96

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

<210> 97
<211> 9
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 97

Cys Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
1 5

<210> 98
<211> 40
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 98

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

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

20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly val Val
35 40

<210> 99
<211> 42
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<400> 99

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

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

Gly Leu Met val Gly Gly val val Ile Ala
35 40

<210> 100
<211> 8
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Mimotop

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> X = I oder V

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> X = W oder Y

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> X = T, V, A, M, Q oder G

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> X = P, A, Y, S, C, G oder kein Aminosäure-Rest

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> X = P, L, G, C oder kein Aminosäure-Rest

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> X = C oder kein Aminosäure-Rest

<400> 100

Xaa Arg Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa

<210> 101
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Mimotop

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X= ist V, R oder L

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> X= ist R oder E

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> X= ist A, H, K, L, Y oder G

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> X= ist P, H, F, Q, C oder keine Aminosäure

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (8)..(8)
 <223> X= ist C oder keine Aminosäure

<400> 101

Glu Xaa Trp His Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

<210> 102
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Amyloid-Beta Fragment

<400> 102

Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
 1 5

<210> 103
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Amyloid-Beta Fragment

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> X = pE, Pyroglutamat

<400> 103

Xaa Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr
1 5

<210> 104

<211> 7

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

<220>

<223> Amyloid-Beta Fragment

<400> 104

Glu Val His His Gln Lys Leu
1 5

Patentansprüche

1. Verwendung von mindestens einer Verbindung mit der Aminosäuresequenz

$EX_1WHX_2X_3(X_4)_n(X_5)_m$ (Formel II),

worin

X_1 Valin (V), Arginin (R) oder Leucin (L) ist,

X_2 Arginin (R) oder Glutaminsäure (E) ist,

X_3 Alanin (A), Histidin (H), Lysin (K), Leucin (L), Tyrosin (Y) oder Glycin (G) ist,

X_4 Prolin (P), Histidin (H), Phenylalanin (F), Glutamin (Q) oder Cystein (C) ist,

X_5 Cystein (C) ist,

n und m unabhängig voneinander 0 oder 1 sind,

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

2. Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Verbindung ein Peptid mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus EVWHRHQ(C), ERWHEKH(C), EVWHRLQ(C), ELWHRYP(C), ELWHRAF(C), ELWHRA(C), EVWHRG(C), EVWHRH(C) und ERWHEK(C), vorzugsweise EVWHRHQ(C), ERWHEKH(C), EVWHRLQ(C), ELWHRYP(C) und ELWHRAF(C) umfasst.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Verbindung an einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, vorzugsweise KLH (Keyhole-Limpet-Hemocyanin), gekoppelt ist.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Verbindung für intravenöse, subkutane, intradermale oder intramuskuläre Verabreichung formuliert ist.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Verbindung mit einem Adjuvans, vorzugsweise Aluminiumhydroxid, formuliert ist.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Verbindung im Medikament in einer Menge von 0,1 ng bis 10 mg, vorzugsweise 10 ng bis 1 mg, insbesondere 100 ng bis 100 μ g enthalten ist.

7. Peptid mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus EVWHRHQ(C), ERWHEKH(C), EVWHRLQ(C), ELWHRYP(C), ELWHRAF(C), ELWHRA(C), EVWHRG(C), EVWHRH(C) und ERWHEK(C).
8. Peptid nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Peptid an einen pharmazeutisch akzeptablen Träger, vorzugsweise KLH (Keyhole-Limpet-Hemocyanin), gekoppelt ist.
9. Pharmazeutische Formulierung, vorzugsweise Vakzine, umfassend mindestens ein Peptid nach Anspruch 7 oder 8.

