

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-526693

(P2004-526693A)

(43) 公表日 平成16年9月2日(2004.9.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/47	C07K 14/47	2G045
A61K 38/00	A61K 39/395	4B064
A61K 39/395	A61K 39/395	4C084
A61P 25/28	A61P 25/28	4C085
C07K 16/18	C07K 16/18	4H045
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-556620 (P2002-556620)	(71) 出願人	500242786 フラウンホファー ゲセルシャフトツール フェールデルンク ダー アンゲヴァン テン フォルシュング エー. ファオ. ドイツ連邦共和国 80686 ミュンヘ ン, ハンザシュトラッセ 27ツェー
(86) (22) 出願日	平成13年12月21日 (2001.12.21)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月10日 (2003.7.10)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/015181	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(87) 国際公開番号	W02002/055552	(72) 発明者	カブルニオツ, アフロディーティ ドイツ連邦共和国 アーヘン 52066 , ローンハイデル ヴェーク 60 最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成14年7月18日 (2002.7.18)		
(31) 優先権主張番号	101 01 430.9		
(32) 優先日	平成13年1月13日 (2001.1.13)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

(54) 【発明の名称】 β -アミロイドペプチドの可溶性環状類似体

(57) 【要約】

本発明は、アミロイド産生インヒビターの生物活性を有するペプチド、ならびにその診断上および医薬上の使用に関するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

アミロイド形成のモジュレーターの生物活性を有するペプチドであって、該ペプチドは -アミロイドペプチド (-A P) であり、かつ少なくとも1個の分子内架橋を有することを特徴とする、上記ペプチド。

【請求項2】

前記モジュレーターがインヒビターである、請求項1に記載のペプチド。

【請求項3】

前記架橋が前記ペプチドを形成しているアミノ酸の側鎖間の共有結合により形成される、請求項1または2に記載のペプチド。

10

【請求項4】

架橋形成に関与している前記ペプチドのアミノ酸が $i + 3$ 、 $i + 4$ 、 $i + 5$ 、 $i + 6$ または $i + 7$ の相対距離で配置されている、請求項1~3のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項5】

架橋形成に関与している前記ペプチドのアミノ酸の側鎖が、直接的にまたはスペーサーを介して共有結合されている、請求項1~4のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項6】

前記スペーサーがアミノカルボキシ、ジアミノまたはジカルボキシ化合物である、請求項1~5のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項7】

架橋形成に関与しているアミノ酸が、天然において前記ペプチドのそれらの位置に存在するアミノ酸である、請求項1~6のいずれか1項に記載のペプチド。

20

【請求項8】

架橋形成に関与しているアミノ酸の少なくとも1つが、天然においてその位置に存在しないアミノ酸である、請求項1~6のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項9】

架橋形成に関与している少なくとも1つのアミノ酸が、天然においてそこに存在するアミノ酸の置換分であるか、または付加的に導入されたアミノ酸である、請求項8に記載のペプチド。

【請求項10】

架橋形成に関与しているアミノ酸が、野生型 -A P の15~24位の範囲に配置されている、請求項8または9に記載のペプチド。

30

【請求項11】

-A P がアミノ酸1-28、1-40または1-42または1-43からなる、請求項10に記載のペプチド。

【請求項12】

架橋形成に関与しているアミノ酸が17位と21位のアミノ酸である、請求項10または11に記載のペプチド。

【請求項13】

前記モジュレーターの生物活性を有するペプチドが、配列番号2~19に示されるアミノ酸配列を有するペプチドからなる群より選択されたペプチドである、請求項10~12のいずれか1項に記載のペプチド。

40

【請求項14】

前記ペプチドが、アルキル基、官能化されたアルキル基、芳香族基、オリゴペプチド、ポリペプチド、糖基および脂質基からなる群より選択された少なくとも1種の官能基で誘導体化されている、請求項1~13のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項15】

前記ペプチドが担体上に固定化されている、請求項1~14のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項16】

50

請求項 1 ~ 15 のいずれか1項に記載のペプチドを特異的に認識する抗体。

【請求項 17】

モノクローナルまたはポリクローナル抗体である、請求項 16 に記載の抗体。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 15 のいずれか1項に記載のペプチドおよび製薬上許容される担体を含有する医薬組成物。

【請求項 19】

検出マーカーをもつ請求項 1 ~ 15 のいずれか1項に記載のペプチドまたは請求項 16 もしくは 17 に記載の抗体を含有する診断用組成物。

【請求項 20】

検出マーカーが放射性標識、蛍光標識、酵素標識、発光標識またはスピン標識である、請求項 19 に記載の診断用組成物。

10

【請求項 21】

検出マーカーをもつ請求項 1 ~ 15 のいずれか1項に記載のペプチドまたは検出マーカーをもつ請求項 16 もしくは 17 に記載の抗体を、プローブとして、検査すべきサンプルに接触させ、該ペプチドと、場合により存在するアミロイド形成性 -A P ペプチドまたはその凝集体と、の結合を検出することを特徴とする、アミロイド形成性 -A P またはその凝集体の定性的および/または定量的検出方法。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 15 のいずれか1項に記載のペプチドを液体と接触させて、インキュベートすることを特徴とする、該液体中に含まれるアミロイド形成性 -A P からの凝集体形成を改変する、特に阻止する、方法。

20

【請求項 23】

請求項 1 ~ 15 のいずれか1項に記載のペプチドおよび/または請求項 16 もしくは 17 に記載の抗体の、アミロイド形成を特徴とする疾患、特にアルツハイマー病、の予防および/または治療のための医薬の製造への使用。

【請求項 24】

請求項 1 ~ 15 のいずれか1項に記載のペプチドの、診断用、治療用および研究用の抗体を生産するための改良された取り扱い特性を有する免疫原としての使用。

【請求項 25】

液体、特に体液、からアミロイドを調製的に枯渇させるための、請求項 22 に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アミロイド形成のモジュレーターを有するペプチド、アミロイド形成性ペプチドまたはその凝集体を探索するための方法、アミロイド形成を伴う疾患の予防および治療のための医薬組成物、ならびにかかる疾患を検出するための診断用組成物に関する。

【背景技術】

40

【0002】

アミロイド疾患すなわちアミロイドーシスは、特定の身体組織中におけるアミロイド産生、アミロイド形成またはアミロイドタンパク質の凝集を伴う疾患で、これはしばしば細胞毒性作用と結びついている。例えば、アルツハイマー病は -アミロイドペプチド (-A P) のアミロイド形成を伴う。

【0003】

各種ペプチドのアミロイド沈着物の形成はアミロイド性疾患の発生および病的合併症の原因であるとされている (Lorenzoら, Nature 368 (1994), 756-760; Lorenzoら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 12243-12247; Lansburyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999), 3342-3344; Kooら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999), 9989-9990;

50

Sipeら, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 31(4), (1994), 325-354)。さらに、アミロイド形成のインヒビターはアミロイド性疾患の予防および治療に好適な医薬であると考えられている。

【0004】

DE-A1 197 25 619には、アミロイド形成のアゴニストおよび/またはインヒビターとして作用する3~15個のアミノ酸からなる直鎖状ペプチドが記載されている。こうしたペプチドは、それらが活性配列として少なくともアミノ酸GAを含有することにより特徴づけられる。

【0005】

米国特許第5,854,204号からは、 β -アミロイド凝集をモジュレートするペプチドが知られている。特に β -アミロイド前駆体タンパク質770から誘導された種々の長さの直鎖状に構築されたペプチドが重要である。

【0006】

国際公開WO 96/39834には、異常なペプチド凝集を伴う疾患を治療する他の直鎖状ペプチドが記載されている。そこに記載されるペプチドは、3~15アミノ酸、3アミノ酸の疎水性セグメント、およびこの疎水性セグメント中の β -シート構造をブロックする少なくとも1個のアミノ酸を有する。

【0007】

国際公開WO 96/07425には、直鎖構造を有する阻害性の合成ペプチドによるアミロイド β -タンパク質の神経毒作用が記載されている。アミリン(Amylin)およびその誘導体を用いてII型真性糖尿病を診断および治療することがEP 0 289 287およびEP 0 309 100 A2に記載されている。

【0008】

アミロイド性疾患を早期診断するための検査方法は、まだ利用できないか、あるいは発症段階でのみ利用可能である。その理由は、アミロイド形成により引き起こされるタンパク質化学および技術的分析の問題がこれまで何らアミロイド形成の分析を可能にしなかったからである。そのため、アミロイド形成のメカニズムは本質的に未解明のままである。さらなる結果として、アミロイド形成のモジュレーター(特にインヒビター)に基づくアミロイド性疾患の治療のための医薬製剤が現在何も存在しない。同様に、アミロイド発生の分析に基づいて構築された診断方法、例えばアミロイド構造の形成を速度論的、定量的および定性的に評価するための*in vitro*検査はほとんど存在しない。例えばアルツハイマー病に関しては、診断はまだ徴候的に行わねばならない。

【0009】

存在する疾患間のアミロイド形成性ペプチドの濃度の異常な上昇を確認するために、アミロイド形成性ペプチドを検出できる好適なプローブに対する需要が存在している。かかるプローブを作製する際の問題点は、プローブそれ自体が凝集を起こしてはならず、しかもアミロイド形成性ペプチドと特異的に相互作用する(すなわち結合する)必要があるという点である。アミロイド形成のインヒビターの必要条件は同様であろう。かかる物質はまた、もちろん凝集を促進すべきでなく、また、それ自体凝集すべきでなく、そしてさらなる凝集を阻止するためにアミロイド形成性ペプチドと特異的に結合できなければならない。上記した基準を満たす何らかの物質を医療上の診断または治療に利用することは、いまのところ可能でない。それゆえ、アミロイド形成を伴う疾患の診断(特に早期診断)のためのプローブとしてだけでなく、その予防を含めた治療のためのプローブとして役立つ物質を調製することが大いに必要とされている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

かくして、本発明は、アミロイド形成を伴う疾患(特にアルツハイマー病)を診断するための、また、そのような疾患を治療するためのプローブとして役立つ物質を調製するという技術的課題に基づくものである。

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、アミロイド形成のモジュレーター、特にアミロイド形成のインヒビター、の生物活性を有するペプチドを調製することにより上記技術的課題を解決するものである。上記ペプチドは、-APまたはその誘導体であり、そして少なくとも1個の分子内架橋、特に該ペプチド中に存在する少なくとも2個のアミノ酸の側鎖間に少なくとも1個の架橋を有する。本発明の特に好ましい実施形態においては、少なくとも1個の架橋が、ペプチドを形成しているアミノ酸またはペプチドに導入されたアミノ酸（置換分として、または配列中の追加分として）のうち少なくとも2個のアミノ酸側鎖間の共有結合により形成される。その際、架橋は側鎖の官能基（例えばアミノ基およびカルボキシル基）間の直接結合により行われることが意図される。しかしまた、架橋形成に關与するペプチドのアミノ酸の側鎖が、スペーサーまたはリンカー（すなわちアミノカルボキシ、ジアミノまたはジカルボキシ化合物）を介して相互に共有結合されることも意図されうる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

疾病の原因となる凝集およびアミロイド形成は、アミロイド形成性ペプチド配列間の分子間 プリーツシートの形成により行われ、この構造は特定のアミノ酸残基の側鎖間の分子間水素結合および疎水性相互作用の形成に必要となる。この プリーツシート構造が初めは2つの、それ以後は2つ以上のアミロイド形成性ペプチド鎖（つまり -AP分子）間の非共有結合をもたらし、続いて不溶性の凝集体またはアミロイド構造体を形成する。

20

【0013】

本発明はいかなる理論によっても拘束されないが、本発明に従って提供されるアミロイド形成のモジュレーターの生物活性を有する -APの分子内架橋は、無秩序ならせんコンフォメーションまたは非アミロイド形成性状態が、凝集したまたは凝集可能な プリーツシート構造へと移行するのを阻止すると考えられる。本発明によれば、分子内架橋の導入により、コンフォメーション拘束、すなわち、ある種の非アミロイド形成性状態の安定化（例えば ターンまたは ヘリックス）が生じる。こうして、本発明による環状ペプチドは、その一次構造が野生型分子である野生型 -APと同一であるか、または非常に類似しているが、その二次構造に関してはこれらのペプチドと天然ペプチドとの間に大きな差異が存在する。本発明により得られた凝集不能なコンフォメーションの -APのコンフォメーション拘束により、凝集インヒビターまたはアミロイド形成インヒビターとして働く非アミロイド形成性分子が提供される。それらはその後、アミロイドペプチドのまたはそのための可溶性アゴニストおよびプローブとして作用しうる。本発明による環状ペプチドは、一方では、その構造の基となっているアミロイドペプチドの天然型すなわち野生型と特異的に非共有結合するか、またはそれらと会合することができ、しかもそれらを検出することができることにより特徴づけられる。その上本発明によるペプチドは、それ自体はアミロイド形成性がなく、同時に天然型のペプチドへの結合に際して他の天然のペプチドとのその会合を阻害することにより特徴づけられる。特に、本発明による環状ペプチドは、まだ凝集していない天然ペプチドの可溶性形態またはモノマーおよびオリゴマーに結合する。

30

40

【0014】

本発明による環状ペプチドはまた、アミロイド形成のアゴニスト、プローブおよびインヒビターとして作用し、これらはアミロイド形成を伴う疾患の診断および治療に使用することができる。その上、これらはアミロイド産生の分析および研究のための、ならびにアルツハイマー病の診断薬および治療薬の研究、開発および製造のための、ならびにアルツハイマー病の予防のための分子ツールとして使用することができ、また、接種剤としても使用しうる。本発明により達成される病因ペプチドのアミロイド形成の阻害は、同時に組織細胞に及ぼすアミロイド凝集体の細胞毒作用を阻害し、また、他の重要な病原体を排除する。本発明による環状ペプチドは、現行の固相ペプチド合成法に従う化学合成により高純度で製造することができる。これらは高い生物学的安定性、特にタンパク質加水分解に対

