



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102007901563914
Data Deposito	12/10/2007
Data Pubblicazione	12/04/2009

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

PRODOTTI E LORO USO PER LA DIAGNOSI PREVENZIONE E-O CURA DI PATOLOGIE UMANE E-O ANIMALI CARATTERIZZATE DALLA ANOMALA DEPOSIZIONE DI SOSTANZA B-AMILOIDE E-O SIMILAMILOIDE IN ORGANI E TESSUTTI UMANI E-O ANIMALI E METODO DI SCREENING PER LA DETERMINAZIONE DEL RISCHIO DI TALI PATOLOGIE.

Descrizione di una domanda di brevetto per invenzione industriale a nome FONDAZIONE I.R.C.C.S. ISTITUTO NEUROLOGICO "CARLO BESTA"

C.C.I.A.A. BREVETTI
12 OTT 2007
MILANO

Depositata il

con numero

DESCRIZIONE

MI2007 A 0 0 1 9 7 5

La malattia di Alzheimer (AD) è la forma più comune di demenza nell'anziano. Si tratta di una malattia degenerativa caratterizzata clinicamente dal progressivo declino delle funzioni cognitive, e neuropatologicamente dall'accumulo di aggregati insolubili di β -amiloide ($A\beta$) e proteina *tau*, nella corteccia cerebrale e in strutture grigie sottocorticali. L' $A\beta$ si deposita sotto forma di amiloide extracellulare nel neuropilo (*placche senili*) e nei vasi cerebrali (*angiopatia congofila*), mentre la proteina *tau* forma filamenti anomali intraneuronali (*degenerazioni neurofibrillari*) (Love S. Neuropathological investigation of dementia: a guide for neurologists. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76, Suppl 5:v8-14, 2005) (Figura 1).

Nel 95% dei casi la malattia di Alzheimer è sporadica, mentre nel 5% circa dei casi ha un carattere familiare ed è associata a mutazioni a carico di 3 geni: presenilina 1 (PSEN1) sul cromosoma 14, presenilina 2 (PSEN2) sul cromosoma 1 e precursore della β -amiloide (APP) sul cromosoma 21. In questi casi la malattia ha spesso un esordio più precoce della forma sporadica ed è trasmessa con meccanismo di tipo autosomico dominante ad alta penetranza.

L'A β deriva dal suo precursore β APP attraverso una via catabolica denominata "*pathway amiloidogenico*" (Figura 2). Questo *pathway* prevede il clivaggio della molecola a monte e a valle della β -proteina per opera di due proteasi, la *beta*- e la *gamma-secretasi*. Il taglio della *beta-secretasi* (BACE) genera un lungo frammento solubile (sAPP β) N-terminale ed un peptide C-terminale di 99 aminoacidi (C99). Questo viene ulteriormente tagliato dalla *gamma-secretasi* in due frammenti che corrispondono ad A β ed a un piccolo peptide C-terminale (AICD) (Selkoe DJ. Deciphering the genesis and fate of amyloid β -protein yields novel therapies for Alzheimer disease. *J Clin Invest* 110:1375–81, 2002). La *gamma-secretasi*, in realtà, ha due principali siti di clivaggio che conducono alla formazione di una forma "breve" e una forma "lunga" di A β (A β 1–40 e A β 1–42), le quali, in condizioni normali hanno un rapporto di 10:1. Analogamente, BACE può agire in corrispondenza di diversi punti del peptide generando forme tronche nella regione N-

terminale (e.g. A β 11-40, A β 11-42 e A β 3-42), le quali risultano spesso aumentate nell'AD (*Liu et al. Characterization of A β 11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated A β species in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Acta Neuropathol 112:163-74, 2006*). β APP può andare incontro ad un *pathway* catabolico alternativo denominato "non amiloidogenico" in quanto la proteina viene tagliata da un'altra proteasi (l'*alfa-secretasi*) in corrispondenza dei residui 16-17 di A β . L'azione di quest'ultimo enzima preclude pertanto la formazione di β -amiloide.

L'*amyloid cascade hypothesis* è supportata da molteplici evidenze:

- mutazioni nel gene APP determinano forme familiari di AD (*Rademakers et al. Genetics of Early-Onset Alzheimer Dementia. ScientificWorldJournal 16:497-519, 2003*);
- la presenza di un'extra-copia del gene APP, come si verifica nella sindrome di Down, è sufficiente a determinare un quadro clinico-patologico di AD;
- la maggior parte delle forme geneticamente determinate di AD è associata ad un aumento della produzione di A β , con incremento del rapporto A β 42/A β 40 (*Kahle et al. Attack on amyloid. EMBO Rep 4:747-51, 2003*);

- l'A β , particolarmente la forma "lunga" a 42 residui, mostra una spiccata tendenza ad aggregarsi in oligomeri e a formare fibrille amiloidi che rappresentano il costituente principale delle placche senili (*Armstrong RA. Plaques and tangles and the pathogenesis of Alzheimer's disease. Folia Neuropathol 44:1-11, 2006*);
- l'A β , specie la forma a 42 aminoacidi, è neurotossica (*Butterfield et al. Amyloid beta-peptide(1-42) contributes to the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain. Brain Pathol 14:426-32, 2004*);
- topi transgenici portatori di mutazioni del gene APP associate ad AD, accumulano β -amiloide nel sistema nervoso centrale e manifestano deficit della sfera cognitivo-comportamentale che si aggravano in funzione dell'età (*Kurt et al. Neurodegenerative changes associated with beta-amyloid deposition in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes. Exp Neurol 171:59-71, 2001*);
- l'immunizzazione verso A β di topi transgenici esprimenti APP umana, riduce la formazione di placche amiloidi e ne migliora i deficit neurologici (*Lemere et al. Amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease transgenic mouse models and wildtype mice. Neurochem Res 28:1017-27, 2003*).

Per quanto riguarda le forme geneticamente determinate, circa l'80% dei casi di AD familiare è associato a mutazioni in PSEN1 e PSEN2 (Rocchi *et al.* Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull* 61:1–24, 2003). Entrambe le preseniline sono coinvolte nella generazione di A β , essendo parte del complesso macromolecolare della *gamma-secretasi*, e loro mutazioni determinano un incremento della produzione di A β , soprattutto di A β 1-42, la quale ha una elevata tendenza a formare aggregati neurotossici.

Il 5% circa delle FAD sono causate da mutazioni localizzate nel gene APP (Rocchi *et al.* Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull* 61:1–24, 2003) (Figura 2). Alcune di queste mutazioni esercitano il loro effetto patogenico favorendo conformazioni di A β ricche in struttura secondaria *beta-sheet*, con conseguente riduzione della solubilità e tendenza all'aggregazione. Altre mutazioni, invece, interferirebbero col processing dell'APP, in virtù della loro localizzazione nei siti della molecola ove agiscono le secretasi (e.g., "Swedish mutation" KM670/671NL). Altre ancora, con meccanismo tuttora ignoto, provocano la produzione e l'accumulo delle forme lunghe ed insolubili di A β (A β 1-42 e A β 1-43). Nei casi di AD associati a mutazioni dell'APP o delle preseniline, l'A β 1-42 aumenta fino a costituire il 15-40% dei peptidi A β secreti, mentre in condizioni normali essa ne

rappresenta solo il 5-10% (*Rocchi et al.* Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull* 61:1-24, 2003; *Lleò et al.* Clinical, Pathological, and Biochemical Spectrum of Alzheimer Disease Associated With PS-1 Mutations. *Am J Geriatr Psychiatry* 12:146-56, 2004).

Compito tecnico della presente invenzione è quello di fornire dei prodotti e un loro uso per la diagnosi e/o prevenzione e/o cura di patologie umane e/o animali caratterizzate dalla anomala deposizione di sostanza β -amiloide e/o simil-amiloide in organi e tessuti umani e/o animali, ed un metodo di screening per la determinazione del rischio di tali patologie.

Il compito tecnico, nonché altri scopi secondo la presente invenzione, vengono raggiunti tramite quanto rivelato nelle rivendicazioni indipendenti di seguito riportate.

Altre caratteristiche dell'invenzione sono definite dalle rivendicazioni successive.

Ulteriori caratteristiche e vantaggi della presente invenzione risulteranno maggiormente evidenti dalla descrizione che segue supportata dalle figure da 1 a 19 allegate.

La presente invenzione si riferisce alla recente scoperta di una nuova mutazione puntiforme nel gene APP umano. La mutazione è caratterizzata dalla sostituzione di una Citosina con una Timidina al codone 673 della sequenza codificante del gene APP umano (D8765), corrispondente al nucleotide 2212 (transizione *c.2212C>T*) dell'isoforma di APP770 umana

(NM_000484.2) secondo la nomenclatura del database *GenBank*, accessibile al sito web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Ai fini di questo brevetto, per sostanza simil-amiloide si intendono aggregati proteici di A β che non possiedono le caratteristiche tintoriali e/o ultrastrutturali dell'amiloide stessa. Tale mutazione, che induce nella sequenza proteica la sostituzione di un'alanina con una valina nella posizione 673 (Ala673Val) dell'APP770, corrispondente al residuo aminoacidico 2 di A β , è stata identificata in omozigosi in un paziente affetto da una grave forma di demenza ad esordio presenile. L'analisi del liquido cefalo-rachidiano del paziente ha evidenziato una notevole diminuzione di A β 1-42 e un aumento della proteina tau totale e tau fosforilata, come si osserva nella malattia di Alzheimer. D'altra parte, i livelli plasmatici di A β 1-40 e A β 1-42 risultavano aumentati rispetto a soggetti di controllo e anche a soggetti portatori della stessa mutazione in eterozigosi. Inoltre, i fibroblasti ottenuti da biopsia cutanea del paziente rilasciavano nel proprio medium di coltura quantità di A β 1-40 e A β 1-42 più elevate rispetto a fibroblasti di controllo. Nel loro insieme questi dati, i cui dettagli sono riportati in alcuni degli esempi elencati successivamente, indicano che la mutazione Ala673Val, in stato di omozigosi, si associa ad una demenza inquadrabile come malattia di Alzheimer e, analogamente ad altre mutazioni nel gene APP, influenza il processing dell'APP incrementando la produzione di A β .

Lo studio genetico di diversi membri della famiglia ha dimostrato la presenza di un altro familiare portatore della mutazione Ala673Val in omozigosi. Questo familiare, più giovane del paziente, è stato sottoposto a valutazione neuropsicologica, la quale ha rivelato iniziali segni di compromissione di diverse funzioni cognitive. L'analisi genetica ha consentito, inoltre, di identificare numerosi soggetti portatori della stessa mutazione in eterozigosi i quali, sorprendentemente, non avevano sviluppato nessuna malattia neurologica pur essendo, alcuni di loro, in età avanzata (IX decade di vita) (Figura 4). Studi di espressione genica eseguiti sull'RNA trascritto a partire dal gene APP, hanno dimostrato che in questi soggetti entrambi gli alleli (i.e., quello wild type e quello mutato) vengono trascritti. Dunque l'assenza di malattia negli eterozigoti non può essere imputato ad un meccanismo di repressione genica (inibizione della trascrizione dell'allele "patologico"). E' pertanto ipotizzabile che la mutazione Ala673Val, contrariamente a quelle finora descritte nel gene APP, tutte autosomiche dominanti a penetranza completa, abbia un'espressione di tipo autosomico recessivo. Ne consegue che alcune forme apparentemente sporadiche di AD potrebbero essere forme geneticamente determinate a trasmissione autosomica recessiva.

Per indagare le basi molecolari di questo fenomeno abbiamo sintetizzato 2 peptidi A β 1-40, uno *wild-type*

(DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV)

, l'altro contenente una valina al posto dell'alanina in posizione 2

(DVEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVV)

. I due peptici sono stati sottoposti ad analisi chimico-fisiche e morfologiche volte a valutare la loro struttura secondaria, la cinetica di aggregazione, e la morfologia e la natura degli aggregati. Queste indagini hanno dimostrato che il peptide mutato ha una propensione a formare fibrille amiloidi molto maggiore di quello *wild-type*. Del tutto sorprendentemente, la miscela costituita da quantità equimolari dei due peptidi non solo aggrega meno del mutato ma anche del peptide *wild-type* da solo. Questo effetto "inibitorio" sull'amiloidogenesi è in sintonia con l'osservazione clinica che la malattia si manifesta esclusivamente nei soggetti omozigoti per la mutazione Ala673Val mentre gli eterozigoti, che co-esprimono a livello cellulare entrambi i peptidi (*wild-type* e mutato) non si ammalano. Sulla base di questi dati è addirittura ipotizzabile che gli individui eterozigoti possano essere protetti dalla malattia di Alzheimer grazie alla scarsa tendenza fibrillogena del peptide A β mutato in presenza del suo corrispettivo *wild-type*.

Per verificare l'ipotesi che la regione N-terminale di A β , sede della mutazione, giochi un ruolo importante nell'aggregazione e che la mutazione Ala673Val abbia un effetto inibitorio, sono stati sintetizzati due peptidi corrispondenti ai primi sei

aminoacidi di A β , uno con la sequenza *wild-type* (DAEFRH) e l'altro contenente una valina al posto dell'alanina in posizione 2 (DVEFRH). I due esapeptidi sono stati quindi co-incubati con l'A β 1-40 *wild-type* ed esaminati a tempi successivi. Lo studio ha dimostrato che entrambi gli esapeptidi inibiscono la spontanea tendenza alla fibrillogenesi di A β 1-40 e che l'effetto dell'esapeptide mutato è maggiore di quello del corrispettivo *wild-type*.