Hierzu 16 Blatt Zeichnungen

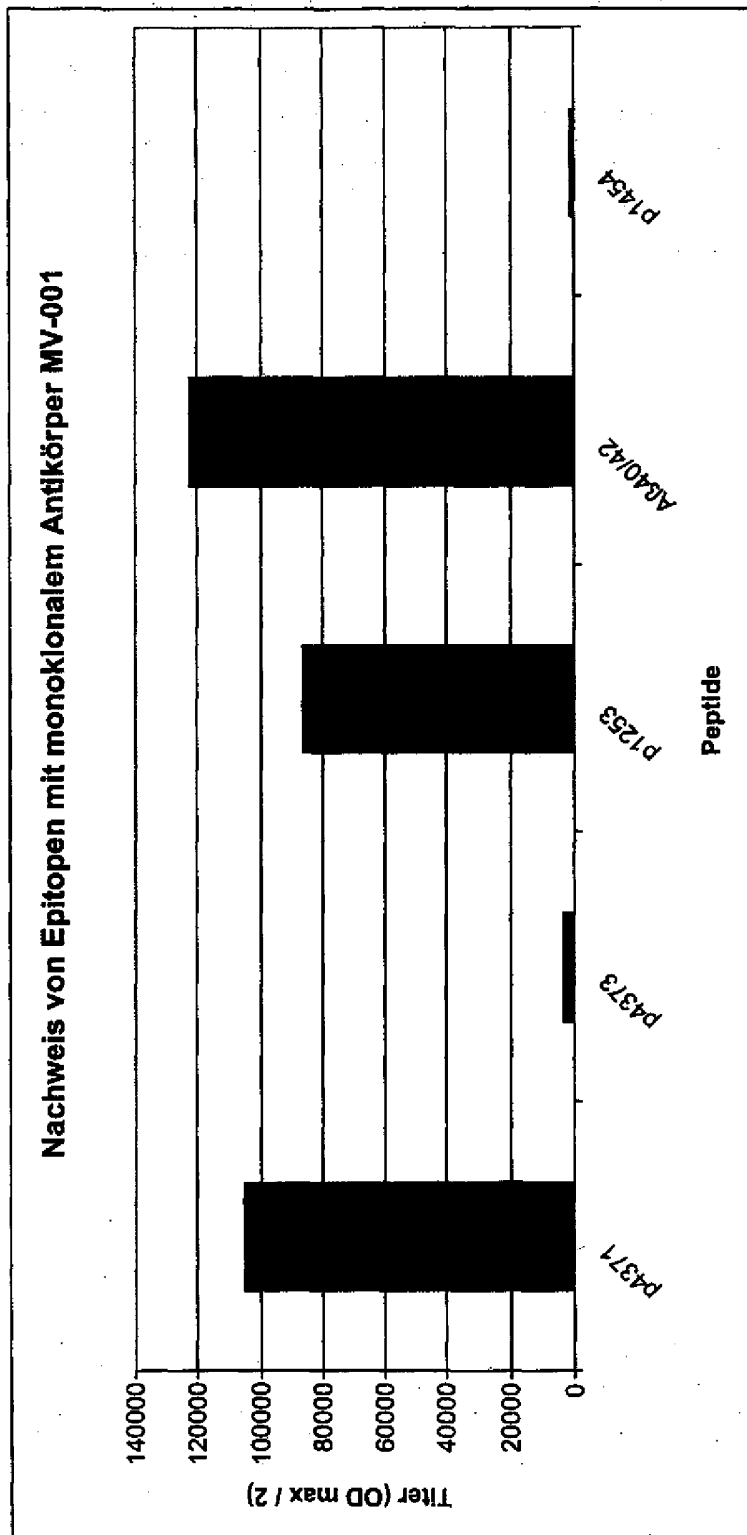


Fig. 1

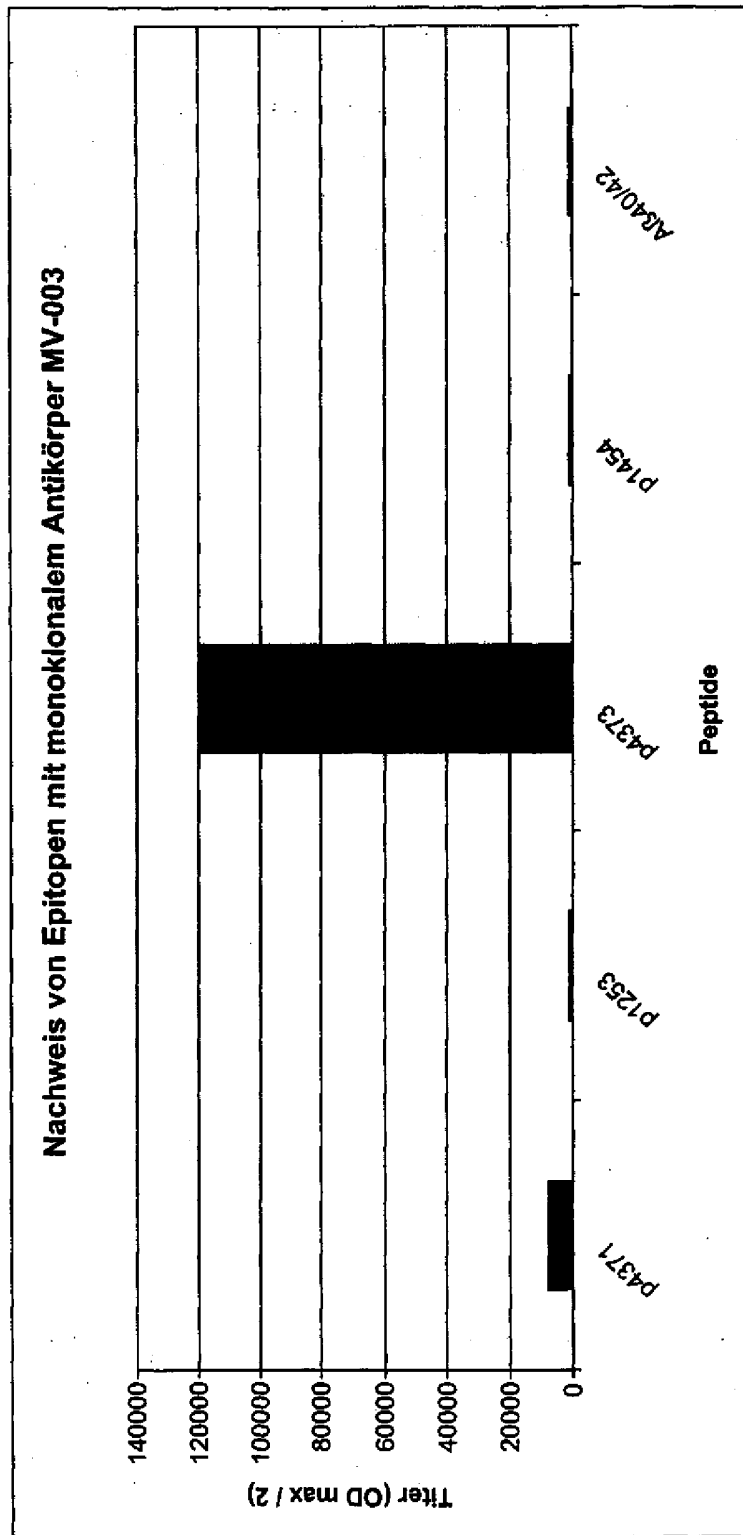


Fig. 2

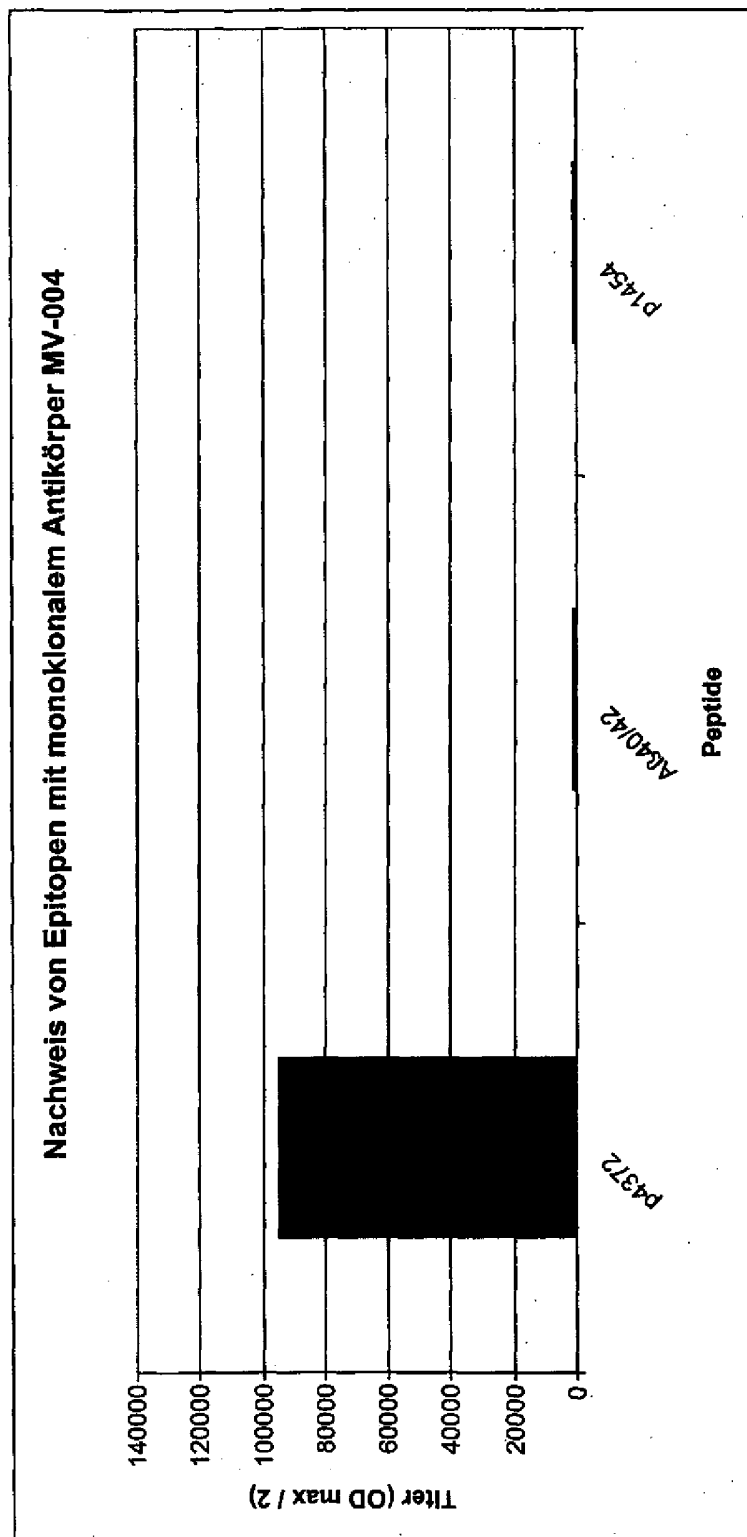


Fig. 3

Nachweis von Mimetopen mittels ELISA unter Verwendung eines für humanes A β (pE 3-40/42)
 spezifischen monoklonalen Antikörpers

