(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 33 139 T3** 2009.09.24

(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 736 106 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 139.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/11782**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 931 873.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/011994**
(86) PCT-Anmeldetag: **17.10.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **04.05.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.10.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **10.09.2003**
(97) Veröffentlichungstag des geänderten Patents beim EPA: **22.04.2009**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.09.2009**

(51) Int Cl.[8]: ***C12Q 1/68*** (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:
143697 **27.10.1993** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Elan Pharmaceuticals, Inc., San Francisco, Calif., US; Eli Lilly and Co., Indianapolis, Ind., US

(74) Vertreter:
Weickmann & Weickmann, 81679 München

(72) Erfinder:
SEUBERT, Peter A., South San Francisco, US; SCHENK, Dale B., Pacifica, US; McCONLOGUE, Lisa C., San Francisco, US; SINHA, Sukanto, San Francisco, US; ZHAO, Jun, La Jolla, US

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON INHIBITOREN DER BILDUNG VON BETA-AMYLOIDPEPTID**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Verfahren zur Überwachung der Prozessierung von β-Amyloidvorläuferprotein. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung derartiger Verfahren für die Diagnose, Prognose und Überwachung der Reaktion auf eine Therapie der Alzheimer-Krankheit, und zum Screenen und Bewerten von potentiellen Arzneimitteln für die Behandlung der Alzheimer-Krankheit.

[0002] Die Alzheimer-Krankheit ist durch die Gegenwart von zahlreichen amyloiden Plaques und neurofibrillären Bündeln (in hohen Maße unlöslichen Proteinaggregaten) gekennzeichnet, welche in den Gehirnen von Alzheimer Krankheit-Patienten vorhanden sind, insbesondere in denjenigen Bereichen, die an Gedächtnis und Wahrnehmung beteiligt sind. Während es in der Vergangenheit eine erhebliche wissenschaftliche Debatte gab, ob die Plaques und Bündel eine Ursache oder lediglich die Folge der Alzheimer-Krankheit sind, deuten neuere Entdeckungen darauf hin, dass der amyloide Plaque ein verursachender Vorläufer oder Faktor ist. Insbesondere wurde entdeckt, dass die Produktion von β-Amyloidpeptid, einem Hauptbestandteil des amyloiden Plaque, aus Mutationen in dem Gen resultieren kann, welches für Amyloidvorläuferprotein kodiert, ein Protein, das bei normaler Prozessierung das β-Amyloidpeptid nicht erzeugt. Es wird derzeit angenommen, dass eine normale (nicht pathogene) Prozessierung des β-Amyloidvorläuferproteins über Spaltung durch eine putative ”α-Secretase” erfolgt, welche zwischen den Aminosäuren 16 und 17 des Proteins spaltet. Es wird weiter angenommen, dass pathogene Prozessierung über eine putative ”β-Secretase” am Aminoterminus des β-Amyloidpeptids innerhalb des Vorläuferproteins erfolgt.

[0003] Die Identifikation von Mutationen im Amyloidvorläuferprotein-Gen, welche familiäre, früh einsetzende Alzheimer-Krankheit verursachen, ist der stärkste Hinweis darauf, dass der Amyloidmetabolismus das zentrale Ereignis in dem der Krankheit zugrunde liegenden pathogenen Prozess ist. Vier veröffentlichte Mutationen, welche die Krankheit hervorrufen, umfassen bezogen auf die 770-Isoform, Valin^{717} zu Isoleucin (Goate et al. (1991) Nature 349: 704–706), Valin^{717} zu Glycin (Chartier Harlan et al. (1991) Nature 353: 844–846), Valin^{717} zu Phenylalanin (Murrell et al. (1991) Science 254: 97–99), und bezogen auf die 695-Isoform, eine Doppelmutation, welche Lysin^{595}-Methionin^{596} zu Asparagin^{595}-Leucin^{596} verändert (Mullan et al. (1992) Nature Genet. 1: 345–347), bezeichnet als die Schwedische Mutation. Darüber hinaus scheint β-Amyloidpeptid für Hirnneuronen toxisch zu sein, und neuronaler Zelltod ist mit der Krankheit assoziiert.

[0004] Somit wäre es von erheblichem Wert für die Diagnose, Prognose und therapeutische Überwachung der Alzheimer-Krankheit, die zelluläre Prozessierung von Amyloidvorläuferprotein überwachen zu können. Insbesondere wäre es wünschenswert, minimal invasive Vorgehensweisen zum Screenen und Bewerten von nachweisbaren diagnostischen Markern in leicht erhältlichen Patientenproben, wie etwa Serum, Zerebrospinalfluid (CSF) und dergleichen, zu identifizieren.

[0005] Eine Reihe von potentiellen diagnostischen Markern für Alzheimer-Krankheit ist vorgeschlagen worden. Von besonderem Interesse für die vorliegende Erfindung sind bestimmte Fragmente des Amyloidvorläuferproteins, umfassend Carboxy-terminale Fragmente (wie etwa das β-Amyloidpeptid selbst und Fragmente davon) und Amino-terminale Fragmente (wie etwa bestimmte 25 kD, 105 kD und 125 kD Fragmente). Bisher hat sich keiner der vorgeschlagenen Marker als verlässlich für die Diagnose vor dem Tod oder die Überwachung von Alzheimer-Krankheit erwiesen.

[0006] Es wäre somit wünschenswert, zusätzliche und alternative diagnostische Marker für die Alzheimer-Krankheit zu identifizieren. Derartige Marker sollten selbst und/oder in Kombination mit anderen diagnostischen Markern und Verfahren geeignet sein. Bevorzugt sollten die diagnostischen Marker in Körperfluiden, wie etwa CSF, Blut, Plasma, Serum, Urin, Gewebe und dergleichen nachweisbar sein, so dass minimal invasive diagnostische Verfahren verwendet werden können.

[0007] Von weiterem Interesse für die vorliegende Erfindung sind in vivo Verfahren zum Screenen von Arzneimittelkandidaten auf die Fähigkeit, die Produktion von β-Amyloidplaques zu inhibieren oder zu verhindern. Es wäre wünschenswert, Verfahren zum Screenen von Testverbindungen auf die Fähigkeit, Amyloidvorläuferprotein in β-Amyloidpeptid zu überführen, bereitzustellen. Insbesondere wäre es wünschenswert, derartige Methoden auf metabolischen Wegen zu basieren, deren Beteiligung an einer derartigen Überführung festgestellt worden ist, wobei die Testverbindungen fähig wären, den metabolischen Weg, welcher zu der Überfüh-

rung führt, zu unterbrechen oder zu stören. Derartige Verfahren sollten rasch, wirtschaftlich, und zum Screenen einer großen Anzahl von Testverbindungen geeignet sein.

2. Beschreibung des Standes der Technik

[0008] β-Amyloidpeptid (auch bezeichnet als A4, βAP, Aβ oder AβP; siehe US Patent Nr. 4,666,829, und Glenner and Wong (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120: 1131–1135) stammt von β-Amyloidvorläuferprotein (βAPP) ab, das in differenziell gespleissten Formen von 695, 751 und 770 Aminosäuren exprimiert wird. Siehe Kang et al. (1987) Nature 325: 773–776; Ponte et al. (1988) Nature 331: 525–527; und Kitaguchi et al. (1988) Nature 331: 530–532. Die normale Prozessierung des Amyloidvorläuferproteins beinhaltet eine proteolytische Spaltung an einer Stelle zwischen den Resten Lys^{16} und Leu^{17} (nummeriert wie in Kang et al. (1987), Nature 325: 773–776, für die vAP-Region, bei der Asp^{597} Rest 1 ist), nahe der Transmembrandomäne, was zu einer konstitutiven Sezernierung einer extrazellulären Domäne führt, welche den Rest der β-Amyloidpeptidsequenz enthält (Esch et al. (1990) Science 248: 1122–1124). Dieser Weg scheint zwischen vielen Spezies konserviert und in vielen Zelltypen vorhanden zu sein. Siehe Weidemann et al. (1989) Cell 57: 115–126, und Oltersdorf et al. (1990) J. Biol. Chem. 265: 4492–4497. Dieser normale Weg spaltet innerhalb der Region des Vorläuferproteins, welche dem β-Amyloidpeptid entspricht, wodurch dessen Bildung anscheinend ausgeschlossen wird. Es wurde eine andere konstitutiv sezernierte Form von βAPP festgestellt (Robakis et al., Soc. Neurosci., October 26, 1993, Abstract No. 15.4, Anaheim, CA.), welche Carboxy-terminal mehr von der βAP-Sequenz enthält als die von Esch et al. (1990) Science 248: 1122–1124, beschriebene Form.

[0009] Golde et al. (1992), Science 255: 728–730, stellten eine Reihe von Deletionsmutanten von Amyloidvorläuferprotein her und beobachteten eine einzige Spaltstelle innerhalb der β-Amyloidpeptidregion. Auf Basis dieser Beobachtung wurde postuliert, dass die Bildung von β-Amyloidpeptid keinen Sezernierungsweg umfasst. Estus et al. (1992), Science 255: 726–728, lehren, dass die zwei größten in Hirnzellen aufgefundenen Carboxy-terminalen proteolytischen Fragmente von Amyloidvorläuferprotein die gesamte β-Amyloidpeptidregion enthalten.

[0010] Die PCT-Anmeldung WO 92/00521 beschreibt Verfahren zur Bewertung von Alzheimer-Krankheit auf Basis einer Messung der Mengen von bestimmten löslichen 25 kD, 105 kD und 125 kD Derivaten von Amyloidvorläuferprotein in Zerebrospinalfluid aus einem Patienten. **Fig. 3** von WO 92/00521 legt nahe, dass eine Spaltung von Amyloidvorläuferprotein angrenzend an den Aminoterminus von β-Amyloidpeptid vorkommen könnte, wobei ein lösliches Amino-terminales Fragment produziert wird, aber in der Anmeldung wird kein Nachweis oder eine Diskussion einer derartigen Spaltung präsentiert. Kennedy et al. (1992), Neurodegeneration 1: 59–64, präsentieren Daten für eine Form von sezerniertem βAPP, welche durch ihre Reaktivität mit Antikörpern gegen die Reste 527–540 von βAPP und ein Fehlen von Reaktivität mit Antikörpern gegen die ersten fünfzehn Reste von βAP gekennzeichnet war. Es wurde kein direkter Nachweis bereitgestellt um die Spaltstelle oder die Identität der Carboxyterminus der βAPP-Form nahe zu legen. Die PCT-Anmeldung WO 91/16628 beschreibt Verfahren zur Diagnostizierung der Krankheit auf Basis eines Nachweises von Amyloidvorläuferproteinen und Fragmenten davon unter Verwendung von Antikörpern gegen die Protease Nexin-2 oder Amyloidvorläuferprotein.

[0011] Neuere Veröffentlichungen zeigen, dass lösliches β-Amyloidpeptid von gesunden Zellen produziert wird, in Kulturmedien hinein (Haass et al. (1992) Nature 359: 322–325), und in CSF von Mensch und Tier (Seubert et al. (1992) Nature 359: 325–327).

[0012] Palmert et al. (1989) Biochem. Biophys. Res. Comm. 165: 182–188 beschreiben drei mögliche Spaltmechanismen für βAPP und präsentieren einen Nachweis, dass die Spaltung von βAPP bei der Produktion von löslichen βAPP-Derivaten nicht an $Methionin^{596}$ stattfindet. US Patent Nr. 5,200,339 diskutiert die Existenz von einem oder mehreren bestimmten proteolytischen Faktoren, die mutmaßlich βAPP an einer Stelle nahe des βAPP-Aminoterminus spalten können.

[0013] Sahasrabudhe et al (1993) J. Biol. Chem. 268: 16699–16705 betrifft die enzymatische Erzeugung des Aminoterminus des β-Amyloidpeptids und diskutiert Experimente, die darauf abzielen, Enzyme zu identifizieren, welche bestimmte synthetische Peptide spalten können.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0014] Verfahren, wie in den Ansprüchen 1, 2 und 8 definiert, zum Nachweis und der Überwachung eines Amino-terminalen Fragments von β-Amyloidvorläuferprotein (βAPP), welches aus β-Secretase-Spaltung resul-

tiert, werden bereitgestellt. Das resultierende Fragment, nachstehend hierin als ATF-βAPP bezeichnet, kann in biologischen Proben nachgewiesen werden und ist zur Überwachung der Prozessierung von βAPP in Tiermodellen geeignet. Insbesondere stellt die vorliegende Erfindung eine Überwachung der Prozessierung von βAPP in vivo bereit, wobei die Gegenwart von ATF-βAPP in einer Probe aus einem von Mensch verschiedenen Tier nachgewiesen wird, das transformiert worden ist, so dass es die Schwedische Mutation von humanem βAPP exprimiert, und wobei das ATF-βAPP zwischen LEU^{596} und ASP^{597} in der 695 Aminosäuren-Isoform, bezogen auf die Nummerierung von Kang et al. (1987) Nature 325: 773–776, gespalten worden ist. Die Schwedische Mutation resultiert aus einer Substitution von LYS^{595}-MET^{596}, die in der 695 Wildtypisoform von βAPP vorhanden sind, durch ASN^{595}-LEU^{596}

[0015] Es wurde festgestellt, dass die von Mensch verschiedenen Tiermodelle, welche die humane Schwedische Mutation des βAPP-Gens exprimieren, besonders produktive Erzeuger des Amino-terminalen Fragments davon sind. Das bedeutet, von Mensch verschiedene Tiermodelle können die humane Schwedische Mutation mit einer höheren Häufigkeit spalten, als sowohl das endogene βAPP oder das humane Wildtyp-βAPP gespalten werden. Es wird weiterhin angenommen, dass die intrazelluläre Prozessierung der Schwedischen Mutation von humanem βAPP zu einer höheren Produktion von ATF-βAPP führt als durch andere Mutationen des βAPP-Gens produziert wird. Somit sind von Mensch verschiedene transgene Tiersysteme, wie etwa transgene Mäuse, welche die Schwedische Mutation von βAPP exprimieren, besonders geeignet als Modelle zur Überwachung der intrazellulären Prozessierung von βAPP sowie zum Screening nach Verbindungen auf die Fähigkeit, die Spaltung von βAPP in Folge von β-Secretaseaktivität, die anscheinend pathogene Form der βAPP-Prozessierung, zu inhibieren oder zu modulieren.

