

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
29 décembre 2004 (29.12.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/113568 A2

- (51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/68 (74) Mandataire : BOUVET, Philippe; AVENTIS PHARMA S.A., Direction des Brevets TRI LE0/144, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 ANTONY CEDEX (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR2004/001509 (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Date de dépôt international : 17 juin 2004 (17.06.2004)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 03 07501 20 juin 2003 (20.06.2003) FR (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Déposant : AVENTIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20, Avenue Raymond Aron, F-92160 ANTONY (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MACE, Sandrine; 11 Rue Louis Chagnot, F-78350 JOUY-EN-JOSAS (FR). RICARD, Sylvain; 120 Boulevard Vincent Auriol, Hall 1, F-75013 PARIS (FR). COUSIN, Emmanuelle; 11 Avenue de Bouvines, F-75011 PARIS (FR). PRADIER, Laurent; 23 Avenue Cambacères, F-91370 VERRIERES (FR). BENAVIDES, Jesus; 105 Rue Anatole France, F-92290 CHATELAIN-MALABRY (FR). DELEUZE, Jean-François; 4 Rue de l'Yerres, F-77380 COMBS-LA-VILLE (FR).
- Publiée :
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHODS FOR THE DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF ALZHEIMER'S DISEASE

(54) Titre : MÉTHODES DE DÉTECTION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

(57) Abstract: The invention relates to methods for the diagnosis or prognosis of Alzheimer's disease in an individual. An inventive method has at least one step for detecting the presence or the absence of the minority allele of polymorphism rs908832 of gene ABCA2. The presence of the minority allele of polymorphism rs908832 of gene ABCA2 indicates that the individual can be afflicted with Alzheimer's disease or is presently at increased risk of developing Alzheimer's disease.

(57) Abrégé : Méthodes de diagnostic ou de pronostic de la maladie d'Alzheimer chez un sujet. Ladite méthode comprend au moins une étape de détection de la présence ou de l'absence de l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2. La présence de l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2 indique que le sujet peut être atteint de la maladie d'Alzheimer ou bien présente un risque accru de développer la maladie d'Alzheimer.



WO 2004/113568 A2

MÉTHODES DE DÉTECTION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

La présente invention se rapporte à des méthodes de diagnostic ou de pronostic de la maladie d'Alzheimer. Elle concerne également les kits de diagnostic ou de pronostic de la maladie d'Alzheimer.

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui affecte une large proportion de la population âgée. Cette maladie est caractérisée sur le plan clinique par la perte des fonctions cognitives, et sur le plan neuropathologique par la présence dans le cerveau de dépôts neurofibrillaires intracellulaires et de dépôts extracellulaires du peptide β -amyloïde ($A\beta$) formant les plaques amyloïdes. Les plaques amyloïdes sont majoritairement composées des peptides $A\beta$ à 40 ou 42 acides aminés qui sont générés par un processus protéolytique de la protéine précurseur du peptide β -amyloïde (APP). Les dépôts extracellulaires d' $A\beta$ sont spécifiques de la maladie d'Alzheimer. Ils représentent la caractéristique précoce et invariable de toutes les formes de la maladie d'Alzheimer, incluant les formes familiales.

Les formes familiales de la maladie apparaissent de manière relativement précoce (entre 40 et 60 ans). Elles semblent dues, au moins en partie, à des mutations dans le gène de l'APP et dans les gènes de la préséniline-1 (PS1) et de la préséniline-2 (PS2). Les mutations dans ces trois gènes induisent des changements dans la protéolyse de l'APP, conduisant à une surproduction d' $A\beta$ et à l'apparition précoce de la pathologie et des symptômes qui sont similaires à ceux des formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer.

Un lien entre le cholestérol et la maladie d'Alzheimer a également été établi à partir d'études épidémiologiques et de résultats d'études biochimiques et de biologie cellulaire récentes (voir revue Hartmann, T. (2001) *TINS* 24 : S45-48). Un taux de cholestérol élevé à l'âge adulte ainsi qu'une tension artérielle élevée accroissent significativement le risque de maladie d'Alzheimer (Kivipelto et al., 2001 *Br Med J.* 322 : 1447).

A l'opposé, un risque très diminué est enregistré dans les populations sous traitement avec les agents hypocholestérolémiants de type statines (Wolozin et al. (2000) *Arch Neurol.* **57** : 1439 ; Jick et al. (2000) *Lancet* **356** : 1627).

Le lien moléculaire semble avoir été récemment établi. *In vitro* et *in vivo*, un
5 taux de cholestérol élevé augmente la production du peptide A- β et accélère
l'apparition de plaques amyloïdes (Sparks et al. (1994) *Exp. Neurol.* **126** : 88-94 ;
Refolo et al. (2000) *Neurobiol. Dis.* **7** : 321-331 ; Puglielli et al. (2001) *Nat. Cell Biol.*
3 : 905 ; Shie et al. (2002). *Neuroreport* **13** : 455) tandis que les inhibiteurs de la voie
de synthèse du cholestérol les diminuent (Simons et al. (1998) *PNAS USA* **95** : 6460-
10 6464 ; Fassbender et al. (2001) *PNAS USA* **98** : 5856, Refolo et al., (2001) *Neurobiol.*
Dis. **8** : 890-899).

Malgré des avancées significatives, le corps médical est toujours confronté à
un manque de molécules réellement efficaces à l'encontre de la maladie d'Alzheimer.
Une des raisons de ce manque réside dans la difficulté à trouver des cibles permettant
15 un criblage performant de molécules susceptibles d'exercer une action thérapeutique
à l'encontre de cette maladie.

D'autre part la détection précoce de cette maladie apparaît déterminante, afin
d'apporter un traitement avant que ne se manifestent les premiers symptômes,
hautement invalidants pour les malades.

20 En outre, du fait des formes variées de cette maladie il apparaît nécessaire de
cibler le traitement en fonction d'une part des individus à traiter et d'autre part de la
molécule susceptible d'être utilisée pour le traitement. Cette approche
pharmacogénomique ou pharmacogénétique apparaît de plus en plus importante.

La protéine ABCA2 est une protéine appartenant à la nombreuse famille des
25 transporteurs à cholestérol de type ABC (ATP binding cassette). Ce transporteur est
exprimé spécifiquement dans le cerveau.

Le clonage du gène ABCA2 a été décrit en 2000 par Zhao et al (Biochem. J.,
350, 865-872). La séquence a en outre fait l'objet de la demande PCT WO 01/14414,
déposée par la société ACTIVEPASS PHARMACEUTICALS. Diverses hypothèses

sont formulées dans cette demande quant au rôle d'ABCA2, mais sans qu'aucun résultat ne vienne les supporter.

Divers polymorphismes du gène ABCA2 ont été déjà identifiés. Leurs séquences sont en particulier accessibles dans la base de données dbSNP du NCBI.

- 5 Le polymorphisme rs908832 est décrit, parmi les différents polymorphismes répertoriés dans cette base.

Ce polymorphisme est caractérisé par un allèle majoritaire dans la population caucasienne qui est une guanine localisée en position 348 sur la séquence SEQ ID N°2 et un allèle minoritaire dans la population caucasienne qui est une adénine
10 localisée en position 348 sur la séquence SEQ ID N°1.

Alternativement, ce polymorphisme mononucléotidique est représenté par les séquences SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4 partiellement complémentaires respectivement des SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2. Ce polymorphisme est alors caractérisé par un allèle majoritaire dans la population caucasienne qui est une
15 cytosine localisée en position 201 sur la séquence SEQ ID N°4 et un allèle minoritaire dans la population caucasienne qui est une thymidine localisée en position 201 sur la séquence SEQ ID N°3.

Ce polymorphisme est synonyme, c'est-à-dire qu'il ne modifie pas la séquence de la protéine traduite. Les deux allèles du polymorphisme font partie de
20 codons qui codent pour un acide aspartique. Ce polymorphisme codant est localisé sur l'exon 14 du transcrit présentant la séquence SEQ ID N°5 en position 2185.

De manière surprenante, la demanderesse a montré que les sujets présentant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2 ont un risque accru de développer précocement la maladie d'Alzheimer.

25 Cette découverte est particulièrement importante car elle apporte pour la première fois, à la connaissance de la demanderesse, la preuve d'un lien entre la protéine ABCA2, et en particulier un polymorphisme du gène codant pour cette protéine, et un état pathologique, tel que la maladie d'Alzheimer.

Elle permet de confirmer et/ou de pronostiquer la sévérité de l'atteinte chez les patients pour lesquels la maladie d'Alzheimer a déjà été diagnostiquée ainsi que l'efficacité probable des traitements envisagés, ou encore de pronostiquer les risques d'apparition de la maladie chez des sujets ne présentant pas de symptômes de la

5 maladie d'Alzheimer incluant les individus apparentés à des patients dont le diagnostic a été confirmé.

Elle permet en outre de confirmer un rôle fonctionnel majeur de ABCA2 dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, justifiant de mettre en œuvre des tests de criblage de molécules susceptibles d'exercer une action stimulatrice ou

10 inhibitrice sur l'activité de ABCA2 en vue d'application thérapeutique à l'encontre de la maladie d'Alzheimer.

