

(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2005-502368
(P2005-502368A)

(43) 公表日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	Z N A A
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	2 G O 4 5
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
C O 7 K 14/47	C O 7 K 14/47	4 B O 6 3
C O 7 K 16/18	C O 7 K 16/18	4 B O 6 4
		4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 83 頁) 最終頁に続く

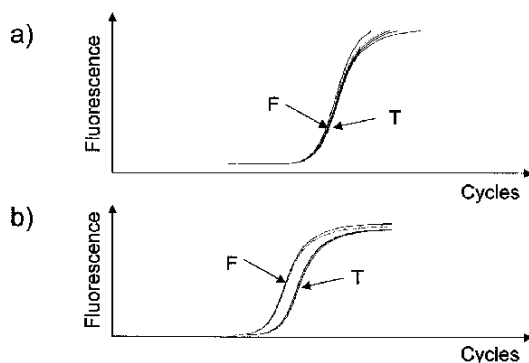
(21) 出願番号	特願2003-527425 (P2003-527425)	(71) 出願人	504087411
(86) (22) 出願日	平成14年9月7日 (2002.9.7)		エヴォテック ニューロサイエンス ゲ
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月5日 (2004.3.5)		ゼルシャフト ミット ベシュレンクテル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/010057		ハフツング
(87) 国際公開番号	W02003/023405		ドイツ連邦共和国 2 2 5 2 5
(87) 国際公開日	平成15年3月20日 (2003.3.20)		ハンブルク シュナッケンブルガリー 1 1 4
(31) 優先権主張番号	01121442.6	(74) 代理人	110000109
(32) 優先日	平成13年9月7日 (2001.9.7)		特許業務法人特許事務所サイクス
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(72) 発明者	フォン デル カンマー ハイנטツ
			ドイツ連邦共和国 2 2 6 0 7
			ハンブルク ヴェルビンドウングスシュトラッセ
			6 デー
		(72) 発明者	ポールナー ヨハーネス
			ドイツ連邦共和国 2 2 1 7 5
			ハンブルク クヴァイテンヴェーク 1 1
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病および関連する神経変性障害のための F - ボックス蛋白質の診断的および治療的使用

(57) 【要約】

本発明は、アルツハイマー病患者の特異的な脳領域中の F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の差次的発現を開示する。この知見に基づき、本発明は、被験者におけるアルツハイマー病の診断もしくは予見方法、または、被験者がアルツハイマー病の発症の高い危険にさらされているかを決定する方法を提供する。更に、本発明は、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、特に F B L 2 をコードする遺伝子を使用する、アルツハイマー病および関連する神経変性障害を治療または予防するための治療法および予防法を提供する。神経変性病の調節剤をスクリーニングする方法も開示する。

Verification of Differential Expression of FBL2 by Quantitative RT-PCR



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者における神経変性病の診断もしくは予見方法、または、被験者が前記病気の発症の高い危険にさらされているかを決定する方法であって、前記被験者からの試料中の

(i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、

(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、

(iii) 前記転写もしくは翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベルおよび/または活性を決定し、既知の病気または健康な状態を表す対照値と前記レベルおよび/または前記活性を比較し、それにより、前記被験者における前記神経変性病を診断もしくは予見するか、または、前記被験者が、前記神経変性病の発症の高い危険にさらされているかを決定することを含む、前記方法。

10

【請求項 2】

被験者における神経変性病の進行のモニター方法であって、前記被験者からの試料中の

(i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、

(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、

(iii) 前記転写もしくは翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベルおよび/または活性を決定し、既知の病気または健康な状態を表す対照値と前記レベルおよび/または前記活性を比較し、それにより、前記被験者における前記神経変性病の進行をモニターすることを含む、前記方法。

20

【請求項 3】

神経変性病の治療の評価方法であって、前記病気を治療される被験者からの試料中の

(i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、

(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、

(iii) 前記転写もしくは翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベルおよび/または活性を決定し、既知の病気または健康な状態を表す対照値と前記レベルおよび/または前記活性を比較し、それにより、前記神経変性病のための前記治療を評価することを含む、前記方法。

30

【請求項 4】

前記神経変性病がアルツハイマー病である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記 F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子が、F B L 2 をコードする遺伝子であり、前記 F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物が、F B L 2 蛋白質である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記試料は、細胞、または組織、または体液、特に脳脊髄液を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 7】

前記対照値は、前記神経変性病を患っていない被験者からの試料中の

(i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、

(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、

(iii) 前記転写もしくは翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベルおよび/または活性のものである、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 8】

前記被験者からの試料細胞、または組織、または体液、特に脳脊髄液中の F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、それらのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体の、既知の健康な状態を表す対照値に対するレベルおよび/または活性の変化が、前記被験者における診断、または予後、またはアルツハイマー病の高い危険性を示す、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

所定期間、前記被験者から採取した一連の試料中の

(i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、 10

(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、

(iii) 前記転写もしくは翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベルおよび/または活性を比較することを更に含む、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記被験者が、1つ以上の前記試料採取前に治療を受ける、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記レベルおよび/または活性が、前記被験者の前記治療前後に決定される、請求項 10 に記載の方法。 20

【請求項 12】

被験者における神経変性病、特にアルツハイマー病を診断もしくは予見するための、または、被験者がそのような病気を発症する傾向もしくは素因を決定するためのキットであって、前記キットは、

(a) (i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物を選択的に検出する試薬、および、(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物を選択的に検出する試薬、からなる群から選ばれる少なくとも1つの試薬；ならびに

(b) (i) 前記被験者からの試料中の F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の前記転写産物および/または前記翻訳産物のレベル、または活性、または前記レベルと前記活性の両方を検出すること；および、(ii) 神経変性病、特にアルツハイマー病を診断もしくは予見すること、または、前記被験者がそのような病気を発症する傾向もしくは素因を決定すること、により、神経変性病、特にアルツハイマー病を、診断もしくは予見するための、または、被験者がそのような病気を発症する傾向もしくは素因を決定するための説明書、 30

を含み、

既知の健康な状態を表す対照値と比べて、前記転写産物および/もしくは前記翻訳産物のレベル、もしくは活性、もしくは前記レベルと前記活性の両方が変化すること；または、前記転写産物および/もしくは前記翻訳産物のレベル、もしくは活性、もしくは前記レベルと前記活性の両方が、既知の病気の状態を表す対照値と類似もしくは同一であることが、神経変性病、特にアルツハイマー病の診断もしくは予後、または、そのような病気の発症の傾向もしくは素因の増加を示す、前記キット。 40

【請求項 13】

被験者における神経変性病、特にアルツハイマー病の治療または予防方法であって、(i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子、および/または、(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、(iii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または(iv) (i) ~ (iii) のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体の活性および/またはレベルに、直接的または間接的に影響を及ぼす薬剤(類)を、治療また 50

は予防に効果的な量で、前記被験者へ投与することを含む、前記方法。

【請求項 14】

(i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子、および/または、(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、(iii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、(iv)(i)~(iii)のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体からなる群から選ばれる少なくとも1つの物質の活性および/またはレベルのモジュレーター。

【請求項 15】

請求項 14 に記載のモジュレーターを含む薬学的組成物。

10

【請求項 16】

薬学的組成物における使用のための、(i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子、および/または、(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、(iii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、(iv)(i)~(iii)のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体からなる群から選ばれる少なくとも1つの物質の活性および/またはレベルのモジュレーター。

【請求項 17】

神経変性病、特にアルツハイマー病の治療または予防のための薬剤の調製のための、(i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子、および/または、(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、(iii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、(iv)(i)~(iii)のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体からなる群から選ばれる少なくとも1つの物質の活性および/またはレベルのモジュレーターの使用。

20

【請求項 18】

1つ以上の容器中に、治療または予防に効果的な量の請求項 15 に記載の薬学的組成物を含むキット。

【請求項 19】

F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする外来遺伝子配列、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体を含む組み換え型非ヒト動物であって、

30

(i) 前記遺伝子配列および選択可能なマーカー配列を含む遺伝子標的構成体の提供、ならびに、

(ii) 前記標的構成体の非ヒト動物の幹細胞への導入、ならびに、

(iii) 前記非ヒト動物幹細胞の非ヒト胚への導入、ならびに、

(iv) 前記胚の偽妊娠非ヒト動物への移植、ならびに、

(v) 前記胚を所定期間成長させること、ならびに、

(vi) そのゲノムが両対立遺伝子中に前記遺伝子配列の一次変異を含む非ヒト遺伝子組み換え動物の同定、ならびに、

(vii) 段階(vi)の非ヒト遺伝子組み換え動物を飼育し、そのゲノムが前記内因性遺伝子の一次変異を含む非ヒト遺伝子組み換え動物を得ること(但し、前記分裂により、神経変性病または関連する病気もしくは機能障害の症状の発症の素因を示す前記非ヒト動物が得られる)、

40

によって得ることができる、前記動物。

【請求項 20】

前記 F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子が、FBL2 をコードする遺伝子である、請求項 19 に記載の動物。

【請求項 21】

神経変性病、特にアルツハイマー病を調査するための動物モデルとしての請求項 19 または 20 に記載の組み換え型非ヒト動物の使用。

50

【請求項 2 2】

- (i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子、および/または、
(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、
(iii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、
(iv) (i) ~ (iii) のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体
からなる群から選ばれる 1 つ以上の物質の、神経変性病、特にアルツハイマー病、または関連する病気もしくは機能障害のモジュレーターをスクリーニングするためのアッセイであって、前記方法は、
- (a) 細胞を試験化合物と接触させること；
(b) (i) ~ (iv) に列挙した 1 つ以上の物質の活性および/またはレベルを測定すること；
(c) 前記試験化合物と接触させない対照細胞中の (i) ~ (iv) に列挙した 1 つ以上の物質の活性および/またはレベルを測定すること；ならびに、
(d) 段階 (b) および (c) の細胞中の物質のレベルおよび/または活性を比較すること、を含み、接触させた細胞中の物質の活性および/またはレベルの変化が、試験化合物が、前記病気または機能障害のモジュレーターであることを示す、前記アッセイ。

10

【請求項 2 3】

- (i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子、および/または、
(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、
(iii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、
(v) (i) ~ (iii) のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体
からなる群から選ばれる 1 つ以上の物質の、神経変性病、特にアルツハイマー病、または関連する病気もしくは機能障害のモジュレーターのためのスクリーニング方法であって、前記方法は、
- (a) (i) ~ (iv) に列挙した物質に関して、神経変性病または関連する病気もしくは機能障害の症状の発症の素因をあらかじめ与えられるか、または既にそれら症状が発症した試験動物に試験化合物を投与すること；
(b) (i) ~ (iv) に列挙した 1 つ以上の物質の活性および/またはレベルを測定すること；
(c) (i) ~ (iv) に列挙した物質に関して、神経変性病または関連する病気もしくは機能障害の症状の発症の素因をあらかじめ与えられるか、または既にそれら症状を発症し、かつ、そのような試験化合物が投与されなかった、対応する対照動物における、(i) ~ (iv) に列挙した 1 つ以上の物質の活性および/またはレベルを測定すること；
(d) 段階 (b) および (c) の動物中の物質の活性および/またはレベルを比較すること、を含み、試験動物中の物質の活性および/またはレベルの変化が、試験化合物が前記病気または機能障害のモジュレーターであることを示す、前記方法。

30

【請求項 2 4】

前記試験動物および/または前記対照動物は、未変性遺伝子転写制御要素ではない転写制御要素の制御下で、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、特に F B L 2、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体を発現する組み換え型動物である、請求項 2 3 に記載の方法。

40

【請求項 2 5】

- F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体とリガンドとの間の結合を阻害するための化合物を試験する、好ましくは複数の化合物をスクリーニングする方法であって、
- (i) 前記 F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体の液体懸濁物を、複数の容器に添加する段階；
(ii) 前記結合の阻害をスクリーニングされるべき化合物、好ましくは複数の化合物を、前

50

記複数の容器に添加する段階；

(iii) 検出可能なリガンド、特に蛍光によって検出可能なリガンドを、前記容器に添加する段階；

(iv) 前記 F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはその前記フラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体の液体懸濁物、および前記化合物、好ましくは前記複数の化合物、および前記リガンドをインキュベートする段階；

(v) 前記 F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはその前記フラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体に関連する検出可能なリガンドまたは蛍光の量を測定する段階；ならびに、

(vi) 前記 F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはその前記フラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体への前記リガンドの結合の、1つ以上の前記化合物による阻害の程度を決定する段階

を含む、前記方法。

【請求項 26】

化合物を試験して、好ましくは複数の化合物をスクリーニングして、前記化合物（類）と F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体との結合の程度を決定する方法であって、

(i) 前記 F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体の液体懸濁物を、複数の容器に添加する段階；

(ii) 前記結合をスクリーニングされるべき、検出可能な化合物、好ましくは複数の検出可能な化合物、特に蛍光によって検出可能な化合物を、前記複数の容器に添加する段階；

(iii) 前記 F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはその前記フラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体の液体懸濁物、および前記化合物、好ましくは前記複数の化合物をインキュベートする段階；

(iv) 前記 F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはその前記フラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体に関連する検出可能な化合物または蛍光の量を測定する段階；ならびに、

(v) 前記 F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはその前記フラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体との、1つ以上の前記化合物による結合の程度を決定する段階

を含む、前記方法。

【請求項 27】

(i) 請求項 22 ~ 24 のいずれかに記載の方法によって、神経変性病、特にアルツハイマー病のモジュレーターを同定する段階、および、(ii) そのモジュレーターを薬学的担体と混合する段階、を含む薬剤の製造方法。

【請求項 28】

請求項 25 に記載の方法によって、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質とリガンドとの間の結合の阻害剤として化合物を同定する段階、および、(ii) その化合物を薬学的担体と混合する段階、を含む薬剤の製造方法。

【請求項 29】

(i) 請求項 26 に記載の方法によって、F - ボックス蛋白質への結合剤として化合物を同定する段階、および、(ii) その化合物を薬学的担体と混合する段階、を含む薬剤の製造方法。

【請求項 30】

請求項 27 ~ 29 に記載の方法のいずれかによって得られ得る薬剤。

【請求項 31】

請求項 27 ~ 29 に記載の方法のいずれかによって得られる薬剤。

【請求項 32】

神経変性病、好ましくはアルツハイマー病を検出するための診断用ターゲットとしての使用のための、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物

10

20

30

40

50

、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体である蛋白質分子。

【請求項 3 3】

神経変性病、好ましくはアルツハイマー病を予防、または治療、または改善する試薬または化合物のためのスクリーニングターゲットとしての使用のための、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体である蛋白質分子。

【請求項 3 4】

F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体である免疫原に対し特異的に免疫反応性である抗体。

10

【請求項 3 5】

被験者からの試料中の細胞の病理的状態の検出のための請求項 3 4 に記載の抗体の使用であって、前記抗体による前記細胞の免疫細胞化学的染色を含み、既知の健康な状態を表す細胞と比較した、前記細胞における染色度の変化または染色パターンの変化が、前記細胞の病理的状態を示す、前記使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、被験者における神経変性病の進行の診断、予見、およびモニター方法に関する。更に、神経変性病の治療制御方法および調節剤(modulating agents)のためのスクリー 20
ニング方法が提供される。本発明は、薬学的組成物、キット、および組み換え型動物モデルも開示する。

20

【0002】

神経変性病、特にアルツハイマー病(AD)は、患者の生命を激しく衰弱させる影響を有する。更に、これらの病気は、非常に大きな健康、社会、および経済的負担を与える。ADは、65歳以上の人口の約10%、85歳以上の45%までに影響を及ぼす、最も一般的な年齢に関連する神経変性状態である(近年の報告については、ビッカーズ(Vickers)ら、*Progress in Neurobiology* 2000、60:139-165を参照)。現在、これは、U S、ヨーロッパ、および日本において、推定1200万ケースに達する。この状況は、先進国における老人の人口増加(“ベビーブーマーの高 30
齢化”)に伴い、必然的にいっそう悪くなるであろう。ADを患う人々の脳において起こる神経病の特徴は、アミロイド - 蛋白質からなる老人斑、ならびに、異常なフィラメント様構造物の出現および神経原線維のもつれの形成と同時に起こる、深刻な(profound)細胞骨格変化である。ADは、記憶形成における早期欠陥(deficits)に関連し、より高い認知機能の完全な衰退を引き起こす、進行性疾患である。ADの病因の特徴は、特定の脳領域および神経細胞の小集団の変性プロセスに対する選択的な影響の受けやすさ(vulnerability)である。具体的には病気の進行中、側頭葉領域および海馬が、早期に、かつより深刻な影響を受ける。一方、前頭皮質、後頭皮質、および小脳内のニューロンの大部分は、影響を受けないままであり、神経変性から保護されている(テリー(Terry)ら、*Annals of Neurology* 1981、10:184 - 192)。

30

40

【0003】

現在、ADのための治療法はなく、ADの進行を止める効果的な治療法もなく、高い確率で死の前の(ante-mortem)ADを診断する方法さえない。個人にADの発症の素因をあらかじめ与えるいくつかの危険因子が同定されており、それらの中で、最も顕著なものは、アポリポ蛋白質E(ApoE)のエプシロン4対立遺伝子である。APP、プレセニリン - 1、およびプレセニリン - 2に対する遺伝子における遺伝的欠陥によって引き起こされると考えられる早期に発症するADの例は稀であるが、遅発型散発性(late-onset sporadic)ADの一般型の病因は、今まで知られていない。神経変性障害の遅い発症および複雑な病因は、治療剤および診断剤の開発への挑戦を難しくする。潜在的な薬剤ターゲットおよび診断マーカーの貯蔵(pool)を増やすことが不可欠である。よって、本発明の目的は 50

50

、神経変性病の病因への洞察 (insight) を提供すること、そして、特に、診断、治療的介入 (therapeutic intervention) に有用な化合物の同定、ならびに、これらの病気の治療の開発およびモニターに適した方法、材料、ならびに動物モデルを提供することである。この目的は、本発明の独立項の特徴によって解決された。サブクレームは、好ましい態様を規定する。

【0004】

F - ボックス蛋白質 (F-box proteins) は、F - ボックスと呼ばれる、約 40 個のアミノ酸モチーフを特徴とする蛋白質群を構成する。F - ボックスモチーフは、最初に、サイクリン F 蛋白質において認められた (バイ (Bai) ら、セル (Cell) 1996, 86:263-274)。その後の研究において、少なくとも 38 個のヒトの F - ボックス蛋白質が同定された (キプレオス (Kipreos) およびパガノ (Pagano)、ゲノム・バイオロジー (Genome Biology) 2000, 1:3002.1-3002.7; センチアレリ (Cenciarelli) ら、カレント・バイオロジー (Current Biology) 1999, 9:1177-1179; ウィンストン (Winston) ら、カレント・バイオロジー (Current Biology) 1999, 9:1180-1182)。しばしば、F - ボックス蛋白質は、ロイシンジッパー、ジンクおよびリングフィンガー、サイクリンドメイン、ならびにプロリン - リーチ (proline-reach) 領域のような二次モチーフを更に含み得る。機能的には、F - ボックスは、蛋白質 - 蛋白質相互作用の部位としての役割を果たすペプチドモジュールである。具体例では、F - ボックスドメインは、蛋白質を、Skp1 (S 期キナーゼ関連蛋白質 (S-phase kinase-associated protein) 1) との複合体に導入し得る。F - ボックス蛋白質は、ユビキチン - プロテアソーム経路を介した細胞制御蛋白質の分解のコントロールに関連する。ユビキチン - プロテアソーム経路による蛋白質分解は、細胞からの蛋白質の選択的除去の重要な細胞プロセスであり、シグナル伝達、転写および細胞サイクルのコントロールを含む、多くの細胞プロセスにおいて、重要な役割を果たす (ヘルシュコ (Hershko) ら、ネイチャー・メディシン (Nature Medicine) 2000, 6:1073-1081; ジョアゼイロ (Joazeiro) およびハンター (Hunter)、サイエンス (Science) 2000, 289:2061; ピカート (Pickart)、ネイチャー・セル・バイオロジー (Nature Cell Biology) 2000, 2:139-141)。ユビキチン - プロテアソーム経路の重要な特徴は、除去することになっている蛋白質への、酵素複合体によるユビキチンの共有結合 (ユビキチン化) である。それにより、ユビキチンタグ (ubiquitin-tagged) 蛋白質は、26S プロテアソームに向けられ、そこで、蛋白質分解される。中枢神経系において、プロテアソームに媒介された蛋白質分解は、ダメージを受けた細胞蛋白質、または異常な折りたたみ構造の細胞蛋白質の分解および除去のために重要である (アルベス - ロドリゲス (Alves-Rodrigues) ら、Trends Neurosci 1998, 21:516-520)。基質へのユビキチンの結合は、連続的な反応において、一般に三種の酵素を含むユビキチンリガーゼ複合体によって行われる。ユビキチン活性化酵素 (E1) は、E1 酵素とユビキチンとの間にチオエステル結合を形成することによって、ユビキチンを活性化する。その後、E2 種の酵素のメンバー (ユビキチン結合酵素) へのトランスエステル化が行われる。最後に、ユビキチンは、(E3) ユビキチンリガーゼの助けにより、E2 酵素から基質蛋白質へ運ばれる。E3 ユビキチンリガーゼは、数種の成分からなる。具体的には、F - ボックス蛋白質は、ユビキチン蛋白質リガーゼの 4 つの成分の 1 つである (デシャイエス (Deshaies)、Annu Rev Cell Dev Biol 1999, 15:435-467)。ユビキチン蛋白質リガーゼ複体内での F - ボックス蛋白質の機能は、ユビキチン結合のために基質を特異的に補充することにより、分解プロセスに基質特異性を与えることであり得る。アルツハイマー病における C.エレガンス (elegans) F - ボックス蛋白質 Sel-10 のヒト相同体 (homolog) の考えられ得る関連性が、近年開示されている (WO 0075328)。Sel-10 は、多数の WD-40 リピート (repeats) を特徴とする、F - ボックス蛋白質のサブファミリーに属する。F - ボックス蛋白質のこのサブファミリーは、“Fbw” と呼ばれる (F - ボックス蛋白質のドメイン構造の詳細な議論のために、F - ボックス蛋白質の 3 つのサブファミリー全体を生じさせる、ウィンストン (Winston) ら、カレント・バイオロジー (Current Biology) 1999, 9:1180-1182 を参照)。“Fbx” と呼ばれるサブファミリーは、既知の蛋白質相互作用ドメインがない。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