[0016] Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren der β-Amyloidproduktion bereit, wobei das Verfahren umfasst das Verabreichen einer Testverbindung einem von Mensch verschiedenen Tier, welches transformiert worden ist, so dass es die Schwedische Mutation von humanem β-Amyloidvorläuferprotein (βAPP) exprimiert, das Nachweisen der Menge eines zwischen Leu^{596} und Asp^{597} gespaltenen Amino-terminalen Fragments von βAPP (ATF-βAPP) in einer Probe aus dem von Mensch verschiedenen Tier, und das Vergleichen der nachgewiesenen Menge an ATF-βAPP mit einer in Abwesenheit der Testverbindung produzierten Kontrollmenge an ATF-βAPP.

[0017] In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird das durch β-Secretasespaltung der Schwedischen Mutation von βAPP produzierte ATF-βAPP durch eine Bindesubstanz nachgewiesen, welche spezifisch an ein Epitop bindet, das an oder in der Nähe des Carboxyterminus von ATF-βAPP vorhanden ist, wobei das Epitop den Carboxy-terminalen Rest (LEU^{596}), und bevorzugt die fünf Aminosäurereste, die am Carboxyterminus von ATF-βAPP vorhanden sind, umfasst. Es wurde festgestellt, dass die Bindung zwischen Bindesubstanzen, wie etwa Antikörpern, gegen ein derartiges C-terminales Epitop für einen Nachweis der Schwedischen Form von ATF-βAPP in hoher Spezifität sorgt. Bevorzugte Antikörper werden gegen ein Peptid erzeugt, umfassend die fünf Reste des Carboxyterminus, der durch β-Sectretasespaltung des Schwedischen βAPP freigelegt ist.

[0018] In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zum Screening nach Testverbindungen auf die Fähigkeit, die Spaltung von βAPP zu inhibieren oder zu modulieren bereit, wobei das Verfahren das Verabreichen einer Testverbindung an eine Maus, die transformiert worden ist, so dass sie die Schwedische Mutation von humanem βAPP exprimiert, wobei das humane βAPP in einer ausreichenden Menge zu ATF-βAPP prozessiert wird, um in einem Hirnhomogenat der transformierten Maus nachgewiesen werden zu können, und das Nachweisen einer Änderung der Prozessierung von βAPP in der transformierten Maus, im Vergleich zu der Prozessierung in Abwesenheit der Testverbindung, umfasst, wobei die Änderung der Prozessierung von βAPP nachgewiesen wird durch Messen einer Änderung der Menge an ATF-βAPP.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0019] Die **Fig. 1A** und **Fig. 1B** erläutern die verschiedenen Isoformen von normalem βAPP bzw. die entsprechenden Isoformen von ATF-βAPP.

[0020] Die **Fig. 2A**, **Fig. 2B** und **Fig. 2C** sind chemilumineszierende Gelmuster von Material, welches aus konditioniertem Medium einer humanen fötalen Hirnzellkultur stammt. Die Bahnen 1, 2 und 3 von jedem Gel stellen das unbehandelte konditionierte Medium, das durch Reaktion mit einem Antikörper, welcher ein Epitop innerhalb der Reste 1–16 des β-Amyloidpeptids erkennt, abgereicherte konditionierte Medium, bzw. das von diesem Antikörper entfernte Material dar. Die Gelmuster A, B und C stellen die nachfolgenden Sonden dar: Antikörper anti-5 (der Stellen Amino-terminal zu der β-Amyloidpeptidregion auf βAPP erkennt); Antikörper 92

(der gegen ein synthetisches Peptid erzeugt worden war, das in dem C-terminalen Methionin endet, welches durch Spaltung von βAP aus βAPP freigelegt worden ist); bzw. Antikörper 10D5 (ein monoklonaler Antikörper, der ein Epitop von βAP innerhalb der Reste 1–16 erkennt).

[0021] Fig. 3 ist ein chemilumineszierendes Gelmuster, das durch Untersuchung von humanem Lumbal-CSF erhalten wurde. Das CSF wurde mit Antikörper 92 getestet, entweder alleine (Bahn 1) oder nach Präinkubation mit verschiedenen Peptiden, welche Variationen des C-Terminus von ATF-βAPP darstellen. Eine signifikante Kompetition (Bindungsverringerung) wurde mit Peptiden beobachtet, die mit dem C-terminalen Methionin enden (Bahnen 3, 4, 6 und 7). Die Peptide waren wie folgt: Bahn 1, kein kompetierendes Peptid zugegeben; Bahn 2, GSGLTNIKTEEISEVK; Bahn 3, YSGLTNIKTEEISEVKM; Bahn 4, ISEVKM; Bahn 5 EISEVKMD; Bahn 6, CISEVKM; Bahn 7, YISEVKM. MW = Molekulargewichtsmarker (angegeben in Kilodalton).

[0022] Fig. 4 ist ein Autoradiogramm, das Elektrophoresegelmuster darstellt, die durch Immunpräzipitation von konditioniertem Medium aus verschiedenen Zelllinien erhalten wurden. Das Material, das von humanen fötalen Hirnkulturen sezerniert und mittels Antikörper 92 immunpräzipitiert worden war (Bahn 11, am Pfeil) ist anscheinend kleiner als das von Antikörper C6C präzipitierte Material (Bahn 10 am Pfeil). Antikörper C6C erkennt ein Epitop innerhalb der Reste 1–16 von βAP.

[0023] Fig. 5 ist ein Autoradiogramm, das Elektrophoresegelmuster darstellt, die durch Immunpräzipitation von konditioniertem Medium aus der humanen Zelllinie 293, welche mit cDNA transfiziert worden war, die für sowohl normales als auch Schwedisches βAPP kodiert, erhalten wurden. Die Menge an ATF-βAPP Material, welche durch die Schwedisch transfizierten Zellen sezerniert wird (Bahnen 11 und 12), ist qualitativ größer als die von normalen βAPP Transfektanten (Bahnen 9 und 10) produzierte Menge.

[0024] Fig. 6 ist ein Immunblot, der die Spezifität eines gegen die Schwedische Mutation von ATF-βAPP erzeugten monoklonalen Antikörpers zeigt (nachstehend hierin als der Antikörper Schwedisch 192 bezeichnet).

[0025] Fig. 7A ist eine Karte des Plasmids pNSEAPPswΔ3'.

[0026] Fig. 7B ist eine Karte des Plasmids pNSEAPPsw.

[0027] Fig. 8 ist ein Western Blot von löslichen Fraktionen von Hirnhomogenaten von transgenen und nicht transgenen (Kontrolle) Mäusen, welche auf die Gegenwart von βAPP-Fragmenten untersucht wurden.

[0028] Fig. 9 sind Western Blots von Hirnhomogenaten von transgenen und nicht transgenen (Kontrolle) Mäusen, welche zeigen, dass der Antikörper Schwedisch 192 nicht mit βAPP-Fragmenten kreuzreagiert, die an der α-Secretasestelle gespalten sind.

BESCHREIBUNG DER SPEZIFISCHEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0029] Die vorliegende Erfindung resultiert aus der Identifikation eines sezernierten Fragments von β-Amyloidvorläuferprotein (βAPP). das aus der Spaltung einer intakten β-Amyloidpeptidregion (βAP) aus dem Vorläuferprotein resultiert. Die sezernierten Fragmente umfassen den Amino-terminalen Abschnitt von βAPP, welcher nach einer derartigen Spaltung übrig bleibt und hierin nachstehend als die Amino-terminale Fragmentform von βAPP (ATF-βAPP) bezeichnet wird. Es wird angenommen, dass ATF-βAPP das Produkt eines alternativen sezernierenden Prozessierungswegs für βAPP ist, der sogar in normalen (nicht erkrankten) Zellen vorhanden ist. Es wird weiterhin angenommen, dass der alternative Sezernierungsweg jedoch für ein essentielles Ereignis in der Produktion von βAP in erkrankten Zellen von Patienten verantwortlich sein kann, und dass abnormale Produktion von ATF-βAPP an Krankheiten in Zusammenhang mit βAP-Plaques beteiligt sein kann, insbesondere Alzheimer-Krankheit und Down Syndrom. Somit stellt die vorliegende Erfindung Verfahren zur Überwachung der zellulären Prozessierung von βAPP auf Basis des Nachweises und der Messung von ATF-βAPP in biologischen Proben bereit.

[0030] ATF-βAPP wird identifiziert und erkannt durch spezifische Bindung an Antikörper, welche gegen Peptide erzeugt wurden, die bestimmte Reste von βAPP umfassen, die unmittelbar an die βAP-Region angrenzen und für normales βAPP das Carboxy-terminale Methionin (in der 695-Isoform als Methionin^{596} nummeriert, wie nachstehend ausgeführt) umfassen. Die Peptide umfassen üblicherweise mindestens fünf aufeinander folgende Reste bis zu und einschließlich Rest^{596}, und spezifische Verfahren zur Herstellung derartiger Antikörper sind nachstehend ausgeführt.

[0031] Nunmehr unter Bezugnahme auf die Fig. 1A und Fig. 1B wird βAPP in drei Isoformen aufgefunden, umfassend 695, 751 bzw. 770 Aminosäuren. Die Isoform 695 ist die häufigste in neuronalen Zellen, wobei die Isoformen 751 und 770 aus Insertionen an Rest 289 der Isoform 695 resultieren (alle Nummerierungen der Isoform 695 sind gemäß Kang et al (1987) Nature 325: 733–736). ATF-βAPP resultiert anscheinend aus einer proteolytischen Spaltung der verschiedenen βAPP-Isoformen an oder innerhalb der fünf Reste an der Amino-terminalen Seite des Aminoterminus der β-Amyloidpeptidregion (βAP), der zwischen den Resten 596 und 597 der Isoform 695 gelegen ist. Eine derartige Spaltung führt zu der Freilegung eines C-terminalen Rests, der üblicherweise Methionin^{596}, Lysin^{595} oder Leucin^{596} zumeist Methionin^{596} oder Leucin^{596} ist, gezeigt als MET^{596} und LEU^{596} in Fig. 1B. Das Freilegen von LEU^{596} findet mit der β-Secretasespaltung der Schwedischen Mutation von humanem βAPP in sowohl Mensch als auch in Tiermodellen statt, wie nachstehend ausführlicher beschrieben. Es wird erkannt werden, dass die C-terminalen Reste natürlich eine unterschiedliche Nummerierung haben würden, wenn das ATF-βAPP von einer unterschiedlichen βAPP-Isoform stammt. Insbesondere wäre in den βAPP-Isoformen 751 bzw. 770 das C-terminale Methionin MET^{652} und MET^{671}, und das C-terminale Leucin wäre LEU^{651} und LEU^{670}. Wie hierin nachstehend und in den Ansprüchen verwendet bezeichnen Methionin^{596}, Lysin^{595} und Leucin^{596} allgemein die entsprechenden Reste in allen anderen Isoformen oder Varianten von βAPP. Es wird derzeit angenommen, dass der N-terminale Rest von ATF-βAPP in allen Isoformen LEU^{18} ist (basierend auf Prozessierung des Aminoterminus von βAPP in sezernierten Formen, die innerhalb der βAP-Region gespalten werden).

[0032] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann ATF-βAPP in einer biologischen Probe aus einem Tiermodell, typischerweise CSF, Blut, Serum, Plasma, Urin, Gewebe und dergleichen, nachgewiesen und/oder gemessen werden. Nachweis und Messung können durch jede Technik bewirkt werden, welche ATF-βAPP von anderen βAPP-Fragmenten, die in der Probe gefunden werden könnten, unterscheiden kann. Günstig können immunologische Nachweistechniken verwendet werden, die Antikörper, Antikörperfragmente oder andere äquivalente spezifische Bindesubstanzen verwenden, welche an ein für ATF-βAPP charakteristisches Epitop binden und im Wesentlich frei von Kreuzreaktivität mit anderen βAPP-Fragmenten sind. Besonders geeignet sind Antikörper und andere Bindesubstanzen, welche an ein Epitop binden, das den C-terminalen Rest von ATF-βAPP umfasst, der nach β-Secretasespaltung der βAP-Region freigelegt ist, z. B. Methionin^{596}, Leucin^{596} oder Lysin^{595}. Es wurde herausgefunden, dass derartige C-terminal-spezifische Antikörper zwischen dem ATF-βAPP und verwandten βAPP-Fragmenten unterscheiden können. Alternativ können immunologische Nachweistechniken auf isoliertem und gereinigtem ATF-βAPP unter Verwendung herkömmlicher Techniken basieren. Die Herstellung von sowohl Antikörpern, die für C-terminale Reste spezifisch sind, als auch von gereinigtem und isoliertem ATF-βAPP werden nachfolgend hierin beschrieben. Insbesondere geeignete Nachweistechniken umfassen ELISA, Western Blotting, Radioimmunassay und dergleichen.

