

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

分析試料中の A P P タンパク質の病的な変化を検出する方法であって、
該 A P P がその病因に關与する、神経変性症状において、特異的変化を受けた A P P のカルボキシ末端部分の異化および/または代謝の断片である、A P P - C 末端断片により構成されるマーカーを使用することを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記断片は、該 A P P の C 末端部の 1 次構造は保持するが、電荷、等電点、溶解性の異なる変異体の形で存在している、該 A P P の、異化および/または代謝の産物であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

アルツハイマー進行の検出に使用され、

14.5、13.5、12、10.5、および 9.5 kDa の 5 個の断片、ならびに、これらの断片、特に、ヒトまたは実験モデルにおける病的状態の間に、変化を受けるもの、を構成する、等電点電気泳動のイソ変異体を、A P P 機能不全マーカーとして使用することを含むことを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

アルツハイマー進行の検出に使用され、

14.5、13.5、12、10.5、9.5、9、8.5、および 6.5 kDa の 8 個の断片、ならびに、これらの断片、特に、ヒトまたは実験モデルにおける病的状態の間に、変化を受けるもの、を構成する、等電点電気泳動のイソ変異体を、A P P 機能不全マーカーとして使用することを含むことを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 5】

ヒトにおけるアルツハイマー進行の検出に使用され、

14.5、13.5、12、10.5、9.5、9、および 6.5 kDa の断片から選択される 1 ~ 7 個の断片、ならびに、これらの断片を構成する等電点電気泳動のイソ変異体を、A P P 機能不全マーカーとして使用することを含むことを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

マウスにおけるアルツハイマー進行の検出に使用され、

14.5、13.5、12、10.5、9.5、9、8.5、および 6.5 kDa の断片から選択される 1 ~ 8 個の断片、ならびに、これらの断片を構成する等電点電気泳動のイソ変異体を、A P P 機能不全マーカーとして使用することを含むことを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

30

【請求項 7】

細胞モデルにおけるアルツハイマー進行の検出に使用され、13.5、12、10.5、9.5、9、8.5、および 6.5 kDa の断片から選択される 1 ~ 7 個の断片、ならびに、これらの断片を構成する等電点電気泳動のイソ変異体を、A P P 機能不全マーカーとして使用することを含むことを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

40

【請求項 8】

該分析試料は、神経組織または神経細胞、非神経組織または非神経細胞、例えば、脳脊髄液、血液、その構成要素の全部または一部などの体液を包含することを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

ポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体のセットを付加的に使用し、A P P - C 末端断片の病的な変成の翻訳後修飾、特に、リン酸化および/またはメチル化および/またはアセチル化および/またはグルコシル化型の修飾を検出することを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

使用されるポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体セットは、14.5、12

50

、および10.5 kDa断片の発現物のリン酸化および変異の検出を可能にすることを特徴とする、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

分析試料中で同定された断片にインデックスを割り当てることによって病状の程度を評価し、このインデックスは、基準系に関しては、インデックス0(ゼロ)は、健常組織における検出に、かつ、インデックス100は、異常組織における検出に対応するように割り当てられることを特徴とする、請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

アルツハイマー病における実験モデル、細胞または動物モデルを確立する、および/または有効性を確認するための、請求項1~11のいずれか一項に記載の方法の応用。

10

【請求項13】

アルツハイマー型神経変性病状に対して、有効な分子を薬理的にスクリーニングするための、請求項12に従って得られるモデルの使用。

【請求項14】

ヒト組織および実験モデルにおける、アルツハイマー型神経変性病状の診断のための、請求項1~11のいずれか一項に記載の方法の応用。

【請求項15】

APPのカルボキシ末端領域に対するポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体のセットを含み、必要に応じて、該APP-C末端断片の病的な変化の翻訳後修飾、特に、リン酸化および/またはメチル化および/またはアセチル化および/またはグルコシル化型の修飾を検出するポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体のセットを含むことを特徴とする、APPの病的な変化に対する診断キット。

20

【請求項16】

免疫化学アッセイ、例えば、ELISA、ウェスタン・ブロット、またはドット・ブロットを実施する上で必要な試薬または材料を含むことを特徴とする、請求項15に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、アルツハイマー病などの神経変性疾患におけるAPPタンパク質(アミロイド前駆体タンパク質)の病的な変化(pathological transformation)を検出する手段に関する。

30

【0002】

本発明は、より詳細には、かかる変化を検出する方法、それに供するキット、ならびにその治療および診断への応用に関する。

【0003】

アルツハイマー病(AD)は、知的機能の喪失、従って、進行性かつ不可逆な痴呆の発症をもたらす神経変性疾患である。この疾患は、加齢が主要な危険因子であるので、人口の高齢化につれ、将来の主要な問題の一つになりつつある。

【0004】

観察される型のうちの99%は、非家族性である。家族性常染色体優性型の場合、病的な変異が、第21番染色体のAPP遺伝子上、ならびに第14番と第1番染色体に見られるPS1およびPS2(プレセニリン(presenilin)1および2)遺伝子上で観察される。

40

【0005】

二通りの変性プロセスがアルツハイマー病の特徴となっている。APPタンパク質の機能不全に起因するアミロイド形成と、神経細胞内のタウ・タンパク質の蓄積に対応する神経原線維変性(NFD)である。

【0006】

APPタンパク質の機能不全は、アルツハイマー病状のまさしく原因であるが、神経の変性および死の明確な原因は未だ解明されていない。

50

【0007】

2つの仮説が提唱されている。最も普及している、第一の仮説によれば、APPの切断産物である、39~43のアミノ酸残基を含むAβペプチドは、神経毒であり、NFD連鎖反応の誘因である。

【0008】

第二の仮説によれば、アミロイド斑の形態へのAβペプチドの蓄積によって、並行してかつ副次的に変形される、該変性は、APP機能の喪失または獲得から引き起こされる。

【0009】

変異されたAPPあるいはAPP+PSI遺伝子を有するトランスジェニック・マウスのおかげで、アミロイド形成のモデル化が可能となっている。このマウスでは、進行的にアミロイド斑を発現させるものの、しかし、NFDは観察されない。このマウスは、Aβペプチドの生成を阻害できる分子を試験するために、医薬業界で既に利用されている。その基本戦略は、Aβペプチドの産生に關与する酵素を妨害することからなる。現在知られている、このタイプの酵素は、およびセクレターゼである(1)。

【0010】

アミロイド沈着物上に固着さえる分子も試験されている。この分子は、構造の破壊剤(シートブレーカー)または抗アミロイド化剤である(2)。

【0011】

アミロイド・ペプチドに対するワクチン接種も評価段階にある(3)。

【0012】

現時点では、アルツハイマー病に罹患したヒト組織内において、APPタンパク質の有意、かつ確実な変異は、1-42Aβペプチド産生の増加、1-42/1-40Aβ比の増加、ならびにその不溶沈着物およびアミロイド斑の形態の凝集以外は、発見されていない。

【0013】

sAPPとして知られる、APPN末端部分の分泌物の変異も、APP上の715変異のin vitro試験で報告されている(4)。

【0014】

本発明者らが実施した研究は、Aβペプチドの検出とは結びつかないが、アルツハイマー病のヒト組織中、ならびに、実験モデル中において、特異的に検出可能である、APPタンパク質の重要な改変に気付かせた。

【0015】

これらの改変は、アルツハイマー病の影響を受けたヒト組織(中枢神経系、末梢の体液および組織)中で、ならびにAPPの機能不全を伴う他の神経変性病状中において、明らかにされている。

【0016】

該重要な改変は、定性的かつ定量的であり、Aβペプチド産生の上流において、検出される。

【0017】

同様な異常は、APP上の病的な変異、あるいは、変異APPと変異プレセニン1を有するトランスジェニック・マウスにおいても、多数見出される。

【0018】

従って、本発明は、APPの病的な改変の、特に、神経変性過程における、検出方法における、マーカーとしての、ヒト大脳組織内で観察されるこれら改変の利用に関する。

【0019】

本発明は、特に、神経変性過程の診断およびモニタリング、動物モデルの開発、ならびに、APP病状に対して有効な薬物のスクリーニングに対する、これらマーカーの使用に関する。

【0020】

本発明は、基準の系に対して設定されたインデックスの定義を含む、前記病状の評価方法

にも関する。

【0021】

分析試料中のAPPタンパク質の病的な変化を検出する方法は、該APPがその病因に関与する、神経変性症状において、特異的な変化を受けたAPPのカルボキシ末端部分の異化および/または代謝の断片、以降APP-C末端断片と称する、により構成されるマーカーを使用することを特徴とする。

【0022】

本発明者らが実施した研究は、予期せぬことに、かかる断片をもたらす変化は、特に、アルツハイマー病の場合において、大脳領域中の変性過程の開始と進行に直接連結されていることを解明した。

10

【0023】

問題の断片は、APP-C末端の一次構造を保持している、APPの異化および/または代謝の産物であり、従って、このAPP-C末端部分に対する抗体によって認識されることが観測されている。

【0024】

従って、本明細書および請求の範囲で使用する「断片」という用語は、実施例に記載されるように、これら変異体は、抗APP-C末端抗体で認識される程度に、例えば、リン酸化および/またはメチル化および/またはアセチル化および/またはグリコシル化などの、翻訳後修飾のために、電荷あるいは等電点が相違している変異体(charge and isoelectric point variants)をも包含する。

20

【0025】

これらは、特に、抗APP-C末端ポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体のセット、さらには、APP-C末端の病的変化体の翻訳後修飾に対する抗体のセットによる、免疫プロットと検出を組み合わせた、1-D電気泳動(1次元電気泳動)または2-D電気泳動(2次元電気泳動)による、分析試料の生化学的分析により同定されえる断片である。

【0026】

該電気泳動は、1次元および/または2次元とすることができる。

【0027】

かかる断片は、病的な組織中において、特異的な変化を受ける。神経変性過程の進行に伴って、これら断片のうちの、特定のものの減少が、さらには、消失すらも、見出されている。同時に、これら断片のうちの、特定のものの、電荷の変異、ならびに溶解性の変化が見出されている。

30

【0028】

本発明は、特に、アルツハイマー化進行の診断のためにこの方法を適用することに関し、すなわち、APP機能不全マーカーとしての、1次元(1-D)電気泳動法で決定される、その分子量は、14.5、13.5、12、10.5、および9.5 kDaである、アルツハイマー化の過程に受ける、5個の主要な断片の利用に関する。便宜上、これらの断片を、A、B、C、D、Eの文字で表す。9 kDa(F)のバンドも存在し、6.5 kDaのバンドも、より少くかつ変動する量であるが、存在することにも注記する。

40

【0029】

消失する変異体は、Aで表す14.5 kDaの1-D電気泳動バンドに対応し、2-Dでは、15 kDaと14.5 kDaの2成分に分離され、15 kDa成分は、等電点が5.13(15/5.13と表す)および15/5.37の、また、他方の成分は、14.5/5.64および14.5/5.95の、等電点変異体(isoelectric variants)を含んでいる。13.5/4.94、ならびに12.7/4.8; 12.7/5.29の等電点変異体を含む、13.5と12.7 kDaの2成分に分離される、13.5 kDaの電気泳動バンドBに相当する断片も消失する。

【0030】

50

アルツハイマー病の早期段階において、有用な断片も修飾を受ける。それらは、電気泳動変異体 (electrophoretic variants) 15 / 4.55、14 / 5.2、14 / 5.37、12.7 / 5.45、12.7 / 5.64、10.5 / 5.91、12.7 / 6.05に相当する。これらの変異体は、初期マーカーとなる程度に、特に情報を与える。

【0031】

アルツハイマー化中に出現する断片は、11 / 4.94、10.5 / 5.35、10.5 / 7.5の等電点変異体を含む、2-Dでは、11 kDaと10.5 kDaの二成分に分離される、10.5 kDaの1-D電気泳動バンド、ならびに、9.5 kDa、pI 5.77の断片に相当する。

10

【0032】

同時に、APP-C末端マーカーの溶解性の変化も、神経変性の病理過程の進展に伴って観察される。大脳組織のアルツハイマー化の間に、14.5と13.5の断片は、その溶解性の減少を示し、10.5と9.5の断片は、その溶解性の増大を示す。

【0033】

かかる断片は、「アルツハイマー化を受けた (alzheimerized)」と評される組織または細胞中において、改変を受ける。それらは、アルツハイマー病理に關与する、変異遺伝子または非変異遺伝子、あるいは遺伝子の組合せを保持しているトランスジェニック動物などの実験モデルにおいても、同様に改変を受けることがある。

【0034】

APP-C末端マーカーにおいて観測されるような、APPタンパク質の異化および代謝における、これらの相違は、神経細胞モデル (例えば、SKNSH SY5Y系統、NT2系統、Kelly系統などの神経芽細胞腫細胞)、グリア芽細胞腫系統 (CCF、U118、T98)のみならず、CHO、COS、HT-29、HeLa系統など非神経細胞でも観察されることは、興味深く注目される。

20

【0035】

各細胞系は、元来、それ独自のこれら断片の発現パターン (細胞モデルの全タンパク質に対する、発現された分子量13.5、12、10.5、9.5、9、8.5、および6.5 kDa断片の総量の変動；各断片間の相対比の変動)を有することも注目される。

【0036】

これらのモデルでは、各モデルに特異的な挙動で、細胞系統の分化状態に応じて、断片A~Fの発現も変更を受ける。

30

【0037】

これらの変動は、動物モデル、特に、可能な異なる構成 (APP変異体および/またはPS1あるいはPS2変異体および/またはPS1発現欠如)および/または変異もしくは非変異タウ遺伝子 (14.5、13.5、12、10.5、9.5、9、8.5、および6.5 kDa)を有するトランスジェニック・マウスにおいても観察される。

【0038】

したがって、前記方法に用いられる分析試料には、神経組織もしくは細胞系統ならびに非神経組織もしくは細胞系統、例えば、脳脊髄液、血液、その構成要素の全部または一部などの体液 (biological liquids)が含まれ、それは、早期診断、患者における危険因子の評価、または治療モニタリングを容易とする。

40

【0039】

これらの組織を、該検出方法における使用を目的として、ホモジナイズまたは、例えば、遠心分離によって、分画すると有益である。

【0040】

上記方法は、レヴィー小体を伴う痴呆やアミロイド血管症などの、アルツハイマー病に關係する神経変性病状の鑑別診断にも利用される。

【0041】

上述の検出方法は、病気と関連するタンパク質へのAPPタンパク質の変異の指標を規定

50

することを可能とする。

【0042】

本発明は、特に、実施例に記載されるような、免疫化学的分析により分析試料中の神経変性の病理過程を評価する方法であって、インデックス0（ゼロ）は、健常組織における検出、インデックス100は、異常組織における検出に相当する、基準の系を参照して、ヒトの、あるいはアルツハイマー病に関係している遺伝子変異を有するトランスジェニック・マウス、あるいは、天然型細胞系統、または前記遺伝子のトランスフェクト体に由来する、試験試料中において同定される断片にインデックスを割り当てることを特徴とする方法に関する。

【0043】

かかるインデックスは、診断および治療上の利点を有する。それは、病的状態を迅速に反映することを可能とする。インデックス値は、実際に、アルツハイマー病を発症する危険があるか否かを判定することを可能とする。高いインデックスが得られたならば、臨床診断の裏付けに役立つ。

【0044】

また、APPの異化と代謝ならびにその調整に基づく治療処置の目的において、かかるインデックスの変異は、治療の効果をモニターすることを可能とする。

【0045】

それは、アルツハイマー病または他の神経変性病状に対する様々な分子の効果を比較することを可能とする基準を構成し、該インデックスの変異は、被験分子の有効性ならびにその治療上の有用性の可能性を示す。

【0046】

かかるインデックスの利用は、該疾患の要因となる早期の病因事象の解析においても利点を示し、新しい有効な分子の発見、ならびに新しい治療戦略の開発をもたらす。

【0047】

このインデックスは、変性を遅くするために、さらには、新たな実験モデルを確立するために、変性を誘発する上でも、利用できることも特筆される。このインデックスは、当該細胞集団の消失を要する治療措置の範囲内において、特定とする変性を誘起することを可能とする情報をも提供する。

【0048】

本発明にかかる方法は、加えて、APP-C末端断片の病的な変異の翻訳後修飾、特に、リン酸化および/またはメチル化および/またはアセチル化および/またはグルコシル化型の修飾を検出するための、ポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体のセットを使用すると有益である。

【0049】

使用するポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体のセットは、14.5、12、10.5 kDa断片のリン酸化および発現の変動を明らかにすることができることが好ましい。

【0050】

本発明にかかる検出方法は、アルツハイマー病の実験モデル、細胞、または動物モデルを確立する、ならびに有効性を検証するために、好適に利用することができる。該適合するモデルは、実施例に記載するように、ヒト組織において観察されるAPP-C末端断片の改変を再現する。

【0051】

患者の選別性を改良することによって、有効な治療試験を確立する上で、それを役立たせることもできる。

【0052】

大いに興味深い、別の使用は、アルツハイマー型の神経変性病状に対して効果的な薬物を選択するための薬理的スクリーニングに関するものである。すなわち、選択される分子は、APP-C末端マーカーの諸特性の修復、またはそれらの物理化学的諸特性（溶解性

10

20

30

40

50

、電荷)の修復へと導くことで、アルツハイマーの上記徴候を緩和できる点に特徴がある。

【0053】

従って、本発明により、有用な分子の迅速で正当な薬理的スクリーニングを実施することが可能となる。

【0054】

本発明は、また、APPのカルボキシ末端領域に対するポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体のセットを含むことを特徴とする、APPの病的な変異の診断用キットにも関する。例えば、これら断片上のリン酸化、メチル化、アセチル化、またはグリコシル化の部位などの、APP-C末端断片上に位置する、病的な変異と関連している翻訳後修飾に対する抗体のセットの使用は、APP-C末端断片の病的な変異の立証と定量化に関する、付加的な情報を提供するの有益である。

10

【0055】

2-D電気泳動によって示されるAPP-C末端断片の異種混交性は、リン酸化トレオニン668 (APP695における番号で示すと)に対するリン依存性(phospho-dependent)ポリクローナル抗体により実証されるように、APP-C末端断片に共通する領域に位置する、リン酸化修飾によって、部分的には説明される。

【0056】

それは、APP-C末端断片の特性(profile)を変更する、抗グリコシル化(anti-glycosylation)薬で示されるように、グリコシル化によっても生じる。メチル化およびアセチル化も、APP-C末端断片の病的な変異に関与する、二種類の翻訳後修飾である。実際、それらは、実質的にリジン残基上に局在しており、酸性化を、それに伴い、等電点の変化を引き起こす。

20

【0057】

これらは、アルツハイマー病に関与する遺伝子による制御の結果でもある。この方法によって、タウタンパク質の過剰発現は、13.5、9.5、および6.5 kDaバンドの比に影響することがある。

【0058】

これらの抗体は、例えば、ELISA、ウェスタン・ブロット、ドット・ブロットなど、免疫化学的アッセイにおいて、使用することができる。従って、本発明にかかるキットは、かかるアッセイを実施する上で必要な要素をも含むと便利である。

30

【0059】

本発明の別の特徴および利点は、それぞれ後述する内容を示す図1~16を参照して、以下の実施例において、明らかにする。

材料と方法

抗体

APP-C末端-C17ポリクローナル抗体の製作

APPのカルボキシ末端部分に対するポリクローナル抗体を、Vaitukaitis等(5)により記述された免疫プロトコルに従って製作した。ニュージーランド・ラビットを、そのカルボキシ末端に相当する、ヒトAPP配列の最後の17アミノ酸を含んでなるペプチドで免疫した。該ペプチドは、共有結合で卵白アルブミンに結合させた。免疫源200μgを2週ごとに注射した。注射前に、最初の感作では、フロイント完全アジュバント1容を免疫源溶液に添加し、また、後続の感作では、完全アジュバントに代えて、フロイント不完全アジュバントを用いた。4回目の注射の後1週目、ならびに、後続の各注射後の1週目に、採血した。血液凝固と、2000gで10分間の遠心分離の後、純粋な血清が得られた。グリセロール1容をこの血清に添加し、この混合物を-20で保存した。