50

する安定性を有し、こうした安定性は例えば非天然アミノ酸や環構造を導入することによりさらに高めることが可能である。本発明による環状ペプチドは取り扱いが簡単であるが、このことは、とりわけ、その高い溶解性に起因している。これは天然分子である天然-A Pの取り扱いが厄介であるのと対照的である。本発明による環状ペプチドはさらに、治療薬として使用したとき、あるにしても、ほんのわずかばかりの副作用および抗原性しか示さない。というのは、本発明のアミロイド形成インヒビターは、その一次構造が体内に存在する天然のペプチドと非常に類似しているからである。

【0015】

本発明に関連してペプチドとは、アミド結合を介して相互に結合した少なくとも2個のアミノ酸を有する分子、例えばオリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質であると理解される。このペプチドは、天然に存在するペプチド、化学的に修飾されたその変異体または新規 (de novo) 合成されたペプチドでありうる。このペプチドには、例えばグリコシル化または他の誘導体化 (例えばアルキル化、ヒドロキシル化、アミノ化等) のような修飾が施されていてもよい。このペプチドは天然に存在する形態、すなわち天然型、から改変されていてもよく、しかも例えばペプチド類似体またはペプチド擬似体のような構造のおよび/または機能的同等物であってもよい。こうした改変はアミノ酸の挿入、アミノ酸の置換、アミノ酸の転移、アミノ酸の付加および/またはアミノ酸の欠失とすることができる。このペプチドはまた通常でないおよび/または非天然のアミノ酸を含んでいてもよい。同様にペプチドのアミノ酸はD-またはL-配置で存在することができる。

10

【0016】

本発明に関連して、アミロイド形成のモジュレーターの生物活性を有するペプチドとは、アミロイドまたはアミロイド様構造を形成するペプチドに影響を及ぼすか、アミロイドへと凝集する能力に関して、特にアミロイド形成を促進するか、開始させるか、または阻害する (例えば抑制または阻止する) ことのできるペプチドと理解される。凝集する能力の促進は、研究のために、または組織 (ここではアミロイドが有害でない) における計画的な組織特異的アミロイド局在化のために望ましいことがある。アミロイド形成のモジュレーターの生物活性を有するペプチドは、それらの凝集する能力が改変されるように、特に、凝集速度や形成された凝集体の大きさまたは量に関して抑制されるように、アミロイド形成性ペプチドと相互作用しうることにより特徴づけられる。この凝集能力の改変は、好ましくはアミロイド形成性ペプチドの可溶性またはアミロイド形成性ペプチドの可溶性オリゴマーに、好ましくは非共有結合を介して、会合または付着させることにより行われる。本発明の特に好ましい実施形態においては、阻害効果は、凝集の遅滞期が天然に存在するアミロイド形成性ペプチドのみの遅滞期と比較して、少なくとも1.5、1.8、2、2.5、3、4、5、8、10、20、40、50または100倍延長される効果である。本発明のさらなる実施形態において、天然に存在するアミロイド形成性ペプチドまたはそれから形成された凝集体のみの凝集度に比較して、凝集度が10、20、30、40、50、60、70、80、90または100%低下する場合は、阻害効果が存在する。

20

30

【0017】

本発明に関連して、-A Pなる概念は、1つの分子内架橋および野生型配列と同一のまたは異なる一次構造 (すなわちアミノ酸配列) を有する、アミロイド形成のモジュレーターの生物活性を有するペプチドと理解される。アミロイド形成、凝集率、凝集度 (凝集総量) および凝集速度または凝集能力のモジュレーションを測定するには、例えば米国特許第5,854,204号に記載されるような公知の試験方法を使用することができる。この特許は、そこに記載される試験方法と合わせて、本教示の開示内容に含めるものとする。

40

【0018】

本発明に関連して、「架橋形成に関与しているアミノ酸」なる概念は、アミノ酸側鎖が、相互に直接または間接的に結合して分子内架橋をもたらす官能基を有する、そのようなペプチドのアミノ酸と理解される。かくして、架橋形成に関与するアミノ酸は官能基をもつ側鎖を有している。その官能基は、ペプチドの異なるアミノ酸の異なる側鎖の他の官能基と直接に結合するか、または官能基が少なくとも1個のスペーサー分子と結合し、そのス

50

ペーサー分子が続いて架橋形成に關与するペプチドの別のアミノ酸の側鎖の官能基と結合する。かかる官能基は例えばヒドロキシ、アミノ、カルボキシおよび/またはチオール基であつてよい。架橋形成に關与するアミノ酸はもともと天然配列中のその位置に存在するアミノ酸とすることができる。本発明によれば、天然に存在するアミノ酸の適切な置換によって、天然ではその部位に存在しない置換用アミノ酸を導入したり、非天然のもしくは一般的なでないアミノ酸を導入したりすることも可能である。それらはその後架橋形成に使用されるか、架橋形成に關与する。もちろん、本発明によれば、架橋形成に關与するアミノ酸を、天然に存在するアミノ酸を欠失させることなく、-A Pのアミノ酸配列中に付加的に導入することも可能である。天然ではその位置に存在しないアミノ酸を導入することは、架橋形成を可能にするかまたは容易にする特別な官能基をその位置に故意に導入できるという利点を有しうる。本発明の好ましい実施形態においては、架橋形成に關与するアミノ酸としてDab(2,4-ジアミノ酪酸)、Dap(2,3-ジアミノプロピオン酸)、Ser、Asp、Glu、Cys、Lysおよび/またはOrnを、例えば置換または付加により、アミノ酸配列中に導入することが意図される。

10

【0019】

本発明の好ましい実施形態においては、架橋形成に關与するペプチドのアミノ酸、好ましくは架橋形成に關与するペプチドの2個のアミノ酸が $i + 3$ 、 $i + 4$ 、 $i + 5$ 、 $i + 6$ または $i + 7$ の相対間隔でペプチド中に配置されることが意図される。

【0020】

本発明の好ましい実施形態においては、架橋形成に關与するペプチドのアミノ酸の側鎖がスペーサーを介して相互に結合することが意図され、ここでスペーサーは、 $X-(CH_2)_n-Y$ (ここで $n = 1 \sim 6$ であり、 X/Y は $NH_2/COOH$ または $COOH/NH_2$ または NH_2/NH_2 または $COOH/COOH$ または OH/OH または SH/SH であるか、または X が NH_2 または $COOH$ または OH または SH からの1つであり、 Y が $COOH$ または NH_2 または SH または OH の1つである) からなる群より選択される。他のスペーサーを使用することももちろん可能である。本発明によれば、 X および Y の性質(つまり、スペーサーまたはリンカーの末端官能基の性質)を、結合すべき側鎖の官能基に適合させて、例えばアミノ基とカルボキシル基との結合、またはカルボキシル基とヒドロキシル基との結合、または2個のヒドロキシル基の結合、または2個のSH基の結合により、それらが化学的共有結合に入ることができるようにすることが大切である。

20

【0021】

他の好ましい実施形態において、本発明の環状ペプチドは架橋形成には関係しないが、例えば担体への固定化、他の分子との相互作用、検出等に役立つ他の官能基をもつていてもよい。かかる基は官能化されたアルキル基、芳香族基、糖基、脂質基、環式基、複素環式基、または多環式基、ピオチン含有基、アビジン含有基、ストレプトアビジン含有基等でありうる。もちろん、本発明のペプチドを他のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質もしくはその断片(例えば野生型 -A P またはその誘導体もしくは断片)と融合させることも意図される。

30

【0022】

本発明によるペプチドはマーカ基、例えば酵素、補欠分子団、蛍光物質、放射性物質または発光物質を有することができる。

40

【0023】

使用できる酵素の例としては、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼがある。補欠分子団の例としては、ストレプトアビジン/ピオチン、アビジン/ピオチンがある。使用できる蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミノフルオレセイン、ダンシルクロライドまたはフィコエリトリンがある。放射性物質としては、例えば ^{14}C 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 9mTc 、 ^{35}S または 3H を使用することができる。

【0024】

本教示中で用いるアミノ酸の番号付けおよび位置は、Hilbichら(J. Mol. Biol. 228 (19

50

92), 460-473) の表 1 に記載されるような、天然の野生型 -A P の配列に基づくものである。この刊行物の開示内容は、-A P のアミノ酸の配列ならびにその調製に関して、本教示の開示内容中に完全に含めるものとし、本発明の状況下ではその保護が求められることを言明する。本教示によるアミノ酸の番号付けは、常にN末端からC末端の方向になされる。

【0025】

元のペプチド(すなわち、幹ペプチド)が -A P である本発明の別の特に好ましい実施形態においては、架橋形成に關与するアミノ酸が -A P の15~24位の範囲に存在する。

-A P 幹ペプチドに關係するこの実施形態の別の好ましい態様によれば、-A P は1-28 (-A P 1-28または -A P 128)、1-40 (-A P 1-40または -A P 140)、1-42 (-A P 1-42または -A P 142)または1-43 (-A P 1-43または -A P 143)アミノ酸を有する。本発明の他の好ましい実施形態においては、架橋形成に關与する -A P のアミノ酸は、天然でそこに存在するアミノ酸であるか、または、例えば置換により導入されたアミノ酸(例えばリジンおよびアスパラギン酸)としてそこに(例えば17および21位に)存在するアミノ酸である。

10

【0026】

本発明の特に好ましい実施形態においては、本発明はシクロ^{17,21}[Lys¹⁷, Asp²¹] -A P (1-28) (c -A P 128またはc -A P (1-28)と略記する)環状ペプチドに關するものである。そのアミノ酸配列を配列番号2に示す。

【0027】

他の好ましい実施形態においては、環状ペプチドはシクロ^{17,21}[Lys¹⁷, Asp²¹] -A P (1-40) (c -A P 140と略記する)である。そのアミノ酸配列を配列番号3に示す。

20

【0028】

他の好ましい実施形態においては、環状ペプチドはシクロ^{17,21}[Lys¹⁷, Asp²¹] -A P (1-42) (c -A P 142と略記する)である。そのアミノ酸配列を配列番号4に示す。

【0029】

本発明の特に好ましい実施形態においては、環状ペプチドはシクロ^{17,21}[Asp¹⁷, Lys²¹] -A P (1-28)である。そのアミノ酸配列を配列番号5に示す。

【0030】

他の好ましい実施形態においては、環状ペプチドはシクロ^{17,21}[Asp¹⁷, Lys²¹] -A P (1-40)である。そのアミノ酸配列を配列番号6に示す。

30

【0031】

他の好ましい実施形態においては、環状ペプチドはシクロ^{17,21}[Asp¹⁷, Lys²¹] -A P (1-42)である。そのアミノ酸配列を配列番号7に示す。

【0032】

本発明の別の特に好ましい実施形態においては、環状ペプチドはシクロ^{17,21}[Asp¹⁷, Orn²¹] -A P (1-28) (Orn:オルニチン)である。そのアミノ酸配列を配列番号8に示す。

【0033】

他の好ましい実施形態においては、環状ペプチドはシクロ^{17,21}[Asp¹⁷, Orn²¹] -A P (1-40)である。そのアミノ酸配列を配列番号9に示す。

40

【0034】

他の好ましい実施形態においては、環状ペプチドはシクロ^{17,21}[Asp¹⁷, Orn²¹] -A P (1-42)である。そのアミノ酸配列を配列番号10に示す。

【0035】

本発明の特に好ましい実施形態においては、環状ペプチドはシクロ^{17,21}[Asp¹⁷, Dab²¹] -A P (1-28) (Dab: 2,4-ジアミノ酪酸)である。そのアミノ酸配列を配列番号11に示す。

【0036】

他の好ましい実施形態においては、環状ペプチドはシクロ^{17,21}[Asp¹⁷, Dab²¹] -A P (1-40)である。そのアミノ酸配列を配列番号12に示す。

50

【0037】

他の好ましい実施形態においては、環状ペプチドはシクロ^{17,21}[Asp¹⁷, Dab²¹] - A P (1-42)である。そのアミノ酸配列を配列番号13に示す。

【0038】

本発明の特に好ましい実施形態においては、環状ペプチドはシクロ^{17,21}[Orn¹⁷, Asp²¹] - A P (1-28)である。そのアミノ酸配列を配列番号14に示す。

【0039】

他の好ましい実施形態においては、環状ペプチドはシクロ^{17,21}[Orn¹⁷, Asp²¹] - A P (1-40)である。そのアミノ酸配列を配列番号15に示す。

【0040】

他の好ましい実施形態においては、環状ペプチドはシクロ^{17,21}[Orn¹⁷, Asp²¹] - A P (1-42)である。そのアミノ酸配列を配列番号16に示す。

【0041】

本発明の特に好ましい実施形態においては、環状ペプチドはシクロ^{17,21}[Dab¹⁷, Asp²¹] - A P (1-28)である。そのアミノ酸配列を配列番号17に示す。

【0042】

他の好ましい実施形態においては、環状ペプチドはシクロ^{17,21}[Dab¹⁷, Asp²¹] - A P (1-40)である。そのアミノ酸配列を配列番号18に示す。

【0043】

他の好ましい実施形態においては、環状ペプチドはシクロ^{17,21}[Dab¹⁷, Asp²¹] - A P (1-42)である。そのアミノ酸配列を配列番号19に示す。

【0044】

本発明はまた、抗体に関し、特に本発明の環状ペプチドを特異的に認識しかつそれに結合できるモノクローナルまたはポリクローナル抗体に関する。これら抗体は慣用の方法で修飾することができ、例えば標識することができる。これらはまた、担体上に固定化された形態で存在してもよく、例えばビーズに固定させることができる。