[0033] Andere Techniken zum Nachweis von ATF-βAPP, welche nicht die Verwendung von ATF-βAPP-spezifischen Antikörpern und/oder kompetierendem Antigen erfordern, können ebenfalls verwendet werden. Beispielsweise kann zweidimensionale Gelelektrophorese verwendet werden, um nah verwandte lösliche Fragmente von βAPP aufzutrennen. Antikörper, die mit vielen oder all den Fragmenten kreuzreaktiv sind, können danach verwendet werden, um die Gele zu untersuchen, wobei die Gegenwart von ATF-βAPP auf Basis seiner genauen Position auf dem Gel identifiziert wird. Andere Techniken zum Nachweis von ATF-βAPP sind ebenfalls dem Fachwissen zuzurechnen. Beispielsweise können die sezernierten βAPP-Spezies, welche die Amino-terminale Region von βAP enthalten, immunologisch aus einer Probe entfernt werden, um ATF-βAPP zu isolieren (siehe Fig. 2A, Bahn 2, und Fig. 5, Bahnen 11 und 12), welches danach durch eine beliebige von verschiedenen Methoden, wie vorstehend diskutiert, nachgewiesen werden kann.

[0034] Antikörper, die für ein Epitop spezifisch sind, das für das Wildtyp ATF-βAPP charakteristisch ist, können gegen ein geeignetes Antigen oder Hapten, umfassend die C-terminale ATF-βAPP-Sequenz einschließlich des Methioninrests, hergestellt werden. Antikörper, die für ein Epitop spezifisch sind, das für die Schwedische Mutation von ATF-βAPP charakteristisch ist, können gegen ein geeignetes Antigen oder Hapten, umfassend die C-terminale ATF-βAPP-Sequenz einschließlich des Leucinrests an Position 596, hergestellt werden. Synthetische Peptide können günstig durch herkömmliche Festphasetechniken hergestellt, an ein geeignetes Immunogen gekoppelt, und zur Herstellung von Antiseren oder monoklonalen Antikörpern durch herkömmliche Techniken verwendet werden. Ein geeignetes synthetisches Peptid besteht aus sechs Resten von ATF-βAPP (ISEVKM), die an der unmittelbaren Amino-terminalen Seite von βAP gelegen sind, und an ein Immunogen gekoppelt und zur Herstellung von spezifischen Antikörpern, wie im experimentellen Abschnitt ausführlich beschrieben, verwendet werden können. Andere geeignete Peptidhaptene umfassen üblicherweise mindestens fünf aufeinander folgende Reste innerhalb von βAPP an der unmittelbaren Amino-terminalen Seite von βAP, und können mehr als sechs Reste umfassen (obwohl herausgefunden wurde, dass ein Peptid, das sechzehn Amino-terminale Reste umfasste, Antiseren ergab, die unspezifischer waren). Die 25 Carboxy-terminalen Res-

te des normalen ATF-βAPP sind wie folgt (unter Verwendung der Ein-Buchstaben Aminosäurebezeichnungen).

DRGLT	TRPGSGLTNI	KTEEISEVKM
576	586	596

[0035] Die 25 Carboxy-terminalen Reste der Schwedischen Mutation von βAPP sind wie folgt:

DRGLT	TRPGSGLTNI	KTEEISEVNL
576	586	596

[0036] Synthetische Polypeptidhaptene können mittels der gut bekannten Merrifield Festphase-Synthesetechnik hergestellt werden, bei der Aminosäuren nacheinander zu einer wachsenden Kette hinzugefügt werden (Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85: 2149–2156). Die Aminosäuresequenzen können auf der vorstehend angegebenen Sequenz von ATF-βAPP beruhen, oder sie können natürlich vorkommende oder konstruierte mutierte Sequenzen verwenden. Beispielsweise hätten die Peptide, welche die Schwedische Mutante nachahmen, Lysin^{595}-Methionin^{596} durch Asparagin^{595}-Leucin^{596} substituiert, und eine andere Substitution könnte lediglich die Substitution von Methionin^{596} durch Leucin^{596} umfassen. Ein bevorzugtes Peptid umfasst die Carboxy-terminalen fünf Aminosäuren von Schwedischem ATF-βAPP: SEVNL.

[0037] Sobald eine ausreichende Menge an Polypeptidhapten erhalten worden ist, kann es an einen geeigneten immunogenen Träger konjugiert werden, wie etwa Serumalbumin, Keyhole Limpet Hämocyanin, oder andere geeignete Proteinträger, wie allgemein beschrieben in Hudson and Hay, Practical Immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, Kapitel 1.3, 1980, dessen Offenbarung durch Bezugnahme hierin aufgenommen wird.

[0038] Sobald eine ausreichende Menge des Immunogens erhalten worden ist, können durch in vitro oder in vivo Techniken Antikörper hergestellt werden, die für den nach Abspaltung von βAP aus ATF-βAPP freigelegten C-terminalen Rest spezifisch sind. In vitro Techniken umfassen das in Kontakt Bringen von Lymphozyten mit den Immunogenen, während in vivo Techniken die Injektion der Immunogene in einen geeigneten Wirbeltierwirt erfordern. Geeignete Wirbeltierwirte sind nicht-human, umfassend Mäuse, Ratten Kaninchen, Schafe, Ziegen und dergleichen. Immunogene werden dem Tier nach einem vorbestimmten Behandlungsplan injiziert, und den Tieren wird in regelmäßigen Abständen Blut entnommen, wobei das entnommene Blut nachfolgender Entnahmen verbesserten Titer und verbesserte Spezifität hat. Die Injektionen können intramuskulär, intraperitoneal, subkutan oder dergleichen erfolgen, und ein Adjuvans, wie etwa inkomplettes Freund Adjuvans, wird verwendet werden.

[0039] Falls gewünscht, können monoklonale Antikörper erhalten werden durch Herstellung immortalisierter Zelllinien, welche Antikörper mit der gewünschten Spezifität produzieren können. Derartige immortalisierte Zelllinien können auf verschiedene Weisen hergestellt werden. Auf günstige Weise wird ein kleines Wirbeltier wie etwa eine Maus durch das oben beschriebene Verfahren mit dem gewünschten Immunogen hyperimmunisiert. Das Wirbeltier wird danach getötet, üblicherweise mehrere Tage nach der Schlussimmunisierung, die Milzzellen werden entfernt, und die Milzzellen werden immortalisiert. Die Art der Immortalisierung ist nicht kritisch. Die derzeit gebräuchlichste Technik ist Fusion mit einem Myelomzell-Fusionspartner, wie zuerst von Kohler und Milstein (1975) Nature 256: 495–497 beschrieben. Andere Techniken umfassen EBV-Transformation, Transformation mit nackter DNA, z. B. Onkogenen, Retroviren, etc., oder jedes andere Verfahren, das für Stabilität der Zelllinie und Produktion von monoklonalen Antikörpern sorgt. Spezifische Techniken zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern sind beschrieben in Antibodies: A Laboratory Manual, Hrsg. Harlow und Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

[0040] Zusätzlich zu monoklonalen Antikörpern und polyklonalen Antikörpern (Antiseren) werden die Nachweistechniken der vorliegenden Erfindung auch Antikörperfragmente verwenden können, wie etwa F(ab), Fv, V_L, V_H und andere Fragmente. Es wird auch möglich sein, rekombinant hergestellte Antikörper (Immunglobuline) und Variationen davon, wie nunmehr in der Patentliteratur und der wissenschaftlichen Literatur gut beschrieben, zu verwenden. Siehe beispielsweise EPO 8430268.0; EPO 85102665.8; EPO 85305604.2; PCT/GB85/00392; EPO 85115311.4; PCT/US86/002269 und die japanische Anmeldung 85239543.

[0041] Es wäre auch möglich, andere rekombinante Proteine herzustellen, welche die Bindespezifität von Antikörpern, hergestellt wie oben beschrieben, nachahmen.

[0042] Isoliertes und gereinigtes ATF-βAPP wird üblicherweise in einer im Wesentlichen reinen Form erhal-

ten. ”Im Wesentlichen rein” bedeutet mindestens etwa 50% w/w (Gewicht/Gewicht) oder eine höhere Reinheit, wobei im Wesentlichen keine störenden Proteine und Kontaminationen vorhanden sind. Bevorzugt wird das ATF-βAPP in einer Reinheit von größer 50% w/w, bevorzugt von 80% w/w oder darüber isoliert oder synthetisiert. Das ATF-βAPP kann aus einer natürlichen Quelle mittels herkömmlicher Proteinreinigungstechniken gereinigt werden, wobei homogene Zusammensetzungen mit einer Reinheit von mindestens etwa 50% w/w durch die Verwendung von Antikörpern, hergestellt wie vorstehend beschrieben, unter Verwendung von herkömmlichen Immunaffinität-Trenntechniken gereinigt werden. Geeignete natürliche Ausgangsmaterialien umfassen konditioniertes Medium aus ATF-βAPP produzierenden Zelllinien, wie etwa fötalen Hirnzellkulturen, und dergleichen. Alternativ kann das ATF-βAPP aus biologischen Proben, die aus einem humanen Wirt erhalten werden, wie etwa CSF, Serum und dergleichen isoliert werden. Geeignete Proteinreinigungstechniken sind beschrieben in Methods in Enzymology, Vol. 182, Hrsg, Deutcher, Academic Press Inc., San Diego, 1990.

[0043] Antikörper und gereinigtes ATF-βAPP, hergestellt wie vorstehend beschrieben, können in verschiedenen herkömmlichen immunologischen Techniken zum Nachweis von ATF-βAPP in biologischen Proben aus Tierproben verwendet werden, zur Überwachung von Krankheiten in Zusammenhang mit β-Amyloid und zum Arzneimittel-Screening. Geeignete immunologische Techniken umfassen Immunassays, wie etwa ELISA, Western Blot-Analysen und dergleichen. Zahlreiche spezifische immunologische Nachweistechniken sind in Antibodies: A Laboratory Manual, Hrsg. Harlow und Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, beschrieben.

[0044] In ähnlicher Weise kann auch eine in vitro Überwachung von ATF-βAPP in Tiermodellen der Alzheimer-Krankheit, wie hierin offenbart, zum Screening von Testverbindungen im Hinblick auf therapeutische Wirksamkeit verwendet werden (üblicherweise zum Testen von Verbindungen, die zuvor in einem in vitro Screening identifiziert wurden). Die Testverbindung bzw. die Testverbindungen werden dem Tier verabreicht, und der Gehalt an ATF-βAPP oder das Verhältnis von ATF-βAPP zu anderen βAPP-Fragmenten wird beobachtet. Diejenigen Verbindungen, die den Gehalt an ATF-βAPP oder das Verhältnis von ATF-βAPP zu anderen βAPP-Fragmenten verringern, würden als Kandidaten für eine weitergehende Bewertung erachtet.

[0045] Die Tiermodelle für die β-Sectretasespaltung von βAPP sind von Mensch verschiedene transgene Tiere, welche die Schwedische Mutation des βAPP-Gens exprimieren, wie vorstehend beschrieben. Es wurde festgestellt, das derartige transgene Tiere, insbesondere transgene Mäuse, große Mengen an ATF-βAPP produzieren, welche mittels der erfindungsgemäßen Verfahren nachgewiesen werden können. Insbesondere wurde festgestellt, dass die Schwedische βAPP-Mutation Mengen an ATF-βAPP produziert, die üblicherweise mindestens zweifach höher sind als bei humanem Wildtyp-βAPP, das in Tieren exprimiert wird.

[0046] Üblicherweise ist die Produktion signifikant höher, wobei sie typischerweise mindestens zweifach höher ist. Mit derart erhöhten Gehalten der ATF-βAPP-Produktion wird die Überwachung der β-Secretaseaktivität unter verschiedenen Bedingungen erheblich erleichtert. Insbesondere wird ein Screening nach Arzneimitteln und anderen Therapien zur Inhibition der β-Secretaseaktivität (und somit zur Inhibition der βAPP-Produktion) in von Mensch verschiedenen Tiermodellen, welche die Schwedische Mutation von humanem βAPP exprimieren, erheblich vereinfacht.

[0047] Die Verwendung von Tiermodellen zum Screening nach Arzneimitteln auf eine Inhibitionsaktivität der β-Secretase wird oftmals durchgeführt werden nachdem in vitro Zellkultur-Screeningtechniken durchgeführt worden sind. Arzneimittel, welche in in vitro Screening als viel versprechend erschienen sind, können dann Testtieren, die von Mensch verschieden sind, wie etwa Testmäusen, die transgen sind und die Schwedische Mutation von humanem βAPP exprimieren, verabreicht werden. Besondere Techniken zur Herstellung von transgenen Mäusen, welche die Schwedische Form von βAPP exprimieren, sind nachstehend hierin im experimentellen Abschnitt beschrieben. Es wird erkannt werden, dass die Herstellung von anderen, von Mensch verschiedenen transgenen Tieren, welche das Schwedische humane βAPP exprimieren, in einfacher Weise bewirkt werden kann, umfassend Ratten, Hamster, Meerschweinchen, Kaninchen und dergleichen.

[0048] Die Wirkung der Testverbindung auf die ATF-βAPP-Produktion in Testtieren kann in verschiedenen Proben aus den Testtieren gemessen werden. Im experimentellen Abschnitt ist der Nachweis von ATF-βAPP in Hirnhomogenaten ausführlich beschrieben. Der Nachweis von ATF-βAPP in Hirnhomogenaten ist beispielhaft, aber nicht notwendigerweise bevorzugt. In manchen Fällen wird es vorteilhaft sein, das ATF-βAPP in anderen Proben zu messen, wie etwa Zerebrospinalfluid, Blut und dergleichen, die aus dem Testtier erhalten werden können ohne das Tier zu opfern.

