

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-500007  
(P2011-500007A)

(43) 公表日 平成23年1月6日(2011.1.6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4B024
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 Z	4B063
<b>C07K 14/47 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 A	4B065
<b>C12N 5/10 (2006.01)</b>	C07K 14/47	4C084
<b>A01K 67/027 (2006.01)</b>	C12N 5/00 102	4C086

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-528323 (P2010-528323)  
 (86) (22) 出願日 平成20年10月10日 (2008.10.10)  
 (85) 翻訳文提出日 平成22年6月8日 (2010.6.8)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2008/008595  
 (87) 国際公開番号 W02009/047002  
 (87) 国際公開日 平成21年4月16日 (2009.4.16)  
 (31) 優先権主張番号 M12007A001975  
 (32) 優先日 平成19年10月12日 (2007.10.12)  
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)

(71) 出願人 510100656  
 フォンダジオーネ アイ. アール. シー. シー. エス. イスティチュート ニューロロジコ ” カルロ ベスタ”  
 イタリア国、ミラノ アイー20133、11、パイア セロリア  
 (74) 代理人 110000877  
 龍華国際特許業務法人  
 (72) 発明者 ディ フェデ、ジュセッペ  
 イタリア国、ミラノ アイー20133、11、パイア セロリア フォンダジオーネ アイ. アール. シー. シー. エス. イスティチュート ニューロロジコ ” カルロ ベスタ” 内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 βアミロイドおよび/またはアミロイド状物質のヒトおよび/または動物の臓器および組織への異常堆積を特徴とするヒトおよび/または動物の病理の診断、予防、および/または、処置のため

(57) 【要約】

本特許は、ホモ接合体およびヘテロ接合体の蛋白質の位置2の点状の変異 A1a > Val (770 アミノ酸を含む蛋白質の A1a673Val 変異前駆体に対応する) に基づき、アミロイドおよび/またはアミロイド状物質のヒトおよび/または動物の臓器および組織への異常堆積を現すヒトおよび/または動物の病理の危険性を判定するべく、ヒトおよび/または動物の臓器から切り離された生体材料に対して行われるスクリーニング方法に関する。特許は、(1) A1a673Val 変異を表す単細胞または多細胞の遺伝子組み換え臓器の生成、(2) この変異を有するペプチドおよび/またはその派生物および/またはこの変異を含む核酸の合成または製造、および、(3) この生成物の、アミロイドおよび/またはアミロイド状物質の異常堆積を特徴とする病理の病因の研究、予防、診断、および処置への利用の可能性を提供する。

【選択図】 図1

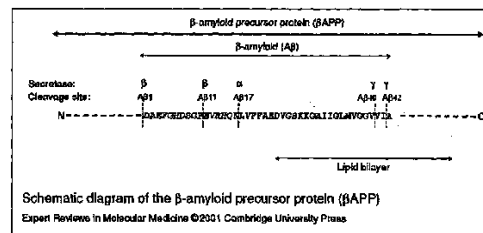


Figure 2. Diagram which illustrates the catabolism of the APP by the secretase.

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

A P P 7 7 0 ( N M \_ 0 0 0 4 8 4 . 2 ) のアイソフォームのヌクレオチド 2 2 1 2 ( c . 2 2 1 2 C > T 遷移 ) に対応するヒトの A P P 遺伝子 ( D 8 7 6 7 5 ) の配列コーディングのコドン 6 7 3 におけるチミジンをもつシトシンの、ホモ接合型またはヘテロ接合型の置き換えに関する研究に基づいて、A の任意のアイソフォームにより形成されるアミロイドおよび/またはアミロイド状物質の異常堆積を特徴とする病理の危険性を判断するべく、ヒトの生物材料に行われるスクリーニング方法であって、変異では、A の位置 2 に相当する A P P 7 7 0 の残基 6 7 3 において、または、A P P の他のアイソフォームの類似する残基においてアラニンがバリンに置き換わるスクリーニング方法。

10

## 【請求項 2】

A P P 7 7 0 の点 1 の後の変異またはコドン 6 7 3 に他の変異を有する前記ヒトの A P P の様々なアイソフォームの遺伝子によるコーディングにより転写されるメッセンジャー N A ( m R N A ) の研究に基づき行われる請求項 1 に記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 3】

A の位置 2 または A P P 7 7 0 のコドン 6 7 3 に他の変異に対応する、Ala673Val 変異を含む蛋白質 A P P および/またはそのアイソフォームの研究に基づき行われる請求項 1 に記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 4】

ゲノム D N A および/または R N A を、生物材料およびその配列から切り離す段階を備える請求項 1 または請求項 2 に記載のスクリーニング方法。

20

## 【請求項 5】

前記 D N A の非アイソフォームの分析による前記変異の前記研究に基づき行われる請求項 1 から 4 のうち一項以上に記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 6】

前記変異の前記研究は、制限酵素を用いた分析、および/または、D H P L C ( 変性高パフォーマンス液体クロマトグラフィ )、および/または、S S C P ( シングル・ストランド・コンフォメーション・ポリモルフィズム )、および/または、インサイチュー交配により行われる請求項 1 から 5 のうち一項以上に記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 7】

前記 D N A は、患者の血液の白血球から得られた請求項 1 から 6 のうち一項以上に記載のスクリーニング方法。

30

## 【請求項 8】

前記病理のいずれか一つは、典型的な形態の A D である、または、異型の表現型で表現される請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のスクリーニング方法。

## 【請求項 9】

内因性ではないプロモータの制御下において、Ala673Val 変異または A P P 7 7 0 のコドン 6 7 3 における他の変異またはそのフラグメントを有するヒトの A P P またはそのフラグメントの異なるアイソフォームを備える構造。

## 【請求項 10】

プロモータ Thy1.1 または Thy1.2 の制御下において、Ala673Val 変異または A P P 7 7 0 のコドン 6 7 3 における他の変異またはそのフラグメントを有するヒトの A P P またはそのフラグメントを備える請求項 9 に記載の構造。

40

## 【請求項 11】

サイトメガロウイルス ( P<sub>cmv</sub> ) のプロモータの制御下において、Ala673Val 変異または A P P 7 7 0 のコドン 6 7 3 における他の変異またはそのフラグメントを有するヒトの A P P またはそのフラグメントを備える請求項 9 に記載の構造。

## 【請求項 12】

請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の前記構造とともに安定して、または遷移するようにトランスフェクションされることを特徴とする細胞株。

50

## 【請求項 1 3】

Ala673Val変異またはAPP770のコードン673における他の変異またはそのフラグメントを含む、ヒトのAPPまたはそのフラグメントの異なるアイソフォームのコードのためのDNA配列またはそのフラグメントを、ホモ接合型またはヘテロ接合型で備える、非ヒトトランスジェニック哺乳類動物。

## 【請求項 1 4】

Ala673Val (APP<sub>673v</sub>) 変異またはAPP770のコードン673における他の変異またはそのフラグメントのコードのためのDNA配列またはそのフラグメントを、ホモ接合型 (遺伝子型APP<sub>673v</sub>/APP<sub>673v</sub>) またはヘミ接合型 (遺伝子型APP<sub>0</sub>/APP<sub>673v</sub>) またはヘテロ接合型 (遺伝子型APP<sub>673A</sub>/APP<sub>673v</sub>) で備える、非ヒト内因性APP用のノックアウトトランスジェニック哺乳類動物。

10

## 【請求項 1 5】

Ala673Val変異 (またはAPP770のコードン673における他の変異またはそのフラグメント) が他の変異と関連している場合の、ヒトのAPPまたはそのフラグメントの異なるアイソフォームのコードのためのDNA配列またはそのフラグメントを、ホモ接合型、ヘミ接合型、またはヘテロ接合型で備える請求項13または14に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳類動物。

## 【請求項 1 6】

Ala673Val変異またはAPP770のコードン673における他の変異またはそのフラグメントが、プレセニン1 (PSEN1) の遺伝子コーディングの変異と関連している場合の、ヒトのAPPまたはそのフラグメントの異なるアイソフォームのコードのためのDNA配列またはそのフラグメントを、ホモ接合型、ヘミ接合型、またはヘテロ接合型で備える、請求項13から15のいずれか一項に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳類動物。

20

## 【請求項 1 7】

Ala673Val変異またはAPP770のコードン673における他の変異またはそのフラグメントが、プレセニン2 (PSEN2) の遺伝子コーディングの変異と関連している場合の、ヒトのAPPまたはそのフラグメントの異なるアイソフォームのコードのためのDNA配列またはそのフラグメントを、ホモ接合型、ヘミ接合型、またはヘテロ接合型で備える、請求項13から15のいずれか一項に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳類動物。

30

## 【請求項 1 8】

Ala673Val変異またはAPP770のコードン673における他の変異またはそのフラグメントが、タウ蛋白質 (MAPT) の遺伝子コーディングの変異と関連している場合の、ヒトのAPPまたはそのフラグメントの異なるアイソフォームのコードのためのDNA配列またはそのフラグメントを、ホモ接合型、ヘミ接合型、またはヘテロ接合型で備える、請求項13から15のいずれか一項に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳類動物。

## 【請求項 1 9】

Ala673Val変異またはAPP770のコードン673における他の変異またはそのフラグメントが、遺伝子PSEN1および/またはPSEN2および/またはMAPTの変異の組み合わせと関連している場合の、ヒトのAPPまたはそのフラグメントの異なるアイソフォームのコードのためのDNA配列またはそのフラグメントを、ホモ接合型、ヘミ接合型、またはヘテロ接合型で備える、請求項13から15のいずれか一項に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳類動物。

40

## 【請求項 2 0】

内因性プロモータの制御下において、内因性のAPPが、ヒトのAPPまたはそのフラグメントによるホモログ組み換えにより、Ala673Val変異またはAPP770のコードン673における他の変異またはそのフラグメントで置き換わるノックアウトである請求項13に記載の非ヒトトランスジェニック哺乳類動物。