40

【0060】

APP-C末端-C17抗体の精製

免疫化に使用したペプチド1mgを、製造者の指示書に従って、NHS-Fast Fl

50

ow Sepharose (登録商標)マトリックス (Amersham Pharmacia Biotech) に結合させた。該担持済みマトリックスを、2 × 結合緩衝液 (pH 8.0 のトリス 50 mM; NaCl 300 mM; Tween-20 0.1% (v/v)) 1 容中に希釈した純粋血清 200 μl に接触させ、4 で終夜軽く攪拌した。該溶液全てを、PD-10 カラムに載せた。該マトリックスを、上記結合緩衝液 10 容で洗浄した。精製済み抗体は、pH 3.5 のアセテート緩衝液 2 容によって溶出させた。そのタンパク質濃度は、Pierce 社の BCA タンパク質定量化キットを用いて決定した。

【0061】

APP-668P ポリクローナル抗体の製作

APP-C 末端 - C17 に対して使用したと同じプロトコルに従って、Val-Ala-Ala-Ala-Val- (リン酸化) Thr-Pro-Glu-Glu-Arg-His-Leu の配列に相当する合成ペプチドに対する抗体を製作した。この抗体は、上記免疫源を認識するが、同一配列を持つが、リン酸化されていないペプチドは認識しない。

【0062】

標本

ヒトおよびネズミの脳組織の標本

ヒト脳組織は、以前よりモニターしていた患者に由来するもので、(6) に記載されている。剖検または生検によって取得し、-80 で保存した、この脳組織標本は、解剖図録を用いて解剖し、次いで、1 × 1-D 溶解緩衝液 (pH 6.8 の 50 mM トリス-HCl; 4 mM EDTA; SDS 5% (w/v)、グリセロール 10% (v/v)、β-メルカプトエタノール 2% (v/v)、プロモフェノールブルー 0.05% (v/v)) 10 容中で、テフロン (登録商標) ポッター (potter) を用いて、1-D 分析用にホモジナイズした。該試料は、10 分間、100 で処理し、その後、使用するまで -80 に維持した。2-D 分析の場合、該組織を、10 mM トリス-HCl pH 6.8 緩衝液中でホモジナイズし、次いで、それに 2 × 2-D 緩衝液 (尿素 7 M; チオ尿素 2 M; 0.4% Pharymalites (登録商標) 3 ~ 10% (w/v)、Triton X-100 8% (v/v)、ジチオスレイトール 10 mM、プロモフェノールブルー 0.1%) 1 容を添加し、使用するまで -80 で保存した。げっ歯動物の脳組織標本の場合、動物の死後、速やかに脳を摘出し、ヒトの標本と同様の方法で処理した。

【0063】

使用したネズミの系統

ネズミ脳組織の標本を、ヒト脳組織の標本と同じプロトコルに従い調製した。脳組織の標本を、非トランスジェニック・マウス、および野生型ヒト APP 遺伝子 (APP^wt) または 670 番と 671 番のコドンに変異のあるヒト APP 遺伝子 (APP^sw) を有するトランスジェニック・マウスから採取した。この APP の変異は、スウェーデン型変異 (Swedish mutation) (7) として知られる、家族性アルツハイマー病と関連がある。非トランスジェニック・マウス、および APP^wt、APP^sw 遺伝子を有する異系統のトランスジェニック・マウスを含む別の標本も使用した。Hsiao K. 等 (8) が開発したトランスジェニック・マウスと同様のネズミ脳組織の標本も使用した。

【0064】

タンパク質分画後の脳組織の試料

脳組織標本を、10 mM トリス-HCl pH 6.8 緩衝液中 1 / 10 (w/v) の比でホモジナイズし、次いで、4 で 1 時間、100,000 g で遠心分離した。その上清 (F1) を確保し、Triton X-100 0.5% (v/v) を含む同一緩衝液中で再度ホモジナイズしたペレットを、それに添加した。遠心分離後、F2 画分と称する、可溶性 Triton X-100 画分を保存する。追加の抽出および遠心分離工程を、

10

20

30

40

50

同一緩衝液中同一条件下で実施して、F 2'画分を作製する。次いで、このペレットを、素早く1-D溶解緩衝液(下記参照)中に取り、F 3画分とする。

【0065】

用いた生化学的手法に従って、使用時に、以下の対応する緩衝液を上清に添加した：1次元(1-D)電気泳動分析用には、2×1-D溶解緩衝液(pH 6.8の100mM トリス-HCl; EDTA 8mM; SDS 10%(w/v); グリセロール 20%(v/v); β-メルカプトエタノール 4%(v/v)、プロモフェノールブルー 0.1%(v/v))1容、2次元(2-D)電気泳動分析用には、2-D溶解緩衝液(尿素 7M; チオ尿素 2M; 0.4% Pharymalytes(登録商標) 3~10%(w/v); Triton X-100 4%(v/v); ジチオスレイトール 10mM; プロモフェノールブルー 0.1%)1容。

【0066】

免疫沈降

APP-C末端断片を免疫沈降するために、F 2画分を使用する。F 2画分100μlを、NP. 401%を含む10mM トリスHCl pH 7.4緩衝液(免疫沈降緩衝液)300μl中に希釈した。10μlのAPP-C末端-C17抗体またはAPP668P抗体を添加し、その混合物を攪拌下4℃で終夜インキュベートする。プロテインA固定アガロース・ビーズ(protein A fixed on agarose beads)(Pierce)40μlを該溶液に添加し、その混合物を攪拌下4℃で1時間インキュベートする。そのアガロース・ビーズを免疫沈降緩衝液中で3回洗浄し、次いで、SDS緩衝液50μlで処理して、APP-C末端断片を遊離させ、遠心分離上清中に回収した。次いで、該APP-C末端断片は、トリス-トリシングル上で電気泳動後、免疫ブロット法により分析した。

【0067】

CHO(ハムスター)またはSKNSH SY5Y(ヒト)培養細胞試料

細胞は、野生型ヒトAPP遺伝子またはスウェーデン型変異を有するヒトAPP遺伝子を用いて、安定した形でトランスフェクトする。細胞のペレットを、10mM トリス-HCl pH 6.8緩衝液中に取り、次いで、超音波にかけた。使用前に、(1-Dまたは2-D)実験に対応する、2×溶解緩衝液1容を試料に添加する。1-D分析の場合、該試料を10分間100℃にする。

【0068】

ヒト白血球の試料

ヒト白血球の調製：

血液10mlをEDTA(エチレンジアミン四酢酸)管中に採集する。遠心分離を15分間、4500rpm(毎分の回転数)で実施する。血漿を除去する。管に、赤血球の溶解用の溶液(溶解溶液：NH₄CO₃ 0.91mM、NH₄Cl 0.132mM)を、その2/3まで満たす。該管を静かに攪拌し、5℃に冷却した水浴中に置く。4000rpmで15分間の遠心分離を実施し、上清を除去する。同じ方法に従って、白血球のペレットを、前記溶解溶液で2回洗浄する。次いで、該ペレットの水分を除去し、24時間以内に使用するか、あるいは輸送または後日使用するために-20℃で凍結させる。

【0069】

白血球のペレットを、10mM トリス-HCl pH 6.8緩衝液中に取り、次いで、超音波にかける。使用前に、(1-Dまたは2-D)実験に対応する、2×溶解緩衝液1容を、該試料に添加する。1-D分析の場合、試料を10分間100℃にする。

【0070】

電気泳動法

1-D電気泳動

Protean IIXi Cell 電気泳動システム(Biorad)を用いて、製造者の指示書に従って実験を実施した。

【0071】

10

20

30

40

50

L a e m m l i (9) によって記述された、ゲル製造用プロトコルに従って、また、S c h a g g e r および V o n J a g o w (1 0) によって記述された泳動条件下で、1 - D 電気泳動を実施した。濃縮ゲルは、4 % のアクリルアミドを含有し、使用した分離ゲルは、1 6 . 5 % のアクリルアミドを含有する。泳動は、トリス - トリシン緩衝液中で行う。使用した泳動プログラムは、以下の通りである：1 時間 3 0 V 一定、次いで、4 5 m A で 1 6 時間。

【 0 0 7 2 】

各ウェルには、等量 (約 1 0 0 μ g / ウェル) のタンパク質を載せた。

【 0 0 7 3 】

2 - D 電気泳動

10

1 次元

製造元の指示に従って、p H 3 ~ 1 0 の勾配をカバーしている、I P G S t r i p (登録商標) として知られるプレキャスト・ゲル・ストリップを用いて、1 次元、すなわちフォーカシング (f o c u s i n g) を実施する。等電点フォーカシングに使用する材料は、P r o t e a n I E F C e l l システム (B i o r a d) である。

【 0 0 7 4 】

1 x 再水和緩衝液 (尿素 7 M、チオ尿素 2 M、t r i t o n X 1 0 0 4 %、C H A P S 0 . 5 %、p H 3 ~ 1 0 の P h a r m a l y t e s (登録商標) 0 / 2 % (w / v)、D T T 1 0 m M、オレンジ G 0 . 0 1 %) を、タンパク質 2 5 0 μ g に添加して、使用用の 4 0 0 μ l とする。該試料 4 0 0 μ l を、装置中に設置したストリップに載せる。これを 1 時間静置して、受動的に再水和させ、次いで、5 0 V / ストリップで 1 0 時間保ち、能動的に再水和させ、次いで、製造者の指示書に従って、前記プログラムを開始する。フォーカシング後、このストリップを使用するか、- 8 0 °C で保存する。

20

【 0 0 7 5 】

2 次元

使用前に、ストリップを 1 - D 緩衝液 (p H 6 . 8 のトリス 5 0 m M ; グリセロール 1 0 % (v / v) ; β - メルカプトエタノール 2 % (v / v) ; S D S 2 % (w / v) ; プロモフェノールブルー 0 . 0 5 % (w / v)) 中で 3 0 分間平衡化し、次いで、アクリルアミド 1 6 . 5 % の 1 - D 分離ゲル上に置く。該ストリップを、アガロース 1 % (w / v) 溶液で回収する。その後の手順は、単一の 1 - D 電気泳動と同じである。

30

【 0 0 7 6 】

メンブレンへの転写と免疫プロット法

転写

P h a r m a c i a L K B m u l t i p h o r (登録商標) セミドライ転写システムを用いて、製造者 (A m e r s h a m - P h a r m a c i a B i o t e c h) の指示書に従って、転写を実施した。タンパク質は、0 . 8 m A / c m ² で H y b o n d (登録商標) E C L ニトロセルロース・メンブレン (P h a r m a c i a - A m e r s h a m) に転写した。

【 0 0 7 7 】

免疫プロット法

40

該メンブレンを、スキムミルク 5 % (w / v) を含有する緩衝液 (p H 8 . 0 のトリス 1 5 m M ; N a C l 1 5 0 m M ; T w e e n (登録商標) - 2 0 0 . 5 % (v / v)) 中で 6 0 分間インキュベートし、次いで、スキムミルクは含まず、0 . 5 % に代えて、T w e e n (登録商標) - 2 0 を 0 . 1 % 含有する同じ緩衝液で洗浄する。

【 0 0 7 8 】

該メンブレンを、インキュベーション緩衝液 (p H 8 . 0 のトリス 1 5 m M、N a C l 1 5 0 m M、T w e e n - 2 0 0 . 1 % (v / v)、スキムミルク 3 % (w / v)) 中で、最終希釈度 1 / 2 0 0 0 (v / v) に希釈される A P P - C 末端 - C 1 7 抗体と共に、室温で 2 時間、または 4 時間で終夜インキュベートする。

【 0 0 7 9 】

50

メンブレンを、スキムミルクを含まないインキュベーション緩衝液中で3回各10分間洗浄する。

【0080】

次いで、該メンブレンを、R a i f o r t ペルオキシダーゼを結合させた抗ウサギヤギ免疫グロブリンと共に、スキムミルクを含まないインキュベーション緩衝液中、最終希釈度1/4000 (v/v) で、室温で1時間インキュベートする。そのメンブレンを、スキムミルクを含まないインキュベーション緩衝液中で3回各10分間洗浄し、E C L (登録商標) 化学ルミネッセンス・キット (Pharmacia - Amersham Biotech) を用いて、製造者の指示書に従って、その免疫反応性ポリペプチドを呈色させる。

10

結果

A P P の異化および/または代謝による切断の概念的な概要を、図1 (A) に、また、利用した抗体のエピトープの位置を、図1 (B) に示す。

【0081】

ヒト大脳組織の1-D分析

1-D分析の方法の欄に記載されるように調製した、ヒト大脳組織の試料を載せ、分析した。電気泳動分離は、上述のトリス-トリシン条件で行った。Image Master (登録商標) 1-D Elite ソフトウェア (Amersham - Pharmacia Biotech) を用いて、この断片の分子量を決定するために、検定済みの分子量マーカー (Bio-rad) を併行して載せた。

20

【0082】

電気泳動で分離されたタンパク質の転写、ならびにA P P - C 末端 - C 1 7 抗体による免疫プロットを、上述の通りに実施した。結果を、図2のA1に示す。

【0083】

正常組織の分析

コントロールのヒト大脳組織においては、見掛けの分子量が、A 14.5 kDa ; B 13.5 kDa ; C 12 kDa ; D 10.5 kDa ; E 9.5 kDa のA、B、C、D、およびEと名付ける6本のバンドが、A P P - C 末端 - C 1 7 ポリクローナル抗体により見出される。それらは、ヒト大脳生検組織およびコントロール被験者の死後大脳組織の双方において検出される (図2、A2 ; レーン 1 : 生検 ; レーン 2 および 3 : 剖検)。各試料の死後の経過時間を、時間 (h) で示す。断片の特性は、死後の期間では、改変を受けないことに注意されたい。従って、該5個の断片は、死後に産生されることがある異化酵素活性に由来したものではない。

30

【0084】

アルツハイマー病の様々な段階にある患者由来の組織の分析

A) アルツハイマー化中における、A P P - C 末端断片の量の減少

図2 B は、同一試料および同一免疫プロットにおける、1999年のD e l a c o u r t e 等の分類によるタウ病因 (tau pathology) (図2、B1) の、ならびにコントロール被験者 (レーン1および2) および2人のアルツハイマー病患者 (レーン3~6) におけるA P P - C 末端断片 (図2、B2) の分析を示す。海馬 (Hip、レーン1、3、5) および後頭皮質 (Oc、レーン2、4、6) の二カ所の大脳領域を調べた。疾患に伴う、A P P - C 末端断片の減少が認められる。この消失は、神経変性的な損傷の重篤さと相関する。実際に、A P P - C 末端断片は、69、64、および60 kDa のタウ病因性タンパク質のトリプレットの存在 (D e l a c o u r t e 等 (6)) によって示される (図2、B1)、タウ病因により侵襲された領域中では消失する (図2、B2) ことは注目される。

40

【0085】

多数の患者の統計学的研究から、タウ異常の程度によって示される病理過程の進行と、分析される大脳組織標本中のA P P - C 末端断片量の減少との間に、極めて高い相関があることが判明している。

50

【0086】

A P P - C 末端量を、コントロール・ケース (C t r l)、痴呆はないがアルツハイマー病に特徴的な病変部を持つ患者に相当する前臨床 (i n f r a c l i n i c a l) ケース (i n f r a A D)、アルツハイマー病 (A D) の臨床ケース、およびアルツハイマー病の家族性常染色体優性ケース (F A D . A D) (図 2、C) の 4 グループの患者の皮質において、決定した。M a n n - W h i t n e y 非母数統計検定は、コントロール C t r l と対比すると、i n f r a A D および A D グループが有意に減少することを示している (i n f r a A D : p < 0 . 0 3 ; A D p < 0 . 0 0 2)。A P P - C 末端の平均減少量は、コントロールグループと比較して、i n f r a A D グループでは、1 / 1 . 5 倍に、A D グループでは、1 / 1 . 7 倍に減少する。i n f r a A D と A D グループの間では、A P P - C 末端減少量には有意な相違はない。これは、この A P P - C 末端の減少は、アルツハイマー医学的病理の初期の現象であることを示している。

10

【0087】

コントロール患者の側頭皮質内のタウ異常と、アルツハイマー病の様々な段階とに対する、A P P - C 末端の発現レベルと間の相関の統計学的研究を実施した (図 2、D)。研究対象の各患者の皮質中にて検出される A P P - C 末端の量と、側頭皮質内ならびに後頭皮質内の、それぞれのタウ異常の様々な程度との間に有意な相関が認められる。

線形回帰

	n	r	p
側頭皮質	26	0.614	0.0009
	n	r	p
後頭皮質	22	0.457	0.0324

20

B) アルツハイマー化過程中的 A P P - C 末端断片の変異

A P P - C 末端断片は、二相において抽出することが好ましい：非イオン性界面活性剤 T r i t o n X 1 0 0 含有緩衝液溶液 (F 2 画分)、ならびにイオン性界面活性剤 ドデシル硫酸ナトリウム (S D S) 含有溶液 (F 3) (図 3、A)。

【0088】

大脳組織のアルツハイマー化において、A P P - C 末端断片の溶解性における、特異的な変化が観測される (図 3 B)。F 2 画分中においては、分子量 9 . 5 (断片 E) および 1 0 . 5 k D a (断片 D) の A P P - C 末端断片の溶解性が增大し、F 3 画分中においては、分子量 1 3 . 5 (断片 B) および 1 4 . 5 k D a (断片 A) の A P P - C 末端断片の不溶性が増大することが認められた。

30

【0089】

正常および病的なヒト大脳組織の 2 - D 分析

3 人の患者に対する結果を、図 4 (A ~ C) に示す。

【0090】

- アルツハイマー型大脳病変部のない 1 コントロール患者 (D e l a c o u r t e 等 (6) による段階 0) (図 4 A)

- アルツハイマー病の臨床段階の極初期にある 1 患者 (D e l a c o u r t e 等 (6) による段階 6) (図 4 B)。

40

【0091】

矢印は、A P P - C 末端 - C 1 7 ポリクローナル抗体を用いて検出されるスポットを示す。それらの分子量は、1 - D 免疫プロットで観察される値とほぼ同じである。それらの等電点は、p H 4 . 5 ~ 7 . 5 の範囲にある。

【0092】

アルツハイマー病の進行に伴う、該スポットの分布における変異が注目される (図 4、C)。アルツハイマー病のさらに進んだ段階にある患者では、その断片をもはや検出することができないので、この手法で研究することはできない。

【0093】

2 - D 分析によって検出される A P P - C 末端の変異体を、Y 軸は、分子量を、X 軸は、

50

等電点を示す、2次元の較正されたグリッド上に模式的に図示する(図4、C)。分子量および等電点の内部標準を用いて、全体を較正した。該等電点のコントロールは、 β -エノラーゼ(47/4.94)、 α -アクチン(42/5.29)、および β -エノラーゼ(47/6.99)である。5.54および8.05の等電点は、大脳組織内部の標準である。

【0094】

図4の概略図には、コントロール被験者、前臨床疾患ステージにあるアルツハイマー病患者、およびアルツハイマー病の初期臨床ステージにあるアルツハイマー病患者のヒト大脳組織中の、APP-C末端-C17抗体を用いて検出されるAPP-C末端断片の2Dプロファイルを重ねて示す。健常ならびに罹患組織中の両者で観察される、該スポット、すなわち、様々な2-D等電点変異体は、白抜き丸で示されている。健常組織に特異的なスポットは、斜線入りの丸で、アルツハイマー化組織に特異的なスポットは、黒丸で示される。

10

【0095】

アルツハイマー病中に改変を受けた、スポットの分子量および等電点の値を表1に示す。

【0096】

ネズミ大脳組織の1-D分析

ヒトAPPの異化および/または代謝の特異性をより明らかにするために、ラット、非トランスジェニック・マウス、ならびに、野生型ヒトAPP遺伝子(APP^{w t})またはスウェーデン型変異を有する遺伝子(APP^{s w})によるトランスジェニック・マウスにおいて、APP-C末端産物を(ヒト大脳組織と同様のやり方で)分析した。ヒト大脳組織のプロファイル(図5A、レーン4)と比較して、コントロールおよびトランスジェニック・マウスのAPP-C末端断片の免疫マーキングを、図5Aに示す。