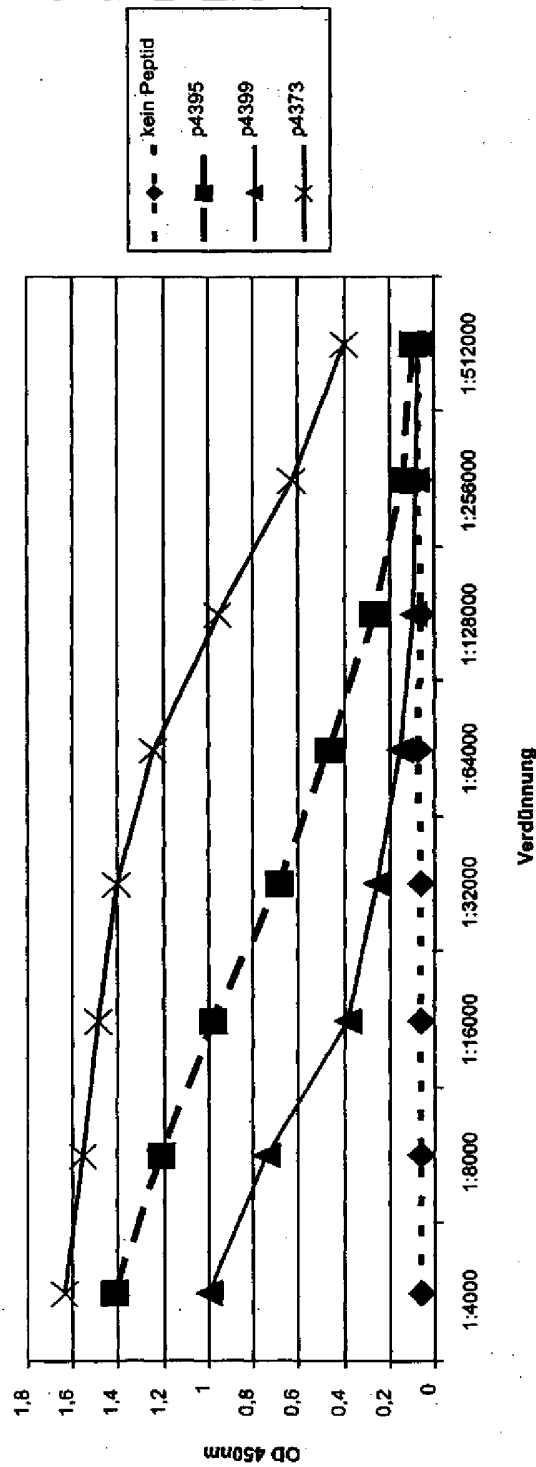


Fig. 4A

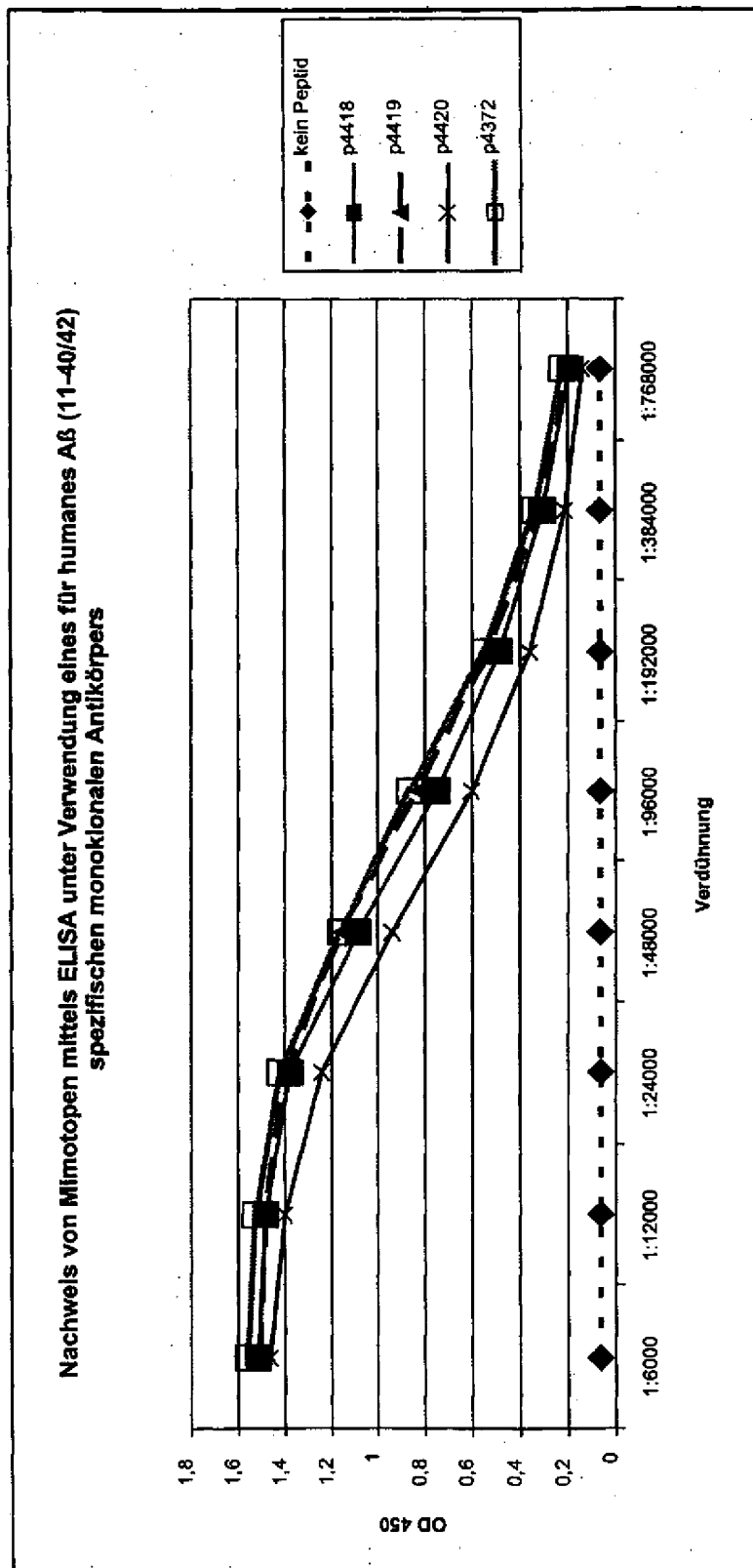


Fig. 4B

