

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 542261

(P2002 - 542261A)

(43)公表日 平成14年12月10日(2002.12.10)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 0 7 K 16/18 19/00		C 0 7 K 16/18 19/00	4 B 0 6 4 4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08		C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D M

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 83数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 612336(P2000 - 612336)

(86)(22)出願日 平成12年4月13日(2000.4.13)

(85)翻訳文提出日 平成13年10月11日(2001.10.11)

(86)国際出願番号 PCT/CA00/00414

(87)国際公開番号 W000/63250

(87)国際公開日 平成12年10月26日(2000.10.26)

(31)優先権主張番号 60/129,495

(32)優先日 平成11年4月15日(1999.4.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 メルク フロスト カナダ アンド カンパニー
カナダ国、ケベック・アシユ・9・アシユ・3・エル・1、カークランド、トランス・カナダ・ハイウェイ・16711

(72)発明者 ジエルベ, フランソワ
カナダ国、ケベック・アシユ・9・アシユ・3・エル・1、カークランド、トランス・カナダ・ハイウェイ・16711

(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外 5 名)

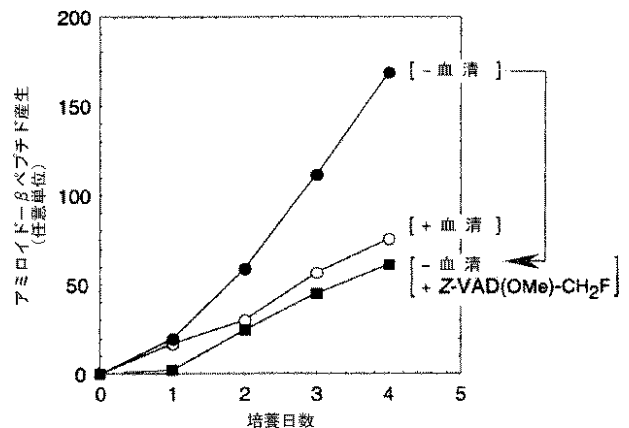
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 カスパーゼにより切断されたA P Pを認識する抗体及びその使用方法

(57)【要約】

アミロイド - ペプチド (A) 形成及びアポトーシスによるニューロンの喪失は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病の病原において密接に関連した過程である。

アミロイド - 前駆体タンパク質 (A P P) の切断及びアミロイド生成A ペプチド種の生合成におけるアポトーシス・プロテアーゼ及びカスパーゼの役割が記載される。カスパーゼにより切断されたA P Pを認識する抗体、及びそれらの様々な利用可能性についても記載される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 カスパーゼにより媒介されるAPP及びAPLPの切断の後に作出されるか又は露出するネオ-エピトープを認識する抗体。

【請求項2】 少なくとも4つのアミノ酸からなるカスパーゼ切断部位のコンセンサス配列を有する抗原決定基を用いて作製され、該コンセンサス配列がV/DXXDを含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】 APPが、カスパーゼ-3、カスパーゼ-6及びカスパーゼ8から選択されるカスパーゼにより切断される、請求項1に記載の抗体。

【請求項4】 APP及びAPLPがカスパーゼ-3により切断される、請求項3に記載の抗体。

【請求項5】 カスパーゼにより媒介されるAPPの切断の後に作出されるか又は露出するネオ-エピトープが、カスパーゼ-3により切断される、請求項4に記載の抗体。

【請求項6】 APPが、APP⁷⁵¹のアミノ酸番号に基づき197、219及び720と命名された3つのカスパーゼ-3切断部位を含む、請求項5に記載の抗体。

【請求項7】 命名された切断部位720におけるカスパーゼ-3切断の後に作出されるか又は露出するネオ-エピトープと結合することができる、請求項6に記載の抗体。

【請求項8】 少なくとも4つのアミノ酸残基からなり、かつカスパーゼ・コンセンサス配列V/DXXDを含有するペプチドを含む抗原決定基を用いて作製された抗体。

【請求項9】 APP⁷¹⁴～APP⁷²⁰のアミノ酸配列を有するペプチドを含む抗原決定基を用いて作製された、請求項8に記載の抗体。

【請求項10】 抗原決定基が抗原性増強物質とカップリングしている、請求項9に記載の抗体。

【請求項11】 カップリングした抗原決定基が、KLH-システイン-APP⁷¹⁴～APP⁷²⁰を含む、請求項10に記載の抗体。

【請求項12】 ポリクローナルである、請求項1に記載の抗体。

【請求項13】 モノクローナルである、請求項1に記載の抗体。

【請求項14】 カスパーゼにより媒介されるAPP及びAPLPの切断の後に露出するネオ-エピトープと結合する能力を有する抗体を含む抗血清。

【請求項15】 カスパーゼにより媒介されるAPP及びAPLPの切断の後に作出されるか又は露出するネオ-エピトープと結合する能力を有する抗体を生成させるための方法であって、

少なくとも4つのアミノ酸残基からなり、かつカスパーゼ・コンセンサス配列V/DXxDを含有するペプチドで哺乳動物を免疫感作し、前記ペプチドに対する抗体を含有する抗血清を提供すること、

該抗血清を収集すること、及び

カスパーゼにより生成するネオ-エピトープに対して特異的な抗体を選択することを含む方法。

【請求項16】 哺乳動物患者におけるカスパーゼ媒介アポトーシスのレベルを検出又は特徴づけするための方法であって、

ニューロンのアポトーシスを有すると疑われる患者から組織試料を入手すること、

該試料を請求項1に記載の抗体と接触させ、カスパーゼにより切断されたAPP及びAPLPの存在又は量を検出すること、並びに

カスパーゼにより切断されたAPP及びAPLPの量を標準と比較することを含む方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の背景)**

本発明は、カスパーゼにより媒介されるアミロイド - 前駆体タンパク質の切断の後に露出するネオ - エピトープ (neo - epitope) を認識する能力を有する新規な抗体、及びそれらの使用に関する。

【0002】

アポトーシス性細胞死による海馬ニューロンの喪失は、アルツハイマー病の顕著な特徴である (Cotman and Su, 1996; Liら., 1997; Smalera., 1995; Suら., 1997)。これらの細胞の未成熟死に対する感受性に寄与する一つの可能性のある因子は、ニューロン変性部位における、又はその付近におけるアミロイド - ペプチド沈着の細胞毒性効果によって生じる。ニューロンを含む培養ヒト細胞をアミロイド生成 A ペプチドで処理すると、それらはアポトーシス性の細胞自殺を起こす (Forloniら., 1996; LaFerlaら., 1995; Looら., 1993)。同時に、アポトーシスを起こしているニューロンは、増加したレベルの細胞毒性 A ペプチド種を生成させる (LeBlanc, 1995)。従って、アルツハイマー病の病理における考え得る筋書は、遺伝的素因又はその他の生理学的因子の結果として起こる A ペプチド形成の亢進が、感受性ニューロンにおける内因性細胞自殺経路の部分的活性化を誘発するというものである。次に、感作された細胞が、A ペプチドのレベルを上昇させ、悪循環の増悪を引き起こし、それが、アルツハイマー病の特徴である進行性のニューロン喪失へと導く。これが正しいのであれば、アポトーシス機構の成分が、直接的又は間接的に、アミロイド - 前駆体タンパク質 (APP) の複雑なタンパク質分解プロセッシングに寄与しているはずである (Haass and Selkoe, 1993; Selkoeら., 1996; Sisodia and Price, 1995)。APPのタンパク質分解プロセッシングにより、A ペプチド形成が上昇し、その他のAPPプロテアーゼ分解産物がアポトーシス細胞中に観察されるようになる。この研究においては、APPプロセッシング及びアミロイド生成 A ペプチド種の生合成におけるア

ポトーシス・プロテアーゼ、特にカスパーゼの役割を提供する。

【0003】

現在のところ、APPカスパーゼ切断産物の存在を特異的に評価する直接的又は間接的な方法は存在しない。従って、APPカスパーゼ切断産物の存在を特異的に検出する薬剤を開発することは有用であろう。切断産物の存在は、ニューロン・アポトーシスの指標として使用されうる。特に、そのような薬剤は、ニューロン変性、ニューロン変性疾患の存在を認識し、哺乳動物においてそのような疾患の進行を評価するために有用であろう。より具体的には、そのような薬剤は、ニューロン・アポトーシスに対する候補阻害剤の効果を評価するための道具として、そして神経変性疾患を診断するための可能性のある道具としても使用されうる。

【0004】

従って、本発明の一つの目的は、APPプロテアーゼ切断産物を特異的に検出することができる薬剤を開発することであった。

【0005】

もう一つの目的は、本発明の薬剤を使用してニューロン・アポトーシスを同定することであった。

【0006】

さらなる目的は、ニューロン・アポトーシスを、カスパーゼ非依存性のニューロンの介し壊死性細胞死と区別するため、本発明の薬剤を使用することであった。

【0007】

さらなる目的は、神経変性状態及び脳損傷の指標としてニューロン・アポトーシスを検出するために本発明の薬剤を使用することであった。

【0008】

これら及びその他の目的は、本明細書に提供される教示から、当業者には明らかとなる。

【0009】

本願は多数の刊行物を引用しているが、それらの内容は参照として完全に本明

細書に組み込まれる。

【0010】

(発明の開示)

本発明は、カスパーゼにより媒介されるAPP又はAPLPの切断の後に作出されるか又は露出するネオ-エピトープを認識する抗体、及びそれらの使用に関する。

【0011】

(図面の簡単な説明)

添付の図面と関連して本発明をさらに説明する。

【0012】

図1Aは、カスパーゼ阻害が、アポトーシスを起こしたニューロン細胞における亢進したアミロイド-ペプチド産生を排除することを示す図である。レチノイン酸により分化したニューロンNT2細胞(hNT)を、血清の存在下()又は非存在下(、)で4日間、培養した。血清枯渴細胞培養物の半分は、Z-VAD(OMe)-CH₂F(100µM初期用量、24時間毎に50µMを追加)で処理した()。得られた細胞培養上清中のA(1-40)を、サンドイッチELISAにより、示された間隔で測定した。定常状態に達した後、A産生の相対速度を計算した(この場合、2~4日目の値の傾き)。代表的な実験(n=2)が示されており、各データ・ポイントは、トリプリケート培養物からの平均値である。

【0013】

図1Bは、アポトーシス中のカスパーゼ関連APPタンパク質切断を示す図である。示されたように、33µMZ-VAD(OMe)-CH₂Fの非存在下又は存在下で、1µg/mlカンプトテシンにより、6時間、アポトーシスを起こすようNT2細胞を誘導した。オリゴヌクレオソームDNA断片化により、アポトーシスを調査した(左パネル)。尿素/SDSを使用して細胞溶解物を調製し、ポリアクリルアミドゲルで分離し、次いでカスパーゼ-3(右上パネル)、ポリ(ADP)-リボースポリメラーゼ(右中パネル)又はAPP(右下パネル)についてイムノプロットした。代表的な実験(n=5)が示されている。

【0014】

図1Cは、アポトーシス細胞抽出物におけるII群カスパーゼによるアミロイド - 前駆体タンパク質のタンパク質分解を示す図である。共役 *in vitro* 転写 / 翻訳により [³⁵S]Met 標識APPを生成させ、次いで健康なジャーカット細胞からのサイトゾル抽出物(レーン1)又はCD-95(Fas、APO-1)イムノライゲーションによりアポトーシスを起こすよう誘導された細胞からの抽出物(レーン2)と共にインキュベートした。完全APP(p120^{APP})は、およそ85、88及び90kDaの3つの異なる中間体(APP)へと切断された。代表的な実験(n=4)が示されている。

【0015】

図1Dは、アポトーシス細胞抽出物におけるII群カスパーゼによるアミロイド - 前駆体タンパク質のタンパク質分解を示す図である。アポトーシスを起こしたジャーカット抽出物中の [³⁵S]Met 標識APPの切断を、示された濃度のテトラペプチド - アルデヒド・カスパーゼ阻害剤(Ac-YVAD-CHO、 ; Ac-DEVD-CHO、 ; Ac-IETD-CHO、)の存在下で試験し、得られたフルオログラムのレーザー濃度分析により定量した。代表的な実験(n=2)が示されている。

【0016】

図1Eは、組換えカスパーゼ-3によるアミロイド - 前駆体タンパク質の分解を示す図である。 [³⁵S]Met 標識APPを、示された濃度の組換えヒト・カスパーゼ3と共に37 で60分間インキュベートした。APP切断をレーザー濃度分析により定量し、関係 $S_t / S_0 = e^{-k_{obs} * t}$ (ここで、 S_t は、時間tにおいて残存している基質(APP)の濃度であり、 S_0 は初期基質濃度であり、 $k_{obs} = k_{cat} * [カスパーゼ-3] / K_m$ である)から k_{cat} / K_m の値を決定するために使用した。代表的な実験(n=2)が示されている。

【0017】

図2は、アルツハイマー脳海馬のCA3野の死滅しつつある錐体ニューロンにおける増加したカスパーゼ-3免疫反応性を示す図である。パラフィン包埋切片

を、抗原回復及びペルオキシダーゼ中和のため処理し、次いでヒト・カスパーゼ3の大サブユニット(MF-R280)に対して作製されたイムノアフィニティ精製抗体を対合させ、抗ウサギHRP可視化(Vectalabs、UK)及びヘマトキシリン対比染色を行った。a)抗血清が、他のヒト・カスパーゼと交差反応できないこと、b)免疫前血清による染色が存在しないこと、c)抗原予備吸着が免疫染色を消失させうること、及びd)他のウサギから得られた抗体を使用した結果と類似していたこと(示していない)から判断されるように、染色は特異的であった。各パネルの幅は、140µmに相当する。他のドナー(アルツハイマー3、対照2)からの脳においても同一の結果が見出された。示された例は、臨床的に、そして死後、アルツハイマー病と診断された82歳の女性、及び臨床的な異常がなく、肺塞栓で死亡し、神経学的に正常と判断された脳を有する88歳の男性からのものである。

【0018】

図2Aは、年齢がマッチした神経学的に正常な個体からのパラフィン包埋切片を示す図である。白矢印は、示したとしても極わずかにしかカスパーゼ-3免疫反応性を示さない、健康なカスパーゼ-3陰性錘体ニューロンを示す。

【0019】

図2Bは、アルツハイマー病患者からのパラフィン包埋切片を示す図である。黒矢印は、アルツハイマー試料における、変性に対して感受性であり、変性形態(「ゴースト」を含む)を有する範囲におけるカスパーゼ-3陽性免疫反応性ニューロン(茶色)を示す。

【0020】

図3Aは、カスパーゼにより媒介されるアミロイド-前駆体タンパク質のタンパク質切断の部位の同定及び突然変異による除去を示す図である。 [³⁵S] Cys対 [³⁵S] Metによるディファレンシャル・マッピング、及びカスパーゼ分解 N-APP欠失構築物の質量分析により3つの可能性のあるカスパーゼ分解部位が同定された(示していない)。次いで、部位特異的突然変異誘発による予測P₁ Asp残基の連続的な除去により、推定部位を確認した(P₁ Aspは、カスパーゼ認識にとって必須である)。示された [³⁵S] Met

A P P突然変異ポリペプチドを、共役 *in vitro* 転写 / 翻訳により生成させ、次いで 8 nM のカスパーゼ - 3 の非存在下 (レーン 1、3、5、7) 又は存在下 (レーン 2、4、6、8) でインキュベートした。代表的な実験 ($n = 3$) が示されている。

【0021】

図 3 B は、他の構造的特徴との関係におけるアミロイド - 前駆体タンパク質内のカスパーゼ切断部位の位置を示す図である。アミロイド - 前駆体タンパク質内のドメイン及び相互作用部位が要約されている。3つのカスパーゼによるタンパク質切断部位は、 P_1 に相当する Asp 残基をさす番号と共に下に示されている。A ペプチドを包含する領域は、VKMD⁶⁵³ ~ VNLD⁶⁵³「スウェーデン型」突然変異 (円内) を含む、括弧内に示された既知の突然変異と共に上に拡大されている。

【0022】

図 4 は、アポトーシス中のインタクト細胞におけるアミロイド - 前駆体タンパク質のカスパーゼ依存的な切断、及びカスパーゼにより生成した C 末端ネオ - エピトープの *in situ* 検出を示す図である。

【0023】

図 4 A は、トランスフェクトされた B 1 0 3 細胞におけるアポトーシス中の A P P の C 末端切断を示す図である。等量の全長野生型 A P P (wt、レーン 1 & 2)、Asp⁷²⁰カスパーゼ切断部位の後の C 末端残基 Ala⁷²¹ ~ Asn⁷⁵¹ を欠く A P P (C - A P P、レーン 3 & 4)、又は Asp⁷²⁰カスパーゼ切断部位を除去するための点突然変異を含有する全長 A P P (D⁷²⁰A、レーン 5 & 6) を発現する安定 B 1 0 3 細胞系を生成させた。アポトーシスを誘導するため、1 μ M スタウロsporin の非存在下 (レーン 1、3、5) 又は存在下 (レーン 2、4、6) で 2 時間、細胞系を処理した。遠心分離により細胞及びアポトーシス残骸を収集し、PBS で洗浄し、ノニデット P - 4 0 を含有する緩衝液で溶解させた。完全 A P P を、C 2 1 抗体 (A P P の C 末端 2 1 アミノ酸に対して作製された) 及びプロテイン A - セファロース収集を使用して免疫枯渇させた。残りの A P P 断片を、プロテイン G - セファロース収集と共に 6 E 1

0抗体（A ペプチドの最初の17残基に対して作製された）を使用して免疫沈降させた。SDS-PAGEによる分離の後、C末端短縮APP断片を、（APPのアミノ末端に対して作製された）22C11抗体を使用したイムノプロットングにより可視化した。矢印は、Asp⁷²⁰の後における切断により生成したAPP産物（C-APP）又は等価なトランスフェクション標準（レーン3&4）の移動を示す。代表的な実験（n=4）が示されている。

【0024】

図4Bは、カスパーゼにより生成したAPPネオ-エピトープの、C^{sp}-APPによる特異的認識を示す図である。共役in vitro転写/翻訳により [³⁵S]Met標識APP変異型を生成させ（上パネル）、次いで、Asp⁷²⁰におけるAPPの切断の後に露出する、カスパーゼにより生成するネオ-エピトープを認識する特異的抗体（C^{sp}-APP）を使用して免疫沈降させた（下パネル）。代表的な実験（n=2）が示されている。

【0025】

図4Cは、トランスフェクトされたB103細胞におけるアポトーシス中のAPPのC末端切断を示す図である。全長野生型APPを保持するB103安定細胞系（図4Aに記載）を、アポトーシスを誘導するための1μMスタウロsporinの非存在下（レーン1）又は存在下（レーン2&3）で2時間、処理した。レーン3の細胞は、100μMのカスパーゼ阻害剤Z-VAD(OMe)-CH₂Fによっても処理した。前記のようにして、細胞及びアポトーシス残骸を収集し、溶解させた。次いで、溶解物をC^{sp}-APPにより免疫沈降させ、SDS-PAGEにより分離し、22C11を使用してC-APPについてイムノプロットした。陽性対照として、安定的トランスフェクションによりC-APPを保持する未処理B103細胞を、同様に処理した（レーン4）。代表的な実験（n=3）が示されている。

【0026】

図4D~図4Iは、NT2細胞アポトーシス中のカスパーゼにより生成したC-APPネオ-エピトープのin situ検出を示す図である。サブコンフルエントのNT2細胞を、50μMのカスパーゼ阻害剤Z-VAD(OMe)-

CH₂Fの非存在下(E、H)又は存在下(F、I)で1 μg/mlのカンプトテシン(E~I)と共に4時間、インキュベートすることにより、アポトーシスを起こすよう誘導した。対照細胞(D、G)は、媒体(DMSO)のみで同様に処理した。細胞の収集及び固定の後、全ての細胞をTUNEL(緑)で染色し、活性型カスパーゼ-3(D、E、F; Csp-3(MF397);赤)又はカスパーゼにより生成したC-APPネオ-エピトープ(G、H、I; C^C_{sp}-APP;赤)のいずれかを認識する抗血清を使用して同時染色した。全てのパネルが、共存する場合には黄色を与える、TUNEL(緑)と免疫反応性(赤)との合成像である。代表的な実験(n=2)が示されている。