明らかに区別できる F - ボックス蛋白質のサブファミリーは、N - 末端に位置する F - ボックスモチーフのほかに、C - 末端ロイシンリッチリピート領域を含む。この F - ボックス蛋白質のサブファミリーのメンバーは、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質 (F-box and leucine-rich repeat proteins)、“Fbl”と呼ばれる。ヒト F - ボックスロイシンリピート蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子は、いくつかのグループによって独立に同定された (ハーパー (Harper) およびエレッジ (Elledge) による特許出願, W09918989; チャイウアー (Chaiur) ら、W00012679; チャン (Zhang) ら、W00075184)。ヒト F B L 2 遺伝子の典型的なヌクレオチド配列は、NCBI ジェンバンク (Genbank) データベースに寄託されている (登録番号: NM_012157 (キュレーテッド (curated) バージョン)、AF176518 および AF174589 (以前のバージョン))。対応する F B L 2 蛋白質の典型的なアミノ酸配列は、NCBI ジェンバンク (Genbank) データベースの登録番号 NP_036289 (キュレーテッドバージョン) を参照のこと (referenced)。F B L 2 蛋白質に関するデータベースの更なる登録 (entries) は、NCBI ジェンバンク (Genbank) 登録番号 AAF04510 および AAF03128 に見られる。ヒト F B L 2 遺伝子のラット相同体は、アミノ酸配列レベルで、そのヒト対応物に対して高い類似性を示す (イリン (Ilyin) ら、FEBS Lett 1999、459:75-79)。ラット F B L 2 遺伝子は、偏在的に発現されるが、異なる大人のラット組織の間で異なる量で発現される。3つの異なるサイズのラット m R N A 転写物が、ノーザンブロット分析によって示された。小さなサイズの転写物が脾臓、胸腺および精巣において主に発現されたのに対し、高分子量転写物は、骨格筋、心臓および脳において好ましく発現された。ヒト骨肉腫 U-20S 細胞において発現されたラット F B L 2 の G F P 融合蛋白質を局部に留め、主に核の近傍の細胞質において病巣 (foci) を中断させることができた。

10

20

【 0 0 0 6 】

今日まで、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、特に F B L 2、をコードする遺伝子の発現の調節不全と、神経変性病、特に A D の病状との関係を示す実験は開示されていなかった。本発明において開示されているそのような関連は、特に、これらの病気の診断および治療のための新たな方法を提案する。

【 0 0 0 7 】

本明細書および請求項において使用される単数形、“a”、“an”、および“the”は、特に断らない限り (unless the context dictates otherwise)、複数形を含む。例えば、“細胞 (a cell)” は、複数の細胞も意味する、以下同様。本明細書および請求項において使用される“および/または (and/or)” という語は、この後の前後の語句が、二者択一 (alternatives) として、または組み合わせで考えられることを意味する。例えば、“レベルおよび/または活性の決定” という語は、レベルのみ、または活性のみ、またはレベルと活性の両方が決定されることを意味する。本明細書において使用される“レベル” という語は、転写産物、例えば m R N A、または翻訳産物、例えば蛋白質もしくはポリペプチド、の量または濃度の尺度 (gage) または指標 (measure) を含む意味である。本明細書において使用される“活性” という語は、転写産物もしくは翻訳産物の生物学的効果をもたらす能力の指標、または、生物学的活性分子のレベルのための指標として理解される。“活性” という語は、酵素活性も意味する。本明細書において使用される“レベル” および/または“活性” という語は、更に、遺伝子発現レベルまたは遺伝子活性を意味する。遺伝子発現は、遺伝子産物の生成をもたらす転写および翻訳による、遺伝子に含まれる情報の利用として定義され得る。遺伝子産物は、R N A または蛋白質のいずれかを含み、かつ、遺伝子の発現の結果である。遺伝子産物の量は、遺伝子がどの程度活性であるかを測定するために使用され得る。本明細書および請求項において使用される“遺伝子” という語は、コード領域 (エキソン) ならびに非コード領域 (例えば、プロモーターまたはエンハンサー、イントロン、リーダーおよびトレーラー配列のような非コード制御要素 (regulatory elements)) の両方を含む。“制御要素” という語は、誘発性および非誘発性プロモーター、エンハンサー、オペレーター、ならびに、遺伝子発現を操作および制御する他の要素を含む。本明細書において使用される“フラグメント” という語は、例えば、選択

30

40

50

的スプライシングされた、または短小化された、または別の方法で切断された(otherwise cleaved)転写産物または翻訳産物を含む意味である。本明細書において使用される“誘導体”という語は、変異体(mutant)、またはRNA修正(RNA-edited)、もしくは化学的変性、もしくは別の方法で変更された転写産物、または、変異体、または化学的変性、もしくは別の方法で変更された翻訳産物を意味する。例えば、“誘導体”は、変更されたリン酸化反応、もしくはグリコシル化反応、もしくは脂質付加反応(lipidation)のようなプロセスによって、または、変更されたシグナルペプチド切断、もしくは他の種類の成熟切断によって生成され得る。これらのプロセスは、翻訳後に起こり得る。F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質FBL2のフラグメント、誘導体、または変異体は、FBL2のポリペプチド配列内に含まれる、機能的F - ボックスドメインまたはロイシンリピートモジュールのような他の機能的モジュールを含み得るが、それらに限定されない。本発明および請求項において使用される“モジュレーター(modulator)”という語は、遺伝子、または遺伝子の転写産物、または遺伝子の翻訳産物のレベルおよび/または活性を変化または変更させ得る分子を意味する。好ましくは、“モジュレーター”は、遺伝子の転写産物または翻訳産物の生物学的活性を変化または変更させ得る。前記調節(modulation)は、例えば、酵素活性の増加もしくは減少、結合特性の変化、または、前記遺伝子の翻訳産物の生物学的、機能的、もしくは免疫学的性質の何らかの他の変化もしくは変更であり得る。“薬剤(agent)”、“試薬(reagent)”、または“化合物(compound)”という語は、細胞、組織、体液に、または、何らかの生物学的システム、もしくは試験される何らかのアクセシシステムの関連で(within the context of)、プラスまたはマイナスの生物学的効果を有する、何らかの物質、化学物質、組成物、または抽出物を意味する。それらは、ターゲットのアゴニスト(agonists)、アンタゴニスト(antagonists)、部分アゴニストまたはインバースアゴニストであり得る。そのような薬剤、試薬、または化合物は、核酸、天然もしくは合成ペプチドもしくは蛋白質複合体、または融合蛋白質であり得る。それらは、抗体、有機または無機分子または組成物、小型分子、薬剤、および、上記の薬剤のいずれかの何らかの組み合わせでもあり得る。それらは、試験のために、診断のために、または治療目的のために使用され得る。“オリゴヌクレオチドプライマー”または“プライマー”という語は、相補的塩基対のハイブリダイゼーションによって所定のターゲットポリヌクレオチドにアニールすることができ、かつ、ポリメラーゼによって伸長され得る短い核酸配列を意味する。それらは、特定の配列に特異的であるように選択され得るか、または、それらは、無作為に選択され得る。例えば、それらは、混合物中で可能な配列すべてを開始する(prime)。本明細書において使用されるプライマーの長さは、10ヌクレオチドから80ヌクレオチドまで変わり得る。“プローブ”は、本明細書において記載され、かつ開示される核酸配列の短い核酸配列であるか、または、それらと相補的な配列である。それらは、完全長配列、または、所定の配列のフラグメント、誘導体、イソ型、もしくは変異体を含み得る。“プローブ”とアッセイされる試料との間のハイブリダイゼーション複合体の同定により、その試料内の他の類似配列の存在を検出することができる。本明細書において使用される“変異体(variant)”という語は、本発明において開示されるポリペプチドおよび蛋白質に関して、本発明の未変性(native)ポリペプチドまたは蛋白質のN末端および/もしくはC末端に、ならびに/または、未変性アミノ酸配列内に、1つ以上のアミノ酸が付加ならびに/または置換ならびに/または欠失ならびに/または挿入された、何らかのポリペプチドまたは蛋白質を意味する。更に、“変異体”という語は、何らかの、より短いか、またはより長いタイプのポリペプチドまたは蛋白質を含む。“変異体”は、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、特にFBL2のアミノ酸配列と、少なくとも約80%の配列が一致し、より好ましくは少なくとも約90%の配列が一致し、最も好ましくは少なくとも約95%の配列が一致する配列も含む。“変異体”は、例えば、高度にコンサバティブな(conservative)領域に、コンサバティブなアミノ酸置換を有する蛋白質を含む。本発明の“蛋白質およびポリペプチド”は、FBL2のアミノ酸配列を含む蛋白質の変異体、フラグメント、および化学的誘導体を含む。それらは、自然界から単離され得るか、または、組み換えおよび/もしくは合成手段によって生成され得る蛋白

10

20

30

40

50

質およびポリペプチドを含み得る。未変性蛋白質またはポリペプチドは、自然発生的な短小化されたか、または分泌された型、自然発生的な変異型(例えばスプライスバリエーション)、および自然発生的対立遺伝子変異体を意味する。本発明において、“危険(risk)”、“影響の受けやすさ(susceptibility)”、および“素因(predisposition)”という語は同等であり、神経変性病、好ましくはアルツハイマー病の発症の確率について使用される。‘AD’という語は、アルツハイマー病を意味する。

【0008】

本発明による神経変性病または神経変性障害は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、ピック病、フロント・テンポラル・デメンチア(fronto-temporal dementia)、進行性核麻痺(progressive nuclear palsy)、大脳皮質基底核変性症、脳血管性痴呆(cerebro-vascular dementia)、多系統萎縮症(multiple system atrophy)、好銀粒痴呆(argyrophilic grain dementia)、および他のタウオパシー(tauopathies)、ならびに、軽度認知障害(mild-cognitive impairment)を含む。神経変性プロセスを含む更なる状態は、例えば、虚血性脳卒中、加齢性黄斑変性症、ナルコレプシー、運動ニューロン疾患、プリオン病、外傷性神経損傷および回復、ならびに多発性硬化症である。

10

【0009】

1つの態様において、本発明は、被験者における神経変性病の診断もしくは予見方法、または、被験者が前記病気の発症の高い(increased)危険にさらされているかを決定する方法を特徴とする。その方法は、前記被験者からの試料中の(i)F-ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、(ii)F-ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、(iii)前記転写もしくは翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベル、または活性、または前記レベルと前記活性の両方を決定し、既知の病気または健康な状態を表す対照値と前記レベルおよび/または前記活性を比較し、それにより、前記被験者における前記神経変性病を診断もしくは予見するか、または、前記被験者が、前記神経変性病の発症の高い危険にさらされているかを決定することを含む。

20

【0010】

本発明は、本発明に開示されている核酸配列、またはそれらのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体に特有のプライマーおよびプローブの構成および使用にも関する。オリゴヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブは、蛍光物質、生物発光物質、磁性物質、または放射性物質によって特異的にラベルされ得る。本発明は、更に、前記特異的オリゴヌクレオチドプライマーを適当な組み合わせで使用し、前記核酸配列、またはそれらのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体の検出および生成に関する。当業者に周知の方法であるPCR-分析を前記プライマーの組み合わせによって行い、核酸を含む試料から、前記遺伝子特異的核酸配列を増幅することができる。そのような試料は、健康な被験者または病気の被験者のどちらかから得られ得る。増幅によって特異的核酸生成物が得られるか否か、および、異なる長さのフラグメントが得られるか否かは、神経変性病、特にアルツハイマー病を暗示し得る。よって、本発明は、神経変性病、特にアルツハイマー病に関連し得る、調べられるべき核酸配列を含む所定の試料における遺伝子変異(gene mutations)および単一ヌクレオチド多型の検出に有用な、少なくとも10塩基長から全コード遺伝子配列までの核酸配列、オリゴヌクレオチドプライマー、およびプローブを提供する。この特徴は、好ましくはキットの形式でもあり得る、迅速なDNAに基づく診断テストの開発に有用である。

30

40

【0011】

更なる態様において、本発明は、被験者における神経変性病の進行のモニター方法を特徴とする。前記被験者からの試料中の(i)F-ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、(ii)F-ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、(iii)前記転写もしくは翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベルまたは活性、または

50

前記レベルと前記活性の両方が決定される。前記レベルおよび/または前記活性は、既知の病気または健康な状態を表す対照値と比較される。それにより、前記被験者における前記神経変性病の進行がモニターされる。

【0012】

更なる態様において、本発明は、神経変性病の治療の評価方法であって、前記病気を治療される被験者から得られる試料中の (i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、(iii) 前記転写もしくは翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベル、または活性、または前記レベルと活性の両方を決定することを含む、前記方法を特徴とする。前記レベル、または前記活性、または前記レベルと前記活性の両方が、既知の病気および健康な状態を表す対照値と比較され、それにより、前記神経変性病の治療が評価される。

10

【0013】

ここで、およびこの後に記載される、本発明の方法、キット、組み換え型動物、分子、アッセイ、および使用の好ましい態様において、前記神経変性病または神経変性障害はアルツハイマー病であり、前記被験者はアルツハイマー病を患う。

【0014】

本発明において、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする前記遺伝子が、FBL2をコードする遺伝子であること (NCBIジェンバンク (Genbank) 登録番号: NM_012157、AF176518、AF174589として参照されるヌクレオチド配列を含む)、および、前記F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質がFBL2であること (NCBIジェンバンク (Genbank) 登録番号: NP_036289として参照されるアミノ酸配列を含む) が特に好ましい。本発明の範囲内で、参照されるヌクレオチドおよびアミノ酸配列は典型的な未変性物であること、ならびに、FBL2をコードする遺伝子、およびその対応する翻訳産物は、前記ヌクレオチドおよびアミノ酸配列のフラグメント、誘導体、および変異体も含むことが理解されるべきである。更に、ヒトF - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードするヒト遺伝子のサブファミリーの現在知られているメンバー、および/または、ヒトF - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質のサブファミリーのメンバー、および/または、それらのフラグメントを、それらの対応するNCBIジェンバンク (Genbank) / EMBL登録番号の典型的な参照とともに、以下に列挙する: FBL1 (Skp2)、U33761; FLR1、AF142481; FBL3、AF186273、AK001271; FBL3a、AF129532、FBL3b、AF129533; FBL4、AF174590、AF176699、AF199420; FBL5、AF174591、AF176700、AF199355、BC030656; FBL6、AF174592、AF199356; FBL7、AF174593; FBL9、AF176701; FBL10、AK027692; FBL11、BC001203; マウスFBL8に対するヒト相同体、AK002140; マウスFBL12に対するヒト相同体、AK000195、BC001586、AK027004; 仮定上の43.3 kDa蛋白質、AL133602; P45SKP2-様蛋白質、AF157323; cDNA FLJ20146、AK000153; cDNA FLJ10576、AK001438; FLJ00115蛋白質、AK024505; cDNA FLJ22888、AK026541; 新規蛋白質BA18114.4、AL121928。

20

30

【0015】

本発明は、AD患者の特異的脳領域における、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、特に、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質FBL2をコードする遺伝子の検出、差次的発現 (differential expression)、および制御を開示する。その結果、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子、およびその対応する遺伝子産物は、ADにおいて典型的に観察される局所的な選択的神経細胞変性において、原因となる役割を有し得る。または、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子、およびその対応する遺伝子産物は、残りの生存している神経細胞に神経保護機能を与え得る。これらの開示に基づいて、本発明は、診断的評価および予後、ならびに、神経変性病、特にADに対する素因の同定に有用である。更に、本発明は、そのような病気の治療を受ける被験者の診断的モニター方法を提供する。

40

【0016】

分析および決定されるべき試料は、脳組織または他の体細胞を含む群から選択されること

50

が好ましい。その試料は、脳脊髄液、または、唾液、尿、血清プラズマもしくは粘液を含む他の体液も含み得る。好ましくは、本発明による、神経変性病の診断、予後、進行のモニター、または治療の評価方法は、肉体外で(ex corpore)行われ得る。そして、そのような方法は、好ましくは、例えば、被験者または患者から除去、回収、または単離された試料、例えば、体液または細胞に関する。

【0017】

更に好ましい態様において、前記参照値は、前記神経変性病を患っていない被験者からの試料中の(i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、前記転写もしくは翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベル、または活性、または前記レベルと前記活性の両方のものである。

10

【0018】

好ましい態様において、前記被験者からの試料細胞、または組織、または体液中の、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、それらのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベルおよび/または活性の、既知の健康な状態を表す対照値に対する変化は、診断、または予後、または神経変性病、特にアルツハイマー病にかかる危険の増加を示す。

【0019】

好ましい態様において、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする転写産物のレベルの測定は、被験者からの試料において、被験者の試料から抽出されたRNAの逆転写によって得られるcDNAからの前記遺伝子特異的配列を増幅するためのプライマーの組み合わせによる定量的PCR - 分析を用いて行われる。前記遺伝子に特異的なプローブによるノーザンブロットも適用され得る。チップに基づくマイクロアレイ技術によって、転写産物を測定することが更に好ましいこともある。これらの技術は、当業者に知られている(サンプロック(Sambrook)およびラッセル(Russell)、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning): ラボラトリー・マニュアル(A Laboratory Manual)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、コールド・スプリング・ハーバー(Cold Spring Harbor)、ニューヨーク、2000を参照)。

20

30

【0020】

F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、前記翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベルおよび/または活性は、免疫アッセイ、活性アッセイ、および/または結合アッセイを用いて検出され得る。これらのアッセイは、抗蛋白質抗体または抗蛋白質抗体に結合する二次抗体のいずれかに結合する、酵素的、量子色力学的(chromodynamic)、放射性、磁性、または発光ラベルの使用により、前記翻訳産物と抗蛋白質抗体との間の結合の量を測定し得る。また、他の高アフィニティリガンドも使用され得る。使用され得る免疫アッセイは、ELISA類、ウエスタンブロット、および当業者に既知の他の技術を含む(ハーロー(Harlow)およびレーン(Lane)、アンチボディズ(Antibodies): ラボラトリー・マニュアル(A Laboratory Manual)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、コールド・スプリング・ハーバー(Cold Spring Harbor)、ニューヨーク、1999を参照)。これらの検出技術はすべて、マイクロアレイ、蛋白質アレイ、抗体マイクロアレイ、または蛋白質チップに基づく技術の形式でも使用され得る。

40

【0021】

本発明の1つの態様において、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または前記翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体の酵素活性を決定することが好ましいこともある。具体的には、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質とユビキチン結合系との結合により、F - ボックスロイシ

50

ンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、前記翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体の酵素活性を、ユビキチン結合酵素活性のためのアッセイにおいて、具体的には、E3ユビキチンリガーゼ活性のためのアッセイにおいて決定することが好ましいこともある。E3ユビキチンリガーゼアッセイは周知である。例えば、そのような活性は、酵母中の再構築されたシステムにおいて、または、精製されたか、もしくは単離されたE1酵素、E2酵素、F-ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/もしくは、前記翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体、ユビキチン、ならびにATP再生システムを含む細胞を含まないシステムにおいて決定され得る(フェルドマン(Feldman)ら、セル(Cell)、1997; 91: 221、セラス(Sears)ら、J Biol Chem、1998、273: 1409; US5976849、WO 0175145)。

10

【0022】

好ましい態様において、前記病気の進行をモニターするために、所定期間(over a period of time)、前記被験者から採取した一連の試料中の(i) F-ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、(ii) F-ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、(iii) 前記転写もしくは翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベル、または活性、または前記レベルと前記活性の両方が比較される。更に好ましい態様において、前記被験者は、1つ以上の前記試料採取前に治療を受ける。更に別の好ましい態様において、前記レベルおよび/または活性は、前記被験者の前記治療前後に決定される。

20

【0023】

別の態様において、本発明は、被験者における神経変性病、特にADを診断もしくは予見するための、または、被験者が神経変性病、特にADを発症する傾向(propensity)もしくは素因(predisposition)を決定するためのキットを特徴とする。前記キットは、

(a) (i) F-ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物を選択的に検出する試薬、(ii) F-ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物を選択的に検出する試薬、からなる群から選ばれる少なくとも1つの試薬; および

(b) - 前記被験者からの試料中のF-ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の前記転写産物および/または前記翻訳産物のレベル、または活性、または前記レベルと前記活性の両方を検出すること; そして、