[0049] In allen Fällen wird es notwendig sein, einen Kontrollwert zu erhalten, der charakteristisch für das Niveau der ATF-βAPP-Produktion in dem Testtier in der Abwesenheit einer (oder mehrerer) Testverbindungen

ist. In Fällen, bei denen das Tier geopfert wird, wird es notwendig sein, einen Mittelwert oder einen typischen Wert von anderen, von Mensch verschiedenen Testtieren, die transgen modifiziert worden sind, so dass sie die Schwedische Mutante von humanem βAPP exprimieren, die jedoch keine Testverbindung oder irgendwelche andere Substanzen verabreicht bekommen haben, von denen erwartet würde, dass sie das Niveau der ATF-βAPP-Produktion beeinflussen, als derartige Kontrollwerte zugrunde zu legen. Sobald ein derartiges Kontrollniveau bestimmt worden ist, können Testverbindungen zusätzlichen Testtieren verabreicht werden, wobei eine Abweichung vom mittleren Kontrollwert darauf hindeutet, dass die Testverbindung eine Wirkung auf die β-Secretaseaktivität in dem Tier hat. Testverbindungen, die als positiv eingestuft werden, d. h. mit einer vermutlich vorteilhaften Wirkung bei der Behandlung von Alzheimer-Krankheit oder anderen Zuständen in Zusammenhang mit β-Amyloid, werden diejenigen sein, welche das Niveau der ATF-βAPP-Produktion um bevorzugt mindestens 20%, stärker bevorzugt um mindestens 50% und am meisten bevorzugt um mindestens 80% erniedrigen können.

[0050] Die Testverbindungen können jedes Molekül, jede Verbindung oder andere Substanz sein, welche zu der Zellkultur zugegeben oder dem Testtier verabreicht werden kann ohne die Lebensfähigkeit der Zellen oder des Tiers wesentlich zu beinträchtigen. Geeignete Testverbindungen können kleine Moleküle, biologische Polymere, wie etwa Polypeptide, Polysaccharide, Polynukleotide und dergleichen sein. Die Testverbindungen werden dem Kulturmedium typischerweise in einer Konzentration im Bereich von etwa 1 nM bis 1 mM, üblicherweise von etwa 10 μM bis 1 mM zugesetzt. Die Testverbindungen werden typischerweise in einer Dosierung im Bereich von 1 ng/kg bis 10 mg/kg, üblicherweise von 10 μg/kg bis 1 mg/kg verabreicht.

[0051] Testverbindungen, welche die Sezernierung oder die tierische Produktion von ATF-βAPP inhibieren können, werden als Kandidaten für weitere Bestimmungen bezüglich der Fähigkeit, die β-Amyloidproduktion in Tieren und Menschen zu blockieren, erachtet. Eine Inhibition der Sezernierung oder Produktion deutet darauf hin, dass die Spaltung von βAPP am Aminoterminus von βAP wahrscheinlich mindestens zum Teil blockiert wurde, wodurch die Menge eines zur Überführung in β-Amyloidpeptid zur Verfügung stehenden Prozessierungsintermediats verringert wird.

[0052] Die nachfolgenden Beispiele werden als Erläuterung, nicht als Einschränkung präsentiert.

EXPERIMENTELLER TEIL

Materialien und Methoden

1. Herstellung von Antikörper und Affinitätsmatrix

[0053] Der monoklonale Antikörper 6C6 wurde auf die gleiche Weise erzeugt und gescreent wie der Antikörper 10D5 (Hyman et al. (1992) J. Neuropath. Exp. Neurol. 51: 76), unter Verwendung eines synthetischen, die βAP-Reste 1–28 enthaltenden Peptids, konjugiert an Serumalbumin aus Kaninchen als dem Immunogen. Sowohl 10D5 als auch 6C6 erkennen ein Epitop innerhalb der ersten 16 Aminosäuren der βAP-Sequenz. 6C6 war in Immunpräzipitation wirksamer als 10D5 und wurde als ein Abfangantikörper verwendet. Zur Herstellung von 6C6-Harz wurden 4 ml Affigel®10 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) mit kaltem Wasser gewaschen und mit 3 ml 6C6 (12,5 mg/ml in PBS (2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4, 8,1 mM Na_2HPO_4, 137 mM NaCl, pH 7,5), 0,5 M NaCl) kombiniert. Die Kopplung erfolgte über Nacht bei 4°C unter sanftem Schütteln. Danach wurden 400 μl 1 M Tris, pH 8,0, zugegeben und das Schütteln wurde 40 Minuten fortgesetzt. Das Harz wurde danach vor Verwendung ausgiebig mit TTBS (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM Tris, 0,5% Tween®20, pH 7,5) gewaschen. Der Antikörper 7H5 ist ebenfalls in Hyman et al (1992) J. Neuropath. Exp. Neurol. 51: 76 beschrieben. Antikörper anti-5 wurden gegen βAPP 444–592 (Oldersdorf et al. (1989) Natrue 341: 144–147 und (1990) J. Biol. Chem. 265: 4492–4497 erzeugt.

[0054] Antikörper (bezeichnet als Antikörper 92) wurden gegen ein synthetisches Peptid erzeugt, welches die Reste 591–596 von βAPP (wie in Kang et al. (1987), Nature 325: 773–776 nummeriert) umfasste. Das Peptid (N-acetyl-CISEVKM) wurde an Serumalbumin aus Kaninchen konjugiert, das mit Sulfomaleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester aktiviert worden war, wobei ein Immunogen gebildet wurde. Mittels Standardmethodiken wurden in Kaninchen Antikörper gegen das Immunogen erzeugt. Während jeder Animpfung erhielten die Kaninchen subkutan 5 μg Immunogen in 0,1 ml Injektionen an etwa 10 Stellen (50 μg/Boost). Das gleiche Peptid wurde an Sulfo-link™-Gel (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) gekoppelt, für die Affinitätsreinigung von Antikörpern aus der IgG-Fraktion.

[0055] Eine ausführlichere Beschreibung der Herstellung von Antikörper 92 ist wie folgt. Kaninchen-Serum-

albumin (12,3 g) wurde 20 min bei 0°C mit 13 mg Sulfomaleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester in 1,25 ml 0,05 M KH_2PO_4, pH 7,0 inkubiert. Das Gemisch wurde unmittelbar danach einer Gelfiltration über eine 1 × 75 cm Säule Sephadex™ G-10, die mit Phosphatpuffer äquilibriert war, unterzogen. Der Proteineluent im Ausschlussvolumen wurde gepoolt und sofort mit 30 mg N-acetyl-CISEVKM-Peptid kombiniert, das mittels automatisierter Festphase-Standardmethodiken synthetisiert worden war. Die Kopplungsreaktion (Volumen 20 ml) wurde über Nacht laufen gelassen und wurde danach für die Erzeugung von Antikörpern an eine kommerzielle Einrichtung gesandt. Das Injektionsprotokoll bestand darin, das Antigen in einem gleichen Volumen von komplettem Freund Adjuvans zu emulgieren, und insgesamt 50 µg Antigen in 0,1 ml Aliquots an etwa 10 Stellen subkutan zu injizieren. Alle drei Wochen danach wurde mittels eines identischen Protokolls, außer dass inkomplettes Freund Adjuvans als der Emulgator verwendet wurde, eine Boosterinjektion verabreicht. Eine Woche nach jeder Injektion wurde den Kaninchen Blut entnommen und das Serum durch Reaktion auf Peptid in einem ELISA auf den Titer untersucht. Das IgG aus den positiv reagierenden Seren wurde durch Präzipitation mit 50% $(NH_4)_2SO_4$ (zweimal) gereinigt und gegen PBS dialysiert. Das Peptid N-acetyl-CISEVKM wurde unter Verwendung der Empfehlungen des Herstellers an Sulfo-link™-Gel (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) gekoppelt, um ein Affinitätsharz für die Reinigung der Peptid-spezifischen Antikörper zu erzeugen. Die IgG-Fraktion wurde auf die Säule aufgetragen, und nach Durchwaschen des nicht spezifisch gebundenen Materials mit PBS wurden die Antikörper mit 0,1 M Glycin, pH 2,5, 0,5 M NaCl, eluiert und danach vor dem Einfrieren gegen PBS dialysiert.

[0056] Der Antikörper Schwedisch 192 wurde gegen ein synthetisches Peptid, das aus den Resten 590–596 der Schwedischen βAPP-Sequenz zusammengesetzt war, erzeugt. Zusätzlich zu der βAPP-Sequenz wurden zwei Glycine und ein Cystein als ein Abstandhalter und ein Linker hinzugefügt, was die nachfolgende Sequenz ergibt: CGGEISEVNL. Das Peptid wurde an ein kommerziell erhältliches, Maleimidaktiviertes kationisiertes Rinderserumalbumin (Pierce Imject Supercarrier Immune Modulator, nachstehend hierin als cBSA bezeichnet) konjugiert. Antiserum wurde erzeugt unter Befolgung des vorstehend für den Antikörper 92 beschriebenen Injektionsschemas.

[0057] Im Allgemeinen wurde cBSA in entionisiertem Wasser auf eine Konzentration von 10 mg/ml resuspendiert. Eine gleiche Milligramm-Menge Peptid wurde zu dem Träger zugegeben, und es wurde vier Stunden bei Raumtemperatur gemischt. Das Konjugat wurde danach ausgiebig gegen Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Calcium und Magnesium dialysiert.

[0058] Das Konjugat wurde auf einem vorgegossenen 6% Novex Tris-Glycin-Gel mit dem Ausgangs-cBSA verglichen. Die erfolgreiche Konjugation wurde durch eine sichtbare Verschiebung zu einem höheren Molekulargewicht hin angezeigt.

2. Humane fötale Hirnzellkultur

[0059] Fötale Nervengewebeproben wurden aus 12–14 Wochen alten toten Föten erhalten. Proben der Großhirnrinde wurden zweimal mit Hank's ausgewogener Salzlösung (Hank's Balanced Saline Solution, HBSS) gewaschen. Hirnrindengewebe (2–3 Gramm) wurde in 10 ml kalte HBSS gegeben, wozu 1 mg DNase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, D3427) zugegeben wurde. Die verriebene Suspension wurde durch Nitex Nylonfilter von 210 µm und danach 130 µm filtriert, wie von Pulliam et al. (1984) J. Virol. Met. 9: 301 beschrieben.

[0060] Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet und in Nervenmedium (MEM mit einem Zusatz von 10% fötalem Rinderserum, 1% Glucose, 1 mM NaPyruvat, 1 mM Glutamin, 20 mM KCl) resuspendiert. Polyethylenimin-beschichtete 100 mm Schalen wurden mit $1,5 \times 10^7$ Zellen in 8 ml Nervenmedium angeimpft. Das Medium wurde zwei Mal pro Woche ausgetauscht. Alle Kulturen in dieser Untersuchung wurden mindestens 30 Tage in vitro wachsen gelassen. Für Serum-freie Wachstumsbedingungen wurden Kulturen in definiertes Medium (DMEM, ergänzt mit 5 µg/ml Rinderinsulin, 0,1 mg/ml Humantransferrin, 0,1 mg/ml BSA Fraktion V, 0,062 µg/ml Progesteron, 1,6 µg/ml Putrescin, 0,039 µg/ml Natriumselenit, 0,042 µg/ml Thyroxin und 0,033 µg/ml Trijod-L-thyronin) überführt und nach 3 Tagen wurde der Überstand geerntet.

[0061] Konditioniertes Medium (10 ml) von den Zellen wurde geentet. EDTA (5 mM), Leupeptin (10 µg/ml) und Tris-HCl (20 mM, pH 8,0) wurden in der angegebenen Endkonzentration zu jeder 10 ml Probe zugegeben, und die Probe wurde 20 Minuten bei 4°C mit 30.000 G zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde in zwei gleiche Aliquots aufgeteilt, zu einem der Aliquots wurde 6C6-Harz zugegeben (200 µl Harz mit etwa 5 mg/ml gebundenem 6C6). Beide Aliquots wurden 6 Stunden bei 4°C sanft gemischt, das Harz wurde pelletiert und ein zweites 200 µl Aliquot Harz wurde zugegeben. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C weiter gemischt. Die vereinigten Harze wurden zweimal mit TTBS gewaschen, danach zweimal kurz extrahiert, mit ein-ml Aliquots

von 0,1 M Glycin, 0,1 M NaCl, pH 2,8.

[0062] Das aus dem Harz extrahierte Material, das durch das Harz abgereicherte Medium und das Ausgangsmedium wurden einzeln mit 10% TCA (Trichloressigsäure) eine Stunde bei 0°C präzipitiert, die Pellets mit Aceton gewaschen und danach in 150 µl SDS-PAGE Probenpuffer unter reduzierenden Bedingungen resuspendiert und gekocht. Jede Probe (25 µl) wurde einer SDS-PAGE unter Verwendung von 10–20% Tricingelen (Novex) unterzogen. Die Proteine wurden über Nacht bei 40 V auf ProBlot PVDF-Membranen transferiert. Die Sichtbarmachung der immunreaktiven Proteine verwendete das TROPIX Chemilumineszenzsystem gemäß den Herstellerangaben für das AMPPD-Substrat. Verwendete Konzentrationen für Primärantikörper waren: anti-5, 0,1 µg/ml; 92, 2 µg/ml; 10D5, 2 µg/ml.