【0027】

図5は、急性の興奮毒性又は虚血による損傷の後のニューロン・アポトーシス中のC末端カスパーゼ部位におけるAPPの*in vivo*短縮を示す図である。アポトーシスを起こしている海馬ニューロンにおけるC-APPの生成を、興奮毒性カイニン酸の全身投与(A~F)又は一過性全体的脳虚血(G~L)の後に、*in vivo*で調査した。

【0028】

図5A~図5Fは、SV129マウスにおける興奮毒性による損傷を示す図である。左パネルA、C、Eは対照であり、右パネルB、D、Fはカイニン酸で処理され、安楽死させられたSV129マウスの、カスパーゼにより生成したAPPネオ-エピトープ(A及びB; C^C_{sp}-APP)、活性カスパーゼ-3(C及びD; Csp-3(MF397))又はTUNEL(E及びF)について染色された隣接脳切片である。海馬のCA3野が、同一拡大率で全てのパネルに示されている(パネルFのバー=100 μ)。代表的な実験(n=4)が示されている。

【0029】

図5G~図5Lは、虚血による損傷の効果を示す図である。12分間の4血管閉塞によりラットにおいて一過性の全体的虚血を起こし、示された時間、再灌流を行った(対照動物(G)は虚血なしに偽の外科的手法を受けた)。海馬のCA1野の切片を、カスパーゼにより生成したAPPネオ-エピトープ(G~J、L

)又はTUNEL(K)について染色した。パネルG~Kの拡大率は、同一であり(パネルKのバー=400 μ)、パネルLはパネルIに輪郭が示されている領域の拡大像(バー=75 μ)である。代表的な例(n=4)が示されている。

【0030】

図6は、老人斑内のC-APPとアミロイド- β との共存を示す図である。パネル6Cのバー=100 μ 。

【0031】

図6Aは、(B)に示されたのと同じ海馬の範囲におけるC^{CS}P-APP免疫反応性により可視化されたC-APPを示す図である。

【0032】

図6Bは、アルツハイマー病と診断された患者の海馬におけるアミロイド-免疫反応性(矢印)により同定された老人斑を示す図である。

【0033】

図6Cは、一致する場合には黄色を与える、カスパーゼにより生成したAPPネオ-エピトープ(赤)とA β (緑)との合成像であり、C-APPとアミロイド- β 免疫反応性との高度の重複を図示している。

【0034】

n=7の臨床的に診断されたアルツハイマー病患者(5~14年のAD診断を有する77~91歳の男性及び女性;死後2.3~4.3時間後の収集)においては、同様の結果が観察されたが、7人の年齢がマッチした対照患者(79~91歳の男性及び女性;死後2.0~4.0時間後の収集)には観察されなかった。

【0035】

図7は、カスパーゼにより媒介されるAPP生成が、アミロイド- β ペプチド形成を上昇させることを示す図である。比較可能なレベルの全長APP(wt、カラム1&3)又はAla⁷²¹~Asn⁷⁵¹(Asp⁷²⁰カスパーゼ切断部位の後のC末端残基(C-APP、カラム2&4))を欠くAPPを発現する、図4Aについて記載されたB103安定細胞系を、新鮮な培地中で20又は48時間培養した後、モノクローナル抗体を用いたイムノアッセイにより、培

養培地中のA ペプチド・レベルを定量した。代表的な実験 ($n = 4$) \pm SDが示されている。

【0036】

図8は、「スウェーデン型」家族性突然変異が、カスパーゼ-6基質としてのAPPの-セクレターゼ標的領域を改善することを示す図である。

【0037】

図8Aは、APPの-セクレターゼ標的領域のVKMD⁶⁵³/A⁶⁵⁴ (VKMD-AMC、) ; 図3Bを参照)、「スウェーデン型」ジペプチド突然変異(VNLD-AMC、)又はポジショナル・スキャンニング・コンビナトリアル基質ライブラリーにより予測されたカスパーゼ-6のための最適なテトラペプチド(VEHD-AMC、)のいずれかに相当するよう合成された蛍光原性テトラペプチド-アミノメチルクマリンを示す図である。カスパーゼ-6基質としてのそれらの適当性を、組換えヒト・カスパーゼ6 (2 nM) と様々な濃度の蛍光原性リガンドとを含有する反応混合物中で試験した。代表的な実験 ($n = 3$) が示されている。

【0038】

図8Bは、N末端カスパーゼ切断部位を除去し(N-APP)、次いで野生型-セクレターゼ領域(VKMD⁶⁵³/A⁶⁵⁴; カラム1&2)、「スウェーデン型」突然変異(VNLD⁶⁵³/A⁶⁵⁴; カラム3&4)又はカスパーゼ認識にとって必須のP₁ AspがAlaに変化している「スウェーデン型」突然変異(VNLA⁶⁵³/A⁶⁵⁴; カラム5&6)のいずれかを含有するよう操作されたAPP構築物の効果を示す図である。共役in vitro転写/翻訳により、これらの構築物から[³⁵S]Met標識タンパク質を生成させ、次いでアポトーシス細胞からのサイトゾル抽出物(無地カラム; 1、3&5)、又は組換えカスパーゼ-6(斜線付きカラム; 2、4&6)と共にインキュベートした。60分間に-セクレターゼ標的領域で切断されたAPPの初期APPに対する割合を、フルオログラフィーにより決定し、 \pm SDで表した。結果は、「スウェーデン型」家族性突然変異によりカスパーゼ-6に対するAPP-セクレターゼ部位の感受性が増加すること、及び「スウェーデン型」APPを

保持している細胞における上昇したアミロイド - ペプチド形成が、カスパーゼ認識に必要な P₁ Asp に依存していることを示している。代表的な実験 (n = 5) が示されている。

【0039】

図8Cは、切断の測定を示す図である。野生型 - セクレターゼ配列 () 又は「スウェーデン型」ジペプチド突然変異 () のいずれかを含有する [³⁵S] Met 標識 N - APP を、示された濃度の組換えヒト・カスパーゼ6と共に37 で60分間インキュベートした。切断断片のホスホールイメージング (phosphor imaging) により切断を定量し、図1Fの説明において記載したような k_{cat} / K_m の値を決定するために使用した。

【0040】

図8Dは、野生型 VKMD⁶⁵³ / A⁶⁵⁴ 部位、「スウェーデン型」突然変異 (VNLD⁶⁵³ / A⁶⁵⁴) 又は P₁ Asp が Ala に変化している「スウェーデン型」突然変異 (VNLA⁶⁵³ / A⁶⁵⁴) を有する全長 APP を保持するよう生成させた安定 K562 細胞系における免疫反応性産物を示す図である。等量の APP 構築物を発現する同量の細胞を、非メチオニン含有培地で1時間培養し、次いで [³⁵S] Met の存在下で5時間培養することにより代謝的に標識した。細胞及び培地を遠心分離により分離し、次いでそれぞれから [³⁵S] A ペプチドを (4G8 抗体を使用して) 免疫沈降させ、SDS - PAGE (10 ~ 20 % ポリアクリルアミド ; トリシンゲル) により分離し、フルオログラフィーにより可視化した。代表的な実験 (n = 3) が示されている。

【0041】

(発明の詳細な説明)

定義

別途定義しない限り、本明細書において使用される科学技術用語及び命名は、本発明が属する分野の当業者により一般的に理解されるものと同一の意味を有する。一般に、細胞培養、感染の手法、分子生物学的方法等は、当分野において使用される一般的な方法である。そのような標準的な技術は、例えばサンプブルック (Sambrook) ら (1989 , Molecular Cloning : A

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories) 及びアウスベル (Ausubel) ら (1994, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley; New York) のような参照マニュアルに見出される。

【0042】

一般に、抗体の生成、動物の免疫感作、ELISA及びアフィニティクロマトグラフィを含む手段による純粋な抗体の単離のような免疫学のための手法は、当分野において使用されている一般的な方法である。そのような標準的な技術は、例えばハーロー (Harlow) ら (1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories) のような参照マニュアルに見出される。

【0043】

本明細書において、ヌクレオチド配列は、当分野において一般的に使用されているようなIUPAC - IUB生化学命名委員会 (Biochemical Nomenclature Commission) (Biochemistry, 1972, 11: 1726 - 1732) の推奨による一文字ヌクレオチド表記を使用して、一本鎖で、5' から3' 方向で、左から右へ表されている。

【0044】

本明細書は、多数の通常使用されている組換えDNA (rDNA) 技術用語に言及している。にもかかわらず、そのようなrDNA用語の選択された例の定義を、明快及び一貫性のため提供する。

【0045】

当分野において既知の「組換えDNA」又は「組換えプラスミド」という用語は、DNAセグメントの接合により生じたDNA分子をさす。これは、しばしば、遺伝子操作とも呼ばれる。

【0046】

「DNAセグメント又は分子又は配列」という用語は、デオキシリボヌクレオチドアデニン (A)、グアニン (G)、チミン (T) 及び/又はシトシン (C)

から構成される分子をさすために、本明細書において使用される。これらのセグメント、分子又は配列は、天然に見出されるか、又は合成的に導出されうる。遺伝暗号に従い読解される場合、これらの配列は、ポリペプチド、タンパク質、タンパク質断片等と呼ばれうるアミノ酸の直鎖状のストレッチ又は配列をコードしうる。

【0047】

本明細書において使用されるように、「遺伝子」という用語は、当分野において周知であり、単一のタンパク質又はポリペプチドを定義する核酸配列に関する。ポリペプチドの機能的活性が保持されている限り、核酸は、ポリペプチドをコードする配列の全部であってもよいし、又は一部であってもよい。

【0048】

「構造遺伝子」とは、RNAへと転写され、特異的なアミノ酸配列を有するタンパク質へと翻訳され、それにより特異的なポリペプチド又はタンパク質を生成させるDNA配列と定義される。

【0049】

「制限エンドヌクレアーゼ又は制限酵素」とは、DNA分子内の特異的な塩基配列（通常、4、5又は6塩基対の長さ）を認識し、この配列が出現する全ての場所でDNA分子を切断する能力を有する酵素である。そのような酵素の一例は、GAATTC/CTTAAGなる塩基配列を認識し、この認識部位でDNA分子を切断するEcoRIである。

【0050】

「制限断片」とは、制限エンドヌクレアーゼによるDNAの消化により産生されたDNA分子である。任意の特定の直鎖状ゲノム又はDNAセグメントが、特定の制限エンドヌクレアーゼにより、少なくとも2つの別々の制限断片分子へと消化されうる。

【0051】

「アガロースゲル電気泳動」とは、DNAのサイズに基づき二本鎖DNA分子を分画するための分析法である。その方法は、DNA分子が篩としてのゲルの中を移動し、それにより最も小さいDNA分子が最も大きい移動度を有し、より遠

くまでゲルを通過するというに基づいている。ゲルの篩過特徴は、最も大きいDNA分子を遅滞させるため、これらは最も小さい移動度を有する。分画されたDNAは、当分野において周知の方法を使用したゲルの染色、核酸ハイブリダイゼーション、又は分画されたDNA分子への検出可能標識の付加により、可視化されうる。これらの方法は全て、当分野において周知であり、具体的な方法は、アウスベルら（前記）に見出される。

【0052】

「オリゴヌクレオチド又はオリゴマー」とは、2つ以上、好ましくは3個超のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドからなる分子である。分子の正確なサイズは、多くの要因に依存し、それら要因は、オリゴヌクレオチドの最終的な機能又は用途に依存する。オリゴヌクレオチドは、合成、クローニング又は増幅により導出されうる。

【0053】

「配列増幅」とは、大量の標的配列を生成させるための方法である。一般に、一つ又は複数の増幅プライマーを核酸配列とアニール化させる。適切な酵素を使用して、プライマーに隣接して、又はプライマー間に見出される配列が増幅される。本明細書において使用される増幅法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。

【0054】

「増幅プライマー」とは、標的配列に隣接したDNA領域とアニール化し、当分野において周知の適当な条件下でDNA合成の開始プライマーとして作用することができるオリゴヌクレオチドをさす。合成されたプライマー伸長産物は、標的配列と相補的である。

【0055】

「プラスミド」又は「ベクター」という用語は、当分野において一般的に既知であり、ヌクレオチド配列又は本発明の配列を取り込み、本発明のDNAをクローニングすることができるDNA媒体として作用することができる遺伝子媒体をさし、これらに限定されないが、プラスミドDNA、ファージDNA、ウイルスDNA等が含まれる。多数のベクター型が存在しており、当分野において周知で

ある。

【0056】

「DNA構築物」という用語は、本明細書において使用されるように、クローニングされたヌクレオチド配列を含むベクター又はプラスミドをさす。

【0057】

「発現」という用語は、構造遺伝子がmRNAへと転写され(転写)、次いでmRNAが一つ又は複数のポリペプチド(又は、タンパク質)へと翻訳される(翻訳)過程と定義される。

【0058】

「発現ベクター」という用語は、宿主への形質転換後に挿入配列の発現を可能にするよう設計されている、前記のようなベクター又は媒体と定義される。通常、プロモーター配列のような調節因子配列の調節下に置かれた、クローニングされた(一つ又は複数の)遺伝子(挿入配列)は、挿入配列の転写を開始する。そのような発現調節配列は、ベクターが、動作可能に連結した遺伝子を発現するよう設計されている宿主が、原核であるのか、真核であるのか又はその両方(シャトルベクター)であるのか、によって様々であり、エンハンサー因子、終結配列、組織特異性因子、並びに/又は翻訳の開始部位及び終止部位のような転写因子をさらに含有しうる。

【0059】

「真核発現系」とは、目的のタンパク質を発現させるために使用されうる、適切な発現ベクターと真核細胞系との組み合わせを意味する。いくつかの系において、タンパク質をコードする遺伝子は、特定の宿主細胞に感染することができるウイルスのゲノムに挿入されうる。所望の遺伝子を含有するプラスミドベクターも、使用されうる。あらゆる場合において、ベクターは、宿主細胞においてタンパク質を発現させるための適切な調節因子(プロモーター)を含有するであろう。さらなる成分、例えば、T7ポリメラーゼをコードするベクター又はウイルスのゲノムも、ある種の発現系においては必要であるかもしれない。典型的に使用される真核細胞型は、プラスミドベクターでトランスフェクトされた酵母(例えば、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevi*

siaae)、ピスチア・パストリス(*Pischia pastoris*); バキュロウイルス(オートグラフィア・カリフォルニカ(*Autographa californica*)又はボンビックス・モリ(*Bombyx mori*))(Luckow, Curr. Op. Biotech., 1993, 4:564-572; Griffiths and Page, 1994, Methods in Molec. biol. 75:427-440;及びMerringtonら., 1997, Molec. Biotech. 8(3):283-297)が感染した昆虫細胞(例えば、SF9、SF21); アデノウイルス、ワクシニアウイルス、シンドビスウイルス又はセムリキ森林ウイルスが感染した哺乳動物細胞; 及び一過性又は構成性(安定的)の発現のためのDNAベクターでトランスフェクトされた哺乳動物細胞である。

【0060】

外因性又は異種のDNA(例えば、DNA構築物)が細胞へ導入されている場合に、宿主細胞は、そのようなDNAによって「トランスフェクト」されている。トランスフェクションDNAは、宿主細胞の染色体DNAに組み込まれても(共有結合)、組み込まれなくてもよい。例えば、原核細胞、酵母細胞及び哺乳動物細胞においては、トランスフェクション/形質転換DNAは、プラスミドのようなエピソーム因子上に維持されうる。真核細胞に関して、安定的にトランスフェクトされた細胞の例は、トランスフェクションDNAが、宿主細胞染色体に組み込まれており、染色体の複製を介して娘細胞に遺伝するようなものである。この安定性は、トランスフェクションDNAを含有する娘細胞の集団からなる細胞系又はクローンを樹立する、真核細胞の能力により証明される。トランスフェクション法は、当分野において周知である(サンプルックら、1989、前記; アウスベルら、1994、前記)。

【0061】

本発明を実施するために有用なヌクレオチド配列及びポリペプチドには、これらに限定されないが、突然変異体、ホモログ、サブタイプ、アレル等が含まれる。一般に、本発明の配列は機能的なタンパク質をコードすることが理解される。本発明が、機能的タンパク質を発現する、それらの全ての変異型、誘導体又は断

片を含むことは、当業者には明らかであろう。

【0062】

本明細書において使用されるように、「変異型」という表現は、本発明に関連して、最初の配列と実質的に類似した（機能的又は構造的な）生物学的活性を保持している核酸配列又はアミノ酸配列をさす。この変異型又は等価物は、同一種由来であっても又は異種由来であってもよく、天然の変異型であっても又は合成により調製されてもよい。そのような変異型には、タンパク質の生物学的活性が保存されているのであれば、一つ又は複数のアミノ酸の置換、欠失又は付加を有するアミノ酸配列が含まれる。配列の生物学的活性が一般に維持されているのであれば、一つ又は複数のヌクレオチドの置換、欠失又は付加を有していてもよい核酸配列の変異型も同様である。

【0063】

「誘導体」という用語は、通常はこれらの分子の一部でない付加的な化学基を含んでいる場合、前記の変異型を含むものとする。これらの化学基は、分子の可溶性、吸収性、生物学的半減期の改善、毒性の減少、及び望ましくない副作用の除去又は減少を含む様々な目的を有しうる。さらに、これらの基は、標識、結合の目的のため使用されてもよく、又はそれらは（一つ又は複数の）融合産物に含まれてもよい。前記の効果を媒介する能力を有する異なる基が、レミントンの薬学の科学と実際（Remington's The Science and Practice of Pharmacy）（1995）に見出される。そのような基と分子とのカップリングのための方法は、当分野において周知である。

「断片」という用語は、同定されたDNA、RNAもしくはアミノ酸配列の任意のセグメント、及び／又は前記の変異型もしくは誘導体の任意のセグメントをさす。

【0064】

本発明の「変異型」、「誘導体」及び「断片」という用語は、本明細書において、単離／精製されたものであってもよいし、化学的に合成されたものであってもよいし、又は組み換えDNA技術により作製されたものであってもよいタンパク質又は核酸分子をさす。これらの方法は全て、当分野において周知である。

【0065】

「APP」という用語は、アミロイド - 前駆体タンパク質の略語である。これらは、交換可能に使用される。異なる型のAPPが当分野において既知であり、アミノ酸配列の長さに従い命名されている。非限定的な例には、APP⁶⁹⁵ (Genbank登録番号CAA31830)、APP⁷⁵¹ (Genbank登録番号CAA30050) 及びAPP⁷⁷⁰ (Genbank登録番号CAA02049) が含まれる。APP⁷⁵¹は中間型APPとも呼ばれる。本願の目的のため、中間型APPが使用され、アミノ酸残基番号は全てAPP⁷⁵¹型に基づく。

【0066】

「APLP」という用語は、アミロイド - 前駆体様タンパク質の略語である。これらは交換可能に使用される。APLPは、アミロイド前駆体タンパク質ファミリーのメンバーである。本発明の目的のため、カスパーゼ切断部位を少なくとも1つ有するAPLPが、本発明の範囲に含まれる。カスパーゼ切断部位を少なくとも1つ有するAPLPは、当分野において既知であり、非限定的な例にはAPLP1 (Swissprot登録番号P51693) 及びAPLP2 (Swissprot登録番号A49321) が含まれる。

【0067】

「エピトープ」及び「抗原決定基」という用語は、従来の意味で同様に使用され、抗体により認識される抗原上の部位をさす。ネオ - エピトープとは、本明細書に記載の抗体により認識されるエピトープをさし、この認識は、カスパーゼ酵素により引き起こされたAPP上の切断イベントの結果として起こり、該エピトープは、そのような切断イベントの非存在下では実質的に認識されない。

