



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 38 326 T2 2008.07.03

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 937 103 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 38 326.1

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/CA97/00489

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 929 070.7

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1998/002452

(86) PCT-Anmeldetag: 11.07.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 22.01.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 25.08.1999

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 28.11.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 03.07.2008

(51) Int Cl.⁸: C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

21612 P 12.07.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

McGill University, Montreal, Quebec, CA

(72) Erfinder:

BLASCHUK, Orest W., Westmount, Quebec H3Z
1N2, CA; GOUR, Barbara Joan, RR 4, Kemptville,
Ontario K0G 1J0, CA

(74) Vertreter:

Eisenführ, Speiser & Partner, 28195 Bremen

(54) Bezeichnung: VERBINDUNGEN UND VERFAHREN ZUR REGULIERUNG DER ZELLANLAGERUNG

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

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

Beschreibung**TECHNISCHER BEREICH**

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich allgemein auf Verfahren zur Regulation von Zelladhäsion und insbesondere auf zyklische Peptide, die eine Cadherin-Zelladhäsionserkennungssequenz aufweisen, und auf den Einsatz einer derartigen Sequenz zur Hemmung oder Verbesserung von Cadherin-vermittelter Zelladhäsion.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Zelladhäsion ist ein komplexer Prozess, der für die Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität und die Erzeugung physikalischer und Permeabilitätsbarrieren im Körper wichtig ist. Alle Gewebe sind in diskrete Kompartimente, von denen jedes aus einem zu ähnlichen Zelltypen gehörenden spezifischen Zelltyp besteht, gegliedert. Eine derartige Adhäsion löst die Bildung interzellulärer Verbindungsstellen aus (d. h. ohne weiteres abgrenzbare Kontaktstellen an den Oberflächen benachbarter Zellen, die zusammengehören), auch bekannt als tight junctions, gap junctions und Band-Desmosomen. Die Bildung solcher Verbindungsstellen führt zu physikalischen und Permeabilitätsbarrieren, die die unbehinderte Passage von Zellen und anderen biologischen Substanzen von einem Gewebekompartiment in das nächste einschränken. Beispielsweise bestehen Blutgefäße aller Gewebe aus Endothelzellen. Damit die Bestandteile aus dem Blut in ein gegebenes Gewebekompartiment eintreten können, müssen sie zuerst aus dem Lumen des Blutgefäßes durch die aus den Endothelzellen dieses Gefäßes gebildete Barriere dringen. In ähnlicher Weise müssen Substanzen, um über den Darm in den Körper zu gelangen, zunächst durch die durch die Epithelzellen dieses Gewebes gebildete Barriere dringen. Um durch die Haut in das Blut zu gelangen, müssen sowohl Epithel- als auch Endothellschichten durchdrungen werden.

[0003] Zelladhäsion wird durch spezifische Zelloberflächen-Adhäsionsmoleküle (CAMs) vermittelt. Es gibt viele unterschiedliche CAM-Familien, einschließlich Immunoglobulin-, Integrin-, Selektin- und Cadherin-Superfamilien, wobei jeder Zelltyp eine einmalige Kombination dieser Moleküle exprimiert. Cadherine sind eine sich schnell ausdehnende Familie kalziumabhängiger CAMs (Munro et al., In: *Cell Adhesion and Invasion in Cancer Metastasis*, P. Brodt, ed., S. 17–34, RG Landes Co. (Austin TX, 1996). Die klassischen Cadherine (abgekürzt CADs) sind integrale Membranglykoproteine, die allgemein Zelladhäsion durch homophile Interaktionen fördern (ein CAD auf der Oberfläche einer Zelle bindet sich an ein identisches CAD auf der Oberfläche einer anderen Zelle), obwohl CADs unter bestimmten Bedingungen und mit geringerer Affinität auch dazu in der Lage zu sein scheinen, miteinander heterotypische Komplexe zu bilden. Es wurde gezeigt, dass Cadherine Epithel-, Endothel-, Nerven- und Krebszelladhäsion regulieren, wobei auf unterschiedlichen Zelltypen unterschiedliche CADs exprimiert werden. N(neural)-Cadherin wird vorwiegend durch Nerven-, Endothel- und einer Vielzahl von Krebszelltypen exprimiert. E(epithelial)-Cadherin wird vorwiegend durch Epithelzellen exprimiert. Andere CADs sind das P(plazental)-Cadherin, das in der menschlichen Haut vorkommt, und das R(retinal)-Cadherin. Eine ausführliche Diskussion zu den klassischen Cadherinen liefert Munro SB et al., 1996, In: *Cell Adhesion and Invasion in Cancer Metastasis*, P. Brodt, Ed., S. 17–34 (RG Landes Company, Austin TX).

[0004] Die Strukturen der CADs sind im Allgemeinen ähnlich. Wie in [Fig. 1](#) dargestellt, bestehen CADs aus fünf extrazellulären Domänen (EC1–EC5), einer einfachen hydrophoben Domäne (TM), die die Plasmamembran (PM) quert, und zwei zytoplasmatischen Domänen (CP1 und CP2). Die extrazellulären Domänen sind mit den Kalzium-bindenden Motiven DXNDN (SEQ.-ID-Nr. 41), DXD und LDRE (SEQ.-ID-Nr. 40) durchsetzt. Die erste extrazelluläre Domäne (EC1) beinhaltet die klassische Cadherin-Zelladhäsionserkennungs-(CAR)-Sequenz HAV (His-Ala-Val), zusammen mit flankierenden Sequenzen auf jeder Seite der CAR-Sequenz, welche bei der Spezifitäts-Übertragung eine Rolle spielen können. Von synthetischen Peptiden, die die CAR-Sequenz und gegen die CAR-Sequenz gerichtete Antikörper beinhalten, wurde gezeigt, dass sie CAD-abhängige Prozesse hemmen (Munro et al. supra; Blaschuk et al. *J. Mol. Biol.* 211: 679–82, 1990; Blaschuk et. al., *Develop. Biol.* 139:227–29, 1990; Alexander et al., *J. Cell. Physiol.* 156: 610–18, 1993). Die dreidimensionale Auflösung und die Kristallstrukturen der EC1-Domäne wurden ermittelt (Overduin et al., *Science* 267: 386–389. 1995; Shapiro et al., *Nature* 374: 327–337, 1995).

[0005] Obwohl Zelladhäsion für bestimmte normale physiologische Funktionen erforderlich ist, gibt es Situationen, in denen der Umfang an Zelladhäsion unerwünscht ist. Zum Beispiel ist mit vielen Krankheiterscheinungen (wie Autoimmunkrankheiten, Krebs und Entzündungskrankheiten) eine anormale Zelladhäsion verbunden. Zelladhäsion kann auch bei Transplantatabstoßung eine Rolle spielen. In derartigen Fällen könnte die Regulation von Zelladhäsion wünschenswert sein.

[0006] Weiterhin erzeugen aus Zelladhäsion entstehende Permeabilitätsbarrieren Schwierigkeiten für den Transport von Arzneimitteln durch den Körper hin zu bestimmten Geweben und Tumoren. Hautpflaster sind beispielsweise ein zweckdienliches Mittel für die Verabreichung von Arzneimitteln durch die Haut. Die Verwendung von Hautpflastern ist jedoch aufgrund der epithelialen und endothelialen Zellbarrieren auf kleine, hydrophobe Moleküle beschränkt gewesen. In ähnlicher Weise sind Blutkapillaren durch Endothelzellen ausgekleidet, die für Arzneimittel weitgehend undurchlässig sind, und die Blut-Hirnschranke hat eine gezielte Steuerung der Arzneimittel zum Zentralnervensystem behindert. Zusätzlich entwickeln viele feste Tumore innen liegende Barrieren, die den Transport von Antitumor-Arzneimitteln und Antikörpern zu den inneren Zellen einschränken.

[0007] Versuche, den Durchlass der Arzneimittel durch solche Barrieren hindurch zu erleichtern, basieren im Allgemeinen auf spezifischen Rezeptoren oder Trägerproteinen, die die Moleküle durch Barrieren hindurch in vivo transportieren. Doch solche Verfahren sind oft aufgrund niedriger endogener Transportgeschwindigkeiten oder der mangelhaften Wirkungsweisen eines Trägerproteins mit Arzneimitteln ineffizient. Obwohl durch den Einsatz einer Vielfalt von chemischen Wirkstoffen, die die Zelladhäsion stören, eine verbesserte Wirksamkeit erreicht wurde, werden solche Mittel typischerweise mit unerwünschten Nebenwirkungen in assoziiert; sie können invasive Vorgehensweisen der Verabreichung erforderlich machen und irreversible Wirkungen zur Folge haben. Es wurde vorgeschlagen, dass lineare synthetische Peptide, die eine Cadherin-CAR-Sequenz aufweisen, für den Arzneimitteltransport eingesetzt werden können (WO 91/04745); doch derartige Peptide sind oft metabolisch instabil und werden im Allgemeinen als mangelhafte therapeutische Wirkstoffe bewertet.

[0008] Dementsprechend gibt es im Fach einen Bedarf an Verbindungen, die Zelladhäsion regulieren und den Arzneimitteltransport durch die Permeabilitätsbarrieren hindurch ohne derartige Nachteile verbessern. Die vorliegende Erfindung erfüllt diesen Bedarf und liefert weitere damit in Verbindung stehende Vorteile.

[0009] Blaschuk et al., Developmental Biology, Bnd. 139, Nr. 1, 1990, S 227–229, bezieht sich auf die Identifizierung der Cadherin-Zelladhäsionerkennungssequenz.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0010] Die vorliegende Erfindung liefert zyklische Peptide, wie in den anhängigen Ansprüchen beansprucht, und Peptide für den Einsatz in Verfahren zur Regulation von Cadherin-vermittelter Zelladhäsion. In einem Aspekt liefert die vorliegende Erfindung zyklische Peptide, die die Sequenz His-Ala-Val aufweisen, dadurch gekennzeichnet, dass die zyklischen Peptide die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion regulieren. Das zyklische Peptid hat die folgende Formel:

(Z₁)-(Y₁)-(X₁)- His-Ala-Val-(X₂)-(Y₂)-(Z₂)



wobei X₁ und X₂ optional sind und, falls vorhanden, voneinander unabhängig aus der Gruppe bestehend aus Aminosäureresten und Kombinationen daraus, in denen die Reste durch Peptidbindungen verbunden sind, ausgewählt werden, und wobei X₁ und X₂ voneinander unabhängig in der Größenordnung zwischen 0 und 10 Resten vorliegen, derartig, dass die Summe der in X₁ und X₂ enthaltenen Reste zwischen 1 und 12 beträgt; wobei Y₁ und Y₂ voneinander unabhängig aus der Gruppe bestehend aus Aminosäureresten ausgewählt werden und wobei eine kovalente Bindung zwischen den Resten Y₁ und Y₂ gebildet wird; und wobei Z₁ und Z₂ optional sind und, falls vorhanden, voneinander unabhängig aus der Gruppe bestehend aus Aminosäureresten und Kombinationen daraus ausgewählt werden, wobei die Reste durch Peptidbindungen miteinander verbunden sind. Derartige zyklische Peptide können Modifikationen wie eine N-Azetyl- oder N-Alkoxylbenzyl-Gruppe und/oder eine C-terminale Amid- oder Estergruppe aufweisen. Zyklische Peptide können beispielsweise über eine Disulfidbindung; eine Amidbindung zwischen terminalen funktionellen Gruppen, zwischen Restseitenketten oder zwischen einer terminalen funktionellen Gruppe und einer Restseitenkette; einer Thioetherbindung oder δ₁δ₁-Dityryptophan oder eines Derivates von diesen zyklisiert werden. Zyklische Peptide können weiterhin an ein Targeting-Agens, ein Arzneimittel, einen festen Träger und/oder einen nachweisbaren Marker gebunden werden.

[0011] In einem anderen Aspekt liefert die vorliegende Erfindung pharmazeutische Verbindungen, die ein oder mehrere wie oben beschriebene zyklische Peptide in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger aufweisen. Derartige Verbindungen können weiterhin ein Arzneimittel aufweisen.

[0012] In weiteren Aspekten werden Peptide für den Einsatz in Verfahren zur Regulierung der Zelladhäsion geliefert, indem eine Cadherin-exprimierende Zelle mit einem wie oben beschriebenen zyklischen Peptid in

Kontakt gebracht wird.

[0013] In einem derartigen Aspekt werden Peptide zur Reduzierung von unerwünschter Zelladhäsion bei einem Säuger geliefert, indem einem Säuger ein wie oben beschriebenes zyklisches Peptid verabreicht wird.

[0014] In einem anderen Aspekt liefert die vorliegende Erfindung Peptide zur Verbesserung des Arzneimitteltransports durch die Haut eines Säugers durch das Inkontaktbringen von Epithelzellen eines Säugers mit einem wie oben beschriebenen zyklischen Peptid und einem Arzneimittel unter den für die Passage des Arzneimittels durch die Epithelzellen notwendigen Bedingungen und dem dafür notwendigen Zeitraum.

[0015] In einem weiteren Aspekt werden Peptide zur Verbesserung des Arzneimitteltransports zu einem Tumor in einem Säuger geliefert, indem einem Säuger eine pharmazeutische Verbindung verabreicht wird, die ein wie oben beschriebenes zyklisches Peptid und ein Arzneimittel aufweist.

[0016] In verwandten Aspekten werden Peptide für die Behandlung von Krebs und/oder die Hemmung der Metastasen von Tumorzellen in einem Säuger geliefert, indem einem an Krebs leidenden Säuger ein wie oben beschriebenes zyklisches Peptid verabreicht wird.

[0017] In einem weiteren Aspekt werden Peptide zur Induktion von Apoptose in einer Cadherin-exprimierenden Zelle geliefert, indem eine Cadherin-exprimierende Zelle mit einem wie oben beschriebenen zyklischen Peptid in Kontakt gebracht wird.

[0018] Die vorliegende Erfindung liefert in anderen Aspekten auch Peptide zur Hemmung von Angiogenese in einem Säuger, indem einem Säuger ein wie oben beschriebenes zyklisches Peptid verabreicht wird.

[0019] In einer weiteren Ausführungsform liefert die vorliegende Erfindung Peptide zur Verbesserung des Arzneimitteltransports zum Gehirn eines Säugers, indem einem Säuger ein wie oben beschriebenes zyklisches Peptid verabreicht wird.

[0020] In noch weiteren Aspekten werden Peptide zur Verbesserung der Zelladhäsion geliefert. In einem derartigen Aspekt werden Peptide zur verbesserten Wundheilung in einem Säuger geliefert, indem eine Wunde eines Säugers mit einem wie oben beschriebenen zyklischen Peptid in Kontakt gebracht wird.

[0021] In einem verwandten Aspekt liefert die vorliegende Erfindung Peptide zur Verbesserung der Adhäsion des bei einem Säuger implantierten Fremdgewebes, indem die Implantationsstelle des Fremdgewebes in einem Säuger mit einem wie oben beschriebenen zyklischen Peptid in Kontakt gebracht wird.

[0022] Die vorliegende Erfindung liefert in weiteren Aspekten auch Peptide zur Verbesserung der Neuritaussprössung, indem ein Neuron mit einem wie oben beschriebenen zyklischen Peptid in Kontakt gebracht wird.

[0023] In einem verwandten Aspekt werden Peptide zur Behandlung von Rückenmarkverletzungen bei einem Säuger geliefert, indem einem Säuger ein wie oben beschriebenes zyklisches Peptid verabreicht wird.

[0024] In einem weiteren verwandten Aspekt liefert die vorliegende Erfindung Peptide zur Behandlung einer neurologischen Demyelisationskrankheit bei einem Säuger, wobei einem Säuger ein wie oben beschriebenes zyklisches Peptid verabreicht wird.

[0025] Die vorliegende Erfindung liefert auch Peptide zur Regulation des Immunsystems eines Säugers, indem einem Säuger ein wie oben beschriebenes zyklisches Peptid verabreicht wird.

[0026] In einem noch anderen Aspekt werden Peptide zur Verhütung der Schwangerschaft eines Säugers geliefert, indem einem Säuger eine wie oben beschriebene Verbindung verabreicht wird.

[0027] In einem weiteren Aspekt werden Peptide zur Erhöhung der Gefäßdurchlässigkeit bei einem Säuger geliefert, indem einem Säuger ein wie oben beschriebenes zyklisches Peptid verabreicht wird.

[0028] Die vorliegende Erfindung liefert auch Verfahren zur Identifizierung eines zyklischen Peptids, das in der Lage ist, die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion zu regulieren. Ein derartiges Verfahren umfasst: (a) Kultivierung von Neuronen auf einem einschichtigen Zellrasen, die bei Vorliegen und Nichtvorliegen eines potenti-

ellen zyklischen Peptids N-Cadherin exprimieren unter Bedingungen und innerhalb eines Zeitraums, der für die Ermöglichung der Neuritenaussprossung ausreichend ist; (b) Bestimmung der mittleren Neuritenlänge der be-sagten Neuronen; und (c) Vergleich der mittleren Neuritenlänge der Neuronen, die bei Vorliegen eines poten-tiellen zyklischen Peptids kultiviert werden, mit der Neuritenlänge der Neuronen, die bei Nichtvorliegen eines poten-tiellen zyklischen Peptids kultiviert werden.

[0029] In einer anderen Ausführungsform beinhaltet das Verfahren: (a) Kultivieren von Zellen, die bei Vorliegen und bei Nichtvorliegen eines poten-tiellen zyklischen Peptids Cadherin exprimieren unter Bedingungen und innerhalb eines Zeitraums, der für die Ermöglichung der Zelladhäsion ausreichend ist; und (b) visuelle Evalu-ation des Grads an Zelladhäsion bei den Zellen.

[0030] In einer noch anderen Ausführungsform beinhaltet das Verfahren: (a) Kultivierung von NRK-Zellen bei Vorliegen und Nichtvorliegen eines poten-tiellen zyklischen Peptids unter Bedingungen und innerhalb eines Zeitraums, der ausreicht, um Zelladhäsion zu ermöglichen; und (b) Vergleich des Gehalts an Zelloberflä-chen-E-Cadherin bei Zellen, die bei Vorliegen eines poten-tiellen zyklischen Peptids kultiviert werden, mit dem Gehalt bei Zellen, die bei Nichtvorliegen eines poten-tiellen zyklischen Peptids kultiviert werden.

[0031] In einer weiteren Ausführungsform beinhaltet das Verfahren: den Vergleich der Menge des Testmar-kers, die bei Vorliegen eines poten-tiellen zyklischen Peptids durch das Epithel der mit dem Testmarker in Kon-takt gebrachten Haut gelangt, mit der Menge, die bei Nichtvorliegen eines poten-tiellen zyklischen Peptids durch die Haut gelangt.

[0032] In einer weiteren Ausführungsform beinhaltet das in vitro-Verfahren: den Vergleich des Grads der An-giogenese eines Blutgefäßes, das mit einem poten-tiellen zyklischen Peptid in Kontakt gebracht wurde, mit ei-nem vorherbestimmten Grad der Angiogenese, der bei einem Blutgefäß bei Nichtvorliegen des poten-tiellen zy-klischen Peptids beobachtet wurde, und daraus die Identifizierung eines zyklischen Peptids, das in der Lage zur Regulation der Zelladhäsion ist.

[0033] Die vorliegende Erfindung liefert in einem weiteren Aspekt auch ein Set für die Verabreichung eines Arzneimittels durch die Haut eines Säugers, und umfasst: (a) ein Hautpflaster; und (b) ein wie oben beschrie-benes zyklisches Peptid.

[0034] In noch weiteren Aspekten liefert die vorliegende Erfindung in vitro-Verfahren zur Regulation von Zel-ladhäsion, die das Inkontaktbringen einer Cadherin-exprimierenden Zelle mit einem Antikörper, der sich an ein wie oben beschriebenes zyklisches Peptid bindet, umfasst. In einem derartigen Aspekt wird ein Verfahren zur gezielten Anwendung eines Arzneimittels bei einer Cadherin-exprimierenden Zelle eines Säugers geliefert und umfasst die Verabreichung eines Antikörpers, der sich an ein wie oben beschriebenes zyklisches Peptid bin-det, an einen Säuger, wobei der Antikörper an ein Arzneimittel gebunden ist.

[0035] Die vorliegende Erfindung liefert auch Verfahren zum Nachweis des Vorliegens von Cadherin-exprimierenden Zellen in einer Probe und umfasst: (a) das Inkontaktbringen der Probe mit einem Antikörper, der sich an ein wie oben beschriebenes zyklisches Peptid bindet, unter Bedingungen und für einen Zeitraum, der ausreicht, um die Bildung eines Antikörper-Cadherin-Komplexes zu ermöglichen; und (b) die Ermittlung der Grö-ße des Antikörper-Cadherin-Komplexes.

[0036] In einem anderen Aspekt liefert die vorliegende Erfindung Sets zum Nachweis des Vorliegen von Cad-herin-exprimierenden Zellen in einer Probe, die umfassen: (a) einen Antikörper, der sich an ein wie oben be-schriebenes zyklisches Peptid bindet; und (b) ein Nachweisreagens.

[0037] Diese und andere Aspekte der Erfindung werden durch Bezugnahme der folgenden ausführlichen Be-schreibung und der beigefügten Skizzen verdeutlicht.

KURZE BESCHREIBUNG DER SKIZZEN

[0038] [Fig. 1](#) zeigt ein Diagramm, in dem die Struktur eines klassischen CADs dargestellt ist. Die fünf extra-zellulären Domänen sind mit EC1-EC5 benannt, die hydrophobe Domäne, die die Plasmamembran (PM) quert, ist durch TM dargestellt, und die zwei zytoplasmatischen Domänen sind mit CP1 und CP2 gekennzeich-net. Die Kalzium-bindenden Motive sind durch DXNDN (SEQ.-ID-Nr. 41), DxD und LDRE (SEQ.-ID-Nr. 40) dar-gestellt. Die CAR-Sequenz HAV ist in EC1 gezeigt. Die zytoplasmatischen Proteine β -Catenin (β), α -Catenin (α) und α -Actinin (ACT), welche die Interaktion zwischen CADs und Mikrofilamenten (MF) vermitteln, sind auch

gezeigt.

[0039] [Fig. 2](#) liefert die Aminosäuresequenzen der klassischen Cadherin-EC1-Domänen bei einem Säuger: menschliches N-Cadherin (SEQ.-ID-Nr. 1), Maus-N-Cadherin (SEQ.-ID-Nr. 2), Kuh-N-Cadherin (SEQ.-ID-Nr. 3), menschliches P-Cadherin (SEQ.-ID-Nr. 4), Maus-P-Cadherin (SEQ.-ID-Nr. 5), menschliches E-Cadherin (SEQ.-ID-Nr. 6) und Maus-E-Cadherin (SEQ.-ID-Nr. 7). [Fig. 3](#) liefert die Strukturen repräsentativer zyklischer Peptide der vorliegenden Erfindung (Strukturen auf der linken Seite) zusammen mit ähnlichen, aber inaktiven Strukturen (rechte Seite).

[0040] [Fig. 4](#) ist ein Histogramm, das die mittlere Neuritenlänge in Mikron für Neuronen, die auf einem einschichtigen Zellrasen von untransfektierten 3T3-Zellen (erste Säule) oder mit N-Cadherin-kodierender cDNA transfektierten 3T3-Zellen (Säulen 2–4), gewachsen sind. In der dritten Säule wird die mittlere Neuritenlänge bei Vorliegen des repräsentativen zyklischen Peptids N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) gezeigt. Säule 4 zeigt die mittlere Neuritenlänge bei Vorliegen des Kontrollpeptids N-Ac-CHGVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 9).

[0041] [Fig. 5](#) ist ein Graph, der eine Dosis-Antwort-Kurve für das repräsentative zyklische Peptid N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) auf Kontroll-3T3-Zellen (ungefüllte Kreise) und auf N-Cadherin-exprimierenden 3T3-Zellen (gefüllte Kreise) zeigt.

[0042] [Fig. 6](#) ist ein Histogramm, das die mittlere Neuritenlänge in Mikron für Neuronen, die bei Vorliegen (gefüllte Säulen) oder Nichtvorliegen (schraffierte Säulen) von 500 µg/mL des repräsentativen zyklischen Peptids N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) gewachsen sind, darstellt. Im ersten Säulenpaar wurden Neuronen, die auf einem einschichtigen Zellrasen von untransfektierten 3T3-Zellen gewachsen sind, dargestellt. Die übrigen Säulen zeigen die mittlere Neuritenlänge für Neuronen, die auf mit N-CAM-(zweites Säulenpaar), L1-(drittes Säulenpaar) oder N-Cadherin-(viertes Säulenpaar) kodierender cDNA transfektierten 3T3-Zellen kultiviert wurden.

[0043] [Fig. 7A-C](#) zeigen Fotos von einschichtigen Zellrasenkulturen von Rinder-Endothelzellen bei Vorliegen ([Fig. 7A](#)) und Nichtvorliegen ([Fig. 7C](#)) eines repräsentativen zyklischen Peptids oder bei Vorliegen eines inaktiven Kontrollpeptids ([Fig. 7B](#)). [Fig. 7A](#) zeigt die Zellen 30 Minuten nach dem Aussetzen in 500 µg/mL N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8). [Fig. 7B](#) zeigt die Zellen 30 Minuten nach dem Einwirken des Kontrollpeptids N-Ac-CHGVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 9). [Fig. 7C](#) zeigt die Zellen bei Nichtvorliegen des zyklischen Peptids. Es wird besonders erwähnt, dass sich die Endothelzellen bei Vorliegen von N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) voneinander zurückzogen.

[0044] [Fig. 8A-C](#) zeigen Fotos von einschichtigen Zellrasenkulturen von Rinder-Endothelzellen bei Vorliegen ([Fig. 8A](#)) und Nichtvorliegen ([Fig. 8C](#)) eines repräsentativen zyklischen Peptids oder bei Vorliegen eines inaktiven Kontrollpeptids ([Fig. 8B](#)). [Fig. 8A](#) zeigt die Zellen 30 Minuten nach der Einwirkung von 500 µg/mL N-Ac-CAHAVDIC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 10). [Fig. 8B](#) zeigt die Zellen 30 Minuten nach der Einwirkung des Kontrollpeptids N-Ac-CAHGVDIC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 11). [Fig. 8C](#) zeigt die Zellen bei Nichtvorliegen des zyklischen Peptids. In diesem Fall zeigt keines der zyklischen Peptide eine Aktivität. [Fig. 9A-C](#) zeigen Fotos von einschichtigen Zellrasenkulturen von Rinder-Endothelzellen bei Vorliegen ([Fig. 9A](#)) und Nichtvorliegen ([Fig. 9C](#)) eines repräsentativen zyklischen Peptids oder bei Vorliegen eines inaktiven Kontrollpeptids ([Fig. 9B](#)). [Fig. 9A](#) zeigt die Zellen 30 Minuten nach der Einwirkung von 500 µg/mL N-Ac-CAHAVDC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 16). [Fig. 9B](#) zeigt die Zellen 30 Minuten nach der Einwirkung des Kontrollpeptids N-Ac-CAHGVDC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 17). [Fig. 9C](#) zeigt die Zellen bei Nichtvorliegen des zyklischen Peptids. Es wird besonders erwähnt, dass sich die Endothelzellen bei Vorliegen von N-Ac-CAHAVDC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 16) voneinander zurückzogen. [Fig. 10A-C](#) zeigen Fotos von einschichtigen Zellrasenkulturen von Rinder-Endothelzellen bei Vorliegen ([Fig. 10A](#)) und Nichtvorliegen ([Fig. 10C](#)) eines repräsentativen zyklischen Peptids oder bei Vorliegen eines inaktiven Kontrollpeptids ([Fig. 10B](#)). [Fig. 10A](#) zeigt die Zellen 30 Minuten nach der Einwirkung von 500 µg/mL N-Ac-CShAVSSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 18). [Fig. 10B](#) zeigt die Zellen 30 Minuten nach der Einwirkung des Kontrollpeptids N-Ac-CSHGVSSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 19). [Fig. 10C](#) zeigt die Zellen bei Nichtvorliegen des zyklischen Peptids. Es wird besonders erwähnt, dass sich die Endothelzellen bei Vorliegen von N-Ac-CShAVSSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 18) voneinander zurückzogen und aufrunden. [Fig. 11A-F](#) zeigen Fotos von einschichtigen Zellrasenkulturen von menschlichen Ovarialkarzinomzellen (SKOV3) bei Vorliegen ([Fig. 11D-F](#)) und Nichtvorliegen ([Fig. 11C](#)) eines repräsentativen zyklischen Peptids oder bei Vorliegen eines inaktiven Kontrollpeptids ([Fig. 11B](#)). [Fig. 11A](#) zeigt die Zellen 24 Stunden nachdem sie bei Vorliegen von 500 µg/mL N-Ac-CHAVC-NH₂ (10-fache Vergrößerung) kultiviert wurden. [Fig. 11B](#) zeigt die Zellen (10-fache Vergrößerung) 24 Stunden nachdem sie bei Vorliegen des Kontrollpeptids N-Ac-CHGVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 9) kultiviert wurden. [Fig. 11C](#) zeigt die Zellen (10-fache Vergrößerung) bei Nichtvorliegen des zyklischen Peptids.

Fig. 11D-F zeigen die Zellen (20-fache Vergrößerung) 48 Stunden nach der Einwirkung von N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) in den jeweiligen Konzentrationen von 1 mg/mL, 100 µg/mL und 10 µg/mL. Es wird besonders erwähnt, dass sich die SKOV3-Zellen voneinander zurückziehen und aufrunden, wenn sie bei Vorliegen von entweder 0,5 oder 1 mg/ml N-AC-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) kultiviert wurden.

[0045] **Fig. 12A** und **Fig. 12B** zeigen Fotos von einschichtigen Zellrasenkulturen von menschlichen Ovarialkarzinomzellen (SKOV3) 24 Stunden nach dem Aussetzen in 500 µg/mL des repräsentativen zyklischen Peptids N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) (**Fig. 12A**) oder des Kontrollpeptids N-Ac-CHGVC-NH₂ (**Fig. 12B**). Es wird besonders erwähnt, dass sich die SKOV3-Zellen aufrunden, wenn sie bei Vorliegen von 0,5 mg/ml N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) kultiviert werden.

[0046] **Fig. 13A-D** zeigen Fotos von einschichtigen Zellrasenkulturen von normalen Rattennieren (NRK)-Zellen, entweder unbehandelt (**Fig. 13A**) oder 48 Stunden nach der Einwirkung in 1 mg/mL H-CHAVSC-OH (SEQ.-ID-Nr. 14) (**Fig. 13B**), dem Kontrollpeptid N-Ac-CHGVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 9) (**Fig. 13C**) oder dem repräsentativen zyklischen Peptid N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) (**Fig. 13D**). Es wird besonders erwähnt, dass sich die NRK-Zellen von einander zurückziehen, wenn sie bei Vorliegen von N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) kultiviert werden. Weiterhin bilden die NRK-Zellen keine pflastersteinartigen einschichtigen Zellrasen, wenn sie diesem Peptid ausgesetzt werden. **Fig. 14A-D** sind Immunofluoreszenz-Bilder von einschichtigen Zellrasen normaler Rattennieren (NRK)-Kulturen, die in **Fig. 13A-D** für E-Cadherin immunmarkiert sind. **Fig. 14A** zeigt unbehandelte Zellen und **Fig. 14B-D** zeigen Zellen, nachdem sie 48 Stunden in entweder 1 mg/mL H-CHAVSC-OH (SE.-ID-Nr.-14) (**Fig. 14B**), dem Kontrollpeptid N-Ac-CHGVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 9) (**Fig. 14C**) oder dem repräsentativen zyklischen Peptid N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) (**Fig. 14D**) ausgesetzt wurden. Es wird besonders erwähnt, dass die E-Cadherin-Expression in den mit N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) behandelten Zellen erheblich reduziert ist im Vergleich zu dem Niveau an E-Cadherin, das von unbehandelten Zellen und den mit den anderen zwei zyklischen Peptiden behandelten Zellen exprimiert wird.

[0047] **Fig. 15A-C** zeigen Fotos von einschichtigen Zellrasenkulturen von menschlichen Ovarialkarzinomzellen (OVCAR3) bei Vorliegen von unterschiedlichen Konzentrationen eines repräsentativen zyklischen Peptids. **Fig. 15A** zeigt die Zellen 24 Stunden nachdem sie bei Vorliegen von 1 mg/ml N-Ac-CHAVSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 14) kultiviert wurden. **Fig. 15B** zeigt die Zellen 24 Stunden nachdem sie bei Vorliegen von 100 µg/ml N-Ac-CHAVSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 14) kultiviert wurden. **Fig. 15C** zeigt die Zellen 24 Stunden nachdem sie bei Vorliegen von 10 µg/ml N-Ac-CHAVSC-NE₂ (SEQ.-ID-Nr. 14) kultiviert wurden. Es wird besonders erwähnt, dass sich die Zellen die bei Vorliegen von 100 µg/ml N-Ac-CHAVSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 14) voneinander zurückziehen, während sie sich bei Vorliegen von 1 mg/ml dieses Peptids aufrunden.

[0048] **Fig. 16A** und B zeigen Fotos von Kulturen von menschlichen Melanom-ME115-Zellen bei Vorliegen (**Fig. 16B**) und Nichtvorliegen (**Fig. 16A**) eines repräsentativen zyklischen Peptids. Die Zellen wurden für Cadherin immunmarkiert. **Fig. 16B** zeigt die Zellen 48 Stunden nachdem sie bei Vorliegen von 500 µg/ml N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) kultiviert wurden. **Fig. 16A** zeigt unbehandelte Kulturen von menschlichen Melanom-ME115-Zellen. Es wird besonders erwähnt, dass sich Cadherin in mit Peptid behandelten Zellen in intrazellulären Vesikeln, während es sich bei den unbehandelten Zellen an der Oberfläche befindet.

[0049] **Fig. 17A** und B zeigen Fotos von einschichtigen Zellrasenkulturen von menschlichen AIN4-Brust-Epithelzellen bei Vorliegen (**Fig. 17B**) und Nichtvorliegen (**Fig. 17A**) eines repräsentativen zyklischen Peptids. Die Zellen wurden für E-Cadherin immunmarkiert. **Fig. 17B** zeigt die Zellen 48 Stunden nachdem sie bei Vorliegen von 500 µg/ml N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) kultiviert wurden. **Fig. 17A** zeigt unbehandelte einschichtige Zellrasenkulturen menschlicher AIN4-Brust-Epithelzellen. Es wird besonders erwähnt, dass die Verteilung von E-Cadherin in mit dem zyklischen Peptid behandelten Zellen nicht zusammenhängend ist. Weiterhin sind Zwischenräume im einschichtigen Zellrasen bei den mit dem Peptid behandelten Zellen aufgetreten.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0050] Wie oben festgestellt liefert die vorliegende Erfindung wie beansprucht zyklische Peptide, die in der Lage zur Regulation von Cadherin-vermittelter Zelladhäsion sind. Bestimmte hier beschriebene zyklische Peptide hemmen Zelladhäsion. Derartige zyklische Peptide können im Allgemeinen beispielsweise zur Behandlung von Krankheiten oder anderen Leiden, die durch unerwünschte Zelladhäsion charakterisiert sind, oder zur Verbesserung des Arzneimitteltransports zu einem spezifischen Gewebetumor eingesetzt werden. Alternativ kann ein zyklisches Peptid, wenn es z. B. durch einen Linker an eine Matrix oder ein anderes zyklisches Peptid gebunden ist, zur Förderung von Zelladhäsion eingesetzt werden. Derartige zyklische Peptid-Matrix-Konjugate können beispielsweise zur Verbesserung von Zelladhäsion verwendet werden (z. B. zur Verbesserung oder

Entfernung von Nahtstichen oder zur Verbesserung von Wundheilung) oder, um Neuritenauswucherungen zu verbessern oder zu lenken, verwendet werden.