3. Kultur von humanen 293 Zellen

[0063] Humane 293 Zellen (ATCC No. CRL-1573) wurden modifiziert, so dass sie APP überexprimierten (Selkoe et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7341). Zellen wurden vor Verwendung in 10 cm Schalen bis zur Subkonfluenz wachsen gelassen. Metabolische Markierung und Immunpräzipitation wurden im Wesentlichen durchgeführt wie früher in Oltersdorf et al. (1989) Nature 341: 144 und (1990) J. Biol. Chem. 265: 4492 beschrieben. In kurzen Worten, wurde die Markierung in 10 cm Schalen durchgeführt. Zellen wurden in Methionin-freiem Medium gewaschen, 20 Minuten in 2 ml Methionin-freiem Medium, das mit 0,5 mCi ^{35}S-Methionin ergänzt war, inkubiert, in Vollmedium gewaschen, und 2 Stunden in 3 ml Vollmedium inkubiert. Konditioniertes Medium wurde gesammelt und mit 3000 G während 10 Minuten, gefolgt von Präabsorption mit Protein A-Sepharose® (Pharmacia, Piscataway, NJ) geklärt. Die Immunpräzipitation wurde mit 1,5 mg Protein A-Sepharose® pro Probe durchgeführt. Antikörper anti-5 wurde in einer Menge von 2 µg pro Probe verwendet, 6C6, 7H5 und 92 wurden in einer Menge von 10 µg pro Probe verwendet. 5 mg anti-Maus IgG aus Kaninchen wurden mit 6C6 und 7H5 sowie in den Kontrollproben verwendet. Präzipitate wurden vier Mal in TBS (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM Tris, pH 7,5), 0,1% NP40, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin gewaschen. SDS-PAGE wurde auf 5% Laemmli-Gelen durchgeführt.

4. Kultur von humanen, mit der Schwedischen Mutation transfizierten 293 Zellen

[0064] Zwei Vertiefungen mit humanen 293 Nierenzellen in einer Schale mit 6 Vertiefungen wurden transient mit Plasmidvektoren transfiziert, die entweder normales humanes βAPP oder die Schwedische Mutationsvariante von βAPP exprimierten, unter Verwendung von DOTAP-vermittelter Transfektion wie vom Hersteller (Boehringer Mannheim) beschrieben. Nach 40 Stunden wurden die Zellen in Methionin-freies DME, enthaltend 10% fötales Kälberserum, eingebracht und 20 Minuten später wurden sie 35 Minuten mit 200 µCi/ml ^{35}S-Methionin markiert. Die Zellen wurden danach zurück in normales DME Medium, enthaltend 10% fötales Kälberserum, gebracht und weitere 2,5 Stunden inkubiert. Das Medium wurde von den Zellen abgenommen und 15 Minuten bei 1000 G zentrifugiert, um alle Zellen zu entfernen. Die Überstände wurden in zwei Hälften aufgeteilt, und eine Hälfte wurde gemäß Standardmethoden mit dem Antikörper anti-5 immunpräzipitiert. Die andere Hälfte wurde über Nacht mit 6C6 Antikörper, an Agarose gekoppelt, inkubiert und das an die 6C6-Agarose gebundene Material wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Das verbleibende Material wurde danach mit Antikörper anti-5 immunpräzipitiert. Die gesamten anti-5 Immunpräzipitate (α5+), 6C6-gebundenen Präzipitate (6C6+) und 6C6 nicht-reaktiven, anti-5 reaktiven Immunpräzipitate (6C6–, α5+) wurden auf einem 5% Laemmli-Gel gefahren und immunreaktive Proteine wurden mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

5. Spezifität des Antikörpers Schwedisch 192

[0065] Konditioniertes Medium von 293 Nierenzellen, die stabil transfiziert worden waren, so dass sie das Schwedische βAPP-Protein überexprimieren, wurde gesammelt. Ein-Milliliter Aliquots wurden zu entweder 100 µl immobilisiertem 6C6-Affinitätsharz (siehe oben) oder 100 µl Heparin-Agarose (Sigma) zugegeben. Die Reaktion mit dem 6C6-Harz war 5 Stunden bei 4°C, die Heparin-Agarose wurde 30 Minuten bei 4°C reagiert. Nach der Inkubation wurden die Harze mit TTBS gewaschen und danach wurden 100 µl 2 × SDS-PAGE Probenpuffer zu jeder Probe zugegeben, die Proben wurden gekocht (5 Minuten) und kurz zentrifugiert. Zwanzig µl der Proben wurden auf 6% SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen und einer Elektrophorese unterzogen. Die Proteine wurden wie vorstehend beschrieben auf ProBlot® Membranen transferiert. Die Proben wurden mit den nachfolgenden Antikörpern getestet: 6C6 (vorstehend beschrieben), Schwedisch 192 (siehe oben) oder 8E5 (ein monoklonaler Antikörper, der ein Epitop von βAPP in der Region der Aminosäuren 444–592 erkennt, unter Verwendung der Nummerierung der 695-Form). Alle Antikörper wurden bei der Untersuchung des Immunblots in einer Konzentration von 2 µg/ml verwendet. Die Sichtbarmachung von immunreaktivem Material wurde erreicht unter Verwendung des Amersham ECL®-Systems gemäß den Empfehlungen des Herstellers. Blockieren

und Antikörperverdünnungen wurden unter Verwendung von 5% Magermilchpulver (Carnation) in TTBS gemacht.

6. Transgene Mäuse

[0066] Transgene Mäuse wurden unter Verwendung der in **Fig.** 7 gezeigten Plasmide (NSEAPPsw und NSEAPPswΔ3') erzeugt. Diese Plasmide enthalten die 751-Form von βAPP, welche die Schwedische Mutation (KM zu NL an den Positionen 595 und 596 der 695-Form) enthält. Der Nerven-spezifische Enolase-Promotor treibt die Expression an und stellt eine Spleißsequenz bereit. Die Ratte-NSE-Promotor- und Spleißsequenzen stammten von pNSE6 (Okayama and Berg (1982) Mol. Cell. Biol. 2: 161–170). Dieser Vektor enthält das 4,2 kb BgIII-Fragment der Ratte-NSE-Promotorregion (das stromaufwärts der BgIII-Stelle beginnt und sich bis zu der BgIII-Stelle im zweiten Intron fortsetzt), kloniert in die BamHI-Stelle des Vektors pSP65 (Promega). Die vom Vektor stammende XbaI-Stelle am 5'-Ende des Promotors definierte das 5'-Ende des verwendeten Promotors, und das die NSE-Translation initiierende ATG, das im zweiten Intron liegt, wurde an das βAPP-initiierende ATG fusioniert.

[0067] NSEAPPsw enthält auch eine Spleißsequenz aus SV40 in der 3'-Region des Gens. Diese Spleißsequenz stammte von dem Okayama/Berg-Vektor pL1, und ist eine Fusion der späten 16 s und 19 s Messagespleißsequenzen (Forss-Petter et al. (1990) Neuron 5: 187–197). Polyadenylierung wird von SV40-Sequenzen bereitgestellt.

[0068] Transgene Mäuse, welche diese Plasmidsequenzen enthielten, wurden unter Verwendung von Standardtechniken erzeugt. Das NotI-Fragment, das die vorstehend beschriebene Expressionskassette enthält, wurde gereinigt und in Eier injiziert, die von einer C57B1/DBA Hybridmaus erhalten worden waren. Die Eier wurden pseudoschwangeren Mäusen implantiert und der Nachwuchs wurde danach mittels PCR, Slot Blot und Southern-Analyse auf die Gegenwart von Plasmidsequenzen in Schwanz-DNA gescreent. Die derart erzeugten Gründermäuse wurden auf Expression von humanem βAPP durch Analyse ihres F1 transgenen Nachwuchses gescreent. Hirne von den F1-Tieren wurden mit einem Hand-Homogenisator (Polytron PT122B, Kinematica AG) homogenisiert, entweder in SDS-Puffer (2% SDS, 20 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA), oder in NP40-Puffer (1% NP40, 50 mM Tris, pH 7,5, 10 mM EDTA, und ein Cocktail von Proteaseinhibitoren, enthaltend 5–10 µg/ml Leupeptin, 2–4 µg/ml Pepstatin A, 5–10 µg/ml Aprotinin und 1–2 mM PMSF) homogenisiert. Die SDS-Lysate wurden für eine Western-Analyse direkt auf Gele aufgetragen. Die NP40-Homogenate wurden 10 Minuten bei 55.000 UpM in einer Beckmann Ultrazentrifuge (Rotor T1100.3) zentrifugiert, und die Überstände wurden für eine Western-Analyse auf Gele aufgetragen. Die Western-Analyse wurde nach Standardverfahren durchgeführt, entweder unter Verwendung von Antikörper anti-5 (0,4 µg/ml) oder von Antikörper 8E5 (5 µg/ml), um das humanspezifische βAPP nachzuweisen. Diejenigen Linien, die relativ hohe βAPP-Gehalte exprimierten, wurden für weitere Analyse ausgewählt.

[0069] Dies umfasste die Linien Hillary 14, Chelsea 32 und Chelsea 58. Die hierin beschriebenen Experimente wurden mit heterozygoten Tieren dieser Linien durchgeführt, welche durch Kreuzen von Tieren, die das Transgen enthielten, mit Wildtyp-Tieren, und Screenen des Nachwuchses auf die Gegenwart des Transgens, erhalten wurden. In ähnlicher Weise können homozygote Tiere aus einer ausgewählten Anzahl von Linien verwendet werden.

Beschreibung der experimentellen Figuren

Fig. 2: Nachweis von verkürztem βAPP in konditioniertem Medium aus humanen Hirnzellgemischkulturen.

[0070] Probe 1 ist das konditionierte Medium aus Kultur; Probe 2 ist das an 6C6-reaktivem βAPP abgereicherte Medium; und Probe 3 ist das aus dem 6C6-Harz extrahierte Material. Gelmuster A wurde mit anti-5 Antikörpern getestet, die gegen die βAPP-Sequenz 444–592 erzeugt worden waren (Oltersdorf et al. (1989) Nature 341: 144–147, und (1990) J. Biol. Chem. 265: 4492–4497). Gelmuster B wurde mit Antikörper 92, beschrieben im Abschnitt Materialien und Methoden, getestet. Gelmuster C wurde mit 10D5 getestet, einem monoklonalen Antikörper, der ein Epitop innerhalb der βAP-Reste 1–16 erkennt, wie im Abschnitt Materialien und Methoden beschrieben. Die in C2 und C3 auftretenden Banden mit niedrigerem Molekulargewicht wurden in C1 nicht beobachtet und stammen aus dem 6C6-Harz und werden von einem Ziege-anti-Maus IgG-alkalische Phosphatase-Konjugat erkannt, unabhängig von einem Primärantikörper (Daten nicht gezeigt).

Fig. 3: Spezifität von Antikörper 92.

[0071] Ein Milliliter einer humanen Lumbal-CSF-Probe, die von einem 75 Jahre alten Mann erhalten worden war, wurde mit 10% TCA präzipitiert, um eine zehnfache Aufkonzentrierung zu bewirken, und wurde wie in **Fig.** 2 beschrieben weiter bearbeitet, außer dass die Geltasche ein 4 cm Schlitz war. Der Antikörper 92 wurde in 0,5 ml TTBS auf 6,7 µg/ml verdünnt, in der Gegenwart von verschiedenen potentiell kompetierenden Peptiden, jedes mit einer annähernden Konzentration von 60 µM, während 10 Stunden bei 4°C unter sanftem Mischen. Der Antikörper wurde danach vor Inkubation mit Streifen des Blots von aus CSF stammendem Material achtfach in 1% Gelatine/TTBS verdünnt und weiter bearbeitet wie in **Fig.** 2 beschrieben. Die kompetierenden Peptide waren wie folgt: Bahn 1, kein kompetierendes Peptid zugegeben; Bahn 2, GSGLTNIKTEEISEVK; Bahn 3, YSGLTNIKTEEISEVKM; Bahn 4, ISEVKM; Bahn 5 EISEVKMD; Bahn 6, CISEVKM; Bahn 7, YISEVKM. MW = Molekulargewichtsmarker (angegeben in Kilodalton).

Fig. 4: Molekulargewichtsheterogenität von sezernierten Formen von APP in Immunpräzipitation, nachgewiesen durch Antikörper gegen unterschiedliche C-Termini in Zelllinien und primären humanen fötalen Hirnkulturen.

[0072] Antikörper: anti-5: Bahnen 3, 6, 9; 6C6 (gerichtet gegen βAP-Peptidreste 1–16): Bahnen 4, 7, 10; Antikörper 92 (gegen die APP-Aminosäuren 591–596): Bahnen 5, 8, 11; 7H5 (gegen APP-KPI): Bahn 12. Zellen: linkes Gelmuster (Bahnen 1 und 3–5): stabil mit APP 695 transfizierte 293 Zellen; mittleres Gelmuster (Bahnen 2 und 6–8): stabil mit APP 751 transfizierte 293 Zellen; rechtes Gelmuster (Bahnen 9–13): humane fötale Hirnkulturen. Kontrollen: Bahnen 1, 2 und 13: Kaninchen-anti-Maus-IgG-Antikörper. Pfeile: ein Beispiel eines Molekulargewichtsunterschieds zwischen sezernierten Formenvon APP, die von den Antikörpern 6C6 und 92 erkannt werden. SDS-PAGE wurde auf einem 5% Laemmli-Gel durchgeführt. MW = Molekulargewichtsmarker (angegeben in Kilodalton).

Fig. 5: Nachweis von verkürztem βAPP in konditioniertem Medium aus humanen, mit der Schwedischen Mutation transfizierten 293 Zellen.

