

(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2013-500741
(P2013-500741A)

(43) 公表日 平成25年1月10日(2013.1.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	4 B O 2 4
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	4 B O 6 5
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68	4 C O 8 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 H O 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-523606 (P2012-523606)
 (86) (22) 出願日 平成22年8月5日 (2010.8.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成24年4月4日 (2012.4.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/002173
 (87) 国際公開番号 W02011/016861
 (87) 国際公開日 平成23年2月10日 (2011.2.10)
 (31) 優先権主張番号 61/231,462
 (32) 優先日 平成21年8月5日 (2009.8.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

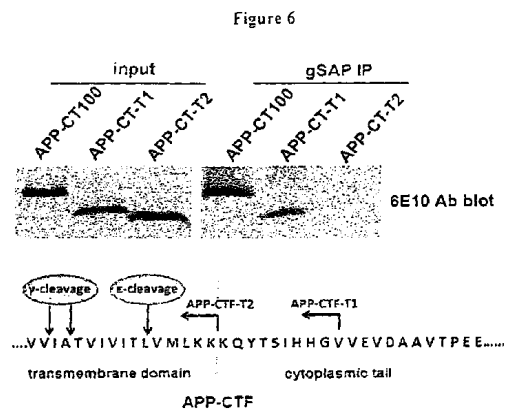
(71) 出願人 507401225
 イントラセラー・セラピーズ・インコーポレイテッド
 I N T R A - C E L L U L A R T H E R A P I E S , I N C .
 アメリカ合衆国10032ニューヨーク州
 ニューヨーク、ブロードウェイ3960番
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (74) 代理人 100127638
 弁理士 志賀 美苗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規調節タンパク質および阻害剤

(57) 【要約】

本発明は、 γ -セクレターゼを活性化し、 β -アミロイドタンパク質 (A β) を生産する、以前に特徴付けられていないタンパク質 (ガンマセクレターゼを活性化するタンパク質または g S A P) を提供する。A β の沈着は、アルツハイマー病および他の病理と関連している。したがって、本発明は、例えば、該新規タンパク質のスクリーニング方法および新規研究手段、阻害剤、ならびにアルツハイマー病および A β の沈着と関連する他の神経変性状態の診断、処置およびコントロールの方法をさらに提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1. a. 図 1 に記載されている配列から選択される配列と少なくとも 60% 類似するペプチド（類似性は B L A S T アルゴリズムにより測定される）、
 b. 図 1 において太字の保存された残基に対応する残基を有するペプチド、
 c. 配列番号 7 (L W D H P M S S N I I S R) および / または配列番号 8 (N H V T R L L Q N Y K K) の配列を含むペプチド、
 d. 図 1 に記載されている配列番号 1 - 6 のいずれかのペプチド、
 e. 任意の哺乳動物種、例えば、マウス、ラットまたはサル由来の g S A P、
 f. ガンマセクレターゼとの複合体を形成することができる g S A P のフラグメント、
 g. 図 1 に記載されている配列番号 1 - 6 のいずれかの C - 末端由来の約 16 k D a のフラグメント
 から選択される g S A P ペプチドであって、天然環境から単離または分離されているペプチド。

10

【請求項 2】

例えば、細菌細胞、バキュロウイルスまたは哺乳動物細胞から選択される組換え細胞により生産される、請求項 1 に記載の g S A P ペプチド。

【請求項 3】

異種プロモーターに作動可能に連結した g S A P ペプチドに対する遺伝子を含むベクター。

20

【請求項 4】

請求項 1 に記載の g S A P ペプチドを発現する異種遺伝子を含むトランスジェニック細胞。

【請求項 5】

哺乳動物細胞における g S A P 発現を阻害することができる R N A 構築物であるか、または該構築物を発現する核酸。

【請求項 6】

g S A P に対する抗体。

【請求項 7】

g S A P の免疫原性フラグメントを適当なアジュバントおよび / または担体と共に含むワクチン。

30

【請求項 8】

g S A P に対する遺伝子が破壊されている、非ヒト g S A P ノックアウト哺乳動物。

【請求項 9】

A 沈着を阻害する化合物を同定するためのアッセイにおける、請求項 1 に記載の g S A P ペプチドの使用。

【請求項 10】

g S A P ペプチドへの試験化合物の結合を測定することを含む、A 沈着を阻害する化合物を同定する方法。

【請求項 11】

イマチニブのメチルピペリジニル部分が標識基で置換または修飾されている、イマチニブの誘導体。

40

【請求項 12】

光標識された誘導体、放射性標識された誘導体およびビオチン化された誘導体から選択される、請求項 11 に記載の誘導体。

【請求項 13】

対照集団を使用して同定された正常値と比較して g S A P における発現レベルおよび / または変異の増加を調べることを含む、アルツハイマー病を発症する危険性がある個体を同定する方法。

【請求項 14】

50

阻害を必要とする温血動物における異常タンパク質凝集体の蓄積を阻害するための方法であって、g S A P 活性を阻害するための有効量の化合物を該動物に投与することを含む方法。

【請求項 15】

有効量の g S A P 活性を阻害するための化合物を投与することを含む、アルツハイマー病、進行性核上まひ、ダウン症候群、記憶および認知障害、認知症、アミロイドニューロパシー、脳の炎症、神経および脳外傷、血管アミロイドーシス、アミロイドーシス (amyloidosis) での脳出血、パーキンソン病、ハンチントン病、プリオン病ならびに / または t a u またはアミロイドタンパク質、例えば、A β の異常発現または蓄積と関連する血管、神経学のおよび / もしくは神経変性障害を処置する方法。

10

【請求項 16】

g S A P 活性を阻害するための化合物が、小分子、阻害性 R N A 分子、阻害性 R N A 分子を生産するベクターおよび細胞、g S A P に対する抗体ならびに g S A P に対するワクチンから選択される、請求項 14 または 15 に記載の方法。

【請求項 17】

標識されている請求項 1 に記載の g S A P ペプチド。

【請求項 18】

疾患介入に対する別の標的として機能することができる g S A P 高分子複合体中のさらなるタンパク質を同定するための生化学的または遺伝学的スクリーニングシステムにおける g S A P 誘導体の使用。

20

【請求項 19】

g S A P に対する抗体または g S A P 発現のための定量 P C R を使用して、g S A P 発現を測定することを含む、g S A P 標的療法での処置のための候補を同定する方法であって、発現の増加が g S A P 標的療法での処置のための候補において見られる方法。

【請求項 20】

g S A P または g S A P 発現または g S A P 活性に影響する変異または遺伝的変異を有する患者を同定することを含む、g S A P 標的療法での処置のための候補を同定する方法であって、このような変異またはハプロタイプを有する患者が g S A P 標的療法での処置のための候補である方法。

【請求項 21】

変異体が以下の群の S N P から選択されるハプロタイプである、請求項 20 に記載の方法：

30

- a) r s 6 9 7 6 5 6 7 | r s 1 4 6 8 6 8 2 | r s 1 8 1 9 8 1 4 、
 b) r s 1 4 6 8 6 8 2 | r s 1 8 1 9 8 1 4 | r s 4 7 2 9 5 3 5 、
 c) r s 1 8 1 9 8 1 4 | r s 4 7 2 9 5 3 5 | r s 4 7 2 9 5 4 0 、
 d) r s 7 7 8 1 6 4 2 | r s 6 9 5 5 5 0 3 | r s 7 7 7 6 9 7 3 。

【請求項 22】

変異体が A P P - C T F の膜近傍領域をコードする配列の変異体である、請求項 20 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

技術分野

本分野は、 - セクレターゼを活性化し、 - アミロイドタンパク質 (A β) を生産する、以前に特徴付けられていないタンパク質に関する。A β の沈着は、アルツハイマー病および他の病理と関連している。本発明は、例えば、該新規タンパク質のスクリーニング方法および新規研究手段、阻害剤、ならびにアルツハイマー病および A β の沈着と関連する他の神経変性状態の処置およびコントロールの方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

50

発明の背景

現在、世界中で1200万を越える人々がアルツハイマー病(AD)に罹患している。この数は、次の40年後に4倍になると予測されている。そのため、ADの処置は、満たされていない大きな医薬的要求の典型である。ADを処置するための現在承認されている医薬は、症状の改善を助け得るが、疾患の進行を停止するために有効ではない。

【0003】

特定の理論に束縛されることなく、アルツハイマー病(「AD」)の病理には、アミロイド-β(「Aβ」)が関与しており、これは、β-アミロイド前駆体タンパク質(アルツハイマー病関連前駆体タンパク質または「APP」)の代謝物であり、ADの主要な病理学的決定因子であると考えられている。これらのペプチドは、主に、40または42個のアミノ酸形態で存在し、それぞれAβ₁₋₄₀(「Aβ₄₀」)またはAβ₁₋₄₂(「Aβ₄₂」)である。Aβ₄₀およびAβ₄₂は、β-セクレターゼによる開裂の後でAPPのC末端近くで起こる2つの酵素的開裂によって産生される。開裂に関与する酵素であるβ-セクレターゼおよびγ-セクレターゼは、それぞれAβのN末端およびC末端を生じる。AβのN末端は、APPのメチオニン残基596とアスパラギン酸残基597の間のβ-セクレターゼ開裂によって形成される(番号は、APP695アイソフォームに基づく)。β-セクレターゼは、このβ-セクレターゼ開裂産物のC末端を、種々の位置、38残基、40残基または42残基で開裂し、Aβペプチドを放出する。第3の酵素であるγ-セクレターゼは、APPおよびAPP開裂部位間で前駆体タンパク質を開裂し、Aβ₄₀生産を排除し、非病理学的であるP3として知られる約3kDaのペプチドを放出する。β-セクレターゼおよびγ-セクレターゼ開裂の両方は、また、それぞれsAPPおよびsAPPとして知られる、APPの可溶性の分泌される末端フラグメントをもたらす。sAPPフラグメントは、神経保護性であることが示唆されている。例えば、β-セクレターゼは、また、Notch-1タンパク質を開裂し、他の基質を有することが考えられている。直接作用するガンマ-セクレターゼ阻害剤は、Notch開裂を必要とする発達経路における効果による実質的な、および望ましくない副作用を有する。乱雑な可能性のある酵素における基質特異性を与える分子メカニズムについては、あまり知られていない。ガンマセクレターゼ酵素は、4つのサブユニット：プレセニン、ニカストリン、前部咽頭欠損1 (anterior pharynx - defective 1) (APH-1)、およびプレセニンエンハンサー2 (PEN-2)を含むことが知られている。

10

20

30

40

50

【0004】

正常個体において、Aβペプチドは、それぞれ異なるCOOH-末端を有する2つの優性型である多数のAβ₁₋₄₀(Aβ₁₋₄₀としても知られている)形態および少数のAβ₁₋₄₂(Aβ₁₋₄₂としても知られている)形態において見られる。ADの主な組織学的病変は、冒された脳領域において起こる老人斑および神経原線維のもつれである。老人斑は、Aβペプチド、主にAβ₄₀およびAβ₄₂からなる。健常なニューロンはAβ₄₂と比較して少なくとも10倍以上のAβ₄₀を生産するが、プラークは高い割合であまり可溶性でないAβ₄₂を含む。家族性アルツハイマー病の最も一般的な形態を有する患者は、Aβ₄₂形態の量において増加を示す。Aβ₄₀形態は、アミロイドプラークの早期沈着と関連しない。対照的に、Aβ₄₂形態は実質性プラークにおいて早期に、および主に蓄積し、Aβ₄₂が家族性アルツハイマー病患者におけるアミロイドプラーク沈着において主な役割を果たすという強力な証拠がある。神経原線維のもつれは、凝集されたtauタンパク質からなり、AD病理学的におけるそれらの役割はあまり明白でない。AD症状は、プラークよりもむしろ全ての脳のAβと非常に密接に相関している。AD事象の約10%は、APPまたはプレセニン1およびプレセニン2遺伝子のいずれかにおける変異の常染色体優性遺伝に起因する。両方の場合において、全Aβ₄₀またはAβ₄₂対Aβ₄₀の生産の増加をもたらす。

【0005】

N2a細胞系は、ADにおける神経変性に関連するAβ₄₂生産のモデル系として、広範囲に試験されている。N2a細胞におけるAβ₄₂の生産を測定するアッセイは既知であり、A

生産活性は、例えば、A E L I S A アッセイおよび/またはウェスタンブロット法により評価される。G l e e v e c (イマチニブ、S T I 5 7 1) のような化合物を含む種々の薬剤は、10 μM 以下の薬物濃度で、N 2 a 細胞系におけるA レベルを低下させることができることが以前に示されている。

【0006】

国際特許公報W O 0 3 / 0 5 7 1 6 5 は、以前に既知のチロシンキナーゼ阻害剤、例えば、イマチニブが、A の生産および蓄積を阻害するために有用であることを記載している。Netzerら Proc Natl Acad Sci., 100 (21) : 12444 - 9 (2003) は、イマチニブがN o t c h - 1 の - セクレターゼ開裂に影響せず、神経に対して許容されない毒性を有さずA の生産を阻害することが示した。しかしながら、イマチニブは、血液脳関門をあまり透過せず、他の生物学的効果を有するため、A Dを処置するための理想的な薬物ではない。A の生産および蓄積の阻害のためのイマチニブの特異的な標的は明確にされておらず、したがって、改善された誘導体の発見という課題を示す。

10

【発明の概要】

【0007】

発明の概要

本発明者らは、- セクレターゼおよびその基質であるアミロイド前駆体タンパク質のC - 末端フラグメント (A P P - C T F) の両方との相互作用に關与するメカニズムを介してA 生産を選択的に調節する、新規の- セクレターゼを活性化するタンパク質 (g S A P) を見出した。g S A P はN o t c h と相互作用せず、- セクレターゼによる開裂に影響しない。組換えg S A P は、インビトロおよび無傷の細胞でA 生産を刺激する。細胞系におけるg S A P の減少はA レベルを減少させる。アルツハイマー病のマウスモデルにおけるg S A P のノックダウンは、A のレベルおよびプラーク発生を減少させる。g S A P は、g S A P の阻害がA 形成における有意な減少をもたらすため、アルツハイマー病および他のA 介在状態の処置のための新規治療標的を示す。

20

【0008】

出願人は、g S A P を阻害し、したがってA の減少を引き起こすが、いくつかのガンマ - セクレターゼ阻害剤の使用で起こりうる副作用であるN O T C H 代謝に影響しない化合物を合成した。