ZYKLISCHE PEPTIDE

[0051] Der hier verwendete Begriff „zyklisches Peptid“ bezieht sich auf ein Peptid oder Salz davon, das aufweist: (1) eine intramolekulare kovalente Bindung zwischen zwei nicht benachbarten Resten und (2) mindestens eine Cadherin-Zelladhäsionserkennungs-(CAR)-Sequenz. Die intramolekulare Bindung kann eine Rückgrat-Rückgrat-, Seitenketten-Rückgrat- oder Seitenketten-Seitenketten-Bindung sein (d. h. terminale funktionelle Gruppen eines linearen Peptids und/oder Seitenketten-funktionelle Gruppen eines terminalen oder internen Rests können zum Erreichen von Cyclisierung verbunden werden). Bevorzugte intramolekulare Bindungen umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Disulfid-, Amid- und Thioether-Bindungen. Mindestens eine CAR-Sequenz beinhaltet im Allgemeinen HAV (His-Ala-Val). Zyklische Peptide können nur eine CAR-Sequenz oder zusätzlich ein oder mehrere andere Adhäsionsmolekül-Verbindungsstellen, die CARs sein können, aber nicht müssen, enthalten. Derartige zusätzliche Sequenzen können durch einen Linker (d. h. ein oder mehrere Peptide, die nicht von einer CAR-Sequenz abgeleitet sind, oder eine andere Adhäsionsmolekül-Bindungsstelle) getrennt werden. In einer derartigen Ausführungsform enthält das zyklische Peptid 2 HAV-Sequenzen. In einer anderen Ausführungsform enthält das zyklische Peptid eine HAV- und eine CAR-Sequenz, die von einer anderen CAM erkannt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die zweite CAR-Sequenz von Fibronektin abgeleitet und wird von einem Integrin erkannt (d. h. Arg-Gly-Asp; siehe Cardarelli et al. J. Biol. Chem. 267: 23159–23164, 1992).

[0052] Zusätzlich zu der(n) CAR-Sequenz(en) beinhalten zyklische Peptide mindestens einen zusätzlichen Rest, so dass die Größe des zyklischen Peptidrings zwischen 4 und bis zu etwa 15 Resten variiert, vorzugsweise zwischen 5 und 10 Resten. Ein derartiger/Derartige zusätzliche(r) Rest(e) können auf der N-terminalen und/oder C-terminalen Seite einer CAR-Sequenz vorliegen und können von Sequenzen abgeleitet werden, die die HAV-Sequenz innerhalb eines oder mehreren natürlich auftretenden Cadherin(en) (z. B. N-Cadherin, E-Cadherin, P-Cadherin, R-Cadherin oder andere Cadherine, die die HAV-Sequenz enthalten) mit oder ohne Aminosäure-Substitutionen und/oder anderen Modifikationen flankieren. Flankierende Sequenzen für endogenes N-, E-, P- und R-Cadherin sind in [Fig. 2](#) und in SEQ.-ID-Nr. 1–7 dargestellt. Die Datenbankzugangsnummern für repräsentative natürlich auftretende Cadherine sind wie folgt: menschliches N-Cadherin M34064, Maus-N-Cadherin M31131 und M22556, Kuh-N-Cadherin X53615, menschliches P-Cadherin X63629, Maus-P-Cadherin X06340, menschliches E-Cadherin 213009, Maus-E-Cadherin X06115. Alternativ können zusätzliche Reste, die auf einer oder beiden Seite(n) der CAR-Sequenz(en) vorhanden sind, nicht in Verbindung zu einer endogenen Sequenz stehen (z. B. Reste, die die Cyclisierung fördern).

[0053] In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen, die unten diskutiert werden, werden relativ kleine zyklische Peptide, die keine signifikanten die HAV-Sequenz flankierenden Sequenzen enthalten, zur Regulation der N-Cadherin- und E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion bevorzugt. Derartige Peptide können eine N-Acetylgruppe und eine C-Amidgruppe (z. B. der 5-Reste-Ring N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) oder N-Ac-KHAVD-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 20) enthalten. Das Ergebnis der vorliegenden Erfindung, dass derartige relativ kleine zyklische Peptide wirksame und für viele Zwecke einzusetzende Inhibitoren von Zelladhäsion sein können, stellt eine unerwartete Entdeckung dar. Derartige zyklische Peptide können gewissermaßen als „Generalschlüssel“ betrachtet werden, die in Peptid-Bindungsstellen jedes anderen klassischen Cadherins passen und in der Lage zur Störung von Zelladhäsion von Nervenellen, Endothelzellen, Epithelzellen und/oder bestimmten Krebszellen sind. Kleine zyklische Peptide können im Allgemeinen verwendet werden, um Zelladhäsion von Nerven- und/oder anderen Zellarten spezifisch mit oder ohne Bindung eines Targeting-Agens an das Peptid durch topische oder durch systemische Verabreichung zu regulieren, wie unten diskutiert.

[0054] In anderen bevorzugten Ausführungsformen kann ein zyklisches Peptid Sequenzen enthalten, die die HAV-Sequenz auf einer oder beiden Seiten flankieren, die so gestaltet sind, dass sie die Spezifität für die von einem oder mehreren spezifischen Cadherin(en) vermittelte Zelladhäsion übertragen können, was zur Gewebe- und/oder Zelltypenspezifität führt. Geeignete flankierende Sequenzen zur Übertragung von Spezifität beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf endogene Sequenzen, die sich in einem oder mehreren natürlich auftretenden Cadherinen befinden; und zyklische Peptide mit Spezifität können mit Hilfe der hier gelieferten präsentativen Screens nachgewiesen werden. Es wurde beispielsweise im Rahmen der vorliegenden Erfindung herausgefunden, dass zyklische Peptide, die zusätzliche, aus der nativen E-Cadherin-Sequenz auf der C-terminalen Seite der CAR-Sequenz abgeleitete, Reste enthalten, spezifisch für Epithelzellen sind (d. h. derartige Peptide stören die E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion stärker als sie die N-Cadherin-Expression stören). Das Hinzufügen von geeigneten endogenen Sequenzen kann ebenso zu Peptiden führen, die die N-Cad-

herin-vermittelte Zelladhäsion stören.

[0055] Zur Unterstützung der Herstellung von zyklischen Peptiden mit einer gewünschten Spezifität können das Kernresonanzspektroskopie (NMR)- und andere Rechenverfahren eingesetzt werden, um die Konformation eines eine bekannte Spezifität übertragenden Peptids zu bestimmen. Die Nutzung von NMR ist weit für die strukturelle Analyse von Molekülen verbreitet. Kreuzpeak-Intensitäten in nuklearen Overhauser-Verstärkungs(NOE)-Spektren, Kopplungskonstanten und chemische Verschiebungen hängen von der Konformation einer Verbindung ab. NOE-Daten liefern den Interprotonenabstand zwischen den Protonen durch die Zwischenräume und durch den Ring der zyklischen Peptide. Diese Information kann verwendet werden, um die Berechnung der niedrigsten Energiekonformation für die HAV-Sequenz zu erleichtern. Die Konformation kann dann mit der Gewebespezifität korreliert werden, um den Nachweis von Peptiden, die in ähnlicher Weise gewebespezifisch sind oder eine verbesserte Gewebespezifität aufweisen, zu ermöglichen.

[0056] Die hier beschriebenen zyklischen Peptide können Reste aus L-Aminosäuren, D-Aminosäuren oder irgendeine Kombination aus diesen enthalten. Aminosäuren können aus natürlichen oder nichtnatürlichen Quellen stammen, vorausgesetzt, es sind mindestens eine Aminogruppe und mindestens eine Carboxylgruppe im Molekül vorhanden; α - und β -Aminosäuren werden im Allgemeinen bevorzugt. Die 20 üblicherweise in Proteinen vorzufindenden L-Aminosäuren sind in Tab. 1 mit den konventionellen Drei- oder Ein-Buchstaben-Abkürzungen und die entsprechenden D-Aminosäuren durch ein Einbuchstabensymbol in Kleinbuchstaben symbolisiert. Ein zyklisches Peptid kann auch ein oder mehrere seltene Aminosäuren (wie 4-Hydroxyprolin oder Hydroxylysin), organische Säuren oder Amide und/oder Derivate von gewöhnlichen Aminosäuren enthalten, wie Aminosäuren, die das C-terminale Carboxylat verestert (z. B. Benzyl, Methyl oder Äthylester) oder amidiert haben und/oder Modifikationen der N-terminalen Aminogruppe (z. B. Acetylierung oder Alkoxy carbonylierung) mit oder ohne einer großen Vielfalt von Seitenketten-Modifikationen und/oder Substitutionen (z. B. Methylierung, Benzylierung, t-Butylierung, Tosylierung, Alkoxy carbonylierung und dergleichen) aufweisen. Bevorzugte Derivate umfassen Aminosäuren mit einer N-Acetylgruppe (derartig, dass die Aminogruppe, die den N-Terminus des linearen Peptids vor der Cyclisierung repräsentiert, acetyliert ist) und/oder eine C-terminale Amidgruppe (d. h. der Carboxy-Terminus des linearen Peptids wird vor der Cyclisierung amidiert). Andere Reste als gewöhnliche Aminosäuren, die in einem zyklischen Peptid vorhanden sein können, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Penicillamin, β,β -Tetramethylen-Cystein, β,β -Pentamethylen-Cystein, β -Mercaptopropionsäure, β,β -Pentamethylen- β -Mercaptopropionsäure, 2-Mercaptobenzol, 2-Mercaptoanilin, 2-Mercaptoprolin, Ornithin, Diaminobuttersäure, α -Aminoadipinsäure, m-Aminomethylbenzoësäure und Diaminopropionsäure.

Tabelle 1

Einbuchstaben- und Dreibuchstaben-Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
R	Arg	Arginin
D	Asp	Asparaginsäure
N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystin
Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
L	Leu	Leucin
K	Lys	Lysin
M	Met	Methionin
F	Phe	Phenylalanin
P	Pro	Prolin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
V	Val	Valin

[0057] Die hier beschriebenen zyklischen Peptide können durch in Fachkreisen gut bekannte Verfahren, einschließlich rekombinanter DNA-Verfahren und chemischer Synthese, synthetisiert werden. Eine chemische

Synthese kann im Allgemeinen unter Einsatz der klassischen Lösungsphasen- oder der Festphasenpeptidsynthese-Verfahren, in denen eine Peptidbindung durch direkte Kondensation der α -Aminogruppe einer Aminosäure mit der α -Carboxylgruppe der anderen Aminosäure unter Eliminierung eines Wassermoleküls auftritt, ausgeführt werden. Peptidbindungssynthese durch die oben formulierte direkte Kondensation erfordert die Unterdrückung des reaktiven Charakters der Aminogruppe der ersten und der Carboxylgruppe der zweiten Aminosäure. Die Maskierungssubstituenten müssen deren sofortige Entfernung ermöglichen, ohne den Zerfall des labilen Peptidmoleküls zu bewirken.

[0058] In der Lösungsphasensynthese kann eine breite Vielfalt an Kupplungsverfahren und Schutzgruppen verwendet werden (siehe Gross und Meienhofer, Hrsg., „The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology“, Bnd. 1–4 (Academic Press, 1979); Bodansky und Bodansky, „The Practice of Peptide Synthesis“, 2. Ed. (Springer Verlag, 1994)). Weiterhin sind intermediäre Reinigung und lineare Vergrößerung möglich. In Fachkreisen wird erkennbar sein, dass die Lösungssynthese die Beachtung der Hauptketten- und Seitenketenschutzgruppen und des Aktivierungsverfahrens erfordert. Weiterhin ist sorgfältige Segmentselektion notwendig, um die Racemisierung während der Segmentkondensation zu minimieren. Ein weiterer Faktor ist die Beachtung der Löslichkeits-Aspekte.

[0059] Festphasenpeptidsynthese verwendet während der organischen Synthese als Träger ein unlösliches Polymer. Die Peptidketten mit dem Polymer als Träger ermöglichen die Anwendung einfacher Wasch- und Filtrierungsschritte anstelle von umständlichen Reinigungen in Zwischenschritten. Festphasenpeptidsynthese kann im Allgemeinen gemäß dem Verfahren von Merrifield et al. J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963, durchgeführt werden, welches die Anknüpfung einer linearen Peptidkette an einen Harzträger unter Verwendung geschützter Aminosäuren beinhaltet. Festphasenpeptidsynthese setzt typischerweise entweder die Boc- oder die Fmoc-Strategie ein. Die Boc-Strategie verwendet ein 1%-ig quervernetztes Polystyrolharz. Die Standard-Schutzgruppe für α -Amin-Funktionen ist die tert-Butyloxycarbonyl(Boc)-Gruppe. Diese Gruppe kann mit verdünnten Lösungen starker Säuren, wie 25%-iger Trifluoressigsäure (TFA) entfernt werden. Die nächste Boc-Aminosäure wird typischerweise unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) an das Aminoacyl-Harz gekoppelt. Nach der Beendigung der Kopplung wird das Peptid-Harz mit wasserfreiem HF behandelt, um die Benzyl-Ester-Bindung zu spalten und das freie Peptid freizusetzen. Seitenkettenfunktionelle Gruppen werden üblicherweise während der Synthese von Benzylabgeleiteten Blockierungsgruppen, die ebenfalls von HF abgespalten wurden, blockiert. Das freie Peptid wird dann mit einem geeigneten Lösungsmittel vom Harz extrahiert, gereinigt und charakterisiert. Neu synthetisierte Peptide können z. B. durch Gelfiltrierung, HPLC, Extraktionschromatographie und/oder durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt werden und z. B. durch Massenspektrometrie oder Aminosäurensequenzanalyse charakterisiert werden. Bei der Boc-Strategie können C-terminal amidierte Peptide durch Verwendung von Benzhydrylamin- oder Methyl-Benzhydrylaminharzen, die Peptid-Amide direkt nach der Abspaltung von HF liefern, erhalten werden.

[0060] In den oben diskutierten Verfahren, hängt die Selektivität der Seitenketten-Blockierungsgruppen und der Peptid-Harz-Bindung von den Unterschieden in der Geschwindigkeit der azidolytischen Abspaltung ab. Es wurden Orthogonol-Systeme vorgestellt, in denen die Seitenketten-Blockierungsgruppen und die Peptid-Harz-Bindung in jedem Syntheseschritt vollkommen stabil zum für die Entfernung der α -Schutzgruppe verwendeten Reagenz sind. Das üblichste dieser Verfahren beinhaltet den 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl(Fmoc)-Ansatz. In diesem Verfahren sind die Seitenketenschutzgruppen und die Peptid-Harz-Bindung vollkommen stabil zu den zur Abspaltung der N- α -Fmoc-Gruppe verwendeten sekundären Aminen. Der Seitenketten-Schutz und die Peptid-Harz-Bindung werden durch milde Acidolyse abgespalten. Der wiederholte Kontakt mit der Base macht das Merrifield-Harz für die Fmoc-Chemie ungeeignet und es werden im Allgemeinen an das Harz gebundene p-Alkoxybenzyl-Ester verwendet. Entschützung und Spaltung werden im Allgemeinen unter Verwendung von TFA durchgeführt.

[0061] Für einen Fachmann wird erkennbar sein, dass in einer Festphasensynthese Entschützungs- und Kupplungsreaktionen zum Abschluss gebracht werden und, dass die Seitenketten-Blockierungsgruppen während der gesamten Synthese stabil sein müssen. Weiterhin ist die Festphasensynthese im Allgemeinen am besten dann geeignet, wenn Peptide im kleinen Maßstab hergestellt werden sollen.

[0062] Die Acetylierung des N-Terminals kann durch eine Reaktion des letzten Peptids mit dem essigsauren Anhydrid vor der Abspaltung vom Harz erreicht werden. C-Amidierung kann unter Einsatz eines geeigneten Harzes wie Methylbenzhydrylamin-Harz unter Verwendung der Boc-Technik erreicht werden.

[0063] Im Anschluss an die Synthese eines linearen Peptids mit oder ohne N-Acetylierung und/oder C-Amidierung kann die Cyclisierung durch irgendein aus der Auswahl von in Fachkreisen gut bekannten Verfahren

erreicht werden. In einer Ausführungsform kann eine Bindung zwischen reaktiven Aminosäure-Seitenketten erzeugt werden. Beispielsweise kann eine Disulfidbrücke aus einem linearen Peptid, das zwei Thiol-enthaltende Reste aufweist, durch Oxidieren des Peptids unter Verwendung eines aus der Reihe der zur Auswahl stehenden Verfahren gebildet werden. Bei einem dieser Verfahren können Disulfid-Bindungen durch Luftoxidation von Thiol über einem Zeitraum von einigen Tagen erzeugt werden, wobei entweder basische oder neutrale wässrige Medien verwendet werden. Das Peptid wird in stark verdünnter Form verwendet, um Aggregation und intermolekulare Nebenreaktionen zu minimieren. Dieses Verfahren weist den Nachteil auf, langsam zu sein, hat jedoch den Vorteil, dass nur H_2O als Nebenprodukt entsteht. Alternativ können für die Bildung von Disulfid-Bindungen stark oxidierende Wirkstoffe wie I_2 und $K_3Fe(CN)_6$ verwendet werden. Der Fachmann wird erkennen, dass dabei Vorsicht geboten ist, damit die sensiblen Seitenketten aus Met, Tyr, Trp oder His nicht oxidiert werden. Durch diese Verfahren hergestellte zyklische Peptide benötigen eine Reinigung unter Verwendung von Standardverfahren, aber diese Oxidation ist auch bei sauren pH-Werten anwendbar. Beispielsweise können stark oxidierende Wirkstoffe verwendet werden, um die unten dargestellte Cyclisierung (SEQ.-ID-Nr. 33 und 34) durchzuführen, wobei der unterstrichene Teil cyclisiert ist:

FmocCysAsp(t-Bu)GlyTyr(t-Bu)ProLys(Boc)Asp(t-Bu)CysLys(t-Bu)Gly-OMe →
FmocCysAsp(t-Bu)GlyTyr(t-Bu)ProLys(Boc)Asp(t-Bu)CysLys(t-Bu)Gly-OMe

[0064] Oxidierende Wirkstoffe ermöglichen auch eine gleichzeitige Entschützung/Oxidation von geeigneten S-geschützten linearen Vorläufersubstanzen (precursors), um eine verfrühte nichtspezifische Oxidation von freiem Cystein zu vermeiden, wie unten (SEQ.-ID-Nr. 35 und 36) dargestellt, wobei X und Y = S-Trt oder S-Acm:

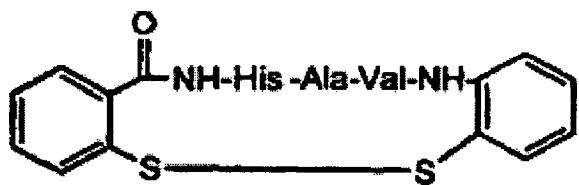
BocCys(X)GlyAsnLeuSer(t-Bu)Thr(t-Bu)Cys(Y)MetLeuGlyOH →
BocCysGlyAsnLeuSer(t-Bu)Thr(t-Bu)CysMetLeuGlyOH

[0065] DMSO ist im Unterschied zu I_2 , und $K_3Fe(CN)_6$ ein schonender Oxidator, der keine oxidativen Nebenreaktionen der oben genannten nukleophilen Aminosäuren verursacht. DMSO ist mit H_2O bei allen Konzentrationen mischbar und Oxidationen können bei saurem bis neutralem pH-Wert mit unschädlichen Nebenprodukten durchgeführt werden. Methyltrichlorsilan-Diphenylsulfoxid kann alternativ als Oxidator zur gleichzeitigen Entschützung/Oxidation von S-Acm, S-Tacm oder S-t-Bu von Cystein eingesetzt werden, ohne, dass andere nukleophile Aminosäuren betroffen werden. Es gibt keine Polymerprodukte, die aus der intermolekularen Bildung der Disulfid-Bindung entstehen. Im Beispiel unten (SEQ.-ID-Nr. 37 und 38) steht X für Acm, Tacm oder t-Bu:

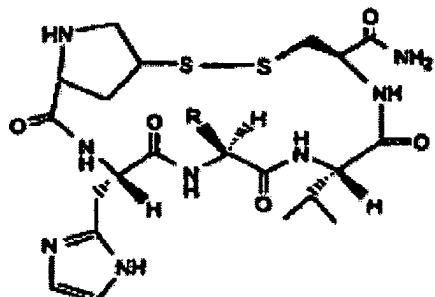
H-Cys(X)TyrIleGlnAsnCys(X)ProLeuGly-NH₂ →
H-CysTyrIleGlnAsnCysProLeuGly-NH₂

[0066] Geeignete Thiol-enthaltende Reste für die Verwendung in derartigen Oxidationsverfahren umfassen, sind aber nicht beschränkt auf Cystein, β,β -Dimethyl-Cystein (Penicillamin oder Pen), β,β -Tetramethylen-Cystein (Tmc), β,β -Pentamethylen-Cystein (Pmc), β -Mercaptopropionsäure (Mpr), β,β -Pentamethylen- β -Mercaptopropionsäure (Pmp), 2-Mercaptobenzol, 2-Mercaptoanilin und 2-Mercaptoprolin. Peptide, die derartige Reste enthalten, werden durch die folgenden repräsentativen Formeln veranschaulicht, in denen der unterstrichene Teil cyclisiert ist. N-Acetylgruppen sind durch N-Ac gekennzeichnet und C-terminale Amidgruppen sind durch -NH₂ dargestellt:

- i) N-Ac-Cys-His-Ala-Val-Cys-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8)
- ii) N-Ac-Cys-Ala-His-Ala-Val-Asp-Ile-Cys-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 10)
- iii) N-Ac-Cys-Ser-His-Ala-Val-Cys-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 12)
- iv) N-Ac-Cys-His-Ala-Val-Ser-Cys-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 14)
- v) N-Ac-Cys-Ala-His-Ala-Val-Asp-Cys-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 16)
- vi) N-Ac-Cys-Ser-His-Ala-Val-Ser-Ser-Cys-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 18)
- vii) N-Ac-Cys-His-Ala-Val-Ser-Cys-OH (SEQ.-ID-Nr. 14)
- viii) N-Ac-Cys-Ala-His-Ala-Val-Asp-Cys-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 16)
- ix) N-Ac-Cys-His-Ala-Val-Pen-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 28)
- x) N-Ac-Ile-Tmc-Tyr-Ser-His-Ala-Val-Ser-Cys-Glu-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 29)
- xi) N-Ac-Ile-Pmc-Tyr-Ser-His-Ala-Val-Ser-Ser-Cys-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 30)
- xii) Mpr-Tyr-Ser-His-Ala-Val-Ser-Ser-Cys-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 31)
- xiii) Pmp-Tyr-Ser-His-Ala-Val-Ser-Ser-Cys-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 32)
- xii)



xiii)



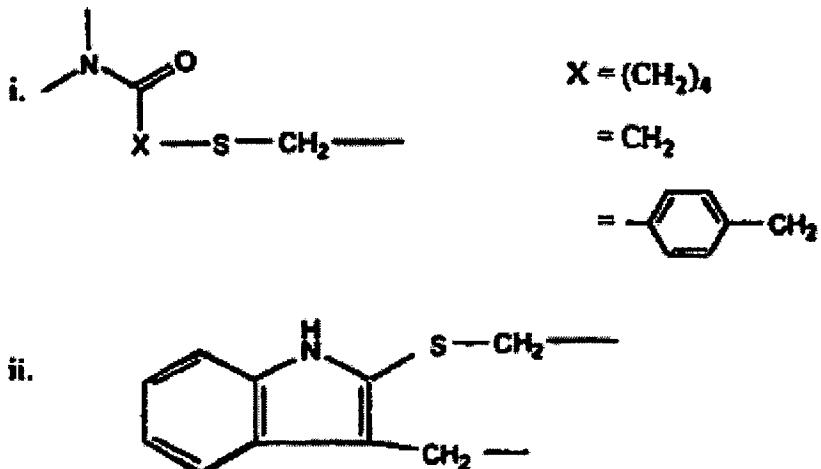
[0067] Einem Fachmann wird ohne Weiteres naheliegend sein, dass in jeder dieser repräsentativen Formeln statt einem oder beiden der angeführten Thiol-enthaltenden Reste jegliches der oben aufgeführten Thiol-enthaltenden Reste eingesetzt werden kann.

[0068] In einer anderen Ausführungsform kann die Cyclisierung durch die Bildung einer Amid-Bindung erreicht werden. Beispielsweise kann eine Peptidbindung zwischen terminalen funktionellen Gruppen (d. h. die Amino- und Carboxy-Termini eines linearen Peptids vor der Cyclisierung) gebildet werden. Zwei solcher zyklischen Peptide sind AHAVDI (SEQ.-ID-Nr. 44) und SHAVSS (SEQ.-ID-Nr. 45), mit oder ohne eine N-terminale Acetylgruppe und/oder ein C-terminales Amid. In einer anderen derartigen Ausführungsform umfasst das lineare Peptid eine D-Aminosäure (z. B. HAVsS). Alternativ kann die Cyclisierung durch eine Verknüpfung eines Terminus mit einer Restseitenkette oder unter Verwendung von zwei Seitenketten, wie bei KHAVD (SEQ.-ID-Nr. 20) oder KSHAVSSD (SEQ.-ID-Nr. 46), mit oder ohne eine N-terminale Acetylgruppe und/oder ein C-terminales Amid, durchgeführt werden. Reste, die in der Lage sind, eine Lactambindung zu bilden, umfassen Lysin, Ornithin (Orn), α -Aminoadipinsäure, m-Aminomethylbenzoësäure, α,β -Diaminopropionsäure, Glutamat oder Aspartat.

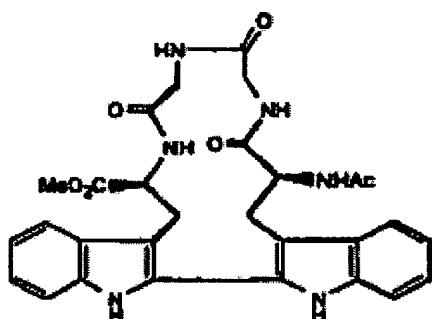
[0069] Verfahren zur Bildung von Amidbindungen sind in Fachkreisen gut bekannt und basieren auf anerkannten Prinzipien der chemischen Reaktivität. In einem derartigen Verfahren kann Carbodiimid-vermittelte Lactambindung durch Reaktion der Carbonsäure mit DCC, DIC, EDAC oder DCCI erreicht werden, was zur Bildung einer O-Acylurea führt, die sofort mit der freien Aminogruppe zur Reaktion gebracht werden kann, um die Cyclisation zu beenden. Die Bildung der inaktiven N-Acylurea, die aus der O \rightarrow N-Migration resultiert, kann verhindert werden durch eine Umwandlung der O-Acylurea in ein aktives Ester durch Reaktion mit einer N-Hydroxy-Bindung wie 1-Hydroxybenzotriazol, 1-Hydroxysuccinimid, 1-Hydroxynorbornen Carboxamid oder Äthyl-2-Hydroximin-2-Cyanoacetat. Zusätzlich zur Minimierung der O \rightarrow N-Migration können diese Zusatzstoffe auch als Katalysatoren während der Cyclisierung dienen und die Verringerung der Racemization unterstützen. Alternativ kann Cyclisierung unter Verwendung der Azid-Methode, in der ein reaktives Azid-Zwischenprodukt über ein Hydrazid aus einem Alkylester generiert wird, durchgeführt werden. Die Hydrazinolyse des terminalen Esters erfordert die Verwendung einer t-Butyl-Gruppe für den Schutz der Seitenketten-Carboxylfunktionen in der Acylierungskomponente. Diese Einschränkung kann überwunden werden durch die Verwendung von Diq-phenylphosphoryl-Säure (DPPA), welche ein Azid direkt nach der Reaktion mit einer Carboxylgruppe versieht. Die langsame Reaktivität von Aziden und die Bildung von Isocyanaten aufgrund ihrer Disproportionierung schränken die Zweckmäßigkeit dieses Verfahrens ein. Das gemischte Anhydridverfahren zur Lactambildung ist aufgrund der einfachen Beseitigung von Reaktionsnebenprodukten weit verbreitet. Das Anhydrid wird nach der Reaktion des Carboxylat-Anions mit einem Alkyl-Chloroformiat oder Pivaloylchlorid gebildet. Der Angriff der Amino-Komponente wird dann durch den Elektronendonator-Effekt der Alkoxygruppe oder die sterische Größe der Pivaloylchlorid-t-Butyl-Gruppe, die den Angriff auf die falsche Carbonyl-Gruppe abschirmt, zum Carbonylkohlenstoff der Acylierungs-Komponente geführt. Gemischte Anhydride mit Phosphorsäurederivaten wurden ebenfalls erfolgreich eingesetzt. Alternativ kann die Cyclisierung unter Verwendung von aktiviertem Ester durchgeführt werden. Die Anwesenheit von Elektronenentzugs-Substituenten auf dem Alkoxykohlenstoff von Estern erhöht deren Suszeptibilität für Aminolyse. Die hohe Reaktivität von Ester von p-Nitrophenol, N-Hydroxyverbindungen und polyhalogen-Phenolen hat diese „aktiven Ester“ für die Synthese von Amidbindungen nützlich gemacht. In den vergangenen Jahren haben sich Benzotriazolyloxy-tris-(Dimethylamino) Phosphoni-

um-Hexafluorophosphat (BOP) und seine gleichartigen Vertreter als vorteilhafte Kupplungsreagenzien erwiesen. Ihre Leistung ist im Allgemeinen besser, als die bewährten Reaktionen der Carbodiimid-Amidbildung.

[0070] In einer weiteren Ausführungsform kann eine Thioether-Bindung zwischen der Seitenkette eines Thiol-enthaltenden Rests und einer entsprechend derivatisierten α -Aminosäure gebildet werden. Als Beispiel kann eine Lysin-Seitenkette durch die Carbodimid-Kupplungsmethode (DCC, EDAC) an Bromessigsäure gekuppelt werden und dann mit der Seitenkette von einem der oben erwähnten Thiol-enthaltenden Reste in Reaktion treten, um eine Thioether-Bindung zu bilden. Um Dithioether zu bilden, kann jedes zwei-Seitenketten-enthaltendes Thiol mit Dibromoethan und Diisopropylamin in DMF in Reaktion gebracht werden. Beispiele für Thiol-enthaltende Bindungen sind unten dargestellt:



[0071] Die Cyclisierung kann auch durch Verwendung von δ_1, δ_1 -Ditryptophan (d. h. Ac-Trp-Gly-Gly-Trp-OMe) (SEQ.-ID-Nr. 39) erreicht werden, wie unten dargestellt:



[0072] Repräsentative Strukturen zyklischer Peptide werden in **Fig. 3** geliefert. In **Fig. 3** sind bestimmte zyklische Peptide, die in der Lage zur Regulation von Zelladhäsion sind (links gezeigt) ähnlichen inaktiven Strukturen (rechts) gegenübergestellt. Die hier angeführten Strukturen und Formeln sind ausschließlich zu Illustrationszwecken geliefert und erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit der hier beschriebenen zyklischen Peptide.

BEWERTUNG DER AKTIVITÄT DES ZYKLISCHEN PEPTIDS

[0073] Wie oben erwähnt, sind die hier beschriebenen zyklischen Peptide in der Lage, Cadherin-vermittelte Zelladhäsion zu regulieren (d. h. zu verbessern oder zu hemmen). Die Fähigkeit eines Peptids zur Regulation von Zelladhäsion kann im Allgemeinen *in vitro* beurteilt werden durch die Untersuchung der Wirkung des zyklischen Peptids auf eins oder mehr von: (1) Neuritenaussprössung, (2) Adhäsion zwischen Endothelzellen (3) Adhäsion zwischen Epithelzellen (z. B. normale Rattennierenzellen und/oder menschliche Haut) und/oder (4) Adhäsion zwischen Krebszellen. Zum Zweck derartiger Untersuchungen werden Peptide, die nicht an ein Trägermaterial oder eine andere Verbindung gebunden sind (wie unten beschrieben), allgemein beurteilt. Im Allgemeinen wird angenommen, dass ein zyklisches Peptid ein Regulator für Zelladhäsion ist, wenn in einer oder mehreren dieser repräsentativen Untersuchungen der Kontakt der Testzellen mit dem Peptid zu einer erkennbaren Störung der Zelladhäsion führt.

[0074] In einer repräsentativen Untersuchung zur Neuritenaussprössung können Neuronen auf einem einschichtigen Zellrasen von N-Cadherin-exprimierenden Zellen (z. B. 3T3) kultiviert werden. Auf derartigen Zel-

len gewachsene Neuronen bilden (unter geeigneten Bedingungen und innerhalb eines ausreichenden Zeitraums) längere Neuriten aus, als Neuronen, die auf nicht N-Cadherin-exprimierenden Zellen kultiviert wurden. Ein zyklisches Peptid, das Cadherin-vermittelte Zelladhäsion reguliert, kann eine derartige Neuritenaussprossung hemmen. Geeignete Wachstumsbedingungen für Kleinhirn-Neuronen beinhalten ein Wachstum von Ca. 18 Stunden in einem SATO/2% FCS-Medium. Unter derartigen Bedingungen ist das Vorliegen von 500 µg/mL des zyklischen Peptids ausreichend, um die Adhäsion von Nervenzellen zu stören, was an einer Reduktion der mittleren Neuritenlänge um mindestens 50% im Verhältnis zur Länge bei Nichtvorliegen des zyklischen Peptids oder bei Vorliegen eines negativen Kontrollpeptids gemessen werden kann.

[0075] In einem repräsentativen Versuch zur Zelladhäsion führt der Zusatz eines zyklischen Peptids zu Zellen, die ein Cadherin exprimieren, zur Störung der Zelladhäsion. Eine hier verwendete „Cadherin-exprimierende Zelle“ kann irgendein Zelltyp sein, der Cadherin zu einem nachweisbaren Niveau auf der Zelloberfläche exprimiert, wobei Standardverfahren wie immunocytochemische Tests (z. B. Blaschuk und Farookhim, Dev. Biol. 136: 564–567, 1989) angewandt werden. Cadherin-exprimierende Zellen umfassen Endothelzellen (z. B. Endothelzellen der Lungenarterie aus dem Rind), Epithel- und/oder Krebszellen (z. B. die menschliche Ovarialkarzinom-Zelllinie SKOV3 (ATCC #HTB-77)). Zum Beispiel können solche Zellen unter Standardbedingungen, welche die Zelladhäsion bei Vorliegen und Nichtvorliegen des zyklischen Peptids erlauben, plattiert werden. (z. B. 500 µg/mL). Eine Störung der Zelladhäsion kann innerhalb von 24 Stunden durch Beobachtung des Zurückziehens der Zellen voneinander visuell ermittelt werden.