Questi dati aprono nuove prospettive nell'ambito delle strategie terapeutiche dell'AD e, più in generale, delle malattie caratterizzate da accumulo di proteine in forma di aggregati insolubili e tossici nel sistema nervoso centrale o in altri tessuti.

Una prima applicazione della nostra invenzione consiste nella produzione, secondo metodiche note agli esperti in materia, di un vettore contenente il cDNA dell'APP umana con mutazione Ala673Val, e l'uso di detto vettore per transfettare linee cellulari utilizzabili per studi di patogenesi e terapia.

Una seconda applicazione consiste nell'uso del costrutto di cui alla precedente applicazione come vettore per la produzione, secondo metodiche note agli esperti del settore, di mammiferi non-umani transgenici capaci di esprimere APP umana con mutazione Ala673Val, come unica forma di APP (animali omozigoti) o in combinazione con APP umana *wild-type* o contenente un'altra mutazione (doppi transgenici). Tali animali

possono essere utilizzati come modelli per lo studio della patogenesi, diagnosi, prevenzione e cura di patologie dell'uomo e/o di animali, caratterizzate dalla anomala formazione e deposizione di sostanza β -amiloide e/o simil-amiloide in organi e tessuti. Nella nostra attuazione l'animale preferito è il topo, ed in particolare il ceppo murino C57BL6 knock-out per la APP endogena, e la patologia preferita è la AD.

Considerando la potenziale capacità del peptide mutato di interferire con l'aggregazione e la fibrillogenesi di $A\beta$, un'altra possibile applicazione della nostra invenzione è rappresentata dalla generazione di un costrutto contenente APP con mutazione Ala673Val da utilizzare nella terapia genica in vivo (il DNA viene trasferito direttamente nelle cellule o nei tessuti del paziente) o ex vivo (il DNA viene dapprima trasferito in cellule isolate dall'organismo e cresciute in laboratorio, le quali, così modificate, possono essere reintrodotte nel paziente) di patologie caratterizzate da anomala deposizione di sostanza β -amiloide in organi e tessuti. Il trasferimento del costrutto nelle cellule bersaglio è realizzabile mediante vettori di tipo virale come ad esempio (a) retrovirus che hanno la capacità di integrare il loro DNA all'interno dei cromosomi di cellule in proliferazione, (b) lentivirus che permettono di trasferire materiale genetico anche in cellule che non proliferano, (c) virus adenoassociati che integrano il loro DNA nei cromosomi della cellula ospite ma sono utilizzabili solo per geni di piccole

dimensioni, (d) adenovirus che possono trasportare geni di grosse dimensioni ma garantiscono tuttavia la loro espressione per periodi di tempo limitati, o (e) il virus dell'herpes simplex che infetta soltanto alcuni tipi di cellule, in particolare i neuroni. In alternativa è possibile utilizzare vettori non virali come i liposomi. L'introduzione di APP con mutazione Ala673Val in organismi affetti da patologie con accumulo anormale di A β potrebbe dunque fornire una fonte di β -proteina mutata in grado di inibire l'accumulo di sostanza β -amiloide nei tessuti.

Un'altra possibile applicazione è rappresentata dall'uso di mRNA antisenso, contenente la mutazione in oggetto, per inibire la traduzione del messaggero in soggetti omozigoti per la mutazione Ala673Val, secondo metodiche note agli esperti in materia (*RNA interference, RNAi*). L'inibizione della traduzione ha lo scopo di determinare un blocco della produzione di peptidi mutati i quali hanno spiccata tendenza all'aggregazione. Gli esperimenti basati sulla tecnologia dell'*RNAi* applicata alla nostra invenzione possono inoltre essere utili nello studio della patogenesi di malattie caratterizzate da anomala formazione e deposizione di sostanza β -amiloide e/o simil-amiloide in organi e tessuti.

Un'altra applicazione della nostra invenzione prevede l'uso della APP umana con mutazione Ala673Val e di peptidi, naturali o di sintesi, contenenti la mutazione stessa per la diagnosi, prevenzione e cura di patologie, dell'uomo e/o di

animali, caratterizzate dalla anomala formazione e deposizione di sostanza β -amiloide e/o simil-amiloide in organi e tessuti.

La nostra attuazione preferita prevede l'uso di peptidi di basso peso molecolare, come l'esapeptide DVEFRH, opportunamente formulato per la somministrazione per via orale e/o parenterale, compresa la somministrazione intratecale. La patologia preferita è la AD. Il trattamento prevede la somministrazione di singoli peptidi o la associazione di più peptidi, utilizzati come unico trattamento o in associazione con altri farmaci.

Una ulteriore applicazione della nostra invenzione prevede la produzione, mediante tecniche note agli esperti del settore, di anticorpi verso le proteine e/o i peptidi di cui alla applicazione precedente, da utilizzare nella diagnosi, prevenzione e/o cura delle patologie dell'uomo e/o di animali, caratterizzate dalla anomala formazione e deposizione di sostanza β -amiloide e/o simil-amiloide in organi e tessuti.

La nostra attuazione preferita prevede un anticorpo monoclonale capace di riconoscere la mutazione Ala673Val nella APP umana e in peptidi da essa derivati e contenenti tale mutazione. Tale anticorpo può essere utilizzato a scopo diagnostico per riconoscere la APP con mutazione Ala673Val o, opportunamente formulato, per il trattamento di amiloidosi caratterizzate dalla presenza di tale APP mutata. La amiloidosi preferita è la AD.

Le applicazioni sopra descritte vengono riportate a titolo di esempio e non sono in alcun modo limitative degli sviluppi della nostra invenzione.

ESEMPI

Esempio 1: *Identificazione di una nuova mutazione del gene APP e descrizione del fenotipo clinico del paziente portatore di tale mutazione.*

L'identificazione della mutazione è stata condotta mediante estrazione del DNA genomico dai linfociti del paziente, amplificazione degli esoni 16 e 17 del gene APP mediante polymerase chain reaction (PCR), utilizzando i primers 5'-GTTTGGGTAGCCTTTG-3' e 5'-GGCAAGACAAACAGTAGTGG-3' e sequenziamento del prodotto di amplificazione (Figura 5) secondo tecniche già descritte (*Wakutani et al. Novel amyloid precursor protein gene missense mutation (D678N) in probable familial Alzheimer's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry 75:1039-42, 2004*).

Poiché la mutazione abolisce un sito di taglio specifico per l'enzima di restrizione HpYCH4V all'interno dell'esone 16, la presenza di Ala673Val è stata evidenziata anche mediante amplificazione dell'esone 16 mediante PCR (primers: 5'-GGCAAGACAAACAGTAGTGG-3' e 5'-TACTTTAATTATGATGTAATA-3'), digestione del prodotto di PCR con HpYCH4V, e separazione dei frammenti su gel di agarosio al 2.5%. Nell'allele *wild-type* la digestione con

HpYCH4 produce due frammenti di 91 e 78 paia di basi (bp), mentre nell'allele mutato genera un unico frammento di 169 bp (Figura 6).

La mutazione Ala673Val è stata identificata in omozigosi in un paziente senza familiarità per demenza, affetto da una sindrome psicorganica evolutiva esordita all'età di 36 anni con ingravescenti deficit di memoria, difficoltà di pianificazione e disturbi del comportamento (Figura 4, III 18). Il quadro clinico è evoluto verso una grave decadimento cognitivo plurisettoriale, al quale si sono associati movimenti involontari di tipo mioclonico, parkinsonismo e tetraparesi spastica.

Lo studio genetico della famiglia ha consentito di identificare un secondo soggetto omozigote per la mutazione Ala673Val (Figura 4, III 20) e diversi soggetti eterozigoti (Figura 4, II 10, III 1, III 2, III 8, III 12, IV 1). L'omozigote (i.e., la sorella del paziente, più giovane di 5 anni) presenta attualmente segni iniziali di deterioramento cognitivo compatibili con un esordio della malattia; al contrario, nessuno dei soggetti eterozigoti ha manifestato segni di patologia neurologica, nemmeno in età avanzata. Questa osservazione suggerisce che la mutazione Ala673Val sia autosomica recessiva, risultando l'unica tra quelle finora descritte in associazione con AD, che esprime un fenotipo patologico solo quando si presenta in omozigosi.

Occorre segnalare che lo stesso codone del gene APP è sede di un polimorfismo Ala673Thr. Questo polimorfismo è stato riscontrato in eterozigosi in un soggetto senza segni clinici o alterazioni neuropatologiche suggestivi di AD (*Peacock et al. Novel polymorphism in the A4 region of the amyloid precursor protein gene in a patient without Alzheimer's disease. Neurology* 43:1254-56, 1993).

Le indagini di laboratorio e strumentali eseguite sul paziente hanno evidenziato:

- un quadro di atrofia cerebrale diffusa con prevalente coinvolgimento delle regioni anteriori, alla RM dell'encefalo;
- incremento significativo dei peptidi A β 1-40 e A β 1-42 nel plasma (426 ± 93 pg/ml e 46 ± 7 pg/ml, rispettivamente) in confronto con un gruppo di controllo rappresentato da soggetti non affetti da demenza (A β 1-40 = 109 ± 12 pg/ml, $p=0.003$; A β 1-42 = 20 ± 6 pg/ml, $p=0.004$) (Figura 7);
- incremento di A β nel medium di coltura dei fibroblasti prelevati dal paziente mediante biopsia cutanea (A β 1-40 = 87.3 ± 9.5 pg/ml; A β 1-42 = $8,8 \pm 0,2$ pg/ml) rispetto ai controlli negativi (A β 1-40 = 34.4 ± 3.8 pg/ml; A β 1-42 = 4.4 ± 0.6 pg/ml) (Figura 8);
- diminuzione di A β 1-42 (151 ± 43 pg/ml versus 392 ± 115 pg/ml di un gruppo di controllo, $p=0.0004$) (Figura 9), e incremento della proteina tau (420 pg/ml; range di normalità:

90-150 pg/ml) e fosfo-tau (63.3 pg/ml; concentrazione media nei controlli: 19.1 pg/ml) (Figura 10) nel liquido cerebro-spinale.

Le alterazioni descritte sono del tutto simili a quelle osservate nella malattia di Alzheimer.

Esempio 2: *Analisi delle caratteristiche chimico-fisiche di peptidi A β contenenti la mutazione Ala673Val.*

Allo scopo di stabilire gli effetti della mutazione Ala673Val e verificare il suo ruolo nella patogenesi della AD, abbiamo sintetizzato 2 peptidi A β 1-40, uno con la sequenza *wild-type* (DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG VV) e l'altro contenente la sostituzione alanina>valina in posizione

2

(DVEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGG VV). I peptidi sono stati prodotti mediante sintesi in fase solida utilizzando un sintetizzatore 433A (Applied Biosystems). I peptidi legati alla resina sono stati quindi derivatizzati all'N-terminale con un probe lipofilico (4-dodecylaminocarbonylfluorene-9-ylmetilsuccinimidyl carbonate) secondo il metodo descritto da Ball *et al.* (*Int J Pept Prot Res* 40:370-9, 1992) con le modificazioni introdotte da Bonetto *et al.* (*J Biol Chem* 277: 31327-34, 2002). Dopo distacco della resina, i peptidi sono stati purificati mediante HPLC utilizzando una colonna in fase inversa C4 (Waters), ottenendo una purezza >95%. L'identità dei peptidi è stata

determinata mediante spettrometria MALDI-TOF (Modello Reflex III Brucker).

Per gli studi fisico-chimici riportati di seguito (se non diversamente specificato) i peptidi A β 1-40 wild-type, A β 1-40 mutato e campioni contenenti miscele equimolari dei due sono stati dissolti in 10 mM NaOH e successivamente diluiti in 50 mM Tris HCl, pH 7.0, alla concentrazione finale di 0.25 e 0.125 mM. I campioni sono stati quindi incubati a 37°C per 1, 4, 8, 24 ore e 3, 5, 10, 15 e 20 giorni. Ad ogni tempo, aliquote dei campioni sono stati analizzate per determinare la struttura secondaria, l'aggregazione, l'ultrastruttura e le proprietà ottico-tintoriali degli aggregati.

Struttura secondaria

Le variazioni indotte dalla mutazione sulla struttura secondaria di A β sono state indagate mediante Dicroismo Circolare secondo la tecnica descritta da Clippingdale et al. (*J Pept Sci* 5:227-49, 2001). I peptidi sono stati diluiti in tampone fosfato 150 mM, pH 7.4, alla concentrazione finale di 100 μ M, e le misure sono state eseguite con uno spettropolarimetro Jasco-810 a temperatura costante di 37°C. Gli spettri sono stati acquisiti usando una cuvetta da 1 mm e una velocità di scansione di 20 nm/min. Dopo aver sottratto lo spettro della soluzione tampone, il rumore è stato ridotto, quando richiesto, utilizzando il metodo del "moving average".