【0068】

アミノ酸については一文字記号が使用され、それらの標準的な従来の意味を有する。

【0069】

特定の実施形態

従って、本発明は、アミロイド前駆体タンパク質ファミリーに属するメンバー

の、プロテアーゼによるタンパク質分解により生成した分解産物、特にカスパーゼ酵素による分解の結果として生成した分解産物を同定する能力を有する薬剤の開発に関する。アミロイド前駆体タンパク質ファミリーに属し、かつカスパーゼ切断部位を少なくとも1つ有するメンバーは、本発明の範囲に含まれ、そのようなメンバーの非限定的な例には、A P L P 及び A P P が含まれ、より具体的には、それぞれ A P L P 1 及び A P L P 2、並びに A P P⁶⁹⁵、A P P⁷⁵¹ 及び A P P⁷⁷⁰ が含まれる。

【0070】

A P P 及び A P L P 1 のカスパーゼ切断の結果の一つは、切断されたタンパク質の切断部位における、又はそのような切断の結果としての、ネオ - エピトープの作出又は露出である。これらのネオ - エピトープと特異的に結合する能力を有する抗体の作製及び単離は、これらの切断産物を選択的に同定する薬剤を提供する。

【0071】

従って、本発明は、特異的かつ選択的に A P P 及び A P L P のカスパーゼ切断産物と結合する能力を有する抗体を提供する。

【0072】

従って、本発明の第一の実施形態は、カスパーゼにより媒介される A P P 及び A P L P の切断の後に作出されるか又は露出するネオエピトープと結合する能力を有する抗体に関する。

【0073】

この実施形態の特定の面において、カスパーゼは、カスパーゼ - 3、カスパーゼ - 6 及びカスパーゼ 8 から選択される。

【0074】

本発明のもう一つの面において、カスパーゼ - 3 は、A P P 上に1個より多い切断部位を有し、A P L P 上に少なくとも1個を有する。特定の面において、A P L P 1 及び A P L P 2 上の切断部位は、それぞれ、アミノ酸残基番号 6 2 0 及び 7 3 2 に存在する。中間型 A P P の切断部位は、A P P⁷⁵¹ のアミノ酸番号に基づき、アミノ酸残基番号 1 9 7、2 1 9 及び 7 2 0 に存在し、これらは、そ

れぞれAPP¹⁹⁷、APP²¹⁹及びAPP⁷²⁰と命名されている部位である。

【0075】

本発明の一つの面において、APP¹⁹⁷、APP²¹⁹及びAPP⁷²⁰を含むAPP⁷⁵¹の命名された切断部位におけるカスパーゼ-3切断により作出されるか又は露出するネオエピトープと結合する能力を有する抗体が提供される。

【0076】

本発明の好ましい面において、APP⁷⁵¹の命名された切断部位APP⁷²⁰におけるカスパーゼ-3切断により作出されるか又は露出するネオ-エピトープと結合する能力を有する抗体が提供される。

【0077】

もう一つの面において、少なくとも4つのアミノ酸残基からなり、かつカスパーゼ・コンセンサス配列V/DXxDを含有するペプチドを含む抗原決定基を用いて作製された抗体が提供される。この抗体は、APLP及びAPPを含むアミロイド前駆体タンパク質ファミリーのメンバーのカスパーゼ媒介切断の後に作出されるか又は露出するネオ-エピトープを認識することができる。好ましくは、アミロイド前駆体タンパク質ファミリーのメンバーは、APP⁶⁹⁵、APP⁷⁵¹及びAPP⁷⁷⁰を含むAPPである。より好ましくは、ファミリーのメンバーは、APP⁷⁵¹である。

【0078】

好ましい面において、APP⁷⁵¹に基づき、アミノ酸残基APP⁷¹⁴~APP⁷²⁰に相当するペプチド配列を含む抗原決定基を用いて作製された抗体が提供される。

【0079】

特定の面において、抗原性を増強する目的のため、抗原決定基は、担体タンパク質KLH(キーホールリンペットヘモシアニン)とのカップリングのための付加的なアミノ酸残基をさらに含む。これは、当分野において周知の方法であり、抗原性を増強することができる任意のその他の手段が、本発明の範囲に含まれる。

。

【0080】

より具体的な面において、カップリング・アミノ酸は、抗原決定基のアミノ末端に存在する。

【0081】

最も具体的な面において、カップリング・アミノ酸は、システインであり、抗原決定基はK L H - システイン - A P P⁷¹⁴ ~ A P P⁷²⁰を含む。

【0082】

本発明のもう一つの面において、抗体は、標的、即ち作出された又は露出されたエピトープと特異的に結合する精製されたポリクローナル抗体である。従来の方法を使用して、A P L P及びA P Pのカスパーゼ切断産物を認識する目的のため、本発明の抗原決定基により作製されたモノクローナル抗体も、本発明の範囲に含まれる。

【0083】

もう一つの面において、カスパーゼにより媒介されるA P L P 1及びA P Pの切断の後に作出されるか又は露出するネオ - エピトープと結合することができる抗体を含有する抗血清を供給するため、哺乳動物を免疫感作するための抗原決定基が提供される。

【0084】

この実施形態のもう一つの面において、抗原決定基は、少なくとも4つのアミノ酸残基を有し、かつカスパーゼ・コンセンサス配列V / D X X Dを含有するペプチドを含む。

【0085】

本発明のもう一つの面において、
少なくとも4つのアミノ酸残基を有し、かつカスパーゼ・コンセンサス配列V / D X X Dを含有するペプチドで、哺乳動物を免疫感作し、該ペプチドに対する抗体を含有する抗血清を提供すること、
該抗血清を収集すること、及び
カスパーゼにより生成するネオ - エピトープに対して特異的な抗体を選択するこ

とを含む、カスパーゼにより媒介されるA P L P及びA P Pの切断の後に作出されるか又は露出するネオ - エピトープと特異的に結合する能力を有する抗体を生成させるための方法が提供される。

【0086】

A P P及びアミロイド - ペプチドの存在は、キャロル (Carroll) により個体のC S Fにおいて、フクチ (Fukuchi) によりトランスジェニックマウスの血漿を含む多数の組織において研究されている。これらの引用文献は、A P P及びA P Pの分解種が脳以外の組織に見出されることを示している。A P L P及びA P L Pカスパーゼ分解産物も、同様に、脳以外の組織に見出されると考えられている。従って、血液、血漿及びC S Fのような組織におけるA P L P及びA P Pのカスパーゼ切断産物の存在は、ニューロン・アポトーシスを検出及び評価しうる臨床標本の容易な入手を可能にするであろう。従って、本発明の抗体は、臨床標本中のA P L P及びA P Pの切断産物を検出することができる診断法において有用である。より具体的には、本発明の抗体は、臨床標本中のカスパーゼ切断A P P産物を少なくとも1つ検出するための診断道具を提供する。

【0087】

A P Pのカスパーゼ媒介切断の後に露出するネオ - エピトープを特異的に認識する能力を有する本発明の抗体は、ニューロン・アポトーシスが存在する状態を診断するための方法において有用である。そのような状態の例には、アルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、進行性多発性硬化症、頭部外傷、プリオン関連状態、クロイツフェルト - ヤーコブ (Creutzfeldt - Jacob) 病、海綿状脳障害、フリートライヒ (Friedreich's) 運動失調、致命的家族性不眠症、ペリツェーウス - メルツバッシャー (Pelizaeus - Merzbacher) 病、精神分裂病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、3型脊髄小脳萎縮症、脊髄延髄筋萎縮症、脊髄損傷、発作及び脳損傷のような神経変性疾患が含まれる。A P Pのカスパーゼ切断断片は、脳以外の組織を使用して哺乳動物において検出され得るため、それらの検出は、疾患検出及び疾患進行の指標として使用されうる。哺乳動物における診断法において使用する

ための容易に入手可能な組織の非限定的な例には、血漿及び脳脊髄液が含まれる。

【0088】

特定の実施形態において、本発明の抗体は、アポトーシス・ニューロン細胞の検出において使用されうる。

【0089】

より具体的には、本明細書に記載の抗体を使用することにより、アポトーシスを起こしているニューロン細胞の進展を追跡することが可能である。

【0090】

本発明の一つの適用において、アポトーシスの調節因子としての試験薬剤の選択における、これらの抗体の使用が提供される。調節化合物には、アポトーシスの誘導剤及び阻害剤が含まれる。

【0091】

本願の一つの面において、ニューロン細胞を人工的にアポトーシスへと誘導し、本発明の抗体を使用してアポトーシス過程の進行を追跡することができる。特に、抗体は、ニューロン・アポトーシスの進展を研究するために使用されうる。

【0092】

本願のもう一つの面において、試験化合物の存在下又は非存在下においてアポトーシスの進行を評価し、その結果を比較することができる。

【0093】

本願の具体的な面において、ニューロン・アポトーシスの調節因子を選択するためのアッセイ系が提供される。

【0094】

本願のより具体的な面において、ニューロン・アポトーシスの阻害剤を同定するためのアッセイが提供される。そのようなアッセイは、ハイスループット系へと拡大されうる。

【0095】

本願の一つの面において、本発明の抗体を使用して同定された候補阻害剤は、そのような治療が必要なヒトを含む哺乳動物を治療するための薬学的組成物に含

まれうる。

【0096】

本発明のさらなる面において、カスパーゼにより媒介されるAPP切断の産物を検出するために生成させた抗体は、キットに含まれていてもよい。そのようなキットは、カスパーゼにより媒介されるAPPの切断の後に露出するネオ-エピトープ少なくとも1つと結合する能力を有する抗体を少なくとも1つ含むであろう。これは、研究又は診断の目的のための適用を有する。

【0097】

以下の実施例と関連して本発明をさらに例示する。

【0098】

実施例1

組換え操作

全てのAPPクローンが、ヒトAPP⁷⁵¹由来であった。以下のクローン表記は、[構築物]：[ベクター]：[挿入部位/挿入放出]：[センス方向]：[同定者]というフォーマットになっている。クローンは、示されたようにしてPCR媒介鋳型修飾により生成させ、使用前に完全に配列決定した。in vitro転写/翻訳のためのクローンには、

【0099】

【化1】

{[wtAPP⁷⁵¹; Met¹-Asn⁷⁵¹]: [pBII KS+]: [EcoRI / SmaI ClaI]: [T7]: [MF-UMP#1335]};

{[ΔN-APP⁷⁵¹; Met¹-Ala¹⁷ Gly²⁵¹-Asn⁷⁵¹]: [pBII KS+]: [EcoRI / SmaI ClaI]: [T7]: [MF-UMP#4476]};

{[APP⁷⁵¹; D⁷²⁰A]: [pBII KS+]: [EcoRI / SmaI ClaI]: [T7]: [MF-UMP#4444]};

{[APP⁷⁵¹; D²¹⁹A, D⁷²⁰A]: [pBII KS+]: [EcoRI / SmaI ClaI]: [T7]: [MF-UMP#4482]};

{[APP⁷⁵¹; D¹⁹⁷A, D²¹⁹A, D⁷²⁰A]: [pBII KS+]: [EcoRI / SmaI ClaI]: [T7]: [MF-UMP#4540]};

{[APP⁷⁵¹-ΔC; Met¹-Asp⁷²⁰]: [pBII KS+]: [EcoRI ClaI / SmaI ClaI]: [T7]: [MF-UMP#4446]};

{[sigΔN-APP⁷⁵¹ VNLD; Met¹-Ala¹⁷ Gly²⁵¹-Asn⁷⁵¹]: [pBII KS+]: [BamHI / ClaI]: [T7]: [MF-UMP#4476]};

{[sigΔN-APP⁷⁵¹ VNLD ('Swedish'); Met¹-Ala¹⁷ Gly²⁵¹-Asn⁷⁵¹, K⁶⁵¹N, M⁶⁵²L]: [pBII KS+]: [BamHI / ClaI]: [T7]: [MF-UMP#4982]};

{[sigΔN-APP⁷⁵¹ VNLA; Met¹-Ala¹⁷ Gly²⁵¹-Asn⁷⁵¹, K⁶⁵¹N, M⁶⁵²L, D⁶⁵³A]: [pBII KS+]: [BamHI / ClaI]: [T7]: [MF-UMP#4983]}; and

{[sigΔN-APP⁷⁵¹ VEHD; Met¹-Ala¹⁷ Gly²⁵¹-Asn⁷⁵¹, K⁶⁵¹E, M⁶⁵²H]: [pBII KS+]: [BamHI / ClaI]: [T7]: [MF-UMP#5165]}.

が含まれる。

【0100】

哺乳動物発現クローンには、

【0101】

【化2】

{[wtAPP⁷⁵¹; Met¹-Asn⁷⁵¹]: [pCEP4]: [NotI XmnI-blunt-BamHI]: [CMV]: [MF-UMP#4573]};

{[APP⁷⁵¹; D⁷²⁰A]: [pCEP4]: [NotI XmnI-blunt-BamHI]: [CMV]: [MF-UMP#4575]};

{[APP⁷⁵¹; D¹⁹⁷A, D²¹⁹A, D⁷²⁰A]: [pCEP4]: [NotI XmnI-blunt-BamHI]: [CMV]: [MF-UMP#4901]};

{[APP⁷⁵¹-ΔC; Met¹-Asp⁷²⁰]: [pCEP4]: [NotI ClaI-blunt-BamHI]: [CMV]: [MF-UMP#4577]};

{[APP⁷⁵¹ VNLD; K⁶⁵¹N, M⁶⁵²L]: [pCEP4]: [NotI XmnI-blunt-BamHI]: [CMV]: [MF-UMP#5149]}; and

{[APP⁷⁵¹ VNLA; K⁶⁵¹N, M⁶⁵²L, D⁶⁵³A]: [pCEP4]: [NotI XmnI-blunt-BamHI]: [CMV]: [MF-UMP#5150]}.

が含まれる。

【0102】

実施例2

安定細胞系

安定細胞系を生成させるため、B103細胞(ラット・ニューロン細胞系)又

はK562細胞（ヒト赤白血病細胞系）を、示されたpCEP4プラスミドでトランスフェクトし、次いでハイグロマイシンにより連続的に選択した。イムノブロットニングにより各実験コース中の発現レベルを決定し、各細胞系が比較可能なレベルの各APP構築物を発現していることを確認した。以下の細胞系表記は、

【0103】

【化3】

[designation]: [expressed protein]: [transfection clone]: [selection]: [identifier].

というフォーマットになっている。安定細胞系には、

【0104】

【化4】

{[B103-APP⁷⁵¹]: [wtAPP⁷⁵¹; Met¹-Asn⁷⁵¹]: [MF-UMP#4573]: [hygro]: [B103:4573; 97106-22]};
 {[B103-APP D⁷²⁰A]: [APP⁷⁵¹; D⁷²⁰A]: [MF-UMP#4575]: [hygro]: [B103:4575; 97106-22]};
 {[B103-APP D¹⁹⁷A, D²¹⁹A, D⁷²⁰A]: [APP⁷⁵¹; D¹⁹⁷A, D²¹⁹A, D⁷²⁰A]: [MF-UMP#4901]: [hygro]: [B103:4901; 97106-43]};
 {[B103-APP⁷⁵¹-ΔC]: [APP⁷⁵¹-ΔC; Met¹-Asp⁷²⁰]: [MF-UMP#4577]: [hygro]: [B103:4577; 97106-22]};
 {[K562-APP⁷⁵¹]: [wtAPP⁷⁵¹; Met¹-Asn⁷⁵¹]: [MF-UMP#4573]: [hygro]: [K562:4573; 97106-16b]};
 {[K562-APP⁷⁵¹ VNLD ('Swedish')]: [APP⁷⁵¹; K⁶⁵¹N, M⁶⁵²L]: [MF-UMP#5149]: [hygro]: [K562:5149; 97106-64]}; and
 {[K562-APP⁷⁵¹ VNLA]: [APP⁷⁵¹; K⁶⁵¹N, M⁶⁵²L, D⁶⁵³A]: [MF-UMP#5150]: [hygro]: [K562:5150; 97106-64]};

が含まれる。

【0105】

実施例3

カスパーゼにより生成するAPPネオ-エピトープを特異的に認識する抗体（C^{CSP}-APP）の生成

アスパラギン酸720におけるカスパーゼ切断部位が続いているAPPの7アミノ酸（N末端APP⁷¹⁴～C末端APP⁷²⁰（両端を含む））及びKLHとのカップリングを可能にするアミノ末端システイン残基を含むペプチドで、2

匹のウサギを免疫感作した。10週間にわたり、免疫感作ペプチドを3回、ウサギに追加接種した。10週目、免疫感作ペプチドに対する力価(ELISAにより決定し、西洋ワサビペルオキシダーゼに対する色原性基質A-TSを使用して、任意に $OD_{450} = 0.2$ と設定された陽性反応を与える最大希釈率として定義した)は、 $> 1:204,800$ 及び $1:12,520$ であった。抗血清をブールし、3つの連続的なクロマトグラフィ工程によりアフィニティ精製した。(1)臭化シアン活性化によりセファロース4B(ファルマシア(Pharmacia))上に固定化された、カスパーゼ切断部位を含むブリッジング・ペプチド(N末端APP⁷¹³~C末端APP⁷²⁶(両端を含む))への吸着により、完全APPを認識する免疫グロブリンを抗血清から枯渇させた。(2)工程(1)からのフロースルーを、((1)に記載されたような支持体に固定化された)免疫感作ペプチドを含有するセファロース4Bカラムへアプライし、カラムを洗浄し、pH勾配によって特異的抗体を溶出させ、ホウ酸緩衝液(0.125Mホウ酸塩)中に置いた。(3)第二工程からの溶出液を(1)に記載されたような固定化ブリッジング・ペプチドに吸着させ、フロースルーを収集した。この抗体調製物のELISA力価は、カスパーゼにより生成するネオ-エピトープに相当する免疫感作ペプチドに対しては、 $< 1:142,000$ ($< 5\text{ ng/ml}$)であり、完全APPに相当するブリッジング・ペプチドに対しては $> 1:71$ ($> 10\text{ }\mu\text{g/ml}$)であった。

【0106】

実施例4

アポトーシスNT2細胞におけるAPPのカスパーゼ切断断片の免疫細胞化学的分析

サブコンフルエントのNT2細胞を、 $50\text{ }\mu\text{M}$ Z-VAD(OMe)-CH₂Fの存在下又は非存在下で、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で、4時間、 $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ カンプトテシン(campthothecin)と共にインキュベートした。カンプトテシン及びZ-VAD(OMe)-CH₂Fを希釈するために使用されたDMSOの最終濃度は、 0.3% (v/v)であった。対照として、 0.3% (v/v) DMSOのみと共に細胞をインキュベートした。細胞解離溶液(Cell

Dissociation Solution) (シグマ)で細胞をプレートから分離し、(浮遊アポトーシス細胞を保持する)培養培地と共にプールした。

【0107】

遠心分離後、10%中性緩衝ホルマリンで室温で10分間、細胞を固定し、リン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄し、次いでサイトスピン(Cytospin)遠心分離器を使用してポリ-L-リシンでコートされたガラススライド(シグマ(Sigma))上へ遠心分離し、一夜乾燥させた。次いで、プロテイナーースK処理を省略したことを除けば以前の記載(Blackら., 1998)と本質的に同様にして、TUNELと1/4000希釈の C^{CSP}-APP又は1/3000希釈の Csp-3(MF397)のいずれかとに関して細胞を同時染色した。

【0108】

実施例5

急性脳損傷のin vivoモデル

全ての動物操作は、カナダ医学研究評議会(Medical Research Council of Canada)により推奨された実験動物の飼育及び使用のための指針(Guide for the Care and Use of Experimental Animals)(Canadian Council on Animal Care, 1993)に従っていた。

【0109】

カイニン酸処理のため、成体雄マウス(C57/B6×XJL; 25~30g; チャールズリバー(Charles River)、モントリオール(Montreal))に、35mg/kgカイニン酸を腹腔内にボラス注射した。48時間後、動物を過量のペントバルビタール(100mg/kg、腹腔内)で安楽死させた。脳を採取し、切開し、下記のようにして分析した。