【0045】

本発明はまた、本発明によるペプチドを、ヒトまたは動物を免疫するための抗原として使用し、生成された抗体を取得する方法を提供する。本発明はまた、本発明によるペプチドを抗原として使用し、特にヒトまたは動物に投与し、免疫後に生成された抗体を取得するか、または抗体産生細胞（例えば脾細胞）をモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の調製のために取得する、モノクローナルおよびポリクローナル抗体の取得方法にも関する。したがって、本発明はまた、それ自体知られた方法を用いてモノクローナルまたはポリクローナル抗体を取得するための本発明によるペプチドの使用に関する。これはまた、組換え法、例えば大腸菌での抗体の生産を含みうる。取得された抗体（ヒト抗体またはヒト化抗体でありうる）は研究目的に例えば研究用ツールとして、あるいは治療または診断目的に、特にアルツハイマー病の診断および治療に使用することができる。本発明によるポリクローナルまたはモノクローナル抗体は、例えば本発明のペプチドで治療された患者の疾病経過を分析するため、または他の治療上有効なペプチドを単離および同定するために用いることができる。本発明によるペプチドは、天然に存在する難溶性の類似体と比較して、取り扱い性が相当に改善されているので、診断および治療用の抗体を生産するため免疫原としてのその使用に関して特に有利であることが判明した。このようにして生産された抗体は、1つの実施形態において、本発明によるペプチドを特異的に検出し、また他の実施形態において、天然に存在する野生型 - A P（場合により凝集形態）も検出でき、そのため本発明による抗体は例えばアルツハイマー病の診断に使用できる。本発明はまた、本発明によるペプチドをヒトまたは動物に適用し、 - A P またはその誘導体に対する免疫感作を達成することによる、ヒトまたは動物の免疫方法にも関する。

【0046】

本発明によるペプチドは慣用の方法で化学的に合成し、かつ/または修飾することができる。それらはまた、組換えDNA技術により生産したり、または天然源から単離して、修飾

10

20

30

40

50

することもできる。

【0047】

本発明はまた、医薬上有効な量の上記環状ペプチドおよび製薬上許容される担体を含有する医薬組成物にも関する。本発明のある実施形態においては、医薬組成物は本発明の環状ペプチドの少なくとも1種を、天然アミロイドペプチドの凝集、特に凝集速度および/または形成される凝集体の量、を改変する(特に抑制する)のに十分な、予防または治療上有効な量で含有する。本発明の他の実施形態においては、本発明の医薬組成物は天然に存在するアミロイド性ペプチドまたはその凝集体の神経毒作用を改変する(特に抑制する)のに十分な、予防または治療上有効な量で本発明の環状ペプチドを少なくとも1種含有する。医薬上有効な量は、疾患の状態、患者の身長、患者の体重、内在するアミロイドペプチドの量といった様々な要因に依存する。

10

【0048】

製薬上許容される担体の例としては、溶媒、分散媒、コーティング剤、充填剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤等が挙げられる。場合により着色剤または風味剤、乳化剤、結合剤、分離剤のような他の添加剤を加えてもよい。

【0049】

本発明の他の実施形態においては、医薬組成物を静脈内、経口、腹腔内、脊髄内、脳内または筋肉内に投与することが意図される。本組成物を無菌の水溶液または分散液の形態で、あるいは粉剤の形態で投与することも意図される。

【0050】

医薬組成物中に本発明の環状ペプチドと一緒に他の医薬上有効な物質を使用することも場合により意図される。例えば標的細胞への(例えば血液 脳関門を通る)輸送に役立つ他の物質を医薬組成物中に加えることも意図される。

20

【0051】

本発明の他の好ましい実施形態において、本発明は、好ましくは検出マーカ-をもつ、本発明の環状ペプチド少なくとも1種を含有する診断用組成物に関する。かかる検出マーカ-は例えば放射性ヨウ素またはテクネチウムのような放射性標識でありうる。しかし、検出マーカ-は蛍光標識、発光標識、酵素標識またはスピン標識であってもよい。

【0052】

他の好ましい実施形態において、本発明は、生物学的サンプルまたは動物もしくはヒトに存在するアミロイド形成性ペプチド(特に、 β -A β またはその誘導体)、アミロイド形成性ペプチドのオリゴマーまたはアミロイド形成性ペプチドの凝集体、あるいは前記物質に対する抗体を検出(特に、スクリーニング、スクヤニング)する方法に関する。この方法では、少なくとも1種の本発明の環状ペプチド(好ましくは検出マーカ-をもつもの)または検出マーカ-をもつ本発明の抗体をプローブとして、好ましくは液体中で、検査すべきサンプルと接触させ、該ペプチドと、アミロイド形成性ペプチド、そのオリゴマー、その凝集体、またはそれに対する抗体と、の会合を定性的および/または定量的に検出する。本発明のある実施形態においては、この方法をin vitroで実施することができ、他の実施形態ではin vivoで実施することができる。それゆえ、「接触させる」なる概念は、環状ペプチドとサンプルとのin vitroインキュベーション、または、ある部位(例えば、天然アミロイドペプチドもしくはその凝集体が存在する部位)への環状ペプチドのin vivo導入を包含する。この方法は、例えば天然 β -A β 、他のペプチド変異体、可能な薬剤、可能な診断薬またはマーカ-物質などの少なくとも1種の他の試験物質の存在下に、例えば競合的試験方法の形式で実施することも意図され、その場合、これら他の試験物質が天然の β -A β および/または本発明によるペプチドの凝集挙動に及ぼす効果を検出できるようにする。

30

40

【0053】

本発明によれば、環状ペプチドを固定化された形態で使用することが意図される。したがって、好ましい様式では、環状ペプチドに、固体担体への固定化を可能にする他の官能基を提供することが意図される。この固定化は、例えば、本発明によるペプチドを、抗体に

50

基づく試験、スクリーニングおよび分析方法において使用して、例えば -A Pまたは -A P誘導体に対して特異的な抗体を同定するために行われる。この固定化はまた、各種の液体からのアミロイドの結合、単離および枯渇のためのアフィニティマトリックスなど、研究および治療における調製的方法のために用いられる。

【0054】

本発明はまた、アミロイド形成を特徴とする疾患、すなわちアミロイドーシス、特に原発性、続発性、遺伝性および/または孤立性アミロイドーシス（例えばアルツハイマー病、特に散発的または家族性アルツハイマー病）を治療するための医薬の製造への本発明の環状ペプチド少なくとも1種の使用にも関する。

【0055】

かくして本発明はまた、本発明の環状ペプチドの少なくとも1種を、ヒトもしくは動物または摘出されたその構成部分に医薬上または診断上有効な量で投与し、診断上の使用の場合は、アミロイド構造への結合を検出する、ことを含んでなる、アミロイドーシスの診断および/または治療（例えば予防）のための方法にも関する。

【0056】

本発明はまた、本発明のペプチドを *in vivo* または *in vitro* でアミロイド形成性ペプチド、そのオリゴマーまたは凝集体と接触させ、そのアミロイド形成性ペプチド、そのオリゴマーまたは凝集体の凝集挙動を改変させる（特に凝集を抑制または阻害する）ことによる、アミロイド形成性ペプチド、そのオリゴマーまたは凝集体の凝集を改変させるための、またはアミロイド形成性ペプチド、そのオリゴマーまたは凝集体の細胞毒性を阻害するための方法にも関する。本発明において、アミロイドーシスとは特にアルツハイマー病のことである。

【0057】

特に本発明は、本発明のペプチドを液体と接触させてインキュベートすることによる、液体中に含有されるアミロイド -A Pからの凝集体の形成を改変する（好ましくは阻止する）ための方法に関する。この方法はまた、液体（例えば体液）からアミロイドを枯渇または除去するためにも役立つ。

【0058】

本発明はまた、本発明による環状ペプチドおよび/またはそれに対するモノクローナルもしくはポリクローナル抗体を包含するキットにも関し、その場合、これらの試薬は標識されていてもよい。

【0059】

本発明の他の好ましい実施形態は請求項から明らかである。

【0060】

本発明を実施例、配列表および添付図面に基づきより詳細に説明する。

【0061】

図1および2は、c -A P 128 (1A)、 -A P (1-28) (1B)、[Lys¹⁷, Asp²¹] -A P (1-28) (直鎖状対照ペプチド) (1C)ならびに -A P (1-28) (2A)、および -A P (1-28)とc -A P 128との1:1混合物(2B)のフィブリル形成挙動の電子顕微鏡写真を示す。

【0062】

図3は、本発明による分子内架橋を示すペプチドならびに直鎖状対照ペプチドの構造を模式的に示す。

【0063】

本教示の一部である配列表は以下のものを示す：

配列番号1： -A P (1-43)の野生型アミノ酸配列、

配列番号2～19： 本発明によるアミノ酸配列（それぞれの場合に、分子内架橋形成がアミノ酸17と21の側鎖間に存在する）。

【実施例1】

【0064】

c -A P 128と対照 -A P (1-28)の調製、精製および特徴づけ

10

20

30

40

50

ペプチドは、PAM樹脂でBoc/Bzl合成ストラテジーを用いて現行の固相ペプチド合成法により調製した (Barany, G., Kneib-Cordonier, N. & Mullen, D. G. (1987) J. Pept. Res. 30, 705-739)。HF/アニソール(10:1)を用いて樹脂からペプチドを切り離し、そしてC18カラム上での調製用HPLCにより精製した (Kapurniotu & Taylor, (1995) J. Med. Chem. 38, 836-847)。c - A P 128を合成するには、Lys¹⁷とAsp²¹の側鎖をFmocまたはフルオレニル-メチルエステル(OFm)保護基で保護し、これらの保護基はその後ラクタム橋の形成に先立って20%ピペリジン/DMFを用いて選択的に除去した (Kapurniotu & Taylor, J. Med. Chem. 38, 836-847 (1995))。側鎖-側鎖環化は、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ-トリス (ジメチルアミノ) ホスホニウム-ヘキサフルオロホスフェート (BOP)を用いて行った。反応の完了についてカイザー試験 (Kapurniotu & Taylor (1995) J. Med. Chem. 38, 836-847)により調べた。完全な環化反応を達成するために、環化反応をDMF、NMPおよびDMSOの混合物中で4回実施した (1回の環化時間は約20時間とした)。HPLCで精製した生成物の塊をMALDI-MSにより測定し、その純度を分析用HPLCにより証明した。

10

【実施例2】

【0065】

c - A P 128: 凝集; フィブリル形成の試験; - A P (1-28) の凝集に及ぼす阻害作用の試験

c - A P 128の物理化学的性質およびフィブリル形成の試験

c - A P の物理化学的性質は、FT-IR (フーリエ変換赤外線分光器) およびCD (円偏光二色性分光偏光計) により調べた。c - A P 128のフィブリルの性質を検査するために、EM (電子顕微鏡) およびAFM (原子力顕微鏡) を使用した。EM研究には、初めに10mM リン酸緩衝液、150mM NaClおよび30%アセトニトリル、pH 5.5中のc - A P 128または - A P (1-28) または [Lys¹⁷, Asp²¹] - A P (1-28) の450 μM溶液を数日間インキュベートし、フィブリル形成について調べた。この研究では、c - A P 128の高濃度溶液は多くの日数 (30日以上) にわたり全くフィブリンを形成しないことが示された (図1A)。これは対照ペプチド - A P (1-28) (天然に存在する配列) および [Lys¹⁷, Asp²¹] - A P (1-28) (直鎖状対照ペプチド) と対照的であり、これらは3日間のインキュベーション後に完全にフィブリル化した (図1B、1C)。

20

【0066】

上記溶液 / 懸濁液のFT-IRは、c - A P 128に導入された架橋形成が プリーツシート配置 (天然の - A P および対照ペプチド [Lys¹⁷, Asp²¹] - A P (1-28) がエージング後にとる配置である) を妨げ、それにより凝集およびフィブリル形成を阻害することを示した。

30

【0067】

図3Aは、 - A P 断片 - A P (1-28)の天然のアミノ酸配列を示す。会合およびフィブリル形成におけるその重要な役割を示すために17~20位を強調してある。図3Bの上方部分に、本発明による - A P (1-28)誘導体であるシクロ^{17,21} [Lys¹⁷, Asp²¹] - A P (1-28) の構造が模式的に示されており、これはシクロ - A P (1-28)と略記されるか、またはc - A P 128と呼ばれる。このペプチドは、Lys¹⁷とAsp²¹の側鎖間、特にLysの - アミノ基と Aspの - カルボキシル基との間に分子内架橋を有する。したがって、この例は、17および21位のアミノ酸の側鎖が、中間のリンカーまたはスパーサーなしに、ラクタム結合により共有結合されている分子内架橋を有する。図3Bの下方部分には、対照ペプチドである対照 - A P (1-28)、すなわち [Lys¹⁷, Asp²¹] - A P (1-28) が示されている。この図面は、17位のロイシンをリジンで置換し、21位のアラニンをアスパラギン酸で置換すると、天然の - A P (1-28) ペプチドとは相違する類似体を得られ、これら置換分の側鎖の (- アミノ基と - カルボキシル基の間に導入されたラクタム橋を介した) 共有結合により本発明の構造が得られることを明示している。

40

【実施例3】

【0068】

c - A P 128による - A P (1-28) または [Lys¹⁷, Asp²¹] - A P (1-28) の凝集およびフィブリル形成の阻害

50

c - A P 128が - A P (1-28)の凝集およびフィブリル形成に及ぼす効果をCDおよびEMで試験した。10mM リン酸緩衝液、150mM NaClおよび30%アセトニトリル、pH 5.5中の450 μ Mの - A P (1-28)およびc - A P 128の溶液を数日間インキュベートし、フィブリル形成についてEMで試験した(図2Aおよび2B)。 - A P 単独または[Lys¹⁷, Asp²¹] - A P (1-28) 単独は10時間以内に プリーツシート構造を形成して、その後不溶性アミロイドとして沈殿したにもかかわらず、CDはこの混合物の1ヶ月以上にわたるCDスペクトルに何の変化も示さなかった。