UNIVERSITÀ
di PADOVA

L'analisi ha dimostrato che il peptide mutato ha una marcata tendenza ad assumere una conformazione secondaria ricca in β -sheet. A tutti i tempi esaminati, il contenuto β -sheet è risultato molto più elevato non solo rispetto a quello del peptide *wild-type* ma anche della miscela equimolare costituita da peptide *wild-type*:peptide mutato (Figura 11).

Questo dato indica che la mutazione Ala673Val condiziona il *folding* di A β determinando un notevole incremento della struttura secondaria β -sheet.

Aggregazione

L'aggregazione di A β 1-40 *wild-type*, A β 1-40 mutato e della loro miscela equimolare è stata valutata determinando la quantità di peptide sedimentabile con centrifugazione. Ai diversi tempi di incubazione, aliquote di 30 μ l dei campioni sono state centrifugate a 15,000 g per 15 minuti a 4°C. Il pellet è stato solubilizzato in 25 μ l di acido formico puro, e la soluzione è stata iniettata in HPLC dotato di colonna PRLP-S 100Å, 4.6 x 150 mm (Labservice Analytica, Polymer Laboratories). L'eluizione è stata fatta utilizzando come fase mobile un eluente A costituito da 0.1% TFA in acqua e un eluente B costituito da 0.08% TFA in acetonitrile, ad una velocità di flusso di 0.7 ml/min, applicando un gradiente lineare 15-60% dell'eluente B in 20 min. Il picco corrispondente al peptide è stato monitorato misurando l'assorbanza dell'eluato a 214 nm.

La quantità di peptide sedimentabile è stata calcolata come percentuale della quantità totale di peptide presente nella soluzione iniziale.

Questi esperimenti hanno dimostrato che il peptide mutato aggrega molto di più e molto più rapidamente del peptide *wild-type* e che, sorprendentemente, la miscela formata dai due peptidi sedimenta meno non solo del peptide mutato ma anche di quello *wild-type* (Figura 12).

Ultrastruttura e proprietà tintoriali degli aggregati

Le caratteristiche ultrastrutturali e le proprietà ottico-tintoriali degli aggregati sono state studiate rispettivamente mediante microscopia elettronica e microscopia a luce polarizzata dopo colorazione con Rosso Congo.

Per l'indagine ultrastrutturale, 5 μ l di sospensione di A β 1-40 *wild-type*, A β 1-40 mutato e della loro miscela equimolare sono stati prelevati a tempi d'incubazione compresi fra 1 ora e 20 giorni, depositati su retini di nickel ricoperti di Formvar-Carbon per 5 minuti, colorati negativamente con una soluzione sovrasatura di acetato di uranile e osservati al microscopio elettronico (EM109 Zeiss). Al ventesimo giorno di incubazione, aliquote dei campioni sono state centrifugate a 15,000 g per 15 minuti. I pellet così ottenuti sono stati fissati in glutaraldeide al 2.5% in tampone fosfato, pH 7.4, post-fissati in 1% osmio tetrossido, disidratati in acetone e inclusi in resina epossidica (Spurr, Electron Microscopy Sciences). Sezioni ultrafini (500 Å) sono

state raccolte su retini di rame, colorate con acetato di uranile e citrato di piombo e osservate al microscopio elettronico.

Per verificare se e in quale misura gli aggregati fossero costituiti da amiloide, 5 μ l di soluzione di ciascun campione, per i diversi tempi di incubazione, sono stati raccolti su vetrini polilisinati (Bio-Optica), colorati con Congo Rosso ed esaminati con microscopio a luce polarizzata (Nikon Eclipse E-800).

L'analisi ultrastrutturale ha mostrato che nei primi due giorni d'incubazione il peptide A β 1-40 *wild-type* forma aggregati amorfi, oligomeri e rare strutture filamentose. Dopo 48 ore compare materiale fibrillare corto, non ramificato, irregolare (protofibrille), e solamente dopo 72 ore di incubazione si osservano fibrille lunghe, rettilinee, di circa 8 nm di diametro, inframezzate a materiale amorfo e protofibrille. Successivamente la densità delle fibrille aumenta e la quantità di materiale amorfo e protofibrille si riduce proporzionalmente. Solo dopo 15 giorni di incubazione la maggior parte del materiale è costituito da dense reti di fibrille.

Per contro, la cinetica di aggregazione del peptide A β 1-40 mutato è risultata molto rapida. Infatti, già a partire da 24 ore di incubazione erano presenti fibrille lunghe, regolari, prive di ramificazioni (Figura 13), e già dopo 5 giorni il campione era costituito da dense reti di fibrille, senza protofibrille e materiale amorfo.

Sorprendentemente, la miscela equimolare dei due peptidi forma meno fibrille non solo rispetto al peptide mutato ma anche a quello *wild-type*, e anche dopo 20 giorni di incubazione la maggior parte degli aggregati era costituita da materiale amorfo (Figura 14).

L'osservazione in luce polarizzata dei preparati colorati con Congo Rosso ha dimostrato che il peptide A β 1-40 mutato è molto più amiloidogenico di A β 1-40 *wild-type* e che la miscela dei due peptidi ha una bassa propensione a formare amiloide. Infatti, piccoli aggregati di materiale birifrangente erano presenti già dopo 24 ore di incubazione (Figura 13) nei campioni di A β 1-40 *mutato*, dopo 72 ore nei campioni di A β 1-40 *wild-type* e solamente dopo 5 giorni nella miscela dei due peptidi. Nei tempi successivi era osservabile un progressivo incremento di materiale birifrangente nei campioni di A β 1-40 mutato e A β 1-40 *wild-type*, mentre l'incremento era molto modesto nella miscela dei due peptidi, anche dopo 20 giorni di incubazione (Figura 14).

Questi dati confermano i risultati degli studi di aggregazione dimostrando che (i) il peptide A β 1-40 mutato è molto più amiloidogenico del *wild-type*, e (ii) la miscela dei due peptidi ha una bassa propensione a formare fibrille amilodi.

Esempio 3. *Inibizione dell'amiloidogenesi mediante peptidi sintetici omologhi alla regione N-terminale di A β contenente la mutazione Ala673Val.*

Poiché lo studio fisico-chimico della miscela dei peptidi A β 1-40 mutato e A β 1-40 *wild-type* suggeriva che la mutazione Ala673Val potesse avere un effetto inibitorio sull'aggregazione di A β , abbiamo verificato questa ipotesi utilizzando due peptidi sintetici corrispondenti ai primi sei aminoacidi di A β , uno con la sequenza *wild-type* (DAEFRH) e l'altro contenente una valina al posto dell'alanina in posizione 2 (DVEFRH). I due esapeptidi sono stati co-incubati con A β 1-40 *wild-type* a concentrazione equimolare o in eccesso (esapeptide:A β 1-40 = 5:1). Le miscele sono state preparate per lo studio ultrastrutturale e istochimico come descritto nell'esempio 2. Lo studio ha rivelato che entrambi gli esapeptidi (sia il mutato che il *wild-type*) inibiscono la fibrillogenesi di A β 1-40, indicando che la regione N-terminale di A β sede della mutazione gioca un ruolo importante nell'aggregazione (Figura 15). Tuttavia, l'esapeptide mutato è risultato più attivo del corrispettivo *wild-type*, sottolineando l'importanza della mutazione Ala673Val per l'effetto inibitorio sulla fibrillogenesi.

Esempio 4: *Transfezione di linee cellulari con APP umana wild-type o contenente la mutazione Ala>Val in posizione 2 di A β .*

Mediante tecniche di ingegneria genetica (*Tesco et al.* APP substitutions V715F and L720P alter PS1 conformation and differentially affect A β and AICD generation. *J Neurochem* 95: 446-56, 2005; *Sudhír et al.* Release of Amino-terminal Fragments from Amyloid Precursor Protein Reporter and Mutated Derivatives in Cultured Cell. *J Biol Chem* 267:25602-08, 1992) sono stati generati due vettori contenenti rispettivamente il cDNA di APP751 umana *wild-type* e il cDNA di APP751 umana con la mutazione Ala>Val in posizione 2 di A β . Con questi vettori sono state transfettate due linee cellulari (COS7 e CHO), sulle quali sono stati successivamente eseguiti dosaggi di A β nel medium con metodo ELISA.

La mutazione Ala>Val in posizione 2 di A β è stata inserita nel cDNA dell'APP751 umana mediante mutagenesi sito-specifica (QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) utilizzando gli oligonucleotidi

5'-GATCTCTGAAGTGAAGATGGATGTAGAATTCC-3' e

5'-GTCATGTCGGAATTCTACATCCATCTTCACTT-3'.

Sia la forma *wild-type* che quella mutata di APP sono state quindi amplificate mediante PCR utilizzando i primers

5'-CCCGGATATCGCCACCATGCTGCCCGGTTTGGCAC-3'

e 5'-ACCGAAGCTTTGTGGCGGGGGTCTAGTTC-3'

(il primo contenente un sito riconosciuto dall'enzima di restrizione EcoRV, il secondo con sito per l'enzima HindIII), e clonate nel vettore pcDNA 3.1, in corrispondenza dei siti di

restrizione EcoRV e HindIII. I costrutti così prodotti sono stati amplificati ulteriormente mediante trasformazione di cellule Top Ten One Shot (Invitrogen), purificati mediante kit Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen), e utilizzati per transfettare cellule COS7 e CHO mediante elettroporazione. L'efficienza delle transfezioni è stata valutata attraverso la quantificazione di APP su lisati cellulari mediante Western blot, utilizzando l'anticorpo 22C11 (Chemicon International Inc.) diretto contro la regione N-terminale della proteina (residui 61-88). Il livello di espressione di APP è stato usato per poter confrontare i livelli di produzione di A β da parte delle cellule transfettate con i due costrutti. Sul medium di coltura delle COS7 e delle CHO esprimenti APP umana *wild-type* e mutata è stato quindi eseguito il dosaggio di peptidi A β 1-40, A β 1-42 e forme troncate all'N-terminale con metodo ELISA (Immuno-Biological Laboratories Gunma).

Lo studio ha dimostrato:

- un marcato incremento di A β 1-40 e A β 1-42 nel medium delle cellule COS7 transfettate con APP mutata (116.8 ± 90.5 pg/ml e 20 ± 12.3 pg/ml, rispettivamente) rispetto a cellule transfettate con APP *wild-type* (21.9 ± 8.6 pg/ml e 4 ± 0.8 pg/ml) (Figura 16);
- un marcato incremento incremento di A β 1-40 e A β 1-42 nel medium di CHO transfettate con APP mutata (84.6 ± 9 pg/ml e 9.6 ± 3.4 pg/ml, rispettivamente) rispetto a cellule transfettate

con APP *wild-type* (49.8 ± 11.8 pg/ml e 4.2 ± 0.8 pg/ml) (Figura 17);

- un significativo incremento delle forme tronche all'N-terminale di A β , in particolare A β 3-42, nel medium delle cellule COS7 transfettate con APP mutata (2.5 ± 0.3 pg/ml) rispetto a cellule transfettate con APP *wild-type* (1.1 ± 0.3 pg/ml).

Questi dati indicano che la mutazione Ala>Val in posizione 2 di A β modifica il processing di APP favorendo la via amiloidogena, con aumento della produzione di A β 1-40, A β 1-42 e forme troncate all'N-terminale.

Esempio 5: *Generazione di topi transgenici portatori della mutazione Ala>Val in posizione 2 di A β .*

Abbiamo prodotto un costrutto veicolante APP umana con mutazione Ala>Val in posizione 2 di A β per la generazione di topi transgenici sui quali eseguire valutazioni comportamentali, neurofisiologiche, neuroradiologiche, neuropatologiche, biochimiche e molecolari per definire le caratteristiche fenotipiche della malattia associata a questo difetto genetico, e condurre studi di patogenesi e terapia.

Il cDNA di APP751 *wild-type* è stato clonato nel vettore pTSC21, contenente il promotore Thy 1.2 murino (siti di restrizione HindIII ed EcoRV) (Figura 18). Il costrutto è stato quindi sottoposto a mutagenesi sito-specifica con inserimento della mutazione Ala>Val in posizione 2 di A β (Stratagene) mediante lo stesso protocollo riportato per le transfezioni

cellulari (v. Esempio 4), ed è stato utilizzato per generare topi transgenici a partire dal ceppo *C57Bl/6*.

Sono stati ottenuti 6 fondatori (3 maschi e 3 femmine) positivi per il transgene, i quali hanno dato vita a tre linee che over-esprimono APP umana con mutazione Ala>Val in posizione 2 di A β nel sistema nervoso centrale. Le due linee migliori verranno incrociate con una linea di topi *C57Bl/6* knock-out per APP endogena -linea già disponibile- al fine di ottenere animali esprimenti APP umana mutata in assenza di APP murina ($huAPP_{mut}/moAPP^{0/0}$, Figura 19). Questi verranno infine incrociati con topi transgenici per APP umana *wild-type* per ottenere animali eterozigoti ($huAPP_{mut}/huAPP_{wt}$).

