

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-533218

(P2004-533218A)

(43) 公表日 平成16年11月4日(2004.11.4)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 25/28	4 B 0 6 5
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/48 Z	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-567141 (P2002-567141)	(71) 出願人	503310224 ブランシェット・ロックフェラー・ニュー ロサイエンス・インスティテュート アメリカ合衆国、メリーランド州 208 50、ロックビル、メディカル・センター ・ドライブ 9601
(86) (22) 出願日	平成14年2月27日 (2002.2.27)	(74) 代理人	100058479 弁理士 鈴江 武彦
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月27日 (2003.8.27)	(74) 代理人	100091351 弁理士 河野 哲
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/005672	(74) 代理人	100088683 弁理士 中村 誠
(87) 国際公開番号	W02002/067764	(74) 代理人	100108855 弁理士 蔵田 昌俊
(87) 国際公開日	平成14年9月6日 (2002.9.6)		
(31) 優先権主張番号	60/271, 416		
(32) 優先日	平成13年2月27日 (2001.2.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/329, 505		
(32) 優先日	平成13年10月17日 (2001.10.17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マイトゲン活性化蛋白質キナーゼリン酸化に基づくアルツハイマー病診断

(57) 【要約】

患者のアルツハイマー病を診断する方法であって、アクチベータ 化合物で刺激した後に前記患者の細胞における指示蛋白質のリン酸化レベルが、基礎リン酸化レベルと比較して異常に上昇したかどうかを決定することを含み、前記指示蛋白質が例えばErk1/2であり且つ前記アクチベータ 化合物が例えばブラジキニンである方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者のアルツハイマー病を診断するための方法であって、該方法は：

- (a)前記被験者の細胞の指示蛋白質のリン酸化の基礎レベルを測定することと；
- (b)前記被験者の細胞をアクチベータ化合物と接触させることと（前記アクチベータおよび前記指示蛋白質は次ぎのように選択される、即ち、前記アクチベータが前記被験者の細胞中の前記指示蛋白質の異なる活性化したリン酸化応答を、前記接触開始後の規定時間に、非アルツハイマーコントロール被験者の細胞における活性化したリン酸化応答と比べて、惹起するように選択される）；
- (c)前記被験者細胞中の前記指示蛋白質の活性化したリン酸化レベルを、接触開始後の規定時間に測定することと；および
- (d)工程(a)の基礎リン酸化レベルと、工程(c)で決定した活性化したリン酸化レベルとの比率を計算することと；および
- (e)前記規定時間にアルツハイマー病細胞であると判明している細胞およびアルツハイマー病細胞ではないと判明している細胞から測定した予め決定した活性リン酸化比率と、工程(d)で計算された比率とを比較することと；を含み、
前記計算された比率と前記アルツハイマー病細胞であると判明している細胞に関して予め決定した比率とを比べて統計学的に差異がないならば、前記診断は陽性と判定され、および/または前記計算された比率と前記非アルツハイマー病細胞と判明している細胞に関して予め決定した比率とを比べて統計学的差異がないならば、前記診断は陰性と判定される方法。

10

20

【請求項 2】

被験者のアルツハイマー病を診断する方法であって、該方法は：

- (a)前記被験者の細胞において、指示物質であるカルシウム シグナリング 経路 蛋白質（この蛋白質のリン酸化は前記細胞におけるIP-3R感受性のCa²⁺上昇に関連する）のバックグラウンドのリン酸化レベルを測定することと；
- (b)前記被験者細胞をIP3R アゴニスト（アルツハイマー被験者細胞の前記指示蛋白質のリン酸化レベルにおいて、非アルツハイマーコントロール細胞における前記レベルと比べて異なる応答を惹起する）と接触させることにより刺激することと；
- (c)その後、接触させた細胞における前記指示蛋白質の応答リン酸化レベルを測定することと；並びに
- (d)前記バックグラウンドレベルと対比させた前記指示蛋白質の前記応答リン酸化レベルが、アルツハイマー被験者に又は健常コントロールに由来することが判明している細胞の前記応答レベルに匹敵するかどうかを決定することと；
を含む方法。

30

【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法であって、最初に細胞の培養物における前記指示蛋白質のバックグラウンドリン酸化レベルを測定することと、次に前記培養物に前記IP3R アゴニストを添加することと、および前記応答リン酸化レベルを測定することと、を含む方法。

【請求項 4】

請求項 2 に記載の方法であって、細胞の第一アリクウォットにおける前記バックグラウンドレベルを測定することと、前記細胞の同様のアリクウォットを刺激することと、および前記アリクウォットにおける前記応答レベルを測定することと、を含む方法。

40

【請求項 5】

請求項 2 に記載の方法であって、前記測定が免疫アッセイを含む方法。

【請求項 6】

請求項 2 に記載の方法であって、前記測定が崩壊した細胞の免疫アッセイを含む方法。

【請求項 7】

請求項 2 に記載の方法であって、前記IP3-Rアゴニストが、ブラジキニン、ボンベシン、コレシストキニン、トロンピン、プロスタグランジン F₂、およびバソプレシンからな

50

る群から選択される方法。

【請求項 8】

請求項 2 に記載の方法であって、前記細胞が繊維芽細胞、口内粘膜細胞、ニューロン、および血液細胞からなる群から選択される方法。

【請求項 9】

被験者のアルツハイマー病を診断する方法であって、該方法は：

- (a)前記被験者から細胞を取得することと；
- (b)前記細胞の指示蛋白質のリン酸化の基礎レベルを測定することと；
- (c)前記細胞と前記指示蛋白質のリン酸化のアクチベータとを接触させることと；
- (d)前記接触の開始後の規定時間に前記細胞の指示蛋白質のリン酸化レベルを測定することと；および
- (e)工程(b)で測定した前記レベルに対する工程(d)で測定した前記レベルの第 1 比率を計算することと、そして前記第 1 比率を、予め決定された、アルツハイマー病細胞と判明した細胞から前記規定時間に取得された前記レベルの第 2 比率および非アルツハイマー病細胞と判明した細胞から前記規定時間に取得された前記レベルの第 3 比率、と比較することと；を含み、
- (i)工程(e)の前記第 1 比率と予め決定した第 2 比率との間に統計学的差異がないならば、前記診断は陽性と判定され、および(ii)工程(e)の前記第 1 比率と予め決定した第 3 比率との間に統計学的差異がないならば、前記診断は陰性と判定される方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法であって、工程(d)の規定時間が、工程(e)の第 2 比率と第 3 比率との間の差異が最大となる時間である方法。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の方法であって、前記アクチベータが、ブラジキニン、ボンベシン、コレシストキニン、トロンピン、プロスタグランジン F2 およびバソプレシンからなる群から選択される方法。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の方法であって、前記測定が免疫アッセイで実施され、且つ前記被験者細胞をリン酸化指示蛋白質に特異的な抗体と接触させ、これにより前記抗体が前記指示蛋白質に結合することが可能となり、そして前記指示蛋白質に結合した前記抗体が検出される方法。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法であって、前記免疫アッセイがラジオイムノアッセイ、ウエスタンブロットアッセイ、免疫蛍光アッセイ、酵素免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、ケミルミネッセンスアッセイ、免疫組織化学アッセイ、ドットプロットアッセイ、またはスロットプロットアッセイである方法。

【請求項 14】

被験者のアルツハイマー病を診断するための方法であって、該方法は下記の工程：

- (a)前記被験者細胞を、希釈剤中の化合物とインキュベートすることと（ここで、前記化合物はカルシウムシグナリング経路が媒介する指示蛋白質のリン酸化を刺激し、これによって刺激された細胞が産生される）；
 - (b)工程(a)の前に、同時に又は後に、前記被験者の同じタイプの細胞をコントロール化合物と又は前記希釈剤とインキュベートし、これにより非刺激コントロール細胞を産生することと；
 - (c)前記刺激された細胞のリン酸化指示蛋白質のレベルを前記非刺激コントロール細胞のリン酸化指示蛋白質のレベルと比較することと；を含み、
- 前記非刺激細胞と比べて前記刺激された細胞のリン酸化指示蛋白質の前記レベルの増加が、アルツハイマー病の存在を示す方法である。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の方法であって、前記比較する工程(c)が、下記の工程：

10

20

30

40

50

(i)前記刺激および/または前記非刺激細胞からの蛋白質サンプルを前記リン酸化指示蛋白質を認識する抗体と接触させることと; および

(ii)前記抗体の前記指示蛋白質に対する結合を検出することと;
を含む方法。

【請求項16】

請求項15に記載の方法であって、更に前記刺激および/または前記非刺激細胞からの蛋白質サンプルを前記指示蛋白質の非リン酸化形態を認識する抗体と接触させることと、並びに前記抗体と非リン酸化指示蛋白質との結合を検出することと、を含む方法。

【請求項17】

請求項14に記載の方法であって、前記比較する工程が、更に前記刺激および前記非刺激細胞から蛋白質サンプルを取得する工程を含む方法。 10

【請求項18】

被験者のアルツハイマー病を診断する方法であって、該方法は:

前記被験者細胞を、イノシトール1,4,5-三リン酸(IP3)レセプターを介した細胞内のカルシウム放出を惹起する薬剤と接触させることと、

前記の接触させる工程後の1以上のタイムポイントで前記被験者細胞のMAPK蛋白質のリン酸化量を測定することと、並びに

1以上のタイムポイントでの前記被験者の細胞におけるMAPK蛋白質のリン酸化量を、非アルツハイマーコントロール被験者の細胞に前記薬剤を接触させた後に同じタイムポイントで測定した前記リン酸化量と比較することと、を含み、 20

前記被験者細胞におけるMAPK蛋白質のリン酸化の前記コントロール細胞と比較した増加が、アルツハイマー病の診断となる方法。

【請求項19】

請求項18に記載の方法であって、前記薬剤がブラジキニンまたはブラジキニンレセプターアゴニストである方法。

【請求項20】

請求項18に記載の方法であって、前記薬剤がボンベシンである方法。

【請求項21】

請求項18に記載の方法であって、前記アゴニストがIP3媒介Ca²⁺放出を誘導するものである方法。 30

【請求項22】

請求項18に記載の方法であって、前記MAPK蛋白質がErk1/2である方法。

【請求項23】

請求項18に記載の方法であって、前記リン酸化量が前記接触させる工程後の1タイムポイントで測定される方法。

【請求項24】

請求項18に記載の方法であって、前記測定することが、

前記接触させる工程の後の第1タイムポイントで前記被験者細胞の第1アリクウォットにおけるリン酸化量を測定することと、および

前記接触させる工程の後の第2タイムポイントで前記被験者細胞の第2アリクウォットにおけるリン酸化量を測定することと、 40

を含む方法。

【請求項25】

請求項18に記載の方法であって、前記タイムポイントが、1以上の約0.5分、1分、2分、2.5分、5分、10分、20分、および30分から選択される方法。

【請求項26】

請求項18に記載の方法であって、前記細胞が末梢組織に由来する方法。

【請求項27】

請求項18に記載の方法であって、前記細胞が皮膚繊維芽細胞である方法。

【請求項28】

請求項 18 に記載の方法であって、前記測定する工程が前記被験者細胞のライセートにおけるリン酸化を検出することを含む方法。

【請求項 29】

請求項 18 に記載の方法であって、前記測定する工程がインビトロで実行される方法。

【請求項 30】

請求項 18 に記載の方法であって、前記測定する工程がゲル電気泳動を含む方法。

【請求項 31】

請求項 18 に記載の方法であって、前記測定する工程がウエスタンブロッティングを含む方法。

【請求項 32】

請求項 31 に記載の方法であって、前記ウエスタンブロッティングが抗リン酸化MAP キナーゼ抗体を使用することを含む方法。

【請求項 33】

請求項 18 に記載の方法であって、前記リン酸化の増加が1タイムポイントにおけるリン酸化蛋白質の量の上昇である方法。

【請求項 34】

請求項 18 に記載の方法であって、前記リン酸化の増加がリン酸化蛋白質の持続時間の増加である方法。

【請求項 35】

請求項 18 に記載の方法であって、前記被験者がアルツハイマー病の臨床徴候を欠失している方法。

【請求項 36】

請求項 18 に記載の方法であって、前記被験者細胞を、蛋白質キナーゼ C 活性のインヒビター、PI-3 キナーゼ活性のインヒビター、C-src 蛋白質チロシンキナーゼ活性のインヒビター、IP-3 レセプターのインヒビターおよび蛋白質ホスファターゼのインヒビターからなる群から選択される1以上のインヒビターと接触させることを更に含む方法。

【請求項 37】

請求項 18 に記載の方法であって、前記リン酸化の増加が、前記被験者細胞を蛋白質キナーゼC活性の、C-src 蛋白質チロシンキナーゼ活性の、PI-3 キナーゼ活性の、およびIP-3 レセプターのインヒビターからなる群から選択されるインヒビターと接触させることによって阻害される方法。

【請求項 38】

請求項 37 に記載の方法であって、前記インヒビターがBiSM-1、PP1、および2 - アミノエトキシジフェニルポラートからなる群から選択される方法。

【請求項 39】

化合物をスクリーニングしてアルツハイマー病の治療または予防に有用な化合物を同定するための方法であって：

AD被験者の試験細胞を、前記接触させる工程の前、途中、または後に、スクリーニングする化合物と接触させることと、前記試験細胞を、イノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP3) レセプターを介した細胞内のカルシウム放出を惹起する薬剤で刺激することと、前記試験細胞におけるMAPK蛋白質のリン酸化量を、前記試験細胞を刺激した後の1以上のタイムポイントで測定することと、

前記1以上のタイムポイントでの前記試験細胞におけるMAPK蛋白質のリン酸化量を、前記化合物と接触させなかったAD被験者のコントロール細胞における同じ1以上のタイムポイントでのリン酸化量と比較することと、並びに増加したリン酸化を阻害または阻止する化合物をリード化合物として承認することと、並びに増加したリン酸化を阻害または阻止しない化合物を棄却することと、を含む方法。

【請求項 40】

請求項 38 に記載の方法であって、前記薬剤がブラジキニンまたはブラジキニンレセプタ

10

20

30

40

50

ーアゴニストである方法。

【請求項 4 1】

請求項 3 8 に記載の方法であって、前記 MAPK 蛋白質が Erk1/2 である方法。

【請求項 4 2】

請求項 3 8 に記載の方法であって、前記接触させる工程の後の 1 タイムポイントで前記リン酸化量を測定することを含む方法。

【請求項 4 3】

請求項 3 8 に記載の方法であって、前記細胞が皮膚繊維芽細胞である方法。

【請求項 4 4】

請求項 3 8 に記載の方法であって、前記測定する工程が前記被験者細胞のライセート中のリン酸化を検出することを含む方法。 10

【請求項 4 5】

刺激応答アッセイにおけるアクチベータ 化合物としての有用性に関して化合物をスクリーニングするための方法であって：

AD 細胞およびコントロール細胞の指示蛋白質のリン酸化における前記化合物の効果を測定することと、並びにコントロール細胞と比べて、AD 細胞において前記指示蛋白質のリン酸化の量および / または持続時間を増加させる化合物を選択することと、を含む方法。

【請求項 4 6】

アルツハイマー病の診断用試験キットであって、抗リン酸化 MAPK 蛋白質抗体およびブラジキニンを含むキット。 20

【請求項 4 7】

アルツハイマー患者のための薬物療法を選択するための方法であって、可能性のある治療化合物を選択することと、

前記可能性のある治療化合物を前記患者に投与することと、その後

前記細胞を前記指示蛋白質のリン酸化を刺激する化合物で活性化した後に、前記患者の細胞のリン酸化指示蛋白質の異常に上昇したレベルの存在または非存在を検出することと、を含み、

かかる上昇したレベルの存在が前記可能性のある治療化合物が前記患者に対して効果がないことを示し、且つかかる上昇したレベルの非存在が前記可能性のある治療化合物が前記患者に対して治療上有用であることを示す方法。 30

【請求項 4 8】

請求項 4 7 に記載の方法であって、更に前記被験者のアルツハイマー病を、前記患者に治療上有用であることが示された化合物を投与することにより治療すること又は予防することを含む方法。

【請求項 4 9】

効果的な量の医薬を投与することを含む、被験者のアルツハイマー病を治療する又は予防するための方法であって、前記医薬が、

(a) コントロール細胞と比べて前記被験者の細胞の MAPK 蛋白質の異常に上昇したリン酸化を阻害する若しくは阻止する；および / または

(b) 前記 MAPK 蛋白質の異常に上昇したリン酸化により生じたイベントを阻害する；方法。 40

【請求項 5 0】

請求項 4 9 に記載の方法であって、前記医薬が Erk1/2 リン酸化を阻害する方法。

【請求項 5 1】

請求項 4 9 に記載の方法であって、前記医薬が蛋白質キナーゼ C 活性の、src 蛋白質チロシンキナーゼ活性の、又は IP-3 レセプターのインヒビターである方法。

【請求項 5 2】

請求項 3 7 に記載の方法であって、前記インヒビターが BiSM-1、PP1、および 2ABP からなる群から選択される方法。

【請求項 5 3】

被験者のアルツハイマー病を診断するための方法であって、 50

- (a)前記被験者の及び非アルツハイマーコントロール被験者の皮膚繊維芽細胞を、効果的なリン酸化刺激濃度のブラジキニンと接触させることと；
- (b)前記被験者細胞のリン酸化Erk1/2量を、2分、5分、10分、20分、および30分からなる群から選択される1以上のタイムポイントで、リン酸化Erk1/2に特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティングにより測定することと；
- (c)非アルツハイマーコントロール被験者の細胞におけるリン酸化Erk1/2量を、(b)と同じタイムポイント（若しくは複数のタイムポイント）で、リン酸化Erk1/2に特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティングにより測定することと；（ここで、工程(b)および(c)の前記リン酸化Erk1/2量は、前記細胞に存在する蛋白質量に対してノルマライズされる）；
- (d)前記タイムポイントで前記被験者細胞のリン酸化Erk1/2量と前記コントロール細胞のリン酸化Erk1/2量とを比較することと；を含み、
- 1以上の前記タイムポイントで前記被験者細胞のリン酸化Erk1/2量の前記コントロール細胞と比較した増加が、アルツハイマー病の診断となる方法。

【請求項54】

請求項53に記載の方法であって、更に前記被験者細胞を、

- (a)蛋白質キナーゼC活性のインヒビター BiSM-1；
- (b)C-src蛋白質チロシンキナーゼ活性のインヒビター PP1；および
- (c)IP-3レセプターのインヒビター 2-アミノエトキシジフェニルボラート；
- からなる群から選択される1以上のインヒビターと接触させることと、を含み、
- 前記コントロール細胞と比較した前記被験者細胞におけるリン酸化Erk1/2量の前記ブラジキニン誘導性の増加が、前記インヒビターにより減少する方法。

【請求項55】

被験者におけるアルツハイマー病の存在を診断するための方法であって、次ぎの工程：

- a)前記被験者細胞を、指示蛋白質のリン酸化を増加させるアクチベータ化合物で刺激することと、および
- b)刺激された細胞における非リン酸化指示蛋白質およびリン酸化指示蛋白質のレベルを、前記被験者の同じタイプの非刺激細胞における非リン酸化指示蛋白質およびリン酸化指示蛋白質のレベルと比較することと、を含み、
- 刺激された細胞におけるリン酸化指示蛋白質の非刺激細胞と比べた際の相対的レベルの増加が、アルツハイマー病の存在を示す方法。

【請求項56】

化合物をスクリーニングしてアルツハイマー病の治療または予防に有用な化合物を同定するための方法であって、

- (a)AD被験者の試験皮膚繊維芽細胞をスクリーニングする化合物と接触させることと；
- (b)前記被験者のコントロール皮膚繊維芽細胞を前記化合物に対するコントロール薬剤と接触させることと或いは前記コントロール繊維芽細胞を非存在下で又は前記化合物もしくは前記コントロール薬剤の何れかの存在下でインキュベーションすることと；
- (c)工程(a)および(b)の前、途中、または後に、前記試験および前記コントロール繊維芽細胞を、効果的なリン酸化刺激濃度のブラジキニンで刺激することと、
- (d)前記試験および前記コントロール繊維芽細胞におけるリン酸化Erk1/2量を、2分、5分、10分、20分、および30分からなる群から選択される1以上のタイムポイントで、リン酸化Erk1/2に特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティングにより測定することと（ここで、前記リン酸化Erk1/3量は、前記試験およびコントロール繊維芽細胞に存在する蛋白質量に対してノルマライズされる）；
- (e)前記試験繊維芽細胞におけるリン酸化Erk1/2量と前記コントロール繊維芽細胞におけるリン酸化Erk1/2量とを比較して、前記化合物が前記コントロール細胞と比較して前記試験細胞におけるErk1/2リン酸化のブラジキニン誘導性の増加を阻害するか又は阻止するかどうかを決定することと；を含み、
- 前記増加したリン酸化を阻害する又は阻止する化合物が、アルツハイマー病の治療または予防に有用な化合物であると同定される方法。

【請求項57】

ヒト細胞における、アミロイド前駆体蛋白質の蛋白質分解、アミロイド蛋白質の分泌、および/またはtau蛋白質のリン酸化を減らすための方法であって(ここで、前記細胞はコントロールヒト細胞と比較してIP3レセプターが媒介するMAPK蛋白質のリン酸化が増加しており)、前記細胞を、前記コントロール細胞のレベルにまでリン酸化の減少に効果的なMAPKリン酸化のインヒビターと接触させることを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0001】

本発明は、アルツハイマー病(「AD」)を診断する及びスクリーニングする試験を提供する。前記試験の例には、前記細胞をブラジキニンなどのアゴニストまたはイノシトール1,4,5-三リン酸(IP3)レセプターを刺激する他の因子で刺激した後に、年齢が適合するコントロールから採取した細胞と比較したAD患者から採取した皮膚繊維芽細胞中の細胞外シグナル制御キナーゼタイプ1もしくは2(「Erk1/2」)の異常に増強したリン酸化を、検出することが含まれる。リン酸化の増強は、リン酸化された蛋白質に特異的な抗体を用いたウエスタンブロット、または他の類似するアプローチにより測定し得る。

【0002】

アルツハイマー病(AD)の早期発病が、細胞内のカルシウムホメオスタシスを混乱させること、およびAD脳の興奮性の毒性および神経細胞死に寄与する酸化ストレスのレベルを増加させることを、これまでに蓄積された証拠は指摘している(Putney, 2000; Yoo et al., 2000; Sheehan et al., 1997)。ブラジキニンレセプターの活性化およびK⁺チャンネルの不活性化にตอบสนองして、AD脳および末梢細胞の細胞内Ca²⁺レベルの上昇が増強されることをいくつかの研究は報告している(Ito et al., 1994; Etcheberrigaray et al., 1994; Hirashima, et al., 1996; Gibson et al., 1996; Etcheberrigaray et al., 1998)。アミロイド前駆体蛋白質(APP)、プレセニリン1およびプレセニリン2(その変異がADの発病と関連する)などの重要な蛋白質が、IP3レセプター(IP3R)およびリアノジンレセプター(RYR-)双方が媒介する細胞内のCa²⁺ホメオスタシスの調節不全を誘導することが報告されている(Yoo et al., 2000; Leissring et al., 1999; 2000; Mattson et al., 2000; Barrow et al., 2000)。サイトゾルのCa²⁺濃度の変化は、ADの病態生理学に寄与すると考えられ、これにはプラーク形成、神経原繊維錯綜(neurifibrillary tangles)の形成に關与するtau蛋白質の過剰リン酸化、および細胞死におけるニューロンの一般的な脆弱性の増強に關与し神経毒である42アミノ酸-アミロイドペプチド(AP)の産生の増大が含まれる。

【0003】

ブラジキニン(BK)は強力な血管作用性ノナペプチド(vasoactive nonapeptide)であり、このペプチドは様々な炎症状態の過程で産生される。BKは、特定の細胞膜BKレセプターに結合しそしてこれを活性化し、これにより「マイトジェン活性化蛋白質キナーゼ」(MAPK; 以下を参照のこと)として知られる蛋白質のリン酸化に至る細胞内イベントのカスケードが惹起される。蛋白質のリン酸化(Ser、ThrまたはTyr残基へのリン酸基の付加)は、蛋白質キナーゼとして知られる多くの酵素により共同的(collectively)に媒介される反応である。

【0004】

リン酸化は、通常は蛋白質の機能を修飾し、そして大抵は蛋白質を活性化する。

【0005】

リン酸化はホメオスタシスにおいて一時的なプロセスであることが要求され、これは基質を脱リン酸化するホスファターゼ酵素により反転(reversed)される。リン酸化または脱リン酸化における如何なる異常によっても、生化学的経路および複数の細胞機能が崩壊する。かかる崩壊が、ある種の脳の病気の基礎となる可能性がある。

【0006】

BKにตอบสนองする細胞内のCa²⁺レベルの増大は、少なくとも「タイプ2」BKレセプター(BKb2)

R) (G-蛋白質共役レセプター) により媒介される。BKによるBKb2Rの刺激によってホスホリパーゼ C (PLC)が活性化され、細胞内のCa²⁺レベルの制御および蛋白質キナーゼ C (PKC)の活性化に参与するセカンド・メッセンジャーであるジアシルグリセロール(DAG)およびイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP3)の産生を生じる。PLC/リン脂質/PKC経路は、MAPK経路を活性化するRas シグナリング 経路とも相互作用する。MAPK(またはMAP キナーゼ)は、「マイトジェン活性化蛋白質キナーゼ」と称される酵素ファミリーを意味し、そのうちの重要なメンバーは、「細胞外シグナル制御キナーゼ」タイプ1または2(「Erk1/2」)である(Berridge, 1984 ; Bassa et al., 1999)。Erk1/2は、複数のシグナル伝達経路からのシグナルを受けとる。そしてErk1/2は、環状アデノシン1リン酸 (cAMP)応答因子結合蛋白質(CREB)を含む多くの転写因子を介した遺伝子発現の制御により細胞増殖および分化を生じる経路の一部を構成するものである。

10

【0007】

Erk1/2は、tau 蛋白質のSer262およびSer356を含む複数のSer/Thr部位 (tauの微小管結合領域中に存在する)をリン酸化する(Reynolds et al., 2000)。

【0008】

Ser262のリン酸化は、微小管を会合させ且つ安定化させるtauの能力を顕著に損なわせる (compromises) (Biernat et al., 1993; Lu et al., 1993)。酸化ストレスの増大、アミロイド前駆体蛋白質 (APP)の異常発現、およびAP への暴露は、MAPKの活性化 (McDonald et al., 1998; ElcinciおよびShea, 1999; Grant et al., 1999)およびtauリン酸化の増強 (Greenberg et al., 1994)を生じる。

20

【0009】

ヤング等 (Young LT et al., Neurosci Lett, 1988, 94 : 198-202) は、ADを罹患していた10被験者および年齢が適合したコントロール10個体を検死解剖 (autopsied) して採取した脳のIP3 レセプター結合部位を調査した。頭頂部 (parietal) の皮質および海馬において [³H]-IP3結合が50~70%損失していたが、前頭部 (frontal)、後頭部 (occipital) および側頭部 (temporal) の皮質、尾状核 (caudate) 或いは扁桃 (amygdala) において変化は観察されなかった。スキッチャード分析により、親和性の変化というよりむしろレセプター密度の減少が確認された。また、多くの神経伝達物質、ホルモンおよび成長因子は、膜レセプター部位で作用してホスファチジルイノシトール 4,5二リン酸 (PIP2) のホスホジエステラーゼ加水分解を刺激し、コメッセンジャー (comessengers) であるIP3およびジアシルグリセロール (DAG)を産生する。DAGはPKCを刺激し、一方IP3は特異的なレセプターを活性化して細胞内のカルシウム (おそらく小胞体からの) の放出を生じると当初推定された。