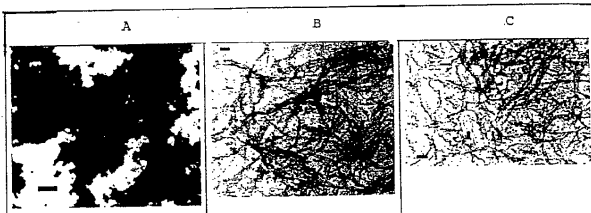
【図面の簡単な説明】
【0069】

【図1】図1Aは、c - A P 128のフィブリル形成挙動を示す電子顕微鏡写真である。図1Bは、 - A P (1-28)のフィブリル形成挙動を示す電子顕微鏡写真である。図1Cは、[Lys¹⁷, Asp²¹] - A P (1-28) (直鎖状の対照ペプチド)のフィブリル形成挙動を示す電子顕微鏡写真である。

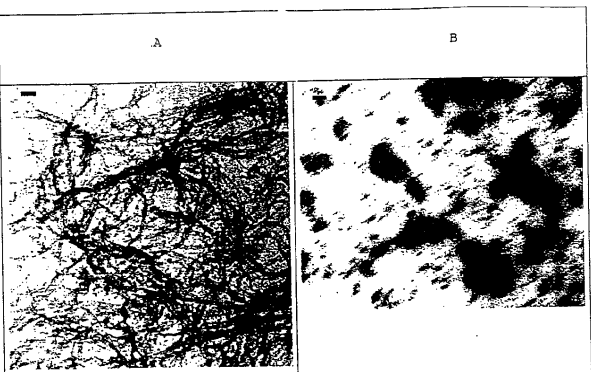
【図2】図2Aは、 - A P (1-28)のフィブリル形成挙動を示す電子顕微鏡写真である。図2Bは、 - A P (1-28)とc - A P 128との1:1混合物のフィブリル形成挙動を示す電子顕微鏡写真である。

【図3】図3Aは - A P (1-28)の天然のアミノ酸配列を示し、図3Bの上方部分には本発明の環状ペプチドであるシクロ - - A P (1-28)の構造を模式的に示し、図3Bの下方部分には直鎖状対照ペプチドである対照 - - A P (1-28)の構造を模式的に示す。

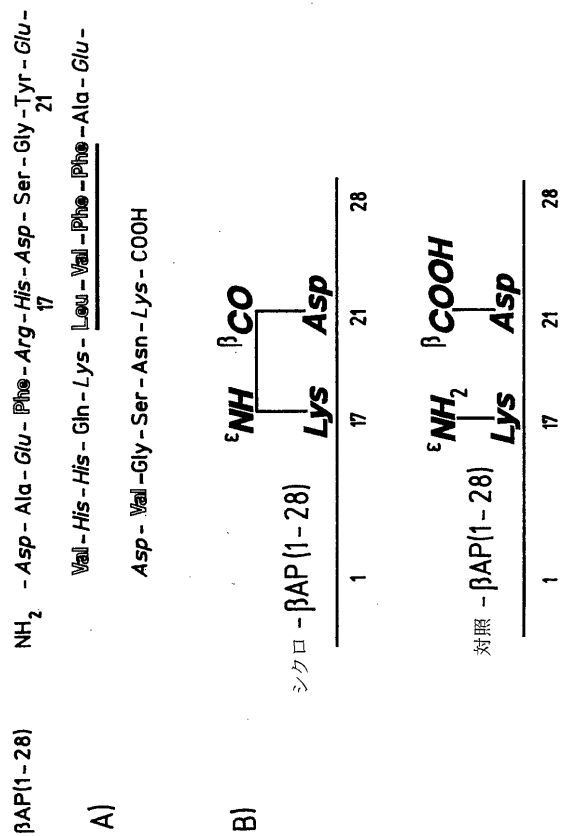
【図1】



【図2】



【図3】



【国際公開パンフレット】

(M)60213740231



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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Juli 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/055552 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: C07K 14/47 (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GM, GR, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KH, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/15181 (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), carisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 21. Dezember 2001 (21.12.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Ausgaben zur Priorität: 101 01 430.9 13. Januar 2001 (13.01.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DT]; Leonrodstraße 54, 80636 München (DE).
- (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KAPURNIOTU, Afroditi [GR/DE]; Friedrich-Schaul-Strasse 6, 72074 Tübingen (DE). BERNHAGEN, Jürgen [DE/DE]; Friedrich-Schaul-Strasse 6, 72074 Tübingen (DE). BRUNNER, Herwig [AT/DE]; An der Heideleiche 6, 70569 Stuttgart (DE).
- (74) Anwälte: SCHRELL, Andreas usw.; Maybachstrasse 6A, 70469 Stuttgart (DE).
- Veröffentlicht: — ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/055552 A2

(54) Title: SOLUBLE CYCLIC ANALOGUES

(54) Bezeichnung: LÖSLICHE CYCLISCHE ANALOGA

(57) Abstract: The invention relates to a peptide that has the biological activity of an amyloid production inhibitor, and to the diagnostic and medical uses thereof.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Peptid mit der biologischen Aktivität eines Inhibitors der Amyloidbildung sowie dessen diagnostische und medizinische Verwendungszwecke.

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

Lösliche cyclische AnalogaBeschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide mit der biologischen Aktivität eines Modulators der Amyloidogenese, Verfahren zum Auffinden amyloidogener Peptide oder deren Aggregate, pharmazeutische Zusammensetzungen zur Prophylaxe und Therapie mit Amyloidogenese einhergehender Krankheiten sowie diagnostische Zusammensetzungen zum Nachweis derartiger Krankheiten.

Amyloide Krankheiten oder Amyloidosen sind Krankheiten, die mit einer Amyloidogenese, Amyloidbildung beziehungsweise Aggregation amyloider Proteine in bestimmten Körpergeweben einhergehen, womit häufig cytotoxische Effekte verbunden sind. So geht die Alzheimersche Krankheit mit einer Amyloidogenese des β -amyloiden Peptids (β -AP) einher.

Es wird angenommen, dass die Bildung der Amyloidablagerung verschiedener Peptide verantwortlich ist für das Entstehen und die pathologische Komplikationen amyloider Krankheiten (Lorenzo et al., Nature 368 (1994), 756-760, Lorenzo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 12243-12247, Lansbury et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999), 3342-3344, Koo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999), 9989-9990, Sipe et al., Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 31(4) (1994), 325-354). Es wird ferner angenommen, dass Inhibitoren

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

-2-

der Amyloidbildung geeignete Pharmazeutika zur Prophylaxe und Bekämpfung der amyloiden Krankheiten darstellen.

5 Aus der DE-A1 197 25 619 sind lineare Peptide aus 3 bis 15 Aminosäuren bekannt, die als Agonisten und/oder Inhibitoren der Amyloidbildung wirken können. Diese Peptide zeichnen sich dadurch aus, dass sie als wirksame Sequenz mindestens die Aminosäuren GA enthalten.

10 Aus dem US-Patent 5,854,204 sind Peptide bekannt, die die β -Amyloidaggregation modulieren. Es handelt sich um linear aufgebaute Peptide unterschiedlicher Länge, welche insbesondere von dem β -Amyloidvorläuferprotein 770 abgeleitet ist.

15 Die WO 96/39834 beschreibt weitere lineare Peptide, die in der Lage sind, Krankheiten mit abnormaler Peptidzusammenlagerung zu heilen. Die beschriebenen Peptide weisen 3 bis 15 Aminosäuren, einen hydrophoben Abschnitt von 3 Aminosäuren und in diesem
20 hydrophoben Abschnitt mindestens eine β -Falthblattstruktur blockierende Aminosäure auf.

Die WO 96/07425 beschreibt neurotoxische Effekte des Amyloid- β -Proteins durch inhibierende synthetische Peptide mit linearer Struktur. Die Diagnose
25 und Behandlung von Typ II Diabetes mellitus unter Verwendung von Amylin und Derivaten davon ist in der EP 0 289 287 und der EP 0 309 100 A2 beschrieben.

Testverfahren zur Früherkennung der amyloiden
30 Krankheiten sind zur Zeit noch nicht verfügbar be-

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

- 3 -

ziehungsweise erst im Entwicklungsstadium. Dies liegt daran, dass die durch die Amyloidbildung verursachten proteinochemischen und technisch-analytischen Probleme bisher keine Analytik der Amyloidbildung erlauben. Als Folge davon ist der Mechanismus der Amyloidbildung im Wesentlichen un-
5 aufgeklärt. Als weitere Folge davon existieren gegenwärtig keine pharmazeutischen Ansätze zur Behandlung der amyloiden Krankheiten auf der Basis von Modulatoren, insbesondere Inhibitoren, der Amy-
10 loidogenese. Ebenso wenig existieren auf der Amyloidbildungsanalyse aufbauende diagnostische Verfahren, zum Beispiel in vitro-Tests zur Bewertung von Kinetik, Quantität und Qualität der Bildung amyloider Strukturen. Nach wie vor muss die Diagnose, beispielsweise der Alzheimerschen Krankheit, symptomatisch durchgeführt werden.

Insbesondere besteht ein Bedarf an geeigneten Sonden, die in der Lage sind, amyloidbildende Peptide
20 nachzuweisen, um so schon im Vorfeld möglicher Krankheiten abnormale Erhöhungen der Konzentration amyloidogener Peptide festzustellen. Die Bereitstellung derartiger Sonden scheiterte bisher daran, dass Sonden selbst nicht aggregieren dürfen, gleichwohl aber spezifisch mit den amyloidogenen Peptiden interagieren, das heißt binden, müssen. Ähnlich sind die Anforderungen, welche an einen In-
25 hibitor der Amyloidbildung gestellt werden. Auch ein solcher Stoff darf selbstverständlich die Aggregation nicht fördern beziehungsweise selber aggregieren, und zudem sollte er spezifisch die amyloidogenen Peptide binden können, um ihre weitere Aggregation zu unterbinden. Eine den vorgenannten

30

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

-4-

Kriterien gerecht werdende Substanz konnte bisher noch nicht erfolgreich in der medizinischen Diagnostik und Therapie eingesetzt werden. Es besteht daher weiterhin ein großer Bedarf an der Bereitstellung von Substanzen, die sowohl als Sonden für die Diagnose, insbesondere Früherkennung, von mit einer Amyloidbildung einhergehenden Krankheiten als auch für die Therapie einschließlich Prophylaxe derselben dienen können.

10 Der vorliegenden Erfindung liegt daher das technische Problem zugrunde, Substanzen bereitzustellen, die in der Lage sind, als Sonden für die Diagnose mit einer Amyloidbildung einhergehender Krankheiten, insbesondere der Alzheimerschen Krankheit, sowie der Therapie derselben dienen können.

Die vorliegende Erfindung löst das ihr zugrundeliegende technische Problem durch die Bereitstellung von Peptiden mit der biologischen Aktivität eines Modulators der Amyloidogenese, insbesondere eines Inhibitors der Amyloidogenese, wobei dieses Peptid β -AP beziehungsweise ein davon abgeleitetes Peptid ist und mindestens eine intramolekulare Brücke aufweist, insbesondere mindestens eine Brücke zwischen Seitenketten zumindest zweier im Peptid vorhandener Aminosäuren. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die mindestens eine Brücke durch eine kovalente Bindung zwischen Seitenketten mindestens zweier das Peptid bildenden Aminosäuren oder in das Peptid eingeführter Aminosäuren (als Substituenten oder zusätzlich in der Sequenz) gebildet. Dabei kann vorgesehen sein, dass die Brücke durch direkte Bin-

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

- 5 -

5 dung zwischen funktionellen Gruppen, zum Beispiel Amino- und Carboxygruppen, der Seitenketten erfolgt. Es kann aber auch vorgesehen sein, dass die Seitenketten der an der Brückenbildung beteiligten Aminosäuren des Peptides über einen Spacer oder Linker, das heißt ein Verbindungsmolekül, beispielsweise eine Aminocarboxy-, Diamino- oder Dicarboxyverbindung, miteinander kovalent verbunden sind.

10 Die Aggregation und krankheitsverursachende Amyloidbildung findet durch eine intermolekulare β -Faltblatt-Bildung zwischen den amyloidogenen Peptidsequenzen statt, wofür die Ausbildung intermolekularer Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten bestimmter Aminosäurereste notwendig ist. Diese β -Faltblatt-Struktur führt zu einer nicht-kovalenten Bindung zwischen zunächst zwei und anschließend mehreren amyloidogenen Peptidketten, also β -AP-Molekülen, welche daraufhin unlösliche Aggregate beziehungsweise Amyloid-Strukturen bilden.

25 Die erfindungsgemäß vorgesehene intramolekulare Brücke in β -AP mit der biologischen Aktivität eines Modulators der Amyloidogenese verhindert, ohne an die Theorie gebunden zu sein, den Übergang zwischen einer ungeordneten, α -helikalen Konformation oder einem nicht amyloidogenen Zustand in eine aggregierte bzw. aggregationsfähige β -Faltblattstruktur. Erfindungsgemäß wird durch das Einführen der intramolekularen Brücke eine Konformationsrestriktion, das heißt Stabilisierung eines bestimmten nicht amyloidogenen Konformationszustandes, zum Beispiel

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

-6-

β -Turn oder α -Helix, erzielt. Die erfindungsgemäßen cyclischen Peptide sind daher hinsichtlich ihrer Primärstruktur identisch oder sehr ähnlich zu den Wildtypmolekülen, als Wildtyp- β -AP, wobei jedoch starke Unterschiede in Bezug auf die Sekundärstruktur zwischen diesen Peptiden und den nativen Peptiden vorhanden sind. Die erfindungsgemäß erzielte Konformationsrestriktion von β -AP in einer nicht aggregationsfähigen Konformation stellt demgemäß nicht amyloidogene Moleküle zur Verfügung, die als Aggregationsinhibitoren oder Amyloidbildungsinhibitoren fungieren und demgemäß als lösliche Agonisten und Sonden von beziehungsweise für amyloide Peptide wirken können. Die erfindungsgemäßen cyclischen Peptide zeichnen sich nämlich dadurch aus, dass sie einerseits spezifisch an die native, das heißt Wildtypform, des ihrer Struktur zugrunde liegenden amyloiden Peptids nicht kovalent binden oder sich mit ihr assoziieren können und so in der Lage sind, diese zu detektieren. Die erfindungsgemäßen Peptide zeichnen sich darüber hinaus dadurch aus, dass sie selber nicht amyloidogen sind und gleichzeitig bei Bindung an die native Form des Peptids dessen Assoziation mit weiteren nativen Peptiden inhibieren. Insbesondere findet eine Bindung der erfindungsgemäßen cyclischen Peptide an noch nicht aggregierte lösliche Formen beziehungsweise an noch lösliche Mono- und Oligomere des nativen Peptides statt.