I topi esprimenti APP umana con mutazione 2 di A β in omozigosi e eterozigosi saranno utilizzati per studi di patogenesi, diagnosi, prevenzione e cura della malattia di Alzheimer e, più in generale, di malattie umane e/o animali caratterizzate da una anomala deposizione di sostanza amiloide e/o simil-amiloide in organi e tessuti.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo di screening effettuato su materiale biologico umano, per la determinazione del rischio di patologie caratterizzate da anomala deposizione di sostanza β -amiloide e/o simil-amiloide formata da qualsiasi isoforma di A β , basato sulla ricerca della sostituzione in forma omo- o eterozigotica di una Citosina con una Timidina al codone 673 della sequenza codificante il gene APP umano (*D87675*), corrispondente al nucleotide 2212 (transizione *c.2212C>T*) dell'isoforma di APP770 (*NM_000484.2*), la mutazione risultando nella sostituzione di Alanina con Valina al residuo 673 di APP770, o al residuo analogo di altre isoforme di APP, che corrisponde alla posizione 2 di A β .
2. Metodo di screening secondo la rivendicazione 1, basato sulla ricerca di RNA messaggeri (mRNA) trascritti dal gene codificante le varie isoforme dell'APP umana con la mutazione di cui al punto 1 o con altre mutazioni al codone 673 di APP770.
3. Metodo di screening secondo la rivendicazione 1, basato sulla ricerca della proteina APP e/o di sue isoforme contenenti la mutazione Ala673Val, corrispondente alla posizione 2 di A β o altre mutazioni al codone 673 di APP770.
4. Metodo di screening secondo le rivendicazioni 1 e 2, caratterizzato dal fatto di comprendere l'isolamento del DNA genomico e/o dell'RNA da qualsiasi materiale biologico e il loro sequenziamento.

5. Metodo di screening secondo una o più rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto di comprendere la ricerca di detta mutazione mediante analisi non-isotopica del DNA.
6. Metodo di screening secondo una o più rivendicazioni precedenti, in cui la ricerca di detta mutazione viene effettuata mediante analisi con enzimi di restrizione e/o DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) e/o SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) e/o ibridazione in situ.
7. Metodo di screening secondo una o più rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che il DNA viene ottenuto da leucociti isolati dal sangue del paziente.
8. Metodo di screening secondo le rivendicazioni 1-7, caratterizzato dal fatto che una di dette patologie è la AD nella sua forma tipica o esprimendosi in fenotipi atipici.
9. Costrutto caratterizzato dal fatto di veicolare le diverse isoforme di APP umana o loro frammenti con mutazione Ala673Val o altre mutazioni al codone 673 di APP770 o loro frammenti, sotto il controllo di qualsiasi promotore non endogeno.
10. Costrutto secondo la rivendicazione precedente, caratterizzato dal fatto di veicolare l'APP umana o suoi frammenti con mutazione Ala673Val o altre mutazioni al codone 673 di APP770 o loro frammenti, sotto il controllo del promotore *Thy1.1* o *Thy1.2*.

11. Costrutto secondo la rivendicazione 9, caratterizzato dal fatto di veicolare l'APP umana o suoi frammenti con mutazione Ala673Val o altre mutazioni al codone 673 di APP770 o loro frammenti, sotto il controllo del promotore del Cytomegalovirus (P_{cmv}).
12. Qualsiasi linea cellulare caratterizzata dal fatto di essere transfettata in modo stabile o transiente con i costrutti di cui alle rivendicazioni 9-11.
13. Mammifero non umano transgenico caratterizzato dal fatto di essere portatore, in forma etero- o omo-zigotica, della sequenza di DNA o di suoi frammenti che codificano le diverse isoforme di APP umana o loro frammenti contenenti la mutazione Ala673Val o altre mutazioni al codone 673 di APP770 o loro frammenti.
14. Mammifero non umano transgenico reso knock-out per l'APP endogena, caratterizzato dal fatto di essere portatore della sequenza di DNA o di suoi frammenti che codificano le diverse isoforme di APP umana o loro frammenti con mutazione Ala673Val (APP_{673V}) o altre mutazioni al codone 673 di APP770 o loro frammenti, in forma omozigotica (genotipo APP_{673V}/APP_{673V}) o emizigotica (genotipo APP_0/APP_{673V}) o eterozigotica (genotipo APP_{673A}/APP_{673V}).
15. Mammifero non umano transgenico secondo le rivendicazioni 13 e 14, caratterizzato dal fatto di essere portatore, in forma omo- o emi- o etero-zigotica, della sequenza

di DNA o di suoi frammenti che codificano le diverse isoforme di APP umana o loro frammenti in cui la mutazione Ala673Val (o altre mutazioni al codone 673 di APP770 o loro frammenti) è associata ad altre mutazioni.

16. Mammifero non umano transgenico secondo le rivendicazioni 13-15, caratterizzato dal fatto di essere portatore, in forma omo- o emi- o etero-zigotica, della sequenza di DNA o di suoi frammenti che codificano le diverse isoforme di APP umana o loro frammenti con mutazione Ala673Val o altre mutazioni al codone 673 di APP770 o loro frammenti, associati a mutazioni nel gene codificante la presenilina 1 (PSEN1).
17. Mammifero non umano transgenico secondo le rivendicazioni 13-15, caratterizzato dal fatto di essere portatore, in forma omo- o emi- o etero-zigotica, della sequenza di DNA o di suoi frammenti che codificano le diverse isoforme di APP umana o loro frammenti con mutazione Ala673Val o altre mutazioni al codone 673 di APP770 o loro frammenti, associati a mutazioni nel gene codificante la presenilina 2 (PSEN2).
18. Mammifero non umano transgenico secondo le rivendicazioni 13-15, caratterizzato dal fatto di essere portatore, in forma omo- o emi- o etero-zigotica, della sequenza di DNA o di suoi frammenti che codificano le diverse isoforme di APP umana o loro frammenti con mutazione Ala673Val o altre mutazioni al codone 673 di APP770 o loro frammenti, associati a mutazioni nel gene codificante la proteina tau (MAPT).

19. Mammifero non umano transgenico secondo le rivendicazioni 13-15, caratterizzato dal fatto di essere portatore, in forma omo- o emi- o etero-zigotica, della sequenza di DNA o di suoi frammenti che codificano le diverse isoforme di APP umana o loro frammenti con mutazione Ala673Val o altre mutazioni al codone 673 di APP770 o loro frammenti, associati a combinazioni di mutazioni nei geni PSEN1 e/o PSEN2 e/o MAPT.
20. Mammifero non umano transgenico secondo la rivendicazione 13, caratterizzato dal fatto di essere un knock-in in cui l'APP endogena è sostituita mediante ricombinazione omologa da APP umana o da suoi frammenti con mutazione Ala673Val o con altre mutazioni al codone 673 di APP770 o loro frammenti, sotto il controllo del promotore endogeno.
21. Mammifero transgenico secondo le rivendicazioni 13-20, caratterizzato dal fatto di essere un roditore.
22. Mammifero transgenico secondo le rivendicazioni 13-20, caratterizzato dal fatto di essere un topo di qualsiasi ceppo.
23. Animale transgenico caratterizzato dal fatto di essere un qualsiasi organismo animale che esprima l'APP umana o suoi frammenti con mutazione Ala673Val o altre mutazioni al codone 673 di APP770 o loro frammenti, con le caratteristiche genotipiche descritte nelle rivendicazioni 13-20 (ad esempio *C. Elegans*, *Drosophila Melanogaster*, *Zebrafish*, etc.).

24. Organismo transgenico caratterizzato dal fatto di essere un qualsiasi micro-organismo eu- o pro-cariotico che esprima l'APP umana o suoi frammenti con mutazione Ala673Val o altre mutazioni al codone 673 di APP770 o loro frammenti, con le caratteristiche genotipiche descritte nelle rivendicazioni 13-20 (ad esempio batteri quali *Escherichia Coli*, lieviti, muffe, etc.).
25. RNA messaggero (mRNA) o frammenti di esso contenenti la sequenza nucleotidica corrispondente (mRNA "senso") o complementare (mRNA "antisenso") al DNA codificante l'APP umana con mutazione Ala673Val o altre mutazioni al codone 673 di APP770.
26. Uso di RNA o di suoi frammenti, conformi alla rivendicazione precedente da utilizzare nell'ambito della tecnologia nota come *RNA interference (RNAi)*, in tutte le sue possibili applicazioni.
27. Uso di RNA o di suoi frammenti, conformi alle rivendicazioni 25 e 26, nella diagnosi, prevenzione e terapia di patologie umane e/o animali esprimenti una anomala deposizione di sostanza β -amiloide e/o simil-amiloide formata da qualsiasi isoforma di A β , in organi e tessuti umani e/o animali.
28. Uso di sostanze conformi alla rivendicazione precedente, in cui una delle patologie è rappresentata da forme sporadiche o genetiche di AD con fenotipo tipico o atipico.

29. Isoforme dell'APP umana caratterizzate dal fatto di presentare mutazione Ala673Val o altre mutazioni al codone 673 di APP770.
30. Frammenti dell'APP umana, comprese tutte le isoforme di A β incluse quelle troncate all'N-terminale e/o estese al C-terminale, caratterizzati dal fatto di presentare mutazione Ala673Val o altre mutazioni al codone 673 di APP770.
31. Frammenti dell'APP umana come nella rivendicazione precedente, rappresentati da A β 1-40, A β 1-42, forme troncate all'N-terminale di A β 1-40 e A β 1-42 e forme estese al C-terminale di A β 1-40 e A β 1-42 o sequenze parziali degli stessi.
32. Peptidi sintetici caratterizzati dal fatto di essere analoghi a frammenti della APP umana conformi alle rivendicazioni 30 e 31.
33. Peptidi secondo le rivendicazioni 30-32, caratterizzati dal fatto di contenere almeno un residuo di amminoacido in forma destrorsa.
34. Peptidi secondo le rivendicazioni 30-33, caratterizzati dal fatto di contenere uno o più residui amminoacidici modificati mediante coniugazione con gruppi chimici di qualsiasi tipo.
35. Strutture chimiche mimetiche non proteiche o solo parzialmente proteiche conformi alle rivendicazioni 30-34, per la preparazione di farmaci finalizzati alla diagnosi, prevenzione e/o cura di patologie umane e/o animali caratterizzate dalla

anomala deposizione di sostanza β -amiloide e/o simil-amiloide in organi e tessuti umani e/o animali.

36. Sostanze conformi alle rivendicazioni 30-35, caratterizzate dal fatto di essere coniugate con molecole che fungono da carriers in grado di veicolare tali sostanze al sito specifico ove esercitare funzioni utili alla diagnosi, prevenzione e/o cura di patologie umane e/o animali caratterizzate dalla anomala deposizione di sostanza β -amiloide e/o simil-amiloide in organi e tessuti umani e/o animali.

37. Uso di sostanze conformi alle rivendicazioni 30-36, per la preparazione di farmaci finalizzati alla diagnosi, prevenzione e/o cura di patologie umane e/o animali caratterizzate dalla anomala deposizione di sostanza β -amiloide e/o simil-amiloide in organi e tessuti umani e/o animali.

38. Uso di sostanze conformi alla rivendicazione precedente in cui una delle patologie è rappresentata da forme sporadiche o genetiche di AD con fenotipo tipico o atipico.

39. Uso di sostanze conformi alle rivendicazioni 30-36, caratterizzate dal fatto di essere carriers in grado di veicolare composti chimici di qualsiasi tipo al sito specifico ove esercitare funzioni utili alla diagnosi, prevenzione e/o cura di patologie umane e/o animali caratterizzate dalla anomala deposizione di sostanza β -amiloide e/o simil-amiloide in organi e tessuti umani e/o animali.

PRODOTTO DA
BIOGEN S.p.A.

40. Uso di sostanze conformi alle rivendicazioni 25 e 30-36, per lo studio della patogenesi di malattie umane e/o animali caratterizzate dalla anomala deposizione di sostanza β -amiloide e/o simil-amiloide in organi e tessuti umani e/o animali.
41. Uso di sostanze conformi alla rivendicazione precedente, caratterizzato dal fatto che una di dette patologie è rappresentata da forme sporadiche o genetiche di AD con fenotipo tipico o atipico.
42. Anticorpi policlonali verso proteine e/o peptidi conformi alle rivendicazioni 29-34.
43. Anticorpi monoclonali o loro frammenti (*single-chain antibodies, nanobodies*) diretti verso proteine e/o peptidi conformi alle rivendicazioni 29-34.
44. Uso di anticorpi conformi alle rivendicazioni 42 e 43, per la preparazione di farmaci finalizzati alla diagnosi, prevenzione e/o cura di patologie umane e/o animali caratterizzate dalla anomala deposizione di sostanza β -amiloide e/o simil-amiloide in organi e tessuti umani e/o animali.
45. Uso di anticorpi verso proteine e/o peptidi secondo la rivendicazione precedente, in cui una delle patologie è rappresentata da forme sporadiche o genetiche di AD con fenotipo tipico o atipico.
46. Uso dei costrutti di cui alle rivendicazioni 9-11, per la terapia genica somatica di patologie umane e/o animali

caratterizzate dalla anomala deposizione di sostanza β -amiloide e/o simil-amiloide in organi e tessuti umani e/o animali.

