



(12)

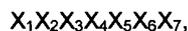
Patentschrift

- (21) Anmeldenummer: A 1184/2004 (51) Int. Cl.⁷: A61K 38/08
(22) Anmeldetag: 2004-07-13
(42) Beginn der Patentdauer: 2005-11-15
(45) Ausgabetag: 2006-07-15

(73) Patentinhaber:
MATTNER FRANK DR.
A-1190 WIEN (AT).
SCHMIDT WALTER DR.
A-1030 WIEN (AT).

(54) IMPFSTOFF GEGEN DIE ALZHEIMER-KRANKHEIT

- (57) Die Erfindung bezieht sich auf die Verwendung einer Verbindung, umfassend die folgende Aminosäuresequenz



worin X_1 eine Aminosäure außer C ist,
 X_2 eine Aminosäure außer C ist,
 X_3 eine Aminosäure außer C ist,
 X_4 eine Aminosäure außer C ist,
 X_5 eine Aminosäure außer C ist,
 X_6 nicht vorhanden oder irgendeine Aminosäure ist,
 X_7 nicht vorhanden oder irgendeine Aminosäure ist,
und worin $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ nicht DAEFRH ist, wobei die Verbindung eine Bindefähigkeit an einen Antikörper hat, der für die natürliche N-terminale A β 42 Sequenz DAEFRH spezifisch ist, und 5-mere davon, die eine Bindefähigkeit an den Antikörper haben, der für die natürliche N-terminale A β 42-Sequenz DAEFRH spezifisch ist, zur Herstellung eines Impfstoffs für die Alzheimer-Krankheit.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Verhütung und Behandlung der Alzheimer-Krankheit (Alzheimer's disease, AD).

5 Amyloid- β -Peptid (A β) spielt in der Neuropathologie der Alzheimer-Krankheit (AD) eine zentrale Rolle (Roher et al., 1993: β -Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: Implications for the pathology of Alzheimer's disease PNAS 90: 10836). Familiäre Formen der Erkrankung sind mit Mutationen im Amyloid-Vorläuferprotein (amyloid precursor protein, APP) und den Präsenilin-Genen in Verbindung gebracht worden. Mit der Erkrankung verbundene Mutationen in diesen Genen führen zu einer erhöhten Produktion der
10 42-Aminosäureform des Peptids (A β 42), welches die Hauptform ist, die in den Amyloid-Plaques der Alzheimer-Krankheit zu finden ist. Ein Tiermodell der Erkrankung ist im Handel erhältlich. Die PDAPP transgene Maus, die mutiertes humanes APP überexprimiert (wobei die Aminosäure in Position 717 F anstelle von V ist), entwickelt progressiv viele der neuropathologischen Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit in Alters- und Gehirn-abhängiger Weise (Games et al.,
15 1995: Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein , Nature 373: 523).

Es sind bereits Vakzinationsstudien mit einem normalen , nicht auf einem Mimotop basierenden Impfstoff durchgeführt worden. Transgene Tiere wurden mit aggregiertem A β 42 immuni-
20 siert, entweder vor Einsetzen der AD-typischen Neuropathologien (6 Wochen) oder in höherem Alter (11 Monate): Die Immunisierung der jungen Tiere verhinderte die Entwicklung der Plaquebildung, neuritische Dystrophie und Astrogliose. Die Behandlung der älteren Tiere reduzierte die AD-artigen Neuropathologien deutlich. Dieser experimentelle Impfansatz löste die Entwicklung von Antikörpern gegen A β 42 aus, die in der Lage waren, die Blut-Hirn-Schranke zu durchbrechen und Amyloid-Plaques anzugreifen (Schenk et al., 1999: Immunization with amyloid- β
25 attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse , Nature 400: 173). Die Plaques werden in der Folge durch mehrere Mechanismen entfernt, einschließlich durch Fc-Rezeptor medierte Phagozytose (Bard et al., 2000: Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse
30 model of Alzheimer disease , Nature Med. 6: 916). Dieser Impfstoff war auch in der Lage, Erinnerungsdefizite aufzuschieben (Janus et al., 2000: A β peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease , Nature 408: 979).

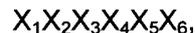
Seit Ende 1999 ist eine äußerst vielversprechende Immunisierungstherapie für AD in der klini-
35 schen Testphase. Es wird angenommen, dass die Immunisierung das Immunsystem dazu bringt, die Plaques anzugreifen und diese Ablagerungen aus dem betroffenen menschlichen Gehirn zu entfernen, obwohl der zugrunde liegende genaue Mechanismus noch mehr im Detail charakterisiert werden muss.

40 Diese klinischen Versuche wurden von der pharmazeutischen Firma Elan zusammen mit ihrer Schwesterfirma American Home Products durchgeführt (therapeutischer Impfstoff AN-1792, QS21 als AdjuVans). Die Versuche der Phase I wurden im Jahre 2000 erfolgreich abgeschlossen. Gegen Ende 2001 wurde mit den Versuchen der Phase II begonnen, um die Wirksamkeit an einer Gruppe von Patienten mit schwacher bis mittlerer AD zu testen.

45 Nun wurden diese Versuche der Phase II wegen Nervenentzündungen bei mehreren Patienten auf Dauer unterbrochen (Editorial 2002, Insoluble problem? , Nature Med. 8: 191). Die Symptome umfassten aseptische Meningoenzephalitis, die zu einem sofortigen Stopp dieser weltweiten Versuche führte. Im schlechtesten Fall wird sich zeigen, dass die betroffenen Patienten eine
50 Autoimmunantwort aufgebaut haben - ein Risiko, das viele Immuntherapien mit sich bringen. Autoimmunkomplikationen hätten angesichts der Allgegenwart von APP vorhergesehen werden können, das natürlich antigene Determinanten trägt, die es mit seinem proteolytischen Produkt gemeinsam hat. In jüngerer Zeit haben sich zusätzliche Studien auf die Eigenschaften von aggregierten A β 42 Immunisierungs-induzierten Antikörpern (bei Menschen und Mäusen) kon-
55 zentriert und gezeigt, dass die meisten Antikörper eine kleine Domäne zwischen Aminosäure 4

und 10 von A β 42 (A β 4-10) erkennen. Die Maus-Antikörper waren in der Lage, die A β -Fibrillogenese zu blockieren, und zerstörten bereits vorhandene A β -Fasern (McLaurin et al., 2002: Therapeutically effective antibodies against amyloid- β peptide target amyloid- β residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis, Nature Med. 8: 1263). Interessanter Weise reagieren die menschlichen Antikörper nicht mit dem auf der Oberfläche von Zellen exponierten APP oder irgendeinem anderen nicht aggregierten proteolytischen Produkt des Vorläufers (Hock et al., 2002: Generation of antibodies specific for β -amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease, Nature Med. 8: 1270). Es wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den Seren von Menschen und Mäusen beobachtet: Im Gegensatz zu den menschlichen Antikörpern erkennen Mausantikörper monomere, oligomere und fibrilläre A β . Dies ist bedeutsam und kann eine Vorbedingung für die therapeutische Wirksamkeit sein, da es immer mehr Anzeichen dafür gibt, dass kleine Oligomere von A β , die von humanem anti-A β nicht erkannt werden, die toxischen Hauptakteure bei der Erkrankung sind (Walsh et al., 2002: Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo, Nature 416: 535). Daher besteht eine potentielle neue Strategie in der Immunisierung mit einem Impfstoff, der β -Amyloid-Aminosäuren 4-10 (anstelle von aggregiertem A β 42) enthält. Trotz der noch unbekanntenen Wirksamkeit kann sich auch diese Strategie mit Autoimmunproblemen konfrontiert sehen, da die Patienten direkt mit einem (linearen B-Zellen-) Selbst-Epitop immunisiert werden sollen.

Trotz dieser enttäuschenden Entwicklungen bei den jüngsten AD-Impfstrategien wird ein A β -Impfstoff noch immer als der verheißungsvollste Weg im Kampf gegen AD angesehen. Es sind jedoch dringend Verbesserungen und neue Strategien bei der AD-Impfung erforderlich. Insbesondere sollte ein solcher Impfstoff keine autoreaktiven T- und/oder B-Zellen anregen. Mimotopen-Peptide, die eine Bindungsfähigkeit für einen Antikörper aufweisen und für die natürliche N-terminale A β 42-Sequenz DAEFRH spezifisch sind, und 5-mere davon, die eine Bindungsfähigkeit für den Antikörper aufweisen, der für die natürliche N-terminale A β 42-Sequenz DAEFRH spezifisch ist, für die Herstellung eines Impfstoffs für Alzheimer-Krankheit (AD) sind in der PCT/EP04/00162 (welche durch Hinweis darauf hierin mit einbezogen ist) beschrieben. Bevorzugte Mimotope umfassen in dieser Anmeldung die folgende Aminosäuresequenz:



worin

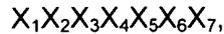
X_1 G oder eine Aminosäure mit einer Hydroxygruppe oder eine negativ geladene Aminosäure, vorzugsweise E, Y, S oder D ist,
 X_2 eine hydrophobe Aminosäure oder eine positiv geladene Aminosäure, vorzugsweise I, L, V, K, W, R, Y, F oder A ist,
 X_3 eine negativ geladene Aminosäure, vorzugsweise D oder E, ist,
 X_4 eine aromatische Aminosäure oder L, vorzugsweise Y, F oder L ist,
 X_5 H, K, Y, F oder R, vorzugsweise H, F oder R ist, und
 X_6 S, T, N, Q, D, E, R, I, K, Y oder G, vorzugsweise T, N, D, R, I oder G ist, insbesondere EIDYHR, ELDYHR, EVDYHR, DIDYHR, DLDYHR, DVDYHR, DIDYRR, DLDYRR, DVDYRR, DKELRI, DWELRI, YREFRI, YAEFRG, EAEFRG, DYEFRG, ELEFRG, DRELRI, DKELKI, DRELKI, GREFRN, EYEFRG, DWEFRDA, SWEFRT, DKELR oder SFEFRG ist.

Weiters können die natürlichen L- oder D-Aminosäuren durch nicht natürliche L- oder D-Aminosäuren substituiert sein. Beispielsweise können L, I oder V durch Nle, Nva, Cha oder alpha-Aminosäuren mit anderen linearen oder zyklischen aliphatischen Seitenketten, W oder F durch aromatische Aminosäuren und R und K durch basische Aminosäuren, wie Ornithin oder Homoarginin, substituiert sein. Serin und Threonin können durch Aminosäuren mit aliphatischen oder aromatischen Seitenketten mit einer terminalen OH-Gruppe substituiert sein.

Weiters sieht die vorliegende Erfindung vor, dass Mimotopen-Peptide (die DAEFRH imitieren)

zur Impfung gegen AD verwendet werden.