【0009】

したがって、本発明は、例えば、g S A P を選択的に阻害する能力を測定することを含むA の減少における潜在的な有用性に関する化合物をスクリーニングする方法、および有効量のg S A P を選択的に阻害する化合物を投与することを含む、A 介在状態、例えば、A Dを処置する方法を提供する。

30

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、種々の動物種、ヒト、イヌ、ウシ、マウス、ラットおよびニワトリ由来のg S A P に関する配列アラインメントを示す。太字の残基は6種にわたって同一である。イタリックの残基は保存的に置換されている。

【図2】図2は、異なる組織におけるg S A P の発現レベルを示す。3月齢の野生型B L / 6 マウス由来の組織を回収し、g S A P レベルをリアルタイムP C R を使用して定量する。アクチンおよびG A P D H の両方を内部コントロール (n = 6) として使用する。組織抽出物を分析前に同じタンパク質レベルに調節する。

40

【図3】図3は、A DマウスモデルにおいてA 生産およびプラーク発生を減少させるs h R N A によるg S A P の阻害を示す。

【図4】図4は、二重トランスジェニックA Dマウスにおけるアミロイドプラーク発生の減少におけるg S A P に対するA A V 2 を有するs h R N A の海馬内注射の効果を示す。

【図5】図5は、A P P 処理におけるg S A P 作用を示す。g S A P 、A P P および - セクレターゼの三重複合体 (上) は、- 開裂 (A - ベータ生産) の増加および - 開裂 (A I C D 生産) の減少と関連する。g S A P の非存在下 (下) で、A P P および -

50

セクレターゼの二元複合体は、 β -開裂の減少および α -開裂の増加と関連する。

【図6】図6は、APP-CTFの切断およびgSAPを介するgSAP抗体を使用する免疫沈降を示し、gSAPがAPP-CTFの膜近傍領域と相互作用することを証明する。APP-CTF-T1は、N-末端からHHGV⁶⁴にわたるAPP-CTFの短縮された形態である。APP-CTF-T2は、N-末端からVMLKK⁵⁵にわたるAPP-CTFの短縮された形態である。短縮された形態は、HEK293細胞において過剰発現し、gSAP抗体と免疫沈降する。6E10抗体を免疫検出のために使用する。

【発明を実施するための形態】

【0011】

10

詳細な説明

詳細な説明において提供される実施例および図面は単に説明であり、あらゆる特許請求の範囲の解釈または説明において特許請求の範囲を限定するために使用すべきでない。

【0012】

主にA β ペプチドから成る老人斑は、アルツハイマー病の特徴である。A β は、 β -セクレターゼによる開裂時にAPP-CTFから生じる。 β -セクレターゼは、また、多数の他のI型膜タンパク質（例えば、Notch）を開裂し、重要な細胞機能を有する細胞内ドメインの放出をもたらす。結果として、非選択的 β -セクレターゼ阻害剤は、それらの臨床的使用を妨げる有害な副作用を有し得る。本研究室は、イマチニブ（STI571、Gleevec（登録商標））がNotch開裂に影響することなく全ての種のA β の生産を阻害することができることを以前に証明した Netzerら Proc Natl Acad Sci., 100(21):12444-9（2003）。本発明者らは、今回、イマチニブのA β を低下させる活性が、本発明者らが β -セクレターゼを活性化するタンパク質（gSAP）と称する以前に知られていない因子との相互作用からもたらされることを決定した。

20

【0013】

イマチニブの選択的なA β を低下させる活性に関与する標的を同定するために、本発明者らは、イマチニブのビオチン化された誘導体である「ビオチン-イマチニブ」を合成した。プレセニン-1、PEN2およびニカストリンを含む可溶性 β -セクレターゼ成分は、固定化されたビオチン-イマチニブにより特異的に捕捉される。イマチニブが直接相互作用するタンパク質を同定するために、本発明者らは、光活性化可能なアジドイマチニブ誘導体であるG01を合成した。¹²⁵I-G01を膜調製物と共にインキュベートし、次に光分解したとき、 β -セクレターゼの4つの成分は標識されない。むしろ、¹²⁵I-G01は、よりゆっくり移動する18kDaのプレセニン-1-CTFと共免疫沈降する~16kDaのタンパク質を標識する。この結果は、細胞透過性³H-G01を使用して無傷の細胞を光標識することにより確認する。¹²⁵I-G01と同様に、³H-イマチニブ誘導体は4つの β -セクレターゼ成分のいずれとも結合せず、PS1と共免疫沈降した~16kDaのバンドを標識しない。

30

【0014】

可能性のある標的タンパク質を精製するために、固定化されたビオチン-イマチニブを可溶性膜調製物と共にインキュベートし、結合したタンパク質をSDS-PAGEにより分離する。銀染色後、~16kDaバンドを観察する。トリプシン消化後の該バンドから得られ、タンデム質量分析により分析されたペプチドフラグメントは、特徴付けられていないタンパク質であるハトホモログタンパク質（PION）（ヒト受入番号：NP_059135）のC-末端領域に対応した。該同定は、16kDaのフラグメントの約20%をカバーする2つのユニークな（unique）トリプシンペプチド（⁷⁶⁶LWDHPMSSNIISR⁷⁷⁸および⁷⁷⁹NHVTRL LQNYKK⁷⁹⁰）に基づいて行う。その配列、とりわけC-末端領域は、ニワトリからヒトまでの多様な種のなか高度に保存されている。発現パターン分析は、該遺伝子が種々の組織において発現されることを示す。本発明者らは、ガンマ-セクレターゼを活性化するタンパク質（gSAP）としてPIONを特徴付ける。

40

50

【0015】

その予測された配列に基づいて、ヒト g S A P の全オープンリーディングフレームは、854個のアミノ酸のタンパク質 (~98 k D a) をコードする。16 k D a のフラグメントが高分子量の前駆体から得ることができるか否かを決定するために、神経芽腫細胞中の内因性 g S A P の代謝をパルス・チェイス分析によりモニタリングする。該結果は、g S A P がホロ (holo) タンパク質 (~98 k D a) として合成され、~16 k D a の C - 末端フラグメント (g S A P - 16 K) に迅速にプロセッシングされることを示した。定常状態において、16 k D a のフラグメントは優性型である。神経芽腫細胞と光活性化可能な ³H - G 0 1 とのインキュベーション、次に抗 g S A P 抗体との免疫沈降によって、イマチニブが g S A P - 16 K に直接結合することを確認する。プレセニン1 / 2 (- / -) 胚幹細胞において、イマチニブはまた、g S A P にも結合し、g S A P へのその結合がプレセニンを必要としないことを示す。g S A P レベルが s i R N A を使用して減少するとき、ピオチン - イマチニブと関連する - セクレターゼの量は有意に減少する。これは、 - セクレターゼ複合体に対するイマチニブのアフィニティーが g S A P に依存することを示す。

10

【0016】

s i R N A を使用して、A P P 6 9 5 を過剰発現する神経芽腫細胞中の g S A P レベルが (72 ± 15 %) 減少されるとき、A のレベルは約50%減少する。イマチニブの添加は、A レベルに対してわずかな付加的な効果を有するか、または付加的な効果がない。A P P S w e d i s h 変異体を発現する H E K 2 9 3 細胞における S h R N A 介在 g S A P ノックダウン (65 ± 12 % まで) は、また、A 40 および A 42 レベルにおいてそれぞれ61%および48%の減少をもたらす。逆に、A P P S w e d i s h 変異体を発現する H E K 2 9 3 細胞における g S A P の過剰発現は、約38%のA 生産を刺激する；該増加はイマチニブ処理により無効にされる。全体として、これらの発見は、g S A P が、イマチニブおよび関連分子がA を低下させる間の分子であることを示す。

20

【0017】

イマチニブの1つの示差的特徴は、N o t c h 開裂に影響しないが、A 生産の選択的な阻害である (Netzer ら 2003)。N o t c h 開裂における g S A P の効果は、 - セクレターゼに対する N o t c h 基質である N o t c h E (細胞外ドメインを有さない N o t c h) を安定に発現する H E K 2 9 3 細胞を使用して評価する。N o t c h 細胞内ドメイン (N I C D) である - セクレターゼ開裂産物のレベルは、s h R N A を使用する g S A P レベルの減少、または g S A P の過剰発現のいずれかにより変化しない。したがって、g S A P は、N o t c h ではなく、A P P の - セクレターゼ開裂を調節する。

30

【0018】

g S A P が - セクレターゼ活性を調節することができるか否かをさらに試験するために、A 生産に対する精製された g S A P の効果を、インビトロでの - セクレターゼアッセイで試験する。大腸菌における発現後に単離される組換え g S A P - 16 K (全長ヒト g S A P の a a 733 - 854) を、過剰発現された A P P - - C T F を含む H E K 2 9 3 細胞由来の膜調製物に加えると、A 生産は 2 . 4 ± 0 . 3 倍に刺激される。これらのインビトロの結果は、g S A P が - セクレターゼ活性の直接的調節によりA 生産を刺激することを示す。

40

【0019】

内因性 g S A P が - セクレターゼとの複合体中にあり得るか否かを決定するために、本発明者らは、1%の C H A P S O に可溶化された神経芽腫細胞由来の膜タンパク質のゲル濾過分析を使用する。内因性 g S A P - 16 K および - セクレターゼは、高い分子量複合体として共遊走する。加えて、内因性 g S A P は、 - セクレターゼ成分と共免疫沈降し、これらのタンパク質が細胞中で複合体で存在するというさらなる証拠を提供する。これらの結果は、インビトロでの - セクレターゼ活性アッセイからの結果と共に、g S A P - 16 K が - セクレターゼとの複合体中にあり、プロテアーゼを活性化することができることを強く示唆する。

50

【0020】

- セクレターゼ活性の他のいくつかの調節因子とは対照的に、g S A Pは、N o t c hではなく、A P Pの開裂に選択的であり、影響する。- セクレターゼによる基質選択のメカニズムは不明なままであるが、広範な基質認識を有する多くの他のプロテアーゼおよびホスファターゼは、コア酵素を基質の一部へ結合する補助因子を介して特異性を達成することができる。g S A Pがこのような特異性を与え得るメカニズムを決定するために、本発明者らは、H E K 2 9 3細胞における特異的な基質へのその結合を分析する。g S A P - 1 6 Kは、N o t c h Eとではなく、A P P - C T Fと免疫沈降する。イマチニブ(10 μM)の添加は、g S A PおよびA P P - C T F間の相互作用を $47 \pm 14\%$ (n = 3)減少させる。N o t c hへではなく、A P P - C T Fへのg S A Pの結合は、A P P処理におけるg S A Pの選択的な効果を説明し得る。イマチニブによるこの相互作用の破壊は、そのA を低下させる活性を説明できる可能性がある。

10

【0021】

g S A PおよびA P P間の相互作用の部位は、A P P - C T Fの膜近傍領域における部位にあると決定される(図6)。A P P - C T Fは、膜貫通ドメインの中央で- セクレターゼにより開裂され、A を産生し(- 開裂)、サイトゾル膜境界付近で開裂され、A P P細胞内ドメイン(A I C D)を産生する(- 開裂)。A I C D生産におけるg S A Pの効果を、A P P 6 9 5を過剰発現するN 2 a細胞において試験する。g S A Pノックダウンおよびイマチニブ処理の両方は、A I C Dのレベルを増加させる(補助的な図7 a)。H E K 2 9 3細胞におけるg S A P過剰発現は、A I C D生産を減少させる(補助的な図7 b)。これらの結果は、g S A PがA P P - C T Fの および - 開裂を特異的に調節し、それぞれA およびA I C Dを形成することを示す。

20

【0022】

本発明者らの見出したことがA D病理と関連しているか否かを決定するために、可溶性A レベルおよびプラーク発生に対するg S A Pの効果をインビボで試験する。g S A Pノックダウンマウス系を、マウスのゲノム遺伝子座へのテトラサイクリン誘導g S A P s h R N Aベクターの組み込みにより産生する。誘導すると、マウスの脳におけるg S A Pのm R N Aレベルは~ 8 5 %減少する。インビボでのA レベルにおけるg S A Pの効果を評価するために、g S A P R N A iマウスを、A P P s w eおよびP S 1 9変異体を有するA Dマウスモデル(A D 2 xマウス)(Jankowskyら 2001)と交雑する。g S A P s h R N A誘導の1月後、交雑されたマウスにおけるA 4 0およびA 4 2レベルは、それぞれ~ 2 8 %および~ 3 2 %低下する。A D 2 xマウスにおけるプラーク発生に対するg S A Pの効果を評価するために、g S A P s h R N Aを有する組換えアデノ随伴ウイルス2(A A V 2)を脳の片側におけるプラーク発生の海馬に注射するが、対側部位にはs h R N Aを有さないA A V 2を与える。g S A Pノックダウンの同側部位におけるアミロイドプラーク発生は、1月後に、対側部位と比較して $26 \pm 8\%$ (p < 0 . 0 0 1、n = 4)抑制される。これらのデータは、g S A PがインビボでA 形成およびプラーク発生において重要な役割を果たすことを示す。

30

【0023】

要約すると、ガンマ-セクレターゼは、これらの開裂部位と低い相同性を有する種々の基質を処理する。発育中および組織ホメオスタシスにおける- セクレターゼの種々の役割には、その活性がしっかりと調節されている必要がある。最近の報告は、- セクレターゼによる開裂の選択性を修飾する生物学的分子の存在を示している。機能が以前に知られていない新規タンパク質であるg S A Pの発見、およびA 形成を選択的に刺激するその能力は、A Dおよび他のA 介在疾患、例えば、アルツハイマー病、進行性核上まひ、ダウン症候群、記憶および認知障害、認知症、アミロイドニューロパシー、脳の炎症、神経および脳外傷、血管アミロイドーシス、アミロイドーシス(amyloeioidosis)での脳出血、パーキンソン病、ハンチントン病、プリオン病ならびに/またはt a uまたはアミロイドタンパク質、例えば、A の異常発現または蓄積と関連する血管、神経学のおよび/もしくは神経変性障害に対処する薬物の開発のための新規戦略を可能にする。g S A Pの阻

40

50

害剤は、 γ -セクレターゼの他の重要な機能に影響することなく、アミロイド形成を選択的に防止するであろう。この展望のサポートにおいて、本発明者らは、広範に使用される抗癌剤であるイマチニブが、他の γ -セクレターゼ機能に影響することなく、A β を産生するための γ -セクレターゼのgSAP活性化を防止することによりA β を低下する効果をなし遂げることを証明する。gSAPの強力かつ直接的な薬理的阻害剤の発見は、アルツハイマー病の処置のための新規治療薬の開発を容易にするはずである。