[0073] Fig. 5 zeigt die Ergebnisse von doppelten Transfektionen für sowohl die normale als auch die Schwedische Form. Die Bahnen 1–4 sind α5+; die Bahnen 5–8 sind 6C6+; und die Bahnen 9–12 sind 6C6–, α5+ Proben. Die Bahnen 1, 2, 5, 6, 9 und 10 sind von normalem βAPP; die Bahnen 3, 4, 7, 8, 11 und 12 sind von Schwedischem βAPP. Die Schwedische Mutation führt zu einer erhöhten Produktion von ATF-βAPP, da die Bahnen 11 und 12 mehr ATF-βAPP Material enthalten als die Bahnen 9 und 10.

Fig. 6: Immunblot, der die Spezifität des Antikörpers Schwedisch 192 zeigt.

[0074] Fig. 6 zeigt einen Immunblot, der die Spezifität des Antikörpers Schwedisch 192 zeigt. Die Bahnen 1, 3, 5 enthalten aus Heparin-Agarose eluiertes Material. Die Bahnen 2, 4, 6 enthalten aus dem 6C6-Harz eluiertes Material. Die Bahnen 1 und 2 wurden mit Antikörper 8E5 getestet; die Bahnen 3 und 4 wurden mit dem Antikörper Schwedisch 192 getestet; die Bahnen 5 und 6 wurden mit Antikörper 6C6 getestet.

Fig. 7A und Fig. 7B: Plasmidkarten.

[0075] Die Fig. 7A und Fig. 7B sind Plasmidkarten von pNSEAPPswΔ3' bzw. pNSEAPPsw, welche zur Herstellung von transgenen Mäusen verwendet werden, wie vorstehend beschrieben.

Fig. 8: Western Blot.

[0076] Fig. 8 ist ein Western Blot von löslichen Fraktionen von transgenen und Kontrolltierhirnen, welche auf die Gegenwart von sezernierten, mit dem Antikörper Schwedisch 192 reaktiven βAPP-Fragmenten getestet wurden. Bahn 1: Molekulargewichtsmarker; Bahn 2: nicht-transgene Linie; Bahn 3: transgene Linie.

Fig. 9: Western Blot.

[0077] Fig. 9 sind Western Blots von Hirnhomogensten von transgenen (+) und nicht-transgenen (–) Tieren, an βAPP-Formen abgereichert, welche mit dem Antikörper 6C6 reaktiv sind, getestet mit Antikörper 8E5 (Gelmuster A) und Antikörper Schwedisch 192 (Gelmuster B).

Ergebnisse

[0078] Der monolionale Antikörper 6C6, der ein βAP-Epitop innerhalb der Reste 1–16 erkennt, wurde dazu verwendet, um bestimmte βAPP-Fragmente aus verschiedenen Proben auf immunologische Weise zu entfernen. Der monoklonale Antikörper 6C6 wurde an ein Harz gekoppelt (wie vorstehend beschrieben) und wurde mit dem konditionierten Medium von humanen fötalen Hirnzellkulturen wie vorstehend beschrieben inkubiert. Wie ersichtlich ist (**Fig.** 2, Bahn C2) entfernt dieses Harz das βPAP 1–6 enthaltende βAPP wirksam aus dem konditionierten Medium der Zellkultur. Es wird jedoch eine erhebliche βAPP-Immunreaktivität nicht durch das Harz abgefangen, wie durch den Antikörper anti-5 nachgewiesen, der gegen ein Epitop N-terminal zu der βPAP-Region gerichtet ist (**Fig.** 2, Bahn A2).

[0079] Um diese Form von βAPP zu charakterisieren, erzeugten wir Antikörper gegen ein synthetisches Peptid, welches die βAPP-Reste 591–596 umfasste (wie vorstehend beschrieben). Es wurde festgestellt, dass dieser Antikörper (bezeichnet als 92) die von dem Harz nicht abgefangenen βAPP-Spezies erkennt (**Fig.** 2, Bahn B2), aber überraschenderweise nicht mit der sezernierten Form von βAPP, welche die βAP-Sequenz 1–16 enthält, reagierte (Bahn B3).

[0080] Die Erklärung für dieses Fehlen an Kreuzreaktivität scheint darin zu liegen, dass der Antikörper 92 ein Epitop in βAPP, umfassend das Carboxy-terminale Methionin, entsprechend Rest 596, erkennt. Demgemäß untersuchten wir die Fähigkeit von verschiedenen synthetischen Peptiden, die mit 92 erzeugte Immunreaktivität zu blockieren. Wie aus Fig. 3 ersichtlich ist, blockieren Peptide mit einer Sequenz auf Basis von βAPP, welche mit dem Äquivalent von Methionin 596 enden, im Wesentlichen die Reaktion von 92, während Peptide, die an ihren Carboxytermini eine Aminosäure länger oder kürzer sind, eine vergleichsweise unwirksame Kompetition zeigen. In Zellkulturüberständen (Daten nicht gezeigt) und in CSF wurde das gleiche Peptidkompetitionsmuster beobachtet. Eine Reihe von Pulse-Chase-Experimenten zeigte, dass nachweisbare Mengen eines von Antikörper 92 immunpräzipitierbaren Materials von 293 Zellen produziert werden, die entweder die 695 oder die 751 Isoform von βAPP überexprimieren (Fig. 4, Bahnen 5 und 8). Ähnliche Experimente an humanen fötalen Hirnzellkulturen zeigen, dass durch 92 immunpräzipitierbares Material von 6C6-reaktivem βAPP durch niederprozentige (5%) SDS-PAGE aufgetrennt werden kann (Fig. 4, Bahnen 9–11). In den fötalen Hirnzellkulturen tritt die alternative Prozessierung von Kunitz-Protease inhibitorische Domäne (KPI)-enthaltenden βAPP-Formen in geringerem Umfang auf, obwohl bei den Immunpräzipitationen von Antikörper 92 und dem anti-KPI-Antikörper 7H5 schwache comigrierende Banden beobachtet werden (Bahnen 11, 12).

[0081] Die Fähigkeit, die von den Antikörpern 92 und 6C6 präzipitierbaren Materialien in Hirngemischkulturen aufzutrennen, beruht zumindest zum Teil darauf, dass nahezu gleiche Mengen der jeweiligen Formen produziert werden, im Vergleich zu der Situation in 293 Zellen. Estus et al. (1992) Science 255: 726–728, beobachteten, dass Humanhirn im Vergleich zu anderen Geweben eine relativ höhere Menge des potentiell amyloidogenen Carboxy-terminalen Fragments enthält, welches auf Basis seiner Größe anscheinend am oder in der Nähe des Aminoterminus von βAP beginnt.

[0082] Die zeitliche Übereinstimmung des Auftretens von βAPP-Materialien, welche von Antikörper 92 und 6C6 präzipitierbar sind, spricht gegen die Wahrscheinlichkeit eines zweiten proteolytischen Ereignisses nach der Sezernierung, insbesondere da längere Chase-Zeiträume nicht zu einer bemerkbaren Veränderung des Verhältnisses der 92- und der 6C6-reaktiven Spezies führen (Daten nicht gezeigt). Die Auflösung der sezernierten Formen mittels SDS-PAGE, gekoppelt mit dem vollständigen Fehlen einer immunologischen Kreuzreaktivität dieser Spezies, demonstriert weiter die Existenz eines alternativen Sezernierungswegs. Die alternative Spaltstelle wurde als die β-Secretase-Stelle bezeichnet, um hervorzuheben, dass die Spaltung Amino-terminal von βAP stattfindet, im Gegensatz zu der von Esch et al. (1990) Science 248: 1122–1124, beschriebenen Spaltung, welche innerhalb des βAP stattfindet.

[0083] Wie aus Fig. 6, Bahn 4, ersichtlich ist, erkennt der Antikörper Schwedisch 192 die 6C6-reaktive Form von βAPP nicht nennenswert, trotz der Tatsache, dass in Bahn 4, verglichen mit Bahn 3, insgesamt mehr βAPP vorhanden ist (vergleiche die Bahnen 1 und 2). Dieses Fehlen von Reaktivität mit βAPP-Formen, welche die βAP-Teilsequenz (6C6-reaktiv) enthalten, legt nahe, dass der Antikörper Schwedisch 192 βAPP erkennt, das am oder in der Nähe des Aminoterminus von βAP gespalten ist, aber nicht, wenn βAPP sich über diese Region hinaus erstreckt.

[0084] Um die Eignung dieses Ansatzes als ein Tiermodell zu verifizieren, wurden lösliche Fraktionen von transgenen Tierhirnen auf die Gegenwart der ”92”-Form des sezernierten βAPP getestet (Fig. 8). Diese Form wird als ein Nebenprodukt der βAP-Produktion produziert, und eine Inhibition der Produktion dieser Form in

kultivierten Zellen geht einher mit einer Inhibition der Spaltung am N-Terminus von βAP, der von β-Secretase gespaltenen Stelle.

[0085] Hirne von transgenen (Hillary 14, Schwedisch) oder nicht-transgenen Mäusen wurden zusammen mit dem vorstehend beschriebenen Proteaseinhibitor-Cocktail in 50 mM Tris, 10 mM EDTA homogenisiert und 10 min bei 55.000 UpM zentrifugiert, wie vorstehend beschrieben. Der Überstand wurde mittels Western Blot analysiert, unter Verwendung des Antikörpers Schwedisch ”192”, der nur mit der von β-Secretase produzierten sezernierten Form von βAPP reagiert. Für die Western-Analyse wurden Proteine auf einem 6% SDS-PAGE Gel (von Novex) aufgetrennt und danach mittels Standardtechniken auf ImmobilonP transferiert. Der Filter wurde unter Verwendung von Standardtechniken mit 2 µg/ml Antikörper Schwedisch ”192” inkubiert, und der gebundene Antikörper wurde unter Verwendung des Amersham ECL-Kits sichtbar gemacht. Wie in **Fig. 8**, Bahn 3, gezeigt gab es in dem Überstand von dem transgenen Tier eine ganze Menge nachweisbares, ”192”-reaktives Material. Das Hirnhomogenat des nicht-transgenen Tiers enthielt eine geringe Menge an immunreaktivem Material mit einer geringfügig höheren Mobilität auf dem Gel als das für das transgene Tier spezifische Material (Bahn 1). Dieses Material ist vermutlich nicht βAPP-verwandt, da es nicht mit anderen βAPP-Antikörpern (z. B. anti-5) hybridisiert.

[0086] In Gewebskultursystemen kreuzreagiert der Antikörper Schwedisch 192 nicht mit sezerniertem βAPP, das an der α-Secretasestelle an Position 17 in der Mitte der βAP-Sequenz gespalten ist. Um nachzuweisen, dass dies auch für die Mausmodelle zutrifft, wurden Hirnhomogenste an den α-Secretase-gespaltenen βAPP-Formen abgereichert, unter Verwendung von Harz-gebundenem 6C6-Antikörper, der für die ersten 16 Aminosäuren von βAP spezifisch ist und daher mit dem Amino-terminalen Fragment des α-Secretase-gespaltenen sezernierten βAPP-Fragments reagiert, aber nicht mit dem kürzeren β-Secretase-gespaltenen sezernierten βAPP-Fragment. Das Harz wurde hergestellt unter Verwendung von Actigel-ALS, gekoppelt in Suspension wie vom Hersteller (Sterogene) beschrieben. Ein Überschuss an Harz-Antikörper wurde mit den Hirnhomogensten von Tieren, die das Transgen enthielten oder nicht, für eine anfängliche Inkubation von 3 Stunden bei 4°C unter Schütteln inkubiert, und gebundenes und ungebundenes Material wurden mittels einminütiger Zentrifugation bei 14.000 UpM voneinander abgetrennt. Der Überstand wurde nochmals 16 Stunden bei 4°C mit einem Überschuss an Harz-gekoppeltem 6C6 inkubiert, und erneut zentrifugiert um das ungebundene Material abzutrennen. Material, das während der ersten Inkubation band, und Material, das nicht an den Harz-gekoppelten 6C6 band, wurden mittels Western Blot unter Verwendung der Antikörper 8E5 und Schwedisch 192 analysiert (**Fig. 9**).

[0087] Homogenate von transgenen (+) oder nicht-transgenen (–) Mäusen wurden mit 8E5 (Gelmuster A) oder Schwedisch 192 (Gelmuster B) getestet. Bahn 1 bezeichnet Gesamthomogenat, Bahn 2 bezeichnet die Fraktion, die nicht an das 6C6-Harz band (d. h. die an dem α-Secretase-gespaltenen βAPP-Fragment abgereichert ist), und Bahn 3 bezeichnet die Fraktion, die an den Harz-gekoppeltem 6C6 band (d. h. die das α-Secretase-gespaltene βAPP-Fragment beinhaltet). Keines der gebundenen βAPP, identifiziert durch ihre Reaktion mit Antikörper anti-5, jreuzreagierte mit dem Antikörper Schwedisch 192. Ungebundenes Material, identifiziert durch Reaktivität mit anti-5, reagierte mit dem Antikörper Schwedisch 192.

[0088] Somit stellt die vorliegende Erfindung ein brauchbares Tiermodell bereit, um die Prozessierung von βAPP zu βAP und verwandten Fragmenten zu untersuchen, und stellt weiterhin ein günstiges System zum Screening nach Inhibitoren der β-Secretaseaktivität und/oder Arzneimitteln, welche β-Secretaseaktivität modulieren, bereit.

[0089] Obwohl die vorstehende Erfindung im Detail beschrieben wurde um das Verständnis zu erleichtern, wird offensichtlich sein, dass bestimmte Modifikationen innerhalb des Umfangs der beigefügten Ansprüche vorgenommen werden können.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER: ATHENA NEUROSCIENCES, INC.

