

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-536600

(P2004-536600A)

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int.Cl. ⁷		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 Q	1/02	C 1 2 Q	1/02	Z N A	2 G O 4 5
A 6 1 K	31/52	A 6 1 K	31/52		2 G O 5 4
A 6 1 K	38/00	A 6 1 K	45/00		4 B O 2 4
A 6 1 K	45/00	A 6 1 P	21/00		4 B O 6 3
A 6 1 P	21/00	A 6 1 P	25/00		4 C O 8 4
		審査請求 未請求 予備審査請求 有		(全 107 頁)	最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2003-508137 (P2003-508137)	(71) 出願人	504002997	ニュー ヨーク ステイト オフィス オ ブ メンタル ヘルス アメリカ合衆国 ニューヨーク州 アルバ ニー ホランド アベニュー 4 4	
(86) (22) 出願日	平成14年6月26日 (2002.6.26)	(74) 代理人	100102978		
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月26日 (2003.12.26)		弁理士 清水 初志		
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/020267	(74) 代理人	100108774		
(87) 国際公開番号	W02003/001881		弁理士 橋本 一憲	マッシュューズ ポール エム. アメリカ合衆国 ニューヨーク州 アービ ントン-オン-ハドソン ホーム プレイ ス 1 0	
(87) 国際公開日	平成15年1月9日 (2003.1.9)	(74) 代理人	100128048		
(31) 優先権主張番号	60/300, 959		弁理士 新見 浩一		
(32) 優先日	平成13年6月26日 (2001.6.26)	(72) 発明者	マッシュューズ ポール エム.		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 アービ ントン-オン-ハドソン ホーム プレイ ス 1 0	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 細胞に基づいた高スループットスクリーニング法

(57) 【要約】

本発明は、試験化合物の非特異的毒性による偽陽性結果を排除し、一方で疾病および疾患に関連した、特にアルツハイマー病に関連した代謝経路における細胞代謝産物を特異的に調節する化合物を検出することができる、細胞に基づいたスクリーニング法を記載する。本方法は、細胞に基づいた系において有効な化合物(薬物)を同定するための高スループットスクリーニング技術に特に適している。本発明の方法は、細胞系において目的の代謝前駆体および代謝産物の両方のレベルを決定することを含み、特に、アルツハイマー病などの疾病および疾患の進行に関連した前駆体および代謝産物分子に対する、高スループット薬物発見および同定において広範囲に適用される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

疾病または疾患に関連した1つまたは複数の細胞代謝産物の生成を、非特異的な細胞毒性を引き起こさずに減少または阻害する化合物を同定するための、細胞に基づいたスクリーニング法であって：

(a)試験化合物と細胞を接触させる段階；

(b)(i)細胞の前駆体タンパク質、または(ii)細胞の前駆体タンパク質のコンホメーション状態のレベルを決定する段階；および

(c)段階(b)の(i)または(ii)から生成される代謝産物のレベルを決定する段階を含み；細胞における代謝産物のレベルを特異的に減少または阻害する化合物は、非処理細胞における場合と比べて代謝産物のレベルのみの減少を示し、かつ非特異的な細胞毒性がある化合物は、(i)のレベル、および選択的に(i)または(ii)の関連した切断産物のレベル、および代謝産物のレベルの減少を示す、方法。

10

【請求項 2】

高スループットスクリーニング法である、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

代謝産物の特異的なエピトープに対する抗体、並びに前駆体タンパク質および選択的に、これに関連した切断産物の特異的なエピトープに対する抗体を使用して、マイクロタイタープレートの単一のウェルにおいて行われる、請求項1または2記載の方法。

【請求項 4】

細胞の前駆体タンパク質のレベルの測定が、細胞の前駆体タンパク質のエピトープに特異的な1つまたは複数の検出可能な抗体を含む酵素結合免疫吸着検定法によって行われる、請求項1記載の方法。

20

【請求項 5】

前駆体タンパク質によって生成される代謝産物のレベルの測定が、代謝産物のエピトープに特異的な1つまたは複数の検出可能な抗体を含む酵素結合免疫吸着検定法によって行われる、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

請求項1記載の方法であって、細胞の前駆体タンパク質(i)は、アミロイド前駆体タンパク質(APP)であり、並びに選択的に、関連した切断産物は、カルボキシ末端断片(CTF)、カルボキシ末端断片(CTF)、およびカルボキシ末端断片(CTF)である方法。

30

【請求項 7】

代謝産物が、翻訳後修飾された細胞の前駆体タンパク質、タンパク質またはペプチドのオリゴマー、タンパク質またはペプチドの多量体、プロト原繊維巨大分子、原繊維巨大分子、およびオリゴマー集合からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

代謝産物が、アミロイド前駆体タンパク質APPのタンパク質分解性産物である、請求項1記載の方法。

【請求項 9】

代謝産物が、カルボキシ末端断片(CTF)またはカルボキシ末端断片(CTF)である、請求項8記載の方法。

40

【請求項 10】

試験化合物と接触した細胞が、初代哺乳類細胞、哺乳類細胞株、神経芽細胞腫、ニューロン、単離された脳細胞、アミロイド前駆体タンパク質APPをコードする遺伝子でトランスフェクトされ、コードされたAPP産物を発現する細胞、およびアルツハイマー病の病理生物学を模倣するように遺伝的に修飾された細胞から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

細胞がヒト細胞またはヒト細胞株である、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

試験化合物が合成有機化合物、化学物質、天然の産物、ポリペプチド、またはペプチドか

50

ら選択される、請求項1記載の方法。

【請求項13】

疾病または疾患を発症する可能性の減少、または重篤度の減少と関連した1つまたは複数の細胞代謝産物の生成を、非特異的な細胞毒性を引き起こさずに増大または増強する化合物を同定するための、細胞に基づいたスクリーニング法であって：

(a)試験化合物と細胞を接触させる段階；

(b)(i)細胞の前駆体タンパク質、または(ii)細胞の前駆体タンパク質のコンホメーション状態のレベルを決定する段階；および、

(c)段階(b)の(i)または(ii)から生成される代謝産物のレベルを決定する段階を含み；細胞における代謝産物のレベルを特異的に増大または増強する化合物は、非処理の細胞に比べて代謝産物のレベルの増大を示すが、(i)または(ii)のレベルを有意に変化させない、方法。 10

【請求項14】

高スループットスクリーニング法である、請求項13記載の方法。

【請求項15】

代謝産物の特異的なエピトープに対する抗体、並びに前駆体タンパク質および選択的に、これに関連した切断産物の特異的なエピトープに対する抗体を使用して、マイクロタイタプレート上の単一のウェルにおいて行われる、請求項13または請求項14記載の方法。

【請求項16】

細胞の前駆体タンパク質のレベルの測定が、細胞の前駆体タンパク質のエピトープに特異的な1つまたは複数の検出可能な抗体を含む酵素結合免疫吸着検定法によって行われる、請求項13記載の方法。 20

【請求項17】

前駆体タンパク質によって生成される代謝産物のレベルの測定が、代謝産物のエピトープに特異的な1つまたは複数の検出可能な抗体を含む酵素結合免疫吸着検定法によって行われる、請求項13記載の方法。

【請求項18】

請求項15記載の方法であって、細胞の前駆体タンパク質は、アミロイド前駆体タンパク質(APP)またはAPPのその他のタンパク質分解性断片であり、並びに選択的に、関連した切断産物は、カルボキシ末端断片(CTF)、カルボキシ末端断片(CTF)、およびカルボキシ末端断片(CTF)である、方法。 30

【請求項19】

代謝産物が、翻訳後修飾された細胞の前駆体タンパク質、タンパク質またはペプチドのオリゴマー、タンパク質またはペプチドの多量体、プロト原繊維巨大分子、原繊維巨大分子、およびオリゴマー集合からなる群より選択される、請求項13記載の方法。

【請求項20】

代謝産物が、アミロイド前駆体タンパク質APPのタンパク質分解性産物である、請求項13記載の方法。

【請求項21】

代謝産物が、分泌性APPまたはAPPのカルボキシ末端断片(CTF)である、請求項20記載の方法。 40

【請求項22】

試験化合物と接触した細胞が、初代哺乳類細胞、哺乳類培養細胞株、神経芽細胞腫、ニューロン、単離された脳細胞、アミロイド前駆体タンパク質APPをコードする遺伝子でトランスフェクトされ、コードされたAPP産物を発現する細胞、およびアルツハイマー病の病理生物学を模倣するように遺伝的に修飾された細胞から選択される、請求項13記載の方法。

【請求項23】

細胞がヒト細胞またはヒト細胞株である、請求項22記載の方法。

【請求項24】

試験化合物が合成有機化合物、化学物質、天然の産物、ポリペプチド、またはペプチドから選択される、請求項13記載の方法。

【請求項25】

アルツハイマー病に関連した代謝事象に關与する細胞のタンパク質分解性経路の活性を特異的に減少する化合物と、細胞に対して非特異的な毒性がある化合物とを区別するための、細胞に基づいたスクリーニング法であって：

(a)試験化合物で細胞を処理する段階；

(b)1つまたは複数のアミロイド前駆体タンパク質(APP)代謝産物のレベルを検出する段階；

(c)アミロイド前駆体タンパク質(APP)のレベルを検出する段階；

10

(d)1つまたは複数のアミロイド前駆体タンパク質(APP)代謝産物のレベルに対する化合物の効果と、アミロイド前駆体タンパク質(APP)のレベルに対する化合物の効果とを比較する段階を含み；アミロイド前駆体タンパク質(APP)のレベルの有意な減少を伴わない、1つまたは複数のアミロイド前駆体タンパク質(APP)代謝産物のレベルの特異的な減少により、化合物が細胞のタンパク質分解性経路を特異的に阻害し、かつ非特異的な細胞毒性がないことが示される、方法。

【請求項26】

高スループットスクリーニング法である、請求項25記載の方法。

【請求項27】

段階(b)において、1つまたは複数のアミロイド前駆体タンパク質(APP)代謝産物が、アミロイド前駆体タンパク質APPのタンパク質分解性プロセッシングによって生じる、細胞に結合したカルボキシ末端断片(CTF)である、請求項25記載の方法。

20

【請求項28】

段階(c)において、さらに、アミロイド前駆体タンパク質(APP)のカルボキシ末端断片(CTF)、カルボキシ末端断片(CTF)、およびカルボキシ末端断片(CTF)を含むタンパク質分解性断片が検出される、請求項25記載の方法。

【請求項29】

1つまたは複数のアミロイド前駆体タンパク質(APP)代謝産物の特異的エピトープに対する抗体、およびアミロイド前駆体タンパク質(APP)の特異的エピトープに対する抗体を使用して、マイクロタイタープレートの単一のウェルにおいて行われる、請求項25または26記載の方法。

30

【請求項30】

1つまたは複数のアミロイド前駆体タンパク質(APP)代謝産物のレベルの測定が、1つまたは複数のAPP代謝産物のエピトープに特異的な1つまたは複数の検出可能な抗体を含む酵素結合免疫吸着検定法によって行われる、請求項25記載の方法。

【請求項31】

アミロイド前駆体タンパク質(APP)のレベルの測定が、アミロイド前駆体タンパク質(APP)のエピトープに特異的な1つまたは複数の検出可能な抗体特性を含む酵素結合免疫吸着検定法によって行われる、請求項25記載の方法。

【請求項32】

40

試験化合物と接触した細胞が、初代哺乳類細胞、哺乳類培養細胞株、神経芽細胞腫、ニューロン、単離された脳細胞、アミロイド前駆体タンパク質APPをコードする遺伝子でトランスフェクトされ、コードされたAPP産物を発現する細胞、およびアルツハイマー病の病理生物学を模倣するように遺伝的に修飾された細胞から選択される、請求項25記載の方法。

【請求項33】

細胞がヒト細胞またはヒト細胞株である、請求項32記載の方法。

【請求項34】

試験化合物が合成有機化合物、化学物質、天然の産物、ポリペプチド、またはペプチドから選択される、請求項25記載の方法。

50

【請求項 35】

アルツハイマー病に関連した代謝事象に関与する細胞のタンパク質分解性経路の活性を特異的に減少する化合物と、細胞に対して非特異的な毒性がある化合物とを区別するための、細胞に基づいたスクリーニング法であって：

(a)試験化合物で細胞を処理する段階；

(b)アミロイド前駆体タンパク質APPのタンパク質分解性プロセッシングによって生じる、細胞に結合した カルボキシ末端断片 (CTF)のレベルを検出する段階；

(c)アミロイド前駆体タンパク質 (APP)並びにこれに関連した カルボキシ末端断片 (CTF)、 カルボキシ末端断片 (CTF)、および カルボキシ末端断片 (CTF)を含む切断断片のレベルを検出する段階；

(d)APPの切断によって生じる CTFのレベルに対する化合物の効果と、アミロイド前駆体タンパク質 (APP)およびこれに関連した切断断片のレベルに対する化合物の効果を比較する段階を含み；対照と比べてアミロイド前駆体タンパク質 (APP)およびこれに関連した切断断片のレベルの有意な減少を伴わない、CTFのレベルの特異的な減少により、化合物が細胞のタンパク質分解性経路を特異的に阻害し、かつ非特異的な細胞毒性がないことが示される、方法。

10

【請求項 36】

高スループットスクリーニング法である、請求項35記載の方法。

【請求項 37】

カルボキシ末端断片 (CTF)の特異的エピトープに対する抗体、並びにアミロイド前駆体タンパク質 (APP)およびこれに関連した切断断片の特異的エピトープに対する抗体を使用して、マイクロタイタープレートの単一のウェルにおいて行われる、請求項35または36記載の方法。

20

【請求項 38】

アミロイド前駆体タンパク質APPのタンパク質分解性プロセッシングによって生じる、細胞に結合した カルボキシ末端断片 (CTF)のレベルの決定が、細胞に結合した カルボキシ末端断片 (CTF)のエピトープに特異的な1つまたは複数の検出可能な抗体を含む酵素結合免疫吸着検定法によって行われる、請求項35記載の方法。

【請求項 39】

アミロイド前駆体タンパク質 (APP)およびこれに関連した切断断片のレベルの決定が、アミロイド前駆体タンパク質 (APP)およびその関連した切断断片のエピトープに特異的な1つまたは複数の検出可能な抗体を含む酵素結合免疫吸着検定法によって行われる、請求項35記載の方法。

30

【請求項 40】

試験化合物と接触した細胞が、初代哺乳類細胞、哺乳類培養細胞株、神経芽細胞腫、ニューロン、単離された脳細胞、アミロイド前駆体タンパク質APPをコードする遺伝子でトランスフェクトされ、コードされたAPP産物を発現する細胞、およびアルツハイマー病の病理生物学を模倣するように遺伝的に修飾された細胞から選択される、請求項35記載の方法。

【請求項 41】

細胞がヒト細胞またはヒト細胞株である、請求項40記載の方法。

40

【請求項 42】

試験化合物が合成有機化合物、化学物質、天然の産物、ポリペプチド、またはペプチドから選択される、請求項35記載の方法。

【請求項 43】

アルツハイマー病代謝経路に関与する細胞の代謝産物の活性を減少または阻害する化合物を同定するための、細胞に基づいたスクリーニング法であって：

(a)アミロイド前駆体タンパク質 (APP)およびAPPの細胞結合代謝産物に対する1つまたは複数の捕獲抗体で被覆された基質上に配置された細胞を試験化合物で処理する段階；

(b)細胞を破壊する段階であって、抽出されたアミロイド前駆体タンパク質 (APP)およびAP

50

Pの細胞結合代謝産物を1つまたは複数の捕獲抗体に結合させる、段階；

(c)捕獲抗体に対するタンパク質の結合を検出抗体で検出する段階であって、検出抗体が、(i)1つまたは複数のAPP代謝産物を特異的に認識する標識された抗体、並びに(ii)アミロイド前駆体タンパク質(APP)および選択的に、そのカルボキシ末端のタンパク質分解性産物を特異的に認識する異なる標識を施された抗体を含む、段階；並びに

(d)(i)1つまたは複数のAPP代謝産物、および(ii)アミロイド前駆体タンパク質(APP)および選択的に、そのカルボキシ末端のタンパク質分解性産物のレベルを検出する段階であって、非処理細胞と比べてAPPタンパク質および選択的に、そのカルボキシ末端タンパク質分解性産物のレベルの有意な減少を伴わない、1つまたは複数のAPP代謝産物のレベルにおける減少により、化合物が細胞のタンパク質分解性経路を特異的に阻害し、かつ非特異的な細胞毒性がないことが示される、方法。

10

【請求項44】

高スループットスクリーニング法である、請求項43記載の方法。

【請求項45】

捕獲抗体がアミロイド前駆体タンパク質(APP)のカルボキシ末端に対するものである、請求項43記載の方法。

【請求項46】

1つまたは複数のAPP代謝産物が、CTF、CTF、およびCTFから選択される、請求項43記載の方法。

【請求項47】

20

1つまたは複数のAPP代謝産物がCTFである、請求項43記載の方法。

【請求項48】

試験化合物で処理された細胞が、初代哺乳類細胞、哺乳類培養細胞株、神経芽細胞腫、ニューロン、単離された脳細胞、アミロイド前駆体タンパク質APPをコードする遺伝子でトランスフェクトされ、コードされたAPP産物を発現する細胞、およびアルツハイマー病の病理生物学を模倣するように遺伝的に修飾された細胞から選択される、請求項43記載の方法。

【請求項49】

細胞がヒト細胞またはヒト細胞株である、請求項48記載の方法。

【請求項50】

30

試験化合物が、合成有機化合物、化学物質、天然の産物、ポリペプチド、またはペプチドから選択される、請求項43記載の方法。

【請求項51】

検出抗体が異なるフルオロフォアで標識される、請求項43記載の方法。

【請求項52】

前駆体および代謝産物が、標識された抗体で検出される、請求項1、13、25、35、および43のいずれか一項記載の方法。

【請求項53】

抗体が、フルオロフォア、酵素、化学発光分子、または放射性同位元素で標識される、請求項52記載の方法。

40

【請求項54】

請求項1または請求項13記載の方法によって検出される、疾病の進行に関連した代謝経路に關与する代謝産物の生成を特異的に減少する化合物。

【請求項55】

請求項1または請求項13記載の方法によって検出される、疾病の進行に関連した代謝経路に關与する代謝産物の生成を特異的に増大する化合物。

【請求項56】

請求項1、請求項13、請求項25、請求項35、または請求項43記載の方法によって検出される、アルツハイマー病に関連したタンパク質分解性代謝経路における代謝産物の生成を特異的に減少する化合物。

50

【請求項 57】

3-メチルアデニンまたはその機能的に関連した誘導体もしくは類似体である、請求項56記載の化合物。

【請求項 58】

請求項1、請求項13、請求項25、請求項35、または請求項43記載の方法によって検出される、アルツハイマー病に関連したタンパク質分解性代謝経路における代謝産物の生成を特異的に増大する化合物。

【請求項 59】

CTFである、請求項58記載の化合物。

【請求項 60】

10
疾病または疾患に関連した経路における細胞代謝産物を特異的に減少または増大し、かつ一般に細胞に有毒でない化合物を検出するためのキットであって、(i)細胞の代謝前駆体タンパク質または(ii)細胞の前駆体タンパク質のコンホメーション状態のレベルを決定するための1つまたは複数の検出可能な試薬を含む容器；ならびに(iii)1つもしくは複数の(i)または(ii)の前駆体タンパク質の代謝産物；および使用のための説明書を含むキット。

【請求項 61】

請求項60記載のキットであって、検出可能な試薬が、代謝前駆体タンパク質に特異的な1つまたは複数の標識されたまたは標識されていない抗体、および1つまたは複数の代謝産物に特異的な標識されたまたは標識されていない抗体を含み；並びに標識されていない特異的な抗体の示差的検出のための1つまたは複数の標識された二次抗体をさらに含む、キ
20
ット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書に記載される研究は、国立保健研究所、国立加齢研究所からの助成金番号P01AG17617によって部分的に支援される。

【0002】

発明の分野

本発明は、疾病および疾患の治療および/または予防における治療剤として有用な化合物(薬物)の同定および発見に使用するための、細胞に基づいたスクリーニング法、特に高ス
30
ループットスクリーニング系に適したものに関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

アルツハイマー病の一般的な特徴は、小さな、すなわち、約40~42残基の、脳実質における不溶性の β -アミロイドプラークとしてのA β ペプチドの沈着である。A β は、主にトランスゴルジ網(TGN)において、および細胞表面において見出される、広く発現されたタイプ1膜貫通タンパク質の約100kDaのアミロイド前駆体タンパク質(APP)のタンパク質分解によって生成される(B. De Strooper および W. Annaert, 2000, 「Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein.」 J. Cell. Sci., 40
113(Pt 11)(7): 1857-1870)。 β -アミロイド前駆体タンパク質APPは、D.J. Selkoeら、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85 (19): 7341-7345; R.E. Tanziら、1988, Nature , 331 (6156): 528-530; およびE. Levyら、1990, Science, 248 (4959): 1124-1126にさらに記載されている。

【0004】

APPの α -切断は、管腔/細胞外のドメイン内のAPPで生じ、2種のAPP断片：(i)細胞から分泌される大きな、可溶性のアミノ末端断片(sAPP)、および(ii)細胞と結合したままである膜貫通カルボキシ末端断片(β -CTF)を生成する。この β -CTFは、全A β ペプチドを含む99アミノ酸を含み、約10kDaの分子量を有する。

【0005】

別の経路は、 β -切断部位から16残基下流の γ -切断部位におけるAPPの切断に関係する。

β -切断と同様に、 γ -切断は、細胞から分泌される分泌型APP(sAPP)断片を生成し、CTF (の84残基および約8kDa)は、膜に結合したままである。 γ -切断は、A β ペプチド配列内で生じ、このように、所与のAPP分子からのA β の生成を防止する。A β は、主に40残基において生じる膜内切断(γ -切断)によってCTFからより小さな範囲に、 β -切断部位から42残基下流において生成され、A β 140またはA β 142を放出する。

【0006】

最近、 β -および γ -切断の原因である主なプロテアーゼ/プロテアーゼ複合体(すなわち、 β -および γ -セクレターゼ)の同定において多大な進歩があった。第一に、膜貫通アスパルチルプロテアーゼファミリーのメンバーであるBACEプロテアーゼが、Citronおよび同僚らによって同定され(R. Vassarら、1999, Science, 286 (5440): 735-741)、細胞内における γ -セクレターゼ活性の多くについて説明されたように思われる。BACEは、エンドソーム-リソソームパターンの分配、並びに酸性の至適pHを有する(R. Vassarら、1999, Science, 286 (5440): 735-741; A. Capellら、2000, J. Biol. Chem., 275 (40): 30849-30854; およびJ. Walterら、2001, J. Biol. Chem., 276 (18): 14634-14641)。さらに、エンドサイトーシスの系におけるBACEを媒介したAPPの切断は、初期のエンドソームがA β 生成に重要な部位であることをAPPの種々の輸送変異体を介して同定した、従来の研究と一致する(E.H. Koo および S. L. Squazzo 1994, J. Biol. Chem., 269 (26): 17386-17389; R. Perezら、1999, J. Biol. Chem., 274 (27): 18851-18856; S. Sorianoら、1999, J. Biol. Chem., 274 (45): 32295-32300; 並びにA.M. Cataldoら、2000, Am. J. Pathol 157 (1): 277-286)。

【0007】

プレセリニン(PS)タンパク質は、 γ -切断において本質的な役割を果たし：家族性ADの発現を引き起こす変異プレセリニンは、残基42で終わるA β の産生を増大する(D.R. Borcheltら、1996, Neuron, 17 (5): 1005-1013; K. Duffら、1996, Nature, 383 (6602): 710-713)。PSヌル表現型は、A β を生成する細胞の能力がないこと、およびCTF類の細胞内蓄積を含む(J. Shenら、1997, Cell, 89 (4): 629-639)。最近の研究では、PS自体が γ -セクレターゼとして直接関係していたが(M.S. Wolfeら、1999, Nature, 398 (6727): 513-517)、ニカストリンなどのPS複合体内のその他のタンパク質は、多分に γ -切断に直接関与しているのであろう(G. Yuら、2000, Nature, 407 (6800): 48-54)。

【0008】

BACEおよびPS複合体は、主要な β -および γ -セクレターゼであろうが、実質的な実験的研究では、その他のプロテアーゼ、特にリソソームのものが関与していた(R.A. Nixonら、2000, Neurochem. Res., 25 (9-10): 1161-1172; およびP.M. Mathewsら、2002, J. Biol. Chem., 277: 5299-5307)。これらのその他のプロテアーゼの相対的な寄与により、これらがエンドサイトーシス区画に誤って輸送されるために、ADにおいて増加している可能性がある(A.M. Cataldoら、1995, Neuron, 14 (3): 671-680; A.M. Cataldoら、1996, Adv. Exp. Med. Biol., 389: 271-280; A.M. Cataldoら、1997, Neuroscience, 17 (16): 6142-6151.; A.M. Cataldoら、2000, Am. J. Pathol., 157 (1): 277-286; R.A. Nixonら、2000, Neurochem. Res., 25 (9-10): 1161-1172; O.M. Grbovicら、2001, Society for Neuroscience annual meeting 2001; および2000年4月28日に出席されたR.A. Nixonらによる米国特許出願第09/560,124号"Methods for the identification of compounds for the treatment of Alzheimer's disease"; to)。

【0009】

実質的な努力は、現在、A β を引き起こす種々のタンパク質分解性事象を阻害する薬物の同定に向けられている。現在のアプローチは、典型的には、精製された酵素を使用するスクリーニングに基づく。これらのアプローチの限界には多種があり、(1)単にインビトロ阻害剤をインビボでの使用に移行することの困難性；(2)本来の仮定がプロテアーゼ標的の同定についてなされること、およびおそらく最も有意には；(3)このようなアプローチは、数ある要因の中で、タンパク質輸送、局所的環境(たとえばpH)、および複雑な酵素相

相互作用が関連する、細胞の複雑な環境におけるA β の発生に影響を及ぼすであろう化合物を検出しないことを含む。この例には、エストロゲン置換療法がADに対して保護性であろう機構によるものであり：エストロゲンは、非A β 生成経路に沿ってAPPの細胞内輸送を促進することによって作用すると考えられる(A.B. Jaffeら、1994, J. Biol. Chem., 269 (18): 13065-13068; H. Xuら、1998, Nat. Med., 4 (4): 447-451; およびS. Gandy and S. Petanceska, 2000, Biochim. Biophys. Acta, 1502 (1): 44-52)。

【0010】

本発明によって提供されるスクリーニング法は、細胞に基づいたスクリーニングの労働集約的なおよび技術的な限界の多くを克服し、一方では同時に、使用者が、細胞応答の複雑さを利用することを可能にし、現在治療することが困難である疾病および疾患、たとえばAD、パーキンソン病、ハンチントン病、リソソームの貯蔵疾患、プリオン疾患、タウに基づく神経変性疾患(tauopathies)、およびその他の非ADアミロイドシスの治療に有益であると考えられる。

10

【発明の開示】

【0011】

発明の概要

本発明は、疾病および疾患、好ましくは1つまたは複数の代謝産物が代謝前駆体または前駆体類から生成され、かつ経路における1つまたは複数の代謝産物の増加または減少が疾病に関連した、代謝および/またはタンパク質分解経路に関連した疾病および疾患を治療するための新規薬物の同定および発見のための、高スループットスクリーニング解析に特

20

【0012】

本発明の細胞に基づいたスクリーニング法は、細胞に基づいた高スループットアッセイスキームにおいて典型的に得られる偽陽性結果の数を劇的に減少する効果を提供する。本発明の使用により、有利には代謝および/またはタンパク質分解経路を特異的に調整する化合物の同定を可能にする。さらに、本発明の方法は、高スループットスクリーニング解析を受けている細胞に対して一般的小および非特異的な毒性があり、その他のアッセイでは潜在的な治療剤として誤って同定され得る化合物を同定する能力を提供する。したがって、本発明は、このような化合物が非特異的に小および/または一般的に細胞に対して毒性がある場合に、潜在的な治療剤としての化合物を除去することができる。

30

【0013】

本発明の1つの局面は、好ましくは、高スループットスクリーニング系において、検出される偽陽性の数を減少させて、効率的かつ確実なスクリーニング技術を得るために、代謝前駆体タンパク質(たとえば、APP)および対応する代謝産物(たとえば、CTF)の両方、好ましくは、生物学上意味がある代謝産物のレベルが決定される、多用途の細胞に基づいたスクリーニング法を提供することである。また、本発明によれば、本明細書に記載されたスクリーニング法により、疾病または疾患に関連した経路における前駆体タンパク質の種々のコンホメーション状態のレベルの検出が提供される。このような方法において、代謝前駆体および代謝産物は、たとえば、プリオン病におけるものなどの、それぞれ同じタンパク質の異なるコンホメーション状態であり得る。もう一つの例として、前駆体タンパク質は、リン酸化されていないこともでき、かつ代謝産物は、前駆体タンパク質のリン酸化された形態である。