47. Uso dei costrutti di cui alle rivendicazioni 9-11, in cui la terapia genica somatica conforme alla rivendicazione 46 è realizzata utilizzando come vettori carriers lipidici o polimeri naturali o sintetici.
48. Uso dei costrutti di cui alle rivendicazioni 9-11, in cui la terapia genica somatica conforme alla rivendicazione 46 è realizzata utilizzando come vettori agenti biologici.
49. Uso dei costrutti di cui alla rivendicazione precedente, in cui la terapia genica somatica conforme alla rivendicazione 46 è realizzata utilizzando come vettori agenti virali (Adenovirus, Adeno-associated virus, SV40, Retrovirus, etc.).
50. Uso dei costrutti di cui alle rivendicazioni 9-11 per la transfezione di cellule autologhe di persone affette da patologie di cui alle rivendicazioni 37 e 38, da utilizzare nella terapia cellulare di dette patologie.
51. Uso dei costrutti di cui alle rivendicazioni 9-11 per la transfezione di cellule eterologhe o xenologhe da utilizzare nella terapia cellulare delle patologie di cui alle rivendicazioni 37 e 38.
52. Uso delle cellule di cui alla rivendicazione 12 e degli organismi geneticamente modificati secondo le rivendicazioni 13-24 come modelli per lo studio della patogenesi e per la

diagnosi, prevenzione e cura delle patologie di cui alle rivendicazioni 37 e 38.

53. Uso delle cellule di cui alla rivendicazione 12 e degli organismi geneticamente modificati secondo le rivendicazioni 13-24 per la produzione di proteine e/o peptidi di cui alle rivendicazioni 29-31.

GLOSSARIO

AD = Malattia di Alzheimer

AICD = Frammento C-terminale che deriva dal taglio di APP da parte della α -secretasi

APP = Proteina Precursore della α -amiloide

APP_{0/0} = Animale knock-out per APP endogena

APP_{673A} = APP wild-type

APP_{673V} = APP con mutazione Ala>Val al codone 673

A β = β -amiloide, peptide derivante dal catabolismo dell'APP

BACE = β -secretasi

bp = paia di basi

Cellule COS = cellule di rene di maschio adulto di cercopiteco etiope trasformate con un mutante difettivo del virus SV40

Cellule CHO = Cellule derivate da ovaio di Hamster cinese

DHPLC = Denaturing high performance liquid chromatography

DNA = acido deossi-ribonucleico

FAD = Forma familiare della malattia di Alzheimer

HPLC = High performance liquid chromatography

huAPP = APP umana normale

huAPP_{mut} = topi transgenici esprimenti APP umana con mutazione Ala>Val in posizione 2 di A β

huAPP_{wt} = topi transgenici esprimenti APP umana wild-type

MAPT = gene codificante la proteina tau

moAPP = APP murina

moAPP^{+/+} = topi con normale espressione di APP

moAPP^{0/0} = topi knock-out per la APP endogena

mRNA = RNA messaggero

Mut = mutato

P_{CMV} = Promotore del Citomegalovirus

PCR = Polymerase chain reaction

PSEN1 = Presenilina 1

PSEN2 = Presenilina 2

RM = Risonanza magnetica

RNA = acido ribonucleico

RNAi = RNA interference

sAPP β = Frammento solubile che deriva dal taglio di APP da parte della β -secretasi

SSCP = single strand conformation polymorphism

Wt = wild-type

Il tutto come sostanzialmente descritto, illustrato, rivendicato e per gli scopi ivi specificati.

Milano, li 12 OTT. 2007

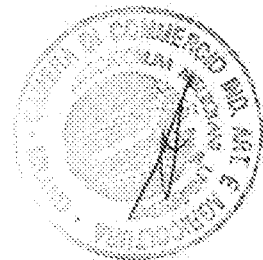
PER INCARICO

p.p. FONDAZIONE I.R.C.C.S.
ISTITUTO NEUROLOGICO
"CARLO BESTA"

UFFICIO BREVETTI
RAPISARDI S.r.l.

UN ILLEGATARIO

Avv. M. CRISTINA RAPISARDI



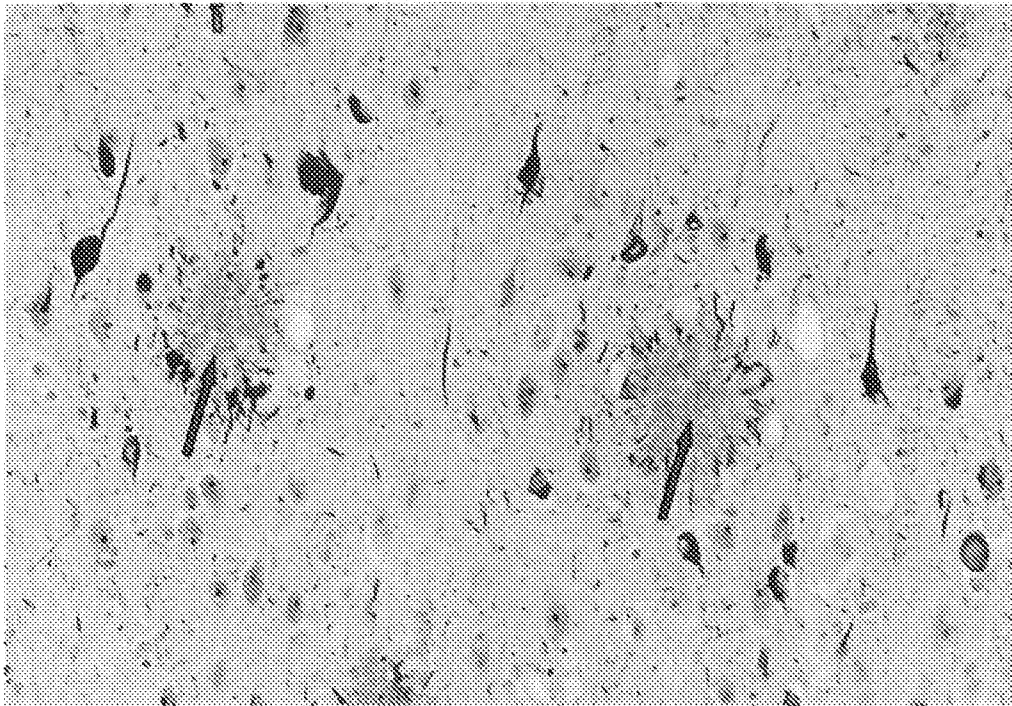


Figura 1. Alterazioni neuropatologiche nella malattia di Alzheimer: Placche senili (indicate da frecce) e degenerazioni neurofibrillari (in marrone scuro). Le placche senili sono formate da β -amiloide e da una corona di neuriti distrofici. Le degenerazioni neurofibrillari sono formate da tau iperfosforilata. (Corteccia cerebrale; impregnazione argentea).

MI2007 A 0 0 1 9 7 5



UFFICIO BREVETTI
RAPISARDI S.p.A.
Via M. Cristina, 10
10121 TORINO

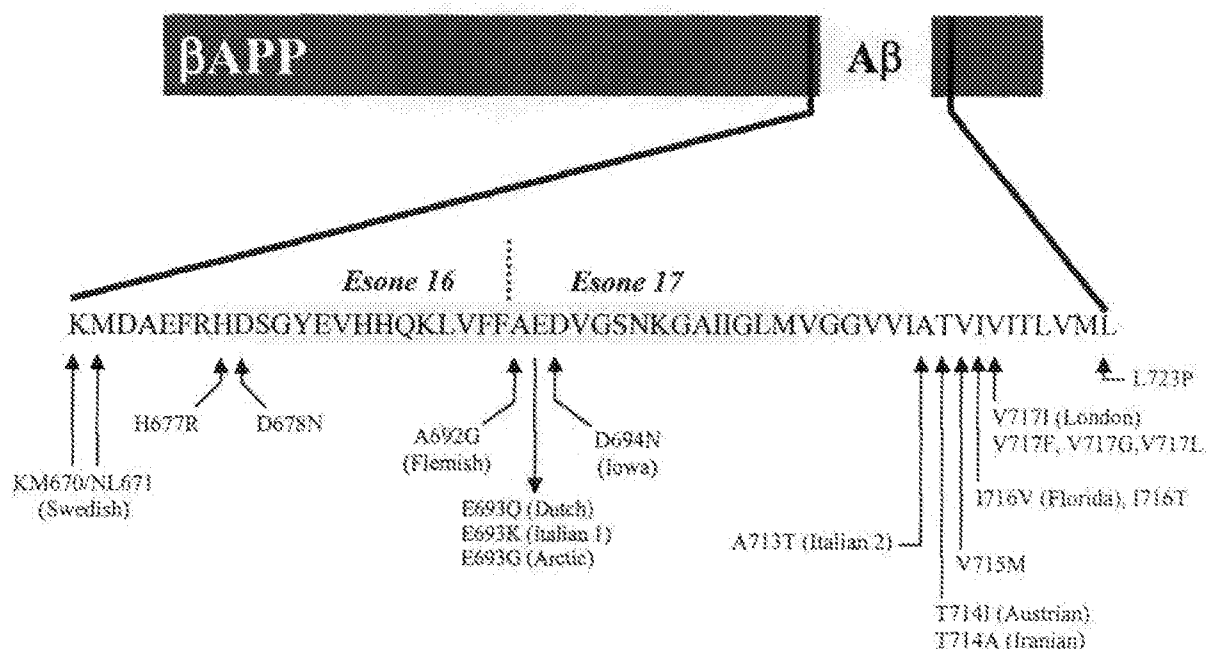


Figura 3. Mutazioni del gene APP associate a malattia di Alzheimer e ad Amiloidosi cerebro-vascolare (indicate in rosso). La Aβ 1-42 è indicata in giallo, e la linea rossa tratteggiata divide la parte di Aβ codificata dall'esone 16 e dall'esone 17 del gene APP. L'aminoacido alanina (A) in posizione 2 di Aβ corrisponde al residuo 673 di APP770.

MI2007 A 001975



UFFICIO BREVETTI
RAPIDARIO S.p.A.
UNIVERSITÀ

AVV. M. CONCINA PATENTISTI

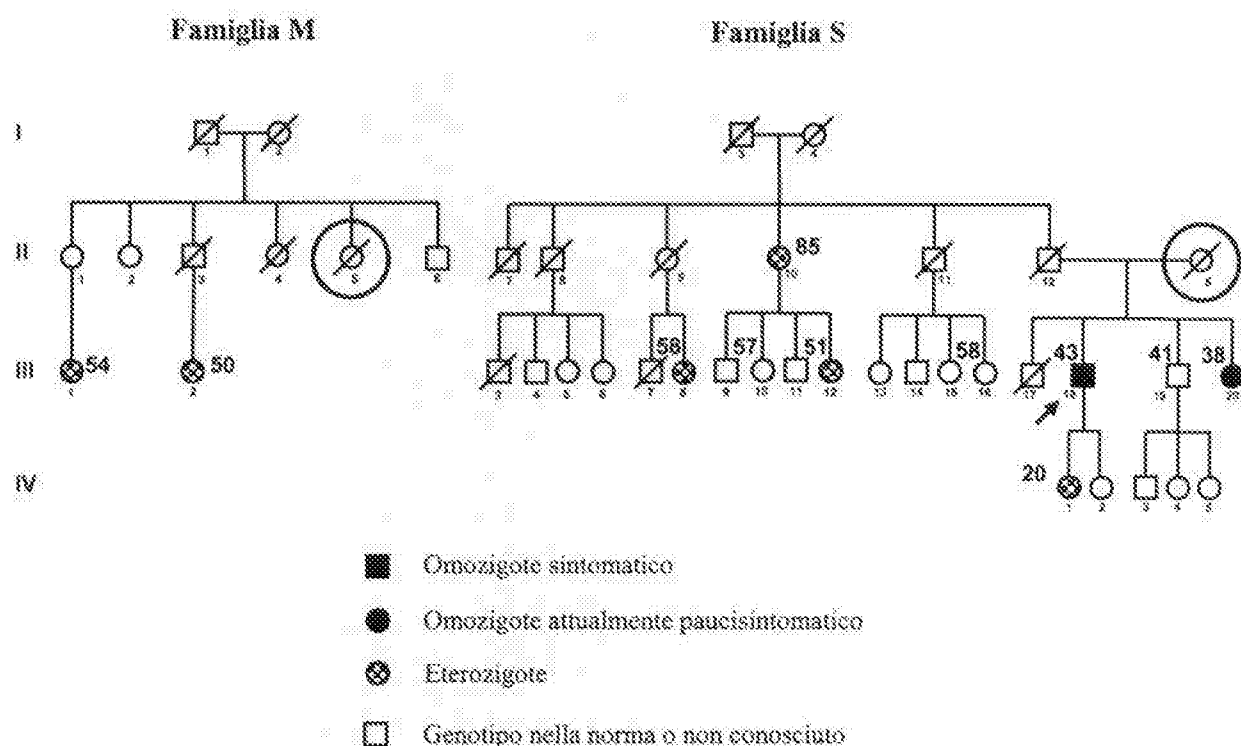


Figura 4. *Albero genealogico del proposito.*

Famiglia M = ramo materno; Famiglia S = ramo paterno. I due soggetti cerchiati in rosso sono la stessa persona. Il proposito è indicato dalla freccia. I numeri in grassetto indicano l'età attuale dei soggetti.