La présente invention a ainsi pour premier objet une méthode de diagnostic ou de pronostic la maladie d'Alzheimer chez un sujet. Ladite méthode comprend au moins une étape de détection des allèles d'un polymorphisme du gène ABCA2.

15 Avantageusement un tel polymorphisme est un polymorphisme impliqué dans la maladie d'Alzheimer. Il est préférentiellement le polymorphisme rs908832, mais il peut être tout autre polymorphisme en déséquilibre de liaison génétique avec le polymorphisme rs908832.

Des sujets appropriés peuvent être par exemple:

- 20
- les personnes qui ne présentent pas les symptômes de la maladie d'Alzheimer,
 - les personnes chez lesquelles le risque de développer la maladie d'Alzheimer a déjà été détecté, mais qui ne présentent pas encore les symptômes de la maladie, et
- 25
- les personnes qui ont préalablement été diagnostiqués comme étant atteintes de la maladie d'Alzheimer pour lesquelles une confirmation du diagnostic est souhaitée.

La, ou les étapes de détection, simultanées ou non, de la présence ou de l'absence de l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 sont effectuées

directement ou indirectement par tout moyen approprié à partir d'échantillons biologiques.

La présente invention concerne donc également une méthode de criblage d'échantillons biologiques prélevés sur des sujets, notamment des sujets ne présentant pas de symptômes de la maladie d'Alzheimer, pour détecter les sujets fortement susceptibles de développer la maladie d'Alzheimer. Un tel criblage comprend la recherche, de manière simultanée ou non, dans lesdits échantillons biologiques, de la présence de l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832.

Lesdits échantillons contenant les ADN ou les protéines à identifier peuvent être de diverses origines. Il peut s'agir par exemple d'échantillons de sang, de sperme, de cheveux (avec leurs racines) ou de tout autre échantillon contenant des cellules nucléées. De préférence, les échantillons biologiques analysés sont des échantillons de sang. Dans ce cas, l'ADN à identifier est prélevé dans les leucocytes.

Au sens de la présente invention, on entend par « échantillon biologique » des échantillons directement issus du sujet pour lequel on souhaite un diagnostic ou un pronostic sans autre transformation, ou des échantillons ayant subi une ou plusieurs étapes de préparation de façon à n'en conserver qu'une fraction utile pour les étapes de détection, par exemple un extrait cellulaire brut.

Les techniques permettant de détecter ou d'identifier la présence ou l'absence des ADN portant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 peuvent être des combinaisons des techniques de Réaction de Polymérisation en Chaîne (« PCR »), d'hybridation, de transfert de Southern, de digestion par des nucléases, de Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction (« RFLP »), et/ou de séquençage direct des produits de la PCR. Toutes ces techniques sont connues de l'homme du métier.

D'une manière générale, toutes les techniques d'identification des ADN portant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 qui peuvent être employées dans le cadre de la présente invention comprennent une étape préalable de collecte du

ou des échantillons biologiques contenant les ADN à identifier et une étape d'extraction de l'ADN génomique selon les techniques standard bien connues de l'homme du métier, par exemple selon la méthode de Smith et al. (*The Lancet*, 1992, 339, pp. 1375-7).

5 Une telle méthode d'identification peut comprendre :

- a) l'extraction de l'ADN dudit sujet,
- b) l'amplification dudit ADN isolé à l'aide d'amorces capables d'amplifier les séquences correspondant à chacun des allèles du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2, et
- 10 c) la détermination d'au moins l'un des allèles du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2 dans l'ADN amplifié.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux, on utilise la technique de PCR. Ainsi l'étape b) comprend avantageusement une étape de réaction de polymérisation en chaîne. Cette technique consiste tout d'abord à synthétiser des oligonucléotides
15 complémentaires de la séquence des régions qui délimitent le segment d'ADN à amplifier (amorces). Ces oligonucléotides servent d'amorces à la DNA polymérase. Puis, on entreprend les étapes de dénaturation par la chaleur (92-95°C) pour séparer les deux brins d'ADN, d'hybridation avec les deux amorces spécifiques grâce à un abaissement de la température (50-55°C) et d'extension des amorces avec une DNA
20 polymérase à 70-72°C.

De telles amorces permettant l'amplification de chacun des allèles du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2, et en particulier de l'allèle minoritaire, ainsi que leurs séquences complémentaires, constituent d'autres objets de la présente demande. Avantageusement elles présentent des séquences respectives telles que le
25 nombre de bases entre leurs points d'hybridation respectifs sur la molécule d'ADN, est compris entre 25 et 2500 paires de bases, et préférentiellement entre 100 et 500 paires de bases.

Avantageusement de telles amorces présentent entre environ 15 et 30 nucléotides contigus de la séquence SEQ ID N°3 ou de la séquence SEQ ID N°4. De manière préférentielle il s'agit d'un couple d'amorces présentant les séquences SEQ ID N°6 et SEQ ID N° 7.

- 5 Selon un mode de mise en œuvre avantageux, la présente demande a pour objet une méthode caractérisée en ce que l'ADN amplifié portant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 est distingué de l'ADN amplifié ne portant pas cet allèle par hybridation spécifique de deux sondes, chacune d'elle étant spécifique d'une des deux formes du polymorphisme. Ces sondes, ainsi que leurs séquences
10 complémentaires, constituent d'autres objets de la présente demande.

Avantageusement ces sondes sont constitués respectivement d'environ 12 à 17 nucléotides contigus de la séquence SEQ ID N°3 ou SEQ ID N°4. De manière préférentielle elles présentent respectivement les séquences SEQ ID N°8 et SEQ ID N°9.

- 15 L'ADN amplifié portant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 peut aussi être distingué de l'ADN amplifié ne portant pas cet allèle par la technique utilisant l'activité 5' nucléase de l'ADN polymérase I (TaqMan).

- Selon un mode de mise en œuvre avantageux, la présente demande a pour objet une
20 méthode caractérisée en ce que l'ADN amplifié portant le polymorphisme rs908832 est distingué de l'ADN amplifié ne portant pas ce polymorphisme par analyse du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP). Avantageusement les fragment de restriction on été obtenus par digestion de l'ADN amplifié à l'aide d'une enzyme de restriction avant migration en gel d'agarose, transfert sur membrane par la
25 technique de Southern et hybridation.

Pour obtenir à la fois une plus grande sensibilité et une meilleure spécificité, il est également possible d'effectuer deux PCR successives en utilisant deux couples d'amorces différents (« nested PCR ») : un premier couple d'amorces externes qui permet d'obtenir un fragment d'ADN amplifié comme en PCR classique et un second

couple d'amorces internes pour amplifier le fragment d'ADN obtenu de la première PCR.

Afin de déterminer l'empreinte génétique de la région souhaitée, les fragments d'ADN obtenus par PCR peuvent également être séparés par électrophorèse selon
5 leur taille et visualisés grâce au BET (bromure d'éthidium) et aux rayons ultraviolets.

Une possibilité particulièrement intéressante dans le cas présent consiste à effectuer une PCR avec une première amorce ayant à son extrémité 3' la séquence de nucléotides mutée, et une seconde amorce ayant à son extrémité 3' la séquence de nucléotides sauvage. La différence de température de dénaturation dans ces deux cas,
10 et en conséquence d'efficacité d'amplification, permet de distinguer l'ADN mutant de l'ADN sauvage.

Selon une autre alternative, les fragments d'ADN amplifiés sont directement identifiés par transfert en point (technique de Dot Blot) qui consiste à déposer un échantillon des fragments d'ADN produits de la PCR sur un filtre de nylon, à
15 effectuer la dénaturation des fragments d'ADN, leur hybridation avec une sonde spécifique radioactive et un lavage pour éliminer l'excès de produit radioactif non-fixé suivi d'un autoradiogramme. La révélation peut également être faite par d'autres moyens grâce à l'emploi de sondes spécifiques comportant un marqueur autre que radioactif, par exemple un colorant ou encore un marqueur fluorescent.

20 Selon une autre alternative, il est également possible de détecter la présence ou l'absence de mutations des ADN comprenant le polymorphisme rs908832 par séquençage direct de tout ou partie des fragments d'ADN amplifiés. Un tel procédé consiste à déterminer la séquence nucléotidique au niveau du polymorphisme rs908832. Le séquençage peut être effectué par toute méthode connue de l'homme de
25 l'art, par exemple par la méthode de Sanger ou bien par la méthode de Maxam et Gilbert.

Selon une autre alternative, la détection de la présence ou l'absence des ADN portant le polymorphisme rs908832 peut être effectuée en utilisant la technique de

transfert de Southern (Southern Blotting) qui consiste à effectuer une électrophorèse des fragments d'ADN obtenus après une attaque par une ou plusieurs enzymes de restriction. Le gel est ensuite dénaturé et un transfert est opéré sur une membrane de nylon. Cette membrane est destinée à être hybridée avec une sonde spécifique. Après
5 lavage pour éliminer l'excès de produit radioactif non fixé, le film est appliqué sur la membrane. Il peut ainsi être décelé une ou plusieurs bandes correspondant aux fragments d'ADN reconnus par la sonde.