40

【0014】

このようなスクリーニング技術は、代謝前駆体タンパク質(たとえば、APP)による細胞のプロセッシング事象(たとえば、 β -セクレターゼ切断)を最終的に調整、たとえば減少または阻害または増加または増大し、これによりアルツハイマー病などの疾病の進行に關与する1つまたは複数の代謝産物の生成に影響を与える化合物の同定を可能にする。

【0015】

本発明の特定の局面は、アルツハイマー病の治療、治療法、および/または予防のための薬物および新規薬物を見出すまたは同定するために、好ましくは高スループットスクリー

50

ニング技術と連動して、 β -切断阻害剤のための特異的かつ高感度なアッセイ/検出系を提供することである。本スクリーニング法は、本発明に従って、アルツハイマー病の治療のためのおよび/またはアルツハイマー病に関する疾病および症状の治療、たとえば β -アミロイド関連疾患のための薬物開発に使用することができる、A β の発症に重要なタンパク質分解事象の阻害剤の検出を可能にする。

【0016】

本発明のさらにもう一つの局面は、アミロイド前駆体タンパク質APPの、細胞に結合したタンパク質分解または切断代謝産物を検出するために、好ましくは高スループットスクリーニング技術と連動して、非常に感受性があり、かつ特異的な新規免疫アッセイ法、すなわち、ELISAを提供することである。本発明によれば、1つの新規ELISAにより、経路に沿って、APPのタンパク質分解性プロセッシングから生じる小ペプチドのA β に産生され、およびアルツハイマー病の発生の中心であると考えられる、鍵となるペプチド断片のCTFの特異的な検出が可能となる。本発明に従った第二の新規ELISAにより、APPホロタンパク質および既知の全てのAPP CTF類(すなわち、 β -CTF、 γ -CTF、および α -CTF)の検出が可能となる。これらのELISAは、APPの β -セクレターゼ切断を阻害するであろう化合物を処理した生細胞のA β 産生経路に沿ったAPPの代謝を決定するための強力な手段として、組み合わせて使用することもできる。

10

【0017】

本発明のさらなる局面、特徴、および利点は、添付の図/図面と共に考慮して発明の詳細な説明を読むことにより、より良く認識される。

20

【0018】

発明の説明

本発明は、好ましくはその代謝前駆体から生じる代謝産物もしくは産物の生成を調整する、または影響を及ぼす薬物に化合物または薬物のための試験を受けている細胞における、代謝前駆体およびその生物学的に関連した代謝産物または産物の両者のレベルを決定するための、効率的かつ経済的である、感受性がありかつ特異的なスクリーニング法/系を記載する。調整するとは、分子の生理活性を変化させること、すなわち、減少させる(すなわち、減少し、阻害し、もしくは遮断する)、または増加させる(すなわち、活性化し、増大し、もしくは増強する)ことを意味する。本明細書において使用されるものとして、化合物は、生物学的薬物もしくは生理活性薬物、または薬物、または物質、または成分、または生体分子、たとえば、さらに本明細書に記載したものをいう。実例として、標的分子の機能もしくは活性または疾病もしくは疾患に関連した代謝的なまたはタンパク質分解性のプロセスは、たとえば、減少され、低下され、もしくは阻害され;または、増加され、増強され、もしくは増大されることによって調整される。

30

【0019】

本発明の好ましい態様において、標的分子または代謝的もしくはタンパク質分解性のプロセスの機能または活性は、減少され、低下され、または阻害される。好ましくは、本発明のスクリーニング法/系は、高スループットスクリーニング法を使用して行われ、より好ましくは、細胞に基づき、したがって、検出可能およびアッセイ可能な代謝前駆体(たとえば、タンパク質)、並びにこれに関連したその代謝産物(たとえば、タンパク質のタンパク質分解性断片)を有する種々の疾病および疾患のための多くの薬物発見スキームに対する適応性を提供する。

40

【0020】

より詳細には、特にアルツハイマー病のための治療および治療法に関して、本発明は、効率的かつ経済的な方法で、細胞によって生成されるA β 産物の量を最終的に減少する治療薬、化合物、または薬物を同定する方法および手順を提供する。上述したように、A β ペプチドは、アルツハイマー病の衰弱効果の一部としての脳実質における不溶性の β -アミロイドプラークを形成する。本方法は、アルツハイマー病の新たな治療および/または予防の決定および利用を可能にする。また、本発明の方法は、たとえば、代謝産物の産生を減少することによって影響を与える、タンパク質分解性もしくは代謝的な経路またはその

50

他の細胞の事象を調整する分子のスクリーニングおよび決定を可能にする。したがって、本発明の細胞に基づいた方法は、有利には、タンパク質、たとえばタンパク質分解性酵素と、その標的、たとえば基質、たとえば β -セクレターゼおよびAPPとの相互作用を阻止する細胞プロセスを調整する化合物または生理活性薬物を同定するために使用することができる。

【0021】

生細胞における高スループット薬物スクリーニングでは、特に活性の減少をアッセイするときに、圧倒的な数の偽陽性ヒットを生じることが多い。これは、試験を行う多くの化合物および薬物が単に毒性があり、往々にして非特異的な毒性が標的の活性を減少させるという理由のためである。この理由のため、所望の結果が特定の細胞活性の減少であるときは、生細胞の高スループットスクリーニングは、まず行われたい。特に本明細書において記載したとおり、細胞によるA β 生成を減少する化合物(D.J. Selkoe, 1999, Nature, 399 (6738 Suppl): A23-31; D.J. Selkoe, 2001, Physiol. Rev., 81 (2): 741-66)および/または脳におけるA β 蓄積を減少する化合物(C. Janusら、2000, Nature, 408 (6815): 979-82; D. Morganら、2000, Nature, 408 (6815): 982-985)は、治療的価値を有していそうであるので、これがアルツハイマー病薬物発見に対する難しいハードルである。

10

【0022】

本発明に従って、新規なスクリーニング法、好ましくは細胞に基づいた方法であって、非特異的な毒性による偽陽性ヒットを排除でき、一方で種々の疾病状態に関連または連結した産物の経路において、たとえばアルツハイマー病に関連したA β 生成の経路に沿って生成される、特に有益な細胞の代謝産物を検出することができる方法が開発された。疾病状態に関連し、おそらく疾病状態の原因であり、および/または疾病状態を悪化させる、代謝経路において機能的に作用している分子を標的とする化合物を同定するために、細胞毒性に関連した偽陽性を克服することにより、高スループットの細胞に基づいたスクリーニングを実用的な、経済的な、かつ魅力のあるアプローチにする。

20

【0023】

実際に、一旦化合物が細胞に基づいた系において有効であると同定されたならば、たとえば精製された酵素、または同様の、より複雑ではないインビトロ系を使用して同定された化合物またはその他の分子のものよりも大きな、インビボにおける有効性および臨床実務への移行の確率を有する。

30

【0024】

本発明の好ましい態様は、アミロイド前駆体タンパク質 β -セクレターゼ、たとえば膜貫通アスパラギン酸プロテアーゼBACE(R. Vassarら、1999, Science, 286 (5440): 735-741)などの、標的タンパク質分解酵素の修飾因子またはエフェクター、好ましくはアンタゴニストまたは阻害剤をスクリーニングするために特異的にデザインされた、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)に基づいた方法およびアプローチである。本発明に従った方法は、アミロイド前駆体タンパク質APPおよびその切断断片(代謝産物)、すなわち、CTF、CTF、およびCTFを単独で、または組み合わせて検出することを含む。

【0025】

本発明に係る方法は、関心対象の代謝前駆体のレベルおよび代謝産物のレベルの両者を細胞系内で決定するために、一般に適用することができる。これらの方法により、タンパク質分解性経路を含む代謝プロセスまたは経路に関与する前駆体および分解分子に影響を及ぼす(たとえば、代謝前駆体からの代謝産物の生成を阻害する、またはたとえば、前駆体もしくはタンパク質の産生もしくは分泌を増大する)修飾因子、たとえば阻害剤、遮断薬、もしくはアンタゴニスト; またはアゴニストもしくは活性化因子を同定することができる。

40

【0026】

アルツハイマー病治療のためのスクリーニング法を提供することに加えて、特に本明細書において例示したとおり、本発明は、その他の多くの疾病および疾患に関連した代謝産物およびそれらの前駆体の細胞環境においてスクリーニングするための方法を提供する。こ

50

のような疾病および疾患の非限定的な例には、アミロイドまたは異常に蓄積された産物を生成する酵素の系が標的とされる、リソソーム貯蔵疾患、パーキンソン病、ハンチントン病、ニューロンのセロイド・リポフスチノーシス、タウに基づく神経変性疾患(tauopathies)、および非ADアミロイドーシス(たとえば、封入体筋炎)、並びにアッセイ可能な代謝分解タンパク質もしくはペプチド産物、または前駆体ポリペプチドから誘導される代謝産物の生成があるその他の症状を含む。更なる例には、プリオン病などの、ユニークなコンホメーション状態のタンパク質が蓄積する疾病を含む。

【0027】

このような疾患において、および本発明の目的のために、正常な、非病理学的なコンホメーションが前駆体であり、一方、有毒なオリゴマーのペプチドを含み得る異常なコンホメーション状態が代謝産物であり、特異的かつ検出可能な抗体などの適切かつ特異的なプローブを使用して、両者をアッセイすることができる。代謝産物と前駆体の関連性には、リン酸化などのその他の翻訳後修飾を含むことができる。ここで、前駆体タンパク質基質および翻訳後修飾されたポリペプチドは両方とも、たとえばタウ症(tauopathies)によさ示したようにアッセイすることができる。さらに、本発明の代謝産物は、タンパク質またはペプチド複合体(たとえば、二量体、三量体、多量体)、オリゴマー、ポリマー、オリゴマー集団、またはたとえば原繊維(protofibrillar)および小繊維分子もしくは巨大分子、たとえばA_β、または巨大分子複合体などの2つ以上のペプチドもしくはタンパク質の結合により生じる分子を含むシートまたはその他の配置のタンパク質もしくはペプチド集合を含む。好ましくは、代謝産物または一つもしくは複数のその部分は、抗原性であり、抗体によって検出可能である。

10

20

【0028】

好ましい態様において、細胞に結合したAPPのタンパク質分解性または切断代謝産物を検出するための非常に感受性があり、かつ特異的な新規のELISA、たとえばサンドイッチELISAが、特に高スループットスクリーニング方法論に関して開発され、本明細書に記載されている。多くの最近の研究は、ADの発病において中心的であると思われるAPPのタンパク質分解性プロセッシング(これにより、小ペプチドA_βが生じる)を修飾することに向けられている。本明細書に記載されたELISAのうちの1つは、A_β-CTF経路に沿って生成される重要なペプチド断片を特異的に検出することができる。第二のELISAでは、APPホロタンパク質、および選択的に、全ての既知のAPP CTF類(すなわち、CTF₁、CTF₂、およびCTF₃)を検出することができる。合わせると、これらのELISAは、APPのβ-セクレターゼ切断を阻害する可能性のある化合物で処理した生細胞において、A_β生成経路に沿ってAPPの代謝を決定するための強力な手段である。

30

【0029】

さらにサンドイッチELISAを単一の系、好ましくは高スループット系と組み合わせることにより、細胞に対して毒性のある化合物を、重要なAPPタンパク質分解工程を特異的に減少するものから迅速に区別することができる。毒性の薬物および化合物は、細胞増殖の減少、細胞生存率の減少、タンパク質生合成毒としての作用、または細胞の代謝を全体的に損なわせるその他の方法などの機構により、APPホロタンパク質、並びに細胞に基づいたスクリーニングにおいて検出されるCTF切断産物のレベルを減少する可能性がある。このような毒性作用は、APP/全CTF ELISAにおいて、シグナルの減少によって検出されるであらう。

40

【0030】

しかし、CTF生成を特異的に減少する化合物およびCTF ELISAシグナルのみの減少を示す化合物は、APP/全CTF ELISAからのシグナルを減少させる可能性はない。したがって、高スループットスクリーニングでは、非処理の細胞からのシグナルと比較して、化合物での処理によって生じるCTF ELISAシグナルの減少を容易に基礎付けることができるが、同じ化合物での処理では、非処理の細胞と比較して、APP/全CTF ELISAシグナルに変化を示さない。したがって、CTF生成を特異的に減少させる化合物は、CTF ELISAにおいてCTFレベルの減少を示し、APP/全CTF ELISAのレベルの有意な減少を示さないと考えら

50

れる。対照的に、一般的に毒性の化合物は、ELISAに基づいたアッセイ法においてシグナルの減少によって検出されるものとして、CTF ELISAレベルおよびAPP/全CTF ELISAレベルの両者を低下させる可能性がある。したがって、本発明に従った方法により、当業者は、非特異的な細胞毒性、または一般的な細胞毒性のある化合物から、-切断特異的な阻害剤化合物を区別することができる。

【0031】

高スループットスクリーニングにおけるさらなる利益は、経時的なアッセイ法において上記2つのELISAを重ね合わせることであり、これにより、並列に96ウェルマイクロタイタープレート(たとえば、図9A~9Dおよびその記載を参照されたい)を使用する必要がなくなる。このようなプロトコルにより、1つまたは複数の標的前駆体タンパク質および1つまたは複数の標的代謝産物に対して特異的な抗体を使用して、アッセイ細胞が培養されている同じウェルにおいて、本方法を実施することができる。本明細書に記載された特定のELISAが、細胞を培養している単一のウェルを使用してうまく行われるのは、一部はC1/6.1およびC2/7.1モノクローナル抗体によって検出されるユニークな細胞内APPエピトープのためである。APPおよび代謝産物などの前駆体タンパク質を含む特定のエピトープに特異的なモノクローナル抗体の産生およびスクリーニングは、当業者には周知である。さらに、必要なプレートおよび行われるアッセイの数を減少させることにより、明らかに費用的利益を有し、かつそれぞれの測定が同じウェル内で行われる対照測定を有するので、アッセイの信頼性が高まる。

10

【0032】

本発明の細胞に基づいた方法を行う際に、修飾因子、好ましくはアンタゴニストまたは阻害剤化合物を同定するために、試験化合物による試験および処理を受けている細胞は、ヒト細胞もしくは細胞株を含む培養されたか、または確立された哺乳類細胞もしくは細胞株、神経細胞、ニューロン、神経芽腫細胞、アミロイド前駆体タンパク質(APP)をコードする遺伝子でトランスフェクトされ、APPを発現する細胞、アルツハイマー病発病に関連したタンパク質(たとえば、プレセニリン(R. Sherringtonら、1995, Nature, 375 (6534): 754-760)をコードする遺伝子をトランスフェクトした細胞、およびrab5過剰発現(O. M. Grbovicら、2001, Society for Neuroscience, annual meeting 2001)などの、アルツハイマー病発病の側面を模倣するように遺伝的に改変された細胞を含みうるが、これらに限定されない。

20

30

【0033】

アルツハイマー病発病の側面を模倣するように遺伝的に改変された細胞のさらなる例は、2000年4月28日に出願されたR.A.Nixonらによる特許出願の米国出願番号第09/560124号「アルツハイマー病の治療のための化合物の同定のための方法」; Alzheimer's Disease: Advances in Etiology, Pathogenesis and Therapeutics (Iqbal K, Sisodia SS, Winblad B, editors), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 461-467; および P.M. Mathewsら、2002, J. Biol. Chem., 277: 5299-5307)に記載されたものを含むが、これらに限定されない。適切な細胞は、脊椎動物、好ましくはヒトを含む哺乳類、脳組織から単離された初代細胞、たとえば、またはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(American Type Culture Collection: ATCC)、10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209から入手可能なものなどの、確立された細胞株、および/またはトランスフェクトされたか、もしくは形質転換された細胞培養であってもよい。

40

【0034】

本発明のスクリーニング法において使用される試験化合物は、本明細書に記載されたものであり、たとえば、合成有機化合物、化学物質、天然物、ポリペプチド、およびペプチドを含むがこれらに限定されない。

【0035】

さらに、本発明のスクリーニング法は、阻害剤化合物、特に、アルツハイマー病に関連したA β の生成において重要なタンパク質分解性事象の阻害剤の、効率的な細胞に基づいたスクリーニングを可能にする。本発明のスクリーニング法および検出法は、APP代謝産物

50

の CTFのレベルを特異的に減少し、ADの進行に関連した代謝経路に關与する、化合物3-メチルアデニン(3MA)を使用する非限定の方法において示されている(実施例6および図10A~10Dを参照されたい)。

【0036】

さらに、本発明の代謝前駆体および生物学上意味がある代謝産物の両方のレベルが両方とも決定される方法は、その他の細胞に基づいたアッセイ法のための高スループットスクリーニングに適用性を有する。実例として、本発明は、対となつたらせんフィラメントの異常な蓄積に関連するタウのホスホ-エピトープの特異的な減少または増加をスクリーニングするための方法を想定する。たとえば、このような条件において、代謝前駆体は、タウであり、生物学上意味がある代謝産物は、特異的にリン酸化された形態のタウ(すなわちホスホ-タウ)である。

10

【0037】

さらに、タンパク質またはペプチド、たとえばAPP前駆体または1つもしくは複数の特定の代謝産物、たとえば分泌されたAPPの増大を可能にする化合物の検出は、有益であろう。たとえば、分泌されたAPPは、神経保護効果を有しているかもしれない。さらに、CTFの生成は、A β 生成を妨げ、したがって防護効果を有し得る。

【0038】

したがって、その局面の1つにおいて、本発明は、疾病または疾患に関連した1つまたは複数の細胞の代謝産物の生成を調整する(すなわち、(i)減少する、阻害する、低下する、もしくは阻害する；または(ii)増加する、増強する、または増大させる)化合物を、非特異的細胞毒性を引き起こさずに同定するための、細胞に基づいたスクリーニングまたは検出方法を包含する。本方法は、試験化合物と細胞を接触させることと；細胞の前駆体タンパク質のレベル、または細胞のタンパク質の前駆体コンホメーション状態のレベルを決定することと；次いで細胞の前駆体タンパク質から生成される代謝産物のレベルを決定することとを含む。代謝産物は、前駆体タンパク質の分解産物または切断産物であることもでき、または、これは修飾された形態の前駆体ポリペプチドの状態、たとえば翻訳後修飾されたポリペプチドであることもできる。本方法によれば、細胞における代謝産物のレベルを特異的に減少させるまたは阻害する試験化合物は、非処理の細胞と比較して代謝産物のレベルのみの減少を示し、非特異的な細胞毒性のある試験化合物は、細胞の前駆体タンパク質、並びに選択的に、その関連した切断産物および代謝産物のレベルの両方の減少を示す。

20

30

【0039】

そのもう一つの局面において、本発明は、疾病もしくは疾患を発症する可能性の減少または重篤度の減少と関連した1つもしくは複数の細胞の代謝産物の生成を増大または増強する化合物を、非特異的な細胞毒性を引き起こさずに同定するための、細胞に基づいたスクリーニング法および検出法を包含する。これらの方法は、試験化合物と細胞を接触させることと；細胞の前駆体タンパク質のレベルまたは細胞のタンパク質の前駆体コンホメーション状態のレベルを決定することと；次いで、細胞の前駆体タンパク質から生成される代謝産物のレベルを決定することとを含む。代謝産物は、上記の通りである。この方法に従って、細胞における代謝産物のレベルを特異的に増大するまたは増強する化合物は、非処理の細胞と比較して、代謝産物のレベルの増加を示すが、有意に前駆体のレベルを変化させない。

40

【0040】

したがって、本発明は、多くの薬物の同定および発見スキームに、好ましくは高スループットスクリーニング型式における用途に適している幅広い細胞に基づいたスクリーニングアプローチを提供する。自動化された高スループットスクリーニングは、たとえばBurbauerら、1997, Current Opinion in Chemical Biology, 1: 72-78；およびSchullickら、1997, Analyt. Biochem., 246: 20-29に記載されている。限定されない例として、本発明に従った高スループットスクリーニングにおいて、液体を取り扱う操作は、Microlab 2000(商標)ピペット操作台(たとえば、Hamilton Instruments)によって行うことができる。ス

50

クリーニングに必要とされるその他の設備(たとえば、インキュベーター、プレート洗浄器、プレートリーダー)は、自動化機能に適しているか、または必要に応じて、自動化モジュールとして商業的に購入することもできる。アッセイを介した試料の移動は、ロボット、たとえばXP(商標)3m長トラックを搭載するロボット(Zymark, Hopkinton, MA)によって行うことができる。

【0041】

本発明に係るスクリーニング方法を介して、合成有機化合物、天然物、ペプチド、およびオリゴヌクレオチドのライブラリーを、これらが疾患プロセスを反映するか、または寄与する特定の標的代謝タンパク質およびこれらの産物(たとえば、切断産物)を調整する能力について評価することができる。特に、化合物が、疾病または疾患に関連した代謝経路において標的とされる成分、たとえば前駆体のプロセッシングに關与する代謝前駆体またはタンパク質分解性酵素であることを同定することができる。たとえば、疾患を引き起こすか、もしくは悪化させ得る、生じた細胞の代謝産物への変換または蓄積を防止するために、化合物が、APPに対する γ -セクレターゼのタンパク質分解活性を特異的に阻害することを確認または同定することができる。

10

【0042】

さらにもう一つのその局面において、本発明は、活性化合物または本明細書に記載された方法の実施において試験され、同定され、もしくは検出された化合物を包含する。非限定的に、本発明の方法(実施例6)において有効性を示す代表的な化合物は、3-メチルアデニン(3MA)およびその関連した誘導体、類似体、または修飾された形態であり、好ましくはその機能または活性を変化しないものである。

20

【0043】

活性化合物は、必要に応じて医薬品化学を経て最適化することができる。まず最初に、たとえばファルマコフォア(類)は、現代の計算機化学的手段を使用して定義することができる、これは、高スループットスクリーンにおいて活性があることが見出された構造を表す。一旦コンセンサスファルマコフォアが同定されると、構造活性の相関を探索するために、集中した化合物のコンビナトリアル・ライブラリーをデザインすることができる。最後に、効力および効率などのリード構造のセットの生物薬物学的性質は、臨床試験のための適切な化合物を同定するために改善することができる。

【0044】

したがって、本発明は、疾病もしくは疾病の増強を引き起こす産物の産生または増強の原因となる細胞内前駆体産物の活性により生じる疾病および症状を治療するための治療的な方法に利用することができる化合物を同定するための新規の細胞に基づいた方法を提供する。

30

【0045】

抗体および抗体産生

抗体という用語は、エピトープに結合することまたは抗原性を決定することができる、無処理の分子並びにFab、 $F(ab')_2$ 、Fvなどのその断片を指す。代謝タンパク質、ポリペプチド、またはペプチド、たとえばAPPに結合する抗体は、無処理のポリペプチドまたは関心対象の小ペプチドを含む断片もしくは免疫抗原として使用するために組換えで調製された断片を使用して調製することができる。(表1、実施例1を参照されたい)。動物を免疫するために使用されるポリペプチドまたはオリゴペプチドは、RNAの翻訳に由来するか、または化学的に合成することができ、必要に応じてキャリアタンパク質との複合体とすることもできる。化学的にペプチドに連結する、共通して使用されるキャリアは、ウシ血清アルブミン(BSA)、キーホールリンベットヘモシニアン(KLH)、およびサイログロブリンを含む。次いで、結合したペプチドを、動物を免疫するために使用する(たとえば、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、またはウサギ)。

40

【0046】

「ヒト化された」抗体という用語は、たとえば、限定されない例であるが、C. L. Queenらにより米国特許第5,585,089号に記載されたような、ヒト抗体により近く似せるために

50

、非抗原結合領域、たとえば相補性決定領域(CDR)のアミノ酸が置換されているが、元の結合能力を保持する抗体分子をいう。トランスジェニックにより、または組換えにより産生されたものなどの完全にヒト化された抗体も、本明細書に包含される。

【0047】

「抗原性決定基」という用語は、特定の抗体と接触する分子の一部分(すなわちエピトープ)を指す。宿主動物を免疫するためにタンパク質またはタンパク質の断片を使用するときは、タンパク質の多くの領域が、タンパク質上の所与の領域または三次元構造に特異的に結合する抗体の産生を誘導する可能性があり；これらの領域または構造は、抗原決定基と称する。抗原決定基は、抗体に対する結合において、無処理の抗原(すなわち、免疫応答を誘発するために使用した免疫原)と競合するであろう。

10

【0048】

「特異的な結合」または「特異的に結合」という用語は、タンパク質またはペプチドとアゴニスト、アンタゴニスト、または抗体などの結合分子との間の相互作用を指す。相互作用は、結合分子によって認識されるタンパク質の特定の構造(たとえば、抗原決定基もしくはエピトープ、または構造決定基)の存在に依存する。たとえば、抗体がエピトープ「A」に特異的な場合、標識された「A」を含む反応中にエピトープA(またはフリーの、標識されていないA)を含むタンパク質および抗体が存在することにより、抗体に結合する標識されたAの量が減少すると考えられる。

【0049】

代謝前駆体ポリペプチド、たとえばAPPまたは代謝産物、たとえばCTFもしくはA、またはその免疫原性ペプチド断片に特異的な抗体は、当該技術分野において既知であり、従来法で実施されている方法を使用して生成させることができる。このような抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、Fab断片、およびFab発現ライブラリーによって産生される断片を含んでもよいが、これらに限定されない。中和抗体、(すなわち、2量体形成を阻害するもの)は、特に治療的な使用のために好ましい。

20

【0050】

抗体を作成するために、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ラット、マウス、ヒト、その他を含む種々の宿主を、適切なポリペプチドまたはその免疫原性を有するペプチド断片もしくはオリゴペプチドのいずれかを注射することによって免疫することができる。宿主種に依存して、免疫応答を増大させるために種々のアジュバントを使用してもよい。適切なアジュバントの非限定の例は、フロイント(不完全な)のもの、水酸化アルミニウムまたはシリカなどのミネラルゲル、並びにリゾレシチン、プルロニック・ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、KLH、およびジニトロフェノールなどの界面活性物質を含む。ヒトにおいて典型的に使用されるアジュバントは、BCG(Bacille Calmette-Guerin)およびコリネバクテリウム・パルバム(*Corynebacterium parvum*)を含む。

30

【0051】

好ましくは、ポリペプチドに対する抗体を誘導するために使用されるペプチド、断片、またはオリゴペプチド(すなわち免疫原)は、少なくとも5アミノ酸、およびより好ましくは、少なくとも6~10アミノ酸を有するアミノ酸配列を有する。また、免疫原は、天然のタンパク質の一部のアミノ酸配列と同一であることが好ましく；これらは、小さな天然に存在する分子の全てのアミノ酸配列を含んでもよい。ペプチド、断片、またはオリゴペプチドは、単一のエピトープもしくは抗原決定基または多数のエピトープを含んでいてもよい。タンパク質またはペプチドを含む短いひと続きのアミノ酸は、KLHなどの別のタンパク質に融合することができ、この場合には、抗体はキメラ分子に対して産生される得る。

40

【0052】

代謝前駆体タンパク質および代謝産物ポリペプチド、ペプチド、またはその免疫原の断片に対するモノクローナル抗体は、培養において、継続的な細胞株による特異的な抗体分子の産生を提供するどのような技術を使用して調製されてもよい。これらは、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびEBV-ハイブリドーマ技術を含むが、これらに限定されない(G. Kohlerら、1975, Nature, 256: 495-497; D. Kozborら、1985, J.