【0024】

gSAPは、例えば、図1に記載されている、種々の動物種において存在することが見出され、高度に保存されている。gSAPペプチドは、以下のペプチドである。

a. BLASTアルゴリズム（例えば、<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>参照）を使用して、図1に記載されている配列から選択される配列と少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%、例えば、少なくとも80%、例えば、少なくとも90%類似しているペプチド

b. 図1において太字の保存された残基に対応する残基を有するペプチド、または

c. 配列番号7（LWDHPMSNIIIR）および/または配列番号8（NHVTRLQNYKK）の配列を含むペプチド、または

d. 図1に記載されている配列番号1-6のいずれかのペプチド、とりわけヒトgSAP、または

e. ガンマセクレターゼとの複合体を形成することができるgSAPのフラグメント、例えば、図1に記載されている配列番号1-6のいずれかのC-末端由来の約16kDaのフラグメント、とりわけヒトgSAP-16K。

【0025】

1つの局面において、本発明は、例えば、細菌、バキュロウイルスまたは哺乳動物細胞により生産される、天然環境から単離され、精製された上記定義のgSAPペプチド、例えば、トランスジェニックgSAPペプチドを提供する。

【0026】

別の局面において、本発明は、異種プロモーターに作動可能に連結したgSAPペプチドに対する遺伝子を含むベクターを提供する。

【0027】

別の局面において、本発明は、gSAPペプチドを発現する異種遺伝子を含む細胞を提供する。

【0028】

別の局面において、本発明は、哺乳動物細胞におけるgSAP発現を阻害することができる阻害性RNA構築物を提供する。

【0029】

別の局面において、本発明は、

a. 例えば、ガンマ-セクレターゼとの相互作用を阻害し、それによりA β 生産および蓄積を阻害または減少することができる、gSAPに対するモノクローナル抗体；

b. gSAPの免疫原性フラグメントを適当なアジュバントおよび/または担体と共に含むワクチン；および

c. 免疫原性担体に連結したgSAPの免疫原性フラグメントを含む免疫原性複合体を提供する。

【0030】

別の局面において、本発明は、gSAPに対する遺伝子が破壊されている、gSAPノックアウト哺乳動物、例えば、哺乳動物、例えば、マウスを提供する。

【0031】

別の局面において、本発明は、以下の1つ以上のことを含む、A β 沈着を阻害する化合物を同定するためのアッセイ、例えば、A β 沈着の阻害剤を同定する方法における、例えば上記定義の、gSAPペプチドの使用を提供する：

a. i. 例えば、競合的結合アッセイにおいて、

10

20

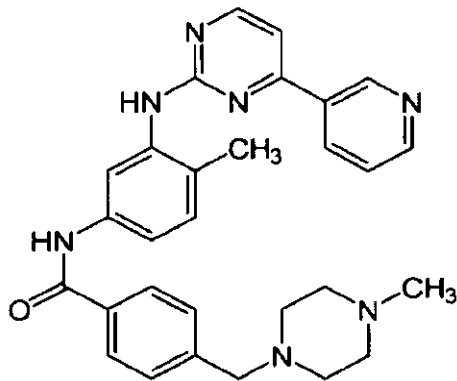
30

40

50

i i . 例えば、イマチニブ

【化 1】



10

の標識化された誘導体を使用して：

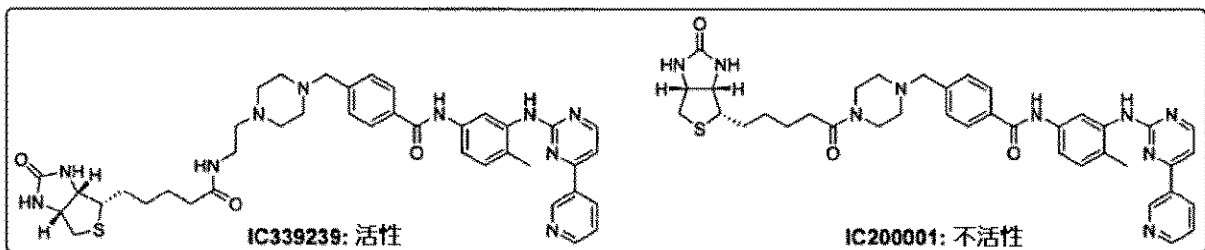
i i i . 例えば、メチルピペリジニル部分にて標識基による置換または標識基での修飾により標識化されている、

i v . 例えば、

- 1 . 光標識された誘導体、例えば、4 - アジド - 2 - ヒドロキシ - N - (4 - メチル - 3 - (4 - (ピリジン - 3 - イル) ピリミジン - 2 - イルアミノ) フェニル) ベンズアミド
- 2 . 放射性標識された誘導体、例えば、4 - アジド - 2 - ヒドロキシ - 5 - ¹²⁵ヨード - N - (4 - メチル - 3 - (4 - (ピリジン - 3 - イル) ピリミジン - 2 - イルアミノ) フェニル) ベンズアミドまたは ³H - イマチニブ、および
- 3 . 例えば、IC339239およびIC200001 (不活性な対照化合物)

20

【化 2】



30

から選択されるビオチン化された誘導体

から選択される、

例えば上記定義の、g S A P ペプチドへの試験化合物の結合を測定すること。

【0032】

したがって、本発明は、例えば上記定義の、イマチニブの標識化された誘導体をさらに提供する。

【0033】

本発明は、対照集団を使用して同定される正常値と比較して、向上したg S A Pにおける発現レベルおよび/または変異を調べることを含む、A Dを発症する危険性がある個体を同定する方法をさらに提供する。

40

【0034】

本発明のこの局面のさらなる特徴において、処置を必要とする温血動物、例えば、ヒトにおける異常タンパク質凝集体の蓄積に対する阻害効果を生産するための方法であって、有効量の式(I)の化合物またはその薬学的に許容される塩を該動物に投与することを含む方法を提供する。

【0035】

さらに、本発明の化合物は、とりわけ脳における異常タンパク質凝集体の蓄積により特

50

徴付けられる疾患、例えば、アルツハイマー病、進行性核上まひ、ダウン症候群、記憶および認知障害、認知症、アミロイドニューロパシー、脳の炎症、神経および脳外傷、血管アミロイドーシス、アミロイドーシスでの脳出血、パーキンソン病、ハンチントン病、プリオン病ならびに / または t a u またはアミロイドタンパク質、例えば、A の異常発現または蓄積と関連する血管、神経学のおよび / もしくは神経変性障害のような疾患の処置、コントロールおよび管理において有用である。このような異常タンパク質凝集体は、例えば、i) アミロイドブラークおよび神経原線維のもつれ、ならびに i i) t a u またはアミロイドタンパク質、例えば、A の沈殿物を含む。

【 0 0 3 6 】

したがって、本発明は、有効量の g S A P 活性を阻害する化合物を投与することを含む、アルツハイマー病、進行性核上まひ、ダウン症候群、記憶および認知障害、認知症、アミロイドニューロパシー、脳の炎症、神経および脳外傷、血管アミロイドーシス、アミロイドーシスでの脳出血、パーキンソン病、ハンチントン病、プリオン病ならびに / または t a u またはアミロイドタンパク質、例えば、A の異常発現または蓄積と関連する血管、神経学のおよび / もしくは神経変性障害の処置の方法を提供する。

【 0 0 3 7 】

g S A P 活性を阻害するために有用な化合物は、既知の小分子、例えば、
 a . 国際特許公報 W O 0 3 / 0 5 7 1 6 5 および米国特許第 5 , 5 2 1 , 1 8 4 号 (これらの内容を出典明示により本明細書に包含させる) において記載されているイマチニブおよび他の化合物、
 b . W O 0 5 / 0 7 2 8 2 6 ; J . Zimmermannら Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. , 7 (2) : 187 - 192 ; E P 1 5 3 3 3 0 4 ; W O 0 4 / 0 0 5 2 8 1 ; W O 0 5 / 0 3 9 5 8 6 ; 米国特許第 5 , 5 2 1 , 1 8 4 号 ; および W O 0 4 / 1 1 0 4 5 2 (これらの内容を出典明示により本明細書に包含させる) に記載されている化合物、および
 c . W O / 2 0 0 8 / 1 5 3 9 7 4 、 W O / 2 0 0 8 / 1 5 3 9 5 9 および W O / 2 0 0 8 / 0 5 7 5 9 9 (これらの内容を出典明示により本明細書に包含させる) において記載されている化合物を含む。

【 0 0 3 8 】

g S A P 活性を阻害するために有用な化合物は、また、本明細書に記載されている新規生物学的薬物、例えば、
 a . 例えば、g S A P に対する m R N A の一部に対応し、g S A P の転写または翻訳を阻害することができる二本鎖、ヘアピン、センスまたはアンチセンス R N A から選択される阻害性 R N A 分子 ; 例えば、
 i . センス配列、例えば、A U G C A G A G C U G G A C G A C A U U U およびアンチセンス配列、例えば、5 ' - P . A U G U C G U C C A G C U C U G C A U U U を含む s i R N A ; または
 i i . g S A P s h R N A コード配列、例えば、T C C C G G A A C T C C A T G A T T G A C A A A T T T C A A G A G A A T T T G T C A A T C A T G G A G T T C C T T T T T A または
 T G C T G T T G A C A G T G A G C G C G G A A A T A G A G T G G T G A T T A A A T A G T G A A G C C A C A G A T G T A T T T A A T C A C C A C T C T A T T T C C A T G C C T A C T G C C T C G G A により生産されるヘアピン転写産物 ;
 b . 阻害性 R N A 分子を生産するベクターおよび細胞、例えば、g S A P s h R N A を有する組換えアデノ随伴ウイルス 2 (A A V 2) ;
 c . g S A P に対する抗体、とりわけモノクローナル抗体、例えば、C - 末端領域からのフラグメント、例えば、1 6 K - g S A P に対する抗体、例えば、より完全に以下に記載されているペプチド C F E G H D N V D A E F V E E A A L K H T (複合体化のために結合された N - 末端システインを有するヒト g S A P の a a 8 2 9 - 8 4 8 に対応する) に対する抗体 ;

10

20

30

40

50

d. g S A Pのフラグメントを免疫原性アジュバントおよび/または担体と共に、例えば、免疫原性担体、例えば、細菌トキソイド、例えば、ジフテリアまたは破傷風菌トキソイド、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H)、ブルー (blue) 担体タンパク質、オポアルブミンまたはウシ血清アルブミンと複合体化されて、および/またはアジュバント、例えば、フロイントアジュバントまたはアラムアジュバントと一緒に送達されることを含む g S A Pに対するワクチンを含む。

【 0 0 3 9 】

本発明は、さらなる態様において、g S A P 標的療法、例えば、上記の g S A P 阻害剤またはワクチンの投与での処置のための候補を同定するための方法、例えば、

1. 例えば、発現が高いことが g S A P 標的療法での処置のための候補において見られる、g S A P に対する抗体または g S A P 発現に対する定量 P C R を使用して、g S A P 発現を測定すること；または

2. g S A P または g S A P 発現に影響する変異を有する、例えば、以下の群の S N P

a) r s 6 9 7 6 5 6 7 | r s 1 4 6 8 6 8 2 | r s 1 8 1 9 8 1 4、

b) r s 1 4 6 8 6 8 2 | r s 1 8 1 9 8 1 4 | r s 4 7 2 9 5 3 5、

c) r s 1 8 1 9 8 1 4 | r s 4 7 2 9 5 3 5 | r s 4 7 2 9 5 4 0、

d) r s 7 7 8 1 6 4 2 | r s 6 9 5 5 5 0 3 | r s 7 7 7 6 9 7 3

のいずれかを含むハプロタイプを有する患者を同定することであって、

このような変異体またはハプロタイプを有する患者が g S A P 標的療法での処置のための候補であると同定すること；

3. g S A P 活性に影響する変異、例えば、A P P - C T F の膜近傍領域をコードする配列での変異を有する患者を同定することであって、このような変異体またはハプロタイプを有する患者が g S A P 標的療法での処置のための候補であると同定することから選択される方法を提供する。

【 0 0 4 0 】

本発明は、例えば、g S A P に対するモノクローナル抗体、または g S A P 遺伝子に対するプライマーもしくはそれらのフラグメント、および g S A P 遺伝子または A P P - C T F に対する遺伝子の膜近傍領域における変異を検出するためのオリゴヌクレオチドプローブを含む、このような方法における使用のための診断アッセイキットをさらに提供する。

【 実施例 】

【 0 0 4 1 】

実施例 1 - 標識されたイマチニブ誘導体の合成

2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 4 - アジド - 2 - ヒドロキシベンゾエート (N H S - A S A) を、ProChem, Inc (Rockford, IL) から購入する。6 - メチル - N¹ - (4 - (ピリジン - 3 - イル) ピリミジン - 2 - イル) ベンゼン - 1, 3 - ジアミンおよび N - (4 - メチル - 3 - (4 - (ピリジン - 3 - イル) ピリミジン - 2 - イルアミノ) フェニル) - 4 - (ピペラジン - 1 - イルメチル) ベンズアミド (N - デスメチルイマチニブ) を、ChemPacific Inc (Baltimore, MD) から購入する。2, 5 - ジオキソピロリジン - 1 - イル 5 - ((3 a S, 4 S, 6 a R) - 2 - オキソ - ヘキサヒドロ - 1 H - チエノ [3, 4 - d] イミダゾール - 4 - イル) ペンタノエート (ビオチン - O S u)、N - (クロロ (ジメチルアミノ) メチレン) - N - メチルメタンアミニウムヘキサフルオロホスフェート (T C F H)、トリフルオロ酢酸 (T F A)、1 H - ベンゾ [d] [1, 2, 3] トリアゾール - 1 - オール (H O B t) および N, N - ジイソプロピルエチルアミン (D I P E A) を、Sigma - Aldrich (St. Louis, MO) から購入する。T e r t - プチル 2 - (ピペラジン - 1 - イル) エチルカルバメートを、Astatech Inc (Bristol, PA) から購入する。