Auch werden die Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung durch Screenen von Peptid-Bibliotheken mit einem Antikörper, der für die natürliche N-terminale A β 42-Sequenz DAEFRH spezifisch ist, vorgesehen. Vorzugsweise haben oder umfassen die Peptide in der Bibliothek die folgende Aminosäuresequenz:



worin X₁ eine Aminosäure außer C ist,

X₂ eine Aminosäure außer C ist,

X₃ eine Aminosäure außer C ist,

X₄ eine Aminosäure außer C ist,

X₅ eine Aminosäure außer C ist,

X₆ nicht vorhanden oder irgendeine Aminosäure, vorzugsweise außer C, ist,

X₇ nicht vorhanden oder irgendeine Aminosäure, vorzugsweise außer C, ist,

und worin X₁X₂X₃X₄X₅X₆ nicht DAEFRH ist, wobei dieses Peptid eine Bindefähigkeit an einen Antikörper hat, der für die natürliche N-terminale A β 42 Sequenz DAEFRH spezifisch ist, und 5-mere davon, die eine Bindungsfähigkeit an diesen Antikörper haben, der für die natürliche N-terminale A β 42-Sequenz DAEFRH spezifisch ist, zur Herstellung eines Impfstoffs für die Alzheimer-Krankheit (Alzheimer's disease, AD).

Erfindungsgemäß wird ein A β 42 Mimotop zur Impfung gegen AD verwendet: Das Mimotop löst die Produktion von Antikörpern gegen A β 42, jedoch nicht gegen das native APP aus. Das Mimotop kann mit einem (monoklonalen) Antikörper und (im Handel erhältlichen) Peptidbibliotheken identifiziert werden (z.B. gemäß Reineke et al., 2002: Identification of distinct antibody epitopes and mimotopes from a peptide array of 5520 randomly generated sequences, J. Immunol. Methods 267: 37). Es wird ein (monoklonaler) Antikörper verwendet, der APP nicht erkennt, jedoch nur verschiedene A β Spezies mit Amino-terminaler Asparaginsäure erkennt (ein Beispiel für einen solchen Antikörper ist in Johnson-Wood et al., 1997, beschrieben: Amyloid precursor protein processing and A β 42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease, PNAS 94: 1550). Ein solcher Antikörper hat sich im Laufe der vorliegenden Erfindung als ein ideales Werkzeug zur Identifizierung von für die Impfung geeigneten Mimotopen erwiesen. Obwohl sich gezeigt hat, dass derartige monoklonale Antikörper in einem Maus-Modell von AD positive Wirkungen haben, wenn sie direkt an die Mäuse verabreicht werden (Bard et al., 2000; Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease, Nature Med. 6: 916), ist niemals vorgeschlagen worden, diese Antikörper als Mimotop-Suchwerkzeuge zur Isolierung von AD-Impfstoffverbindungen zu verwenden.

Im Stand der Technik konzentrierten sich alle Bemühungen auf das natürlich vorkommende A β -Peptid. Wie oben erwähnt, wurden die klinischen Versuche mit A β -Peptid-Impfstoffen auf Grund des Vorkommens von Nervenentzündungen gestoppt. Tatsächlich schlagen T-Zellen-Epitop-Vorhersageprogramme (BIMAS für Klasse I-beschränkte Epitope und TEPITOPE für Klasse II-beschränkte Epitope) eine große Anzahl von (Selbst-)Epitopen innerhalb der Sequenz vor. Dies könnte implizieren, dass die Nervenentzündungen durch Autoimmunreaktionen ausgelöst wurden, was einen solchen Impfstoff für die allgemeine Anwendung ungeeignet machen würde.

Im Gegensatz zu solchen A β -Impfstoffen, die im Stand der Technik vorgeschlagen wurden, ist während der Behandlung mit einem Impfstoff, der ein erfindungsgemäßes Mimotop enthält, kein Auftreten von Autoimmunreaktionen zu erwarten, da der erfindungsgemäß für die Mimotopenidentifizierung verwendete (monoklonale) Antikörper APP nicht erkennt und sich die Mimotopsequenz von von A β 42 abgeleiteten Selbstsequenzen unterscheidet, die in Versuchen bisher verwendet wurden oder in zukünftigen Versuchen verwendet werden sollen.

Der erfindungsgemäß für die Mimotopenidentifizierung verwendete Antikörper erkennt die von A β abgeleitete Aminosäuresequenz DAEFRH (= ursprüngliches Epitop) mit einer freien Amino-terminalen Asparaginsäure, natives APP jedoch nicht. Der Antikörper kann ein monoklonales oder polyklonales Antikörperpräparat oder jeglicher Antikörperteil oder Derivat davon sein, die
 5 einzige Vorbedingung ist, dass das Antikörpermolekül spezifisch das DAEFRH-Epitop erkennt, d.h. dass es nicht an die natürlichen N-terminal verlängerten Formen des Amyloid-Vorläuferproteins bindet, was bedeutet, dass die Bindungsfähigkeit an das DAEFRH-Epitop mindestens 100 Mal, vorzugsweise mindestens 1000 Mal, noch mehr bevorzugt mindestens
 10 10^5 Mal höher ist als an das APP-Molekül. Der Antikörper kann ein Antikörper sein, der die gleiche oder eine höhere Bindungsfähigkeit an die DAEFRH-Sequenz aufweist als der Antikörper, der von Johnson-Wood et al. 1997 beschrieben wurde. Selbstverständlich können auch Antikörper mit einer geringeren Bindungsfähigkeit verwendet werden (> 10%, > 50% oder > 80% der Bindungsfähigkeit des Antikörpers von Johnson-Wood et al.), obwohl die höhere Bindungsfähigkeit mehr bevorzugt ist.

15 Die erfindungsgemäßen Verbindungen binden an jene Antikörper mit vergleichbarer Spezifität wie die DAEFRH-Sequenz.

Die erfindungsgemäß zu verwendende Verbindung umfasst oder besteht vorzugsweise aus
 20 einem Peptid, worin
 X₁ G oder eine Aminosäure mit einer Hydroxygruppe oder eine negativ geladene Aminosäure ist, vorzugsweise G, E, Y, S oder D,
 X₂ eine hydrophobe Aminosäure oder eine positiv geladene Aminosäure ist, vorzugsweise N, I, L, V, K, W, R, Y, F oder A,
 25 X₃ eine negativ geladene Aminosäure ist, vorzugsweise D oder E,
 X₄ eine aromatische Aminosäure oder eine hydrophobe Aminosäure, ist, vorzugsweise Y, F oder L,
 X₅ H, K, Y, F oder R ist, vorzugsweise H, F oder R, und
 X₆ jede beliebige Aminosäure außer P, oder - wenn X₇ vorhanden ist - außer C ist, vorzugsweise
 30 S, T, N, Q, D, E, R, I, K, Y oder G, insbesondere T, N, D, R, I oder G.

Dabei können die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren durch ihre chemischen Analoga oder durch D-Aminosäuren ersetzt werden; z.B. kann L durch Nle, Nva oder Cha ersetzt werden. Die Durchführbarkeit eines solchen Austausches kann mit dem im Beispielabschnitt der
 35 vorliegenden Anmeldung beschriebenen Versuchsmodell leicht getestet werden. Sterische Überlegungen können auch über Computermodelle für die Bindung des Antikörpers an das Peptid berechnet werden.

Speziell bevorzugt sind Peptide, die die folgende(n) Sequenz(en) aufweisen: DAEFRWP,
 40 DNEFRSP, GSEFRDY, GAEFRFT, SAEFRTO, SAEFRAT, SWEFRNP, SWEFRLY, SWELRQA, SVEFRYH, SYEFRHH, SQEFRTP, SSEFRVS, DWEFRD, DAELRY, DWELRQ, SLEFRF, GPEFRW, GKEFRT, AYEFRH, DKE(Nle)R, DKE(Nva)R oder DKE(Cha)R, insbesondere DAEFRWP, DNEFRSP, SAEFRTO, SAEFRAT, SWEFRNP, SWEFRLY, SWELRQA, SVEFRYH, SYEFRHH, SQEFRTP, SSEFRVS, DWEFRD, DAELRY, DWELRQ, SLEFRF,
 45 GPEFRW oder GKEFRT.

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

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

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

Das Isolieren geeigneter 5-mere gemäß der vorliegenden Erfindung kann auf die oben beschriebene Weise, auf Bibliotheken mit 5 Aminosäure-Variablen adaptiert, erreicht werden, und kann vorzugsweise entweder durch Screenen einer Bibliothek mit den Aminosäure-Variablen X₁ bis X₅, wie hierin beschrieben, oder durch Identifizieren geeigneter 5-mere in einem positiven, in einer 6-mer-Bibliothek gescreenten Mitglied (siehe oben) durchgeführt werden. Auf dieselbe Weise können auch 7-mere, 8-mere, 9-mere, 10-mere, ... Bibliotheken demgemäß zum Screenen auf geeignete Sequenzen, die an den vorliegenden Antikörper-Typ binden, angewendet werden. Geeignete Antikörper-bindende Fragmente solcher längerer Sequenzen können z.B. durch Testen dieser Fragmente mit einer Länge von 5, 6, 7, 8, 9, ... Aminosäureresten auf Bindung an den vorliegenden Antikörper gefunden werden.

Ein solches Verfahren hat sich zum Vorsehen von Aβ Mimotopen gemäß der vorliegenden Erfindung als erfolgreich erwiesen.

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

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

Die Bibliothek muss konstruiert werden, um die natürlich vorkommende Aβ Sequenz (z.B. DAEFRH) auszuschließen, da eine Impfung mit dieser Sequenz von dieser Erfindung eindeutig ausgeschlossen ist.

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

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf eine Zusammensetzung umfassend ein anti-N-terminales Aβ42-Antikörper-bindendes Peptid (oder in bestimmten Fällen bevorzugt, ein größeres Molekül, das ein solches Peptid (z.B. das an ein Träger- oder Abgabemolekül gebundene

Peptid) aufweist), wie hierin definiert (gegebenenfalls als einzige wirksame Komponente), vorzugsweise auf einen Impfstoff gegen die Alzheimer-Krankheit, umfassend ein solches Antigen. Ein geeignetes Antigen beinhaltet zumindest ein Peptid, ausgewählt aus der Gruppe DAEFRWP, DNEFRSP, GSEFRDY, GAEFRFT, SAEFRTO, SAEFRAT, SWEFRNP, SWEFRLY, SWELRQA, SVEFRYH, SYEFRHH, SQEFRTP, SSEFRVS, DWEFRD, DAELRY, DWELRQ, SLEFRF, GPEFRW, GKEFRF, AYEFRH, DKE(Nle)R, DKE(Nva)R oder DKE(Cha)R. Diese Peptide sind neben den anderen mit der vorliegenden Erfindung zur Verfügung gestellten Peptiden spezifisch für die Verwendung zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, insbesondere für AD-Impfstoffe, geeignet. Diese Sequenzen sind rein künstliche A β -Mimotope. Die Peptide können - für Impfzwecke - (kovalent oder nicht kovalent) an geeignete Träger gekoppelt sein und können als Peptidverbindungen oder Komplexe zusammen mit anderen Verbindungen oder Moietäten, z.B. Adjuvantien, Peptiden oder Proteinträgern, etc. vorliegen und auf geeignete Weise verabreicht werden (wie z.B. in O'Hagan et al., Nature Reviews, Drug Discovery 2 (9) (2003), 727-735 beschrieben).