Il est également possible d'utiliser la technique de la RFLP associée à la technique de Southern Blotting et/ou de PCR pour détecter la présence ou l'absence
10 du polymorphisme rs908832. La RFLP permet de comparer les ADN de différents individus et de rechercher si des mutations ponctuelles faisant apparaître ou disparaître des sites de restriction se sont produites. Deux ADN de séquence identique traités par des enzymes de restriction donneront des fragments identiques, et les Southern Blot obtenus avec ces fragments seront donc identiques. Au contraire, si un
15 site de restriction a disparu ou bien est apparu à la suite d'une mutation, les fragments n'auront plus des tailles identiques ce qui sera visible sur les autoradiogrammes. Il en est de même si un nouveau site de restriction est apparu à la suite d'une mutation.

Il est encore possible de détecter le polymorphisme rs908832 du gène ABCA2 en déterminant le nucléotide en position 2185 du transcrit codant pour la protéine
20 ABCA2.

Toutes les techniques décrites ci-avant sont bien connues de l'homme de l'art. Toute autre technique connue et également appropriée pour la détection de la présence ou de l'absence du polymorphisme rs908832 peut être employée. On peut à ce titre par exemple citer les techniques de « Ligase Chain Reaction », « Strand
25 Displacement Amplification », « Transcription-based Amplification » etc... De façon avantageuse, lesdites étapes de détection sont effectuées par PCR, RFLP, Southern Blotting et/ou une combinaison de ces techniques, conformément aux méthodes décrites dans la littérature (voir par exemple : Gough et al., *Nature*, 1990, 347, p.773 ; Kagimoto et al., *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, p. 17209 ; Wolf et al., *The Lancet*, 1990,

336, p. 1452 ; Hayashi et al., *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, p. 4797 ; Daly et al., *Pharmacogenetics*, 1991, 1, p. 33 ; Spurr et al., *Methods Enzymol.*, 1991, 206, p. 149 ; Armstrong et al., *The Lancet*, 1992, 339, p. 1017 ; Kurth et al., *Am. J. of Med. Genet.*, 1993, 48, p. 166 ; McCann et al., *J. Neurol. Sci.*, 1997, 153, p. 50 ;
5 Stroombergen et al., *Hum. & Exper. Toxicol.*, 1999, 18, p. 141).

Toutes ces méthodes de détection sont particulièrement utiles car elles constituent la base permettant de déterminer si un sujet peut être atteint par la maladie d'Alzheimer ou bien présente un risque accru de développer la maladie d'Alzheimer.

Ainsi, un autre objet de la présente invention concerne une méthode d'analyse
10 d'échantillons biologiques prélevés sur un sujet qui consiste à :

- a) déterminer le génotype pour le gène ABCA2 dudit sujet, et
- b) convertir les données obtenues en a) afin de pronostiquer le risque dudit sujet de développer la maladie d'Alzheimer et l'efficacité de traitements thérapeutiques envisageables pour cette maladie.

15 Selon un autre aspect, la présente invention concerne également les trousse, ou kits, de diagnostic ou de pronostic de la maladie d'Alzheimer chez un sujet.

De tels kits peuvent se présenter sous forme d'un emballage compartimenté de façon à recevoir différents récipients tels que par exemple des ampoules ou des tubes. Chacun de ces récipients comprend les différents éléments nécessaires pour effectuer
20 la détection de la présence ou de l'absence de l'ADN portant le polymorphisme rs908832.

Lesdits éléments permettant d'effectuer la ou les réactions de détection sont choisis parmi ceux décrits ci-avant. Il peut s'agir par exemple :

- d'un couple d'amorces hybridant une région définie du gène ABCA2 et éventuellement les moyens nécessaires à la réalisation d'une réaction d'amplification, ou
 - de sondes oligonucléotidiques, éventuellement immobilisées sur un support et comprenant un marqueur détectable, et éventuellement les réactifs nécessaires à la réalisation d'une réaction d'hybridation.
- 25

Un autre objet de la présente invention est une méthode de traitement de la maladie d'Alzheimer caractérisée en ce qu'elle comprend :

- 5 -au moins une étape de détection de la présence de l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 chez un sujet, et
-l'administration d'un composé, ou d'un mélange de composés connus pour leur activité à l'encontre de la maladie d'Alzheimer chez un sujet présentant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832.

De manière préférentielle la maladie est la maladie d'Alzheimer de type précoce.

- 10 Un autre objet de la présente invention est une méthode de sélection d'un composé destiné à être administré à un individu présentant une maladie associée à l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2 caractérisée en ce qu'elle comprend :

- 15 a. au moins une étape de détermination de la présence de l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2 dans un échantillon biologique dudit individu, et
b. la sélection du composé approprié si ledit allèle est présent.

Un autre objet de la présente invention est une méthode de sélection d'un composé destiné à être administré à un individu présentant la maladie d'Alzheimer caractérisée

- 20 en ce qu'elle comprend :

- a. au moins une étape de détermination de la présence de l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2 dans un échantillon biologique dudit individu, et
b. la sélection du composé approprié si ledit allèle est présent.

25

La présente demande est en outre relative à l'utilisation d'un composé, ou d'un mélange de composés connus pour leur activité à l'encontre de la maladie

d'Alzheimer pour la fabrication d'un médicament pour le traitement d'un sujet atteint par la maladie d'Alzheimer, chez lequel la présence de l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 a été détectée préalablement au traitement.

Lesdits composés connus pour leur activité à l'encontre de la maladie d'Alzheimer peuvent être par exemple des inhibiteurs de l'acétylcholine esterase (AChEIs tels que le Donepezil (Aricept), le Galantamine (Reminyl) ou l'Exelon (rivastigmine)), des antagonistes du récepteur canal NMDA (tel que le Memantine (Ebixa)), des inhibiteurs de la production du peptide amyloïde tels que le BMS 299897 ou des futurs agents modulateurs de l'activité de ABC A2.

10 Les composés de l'association peuvent être administrés par voie orale, parentérale, transdermale ou rectale soit simultanément soit séparément soit de façon étalée dans le temps.

Les composés sont formulés sous forme de compositions pharmaceutiques contenant l'association de un ou plusieurs composés tels que définis précédemment avec un
15 véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Comme compositions solides pour administration orale, peuvent être utilisés des comprimés, des pilules, des poudres (capsules de gélatine, cachets) ou des granulés. Dans ces compositions, les principes actifs sont mélangés à un ou plusieurs diluants inertes, tels que amidon, cellulose, saccharose, lactose ou silice, sous courant d'argon.
20 Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres que les diluants, par exemple un ou plusieurs lubrifiants tels que le stéarate de magnésium ou le talc, un colorant, un enrobage (dragées) ou un vernis.

Comme compositions liquides pour administration orale, on peut utiliser des solutions, des suspensions, des émulsions, des sirops et des élixirs
25 pharmaceutiquement acceptables contenant des diluants inertes tels que l'eau, l'éthanol, le glycérol, les huiles végétales ou l'huile de paraffine. Ces compositions peuvent comprendre des substances autres que les diluants, par exemple des produits mouillants, édulcorants, épaississants, aromatisants ou stabilisants.

Les compositions stériles pour administration parentérale, peuvent être de préférence des solutions aqueuses ou non aqueuses, des suspensions ou des émulsions. Comme solvant ou véhicule, on peut employer l'eau, le propylèneglycol, un polyéthylèneglycol, des huiles végétales, en particulier l'huile d'olive, des esters organiques injectables, par exemple l'oléate d'éthyle ou d'autres solvants organiques convenables. Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants, en particulier des agents mouillants, isotonisants, émulsifiants, dispersants et stabilisants. La stérilisation peut se faire de plusieurs façons, par exemple par filtration aseptisante, en incorporant à la composition des agents stérilisants, par irradiation ou par chauffage. Elles peuvent également être préparées sous forme de compositions solides stériles qui peuvent être dissoutes au moment de l'emploi dans de l'eau stérile ou tout autre milieu stérile injectable.

Les compositions pour administration rectale sont les suppositoires ou les capsules rectales qui contiennent, outre le produit actif, des excipients tels que le beurre de cacao, des glycérides semisynthétiques ou des polyéthylèneglycols.

Les compositions pharmaceutiques renfermant l'association telle que définie précédemment contiennent généralement 0,1 à 500 mg de composé.

Les doses dépendent de l'effet recherché, de la durée du traitement et de la voie d'administration utilisée; elles sont généralement de 0,1 à 500 mg par jour par voie orale pour un adulte de composé.

D'une façon générale, le médecin déterminera la posologie appropriée en fonction de l'âge, du poids et de tous les autres facteurs propres au sujet à traiter.

La présente invention concerne en outre un animal transgénique dans le génome duquel est inséré au moins une séquence d'ADN exogène portant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 de telle sorte que la fonction du gène ABCA2 est modifiée.