20

【0097】

大脳組織ホモジネートの同スポット量を、各電気泳動ウェル中に導入した。APP-C末端断片を、APP-C末端-C17ポリクローナル抗体を用いて検出した。図5のレーン1は、トランスフェクトされていないマウス(負のコントロール)の分析結果に対応し、レーン2は、APP^{w t}ヒト遺伝子の単一コピーを有するマウスに対応し、レーン3は、APP^{s w}ヒト変異遺伝子を有するトランスジェニック・マウスに対応し、レーン4は、コントロールのヒト大脳組織に対応する。矢印は、検出された電気泳動バンドの分子量を示す。

30

【0098】

コントロールのマウスまたはAPP^{w t}遺伝子の単一コピーを有するものは、基本的に4個のAPP-C末端断片を産生し、一方、APP^{s w}遺伝子を有するマウスおよび正常ヒト大脳組織は、14.5、13.5、12、10.5、および9.5 kDaの分子量を有する5個のAPP-C末端断片を産生することが注目される。

【0099】

これらの結果は、5匹の非トランスジェニック・マウス、野生型ヒトAPP遺伝子を有する2匹のトランスジェニック・マウス、およびAPP^{s w}遺伝子を有する5匹のトランスジェニック・マウスで検証された。

40

【0100】

図5Bのレーン1~3は、APP-C末端-C17抗体を用いた、様々なAPP^{s w}トランスジェニック・マウス系統の免疫プロットの結果を示し(図5、レーン1~3)、その中には、Hsiao等(8)によって記述されたリファレンスのAPP^{s w}系統(レーン3)が示される。従って、該APP^{s w}トランスジェニック・マウスは、本明細書に記載されるように、特定のプロファイルを体系的に有している。

【0101】

マウス大脳組織のAPP-C末端断片の2-D分析

ヒト大脳組織に対して、上で記載した(図4)と同様の操作を実施する。従って、コントロール・マウス(図6A)、APP^{w t}マウス(図6B)、ならびにAPP^{s w}マウス(

50

図6c)において観察される、様々な変異体を特徴づけることが可能である。APPswマウスにおける変異体の発現に亢進が認められ、また、特定の変異体においては、プロファイルの変異が認められる(図6)。これらの分子量および等電点の値は、図7Aおよび表3に示す。

【0102】

細胞モデルにおけるヒトAPPの改変の1-D分析

- 非神経モデル

野生型ヒトAPP遺伝子(APPwt)またはAPPsw遺伝子を安定した形でトランスフェクトしたCHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞を、上述のプロトコルに従って分析した。図8の結果は、APPwtまたはAPPsw遺伝子によるトランスジェニック・マウス由来の脳組織と比較して、CHO細胞のAPP-C末端断片を示す。

10

【0103】

APPwt CHO細胞(図8、レーン3)では、見掛けの分子量16、14.5、13.5、12、10.5、および9.5kDaの6本のバンドが検出される。主要なバンドは、16、14.5、13.5、および9.5kDaのバンドである。APPsw CHO細胞(図8、レーン4)では、シグナル全体、特に16、13.5、および9.5kDa断片で減少が観測される。

【0104】

APPwt(レーン1)およびAPPsw(レーン2)トランスジェニック・マウスの脳組織のホモネートとの比較は、CHO細胞中において検出されるバンドは、16kDaのバンドを除き、該脳組織のバンドと共通していることが示す。

20

【0105】

CCF、U118、およびT9グリア細胞系統は、13.5、12、10.5、9.5、9、および8.5kDaの6本のバンドを有するプロファイルを示し、9.5から8.5kDaまでの3本のバンドが強いことが認められる(図8B)。同様なプロファイルは、HeLa、COS、およびAPPswでトランスフェクトされたSY-5Y細胞系統で観測されている(図8B)。

【0106】

その他、HT-29上皮細胞系統は、14.5、13.5、12、10.5、9.5および9kDaの6本のバンドのプロファイルを示す(図8:HT-29)。該9kDaのバンドは、HT-29上皮細胞では分離しており、グリコシル化ならびにグリコシル化タンパク質の配向を阻害するベンジル-O-GalNAcで処理した後に、より強くなる。これは、グリコシル化が、APP-C末端の発現およびプロファイルを制御している、翻訳後修飾であることを示唆する。従って、この修飾は、アルツハイマー化中のAPP-C末端分子の病的な変異の研究において、考慮すべき重要な要素である。

30

【0107】

- 神経モデル

非トランスフェクト細胞と対比させて、APPsw、APPwt、変異PS1、およびタウ遺伝子を安定した形でトランスフェクトしたヒト神経芽細胞腫細胞(SKNSH-SY5Y)を分析した。結果を図9に示す。非トランスフェクト細胞では、APP-C末端シグナルは、10.5kDaバンドに対応する(図9:未変性)。一方、13.5、12、10.5、9.5、9、および8.5kDaの6個の断片が、APPswでトランスフェクトした未分化(non-differentiated)SKNSH細胞中で全て同定されている(図9:APPsw)。6本のバンドのプロファイルは、APPwtをトランスフェクトした細胞にも見られる(図9:野生型)。変異PS1遺伝子のSY5Y細胞へのトランスフェクトは、5本のバンドの増大、その際、強い9.5kDaのバンドが増大し、セクレターゼの作用によって遊離される、6.5kDa断片の増加を誘起する。

40

【0108】

Kelly細胞、さらには変異APPまたはPS1遺伝子をトランスフェクトしたSKNSH細胞、NT2細胞、hNT細胞などの、他の未変性神経細胞系も、未変性SKNSH

50

タイプのプロファイルを有する。

【0109】

S Y 5 Y 細胞を14日にわたり分化させると、6.5 kDaのバンドの出現と、10.5 kDaのバンドの減少を伴う、プロファイルの変化が誘起される。同一条件下で、3R タウ遺伝子をトランスフェクトした細胞および未分化細胞では、「セクレターゼ」断片の遊離が増大するのに対応して、13.5 kDaバンドが出現する。これらの分化細胞では、6.5 kDaのバンドの消失が観測される。

【0110】

これは、遺伝子が、APP-C末端断片の発現および相対的分布を変化させることが可能であることを示している。従って、これらのモデルは、ヒト大脳組織において観察されるように、APP-C末端断片の病的な変化のモデルとなる可能性を有している。

10

【0111】

ヒト白血球APP-C末端断片の分析

ヒト白血球のペレットを、(医薬または病院の)分析室において利用される標準プロトコルに従って調製した。このペレットを、上述と同様に処理し、APP-C末端-C17抗体を用いた免疫プロット法によって分析した。この結果は、図10Aに示し。レーン1~5はコントロールに対応し、レーン6~11はアルツハイマー病に罹患した患者由来の試料に対応する。性別と年齢を示す(図10A:性別、年齢)。

【0112】

APP-C末端-C17抗体は、分子量14 kDa、10.5 kDa、および9.5 kDaの3個の断片を検出する。

20

【0113】

コントロール被験者およびアルツハイマー病と診断された患者由来の白血球の対比1-D分析は、(ヒト大脳組織の研究と同様に)コントロール被験者の白血球(レーン1~5)と比較して、患者の白血球中におけるAPP-C末端断片の減少(レーン6~11)を立証することを可能とする。

【0114】

白血球のAPP-C末端断片の変異体は、2-Dでも分析された(図10B)。検出された各スポットの分子量と等電点の値を図7Cおよび表2に示す。

【0115】

様々な免疫プローブ(immunological probes)を用いたAPP-C末端断片の特定

AペプチドのN末端に対する抗体は、セクレターゼの切断断片の位置特を可能とする。それは、FCA18抗体である(4)。白血球の14 kDa断片は、この抗体によって検出され、それが、セクレターゼによって作製されるAPP-C末端断片であることを示唆している(図11B)。大脳組織においては、2本のバンドA(14.5 kDa)とB(13.5 kDa)は、Aペプチドの5~11部分に対するモノクローナル抗体(Abeta、GmbH、ハイデルベルク、ドイツ)である、WO2によって認識され、また、バンドBは、FCA18によって検出される。このことは、バンドAおよびBが、セクレターゼ領域の濃度に応じた、切断によって産生されることを示している(図1参照)。さらに、データベース調査(例えば、SwissProt)から、分子量9.5 kDa(図11)、等電点6.99のAPP-C末端断片は、図1に示すように、セクレターゼ断片に相当することが示される。従って、アルツハイマー病に伴い、改変を受ける、白血球のこの2つの主要なAPP-C末端断片が同定された(図11、AおよびB)。

30

40

【0116】

また、5個の断片A~Cに共通な特定部位は、特異的な改変を受ける場合がある。従って、例えば、リン酸化トレオニン668を特異的に認識するポリクローナル抗体は、バンドA、C、およびDを選択的に認識する。本明細書に記載されている方法により、変性過程に関連している、翻訳後修飾を特定することが可能になる。従って、それは、APP-C末端断片の病的な変異に対する診断キットを有利にもたらし、新たな免疫ツールの開発を

50

可能とするものである。

【0117】

A P P - C 末端断片のリン酸化は、その病的な変異における決定要素である。

【0118】

A P P - C 末端の代謝およびリン酸化の改変が、アルツハイマー病で起こる。コントロール被験者およびアルツハイマー病患者の脳組織の A P P - C 末端を、A P P - C 末端 - C 17 抗体を用いて免疫沈降させると、14.5、13.5、12、10.5、および9.5 k D a (断片 A、B、C、D、および E) の5個の断片が、トリス - トリシゲル中で同一抗体を用いた電気泳動後に見出される (図13、レーン1および2)。この免疫沈降 A P P - C 末端断片を、子ウシ腸アルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化し (図13、レーン3および4)、次いで、同じプロトコルに従って A P P - C 末端 - C 17 抗体を用いて検出した。13.5、10.5、および9.5 k D a の、3個の主要な断片が、コントロールのホモジネート中に検出される。これら3個の断片は、アルツハイマーのホモジネート中でも検出される。しかし、この13.5 k D a 断片の量は少量で、一方、10.5 および9.5 k D a 断片は多量である。この結果は、セクレターゼ切断による、これらの断片の蓄積と、それに、それらのより高いリン酸化を示している。

10

【0119】

リン酸化指数の変化は、特に、抗リン酸化トレオニン668抗体を用いて実証される (図13、レーン5および6)。トレオニン668上のリン酸化された A P P - C 末端断片は、トリス - トリシゲル中での電気泳動後、A P P - C 末端 - C 17 抗体を用いて免疫沈降し検出される。14.5、12、および10.5断片がコントロールのホモジネート中に検出される。アルツハイマーのホモジネート中では、多量に検出されるのは実質的に12.5 および10.5の断片である。この結果が、A P P - C 末端断片 C および D がよりリン酸化され、かつアルツハイマー病の初期段階で多量にリン酸化され、同時に、断片 A は、668部位で全くまたはほんの僅かしかリン酸化されないことを確認する。

20

【0120】

要点のまとめ

本発明の実施の上で、特に情報価値のある変異体を、表にまとめて示す (図14 ~ 16)。これら様々な変異体は、神経組織中、ならびに非神経組織、特に、リンパ球中の双方における、A P P の病的な変異を検出するための極めて有用なマーカーを構成する。

30

【0121】

A P P - C 末端断片のトレオニン、セリン、チロシン上のリン酸化 (図1) は、A P P - C 末端の全般的なプロファイルに寄与する。まず、特に、リン酸化トレオニン668によって示されるように、これら様々な A P P - C 末端断片のリン酸化指数に違いが観測される (図11および13)。次いで、脱リン酸化 A P P - C 末端断片のプロファイルが変化し、特に、14.5 k D a バンドが消失し、従って、その新たなプロファイルは、A P P s w をトランスフェクトした S K N S H 細胞モデルのそれとに類似している (図13)。

【0122】

さらに、A P P - C 末端断片の脱リン酸化は、特に、A P P - C 末端断片のセクレターゼ切断産物に対応する、バンド C、D、E の蓄積 (図13) を伴う正常組織とアルツハイマー組織との間のプロファイル変化を説明する。従って、脱リン酸化は、重要な翻訳後の現象であり、A P P - C 末端断片の病的な変異のマーカーである。

40

【0123】

この改変は、その細胞モデルによって示されるように (図9)、アルツハイマー病に関与する遺伝子によってその発現が変化を受ける、6.5 k D a のセクレターゼ断片においても反映される。

【0124】

A P P - C 末端断片の検出は、ヒト神経組織 (図12A: ヒト脳組織) またはヒト非神経組織 (図12B: ヒトリンパ球)、ならびに実験動物 (図12C: A P P s w および

50

APPwtトランスジェニック・マウス由来の脳組織)、または細胞、神経(図12D:神経芽細胞腫細胞)、または非神経(CHO細胞、COSなど)のモデルに適用可能な、病的変異の指標の定義を可能とする。この指標は、0(健全組織)から100%(アルツハイマー化病的組織)まで変化する(図12)。

参考文献

1. De Strooper B, Konig G (1999) Alzheimer's disease. A firm base for drug development [news] [comment]. *Nature*, 402, 471-2.
2. Sigurdsson EM, Permanne B, Soto C, Wisniewski T, Frangione B (2000) In vivo reversal of amyloid-beta lesions in rat brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 59, 11-7. 10
3. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandever C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 400:173-7. 20
4. Ancolio K, Dumanchin C, Barelli H, Warte JM, Brice A, Campion D, et al. (1999) Unusual phenotypic alteration of beta amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 96, 4119-24.
5. Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieschlag E, Ross GT (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 33, 988-91. 30
6. Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buee L, Wattez A, Vermersch P, et al. (1999) The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*, 52, 1158-65.
7. Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, et al. (1996) Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*, 383, 710-3. 40
8. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 274, 99-102.
9. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5. 50

10. Schagger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem., 166, 368-79.

【図面の簡単な説明】

【図1】

A P P - C 末端断片の切断を概念的に示す図と、利用した抗体のエピトープの位置を示す図である。

10

【図2】

ヒト大脳組織の(1-D)ウェスタン・プロットの結果(図2(A)と図2(B))と、A P P - C 末端断片のアッセイ結果(図2(C)と図2(D))を示す写真である。

【図3】

ヒト大脳組織分画のウェスタン・プロットの結果(図3(A)と図3(B))を示す写真である。

【図4】

ヒト大脳組織の(2-D)ウェスタン・プロットの結果(図4(A)~図4(C))を示す写真である。

【図5】

トランスジェニック・マウス大脳組織の(1-D)ウェスタン・プロットの結果(図5(A)と図5(B))を示す写真である。

20

【図6】

マウス大脳組織の(2-D)ウェスタン・プロットの結果を示す写真である。

【図7】

マウス大脳組織中(図7(A))、ヒト大脳組織中(図7(B))、ならびにヒトリンパ球中(図7(C))のA P P - C 末端断片の2-Dプロファイルを合成した結果を示す図である。

【図8】

W T および S W マウスの大脳組織、A P P w t および A P P s w を有する非神経細胞系統のウェスタン・プロットの結果を示す写真である。

30

【図9】

A P P w t、A P P s w、変異 P S 1、3 R タウ、または 4 R タウをトランスフェクトした、またはトランスフェクトしていない神経型細胞系統と、ヒト大脳組織とを比較したウェスタン・プロットの結果を示す写真である。

【図10】

ヒトリンパ球の1-D分析結果(図10(A))と2-D分析結果(図10(B))を示す図である。

【図11】

抗 A - N 末端抗体、A P P - C 末端抗体、およびリン依存性 A P P - C 末端抗体による A P P - C 末端断片の同定の結果を示す図である。