50

Immunol. Methods, 81: 31-42; R. J. Coteら、1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 2026-2030; および S. P. Coleら、1984, Mol. Cell Biol., 62: 109-120)。モノクローナル抗体の産生およびスクリーニングは、当該技術分野において周知で、かつルーチンで使用される。

【0053】

さらに、マウス抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子にスプライシングして、適切な抗原特異性および生物学的活性を得る、「キメラ抗体」の産生のために開発された技術を使用することもできる(S. L. Morrisonら、1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855; M. S. Neubergerら、1984, Nature, 312: 604-608; および S. Takedaら、1985, Nature, 314: 452-454)。または、当該技術分野において既知の方法を使用する、単鎖抗体を産生するために記載された技術を、特定のタンパク質またはペプチドに特異的な単鎖抗体を産生するために適応してもよい。関連した特異性を有するが、異なったイディオタイプの組成物の抗体は、ランダム・コンビナトリアル・免疫グロブリンライブラリーから鎖シャッフリングによって生成されてもよい(D. R. Burton, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 11120-3)。また、抗体は、リンパ性の細胞群においてインビボでの産生を誘導することによって、または非常に特異的な結合試薬の組換え免疫グロブリンライブラリーまたはパネルを、文献に開示されたようにスクリーニングすることによって産生されてもよい(R. Orlandiら、1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 3833-3837 and G. Winterら、1991, Nature, 349: 293299)。

10

【0054】

また、所与のタンパク質またはペプチドに特異的な結合部位を含む抗体断片を、作製してもよい。たとえば、このような断片は、抗体分子のペプシン消化によって生成させることができるF(ab')₂断片およびF(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することによって生成させることができるFab断片を含むが、これらに限定されない。または、Fab発現ライブラリーを構築して、所望の特異性を有するモノクローナルFab断片(W. D. Huseら、1989, Science, 254: 1275-1281)による迅速かつ容易な同定を可能にしてもよい。

20

【0055】

種々の免疫アッセイ法を、所望の特異性を有する抗体を同定するためのスクリーニングに使用することができる。確立された特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用する競合的結合アッセイ法または免疫放射定量アッセイ法のための多数のプロトコルは、当該技術分野において周知である。このような免疫アッセイ法は、典型的には、特定のタンパク質またはポリペプチドとその特異抗体との間の複合体の形成を測定することを含む。

30

【0056】

スクリーニング法

タンパク質またはペプチドに特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかを使用する、タンパク質およびペプチドを検出し、かつ測定するための様々なプロトコルは、当該技術分野において既知であり、実施されている。例には、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、放射免疫アッセイ法(RIA)、および蛍光標示式細胞分取器(FACS)を含む。競合的結合アッセイ法ができるので、ポリペプチド上の2つの干渉しないエピトープと反応するモノクローナル抗体を利用する、2つの部位のモノクローナルに基づいた免疫アッセイ法を使用することができる。これらのおよびまた他のアッセイ法は、R. Hamptonら、1990; Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN and D. E. Maddoxら、1983; J. Exp. Med., 158: 1211-1216の刊行物によって示されるように、従来技術に記載されている。

40

【0057】

本明細書に記載された新規の細胞に基づいたスクリーニングアッセイ法は、代謝前駆体の機能または生理活性を調整する、好ましくは減少する、または阻害する候補物質生理活性剤または薬物を同定するために使用することができる。この方法では、たとえば標的前駆体タンパク質(たとえば、タンパク質分解性酵素)を収容している細胞を死滅させるか、ま

50

たは増殖を停止することができるように、タンパク質分解による分解産物の産生によって特徴づけられる疾病および疾患の治療に使用するために、薬物を同定することができる。

【0058】

一般に、スクリーニング法を行う際に、単離された試料を受ける領域を有する不溶性の支持体(たとえばマイクロタイタープレート、アレイ、その他)に、細胞または特定の代謝経路に關与するポリペプチドまたはペプチド類でさえも、拡散されないように結合することができる。適切な不溶性の支持体の条件は、これらが、細胞またはポリペプチドを結合することができるどのような組成物で作製されることもでき;これらが、容易に可溶性物質から分離され;および、これらが、他の全ての点でスクリーニング方法の全体にわたって適合性を有することである。このような支持体の表面は、固体または多孔質であってもよく、任意の便利な大きさまたは形であってもよい。適切な不溶性の支持体の例は、マイクロタイタープレート、アレイ、膜、およびビーズを含む。これらは、典型的には、ガラス、プラスチック(たとえばポリスチレン)、多糖、ナイロン、またはニトロセルロースでできている。

10

【0059】

マイクロタイタープレートおよびアレイは、少量の試薬および試料を使用して多数のアッセイを同時に実行することができるので、特に便利である。ポリペプチドを結合する詳細な方法は、本発明の試薬および全体的な方法に適合性を有し、ペプチドの細胞生存率をまたは活性を維持し、かつ拡散されない限り重要ではない。

【0060】

好ましい結合の方法は、抗体、「粘着質」に対する直接の結合、またはイオン支持、化学的架橋、その他の使用を含む。細胞またはポリペプチドの結合後、過剰な未結合物質を洗浄することによって除去する。次いで、試料を受ける領域を、必要に応じて、たとえばウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、またはその他の無害な/非反応性のタンパク質とインキュベーションすることにより遮断してもよい。

20

【0061】

候補生物活性剤または薬物をアッセイに添加する。新規の結合剤は、特異抗体、化学物質ライブラリーのスクリーニングで同定された非天然の結合剤、ペプチド類似体、その他を含むことができる。ヒト細胞に対して低い毒性を有する薬物のスクリーニングアッセイに、特に興味を持たれる;しかし、本発明によれば通常は細胞に対して毒性のある薬物を、本明細書に記載したとおりの細胞に基づいた方法において効率よくアッセイすることができる。

30

【0062】

ELISA免疫アッセイ法は、本発明の適切な薬物または生理活性薬物を同定するために好ましい。さらに、標識されたインピトロにおけるタンパク質タンパク質結合アッセイ法、電気泳動易動度変化アッセイ法、タンパク質結合のためのその他の免役アッセイ法などを含むその他のアッセイ法も、この目的に使用することができる。本明細書において使用されるものとして、「剤」の用語は、代謝前駆体ポリペプチドなどの標的分子の活性および機能を直接的または間接的に変化させる能力を有する、たとえばタンパク質、オリゴペプチド、小有機分子、多糖、ポリヌクレオチド、その他のあらゆる分子をいう。通常、種々の濃度に対して異なった反応を得るために、複数のアッセイ混合液を種々の薬物濃度で並列して実施する。典型的には、これらの濃度のうちの1つは、ネガティブ対照として、すなわちゼロ濃度でまたは検出レベル以下で行う。

40

【0063】

候補物質、化合物、薬物などは、典型的には、これらが有機分子、好ましくは、限定されない例として、100以上で約10,000ダルトン未満、好ましくは約2000~5000ダルトン未満の分子量を有する小有機化合物であるにもかかわらず、多くの化学物の分類を包含する。候補薬物は、タンパク質と構造上の相互作用、特に水素結合形成のために必要な官能基を含み、典型的には、少なくともアミン、カルボニル、ヒドロキシル、またはカルボキシル基、好ましくは機能の化学基のうちの少なくとも2つを含む。候補薬物は、多くの場合、

50

上記の官能基の一つまたは複数で置換された、環状炭素もしくは複素環構造および/または芳香族もしくはポリ芳香族構造を含む。また、候補薬物は、ペプチド、サッカライド、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造類似体、またはその組み合わせを含む生体分子の中で見出される。

【0064】

候補となる生物活性剤、化合物、薬物、生体分子などは、合成または天然の化合物のライブラリーを含む多種多様な供与源から得られる。たとえば、多種多様な有機化合物および生体分子のランダムかつ定方向合成のために、ランダム化オリゴヌクレオチドの発現を含む多くの手段を利用できる。または、細菌の、真菌の、植物の、および動物の抽出物の形態の天然化合物のライブラリーが、利用可能である、または容易に作製される。さらに、天然のまたは合成的に作製されたライブラリーおよび化合物は、従来の化学的、物理的、および生化学的手段を介して容易に修飾される。既知の薬理学的薬物は、アシル化、アルキル化、エステル化、アミド化(amidification)して構造類似体を産生するなどの、定方向のまたはランダムな化学的処理を行ってもよい。

10

【0065】

様々なその他の試薬を、本発明に従ったスクリーニングアッセイ法に含めてもよい。このような試薬は、塩、中性タンパク質、たとえばアルブミン、界面活性剤、その他を含み(これらに限定されない)、これらを最適なタンパク質-タンパク質結合を容易にするために、および/または非特異的またはバックグラウンドの相互作用を減少するために使用してもよい。さらに、プロテアーゼ阻害剤、抗菌因子、その他などの別な方法でアッセイ法の効率を改善する試薬を使用してもよい。さらに、本方法における成分の混合液は、どのような順序で添加して要求される結合を提供してもよい。

20

【0066】

キットは、本発明の一態様として含まれ、試験化合物をスクリーニングするために必要な試薬を有する容器を含む。試験のデザインおよびスクリーニングされる化合物のタイプに依存して、このようなキットは、代謝前駆体ポリペプチドもしくはペプチドに対する抗体および/または代謝産物の標識されまたは標識されていないものに対する抗体、およびアッセイ法を行うための説明書を含む。

【0067】

実施例

以下の実施例は、本発明を例示する特定の本発明の態様を記載し、当業者に本方法の記載を提供する。本実施例は、本発明およびその種々の局面の理解および実施に有用な特定の方法論を単に提供するだけであるので、本実施例は、本発明を限定するものとして解釈されるべきでない。

30

【0068】

実施例1

細胞株、cDNA構築物、およびトランスフェクション Ltk細胞(マウスの繊維芽細胞様細胞株; (S. Kitら、1967, J. Virol., 1 (1) : 238-240)を、10%のウシ胎児血清(Gemini, Woodland, CA)、2mMのグルタマックスI(glutamaxI)(Gibco/BRL, Gaithersburg, MD)、およびペニシリン/ストレプトマイシン(Cellgro)を含むように補った高グルコースDMEM(Cellgro, Herndon, VA)において、37 °Cおよび5%のCO₂で維持した。ヒトAPP₆₉₅をコードするcDNAおよびヒトrab5を、哺乳類発現ベクターpcDNA3(Invitrogen, Carlsbad, CA)に挿入した。リポフェクチンを使用するトランスフェクション(製造業者のプロトコル; Gibco/BRL)に続いて、APP₆₉₅を過剰発現する安定L細胞株を400 μg/mlのG418(Gemini)中で選択して、発現をスクリーニングした。一過性のrab5のトランスフェクションは、製造者のプロトコルに従って、リポフェクトアミン(lipofectAMINE)(Gibco/BRL)またはフューゼン(fugene)(Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN)を使用して行った。

40

【0069】

抗体 表1は、本発明に係る方法に使用したモノクローナル抗体を記載する。

(表1) モノクローナル抗体

50

抗体	エピトープ 特異性	検出されるAPP種	免疫原配列
C1/6.1	APPのカルボキシ 末端の20残基内	APPホロタンパク質 ；全てのCTF類	KMQQNGYENP TYKFFEQMQN (配列番号 :2)
C2/7.1	APP ₆₉₅ の残基644 ～676内	APPホロタンパク質 ；全てのCTF類	LVMLKKKQYTS IHHGVVEVDAA VTPEERHLSK (配列番号 :3)
JRF/AβN/25	Aβの最初の7残基 内；β切断が必要	βCTF；ELISAによる Aβ1-X	DAEFRHHD (配列番号 :4)
JRF/Aβtot/17	ヒトAβの残基1～ 16内	APPホロタンパク質 ；βCTF；ELISAに よるAβ	DAEFRHDSGY EVHHQKLVEFA EDVGSNKGAI GLMVGGVV (配列番号 :5)

10

20

【0070】

表1は、免疫化に使用した免疫原ペプチドに基づくモノクローナル抗体および既知のエピトープの特異性、並びにさらなる合成ペプチドに対するELISAによる抗体の結合を示す。さらに、種々のAPPタンパク質分解種に対するこれらの抗体の結合を、本明細書に記載してある。A に対するJRF/AN/25およびJRF/A tot/17の特異性およびA サンドイッチELISAにおけるこれらの2つのモノクローナル抗体の使用は、(C. Janusら、2000, Nature, 408 (6815): 979-982; S. D. Schmidtら、2001, Society for Neuroscience, annual meeting 2001)に記載されたとおりである。

【0071】

C1/6.1抗体は、APP(APP₆₉₅の残基676～695)(配列番号:2)の保存されたカルボキシ末端の20残基に対して生じさせ、免疫ラベリング、免疫沈降、およびウエスタンブロット解析に有用である(C. Janusら、2000, Nature, 408 (6815): 979-982も参照されたい)。C2/7.1抗体は、APP₆₉₅の残基644～676(配列番号:3)に対して生じさせ、また、免疫ラベリング、免疫沈降、およびウエスタンブロット解析に有用である。JRF/AN/25は、ヒトA の1～7残基を包含する合成ペプチドに対して生じさせた。JRF/AN/25は、A の残基1におけるβ切断を必要とするという多彩な証拠を本明細書に示してある。その他の抗体、これらの特異性、およびサンドイッチELISAにおけるこれらの使用は、(C. Janusら、Id.)に記載されたとおりである。

30

【0072】

サンドイッチELISA 表1に示した抗体を使用するサンドイッチELISAは、細胞に結合したAPP代謝産物を検出するために修飾し、本質的に報告されたとおりに行った(C. Janus et al. Id. ; R. Rozmahelら、Neurobiology of Aging, 23: 187-194; およびP. M. Mathewsら、2002, J. Biol. Chem., 277: 5299-5307)。ヌンク-イムノプレートの(Nunc A/S, Roskilde, Denmark)のウェルを20μg/mlのC1/6.1を使用して4 で一晩被覆し、および残りのタンパク質結合部位を、1%のブロックエース(Block Ace)(Yukijirushi Milk, Sapporo Japan)のPBS溶液(200μl/ウェル)で4時間において室温でインキューベートすることによってブロックした。

40

【0073】

CTF ELISAのために、JRF/AN/25のエピトープ(配列番号:4)およびC1/6.1のエピトープ(配

50

列番号：2)の両方を含む合成ペプチド、すなわち
DAEFRHDKMQQNGYENPTYKFFEQMQN (配列番号:1)

を調製した(表1を参照されたい)。APP/全CTF ELISAのために、ヒトAPPのC末端の99残基を含むグルタチオンSトランスフェラーゼ融合タンパク質(GST-PP672~770;(K. Islam and E. Levy, 1997, Am. J. Pathol. 151 (1): 265-71)を調製した。この融合タンパク質は、C1/6.1およびC2/7.1エピトープの両方を含む。原液として調製したこれらの標準は、DM SOに溶解して-70 貯蔵し、使用直前に20mMのリン酸Na、2mMのEDTA、400mMのNaCl、0.2%のBSA、0.05%のCHAPS、0.4%のブロックエース、および0.05%のNaN₃を含む緩衝液pH7.0にさらに希釈する。

10

【0074】

ELISAプレートを、試料および標準と共に4 で一晩インキュベートした。試料は、本明細書に記載したとおり、1%のトリトンX-100(登録商標)、140mMのNaCl、25mMのトリス(pH7.4)、0.5mMのEDTA、およびプロテアーゼ阻害剤中に調製された細胞溶解物であった。溶解液を簡潔にボルテックスにかけて、氷上に30分間おいてエッペンドルフ遠心機において6,000rpmで遠心した。上澄をELISAのために使用した。APPおよびAPP代謝産物を捕獲抗体(C1/6.1)に対して一晩結合させた後、ウェルを0.5%のトリトンX-100(登録商標)/0.05%のTween-20を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で2回洗浄し、続いてPBSで2回洗浄した。次いで、20mMのリン酸Na、2mMのEDTA、400mMのNaClおよび1%のBSA、pH7.0を含む溶液を、室温で1時間ウェルに添加した。

20

【0075】

APPおよび細胞に結合したAPP代謝産物は、20mMのリン酸Na、2mMのEDTA、400mMのNaCl、1%のBSA、pH7.0に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合C2/7.1またはJRF/A N/25と共に室温で4時間インキュベートすることによって検出した。その後、ウェルを再び0.5%のトリトンX-100(登録商標)/0.05%のTween-20を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で2回洗浄し、続いてPBSで2回洗浄した。ELISAプレートを呈色反応を使用して発色させ(TMB Microwell Peroxidase Substrate System, Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD)、OD₄₅₀を読んだ。ELISAシグナルは、標準と比較して、mIにつきフェムトモルの2つ以上のウェルの平均+SEとして記録した。

30

【0076】

代謝性標識、免疫沈降、およびウエスタンブロット解析 APPおよびCTF類を検出するために、 5×10^5 の細胞を35mmの直径の組織培養皿にまき、続いて20mMの酪酸塩で24時間、ヒトAPP695発現を誘導した(P. M. Mathewsら、1992, J. Cell. Biol., 118 (5): 1027-1040; P. M. Mathewsら、2000, Mol. Med., 6 (10): 878-891)。培養液は、メチオニン/システインを20分間枯渇させ、100 μ Ci/mlのTRANS35S-LABEL(Dupont-NEN)で15分間パルス標識して洗浄し、2mMの標識されていないメチオニンを含む完全培地中で追跡した(P. M. Mathewsら、1992, J. Cell. Biol., 118 (5): 1027-10400)。本明細書に記載したとおり、メチオニン/システイン枯渇の前に3時間、カルパイン阻害剤を細胞増殖培地に添加し、次いでパルスラベリングを介して追跡した。

40

【0077】

細胞溶解物(1%のトリトンX-100、140mMのNaCl、25mMのトリス、pH7.4、0.5mMのEDTA、10mMのメチオニンおよびプロテアーゼ阻害剤中に調製;(P. M. Mathewsら、1992, J. Cell. Biol., 118 (5): 1027-1040; A. Beggahら、1996, J. Biol. Chem., 271 (34): 20895-209022)を、実施例2に記載したとおり、種々のモノクローナル抗体による免疫沈降に供した。免疫沈降されたタンパク質をSDS-PAGEによって大きさで分け、標識されたタンパク質をX線膜に暴露することによって視覚化し、ストーム840ホスホイメジャー(Storm 840 @jps@jpo,ager)(Molecular Dynamics/Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA)を使用し、および/またはスキャン解析(NIHImage)によって定量的に解析した。

【0078】

ウエスタンブロット解析のためには、細胞溶解物中のタンパク質濃度を決定し(BioRad DC

50

Protein Assay, BioRad, Rockville Center, NY)、同量のタンパク質をSDS-PAGEによって分離してPVDF膜へ転写した。膜をC1/6.1(2 μ g/ml)中で一晩インキューベートし、洗浄し、HRP結合ヤギ抗マウスIgGと共に1.5時間インキューベートした。膜をECL基質(Amersham, Arlington Heights, IL)中でインキューベートしてX線膜に暴露した。

【0079】

ELISAのための細胞溶解物の調製 細胞を6ウェルのディッシュにまいて一晩おいた。L細胞におけるヒトAPP₆₉₅の発現を20mMの酪酸塩で約40時間誘導し(P. M. Mathewsら、1992, J. Cell. Biol., 118 (5): 1027-1040)、細胞を0.5mlの細胞溶解緩衝液(1%のトリトンX100、140mMのNaCl、25mMのトリス、pH7.4、0.5mMのEDTA、プロテアーゼ阻害剤)に抽出する前に、ハンクのBSSで2回洗浄した。細胞溶解物を簡潔にボルテックスにかけて、氷上に約15分間おき、エッペンドルフ遠心機で6,000rpmで穏やかに回転した。上澄を回収して、ELISAのために手際よくロードした。

10

【0080】

実施例2

モノクロナール抗体の特異性 実施例1の表Iは、本発明に従った方法に使用したモノクロナール抗体、並びにそれぞれの抗体を生成するために使用した合成ペプチドの配列を示す。APPホロタンパク質およびCTF類を、APPのカルボキシ末端の99残基内で異なったエピトープを認識するモノクロナール抗体：C1/6.1、JRF/AN/25およびJRF/A tot/17を使用して免疫沈降した(表Iおよび図1を参照されたい)。

【0081】

特定のモノクロナール抗体がAPPホロタンパク質および/またはCTFおよび/またはCTFまたは両方ともを検出したかどうかを決定するために、ヒトAPP₆₉₅(L/APP細胞)を過剰発現するL細胞を15分間代謝的に標識し、次いで1時間追跡した(図1、レーン1~6)。

20

【0082】

カルpain阻害剤は、APPCTF類のレベルを細胞内で増大させることが知られている(H. K. lafkiら、1996, J. Biol. Chem., 271 (45): 28655-28659; L. Zhangら、1999, J. Biol. Chem., 274 (13): 8966-9872; G. Verdileら、2000, J. Biol. Chem., 275 (27): 20794-20798)。以前の報告とは逆に、カルpainを阻害することにより、-および-切断されたCTF類の両方の生合成を増大することによって、CTF類のレベルを増大させることが報告された(P. M. Mathewsら、2001, Society for Neuroscience, annual meeting 2001)

30

【0083】

したがって、対照条件に加えて、パルスおよび追跡の期間の前に、並びにその際に、示したカルpain阻害剤(図1、レーン7~18)で細胞を3時間処理して、免疫沈降の前に代謝的に標識されるCTF類のレベルを増大させる。パルスおよび追跡の期間から調製した界面活性剤可溶化液の同体積を、それぞれのモノクロナール抗体による免疫沈降に供し、標識されたAPP種を4~20%勾配のSDS-PAGEにおいて解析した。

【0084】

非処理のL/APP細胞(図1、レーン1~6)において、C1/6.1は、パルス期間に由来する標識されたホロタンパク質を免疫沈降した(図1、レーン1)。1時間の追跡に続き、C1/6.1の免疫沈降では、2つの迅速に移動するAPP断片も示した(図1レーン4; 矢印は、CTFおよびCTFを示している)。JRF/A N/25の免疫沈降では、APPホロタンパク質(図1、レーン2および5)を沈降することができず、したがって、JRF/A N/25のためのエピトープは、APの残基1で切断されたアミノ末端を必要とすることが確認された。1時間の追跡後、このJRF/A N/25を免疫沈降して、C1/6.1免疫沈降によってCTF類のうちの1つと共に移動したことが示されたタンパク質を(図1、レーン4および5を比較する)、結論的にAPPの-切断されたCTFとしてこれを同定した。

40

【0085】

Aの残基1~16内のエピトープを認識するJRF/A tot/17により、パルスおよび追跡の期間におけるAPPホロタンパク質、並びに追跡後のCTFを免疫沈降した(図1、レーン3およ

50

び6)。これらの3つのモノクローナル抗体の特異性およびこれらが免疫沈降したCTF類のSDS-PAGEにおける移動度を考えると、C1/6.1によって同定される最も迅速に移動する種が、
-切断CTFであったと結論付けられた。

【0086】

10 μ Mのカルペプチンまたは10 μ Mのカルpain阻害剤IIIのいずれかで処理した細胞では、パルス標識した可溶化液からの免疫沈降パターンが、非処理の細胞において見られるものと同じであった(図1、レーン7~9およびレーン13~15とレーン1~3を比較)。しかし、カルpainの阻害では、CTF類の存在量における著しい相違が、1時間の追跡後に見られた。C1/6.1の免疫沈降では、いずれのカルpain阻害剤によっても、CTF類およびCTF類の両方のレベルに実質的にかつ明らかに比例して増加することを示した(図1、レーン10および16とレーン4を比較)。CTFにおけるこの増加は、JRF/A N/25およびJRF/A tot/17による免疫沈降によって確かめられた(図1、レーン11、12、17、および18)。

10

【0087】

C1/6.1の免疫沈降に由来するこれらのバンドの濃度測定の数量化により、CTFに対するCTFの比(約2:1のまま)は、両CTF類の生合成が約4倍増加するにもかかわらずカルpain阻害による影響を受けないと思われるという本明細書に記載した観測を確証させた。最後に、APPホロタンパク質が、CTF類が含むよりも5倍以上多くのメチオニンを含み、したがって、代謝ラベリングでは、実質的にCTF類の相対的な存在量が過小評価されることは重要である。

【0088】

図2Aおよび2Bに示したパルスチェイス実験は、C1/6.1がその他のCTF類種(たとえばCTF)を検出することができるかどうかを決定するためにデザインした。したがって、C1/6.1で可溶化液を免疫沈降する前に、L/APP細胞を15分間パルス標識して6時間までの示された時間追跡した。図2Aは、対照(レーン1~6)におけるAPPホロタンパク質の代謝回転を示し、10 μ Mのカルペプチンを処理した細胞(レーン7~12)においても同様であることを示す。これらのデータの数量化により、APPホロタンパク質の代謝回転がカルペプチン処理によって変化しないことが確認された。

20

【0089】

図2Bは、同じ免疫沈降においてより長時間暴露したものでは、CTF類の生成および代謝回転を示すことを示している。図1におけるデータと一致して、10 μ Mのカルペプチン処理では、追跡の最初の1時間の間にCTF類の両方の生成を実質的に増大した(図2B、レーン7から9とレーン1~3を比較)。以前の解釈とは対照的に(L. Zhangら、1999, J. Biol. Chem., 274 (13): 8966-8972)、このカルペプチン濃度は、CTF類の代謝回転を減少しないように思われた。CTF類の生成は、実質的に増加するが、それらの分解速度は、APPの代謝回転と同様に、カルペプチン処理による影響を受けないように思われた。

30

【0090】

さらに、図2Bに示した長時間の曝露では、絶えず検出されるその他のCTF類がめだった。これには、CTFより上に移動するC1/6.1によって認識される断片(図2B、レーン9)、並びにCTFより迅速に移動し、かつ長期間の追跡後(>2時間)に現れる断片を含む(図2B、レーン10~12、標識されたCTF)。より大きな断片は、切断部位に対する不均一なアミノ末端の切断を示唆する。CTFより小さい断片は、外観の大きさおよび時間経過において、APPのCTFと一致している。

40

【0091】

したがって、実施例2の結果から、C1/6.1抗体がAPP(APPホロタンパク質およびCTF類)の全ての既知の細胞に結合した代謝産物を検出し、JRF/A N/25抗体が-切断されたCTFを特異的に検出したと結論づけられる。また、C2/7.1抗体は、APPのカルボキシ末端に対して生じ、C1/6と同じであるので、C2/7.1モノクローナル抗体を使用した結果は、C1/6.1を使用して得られたものと同様であり、C2/7.1も、APPホロタンパク質および全てのCTF類を検出すると結論づけられた。

【0092】

50

実施例3

CTF特異的なELISA 捕獲抗体としてC1/6を、および検出抗体としてJRF/A N/25を使用して、細胞に結合した CTF類を特異的に認識するELISAを開発した。図3は、そのアミノ末端(太字のもの)にJRF/A N/25のエピトープ(配列番号:4)およびそのカルボキシ末端(イタリックのもの)にC1/6.1のエピトープ(配列番号:2)を含む合成ペプチド

(**DAEFRHDKMQQNGYENPTYKFFEQMQN**) (配列番号:1)

に対するこのELISAの感受性および直線性を示す。

【0093】

この図3のELISAは、A サンドイッチELISAで得られた範囲と同様の、低いfmole/ml範囲(示した範囲は、3~100fmole/mlである)において、かつインピボで細胞によって生成される CTF類を検出するために十分に必要範囲内で直線状の検出を示す(C. Janusら、2000, Nature, 408 (6815): 979-982; S. D. Schmidtら、2001, Society for Neuroscience, annual meeting 2001)。

【0094】

このようなELISAプロトコルを、細胞から単離した CTF類を検出するために使用することができるかどうかを決定するために、同密度のL/APP細胞および10 μ Mカルペプチンで6時間処理したL/APP細胞から調製した界面活性剤可溶化液を検査した。非処理のL/APP細胞では、5.8 \pm 0.3fmole/mlの CTF類が検出された(図4)。10 μ Mのカルペプチンの6時間の添加では、カルペプチン処理後の CTF類の増大を示すパルス標識法のデータと一致して、ELISAによって検出される CTF類のレベルをほぼ2倍にした(10.0 \pm 0.6fmole/ml)。この結果は、CTF ELISAが細胞内で生成される CTF類のレベルの変化を定量的に検出することができることを示す。

【0095】

図5Aおよび5Bに示したさらなる結果は、細胞によって生成される CTF類の量の変化を検出するために、この CTF ELISAを使用することができることを確信させる。初期の段階の散発性アルツハイマー病において見られる、ニューロンのエンドソーム系の異常(たとえば、A. M. Cataldoら、1997, J. Neurosci., 17 (16): 6142-6151. (1998); A. M. Cataldoら、2000, Am. J. Pathol., 157 (1) : 277-286; R. A. Nixonら、2000, Neurochem. Res., 25 (9-10): 1161-1172を参照されたい)は、エンドサイトーシスの重要な調節タンパクのrab5を過剰発現することによってモデルされた(P. Chavrierら、1990, Cell, 62 (2): 317329.; J. P. Gorvelら、1991, Cell, 64 (5): 915-925; C. Bucciら、1992, Cell, 70 (5): 715-728; M. A. Barbieriら、1996, Biocell, 20 (3): 331-338; およびG. Li, 1996, Biocell, 20 (3): 325-330; および特許出願では、2000年4月28日にR. A. Nixonらによって出願された、米国特許出願第09/560,124号、表題「Methods for the identification of compounds for the treatment of Alzheimer's disease」)。

【0096】

このrab5の過剰発現実験において、L/APP細胞には、DNAなしで(図5A、レーン1および2)またはrab5 cDNA(図5A、レーン3~5)を一過性にトランスフェクションさせ、APPホロタンパク質およびCTF類のレベルをC1/6.1を使用するウエスタンブロット解析によって決定した。(図5A)。予想されるとおり、10 μ Mのカルペプチンでの処理では、検出されるCTF類レベルが非常に増大され(図5A、レーン1および2を比較する)、パルスチェイスのデータでは、主に CTF類を、およびより少量の CTF類および CTF類を含むことを示す。