【0110】

一過性前脳虚血のため、成体雄ウイスター(Wistar)ラット(250~275g; チャールズリバー、モントリオール)を全実験に使用した。一時的な前脳虚血は、4血管閉塞(4-VO)法(Pulsinelliら., 1982

)の発表されている変法(Pulsinelli and Buchan, 1988)を使用して起こした。4-V O中、又は再灌流の後に痙攣を起こした動物は、虚血中の立直り反射の欠損を完全には発現しなかった動物と共に、研究から排除した。偽処理動物の場合には、頸動脈を露出させたが、閉塞は行わなかった。

【0111】

実施例6

齧歯類及びヒトの脳のTUNEL及び蛍光免疫組織化学

新鮮な凍結脳切片(厚さ12 μ m)を0.1%(v/v)トリトンX-100を含有するPBSで前処理した。次いで、活性型カスパーゼ-3を選択的に認識する一次抗血清(Csp-3(MF397));(p17/p12)₂カスパーゼ3に対して作製されたウサギ・ポリクローナル抗血清;1/2000希釈で使用された又はカスパーゼにより生成するC-APPネオ-エピトープを認識する精製された免疫グロブリン(1/2000希釈で使用された C^{Csp}-APP(前記参照))と共に、4 で、48時間、切片をインキュベートした。PBSで3回洗浄した後(各5分)、切片をCY³標識ロバ抗ウサギIgG(1/500、アマシャム)と共に、室温で、2時間、インキュベートし、活性カスパーゼ-3又はC-APPの免疫反応性を可視化した。アポトーシスに特徴的なDNA断片化を、以前に記載されたようにしてTUNELにより検出した(Xuら., 1997)。

【0112】

実施例7

DNAラダー形成

オリゴヌクレオソーム断片化を可視化するためのDNAの抽出は、以下のようにして実施した。サブコンフルエントなNT2細胞を、33.3 μ M Z-VAD(OMe)-CH₂Fの存在下又は非存在下で、37、5%CO₂で、6時間、1 μ g/mlカンプトテシンと共にインキュベートした。対照として、媒体(0.2%(v/v)DMSO)のみと共に細胞をインキュベートした。細胞を剥離によりディッシュから除去し、培養培地と共にプールし、10,000 \times g

で10分間ペレット化した。細胞ペレット (2×10^5 細胞/ペレット) を0.5 mlの0.6% (w/v) SDS、10 mM EDTA (pH 7.5) に再懸濁させ、最終濃度1 MとなるようNaClを添加した。4 で一夜のインキュベーションの後、4、14,000 × g、20分間の遠心分離により細胞を清浄化し、7 μg/ml 非DNase含有RNaseで37 で45分間処理した。DNAをフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1、v/v/v) で1回抽出し、イソプロパノール沈殿させ、ローディング緩衝液 (30% (v/v) グリセロール、10 mM EDTA pH 7.5、0.05% (w/v) ブロモフェノールブルー) に再懸濁させ、1 × TAE (40 mM トリス酢酸、1 mM EDTA pH 8.3) 中で1.2%アガロースゲル上で電気泳動により分析した。臭化エチジウム染色の後、バンドを可視化した。

【0113】

実施例 8

その他の手法

組換えヒト・カスパーゼは、以前に記載されたようにして生成させ (Rondaら., 1996; Thornberryら., 1997)、50 mMヘペス/KOH (pH 7.0)、10% (w/v) ショ糖、2 mM EDTA、0.1% (w/v) CHAPS、5 mMジチオトレイトールから構成された緩衝液中で*in vitro*切断アッセイを実施した。ペプチドアルデヒド及び蛍光原性アミノメチルクマリンは、本質的に以前の記載 (Ranoら., 1997) のような固相合成により調製した。Z-VAD (OMe) - CH₂F、パン・カスパーゼ阻害剤 (Garcia-Calvoら., 1998) は、エンザイム・システムズ・プロダクツ (Enzyme Systems Products) より購入した。NT2細胞 (ヒト・ニューロン前駆細胞) 及びB103細胞 (ラット・ニューロン細胞) は、抗生物質及び10% (v/v) 胎児ウシ血清 (FBS) を含有するDMEM中で維持した。レチノイン酸分化NT2ニューロン (hNT) は、DMEM (-/+10% (v/v) FBS) 中で培養した血清枯渇実験の過程を除き、ニューロン調整培地 (ストラタジーン) 中で維持した。K562細胞 (ヒト赤白血病) 及びジャーカット細胞 (ヒトTリンパ球) は、抗生物質及び

10% (v/v) FBSを含有するRPMI-1640中で維持した。アポトーシスは、示されたように、1 μ Mスタウロスポリン(全細胞系)又は1 μ g/mlカンプトテシン(全細胞系)と共に1 μ g/ml抗Fas抗体(ジャーカットのみ)を使用することによるCD95(Fas/APO-1)ライゲーションにより誘導した。細胞抽出物は、以前の記載のようにして調製した(Nicholsonら., 1995)。

【0114】

結果

ニューロンNT2細胞は、アポトーシス中、上昇したレベルのアミロイドペプチドを産生し、それはカスパーゼ阻害により減弱する。

【0115】

アポトーシスを起こしている一次ヒト・ニューロンは、アミロイドペプチド形成の速度を3~4倍増加させることが示されている(LeBlanc, 1995)。従って、これが、培養ヒト・ニューロン細胞系で再現されるか否か、及びアポトーシス阻害がA β 産生を防止するか否かを決定した。血清枯渇によりアポトーシスを起こすよう誘導されたレチノイド分化ヒト・ニューロンNT2細胞(hNT)は、A β ペプチド形成の本質的に上昇した速度を有しており(約4倍)(図1A)、このアポトーシス関連A β 形成増加は、非選択的な不可逆性カスパーゼ阻害剤により減弱した。カスパーゼ阻害剤の存在下でのA β 産生速度は、非アポトーシスhNT細胞に見出される定常状態レベルへと回復したが、完全には消失せず、このことから、アポトーシスはA β 生成へと至る経路を増強するが、その発生にとって必須ではないことが示された。カンプトテシンによるニューロン前駆細胞系NT2の急性アポトーシス誘導(図1B)は、オリゴヌクレオソームDNA断片化をもたらし、同時に、プロカスパーゼ-3の成熟、(PARP; ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼのような)カスパーゼ-3基質の切断、及び内因性APPの質量の約3.5 kDaの減少(レーン2)をもたらした。3つのポリペプチド全てのタンパク質分解の程度は、ほぼ同一であり(プロカスパーゼ-3 = 37 \pm 4%; PARP = 66 \pm 9%; APP = 44 \pm 4%; n = 5)、いずれの場合においても、カスパーゼ阻害剤との共インキュベーションに

より消失した(レーン3)。このことは、APPがアポトーシス中にカスパーゼ依存的なイベントによりプロセシングされることを示しており、カスパーゼ切断が、アポトーシス細胞に観察される比較的高いA_βペプチド形成傾向に直接寄与している可能性を示している。

【0116】

カスパーゼ-3はアミロイド-前駆体タンパク質を直接的かつ効率的に切断する。

【0117】

ニューロン・アポトーシスには、APPタンパク質切断及びA_βペプチド形成の増加が伴っているため、細胞死経路の生化学的成分がこの過程に寄与しているか否かを決定することにした。アポトーシス自体は、細胞ポリペプチドの別サブセットをAsp-x結合において切断することによりアポトーシス表現型を呈するシステインプロテアーゼのファミリー、カスパーゼに依存している(Alnemriら., 1996; Nicholson and Thornberry, 1997; Thornberryら., 1997)。カスパーゼのためのコア基質認識モチーフは、切断を受ける結合のN末端に存在するテトラペプチド(P₄~P₁)からなっており、P₁のAspは切断のための絶対的な要件であり、P₄残基は主要な特異性決定基である。カスパーゼは、通常、健康な細胞においては不活型のプロ酵素として存在するが、多様なアポトーシス刺激に反応してタンパク質分解により活性プロテアーゼへと変換される。まず、[³⁵S]標識APPを健康ジャーカット細胞及びアポトーシス・ジャーカット細胞からの抽出物と合わせることで、APPプロセシングにおけるカスパーゼの可能性のある直接的な役割を試験した(図1C)。ジャーカット細胞を最初に選択したのは、アポトーシス中に容易に活性化される複数のカスパーゼファミリーのメンバー(カスパーゼ-2、-3、-4、-6、-7、-8及び-9)を含有しているためである(未発表)。120kDaのAPPは、およそ85~90kDaの比較的小さいポリペプチドの三つ組へと迅速にプロセシングされた。これらのポリペプチドは、栄養的な支持を枯渇させた一次ヒト・ニューロン(LeBlanc, 1995; LeBlancら, 1996)、又はH₂O₂誘導アポトーシス中のヒ

ト・ニューロン細胞系 (Zhangら , 1997) において観察されたAPPプロセシング中間体と質量が一致しており、このことは、細胞抽出物によるAPPの*in vitro*タンパク質分解が、ニューロン細胞における現象を表していることを示唆している。同様のAPP切断産物はNT2ヒト・ニューロン前駆細胞及びB103神経芽腫細胞を含む、他の細胞型からのアポトーシス抽出物によっても生成した (示していない)。アポトーシス中に完全NT2細胞において単一のAPP切断イベントが観察されたことは (図1B)、APPの膜貫通方向が分解部位のタンパク質分解感受性を制限していること、及び3つの切断部位のうちの1つが、*in vivo*で、より脆弱であるのかもしれないことを示唆している。プロテアーゼ阻害剤プロファイルは、3つの切断産物が全て、カスパーゼの特徴である非E64感受性システインプロテアーゼの結果として生じること示した (示していない)。これは、カスパーゼ特異的ペプチド - アルデヒドが、85 ~ 90 kDa三つ組へのAPPプロセシングを遮断しうることにより確認された (図1D)。カスパーゼ阻害剤Ac - DEVD - CHOがAPPプロセシングの強力な阻害剤であり ($IC_{50} = 1 \text{ nM}$)、Ac - IETD - CHO及びAc - YVAD - CHOの効果はいずれも実質的に低かった。ジャーカット細胞は3つのカスパーゼ・サブグループ全てのメンバーを含有しているため、これらの結果は、カスパーゼ - 3 (ニューロン・アポトーシスの重要媒介因子) を含むII群カスパーゼが、アポトーシス細胞において観察されるAPP切断の主な原因であることを示している。NT2ニューロン前駆細胞においても同一の結果が得られたが、この細胞系においてはカスパーゼ - 3が主要なカスパーゼであるため ([カスパーゼ - 3] 約55 pM ; 他の全てのカスパーゼ < 14 pM ; 未発表)、それは驚くべきことではない。総合的に、これらの結果は、カスパーゼ - 3がアポトーシス中のAPPタンパク質分解の主な原因であることを示している。これを支持するように、120 kDa APPの85 ~ 90 kDa三つ組へのタンパク質分解は、組換えカスパーゼ - 3によっても再現され (図1E)、切断動力学的分析は、カスパーゼ - 3によるAPPタンパク質切断が、ポリ (ADP - リボース) ポリメラーゼ (同一実験において $k_{cat} / K_m = 15.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 示していない) のような確実なカスパーゼ - 3基質と類似した適

切な動力学的特性 ($k_{cat} / K_m = 5.14 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) で起こることを示している。試験されたヒト・カスパーゼ (カスパーゼ - 1 ~ 10 及びグランザイム (granzyme) B ; それぞれ同一条件下で等モル濃度で試験された) のうち、カスパーゼ - 3 が、APP を切断する最も効率的な酵素であったが、カスパーゼ - 6 及び - 8 によっても、わずかに切断が起こった (示していない)。

【0118】

カスパーゼ - 3 レベルは、ヒト・アルツハイマー脳における瀕死のニューロンにおいて上昇している。

【0119】

カスパーゼ - 3 が APP プロセッシング及びニューロン・アポトーシスに關与しているのであれば、それは A β 産生及び神経変性の部位に存在するはずである。

【0120】

カスパーゼ - 3 (CPP32、アポパイン (apopain)、Yama) (Fernandes - Alnemriら., 1994; Nicholsonら., 1995; Tewariら., 1995) は、哺乳動物細胞自殺における重要なエフェクター・カスパーゼのうちの一つである。特にニューロン細胞死において重要であるかもしれないことは、脳膨大 (2 ~ 3 倍)、過剰な細胞重量及び二重脳構造へと至る、発達途中のニューロン・アポトーシスの重度の欠陥を有するカスパーゼ - 3 欠損マウスの表現型により強調される (Kuidaら., 1996)。本発明者らは、アルツハイマー病患者において、アルツハイマー病におけるニューロン欠損の主要部位の一つである CA3 野を含む海馬の瀕死の錘体ニューロンにおいて、カスパーゼ - 3 免疫反応性が上昇していることを見出した (図 2)。この情況証拠は、カスパーゼ - 3 が、神経変性におけるこれらの細胞死を媒介しているか、又はそれらに寄与していること、及びカスパーゼ - 3 により媒介される APP のタンパク質切断が、ヒト・アルツハイマー病の病原の一成分としてこの過程に伴っていることを示唆している。

【0121】

カスパーゼにより媒介される APP タンパク質切断の 3 つの主要部位の同定

120 kDa APPポリペプチド内のカスパーゼによるタンパク質分解の部位を決定した。まず、APPのアミノ末端に通常は存在しないCys残基を配置することにより、これを容易にした。組換えカスパーゼ-3による $[^{35}\text{S}]$ Cys標識APPの処理により、2つの小さい $[^{35}\text{S}]$ Cys含有断片(23及び25 kDa)及び比較的大きいポリペプチド(85 kDa)が生成したことから、カスパーゼ切断部位のうちの2つが、APPの最初のN末端220アミノ酸に存在し、第3の部位が残基700付近に存在することが示された(示していない)。N末端220アミノ酸を欠くAPP構築物(N-APP)を切断することにより、後者の部位の位置をさらに特定した。 $[^{35}\text{S}]$ Cys APP及び $[^{35}\text{S}]$ Met APPの断片サイズの分析によりカスパーゼ切断部位を含有すると予測された3つの各領域には、APP¹⁹⁴~APP¹⁹⁷、APP²¹⁶~APP²¹⁹及びAPP⁷¹⁷~APP⁷²⁰(両端を含む)に、優れたカスパーゼ・コンセンサス部位(Thornberryら., 1997)が存在していた。これらの部位は、それぞれ、(P₄)DNVD¹⁹⁷(P₁)/S、(P₄)DYAD²¹⁹(P₁)/G及び(P₄)VEVD⁷²⁰(P₁)/Aと命名されている(図3B)。各部位の必須のP₁ Aspの部位特異的突然変異誘発により、これらが実際にカスパーゼによるタンパク質分解部位であることが確認された(図3A)。例えば、APP三重突然変異体(APP^{D197A}, APP^{D219A}, APP^{D720A})は、組換えカスパーゼ(レーン7&8)によっても、アポトーシス細胞からの抽出物(示していない)によっても分解され得なかった。(図3Aに記載された断片の低分子量カウンターパートについても、等しい結果が観察された(示していない)。)

【0122】

カスパーゼにより媒介されるAPPタンパク質分解は、完全細胞においては、主にAsp⁷²⁰において起こり、そしてアポトーシス中に上昇する。

【0123】

次に、野生型又はP₁ AspからAlaへの突然変異のいずれかを含有するAPPによるB103ニューロン細胞の安定的なトランスフェクションにより、前記の部位における切断を完全細胞において試験した。(B103細胞は、内因

性APPのレベルが極めて低く、トランスフェクトされた部位特異的突然変異体の分析が容易であるため選択された。) 安定的にトランスフェクトされた野生型APPを保持するB103細胞を、アポトーシスを起こすよう誘導したところ、カスパーゼにより媒介されるカルボキシ末端(P₄)VEVD⁷²⁰(P₁)/Aにおける切断が観察された(図4A、レーン1&2)。この切断イベントは、三重突然変異体(示していない)又はD⁷²⁰A点突然変異体(レーン5&6)によって完全に除去されたことから、完全ニューロン細胞におけるAPPプロセシングに、カスパーゼが直接関与していることが実証された。非アポトーシス細胞も、アポトーシス細胞において起こる速度の約15%で、カルボキシ末端においてAPPを切断し(レーン1対2)、これも、カスパーゼ認識にとって必要なP₁ Aspの突然変異(D⁷²⁰A)によって除去された(レーン5)。VEVD⁷²⁰A部位における切断は、NT2細胞においてアポトーシス中に観察されたAPPの約3.5kDaの減少と一致しており(図1B、レーン2参照)、少なくとも試験した細胞系においては、完全細胞におけるカスパーゼによるタンパク質分解の主要部位であると考えられる(ただし、2つの上流の部位における切断に相当するAPP断片が観察されたこともある(Zhangら., 1997))。このC末端切断イベントの決定的な同定は、カスパーゼにより生成するC-APPの免疫組織化学的検出のため本発明者らが生成させたネオ-エピトープ抗体を使用して*in situ*で確認された。その抗血清は、C-APPの新生C末端に相当する合成ペプチド[KLH-システイン-APP⁷¹⁴~APP⁷²⁰]に対して作製され、次いで同ペプチドへの免疫吸着(*immuno adsorption*)、及びアミノ酸残基APP⁷¹⁴~APP⁷²⁶(両端を含む)を含む、切断部位を内含する完全APPに相当するブリッジング・ペプチドを用いた2サイクルの免疫枯渇(*immunodepletion*)により精製された。C^{CSP}-APPと命名されるこの抗体は、3つの基準により、APP内のカスパーゼにより生成するネオ-エピトープに対して高度に特異的であることが確認された。a) ELISAによる力価が、免疫感作ペプチド(C-APPに相当)に対して、同配列を保持するブリッジング・ペプチド(完全APPに相当)よりも、>2000倍選択的であった(方法を参照)。b) その抗

体は、D⁷²⁰カスパーゼ部位で短縮された生合成 [³⁵S] APPを免疫沈降させることができたが、完全APPは免疫沈降させることができなかった(図4B)。そして、c)その抗体は、健康なNT2細胞からの完全APPは免疫沈降させることができなかったが、その後のアポトーシス誘導はC-APP切断産物を免疫沈降させることができた(図4C)。後者の場合、NT2細胞内の免疫沈降可能C-APPの形成は、カスパーゼ阻害剤の存在により消失した(レーン3対2)。NT2細胞の免疫組織化学的染色によっても、比較可能な結果が得られた(図4D~I)。カンプトテシンによりアポトーシスを起こすよう誘導されたNT2細胞は、TUNEL陽性となり、同時に、活性カスパーゼ-3(パネルE)及びカスパーゼにより生成するAPPネオ-エピトープ(パネルH)についての染色も陽性となった。これらの3つのアポトーシス関連イベントは、全て、カスパーゼ阻害剤の存在により消失した(パネルF及びI)。集約すると、これらの実験は、カスパーゼにより媒介されるC末端VEVD⁷²⁰A部位におけるAPPのタンパク質分解が、完全細胞においてアポトーシス中に起こることを証明している。さらに、C^{CSP}-APPネオ-エピトープ抗体は、*in situ*でカスパーゼによるタンパク質分解により生成した末端を認識する能力を有するため、この切断イベントを*in vivo*で追跡するための有用な道具となる。

【0124】

カスパーゼにより媒介されるAPPタンパク質分解が、急性脳損傷において*in vivo*で海馬ニューロンにおいて起こる

海馬ニューロンの初期の欠損は、アルツハイマー病の病原における顕著な特徴である。従って、本発明者らは、カスパーゼにより媒介されるAPPタンパク質切断が、海馬細胞死の際に*in vivo*で検出されるか否かを決定することにした。これらのイベントを調査するため、アポトーシスによる海馬ニューロンの欠損をもたらす、2つの実験的な急性脳損傷モデルを使用した。すなわち、a)CA3ニューロンが主に死亡する、カイニン酸(興奮毒性)により誘導された発作、及びb)CA1ニューロンが消滅する、全体的な大脳虚血である。これらのモデルは、急性脳損傷がアルツハイマー病感受性の確立されたリスクファクタ