30

- 神経変性病、特にADを診断もしくは予見すること、または、前記被験者がそのような病気を発症する傾向もしくは素因を決定すること

により、神経変性病、特にADを、診断もしくは予見するための、または、被験者がそのような病気を発症する傾向もしくは素因を決定するための説明書(instruction)

を含む。ここで、既知の健康な状態を表す対照値と比べて、前記転写産物および/もしくは前記翻訳産物のレベル、もしくは活性、もしくは前記レベルと前記活性の両方が変化すること、または、前記転写産物および/もしくは前記翻訳産物のレベル、もしくは活性、もしくは前記レベルと前記活性の両方が、既知の病気の状態を表す対照値と類似もしくは同一であることは、神経変性病、特にADの診断もしくは予後、または、そのような病気の発症の傾向もしくは素因の増加を示す。本発明によるキットは、神経変性病、特にADの発症の危険にさらされている人々を同定するために、特に有用であり得る。その結果、本発明によるキットは、病気の経過中の非可逆的(irreversible)ダメージ前に、病気の発症前の早期予防的測定または治療的介入のために、同定された人々に目標を定める(targeting)ための手段として役立つ。更に、好ましい態様において、本発明において特徴的なキットは、被験者において、神経変性病、特にADの進行をモニターするために、ならびに、そのような前記被験者の病気の治療(therapeutic treatment)の成功または失敗をモニターするために有用である。

40

【0024】

別の態様において、本発明は、被験者における神経変性病、特にアルツハイマー病の治療

50

または予防方法であって、(i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子、および/または、(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、(iii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または(iv)(i)~(iii)のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベル、または活性、または前記レベルと前記活性の両方に、直接的または間接的に影響を及ぼす薬剤(類)を、治療または予防に効果的な量で、前記被験者へ投与することを含む、前記方法、を特徴とする。前記薬剤は、小型分子を含み得るか、または、それは、ペプチド、オリゴペプチド、もしくはポリペプチドも含み得る。前記ペプチド、オリゴペプチド、またはポリペプチドは、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のアミノ酸配列を有し得る。本発明による、神経変性病、特にADの治療または予防のための薬剤は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、またはポリヌクレオチドからなり得る。前記オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、センスまたはアンチセンス方向に(in sense or antisense orientation)、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を含み得る。

10

【0025】

好ましい態様において、その方法は、前記薬剤(類)を投与するための、遺伝子治療および/またはアンチセンス核酸技術のそれ自体既知の方法の適用を含む。一般に、遺伝子治療は、いくつかのアプローチ：変異(mutated)遺伝子の分子置換、新たな遺伝子の添加による治療に有効な蛋白質の合成、および組み換え発現法または薬剤による内因性細胞遺伝子発現の調節、を含む。遺伝子導入技術は詳細に記載されており(例えば、ベーレ(Behr)、Acc Chem Res 1993、26:274-278およびムリガン(Mulligan)、サイエンス(Science)、1993、260: 926-931を参照)、かつ、細胞内へのDNAの機械的マイクロインジェクションのような直接的な遺伝子導入技術、ならびに、生物学的ベクター(例えば組み換え型ウイルス、特にレトロウイルス)、もしくはモデルリポソームを使用する間接的な技術、または、ポリカチオンとのDNA共沈殿によるトランスフェクションに基づく技術、化学的(溶媒、洗浄剤、ポリマー、酵素)もしくは物理的手段(機械的ショック、浸透圧によるショック、熱的ショック、電氣的ショック)による細胞膜振動(cell membrane perturbation)を含む。中枢神経系への出生後の遺伝子導入は、詳細に記載されている(例えば、ウォルフ(Wolff)、Curr Opin Neurobiol 1993、3:743-748を参照)。

20

30

【0026】

特に、本発明は、アンチセンス核酸治療、即ち、所定の重大な(critical)細胞へのアンチセンス核酸またはそれらの誘導体の導入による、不適当に発現されたか、または不完全な遺伝子のダウンレギュレーション(down-regulation)、によって、神経変性病を治療または予防する方法を特徴とする(例えば、ギレスピー(Gillespie)、DN&P 1992、5:389-395; アグローワル(Agrawal)およびアクター(Akhtar)、Trends Biotechnol 1995、13: 197-199; クローク(Crooke)、バイオテクノロジー(Biotechnology) 1992、10: 882-6を参照)。ハイブリダイゼーションストラテジーのほかに、病気の情報を運ぶRNAを破壊する、リボザイム、即ち、酵素の役割を果たすRNA分子の適用も記載されている(例えば、バリナガ(Barinaga)、サイエンス(Science) 1993、262: 1512-1514を参照)。好ましい態様において、治療されるべき被験者はヒトであり、かつ、治療に有効なアンチセンス核酸またはそれらの誘導体はヒトF - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質遺伝子、特にFBL2遺伝子に対するものである。被験者の中枢神経系、特に脳の細胞がそのように治療されることが好ましい。細胞浸透(Cell penetration)は、アンチセンス核酸およびそれらの誘導体の担体粒子への結合のような既知のストラテジー、または上記の技術によって行われ得る。目的の(targeted)治療に有効なオリゴデオキシヌクレオチドを投与するためのストラテジーは、当業者に知られている(例えば、ウィクストロム(Wickstrom)、Trends Biotechnol、1992、10: 281-287を参照)。いくつかの場合には、輸送は単なる局所的適用によって行われ得る。更なるアプローチは、アンチセンスRNAの細胞内発現に関する。このストラテジーでは、ターゲット核酸の領域と相補的なRNAの合成のための組み換え

40

50

型遺伝子によって、エクスピボ(ex vivo)で細胞を形質転換させる。細胞内で発現したアンチセンスRNAの治療的使用は、遺伝子治療と手法的に(procedurally)類似している。RNA干渉(RNAi)としてさまざまに知られている、近年開発された、二本鎖RNAの使用による遺伝子の細胞内発現の制御方法は、核酸治療のための別の効果的なアプローチであり得る(ハノン(Hannon)、ネイチャー(Nature) 2002、418: 244-251)。

【0027】

更に好ましい態様において、その治療方法は、ドナー細胞を、前記被験者の中枢神経系、好ましくは脳へ移植することを含み、または、ドナー細胞は、移植片拒絶を最少化または低減するように処理されていることが好ましい。ここで、前記ドナー細胞は、前記薬剤(類)をコードする少なくとも1つのトランス遺伝子の挿入によって遺伝的に変更されている。前記トランス遺伝子は、ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターによって運ばれ得る。トランス遺伝子は、トランス遺伝子をコードするDNAの非ウイルス的な物理的トランスフェクションによって、特にマイクロインジェクションによって、ドナー細胞内へ挿入され得る。トランス遺伝子の挿入は、エレクトロポレーション、化学的に媒介されたトランスフェクション、特にリン酸カルシウムトランスフェクションまたはリポソーム媒介トランスフェクションによって行うこともできる。

10

【0028】

好ましい態様において、神経変性病、特にADの治療および予防のための前記薬剤は、被験者の細胞を前記被験者に導入することを含む工程によって、前記被験者、好ましくはヒトに投与され得る治療に有効な蛋白質である。前記被験者の細胞は、前記治療に有効な蛋白質をコードするDNAセグメントを挿入するためにインビトロで処理されていて、インビボで前記被験者において治療に効果的な量の前記治療に有効な蛋白質を発現する。前記DNAセグメントは、ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターによって、インビトロで前記細胞内に挿入され得る。前記薬剤、特に治療に有効な蛋白質は、融合蛋白質の注射または全身投与を含む工程によって前記被験者に更に投与され得る。前記融合蛋白質は、蛋白質形質導入ドメインの前記薬剤との融合である。

20

【0029】

本発明による治療方法は、前述の細胞および遺伝子治療法のいずれかと組み合わせた、治療的クローニング、移植、ならびに、胚幹細胞または胚細胞(embryonic germ cell)および大人の神経幹細胞を用いた幹細胞治療の適用を含む。幹細胞は、分化全能性または多能性であり得る。それらは、組織特異的でもあり得る。病気の、および/または、ダメージを受けた脳細胞または組織の修復のための戦略は、(i)大人の組織からのドナー細胞の採取を含む。それら細胞の核は、遺伝的材料が取り除かれた未受精卵細胞内へ移植される。胚幹細胞は、体細胞核輸送を受けた細胞の胚胎段階から単離される。その後、分化因子の使用により、特殊化した細胞型、好ましくは神経細胞への幹細胞の方向付けられた(directed)発達が引き起こされる(ランザ(Lanza)ら、ネイチャー・メディスン(Nature Medicine) 1999、9: 975-977)。または、病気の、および/または、ダメージを受けた脳細胞または組織の修復のための戦略は、(ii)インビトロ拡大(expansion)およびその後の移植(grafting and transplantation)のための中枢神経系、もしくは骨髄から単離された大人の幹細胞(間葉幹細胞)の精製、または、(iii)直接、内因性神経幹細胞を増殖、移動、および機能的ニューロンへ分化させることを含む(ピーターソン(Peterson) DA, Curr. Opin. Pharmacol. 2002、2: 34-42)。大人の脳の胚中心は、ニューロン損傷または機能障害がないので、大人の神経幹細胞は、ダメージを受けたか、または病気の脳組織を修復するための多くの可能性を有する(コルマン(Colman A)、ドラッグ・ディスカバリー・ワールド(Drug Discovery World) 2001、7: 66-71)。

30

40

【0030】

好ましい態様において、本発明による治療または予防のための被験者は、ヒト、実験動物、例えば哺乳動物、マウス、ラット、魚、ハエ、蠕虫；家畜または非ヒト霊長類であり得る。実験動物は、神経変性障害のための動物モデル、例えばAD型神経病理学を有するトランスジェニックマウスであり得る。

50

【0031】

更なる態様において、本発明は、(i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子、および/または、(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、(iii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、(iv)(i)~(iii)のフラグメント、もしくは誘導體、もしくは変異体からなる群から選ばれる少なくとも1つの物質の活性、またはレベル、または前記活性と前記レベルの両方のモジュレーターを特徴とする。

【0032】

更なる態様において、本発明は、前記モジュレーターおよび好ましくは薬学的担体を含む薬学的組成物を特徴とする。前記担体は、それとともにモジュレーターが投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクル(vehicle)を意味する。

10

【0033】

更なる態様において、本発明は、薬学的組成物における使用のための、(i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子、および/または、(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、(iii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、(iv)(i)~(iii)のフラグメント、もしくは誘導體、もしくは変異体からなる群から選ばれる少なくとも1つの物質の活性、またはレベル、または前記活性と前記レベルの両方のモジュレーターを特徴とする。

【0034】

別の態様において、本発明は、神経変性病、特にADの治療または予防のための薬剤の調製のための、(i) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子、および/または、(ii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、(iii) F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、(iv)(i)~(iii)のフラグメント、もしくは誘導體、もしくは変異体からなる群から選ばれる少なくとも1つの物質の活性、またはレベル、または前記活性と前記レベルの両方のモジュレーターの使用を提供する。

20

【0035】

1つの態様において、本発明は、治療または予防に効果的な量の前記薬学的組成物で満たされた1つ以上の容器を含むキットも提供する。

30

【0036】

更なる態様において、本発明は、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする外来(non-native)遺伝子配列、またはそのフラグメント、もしくは誘導體、もしくは変異体を含む、組み換え型非ヒト動物を特徴とする。前記組み換え型非ヒト動物の生成は、(i)前記遺伝子配列および選択可能なマーカー配列を含む遺伝子標的構成体の提供、ならびに、(ii)前記標的構成体の非ヒト動物の幹細胞への導入、ならびに、(iii)前記非ヒト動物幹細胞の非ヒト胚への導入、ならびに、(iv)前記胚の偽妊娠非ヒト動物への移植、ならびに、(v)前記胚を所定期間成長させること(develop to term)、ならびに、(vi)そのゲノムが両対立遺伝子中に前記遺伝子配列の一次変異(modification)を含む非ヒト遺伝子組み換え動物の同定、ならびに、(vii)段階(vi)の非ヒト遺伝子組み換え動物を飼育し、そのゲノムが前記内因性遺伝子の一次変異を含む非ヒト遺伝子組み換え動物を得ること、を含む。前記遺伝子は、異所発現されるか(mis-expressed)、または低発現されるか(under-expressed)、または高発現され(over-expressed)、かつ、前記分裂または変更(alteration)により、神経変性病、特にADの症状の発症の素因を示す前記非ヒト動物が得られる。そのような動物の生成および構成のためのストラテジーおよび技術は、当業者に知られている(例えば、カペッチ(Capecci)、サイエンス(Science)、1989、244:1288-1292および Hogan)ら、1994、マウス胚の操作(Manipulating the Mouse Embryo):ラボラトリー・マニュアル(A Laboratory Manual)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、コールド・スプリング・ハーバー(Cold Spring Harbor)、ニューヨークを参照)。神経変性病、特にADを調査するため

40

50

の動物モデルとして、そのような組み換え型非ヒト動物を利用することが好ましい。

【0037】

好ましい態様において、前記組み換え型非ヒト動物は、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質FBL2をコードする外来遺伝子配列、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体を含む。

【0038】

別の態様において、本発明は、(i)F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子、および/または、(ii)F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、(iii)F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、(iv)(i)~(iii)のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体からなる群から選ばれる少なくとも1つの物質の神経変性病、特にAD、または関連する病気および機能障害のモジュレーターをスクリーニングするためのアッセイを特徴とする。このスクリーニング方法は、(a)細胞を試験化合物と接触させること、ならびに、(b)(i)~(iv)に列挙した1つ以上の物質のレベル、または活性、またはレベルと活性の両方を測定すること、ならびに、(c)前記試験化合物と接触させない対照細胞中の前記物質のレベル、または活性、またはレベルと活性の両方を測定すること、ならびに、(d)段階(b)および(c)の細胞中の物質のレベルを比較すること、を含む。ここで、接触させた細胞中の前記物質のレベルおよび/または活性の変化は、試験化合物が、前記病気および機能障害のモジュレーターであることを示す。

10

【0039】

1つの更なる態様において、本発明は、(i)F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子、および/または、(ii)F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の転写産物、および/または、(iii)F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、(iv)(i)~(iii)のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体からなる群から選ばれる少なくとも1つの物質の神経変性病、特にAD、または関連する病気および機能障害のモジュレーターのためのスクリーニングアッセイであって、(a)神経変性病または関連する病気もしくは機能障害の症状の発症の素因をあらかじめ与えられるか、または既にそれら症状が発症した試験動物に試験化合物を投与すること、ならびに、(b)(i)~(iv)に列挙した1つ以上の物質のレベルおよび/または活性を測定すること、ならびに、(c)前記神経変性病の症状の発症の素因をあらかじめ同様に与えられるか、または既にそれら症状を発症し、かつ、そのような試験化合物が投与されなかった対応する(matched)対照動物における前記物質のレベルおよび/または活性を測定すること、ならびに、(d)段階(b)および(c)の動物中の物質のレベルおよび/または活性を比較すること、を含むスクリーニングアッセイを特徴とする。ここで、試験動物中の物質のレベルおよび/または活性の変化は、試験化合物が前記病気および機能障害のモジュレーターであることを示す。

20

30

【0040】

好ましい態様において、前記試験動物および/または前記対照動物は、未変性遺伝子転写制御調節要素ではない転写調節要素の制御下で、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、特にFBL2、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体を発現する組み換え型非ヒト動物である。

40

【0041】

別の態様において、本発明は、(i)上記スクリーニングアッセイの方法によって神経変性病のモジュレーターを同定する段階、および、(ii)モジュレーターを薬学的担体と混合する段階、を含む、薬剤の製造方法を提供する。前記モジュレーターは、他のスクリーニングのアッセイによっても同定され得る。

【0042】

別の態様において、本発明は、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体とリガンドとの間の結合を阻害するための化合物を試験するための、特に複数の化合物をスクリーニングするためのアッセイを提

50

供する。前記スクリーニングアッセイは、(i)前記F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体の液体懸濁物を、複数の容器に添加する段階、ならびに、(ii)前記阻害をスクリーニングされるべき化合物、好ましくは複数の化合物を、前記複数の容器に添加する段階、ならびに、(iii)検出可能なリガンド、好ましくは蛍光によって検出可能なリガンドを、前記容器に添加する段階、ならびに、(iv)前記F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはその前記フラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体の液体懸濁物、および前記化合物、および前記検出可能なリガンドをインキュベートする段階、ならびに、(v)F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体に関連する検出可能なリガンドまたは蛍光の量を測定する段階、ならびに、(vi)前記F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはその前記フラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体への前記リガンドの結合の、1つ以上の前記化合物による阻害の程度を決定する段階、を含む。蛍光によって検出可能なラベルの利用の代わりに、いくつかの態様では、当業者に既知の何らかの他の検出可能なラベル、例えば、放射性ラベルを使用し、それによりそれを検出することが好ましいこともある。前記方法は、新規化合物の同定のために、ならびに、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体とのリガンドの結合を阻害するそれらの能力が改善されたか、さもなければ最適化された化合物の評価のために有用であり得る。1つの更なる態様において、本発明は、上記阻害結合アッセイの方法により、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の遺伝子産物とリガンドとの間の結合の阻害剤として化合物を同定する段階、および、(ii)その化合物を薬学的担体と混合する段階、を含む、薬剤の製造方法を提供する。前記化合物は、他のタイプのスクリーニングアッセイによっても同定され得る。

【0043】

別の態様において、本発明は、化合物を試験して、好ましくは複数の化合物をスクリーニングして、前記化合物(類)とF - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体との結合の程度を決定するアッセイを特徴とする。前記スクリーニングアッセイは、(i)前記F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体の液体懸濁物を、複数の容器に添加する段階、ならびに、(ii)前記結合をスクリーニングされるべき、検出可能な化合物、好ましくは複数の検出可能な化合物、特に蛍光によって検出可能な化合物を、前記複数の容器に添加する段階、ならびに、(iii)前記F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはその前記フラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体の液体懸濁物、および前記検出可能な化合物、好ましくは前記複数の検出可能な化合物をインキュベートする段階、ならびに、(iv)F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体に関連する検出可能な化合物または蛍光の量を測定する段階、ならびに、(v)前記F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質、またはその前記フラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体との1つ以上の前記化合物による結合の程度を決定する段階、を含む。このタイプのアッセイでは、蛍光ラベルを使用することが好ましいこともある。しかし、何らかの他のタイプの検出可能なラベルも使用され得る。前記方法は、新規化合物の同定のために、ならびに、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質へ結合するそれらの能力が改善されたか、さもなければ最適化された化合物を評価するために有用であり得る。

【0044】

1つの更なる態様において、本発明は、(i)上記の結合アッセイによって、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質への結合剤として化合物を同定する段階、および、(ii)その化合物を薬学的担体と混合する段階、を含む、薬剤の製造方法を提供する。前記化合物は、他のタイプのスクリーニングアッセイによっても同定され得る。

【0045】

別の態様において、本発明は、本明細書および特許請求の範囲に記載のスクリーニングア

ッセイによるいずれかの方法によって得られ得る薬剤を提供する。1つの更なる態様において、本発明は、本明細書に記載のスクリーニングアッセイによるいずれかの方法によって得られる薬剤を提供する。

【0046】

本明細書で開示されたすべてのタイプのアッセイにおいて、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質FBL2によって、スクリーニングアッセイを研究し、かつ行うことが好ましい。

【0047】

本発明は、神経変性病、特にアルツハイマー病を検出するための診断用ターゲットとしての使用のための、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体である蛋白質分子を特徴とする。

10

【0048】

本発明は、神経変性病、特にアルツハイマー病を予防、または治療、または改善する試薬または化合物のためのスクリーニングターゲットとしての使用のための、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体である蛋白質分子を更に特徴とする。

【0049】

本発明は、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体である免疫原に対し特異的に免疫反応性である抗体を特徴とする。免疫原は、前記遺伝子の翻訳産物の免疫原性または抗原性エピトープまたは一部を含み得る。前記翻訳産物の免疫原性または抗原性部はポリペプチドであり、前記ポリペプチドは動物中で抗体応答を誘発し、前記ポリペプチドは、前記抗体と免疫特異的に結合する。抗体の生成方法は、当業者に周知である（ハーロー(Harlow)ら、アンチボディズ(Antibodies)、ラボラトリー・マニュアル(A Laboratory Manual)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、コールド・スプリング・ハーバー(Cold Spring Harbor)、ニューヨークを参照)。本発明において使用される“抗体”という語は、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、組み換え型、抗イディオタイプの、ヒト化、または一本鎖抗体のような、当分野で知られているすべての種類の抗体、ならびに、それらのフラグメントを含む。本発明の抗体は、例えば、F - ボックスロイシンリッチリピート蛋白質をコードする遺伝子の翻訳産物の検出を含む様々な診断法および治療法において有用である。

20

30

【0050】

本発明の好ましい態様において、前記抗体は、前記抗体による前記細胞の免疫細胞化学的染色を含む、被験者からの試料中の細胞の病理的状態の検出のために使用され得る。ここで、既知の健康な状態を示す細胞と比較した、前記細胞における染色度の変化または染色パターンの変化は、前記細胞の病理的状態を示す。好ましくは、病理的状態は、神経変性病、特にADに関する。細胞の免疫細胞化学的染色は、当分野で周知の多くの異なる実験法によって行われ得る。しかし、抗体結合の検出のために、自動化された方法（細胞の染色度の決定、または、細胞の細胞もしくは細胞以下の染色パターン、もしくは、細胞表面上もしくは細胞内の細胞小器官(organelles)および他の細胞以下の構造間のトポロジー分布(topological distribution)の決定が、米国特許6150173号に記載の方法によって行われる)を適用することが好ましいこともある。