Die Erfindung ist in den folgenden Beispielen und Zeichnungen noch weiter beschrieben, selbstverständlich ohne darauf beschränkt zu sein.

Fig. 1 zeigt die individualisierten Peptidmitglieder von Bibliothek 4, die für den vorliegenden Screening-Prozess verwendet werden.

Fig. 2 zeigt einen Inhibitionsassay mit Mimotopen für DAEFRH.

Fig. 3 zeigt einen weiteren Inhibitionsassay mit anderen Mimotopen für DAEFRH.

Fig. 4 und 5 beschreiben die Ergebnisse von Inhibitionsassays, die mit anderen Mimotopen-Peptiden gemäß der vorliegenden Erfindung durchgeführt wurden.

Fig. 6 bis 9 zeigen die Ergebnisse von Inhibitionsassays, die mit den Mimotopen-Peptiden 4011-4018, 4019-4025, 4031-4038 bzw. 4061-4064 durchgeführt wurden.

BEISPIELE:

1.: Herstellung monoklonaler Antikörper (mAb) zum Nachweis von von A β 42 abgeleiteten Peptidarten mit freiem N-Terminus (freie Asparaginsäure am N-Terminus)

Mäuse werden mit dem 6-meren Peptid DAEFRH (natürliche N-terminale A β 42-Sequenz) geimpft, das mit dem Protein Rinderserumalbumin BSA verbunden ist (um den Hapten-Träger-Effekt auszunützen), emulgiert in CFA (erste Injektion) und IFA (Booster-Injektionen). DAEFRH-Peptid-spezifische, Antikörper produzierende Hybridome werden mittels ELISA nachgewiesen (DAEFRH-Peptid-beschichtete ELISA-Platten). Peptid SEVKMDAEFRH (natürliche N-terminal verlängerte Sequenz, von APP abgeleitet, enthaltend die von A β 42 abgeleitete Sequenz DAEFRH) wird als negatives Kontrollpeptid verwendet: Hybridome, die das verlängerte Peptid erkennen, werden ausgeschlossen, da sie nicht zwischen von A β 42 abgeleiteten Peptiden mit freier Asparaginsäure am N-Terminus und von APP abgeleitetem Peptid DAEFRH ohne freie Asparaginsäure unterscheiden.

2.: Konstruktion von Peptidbibliotheken:

Die Mimotope der vorliegenden Erfindung wurden durch Adaptierung des Verfahrens von Reinke et al., 2000, durch Screening von Peptidbibliotheken auf Bindungen an einen Antikörper (vorzugsweise einen monoklonalen Antikörper) gefunden, der spezifisch für A β -Arten mit Amino-terminaler Asparaginsäure ist. Ein weiteres Verfahren ist im Handel als MULTIPIN Peptid-technologie erhältlich.

Die MULTIPIN Peptidtechnologie beinhaltet das Synthetisieren von Peptiden auf speziell hergestellte Polyethylenadeln (pins), die in einem Format, das zur standardmäßigen 8 x 12 Mikrotiterplatte passt, die für zahlreiche biologische Assays verwendet wird, auf Blöcken montiert sind. Sowohl an Nadeln gebundene (nicht spaltbare Peptide, die kovalent an der Nadel gebunden bleiben) als auch Lösungsphasen-Peptide (jene, die von der Oberfläche der Nadel abgespalten wurden) können mit Hilfe dieses Verfahrens hergestellt werden. PepSets, basierend auf dem Multipin-Synthesystem, ermöglichen gleichzeitig die Synthese und das Screening großer Mengen von Peptiden.

PepSets bestehen aus Blöcken von 96 individuell synthetisierten Peptiden, von welchen zwei sorgfältig ausgewählte Kontrollsequenzen sind. Abgespaltene Kontrollen werden mittels Reversphasen-HPLC auf Reinheit geprüft, und der Peptidgehalt wird mittels Aminosäureanalyse quantifiziert. Positive und negative nicht spaltbare Kontrollen werden mittels standardmäßiger ELISA-Techniken geprüft.

PepSet-Peptide sind mit einer Vielzahl von chemischen Modifikationen erhältlich, einschließlich Acetylierung, Biotinylierung, Phosphorylierung und Zyklisierung. Die Lösungsphasen-(gespaltenen) Peptide werden als lyophilisierte Pulver transportiert.

Für die Herstellung von Peptiden in der Lösungsphase gibt es eine Auswahl an C-terminalen Endungen, einschließlich Säure und Amid, je nach der angestrebten Anwendung des Peptids. Die spaltbare Bindung wird auf die Nadeloberfläche inkorporiert, entweder als ein vorgeformtes Esterderivat der C-terminalen Aminosäure, oder auf den Rink Amidlinker. Peptide mit Säure- oder Amid-Endgruppen werden dann freigesetzt, indem die an die Nadeln gebundenen Peptide mit starker Säure behandelt werden. Möglichkeiten für den Maßstab der Synthese sind eine Nominalmenge von 1 Mikromol oder 5 Mikromol. Faktoren wie Hydrophobizität und Spalteffizienz beeinflussen die Gewinnung der Peptide, so dass die erwartete Ausbeute an Peptid 0,5 bis 1 Mikromol beträgt (etwa 1 mg eines 15-meren Peptids), wenn die Peptide auf dem nominalen Maßstab von 1 Mikromol synthetisiert werden, oder eine Ausbeute von 2,5 bis 5 Mikromol für Peptide, die auf dem nominalen Maßstab von 5 Mikromol synthetisiert werden.

Nicht spaltbare Peptide bleiben kovalent an die Nadeln gebunden und können verwendet werden, um unter Verwendung von ELISA-Techniken rasch auf interessante Peptide zu screenen. Solche Peptide sind für die Zwecke des Scannens von Antikörperepitopen und für Studien zum Verhältnis von Struktur und Aktivität (structure activity relationship, SAR) nützlich. Das Entfernen von gebundenen Antikörpern oder anderen Proteinen regeneriert die Peptide und ermöglicht ihre Wiederverwendung in weiteren Assays. PepSets werden für eine Vielzahl von Anwendungen verwendet, einschließlich Identifizierung von Peptidbahnen (peptide leads) von biologischem Interesse vom Durchscannen von Proteinsequenzen, Optimierung von Peptidbahnen und Entwicklung von neuen Generationen von Analogen. Die Flexibilität im Hinblick auf die Gesamtstrategie, die bei Screeningverfahren verwendet wird, wird durch die Verwendung einer Vielzahl von Synthesedesigns sehr verstärkt, die zusammen ein systematisches Verfahren bieten, um den Hauptkandidaten vollständig zu charakterisieren.

Die Gesamtergebnisse, die von systematischen Peptidsets erhalten werden, identifizieren nicht nur Peptide von Interesse, sondern geben auch kritische Reste, ihre Ersetzbarkeit und die optimale Peptidlänge an. Daher kann an Hand solcher Ergebnisse ein Ranking einer Reihe von verwandten Peptiden erstellt werden. Das Ersetzen der L-Aminosäuren durch D-Aminosäuren und andere unübliche Reste ist ein wirkungsvoller Ansatz, um die Struktur und Konformation eines Peptids zu manipulieren. Dieses Verfahren ist auch ein rascher Weg, um neue Analoge mit verschiedenen pharmakologischen Eigenschaften zu entdecken, wie Antagonisten und Peptide mit erhöhter Stabilität.

Ausgehend von einer bekannten Proteinsequenz kann unter Verwendung des Multipin-Ansatzes ein Plan von allen sequenziellen Antikörperepitopen erstellt werden. Heute sind

mehrere alternative Verfahren zur Kartierung sequenzieller B-Zellen-Epitope möglich. Diese beinhalten nadelgebundene Peptide, Lösungsphasen-Peptide, die direkt als Schicht auf Mikrotiterplatten aufgetragen werden, und biotinylierte Peptide, die auf Mikrotiterplatten festgehalten sind, die vorher mit Avidin oder Streptavidin beschichtet wurden.

5

Für die vorliegenden Beispiele wird der in Beispiel 1 beschriebene Antikörper verwendet, um Peptidbibliotheken zu screenen, jedoch ist jegliches Antikörperpräparat geeignet, das spezifisch die DAEFRH-Sequenz erkennt, jedoch nicht die natürliche N-Terminal verlängerte Sequenz des A β Moleküls (z.B. MDAEFRH, KMDAEFRH, SEVKMDAEFRH oder das komplette Amyloid-(Vorläufer-) Protein (amyloid precursor protein, APP)), wie z.B. von Johnson-Wood et al., 1997, beschrieben.

10

Vier Bibliotheken sind für diesen Zweck konstruiert worden:

15

2.1.: *Bibliothek 1*: Diese 6-mere Bibliothek enthält Peptide mit den folgenden Sequenzen (Aminosäurepositionen 1 bis 6):

Position 1: alle natürlichen AS außer D, K und C (17 Möglichkeiten)

Position 2: alle natürlichen AS außer A, K und C (17 Möglichkeiten)

20

Position 3: alle natürlichen AS außer E, K und C (17 Möglichkeiten)

Position 4: alle natürlichen AS außer F, K und C (17 Möglichkeiten)

Position 5: alle natürlichen AS außer R, K und C (17 Möglichkeiten)

Position 6: alle natürlichen AS außer H, K, C und P (16 Möglichkeiten)

25

Bibliothek 1 ist eine Mischung von Hexapeptiden. Theoretisch beinhaltet sie alle möglichen Peptide, die 17 verschiedene Aminosäuren haben (siehe unten). Die Mischung enthält keine Lysin- und Cystein-Reste. Weiters enthält die Mischung nicht:

Asparaginsäure in der spezifischen Position 1,

30

Alanin in der spezifischen Position 2,

Glutaminsäure in der spezifischen Position 3,

Phenylalanin in der spezifischen Position 4,

Arginin in der spezifischen Position 5 und

Histidin in der spezifischen Position 6.

35

Die Synthese wird auf einem Applied Biosystems 431A-Synthesizer nach dem FastMoc Protokoll mit einem Synthesemaßstab von 0,25 mMol durchgeführt.