On entend par animal transgénique tout animal non-humain présentant une modification artificielle de son génome. La modification du génome peut résulter d'une altération ou d'une modification de un ou plusieurs gènes par « knock-in » ou par « knock-out » (inactivation/modification de gènes par recombinaison homologue) ou la surexpression du gène humain sous le contrôle de promoteurs spécifiques des types cellulaires neuronaux (tel que Thyl, PDGF ou prion) ou glial (tel que GFAP) dans la souris. Cette modification peut être due à l'action d'agents altérants ou mutagènes classiques ou bien effectuée par insertion stable d'une cassette d'expression permettant l'expression d'un gène hybride. En particulier, on peut par exemple opérer selon des méthodes identiques ou analogues à celles décrites dans les demandes WO 01/02552 ou encore WO 01/13176.

La modification du génome peut également résulter d'une insertion de gène(s) ou d'un remplacement de gène(s) dans sa (leur) forme sauvage ou mutée.

Les modifications sont avantageusement effectuées sur des cellules souches reproductrices.

A l'heure actuelle, la modification du génome en utilisant la technologie « knock-in » et « knock-out » est limitée à la souris comme modèle du fait que seules les cellules souches (dites cellules « ES ») ayant la capacité de coloniser la lignée germinale issue de l'embryon de souris sont disponibles. Lorsque les lignées cellulaires ES seront établies pour d'autres espèces, ces technologies pourront facilement être appliquées par l'homme de l'art à ces autres espèces pour générer des modèles KO et/ou KI. De plus, les approches basées sur l'utilisation d'oligonucléotides (ADN, ARN ou hybrides) seuls ou liés à des enzymes modifiant l'ADN/ARN, peuvent être utilisées pour introduire une modification/mutation définie à un locus prédéterminé dans le génome. Même des irradiations ou des mutagènes chimiques qui induisent des modifications aléatoires dans le génome peuvent être employées s'ils sont combinés avec un jeu efficace de marqueurs biologiques (phénotype) et avec une procédure de clonage positionnel à haut débit.

L'approche la plus directe pour la modification du génome d'animaux de laboratoire (souris, rats, vaches, cochons, moutons...) est cependant l'intégration aléatoire de transgènes par microinjection d'ADN linéarisé dans un ou deux pronucléi d'ovocytes fertilisés à l'étape de cellule unique (de préférence pour éviter la
5 génération d'animaux chimériques bien que l'injection au stade deux cellules ou plus puisse également être mise en œuvre). En règle générale, un transgène est composé de deux parties : les éléments de régulation qui imposent le contrôle spatio-temporel de l'expression de l'ARN codé par l'ADN, et ledit ADN juxtaposé (ADNc ou fragment génomique). Ces deux éléments (l'élément de régulation et l'ADN codant pour la
10 protéine désirée) peuvent être homologues ou bien hétérologues du génome cible. Les animaux transgéniques concernés sont d'une manière générale choisis parmi les mammifères non-humains. Il peut s'agir par exemple de murins, à savoir les souris, les rats et les cobayes, de lapins, de chats, de chiens, d'ovins, ou encore de bovins. De préférence, il s'agit de murins, de rats ou de lapins obtenus selon les techniques
15 classiques de transgénèse. D'autres objets de la présente invention sont des lignées de cellules souches et lignées de cellules différenciées à partir de ces lignées de cellules souches, dans le génome desquels est insérée au moins une séquence d'ADN exogène génomique portant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832.

Succinctement, l'obtention des animaux transgéniques, des lignées de cellules
20 souches et lignées de cellules différenciées selon l'invention consiste en un procédé mettant en œuvre la génération d'animaux transgéniques par insertion par recombinaison homologue d'un ADN exogène génomique codant pour la protéine ABCA2 dans le gène correspondant de l'animal (l'insertion du transgène est ciblée immédiatement après le promoteur du gène de l'animal de façon à imposer le profil
25 d'expression correct au transgène et à empêcher l'expression du gène endogène de l'animal : knocked out) ou bien par insertion de la mutation spécifique décrite dans la présente invention correspondant à une isoforme du gène ABCA2 humain dans le gène endogène de l'animal (la modification est faite par recombinaison homologue dans les cellules souches : knocked in), ou bien par surexpression du gène ABCA2
30 portant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832.

Dans le cas des souris, ces animaux pourront être avantageusement croisées avec des souris transgéniques portant le gène APP humain arborant des mutations de type Alzheimer et qui développent des plaques amyloïdes. Les animaux doubles transgéniques ainsi obtenus reproduisent le génotype observé chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer ou à risque. Le contrôle du génotype du polymorphisme rs908832 de l'animal nouveau-né ainsi obtenu peut être effectué en utilisant les techniques déjà décrites ci-avant, notamment en utilisant une réaction d'amplification (PCR) et/ou de Southern.

De tels animaux transgéniques sont particulièrement intéressants car ils fournissent un modèle avantageux pour la compréhension de la maladie d'Alzheimer qui reproduit très fidèlement les caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. En comparaison des modèles connus, ce modèle permet notamment la mise en évidence de composés particulièrement adaptés au traitement de la maladie d'Alzheimer, notamment telle que décrite chez l'homme. Ces composés peuvent être des molécules chimiques, des molécules peptidiques ou protéiques, des anticorps, des molécules chimériques ainsi que des ADNs antisens ou des ribozymes.

Les composés ainsi mis en évidence peuvent être utilisés comme médicament, tels quels ou en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable afin d'obtenir une composition pharmaceutique. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les injections pouvant être réalisées par voie stéréotaxique, topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc.

La mise en évidence des composés décrits précédemment repose sur la mise en contact, notamment par une administration telle que par exemple une injection, du modèle animal de l'invention avec un composé ou un mélange de composés

supposé(s) avoir une action et de mesurer ensuite le ou les effet(s) des composés notamment au niveau cérébral du modèle sur différents changements biochimiques et/ou histologiques.

Outre le fait de pouvoir tester *in vivo* des composés thérapeutiques permettant
5 de prévenir, d'atténuer ou de guérir la maladie d'Alzheimer, ces animaux transgéniques permettent également de disposer d'un modèle animal de la maladie d'Alzheimer utile pour cribler des facteurs environnementaux qui induisent ou accélèrent la pathogenèse, ou encore pour étudier le comportement lors du développement de la maladie et étudier les divers mécanismes biologiques qui sont
10 impliqués, par exemple dans le but de l'étude de nouveaux médicaments ou la détermination des quantités efficaces de médicaments et de la toxicité. Ainsi, un autre objet de la présente invention concerne l'utilisation d'un animal transgénique, de lignées de cellules souches ou de lignées de cellules différenciées tels que définis ci-avant pour tester l'activité de composés ou de méthodes destinées à prévenir et/ou
15 traiter la maladie d'Alzheimer. Un autre objet de l'invention concerne une cellule extraite des animaux transgéniques tels que décrits précédemment ainsi que son utilisation pour la mise en évidence de composés destinés au traitement de la maladie d'Alzheimer.

La mise en évidence de composés décrits précédemment repose sur la mise en
20 contact de cellules extraites du modèle animal de l'invention avec un composé ou un mélange de composés supposé(s) avoir une action et de mesurer ensuite le ou les effets des composés au niveau des cellules entières, dans des homogénats de cellules ou sur une fraction sub-cellulaire, sur différents paramètres tels que la mort cellulaire par exemple.

25 Outre les dispositions qui précèdent, la présente invention comprend également d'autres caractéristiques et avantages qui ressortiront des exemples et figures qui suivent, et qui doivent être considérés comme illustrant l'invention sans en limiter la portée.

EXEMPLES

Exemple 1 : Etude du génotype du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2 dans un échantillon de patients

Une collection d'ADNs issus de patients d'origine caucasienne atteints de la maladie
5 d'Alzheimer et d'individus témoins a été utilisée, après leur consentement éclairé.

La fréquence des polymorphismes a été déterminée par génotypage d'un échantillon
de 47 individus d'un panel commercialisé par l'institut Coriell (USA).

Dix polymorphismes (dont le polymorphisme rs908832) ont été sélectionnés sur la
base de leur localisation dans le gène et de leur fréquence afin d'être génotypés chez
10 les patients atteints de la maladie d'Alzheimer et les témoins.

Les génotypes ont été réalisés par la méthode de 5' nuclease assay (technique de
discrimination allélique d'Applied Biosystems, Foster City, USA), puis une analyse
statistique de type Chi2 a été réalisée en testant l'association de chacun de ces
marqueurs avec la maladie d'Alzheimer (test d'hétérogénéité). Pour l'analyse, des
15 groupes ont été distingués selon de l'âge d'apparition de la maladie ((précoce (avant
ou à 65 ans) ou tardive (après 65 ans)) et son origine (sporadique (premier cas connu)
ou familiale (d'autres cas déjà connus dans la même famille)).

Les résultats obtenus pour le polymorphisme rs908832 sont les suivants :

- fréquence de l'allèle minoritaire (T) chez les patients (440 génotypes): 7.4
- 20 - fréquence de l'allèle minoritaire (T) chez les témoins (519 génotypes): 3.4

Les proportions d'Hardy Weinberg ont été vérifiées chez les patients et les témoins:
on n'observe pas d'écart significatif ce qui confirme qu'il n'y a pas d'erreur de
génotypage.