【 0 0 4 2 】

(a) ビオチン - イマチニブ (活性な、および不活性な形態) の合成およびキナーゼ

10

20

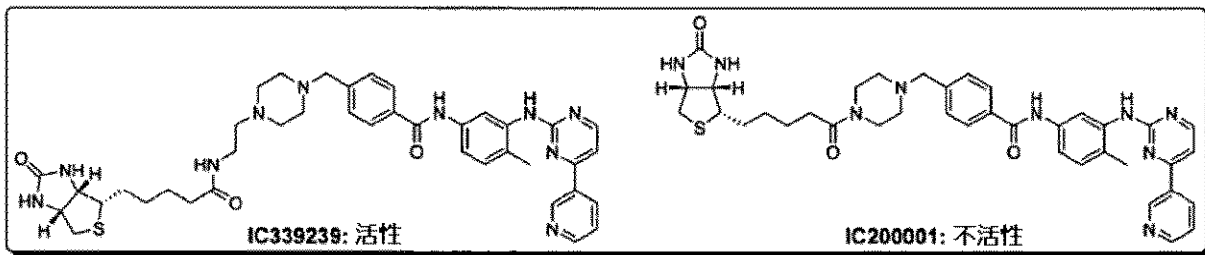
30

40

50

ロファイリング：ピオチンイマチニブの2つの形態が合成され、一方はイマチニブの特徴的なキナーゼ活性を有し、もう一方はキナーゼ活性を欠いている。

【化3】

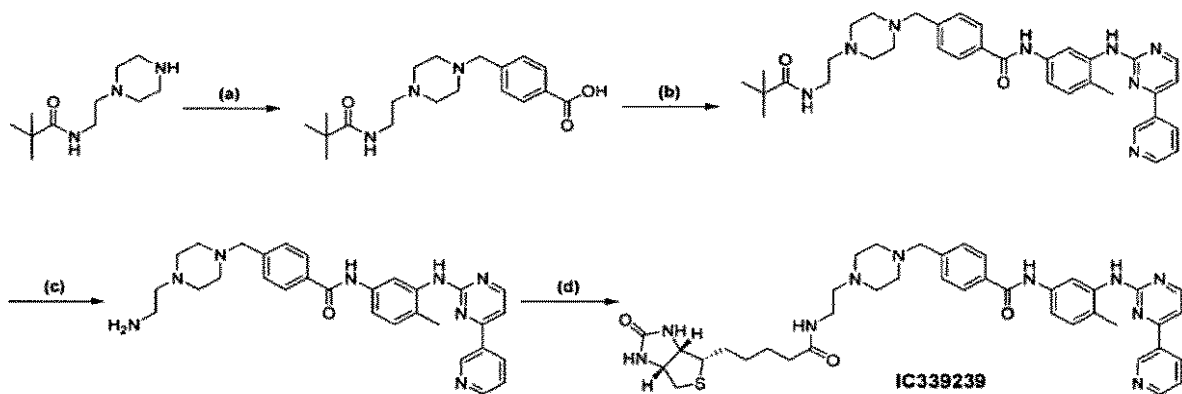


10

【0043】

不活性なピオチン - イマチニブ (IC200001) は、N - デスメチルイマチニブをピオチン - OSuと反応させることにより合成される。活性なピオチン - イマチニブ (IC339239) は、重要な中間体である tert - ブチル 2 - (ピペラジン - 1 - イル) エチルカルバメートおよび 6 - メチル - N¹ - (4 - (ピリジン - 3 - イル) ピリミジン - 2 - イル) ベンゼン - 1, 3 - ジアミンから4つの工程を介して合成される：

【化4】



20

30

試薬および条件：(a) 4 - (プロモメチル)安息香酸、K₂CO₃、DMF、室温、2時間。(b) 6 - メチル - N¹ - (4 - (ピリジン - 3 - イル)ピリミジン - 2 - イル)ベンゼン - 1, 3 - ジアミン、TCFH、DIPEA、DMF、室温、一晚。(c) TFA、CH₂Cl₂、室温、30分。(d) ピオチン - OSu、HOBT、DIPEA、室温、一晚、次にHPLC精製。

【0044】

キナーゼプロファイリングを、AblキナーゼおよびPDGF受容体(ATP = 45 μM)の標準アッセイを使用するMillipore Incにより行う。化合物IC200001は、どちらのキナーゼに対しても有意な阻害活性を示さないが、化合物IC339239は、Ablキナーゼに対して146 nMのIC₅₀(イマチニブは79 nMのIC₅₀を有する)およびPDGF受容体に対して6.6 μMのIC₅₀(イマチニブは4.8 μMのIC₅₀を有する)を有する。したがって、本発明者らは、IC200001を「不活性なピオチン - イマチニブ」と、IC339239を「活性なピオチン - イマチニブ」と称する。

40

【0045】

(b) フォトアフィニティー標識のイマチニブであるG01の合成：イマチニブ誘導体である4 - アジド - 2 - ヒドロキシ - N - (4 - メチル - 3 - (4 - (ピリジン - 3 - イル)ピリミジン - 2 - イルアミノ)フェニル)ベンズアミドは、光活性化されることができる。N, N - ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)(63 μl, 0.36 mmol)

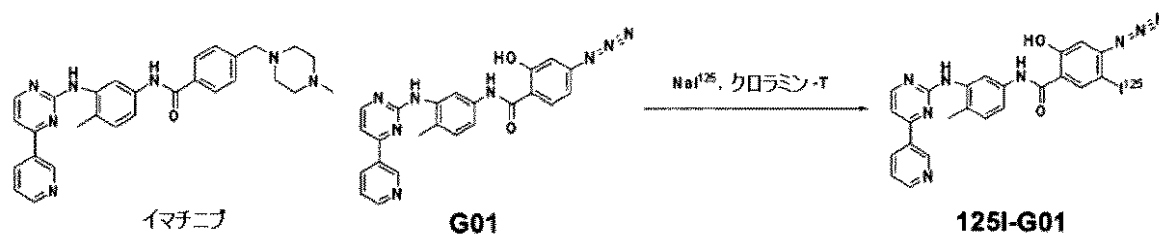
50

1) を、DMF (2 ml) 中の NHS - ASA (50 mg、0.18 mmol)、HOBt (25 mg、0.18 mmol) および 6 - メチル - N¹ - (4 - (ピリジン - 3 - イル)ピリミジン - 2 - イル)ベンゼン - 1, 3 - ジアミン (50 mg、0.18 mmol) の溶液に加える。反応混合物を、アルゴン雰囲気下で一晩室温で攪拌する。産生された粗生成物を半分取 HPLC により精製し、54 mg の表題化合物を 68% の収率で得る。生成物である G01 の 4 - アジド - 2 - ヒドロキシ - N - (4 - メチル - 3 - (4 - (ピリジン - 3 - イル)ピリミジン - 2 - イルアミノ)フェニル)ベンズアミドをポジティブモード [M + H]⁺ において ESI - MS を使用する質量スペクトル分析により行い、439.1 の m/z を証明する。

【0046】

(c) ¹²⁵I による G01 の放射性ヨウ素化をクロラミン - T 処理の修飾を使用して担体なしで行い、ヨウ素化生成物を HPLC により精製する。具体的には、全容量 0.9 ml の UV 保護「V」バイアルにおいて、~10 mCi の ¹²⁵I 貯蔵アイソトープ (容量 = 25 μl) を 200 μl の 0.2 M のリン酸バッファー、pH 7.2 に加える。G01 をエタノールに 1 mg/ml で溶解し、25 μl のこの溶液を水 (50 μl) 中 1 mg/ml でクロラミン - T と混合し、次に V - バイアルに加える。反応を 1 分間行い、50 μl の 1 mg/ml のメタ - 亜硫酸水素塩の添加により終了させる。反応混合物を、「A」溶媒として水中 0.1% の TFA および「B」溶媒としてアセトニトリル中 0.1% の TFA を使用して、25 cm の Waters RP - C18 カラムでクロマトグラフィーする。勾配は、1 ml/分で、0% の B から 50% の B で 45 分間行い、50% の B で 15 分保持する。生成物は 54.5 分の保持時間を証明し、放射化学検出し、ミリモルあたり 2000 キュリーの比活性を有した。¹²⁵I 標識実験を PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc により行う。イマチニブと比較して、G01、¹²⁵I - G01 の構造は以下のとおりである：

【化5】



³H - G01 を、G01 の触媒トリチウム交換を介して V i T r a x 放射化学により製造する。標識された生成物を HPLC により精製する。精製された生成物の組成を、トリチウム標識生成物とそのコールド (cold) 前駆体との共インジェクションおよび両化合物を分析的 HPLC で共クロマトグラフィーすることにより確かめる。

【0047】

(d) A 生産の細胞アッセイおよび G01 とのインキュベーション

ヒト APP 695 を安定に過剰発現する神経芽腫 2a 細胞を、10 μM の G01 で 3 時間処理する。DMSO または DMSO プラス イマチニブで処理された細胞を対照として使用する。3 時間後、馴化培地を回収し、A 免疫沈降を 4G8 抗体を使用して行う。免疫沈降された A を 10 - 20% のトリス - トリシゲルで分離し、PVDF 膜に移し、6E10 抗体により検出する。イマチニブほど強力ではないが、G01 は、10 μM のレベルで DMSO ビヒクルと比較して、A を有意に減少させる。

【0048】

実施例 2 : イマチニブの固定化およびアフィニティー精製

10

20

30

40

50

アフィニティー精製のために、HEK293細胞をプロテアーゼ阻害剤の存在下で10 mMのHepes、250 mMのスクロース、pH 7.4とホモジェナイズする。細胞残屑を1,000 gで5分間の遠心分離により取り除いた後、上清を100,000 gで1時間超遠心分離に付す。次に、膜ペレットをプロテアーゼ阻害剤(Roche Inc. cat#04 69 3 132 001)を含む50 mMのHepes、150 mMのNaCl、5 mMのMgCl₂、5 mMのCaCl₂および1%のCHAPS中で氷上で1時間可溶化し、100,000 gで1時間、超遠心分離に付す。可溶性膜抽出物を、結合した活性なビオチン-イマチニブを含むMyoneTM ストレプトアビジンT1ビーズ(cat#656-01, Invitrogen)と4で3時間インキュベートする。次に、ビーズを溶解物バッファーで3回洗浄する。結合したタンパク質をトリシンSDS-PAGEサンプルバッファーで溶離し、10-20%のトリス-トリシゲルで分離する。免疫プロット法のために、ゲルを次にPVD F膜に移し、 α -セクレターゼ抗体で調べる：PS1抗体(cat#529592)およびPen-2抗体(cat#NE1008)はEMD Biosciencesからであり、ニカストリン抗体はBD Transduction Laboratories(cat # 612290)からである。銀染色を使用して、SDS-PAGEゲルにおけるタンパク質バンドを同定する。~16 kDaのバンドを切り取り、トリプシン処理し、タンデムMS/MS質量分析により配列決定する。

10

【0049】

イマチニブの選択的なAを低下させる活性に関与する標的を同定するために、本発明者らは、プレセニン-1、PEN2およびニカストリンを含む可溶化 α -セクレターゼ成分を特異的に捕獲するイマチニブのビオチン化された誘導体「ビオチン-イマチニブ」を合成する。イマチニブが直接相互作用するタンパク質を同定するために、本発明者らは光活性化可能なアジドイマチニブ誘導体であるG01を合成する。¹²⁵I-G01を膜調製物とインキュベートし、次に光分解すると、 α -セクレターゼの4つの成分は標識されない。むしろ、¹²⁵I-G01は、よりゆっくり移動する18 kDaのプレセニン-1-CTFと共免疫沈降する~16 kDaのタンパク質を標識する。この結果は、細胞透過性³H-G01を使用して無傷の細胞を光標識することにより確認する。¹²⁵I-G01と同様に、³H-イマチニブ誘導体は4つの α -セクレターゼ成分のいずれかと結合せず、PS1と共免疫沈降した~16 kDaのバンドを標識しない。

20

【0050】

可能性のある標的タンパク質を精製するために、固定化された活性なビオチン-イマチニブを可溶化膜調製物とインキュベートし、結合したタンパク質をSDS-PAGEにより分離する。銀染色後、~16 kDaバンドを観察する。ペプチドフラグメントは、トリプシン消化後のこのバンドから得られ、タンデム質量分析により分析し、特徴付けられていないタンパク質であるハトホモログタンパク質(PION)(ヒト受入番号:NP_059135)のC-末端領域に対応した。該同定は、16 kDaのフラグメントの約20%をカバーする2つのユニークなトリプシンペプチド(⁷⁶⁶LWDHPMSSNIISR⁷⁷⁸および⁷⁷⁹NHVTRL LQNYKK⁷⁹⁰)に基づいて行う。その配列、とりわけC-末端領域は、ニワトリからヒトへ多重種中で高度に保存されている。発現パターン分析は、この遺伝子が種々の組織において発現されることを示す。本発明者らは、ガンマ-セクレターゼを活性化するタンパク質(gSAP)としてPIONを特徴付ける。

30

40

【0051】

実施例3：インビトロでの無傷の細胞の光標識化

インビトロでの標識化のために、膜ペレットを上記のとおり調製し、50 mMのHepes、pH 7.4、150 mMのNaCl、5 mMのMgCl₂、5 mMのCaCl₂に再懸濁する。再懸濁された膜を20 nMの¹²⁵I-G01と4で3時間インキュベートし、254 nMで2分間、緻密化UVランプ(4ワット、モデル UVGL-25、UVP Inc.)を使用して光分解する。標識化特異性を試験するために、50 μ Mのイマチニブを平行アッセイに加える。光分解後、膜を100,000 gで1時間の超遠心分離によりペレット化し、50 mMのHepes、150 mMのNaCl、1% CHAPS、5 mMのMgCl₂、5 mMのCaCl₂で可溶化する。上清をタンパク質G

50

プラス/タンパク質 A ビーズ (EMD Biosciences, cat#IP05) で 30 分間で前除去し、タンパク質をタンパク質 G プラス/タンパク質 A ビーズと結合している P S 1 抗体 (EMD Biosciences, cat#529592) を使用して 2 時間で沈澱させ、溶解バッファーで 4 回洗浄する。結合した物質を S D S - トリシンサンプルバッファーで溶離し、10 - 20 %のトリス - トリシゲルを使用して分離し、次に P V D F 膜に移す。該膜を乾燥させ、オートラジオグラフィー用の K o d a k M S フィルムに暴露させる。無傷の細胞の標識化のために、~ 80 %の密集度 (~ 10⁷ 細胞) にまで増殖させたヒト胚腎臓細胞 (H E K 2 9 3) を、O p t i - M E M 中の 0 . 1 μ M の ³ H - G 0 1 でインキュベーター中で 5 %の C O₂ で 37 °C で 2 時間インキュベートし、1 時間氷に移す。培地を取り出し、細胞を冷リン酸緩衝生理食塩水 (P B S)、p H 7 . 4 で 2 回洗浄する。光分解を 2 5 4 n M で緻密化 U V ランプ (4 ワット、モデル U V G L - 2 5、U V P I n c .) を使用して氷上で 2 分間行う。対照として、細胞を、U V 架橋なし、または 5 0 μ M の標識されていないイマチニブの存在下のいずれかでインキュベートする。光分解後、細胞 (それぞれの処置に対して ~ 10⁷ 細胞) を、氷上でプロテアーゼ阻害剤混合物 (Roche) を有する 1 m l の 5 0 m M の H e p e s、p H 7 . 4、1 5 0 m M の N a C l、1 %の C H A P S O、5 m M の M g C l₂、5 m M の C a C l₂ 中で即座にホモジェナイズする。タンパク質 G プラス/タンパク質 A ビーズでの前除去後、タンパク質を 1 0 μ l の P S 1 - ループ抗体 (cat#529592 EMD Biosciences) を使用して 2 時間、免疫沈降する。免疫沈降物を溶解バッファーで 3 回洗浄する。免疫精製された (I P) 物質を S D S サンプルバッファーで溶離し、生成物を 10 - 20 %のトリス - トリシン S D S - P A G E ゲルを使用して分離し、P V D F 膜に移し、該膜を乾燥させ、オートラジオグラフィー用の K o d a k M S フィルムに暴露させる。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 2 】