40

Die Synthese beginnt mit dem Abwiegen von 1 mMol aller gewünschten Aminosäuren (Aminogruppen und Seitenketten geschützt). Dann wurde eine Mischung aus Asn, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val hergestellt. Positionsspezifisch werden die folgenden Aminosäuren zugesetzt:

Ala, Glu, Phe, Arg, His (Position/Mischung 1),

45

Asp, Glu, Phe, Arg, His (Position/Mischung 2),

Asp, Ala, Phe, Arg, His (Position/Mischung 3),

Asp, Ala, Glu, Arg, His (Position/Mischung 4),

Asp, Ala, Glu, Phe, His (Position/Mischung 5) und

Asp, Ala, Glu, Phe, Arg (Position/Mischung 6, ohne Pro).

50

Mischung 6 wurde verwendet, um das Harz (2-Chlor-tritylchlorid-Harz, 1,49 mMol/g, Alexis, Deutschland) zu laden:

1 mMol Aminosäurerest-Mischung 6

55

611 mg Harz (= 0,91 mMol reaktive Gruppen)

15 ml Dichlormethan
5,5 Äquivalent = 5 mMol Diisopropylethylamin (871 µl).

5 Die Mischung wird in einem Kolben 1 Std. lang geschüttelt. Dann wird 1 ml Methanol zugesetzt, und die Mischung wird weitere 10 min geschüttelt. Das geladene Harz wird über eine Fritte extrahiert und zwei Mal mit Dimethylformamid, Dichlormethan, Isopropanol, Methanol und Ether (jeweils 30 ml) gewaschen. Das Trocknen erfolgt über Nacht in hohem Vakuum. Die ausgewogene Menge beträgt 737 mg.

10 Ein Aliquot von 5,66 mg wird 30 min lang mit 1 ml 20% Piperidin in DMF behandelt, um die Dichte des Harzes zu definieren. Dann wird die Mischung zentrifugiert. Die freie Fmoc Schutzgruppe wird fotometrisch im Überstand gemessen (301 nm, Extinktionskoeffizient = 7800 M (e-1)). Daher beträgt die Dichte des Harzes 0,49 mMol/g.

15 Alle folgenden Schritte werden beim Synthesizer durchgeführt, wobei die anderen Mischungen (in 5 verschiedenen Patronen) verwendet werden. Es werden 515 mg geladenes Harz verwendet (entsprechend 0,25 mMol: Aminosäuremischungen werden in 4-fachem Überschuss verwendet). Die N-terminale Fmoc Schutzgruppe wird am Ende der Synthese abgespalten. Nach dem Waschen mit Ethanol und Trocknen über Nacht wird die Abspaltung der Peptide vom Harz
20 mittels TFA/H₂O (95:5, v:v) durchgeführt. Die TFA-Lösung wird in einem Speed Vac auf 1/5 des Volumens konzentriert und ausgefällt und in Diethylether gewaschen und lyophilisiert.

Die 6-meren Peptide EIDYHR, ELDYHR und EVDYHR sind Beispiele für Mimotope, die vom monoklonalen Antikörper, hergestellt nach Beispiel 1 oben, nachgewiesen werden können.

25 2.2.: *Bibliothek 2*: Diese 6-mere Bibliothek enthält Peptide mit den folgenden Sequenzen (Aminosäurepositionen 1 bis 6):

Position 1: D (fixiert)

30 Position 2: alle natürlichen AS außer A, K und C (17 Möglichkeiten)

Position 3: alle natürlichen AS außer E, K und C (17 Möglichkeiten)

Position 4: alle natürlichen AS außer F, K und C (17 Möglichkeiten)

Position 5: alle natürlichen AS außer R, K und C (17 Möglichkeiten)

Position 6: alle natürlichen AS außer H, K, C und P (16 Möglichkeiten)

35 Die Peptidbibliothek 2 wurde gemäß dem oben (unter 2.1) für Bibliothek 1 beschriebenen Verfahren aufgebaut.

40 Die 6-meren Peptide DIDYHR, DLDYHR und DVDYHR sind Beispiele für Mimotope, die vom gemäß 1. oben hergestellten monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden können.

45 2.3.: *Bibliothek 3*: In einem zusätzlichen Ansatz wird eine dritte Peptidbibliothek verwendet, um Mimotopsequenzen zu definieren. Diese Bibliothek enthält die ursprüngliche Sequenz und ermöglicht den Nachweis von Mimotopen, die mit dem ursprünglichen Epitop näher verwandt sind.

Die 6-mere Bibliothek enthält Peptide mit den folgenden Sequenzen (Aminosäurepositionen 1 bis 6):

50 Position 1: alle natürlichen AS außer K und C (18 Möglichkeiten)

Position 2: alle natürlichen AS außer K und C (18 Möglichkeiten)

Position 3: alle natürlichen AS außer K und C (18 Möglichkeiten)

Position 4: alle natürlichen AS außer K und C (18 Möglichkeiten)

Position 5: alle natürlichen AS außer K und C (18 Möglichkeiten)

55 Position 6: alle natürlichen AS außer K, C und P (17 Möglichkeiten)

Die Peptidbibliothek 3 wurde gemäß dem oben (unter 2.1) für Bibliothek 1 beschriebenen Verfahren aufgebaut.

Die 6-meren Peptide DIDYRR, DLDYRR und DVDYRR sind Beispiele für Mimotope, die von dem gemäß 1. oben hergestellten monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden können (D in Position 1 und R in Position 5 sind ident mit dem ursprünglichen Epitop).

2.4.: *Bibliothek 4*: Diese Peptidbibliothek 4 besteht aus $5 \times 18 = 90$ Peptiden, ist im Handel von Mimotopes Ltd. (Paris, Frankreich; siehe Anweisungen des Herstellers) erhältlich und ist entsprechend der natürlichen N-terminalen A β 42 Sequenz DAEFRH angelegt.

Position 1: D (fixiert)

Position 2: alle natürlichen Aminosäuren außer K und C (18 verschiedene Peptide)

Position 3: alle natürlichen Aminosäuren außer K und C (18 verschiedene Peptide)

Position 4: alle natürlichen Aminosäuren außer K und C (18 verschiedene Peptide)

Position 5: alle natürlichen Aminosäuren außer K und C (18 verschiedene Peptide)

Position 6: alle natürlichen Aminosäuren außer K und C (18 verschiedene Peptide)

Die individualisierten Peptidmitglieder von Bibliothek 4 sind in Fig. 1 dargestellt. Peptide Nr. 1, 24, 48, 56 und 80 haben die ursprüngliche Sequenz der A β 42 N-terminalen Sequenz. Alle anderen Peptide sind Anwärterpeptide, die in Bezug auf ihre Bindungsfähigkeit an einen DAEFRH bindenden Antikörper getestet werden.

2.5.: *ELISA mit Peptidbibliotheken*:

Wie oben erwähnt, werden die Peptidbibliotheken 1, 2 und 3 mit einem Applied Biosystems 431A Peptidsynthesizer gemäß der klassischen Fmoc-Chemie hergestellt. Die im Handel erhältliche Peptidbibliothek 4 wird nach der Beschreibung des Herstellers hergestellt (siehe oben und unter www.mimotopes.com). Die 90 Peptide sind C-terminal an eine Nadel gebunden.

Die ELISA mit jeder der Peptidbibliotheken wurden nach folgenden Standardprotokollen durchgeführt:

Die Peptidbibliothek wird in 100% DMSO gelöst (Endkonzentration 10 mg/ml).

Die Peptidlösung wird in PBS weiter verdünnt.

Die Peptidmischung wird über Nacht (4°C) als Schicht auf ELISA-Platten aufgetragen (Nunc Maxisorp, Deutschland), beginnend mit 500 µg/Näpfchen, und titriert bis 100 ng/Näpfchen.

Die Platten werden 3 Mal mit PBS/Tween 20 (0,1% v/v) gewaschen.

Die Platten werden mit PBS/BSA (2 h bei Raumtemperatur) blockiert.

Die Platten werden 3 Mal mit PBS/Tween gewaschen.

Die Platten werden 4 h lang bei Raumtemperatur mit biotinyliertem DAEFRH-spezifischen mAk (10 µg/ml in PBS) inkubiert.

Die Platten werden 3 Mal mit PBS/Tween gewaschen.

Die Platten werden mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (30 min bei Raumtemperatur) inkubiert.

Die Platten werden 5 Mal mit PBS/Tween gewaschen.

Die Platten werden mit ABTS + H₂O₂ (0,1% Gew./Vol.; 10 bis 45 min) inkubiert, und die Reaktion wird mit Zitronensäure gestoppt, gefolgt von einer fotometrischen Auswertung (Wellenlänge 405 nm).

3.: *Verifizierung von Mimotopen mittels Inhibitionsassay*

3.1. *Zusätzliche Bibliothek*

Zusätzlich zu den oben beschriebenen 4 Bibliotheken (siehe 2.1, 2.2, 2.3 und 2.4) wird eine

fünfte Bibliothek verwendet, um Mimotopsequenzen zu definieren. Diese 6-mere Bibliothek ist im Handel bei EMC Microcollections (Tübingen, Deutschland) erhältlich und enthält 114 verschiedene Hexapeptidmischungen; eine Position pro Mischung ist durch eine von allen natürlichen Aminosäuren außer C definiert (19 Möglichkeiten), die restlichen 5 Positionen sind variabel:

Mischungen 01 bis 06 (eine Position ist fix, Alanin A, die restlichen 5 variabel, X):

Mischung 01: AXXXXX
Mischung 02: XXXXXX
Mischung 03: XXXXXX
Mischung 04: XXXXXX
Mischung 05: XXXXAX
Mischung 06: XXXXXA

Die Mischungen 07 bis 12 (eine Position fix, Arginin R, die restlichen 5 variabel, X):

Mischung 07: RXXXXX
Mischung 08: XRXXXX
Mischung 09: XRXXXX
Mischung 10: XXXRXX
Mischung 11: XXXRXR
Mischung 12: XXXXXR

Dem entsprechend sind die Mischungen 13 bis 114 unter Verwendung aller natürlichen AS außer C angelegt.

3.2. Inhibitionsassay

Die Figuren 2 und 3 beschreiben die Ergebnisse von Inhibitionsassays, die mit Mimotopenpeptiden durchgeführt wurden, die in den 5 Bibliotheken enthalten sind und von diesen erhalten wurden (wie beschrieben). Die Mimotopenpeptide konkurrieren mit dem ursprünglichen Epitop um die Erkennung durch den monoklonalen Antikörper. Das ursprüngliche Epitop und Mimotopenpeptide enthalten ein zusätzliches C am C-Terminus zur Koppelung an einen Proteinträger (falls erwünscht).