Résultats des tests effectués chez les patients présentant une forme précoce de la
25 maladie (avant ou à 65ans):

- 136 cas sporadiques vs 272 témoins:

- test d'hétérogénéité: χ^2 (1ddl) = 22.69 $p = 2.10^{-6}$

- test allélique (freq(T) vs freq(C)): χ^2 (1ddl) = 21.27 $p = 4.10^{-6}$

5

- 104 cas familiaux vs 272 témoins:

- test d'hétérogénéité: χ^2 (2ddl) = 7.80 $p = 0.02$

- test allélique (freq(T) vs freq(C)): χ^2 (1ddl) = 7.27 $p = 7.10^{-3}$

- 10 L'odd ratio a été estimé par régression logistique chez les 240 patients présentant la forme précoce (ajustement sur le sexe et le statut APOE-ε4). Le résultat est également significatif : OR = 3.97 IC = [2.23 - 7.09]

- 15 Les valeurs obtenues restent significatives (seuil fixé à 0,05) même après correction pour tests multiples par la méthode de Bonferroni.

Ces résultats indiquent que le gène ABCA2 est un gène important dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer.

- 20 En terme de risque ce résultat est du même ordre de grandeur que le risque conféré par l'apolipoprotéine E4, le facteur de risque le plus fort connu à ce jour pour la maladie d'Alzheimer.

Exemple 2 : Obtention de souris transgéniques

1. Génération d'une souris transgénique exprimant la protéine humaine

ABC A2

La mutagenèse de l'ABCA2 humaine est faite via l'utilisation d'un système de mutagenèse *in vitro* comme le Sculptor™ (Amersham, France). La région codante de l'ABCA2, est sous-clonée dans un vecteur de clonage du type Bluescript (Stratagène) et les mutations sont introduites selon le protocole fourni par le fabricant

via l'utilisation d'oligonucléotides contenant la mutation désirée. Les séquences mutées sont à vérifier par analyse de séquence.

2. Génération et identification des souris transgéniques ABCA2

Pour la construction du transgène, l'ADN génomique codant pour l'ABCA2 et
5 présentant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 humain est sous-clonée
dans le polylinker d'un vecteur d'expression transgénique spécifique de certains
tissus/types cellulaires comme le THY1 (Lüthi et al., J. Neuroscience, 17, pp. 4688-
99), , PDGF ou prion pour les types neuronaux, ou GFAP pour les types astrocytaires
. Un kit de préparation de plasmide (Qiagen) est utilisé pour préparer de l'ADN
10 superenroulé. Pour la microinjection, les séquences du vecteur sont à éliminer par
digestion avec une enzyme de restriction définie, laissant intacte la totalité du
transgène et le séparant des séquences inutiles du vecteur de clonage. Ensuite, le
fragment contenant la cassette d'expression est purifié par électrophorèse sur un gel
d'agarose.

15 Les aliquotes destinés à la microinjection sont dialysés contre un tampon TE
(10 mM Tris pH 7,4 ; 0,1 mM EDTA) sur un filtre flottant (Millipore ; type de
membrane : VS ; 0,025 µm) puis filtrés (Spin-X ; Costar ; membrane polyacétate ;
0,22 µm). L'ADN est dilué à la concentration finale de 1-2 ng/µl pour la
microinjection. Le fragment purifié est injecté dans un des deux pronucléi des
20 ovocytes fertilisés de souris. Les embryons survivants sont immédiatement
transplantés dans l'oviducte de mères adoptives (« pseudopregnant »). La présence du
transgène chez les nouveau-nés est déterminée soit par PCR soit par une analyse en
Southern, en utilisant des sondes/séquences spécifiques. Par l'ensemble de ces
analyses, tout réarrangement majeur ou délétions du transgène dans les fondateurs et
25 leur descendance peuvent être exclus.

3. Génération d'animaux transgéniques comportant la protéine humaine ABCA2 dans leur génome

On utilise la technologie de recombinaison homologue dans les cellules souches pour introduire le gène ABCA2 présentant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 humain à la position prédéfinie désirée dans le gène de la souris. Les amorces et échantillons décrits dans la présente invention peuvent être
5 facilement utilisés pour cribler des bibliothèques génomiques isogéniques de souris (bibliothèques lambda, BAC, YAC ...) afin d'isoler et de cloner le gène correspondant de la souris. Ledit gène de la souris est caractérisé pour son organisation génomique et sa séquence en utilisant les techniques standard connues de l'homme de l'art (cartographie des sites de restriction, séquençage, outils bioanalytiques) afin de
10 définir la place exacte où l'ADN humain doit être inséré pour obtenir le profil d'expression de l'ADN humain désiré tout en interrompant définitivement l'expression du gène murin. Une fois la position exacte identifiée, on construit un vecteur de ciblage standard pour les cellules souches (c'est-à-dire un vecteur ayant des marqueurs pour la sélection des événements désirés, lesdits marqueurs étant tous
15 bien connus de l'homme de l'art spécialiste du domaine). Rapidement, une cassette de sélection (gène de résistance à un antibiotique) est mise en limite des extrémités 3' et 5' des fragments d'ADN génomique de la souris (2-6 kb) identiques aux extensions 3' et 5' de la séquence du gène murin ABCA2 situé immédiatement après le site d'insertion sélectionné.

20 Sur la base de la connaissance du gène de la souris, un vecteur de contrôle positif pour le criblage des cellules souches recombinantes est généré (le vecteur reproduit le locus du gène murin une fois l'intégration réussie) afin d'optimiser et valider la procédure de criblage à haut débit.

Conformément aux procédures standards, l'ADN est purifié pour les essais de
25 ciblage. Le vecteur de ciblage est introduit dans les cellules souches en utilisant des techniques d'électroporation standardisées, après quoi les clones de cellules souches sont soumis à une procédure de criblage séquentiel (antibiotiques) de façon à favoriser les clones de cellules souches portant la recombinaison désirée. En général, le criblage prend environ 2 semaines. Les clones des cellules souches résistants sont
30 criblés par PCR et/ou Southern.

Les clones des cellules souches ayant la recombinaison désirée sans autre modification détectable dans leur génome sont développés de façon à obtenir suffisamment de cellules. Puis, lesdites cellules sont injectées dans des embryons de 3 jours et demi obtenus d'une femelle ayant ovulé naturellement. Les blastocytes
5 survivants (comportant les cellules souches) sont implantés dans une femelle receveuse qui permettra le développement des blastocytes à leur terme et donnera naissance à des souriceaux nouveau-nés composés de cellules provenant des blastocytes hôtes et des clones de cellules souches. Ce type d'animal est appelé « animal chimère ».

10 Ces chimères (de préférence des mâles puisque la plupart des lignées de cellules souches sont obtenues de souris mâles) sont « mariées » avec des souris de type sauvage de façon à obtenir des animaux hétérozygotes pour la modification. L'élevage d'animaux hétérozygotes entre eux permet de générer des animaux homozygotes.

15 **4. Génération d'animaux transgéniques comportant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2 humain dans leur gène correspondant**

De la même façon que décrit précédemment, le gène murin est isolé et caractérisé. Pour ce type de modification, il est essentiel de comparer le gène humain
20 et le gène murin de façon à identifier la position exacte où le point de mutation trouvé chez l'homme doit être introduit dans le gène murin. Une bioanalyse est essentielle à cette étape. A la fin, le vecteur de ciblage est élaboré et assemblé de la même façon que décrit ci-avant. Après recombinaison homologue réussie, rien d'autre que le point de mutation désiré n'a changé dans la séquence codante du gène murin. Certains
25 marqueurs de sélection peuvent rester dans un intron, mais ils n'ont en général aucune influence sur l'expression du gène. Si nécessaire, ils peuvent être éliminés en utilisant une seconde génération de vecteurs de ciblage incluant des éléments de reconnaissance recombinaise. Une fois la construction assemblée, les étapes sont identiques à celles de la procédure décrite précédemment.

De façon générale, ces souris transgéniques ABCA2 seront favorablement croisées avec des souris transgéniques exprimant le gène APP portant les mutations des formes familiales de la maladie d'Alzheimer afin de favoriser la déposition de plaques amyloïdes.

5 5. Neurohistopathologie

Préparation du tissu cérébral

Les souris doivent être profondément anesthésiées (Pentobarbital: 60 mg/ml/kg i.p., Kétamine: 40 mg/ml/kg i.p.) puis perfusées en transcardiaque avec du sérum physiologique puis du paraformaldéhyde (4% dans du PBS). Les cerveaux sont
10 ensuite prélevés puis postfixés dans la même solution de fixation 24 heures à 4°C. Après la fixation, les cerveaux sont séparés en hémicerveaux droit et gauche puis soumis au protocole classique d'enrobage dans la paraffine.