実施例 4 : g S A P 抗体生産および代謝物標識化

g S A P に対するウサギポリクローナル抗血清を、キーホールリンペットヘモシアニン (cat#PI - 77563, Fisher Scientific) と結合しているペプチド C F E G H D N V D A E F V E E A A L K H T (複合体化のために結合された N - 末端システインを有するヒト g S A P の a a 8 2 9 - 8 4 8 に対応する) をニュージーランド 白色ウサギに注射することにより産生する。ウサギ注射、出血および飼育は、Cocalico Biologicals (Reamstown, PA) により行う。抗体を、会社の指示にしたがって固定化され、溶離される抗原ペプチドを有する S u l f o l i n k 樹脂 (Thermo Scientific, cat#44999) に血清を通すことにより精製する。パルス・チェイス標識化のために、神経芽腫 2 a 細胞を、メチオニンおよびシステインを欠く D M E 最小必須培地 (M e t - C y s - D M E M) で 30 分間インキュベートする。細胞タンパク質を、E X P R E S S ^{3 5} S タンパク質標識化ミックス (cat#NEG772014MC, Perkin Elmer) を含む M e t - C y s - D M E M で 37 °C で 15 分標識化する。追跡期間は、培地を完全培養培地 50 %の D M E M / 50 %の O p t i - M E M、5 %のウシ胎児血清 (F B S) と置き換えることにより開始し、細胞を 37 °C で種々の時間インキュベートする。連続的な標識化のために、細胞を追跡なしで 4 時間、^{3 5} S タンパク質標識化ミックス (P e r k i n E l m e r) で標識化し、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水 (D P B S) で洗浄する。細胞単層を、プロテアーゼ阻害剤を含む R I P A バッファー (10 m M の T r i s、1 %のデオキシコール酸塩、1 %の T r i t o n X - 1 0 0、0 . 1 %の S D S、p H 7 . 4) に溶解させる。該溶解物を 1 3 , 0 0 0 r p m で 20 分の遠心分離により浄化し、上清をタンパク質 G プラス/タンパク質 A ビーズで前除去し、g S A P 抗体を使用して 2 時間免疫沈降する。ビーズをトリス - トリシンサンプルバッファーとインキュベートし、結合したタンパク質を溶離し、10 - 20 %のトリス - トリシゲルにより分離し、P V D F 膜に移し、オートラジオグラフィー用の K o d a k M R フィルムに暴露させる。

【 0 0 5 3 】

実施例 5 : 細胞ノックダウンおよび過剰発現

細胞 g S A P ノックダウン試験のために、g S A P の低分子干渉 R N A (s i R N A)

をDharmacon Incから購入する。使用される *siRNA* の配列は以下のとおりである：センス配列：AUGCAGAGCUGGACGACAUUU；アンチセンス配列：5' - P . AUGUCGUCCAGCUCUGCAUUU。APP695を安定に過剰発現する神経芽腫2a細胞系に、製造業者により提供される指示にしたがって50nMの濃度でDharmafect2試薬を使用して*siRNA*をトランスフェクトする。非標的対照*siRNA* (cat# D-001810-01, Dharmacon Inc.)を対照として平行にトランスフェクトする。gSAPの小ヘアピンRNA (*shRNA*)をOpen Biosystemsから購入し、リポフェクタミン 2000を使用して細胞にトランスフェクトする。pGIPZ *shRNAmir* - GFPベクター中のマウスgSAP *shRNA*の配列は、以下のとおりである：TGCTGTTGACAGTGAGCGCGGGTATAGCCTTATTTGCATATAGTGAAGCCACAGATGTATATGCAATAAAGGCTATACCCATGCCTACTGCCTCGGA。pGIPZ *shRNAmir* - GFPベクター中のヒトgSAP *shRNA*の配列は、以下のとおりである：TGCTGTTGACAGTGAGCGCGGAATAAGAGTGGTGAATTAATAAGTGAAGCCACAGATGTATTTAATCACCACTCTATTTCCATGCCCTACTGCCTCGGA。ノックダウン有効性は、リアルタイムRT-PCRキット (cat#12183, Invitrogen) を使用して試験する。

10

【0054】

細胞におけるgSAP過剰発現のために、全長およびC-末端HAタグをコードするgSAPの16KDaのC-末端フラグメント(アミノ酸配列733-854)を有する哺乳動物発現ベクター *preceiver* - M07を、Genecopoeia Incから購入する。プラスミドでXL1ブルーコンピテント細胞 (cat#200249-11, Stratagene) を形質転換し、EndoFree Maxi調製キット (cat#12362, Qiagen) を使用して精製する。プラスミドを、Fugene 6 (cat# 11815091001, Roche) を使用して、Swedish変異を含むAPP695を過剰発現する安定なHEK293細胞系にトランスフェクトする。

20

【0055】

A アッセイのために、培地をトランスフェクションの48時間後に取り出し、3時間のインキュベーション用のOpti-MEMと置き換える。次に、A を、4G8抗体を使用して馴化培地から免疫沈降する。馴化培地中のA レベルの定量を、また、A 40 およびA 42 ELISAキット (Invitrogen) を使用して評価する。該処理は、製造業者の指示にしたがって行う。

30

【0056】

siRNA を使用して、APP695を過剰発現する神経芽腫細胞中のgSAPレベルを(72±15%)減少されるとき、A のレベルは約50%減少する。イマチニブの添加は、A レベルに対してわずかな付加的な効果を有するか、または付加的な効果がない。APP Swedish変異体を発現するHEK293細胞における*shRNA*介在gSAPノックダウン(65±12%まで)は、また、A 40およびA 42レベルにおいてそれぞれ61%および48%の減少をもたらす。逆に、APP Swedish変異体を発現するHEK293細胞におけるgSAPの過剰発現は、約38%のA 生産を刺激する；該増加はイマチニブ処理により無効にされる。

40

【0057】

実施例6：共免疫沈降

共免疫沈降のために、 $\sim 10^7$ 個の細胞を、氷上でプロテアーゼ阻害剤を有する1mlの50mMのHepes、150mMのNaCl、1%のCHAPS、5mMのMgCl₂、5mMのCaCl₂で30分溶解させる。細胞残屑および核を13,000rpmで20分、遠心分離により除去する。タンパク質G プラス/タンパク質Aビーズで30分間前除去後、免疫沈降を、対応する抗体および30μlのビーズを使用して氷上で2時間行う。該ビーズを溶解バッファーで4回洗浄し、30μlのSDSサンプルバッファーで95℃で5分間溶解する。免疫沈降されたタンパク質をSDS-PAGEにより決定し

50

、免疫プロット法により分析する。プレセニン1ループ抗体A B 1 4 (EMD Bioscience s #529594) をP S 1 - N T Fを検出するために使用し、P e n - 2抗体はE M D B i o s c i e n c e s (#NE1008) から購入する。ニカストリン抗体はB D B i o s c i e n c e s (#612290) からである。H Aモノクローナル抗体 (#A0089) およびM y c タグ ポリクローナル抗体 (#A00172) は、G e n s c r i p t I n cからである。A P P - C T Fを3 6 9抗体 (Xu et al. 1998) を使用して検出する。C o v a n c eからの6 E 1 0 (#SIG39320) および4 G 8 (#SIG39220) 抗体をA を検出するために使用する。

【0058】

H E K 2 9 3細胞膜調製物からの可溶性 - セクレターゼ成分を、固定化されたイマチニブ誘導体であるビオチン - イマチニブに結合させ、免疫プロット法により検出する。ビオチン被覆ビーズおよび不活性なビオチン - イマチニブ誘導体の両方を対照として使用した。内因性 - セクレターゼ成分を、ニカストリン、P S 1 - C T FおよびP e n - 2に対する特異的抗体により検出する。光活性化可能な^{1 2 5}Iおよび³H - G 0 1を、膜調製物または無傷なH E K 2 9 3細胞のそれぞれを標識化するために使用する。溶解およびP S 1抗体での免疫沈降後、結合したタンパク質を10 - 20%のトリス - トリシンS D S - P A G Eにより分離する。16 k D aのバンドを、両方とも光標識化条件下でオートラジオグラフィにより検出する。この標識化は、光分解前の50 μ Mの標識されていないイマチニブとの共インキュベーションにより除去される。P S 1 - C T F抗体で調べられた同じ膜は、P S 1 - C T Fが16 k D aのバンドよりもゆっくりな移動度で移動し、G 0 1により標識化されていないことを示す。ビオチン - イマチニブビーズに結合するH E K 2 9 3細胞溶解物中のタンパク質をS D S - P A G Eで分離し、銀染色で可視化する。ビオチン単独または不活性なビオチン - イマチニブに結合していない~ 16 k D aのバンドを検出する (アロー (arrow) および標識「g S A P」)。トリプシン処理後、16 k D aのバンドを、M S / M S質量分析によりg S A PのC - 末端ドメインとして同定する。

【0059】

N 2 a細胞中の内因性g S A Pの^{3 5}S - メチオニン パルス・チェイス標識化の次に、g S A PのC - 末端に対するポリクローナル抗体を使用する免疫沈降を行う。g S A Pは、全長98 k D aの前駆体タンパク質として合成され、16 k D aに移動するC - 末端フラグメントに迅速に処理される。連続的な^{3 5}S - メチオニン標識化 (定常状態条件) の4時間後、g S A Pの優勢な細胞型は、16 k D aの種類である。無傷なN 2 a細胞の標識化を³H - G 0 1とのインキュベーションにより行う。細胞をR I P Aバッファで溶解し、タンパク質をg S A P抗体と免疫沈降する。S D S - P A G Eおよびラジオグラフィでの分離後、g S A P - 16 Kは、³H - G 0 1により特異的に標識化されることが見られる；この標識化は50 μ Mのイマチニブとの細胞の前インキュベーションによりクエンチされる。ビオチン - イマチニブと結合したプレセニン1ループ胚幹細胞においてP S 1で、またはP S 1なしで過剰発現されるg S A Pを、免疫プロット法により検出する。g S A P s i R N Aノックダウン条件下で、P S 1は、もはやビオチン - イマチニブを捕獲しない。

【0060】

実施例7：ゲル濾過クロマトグラフィー

N 2 a細胞を、上記のとおり、^{3 5}Sタンパク質標識化ミックス (Perkin Elmer) で4時間で標識する。可溶性膜調製物 (0.2 ml、50 mMのH e p e s、150 mMのN a C l、1%のC H A P S O、5 mMのM g C l₂、5 mMのC a C l₂中で~ 1 mgの可溶性タンパク質) を、100,000 gで1時間遠心し、可能性のある凝集物質を除去する。得られる上清を、A K T A高速液体クロマトグラフィー系 (Amersham Biosciences) のS u p e r d e x 200 10 / 300 G Lカラム (Amersham Biosciences) に負荷する。分別を0.5 ml / 分の流速で溶解バッファ中で行い、1 mlの画分を分析のために回収する。それぞれの画分を、 - セクレターゼ抗体に対するウェスタンプロット

10

20

30

40

50

トにより分析する。内因性 g S A P を検出するために、それぞれの画分を g S A P 抗体と免疫沈降する。免疫沈降した物質をトリス - トリシン サンプルバッファーで溶離し、10 - 20 % のトリス - トリシゲルにより分離し、P V D F 膜に移し、オートラジオグラフィ用の K o d a k M R フィルムに暴露する。

【 0 0 6 1 】

実施例 8 : インビトロでの - セクレターゼアッセイ

膜ペレットを、上記のとおり、A P P - - C T F (C T - 1 0 0) でトランスフェクトされた H E K 2 9 3 細胞から調製し、該膜をアッセイバッファー (1 0 m M の H e p e s , 1 4 0 m M の K O A c , 2 . 5 m M の M g O A c , 0 . 1 m M の C a C l ₂ , 1 m M の A T P , p H 7 . 2) で洗浄し、4 で 1 0 0 , 0 0 0 g で 3 0 分間ペレット化する。組換え g S A P - 1 6 K (ヒト g S A P の a a 7 3 3 - 8 5 4) を、B L 2 1 D E 3 大腸菌から発現させ、精製する。該膜を、2 μ g の組換え g S A P - 1 6 K または対照として同量の B S A を含む 2 0 0 μ l のアッセイバッファーに再懸濁する。1 μ M の L 6 8 5 , 4 5 8 (- セクレターゼ阻害剤) での平行系を、また、対照として使用する。膜懸濁液を 4 で 1 時間、前インキュベートし、次に 3 7 で 2 時間インキュベートし、インビトロで A の産生を可能にする。該膜を、1 / 4 の容量の 2 0 0 m M の T r i s , p H 7 . 8 , 7 6 0 m M の N a C l , 2 4 m M の E D T A , 1 0 % の T r i t o n X - 1 0 0 において可溶化し、不溶性物質を 1 0 , 0 0 0 g で 2 0 分間の遠心分離により除去する。A を、4 G 8 抗体を使用して溶解物から免疫沈降し、10 - 20 % のトリス - トリシゲルで分離し、P V D F 膜に移し、K o d a k M R フィルムを使用するオートラジオグラフィに付す。