であるという付加的な利点を有し、従って、この脆弱性の増加についての分子的基礎を解明するかもしれない。ニューロン損傷の興奮毒性モデル(図5A~F)において、 $C^{CSp} - APP$ 免疫反応性により測定された、カスパーゼにより媒介されるAPPタンパク質切断は、対照マウスの海馬のCA3野には検出不可であったが(パネルA)、カイニン酸投与(25mg/kg、s.c.)の48時間後のSV129マウスのCA3ニューロンには強い $C^{CSp} - APP$ 免疫反応性が観察された(パネルB)。カスパーゼ-3依存的な機序によるこの断片の生成と一致して、カイニン酸を注射された動物からの隣接海馬組織切片のCA3野には活性カスパーゼ-3免疫反応性の顕著な上昇が観察されたが(パネルD)、媒体を注射された動物には観察されなかった(パネルC)。TUNEL標識により、 $C^{CSp} - APP$ 及び活性カスパーゼ-3の免疫反応性を示したCA3ニューロンが、アポトーシスを起こしていることが確認された(パネルF)。カスパーゼにより媒介されるAPPタンパク質切断が*in vivo*で起こることをさらに確立するため、本発明者らは、短時間の全体的虚血により生じたアポトーシス性のCA1ニューロン死にも、 $C - APP$ の産生の増加が伴うか否かを決定した(図5G~L)。偽の外科的手法を受けたラットのCA1野には、基底 $C^{CSp} - APP$ 免疫反応性が観察されなかったが(パネルG)、12分間の4血管閉塞により生じた一時的な全体的虚血の24時間後には、脆弱なCA1ニューロンに $C^{CSp} - APP$ 免疫反応性が明確に可視となった(パネルH)。48時間目には、 $C^{CSp} - APP$ 免疫標識は、24時間の時点と比較して、より強くなり(パネルI)、72時間後には、少数の残存CA1ニューロンにのみ免疫反応性が見られた(パネルJ)。この短時間の全体的虚血の後のCA1ニューロンにおいて、活性カスパーゼ-3免疫反応性及び $C^{CSp} - APP$ 免疫反応性の生成のタイムコースは類似していた(データは示していない)。CA1ニューロンが一時的な全体的虚血の後にアポトーシスを起こすことを示している以前の所見と一致して、CA1ニューロンにおいてはTUNEL標識が上昇していた(パネルK)。高倍率においては、瀕死のCA1ニューロンの樹状突起にも細胞体にも $C^{CSp} - APP$ 免疫反応性が明白であった(パネルL)。総合すると、これらの結果は、興奮毒性又は虚血いずれかによる損

傷により生じた齧歯類の海馬におけるニューロン・アポトーシスが、C - A P P形成の上昇と関連していることを示している。C - A P P断片がカスパーゼにより媒介されるA P Pタンパク質切断に由来することを示している本発明者らの*in vitro*の所見と一致して、*in vivo*におけるC - A P P産生の増加は、アポトーシス・ニューロンにおける活性カスパーゼ - 3の生成に伴っていた。急性脳損傷後の、カスパーゼにより媒介されるA P Pプロセシングの改変は、ヒト患者においても、アルツハイマー病感受性の増加の原因の一部であるかもしれない。

カスパーゼにより切断されたA P Pは、ヒト・アルツハイマー脳における老人斑と共存している。

【0125】

カスパーゼにより媒介されるA P Pの切断と老人斑形成との関連を、後期アルツハイマー病と診断されたヒト患者において調査した(図6)。老人斑及びC^{CS}P - A P P免疫反応性は、アルツハイマー病を患っていない、年齢がマッチした対照患者には稀にしか観察されなかった。対照的に、アルツハイマー病を患う患者からの海馬切片には、多数のアミロイド - 陽性斑が観察され(パネルB)、老人斑にはC^{CS}P - A P P免疫反応性が高頻度に観察された(> 90%) (パネルA)。これらの沈積物は、斑点状の様相を有し、老人斑内に局在していた(パネルC)。しかしながら、C^{CS}P - A P P免疫反応性が局在している細胞の表現型を、形態学的に定義することは不可能であった。これらの所見は、カスパーゼにより生成するC - A P Pが斑形成に寄与するという仮説と一致している。

【0126】

カスパーゼにより媒介されるA P Pタンパク質切断は、ニューロン細胞におけるアミロイド - ペプチド形成の速度を増加させる。

【0127】

A P Pは*in vivo*でニューロン損傷中にカスパーゼにより切断されるため、本発明者らは、次に、これがA ペプチド形成に至る内因性A P Pプロセシング経路に対する効果を有するか否かを決定した。これは、D⁷²⁰部位におけ

るカスパーゼによるタンパク質分解の産物に相当するC末端短縮APP構築物(C-APP)を保持する、安定的にトランスフェクトされたB103細胞において試験された(図7)。これらの細胞からのAβペプチド産生は、全長APPで安定的にトランスフェクトされ、同等レベルの全長APPを発現する細胞と比較して5倍上昇した(20hにおけるカラム2対1、48hにおける4対3)。この効果の一つの可能な説明は、カスパーゼによるタンパク質分解がAPPからのAβ切り出しの直接の原因ではないとすると、カスパーゼによるタンパク質分解は正常な内因性のAPP代謝への混入物であり、おそらく完全APPポリペプチドのC末端に含まれる重要な相互作用ドメインの分離により、短縮された分子は、アミロイド生成経路により代謝される傾向が高くなるというものである(図3Bに要約されている)。例えば、X11のShc様PTBドメインは、APPのC末端にあるNPTYモチーフと相互作用し、APPと結合しAPPプロセッシングを遅延させることによりAβペプチド形成を減少させることが、最近証明されている(Borgら., 1998)。APPのC末端のこれ及びその他の重要成分の除去が、アミロイド生成経路による細胞分解経路にバイアスをかけるという可能性が高い(Russoら., 1998)。

【0128】

APPの「スウェーデン型(Swedish)」家族性突然変異は、 β -セクレターゼ(secretase)領域内の不十分なカスパーゼ・コンセンサス部位を改善する

APPポリペプチドに含まれる3つのカスパーゼ切断部位(主なプロセッシング部位はAsp⁷²⁰である)(図3B)に加え、少なくとも1つの証明された家族性アルツハイマー病(FAD)突然変異が、付加的なカスパーゼ感受性部位を分子に導入する。APPの「スウェーデン型」突然変異は、早期の発症及び4kDaのアミロイド生成Aβペプチドの産生の上昇を有する遺伝型アルツハイマー病と関連している(Caiら., 1993; Citronら., 1992; Haassら., 1995; Holcombら., 1998)。その突然変異は、 β -セクレターゼ部位におけるVKMD⁶⁵³配列(APP⁶⁵⁰~APP⁶⁵³に相当するアミノ酸残基)を、実質的に改善されたカスパーゼ認識因子を有する

モチーフであるVNLD⁶⁵³に変化させる。特に、「スウェーデン型」突然変異は、本発明者らのポジショナル・スキャニング・コンビナトリアル基質ライブラリー(Thornberryら, 1997)により予測されたように、III群カスパーゼ、特にカスパーゼ-6により優先的に認識されるであろう部位を生成させる。この可能性を試験するため、野生型配列及び「スウェーデン型」配列に相当する蛍光原性テトラペプチドを合成し、組換えカスパーゼ-6により切断される能力について試験した。VNLD-AMC(スウェーデン型)の*in vitro*切断は、コンビナトリアル・ライブラリーにより予測された最適なカスパーゼ-6一次認識配列を含有するペプチドVEHD-AMCよりは低かったが、VKMD-AMC(野生型)蛍光原性ペプチドよりも顕著に高かった(図8A)。アポトーシス細胞からのサイトゾル抽出物及び組換えカスパーゼ-6を用いた全長APPポリペプチドに関する差違が生じた(図8B)。いずれの場合にも、「スウェーデン型」突然変異は、 -セクレターゼ部位におけるタンパク質分解の速度を加速し(カラム3&4)、この分解はカスパーゼ認識にとって必須のP₁ Aspの突然変異(D⁶⁵³A)により完全に消失した(カラム5&6)。アポトーシス細胞抽出物において観察された 切断活性がカスパーゼ-6に起因するという可能性は、III群カスパーゼ(カスパーゼ-6を含む)が原因であることと一致する、その阻害剤プロファイル(Ac-IETD-CHOの効力>Ac-DEV D-CHO>Ac-YVAD-CHO)により支持された(示していない)。カスパーゼ-6により媒介される -セクレターゼ部位のタンパク質分解の速度の測定(図8C)により、「スウェーデン型」突然変異が、APPポリペプチド内のカスパーゼ-6部位として、それを3倍改善することが示された(野生型APPについては $k_{cat}/K_m = 0.8 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、 「スウェーデン型」突然変異を含有するAPPについては $k_{cat}/K_m = 2.2 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$)。野生型APPも、「スウェーデン型」突然変異を含有するAPPも、カスパーゼ-1、-3、-7及び-8、又はグランザイムBのような他のカスパーゼによっては、この部位において切断され得なかったことから(示していない)、このイベントがカスパーゼ-6に限定されていることが示された。

【0129】

アミロイド - ペプチド形成の増強が、APPの「スウェーデン型」突然変異を保持する細胞において起こり、それは、 - セクレターゼ部位におけるカスパーゼによるタンパク質切断に依存している。

【0130】

安定的にトランスフェクトされたK562細胞における「スウェーデン型」突然変異の結果は、細胞によるアミロイド - ペプチド産生の実質的な上昇(図8D)を含め、以前に報告されたものと一致していた(Citronら., 1992; Citronら., 1995)。アミロイド生成4kDa A ペプチドの形成は、カスパーゼによるタンパク質分解にとって必要なP₁ Aspが - セクレターゼ領域から除去された「スウェーデン型」APPを含有するK562細胞において劇的に減少したが(D⁶⁵³A、レーン3対2、6対5)、3kDa

A ペプチドの形成は減少しなかった。A (1-40) サンドイッチELISAは、同一の結果(「スウェーデン型」突然変異を保持する細胞における実質的に上昇したA 産生(65 ± 4任意単位、それに対し野生型APPを保持する細胞におけるレベルは検出不可)及びP₁ D⁶⁵³A突然変異による減弱(16 ± 4任意単位))を与えた。類似の結果は、同構築物を発現するB103ニューロン細胞においても見られた(K562細胞で観察されたのと同様に、D⁶⁵³A細胞培養上清において、細胞内4kDa A ペプチド形成は排除されたが、<4kDaの細胞外A ペプチドを産生する別の切断(おそらく、以前に報告されたようなPhe⁶⁵⁶における切断(Citronら., 1995))が起こった(示していない))。総合すると、これらの所見は、APPの「スウェーデン型」突然変異を保持する細胞において起こるA 産生の増強にカスパーゼが直接関与していることを示している。その他の証拠も、カスパーゼ(特に、カスパーゼ-6)が、特に「スウェーデン型」アルツハイマー病突然変異において、 - セクレターゼ活性に寄与していることを支持している。第一に、A ペプチドのアミノ末端には不均一性が存在するが、生成するペプチドのうちの一部は、V(K又はN)(M又はL)D⁶⁵³/A⁶⁵⁴カスパーゼ-6部位における切断に相当している(Wangら., 1996)。第二に、 - セクレターゼ活性

を担う「主要プロテアーゼ」(Val⁶⁵⁰~Ala⁶⁵⁴と決定された)の最小認識領域を構成するAPP内のアミノ酸残基の分析は、P₄-P₁'カスパーゼ-6認識部位と正確に一致する(Citronら., 1995)。最後に、カスパーゼ-6は、ヒト・アルツハイマー脳試料(及び年齢がマッチした対照)の海馬及び前頭皮質に、イムノブロットングにより容易に検出されうるレベルで存在している(示していない)。集約すると、これらの所見は、 γ -セクレターゼ領域でのAPP切断におけるカスパーゼ-6の役割を支持しており、「スウェーデン型」家族性突然変異を有する患者においてA β ペプチド形成が上昇している理由となる、カスパーゼにより補助される機序を示唆している。

【0131】

カスパーゼは、アミロイド-前駆体タンパク質の複雑なタンパク質分解プロセシングに寄与しており、少なくとも2つの別々の機序によりアミロイド生成A β ペプチド形成に寄与していると考えられる。内因性カスパーゼ・コンセンサス部位((P₄)DNVD¹⁹⁷(P₁)/S、(P₄)DYAD²¹⁹(P₁)/G及び主要な(P₄)VEVD⁷²⁰(P₁)/A)におけるAPPの切断は、おそらく、A β ペプチドの形成又は蓄積を防止するであろうAPPの正常な細胞内プロセシングを妨害する。従って、感受性ニューロンにおいては、以下の工程によって、長期にわたり起こる「悪循環」が進行するのかもしれない。a)カスパーゼ-3により媒介されるC末端におけるAPPの短縮、b)残りのポリペプチドのアミロイド生成経路への分流の、正常APPプロセシングへの混入、c)A β により誘導されるニューロン・ストレスをもたらす、上昇したレベルの細胞毒性A β ペプチド種の生成、d)進行性の内因性カスパーゼのアップレギュレーション及び/又は活性化、並びにe)悪化したAPPタンパク質切断。さらに、さらなるAPPをサイクルに投入する可能性がある、(カスパーゼ切断に対して感受性の)APPレベルの上昇が、瀕死の運動ニューロンにおいて報告されている(Barnesら., 1998)。カスパーゼ・プロ酵素は、成熟カウンターパートと比較すると低レベルではあるが、触媒能を有するため、このサイクルが進行するためにアポトーシス開始イベントは必ずしも必要でない(Muzioら., 1998; Srinivasularaら., 1998; Yangら., 19

98)。第二の機序は、 - セクレターゼ領域におけるカスパーゼ - 6 により媒介されるタンパク質分解を含んでいる。その過程は、この酵素に対する感受性を改善する「スウェーデン型」ジペプチド突然変異のような、この部位における残基変化により加速される。カスパーゼは、APP切断に加え、別のプレセニリン (presenilin) タンパク質分解にも関与していることが最近示されている (Kimら., 1997; Vitoら., 1997)。従って、カスパーゼは、アルツハイマー病における神経毒性Aβペプチドの生成にも、アポトーシスによる最終的なニューロン死にも、重要な役割を果たしている可能性がある。

【0132】

【表1】

References

- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature [letter]. *Cell* 87, 171.
- Barnes, N. Y., Li, L., Yoshikawa, K., Schwartz, L. M., Oppenheim, R. W., and Milligan, C. E. (1998). Increased production of amyloid precursor protein provides a substrate for caspase-3 in dying motoneurons. *J Neurosci* 18, 5869-80.
- Black, S. C., Huang, J. Q., Rezaiefar, P., Radinovic, S., Eberhart, A., Nicholson, D. W., and Rodger, I. W. (1998). Co-localization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 30, 733-42.
- Borg, J. P., Yang, Y., De Taddeo-Borg, M., Margolis, B., and Turner, R. S. (1998). The X11alpha protein slows cellular amyloid precursor protein processing and reduces Abeta40 and Abeta42 secretion. *J Biol Chem* 273, 14761-6.
- Cai, X. D., Golde, T. E., and Younkin, S. G. (1993). Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* 259, 514-6.
- Carroll, R.T, Lust, M.R., Kim, K.S., Doyle, P.D. and Emmering, M.R. (1995). An age-related correlation between levels of beta-amyloid precursor protein and beta-amyloid in human cerebrospinal fluid. *Biochem Biophys Res Commun* 210,345-349
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D. J. (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360, 672-4.

- Citron, M., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1995). Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* 14, 661-70.
- Cotman, C. W., and Su, J. H. (1996). Mechanisms of neuronal death in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 6, 493-506.
- Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E. S. (1994). CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta- converting enzyme. *J Biol Chem* 269, 30761-4.
- Fukuchi, K., Ho, L., Younkin, S.G., Kunkel, D.D., Ogburn, C.E., LeBoeuf, R.C., Furlong, C.E., Deeb, S.S., Nochlin, D., Wegiel, J., Wisniewski, H.M. (1996). High levels of circulating beta-amyloid peptide do not cause cerebral beta-amyloidosis in transgenic mice. *Am J Pathol* 149, 219-227
- Forloni, G., Bugiani, O., Tagliavini, F., and Salmona, M. (1996). Apoptosis-mediated neurotoxicity induced by beta-amyloid and PrP fragments. *Mol Chem Neuropathol* 28, 163-71.
- Garcia-Calvo, M., Peterson, E. P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D. W., and Thornberry, N. A. (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* 273, 32608-13.
- Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L., and Selkoe, D. J. (1995). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta- secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med* 1, 1291-6.
- Haass, C., and Selkoe, D. J. (1993). Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 75, 1039-42.
- Holcomb, L., Gordon, M. N., McGowan, E., Yu, X., Benkovic, S., Jantzen, P., Wright, K., Saad, I., Mueller, R., Morgan, D., Sanders, S., Zehr, C., O'Campo, K., Hardy, J., Prada, C. M., Eckman, C., Younkin, S., Hsiao, K., and Duff, K. (1998).

Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* 4, 97-100.

Kim, T. W., Pettingell, W. H., Jung, Y. K., Kovacs, D. M., and Tanzi, R. E. (1997). Alternative Cleavage of Alzheimer-Associated Presenilins During Apoptosis by a Caspase-3 Family Protease. *Science* 277, 373-6.

Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., and Flavell, R. A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32- deficient mice. *Nature* 384, 368-72.

LaFerla, F. M., Tinkle, B. T., Bieberich, C. J., Haudenschild, C. C., and Jay, G. (1995). The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nat Genet* 9, 21-30.

LeBlanc, A. (1995). Increased production of 4 kDa amyloid beta peptide in serum deprived human primary neuron cultures: possible involvement of apoptosis. *J Neurosci* 15, 7837-46.

LeBlanc, A. C., Xue, R., and Gambetti, P. (1996). Amyloid precursor protein metabolism in primary cell cultures of neurons, astrocytes, and microglia. *J Neurochem* 66, 2300-10.

Li, W. P., Chan, W. Y., Lai, H. W., and Yew, D. T. (1997). Terminal dUTP nick end labeling (TUNEL) positive cells in the different regions of the brain in normal aging and Alzheimer patients. *J Mol Neurosci* 8, 75-82.

Loo, D. T., Copani, A., Pike, C. J., Whittemore, E. R., Walencewicz, A. J., and Cotman, C. W. (1993). Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7951-5.

Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273, 2926-30.

Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A., and et al. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376, 37-43.

Nicholson, D. W., and Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22, 299-306.

Pulsinelli, W. A., Brierley, J. B., and Plum, F. (1982). Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol* 11, 491-8.

Pulsinelli, W. A., and Buchan, A. M. (1988). The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* 19, 913-4.

Rano, T. A., Timkey, T., Peterson, E. P., Rotonda, J., Nicholson, D. W., Becker, J. W., Chapman, K. T., and Thornberry, N. A. (1997). A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE). *Chem Biol* 4, 149-55.

Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P., Thornberry, N. A., and Becker, J. W. (1996). The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 3, 619-25.

Russo, T., Faraonio, R., Minopoli, G., De Candia, P., De Renzis, S., and Zambrano, N. (1998). Fe65 and the protein network centered around the cytosolic domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *FEBS Lett* 434, 1-7.

Selkoe, D. J., Yamazaki, T., Citron, M., Podlisny, M. B., Koo, E. H., Teplow, D. B., and Haass, C. (1996). The role of APP processing and trafficking pathways in the formation of amyloid beta-protein. *Ann N Y Acad Sci* 777, 57-64.

Sisodia, S. S., and Price, D. L. (1995). Role of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Faseb J* 9, 366-70.