MI2007 A 0 0 1 9 7 5



UFFICIO BREVETTI
RAPIDISSIMO
ECC.

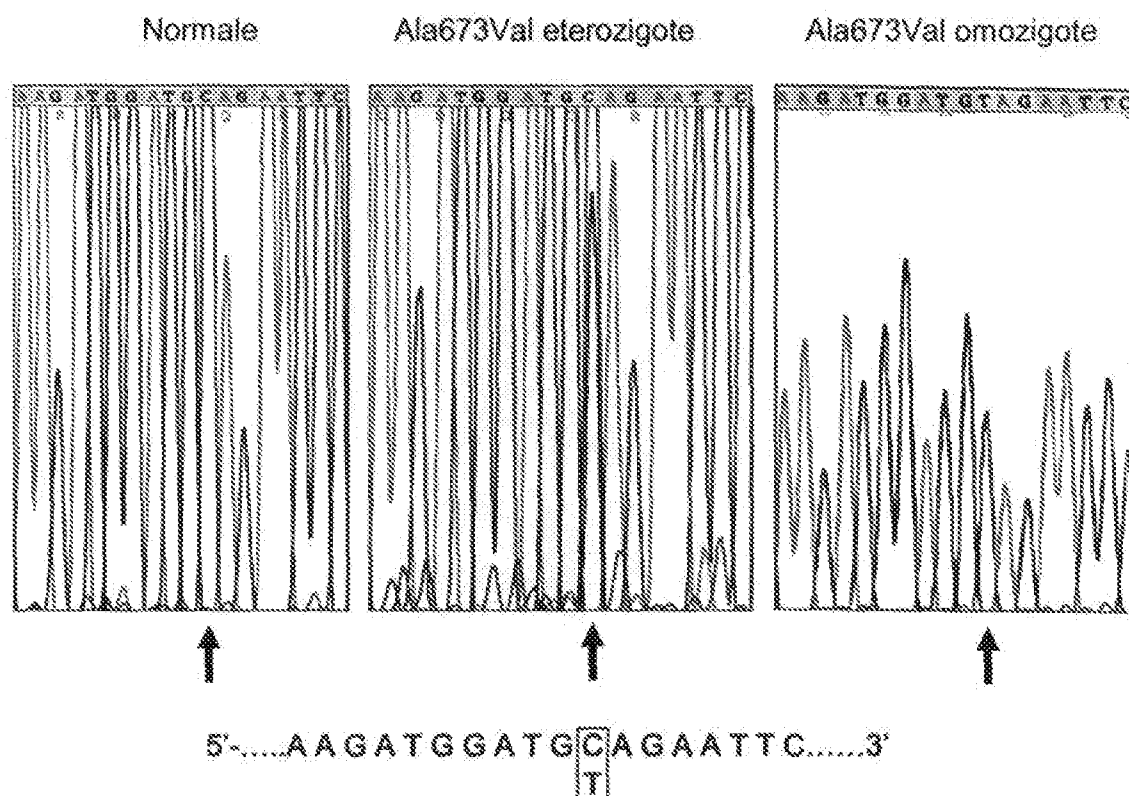


Figura 5. Sequenza dell'esone 16 del gene APP.

I tre pannelli riportano la sequenza normale, la sequenza di un soggetto eterozigote per la mutazione Ala673Val, e quella di un soggetto omozigote (proposito).

MI2007 A 001975



UFFICIO BREVETTI
RAPISARDI S.r.l.
ULMAGGIORATO

Avv. M. CRISTINA RAPISARDI

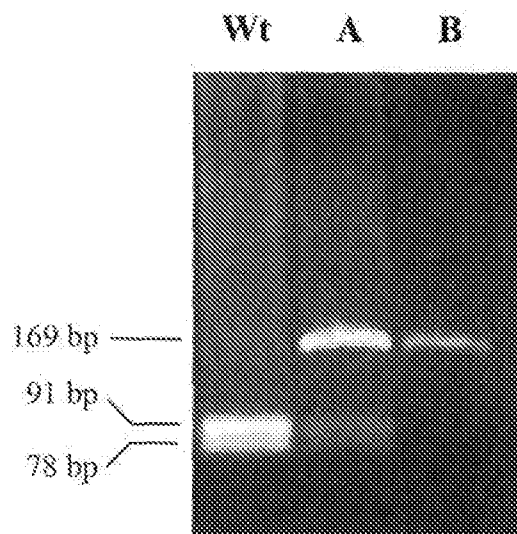
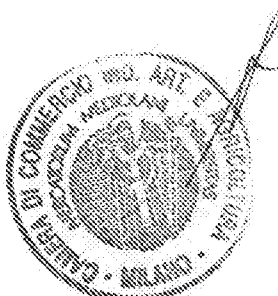


Figura 6. Analisi mediante digestione con enzimi di restrizione di un frammento di DNA contenente l'esone 16 del gene APP.

Il frammento di DNA è stato amplificato mediante PCR. Il prodotto di amplificazione è stato sottoposto a digestione con l'enzima HpYCH4V ed i prodotti di digestione sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio. Wt = soggetto normale; A = soggetto con mutazione eterozigote Ala673Val; B = soggetto con mutazione omozigote Ala673Val.

MI2007 A 0 0 1 9 7 5



UFFICIO BREVETTI
RAPID PATENT S.p.A.
L. 10/10/2007

Adv. M. ORTINI - RAPIDPATENT

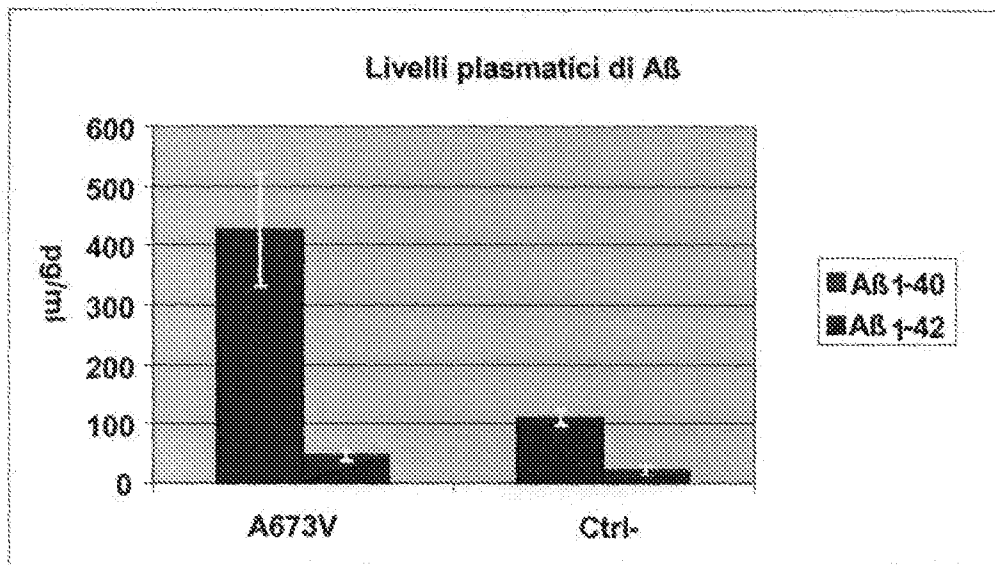


Figura 7. Confronto tra i valori di Aβ1-40, Aβ1-42 riscontrati nel plasma del probando e in un gruppo di controlli negativi.

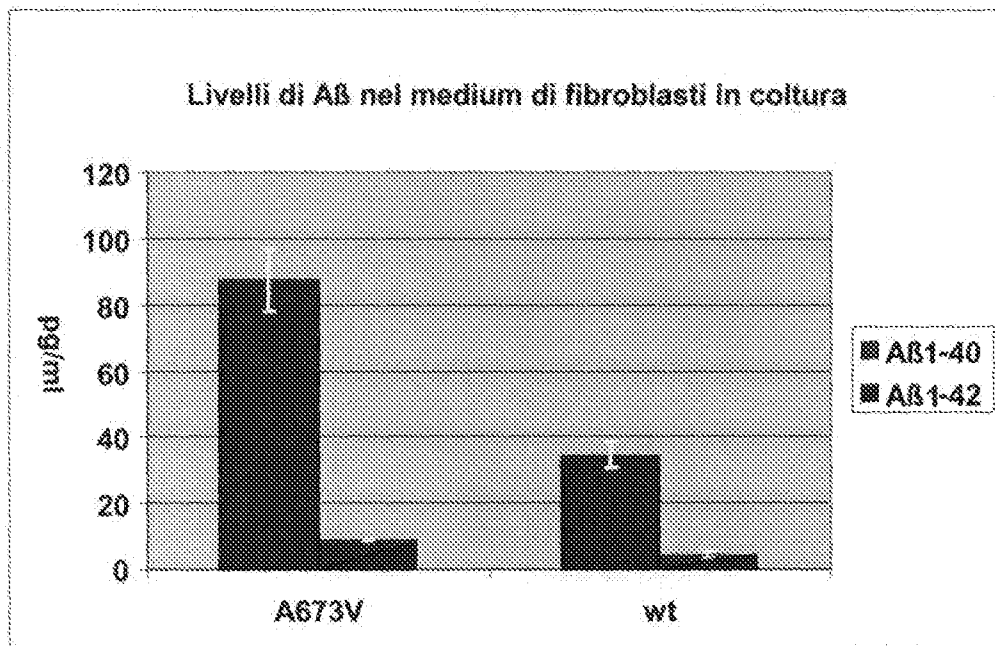


Figura 8. Confronto tra i valori di Aβ1-40, Aβ1-42 nel medium di fibroblasti in coltura prelevati dal probando e di quelli appartenenti ad un controllo negativo.



MI2007 A 001975

UFFICIO BREVETTI
RAPISARDI S.r.l.
UNO DEI SOCIARI

Avv. M. CRISTINA RAPISARDI

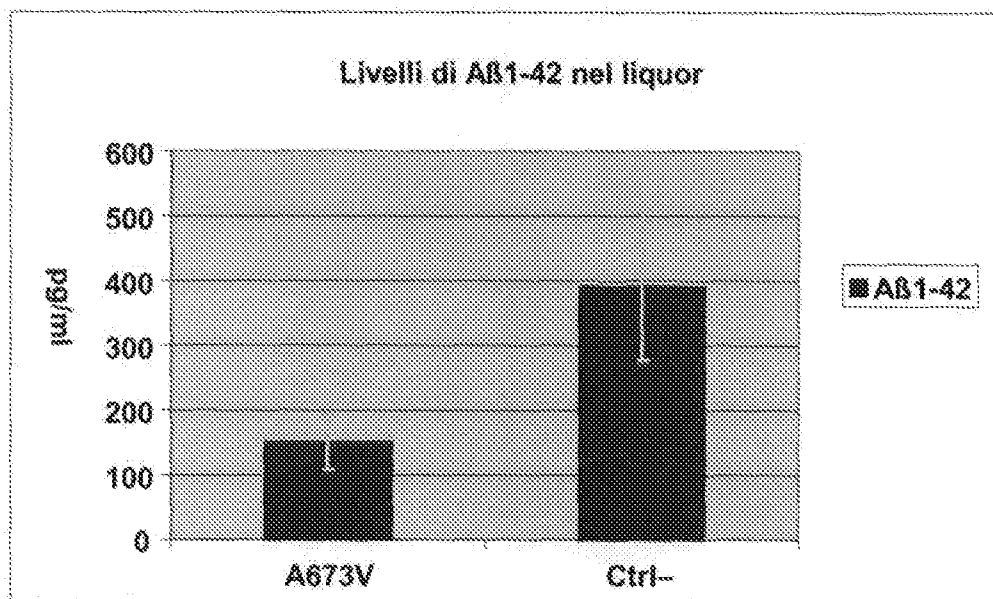


Figura 9. Confronto tra i valori di A β 1-42 rilevati nel liquor del probando (A673V) e in un gruppo di controlli normali (Ctrl-).

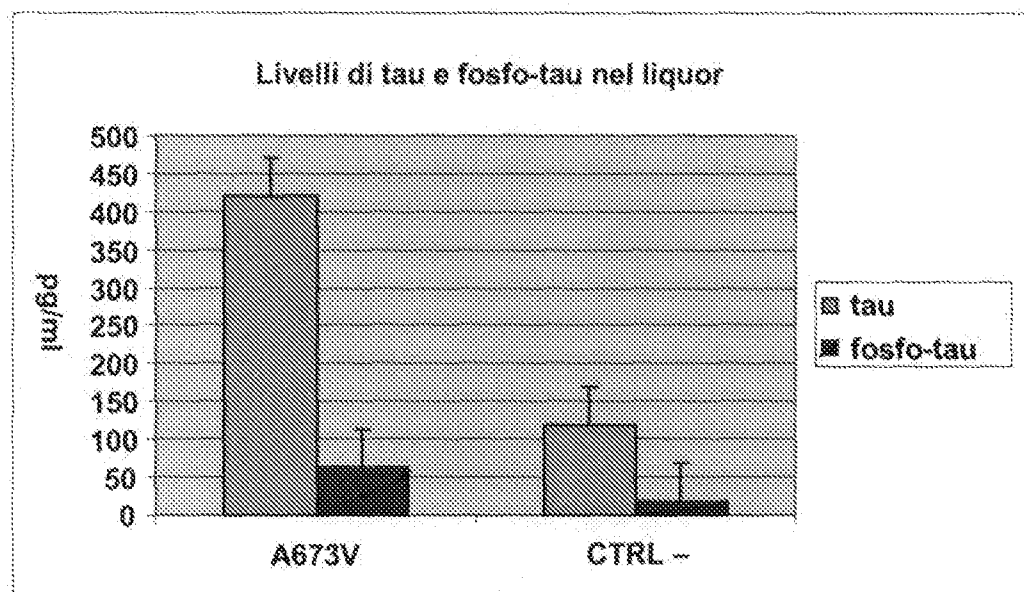


Figura 10. Confronto tra i valori di proteina tau totale e tau fosforilata nel liquor del probando (A673V) e in un gruppo di controlli normali (CTRL-).