Les hémicerveaux gauches enrobés dans la paraffine des souris transgéniques et non transgéniques, et également des blocs de tissu de cerveau humain postmortem
15 (cortex frontal) de sujets atteints par la maladie d'Alzheimer et d'un sujet contrôle sont coupés à 6 µm d'épaisseur (coupes sériées), via l'utilisation d'un microtome (LEICA RM 2155, France). Les blocs de tissu correspondants aux hémicerveaux droits des souris transgéniques et non transgéniques sont coupés à une épaisseur de 25 µm.

L'immunoréactivité contre le peptide amyloïde Aβ sera détectée comme
20 communément décrit par l'homme de l'art.

REVENDECATIONS

1. Méthode de diagnostic ou de pronostic de la maladie d'Alzheimer chez un sujet caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une étape de détection de la présence d'un polymorphisme du gène ABCA2.
- 5 2. Méthode selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une étape de détection de la présence de l'allèle minoritaire d'un polymorphisme du gène ABCA2 associé génétiquement avec la maladie d'Alzheimer.
3. Méthode selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une étape de détection de la présence de l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832
10 du gène ABCA2.
4. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdites étapes de détection sont effectuées à partir d'échantillons biologiques.
5. Méthode de diagnostic ou de pronostic de la maladie d'Alzheimer chez un sujet selon la revendication 4, caractérisée en ce que lesdits échantillons biologiques sont
15 des échantillons contenant des cellules nucléées.
6. Méthode de diagnostic ou de pronostic de la maladie d'Alzheimer chez un sujet selon les revendications 4 ou 5, caractérisée en ce que lesdits échantillons biologiques sont des échantillons de sang, de sperme ou de cheveux.
7. Méthode de diagnostic ou de pronostic de la maladie d'Alzheimer chez un sujet
20 selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdites étapes de détection de la présence ou de l'absence des ADN portant le polymorphisme sont effectuées par des techniques de réaction de polymérisation en chaîne (PCR), d'hybridation, de transfert sur membrane par la technique de Southern, de digestion par des nucléases, de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), ou de séquençage
25 direct, ou leur combinaison.

8. Méthode selon la revendication 7 caractérisée en ce qu'elle comprend :

- a. l'extraction de l'ADN dudit sujet,
- b. l'amplification dudit ADN isolé à l'aide d'amorces capables d'amplifier la séquence correspondant au polymorphisme rs908832 du gène ABCA2,
- 5 c. la détermination de la présence d'au moins l'une des allèles du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2 dans l'ADN amplifié.

9. Méthode selon la revendication 8 caractérisée en ce que l'étape d'amplification b) comprend une réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

10. Méthode selon la revendication 8 caractérisée en ce que l'ADN amplifié portant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 est distingué de l'ADN amplifié ne portant pas cet allèle par la technique utilisant l'activité 5' nucléase de l'ADN polymérase I (TaqMan).

11. Méthode selon la revendication 8 caractérisée en ce que l'ADN amplifié portant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 est distingué de l'ADN amplifié ne portant pas ce polymorphisme par analyse du polymorphisme des fragments de restriction (RFLP).

12. Méthode selon la revendication 11 caractérisée en ce que les fragments de restriction ont été obtenus par digestion de l'ADN amplifié à l'aide d'une enzyme de restriction avant migration en gel d'agarose, transfert sur membrane par la technique de Southern et hybridation.

13. Méthode de détection du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2 comprenant la détermination du nucléotide en position 2185 du transcrit codant pour la protéine ABCA2.

14. Méthode d'analyse d'échantillons biologiques prélevés sur un sujet caractérisée en ce que :

- a. on détermine le génotype pour le gène ABAC2, et
 - b. on convertit les données obtenues afin de pronostiquer le risque dudit sujet de développer la maladie d'Alzheimer et l'efficacité de traitements thérapeutiques envisageables pour cette maladie.
- 5 15. Amorce permettant l'amplification de l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832.
16. Amorce selon la revendication 15 présentant entre environ 15 et 30 nucléotides contigus de la séquence SEQ ID N°3.
17. Amorce selon la revendication 16 caractérisée en ce qu'elle présente la séquence
10 SEQ ID N°6.
18. Amorce selon la revendication 15 présentant entre environ 15 et 30 nucléotides contigus de la séquence complémentaire de la SEQ ID N°3.
19. Amorce selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID N° 7.
- 15 20. Sonde présentant entre environ 12 et 17 nucléotides contigus de la séquence complémentaire de la SEQ ID N°3.
21. Sonde selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID N°8.
22. Sonde présentant entre environ 12 et 17 nucléotides contigus de la séquence
20 complémentaire de la SEQ ID N°4.
23. Sonde selon la revendication 22 caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID N°9.
24. Amorces et sondes complémentaires des amorces et sondes selon l'une des revendications 16 à 23.

25. Trousse, ou kit, de diagnostic ou de pronostic de la maladie d'Alzheimer caractérisé en ce qu'il comprend les différents éléments nécessaires pour effectuer la détection de la présence ou de l'absence des ADN portant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832.
- 5 26. Trousse selon la revendication 25 caractérisée en ce qu'elle comprend un couple d'amorces selon l'une des revendications 15 à 19.
27. Animaux transgéniques, lignées de cellules souches et lignées de cellules différenciées à partir de ces lignées de cellules souches, dans le génome desquels est insérée au moins une séquence d'ADN exogène génomique portant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2.
- 10 28. Animaux transgéniques selon la revendication 27 caractérisés en ce qu'ils sont choisis parmi les mammifères non-humains.
29. Procédé d'obtention d'animaux transgéniques, de lignées de cellules souches et de lignées de cellules différenciées à partir de ces lignées de cellules souches, selon l'une des revendications 27 et 28, caractérisé en ce qu'il comprend la génération d'animaux transgéniques, de lignées de cellules souches et de lignées de cellules différenciées à partir de ces lignées de cellules souches, comprenant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2 humain.
- 15 30. Utilisation d'animaux transgéniques, de lignées de cellules souches et de lignées de cellules différenciées à partir de ces lignées de cellules souches, selon l'une des revendications 27 et 28 pour tester l'activité d'agents ou de méthodes destinés à prévenir et/ou traiter la maladie d'Alzheimer.
- 20 31. Cellule extraite d'animaux transgéniques tel que décrit dans l'une des revendications 27 et 28.
- 25 32. Utilisation d'une cellule selon la revendication 31 pour la mise en évidence de composés destinés au traitement de la maladie d'Alzheimer.

33. Utilisation d'un composé, ou d'un mélange de composés connus pour leur activité à l'encontre de la maladie d'Alzheimer pour la fabrication d'un médicament pour le traitement d'un sujet atteint par la maladie d'Alzheimer, chez lequel la présence l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2a été détectée
5 préalablement au traitement.

34. Utilisation selon la revendication 33 caractérisée en ce que la maladie est du type maladie d'Alzheimer précoce.

35. Méthode de sélection d'un composé destiné à être administré à un individu présentant une maladie associée à l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 du
10 gène ABCA2 caractérisée en ce qu'elle comprend :

a. au moins une étape de détermination de la présence de l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2 dans un échantillon biologique dudit individu, et

b. la sélection du composé approprié si ledit allèle est présent.

15 36. Méthode selon la revendication 35 caractérisée en ce que la maladie associée à l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 est la maladie d'Alzheimer.

37. Méthode de sélection d'un composé destiné à être administré à un individu présentant la maladie d'Alzheimer caractérisée en ce qu'elle comprend :

20 a. au moins une étape de détermination de la présence de l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2 dans un échantillon biologique dudit individu, et

b. la sélection du composé approprié si ledit allèle est présent.

38. Méthode de traitement de la maladie d'Alzheimer caractérisée en ce qu'elle comprend :

-au moins une étape de détection de la présence de l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2 chez un sujet, et

- 5 -l'administration d'un composé, ou d'un mélange de composés connus pour leur activité à l'encontre de la maladie d'Alzheimer chez un sujet présentant l'allèle minoritaire du polymorphisme rs908832 du gène ABCA2.

SEQUENCE LISTING

<110> AVENTIS PHARMA S.A.