【0097】

rab5過剰発現によるエンドサイトーシス刺激では、ウエスタンブロット解析によって検出されるCTF類のレベルが増大したが(レーン5において最も明らかである、図5A)、カルペプチン処理のものとは同程度ではなかった。ウエスタンブロット解析に加えて、それぞれの可溶化液の一定分量を、ELISAによって検査して、細胞における CTF類のレベルを決定した(図5B)。図4に見られるように、カルペプチン処理では、ELISAによって検出される CTF類の量を実質的に増大させた(すなわち、16.1から26.0fmole/mlに)。さらに、rab5の過

10

20

30

40

50

剰発現でも、ELISAによって検出される CTF類の量を、カルペプチン処理したものとほとんど同程度に増大したことから、rab5過剰発現に続くC1/6.1ウエスタンブロット解析によって検出されるCTF類は、主に CTF類であり、さらにこのELISAの CTFに対する特異性を支持することが示唆される。

【0098】

これらの結果は、CTF ELISAが感受性があり、特異的であり、生細胞によって生成される CTF類を検出することができ、薬理学的並びに遺伝的操作から生じる CTF類レベルの変化を検出することができることを示す。

【0099】

実施例4

APP / 全CTF ELISA CTF ELISAに加えて、APPホロタンパク質、並びに(APP / 全CTF ELISA)からの全ての細胞に結合したCTF類を検出する新規のELISAを開発した。このELISAは、

CTF ELISAと同様に、捕獲抗体としてC1/6.1を使用するが、検出抗体としてJRF/A N/25抗体よりむしろC2/7.1抗体を使用する。

【0100】

図6は、細菌の融合タンパク質として発現されたAPPのカルボキシ末端の99アミノ酸からなる標準を検出するためにこのELISAを使用する例を示す(GST- PP672~770(K. Islam and E. Levy, 1997, Am. J. Pathol., 151 (1) : 265-271)。この融合タンパク質は、C1/6.1およびC2/7.1エピトープの両方を含む。CTF ELISAと同様に、APP/全CTF ELISAは、(図6に示したとおり、100~800fmole/ml)標準の低いfmole/ml下までの幅広い直線的範囲を示した。

【0101】

APPおよび全CTF類のレベルを、このELISAを使用して細胞から調製した可溶化液において検討した。図7Aは、C1/6.1ウエスタンブロット解析による、ヒトAPP₆₉₅を過剰発現するL細胞株(L/APP)に対するL細胞におけるAPPホロタンパク質発現の相対的レベルを示す。図7Bでは、対照条件下で培養されたか、またはカルペプチン処理に供されたこれらのいずれかの細胞から調製した可溶化液を、C1/6.1-C2/7.1のサンドイッチELISAを使用して検討した。予想されるとおり、ウエスタンブロット解析によって検出されるAPPのレベルを考えると、L/APP細胞は、親L細胞よりも有意に高いELISAシグナルを示した。カルペプチンの添加により、L細胞におけるシグナルが増大したが、統計学的に有意な程度ではなかった。しかし、L/APP細胞では、カルペプチンの添加により、有意にELISAシグナルを増大し、これは、この系におけるCTF類の生成のためであることが予想される。この結果は、APP/全CTF ELISAを、細胞によって生成される細胞に結合したAPP代謝産物のレベルの飛跡変化について使用することができることを確信させる。

【0102】

実施例5

毒性と CTFレベルに対する特異的な効果との識別 CTF ELISAおよびAPP/全CTF ELISAの組み合わせにより、毒性効果と CTFレベルに対する特異的な効果の間の区別ができるかどうかを決定するために、タンパク合成阻害剤シクロヘキサミドを、毒性化合物をモデルするために使用した。シクロヘキサミドは、多くの化合物の特徴を有し、これが、細胞生存率を減少し、したがって劇的にA 生成を減少することにより、標準的なスクリーンにおいて偽陽性を与えるであろう。

【0103】

スクリーニングプロトコルは、唯一の結果測定としてのA の減少に依存するが、シクロヘキサミド処理では、A 産生を減少して潜在的に治療的であるとみなされる；しかし、シクロヘキサミドは非常に有毒である。図8Aおよび8Bは、対照L/APP細胞を、10μMのカルペプチンまたは75μg/mlのシクロヘキサミドで6時間処理した同密度のL/APP細胞と比較した実験の結果を示す。図8Aは、CTFレベルを示し、図8Bは、ELISAによって決定したAPPホロタンパク質 / CTFのレベルを示す。カルペプチン処理では、CTFレベルの有意な増大が見られたが(約2.7から5.4fmole/ml細胞溶解物へ2倍になる)、APP / 全CTF ELISAを使用

10

20

30

40

50

して、APP/全CTFレベルのより少ない相対的増大を示した。シクロヘキサミド処理では、CTFレベルが減少したが(78%間で、2.7fmole/mlから0.6fmole/mlまで)、同時に、劇的にAPP/全CTFレベルも減少した(88%まで、対照における608fmole/mlからシクロヘキサミド処理したL/APP細胞における74fmole/mlまで)。

【0104】

これらの結果は、組み合わせると、これらの2つのELISAが、有利にはCTFレベルの減少を検出するために使用することができ、一方で、 β -切断(望ましい結果)を特異的に減少する化合物と一般的な細胞毒性を経てCTFレベルを減少する化合物を区別するために使用することができる(たとえば、シクロヘキサミドを使用して示したように)。

【0105】

10

実施例6

本発明にしたがって、CTFおよびAPP/全CTFを使用する、CTF生成の選択的阻害剤の検出細胞の自己貪食阻害剤の3-メチルアデニン(3mA)(P. O. Seglen and P. B. Gordon, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 (6): 1889-1892; P. E. Schwarze and P. O. Seglen, 1985, Exp. Cell. Res., 157 (1): 15-28; およびP. O. Seglenら、1986, Exp. Cell. Res., 162 (1): 273-277)は、ADおよび/またはその他のニューロンの萎縮に関連した発狂疾患において潜在的な治療的価値を有することが報告された(特許出願、2000年4月28日に出願されたR. A. Nixonらによる米国特許出願第09/561582号「ニューロンの萎縮に関連した痴呆の治療のための方法」)。

【0106】

20

本実施例は、本方法およびその利点を示すために、試験化合物として3MAを使用して行った実験結果を記載する。図10A-10Dは、これらの実験の結果を示し、L/APP細胞におけるCTF生成およびA β 生成の3MAによる特異的な減少を示す。図10Aは、3MA処理では、非処理の対照細胞におけるAPPレベルと比較して細胞のAPPレベルを減少させないが、シクロヘキサミド処理では、減少することを示す。図10Bは、3MA処理では、対照と比較して50%までCTFレベルを減少したが、シクロヘキサミド処理では、CTFレベルをいくぶん多く減少したことを示す。これらの結果は、シクロヘキサミドが全細胞のAPPレベルを減少する非特異的な細胞毒があることに対応し、これによりCTFレベルを減少させる。これらの結果は、CTFレベルに対する3MAの効果が特異的であり、一般的な細胞毒性の結果ではないことをさらに示す。本実験は、本発明に従って、ELISAを組み合わせ、潜在的に治療的な化合物(たとえば3MA)と毒性化合物(たとえば、シクロヘキサミド)を区別することができることを示す。

30

【0107】

さらに、増殖培地におけるA β レベルを、これらの試験細胞により検討した。図10Cは、対照と比較して、3MAおよびシクロヘキサミド処理の両方で観察されるA β 1~40のレベルの減少を示す。図10Dは、対照と比較して、両者の処理で顕著であるA β 1~42のレベルにおける同様の減少を示す。また、シクロヘキサミド処理で得られるA β 生成の減少は、非特異的な細胞毒性によるが、3MA処理後に得られるA β 生成の減少は、CTF生成の特異的な減少に関連する。

【0108】

40

これらの所見は、生細胞系を使用して、前駆体のレベルおよび代謝産物のレベル、特に、AD経路に關与するCTF ELISAおよびAPP/全CTF ELISAの両方をアッセイして、一般に有毒な化合物と潜在的な治療的価値を有する化合物を区別する、本発明の細胞に基づいたスクリーニング方法の有用性を示す。

【0109】

全ての特許、特許出願、公開された米国およびPCT出願、論文、本、参照、参照マニュアル、配列表、および本明細書において引用される抄録の内容は、本発明が属する技術水準をより完全に記載するために、参照としてその全体を本明細書に引用したものとする。

【0110】

本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく、上述した主題に種々の変更を行うことが

50

できるため、上記の説明に含まれ、または添付の特許請求の範囲において定義される全ての主題は、本発明を記述しかつ図示するものとして解釈されることが企図される。上記の開示を考慮して、本発明の多くの改変および変更が可能である。

【図面の簡単な説明】

【0111】

(図1) APPホロタンパク質およびCTF類に対するモノクローナル抗体の特異性 ヒトAPP(L/APP)を過剰発現しているL細胞株を15分間代謝的に標識して、示したとおりに1時間追跡した。細胞には、代謝標識する前に、並びに標識および追跡の際に、示したカルパイン阻害剤で前もって3時間処理した。細胞溶解物を調製し、3つのモノクローナル抗体：APPの20カルボキシ末端の大部分の残基内のエピトープを認識するC1/6.1；APの残基1～7内のエピトープを認識するJRF/A N/25；およびADの残基1～16内のエピトープを認識するJRF/A tot/17のうちの1つで同体積を免疫沈降した。(表1、実施例1)。標識された免疫沈降タンパク質をSDS-PAGEにおいて大きさによって分離し、実施例1の方法に記載したとおりに検出した。矢印は、APPホロタンパク質(APPn)並びに - および - 切断されたCTF類(それぞれ CTFおよび CTF)を示す。

(図2) C1/6.1によるAPPホロタンパク質および CTF類、 CTF類および CTF類の検出 APPを過剰発現しているL細胞株を代謝的に標識して、示した時間追跡した。カルパイン処理は、図1に記載したとおりに行った。細胞溶解物は、実施例2に記載とおりに、C1/6.1モノクローナル抗体で免疫沈降した。図2Aは、APPホロタンパク質(APP_{f1})の代謝回転を示す短い暴露を表す。図2Bは、APPホロタンパク質並びに -、 -、および - 切断されたCTF類(CTF、 CTF、 CTF；星印および矢印によって示した)を示すより長い暴露を表す。

(図3) CTFのELISA ELISAプレートをC1/6.1モノクローナル抗体で被覆し、合成ペプチド標準

DAEFRHDKMQQNGYENPTYKFFEQMQN (配列番号:1)

を結合させて、実施例1の方法および実施例3に記載したとおりに、結合したペプチドをJRF/A N/25で検出した。光学濃度(450nmにおけるもの)は、それぞれのウェルに添加したペプチドのフェムトモル/mlの関数としてグラフに示した。値は、2回の測定の平均である。

(図4) 細胞から単離された CTF類の定量的検出 L細胞(L/APP)を過剰発現しているヒトAPPを培養し、実施例1の方法に記載したとおりに、ヒトAPP₆₉₅の発現を誘導した。界面活性剤可溶化液を対照ウェルおよび抽出前に10μMカルパインで6時間処理したウェルから調製した。CTFレベルは、捕獲抗体としてC1/6.1および検出抗体としてJRF/A N/25を使用するELISAによって決定した。値は、2回のELISA読み込みの平均±SDとして報告する。(実施例3)。

(図5) 薬理学的および遺伝的操作後の CTFレベルの変化の定量的ELISA検出 (実施例3)。図5Aは、記載されたとおりに培養したL/APP細胞のC1/6.1を使用するウエスタンブロット解析を示す。レーン1は、非処理のL/APP細胞をロードした；レーン2、抽出前に10μMカルパインで6時間処理した細胞；レーン3、抽出48時間前に5μg/ウェルrab5cDNAを一過性トランスフェクトした細胞；レーン4、フュージョン(fugene)を使用して1.0μg/ウェルrab5cDNAを一過性トランスフェクトした細胞；レーン5、リポフェクトアミン(lipofectAMINE)(Gibco/BRL, Gaithersburg, MD)を使用して1.0μg/ウェルrab5cDNAを一過性トランスフェクトした細胞。APPホロタンパク質(APP_{f1})およびCTF類を示してある。図5Bは、これらの可溶化液からELISAによって検出される CTF類のレベルを示す。カルペプチン処理とは異なり、rab5の過剰発現により、細胞における CTFレベルを増大したが、 CTFレベルは増大しない(O.M.Grbovicら、2001, Society for Neuroscience annual meeting 2001)。

(図6) APP/全CTFのELISA ELISAプレートをC1/6.1で被覆した。GST- PP672-770の融合タンパク質標準を結合させて、実施例1方法および実施例4に記載したとおり、結合したGST- PP672-770をC2/7.1で検出した。光学濃度(450nmにおけるもの)は、それぞれのウェルに添加したペプチドのフェムトモル/mlの関数としてグラフに示した。値は、2回の測定の平均である。

10

20

30

40

50

(図7) 細胞におけるAPPホロタンパク質および全CTF類のELISAによる定量 同数の親L細胞およびL/APP細胞をまき、APP695発現を誘導した。細胞溶解物を調製し、図7Aには、C1/6.1モノクローナル抗体を使用するウエスタンブロットによって解析した(APPホロタンパク質を示してある)。図7Bでは、同様の細胞溶解物を捕獲抗体としてC1/6.1および検出のためにC2/7.1を使用するELISAによって解析した。上記のように、抽出前に6時間10 μ Mカルペプチンで細胞を処理した(実施例4)。

(図8) シクロヘキサミド処理により、CTFおよびAPP/全CTFの両者のレベルを減少する。L/APP細胞を同密度でまき、APP発現を誘導した。誘導の最後の6時間の間に、示したとおり、細胞を10 μ Mのカルペプチンまたは75 μ g/mlのシクロヘキサミドで処理した。可溶化液を調製して、実施例1の方法および実施例5に記載したとおり、CTFレベル(図8A)について、およびAPP/全CTFレベル(図8B)について、ELISAによって解析した。結果は、2回の測定の平均であり、標準と比較して細胞溶解物のfmole/mlとして表してある。

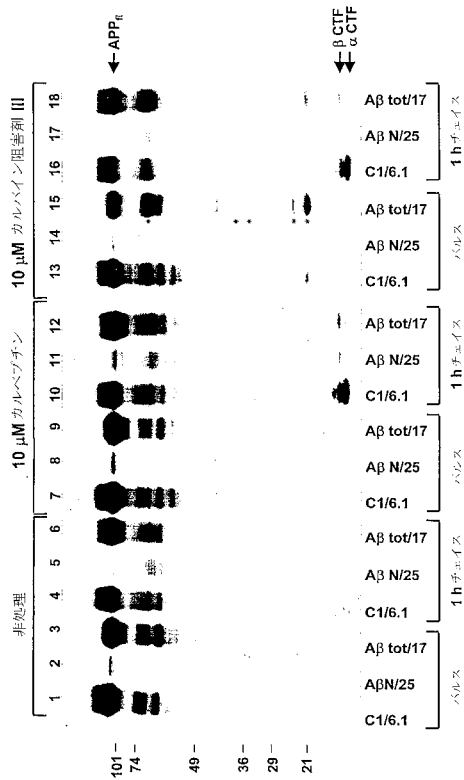
(図9) 高スループットスクリーニングプロトコルの図解 (図9A): ELISAウェルを、まず最初にAPPの細胞内カルボキシ末端特異的に結合するC1/6.1モノクローナル抗体(捕獲抗体)またはAPPの細胞代謝産物(APPのカルボキシ末端断片、すなわち、CTF、CTF、またはCTF)に特異的に結合する抗体で被覆する。(図9B): 関心対象の細胞(すなわち、ヒトを含む哺乳類、細胞および細胞株、神経芽細胞腫などの細胞タイプ、APPもしくはその他のADの発病に関連したタンパク質を発現するようにトランスフェクトした細胞; またはAD病理生物学の側面を模倣するように遺伝的に改変された細胞)をウェルにまいて、定着させ、試験化合物を添加した。

増殖培養液に分泌されたA β の代謝回転と比較して、CTFの迅速な代謝回転のために、薬物の処理は、A β を測定する場合に必要なものよりも、非常に短い期間であることができる(たとえば1~2時間)。さらに、増殖培地の交換は不要である。(図9C): 細胞をインサイチューで分離し(溶解させ)、界面活性剤で抽出したAPP断片を、予め被覆した捕獲抗体(類)に結合させた。または、細胞を別々のウェルで培養し、細胞溶解物を捕獲抗体に添加する。洗浄後、異なった標識がされた(たとえば、異なるフルオロフォアによる)2つの検出抗体を結合させる。(図9D): 検出抗体のうちの一方のJRF/A β N/25(黒抗体)は、CTFのみを認識し、他方の検出抗体C2/7.1は、APPホロタンパク質およびCTF(灰色抗体)を含む全てのAPP/CTF類を認識する。次いで、これらの抗体の結合を、たとえば、C. Janusら、2000, Nature, 408(6815): 978-82によって記載された呈色反応などの標準的なアッセイ法を使用して、またはフルオロフォア結合抗体および蛍光検出を使用することによって、定量的に検出する。

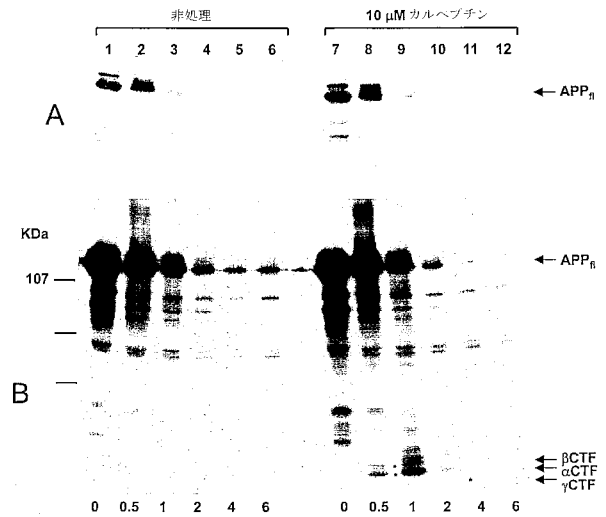
CTFおよびAPPおよびその切断代謝産物のレベルは、対照と比較した呈色反応または蛍光シグナルの強度に基づいて決定される。APPおよび全てのAPP切断代謝産物(すなわち、CTF、CTF、CTF、およびCTF)に結合する特異的な抗体と、CTFに結合する特異的な抗体の比を決定することができ(灰色抗体に対する黒抗体の比)、対照における同じ比と比較することができる。必要であるか、または技術的理由のために望まれるならば、これらの2つの抗体を使用する検出により、このスクリーンが β -切断を特異的に減少する化合物と細胞に対して単に毒性がある化合物とを区別する能力に障害を生じさせずに、異なるウェルにおいて行うことができる。

(図10) 3-メチルアデニン β は、全細胞APPの減少を伴わずに、CTF生成およびA β 産生を選択的に阻害する。L/APP細胞を同密度でまき、APP発現を誘導した。次いで、10 μ g/mlのシクロヘキサミドまたは10 μ g/mlの3-メチルアデニン(3MA)の処理を伴わずに、または添加して、細胞を6時間インキュベートした。次いで、細胞溶解物におけるAPP/全CTFレベル(図10A)およびCTFレベル(図10B)をELISAによって決定した。この6時間のインキュベーションの間に増殖培地中に分泌されるA β 1~40(図10C)およびA β 1~42(図10D)のレベルをELISAによって決定した(C. Janusら、2000, Nature, 408 (6815): 979-982)。データは、それぞれのアッセイについて非処理の対照細胞において見られるレベルのパーセンテージとして表してある。

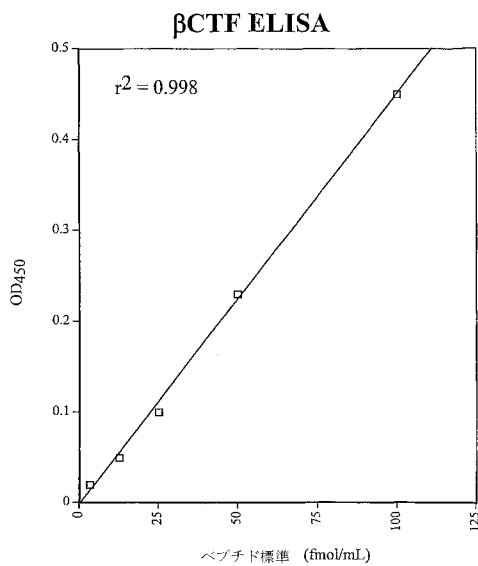
【図 1】



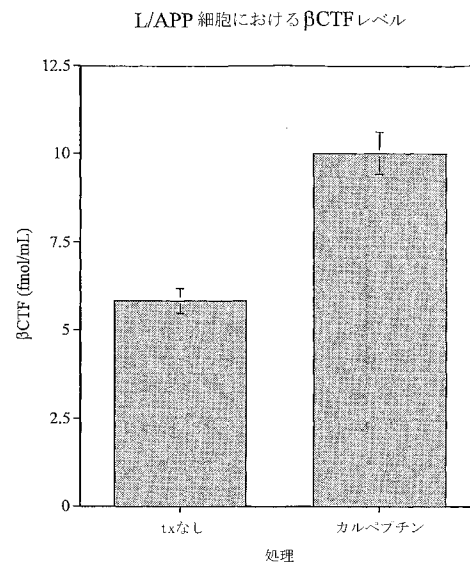
【図 2】



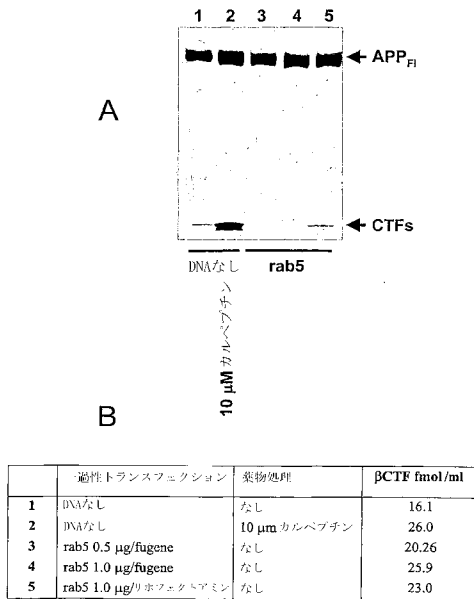
【図 3】



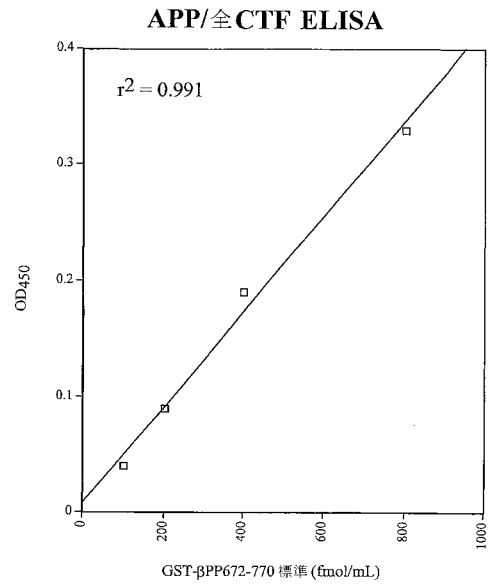
【図 4】



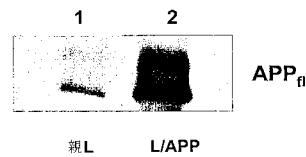
【図5】



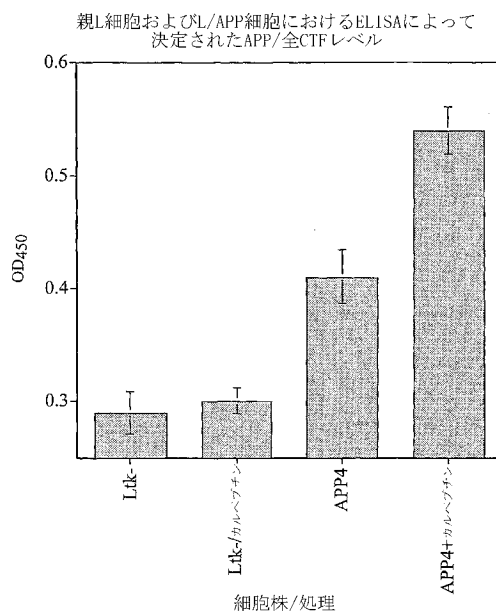
【図6】



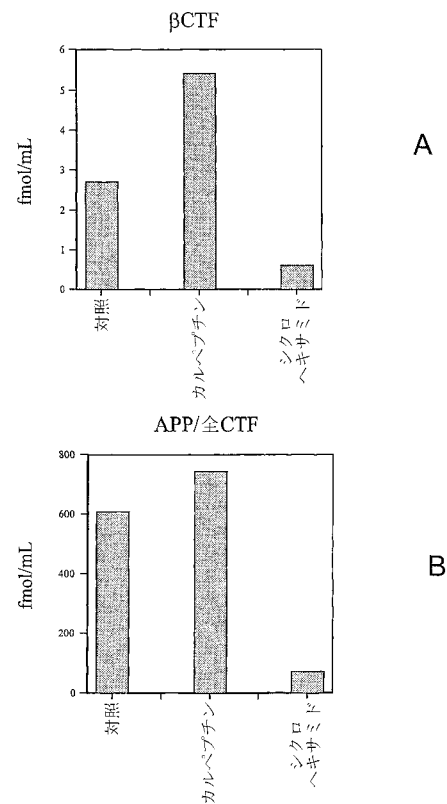
【図7A】



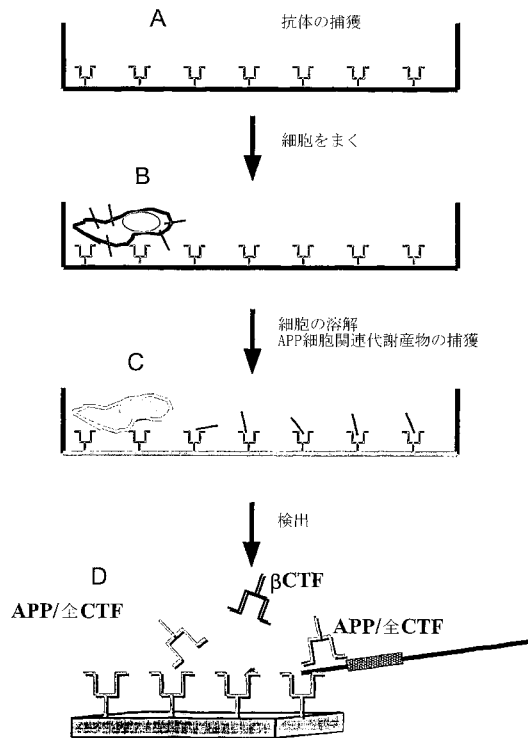
【図7B】



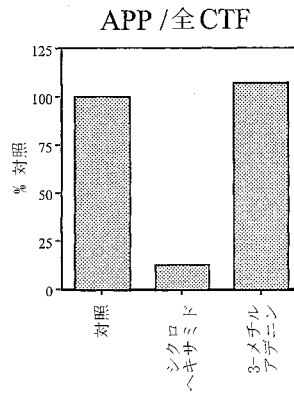
【図8】



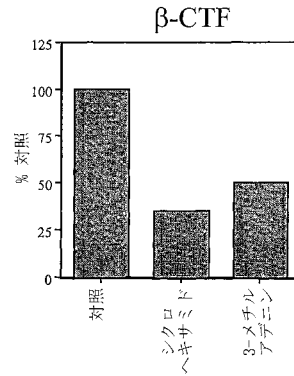
【図 9】



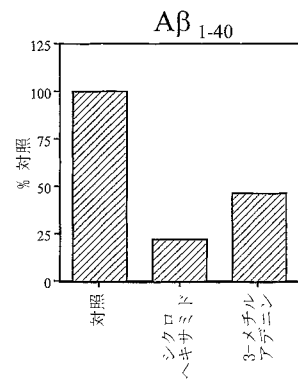
【図 10 A】



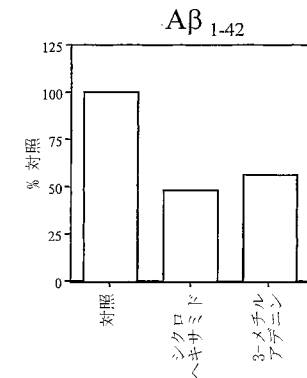
【図 10 B】



【図 10 C】



【図 10 D】



【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
9 January 2003 (09.01.2003)

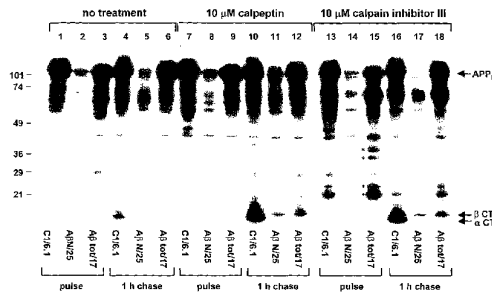
PCT

(10) International Publication Number
WO 03/001881 A2

- (51) International Patent Classification: Not classified (74) Agent: SERUNIAN, Leslie, A.; Morgan & Finnegan, L.L.P., 345 Park Avenue, New York, NY 10154 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/20267
- (22) International Filing Date: 26 June 2002 (26.06.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/300,959 26 June 2001 (26.06.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): NEW YORK STATE OFFICE OF MENTAL HEALTH [US/US]; 44 Holland Avenue, Albany, NY 12229 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MATHEWS, Paul, M. [US/US]; 10 Ilome Place, Irvington-on-Hudson, NY 10533 (US). NIXON, Ralph, A. [US/US]; 1 Hillside Place, Tarrytown, NY 10591 (US). SCHMIDT, Stephen, D. [US/US]; 34 Linn Road, Nutley, NJ 07110 (US). JIANG, Ying [US/US]; 48 Harding Avenue, Valhalla, NY 10595 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GF, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SL, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BH, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: CELL-BASED HIGH-THROUGHPUT SCREENING METHODS



(57) Abstract: The present invention describes cell-based screening methods that allow for the elimination of false-positive results due to nonspecific toxicity of test compounds, while detecting those compounds that specifically modulate cellular metabolites in metabolic pathways associated with diseases and disorders, with particular regard to Alzheimer's disease. The methods are particularly suited to high-throughput screening techniques to identify compounds (drugs) that are effective in a cell-based system. The methods of the invention involve determining within a cell system the levels of both a metabolic precursor and a metabolite of interest and have broad application in high-throughput drug discovery and identification, particularly for precursor and metabolite molecules which are associated with disease and disease progression, such as Alzheimer's disease.