40

【0051】

本発明の他の特徴および利点は、以下の図面の説明および実施例から明らかであるが、それらは説明のためだけのものであって、開示の残りを多少なりとも限定するものではない。

【0052】

図1は、ADにおけるニューロンの欠損および変性の影響を選択的に受けやすい脳領域を示す。第一に、下位の(inferior)側頭葉、嗅内皮質、海馬、および扁桃体が、ADにおい

50

て神経変性プロセスに付される(テリー(Terry)ら、Annals of Neurology 1981、10:184-192)。これらの脳領域は、主に、学習機能および記憶機能の処理に関連する。それに対して、前頭皮質、後頭皮質、および小脳内のニューロンは、大部分が無傷であり、ADにおける神経変性プロセスから守られたままである。AD患者および健康な同等の年齢の(age-matched)対照の人々の前頭皮質(F)および側頭皮質(T)からの脳組織を、本明細書で開示した実施例のために使用した。説明目的のために、正常な健康な脳の像をストレンジ(Strange)による刊行物から得た(ブレインバイオケミストリー・アンド・ブレインディスオーダー(Brain Biochemistry and Brain Disorders)、オクスフォード・ユニバーシティ・プレス(Oxford University Press)、オクスフォード(Oxford)、1992、p.4)。

【0053】

図2は、定量的RT-PCR分析によるFBL2遺伝子の差次的発現の確認を示す。ライトサイクラー(LightCycler)急速加熱サイクリング技術によって、健康な同等の年齢の対照の人々(図2a)およびAD患者(図2b)の前頭皮質(F)および側頭皮質(T)から回収されたRNA試料からのRT-PCR産物の定量を行った。一組の標準的な遺伝子(それらは遺伝子発現レベルの顕著な違いを示さなかった)の組み合わせた平均値に対してデータを標準化した。前記一組の標準的な遺伝子は、リボソーム蛋白質S9、トランスフェリンレセプター、GAPDH、およびベータアクチンに対する遺伝子からなるものであった。図は、その蛍光によって測定された増幅された材料の量に対してサイクル数をプロットすることによる増幅の速度論(kinetics)を示す。反応の対数期の中の正常な対照の人々の前頭皮質および側頭皮質の両方からのFBL2 cDNAの増幅速度論は重複するのに対し、アルツハイマー病では、前頭皮質および側頭皮質から得られた試料に関する曲線は顕著に分離する。このことは、側頭皮質に対して前頭皮質においてFBL2遺伝子発現がアップレギュレート(up-regulation)されることを示す。

【0054】

表1には、4人のAD患者(1.84~5.44倍)および4人の健康な同等の年齢の対照の人々(0.67~1.45倍)におけるFBL2遺伝子に関する、側頭皮質に対する前頭皮質における遺伝子発現レベルが記載されている。示した値は、本発明に記載の式による逆数値(reciprocal values)である。

【0055】

実施例I:

アルツハイマー病の患者からの脳組織切開:

AD患者および同等の年齢の対照被験者からの脳組織を、平均して死後5時間以内に回収し、ドライアイス上で直ちに凍結した。その後の診断の病理組織学的確認のために、各組織からの試料片をパラホルムアルデヒド中に固定した。差次的発現分析のための脳領域を同定し(図1参照)、RNA抽出が行われるまで、マイナス80℃で保存した。

【0056】

(i)全mRNAの単離:

製造者のプロトコルに従ってRNeasyキット(キアゲン(Qiagen))を使用することにより、死後の脳組織から全RNAを抽出した。調製したRNAの品質を、標準的な工程に従って(サンプロック(Sambrook)およびラッセル(Russell)、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning):ラボラトリー・マニュアル(A Laboratory Manual)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、コールド・スプリング・ハーバー(Cold Spring Harbor)、ニューヨーク、2000)、ホルムアルデヒドアガロースゲル電気泳動およびノーザンブロットングによって決定した。正確なRNA濃度およびRNAの品質も、アジレント(Agilent) 2100 バイオアナライザー(Bioanalyzer)(アジレント・テクノロジーズ(Agilent Technologies))を用いて、DNA ラボチップ(LabChip)システムによって決定した。調製したRNAの更なる品質試験、即ち、部分分解およびゲノムDNA汚染の試験のために、特別にデザインされたイントロンGAPDHオリゴヌクレオチド、および参照対照としてゲノムDNAを使用し、製造者(ロシュ(Roche))によって供給されたプロトコルに記載のライトサイクラー(LightCycler)技術

10

20

30

40

50

によって融解曲線を得た。

【0057】

(iii) サプレッシブサブトラクティブハイブリダイゼーション (suppressive subtractive hybridization) による c D N A 合成および差次的発現遺伝子の同定 : この技術は、m R N A の 2 つの群を比較し、一方の群では発現されるが他方の群では発現されない遺伝子のクローンを提供する。適用した技術は、ディアチェンコ (Diatchenko) らによって詳細に記載された (Proc Natl Acad Sci USA 1996、93 : 6025-30) 。本発明では、A D 患者の異なる脳領域から得た m R N A 群を比較した。特に、前頭皮質の m R N A を、下位の側頭皮質の m R N A からサブトラクトした (subtracted) 。必要な試薬を R N A - セレクト c D N A サブトラクションキット (PCR-Select cDNA subtraction kit) (クロンテック (Clontech)) から得て、全段階を製造者のプロトコルに記載のように行った。特に、一本鎖および二本鎖 c D N A 合成のために、各 2 μ g の m R N A を使用した。RsaI 消化およびアダプターライゲーション後、テスターとドライバートとのハイブリダイゼーションを、68 °C で 8 時間 (第一ハイブリダイゼーション) および 15 時間 (第二ハイブリダイゼーション) 行った。2 つの P C R 段階を行い、アダプター特異的プライマー (サブトラクションキットに含まれる) および 50 \times アドバンテージポリメラーゼミックス (Advantage Polymerase Mix) (クロンテック (Clontech)) を用いて、差次的発現遺伝子を増幅した (第一 PCR : 94 °C および 30 秒、66 °C および 30 秒、ならびに 72 °C および 1.5 分の 27 サイクル ; ネステッド (nested) PCR : 94 °C および 30 秒、66 °C および 30 秒、ならびに 72 °C および 1.5 分の 12 サイクル) 。RsaI 消化、アダプターライゲーション、およびサブトラクティブハイブリダイゼーションの効率を、キットで推奨されているように確認した。サブトラクト (Subtracted) c D N A を p C R - ベクター内に挿入し、E.coli INVaF' 細胞 (インビトロゲン (Invitrogen)) に形質転換した。サブトラクトライブラリーの各 c D N A を単離するために、単一のバクテリア形質転換体を、100 μ l の L B (50 μ g / m l のアンピシリンを含む) 中で、37 °C で少なくとも 4 時間、インキュベートした。10 mM Tris-HCl pH 9.0、1.5 mM MgCl₂、50 mM KCl、200 μ M dNTP、0.5 μ M アダプター特異的プライマー (サブトラクションキットに含まれる) 、1.5 単位の Taq ポリメラーゼ (ファルマシア・バイオテック (Pharmacia Biotech)) 、および 1 μ l のバクテリア培養液を含む 20 μ l 容量中で、挿入断片を P C R 増幅した (95 °C および 30 秒、68 °C および 3 分を 30 サイクル) 。3 μ l の P C R 増幅挿入断片および 2 μ l の 0.3 N N a O H / 15 % フィコール (FicolI) を含む混合物のアリコート (1.5 μ l) をプラスに帯電したナイロン膜 (ロシユ (Roche)) 上にスポットした。この方法で、その後のハイブリダイゼーションのために、同じ (duplicate) フィルター上に数百のスポットを並べた。ディファレンシャル (differential) スクリーニング段階は、バックグラウンドを最小化するためのサブトラクトライブラリーとそれ自体とのハイブリダイゼーションからなるものであった (ワン (Wang) および ブラウン (Brown) 、Proc Natl Acad Sci USA 1991、88 : 11505-9) 。クロンテック (Clontech) サブトラクションキットの説明に従い、プローブは、サブトラクションのネステッド P C R 産物からなるものであった。DIG DNA ラベリングキット (Labeling Kit) (ロシユ (Roche)) によって、ジゴキシゲニンによるラベリングを行った。DIG イージー (Easy) HYB (ロシユ (Roche)) において 43 °C で一晩、ハイブリダイゼーションを行った。フィルターを、68 °C で 15 分間、2 \times SSC / 0.5 % SDS 中で 2 回、そして、68 °C で 15 分間、0.1 \times SSC / 0.5 % SDS 中で 2 回洗浄し、DIG DNA デテクション・キット (Detection Kit) (ロシユ (Roche)) の説明に従って、化学発光基質として抗-DIG-AP 接合体 (conjugates) および CDP-Star を使用する検出に付した。プロットを、室温で数分間、コダック・バイオマックス (Kodak Biomax) MR ケミルミネセント・フィルム (chemiluminescent film) に曝した。当業者に周知の方法を使用して、目的のクローンのヌクレオチド配列を得た。ヌクレオチド配列分析のために、公に入手可能なヌクレオチドおよび蛋白質配列情報 (NCBI ジェンバンクおよび EMBL データベース) とともに、ユニバーシティ・オブ・ウィスコンシン・ジェネティクス・コンピューター・グループ (the University of Wisconsin Genetic s Computer Group) (GCG) のアライメント、およびホモロジーサーチ、コンピューターアル

10

20

30

40

50

ゴリズムを使用した。

【0058】

(ii) 定量的 RT-PCR による差次的発現の確認：

ライトサイクラー (LightCycler) 技術 (ロシュ (Roche)) を使用して、FBL 遺伝子の差次的発現のプラスの実証 (Positive corroboration) を行った。この技術は、ポリメラーゼチェーン反応のための急速加熱サイクリングならびに増幅中の蛍光シグナルのリアルタイム測定を特徴とし、それにより、エンドポイントアプローチよりむしろ速度論を使用することによって、RT-PCR 産物の非常に正確な定量が可能になる。側頭皮質に対する前頭皮質からの FBL 2 cDNA の割合が決定された (相対的な定量)。第一に、FBL 2 に特異的なプライマーによる PCR の効率を決定するために検量線を作成した (5' -TACTGGGTGGAGCAGGGTCTT-3' および 5' -GGTCCCTGGAGGTGTATATGACA-3')。ライトサイクラー (Lightcycler)-DNA-マスター (Master)-SYBR-グリーンミックス (Green mix) (Taq DNA ポリメラーゼ、反応バッファー、dTTP の代わりに dUTP を含む dNTP ミックス (mix)、SYBR グリーン (Green) I 色素、および 1 mM MgCl₂、ロシュ (Roche) を含む) を含み、3 mM MgCl₂、0.5 μM プライマー、0.16 μl TaqStart 抗体 (クロンテック (Clontech))、および 1 μl の cDNA 希釈物シリーズ (40、20、10、5、および 1 ng ヒト全脳 cDNA、クロンテック (Clontech)) を更に含む 20 μl の容量中で、PCR 増幅 (95 で 1 秒、56 で 5 秒、および 72 で 5 秒) を行った。融解曲線は、約 83 で、目に見えるプライマー二量体なしに、単一ピークを示した。アガロースゲル電気泳動および DNA ラボチップ (LabChip) 分析 (アジレント (Agilent) 2100 バイオアナライザー (Bioanalyzer)、アジレント・テクノロジーズ (Agilent Technologies)) によって、PCR 産物の品質およびサイズを決定した。予想サイズ 66 bp の単一バンドが観察された。

【0059】

同様の方法で、上記の PCR プロトコルを適用し (示した例外とともに)、定量のための対照標準として選択された、一組の対照遺伝子の PCR 効率を決定した。本発明では、5 つのそのような対照遺伝子の平均値を決定した：(1) サイクロフィリン B、特異的プライマー、5' -ACTGAAGCACTACGGGCCTG-3' および 5' -AGCCGTTGGTGTCTTTGCC-3'、を使用 (例外：3 mM の代わりに、更に 1 mM の MgCl₂ を添加した)。融解曲線分析は、約 87 で、目に見えるプライマー二量体なしに、単一ピークを示した。PCR 産物のアガロースゲル分析は、予想サイズ (62 bp) の 1 つの単一バンドを示した。(2) リボソーム蛋白質 S9 (RPS9)、特異的プライマー、5' -GGTCAAATTTACCCTGGCCA-3' および 5' -TCTCATCAAGCGTCAGCAGTTC-3'、を使用 (例外：3 mM の代わりに、更に 1 mM の MgCl₂ を添加した)。融解曲線分析は、約 85 で、目に見えるプライマー二量体なしに、単一ピークを示した。PCR 産物のアガロースゲル分析は、予想サイズ (62 bp) の 1 つの単一バンドを示した。(3) ベータアクチン、特異的プライマー、5' -TGGAACGGTG AAGGTGACA-3' および 5' -GGCAAGGGACTTCCTGTAA-3'、を使用。融解曲線分析は、約 87 で、目に見えるプライマー二量体なしに、単一ピークを示した。PCR 産物のアガロースゲル分析は、予想サイズ (142 bp) の 1 つの単一バンドを示した。(4) GAPDH、特異的プライマー、5' -CGTCATGGGTGTGAACCATG-3' および 5' -GCTAAGCAGTTGGTGGTGCAG-3'、を使用。融解曲線分析は、約 83 で、目に見えるプライマー二量体なしに、単一ピークを示した。PCR 産物のアガロースゲル分析は、予想サイズ (81 bp) の 1 つの単一バンドを示した。(5) トランスフェリンレセプター TRR、特異的プライマー、5' -GTCGCTGGTCAGTTCGTGATT-3' および 5' -AGCAGTTGGCTGTTGTACCTCTC-3'、を使用。融解曲線分析は、約 83 で、目に見えるプライマー二量体なしに、単一ピークを示した。PCR 産物のアガロースゲル分析は、予想サイズ (80 bp) の 1 つの単一バンドを示した。

【0060】

値の算出のために、最初に、FBL 2 および 5 つの対照標準遺伝子について、cDNA 濃度の対数を、閾値サイクル数 C_t に対してプロットした。すべての遺伝子について、検量線 (即ち、直線回帰) の傾きおよび切片を算出した。第二段階において、側頭皮質および

前頭皮質からの cDNA を並行に分析し、サイクロフィリン B に対して標準化した。C_t 値を測定し、対応する検量線を使用して、全脳 cDNA の ng に換算した：

【式 1】

【0061】

$$10^{\left((C_t \text{ 値} - \text{切片}) / \text{傾き} \right)} \quad [\text{ng 全脳 cDNA}]$$

【0062】

側頭および前頭皮質 FBL2 cDNA の値を、サイクロフィリン B に対して標準化し、以下の式を使用して割合を算出した：

【式 2】

【0063】

$$\text{FBL2 側頭 [ng]} / \text{サイクロフィリン B 側頭 [ng]}$$

$$\text{割合} = \frac{\text{FBL2 側頭 [ng]} / \text{サイクロフィリン B 側頭 [ng]}}{\text{FBL2 前頭 [ng]} / \text{サイクロフィリン B 前頭 [ng]}}$$

$$\text{FBL2 前頭 [ng]} / \text{サイクロフィリン B 前頭 [ng]}$$

【0064】

第三段階において、一組の対照標準遺伝子を並行に分析し、各個人の脳試料について、対照標準遺伝子の発現レベルの側頭と前頭の割合の平均値を決定した。段階 2 および段階 3 においてサイクロフィリン B を分析し、そして異なる操作における 1 つの遺伝子から別の遺伝子への割合を一定に保ったので、1 つの単一遺伝子のみに対して標準化する代わりに、一組の対照標準遺伝子の平均値に対して、FBL2 を標準化することができた。全ハウスキーピング遺伝子の平均値からのサイクロフィリン B の偏差で上記に示した割合を割ることによって計算を行った。FBL2 遺伝子に関する 1 つのそのような定量的 RT-PCR 分析の結果を、図 2 に示す。

【図面の簡単な説明】

【0065】

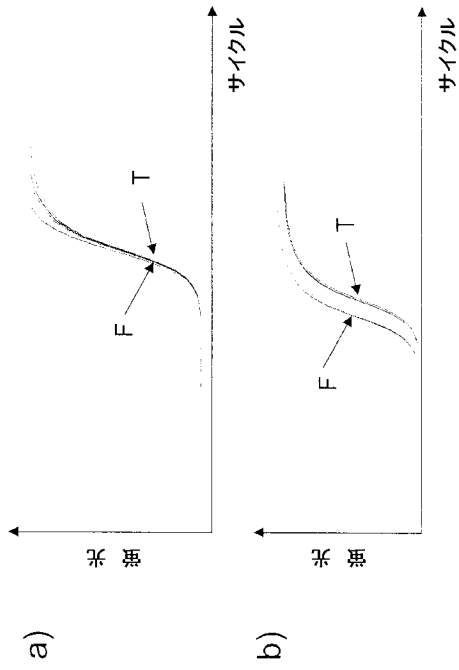
【図 1】図 1 は、AD におけるニューロンの欠損および変性の影響を選択的に受けやすい脳領域を示す。

【図 2】図 2 は、定量的 RT-PCR 分析による FBL2 遺伝子の差次的発現の確認を示す。

【図 3】表 1 には、4 人の AD 患者（1.84 ~ 5.44 倍）および 4 人の健康な同等の年齢の対照の人々（0.67 ~ 1.45 倍）における FBL2 遺伝子に関する、側頭皮質に対する前頭皮質における遺伝子発現レベルが記載されている。

【 図 2 】

図2: 定量的RT-PCRによるFBL2の差次的発現の確認



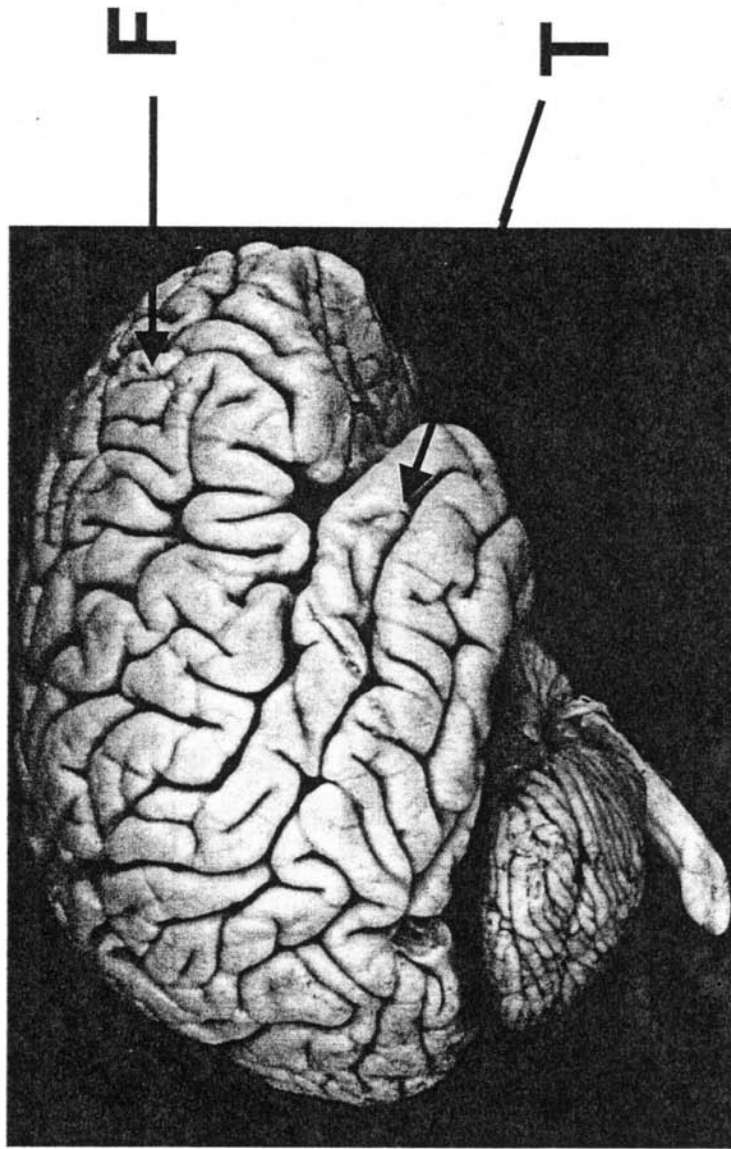
【 図 3 】

表1:

試料	Δ (倍)
患者 1 (#16)	1.98
患者 2 (#10)	5.44
患者 3 (#11)	2.23
患者 4 (#14)	1.84
対照 1 (#10)	0.97
対照 2 (#11)	0.94
対照 3 (# 5)	1.45
対照 4 (# 4)	0.67

【 図 1 】

図1:アルツハイマー病の病状に関連する遺伝子の同定



【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
20 March 2003 (20.03.2003)

PCT

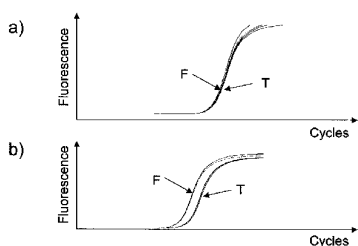
(10) International Publication Number
WO 03/023405 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68
- (74) Agents: MEYERS, Hans-Wilhelm et al.; Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).
- (21) International Application Number: PCT/EP02/10057
- (22) International Filing Date: 7 September 2002 (07.09.2002)
- (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, 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, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01121442.6 7 September 2001 (07.09.2001) EP
- (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, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (71) Applicant (for all designated States except US): EVOTEC NEUROSCIENCES GMBH [DE/DE]; Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburg (DE).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): VON DER KAMMER, Heinz [DE/DE]; Verbindungsstrasse 6d, 22607 Hamburg (DE); POHLNER, Johannes [DE/DE]; Quilteweg 11, 22175 Hamburg (DE); HIPFEL, Rainer [DE/DE]; Albert-Fräinkel-Str. 6, 69126 Heidelberg (DE).
- Published: with international search report

[Continued on next page]

(54) Title: DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC USE OF F-BOX PROTEINS FOR ALZHEIMER'S DISEASE AND RELATED NEURODEGENERATIVE DISORDERS

Verification of Differential Expression of FBL2 by Quantitative RT-PCR



(57) Abstract: The present invention discloses the differential expression of the gene coding for F-box and leucine-rich repeat protein FBL2 in specific brain regions of Alzheimer's disease patients. Based on this finding, the invention provides a method for diagnosing or prognosticating Alzheimer's disease in a subject, or for determining whether a subject is at increased risk of developing Alzheimer's disease. Furthermore, the invention provides therapeutic and prophylactic methods for treating or preventing Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders using a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, in particular FBL2. A method of screening for modulating agents of neurodegenerative diseases is also disclosed.