30

【0010】

早期の報告は、肝臓および副腎のミクロソーム並びに透過化処理された (permeabilized) 好中球および肝臓細胞に結合した³²P-IP3を検出した。Solomon Snyderのグループが、初めてIP3 レセプターを特定 (localize) し、分離し、分析し、そして後にクローン化した。Worley PF等 (Worley PF et al., Nature 1987; 325: 159-161) は、³Hおよび³²P標識したIP3に対する高親和性で選択的な結合サイトが脳 (末梢組織で観察されたよりも100~300倍高いレベル) に存在することを示した。これらのレセプターは生理学的に関連性があると考えられ、なぜならIP3 結合部位での様々なミオイノシトール (myoinositol) アナログの効力 (potencies) がミクロソームからのカルシウム放出におけるそれらの効力に対応するからである。脳のオートラジオグラムは、IP3 レセプターが不連続的 (discrete) で不均質 (heterogeneous) に局在することを示した。1988年にこのグループ (Supatapone S et al., J Biol Chem, 1988, 263: 1530-1534) は、ラット小脳からIP3 レセプターを可溶化し、均質に精製し、そしてその特性を調査した。精製したレセプターは、電気泳動において260 kDaのMrを有する1つの蛋白質バンドを呈する球状蛋白質であった。

40

【0011】

レビュー中でSnyder等 (Cell Calcium, 1989, 10: 337-342) は、精製したレセプター 蛋白質に対する抗血清を用いた免疫組織化学研究により、シナプス領域 (synaptic areas)

50

に及び核膜と密接に関連した領域に出現する粗面小胞体の細区画 (subdivision) にレセプターが局在化していることを示している。IP3 レセプター 蛋白質は、cAMP依存性蛋白質キナーゼにより選択的にリン酸化された。このリン酸化により、脳膜からのカルシウム放出におけるIP3の効力が10倍減少した。Ferris CD等 (Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 2232-2235) は、リポゾーム (蛋白質キナーゼを阻害し得る界面活性剤を除くため) 中に再構成した精製レセプター 蛋白質を用いてIP3 レセプターのリン酸化を研究した。IP3 レセプターは、蛋白質キナーゼ C (PKC) およびCaM キナーゼ IIにより、同様に蛋白質キナーゼ A (PKA)により化学量論的にリン酸化された。IP3 レセプターは、付加的に作用する3つの酵素により触媒され、異なるペプチド配列に関係するリン酸化により制御される。Ca²⁺ およびDAG (イノシトール リン脂質のターンオーバーの間に形成される) は、(1)Ca²⁺ およびDAGにより刺激されたPKCによって、並びに(2)Ca²⁺を要求するCaM キナーゼ IIによるリン酸化によって、IP3 レセプターを制御する。Chadwick CC 等 (Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 2132-2136) は、平滑筋からのIP3 レセプター (224 kDaのMrを有する単一ポリペプチドのオリゴマーであった) の分離を記載している。Furuichi T等 (FEBS Lett, 1990, 267: 85-88) は、マウス組織中のIP3 レセプター mRNAの分布を調査した。その濃度は、小脳組織中で最大であった。IP3 レセプター mRNAは、他の脳組織: 胸腺、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、および子宮に中等度の量が存在していた。IP3 レセプター mRNAは、骨格筋および精巣組織で少量観察された。インサイチューハイブリダイゼーションに基づいて調査したところ、顕著な量のIP3 レセプター mRNAが、動脈、細気管支 (bronchioles)、卵管および子宮などの平滑筋細胞に局在していた。Ferris CD 等 (JBiol Chem, 1992, 267: 7036-704) は、精製し、そして再構成したIP3 レセプター中のセリン自己リン酸化を実証し、そして特定のペプチド 基質に対してIP3 レセプターのセリン蛋白質キナーゼ活性を見つけた。実験者は、IP3 レセプター 蛋白質とリン酸化活性とが、同じ分子中に備わっていると結論した。Ross CA 等 (Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 4265-4269) は、マウスの胎盤cDNAライブラリーから、3つのIP3R cDNAs (IP3R-II, -I II, および-IVと称される) をクローン化した。3つ全てが、元々クローン化されていた小脳のIP3R-Iの膜貫通ドメイン M7およびM8に対して高い相同性を示しており、多様性は主に細胞質ドメインに認められている。一般的に3つの付加的なIP3RsのmRNAのレベルは、IP3R-Iのものよりも実質的に低かったが、胃腸路では例外的に匹敵するレベルであった。

10

20

30

【0012】

小脳のプルキンエ細胞は、少なくとも2つ、もしかしたら3つの別個のIP3Rsを発現しており、この事実は単一細胞内におけるIP3作用の異質性を示唆している。Sharp AH (Neuroscience, 1993, 53: 927-42) は、免疫組織化学的な手法を用いてラットの脳および脊髄におけるIP3 レセプター分布を詳細に調査した。IP3 レセプターは、CNS全体をとおした広い分布領域 (嗅球、視床核および脊髄の後角を含む) において、脳室周囲器官群 (circumventricular organs) 並びに最後野 (postrema)、脈絡叢 (choroid plexus)、下口角器官 (subcommisural organ)、松果腺 (pineal gland) および下垂体 (pituitary) などの神経内分泌構造 (neuroendocrine structures) 中の、ニューロン細胞、繊維 (fibers) および終端 (terminals) に存在している。ホスホイノシチド・セカンド・メッセンジャー系により媒介されるCa²⁺ 放出は、多様な生理学的プロセスのコントロールに重要である。リンパ球 (T細胞) におけるIP3 レセプターの研究 (Snyderのグループによる) によって、これらのレセプターが形質膜に局在していたことが見つけられた。

40

【0013】

T細胞レセプターとCD3との複合体のキャッピング (シグナル伝達に関連する) は、IP3 レセプターのキャッピングを伴うものであった。T細胞上のIP3 レセプターは、増殖応答を開始するCa²⁺の侵入に働くように思われる (Khan, AA et al., Science, 1992, 257: 815-818)。

【0014】

更にIP3に関してWilcox RA 等 (Trends Pharmacol Scz, 1998, 19: 467475) は、レセ

50

ブターが媒介するPLCの活性化（IP₃を産生する）が哺乳類系に遍在するシグナリング経路であることを記載している。3つのIP₃レセプターサブタイプ単量体のファミリーは、機能的な四量体を形成し、この四量体がIP₃エフェクターとして作用して、細胞区画間のCa²⁺イオンの移動を可能にするリガンドゲートチャンネルが供給される。IP₃レセプターは主に小胞体膜に局在（その領域に限られないが）するので、IP₃はCa²⁺を細胞内貯蔵から動員して様々な生理学および病理生理学的な現象に影響するセカンド・メッセンジャーであると考えられる。Patel S等（Cell Calcium, 1999,25: 247-264）は、IP₃レセプターの分子特性に関する総説を記載している。

【0015】

Ca²⁺結合サイトおよびCa²⁺カルモジュリン結合ドメインが、タイプ I IP₃レセプター内にマップされた、そして精製した小脳のIP₃レセプターをもちいた研究は、第二のCa²⁺非依存性のカルモジュリン結合ドメインの存在を示唆するものであった。IP₃レセプターの過剰発現により、細胞内に存在する個々のIP₃レセプターアイソフォームの制御を、またIP₃依存性Ca²⁺シグナルの発生において彼等が担う役割を理解する手がかりが見出された。IP₃レセプターは、増殖およびアポトーシスなどの細胞プロセスに関与し得る。Abdel-Latif AA. [Exp Biol Med (Maywood) 2001 Mar; 226 (3): 153-63] は、非血管および血管の平滑筋の双方を用いた実験から、サイクリック・ヌクレオチド（cAMPおよびcGMPの各々に対応する蛋白質キナーゼを介した）、およびアゴニスト誘導性の収縮に関与するCa²⁺依存性およびCa²⁺非依存性シグナリング経路の間のクロストークに関する証拠に関して概観している。これらには、PKC、MAPキナーゼおよびRhoキナーゼを含むIP₃-Ca²⁺-CaM-ミオシン軽鎖キナーゼ（MLCK）経路並びにCa²⁺非依存性経路が含まれる。Mikoshiha K等 [Sci STKE 2000 Sep 26; 2000 (51): P] は、IP₃レセプターにより細胞内貯蔵からのカルシウム放出が制御されること、およびストア感受性（store-operated）カルシウムチャンネルを介した細胞外環境からのカルシウム流入とこの放出機構との関連性を記載している。彼等は、細胞内および形質膜カルシウムチャンネルの機能的および物理的な連結（coupling）のモデルを開示した。

【0016】

ADが重篤な脳障害および記憶喪失を生じることが周知であるが、病理学的変化は体の他の部分でも明らかであり、そしてその変化を細胞レベルで検出することが可能である。皮膚の深層に横たわっている皮膚繊維芽細胞は、AD傷害に特徴的な細胞上の及び分子的な異常を呈している。皮膚繊維芽細胞は容易に取得され、そして診断の目的で培養される（2000年8月22日に公開された米国特許6,107,050、「アルツハイマー病に関する診断検査」、この文献は本明細書中に参照によって援用される）。しかしながら、より単純で、より経済的で、正確、且つ信頼性の高いアルツハイマー病を診断するための方法が必要とされている。

【0017】

細胞内Ca²⁺放出のアクチベータの異なる効果を測定できることは、例えば米国特許6,107,050（Alkon等）に記載されている。健常な及びアルツハイマーの細胞タイプの双方は、貯蔵（storage）からのカルシウム放出を呈しているが、しかしアルツハイマーの細胞はより多量の放出を呈する。Ca²⁺放出を測定するための既知の方法には、(i) 蛍光指示物質、吸光度指示物質またはCa²⁺「パッチ・クランプ」電極、および他の手段が含まれ、そしてかかる方法は診断の目的で使用し得る。しかしながら、ための、診断、研究、および臨床目的のためのより効果的なIP₃Rアクチベータの異なる効果を測定する技術が渴望されている。

【発明の概要】

【0018】

本発明は、患者のアルツハイマー病を診断する方法を提供し、この方法は、前記患者の細胞を該細胞中の指示蛋白質のリン酸化を刺激する化合物で活性化することと、その後リン酸化した前記指示蛋白質の異常な上昇レベルの存在または非存在を検出することと、を含み、かかる上昇レベルの存在がアルツハイマー病が陽性であるとの診断を示す方法であ

る。

【0019】

前記診断方法は、前記患者の細胞をアクチベータ化合物で刺激することと、その後規定時間で前記患者の細胞中の指示蛋白質のリン酸化レベルを測定することと、および刺激なしの基礎リン酸化レベルと刺激され異常に上昇したレベルとの比較値を決定することと、を含む。

【0020】

本発明は、被験者のアルツハイマー病を診断する方法を提供し、該方法は：

- (a)前記被験者の細胞の指示蛋白質のリン酸化の基礎レベルを測定することと；
- (b)前記被験者の細胞をアクチベータ化合物と接触させることと（ここで、前記アクチベータおよび前記指示蛋白質は次ぎのように選択される、即ち、前記アクチベータが前記被験者の細胞中の前記指示蛋白質の異なる活性化したリン酸化応答を、前記接触が開始された後の規定時間に、非アルツハイマーコントロール被験者の細胞における活性化したリン酸化応答と比べて、惹起 (elicits) するように選択される)；
- (c)前記被験者細胞中の前記指示蛋白質の活性化したリン酸化レベルを、接触開始後の規定時間に測定することと；および
- (d)工程(a)の基礎リン酸化レベルと、工程(c)で決定した活性化したリン酸化レベルとの比率を計算することと；および
- (e)前記規定時間にアルツハイマー病細胞であると判明している細胞およびアルツハイマー病細胞ではないと判明している細胞から測定した予め決定した活性リン酸化比率 (activated phosphorylation ratios) と、工程(d)で計算された比率とを比較することと；を

含み、前記計算された比率と前記アルツハイマー病細胞であると判明している細胞に関して予め決定した比率とを対比して統計学的差異がないならば、前記診断は陽性と判定され、および/または前記計算された比率と前記アルツハイマー病細胞ではないと判明している細胞に関して予め決定した比率とを対比して統計学的差異がないならば、前記診断は陰性と判定される方法である。

【0021】

本発明は、更に被験者のアルツハイマー病を診断する方法を提供し、該方法は、前記被験者の細胞において、

指示物質であるカルシウム シグナリング 経路 蛋白質（この蛋白質のリン酸化が前記細胞におけるIP-3R感受性のCa²⁺ 上昇に関連する）のバックグランドリン酸化レベルを測定することと；

前記被験者の細胞をIP3R アゴニスト（このアゴニストは、アルツハイマー被験者細胞の前記指示蛋白質のリン酸化レベルにおいて、非アルツハイマーコントロール細胞における前記レベルと比べて異なる応答を惹起する）と接触させることにより刺激することと；その後、

接触させた細胞における前記指示蛋白質の応答リン酸化レベルを測定することと；並びに前記指示蛋白質の前記応答リン酸化レベルが、前記バックグランドレベルと対比させて、アルツハイマー被験者に又は健常コントロールに由来することが判明している細胞の前記応答レベルに匹敵するかどうかを決定することと、を含む方法である。

【0022】

前記方法は、最初に細胞の培養物における前記指示蛋白質の前記バックグランドリン酸化レベルを測定することと、次に前記培養物に前記IP3R アゴニストを添加することと、および前記応答リン酸化レベルを測定することと、を含んでいてもよい。或いは、前記方法は、細胞の第一アリクウォットのの前記バックグランドレベルを測定することと、前記細胞の同様のアリクウォットを刺激することと、および前記アリクウォットにおける前記応答レベルを測定することと、を含んでいてもよい。

【0023】

前記アクチベータ 化合物は、ブラジキニン (bradykinin)、ボンベシン (bombesin)、

コレシストキニン (cholecystokinin)、トロンピン、プロスタグランジン F₂、およびバソプレシンからなる群から選択される IP3-R アゴニストであってもよい。

【0024】

前記細胞は、繊維芽細胞、口内粘膜細胞 (buccal mucosal)、ニューロン、および血液細胞からなる群から選択されてもよい。

【0025】

本発明による被験者のアルツハイマー病を診断する方法は、

(a)前記被験者から細胞を取得することと；

(b)前記細胞の指示蛋白質のリン酸化の基礎レベルを測定することと；

(c)前記細胞と前記指示蛋白質のリン酸化のアクチベータとを接触させることと；

(d)前記接触の開始後の規定時間に前記細胞の指示蛋白質のリン酸化レベルを測定することと；および

(e) 工程 (b)で測定した前記レベルに対する工程 (d)で測定した前記レベルの第 1 比率を計算することと、そして、前記第 1 比率を、予め決定された、アルツハイマー病細胞と判明した細胞から前記規定時間に取得された前記レベルの第 2 比率およびアルツハイマー病細胞ではないと判明した細胞から前記規定時間に取得された前記レベルの第 3 比率、と比較することと；を含み、

(i)工程 (e)の前記第 1 比率と予め決定した第 2 比率との間に統計学的差異がないならば、前記診断は陽性と判定され、および (ii)工程 (e)の前記第 1 比率と予め決定した第 3 比率との間に統計学的差異がないならば、前記診断は陰性と判定される方法である。工程 (d)の規定時間は、工程 (e)の第 2 比率および第 3 比率の間の差異が最大となる時間であってもよい。

【0026】

発明の方法において、前記の測定することは、崩壊した細胞の免疫アッセイを含んでいてもよく、および前記被験者細胞をリン酸化指示蛋白質に特異的な抗体と接触させてもよく、これにより前記抗体が前記指示蛋白質に結合することが可能となり、そして前記指示蛋白質に結合した前記抗体が検出される。前記免疫アッセイは、ラジオイムノアッセイ、ウエスタンブロットアッセイ、免疫蛍光アッセイ、酵素免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、ケミルミネッセンス アッセイ、免疫組織化学 アッセイ、ドットブロット アッセイ、またはスロットブロット アッセイであってもよい。

【0027】

更なる発明の被験者のアルツハイマー病を診断する方法は：

(a)前記被験者の細胞を、希釈剤中の化合物とインキュベートすることと（ここで、前記化合物はカルシウム シグナリング 経路が媒介する指示蛋白質のリン酸化を刺激し、これによって刺激された細胞が産生される）；

(b)工程 (a)の前に、同時に又は後に、前記被験者の同じタイプの細胞を、コントロール化合物と又は前記希釈剤とインキュベートし、これにより非刺激コントロール細胞を産生することと；

(c)前記刺激された細胞のリン酸化指示蛋白質のレベルを、前記非刺激コントロール細胞のリン酸化指示蛋白質のレベルと比較することと、を含み、

前記非刺激細胞と比べて前記刺激された細胞のリン酸化指示蛋白質の前記レベルの増加が、アルツハイマー病の存在を示す方法である。

【0028】

比較する工程 (c)は、次ぎの工程、即ち：

(i)前記刺激および/または前記非刺激細胞からの蛋白質サンプルを、前記リン酸化指示蛋白質を認識する抗体と、接触させることと；並びに

(ii)前記抗体の前記指示蛋白質に対する結合を検出することと、を含んでいてもよい。

【0029】

前記方法は、更に、前記刺激および/または前記非刺激細胞からの蛋白質サンプルを、前記指示蛋白質の非リン酸化型を認識する抗体と接触させることと、並びに前記の抗体と非

リン酸化指示蛋白質との結合を検出することと、並びに蛋白質の前記レベルをノルマライズすることと、を含んでいてもよい。比較する工程は、更に、前記刺激した及び前記非刺激の細胞から蛋白質サンプルを取得する工程を含んでいてもよい。

【0030】

被験者におけるアルツハイマー病の存在を診断する方法は、次ぎの工程、即ち：

a)前記被験者の細胞を、指示蛋白質のリン酸化を増加させるアクチベータ化合物で刺激することと、および

b)刺激された細胞における非リン酸化指示蛋白質およびリン酸化指示蛋白質のレベルを、前記被験者の同じタイプの非刺激細胞における非リン酸化指示蛋白質およびリン酸化指示蛋白質のレベルと比較することと、を含んでいてもよく、
ここで、刺激された細胞におけるリン酸化指示蛋白質の非刺激細胞と比べた際の相対的レベルの増加が、アルツハイマー病の存在を示す方法である。

10

【0031】

本発明は、被験者のアルツハイマー病を診断する方法を提供する。該方法は、前記被験者の細胞を、イノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP3) レセプターを介した細胞内のカルシウム放出を惹起する薬剤と接触させることと、前記の接触させる工程後の1以上のタイムポイントで前記被験者細胞のMAPK蛋白質のリン酸化量を測定することと、並びに

1以上のタイムポイントでの前記被験者の細胞におけるMAPK蛋白質のリン酸化量を、非アルツハイマーコントロール被験者の細胞に前記薬剤を接触させた後に同じタイムポイントで測定した前記リン酸化量と比較することと、
を含み、

20

前記被験者細胞におけるMAPK蛋白質のリン酸化の前記コントロール細胞と比較した増加が、アルツハイマー病の診断となる方法である。

【0032】

本発明の方法において、前記薬剤は、ブラジキニン若しくはブラジキニン レセプター アゴニスト、またはポンペシンであってもよく、またIP3が媒介するCa²⁺放出を誘導するアゴニストであってもよい。

【0033】

前記リン酸化量は、前記接触させる工程の後の1タイムポイントで測定されてもよい。本発明によると、前記の測定することには、前記接触させる工程の後の第1タイムポイントで前記被験者細胞の第1アリクウォットにおけるリン酸化量を測定することと、および前記接触させる工程の後の第2タイムポイントで前記被験者細胞の第2アリクウォットにおけるリン酸化量を測定することと、が含まれてもよい。前記タイムポイントは、細胞タイプ、アクチベータ、および指示蛋白質のいくつかの組み合わせに関して、約0.5分間以下、1分間、2分間、2.5分間、5分間、10分間、20分間、30分間、45分間、若しくは1時間、又はそれ以上であってもよい。

30

【0034】

前記細胞は、典型的には皮膚の繊維芽細胞などの末梢組織である。

【0035】

本発明の方法における前記測定する工程は、随意的にインビトロで前記被験者細胞のライセートにおけるリン酸化を検出することを含み、またゲル電気泳動、抗リン酸化MAPK抗体 および/または抗レギュラーMAPK蛋白質抗体を用いた、ウエスタンブロッティングを含んでいてもよい。

40

【0036】

増加したリン酸化は、1タイムポイントにおけるリン酸化蛋白質の量の上昇、またはリン酸化蛋白質の持続時間の増加であってもよい。

【0037】

前記方法は、前記被験者がアルツハイマー病の臨床徴候が欠失している被験者の診断に効果的である。

50

【0038】

本発明によれば、前記方法は、更に前記被験者細胞を蛋白質キナーゼ C活性のインヒビター、PI-3 キナーゼ活性のインヒビター、C-src 蛋白質チロシンキナーゼ活性のインヒビター、IP-3 レセプターのインヒビターおよび蛋白質ホスファターゼのインヒビターからなる群から選択される1以上のインヒビターと接触させることを含んでいてもよい。また、本発明の特に際立った態様を特徴付けると、前記方法は、前記被験者細胞を、蛋白質キナーゼ C活性、C-src 蛋白質チロシンキナーゼ活性、PI-3 キナーゼ活性、および IP-3 レセプターのインヒビターからなる群から選択されるインヒビターと接触させることにより阻害される増加したリン酸化を有することで特徴付けられる。かかる方法において、前記インヒビターは、BiSM-1, PP1, および 2 - アミノエトキシジフェニルボレート (2-aminoethoxydiphenyl borate) からなる群から選択されてもよい。

10

【0039】

本発明は、更に化合物をスクリーニングしてアルツハイマー病の治療に又は予防に有用な化合物を同定する、化合物をスクリーニングするための方法を提供する。該方法は、AD 被験者の試験細胞を、前記接触させる工程の前、途中、または後に、スクリーニングする化合物と接触させることと、前記試験細胞を、イノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP3) レセプターを介した細胞内のカルシウム 放出を惹起する薬剤で刺激することと、前記試験細胞におけるMAPK 蛋白質のリン酸化量を、前記試験細胞を刺激した後の1以上のタイムポイントで測定することと、前記1以上のタイムポイントでの前記試験細胞におけるMAPK 蛋白質のリン酸化量を、前記化合物と接触させなかったAD 被験者のコントロール細胞における同じ1以上のタイムポイントでのリン酸化量と比較することと、を含む。

20

【0040】

前記方法は、更にリード化合物として増加したリン酸化を阻害する又は阻止する化合物を承認 (accepting) することと、および増加したリン酸化を阻害しない又は阻止しない化合物を棄却 (rejecting) することと、を含んでいてもよい。本発明の全ての方法について、前記薬剤はブラジキニンまたはブラジキニン レセプター アゴニストであってもよく、また前記MAPK 蛋白質はErk1/2であってもよい。前記方法は、前記接触させる工程の後の1タイムポイントで前記リン酸化量を測定することを含んでいてもよい。

【0041】

更なる態様は、刺激応答アッセイ (stimulus-response assay) においてアクチベータ 化合物として有用な化合物のスクリーニング方法を提供する。該方法は、AD細胞およびコントロール細胞の指示蛋白質のリン酸化における前記化合物の効果を測定することと、コントロール細胞と比べて、AD細胞において前記指示蛋白質のリン酸化の量および/または持続時間を増加させる化合物を選択することと、を含む。

30

【0042】

本発明の別態様は、抗リン酸化MAPK 蛋白質抗体およびブラジキニンを含む、アルツハイマー病のための診断検査キットである。

【0043】

一態様は、アルツハイマー患者のための薬物療法 (medication) を選択するための方法を提供する。該方法は、可能性のある治療化合物 (therapeutic compound) を選択することと、前記可能性のある治療化合物を前記患者に投与することと、そして後に、前記細胞を前記指示蛋白質のリン酸化を刺激する化合物で活性化した後に、前記患者の細胞のリン酸化指示蛋白質の異常に上昇したレベルの存在または非存在を検出することと、を含み、かかる上昇したレベルの存在が前記可能性のある治療化合物が前記患者に対して効果がないことを示し、且つかかる上昇したレベルの非存在が前記可能性のある治療化合物が前記患者に対して治療上有用であることを示す、方法である。前記方法は、更に前記被験者のアルツハイマー病を、前記患者に治療上有用であることが示された化合物を投与すること

40

50

により治療すること又は予防することを含んでいてもよい。

【0044】

本発明は、効果的な量の医薬 (medicament) を投与することを含む、被験者のアルツハイマー病の治療する又は予防するための方法を提供する。前記医薬は、

(a) コントロール細胞と比べて前記被験者の細胞のMAPK 蛋白質の異常に上昇したリン酸化を阻害する若しくは阻止する；および/または

(b) 前記MAPK 蛋白質の異常に上昇したリン酸化により生じたイベントを阻害する；医薬である。

【0045】

前記医薬は、Erk1/2 リン酸化を阻害し得る。そしてこの医薬は蛋白質キナーゼ C活性の、src 蛋白質チロシンキナーゼ活性の、又はIP-3 レセプターのインヒビターであってもよい。前記インヒビターは、BiSM-1, PP1, および 2ABPからなる群から選択されてもよい。

10

【0046】

特に、本発明は、被験者のアルツハイマー病を診断するための方法を提供する。該方法は、

(a) 前記被験者の及び非アルツハイマーコントロール被験者の皮膚繊維芽細胞を、効果的なリン酸化刺激濃度のブラジキニンと接触させることと、

(b) 前記被験者細胞のリン酸化されたErk1/2量を、2分、5分、10分、20分、および30分からなる群から選択される1以上のタイムポイントで、リン酸化Erk1/2に特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティングにより測定することと；

20

(c) 非アルツハイマーコントロール被験者の細胞のリン酸化Erk1/2量を、(b)と同じタイムポイント(若しくは複数のタイムポイント)で、リン酸化Erk1/2に特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティングにより測定することと(ここで、工程(b)および(c)の前記リン酸化Erk1/3量は、前記細胞に存在する蛋白質量に対してノルマライズされる)；

(d) 前記タイムポイントで前記被験者細胞のリン酸化Erk1/2量と前記コントロール細胞のリン酸化Erk1/2量とを比較することと；を含み、

1以上の前記タイムポイントで前記被験者細胞のリン酸化Erk1/2量の前記コントロール細胞と比較した増加が、アルツハイマー病の診断となる方法である。

【0047】

前記方法は、前記被験者細胞を蛋白質キナーゼ C活性のインヒビターBiSM-1、C-src 蛋白質チロシンキナーゼ活性のインヒビターPP1；及びIP-3 レセプターのインヒビター2-アミノエトキシジフェニルボラートからなる群から選択される1以上のインヒビターと接触させることと(ここで、前記コントロール細胞と比較した前記被験者細胞におけるリン酸化Erk1/2量の前記ブラジキニン誘導性の増加は、前記インヒビターにより減少する)、を更に含んでいてもよい。

30

【0048】

本発明の更なる態様は、化合物をスクリーニングしてアルツハイマー病の治療または予防に有用な化合物を同定するための方法を提供する。該方法は、下記の工程、即ち：

(a) AD 被験者の試験皮膚繊維芽細胞を、スクリーニングする化合物と接触させることと；

40

(b) 前記被験者のコントロール 皮膚繊維芽細胞を前記化合物に対するコントロール 薬剤と接触させることと或いは前記コントロール 繊維芽細胞を非存在下で又は前記化合物もしくは前記コントロール 薬剤の何れかの存在下でインキュベーションすることと；

(c) 工程 (a)および(b)の前、途中、または後に、前記試験および前記コントロール 繊維芽細胞を、効果的なリン酸化刺激濃度のブラジキニンで刺激することと、

(d) 前記試験および前記コントロール 繊維芽細胞におけるリン酸化Erk1/2量を、2分間、5分間、10分間、20分間、および30分間からなる群から選択される1以上のタイムポイントで、リン酸化Erk1/2に特異的な抗体を用いたウエスタンブロッティングにより測定することと(ここで、前記リン酸化Erk1/3量は、前記試験およびコントロール 繊維芽細胞に存在する蛋白質量に対してノルマライズされる)；