40

【図12】

病的な変性のインデックスを示す図である。

【図13】

A P P - C 末端の病的な変性体に対するリン酸化の影響を示す図である。

【図14】

本発明にかかる変異体の一覧表を示す。

【図15】

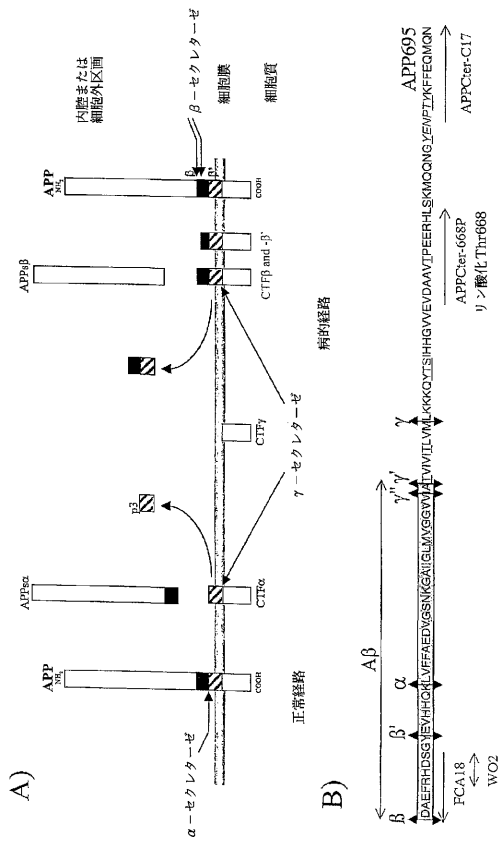
本発明にかかる変異体の一覧表を示す。

【図16】

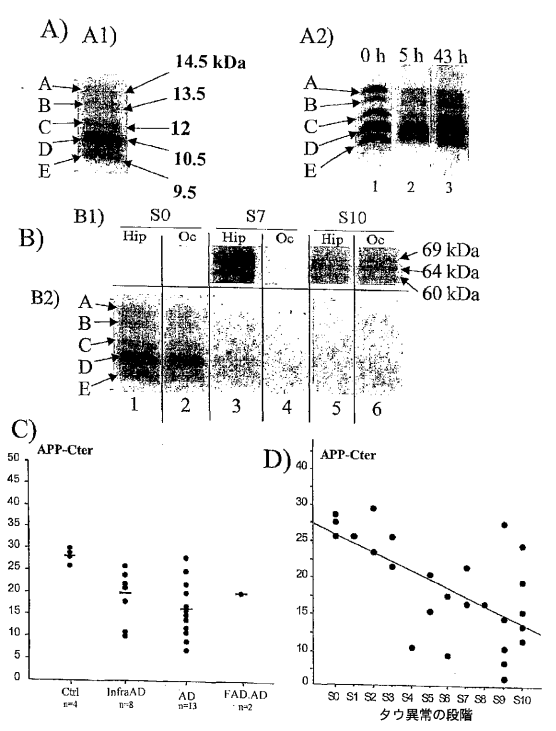
50

本発明にかかる変異体の一覧表を示す。

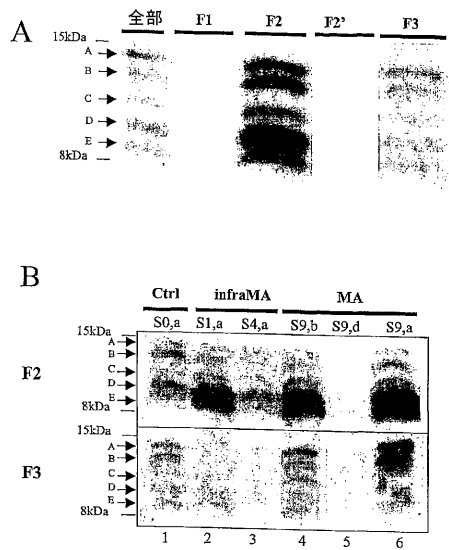
【図1】



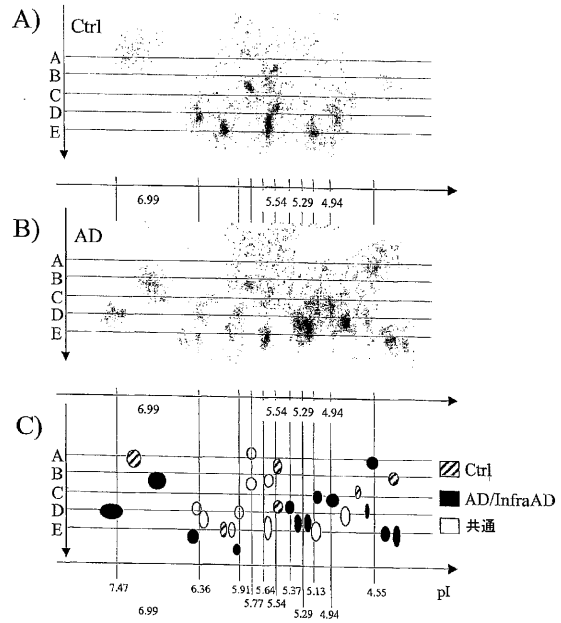
【図2】



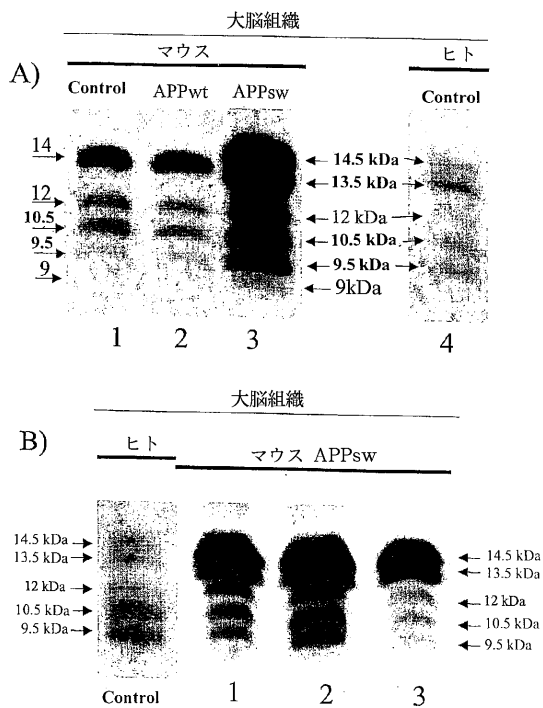
【 図 3 】



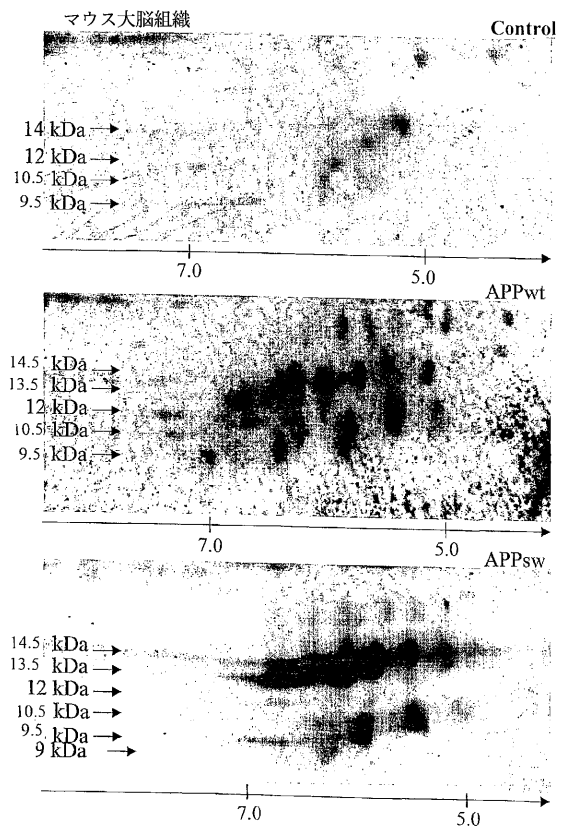
【 図 4 】



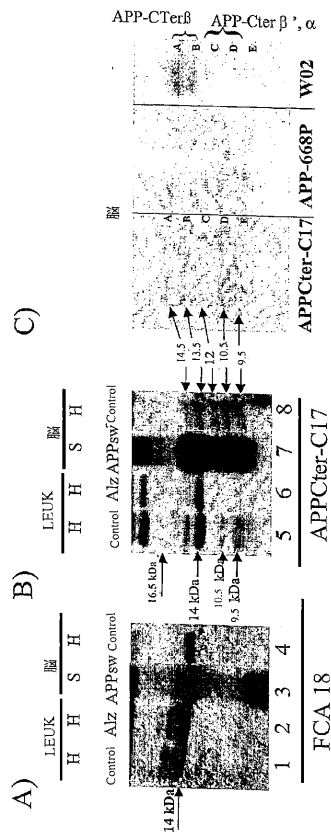
【 図 5 】



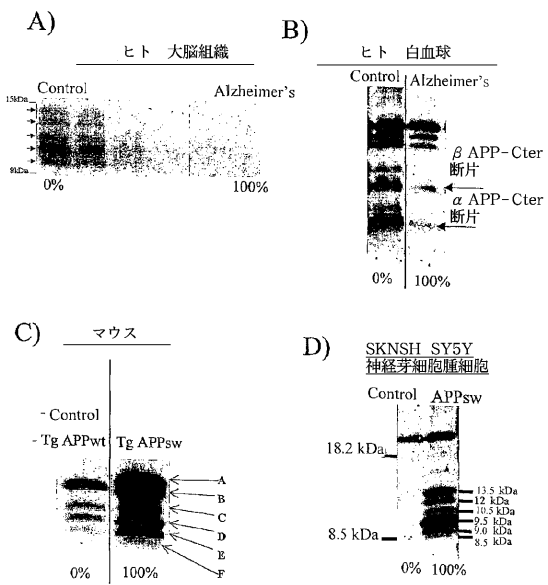
【 図 6 】



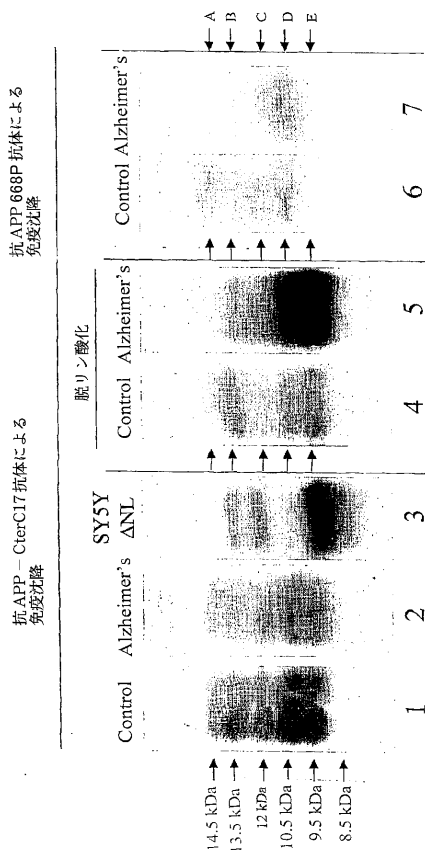
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

アルツハイマー病において消失する APP-Cter 断片				
APP-Cter	分子量	等電点		
A	15.0 kDa		5.37	5.13
	14.5 kDa	5.95	5.64	
B	13.5 kDa		4.94	4.80
	12.7 kDa	5.90	5.29	
アルツハイマー病に特異的な APP-Cter 断片				
APP-Cter	分子量	等電点		
D	11.0 kDa			4.94
	10.5 kDa	7.5	5.35	
E	9.5 kDa		5.77	
アルツハイマー病の前臨床段階ならびにアルツハイマー病とに共通する APP-Cter 断片				
APP-Cter	分子量	等電点		
A	15 kDa			4.55
B	14.0 kDa		5.37	5.2
C	12.7 kDa		5.64	5.45
D	10.5 kDa	6.05	5.91	

【 図 1 5 】

コントロールのヒト白血球の APP-Cter 断片							
APP-Cter	分子量	等電点					
		A	14 kDa			5.45	4.85
C	12.0 kDa		5.64		4.96		
D	10.5 kDa		5.77				
	10 kDa	6.25					
E	9.5 kDa	6.99					
アルツハイマー病のヒト白血球の APP-Cter 断片							
APP-Cter	分子量	等電点					
		A	14.5 kDa			5.45	

【 図 1 6 】

内因性の APP-Cter 断片と相違する、 トランスジェニック・マウスの APP-Cter 断片							
APP-Cter	分子量	等電点					
		A	18 kDa	5.91	5.77	5.54	5.37
17.5 kDa	6.20		5.91				
16 kDa	6.20		5.91	5.64	5.37	5.13	4.55
14.5 kDa			6.80	6.60	6.36	6.20	5.91
13.5 kDa						6.36	6.20
B	13.0 kDa	6.70	6.63	6.40	6.27	6.15	5.10
C	12.0 kDa		7.50	6.20	5.91	5.37	5.00
D	10.5 kDa					7.40	5.37
E	9.5 kDa	6.75	6.63	6.50	6.25	6.15	6.00

【国際公開パンフレット】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle Bureau international



(43) Date de la publication internationale 10 mai 2002 (10.05.2002)

PCT

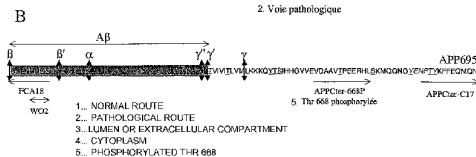
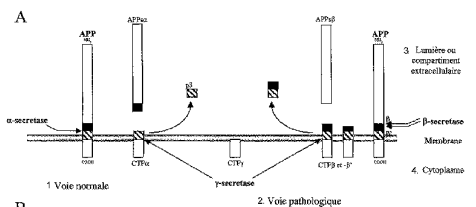
(10) Numéro de publication internationale WO 02/37118 A1

- (51) Classification internationale des brevets⁷: G01N 33/68 RECHERCHE MEDICALE (I.N.S.E.R.M.) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 PARIS CEDEX 13 (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR01/03410 (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : DELACOURTE, André [FR/FR]; 75, rue Gambetta, F-59155 FACHES-THUMESNIL (FR); SERGEANT, Nicolas [FR/FR]; 9 rue J. Jaurès, F-59790 RONCHIN (FR).
- (22) Date de dépôt international : 5 novembre 2001 (05.11.2001)
- (25) Langue de dépôt : français (74) Mandataires : PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet ARMENGAUD AINÉ, 3, Avenue Bugeand, F-75116 PARIS (FR).
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 00/14143 3 novembre 2000 (03.11.2000) FR (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, 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, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI.
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: MEANS FOR DETECTING PATHOLOGICAL TRANSFORMATION OF THE APP PROTEIN AND THEIR USES

(54) Titre : MOYENS DE DETECTION DE LA TRANSFORMATION PATHOLOGIQUE DE LA PROTEINE APP ET LEURS APPLICATIONS



(57) Abstract: The invention concerns a method for detecting, in a sample to be analysed, pathological modifications of the APP protein, characterised in that it consists in using markers consisting of catabolic and/or metabolic fragments of the carboxyl-terminal part of the APP, APP-Cter fragments, specifically modified in neurodegenerative situations wherein the APP participates in the etiology. The invention has diagnostic and therapeutic applications in degenerative pathologies such as Alzheimer disease.

[Suite sur la page suivante]



WO 02/37118 A1

WO 02/37118 A1 

SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

Publiée :
— avec rapport de recherche internationale

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

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

(57) Abrégé : L'invention se rapporte à une méthode pour détecter, dans un échantillon à analyser, des modifications pathologiques de la protéine APP, caractérisée en ce qu'on utilise des marqueurs constitués par des fragments cataboliques et/ou métaboliques de la partie carboxy-terminale de l'APP, fragments APP-Cter, spécifiquement modifiés dans les situations neurodégénératives où l'APP participe à l'étiologie. Application diagnostiques et thérapeutiques de pathologies dégénératives de type Alzheimer.

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

MOYENS DE DETECTION DE LA TRANSFORMATION PATHOLOGIQUE DE LA
PROTEINE APP ET LEURS APPLICATIONS

L'invention se rapporte à des moyens de détection de la
5 transformation pathologique de la protéine APP (pour Amyloid
Precursor Protein) dans des maladies neurodégénératives telle
que la maladie d'Alzheimer.

Elle vise plus particulièrement une méthode de détection
d'une telle transformation, les kits pour sa mise en oeuvre,
10 ainsi que ses applications thérapeutiques et diagnostiques.

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie
neurodégénérative qui conduit à la perte des fonctions
intellectuelles et donc à l'installation progressive et
irréversible d'une démence. L'avenir de cette maladie s'annonce
15 redoutable avec le vieillissement de la population car le
facteur de risque majeur est l'âge.

99% des formes observées sont non-familiales. Pour les
formes familiales autosomiques dominantes, les mutations
pathologiques sont observées sur le gène APP du chromosome 21,
20 et sur les gènes PS1 et PS2 (présénilines 1 et 2) qui se
trouvent sur les chromosomes 14 et 1.

Deux processus dégénératifs caractérisent la maladie
d'Alzheimer. L'amyloïdogénèse, qui résulte d'un
dysfonctionnement de la protéine APP, et la dégénérescence
neurofibrillaire (DNF), qui correspond à l'accumulation de
25 protéine tau dans les cellules nerveuses.

Le dysfonctionnement de la protéine APP est à l'origine même
de la pathologie Alzheimerienne, mais la cause précise de la
dégénérescence et de la mort neuronale ne sont pas encore
30 connues.

Deux hypothèses ont été émises. Selon la première hypothèse,
qui est la plus répandue, le produit de clivage de l'APP, le
peptide A β , de 39 à 43 résidus d'acides aminés, est neurotoxique
et responsable de la réaction en chaîne de DNF.

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

2

Selon la seconde hypothèse, la dégénérescence résulterait d'une perte ou d'un gain de fonction de l'APP, qui se traduirait parallèlement et secondairement par une accumulation du peptide A β sous forme de plaques amyloïdes.

5 La modélisation de l'amyloïdogénèse est possible grâce aux souris transgéniques avec les gènes mutés APP ou APP+PS1. Ces souris développent progressivement des plaques amyloïdes, mais on n'observe pas de DNF. Ces souris sont déjà utilisées par l'industrie pharmaceutique pour tester des molécules capables
10 d'inhiber la formation du peptide A β . La stratégie principale consiste à bloquer les enzymes responsables de la production du peptide A β . Les enzymes de ce type connues à ce jour sont les secrétases β et γ (1).

15 Des molécules se fixant sur les dépôts amyloïdes sont également testées. Il s'agit de casseurs de structures β (β sheet breakers) ou anti- amyloïdes (2).

La vaccination contre le peptide amyloïde est également en cours d'évaluation (3).

20 A l'heure actuelle, aucune modification significative et confirmée de la protéine APP dans le tissu humain affecté par la maladie d'Alzheimer n'a été découverte, autre que l'augmentation de la production du peptide A β 1-42, l'augmentation du rapport A β 1-42/1-40 et son agrégation sous forme de dépôts insolubles et de plaques amyloïdes.

25 Une modification de la sécrétion de la partie N- terminale de l'APP, nommée sAPP, a également été signalée dans des essais *in vitro* testant la mutation 715 sur l'APP (4).

30 Les recherches menées par les inventeurs les ont amené à observer des modifications significatives de la protéine APP qui ne sont pas liées à la détection des peptides A β , et qui sont spécifiquement détectables dans le tissu humain Alzheimerisé et dans les modèles expérimentaux

35 Ces modifications sont mises en évidence dans le tissu humain (système nerveux central, liquides et tissus périphériques) affecté par la maladie d'Alzheimer, ainsi que

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

3

dans d'autres pathologies neurodégénératives avec dysfonctionnement de l'APP.

Les modifications significatives sont à la fois qualitatives et quantitatives et elles sont détectées en amont de la production du peptide A β .

Des anomalies similaires peuvent être retrouvées en grande quantité chez les souris transgéniques avec les mutations pathologiques sur l'APP ou APP mutée + préséniline 1 mutée.

L'invention vise donc l'utilisation de ces modifications observées dans le tissu cérébral humain comme marqueurs dans une méthode de détection de la transformation pathologique de APP, notamment dans un processus neurodégénératif.

Elle vise l'application de ces marqueurs notamment pour le diagnostic et le suivi d'un processus neurodégénératif, la mise au point de modèles animaux et le criblage de médicaments efficaces contre les pathologies de l'APP.

L'invention vise également une méthode d'évaluation desdites pathologies comprenant la définition d'un indice établi par rapport à un référentiel.

La méthode pour détecter, dans un échantillon à analyser, des modifications pathologiques de la protéine APP est caractérisée en ce qu'on utilise des marqueurs constitués par des fragments cataboliques et/ou métaboliques de la partie carboxy terminale de l'APP, appelés ci-après fragments APP-Cter, spécifiquement modifiés dans les situations pathologiques neurodégénératives où l'APP participe à l'étiologie.

Les études réalisées par les inventeurs ont montré que, de manière inattendue, les modifications concernant de tels fragments étaient directement liées à l'installation et à la progression du processus dégénératif dans les régions cérébrales, notamment dans le cas de la maladie d'Alzheimer.

On observera que les fragments en question sont des produits cataboliques et/ou métaboliques de l'APP qui ont conservé la structure primaire de l'extrémité C-terminale de l'APP et seront

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

4

donc reconnaissables par un anticorps dirigé contre cette partie C-terminale de l'APP.

Le terme "fragment" tel qu'utilisé dans la description et les revendications englobe donc les variants de charge et de point isoélectrique différents suite à des modifications post-traductionnelles, comme par exemple la phosphorylation et/ou la méthylation et/ou l'acétylation et/ou la glycosylation, dans la mesure où ces variants sont reconnus par un anticorps anti-APP-Cter comme décrit dans les exemples.

Il s'agit notamment de fragments tels qu'identifiés par analyse biochimique d'un échantillon à analyser, par électrophorèse 1-D (électrophorèse monodimensionnelle) ou 2-D (électrophorèse bidimensionnelle) couplée à une immunoempreinte et révélation par un jeu d'anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux anti-APP-Cter, et en complément par un jeu d'anticorps contre les modifications post-traductionnelles de la transformation pathologique de l'APP-Cter.

L'électrophorèse peut être mono et/ou bidimensionnelle.

De tels fragments sont spécifiquement modifiés dans les tissus pathologiques. On note la diminution, voire la disparition de certains de ces fragments avec la progression du processus neurodégénératif. Parallèlement, on note une modification de la charge électrique de certains de ces fragments et une modification de leur solubilité.

L'invention vise spécialement l'application de cette méthode au diagnostic du processus d'Alzheimérisation et, à ce titre, vise l'utilisation comme marqueurs de dysfonctionnements de l'APP, de 5 fragments majeurs qui sont modifiés au cours de l'Alzheimérisation, dont les poids moléculaires déterminés par électrophorèse monodimensionnelle (1-D) sont de 14,5 ; 13,5 ; 12 ; 10,5 et 9,5 kDa. Par commodité, ces fragments sont désignés par les lettres A, B, C, D, E. Il est à noter qu'une bande de 9 kDa (F) est également présente et une bande de 6,5 kDa, en quantités moindres et variables.

Les variants qui disparaissent correspondent à la bande électrophorétique 1-D de 14,5 kDa, nommée A, dédoublée en deux

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

5

composantes de 15 kDa et 14,5 kDa en 2-D, avec des variants isoélectriques de points isoélectriques de 5,13 (représenté par 15/5,13) et 15/5,37 pour la composante de 15 kDa et de 14,5/5,64 et 14,5/5,95 pour l'autre composante. Il y a également 5 disparition de fragments correspondant à la bande électrophorétique B de 13,5 kDa qui est dédoublée en deux composantes de 13,5 et 12,7kDa, avec les variants isoélectriques 13,5/4,94 et 12,7/4,8; 12,7/5,29.

Des fragments d'intérêt sont également modifiés en phase 10 précoce de la maladie d'Alzheimer. Ils correspondent aux variants électrophorétiques 15/4,55; 14/5,2; 14/5,37; 12,7/5,45; 12,7/5,64; 10,5/5,91; 12,7/6,05. Ces variants sont particulièrement informatifs dans la mesure où ce sont des marqueurs précoces.

15 Les fragments qui apparaissent au cours de l'Alzheimérisation correspondent à la bande électrophorétique 1-D de 10,5 kDa, dédoublée en deux composantes de 11 kDa et 10,5 kDa en 2-D, avec des variants isoélectriques 11/4,94; 10,5/5,35 et 10,5/7,5 et le fragment de 9,5 kDa et de pI 5,77.