WO 03/023405 A1

WO 03/023405 A1 

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.

**DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC USE OF F-BOX PROTEINS FOR
ALZHEIMER'S DISEASE AND RELATED NEURODEGENERATIVE
DISORDERS**

The present invention relates to methods of diagnosing, prognosticating and monitoring the progression of neurodegenerative diseases in a subject. Furthermore, methods of therapy control and screening for modulating agents of neurodegenerative diseases are provided. The invention also discloses pharmaceutical compositions, kits and recombinant animal models.

Neurodegenerative diseases, in particular Alzheimer's disease (AD), have a severely debilitating impact on a patient's life. Furthermore, these diseases constitute an enormous health, social, and economic burden. AD is the most common age-related neurodegenerative condition affecting about 10 % of the population over 65 years of age and up to 45 % over age 85 (for a recent review see Vickers et al., *Progress in Neurobiology* 2000, 60:139-165). Presently, this amounts to an estimated 12 million cases in the US, Europe, and Japan. This situation will inevitably worsen with the demographic increase in the number of old people ("aging of the baby boomers") in developed countries. The neuropathological hallmarks that occur in the brains of individuals suffering from AD are senile plaques, composed of amyloid- β protein, and profound cytoskeletal changes coinciding with the appearance of abnormal filamentous structures and the formation of neurofibrillary tangles. AD is a progressive disease that is associated with early deficits in memory formation and ultimately leads to the complete erosion of higher cognitive function. A characteristic feature of the pathogenesis of AD is the selective vulnerability of particular brain regions and subpopulations of nerve cells to the degenerative process. Specifically, the temporal lobe region and the hippocampus are affected early and more severely during the progression of the disease. On the other hand, neurons within the frontal cortex, occipital

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

2

cortex, and the cerebellum remain largely intact and are protected from neurodegeneration (Terry et al., *Annals of Neurology* 1981, 10:184-192).

Currently, there is no cure for AD, nor is there an effective treatment to halt the progression of AD or even a method to diagnose AD ante-mortem with high probability. Several risk factors have been identified that predispose an individual to develop AD, among them most prominently the epsilon4 allele of apolipoprotein E (ApoE). Although there are rare examples of early-onset AD which have been attributed to genetic defects in the genes for APP, presenilin-1, and presenilin-2, the prevalent form of late-onset sporadic AD is of hitherto unknown etiologic origin. The late onset and complex pathogenesis of neurodegenerative disorders pose a formidable challenge to the development of therapeutic and diagnostic agents. It is crucial to expand the pool of potential drug targets and diagnostic markers. It is therefore an object of the present invention to provide insight into the pathogenesis of neurodegenerative diseases and to provide methods, materials, and animal models which are suited inter alia for the diagnosis, identification of compounds useful for therapeutic intervention, and development and monitoring of a treatment of these diseases. This object has been solved by the features of the independent claims of the present invention. The subclaims define preferred embodiments.

F-box proteins constitute a family of proteins characterized by an approximately 40 amino-acid motif called the F-box. The F-box motif was first recognized in the cyclin F protein (Bai et al., *Cell* 1996, 86:263-274). In subsequent studies, at least 38 human F-box proteins have been identified (Kipreos and Pagano, *Genome Biology* 2000, 1:3002.1-3002.7; Cenciarelli, et al., *Current Biology* 1999, 9:1177-1179; Winston et al., *Current Biology* 1999, 9:1180-1182). Frequently, F-box proteins may contain further secondary motifs such as leucine zippers, zinc and ring fingers, cyclin domains, and proline-rich regions. Functionally, the F-box is a peptide module acting as a site of protein-protein interactions. In specific examples, the F-box domain allows proteins to enter into a complex with Skp1 (S-phase kinase-associated

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

3

protein 1). F-box proteins have been implicated in the control of degradation of cellular regulatory proteins via the ubiquitin-proteasome pathway. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway is an essential cellular process of selective removal of proteins from the cell and plays a major role in many cellular processes including signal transduction, transcription and the control of the cell cycle (Hershko et al., *Nature Medicine* 2000, 6:1073-1081; Joazeiro and Hunter, *Science* 2000, 289:2061; Pickart, *Nature Cell Biology* 2000, 2:139-141). A key feature of the ubiquitin-proteasome pathway is the covalent attachment of ubiquitin (ubiquitination) by an enzyme complex to a protein destined for removal. Thereby, the ubiquitin-tagged protein is targeted to the 26S proteasome where it becomes proteolytically degraded. In the central nervous system, proteasome-mediated protein degradation is critical for the breakdown and removal of damaged or misfolded cellular proteins (Alves-Rodrigues et al., *Trends Neurosci* 1998, 21:516-520). The linkage of ubiquitin to a substrate is carried out by the ubiquitin ligase complex, generally comprising three classes of enzymes in a sequential reaction. Ubiquitin activating enzymes (E1) activate ubiquitin by forming a thioester bond between the E1 enzyme and ubiquitin. Subsequently, a transesterification to a member of the E2 class of enzymes (ubiquitin conjugating enzyme) is carried out. Finally, ubiquitin is transferred from the E2 enzyme to the substrate protein with the assistance of a (E3) ubiquitin ligase. E3 ubiquitin ligases are made up of several components. Specifically, F-box proteins are one of the four components of ubiquitin protein ligases (Deshaies, *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999, 15:435-467). The function of F-box proteins within the ubiquitin protein ligase complex may be to specifically recruit substrates for ubiquitin conjugation thus conferring substrate specificity to the degradation process. A possible involvement of the human homolog of the *C.elegans* F-box protein Sel-10 in Alzheimer's disease has been disclosed recently (WO 0075328). Sel-10 belongs to a subfamily of F-box proteins which is characterized by multiple WD-40 repeats. This subfamily of F-box proteins is referred to as "Fbw" (for a detailed discussion of the domain structure of F-box proteins, giving rise to altogether three subfamilies

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

4

of F-box proteins, refer to Winston et al., *Current Biology* 1999, 9:1180-1182). The subfamily referred to as "Fbx" lacks known protein-interaction domains.

A clearly distinguishable subfamily of F-box proteins contains a C-terminal leucine-rich repeat region in addition to the N-terminally situated F-box motif. Members of this subfamily of the F-box proteins are referred to as F-box and leucine-rich repeat proteins, "Fbl". The gene coding for the human F-box and leucine-repeat protein FBL2 was independently identified by several groups (patent applications by Harper and Elledge, WO9918989; Chair et al., WO0012679; Zhang et al., WO0075184). Exemplary nucleotide sequences of the human FBL2 gene have been deposited in the NCBI Genbank database (accession numbers: NM_012157 (curated version), AF176518 and AF174589 (previous versions)). An exemplary amino acid sequence of the corresponding FBL2 protein is referenced in the NCBI Genbank database under the accession number NP_036289 (curated version). Further entries into the database for the FBL2 protein can be found under the NCBI Genbank accession numbers AAF04510 and AAF03128. The rat homolog of the human FBL2 gene exhibits a high degree of similarity to its human counterpart on the amino-acid sequence level (Ilyin et al., *FEBS Lett* 1999, 459:75-79). The rat FBL2 gene is expressed ubiquitously but with varying amounts among different adult rat tissues. Three different sizes of rat mRNA transcripts were revealed by Northern blot analysis. Whereas the low-sized transcript was predominantly expressed in spleen, thymus and testis, the high molecular weight transcripts were preferably expressed in skeletal muscle, heart and brain. A GFP fusion protein of rat FBL2 expressed in human osteosarcoma U-2OS cells could be localized to punctuate foci in the cytoplasm mainly in the vicinity of the nucleus.

To date, no experiments have been disclosed that demonstrate a relationship between the dysregulation of expression of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, in particular FBL2, and the pathology of neurodegenerative diseases, in particular AD. Such a link, as disclosed in the

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

5

present invention, offers new ways, inter alia, for the diagnosis and treatment of these diseases.

The singular forms "a", "an", and "the" as used herein and in the claims include plural reference unless the context dictates otherwise. For example, "a cell" means as well a plurality of cells, and so forth. The term "and/or" as used in the present specification and in the claims implies that the phrases before and after this term are to be considered either as alternatives or in combination. For instance, the wording "determination of a level and/or an activity" means that either only a level, or only an activity, or both a level and an activity are determined. The term "level" as used herein is meant to comprise a gage of, or a measure of the amount of, or a concentration of a transcription product, for instance an mRNA, or a translation product, for instance a protein or polypeptide. The term "activity" as used herein shall be understood as a measure for the ability of a transcription product or a translation product to produce a biological effect or a measure for a level of biologically active molecules. The term "activity" also refers to enzymatic activity. The terms "level" and/or "activity" as used herein further refer to gene expression levels or gene activity. Gene expression can be defined as the utilization of the information contained in a gene by transcription and translation leading to the production of a gene product. A gene product comprises either RNA or protein and is the result of expression of a gene. The amount of a gene product can be used to measure how active a gene is. The term "gene" as used in the present specification and in the claims comprises both coding regions (exons) as well as non-coding regions (e.g. non-coding regulatory elements such as promoters or enhancers, introns, leader and trailer sequences). The term "regulatory elements" shall comprise inducible and non-inducible promoters, enhancers, operators, and other elements that drive and regulate gene expression. The term "fragment" as used herein is meant to comprise e.g. an alternatively spliced, or truncated, or otherwise cleaved transcription product or translation product. The term "derivative" as used herein refers to a mutant, or an RNA-edited, or a chemically modified, or otherwise altered transcription product, or to a mutant, or chemically modified,

or otherwise altered translation product. For instance, a "derivative" may be generated by processes such as altered phosphorylation, or glycosylation, or lipidation, or by altered signal peptide cleavage or other types of maturation cleavage. These processes may occur post-translationally. Fragments, derivatives, or variants of the F-box and leucine-rich repeat protein FBL2 may include, but are not limited to, a functional F-box domain or other functional modules, such as leucine-repeat modules, contained within the polypeptide sequence of FBL2. The term "modulator" as used in the present invention and in the claims refers to a molecule capable of changing or altering the level and/or the activity of a gene, or a transcription product of a gene, or a translation product of a gene. Preferably, a "modulator" is capable of changing or altering the biological activity of a transcription product or a translation product of a gene. Said modulation, for instance, may be an increase or a decrease in enzyme activity, a change in binding characteristics, or any other change or alteration in the biological, functional, or immunological properties of said translation product of a gene. The terms "agent", "reagent", or "compound" refer to any substance, chemical, composition, or extract that have a positive or negative biological effect on a cell, tissue, body fluid, or within the context of any biological system, or any assay system examined. They can be agonists, antagonists, partial agonists or inverse agonists of a target. Such agents, reagents, or compounds may be nucleic acids, natural or synthetic peptides or protein complexes, or fusion proteins. They may also be antibodies, organic or inorganic molecules or compositions, small molecules, drugs and any combinations of any of said agents above. They may be used for testing, for diagnostic or for therapeutic purposes. The terms "oligonucleotide primer" or "primer" refer to short nucleic acid sequences which can anneal to a given target polynucleotide by hybridization of the complementary base pairs and can be extended by a polymerase. They may be chosen to be specific to a particular sequence or they may be randomly selected, e.g. they will prime all possible sequences in a mix. The length of primers used herein may vary from 10 nucleotides to 80 nucleotides. "Probes" are short nucleic acid sequences of the nucleic acid sequences described and disclosed herein or sequences complementary

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

7

therewith. They may comprise full length sequences, or fragments, derivatives, isoforms, or variants of a given sequence. The identification of hybridization complexes between a "probe" and an assayed sample allows the detection of the presence of other similar sequences within that sample. The term "variant" as used herein refers to any polypeptide or protein, in reference to polypeptides and proteins disclosed in the present invention, in which one or more amino acids are added and/or substituted and/or deleted and/or inserted at the N-terminus, and/or the C-terminus, and/or within the native amino acid sequences of the native polypeptides or proteins of the present invention. Furthermore, the term "variant" shall include any shorter or longer version of a polypeptide or protein. "Variants" shall also comprise a sequence that has at least about 80% sequence identity, more preferably at least about 90% sequence identity, and most preferably at least about 95% sequence identity with the amino acid sequences of an F-box and leucine-rich repeat protein, in particular FBL2. "Variants" include, for example, proteins with conservative amino acid substitutions in highly conservative regions. "Proteins and polypeptides" of the present invention include variants, fragments and chemical derivatives of the protein comprising the amino acid sequences of FBL2. They can include proteins and polypeptides which can be isolated from nature or be produced by recombinant and/or synthetic means. Native proteins or polypeptides refer to naturally-occurring truncated or secreted forms, naturally occurring variant forms (e.g. splice-variants) and naturally occurring allelic variants. In the present invention, the terms "risk", "susceptibility", and "predisposition" are tantamount and are used with respect to the probability of developing a neurodegenerative disease, preferably Alzheimer's disease. The term 'AD' shall mean Alzheimer's disease.

Neurodegenerative diseases or disorders according to the present invention comprise Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Pick's disease, fronto-temporal dementia, progressive nuclear palsy, corticobasal degeneration, cerebro-vascular dementia, multiple system atrophy, argyrophilic grain dementia and other tauopathies, and mild-cognitive impairment. Further conditions involving

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

8

neurodegenerative processes are, for instance, ischemic stroke, age-related macular degeneration, narcolepsy, motor neuron diseases, prion diseases, traumatic nerve injury and repair, and multiple sclerosis.

In one aspect, the invention features a method of diagnosing or prognosticating a neurodegenerative disease in a subject, or determining whether a subject is at increased risk of developing said disease. The method comprises: determining a level, or an activity, or both said level and said activity of (i) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or of (ii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or of (iii) a fragment, or derivative, or variant of said transcription or translation product in a sample from said subject and comparing said level, and/or said activity to a reference value representing a known disease or health status, thereby diagnosing or prognosticating said neurodegenerative disease in said subject, or determining whether said subject is at increased risk of developing said neurodegenerative disease.

The invention also relates to the construction and the use of primers and probes which are unique to the nucleic acid sequences, or fragments, or derivatives, or variants thereof, as disclosed in the present invention. Oligonucleotide primers and/or probes can be labeled specifically with fluorescent, bioluminescent, magnetic, or radioactive substances. The invention further relates to the detection and the production of said nucleic acid sequences, or fragments, or derivatives, or variants thereof, using said specific oligonucleotide primers in appropriate combinations. PCR-analysis, a method well known to those skilled in the art, can be performed with said primer combinations to amplify said gene specific nucleic acid sequences from a sample containing nucleic acids. Such sample may be derived either from healthy or diseased subjects. Whether an amplification results in a specific nucleic acid product or not, and whether a fragment of different length can be obtained or not, may be indicative for a neurodegenerative disease, in particular Alzheimer's disease. Thus, the invention provides nucleic acid

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

9

sequences, oligonucleotide primers, and probes of at least 10 bases in length up to the entire coding and gene sequences, useful for the detection of gene mutations and single nucleotide polymorphisms in a given sample comprising nucleic acid sequences to be examined, which may be associated with neurodegenerative diseases, in particular Alzheimers disease. This feature has utility for developing rapid DNA-based diagnostic tests, preferably also in the format of a kit.

In a further aspect, the invention features a method of monitoring the progression of a neurodegenerative disease in a subject. A level, or an activity, or both said level and said activity, of (i) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or of (ii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or of (iii) a fragment, or derivative, or variant of said transcription or translation product in a sample from said subject is determined. Said level and/or said activity is compared to a reference value representing a known disease or health status. Thereby, the progression of said neurodegenerative disease in said subject is monitored.

In still a further aspect, the invention features a method of evaluating a treatment for a neurodegenerative disease, comprising determining a level, or an activity, or both said level and said activity of (i) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or of (ii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or of (iii) a fragment, or derivative, or variant of said transcription or translation product in a sample obtained from a subject being treated for said disease. Said level, or said activity, or both said level and said activity are compared to a reference value representing a known disease or health status, thereby evaluating the treatment for said neurodegenerative disease.

In a preferred embodiment of the herein and hereinafter claimed methods, kits, recombinant animals, molecules, assays, and uses of the instant

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

10

invention, said neurodegenerative disease or disorder is Alzheimer's disease, and said subjects suffer from Alzheimer's disease.

In the present invention, it is particularly preferred that said gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein is the gene coding for FBL2 (comprising nucleotide sequences referenced under NCBI Genbank accession numbers: NM_012157, AF176518, AF174589), and that said F-box and leucine-rich repeat protein is FBL2 (comprising amino acid sequences referenced under NCBI Genbank accession number: NP_036289). It should be understood that, within the scope of the instant invention, the referenced nucleotide and amino acid sequences are of exemplary nature, and that a gene coding for FBL2, and the corresponding translation products thereof, also comprise fragments, derivatives, and variants of said nucleotide and amino acid sequences. Further currently known members of the subfamily of human genes coding for F-box and leucine-rich repeat proteins and/or members of the subfamily of human F-box and leucine-rich repeat proteins, and/or fragments thereof, are listed in the following with exemplary referencing of their corresponding NCBI Genbank / EMBL accession numbers: FBL1 (Skp2), U33761; FLR1, AF142481; FBL3, AF186273, AK001271; FBL3a, AF129532, FBL3b, AF129533; FBL4, AF174590, AF176699, AF199420; FBL5, AF174591, AF176700, AF199355, BC030656; FBL6, AF174592, AF199356; FBL7, AF174593; FBL9, AF176701; FBL10, AK027692; FBL11, BC001203; human homolog to mouse FBL8, AK002140; human homolog to mouse FBL12, AK000195, BC001586, AK027004; hypothetical 43.3 kDa protein, AL133602; P45SKP2-like protein, AF157323; cDNA FLJ20146, AK000153; cDNA FLJ10576, AK001438; FLJ00115 protein, AK024505; cDNA FLJ22888, AK026541; novel protein BA18114.4, AL121928.

The present invention discloses the detection, differential expression and regulation of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, in particular the F-box and leucine-rich repeat protein FBL2, in specific brain regions of AD patients. Consequently, a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein and its corresponding gene products may have a

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

11

causative role in the regional selective neuronal degeneration typically observed in AD. Alternatively, a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein and its corresponding gene products may confer a neuroprotective function to the remaining surviving nerve cells. Based on these disclosures, the present invention has utility for the diagnostic evaluation and prognosis as well as for the identification of a predisposition to a neurodegenerative disease, in particular AD. Furthermore, the present invention provides methods for the diagnostic monitoring of patients undergoing treatment for such a disease.

It is preferred that the sample to be analyzed and determined is selected from the group comprising brain tissue or other body cells. The sample can also comprise cerebrospinal fluid or other body fluids including saliva, urine, serum plasma, or mucus. Preferably, the methods of diagnosis, prognosis, monitoring the progression or evaluating a treatment for a neurodegenerative disease, according to the instant invention, can be practiced *ex corpore*, and such methods preferably relate to samples, for instance, body fluids or cells, removed, collected, or isolated from a subject or patient.

In further preferred embodiments, said reference value is that of a level, or an activity, or both said level and said activity of (i) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or of (ii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or of (iii) a fragment, or derivative, or variant of said transcription or translation product in a sample from a subject not suffering from said neurodegenerative disease.

In preferred embodiments, an alteration in the level and/or activity of a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein and/or a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein and/or a fragment, or derivative, or variant thereof, in a sample cell, or tissue, or fluid, from said subject relative to a reference value representing a known health status indicates a diagnosis, or prognosis,

or increased risk of becoming diseased with a neurodegenerative disease, particularly Alzheimer's disease.