50

(e)前記試験繊維芽細胞におけるリン酸化Erk1/2量と前記コントロール 繊維芽細胞におけるリン酸化Erk1/2量とを比較して、前記化合物が前記コントロール細胞と比較して前記試験細胞におけるErk1/2リン酸化のブラジキニン誘導性の増加を阻害するか又は阻止するかどうかを決定することと；を含み、

前記増加したリン酸化を阻害するか又は阻止する化合物は、アルツハイマー病の治療または予防に有用な化合物であると同定される方法である。

【0049】

本発明の方法は、ヒト細胞の、アミロイド前駆体蛋白質の蛋白質分解、アミロイド蛋白質の分泌、および/または tau 蛋白質のリン酸化を減らすための方法であって（ここで、前記細胞はコントロール ヒト細胞と比較してIP3 レセプターが媒介するMAPK 蛋白質のリン酸化が増加しており）、前記細胞を、前記コントロール細胞のレベルにまでリン酸化の減少に効果的なMAPKリン酸化のインヒビターと接触させることを含む方法である。

10

【0050】

本明細書中に列挙される本発明の構成要件は、当業者に明白な特定の態様の記載において、組み合わされるか又は除外されてもよい。

【発明の詳細説明】

【0051】

本発明によれば、アクチベータ、またはIP3媒介の細胞内のカルシウム 放出を刺激する薬剤は、前記背景に記載されたようなIP3 レセプター及び関連する経路についての公開された情報に基づいて、当業者が本明細書中に記載される方法を用いて同定できるものである。

20

【0052】

刺激/非刺激処理後のリン酸化レベルの異常に上昇したレベル又は比率は、ある規定時間で非アルツハイマー病細胞であると判明している細胞に対して予め決定されたレベルを超えたものを意味しており、アルツハイマー病細胞の特徴であり且つ非アルツハイマー病細胞の特徴ではない統計学的に有意な量で提示される。

【0053】

指示蛋白質、又はMAPK 蛋白質という用語は、一般的に本明細書中で相互に変換可能な用語であり、アクチベータ 化合物の投与にตอบสนองするカルシウム シグナリング 経路の一部としてリン酸化される蛋白質を意味しており、そのリン酸化の程度はコントロール細胞よりもAD細胞において明らかに高い。前記指示蛋白質は、その蛋白質のリン酸化が前記細胞におけるIP3R-感受性 Ca^{2+} 上昇と関連しているカルシウム シグナリング 経路の蛋白質であってもよい。指示蛋白質/MAPK 蛋白質は、Erk1/2などのIP3Rが媒介するカルシウム 放出にตอบสนองしてリン酸化されるものを含む。

30

【0054】

細胞の活性化又は刺激とは、インタクト細胞がインビトロで前記アクチベータと接触させられることを意味しており、典型的には前記アクチベータ 化合物を含有している溶液を添加することにより実施されるか、または当業者に既知の別の様式により実施される。

【0055】

アクチベータ 化合物は、ヒト細胞への導入に際して、前記指示蛋白質のリン酸化を刺激するものである。アクチベータ 化合物は、前記指示蛋白質のリン酸化レベルに関して、非アルツハイマー被験者のコントロール細胞の前記レベルと比べてアルツハイマー被験者の細胞において異なる応答を惹起する。アクチベータ 化合物は、細胞培養培地中に導入された場合に効果的である。アクチベータ 化合物をIP3R アゴニストと称してもよく、なぜならそれらは直接的に又は間接的にIP3Rが媒介する細胞内の Ca^{2+} 上昇を誘導するからである。

40

【0056】

指示蛋白質のリン酸化レベルは、リン酸化指示蛋白質（および随意的に非リン酸化指示蛋白質）の量を測定することと、並びに解析されるサンプルにおける指示蛋白質の全量に対する前記リン酸化蛋白質量をノルマライズすることと、により一般的に決定される。計算

50

された応答リン酸化レベルおよび基礎の若しくはバックグラウンドのリン酸化レベルは、それゆえ特定時間 (given time) での前記指示蛋白質の絶対量の差によって影響されない。

【0057】

識別可能タイムポイント (discriminatory time point)、または前記細胞を前記アクチベータ化合物で刺激した後の規定時間は、AD細胞と判明した細胞の及びコントロール細胞と判明した細胞の指示蛋白質のリン酸化レベル間を較正して統計学的に有意な差が認められるように選択される。前記の差は、前記規定時間で最大であってもよいが、これは必須ではなく、試験の他のパラメーターに依存するものである。

【0058】

任意の特定のアクチベータ化合物に対し、有限数 (finite number) の適切な指示蛋白質が存在し、その逆も同様である。本発明によれば、前記アクチベータ化合物および指示蛋白質の組み合わせは、次のように選択される。即ち、前記アクチベータが、前記細胞を前記アクチベータと接触させる工程後の規定時間で、アルツハイマー被験者の細胞における前記指示蛋白質のリン酸化レベルにおいて、健常コントロール細胞の前記レベルと比べて異なる応答を惹起するように前記組み合わせが選択される。当業者は、そのような異なるリン酸化が生じるかどうかを決定することにより、適切な指示蛋白質およびアクチベータ化合物を選択しえる。一連の指示蛋白質およびアクチベータ化合物を選択して、次に前記アッセイパラメーターが、識別可能タイムポイント、前記蛋白質およびアクチベータの適切な濃度、前記リン酸化蛋白質もしくは非リン酸化蛋白質に対する適切な抗体、或いは他の検出手段等に関して最適化されてもよい。

10

20

【0059】

基礎リン酸化レベルに対する活性化したリン酸化レベルの比率の計算は、当然ながら反対に計算してもよい。即ち、便宜上、我々は判明したレベルよりも高い活性化/基礎の比率を指標として使用しているが、前記比率の分子および分母を反転させることにより、活性化していないリン酸化という視点で観察したレベルが判明したレベルよりも低いと考えられる場合に同じ結果が得られることは当業者に自明である。従って、前記比率の計算が本明細書中に一様式 (one way) において記載される場合、それには逆に計算することをも含まれることは当業者に自明である。また、本明細書中に記載されるような比率の計算は有用な比較数 (comparative numbers) を提供するのにも有益であるが、リン酸化レベルの活性化と基礎との間の及び試験被験者とコントロール被験者との間の絶対差 (absolute differences) の計算もまた本発明にしたがって用いられ、この計算も有効であろう。

30

【0060】

規定の又は識別可能な時間で、アルツハイマー病細胞および非アルツハイマー病細胞と判明した細胞に関して予め決定した比率が、チャートに記載されるか又は診断の結果を決定し得るコンピュータデータベースに入力される。従って、実際には診断の試験が実施され、活性化/基礎リン酸化比率が計算され、そしてその計算された比率がアルツハイマー病細胞と判明した細胞に関して予め決定された比率と同じか又はそれを超える場合、診断は陽性である。前記の計算された比率が、非アルツハイマー病細胞と判明した細胞に関して予め決定した比率よりも低い場合、診断は陰性である。

【0061】

本発明は、BK刺激に対するMAPキナーゼ (MAPK) 蛋白質の応答の測定を含むADのための診断試験を提供する。AD細胞における応答は、年齢が適合したコントロール (痴呆に関連する疾患を含む、他の疾患を罹患した被験者を含んでいてもよい) の細胞における応答と比較される。好適な態様において、前記試験は、前記細胞をBKで刺激した後にAD (家族性および非家族性タイプの双方の) の存在を診断する試験であって、皮膚繊維芽細胞におけるErk1/Erk2の異常に高いリン酸化の検出に基づく試験である。リン酸化の評価は、ウエスタンブロッティングまたは他のアプローチによるものであってもよい。

40

【0062】

リン酸化は生化学的な反応であって、その反応においてリン酸基が蛋白質のSer, ThrまたはTyr残基に付加され、そしてリン酸化は蛋白質キナーゼ酵素によって触媒される。

50

【0063】

リン酸化は、通常は標的蛋白質の機能を修飾し、典型的には活性化を生じる。細胞の恒常性機構の一部として、リン酸化は、ホスファターゼと称される他の酵素により元に戻るごく一時的なプロセスである。前記の反応（リン酸化 vs. 脱リン酸化）の何れかの側において異常性が存在することにより、細胞機能が崩壊させられる可能性がある。

【0064】

これらの崩壊が、様々な脳疾患の基礎的な土台（fundamental underpinnings）である可能性がある。

【0065】

本発明にしたがって、カルシウム シグナリング 経路 モジュレーターに応答する指示蛋白質の上昇したリン酸化を生じさせる異常なリン酸化活性が、診断を解析中のAD患者において検出される。前記異常は、健常患者の細胞における前記レベルに対して、特定のタイムでリン酸化が増加または減少することである。

10

【0066】

任意の末梢組織（即ち、中枢神経系の外側）におけるAD特異的な差の検出は、ADの早期診断のための並びに薬剤開発のための治療上の標的をスクリーニングする及び同定するための経済的な試験の基礎として利用される。従って、本発明は、ADの存在または非存在を検出するための方法、試薬、およびキットを提供する。

【0067】

MAPK 酵素は、細胞外シグナルを細胞核へ伝達することにおいて中心的な役割を担っており、遺伝子発現をコントロールする。それらは、ADの病因において重要な事項である、微小管関連蛋白質tauのリン酸化の制御に並びに アミロイド 蛋白質の産生および分泌にも関与している。本発明によると、MAPK Erk1/2の異常に長期化したリン酸化が、年齢が適合した コントロールと比較した場合にBKによる刺激に応答してAD 繊維芽細胞中で生じ、そして検出される。

20

【0068】

本発明の発明者はBKによる刺激で最初の試験を実施したが、BKは細胞のIP3 レセプターの刺激を達成する一様性を代表していることを理解すべきである。従って、本明細書中のBKに関する記載は、他の適切な アクチベータまたは刺激化合物を含むと解釈される。この刺激は、ADの特性である増大したErk1/2 リン酸化を生じる共通のステップとして働く。実際、IP3 レセプターの阻害がBK刺激によるErk1/2リン酸化を全面的に無効化することが観察された。

30

【0069】

Erk1/2 リン酸化のAD特異的な増加は、AD細胞におけるPKCおよびMAP キナーゼ キナーゼ（MAPK/Erk キナーゼまたはMEKとしても知られる）アイソフォームの遺伝子の増強発現に、同様に微小管関連蛋白質tauおよびMAPKを脱リン酸化するホスファターゼ1、2A、および2Bをコードする遺伝子の減弱発現に関連していた。AD細胞における遺伝子発現の変更は、蛋白質キナーゼとホスファターゼとの間の活性バランスを変化させ、このことによりAD特異的な長期化したErk1/2活性化に、同様にAD脳で神経原繊維錯綜を形成するtauの過剰リン酸化に影響し得る。皮膚繊維芽細胞におけるこれらのErk1/2 異常活性の検出は、脳での類似する変化を反映しており、それゆえこの検出によりADの早期の病理生理学的な診断がなされる。

40

【0070】

従って、本発明によれば、BK 刺激は、AD 繊維芽細胞においてErk1/2リン酸化の異常に長期化した増加を生じ、IP3 レセプターが媒介するCa²⁺ 放出に依存した変化を生じる。IP3 キナーゼは、非AD コントロール細胞をBK刺激した際のErk1/2 リン酸化に関与しているように思われるが、AD細胞におけるErk1/2のこのリン酸化はIP3 キナーゼ-非依存性である。

【0071】

Erk1/2 リン酸化におけるAD特異的な増加は、IP3が媒介するCa放出に続くものであった。

50

蛋白質キナーゼ C (PKC)および非レセプター 蛋白質チロシンキナーゼ (PTK) c-Srcは、Erk1/2活性化の上流のシグナリング 経路に関与しており、これはPKC インヒビター ビスインドリルマレイミド - 1 およびc-Src インヒビター (PP1) の双方がBK刺激によるErk1/2 リン酸化を完全に無効化すると結果により示されている。PI-3 キナーゼ、LY924002 が、コントロール非AD細胞中のBK刺激によるErk1/2 リン酸化を部分的に阻害したが、AD細胞においては如何なる効果も示していない。このことは、BK誘導によるErk1/2 リン酸化がPI-3 キナーゼに非依存性のシグナリング 経路に関与しているだろうことを示唆している。

【 0 0 7 2 】

cAMP応答因子結合蛋白質 (CREB)の活性化 (Ser-133のリン酸化の増加として測定される) も、BK 刺激後に観察された。Erk1/2 リン酸化と類似して、BK誘導によるCREB リン酸化は、ACおよびAD細胞の双方でPKCおよびc-srcのインヒビターによって完全に阻害された。AC細胞 (AD細胞ではなく)におけるCREB リン酸化のみが、IP-3 キナーゼ インヒビター LY-294002により部分的に阻害された。

10

【 0 0 7 3 】

異常に増強し且つ長期化した Erk1/2のリン酸化及び活性化を生じる、AD細胞におけるBKに応答したシグナリング 経路の攪乱 (derangement) が、遺伝子転写、APP (アミロイド前駆体蛋白質)プロセッシングおよびtau 蛋白質リン酸化などの細胞作用 (これらの全てはADの病因の基礎に存在する) を順番に混乱 (perturb) させることをこれらの結果は示唆している。これらの経路における変化を理解することは、ADの顕著な特徴 (hallmark) である早期の物忘れを解明する助けとなるかもしれない。加えて、末梢組織のAD特異的な差を検出することにより、(1) ADの早期診断のための効率的な手段、および(2) 薬開発の治療上の標的を同定するための生化学的基礎、が提供される。

20

【 0 0 7 4 】

上述の事項、および同じ細胞は異なる外部メッセージをエンコード (encode) するために異なる組み合わせの細胞内Ca²⁺放出メッセンジャーを使用するだろうとの理由を考慮すると、IP3 レセプターを刺激してカルシウムの内部ストアの放出を生じることが可能な任意の薬剤が、本発明の試験に使用でき、そしてAD細胞の増加したErk1/2 リン酸化特性の誘導物質である可能性がある。また、BKはかかる薬剤の1つであるが、他のBK レセプターアゴニストも同様に有用である。また、IP3 レセプターに対するリガンドである分子も、使用し得る。IP3 レセプターは、ATP、カルシウム、並びに蛋白質キナーゼ A、蛋白質キナーゼ C、およびCa²⁺ カルモジュリン依存性蛋白質キナーゼ II (CaM キナーゼ II)によるリン酸化により制御されるので、ATPの又はこれらキナーゼのレベルを若しくは活性を調節する薬剤は、類似する効果を達成させることが可能であり且つ本発明におけるBKの代用となることが可能である。

30

【 0 0 7 5 】

かかる薬剤の1つは、14 アミノ酸ペプチドであるボンベシン (Anastasi A. et al., Arch Biochem Biophys, 1972,148: 443-446; Woodruff GN et al., Ann N Y Acad Sci, 1996, 780: 223-243)、又はその生物学的に活性なアナログ若しくは断片 (Rivier JE et al., Biochemistry, 1978, 17: 1766-71; Orloff MS et al., peptides, 1984 5: 865-70; Walsh, JH et al., peptides, 1985, 6 Suppl 3: 63-68) である。もう一つは、コレシソキニンである。ボンベシンおよびコレシソキニンが誘導するIP3およびIP3 レセプターを介したカルシウムシグナリングに関しては、例えば、文献 (Cook SJ et al., Biochem J, 1990,265: 617-620 Schulz I et al., Biol Chem, 1999,380: 903-908; Burdakov D, et al., Curr Biol, 2000,10: 993-996) を参照のこと。試験は皮膚繊維芽細胞を用いて本明細書中に例示されるが、取得し、そして処理するのにより便利な他の細胞が、本発明の試験に使用される。従って、血液細胞 (好ましくは、リンパ球またはモノサイト) が末梢血から容易に調製され、そして本発明にしたがって使用される。当業者は、適切な タイムポイントおよび実験条件を較正して、適切な 指示蛋白質およびアクチベータ 化合物を用いて、かかる細胞に基づく診断方法を得ることが可能である。

40

50

【0076】

本発明の発明者等は、重要な酵素であるMAPK〔マイトゲン活性化蛋白質キナーゼ (MAP キナーゼ)を意味している〕の活性が、年齢が適合したコントロールの細胞と比較して、アルツハイマー病 皮膚繊維芽細胞中で異常に長期化したインターバルで刺激されていたことを発見した。以下に記載する実施例は、Erk1/2のリン酸化が、BKでの刺激に際してAD 繊維芽細胞中で長期化していたことを示している。IP3 レセプターが媒介するCa²⁺ 放出、並びにPKCおよび非レセプター 蛋白質チロシンキナーゼ (PTK) c-Srcの活性は、このErk1/2 リン酸化に必須である。IP3 キナーゼはAC細胞のBK刺激によるErk1/2 リン酸化に関与すると思われるが、AD細胞の同じリン酸化はIP3 キナーゼ非依存性である。

【0077】

本発明によれば、細胞は、IP3 レセプターを刺激して細胞内のカルシウムを放出する薬剤で刺激される；かかる薬剤の例は、BKおよびそのアナログである。

10

【0078】

BKは強力なノナペプチドであり、これは特異的なBK レセプターに結合し、そしてこれを活性化し、順番に細胞内の分子イベントのカスケードを惹起する。このイベントには、IP3 レセプターの刺激およびMAPK 蛋白質のリン酸化が含まれる。リン酸化は生化学的反応であり、この反応においてリン酸基が蛋白質に結合する。この反応は、蛋白質キナーゼと称される酵素によって開始される；これにより普通は標的 蛋白質の機能が修飾され、そして通常は蛋白質の活性化を生じる。細胞はその機能に関してバランスのとれたシステムを維持することが要求される。故にリン酸化はほんの一時的なプロセスであり、これはホスファターゼと称される別の酵素で元に戻される必要がある。

20

【0079】

前記の反応 (リン酸化 vs. 脱リン酸化) の何れかの側において異常性が存在することにより、分子ネットワークの統合性を壊し、そして細胞機能を崩壊させる。これらの崩壊が、様々な脳疾患の基礎的な土台 (fundamental underpinnings) である可能性がある。

【0080】

このようにAD 繊維芽細胞においてMAPKリン酸化が長期間持続することは、これらの細胞において本酵素の活性が異常に増強したことを示している。このAD特異的な効果は、他の異常な細胞の及び酵素的な活性に関連するようと思われる。長期化したMAPK リン酸化は、IP3 レセプターにより媒介される細胞内の特定の貯蔵部位からの過剰なCa²⁺ 放出に対して二次的 (secondary) なものであった。

30

【0081】

MAPKリン酸化がPI3 キナーゼ活性に部分的に依存性であり、そしてPI3 キナーゼ依存性の機構がAD細胞中のMAPKリン酸化に関与していることが示された。

【0082】

AD細胞における遺伝子発現プロファイルを年齢が適合した コントロール細胞と比較した際に、本発明の発明者等は、PKCおよびMEKの発現がAD細胞において増加していたことを見出した。PKC及びMEKの双方は、MAPKリン酸化を触媒する上流の分子である。また、本発明の発明者等は、MAPKを脱リン酸化するいくつかのホスファターゼの発現の減少をも見出した。それ故、不均衡 (即ち、AD細胞において診断上有用な差の原因であるMAPK リン酸化を制御する酵素の量および活性が組み合わされた変化) は、MAPK リン酸化を長期化させる。

40

【0083】

本発明は、ADにおいて異常に増強した MAPK活性を最初に発見した発明である。

【0084】

MAPKファミリーの酵素は、細胞膜から核への細胞シグナリングにおける決定的なステップを担っている。それらは、細胞表面で作用する様々なシグナル (例えば、マイトゲン) により刺激され、そして細胞分裂 (マイトーシス) を生じる。このプロセスは損傷または病気によって傷害を受けた細胞の成長および発生、同様に交換および/または修復に必要とされる。

50

【0085】

また、MAPKは、学習および記憶形成などの機能の基礎であるニューロンのシグナル伝達において重要な役割を担っている。また、MAPKは、脳細胞においてアミロイドペプチド APの分泌およびtau 蛋白質のリン酸化を制御する。神経細胞外側での APの蓄積、およびtauの過剰リン酸化は、ニューロンに対して毒性が高く、それぞれブランクおよび神経原繊維錯綜(NFT)を生じる。実際、これらはAD脳における2つの特徴的な病理学的な特性である。

【0086】

本発明によると、異常に増強した MAPK活性は、異常なアミロイドプロセッシングおよびtau 蛋白質機能に影響する。この結果は、ADの病理生理学と同様に脳における正常な記憶形成に関する分子的理解の基礎に新たな見識を提供する。この後者を理解することにより、前記疾患の予防および治療のための新規分子標的の同定を達成することが期待される。

10

【0087】

現時点の実用において、本発明の結果は、迅速な臨床診断の重要性を示す結果である。なぜなら(a) 皮膚繊維芽細胞が、家族性および非家族性双方で、ADの特徴的なMAPK活性の変化を提示し、(b) 皮膚繊維芽細胞は、大変簡単に取得され(脳組織と比べて)、皮膚繊維芽細胞で実施したMAPKに基づく診断試験は、ADの早期診断のための単純で且つ経済的な試験を提供する。

【0088】

本発明による新たな発見は、「過剰なカルシウム シグナリングがBK刺激されたAD 繊維芽細胞において検出可能であった(Ito et al., 1994; Gibson et al., 1996; Etcheberry et al., 1998)」という他者により見出された知見と整合性がある発見である。

20

【実施例1】

【0089】

本研究は、52~67歳の範囲のAD患者20個体の皮膚繊維芽細胞および年齢が適合したコントロール22個体の皮膚繊維芽細胞を使用した。サンプルのいくつかは、以前に保存された細胞であったが、他の細胞はヒト皮膚から新たに採取され、そして培養された。

【0090】

<材料および方法>

家族性(FAD)および非家族性(nFAD) AD患者の皮膚繊維芽細胞並びに年齢が適合したコントロール(AC)の保存された皮膚繊維芽細胞は、Coriell Institute for Medical Researchから購入した。培養液は、ウシ胎児血清(FBS; Bio Fluids)を添加したダルベッコ・モディファイド・イーグルス培地(DMEM; Gibco BRL)を使用した。ブラジキニン、ジフェニルボリックアシッド2-アミノエチルエステル(2ABP; diphenylboric acid 2-aminoethyl ester)、プロテアーゼ及びホスファターゼインヒビターカクテルはシグマ社から; ビスインドリルマレイミド(BiSM-1; ビスインドリルマレイミド-1)及びLY29400はAlexis社から; PP1はピショップ博士(Dr Anthony Bishop, Princeton University)から入手した。抗リン酸化Erk1/2、抗リン酸化CREB、および抗CREB抗体はCell Signaling Technology社から入手した。抗Erk1/2抗体は、Upstate Biotechnology社から入手した。4-20% SDS-ミニゲルは、InvertroGene Novexから入手した。ニトロセルロース膜は、Schleicher & Schuellより入手した。全てのSDS電気泳動試薬は、バイオラッド社から入手した。スーパーシグナルケミルミネッセント基質キットは、ピアス社から入手した。

30

40

【0091】

[ACおよびAD 繊維芽細胞の培養]

家族性(FAD)および非家族性(nFAD)両方のタイプを含むアルツハイマー病患者の、並びに年齢が適合したコントロール(AC)の保存された繊維芽細胞を、DMEM + 10% FBSと共にT-25/T75フラスコ中で維持および継代した。前記細胞を52~67歳の範囲の被験者から採取した(80%以上のサンプルは男性から採取した)。前記細胞を継代6~17の間に使用した。

【0092】

50

[バイオプシーにより新たに採取した繊維芽細胞のプロセッシングおよび培養]

新規に取得した皮膚組織からの繊維芽細胞の採取と培養は以下のように実施した。nFAD患者および年齢が適合した コントロールからパンチバイオプシー皮膚組織を、Copper Ridge Institute (Sykesville, MD)およびJohns Hopkins Hospital (Baltimore, MD)で資格のある担当者が許可されたプロトコールにしたがって採取した。サンプルを1x PBS中に配置し、そして輸送用培地に入れてプロセッシングを行う研究室へと輸送した。組織を、輸送用培地から取り出し、PBSでリンスし、そして1mmの外植片に切断した。外植片を、45% FBS並びに100 U/ml ペニシリン及び100 U/ml ストレプトマイシン (Pen/Strep)を含有する3 mlのバイオプシー培地を入れた通気処置 (vented) T-25フラスコの成長表面 (growth surface) 上に個別に移した。前記組織を、10% FBSを含有している2 mlのバイオプシー培地の添加前に24時間37℃で培養した。前記培地を、48時間後に、10% FBSおよびPen/Strepを含有している標準の培養培地5 mlで置換した。前記細胞を、次に上記のように継代し、そして維持した。

【0093】

[繊維芽細胞の異なる薬理学的薬剤による処理]

繊維芽細胞をBK、および様々なインヒビターで処理した。これらには、IP3 レセプターインヒビター、ジフェニルボリックアシッド 2-アミノエチルエステル (2ABP)、蛋白質キナーゼ C インヒビター ビスインドリルマレイミド I (BiSM-1)、C-src 蛋白質チロシンキナーゼ インヒビター PP1、およびPI3 キナーゼ インヒビター LY294002が含まれる。

【0094】

保存された ACおよびAD 繊維芽細胞を、それらを血清フリーのDMEM中で一晩「飢餓させる」前に80~100%コンフルエンスにまで成長させた。細胞を、異なるインターバルで37℃で10 nM BKで処理して、BK効果に対するタイムコースを設定した。同じ容量のPBSを、各系の細胞のコントロール フラスコに添加した。反応を、培地を除いて、迅速に事前に冷やしたPBSでリンスして、そして前記フラスコをドライアイス/エタノール上に移して、停止させた。

【0095】

新鮮なバイオプシー 組織から採取した細胞を、最適濃度のBK (0.1 nM) で10分間37℃でインキュベートした。

【0096】

阻害実験のために、細胞を次に示す濃度のインヒビターとインターバルとで37℃でプレインキュベートした、即ち; 2ABP (50 μMで30 min); PP1 (10 μMで15 min); Ly294002 (5 μMで15 min); およびBiSM-1 (5 μMで15 min)である。パラレルコントロール フラスコを同一容量のDMSOビヒクルとインキュベートした。このインキュベーションの終了時に、記載の濃度の同じインヒビターを添加し、そしてすぐにBKを10 nMの終濃度まで添加した。BK (10 nM)を、DMSO コントロールにも添加した。基礎コントロール () には、BKおよびインヒビターが添加されていない細胞を使用した。5分間37℃でのインキュベーション後、反応を上記のように停止した。

【0097】

細胞ライセートを様々な群の細胞から調製した。フラスコをドライアイス/エタノールから水へと移動させた。各フラスコに1 mlの溶解用緩衝液 [10 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH8, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100, 1% プロテアーゼ インヒビター カクテル (シグマ社), セリン/スレオニン (Ser/Thr) ホスファターゼ インヒビター およびチロシン (Tyr) ホスファターゼ インヒビターの1% カクテル(シグマ社)] を添加した。低温室内に設置したエンドツーエンドシェーカー上で30分間揺動させた後、細胞を各フラスコから細胞スクレーパーで採取した。細胞を超音波破碎し、5分間5000 rpmで遠心分離し、そして上清のサンプルをウエスタンブロットティングに供試した。

【0098】

[ウエスタンブロットティング]

細胞ライセートを、等容量の2X SDSサンプルバッファー中で10分間沸騰させた。各サン

10

20

30

40

50

ブルの蛋白質を、4~20%のミニグラジエントゲル上で分離し、そしてニトロセルロース膜上に転写した。リン酸化したErk1/2を、スーパーシグナル ECL 検出キットを用い抗リン酸化Erk1/2で検出した。Erk1/2の総量に対するリン酸化Erk1/2量をノルマライズするために、前記抗体でプロットした同じ膜をストリッピングバッファー(62.5 mM Tris-HCl pH 6.7, 2% SDS および 100 mM 2-メルカプトエタノール)で60分間で45分間ストリッピングした。0.01% Tween-20を含有している10 mM PBS (pH 7.4)で洗浄した後(3 x 10分)、前記膜を抗非リン酸化Erk1/2抗体でプロットした。これによってゲル中にロードしたErk1/2の総量を計算することが可能である。