20 Parallèlement, des modifications de solubilité des marqueurs APP-Cter sont également observées au cours de l'évolution du processus pathologique de neurodégénérescence. Les fragments de 14,5 et 13,5 voient leur solubilité diminuer et les fragments de 10,5 et 9,5 voient leur solubilité augmenter au cours de 25 l'Alzheimérisation du tissu cérébral.

De tels fragments sont modifiés dans les tissus ou cellules dits alzheimérisés. Ils peuvent être modifiés d'une manière 30 similaire dans des modèles expérimentaux, tels les animaux transgéniques portant un gène ou une combinaison de gènes mutés ou non mutés, impliqués dans la pathologie d'Alzheimer.

On notera avec intérêt que ces différences de catabolisme et de métabolisme de la protéine APP, tels qu'observés avec les 35 marqueurs APP-Cter, sont observées dans les modèles cellulaires neuronaux (par exemple les cellules de neuroblastome comme la souche SKNSH SY5Y, la souche NT2, la souche Kelly), les souches de glioblastome (CCF, U118, T98) mais également dans des

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

5

cellules non neuronales, comme les souches CHO, COS, HT-29, et HeLa.

On notera également que chaque lignée cellulaire possède naturellement un patron d'expression de ces fragments qui lui est propre (variation de la quantité globale des fragments de masse moléculaire 13,5 ; 12 ; 10,5 ; 9,5 ; 9 ; 8,5 et 6,5 kDa exprimés par rapport aux protéines totales du modèle cellulaire; variations du rapport entre chaque fragment.

Pour ces modèles, et d'une manière spécifique à chaque modèle, l'expression des fragments A-F est également modifiée en fonction de l'état de différenciation des souches cellulaires.

Ces variations sont également observées dans les modèles animaux, notamment dans les souris transgéniques avec les différentes constructions possibles (mutations APP et/ou mutations PS1 ou PS2 et/ou absence d'expression de PS1) et/ou gène tau muté ou non muté (14,5 ; 13,5 ; 12 ; 10,5 ; 9,5 ; 9 ; 8,5 et 6,5 kDa).

Les échantillons à analyser utilisés dans ladite méthode comprennent donc aussi bien des tissus ou des souches cellulaires neuronales, que des tissus ou des souches cellulaires non neuronales, par exemple les liquides biologiques comme le liquide céphalo-rachidien, le sang et tout ou partie de ses éléments figurés, ce qui facilite un diagnostic précoce, l'évaluation de facteurs de risque chez un patient ou le suivi thérapeutique.

Ces tissus sont avantageusement homogénéisés ou fractionnés, par exemple par centrifugation, en vue de leur mise en oeuvre dans la méthode de détection.

La méthode ci-dessus s'applique également au diagnostic différentiel de pathologies neurodégénératives voisines de la maladie d'Alzheimer, comme la démence à corps de Lewy ou les angiopathies amyloïdes.

La méthode de détection définie ci-dessus permet de définir un indice de transformation de la protéine APP en protéine pathologique.

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

7

L'invention vise en particulier une méthode d'évaluation d'un processus pathologique neurodégénératif dans un échantillon à analyser, par analyse immuno-chimique, comme décrit dans les exemples, caractérisé en ce qu'on affecte un indice aux fragments identifiés dans l'échantillon étudié, par rapport à un référentiel où l'indice 0 (zéro) correspond à la détection dans le tissu sain et l'indice 100 (cent) dans le tissu pathologique, qu'il soit humain, de souris transgéniques avec des mutations des gènes incriminés dans la pathologie Alzheimer, ou de souches cellulaires natives ou transfectés avec lesdits gènes.

Un tel indice présente un avantage en diagnostic et en thérapeutique. Il permet de refléter rapidement l'état pathologique. La valeur de l'indice permet en effet de déterminer s'il existe un risque de développement de la maladie d'Alzheimer. L'obtention d'un indice élevé peut aider à conforter un diagnostic clinique.

En outre, dans le cadre d'un traitement thérapeutique basé sur le catabolisme et le métabolisme de l'APP ou sa correction, les modifications d'un tel indice permettront de suivre l'effet du traitement.

Il constitue une référence permettant de comparer l'effet de différentes molécules contre la maladie d'Alzheimer ou autres pathologies neurodégénératives, une modification de l'indice démontrant l'efficacité des molécules testées et les potentialités de leur intérêt thérapeutique.

L'utilisation d'un tel indice présente également un intérêt pour disséquer les événements étiologiques précoces responsables de la maladie, et aboutir à la découverte de nouvelles molécules efficaces, ainsi qu'au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

On notera également que cet indice peut être utilisé pour ralentir ou même pour induire une dégénérescence pour établir de nouveaux modèles expérimentaux. Cet indice peut aussi fournir des informations permettant de provoquer une dégénérescence ciblée dans le cadre d'actions thérapeutiques nécessitant de provoquer la disparition d'une population cellulaire précise.

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

8

La méthode selon l'invention peut avantageusement utiliser en complément un jeu d'anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux afin de révéler des modifications post-traductionnelles de la transformation pathologique des fragments APP-Cter, en particulier une modification de type phosphorylation, et/ou méthylation et/ou acétylation et/ou glycosylation.

Préférentiellement, le jeu d'anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux utilisé permet de révéler les phosphorylations et la variation d'expression des fragments de 14,5 ; 12 et 10,5 kDa.

La méthode de détection selon l'invention est avantageusement utilisable pour établir et valider des modèles expérimentaux, cellules ou modèles animaux de la maladie d'Alzheimer. Les modèles pertinents reproduiront les modifications des fragments APP-Cter tels qu'observés dans le tissu humain, comme décrit dans les exemples.

Elle permet également d'aider à la mise en place d'essais thérapeutiques efficaces en améliorant la sélection des patients.

Une autre application de grand intérêt concerne le criblage pharmacologique pour la sélection de médicaments efficaces contre les pathologies neurodégénératives de type Alzheimer. Ainsi, les molécules sélectionnées sont caractérisées en ce qu'elles sont capables de modifier le profil Alzheimer évoqué ci-dessus, en conduisant à une restauration des propriétés des marqueurs APP-Cter, ou à une restauration de leurs propriétés physico-chimiques (solubilité, charge électrique).

L'invention permet ainsi de réaliser un criblage pharmacologique rapide et pertinent de molécules d'intérêt.

L'invention vise également un kit de diagnostic de la transformation pathologique de APP, caractérisé en ce qu'il comprend un jeu d'anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux dirigé contre la région carboxy-terminale de l'APP. L'utilisation d'un jeu d'anticorps dirigé contre les modifications post-traductionnelles liées à la transformation pathologique située sur des fragments APP-Cter, comme par exemple des sites de phosphorylation, méthylation, acétylation ou de glycosylation

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

9

sur ces fragments, pourra avantageusement apporter des informations complémentaires sur la mise en évidence et la quantification de la transformation pathologique des fragments APP-Cter.

5 L'hétérogénéité des fragments APP-Cter démontrée par les électrophorèses 2D est expliquée en partie par les modifications de phosphorylation, comme le démontre un anticorps polyclonal phospho-dépendant dirigé contre la thréonine 668 phosphorylée (nomenclature avec l'APP 695), située dans une région commune
10 aux fragments APP-Cter.

Elles résultent également de glycosylation, comme le montre les drogues anti-glycosylation qui modifient le profil des fragments APP-Cter. La méthylation et l'acétylation sont deux modifications post-traductionnelles qui sont également
15 impliquées dans la transformation pathologique des fragments APP-Cter. En effet, elles sont localisées essentiellement sur des résidus lysine, ce qui provoque une acidification et donc un changement de point isoélectrique.

Elles sont également la résultante d'un contrôle par des
20 gènes impliqués dans la maladie d'Alzheimer. C'est ainsi que la surexpression de la protéine Tau est capable d'influencer le rapport des bandes de 13,5 ; 9,5 et 6,5 kDa.

Ces anticorps sont utilisables dans un dosage immuno-chimique par exemple en ELISA, Western blot, dot blot. Les kits
25 selon l'invention renfermeront donc avantageusement les éléments nécessaires pour la réalisation de tels dosages.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent, avec référence aux figures 1 à 16, qui représentent, respectivement,

30 - le schéma théorique de coupure des fragments APP-Cter et localisation des épitopes des anticorps utilisés (figure 1)
- les photos d'empreintes Western de
. tissu cérébral humain (1-D) (figures 2A à 2B), et dosage des fragments APP-Cter (fig 2C et 2D).
35 . fractionnement du tissu cérébral humain (figure 3A et 3B)
. tissu cérébral humain (2-D) (figures 4A à 4C),

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

10

- . tissu cérébral de souris transgéniques (1-D) (figures 5A et 5B),
- . tissus cérébral de souris (2-D) (figure 6),
- une synthèse des profils 2-D de fragments APP-Cter dans les
- 5 souris, le tissu cérébral humain et les lymphocytes humains (respectivement figures 7A, 7B, 7C),
- les photos d'empreintes Western de
- . tissu cérébral de souris WT et SW, des souches cellulaires non-neuronales avec APP wt et sw (figure 8),
- 10 . comparaison du tissu cérébral humain avec les souches cellulaires de type neuronal transfectées ou non avec APP wt, sw, P81 muté, Tau 3R ou 4R (figure 9),
- . lymphocytes humains : analyses 1-D et 2-D (figures 10A et 10B),
- 15 - la caractérisation des fragments APP-Cter avec des anticorps anti-A β -N-terminal, APP-Cter et un anticorps APP-Cter phospho-dépendant (figure 11)
- l'indice de transformation pathologique (figures 12 A à D)
- l'influence de la phosphorylation sur la transformation
- 20 pathologique des APP-Cter (figure 13)
- des tableaux récapitulatifs des variants selon l'invention (figures 14 à 16).

MATERIELS ET METHODES

25 Anticorps

Production de l'anticorps polyclonal APP-Cter-C17

- Un anticorps polyclonal dirigé contre la partie carboxy-terminale de l'APP a été produit selon le protocole d'immunisation décrit par Vaitukaitis et al, (5). Des lapins New
- 30 Zealand ont été immunisés avec un peptide comprenant les 17 derniers acides aminés de la séquence de l'APP humaine, correspondant à son extrémité carboxy-terminale. Le peptide a été couplé par covalence à l'ovalbumine. 200 μ g d'immunogène ont été injectés toutes les deux semaines. Avant l'injection, la
- 35 solution d'immunogène a été complétée avec 1 volume d'adjuvant

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

11

complet de Freund lors du 1er rappel et lors des rappels suivants, avec de l'adjuvant incomplet de Freund à la place de l'adjuvant complet. Le sang a été prélevé une semaine après la 4ème injection et une semaine après chaque injection suivante.

- 5 Le sérum pur a été obtenu après coagulation du sang et centrifugation 10 min à 2000g. On a ajouté au sérum pur 1 volume de glycérol et on a conservé le mélange à -20°C.

Purification de l'anticorps APP-Cter-C17

- 1 mg de peptide utilisé pour l'immunisation a été couplé à une
10 matrice NHS-Fast Flow Sepharose® (Amersham-Pharmacia Biotech) suivant les instructions du fabricant. On a mis en contact la matrice couplée avec 200 µl de sérum pur dilué dans un volume de tampon de liaison 2X (50 mM Tris pH 8,0 ; 300 mM NaCl et 0,1 % (v/v) de Tween-20) et on a agité doucement jusqu'au lendemain à
15 4°C. On a fait passer la totalité des solutions sur une colonne PD-10. On a lavé la matrice avec 10 volumes de tampon de liaison. L'anticorps purifié a été élué avec 2 volumes de tampon acétate à pH 3,5. La concentration en protéine a été déterminée à l'aide du kit de quantification de protéine BCA de Pierce.

20

Production de l'anticorps polyclonal APP-668P

- Un anticorps dirigé contre un peptide synthétique correspondant à la séquence Val-Asp-Ala-Ala-Ala-Val-Thr(phosphorylé)-Pro-Glu-
25 Glu-Arg-His-Leu a été produit, en suivant le même protocole que celui utilisé pour l'APP-Cter-C17. Cet anticorps reconnaît l'immunogène, mais il ne reconnaît pas un peptide ayant la même séquence, mais non phosphorylé.

30 Echantillons

Echantillons de tissu cérébral humain et murin

- Le tissu cérébral humain provient de patients qui ont été suivis prospectivement, et décrits dans (6). Les échantillons de tissu
35 cérébral, obtenus après autopsie ou biopsie et conservés à -

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

12

80°C, ont été disséqués à l'aide d'un atlas anatomique, puis homogénéisés avec un potter en Téflon® dans 10 volumes de tampon de lyse 1-D 1X (50 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 4mM EDTA ; 5% (p/v) de SDS, 10 % (v/v) de glycérol, 2 % (v/v) de β -mercaptoéthanol et 0,05% Bleu de Bromophénol) pour une analyse 1-D. Les échantillons ont été portés à 100°C pendant 10 minutes puis maintenus à -80°C jusqu'à leur utilisation. Pour une analyse 2-D, le tissu est homogénéisé dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 6,8, puis complété avec un volume de tampon 2-D 2X (7M urée ; 2M thiourée ; 0,4% Pharmalytes® 3-10 (p/v) ; 8% (v/v) Triton X-100 ; 10 mM de dithiothréitol ; 0,1% Bleu de Bromophénol) et stocké à -80°C jusqu'à utilisation. Pour les échantillons de tissu cérébral de rongeur, le cerveau a été prélevé rapidement après la mort de l'animal et traité de la même manière que les échantillons humains.

Lignées murines utilisées.

On a préparé des échantillons de tissu cérébral murin en suivant le même protocole que pour les échantillons de tissu cérébral humain. On a utilisé des échantillons de tissu cérébral de souris non transgéniques et de souris transgéniques avec le gène APP humain de type sauvage (APPwt) ou le gène humain APP muté aux codons 670 et 671 (APPsw). Cette mutation de l'APP est liée à une forme familiale de la maladie d'Alzheimer, appelée mutation suédoise(7). D'autres échantillons ont été également utilisés, comprenant des souris non transgéniques, et différentes lignées de souris transgéniques avec le gène APPwt et APPsw. On a également utilisé un échantillon de tissu cérébral murin similaire à la souris transgénique développée par Hsiao K. et al. (8).

Echantillons de tissu cérébral après fractionnement protéique

Les échantillons de tissu cérébral ont été homogénéisés selon un ratio 1/10 (p/v) dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 6,8 puis

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

13

centrifugés à 100 000 g pendant 1 heure à 4°C. Le surnageant (F1) a été conservé et le culot ré-homogénéisé dans le même tampon complété avec 0,5 % (v/v) de Triton X-100. Après centrifugation, la fraction Triton X100 soluble, nommée fraction F2, est stockée. Une étape supplémentaire d'extraction et de centrifugation dans le même tampon a été effectuée dans les mêmes conditions, ce qui donne la fraction F2'. Le culot est ensuite directement repris dans le tampon de lyse 1-D (voir ci-dessous) et correspond à la fraction F3.

10 Selon la technique biochimique utilisée, on a ajouté aux surnageants, au moment de l'utilisation, les tampons correspondants: 1 volume de tampon de lyse 1-D 2X (100 mM Tris-HCl pH 6,8 ; 8mM EDTA ; 10% (p/v) de SDS ; 20 % (v/v) de glycérol ; 4 % (v/v) de β -mercaptoéthanol et 0,1% Bleu de Bromophénol) pour une étude par électrophorèse monodimensionnelle (1-D) ou 1 volume de tampon de lyse 2-D (7M urée ; 2M thiourée ; 0,4% Pharmalytes® 3-10 (p/v) ; 4% (v/v) Triton X-100 ; 10 mM de dithiothréitol ; 0,1% Bleu de Bromophénol) pour une étude par électrophorèse bidimensionnelle (2-D).

15
20

Immunoprécipitation

La fraction F2 est utilisée pour immunoprécipiter les fragments APP-Cter. 100 μ l de la fraction F2 sont dilués dans 25 300 μ l de tampon Tris 10 mM pH 7,4 contenant 1% de NP-40 (Tampon d'immunoprécipitation). 10 μ l d'anticorps APP-CterC17 ou APP668P sont ajoutés et l'ensemble est incubé sous agitation durant la nuit à 4°C. 40 μ l de protéine A fixée sur des billes d'agarose (Pierce) sont ajoutés à la solution et l'ensemble est incubé 30 sous agitation à 4°C pendant une heure. Les billes d'agarose sont lavées trois fois dans le tampon d'immunoprécipitation puis les fragments APP-Cter sont décrochés par un traitement avec 50 μ l de tampon SDS et récupérés dans le surnageant de centrifugation. Les fragments APP-Cter sont ensuite analysés par 35 immuno-empreinte après électrophorèse en gel Tris-Tricine.

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

14

Echantillons de cultures cellulaires CHO
(hamster) ou SKNSH SY5Y (humain)

Les cellules sont transfectées de manière stable avec le gène
5 APP humain de type sauvage ou le gène APP humain portant la
mutation suédoise. Le culot de cellules a été repris dans un
tampon Tris-HCl 10mM pH 6,8 puis passé aux ultrasons. Avant
utilisation, l'échantillon est complété avec 1 volume de tampon
de lyse correspondant à l'expérience (1-D ou 2-D) 2X. Dans le
10 cas d'une analyse 1-D, l'échantillon est porté 10 min à 100°C.

Echantillons de globules blancs humains

Préparation des globules blancs humains: 10 millilitres de sang
sont collectés dans des tubes EDTA (tétra-acétate d'éthylène
15 diamine). On procède à une centrifugation à 4500 rpm (rotation
par minute) pendant 15 minutes. Le plasma est éliminé. Le tube
est rempli au deux tiers d'une solution de lyse des globules
rouges (solution de lyse : NH_4CO_3 0,91 mM et NH_4Cl 0,132 mM). On
agite délicatement le tube et il est placé au bain-marie
20 réfrigéré à 5°C. On procède à une centrifugation à 4000 rpm
pendant 15 minutes et le surnageant est éliminé. Le culot de
globules blancs est rincé deux fois avec la solution de lyse
suivant la même méthodologie. Le culot est ensuite égoutté et,
il est soit utilisé dans les 24 heures, soit congelé à -20°C
25 pour son transport ou son utilisation ultérieure.

Le culot de globules blancs est repris dans un tampon Tris-HCl
10mM pH 6,8 puis passé aux ultrasons. Avant utilisation,
l'échantillon est complété avec 1 volume de tampon de lyse 2X
correspondant à l'expérience (1-D ou 2-D). Dans le cas d'une
30 analyse 1-D, l'échantillon est porté 10 min à 100°C.

Techniques Electrophorétiques

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

15

Electrophorèse 1-D

Les expériences ont été réalisées à l'aide du système d'électrophorèse Protean IIXi Cell (Biorad) selon les instructions du fabricant.

5

Les électrophorèses 1-D ont été réalisées selon les protocoles décrits par Laemmli (9) pour la fabrication du gel et dans les conditions de migrations décrits par Schägger et Von Jagow (10). Le gel de concentration contient 4% d'acrylamide et le gel de séparation utilisé contient 16,5% d'acrylamide. La migration se fait en tampon Tris-Tricine. Le programme de migration utilisé est le suivant : 1h à 30V constant puis 16h à 45mA . On a chargé une quantité équivalente de protéine dans chaque puit (environ 100 µg/puit) ;

15

Electrophorèse 2-D1^{ère} dimension

La première dimension ou focalisation est réalisée à l'aide des bandelettes de gels pré-coulés nommées IPG-Strip® couvrant un gradient de pH 3-10, selon les instructions du constructeur. Le matériel utilisé pour l'isoélectrofocalisation est le système IEF Protean Cell (Biorad) .

20

Une quantité de 250 µg de protéines est complétée avec du tampon de réhydratation 1X (7M urée, 2M thiourée, 4% triton X100; 0,5% CHAPS; 0,2 % (p/v) de Pharmalytes® pH 3-10; 10mM DTT; 0,01% orange G) pour avoir 400µl à déposer. Les 400µl d'échantillons sont déposés sur les bandelettes placées dans l'appareil. On laisse réhydrater passivement 1 h puis activement 10h à 50V/bandelette puis on lance le programme selon les instructions du fabricant. Après la focalisation, les bandelettes sont utilisées ou conservées à -80°C.