[0076] In einem anderen derartigen Versuch kann die Wirkung eines zyklischen Peptids auf eine normale Ratteniere (NRK-52E; ATCC #1571-CRL) evaluiert werden. Bei Nichtvorliegen des zyklischen Peptids bilden NRK-Zellen charakteristische eng adhärente einschichtige Zellrasen mit Pflastersteinmorphologie, in der die Zellen eine polygonale Form zeigen. NRK-Zellen, die mit einem zyklischen Peptid behandelt werden, nehmen typischerweise innerhalb von 48 Stunden Behandlungszeit mit 0,1 mg/mL des Peptids eine nicht-polygonale und spitz zulaufende Morphologie an (d. h. die Form eines Fibroblasten). In konfluenten Kulturen derartiger Zellen erscheinen Zwischenräume. Weiterhin induziert 1 mg/mL eines derartigen Peptids eine sofort sichtbare Reduktion der Zelloberflächenfärbung von E-Cadherin von mindestens 75% innerhalb von 48 Stunden, wie mit der Immunfluoreszenz-Mikroskopie (Laird et al., J. Cell Biol. 131: 1193–1203, 1995) festgestellt wurde.

[0077] Ein dritter Versuch zur Zelladhäsion beinhaltet die Evaluation der Wirkung eines zyklischen Peptids auf die Durchlässigkeit von adhärenten Epithel- und/oder Endothel-Zellschichten. Beispielsweise kann die Durchlässigkeitswirkung auf der menschlichen Haut evaluiert werden. Eine derartige Haut kann von einer natürlichen Quelle stammen oder synthetisch sein. Abdominalhaut vom Menschen für die Verwendung in derartigen Versuchen kann im Allgemeinen durch Autopsie innerhalb von 24 Stunden nach dem Tod von Menschen erhalten werden. Zusammengefasst können ein zyklisches Peptid und ein Testmarker (z. B. der Fluoreszenzmarker Oregon Green™ und Rhodamine Green™ Dextran) in einem sterilen Puffer aufgelöst und die Fähigkeit des Markers, durch die Haut und in eine Rezeptorflüssigkeit einzudringen, mit Hilfe eines Franz-Zellapparates gemessen werden (Franz, Curr. Prob. Dermatol. 7: 58–68, 1978; Franz, J. Invest. Dermatol. 64: 190–195, 1975). Im Allgemeinen führt ein zyklisches Peptid, dass die Durchlässigkeit der menschlichen Haut fördert, nach 6–48 Stunden bei Vorliegen von 500 µg/mL des Peptids zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Menge an Markern im Rezeptorkompartiment.

MODIFIKATION UND FORMULIERUNGEN DES ZYKLISCHEN PEPTIDS

[0078] Ein hier beschriebenes zyklisches Peptid kann, muss aber nicht mit einem oder mehreren zusätzlichen Molekülen verbunden sein. Beispielsweise können zwei oder mehrere zyklische Peptide unter Verwendung gut bekannter Techniken miteinander verbunden werden, wie weiter unten diskutiert wird. In bestimmten Ausführungsformen können die verbundenen zyklischen Peptide HAV-Sequenzen enthalten und durch einen Linker, welcher eine Peptid- und/oder Nicht-Peptidsequenz sein kann, miteinander verbunden werden. Vorzugsweise erzeugt der Linker einen Separationsabstand von 50–200 µ zwischen den Erkennungsstellen. Ein Linker, der für derartige Zwecke verwendet werden kann, ist $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$ oder Derivate davon, wobei n zwischen 1–10 beträgt. Andere Linker, die eingesetzt werden können, werden dem Fachmann naheliegend sein. Auf diese Weise verbundene zyklische Peptide können im Allgemeinen in Verfahren verwendet werden, in denen eine Verbesserung der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion erwünscht ist.

[0079] Alternativ kann ein wie hier beschriebenes zyklisches Peptid an ein Molekül mit einer Zelladhäsions-erkennungssequenz für ein anderes Adhäsionsmolekül (einschließlich, aber nicht beschränkt auf andere CAMs), vorzugsweise durch einen Linker getrennt, gebunden werden. Der Begriff „Adhäsionsmolekül“ bezieht sich hier auf jedes Molekül, das Zelladhäsion auf der Oberfläche der Zelle über einen Rezeptor vermittelt. Ad-

häionsmoleküle umfassen Zelladhäsionsproteine (wie Integrine und Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie wie N-CAM als auch extrazelluläres Matrixprotein) wie Laminin, Fibronektin, Collagen, Vitronekton und Tenascin. Bevorzugte Zelladhäsionserkennungssequenzen für die Bindung an ein zyklisches Peptid umfassen Arg-Gly-Asp, das durch Integrine gebunden, und Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (SEQ.-ID-Nr. 47), das durch Laminine gebunden wird. Zykliche Peptide, die an derartige Moleküle (die selbst zyklisch sind können) gebunden sind, können in Verfahren verwendet werden, in denen es erwünscht ist, durch multiple Adhäsionsmoleküle vermittelte Zelladhäsion zu stören.

[0080] Weiterhin kann es für einige weiter unten diskutierte Anwendungen vorteilhaft sein, ein oder mehrere zyklische Peptide an ein Gel oder ein festes Trägermaterial, derartig wie eine Polymermatrix (die als Membran oder Mikrostruktur, wie z. B. ein ultradünner Film formuliert sein kann), eine Behälteroberfläche (z. B. die Oberfläche einer Gewebekulturplatte oder die innere Oberfläche eines Bioreaktors) oder ein Kugelchen (bead) oder ein anderes Teilchen, das aus einer Auswahl an Materialien einschließlich Glas, Plastik oder Keramik hergestellt sein kann, zu binden. Für bestimmte Anwendungen werden biologisch abbaubare Trägermaterialien bevorzugt, derartig wie Cellulose und Derivate davon, Collagen oder eines aus der Auswahl an Polyester (z. B. aus Hydroxysäuren und/oder Lactonen abgeleitete), Spinnenseide oder Fäden (siehe U.S. Patent-Nr. 5.245.012). Geeignete Verfahren zur Bindung eines zyklischen Peptids an ein Trägermaterial hängen von der Zusammensetzung des Trägers und der intendierten Verwendung ab und werden dem Fachmann ohne weiteres naheliegend sein. Die Bindung kann im Allgemeinen durch eine nichtkovalente Assoziation, derartig wie Adsorption oder Affinität oder vorzugsweise über eine kovalente Bindung erreicht werden (die eine direkte Bindung zwischen einem zyklischen Peptid und funktionellen Gruppen am Träger oder eine Bindung über ein quervernetzendes Agens sein kann). Die Bindung eines zyklischen Peptids durch Adsorption kann durch Kontakt in einem geeigneten Puffer mit einem festen Träger in einem angemessenen Zeitraum erreicht werden. Die Kontaktzeit hängt von der Temperatur ab, beträgt aber im Allgemeinen zwischen ungefähr 5 Sekunden und 1 Tag und typischerweise zwischen ca. 10 Sekunden und 1 Stunde.

[0081] Die kovalente Bindung eines zyklischen Peptids an einen festen Träger kann im Allgemeinen durch eine erste Reaktion des Trägermaterials mit einem Linker oder einem bifunktionalen Reagens, das sowohl mit dem Träger als auch mit einer funktionellen Gruppe, wie einer Hydroxyl- oder Aminogruppe, reagiert, auf dem zyklischen Peptid erreicht werden. Ein zyklisches Peptid kann beispielsweise an einen geeigneten polymeren Träger oder eine Beschichtung gebunden sein unter Verwendung von Benzoquinon, durch Kondensation einer Aldehydgruppe auf dem Träger mit einem Amin und einem aktiven Hydrogen auf dem zyklischen Peptid oder durch Kondensation einer Aminogruppe auf dem Träger mit einer Carbonsäure auf dem zyklischen Peptid. Ein bevorzugtes Verfahren für das Erzeugen einer Bindung wird über Aminogruppen unter Verwendung von Glutaraldehyd erreicht. Ein zyklisches Peptid kann mit Cellulose über Esterbindungen verbunden sein. In ähnlicher Weise können Amidbindungen für andere Trägermaterialien, wie Hämocyanin der Schlüsselloch-Napfschnecke, geeignet sein.

[0082] Obwohl sich die hier beschriebenen zyklischen Peptide vorzugsweise an spezifischen Geweben oder Zellen binden und somit ausreichend sein können, eine gewünschte Stelle *in vivo* anzuzielen, kann es für bestimmte Anwendungen von Vorteil sein, einen zusätzlichen Targeting-Agens einzubeziehen. Dementsprechend kann ein Targeting-Agens auch oder alternativ mit einem zyklischen Peptid verbunden werden, um das Anzielen auf ein oder mehrere spezifische Gewebe zu erleichtern. Ein hier verwendeter „Targeting-Agens“ beinhaltet irgendeine Substanz (derartig wie eine Verbindung oder eine Zelle), die, wenn sie mit einem Peptid verbunden wird, den Transport des Peptids zu einem Zielgewebe verbessert und auf diese Weise die vor Ort befindende Konzentration des zyklischen Peptids erhöht. Targeting-Agenzien umfassen Antikörper oder Fragmente von diesen, Rezeptoren, Liganden und andere Moleküle, die Zellen im Zielgewebe oder in der Nähe davon binden. Bekannte Targeting-Agenzien umfassen Hormone, Antikörper gegen Zelloberflächenantigen, Lectine, Adhäsionsmoleküle, Tumorzelloberflächen-bindende Liganden, Steroide, Cholesterin, Lymphokine, fibrinolytische Enzyme und solche Arzneimittel und Proteine, die sich an einer gewünschten Zielstelle binden. Zu den vielen monoklonalen Antikörpern, die als Targeting-Agenzien dienen können, zählen Anti-TAC oder andere Interleukin-2-Rezeptor-Antikörper; 9.2.27 und NR-ML-05, reaktiv mit dem 250-Kilodalton-human-Melanom-assozierten Proteoglycan; und NR-LU-10, reaktiv mit einem Pankarzinom-Glykoprotein. Der in der vorliegenden Erfindung eingesetzte Antikörper kann ein intaktes (ganzes) Molekül, ein Fragment davon oder ein funktionelles Equivalent davon sein. Beispiele für Antikörperfragmente sind F(ab')2, -Fab', Fab und F[v]-Fragmente, die durch konventionelle Verfahren oder durch genetische oder Proteintechnologie hergestellt werden können. Die Verbindung kann über jede geeignete kovalente Bindung unter in Fachkreisen gut bekannten Standard-Verfahren hergestellt werden. Eine Derartige Bindung ist am Allgemeinen kovalent und kann z. B. durch direkte Kondensation oder andere Reaktionen durch bi- oder multifunktionale Linker erreicht werden.

[0083] In bestimmten Ausführungsformen kann es nützlich sein, auch oder alternativ ein Arzneimittel an ein zyklisches Peptid zu binden. Der Begriff „Arzneimittel“ bezieht sich hier auf alle bioaktiven Wirkstoffe, die zur Verabreichung an einen Säuger vorgesehen sind, um eine Krankheit oder ein anderes unerwünschtes Leiden zu verhindern oder zu behandeln. Arzneimittel umfassen Hormone, Wachstumsfaktoren, Proteine, Peptide und andere Verbindungen. Die Verwendung bestimmter spezifischer Arzneimittel im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird im Folgenden diskutiert.

[0084] In bestimmten Aspekten der vorliegenden Erfindung kann/können ein oder mehrere der hier beschriebenen zyklischen Peptide in einer pharmazeutischen Verbindung auftreten. Eine pharmazeutische Verbindung weist ein oder mehrere zyklische Peptide in Kombination mit einem oder mehreren pharmazeutisch oder physiologisch verträglichen Träger(n), Verdünnungsmittel(n) oder Trägerstoff(en) auf. Solche Verbindungen können Puffer (z. B. neutralgepufferte Salzlösung oder phosphatgepufferte Salzlösung), Kohlenhydrate (z. B. Glucose, Mannose, Sukrose oder Dextran), Mannitol, Proteine, Polypeptide oder Aminosäuren wie Glycerin, Antioxidanten, Chelatbildner wie EDTA oder Glutathion, Adjuvans (z. B. Aluminiumhydroxid) und/oder Konservierungsmittel aufweisen. In noch anderen Ausführungsformen können die Verbindungen der vorliegenden Erfindung als ein Lyophilisat formuliert sein. Ein zyklisches Peptid (allein oder in Kombination mit einem Targeting-Agens und/oder Arzneimittel) kann, aber muss nicht, unter Anwendung einer gut bekannten Technologie in Liposomen verkapselt werden. Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können für jede geeignete Weise der Verabreichung, einschließlich z. B. topisch, oral, nasal, intravenös, intrakraniel, intraperitoneal, subkutan oder intramuskulär formuliert werden.

[0085] Eine pharmazeutische Verbindung kann auch, oder alternativ, ein oder mehrere Arzneimittel beinhalten, welche(s) mit einem zyklischen Peptid verbunden oder frei in der Verbindung vorhanden sein kann/können. Praktisch jedes Arzneimittel kann in Kombination mit einem wie hier beschriebenen zyklischen Peptid für eine Vielfalt von Zwecken, die unten beschrieben sind, verabreicht werden. Beispiele für Arzneimittelarten, die mit einem zyklischen Peptid verabreicht werden können, umfassen Analgetika, Anästhetika, antianginale Arzneimittel, Antimykotika, Antibiotika, Antikrebsmittel (z. B. Taxol oder Mitomycin C), entzündungshemmende Arzneimittel (z. B. Ibuprofen und Indomethacin), Anthelminthika, Antidepressiva, Antidote, Antiemetika, Antihistamine, Antihypertensiva, Antimalariamittel, Antimikrotubula-Wirkstoffe (z. B. Colchicin oder Vinca-Alkalioide), Antimigräne-Wirkstoffe, Antimikrobiale, Antipsychotika, Antipyretika, Antiseptika, antisignalisierende Wirkstoffe (z. B. Protein-Kinase-C-Inhibitoren oder Inhibitoren intrazellulärer Kalziummobilisierung), Antiarthritika, Antithrombin-Wirkstoffe, Antituberkulotika, Antitussiva, Antivirale, Appetitzügler, herzwirksame Arzneimittel, Arzneimittel gegen chemische Abhängigkeiten, Kathartika, chemotherapeutische Wirkstoffe, Koronarmittel, zerebrale oder periphere Vasodilatoren, kontrazeptive Wirkstoffe, Depressiva, Diuretika, Expektorantia, Wachstumsfaktoren, Hormonwirkstoffe, Hypnotika, Immunosuppressiva, narkotische Antagonisten, Parasympathomimetika, Sedativa, Stimulanten, Sympathomimetika, Toxine (z. B. Choleratoxin), Tranquillizer und urinäre Antiinfektiva.

[0086] Für Bildgebungsziele kann jedes aus der Auswahl an diagnostischen Wirkstoffen in eine pharmazeutische Verbindung integriert werden, unabhängig davon, ob es an ein zyklisches Peptid gebunden oder frei in der Verbindung ist. Diagnostische Wirkstoffe umfassen jede Substanz, die verabreicht wird, um eine physiologische Funktion in einem Patienten zu beleuchten, während andere physiologische Funktionen im Allgemeinen unbeeinflusst bleiben. Diagnostische Wirkstoffe beinhalten Metalle, radioaktive Isotope und Radioopaque-Wirkstoffe (z. B. Gallium, Technetium, Indium, Strontium, Jod, Barium, Brom und phosphorhaltige Wirkstoffe), strahlendurchlässige Wirkstoffe, Kontrastmittel, Farbstoffe (z. B. fluoreszierende Farbstoffe und Chromophore) und Enzyme, die eine kolorimetrische oder fluorometrische Reaktion katalysieren. Im Allgemeinen können derartige Wirkstoffe unter Verwendung einer Auswahl der oben beschriebenen Verfahren gebunden werden und in jeder Orientierung auftreten.

[0087] Die hier beschriebenen Verbindungen können als Teil einer hinhaltenden Freigabeformulierung verabreicht werden (d. h. eine Formulierung als Kapsel oder Schwamm, die eine langsame Freigabe des zyklischen Peptids nach der Verabreichung bewirken). Derartige Zubereitungen können mit gut bekannten Verfahren hergestellt und z. B. durch orale, rektale oder subkutane Implantation oder durch Implantation an die gewünschte Zielstelle verabreicht werden. Formulierungen für die hinhaltende Freigabe können ein zyklisches Peptid enthalten, das in einer Träger-Matrix verteilt und/oder in einem von einer geschwindigkeitskontrollierenden Kontrollmembran umgebenen Reservoir enthalten ist (siehe dazu z. B. Europäische Patentanmeldung 710.491 A). Träger für die Verwendung in derartigen Formulierungen sind biokompatibel und können auch biologisch abbaubar sein; vorzugsweise liefert die Formulierung ein relativ konstantes Freigabeniveau an zyklischen Peptiden. Die Menge des zyklischen Peptids, die in einer hinhaltenden Freigabeformulierung enthalten ist, ist von der Stelle der Implantation, der Geschwindigkeit und der erwarteten Dauer der Freigabe und der Art der zu

behandelnden oder zu verhindernden Krankheit abhängig.

[0088] Pharmazeutische Verbindungen der vorliegenden Erfindung können in einer für die zu behandelnde (oder vorzubeugende) Krankheit geeigneten Weise verabreicht werden. Geeignete Dosierungen und eine geeignete Verabreichungsdauer und -häufigkeit werden durch Faktoren, wie dem Leiden des Patienten, der Art und der Schwere der Krankheit des Patienten und dem Verabreichungsverfahren bestimmt. Im Allgemeinen wird in einer angemessenen Dosierungs- und Behandlungsweise für eine ausreichende Menge des/der zyklischen Peptids(e) gesorgt, um einen therapeutischen und/oder prophylaktischen Nutzen zu liefern. In besonders bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung kann ein wie hier beschriebenes zyklisches Peptid oder eine pharmazeutische Verbindung in der Verabreichungsdosierung von 0,001 bis 50 mg/kg Körpergewicht reichen, vorzugsweise von 0,1 bis 20 mg/kg, bei einer Einnahmeverordnung von einfachen oder mehrfachen Dosierungen täglich. Für die topische Verabreichung weist eine Creme typischerweise eine Menge des zyklischen Peptids zwischen 0,00001% und 1%, vorzugsweise zwischen 0,0001% und 0,002% auf. Flüssige Verbindungen enthalten typischerweise eine Menge des zyklischen Peptids zwischen 10 ng/ml und 5 mg/ml, vorzugsweise zwischen 10 µg und 2 mg/mL. Geeignete Dosierungen können im Allgemeinen durch experimentelle Modelle und/oder klinische Versuche ermittelt werden. Im Allgemeinen wird die Verwendung der minimalen Dosierung, die ausreichend für eine effektive Therapie ist, bevorzugt. Patienten können im Allgemeinen auf therapeutische Wirksamkeit beobachtet werden, wobei geeignete Tests für die zu behandelnde oder zu verhindernende Krankheit angewandt werden, die dem Fachmann bekannt sind.

ANWENDUNGSVERFAHREN DES ZYKLISCHEN PEPTIDS

[0089] Im Allgemeinen können die hier beschriebenen zyklischen Peptide und Verbindungen für die Regulation der Adhäsion von Cadherin-exprimierenden Zellen (d. h. Zellen, die ein oder mehrere von E-Cadherin, N-Cadherin, P-Cadherin, R-Cadherin und/oder andere Cadherin(en), die die HAV-Sequenz enthält/enthalten, einschließlich bisher unentdeckte Cadherine, exprimieren) in vitro und/oder in vivo verwendet werden. Im Allgemeinen weisen die hier beschriebenen Verfahren den Vorteil gegenüber früheren Techniken auf, dass sie die Passage von Molekülen, die groß und/oder durch die Barrieren von Cadherin-exprimierenden Zellen geladen sind, ermöglichen. Wie unten ausführlicher diskutiert, können wie hier beschriebene zyklische Peptide verwendet werden, um auch Zelladhäsion in einer Vielzahl von anderen Zusammenhängen zu stören oder zu verbessern. In den hier beschriebenen Verfahren kann/können ein oder mehrere zyklische Peptide im Allgemeinen allein oder in einer pharmazeutischen Verbindung verabreicht werden. In jedem hier beschriebenen spezifischen Verfahren, kann, wie oben festgestellt, ein Targeting-Agens eingesetzt werden, um die Konzentration des zyklischen Peptids an der Zielstelle vor Ort zu erhöhen.

[0090] In einem derartigen Aspekt liefert die vorliegende Erfindung Peptide zur Reduzierung unerwünschter zellulärer Adhäsion durch die Verabreichung eines wie hier beschriebenen zyklischen Peptids. Unerwünschte zelluläre Adhäsion kann auftreten zwischen Tumorzellen, zwischen Tumorzellen und normalen Zellen oder zwischen normalen Zellen im Ergebnis von Chirurgie, Verletzung, Chemotherapie, Krankheit, Entzündung oder einer anderen Krankheit, die die Zelllebensfähigkeit oder -funktion gefährden. Bevorzugte zyklische Peptide für die Verwendung in derartigen Verfahren umfassen N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8), N-Ac-CHAVSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 14), N-Ac-CAHAVDC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 16), N-Ac-CSHAVSSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 18) und N-Ac-KHAVD-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 20). Im Allgemeinen wird die topische Verabreichung des/der zyklischen Peptids(e) bevorzugt, aber es können auch andere Mittel eingesetzt werden. Vorzugsweise weist eine flüssige Verbindung für die topische Verabreichung (zum Beispiel physiologisches Salz aufweisend) eine wie oben beschriebene Menge des zyklischen Peptids und noch bevorzugter eine Menge zwischen 10 µg/mL und 1 mg/mL auf. Cremes können im Allgemeinen in der oben beschriebenen Weise formuliert werden. Die topische Verabreichung im chirurgischen Bereich kann einmal am Ende des chirurgischen Eingriffs durch Wässerung der Wunde oder als intermittierende oder kontinuierliche Wässerung unter Verwendung postoperativer Wunddrainagen oder durch speziell gelegte Drainagen an einer entzündeten, verletzten oder kranken Stelle in Fällen, in denen ein chirurgischer Eingriff nicht ausgeführt werden muss, erfolgen. Alternativ kann eine parenterale oder transkutane Verabreichung zum Erreichen ähnlicher Wirkungen eingesetzt werden.

[0091] In einem anderen Aspekt werden Verfahren für die Verbesserung des Arzneimitteltransports durch die Haut eines Säugers geliefert. Die transdermale Zuführung von Arzneimitteln ist ein zweckdienliches und nichtinvasives Verfahren, das eingesetzt werden kann, um einen relativ konstanten Spiegel eines Arzneimittels im Blut zu erreichen. Um den Arzneimitteltransport über die Haut zu unterstützen, ist es im Allgemeinen notwendig, die Adhäsion zwischen den Epithelzellen (Keratinozyten) und den Endothelzellen in der Mikrovaskulatur zu stören. Beim Einsatz gegenwärtig verfügbarer Verfahren können nur kleine, ungeladene Moleküle in vivo durch die Haut transportiert werden. Die hier beschriebenen Verfahren sind diesem Grad an Beschrän-

kung nicht unterworfen. Dementsprechend kann eine breite Vielfalt an Arzneimitteln für die systemische oder topische Verabreichung über die epithelialen und endothelialen Zellschichten der Haut transportiert werden. Derartige Arzneimittel können zu Melanomen transportiert werden oder in den Blutstrom des Säugers zum weiteren Transport zu anderen Stellen innerhalb des Körpers gelangen.

[0092] Um den Arzneimitteltransport durch die Haut zu verbessern, werden ein hier beschriebenes zyklisches Peptid und ein Arzneimittel mit der Hautoberfläche in Verbindung gebracht. Bevorzugte zyklische Peptide für den Einsatz in derartigen Verfahren weisen eine wie oben beschriebene N-Acetylgruppe, wie N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) auf. Der Kontakt kann durch direkte Applikation des zyklischen Peptids, das im Allgemeinen in einer Verbindung als Creme oder Gel formuliert wird, oder unter Verwendung eines aus der Vielfalt von Hautkontakt-Vorrichtungen zur transdermalen Applikation hergestellt werden (wie beschriebenen in der Europäischen Patentanmeldung Nr. 566.816 A; U.S. Patent-Nr. 5.613.958; U.S. Patent-Nr. 5.505.956). Ein Hautpflaster liefert ein zweckdienliches Verabreichungsverfahren (insbesondere bei Zubereitungen mit langsamer Freigabe). Solche Pflaster können einen Speicher für zyklische Peptide und Arzneimittel, welcher von der Haut, durch die das Arzneimittel diffundiert, durch eine Membran abgetrennt ist, enthalten. Bei anderen Pflasterformen können das zyklische Peptid und das Arzneimittel in einem Polymer oder einer Adhäsionsmatrix, welche(s) dann in direkten Kontakt mit der Haut des Patienten gebracht wird, gelöst oder dorthin suspendiert werden. Das zyklische Peptid und das Arzneimittel können dann von der Matrix in die Haut diffundieren. In der gleichen Verbindung oder in dem Hautpflaster kann/können (ein) zyklische(s) Peptid(e) und (ein) Arzneimittel enthalten sein, oder sie können auch davon separat verabreicht werden, obwohl die zeit- und ortgleiche Verabreichung bevorzugt wird. Im Allgemeinen variiert die Menge des über die Haut verabreichten zyklischen Peptids in Abhängigkeit von der Art der behandelten oder vorgebeugten Erkrankung, kann jedoch im oben beschriebenen Bereich variieren. Solche Niveaus können durch geeignete Abstimmung an die verwendete Vorrichtung oder durch die Anwendung einer Creme mit der oben beschriebenen Formulierung erreicht werden. Der Transfer des Arzneimittels durch die Haut und zum Zielgewebe kann auf der Grundlage von in vivo-Untersuchungen, beispielsweise unter Verwendung eines Franz-Zellapparates, vorhergesagt werden und durch geeignete Mittel, die dem Fachmann naheliegend sind, in vivo evaluiert werden. Beispielsweise liefert die Beobachtung des Serumniveaus des verabreichten Arzneimittels über einen Zeitraum eine einfache Bestimmungsmöglichkeit über den Arzneimitteltransfer durch die Haut.

[0093] Der hier beschriebene transdermale Arzneimitteltransport ist besonders nützlich in Situationen, in denen eine konstante Rate an Arzneimitteltransport wünschenswert ist, um schwankende Arzneimittelspiegel im Blut zu vermeiden. Morphin ist beispielsweise ein Analgetikum, das üblicherweise sofort nach einem chirurgischen Eingriff verwendet wird. Wird es intermittierend in einer parentalen Form verabreicht (intramuskulär, intravenös), fühlt sich der Patient gewöhnlich während der ersten Stunde schläfrig, während der nächsten 2 Stunden wohl und hat in der letzten Stunde Schmerzen, weil der Blutspiegel nach der Injektion schnell ansteigt und vor Ablauf des 4-Stunden-Intervalls, das bis zur erneuten Injektion vorgesehen ist, unter das gewünschte Niveau sinkt. Die hier beschriebene transdermale Verabreichung erlaubt die Beibehaltung konstanter Spiegel über lange Zeiträume (z. B. Tage), was gleichzeitig eine geeignete Schmerzkontrolle sowie geistige Wachheit erlaubt. Insulin liefert ein weiteres derartiges Beispiel. Viele Diabetes-Patienten müssen einen konstanten Basisspiegel an Insulin, der sich von dem zu den Mahlzeiten notwendigen Spiegel unterscheidet, beibehalten. Der Basisspiegel kann durch die hier beschriebene transdermale Verabreichung von Insulin aufrechterhalten werden. Auch Antibiotika können in konstanten Raten verabreicht werden, wodurch ein konstanter bakterizider Blutspiegel beibehalten wird, während hohe Spiegel vermieden werden, die oft für die Toxizität verantwortlich sind (z. B. Gentamicin, bei dem der Spiegel typischerweise zu hoch ist, was zu Nierengiftigkeit führt).

[0094] Der Arzneimitteltransport nach den Verfahren der vorliegenden Offenbarung liefert auch ein zweckdienliches Verfahren für die Arzneimittelverabreichung. Beispielsweise ist es häufig aufgrund der Schwierigkeit im Zusammenhang mit dem Finden von Venen von akzeptablem Durchmesser für das Legen von Kathetern besonders schwierig, Neugeborenen und Kindern parenterale Arzneimittel zu verabreichen. Andererseits haben Neugeborene und Kleinkinder oft eine relativ große Hautoberfläche im Vergleich zu Erwachsenen. Der transdermale Arzneimitteltransport erlaubt einen einfacheren Umgang mit solchen Patienten und ermöglicht die Durchführung von bestimmten Behandlungen zu Hause, die heute nur in Krankenhäusern geleistet werden können. Weitere Patienten, die typischerweise ähnliche Schwierigkeiten mit venöser Katheterisierung haben, sind Patienten, die mit Chemotherapie behandelt werden oder Patienten mit Dialyse. Weiterhin ist die transdermale Verabreichung zweckdienlicher für Patienten, die in einer längeren Therapie behandelt werden, als die parenterale Verabreichung.

[0095] Die hier beschriebene transdermale Verabreichung erlaubt auch die Vermeidung des Gastrointestinaltrakts in Situationen, in denen die parenterale Verwendung unpraktisch wäre. Zum Beispiel gibt es einen zu-

nehmenden Bedarf an Verfahren, die für die Verabreichung von therapeutischen kleinen Peptiden und Proteinen, die typischerweise im Gastrointestinaltrakt aufgeschlossen werden, geeignet sind. Die hier beschriebenen Verfahren ermöglichen die Verabreichung solcher Verbindungen und die einfache Verabreichung über längere Zeiträume hinweg. Patienten, die wegen anhaltendem Ileus oder bestimmten gastrointestinalen Krankheiten, die die Arzneimittelaufnahme einschränken, Probleme mit der Absorption durch ihren Gastrointestinaltrakt haben, können ebenfalls von den hier beschriebenen Arzneimitteln mit Formulierungen für die transdermale Anwendung profitieren.

[0096] Weiterhin gibt es viele klinische Situationen, in denen es schwierig ist, Compliance zu erhalten. Beispielsweise sind Patienten mit geistigen Problemen (z. B. Patienten mit Alzheimer-Krankheit oder Psychose) leichter behandelbar, wenn eine konstante Zuführungsrate an Arzneimitteln gegeben ist, ohne sich auf die Fähigkeit des Patienten verlassen zu müssen, dass er die Arzneimittel zur bestimmten Tageszeit einnimmt. Auch Patienten, die einfach vergessen, ihre Arzneimittel einzunehmen, werden dies weniger tun, wenn sie nur in regelmäßigen Abständen ein Hautpflaster anlegen müssen (z. B. alle 3 Tage). Patienten mit Krankheiten, die keine Symptome aufweisen, wie Patienten mit Hypertonie, sind besonders gefährdet, die Einnahme, ihre Arzneimittel in der verordneten Weise zu vergessen.

[0097] Für Patienten, die vielfache Arzneimittel einnehmen, können Vorrichtungen zur transdermalen Anwendung, wie Hautpflaster, mit Kombinationen aus Arzneimitteln, die häufig zusammen eingenommen werden, formuliert werden. Beispielsweise wird vielen Patienten mit Herzinsuffizienz Digoxin in Kombination mit Furosemid verabreicht. Die Kombination aus beiden Arzneimitteln in einem einzelnen Hautpflaster erleichtert die Verabreichung, reduziert das Risiko von Fehlern (die richtigen Pillen zur richtigen Zeit einzunehmen ist für ältere Menschen oft verwirrend), senkt die psychologische Belastung, „so viele Pillen“ einzunehmen, reduziert ausgelassene Dosierungen aufgrund von unregelmäßigen Aktivitäten und verbessert Compliance.

[0098] Die hier beschriebenen Verfahren sind besonders für Menschen geeignet, finden aber auch eine Reihe von Anwendungen im Veterinärbereich, wie die Verabreichung von Wachstumsfaktoren oder Hormonen (z. B. zur Fruchtbarkeitskontrolle) bei einem Tier.

[0099] Wie oben erwähnt, kann eine Reihe von Arzneimitteln gemäß der hier gelieferten Verfahren verabreicht werden. Einige Beispiele von Arzneimittelkategorien, die transdermal verabreicht werden können, umfassen entzündungshemmende Arzneimittel (z. B. bei Arthritis und anderen Leiden) wie alle NSAID, Indometacin, Prednison, usw.; Analgetika (besonders, wenn die orale Absorption, wie nach einem chirurgischen Eingriff nicht möglich, und die parenterale Verabreichung nicht zweckdienlich oder erwünscht ist), einschließlich Morphin, Kodein, Demerol, Acetaminophen und Kombinationen aus diesen (z. B. Kodein plus Acetaminophen); Antibiotika wie Vancomycin (das nicht vom GI-Trakt absorbiert wird und häufig intravenös gegeben wird) oder eine Kombination aus INH und Rifampicin (z. B. für Tuberkulose); Antikoagulanten wie Heparin (das nicht gut vom GI-Trakt absorbiert und im Allgemeinen parenteral gegeben wird, was zu Schwankungen im Blutspiegel mit einem erhöhten Risiko zu Blutungen bei hohen Spiegeln führt und das Risiko der Ineffizienz bei niedrigen Spiegeln birgt) und Warfarin (das vom GI-Trakt absorbiert wird, aber aufgrund des der Abdominalchirurgie typischerweise folgenden Ileus nicht sofort verabreicht werden kann); Antidepressiva (z. B. in Situationen, in denen Compliance ein Problem darstellt, wie bei der Alzheimer-Krankheit oder wenn das Beibehalten stabiler Blutspiegelwerte zu einer signifikanten Reduzierung anticholinriger Nebenwirkungen und einer besseren Verträglichkeit durch den Patienten führt), wie Amitriptylin, Imipramin, Prozac, etc.; Antihypertensiva (um z. B. Compliance zu verbessern und die mit schwankenden Blutspiegelwerten verbundenen Nebenwirkungen zu reduzieren), wie Diuretika und Beta-Blocker (die durch das gleiche Pflaster verabreicht werden können; z. B. Furosemid und Propanolol); Antipsychotika (z. B. um Compliance und die Verabreichung der Arzneimittel von Seiten der Pflegenden und Familienangehörigen zu erleichtern), wie Haloperidol und Chlorpromazin; und Anxiolytika oder Sedativa (z. B. um die nach oraler Verabreichung mit hohen Blutspiegelwerten verbundene Vigilanzreduktion zu vermeiden und einen kontinuierlichen Nutzen über den Tag zu ermöglichen, indem die therapeutischen Mengen konstant gehalten werden).

[0100] Es können zahlreiche weitere Arzneimittel in der hier beschriebenen Weise verabreicht werden, einschließlich natürlich auftretende und synthetische Hormone, Wachstumsfaktoren, Proteine und Peptide. Zum Beispiel können Insulin und menschliche Wachstumshormone, Wachstumsfaktoren wie Erythropoietin, Interleukine und Interferone über der Haut verabreicht werden.

[0101] Durch die vorliegende Erfindung werden auch Sets für das Verabreichen eines Arzneimittels über die Haut eines Säugers geliefert. Derartige Sets beinhalten im Allgemeinen eine Vorrichtung zur transdermalen Anwendung (z. B. ein Hautpflaster) in Kombination mit oder imprägniert mit einem oder mehreren zyklischen

Peptiden. In derartigen Sets kann zusätzlich auch ein Arzneimittel enthalten sein.