<120> METHODES DE DETECTION DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

<130> PRJ03027

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 562

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ttcatcacct gcggggtgggc caggggcttg gggcaggccc cgaggaggac gccgcccctc	60
cctgccagcc cgcgcctcca gggagagtcc cgcccgcgc acctccttga gccggtgctc	120
cttctccgcc acgatgtgct ggatggcat ggccacggag tagaccagg agatcaccat	180
gcacagcggc atcatgtgct caatgacaaa caggaagctg cgaggaggcc gcgctcaggc	240
gccactcagc ccagccccca gcccagccc cggcgccca gactcactc atcgcggtg	300
tagcaggggt aggggaacat ctgcacgtag ctgcctggct ccaccacatc gtgccccaca	360
aaagtgtcga tgatggcgct ctccatcatg tctgtgggtg gggcagcca tcaggtgccg	420
ggcaggccct ctgcctcctc cacctgtcct ccccatgaa tcctccagcc ggtcttccgg	480
gcctgtcct caccctggat ccagacgaag ccgtagagga agtagaagcg gccgccagta	540
ttgggcccag gccgccagta gg	562

<210> 2

<211> 562

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ttcatcacct gcggggtgggc caggggcttg gggcaggccc cgaggaggac gccgcccctc	60
cctgccagcc cgcgcctcca gggagagtcc cgcccgcgc acctccttga gccggtgctc	120
cttctccgcc acgatgtgct ggatggcat ggccacggag tagaccagg agatcaccat	180
gcacagcggc atcatgtgct caatgacaaa caggaagctg cgaggaggcc gcgctcaggc	240
gccactcagc ccagccccca gcccagccc cggcgccca gactcactc atcgcggtg	300
tagcaggggt aggggaacat ctgcacgtag ctgcctggct ccaccacgct gtgccccaca	360
aaagtgtcga tgatggcgct ctccatcatg tctgtgggtg gggcagcca tcaggtgccg	420
ggcaggccct ctgcctcctc cacctgtcct ccccatgaa tcctccagcc ggtcttccgg	480

2

gcctgctcct caccctggat ccagacgaag ccgtagagga agtagaagcg gccgccagta 540
 ttggggcccag gccgccagta gg 562

<210> 3
 <211> 400
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 gggcccaata ctggcggccg cttctacttc ctctacggct tcgtctggat ccaggggtgag 60
 gagcaggccc ggaagaccgg ctggaggatt catgggggag gacaggtgtg aggacgagag 120
 ggcttgcccg gcacctgatg gctgccccca cccacagaca tgatggagcg cgccatcatc 180
 gacacttttg tggggcacga tgtggtggag ccaggcagct acgtgcagat gttcccctac 240
 ccctgctaca cacgcgatga gtgagtgtg ggcgcccggg gctggggctg gggctggggc 300
 tgagtggcgc ctgagcgcg cctccccgca gcttcctgtt tgtcattgag cacatgatgc 360
 cgctgtgcat ggtgatctcc tgggtctact ccgtggccat 400

<210> 4
 <211> 400
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 gggcccaata ctggcggccg cttctacttc ctctacggct tcgtctggat ccaggggtgag 60
 gagcaggccc ggaagaccgg ctggaggatt catgggggag gacaggtgtg aggacgagag 120
 ggcttgcccg gcacctgatg gctgccccca cccacagaca tgatggagcg cgccatcatc 180
 gacacttttg tggggcacga cgtggtggag ccaggcagct acgtgcagat gttcccctac 240
 ccctgctaca cacgcgatga gtgagtgtg ggcgcccggg gctggggctg gggctggggc 300
 tgagtggcgc ctgagcgcg cctccccgca gcttcctgtt tgtcattgag cacatgatgc 360
 cgctgtgcat ggtgatctcc tgggtctact ccgtggccat 400

<210> 5
 <211> 8154
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 ggggcggagc cagcgcggat cgggtcccgg acgcccagac gcccgcgccc cgcgcgggcg 60
 atgcccagcg gcgcggcggg ctgcggggcc cggcgggggc cgcagaggag cgggcccgcg 120
 cgctgaggcg gcggagcgtg gcccgcgcat gggcttcctg caccagctgc agctgctgct 180
 ctggaagaac gtgacgctca aacgccggag cccgtgggtc ctggccttcg agatcttcat 240

ccccctggtg ctgttcttta tctgtctggg gctgcgacag aagaagccca ccatctccgt 300
gaaggaagtc cccttctaca cagcggcgcc cctgacgtct gccggcatcc tgcctgtcat 360
gcaatcgctg tgcccggacg gccagcgaga cgagttcggc ttctgtcagt acgccaactc 420
cacggtcacg cagctgcttg agcgcttggg ccgctgtggg gaggaaggca acctgtttga 480
cccagcgcgg ccagccttg gctcagagct cgaggcccta cgccagcatc tggaggccct 540
cagtgcgggc ccgggcacct cggggagcca cctggacaga tccacagtgt ctctcttctc 600
tctggactcg gtggccagaa acccgagga gctctggcgt ttctgtacgc aaaacttgtc 660
gctgcccatt agcacggccc aagcactctt ggccgcccgt gtggaccgc cagaggtcta 720
ccacctgctc tttggctcct catctgcctt ggattcacag tctggcctcc acaagggtca 780
ggagccctgg agccgcctag ggggcaatcc cctgttccgg atggaggagc tgctgtctggc 840
tctgcccctc ctggagcagc tcacctgcac gccgggctcg ggggagctgg gccggatcct 900
cactgtgcct gagagtcaga agggagccct gcagggtac cgggatgctg tctgcagtgg 960
gcaggctgct gcgctgcca ggcgcttctc tgggctgtct gctgagctcc ggaaccagct 1020
ggagctggcc aaggtctccc agcagctggg cctggatgcc cccaacggct cggactcctc 1080
gccacaggcg ccacccccac ggaggctgca ggcgcttctg ggggacctgc tggatgccc 1140
gaaggttctg caggatgtgg atgtcctgtc ggccctggcc ctgctactgc ccagggtgc 1200
ctgcactggc cggacccccg gacccccagc cagtgggtgc ggtggggcg ccaatggcac 1260
tggggcaggg gcagtcattg gcccacgc caccgctgag gagggcgac cctctgtctc 1320
agcactggcc accccggaca cgctgcaggg ccagtgtca gccttcgtac agctctgggc 1380
cggcctgcag cccatcttgt gtggcaaaa ccgcaccatt gaaccgagg cgctgcggcg 1440
gggcaacatg agctccctgg gcttcacgag caaggagcag cggaacctgg gcctcctcgt 1500
gcacctcatg accagcaacc ccaaaatcct gtacgcgcct gcgggctctg aggtcgaccg 1560
cgtcatcctc aaggccaacg agacttttgc ttttgtgggc aacgtgactc actatgccc 1620
ggtctggctc aacatctcgg cggagatccg cagcttctctg gagcagggca ggctgcagca 1680
acacctgcgc tggctgcagc agtatgtagc agagctgcgg ctgcaccccg aggcactgaa 1740
cctgtcactg gatgagctgc cgccggccct gagacaggac aacttctcgc tgcccagtgg 1800
catggccctc ctgcagcagc tggataccat tgacaacgcg gcctgcggct ggatccagtt 1860
catgtccaag gtgagcgtgg acatcttcaa gggcttcccc gacgaggaga gcattgtcaa 1920
ctacaccctc aaccaggcct accaggacaa cgtcactgtt ttgcccagtg tgatcttcca 1980
gacccggaag gacggctcgc tccgcctca cgtgcactac aagatccgc agaactccag 2040
cttcaccgag aaaaccaacg agatccgccc cgcctactgg cggcctgggc ccaatactgg 2100

cggccgcttc tacttcctct acggcttcgt ctggatccag gacatgatgg agcgcgccat 2160
catcgacact tttgtggggc acgacgtggg ggagccaggc agctacgtgc agatgttccc 2220
ctaccctgc tacacacgcg atgacttcct gtttgtcatt gagcacatga tgccgctgtg 2280
catggtgatc tcctgggtct actccgtggc catgaccatc cagcacatcg tggcggagaa 2340
ggagcaccgg ctcaaggagg tgatgaagac catgggcctg aacaacgcgg tgcactgggt 2400
ggcctggttc atcaccggct ttgtgcagct gtccatctcc gtgacagcac tcaccgccat 2460
cctgaagtac ggccagggtc ttatgcacag ccacgtgggtc atcatctggc tcttcctggc 2520
agtctacgcg gtggccacca tcatgttctg cttcctgggtg tctgtgctgt actccaaggc 2580
caagctggcc tcggcctgcg gtggcatcat ctacttcctg agctacgtgc cctacatgta 2640
cgtggcgatc cgagaggagg tggcgcatga taagatcacg gccttcgaga agtgcacgcg 2700
gtccctcatg tccacgacgg cttttggtct gggctctaag tacttcgcgc tgtatgaggt 2760
ggccggcgtg ggcatccagt ggcacacctt cagccagtcc ccggtggagg gggacgactt 2820
caacttgctc ctggctgtca ccatgctgat ggtggacgcc gtggtctatg gcacctcac 2880
gtggtacatt gaggctgtgc acccaggcat gtacgggctg ccccggccct ggtacttccc 2940
actgcagaag tcctactggc tgggcagtgg gcggacagaa gcctgggagt ggagctggcc 3000
gtgggcacgc accccccgcc tcagtgtcat ggaggaggac caggcctgtg ccatggagag 3060
ccggcgcttt gaggagaccg gtggcatgga ggaggagccc acccacctgc ctctggttgt 3120
ctgcgtggac aaactcacca aggtctacaa ggacgacaag aagctggccc tgaacaagct 3180
gagcctgaac ctctacgaga accagggtgt ctccttcttg ggccacaacg gggcgggcaa 3240
gaccaccacc atgtccatcc tgaccggcct gttccctcca acgtcgggtt ccgccaccat 3300
ctacgggcac gacatccgca cggagatgga tgagatccgc aagaacctgg gcatgtgccc 3360
gcagcacaat gtgctctttg accggctcac ggtggaggaa cacctctggt tctactcacg 3420
gctcaagagc atggctcagg aggagatccg cagagagatg gacaagatga tcgaggacct 3480
ggagctctcc aacaaacggc actcactggt gcagacattg tcgggtggca tgaagcgcaa 3540
gctgtccgtg gccatcgcct tcgtgggcgg ctctcgcgcc atcatcctgg acgagcccac 3600
ggcgggcgtg gaccctacg cgcgccgcgc catctgggac ctcatcctga agtacaagcc 3660
aggccgcacc atccttctgt ccaccacca catggatgag gctgacctgc ttggggaccg 3720
cattgccatc atctcccatg ggaagctcaa gtgctgcggc tccccgctct tcctcaaggg 3780
cacctatggc gacgggtacc gcctcacgct ggtcaagcgg cccgccgagc cggggggccc 3840
ccaagagcca gggctggcat ccagcccccc aggtcggggc ccgctgagca gctgctccga 3900