【0099】

CREBを同様の方法を用いて検出した。

10

【0100】

[データ分析]

リン酸化および非リン酸化Erk1/2(またはCREB)から生じたシグナルを、フジフィルムLAS-1000プラススキャナーでスキャンした。各蛋白質バンドの平均光学濃度を、NIHイメージソフトウエアを用いて測定した。リン酸化Erk1/2シグナルの値を、Erk1/2の総シグナルに対してそれぞれノルマライズした。ノルマライズ後、処理細胞から取得したデータを、基礎コントロールのパーセンテージへと変換し、そして統計分析に供試した。

【0101】

[免疫細胞化学]

繊維芽細胞を、0.02 mg %ポリリジンでコートしたカバーガラスの表面で成長させた。上記のようにBKでの処理後、細胞を冷PBSで迅速にリンスし、4%ホルムアルデヒド(PBS中)で室温で15分間固定し、PBSで3回(それぞれ5分間)洗浄し、そして0.1% TritonX-100(PBS中)で室温で30分間孔をあけた。10%の通常のウマ血清(PBS中)で室温で30分間インキュベート後、細胞を抗リン酸化Erk1/2抗体(1:200)で4時間一晩インキュベートした。カバーガラスをPBSで3回洗浄し、そしてフルオレセインラベルした抗マウスIgG, 1:200(Vector Lab)を添加し、そして室温で60分間インキュベートさせた。PBSによる3回の洗浄、そしてベクタシールド(Vector Lab)によるシーリングに続き、細胞中の免疫染色シグナルを蛍光顕微鏡で観察した。蛍光シグナルの強度を、バイオラッドクオンティティワン(R)ソフトウエア(バイオラッド社)で測定した。繊維芽細胞中のBKレセプターの局在観察のために、モノクローナル抗BK B2抗体を正常な繊維芽細胞に適用し、次にCY5結合抗マウスIgGとインキュベーションし、そして前記細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

20

30

【0102】

<結果>

[ACおよびAD細胞のErk1/2のBK刺激による活性化]

BKは、コントロール被験者のヒト皮膚繊維芽細胞中で顕著であるが、一時的なErk1/2のリン酸化を惹起させた(図1)。リン酸化のピークは、刺激に後の約2.5分で生じ、その後Erk1/2のリン酸化は衰退し、そして刺激後の10分までにコントロールレベルまで戻った。BK処理後の20分で、Erk1/2のリン酸化は、コントロールの68%であった(図1)。しかしながら、ADを有する被験者の細胞では、Erk1/2の増加したリン酸化レベルが、著しく長期化した期間にわたって維持されていた(図1)。

40

【0103】

差は、5分($p < 0.01$)で統計学的に有意(ステューデントのt検定)であり、10分($p < 0.0001$)で最大の相違(divergence)が生じた。このADおよびAC細胞の間の差は、BK刺激後の20分($P = 0.002$)で有意のままであった。

【0104】

図2は、BK誘導によるErk1/2リン酸化を、AD患者の及び年齢が適合したコントロールの新鮮な組織サンプルから、同様にADおよびAC群の保存された細胞株から採取された皮膚繊維芽細胞において刺激後10分で検査した試験結果を示している。AD繊維芽細胞におけるErk1/2リン酸化は、年齢が適合したコントロールと比較して一貫して上昇していた

50

(図2A)。同様に、細胞株のBK刺激によるErk1/2リン酸化は、図2Bに示されるようにAD細胞株において上昇していることが再現され、この結果は3つの独立した反復実験(ランダムに選択されたACおよびAD系からの)により示された。

【0105】

繊維芽細胞を抗P-Erk1/2抗体で免疫染色した場合、リン酸化したErk1/2の増加レベルが、BK処理の10分後に、AD細胞で観察されたが、AC細胞では観察されなかった(図3)。これらの増強したシグナルは、核傍領域(para-nuclear area)に集中していた(図3、下部右パネル)。

【0106】

[BK誘導によるErk1/2リン酸化におけるIP3レセプターインヒビター2ABPの効果] 10
BKは、IP3感受性ストアからのCa²⁺放出を刺激する(Cruzblanca et al., 1998; Pascale et al., 1999)。本研究では、BK誘導Erk1/2リン酸化における、Ca²⁺放出(IP3レセプターからの)の関与を調査した。2ABP(IP-3Rの強力な膜透過型インヒビター)の添加は、ACおよびAD細胞双方のBK刺激によるErk1/2リン酸化を完全に無効化した(図4A)。二元配置ANOVAにより、処理効果が高度に有意($F_{1,36} = 187.4$, $p < 0.0001$)であったことが示された。この結果は、Erk1/2のリン酸化およびその後の分子カスケードが、前記細胞におけるIP-3R感受性Ca²⁺上昇の下流であることを証明している。

【0107】

[BK誘導によるErk1/2リン酸化におけるPKCインヒビターBiSM-1の効果] 20
この実験において、ACおよびAD細胞をBKの前に特異的なPKCインヒビターBiSM-1とプレインキュベートした。図4Bに示されるように、BK刺激によるErk1/2のリン酸化は、再度無効化された(ACおよびAD細胞双方ににおいて)。二元配置ANOVAは、有意な処理効果を示した。この結果は、PKC活性が、ACおよびAD細胞双方におけるErk1/2のBK刺激による活性化に必要とされることを示している。

【0108】

[BK刺激によるErk1/2リン酸化におけるC-src蛋白質チロシンキナーゼインヒビター(PP1)の効果] 30
非レセプターPTKであるC-srcがBKによるErk1/2の活性化に関与しているかどうかを試験するために、ACおよびAD細胞をBK前に10 μ M PP1でプレインキュベートした。上記の2ABPおよびBiSM-1と同様に、PP1はBK誘導によるErk1/2リン酸化を完全に阻害した(図4C)。二元配置ANOVAは、有意な処理効果($F_{1,40} = 234$; $p < 0.0001$)を示した。この結果は、それ故にC-src PTK活性もBKによるErk1/2の活性化に関与していたことを示している。

【0109】

[BK誘導によるErk1/2リン酸化におけるPI3キナーゼインヒビター(LY294002)の効果] 40
PI3キナーゼ活性がBK刺激によるErk1/2活性化に関与しているかどうかを試験するためこの研究が実施された。繊維芽細胞をBK前に5 μ M LY294002とインキュベートした。

【0110】

IP-3R、PCKおよびC-srcのインヒビターの効果とは対照的に、LY294002はAC細胞のErk1/2リン酸化の中等度(しかし有意に)阻害を生じたが(図4D)、一方それは、AD細胞のBK刺激によるErk1/2のリン酸化阻害には失敗した(図4D)。二元配置ANOVAは、有意な処理効果($F_{1,20} = 136.2$, $p < 0.001$)およびグループ効果(group effects)($F_{1,20} = 11.55$; $p < 0.05$)を示した。この結果は、PI3キナーゼ活性が、AD患者細胞においてBK誘導Erk1/2リン酸化に関与していないことを示唆している。

【0111】

[サイクリックAMP応答因子結合蛋白質(CREB)の活性化におけるBKの効果] 50
CREBの活性化におけるBKの効果(通常はErk1/2の下流)を試験した。図5に示されるように、10 nM BKは、ACおよびAD細胞双方において、高度に有意なCREBのリン酸化を誘導した。増加したリン酸化は、BK刺激後5分程度で検出され、そして10分で更に増加した(図5A)。二元配置ANOVAは、有意な時間効果を示した($F_{1,28} = 14.09$, $p < 0.001$)が、

ループ効果は示さなかった。図5Bは、ACおよびAD細胞において、BK処理後の10分で同様に上昇したCREBリン酸化を示している。BK処理は、10分でCREB蛋白質総量の著しい減少化をも生じた(図5C) ($p < 0.001$)。要約すると、ACおよびAD細胞の間の総CREBのBK誘導によるCREBリン酸化または減少化において有意差はなかった。

【0112】

[BKで誘導したCREBリン酸化におけるPKC、C-src、およびPI3キナーゼインヒビターの効果]

繊維芽細胞をPKCインヒビターであるBiSM-1で治療することにより、BK刺激によるCREBリン酸化を完全に無効化した(図6A)。二元配置ANOVAは、有意な処理効果 ($F_{1,30}=53.76$, $p < 0.0001$)を示したが、グループ効果を示されなかった。同様に、c-srcインヒビターPP1は、BK刺激によるCREBリン酸化を阻害した(図6B)。これらの結果は、この場合もPKCおよびc-srcの双方が、BKがErk1/2およびCREB双方を活性化するシグナリング経路に参与していることを示している。PI3キナーゼインヒビターであるLY294002は、Erk1/2での効果と同様に、ACにおいてCREBリン酸化を部分的に阻害したが、AD細胞におけるCREBリン酸化に如何なる効果も有していなかった(図6C)。二元配置ANOVAは、有意な処理効果 ($F_{1,30} = 36.23$; $p < 0.0001$)およびグループ効果 ($F_{1,30}=4.7$; $p < 0.05$)を示した。

10

【0113】

[繊維芽細胞におけるBK B2レセプターの発現]

BKに応答して増強したErk1/2およびCREBのリン酸化が、AD細胞上で発現されるBKレセプターの数の増加によるものかどうかを試験するために、ADおよびコントロールAC細胞中のBKレセプター発現を、タイプ2BKレセプター(BKb2R)に特異的な抗体を用いたウエスタンブロットにより測定した。レセプター発現に関して有意差は認められなかった。

20

【0114】

免疫蛍光染色により、BK2bRが、繊維芽細胞の細胞質、核、および核傍領域に存在することが実証された(図7)。しかしながら、BKb2Rの強度または分布パターンの何れかにおいて明確な差は、ADとAC細胞との間で観察されなかった。

【0115】

<実験結果の考察>

繊維芽細胞をADおよび他の遺伝疾患の有用なモデルとして使用した、なぜならこれらの細胞(全身に局在する)は、脳の疾患に関連する遺伝的な異常を提示する可能性があるからである。BKレセプターの刺激がAD繊維芽細胞のMAPK経路に異常シグナル伝達を生じさせるという証拠を本研究は提供した。BKは、最も強力な内在性で疼痛性(algesic)の前炎症物質の1つである。BKは、疾患、損傷およびCNS同様に末梢の炎症において必要な重要な機能を担っている。本研究において、BK刺激は、IP3レセプターを介した Ca^{2+} 放出に依存する様式で、AD細胞中のErk1/2リン酸化を増強させ及び長期化させた。この結果は、上昇したIP3感受性 Ca^{2+} 放出が、BK刺激後にAD皮膚繊維芽細胞において検出されたという以前の報告(Gibson et al., 1996; Etcheberrigaray et al., 1998)と整合性のある結果である。しかしながら、このAD Erk1/2の長期化したリン酸化は、BKb2レセプターまたはErk1/2の増加した発現によるものではなかった。これはこれら2つの蛋白質の発現または濃度が、コントロールとAD細胞とで差がなかったことから確かめられた。ADのBKレセプターおよび/またはIP3レセプターの特性または感受性に対する特異的な他の変化、加えて、このシグナル伝達経路に関わる他の分子の変化をも除外することはできない。

30

40

【0116】

BK2bRの活性化は、PLC系の活性化を刺激し、これにより順に細胞内の Ca^{2+} の上昇を伴ってPKC活性化を誘導する。加えて、いくつかのG蛋白質共役レセプター(「GPCRs」)がc-srcPTK活性を刺激することが知られており、これも細胞シグナリングの重要な中間媒介因子(中間媒介因子)としてErk1/2の活性化に参加する可能性がある。本研究は、BK刺激によるErk1/2リン酸化において、PKCおよびc-srcPTK双方の関与を試験した。このリン酸化

50

がPKCインヒビター (BiSM-1) およびc-src インヒビター (PP1) により無効化されるとの事実は、複数の上流の蛋白質キナーゼが集合することによりErk1/2 活性が制御されることを示している。IP3 レセプター インヒビターである2ABPと同様に、BiSM-1およびPP1の双方は、同様にADおよびコントロール細胞のErk1/2 リン酸化を無効化した。従って、ADに関連したErk1/2 リン酸化の増強が、上昇したPKCまたはc-src PTKの活性によるものではないであろう。

【0117】

AD特異的なErk1/2 リン酸化の増強の根底に存在しているシグナリング 経路を解析するため、本発明の発明者等は、PI-3 キナーゼ (GPCRs によるErk1/2 活性化に關与する別の酵素) の關与を試験した。様々な系に関する試験に基づくと、GPCR 刺激後のPI-3 キナーゼの活性化は、PKC (Rasの下流でc-src PTKと關係している) の活性化に依存している。特異的なPI-3 キナーゼ インヒビター LY294002は、コントロール 纖維芽細胞中でBK誘導によるErk1/2 リン酸化の中等度の障害を生じたが、AD細胞で効果はなかった。これは、PI-3 キナーゼが正常な纖維芽細胞のBK-活性化によるErk1/2 リン酸化に部分的に寄与するが、AD細胞のErk1/2 リン酸化はこの酵素非依存性であるように思われることを示唆している。

10

【0118】

Erk1/2/MAPKの主要な効果は、転写因子を制御することにより遺伝子発現を活性化することである。CREB活性化は、本研究においても觀察された (Ser133のリン酸化)。コントロール細胞におけるErk1/2のリン酸化とは異なり (BK処理後に10分未満の時間持続する)、高度にリン酸化したCREBがBK処理後10分で、ADおよびコントロール細胞の双方に存在していた。このことはCREB 活性化が異なるタイムコースで生じることを示唆している。PKC、c-srcおよびPI3 キナーゼのインヒビターは、Erk1/2 リン酸化の障害と同様な様式でCREBリン酸化を障害する。これは、CREB 活性化が同じシグナル 経路により制御されることを示唆している。PP1はBK刺激によるCREB リン酸化を完全に障害するが、コントロール細胞 (図6B) におけるCREB 蛋白質の発現増加を生じ、これはおそらく正常な補償的フィードバック機構の存在を反映した結果であろう。PP1のこの効果は、AD細胞で觀察されていなく、これはCREB発現の制御がADでは損なわれているだろうことを示唆している。

20

【0119】

本試験結果は、図6に要約されるように、ADの病因がMAPKに關連する分子カスケードの攪乱を引き起こすという結果を支持する証拠を提供する。他者による最近の研究結果は、学習および記憶などのニューロンの柔軟性 (neuronal plasticity) に關連する脳機能にとってMAPKが重要であること示唆している。Erkは、tau 蛋白質をSer262およびSer356を含む複数のSer/Thr 部位でリン酸化する (Reynolds et al., 2000)、この領域はtauの微小管結合領域中に存在する。Ser262のリン酸化は、微小管を会合させ且つ安定化させるtauの機能を著しく損なわせる。MAPKが關与する損傷したシグナリング 経路により、細胞は多くの他の蛋白質の異常発現を誘導して細胞外および細胞内のシグナルに応答し得る。

30

【0120】

MAPK リン酸化の増強または長期化などの分子シグナリングにおける異常の全体徴候 (Systemic manifestations) は、大きく行動/認識に影響するCNSの異常性 (例えば、物忘れ) に反映している可能性がある。従って、簡単に入手できる末梢部位に見出される細胞 (皮膚纖維芽細胞が例である) における、MAPKおよびそれに関連するシグナリング 経路におけるAD特異的な異常の検出は、ADの早期診断のための手段と同様に薬剤開発の治療標的を同定するための効率的で且つ信頼性のある手段を提供する。

40

【実施例2】

【0121】

ハンティングトン痴呆 (HD ; Huntington's dementia) に罹患した個体の皮膚纖維芽細胞を用いて、BK刺激したErk1/2 活性の長期化がAD特異的であるかどうかを試験して決定した。図8は、纖維芽細胞のErk1/2のリン酸化におけるブラジキニンの効果を示している (N=4およびP=0.39, t 検定)。HD細胞を、10分間10 nM BKで処理した。図8は、HD細胞を

50

10分間10 nM BKで処理した場合、Erk1/2のリン酸化レベルが年齢適合コントロールのレベルと差がなかったことを示しており、これはErk1/2 活性のBK刺激による増強がハンティングトン痴呆には存在しないことを示唆している。従って、本発明によるアルツハイマー病のためのMAP キナーゼ アッセイは、ハンティングトン痴呆に関して陰性の診断を提示しており、この結果は前記アッセイがアルツハイマーに特異的であることを示している。

【0122】

本発明の好適な態様の記載中には、本発明を明確に説明するために特定の専門用語が使用される。しかしながら、本発明は、そのように選択された前記の特定の専門用語に限定されない。各々の特定の構成要素は、類似する目的を達成するために類似する様式で実施される、全ての技術的に均等なものを含む。

10

【0123】

上記に記載された本発明の態様は、本発明の範囲内で上記技術を考慮して当業者に適するように、修飾されるか又は変化する、また構成要素が付加されるか又は削除される。本明細書中で参照した各々の参照文献は、各々の文献が個別に参照によって援用されるように、参照によって援用される。

【参考文献】

【0124】

【参照文献】

1. Barrow, P. A. Empson, R. M. Gladwell, S. J. Anderson, C. M. Killick, R., Yu, X., Jefferys, J. G. and Duff, K. (2000) *Neurobiol Dis* 7, 119-126 ("Barrow et al., 2000").
2. Bassa BV, Roh DD, Vaziri ND, Kirschenbaum MA, Kamanna VS (1999) *Am J Physiol* 277, F328-337 ("Bassa et al., 1999").
3. Berridge MJ (1984) *Biochem J* 220, 345-360 ("Berridge, 1984"). 10
4. Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E. W., and Mandelkow, E. (1993) *Neuron* 11, 153-163 ("Biernat et al., 1993").
5. Cruzblanca H, Koh DS, Hille B. (1998) Bradykinin inhibits M current via phospholipase C and Ca²⁺ release from IP3-sensitive Ca²⁺ stores in rat sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7151-7156 ("Cruzblanca et al., 1998").
6. Ekinici, F. J. and Shea, T. B. (1999) *Cell Mol. Neurobiol.* 19, 249-260 ("Ekinici and Shea, 1999").
7. Etcheberrigaray E, Gibson GE, Alkon DL (1994) Molecular mechanisms of memory and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 747:245-55 20
("Etcheberrigaray et al., 1994")
8. Etcheberrigaray, R., Hirashima, N., Nee, L., Prince, J., Govoni, S., Racchi, M., Tanzi, R. E. and Alkon, D. I. (1998) *Neurobiol. Diseases.* 5, 37-45 ("Etcheberrigaray, et al., 1998").
9. Gibson, G. E., Zhang, H., Toral-Barza, L., Szolosi, S., and Tofel-Grehl, B. (1996) *Biochim, Biophys Acta* 1316, 71-77 ("Gibson et al., 1996").
10. Grant SM, Morinville A, Maysinger D, Szyf M, Cuellar AC. (1999) *Brain Res Mol Brain Res.* 72, 115-20 ("Grant et al., 1999"). 30
11. Greenberg SM, Koo EH, Selkoe DJ, Qiu WQ, Kosik KS. (1994) Secreted beta-amyloid precursor protein stimulates mitogen-activated protein kinase and enhances tau phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7104-7108 ("Greenberg et al., 1994").
12. Hirashima, N., Etcheberrigaray, R., Bergamashi, S., Racchi, M., Battaini, F., Binetti, G., Govoni, S., Alkon, D. L. (1996) *Neurobiol Aging* 17, 549-555 ("Hirashima, et al., 1996").
13. Ito E, Oka K, Etcheberrigaray R, Nelson TJ, McPhie DL, Tofel-Grehl B, Gibson GE, Alkon DL (1994) Internal Ca²⁺ mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91,534-538 ("Ito et al., 1994"). 40

14. Leissring, M. A., Akbari, Y., Fanger, C. M., Cahalan, M. D., Mattson, M. P. and Laferla, F. M. (2000) *J Cell Biol* 149, 793-798 ("Leissring et al., 2000").
15. Leissring, M. A., Parker, I., LaFerla, F. M. (1999) *J Biol Chem* 274, 32535-32538 ("Leissring et al., 1999").
16. Lu, Q., Soria, J. P., and Wood, J. G. (1993) *J. Neurosci. Res.* 35, 439-444 ("Lu et al., 1993").
17. Mattson, M. P., Zhu, H., Yu, J. and Kindy, M. S. (2000) *J. Neurosci.* 20, 1358-1364 ("Mattson et al., 2000").
18. McDonald DR, Bamberger ME, Combs CK, Landreth GE (1998) *J Neurosci* 18, 4451-4460 ("McDonald et al., 1998").
19. Pascale A, Bhagavan S, Nelson TJ, Neve RL, McPhie DL, Etcheberrigaray R. (1999) Enhanced BK-induced calcium responsiveness in PC12 cells expressing the C100 fragment of the amyloid precursor protein. *Brain Res Mol Brain Res* 72:205-2 ("Pascale et al., 1999").
20. Putney J. W. Jr. (2000) *Neuron* 27, 411-412 ("Putney, 2000").
21. Reynolds, C. H., Betts, J. C., Blackstock, W. P., Nebreda, A. R. and Anderton, B. H. (2000) *J. Neurochem.* 74, 1587-1595 ("Reynolds et al., 2000").
22. Sheehan JP, Swerdlow RH, Miller SW, Davis RE, Parks JK, Parker WD, Tuttle JB. (1997) *J Neurosci* 17, 4612-4622 ("Sheehan et al., 1997").
23. Yoo, A. S., Cheng, I., Chung, S., Grenfell, T. Z., Lee, H., Pack-Chung, E., Handler, M., Shen, J., Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry. *Neuron*. 2000 Sep;27(3):561-72 ("Yoo et al., 2000").

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0125】

【図1】図1(1A1, 1A2および1B)は、Erk1/2のBK刺激による活性化のタイムコースを示す図である。

AD細胞および年齢が適合した正常なコントロールの細胞(「AC」)を、10 nM BKで異なる時間処理し、そして反応を実施例に記載のように停止させた。各細胞株のコントロールに同容量のPBSを添加した。最上段のイメージは、ADおよびAC細胞の活性化したErk1/2 (P-Erk1/2)に対する代表的なウエスタンブロットである。各サンプルの平均密度を、蛋白質総量に対してノルマライズした。これは、抗レギュラーMAPキナーゼ抗体(R-Erk1/2)を用いて決定された。11の非依存性細胞株の値の統計学的な有意差を独立学生t検定により評価した。結果を下部のグラフに要約して示した。

【0126】

【図2】図2(2Aおよび2B)は、BK刺激後のADとAC細胞との間のErk1/2のリン酸化を比較したスキャッタープロットである。

【0127】

2Aは、BK刺激10分後のADとAC細胞との間のErk1/2のリン酸化を比較したスキャッタープロットである。20個体のAD患者および22個体の年齢が適合したコントロールの細胞をBKで処理し、そして図1の解説部分に記載のように処理した。活性化したErk1/2およびトータルのErk1/2を、適切な抗体でウエスタンブロットングすることによって検出した。結果を処理し、そして図1に関して記載されたように分析した。2Bは、各々ランダム

に選択された細胞株に関する3つの独立した反復実験から得られたBK刺激によるErk1/2リン酸化を示している。

【0128】

【図3】図3(3A1, 3A2, 3B1および3B2)は、ヒト 繊維芽細胞における活性化したErk1/2の免疫細胞化学染色を示す顕微鏡写真である。

AD患者および年齢が適合した コントロールの繊維芽細胞を、カバーガラス (glass cover slips) 上で培養し、そして10 nM BKで10分間刺激した。活性化したErk1/2を抗リン酸化Erk1/Erk2抗体で検出した。AC細胞(最上部のイメージ)にBK処理の前後で明らかな差が認められなかったことを結果は示している。しかしながら、AD細胞において、高度に増強した免疫蛍光シグナル(下右イメージ、3B2)が、BK処理した細胞で認められた(10分)。

10

【0129】

【図4】図4(4A1, 4A2, 4B1, 4B2, 4C1, 4C2, 4D1および4D2)は、Erk1/2のBK刺激による活性化における異なるインヒビターの効果を示す図である。

AD患者および年齢が適合した コントロールの繊維芽細胞を、37 °Cの温度条件において、50 μM 2APBで30分間(図4A)、5 μM BiSm-1で15分間(図4B); 10 μM PP1で15分間(図4C)および5 μM LY294002で15分間(図4D)、別々にプレインキュベートした。各細胞株の第2のフラスコを、同容量のDMS0ピヒクルとインキュベートした。インキュベーション終了時、反応停止前に細胞を10 nM BKで5分間処理した。活性化型および通常(レギュラー)型のErk1/2を、次に上記の2つの抗体でウエスタンブロットして検出した。左のパネルは代表的なウエスタンブロットを示し、そして右はADおよびAC双方から得られた11細胞株の結果を要約したグラフを示す(** p < 0.001; *p < 0.05)。

20

【0130】

【図5】図5(5A, 5B1, 5B2, 5C1および5C2)は、BK 刺激後のCREBのリン酸化および量の変化を示す図である。

ACおよびAD細胞を10 nM BKで5または10分間処理した。リン酸化したCREB (P-CREB)を、ウエスタンブロット上で抗リン酸化CREB-Ser133抗体を用いて測定した。P-CREBの平均密度を、抗レギュラーCREB抗体を用いて測定したCREBの総量に対してノルマライズし、そして統計分析を行った。5Aは、処理後5および10分でのBK誘導によるCREBリン酸化を示している。5Bは、BK処理後10分での代表的なP-CREBのプロットを示している。5Cは、CREB総量が10分間のBK処理後に有意に減ったことを示している。

30

【0131】

【図6】図6(6A1, 6A2, 6B1, 6B2, 6C1および6C2)は、CREBのBK刺激によるリン酸化における異なるインヒビターの効果を示す図である。

10 nM BKで10分間インキュベーションする前に、ACおよびAD細胞を37 °Cの温度条件下で15分間、5 μM BiSM-1 (6A)、10 μM PP1 (6B)、または5 μM Ly294002 (6C)でプレインキュベートした。ノルマライゼーションを図5A~5Cと同様に実施し、統計学的な有意差を二元配置ANOVA分析により評価した(** p < 0.0001; * < 0.05)。

【0132】

【図7】図7(7Aおよび7B)は、ヒト 皮膚繊維芽細胞におけるBKb2 レセプターの分布を示す顕微鏡写真である。

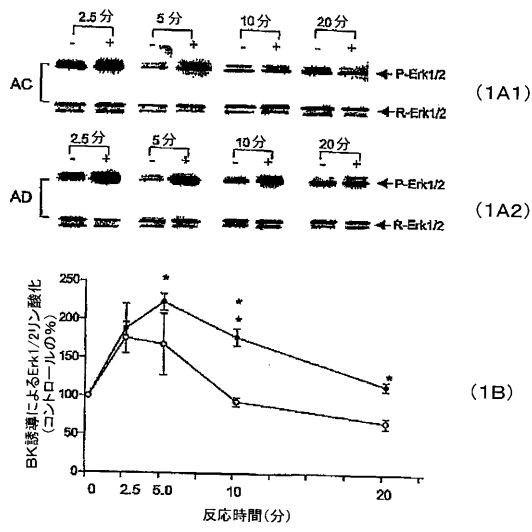
40

繊維芽細胞を、抗BKb2 レセプター抗体と、次にフルオレセインラベルした二次抗体とインキュベートした。最上部パネルは、前記細胞の微分干渉コントラスト(DIC; differential interference contrast)によるイメージを示し、そして下部パネルは、繊維芽細胞におけるBK b2 レセプターの免疫蛍光を示す。