[0102] In einer verwandten Ausführungsform kann der Einsatz der hier beschriebenen zyklischen Peptide für die Verbesserung der Hautpermeabilität auch die Probenahme des Blutkompartiments durch passive Diffusion erleichtern, indem das Feststellen und/oder die Messung des Spiegels spezifischer im Blut zirkulierender Moleküle ermöglicht werden. Beispielsweise wird es dem Hautpflaster bei der Anwendung eines oder mehrerer zyklischer Peptide über ein hier beschriebenes Hautpflaster auf der Haut ermöglicht, wie ein Schwamm zu funktionieren, indem es eine kleine Menge Flüssigkeit, die die repräsentative Probe des Serums enthält, zu speichert. Das Pflaster wird dann nach einem spezifizierten Zeitraum entfernt und durch geeignete Verfahren auf die interessante Verbindung hin analysiert (z. B. ein Arzneimittel, Hormon, Wachstumsfaktor, Metabolit oder Marker). Alternativ kann ein Pflaster mit Reagenzien imprägniert sein, um eine Farbänderung zu ermöglichen, wenn eine bestimmte Substanz (z. B. ein Enzym) entdeckt wird. Substanzen, die auf diese Weise ermittelt werden können, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf illegale Drogen wie Kokain, HIV-Enzyme, Glucose und PSA. Diese Technologie ist von besonderem Nutzen für Heim-Prüfsets.

[0103] In einem weiteren Aspekt werden Peptide zur Verbesserung des Arzneimitteltransports zu einem Tumor in einem Säuger geliefert, indem ein zyklisches Peptid in Kombination mit einem Arzneimittel an einen Säuger mit einem Tumor verabreicht wird. Zykliche Peptide für die Verwendung in derartigen Verfahren umfassen solche, die E-Cadherin- und/oder N-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion stören und umfassen N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8), N-Ac-CHAVSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 14), N-Ac-CAHAVDC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 16), N-Ac-CSHAVSSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 18) und N-Ac-KHAVD-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 20). Vorzugsweise werden das zyklische Peptid und das Arzneimittel in der gleichen Verbindung oder Arzneimittelzuführungs-Vorrichtung vor der Verabreichung formuliert. Im Allgemeinen kann ein zyklisches Peptid den Arzneimitteltransport zu jedem Tumor verbessern und das Verabreichungsverfahren kann auf Grundlage des Zieltumortyps ausgewählt werden. Zum Beispiel kann für Melanome und andere zugängliche Tumore die oben beschriebene Injektion oder topische Verabreichung bevorzugt werden (z. B. können Metastasen von primären Ovarialtumoren durch daß Spülen der Peritonealhöhle mit der Verbindung behandelt werden). Andere Tumore (z. B. Harnblasentumor) können durch Injektion mit dem zyklischen Peptid und dem Arzneimittel (wie Mitomycin C) in die Tumorstelle behandelt werden. In anderen Fällen kann die Verbindung systemisch und zielgerichtet an den Tumor verabreicht werden, indem eines aus der Vielfalt spezifischer Targeting-Agenzien eingesetzt wird. Geeignete Arzneimittel können durch den Fachmann auf Grundlage des zu behandelnden Karzinoms festgestellt werden (z. B. Mitomycin C für Harnblasenkrebs). Im Allgemeinen variiert die Menge des verabreichten zyklischen Peptids in Abhängigkeit vom Verabreichungsverfahren und der Art des Tumors innerhalb der oben genannten Bereichs, vorzugsweise zwischen ca. 1 µg/mL und ca. 2 mg/mL und noch bevorzugter zwischen ca. 10 µg/mL und 10 µg/mL (sic! A. d. Ü.). Der Transfer des Arzneimittels zum Zieltumor kann durch geeignete Mittel, die dem Fachmann naheliegend sind, evaluiert werden. Arzneimittel können auch markiert werden (z. B. unter Verwendung von Radionukliden), um eine direkte Beobachtung des Transfers zum Zieltumor unter Verwendung von Standard-Bildgebungsverfahren zu ermöglichen.

[0104] In einem verwandten Aspekt liefert die vorliegende Erfindung Verfahren zur Behandlung von Krebs und/oder zur Hemmung von Metastasen bei einem Säuger. Krebstumore sind unkontrolliert wachsende feste Zellmassen, die ihre Nahrungszufuhr über Blutgefäße benötigen. Die Bildung neuer Kapillaren sind eine Grundvoraussetzung für das Tumorwachstum und das Entstehen von Metastasen. Die Verabreichung von hier beschriebenen zyklischen Peptiden kann das Wachstum solcher Blutgefäße stören, wodurch eine effektive Therapie für den Krebs und/oder die Hemmung der Metastasen geliefert wird. Zykliche Peptide können auch zur Behandlung von Leukämie verwendet werden. Bevorzugte zyklische Peptide zur Verwendung in derartigen Verfahren umfassen solche, die die N-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion stören, wie N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8), N-Ac-CHAVSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 14), N-Ac-CAHAVDC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 16), N-Ac-CSHAVSSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 18) und N-Ac-KHAVD-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 20). Ein zyklisches Peptid kann allein (z. B. über die Haut) oder in einer pharmazeutischen Verbindung verabreicht werden. Für Melanome und bestimmte andere zugängliche Tumore kann die oben beschriebene Injektion oder die topische Verabreichung bevorzugt werden. Für Ovarialkarzinome kann das Spülen der Peritonealhöhle mit einer Verbindung, die einen oder mehrere zyklische Peptide aufweist, Metastasen von Ovarialkarzinomzellen vorbeugen. Andere Tumore (z. B. Harnblasentumor, bronchiale Tumore oder tracheale Tumore) können durch Injektion des zyklischen Peptids in das Cavum behandelt werden. In anderen Fällen kann die Verbindung systemisch verabreicht werden und unter Anwendung einer Vielfalt von oben beschriebenen spezifischen Targeting-Agenzien auf den Tumor gerichtet sein. Im Allgemeinen variiert die verabreichte Menge an zyklischen Peptiden in Abhängigkeit von Verabreichungsverfahren und Krebstyp, variiert jedoch innerhalb der oben beschriebenen Bereiche. Die Wirksamkeit der Krebsbehandlung oder der Hemmung von Metastasen kann unter Verwendung gut bekannter klinischer Beobachtungsverfahren, wie die Beobachtung der Werte von Serumtumormarkern (z. B. CEA oder

PSA), evaluiert werden.

[0105] In einem weiteren verwandten Aspekt kann ein zyklisches Peptid verwendet werden, um Angiogenese (d. h. das Wachstum von Blutgefäßen von vorhandenen Blutgefäßen) in einem Säuger zu hemmen. Im Allgemeinen kann die Hemmung von Angiogenese zum Beispiel bei Patienten mit Krankheiten wie Krebs oder Arthritis von Vorteil sein. Bevorzugte zyklische Peptide für die Hemmung von Angiogenese umfassen H-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) und N-Ac-CHAVSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 14). Die Wirkung eines speziellen zyklischen Peptids auf Angiogenese kann im Allgemeinen durch eine Wirkungsevaluation des Wirkstoffs auf die Blutgefäßbildung ermittelt werden. Eine derartige Ermittlung kann im Allgemeinen z. B. unter Verwendung des Hühner-Chorioallantois-Membran-Assays (Iruela-Arispe et al. Molecular Biology of Cell 6: 327-343, 1995) durchgeführt werden. Zusammengefasst kann ein zyklisches Peptid in eine aus Vitrogen bestehende Matrix bei einer oder mehreren Konzentrationen (z. B. zwischen ca. 1 und 100 µg/Matrix) überschichtet werden. Die Matrix/Matrixen kann/können dann auf die Hühner-Chorioallantois-Membranen aufgetragen werden. Nach 24 Stunden kann die Wirkung des Peptids unter Verwendung einer Computer-gestützten morphometrischen Analyse bestimmt werden. Ein zyklisches Peptid sollte Angiogenese bei einer Konzentration von 33 µg/Matrix zu mindestens 25% hemmen.

[0106] Der Zusatz eines wie oben beschriebenen Targeting-Agents kann insbesondere dann von Nutzen sein, wenn die Verabreichung systemisch ist. Geeignete Verabreichungs- und Dosierungsmodi hängen von der zu behandelnden oder vorzubeugenden Krankheit ab, allerdings eignet sich im Allgemeinen die Verabreichung durch Injektion. Die Dosierungen können in der oben beschriebenen Weise variieren. Die Wirksamkeit der Hemmung kann grob durch die eine Analyse der Tumore über deren Unfähigkeit, ihr Wachstum aufrechtzuerhalten, sowie mikroskopisch durch das Beobachten des Fehlens von Nerven in der Peripherie des Tumors abgeschätzt werden.

[0107] In einem noch weiteren verwandten Aspekt liefert die vorliegende Erfindung Verfahren zur Induktion von Apoptose in einer Cadherin-exprimierenden Zelle. Im Allgemeinen können von Krebs betroffene Patienten durch eine derartige Behandlung profitieren. Bevorzugte zyklische Peptide zur Verwendung in derartigen Verfahren umfassen N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8), N-Ac-CHAVSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 14), N-Ac-CA-HAVDC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 16), N-Ac-CSHAVSSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 18) und N-Ac-KHAVD-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 20). Es werden auch zyklische Peptide bevorzugt, die mit einem Molekül mit einer Bindungsstelle für ein zweites Adhäsionsmolekül (wie Arg-Gly-Asp) durch einen Linker verbunden sind. Die Verabreichung kann topisch über Injektion oder mit anderen Mitteln durchgeführt werden und der Zusatz eines Targeting-Agents kann insbesondere dann von Nutzen sein, wenn die Verabreichung systemisch ist. Geeignete Verabreichungs- und Dosierungsmodi sind abhängig von Lage und Art der Zellen, für die die Induktion von Apoptose erwünscht ist, die Dosierungen variieren jedoch im Allgemeinen im oben beschriebenen Bereich. Eine Biopsie kann ausgeführt werden, um die Induktionsstufe der Apoptose zu bewerten.

[0108] Die vorliegende Erfindung liefert Verfahren zur Verbesserung des Arzneimitteltransports in das Zentralnervensystem eines Säugers. Die Blut-Hirnschranke ist weitgehend undurchlässig für die meisten neuroaktiven Wirkstoffe und der Transport von Arzneimitteln in das Gehirn eines Säugers erfordert häufig invasive Eingriffe. Unter Verwendung eines hier beschriebenen zyklischen Peptids ist der Transport jedoch beispielsweise als systemische Verabreichung aus einer Kombination aus zyklischem Peptid, Arzneimittel und Targeting-Agent möglich durch Injektion eines zyklischen Peptids (allein oder in Kombination mit einem Arzneimittel und/oder Targeting-Agent) in die Halsschlagader oder unter Verwendung eines ein zyklisches Peptid aufweisenden Hautpflasters an den Kopf des Patienten. Bestimmte bevorzugte Peptide für die Verwendung in derartigen Verfahren sind relativ klein (z. B. eine Ringgröße von 4-10 Resten; vorzugsweise 5-7 Reste) und umfassen Peptide, die einen 5-Restering wie N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) und N-Ac-KHAVD-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 20) aufweisen. Im Allgemeinen variiert die Menge des verabreichten zyklischen Peptids in Abhängigkeit vom Verabreichungsverfahren und der Art der behandelten oder vorgebeugten Krankheit, variiert jedoch typischerweise im oben beschriebenen Bereich. Die Arzneimittelzuführung in das Zentralnervensystem kann durch geeignete, dem Fachmann naheliegende Mittel, wie Magnetresonanztomographie (MRI) oder PET-Scan (Positronen-Emissions-Tomographie) evaluiert werden.

[0109] In noch weiteren Aspekten liefert die vorliegende Erfindung Peptide zur Verbesserung der Adhäsion von Cadherin-exprimierenden Zellen. In derartigen Ausführungsformen wird ein zyklisches Peptid im Allgemeinen mit einem wie oben beschriebenen festen Träger verbunden. Die entstehende Matrix, welche multiple verbundene zyklische Peptide umfasst, kann als „biologischer Leim“ für die Bindung von multiplen Cadherin-exprimierenden Zellen in einer Vielfalt von Zusammenhängen verwendet werden.

[0110] In einer Ausführungsform können Matrix-gebundene zyklische Peptide verwendet werden, um Wundheilung zu verbessern und/oder Narbengewebe bei einem Säuger zu reduzieren. Bevorzugte zyklische Peptide für die Verwendung in derartigen Verfahren umfassen N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8), N-Ac-KHAVD-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 20) und zyklische Peptide, die mit einer biokompatiblen und biologisch abbaubaren Matrix wie Cellulose oder Collagen verbunden sind, werden besonders bevorzugt. Für die Verwendung in derartigen Verfahren sollte ein zyklisches Peptid eine freie Amino-Hydroxyl-Gruppe aufweisen. Die Peptide werden der Wunde im Allgemeinen topisch verabreicht, wo sie die Schließung der Wunde erleichtern können und Nahtstiche verbessern oder sogar ersetzen können. In ähnlicher Weise kann die Verabreichung von Matrix-gebundenen zyklischen Peptiden die Zelladhäsion bei Hauttransplantation und prosthetischen Implantaten erleichtern und die Dauer und den Nutzen der Collagen-Injektion steigern. Im Allgemeinen variiert die Menge der Matrix-gebundenen verabreichten zyklischen Peptide für eine Wunde, Transplantat oder Implantat in Abhängigkeit von der Schwere und/oder der Art der Wunde, Transplantat oder Implantat, kann jedoch im oben diskutierten Bereich variieren.

[0111] In einer weiteren Ausführungsform kann/können eine oder mehrere zyklische(s) Peptid(e) mit der inneren Oberfläche einer Gewebekulturplatte oder einem anderen Zellkulturträger, wie für die Verwendung in einem Bioreaktor, verbunden sein. Eine derartige Verbindung kann mit irgendeinem in der oben beschriebenen Weise geeigneten Verfahren durchgeführt werden. Zyklische Peptide, die in dieser Weise gebunden sind, können im Allgemeinen verwendet werden, um Cadherin-exprimierende Zellen zu immobilisieren. Zum Beispiel können mit einem oder mehreren zyklischen Peptid(en) beschichtete Schalen oder Platten in einer Vielzahl von Versuchen und Screens dazu verwendet werden, Cadherin-exprimierende Zellen zu immobilisieren. In Bioreaktoren (d. h. Systeme für die Herstellung von Zellen oder Organellen in großem Umfang) können zyklische Peptide im Allgemeinen genutzt werden, um den Zellkontakt zu verbessern und das Zellwachstum zu stabilisieren. Zyklische Peptide können auch in Bioreaktoren verwendet werden, um die Bildung und Funktion von hoch differenzierten Organellen, die beispielsweise aus verstreuten Populationen von fötalen Säugerzellen abgeleitet sind, zu verbessern. Bioreaktoren, die Biomatrizen von (einem) zyklischen Peptid(en) enthalten, können ebenfalls verwendet werden, um die Herstellung spezifischer Proteine zu erleichtern.

[0112] Hier beschriebene zyklische Peptide können im Zusammenhang mit einer Vielfalt von Bioreaktor-Konfigurationen verwendet werden. Im Allgemeinen ist ein Bioreaktor mit einer Innenoberfläche ausgestaltet, die ausreicht, um große Mengen adhärenter Zellen zu tragen. Diese Oberfläche kann unter Verwendung von Membranen, Röhren, Mikrotiterwells, Säulen, Hohlfasern, Rollflaschen, Platten, Schalen, Kugelchen (beads) oder einer Kombination aus diesen geschaffen werden. Ein Bioreaktor kann kompartimentiert sein. Das Trägermaterial innerhalb eines Bioreaktors kann irgendein in Fachkreisen bekanntes geeignetes Material sein; vorzugsweise löst sich oder schwilkt das Trägermaterial nicht in Wasser. Bevorzugte Trägermaterialien umfassen, sind aber nicht beschränkt auf synthetische Polymere wie Acryle, Vinyle, Polyäthylen, Polypropylen, Polytetrafluorethylen, Nylons, Polyurethane, Polyamide, Polysulfone und Poly-(Ethylen-Terephthalat); Keramik; Glas und Kieselerde.

[0113] Zyklische Peptide können auch in anderen Aspekten der vorliegenden Erfindung verwendet werden, um neurologisches Wachstum zu verbessern und/oder zu lenken. In einem Aspekt kann Neuritenaussprössung verbessert und/oder gelenkt werden, indem ein Neuron mit einem oder mehreren zyklischen Peptid(en) in Kontakt gebracht wird. Bevorzugte zyklische Peptide für die Verwendung in derartigen Verfahren sind mit einer Polymermatrix oder einem anderen Träger verbunden und umfassen solche Peptide, die keine wie oben beschriebenen substanzialen flankierenden Sequenzen aufweisen. In besonders bevorzugten Ausführungsformen ist das zyklische Peptid N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) oder N-Ac-KHAVD-NH₂ (20). In anderen bevorzugten Ausführungsformen ist ein zyklisches Peptid mit einem Molekül verbunden, das eine wie oben beschriebene Integrin-Zellerkennungssequenz (Arg-Gly-Asp) aufweist. Das Verfahren zum Erreichen des Kontakts und die Menge des verwendeten zyklischen Peptids hängen von der Stelle des Neurons sowie Länge und Art der gewünschten Aussprössung ab. Zum Beispiel kann ein Neuron (z. B. über Implantation) mit (einem) zyklischen Peptid(en), das an ein Trägermaterial wie Faden, Fasernervenweiser (fiber nerve guide) oder eine andere prosthetische Vorrichtung gebunden ist, in Kontakt gebracht werden, so dass die Aussprössung am Trägermaterial entlang gelenkt wird. Alternativ kann ein röhrenförmiger Nervenweiser (tubular nerve guide) eingesetzt werden, in dem das Lumen des Nervenweisers eine Verbindung enthält, die das zyklische Peptid beinhaltet. In vivo können derartige Nervenweiser oder andere getragene zyklische Peptide mit Hilfe gut bekannter Verfahren implantiert werden, um beispielsweise das Wachstum von abgetrennten neuronalen Verbindungen zu fördern und/oder, um Rückenmarksverletzungen zu behandeln. Dem Fachmann wird ohne Weiteres naheliegend sein, dass die Struktur und die Verbindung des Trägers der jeweiligen zu behandelnden Verletzung angemessen sein sollte. In vitro kann eine Polymermatrix in ähnlicher Weise verwendet werden, um das Wachstum von Neuronen auf strukturierten Oberflächen zu lenken, wie beispielsweise in US-Patent-Nr.

5.510.628 beschrieben.

[0114] In einem anderen derartigen Aspekt kann/können ein oder mehrere zyklische(s) Peptid(e) für die Therapie einer neurologischen Demyelinisationskrankheit in einem Säugling verwendet werden. Es wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung herausgefunden, dass die Migration von Schwannzellen auf Astrozyten durch N-Cadherin gehemmt wird. Es gibt eine Anzahl von neurologischen Krankheiten, wie Multiple Sklerose, bei denen Oligodendrozyten sterben. In der Theorie konnten Schwannzellen des peripheren Nervensystems verwendet werden, um beschädigte Oligodendrozyten im ZNS zu ersetzen. Allerdings sind frühere Versuche zur Durchführung eines derartigen Austauschs gescheitert, weil die in das Gehirn implantierten Schwannzellen nicht auf Astrozyten oder remyelinisierte beschädigte Neuronen migriert sind. Wie hier beschriebene zyklische Peptide können, wenn sie mit Schwannzellen in das Gehirn injiziert werden, die Migration von Schwannzellen erleichtern und die Durchführung einer derartigen Therapie ermöglichen.

[0115] Für die Behandlung für Multiple Sklerose geeignete Patienten können anhand von Kriterien ermittelt werden, die eine Diagnose über klinisch sichere oder klinisch wahrscheinliche MS ergibt (siehe Poser et al. Ann. Neurol. 13: 227, 1983). Potentielle Patienten für eine präventive Therapie können durch vorliegende genetische Faktoren wie HLA-Typ DR2a und DR2b oder durch das Vorliegen einer früheren Krankheit des schubförmig remittierenden Typs identifiziert werden.

[0116] Schwann-Zelltransplantate können zusammen mit dem/den zyklischen Peptid(en) mit Hilfe von Standardverfahren direkt in das Gehirn implantiert werden. Bevorzugte zyklische Peptide für die Verwendung in derartigen Verfahren umfassen N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) und N-Ac-KHAVD-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 20). Geeignete Mengen des zyklischen Peptids variieren im Allgemeinen im oben beschriebenen Bereich, vorzugsweise zwischen etwa 10 µg/mL und etwa 1 mg/mL.

[0117] Alternativ kann ein zyklisches Peptid allein oder in einer pharmazeutischen Verbindung verabreicht werden. Die Dauer und Häufigkeit der Verabreichung werden durch Faktoren, wie dem Leiden des Patienten und Art und Schweregrad der Krankheit des Patienten, bestimmt. In besonders bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung kann das zyklische Peptid oder die pharmazeutische Verbindung in Dosierungen zwischen 0,1 mg/kg und 20 mg/kg verabreicht werden, obwohl die angemessenen Dosierungen mittels klinischer Tests ermittelt werden können. Verabreichungsverfahren umfassen intravenöse oder intrathekale Injektion (d. h. direkt in die Zerebrospinalflüssigkeit).

[0118] Eine wirksame Behandlung von Multipler Sklerose kann mit Hilfe der folgenden Kriterien nachgewiesen werden: EDSS-Skala (Extended Disability Status Scale), Erscheinung von Verschlimmerungen oder MRI (Magnetresonanztomographie). EDSS ist ein Mittel zur Klassifizierung der klinischen Beeinträchtigung aufgrund von MS (Kurtzke, Neurology 33: 1444, 1983) und eine Verminderung von einer ganzen Stufe kennzeichnet eine wirksame Behandlung im Rahmen der vorliegenden Erfindung (Kurtzke, Ann. Neurol. 36: 573–79, 1994). Verschlimmerungen sind durch das Erscheinen eines neuen auf MS zurückzuführenden Symptoms gekennzeichnet und von einer entsprechenden neuen neurologischen Abnormalität begleitet (Sipe et al. Neurology 34: 1368, 1984). Eine Therapie wird als wirksam betrachtet, wenn es einen statistisch signifikanten Unterschied in der Rate oder dem Anteil an Patienten ohne Verschlimmerungen zwischen der behandelten und der Placebogruppe oder einen statistisch signifikanten Unterschied in der Zeit bis zur ersten Verschlimmerung oder der Dauer und dem Schweregrad im Vergleich zwischen behandelter und Kontrollgruppe gibt. MRI kann eingesetzt werden, um aktive Verletzungen mit Hilfe des verbesserten bildgebenden Verfahrens mit Gadolinium-DTPA (McDonald et al. Ann. Neurol. 36: 14, 1994) oder die Stelle und die Ausdehnung der Verletzungen unter Verwendung von T₂-gewichteten Verfahren zu messen. Das Vorliegen, die Stelle und das Ausmaß der MS-Verletzungen können von Röntgenologen unter Verwendung von Standardverfahren bestimmt werden. Eine Verbesserung aufgrund von Therapie wird nachgewiesen, wenn eine statistisch signifikante Verbesserung bei einem einzelnen Patienten im Vergleich zum Ausgangsniveau oder einer behandelten Gruppe gegenüber einer Placebogruppe auftritt.

[0119] Die Wirksamkeit des zyklischen Peptids im Zusammenhang mit Prävention kann auf der Grundlage von klinischen Messungen wie der Rückfallrate und EDSS evaluiert werden. Andere Kriterien umfassen eine Änderung von Gebiet und Volumen von T2-Bildern im MRI sowie Anzahl und Volumen von Gadolinium-verbeserten Aufnahmen.

[0120] In einem anderen Aspekt können hier beschriebene zyklische Peptide für die Regulation des Immunsystems eines Säuglings durch irgendeine der verschiedenen Möglichkeiten eingesetzt werden. Cadherine werden sowohl auf unreifen B- und T-Zellen (Thymozyten- und Knochenmark-Prä-B-Zellen) als auch auf bestim-

ten Teilmengen von aktivierte B- und T-Lymphozyten sowie einigen hämatologischen Malignitäten exprimiert (siehe Lee et al. J. Immunol. 152: 5653–5659, 1994; Munro et al. Cellular Immunol. 169: 309–312, 1996; Tsutsui et al., J. Biochem. 120: 1034–1039, 1996; Cepk et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 6567–6571, 1996). Zyklische Peptide können im Allgemeinen zur Regulation spezifischer Stufen bei zellulären Interaktionen während einer Immunantwort oder während der Verbreitung von malignen Lymphozyten eingesetzt werden.

[0121] Beispielsweise kann ein wie hier beschriebenes zyklisches Peptid verwendet werden, um Krankheiten zu behandeln, die mit einer übermäßigen Produktion von sonst normalen T-Zellen verbunden sind. Ohne die Absicht zu haben, durch eine besondere Theorie gebunden zu werden, wird davon ausgegangen, dass die Interaktion von Cadherinen mit reifenden T-Zellen und B-Zellen-Teilmengen zum Schutz dieser Zellen vor programmiertem Zelltod beiträgt. Ein zyklisches Peptid kann solche Interaktionen, die zur Induktion von programmiertem Zelltod führen, verringern. Dementsprechend können zyklische Peptide verwendet werden, um bestimmte Arten von Diabetes und Rheumtoidarthritis besonders bei jungen Kindern, bei denen die Cadherin-Expression auf thymischen Prä-T-Zellen am stärksten ist, zu behandeln.

[0122] Zyklische Peptide können auch Patienten verabreicht werden, die an bestimmten Hautkrankheiten leiden (wie Haut-Lymphome), akute B-Zell-Leukämie und übermäßige Immunreaktionen, die auch das humorale Immun-System und die Bildung von Immunglobulin betreffen, wie allergieempfindliche Reaktionen und Antikörper-vermittelte Transplantatabstoßung. Außerdem können Patienten mit zirkulierenden Cadherin-positiven malignen Zellen (z. B. bei Einnahmeverordnungen, in denen Chemotherapie oder Strahlungstherapie einen Großteil der malignen Zellen im Knochenmark und anderen lymphartigen Geweben eliminiert) von der Behandlung mit einem zyklischen Peptid profitieren. Eine derartige Behandlung kann auch für Patienten, die von einer Transplantation von peripheren Blutstammzellen betroffen sind, nützlich sein.

[0123] Bevorzugte zyklische Peptide für die Verwendung in derartigen Verfahren umfassen E-Cadherin und/oder N-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion, wie N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8), N-Ac-CHAVSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 14), N-Ac-CSHAVSSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 18) und N-Ac-KHAVD-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 20). In den oben erwähnten Verfahren wird/werden das/die zyklische(n) Peptid(e) vorzugsweise systemisch (üblicherweise durch Injektion) oder topisch verabreicht. Ein zyklisches Peptid kann mit einem Targeting-Agens verbunden sein. Zum Beispiel kann das Abzielen auf das Knochenmark nützlich sein. Eine geeignete Dosierung ist dann ausreichend, wenn eine statistisch signifikante Herabsetzung der Population von Cadherin-exprimierenden B- und/oder T-Zellen und/oder eine Verbesserung in der klinischen Manifestation der behandelten Krankheit bewirkt werden. Typische Dosierungen befinden sich im oben beschriebenen Bereich.

[0124] In weiteren Aspekten liefert die vorliegende Erfindung Peptide und Sets zur Verhütung von Schwangerschaft in einem Säuger. Im Allgemeinen verhindert die Störung der E-Cadherin-Funktion die Adhäsion von Trophoblasten und deren anschließende Verschmelzung zur Ausbildung von Synzytiotrophoblasten. In einer Ausführungsform können ein oder mehrere wie hier beschriebene zyklische Peptide in irgendeine aus der Vielzahl von gut bekannten kontrazeptiven Vorrichtungen, wie Schwämme, die für die intravaginale Einführung geeignet sind (siehe z. B. US-Patent-Nr. 5.417.224), oder Kapseln zur subdermalen Implantation, integriert werden. Andere Verabreichungsformen sind möglich, jedoch, einschließlich der transdermalen Verabreichung, für an einen entsprechenden Targeting-Agens gebundene zyklische Peptide. Bevorzugte zyklische Peptide für die Verwendung in derartigen Verfahren umfassen N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8), N-Ac-CHAVSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 14), N-Ac-CSHAVSSC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 18) und N-Ac-KHAVD-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 20). Geeignete Verfahren für die Integration in eine derartige Vorrichtung sind abhängig von der Art der Vorrichtung und in Fachkreisen gut bekannt. Derartige Vorrichtungen erleichtern die Verabreichung des/der zyklischen Peptids(e) in die Gebärmutterregion und können eine hinhaltende Freigabe des/der zyklischen Peptids(e) liefern. Im Allgemeinen kann/können das/die zyklische(n) Peptid(e) über eine derartige kontrazeptive Vorrichtung in einer Dosierung von 0,1 bis 20 mg/kg verabreicht werden, doch die geeigneten Dosierungen können durch Überprüfung des hCG-Spiegels im Urin bestimmt werden. hCG wird von der Plazenta produziert und der Spiegel dieses Hormons steigt im Urin von schwangeren Frauen an. Das hCG-Niveau im Urin kann durch Radioimmunoassay mit Hilfe von gut bekannten Verfahren ermittelt werden. Sets zur Schwangerschaftsverhütung umfassen im Allgemeinen eine mit einem oder mehreren zyklischen Peptid(en) imprägnierte kontrazeptive Vorrichtung.

[0125] Alternativ kann einem Säuger zur Schwangerschaftsverhütung eine hinhaltende Freigabeformulierung von einem oder mehreren zyklischen Peptid(en) typischerweise subdermal implantiert werden. Eine derartige Implantation kann mit Hilfe von gut bekannten Verfahren ausgeführt werden. Vorzugsweise liefert die implantierte Formulierung eine wie oben beschriebene Dosierung, wobei die minimale wirksame Dosierung durch den Fachmann beispielsweise durch Evaluation des hCG-Spiegels im Urin der Frau ermittelt werden kann.

[0126] Die vorliegende Offenbarung liefert auch Verfahren zur Erhöhung der Gefäßdurchlässigkeit in einem Säuger durch die Verabreichung eines oder mehrerer zyklischen(r) Pepids(e) oder pharmazeutischer Verbindungen. In Blutgefäßen führt Endothel-Zelladhäsion (vermittelt durch N-Cadherin) zu verminderter Gefäßdurchlässigkeit. Dementsprechend können wie hier beschriebene zyklische Peptide zur Erhöhung der Gefäßdurchlässigkeit verwendet werden. In bestimmten Ausführungsformen umfassen bevorzugte zyklische Peptide für die Verwendung in derartigen Verfahren Peptide, die in der Lage zur Reduktion von sowohl Endothel- als auch Tumorzelladhäsion sind. Derartige Peptide können eingesetzt werden, um die Penetration von therapeutischen oder diagnostischen Antitumor-Wirkstoffen (z. B. monoklonale Antikörper) durch Endothelzell-Permeabilitätsbarrieren und Tumorbarrieren hindurch zu erleichtern. Besonders bevorzugte Peptide umfassen N-Ac-CHAVC-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 8) und N-Ac-KHAVD-NH₂ (SEQ.-ID-Nr. 20).

[0127] Die Behandlung mit einem zyklischen Peptid kann beispielsweise vor der Verabreichung eines therapeutischen oder diagnostischen Antitumor-Wirkstoffs (z. B. ein monoklonaler Antikörper oder ein anderes Makromolekül), eines antimikrobiellen Wirkstoffs oder eines entzündungshemmenden Wirkstoffs geeignet sein, um die Konzentration derartiger Wirkstoffe in der Umgebung des Zieltumors, Organismus oder der Entzündung zu erhöhen, ohne die Gesamtdosis für den Patienten zu erhöhen. Zykliche Peptide für die Verwendung in derartigen Verfahren können an einen Targeting-Agens gebunden sein, um die lokale Konzentration des zyklischen Peptids weiter zu erhöhen, obwohl eine systemische Verabreichung eines vasoaktiven Wirkstoffs die Perfusion bestimmter Tumore relativ zu anderen Geweben selbst bei Nichtvorliegen eines Targeting-Agens verstärkt. Geeignete Targeting-Agenzien beinhalten Antikörper und andere Moleküle, die sich spezifisch an Tumorzellen oder an Komponenten mit strukturell abnormalen Blutgefäßen binden. Beispielsweise kann ein Targeting-Agens ein Antikörper sein, der sich an ein Fibrinabbauprodukt oder ein Zellenzym, wie Peroxidase, das von Granulozyten oder anderen Zellen in nekrotischen oder entzündeten Geweben freigesetzt wird, bindet.

[0128] Die Verabreichung über intravenöse Injektion oder die transdermale Verabreichung werden im Allgemeinen bevorzugt. Wirksame Dosierungen sind im Allgemeinen ausreichend, wenn die Lokalisierung eines anschließend verabreichten diagnostischen oder therapeutischen Wirkstoffs so lange erhöht wird, bis die klinische Therapiewirksamkeit der Diagnosegenauigkeit zu einem statistisch signifikanten Maß erreicht ist. Ein Vergleich kann zwischen behandelten und unbehandelten Tumor-Wirtstieren, denen eine äquivalente Dosis des diagnostischen oder therapeutischen Wirkstoffs verabreicht wird, angestellt werden. Im Allgemeinen liegen die Dosierungen im oben beschriebenen Bereich.

[0129] Andere Aspekte der vorliegenden Erfindung liefern Verfahren, die die immunogenen Eigenschaften der zyklischen Peptide ausnutzen. Beispielsweise können polyklonale und monoklonale Antikörper gegenüber einem zyklischen Peptid unter Verwendung konventioneller Verfahren bevorzugt werden. Derartige Antikörper können durch irgendein aus einer Vielzahl von Verfahren hergestellt werden, die dem Fachmann bekannt sind. Siehe z. B Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. In einem derartigen Verfahren, wird ein Immunogen, das das zyklische Peptid aufweist, zunächst in eines aus der breiten Vielfalt von Säugern (z. B. Mäuse, Ratten, Kaninchen, Schafe oder Ziegen) injiziert. Aufgrund der kleinen Größe sollte das zyklische Peptid an ein Trägerprotein, wie Rinderserumalbumin oder ein Hämocyanin der Schlüsselloch-Napfschnecke gebunden werden. Nach einer oder mehreren Injektionen werden die Tiere periodisch geblutet. Polyklonale Antikörper, die spezifisch für das zyklische Peptid sind, können dann von derartigen Antisera beispielsweise durch Affinitätschromatographie unter Verwendung des Polypeptids, das an einen geeigneten festen Träger gekoppelt ist, gereinigt werden.

[0130] Monoklonale Antikörper, die spezifisch für das zyklische Peptid von Interesse sind, können zum Beispiel unter Verwendung des Verfahrens von Kohler und Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6: 511–519, 1976, und Verbesserungen dazu hergestellt werden. Zusammengefasst beinhalten diese Verfahren die Herstellung von immortalen Zelllinien aus Milzzellen, die aus einem wie oben beschriebenen immunisierten Tier erhaltenen und in der Lage zur Produktion von Antikörpern mit der gewünschten Spezifität sind. Die Milzzellen werden zum Beispiel durch Fusion mit einer Myelomzelle als Fusionspartner, vorzugsweise einer, die syngenetisch mit dem immunisierten Tier ist, immortalisiert. Einzelne Kolonien werden ausgewählt und ihre Kultur-Supernatanten auf Bindungsaktivität gegenüber dem Polypeptid getestet. Hybridom mit hoher Reaktionsfähigkeit und Spezifität werden bevorzugt.