Die erfindungsgemäßen cyclischen Peptide wirken also als Agonisten, Sonden und Amyloidbildungsinhibitoren, die für die Diagnostik und Therapie von mit Amyloidbildung einhergehenden Krankheiten einge-

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

- 7 -

setzt werden können. Darüber hinaus können sie als molekulares Werkzeug zur Analyse und Untersuchung der Amyloidogenese sowie zur Erforschung, Entwicklung und Herstellung von auf die Alzheimersche Krankheit bezogenen Diagnostika und Therapeutika sowie zum Schutz vor der Alzheimerschen Krankheit auch als Impfstoffe eingesetzt werden. Durch die erfindungsgemäß erzielte Inhibition der Amyloidogenese der krankheitsverursachenden Peptide wird gleichzeitig die zytotoxische Wirkung der Amyloidaggregate auf Gewebszellen inhibiert und ein weiterer wichtiger Krankheitsauslöser ausgeschaltet. Die erfindungsgemäßen cyclischen Peptide lassen sich durch eine Chemosynthese in hoher Reinheit nach gängigen Methoden der Festphasenpeptidsynthese herstellen. Sie weisen eine hohe biologische, insbesondere proteolytische, Stabilität auf, welche beispielsweise durch den Einbau von unnatürlichen Aminosäuren und Ringstrukturen erreicht beziehungsweise weiter erhöht werden kann. Die erfindungsgemäßen cyclischen Peptide sind einfach handhabbar, was unter anderem auf ihrer hohen Löslichkeit beruht. Dies steht im Gegensatz zu der problematischen Handhabbarkeit der nativen Moleküle, also nativem β -AP. Die erfindungsgemäßen cyclischen Peptide weisen ferner, wenn überhaupt, nur geringe Nebenwirkungen und Antigenizität beim Einsatz als Therapeutikum auf, da die erfindungsgemäßen Amyloidbildungsinhibitoren eine sehr ähnliche Primärstruktur wie die im Körper vorkommenden nativen Peptide aufweisen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem Peptid ein mindestens zwei über eine

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

- 8 -

Amidbindung miteinander verknüpfte Aminosäuren aufweisendes Molekül verstanden, zum Beispiel ein Oligopeptid, ein Polypeptid oder ein Protein. Das Peptid kann ein natürlicherweise vorkommendes Peptid, eine chemisch modifizierte Variante davon oder ein denovo synthetisiertes Peptid sein. Das Peptid kann Modifizierungen aufweisen, wie beispielsweise Glycosylierungen oder andere Derivatisierungen wie Alkylierungen, Hydroxylierungen, Aminierungen oder ähnliches. Das Peptid kann gegenüber der natürlicherweise vorkommenden Form, also der nativen Form, abgewandelt sein, also beispielsweise ein strukturelles und/oder funktionelles Äquivalent darstellen wie ein Peptidanalogue oder ein Peptidomimetikum, wobei diese Abwandlungen in Aminosäureinsertionen, Aminosäureaustauschen, Aminosäureinversionen, Aminosäureadditionen oder/und Aminosäuredeletionen bestehen können. Das Peptid kann auch ungewöhnliche und/oder unnatürliche Aminosäuren enthalten. Ebenso können die Aminosäuren des Peptids in D- oder L-Konfiguration vorliegen.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter einem Peptid mit der biologischen Aktivität eines Modulators der Amyloidogenese ein Peptid verstanden, welches in der Lage ist, Amyloid- oder Amyloidähnliche Strukturen bildende Peptide hinsichtlich ihrer Aggregationsfähigkeit zu Amyloiden zu beeinflussen, insbesondere die Amyloidogenese zu fördern, zu initiieren oder zu inhibieren, zum Beispiel zu reduzieren oder zu blockieren. Eine Förderung der Aggregationsfähigkeit kann für Forschungsarbeiten oder für die gezielte, gewebespezifische Lokalisation von Amyloiden in Geweben, in denen sie

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

- 9 -

nicht schädlich sind, erwünscht sein. Ein Peptid mit der biologischen Aktivität eines Modulators der Amyloidogenese zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass dieses Peptid in der Lage ist, mit amyloidogenen Peptiden derart zu interagieren, dass deren Aggregationsfähigkeit, insbesondere hinsichtlich der Aggregationsrate, also der Aggregationsgeschwindigkeit, und der Größe bzw. Menge gebildete Aggregate, geändert, insbesondere inhibiert wird.

5 Diese Änderung der Aggregationsfähigkeit amyloidogener Peptide findet vorzugsweise durch Assoziation beziehungsweise Anheften, vorzugsweise durch nicht-kovalente Bindung, an die vorzugsweise lösliche Form des amyloidogenen Peptids oder eines löslichen Oligomers des amyloidogenen Peptides statt. In besonders bevorzugter Ausführungsform ist ein inhibitorischer Effekt der vorliegenden Erfindung ein Effekt, gemäss dem die lag-Phase der Aggregation wenigstens 1,5; 1,8; 2; 2,5; 3; 4; 5; 8; 10; 20; 40; 50; oder 100-fach gegenüber der mit nur natürlicherweise vorkommenden amyloidogenen Peptiden vorliegenden lag-Phase verlängert ist. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung liegt ein inhibitorischer Effekt dann vor, wenn der Aggregationsgrad gegenüber dem bei nur natürlicherweise vorkommenden amyloidogenen Peptiden beziehungsweise daraus gebildeten Aggregaten vorhandenen Aggregationsgrad um 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 oder 100 % vermindert ist.

10
15
20
25
30

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff β -AP ein Peptid mit der biologischen Aktivität eines Modulators der Amyloidogenese verstanden, wobei dieses eine intramolekulare Brücke

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

- 10 -

cke aufweist und gegenüber der Wildtypsequenz die gleiche Primärstruktur oder eine abweichende Primärstruktur, das heißt Aminosäuresequenz aufweisen kann. Zur Ermittlung der Modulation der Amyloidogenese, der Aggregationsrate, dem Aggregationsgrad (Gesamtmenge an Aggregation) und der Aggregationsgeschwindigkeit sowie -fähigkeit können üblicherweise bekannte Testverfahren, wie sie beispielsweise in der US 5,854,204 beschrieben sind, eingesetzt werden, die im Zusammenhang mit den dort beschriebenen Testverfahren in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Lehre mit einbezogen werden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter dem Begriff „an der Brückenbildung beteiligte Aminosäuren“ diejenigen Aminosäuren des Peptides verstanden, deren Seitenketten die funktionellen Gruppen aufweisen, die zu einer kovalenten, zu der intramolekularen Brücke führenden Bindung direkt oder indirekt miteinander verknüpft sind. Die an der Brückenbildung beteiligten Aminosäuren weisen also Seitenketten auf, die funktionelle Gruppen umfassen, die entweder jeweils direkt mit anderen funktionellen Gruppen einer anderen Seitenkette einer anderen Aminosäure des Peptides verknüpft sind oder deren funktionelle Gruppe mit mindestens einem Spacermolekül verknüpft sind, welches wiederum mit der funktionellen Gruppe einer Seitenkette einer anderen an der Brückenbildung beteiligten Aminosäure des Peptids verknüpft ist. Derartige funktionelle Gruppen können zum Beispiel Hydroxy-, Amino-, Carboxyl-, und/oder Thiolgruppen sein. Die an der Brückenbildung beteiligten Aminosäuren können natürlicherweise in der nativen Sequenz an die-

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

-11-

ser Position vorhandene Aminosäuren sein. Erfindungsgemäß ist es auch möglich, durch geeignete Substitutionen der nativ vorkommenden Aminosäuren durch an dieser Stelle natürlicherweise nicht vorkommende oder unnatürliche oder ungewöhnliche Aminosäuren substituierende Aminosäuren einzuführen, die für die Brückenbildung verwendet werden beziehungsweise daran beteiligt sind. Selbstverständlich ist es erfindungsgemäß auch möglich, dass die an der Brückenbildung beteiligten Aminosäuren zusätzlich in die Aminosäuresequenz des β -AP eingefügt wurden, ohne dass eine natürlicherweise vorkommende Aminosäure deletiert wird. Das Einführen natürlicherweise an dieser Position nicht vorkommender Aminosäuren kann den Vorteil aufweisen, dass gezielt an dieser Position spezifische funktionelle Gruppen eingeführt werden, die eine Brückenbildung ermöglichen oder erleichtern. Erfindungsgemäß ist es in bevorzugter Ausführungsform vorgesehen, als an der Brückenbildung beteiligte Aminosäuren Dab (Dab ist 2,4-Diaminobuttersäure), Dap (Dap ist 2,3-Diaminopropionsäure), Ser, Asp, Glu, Cys, Lys und/oder Orn in die Aminosäuresequenz einzuführen, beispielsweise als Substitution oder als Addition.

Die Erfindung sieht in einer vorteilhaften Ausgestaltung vor, dass die an der Brückenbildung beteiligten Aminosäuren des Peptides, vorzugsweise die zwei an der Brückenbildung beteiligten Aminosäuren des Peptides im Abstand von i+3, i+4, i+5, i+6 oder i+7 zueinander in dem Peptid angeordnet sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird vorgesehen, die Seitenketten der

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

- 12 -

an der Brückenbildung beteiligten Aminosäuren des Peptides über einen Spacer miteinander zu verknüpfen, wobei der Spacer ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus $X-(CH_2)_n-Y$ mit $n = 1$ bis 6 ; und

5 X/Y : $NH_2/COOH$ oder $COOH/NH_2$ oder NH_2/NH_2 oder $COOH/COOH$ oder OH/OH oder SH/SH ; oder X ist eins von NH_2 oder $COOH$ oder OH oder SH und Y ist eins von $COOH$ oder NH_2 oder SH oder OH . Selbstverständlich ist es möglich, auch andere Spacer einzusetzen. Erfindungsgemäß von Bedeutung ist, dass die

10 Natur von X und Y , also den endständigen funktionellen Gruppen des Spacers oder Linkers an die funktionellen Gruppen der zu verknüpfenden Seitenketten so angepasst ist, dass eine chemisch kovalente Bindung eingegangen werden kann, beispielsweise durch Verknüpfung einer Aminogruppe mit einer Carboxygruppe oder einer Carboxygruppe mit einer Hydroxylgruppe oder zweier Hydroxylgruppen oder zweier SH-Gruppen.

20 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform können die cyclischen Peptide der vorliegenden Erfindung weitere funktionelle Gruppen aufweisen, die nicht im Zusammenhang mit der Brückenbildung stehen, sondern beispielsweise der Immobilisierung an Trägern, der Wechselwirkung mit anderen Molekülen, der Detektion oder Ähnlichem dienen. Derartige Gruppen können funktionalisierte Alkylgruppen, aromatische Gruppen, Glykogruppen, Lipidgruppen, zyklische-, heterozyklische- oder polyzyklische Gruppen, biotinhaltige Gruppen, Avidin-haltige Gruppen, Streptavidin-haltige Gruppen oder Ähnliches sein. Selbstverständlich kann auch vorgesehen sein, das

30 Peptid der vorliegenden Erfindung mit anderen Pep-

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

- 13 -

tiden, Polypeptiden oder Proteinen oder Fragmenten davon zu fusionieren, zum Beispiel mit Wildtyp- β -AP, Derivaten oder Fragmenten davon.

Die erfindungsgemäßen Peptide können Markierungen aufweisen, zum Beispiel Enzyme, prosthetische Gruppen, fluoreszente Materialien, radioaktive Materialien oder lumineszente Materialien.

Als Enzym kann beispielsweise die Meerrettichperoxidase, die alkalische Phosphatase, die β -Galaktosidase oder die Acetylcholinesterase eingesetzt werden. Als prosthetische Gruppen können beispielsweise Streptavidin/Biotin, Avidin/Biotin und als fluoreszente Materialien Umbelliferon, Fluorescein, Fluorescein-Isothiocyanat, Rhodamin, Dichlorotriazinylaminfluorescein, Dansylchlorid oder Phycocerythrin eingesetzt werden. Als radioaktive Materialien können beispielsweise ^{14}C , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{35}S oder ^3H eingesetzt werden.

Die in der vorliegenden Lehre verwendeten Aminosäurennummerierungen und Positionen beziehen sich auf die Sequenz des nativen Wildtyp- β -AP, so wie es in Tabelle 1 von Hilbich et al. (J. Mol. Biol. 228 (1992), 460-473) beschrieben ist. Der Offenbarungsgehalt dieser Druckschrift wird hinsichtlich der Sequenz der Aminosäuren von β -AP sowie dessen Bereitstellung vollinhaltlich in den Offenbarungsgehalt der vorliegenden Lehre mit einbezogen und klargestellt, dass im erfindungsgemäßen Kontext dafür Schutz begehrt wird. Die Nummerierung gemäß der vorliegenden Lehre erfolgt immer vom N-Terminus zum C-Terminus.