In preferred embodiments, measurement of a level of transcription products of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein is performed in a sample from a subject using a quantitative PCR-analysis with primer combinations to amplify said gene-specific sequences from cDNA obtained by reverse transcription of RNA extracted from a sample of a subject. A Northern blot with probes specific for said gene can also be applied. It might further be preferred to measure transcription products by means of chip-based microarray technologies. These techniques are known to those of ordinary skill in the art (see Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2000).

Furthermore, a level and/or activity of a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or fragment, or derivative, or variant of said translation product, can be detected using an immunoassay, an activity assay, and/or binding assay. These assays can measure the amount of binding between said translation product and an anti-protein antibody by the use of enzymatic, chromodynamic, radioactive, magnetic, or luminescent labels which are attached to either the anti-protein antibody or a secondary antibody which binds the anti-protein antibody. In addition, other high affinity ligands may be used. Immunoassays which can be used include e.g. ELISAs, Western blots and other techniques known to those of ordinary skill in the art (see Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999). All these detection techniques may also be employed in the format of microarrays, protein-arrays, antibody microarrays, or protein-chip based technologies.

In one embodiment of the present invention, it might be preferred to determine an enzymatic activity of a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or a fragment, or derivative, or variant of said translation product. Specifically, due to an association of F-box

and leucine-rich repeat proteins with the ubiquitin-conjugating system, it might be preferred to determine an enzymatic activity of a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or a fragment, or derivative, or variant of said translation product in an assay for ubiquitin-conjugating enzyme activity, specifically in an assay for E3 ubiquitin-ligase activity. E3 ubiquitin-ligase assays are well known. For instance, such an activity can be determined in a reconstituted system in yeast or in cell-free systems comprising purified or isolated E1 enzyme, E2 enzyme, a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or a fragment, or derivative, or variant of said translation product, ubiquitin, and an ATP regenerating system (Feldman et al., *Cell*, 1997; 91:221, Sears et al., *J Biol Chem*, 1998, 273:1409; US5976849, WO0175145).

In a preferred embodiment, the level, or the activity, or both said level and said activity of (i) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or of (ii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or of (iii) a fragment, or derivative, or variant of said transcription or translation product in a series of samples taken from said subject over a period of time is compared, in order to monitor the progression of said disease. In further preferred embodiments, said subject receives a treatment prior to one or more of said sample gatherings. In yet another preferred embodiment, said level and/or activity is determined before and after said treatment of said subject.

In another aspect, the invention features a kit for diagnosing or prognosticating neurodegenerative diseases, in particular AD, in a subject, or determining the propensity or predisposition of a subject to develop a neurodegenerative disease, in particular AD, said kit comprising:

(a) at least one reagent which is selected from the group consisting of (i) reagents that selectively detect a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein (ii) reagents that selectively detect a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein; and

(b) instruction for diagnosing, or prognosticating a neurodegenerative disease, in particular AD, or determining the propensity or predisposition of a subject to develop such a disease by

- detecting a level, or an activity, or both said level and said activity, of said transcription product and/or said translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, in a sample from said subject; and
- diagnosing or prognosticating a neurodegenerative disease, in particular AD, or determining the propensity or predisposition of said subject to develop such a disease, wherein a varied level, or activity, or both said level and said activity, of said transcription product and/or said translation product compared to a reference value representing a known health status; or a level, or activity, or both said level and said activity, of said transcription product and/or said translation product similar or equal to a reference value representing a known disease status, indicates a diagnosis or prognosis of a neurodegenerative disease, in particular AD, or an increased propensity or predisposition of developing such a disease. The kit, according to the present invention, may be particularly useful for the identification of individuals that are at risk of developing a neurodegenerative disease, in particular AD. Consequently, the kit, according to the present invention, may serve as a means for targeting identified individuals for early preventive measures or therapeutic intervention prior to disease onset, before irreversible damage in the course of the disease has been inflicted. Furthermore, in preferred embodiments, the kit featured in the invention is useful for monitoring a progression of a neurodegenerative disease, in particular AD in a subject, as well as monitoring success or failure of therapeutic treatment for such a disease of said subject.

In another aspect, the invention features a method of treating or preventing a neurodegenerative disease, in particular Alzheimer's disease, in a subject comprising the administration to said subject in a therapeutically or prophylactically effective amount of an agent or agents which directly or indirectly affect a level, or an activity, or both said level and said activity, of (i) a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (ii) a

transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iv) a fragment, or derivative, or variant of (i) to (iii). Said agent may comprise a small molecule, or it may also comprise a peptide, an oligopeptide, or a polypeptide. Said peptide, oligopeptide, or polypeptide may comprise an amino acid sequence of a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, or a fragment, or derivative, or variant thereof. An agent for treating or preventing a neurodegenerative disease, in particular AD, according to the instant invention, may also consist of a nucleotide, an oligonucleotide, or a polynucleotide. Said oligonucleotide or polynucleotide may comprise a nucleotide sequence of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, either in sense or in antisense orientation.

In preferred embodiments, the method comprises the application of per se known methods of gene therapy and/or antisense nucleic acid technology to administer said agent or agents. In general, gene therapy comprises several approaches: molecular replacement of a mutated gene, addition of a new gene resulting in the synthesis of a therapeutic protein, and modulation of endogenous cellular gene expression by recombinant expression methods or by drugs. Gene-transfer techniques are described in detail (see e.g. Behr, *Acc Chem Res* 1993, 26:274-278 and Mulligan, *Science*, 1993, 260: 926-931) and include direct gene-transfer techniques such as mechanical microinjection of DNA into a cell as well as indirect techniques employing biological vectors (like recombinant viruses, especially retroviruses) or model liposomes, or techniques based on transfection with DNA coprecipitation with polycations, cell membrane perturbation by chemical (solvents, detergents, polymers, enzymes) or physical means (mechanic, osmotic, thermic, electric shocks). The postnatal gene transfer into the central nervous system has been described in detail (see e.g. Wolff, *Curr Opin Neurobiol* 1993, 3:743-748).

In particular, the invention features a method of treating or preventing a neurodegenerative disease by means of antisense nucleic acid therapy, i.e.

the down-regulation of an inappropriately expressed or defective gene by the introduction of antisense nucleic acids or derivatives thereof into certain critical cells (see e.g. Gillespie, *DN&P* 1992, 5:389-395; Agrawal and Akhtar, *Trends Biotechnol* 1995, 13:197-199; Crooke, *Biotechnology* 1992, 10:882-6). Apart from hybridization strategies, the application of ribozymes, i.e. RNA molecules that act as enzymes, destroying RNA that carries the message of disease has also been described (see e.g. Barinaga, *Science* 1993, 262:1512-1514). In preferred embodiments, the subject to be treated is a human, and therapeutic antisense nucleic acids or derivatives thereof are directed against a human F-box and leucine-rich repeat protein gene, particularly the FBL2 gene. It is preferred that cells of the central nervous system, preferably the brain, of a subject are treated in such a way. Cell penetration can be performed by known strategies such as coupling of antisense nucleic acids and derivatives thereof to carrier particles, or the above described techniques. Strategies for administering targeted therapeutic oligodeoxynucleotides are known to those of skill in the art (see e.g. Wickstrom, *Trends Biotechnol*, 1992, 10: 281-287). In some cases, delivery can be performed by mere topical application. Further approaches are directed to intracellular expression of antisense RNA. In this strategy, cells are transformed *ex vivo* with a recombinant gene that directs the synthesis of an RNA that is complementary to a region of target nucleic acid. Therapeutical use of intracellularly expressed antisense RNA is procedurally similar to gene therapy. A recently developed method of regulating the intracellular expression of genes by the use of double-stranded RNA, known variously as RNA interference (RNAi), can be another effective approach for nucleic acid therapy (Hannon, *Nature* 2002, 418:244-251).

In further preferred embodiments, the method of treatment comprises grafting donor cells into the central nervous system, preferably the brain, of said subject, or donor cells preferably treated so as to minimize or reduce graft rejection, wherein said donor cells are genetically modified by insertion of at least one transgene encoding said agent or agents. Said transgene might be carried by a viral vector, in particular a retroviral vector. The transgene can be

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

17

inserted into the donor cells by a nonviral physical transfection of DNA encoding a transgene, in particular by microinjection. Insertion of the transgene can also be performed by electroporation, chemically mediated transfection, in particular calcium phosphate transfection or liposomal mediated transfection.

In preferred embodiments, said agent for treating and preventing a neurodegenerative disease, in particular AD, is a therapeutic protein which can be administered to said subject, preferably a human, by a process comprising introducing subject cells into said subject, said subject cells having been treated *in vitro* to insert a DNA segment encoding said therapeutic protein, said subject cells expressing *in vivo* in said subject a therapeutically effective amount of said therapeutic protein. Said DNA segment can be inserted into said cells *in vitro* by a viral vector, in particular a retroviral vector. Said agent, particularly a therapeutic protein, can further be administered to said subject by a process comprising the injection or the systemic administration of a fusion protein, said fusion protein being a fusion of a protein transduction domain with said agent.

Methods of treatment, according to the present invention, comprise the application of therapeutic cloning, transplantation, and stem cell therapy using embryonic stem cells or embryonic germ cells and neuronal adult stem cells, combined with any of the previously described cell- and gene therapeutic methods. Stem cells may be totipotent or pluripotent. They may also be organ-specific. Strategies for repairing diseased and/or damaged brain cells or tissue comprise (i) taking donor cells from an adult tissue. Nuclei of those cells are transplanted into unfertilized egg cells from which the genetic material has been removed. Embryonic stem cells are isolated from the blastocyst stage of the cells which underwent somatic cell nuclear transfer. Use of differentiation factors then leads to a directed development of the stem cells to specialized cell types, preferably neuronal cells (Lanza et al., *Nature Medicine* 1999, 9: 975-977), or (ii) purifying adult stem cells, isolated from the central nervous system, or from bone marrow (mesenchymal stem cells), for

in vitro expansion and subsequent grafting and transplantation, or (iii) directly inducing endogenous neural stem cells to proliferate, migrate, and differentiate into functional neurons (Peterson DA, *Curr. Opin. Pharmacol.* 2002, 2: 34-42). Adult neural stem cells are of great potential for repairing damaged or diseased brain tissues, as the germinal centers of the adult brain are free of neuronal damage or dysfunction (Colman A, *Drug Discovery World* 2001, 7: 66-71).

In preferred embodiments, the subject for treatment or prevention, according to the present invention, can be a human, an experimental animal, e.g. a mammal, a mouse, a rat, a fish, a fly, or a worm; a domestic animal, or a non-human primate. The experimental animal can be an animal model for a neurodegenerative disorder, e.g. a transgenic mouse with an AD-type neuropathology.

In a further aspect, the invention features a modulator of an activity, or a level, or both said activity and said level of at least one substance which is selected from the group consisting of (i) a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (ii) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iv) a fragment, or derivative, or variant of (i) to (iii).

In an additional aspect, the invention features a pharmaceutical composition comprising said modulator and preferably a pharmaceutical carrier. Said carrier refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the modulator is administered.

In a further aspect, the invention features a modulator of an activity, or a level, or both said activity and said level of at least one substance which is selected from the group consisting of (i) a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (ii) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iii) a translation product

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

19

of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iv) a fragment, or derivative, or variant of (i) to (iii) for use in a pharmaceutical composition.

In another aspect, the invention provides for the use of a modulator of an activity, or a level, or both said activity and said level of at least one substance which is selected from the group consisting of (i) a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (ii) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iv) a fragment, or derivative, or variant of (i) to (iii) for a preparation of a medicament for treating or preventing a neurodegenerative disease, in particular AD.

In one aspect, the present invention also provides a kit comprising one or more containers filled with a therapeutically or prophylactically effective amount of said pharmaceutical composition.

In a further aspect, the invention features a recombinant, non-human animal comprising a non-native gene sequence coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, or a fragment, or a derivative, or a variant thereof. The generation of said recombinant, non-human animal comprises (i) providing a gene targeting construct containing said gene sequence and a selectable marker sequence, and (ii) introducing said targeting construct into a stem cell of a non-human animal, and (iii) introducing said non-human animal stem cell into a non-human embryo, and (iv) transplanting said embryo into a pseudopregnant non-human animal, and (v) allowing said embryo to develop to term, and (vi) identifying a genetically altered non-human animal whose genome comprises a modification of said gene sequence in both alleles, and (vii) breeding the genetically altered non-human animal of step (vi) to obtain a genetically altered non-human animal whose genome comprises a modification of said endogenous gene, wherein said gene is mis-expressed, or under-expressed, or over-expressed, and wherein said disruption or

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

20

alteration results in said non-human animal exhibiting a predisposition to developing symptoms of a neurodegenerative disease, in particular AD. Strategies and techniques for the generation and construction of such an animal are known to those of ordinary skill in the art (see e.g. Capecchi, *Science*, 1989, 244:1288-1292 and Hogan et al., 1994, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). It is preferred to make use of such a recombinant non-human animal as an animal model for investigating neurodegenerative diseases, in particular AD.

In preferred embodiments, said recombinant, non-human animal comprises a non-native gene sequence coding for the F-box and leucine-rich repeat protein FBL2, or a fragment, or derivative, or variant thereof.

In another aspect, the invention features an assay for screening for a modulator of neurodegenerative diseases, in particular AD, or related diseases and disorders of one or more substances selected from the group consisting of (i) a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (ii) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iv) a fragment, or derivative, or variant of (i) to (iii). This screening method comprises (a) contacting a cell with a test compound, and (b) measuring the level, or the activity, or both the level and the activity of one or more substances recited in (i) to (iv), and (c) measuring the level, or the activity, or both the level and the activity of said substances in a control cell not contacted with said test compound, and (d) comparing the levels of the substance in the cells of step (b) and (c), wherein an alteration in the level and/or activity of said substances in the contacted cells indicates that the test compound is a modulator of said diseases and disorders.

In one further aspect, the invention features a screening assay for a modulator of neurodegenerative diseases, in particular AD, or related

diseases and disorders of one or more substances selected from the group consisting of (i) a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (ii) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iv) a fragment, or derivative, or variant of (i) to (iii), comprising (a) administering a test compound to a test animal which is predisposed to developing or has already developed symptoms of a neurodegenerative disease or related diseases or disorders, and (b) measuring the level and/or activity of one or more substances recited in (i) to (iv), and (c) measuring the level and/or activity of said substances in a matched control animal which is equally predisposed to developing or has already developed said symptoms of a neurodegenerative disease, and to which animal no such test compound has been administered, and (d) comparing the level and/or activity of the substance in the animals of step (b) and (c), wherein an alteration in the level and/or activity of substances in the test animal indicates that the test compound is a modulator of said diseases and disorders.

In a preferred embodiment, said test animal and/or said control animal is a recombinant, non-human animal which expresses an F-box and leucine-rich repeat protein, in particular FBL2, or a fragment, or a derivative, or a variant thereof, under the control of a transcriptional regulatory element which is not the native gene transcriptional control regulatory element.

In another embodiment, the present invention provides a method for producing a medicament comprising the steps of (i) identifying a modulator of neurodegenerative diseases by a method of the aforementioned screening assays and (ii) admixing the modulator with a pharmaceutical carrier. Said modulator may also be identifiable by other assays of screening.

In another aspect, the present invention provides for an assay for testing a compound, preferably for screening a plurality of compounds, for inhibition of binding between a ligand and an F-box and leucine-rich repeat protein, or a

fragment, or derivative, or variant thereof. Said screening assay comprises the steps of (i) adding a liquid suspension of said F-box and leucine-rich repeat protein, or a fragment, or derivative, or variant thereof, to a plurality of containers, and (ii) adding a compound, preferably a plurality of compounds, to be screened for said inhibition to said plurality of containers, and (iii) adding detectable ligand, preferably fluorescently detectable ligand, to said containers, and (iv) incubating the liquid suspension of said F-box and leucine-rich repeat protein, or said fragment, or derivative, or variant thereof, and said compounds, and said detectable ligand, and (v) measuring the amounts of detectable ligand or fluorescence associated with said F-box and leucine-rich repeat protein, or with said fragment, or derivative, or variant thereof, and (vi) determining the degree of inhibition by one or more of said compounds of binding of said ligand to said F-box and leucine-rich repeat protein, or said fragment, or derivative, or variant thereof. Instead of utilizing a fluorescently detectable label, it might in some aspects be preferred to use any other detectable label known to the person skilled in the art, e.g. radioactive label, and detect it accordingly. Said method may be useful for the identification of novel compounds as well as for evaluating compounds which have been improved or otherwise optimized in their ability to inhibit the binding of a ligand to an F-box and leucine-rich repeat protein, or a fragment, or derivative, or variant thereof. In one further embodiment, the present invention provides a method for producing a medicament comprising the steps of (i) identifying a compound as an inhibitor of binding between a ligand and a gene product of the gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein by the aforementioned method of inhibitory binding assay and (ii) admixing the compound with a pharmaceutical carrier. Said compound may also be identifiable by other types of screening assays.

In another aspect, the invention features an assay for testing a compound, preferably for screening a plurality of compounds, to determine the degree of binding of said compound or compounds to an F-box and leucine-rich repeat protein, or to a fragment, or derivative, or variant thereof. Said screening assay comprises the steps of (i) adding a liquid suspension of said F-box and

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

23

leucine-rich repeat protein, or a fragment, or derivative, or variant thereof, to a plurality of containers, and (ii) adding a detectable compound, preferably a plurality of detectable compounds, in particular fluorescently detectable compounds, to be screened for said binding to said plurality of containers, and (iii) incubating the liquid suspension of said F-box and leucine-rich repeat protein, or said fragment, or derivative, or variant thereof, and said detectable compound, preferably said plurality of detectable compounds, and (iv) measuring the amounts of detectable compound or fluorescence associated with said F-box and leucine-rich repeat protein, or with said fragment, or derivative, or variant thereof, and (v) determining the degree of binding by one or more of said compounds to said F-box and leucine-rich repeat protein, or said fragment, or derivative, or variant thereof. In this type of assay it might be preferred to use a fluorescent label. However, any other type of detectable label might also be employed. Said method may be useful for the identification of novel compounds as well as for evaluating compounds which have been improved or otherwise optimized in their ability to bind to an F-box and leucine-rich repeat protein.

In one further embodiment, the present invention provides a method for producing a medicament comprising the steps of (i) identifying a compound as a binder to an F-box and leucine-rich repeat protein by the aforementioned binding assays and (ii) admixing the compound with a pharmaceutical carrier. Said compound may also be identifiable by other types of screening assays.

In another embodiment, the present invention provides for a medicament obtainable by any of the methods according to the herein claimed screening assays. In one further embodiment, the instant invention provides for a medicament obtained by any of the methods according to the herein claimed screening assays.

In all types of assays disclosed herein it is preferred to study and conduct screening assays with the F-box and leucine-rich repeat protein FBL2.

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

24

The present invention features a protein molecule, said protein molecule being a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, or a fragment, or derivative, or variant thereof, for use as a diagnostic target for detecting a neurodegenerative disease, in particular Alzheimer's disease.

The present invention further features a protein molecule, said protein molecule being a translation product of the gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, or a fragment, or derivative, or variant thereof, for use as a screening target for reagents or compounds preventing, or treating, or ameliorating a neurodegenerative disease, in particular Alzheimer's disease.

The present invention features an antibody which is specifically immunoreactive with an immunogen, wherein said immunogen is a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, or a fragment, or derivative, or variant thereof. The immunogen may comprise immunogenic or antigenic epitopes or portions of a translation product of said gene, wherein said immunogenic or antigenic portion of a translation product is a polypeptide, and wherein said polypeptide elicits an antibody response in an animal, and wherein said polypeptide is immunospecifically bound by said antibody. Methods for generating antibodies are well known in the art (see Harlow et al., *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York). The term "antibody", as employed in the present invention, encompasses all forms of antibodies known in the art, such as polyclonal, monoclonal, chimeric, recombinatorial, anti-idiotypic, humanized, or single chain antibodies, as well as fragments thereof. Antibodies of the present invention are useful, for instance, in a variety of diagnostic and therapeutic methods involving detecting translation products of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein.

In a preferred embodiment of the present invention, said antibodies can be used for detecting the pathological state of a cell in a sample from a subject, comprising immunocytochemical staining of said cell with said antibody, wherein an altered degree of staining, or an altered staining pattern in said cell compared to a cell representing a known health status indicates a pathological state of said cell. Preferably, the pathological state relates to a neurodegenerative disease, in particular to AD. Immunocytochemical staining of a cell can be carried out by a number of different experimental methods well known in the art. It might be preferred, however, to apply an automated method for the detection of antibody binding, wherein the determination of the degree of staining of a cell, or the determination of the cellular or subcellular staining pattern of a cell, or the topological distribution of an antigen on the cell surface or among organelles and other subcellular structures within the cell, are carried out according to the method described in US patent 6150173.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following description of figures and examples which are illustrative only and not intended to limit the remainder of the disclosure in any way.

Figure 1 depicts the brain regions with selective vulnerability to neuronal loss and degeneration in AD. Primarily, neurons within the inferior temporal lobe, the entorhinal cortex, the hippocampus, and the amygdala are subject to degenerative processes in AD (Terry et al., *Annals of Neurology* 1981, 10:184-192). These brain regions are mostly involved in the processing of learning and memory functions. In contrast, neurons within the frontal cortex, the occipital cortex, and the cerebellum remain largely intact and preserved from neurodegenerative processes in AD. Brain tissues from the frontal cortex (F) and the temporal cortex (T) of AD patients and healthy, age-matched control individuals were used for the herein disclosed examples. For illustrative purposes, the image of a normal healthy brain was taken from a publication by Strange (*Brain Biochemistry and Brain Disorders*, Oxford University Press, Oxford, 1992, p.4).