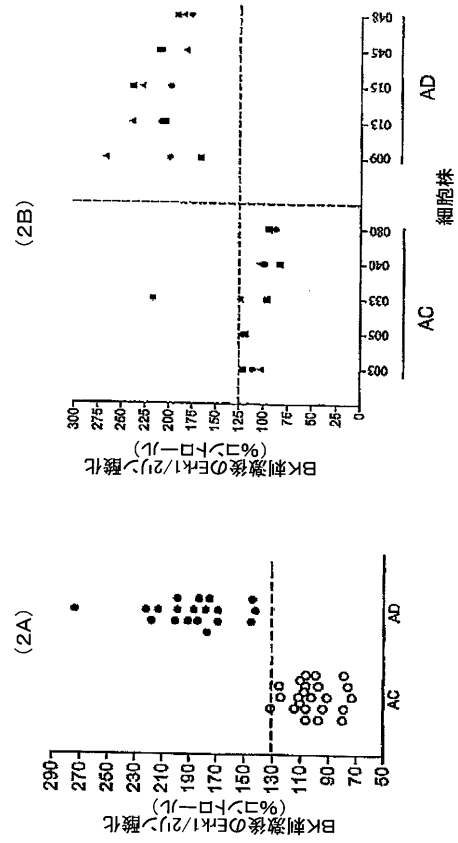
【0133】

【図8】図8は、ハンティングトン痴呆(HD)に罹患した個体から採取した繊維芽細胞のErk1/2のリン酸化におけるブラジキニンの効果を示す図である(N=4およびP=0.39、t検定)。

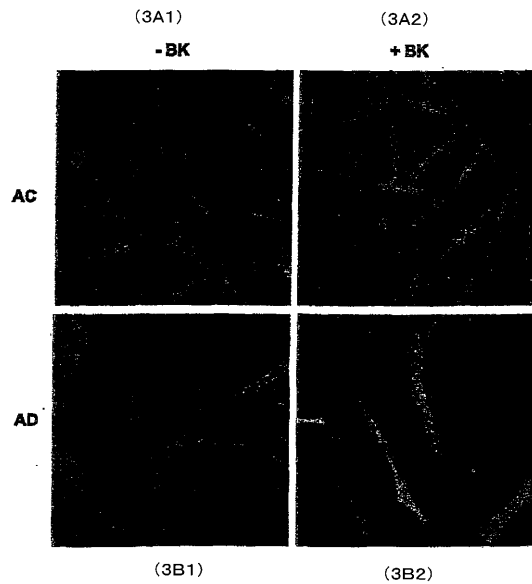
【 図 1 】



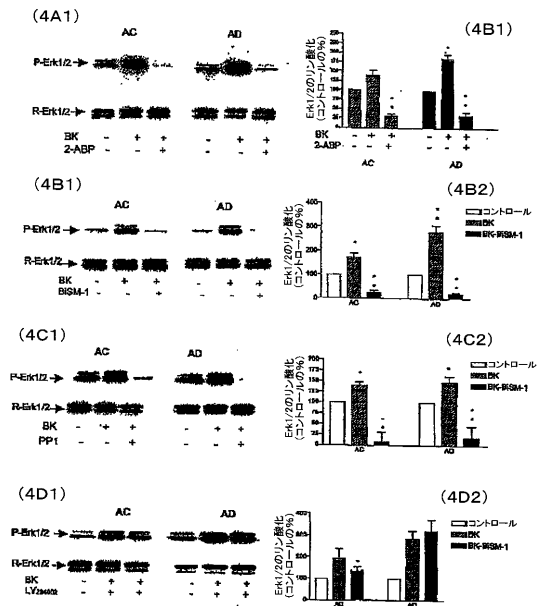
【 図 2 】



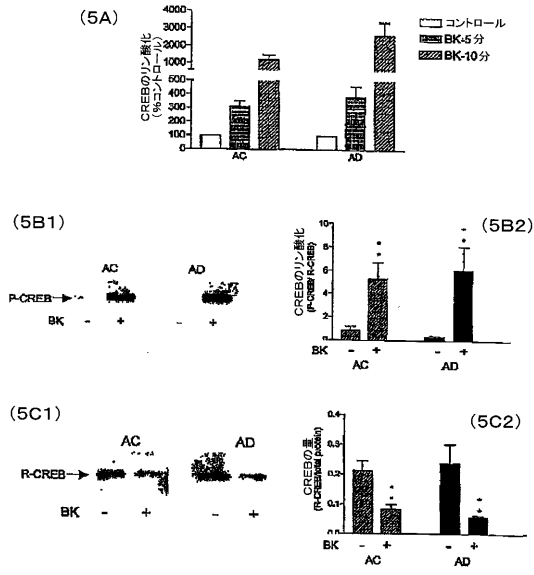
【 図 3 】



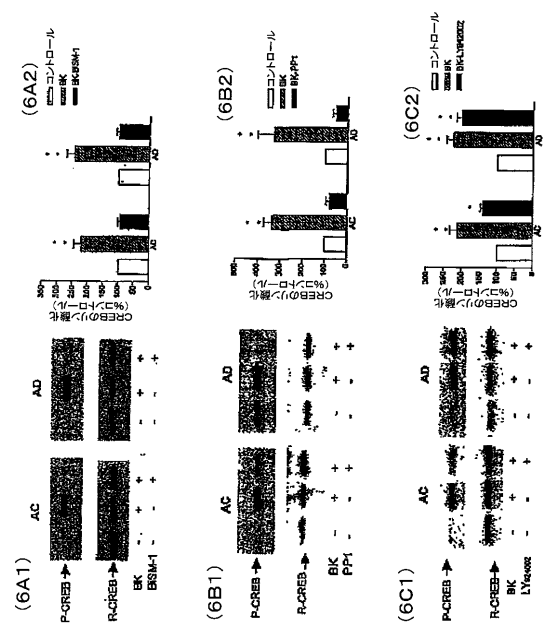
【 図 4 】



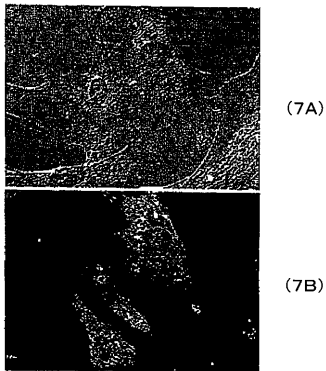
【 図 5 】



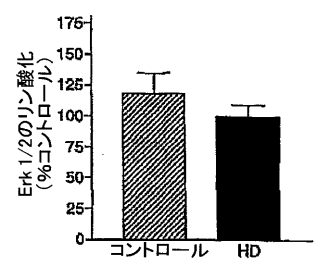
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 September 2002 (06.09.2002)

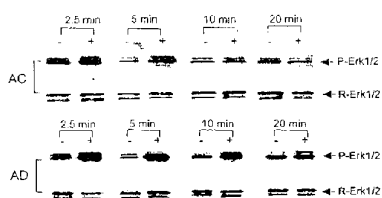
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/067764 A2

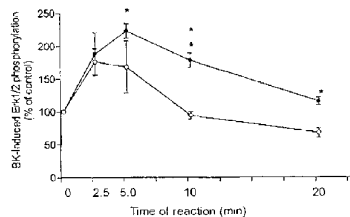
(51) International Patent Classification: A61B
 (71) Applicant and (72) Inventor: ALKON, Daniel, L. [USA/US]; 6701 Bonaventure Court, Bethesda, MD 20817 (US).
 (21) International Application Number: PCT/US02/05672
 (72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (for US only): ZHAO, Wei-Qin [AU/US]; 409 Westside Drive, #102, Bethesda, MD 20878 (US).
 (22) International Filing Date: 27 February 2002 (27.02.2002)
 (74) Agents: GOLLIN, Michael, A. et al.; VENABLE, BAETJER, HOWARD & CIVILETTI, LLP, 1201 New York Avenue, NW, Suite 1000, P.O. Box 34385, Washington, DC 20043-9998 (US).
 (25) Filing Language: English
 (26) Publication Language: English
 (30) Priority Data:
 60/271,416 27 February 2001 (27.02.2001) US
 60/329,505 17 October 2001 (17.10.2001) US
 (71) Applicant (for all designated States except US): BLANCHETTE, ROCKEFELLER NEUROSCIENCES INSTITUTE [USA/US]; 9601 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850 (US).
 (81) Designated States (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, GI, GR, GM, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

[Continued on next page]

(54) Title: ALZHEIMER'S DISEASE DIAGNOSIS BASED ON MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE PHOSPHORYLATION



(57) Abstract: A method of diagnosing Alzheimer's disease in a patient comprises determining whether the phosphorylation level of an indicator protein in cells of the patient after stimulus with an activator compound is abnormally elevated as compared to a basal phosphorylation level, the indicator protein being e.g. Erk1/2 and the activator compound being e.g. bradykinin.



WO 02/067764 A2

WO 02/067764 A2 

MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

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

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/067764

PCT/US02/05672

**ALZHEIMER'S DISEASE DIAGNOSIS BASED ON MITOGEN-ACTIVATED
PROTEIN KINASE PHOSPHORYLATION****BACKGROUND OF THE INVENTION**

5 The invention provides a diagnostic and screening test for Alzheimer's disease ("AD"). An example of the test involves detecting abnormally enhanced phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase type 1 or 2 ("Erk1/2") in skin fibroblasts from AD patients after stimulating the cells with agonist such as bradykinin or other agents that stimulate the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor, in comparison to cells from age-matched controls. Enhanced phosphorylation may be measured by Western blot using antibodies specific for the phosphorylated protein or other similar approaches.

10 Accumulating evidence indicates that the early pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) involves perturbation of intracellular calcium homeostasis and increased levels of oxidative stress that contribute to excitatory toxicity and neuronal death in the AD brain (Putney, 2000; Yoo *et al.*, 2000; Sheehan *et al.*, 1997). Studies have reported enhanced elevation of intracellular Ca^{2+} levels in AD brains as well as in peripheral cells in response to activation of bradykinin receptors and inactivation of a K^+ channel (Ito *et al.*, 1994; Etcheberrigaray *et al.*, 1994; Hirashima, *et al.*, 1996; Gibson *et al.*, 1996; Etcheberrigaray *et al.*, 1998). Critical proteins such as amyloid precursor protein (APP), presenilin 1 and 20 presenilin 2, mutations of which are associated with the pathogenesis of AD, have been reported to induce dysregulation of both the IP3 receptor (IP3R) and the ryanodine receptor- (RyR-) mediated intracellular Ca^{2+} homeostasis (Yoo *et al.*, 2000; Leissring *et al.*, 1999; 2000; Mattson *et al.*, 2000; Barrow *et al.*, 2000). The alteration in cytosolic Ca^{2+} concentration is thought to contribute to the pathophysiology of AD, including increased 25 production of the neurotoxic 42 amino acid β -amyloid peptide ($A\beta$) involved in plaque formation, hyperphosphorylation of tau protein involved in formation of neurofibrillary tangles, and enhanced general vulnerability of neurons to cell death.

Bradykinin (BK) is a potent vasoactive nonapeptide that is generated in the course of various inflammatory conditions. BK binds to and activates specific cell membrane BK 30 receptor(s), thereby triggering a cascade of intracellular events leading to the phosphorylation of proteins known as "mitogen activated protein kinase" (MAPK; see

WO 02/067764

PCT/US02/05762

5 below). Phosphorylation of proteins, the addition of a phosphate group to a Ser, Thr or Tyr residue, is mediated by a large number of enzymes known collectively as protein kinases. Phosphorylation normally modifies the function of, and usually activates, a protein. Homeostasis requires that phosphorylation be a transient process, which is reversed by phosphatase enzymes that dephosphorylate the substrate. Any aberration in phosphorylation
10 or dephosphorylation disrupts biochemical pathways and multiple cellular functions. Such disruptions may be the basis for certain brain diseases.

Increased intracellular Ca^{2+} levels in response to BK is mediated at least by the "type 2" BK receptor (BKb2R), a G-protein-coupled receptor. Stimulation of BKb2R by BK activates phospholipase C (PLC) resulting in production of diacylglycerol (DAG) and
15 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3), second messengers involved in regulation of intracellular Ca^{2+} levels and activation of protein kinase C (PKC). The PLC/phospholipid/PKC pathway also interact with the Ras signaling pathway that activates the MAPK pathway. MAPK (or MAP kinase) refers to an enzyme family termed "mitogen activated protein kinase," an important member of which is the "extracellular signal-regulated kinase" type 1 or 2
20 ("Erk1/2") (Berridge, 1984; Bassa *et al.*, 1999). Erk1/2 receive signals from multiple signal transduction pathways and is part of a pathway that leads to cell proliferation and differentiation by regulation of gene expression through a number of transcriptional factors including cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-responsive element binding protein (CREB).

25 Erk1/2 phosphorylates tau protein at multiple Ser/Thr sites including Ser262 and Ser356 (Reynolds *et al.*, 2000), which are in microtubule-binding regions of tau. Phosphorylation of Ser262 markedly compromises the ability of tau to assemble and stabilize microtubules (Biernat *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1993). Increased oxidative stress, aberrant expression of amyloid precursor protein (APP), and exposure to $AP\beta$ cause
30 activation of MAPK (McDonald *et al.*, 1998; Ekinci and Shea, 1999; Grant *et al.*, 1999) and enhanced tau phosphorylation (Greenberg *et al.*, 1994).

Young LT *et al.*, *Neurosci Lett*, 1988, 94:198-202 studied IP3 receptor binding sites in autopsied brains from 10 subjects with AD and 10 age-matched controls. In the parietal cortex and hippocampus, there was a 50-70% loss of [3H]-IP3 binding whereas no
35 significant changes were observed in frontal, occipital and temporal cortices, caudate or amygdala. Scatchard analysis confirmed a reduction in receptor density rather than a change in affinity. Also, many neurotransmitters, hormones and growth factors act at membrane

WO 02/067764

PCT/US02/05762

5 receptors to stimulate the phosphodiesterase hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) generating the messengers IP₃ and diacylglycerol (DAG). DAG stimulates PKC while IP₃ was initially postulated to activate specific receptors leading to release of intracellular calcium, probably from the endoplasmic reticulum.

10 Though earlier reports had detected ³²P-IP₃ binding to liver and adrenal microsomes and to permeabilized neutrophils and liver cells, Solomon Snyder's group was the first to localize, isolate, analyze and later clone, IP₃ receptors. Worley PF *et al.*, *Nature* 1987;325:159-161, demonstrated high affinity, selective binding sites for ³H- and ³²P-labelled IP₃ in the brain at levels 100-300 times higher than those observed in peripheral tissues. These receptors were considered physiologically relevant because the potencies of
15 various myoinositol analogues at the IP₃ binding site corresponded to their potencies in releasing calcium from microsomes. Brain autoradiograms demonstrated discrete, heterogeneous localization of IP₃ receptors. In 1988, this group (Supattapone S *et al.*, *J Biol Chem*, 1988, 263:1530-1534, reported the solubilization, purification to homogeneity, and characterization of an IP₃ receptor from rat cerebellum. The purified receptor was a
20 globular protein that migrated in electrophoresis as one protein band with an Mr of 260 kDa. In a review, Snyder *et al.* (*Cell Calcium*, 1989, 10:337-342) noted that immunohistochemical studies with antisera to the purified receptor protein localized the receptor to a subdivision of the rough endoplasmic reticulum occurring in synaptic areas and in close association with the nuclear membrane. The IP₃ receptor protein was selectively phosphorylated by cAMP-
25 dependent protein kinase. This phosphorylation decreased 10-fold the potency of IP₃ in releasing calcium from brain membranes. Ferris CD *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991 88:2232-2235 later studied phosphorylation of IP₃ receptors with purified receptor protein reconstituted in liposomes (to remove detergent that can inhibit protein kinases). The IP₃ receptor was stoichiometrically phosphorylated by protein kinase C (PKC) and CaM kinase
30 II as well as by protein kinase A (PKA). IP₃ receptors are regulated by phosphorylation catalyzed by the three enzymes which was additive and involved different peptide sequences. Phosphorylation by (1) PKC which was stimulated by Ca²⁺ and DAG, and (2) by CaM kinase II which required Ca²⁺, provided a means whereby Ca²⁺ and DAG, formed during inositol phospholipid turnover, regulate IP₃ receptors. Chadwick CC *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990 87:2132-2136, described the isolation from smooth muscle of an
35 IP₃ receptor that was an oligomer of a single polypeptide with a Mr of 224 kDa. Furuichi T, *et al.*, *FEBS Lett*, 1990 267:85-88 examined distribution of IP₃ receptor mRNA in mouse

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 tissues. The concentration of was greatest in cerebellar tissue. Moderate amounts of IP3
receptor mRNA were present in other brain tissue: thymus, heart, lung, liver, spleen, kidney,
and uterus. Small amounts of IP3 receptor mRNA were observed in skeletal muscle and
testicular tissue. Based on *in situ* hybridization, a considerable amount of IP3 receptor
10 mRNA was located in smooth muscle cells, such as those of the arteries, bronchioles,
oviduct and uterus. Ferris CD *et al.*, *J Biol Chem*, 1992, 267:7036-7041, demonstrated serine
autophosphorylation of the purified and reconstituted IP3 receptor and found serine protein
kinase activity of the IP3 receptor toward a specific peptide substrate. The investigators
concluded that the IP3 receptor protein and the phosphorylating activity reside in the same
molecule. Ross CA *et al.* (*Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:4265-4269), cloned three
15 IP3R cDNAs, designated IP3R-II, -III, and -IV, from a mouse placenta cDNA library. All
three displayed strong homology in membrane-spanning domains M7 and M8 to the
originally cloned cerebellar IP3R-I, with divergences predominantly in cytoplasmic
domains. Levels of mRNA for the three additional IP3Rs in general were substantially
lower than for IP3R-I, except for the gastrointestinal tract where levels were comparable.
20 Cerebellar Purkinje cells expressed at least two and possibly three distinct IP3Rs, suggesting
heterogeneity of IP3 action within a single cell. Sharp AH, *Neuroscience*, 1993, 53:927-42,
examined in detail the distribution of IP3 receptors in the rat brain and spinal cord using
immunohistochemical methods. IP3 receptors are present in neuronal cells, fibers and
terminals in a wide distribution of areas throughout the CNS, including . the olfactory bulb,
25 thalamic nuclei and dorsal horn of the spinal cord, in circumventricular organs and
neuroendocrine structures such as the area postrema, choroid plexus, subcommissural organ,
pineal gland and pituitary. Ca²⁺ release mediated by the phosphoinositide second messenger
system is important in control of diverse physiological processes. Studies of IP3 receptors in
lymphocytes (T cells) by Snyder's group localized these receptors to the plasma membrane.
30 Capping of the T cell receptor-CD3 complex, which is associated with signal transduction,
was accompanied by capping of IP3 receptors. The IP3 receptor on T cells appears to be
responsible for the entry of Ca²⁺ that initiates proliferative responses (Khan, AA *et al.*,
Science, 1992, 257:815-818)

Further with regard to IP3, Wilcox RA *et al.*, *Trends Pharmacol Sci*, 1998, 19:467-
35 475, noted that receptor-mediated activation of PLC to generate IP3 is a ubiquitous
signalling pathway in mammalian systems. A family of three IP3 receptor subtype
monomers form functional tetramers, which act as IP3 effectors, providing a ligand-gated

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 channel that allows Ca^{2+} ions to move between cellular compartments. As IP3 receptors are located principally, although not exclusively, in the endoplasmic reticular membrane, IP3 is considered to be a second messenger that mobilizes Ca^{2+} from intracellular stores contributing to a variety of physiological and pathophysiological phenomena. Patel S *et al.*, *Cell Calcium*, 1999, 25:247-264, reviewed the molecular properties of IP3 receptors.

10 Several Ca^{2+} -binding sites and a Ca^{2+} -calmodulin-binding domain were mapped within the type I IP3 receptor, and studies on purified cerebellar IP3 receptors suggested a second Ca^{2+} -independent calmodulin-binding domain. Overexpression of IP3 receptors provided further clues to the regulation of individual IP3 receptor isoforms present within cells, and the role that they play in the generation of IP3-dependent Ca^{2+} signals. IP3 receptors may be

15 involved in cellular processes such as proliferation and apoptosis. Abdel-Latif AA. *Exp Biol Med* (Maywood) 2001 Mar;226(3):153-63 reviewed evidence, both from nonvascular and vascular smooth muscle, for cross talk between the cyclic nucleotides, cAMP and cGMP via their respective protein kinases, and the Ca^{2+} -dependent- and Ca^{2+} -independent-signaling pathways involved in agonist-induced contraction. These included the IP3- Ca^{2+} -CaM-myosin light chain kinase (MLCK) pathway and the Ca^{2+} -independent pathways, including PKC, MAP kinase, and Rho-kinase. Mikoshiba K *et al.*, *Sci STKE* 2000 Sep 26;2000(51):P, described the regulated release of calcium from intracellular stores by the IP3 receptor and the relationship of this release mechanism to calcium influx from the extracellular milieu through store-operated calcium channels. They disclosed a model of

25 functional and physical coupling of intracellular and plasma membrane calcium channels.

Although AD is well known for its severe brain damage and memory loss, pathological changes are manifest elsewhere in the body and can be detected at the cellular level. Skin fibroblasts lying in the deep layer of skin reveal characteristic cellular and molecular abnormalities of AD damage. Skin fibroblasts are readily obtained and cultured

30 for diagnostic purposes (U.S. Patent 6,107,050, "Diagnostic Test for Alzheimer's Disease," issued August 22, 2000, which is incorporated herein by reference). However, there is a need for simpler, more economical, accurate and reliable methods for diagnosis of Alzheimer's disease.

It is known e.g. from US patent 6,107,050, Alkon *et al.*, that differential effects of an

35 activator of intracellular Ca^{2+} release can be measured. Both healthy and Alzheimer's cell types exhibit a release of calcium from storage, but Alzheimer's cells exhibit a much greater release. Known methods for measuring the release of Ca^{2+} include fluorescent

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 indicators, absorbance indicators or a Ca²⁺ "patch clamp" electrode, and others, and such methods may be used for diagnostic purposes. However, there is a tremendous need for more effective techniques for measuring the differential effects of IP₃R activators, for diagnostic, research, and clinical purposes.

10 **SUMMARY OF THE INVENTION**

The invention provides a method of diagnosing Alzheimer's disease in a patient comprising detecting the presence or absence of an abnormally elevated level of a phosphorylated indicator protein in cells of the patient after activating the cells with a compound that stimulates phosphorylation of the indicator protein, the presence of such an elevated level indicating a positive diagnosis for Alzheimer's disease.

The diagnostic method comprises measuring a phosphorylation level of an indicator protein in cells of the patient at a predetermined time after stimulating the cells with an activator compound, and determining comparing the stimulus abnormally elevated as compared to a basal phosphorylation level without stimulus.

20 The invention provides a method of diagnosing Alzheimer's disease in a subject, said method comprising: (a) measuring a basal level of phosphorylation of an indicator protein in cells from the subject; (b) contacting cells from the subject with an activator compound, the activator compound and indicator protein being selected such that the activator elicits a differential response of activated phosphorylation of the indicator protein in cells of the subject as compared to an activated phosphorylation response in cells from a non-Alzheimer's control subject at a predetermined time after the contacting is initiated; (c) measuring an activated phosphorylation level of the indicator protein in said subject cells at the predetermined time after contacting is initiated; and (d) calculating a ratio of the activated phosphorylation level determined in step (c) to the basal phosphorylation level of step (a); and (e) comparing the calculated ratio of step (d) to previously determined activated phosphorylation ratios measured from known Alzheimer's disease cells and from known non-Alzheimer's disease cells at said predetermined time; wherein if the calculated ratio is not statistically different from the previously determined ratios for said known Alzheimer's disease cells, the diagnosis is positive, and/or if the calculated ratio is not statistically different from the previously determined ratios for said known non-Alzheimer's disease cells, the diagnosis is negative.

The invention further provides a method of diagnosing Alzheimer's disease in a

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 subject comprising: in cells of the subject, measuring a background phosphorylation level of
an indicator calcium signalling pathway protein whose phosphorylation is associated with
IP-3R-sensitive Ca^{2+} elevation in the cells; stimulating cells of the subject by contact with
an IP3R agonist that elicits a differential response in the phosphorylation level of the
indicator protein in cells of Alzheimer's subjects as compared to the level in a non-
10 Alzheimer's control cell; thereafter, measuring a response phosphorylation level of the
indicator protein in the contacted cells, and determining whether the response
phosphorylation level of the indicator protein as compared to the background level matches
the response level known for a cell from an Alzheimer's subjects or from a healthy control
cell.

15 The methods may comprise first measuring the background phosphorylation level of
the indicator protein in a culture of cells, then adding the IP3R agonist to the culture, and
measuring the response phosphorylation level. Or the method may comprise measuring the
background level in a first aliquot of cells, stimulating a similar aliquot of the cells, and
measuring the response level in the aliquot.

20 The activator compound may be an IP3-R agonist selected from the group consisting
of bradykinin, bombesin, cholecystokinin, thrombin, prostaglandin $F_{2\alpha}$ and vasopressin.

The cells may be selected from the group consisting of fibroblasts, buccal mucosal
cells, neurons, and blood cells.

According to the invention, a method of diagnosing Alzheimer's disease in a subject
25 comprises (a) obtaining cells from said subject; (b) measuring the basal level of
phosphorylation of an indicator protein in said cells; (c) contacting said cells with an
activator of phosphorylation of the indicator protein; (d) measuring the phosphorylation
level of the indicator protein in said cells at a predetermined time after initiation of the
contacting; and (e) calculating a first ratio of the level measured in step (d) to the level
30 measured in step (b) and comparing said first ratio to a previously determined second ratio of
said levels obtained at said predetermined time from known Alzheimer's disease cells and a
third ratio of said levels obtained at said predetermined time from known non-Alzheimer's
disease cells; wherein (i) if the first ratio of step (e) is statistically not different from the
previously determined second ratio, the diagnosis is positive, and (ii) if the first ratio of step
35 (e) is not statistically different from the previously determined third ratio, the diagnosis is
negative. The predetermined time of step (d) may be a time when the difference between
the second ratio and the third ratio of step (e) is greatest.

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 In the inventive methods, the measuring may comprise an immunoassay of disrupted cells, and the subject's cells may be contacted with an antibody specific for the phosphorylated indicator protein, permitting the antibody to bind to the indicator protein, and detecting the antibody bound to the indicator protein. The immunoassay may be a radioimmunoassay, a Western blot assay, an immunofluorescence assay, an enzyme
10 immunoassay, an immunoprecipitation assay, a chemiluminescence assay, an immunohistochemical assay, a dot blot assay, or a slot blot assay.

A further inventive method of diagnosing Alzheimer's disease in a subject comprises:

- (a) incubating cells from said subject with a compound in a diluent, wherein the compound stimulates calcium signaling pathway-mediated phosphorylation of an
15 indicator protein, thereby producing stimulated cells;
- (b) before, at the same time or after step (a) incubating cells of the same type from the subject with a control compound or with said diluent, thereby producing unstimulated control cells;
- (c) comparing a level of the phosphorylated indicator protein in the stimulated
20 cells to a level of phosphorylated indicator protein in the unstimulated control cells, wherein an increase in the level of the phosphorylated indicator protein in stimulated cells as compared to the unstimulated cells indicates the presence of Alzheimer's disease.

The comparing step (c) may include the following steps: (i) contacting a protein sample
25 from said stimulated and/or said unstimulated cells with an antibody which recognizes the phosphorylated indicator protein; and (ii) detecting the binding of said antibody to said indicator protein.

The method may further comprise contacting a protein sample from said stimulated and/or said unstimulated cells with an antibody which recognizes an unphosphorylated form
30 of said indicator protein, and detecting the binding of said antibody and unphosphorylated indicator protein, and normalizing the level of protein. The comparing step may further include the step of obtaining a protein sample from said stimulated and said unstimulated cells.