[0131] Monoklonale Antikörper können von den Supernatanten wachsender Hybridom-Kolonien mit oder ohne die Verwendung verschiedener in Fachkreisen gut bekannter Verfahren isoliert werden. Kontaminanten können von den Antikörpern mit konventionellen Verfahren, wie Chromatographie, Gelfiltrierung, Ausfällung und Extraktion, entfernt werden. Antikörper mit der gewünschten Aktivität können im Allgemeinen durch die Immunfluoreszenz-Analyse von Gewebeabschnitten, Zelle oder anderen Proben, in denen sich das Ziel-Cad-

herin befindet, lokalisiert werden.

[0132] Derartige Antikörper können in vitro oder in vivo verwendet werden, um Zelladhäsion zu regulieren. In bestimmten Ausführungsformen können Antikörper in Verfahren verwendet werden, in denen eine verbesserte Zelladhäsion erwünscht ist; wie oben beschrieben. Beispielsweise können Antikörper in den oben genannten Verfahren verwendet werden, um Neuritenaussprössung in vitro oder in vivo zu verbessern und/oder zu lenken. Antikörper können innerhalb des Lumens eines röhrenförmigen Nervenweisers (tubular nerve guide) verwendet werden oder an einen Fasernervenweiser (fiber nerve guide), Faden oder an einen anderen festen Träger gebunden werden und wie oben beschrieben für zyklische Peptide verwendet werden. Dosierungen für Antikörper sind ausreichend, um Neuritenaussprössungen zu verbessern oder zu lenken und variieren je nach Verabreichungsverfahren und dem zu behandelnden Leiden.

[0133] Antikörper können, wie oben beschrieben, auch als „biologischer Leim“ zur Bindung multipler Cadherin-exprimierender Zellen in einer Vielzahl von Zusammenhängen verwendet werden; wie Verbesserung von Wundheilung und/oder die Reduktion von Narbengewebe und/oder zur Förderung von Zelladhäsion bei Hauttransplantation oder prosthetischen Implantaten. Im Allgemeinen variiert die Menge des Matrix-gebundenen verabreichten Antikörpers für eine Wunde, Transplantat oder Implantat in Abhängigkeit von der Schwere und/oder der Art der Wunde, Transplantat oder Implantat, kann jedoch im oben diskutierten Bereich variieren. Antikörper können auch an einen aus der Vielzahl von wie oben beschriebenen Trägermaterialien für die Verwendung in Gewebekulturen oder Bioreaktoren gebunden werden.

[0134] In bestimmten Ausführungsformen können Antikörper (oder Antigen-bindende Fragmente davon) in Situationen verwendet werden, in denen eine Hemmung der Zelladhäsion erwünscht ist. Derartige Antikörper oder Fragmente können zum Beispiel für die Behandlung von Demyelinisationskrankheiten wie MS oder zur Hemmung der Interaktionen zwischen Tumorzellen verwendet werden; wie oben beschrieben. Die Verwendung von Fab-Fragmenten wird im Allgemeinen bevorzugt.

[0135] Zyklische Peptide können auch verwendet werden, um wie oben beschriebene monoklonale Antikörper zu generieren, die spezifisch für bestimmte Cadherine sind (z. B. Antikörper, die sich an E-Cadherin binden, sich aber nicht signifikant an N-Cadherin binden und umgekehrt). Derartige Antikörper können im Allgemeinen für Therapie-, Diagnose- und Untersuchungszwecke verwendet werden. Zum Beispiel können derartige Antikörper an ein Arzneimittel gebunden und einem Säuger verabreicht werden, um das Arzneimittel zu einer speziellen Cadherin-exprimierenden Zelle, wie einer Leukämiezelle im Blut zu lenken.

[0136] Versuche beinhalten typischerweise einen Antikörper zur Feststellung des Vorliegen oder Nichtvorliegens von Cadherin (frei oder an der Zelloberfläche) oder eines proteolytischen Fragments, das die EC1-Domäne in einer geeigneten biologischen Probe, wie Tumor- oder normale Gewebebiopsien, Blut-, Lymphknoten-, Serum- oder Harnproben, Gewebe, Homogenat oder ein anderes aus diesem von einem Patienten erhaltenes Exakt, enthält.

[0137] Es gibt eine Vielzahl von dem Fachmann bekannten Versuchsformaten für die Verwendung eines Antikörpers, um ein Zielmolekül in einer Probe festzustellen. Siehe z. B. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Der Versuch kann zum Beispiel in einem Western Blot-Format durchgeführt werden, wobei eine Proteinzubereitung von der biologischen Probe zur Gelelektrophorese gegeben, auf eine geeignete Membran transferiert und dieser eine Reaktion mit dem Antikörper ermöglicht wird. Das Vorliegen des Antikörpers auf der Membran kann dann unter Verwendung einer geeigneten, unten beschriebenen Nachweisreagenz festgestellt werden.

[0138] In einer weiteren Ausführungsform beinhaltet der Versuch den Einsatz von immobilisierten Antikörpern auf einem festen Träger, der das Ziel-Cadherin oder ein proteolytisches Fragment davon, das die EC1-Domäne beinhaltet, bindet, und dieses vom Rest der Probe entfernt. Das gebundene Cadherin kann dann unter Verwendung eines zweiten Antikörpers oder Reagenz, der/das eine Reportergruppe enthält, festgestellt werden. Alternativ kann ein konkurrierender Versuch angewandt werden, in dem das Cadherin mit einer Reportergruppe markiert wird und ihm die Möglichkeit gegeben wird, sich nach der Inkubation des Antikörpers mit der Probe an den immobilisierten Antikörper zu binden. Der Umfang, in dem die Komponenten der Probe die Bindung des markierten Cadherins an den Antikörper hemmen, gibt Hinweis auf die Reaktivität der Probe mit dem immobilisierten Antikörper und in der Folge auf die in der Probe enthaltene Menge an Cadherin.

[0139] Der feste Träger kann irgendein dem Fachmann bekanntes Material, an das der Antikörper gebunden werden kann, sein, wie ein Well in einer Mikrotierplatte, ein Nitrozellulosefilter oder eine andere geeignete

Membran. Alternativ kann der Träger ein Kugelchen oder eine Scheibe sein, wie aus Glas, Glasfaser, Latex oder Plastik wie Polystyrol oder Polyvinylchlorid. Der Antikörper kann auf dem festen Träger unter Einsatz einer Vielfalt von dem Fachmann bekannten Verfahren, die in der Patent- und Wissenschaftsliteratur umfangreich beschrieben sind, immobilisiert werden.

[0140] In bestimmten Ausführungsformen besteht der Versuch für die Feststellung von Cadherin in einer Probe in einem doppelten Antikörper-Sandwich-Versuch. Dieser Versuch kann ausgeführt werden, indem zuerst der auf einem festen Träger, der üblicherweise das Well einer Mikrotierplatte ist, immobilisierte Antikörper mit der biologischen Probe in Kontakt gebracht wird, so dass es dem Cadherin in der Probe ermöglicht wird, sich an den immobilisierten Antikörper zu binden (eine 30-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur ist im Allgemeinen ausreichend). Die ungebundene Probe wird dann von dem immobilisierten Cadherin-Antikörper-Komplex entfernt und ein zweiter Antikörper (der eine Reportergruppe wie ein Enzym, Farbstoff, Radionuklid, lumineszierende Gruppe, fluoreszierende Gruppe oder Biotin aufweist), der in der Lage zur Bindung an einer anderen Stelle auf dem Cadherin ist, hinzugefügt. Die Menge des zweiten Antikörpers, der am festen Träger gebunden bleibt, wird dann unter Einsatz eines für die spezifische Reportergruppe geeigneten Verfahrens bestimmt. Das angewandte Verfahren für die Ermittlung der Reportergruppe hängt von der Art der Reportergruppe ab. Für radioaktive Gruppen sind im Allgemeinen Szintillationszähler oder Autoradiographie geeignet. Spektroskopische Verfahren können eingesetzt werden, um Farbstoffe, lumineszierende Gruppen und fluoreszierende Gruppen zu ermitteln. Biotin kann unter Einsatz von Avidin, das an eine andere Reportergruppe (gewöhnlich eine radioaktive oder fluoreszierende Gruppe oder ein Enzym) gebunden ist, ermittelt werden. Enzym-Reportergruppen können im Allgemeinen durch Zusatz von Substrat (im Allgemeinen für einen bestimmten Zeitraum), gefolgt von einer spektroskopischen oder anderen Analyse der Reaktionsprodukte, nachgewiesen werden. Es können Standards und Standardzusätze unter Verwendung gut bekannter Verfahren eingesetzt werden, um die Menge an Cadherin in einer Probe zu bestimmen.

[0141] Die vorliegende Erfindung liefert auch Sets für die Verwendung in derartigen Immunoassays. Derartige Sets beinhalten einen oder mehrere wie oben beschriebene Antikörper. Weiterhin beinhalten im Allgemeinen ein oder mehrere zusätzliche Kompartimente oder Behälter eines Sets Elemente wie Reagenzien, Puffer und/oder Waschlösungen zur Verwendung im Immunoassay.

[0142] In weiteren Aspekten können zyklische Peptide oder Antikörper davon verwendet werden, um die Zell-Identifizierung und -Sortierung in vitro oder die Bildgebung in vivo zu erleichtern, was die Selektion von Zellen, die verschiedene Cadherine (oder verschiedene Cadherin-Niveaus) exprimieren, ermöglicht. Vorzugsweise ist/sind das/die zyklische(n) Peptid(e) für die Verwendung in derartigen Verfahren an einen nachweisbaren Marker gebunden. Geeignete Marker sind in Fachkreisen gut bekannt und umfassen Radionuklide, lumineszierende Gruppen, fluoreszierende Gruppen, Enzyme, Farbstoffe, konstante Immunoglobulin-Domänen und Biotin. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein zyklisches Peptid oder Antikörper, das/der an einen Fluoreszenzmarker, wie Fluoreszin gebunden ist, mit Zellen in Kontakt gebracht, die dann durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) analysiert werden.

[0143] Die folgenden Beispiele dienen der Illustration und nicht dem Zweck einer Einschränkung.

BEISPIEL 1

Herstellung von repräsentativen zyklischen Peptiden

[0144] Dieses Beispiel veranschaulicht die Festphasensynthese von repräsentativen zyklischen Peptiden.

[0145] Die Peptide wurden an ein Methylbenzhydrylamin-Harz (MBHA-Harz) für die C-terminalen Amid-Peptide gefügt. Die traditionellen Merrifield-Harze wurden für alle C-terminalen sauren Peptide verwendet. Die Bags eines Polypropylen-Matrix-Materials wurden mit dem Harz gefüllt und in Dichlormethan getränkt. Die Harz-Pakete wurden drei Mal mit 5%-igem Diisopropylethylamin in Dichlormethan und dann mit Dichlormethan gewaschen. Die Pakete wurden dann sortiert und in eine Nalgene-Flasche platziert, die eine Lösung der interessanten Aminosäure in Dichlormethan enthält. Es wurde eine gleiche Menge an Diisopropylcarbodiimid (DIC) in Dichlormethan hinzugefügt, um die Kupplungsreaktion zu aktivieren. Die Flasche wurde eine Stunde lang geschüttelt, um die Beendigung der Reaktion sicherzustellen. Die Reaktionsmischung wurde abgeschieden und die Pakete mit DMF gewaschen. Das N- α -Boc wurde durch Acidolyse unter einer 30 Minuten lang andauernden Anwendung einer 55%-igen TFA in Dichlormethan entfernt, wobei das TFA-Salz der Aminogruppe zurückblieb. Die Bags wurden gewaschen und die Synthese durch das Wiederholen des gleichen Verfahrens fertiggestellt, wobei die entsprechenden Aminosäuren in der Kupplungsphase substituiert wurden. Die Acetyl-

lierung des N-Terminals wurde durch Reaktion der Peptid-Harze mit einer Lösung aus essigsaurem Anhydrid in Dichlormethan bei Vorliegen von Diisopropylethylamin durchgeführt. Das Peptid wurde dann Seitenketten-entschützt und spaltete sich bei 0°C bei Vorliegen von Anisol als Karbokation-Fängersubstanz mit flüssigem HF vom Harz ab.

[0146] Die rohen Peptide wurden durch Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigchromatographie gereinigt. Gereinigte lineare Vorläufersubstanzen (precursors) der zyklischen Peptide wurden in 75%-er Essigsäure bei einer Konzentration von 2-10 mg/mL aufgelöst. Es wurde tropfenweise eine 10%-ige Lösung aus Jod in Methanol hinzugegeben, bis eine stabile Färbung erreicht wurde. Dann wurde der Mischung eine 5%-ige Askorbinsäurelösung in Wasser bis zur Entfärbung beigefügt. Die Disulfidbrücken-enthaltenden Verbindungen wurden dann mit HPLC gereinigt und durch analytische HPLC und Massenspektroskopische Analyse charakterisiert.

BEISPIEL 2

Störung der Fähigkeit der Kleinhirn-Neuronen der Maus zur Verlängerung von Neuriten

[0147] Drei Zelladhäsionsmoleküle, N-Cadherin, N-CAM und L1 sind in der Lage zur Regulation von Neuritenaussprossung (Doherty und Walsh, Curr. Op. Neurobiol. 4: 49–55, 1994; Williams et al. Neuron 13: 583–594, 1994; Hall et al. Cell Adhesion and Commun. 3: 441–450, 1996; Doherty und Walsh, Mol. Cell. Neurosci. 8: 99–111, 1994; Safell et al. Neuron 18: 231–242, 1997). Neuronen, die auf einschichtigen Zellrasen von mit N-Cadherin-, N-CAM- oder L1-kodierender cDNA transfektierten 3T3-Zellen kultiviert werden, entwickeln längere Neuriten als auf 3T3-Zellen kultivierte Neuronen, die diese Zelladhäsionsmoleküle nicht exprimieren. Dieses Beispiel veranschaulicht die Verwendung eines repräsentativen zyklischen Peptids zur Hemmung von Neuritenaussprossung.

[0148] Neuronen wurden auf einschichtigen Zellrasen von mit N-Cadherin-kodierender cDNA transfektierten 3T3-Zellen, im Wesentlichen gemäß der Beschreibung von Doherty und Walsh, Curr. Op. Neurobiol. 4: 49–55, 1994; Williams et al., Neuron 13: 583–594, 1994; Hall et al. Cell Adhesion und Commun. 3: 441–450, 1996; Doherty und Walsh, Mol. Cell. Neurosci. 8: 99–111, 1994; Safell et al., Neuron 18: 231–242, 1997, kultiviert. Zusammengefasst wurden einschichtige Zellrasen von Kontroll-3T3-Fibroblasten und N-Cadherin-exprimierenden 3T3-Fibroblasten von 80.000 Zellen in einzelnen Wells einer 8-Kammer-Gewebekulturplatte durch Übernachtkultivierung erstellt. 3000 Kleinhirn-Neuronen, isoliert von nachgeburtlichen Tag-3 Mäusehirnen, wurden 18 Stunden lang auf den verschiedenen einschichtigen Zellrasen im Kontrollmedium (SATO/2%FCS) oder einem mit verschiedenen Konzentrationen des zyklischen Peptids N-Ac-CHAVC-NH₂ oder des Kontrollpeptids ohne die HAV-Sequenz (N-Ac-CJHGVC-NH₂) angereicherten Medium, kultiviert. Die Kulturen wurden dann fixiert und für GAP-43, das sich spezifisch an Neuronen und deren Neuriten bindet, gefärbt. Die Länge des längsten Neuriten auf jedem GAP-43-positiven Neuron wurde dann unter Verwendung einer computergestützten morphometrischen Analyse bestimmt.

[0149] Wie in [Fig. 4](#) gezeigt, hat die 18-stündige Kultivierung mit N-Ac-CHAVC-NH₂ in einer Konzentration von 500 µg/mL die Neuritenaussprossung auf N-Cadherin-exprimierenden 3T3-Zellen gehemmt, während das zyklische Peptid N-Ac-CHGVC-NH₂ (ebenfalls bei einer Konzentration von 500 µg/ml) keine Wirkung auf diesen Prozess hatte. Weiterhin hat das zyklische Peptid N-Ac-CHAVC-NH₂ (verwendet bei einer Konzentration von 500 µg/ml) die Neuritenaussprossung auf 3T3-Zellen, die N-Cadherin, N-CAM oder L1 (Kontrollzellen) nicht exprimierenden, nicht gehemmt, und somit angezeigt, dass das Peptid nicht toxisch ist und, dass es keine nicht-spezifischen Wirkungen auf die Neuritenaussprossung hat ([Fig. 4](#), vgl. Säule 3 und 1). Diese Werte zeigen auch, dass sich das Peptid nicht auf die Integrin-Funktion auswirkt.

[0150] Eine Dosis-Antwort-Studie hat gezeigt, dass N-Ac-CHAVC-NH₂ die Neuritenaussprossung auf N-Cadherin-exprimierenden 3T3-Zellen bei einer Konzentration von 50 µg/mL signifikant und die Neuritenaussprossung auf diesen Zellen bei einer Konzentration von 500 µg/mL vollständig hemmte ([Fig. 5](#)). Schließlich hat N-Ac-CHAVC-NH₂ (verwendet bei einer Konzentration von 500 µg/mL) die Neuritenaussprossung auf weder N-CAM- noch L1-exprimierenden 3T3-Zellen gehemmt ([Fig. 6](#)). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Peptid N-Ac-CHAVC-NH₂ die Funktion von N-Cadherin spezifisch hemmt. Insgesamt demonstrieren die aus diesen Studien erhaltenen Ergebnisse, dass N-Ac-CHAVC-NH₂ aufgrund seiner Fähigkeit zur Störung der Funktion von N-Cadherin ein wirksamer Hemmstoff für Neuritenaussprossung ist.

BEISPIEL 3

Störung der Rinder-Endothel-Zelladhäsion

[0151] Dieses Beispiel verdeutlicht die Verwendung von repräsentativen zyklischen Peptiden zur Störung der Adhäsion von N-Cadherin-exprimierenden Endothelzellen.

[0152] Die Endothelzellen der Lungenarterie von Rindern wurden durch sterile Ablation und Digestion in 0,1% Kollagenase (Typ II; Worthington Enzyme, Freehold, NJ) geerntet. Die Zellen wurden in Dulbecco's Minimum Essential Medium (Clonetics, San Diego, CA), angereichert mit 10% fötalem Kalbsserum (Atlantics biological, Nor cross, GA) und einem 1%-igen antibiotischen Antimykotikum, bei 37°C und 7% CO₂ in der Luft gehalten. Die Kulturen wurden wöchentlich in Trypsin-EDTA (Gibco, Grand Island, NY) passagiert und für alle Versuche in eine Gewebekulturs-Plastik bei 20.000 Zellen/cm² gesät. Die Endothel-Kulturen wurden 1 Woche in der Kulturs verwendet, was etwa 3 Tage nach dem Erreichen der Konfluenz der Kultus ist. Die in allen Protokollen verwendeten Zellen waren zwischen Passage 4 und Passage 10. Die Zellen wurden auf Deckgläschen gesät und 30 Minuten bei 500 µg/mL mit N-Ac-CHAVC-NH₂ oder N-Ac-CHGVC-NH₂ behandelt und dann mit 1% Paraformaldehyd fixiert.

[0153] Das Peptid N-Ac-CHAVC-NH₂ störte den einschichtigen Zellrasen der Endothelzellen innerhalb von 30 Minuten nach der Hinzufügung zum Kulturmedium, während N-Ac-CHGVC-NH₂ keine Wirkung auf die Zellen hatte (**Fig. 7**). Die endotheliale Zellmorphologie wurde durch N-Ac-CHAVC-NH₂ drastisch beeinflusst und die Zellen zogen sich auseinander und wurden nicht-adhären. Diese Daten zeigen, dass N-Ac-CHAVC-NH₂ in der Lage zur Hemmung von Endothel-Zelladhäsion ist.

[0154] Unter den gleichen Bedingungen hatten die zyklischen Peptide H-CHAVC-NH₂, N-Ac-CAHAVDIC-NH₂ (**Fig. 8**) und N-Ac-CHAVSC-NH₂ keine Wirkung auf die endotheliale Zellmorphologie, was darauf hinweist, dass nicht alle zyklischen HAV-enthaltenden Peptide bei einer Konzentration von 500 µg/mL in der Lage zur Störung der Endothel-Zelladhäsion sind. Es ist nicht unerwartet, dass die Wirksamkeiten einzelner zyklischer Peptiden variieren. Das zyklische Peptid (N-Ac-CAHAVDC-NH₂) (**Fig. 9**) hatte eine leichte Wirkung, während N-Ac-CSHAVSSC-NH₂ (**Fig. 10**) den einschichtigen Zellrasen der Endothelzellen gestört und ein Auseinanderziehen der Zellen bewirkt hat.

BEISPIEL 4

Störung menschlicher Ovarialkarzinomzelladhäsion

[0155] Dieses Beispiel verdeutlicht die Verwendung eines typischen zyklischen Peptids zur Störung der Adhäsion menschlicher Ovarialkarzinomzellen.

[0156] Die menschliche Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3 (ATCC #HTB 77) exprimiert N-Cadherin. Die SKOV3-Zellen wurden in einem modifizierten MEM-basierten, 10% FCS-enthaltenden Medium kultiviert. Die Zellen sind in T250-Kulturflaschen gewachsen und unter periodischer Subkultivierung gehalten. Zyklische Peptide wurden auf den in einzelnen Wells der 96-Well-Kulturschalen gezogenen Zellen getestet (die Oberfläche jedes Wells betrug 0,32 cm²). Die Zellen wurden aus den Flaschen geerntet und bei einer Dichte von 50.000 Zellen pro Well in 0,1 mL Medium gesät, das die zyklischen Peptide bei einer Konzentrationen von 1, 0,1 oder 0,01 mg/mL enthielt oder frei von dem zyklischen Peptid war. Es wurden auch Medienkontroll-Wellen eingerichtet. Die Kulturen wurden periodisch durch mikroskopische Untersuchung unter sowohl Hellfeld- und Phasenkontrastbedingungen evaluiert. Die Kulturen wurden 48 Stunden lang gehalten.

[0157] Wie in **Fig. 11A** (vgl. mit **Fig. 11C**) und **Fig. 12A** dargestellt, hat das Peptid N-Ac-CHAVC-NH₂ (letzte Konzentration von 1 mg/ml Medium) die SKOV3-Zelladhäsion innerhalb von 24 Stunden gestört, während das Kontroll-N-Ac-CHGVC-NH₂ keine Wirkung auf die Zelladhäsion hatte (**Fig. 11B** und **Fig. 12B**). Die Wirkung von verschiedenen Mengen an N-Ac-CHAVC-NH₂ nach 48 Stunden ist in **Fig. 11D**-F gezeigt. Bei Vorliegen von N-Ac-CHGVC-NH₂ (**Fig. 11B** und **Fig. 12B**) bilden die SKOV3-Zellen eng adhärente einschichtige Zellrasen. Im Unterschied dazu breiteten sich die SKOV3-Zellen weder auf die Substrate aus, noch bildeten sie bei Vorliegen von N-Ac-CHAVC-NH₂ eng andärente einschichtige Zellrasen (**Fig. 11A**, D und **Fig. 12A**). Diese Daten zeigen, dass N-Ac-CHAVC-NH₂ in der Lage zur Hemmung der Funktion von menschlichem N-Cadherin ist.

[0158] Die zyklischen Peptide N-Ac-CAHAVDIC-NH₂, N-Ac-CAHAVDC-NH₂ und N-Ac-KHAVD-NH₂ waren in den SKOV3-Zellen inaktiv und zeigten, dass nicht alle zyklischen HAV-enthaltenden Peptide bei Konzentrativen

onen von 0,01–1 mg/mL in der Lage zur Störung der Epithel-Zelladhäsion sind. Es ist nicht unerwartet, dass die Wirksamkeiten der zyklischen Peptide variieren.

BEISPIEL 5

Störung der Angiogenese

[0159] Blutgefäße bestehen aus adhärenten Endothelzellen. Dieses Beispiel verdeutlicht die Verwendung eines repräsentativen zyklischen Peptids zur Blockierung der Angiogenese (das Wachstum von Blutgefäßen von vorhandenen Blutgefäßen).

[0160] Der Hühner-Chorioallantois-Membran-Assay wurde verwendet, um die Wirkungen des zyklischen Peptids auf Angiogenese zu untersuchen (Iruela-Arispe et al. Molecular Biology of Cell 6: 327–343, 1995). Zykliche Peptide wurden mit einer aus Vitrogen bestehenden Matrix bei Konzentrationen von 3, 17 und 33 µg/Matrix überschichtet. Die Matrizen wurden dann auf die Hühner-Chorioallantois-Membranen aufgetragen. Nach 24 Stunden wurden die Wirkungen der Peptide unter Verwendung einer computergestützten morphometrischen Analyse bestimmt. Das zyklische Peptid H-CHAVC-NH₂ mit der entfernten N-terminalen Blockierungsgruppe hat Angiogenese jeweils zu 27%, 34% und 35% bei Konzentrationen von 3, 17 und 33 µg/Matrix gehemmt. Es wurde herausgefunden, dass das zyklische Peptid N-Ac-CHAVSC-NH₂ in diesem Versuch inaktiv war.

BEISPIEL 6

Störung der Zelladhäsion von normalen Rattennieren (NRK)

[0161] NRK-Zellen exprimieren E-Cadherin und einschichtige Zellrasen dieser Zellen zeigen eine Pflastersteinmorphologie. Dieses Beispiel verdeutlicht die Fähigkeit eines repräsentativen zyklischen Peptids zur Störung von NRK-Zelladhäsion.

[0162] NRK-Zellen (ATCC #1571-CRL) wurden bei 10–20.000 Zellen pro 35 mm Gewebekulturflaschen mit 10% FCS enthaltendem DMEM plattierte und periodisch subkultiviert (Laird et al., J. Cell Biol. 131: 1193–1203, 1995). Die Zellen wurden geerntet und in 35 mm Gewebekulturflaschen, die 1 mm Deckgläsern enthalten, umplattierte und inkubiert, bis sie 50–65% konfluent waren (24–36 Stunden). In dieser Zeit wurden die Deckgläser auf eine 24er-Wellplatte transferiert, einmal mit frischem DMEM gewaschen und dann den zyklischen Peptidlösungen (N-Ac CHAVC-NH₂ und N-Ac-CHGVC-NH₂) 24 Stunden lang bei einer Konzentration von 1 mg/mL ausgesetzt. Dann wurden frische Peptidlösungen hinzugefügt und die Zellen für weitere 24 Stunden gelassen. Die Zellen wurden 10 Minuten lang mit 100%-igem Methanol fixiert und dann drei Mal mit PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden für 1 Stunde in 2%-igem BSA/PBS blockiert und für eine weitere Stunde bei Vorliegen eines Maus-anti-Cadherin-Antikörpers (Transduction Labs. Verdünnung 1:250) inkubiert. Primäre und sekundäre Antikörper wurden in 2%-igem BSA/PBS verdünnt. Nach der Inkubation im primären Antikörper wurden die Deckgläser jeweils drei Mal 5 Minuten lang in PBS gewaschen und eine Stunde lang mit Esel-anti-Maus-Antikörper-konjugiertem Floureszin (Jackson Immunresearch Laboratories Inc., Westgrove, PA, Verdünnung 1:2000) inkubiert. Nach einer weiteren Wäsche in PBS (3 × 5 min) wurden die Deckgläser aufgelegt und mit einem konfokalen Mikroskop betrachtet.

[0163] Das Peptid N-Ac-CHAVC-NH₂ störte die NRK-Zelladhäsion ([Fig. 13D](#), im Vgl. zu [Fig. 13A](#)), während N-Ac-CHGVC-NH₂ keine Wirkung auf die Zelladhäsion ([Fig. 13C](#)) hatte. Bei Vorliegen von N-Ac-CHGVC-NH₂ bildeten die NRK-Zellen eng adhäsente einschichtige Zellrasen mit einer Pflastersteinmorphologie. Auch sie exprimierten E-Cadherin, was anhand der Immunfluoreszenz-Mikroskopie (Laird et al., J. Cell Biol. 131: 1193–1203, 1995) ([Fig. 14C](#)) festgestellt wurde. Im Unterschied dazu hafteten die NRK-Zellen, die mit N-Ac-CHAVC-NH₂ behandelt wurden, nicht aneinander und bildeten keinen zusammenhängenden einschichtigen Zellrasen ([Fig. 13D](#)). Weiterhin exprimierten diese Zellen sehr reduzierte Mengen an E-Cadherin ([Fig. 14D](#)). Diese Daten zeigen, dass N-Ac-CHAVC-NH₂ in der Lage zur Störung von NRK-Zelladhäsion ist.

BEISPIEL 7

Verbesserung der menschlichen Hautdurchlässigkeit

[0164] Die Epithelzellen der Haut (als Keratinozyten bekannt) exprimieren E-Cadherin. Dieses Beispiel verdeutlicht die Verwendung eines repräsentativen zyklischen Peptids zur Verbesserung der Durchlässigkeit der

menschlichen Haut.

[0165] Bei diesen Versuchen wurde die Abdominalhaut des Menschen bei einer Autopsie innerhalb von 24 Stunden nach dem Tod verwendet. Es wurde die Wirkung von N-Ac-CHAVC-NH₂ und N-Ac-CHGVC-NH₂ (bei einer Konzentration von 500 µg/ml) auf die Durchdringung von zwei Fluoreszenzmarkern, Oregon Green (Ladung -1, MW 386 Dalton) und Rhodamin Green Dextran (keine Ladung, MW 3000 Dalton) durch die menschliche Haut unter Verwendung eines Franz-Zellapparates (Franz, Curr. Prob. Dermatol. 7: 58-68, 1978; Franz, J. Invest. Dermatol. 64: 190-195, 1975) untersucht. Die Peptide und Marker wurden in sterilem Phosphatpuffer, PH-Wert 7,2, aufgelöst, und der Phosphatpuffer wurde als Rezeptorflüssigkeit verwendet. Die Durchdringung der Marker durch die Haut wurde bei 6, 12, 24, 36 und 48 Stunden nach Beginn des Versuchs untersucht. Für jede Peptid- und Markerkombination wurde der Versuch dreimal ausgeführt.

[0166] N-Ac-CHAVC-NH₂ (Probe #1) hat die Durchdringung von Oregon Green durch die Haut im Vergleich zur Wirkung von N-Ac-CHGVC-NH₂ (Probe #3) auf die Durchdringung dieses Markers (Tab. 2) leicht gesteigert. Die Durchdringung von Rhodamine Green durch die Haut wurde bei Vorliegen von N-Ac-CHAVC-NH₂ im Vergleich zu N-Ac-CHGVC-NH₂ (Tab. 3) signifikant gesteigert.

Tabelle 2

Konzentration der percutanen Absorption (µg/5 ml) für Oregon-Greens™ 488 als Zeitfunktion						
#Probe#	t = 6 Stunden	t = 12 Stunden	t = 24 Stunden	t = 36 Stunden	t = 48 Stunden	
1 Probe#1	0,028	0,096	0,470	0,544	0,665	
2 Probe#1	0,167	0,322	1,096	1,56	1,725	
3 Probe#1	0,058	0,352	0,773	0,902	0,971	
Mittlere Probe#1	0,084	0,225	0,780	1,00	1,120	
1 Probe#3	0,098	0,200	0,709	0,769	0,923	
2 Probe#3	0,022	0,107	0,864	0,923	1,021	
3 Probe#3	0,045	0,088	0,522	0,714	0,764	
Mittlere Probe#3	0,055	0,132	0,698	0,802	0,902	
* definiert als im Empfängerkompartiment gefundene Menge (Volumen = 5 ml)						

Tabelle 3

Konzentration der percutanen Absorption (µg/5 ml) für Dextran Rhodamine Green 3000 als Zeitfunktion						
#Probe#	t = 6 Stunden	t = 12 Stunden	t = 24 Stunden	t = 36 Stunden	t = 48 Stunden	
1 Probe#1	0,4	3,0	16,174	21,044	25,747	
2 Probe#1	0,8	2,0	4,074	5,556	6,481	
3 Probe#1	1,2	5,556	13,158	17,565	27,826	
Mittlere Probe#1	0,8	3,52	11,15	14,72	20,02	
1 Probe#3	0,2	0,6	1,0	1,0	1,8	
2 Probe#3	0,3	1,0	1,4	1,6	5,370	
3 Probe#3	0,2	0,4	0,8	1,0	1,8	
Mittlere Probe#3	0,23	0,67	1,07	1,2	2,99	
* definiert als im Empfängerkompartiment gefundene Menge (Volumen = 5 ml)						

BEISPIEL 8

Störung menschlicher Ovarialkarzinomzelladhäsion

[0167] Dieses Beispiel verdeutlicht weiter die Fähigkeit von repräsentativen zyklischen Peptiden zur Störung von menschlicher Ovarialkarzinom-Zelladhäsion.

[0168] In diesen Versuchen wurde die menschliche Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR-3, die das E-Cadherin exprimiert, verwendet. Die Zellen wurden in mit Insulin ergänztem und 20% FCS enthaltendem RPMI kultiviert. Die Zellen wurden in T-250 Kulturflaschen gezogen und unter periodischem Subkultivieren gehalten. Die Zellen wurden aus den Flaschen geerntet und in einzelne Wells der 96-Well-Kulturschalen (die Oberfläche jedes Wells betrug $0,32 \text{ cm}^2$) bei einer Dichte von 50.000 Zellen pro Well in 0,1 ml Medien, die die zyklischen Peptide (in Konzentrationen von 1, 0,1 oder 0,01 mg/ml) enthielten, gesät. Es wurden auch Medienkontroll-Wellen erstellt. Die Kulturen wurden periodisch durch mikroskopische Untersuchung unter sowohl Hellfeld- als auch Phasenkontrastbedingungen evaluiert und 48 Stunden gelassen. Es wurde herausgefunden, dass N-Ac-CHAVC-NH₂ in dieser Untersuchung bei diesen Konzentrationen inaktiv war. Das zyklische Peptid N-Ac-CHAVSC-NH₂ störte jedoch die OVCAR 3-Adhäsion (**Fig. 15A-C**). Diese Daten zeigen, dass N-Ac-CHAVSC-NH₂ spezifisch E-Cadherin-exprimierende Zellen beeinflusst.

BEISPIEL 9

Störung der Melanom-Zelladhäsion

[0169] Dieses Beispiel verdeutlicht die Fähigkeit eines repräsentativen zyklischen Peptids zur Störung der Melanom-Zelladhäsion.