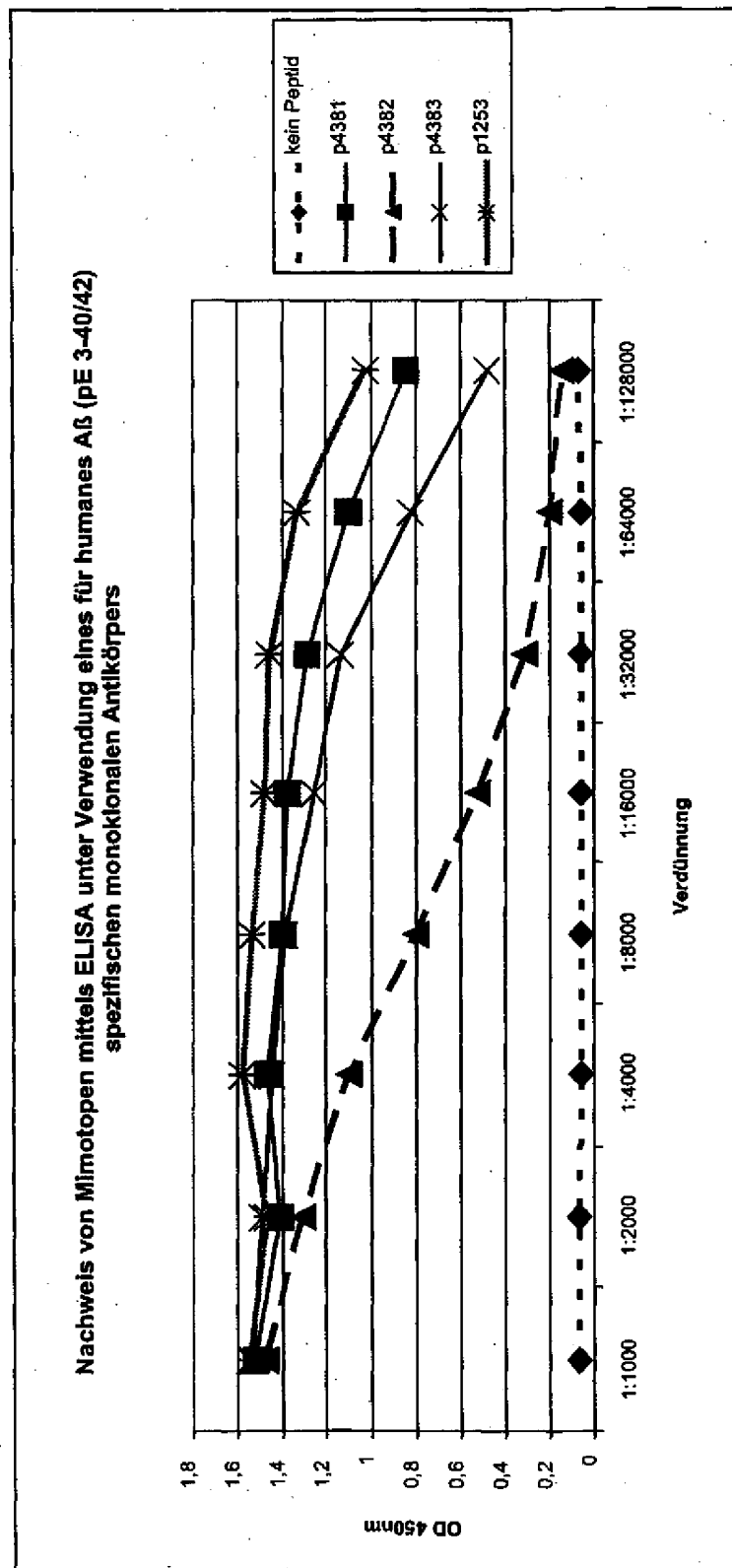


Fig. 4C

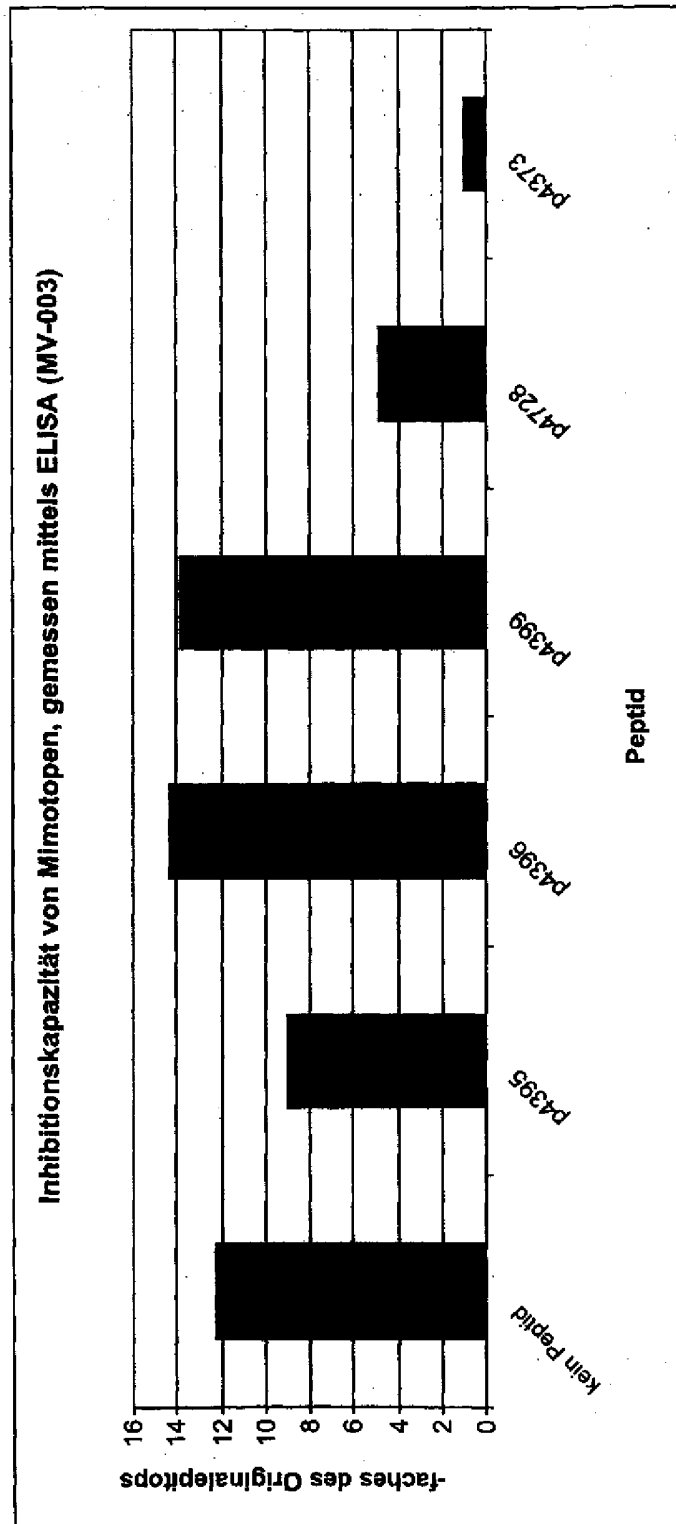


Fig. 5A

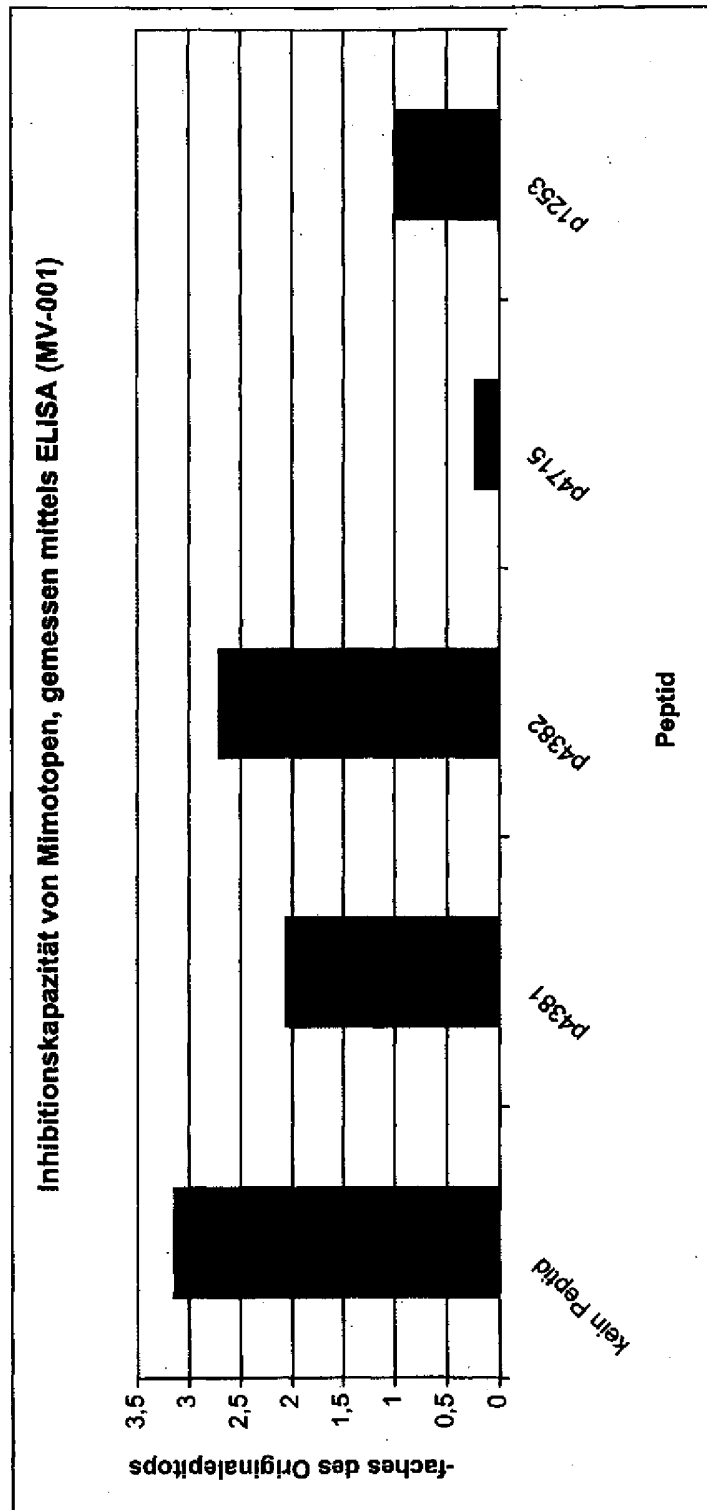