UFFICIO BREVETTI
RAPISARTI S.r.l.
VIA S. PIETRO 10

AVV. D. CASSINIA RAPISARTI

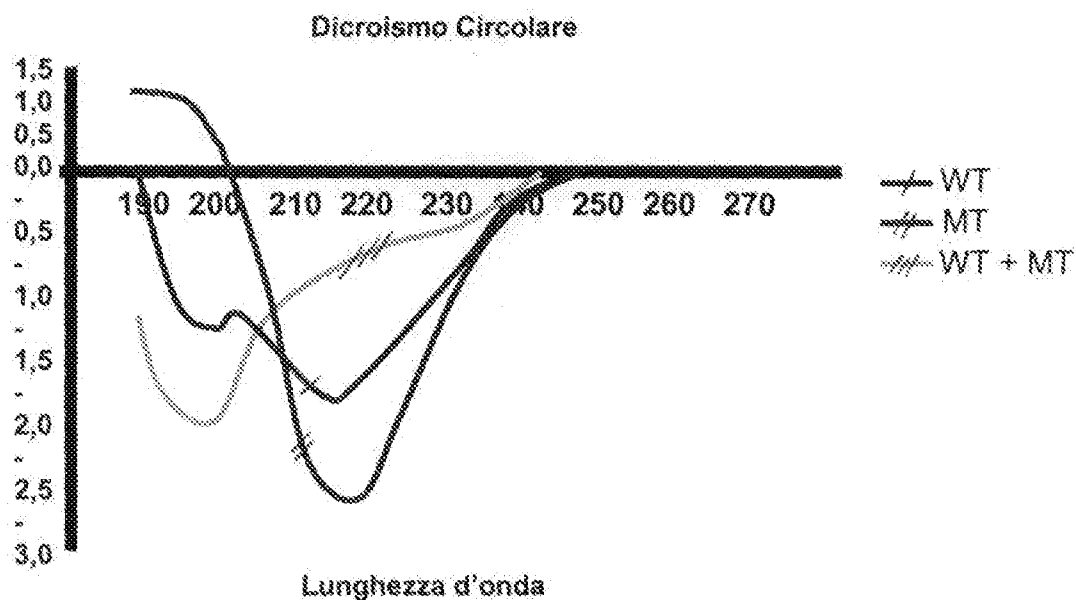
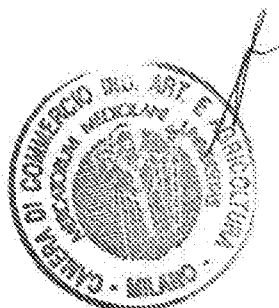


Figura 11. Confronto tra la struttura secondaria del peptide wild-type (WT), di quello mutato (MT) e della miscela dei due (WT+MT), valutata dopo 7 giorni di incubazione.

MI2007 A 001975



UFFICIO BREVETTI
RAPISARDI S.p.A.
VIA ...

... ..

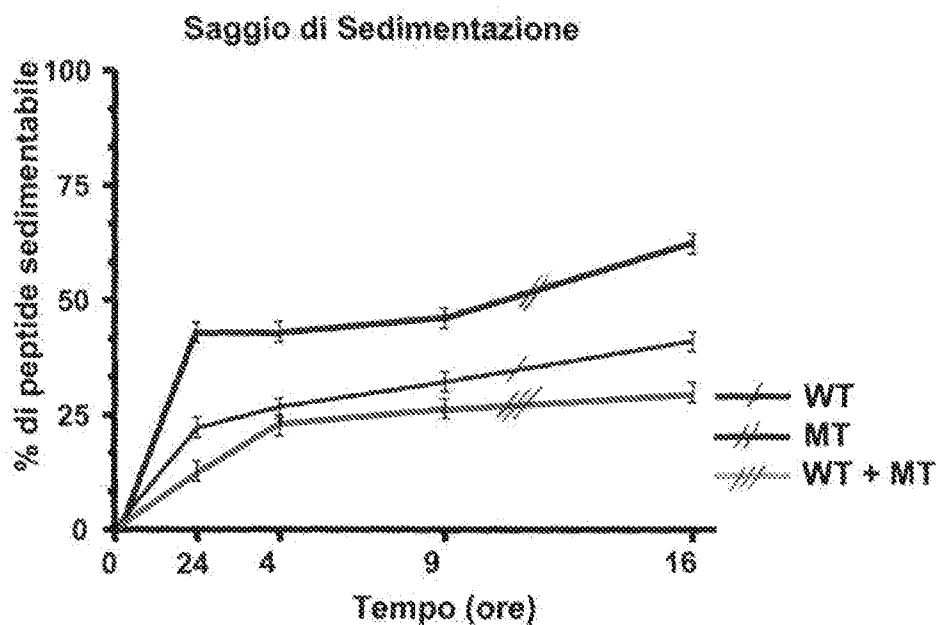


Figura 12. Confronto tra la sedimentabilità del peptide wild-type (WT), di quello mutato (MT) e della miscela dei due (WT+MT).



MI2007 A 001975

UFFICIO BREVETTI
RAPISARDI S.r.l.

Avv. M. CRISTINA RAPISARDI

24 ore di incubazione

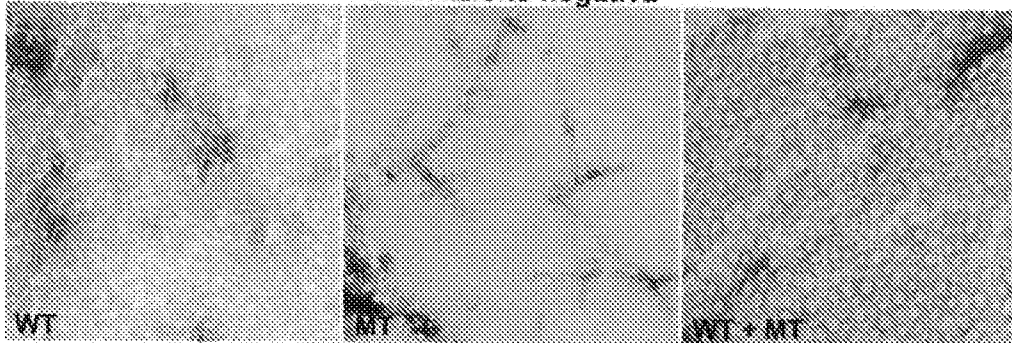
Microscopia Elettronica

Microscopia Elettronica

24 ore di incubazione

24 ore di incubazione

Microscopia Elettronica
Colorazione negativa



Rosso Congo (Luce Polarizzata)

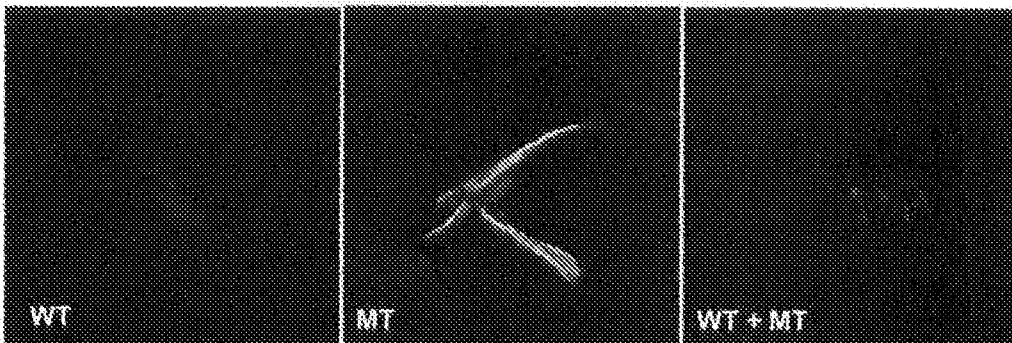
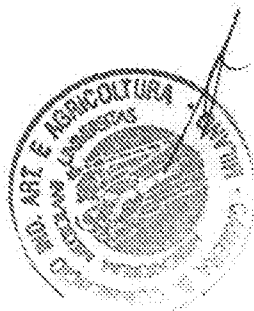


Figura 13. Ultrastruttura e proprietà tintoriali degli aggregati formati dal peptide wild-type (WT), da quello mutato (MT) e dalla miscela dei due (WT+MT) dopo 24 ore di incubazione.

L'esame ultrastrutturale dimostra che solo il peptide mutato forma aggregati fibrillari dopo 24 ore di incubazione. Il dato viene confermato anche dall'esame alla luce polarizzata, che dimostra presenza di birifrangenza solo nei campioni di peptide mutato.

MI2007 A 001975

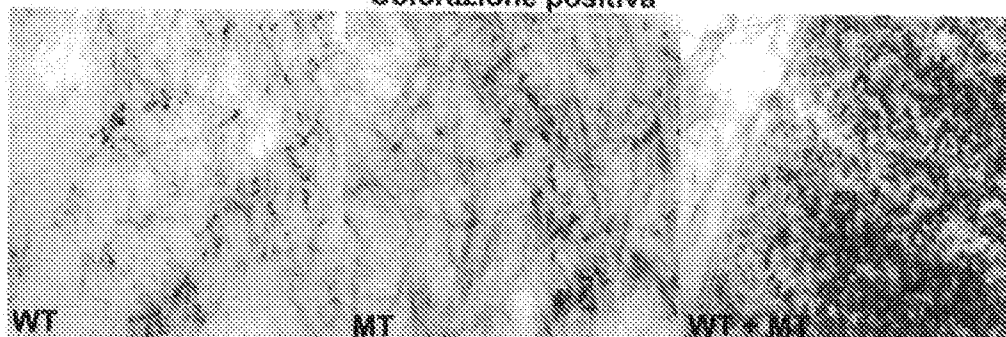


UFFICIO BREVETTI
RAPID PDI S.r.l.

Avv. M. CRISTINA RAPISARDO

20 giorni di incubazione

Microscopia Elettronica
Colorazione positiva



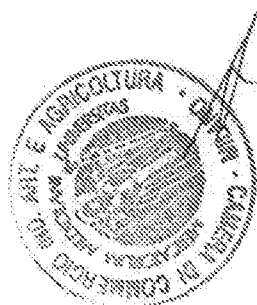
Rosso Congo (Luce polarizzata)



Figura 14. Ultrastruttura e proprietà tintoriali degli aggregati formati dal peptide wild-type (WT), da quello mutato (MT) e dalla miscela dei due (WT+MT) dopo 20 giorni di incubazione.

All'esame ultrastrutturale si può notare che la maggior parte del materiale presente nella miscela dei due peptici è amorfo. L'esame a luce polarizzata dopo colorazione con Congo rosso conferma che la miscela dei due peptidi forma aggregati congofili in misura molto inferiore rispetto al peptide wild-type ed al peptide mutato.

MI2007 A 001975



UFFICIO BREVETTI
RAPID S.p.A.

AVV. ROBERTO RAFFAELLI

120 h di incubazione
in assenza o presenza di un esapeptide
contenente la mutazione

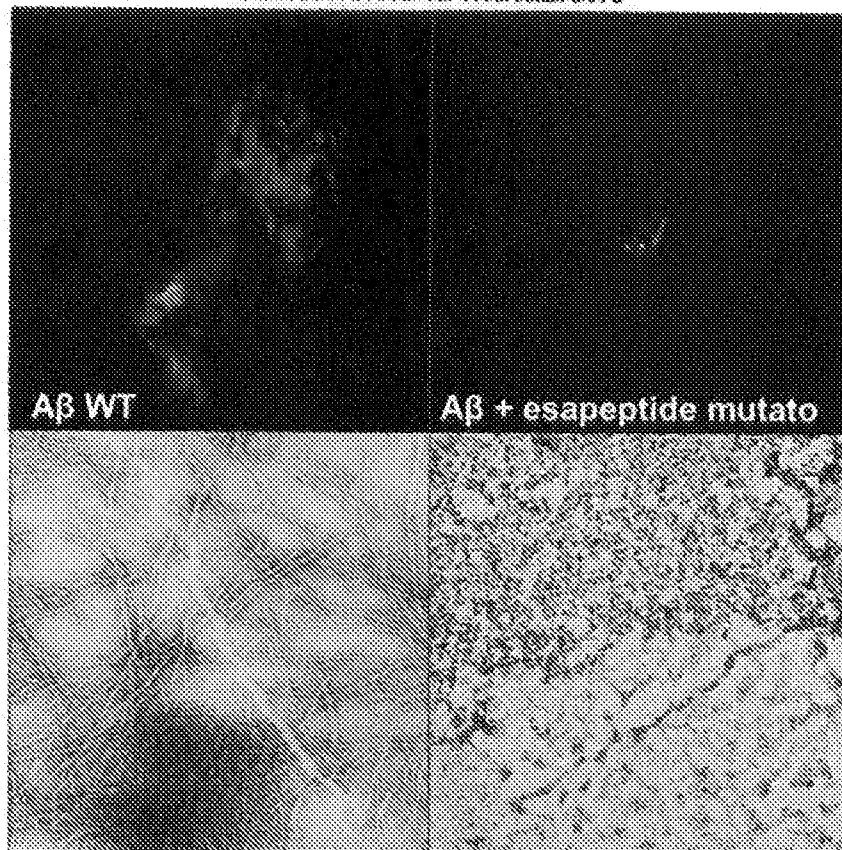
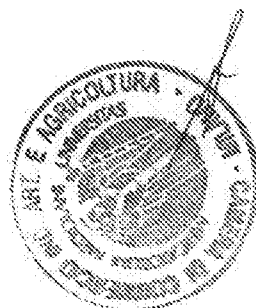


Figura 15. Ultrastruttura e proprietà tintoriali degli aggregati formati da A β 1-40 wild-type incubato per 5 giorni in assenza o in presenza di esapeptide mutato, in rapporto molare di 1:5.