[0170] Melanom-ME115-Zellen (freundlicherweise geliefert von Meenhard Herlyn, Wistar-Institut, Philadelphia, PA) wurden auf Glas-Deckgläschchen plattiert und 24 Stunden in 50% Keratinozyten-Wachstumsmedium (Clonetics, San Diego, CA) und 50% L15 kultiviert. Dann wurde ein frisches Medium, das die zyklischen Peptide (letzte Konzentration 500 $\mu\text{g/mL}$ Medien) N-Ac-CHAVC-NH₂ oder N-Ac-CHGVC-NH₂ enthält, hinzugefügt. Nach 24 Stunden Kultivierung bei Vorliegen der Peptide wurde das Medium entfernt und ein frisches Medium, das die Peptide enthielt, wurde hinzugefügt. Die Zellen wurden 24 Stunden später mit kaltem Methanol fixiert und in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gelagert.

[0171] Die Deckgläschchen wurden 1 Stunde in 3%-igen Ovalbumin/PBS blockiert und für eine weitere 1 Stunde bei Vorliegen des 1:500 verdünnten Kaninchen-Pan-Cadherin-Antikörpers (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) inkubiert. Haupt- und sekundäre Antikörper wurden in PBS, enthaltend 6% normales Ziegenserum, verdünnt. Nach der Inkubation im Hauptantikörper wurden die Deckgläschchen 3 mal je 5 Minuten in PBS gewaschen und für 1 Stunde in 1:100 verdünntem Fluoreszein-konjugiertem Ziegen-Anti-Kaninchen-Immunglobulin G inkubiert. Nach einer weiteren Wäsche in PBS (3 \times 5 Minuten) wurden die Deckgläschchen in Vectashield (Vector-Labors, Burlingame, CA) aufgesetzt und mit einem unendlich-korrigierten Mikroskop von Zeiss betrachtet.

[0172] Die Fotos (gezeigt in **Fig. 16**) zeigen ein Nichtvorliegen der Zellmembranfärbung und das Erscheinen von hellen intrazellulären vesikulären Färbungen in mit N-Ac-CHAVC-NH₂ behandelten Zellen. Im Unterschied dazu zeigten Zellen, die N-Ac-CHGVC-NH₂ ausgesetzt waren, über die gesamte Zellmembran hinweg eine Cadherin-Färbung an. Gelegentlich war die Färbung an Punkten des Zell-Zell-Kontakts konzentriert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das repräsentative zyklische Peptid N-Ac-CHAVC-NH₂ die Melanom-Zelladhäsion stört.

BEISPIEL 10

Störung der Brustkrebs-Zelladhäsion

[0173] Dieses Beispiel verdeutlicht die Fähigkeit eines repräsentativen zyklischen Peptids zur Störung der Epithel-Zelladhäsion der menschlichen Brust.

[0174] Die menschlichen Brust-Epithelzellen AIN4 (freundlicherweise geliefert von Martha Stampfer, Lawrence Berkeley-Labor, Berkeley, CA) wurden auf Glas-Deckgläschchen plattiert und in F12/DME, enthaltend 0,5% FCS und 10 ng/ml EGF, 24 Stunden lang kultiviert. Dann wurde frisches Medium, enthaltend die zyklischen Peptide (letzte Konzentration 500 $\mu\text{g/mL}$ Medien) N-Ac-CHAVC-NH₂ oder N-Ac-CHGVC-NH₂ hinzuge-

fügt. Nach 24 Stunden Kultivierung bei Vorliegen der Peptide wurde das Medium entfernt und frisches, die Peptide enthaltendes Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden 24 Stunden später mit kaltem Methanol fixiert und in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gelagert.

[0175] Die Deckgläschchen wurden 1 Stunde lang in 3% Ovalbumin/PBS blockiert und für eine weitere Stunde bei Vorliegen von 1 µg/mL Maus-anti-E-Cadherin-Antikörper (Zymed, Gaithersburg, MD) inkubiert. Haupt- und sekundäre Antikörper wurden in 6% normales Ziegenserum enthaltendem PBS verdünnt. Nach der Inkubation im primären Antikörper wurden die Deckgläschchen 3 mal je 5 Minuten in PBS gewaschen und eine weitere Stunde mit in 1:100 verdünntem Fluoreszin-konjugierter Ziege-anti-Maus (Kiekegard und Perry, Süd San Francisco, CA) inkubiert. Nach einer weiteren Wäsche in PBS (3 × 5 Minuten) wurden die Deckgläschchen in Vectashield (Vector-Labors, Burlingame, CA) aufgesetzt und mit einem unendlich-korrigierten Mikroskop von Zeiss betrachtet.

[0176] Die in [Fig. 17A](#) und B gezeigten Fotos zeigen eine reduzierte E-Cadherin-Färbung mit einer maschenhaften Erscheinung in mit N-Ac-CHAVC-NH₂ behandelten Zellen. Außerdem sind Löcher im einschichtigen Zellrasen an Stellen vorhanden, an denen sich die Zellen voneinander zurückgezogen haben. Im Unterschied dazu zeigen Zellen, die N-Ac-CHGVC-NH₂ ausgesetzt sind, konzentriert an Stellen mit Zell-Zell-Kontakt eine E-Cadherin-Färbung und bildeten einen eng adhärenten einschichtigen Zellrasen.

BEISPIEL 11

Toxizitäts- und Zellproliferationsstudien

[0177] Dieses Beispiel verdeutlicht die Anfangsarbeit bei der Evaluation von zytotoxischen Wirkungen von repräsentativen zyklischen Peptiden.

[0178] N-Ac-CHAVC-NH₂ und das Kontrolleptid N-Ac-CHGVC-NH₂ wurden auf mögliche zytotoxische Wirkungen auf menschliche mikrovaskuläre Endothel-(HMVEC; Clonetics), menschliche Umbilikalvenen-Endothel-(HUVEC; ATCC #CRL-1730), IAFp2 (menschliche Fibroblasten-Zelllinie; Institute Armand-Frapier, Montreal, Quebec), WI-38-(menschliche Fibroblasten-Zelllinie; ATCC #CCL-75), MDA-MB231- (menschliche Brustkrebs-Zelllinie; ATCC #HTB-26) und PC-3- (menschliche Prostatakrebs-Zelllinie; ATCC #CRL-1435) Zellen unter Verwendung des MTT-Assays (Plumb et al., Cancer Res. 49: 4435–4440, 1989) untersucht. Keines der Peptide war in Konzentrationen bis und einschließlich 100 µM zytotoxisch. Entsprechend war keines der Peptide in der Lage, die Proliferation der oben genannten Zelllinien in Konzentrationen bis zu 100 µM zu hemmen, was mit Hilfe des ³H-Thymidin-Inkorporation-Assays ermittelt wurde.

[0179] Außerdem wurden sowohl H-CHAVC-NH₂ als auch N-Ac-CHAVSC-NH₂ sowie deren entsprechenden Kontrollpeptide H-CHGVC-NE₂ und N-Ac-CHGVSC-NH₂ auch auf mögliche zytotoxische Wirkungen auf die oben beschriebenen Zelllinien unter Verwendung des MTT-Assays evaluiert. Keines der Peptide war bei Konzentrationen bis zu 100 µM zytotoxisch. Aber N-Ac-CHAVSC-NH₂ und N-Ac-CHGVSC-NH₂ haben die Proliferation von HUVEC bei Konzentrationen (TC₅₀-Werte) von jeweils 57 µM und 42 µM gehemmt, was mit Hilfe des ³H-Thymidin-Inkorporations-Assays ermittelt wurde. N-Ac-CHAVSC-NH₂ hat die Proliferation von MDA-MB231-Zellen bei einer Konzentration von 52 µM (Tab. 4 und 5) auch gehemmt.

Tabelle 4

		Normale Zellen						
		HMVEC	HUVEC		IAFP2	WI-38		
Peptid	Zell-Prol.	Zytotox.	Zell-Prol.	Zytotox.	Zell-Prol.	Zytotox.	Zell-Prol.	Zytotox.
N-Ac- <u>CHGV</u> C-NH ₂ (Kontrolle für #1)	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM
N-Ac- <u>CHAV</u> C-NH ₂ (#1)	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM
H- <u>CHGV</u> C-NH ₂ (Kontrolle für #2)	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM
H- <u>CHAV</u> C-NH ₂ (#2)	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM
N-Ac- <u>CHGVSC</u> -NH ₂ (Kontrolle für #18)	> 100 mM	> 100 mM	42 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM
N-Ac- <u>CHAVSC</u> -NH ₂ (#18)	> 100 mM	> 100 mM	57 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM

Tabelle 5

Evaluation von Peptiden auf Zytotoxizität und Kapazität zur Hemmung der Zellproliferation von Tumorzellen (IC ₅₀ in mM)				
Peptid	Tumorzellen			
	MDA-	MB231	PC	3
	Zell-Prol.	Zytotox.	Zell-Prol.	Zytotox.
N-Ac-CHGVC-NH ₂ (Kontrolle für #1)	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM
N-Ac-CHAVC-NH ₂ (#1)	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM
H-CHGVC-NH ₂ (Kontrolle für #2)	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM
H-CHAVC-NH ₂ (#2)	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM
N-Ac-CHGVSC-NH ₂ (Kontrolle für #18)	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM
N-Ac-CHAVSC-NH ₂ (#18)	52 mM	> 100 mM	> 100 mM	> 100 mM

[0180] Aus dem Vorstehenden wird ersichtlich sein, dass, obwohl einzelne Ausführungsformen der Erfindung zu Illustrationszwecken beschrieben worden sind, verschiedene Modifikationen gemacht werden können, ohne vom hier beanspruchten Umfang abzuweichen.

LISTE DER SEQUENZEN

(1) ALLGEMEINE ANGABEN

- (i) ANMELDER: McGill Universität
- (ii) BEZEICHNNUNG DER ERFINDUNG: Verbindungen und Verfahren zur Regulation von Zelladhäsion
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 47
- (iv) ZUSTELLANSCHRIFT:
 - (A) ADRESSE: SEED and BERRY LLP
 - (B) STRASSE: 6300 Columbia Center , 701 Fifth Avenue
 - (C) STADT: Seattle
 - (D) STAAT: Washington
 - (E) LAND: USA
 - (F) POSTLEITZAHL: 98104
- (v) COMPUTER LESBARE FORM:
 - (A) MEDIENART: Floppy-Disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: Patent In Release #1.0, Version #1.30
- (vi) ANGABEN ZUR AKTUELLEN ANMELDUNG:
 - (A) ANMELDENUMMER.: US
 - (B) ANMELDETAG: 11. Juli 1997
 - (C) KLASIFIZIERUNG:
- (vii) ANGABEN ZUM ANWALT/VERTRETER:
 - (A) NAME: Maki, David J.
 - (B) REGISTRIERUNGS-NR.: 31.392
 - (C) REF:/LISTEN-NR: 100086.401PC
- (ix) TELEPHONISCHE ANGABEN:
 - (A) TELEFON: (206) 622-4900

TELEFAX: (206) 682-6031

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr: 1

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 108 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 1:

Asp 1	Trp	Val	Ile	Pro 5	Pro	Ile	Asn	Leu	Pro 10	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly 15	Pro
Phe	Pro	Gln	Glu 20	Leu	Val	Arg	Ile	Arg 25	Ser	Asp	Arg	Asp	Lys 30	Asn	Leu
Ser	Leu	Arg 35	Tyr	Ser	Val	Thr	Gly 40	Pro	Gly	Ala	Asp	Gln 45	Pro	Pro	Thr
Gly	Ile 50	Phe	Ile	Leu	Asn	Pro 55	Ile	Ser	Gly	Gln	Leu 60	Ser	Val	Thr	Lys
Pro 65	Leu	Asp	Arg	Glu 70	Gln	Ile	Ala	Arg	Phe	His 75	Leu	Arg	Ala	His 80	Ala
Val	Asp	Ile	Asn	Gly 85	Asn	Gln	Val	Glu	Asn 90	Pro	Ile	Asp	Ile	Val 95	Ile
Asn	Val	Ile	Asp 100	Met	Asn	Asp	Asn	Arg 105	Pro	Glu	Phe				

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 108 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 2:

Asp 1	Trp	Val	Ile	Pro 5	Pro	Ile	Asn	Leu	Pro 10	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly 15	Pro
Phe	Pro	Gln	Glu 20	Leu	Val	Arg	Ile	Arg 25	Ser	Asp	Arg	Asp	Lys 30	Asn	Leu
Ser	Leu	Arg 35	Tyr	Ser	Val	Thr	Gly 40	Pro	Gly	Ala	Asp	Gln 45	Pro	Pro	Thr
Gly	Ile 50	Phe	Ile	Ile	Asn	Pro 55	Ile	Ser	Gly	Gln	Leu 60	Ser	Val	Thr	Lys
Pro 65	Leu	Asp	Arg	Glu 70	Gln	Ile	Ala	Arg	Phe	His 75	Leu	Arg	Ala	His 80	Ala
Val	Asp	Ile	Asn	Gly 85	Asn	Gln	Val	Glu	Asn 90	Pro	Ile	Asp	Ile	Val 95	Ile
Asn	Val	Ile	Asp 100	Met	Asn	Asp	Asn	Arg 105	Pro	Glu	Phe				

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 108 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure

- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 3:

Asp 1	Trp	Val	Ile	Pro 5	Pro	Ile	Asn	Leu	Pro 10	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly 15	Pro
Phe	Pro	Gln	Glu 20	Leu	Val	Arg	Ile	Arg 25	Ser	Asp	Arg	Asp	Lys 30	Asn	Leu
Ser	Leu	Arg 35	Tyr	Ser	Val	Thr	Gly 40	Pro	Gly	Ala	Asp	Gln 45	Pro	Pro	Thr
Gly	Ile 50	Phe	Ile	Ile	Asn	Pro 55	Ile	Ser	Gly	Gln	Leu 60	Ser	Val	Thr	Lys
Pro 65	Leu	Asp	Arg	Glu	Leu 70	Ile	Ala	Arg	Phe	His 75	Leu	Arg	Ala	His 80	Ala
Val	Asp	Ile	Asn	Gly 85	Asn	Gln	Val	Glu	Asn 90	Pro	Ile	Asp	Ile	Val 95	Ile
Asn	Val	Ile	Asp 100	Met	Asn	Asp	Asn	Arg 105	Pro	Glu	Phe				

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 108 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 4:

Asp 1	Trp	Val	Val	Ala 5	Pro	Ile	Ser	Val	Pro 10	Glu	Asn	Gly	Lys	Gly 15	Pro
Phe	Pro	Gln	Arg 20	Leu	Asn	Gln	Leu	Lys 25	Ser	Asn	Lys	Asp	Arg 30	Asp	Thr
Lys	Ile	Phe 35	Tyr	Ser	Ile	Thr	Gly 40	Pro	Gly	Ala	Asp	Ser 45	Pro	Pro	Glu
Gly	Val 50	Phe	Ala	Val	Glu	Lys 55	Glu	Thr	Gly	Trp	Leu 60	Leu	Leu	Asn	Lys
Pro 65	Leu	Asp	Arg	Glu	Glu 70	Ile	Ala	Lys	Tyr	Glu 75	Leu	Phe	Gly	His 80	Ala
Val	Ser	Glu	Asn	Gly 85	Ala	Ser	Val	Glu	Asp 90	Pro	Met	Asn	Ile	Ser 95	Ile
Ile	Val	Thr	Asp 100	Gln	Asn	Asp	His	Lys 105	Pro	Lys	Phe				

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 108 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 5:

Glu 1	Trp	Val	Met	Pro 5	Pro	Ile	Phe	Val	Pro 10	Glu	Asn	Gly	Lys	Gly 15	Pro
Phe	Pro	Gln	Arg 20	Leu	Asn	Gln	Leu	Lys 25	Ser	Asn	Lys	Asp	Arg 30	Gly	Thr
Lys	Ile	Phe	Tyr	Ser	Ile	Thr	Gly	Pro	Gly	Ala	Asp	Ser	Pro	Pro	Glu

Gly	Val	Phe	Thr	Ile	Glu	Lys	Glu	Ser	Gly	Trp	Leu	Leu	Leu	His	Met
	50	35				55	40				60				
Pro	Leu	Asp	Arg	Glu	Lys	Ile	Val	Lys	Tyr	Glu	Leu	Tyr	Gly	His	Ala
65					70					75					80
Val	Ser	Glu	Asn	Gly	Ala	Ser	Val	Glu	Glu	Pro	Met	Asn	Ile	Ser	Ile
				85				90						95	
Ile	Val	Thr	Asp	Gln	Asn	Asp	Asn	Lys	Pro	Lys	Phe				
				100				105							

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 108 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 6:

Asp	Trp	Val	Ile	Pro	Pro	Ile	Ser	Cys	Pro	Glu	Asn	Glu	Lys	Gly	Pro
1				5					10					15	
Phe	Pro	Lys	Asn	Leu	Val	Gln	Ile	Lys	Ser	Asn	Lys	Asp	Lys	Glu	Gly
				20				25					30		
Lys	Val	Phe	Tyr	Ser	Ile	Thr	Gly	Gln	Gly	Ala	Asp	Thr	Pro	Pro	Val
			35				40					45			
Gly	Val	Phe	Ile	Ile	Glu	Arg	Glu	Thr	Gly	Trp	Leu	Lys	Val	Thr	Glu
50						55					60				
Pro	Leu	Asp	Arg	Glu	Arg	Ile	Ala	Thr	Tyr	Thr	Leu	Phe	Ser	His	Ala
65					70					75					80
Val	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn	Ala	Val	Glu	Asp	Pro	Met	Glu	Ile	Leu	Ile
				85				90						95	
Thr	Val	Thr	Asp	Gln	Asn	Asp	Asn	Lys	Pro	Glu	Phe				
				100				105							

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 108 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:

- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 7:

Asp	Trp	Val	Ile	Pro	Pro	Ile	Ser	Cys	Pro	Glu	Asn	Glu	Lys	Gly	Glu
1				5					10					15	
Phe	Pro	Lys	Asn	Leu	Val	Gln	Ile	Lys	Ser	Asn	Arg	Asp	Lys	Glu	Thr
				20				25					30		
Lys	Val	Phe	Tyr	Ser	Ile	Thr	Gly	Gln	Gly	Ala	Asp	Lys	Pro	Pro	Val
			35				40					45			
Gly	Val	Phe	Ile	Ile	Glu	Arg	Glu	Thr	Gly	Trp	Leu	Lys	Val	Thr	Gln
50						55					60				
Pro	Leu	Asp	Arg	Glu	Ala	Ile	Ala	Lys	Tyr	Ile	Leu	Tyr	Ser	His	Ala

65	Val	Ser	Ser	Asn	Gly	70	Glu	Ala	Val	Glu	Asp	75	Pro	Met	Glu	Ile	80
					85					90						95	
Thr	Val	Thr	Asp	Gln	Asn	Asp	Asn	Arg	105	Pro	Glu	Phe					
			100														

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 8:

Cys	His	Ala	Val	Cys
1				5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 9:

Cys	His	Gly	Val	Cas
1				5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 10:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 10:

Cys	Ala	His	Ala	Val	Asp	Ile	Cys
1							5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 11:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 11:

Cys Ala His Gly Val Asp Ile Cys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 12:

Cys Ser His Ala Val Cys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 13:

Cys Ser His Gly Val Cys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 14:

Cys His Ala Val Ser Cys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 15:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: zirkulär
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 15:

Cys His Gly Val Ser Cys
 1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 16:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: zirkulär
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 16:

Cys Ala His Ala Val Asp Cys
 1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: zirkulär
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 17:

Cys Ala His Gly Val Asp Cys
 1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 18:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: zirkulär
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 18:

Cys Ser His Ala Val Ser Ser Cys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 19:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: zirkulär

- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 19:

Cys Ser His Gly Val Ser Ser Cys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 20:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: zirkulär

- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 20:

Lys His Ala Val Asp
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 21:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: zirkulär

- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 21:

Lys His Gly Val Asp
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 22:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: zirkulär

- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 22:

Cys	Ala	His	Ala	Val	Asp	Ile	Pro
1				5			

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 23:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 23:

Cys	Ala	His	Gly	Val	Asp	Ile	Pro
1				5			

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 24:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Seite
 - (B) LAGE: 1
 - (D) SONSTIGE ANGABEN: /Produkt = „Dbu“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 24:

Xaa	His	Ala	Val	Ser	Gly
1				5	

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 25:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (ix) MERKMAL:
- (C) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Seite
 - (D) LAGE: 1
 - (E) SONSTIGE ANGABEN: /Produkt = „Orn“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 25:

Xaa His Ala Val Ser
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 26:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 26:

Leu Ala His Ala Val Asp Ile
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 27:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 7 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 27:

Leu Ala His Gly Val Asp Ile
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 28:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Seite
 (B) LAGE: 5
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /Produkt = „SONSTIG“

/Anmerkung: „Wobei der Rest Beta,Beta-Dimethylcystein ist“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 28:

Cys His Ala Val Xaa
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 29:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Seite
 - (B) LAGE: 2
 - (D) SONSTIGE ANGABEN: /Produkt = „SONSTIG“

/Anmerkung: „Wobei der Rest Beta,Beta-Tetramethylen-Cystein ist“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 29:

Ile	Xaa	Tyr	Ser	His	Ala	Val	Ser	Cys
1								

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 30:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Seite
 - (B) LAGE: 2
 - (D) SONSTIGE ANGABEN: /Produkt = „SONSTIG“

/Anmerkung: „Wobei der Rest Beta,Beta-Pentamethylen-Cystein ist“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 30:

Ile	Xaa	Tyr	Ser	His	Ala	Val	Ser	Ser	Cys
1									
					5				10

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 31:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär
- (ii) MOLEKÜLTYP: Peptid
- (ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Seite
 - (B) LAGE: 1
 - (D) SONSTIGE ANGABEN: /Produkt = „SONSTIG“

/Anmerkung: „Wobei der Rest Beta-Mercaptopropionsäure ist“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 31:

Xaa Tyr Ser His Ala Val Ser Ser Cys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 32:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

- (ix) MERKMAL:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Seite
 (B) LAGE: 1
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /Produkt = „SONSTIG“

/Anmerkung: „Wobei der Rest Beta,Beta-Pentamethylen-beta- Mercaptopropionsäure ist“

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 32:

Xaa Tyr Ser His Ala Val Ser Ser Cys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 33:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 33:

Cys Asp Gly Tyr Pro Lys Asp Cys Lys Gly
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 34:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 34:

Cys Asp Gly Tyr Pro Lys Asp Cys Lys Gly
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 35:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 35:

Cys Gly Asn Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 36:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 10 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 36:

Cys Gly Asn Leu Ser Thr Cys Met Leu Gly
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 37:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 37:

Cys Tyr Ile Gln Asn Cys Pro Leu Gly
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 38:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 38:

Cys Tyr Ile Gln Asn Cys Pro Leu Gly
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 39:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:

(D) TOPOLOGIE: zirkulär

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 39:

Trp Gly Gly Trp
1

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 40:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 40

Leu Asp Arg Glu
1

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 41:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 41

Asp Xaa Asn Asp Asn
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 42:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 42

Xaa Asp Xaa Glu
1

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 43:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 43

Asp	Val	Asn	Glu
1			

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 44:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID- Nr. 44

Ala	His	Ala	Val	Asp	Ile
1				5	

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 45:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 45

Ser	His	Ala	Val	Ser	Ser
1				5	

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID- Nr. 46:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM:
 - (D) TOPOLOGIE: zirkulär

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID- Nr. 46

Lys	Ser	His	Ala	Val	Ser	Ser	Asp
1					5		

(2) ANGABEN ZU SEQ.-ID-Nr. 47:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren

- (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM:
 (A) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ.-ID-Nr. 47

Tyr Ile Gly Ser Arg
 1 5

In der Beschreibung angeführte Referenzen

[0181] Diese Liste der vom Anmelder angeführten Referenzen dient lediglich der Annehmlichkeit des Lesers. Sie ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokuments. Obwohl beim Zusammenstellen der Referenzen auf große Sorgfalt geachtet wurde, können Fehler oder Auslassungen nicht ausgeschlossen werden, und das EPO lehnt jegliche Verantwortung in dieser Hinsicht ab.

In der Beschreibung angeführte Patentdokumente

- WO 9104745 A [0007]
- US 5245012 A [0080]
- EP 710491 A [0076]
- EP 566816 A [0092]
- US 5613958 A [0092]
- US 5505956 A [0092]
- US 5510628 A [0113]
- US 5417224 A [0113]

In der Beschreibung angeführte Nicht-Patentliteratur

- MUNRO et al. In: Cell Adhesion and Invasion in Cancer Metastasis (Arbeitsübers.: Zelladhäsion und Invasion in Krebsmetastasen). RG Landes Co, 1996, 17–34 [0003]
- MUNRO SB et al. In: Cell Adhesion and Invasion in Cancer Metastasis (Arbeitsübers.: Zelladhäsion und Invasion in Krebsmetastasen). AG Landes Company, 1996, 17–34 [0003]
- BLASCHUK et al. J. Mol. Biol., 1990, Bnd. 211, 679–82 [0004]
- BLASCHUK et al. Develop. Biol. 1990, Bnd. 139, 227–29 [0004]
- ALEXANDER et al. J. Cell. Physiol. 1993, Bnd. 156, 610–18 [0004]
- OVERDUIN et al. Science, 1995, Bnd. 267, 386–389 [0004]
- SHAPIRO et al. Nature, 1995, Bnd. 374, 327–337 [0004]
- BLASCHUK et al. Developmental Biology, 1990, Bnd. 139 (1), 227–229 [0009]
- CARDARELLI et al. J. Biol. Chem., 1992, Bnd. 267, 23159–23164 [0051]
- The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology (Arbeitsübers.: Die Peptide: Analyse, Synthese, Biologie). Academic Press, 1979, Bnd. 1–4 [0058]
- BODANSKY; BODANSKY. The Practice of Peptide Synthesis (Arbeitsübers.: Die Praxis der Peptidsynthese). Springer Verlag, 1994 [0058]
- MERRIFIELD et al. J. Am. Chem. Soc., 1963, Bnd. 85, 2149 [0059]
- BLASCHUK; FAROOKHIM. Dev. Biol. 1989, Bnd. 136, 564–567 [0075]
- LAIRD et al. J. Cell Biol, 1995, Bnd. 131, 1193–1203 [0076] [0162] [0163]
- FRANZ. Curr. Prob. Dermatol, 1978, Bnd. 7, 58–68 [0077] [0165]
- FRANZ. J. Invest. Dermatol, 1975, Bnd. 64, 190–195 [0077] [0165]
- IRUELA-ARISPE et al. Molecular Biology of the Cell, 1995, Bnd. 6, 327–343 [0105] [0160]
- POSER et al. Ann. Neurol., 1983, Bnd. 13, 227 [0115]
- KURTZKE Neurology, 1983, Bnd. 33, 1444 [0118]
- KURTZKL Ann. Neurol., 1994, Bnd. 36, 573–79 [0118]
- SIPE et al. Neurology, 1984, Bnd. 34, 1368 [0118]
- MCDONALD et al. Ann. Neurol., 1994, Bnd. 36, 14 [0118]
- LEE et al. J. Immunol, 1994, Bnd. 152, 5653–5659 [0120]
- MUNRO et al. Cellular Immunol., 1996, Bnd. 169, 309–312 [0120]
- TSUTSUI et al. J. Biochem., 1996, Bnd. 120, 1034–1039 [0120]
- CEPEK et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, Bnd. 93, 6567–6571 [0120]
- HARLOW; LANE. Antibodies: A Laboratory Manual (Arbeitsübers.: Antikörper: Ein Labor-Leitfaden). Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 [0129] [0137]
- KOHLER; MILSTEIN. Eur. J. Immunol., 1976, Bnd. 6, 511–519 [0130]
- DOHERTY; WALSH. Curr. Op. Neurobiol., 1994, Bnd. 4, 49–55 [0147] [0148]
- WILLIAMS et al. Neuron, 1994, Bnd. 13, 583–594 [0147] [0148]
- HALL et al. Cell Adhesion and Commun., 1996, Bnd. 3, 441–450 [0147] [0148]

- DOHERTY; WALSH. Mol. Cell. Neurosci., 1994, Bnd. 8, 99–111 [0147] [0148]
- SAFELL et al. Neuron, 1997, Bnd. 18, 231–242 [0147] [0148]
- PLUMB et al. Cancer Res., 1989, Bnd. 49, 4435–4440 [0178]

Patentansprüche

- Zyklisches Peptid mit der Formel: $(Z_1)-(Y_1)-(X_1)$ -His-Ala-Val-(X₂)-(Y₂)-(Z₂), wobei X₁ und X₂ optional sind und, falls vorhanden, voneinander unabhängig aus der Gruppe bestehend aus Aminosäureresten und Kombinationen daraus ausgewählt werden, wobei die Reste durch Peptidbindungen verbunden sind und wobei X₁ und X₂ voneinander unabhängig in der Größeordnung von 0 bis 10 Resten vorliegen, so dass die Summe der in X₁ und X₂ enthaltenen Reste zwischen 1 und 12 beträgt; wobei Y₁ und Y₂ voneinander unabhängig aus der Gruppe bestehend aus Aminosäureresten ausgewählt werden und wobei eine kovalente Bindung zwischen den Resten Y₁ und Y₂ gebildet wird und wobei Z₁ und Z₂ optional sind und, falls vorhanden, voneinander unabhängig aus der Gruppe bestehend aus Aminosäureresten und Kombinationen daraus ausgewählt werden, wobei die Reste durch Peptidbindungen verbunden sind, wobei das besagte zyklische Peptid die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion reguliert.
- Zyklisches Peptid gemäß Anspruch 1, wobei Z₁ nicht vorliegt und Y₁ eine N-Acetylgruppe aufweist oder wobei Z₂ nicht vorliegt ist und Y₂ eine C-terminale Amidgruppe aufweist oder wobei Y₁ und Y₂ über eine Disulfidbindung kovalent gebunden sind oder wobei Y₁ und Y₂ über eine Thioetherbindung kovalent gebunden sind.
- Zyklisches Peptid gemäß Anspruch 2, wobei Y₁ und Y₂ über eine Disulfidbindung kovalent gebunden sind und wobei Y₁ und Y₂ jeweils unabhängig voneinander aus der Gruppe bestehend aus Penicillamin, β,β-Tetramethylcystein, β,β-Pentamethylcystein, β-Mercaptopropionsäure, β,β-Pentamethylen-β-Mercaptopropionsäure und 2-Mercaptobenzen, 2-Mercaptoanilin und 2-Mercaptoprolin ausgewählt werden.
- Zyklisches Peptid gemäß Anspruch 2, wobei Y₁ und Y₂ über eine Disulfidbindung kovalent gebunden sind und wobei Y₁ und Y₂ Cysteinreste sind.
- Zyklisches Peptid gemäß Anspruch 4, wobei das besagte zyklische Peptid die Sequenz Cys-His-Ala-Val-Cys (SEQ.-ID-NR. 8) aufweist.
- Zyklisches Peptid gemäß Anspruch 5, das ferner eine N-Acetylgruppe oder eine C-terminale Amidgruppe aufweist.
- Zyklisches Peptid gemäß Anspruch 4, wobei das besagte zyklische Peptid eine Sequenz aus der Gruppe bestehend aus Cys-Ala-His-Ala-Val-Asp-Ile-Cys (SEQ.-ID-NR. 10), Cys-Ser-His-Ala-Val-Cys (SEQ.-ID-NR. 12), Cys-His-Ala-Val-Ser-Cys (SEQ.-ID-NR. 14), Cys-Ala-His-Ala-Val-Asp-Cys (SEQ.-ID-NR. 16) und Cys-Ser-His-Ala-Val-Ser-Cys (SEQ.-ID-NR. 18) aufweist.
- Zyklisches Peptid gemäß Anspruch 2, wobei Y₁ und Y₂ über eine Amidbindung kovalent gebunden sind und wobei die besagte Amidbindung zwischen terminalen funktionalen Gruppen gebildet wird oder wobei die besagte Amidbindung zwischen Restseitenketten gebildet wird oder wobei die besagte Amidbindung zwischen einer terminalen funktionalen Gruppe und einer Restseitenkette gebildet wird.
- Zyklisches Peptid gemäß Anspruch 2, wobei Y₁ und Y₂ über eine Amidbindung kovalent gebunden sind und wobei:
 - Y₁ aus der Gruppe bestehend aus Lysin und Ornithin ausgewählt wird und Y₂ aus der Gruppe bestehend aus Aspartat und Glutamat ausgewählt wird oder
 - Y₂ aus der Gruppe bestehend aus Lysin und Ornithin ausgewählt wird und Y₁ aus der Gruppe bestehend aus Aspartat und Glutamat ausgewählt wird.
- Zyklisches Peptid gemäß Anspruch 2, wobei Y₁ und Y₂ über eine Amidbindung kovalent gebunden sind und wobei das besagte zyklische Peptid die Sequenz Lys-His-Ala-Val-Asp (SEQ.-ID-NR. 20) oder Ala-His-Ala-Val-Asp-Ile (SEQ.-ID-NR. 44) aufweist.
- Zyklisches Peptid gemäß Anspruch 1, wobei Y₁ und Y₂ jeweils Tryptophan sind, so dass die besagte kovalente Bindung δ₁δ₁-Dityryptophan erzeugt.
- Zyklisches Peptid gemäß einem der Ansprüche 1–1, das an ein Targeting-Agens oder Arzneimittel oder

einen festen Träger oder einen nachweisbaren Marker gebunden ist.

13. Zyklisches Peptid gemäß Anspruch 12, wobei der besagte feste Träger eine Polymermatrix ist.
14. Zyklisches Peptid gemäß Anspruch 13, wobei der besagte feste Träger aus der Gruppe bestehend aus Plastikschalen, Plastikrörchen, Nahtmaterial, Membranen, ultradünnen Folien, Bioreaktoren und Mikropartikeln ausgewählt wird.
15. Zyklisches Peptid gemäß einem der Ansprüche 1–11, das an ein Molekül gebunden ist, das eine Bindungsstelle für ein Adhäsionsmolekül aufweist, wobei das besagte Adhäsionsmolekül kein klassisches Cadherin ist.
16. Pharmazeutisches Mittel, das ein zyklisches Peptid gemäß einem der Ansprüche 1–11 in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger aufweist.
17. Mittel gemäß Anspruch 16, das ferner ein Arzneimittel aufweist.
18. Mittel gemäß Anspruch 17, wobei das besagte Arzneimittel an das besagte zyklische Peptid gebunden ist.
19. Mittel gemäß Anspruch 16, wobei das besagte zyklische Peptid in einer Retardformulierung vorliegt.
20. In-vitro-Verfahren zur Regulation der Zelladhäsion, das das Inkontaktbringen einer Cadherin-exprimierenden Zelle mit einem zyklischen Peptid gemäß einem der Ansprüche 1–11 umfasst.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, wobei das besagte Cadherin aus der Gruppe bestehend aus E-Cadherin und N-Cadherin ausgewählt wird oder wobei das besagte Cadherin aus der Gruppe bestehend aus P-Cadherin, R-Cadherin und anderen Cadherinen mit der Zelladhäsionerkennungssequenz HAV ausgewählt wird.
22. Verfahren gemäß Anspruch 20, wobei die besagte Zelle aus der Gruppe bestehend aus Epithelzellen, Endothelzellen, Nervenzellen, Tumorzellen und Lymphozyten ausgewählt wird.
23. Verfahren gemäß Anspruch 20, wobei das besagte zyklische Peptid die Zelladhäsion hemmt.
24. Zyklisches Peptid gemäß einem der Ansprüche 1–11 zur Verwendung in einem Verfahren zur Reduzierung der unerwünschten Zelladhäsion bei einem Säuger, das die Verabreichung des besagten Peptids an einen Säuger umfasst.
25. Zyklisches Peptid gemäß einem der Ansprüche 1–11 zur Verwendung in einem Verfahren zur Verbesserung der Abgabe eines Arzneimittels durch die Haut eines Säugers, das das Inkontaktbringen von Epithelzellen eines Säugers mit dem besagten Peptid und einem Arzneimittel unter Bedingungen und innerhalb einer Zeit umfasst, die ausreichen, um den Durchgang des besagten Arzneimittels durch die besagten Epithelzellen zu ermöglichen.
26. Peptid gemäß Anspruch 25, wobei das besagte zyklische Peptid in den Blutstrom des besagten Säugers gelangt.
27. Mittel gemäß Anspruch 16 zur Verwendung in einem Verfahren zur Verbesserung der Abgabe eines Arzneimittels an einen Tumor bei einem Säuger, das die Verabreichung des besagten Mittels an einen Säuger umfasst.
28. Mittel gemäß Anspruch 27, wobei das besagte Mittel bei dem besagten Tumor angewandt wird.
29. Mittel gemäß Anspruch 27, wobei der Tumor aus der Gruppe bestehend aus Blasentumoren, Ovarialtumoren und Melanomen ausgewählt wird.
30. Mittel gemäß Anspruch 27, wobei das besagte Mittel durch Injektion oder topisch oder systematisch verabreicht wird.