Es werden die folgenden Peptide verwendet:

Peptid 1737 DAEFRH
Peptid 3001 DKELRI
Peptid 3002 DWELRI
Peptid 3003 YREFFI
Peptid 3004 YREFRI
Peptid 3005 YAEFRG
Peptid 3006 EAEFRG
Peptid 3007 DYEFRG
Peptid 3008 ELEFRG
Peptid 3009 SFEFRG
Peptid 3010 DISFRG
Peptid 3011 DIGWRG

Verfahren:

ELISA-Platten (Nunc Maxisorp) werden mit dem ursprünglichen Peptidepitop DAEFRH (C-terminal verlängert mit C und an bovines Serumalbumin BSA gekoppelt) in einer Konzentra-

tion von 0,1 µg/ml Peptid-BSA (100 µl/Näpfchen, 12 h, 4°C) beschichtet. Nach dem Blockieren mit PBS/BSA 1% (200 µl/Näpfchen, 12 h, 4°C) werden die Platten 3 Mal mit PBS/Tween gewaschen. Dann werden 20 min lang bei 37°C biotinylierter monoklonaler Antikörper (1 : 2000, 50 µl/Näpfchen) und Peptide (50 µl/Näpfchen) zu 50, 5, 0,5, 0,05, 0,005 und 0,0005 µg/ml zugesetzt. Die Platten werden 3 Mal mit PBS/Tween gewaschen und mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) markiertem Streptavidin (100 µl/Näpfchen, 30 min, RT) inkubiert. Die Platten werden 5 Mal mit PBS/Tween gewaschen und mit ABTS + H₂O₂ (0,1% Gew./Vol., 10 bis 45 min) inkubiert, und die Reaktion wird mit Zitronensäure gestoppt, worauf eine fotometrische Auswertung erfolgt (Wellenlänge 405 nm).

Wie erwartet und in Fig. 2 zu sehen ist, kann das Peptid 1737 DAEFRH mit dem BSA-gekoppelten, plattengebundenen Peptid DAEFRH konkurrieren und verhindert dadurch das Erkennen durch den monoklonalen Antikörper. Weiters zeigt sich, dass das Peptid 3003 nicht in der Lage ist, die Bindung des monoklonalen Antikörpers an das ursprüngliche Epitop zu inhibieren. Im Gegensatz dazu blockieren die Peptide 3001, 3002, 3004, 3005, 3006 und 3007 (in verschiedenem Ausmaß) die Erkennung des Epitops. Während das Peptid 3004 nur in einer hohen Konzentration inhibierend wirkt (50 µg/ml) sind die Peptide 3001, 3006 und 3007 mit einem IC₅₀ von weniger als 0,5 µg/ml stark hemmend. Die Peptide 3002 und 3005 sind mittlere Inhibitoren mit einem IC₅₀ von mehr als 0,5 µg/ml.

Wie erwartet und in Fig. 3 zu sehen ist, kann in einem zusätzlich durchgeführten, unabhängigen Experiment das Peptid 1737 DAEFRH erfolgreich mit dem mit BSA gekoppelten, plattengebundenen Peptid DAEFRH um die Erkennung durch den monoklonalen Antikörper konkurrieren. Weiters zeigt sich, dass die Peptide 3010 und 3011 bei den getesteten Konzentrationen nicht inhibierend wirken, während die Peptide 3008 und 3009 mit einem IC₅₀ von weniger als 5 µg/ml (relativ) schwache Inhibitoren sind.

Tabelle 1 fasst kurz die Inhibitionsfähigkeit von Mimotopen zusammen, die in Bibliotheken enthalten sind und von solchen erhalten werden (wie beschrieben):

Tabelle 1: Inhibitionsfähigkeit von Mimotopen:

Peptid 3001 DKELRI	stark
Peptid 3002 DWELRI	mittel
Peptid 3003 YREFFI	keine
Peptid 3004 YREFRI	schwach
Peptid 3005 YAEFRG	mittel
Peptid 3006 EAEFRG	stark
Peptid 3007 DYEFRG	stark
Peptid 3008 ELEFRG	schwach
Peptid 3009 SFEFRG	schwach
Peptid 3010 DISFRG	keine
Peptid 3011 DIGWRG	keine

4. Inhibitionsassay für zusätzliche, gemäß der vorliegenden Erfindung gescreente Mimotope

Inhibitionsassay

Fig. 4 und 5 beschreiben die Ergebnisse der Inhibitionsassays, die mit den in den 5 Bibliotheken inkludierten und aus diesen erhaltenen Mimotopenpeptiden (wie beschrieben) durchgeführt wurden. Die Mimotopenpeptide konkurrieren mit dem ursprünglichen Epitop um die Erkennung durch den monoklonalen Antikörper. Das ursprüngliche Epitop und Mimotopenpeptide enthalten ein zusätzliches C am C-Terminus (Position 7) für die Koppelung an einen Proteinträger (falls erwünscht).

Die folgenden Peptide werden verwendet:

Peptid 1737 DAEFRH (ursprüngliches Epitop + C)

Peptid 1234 KKELRI

5 Peptid 1235 DRELRI

Peptid 1236 DKELKI

Peptid 1237 DRELKI

Peptid 1238 DKELR

Peptid 1239 EYEFRG

10 Peptid 1241 DWEFRDA

Peptid 4002 SWERFT

Peptid 4003 GREFRN

Peptid 4004 WHWSWR

15 Verfahren:

ELISA-Platten (Nunc Maxisorp) werden mit dem ursprünglichen Peptidepitop DAEFRH (C-terminal verlängert mit C und an bovines Serumalbumin BSA gekoppelt) in einer Konzentration von 0,1 µg/ml Peptid-BSA (100 µl/Näpfchen, 12 h, 4°C) beschichtet. Nach dem Blockieren mit PBS/BSA 1% (200 µl/Näpfchen, 12 h, 4°C) werden die Platten 3 Mal mit PBS/Tween gewaschen. Dann werden 20 min lang bei 37°C biotinylierter monoklonaler Antikörper (1 : 2000, 50 µl/Näpfchen) und Peptide (50 µl/Näpfchen) in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Die Platten werden 3 Mal mit PBS/Tween gewaschen und mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) markiertem Streptavidin (100 µl/Näpfchen, 30 min, RT) inkubiert. Die Platten werden 5 Mal mit PBS/Tween gewaschen und mit ABTS + H₂O₂ (0,1% Gew./Vol., 10 bis 45 min) inkubiert, und die Reaktion wird mit Zitronensäure gestoppt, worauf eine fotometrische Auswertung erfolgt (Wellenlänge 405 nm).

Wie erwartet und in Fig. 4 zu sehen ist, kann das Peptid 1737 DAEFRH mit dem BSA-gekoppelten, plattengebundenen Peptid DAEFRH konkurrieren und inhibiert dadurch das Erkennen durch den monoklonalen Antikörper. Weiters zeigt sich, dass das Peptid 4004 nicht in der Lage ist, die Bindung des monoklonalen Antikörpers an das ursprüngliche Epitop zu inhibieren. Im Gegensatz dazu blockieren die Peptide 4002 und 4003 (in verschiedenem Ausmaß) die Erkennung des Epitops. Während das Peptid 4003 nur in einer relativ hohen Konzentration inhibierend wirkt (10 µg/ml) ist das Peptid 4002 mit einem IC₅₀ von weniger als 0,4 µg/ml stark hemmend.

Wie erwartet und in Fig. 5 zu sehen ist, kann in einem zusätzlich durchgeführten, unabhängigen Experiment das Peptid 1737 DAEFRH erfolgreich mit dem mit BSA gekoppelten, plattengebundenen Peptid DAEFRH um die Erkennung durch den monoklonalen Antikörper konkurrieren. Weiters zeigt sich, dass das Peptid 1234 bei den getesteten Konzentrationen kaum inhibierend wirkt, während die Peptide 1235, 1236, 1237, 1238, 1239 und 1241 (in verschiedenem Ausmaß) die Epitop-Erkennung blockieren. Die Peptide 1235, 1238 und 1241 sind mit einem IC₅₀ von weniger als 0,5 µg/ml starke Inhibitoren, während die Peptide 1236 und 1237 mit einem IC₅₀ von mehr als 5 µg/ml (relativ) schwache Inhibitoren sind. Das Peptid 1239 ist mit einem IC₅₀ von mehr als 0,5 µg/ml ein mittlerer Inhibitor.

Tabelle 2 fasst kurz die Inhibitionsfähigkeit von Mimotopen zusammen, die in Bibliotheken enthalten sind und von solchen erhalten werden (wie beschrieben):

50

Tabelle 2: Inhibitionsfähigkeit von Mimotopen:

55	Peptid 1234 KKELRI	keine
	Peptid 1235 DRELRI	stark
	Peptid 1236 DKELKI	schwach

Peptid 1237 DRELKI schwach
 Peptid 1238 DKELR stark
 Peptid 1239 EYEFRG mittel
 Peptid 1241 DWEFRDA stark
 5 Peptid 4002 SWEFRT stark
 Peptid 4003 GREFRN schwach
 Peptid 4004 WHWSWR keine

10 Die in den Fig. 4 und 5 angeführten Ergebnisse zeigen, dass zusätzlich zu verschiedenen 6-meren Peptiden (wie hier und zuvor gezeigt), 5-meren Peptide (nämlich das Peptid 1238 DKELR) und 7-meren Peptide (nämlich das Peptid 1241 DWEFRDA) als Epitope in einem Alzheimer-Impfstoff auf Mimotopen-Basis verwendet werden können.

15 5. Unabhängige neue Runde für ein Screening:

15 Bibliotheken:

Das Mimotop hat eine bevorzugte Länge von 5 bis 15 Aminosäuren. Zwei verschiedene Bibliotheken werden in ELISA-Assays verwendet, um Mimotopen-Sequenzen zu definieren:

20 Bibliothek 1: Diese 6-meren Bibliothek enthält Peptide mit den folgenden Sequenzen (Aminosäurepositionen 1 bis 6):

25 Position 1: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)
 Position 2: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)
 Position 3: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)
 Position 4: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)
 Position 5: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)
 Position 6: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)

30 Bibliothek 2: Diese 7-meren Bibliothek enthält Peptide mit den folgenden Sequenzen (Aminosäurepositionen 1 bis 7):

35 Position 1: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)
 Position 2: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)
 Position 3: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)
 Position 4: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)
 Position 5: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)
 Position 6: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)
 40 Position 7: alle natürlichen AS außer C (19 Möglichkeiten)

Inhibitionsassay

45 Die Figuren 6 bis 8 beschreiben die Ergebnisse von Inhibitionsassays, die mit Mimotopenpeptiden durchgeführt wurden, die in den 2 Bibliotheken enthalten sind und von diesen erhalten wurden (wie oben beschrieben). Die Mimotopenpeptide konkurrieren mit dem ursprünglichen Epitop um die Erkennung durch den monoklonalen Antikörper. Das ursprüngliche Epitop und Mimotopenpeptide enthalten ein zusätzliches C am C-Terminus (Position 7 bzw. Position 8) zur Koppelung an einen Proteinträger (falls erwünscht).