10

20

【 0 0 6 2 】

実施例 9 : N o t c h 開裂分析

N o t c h E (C - 末端 m y c タグを有する、N o t c h 細胞外ドメインのほとんどを欠いている短縮された N o t c h - 1) をコードするプラスミドは、以前に記載されている (Netzer et al. 2003) 。 N o t c h E でトランスフェクトされた細胞を、g S A P - s h R N A または g S A P プラスミドと共トランスフェクトする。トランスフェクションの 2 日後、N o t c h 発現および開裂を、抗 - m y c 抗体で検出する。開裂された N o t c h 細胞内ドメイン (N I C D) を、開裂 - 特異的抗体 (Notch1 Val - 1744, Cell Signaling Inc.) で検出する。L - 6 8 5 , 4 5 8 で処理された細胞を対照として使用する。

30

【 0 0 6 3 】

g S A P は、A b 生産を調節するが、N o t c h 開裂に影響しない。A P P 6 9 5 を過剰発現する N 2 a 細胞における g S A P の s i R N A 介在ノックダウンは、A 生産の低下をもたらす。イマチニブおよび s i R N A の A を低下する効果は、付加的でない。S w e d i s h 変異を含むヒト A P P を安定に発現する H E K 2 9 3 細胞の g S A P s h R N A でのトランスフェクションは、A b 4 0 および A b 4 2 の両方のレベルを減少させる。H E K 2 9 3 細胞における g S A P 過剰発現は A b レベルを増加させ、この効果はイマチニブにより遮断される。g S A P ノックダウンまたは過剰発現条件下のいずれかで、N o t c h 処理は、細胞外ドメインを短縮された N o t c h (C - 末端 m y c タグを有する N o t c h E) を過剰発現する H E K 2 9 3 細胞において影響しない。N I C D を、m y c 抗体および開裂生成物特異的抗体 (N o t c h 1 V a l - 1 7 4 4) を使用して検出する。大腸菌から精製される組換え g S A P - 1 6 K は、インビトロでの - セクレターゼアッセイにおいて A b 生産を刺激する。- セクレターゼ阻害剤である L 6 8 5 , 4 5 8 (1 μ M) は、A 生産を破壊する。

40

【 0 0 6 4 】

g S A P は、- セクレターゼおよび A P P - C T F と相互作用するが、N o t c h E と相互作用しない。N 2 a 細胞由来の膜調製物を調製し、1 % の C H A P S O に溶解させ、ゲル濾過に付し、ウェスタンブロット法により検出する。内因性 g S A P - 1 6 K は、- セクレターゼ成分と共遊走する。カラム空隙比 = 6。内因性 g S A P の免疫沈降は

50

、 - セクレターゼ成分の共免疫沈降をもたらす。Notch E - myc、APP - CTFおよびgSAP - 16K - HAを共発現するHEK293細胞において、gSAP - 16Kの免疫沈降は、APP - CTFの共免疫沈降と関連するが、Notch Eの共免疫沈降と関連しない。Notch Eではなく、APP - CTFの免疫沈降は、gSAP - 16Kの共免疫沈降と関連する。イマチニブでの処置は、gSAP - 16KおよびAPP - CTF間の関連性を減少させる。

【0065】

実施例10：gSAP RNAiマウス系産生およびA β レベル測定

RNAiマウスを、前記の処理にしたがって生産する(Seibler et al. 2007)。具体的には、gSAP shRNAコード配列TCCCGGAACCTCCATGATTGACAAATTTCAAGAGAATTTGTCAATCATGGAGTTCCTTTTTAを有する交換ベクターは、H1 - Tetプロモーターのコントロール下である。リコンビナーゼ介在カセット交換(RMCE)技術を使用して、ベクターをマウスES細胞ゲノムに組み込む(B6/129S6背景)。次に、トランスフェクトされたES細胞を4倍体胚盤胞に注射し、誘導RNAiマウスを産生する。次に、ヘテロ接合体RNAiマウスをAPPswおよびPS1⁹変異を有するADマウスモデル(AD^{2x}マウス)と交雑し、gSAP - RNAi ADマウスを産生する。shRNA誘導を、10%のスクロースを含む飲料水中の2mg/mlのドキシサイクリン(Sigma D - 9891)を導入することにより行う。対照マウスを、10%のスクロースを含む飲料水で飼育する。飲料水を2日毎に交換し、暗所を維持する。マウスにおけるgSAPノックダウン効率を、定量リアルタイムRT - PCRを使用してアッセイする。全RNAを標準処理にしたがって単離し、cDNAを逆転写Core Kit(Eurogentec)を使用して合成する。リアルタイムPCR反応は、iCycler Thermal cycler instrument(Bio - Rad)を使用して行う。マウス脳のA β レベル測定のために、2月齢gSAP - RNAi ADマウスを1月間ドキシサイクリンで誘導し、脳組織をELISAアッセイのためにギ酸で抽出する。

【0066】

gSAPのノックダウンは、ADマウスモデルにおけるA β 生産およびプラーク発生を減少させる。gSAP RNAi - ADマウスを、二重トランスジェニックADマウスと誘導gSAP RNAiマウスの異種交配により産生する。gSAP shRNA発現(ドキシサイクリン誘導下)は、マウスの脳におけるA β 40およびA β 42レベルの両方をそれぞれ~28%および~32%減少させる(** : P < 0.01. n = 4)(図3)。

【0067】

実施例11：PS/A β トランスジェニックマウスへのAAV2 - gSAP shRNAの海馬内注射

マウスGIPZ shRNAmirの個々のクローン(V2LMM_88580：マウスgSAP遺伝子に関するヘアピン配列

TGCTGTTGACAGTGAGCGCGGGTATAGCCTTATTTGCATATAGTGAAGCCACAGATGTATATGCAATAAGGCTATACCCATGCCTACTGCCTCGGAを含む)を、Openbiosystems/ThermoScientificから購入する。ヘアピン領域を切り出し、BamHIおよびHindIIIサイトを介してAAV2 - siln4.1 - MCS - EGFPベクター(Vectorbiolabs)に挿入する。三重トランスジェニックADマウス(6月齢)をA β に対して分析する。二重トランスジェニックADマウス(13月齢)をプラークに関して分析する。それぞれのグループにおいて、マウスを、ケタミン(100mg/kg)およびキシラジン(10mg/kg)の混合物で深く麻酔し、定位フレームに置く。AAV2 - gSAP shRNA - GFPまたはAAV2 - GFPを有するAAV2ウイルスを、右または左の海馬に左右相称に注射する。定位座標をマウスの脳のPaxinos Atlasにしたがって決定する：前後方向2.18mm、中外側1.97m

10

20

30

40

50

mおよび背腹2mm。1 μ lのそれぞれのAAV2(gSAPまたはGFP対照に関してshRNA)(3.3×10^{13} vg/ml)を、0.2 μ l/分の速度で5分間、電動注射ポンプを備えた10 μ lのHamiltonシリンジで注射する。注射針をさらに5分間、脳に維持し、液体溢出を防止する。マウスを注射4週間後に殺す。

【0068】

Aレベルを決定するために、海馬を取り出し、プロテアーゼ阻害剤を含む2%のSDSに可溶化する。溶解物を13,000rpmで20分間遠心し、上清をA40およびA42アッセイキット(Invitrogen Inc.)を使用するELISA分析のために使用する。

【0069】

免疫学的局在決定試験のために、マウスを0.1MのPBS、次に4%のパラホルムアルデヒド/PBSで心臓内灌流に付す。灌流後、脳を取り出し、4%のパラホルムアルデヒド/PBSで4で一晩で固定し、次に15%のスクロースで、次に30%のスクロースで24時間インキュベーションする。冷凍保護された脳を、クライオスタットを使用して25-50 μ Mの薄い切片に切る。切片を、M.O.M免疫検出キット(Vector Laboratories, PK-2200)を使用して、細胞外アミロイドプラークを可視化するために抗A抗体6E10(1:1000、Novus Biologicals)、およびAAVウイルスをコードするshRNAで確実に形質導入されたニューロンを可視化するために抗EGFP抗体(1:500、Invitrogen)で標識化する。画像化をZeiss LSM510共焦点顕微鏡を使用して行う。

【0070】

gSAPに対するshRNAを有するAAV2の海馬内注射は、二重トランスジェニックADマウスにおけるアミロイドプラーク発生を減少させる。GFP染色を示す領域はAAV2ベクター発現の領域を示し、赤色の蛍光はアミロイドプラークを示し、ベクター発現がプラーク形成の減少と一致することを示す。5つの連続的な切片からのGFP陽性領域を共焦点顕微鏡により分析する。データは、 mm^2 あたりのプラークとして示す($n=4$ 。***: $P < 0.001$) (図4)。

【0071】

実施例12: N-(6-メチル-5-(4-フェニルピリミジン-2-イルアミノ)ピリジン-3-イル)-4-((1-メチルピペリジン-4-イル)メチル)ベンズアミドは、gSAPに結合し、Aを低下させる

N-(6-メチル-5-(4-フェニルピリミジン-2-イルアミノ)ピリジン-3-イル)-4-((1-メチルピペリジン-4-イル)メチル)ベンズアミド(WO/2008/153974、ex.7)を、40個のキナーゼに対して試験されるとき(データは示していない)、少しのキナーゼ阻害活性を有する典型的なイマチニブ類似体として選択する。約100nMの K_i 対Ablキナーゼ(承認された抗癌適応に対する主要標的)を有するイマチニブと比較して、N-(6-メチル-5-(4-フェニルピリミジン-2-イルアミノ)ピリジン-3-イル)-4-((1-メチルピペリジン-4-イル)メチル)ベンズアミドは、約12,000nMの K_i 対このキナーゼの100倍弱い活性を有する。この化合物は、それにもかかわらず、イマチニブと度応用の様式においてAを阻害する。これは、イマチニブのキナーゼ阻害活性がgSAPに対する活性の根拠ではなく、むしろ、それがgSAPおよびガンマセクレターゼ間の相互作用における特異的な効果を有することをさらにサポートする。

【0072】

HEK293細胞をC-末端ヘマグルチニン(HA)タグを有するgSAPでトランスフェクトする。膜ペレットを調製し、50mMのHepes、150mMのNaCl、5mMのMgCl₂、5mMのCaCl₂に再懸濁し、指定量のイマチニブまたはN-(6-メチル-5-(4-フェニルピリミジン-2-イルアミノ)ピリジン-3-イル)-4-((1-メチルピペリジン-4-イル)メチル)ベンズアミドのいずれかと2時間インキュベートし、次に2 μ Mのピオチン-NCGを添加し、1時間インキュベートする。膜

10

20

30

40

50

をペレットダウン (pellet down) し、50 mM の H e p e s、150 mM の N a C l、1% のオクチル - D - グルコピラノシドに可溶化し、M y o n e ストレプトアビジン T 1 ビーズと1時間結合させ、次に3回洗浄する。捕獲されたタンパク質を S D S サンプルバッファ-とのインキュベーションにより放出させ、ウェスタンブロットにより検出する。

【0073】

N 2 a 細胞系における全ヒト A を、検出のために A 40 および A 42 を補足する特異的モノクローナル抗体 (6E10, Signet Laboratories) および A 17 - 24 に対する抗体 (4G8, Signet Laboratories, Dedham, MA) を使用することにより標準サンドウィッチ E L I S A において測定する。細胞培養培地 (5 μ L / ウェル) をリン酸緩衝塩水 / 0.2% の T w e e n 20 において 100 μ L に希釈し、E L I S A プレートに負荷する。ウェスタンブロットアッセイにおいて、細胞培地を 2 x トリシンドデシル硫酸ナトリウムサンプルバッファ-で希釈し、95 で5分加熱する。A を16%のトリシンポリアクリルアミドゲル (B i o R a d) における電気泳動法により分離し、タンパク質をニトロセルロース膜に移し、L i C o r ブロッキングバッファ- (LiCor, Lincoln, NE) で一晩ブロックする。A を抗体 4 G 8 および A l e x a 680 - 接合ウサギ抗 - マウス二次で検出し、L i C o r O d y s s e y 赤外線走査装置でスキャンする。N - (6 - メチル - 5 - (4 - フェニルピリミジン - 2 - イルアミノ) ピリジン - 3 - イル) - 4 - ((1 - メチルピペリジン - 4 - イル) メチル) ベンズアミドは、< 500 nM の濃度で A を有意に低下させる。

10

20

【0074】

N o t c h 開裂の検出のために、H E K 293 ヒト胚腎臓細胞を C - 末端 m y c タグを有するマウス E - N o t c h c D N A でトランスフェクトする。E - N o t c h 開裂の分析のために、細胞を試験化合物と4時間インキュベートする。細胞抽出物を、細胞溶解バッファ- (50 mM の T r i s、pH 7.5、10 mM の N a C l、5 mM の E G T A、1 mM の E D T A および完全プロテアーゼ阻害剤 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) に細胞を溶解させることにより調製する。タンパク質濃度をタンパク質検出試薬を使用して決定する。容量を細胞溶解バッファ-で調節し、次に 4 x サンプル ローディングバッファ- (トリス - トリシングル ローディングバッファ-) を加え、サンプルを 95 で5分加熱し、それぞれの処理に対して等量の細胞タンパク質を 10% の B i s - T r i s ゲルに負荷する。C - 末端 N o t c h 種を、モノクローナル 抗 - c - m y c 抗体 9 E 10 (Roche Diagnostics) および蛍光ヤギ抗マウス二次抗体で検出する。蛍光抗体を、L i C o r O d y s s e y 赤外蛍光検出器を介して定量する。

30

40

【0075】

N - (6 - メチル - 5 - (4 - フェニルピリミジン - 2 - イルアミノ) ピリジン - 3 - イル) - 4 - ((1 - メチルピペリジン - 4 - イル) メチル) ベンズアミドおよびイマチニブは、記載されている細胞系における N O T C H 代謝に影響しない。競合および直接ガンマ - セクレターゼ阻害剤 D A P T を、アッセイにおける陽性コントロールとして使用する。N O T C H 処理の阻害が望ましくない副作用を引き起こす可能性があるため、N O T C H の処理を防止する化合物は、薬物候補としてあまり望ましくない。N - (6 - メチル - 5 - (4 - フェニルピリミジン - 2 - イルアミノ) ピリジン - 3 - イル) - 4 - ((1 - メチルピペリジン - 4 - イル) メチル) ベンズアミドは、このアッセイにおいてイマチニブに匹敵する。

【0076】

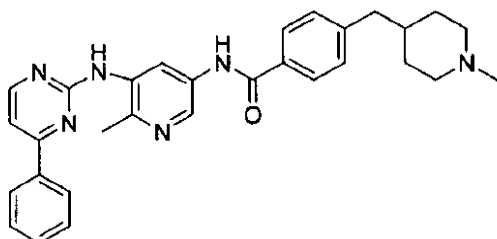
実施例 13 : N - (6 - メチル - 5 - (4 - フェニルピリミジン - 2 - イルアミノ) ピリジン - 3 - イル) - 4 - ((1 - メチルピペリジン - 4 - イル) メチル) ベンズアミドの合成