31. Mittel gemäß Anspruch 16 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von Krebs bei einem Säuger, das die Verabreichung des besagten Mittels an einen an Krebs leidenden Säuger umfasst.
32. Mittel gemäß Anspruch 31, wobei der besagte Krebs aus der Gruppe bestehend aus Karzinomen, Leukämie und Melanomen ausgewählt wird.
33. Mittel gemäß Anspruch 16 zur Verwendung in einem Verfahren zur Hemmung der Metastasierung von Tumorzellen bei einem Säuger, das die Verabreichung des besagten Mittels an einen Säuger umfasst.
34. Mittel gemäß Anspruch 16 zur Verwendung in einem Verfahren zur Hemmung der Angiogenese bei einem Säuger, das die Verabreichung des besagten Mittels an einen Säuger umfasst
35. Mittel gemäß Anspruch 16 zur Verwendung in einem Verfahren zur Verbesserung der Arzneimittelsabgabe an das Gehirn eines Säugers, das die Verabreichung des besagten Mittels an einen Säuger umfasst.
36. Mittel gemäß Anspruch 35, wobei das besagte Mittel durch Injektion verabreicht wird.
37. Verfahren gemäß Anspruch 20, wobei das besagte zyklische Peptid die Zelladhäsion verbessert.
38. Zyklisches Peptid gemäß Anspruch 13 zur Verwendung in einem Verfahren zur Verbesserung der Wundheilung bei einem Säuger, das das Inkontaktbringen der Wunde eines Säugers mit dem besagten Peptid umfasst.
39. Zyklisches Peptid gemäß Anspruch 13 zur Verwendung in einem Verfahren zur Verbesserung der Adhäsion des bei einem Säuger transplantierten Fremdgewebes, das das Inkontaktbringen der Implantationsstelle des Fremdgewebes bei einem Säuger mit dem besagten Peptid umfasst.
40. Peptid gemäß Anspruch 39, wobei das besagte Fremdgewebe ein Hautimplantat oder ein Organimplantat ist.
41. Verfahren zur Induktion der Apoptose in einer Cadherin-exprimierenden Zelle, das das Inkontaktbringen der Cadherin-exprimierenden Zelle mit einem zyklischen Peptid gemäß einem der Ansprüche 1–11 umfasst.
42. Verfahren zur Verbesserung und/oder Lenkung der Neuritenaussprössung, das das Inkontaktbringen eines Neurons mit einem zyklischen Peptid gemäß einem der Ansprüche 1–11 umfasst.
43. Mittel gemäß Anspruch 16 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von Rückenmarksverletzungen bei einem Säuger, das die Verabreichung des besagten Mittels an einen Säuger umfasst.
44. Zyklisches Peptid gemäß Anspruch 13 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von Rückenmarksverletzungen bei einem Säuger, das die Verabreichung des besagten Mittels an einen Säuger umfasst.
45. Mittel gemäß Anspruch 16 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung einer neurologischen Demyelinisationskrankheit bei einem Säuger, das die Verabreichung des besagten Mittels an einen Säuger umfasst.
46. Mittel gemäß Anspruch 45, wobei die besagte Krankheit multiple Sklerose ist.
47. Mittel gemäß Anspruch 16 zur Verwendung in einem Verfahren zur Regulation des Immunsystems eines Säugers, das die Verabreichung des besagten Mittels an den Säuger umfasst.
48. Mittel gemäß Anspruch 19 zur Verwendung in einem Verfahren zur Verhütung der Schwangerschaft eines Säugers, das die Verabreichung des besagten Mittels an den Säuger umfasst.
49. Mittel gemäß Anspruch 48, wobei der Schritt der Verabreichung intravaginal oder intrauterin erfolgt.
50. Mittel gemäß Anspruch 16 zur Verwendung in einem Verfahren zur Erhöhung der Gefäßdurchlässigkeit bei einem Säuger, das die Verabreichung des besagten Mittels an einen Säuger umfasst.

51. Verfahren zur Identifizierung eines zyklischen Peptids, das imstande ist, die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion zu regulieren, das Folgendes umfasst:

- (a) die Kultivierung von Neuronen auf einem einschichtigen Zellrasen, die bei Vorliegen und Nichtvorliegen eines potentiellen zyklischen Peptids unter Bedingungen und innerhalb eines Zeitraums N-Cadherin exprimieren, der ausreicht, um die Neuritenaussprossung zu ermöglichen;
- (b) die Bestimmung der mittleren Neuritenlänge der besagten Neuronen;
- (c) den Vergleich der mittleren Neuritenlänge der Neuronen, die bei Vorliegen eines potentiellen zyklischen Peptids kultiviert werden, mit der Neuritenlänge der Neuronen, die bei Nichtvorliegen eines potentiellen zyklischen Peptids kultiviert werden, und daraus die Identifizierung eines zyklischen Peptids, das imstande ist, die Zelladhäsion zu regulieren.

52. Verfahren zur Identifizierung eines zyklischen Peptids, das imstande ist, die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion zu regulieren, das Folgendes umfasst:

- (a) die Kultivierung von Zellen, die Cadherin bei Vorliegen und Nichtvorliegen eines potentiellen zyklischen Peptids unter Bedingungen und innerhalb eines Zeitraums exprimieren, der ausreicht, um die Zelladhäsion zu ermöglichen;
- (b) die visuelle Evaluation des Grads der Zelladhäsion bei den besagten Zellen und daraus die Identifizierung eines zyklischen Peptids, das imstande ist, die Zelladhäsion zu regulieren.

53. Verfahren gemäß Anspruch 52, wobei die besagten Zellen aus der Gruppe bestehend aus Endothel-, Epithel- und Krebszellen ausgewählt werden.

54. Verfahren zur Identifizierung eines zyklischen Peptids, das imstande ist, die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion zu regulieren, das Folgendes umfasst:

- (a) die Kultivierung von NRK-Zellen bei Vorliegen und Nichtvorliegen eines potentiellen zyklischen Peptids unter Bedingungen und innerhalb eines Zeitraums, der ausreicht, um die Zelladhäsion zu ermöglichen;
- (b) den Vergleich des Gehalts an Zelloberflächen-E-Cadherin bei Zellen, die bei Vorliegen eines potentiellen zyklischen Peptids kultiviert werden, mit dem Gehalt bei Zellen, die bei Nichtvorliegen eines potentiellen zyklischen Peptids kultiviert werden, und daraus die Identifizierung eines zyklischen Peptids, das imstande ist, die Zelladhäsion zu regulieren.

55. Verfahren zur Identifizierung eines zyklischen Peptids, das imstande ist, die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion zu regulieren, das Folgendes umfasst:

- (a) das Inkontaktbringen einer Epitheloberfläche der Haut mit einem Testmarker bei Vorliegen und Nichtvorliegen eines potentiellen zyklischen Peptids;
- (b) den Vergleich der Menge des Testmarkers, der bei Vorliegen eines potentiellen zyklischen Peptids durch die besagte Haut gelangt, mit der Menge, die bei Nichtvorliegen eines potentiellen zyklischen Peptids durch die besagte Haut gelangt, und daraus die Identifizierung eines zyklischen Peptids, das imstande ist, die Zelladhäsion zu regulieren.

56. Verfahren gemäß Anspruch 55, wobei die besagte Haut menschliche Haut ist.

57. In-vitro-Verfahren zur Identifizierung eines zyklischen Peptids, das imstande ist, die Cadherin-vermittelte Zelladhäsion zu regulieren, das Folgendes umfasst:

- (a) das Inkontaktbringen eines Blutgefäßes mit einem potentiellen zyklischen Peptid;
- (b) den Vergleich des Grads der Angiogenese des besagten Blutgefäßes mit einem vorherbestimmten Grad der Angiogenese, der bei einem Blutgefäß bei Vorliegen eines potentiellen zyklischen Peptids beobachtet wurde, und daraus die Identifizierung eines zyklischen Peptids, das imstande ist, die Zelladhäsion zu regulieren.

58. Set zur Verabreichung eines Arzneimittels über die Haut eines Säugers, das Folgendes umfasst:

- (a) ein Hautpflaster;
- (b) ein zyklisches Peptid gemäß einem der Ansprüche 1–11.

59. Set gemäß Anspruch 58, wobei das besagte Hautpflaster mit dem besagten zyklischen Peptid getränkt wird.

60. Set gemäß Anspruch 59, das ferner ein Arzneimittel umfasst.

61. Verfahren zur Regulation der Zelladhäsion, das daß Inkontaktbringen einer Cadherin-exprimierenden Zelle mit einem Antikörper umfasst, der sich speziell an ein zyklisches Peptid gemäß einem der Ansprüche

1–11 bindet.

62. Verfahren zur gezielten Anwendung eines Arzneimittels bei einer Cadherin-exprimierenden Zelle eines Säugers, das die Verabreichung eines Antikörpers an einen Säuger umfasst, der sich speziell an ein zyklisches Peptid gemäß einem der Ansprüche 1–11 bindet, wobei der besagte Antikörper an ein Arzneimittel gebunden ist.

63. Verfahren zum Nachweis des Vorliegen von Cadherin-exprimierenden Zellen in einer Probe, das Folgendes umfasst:

- (a) das Inkontaktbringen der Probe mit einem Antikörper, der sich speziell an ein zyklisches Peptid gemäß einem der Ansprüche 1–11 bindet, unter Bedingungen und für einen Zeitraum, der ausreicht, um die Bildung eines Antikörper-Cadherin-Komplexes zu ermöglichen;
 - (b) die Ermittlung der Größe des Antikörper-Cadherin-Komplexes,
- und daraus der Nachweis des Vorliegen von Cadherin-exprimierenden Zellen in einer Probe.

64. Verfahren gemäß Anspruch 63, wobei der besagte Antikörper an ein Trägermaterial gebunden ist.

65. Verfahren gemäß Anspruch 63, wobei der besagte Antikörper an einen nachweisbaren Marker gebunden ist.

66. Verfahren gemäß Anspruch 65, wobei der besagte nachweisbare Marker ein Fluoreszenzmarker ist und wobei der Schritt des Nachweisen unter Verwendung der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung durchgeführt wird.

67. Set zum Nachweis des Vorliegen von Cadherin-exprimierenden Zellen in einer Probe, das Folgendes umfasst:

- (a) einen Antikörper, der sich speziell an ein zyklisches Peptid gemäß einem der Ansprüche 1–11 bindet;
- (b) ein Nachweisreagens.

68. Zyklisches Peptid gemäß einem der Ansprüche 1–11 zur Verwendung in einem Verfahren zur Regulation der Zelladhäsion, das das Inkontaktbringen einer Cadherin-exprimierenden Zelle mit dem besagten Peptid umfasst.

69. Peptid gemäß Anspruch 68, wobei das besagte Cadherin aus der Gruppe bestehend aus E-Cadherin und N-Cadherin ausgewählt wird oder wobei das besagte Cadherin aus der Gruppe bestehend aus P-Cadherin, R-Cadherin und anderen Cadherinen mit der Zelladhäsionerkennungssequenz HAV ausgewählt wird.

70. Peptid gemäß Anspruch 68, wobei die besagte Zelle aus der Gruppe bestehend aus Epithelzellen, Endothelzellen, Nervenzellen, Tumorzellen und Lymphozyten ausgewählt wird.

71. Peptid gemäß Anspruch 68, wobei das besagte zyklische Peptid die Zelladhäsion hemmt.

72. Peptid gemäß Anspruch 68, wobei das besagte zyklische Peptid die Zelladhäsion verbessert.

73. Zyklisches Peptid gemäß einem der Ansprüche 1–11 zur Verwendung in einem Verfahren zur Induktion der Apoptose bei Cadherin-exprimierenden Zellen, das das Inkontaktbringen einer Cadherin-exprimierenden Zelle mit dem besagten Peptid umfasst.

74. Zyklisches Peptid gemäß einem der Ansprüche 1–11 zur Verwendung in einem Verfahren zur Verbeserung und/oder Lenkung der Neuritenaussprössung, das das Inkontaktbringen eines Neurons mit dem besagten Peptid umfasst.

75. Antikörper, der sich speziell an ein zyklisches Peptid gemäß einem der Ansprüche 1–11 bindet, zur Verwendung in einem Verfahren zur Regulation der Zelladhäsion, das das Inkontaktbringen einer Cadherin-exprimierenden Zelle mit dem besagten Antikörper umfasst.

76. Antikörper, der sich speziell an ein zyklisches Peptid gemäß einem der Ansprüche 1–11 bindet, zur Verwendung in einem Verfahren zur gezielten Anwendung eines Arzneimittels bei einer Cadherin-exprimierenden Zelle eines Säugers, das die Verabreichung des besagten Antikörpers an einen Säuger umfasst, wobei der

besagte Antikörper an ein Arzneimittel bebenden ist.

Es folgen 24 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

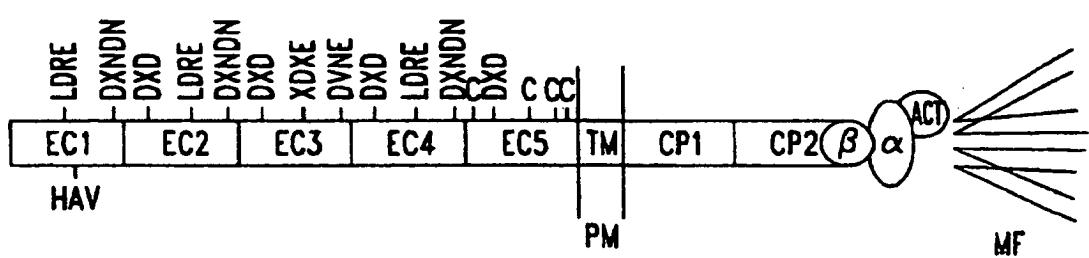


Fig. 1

menschliches N-cad	DWVIPPINLPENSRGPPQELVIRISDRDKNLSLRYSVTGPGADQPPGTGIFILNPISGQLSVTAKPLDREQ	IARFHLLRAHAVDINGNQVENPIDIVINVIDMNNDNRPEF
Maus-N-cad	DWVIPPINLPENSRGPPQELVIRISDRDKNLSLRYSVTGPGADQPPGTGIFILNPISGQLSVTAKPLDREL	IARFHLLRAHAVDINGNQVENPIDIVINVIDMNNDNRPEF
Kuh-N-cad	DWVIPPINLPENSRGPPQELVIRISDRDKNLSLRYSVTGPGADQPPGTGIFILNPISGQLSVTAKPLDREL	IARFHLLRAHAVDINGNQVENPIDIVINVIDMNNDNRPEF
menschliches P-cad	DWVVAPISVPENGKGPFPQRNLNLQKSNKDRDTKIFYSITGPGADSSPEGVFAVEKEKGWLLHMPMLDREK	IAKYELFGHASENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKF
Maus-P-cad	EWVMPPIFVPPENGKGPFPQRNLNLQKSNKDRGTKIFYSITGPGADSSPEGVFTIEKGSGWLLHMPMLDREK	IAKYELFGHASENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKF
menschliches E-cad	DWVIPPISCPENEKGPFPKNLVQIKSNKDKEGKVFYSITGQGADTPPGVFTIERETGWLKVTEPLDRER	IATYELFLSHAVSSNGAEDAEPMEILITVTDQNDNKPEF
Maus-E-cad	DWVIPPISCPENEKGEFPKNLVQIKSNRDKEKVFYSITGQGADTPPGVFTIERETGWLKVTEPLDRER	IAKYELFLSHAVSSNGAEDAEPMEIVITVTDQNDNRPEF

Fig. 2

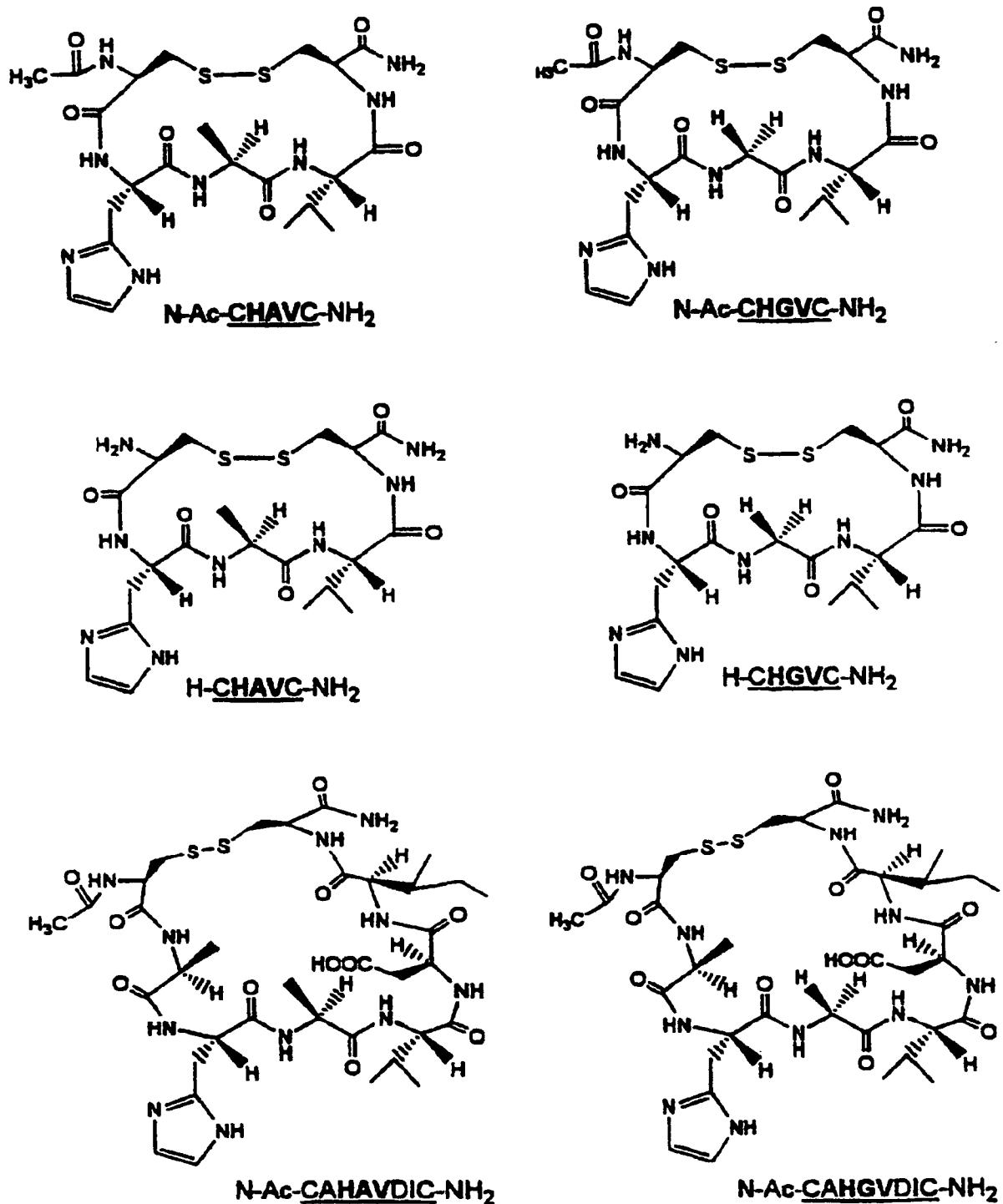


Fig. 3-1

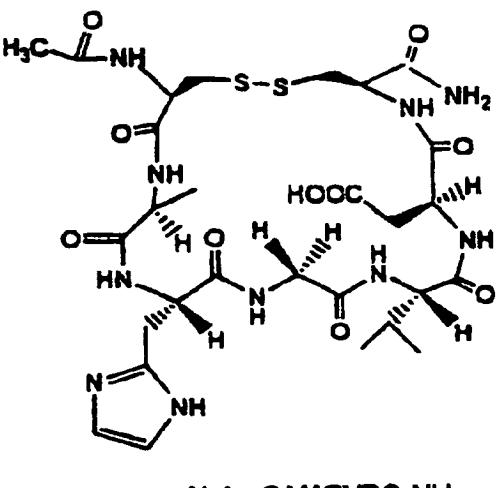
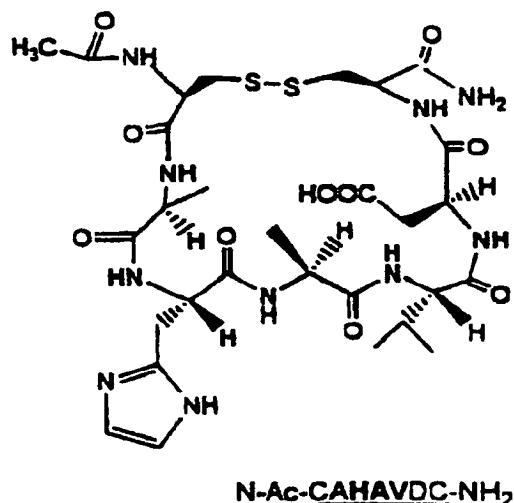
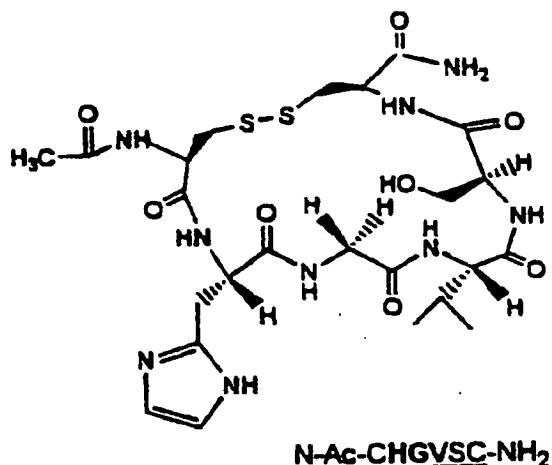
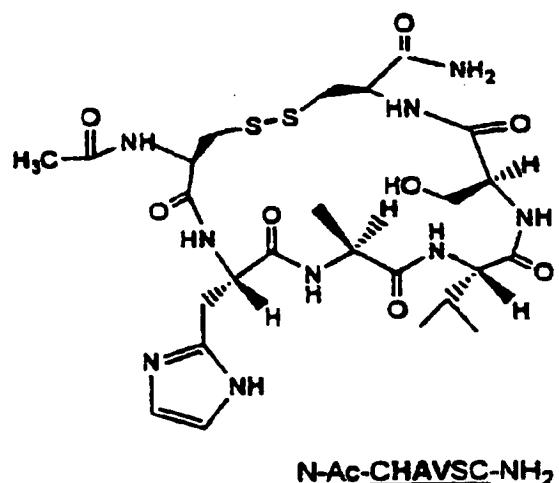
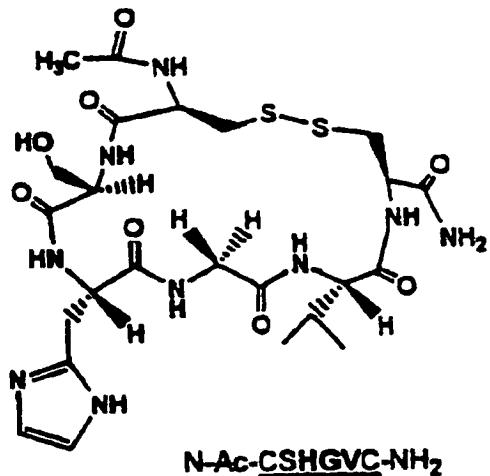
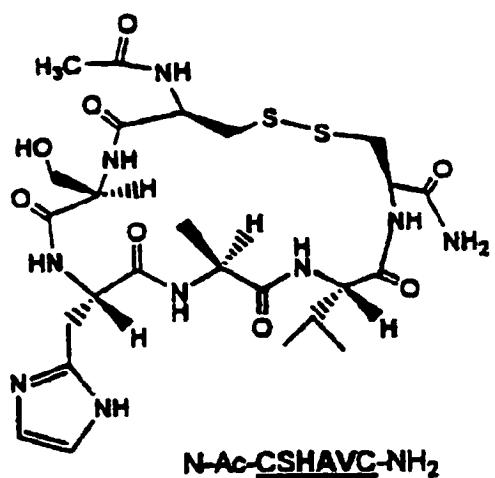
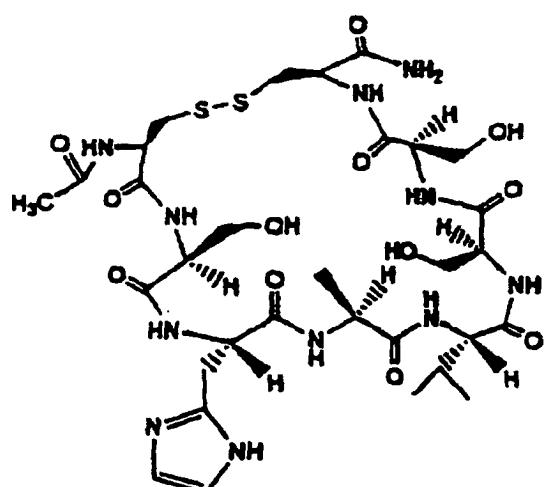
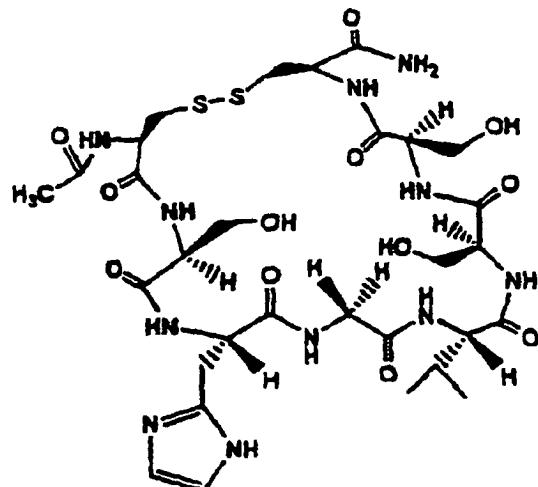


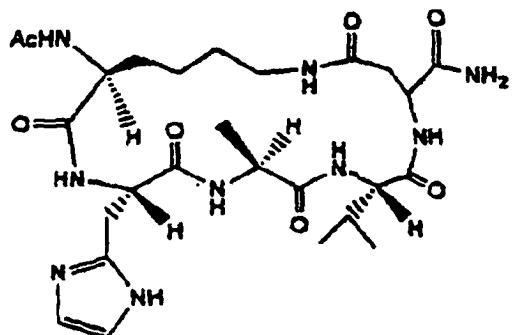
Fig. 3-2



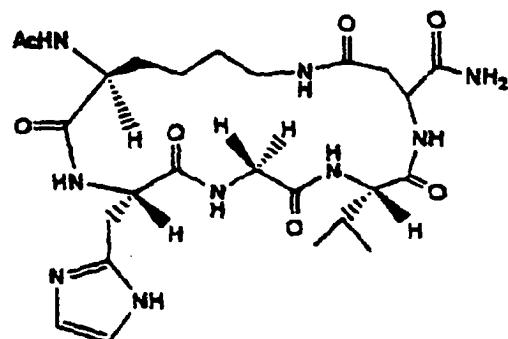
N-Ac-CSHAVSSC-NH₂



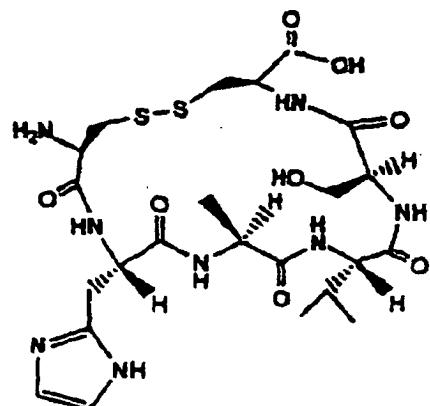
N-Ac-CSHGVSSC-NH₂



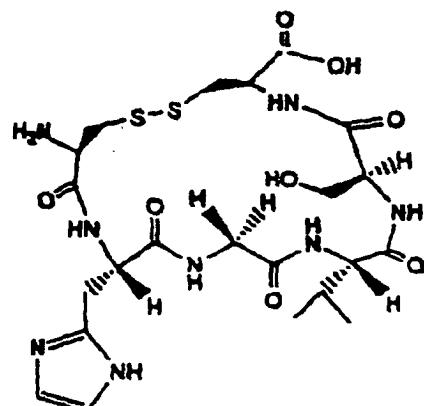
N-Ac-KHAVD-NH₂



N-Ac-KH GVD-NH₂



$$\text{H}-\underline{\text{CH}_2}\text{VSC}-\text{OH}$$



$$\text{H}-\underline{\text{CHGVS}}\text{C}-\text{OH}$$

Fig. 3-3

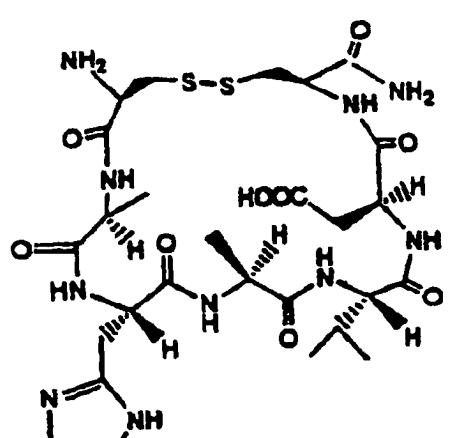
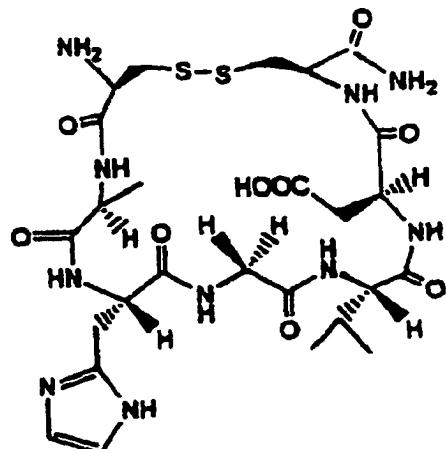
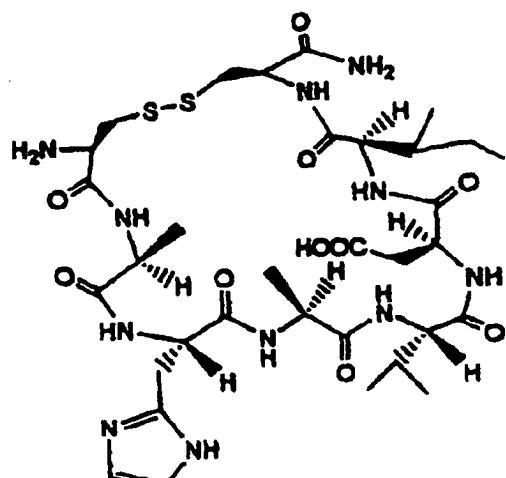
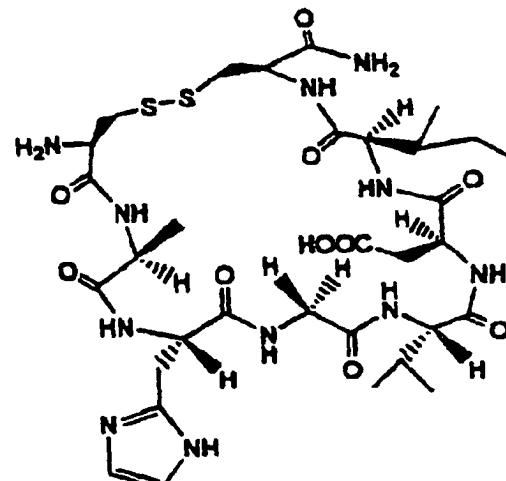
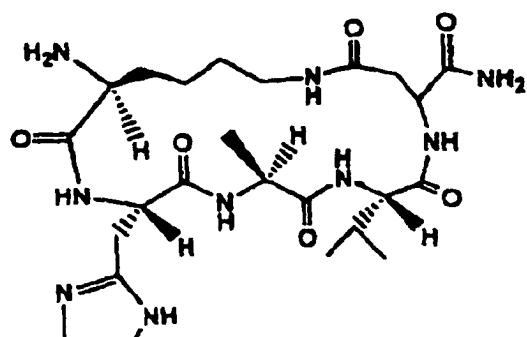
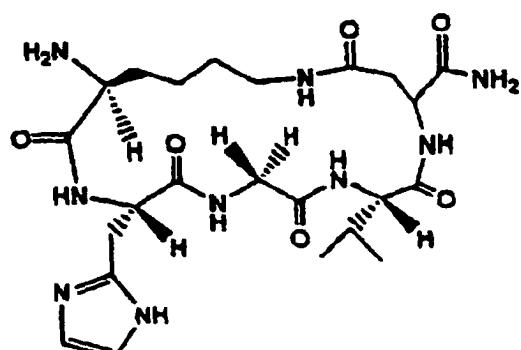
H-CAHAVDC-NH₂H-CAHGVDC-NH₂H-CAHAVDIC-NH₂H-CAHGVDIC-NH₂H-KHAVD-NH₂H-KHAGVD-NH₂