## 【請求項 2 1】

50

齧歯動物である請求項 13 から 20 のいずれか一項に記載のトランスジェニック哺乳類動物。

【請求項 22】

任意の株のマウスである請求項 13 から 20 のいずれか一項に記載のトランスジェニック哺乳類動物。

【請求項 23】

トランスジェニック動物であって、Ala673Val 変異または A P P 7 7 0 のコドン 6 7 3 における他の変異またはそのフラグメントを有するヒトの A P P またはそのフラグメントを表す任意の動物の臓器であり、シノラブディス・エレガンス、キイロショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ等の請求項 13 から 20 のいずれか一項に記載の遺伝子型の特徴を備えるトランスジェニック哺乳類動物。

10

【請求項 24】

遺伝子組み換えされた臓器であって、Ala673Val 変異または A P P 7 7 0 のコドン 6 7 3 における他の変異またはそのフラグメントを有するヒトの A P P またはそのフラグメントを表す任意の真核微生物または原核微生物であり、大腸菌、イースト、糸状菌等の細菌である請求項 13 から 20 のいずれか一項に記載の遺伝子型の特徴を備える遺伝子組み換えされた臓器。

【請求項 25】

メッセンジャー R N A ( m R N A ) またはそのフラグメントであって、Ala673Val 変異または A P P 7 7 0 のコドン 6 7 3 における他の変異を有するヒトの A P P の D N A コーディングに対応する(「ポジティブな意味での」 m R N A ) または相補性(「ネガティブな意味での」 m R N A ) のヌクレオチド配列を備えるメッセンジャー R N A またはそのフラグメント。

20

【請求項 26】

全ての可能性ある用途において R N A 干渉 ( R N A i ) として知られている技術分野での請求項 25 に記載の R N A またはそのフラグメントの利用。

【請求項 27】

ヒトおよび/または動物の臓器および組織における A の任意のアイソフォームから形成された アミロイドおよび/またはアミロイド状物質の異常堆積を表すヒトおよび/または動物の病理の診断、予防、および/または、処置における請求項 25 または 26 に記載の R N A またはそのフラグメントの利用。

30

【請求項 28】

前記病理のいずれか一つは、典型的または非典型的な表現型の A D の散発的または遺伝的な型で表される請求項 27 に記載の物質の利用。

【請求項 29】

Ala673Val 変異または A P P 7 7 0 のコドン 6 7 3 における他の変異を備えるヒトの A P P のアイソフォーム。

【請求項 30】

N 末端が切断されたもの、および/または、C 末端が拡張されたものを含む A のアイソフォーム全てを備え、Ala673Val 変異または A P P 7 7 0 のコドン 6 7 3 における他の変異を備えるヒトの A P P のフラグメント。

40

【請求項 31】

A 1-40、A 1-42、A 1-40 および A 1-42 の N が切断された形態、および A 1-40 および A 1-42 の C 末端が拡張された形態、またはそれらの部分配列で表される請求項 30 に記載のヒトの A P P のフラグメント。

【請求項 32】

請求項 30 または 31 に記載のヒトの A P P のフラグメントに類似した合成ペプチド。

【請求項 33】

右旋性形態の少なくとも 1 つのアミノ酸残基を備える請求項 30 から 32 のいずれか一項に記載のペプチド。

50

## 【請求項 34】

任意の種類化学基との結合により変質させられる 1 以上のアミノ酸残基を備える請求項 30 から 33 のいずれか一項に記載のペプチド。

## 【請求項 35】

アミロイド物質および/またはアミロイド状物質のヒトおよび/または動物の臓器および組織への異常堆積を特徴とするヒトおよび/または動物の病理の診断および/または予防および/または処置用に設計される薬物の準備用の、請求項 30 から 34 のいずれか一項に記載の擬晶化学構造 (minetic chemical structure)、非蛋白質、または部分的な蛋白質。

## 【請求項 36】

アミロイド物質および/またはアミロイド状物質のヒトおよび/または動物の臓器および組織への異常堆積を特徴とするヒトおよび/または動物の病理の診断および/または予防および/または処置に有用な機能を実行する特定のサイトへ物質を搬送するキャリアとして機能する分子と接合する請求項 30 から 35 のいずれか一項に記載の物質。

## 【請求項 37】

アミロイド物質および/またはアミロイド状物質のヒトおよび/または動物の臓器および組織への異常堆積を特徴とするヒトおよび/または動物の病理の診断および/または予防および/または処置用に設計される薬物の準備における請求項 30 から 36 のいずれか一項に記載の物質の利用。

## 【請求項 38】

前記病理のいずれか 1 つは、典型的または非典型的な表現型の AD の散発的または遺伝的な型で表される請求項 37 に記載の物質の利用。

## 【請求項 39】

アミロイド物質および/またはアミロイド状物質のヒトおよび/または動物の臓器および組織への異常堆積を特徴とするヒトおよび/または動物の病理の診断および/または予防および/または処置に有用な機能を実行する特定のサイトへ任意の種類化学化合物を搬送するキャリアである請求項 30 から 36 のいずれか一項に記載の物質の利用。

## 【請求項 40】

アミロイド物質および/またはアミロイド状物質のヒトおよび/または動物の臓器および組織への異常堆積を特徴とするヒトおよび/または動物の疾病の病因の研究における請求項 25、請求項 30 から 36 のいずれか一項に記載の物質の利用。

## 【請求項 41】

前記病理のいずれか 1 つは、典型的または非典型的な表現型の AD の散発的または遺伝的な型で表される請求項 40 に記載の物質の利用。

## 【請求項 42】

請求項 29 から 34 のいずれか一項に記載の蛋白質および/またはペプチドに対するポリクローナル抗体。

## 【請求項 43】

請求項 29 から 34 のいずれか一項に記載の蛋白質および/またはペプチドに対するモノクローナル抗体またはそのフラグメント (単鎖抗体、ナノボディ)。

## 【請求項 44】

アミロイド物質および/またはアミロイド状物質のヒトおよび/または動物の臓器および組織への異常堆積を特徴とするヒトおよび/または動物の病理の診断および/または予防および/または処置用の薬物の調合における請求項 42 または 43 に記載の抗体の利用。

## 【請求項 45】

前記病理のいずれか一つは、典型的または非典型的な表現型の AD の散発的または遺伝的な型で表現される、請求項 44 に記載の蛋白質および/またはペプチドに対する抗体の利用。

## 【請求項 46】

10

20

30

40

50

アミロイド物質および/またはアミロイド状物質のヒトおよび/または動物の臓器および組織への異常堆積を特徴とするヒトおよび/または動物の病理の体細胞遺伝子療法における請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の構造の利用。

【請求項 47】

請求項 46 に記載の体細胞療法は、キャリアベクター、天然または合成の脂質またはポリマーを利用して行われる請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の構造の利用。

【請求項 48】

請求項 46 に記載の前記体細胞遺伝子療法は、生物剤をベクターとして利用して行われる請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の構造の利用。

【請求項 49】

請求項 46 に記載の前記体細胞遺伝子療法は、ウイルス因子をベクター（アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、SV40、レトロウイルス等）として利用して行われる請求項 48 に記載の構造の利用。

【請求項 50】

請求項 37 または 38 に記載の病理に犯されているヒトの自己細胞のトランスフェクションを、前記病理の細胞療法で利用する請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の構造の利用。

【請求項 51】

請求項 37 または 38 に記載の病理の細胞療法で、異種のまたは相同（xenologous）の細胞のトランスフェクションを利用する請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の構造の利用。

【請求項 52】

請求項 12 に記載の細胞、および、請求項 13 から 24 のいずれか一項に記載の遺伝子組み換えされた臓器の、請求項 37 または 38 に記載の病理の病因の研究、および診断、予防、および処置のモデルとしての利用。

【請求項 53】

請求項 12 に記載の細胞、および、請求項 13 から 24 のいずれか一項に記載の遺伝子組み換えされた臓器の、請求項 29 から 31 のいずれか一項に記載の蛋白質および/またはペプチド生成への利用。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

アルツハイマー病は、高齢者に最も一般的な認知症である。臨床的には認知機能の進行性退化で特徴付けられ、神経病理学的には、アミロイド（A）およびタウ蛋白質の不溶解凝集物が脳皮質および皮質下灰白質に蓄積することを特徴とする変性疾患である。A は、神経網（老人斑）および脳血管（コンゴレッド親和性血管障害）に細胞外アミロイドの形状で堆積し、タウ形状の蛋白質は、異常ニューロン内フィラメント（神経原線維変性）の形状で形成される（Love S. 認知症の神経病理学的研究：神経学者への手引き書. J Neurol Neurosurg Psychiatry 76, 補足5:v8-14, 2005）（図 1）。

【0002】

アルツハイマー病の 95 パーセントのケースは散発性であるが、うち約 5 パーセントが家族性を有し、染色体 14 上のプレセニリン（PSEN1）、染色体 1 上のプレセニリン（PSEN2）、染色体 21 上のアミロイド（APP）の前駆体という、3つの遺伝子の突然変異と関連付けられる。これらのケースのアルツハイマー病は、散発的な形態よりも早期に発症して、常染色体優性型メカニズムにより高い浸透率で遺伝される。

【0003】

ADのethiopathogenesisは完全に理解されるに至っていないが、ここ10年の間に普及している仮説に、「アミロイドカスケード仮説」というものがあり（Wilquet et al. 神経変性におけるアミロイド前駆体蛋白質プロセッシング. Curr Opin Neurol 14:582-8, 2004; Lee et al. アミロイドカスケード仮説の概説. J Alzheimers

10

20

30

40

50

Dis 6:137-45, 2004)、この仮説によると、家族性(FAD)および散発性両方においてA<sub>β</sub>が中心的な役割を果たしている、ということである。