Fig. 5B

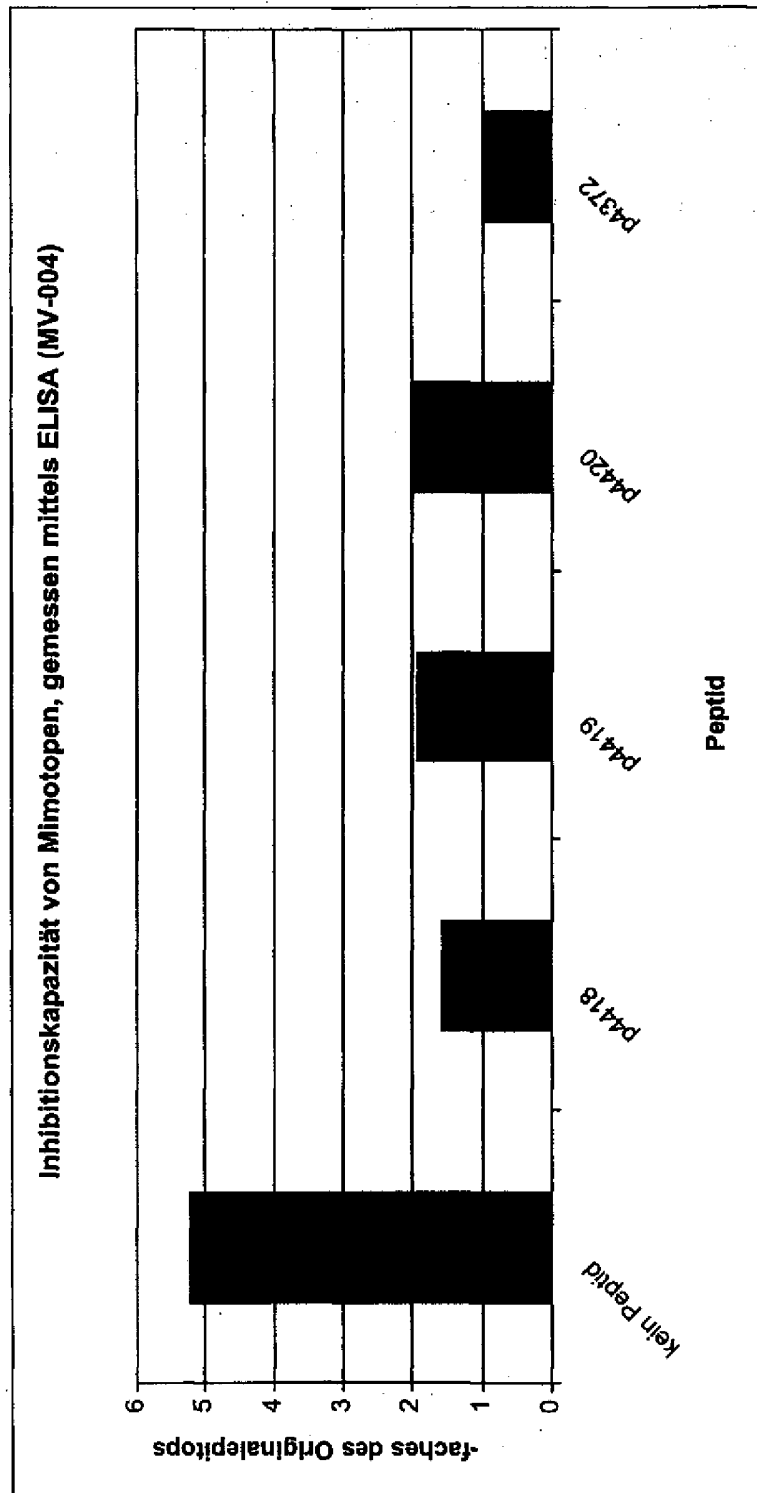


Fig. 5C

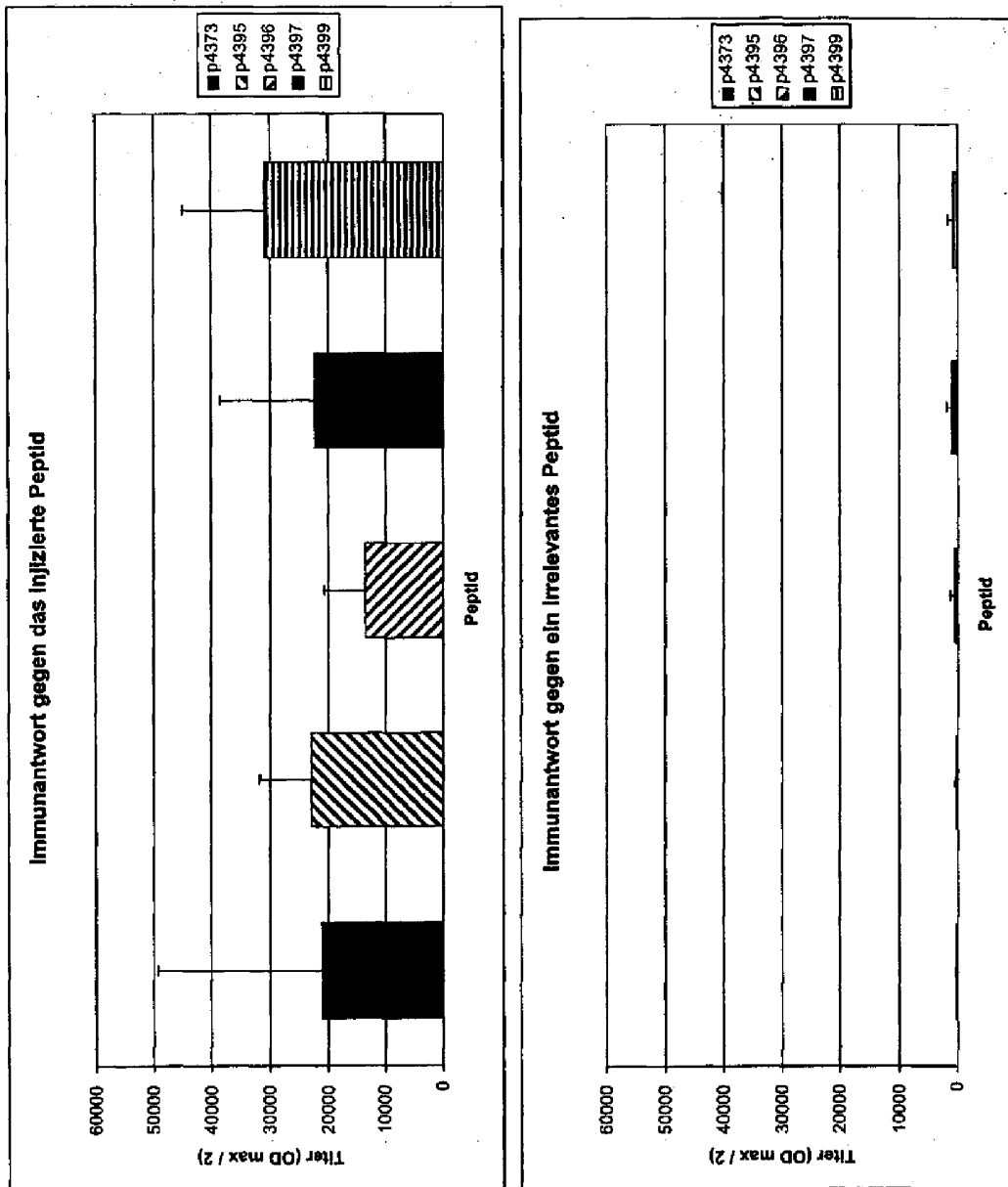


Fig. 6A