Fig. 3-4

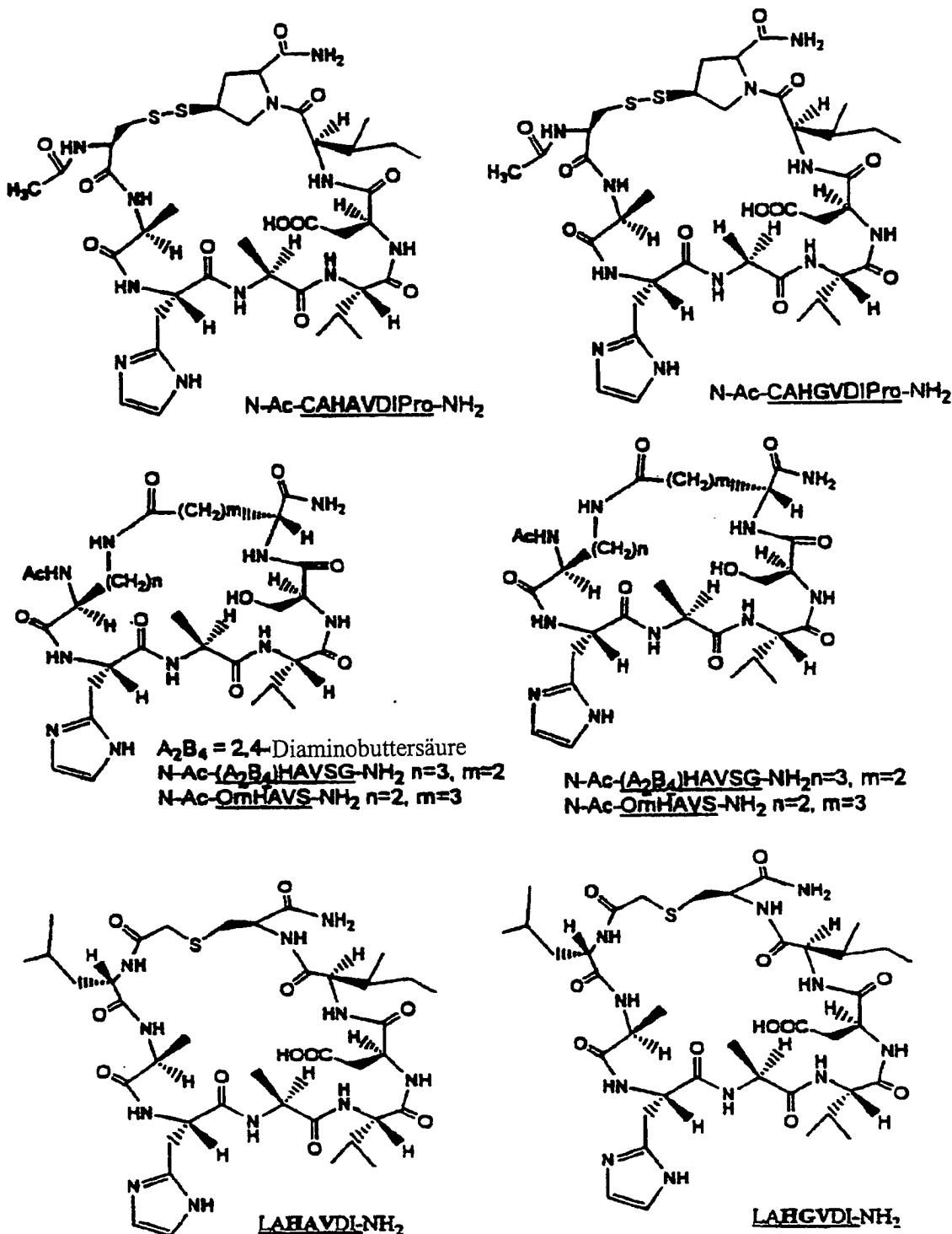


Fig. 3-5

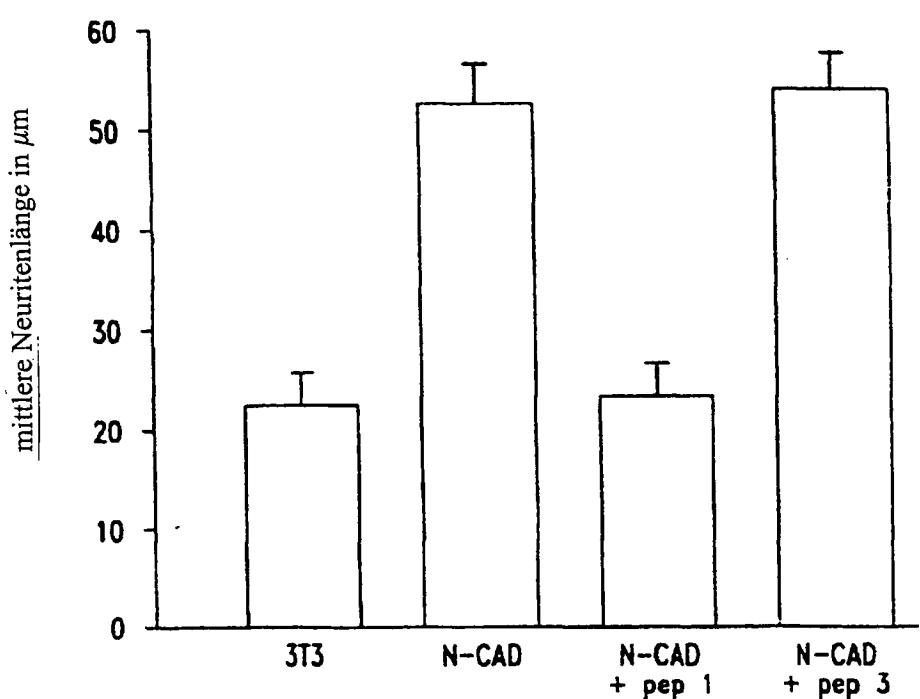


Fig. 4

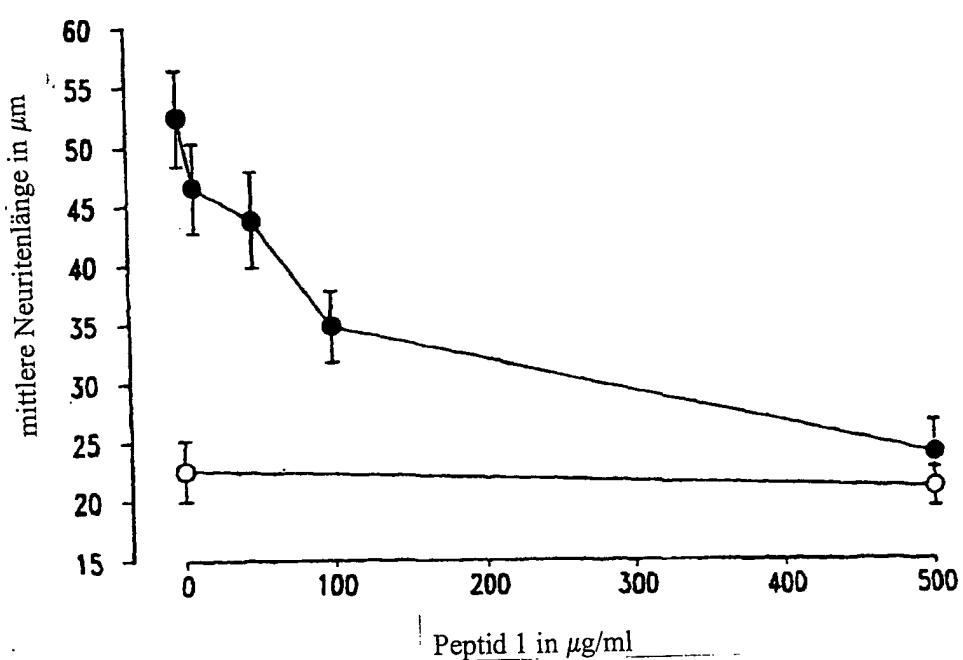


Fig. 5

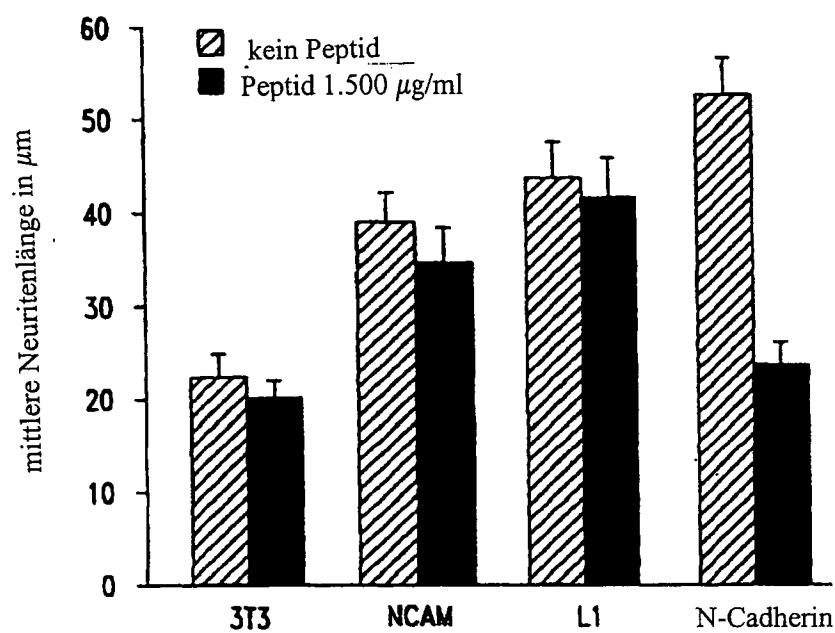


Fig. 6



Fig. 7A

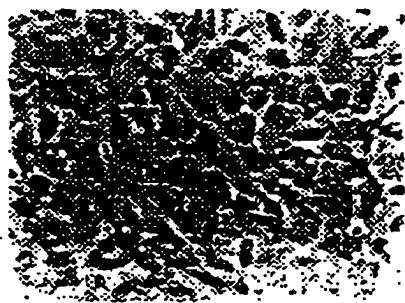


Fig. 7B

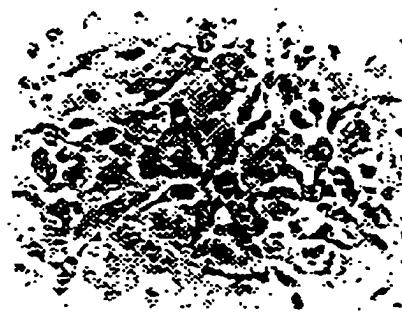


Fig. 7C



Fig. 8A



Fig. 8B

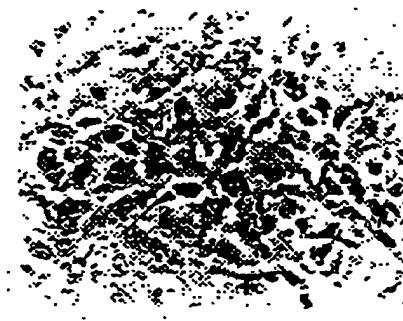


Fig. 8C

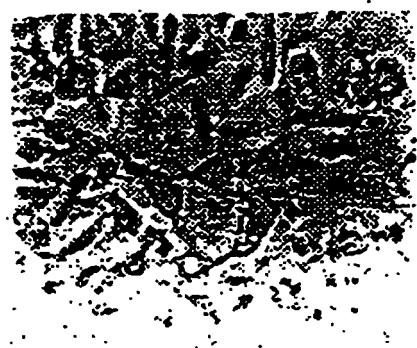


Fig. 9A



Fig. 9B



Fig. 9C

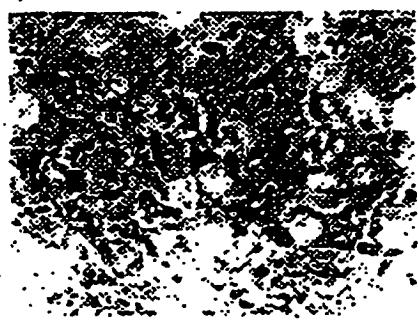


Fig. 10A



Fig. 10B



Fig. 10C

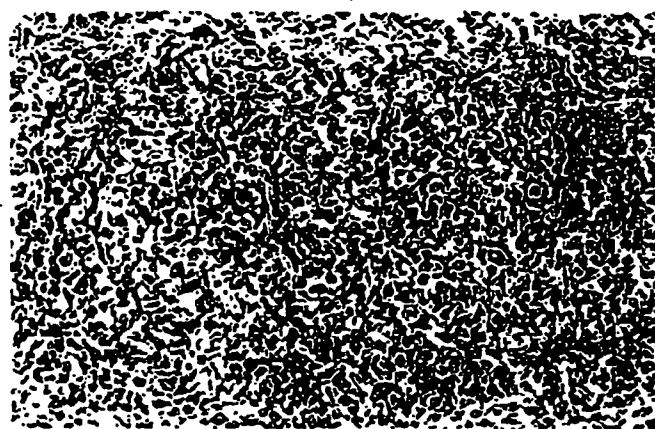


Fig. 11A

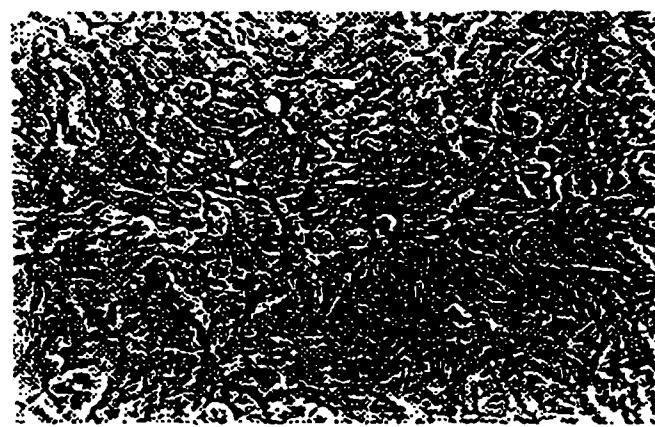


Fig. 11B



Fig. 11C

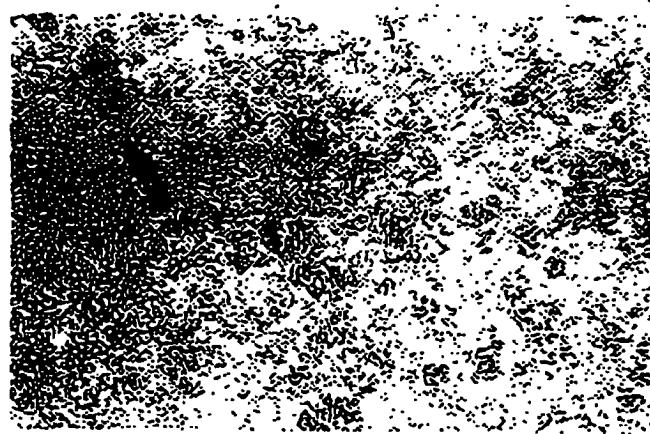


Fig. 11D

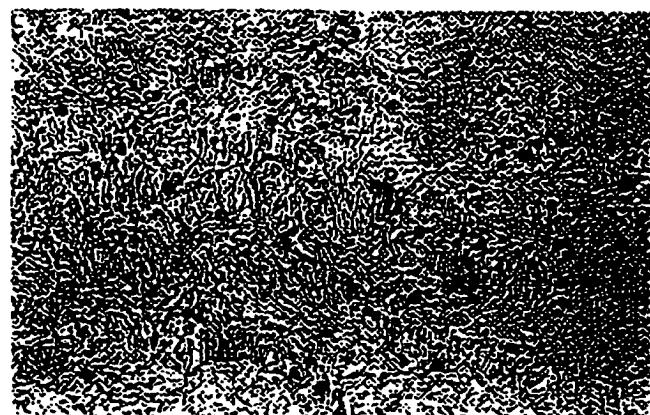


Fig. 11E



Fig. 11F

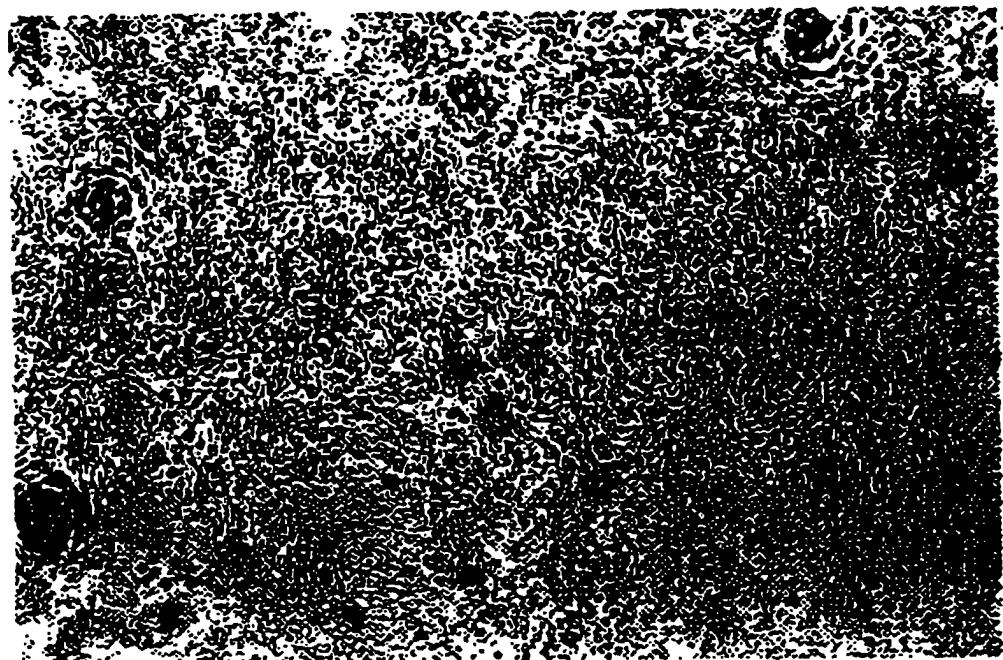


Fig. 12A

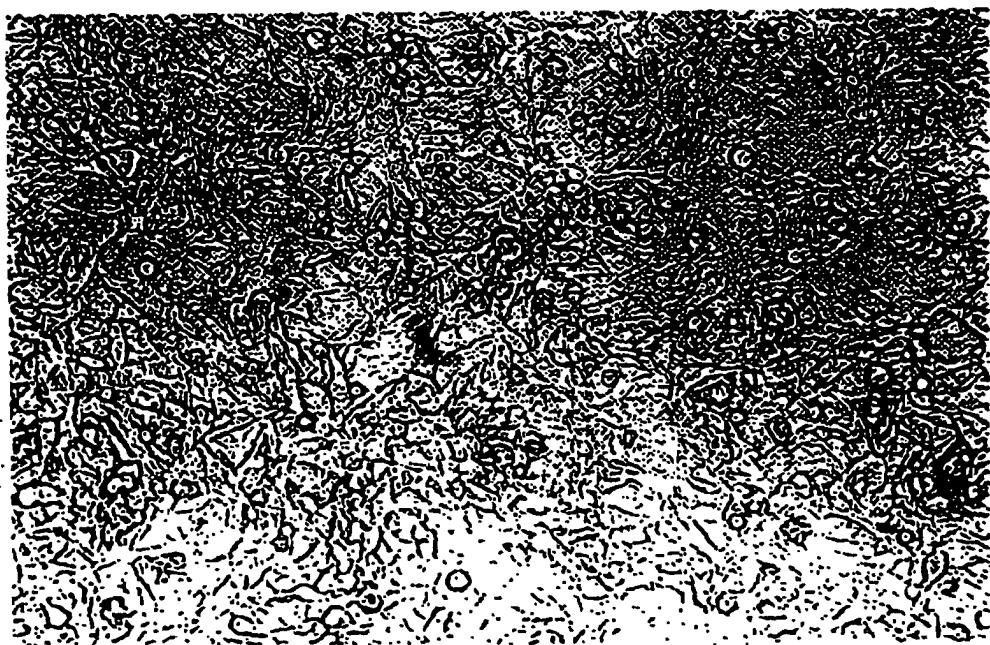


Fig. 12B

Unbehandelt

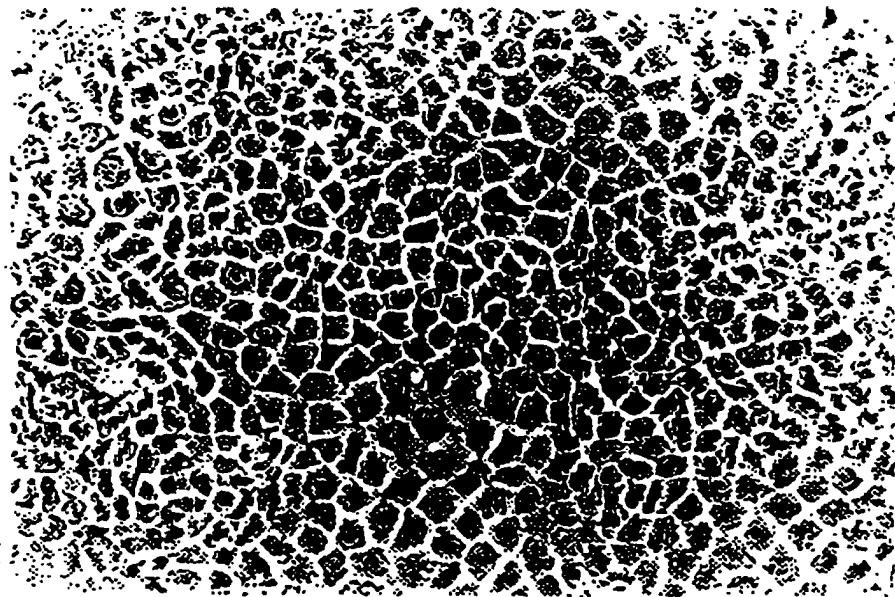


Fig. 13A

HAVS

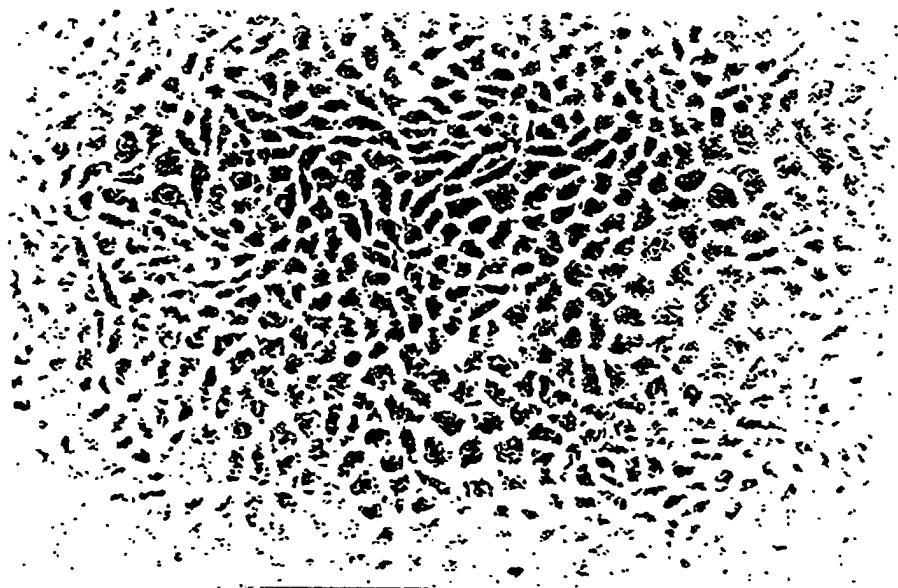


Fig. 13B

HGV

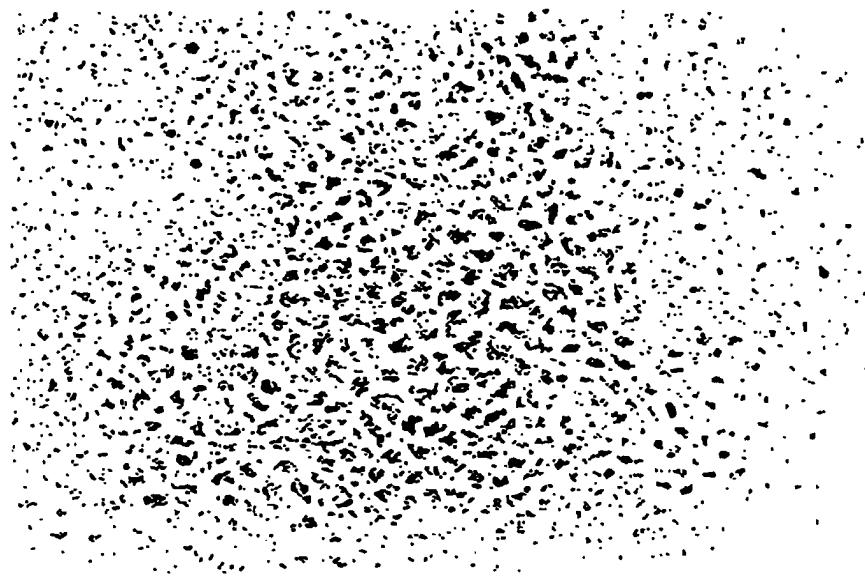


Fig. 13C

HAV



Fig. 13D

Unbehandelt

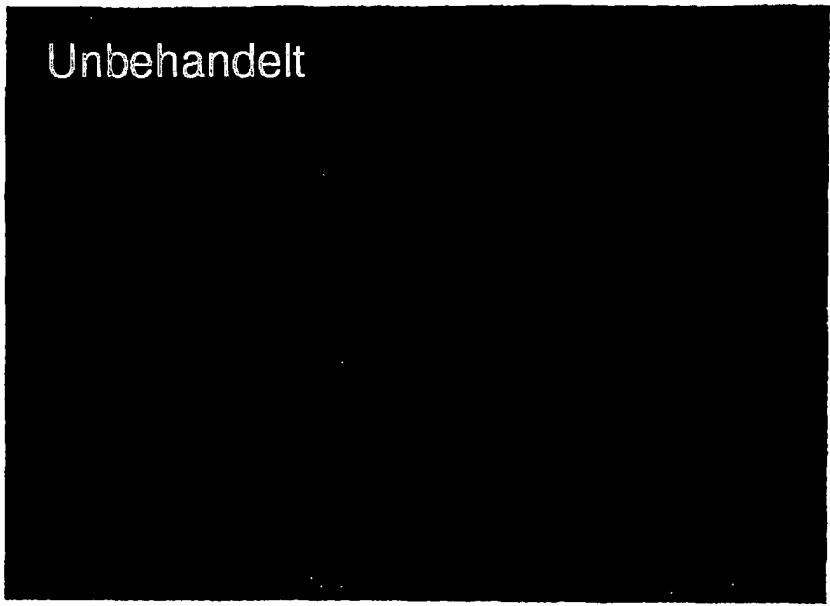


Fig. 14A

HAVS

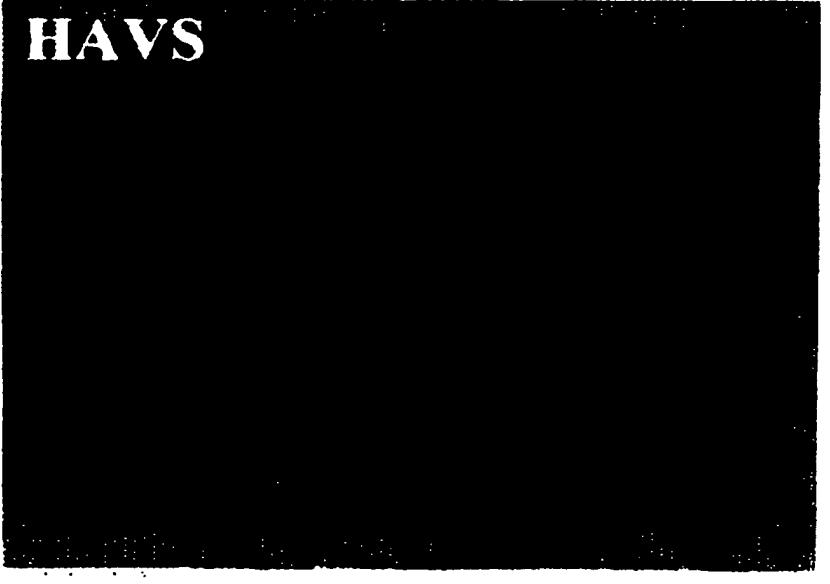


Fig. 14B

HGV

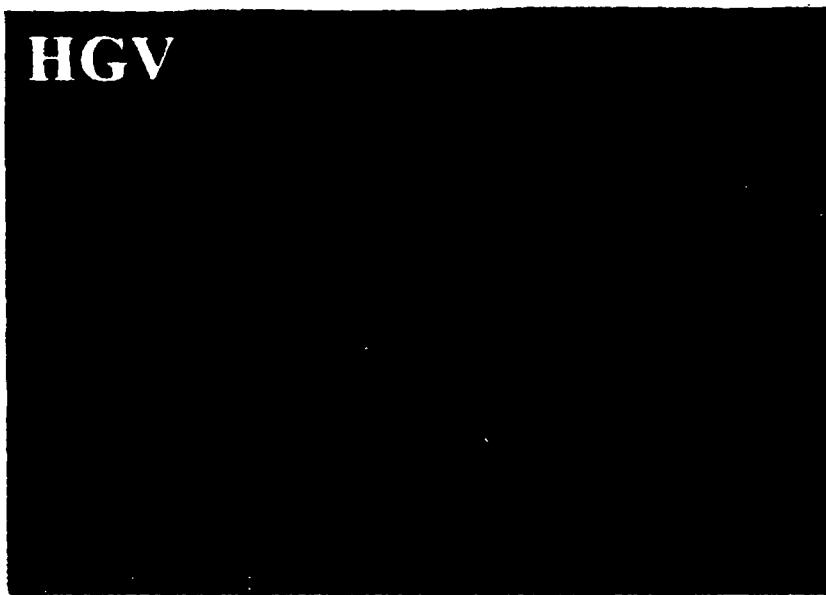


Fig. 14C

HAV

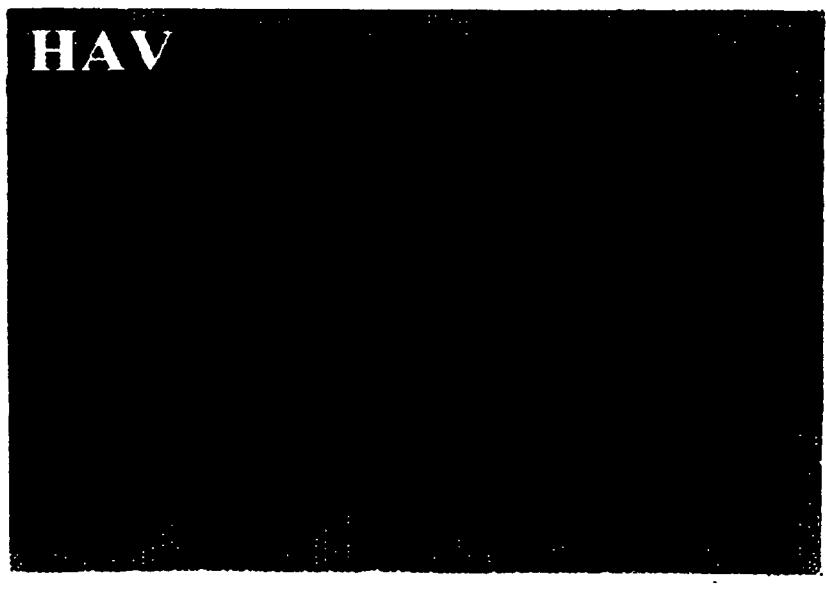


Fig. 14D



Fig. 15A

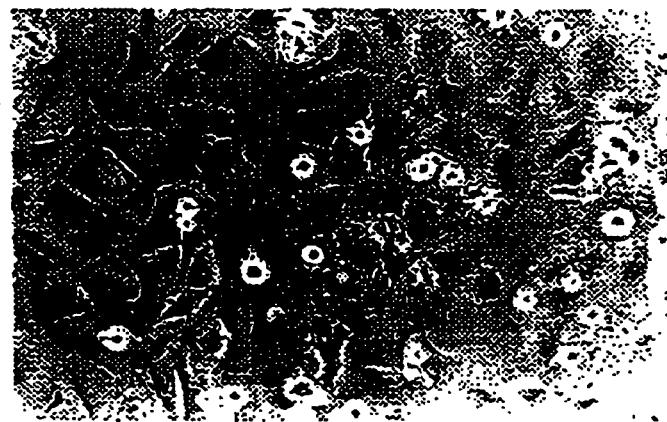


Fig. 15B

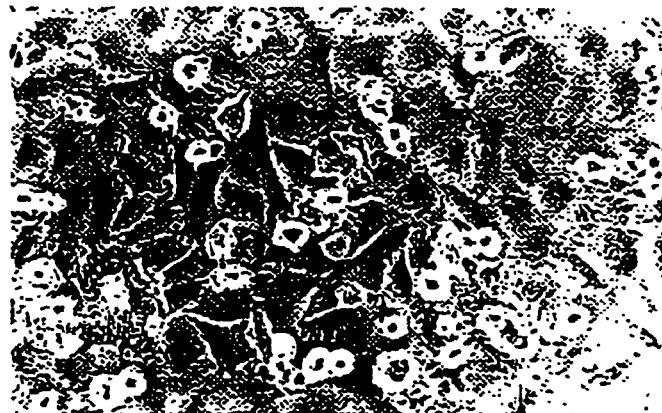


Fig. 15C



Fig. 16A



Fig. 16B

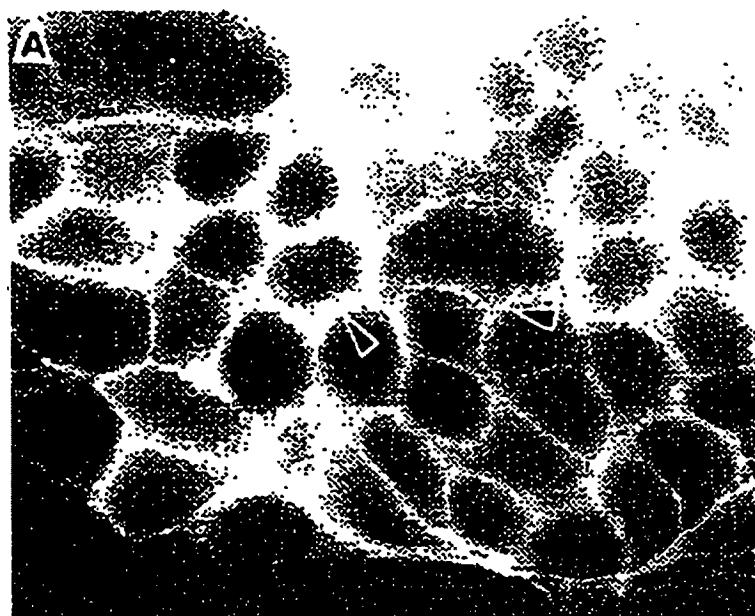


Fig. 17A

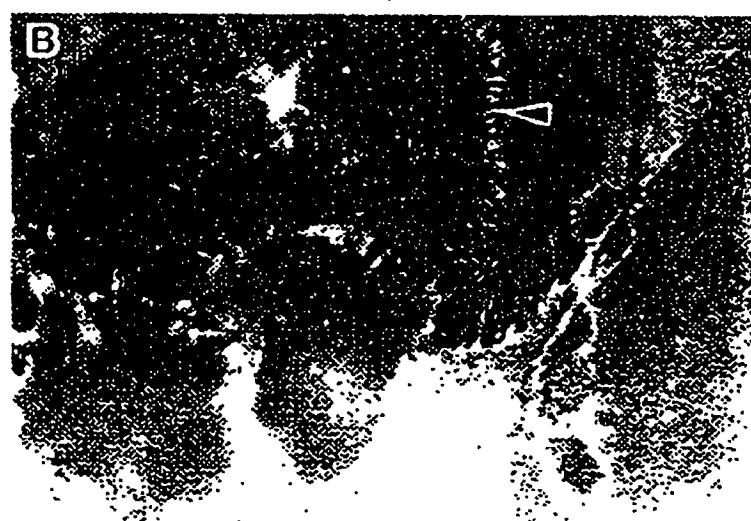


Fig. 17B