#### 【0004】

A<sub>β</sub>は、「アミロイド生成経路」と称される異化代謝経路を通るAPP前駆体により得られる(図2)。この経路により、蛋白質の分子の上流および下流が、ベータセクレターゼおよびガンマセクレターゼという2つのプロテアーゼにより分割する。ベータセクレターゼ(BACE)の分割によって、99アミノ酸(C99)の長い、可溶性N末端のフラグメント(sAPP)およびC末端ペプチドが生成される。これがさらにガンマセクレターゼにより、A<sub>β</sub>および小さいC末端ペプチド(AICD)に相当する2つのフラグメントへと切断される(Selkoe DJ. アミロイド たんぱく質の発生および運命の解読によるアルツハイマー病の新治療法の発見 J Clin Invest 110:1375-81, 2002)。実際にはガンマセクレターゼは、2つの主要な分割サイトを有し、これらが各々A<sub>β</sub>の「短い」形態および「長い」形態(A<sub>β</sub>1-40およびA<sub>β</sub>1-42)の形成に結びつき、通常の条件下では10:1の割合で存在する。これと同様に、BACEも、ペプチドの異なる点として機能して、N末端領域(例えばA<sub>β</sub>11-40、A<sub>β</sub>11-42、およびA<sub>β</sub>3-42)において切断形状を呈するが、ADで増加する傾向にある(Liu et al. アルツハイマー病患者の脳およびダウン症児の脳へのA<sub>β</sub>11-40/42ペプチドの堆積の特徴付け:アルツハイマー病についての示唆 Acta Neuropathol 112:163-74, 2006)。APPは、これとは別の「非アミロイド生成性」と称される異化代謝経路に遭遇することもあるが、これは蛋白質がA<sub>β</sub>の残基16-17で別のプロテアーゼ(アルファセクレターゼ)により切断されるからである。後者の酵素の作用により、アミロイドの形成が阻害される。

10

20

#### 【0005】

アミロイドカスケード仮説は多数の証拠により裏付けられている。

- ・ 遺伝子APPの変異により、ADの家族性形態が判断される(Rademakers et al., アルツハイマー認知症の早期発症の遺伝学 ScientificWorldJournal 16:497-519, 2003)

- ・ ダウン症で検証された遺伝子APPのさらなる複製の存在により、ADの臨床病理的記述を十分に判断できる。

- ・ ADの遺伝子的に判断される形態の殆どは、A<sub>β</sub>生成増加と関連付けられており、A<sub>β</sub>42/A<sub>β</sub>40の割合も増加する(Kahle et al. アミロイドに対する攻撃 EMBO Rep 4:747-51, 2003)。

30

- ・ A<sub>β</sub>、特に、「長い」42残基形態におけるA<sub>β</sub>は、凝集してオリゴマーを形成し、老人斑の主要成分であるアミロイド原線維を形成する傾向が強い(Armstrong RA. アルツハイマー病のプラーク、もつれ、および病因(Plaques and tangles and the pathogenesis of Alzheimer's disease) Folia Neuropathol 44:1-11, 2006)。

- ・ A<sub>β</sub>、特に42アミノ酸形態のA<sub>β</sub>は、神経毒性を有する(Butterfield et al. アミロイドペプチド(1-42)の、アルツハイマー病患者の脳に存在する酸性ストレスおよび神経変性への貢献(Amyloid beta-peptide (1-42) contributes the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain) Brain Pathol 14:426-32, 2004)。

40

- ・ ADに関連するAPP遺伝子を保持するトランスジェニックマウスは、アミロイドを中枢神経系に蓄積して、行動認知領域における欠陥を示し、これは年齢とともに悪化した(Kurt et al. 変異プレセニリン1のトランスジーンを持つマウスの脳へのアミロイドの堆積に関する神経変性の変化(Neurodegenerative changes associated with beta-amyloid deposition in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes) Exp Neurol 171:59-71, 2001)。

- ・ ヒトのAPPを表すトランスジェニックマウスのA<sub>β</sub>に対する免疫処置により、アミロイドプラークの形成が低減し、神経病学上の欠陥が向上した(Lemere et al. アルツハイマー病のトランスジェニックマウスのモデルおよび野生のマウスにおけるアミロイド

50

免疫処置 (Amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease transgenic mouse models and wildtype mice) Neurochem Res 28:1017-27, 2003)。

【0006】

遺伝的に決定された形態に関しては、家族性ADケースの約80パーセントがPSEN1およびPSEN2変異に関連付けられている (Rocchi et al. アルツハイマー病の原因となり、感受性を有する遺伝子 (Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease): a review. Brain Res Bull 61:1-24, 2003)。両プレセニリンがA $\beta$ の生成に関わっており、これはガンマセクレターゼの巨大分子錯体の一部であり、その変異したケースではA $\beta$  (とりわけA $\beta$  1-42)生成が増加が見られ、これにより神経毒性の凝集物が形成される傾向が高い。

10

【0007】

FADの約5パーセントは、APP遺伝子に局所化した変異により引き起こされる (Rocchi et al. アルツハイマー病の原因となり、感受性を有する遺伝子 (Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease): a review. Brain Res Bull 61:1-24, 2003) (図2)。これら変異のなかには、可溶性および凝集化する傾向を結果として低下させる二次シート構造内の好ましいA $\beta$ に富む構造の助けをすることにより病原性効果を発揮するものがある。他方で他の変異のなかには、セクレターゼが働きかける分子のサイトへの局所化によって、APPのプロセッシングを阻害するものもある (例えば、「スウェーデン人の変異」KM670/671NL参照のこと)。また他のものの中には、全く知られていないメカニズムを有することで、長く、不溶性の形態のA $\beta$  (A $\beta$  1-42、A $\beta$  1-43)の生成物の蓄積を引き起こすものもある。APPのおよびプレセニリンの変異に関連するADのケースでは、A $\beta$  1-42が、分泌されたA $\beta$ ペプチドの15-40パーセントとなるまで増加するものもある (通常の条件下では、その5-10パーセントにしかならない) (Rocchi et al. アルツハイマー病の原因となり、感受性を有する遺伝子 (Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease): a review. Brain Res Bull 61:1-24, 2003、および、Lleo et al. PS-1変異に関するアルツハイマー病の臨床、病理学上、および生化学上の範囲 (Clinical, Pathological, and Biochemical Spectrum of Alzheimer Disease Associated with PS-1 Mutations) Am J Geriatr Psychiatry 12:146-56. 2004)。

20

【発明の概要】

30

【0008】

本発明の技術的課題は、アミロイド物質および/またはアミロイド状物質のヒトおよび/または動物の組織および/または臓器への異常堆積を特徴とするヒトおよび/または動物の病理の診断および/または予防および/または処置のための製品およびその利用法、および、病理の危険性を判定するスクリーニング方法の提供に関する。

【0009】

本発明のこの技術的課題およびその他の目的は、以下に記す独立請求項に示される手段により達成される。

【0010】

本発明の他の特徴が従属請求項により定義される。

40

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

【図2】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

【図3】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

【図4】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

50

【図 5】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

【図 6】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

【図 7】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

【図 8】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

【図 9】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

10

【図 10】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

【図 11】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

【図 12】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

【図 13】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

【図 14】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

20

【図 15】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

【図 16】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

【図 17】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

【図 18】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

【図 19】以下の記載からより明らかになる本発明のさらなる特徴および利点を支持する図である。

30

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、ヒトの A P P 遺伝子の新たな点状の変異 (punctiform mutation) の最近の発見に係る。変異は、ヒトの A P P 遺伝子 (D 8 7 6 5) のコード配列のコドン 6 7 3 におけるチミジンがシトシンで置き換わっていることを特徴としており、これは、ウェブサイト <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> からアクセス可能な G e n B a n k データベースにおける分類法ではヒトの A P P 7 7 0 (NM\_000484.2) のアイソフォームのヌクレオチド 2 2 1 2 (遷移 c.2212>T) に相当する。本特許の目的からは、アミロイド状の物質とは、A の蛋白質凝集物のことを意味し、これにはアミロイド自身の着色および/または超微細構造上の特性がない。このような変異の蛋白質配列では、A P P 7 7 0 の 6 7 3 の位置 (Ala673Val) のアラニンがパリンに置き換わっており、これは A のアミノ酸の残基 2 と対応しており、これは、重症の初老性の認知症を患う患者のホモ接合体で発見された。患者の頭脊液 (cephalorachidian) 液 (liquid) を分析すると、アルツハイマー病に見られるのと同様な、タウ蛋白質およびリン酸化タウ全量の顕著な減少が見られた。他方で、A 1 - 4 0 および A 1 - 4 2 のプラズマレベルは、制御対象に対して増加しており、さらに、ヘテロ接合体の同じ変異を有する対象に対しても増加している。加えて、患者からの生検材料から得られた線維芽細胞は、その培養媒体において、制御線維芽細胞に対して大量の A 1 - 4 0 および A 1 - 4 2 を示した。概して、このデータは、以下に示す例の幾つかでもその詳細が取り上げられるように、ホモ接合体の Ala673Val 変異が、アルツハイマー病として説明されうる認知症に関してあり、且つ、A P