50 Die folgenden Peptide werden verwendet:

Peptid 1737 DAEFRH	ursprüngliches Epitop	
Peptid 4011 DAEFRWP	7-mer	s
55 Peptid 4012 DNEFRSP	7-mer	s

	Peptid 4013 GSEFRDY	7-mer	m
	Peptid 4014 GAEFRFT	7-mer	m
	Peptid 4015 SAEFRRTQ	7-mer	s
	Peptid 4016 SAEFRAT	7-mer	s
5	Peptid 4017 SWEFRNP	7-mer	s
	Peptid 4018 SWEFRLY	7-mer	s
	Peptid 4019 SWRFNP	6-mer	-
	Peptid 4020 SWELRQA	7-mer	s
	Peptid 4021 SVEFRYH	7-mer	s
10	Peptid 4022 SYEFRHH	7-mer	s
	Peptid 4023 SQEFRTP	7-mer	s
	Peptid 4024 SSEFRVS	7-mer	s
	Peptid 4025 DWEFRD	6-mer	s
	Peptid 4031 DAELRY	6-mer	s
15	Peptid 4032 DWELRQ	6-mer	s
	Peptid 4033 SLEFRF	6-mer	s
	Peptid 4034 GPEFRW	6-mer	s
	Peptid 4035 GKEFRT	6-mer	s
	Peptid 4036 AYEFRH	6-mer	m
20	Peptid 4037 VPTSALA	7-mer	-
	Peptid 4038 ATYAYWN	7-mer	-

Weiters werden die folgenden 5-meren Peptide (mit nicht-natürlichen Aminosäuren) für Inhibitionsassays verwendet:

25	Peptid 4061 DKE (tBuGly) R	5-mer	-
	Peptid 4062 DKE (Nle) R	5-mer	m
	Peptid 4063 DKE (Nva) R	5-mer	m
	Peptid 4064 DEK ((Cha) R	5-mer	m
30	(s: starke Inhibition, m: moderate Inhibition; -: keine Inhibition)		

Verfahren:

ELISA-Platten (Nunc Maxisorp) werden mit dem ursprünglichen Peptidepitop DAEFRH (C-terminal verlängert mit C und an bovines Serumalbumin BSA gekoppelt) in einer Konzentration von 0,1 µg/ml Peptid-BSA (100 µl/Näpfchen, 12 h, 4°C) beschichtet. Nach dem Blockieren mit PBS/BSA 1% (200 µl/Näpfchen, 12 h, 4°C) werden die Platten 3 Mal mit PBS/Tween gewaschen. Dann werden 20 min lang bei 37°C biotinylierter monoklonaler Antikörper (1 : 2000, 50 µl/Näpfchen) und Peptide (50 µl/Näpfchen) in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Die Platten werden 3 Mal mit PBS/Tween gewaschen und mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) markiertem Streptavidin (100 µl/Näpfchen, 30 min, RT) inkubiert. Die Platten werden 5 Mal mit PBS/Tween gewaschen und mit ABTS + H₂O₂ (0,1% Gew./Vol., 10 bis 45 min) inkubiert, und die Reaktion wird mit Zitronensäure gestoppt, worauf eine fotometrische Auswertung erfolgt (Wellenlänge 405 nm).

Wie erwartet und in Fig. 6 (die die Peptide 4011-4018 zeigt) zu sehen ist, kann das Peptid 1737 DAEFRH mit dem BSA-gekoppelten, plattengebundenen Peptid DAEFRH konkurrieren und inhibiert dadurch das Erkennen durch den monoklonalen Antikörper. Weiters zeigt sich, dass die Peptide 4012 DNEFRSP, 4013 GSEFRDY und 4014 GAEFRFT in der Lage sind, die Bindung des monoklonalen Antikörpers an das ursprüngliche Epitop moderat zu inhibieren. Im Gegensatz dazu blockieren die Peptide 4011 DAEFRWP, 4015 SAEFRRTQ, 4016 SAEFRAT, 4017 SWEFRNP und 4018 SWEFRLY (in verschiedenem Ausmaß) stark die Erkennung des Epitops.

Wie erwartet und in Fig. 7 (die die Peptide 4019-4025 zeigt) zu sehen ist, kann in einem zusätz-

lich durchgeführten, unabhängigen Experiment das Peptid 1737 DAEFRH erfolgreich mit dem mit BSA gekoppelten, plattengebundenen Peptid DAEFRH um die Erkennung durch den monoklonalen Antikörper konkurrieren. Weiters zeigt sich, dass das Peptid 4019 SWFRNP bei den getesteten Konzentrationen nicht inhibierend wirkt, während die Peptide 4020 SWELRQA, 4021 SVEFRYH, 4022 SYEFRHH, 4023 SQEFRTP, 4024 SSERFVS und 4025 DWEFRD (in verschiedenem Ausmaß) die Epitop-Erkennung blockieren. Die Peptide 4021, 4022, 4023, 4024 und 4025 sind mit einem IC₅₀ von weniger als 0,5 µg/ml starke Inhibitoren, während das Peptid 4020 mit einem IC₅₀ von mehr als 5 µg/ml ein mittlerer Inhibitor ist.

Wie erwartet und in Fig. 8 (Peptide 4031-4038) zu sehen ist, kann in einem dritten unabhängigen Experiment das Peptid 1737 DAEFRH erfolgreich mit dem mit BSA gekoppelten, plattengebundenen Peptid DAEFRH um die Erkennung durch den monoklonalen Antikörper konkurrieren. Weiters zeigt sich, dass die Peptide 4037 VPTSALA und 4038 ATYAYWN bei den getesteten Konzentrationen nicht inhibitorisch wirken, während die Peptide 4031 DAELRY, 4032 DWELRQ, 4033 SLEFRF, 4034 GPEFRW, 4035 GKEFRT und 4036 AYEFRH (in verschiedenem Ausmaß) die Epitop-Erkennung blockieren. Die Peptide 4031, 4032, 4033, 4034 und 4035 sind mit einem IC₅₀ von weniger als 0,5 µg/ml relativ starke Inhibitoren, während das Peptid 4036 mit einem IC₅₀ von mehr als 0,5 µg/ml ein (relativ) schwacher Inhibitor ist.

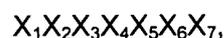
Inhibitionsassay mit definierten 5-meren Peptiden: nicht-natürliche Aminosäuren

Es wurde schon früher gezeigt, dass das 5-mer Peptid 1238 DKELR als Epitop in einem Alzheimer-Impfstoff auf Mimotopen-Basis verwendet werden kann (vgl. PCT/EP04/00162). Im folgenden werden die Aminosäuren des ursprünglichen 5-meren Epitops durch nicht-natürliche Aminosäuren ersetzt: L wird durch die nicht natürlichen Aminosäuren tBuGly, Nle, Nva oder Cha ersetzt.

Wie erwartet und in Fig. 9 dargestellt ist (Peptide 4061-4064 DKELR-Varianten), kann das Peptid 1737 DAEFRH mit dem BSA-gekoppelten, plattengebundenen Peptid DAEFRH in einem vierten unabhängigen Experiment um die Erkennung durch den monoklonalen Antikörper erfolgreich konkurrieren. Weiters ist gezeigt, dass das Peptid 4061 DKE(tBuGly)R bei den getesteten Konzentrationen nicht inhibitorisch wirkt. Interessanterweise blockieren die Peptide 4062 DKE(Nle)R, 4063 DKE((Nva)R und 4064 DKE(Cha)R (in verschiedenem Ausmaß) die Erkennung des Epitops. Die Peptide 4062, 4063 und 4064 sind mit einem IC₅₀ von mehr als 0,5 µg/ml relativ schwache Inhibitoren.

Patentansprüche:

1. Verwendung einer Verbindung umfassend die folgende Aminosäuresequenz



worin X₁ eine Aminosäure außer C ist,

X₂ eine Aminosäure außer C ist,

X₃ eine Aminosäure außer C ist,

X₄ eine Aminosäure außer C ist,

X₅ eine Aminosäure außer C ist,

X₆ nicht vorhanden oder irgendeine Aminosäure ist,

X₇ nicht vorhanden oder irgendeine Aminosäure ist

und worin X₁X₂X₃X₄X₅X₆ nicht DAEFRH ist, wobei die Verbindung eine Bindefähigkeit an einen Antikörper hat, der für die natürliche N-terminale Aβ₄₂ Sequenz DAEFRH spezifisch ist, und 5-mer davon, die eine Bindefähigkeit an den Antikörper haben, der für die natürliche N-terminale Aβ₄₂-Sequenz DAEFRH spezifisch ist, zur Herstellung eines Impfstoffs für die Alzheimer-Krankheit (Alzheimer's disease, AD).

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, dass diese Verbindung ein Peptid umfasst oder aus einem solchen besteht, worin
 X₁ G oder eine Aminosäure mit einer Hydroxygruppe oder eine negativ geladene Aminosäure ist, vorzugsweise G, E, Y, S oder D,
 5 X₂ eine hydrophobe Aminosäure oder eine positiv geladene Aminosäure ist, vorzugsweise N, I, L, V, K, W, R, Y, F oder A,
 X₃ eine negativ geladene Aminosäure ist, vorzugsweise D oder E,
 X₄ eine aromatische Aminosäure oder eine hydrophobe Aminosäure ist, vorzugsweise Y, F oder L,
 10 X₅ H, K, Y, F oder R ist, vorzugsweise H, F oder R, und
 X₆ irgendeine Aminosäure außer P oder - wenn X₇ vorhanden ist - außer C ist, vorzugsweise S, T, N, Q, D, E, R, I, K, Y oder G, insbesondere T, N, D, R, I oder G,
 insbesondere DAEFRWP, DNEFRSP, GSEFRDY, GAEFRFT, SAEFRFTQ, SAEFRAT,
 SWEFRNP, SWEFRLY, SWELRQA, SVEFRYH, SYEFRHH, SQEFRTP, SSEFRVS,
 15 DWEFRD, DAELRY, DWELRQ, SLEFRF, GPEFRW, GKEFRT, AYEFRH, DKE(Nle)R, DKE(Nva)R oder DKE(Cha)R.
3. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Verbindung ein Polypeptid ist, das 5 bis 15 Aminosäurereste umfasst.
- 20 4. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Verbindung an einen pharmazeutisch annehmbaren Träger, vorzugsweise KLH, und vorzugsweise Aluminiumhydroxid gekoppelt ist.
- 25 5. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Verbindung in einer Menge von 0,1 ng bis 10 mg enthalten ist, vorzugsweise 10 ng bis 1 mg, insbesondere 100 ng bis 100 µg.
- 30 6. Verfahren zur Isolierung einer Verbindung, die an einen Antikörper bindet, der für die natürliche N-terminale Aβ42 Sequenz DAEFRH spezifisch ist, umfassend die folgenden Schritte:
 - Zur-Verfügung-Stellen einer Peptidverbindungsbibliothek, umfassend Peptide, die die folgende Aminosäuresequenz enthalten:
- $$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7,$$
- 35 worin X₁ eine Aminosäure außer C ist,
 X₂ eine Aminosäure außer C ist,
 X₃ eine Aminosäure außer C ist,
 X₄ eine Aminosäure außer C ist,
 40 X₅ eine Aminosäure außer C ist,
 X₆ nicht vorhanden oder irgendeine Aminosäure ist,
 X₇ nicht vorhanden oder irgendeine Aminosäure ist,
 und worin X₁X₂X₃X₄X₅X₆ nicht DAEFRH ist,
 - In-Kontakt-Bringen dieser Peptidbibliothek mit diesem Antikörper, und
 45 - Isolieren jener Mitglieder der Peptidbibliothek, die an diesen Antikörper binden.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, *dadurch gekennzeichnet*, dass diese Peptide in der genannten Bibliothek in individualisierter Form zur Verfügung gestellt sind, insbesondere immobilisiert auf einer festen Oberfläche.
- 50 8. Verfahren gemäß Anspruch 6 oder 7, *dadurch gekennzeichnet*, dass dieser Antikörper einen Marker umfasst, der seinen Nachweis oder seine Isolierung bei Bindung an ein Peptid der Bibliothek ermöglicht.
- 55 9. Impfstoff gegen die Alzheimer-Krankheit, umfassend ein Antigen, das zumindest ein Peptid