- Smale, G., Nichols, N. R., Brady, D. R., Finch, C. E., and Horton, W. E., Jr. (1995). Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 133, 225-30.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1, 949-57.
- Su, J. H., Deng, G., and Cotman, C. W. (1997). Bax protein expression is increased in Alzheimer's brain: correlations with DNA damage, Bcl-2 expression, and brain pathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 86-93.
- Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., Poirier, G. G., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1995). Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81, 801-9.
- Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T., and Nicholson, D. W. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17907-11.
- Vito, P., Ghayur, T., and D'Adamio, L. (1997). Generation of anti-apoptotic presenilin-2 polypeptides by alternative transcription, proteolysis, and caspase-3 cleavage. *J Biol Chem* 272, 28315-20.
- Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S. E., and Sisodia, S. S. (1996). The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry. *J Biol Chem* 271, 31894-902.
- Xu, D. G., Crocker, S. J., Doucet, J. P., St-Jean, M., Tamai, K., Hakim, A. M., Ikeda, J. E., Liston, P., Thompson, C. S., Korneluk, R. G., MacKenzie, A., and Robertson, G. S. (1997). Elevation of neuronal expression of NAIP reduces ischemic damage in the rat hippocampus. *Nat Med* 3, 997-1004.
- Yang, X., Chang, H. Y., and Baltimore, D. (1998). Autoproteolytic activation of procaspases by oligomerization. *Mol Cell* 1, 319-25.
- Zhang, L., Zhao, B., Yew, D. T., Kusiak, J. W., and Roth, G. S. (1997). Processing of Alzheimer's amyloid precursor protein during H₂O₂-induced apoptosis in human neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 235, 845-8.

All references cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety.

【 0 1 3 3 】

本明細書において引用された全ての参照が、参照として完全に本明細書に組み

込まれる。

【図面の簡単な説明】

【図1A】

カスパーゼ阻害が、アポトーシスを起こしたニューロン細胞における亢進したアミロイド - ペプチド産生を排除することを示す図である。

【図1B】

アポトーシス中のカスパーゼ関連APPタンパク質切断を示す図である。

【図1C】

アポトーシス細胞抽出物におけるII群カスパーゼによるアミロイド - 前駆体タンパク質のタンパク質分解を示す図である。

【図1D】

アポトーシス細胞抽出物におけるII群カスパーゼによるアミロイド - 前駆体タンパク質のタンパク質分解を示す図である。

【図1E】

組換えカスパーゼ - 3によるアミロイド - 前駆体タンパク質の分解を示す図である。

【図2A】

アルツハイマー脳海馬のCA3野の死滅しつつある錘体ニューロンにおける増加したカスパーゼ - 3免疫反応性を示す図である。年齢がマッチした神経学的に正常な個体からのパラフィン包埋切片を示す図である。

【図2B】

アルツハイマー脳海馬のCA3野の死滅しつつある錘体ニューロンにおける増加したカスパーゼ - 3免疫反応性を示す図である。アルツハイマー病患者からのパラフィン包埋切片を示す図である。

【図3A】

カスパーゼにより媒介されるアミロイド - 前駆体タンパク質のタンパク質切断の部位の同定及び突然変異による除去を示す図である。

【図3B】

他の構造的特徴との関係におけるアミロイド - 前駆体タンパク質内のカスバ

ーゼ切断部位の位置を示す図である。

【図4A】

アポトーシス中のインタクト細胞におけるアミロイド - 前駆体タンパク質のカスパーゼ依存的な切断、及びカスパーゼにより生成したC末端ネオ - エピトープの *in situ* 検出を示す図である。トランスフェクトされたB103細胞におけるアポトーシス中のAPPのC末端切断を示す図である。

【図4B】

アポトーシス中のインタクト細胞におけるアミロイド - 前駆体タンパク質のカスパーゼ依存的な切断、及びカスパーゼにより生成したC末端ネオ - エピトープの *in situ* 検出を示す図である。カスパーゼにより生成したAPPネオ - エピトープの、 C^{CSP} - APPによる特異的認識を示す図である。

【図4C】

アポトーシス中のインタクト細胞におけるアミロイド - 前駆体タンパク質のカスパーゼ依存的な切断、及びカスパーゼにより生成したC末端ネオ - エピトープの *in situ* 検出を示す図である。トランスフェクトされたB103細胞におけるアポトーシス中のAPPのC末端切断を示す図である。

【図4D】

NT2細胞アポトーシス中のカスパーゼにより生成したC - APPネオ - エピトープの *in situ* 検出を示す図である。

【図4E】

NT2細胞アポトーシス中のカスパーゼにより生成したC - APPネオ - エピトープの *in situ* 検出を示す図である。

【図4F】

NT2細胞アポトーシス中のカスパーゼにより生成したC - APPネオ - エピトープの *in situ* 検出を示す図である。

【図4G】

NT2細胞アポトーシス中のカスパーゼにより生成したC - APPネオ - エピトープの *in situ* 検出を示す図である。

【図4H】

NT2細胞アポトーシス中のカスパーゼにより生成した C - A P Pネオ - エ
ピトープの *i n s i t u* 検出を示す図である。

【図4 I】

NT2細胞アポトーシス中のカスパーゼにより生成した C - A P Pネオ - エ
ピトープの *i n s i t u* 検出を示す図である。

【図5 A】

S V 1 2 9 マウスにおける興奮毒性による損傷を示す図である。

【図5 B】

S V 1 2 9 マウスにおける興奮毒性による損傷を示す図である。

【図5 C】

S V 1 2 9 マウスにおける興奮毒性による損傷を示す図である。

【図5 D】

S V 1 2 9 マウスにおける興奮毒性による損傷を示す図である。

【図5 E】

S V 1 2 9 マウスにおける興奮毒性による損傷を示す図である。

【図5 F】

S V 1 2 9 マウスにおける興奮毒性による損傷を示す図である。

【図5 G】

虚血による損傷の効果を示す図である。

【図5 H】

虚血による損傷の効果を示す図である。

【図5 I】

虚血による損傷の効果を示す図である。

【図5 J】

虚血による損傷の効果を示す図である。

【図5 K】

虚血による損傷の効果を示す図である。

【図5 L】

虚血による損傷の効果を示す図である。

【図6A】

老人斑内の C - A P P と アミロイド - の共存を示す図である。(B)に示されたのと同じ海馬の範囲における C^{SP} - A P P 免疫反応性により可視化された C - A P P を示す図である。

【図6B】

老人斑内の C - A P P と アミロイド - の共存を示す図である。アルツハイマー病と診断された患者の海馬におけるアミロイド - 免疫反応性(矢印)により同定された老人斑を示す図である。

【図6C】

老人斑内の C - A P P と アミロイド - の共存を示す図である。一致する場合には黄色を与える、カスパーゼにより生成した A P P ネオ - エピトープ(赤)と A (緑)との合成像であり、C - A P P と アミロイド - 免疫反応性との高度の重複を図示している。

【図7】

カスパーゼにより媒介される A P P 生成が、アミロイド - ペプチド形成を上昇させることを示す図である。比較可能なレベルの全長 A P P (w t、カラム1 & 3)又は A₁a⁷²¹ ~ A_sn⁷⁵¹ (A_sp⁷²⁰カスパーゼ切断部位の後)の C 末端残基 (C - A P P、カラム2 & 4) を欠く A P P を発現する、図4Aについて記載された B 1 0 3 安定細胞系を、新鮮な培地中で 2 0 又は 4 8 時間培養した後、モノクローナル抗体を用いたイムノアッセイにより、培養培地中の A ペプチド・レベルを定量した。代表的な実験 (n = 4) ± S D が示されている。

【図8A】

「スウェーデン型」家族性突然変異が、カスパーゼ - 6 基質としての A P P の - セクレターゼ標的領域を改善することを示す図である。A P P の - セクレターゼ標的領域の V K M D⁶⁵³ / A⁶⁵⁴ (V K M D - A M C、 ; 図3Bを参照)、「スウェーデン型」ジペプチド突然変異 (V N L D - A M C、) 又はポジショナル・スキャニング・コンビナトリアル基質ライブラリーにより予測されたカスパーゼ - 6 のための最適なテトラペプチド (V E H D - A M C、) の

いずれかに相当するよう合成された蛍光原性テトラペプチド - アミノメチルクマリンを示す図である。

【図8B】

「スウェーデン型」家族性突然変異が、カスパーゼ - 6 基質としてのAPPの - セクレターゼ標的領域を改善することを示す図である。N末端カスパーゼ切断部位を除去し (N - APP)、次いで野生型 - セクレターゼ領域 (VKMD⁶⁵³ / A⁶⁵⁴ ; カラム1 & 2)、 「スウェーデン型」突然変異 (VNLD⁶⁵³ / A⁶⁵⁴ ; カラム3 & 4) 又はカスパーゼ認識にとって必須のP₁ A s pがAlaに変化している「スウェーデン型」突然変異 (VNLA⁶⁵³ / A⁶⁵⁴ ; カラム5 & 6) のいずれかを含有するよう操作されたAPP構築物の効果を示す図である。

【図8C】

「スウェーデン型」家族性突然変異が、カスパーゼ - 6 基質としてのAPPの - セクレターゼ標的領域を改善することを示す図である。切断の測定を示す図である。

【図8D】

「スウェーデン型」家族性突然変異が、カスパーゼ - 6 基質としてのAPPの - セクレターゼ標的領域を改善することを示す図である。野生型VKMD⁶⁵³ / A⁶⁵⁴部位、「スウェーデン型」突然変異 (VNLD⁶⁵³ / A⁶⁵⁴) 又はP₁ A s pがAlaに変化している「スウェーデン型」突然変異 (VNLA⁶⁵³ / A⁶⁵⁴) を有する全長APPを保持するよう生成させた安定K562細胞系における免疫反応性産物を示す図である。

【図1A】

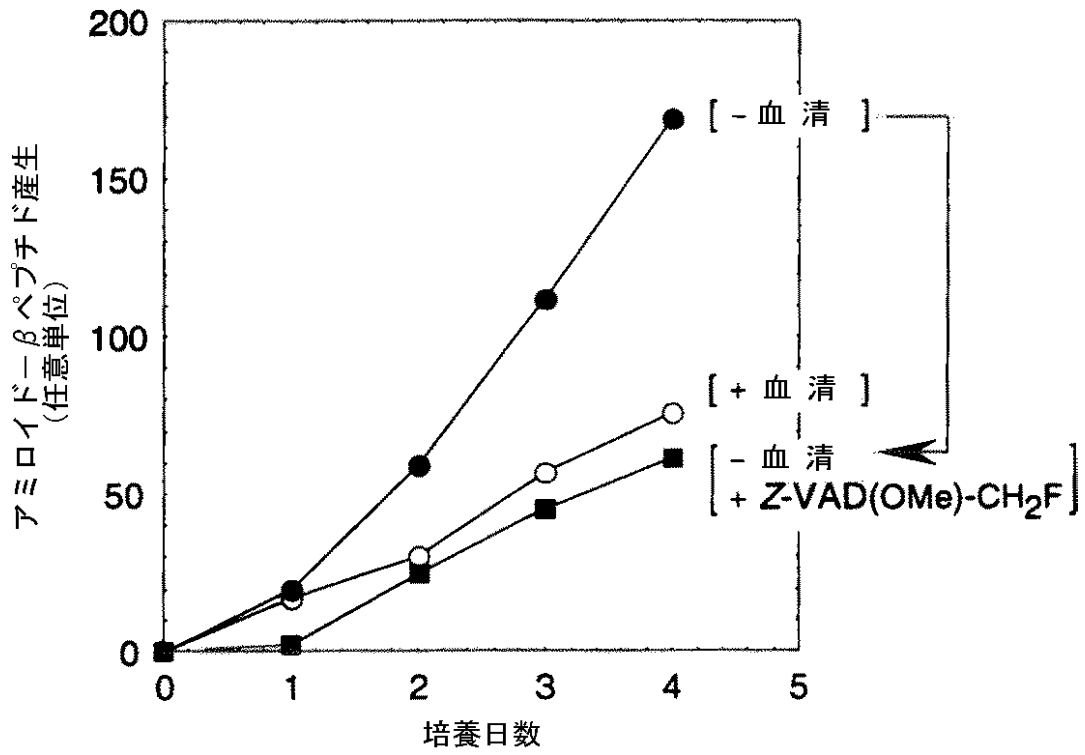


FIG.1A

【図1B】

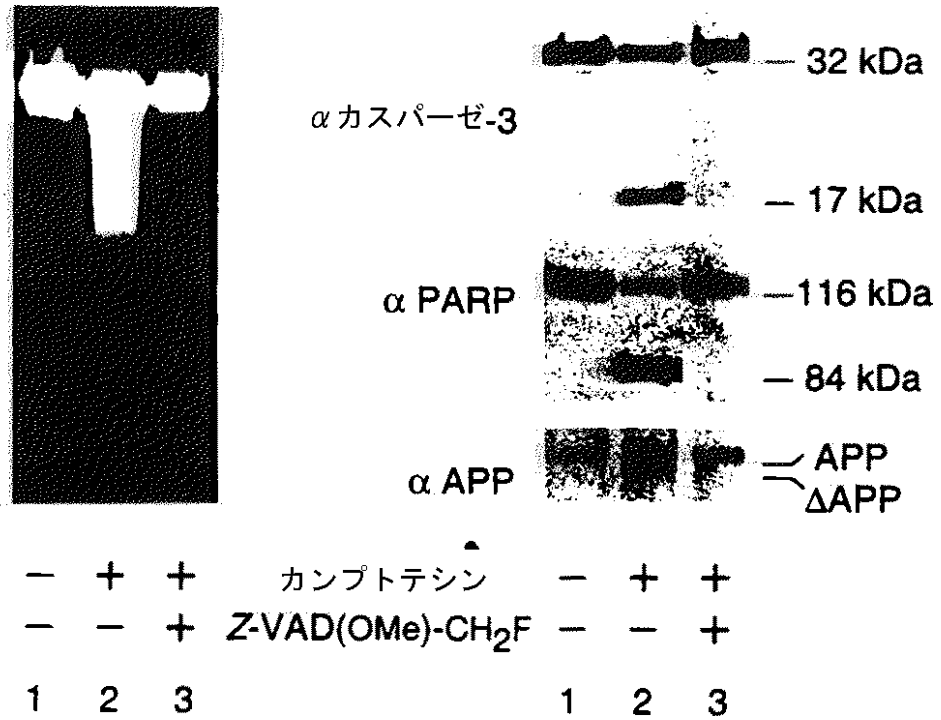


FIG.1B

【図1C】



FIG. 1C

【図1D】

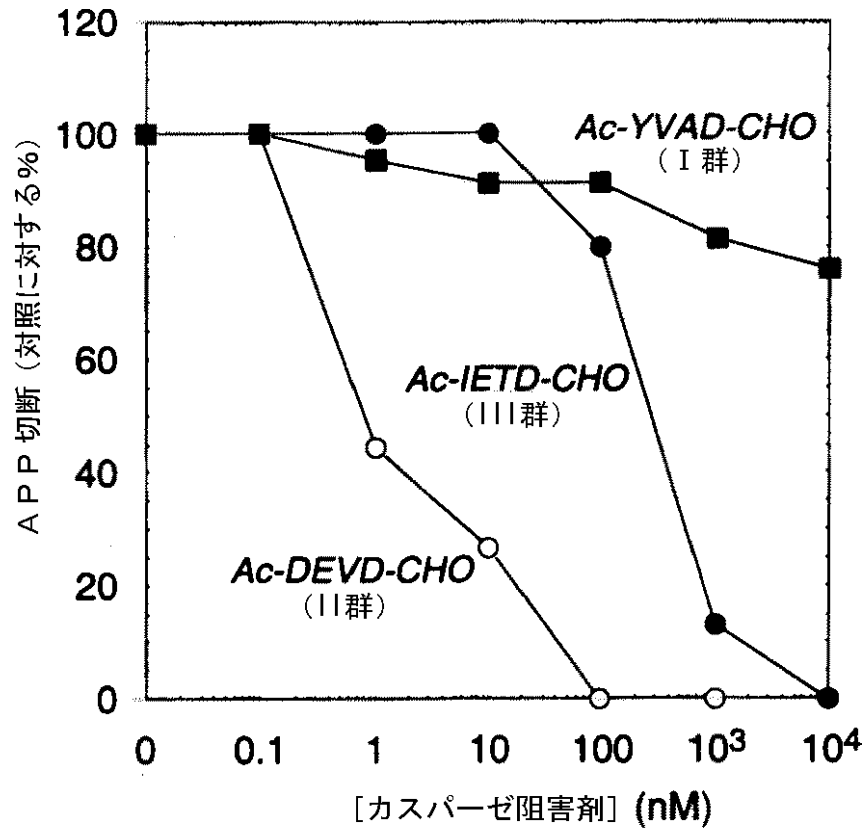
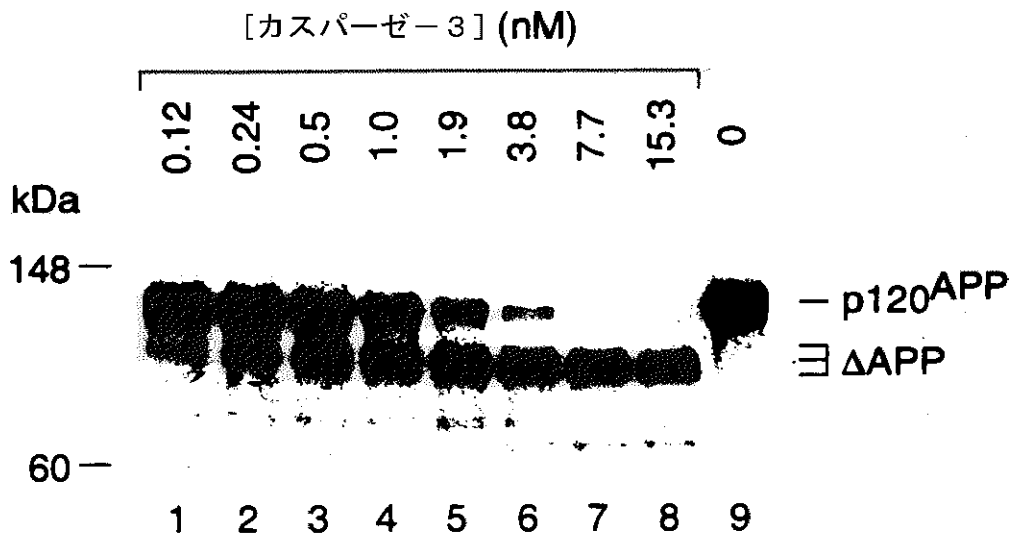