gctccaggtg tcccagttca tccgcaagca tgtggcctcc tgccctgctgg tctcagacac 3960
aagcacggag ctctctctaca tcttgcccag cgaggccgcc aagaaggggg ctttcgagcg 4020
cctcttccag cacctggagc gcagcctgga tgcactgcac ctgagcagct tcgggctgat 4080
ggacacgacc ctggaggaag tgttcctcaa ggtgtcggag gaggatcagt cgctggagaa 4140
cagtgaggcc gatgtgaagg agtccaggaa ggatgtgctc cctggggcgg agggcccggc 4200
gtctggggag ggtcacgctg gcaatctggc ccggtgctcg gagctgacct agtcgcaggc 4260
atcgctgcag tcggcgctcat ctgtgggctc tgcccgtggc gacgaggag ctggctacac 4320
cgacgtctat ggcgactacc gccccctctt tgataacca caggaccag acaatgtcag 4380
cctgcaagag gtggaggcag aggccctgtc gagggtcggc cagggcagcc gcaagctgga 4440
cggcggttg ctgaagggtc gccagttcca cgggctgctg gtcaaactgt tccactgcgc 4500
ccgcgcgaac tccaaggcac tcttctccca gatcttgctg ccagccttct tcgtctgcgt 4560
ggccatgacc gtggccctgt ccgtcccga gattggtgat ctgccccgc tggctctgtc 4620
accttcccag taccacaact acaccagcc ccgtggcaat ttcacccct acgccaacga 4680
ggagcgccgc gagtaccggc tgccgctatc gcccgacgc agccccagc agctcgtgag 4740
cacgttccgg ctgcgcgctg ggggtgggtgc cacctgcgtg ctcaagtctc ccgccaacgg 4800
ctcgctgggg ccacgcttga acctgagcag cggggagtcg cgcctgctgg cggctcgggt 4860
cttcgacagc atgtgtcttg agtccttcac acaggggctg ccactgtcca atttcgtgcc 4920
acccccaccc tcgcccgcgc catctgactc gccagcgtcc ccgcatgagg acctgcaggc 4980
ctggaacgtc tccctgccgc ccaccgctgg gccagaaatg tggacgtcgg caccctccct 5040
gccgcgcctg gtacggggagc ccgtccgctg cacctgctct gcgcagggca ccggcttctc 5100
ctgccccagc agtgtgggag ggcaccgcgc ccagatgcgg gtggtcacag gcgacatcct 5160
gaccgacatc accggccaca atgtctctga gtacctgtc ttcacctccg accgcttccg 5220
actgcaccgg tatggggcca tcacctttgg aaacgtcctg aagtccatcc cagcctcatt 5280
tgccaccagg gccccacca tgggtcggaa gatcgcggtg cgcagggctg ccaggtttt 5340
ctacaacaac aagggtatc acagcatgcc cacctacctc aacagcctca acaacgccat 5400
cctgcgtgcc aacctgcca agagcaagg caaccggcg gcttacggca tcaccgtcac 5460
caaccacccc atgaataaga ccagcgccag cctctccctg gattacctgc tgcagggcac 5520
ggatgtcgtc atcgccatct tcatcatcgt ggccatgtcc ttcgtgccgg ccagcttcgt 5580
tgtcttctc gtggccgaga agtccaccaa ggccaagcat ctgcagtttg tcagcggctg 5640
caaccacatc atctactggc tggcgaacta cgtgtgggac atgtcaact acctggtccc 5700
cgctacctgc tgtgtcatca tctgtttgt gttcgacctg ccggcctaca cgtcgccac 5760

caacttccct gccgtcctct ccctcttct gctctatggg tgggtccatca cgcccatcat	5820
gtacccggcc tccttctggt tcgaggtccc cagctccgcc tacgtgttcc tcattgtcat	5880
caatctcttc atcggcatca ccgccaccgt ggccaaccttc ctgctacagc tcttcgagca	5940
cgacaaggac ctgaagggtg tcaacagtta cctgaaaagc tgcttctca ttttcccaa	6000
ctacaacctg ggccacgggc tcatggagat ggctacaac gagtacatca acgagtacta	6060
cgccaagatt ggccagtttg acaagatgaa gtccccgttc gagtgggaca ttgtcaccg	6120
cggactggtg gccatggcgg ttgagggcgt cgtgggcttc ctctgacca tcatgtgcca	6180
gtacaacttc ctgcggcggc cacagcgcgt gcctgtgtct accaagcctg tggaggatga	6240
tgtggacgtg gccagtgagc ggcagcgagt gctccgggga gacgccgaca atgacatggt	6300
caagattgag aacctgacca aggtctacaa gtcccgggaag attggccgta tcctggcgt	6360
tgaccgcctg tgcctgggtg tgcgtctgg cgagtgttc gggctcctgg gcgtcaacgg	6420
tgcgggcaag accagcacct tcaagatgct gaccggcgac gagagcacga cggggggcga	6480
ggccttcgtc aatggacaca gcgtgctgaa ggagctgctc cagggtgcagc agagcctcgg	6540
ctactgcccg cagtgtgacg cgctgttoga cgagctcacg gcccgggagc acctgcagct	6600
gtacacgcgg ctgcgtggga tctcctggaa ggacgaggcc cgggtggtga agtgggctct	6660
ggagaagctg gagctgacca agtacgcaga caagccggct ggcacctaca gcggcgga	6720
caagcggaag ctctccacgg ccatcgccct cattgggtac ccagccttca tcttcctgga	6780
cgagcccacc acaggcatgg accccaaggc cggcgcttc ctctggaacc tcctcctcga	6840
cctcatcaag acagggcgtt cagtgggtgt gacatcacac agcatggagg agtgcgaggc	6900
gctgtgcacg cggctggcca tcatggtgaa cggctgcctg cggctgcctgg gcagcatcca	6960
gcacctgaag aaccggtttg gagatggcta catgatcacg gtgcggacca agagcagcca	7020
gagtgtgaag gacgtgggtg ggttcttcaa ccgcaacttc ccggaagcca tgctcaagga	7080
gcggcaccac acaaagggtg agtaccagct caagtcggag cacatctcgc tggcccaggt	7140
gttcagcaag atggagcagg tgtctggcgt gctgggcctc gaggactact cggctcagcca	7200
gaccacactg gacaatgtgt tcgtgaactt tgccaagaag cagagtgaca acctggagca	7260
gcaggagacg gagccgccat ccgcactgca gtcccccttc ggctgcttgc tcagcctgct	7320
ccggccccgg tctgccccca cggagctccg ggcacttgtg gcagacgagc ccgaggacct	7380
ggacacggag gacgagggcc tcatcagctt cgaggaggag cgggcccagc tgtccttcaa	7440
cacggacacg ctctgctgac caccagagc tgggccaggg aggacacgct cactgacca	7500
cccagagctg ggccagggac tcaacaatgg ggacagaagt ccccagtgct ctgccagggc	7560

ctggagtgga ggttcaggac caaggggctt ctggtcctcc agcccctgta ctgggccatg 7620
ccctgcggtc actgcggttg ccgcccctaa ttgtgccaaa ggctgaccgc gcccgggctg 7680
cgtacaccct tgccctgctt tgccttaaag cctcggggtc tgcccggccc ctgccccctg 7740
cctggcactg ctcaccgccc aaggcgacgc cggctggacc aggcactgct ggcctttctc 7800
ctgcccggcc tcggaaccag cttttctctc ttacgatgaa ggctgatgcc gagagcgggc 7860
tgtgggcgga gctgggtcag tcccgtatth atthtgctth gagaagaggc tcctctggcc 7920
ctgctctcct gcagggaggt ggctgtcccg cgggaagcca tcagcttggg ccagctggca 7980
ggtggcagga atggagaagc tgaccctgct ggccaggcaa ggggccagac ccccccaac 8040
ccccagctgc catcgtctc ccaccagct tggccccctg cccgcccacc tccttgggag 8100
ccgggcctgt acatagcgca cagatgtttg ttttaaataa ataaacaaaa tgtc 8154

<210> 6
<211> 16
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
agcgcgccat catcga 16

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
cactcatcgc gtgtgtagca 20

<210> 8
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
cacgatgtgg tggag 15

<210> 9
<211> 14
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
cacgacgtgg tgga 14