WO 03/001881 A2

WO 03/001881 A2

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

WO 03/001881

PCT/US02/20267

Docket No.: 1079-4014PC**CELL-BASED HIGH-THROUGHPUT SCREENING METHODS**

5

The work described herein is supported in part by grant no. P01 AG17617 from The National Institutes of Health, National Institute of Aging.

FIELD OF THE INVENTION

10

The present invention relates to cell-based screening methods, particularly suitable for high-throughput screening systems, for use in the identification and discovery of compounds (drugs) that can serve as therapeutics in the treatment and/or prevention of diseases and disorders.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15

An invariant feature of Alzheimer's disease is the deposition of the small, i.e., approximately 40 to 42 residues, A β peptide as insoluble β -amyloid plaque in the brain parenchyma. A β is generated by proteolysis of the approximately 100 kDa amyloid precursor protein (APP), a broadly expressed type-1 transmembrane protein that is found primarily in the trans-Golgi network (TGN) and at the cell surface (reviewed in B. De Strooper and W. Annaert, 2000, "Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein." *J. Cell. Sci.*, 113(Pt 11)(7):1857-1870). The β -amyloid precursor protein APP is further described in D.J. Selkoe et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85(19):7341-7345; R.E. Tanzi et al., 1988, *Nature*, 331(6156):528-530; and E. Levy et al., 1990, *Science*, 248(4959):1124-1126.

20

The β -cleavage of APP occurs within the luminal/extracellular domain of APP and generates two APP fragments: (i) a large, soluble amino-terminal fragment (sAPP) that is secreted from the cell, and (ii) a

25

transmembrane, carboxy-terminal fragment (β CTF) that remains associated

30

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 2 -

with the cell. This β CTF contains 99 amino acids, comprises the whole $A\beta$ peptide, and has a molecular weight of approximately 10 kDa.

An alternative pathway involves the cleavage of APP sixteen residues downstream from the β -cleavage site at the α -cleavage site. Like
5 β -cleavage, α -cleavage generates a secreted APP (sAPP) fragment that is secreted from the cell and an α CTF (of 84 residues and approximately 8 kDa) that remains membrane associated. α -cleavage occurs within the $A\beta$ peptide sequence, and as such, prevents the generation of $A\beta$ from a given APP molecule. $A\beta$ is generated from the β CTF by an intra-membrane
10 cleavage (γ -cleavage) that occurs primarily at 40 residues, and to a lesser extent, at 42 residues downstream from the β -cleavage site, releasing $A\beta$ 1-40 or $A\beta$ 1-42.

Recently, much progress has been made in identifying the major proteases/protease complexes responsible for β - and γ -cleavage (i.e.,
15 the β - and γ -secretases). The BACE proteases, which are members of a family of transmembrane aspartyl proteases, were first identified by Citron and colleagues (R. Vassar et al., 1999, *Science*, 286(5440):735-741) and appear to account for much of the β -secretase activity within a cell. BACE has an endosomal-lysosomal pattern of distribution, as well as an acidic pH
20 optimum (R. Vassar et al., 1999, *Science*, 286(5440):735-741; A. Capell et al., 2000, *J. Biol. Chem.*, 275(40):30849-30854; and J. Walter et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, 276(18):14634-14641). In addition, BACE-mediated cleavage of APP in the endocytic system is consistent with prior work that has identified, through various trafficking mutants of APP, the early
25 endosome as an important site for $A\beta$ generation (E.H. Koo and S.L. Squazzo 1994, *J. Biol. Chem.*, 269(26):17386-17389; R. Perez et al., 1999, *J. Biol. Chem.*, 274(27):18851-18856; S. Soriano et al., 1999, *J. Biol. Chem.*, 274(45):32295-32300; and A.M. Cataldo et al., 2000, *Am. J. Pathol.*, 157(1):277-286).

The presenilin (PS) proteins play an intimate role in γ -cleavage: expression of familial AD-causing mutant presenilin increases the production of A β terminating at residue 42 (D.R. Borchelt et al., 1996, *Neuron*, 17(5):1005-1013; K. Duff et al., 1996, *Nature*, 383(6602):710-713).

- 5 The PS-null phenotype includes the inability of the cell to generate A β and the intracellular accumulation of CTFs (J. Shen et al., 1997, *Cell*, 89(4):629-639). Recent work has directly implicated PS itself as the γ -secretase (M.S. Wolfe et al., 1999, *Nature*, 398(6727):513-517), although other proteins within the PS complex, such as nicastrin (G. Yu et al., 2000, *Nature*,
10 407(6800):48-54), may well be directly involved in γ -cleavage.

- While BACE and the PS complex may be the major β - and γ -secretases, substantial experimental work has implicated other proteases, particularly those of the lysosome (R.A. Nixon et al., 2000, *Neurochem. Res.*, 25(9-10):1161-1172; and P.M. Mathews et al., 2002, *J. Biol. Chem.*,
15 277:5299-5307). The relative contribution of these other proteases may be increased in AD due to their mis-trafficking to endocytic compartments (A.M. Cataldo et al., 1995, *Neuron*, 14(3):671-680; A.M. Cataldo et al., 1996, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 389:271-280; A.M. Cataldo et al., 1997, *Neuroscience*, 17(16):6142-6151.; A.M. Cataldo et al., 2000, *Am. J. Pathol.*, 157(1): 277-
20 286; R.A. Nixon et al., 2000, *Neurochem. Res.*, 25(9-10):1161-1172; O.M. Grbovic et al., 2001, *Society for Neuroscience annual meeting 2001*; and patent application U.S. Serial No. 09/560,124 "Methods for the identification of compounds for the treatment of Alzheimer's disease"; to R.A. Nixon et al., filed April 28, 2000).

- 25 Substantial effort is currently directed toward the identification of drugs that inhibit the various proteolytic events giving rise to A β . Existing approaches are typically based upon screens that employ the purified enzyme. The limitations of these approaches are numerous, and include (1) the difficulty of translating purely *in vitro* inhibitors into *in vivo* use; (2)
30 inherent assumptions made about the identity of the protease target; and perhaps most significantly, (3) such approaches do not detect compounds

that will affect A β generation in the complex environment of the cell, where protein trafficking, local environment (e.g. pH), and complex enzyme interactions, among other factors, are relevant. An example of this is the mechanism by which estrogen replacement therapy may be protective
5 against AD: estrogen is thought to act by promoting the intracellular trafficking of APP along non-A β generating pathways (A.B. Jaffe et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269(18):13065-13068; H. Xu et al., 1998, *Nat. Med.*, 4(4):447-451; and S. Gandy and S. Petanceska, 2000, *Biochim. Biophys. Acta*, 1502(1):44-52).

10 The screening method provided by the present invention overcomes many of the labor-intensive and technical limitations of cell-based screening, while at the same time allows the user to take advantage of the complexity of cellular responses that may be of benefit in treating diseases and disorders that presently are difficult to treat, for example, AD,
15 Parkinson's disease, Huntington's disease, lysosomal storage disorders, prion diseases, the tau-based neurodegenerative disorders (the tauopathies), and other non-AD amyloidoses.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides new cell-based screening
20 methods and techniques that are particularly suited for high-throughput screening analyses for the identification and discovery of new drugs for treating diseases and disorders, preferably diseases and disorders associated with metabolic and/or proteolytic pathways in which one or more metabolites is generated from a metabolic precursor or precursors, and in
25 which an increase or decrease of the one or more metabolites in the pathway is associated with disease.

The cell-based screening methods according to the present invention provide the advantage of dramatically reducing the number of false-positive results that are typically obtained in cell-based high-throughput
30 assay schemes. Use of the present invention advantageously allows the

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 5 -

identification of compounds that specifically modulate a metabolic and/or proteolytic pathway. Moreover, the present inventive methods provide the ability to identify those compounds that are generally and non-specifically toxic to cells undergoing high-throughput screening analysis, which, in other assays, could be erroneously identified as potential therapeutics. Thus, the present invention allows for the elimination of compounds as potential therapeutics if such compounds are non-specifically and/or generally toxic to cells.

It is one aspect of the present invention to provide a versatile cell-based screening method in which the levels of both a metabolic precursor protein (e.g., APP) and a corresponding metabolite product (e.g., β CTF) are determined, preferably a biologically meaningful metabolite product and preferably in a high-throughput screening system, so as to reduce the number of false-positives that are detected and yield an efficient and reliable screening technique. Also in accordance with the present invention, detection of the levels of different conformation states of a precursor protein in a pathway associated with a disease or disorder is provided by the screening methods described herein. In such methods, the metabolic precursor and metabolite can be, respectively, the different conformation states of the same protein, for example, as in the prion disease. As another example, the precursor protein can be unphosphorylated and the metabolite is a phosphorylated form of the precursor protein.

Such screening techniques allow for the identification of compounds that ultimately modulate, e.g., reduce or inhibit or increase or augment, a cellular processing event (e.g., β -secretase cleavage) upon a metabolic precursor protein (e.g., APP), thereby influencing the generation of one or more metabolites involved in progression of disease, such as Alzheimer's disease.

It is a particular aspect of the present invention to provide a specific and sensitive assay / detection system for β -cleavage inhibitors to

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 6 -

discover or identify agents and new drugs for the treatment, therapy, and/or prevention of Alzheimer's disease, preferably in conjunction with high-throughput screening techniques. The screening methods allow for the detection of inhibitors of a critical proteolytic event in the generation of A β , which in accordance with this invention can be used in drug development for treatments of Alzheimer's disease and/or for treatments of diseases and conditions related to Alzheimer's disease, e.g., β -amyloid related diseases.

It is yet another aspect of the present invention to provide highly sensitive and specific novel immunoassays, namely ELISAs, to detect cell-associated proteolytic or cleavage metabolites of the amyloid precursor protein APP, preferably in conjunction with high-throughput screening techniques. In accordance with this invention, one novel ELISA allows for the specific detection of a key peptide fragment, β CTF, which is generated along the pathway to the small peptide A β , resulting from the proteolytic processing of APP, and which is believed to be central to the pathogenesis of Alzheimer's disease. A second novel ELISA according to this invention allows for the detection of APP holoprotein and all known APP CTFs (i.e., the α CTF, the β CTF and the γ CTF). These ELISAs can be used in combination as powerful tools to determine the metabolism of APP along an A β -generating pathway in a living cell treated with a compound that may inhibit β -secretase cleavage of APP.

Further aspects, features and advantages of the present invention will be better appreciated upon a reading of the detailed description of the invention when considered in connection with the accompanying figures/drawings.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIG. 1: Monoclonal antibody specificity for APP

holoprotein and CTFs. An L cell line overexpressing human APP (L/APP) was metabolically labeled for 15 minutes and chased for 1 hour as indicated. Cells were pretreated with the indicated calpain inhibitors for 3 hours prior to

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 7 -

metabolic labeling, as well as during labeling and chase. Cell lysates were prepared, and equal volumes were immunoprecipitated with one of three monoclonal antibodies: C1/6.1, which recognizes an epitope within the 20 carboxy-terminal-most residues of APP; JRF/A β N/25, which recognizes an epitope within residues 1-7 of A β ; and JRF/A β tot/17, which recognizes an epitope within residues 1-16 of A β . (Table 1, Example 1). Labeled, immunoprecipitated proteins were sized on SDS-PAGE and detected as described in Example 1, Methods. Arrows indicate the APP holoprotein (APP_h) and the α - and β -cleaved CTFs (α CTF and β CTF, respectively).

FIGS. 2A and 2B: Detection of APP holoprotein and α CTFs, β CTFs, and γ CTFs with C1/6.1. The L cell line overexpressing APP was metabolically labeled and chased for the indicated times. Calpeptin treatment was performed as described for Figure 1. Cell lysates were immunoprecipitated with C1/6.1 monoclonal antibody as described in Example 2. **FIG. 2A** depicts a short exposure showing the turnover of the APP holoprotein (APP_h). **FIG. 2B** depicts a longer exposure showing the APP holoprotein and the α -, β -, and γ -cleaved CTFs (α CTF, β CTF, γ CTF; indicated by asterisks and arrows).

FIG. 3: β CTF ELISA. ELISA plates were coated with C1/6.1 monoclonal antibody, a synthetic peptide standard, DAEFRHDKMQNGYENPTYKFFEQMQN, (SEQ ID NO:1), was bound, and bound peptide was detected with JRF/A β N/25 as described in Example 1, Methods, and in Example 3. The optical density (at 450 nm) was graphed as a function of the femtomoles/ml of peptide added to each well. Values are the mean of two measurements.

FIG. 4: Quantitative detection of β CTFs isolated from cells. Human APP overexpressing L cells (L/APP) were grown and human APP₆₉₅ expression was induced as described in Example 1, Methods. Detergent lysates were prepared from a control well and a well treated with 10 μ M calpeptin for 6 hours prior to extraction. β CTF levels were

determined by ELISA using C1/6.1 as the capture antibody and JRF/A β N/25 as the detecting antibody. Values are reported as the mean of duplicate ELISA readings \pm SD. (Example 3).

FIGS. 5A and 5B: Quantitative ELISA detection of changes

5 **in β CTF levels following pharmacological and genetic manipulations.** (Example 3). **FIG. 5A** presents a Western blot analysis using C1/6.1 of L/APP cells grown as described. Lane 1 was loaded with untreated L/APP cells; lane 2, cells treated with 10 μ m calpeptin for 6 hours prior to extraction; lane 3, cells transiently transfected with 0.5 μ g/well rab5 cDNA
10 48 hours prior to extraction; lane 4, cells transiently transfected with 1.0 μ g/well rab5 cDNA using fugene; lane 5, cells transiently transfected with 1.0 μ g/well rab5 cDNA using lipofectAMINE (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD). The APP holoprotein (APP_H) and CTFs are indicated. **FIG. 5B** presents the levels of β CTFs detected from these lysates by ELISA. Unlike calpeptin
15 treatment, rab5 overexpression increased β CTF levels in the cells, while not increasing α CTF levels (O.M. Grbovic et al., 2001, Society for Neuroscience annual meeting 2001).

FIG. 6: APP/total CTF ELISA. ELISA plates were coated with C1/6.1, the GST- β PP672-770 fusion protein standard was bound, and
20 bound GST- β PP672-770 was detected with C2/7.1 as described in Example 1, Methods, and in Example 4. The optical density (at 450 nm) was graphed as a function of the femtomoles/ml of fusion protein added to each well. Values are the mean of two measurements.

FIGS. 7A and 7B: Quantification by ELISA of APP

25 **holoprotein and all CTFs in cells.** Equal numbers of parental L cells and L/APP cells were plated and APP₆₉₅ expression was induced. Cell lysates were prepared and, in **FIG. 7A**, analyzed by Western blot using C1/6.1 monoclonal antibody (APP holoprotein is indicated). In **FIG. 7B**, similar cell lysates were analyzed by ELISA using C1/6.1 as the capture antibody and

C2/7.1 for detection. As indicated, cells were treated with 10 μ M calpeptin for 6 hours prior to extraction. (Example 4).

FIGS. 8A and 8B: Cyclohexamide treatment reduces both β CTF and APP/total CTF levels. L/APP cells were plated at equal density and APP expression was induced. During the final 6 hours of induction, cells were treated with 10 μ M calpeptin or 75 μ g/ml cyclohexamide as indicated. Lysates were prepared and analyzed by ELISA for β CTF levels (**FIG. 8A**) and for APP/total CTF levels (**FIG. 8B**) as described in Example 1, Methods, and in Example 5. Results are the mean of duplicate measurements and are expressed as fmole/ml of cell lysate relative to standard.

FIGS. 9A – 9D: Schematic of high-throughput screening protocol. (**FIG. 9A**): ELISA wells are initially coated with C1/6.1 monoclonal antibody, which specifically binds to the intracellular, carboxy-terminus of APP (the capture antibody), or antibodies which specifically bind to the APP cellular metabolites (carboxy-terminal fragments of APP, i.e., α CTF, β CTF, or γ CTF). (**FIG. 9B**): Cells of interest (i.e., mammalian, including human, cells and cell lines, cell types such as neuroblastomas, cells transfected to express APP or other proteins linked to AD pathogenesis; or cells genetically modified to mimic aspects of AD pathobiology) are seeded into the well, allowed to settle, and the test compound added.

Due to the rapid turnover of the β CTF, compared with the turnover of $A\beta$ secreted into the growth medium, drug treatment can be for a much shorter time period (e.g., about 1-2 hours) than that required if $A\beta$ were to be measured. Moreover, no changes of the growth media are required. (**FIG. 9C**): Cells are disrupted (lysed) *in situ* and the detergent extracted-APP fragments allowed to bind to the pre-coated capture antibody(ies). Alternatively, cells are grown in separate wells and cell lysates are added to the capture antibody. Following washes, the two

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 10 -

detection antibodies, which are differently labeled (e.g., with different fluorophores), are allowed to bind. (FIG. 9D): One of the detection antibodies, JRF/A β N/25 (black antibody), recognizes only β CTF and the other detection antibody C2/7.1 recognizes APP holoprotein and all APP CTFs, including the β CTF (gray antibody). The binding of these antibodies is then detected quantitatively using standard assays, such as a color reaction as described, for example, by C. Janus et al., 2000, *Nature*, 408(6815): 979-82, or by employing fluorophore-coupled antibodies and fluorescence detection.

The levels of β CTF and APP and its cleavage metabolites are determined, based on the intensity of a color reaction or fluorescence signals relative to control. A ratio of specific antibody binding to β CTF to specific antibody binding to APP and all APP cleavage metabolites (i.e., α CTF, β CTF and γ CTF) can be determined (ratio of black antibody to gray antibody) and compared to the same ratio in the control. If necessary or desired for technical reasons, detection using these two antibodies can be performed in different wells, without compromising the ability of this screen to differentiate between compounds that specifically reduce β -cleavage and compounds that are simply toxic to the cells.

FIGS. 10A-10D: 3-methyl adenine selectively inhibits β CTF generation and A β production without reducing total cellular APP.

L/APP cells were plated at equal density and APP expression was induced. Cells were then incubated for 6 hours without treatment, or with the addition of 10 μ g/ml cyclohexamide or 10 μ g/ml 3-methyl adenine (3MA). APP/total CTF levels (FIG. 10A) and β CTF levels (FIG. 10B) in cell lysates were then determined by ELISA. A β 1-40 (FIG. 10C) and A β 1-42 (FIG. 10D) levels secreted into the growth media during this 6 hour incubation were determined by ELISA (C. Janus et al., 2000, *Nature*, 408(6815):979-982). Data are expressed as a percentage of the level seen in untreated control cells for each assay.

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 11 -

DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention describes a sensitive and specific screening method/system, which is also both efficient and economical, to determine the levels of both a metabolic precursor and its biologically relevant metabolite or product, preferably in cells undergoing testing for compounds or agents that modulate or affect the generation of the resulting metabolite or product from its metabolic precursor. By modulate is meant that the bioactivity of a molecule is altered, i.e., either decreased (i.e., reduced, inhibited, or blocked), or increased (i.e., activated, enhanced, or augmented). As used herein, compound refers to a biological or bioactive agent, or drug, or substance, or ingredient, or biomolecule, for example, as further described herein. Illustratively, the function or activity of a target molecule, or a metabolic or proteolytic process associated with a disease or disorder is modulated, for example, by being reduced, decreased, or inhibited; or increased, augmented, or enhanced.

In a preferred embodiment according to the present invention, the function or activity of a target molecule or metabolic or proteolytic process is reduced, decreased, or inhibited. Preferably, the screening method/system of this invention is performed using high throughput screening procedures, and more preferably is cell-based, thus providing applicability to many drug discovery schemes for various diseases and disorders having a detectable and assayable metabolic precursor (e.g., a protein) and its metabolite product (e.g., a proteolytic fragment of the protein) associated therewith.

More specifically, with particular regard to treatments and therapies for Alzheimer's disease, the present invention provides methods and procedures to identify, in an efficient and cost-effective manner, therapeutic agents, compounds, or drugs that ultimately reduce the amount of the A β product generated by a cell. As mentioned above, the A β peptide forms insoluble β -amyloid plaques in the brain parenchyma as part of the debilitating effects of Alzheimer's disease. The present methods allow the

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 12 -

determination and employment of new treatments for, and/or the prevention of, Alzheimer's disease. The methods of the present invention also allow the screening and determination of molecules that modify proteolytic or metabolic pathways, or other cellular events, that affect, e.g., by reducing, the production of a metabolite. Thus, the cell-based methods of the invention can be advantageously employed to identify compounds or bioactive agents that modulate cellular processes that prevent an interaction between a protein, e.g., a proteolytic enzyme, and its target, e.g., a substrate, for example, β -secretase and APP.

High-throughput drug screening on living cells often generates an overwhelming number of false-positive hits, particularly when a reduction in an activity is being assayed. This is because many compounds and agents undergoing testing are simply toxic, and nonspecific toxicity frequently reduces the target activity. For this reason, high-throughput screening of living cells is rarely carried out when the desired outcome is a reduction in a particular cellular activity. As more particularly described herein, this is a challenging hurdle for Alzheimer's disease drug discovery, as compounds that reduce A β generation by a cell (D.J. Selkoe, 1999, *Nature*, 399(6738 Suppl): A23-31; D.J. Selkoe, 2001, *Physiol. Rev.*, 81(2): 741-66) and/or reduce A β accumulation in the brain are likely to have treatment value (C. Janus et al., 2000, *Nature*, 408(6815): 979-82; D. Morgan et al., 2000, *Nature*, 408(6815): 982-985).

According to the present invention a novel screening method, preferably a cell-based method, has been developed that allows for the elimination of false-positive hits due to nonspecific toxicity while detecting particularly informative cellular metabolites that are generated in the pathway of products that are associated with or linked to various disease states, for example, along the pathway to A β generation associated with Alzheimer's disease. Overcoming the false-positives associated with cell toxicity makes high-throughput cell-based screening a practical, cost effective and appealing approach to identifying compounds that target

molecules which are operative in the metabolic pathways that are associated with, and perhaps cause and/or exacerbate, a disease state.

Indeed, once a compound is identified as being effective in a cell-based system, it has a much greater probability of *in vivo* efficacy and translation to clinical practice than does a compound or other molecule identified, for example, using a purified enzyme, or a similar, less complex *in vitro* system.

A preferred embodiment of the present invention is an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)-based method and approach that is specifically designed to screen for modulators or effectors, preferably, antagonists or inhibitors, of target proteolytic enzymes, such as the amyloid precursor protein β -secretases, e.g., the transmembrane aspartic protease BACE, (R. Vassar et al., 1999, *Science*, 286(5440): 735-741). The method according to the invention involves the detection of the amyloid precursor protein APP and its cleavage fragments (metabolites), namely, α CTF, β CTF and γ CTF, alone or in combination.

The methods according to this invention are generally applicable to determining within a cell system both the levels of a metabolic precursor and the levels of a metabolite of interest. These methods allow the identification of modulators, e.g., inhibitors, blockers, or antagonists; or agonists or activators, that affect (e.g., inhibit the generation of a metabolite from a metabolic precursor, or e.g., increase the production or secretion of a precursor or protein) precursor and breakdown molecules involved in metabolic processes or pathways, including proteolytic pathways.

In addition to providing a screen for Alzheimer's disease therapeutics, as particularly exemplified herein, the present invention provides a way to screen in a cellular milieu for metabolites and their precursors that are associated with a number of other diseases and disorders. Nonlimiting examples of such diseases and disorders include lysosomal storage disorders, Parkinson's disease, Huntington's disease, neuronal ceroid lipofuscinoses, the tau-based neurodegenerative disorders

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 14 -

(the tauopathies), and non-AD amyloidoses (e.g., inclusion body myositis) in which the enzymatic system that generates the amyloid or abnormally accumulated product is targeted, as well as other conditions in which there is the generation of an assayable metabolic breakdown protein or peptide product, or metabolite, derived from a precursor polypeptide. Additional examples include diseases in which a unique conformational state of protein accumulates, such as the prion diseases.

In such diseases and for the purposes of this invention, the normal, non-pathological conformation is the precursor, while the pathological conformational state, which can include toxic oligomeric peptides, is the metabolite, where both can be assayed using appropriate and specific probes, such as specific and detectable antibodies. A precursor to metabolite relationship can include other post-translational modifications, such as phosphorylation, where the precursor protein substrate and post-translationally modified polypeptide can both be assayed, e.g., as illustrated by tauopathies. In addition, metabolites in accordance with the present invention also include protein or peptide complexes (e.g., dimers, trimers, multimers), oligomers, polymers, oligomeric assemblages, or protein or peptide assemblies, for example, in beta-sheets or other arrangements, including, for example, protofibrillar and fibrillar molecules or macromolecules, e.g., A β , or a molecule resulting from the association of two or more peptides or proteins, such as a macromolecular complex. Preferably, the metabolite, or one or more portions thereof, is antigenic and detectable by an antibody.

In a preferred embodiment, highly sensitive and specific novel ELISAs, e.g., sandwich ELISAs, to detect cell-associated proteolytic or cleavage metabolites of the APP have been developed and are described herein, with particular regard to high-throughput screening methodologies. Much current research is directed at modifying the proteolytic processing of APP, which yields the small peptide A β , thought to be central to the pathogenesis of AD. One of the ELISAs described herein allows for the

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 15 -

specific detection of a key peptide fragment generated along the pathway to A β – the β CTF. A second ELISA allows for the detection of APP holoprotein, and, optionally, all known APP CTFs, namely, the α CTF, β CTF and the γ CTF. In combination, these ELISAs are powerful tools to

5 determine the metabolism of APP along an A β -generating pathway in a living cell treated with compound that may inhibit β -secretase cleavage of APP.

Moreover, by combining the sandwich ELISAs into a single system, preferably a high-throughput system, compounds that are toxic to a

10 cell can be rapidly distinguished from those that specifically reduce the critical APP proteolytic step. Toxic agents and compounds are likely to reduce the levels of APP holoprotein, as well as the CTF cleavage products that are detected in a cell-based screen, by such mechanisms as reducing cell growth, reducing cell viability, acting as protein biosynthesis poisons, or

15 in other ways that globally compromise the cell's metabolism. Such a toxic effect would be detected by a reduced signal in an APP/total CTF ELISA.

However, a compound that specifically reduces β CTF generation and shows a reduction only in the β CTF ELISA signal is unlikely to reduce the signal from an APP/total CTF ELISA. Therefore, a high-

20 throughput screen can readily be based upon a reduction in the β CTF ELISA signal resulting from treatment with a compound, relative to the signal from untreated cells, while treatment with the same compound shows no change in the APP/total CTF ELISA signal relative to untreated cells. Accordingly, compounds that specifically reduce β CTF generation will show

25 a reduction of β CTF levels in the β CTF ELISA, and will not show a significant reduction in the levels of APP/total CTF ELISA. In contrast, generally toxic compounds are likely to lower both the β CTF ELISA level and the APP/total CTF ELISA level, as detected by reduced signal in an ELISA-based assay. Thus, the methods according to the present invention allow

30 the skilled practitioner to differentiate β -cleavage-specific inhibitor

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 16 -

compounds from compounds that are non-specifically cytotoxic, or toxic to cells in general.