FIG.1D

【図1E】



$$k_{cat}/K_m = 5.14 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$$

FIG.1E

【図2A】



FIG.2A

【図2B】



FIG.2B

【図3A】

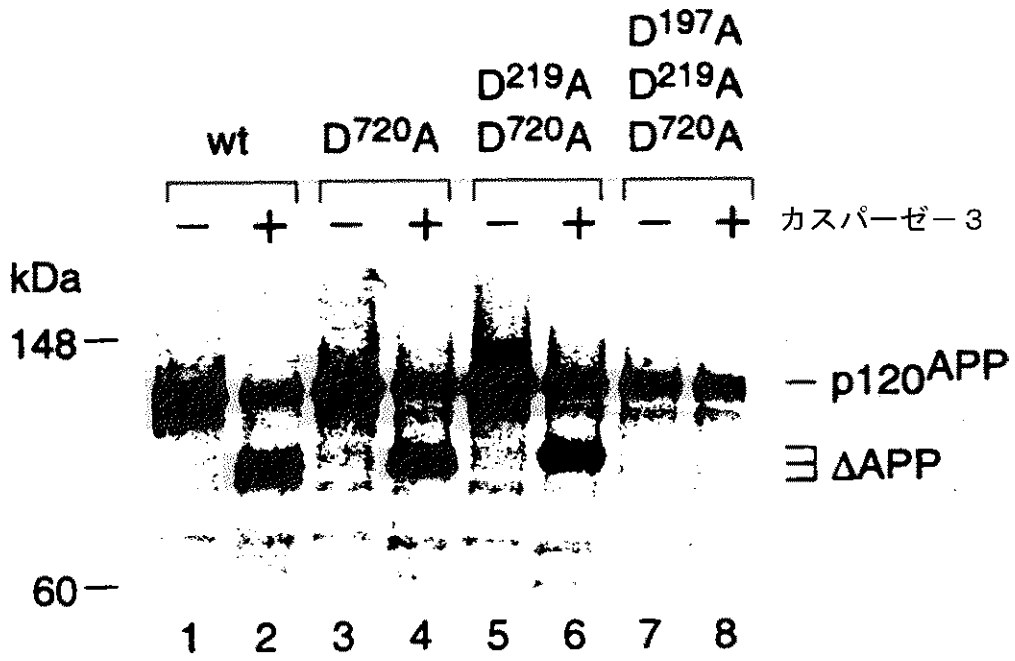


FIG.3A

【図3B】

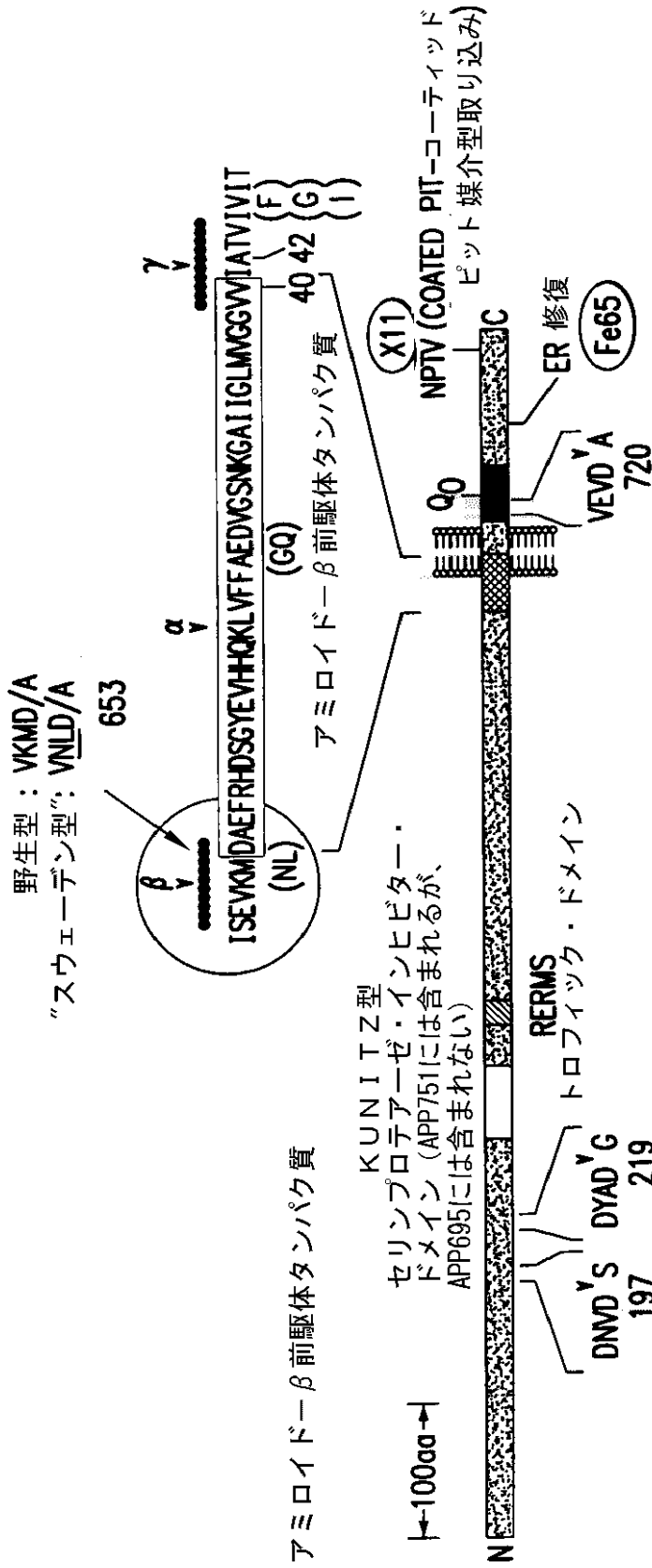


FIG. 3B

【図4A】

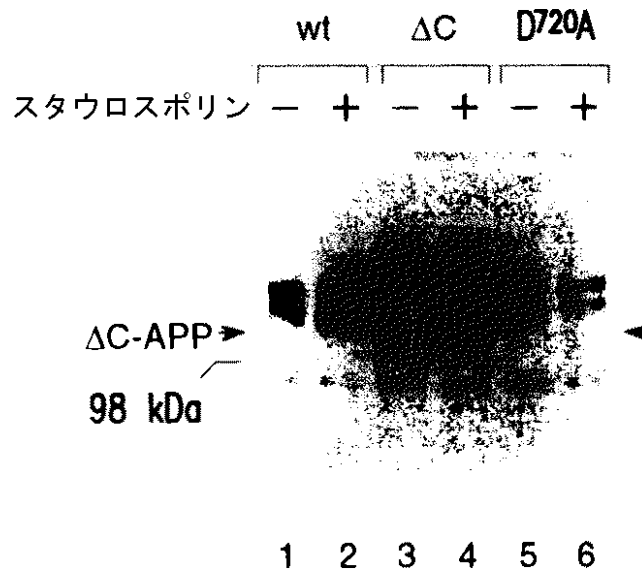


FIG.4A

【図4B】

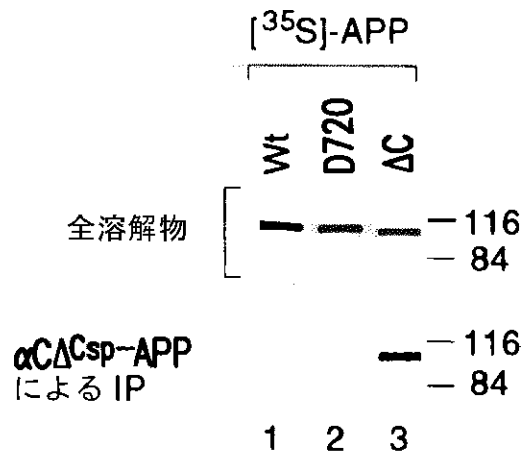


FIG.4B

【図4C】

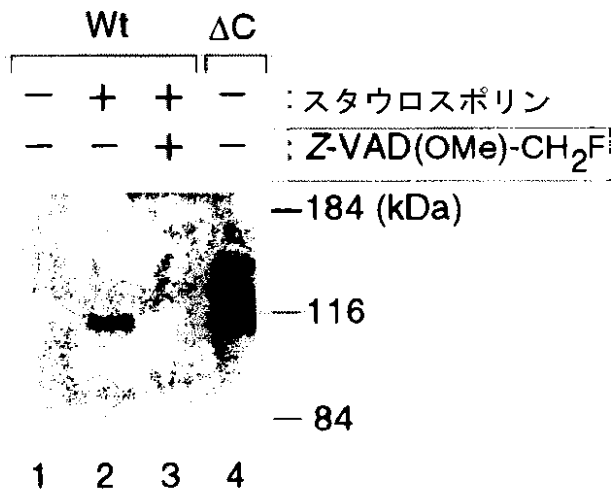


FIG.4C

【図4D】

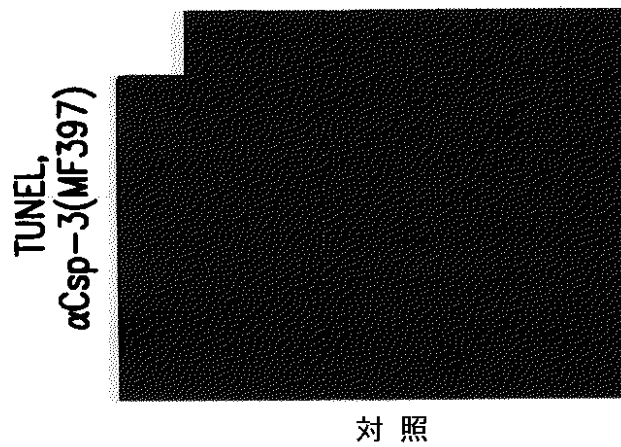


FIG.4D

【図4E】

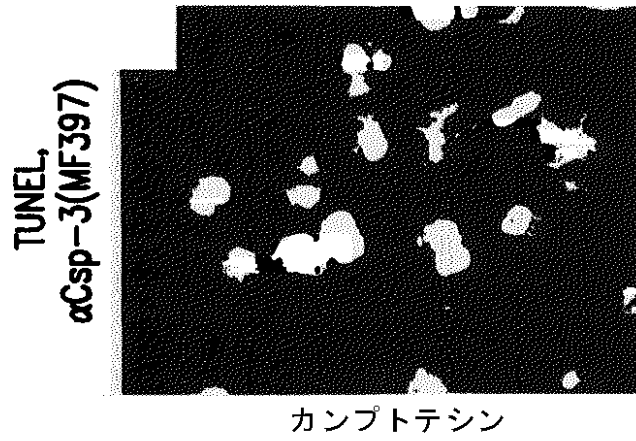


FIG.4E

【図4F】

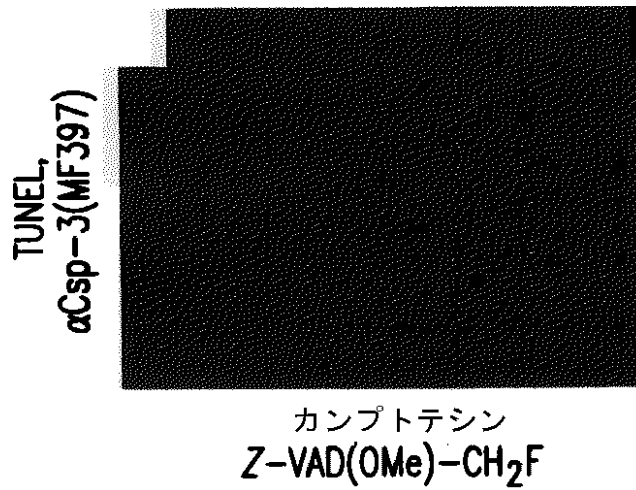


FIG.4F

【図4G】

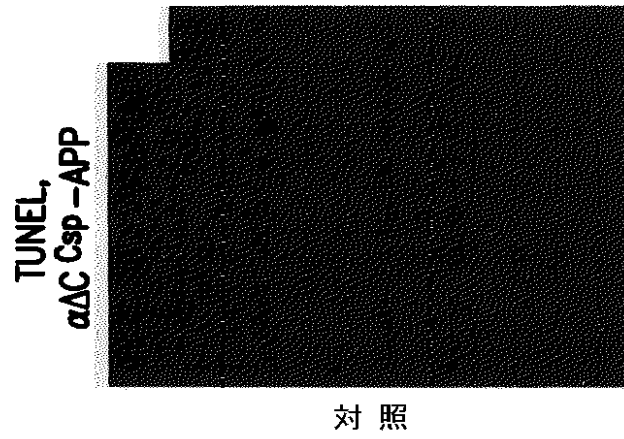


FIG.4G

【図4H】

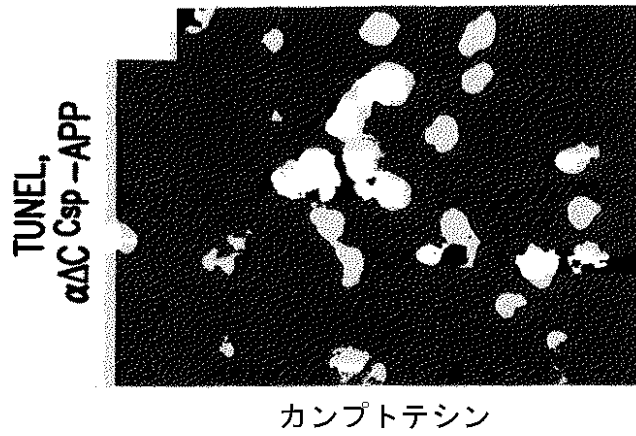
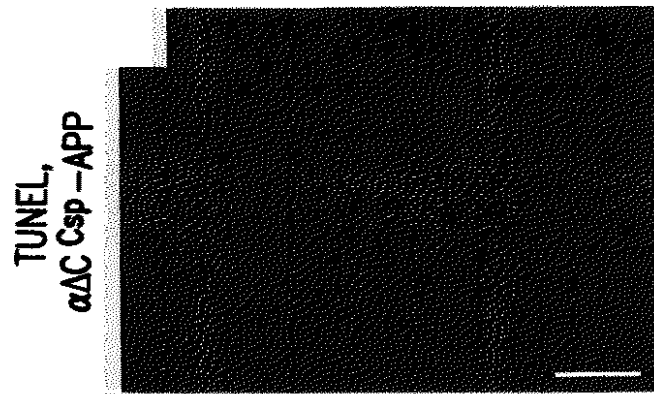