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zum Screening nach Inhibitoren der beta-Amyloidpeptid Produktion

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 12

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: Townsend and Townsend Khourie and Crew

(B) STRASSE: One Market Plaza, Steuart Tower, Ste. 2000

(C) ORT: San Fransisco

(D) BUNDESLAND: Kalifornien

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL: 94105

(v) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Diskette

(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMM: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) DATEN DER FRÜHEREN ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: US 08/143,697

(B) ANMELDETAG: 27. Oktober 1993

(C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) DATEN DER FRÜHEREN ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: US 07/965,971

(B) ANMELDETAG: 26. Oktober 1992

(viii) DATEN DER FRÜHEREN ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: US 07/868,949

(B) ANMELDETAG: 15. April 1992

(ix) ANGABEN ZU ANWALT/AGENT:

(A) NAME: Heslin, James M.

(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 29,541

(C) REFERENZ/VERZEICHNIS NUMMER: 15270-4-2PC

(x) ANGABEN ZU TELEKOMMUNIKATION:

(A) TELEFON: 415-326-2400

(B) TELEFAX: 415-326-2422

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Gly	Ser	Gly	Leu	Thr	Asn	Ile	Lys	Thr	Glu	Glu	Ile	Ser	Glu	Val	Lys
1				5					10						15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 17 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Tyr	Ser	Gly	Leu	Thr	Asn	Ile	Lys	Thr	Glu	Glu	Ile	Ser	Glu	Val	Lys	Met
1				5					10						15	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Ile	Ser	Glu	Val	Lys	Met
1				5	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 8 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Glu	Ile	Ser	Glu	Val	Lys	Met	Asp
1				5			

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 7 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Cys	Ile	Ser	Glu	Val	Lys	Met
1				5		

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 7 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Tyr	Ile	Ser	Glu	Val	Lys	Met
1				5		

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Asp	Arg	Gly	Leu	Thr
1				5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Thr	Arg	Pro	Gly	Ser	Gly	Leu	Thr	Asn	Ile
1				5					10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Lys	Thr	Glu	Glu	Ile	Ser	Glu	Val	Lys	Met
1				5					10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Lys	Thr	Glu	Glu	Ile	Ser	Glu	Val	Asn	Leu
1				5					10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Ser	Glu	Val	Asn	Leu
1				5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Cys	Gly	Gly	Glu	Ile	Ser	Val	Asn	Leu
1				5				

Patentansprüche

1. Verfahren zur Überwachung der Prozessierung von β-Amyloidvorläuferprotein (βAPP) in vivo, wobei das Verfahren den Nachweis der Gegenwart eines Amino-terminalen Fragments von βAPP (ATF-βAPP) umfasst, in einer Probe aus einem von Mensch verschiedenen Tier, welches transformiert worden ist, so dass es die Schwedische Mutation von humanem βAPP exprimiert, wobei das Amino-terminale Fragment zwischen Leu^{596} und Asp^{597} gespalten ist.

2. Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren der β-Amyloidproduktion, wobei das Verfahren umfasst:
Nachweisen der Menge eines zwischen Leu^{596} und Asp^{597} gespaltenen Aminoterminalen Fragments von βAPP (ATF-βAPP) in einer Probe aus einem von Mensch verschiedenen Tier, welches transformiert worden ist, so dass es die Schwedische Mutation von humanem β-Amyloidvorläuferprotein (βAPP) exprimiert, und dem eine Testverbindung verabreicht worden ist, und
Vergleichen der nachgewiesenen Menge an ATF-βAPP mit einer in Abwesenheit der Testverbindung produzierten Kontrollmenge an ATF-βAPP.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Kontrollmenge an ATF-βAPP in dem gleichen von Mensch verschiedenen Tier gemessen wird, das die Testverbindung erhält, oder wobei die Kontrollmenge an ATF-βAPP ein Mittelwert ist, bestimmt in mehreren von Mensch verschiedenen Testtieren, welche die Schwedische Mutation von humanem βAPP exprimieren.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Gegenwart von ATF-βAPP nachgewiesen wird

durch Reaktion der Probe mit einer Bindesubstanz, welche für ein die Aminosäuresequenz Ser-Glu-Val-Asn-Leu umfassendes Epitop am Carboxyterminus von ATF-βAPP spezifisch ist, wobei die Bindesubstanz gegebenenfalls ein monoklonaler Antikörper ist, der gegen ein die Aminosäuren umfassendes Peptid erzeugt worden ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Probe Zerebrospinalfluid oder Hirnhomogenat ist.

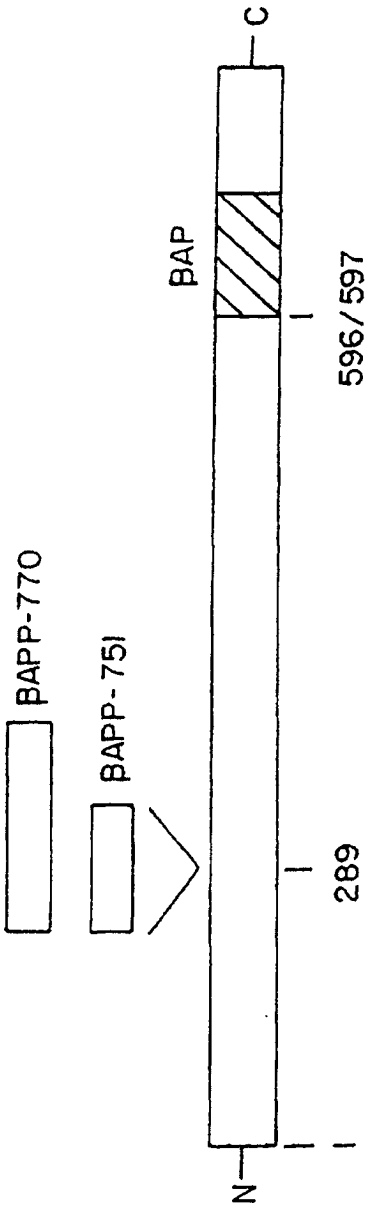
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Gegenwart von ATF-βAPP durch Reaktion der Probe mit einer Bindesubstanz, die zwischen ATF-βAPP und verwandten βAPP-Fragmenten unterscheiden kann, nachgewiesen wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das von Mensch verschiedene Tier eine Maus ist.

8. Verfahren zum Screening nach Testverbindungen auf die Fähigkeit, die Spaltung von βAPP zu inhibieren oder zu modulieren, wobei das Verfahren umfasst:
Verabreichen einer Testverbindung an eine Maus, die transformiert worden ist, so dass sie die Schwedische Mutation von humanem βAPP exprimiert, wobei das humane βAPP in einer ausreichenden Menge zu ATF-βAPP prozessiert wird, um in einem Hirnhomogenat der transformierten Maus nachgewiesen werden zu können, und
Nachweisen einer Änderung der Prozessierung von βAPP in der transformierten Maus, im Vergleich zu der Prozessierung in Abwesenheit der Testverbindung, wobei die Änderung der Prozessierung von βAPP nachgewiesen wird durch Messen einer Änderung der Menge an ATF-βAPP.

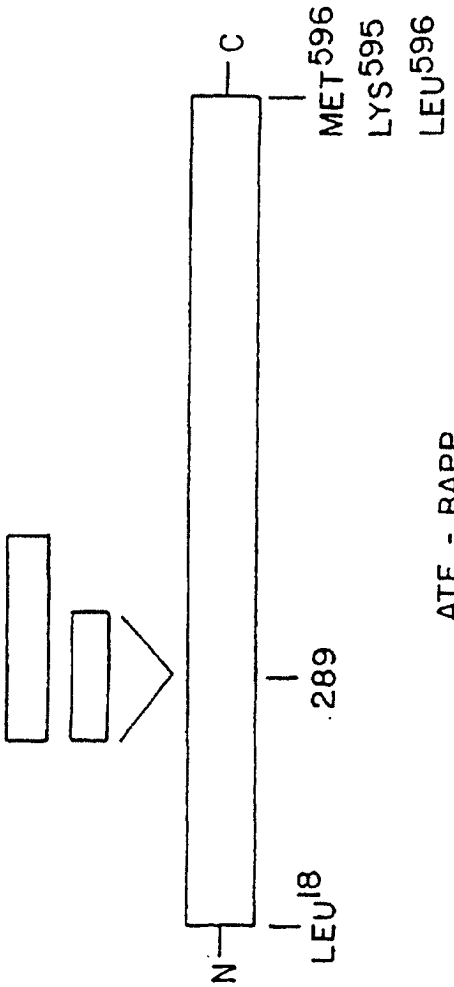
Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



βAPP - 695 ISOFORM

FIG. IA.



ATF - βAPP

FIG. IB.

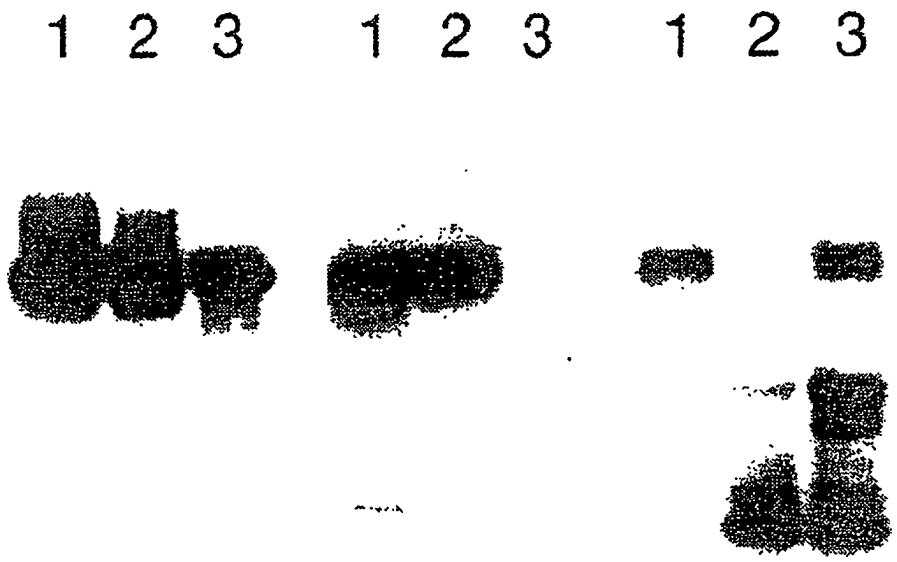


FIG. 2A. FIG. 2B. FIG. 2C.

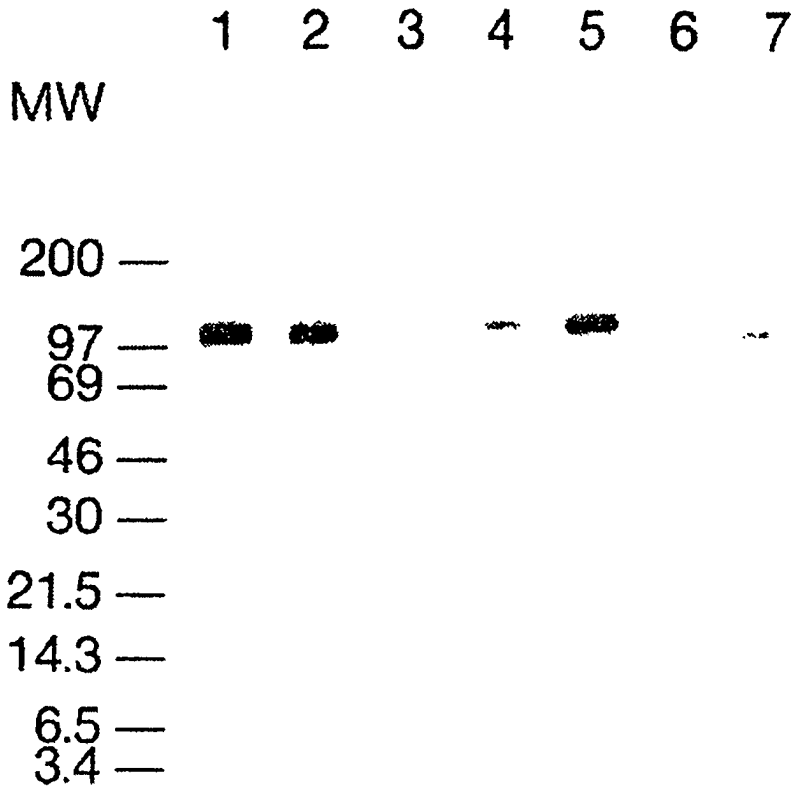


FIG. 3.