以下に記載されている N - (6 - メチル - 5 - (4 - フェニルピリミジン - 2 - イルアミノ) ピリジン - 3 - イル) - 4 - ((1 - メチルピペリジン - 4 - イル) メチル) ベンズアミドは、W O / 2008 / 153974 において記載されているが、合成を便宜上の

50

目的で提供する：

【化6】



10

【0077】

a) (2-メチル-5-ニトロ-ピリジン-3-イル)-(4-フェニル-ピリミジン-2-イル)-アミン

乾燥トルエン(25 mL)中の3-プロモ-2-メチル-5-ニトロ-ピリジン(4.46 g、2.10 mmol)および4-フェニル-2-ピリミジンアミン(1.3 g、1.75 mmol)の混合物にCs₂CO₃(0.85 g、2.62 mmol)、Pd₂(dba)₃(32 mg、0.035 mmol)およびXantphos(60 mg、0.105 mmol)を加える。混合物をN₂で空気を抜き、パージし、窒素下で90℃に24時間加熱する。反応混合物を室温に冷却し、EtOAcで希釈し、濾過する。濾液を減圧下濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、生成物を黄色固体として得る(320 mg、収率59%)。¹H NMR(200 MHz, CDCl₃): 2.75 (s, 3H), 7.19 (s, 1H), 7.37 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 7.57 - 7.54 (m, 3H), 8.17 - 8.12 (m, 2H), 8.59 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 9.02 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 9.87 (d, J = 2.0 Hz, 1H); MS ESI⁺ m/z 308 [M+H]⁺。

20

【0078】

(b) 2-メチル-N³-(4-フェニルピリミジン-2-イル)ピリジン-3,5-ジアミン

ヒドラジン水和物(12 mL)およびメタノール(20 mL)中の触媒塩化第二鉄(12 mg)、(2-メチル-5-ニトロ-ピリジン-3-イル)-(4-フェニル-ピリミジン-2-イル)-アミン(320 mg、1.04 mmol)の混合物を15分還流する。反応混合物を室温に冷却し、減圧下濃縮し、粗残渣を水に溶解し、EtOAcで抽出する。合わせた抽出物を無水Na₂SO₄上で乾燥させ、減圧下濃縮する。残渣をEt₂Oと5分間攪拌し、エーテル層をデカントし、残渣を真空乾燥させ、生成物を黄色固体として得る(270 mg、収率93%)。Mp: 133.1 - 133.4; ¹H NMR(200 MHz, CDCl₃): 2.51 (s, 3H), 3.62 (bs, 2H), 6.93 (s, 1H), 7.20 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.52 - 7.49 (m, 3H), 7.74 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.08 - 8.03 (m, 2H), 8.13 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 8.48 (d, J = 4.0 Hz, 1H); MS (ESI⁺) m/z 278 [M+H]⁺。

30

【0079】

(c) 4-((1-メチルピペリジン-4-イル)メチル)安息香酸

40

4-(ピペリジン-4-イルメチル)安息香酸(114 mg、0.342 mmol)を2 mLのメタノールに溶解し、次に37%のホルムアルデヒド水溶液(56 μL、0.685 mmol)を加える。反応混合物を室温で5分間攪拌し、次にNaBH₃CN(26 mg、0.41 mmol)を加える。混合物を室温で2時間攪拌し、少量の水でクエンチし、次に高真空下で乾燥のために蒸発させ、白色の泡状固体を得、これをさらなる精製なしに次の反応のために使用する。MS (ESI⁺) m/z 234.1 [M+H]⁺。

【0080】

d) N-(6-メチル-5-(4-フェニルピリミジン-2-イルアミノ)ピリジン-3-イル)-4-((1-メチルピペリジン-4-イル)メチル)ベンズアミド

DEIA(149 μL、0.86 mmol)を、DMF中の2-メチル-N³-(4-

50

フェニルピリミジン - 2 - イル)ピリジン - 3 , 5 - ジアミン (47 mg、0 . 17 mmol)、4 - ((1 - メチルピペリジン - 4 - イル)メチル)安息香酸 (40 mg、0 . 17 mmol)、BOP (91 mg、0 . 21 mmol) の懸濁液に加える。反応混合物をアルゴン雰囲気下で室温で一晩攪拌する。混合物を 0 . 45 μm のマイクロフィルターを介して濾過し、濾液を Waters 半分取 HPLC により精製し、16 mg の最終産物を白色粉末として得る。MS (ESI⁺) m/z 493.1 [M+H]⁺。

【0081】

温度はセ氏温度 () で与えられる ; 操作は 18 - 25 の範囲である室温または环境温度 (「rt」) で行う。有機溶液を無水硫酸ナトリウム上で乾燥させ ; 溶媒の蒸発を、60 までの浴槽温度で減圧下で (600 - 4000 Pascals ; 4.5 - 30 mmHg) ロータリーエバポレーターを使用して行う。一般的に、反応コースは、TLC に続き、反応時間は説明のためにのみに挙げられる ; 最終産物は満足のいくプロトン核磁気共鳴 (NMR) スペクトルおよび / または質量スペクトルデータを有する。収率は説明のためにのみに与え、必ずしも熱心な処理開発により得ることができるものでない ; さらなる物質が必要であるとき、製造を繰り返す。得られるとき、NMR データは、内部標準としてのテトラメチルシラン (TMS) と比較して 100 万分の 1 (ppm) において挙げられる主な診断プロトンに対するデルタ値の形態である。化学記号は通常の意味を有する ; SI 単位および記号を使用する。以下の略語を使用している :

【表 1】

CS ₂ CO ₃	炭酸セシウム ;	20
HPLC	高速液体クロマトグラフィー ;	
Na ₂ SO ₄	硫酸ナトリウム ;	
NaBH ₃ CN	シアノ水素化ホウ素ナトリウム	
BOP	ベンゾトリアゾール - 1 - イルオキシトリス (ジメチルアミノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート ;	
DMF	N, N - ジメチルホルムアミド ;	
EtOAc	酢酸エチル ;	
DEEA	N, N - ジイソプロピルエチルアミン ;	
Pd ₂ (dba) ₃	トリス (ジベンジリデンアセトン) ニパラジウム (0) ; および	30
Xantphos	4, 5 - ビス (ジフェニルホスフィノ) - 9, 9 - ジメチルキサンテン	

【0082】

実施例 15 : 結合アッセイ

1 つの例において、アッセイは、gSAP タンパク質の阻害剤に対して試験するために使用され得る。gSAP タンパク質の選択される配列は、可能性のある阻害剤との結合を検出するために使用され得る。

【0083】

実施例 16 : 診断アッセイ

a . 診断アッセイを gSAP タンパク質のレベルを測定するために使用する。gSAP タンパク質のレベルの増加は、疾患と関連であり得る。

【0084】

b . gSAP 領域中の変異の遺伝学的分析を、gSAP を標的とする治療に対する候補を同定するために使用する。gSAP に対する遺伝子の領域中の 9 つの SNP を同定する (PION) 。単一のマーカー分析において、SNP は多重検定に関する補正後、AD と関連しない。しかしながら、スライドウィンドウハプロタイプ分析において、4 つのハプロタイプは AD と関連する :

a) rs6976567 | rs1468682 | rs1819814、

10

20

30

40

50

- b) rs 1468682 | rs 1819814 | rs 4729535、
- c) rs 1819814 | rs 4729535 | rs 4729540、
- d) rs 7781642 | rs 6955503 | rs 7776973。

これらのハプロタイプにおける2つのSNP (rs 4729540およびrs 7776973)は、また、単一のマーカー分析における遅延型認識試験と有意に関連する。したがって、これらのハプロタイプを有すると同定された患者は、gSAP阻害剤での処置のための候補である。

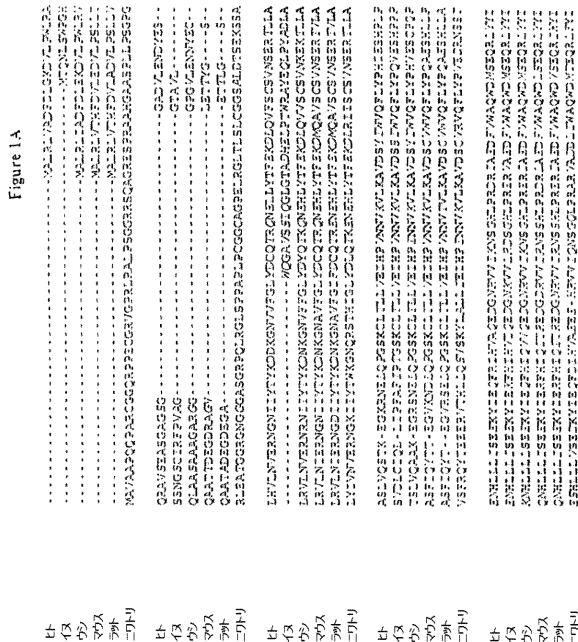
【0085】

実施例17：gSAPおよびAPP間の相互作用の領域の同定

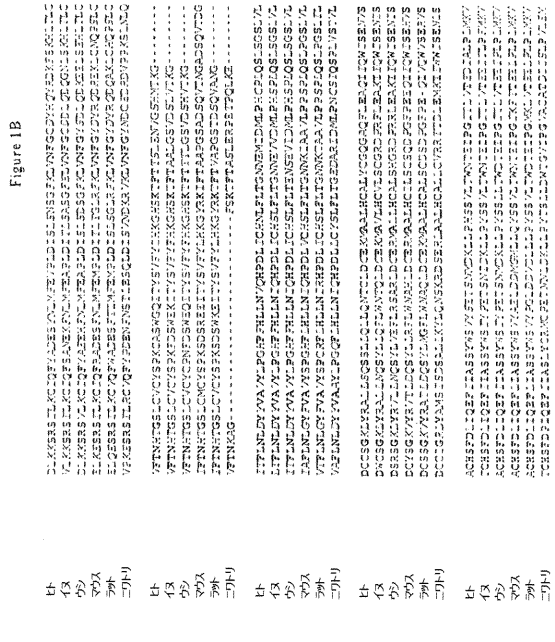
提供される例の代替的組合せおよび変化が、本記載に基づいて明らかである。記載されている態様の全ての多数の可能性のある組合せおよび変化に関する特定の例を提供することは不可能であるが、このような組合せおよび変化は、記載されている特許請求の範囲の範囲内である。

10

【図1-1】

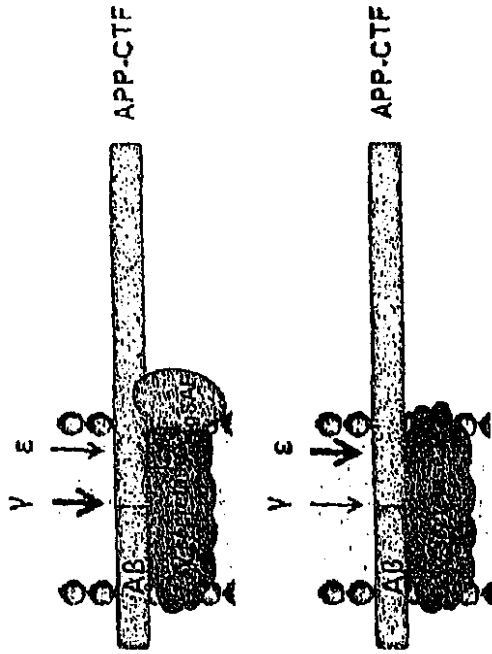


【図1-2】



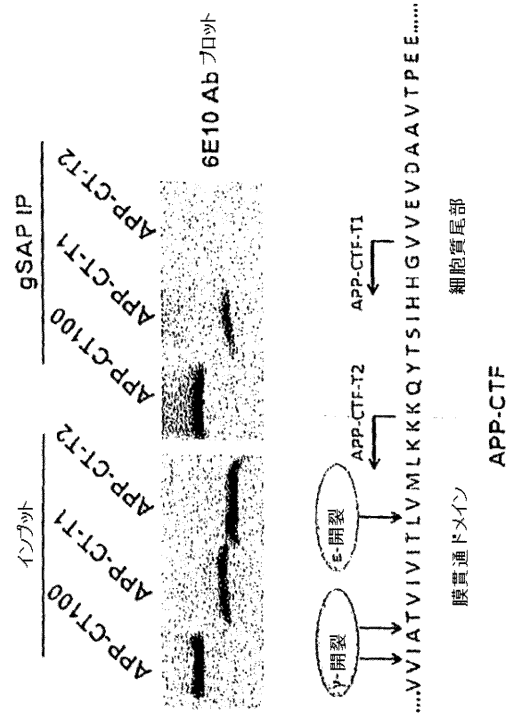
【 図 5 】

FIGURE 5



【 図 6 】

Figure 6



【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成24年4月10日 (2012.4.10)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

[2013500741000001.app](#)

【 国際調査報告 】

PCT/US2010/002173 10.07.2012

61200390004



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION <small>see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.</small>	
International application No. PCT/US 10/02173	International filing date (<i>day/month/year</i>) 05 August 2010 (05.08.2010)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 05 August 2009 (05.08.2009)
Applicant INTRA-CELLULAR THERAPIES, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed.
 a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).c. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.2. Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).3. Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

- the text is approved as submitted by the applicant.
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- the text is approved as submitted by the applicant.
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 6
 as suggested by the applicant.
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b. none of the figures is to be published with the abstract.

PCT/US2010/002173 10.07.2012

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/02173

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

PCT/US2010/002173 10.07.2012

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/02173

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
 This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.
 Group I+: claims 1-2, 4, 9-10, 17, drawn to a gSAP peptide selected from a-g as indicated in claim 1, wherein the gSAP peptide is isolated or separated from its natural environment. The first named invention is limited to wherein the gSAP peptide is 100% identical to the first sequence depicted in Figure 1 (a), that is SEQ ID NO: 1. Applicant is invited to elect additional features from a.-g from claim 1, including different SEQ ID NO(s), or a fragment of gSAP capable of forming a complex with gamma secretase (claim 1-f), or a gSAP from mammalian species that is not represented by the claimed SEQ ID NOs: 1-6 (claim 1-e), a transgenic cell containing a heterologous gene which expresses a gSAP peptide (claim 4), or/and a method of identifying compounds using gSAP peptide (claims 9-10) to be searched by paying additional fee for each election. Note, the additional claims and scope of each claim will be searched will depend upon the applicant's election.