FIG.4H

【図4I】



カンプトテシン
Z-VAD(OMe)-CH₂F
FIG.4I

【図5A】

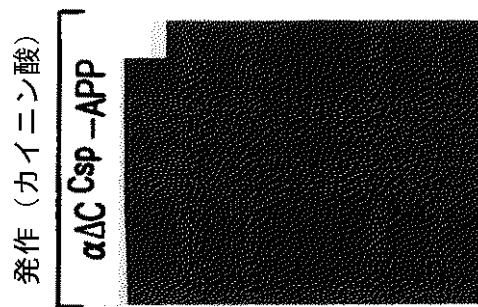


FIG.5A

【図5B】

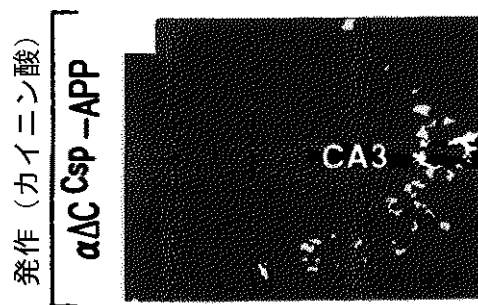


FIG.5B

【図5C】

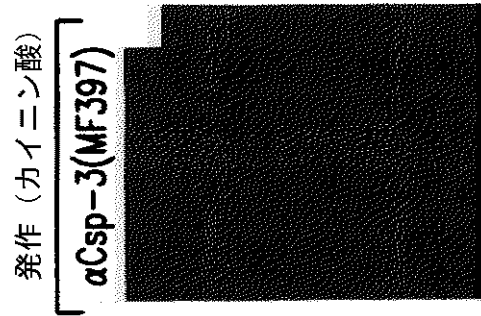


FIG.5C

【図5D】

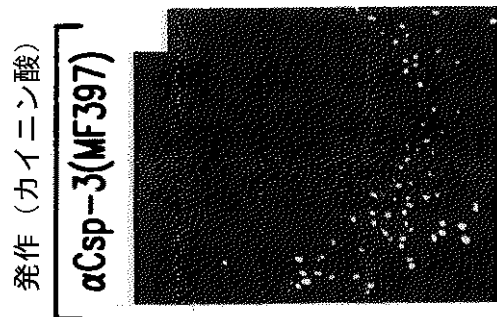


FIG.5D

【図5E】

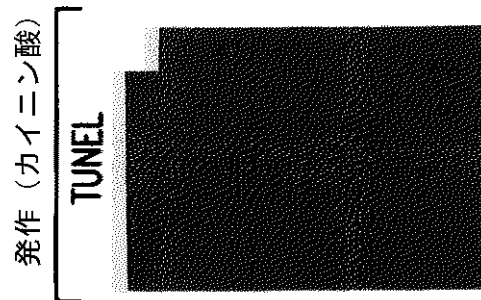


FIG.5E

【図5F】

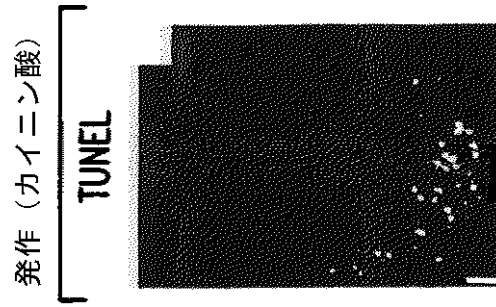


FIG.5F

【図5G】

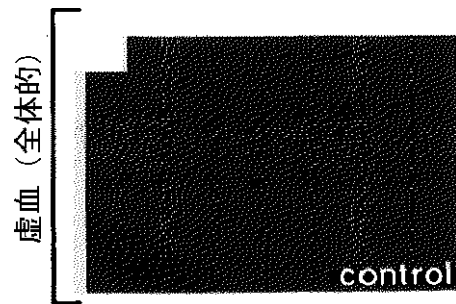


FIG.5G

【図5H】

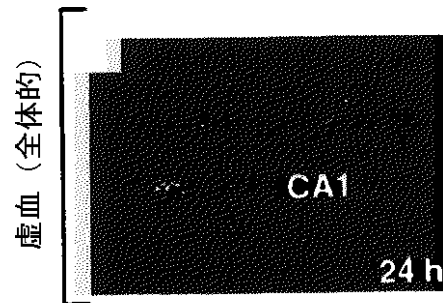


FIG.5H

【図5I】

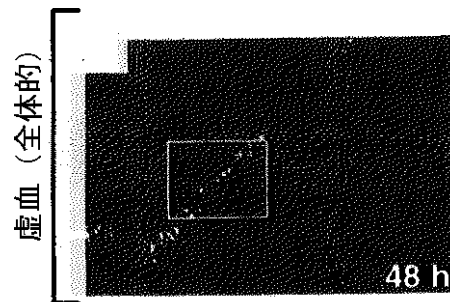


FIG.5I

【图5J】

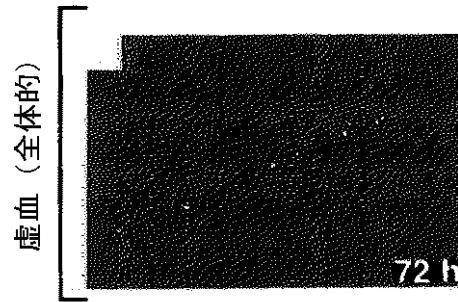


FIG.5J

【图5K】

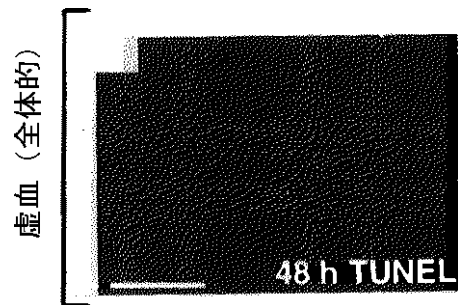


FIG.5K

【图5L】

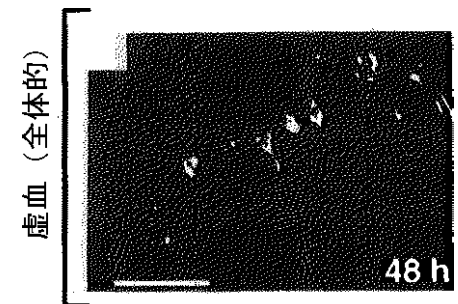


FIG.5L

【図6A】

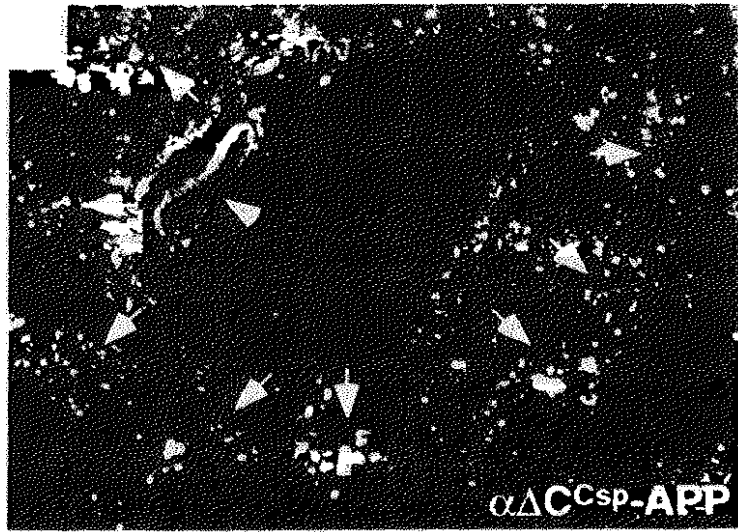


FIG.6A

【図6B】

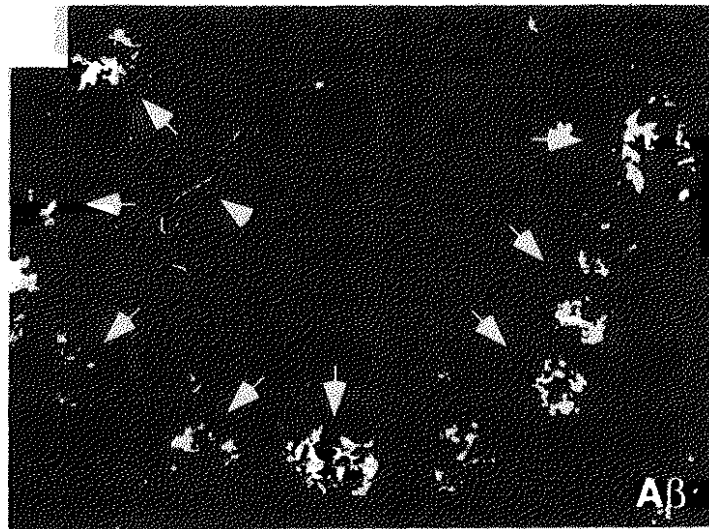


FIG.6B

【図6C】

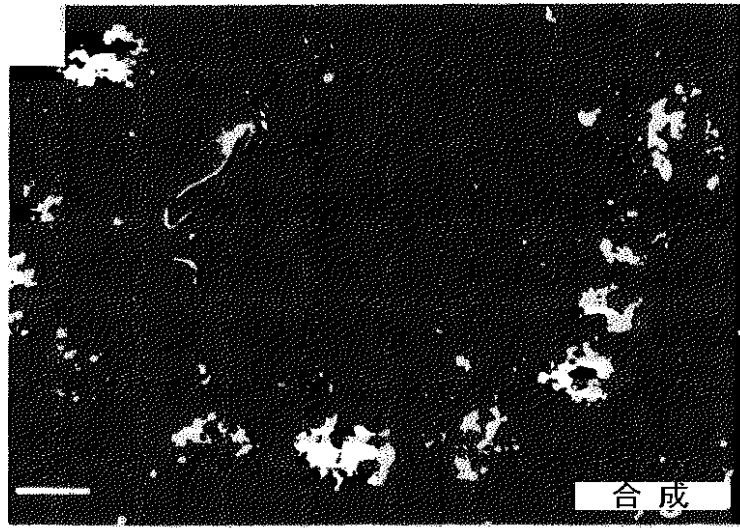


FIG.6C

【図7】

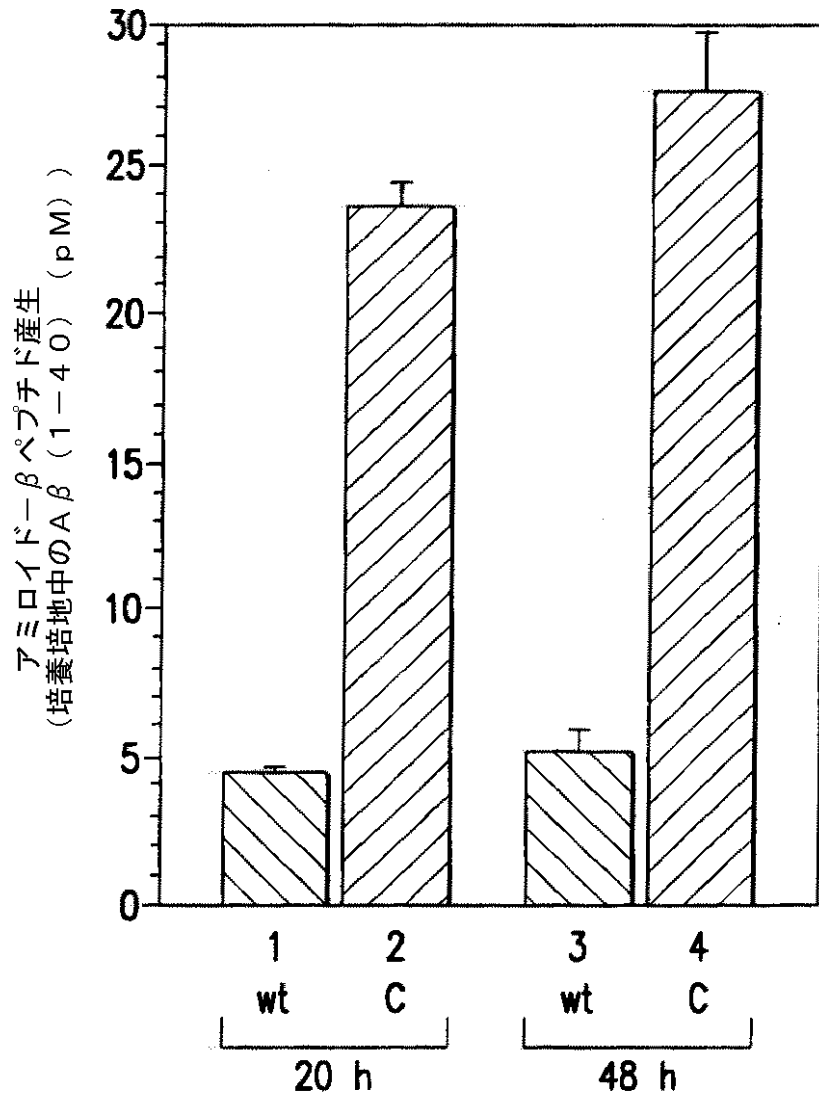


FIG.7

【図8A】

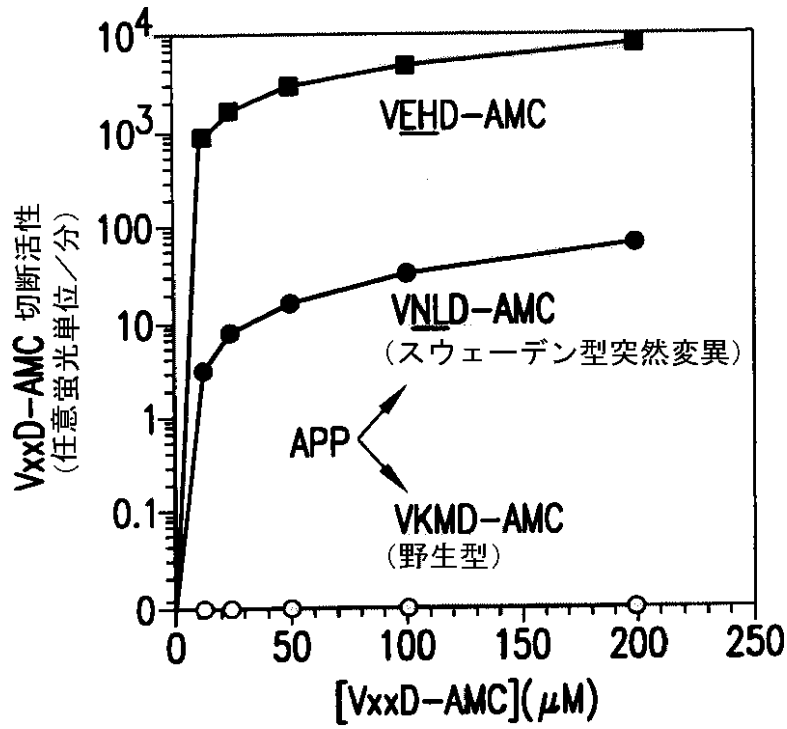


FIG.8A

【図8B】

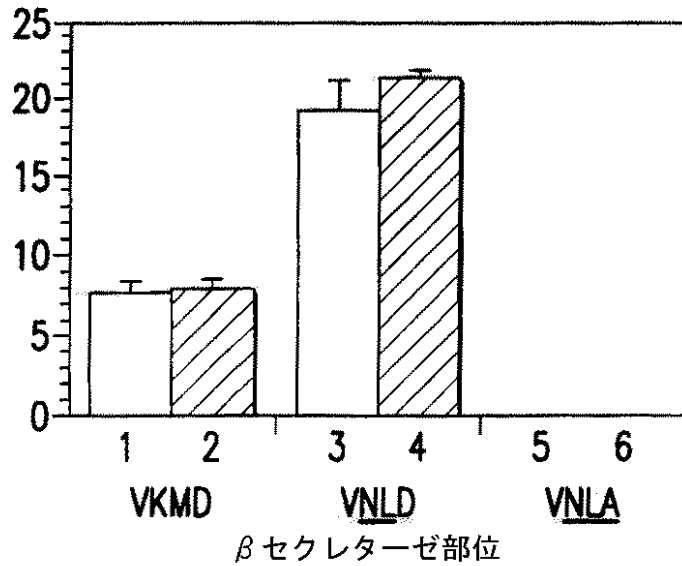


FIG.8B

【図8C】

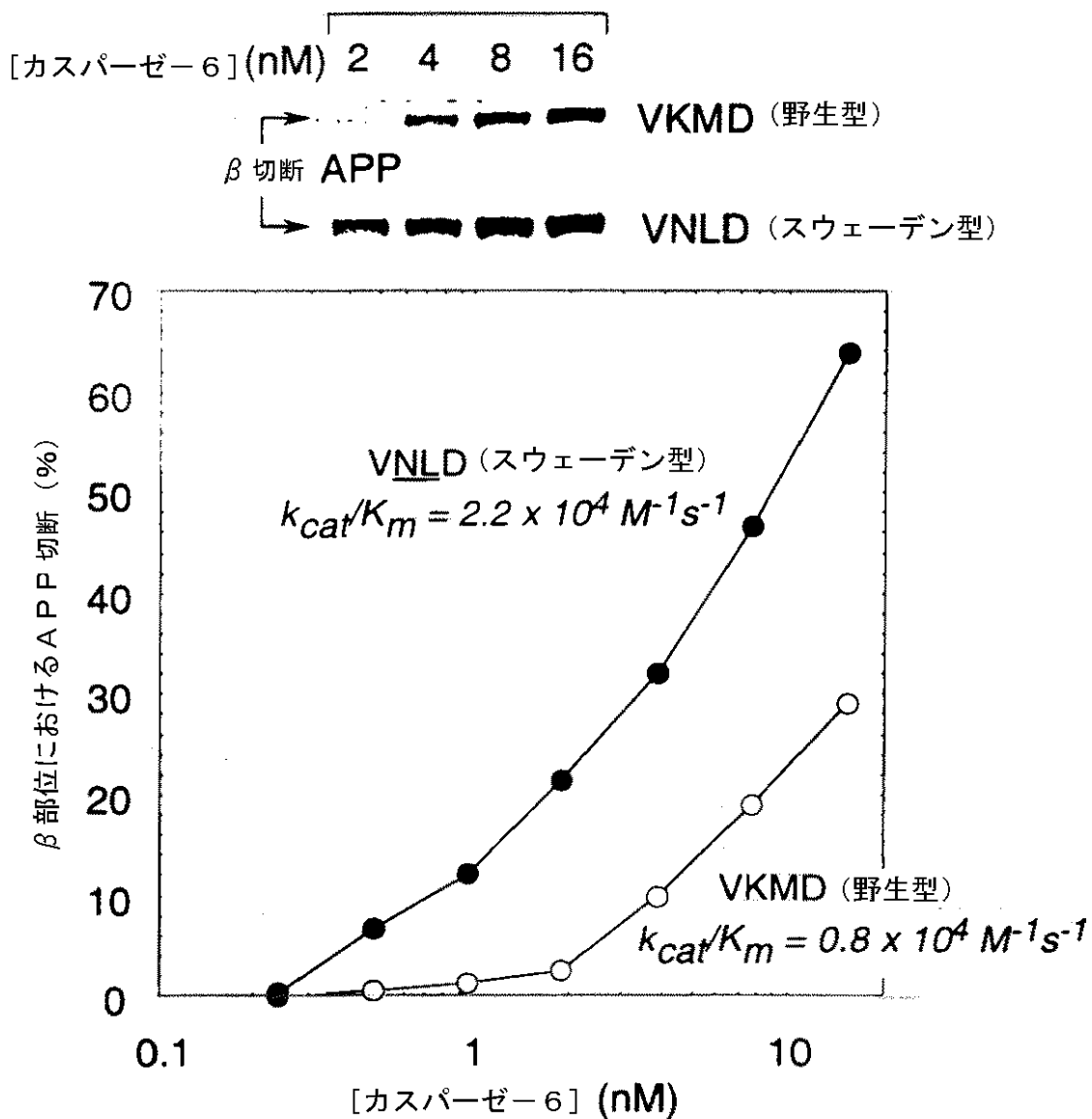


FIG.8C

【図8D】

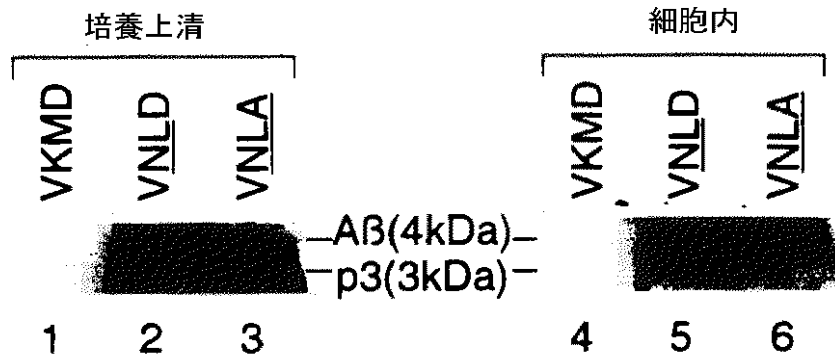


FIG.8D

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/CA 00/00414
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/18 G01N33/68 A61K39/00 C07K14/47		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EP0-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 21590 A (CEPHALON INC) 22 May 1998 (1998-05-22)	8
Y	abstract page 3, line 7 - line 16 page 4, line 15 - line 29 page 10, line 12 - line 27 page 14; example 1 ---	1-7,9-25
X	WO 98 52597 A (CHIRON CORP ;KOTHS KIRSTON (US); KOTHAKOTA SRINIVAS (US); REINHART) 26 November 1998 (1998-11-26)	8
Y	abstract page 3, paragraph 2 - paragraph 3 page 20, paragraph 2 -page 21, paragraph 1 --- -/--	1-7,9-25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 16 August 2000		Date of mailing of the international search report 15.09.00
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Montrone, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA 00/00414

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>GERVAIS F ET AL: "Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's beta amyloid precursor protein and amyloidogenic beta-peptide formation." SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 24, no. 1-2, 1998, page 206 XP000917593</p> <p>28th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Part 1; Los Angeles, California, USA; November 7-12, 1998 ISSN: 0190-5295 abstract</p>	1-7,9-25
Y	<p>WEIDEMANN ANDREAS ET AL: "Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein within its cytoplasmic domain by caspase-like proteases." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 9, 26 February 1999 (1999-02-26), pages 5823-5829, XP002145058 ISSN: 0021-9258 abstract figure 1 page 5825, column 1, paragraph 2 -page 5826, column 2, paragraph 2 page 5827, column 2, paragraph 3 -page 5828, column 1, paragraph 1</p>	1-7,9-25
Y	<p>BARNES N Y ET AL: "Caspase 3 cleaves amyloid precursor protein in dying motoneurons." SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 24, no. 1-2, 1998, page 1786 XP000917592</p> <p>28th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Part 2; Los Angeles, California, USA; November 7-12, 1998 ISSN: 0190-5295 abstract</p>	1-7,9-25
Y	<p>BARNES NATALIE Y ET AL: "Increased production of amyloid precursor protein provides a substrate for caspase-3 in dying motoneurons." JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 18, no. 15, 1 August 1998 (1998-08-01), pages 5869-5880, XP000917584 ISSN: 0270-6474 abstract page 5874, column 2, paragraph 2 -page 5875, column 1, paragraph 1 figure 7</p>	1-7,9-25
	---	-/--

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA 00/00414

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>THORNBERRY NANCY A ET AL: "A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B: Functional relationships established for key mediators of apoptosis." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 29, 1997, pages 17907-17911, XP002145059 ISSN: 0021-9258 abstract figures 1-3</p>	1-14
P, X	<p>GERVAIS FRANCOIS G ET AL: "Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic Abeta peptide formation." CELL, vol. 97, no. 3, 30 April 1999 (1999-04-30), pages 395-406, XP000919376 ISSN: 0092-8674 abstract page 398, column 1, paragraph 2 -page 401, column 1, paragraph 1 figure 4 page 401, column 2, paragraph 4 -page 403, column 1, paragraph 1 figure 8 page 404, column 1, paragraph 2</p>	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA 00/00414**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 15 to 22 (partially) are directed to a method of treatment or surgery of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CA 00/00414

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9821590 A	22-05-1998	US 6048703 A	11-04-2000
		AU 5169998 A	03-06-1998
		EP 0975971 A	02-02-2000
WO 9852597 A	26-11-1998	AU 7578498 A	11-12-1998
		EP 1003543 A	31-05-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
G 0 1 N 33/566		G 0 1 N 33/566	
(72)発明者	ロイ, ソフィー カナダ国、ケベック・アシユ・9・アシ ユ・3・エル・1、カークランド、トラン ス - カナダ・ハイウエイ・16711		
(72)発明者	ニコルソン, ドナルド・ダブリユ カナダ国、ケベック・アシユ・9・アシ ユ・3・エル・1、カークランド、トラン ス - カナダ・ハイウエイ・16711		
(72)発明者	シユウ, ダイケン カナダ国、ケベック・アシユ・9・アシ ユ・3・エル・1、カークランド、トラン ス - カナダ・ハイウエイ・16711		
(72)発明者	ロバートソン, ジョージ カナダ国、ケベック・アシユ・9・アシ ユ・3・エル・1、カークランド、トラン ス - カナダ・ハイウエイ・16711		
(72)発明者	ホアン, チンチー カナダ国、ケベック・アシユ・9・アシ ユ・3・エル・1、カークランド、トラン ス - カナダ・ハイウエイ・16711		
F ターム(参考)	4B064 AG27 CA10 CD20 CE12 DA13 4H045 AA11 AA20 BA42 CA40 DA76 EA50 FA71 GA26		

专利名称(译)	抗体识别APP被caspase切割及其用途		
公开(公告)号	JP2002542261A	公开(公告)日	2002-12-10
申请号	JP2000612336	申请日	2000-04-13
[标]申请(专利权)人(译)	默克弗罗斯特加拿大有限公司		
申请(专利权)人(译)	默克弗罗斯特加拿大和有限		
[标]发明人	ジエルベフランソワ ロイソフイー ニコルソンドナルドダブリユ シユウダイケン ロバートソンジョージ ホアンチンチー		
发明人	ジエルベ,フランソワ ロイ,ソフイー ニコルソン,ドナルド・ダブリユ シユウ,ダイケン ロバートソン,ジョージ ホアン,チンチー		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 C07K16/28 C07K19/00 C12P21/08 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	C07K16/28 C07K2317/34 G01N33/6896		
FI分类号	C07K16/18 C07K19/00 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CD20 4B064/CE12 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/BA42 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/GA26		
优先权	60/129495 1999-04-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

淀粉样β肽 (Aβ) 的形成和凋亡导致的神经元丢失是神经退行性疾病，尤其是阿尔茨海默氏病的发病机理中密切相关的过程。描述了凋亡蛋白酶和胱天蛋白酶在淀粉样β-前体蛋白 (APP) 的切割和淀粉样生成的Aβ肽物种的生物合成中的作用。还描述了识别可被半胱天冬酶裂解的APP的抗体及其各种用途。