Figure 2 illustrates the verification of the differential expression of the FBL2 gene by quantitative RT-PCR analysis. Quantification of RT-PCR products from RNA samples collected from the frontal cortex (F) and temporal cortex (T) of healthy, age-matched control individuals (Fig 2a) and AD patients (Fig 2b) was performed by the LightCycler rapid thermal cycling technique. The data were normalized to the combined average values of a set of standard genes which showed no significant differences in their gene expression levels. Said set of standard genes consisted of genes for the ribosomal protein S9, the transferrin receptor, GAPDH, and beta-actin. The figure depicts the kinetics of amplification by plotting the cycle number against the amount of amplified material as measured by its fluorescence. The amplification kinetics of FBL2 cDNA from both the frontal and temporal cortices of a normal control individual during the exponential phase of the reaction overlap, whereas in Alzheimer's disease there is a significant separation of the curves for the samples derived from frontal and temporal cortex, which is indicative of an up-regulation of FBL2 gene expression in frontal cortex relative to temporal cortex.

Table 1 lists the gene expression levels in the frontal cortex relative to the temporal cortex for the FBL2 gene in four AD patients (1.84 to 5.44 fold) and four healthy, age-matched control individuals (0.67 to 1.45 fold). The values shown are reciprocal values according to the formula described in present invention.

EXAMPLE I:

Brain tissue dissection from patients with Alzheimer's disease:

Brain tissues from AD patients and age-matched control subjects were collected on average within 5 hours post-mortem and immediately frozen on dry ice. Sample sections from each tissue were fixed in paraformaldehyde for subsequent histopathological confirmation of the diagnosis. Brain areas for differential expression analysis were identified (see Fig. 1) and stored at minus 80°C until RNA extractions were performed.

(i) Isolation of total mRNA:

Total RNA was extracted from post-mortem brain tissue by using the RNeasy kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. The quality of the prepared RNA was determined by formaldehyde agarose gel electrophoresis and Northern blotting according to standard procedures (Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2000). The accurate RNA concentration and RNA quality were also determined with the DNA LabChip system using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). For additional quality testing of the prepared RNA, i.e. testing for partial degradation and genomic DNA contamination, specifically designed intronic GAPDH oligonucleotides and genomic DNA as reference control were utilized to generate a melting curve with the LightCycler technology as described in the protocol supplied by the manufacturer (Roche).

(iii) cDNA synthesis and identification of differentially expressed genes by suppressive subtractive hybridization: This technique compares two populations of mRNA and provides clones of genes that are expressed in one population but not in the other. The applied technique was described in detail by Diatchenko et al. (*Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:6025-30). In the present invention, mRNA populations derived from different brain regions of AD patients were compared. Specifically, mRNA of the frontal cortex was subtracted from mRNA of the inferior temporal cortex. The necessary reagents were taken from the PCR-Select cDNA subtraction kit (Clontech), and all steps were performed as described in the manufacturer's protocol. Specifically, 2µg mRNA each were used for first-strand and second-strand cDNA synthesis. After RsaI-digestion and adaptor ligation, hybridization of tester and driver was performed for 8 hours (first hybridization) and 15 hours (second hybridization) at 68°C. Two PCR steps were performed to amplify differentially expressed genes (first PCR: 27 cycles of 94°C and 30 sec, 66°C and 30 sec, and 72°C and 1.5 min; nested PCR: 12 cycles of 94°C and 30 sec, 66°C and 30 sec, and 72°C and 1.5 min) using adaptor specific primers

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

28

(included in the subtraction kit) and 50x Advantage Polymerase Mix (Clontech). Efficiencies of *Rsa*I-digestions, adaptor ligations and subtractive hybridizations were checked as recommended in the kit. Subtracted cDNAs were inserted into the pCR-vector and transformed into *E. coli* INV α F' cells (Invitrogen). To isolate individual cDNAs of the subtracted library, single bacterial transformants were incubated in 100 μ l LB (with 50 μ g/ml ampicillin) at 37°C for at least 4 hours. Inserts were PCR amplified (95°C and 30 sec, 68°C and 3 min for 30 cycles) in a volume of 20 μ l containing 10 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 200 μ M dNTP, 0.5 μ M adaptor specific primers (included in the subtraction kit), 1.5 Units Taq polymerase (Pharmacia Biotech), and 1 μ l of bacterial culture. An aliquot of the mixture (1.5 μ l) containing 3 μ l PCR amplified inserts and 2 μ l 0.3 N NaOH / 15% Ficoll were spotted onto a positively charged nylon membrane (Roche). In this way, hundreds of spots were arrayed on duplicate filters for subsequent hybridization. The differential screening step consisted of hybridizations of the subtracted library with itself to minimize background (Wang and Brown, *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88:11505-9). The probes were made of the nested PCR product of the subtraction following the instructions of the Clontech subtraction kit. Labeling with digoxigenin was performed with the DIG DNA Labeling Kit (Roche). Hybridizations were carried out overnight in DIG Easy HYB (Roche) at 43°C. The filters were washed twice in 2 x SSC / 0.5 % SDS at 68°C for 15 min and twice in 0.1 x SSC / 0.5 % SDS at 68°C for 15 min, and subjected to detection using anti-DIG-AP conjugates and CDP-Star as chemiluminescent substrate according to the instructions of the DIG DNA Detection Kit (Roche). Blots were exposed to Kodak Biomax MR chemiluminescent film at room temperature for several minutes. The nucleotide sequences of clones of interest were obtained using methods well known to those skilled in the art. For nucleotide sequence analysis, alignments, and homology searches, computer algorithms of the University of Wisconsin Genetics Computer Group (GCG) in conjunction with publicly available nucleotide and protein sequence information (NCBI Genbank and EMBL databases) were employed.

(ii) Confirmation of differential expression by quantitative RT-PCR:

Positive corroboration of differential expression of the FBL2 gene was performed using the LightCycler technology (Roche). This technique features rapid thermal cycling for the polymerase chain reaction as well as real-time measurement of fluorescent signals during amplification and therefore allows for highly accurate quantification of RT-PCR products by using a kinetic rather than an endpoint approach. The ratio of FBL2 cDNA from the frontal cortex versus temporal cortex was determined (relative quantification). First, a standard curve was generated to determine the efficiency of the PCR with specific primers for FBL2 (5'-TACTGGGTGGAGCAGGGTCTT-3' and 5'-GGTCCCTGGAGGTGTATATGACA-3'). PCR amplification (95°C and 1 sec, 56°C and 5 sec, and 72°C and 5 sec) was performed in a volume of 20 µl containing Lightcycler-DNA-Master-SYBR-Green mix (containing Taq DNA polymerase, reaction buffer, dNTP mix with dUTP instead of dTTP, SYBR Green I dye, and 1 mM MgCl₂, Roche), additionally containing 3 mM MgCl₂, 0,5 µM primers, 0,16 µl TaqStart antibody (Clontech), and 1 µl of a cDNA dilution series (40, 20, 10, 5, and 1 ng human total brain cDNA, Clontech). Melting curve analysis revealed a single peak at approximately 83°C with no visible primer dimers. Quality and size of the PCR product were determined by agarose gel electrophoresis and DNA LabChip analysis (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies). A single band of the expected size 66 bp was observed.

In an analogous manner, the above described PCR protocol (with indicated exceptions) was applied to determine the PCR efficiency of a set of reference genes which were selected as a reference standard for quantification. In the present invention, the mean value of five such reference genes was determined: (1) cyclophilin B, using the specific primers 5'-ACTGAAGCACTACGGCCTG-3' and 5'-AGCCGTTGGTCTTTGCC-3', (exception: an additional 1 mM MgCl₂ was added instead of 3 mM). Melting curve analysis revealed a single peak at approximately 87 °C with no visible primer dimers. Agarose gel analysis of the PCR product showed one single band of the expected size (62 bp). (2) Ribosomal protein S9 (RPS9), using

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

30

the specific primers 5'-GGTCAAATTTACCCTGGCCA-3' and 5'-TCTCATCAAGCGTCAGCAGTTC-3' (exception: an additional 1 mM MgCl₂ was added instead of 3 mM). Melting curve analysis revealed a single peak at approximately 85°C with no visible primer dimers. Agarose gel analysis of the PCR product showed one single band with the expected size (62 bp). (3) beta-actin, using the specific primers 5'-TGGAACGGTGAAGGTGACA-3' and 5'-GGCAAGGGACTTCCTGTAA-3'. Melting curve analysis revealed a single peak at approximately 87°C with no visible primer dimers. Agarose gel analysis of the PCR product showed one single band with the expected size (142 bp). (4) GAPDH, using the specific primers 5'-CGTCATGGGTGTGAACCATG-3' and 5'-GCTAAGCAGTTGGTGGTGCAG-3'. Melting curve analysis revealed a single peak at approximately 83°C with no visible primer dimers. Agarose gel analysis of the PCR product showed one single band with the expected size (81 bp). (5) Transferrin receptor TRR, using the specific primers 5'-GTCGCTGGTCAGTTCGTGATT-3' and 5'-AGCAGTTGGCTTTGTACCTCTC-3'. Melting curve analysis revealed a single peak at approximately 83°C with no visible primer dimers. Agarose gel analysis of the PCR product showed one single band with the expected size (80 bp).

For calculation of the values, first the logarithm of the cDNA concentration was plotted against the threshold cycle number C_t for FBL2 and the five reference standard genes. The slopes and the intercepts of the standard curves (i.e. linear regressions) were calculated for all genes. In a second step, cDNAs from temporal cortex and frontal cortex were analyzed in parallel and normalized to cyclophilin B. The C_t values were measured and converted to ng total brain cDNA using the corresponding standard curves:

$$10^{-(C_t \text{ value} - \text{intercept}) / \text{slope}} \quad [\text{ng total brain cDNA}]$$

The values of temporal and frontal cortex FBL2 cDNAs were normalized to cyclophilin B, and the ratio was calculated using the following formula:

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

31

$$\text{Ratio} = \frac{\text{FBL2 temporal [ng]} / \text{cyclophilin B temporal [ng]}}{\text{FBL2 frontal [ng]} / \text{cyclophilin B frontal [ng]}}$$

In a third step, the set of reference standard genes was analyzed in parallel to determine the mean average value of the temporal to frontal ratios of expression levels of the reference standard genes for each individual brain sample. As cyclophilin B was analyzed in step 2 and step 3, and the ratio from one gene to another gene remained constant in different runs, it was possible to normalize FBL2 to the mean average value of the set of reference standard genes instead of normalizing to one single gene alone. The calculation was performed by dividing the ratio shown above by the deviation of cyclophilin B from the mean value of all housekeeping genes. The results of one such quantitative RT-PCR analysis for the FBL2 gene are shown in Fig. 2.

CLAIMS

1. A method of diagnosing or prognosticating a neurodegenerative disease in a subject, or determining whether a subject is at increased risk of developing said disease, comprising determining a level and/or an activity of
 - (i) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or
 - (ii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or
 - (iii) a fragment, or derivative, or variant of said transcription or translation product,in a sample from said subject and comparing said level and/or said activity to a reference value representing a known disease or health status, thereby diagnosing or prognosticating said neurodegenerative disease in said subject, or determining whether said subject is at increased risk of developing said neurodegenerative disease.
2. A method of monitoring the progression of a neurodegenerative disease in a subject, comprising determining a level and/or an activity of
 - (i) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or
 - (ii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or
 - (iii) a fragment, or derivative, or variant of said transcription or translation product,in a sample from said subject and comparing said level and/or said activity to a reference value representing a known disease or health status, thereby monitoring the progression of said neurodegenerative disease in said subject.
3. A method of evaluating a treatment for a neurodegenerative disease, comprising determining a level and/or an activity of

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

33

- (i) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or
- (ii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or
- (iii) a fragment, or derivative, or variant of said transcription or translation product,

in a sample from a subject being treated for said disease and comparing said level and/or said activity to a reference value representing a known disease or health status, thereby evaluating said treatment for said neurodegenerative disease.

4. The method according to any of claims 1 to 3 wherein said neurodegenerative disease is Alzheimer's disease.

5. The method according to any of claims 1 to 4 wherein said gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein is the gene coding for FBL2, and wherein said translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein is the FBL2 protein.

6. The method according to any of claims 1 to 5 wherein said sample comprises a cell, or a tissue, or a body fluid, in particular cerebrospinal fluid.

7. The method according to any of claims 1 to 6 wherein said reference value is that of a level and/or an activity of

- (i) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or
- (ii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or
- (iii) a fragment, or derivative, or variant of said transcription or translation product,

in a sample from a subject not suffering from said neurodegenerative disease.

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

34

8. The method according to any of claims 1 to 7 wherein an alteration in the level and/or activity of a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein and/or a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein and/or a fragment, or derivative, or variant thereof, in a sample cell, or tissue, or body fluid, in particular cerebrospinal fluid, from said subject relative to a reference value representing a known health status indicates a diagnosis, or prognosis, or increased risk of Alzheimer's disease in said subject.
9. The method according to any of claims 1 to 8, further comprising comparing a level and/or an activity of
- (i) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or
 - (ii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or
 - (iii) a fragment, or derivative, or variant of said transcription or translation product,
- in a series of samples taken from said subject over a period of time.
10. The method according to claim 9 wherein said subject receives a treatment prior to one or more of said sample gatherings.
11. The method according to claim 10 wherein said level and/or activity is determined before and after said treatment of said subject.
12. A kit for diagnosing or prognosticating a neurodegenerative disease, in particular Alzheimer's disease, in a subject, or determining the propensity or predisposition of a subject to develop such a disease, said kit comprising:
- (a) at least one reagent which is selected from the group consisting of (i) reagents that selectively detect a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein and (ii) reagents that selectively detect a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and

- (b) an instruction for diagnosing or prognosticating a neurodegenerative disease, in particular Alzheimer's disease, or determining the propensity or predisposition of a subject to develop such a disease by (i) detecting a level, or an activity, or both said level and said activity, of said transcription product and/or said translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein in a sample from said subject; and (ii) diagnosing or prognosticating a neurodegenerative disease, in particular Alzheimer's disease, or determining the propensity or predisposition of said subject to develop such a disease, wherein a varied level, or activity, or both said level and said activity, of said transcription product and/or said translation product compared to a reference value representing a known health status; or a level, or activity, or both said level and said activity, of said transcription product and/or said translation product similar or equal to a reference value representing a known disease status indicates a diagnosis or prognosis of a neurodegenerative disease, in particular Alzheimer's disease, or an increased propensity or predisposition of developing such a disease.
13. A method of treating or preventing a neurodegenerative disease, in particular Alzheimer's disease, in a subject comprising administering to said subject in a therapeutically or prophylactically effective amount an agent or agents which directly or indirectly affect an activity and/or a level of (i) a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (ii) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iv) a fragment, or derivative, or variant of (i) to (iii).
14. A modulator of an activity and/or of a level of at least one substance which is selected from the group consisting of (i) a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (ii) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iv) a fragment, or derivative, or variant of (i) to (iii).

15. A pharmaceutical composition comprising a modulator according to claim 14.
16. A modulator of an activity and/or of a level of at least one substance which is selected from the group consisting of (i) a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (ii) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iv) a fragment, or derivative, or variant of (i) to (iii) for use in a pharmaceutical composition.
17. Use of a modulator of an activity and/or of a level of at least one substance which is selected from the group consisting of (i) a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (ii) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or (iv) a fragment, or derivative, or variant of (i) to (iii) for a preparation of a medicament for treating or preventing a neurodegenerative disease, in particular Alzheimer's disease.
18. A kit, comprising in one or more containers, a therapeutically or prophylactically effective amount of the pharmaceutical composition of claim 15.
19. A recombinant, non-human animal comprising a non-native gene sequence coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, or a fragment, or a derivative, or a variant thereof, said animal being obtainable by:
- (i) providing a gene targeting construct comprising said gene sequence and a selectable marker sequence, and
 - (ii) introducing said targeting construct into a stem cell of a non-human animal, and

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

37

- (iii) introducing said non-human animal stem cell into a non-human embryo, and
- (iv) transplanting said embryo into a pseudopregnant non-human animal, and
- (v) allowing said embryo to develop to term, and
- (vi) identifying a genetically altered non-human animal whose genome comprises a modification of said gene sequence in both alleles, and
- (vii) breeding the genetically altered non-human animal of step (vi) to obtain a genetically altered non-human animal whose genome comprises a modification of said endogenous gene, wherein said disruption results in said non-human animal exhibiting a predisposition to developing symptoms of a neurodegenerative disease or related disease or disorders.

20. The animal according to claim 19 wherein said gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein is the gene coding for FBL2.

21. Use of the recombinant, non-human animal according to claims 19 or 20 as an animal model for investigating neurodegenerative diseases, in particular Alzheimer's disease.

22. An assay for screening for a modulator of neurodegenerative diseases, in particular Alzheimer's disease, or related diseases or disorders of one or more substances selected from the group consisting of

- (i) a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or
- (ii) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or
- (iii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or
- (iv) a fragment, or derivative, or variant of (i) to (iii),

said method comprising:

- (a) contacting a cell with a test compound;

- (b) measuring the activity and/or level of one or more substances recited in (i) to (iv);
- (c) measuring the activity and/or level of one or more substances recited in (i) to (iv) in a control cell not contacted with said test compound; and
- (d) comparing the levels and/or activities of the substance in the cells of step (b) and (c), wherein an alteration in the activity and/or level of substances in the contacted cells indicates that the test compound is a modulator of said diseases or disorders.

23. A method of screening for a modulator of neurodegenerative diseases, in particular Alzheimer's disease, or related diseases or disorders of one or more substances selected from the group consisting of

- (i) a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or
- (ii) a transcription product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or
- (iii) a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, and/or
- (v) a fragment, or derivative, or variant of (i) to (iii),

said method comprising:

- (a) administering a test compound to a test animal which is predisposed to developing or has already developed symptoms of a neurodegenerative disease or related diseases or disorders in respect of the substances recited in (i) to (iv);
- (b) measuring the activity and/or level of one or more substances recited in (i) to (iv);
- (c) measuring the activity and/or level of one or more substances recited in (i) or (iv) in a matched control animal which is predisposed to developing or has already developed symptoms of a neurodegenerative disease or related diseases or disorders in respect to the substances recited in (i) to (iv) and to which animal no such test compound has been administered;

- (d) comparing the activity and/or level of the substance in the animals of step (b) and (c), wherein an alteration in the activity and/or level of substances in the test animal indicates that the test compound is a modulator of said diseases or disorders.

24. The method according to claim 23 wherein said test animal and/or said control animal is a recombinant animal which expresses an F-box and leucine-rich repeat protein, in particular FBL2, or a fragment, or derivative, or variant thereof, under the control of a transcriptional control element which is not the native gene transcriptional control element.

25. A method of testing a compound, preferably of screening a plurality of compounds, for inhibition of binding between a ligand and an F-box and leucine-rich repeat protein, or a fragment, or derivative, or variant thereof, said method comprising the steps of:

- (i) adding a liquid suspension of said F-box and leucine-rich repeat protein, or a fragment, or derivative, or variant thereof, to a plurality of containers;
- (ii) adding a compound, preferably a plurality of compounds, to be screened for said inhibition of binding to said plurality of containers;
- (iii) adding a detectable ligand, in particular a fluorescently detectable ligand, to said containers;
- (iv) incubating the liquid suspension of said F-box and leucine-rich repeat protein, or said fragment, or derivative, or variant thereof, and said compound, preferably said plurality of compounds, and said ligand;
- (v) measuring amounts of detectable ligand or fluorescence associated with said F-box and leucine-rich repeat protein, or with said fragment, or derivative, or variant thereof; and
- (vi) determining the degree of inhibition by one or more of said compounds of binding of said ligand to said F-box and leucine-rich repeat protein, or said fragment, or derivative, or variant thereof.

26. A method of testing a compound, preferably of screening a plurality of compounds, to determine the degree of binding of said compound or compounds to an F-box and leucine-rich repeat protein, or to a fragment, or derivative, or variant thereof, said method comprising the steps of:

- (i) adding a liquid suspension of said F-box and leucine-rich repeat protein, or a fragment, or derivative, or variant thereof, to a plurality of containers;
- (ii) adding a detectable compound, preferably a plurality of detectable compounds, in particular fluorescently detectable compounds, to be screened for said binding to said plurality of containers;
- (iii) incubating the liquid suspension of said F-box and leucine-rich repeat protein, or said fragment, or derivative, or variant thereof, and said compound, preferably said plurality of compounds;
- (iv) measuring amounts of detectable compound or fluorescence associated with said F-box and leucine-rich repeat protein, or with said fragment, or derivative, or variant thereof; and
- (v) determining the degree of binding by one or more of said compounds to said F-box and leucine-rich repeat protein, or said fragment, or derivative, or variant thereof.

27. A method for producing a medicament comprising the steps of (i) identifying a modulator of neurodegenerative diseases, in particular Alzheimer's disease, by a method according to any of claims 22 to 24 and (ii) admixing the modulator with a pharmaceutical carrier.

28. A method for producing a medicament comprising the steps of (i) identifying a compound as an inhibitor of binding between a ligand and an F-box and leucine-rich repeat protein by a method according to claim 25 and (ii) admixing the compound with a pharmaceutical carrier.