Note: Claims 4, 9-10 are excluded from the search because they require a search of nonelected subject matters.
 -see continuation sheet-

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-2, 17, limited to wherein the gSAP peptide is 100% identical to the first sequence depicted in Figure 1 (a), that is SEQ ID NO: 1

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

PCT/US2010/002173 10.07.2012

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/02173

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

The disclosure provides a gamma secretase activating protein (gSAP) that activates gamma-secretase to produce beta-amyloid protein (A.beta). Deposition of A.beta has been associated with Alzheimer's disease and other pathologies. The disclosure further provides screening methods, research tools, inhibitors of gSAP, and methods of diagnosis, treatment and control of Alzheimer's disease as well as other neurodegenerative conditions associated with deposition of A.beta.

PCT/US2010/002173 10.07.2012

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/02173

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 1/00; C07K 16/00; C12P 21/06 (2012.01) USPC - 530/350; 530/387.1; 435/69.1 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(8) - C07K 1/00; C07K 16/00; C12P 21/06; C12N 15/00; C12N 5/00; C12N 15/11; A61K 39/395; A01K 67/00; C07H 21/04 (2012.01) USPC - 530/350; 530/387.1; 435/69.1; 435/320.1; 435/325; 514/44A; 424/130.1; 800/13; 536/23.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(8) - C07K 1/00; C07K 16/00; C12P 21/06; C12N 15/00; C12N 5/00; C12N 15/11; A61K 39/395; A01K 67/00; C07H 21/04 (2012.01) USPC - 530/350; 530/387.1; 435/69.1; 435/320.1; 435/325; 514/44A; 424/130.1; 800/13; 536/23.1 - see keyword below Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); Medline, Google: gamma-secretase activating protein, gSAP, PION, Pigeon homologous protein, oligodendrocyte, alzheimer's, transgenic cell, integrate, stable, express, isolate, purify, protein, polypeptide, fragment, peptide, label, tag, activate, secretase, recombinant cell, bacterial, baculovirus, mammalian		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Uniprot A4D1B5, Gamma-secretase-activating protein, Protein pigeon homolog, Last modified 20 May 2008 [online]. [Retrieved on 2011.11.10]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.uniprot.org/uniprot/A4D1B5 > Gene Names; Protein names; and Sequence, that is 100% identical to the claimed SEQ ID NO: 1	1-2, 17
Y	US 2004/0171823 A1 (NADLER et al.) 02 September 2004 (02.09.2004), Abstract, para [0003], [0011], [0014], [0042], [0043], [0044], [0077], [0107], [0112], and SEQ ID NO: 466 (268 a.a.), which is 100% identical to amino acid residues 587-854 of the claimed SEQ ID NO: 1 (854 a.a.), and comprises a region between amino acid residues 180-192, that is 100% identical to the claimed SEQ ID NO: 7, and a region between amino acid residues 193-204, that is 100% identical to the claimed SEQ ID NO: 8. [note: this reference anticipates claim 1-c, but is not in the scope of this opinion.]	1-2, 17
A	WO 2005/016962 A2 (ABBAS et al.) 24 February 2005 (24.02.2005), pg 12, ln 6, 17-19, and 28; and SEQ ID NO: 2741 (268 amino acids) that is 100% identical to a region between amino acid residues 587-854 of the claimed SEQ ID NO: 1 (854 a.a.)	1-2, 17
T	HE et al. Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease. Nature. 2010 Sep 2, Vol. 467, p. 95-98. Entire documentation especially Abstract; pg 95, col 2; and pg 96, col 2, last para and Fig 1	1-2, 17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 June 2012 (26.06.2012)		Date of mailing of the international search report 10 JUL 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT Q&P: 571-272-7774

PCT/US2010/002173 10.07.2012

6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/02173

Continuation of
Box No III (unity of invention is lacking)

Group II, claim 3, drawn to a vector comprising a gene for a gSAP peptide operably linked to a heterologous promoter.

Group III, claim 5, drawn to a nucleic acid which is or which expresses a RNA construct capable of inhibiting gSAP expression in a mammalian cell.

Group IV, claim 6, drawn to an antibody to a gSAP.

Group V, claim 7, drawn to an vaccine comprising an immunogenic fragment of gSAP in combination with a suitable adjuvant and/or carrier.

Group VI, claim 8, drawn to a non-human gSAP knockout mammal, wherein its gene for gSAP is disrupted.

Group VII, claims 11-12, drawn to a derivative of imatinib wherein the methylpiperiziny moiety of imatinib is substituted or modified with a labeling group.

Group VIII, claims 13, 14-16, and 19-22, drawn to a method of identifying persons at risk of developing Alzheimer's disease, or a method of identifying a candidate for treatment with gSAP-targeted therapy, comprising measuring gSAP expression, or identifying patients having mutations or genetic variations affecting gSAP, or a method for inhibiting the accumulation of abnormal protein aggregates in a warm-blooded animal, or a method of treating Alzheimer's disease, and/or other disorders as indicated in claim 15, comprising administering an effective amount of a compound to inhibit gSAP activity.

Group IX, claim 18, drawn to use of gSAP derivatives in biochemical or genetic screening systems to identify further proteins in the gSAP macromolecular complex.

The inventions listed as Groups I-IX do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups I- VIII do not include the inventive concept of using biochemical or genetic screening systems to identify further proteins in the gSAP macromolecular complex, as required by Group IX.

Groups I-VII and IX do not include the inventive concept of measuring gSAP expression, or identifying patients having mutations or genetic variations affecting gSAP, or the inventive concept of administering an effective amount of a compound to inhibit gSAP activity as required by Group VIII.

Groups I-VI and VIII-IX do not include the inventive concept of a derivative of imatinib, as required by Group VII.

Groups I-V and VII-IX do not include the inventive concept of a non-human gSAP knockout mammal, wherein its gene for gSAP is disrupted, as required by Group VI.

Groups I-IV and VI-IX do not include the inventive concept of an vaccine comprising an immunogenic fragment of gSAP in combination with a suitable adjuvant, as required by Group V.

Groups I-III and V-IX do not include the inventive concept of an antibody to a gSAP, as required by Group IV.

Groups I-II and IV-IX do not include the inventive concept of a nucleic acid which is or which expresses a RNA construct capable of inhibiting gSAP expression in a mammalian cell, as required by Group III.

Groups I and III-IX do not include the inventive concept of a vector comprising a gene for a gSAP peptide operably linked to a heterologous promoter, as required by Group II.

Furthermore, among Group I+, each sequence in Table 1 (SEQ ID NO: 1-6), is structurally different from all others; and a peptide that is at least 60% identical to the claimed SEQ ID NO: 1 will not be at least 60% identical to the claimed SEQ ID NO: 2-6 because of the sequence differences among SEQ ID NOs: 1-6, and vice versa. Further more a peptide that is produced by a recombinant cell or a labeled peptide does not included the inventive concept of a fragment of gSAP capable of forming a complex with gamma secretase, a transgenic cell containing a heterologous gene which expresses the peptide, or a method of identifying compounds using the peptide, and vice versa, each peptide product or method requires different technologies to produce or detect.

*****Continued in the next extra sheet*****

PCT/US2010/002173 10.07.2012

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/02173

Continuation of

The previous extra sheet - Box No III (unity of invention is lacking)

The inventions Groups I-IV and VIII-IX share the technical feature of a gSAP peptide selected from a-g as indicated in claim 1, including a. A peptide at least 60% similar to a sequence selected from the sequences depicted in Figure 1, c. a peptide comprising the sequence Seq ID No.7 (LWDHPMSSNIISR) and/or Seq ID No.8 (NHVTRLLQNYKK), d. any of the peptides of Seq ID Nos. 1-6 as depicted in Figure 1, g. a fragment of approximately 16 kDa from the C-terminal of any of Seq ID Nos. 1-6 as depicted in Figure 1, wherein the gSAP peptide is isolated or separated from its natural environment. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, Uniprot_A4D1B5, discloses a PION sequence that is renamed as Gamma-secretase-activating protein, (Last modified: 20 May 2008 [Retrieved on 2011.11.10] URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/A4D1B5>), that is 100% identical to the claimed SEQ ID NO: 1. Please also see He et al. (Nature, 2010, Vol. 467, p. 95-98; pg 95, col 2, top para - 'we characterize PION as a GSAP'). Furthermore, US 2004/0171823 A1 to NADLER et al. (hereinafter 'Nadler') discloses an isolated peptide comprising the sequence Seq ID No.7 (LWDHPMSSNIISR) and/or Seq ID No.8 (NHVTRLLQNYKK) (para [0014] - 'isolated proteins, polypeptides, peptides ... which regulate the NF-kappa.B pathway ... comprise the amino acid sequences ... set forth in Tables 1-6'; para [0044] - the amino acid sequences shown in Tables 1-6 (SEQ ID NOS ...466', wherein SEQ ID NO: 466 (268 a.a.) comprising a region between amino acid residues 180-192, that is 100% identical to the claimed SEQ ID NO: 7, and a region between amino acid residues 193-204, that is 100% identical to the claimed SEQ ID NO: 8), and (g) a fragment of approximately 16 kDa from the C-terminal of Seq ID NO. 1, wherein the peptide is isolated or separated from its natural environment (para [0014] - 'isolated...peptides ... Tables 1-6'; para [0044] - the amino acid sequences ... in Tables 1-6 (SEQ ID NOS ...466', wherein SEQ ID NO: 466 (268 a.a.) is 100% identical to the C-terminal region between amino acid residues 587-854 of the claimed SEQ ID NO: 1 (854 a.a.), that is a fragment of about 29 kDa from the C-terminal of the claimed SEQ ID NO: 1 and comprises a fragment of approximately 16 kDa from the C-terminal of the Seq ID NO. 1; para [0043] - 'a protein fragment, or peptide ...is further embraced by the present invention'; pg 51, Table 4 - 'Oligodendrocyte...446'). Nadler further discloses wherein the isolated peptide is labeled (para [0112] - 'labeled NF-kappa.B pathway-associated polypeptide'; para [0014], [0044]; SEQ ID NO: 466). Although Nadler does not specifically teach the protein is a fragment of gSAP, the sequence of the peptide disclosed indicates the SEQ ID NO: 466 disclosed by Nadler is the c-terminal portion between amino acid residues 587-854 of gSAP having SEQ ID NO: 1. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

The inventions of Group IV and the claim 19 of Group VIII further share a technical feature of an antibody that binds to gSAP. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, Nadler further discloses an antibody against a gSAP peptide sequence (para [0016] - 'isolated antibodies,...that are specifically reactive with the NF-kappa.B-associated polypeptides'; para para [0014] - 'isolated proteins, polypeptides, peptides ... which regulate the NF-kappa.B pathway ... comprise the amino acid sequences ... set forth in Tables 1-6'; para [0044] - the amino acid sequences shown in Tables 1-6 (SEQ ID NOS ...466', wherein SEQ ID NO: 466 (268 a.a.) is 100% identical to the C-terminal region between amino acid residues 587-854 of the claimed SEQ ID NO: 1 (854 a.a.), that is a fragment of about 29 kDa from the C-terminal of the claimed SEQ ID NO: 1, as discussed above). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I-IX therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	C 0 7 K 7/08	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
	A 6 1 P 25/28	

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

(72) 発明者 ポール・グリーンガード
アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 - 6 3 9 9 ニューヨーク州ニューヨーク、ヨーク・アベニュー 1 2 3 0
番、ザ・ロックフェラー・ユニバーシティー

(72) 発明者 ウェンジー・ルー
アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 - 6 3 9 9 ニューヨーク州ニューヨーク、ヨーク・アベニュー 1 2 3 0
番、ザ・ロックフェラー・ユニバーシティー

(72) 発明者 ゲン・ヘ
アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 - 6 3 9 9 ニューヨーク州ニューヨーク、ヨーク・アベニュー 1 2 3 0
番、ザ・ロックフェラー・ユニバーシティー

(72) 発明者 ペン・リ
アメリカ合衆国 1 0 0 3 2 ニューヨーク州ニューヨーク、ブロードウェイ 3 6 9 0 番、イントラ -
セルラー・セラピーズ・インコーポレイテッド

(72) 発明者 ローレンス・ウェノグル
アメリカ合衆国 1 0 0 3 2 ニューヨーク州ニューヨーク、ブロードウェイ 3 6 9 0 番、イントラ -
セルラー・セラピーズ・インコーポレイテッド

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA40 DA20 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 BA80 CA01 DA02 DA05 FA02 GA11 HA01
4B065 AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA45 CA46
4C085 AA03 BB11 CC01 DD62 EE01 EE06 GG01
4H045 AA10 BA10 BA16 CA40 DA83 EA21 FA20 FA74

专利名称(译)	新型调节蛋白和抑制剂		
公开(公告)号	JP2013500741A	公开(公告)日	2013-01-10
申请号	JP2012523606	申请日	2010-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	细胞内治疗公司		
申请(专利权)人(译)	内部-蜂窝·塞拉珍珠·苹果公司		
[标]发明人	ポールグリーンガード ウェンジールー ゲンヘ ペンリ ローレンスウェノグル		
发明人	ポール・グリーンガード ウェンジー・ルー ゲン・ヘ ペン・リ ローレンス・ウエノグル		
IPC分类号	C12N15/09 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/68 G01N33/53 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A01K67/027 C07K7/08 A61K39/00 A61P25/28		
CPC分类号	A01K67/0275 A01K2207/05 A01K2217/058 A01K2217/15 A01K2217/203 A01K2227/105 A01K2267/0312 A61K31/506 A61K38/00 A61K39/0007 A61P9/00 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/28 C07K14/4705 G01N33/6896 G01N2800/2821 C07K16/18 C12N15/113 C12Q1/6827 C12Q1/686		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/53.M C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A01K67/027 C07K7/08 A61K39/00.H A61P25/28		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/CC01 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/BA16 4H045/CA40 4H045/DA83 4H045/EA21 4H045/FA20 4H045/FA74		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	61/231462 2009-08-05 US		
其他公开文献	JP6166534B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种先前未表征的蛋白质（蛋白质激活 γ 分泌酶或gSAP），其激活 γ -分泌酶并产生 β -淀粉样蛋白（A β ）。A β 的沉积与阿尔茨海默病和其他病理相关。因此，本发明进一步提供了例如筛选新蛋白质的方法和用于诊断，治疗和控制阿尔茨海默病和与A β 沉积相关的其他神经变性病症的新研究手段，抑制剂和方法。

Figure 6