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

-14-

In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung, gemäß der das ursprüngliche Peptid, also das Stammpetid, β -AP ist, befinden sich die erfindungsgemäß an der Brückenbildung beteiligten Aminosäuren im Bereich der Positionen 15 bis 24 des β -AP. Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung dieser auf das β -AP Stammpetid zurückzuführenden Ausführungsform weist das β -AP 1 bis 28 (β -AP 1-28 oder β -AP128), 1 bis 40 (β -AP 1-40 oder β -AP140), 1 bis 42 (β -AP 1-42 oder β -AP142) oder 1 bis 43 (β -AP 1-43 oder β -AP143) Aminosäuren auf. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die an der Brückenbildung beteiligten Aminosäuren des β -AP die natürlicherweise oder dort zum Beispiel als Substitution eingeführten Aminosäuren, zum Beispiel Lysin und Asparaginsäure, zum Beispiel an den Positionen 17 und 21.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft die Erfindung das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Lys¹⁷, Asp²¹] β -AP (1 bis 28) (abgekürzt als: c β -AP 128 oder c β -AP (1 bis 28)). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 2.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Lys¹⁷, Asp²¹] β -AP (1 bis 40) (abgekürzt als: c β -AP 140). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 3.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Lys¹⁷, Asp²¹] β -AP (1

WQ 02/055552

PCT/EP01/15181

-15-

bis 42) (abgekürzt als: c β -AP 142). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 4.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft die Erfindung das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Asp¹⁷, Lys²¹] β -AP (1 bis 28). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 5.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Asp¹⁷, Lys²¹] β -AP (1 bis 40). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 6.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Asp¹⁷, Lys²¹] β -AP (1 bis 42). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 7.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft die Erfindung das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Asp¹⁷, Orn²¹] β -AP (1 bis 28) (Orn: Ornithin). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 8.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Asp¹⁷, Orn²¹] β -AP (1 bis 40). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 9.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Asp¹⁷, Orn²¹] β -AP (1 bis 42). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 10.

WQ 02/055552

PCT/EP01/15181

-16-

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft die Erfindung das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Asp¹⁷, Dab²¹] β-AP (1 bis 28) (Dab: 2,4-Diaminobuttersäure). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 11.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Asp¹⁷, Dab²¹] β-AP (1 bis 40). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 12.

10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Asp¹⁷, Dab²¹] β-AP (1 bis 42). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 13.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft die Erfindung das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Orn¹⁷, Asp²¹] β-AP (1 bis 28). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 14.

20 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Orn¹⁷, Asp²¹] β-AP (1 bis 40). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 15.

25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Orn¹⁷, Asp²¹] β-AP (1 bis 42). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 16.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft die Erfindung das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Dab¹⁷, Asp²¹] β-AP (1 bis

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

-17-

28). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 17.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Dab¹⁷, Asp²¹] β-AP (1 bis 40). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 18.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das cyclische Peptid Cyclo^{17,21} [Dab¹⁷, Asp²¹] β-AP (1 bis 42). Die Aminosäuresequenz ist dargestellt in SEQ ID No. 19.

Die Erfindung betrifft auch Antikörper, insbesondere monoclonale oder polyclonale Antikörper, die spezifisch die cyclischen Peptide der Erfindung erkennen und an diese binden können. Die Antikörper können in üblicher Weise modifiziert, zum Beispiel markiert sein. Sie können auch in immobilisierter Form auf einem Träger oder an Kügelchen fixiert vorliegen.

Die Erfindung sieht auch Verfahren vor, gemäß derer die erfindungsgemäßen Peptide als Antigene zur Immunisierung von menschlichen oder tierischen Organismen verwendet werden und die gebildeten Antikörper gewonnen werden. Die Erfindung betrifft also auch Verfahren zur Gewinnung von mono- und polyclonalen Antikörpern, wobei die erfindungsgemäßen Peptide als Antigene verwendet werden, insbesondere menschlichen oder tierischen Organismen zugeführt und die sich nach der Immunisierung bildenden Antikörper gewonnen beziehungsweise Antikörper bildende Zellen, zum Beispiel Milzzellen, zur Herstellung

WQ 02/055552

PCT/EP01/15181

- 18 -

von monoclonale Antikörper bildenden Hybridomzellen erhalten werden. Die Erfindung betrifft also auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Peptide zur Gewinnung von monoclonalen oder polyclonalen Antikörpern mittels an sich bekannter Verfahren, wobei es sich hierbei auch um rekombinante Verfahren, also zum Beispiel der Herstellung von Antikörpern in *E. coli*, handeln kann. Die gewonnenen Antikörper, bei welchen es sich also auch um humanisierte oder humane Antikörper handeln kann, können für Forschungszwecke, zum Beispiel als Forschungswerkzeuge, für therapeutische oder diagnostische Zwecke eingesetzt werden, insbesondere bei der Diagnose und Therapie der Alzheimerschen Krankheit. Die erfindungsgemäßen polyclonalen oder monoclonalen Antikörper können beispielsweise zur Analyse des Krankheitsverlaufes von zum Beispiel mit erfindungsgemäßen Peptiden behandelten, Patienten oder zur Isolierung und Identifizierung von weiteren therapeutisch wirksamen Peptiden dienen. Die erfindungsgemäßen Peptide erweisen sich im Rahmen ihres Einsatzes als Immunogen für die Herstellung von Antikörpern für diagnostische und therapeutische Zwecke aufgrund ihrer erheblich verbesserten Handhabbarkeit gegenüber den nativ-vorkommenden schwerlöslichen Analoga als besonders vorteilhaft. Die so hergestellten Antikörper können in einer Ausführungsform spezifisch die erfindungsgemäßen Peptide und in einer anderen Ausführungsform auch das nativ vorhandene Wildtyp β -AP, gegebenenfalls in aggregierter Form erkennen, so dass die erfindungsgemäßen Antikörper zum Beispiel zur Diagnose der Alzheimerschen Krankheit eingesetzt werden können. Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Immunisierung

WO 02/055552

PCT/EP01/45181

- 19 -

von menschlichen oder tierischen Organismen, wobei die erfindungsgemäßen Peptide menschlichen oder tierischen Organismen appliziert und eine Immunisierung gegen β -AP beziehungsweise dessen Derivate erreicht wird.

Die erfindungsgemäßen Peptide können in üblicher Weise chemisch synthetisiert und/oder modifiziert werden. Sie können auch durch rekombinante DNA-Technik hergestellt oder aus natürlichen Quellen isoliert und modifiziert werden.

Die Erfindung betrifft auch pharmazeutische Zusammensetzungen, enthaltend ein vorgenanntes cyclisches Peptid in pharmazeutisch wirksamer Menge und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung enthält die pharmazeutische Zusammensetzung mindestens ein cyclisches Peptid der vorliegenden Erfindung in einer prophylaktisch oder therapeutisch wirksamen Menge, die ausreicht, die Aggregation, insbesondere die Aggregationsrate und/oder die Menge gebildete Aggregate, nativer amyloider Peptide zu ändern, insbesondere zu inhibieren. In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist die pharmazeutische Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung mindestens ein cyclisches Peptid der vorliegenden Erfindung in einer prophylaktisch oder therapeutisch wirksamen Menge auf, die ausreicht, die neurotoxische Wirkung natürlicherweise vorkommender amyloider Peptide bzw. deren Aggregate zu ändern, insbesondere zu inhibieren. Die pharmazeutisch wirksame Menge hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie dem Krankheitszustand, der Größe des

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

-20-

Patienten, dem Gewicht des Patienten, der Menge an endogen vorhandenem amyloiden Peptid usw.

Pharmazeutisch verträgliche Träger sind zum Beispiel Lösungsmittel, Dispersionsmittel, Beschichtungen, Füllstoffe, antibakterielle und antifungale Agenzien, isotonische Agenzien usw. Gegebenenfalls können weitere Additive wie Farb- oder Geschmacksstoffe, Emulgatoren, Bindemittel, Trennmittel etc. hinzugefügt werden.

10 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann vorgesehen sein, die pharmazeutische Zusammensetzung intravenös, oral, intraperitoneal, intraspinal, intrazerebral oder intramuskulär zu verabreichen. Es kann vorgesehen sein, die Zusammensetzung in Form einer sterilen wässrigen Lösung oder Dispersion oder eines Pulvers zu verabreichen.

Gegebenenfalls kann auch vorgesehen sein, weitere medizinisch wirksame Substanzen zusammen mit dem cyclischen Peptid der vorliegenden Erfindung in der pharmazeutischen Zusammensetzung zu verwenden. Es kann vorgesehen sein, weitere Substanzen in der pharmazeutischen Zusammensetzung einzusetzen, die zum Beispiel dem Transport im Zielorganismus, beispielsweise durch die Blut-Hirn-Schranke, dienen.

25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft diese diagnostische Zusammensetzungen, enthaltend mindestens ein cyclisches Peptid der vorliegenden Erfindung, welches vorzugsweise mit einem Detektionsmarker versehen ist. Ein derartiger Detektionsmarker kann eine ra-

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

-21-

dioaktive Markierung wie zum Beispiel radioaktives Jod oder Technetium sein. Der Detektionsmarker kann jedoch auch ein Fluoreszenzmarker, Lumineszenz- oder Enzymmarker, oder ein Spin-Label sein.

- 5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis, insbesondere Screenen, Absuchen oder Detektieren, amyloidogener Peptide, insbesondere β -AP oder Derivaten davon, von Oligomeren aus amyloidogenen Peptiden oder Aggregaten aus amyloidogenen Peptiden
- 10 sowie von Antikörpern gegen die sogenannten Materialien in einer biologischen Probe oder einem tierischen oder menschlichen Organismus, wobei mindestens ein, vorzugsweise mit einem Detektionsmarker versehenes, cyclisches Peptid der vorliegenden Erfindung oder ein mit einem Detektionsmarker versehener Antikörper der vorliegenden Erfindung als Sonde mit einer zu untersuchenden Probe, vorzugsweise in einer Flüssigkeit, in Kontakt gebracht und eine Assoziation des Peptides mit amyloidogenen Peptiden, Oligomeren davon, Aggregaten davon oder Antikörpern dagegen qualitativ oder/und quantitativ nachgewiesen wird. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann dieses
- 20 Verfahren in vitro und in einer anderen Ausführungsform in vivo durchgeführt werden. Der Begriff in-Kontakt-bringen erfasst daher die Inkubation des cyclischen Peptides mit einer Probe in vitro oder das Einbringen des cyclischen Peptides zu einem Ort in vivo, wo zum Beispiel natürliches amyloides Peptid oder deren Aggregate vorhanden ist. Selbstverständlich ist es auch vorgesehen, dieses Verfahren in Gegenwart mindestens einer weiteren Testsub-
- 25
- 30

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

-22-

stanz, zum Beispiel von nativem β -AP, anderer Peptidvarianten, potentiellen Pharmazeutika, potentiellen Diagnostika oder Markersubstanzen in Form zum Beispiel kompetitiver Testverfahren durchzuführen, wobei die Wirkung dieser weiteren Testsubstanz auf das Aggregationsverhalten von natürlichen β -AP oder/und erfindungsgemäßen Peptiden nachgewiesen wird.

10 Erfindungsgemäß kann vorgesehen sein, die cyclischen Peptide in immobilisierter Form zu verwenden. So kann in bevorzugter Weise vorgesehen sein, das cyclische Peptid mit weiteren funktionellen Gruppen zu versehen, die eine Immobilisierung an festen Trägern ermöglichen. Die Immobilisierung kann be-
15 spielsweise bei der Anwendung der erfindungsgemäßen Peptide in Antikörper-basierten Test-, Screening- und Analyseverfahren zum Beispiel zur Identifizierung von β -AP oder β -AP-Derivat-spezifischen Antikörpern vorgenommen werden. Die Immobilisierung
20 kann auch für präparative Verfahren in der Forschung und Therapie eingesetzt werden, wie für Affinitätsmatrices zur Bindung, Isolierung und Abreicherung von Amyloiden aus verschiedenen Flüssigkeiten.

25 Die Erfindung betrifft auch die Verwendung mindestens eines cyclischen Peptids der vorliegenden Erfindung zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung von durch Amyloidbildung gekennzeichneten Krankheiten, das heißt Amyloidosen, insbesondere primäre, sekundäre, vererbliche oder/und
30 isolierte Amyloidosen wie die Alzheimersche Krankheit,

WQ 02/055552

PCT/EP01/15181

-23-

insbesondere sporadische oder familiengebundene Alzheimer'sche Krankheit.

Die Erfindung betrifft also auch Verfahren zur Diagnose und/oder Therapie, zum Beispiel Prophylaxe von Amyloidosen, gemäß der mindestens ein cyclisches Peptid der vorliegenden Erfindung einem menschlichen oder tierischen Körper oder einem isolierten Bestandteil davon in einer pharmazeutisch oder diagnostisch wirksamen Menge appliziert und im Falle des diagnostischen Einsatzes eine Bindung an amyloide Strukturen nachgewiesen wird.

Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Veränderung der Aggregation amyloidogener Peptide, Oligomeren oder Aggregaten davon oder zur Inhibierung der Zytotoxizität von amyloidogenen Peptiden, Oligomeren oder Aggregaten davon, wobei Peptide der vorliegenden Erfindung in vivo oder in vitro mit den amyloidogenen Peptiden, Oligomeren oder Aggregaten davon in Kontakt gebracht werden und das Aggregationsverhalten der amyloidogenen Peptide, Oligomere oder Aggregate davon geändert wird, insbesondere die Aggregation reduziert oder inhibiert wird. Eine Amyloidose im Sinne der vorliegenden Erfindung ist insbesondere die Alzheimer'sche Krankheit.

Insbesondere betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Modifizierung, vorzugsweise Verhinderung, der Aggregatbildung von in einer Flüssigkeit enthaltenem amyloidem β -AP, wobei ein Peptid der vorliegenden Erfindung mit der Flüssigkeit in Kontakt gebracht und inkubiert wird. Dieses Verfahren kann

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

-24-

auch zur Abreicherung beziehungsweise Entfernung von Amyloid aus Flüssigkeit, zum Beispiel Körperflüssigkeiten, dienen.

5 Die vorliegende Erfindung betrifft auch Kits, umfassend die erfindungsgemäßen cyclischen Peptide und/oder dagegen gerichtete monoclonale oder polyclonale Antikörper, wobei diese Agenzien gegebenenfalls markiert sein können.