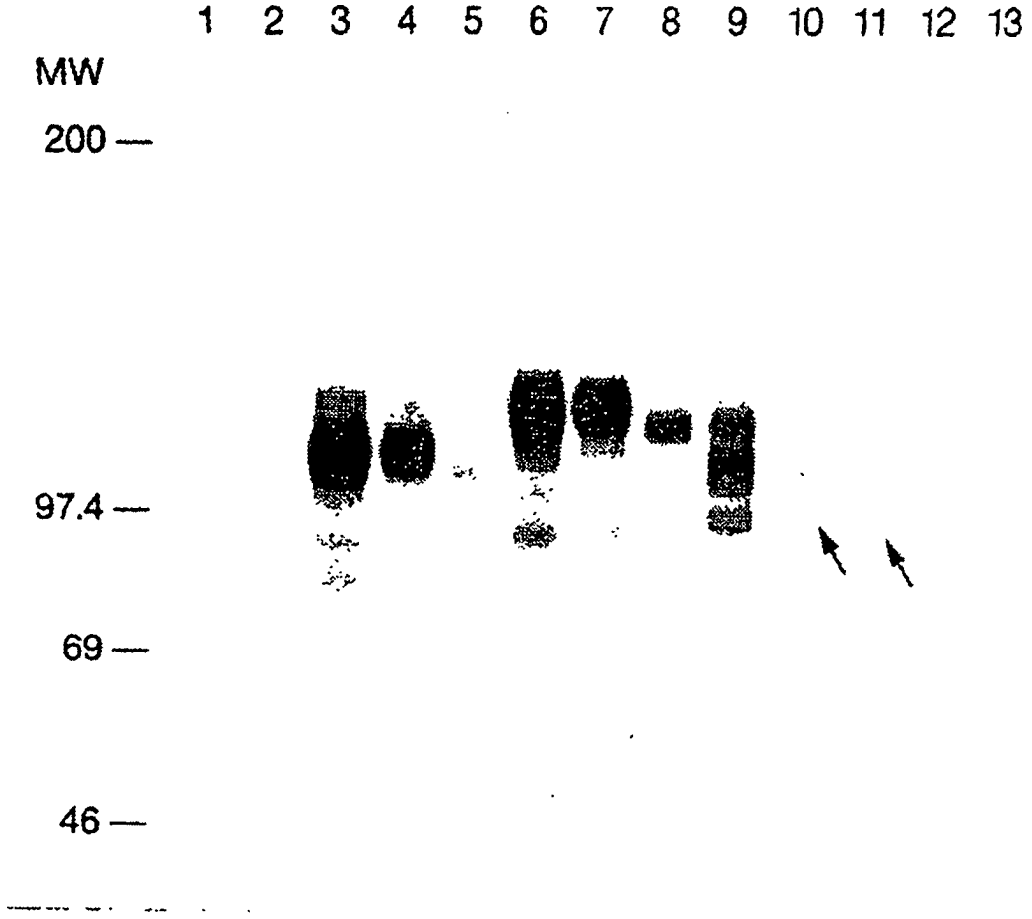


FIG. 4.

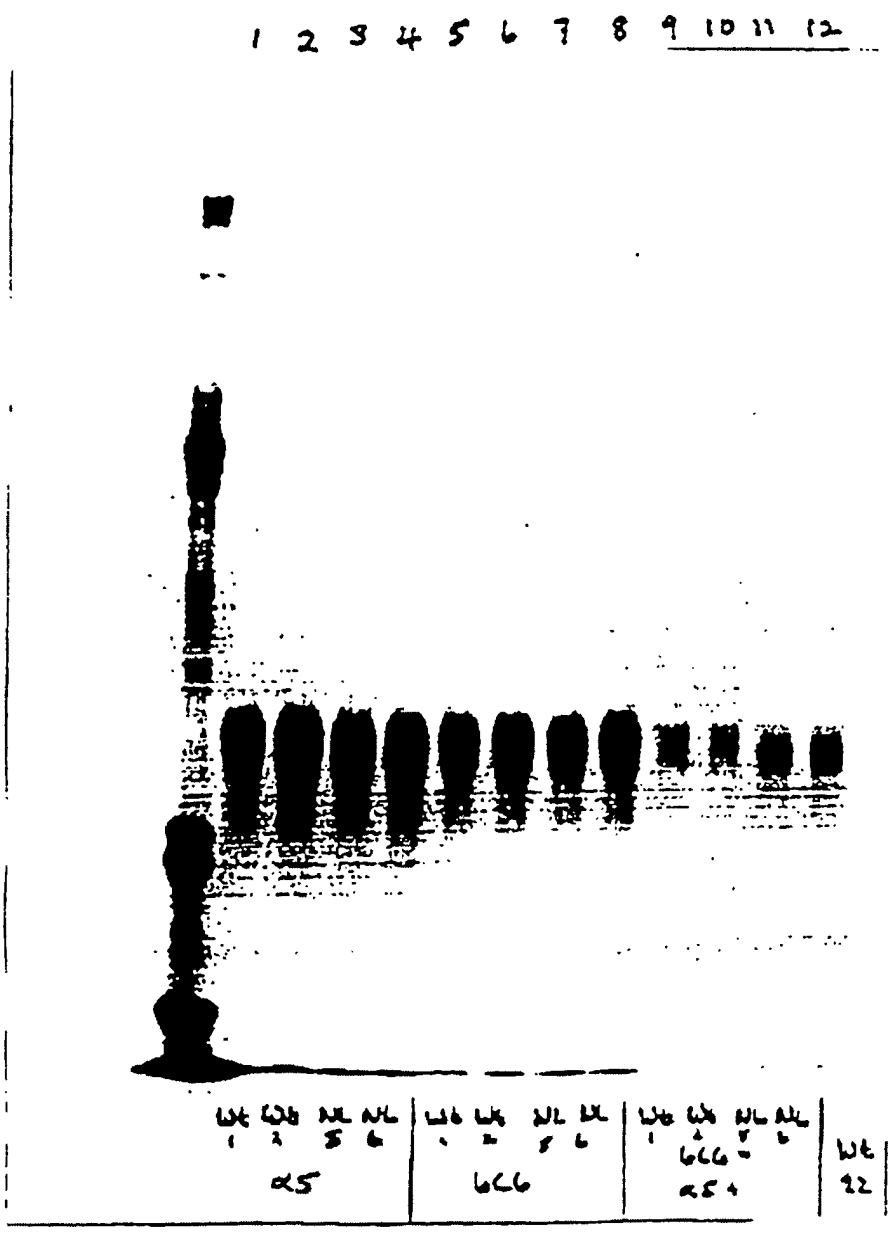


Fig. 5

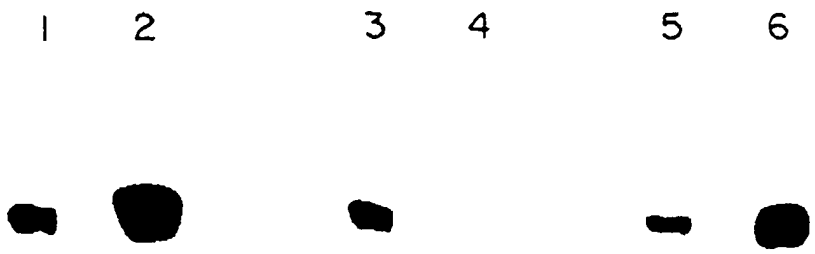


FIG. 6.

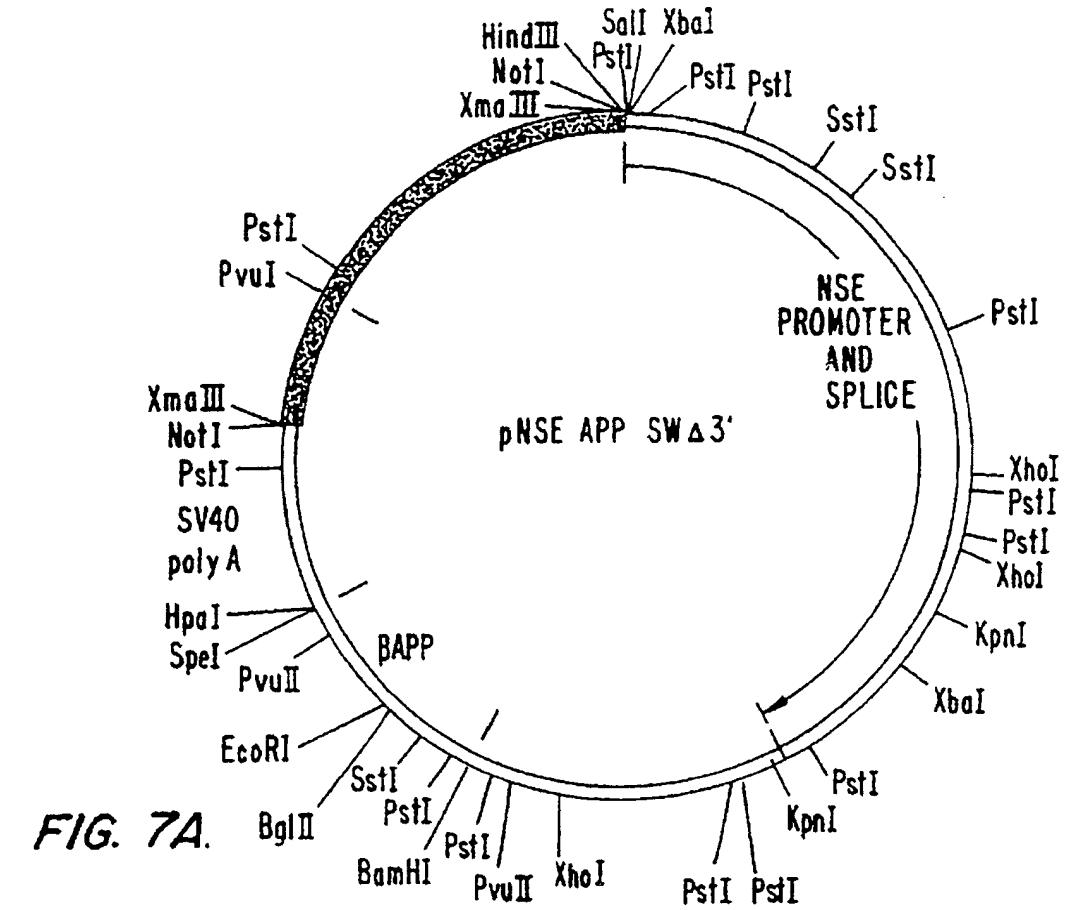

HindIII
NotI
XmaIII
SalI
XbaI
PstI
PstI
PstI
SstI
SstI
PstI
PvuI
NSE
PROMOTER
AND
SPLICE
PstI
pNSE APP SWΔ3'
XmaIII
NotI
PstI
SV40
poly A
XhoI
PstI
PstI
XhoI
HpaI
SpeI
PvuII
βAPP
KpnI
XbaI
EcoRI
SstI
BglII
PstI
BamHI
PstI
PvuII
XhoI
PstI
PstI
KpnI
PstI

FIG. 7A.

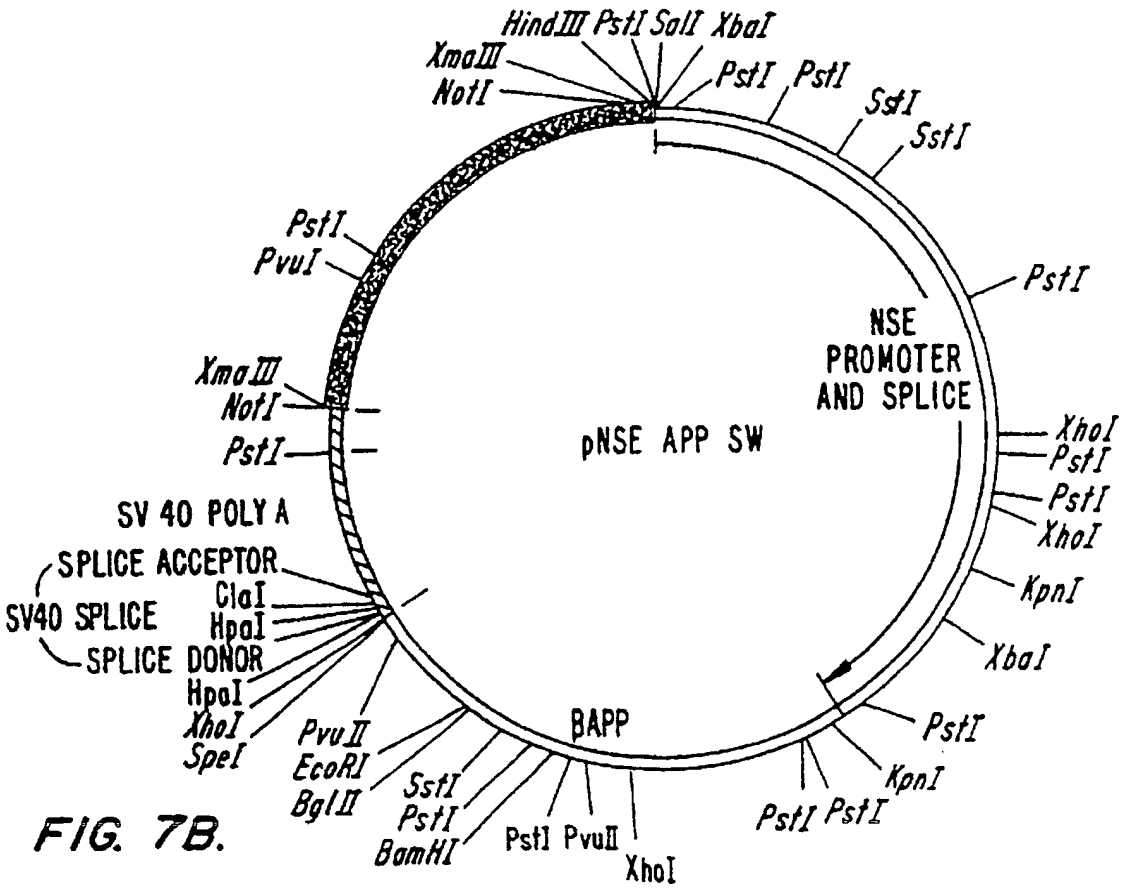

HindIII
PstI
SalI
XbaI
XmaIII
NotI
PstI
PstI
SstI
SstI
PstI
PvuI
PstI
NSE
PROMOTER
AND SPLICE
XmaIII
NotI
PstI
pNSE APP SW
XhoI
PstI
PstI
XhoI
KpnI
XbaI
SV 40 POLY A
SPLICE ACCEPTOR
SV40 SPLICE
ClaI
HpaI
SPLICE DONOR
HpaI
XhoI
SpeI
PvuII
EcoRI
BglII
βAPP
PstI
KpnI
SstI
PstI
BamHI
PstI
PvuII
XhoI
PstI
PstI

FIG. 7B.

FIG. 8



FIG. 9