Si può notare che in presenza di eccesso di esapeptide mutato la capacità di formare fibrille amiloidi da parte del peptide A β 1-40 risulta pressoché completamente abolita.

MI2007 A 0 0 1 9 7 5



UFFICIO BREVETTI
 RAPISARDO S.p.A.
 VIA ...
 AVV. M. CRISTINA RAPISARDO

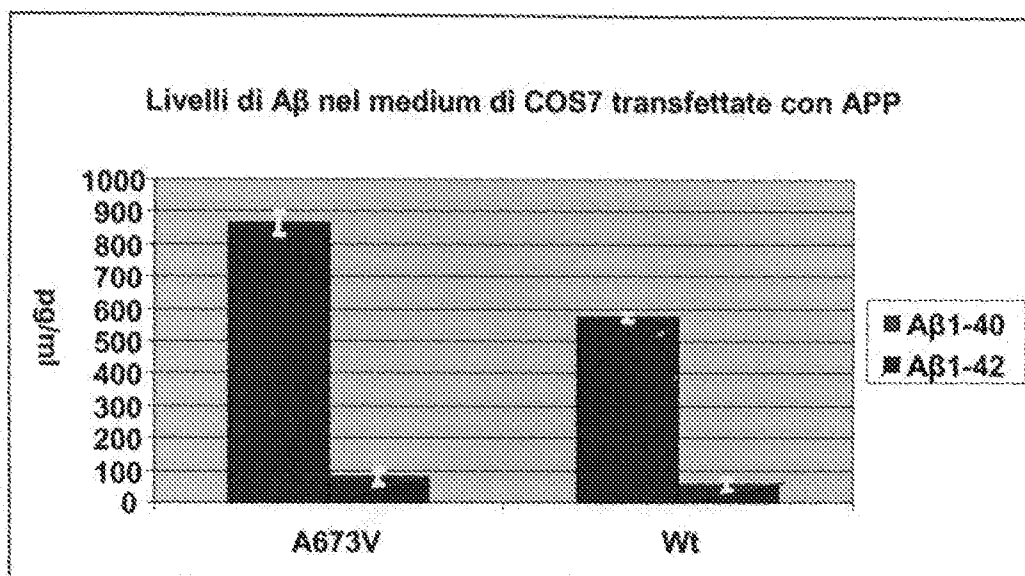


Figura 16. Confronto tra i valori di A β 1-40 e A β 1-42 nel medium di COS7 transfettate con APP A673V e di COS7 transfettate con APP wild-type.

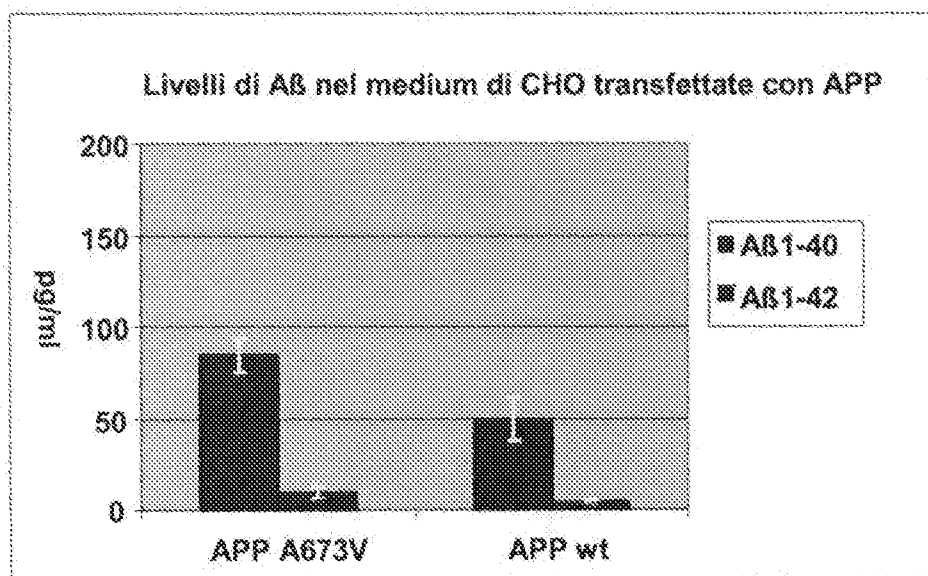
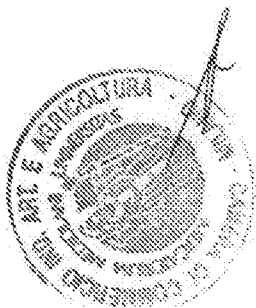


Figura 17. Confronto tra i valori di A β 1-40 e A β 1-42 nel medium di CHO transfettate con APP A673V e di CHO transfettate con APP wild-type.



M/2007 A001975

UFFICIO GREGORI
RAPISARDO S.R.L.
LIVORNO
AVV. M. CRISTIANE RIVOLVERA

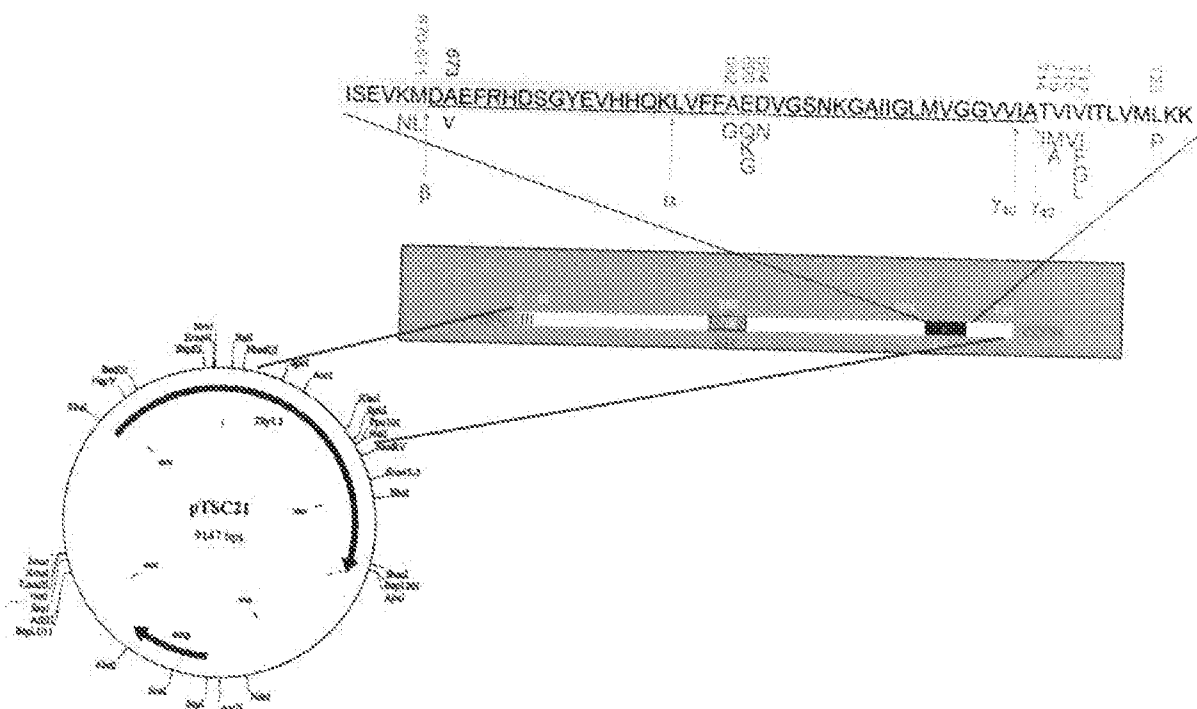


Figura 18. Schema del costrutto veicolante APP umana wild-type o con mutazione Ala>Val in posizione 2 di A β utilizzato per la produzione di topi transgenici.

L'APP umana wild-type è stata introdotta nel plasmide pTSC21, sotto il controllo del promotore murino Thy1.2. Mediante mutagenesi è stata successivamente introdotta la mutazione.

MI2007 A 001975



UFFICIO BREVETTI
RAPISARDI S.r.l.
UN MANDATARIO
RAPISARDI S.r.l.
RAPISARDI S.r.l.

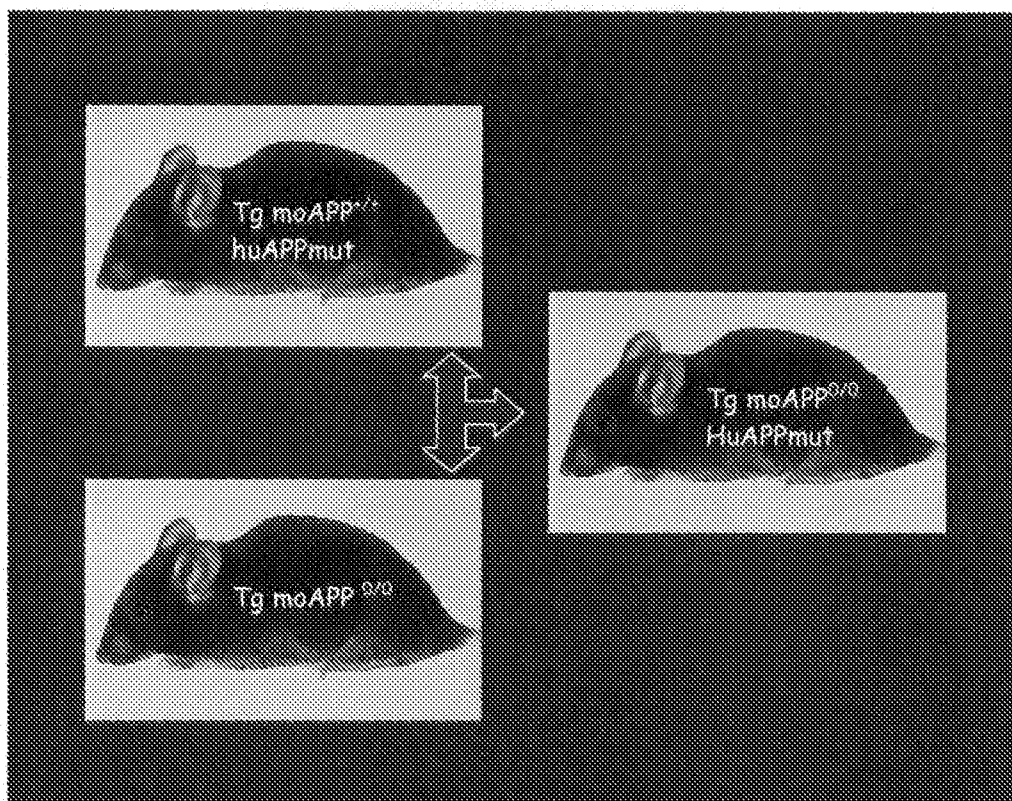
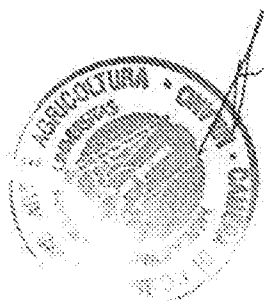


Figura 19. Schema di "breeding" dei topi transgenici C57Bl portatori della mutazione Ala>Val in posizione 2 di A β .

I topi transgenici esprimenti APP umana con mutazione Ala>Val in posizione 2 di A β ed APP endogena (Tg moAPP^{+/+} huAPP_{mut}) saranno incrociati con topi knock-out per l'APP endogena (Tg moAPP^{0/0}) così da ottenere topi (Tg moAPP^{0/0} huAPP_{mut}) esprimenti esclusivamente APP umana con la mutazione. Questi ultimi verranno infine incrociati con topi transgenici per APP umana wild-type per ottenere animali eterozigoti (huAPP_{wr}/huAPP_{mut}).



MI2007 A 0 0 1 9 7 5

UFFICIO BREVETTI
RAPICOR S.p.A.
MILANO

AD. M. COSTA RIVIERA