40

50

P 遺伝子の他の変異同様に、A 生成が増えることで A P P 処理に影響が及ぼされることを示している。

【 0 0 1 3 】

様々な家族構成員を遺伝的に研究することにより、ホモ接合体の Ala673Val 変異の別の親族キャリア (familial carrier) の存在が示された。患者より若いこの親戚は、神経心理学的評定がなされ、様々な認知機能の悪化の初期の兆候が検出された。さらなる遺伝的分析により、驚くべきことに、神経病学的現象を引き起こさなかったヘテロ接合体の同じ変異のキャリア対象者が幾人も見つかり、そのうち数人は高齢でもあった ( 齢 9 0 歳 (IX decade of life) ) ( 図 4 )。遺伝子 A P P から始まる転写 R N A に対して行われた遺伝子発現に関する研究により、これら対象では、対立遺伝子 ( 野性型および変種 ) が転写されていることが示された。したがって、ヘテロ接合体において病気がないことは、遺伝子の抑制メカニズムによるものではない ( 「 病的 」 対立遺伝子の転写の阻害 )。従って、A P P 遺伝子についてこれまで記載してきたこととは反対に、Ala673Val 変異では、常染色体優性型メカニズムにより高い浸透率で遺伝し、常染色体劣性型の発現がある。したがって、明らかに散発性の形態のなかに、常染色体劣性型の遺伝により引き起こされたものもあることがある。この現象の分子基盤を調べるべく、2 A 1 - 4 0 ペプチド、1 つの野生型 ( DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV )、および位置 2 にアラニンの代わりにバリンを含む他のもの ( DVEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAI IGLMVGGVV ) を合成した。2 つのペプチドには、化学物理および形態学上の分析を行い、その二次構造、凝集速度、および凝集の形態および性質を調べた。これら調査により、変異したペプチドは、野生型よりもかなり大きなアミロイド原線維を形成する傾向があることが分かった。また驚くべきことに、2 つのペプチドの等モル量は、変異したペプチドよりも小さいだけでなく、自身の野生型のペプチドよりも小さく凝集する。アミロイド形成に対するこの「抑制」作用は、疾病が、もっぱら Ala673Val 変異を受けるホモ接合体に発現し、細胞レベルのペプチド両方 ( 野生型および変異型 ) 両方を共に表現するヘテロ接合体では発症しない、という臨床的な観察結果とも合致する。このデータに基づいて、個々のヘテロ接合体は、それに対応する野生型の存在における変異 A ペプチドという小さな原線維の形成によってアルツハイマー病から守られる、と仮定することができる。

【 0 0 1 4 】

変異を含んでいる A の N 末端領域が凝集において重要な役割を持ち、Ala673Val 変異が抑制効果を有するという仮定を検証するべく、A の最初の 6 つのアミノ酸に対応するよう、2 つのペプチド ( 1 つが野生型の配列 ( DAEFRH ) であり、他方が、位置 2 にアラニンの代わりにバリンを含むもの ( DVEFRH ) である ) を合成する。その後、2 つのヘキサペプチドは、A 1 - 4 0 野生型とともに培養され、検査される。この検査により、両方のヘキサペプチドにより、A 1 - 4 0 原線維が自然に形成されるという傾向が抑制され、変異したヘキサペプチドの効果が、対応する野生型のものよりも大きいことが分かった。

【 0 0 1 5 】

このデータは、A D の治療法に新たな可能性を開き、さらには、中枢神経系または他の組織に不溶性および毒性の凝集物の形で蛋白質が蓄積されることを特徴とする疾病全般に対しても新たな治療法の可能性となる。

【 0 0 1 6 】

本発明の第 1 の用途は、当業者には公知な方法により、Ala673Val を有するヒトの A P P の c D N A を含むベクターを生成すること、および該ベクターを利用して病理学研究および治療に利用可能な細胞株をトランスフェクションすることである。

【 0 0 1 7 】

第 2 の用途は、当業者には公知な方法により前の用途による構造を、Ala673Val 変異を有するヒトの A P P を表すことのできるヒトではないヒト以外のトランスジェニック哺乳類動物 ( A P P ( ホモ接合体動物 ) 単体または野生型のヒトの A P P または他の変異 ( ダブルトランスジェニック ) を含む組み合わせ ) のベクターとして利用する。これら動物は、アミロイドおよび / またはアミロイド状物質の臓器および組織への異常形成および堆

10

20

30

40

50

積に特徴付けられるヒトおよび/または動物の病理に関する病理学研究、診断、予防、および処置のモデルとして利用することができる。本実施形態では、好適な動物はマウスであり、特に内因性 A P P のノックアウトマウス株 C57BL6 が好適であり、好適な病理は A D である。

#### 【0018】

変異したペプチドが A の凝集および原線維の形成を妨げるという潜在的な可能性を考慮に入れ、本発明の別の可能な用途は、組織および臓器の アミロイド物質の異常堆積を特徴とする病理のインビボによる遺伝子治療 ( D N A を患者の細胞または組織に直接埋め込む )、またはエクスビボによる遺伝子治療 ( D N A をまずは臓器から切り離れた細胞内に埋め込み、研究所で培養してから、変質したものを患者の体内に戻すこと ) により、  
Ala673Val 変異を有する A P P を含む構造の生成である。構造を対象細胞に埋め込むことは、ウィルス型のベクター (例えば、( a ) 増殖細胞染色体内の自身の D N A を統合することのできるレトロウィルス、( b ) 増殖性ではなく細胞内に遺伝物質を転移させることのできるレンチウィルス、( c ) 自身の D N A を細胞の染色体に探さず、小型の遺伝子のみを利用可能なアデノ随伴ウィルス、( d ) 大型の遺伝子を転移させることができ、且つ、自身の表現も限られた時間内は可能であるアデノウィルス、または ( e ) 特にニューロンといった特定の種類の細胞のみに感染する単純ヘルペスウィルス ( herpex simplex virus ) ) により達成可能である。または、リポソーム等の非ウィルス性のベクターを利用することもできる。A が異常蓄積する病理に犯された臓器に Ala673Val 変異を有する A P P を埋め込むことにより、組織の アミロイド物質の蓄積を阻害することのできる変異した蛋白質源を提供することができる。

10

20

#### 【0019】

他の可能性ある用途に、当業者には公知な方法の利用により ( R N A 干渉、R N A i )、この変異体を含むマイナス鎖 m R N A を用いて、Ala673Val 変異用のホモ接合体である対象物におけるメッセンジャの翻訳を抑える利用法がある。翻訳の阻害には、凝集する傾向の強い、変異したペプチドの生成を抑える目的がある。本発明に利用される R N A i 技術に基づく実験も、 アミロイドおよび/またはアミロイド状物質の組織および臓器への異常堆積に特徴付けられる疾病の病理研究には有効でありうる。本発明の別の用途によると、 アミロイドおよび/またはアミロイド状物質の組織および臓器への異常堆積に特徴付けられるヒトおよび/または動物の病理の診断、予防、および処置用に、Ala673Val 変異および天然または合成のペプチドを有するヒトの A P P が利用される。

30

#### 【0020】

好適な実施形態では、くも膜下投与等の経口および/または非経口投与に合わせて調合されたヘキサペプチド DVEFRH 等の低分子量ペプチドの利用が提供される。好適な病理は A D である。処置により、単一の治療で、または他の薬との関連で利用される単一のペプチドまたは幾らかのペプチドの投与がなされる。

#### 【0021】

本発明のさらなる用途では、当業者には公知な方法の利用により、 アミロイドおよび/またはアミロイド状物質の組織および臓器への異常形成および堆積に特徴付けられるヒトおよび/または動物の病理の診断、予防、および処置用に本願による蛋白質および/またはペプチドに対する抗体が生成される。好適な実施形態では、ヒトの A P P およびそれに由来するペプチドの Ala673Val 変異を認識することのできるそれら変異を含むモノクローナル抗体が提供される。これら抗体は、Ala673Val 変異を有する A P P を認識する目的に利用することができ、適切に調合されると、この変異した A P P の存在により特徴付けられるアミロイドーシスの処置用に利用することができる。好適なアミロイドーシスは A D である。上述の用途は例示であり、本発明の開発を制限するものではない。

40

#### 【0022】

< 例示 >

< 例 1 . A P P 遺伝子の新たな変異体の識別およびこの変異体を有するキャリア患者の臨床上的表現型の説明 > 変異体の識別は、既に記載した技術 ( Wakutani et al 家族性が

50

疑われるアルツハイマー病における新規なアミロイド前駆体蛋白質遺伝子ミスセンス変異 (D678N) (Novel amyloid precursor protein gene missense mutation (D678N) in probably familial Alzheimer's disease) J Neurol Neurosurg Psychiatry 75:1039-42, 2004) により、プライマー-5'-GTTTTGGGTAGCCTTTG-3'および5'-GGCAAGACAAAACAGTAGTGG-3'および増幅による生成物(図5)を利用して、患者のリンパ球からゲノムDNAを抽出して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)させることで、遺伝子APPのエクソン16および17を増幅させることで、行うことができる。変異体は、エクソン16内の制限酵素HpYCH4Vの特定の切断サイトがないので、Ala673Valの存在も、PCRによるエクソン16の増幅(プライマー:5'-GGCAAGACAAAACAGTAGTGG-3'および5'-TACTTTAATTATGATGTAATA-3')、HpYCH4VによるPCR生成物の消化、および、2.5パーセントのアガロースゲル上のフラグメントの分離により示される。野生型の対立遺伝子では、HpYCH4による消化により91および78塩基対(bp)という2つのフラグメントが生成され、一方で、変異した対立遺伝子は、169bpの単一のフラグメントを生成する(図6)。

10

## 【0023】

認知症に家族性がなく、36歳で進行性の心理組成症状(evolutionary psycho-organic syndrome)を発病して、記憶障害、計画障害、および行動障害が悪化途中にある患者からAla673Val変異が特定された(図4、III 18)。臨床記述は、多方面の認識退化へと進行して、ミオクローヌス型のパーキンソン病および痙攣性の四肢麻痺(spastic tetraparesis)に関する不随意運動を伴う。

## 【0024】

20

家族の遺伝研究により、Ala673Val変異の第2のホモ接合体対象(図4、III 20)、および、様々なヘテロ接合体対象(図4、II 10、III 1、III 2、III 8、III 12、およびIV 1)を特定することができた。ホモ接合体(つまり、5歳年下の妹)には、現在この疾病の初期症状と合致する認識障害の初期の兆候が現れており、他方で、ヘテロ接合体対象からは、高齢者のなかからも誰も神経学上の病理の兆候が見られない。この観察により、Ala673Val変異は常染色体劣性型であり、これまでにADに関して記載したもののうち1つしかホモ接合体に存在するときには病理表現型を表わしていないことが分かる。