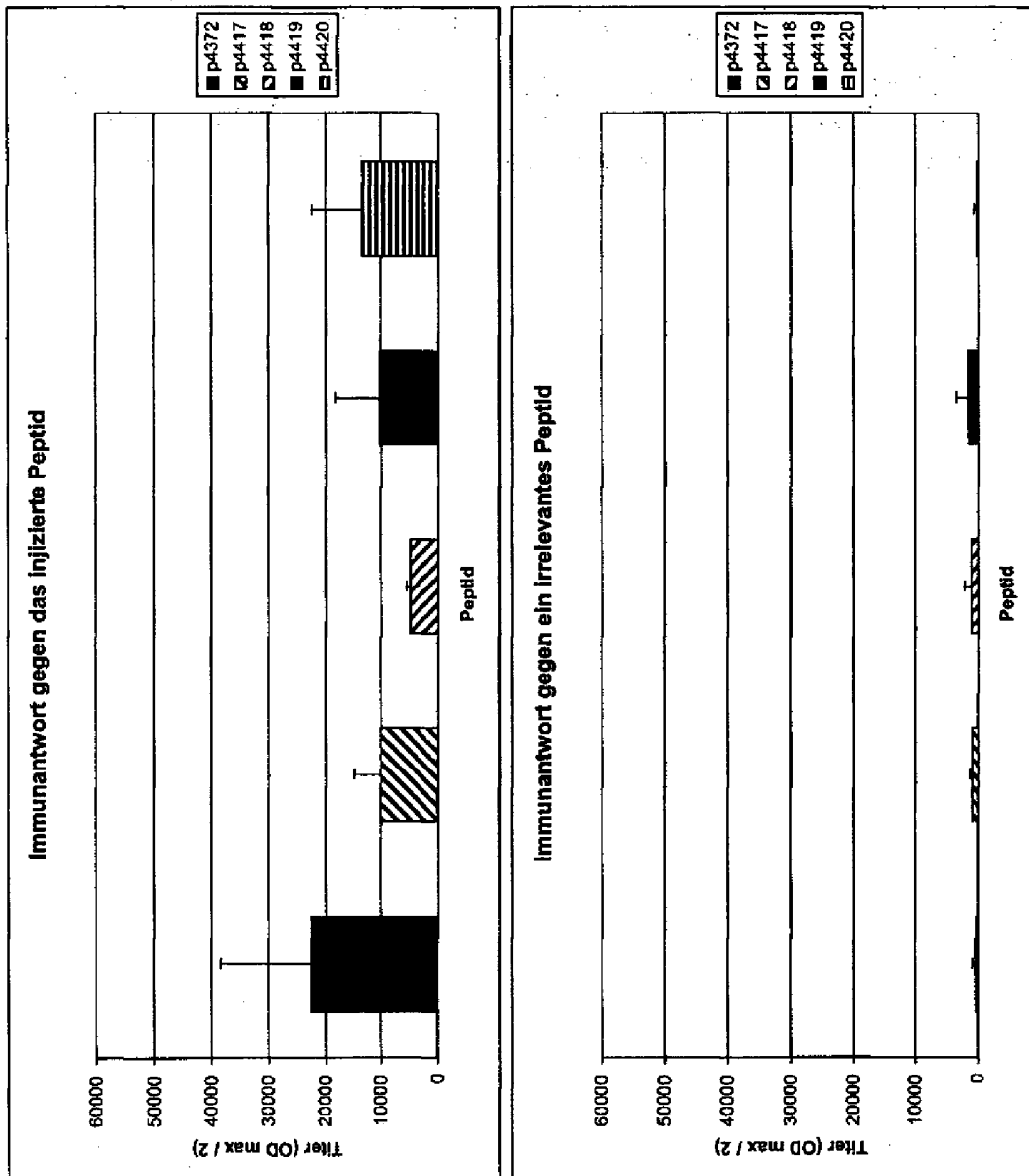


Fig. 6B

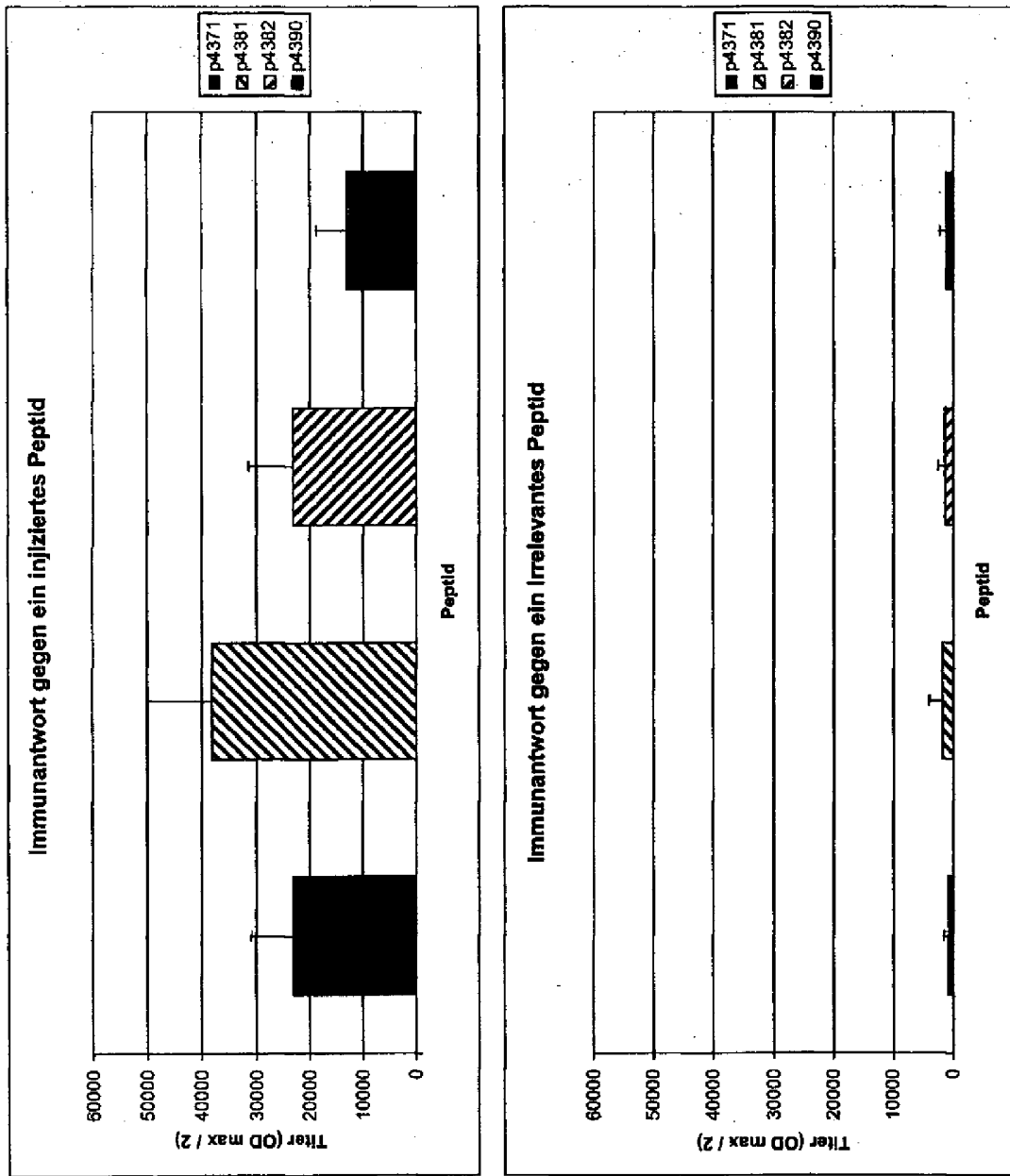


Fig. 6C