30

2^{ème} dimension

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

16

Avant utilisation, les bandelettes sont équilibrées pendant 30 minutes dans un tampon pour 1-D (50 mM Tris pH 6,8 ; 10 % (v/v) de glycérol ; 2 % (v/v) de β -mercaptoéthanol ; 2 % (p/v) de SDS ; 0.05% (p/v) bleu de bromophénol) puis déposées sur le haut d'un gel de séparation pour 1-D de 16,5% acrylamide. On recouvre la bandelette avec une solution d'agarose 1% (p/v). La suite est identique à une simple électrophorèse 1-D.

Transfert sur membrane et Immunoempreinte

10

Transfert

Le transfert a été effectué en utilisant le système de transfert semi-sec Pharmacia LKB multiphor® en suivant les instructions du fabricant (Amersham-Pharmacia Biotech). Les protéines ont été transférées à 0,8 mA/cm² sur une membrane de nitrocellulose Hybond® ECL (Pharmacia-Amersham).

Immunoempreinte

La membrane est incubée 60 min. dans du tampon (Tris 15 mM pH 8,0 ; NaCl 150 mM ; 0,5 % (v/v) de Tween®-20) contenant 5% (p/v) de lait écrémé puis lavée avec le même tampon exempt de lait contenant 0,1% de Tween®-20 au lieu de 0,5%.

La membrane est incubée, 2h à température ambiante ou 1 nuit à 4°C, avec l'anticorps APP-Cter-CL7 dilué au 1/2000ème (v/v) final dans un tampon d'incubation (15 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) de Tween-20 et 3 % (p/v) de lait écrémé).

La membrane est lavée 3 fois pendant 10 minutes dans le tampon d'incubation exempt de lait.

La membrane est ensuite incubée, 1h à température ambiante, avec une immunoglobuline de chèvre anti-lapin couplée à la peroxydase de raifort, à une dilution finale de 1/4000ème (v/v) dans du tampon d'incubation exempt de lait.

La membrane est lavée 3 fois pendant 10 minutes dans du tampon d'incubation exempt de lait et les polypeptides immunoréactifs sont révélés à l'aide du kit de chimiluminescence ECL®

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

17

(Pharmacia-Amersham Biotech) selon les instructions du fabricant.

5

RESULTATS

L'analyse théorique des coupures cataboliques et/ou métaboliques de l'APP est présentée dans la figure 1A et la localisation des épitopes des anticorps utilisés sur la figure 1B.

10 Analyse 1-D du tissu cérébral humain

Des échantillons de tissu cérébral humain, préparés comme décrit dans la méthodologie pour une analyse 1-D, ont été chargés et analysés. La séparation électrophorétique a eu lieu en condition 15 Tris-Tricine comme décrit. Des marqueurs de poids moléculaires calibrés (Biorad) ont été déposés en parallèle afin de déterminer la masse moléculaire des fragments grâce au logiciel ImageMaster® 1-D Elite (Amersham-Pharmacia Biotech).

Un transfert des protéines séparées par électrophorèse et une 20 immunoeempreinte avec l'anticorps APP-Cter-C17 ont été réalisés comme décrit. Les résultats sont représentés sur la figure 2, A1.

Analyse du tissu normal.

25 Dans le tissu cérébral humain témoin, cinq bandes nommées A, B, C, D et E de masses moléculaires apparentes A 14,5 kDa ; B 13,5 kDa ; C 12 kDa ; D 10,5 kDa ; E 9,5 kDa sont révélées par l'anticorps polyclonal APP-Cter-C17. Elles sont détectées aussi bien dans la biopsie de tissu cérébral humain que dans le tissu 30 cérébral post-mortem d'un sujet témoin (figure 2, A2; piste 1: biopsie; pistes 2 et 3: autopsie). Le délai post-mortem est indiqué en heure pour chacun des échantillons. On peut noter que le profil des fragments n'est pas modifié au cours du délai post-mortem. Les 5 fragments ne résultent donc pas d'une 35 activité enzymatique catabolique pouvant se produire après la mort.

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

18

Analyse du tissu de patients à différents stades de la maladie d'Alzheimer.

A) Diminution de la quantité de fragments APP-Cter au cours de l'Alzheimérisation

La figure 2B représente l'analyse, sur les mêmes échantillons et les mêmes immunoempreintes, de la pathologie tau selon la classification de Delacourte et al, 1999 (figure 2, B1) et des fragments APP-Cter (figure 2, B2) chez un sujet témoin (Pistes 1 et 2) et deux patients atteints de la maladie d'Alzheimer (pistes 3 à 6). Deux régions cérébrales ont été étudiées: l'hippocampe (Hip, pistes 1, 3 et 5) et le cortex occipital (Oc, pistes 2, 4 et 6). On note une diminution des fragments APP-Cter au cours de la maladie. Cette disparition est corrélée à la sévérité de l'atteinte neurodégénérative. En effet, on peut noter que les fragments APP-Cter disparaissent (figure 2, B2) dans les régions touchées par la pathologie tau, visualisée par la présence du triplet de protéines tau pathologiques de 69, 64 et 60 kDa (figure 2, B1) (Delacourte et al, (6)).

Un étude statistique, sur un grand nombre de patients, montre l'excellente corrélation entre l'avancée du processus pathologique, révélée par les stades de pathologie tau, et la diminution de la quantité de fragments APP-Cter dans les échantillons de tissu cérébral étudié.

Les quantités d'APP-Cter ont été déterminées dans le cortex de 4 groupes de patients: les cas témoins (Ctrl), les cas infracliniques (infrAMA) qui correspondent à des patients non-déments, mais avec les lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, les cas cliniques de maladie d'Alzheimer (MA) et les cas familiaux autosomiques dominants de maladie d'Alzheimer (FAD.MA) (figure 2, C). Le test statistique non-paramétrique de Mann-Whitney indique une diminution significative entre les groupes infrAMA et MA par rapport aux témoins Ctrl (infrAMA: $p < 0.03$; MA $p < 0.002$). La diminution moyenne des APP-Cter est de

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

19

1.5 fois pour le groupe infraMA et 1.7 fois pour le groupe MA, par rapport au groupe témoin. La diminution des APP-Cter dans les groupes infraMA et MA n'est pas significativement différente. Ceci démontre que cette diminution de APP-Cter est un événement précoce de la physiopathologie Alzheimer.

L'étude statistique de la relation entre les niveaux d'expression des APP-Cter par rapport aux stades de la pathologie tau dans le cortex temporal des patients témoins et à différents stades de la maladie d'Alzheimer a été effectuée (figure 2, D). Une relation significative est observée entre les quantités d'APP-Cter détectées dans le cortex de chaque patient étudié et les différents stades de la pathologie tau, aussi bien dans le cortex temporal que dans le cortex occipital.

Régression
linéaire

	n	r	p
cortex temporal	26	0,614	0,0009
cortex occipital	22	0,457	0,0324

15 B) Transformation des fragments APP-Cter au cours du processus d'Alzheimérisation

Les fragments APP-Cter sont extraits préférentiellement dans deux phases: une solution tampon contenant un détergent non-ionique, le Triton X100 (Fraction F2), et une solution contenant un détergent ionique, le sodium dodecyl sulfate (SDS) (F3) (figure 3, A).

Il est observé des variations différentielles de solubilité des fragments APP-Cter au cours de l'Alzheimerization du tissu cérébral (figure 3B). On note une augmentation de la solubilité des fragments APP-Cter de masse moléculaire de 9,5 (fragment E) et 10,5 kDa (fragment D) dans la fraction F2 et une augmentation de l'insolubilité des fragments APP-Cter de masse moléculaire de 13,5 (fragment B) et 14,5 kDa (fragment A) dans la fraction F3.

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

20

Analyse 2-D du tissu cérébral humain normal et pathologique

Les résultats sur 3 patients sont présentés sur la figure 4 (A à C)

5 - un patient témoin, sans lésions cérébrales de type Alzheimer (Stade 0 de Delacourte et al, (6)) (figure 4A)

- un patient au tout début de la phase clinique de maladie d'Alzheimer, au stade 6 de Delacourte et al (6) (figure 4B).

Les flèches indiquent les spots détectés par l'anticorps polyclonal APP-Cter-C17. Leurs masses moléculaires sont similaires à celles observées sur les immunoprintes 1-D. Les points isoélectriques sont compris dans la gamme de pH de 4,5 à 7,5.

On peut noter une modification de la répartition des spots au cours du développement de la maladie d'Alzheimer (figure 4, C).

Les patients à un stade plus avancé de la maladie d'Alzheimer n'ont pas pu être étudiés par cette approche, puisque les fragments ne sont plus détectables.

Les variants APP-Cter détectés par analyse 2D sont représentés schématiquement (figure 4, C) sur une grille calibrée en deux dimensions, l'axe des Y représentant les masses moléculaires et l'axe des X les points isoélectriques. L'ensemble a été étalonné avec des témoins internes de masse moléculaire et de point isoélectrique. Les témoins de points isoélectriques sont la gamma-énolase (47/4,94), l'alpha-actine (42/5,29) et l'alpha-énolase (47/6,99). Les points isoélectriques à 5,54 et 8,05 sont des standards internes du tissu cérébral.

Le schéma de la figure 4, représente la superposition des profils 2D des fragments APP-Cter détectés avec l'anticorps APP-Cter-C17 dans le tissu cérébral humain d'un sujet témoin et de patients Alzheimer au stade infraclinique de la maladie et au début du stade clinique de la maladie d'Alzheimer. Les spots, c'est à dire les différents variants isoélectriques de 2-D, observés à la fois dans le tissu sain et pathologique sont représentés par des cercles vides. Les spots spécifiques du

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

21

tissu sain sont représentés par des cercles avec fond hachuré et ceux spécifiques du tissu Alzheimerisé par un fond noir.

Les valeurs des masses moléculaires et des points isoélectriques des spots modifiés au cours de la pathologie Alzheimer sont reportés dans le tableau 1.

Analyses 1-D du tissu cérébral murin

Afin de mieux caractériser la spécificité du catabolisme et/ou du métabolisme de l'APP humain, les produits APP-Cter ont été analysés (de la même manière que dans le tissu cérébral humain) chez un rat et des souris non transgéniques mais également chez des souris transgéniques pour le gène de l'APP humain sauvage (APPwt) ou portant la mutation suédoise (APPsw). La figure 5A représente l'immunomarquage des fragments APP-Cter des souris témoins, et transgéniques, comparé au profil du tissu cérébral humain (figure 5A, piste 4).

Des dépôts identiques d'homogénats de tissu cérébral ont été déposés dans chaque puit d'électrophorèse. Les fragments APP-Cter ont été détectés avec l'anticorps polyclonal APP-Cter-C17. La piste 1 de la figure 5 correspond à l'analyse de la souris non transfectée (contrôle négatif), la piste 2 correspond à la souris avec une seule copie du gène humain APPwt, la piste 3 correspond à la souris transgénique avec le gène muté humain APPsw et la piste 4 correspond à du tissu cérébral humain témoin. Les flèches indiquent les masses moléculaires des bandes électrophorétiques détectées.

On peut noter que les souris témoins ou avec une seule copie du gène APPwt synthétisent essentiellement 4 fragments APP-Cter, tandis que les souris avec le gène APPsw et le tissu cérébral humain normal synthétisent 5 fragments APP-Cter, de masse moléculaire de 14,5 ; 13,5 ; 12 ; 10,5 et 9,5 kDa.

Ces résultats ont été vérifiés sur 5 souris non transgéniques, 2 souris transgéniques avec le gène APP humain de type sauvage et 5 souris transgéniques avec le gène APPsw.

On rapporte sur la figure 5B, piste 1 à 3, les résultats de l'immunoempreinte avec l'anticorps APP-Cter-C17 sur différentes

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

22

lignées de souris transgéniques APPsw (fig 5B piste 1 à 3) parmi lesquelles on trouve (piste 3) la lignée APPsw de référence décrite par Hsiao et al., (8). Les souris transgéniques APPsw possèdent dont systématiquement un profil particulier, tel que décrit ici.

Analyse 2-D des fragments APP-Cter du tissu cérébral de souris

On opère comme décrit pour le tissu cérébral humain (figure 4). Il est ainsi possible de caractériser les différents variants observés chez les souris Témoin (figure 6A), APPwt (figure 6B) et APPsw (figure 6C). On peut noter l'augmentation de l'expression des variants pour les souris APPsw et une modification du profil pour certains variants (figure 6). Les valeurs de masse moléculaire et de point isoélectrique sont reportées dans la figure 7A et le tableau 3.

Analyse 1-D des modifications de l'APP humain dans des modèles cellulaires

- modèles non neuronaux

Des cellules CHO (Chinese Hamster ovarian), transfectées de façon stable avec le gène APP humain de type sauvage (APPwt) ou le gène APPsw, ont été analysés selon le protocole décrit. Les résultats de la figure 8 montrent les fragments APP-Cter des cellules CHO, comparativement au tissu cérébral de souris transgéniques avec le gène APPwt ou APPsw.

Dans les cellules CHO APPwt (figure 8, piste 3), 6 bandes de masses moléculaires apparentes 16 ; 14,5 ; 13,5 ; 12 ; 10,5 et 9,5 kDa sont détectées. Les bandes majeures sont les bandes à 16 ; 14,5 ; 13,5 et 9,5 kDa. Dans les cellules CHO APPsw (figure 8, piste 4), on observe une diminution du signal global surtout des fragments de 16 ; 13,5 et 9,5 kDa.

La comparaison avec les homogénats de tissu cérébral de souris transgénique APPwt (piste 1) et APPsw (piste 2) indique que les bandes détectées dans les CHO sont communes à celles du tissu cérébral, excepté pour la bande à 16 kDa.

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

23

On notera que les souches de cellules gliales CCF, U118 et T98 possèdent un profil avec 6 bandes à 13,5, 12,10,5, 9,5, 9 et 8,5 kDa, avec une abondance des 3 bandes entre 9,5 et 8,5 kDa (figure 8B). Un profil similaire est observé dans souches cellulaires Hela, COS et SY-5Y transfectée avec l'APPsw (figure 8B).

En outre, la souche cellulaire épithéliale HT-29 présente un profil à 6 bandes à 14,5, 13,5, 12, 10,5, 9,5 et 9 kDa (figure 8: HT-29). La bande à 9 kDa qui est discrète dans les cellules épithéliales HT-29 devient plus abondante après traitement par le benzyl-0-GalNac qui inhibe la glycosylation et l'adressage des protéines glycosylées. Ceci démontre que la glycosylation est une modification post-traductionnelle qui régule l'expression et le profil des APP-Cter. Cette modification est donc un élément important à prendre en compte dans la recherche des transformations pathologiques moléculaires des APP-Cter au cours de l'Alzheimérisation.

- Modèles neuronaux

Des cellules de neuroblastome humain (SKNSH-SY5Y) transfectées, de façon stable, avec les gènes APPsw, APPwt, PS1 muté et Tau ont été analysées comparativement à des cellules non transfectées. Les résultats sont représentés sur la figure 9. Dans les cellules non transfectées, le signal APP-Cter correspond à la bande de 10,5 kDa (figure 9 : Native). En revanche, 6 fragments à 13,5, 12, 10,5, 9,5, 9 et 8,5 kDa sont parfaitement identifiables dans les cellules SKNSH non-différenciées, transfectées avec APPsw (figure 9 : APPsw). On retrouve également le profil des 6 bandes avec les cellules transfectées avec APP wt (figure 9: wild type). La transfection des cellules SY5Y avec le gène PS1 muté provoque une augmentation des 5 bandes, de la bande à 9,5 kDa qui est ici abondante, et également du fragment de 6,5 kDa, libéré par l'activité gamma secrétase.

D'autres lignées neuronales natives possèdent également des profils du type SKNSH natif, comme les cellules Kelly, ou, par

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

24

ailleurs, comme les cellules SKNSH transfectées avec un gène muté de APP ou PS1, comme les cellules NT2 et hNT.

La différenciation pendant 14 jours des cellules SY5Y provoque un changement de profil, avec l'apparition de la bande gamma à 6,5 kDa et d'une diminution de la bande à 10,5 kDa. Dans les mêmes conditions, les cellules transfectées avec le gène tau 3R et non différenciées voient l'apparition de la bande à 13,5 kDa, correspondant à une augmentation de la libération des fragments "bêta sécrétase". Dans ces cellules différenciées, on observe la disparition de la bande gamma à 6,5 kDa.

Ceci démontre que des gènes sont capables de moduler l'expression et la répartition relative des fragments APP-Cter. Ces modèles ont donc la potentialité de modéliser les modifications pathologiques des fragments APP-Cter, tels qu'observé dans le tissu cérébral humain.

Analyse des fragments APP-Cter des globules blancs humains

Des culots de globules blancs humains ont été préparés selon un protocole standard utilisé en laboratoire d'analyse (médical ou hospitalier). Ces culots ont été traités comme décrit et analysés par immunoprintes avec l'anticorps APP-Cter-C17. Les résultats sont rapportés sur la figure 10A où les pistes 1 à 5 correspondent aux témoins et les pistes 6 à 11 à des échantillons provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Le sexe et l'âge sont mentionnés (figure 10A : sexe.âge).

L'anticorps APP-Cter-C17 détecte trois fragments de masse moléculaire de 14 kDa, 10,5 kDa et 9,5 kDa.

Une analyse 1-D comparative entre globules blancs de sujets témoins et de patients diagnostiqués maladie d'Alzheimer a permis de mettre en évidence (comme dans l'étude du tissu cérébral humain) une diminution des fragments APP-Cter dans les globules blancs des malades (pistes 6 à 11) par rapport aux globules blancs de témoins (pistes 1 à 5).

Les variants des fragments APP-Cter des globules blancs ont également été analysés en 2-D (figure 10B). Les valeurs de masse

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

25

moléculaire et de point isoélectrique de chaque spot détecté ont été rapportées sur la figure 7C et le tableau 2.

5 Caractérisation des fragments APP-Cter avec différentes sondes immunologiques

Un anticorps dirigé contre l'extrémité N-terminale du peptide A β permet de localiser le fragment de coupure de la bêta-sécrétase. Il s'agit de l'anticorps FCA18 (4). Le fragment 14 kDa des globules blancs est détecté par cet anticorps, indiquant qu'il s'agit du fragment APP-Cter produit par la bêta secrétase (figure 11B). Dans le tissu cérébral, les deux bandes A (14,5 kDa) et B (13,5 kDa) sont reconnues par WO2, un anticorps monoclonal (Abeta, GmbH, Heidelberg, Germany) dirigé contre la partie 5-11 du peptide A β tandis que la bande B est détectée par FCA18, ce qui indique que les bandes A et B sont générées par une coupure située au niveau de la région beta secrétase (voir figure 1). Par ailleurs, l'interrogation des bases de données (SwissProt par exemple) indique que le fragment APP-Cter de masse moléculaire de 9,5 kDa (figure 11) et de point isoélectrique 6,99 correspond au fragment alpha secrétase, comme représenté dans la figure 1. Les deux fragments APP-Cter majeurs des globules blancs qui sont modifiés au cours de la maladie d'Alzheimer ont donc été identifiés (figure 11, A et B).

Par ailleurs, certains sites communs aux 5 fragments A à C peuvent être modifiés différemment. Ainsi, par exemple, un anticorps polyclonal reconnaissant spécifiquement la thréonine 668 phosphorylée reconnaît préférentiellement les bandes A, C et D. La méthode décrite ici permet de caractériser les modifications post-traductionnelles liées au processus dégénératif. Elle débouche de ce fait sur la possibilité d'élaborer de nouveaux outils immunologiques qui viendront compléter avantageusement le kit de diagnostic de la transformation pathologique des fragments APP-Cter.