## 【0025】

30

APP遺伝子の同じコドンがAla673Thr同質異像を含んでいることに留意されたい。この同質異像現象は、ADを示唆する臨床的兆候または神経病理学上の変質のない対象のヘテロ接合体で見つかった(Peacock et al."アルツハイマー病を患っていない患者のアミロイド前駆体蛋白質遺伝子のA4領域における新規な同質異像現象"(Novel polymorphism in the A4 region of the amyloid precursor protein gene in a patient without Alzheimer's disease) Neurology 43:1254-56, 1993)。

## 【0026】

患者に行われた研究所での計器による調査は、以下を示している。

- ・ 脳のRMにおける、特に前領域に顕著な、広範にわたる脳萎縮。
- ・ 認知症に犯されていない対象が示す制御グループのもの(A<sub>1-40</sub>=109±12 pg/ml, p=0.003; A<sub>1-42</sub>=20±6pg/ml, p=0.004)と比較したときの、プラズマ内のペプチドA<sub>1-40</sub>およびA<sub>1-42</sub>の顕著な増加(それぞれ426±93 pg/mlおよび46±7 pg/ml)(図7)

40

- ・ 陰性制御対象群(A<sub>1-40</sub>=34.4±3.8 pg/ml; A<sub>1-42</sub>=4.4±0.6 pg/ml)と比した場合の、皮膚生検により患者から得られた線維芽細胞の培養媒体におけるA<sub>1</sub>の増加(A<sub>1-40</sub>=87.3±9.5 pg/ml; A<sub>1-42</sub>=8.8±0.2 pg/ml)(図8)

- ・ 脳脊髄液における制御群のA<sub>1</sub>の低減42±43 pg/ml対392±115 pg/mlの低減、p=0.0004(図9)、および、タウ蛋白質の増加(420 pg/ml; 正常範囲90-150 pg/ml)およびリン酸化タウの増加(63.3 pg/ml; 制御グループにおける平均濃度: 19.1 pg/ml)(図10) 上述の変質は、アルツハイマー病で観察されたものと全体的に類似している。

## 【0027】

50

< 例 2 : Ala673Val 変異を含む A<sub>1-40</sub> ペプチドの化学物理特性 >

Ala673Val 変異の効果を確認、その A D の病因における役割を確認するべく、2 A<sub>1-40</sub> ペプチドを合成した (一方が野生型 (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV) 配列を有し、他方が、位置 2 にアラニンの代わりにパリンを含む (DVEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV))。これらペプチドは、シンセサイザ 433A (Applied Biosystems 社製) で生成された。樹脂で接着されたペプチドはその後、N 末端で脂肪親和性プローブ (4 - ドデシルアミノカルボニルフルオレン 9 - イルメチルサクシニミジルカルボネート) (4-dodecylaminocarbonylfluorene-9-ylmethylsuccinimidyl carbonate) で、Ball et al. (Int J Pept Prot Res 40:370-9, 1992) の開示する方法に、Bonetto et al. (J Biol Chem 277: 31327-34, 2002) の修正を加えたものにより、誘導体化された。樹脂から切り離された後に、ペプチドは逆相カラム C4 (ウォーターズ) を用いて HPLC により浄化され、95 パーセントを超える純度が得られた。ペプチドの特定は、MALDI-TOF スペクトロメトリ (反射 III、Brucker Model) により行われた。

10

【0028】

以下に示す物理化学研究は、そうではないと明記しない限りにおいて、ペプチド野生型 A<sub>1-40</sub>、変異した A<sub>1-40</sub>、および 2 つの等モル混合物を含むサンプルが、10 mM の NaOH に溶解され、その後 50 mM の Tris HCl 内で、pH 7.0 で、最終濃度が 0.25 および 0.125 mM となるよう、希釈された。その後サンプルを摂氏 37 度で 1、4、8、24 時間の間、3、5、10、15 および 20 日間の間、培養した。各回、一定量のサンプルを分析して、二次構造、凝集物、ならびに、凝集物の超微細構造および光学着色特性 (optical-tinctorial properties) を調べた。

20

【0029】

< 二次構造 > A<sub>1-40</sub> の二次構造の変異による異形は、Clippingdale et al. (J Pept Sci 5:227-49, 2001) に記載されている技術による円偏光二色性により調べられた。ペプチドは、150 mM のリン酸緩衝液で、pH 7.4 で希釈され、最終的な濃度は 100 μM となり、摂氏 37 度で Jasco - 810 分光旋光計で計測された。スペクトルは、1 mm の試験管を用いて、20 nm / 分の走査速度で得られた。緩衝溶液のスペクトルを得た後で、移動平均法により適宜ノイズを低減させた。

【0030】

分析により、変異したペプチドはシートに第 2 の構造 (secondary conformation) が多い傾向が強いことが分かった。試験時間にわたり、シートコンテンツは、野生型のペプチドのものに比べてかなり高く、変異した野生型のペプチドからなる等モルの混合物と比べてもかなり高かった (図 11)。これは、Ala673Val 変異において、A<sub>1-40</sub> の折り返し条件とされており、二次シート構造が顕著に増加したことを示している。

30

【0031】

< 凝集 > 野生型 A<sub>1-40</sub>、変異した A<sub>1-40</sub>、およびそれらの等モル混合物の凝集物を、遠心分離により沈殿しうるペプチドの量を判断することにより評価した。様々な培養時間において、30 μl の一定量のサンプルを、摂氏 4 度で 15 分間、15,000 g で遠心分離した。ペレットは、25 μl の純粋なギ酸で溶解され (solubilised)、溶液が、4.6 X 150 mm の 100 オングストロームのカラムをもつ HPLC に注入された (Labservice Analytica, Polymer Laboratories)。溶出液は、流速 0.7 ml / 分で、溶出剤 B の直線濃度勾配を 15 - 60 パーセントで 20 分間用い、0.1 パーセント TFA からなる溶出剤 A を水に溶かし、0.08 パーセント TFA からなる溶出剤 B をアセトニトリルに溶かした可動相 (movable phase) を用いて生成された。ペプチドに相当するピークは、214 nm における溶出剤の吸収度を計測することにより修正された。

40

【0032】

沈殿されうるペプチド量は、当初の溶液に存在するペプチドの総量のパーセンテージとして計算された。

【0033】

これら実験により、変異したペプチドが、野生型のペプチドより多く、且つ、より速く

50

凝集し、驚くべきことに、2つのペプチドの沈殿した部分により形成される混合物は、変異したペプチドおよび野生型のペプチドにより小さいことが分かった(図12)。

【0034】

<凝集物の超微細構造特性および着色特性>

凝集物の超微細構造特性および光学着色特性(optical-tinctorial properties)を、それぞれ、コンゴレッドで着色した後に電子顕微鏡および偏光顕微鏡で観察した。

【0035】

超微細構造を調べた結果、野生型 A<sub>1-40</sub>、変異した A<sub>1-40</sub>、およびそれらの等モル混合物の 5 μl の懸濁液を、1時間から 20 日間の間の培養時間の間延伸させ(drawn)、Formvar-Carbon で覆ったニッケル製のスクリーン上に 5 分間堆積させ、ウラニルの過飽和溶液でネガティブカラーに染色して(negatively coloured)、電子顕微鏡(EM109Zeiss)で観察した。培養 20 日目に、一定量のサンプルを 15,000g で 15 分間遠心分離した。これにより得られたペレットは、pH 7.4 のリン酸緩衝液で 2.5 パーセントのグルタルアルデヒドにフィックスされ、1 パーセントのオスミウム酸でポストフィックスされ、アセトンで脱気され、エポキシ樹脂(epoxy resin)(Supurr, Electron Microscopy Sciences)に含められた。超微細な箇所(500 オングストローム)が、銅製のスクリーン上に収集され、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛(lead citrate)で着色され、電子顕微鏡で観察された。

10

【0036】

凝集物がアミロイドで形成されているかどうかを確かめ、かつ、形成されているアミロイドの範囲を計測するべく、様々な培養時間において、各サンプルの 5 μl の水溶液をポリリジンコートスライドガラス(Bio-Optical)上に集め、コンゴレッドで着色して、偏光顕微鏡(Nikon Eclipse E-800)で観察した。超微細構造の分析により、最初の二日間の培養期間では、野生型の A<sub>1-40</sub> のペプチドが、アモルファス凝集してオリゴマーおよび稀な線維状構造を形成した。48 時間後に、短い原線維材料が未分化状態で不規則に現れ(プロトフィブリル)、培養 72 時間の後に初めて、長い直線状原線維が観察され、その直径は約 8 nm であり、アモルファスとプロトフィブリル材料との間に介在していた。この後で、原線維の密度が増え、アモルファスおよびプロトフィブリル量が比例して増加した。培養 15 日後になって初めて、殆どが密度の高い原線維ネットワークからなる材料で形成されるようになった。

20

30

【0037】

他方、変異したペプチド A<sub>1-40</sub> の凝集速度は、非常に速かった。つまり、培養 24 時間の頃から、長く、未分化の規則的な原線維は存在しており(図13)、5日を過ぎると、サンプルは、プロトフィブリルおよびアモルファス材料のない、密度の高い原線維ネットワークで構成されるようになった。驚くべきことに、2つのペプチドの等モル混合物が形成した原線維は、変異したペプチドと比較しても、野生型と比較しても少なく、培養 20 日を過ぎると、凝集物の殆どがアモルファス材料からなるようになった(図14)。

【0038】

コンゴレッドで着色された準備物を偏光で観察することにより、変異したペプチド A<sub>1-40</sub> が野生型の A<sub>1-40</sub> よりもアミロイド生成機能に優れ(amyloidogenic)、2つのペプチドの混合物は、アミロイドを形成機能に劣る傾向にあることが分かった。つまり、複屈折材料の小さな凝集物は、変異した A<sub>1-40</sub> のサンプルでは培養 24 時間を過ぎると既に観察されたが(図13)、野生型の A<sub>1-40</sub> では 72 時間後に観察され、2つのペプチドの混合物では 5 日後になって初めて観察された。後になって、複屈折材料の進行性の増加が変異型の A<sub>1-40</sub> および野生型の A<sub>1-40</sub> サンプルに観察されたが、2つのペプチドの混合物ではその増加が、培養 20 日を過ぎても非常に遅かった(図14)。このデータから、凝集物を調べた結果、(i)変異したペプチド A<sub>1-40</sub> は、野生型よりもアミロイド生成機能に優れ、(ii)2つのペプチドの混合物は、アミロイドを形成機能に劣る傾向にあることが確認することができる。