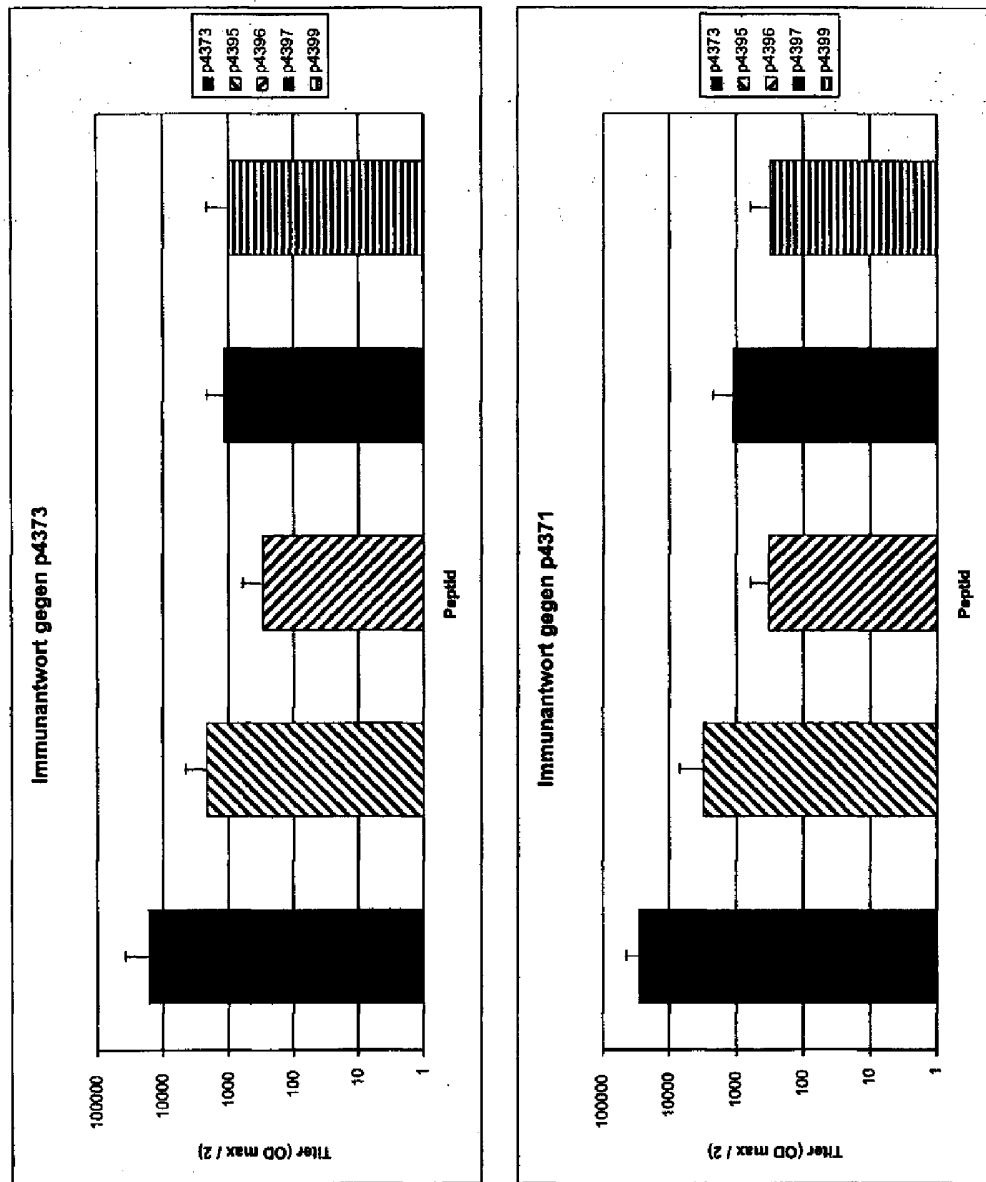


Fig. 7A

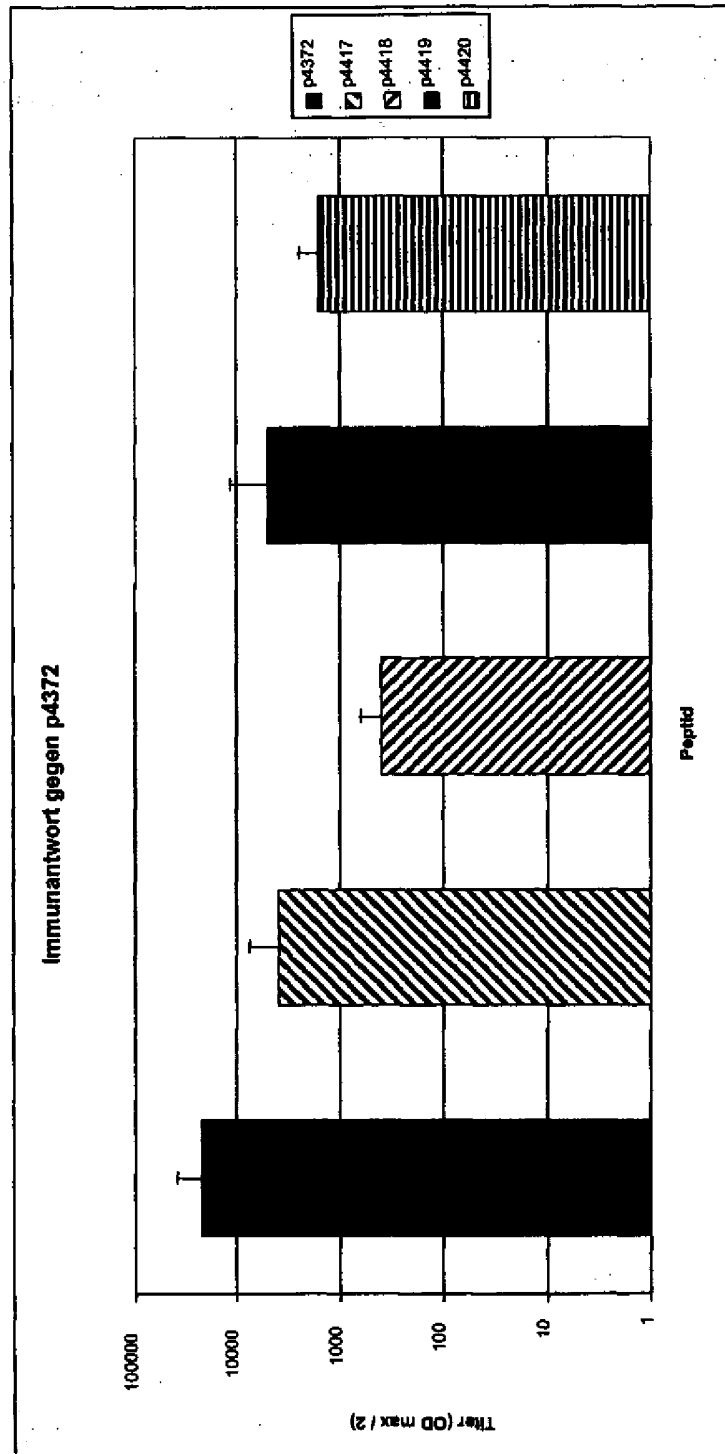


Fig. 7B

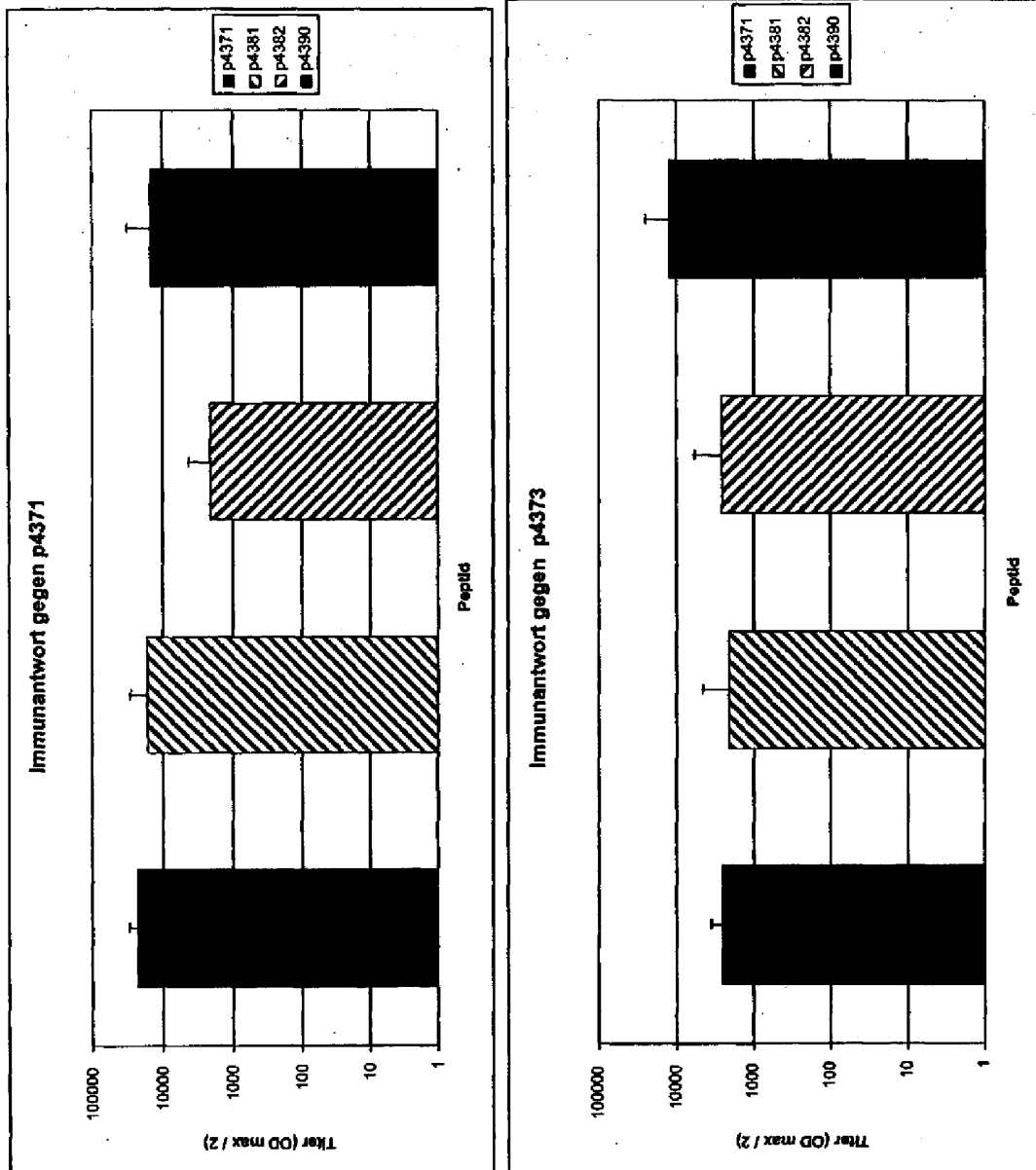