An additional benefit for high-throughput screening is to overlay the above-described two ELISAs into a sequential assay that obviates the need for the use of parallel 96-well microtiter plates (see, e.g., FIGS. 9A-9D and description thereof). Such a protocol allows the method to be carried out in the same well in which the assay cells are grown using specific antibodies directed toward one or more target precursor proteins and one or more target metabolites. That the particular ELISAs described herein perform well using a single well in which the cells are grown is due in part to the unique intracellular APP epitopes detected by the C1/6.1 and C2/7.1 monoclonal antibodies. The production and screening of monoclonal antibodies that are specific for particular epitopes comprising a precursor protein such as APP and metabolite products are well known to those having skill in the art. Further, reducing the numbers of plates needed and assays performed has clear cost benefits and enhances the reliability of the assay, as each determination has a control measurement that is carried out within the same well.

In performing the cell-based methods of the present invention, cells that are undergoing testing and treatment with test compounds to identify modulators, preferably antagonist or inhibitor compounds, can include, without limitation, cultured or established mammalian cells or cell lines, including human cells or cell lines, nerve cells, neurons, neuroblastoma cells, cells transfected with a gene encoding amyloid precursor protein (APP) and which express APP, cells transfected with a gene encoding a protein linked to Alzheimer's disease pathogenesis (e.g., presenilin (R. Sherrington et al., 1995, *Nature*, 375(6534):754-760), and cells genetically modified to mimic aspects of Alzheimer's disease pathobiology, such as rab5 overexpression (O.M. Grbovic et al., 2001, *Society for Neuroscience*, annual meeting 2001).

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 17 -

Further examples of cells genetically modified to mimic aspects of Alzheimer's disease pathobiology include, but are not limited to, those described in patent application U.S. Serial No. 09/560,124 "Methods for the identification of compounds for the treatment of Alzheimer's disease";

5 to R.A. Nixon et al., filed April 28, 2000; in P.M. Mathews et al., 2001, "Accelerated A β generation in a cell model of Alzheimer's disease-related endosomal-lysosomal system upregulation." *Alzheimer's Disease: Advances in Etiology, Pathogenesis and Therapeutics* (Iqbal K, Sisodia SS, Winblad B, editors), John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 461-467; and

10 P.M. Mathews et al., 2002, *J. Biol. Chem.*, 277:5299-5307). Suitable cells may be vertebrate, preferably mammalian, including human, primary cells isolated from brain tissue, for example, or established cell lines, and/or transfected or transformed cell cultures, such as those available from the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard,

15 Manassas, VA 20110-2209.

Test compounds employed in the screening methods of this invention are as described herein, and include for example, without limitation, synthetic organic compounds, chemical compounds, natural products, polypeptides and peptides.

20 In addition, the screening methods of the present invention allow for efficient cell-based screening of inhibitor compounds, and in particular, of inhibitors of a critical proteolytic event in the generation of A β associated with Alzheimer's disease. The screening and detection methods of the present invention have been demonstrated in a nonlimiting manner

25 using the compound 3-methyladenine (3MA), (see, Example 6 and FIGS. 10A-10D), which specifically reduces the levels of the APP metabolite β CTF, which is involved in a metabolic pathway associated with AD progression.

Further, the methods of this invention, in which the levels of both a metabolic precursor and a biologically meaningful metabolite are both

30 determined, have applicability in high-throughput screens for other cell-based assays. Illustratively, the present invention contemplates methods for

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 18 -

screening for a specific decrease or increase in phospho-epitopes on tau that are relevant to the pathological accumulation of paired helical filaments. For example, in such a condition, the metabolic precursor is tau and the biologically meaningful metabolite is a specific phosphorylated form of tau (i.e., phospho-tau).

5 In addition, the detection of compounds that allow an increase in a protein or peptide, for example, the APP precursor, or one or more particular metabolites, e.g., secreted APP, may be beneficial. For example, secreted APP may have neuroprotective effects. Further, generation of the α CTF precludes A β generation and therefore can have a protective effect.

10 Accordingly, in one of its aspects, the present invention embraces cell-based screening or detection methods to identify compounds that modulate (i.e., (i) reduce, inhibit, decrease, or block; or (ii) increase, enhance, or augment) the generation of one or more cellular metabolites associated with a disease or disorder, without causing non-specific cytotoxicity. The methods involve contacting cells with a test compound; determining the levels of a cellular precursor protein, or the levels of a precursor conformation state of a cellular protein; and then determining levels of a metabolite generated from the cellular precursor protein. The metabolite can be a breakdown or cleavage product of the precursor protein, or it can be a modified form of the state of the precursor polypeptide, e.g., a post-translationally modified polypeptide. According to the method, a test compound that specifically reduces or inhibits the level of the metabolite in cells shows a reduction only in the level of the metabolite relative to that in untreated cells, and a test compound that is non-specifically cytotoxic shows a reduction in the levels of both the cellular precursor protein, and, optionally, its associated cleavage products and the metabolite.

20 In another of its aspects, the present invention embraces a cell-based screening or detection method to identify compounds that increase or augment the generation of one or more cellular metabolites associated with a decreased likelihood of developing, or decreasing the

25

30

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 19 -

severity of, a disease or disorder, without causing non-specific cytotoxicity. These methods involve contacting cells with a test compound; determining levels of a cellular precursor protein or the levels of a precursor conformation state of a cellular protein; and then determining levels of a metabolite generated from the cellular precursor protein. The metabolite is as described above. In accordance with this method, a compound that specifically increases or augments the level of the metabolite in cells shows an increase in the levels of the metabolite relative to untreated cells, while not significantly altering the levels of the precursor.

Thus, the present invention provides a broad cell-based screening approach that is suitable for use with many drug identification and discovery schemes, preferably in a high-throughput screening format. Automated high throughput screening is described, for example, in Burbaum et al., 1997, *Current Opinion in Chemical Biology*, 1:72-78; and Schullek et al., 1997, *Analyt. Biochem.*, 246:20-29. As a nonlimiting example, in high-throughput screening according to the present invention, liquid handling operations can be performed by a Microlab 2000.TM. pipetting station (e.g., Hamilton Instruments). Other equipment needed for the screening (e.g., incubators, plate washers, plate readers) can either be adapted for automated functioning, as necessary, or commercially purchased as automated modules. Movement of samples through the assay can be performed by robots, for example, an XP.TM. robot mounted on a 3 m-long track (Zymark, Hopkinton, MA)

Through the screening method according to this invention, libraries of synthetic organic compounds, natural products, peptides, and oligonucleotides can be evaluated for their capacity to modulate particular target metabolic proteins and their products (e.g., cleavage products) that reflect or contribute to a disease process. Specifically, compounds can be identified that target components in a metabolic pathway associated with a disease or disorder, e.g., a metabolic precursor or a proteolytic enzyme involved in the processing of the precursor. For example, compounds can

be detected or identified that specifically inhibit β -secretase proteolytic activity on APP so as to prevent conversion to, or accumulation of, resulting cellular metabolites that can cause or exacerbate a disease.

In yet another of its aspects, the present invention

- 5 encompasses an active compound or compounds tested in, or identified or detected from, the performance of the methods as described herein. A nonlimiting, representative compound that demonstrated efficacy in the methods of the invention (Example 6) is 3-methyladenine (3MA) and related derivative, analog, or modified forms thereof that preferably do not alter its
- 10 function or activity.

- Active compounds can be optimized, if desired, via medicinal chemistry. Initially, for example, pharmacophore(s) can be defined using modern computational chemistry tools and that are representative of the structures found to be active in the high throughput screens. Once a
- 15 consensus pharmacophore is identified, focused combinatorial libraries of compounds can be designed to probe structure-activity relationships. Finally, the biopharmaceutical properties, such as potency and efficacy, of a set of lead structures can be improved to identify suitable compounds for clinical testing.

- 20 Thus, the present invention provides novel cell-based methods for identifying compounds that can be utilized in therapeutic methods for treating diseases and conditions resulting from an intracellular precursor-product activity that causes the production, or buildup, of product leading to disease or augmentation of disease.

25 Antibodies and Antibody Production

- The term antibody refers to intact molecules as well as fragments thereof, such as Fab, F(ab')₂, Fv, which are capable of binding an epitopic or antigenic determinant. Antibodies that bind to a metabolic protein, polypeptide or peptide, e.g., APP, can be prepared using intact
- 30 polypeptides or fragments containing small peptides of interest or prepared recombinantly for use as the immunizing antigen. (see, Table 1, Example

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 21 -

- 1). The polypeptide or oligopeptide used to immunize an animal can be derived from the translation of RNA or synthesized chemically, and can be conjugated to a carrier protein, if desired. Commonly used carriers that are chemically coupled to peptides include bovine serum albumin (BSA),
5 keyhole limpet hemocyanin (KLH), and thyroglobulin. The coupled peptide is then used to immunize the animal (e.g., a mouse, rat, sheep, goat, or rabbit).

The term "humanized" antibody refers to antibody molecules in which amino acids have been replaced in the non-antigen binding regions, e.g., the complementarity determining regions (CDRs), in order to more closely resemble a human antibody, while still retaining the original binding capability, e.g., as described in U.S. Patent No. 5,585,089 to C.L. Queen et al., which is a nonlimiting example. Fully humanized antibodies, such as those produced transgenically or recombinantly, are also encompassed
15 herein.

The term "antigenic determinant" refers to that portion of a molecule that makes contact with a particular antibody (i.e., an epitope). When a protein or fragment of a protein is used to immunize a host animal, numerous regions of the protein may induce the production of antibodies which bind specifically to a given region or three-dimensional structure on the protein; these regions or structures are referred to as antigenic
20 determinants. An antigenic determinant may compete with the intact antigen (i.e., the immunogen used to elicit the immune response) for binding to an antibody.

The terms "specific binding" or "specifically binding" refer to the interaction between a protein or peptide and a binding molecule, such as an agonist, an antagonist, or an antibody. The interaction is dependent upon the presence of a particular structure (e.g., an antigenic determinant or epitope, or a structural determinant) of the protein that is recognized by the binding molecule. For example, if an antibody is specific for epitope "A", the
25 presence of a protein containing epitope A (or free, unlabeled A) in a

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 22 -

reaction containing labeled "A" and the antibody will reduce the amount of labeled A bound to the antibody.

Antibodies specific for a metabolic precursor polypeptide, e.g., APP, or metabolic product, e.g., β CTF or $A\beta$, or immunogenic peptide fragments thereof, can be generated using methods that have long been known and conventionally practiced in the art. Such antibodies may include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments, and fragments produced by an Fab expression library. Neutralizing antibodies, (i.e., those which inhibit dimer formation) are especially preferred for therapeutic use.

For the production of antibodies, various hosts including goats, rabbits, sheep, rats, mice, humans, and others, can be immunized by injection with the appropriate polypeptide, or any peptide fragment or oligopeptide thereof, which has immunogenic properties. Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase the immunological response. Nonlimiting examples of suitable adjuvants include Freund's (incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide or silica, and surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, KLH, and dinitrophenol. Adjuvants typically used in humans include BCG (bacilli Calmette Guérin) and *Corynebacterium parvum*.

Preferably, the peptides, fragments, or oligopeptides used to induce antibodies to the polypeptides (i.e., immunogens) have an amino acid sequence having at least five amino acids, and more preferably, at least 6 to 10 amino acids. It is also preferable that the immunogens are identical to a portion of the amino acid sequence of the natural protein; they may also contain the entire amino acid sequence of a small, naturally occurring molecule. The peptides, fragments or oligopeptides may comprise a single epitope or antigenic determinant or multiple epitopes. Short stretches of amino acids comprising the protein or peptide can be fused to

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 23 -

those of another protein, such as KLH, in which case antibodies can be produced against the chimeric molecule.

Monoclonal antibodies to metabolic precursor proteins and metabolite product polypeptides, peptides, or immunogenic fragments thereof, may be prepared using any technique which provides for the production of specific antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the EBV-hybridoma technique (G. Kohler et al., 1975, *Nature*, 256:495-497; D. Kozbor et al., 1985, *J. Immunol. Methods*, 81:31-42; R.J. Cote et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:2026-2030; and S.P. Cole et al., 1984, *Mol. Cell Biol.*, 62:109-120). The production and screening of monoclonal antibodies is well known and routinely used in the art.

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies," the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with appropriate antigen specificity and biological activity can be used (S.L. Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855; M.S. Neuberger et al., 1984, *Nature*, 312:604-608; and S. Takeda et al., 1985, *Nature*, 314:452-454). Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies may be adapted, using methods known in the art, to produce single chain antibodies specific for a particular protein or peptide. Antibodies with related specificity, but of distinct idiotypic composition, may be generated by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries (D.R. Burton, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:11120-3). Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in a lymphocytic cell population or by screening recombinant immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in the literature (R. Orlandi et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3833-3837 and G. Winter et al., 1991, *Nature*, 349:293-299).

Antibody fragments which contain specific binding sites for a given protein or peptide may also be generated. For example, such fragments include, but are not limited to, F(ab')₂ fragments which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and Fab fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity (W.D. Huse et al., 1989, *Science*, 254:1275-1281).

Various immunoassays can be used for screening to identify antibodies having the desired specificity. Numerous protocols for competitive binding or immunoradiometric assays using either polyclonal or monoclonal antibodies with established specificities are well known in the art. Such immunoassays typically involve measuring the formation of complexes between a particular protein or polypeptide and its specific antibody.

Screening Methods

A variety of protocols for detecting and measuring proteins and peptides using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the protein or peptide are known and practiced in the art. Examples include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), and fluorescence activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay utilizing monoclonal antibodies reactive with two non-interfering epitopes on a polypeptide can be employed, as can competitive binding assays. These and other assays are described in the art, as represented by the publications of R. Hampton et al., 1990; *Serological Methods, a Laboratory Manual*, APS Press, St Paul, MN and D.E. Maddox et al., 1983; *J. Exp. Med.*, 158:1211-1216).

The novel cell-based screening assays described herein can be used to identify candidate bioactive agents or drugs that modulate, preferably reduce or inhibit, the function or bioactivity of a metabolic precursor. In this way agents can be identified for use in treating diseases

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 25 -

and disorders characterized by the production of a proteolytic breakdown product, for example, so that cells harboring the target precursor protein (e.g., a proteolytic enzyme) can be killed or growth arrested.

Generally, in performing screening methods, cells, or even
5 polypeptides or peptides involved in a particular metabolic pathway, can be non-diffusably bound to an insoluble support having isolated sample receiving areas (e.g. a microtiter plate, an array, etc.). The criteria for suitable insoluble supports are that they can be made of any composition to which cells or polypeptides can be bound; they are readily separated from
10 soluble material; and they are otherwise compatible with the overall method of screening. The surface of such supports may be solid or porous and of any convenient size or shape. Examples of suitable insoluble supports include microtiter plates, arrays, membranes and beads. These are typically made of glass, plastic (e.g., polystyrene), polysaccharides, nylon or
15 nitrocellulose.

Microtiter plates and arrays are especially convenient, because a large number of assays can be carried out simultaneously, using small amounts of reagents and samples. The particular manner of binding the polypeptide is not crucial, so long as it is compatible with the reagents
20 and overall methods of the invention, maintains cell viability or the activity of the peptide and is nondiffusable.

Preferred methods of binding include the use of antibodies, direct binding to "sticky" or ionic supports, chemical crosslinking, etc. Following binding of the cells or polypeptides, excess unbound material is
25 removed by washing. The sample receiving areas may then be blocked as needed through incubation with, for example, bovine serum albumin (BSA), casein or other innocuous/nonreactive protein.

A candidate bioactive agent or drug is added to the assay. Novel binding agents can include specific antibodies, non-natural binding
30 agents identified in screens of chemical libraries, peptide analogs, etc. Of particular interest are screening assays for agents that have a low toxicity

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 26 -

for human cells; however, in accordance with the present invention, agents that are normally toxic to cells can be successfully assayed in the cell-based methods as described herein.

ELISA immunoassays are preferred for identifying suitable
5 drugs or bioactive agents according to the present invention. In addition, other assays can be used for this purpose, including labeled *in vitro* protein-protein binding assays, electrophoretic mobility shift assays, other immunoassays for protein binding, and the like. The term "agent" as used herein refers to any molecule, e.g., protein, oligopeptide, small organic
10 molecule, polysaccharide, polynucleotide, etc., having the capability of directly or indirectly altering the activity or function of a target molecule, such as a metabolic precursor polypeptide. Generally a plurality of assay mixtures are run in parallel with different agent concentrations to obtain a differential response to the various concentrations. Typically, one of these
15 concentrations serves as a negative control, i.e., at zero concentration, or below the level of detection.

Candidate agents, compounds, drugs, and the like encompass numerous chemical classes, though typically they are organic molecules, preferably small organic compounds having a molecular weight of more than
20 100 and less than about 10,000 daltons, preferably, less than about 2000 to 5000 daltons, as a nonlimiting example. Candidate agents comprise functional groups necessary for structural interaction with proteins, particularly hydrogen bonding, and typically include at least an amine, carbonyl, hydroxyl or carboxyl group, preferably at least two of the functional
25 chemical groups. The candidate agents often comprise cyclical carbon or heterocyclic structures and/or aromatic or polyaromatic structures substituted with one or more of the above functional groups. Candidate agents are also found among biomolecules including peptides, saccharides, fatty acids, steroids, purines, pyrimidines, derivatives, structural analogs or
30 combinations thereof.

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 27 -

Candidate bioactive agents, compounds, drugs, biomolecules and the like are obtained from a wide variety of sources, including libraries of synthetic or natural compounds. For example, numerous means are available for random and directed synthesis of a wide variety of organic compounds and biomolecules, including expression of randomized oligonucleotides. Alternatively, libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant and animal extracts are available or readily produced. In addition, natural or synthetically produced libraries and compounds are readily modified through conventional chemical, physical and biochemical means. Known pharmacological agents may be subjected to directed or random chemical modifications, such as acylation, alkylation, esterification, amidification to produce structural analogs.

A variety of other reagents may be included in the screening assay according to the present invention. Such reagents include, but are not limited to, salts, neutral proteins, e.g. albumin, detergents, etc., which may be used to facilitate optimal protein-protein binding and/or to reduce non-specific or background interactions. In addition, reagents that otherwise improve the efficiency of the assay, such as protease inhibitors, anti-microbial agents, etc. may be used. Further, the mixture of components in the method may be added in any order that provides for the requisite binding.

Kits are included as an embodiment of the present invention which comprise containers with reagents necessary to screen test compounds. Depending on the design of the test and the types of compounds to be screened, such kits include antibodies to metabolic precursor polypeptide, or peptide, and/or antibodies to metabolite product, labeled or unlabeled, and instructions for performing the assay.

EXAMPLES

The following examples describe specific aspects of the invention to illustrate the invention and provide a description of the present

methods for those of skill in the art. The examples should not be construed as limiting the invention, as the examples merely provide specific methodology useful in understanding and practice of the invention and its various aspects.

5

Example 1

Cell lines, cDNA constructs, and transfections. Ltk-cells (a murine fibroblast-like cell line; (S. Kit et al., 1967, *J. Virol.*, 1(1): 238-240) were maintained at 37°C and 5% CO₂ in high glucose DMEM , (Cellgro, Herndon, VA) supplemented to contain 10% fetal bovine serum (Gemini, Woodland, CA), 2 mM glutamax I (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD), and penicillin/streptomycin (Cellgro). cDNAs encoding human APP₆₉₅ and human rab5 were inserted into the mammalian expression vector pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Following transfection using lipofectin (manufacturer's protocol; Gibco/BRL), stable L cell lines overexpressing APP₆₉₅ were selected in 400 µg/ml G418 (Gemini) and screened for expression. Transient transfections with rab5 were done using lipofectAMINE (Gibco/BRL) or fugene (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN) according to the manufacturers' protocol.

Antibodies. Table I describes the monoclonal antibodies used in the methods according to the present invention.

25

30

Table I
Monoclonal antibodies

Antibody	Epitope Specificity	APP-species detected	Immunogen Sequence
C1/6.1	within carboxy-terminal 20 residues of APP	APP holoprotein; all CTFs	KMQQNGYENP TYKFFEQMGN (SEQ ID NO:2)
C2/7.1	within residues 644-676 of APP ₆₉₅	APP holoprotein; all CTFs	LVMLKKKKQYTS IHGIVVEVDAA VTPEERHLSK (SEQ ID NO:3)
JRF/A β N/25	within first 7 residues of A β ; requires β -cleavage	β CTF; A β 1-X by ELISA	DAEFRHD (SEQ ID NO:4)
JRF /A β tot/17	within residues 1-16 of human A β	APP holoprotein; β CTF; A β by ELISA	DAEFRHDSGY EVHHQKLIVFFA EDVGSNKGAI GLMVGGVV (SEQ ID NO:5)

Table 1 shows the monoclonal antibodies and the known epitope specificity based upon the immunogenic peptide used for immunization, as well as the antibody's binding by ELISA to additional synthetic peptides. Additionally, the binding of these antibodies to various APP proteolytic species is as described herein. The specificity of JRF/A β N/25 and JRF/A β tot/17 for A β , and the use of these two monoclonal antibodies in an A β sandwich ELISAs is as described (C. Janus et al., 2000, *Nature*, 408(6815): 979-982; S.D. Schmidt et al., 2001, *Society for Neuroscience*, annual meeting 2001).

The C1/6.1 antibody was raised against the conserved carboxy-terminal 20 residues of APP (residues 676-695 of APP₆₉₅), (SEQ ID NO:2) and is useful for immunolabeling, immunoprecipitation, and Western

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 30 -

blot analysis (see also, C. Janus et al., 2000, *Nature*, 408(6815):979-982). The C2/7.1 antibody was raised against residues 644-676 of APP₆₉₅ (SEQ ID NO:3), and is also useful for immunolabeling, immunoprecipitation, and Western blot analysis. JRF/AβN/25 was raised against a synthetic peptide

5 encompassing residues 1 to 7 of human Aβ. Extensive evidence that JRF/AβN/25 requires β-cleavage at residue 1 of Aβ is presented herein. Other antibodies, their specificity and their use in a sandwich ELISA are as described. (C. Janus et al., *Id.*)

Sandwich ELISAs. Sandwich ELISAs using the antibodies as presented in Table 1 were performed essentially as has been reported (C. Janus et al. *Id.*; R. Rozmahel et al., *Neurobiology of Aging*, 23:187-194; and P.M. Mathews et al., 2002, *J. Biol. Chem.*, 277: 5299-5307), with modifications to detect cell-associated APP metabolites. The wells of Nunc-Immuno Plates (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) were coated overnight at 4° C using 20

15 μg/ml of C1/6.1 and the remaining protein binding sites were blocked by incubating with 1% Block Ace (Yukijirushi Milk, Sapporo Japan) in PBS (200 μl/well) for 4 hours at room temperature.

For the βCTF ELISA, a synthetic peptide was prepared, i.e., DAEFRHDKMQNGYENPTYKFFEQMQN, (SEQ ID NO:1), that contains

20 both the JRF/AβN/25 epitope (SEQ ID NO:4) and the C1/6.1 epitope (SEQ ID NO:2), (see Table I). For the APP/total CTF ELISA, a glutathione S-transferase fusion protein containing the C-terminal 99 residues of human APP (GST-βPP672-770; (K. Islam and E. Levy, 1997, *Am. J. Pathol.* 151(1):265-71) was prepared. This fusion protein contains both the C1/6.1

25 and C2/7.1 epitopes. These standards, prepared as stock solutions, were dissolved in DMSO, stored at -70°C, and were further diluted in buffer containing 20 mM Na phosphate, 2 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.2% BSA, 0.05% CHAPS, 0.4% Block Ace and 0.05% NaN₃, pH 7.0 immediately prior to use.

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 31 -

ELISA plates were incubated overnight at 4°C with samples and standards. Samples, as described herein, were cell lysates prepared in 1% Triton X-100®, 140 mM NaCl, 25 mM Tris (pH 7.4), 0.5 mM EDTA, and protease inhibitors. Lysates were vortexed briefly, allowed to rest on ice for 5 30 minutes, and centrifuged at 6,000 rpm in an Eppendorf centrifuge. The supernatant was used for the ELISA. Following overnight binding of APP and APP metabolites to the capture antibody (C1/6.1), the wells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5% Triton X-100®/0.05% Tween-20 followed by two washes with PBS. A solution 10 containing 20 mM Na phosphate, 2 mM EDTA, 400 mM NaCl, and 1% BSA, pH 7.0 was then added to the wells for 1 hour at room temperature.

APP and cell-associated APP metabolites were detected by incubating for 4 hours at room temperature with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated C2/7.1 or JRF/AβN/25 diluted in 20 mM Na phosphate, 2 15 mM EDTA, 400 mM NaCl, 1% BSA, pH 7.0. Thereafter, the wells were again washed twice with phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5% Triton X-100®/0.05% Tween-20, followed by two washes with PBS. ELISA plates were developed using a color reaction (TMB Microwell Peroxidase Substrate System, Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD) and the OD₄₅₀ 20 was read. ELISA signals are reported as the mean ± SE of two or more wells in femtomoles per ml relative to standard.

Metabolic labeling, immunoprecipitation and Western blot analysis. To detect APP and CTFs, 5×10^5 cells were seeded onto 35-mm diameter tissue culture dishes followed by induction of human APP₆₉₅ expression with 25 20 mM butyrate for 24 hours (P.M. Mathews et al., 1992, *J. Cell. Biol.*, 118(5):1027-1040; P.M. Mathews et al., 2000, *Mol. Med.*, 6(10):878-891). Cultures were methionine/cysteine starved for 20 minutes, pulse-labeled for 15 minutes with 100 µCi/ml TRANS³⁵S-LABEL (Dupont-NEN), washed, and chased in complete medium containing 2 mM unlabeled methionine (P.M. 30 Mathews et al., 1992, *J. Cell. Biol.*, 118(5):1027-1040). Calpain inhibitors, as described herein, were added to the growth medium 3 hours prior to

methionine/cysteine starvation and then throughout pulse-labeling and chase.

Cell lysates (prepared in 1% Triton X-100, 140 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 10 mM methionine, and protease inhibitors; 5 (P.M. Mathews et al., 1992, *J. Cell. Biol.*, 118(5):1027-1040; A. Beggah et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, 271(34):20895-20902) were subjected to immunoprecipitation with various monoclonal antibodies as described in Example 2. Immunoprecipitated proteins were sized by SDS-PAGE and labeled proteins were visualized by exposure to x-ray film and analyzed 10 quantitatively using a Storm 840 phosphorimager (Molecular Dynamics/Amersham Biosciences, Sunnyvale, CA) and/or by scan analysis (NIH Image).

For Western blot analysis, protein concentration in cell lysates was determined (BioRad DC Protein Assay, BioRad, Rockville Center, NY), 15 and equal amounts of proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. Membranes were incubated in C1/6.1 (2 µg/ml) overnight, washed, and incubated with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG for 1.5 hours. Membranes were incubated in ECL substrate (Amersham, Arlington Heights, IL) and exposed to x-ray film.

20 **Preparation of cell lysates for ELISA.** Cells were seeded into 6-well dishes and allowed to settle overnight. Human APP₆₉₅ expression in L cells was induced with 20 mM butyrate for approximately 40 hours (P.M. Mathews et al., 1992, *J. Cell. Biol.*, 118(5):1027-1040), cells were washed twice with Hank's BSS before extraction in 0.5 ml lysis buffer (1% Triton X- 25 100, 140 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7.4, 0.5 mM EDTA, protease inhibitors). Cell lysates were vortexed briefly, allowed to rest on ice for approximately 15 minutes, and gently spun at 6,000 rpm in an Eppendorf centrifuge. Supernatants were collected and loaded neat for ELISA.

Example 2

Specificity of monoclonal antibodies. Table I in Example 1 presents the monoclonal antibodies used in the method according to the invention, as well as the sequences of the synthetic peptides used to generate each antibody. APP holoprotein and CTFs were immunoprecipitated using

5 monoclonal antibodies that recognize different epitopes within the carboxy-terminal 99 residues of APP: C1/6.1, JRF/A β N/25, and JRF/A β tot/17 (see Table I and FIG. 1).

To determine whether a particular monoclonal antibody

10 detected APP holoprotein and/or α CTF and/or β CTF or both, L cells overexpressing human APP₆₉₅ (L/APP cells) were metabolically labeled for 15 minutes, and then were chased for 1 hour (FIG. 1, lanes 1-6).

Calpain inhibitors are known to increase the levels of APP CTFs within cells (H. Klafki et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, 271(45):28655-28659; L. Zhang et al., 1999, *J. Biol. Chem.*, 274(13):8966-9872; G. Verdile et al., 2000, *J. Biol. Chem.*, 275(27):20794-20798). It has recently been reported that, contrary to previous reports, inhibiting calpains increases the levels of CTFs by increasing the biosynthesis of both α - and β -cleaved CTFs (P.M. Mathews et al., 2001, *Society for Neuroscience*, annual meeting

15 2001).

Thus, in addition to control conditions, cells were treated for 3 hours prior to, as well as during, the pulse and chase periods with the indicated calpain inhibitors (FIG. 1, lanes 7-18) to increase the levels of metabolically labeled CTFs prior to immunoprecipitation. Equal volumes of

25 detergent lysates prepared from the pulse and chase periods were subjected to immunoprecipitation with each of the monoclonal antibodies and labeled APP species were resolved on 4-20% gradient SDS-PAGE.