40

50

## 【 0 0 3 9 】

< 例 3 : 合成ペプチドによるアミロイド生成の阻害、Ala673Val変異体を含む A の N 末端領域の同族体 >

変異型の A 1 - 4 0 と野生型の A ベータ 1 - 4 0 ペプチドの混合物を物理化学的に研究した結果、Ala673Val変異体が A の凝集物に対して持つ抑制効果が示唆されたので、A の初めの 6 つのアミノ酸に対応する 2 つの合成ペプチド ( 1 つが野生型列 ( DAEFRH ) を有し、他方が、( DVEFRH ) というように、位置 2 がアラニンからバリンに替わっている ) を用いてこの仮説を検証した。2 つのヘキサペプチドとともに、等モル濃度で、またはそれを超える濃度 ( ヘキサペプチド : A 1 - 4 0 = 5 : 1 ) で野生型 A 1 - 4 0 とともに培養した。混合物を、例 2 に示すように超微細構造的に、および組織化学的に調べた。調査の結果、ヘキサペプチド両方において ( 変異体および野生型両方 )、A 1 - 4 0 の原線維の形成が抑制されたことが分かり、A の N 末端領域、つまり変異したサイトが、凝集に重要な役割を担っていることが分かった ( 図 1 5 )。しかし、変異したヘキサペプチドは、対応する野生型よりもずっと活性化されていたので、原線維の形成に対する抑制効果による Ala673Val 変異体の重要性が理解される。

10

## 【 0 0 4 0 】

< 例 4 : 野生型のヒトの A P P で細胞株をトランスフェクションする、または、A の位置 2 に A l a > V a l 変異を含む >

ジェネティックエンジニアリング法では ( Tesco et al. APP の代替物 V715F および L720P が、PS1 構造を変質させ、別途 A および AICD 生成に影響を持つ ( APP substitutions V715 F and L720P alter PS1 conformation and differentially affect A and AICD generation ) J Neurochem 95: 446-56, 2005; Sudhir et al. アミノ末端基のフラグメントの、培養細胞のアミロイド前駆体蛋白質レポーターおよび変異誘導体からの放出 ( Release of Amino-terminal Fragments from Amyloid Precursor Protein Reporter and Mutated Derivatives in Cultured Cell ) J Biol Chem 267:25602-08, 1992 )、それぞれ野生型のヒトの A P P 7 5 1 の c D N A およびヒトの A P P 7 5 1 の c D N A ( A の位置 2 における A l a > V a l 変異体 ) を含む 2 つのベクターを生成した。これらベクターにより、2 つの細胞株がトランスフェクションされ ( C O S 7 および C H O )、A 計量を E L I S A 法により媒体内で行った。A の位置 2 における A l a > V a l 変異体を、サイト特定突然変異生成 ( QuikChange ( 登録商標 ) XL サイト対象突然変異分析キット、Stratagene ) により、オリゴヌクレオチド 5' -GATCTCTGAAGTGAAGATGGATGTAGAATTCC-3' および 5' -GTCA TGTCGGAATTCTACATCCATCTTCACTT 3' を利用して、ヒト A P P 7 5 1 の c D N A に挿入した。

20

30

## 【 0 0 4 1 】

A P P の野生型および変異型両方を、P C T により、プライマー 5' -CCCGGATATCGCCACCA TGCTGCCCGGTTTGGCAC-3' および 5' -ACCGAAGCTTTGTGGCGGGGTCTAGTTC-3' ( 前者は、制限酵素 E c o R V により認識されるサイトを含み、後者は、酵素 H i n d I I I のサイトを有する ) を用いて増幅し、制限サイト E c o R V および H i n d I I I で p c D N A 3 . 1 ベクターでクローン化した。この構成物をさらに、Top Ten One Shot ( Invitrogen ) 細胞の変換により増幅して、Endofree Plasmid Maxi Kit ( Qiagen ) というキットで浄化して、エレクトロポレーションで C O S 7 および C H O 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション効率を、ウエスタンブロット法により、蛋白質の N 末端領域 ( 残基 6 1 - 8 8 ) に対する抗体 2 2 C 1 1 ( Chemicon International Inc. ) を用いて細胞溶解物の A P P の資質によって評価した。A P P 表現レベルを利用して、2 つの構造でトランスフェクションされた細胞による A 生成のレベルを比較した。野生型および変異型のヒトの A P P を表す C O S 7 および C H O の培養媒体上では、ペプチド A 1 - 4 0 および A 1 - 4 2、ならびに、N 末端を E L I S A で切断した形状を計測した ( Immuno-Biological Laboratories Gunma )。

40

## 【 0 0 4 2 】

研究の結果以下が示された。

50

・ 変異した A P P をトランスフェクションした C O S 7 細胞の媒体の A 1 - 4 0 および A 1 - 4 2 はそれぞれ  $116.8 \pm 90.5$  pg/ml および  $20 \pm 12.3$  pg/ml であり、野生型の A P P をトランスフェクションした細胞のもの ( $21.9 \pm 8.6$  pg/ml および  $4 \pm 0.8$  pg/ml) と比して大幅に多い (図 1 6)。

・ 変異した A P P をトランスフェクションした C H O の媒体の A 1 - 4 0 および A 1 - 4 2 はそれぞれ  $84.6 \pm 9$  pg/ml および  $9.6 \pm 3.4$  pg/ml であり、野生型の A P P をトランスフェクションされた細胞のもの ( $49.8 \pm 11.8$  pg/ml および  $4.2 \pm 0.8$  pg/ml) と比して大幅に多い (図 1 7)。

・ A の N 末端を切断した形状は、野生型の A P P をトランスフェクションされた細胞のもの ( $1.1 \pm 0.3$  pg/ml) と比較して、変異した A P P をトランスフェクションした C O S 7 細胞の媒体において ( $2.5 \pm 0.3$  pg/ml であった)、特に A 3 - 4 2 で顕著に多い。このデータは、A の位置 2 における A 1 a > V a 1 変異体が A P P プロセッシングを変質させて、アミロイド生成経路について有利に機能させ、A 1 - 4 0 および A 1 - 4 2 生成が増加し、且つ、N 末端を切断した形状も増加したことを示している。

#### 【 0 0 4 3 】

< 例 5 : トランスジェニックマウス、A の位置 2 における A 1 a > V a 1 のキャリアの生成 >

A の位置 2 における A 1 a > V a 1 変異体を有するヒトの A P P を有する構造を生成して、行動的、神経生理学上、神経放射線学上、神経病理学上、生化学上、および分子についてのテストを行う対象であるトランスジェニックマウスを生成し、この遺伝子の欠陥に纏わる疾病の表現型特徴を定義し、病因および治療の研究を行った。

#### 【 0 0 4 4 】

野生型 A P P 7 5 1 の c D N A は、ベクター p T S C 2 1 にクローン化されており、プロモーターであるマウス T h y 1 . 2 を含んでいた (制限サイト H i n d I I I および E c o R V) (図 1 8)。次にこの構造に対して、細胞トランスフェクション (例 4 参照のこと) で報告されているものと同じプロトコルを用いて A ( S t r a t a g e n e ) の位置 2 における A 1 a > V a 1 変異体を組み入れてサイト特定突然変異生成を行い、これを用いて株 C57B1/6 から始まるトランスジェニックマウスを生成した。

#### 【 0 0 4 5 】

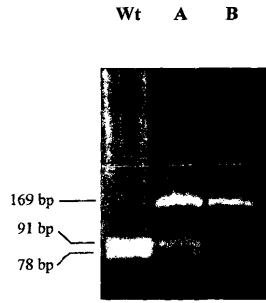
トランスジーンとしてポジティブな 6 つのファウンダ (オス 3、メス 3) を使い、これらがそれぞれ 3 つの株で子を産み、中枢神経系において A の位置 2 における A 1 a > V a 1 変異体を有するヒトの A P P を過剰発現した。2 つの最良の株を、既に利用可能な近因性 A P P の C57B1/6 ノックアウトマウスの 1 株と交配させて、マウス A P P のない変異したヒトの A P P を表す動物を得た (図 1 9 の  $huAPP_{mut}/moAPP_0^{/0}$ )。最後に、これらを、野生型のヒトの A P P のトランスジェニックマウスと交配して、ヘテロ接合体の動物を得た ( $huAPP_{mut}/huAPP_{wt}$ )。

#### 【 0 0 4 6 】

ホモ接合体およびヘテロ接合体の A における位置 2 の変異体を有するヒトの A P P を表すマウスは、アルツハイマー病の、および、より一般的には、アミロイドおよび/またはアミロイド状物質の臓器および組織への異常堆積を特徴とするヒトおよび/または動物の疾病の病因学研究、診断、予防、および処置に利用することができる。



【 図 6 】

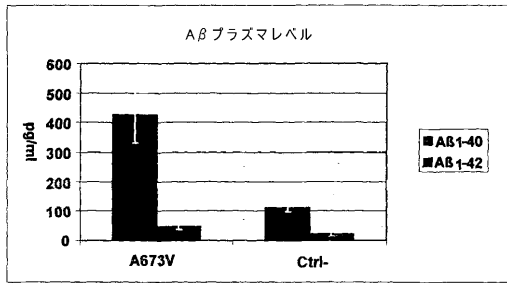


遺伝子APPのエクソン16を含むDNAフラグメントの制限酵素による消化による分析。

DNAフラグメントは、PCRにより増幅させられる。増幅した生成物は、酵素H<sub>p</sub>YCH4Vにより消化され、消化された生成物がエレクトロフォーシスによりアガロースゲル上で分離される。