A method of diagnosing the presence of Alzheimer's disease in a subject may
35 comprise the steps of: a) stimulating cells from said subject with an activator compound that increases phosphorylation of an indicator protein, and b) comparing the level of unphosphorylated indicator protein and phosphorylated indicator protein in stimulated cells

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 to the level of unphosphorylated indicator protein and phosphorylated indicator protein in unstimulated cells of the same type from said subject, wherein an increase in the relative level of phosphorylated indicator protein in stimulated cells as compared to unstimulated cells indicates the presence of Alzheimer's disease.

10 The invention provides a method of diagnosing Alzheimer's disease in a subject, comprising: contacting cells from the subject with an agent that triggers intracellular calcium release via the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor, measuring the amount of phosphorylation of a MAPK protein in the subject's cells at one or more time points after the contacting step, and comparing the amount of phosphorylation of the MAPK protein in the subject's cells at the one or more time points with the amount of phosphorylation in cells 15 from a non-Alzheimer's control subject at the same time points after contacting the control cells with the agent, wherein increased phosphorylation of the MAPK protein in the subject's cells compared to the control cells is diagnostic of Alzheimer's disease.

In the methods of the invention, the agent may be bradykinin or a bradykinin receptor agonist, or bombesin, and may be an agonist which induces IP3-mediated Ca²⁺ 20 release.

The amount of phosphorylation may be measured at a single time point after the contacting step. According to the invention, the measuring may comprise measuring the amount of phosphorylation in a first aliquot of the subject's cells at a first time point after the contacting step, and measuring the amount of phosphorylation in a second aliquot of the subject's cells at a second time point after the contacting step. The time points may be 25 about 0.5 minutes or shorter, 1 minute, 2 minutes, 2.5 minutes, 5 minutes, 10 minutes, 20 minutes, 30 minutes, 45 minutes, or 1 hour, or longer for some combinations of cell types, activators, and indicator proteins.

The cells are typically from peripheral tissue, such as skin fibroblasts.

30 The measuring step in the inventive methods optionally comprises detecting phosphorylation in a lysate of the subject's cells, *in vitro*, and may comprise gel electrophoresis, Western blotting, using an anti-phospho-MAPK antibody and/or an anti-regular MAPK protein antibody.

The increased phosphorylation may be an elevation in the amount of phosphorylated protein at a single time point or an increase in duration of the phosphorylated protein 35

The methods are effective in diagnosis where the subject lacks clinical manifestations of Alzheimer's disease.

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 According to the invention, the methods may further comprise contacting the subject's cells with one or more inhibitors selected from the group consisting of an inhibitor of protein kinase C activity, an inhibitor of PI-3 kinase activity, an inhibitor of C-src protein tyrosine kinase activity, an inhibitor of the IP-3 receptor and an inhibitor of a protein phosphatase. Also, by way of characterizing a particularly discriminating embodiment of
10 the invention, the methods may be characterized as having the increased phosphorylation inhibited by contacting the subject's cells with an inhibitor selected from the group consisting of an inhibitor of protein kinase C activity, C-src protein tyrosine kinase activity, PI-3 kinase activity, and the IP-3 receptor. In such methods said inhibitor can be selected from the group consisting of BiSM-1, PP1, and 2-aminoethoxydiphenyl borate.

15 The invention further provides a method for screening compounds to identify a compound useful for treatment or prevention of Alzheimer's disease comprising:

contacting test cells from an AD subject with a compound being screened,
before, during, or after the contacting step, stimulating the test cells with an agent that triggers intracellular calcium release via the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor,
20 measuring the amount of phosphorylation of a MAPK protein in the test cells at one or more time points after stimulating the test cells,

comparing the amount of phosphorylation of the MAPK protein in the test cells at the one or more time points with the amount of phosphorylation at the same one or more time points in control cells from an AD subject that are not contacted with the compound.

25 The methods may further comprise accepting a compound that inhibits or prevents the increased phosphorylation as a lead compound, and rejecting a compound that does not inhibit or prevent the increased phosphorylation. As in all the methods of the invention, the agent may be bradykinin or a bradykinin receptor agonist and the the MAPK protein may be Erk1/2. The methods may comprise measuring the amount of phosphorylation at a single
30 time point after the contacting step.

A further embodiment provides a method of screening compounds for usefulness as activator compounds in a stimulus-response assay, comprising measuring the effect of the compound on phosphorylation of an indicator protein in AD cells and control cells and selecting a compound that increases phosphorylation of the indicator protein in amount
35 and/or duration in AD cells as compared to control cells.

Another embodiment of the invention is a diagnostic test kit for Alzheimer's disease comprising anti-phospho-MAPK protein antibody and bradykinin.

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 An embodiment provides a method for selecting medication for an Alzheimer's patient comprising selecting a possible therapeutic compound, administering the possible therapeutic compound to the patient, and thereafter, detecting the presence or absence of an abnormally elevated level of a phosphorylated indicator protein in cells of the patient after activating the cells with a compound that stimulates phosphorylation of the indicator protein,
10 the presence of such an elevated level indicating that the possible therapeutic compound is not effective for the patient, and the absence of such a level indicating that the possible therapeutic compound is therapeutic for the patient. The method may further comprise treating or preventing Alzheimer's disease in the subject by administering to the subject the compound shown to be therapeutic for the patient.

15 The invention provides a method of treating or preventing Alzheimer's disease in a subject comprising administering an effective amount of a medicament that

- (a) inhibits or prevents abnormally elevated phosphorylation of a MAPK protein in cells of the subject as compared to control cells; and/or
- (b) inhibits events caused by abnormally elevated phosphorylation of said
20 MAPK proteia.

The medicament may inhibit Erk1/2 phosphorylation, and may be an inhibitor of protein kinase C activity, src protein tyrosine kinase activity, or the IP-3 receptor. The inhibitor may be selected from the group consisting of BiSM-1, PP1, and 2ABP.

25 In particular, the invention provides a method of diagnosing Alzheimer's disease in a subject, comprising:

- (a) contacting skin fibroblast cells from the subject and from a non-Alzheimer's control subject with an effective, phosphorylation-stimulating concentration of bradykinin,
- (b) measuring the amount of phosphorylated Erk1/2 in the subject's cells at one
30 or more time points selected from the group consisting of 2 minutes, 5 minutes, 10 minutes, 20 minutes, and 30 minutes, by Western blotting using an antibody specific for phospho-Erk1/2;
- (c) measuring the amount of phosphorylated Erk1/2 in cells from a non-Alzheimer's control subject at the same time point or points as in (b) by Western
35 blotting using an antibody specific for phospho-Erk1/2, wherein the amount of phosphorylated Erk1/2 in steps (b) and (c) is normalized to the amount of protein present in said cells;

WO 02/067764

PCT/US02/05672

- 5 (d) comparing the amount of phosphorylated Erk1/2 in the subject's cells with the amount of phosphorylated Erk1/2 in the control cells at said time points, wherein an increased amount of phosphorylated Erk1/2 in the subject's cells compared to the control cells at one of more of said time points is diagnostic of Alzheimer's disease.
- The method may further comprise contacting the subject's cells with one or more inhibitors selected from the group consisting of the inhibitor of protein kinase C activity, BiSM-1, the inhibitor of C-src protein tyrosine kinase activity, PP1; and the inhibitor of the IP-3 receptor, 2-aminoethoxydiphenyl borate, wherein the bradykinin-induced increase in the amount of phosphorylated Erk1/2 in the subject's cells compared to the control cells is reduced by said inhibitor.
- 10
- 15 A further embodiment of the invention provides a method for screening compounds to identify a compound useful for treatment or prevention of Alzheimer's disease comprising:
- (a) contacting test skin fibroblasts from an AD subject with a compound being screened;
- (b) contacting control skin fibroblasts from said subject with a control agent for said compound or incubating said control fibroblasts in the absence or either said compound or said control agent;
- 20
- (c) before, during, or after step (a) and (b) stimulating the test and the control fibroblasts with an effective, phosphorylation-stimulating concentration of bradykinin,
- 25 (d) measuring the amount of phosphorylated Erk1/2 in the test and in the control fibroblasts at one or more time points selected from the group consisting of 2 minutes, 5 minutes, 10 minutes, 20 minutes, and 30 minutes, by Western blotting using an antibody specific for phospho-Erk1/2, wherein the amount of phosphorylated Erk1/3 is normalized to the amount of protein present in said test and control fibroblasts;
- 30
- (e) comparing the amount of phosphorylated Erk1/2 in the test fibroblasts with the amount of phosphorylated Erk1/2 in the control fibroblasts, to determine whether the compound inhibits or prevents bradykinin -induced increase in phosphorylation of Erk1/2 in the test cells compared to the control cells,
- 35 wherein a compound that inhibits or prevents the increased phosphorylation is identified as useful for the treatment or prevention of Alzheimer's disease.

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 A method of the invention is a method of reducing proteolysis of amyloid precursor protein, secretion of amyloid protein β , and/or phosphorylation of tau protein in a human cell, the cell having increased IP3 receptor mediated phosphorylation of MAPK protein compared to a control human cell, comprising contacting the cell with an inhibitor of phosphorylation of MAPK effective to reduce phosphorylation to the level in the control cell

10 The elements of the invention recited herein may be combined or eliminated among the particular embodiments described, as would be apparent to a person of ordinary skill.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

15 Figures 1A1, 1A2 and 1B. Time course of the BK-stimulated activation of Erk1/2. AD cells and cells from age-matched normal controls ("AC") were treated with 10 nM BK for different times and the reactions were terminated as described in the Examples. To the control for each cell line was added the same volume of PBS. The top images were representative Western blots for activated Erk1/2 (P-Erk1/2) from AD and AC cells. The mean density of each sample was normalized to the total amount of protein, which was determined using an anti-"regular MAP kinase" antibody (R-Erk1/2). Statistical significance of values from 11 independent cell lines was evaluated by an unpaired Student's t-test. Results are summarized and presented in the lower graph.

20 Figures 2A and 2B. Scatter plot-comparing phosphorylation of Erk1/2 between AD and AC cells after 10 min of BK stimulation (Fig 2A). Cells from 20 AD patients and 22 age-matched controls were treated with BK and processed as described in the description of Fig. 1. Activated and the total Erk1/2 were detected by Western blotting with appropriate antibodies. Results were processed and analyzed as described for Figure 1. Fig. 2B shows BK-stimulated Erk1/2 phosphorylation from three independent replications for each randomly selected cell line.

30 Figures 3A1, 3A2, 3B1 and 3B2. Immunocytochemical staining of activated Erk1/2 in the human fibroblasts. Fibroblasts from AD patients and the age-matched controls were cultured on glass cover slips and stimulated with 10 nM BK for 10 min. Activated Erk1/2 was detected with an anti-phospho-Erk1/Erk2 antibody. The results showed that there were no apparent difference in AC cells (top image) between pre- and after BK treatment. In the AD cells, however, highly enhanced immunofluorescent signals (lower right image, 3B2) were seen in the BK-treated cells (10 min).

WO 02/067764

PCT/US02/05672

- 5 Figures 4A1, 4A2, 4B1, 4B2, 4C1, 4C2, 4D1 and 4D2. Effects of different inhibitors on BK-stimulated activation of Erk1/2: Fibroblasts from AD patients and the age-matched controls were respectively preincubated at 37°C with 50 μ M 2APB for 30 min (Fig. 4A); 5 μ M BisM-1 for 15 min (Fig. 4B); 10 μ M PP1 for 15 min (Fig. 4C) and 5 μ M LY294002 for 15 min (Fig. 4D). A second flask of cells of each cell line was incubated with an identical volume of DMSO vehicle. At the end of incubation, cells were treated with 10 nM BK for 5 min before the reaction was terminated. The activated and "regular" forms of Erk1/2 were then detected in Western blots with the two antibodies described above. The panels at left show representative Western blots and the graphs at right summarize results from 11 cell lines from both AD and AC. ** $p < 0.001$; * $p < 0.05$.
- 10 Figures 5A, 5B1, 5B2, 5C1 and 5C2. Changes in phosphorylation of, and amounts of CREB after BK stimulation. AC and AD cells were treated with 10 nM BK for 5 or 10 min. Phosphorylated CREB (P-CREB) was measured using a anti-phospho-CREB-Ser133 antibody on Western blots. The mean densities of P-CREB were normalized against the total amount of CREB measured using an anti-"regular CREB" antibody and subjected to statistic analyses. Fig. 5A shows the BK-induced CREB phosphorylation at 5 and 10 min post-treatment. Fig. 5B shows a representative blot of P-CREB at 10 min after BK treatment. Fig. 5C shows that the total amount of CREB was significantly reduced after 10 min BK treatment.
- 15 Figures 6A1, 6A2, 6B1, 6B2, 6C1 and 6C2. Effects of different inhibitors on BK-stimulated phosphorylation of CREB. AC and AD cells were preincubated at 37°C for 15 min with 5 μ M BisM-1 (Fig. 6A), 10 μ M PP1 (Fig. 6B), or 5 μ M Ly294002 (Fig. 6C) before incubation with 10 nM BK for 10 min. Normalization was performed as with Figures 5A-5C and statistical significance of differences were evaluated by 2-way ANOVA. ** $p < 0.0001$; * $p < 0.05$.
- 20 Figures 7A and 7B. Distribution of BKb2 receptor in the human skin fibroblasts. Fibroblasts were incubated with an anti-BKb2 receptor antibody followed by a fluorescein-labeled secondary antibody. The top panel shows the differential interference contrast (DIC) image of the cells, and the lower panel shows the immunofluorescence of the BK b2 receptor in fibroblasts.
- 25 Figure 8. The effect of bradykinin on phosphorylation of Erk1/2 on fibroblasts from individuals with Huntington's dementia (HD). N=4 and P=0.39, t test.
- 30
- 35

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 **DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

According to the invention, an activator, or agent that stimulates an IP3 mediated intracellular calcium release is one which can be identified by a person of ordinary skill in the art using the methods disclosed herein, based on published information about the IP3 receptor and related pathways, as described in the background.

10 An abnormally elevated level or ratio of stimulated/unstimulated phosphorylation levels means one which exceeds a previously determined level for known non-Alzheimer's disease cells at a predetermined time, by an amount that is statistically significantly characteristic of Alzheimer's disease cells and not characteristic of non-Alzheimer's disease cells.

15 The term indicator protein, or MAPK protein, generally used interchangeably herein, means a protein which is phosphorylated as part of the calcium signaling pathway, in response to administration of an activator compound, and whose degree of phosphorylation is differentially higher in AD cells than control cells. The indicator protein may be a calcium signaling pathway protein whose phosphorylation is associated with IP3R-sensitive
20 Ca²⁺ elevation in the cells. Indicator/MAPK proteins include those which are phosphorylated in response to IP3R mediated calcium release, such as Erk1/2.

The activation or stimulation of cells means that the intact cells are contacted with the activator in vitro, typically by adding a solution containing the activator compound, or otherwise as would be known to a person of ordinary skill in the art.

25 An activator compound is one that, upon introduction to human cells, stimulates phosphorylation of the indicator protein. Activator compounds elicit a differential response in the phosphorylation level of the indicator protein in cells of Alzheimer's subjects as compared to the level in control cells of a non-Alzheimer's subject. Activator compounds are effective when delivered in cell culture medium. Activator compounds may be referred
30 to as IP3R agonists because they induce an IP3R mediated intracellular Ca²⁺ elevation, either directly or indirectly.

The phosphorylation level of an indicator protein is generally determined by measuring the amount of phosphorylated indicator protein and, optionally, of unphosphorylated indicator protein, and normalizing the amount of phosphorylated protein
35 to the total of indicator protein in the sample being analyzed. The calculated response phosphorylation level and the basal or background phosphorylation levels are thus not affected by differences in the absolute quantity of the indicator protein at a given time.

WO 02/067764

PCT/US02/05762

5 The discriminatory time point, or predetermined time after stimulating the cells with the activator compound is selected to achieve a calibrated statistically significant difference between the phosphorylation level of indicator protein in known AD cells and known control cells. The difference may be maximal at the predetermined time but that is not required and depends on other parameters of the test.

10 For any given activator compound, there are a finite number of suitable indicator proteins and vice versa. According to the invention, the activator compound and indicator protein combination is selected such that the activator elicits a differential response in the phosphorylation level of the indicator protein in cells of Alzheimer's subjects as compared to the level in a healthy control cells at a predetermined time after contacting the cells with
15 the activator. A person of ordinary skill may select suitable indicator proteins and activator compounds by determining whether such a differential phosphorylation occurs. Having selected a set of indicator proteins and activator compounds, the assay parameters may then be optimized as to the discriminatory time point, suitable concentrations of the protein and activator, suitable antibodies to the phosphoproteins or unphosphorylated proteins, or other
20 detection means, and so on.

Calculation of a ratio of the activated phosphorylation level to the basal phosphorylation level may of course be reversed. That is, for convenience we refer to the activated/basal ratio being higher than a known level, it is apparent to those skilled in the art that reversing the numerator and denominator in the ratio gives the same result if the viewed
25 from the perspective of the unactivated phosphorylation is considered lower than a known level. Thus, where calculation of the ratio is described one way herein it is to be understood to encompass calculating the inverse as is apparent to a person of ordinary skill. Also, whereas the calculation of ratios as described herein is beneficial in providing useful comparative numbers, calculation of absolute differences between activated and basal phosphorylation levels, and between test subjects and control subjects, could also be
30 employed and would be effective according to the invention

The previously determined ratios for known Alzheimer's disease cells and non-Alzheimer's disease cells at the predetermined or discriminatory time may be written in a chart or set forth in a computer database from which diagnostic results may be determined.
35 Accordingly, in practice, a diagnostic test is performed, an activated/basal phosphorylation ratio is calculated, and if the calculated ratio is the same as or greater than the previously determined ratio for known Alzheimer's disease cells, the diagnosis is positive. If the

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 calculated ratio is less than the previously determined ratio for known non-Alzheimer's disease cells, the diagnosis is negative.

The present invention provides a diagnostic test for AD that comprises measurement of the response of a MAP kinase (MAPK) protein to BK stimulation. The response in AD cells is compared to the response in cells from age-matched controls (which may include
10 subjects with other diseases, including other diseases associated with dementia). In a preferred embodiment, the test is based on the detection of abnormally high phosphorylation of Erk1/Erk2 in skin fibroblasts as diagnostic of the presence of AD (of both familial and non-familial type) after stimulation of the cells with BK. Evaluation of phosphorylation may be by Western blotting or other approaches.

15 Phosphorylation is a biochemical reaction in which a phosphate group is added to Ser, Thr or Tyr residues of a protein and is catalyzed by protein kinase enzymes. Phosphorylation normally modifies the functions of target proteins, typically causing activation. As part of the cell's homeostatic mechanisms, phosphorylation is only a transient process which is reversed by other enzyme called phosphatases. Any aberration in either
20 side of the reaction (phosphorylation vs. dephosphorylation) can disrupt cellular function. These disruptions may be the fundamental underpinnings of various brain diseases.

According to the invention abnormal phosphorylation activity producing elevated phosphorylation of indicator proteins in response to calcium signaling pathway modulators can be detected in AD patients in a diagnostic analysis. The abnormality is an increase or
25 decrease of phosphorylation at a given time relative to the levels in a healthy patient's cells. Detection of AD-specific differences in MAPK in any peripheral tissue (*i.e.*, outside the central nervous system) serves as the basis for an economical test for early diagnosis of AD and for screening and identification of therapeutic targets for drug development. Thus, this invention provides methods, reagents, and kits for detecting the presence or absence of AD.

30 MAPK enzymes play a central role in conveying extracellular signals to the cell nucleus leading to control of gene expression. They are also involved in regulating phosphorylation of the microtubule-associated protein tau and generation and secretion of the β amyloid protein, events critical to the pathogenesis of AD. According to the invention, abnormally prolonged phosphorylation of the MAPK Erk1/2 occurs in, and is detected in,
35 AD fibroblasts in response to stimulation by BK when compared to age-matched controls.

Although the present inventors conducted their initial tests with BK as the stimulus, it is to be understood that BK represents but one way to achieve stimulation of cellular IP3

WO 02/067764

PCT/US02/05762

5 receptors. Accordingly, reference herein to BK should be interpreted to encompass other suitable activator or stimulus compounds. This stimulation serves as the common step that results in the heightened Erk1/2 phosphorylation characteristic of AD. Indeed, it was observed that inhibition of the IP3 receptor totally abolished the BK-stimulated Erk1/2 phosphorylation suggesting that the IP3-sensitive Ca²⁺ release accounts for this outcome.

10 The AD-specific increases in Erk1/2 phosphorylation were also associated with enhanced expression of genes for PKC and MAP kinase kinase (also known as "MAPK/Erk kinase or MEK) isoforms in AD cells, as well as reduced expression in genes for phosphatase 1, 2A, and 2B which dephosphorylate the microtubule-associated protein tau and MAPK. The alterations of gene expression in AD cells may change the balance of activities between

15 protein kinases and phosphatases that could contribute to this AD-specific prolonged Erk1/2 activation, as well as to the hyperphosphorylation of tau that forms neurofibrillary tangles in the AD brain. Detection of these Erk1/2 abnormal activities in skin fibroblasts reflects similar changes in the brain, and thus is diagnostic of the early pathophysiology of AD.

Thus, according to the invention, BK stimulation evokes an abnormally prolonged increase in phosphorylation of Erk1/2 in AD fibroblasts, a change that depends upon IP3 receptor-mediated Ca²⁺ release. While the IP3 kinase appears to be involved in the BK-stimulated Erk1/2 phosphorylation in cells from non-AD controls, this phosphorylation of Erk1/2 in the AD cells is IP3 kinase-independent.

The AD-specific increase in Erk1/2 phosphorylation was subsequent to the IP3-mediated Ca²⁺ release. Protein Kinase C (PKC) and the nonreceptor protein tyrosine kinase (PTK) c-Src are involved in the upstream signaling pathway of the Erk1/2 activation, indicating by the results that both the PKC inhibitor bisindolylmaleimide-1 and the c-Src inhibitor, PP1, completely abolished the BK-stimulated Erk1/2 phosphorylation. The PI-3 kinase, LY924002, partially inhibited the BK-stimulated Erk1/2 phosphorylation in the control, nonAD cells, but showed no effect in the AD cells, suggesting the BK-induced

25 phosphorylation may involve signaling pathways independent of PI-3 kinase.

Activation of cAMP-responsive element binding protein (CREB), measured as an increase in phosphorylation at Ser-133 was also observed after BK stimulation. Similar to Erk1/2 phosphorylation, the BK-induced CREB phosphorylation was completely inhibited

35 by inhibitors of PKC and c-src in both AC and AD cells. Only the CREB phosphorylation in the AC but not the AD cells was partially inhibited by IP-3 kinase inhibitor LY-294002.

WO 02/067764

PCT/US02/05762

5 These results suggest a derangement of signaling pathways in response to BK in AD cells leading to abnormally enhanced and prolonged Erk1/2 phosphorylation and activation which, in turn perturb cellular processes such as gene transcription, APP (amyloid precursor protein) processing and tau protein phosphorylation, all of which underlie the pathogenesis of AD. The understanding of alterations in these pathways may also help explain the early
10 memory loss that is a hallmark of AD. Moreover, detection of AD-specific differences in MAPK in peripheral tissues provides (1) an efficient means for early diagnosis of AD and (2) a biochemical basis for identifying therapeutic targets for drug development.

 In view of the foregoing, and because the same cell may use different combinations of intracellular Ca^{2+} -releasing messengers to encode different external messages, any agent
15 that is capable of stimulating IP3 receptors to cause release of internal stores of calcium, may be used in the test of the present invention as an inducer of the increased Erk1/2 phosphorylation characteristic of AD cells. Again, BK is but one such agent, and other BK receptor agonists are similarly useful. Molecules that are ligands for the IP3 receptor may also be used. Because the IP3 receptor is regulated by ATP, calcium, and phosphorylation
20 by protein kinase A, protein kinase C, and Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II (CaM kinase II), agents that modulate the levels or activities of ATP or these kinases can achieve similar effects and can substitute for BK in the present invention.

 One such agent is the 14 amino acid peptide bombesin (Anastasi A. *et al.*, *Arch Biochem Biophys*, 1972, 148:443-446); Woodruff GN *et al.*, *Ann N Y Acad Sci*, 1996,
25 780:223-243, or biologically active analogues or fragments thereof (Rivier JE *et al.*, *Biochemistry*, 1978, 17:1766-71; Orloff MS *et al.*, *Peptides*, 1984 5:865-70; Walsh, JH *et al.*, *Peptides*, 1985, 6 Suppl 3:63-68). Another is cholecystokinin. For bombesin and cholecystokinin induced calcium, signaling via IP3 and IP3 receptors, see, *e.g.*, Cook SJ *et al.*, *Biochem J*, 1990, 265:617-620 Schulz I *et al.*, *Biol Chem*, 1999, 380:903-908; Burdakov
30 D, *et al.*, *Curr Biol*, 2000, 10:993-996. Although the test is exemplified herein using skin fibroblasts, other cells that are as or more convenient to obtain and process may be used in the test of this invention, thus blood cells, preferably lymphocytes or monocytes, are easily prepared from peripheral blood and used in accordance with this invention. A person of ordinary skill can calibrate the suitable time points and experimental conditions to obtain a
35 diagnostic method based on such cells, using suitable indicator proteins and activator compounds.

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 The present inventors discovered that the activity of an important enzyme, MAPK, meaning mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) was stimulated for an abnormally prolonged interval in Alzheimer's disease skin fibroblasts compared to cells from age-matched controls. The Examples below show that phosphorylation of Erk1/2 was prolonged in AD fibroblasts upon stimulation with BK. IP3 receptor-mediated Ca^{2+} release, and the activity of PKC and of the nonreceptor protein tyrosine kinase (PTK) c-Src are essential for this Erk1/2 phosphorylation. Although an IP3 kinase appears to be involved in BK-stimulated Erk1/2 phosphorylation in AC cells, the same phosphorylation in AD cells is IP3 kinase-independent.

10 According to the invention, cells are stimulated with an agent that stimulates the IP3 receptor to release intracellular calcium; examples of such agents are BK and its analogs. BK is a potent nonapeptide that binds to and activates specific BK receptor(s), which, in turn triggers a cascade of molecular events inside the cell including stimulation of IP3 receptor and the phosphorylation of MAPK proteins. Phosphorylation is a biochemical reaction in which a phosphate group is attached to a protein initiated by an enzyme called protein kinase; it normally modifies functions of target proteins and usually causes activation of a protein. Cells need to maintain a balanced system for their functions so phosphorylation is only a transient process, which needs to be reversed by another enzyme, called phosphatase. Any aberration in either side of the reaction (phosphorylation vs. dephosphorylation) will break the integrity molecular network and disrupt cellular functions. These disruptions may be the fundamental underpinnings of various brain diseases.

15 Such long-lasting phosphorylation of MAPK in AD fibroblasts indicates abnormally enhanced activity of this enzyme in those cells. This AD-specific effect appears to be related to other abnormal cellular and enzymatic activities. The prolonged MAPK phosphorylation was secondary to excessive Ca^{2+} release mediated by IP3 receptors from a specific store inside the cell.

20 Phosphorylation of MAPK was partially dependent on PI3 kinase activity, and a PI3 kinase-dependent mechanism was shown to be involved in phosphorylation of MAPK in AD cells.

25 In comparing the gene expression profile in AD cells with the age-matched control cells, the present inventors found that expression of PKC and MEK was increased in AD cells. Both PKC and MEK are upstream molecules that catalyze phosphorylation of MAPK. The present inventors also found reduced expression of several phosphatases that

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 dephosphorylate MAPK. Therefore, the imbalance, ie, combined changes in the amounts and activities of enzymes that regulate MAPK phosphorylation account for the diagnostically-useful difference in AD cells - prolonged MAPK phosphorylation.

This is the first discovery of abnormally enhanced MAPK activity in AD. The MAPK family of enzymes performs crucial steps in cell signaling from the cell membrane to the nucleus. They are stimulated by a variety of signals (e.g., mitogens) acting at the cell surface and leading to cell division (mitosis), a process required for growth and development, as well as replacement and/or repair of cells damaged by injury or disease.