In untreated L/APP cells (FIG. 1, lanes 1-6), C1/6.1 immunoprecipitated labeled holoprotein from the pulse period (FIG. 1, lane

30 1). Following the 1 hour chase, C1/6.1 immunoprecipitation also revealed

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 34 -

two rapidly migrating APP fragments (FIG. 1, lane 4; arrows indicating α CTF and β CTF). JRF/A β N/25 immunoprecipitation failed to bring down APP holoprotein (FIG. 1, lanes 2 and 5), thus confirming that the epitope for JRF/A β N/25 requires a cleaved amino-terminus at residue 1 of A β . That

5 JRF/A β N/25 immunoprecipitated, following the 1 hour chase, a protein that co-migrated with one of the CTFs revealed by C1/6.1 immunoprecipitation (compare FIG. 1, lanes 4 and 5), conclusively identified this as the β -cleaved CTF of APP.

JRF/A β tot/17, which recognizes an epitope that resides within
10 residues 1-16 of A β , immunoprecipitated APP holoprotein in the pulse and chase periods (FIG. 1, lanes 3 and 6, respectively), as well as the β CTF following chase. Given the specificities of these three monoclonal antibodies and the mobility on SDS-PAGE of the CTFs that they immunoprecipitated, it was concluded that the most rapidly migrating
15 species identified by C1/6.1 was the α -cleaved CTF.

In cells treated with either 10 μ M calpeptin or 10 μ M calpain inhibitor III, the immunoprecipitation pattern from the pulse-labeled lysates was similar to that seen in untreated cells (compare FIG. 1, lanes 1-3 with lanes 7-9 and lanes 13-15). However, with calpain inhibition, striking
20 differences in the abundance of CTFs were seen following the 1 hour chase. C1/6.1 immunoprecipitation demonstrated a substantial and apparently proportionate increase in the levels of both α CTFs and β CTFs with either calpain inhibitor (compare FIG. 1, lane 4 with lanes 10 and 16). This increase in the β CTF was confirmed by immunoprecipitation with
25 JRF/A β N/25 and JRF/A β tot/17 (FIG. 1, lanes 11, 12, 17 and 18).

Densitometric quantification of these bands from the C1/6.1 immunoprecipitation confirmed the observation described herein that the ratio of α CTF to β CTF appeared not to be affected by calpain inhibition (remaining at approximately 2:1), in spite of an approximate 4-fold increase
30 in the biosynthesis of both CTFs. Finally, it is noted that the APP

holoprotein contains 5 times more methionines than do the CTFs, thus, the metabolic labeling substantially under-estimates the relative abundance of the CTFs.

The pulse-chase experiment shown in FIGS. 2A and 2B was designed to determine if C1/6.1 was able to detect other species of CTFs (e.g. the γ CTF). Accordingly, L/APP cells were pulse-labeled for 15 minutes and chased for the indicated times up to 6 hours prior to immunoprecipitation of lysates with C1/6.1. FIG. 2A shows that the turnover of APP holoprotein in control (lanes 1-6) and in 10 μ M calpeptin treated cells (lanes 7-12) is similar. Quantification of these data confirmed that the turnover of APP holoprotein was unchanged by calpeptin treatment.

FIG. 2B shows a longer exposure of the same immunoprecipitation revealing the generation and turnover of the CTFs. In agreement with the data in FIG. 1, 10 μ M calpeptin treatment substantially increased the generation of both α and β CTFs during the initial 1 hour of chase (compare FIG. 2B, lanes 1-3 with lanes 7-9). In contrast to a previous interpretation (L. Zhang et al., 1999, *J. Biol. Chem.*, 274(13):8966-8972), this calpeptin concentration did not appear to reduce the turnover of CTFs. While the generation of CTFs is substantially increased, the rate of their degradation, like the turnover of APP, did not appear to be affected by calpeptin treatment.

In addition, the long exposure shown in FIG. 2B highlights other CTFs that are consistently detected. This includes fragments recognized by C1/6.1 that migrate above β CTF (FIG. 2B, lane 9), as well as a fragment that migrates more rapidly than α CTF and that appears following long chase periods (>2 hours), (FIG. 2B, lanes 10-12, labeled γ CTF). The larger fragments suggest cleavage heterogeneity amino-terminal to the β -cleavage site. The fragment smaller than the α CTF is consistent in size and time course of appearance with the γ CTF of APP.

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 36 -

Thus, it was concluded from the results in Example 2 that C1/6.1 antibody detected all of the known cell-associated metabolites of APP (APP holoprotein and CTFs) and that JRF/A β N/25 antibody specifically detected the β -cleaved CTF. Also, since the C2/7.1 antibody was raised against the carboxy-terminus of APP, as was C1/6.1, and results using the C2/7.1 monoclonal antibody were similar to those obtained using C1/6.1, it was concluded that C2/7.1 also detects APP holoprotein and all CTFs.

Example 3

The β CTF specific ELISA. Using C1/6.1 as the capture antibody and JRF/A β N/25 as the detection antibody, an ELISA was developed that specifically recognizes cell-associated β CTFs. FIG. 3 illustrates the sensitivity and linearity of this ELISA against a synthetic peptide (DAEFRHDKMQQNGYENPTYKFFEQMQM), (SEQ ID NO:1) containing the JRF/A β N/25 epitope (SEQ ID NO:4) at its amino-terminus (in bold) and the C1/6.1 epitope (SEQ ID NO:2) at its carboxy-terminus (in italics).

This FIG. 3 ELISA shows linear detection into the low fmole/ml range (range shown is 3 to 100 fmole/ml), similar to the range that was obtained with A β sandwich ELISAs (C. Janus et al., 2000, *Nature*, 408(6815):979-982; S.D. Schmidt et al., 2001, *Society for Neuroscience*, annual meeting 2001) and well within the range necessary to detect the β CTFs generated *in vivo* by a cell.

To determine whether such an ELISA protocol could be used to detect β CTFs isolated from cells, detergent lysates prepared from equal density L/APP cells and L/APP cells treated with 10 μ M calpeptin for 6 hours were examined. In untreated L/APP cells, 5.8 ± 0.3 fmole/ml of β CTFs were detected (FIG. 4). The addition of 10 μ M calpeptin for 6 hours nearly doubled the levels of β CTFs detected by ELISA (10.0 ± 0.6 fmole/ml), in agreement with pulse-labeling data showing an increase in β CTFs following

calpeptin treatment. This result demonstrates that the β CTF ELISA can quantitatively detect changes in levels of β CTFs generated within cells.

Additional results shown in FIGS. 5A and 5B confirm that this β CTF ELISA can be used to detect changes in the amount of β CTFs

5 generated by a cell. Abnormalities of the neuronal endosomal system seen in early-stage, sporadic Alzheimer's disease (see, e.g., A.M. Cataldo et al., 1997, *J. Neurosci.*, 17(16): 6142-6151.(1998); A.M. Cataldo et al., 2000, *Am. J. Pathol.*, 157(1):277-286; R.A. Nixon et al., 2000, *Neurochem. Res.*, 25(9-10):1161-1172) were modeled by overexpressing rab5, an important
10 regulator protein of endocytosis (P. Chavrier et al., 1990, *Cell*, 62(2):317-329.; J.P. Gorvel et al., 1991, *Cell*, 64(5):915-925; C. Bucci et al., 1992, *Cell*, 70(5):715-728; M.A. Barbieri et al., 1996, *Biocell*, 20(3):331-338; and G. Li, 1996, *Biocell*, 20(3):325-330; and in patent application U.S. Serial No.: 09/560,124, entitled, "Methods for the identification of compounds for the
15 treatment of Alzheimer's disease"; to R.A. Nixon et al., filed April 28, 2000).

In this rab5 overexpression experiment, L/APP cells were transiently-transfected with no DNA (FIG. 5A, lanes 1 and 2), or rab5 cDNA (FIG. 5A, lanes 3-5) and the levels of APP holoprotein and CTFs were determined by Western blot analysis using C1/6.1 (FIG. 5A). As expected,
20 treatment with 10 μ m calpeptin greatly increased the levels of CTFs detected (compare FIG. 5A, lanes 1 and 2), which the pulse-chase data indicate contain predominantly α CTFs and lesser amounts of β CTFs and γ CTFs.

Stimulating endocytosis by rab5 overexpression also
25 increased the levels of CTFs detected by Western blot analysis (most apparent in lane 5, FIG. 5A), although not to the same extent as did calpeptin treatment. In addition to the Western blot analysis, an aliquot of each of the lysates was examined by ELISA to determine the levels of β CTFs in the cells (FIG. 5B). As was seen in FIG. 4, calpeptin treatment
30 substantially increased the amount of β CTFs detected by ELISA (i.e., from

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 38 -

16.1 to 26.0 fmole/ml). In addition, overexpression of rab5 also increased the amount of β CTFs detected by ELISA, nearly to the same extent as did calpeptin treatment, suggesting that the CTFs detected by the C1/6.1 Western blot analysis following rab5 overexpression are predominantly β CTFs, and further supporting the specificity of this ELISA for the β CTF.

These results show that the β CTF ELISA is sensitive, specific, can detect β CTFs generated by a living cell, and can detect changes in the levels of β CTFs resulting from pharmacological as well as genetic manipulations.

10

Example 4

The APP/total CTF ELISA. In addition to the β CTF ELISA, a novel ELISA was developed that detects APP holoprotein, as well as all cell-associated CTFs from cells (APP/total CTF ELISA). This ELISA uses C1/6.1 as the capture antibody, as did the β CTF ELISA, but uses the C2/7.1 antibody, rather than the JRF/A β N/25 antibody, as the detecting antibody.

FIG. 6 illustrates the use of this ELISA to detect a standard that consists of the carboxy-terminal 99 amino acids of APP expressed as a bacterial fusion protein (GST- β PP672-770; (K. Islam and E. Levy, 1997, *Am. J. Pathol.*, 151(1):265-271). This fusion protein contains both the C1/6.1 and C2/7.1 epitopes. Like the β CTF ELISA, the APP/total CTF ELISA showed a broad linear range down to low fmole/ml of the standard (as shown in FIG. 6, 100-800 fmole/ml).

Levels of APP and total CTFs were examined in lysates prepared from cells using this ELISA. FIG. 7A shows by C1/6.1 Western blot analysis the relative level of APP holoprotein expression in L cells versus the human APP₆₉₅ overexpressing L cell line (L/APP). In FIG. 7B, lysates prepared from these cells either grown under control conditions or subjected to calpeptin treatment were examined using the C1/6.1-C2/7.1 sandwich ELISA. As expected given the levels of APP detected by Western

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 39 -

blot analysis, L/APP cells showed significantly more ELISA signal than did the parental L cells. The addition of calpeptin increased the signal in the L cells, although not to a statistically significant degree. In L/APP cells, however, the addition of calpeptin greatly increased the ELISA signal, as would be expected due to the generation of CTFs in this system. This results confirms that the APP/total CTF ELISA can be used to track changes in the levels of cell-associated APP metabolites generated by a cell.

Example 5

Differentiating between toxicity and specific effects on β CTF levels. To determine whether the combination of the β CTF ELISA and the APP/total CTF ELISA allowed differentiation between a toxic effect and a specific effect on β CTF levels, the protein synthesis inhibitor cyclohexamide was used to model a toxic compound. Cyclohexamide has many of the characteristics of a compound that would give a false-positive in a standard screen by reducing cell viability and therefore dramatically reducing A β generation.

Were a screening protocol to rely upon a reduction in A β as the sole outcome measure, cyclohexamide treatment would reduce A β production and be seen as a potential therapeutic; however, cyclohexamide is highly toxic. FIG. 8A and 8B show the results from an experiment in which control L/APP cells were compared with equally dense L/APP cells treated with either 10 μ M calpeptin or 75 μ g/ml cyclohexamide for 6 hours. FIG. 8A shows β CTF levels and FIG. 8B shows APP holoprotein/CTF levels determined by ELISA. Calpeptin treatment was seen to significantly increase β CTF levels (approximately doubling from 2.7 to 5.4 fmole/ml cell lysate), while showing a smaller relative increase in APP/total CTF levels using the APP/total CTF ELISA. Cyclohexamide treatment reduced β CTF levels (by 78%, from 2.7 fmole/ml to 0.6 fmole/ml) while at the same time dramatically reducing APP/total CTF levels (by 88%, from 608 fmole/ml in control to 74 fmole/ml in cyclohexamide-treated L/APP cells).

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 40 -

These results demonstrate that, in combination, these two ELISAs can be advantageously used to detect a reduction in β CTF levels, while differentiating between compounds that specifically reduce β -cleavage (a desirable outcome) and compounds that reduce β CTF levels via general cell toxicity (e.g., as demonstrated using cyclohexamide).

Example 6

Detection of a selective inhibitor of β CTF generation using β CTF and APP/total CTF ELISAs according to the present invention.

3-methyl adenine (3MA), an inhibitor of cellular autophagy (P.O. Seglen and P.B. Gordon, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79(6):1889-1892; P.E. Schwarze and P.O. Seglen, 1985, *Exp. Cell. Res.*, 157(1):15-28; and P.O. Seglen et al., 1986, *Exp. Cell. Res.*, 162(1):273-277), has been reported to have potential therapeutic value in AD and/or other neuronal atrophy-associated dementing disorders (patent application U.S. Serial No. 09/561,582 "Methods for the treatment of neuronal atrophy-associated dementia"; to R. A. Nixon et al., filed April 28, 2000).

This example describes the results of experiments conducted using 3MA as a test compound to demonstrate the present method and its advantages. FIGS. 10A-10D present the results of these experiments which demonstrate a specific reduction by 3MA of β CTF generation and $A\beta$ production in L/APP cells. FIG. 10A shows that 3MA treatment did not reduce cellular APP levels relative to levels of APP in untreated control cells, while cyclohexamide treatment did. FIG. 10B shows that 3MA treatment reduced β CTF levels by 50% relative to control while cyclohexamide treatment reduced β CTF levels somewhat more. These results are consistent with cyclohexamide being a non-specific cellular toxin that reduces total cellular APP levels, thereby also reducing β CTF levels. These results further indicate that the effect of 3MA on β CTF levels is specific, and is not the result of general cell cytotoxicity. This experiment demonstrates that, according to the present invention, the ELISAs in combination can

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 41 -

differentiate between potentially therapeutic compounds (e.g., 3MA) and a toxic compound (e.g., cyclohexamide).

In addition, A β levels in the growth media were examined from these test cells. FIG. 10C shows the reduction in A β 1-40 levels relative to control, which is observed with both 3MA and cyclohexamide treatment. FIG. 10D shows a similar reduction in A β 1-42 levels relative to control, which is evident with both treatments. Again, the reduction in A β generation obtained with cyclohexamide treatment is due to non-specific cytotoxicity, while the reduction in A β generation obtained following 3MA treatment is linked to a specific reduction in β CTF generation.

These findings demonstrate the usefulness of the method of the cell-based screening methods of the present invention in which levels of a precursor and levels of a metabolite are both assayed, and, in particular, the use of a β CTF ELISA and an APP/total CTF ELISA involved in AD pathways, to differentiate between generally toxic compounds and compounds with potential therapeutic value using a living cell system.

The contents of all patents, patent applications, published US and PCT applications, articles, books, references, reference manuals, the Sequence Listing and abstracts cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety to more fully describe the state of the art to which the invention pertains.

As various changes can be made in the above-described subject matter without departing from the scope and spirit of the present invention, it is intended that all subject matter contained in the above description, or defined in the appended claims, be interpreted as descriptive and illustrative of the present invention. Many modifications and variations of the present invention are possible in light of the above teachings.

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 42 -

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A cell-based screening method to identify compounds that reduce or inhibit the generation of one or more cellular metabolites associated with a disease or disorder, without causing non-specific cytotoxicity, comprising:
 - 5 (a) contacting cells with a test compound;
 - (b) determining levels of (i) a cellular precursor protein, or (ii) a conformation state of a cellular precursor protein; and
 - (c) determining levels of a metabolite generated from (i) or (ii) of step (b); wherein a compound that specifically reduces or inhibits the level of
 - 10 the metabolite in cells shows a reduction only in the level of the metabolite relative to that in untreated cells, and a compound that is non-specifically cytotoxic shows a reduction in the levels of (i), and, optionally, associated cleavage products of (i); or of (ii); and of the metabolite.
2. The method according to claim 1, which is a high-throughput
- 15 screening method.
3. The method according to claim 1 or claim 2, wherein the method is performed in a single well of a microtiter plate using antibodies directed toward specific epitopes of the metabolite and antibodies directed toward specific epitopes of the precursor protein and, optionally, its associated
- 20 cleavage products.
4. The method according to claim 1, wherein the determination of the levels of the cellular precursor protein is performed by an enzyme linked immunosorbent assay comprising one or more detectable antibodies specific for epitopes of the cellular precursor protein.
- 25 5. The method according to claim 1, wherein the determination of the levels of the metabolite generated by the precursor protein is performed by an enzyme linked immunosorbent assay comprising one or more detectable antibodies specific for epitopes of the metabolite.

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 43 -

6. The method according to claim 1, wherein the cellular precursor protein (i) is amyloid precursor protein (APP) and, optionally, the associated cleavage products are α carboxy-terminal fragment (α CTF), β carboxy-terminal fragment (β CTF) and γ carboxy-terminal fragment (γ CTF).
- 5 7. The method according to claim 1, wherein the metabolite is selected from the group consisting of post-translationally modified cellular precursor protein, protein or peptide oligomers, protein or peptide multimers, protofibrillar macromolecules, fibrillar macromolecules and oligomeric assemblies.
- 10 8. The method according to claim 1, wherein the metabolite is a proteolytic product of amyloid precursor protein APP.
9. The method according to claim 8, wherein the metabolite is β carboxy-terminal fragment (β CTF) or α carboxy-terminal fragment (α CTF).
10. The method according to claim 1, wherein the cells contacted with the
15 test compound are selected from primary mammalian cells, mammalian cell lines, neuroblastomas, neurons, isolated brain cells, cells transfected with the gene encoding amyloid precursor protein APP and expressing the encoded APP product, and cells genetically modified to mimic Alzheimer's disease pathobiology.
- 20 11. The method according to claim 10, wherein the cells are human cells or human cell lines.
12. The method according to claim 1, wherein the test compound is selected from a synthetic organic compound, a chemical compound, a natural product, a polypeptide, or a peptide.
- 25 13. A cell-based screening method to identify compounds that increase or augment the generation of one or more cellular metabolites associated

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 44 -

with a decreased likelihood of developing, or with a decreased severity of, a disease or disorder, without causing non-specific cytotoxicity, comprising:

- (a) contacting cells with a test compound;
- (b) determining levels of (i) a cellular precursor protein, or (ii) a
5 conformation state of a cellular precursor protein; and
- (c) determining levels of a metabolite generated from (i) or (ii) of
step (b); wherein a compound that specifically increases or augments the
level of the metabolite in cells shows an increase in the levels of the
metabolite relative to untreated cells, while not significantly changing the
10 levels of (i) or (ii).

14. The method according to claim 13, which is a high-throughput screening method.

15. The method according to claim 13 or claim 14, wherein the method is performed in a single well of a microtiter plate using antibodies directed
15 toward specific epitopes of the metabolite and antibodies directed toward specific epitopes of the precursor protein and, optionally, its associated cleavage products.

16. The method according to claim 13, wherein the determination of the levels of the cellular precursor protein is performed by an enzyme linked
20 immunosorbent assay comprising one or more detectable antibodies specific for epitopes of the cellular precursor protein.

17. The method according to claim 13, wherein the determination of the levels of the metabolite generated by the precursor protein is performed by an enzyme linked immunosorbent assay comprising one or more detectable
25 antibodies specific for epitopes of the metabolite.

18. The method according to claim 15, wherein the cellular precursor protein is amyloid precursor protein (APP), or other proteolytic fragment of APP, and, optionally, the associated cleavage products are α carboxy-

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 45 -

terminal fragment (α CTF), β carboxy-terminal fragment (β CTF) and γ carboxy-terminal fragment (γ CTF).

19. The method according to claim 13, wherein the metabolite is selected from the group consisting of post-translationally modified cellular precursor
- 5 protein, protein or peptide oligomers, protein or peptide multimers, protofibrillar macromolecules, fibrillar macromolecules and oligomeric assemblies.
20. The method according to claim 13, wherein the metabolite is a proteolytic product of amyloid precursor protein APP.
- 10 21. The method according to claim 20, wherein the metabolite is secretory APP or α carboxy-terminal fragment (α CTF) of APP.
22. The method according to claim 13, wherein the cells contacted with the test compound are selected from primary mammalian cells, cultured mammalian cell lines, neuroblastomas, neurons, isolated brain cells, cells
- 15 transfected with the gene encoding amyloid precursor protein APP and expressing the encoded APP product, and cells genetically modified to mimic Alzheimer's disease pathobiology.
23. The method according to claim 22, wherein the cells are human cells or human cell lines.
- 20 24. The method according to claim 13, wherein the test compound is selected from a synthetic organic compound, a chemical compound, a natural product, a polypeptide, or a peptide.
- 25 A cell-based screening method for distinguishing between a compound that specifically reduces activity of cellular proteolytic pathways involved in metabolic events associated with Alzheimer's disease, and a compound that is non-specifically toxic to cells, comprising:
- (a) treating cells with a test compound;

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 46 -

- (b) detecting levels of one or more amyloid precursor protein (APP) metabolites;
- (c) detecting levels of amyloid precursor protein (APP);
- (d) comparing the effect of the compound on the levels of the one
- 5 or more amyloid precursor protein (APP) metabolites and the effect of the compound on the levels of amyloid precursor protein (APP); wherein a specific reduction in the levels of the one or more amyloid precursor protein (APP) metabolites, with no significant reduction in the levels of the amyloid precursor protein (APP), indicates that the compound
- 10 specifically inhibits cellular proteolytic pathways and is not non-specifically cytotoxic.
26. The method according to claim 25, which is a high-throughput screening method.
27. The method according to claim 25, wherein, in step (b), the one or
- 15 more amyloid precursor protein (APP) metabolites is cell-associated β carboxy-terminal fragment (β CTF) resulting from proteolytic processing of amyloid precursor protein APP.
28. The method according to claim 25, further wherein, in step (c), proteolytic fragments comprising α carboxy-terminal fragment (α CTF), β
- 20 carboxy-terminal fragment (β CTF) and γ carboxy-terminal fragment (γ CTF) of the amyloid precursor protein (APP) are detected.
29. The method according to claim 25 or 26, wherein the method is performed in a single well of a microtiter plate using antibodies directed toward specific epitopes of the one or more amyloid precursor protein (APP)
- 25 metabolites and antibodies directed toward specific epitopes of amyloid precursor protein (APP).
30. The method according to claim 25, wherein the determination of the levels of the one or more amyloid precursor protein (APP) metabolites is

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 47 -

performed by an enzyme linked immunosorbent assay comprising one or more detectable antibodies specific for epitopes on the one or more APP metabolites.

31. The method according to claim 25, wherein the determination of the levels of the amyloid precursor protein (APP) is performed by an enzyme linked immunosorbent assay comprising one or more detectable antibodies specific for epitopes on the amyloid precursor protein (APP).

32. The method according to claim 25, wherein the cells contacted with the test compound are selected from primary mammalian cells, cultured mammalian cell lines, neuroblastomas, neurons, isolated brain cells, cells transfected with the gene encoding amyloid precursor protein APP and expressing the encoded APP product, and cells genetically modified to mimic Alzheimer's disease pathobiology.

33. The method according to claim 32, wherein the cells are human cells or human cell lines.

34. The method according to claim 25, wherein the test compound is selected from a synthetic organic compound, a chemical compound, a natural product, a polypeptide, or a peptide.

35. A cell-based screening method for distinguishing between a compound that specifically reduces activity of cellular proteolytic pathways involved in metabolic events associated with Alzheimer's disease, and a compound that is non-specifically toxic to cells, comprising:

- (a) treating cells with a test compound;
- (b) detecting levels of cell-associated β carboxy-terminal fragment (β CTF) resulting from proteolytic processing of amyloid precursor protein APP;
- (c) detecting levels of amyloid precursor protein (APP) and its associated cleavage fragments comprising α carboxy-terminal fragment

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 48 -

(α CTF), β carboxy-terminal fragment (β CTF) and γ carboxy-terminal fragment (γ CTF);

(d) comparing the effect of the compound on the levels of β CTF generated from the cleavage of APP and the effect of the compound on the levels of amyloid precursor protein (APP) and its associated cleavage fragments; wherein a specific reduction in the levels of β CTF, with no significant reduction in the levels of amyloid precursor protein (APP) and its associated cleavage fragments relative to control, indicates that the compound specifically inhibits cellular proteolytic pathways and is not non-specifically cytotoxic.

36. The method according to claim 35, which is a high-throughput screening method.

37. The method according to claim 35 or claim 36, wherein the method is performed in a single well of a microtiter plate using antibodies directed toward specific epitopes of the β carboxy-terminal fragment (β CTF) and antibodies directed toward specific epitopes of amyloid precursor protein (APP) and its associated cleavage fragments.

38. The method according to claim 35, wherein the determination of the levels of the cell-associated β carboxy-terminal fragment (β CTF) resulting from the proteolytic processing of amyloid precursor protein APP is performed by an enzyme linked immunosorbent assay comprising one or more detectable antibodies specific for epitopes on the cell-associated β carboxy-terminal fragment (β CTF).

39. The method according to claim 35, wherein the determination of the levels of the amyloid precursor protein (APP) and its associated cleavage fragments is performed by an enzyme linked immunosorbent assay comprising one or more detectable antibodies specific for epitopes on the amyloid precursor protein (APP) and its associated cleavage fragments.

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 49 -

40. The method according to claim 35, wherein the cells treated with the test compound are selected from primary mammalian cells, cultured mammalian cell lines, neuroblastomas, neurons, isolated brain cells, cells transfected with the gene encoding amyloid precursor protein APP and
5 expressing the encoded APP product, and cells genetically modified to mimic Alzheimer's disease pathobiology.

41. The method according to claim 40, wherein the cells are human cells or human cell lines.

42. The method according to claim 35, wherein the test compound is
10 selected from a synthetic organic compound, a chemical compound, a natural product, a polypeptide, or a peptide.

43. A cell-based screening method to identify compounds that reduce or inhibit the activity of cellular metabolites involved in an Alzheimer's disease metabolic pathway, comprising:

- 15 (a) treating with a test compound cells plated onto a substrate coated with one or more capture antibodies directed against amyloid precursor protein (APP) and APP cell associated metabolites;
- (b) disrupting the cells, wherein extracted amyloid precursor protein (APP) and APP cell associated metabolites bind to the one or more
20 capture antibodies;
- (c) detecting binding of protein to capture antibody with detection antibodies, wherein the detection antibodies comprise (i) labeled antibodies that specifically recognize one or more APP metabolites and (ii) differently labeled antibodies that specifically recognize amyloid precursor protein
25 (APP) and, optionally, carboxy-terminal proteolytic products thereof; and
- (d) determining the levels of (i) the one or more APP metabolites, and (ii) the amyloid precursor protein (APP) and, optionally, the carboxy-terminal proteolytic products thereof; wherein a decrease in the levels of the one or more APP metabolites, without a significant decrease in the level of

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 50 -

the APP protein, and optionally, the carboxy-terminal proteolytic products thereof, relative to untreated cells, indicates that the compound specifically inhibits cellular proteolytic pathways and is not non-specifically cytotoxic.

44. The method according to claim 43, which is a high-throughput
5 screening method.

45. The method according to claim 43, wherein the capture antibody is directed against the carboxy-terminus of the amyloid precursor protein (APP).

46. The method according to claim 43, wherein the one or more APP
10 metabolites is selected from β CTF, α CTF and γ CTF.

47. The method according to claim 43, wherein the one or more APP metabolites is β CTF.

48. The method according to claim 43, wherein the cells treated with the test compound are selected from primary mammalian cells, cultured
15 mammalian cell lines, neuroblastomas, neurons, isolated brain cells, cells transfected with the gene encoding amyloid precursor protein APP and expressing the encoded APP product, and cells genetically modified to mimic Alzheimer's disease pathobiology.

49. The method according to claim 48, wherein the cells are human cells
20 or human cell lines.

50. The method according to claim 43, wherein the test compound is selected from a synthetic organic compound, a chemical compound, a natural product, a polypeptide, or a peptide.