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

26

La phosphorylation des fragments APP-Cter est un élément déterminant de leur transformation pathologique

Il se produit une modification du métabolisme et de la phosphorylation des APP-Cter dans la maladie d'Alzheimer. Les APP-Cter du tissu cérébral d'un sujet témoin et d'un patient Alzheimer ont été immunoprécipités à l'aide de l'anticorps APP-CterC17 et les 5 fragments à 14,5, 13,5, 12, 10,5, et 9,5 kDa (fragments A, B, C, D et E) sont révélés après électrophorèse en gel Tris-Tricine avec le même anticorps (figure 13, pistes 1 et 2). Les fragments APP-Cter immunoprécipités ont été déphosphorylés à l'aide de la phosphatase alcaline d'intestin de veau (figure 13, pistes 3 et 4) puis révélés avec l'anticorps APP-CterC17 suivant le même protocole. Trois fragments majeurs sont détectés dans l'homogénat témoin à 13,5 ; 10,5 et 9,5 kDa. Ces trois fragments sont également détectés dans l'homogénat Alzheimer. Cependant le fragment à 13,5 kDa est en plus faible quantité alors que les fragments à 10,5 et 9,5 kDa sont en plus grande quantité. Ce résultat montre l'accumulation des fragments générés par la coupure alpha-sécrétase, mais également leur phosphorylation plus importante.

Les modifications de l'indice de phosphorylation sont démontrées en particulier avec l'anticorps anti-thréonine 668 phosphorylée (figure 13, pistes 5 et 6). Les fragments APP-Cter phosphorylés sur la Thréonine 668 ont été immunoprécipités et révélés à l'aide de l'anticorps APP-CterC17 après électrophorèse en gel Tris-Tricine. Les fragments à 14,5 ; 12 et 10,5 sont détectés dans l'homogénat témoin. Dans l'homogénat Alzheimer ce sont essentiellement les fragments à 12,5 et 10,5 kDa qui sont détectés en grande quantité. Ce résultat confirme que les fragments APP-Cter C et D sont plus phosphorylés et en plus grande quantité dans la phase précoce de la maladie d'Alzheimer, et que parallèlement le fragment A est peu ou pas phosphorylé au site 668.

35 Récapitulatif

Des variants particulièrement informatifs pour la mise en œuvre

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

27

de l'invention sont rapportés dans les tableaux récapitulatifs (figures 14 à 16). Ces différents variants constituent des marqueurs de grand intérêt pour détecter les modifications pathologiques de l'APP, aussi bien dans les tissus neuronaux que dans les tissus non-neuronaux, et en particulier les lymphocytes.

La phosphorylation sur les thréonines, sérines et tyrosines des fragments APP-Cter (figure 1) contribuent au profil général des APP-Cter. En premier lieu, on observe une différence de l'indice de phosphorylation de ces différents fragments APP-Cter, comme le montre en particulier la thréonine 668 phosphorylée (figures 11 et 13). Ensuite, le profil des fragments APP-Cter déphosphorylés est modifié, avec notamment la disparition de la bande de 14,5 kDa, et le nouveau profil ressemble alors à celui des modèles cellulaires SKNSH transfectés avec APPsw (Figure 13).

La déphosphorylation des fragments APP-Cter révèle par ailleurs un changement de profil entre le tissu normal et le tissu Alzheimer, avec notamment une accumulation des bandes C,D,E des fragments APP-Cter, correspondant aux produits de coupure de l'alpha sécrétase (figure 13). La phosphorylation est donc un événement post-traductionnel important, et un marqueur de la transformation pathologique des fragments APP-Cter.

Cette modification se reflète également sur le fragment gamma-sécrétase, de 6,5 kDa, qui est modifié dans son expression par les gènes impliqués dans la maladie d'Alzheimer, comme le montrent les modèles cellulaires (figure 9).

La détection des fragments APP-Cter permet la définition d'un indice de transformation pathologique, applicable au tissu humain neuronal (figure 12A: tissu cérébral humain) ou non-neuronal (figure 12B: lymphocytes humains), ainsi qu'aux modèles expérimentaux, animaux (figure 12C: tissu cérébral de souris transgénique APPsw et wt) ou cellulaires, neuronaux (figure 12D: cellules de neuroblastome) ou non-neuronaux (cellules CHO, COS,...). Cet indice varie de 0 (tissu sain) à 100% (tissu pathologique Alzheimerisé) (figure 12).

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

28

5 RÉFÉRENCES

1. De Strooper B, Konig G (1999) Alzheimer's disease. A firm base for drug development [news] [comment]. *Nature*, 402, 471-2.
2. Sigurdsson EM, Permanne B, Soto C, Wisniewski T, Frangione B
10 (2000) In vivo reversal of amyloid-beta lesions in rat brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59, 11-7.
3. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P.
15 (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400:173-7.
4. Anclio K, Dumanchin C, Barelli H, Warter JM, Brice A, Campion D, et al. (1999) Unusual phenotypic alteration of beta
20 amyloid precursor protein (betaAPP) maturation by a new Val-715 --> Met betaAPP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 4119-24.
5. Vaitukaitis J, Robbins JB, Nieschlag E, Ross GT (1971) A
25 method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J Clin Endocrinol Metab*, 33, 988-91.
6. Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buee L, Wattez A, Vermersch P, et al. (1999) The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease,
30 *Neurology*, 52, 1158-65.
7. Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, et al. (1996) Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*, 383, 710-3.
8. Hsiao K, Chapman P, Nilssen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation,
35 and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 274, 99-102.

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

29

9. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
10. Schagger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of
5 proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166, 368-79.

REVENDICATIONS

- 1/ Méthode pour détecter, dans un échantillon à analyser, des modifications pathologiques de la protéine APP, caractérisée en ce qu'on utilise des marqueurs constitués par des fragments cataboliques et/ou métaboliques de la partie carboxy-terminale de l'APP, fragments APP-Cter, spécifiquement modifiés dans les situations neurodégénératives où l'APP participe à l'étiologie.
- 2/ Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdits fragments sont des produits cataboliques et/ou métaboliques de l'APP ayant conservé la structure primaire de l'extrémité C-terminale de l'APP, mais se présentant sous la forme de variants de charge, de point isoélectrique et de solubilité différents.
- 3/ Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la détection du processus d'Alzheimer et comprend l'utilisation, comme marqueurs de dysfonctionnement de l'APP, de 5 fragments de 14,5 ; 13,5 ; 12 ; 10,5 et 9,5 kDa et des isovariants d'isoélectrofocalisation constituant ces fragments, en particulier ceux qui sont modifiés au cours des situations pathologiques chez l'homme ou dans les modèles expérimentaux.
- 4/ Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la détection du processus d'Alzheimer et comprend l'utilisation, comme marqueurs de dysfonctionnement de l'APP, de 8 fragments de 14,5 ; 13,5 ; 12 ; 10,5 ; 9,5 ; 9 ; 8,5 et 6,5 kDa et des isovariants d'isoélectrofocalisation constituant ces fragments, en particulier ceux qui sont modifiés au cours des situations pathologiques chez l'homme ou dans les modèles expérimentaux.
- 5/ Méthode selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la détection du processus d'Alzheimer chez l'homme et comprend l'utilisation, comme marqueurs de dysfonctionnement de l'APP, de 1 à 7 fragments choisis parmi ceux de 14,5 ; 13,5 ; 12 ; 10,5 ; 9,5 ; 9 et 6,5 kDa et des isovariants d'isoélectrofocalisation constituant ces fragments.

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

31

6/ Méthode selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la détection du processus d'Alzheimer chez la souris et comprend l'utilisation, comme marqueurs de dysfonctionnement de l'APP, de 1 à 8 fragments choisis parmi ceux de 14,5 ; 13,5 ; 12 ; 10,5 ; 9,5 ; 9 ; 8,5 et 6,5 kDa et des isovariants d'isoélectrofocalisation constituant ces fragments.

7/ Méthode selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la détection du processus d'Alzheimer sur des modèles cellulaires et comprend l'utilisation, comme marqueurs de dysfonctionnement de l'APP, de 1 à 7 fragments choisis parmi ceux de 13,5 ; 12 ; 10,5 ; 9,5 ; 9 ; 8,5 et 6,5 kDa et des isovariants d'isoélectrofocalisation constituant ces fragments.

8/ Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que les échantillons à analyser comprennent des tissus ou des cellules neuronales, ou des tissus ou des cellules non neuronales, par exemple des liquides biologiques comme le liquide céphalo-rachidien, le sang et tout ou partie de ses éléments figurés.

9/ Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en qu'on utilise en complément un jeu d'anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux révélant les modifications post-traductionnelles de la transformation pathologique des fragments APP-Cter, en particulier une modification de type phosphorylation et/ou méthylation et/ou acétylation et/ou glycosylation.

10/ Méthode selon la revendication 9, caractérisée en que le jeu d'anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux utilisé permet de révéler les phosphorylations et la variation d'expression des fragments de 14,5 ; 12 et 10,5 kDa.

11/ Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'on évalue le degré de la pathologie en affectant un indice aux fragments identifiés dans l'échantillon étudié, cet indice étant attribué par rapport à un référentiel

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

32

où l'indice 0 (zéro) correspond à la détection dans le tissu sain et l'indice 100 (cent), dans le tissu pathologique.

12/ Application de la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, pour établir et/ou valider des modèles expérimentaux, cellules ou modèle animal, de la maladie d'Alzheimer.

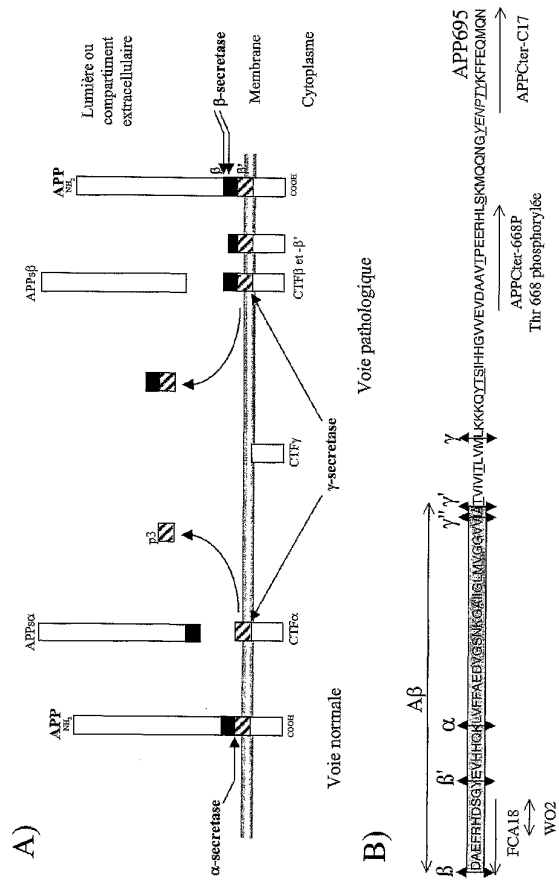
13/ Utilisation des modèles obtenus selon la revendication 12, pour le criblage pharmacologique de molécules efficaces contre les pathologies neurodégénératives du type Alzheimer.

14/ Application de la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, au diagnostic de pathologies dégénératives de type Alzheimer sur le tissu humain et sur les modèles expérimentaux.

15/ Kit de diagnostic de la transformation pathologique de APP, caractérisé en ce qu'il comprend un jeu d'anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux dirigé contre la région carboxy-terminale de l'APP, complété si nécessaire par un jeu d'anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux révélant les modifications post-traductionnelles de la transformation pathologique des fragments APP-Cter, en particulier des modifications de type phosphorylation, et/ou méthylation et/ou acétylation et/ou glycosylation.

16/ Kit selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend les réactifs et matériels nécessaires pour réaliser des dosages immunochimiques par exemple ELISA, Western blot, ou dot blot.

Figure 1



WO 02/37118

PCT/FR01/03410

2/16

Figure 2

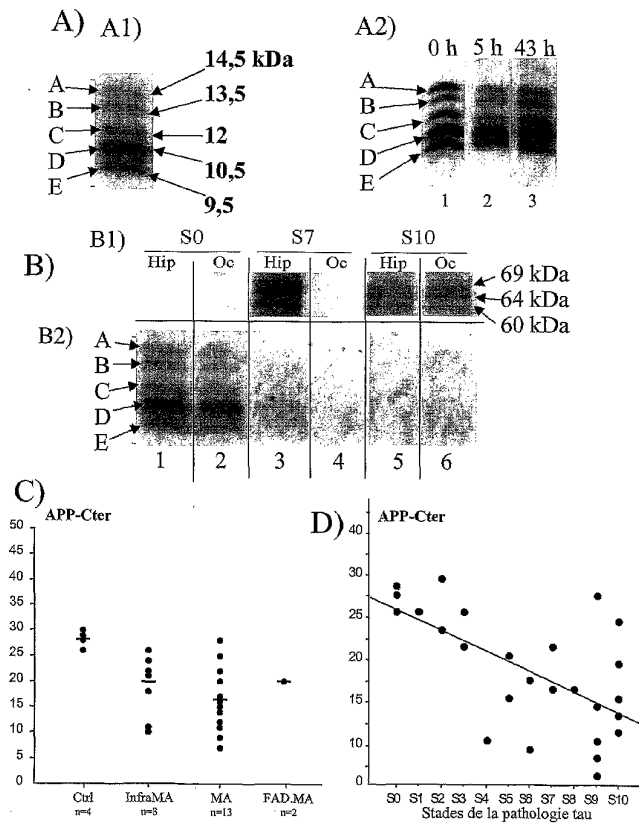
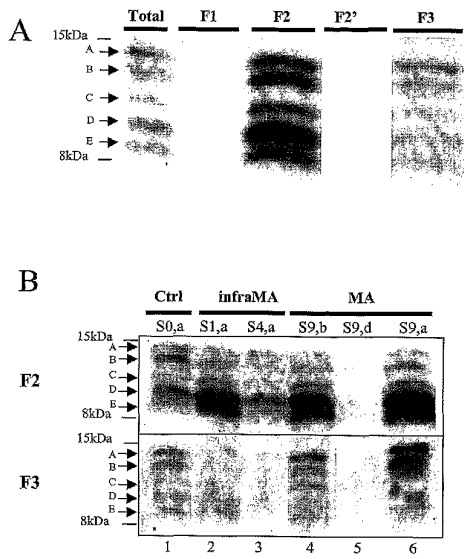