beinhaltet, ausgewählt aus der Gruppe DAEFRWP, DNEFRSP, GSEFRDY, GAEFRFT, SAEFRTO, SAEFRAT, SWEFRNP, SWEFRLY, SWELRQA, SVEFRYH, SYEFRHH, SQEFRTP, SSEFRVS, DWEFRD, DAELRY, DWELRQ, SLEFRF, GPEFRW, GKEFRT, AYEFRH, DKE(Nle)R, DKE(Nva)R oder DKE(Cha)R.

5

Hiezu 9 Blatt Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55



Fig. 1A

1	Alanin	ala	A
2	Arginin	arg	R
3	Asparagin	asn	N
4	Asparaginsäure	asp	D
5	Cystein	cys	C
6	Glutamin	gln	Q
7	Glutaminsäure	glu	E
8	Glycin	gly	G
9	Histidin	his	H
10	Isoleucin	ile	I
11	Leucin	leu	L
12	Lysin	lys	K
13	Methionin	met	M
14	Phenylalanin	phe	F
15	Prolin	pro	P
16	Serin	ser	S
17	Threonin	thr	T
18	Tryptophan	trp	W
19	Tyrosin	tyr	Y
20	Valin	val	V



Fig.1B

No.	D	A	E	F	R	H	
1	D	A	E	F	R	H	positive Kontrolle
2	D	R	E	F	R	H	
3	D	N	E	F	R	H	
4	D	D	E	F	R	H	
5	D	Q	E	F	R	H	
6	D	E	E	F	R	H	
7	D	G	E	F	R	H	
8	D	H	E	F	R	H	
9	D	I	E	F	R	H	
10	D	L	E	F	R	H	
11	D	M	E	F	R	H	
12	D	F	E	F	R	H	
13	D	P	E	F	R	H	
14	D	S	E	F	R	H	
15	D	T	E	F	R	H	
16	D	W	E	F	R	H	
17	D	Y	E	F	R	H	
18	D	V	E	F	R	H	
19	D	A	A	F	R	H	
20	D	A	R	F	R	H	
21	D	A	N	F	R	H	
22	D	A	D	F	R	H	
23	D	A	Q	F	R	H	
24	D	A	E	F	R	H	positive Kontrolle
25	D	A	G	F	R	H	
26	D	A	H	F	R	H	
27	D	A	I	F	R	H	
28	D	A	L	F	R	H	
29	D	A	M	F	R	H	
30	D	A	F	F	R	H	
31	D	A	P	F	R	H	
32	D	A	S	F	R	H	
33	D	A	T	F	R	H	
34	D	A	W	F	R	H	
35	D	A	Y	F	R	H	
36	D	A	V	F	R	H	
37	D	A	E	A	R	H	
38	D	A	E	R	R	H	
39	D	A	E	N	R	H	
40	D	A	E	D	R	H	
41	D	A	E	Q	R	H	
42	D	A	E	E	R	H	
43	D	A	E	G	R	H	
44	D	A	E	H	R	H	
45	D	A	E	I	R	H	
46	D	A	E	L	R	H	
47	D	A	E	M	R	H	
48	D	A	E	F	R	H	positive Kontrolle
49	D	A	E	P	R	H	
50	D	A	E	S	R	H	



Fig.1C

51	D	A	E	T	R	H	
52	D	A	E	W	R	H	
53	D	A	E	Y	R	H	
54	D	A	E	V	R	H	
55	D	A	E	F	A	H	
56	D	A	E	F	R	H	positive Kontrolle
57	D	A	E	F	N	H	
58	D	A	E	F	D	H	
59	D	A	E	F	O	H	
60	D	A	E	F	E	H	
61	D	A	E	F	G	H	
62	D	A	E	F	H	H	
63	D	A	E	F	I	H	
64	D	A	E	F	L	H	
65	D	A	E	F	M	H	
66	D	A	E	F	F	H	
67	D	A	E	F	P	H	
68	D	A	E	F	S	H	
69	D	A	E	F	T	H	
70	D	A	E	F	W	H	
71	D	A	E	F	Y	H	
72	D	A	E	F	V	H	
73	D	A	E	F	R	A	
74	D	A	E	F	R	R	
75	D	A	E	F	R	N	
76	D	A	E	F	R	D	
77	D	A	E	F	R	Q	
78	D	A	E	F	R	E	
79	D	A	E	F	R	G	
80	D	A	E	F	R	H	positive Kontrolle
81	D	A	E	F	R	I	
82	D	A	E	F	R	L	
83	D	A	E	F	R	M	
84	D	A	E	F	R	F	
85	D	A	E	F	R	P	
86	D	A	E	F	R	S	
87	D	A	E	F	R	T	
88	D	A	E	F	R	W	
89	D	A	E	F	R	Y	
90	D	A	E	F	R	V	