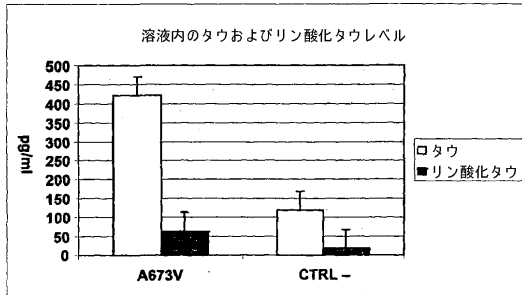
Wt=通常の対象物、A=ヘテロ接合体変異Ala673Valを有する対象物、B=ホモ接合体変異Ala673Valを有する対象物

【 図 7 】



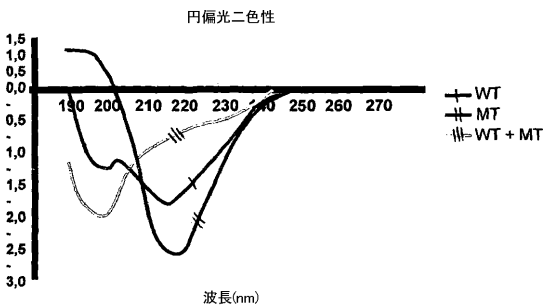
発端者のプラズマおよび陰性対象群で見つかったAβ1-40およびAβ1-42の値間の比較

【 図 10 】



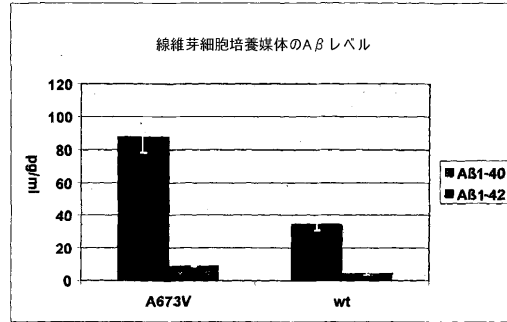
発端者(A673V)の溶液および通常制御対象群(CTRL-)におけるタウ蛋白質値とリン酸化タウ蛋白質値との間の比較

【 図 11 】



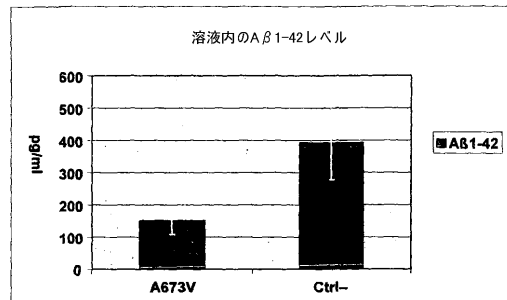
培養7日の後に評価された野生型ペプチド(WT)、変異型ペプチド(MT)および2つの混合物(WT+MT)の二次構造の比較

【 図 8 】



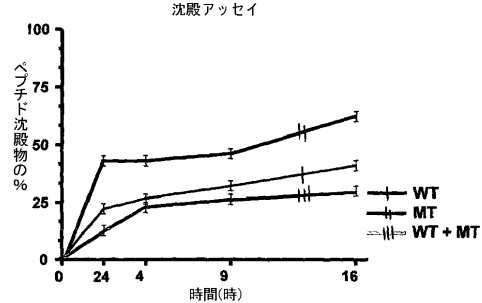
発端者からの線維芽細胞および陰性対象群に属する線維芽細胞の培養媒体中のAβ1-40およびAβ1-42の値間の比較

【 図 9 】



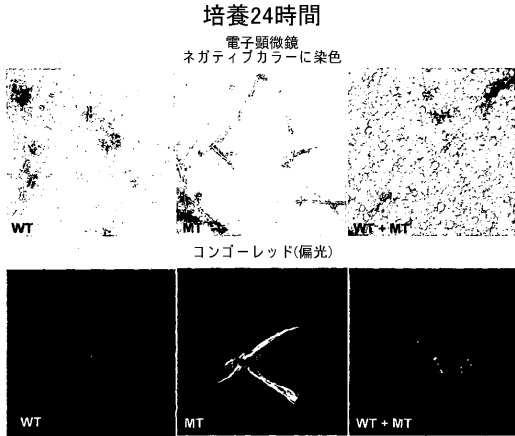
発端者(A673V)の溶液および通常制御対象群(Ctrl-)で検出されたAβ1-42値間の比較

【 図 12 】



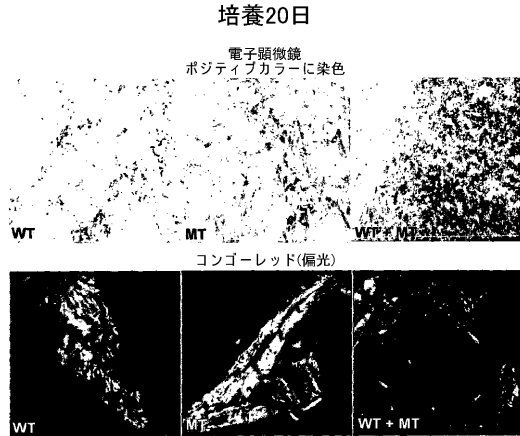
野生型(WT)ペプチド、変異型(MT)ペプチドおよび2つの混合物(WT+MT)の沈殿性の比較

【 図 1 3 】



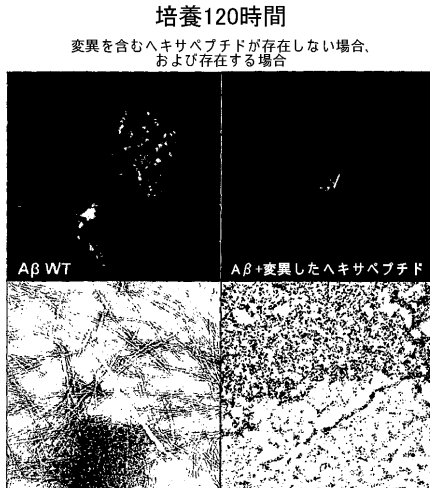
培養24時間後に野生型(WT)ペプチド、変異型(MT)ペプチドおよび2つの混合物(WT+MT)が形成する凝集物の超微細構造および着色特性超微細構造を検査すると、変異したペプチドのみが、培養24時間の後で原線維凝集物を形成した。このデータはさらに、偏光による検査からも確認され、これにより、変異したペプチドのサンプル内のみ複屈折の存在が見つかった。

【 図 1 4 】



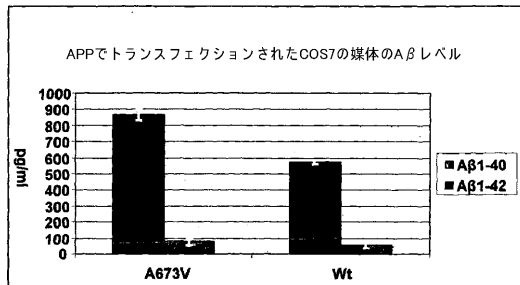
培養20日後に野生型(WT)ペプチド、変異型(MT)ペプチドおよび2つの混合物(WT+MT)が形成する凝集物の超微細構造および着色特性超微細構造を検査すると、2つのペプチドの混合物に見られる殆どの材料がアモルファスであることが観察される。コンゴールレッドを利用した染色後の偏光検査では、2つのペプチドの混合物によると、野生型ペプチドおよび変異型ペプチドよりもコンゴールレッド親和性凝集の形成範囲が小さいことが分かる。

【 図 1 5 】



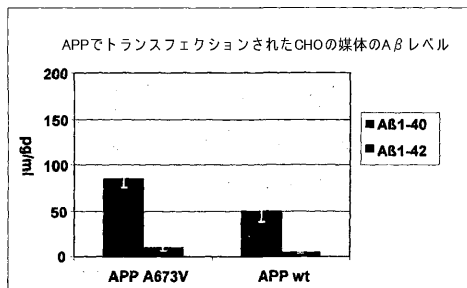
変異したヘキサペプチドが存在しない場合、および存在する場合に、5日間培養した野生型のAβ1-40から形成された凝集物の超微細構造および着色特性(1.5モル比)変異したヘキサペプチドが過剰に存在している場合には、ペプチドAβ1-40によるアミロイド線維の形成能力は略完全に抑制されている

【 図 1 6 】



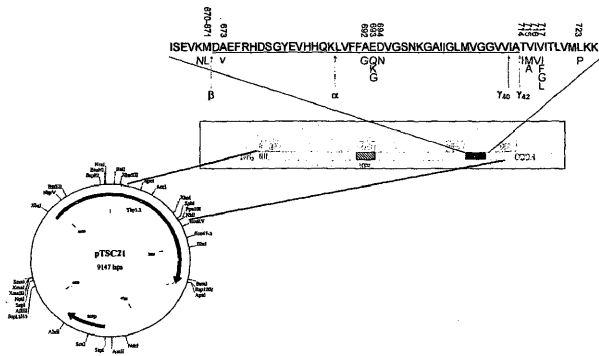
APP A673VでトランスフェクションされたCOS7および野生型APPでトランスフェクションされたCOS7の媒体におけるAβ1-40およびAβ1-42の値の比較

【 図 1 7 】



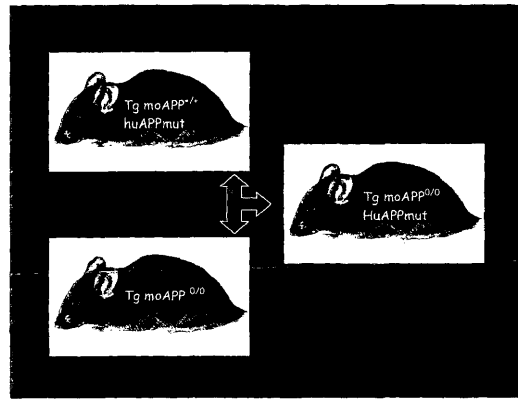
APP A673VでトランスフェクションされたCHOおよび野生型APPでトランスフェクションされたCHOの媒体におけるAβ1-40およびAβ1-42の値の比較