10 Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Die Erfindung wird anhand der Beispiele, des Sequenzprotokolls und der dazugehörigen Figuren näher erläutert.

15 Die Figuren 1 und 2 zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen des Fibrillierungsverhaltens von c β -AP128 (1A), β -AP(1-28) (1B), [Lys¹⁷, Asp²¹] β -AP (1-28) (lineares Kontrollpeptid) (1C) sowie β -AP(1-28) (2A) und einer 1:1-Mischung von β -AP(1-28) und c β -AP128 (2B).

20 Figur 3 zeigt schematisch die Struktur eines erfindungsgemäßen eine intramolekulare Brücke aufweisenden Peptids sowie der linearen Kontrollpeptide.

Das zu der vorliegenden Lehre gehörige Sequenzprotokoll zeigt:

25 SEQ ID Nr. 1 die Wildtyp-Aminosäuresequenz von β -AP (1-43),

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

-25-

SEQ ID Nr. 2-19 die erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen, wobei eine intramolekulare Brückenbildung jeweils zwischen den Seitenketten der Aminosäuren 17 und 21 vorliegt.

5

Beispiel 1

Herstellung, Reinigung und Charakterisierung von c β -AP128 und Control- β -AP(1-26)

Die Peptide wurden nach gängigen Methoden der Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung der Boc/Bzl-Synthesestrategie an PAM-Harz hergestellt (Barany, G., Kneib-Cordonier, N. & Mullen, D. G. (1987) J. Pept. Res. 30, 705-739), mittels HF/Anisol (10:1) vom Harz abgespalten und durch präparative HPLC über eine C18-Säule gereinigt (Kapurniotu & Taylor, (1995) J. Med. Chem. 38, 836-847). Für die Synthese von c β -AP128 wurden die Seitenketten von Lys¹⁷ und Asp²¹ mittels der Fmoc- beziehungsweise Fluorenylmethylester (OFm)-Schutzgruppen geschützt, welche dann selektiv mittels 20% Piperidin/DMF vor Bildung der Laktambrücke abgespalten wurden (Kapurniotu & Taylor, J. Med. Chem. 38, 836-847 (1995)). Die Seitenketten-zu-Seitenketten-Zyklisierung wurde mit Benzotriazol-1-yloxy-tris-(dimethylamino) phosphonium-hexafluorophosphat (BOP) durchgeführt und mit dem Kaisertest auf Vollständigkeit überprüft (Kapurniotu & Taylor (1995) J. Med. Chem. 38, 836-847)). Um eine vollständige Zyklisierungsreaktion zu erhalten, wurde die Zyklisierungsreaktion in Mischungen aus DMF, NMP und DMSO 4-mal (die Dauer ei-

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

-26-

ner Zyklisierung betrug um die 20 h) durchgeführt. Die Massen der mittels HPLC gereinigten Produkte wurden durch MALDI-MS bestimmt und ihre Reinheit durch analytische HPLC verifiziert.

5 Beispiel 2

c β AP128: Aggregation, Testung der Fibrillenbildung, Testung der inhibitorischen Wirkung auf die Aggregation von β -AP(1-28).

10 Physikochemische Eigenschaften von c β -AP128 und Testung der Fibrillenbildung

Die physikochemischen Eigenschaften von c β -AP wurden durch FT-IR (Fourier transformierte Infrarot-Spektroskopie) und CD (Circulardichroismus-Spektropolarimetrie) untersucht. EM (Elektronenmikroskopie) und AFM (Rasterkraftmikroskopie) wurden verwendet, um die Fibrilleneigenschaften von c β -AP128 zu testen. Für die EM-Studien wurden zunächst 450 μ M Lösungen von c β -AP128 oder β -AP(1-28) oder [Lys¹⁷, Asp²¹] β -AP(1-28) in 10 mM-Phosphatpuffer, 150 mM NaCl und 30% Acetonitril, pH 5,5, mehrere Tage lang inkubiert und auf Fibrillenbildung untersucht. Diese Studien zeigten, dass hochkonzentrierte Lösungen von c β -AP128 mehrere Tage lang (mehr als 30) keine Fibrillen bilden (Abb. 1A); dies ist im Gegensatz zu den Kontrollpeptiden β -AP(1-28) (nativ vorkommende Sequenz) und [Lys¹⁷, Asp²¹] β -AP(1-28) (lineares Kontrollpeptid), welche nach drei Tagen Inkubation vollständig fibrilliert sind (Abb. 1B, 1C).

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

- 27 -

FT-IR der obigen Lösungen/Suspensionen zeigte, dass die eingeführte Verbrückung in c β -AP128 die β -Faltblatt Konformation, welche natives β AP und das Kontrollpeptid [Lys¹⁷, Asp²¹] β -AP(1-28) nach Alterung einnehmen, unterbindet und somit die Aggregation und Fibrillenbildung inhibiert.

Die Figur 3 zeigt in A) die native Aminosäuresequenz des β -AP-Fragmentes β -AP(1-28). Die Positionen 17 bis 20 sind hervorgehoben, um ihre wichtige Rolle bei der Assoziation und Fibrillenbildung darzustellen. Im oberen Teil von Figur 3B wird schematisch die Struktur des erfindungsgemäßen β -AP(1-28)-Derivats Cyclo^{17,21} [Lys¹⁷, Asp²¹] β -AP(1-28) abgekürzt als Cyclo- β -AP(1-28) oder bezeichnet als c β -AP128 mit der intramolekularen Brücke zwischen den Seitenketten von Lys¹⁷ und Asp²¹, insbesondere der ϵ -Aminogruppe von Lys und der β -Carboxylgruppe von Asp dargestellt. Es handelt sich bei diesem Beispiel also um eine intramolekulare Brücke, wobei ohne Zwischenschaltung eines Linkers oder Spacers die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen 17 und 21 durch eine Lactambindung kovalent verknüpft werden. Im unteren Teil von Figur 3B wird das Kontrollpeptid Kontroll- β -AP(1-28), also [Lys¹⁷, Asp²¹] β -AP(1-28), dargestellt. Die Figur verdeutlicht, dass durch den Austausch des Leucin an Position 17 durch Lysin und von Alanin an Position 21 durch Asparaginsäure Analoga erhalten werden, die sich vom nativen β -AP(1-28)-Peptid unterscheiden und die durch kovalente Bindung der Seitenketten dieser Substituenten, also durch die eingeführten Lactambrücken zwischen der ϵ -Aminogruppe

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

- 28 -

und der β -Carboxygruppe zur erfindungsgemäßen Struktur führen.

Beispiel 3

5 Inhibition der Aggregation und Fibrillenbildung von β -AP(1-28) oder [Lys¹⁷, Asp²¹] β -AP(1-28) durch c β -AP128

Der Einfluss von c β -AP128 auf die Aggregations- und Fibrillenbildung von β -AP(1-28) wurde durch CD und
10 EM getestet. Eine Lösung von 450 μ M β -AP(1-28) und c β -AP128 in 10 mM Phosphatpuffer, 150 mM NaCl und 30 % Acetonitril, pH 5,5, wurde mehrere Tage lang inkubiert und durch EM auf Fibrillierung getestet (Abb. 2A und 2B). CD zeigte keine Veränderungen der
15 CD-Spektren für mehr als 1 Monat in diesen Mischungen, obwohl β -AP allein oder [Lys¹⁷, Asp²¹] β -AP(1-28) allein in weniger als 10 Stunden β -Faltblätter gebildet haben und anschließend als unlösliches Amyloid auspräzipitierten.

20

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

-29-

5 Ansprüche

1. Peptid mit der biologischen Aktivität eines Modulators der Amyloidogenese, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Peptid β -AP (β -Amyloid Peptid) ist und mindestens eine intramolekulare Brücke aufweist.
10
2. Peptid nach Anspruch 1, wobei der Modulator ein Inhibitor ist.
3. Peptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Brücke durch kovalente Bindung zwischen
15 Seitenketten der das Peptid bildenden Aminosäuren gebildet wird.
4. Peptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die an der Brückenbildung beteiligten Aminosäuren des Peptids im Abstand von i+3, i+4, i+5,
20 i+6 oder i+7 zueinander angeordnet sind.
5. Peptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Seitenketten der an der Brückenbildung beteiligten Aminosäuren des Peptids direkt oder über einen Spacer kovalent miteinander verbunden
25 sind.
6. Peptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Spacer eine Aminocarboxy-, eine Diamino- oder Dicarboxyverbindung ist.

WO 02/055582

PCT/EP01/15181

- 30 -

7. Peptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die an der Brückenbildung beteiligten Aminosäuren die an dieser Position des Peptids natürlicherweise vorkommenden Aminosäuren sind.
- 5 8. Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei mindestens eine der an der Brückenbildung beteiligten Aminosäuren in dem Peptid an dieser Position natürlicherweise nicht vorkommt.
9. Peptid nach Anspruch 8, wobei die mindestens eine an der Brückenbildung beteiligte Aminosäure ein Substituent der natürlicherweise dort vorkommenden Aminosäure oder eine zusätzlich hinzugefügte Aminosäure ist.
- 10 10. Peptid nach Anspruch 8 oder 9, wobei die an der Brückenbildung beteiligten Aminosäuren im Bereich der Positionen 15 bis 24 des Wildtyp- β -AP angeordnet sind.
11. Peptid nach Anspruch 10, wobei β -AP aus den Aminosäuren 1 bis 28, 1 bis 40 oder 1 bis 42 oder 1 bis 43 besteht.
- 20 12. Peptid nach einem der Ansprüche 10 oder 11, wobei die an der Brückenbildung beteiligten Aminosäuren die Aminosäuren an den Positionen 17 und 21 sind.
- 25 13. Peptid nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei das Peptid mit der biologischen Aktivität eines Modulators ein Peptid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus den Peptiden mit den Aminosäuresequenzen dargestellt in SEQ ID Nr. 2 bis 19.

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

-31-

14. Peptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Peptid mit mindestens einer funktionellen Gruppe derivatisiert ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Alkylgruppe, funktionalisierten Alkylgruppe, aromatische Gruppe, Oligopeptide, Polypeptide, Glycogruppe und Lipidgruppe.
15. Peptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Peptid auf einem Träger immobilisiert ist.
- 10 16. Antikörper, der spezifisch ein Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 15 erkennt.
17. Antikörper nach Anspruch 16, der ein monoclonaler oder polyclonaler Antikörper ist.
- 15 18. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend ein Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 15 und einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
- 20 19. Diagnostische Zusammensetzung, enthaltend ein mit einem Detektionsmarker versehenes Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 15 oder einen Antikörper nach Anspruch 16 oder 17.
20. Diagnostische Zusammensetzung nach Anspruch 19, wobei der Detektionsmarker ein radioaktiver Marker, ein Fluoreszenzmarker, ein Enzymmarker, ein Lumineszenzmarker oder ein Spin-Label ist.
- 25 21. Verfahren zum qualitativen und/oder quantitativen Nachweis von amyloidogenem β -AP oder dessen Aggregaten, wobei ein mit einem Detektionsmarker versehenes Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 15

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

-32-

oder ein mit einem Detektionsmarker versehender Antikörper nach einem der Ansprüche 16 oder 17 als Sonde mit einer zu untersuchenden Probe in Kontakt gebracht und eine Bindung des Peptids mit gegebenenfalls vorhandenen amyloidogenen β -AP-Peptiden oder dessen Aggregaten nachgewiesen wird.

22. Verfahren zur Modifizierung, insbesondere Verhinderung der Aggregatbildung von in einer Flüssigkeit enthaltendem amyloidogenem β -AP, wobei ein Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 15 mit der Flüssigkeit in Kontakt gebracht und inkubiert wird.

23. Verwendung eines Peptides nach einem der Ansprüche 1 bis 15 oder/und eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 16 oder 17 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Prophylaxe und/oder Behandlung von durch Amyloidbildung gekennzeichneten Krankheiten, insbesondere der Alzheimerschen Krankheit.

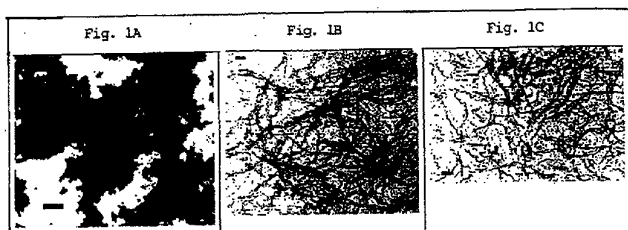
24. Verwendung eines Peptides nach einem der Ansprüche 1 bis 15 als ein verbessert handhabbares Immunogen für die Herstellung von Antikörpern für diagnostische, therapeutische und Forschungszwecke.

25. Verfahren nach Anspruch 22 zur präparativen Anreicherung von Amyloid aus Flüssigkeiten, insbesondere Körperflüssigkeiten.

WO 02/05552

PCT/EP01/15181

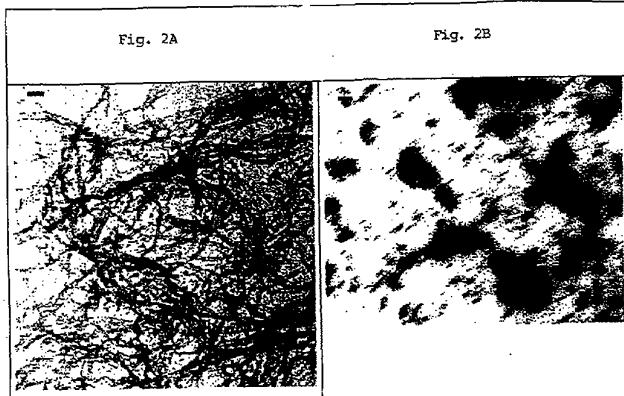
1/3



WO 02/055552

PCT/EP01/15181

2/3



WO 02/055552

3/3

PCT/EP01/15181

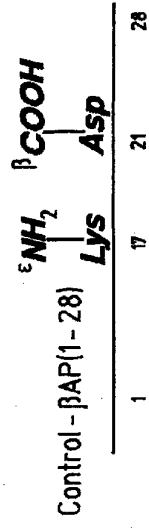
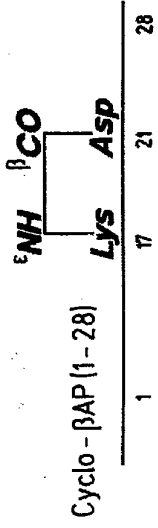
Fig.3

β AP(1-28) NH₂ - Asp - Ala - Glu - Phe - Arg - His - Asp - Ser - Gly - Tyr - Glu -

Val - His - His - Gln - Lys - Leu - Val - Phe - Phe - Ala - Glu -

Asp - Val - Gly - Ser - Asn - Lys - COOH

A)



WO 02/055552

1/8

PCT/EP01/15181

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Fraunhofer Ges. zur Förd. der angewandten...