MAPK also plays an important role in transmitting signals in neurons that underlie functions such as learning and memory formation. MAPK also regulates secretion of the amyloid peptide β AP and phosphorylation of tau protein in brain cells. Accumulation of β AP outside nerve cells and excessive phosphorylation of tau are highly toxic to neurons, leading to plaques and neurofibrillary tangles (NFT), respectively. Indeed these are two characteristic pathological features in AD brains.

According to the present invention, abnormally enhanced MAPK activity contributes to aberrant amyloid processing and tau protein function. The present results provide new insights into molecular substrates for normal memory formation in the brain as well as pathophysiology of AD. This latter understanding is expected to lead to the identification of new molecular targets for prevention and treatment of the disease.

More practically for now, the present results have immediate clinical diagnostic significance. Because (a) skin fibroblasts manifest the alternations in MAPK activity characteristic of AD, both familial and non-familial, (b) skin fibroblasts are so easily obtained (vs. brain tissue), a diagnostic test based on MAPK performed on skin fibroblasts provides a simple and economic test for early diagnosis of AD.

The present new discoveries are consistent with finding by others that excessive calcium signaling was detectable in BK-stimulated AD fibroblasts (Ito *et al.*, 1994; Gibson *et al.*, 1996; Etcheberrigaray, *et al.*, 1998).

EXAMPLE I

35

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 The present study used skin fibroblasts from 20 AD patients with ages ranging from 52-67 years and from 22 age-matched controls. Some of the samples were previously banked cells, while others were freshly collected and cultured from human skin.

Materials and methods

10 Banked skin fibroblasts from familial (FAD) and nonfamilial (nFAD) AD patients and from the age-matched controls (AC) were purchased from the Coriell Institute for Medical Research. The medium was Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL) supplemented with fetal bovine serum (FBS; Bio Fluids). Bradykinin, diphenylboric acid 2-aminoethyl ester (2ABP), protease and phosphatase inhibitor cocktails were from Sigma; bisindolylmaleimide-1 (Bism-1) and LY294002 were from Alexis; PP1 was from Dr Anthony Bishop, Princeton University. Anti Phospho-Erk1/2, anti-phospho-CREB, and anti-CREB antibodies were from Cell Signaling Technology. Anti- Erk1/2 antibody was from Upstate Biotechnology. 4-20% SDS-mini gels were from InvertoGene Novex. Nitrocellulose membranes were from Schleicher & Schuell. All the SDS electrophoresis reagents were from BioRad. SuperSignal chemiluminescent substrate kit was from Pierce.

Culture of AC and AD fibroblasts: Banked fibroblasts from Alzheimer's disease patients including both familial (FAD) nonfamilial (nFAD) types, and from the age-matched controls (AC) were maintained and passaged in T-25/T75 flasks with the DMEM + 10% FBS. Cells were from subjects ranging in age from 52 to 67 years and over 80 % of the samples were from males. The cells were used during passages 6 - 17.

Processing and culture of fibroblasts from fresh biopsies: The collection and culture of fibroblasts from freshly obtained skin tissue were performed as follows. Punch biopsy skin tissues from nFAD patients and the age-matched controls were taken by qualified personnel at Copper Ridge Institute (Sykesville, MD) and Johns Hopkins Hospital (Baltimore, MD) under an approved protocol. Samples were placed in 1x PBS and transported in transfer medium to the laboratory for processing. Tissue was removed from transfer medium, rinsed with PBS and chopped into 1mm explants. The explants were transferred individually onto the growth surface of vented T-25 flasks with 3 ml of biopsy medium containing 45% FBS and 100 U/ml Penicillin and 100 U/ml streptomycin (Pen/Strep). The tissues were cultured at 37°C for 24 hours before addition of 2 ml of biopsy medium containing 10% FBS. The medium was replaced, after 48 hours, with 5 ml of

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 regular culture medium containing 10% FBS and Pen/Strep. The cells were then passaged and maintained as above.

Treatment of fibroblast cells with different pharmacological agents: Fibroblasts were treated with BK, and various inhibitors. These include the IP3 receptor inhibitor, diphenylboric acid 2-aminoethyl ester (2ABP, the protein kinase C inhibitor
10 Bisindolylmaleimide I (BisM-1), C-src protein tyrosine kinase inhibitor PP1, and PI3 kinase inhibitor LY294002.

Banked AC and AD fibroblasts were grown to 80-100% confluence before they were "starved" in a serum-free DMEM overnight. Cells were treated with 10 nM BK at 37°C for different intervals to establish a time course for BK effects. The same volume of PBS was
15 added to a control flask of cells of each line. The reaction was terminated by removing the medium, rapidly rinsing the cells with pre-cooled PBS, pH 7.4, and transferring the flask onto dry ice/ethanol.

Cells from fresh biopsy tissue were incubated with an optimal concentration of BK, 0.1 nM for 10 min at 37°C.

20 For inhibition studies, cells were preincubated with the following concentration of inhibitor at 37°C for the intervals indicated: 2ABP (50 µM for 30 min); PP1 (10 µM for 15 min); Ly294002 (5 µM for 15 min); and BisM-1 (5 µM for 15 min). A parallel control flask was incubated with an identical volume of DMSO vehicle. At the end of this incubation, the same inhibitor at the indicated concentration was added and followed immediately by BK to
25 a final concentration of 10 nM. BK (10 nM) was also added to DMSO controls. Basal controls were cells to which neither BK nor inhibitors were added. After a 5-min incubation at 37°C, the reaction was terminated as above.

Cell lysates were prepared from cells of the various groups. Flasks were moved from dry ice/ethanol to ice water. Each flask received 1 ml of lysis buffer (10 mM Tris pH 7.4,
30 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, pH8, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100, 1% protease inhibitor cocktail (Sigma), 1% cocktail of serine/threonine (Ser/Thr) phosphatase inhibitor and tyrosine (Tyr) phosphatase inhibitor (Sigma). After rocking on an end-to-end shaker in a cold room for 30 min, cells were collected from each flask with a cell scraper. Cells were sonicated, centrifuged at 5000 rpm for 5 min, and a sample of the supernatant
35 was subjected to Western blotting.

Western blotting: Cell lysates were boiled in an equal volume of 2X SDS-sample buffer for 10 min. Proteins from each sample were resolved on a 4-20% mini gradient gel

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 and transferred onto a nitrocellulose membrane. Phosphorylated Erk1/2 was detected with anti-phospho-Erk1/2 antibody using the SuperSignal ECL detection kit. In order to normalize the amount of phosphorylated Erk1/2 against the total amount of Erk1/2, the same membrane blotted with the antibody was stripped with a stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl pH6.7, 2% SDS and 100 mM 2-mercaptoethanol) at 60 °C for 45 min. After washing with 10 mM PBS pH 7.4 containing 0.01% Tween-20 (3x at 10 min), the membrane was blotted with an anti-non-phospho-Erk1/2 antibody, which allowed calculation of the total amount of Erk1/2 loaded on the gel.

CREB was detected using analogous methods.

Data analysis: Signals from phosphorylated and nonphosphorylated Erk1/2 (or CREB) were scanned with a Fujifilm LAS-1000 Plus scanner. The mean optical density of each protein band was measured using NIH Image software. Values from the phosph-Erk1/2 signals were normalized respectively against the total signal of Erk1/2. After normalization, data from treated cells was converted to a percentage of the basal control and subjected to statistical analyses.

Immunocytochemistry: Fibroblasts were grown on the surface of glass coverslips coated with 0.02 mg % polylysine. After treatment with BK as above, cells were rapidly rinsed with cold PBS, fixed with 4% formaldehyde in PBS at room temperature for 15 min, washed with PBS 3 times 5 min each, and penetrated with 0.1% TritonX-100 in PBS at room temperature for 30 min. After incubated with 10% normal horse serum in PBS at room temperature for 30 min, cells were incubated with anti-Phospho-Erk1/2 antibody (1:200) at 4°C overnight. Coverslips were washed with PBS 3 times, and fluorescein-labeled anti-mouse IgG, 1:200 (Vector Lab) was added and allowed to incubate at room temperature for 60 min. Following three washes with PBS, and sealing with Vectashield (Vector Lab), immunostaining signals in the cells were observed in a fluorescence microscope. The intensity of the fluorescent signals was measured with BioRad Quantity One® software (BioRad). For localization of BK receptors in the fibroblasts, a monoclonal anti BK B2 antibody was applied to the normal fibroblasts, followed by incubation with CY5-conjugated anti-mouse IgG and the cells examined by fluorescence microscopy.

35 Results

BK-induced activation of Erk1/2 in AC and AD cells

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 BK elicited marked, but transient phosphorylation of Erk1/2 in human skin fibroblasts from control subjects (Fig. 1). Peak phosphorylation occurred at about 2.5 min following stimulation, after which phosphorylation of Erk1/2 declined, and returned to control levels by 10 min after stimulation. At 20 min post-BK treatment, phosphorylation of Erk1/2 was 68% of the control (Fig. 1). In cells from subjects with AD, however, increased phosphorylation levels of Erk1/2 were maintained for a markedly prolonged period (Fig. 1). Differences were statistically significant (Student's t test) at 5 min ($p < 0.01$), with the greatest divergence occurred at 10 min ($p < 0.0001$). This difference between AD and AC cells remained significant when measured at 20 min ($P = 0.002$) after BK stimulation.

15 Figure 2 shows results of a study in which BK-induced Erk1/2 phosphorylation was examined at 10 minutes after stimulation with skin fibroblasts from fresh tissue samples taken from AD patients and age-matched controls as well as from banked cells lines from AD and AC groups. Erk1/2 phosphorylation in AD fibroblasts was consistently elevated compared to age-matched controls (Fig. 2A). Similarly, BK-stimulated Erk1/2 phosphorylation in cell lines was reproducibly elevated in AD cell lines as shown in Fig. 2B, which illustrates three independent replications (from randomly chosen AC and AD lines).

When fibroblasts were immunostained with anti-P-Erk1/2 antibody, increased levels of phosphorylated Erk1/2 were observed in AD cells, but not in AC cells, 10 min after -BK treatment (Fig. 3). These enhanced signals were concentrated in the para-nuclear area (Fig. 3, lower right panel).

25 **Effects of the IP3 receptor inhibitor 2ABP on BK-induced Erk1/2 phosphorylation**

BK stimulates Ca^{2+} release from IP3-sensitive stores (Cruzblanca *et al.*, 1998; Pascual *et al.*, 1999). In the present study, the involvement of Ca^{2+} release from IP3 receptor in the BK-induced Erk1/2 phosphorylation was examined. Addition of 2ABP, a potent membrane-permeable inhibitor of the IP-3R, to cells before BK completely abolished BK-stimulated Erk1/2 phosphorylation -- in both AC and AD cells (Fig. 4A). Two-way ANOVA showed that the treatment effects were highly significant ($F_{1,36} = 187.4$, $p < 0.0001$). This result proves that phosphorylation of Erk1/2 and the subsequent molecular cascade is downstream of the IP-3R-sensitive Ca^{2+} elevation in the cells.

35 **Effect of the PKC inhibitor BISM-1 on the BK-induced Erk1/2 phosphorylation**

WO 02/067764

PCT/US02/05762

5 In this experiment, AC and AD cells were preincubated with the specific PKC inhibitor BisM-1 before BK. As shown in Fig. 4B, BK-induced phosphorylation of Erk1/2 was again abolished (in both AC and AD cells). A two-way ANOVA showed significant treatment effects. This result indicates that PKC activity is required for the BK-stimulated activation of Erk1/2 in both AC and AD cells.

10 **Effect of the C-src protein tyrosine kinase inhibitor, PP1, on the BK-induced Erk1/2 phosphorylation**

To test whether the non receptor PTK, C-src is involved in activation of Erk1/2 by BK, AC and AD cells were preincubated with 10 μ M PP1 prior to BK. Similar to 2ABP and BiSM-1, above, PP1 completely inhibited BK-induced Erk1/2 phosphorylation (Fig. 4C).
15 Two-way ANOVA showed significant treatment effects ($F_{1,40}=234$; $p<0.0001$). This result therefore suggests that C-src PTK activity is also involved in activation of Erk1/2 by BK.

Effects of PI3 kinase inhibitor, LY294002, on BK-induced Erk1/2 phosphorylation

A study was conducted to test whether PI3 kinase activity is involved in BK-stimulated Erk1/2 activation. Fibroblasts were incubated with 5 μ M LY294002 prior to BK.
20 In contrast to the effects of inhibitors of the IP-3R, PCK and C-src, LY294002 caused a modest, though significant, inhibition of Erk1/2 phosphorylation in AC cells (Fig. 4D) while it failed to inhibit the BK-induced phosphorylation of Erk1/2 in AD cells (Fig. 4D). A two-way ANOVA showed significant treatment effects ($F_{1,20}=136.2$; $p<0.001$) and group effects ($F_{1,20}=11.55$; $p<0.05$). This result suggests that PI3 kinase activity is not involved in BK-induced Erk1/2 phosphorylation in cells of AD patients.

Effects of BK on activation of cyclic-AMP response element binding protein (CREB)

The effect of BK on activation of CREB, which normally is downstream of Erk1/2, was tested. As shown in Fig 5, 10 nM BK induced highly significant phosphorylation of CREB in both AC and AD cells. The increased phosphorylation was detected as early as 5
30 min after BK stimulation, and increased further at 10 min (Fig. 5A). A two-way ANOVA showed a significant time effect ($F_{1,28}=14.09$, $p<0.001$) but not group effect. Fig. 5B shows similarly elevated CREB phosphorylation 10 min after BK treatment in AC and AD cells. The BK treatment also caused a marked reduction in the total amount of CREB protein at 10 min (Fig. 5C) ($p<0.001$). In summary, there were no significant differences in BK-induced
35 CREB phosphorylation or reduction in total CREB between AC and AD cells.

Effects of PKC, C-src, and PI3 kinase inhibitors on BK-induced CREB phosphorylation

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 Treatment of fibroblasts with the PKC inhibitor, BISM-1, completely abolished the BK-stimulated CREB phosphorylation (Fig. 5A). A two-way ANOVA showed significant treatment effect ($F_{1,30}=53.76$, $p<0.0001$), but no group effect. Similarly, the c-src inhibitor PP1 inhibited BK-stimulated CREB phosphorylation (Fig. 6B). These results again indicate that both PKC and c-src are involved in the signaling pathway by which BK activates both
10 Erk1/2 and CREB. Similar to the effect with Erk1/2, the PI3 kinase inhibitor, LY294002 partially inhibited CREB phosphorylation in AC but did not have any effect on CREB phosphorylation in AD cells (Fig. 6C). A two-way ANOVA showed significant treatment effect ($F_{1,30} = 36.23$; $p<0.0001$) and group effect ($F_{1,30}=4.7$; $p<0.05$).

Expression of BK B2 receptor in fibroblasts

15 To test whether enhanced Erk1/2 and CREB phosphorylation in response to BK was due to an increase in the number of BK receptors expressed on AD cells, a study was performed to measure BK receptor expression in AD and control AC cells by Western blot using a specific antibody for type 2 BK receptor (BKb2R). No significant differences in receptor expression were observed.

20 By immunofluorescent staining, BK2bR was demonstrated in cytosol, nuclei, and paranuclear areas of fibroblasts (Fig. 7). However, no apparent differences in either intensity or distribution pattern of the BKb2R were observed in AD vs AC cells.

Discussion of Experimental Results

25 Fibroblasts have served as a useful model for studying AD and other hereditary diseases presumably because these cells, located all over the body, can express genetic abnormalities associated with some diseases of the brain. The present study has provided evidence that stimulation of the BK receptor results in abnormal signal transduction by the MAPK pathway in AD fibroblasts. BK is one of the most potent endogenous algescic and proinflammatory substances, playing important roles following injury, disease and CNS as well as peripheral inflammation. In the present study, BK stimulation enhanced and prolonged Erk1/2 phosphorylation in AD cells in a manner that was dependent on Ca^{2+} release from IP3 receptor. This is consistent with previous reports that elevated IP3-sensitive Ca^{2+} release was detected in AD skin fibroblasts following BK stimulation (Gibson
30 *et al.*, 1996; Etcheberrigaray *et al.*, 1998). However, this prolonged phosphorylation of AD Erk1/2 was not due to increased expression of the BKb2 receptor or Erk1/2, since neither the expression nor concentration of these two proteins was different in AD cells compared to

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 controls. It is not possible to rule out specific other changes in the properties or sensitivities of the BK receptor and/or IP3 receptor in AD, in addition to changes in other molecules involved in this signal transduction pathway.

The activation of the BK2bR stimulates activation of the PLC system, which in turn, together with the elevated intracellular Ca^{2+} , induces PKC activation. In addition, some G
10 protein-coupled receptors ("GPCRs") are known to stimulate c-src PTK activity, which, as a key intermediate in cellular signaling, also may participate in activation of Erk1/2. The present study tested the involvement of both PKC and c-src PTK in BK-stimulated Erk1/2 phosphorylation. The fact that this phosphorylation was abolished by a PKC inhibitor, BiSM-1, and a c-src inhibitor, PP1, indicate that Erk1/2 activity is regulated by convergence
15 of multiple upstream protein kinases. Like the IP3 receptor inhibitor, 2ABP, both BiSM-1 and PP1 abolished the Erk1/2 phosphorylation similarly in AD and control cells. It is unlikely, therefore, that the enhancement of Erk1/2 phosphorylation associated with AD was due to elevated PKC or c-src PTK activity.

In analyzing the signaling pathway(s) that underlies the AD-specific enhancement of
20 Erk1/2 phosphorylation, the present inventors tested the involvement of PI-3 kinase, another enzyme involved in Erk1/2 activation by GPCRs. Based on studies in various systems, activation of PI-3 kinase following GPCR stimulation is dependent on activation of PKC, down stream of Ras and to involve c-src PTK. The specific PI-3 kinase inhibitor LY294002 only caused a modest inhibition of the BK-induced Erk1/2 phosphorylation in control
25 fibroblasts but had no effect in AD cells. This suggests that, while PI-3 kinase partially contributes to the BK-activated Erk1/2 phosphorylation in normal fibroblasts, Erk1/2 phosphorylation in AD cells appears to be independent of this enzyme.

A major function of Erk1/2/MAPK is the activation of gene expression by regulation of transcriptional factors. Activation of CREB has also been observed in the present study
30 (phosphorylation of Ser133). Unlike the phosphorylation of Erk1/2 in control cells, which lasted less than 10 min following BK treatment, highly phosphorylated CREB was present 10 min after BK treatment in both AD and control cells, suggesting a different time course for CREB activation. Inhibitors of PKC, c-src and PI3 kinase inhibit phosphorylation of CREB in a manner similar to their inhibition of Erk1/2 phosphorylation, suggesting that
35 CREB activation is regulated by the same signal pathway. While PP1 completely inhibited BK-stimulated CREB phosphorylation, it resulted in increased expression of the CREB protein in control cells (Fig. 6B), presumably reflecting a normal compensatory feedback

WO 02/067764

PCT/US02/05762

5 mechanism. This effect of PP1 was not observed in AD cells, however, suggesting that regulation of CREB expression may be impaired in AD.

The present results provide evidence that AD pathogenesis involves derangement of molecular cascades associated with MAPK as summarized in Fig. 6. Recent results from others suggest that MAPK is important for brain functions that are related to neuronal plasticity, for example, learning and memory. Erk phosphorylates tau protein at multiple Ser/Thr sites, including Ser262 and Ser356 (Reynolds *et al.*, 2000), which are in the microtubule-binding regions of tau. Phosphorylation of Ser262 markedly compromises the functional ability of tau to assemble and stabilize microtubules. With compromised signaling pathways involving MAPK, cells may respond to extra- and intracellular signals by inducing aberrant expression of numerous other proteins.

Systemic manifestations of abnormalities in molecular signaling such as enhanced or prolonged MAPK phosphorylation, may reflect aberrations in the CNS, e.g., memory loss, that have grave behavioral/cognitive consequences. Thus, detection of AD-specific abnormalities in MAPK and its related signaling pathways in cells found at easily accessible peripheral sites, exemplified by skin fibroblasts, provides an efficient and reliable means for early diagnosis of AD as well as for identifying therapeutic targets for drug development.

EXAMPLE 2

25 Using skin fibroblasts from individuals with Huntington's dementia (HD), tests were conducted to determine whether the BK-induced prolonged Erk1/2 activity was AD specific. Figure 8 represents the effect of bradykinin on phosphorylation of Erk1/2 on fibroblasts. N=4 and P=0.39, t test. The HD cells were treated with 10 nM BK for 10 minutes. Figure 8 shows that when HD cells were treated with 10 nM BK for 10 minutes, the phosphorylation levels of Erk1/2 were not different from that of the age-matched controls indicating that the BK-induced enhancement of Erk1/2 activity is not present in Huntington's dementia. Thus, a MAP kinase assay for Alzheimer's disease according to the invention gives a negative diagnosis for Huntington's dementia, showing that the assay is specific to Alzheimer's.

35 In describing preferred embodiments of the present invention, specific terminology is employed for the sake of clarity. However, the invention is not intended to be limited to the specific terminology so selected. It is to be understood that each specific element includes all technical equivalents, which operate in a similar manner to accomplish a similar purpose.

WO 02/067764

PCT/US02/05672

- 5 The above-described embodiments of the invention may be modified or varied, and elements added or omitted, without departing from the invention, as appreciated by those skilled in the art in light of the above teachings. Each reference cited here is incorporated by reference as if each were individually incorporated by reference.

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 References

U.S. provisional patent application 60/312,064, filed February 27, 2001, and the following publications are incorporated herein by reference.

1. Barrow, P. A. Empson, R. M. Gladwell, S. J. Anderson, C. M. Killick, R., Yu, X.,
10 Jefferys, J. G. and Duff, K. (2000) *Neurobiol Dis* 7, 119-126 ("Barrow et al., 2000").
2. Bassa BV, Roh DD, Vaziri ND, Kirschenbaum MA, Kamanna VS (1999) *Am J Physiol*
277, F328-337 ("Bassa et al., 1999").
3. Berridge MJ (1984) *Biochem J* 220, 345-360 ("Berridge, 1984").
4. Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E. W., and Mandelkow, E. (1993)
15 *Neuron* 11, 153-163 ("Biernat et al., 1993").
5. Cruzblanca H, Koh DS, Hille B. (1998) Bradykinin inhibits M current via phospholipase
C and Ca²⁺ release from IP3-sensitive Ca²⁺ stores in rat sympathetic neurons. *Proc Natl
Acad Sci U S A* 95:7151-7156 ("Cruzblanca et al., 1998").
6. Ekinci, F. J. and Shea, T. B. (1999) *Cell Mol. Neurobiol.* 19, 249-260 ("Ekinci and Shea,
20 1999").
7. Etcheberrigaray E, Gibson GE, Alkon DL (1994) Molecular mechanisms of memory and
the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 747:245-55
("Etcheberrigaray et al., 1994")
8. Etcheberrigaray, R., Hirashima, N., Nee, L., Prince, J., Govoni, S., Racchi, M., Tanzi, R.
25 E. and Alkon, D. I. (1998) *Neurobiol. Diseases.* 5, 37-45 ("Etcheberrigaray, et al., 1998").
9. Gibson, G. E., Zhang, H., Toral-Barza, L., Szolosi, S., and Tofel-Greihl, B. (1996)
Biochim, Biophys Acta 1316, 71-77 ("Gibson et al., 1996").
10. Grant SM, Morinville A, Maysinger D, Szyf M, Cuello AC. (1999) *Brain Res Mol Brain
Res.* 72, 115-20 ("Grant et al., 1999").
- 30 11. Greenberg SM, Koo EH, Selkoe DJ, Qiu WQ, Kosik KS. (1994) Secreted beta-amyloid
precursor protein stimulates mitogen-activated protein kinase and enhances tau
phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7104-7108 ("Greenberg et al., 1994").
12. Hirashima, N., Etcheberrigaray, R., Bergamashi, S., Racchi, M., Battaini, F., Binetti, G.,
Govoni, S., Alkon, D. I. (1996) *Neurobiol Aging* 17, 549-555 ("Hirashima, et al.,
35 1996").
13. Ito E, Oka K, Etcheberrigaray R, Nelson TJ, McPhie DL, Tofel-Greihl B, Gibson GE,
Alkon DL (1994) Internal Ca²⁺ mobilization is altered in fibroblasts from patients with
Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91,534-538 ("Ito et al., 1994").

WO 02/067764

PCT/US02/05672

- 5 14. Leissring, M. A., Akbari, Y., Fanger, C. M., Cahalan, M. D., Mattson, M. P. and LaFerla,
F. M. (2000) *J Cell Biol* 149, 793-798 ("Leissring et al., 2000").
15. Leissring, M. A., Parker, L., LaFerla, F. M. (1999) *J Biol Chem* 274, 32535-32538
("Leissring et al., 1999").
16. Lu, Q., Soria, J. P., and Wood, J. G. (1993) *J. Neurosci. Res.* 35, 439-444 ("Lu et al.,
10 1993").
17. Mattson, M. P., Zhu, H., Yu, J. and Kindy, M. S. (2000) *J. Neurosci.* 20, 1358-1364
("Mattson et al., 2000").
18. McDonald DR, Bamberger ME, Combs CK, Landreth GE (1998) *J Neurosci* 18, 4451-
4460 ("McDonald et al., 1998").
- 15 19. Pascale A, Bhagavan S, Nelson TJ, Neve RL, McPhie DL, Etcheberrigaray R. (1999)
Enhanced BK-induced calcium responsiveness in PC12 cells expressing the C100
fragment of the amyloid precursor protein. *Brain Res Mol Brain Res* 72:205-2 ("Pascale
et al., 1999").
20. Putney J. W. Jr. (2000) *Neuron* 27, 411-412 ("Putney, 2000").
- 20 21. Reynolds, C. H., Betts, J. C., Blackstock, W. P., Nebreda, A. R. and Anderton, B. H.
(2000) *J. Neurochem.* 74, 1587-1595 ("Reynolds et al., 2000").
22. Sheehan JP, Swerdlow RH, Miller SW, Davis RE, Parks JK, Parker WD, Tuttle JB.
(1997) *J Neurosci* 17, 4612-4622 ("Sheehan et al., 1997").
23. Yoo, A. S., Cheng, I., Chung, S., Grenfell, T. Z., Lee, H., Paek-Chung, E., Handler, M.,
25 Shen, J., Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry. *Neuron.* 2000
Sep;27(3):561-72 ("Yoo et al., 2000").

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of diagnosing Alzheimer's disease in a subject, said method comprising:

- 10 (a) measuring a basal level of phosphorylation of an indicator protein in cells from the subject;
- 15 (b) contacting cells from the subject with an activator compound, the activator compound and indicator protein being selected such that the activator elicits a differential response of activated phosphorylation of the indicator protein in cells of the subject as compared to an activated phosphorylation response in cells from a non-Alzheimer's control subject at a predetermined time after the contacting is initiated ;
- (c) measuring an activated phosphorylation level of the indicator protein in said subject cells at the predetermined time after contacting is initiated; and
- 20 (d) calculating a ratio of the activated phosphorylation level determined in step (c) to the basal phosphorylation level of step (a); and
- (e) comparing the calculated ratio of step (d) to previously determined activated phosphorylation ratios measured from known Alzheimer's disease cells and from known non-Alzheimer's disease cells at said predetermined time;

25 wherein if the calculated ratio is not statistically different from the previously determined ratios for said known Alzheimer's disease cells, the diagnosis is positive, and/or if the calculated ratio is not statistically different from the previously determined ratios for said known non-Alzheimer's disease cells, the diagnosis is negative.