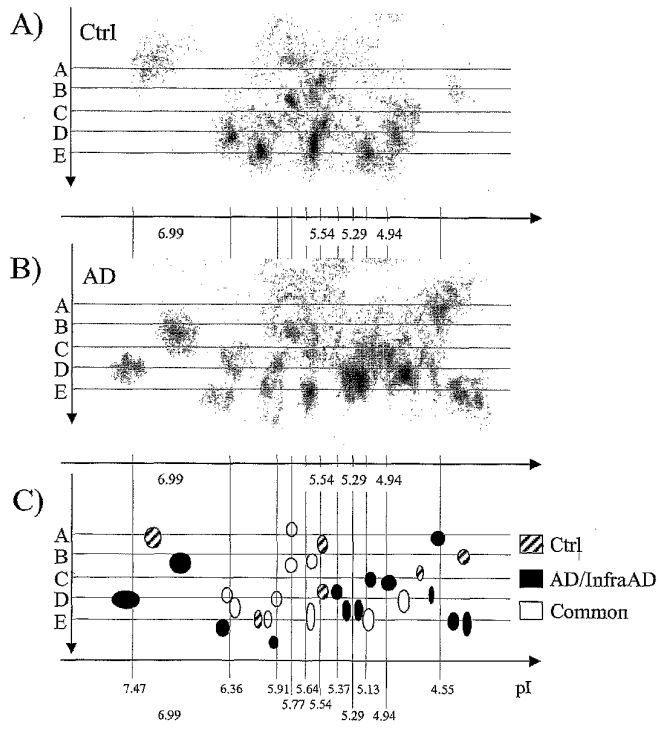
Figure 3



WO 02/37118

PCT/FR01/03410

⁴/₁₆
Figure 4

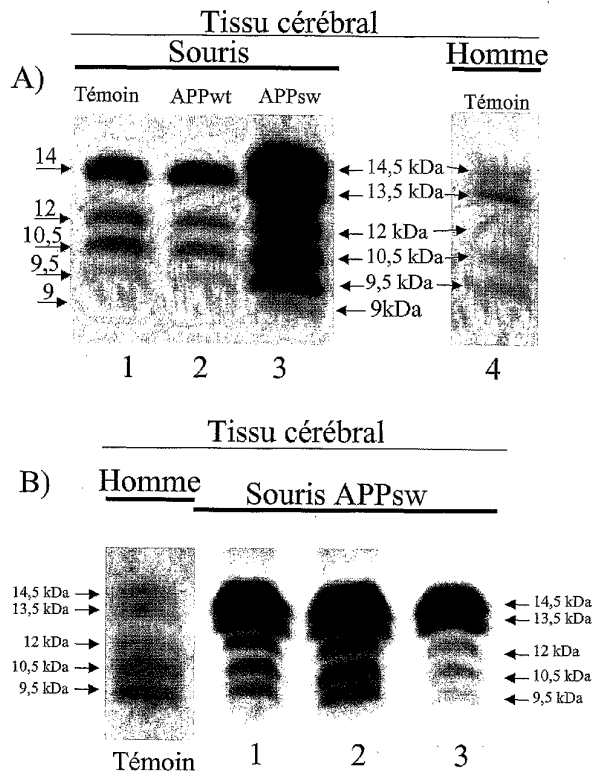


WO 02/37118

PCT/FR01/03410

5/16

Figure 5



WO 02/37118

PCT/FR01/03410

⁶/₁₆

Figure 6

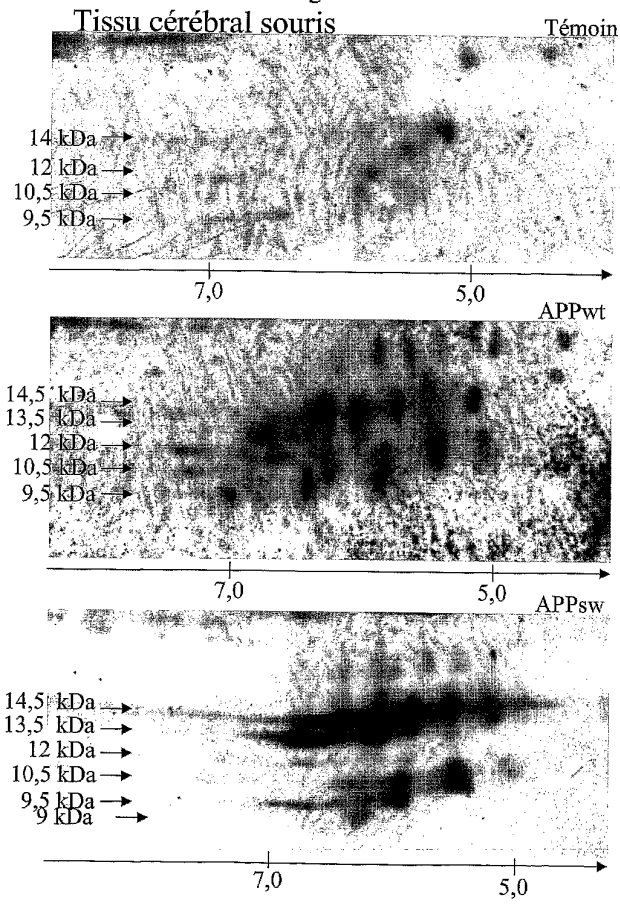


Figure 7

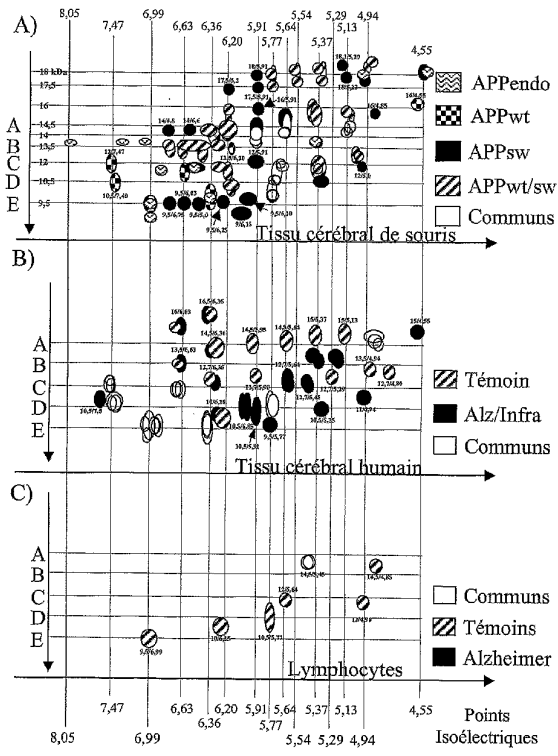


Figure 8

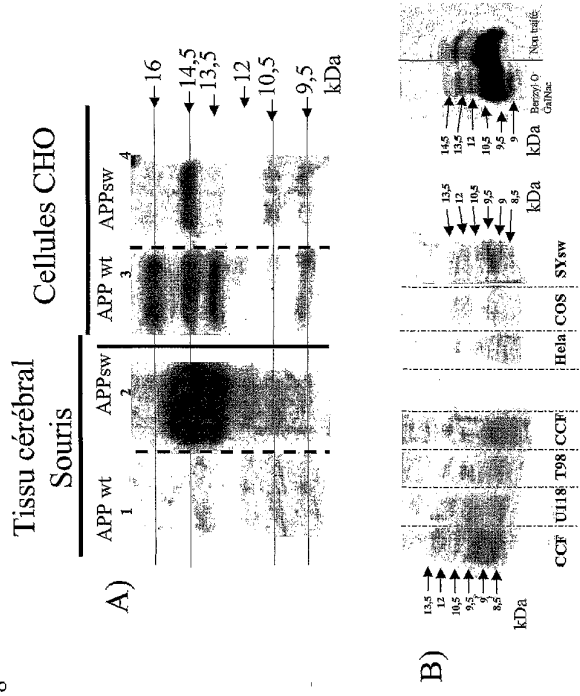


Figure 9

Modèles cellulaires neuronaux: Neuroblastomes

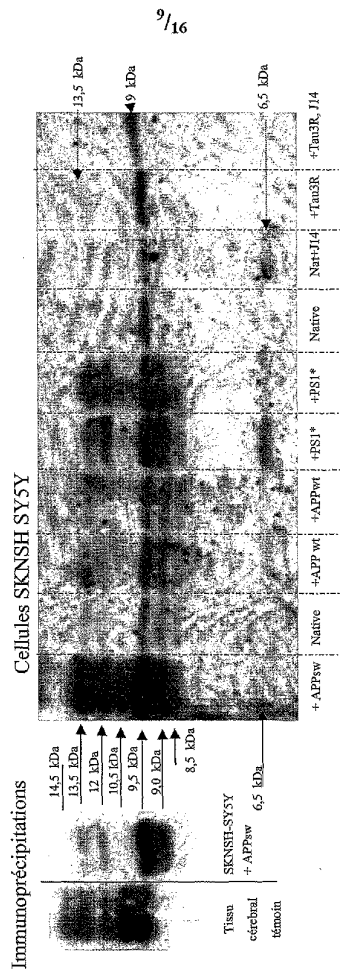


Figure 10

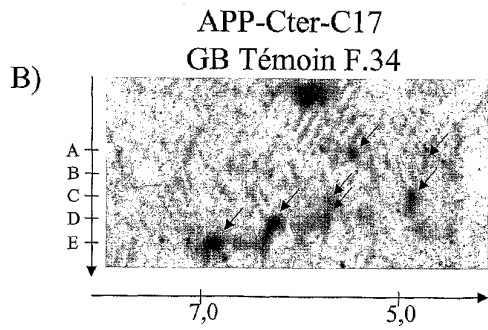
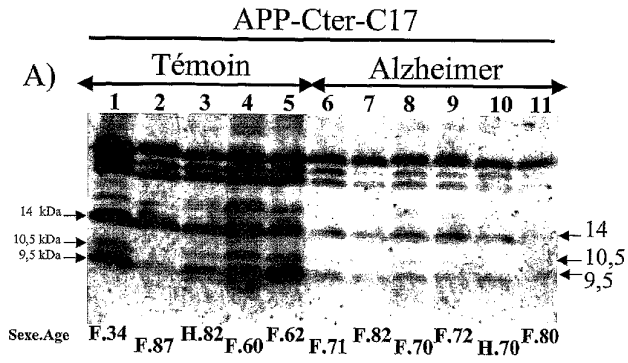
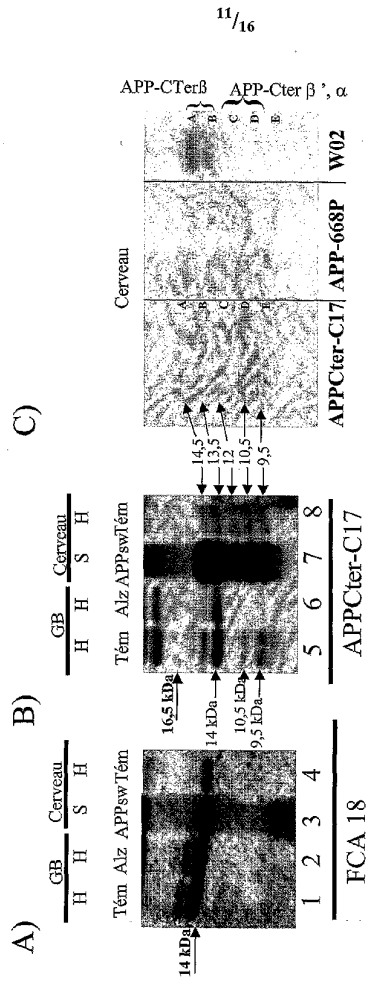


Figure 11

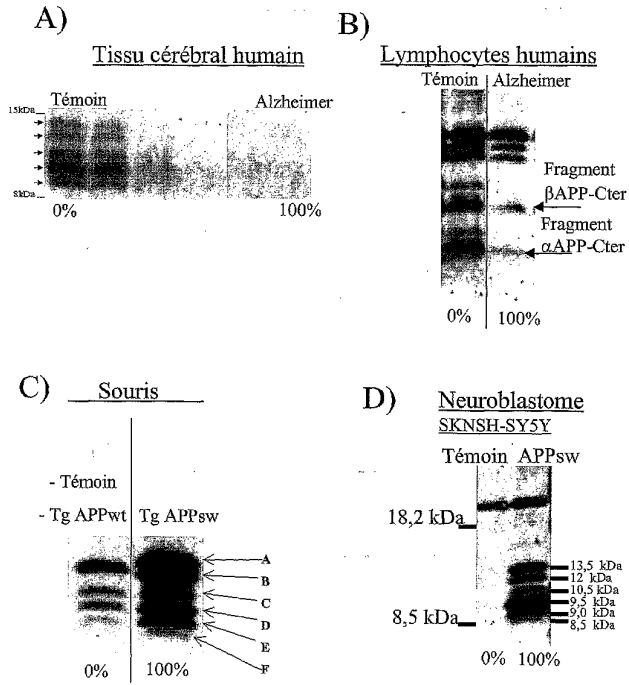


WO 02/37118

PCT/FR01/03410

12/16

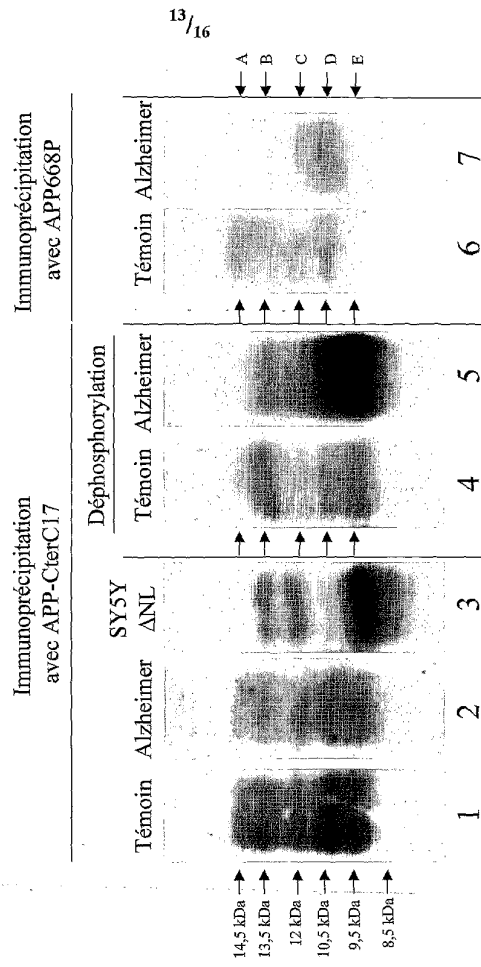
Figure 12



WO 02/37118

PCT/FR01/03410

Figure 13



WO 02/37118

PCT/FR01/03410

14/16

Figure 14

Fragments APP-Cter qui disparaissent dans l'Alzheimer						
		Points isoélectriques				
APP-Cter	Masse Moléculaire					
A	15,0 kDa			5,37	5,13	
	14,5 kDa	5,95	5,64			
B	13,5 kDa			4,94	4,80	
	12,7 kDa	5,90	5,29			
Fragments APP-Cter spécifiques à l'Alzheimer						
		Points isoélectriques				
APP-Cter	Masse Moléculaire					
D	11,0 kDa				4,94	
	10,5 kDa	7,5		5,35		
E	9,5 kDa		5,77			
Fragments APP-Cter communs aux formes précliniques et à l'Alzheimer						
		Points isoélectriques				
APP-Cter	Masse Moléculaire					
A	15 kDa				4,55	
B	14,0 kDa			5,37	5,2	
C	12,7 kDa		5,64	5,45		
D	10,5 kDa	6,05	5,91			

Figure 15

Fragments APP-Cter des lymphocytes humains témoins					
APP-Cter	Masse Moléculaire	Points isoélectriques			
A	14 kDa		5,45	4,85	
C	12,0 kDa	5,64		4,96	
D	10,5 kDa	5,77			
	10 kDa	6,25			
E	9,5 kDa	6,99			
Fragments APP-Cter des lymphocytes humains Alzheimer					
APP-Cter	Masse Moléculaire	Points isoélectriques			
A	14,5 kDa		5,45		

WO 02/37118

PCT/FR01/03410

16/
16

Figure 16

Fragments APP-Cter des souris transgéniques et différents des fragments APP-Cter endogènes		Points isoélectriques					
APP-Cter	Masse Moléculaire						
A	18 kDa	5,91	5,77	5,54	5,37	5,20	5,13
	17,5 kDa	6,20	5,91				
	16 kDa	6,20	5,91	5,64	5,37	5,13	4,55
	14,5 kDa		6,80	6,60	6,36	6,20	5,91
B	13,5 kDa					6,36	6,20
	13,0 kDa	6,70	6,63	6,40	6,27	6,15	5,10
C	12,0 kDa		7,50	6,20	5,91	5,37	5,00
D	10,5 kDa					7,40	5,37
E	9,5 kDa	6,75	6,63	6,50	6,25	6,15	6,00

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/FR 01/03410
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 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 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 441 870 A (SCHENK DALE B ET AL) 15 August 1995 (1995-08-15) the whole document	1-16
X	US 5 234 814 A (CARD JOHN P ET AL) 10 August 1993 (1993-08-10) the whole document	1-16
X	WO 92 00521 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE) 9 January 1992 (1992-01-09) the whole document	1-16
X	EP 0 564 946 A (MILES INC) 13 October 1993 (1993-10-13) the whole document	1-16
	-/-	
<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. *Δ* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 5 February 2002		Date of mailing of the international search report 20/02/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 3200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-3300, Tx. 31 651 apo nl Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pellegriani, P

Form PCT/ISA/210 (revised August 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/FR 01/03410

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 07144 A (US ARMY) 31 March 1994 (1994-03-31) abstract claim 12	1-16
X	KOSIK K S: "ALZHEIMER'S DISEASE: A CELL BIOLOGICAL PERSPECTIVE" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 256, 8 May 1992 (1992-05-08), pages 780-783, XP002045838 ISSN: 0036-8075 page 781, column 2, paragraph 2 -page 782, column 1, paragraph 1	1-16
X	GANDY S E ET AL: "THE NATURE AND METABOLISM OF POTENTIALLY AMYLOIDGENIC CARBOXYL-TERMINAL FRAGMENTS OF THE ALZHEIMER BETA/A4-AMYLOID PRECURSOR PROTEIN: SOME TECHNICAL NOTES" NEUROBIOLOGY OF AGING, TARRYTOWN, NY, US, vol. 13, no. 5, 1992, pages 601-603, XP000614997 ISSN: 0197-4580 the whole document	1-16
X	SUZUKI T ET AL: "PHOSPHORYLATION OF ALZHEIMER AMYLOID PRECURSOR PROTEIN BY PROTEIN KINASE C" NEUROSCIENCE, vol. 48, no. 4, 1992, pages 755-761, XP001053372 ISSN: 0306-4522 the whole document	1-16

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No PCT/FR 01/03410	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
US 5441870	A	15-08-1995	AU 688726 B2	19-03-1998	
			AU 3782793 A	18-11-1993	
			EP 0638172 A1	15-02-1995	
			FI 944847 A	14-10-1994	
			JP 7506967 T	03-08-1995	
			NO 943912 A	10-11-1994	
			NZ 251053 A	26-11-1996	
			WO 9321526 A1	28-10-1993	
			US 5604102 A	18-02-1997	
			US 5605811 A	25-02-1997	
			US 5721130 A	24-02-1998	
			US 6018024 A	25-01-2000	
			US 5234814	A	10-08-1993
AU 5817390 A	07-01-1991				
CA 2017832 A1	01-12-1990				
EP 0474765 A1	18-03-1992				
JP 4505865 T	15-10-1992				
WO 9015331 A1	13-12-1990				
WO 9200521	A	09-01-1992	AU 8215391 A	23-01-1992	
			WO 9200521 A1	09-01-1992	
EP 0564946	A	13-10-1993	AU 3318793 A	14-10-1993	
			CA 2086165 A1	10-10-1993	
			EP 0564946 A1	13-10-1993	
			IL 105216 A	16-10-1996	
			JP 7051096 A	28-02-1995	
			MX 9302021 A1	31-08-1994	
			NZ 247356 A	27-04-1995	
			US 5981208 A	09-11-1999	
WO 9407144	A	31-03-1994	AU 5135393 A	12-04-1994	
			WO 9407144 A1	31-03-1994	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		no. de l'internationale No PCT/FR 01/03410
A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 G0IN33/68		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G0IN		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 441 870 A (SCHENK DALE B ET AL) 15 août 1995 (1995-08-15) le document en entier	1-16
X	US 5 234 814 A (CARD JOHN P ET AL) 10 août 1993 (1993-08-10) le document en entier	1-16
X	WO 92 00521 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE) 9 janvier 1992 (1992-01-09) le document en entier	1-16
X	EP 0 564 946 A (MILES INC) 13 octobre 1993 (1993-10-13) le document en entier	1-16
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document dérivant de l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "C" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (celle qu'indiquées) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tout autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'événement revendiqué ne peut être considéré comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'événement revendiqué ne peut être considéré comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 5 février 2002		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 20/02/2002
Nom et adresse postale de l'Administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5618 Patentkanal 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Pellegrini, P

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juin 1999)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Doc. internationale No
 PCT/FR 01/03410

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 94 07144 A (US ARMY) 31 mars 1994 (1994-03-31) abrégé revendication 12	1-16
X	KOSIK K S: "ALZHEIMER'S DISEASE: A CELL BIOLOGICAL PERSPECTIVE" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 256, 8 mai 1992 (1992-05-08), pages 780-783, XP002045838 ISSN: 0036-8075 page 781, colonne 2, alinéa 2 -page 782, colonne 1, alinéa 1	1-16
X	GANDY S E ET AL: "THE NATURE AND METABOLISM OF POTENTIALLY AMYLOIDGENIC CARBOXYL-TERMINAL FRAGMENTS OF THE ALZHEIMER BETA/A4-AMYLOID PRECURSOR PROTEIN: SOME TECHNICAL NOTES" NEUROBIOLOGY OF AGING, TARRYTOWN, NY, US, vol. 13, no. 5, 1992, pages 601-603, XP000614997 ISSN: 0197-4580 le document en entier	1-16
X	SUZUKI T ET AL: "PHOSPHORYLATION OF ALZHEIMER AMYLOID PRECURSOR PROTEIN BY PROTEIN KINASE C" NEUROSCIENCE, vol. 48, no. 4, 1992, pages 755-761, XP001053372 ISSN: 0306-4522 le document en entier	1-16

1

Formulaire PCT/ISA210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE				Date de l'application internationale No PCT/FR 01/03410	
Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
US 5441870	A	15-08-1995	AU 688726 B2	19-03-1998	
			AU 3782793 A	18-11-1993	
			EP 0638172 A1	15-02-1995	
			FI 944847 A	14-10-1994	
			JP 7506967 T	03-08-1995	
			NO 943912 A	10-11-1994	
			NZ 251053 A	26-11-1996	
			WO 9321526 A1	28-10-1993	
			US 5604102 A	18-02-1997	
			US 5605811 A	25-02-1997	
			US 5721130 A	24-02-1998	
			US 6018024 A	25-01-2000	
			US 5234814	A	10-08-1993
AU 5817390 A	07-01-1991				
CA 2017832 A1	01-12-1990				
EP 0474765 A1	18-03-1992				
JP 4505865 T	15-10-1992				
WO 9015331 A1	13-12-1990				
WO 9200521	A	09-01-1992	AU 8215391 A	23-01-1992	
			WO 9200521 A1	09-01-1992	
EP 0564946	A	13-10-1993	AU 3318793 A	14-10-1993	
			CA 2086165 A1	10-10-1993	
			EP 0564946 A1	13-10-1993	
			IL 105216 A	16-10-1996	
			JP 7051096 A	28-02-1995	
			MX 9302021 A1	31-08-1994	
			NZ 247356 A	27-04-1995	
			US 5981208 A	09-11-1999	
WO 9407144	A	31-03-1994	AU 5135393 A	12-04-1994	
			WO 9407144 A1	31-03-1994	

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 27/26	3 1 5 H
	G 0 1 N 27/26	3 1 5 F
	G 0 1 N 27/26	3 0 1 A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, 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, DE, 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, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(74) 代理人 100088328

弁理士 金田 暢之

(74) 代理人 100106297

弁理士 伊藤 克博

(74) 代理人 100106138

弁理士 石橋 政幸

(72) 発明者 ドラクールト、 アンドレ

フランス国 エフ - 5 9 1 5 5 ファシェ テュメニ ル ガンベタ 7 5

(72) 発明者 セルジュアン、 ニコラ

フランス国 エフ - 5 9 7 9 0 ロンシアン ル ジアン ジョーレ 9

(72) 発明者 ヴァニユクシーム、 ドロテ

フランス国 エフ - 5 9 3 1 0 ランベルサル ル ガブリエル ブヴェル 2 4 ビス

专利名称(译)	检测APP蛋白病理变态的方法及其用途		
公开(公告)号	JP2004522940A	公开(公告)日	2004-07-29
申请号	JP2002539821	申请日	2001-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	国家健康科学研究所		
申请(专利权)人(译)	国家研究所德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 (B , NA , ES中.D.啤酒 , EM) .		
[标]发明人	ドラクールトアンドレ セルジュアンニコラ ヴァニユクシームドロテ		
发明人	ドラクールト、 アンドレ セルジュアン、 ニコラ ヴァニユクシーム、 ドロテ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N27/447 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2500/00 G01N2800/2821		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/15.Z G01N33/50.T G01N33/50.Z G01N33/577.B G01N27/26.315.H G01N27/26.315.F G01N27/26.301.A		
代理人(译)	宫崎昭雄 伊藤 克博		
优先权	2000014143 2000-11-03 FR		
其他公开文献	JP4294953B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明特别，其特征在于它的病因进行修改在神经变性症状APP涉及分解代谢和/或APP的羧基端部分的代谢的片段，使用由APP-C-末端片段的标记物的是，分析样品中的，用于检测的APP蛋白质的病理改变的方法。本发明可应用于诊断和治疗退行性病变如阿尔茨海默病。