<120> Lösliche cyclische Analoga....

<130> 16069

<140>

<141>

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 43

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala Thr
 35 40

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (17)..(21)

<223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
 17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke
 miteinander verbunden.

<400> 2

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

Lys Val Phe Phe Asp Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 20 25

<210> 3

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (17)..(21)

<223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
 17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke
 miteinander verbunden.

WO 02/055552 2/8 PCT/EP01/15181

<400> 3
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Lys Val Phe Phe Asp Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40

<210> 4
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)..(21)
 <223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
 17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke
 miteinander verbunden.

<400> 4
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Lys Val Phe Phe Asp Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Ile Ala
 35 40

<210> 5
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)..(21)
 <223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
 17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke
 miteinander verbunden.

<400> 5
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Asp Val Phe Phe Lys Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 20 25

<210> 6
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)..(21)
 <223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
 17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke
 miteinander verbunden.

WO 02/055552

PCT/EP01/15181

3/8

<400> 6
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Asp Val Phe Phe Lys Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40

<210> 7
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)..(21)
 <223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
 17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke
 miteinander verbunden.

<400> 7
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Asp Val Phe Phe Lys Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

<210> 8
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)..(21)
 <223> Xaa=Orn
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)..(21)
 <223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
 17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke
 miteinander verbunden.

<400> 8
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Asp Val Phe Phe Xaa Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 20 25

<210> 9
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

WO 02/05552

4/8

PCT/EP01/15181

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (21)
 <223> Xaa-Orn

 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)..(21)
 <223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
 17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke
 miteinander verbunden..

 <400> 9
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Asp Val Phe Phe Xaa Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40

<210> 10
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (21)
 <223> Xaa-Orn

 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)..(21)
 <223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
 17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke
 miteinander verbunden.

 <400> 10
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Asp Val Phe Phe Xaa Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

<210> 11
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (21)
 <223> Xaa-Dab

 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)..(21)
 <223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
 17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke

WO 02/055552

5/8

PCT/EP01/15181

miteinander verbunden.

<400> 11
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Asp Val Phe Phe Xaa Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 20 25

<210> 12
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (21)
 <223> Xaa=Dab

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)..(21)
 <223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
 17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke
 miteinander verbunden.

<400> 12
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Asp Val Phe Phe Xaa Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40

<210> 13
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (21)
 <223> Xaa=Dab

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)..(21)
 <223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
 17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke
 miteinander verbunden.

<400> 13
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Asp Val Phe Phe Xaa Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

WO 01/055552

6/8

PCT/EP01/15181

<210> 14
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)
 <223> Xaa=Orn

 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)..(21)
 <223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
 17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke
 miteinander verbunden.

 <400> 14
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Xaa Val Phe Phe Asp Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 20 25

<210> 15
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)
 <223> Xaa=Orn

 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)..(21)
 <223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
 17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke
 miteinander verbunden.

 <400> 15
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Xaa Val Phe Phe Asp Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40

<210> 16
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)
 <223> Xaa=Orn

 <220>
 <221> PEPTIDE

WO 02/055552

7/8

PCT/EP01/15181

<222> (17)..(21)
 <223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
 17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke
 miteinander verbunden.

<400> 16
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Xaa Val Phe Phe Asp Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

<210> 17
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)
 <223> Xaa=Dab

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)..(21)
 <223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
 17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke
 miteinander verbunden.

<400> 17
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Xaa Val Phe Phe Asp Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
 20 25

<210> 18
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)
 <223> Xaa=Dab

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (17)..(21)
 <223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
 17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke
 miteinander verbunden.

<400> 18
 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15
 Xaa Val Phe Phe Asp Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30
 Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
 35 40

WO 02/055552

8/8

PCT/EP01/15181

<210> 19
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (17) .. (21)
<223> Xaa=Dab

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (17) .. (21)
<223> Die Seitenketten der Aminosäuren an den Positionen
17 und 21 sind über eine intramolekulare Brücke
miteinander verbunden.

<400> 19
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

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

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

【 国際公開パンフレット (コレクション) 】

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Juli 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/055552 A3

(51) Internationale Patentklassifikation: C07K 14/47, A61K 38/17, C07K 14/16 (74) Anwälte: SCHRELL, Andreas usw.: Maybachstrasse 6A, 70469 Stuttgart (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/15181

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GI, GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. Dezember 2001 (21.12.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 01 430.9 13. Januar 2001 (13.01.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): FRAUNHOFER-GESSELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstraße 54, 80656 München (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
mit internationalem Recherchenbericht(72) Erfinder: und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KAPURNIOTU, Afroditi [GR/DE]; Friedrich-Schaal-Strasse 6, 72074 Tübingen (DE). BERNHAGEN, Jürgen [DE/DE]; Friedrich-Schaal-Strasse 6, 72074 Tübingen (DE). BRUNNER, Herwig [AT/DE]; An der Betteleiche 6, 70569 Stuttgart (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 24. April 2003

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



WO 02/055552 A3

(54) Title: SOLUBLE CYCLIC ANALOGUES OF BETA AMYLOID PEPTIDE

(54) Bezeichnung: LÖSLICHE CYCLISCHE ANALOGA DES BETA AMYLOIDEN PEPTIDES

(57) Abstract: The invention relates to a peptide that has the biological activity of an amyloid production inhibitor, and to the diagnostic and medical uses thereof.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Peptid mit der biologischen Aktivität eines Inhibitors der Amyloidbildung sowie dessen diagnostische und medizinische Verwendungswecke.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In-ternational Application No. PCT/JP 01/15181
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 A61K38/17 C07K14/16		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FINDEIS, MARK A. ET AL: "Modified - Peptide Inhibitors of Amyloid beta.-Peptide Polymerization" BIOCHEMISTRY (1999), 38(21), 6791-6800 , XP002143947 page 6792, last paragraph -page 6796, right-hand column, paragraph 2; table 1	1-25
A	HARKANY, TIBOR ET AL: "Neuroprotective approaches in experimental models of beta-amyloid neurotoxicity: relevance to Alzheimer's disease" PROGRESS IN NEURO-PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY (1999), 23(6), 963-1008 , XP002210191 page 990, paragraph 3 -page 991, paragraph 3	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
30 August 2002	18/09/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-2016	Authorized officer Griesinger, I	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/15181

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 01 34631 A (AXONYX INC) 17 May 2001 (2001-05-17) page 15, line 18 -page 16, line 9; claims 1-7,17	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP01/15181

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see supplemental sheet
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims, it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP01/15181

Continuation of Box I.1

Although Claim 21 relates to a diagnostic method practiced on the human or animal body and although Claim 22 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/15181

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0134631 A	17-05-2001	AU 1463501 A	06-06-2001
		WO 0134631 A2	17-05-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Int. Aktenzeichen PCT/EP 01/15181
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C07K14/47 A61K38/17 C07K14/16		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfgebiet (Klassifikationssystem und Klassifikations Symbole) IPK 7 C07K A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfgebiet gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen:		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) CHEM ABS Data, EPO-internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	FINDEIS, MARK A. ET AL: "Modified - Peptide Inhibitors of Amyloid.beta.-Peptide Polymerization" BIOCHEMISTRY (1999), 38(21), 6791-6800, XP002143947 Seite 6792, letzter Absatz -Seite 6796, rechte Spalte, Absatz 2; Tabelle 1 ---	1-25
A	HARKANY, TIBOR ET AL: "Neuroprotective approaches in experimental models of beta-amyloid neurotoxicity: relevance to Alzheimer's disease" PROGRESS IN NEURO-PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY (1999), 23(6), 963-1008, XP002210191 Seite 990, Absatz 3 -Seite 991, Absatz 3 --- -/--	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *B* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung bestritten werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angeht *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden ** Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *3* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absenddatum des Internationalen Recherchenberichts	
30. August 2002	18/09/2002	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 6518 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010	Bevollmächtigter Bediensteter Griesinger, I	

Formblatt PCT/ISA210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
Publ./EP 01/15181

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Blatt- Anspruch Nr.
P, X	WO 01 34631 A (AXONYX INC) 17. Mai 2001 (2001-05-17) Seite 15, Zeile 18 -Seite 16, Zeile 9; Ansprüche 1-7,17 -----	1-25

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01/15181	
Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)	
Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:	
1.	<input checked="" type="checkbox"/> Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2.	<input type="checkbox"/> Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.	<input type="checkbox"/> Ansprüche Nr. weil es dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 5.4 a) abgefaßt sind.
Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)	
Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:	
1.	<input type="checkbox"/> Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.	<input type="checkbox"/> Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.	<input type="checkbox"/> Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.:
4.	<input type="checkbox"/> Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs	
	<input type="checkbox"/> Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
	<input type="checkbox"/> Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01 /5181

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl der Anspruch 21 sich auf Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, bezieht und obwohl der Anspruch 22 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT				In dieses Aktenzeichen F U I L P 01/15181	
Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0134631	A	17-05-2001	AU	1463501 A	06-06-2001
			WO	0134631 A2	17-05-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
// C 1 2 P 21/08	A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N 33/15	C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15	Z
	G 0 1 N 33/50	Z

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH, GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,P T,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 バーンハーゲン, ユールゲン

ドイツ連邦共和国 アーヘン 5 2 0 6 6 , ローンハイデル ヴェーク 6 0

(72)発明者 ブルネール, ヘルヴィッヒ

ドイツ連邦共和国 シュトゥットガルト 7 0 5 6 9 , アン デル ベーテライヒ 6

Fターム(参考) 2G045 AA34 DA36 FB03

4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13

4C084 AA02 AA03 BA01 BA19 BA25 MA17 MA21 MA43 MA52 MA66

MA70 NA14 ZA162

4C085 AA13 AA14 AA19 BB11 CC22 CC23 GG02 GG03 GG06 GG08

GG10

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA31 BA41 BA42 BA50 BA51

BA53 BA60 BA70 BA71 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50 EA61

EA65 FA33 FA41 FA58 FA71 FA72 GA25

专利名称(译)	β-淀粉样肽的可溶性环状类似物		
公开(公告)号	JP2004526693A	公开(公告)日	2004-09-02
申请号	JP2002556620	申请日	2001-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	弗劳恩霍夫应用研究促进协会		
申请(专利权)人(译)	弗劳恩霍夫Geseru轴工具无法删除链接泽德Angevanten Forushunku呃粮农组织.		
[标]发明人	カプルニオツアフロディーティ バーンハーゲンユールゲン ブルネールヘルヴィッヒ		
发明人	カプルニオツ,アフロディーティ バーンハーゲン,ユールゲン ブルネール,ヘルヴィッヒ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/395 A61P25/28 C07K14/47 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/15 G01N33/50		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/28 C07K14/4711		
FI分类号	C07K14/47 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P25/28 C07K16/18 G01N33/53.D A61K37/02 C12P21 /08 G01N33/15.Z G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/DA36 2G045/FB03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064 /CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA01 4C084/BA19 4C084/BA25 4C084/MA17 4C084/MA21 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA66 4C084/MA70 4C084/NA14 4C084 /ZA162 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/BB11 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045 /AA30 4H045/BA10 4H045/BA31 4H045/BA41 4H045/BA42 4H045/BA50 4H045/BA51 4H045/BA53 4H045/BA60 4H045/BA70 4H045/BA71 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045 /EA50 4H045/EA61 4H045/EA65 4H045/FA33 4H045/FA41 4H045/FA58 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/GA25		
优先权	10101430 2001-01-13 DE		
其他公开文献	JP4079775B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及具有淀粉样蛋白形成抑制剂的生物活性的肽及其诊断和医学用途。

特許公開番号 JP2004-52669 (43) 公表日 平成16年9月2日(2004.9.2)		
(6) Int. Cl. ⁷	FI	テーマコード(参考)
C07K 14/47	C07K 14/47	2G045
A61K 38/00	A61K 39/395 D	4B064
A61K 39/395	A61K 39/395 N	4C084
A61P 25/28	A61P 25/28	4C085
C07K 16/18	C07K 16/18	4H045
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 69 頁) 最終頁に1	
(21) 出願番号 特願2002-556620(P2002-556620)	(71) 出願人 500242786	
(86) (22) 出願日 平成13年12月21日(2001.12.21)	フラウンホフアー ゲセルシャフトフ	
(85) 翻訳文提出日 平成15年7月10日(2003.7.10)	フェールダルク ダー アンゲヴァ	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2001/015181	テン フォルシュング エー. ファオ.	
(87) 国際公開番号 W02002/055552	ドイツ連邦共和国 80686 ミュン	
(87) 国際公開日 平成14年7月18日(2002.7.18)	ン, ハンザシュタデー 27ツエー	
(31) 優先権主張番号 101 01 430, 9	(74) 代理人 100091096	
(32) 優先日 平成13年1月13日(2001.1.13)	弁理士 平木 祐輔	
(33) 優先権主張国 ドイツ(DE)	(74) 代理人 100118773	
	弁理士 藤田 節	
	(74) 代理人 100096183	
	弁理士 石井 貞次	
	(72) 発明者 カプルニオツ, アフロディーティ	
	ドイツ連邦共和国 アーヘン 5206	
	, ローンハイデル ウェーク 60	
	最終頁に続く	