51. The method according to claim 43, wherein the detection antibodies
25 are labeled with different fluorophores.

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 51 -

52. The method according to any one of claims 1, 13, 25, 35 and 43, wherein the precursor and the metabolite are detected with labeled antibodies.
53. The method according to claim 52, wherein the antibodies are labeled with a fluorophore, an enzyme, a chemiluminescent molecule, or a radioisotope.
54. A compound that specifically reduces the generation of a metabolite involved in a metabolic pathway associated with disease progression, detected according to the method of claim 1 or claim 13.
- 10 55. A compound that specifically increases the generation of a metabolite involved in a metabolic pathway associated with disease progression, detected according to the method of claim 1 or claim 13.
56. A compound that specifically reduces the generation of a metabolite in a proteolytic metabolic pathway associated with Alzheimer's disease, as detected by the method according to claim 1, claim 13, claim 25, claim 35, or claim 43.
- 15 57. The compound according to claim 56, said compound being 3-methyladenine or functionally related derivatives or analogs thereof.
58. A compound that specifically increases the generation of a metabolite in a proteolytic metabolic pathway associated with Alzheimer's disease, as detected by the method according to claim 1, claim 13, claim 25, claim 35, or claim 43.
- 20 59. The compound according to claim 58, said compound being α CTF.
60. A kit for detecting compounds which specifically reduce or increase a cellular metabolite in a pathway associated with a disease or disorder, and which are not generally toxic to cells, comprising containers comprising one
- 25

WO 03/001881

PCT/US02/20267

- 52 -

or more detectable reagents to determine levels of (i) a cellular metabolic precursor protein or (ii) a conformation state of a cellular precursor protein; and (iii) one or more metabolites of the precursor protein of (i) or (ii); and instructions for use.

- 5 61. The kit according to claim 60, wherein the detectable reagents comprise one or more labeled or unlabeled antibodies specific for the metabolic precursor protein and labeled or unlabeled antibodies specific for the one or more metabolites; and further comprising one or more labeled
10 secondary antibodies for differential detection of the unlabeled specific antibodies.

WO 03/001881

PCT/US02/20267

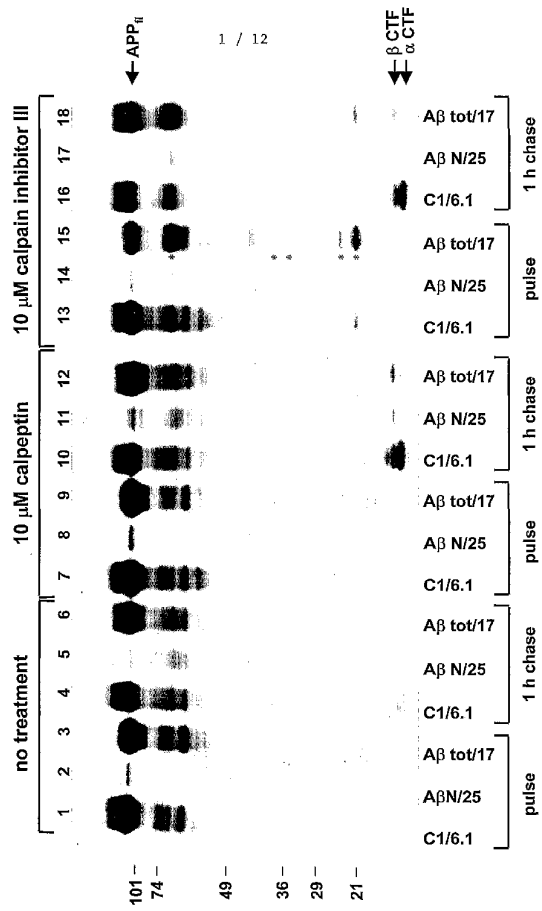


FIG. 1

WO 03/001881

PCT/US02/20267

2 / 12

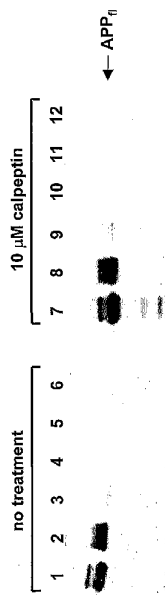


FIG. 2A

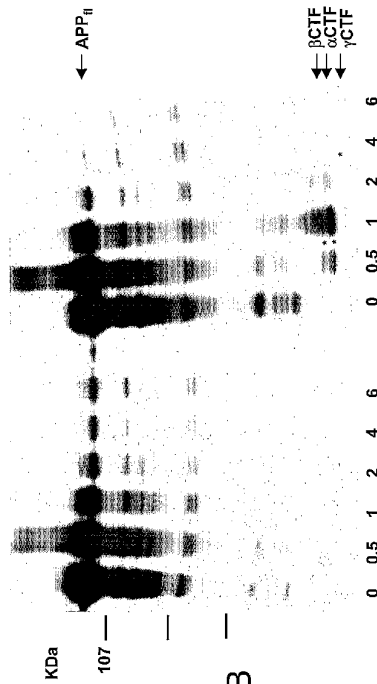


FIG. 2B

WO 03/001881

PCT/US02/20267

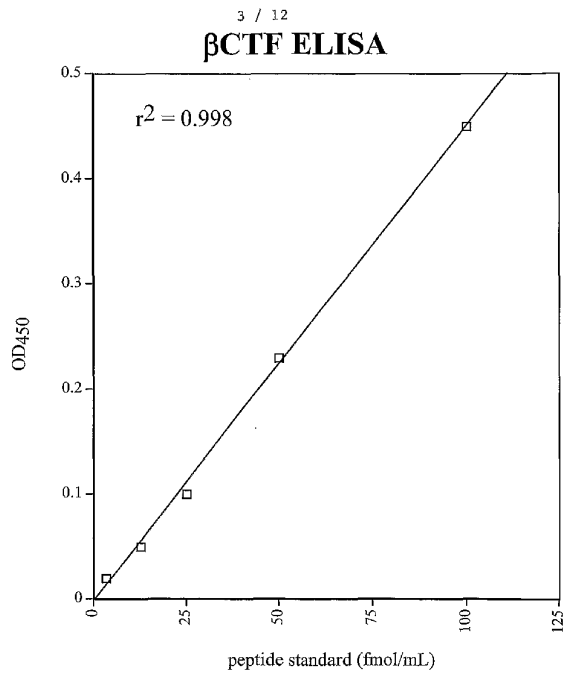


FIG. 3

WO 03/001881

PCT/US02/20267

4 / 12

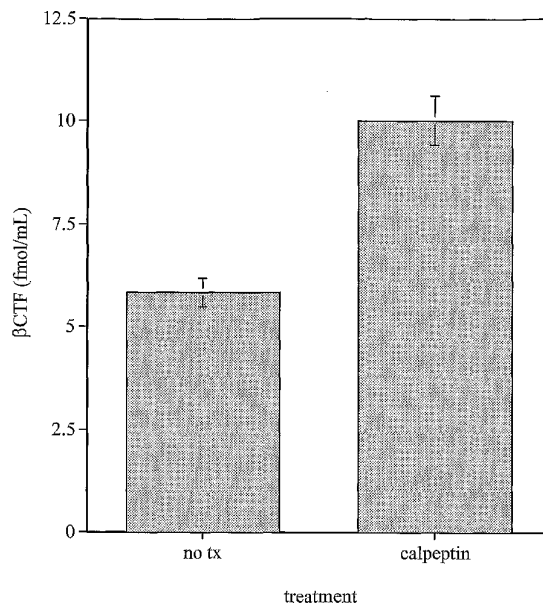
 β CTF levels in L/APP cells

FIG. 4

WO 03/001881

PCT/US02/20267

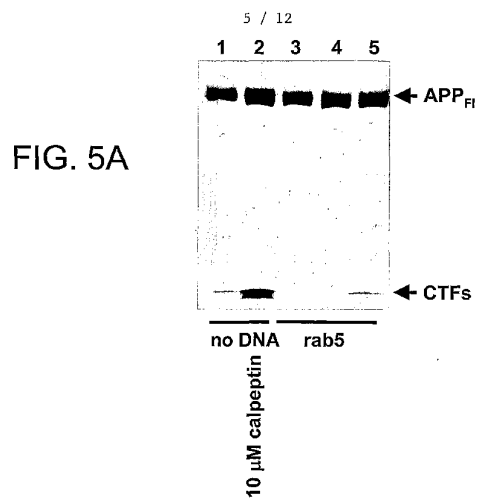


FIG. 5B

	transient transfection	drug treatment	β CTF fmole/ml
1	no DNA	none	16.1
2	no DNA	10 μ M calpeptin	26.0
3	rab5 0.5 μ g/fugene	none	20.26
4	rab5 1.0 μ g/fugene	none	25.9
5	rab5 1.0 μ g/lipofectAMINE	none	23.0

WO 03/001881

PCT/US02/20267

6 / 12

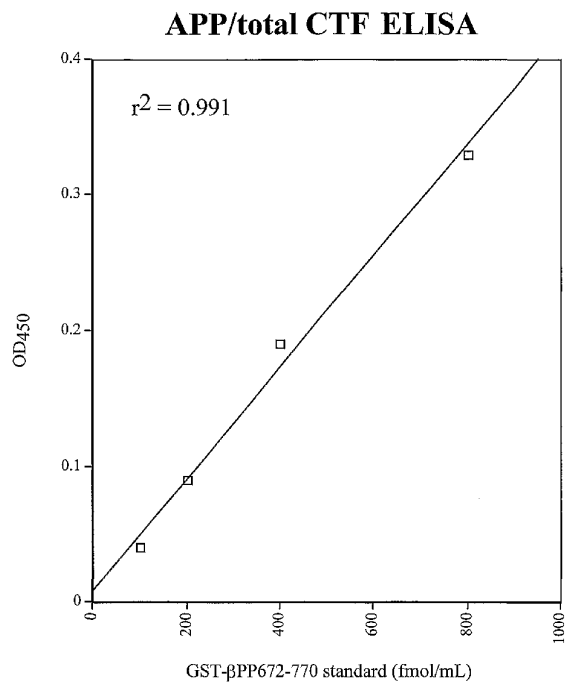


FIG. 6

WO 03/001881

PCT/US02/20267

7 / 12

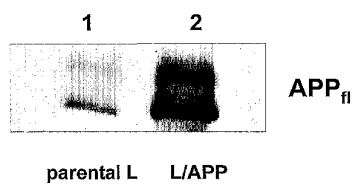


FIG. 7A

WO 03/001881

PCT/US02/20267

8 / 12

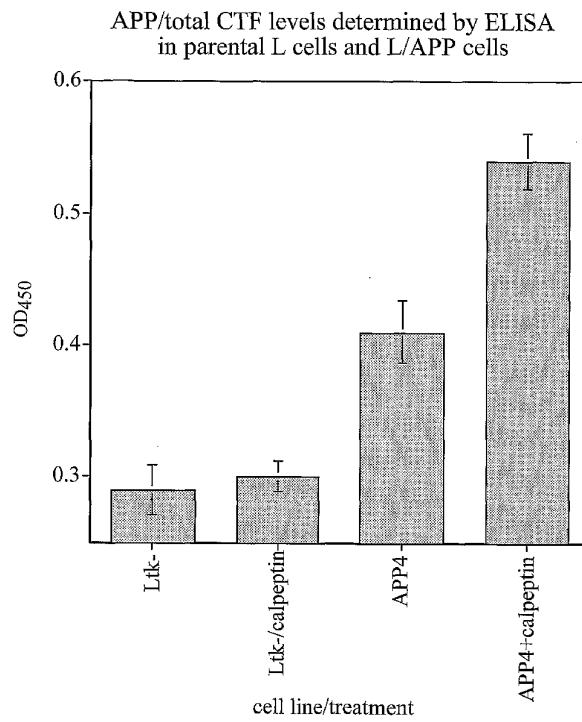


FIG. 7B

WO 03/001881

PCT/US02/20267

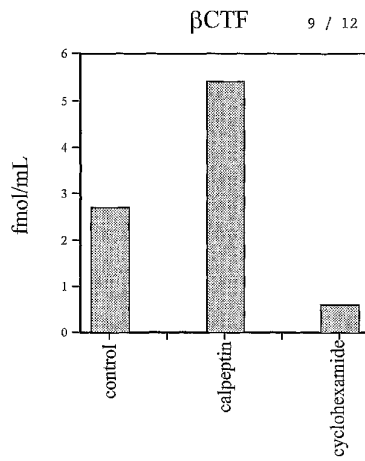


FIG. 8A

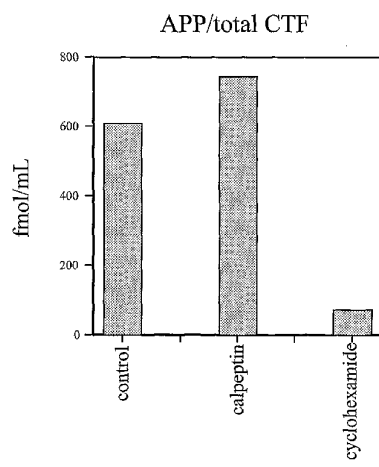
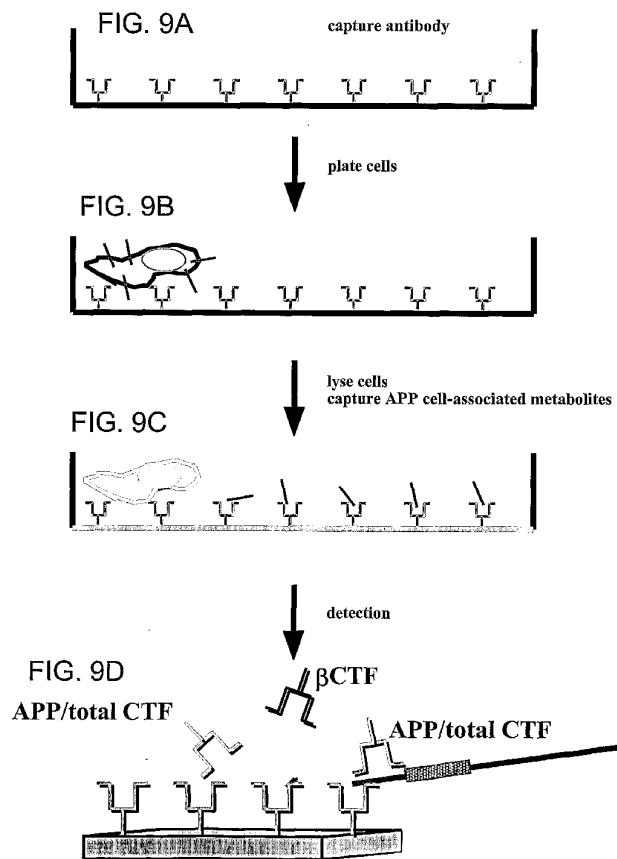


FIG. 8B

WO 03/001881

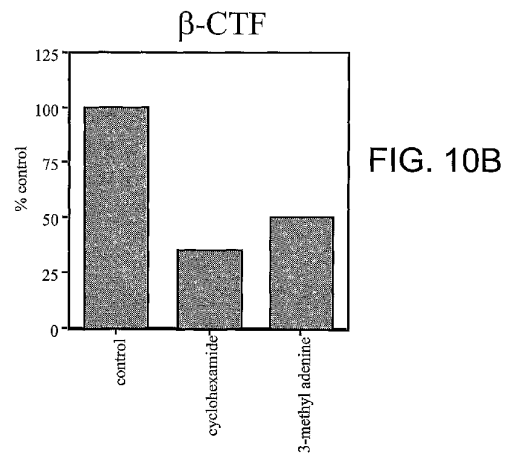
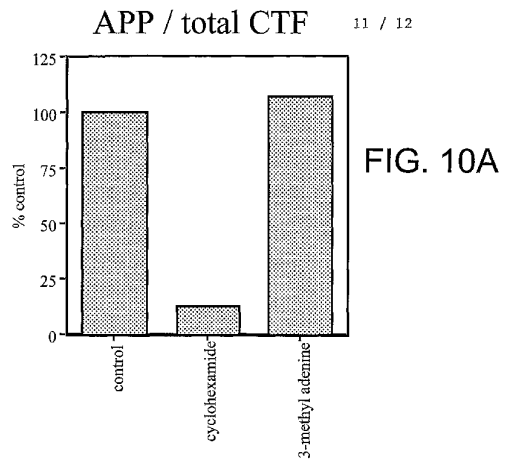
PCT/US02/20267

10 / 12



WO 03/001881

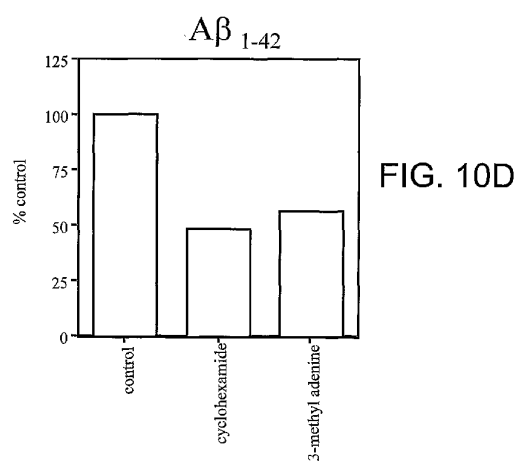
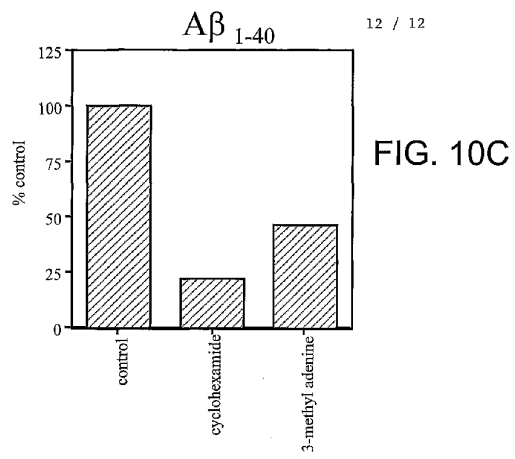
PCT/US02/20267



WO 03/001881

PCT/US02/20267

12 / 12



WO 03/001881

1/3

PCT/US02/20267

SEQUENCE LISTING

<110> New York State Office of Mental Health
<120> Cell-based High Throughput Screening Methods
<130> 1079-4014FC
<150> US 60/300,959
<151> 2001-06-26
<160> 5
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide containing epitope sequences of SEQ ID N
O:2 and
SEQ ID NO:4.
<400> 1
Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn
1 5 10 15
Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
20 25
<210> 2
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic peptide containing residues 676-695 of APP695.
<400> 2
Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu
1 5 10 15

WO 03/001881

2/3

PCT/US02/20267

Gln Met Gln Asn
20

<210> 3
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide containing residues 644-676 of APP695.

<400> 3

Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr Thr Ser Ile His His Gly Val
1 5 10 15

Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys
20 25 30

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide containing epitope for JRF/ABN/25 antibody.

<400> 4

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp
1 5

<210> 5
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide recognized by JRF/ABtot/17 antibody.

<400> 5

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

WO 03/001881

3/3

PCT/US02/20267

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val
35 40

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
9 January 2003 (09.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/001881 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/85,
15/86, G01N 33/53, C07K 5/00, 7/00, 16/00

(21) International Application Number: PCT/US02/20267

(22) International Filing Date: 26 June 2002 (26.06.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/300,959 26 June 2001 (26.06.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): NEW
YORK STATE OFFICE OF MENTAL HEALTH
[US/US]; 44 Holland Avenue, Albany, NY 12229 (US).(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE (utility model), DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HN, 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, MY, NZ, OM, PH, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
with international search report

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MATHEWS, Paul,
M. [US/US]; 10 Home Place, Irvington-on-Hudson, NY
10533 (US); NIXON, Ralph, A. [US/US]; 1 Hillside
Place, Tarrytown, NY 10591 (US); SCHMIDT, Stephen,
D. [US/US]; 34 Linn Road, Nutley, NJ 07110 (US);
JIANG, Ying [US/US]; 48 Harding Avenue, Valhalla, NY
10595 (US).(88) Date of publication of the international search report:
27 February 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.(74) Agent: SERUNIAN, Leslie, A.; Morgan & Finnegan,
L.L.P., 345 Park Avenue, New York, NY 10154 (US).

WO 03/001881 A3

(54) Title: CELL-BASED HIGH-THROUGHPUT SCREENING METHODS

(57) Abstract: The present invention describes cell-based screening methods that allows for the elimination of false-positive results due to nonspecific toxicity of test compounds, while detecting those compounds that specifically modulate cellular metabolites in metabolic pathways associated with diseases and disorders. The methods of the invention involved determining within a cell system the levels of both a metabolic precursor and a metabolic of interest that are associated with disease and disease progression with particular regard to Alzheimer's disease.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/20267
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12N 15/85, 86; G01N 33/53; C07K 5/00, 7/00, 16/00 US CL : 435/325; 435/7.1; 530/234, 326, 327 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/325; 435/7.1; 530/234, 326, 327 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	HAUGABOOK et al. High throughput screens for the identification of compounds that alter the accumulation of the Alzheimer's amyloid beta peptide (Abeta). 30 July 2001, Vol. 108, pp. 171-179, especially pages 171-173.	1-54
A	ESLER et al. Abeta Deposition Inhibitor Screen Using Synthetic Amyloid. Nature Biotechnology, March 1997, Vol. 15, pages 258-263.	1-61
A	LIN et al. Amyloid Fibril Formation in microwell plates for screening of inhibitors. September 2001.	1-53
A	AUSTEN et al. The Use of Solid ProteinChip Arrays to Monitor Production of Alzheimer's beta-Amyloid in Transfected Cells. 2000, Vol. 6, pages 459-469.	1-61
A	MCLENDON et al. Cell-free Assays for gamma-Secretase Activity. FASEB, December 2000, Vol. 14, pages 2383-2386.	1-61
X,P	KARLSTROM et al. A Sensitive and Quantitative Assay for Measuring Cleavage of Presenilin Substrates. Journal of Biological Chemistry. 13 December 2001, Vol. 277, No. 9, pages 6763-6766, especially pages 6763-6764.	1-53
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" documents 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 October 2002 (28.10.2002)		Date of mailing of the international search report 09 DEC 2002
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Valerie Bell-Hamilton</i> Christopher Nichols, Ph.D. Telephone No. 703-308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/20267
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEIFFERT et al. Positive-Negative Epitope Tagging of beta amyloid Precursor Protein to identify Inhibitors of Abeta Processing. Molecular Brain Research. Vol. 84, pages 115-126, especially page 115 (Abstract).	1-53
X	DASH et al. Inhibitors of endocytosis, Endosome Fusion, and Lysosomal Processing Inhibit the Intracellular Proteolysis of the Amyloid Precursor Protein. Neuroscience Letters. 1993, Vol. 164, pages 183-186, especially page 183 (Abstract) and 185 (Figure 2A-C).	54-69
X	PINNIX et al. A Novel gamma-Secretase Assay Based on Detection of the Putative C-terminal Fragment-gamma of Amyloid beta Protein Precursor. Journal of Biological Chemistry. 05 January 2001, pages 481-487, especially page 481 (Abstract) and page 486 (Discussion).	1-53
X	WO 00/42166 A2 DUPONT PHARMACEUTICALS COMPANY, 20 July 2000 (20.07.2000), page 1 lines 20-33, see entire documents.	1-61

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/20267
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim 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.	<input type="checkbox"/>	Claim 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: Please See Continuation Sheet		
1.	<input checked="" 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 SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/20267

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

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 1, claim(s) 1-53, drawn to a cell-based screening method to identify compounds that reduce or inhibit the generation of one or more metabolites associated with a decreased likelihood of developing or a decreased severity of Alzheimer's disease (AD) wherein the metabolite is a proteolytic product of amyloid precursor protein (APP).

Group 2, claim(s) 54-59 (each in part), drawn to α CTF.

Group 3, claim(s) 54-59 (each in part), drawn to 3-methyladenine.

Group 4, claim(s) 60-61, drawn to a kit for detecting compounds.

The inventions listed as Groups 1-4 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:

Group 1 requires a cell-based screening method, which is not required by any of the other Groups. Therefore, unity of invention is lacking.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

STN, MEDLINE/PubMed, WEST

"Alzheimer's disease" "Cell-based Assay" "Amyloid" "alphaCTF" "gammaCTF" "betaAmyloid" "Inhibitors" "3-methyladenine"

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US02/20267
Box III TEXT OF THE ABSTRACT (Continuation of Item 5 of the first sheet)	
NEW ABSTRACT <p>The present invention describes cell-based screening methods that allows for the elimination of false-positive results due to non-specific toxicity of test compounds, while detecting those compounds that specifically modulate cellular metabolites in metabolic pathways associated with diseases and disorders. The methods of the invention involved determining within a cell system the levels of both a metabolic precursor and a metabolite of interest that are associated with disease and disease progression with particular regard to Alzheimer's disease.</p>	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/14	4 C 0 8 6
A 6 1 P 25/14	A 6 1 P 25/16	4 H 0 4 5
A 6 1 P 25/16	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 43/00	
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	G 0 1 N 21/78	C
G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/543	5 4 5 Z
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/543	5 7 5
// C 0 7 D 473/34	A 6 1 K 37/02	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A
	C 0 7 D 473/34	3 1 1

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

(72)発明者 ニクソン ラルフ エイ .

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 タリータウン ヒルサイド プレイス 1

(72)発明者 シュミッド ステファン ディー .

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 ナットレー リン ロード 3 4

(72)発明者 チヤン イン

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 バルハラ ハーディング アベニュー 4 8

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA40 BB01 BB14 CB01 FB03 FB07 FB12 GC15 HA16
 2G054 AA08 AB04 CA23 CE02 EA03 FA06 GA04 GB02
 4B024 AA11 CA04 DA02 EA02 EA04 FA02 GA11 HA11
 4B063 QA01 QA18 QQ05 QQ13 QR32 QR33 QR59 QR77 QR80 QS05
 QS11 QS36 QX02
 4C084 AA01 AA17 BA01 BA08 BA19 BA23 CA18 CA28 DC50 NA14
 ZA01 ZA02 ZA16 ZA94
 4C086 AA01 AA03 CB07 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA02 ZA16 ZA94
 4H045 AA11 AA30 CA40 EA20 FA72 FA74

专利名称(译)	基于细胞的高通量筛选方法		
公开(公告)号	JP2004536600A	公开(公告)日	2004-12-09
申请号	JP2003508137	申请日	2002-06-26
[标]申请(专利权)人(译)	心理健康的纽约州办公室		
申请(专利权)人(译)	心理健康的纽约州办公室		
[标]发明人	マシューズポールエム ニクソンラルフエイ シュミットステファンディー チャンイン		
发明人	マシューズ ポール エム. ニクソン ラルフ エイ. シュミット ステファン ディー. チャン イン		
IPC分类号	A61K31/52 A61K38/00 A61K45/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P31/00 A61P43/00 C07D473/34 C07K14/47 C12N15/09 C12Q1/02 G01N21/78 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/567 G01N33/68		
CPC分类号	A61P21/00 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P31/00 G01N33/5008 G01N33/5014 G01N33/502 G01N33/5058 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2821		
FI分类号	C12Q1/02.ZNA A61K31/52 A61K45/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P31/00 A61P43/00 C07K14/47 G01N21/78.C G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/543.545.Z G01N33/543.575 A61K37/02 C12N15/00.A C07D473/34.311		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA40 2G045/BB01 2G045/BB14 2G045/CB01 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/HA16 2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/FA06 2G054/GA04 2G054/GB02 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ13 4B063/QR32 4B063/QR33 4B063/QR59 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS11 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA01 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA19 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/CA28 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA02 4C084/ZA16 4C084/ZA94 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/CB07 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA02 4C086/ZA16 4C086/ZA94 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/300959 2001-06-26 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明描述了基于细胞的筛选方法，该方法允许消除由于测试化合物的非特异性毒性而导致的假阳性结果，同时检测那些特别调节与疾病和病症相关的代谢途径中的细胞代谢产物的化合物，特别是针对阿尔茨海默氏病 疾病。 该方法特别适用于高通量筛选技术，以鉴定在基于细胞的系统中有效的化合物（药物）。本发明的方法涉及确定细胞系统内代谢前体和目标代谢物的水平，并且在高通量药物发现和鉴定中具有广泛的应用，特别是与疾病和疾病进展相关的前体和代谢物分子。 ，例如阿尔茨海默氏病。

抗体	エпитープ 特異性	検出されるAPP種	免疫原配列
C1/6.1	APPのカルボキシ 末端の20残基内	APPホロタンパク質 ；全てのCTF類	KMQQNGYENP TYKFFEQMQN (配列番号 :2)
C2/7.1	APP ₆₉₅ の残基644 ～676内	APPホロタンパク質 ；全てのCTF類	LVMLKKKQYTS IHHGVVEVDAA VTPEERHLSK (配列番号 :3)
JRF/AβN/25	Aβの最初の7残基 内；β切断が必要	βCTF；ELISAによる Aβ1-X	DAEFRHHD (配列番号 :4)
JRF /Aβto/17	ヒトAβの残基1～ 16内	APPホロタンパク質 ；βCTF；ELISAに よるAβ	DAEFRHDSGY EVHHQKLVFFA EDVGSNKGAI GLMVGGVV (配列番号 :5)