Fig. 7C

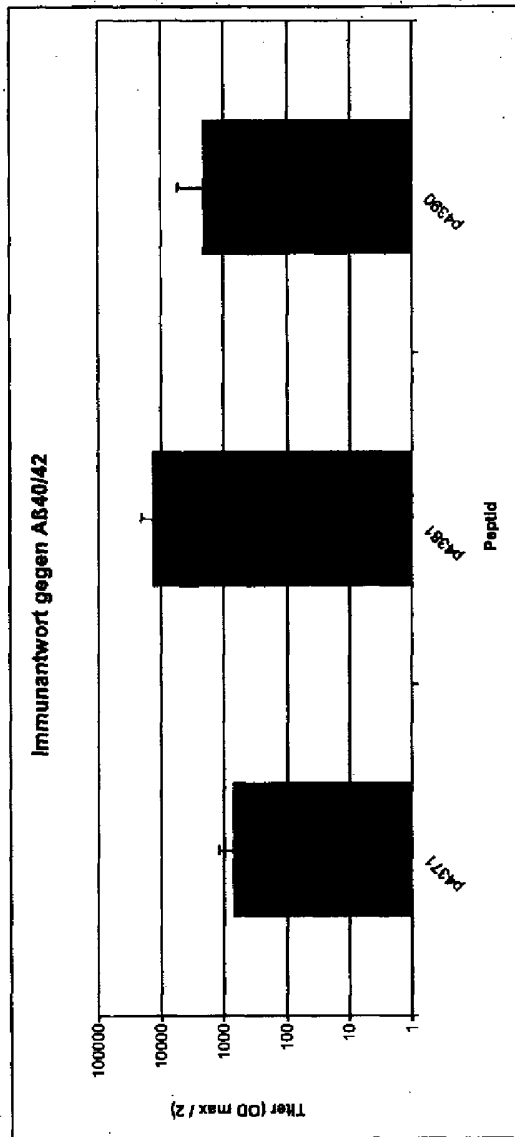


Fig. 8A

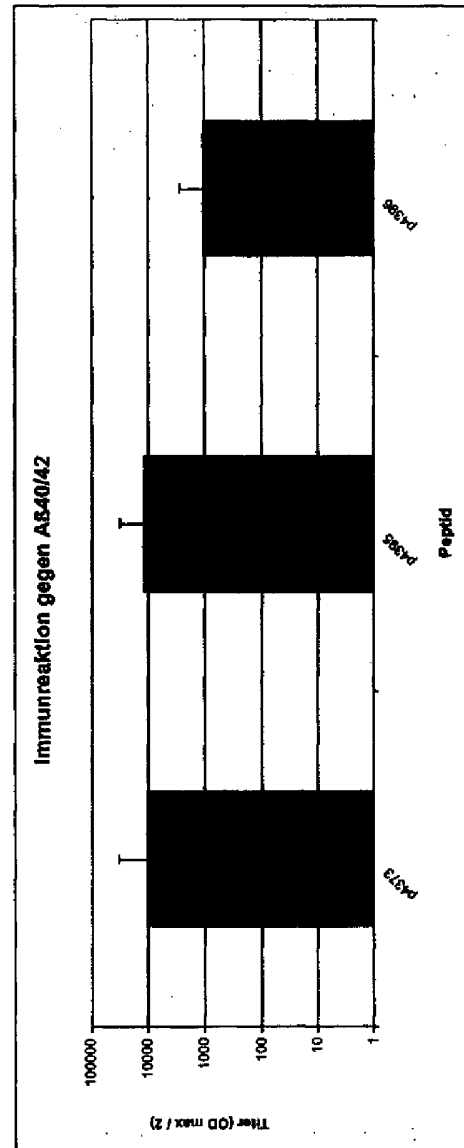


Fig. 8B