【 図 18 】



トランスジェニックマウスの生成に利用される、ヒトのAPP、野生型またはAβの位置2のAla>Val変異を保持する構造を示す図  
 マウス株プロモータThy1.2制御下で、野生型のヒトのAPPがpTSC21プラスミドに導入される。その後、変異を突然変異生成により導入した。

【 図 19 】



Aβの位置2のAla>Val変異を保持するトランスジェニックマウスC57Blの「交配」図

Aβの位置2のAla>Val変異を保持するヒトのAPPおよび内因性APP(Tg moAPP<sup>+/+</sup> huAPP<sub>mut</sub>)を表すトランスジェニックマウスを、内因性APP(Tg moAPP<sup>0/0</sup>)ノックアウトマウスと交配して、変異を有するヒトのAPPのみを表すマウス(Tg moAPP<sup>0/0</sup> huAPP<sub>mut</sub>)を得た。

最後に、後者を、野生型のヒトのAPPのトランスジェニックマウスと交配して、ヘテロ接合体動物(huAPP<sub>wt</sub>/huAPP<sub>mut</sub>)を得た。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/EP2008/008595
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 G01N33/68 C07K14/47 C07K16/18 A61K39/395 A01K67/027 C12N15/85 C12N15/11		
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) C12N A01K G01N C07K A61K C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EBI [Online] EMBL; 26 February 2004 (2004-02-26), DIAS NETO E. ET AL: "RCO-HT0505-010200-012-h02 HT0505 Homo sapiens cDNA, mRNA sequence". XP002528966 Database accession no. BG877527 abstract	9-15, 21-25,53
X	WO 2004/058940 A (UNIV IOWA RES FOUND [US]; PAULSON HENRY [US]; MILLER VICTOR [US] PAULS) 15 July 2004 (2004-07-15) page 97	26-28
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 May 2009		Date of mailing of the international search report 08/06/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Knudsen, Henrik

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No  
 PCT/EP2008/008595

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PEACOCK M L ET AL: "Novel polymorphism, in the A4 region of the amyloid precursor protein gene in a patient without Alzheimer's disease" NEUROLOGY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, PHILADELPHIA, US, vol. 43, no. 6, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 1254-1256, XP009093023 ISSN: 0028-3878 abstract	29-33
X	WO 2006/121656 A (MERCK & CO INC [US]; GARSKY VICTOR M [US]; JOYCE JOSEPH G [US]; KELLER) 16 November 2006 (2006-11-16) figure 5; sequence 76	34-41
X	WO 2007/064917 A (ABBOTT LAB [US]; ABBOTT GMBH & CO KG [DE]; HOLZMAN THOMAS F [US]; HARL) 7 June 2007 (2007-06-07) abstract	42-45
A	JONES C T ET AL: "Mutation in codon 713 of the beta amyloid precursor protein gene presenting with schizophrenia." NATURE GENETICS JUL 1992, vol. 1, no. 4, July 1992 (1992-07), pages 306-309, XP002528905 ISSN: 1061-4036 abstract	1-53
A	TUGYI REGINA ET AL: "Partial D-amino acid substitution: Improved enzymatic stability and preserved Ab recognition of a MUC2 epitope peptide" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 102, no. 2, 11 January 2005 (2005-01-11), pages 413-418, XP002529045 ISSN: 0027-8424	33
T	DI FEDE GIUSEPPE ET AL: "A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis." SCIENCE (NEW YORK, N.Y.) 13 MAR 2009, vol. 323, no. 5920, 13 March 2009 (2009-03-13), pages 1473-1477, XP002528904 ISSN: 1095-9203 the whole document	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/008595

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2004058940	A	15-07-2004	AU 2003249657 A1	23-02-2004
			AU 2003251383 A1	23-02-2004
			CA 2494859 A1	12-02-2004
			CA 2494868 A1	12-02-2004
			EP 1534861 A1	01-06-2005
			EP 1576118 A2	21-09-2005
			GB 2407091 A	20-04-2005
			GB 2407092 A	20-04-2005
			WO 2004013280 A2	12-02-2004
			US 2006009408 A1	12-01-2006
			US 2005255086 A1	17-11-2005
			US 2005106731 A1	19-05-2005
			US 2004241854 A1	02-12-2004
			US 2005042646 A1	24-02-2005
WO 2006121656	A	16-11-2006	AU 2006246382 A1	16-11-2006
			BR PI0610093 A2	09-12-2008
			CA 2607868 A1	16-11-2006
			CN 101171031 A	30-04-2008
			EP 1879613 A2	23-01-2008
			JP 2008540417 T	20-11-2008
			KR 20080005260 A	10-01-2008
			US 2009098155 A1	16-04-2009
WO 2007064917	A	07-06-2007	CA 2637472 A1	07-06-2007
			EP 1963363 A2	03-09-2008

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	A 0 1 K 67/027	4 C 0 8 7
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	G 4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/53	D

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

(72) 発明者 モルビン、ミケラ

イタリア国、ミラノ アイ - 2 0 1 3 3、1 1、バイア セロリア フォンダジオーネ アイ . アール . シー . シー . エス . イスティチュート ニューロロジコ "カルロ ベスタ" 内

(72) 発明者 タリアビーニ、ファブリジオ

イタリア国、ミラノ アイ - 2 0 1 3 3、1 1、バイア セロリア フォンダジオーネ アイ . アール . シー . シー . エス . イスティチュート ニューロロジコ "カルロ ベスタ" 内

(72) 発明者 マルチーニ、アルフレッド

イタリア国、ミラノ アイ - 2 0 1 3 3、1 1、バイア セロリア フォンダジオーネ アイ . アール . シー . シー . エス . イスティチュート ニューロロジコ "カルロ ベスタ" 内

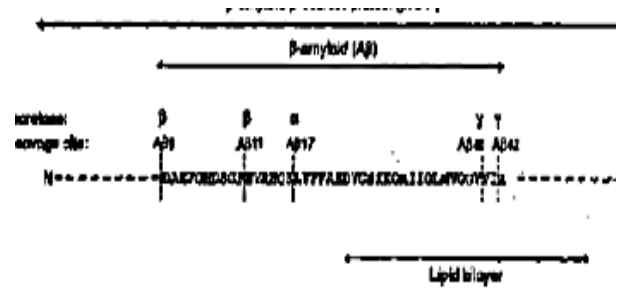
F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 CA11 CA12 DA02  
 4B063 QA13 QA17 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ53  
 4B065 AA90X AA90Y AA93Y AB01 BA02 BA16 CA24 CA44  
 4C084 AA13 NA14 ZA162  
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA16  
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZA16  
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA09 CA40 DA76 EA20 FA74

(54) 【発明の名称】 アミロイドおよび/またはアミロイド状物質のヒトおよび/または動物の臓器および組織への異常堆積を特徴とするヒトおよび/または動物の病理の診断、予防、および/または、処置のための製品およびその利用法、および、病理の危険性を判定するスクリーニング方法

专利名称(译)	用于诊断, 预防和/或治疗人和/或动物特征的病理学的产品, 其特征在于人和/或动物器官和组织中β淀粉样蛋白和/或淀粉样物质的异常积累及其用途确定病理风险的方法和筛选方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011500007A</a>	公开(公告)日	2011-01-06
申请号	JP2010528323	申请日	2008-10-10
[标]申请(专利权)人(译)	FOND我R C ( C S ) INST NEUROLOGICO CARLO无敌		
申请(专利权)人(译)	Fondajione眼球.伯爵.海.海.长者.Isutichuto Nyurorojiko“卡罗灶神星”		
[标]发明人	ディフェデジュセツベ モルビンミケラ タリアビーニファブリジオ マルチャーニアルフレッド		
发明人	ディフェデ、ジュセツベ モルビン、ミケラ タリアビーニ、ファブリジオ マルチャーニ、アルフレッド		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C07K14/47 C12N5/10 A01K67/027 C12N15/113 C07K16/18 A61K31/713 A61P25/28 A61K48/00 A61K35/76 G01N33/53		
CPC分类号	A01K67/0278 A01K2207/15 A01K2217/00 A01K2217/05 A01K2217/075 A01K2217/15 A01K2227/105 A01K2267/0312 A61P25/28 C07K14/4711 C12N15/8509 C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N2333/4709		
FI分类号	C12N15/00.A C12Q1/68.Z C12Q1/68.A C07K14/47 C12N5/00.102 A01K67/027 C12N15/00.G C07K16 /18 A61K31/713 A61P25/28 A61K48/00 A61K35/76 G01N33/53.M G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/DA02 4B063 /QA13 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BA16 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084 /AA13 4C084/NA14 4C084/ZA162 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA16 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087 /ZA16 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
优先权	102007901563914 2007-10-12 IT		
其他公开文献	JP2011500007A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

该专利基于β淀粉样蛋白和/或淀粉样蛋白的纯合和杂合β蛋白(对应于含770个氨基酸的β蛋白的Ala673Val突变的前体)的2位的点状突变Ala>Val。与人类和/或动物器官分离的生物材料,以确定人类和/或动物病理表现出颗粒物质在人和/或动物器官和组织上异常沉积的风险。相关的筛选方法。该专利要求保护(1)代表Ala673Val突变的单细胞或多细胞转基因器官的产生,(2)具有该突变和/或其衍生物和/或含有该突变的核酸的肽的合成或产生,和(3)该产品可用于研究,预防,诊断和治疗以β-淀粉样蛋白和/或淀粉样蛋白物质异常沉积为特征的病理学发病机制。[选型图]图1



Schematic diagram of the  $\beta$ -amyloid precursor protein ( $\beta$ APP)  
 from *Review in Molecular Medicine* ©2001 Cambridge University Press

*Figure 2. Diagram which illustrates the catabolism of the APP by*