WO 03/023405

PCT/EP02/10057

41

29. A method for producing a medicament comprising the steps of (i) identifying a compound as a binder to an F-box protein by a method according to claim 26 and (ii) admixing the compound with a pharmaceutical carrier.
30. A medicament obtainable by any of the methods according to claim 27 to 29.
31. A medicament obtained by any of the methods according to claim 27 to 29.
32. A protein molecule, said protein molecule being a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, or a fragment, or derivative, or variant thereof, for use as a diagnostic target for detecting a neurodegenerative disease, preferably Alzheimer's disease.
33. A protein molecule, said protein molecule being a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, or a fragment, or derivative, or variant thereof, for use as a screening target for reagents or compounds preventing, or treating, or ameliorating a neurodegenerative disease, preferably Alzheimer's disease.
34. An antibody specifically immunoreactive with an immunogen, wherein said immunogen is a translation product of a gene coding for an F-box and leucine-rich repeat protein, or a fragment, or derivative, or variant thereof.
35. Use of an antibody of claim 34 for detecting the pathological state of a cell in a sample from a subject, comprising immunocytochemical staining of said cell with said antibody, wherein an altered degree of staining, or an altered staining pattern in said cell compared to a cell representing a known health status indicates a pathological state of said cell.

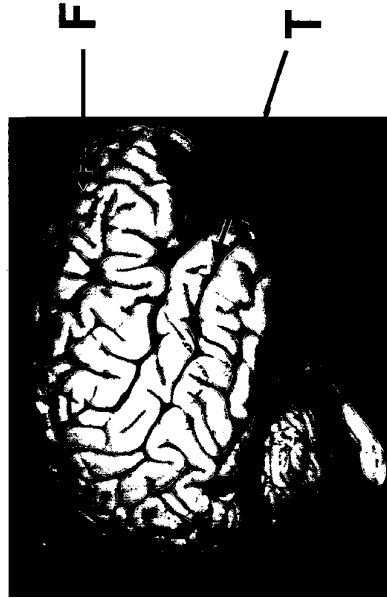
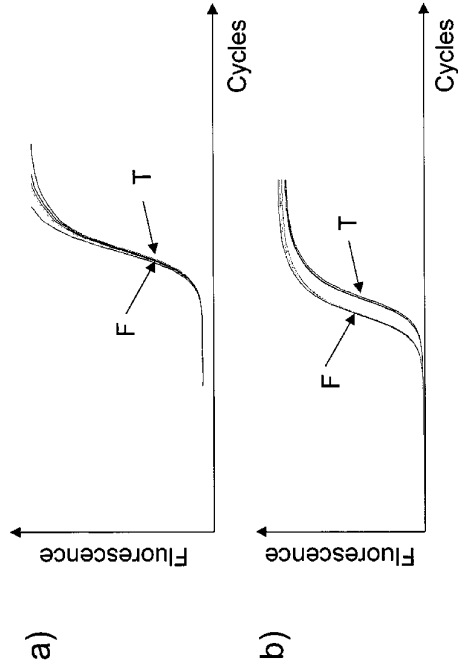


Fig. 1: Identification of genes involved in Alzheimer's Disease pathology

Fig. 2: Verification of Differential Expression of FBL2 by Quantitative RT-PCR



WO 03/023405

PCT/EP02/10057

- 3 / 3 -**Table 1:**

SAMPLE	Δ (fold)
patient 1 (#16)	1.98
patient 2 (#10)	5.44
patient 3 (#11)	2.23
patient 4 (#14)	1.84
control 1 (#10)	0.97
control 2 (#11)	0.94
control 3 (# 5)	1.45
control 4 (# 4)	0.67

【手続補正書】

【提出日】平成15年8月27日(2003.8.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験者における神経変性病の診断もしくは予見方法、または、被験者が前記病気の発症の高い危険にさらされているかを決定する方法であって、前記被験者からの試料中の

- (i) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の転写産物、および/または、
- (ii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、
- (iii) 前記転写もしくは翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベルおよび/または活性を決定し、既知の病気または健康な状態を表す対照値と前記レベルおよび/または前記活性を比較し、それにより、前記被験者における前記神経変性病を診断もしくは予見するか、または、前記被験者が、前記神経変性病の発症の高い危険にさらされているかを決定することを含む、前記方法。

【請求項2】

被験者における神経変性病の進行のモニター方法であって、前記被験者からの試料中の

- (i) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の転写産物、および/または、
- (ii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、
- (iii) 前記転写もしくは翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベルおよび/または活性を決定し、既知の病気または健康な状態を表す対照値と前記レベルおよび/または前記活性を比較し、それにより、前記被験者における前記神経変性病の進行をモニターすることを含む、前記方法。

【請求項3】

神経変性病の治療の評価方法であって、前記病気を治療される被験者からの試料中の

- (i) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の転写産物、および/または、
- (ii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、
- (iii) 前記転写もしくは翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベルおよび/または活性を決定し、既知の病気または健康な状態を表す対照値と前記レベルおよび/または前記活性を比較し、それにより、前記神経変性病のための前記治療を評価することを含む、前記方法。

【請求項4】

前記神経変性病がアルツハイマー病である、請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】

前記試料は、細胞、または組織、または体液、特に脳脊髄液を含む、請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】

前記対照値は、前記神経変性病を患っていない被験者からの試料中の

- (i) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の転写産物、および/または、
- (ii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、
- (iii) 前記転写もしくは翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベルおよび/または活性のものである、請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

前記被験者からの試料細胞、または組織、または体液、特に脳脊髄液中の F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の転写産物、および/または、 F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、それらのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体の、既知の健康な状態を表す対照値に対するレベルおよび/また

は活性の変化が、前記被験者における診断、または予後、またはアルツハイマー病の高い危険性を示す、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

所定期間、前記被験者から採取した一連の試料中の

(i) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の転写産物、および / または、
(ii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の翻訳産物、および / または、
(iii) 前記転写もしくは翻訳産物のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベルおよび / または活性を比較することを更に含む、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

前記被験者が、1 つ以上の前記試料採取前に治療を受ける、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記レベルおよび / または活性が、前記被験者の前記治療前後に決定される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

被験者における神経変性病、特にアルツハイマー病を診断もしくは予見するための、または、被験者がそのような病気を発症する傾向もしくは素因を決定するためのキットであって、前記キットは、

(a) (i) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の転写産物を選択的に検出する試薬、および、(ii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の翻訳産物を選択的に検出する試薬、からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの試薬 ; ならびに

(b) (i) 前記被験者からの試料中の F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の前記転写産物および / または前記翻訳産物のレベル、または活性、または前記レベルと前記活性の両方を検出すること ; および、(ii) 神経変性病、特にアルツハイマー病を診断もしくは予見すること、または、前記被験者がそのような病気を発症する傾向もしくは素因を決定すること、により、神経変性病、特にアルツハイマー病を、診断もしくは予見するための、または、被験者がそのような病気を発症する傾向もしくは素因を決定するための説明書、

を含み、

既知の健康な状態を表す対照値と比べて、前記転写産物および / もしくは前記翻訳産物のレベル、もしくは活性、もしくは前記レベルと前記活性の両方が変化すること ; または、前記転写産物および / もしくは前記翻訳産物のレベル、もしくは活性、もしくは前記レベルと前記活性の両方が、既知の病気の状態を表す対照値と類似もしくは同一であることが、神経変性病、特にアルツハイマー病の診断もしくは予後、または、そのような病気の発症の傾向もしくは素因の増加を示す、前記キット。

【請求項 12】

被験者における神経変性病、特にアルツハイマー病の治療または予防方法であって、(i) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子、および / または、(ii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の転写産物、および / または、(iii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の翻訳産物、および / または (iv) (i) ~ (iii) のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体の活性および / またはレベルに、直接的または間接的に影響を及ぼす薬剤 (類) を、治療または予防に効果的な量で、前記被験者へ投与することを含む、前記方法。

【請求項 13】

(i) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子、および / または、(ii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の転写産物、および / または、(iii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の翻訳産物、および / または、(iv) (i) ~ (iii) のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの物質の活性および / またはレベルのモジュレーター。

【請求項 14】

請求項 13 に記載のモジュレーターを含む薬学的組成物。

【請求項 15】

薬学的組成物における使用のための、(i) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子、および/または、(ii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の転写産物、および/または、(iii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、(iv) (i) ~ (iii) のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの物質の活性および/またはレベルのモジュレーター。

【請求項 16】

神経変性病、特にアルツハイマー病の治療または予防のための薬剤の調製のための、(i) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子、および/または、(ii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の転写産物、および/または、(iii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、(iv) (i) ~ (iii) のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの物質の活性および/またはレベルのモジュレーターの使用。

【請求項 17】

1 つ以上の容器中に、治療または予防に効果的な量の請求項 14 に記載の薬学的組成物を含むキット。

【請求項 18】

F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする外来遺伝子配列、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体を含む組み換え型非ヒト動物であって、

(i) 前記遺伝子配列および選択可能なマーカー配列を含む遺伝子標的構成体の提供、ならびに、

(ii) 前記標的構成体の非ヒト動物の幹細胞への導入、ならびに、

(iii) 前記非ヒト動物幹細胞の非ヒト胚への導入、ならびに、

(iv) 前記胚の偽妊娠非ヒト動物への移植、ならびに、

(v) 前記胚を所定期間成長させること、ならびに、

(vi) そのゲノムが両対立遺伝子中に前記遺伝子配列の一次変異を含む非ヒト遺伝子組み換え動物の同定、ならびに、

(vii) 段階 (vi) の非ヒト遺伝子組み換え動物を飼育し、そのゲノムが前記内因性遺伝子の一次変異を含む非ヒト遺伝子組み換え動物を得ること（但し、前記分裂により、神経変性病または関連する病気もしくは機能障害の症状の発症の素因を示す前記非ヒト動物が得られる）、

によって得ることができる、前記動物。

【請求項 19】

神経変性病、特にアルツハイマー病を調査するための動物モデルとしての請求項 18 に記載の組み換え型非ヒト動物の使用。

【請求項 20】

(i) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子、および/または、

(ii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の転写産物、および/または、

(iii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、

(iv) (i) ~ (iii) のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体

からなる群から選ばれる 1 つ以上の物質の、神経変性病、特にアルツハイマー病、または関連する病気もしくは機能障害のモジュレーターをスクリーニングするためのアッセイであって、前記方法は、

(a) 細胞を試験化合物と接触させること；

(b) (i) ~ (iv) に列挙した 1 つ以上の物質の活性および/またはレベルを測定すること；

(c) 前記試験化合物と接触させない対照細胞中の (i) ~ (iv) に列挙した 1 つ以上の物質の活性および/またはレベルを測定すること；ならびに、

(d) 段階 (b) および (c) の細胞中の物質のレベルおよび/または活性を比較すること、を含み、接触させた細胞中の物質の活性および/またはレベルの変化が、試験化合物が、

前記病気または機能障害のモジュレーターであることを示す、前記アッセイ。

【請求項 2 1】

- (i) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子、および/または、
(ii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の転写産物、および/または、
(iii) F - ボックス蛋白質 F B L 2 をコードする遺伝子の翻訳産物、および/または、
(iv)(i) ~ (iii) のフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体
からなる群から選ばれる 1 つ以上の物質の、神経変性病、特にアルツハイマー病、または
関連する病気もしくは機能障害のモジュレーターのためのスクリーニング方法であって、
前記方法は、
(a)(i) ~ (iv) に列挙した物質に関して、神経変性病または関連する病気もしくは機能障害
の症状の発症の素因をあらかじめ与えられるか、または既にそれら症状が発症した試験動
物に試験化合物を投与すること；
(b)(i) ~ (iv) に列挙した 1 つ以上の物質の活性および/またはレベルを測定すること；
(c)(i) ~ (iv) に列挙した物質に関して、神経変性病または関連する病気もしくは機能障害
の症状の発症の素因をあらかじめ与えられるか、または既にそれら症状を発症し、かつ、
そのような試験化合物が投与されなかった、対応する対照動物における、(i) ~ (iv) に列
挙した 1 つ以上の物質の活性および/またはレベルを測定すること；
(d) 段階 (b) および (c) の動物中の物質の活性および/またはレベルを比較すること、を含
み、試験動物中の物質の活性および/またはレベルの変化が、試験化合物が前記病気また
は機能障害のモジュレーターであることを示す、前記方法。

【請求項 2 2】

前記試験動物および/または前記対照動物は、未変性遺伝子転写制御要素ではない転写制
御要素の制御下で、F - ボックス蛋白質 F B L 2、またはそのフラグメント、もしくは誘
導体、もしくは変異体を発現する組み換え型動物である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

F - ボックス蛋白質 F B L 2、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異
体とリガンドとの間の結合を阻害するための化合物を試験する、好ましくは複数の化合物
をスクリーニングする方法であって、

- (i) 前記 F - ボックス蛋白質 F B L 2、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もし
くは変異体の液体懸濁物を、複数の容器に添加する段階；
(ii) 前記結合の阻害をスクリーニングされるべき化合物、好ましくは複数の化合物を、前
記複数の容器に添加する段階；
(iii) 検出可能なリガンド、特に蛍光によって検出可能なリガンドを、前記容器に添加す
る段階；
(iv) 前記 F - ボックス蛋白質 F B L 2、またはその前記フラグメント、もしくは誘導体
、もしくは変異体の液体懸濁物、および前記化合物、好ましくは前記複数の化合物、およ
び前記リガンドをインキュベートする段階；
(v) 前記 F - ボックス蛋白質 F B L 2、またはその前記フラグメント、もしくは誘導体、
もしくは変異体に関連する検出可能なリガンドまたは蛍光の量を測定する段階；ならびに
、
(vi) 前記 F - ボックス蛋白質 F B L 2、またはその前記フラグメント、もしくは誘導体、
もしくは変異体への前記リガンドの結合の、1 つ以上の前記化合物による阻害の程度を決
定する段階
を含む、前記方法。

【請求項 2 4】

化合物を試験して、好ましくは複数の化合物をスクリーニングして、前記化合物(類)と
F - ボックス蛋白質 F B L 2、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異
体との結合の程度を決定する方法であって、

- (i) 前記 F - ボックス蛋白質 F B L 2、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もし
くは変異体の液体懸濁物を、複数の容器に添加する段階；

(ii)前記結合をスクリーニングされるべき、検出可能な化合物、好ましくは複数の検出可能な化合物、特に蛍光によって検出可能な化合物を、前記複数の容器に添加する段階；
(iii)前記F - ボックス蛋白質F B L 2、またはその前記フラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体の液体懸濁物、および前記化合物、好ましくは前記複数の化合物をインキュベートする段階；
(iv)前記F - ボックス蛋白質F B L 2、またはその前記フラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体に関連する検出可能な化合物または蛍光の量を測定する段階；ならびに、
(v)前記F - ボックス蛋白質F B L 2、またはその前記フラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体との、1つ以上の前記化合物による結合の程度を決定する段階を含む、前記方法。

【請求項25】

(i)請求項20～22のいずれかに記載の方法によって、神経変性病、特にアルツハイマー病のモジュレーターを同定する段階、および、(ii)そのモジュレーターを薬学的担体と混合する段階、を含む薬剤の製造方法。

【請求項26】

請求項23に記載の方法によって、F - ボックス蛋白質F B L 2とリガンドとの間の結合の阻害剤として化合物を同定する段階、および、(ii)その化合物を薬学的担体と混合する段階、を含む薬剤の製造方法。

【請求項27】

(i)請求項24に記載の方法によって、F - ボックス蛋白質F B L 2への結合剤として化合物を同定する段階、および、(ii)その化合物を薬学的担体と混合する段階、を含む薬剤の製造方法。

【請求項28】

請求項25～27に記載の方法のいずれかによって得られ得る薬剤。

【請求項29】

請求項25～27に記載の方法のいずれかによって得られる薬剤。

【請求項30】

神経変性病、好ましくはアルツハイマー病を検出するための診断用ターゲットとしての使用のための、F - ボックス蛋白質F B L 2をコードする遺伝子の翻訳産物、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体である蛋白質分子。

【請求項31】

神経変性病、好ましくはアルツハイマー病を予防、または治療、または改善する試薬または化合物のためのスクリーニングターゲットとしての使用のための、F - ボックス蛋白質F B L 2をコードする遺伝子の翻訳産物、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体である蛋白質分子。

【請求項32】

F - ボックス蛋白質F B L 2をコードする遺伝子の翻訳産物、またはそのフラグメント、もしくは誘導体、もしくは変異体である免疫原に対し特異的に免疫反応性である抗体。

【請求項33】

被験者からの試料中の細胞の病理的状態の検出のための請求項32に記載の抗体の使用であって、前記抗体による前記細胞の免疫細胞化学的染色を含み、既知の健康な状態を表す細胞と比較した、前記細胞における染色度の変化または染色パターンの変化が、前記細胞の病理的状態を示す、前記使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/10057
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 12679 A (UNIV NEW YORK) 9 March 2000 (2000-03-09) cited in the application claims ---	32-35
X	WINSTON J T ET AL: "A FAMILY OF MAMMALIAN F-BOX PROTEINS" CURRENT BIOLOGY, CURRENT SCIENCE, GB, vol. 9, 1999, pages 1180-1182, XP000960309 ISSN: 0960-9822 cited in the application figure 1 --- -/--	32-35
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation of other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 November 2002		05/12/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2016		Authorized officer Vadot-Van Geldre, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/10057

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 00 75328 A (GURNEY MARK E ;UPJOHN CO (US); LI JINHE (US); PAULEY ADELE M (US)) 14 December 2000 (2000-12-14) page 2, line 22-28 page 9, line 3-6 page 16, paragraphs 6-32 page 18, line 6-26 page 22, line 1-5 page 24, line 7-9 page 28, line 29 -page 29, line 18 page 30, line 1-31 page 33, line 29 -page 34, line 4; claims 34-50; examples ---</p>	1-35
A	<p>HOFMANN K ET AL: "A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems" TIBS TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, ELSEVIER PUBLICATION, CAMBRIDGE, EN, vol. 26, no. 6, 1 June 2001 (2001-06-01), pages 347-350, XP004245047 ISSN: 0968-0004 page 348, column 3 -----</p>	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 02/10057
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: — because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: — because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: — because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 02 10057

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 13 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Continuation of Box I.2

Present claims 14-31, cover all modulators and pharmaceutical compositions thereof and their use, screening assays for modulators using cell-lines or recombinant animals defined by reference to a desirable characteristic or property, namely having an interaction with F-box genes, translation or transcription products thereof, whereas the provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for a no such compounds and a very limited amount of methods. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound and method by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the methods for diagnosis of Alzheimer disease via analysis of F-box protein/gene/mRNA expression/activity, such as described in the examples and related methods.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 02/10057

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0012679	A	09-03-2000	AU 5586999 A 21-03-2000
			CA 2341064 A1 09-03-2000
			EP 1108008 A1 20-06-2001
			WO 0012679 A1 09-03-2000

WO 0075328	A	14-12-2000	AU 5586500 A 28-12-2000
			EP 1192251 A1 03-04-2002
			WO 0075328 A1 14-12-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/48	G 0 1 N 33/48	P
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	Y
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(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,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,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,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ヒッペフェル ライナー

ドイツ連邦共和国 6 9 1 2 6 ハイデルベルク アルベルト フレンケル シュトラッセ 6

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 BA14 BB03 BB20 BB24 CB17 DA12 DA13 DA14
 DA36 DA37 DA77
 4B024 AA01 AA11 BA61 BA80 CA02 CA04 CA11 GA01 GA11 HA08
 4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QQ79 QR08 QR32 QR42
 QR55 QR62 QR66 QR72 QR77 QS25 QS28 QS34 QS36 QS39
 4B064 AG26 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13
 4C084 AA17 NA14 ZA161 ZA162
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA09 CA40 CA45 DA75 EA21 EA50 FA74

专利名称(译)	F-box蛋白在阿尔茨海默病和相关神经退行性疾病中的诊断和治疗用途		
公开(公告)号	JP2005502368A	公开(公告)日	2005-01-27
申请号	JP2003527425	申请日	2002-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	埃沃技术神经科学顺GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tsungu		
申请(专利权)人(译)	埃沃技术神经科学顺GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	フォンデルカンマーハインツ ポールナーヨハーネス ヒツペフェルライナー		
发明人	フォン デル カンマー ハイנטツ ポールナー ヨハーネス ヒツペフェル ライナー		
IPC分类号	A01K67/027 A61K45/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2800/28 G01N2800/2821		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A A01K67/027 A61K45/00 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/15.Z G01N33/48.P G01N33/50.Z G01N33/53.Y C12N15/00.A C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/BA14 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA77 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B064/AG26 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA161 4C084/ZA162 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/CA45 4H045/DA75 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2001121442 2001-09-07 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了在阿尔茨海默氏病患者的特定脑区中编码富含F-富含亮氨酸的重复蛋白FBL2的基因的差异表达。基于这一发现，本发明提供了一种确定受试者中的预见的阿尔茨海默病的诊断或方法的方法，或受试者处于高发阿尔茨海默病的风险。此外，本发明提供了使用编码富含F-富含亮氨酸的重复蛋白，特别是FBL2的基因来治疗或预防阿尔茨海默病和相关神经变性疾病的治疗和预防方法。还公开了筛选神经变性疾病的调节剂的方法。