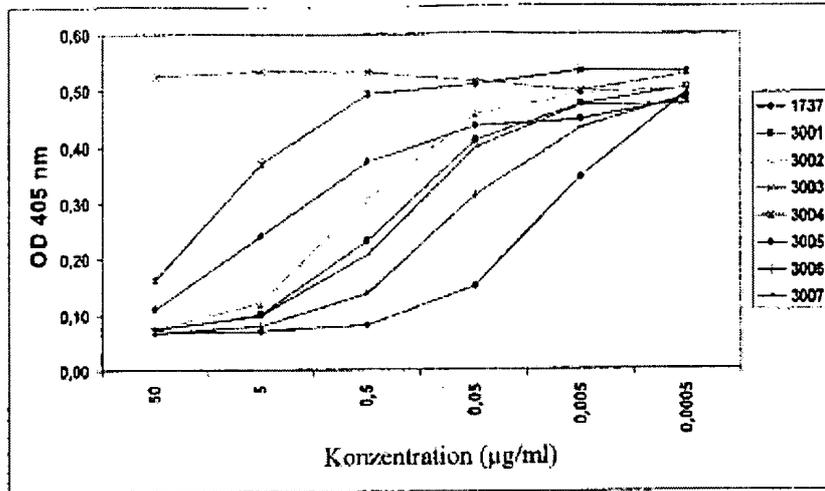


Fig.2

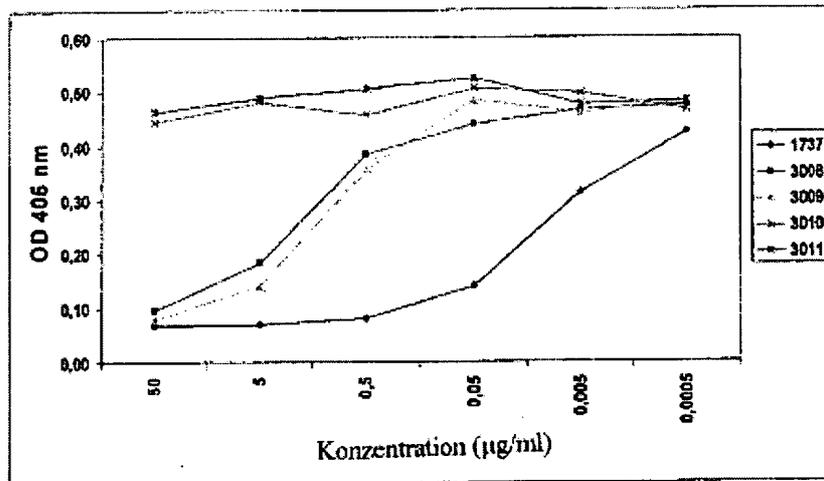


Fig.3

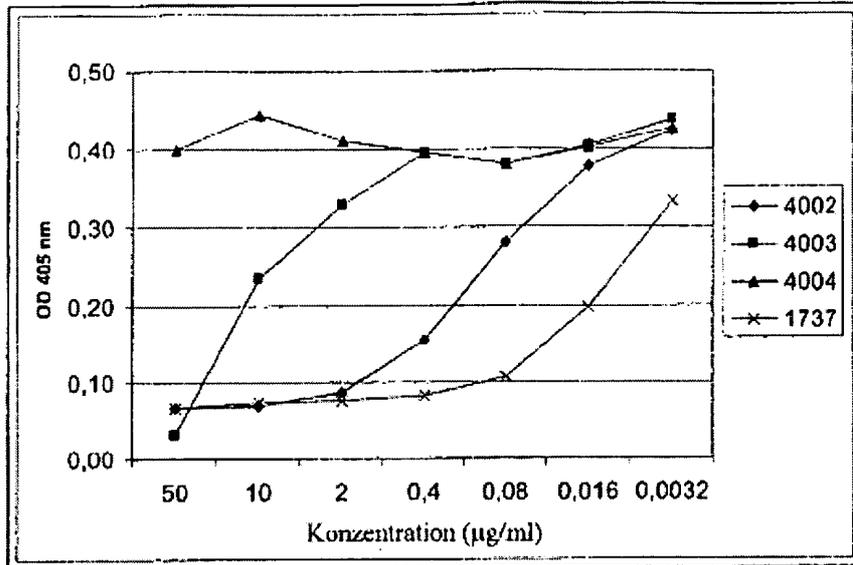


Fig.4

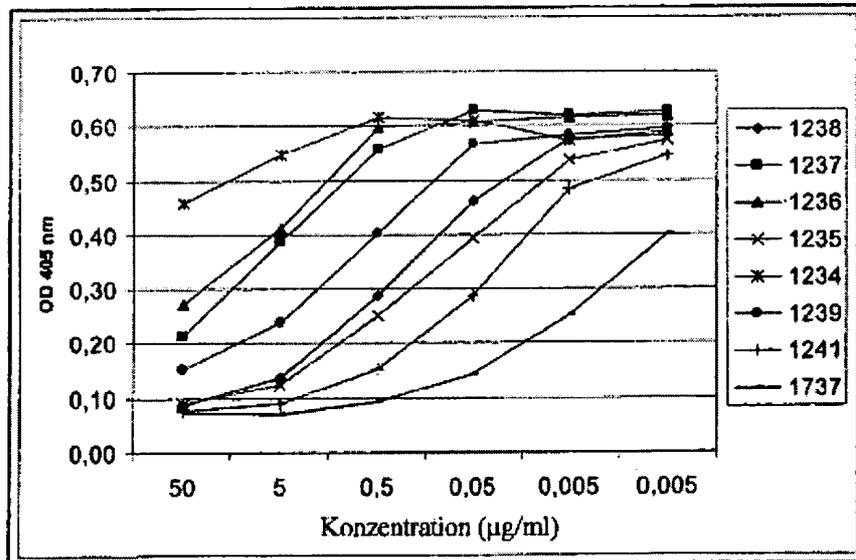


Fig.5



Fig. 6: Peptide 4011-4018

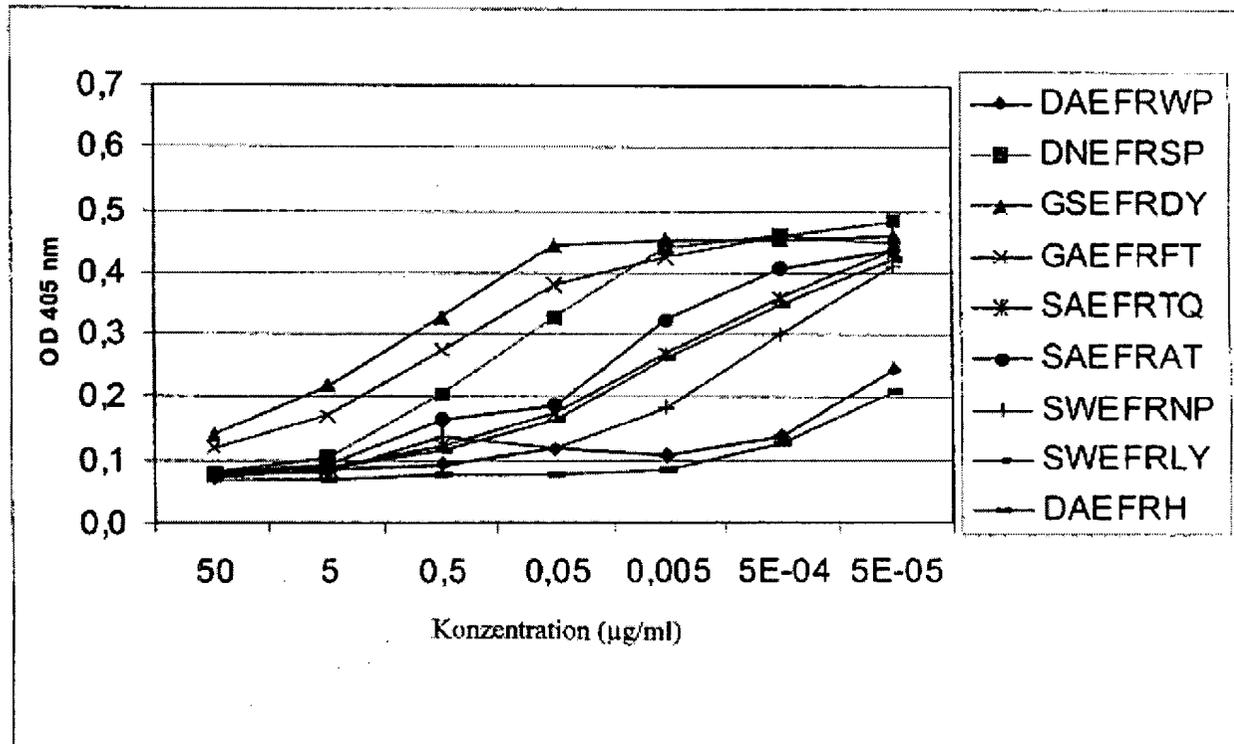




Fig. 7: Peptide 4019-4025

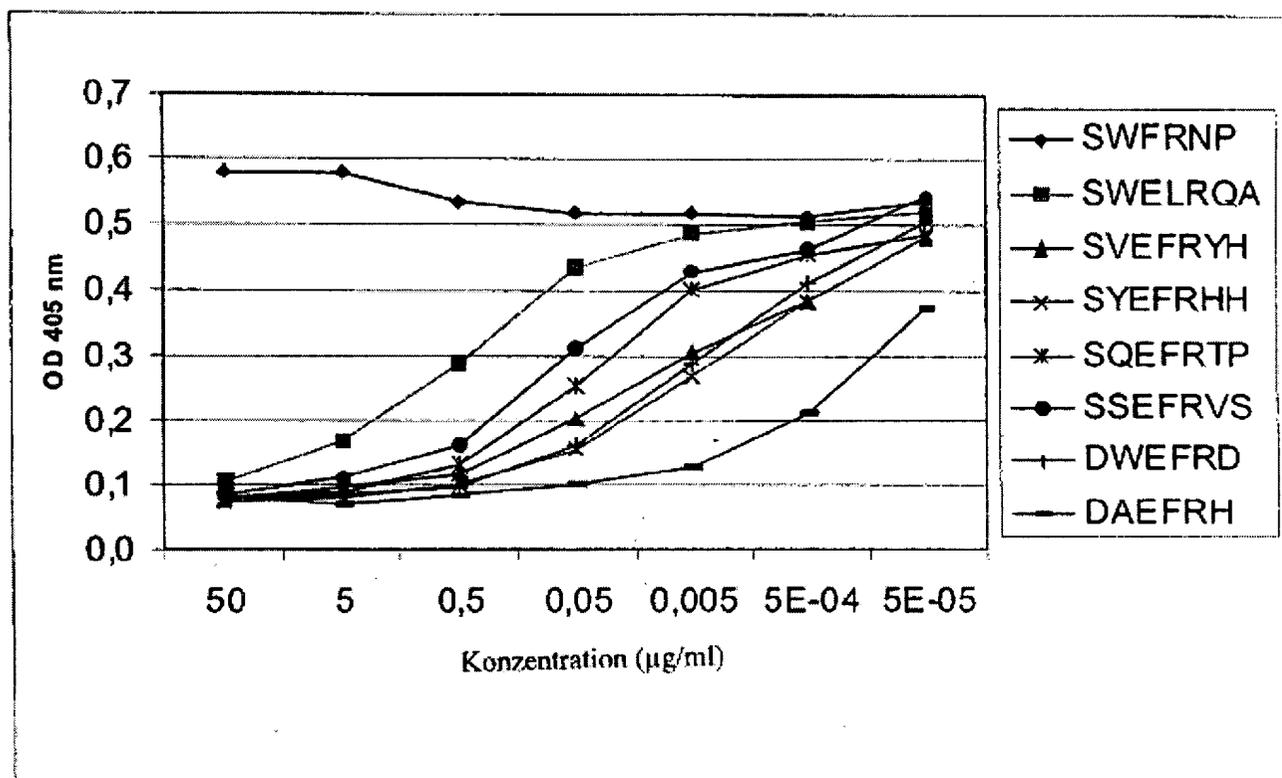




Fig. 8: Peptide 4031-4038

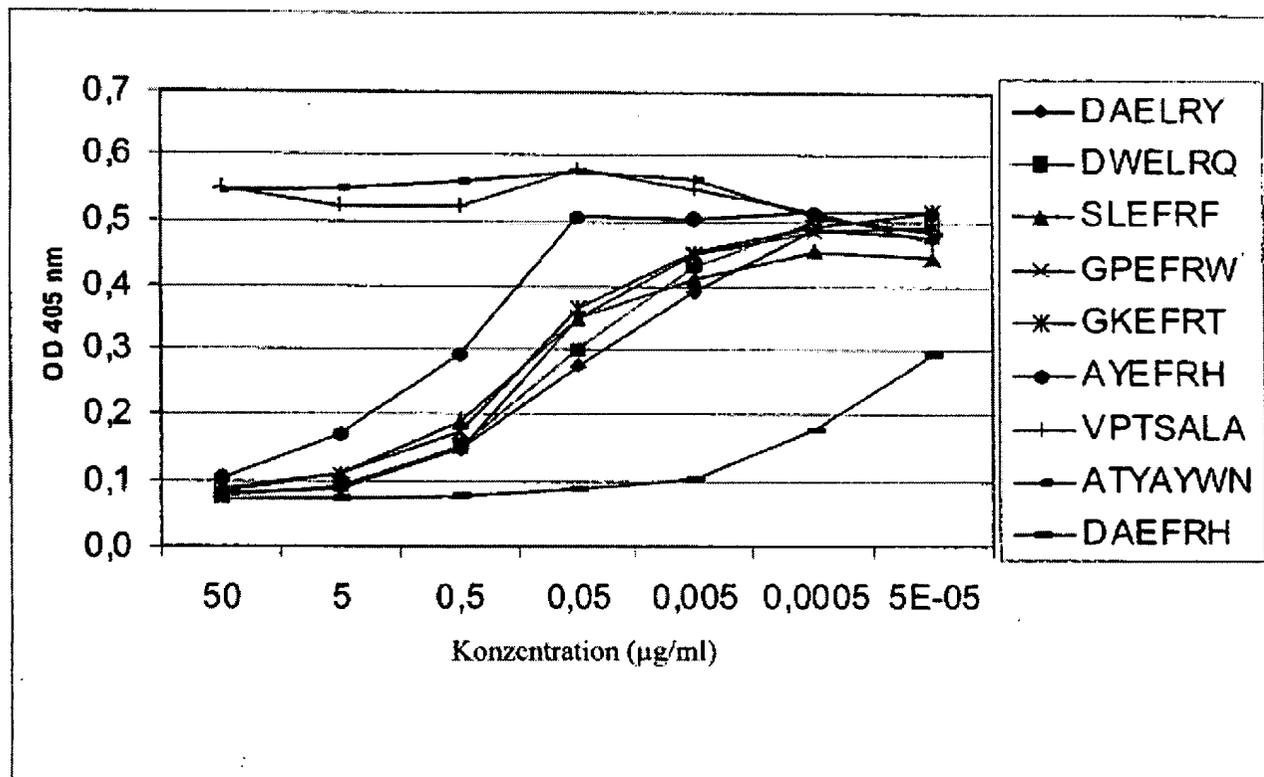




Fig. 9: Peptide 4061-4064 DKELR-Varianten