2. A method of diagnosing Alzheimer's disease in a subject comprising:

- 30 (a) in cells of the subject, measuring a background phosphorylation level of an indicator calcium signaling pathway protein whose phosphorylation is associated with IP-3R-sensitive Ca^{2+} elevation in the cells;
- (b) stimulating cells of the subject by contact with an IP3R agonist that elicits a differential response in the phosphorylation level of the indicator protein in cells of Alzheimer's subjects as compared to the level in a non-Alzheimer's control cell;
- 35 (c) thereafter, measuring a response phosphorylation level of the indicator protein in

WO 02/067764

PCT/US02/05672

- 5 the contacted cells, and
- (d) determining whether the response phosphorylation level of the indicator protein as compared to the background level matches the response level known for a cell from an Alzheimer's subjects or from a healthy control cell.
- 10 3. The method of claim 2, comprising first measuring the background phosphorylation level of the indicator protein in a culture of cells, then adding the IP3R agonist to the culture, and measuring the response phosphorylation level.
- 15 4. The method of claim 2, comprising measuring the background level in a first aliquot of cells, stimulating a similar aliquot of the cells, and measuring the response level in the aliquot.
- 20 5. The method of claim 2, wherein the measuring comprises an immunoassay
6. The method of claim 2, wherein the measuring comprises an immunoassay of disrupted cells.
- 25 7. The method of claim 2, wherein the IP3-R agonist is selected from the group consisting of bradykinin, bombesin, cholecystokinin, thrombin, prostaglandin $F_{2\alpha}$ and vasopressin.
8. The method of claim 2, wherein said cells are selected from the group consisting of fibroblasts, buccal mucosal cells, neurons, and blood cells.
- 30 9. A method of diagnosing Alzheimer's disease in a subject, comprising:
- (a) obtaining cells from said subject;
- (b) measuring the basal level of phosphorylation of an indicator protein in said cells;
- (c) contacting said cells with an activator of phosphorylation of the indicator protein;
- 35 (d) measuring the phosphorylation level of the indicator protein in said cells at a predetermined time after initiation of the contacting; and

WO 02/067764

PCT/US02/05672

- 5 (e) calculating a first ratio of the level measured in step (d) to the level measured in step (b) and comparing said first ratio to a previously determined second ratio of said levels obtained at said predetermined time from known Alzheimer's disease cells and a third ratio of said levels obtained at said predetermined time from known non-Alzheimer's disease cells;
- 10 wherein (i) if the first ratio of step (e) is statistically not different from the previously determined second ratio, the diagnosis is positive, and (ii) if the first ratio of step (e) is not statistically different from the previously determined third ratio, the diagnosis is negative.
- 15 10. The method of claim 9, wherein the predetermined time of step (d) is a time when the difference between the second ratio and the third ratio of step (e) is greatest.
- 20 11. The method of claim 1, wherein the activator is selected from the group consisting of bradykinin, bombesin, cholecystokinin, thrombin, prostaglandin F_{2α} and vasopressin.
- 25 12. The method of claim 1 wherein the measuring is by immunoassay, and wherein said subject's cells are contacted with an antibody specific for the phosphorylated indicator protein, permitting the antibody to bind to the indicator protein, and detecting the antibody bound to the indicator protein.
- 30 13. The method of claim 12 wherein said immunoassay is a radioimmunoassay, a Western blot assay, an immunofluorescence assay, an enzyme immunoassay, an immunoprecipitation assay, a chemiluminescence assay, an immunohistochemical assay, a dot blot assay, or a slot blot assay.
- 35 14. A method of diagnosing Alzheimer's disease in a subject, comprising the steps of:
- (a) incubating cells from said subject with a compound in a diluent, wherein the compound stimulates calcium signaling pathway-mediated phosphorylation of an indicator protein, thereby producing stimulated cells;

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 (b) before, at the same time or after step (a) incubating cells of the same type from the subject with a control compound or with said diluent, thereby producing unstimulated control cells;

(c) comparing a level of the phosphorylated indicator protein in the stimulated cells to a level of phosphorylated indicator protein in the unstimulated control cells,

10 wherein an increase in the level of the phosphorylated indicator protein in stimulated cells as compared to the unstimulated cells indicates the presence of Alzheimer's disease.

15 15. The method of claim 14 wherein said comparing step (c) includes the following steps:

(i) contacting a protein sample from said stimulated and/or said unstimulated cells with an antibody which recognizes the phosphorylated indicator protein; and

20 (ii) detecting the binding of said antibody to said indicator protein.

16. The method of claim 15, further comprising contacting a protein sample from said stimulated and/or said unstimulated cells with an antibody which recognizes an unphosphorylated form of said indicator protein, and detecting the binding of said antibody and unphosphorylated indicator protein.

25 17. The method of claim 14, wherein said comparing step further includes the step of obtaining a protein sample from said stimulated and said unstimulated cells.

30 18. A method of diagnosing Alzheimer's disease in a subject, comprising: contacting cells from the subject with an agent that triggers intracellular calcium release via the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor,

measuring the amount of phosphorylation of a MAPK protein in the subject's cells at one or more time points after the contacting step, and

35 comparing the amount of phosphorylation of the MAPK protein in the subject's cells at the one or more time points with the amount of phosphorylation in cells from a non-Alzheimer's control subject at the same time points after contacting the control cells with the agent,

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5 wherein increased phosphorylation of the MAPK protein in the subject's cells compared to the control cells is diagnostic of Alzheimer's disease.

19. The method of claim 18, wherein the agent is bradykinin or a bradykinin receptor agonist.

10

20. The method of claim 18, wherein the agent is bombesin.

21. The method of claim 18, wherein the agonist is one which induces IP3-mediated Ca^{2+} release.

15

22. The method of claim 18, wherein the MAPK protein is Erk1/2.

23. The method of claim 18, wherein the amount of phosphorylation is measured at a single time point after the contacting step.

20

24. The method of claim 18, wherein the measuring comprises measuring the amount of phosphorylation in a first aliquot of the subject's cells at a first time point after the contacting step, and measuring the amount of phosphorylation in a second aliquot of the subject's cells at a second time point after the contacting step.

25

25. The method of claim 18, wherein the time points are selected from one or more of about 0.5 minutes, 1 minute, 2 minutes, 2.5 minutes, 5 minutes, 10 minutes, 20, and 30 minutes.

30

26. The method of claim 18, wherein the cells are from peripheral tissue.

27. The method of claim 18, wherein the cells are skin fibroblasts.

28. The method of claim 18, wherein the measuring step comprises detecting phosphorylation in a lysate of the subject's cells.

35

29. The method of claim 18, wherein the measuring step is carried out *in vitro*.

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5

30. The method of claim 18, wherein the measuring step comprises gel electrophoresis.

31. The method of claim 18, wherein the measuring step comprises Western blotting.

32. The method of claim 31, wherein the Western blotting comprises using an anti-phospho-MAP kinase antibody.

33. The method of claim 18, wherein the increased phosphorylation is an elevation in the amount of phosphorylated protein at a single time point.

34. The method of claim 18, wherein the increased phosphorylation is an increase in duration of the phosphorylated protein

35. The method of claim 18, wherein the subject lacks clinical manifestations of Alzheimer's disease.

36. The method of claim 18, further comprising contacting the subject's cells with one or more inhibitors selected from the group consisting of an inhibitor of protein kinase C activity, an inhibitor of PI-3 kinase activity, an inhibitor of C-src protein tyrosine kinase activity, an inhibitor of the IP-3 receptor and an inhibitor of a protein phosphatase.

37. The method of claim 18, wherein the increased phosphorylation is inhibited by contacting the subject's cells with an inhibitor selected from the group consisting of an inhibitor of protein kinase C activity, C-src protein tyrosine kinase activity, PI-3 kinase activity, and the IP-3 receptor.

38. The method of claim 37, wherein said inhibitor is selected from the group consisting of BisM-1, PP1, and 2-aminoethoxydiphenyl borate.

WO 02/067764

PCT/US02/05672

- 5 39. A method for screening compounds to identify a compound useful for
treatment or prevention of Alzheimer's disease comprising:
 contacting test cells from an AD subject with a compound being screened,
 before, during, or after the contacting step, stimulating the test cells with an agent
 that triggers intracellular calcium release via the inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor,
10 measuring the amount of phosphorylation of a MAPK protein in the test cells at one
or more time points after stimulating the test cells,
 comparing the amount of phosphorylation of the MAPK protein in the test cells at
 the one or more time points with the amount of phosphorylation at the same one or more
 time points in control cells from an AD subject that are not contacted with the compound,
15 and accepting a compound that inhibits or prevents the increased phosphorylation as a lead
compound, and rejecting a compound that does not inhibit or prevent the increased
phosphorylation.
40. The method of claim 38, wherein the agent is bradykinin or a bradykinin
20 receptor agonist.
41. The method of claim 38, wherein the MAPK protein is Erk1/2.
- 25 42. The method of claim 38, comprising measuring the amount of
phosphorylation at a single time point after the contacting step.
43. The method of claim 38, wherein the cells are skin fibroblasts.
- 30 44. The method of claim 38, wherein the measuring step comprises detecting
phosphorylation in a lysate of the subject's cells.
45. A method of screening compounds for usefulness as activator compounds in
a stimulus-response assay, comprising:
35 measuring the effect of the compound on phosphorylation of an indicator protein in
AD cells and control cells and selecting a compound that increases phosphorylation of the
indicator protein in amount and/or duration in AD cells as compared to control cells.

WO 02/067764

PCT/US02/05672

5

46. A diagnostic test kit for Alzheimer's disease comprising anti-phospho-MAPK protein antibody and bradykinin.

47. A method for selecting medication for an Alzheimer's patient comprising:
10 selecting a possible therapeutic compound,
administering the possible therapeutic compound to the patient,
thereafter, detecting the presence or absence of an abnormally elevated level of a
phosphorylated indicator protein in cells of the patient after activating the cells with a
15 compound that stimulates phosphorylation of the indicator protein, the presence of such an
elevated level indicating that the possible therapeutic compound is not effective for the
patient, and the absence of such a level indicating that the possible therapeutic compound is
therapeutic for the patient.

48. The method of claim 47, further comprising treating or preventing
20 Alzheimer's disease in the subject by administering to the subject the compound shown to
be therapeutic for the patient.

49. A method of treating or preventing Alzheimer's disease in a subject
comprising administering an effective amount of a medicament that
25 (a) inhibits or prevents abnormally elevated phosphorylation of a MAPK protein
in cells of the subject as compared to control cells; and/or
(b) inhibits events caused by abnormally elevated phosphorylation of said
MAPK protein.

30 50. The method of claim 49 wherein said medicament inhibits Erk1/2
phosphorylation.

51. The method of claim 49, wherein said medicament is an inhibitor of protein
kinase C activity, src protein tyrosine kinase activity, or the IP-3 receptor.

35

WO 02/067764

PCT/US02/05672

- 5 52. The method of claim 37 wherein said inhibitor is selected from the group consisting of BiSM-1, PP1, and 2A3P.
53. A method of diagnosing Alzheimer's disease in a subject, comprising:
- 10 (a) contacting skin fibroblast cells from the subject and from a non-Alzheimer's control subject with an effective, phosphorylation-stimulating concentration of bradykinin,
- (b) measuring the amount of phosphorylated Erk1/2 in the subject's cells at one or more time points selected from the group consisting of 2 minutes, 5 minutes, 10 minutes, 20 minutes, and 30 minutes, by Western blotting using an antibody specific for phospho-Erk1/2;
- 15 (c) measuring the amount of phosphorylated Erk1/2 in cells from a non-Alzheimer's control subject at the same time point or points as in (b) by Western blotting using an antibody specific for phospho-Erk1/2;
- wherein the amount of phosphorylated Erk1/3 in steps (b) and (c) is normalized to the amount of protein present in said cells;
- 20 (d) comparing the amount of phosphorylated Erk1/2 in the subject's cells with the amount of phosphorylated Erk1/2 in the control cells at said time points, wherein an increased amount of phosphorylated Erk1/2 in the subject's cells compared to the control cells at one of more of said time points is diagnostic of Alzheimer's disease.
- 25 54. The method of claim 53, further comprising contacting the subject's cells with one or more inhibitors selected from the group consisting of
- (a) the inhibitor of protein kinase C activity, BiSM-1,
- (b) the inhibitor of C-src protein tyrosine kinase activity, PP1; and
- 30 (c) the inhibitor of the IP-3 receptor, 2-aminoethoxydiphenyl borate
- wherein the bradykinin-induced increase in the amount of phosphorylated Erk1/2 in the subject's cells compared to the control cells is reduced by said inhibitor.
55. A method of diagnosing the presence of Alzheimer's disease in a subject, comprising the steps of:
- 35 a) stimulating cells from said subject with an activator compound that increases phosphorylation of an indicator protein, and

WO 02/067764

PCT/US02/05672

- 5 b) comparing the level of unphosphorylated indicator protein and phosphorylated indicator protein in stimulated cells to the level of unphosphorylated indicator protein and phosphorylated indicator protein in unstimulated cells of the same type from said subject,
- 10 wherein an increase in the relative level of phosphorylated indicator protein in stimulated cells as compared to unstimulated cells indicates the presence of Alzheimer's disease.

56. A method for screening compounds to identify a compound useful for treatment or prevention of Alzheimer's disease comprising:

- (a) contacting test skin fibroblasts from an AD subject with a compound being screened;
- 15 (b) contacting control skin fibroblasts from said subject with a control agent for said compound or incubating said control fibroblasts in the absence or either said compound or said control agent;
- (c) before, during, or after step (a) and (b) stimulating the test and the control fibroblasts with an effective, phosphorylation-stimulating concentration of
- 20 bradykinin,
- (d) measuring the amount of phosphorylated Erk1/2 in the test and in the control fibroblasts at one or more time points selected from the group consisting of 2 minutes, 5 minutes, 10 minutes, 20 minutes, and 30 minutes, by Western blotting using an antibody specific for phospho-Erk1/2, wherein the amount of
- 25 phosphorylated Erk1/2 is normalized to the amount of protein present in said test and control fibroblasts;
- (e) comparing the amount of phosphorylated Erk1/2 in the test fibroblasts with the amount of phosphorylated Erk1/2 in the control fibroblasts, to determine whether the compound inhibits or prevents bradykinin -induced increase in phosphorylation of
- 30 Erk1/2 in the test cells compared to the control cells,

wherein a compound that inhibits or prevents the increased phosphorylation is identified as useful for the treatment or prevention of Alzheimer's disease.

57. A method of reducing proteolysis of amyloid precursor protein, secretion of amyloid protein β , and/or phosphorylation of tau protein in a human cell, the cell having increased IP3 receptor mediated phosphorylation of MAPK protein compared to a control

WO 02/067764

PCT/US02/05672

- 5 human cell, comprising contacting the cell with an inhibitor of phosphorylation of MAPK effective to reduce phosphorylation to the level in the control cell

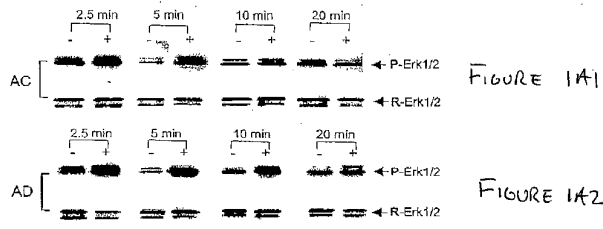


FIGURE 1A1

FIGURE 1A2

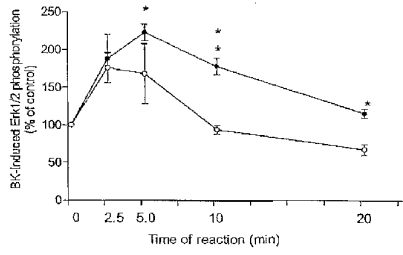


FIGURE 1B

FIGURE 1

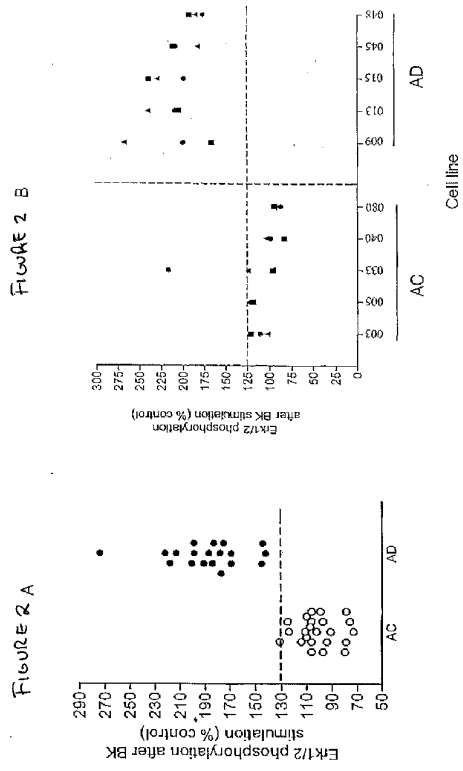


FIGURE 2

FIGURE 3A1

FIGURE 3A2

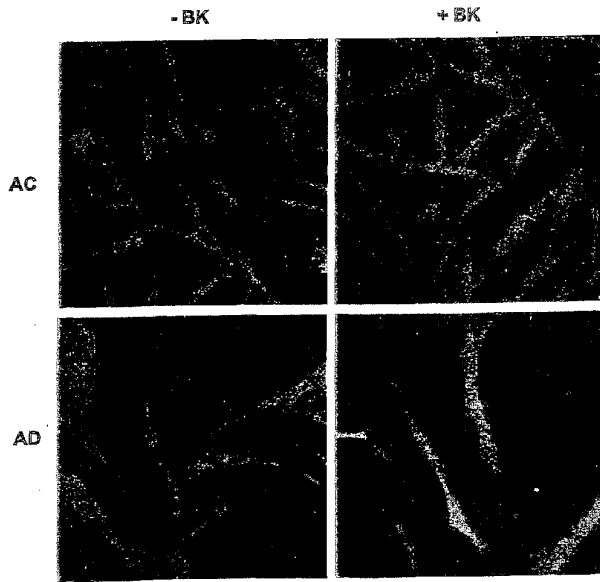


FIGURE 3B1

FIGURE 3B2

FIGURE 3

WO 02/067764

4/8

PCT/US02/05672

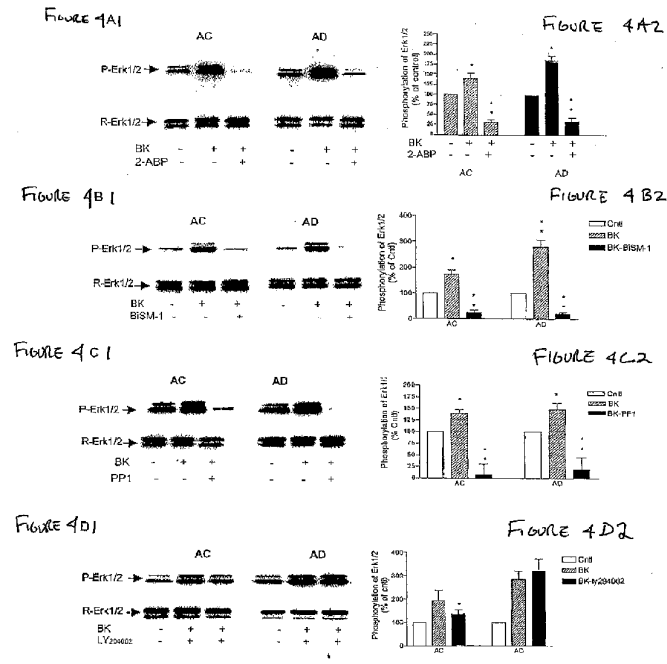


FIGURE 4

WO 02/067764

5/8

PCT/US02/05672

FIGURE 5A

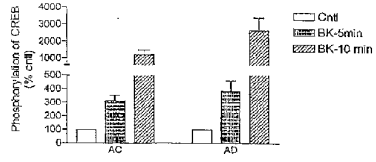


FIGURE 5B1

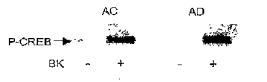


FIGURE 5B2

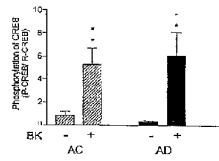


FIGURE 5C1

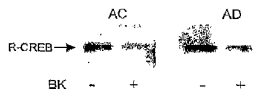


FIGURE 5C2

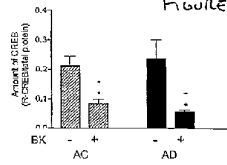


FIGURE 5

WO 02/067764

6/8

PCT/US02/05672

FIGURE 6A1

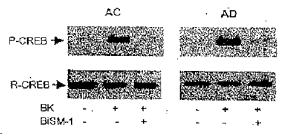


FIGURE 6A2

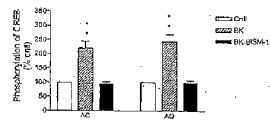


FIGURE 6B1

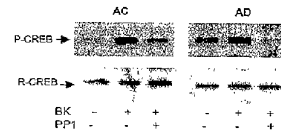


FIGURE 6B2

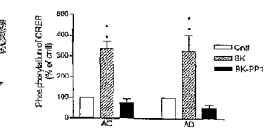


FIGURE 6C1

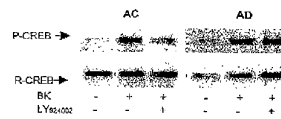


FIGURE 6C2

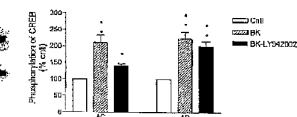


FIGURE 6

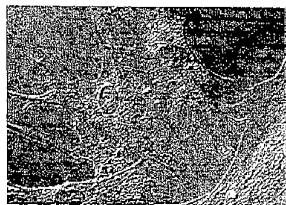


FIGURE 7A

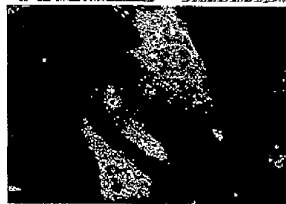


FIGURE 7 B

FIGURE 7

WO 02/067764

PCT/US02/05672

8/8

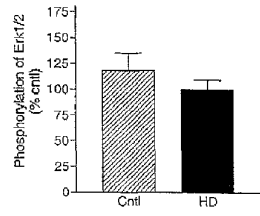


FIGURE 8

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 September 2002 (06.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/067764 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 38/00, 49/00, C12N 9/00, G01N 33/48, 33/53, 33/537
- (21) International Application Number: PCT/US02/05672
- (22) International Filing Date: 27 February 2002 (27.02.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/271,416 27 February 2001 (27.02.2001) US
60/329,505 17 October 2001 (17.10.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US):
BLANCHETTE ROCKEFELLER NEURO-
SCIENCES INSTITUTE [US/US]; 9601 Medical
Center Drive, Rockville, MD 20850 (US).
- (71) Applicant and
(72) Inventor: ALKON, Daniel, L. [US/US]; 6701 Bonaven-
ture Court, Bethesda, MD 20817 (US).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): ZHAO, Wei-Qin
[AU/US]; 409 Westside Drive, #102, Bethesda, MD 20878
(US).
- (74) Agents: GOLLIN, Michael, A. et al.; VENABLE, BAET-
JER, HOWARD & CIVILETTI, LLP, 1201 New York Av-
enue, NW, Suite 1000, P.O. Box 34385, Washington, DC:
20043-9998 (US).
- (81) Designated States (national): AI, 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, GI,
GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BE, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments
- (88) Date of publication of the international search report:
14 November 2002
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/067764 A3

(54) Title: ALZHEIMER'S DISEASE DIAGNOSIS BASED ON MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE PHOSPHORY-
LATION(57) Abstract: A method of diagnosing Alzheimer's disease in a patient comprises determining whether the phosphorylation level
of an indicator protein in cells of the patient after stimulus with an activator compound is abnormally elevated as compared to a basal
phosphorylation level, the indicator protein being e.g. Erk1/2 and the activator compound being e.g. bradykinin.

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/05672																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER																				
IPC(7) : A61K 38/00, 49/00; C12N 9/00; G01N 33/48, 33/53, 33/537 US CL : 424/9.2; 435/7.1, 7.92, 183; 436/63; 530/314 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) U.S. : 424/9.2; 435/7.1, 7.92, 183; 436/63; 530/314																				
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 practicable, search terms used) MEDLINE, BIOSIS, CAPLUS, EMBASE																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
A	HAUG, L. S. et al. Decreased inositol (1,4,5)-triphosphate receptor levels in Alzheimer's disease cerebral cortex: selectivity of changes and possible correlation to pathological severity. Neurodegeneration, 1996, Vol.5, pp.169-176	1-57																		
A	YOUNG, L. T. Decreased brain [3H]inositol 1,4,5-triphosphate binding in Alzheimer's disease. Neuroscience Letters, 1988, 94, pp.198-202	1-57																		
A	KURUMATANI, T. et al. Loss of inositol 1,4,5-triphosphate receptor sites and decreased PKC levels correlate with staging of Alzheimer's disease neurofibrillary pathology. Brain Research, 1998, Vol.796, pp.209-221	1-57																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
<table border="0"> <tr> <td colspan="2">* Special categories of cited documents:</td> <td>"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.</td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"X"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"V"</td> <td>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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"S"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:		"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.	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"V"	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	"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)	"S"	document member of the same patent family	"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		
* Special categories of cited documents:		"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.																		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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																		
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"V"	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																		
"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)	"S"	document member of the same patent family																		
"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																				
Date of the actual completion of the international search 14 July 2002 (14.07.2002)		Date of mailing of the international search report 09 SEP 2002																		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Olga N. Chernyshev Telephone No. (703)308-0196																		

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/48	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	B

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, 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, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100075672

弁理士 峰 隆司

(74) 代理人 100109830

弁理士 福原 淑弘

(74) 代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74) 代理人 100092196

弁理士 橋本 良郎

(72) 発明者 アルコン、ダニエル・エル

アメリカ合衆国、メリーランド州 2 0 8 1 7、ベセスダ、ボナベンチャー・コート 6 7 0 1

(72) 発明者 ザオ、ウェイ - クイン

アメリカ合衆国、メリーランド州 2 0 8 7 8、ベセスダ、ナンバー 1 0 2、ウェストサイド・ドライブ 4 0 9

F ターム(参考) 2G045 BB14 BB20 BB50 CB01 DA36 FA11 FA16 FB05 GC15
 4B063 QA01 QA05 QA19 QQ02 QQ08 QQ21 QQ27 QQ41 QQ61 QQ89
 QQ91 QR48 QR51 QR67 QR77 QS16 QS33 QX02
 4B065 AA93X AC20 BA30 CA43 CA44 CA46
 4C084 AA17 NA14 ZA16 ZC20 ZC42 ZC54

专利名称(译)	基于丝裂原活化蛋白激酶磷酸化的阿尔茨海默病诊断		
公开(公告)号	JP2004533218A	公开(公告)日	2004-11-04
申请号	JP2002567141	申请日	2002-02-27
申请(专利权)人(译)	布兰切特洛克菲勒神经科学我研究所		
[标]发明人	アルコンダニエルエル ザオウェイクイン		
发明人	アルコン、ダニエル・エル ザオ、ウェイ・クイン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P25/28 A61P43/00 C12N5/10 C12Q1/02 C12Q1/48 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	A61P25/28 A61P43/00 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2500/00 G01N2800/2821 A61K31/404 A61K31/519 A61K31/5377 A61K31/69 G01N2333/91205 G01N2500/10		
FI分类号	C12Q1/02 A61K45/00 A61P25/28 A61P43/00.111 C12Q1/48.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FA16 2G045/FB05 2G045/GC15 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ27 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR67 4B063/QR77 4B063/QS16 4B063/QS33 4B063/QX02 4B065/AA93X 4B065/AC20 4B065/BA30 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA16 4C084/ZC20 4C084/ZC42 4C084/ZC54		
代理人(译)	河野 哲 中村 诚		
优先权	60/271416 2001-02-27 US 60/329505 2001-10-17 US		
其他公开文献	JP4246495B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种用于诊断患者的阿尔茨海默氏病的方法，包括确定与用活化剂化合物刺激后的基础磷酸化水平相比，患者细胞中指示蛋白的磷酸化水平是否异常升高。其中指示蛋白质是例如Erk1 / 2，活化剂化合物是例如缓激肽。

【图 2】

