

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780020001.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

[43] 公开日 2009年6月10日

[11] 公开号 CN 101454671A

[22] 申请日 2007.3.30

[21] 申请号 200780020001.0

[30] 优先权

[32] 2006.3.31 [33] US [31] 60/788,524

[32] 2007.3.30 [33] US [31] 11/693,926

[86] 国际申请 PCT/US2007/007908 2007.3.30

[87] 国际公布 WO2007/123680 英 2007.11.1

[85] 进入国家阶段日期 2008.11.28

[71] 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 纳兹尼恩·德维基

S·乔纳森·辛格

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 陶贻丰 武晶晶

权利要求书3页 说明书48页 附图12页

[54] 发明名称

用于治疗神经变性疾病和阿尔茨海默病以及改善正常记忆的方法和组合物

[57] 摘要

本公开的内容总的涉及神经变性疾病，更具体地涉及一组早老素/G-蛋白/c-src 结合多肽以及使用它们来调节阿尔茨海默病的信号转导和发展的方法。

- 1.一种识别调节早老素 G-蛋白偶联受体(GPCR) 活性的药剂的方法，该方法包括
- 5 a) 将早老素，或其片段与 G-蛋白在允许 G-蛋白结合至早老素的条件下进行接触；
- b)在进行 a) 之前，与 a) 同时，或在 a) 之后，将早老素，或其片段与一种药剂接触；
- c) 对早老素介导的对 G-蛋白的结合进行监控；以及
- 10 d) 确定该药剂是否对早老素和 G-蛋白的结合进行调节，从而鉴别出对早老素 G-蛋白偶联的受体(GPCR) 活性进行调节的药剂。
2. 权利要求 1 的方法，其中调节是通过抑制早老素对 G-蛋白的结合进行的。
3. 权利要求 1 的方法，其中调节是通过激活早老素对 G-蛋白的结合
- 15 进行的。
4. 权利要求 1 的方法，其中早老素是早老素-1 (PS-1)。
5. 权利要求 4 的方法，其中 PS-1 包含氨基酸残基 1 到约 430。
6. 权利要求 1 的方法，其中早老素是早老素-2 (PS-2)。
7. 权利要求 1 的方法，其中 G-蛋白选自由 G_o ， G_s ， G_i ， G_z 和 G_q 组
- 20 成的组。
8. 权利要求 7 的方法，其中 G-蛋白是含有 $G\alpha$ 亚基的 G_o 。
9. 权利要求 8 的方法，其中 $G\alpha$ 亚基是 G_{oA} 。
10. 权利要求 8 的方法，其中 $G\alpha$ 亚基是 G_{oB} 。
11. 权利要求 1 的方法，其中所述药剂选自由天然或合成的多肽或
- 25 寡肽，拟肽类，小有机分子，多糖，脂质，脂肪酸，多核苷酸，RNAi 或 siRNA，asRNA，和寡核苷酸组成的组。
12. 权利要求 1 的方法，其中接触是离体的。

13. 权利要求 1 的方法，其中接触是在活体内的。

14. 权利要求 1 的方法，进一步包括在将早老素与 G-蛋白接触之前，与之同时，或在其之后将早老素与 β -APP 进行接触。

15. 一种确认对早老素介导的 Src 蛋白激酶活性进行调节的药剂的方法，该方法包括

a) 将早老素，或其片段与 β -APP 在允许 β -APP 结合至早老素的条件下进行接触；

b) 在进行 a) 之前，与 a) 同时，或在 a) 之后，将早老素，或其片段与一种药剂接触；

10 c) 对早老素介导的 Src 蛋白激酶活性进行监控；以及

d) 确定该药剂是否对早老素介导的 Src 蛋白激酶活性进行调节。

16. 权利要求 15 的方法，其中调节是通过抑制早老素-介导的 Src 蛋白激酶活性进行的。

15 17. 权利要求 15 的方法，其中调节是通过激活早老素-介导的 Src 蛋白激酶活性进行的。

18. 权利要求 15 的方法，其中早老素是早老素-1 (PS-1)。

19. 权利要求 15 的方法，其中早老素是早老素-2 (PS-2)。

20. 权利要求 1 的方法，其中该药剂选自由天然或合成的多肽或寡肽，拟肽类，小有机分子，多糖，脂质，脂肪酸，多核苷酸，RNAi 或 siRNA，20 asRNA，和寡核苷酸组成的组。

21. 权利要求 15 的方法，其中接触是离体的。

22. 权利要求 15 的方法，其中接触是在活体内的。

23. 一种通过干扰 β APP 与早老素-1 (PS-1)和/或早老素-2 (PS-2)的细胞间结合抑制 $A\beta$ 产生的方法，包括：抑制 β APP 的 N-末端细胞外结构域与 PS-1 和 PS-2，或者 PS-1 或 PS-2 的 N-末端结构域的结合，其中干扰剂 25 为肽，小分子，拟肽类或抗体。

24. 权利要求 24 的方法，其中肽为 PS-1 或 PS-2 的可溶 N-末端结构域。

25. 一种抑制 A β 产生的方法，其通过将表达 PS-1 和/或 PS-2 的细胞与抑制 PS-1 和/或 PS-2 与 G_{oA} 和 G_{oB} 相互作用的药剂接触。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述药剂与和 G_{oA} 和/或 G_{oB} 相互作用的 PS-1 和/或 PS-2 的 C-末端尾和/或其他胞质结构域发生相互作用。

5 27. 一种抑制 A β 产生的方法，其通过将表达 PS-1 和/或 PS-2 的细胞与干涉 PS-1 和/或 PS-2 结合至 G_o 的下游结果如用磷脂酶 C 激活 G_o 的药剂进行接触。

28. 一种抑制 A β 产生的方法，其通过抑制在表达 PS-1 和/或 PS-2 的细胞中的酪氨酸激酶的 Src 家族成员的活性进行。

10 29. 一种对阿尔茨海默疾病发展的抑制剂进行分析的方法，包括将含有表达 β APP 的第一种细胞与表达 PS-1 和/或 PS-2 的第二种细胞的细胞系统与药剂接触，并测量 (a) 酪氨酸激酶的 Src 家族活性，(b) G_{oA} 和/或 G_{oB} 与 PS-1 和/或 PS-2 的相互作用的活性，和/或(c) β APP 的 N-末端结构域与 PS-1 和/或 PS-2 的 N-末端结构域的相互作用的活性。

15 30. 一种改善记忆的方法，包括向研究对象施用一抑制 PS-1 和/或 PS-2 与 G-蛋白相互作用的药剂。

31. 权利要求 30 的方法，其中 G-蛋白选自由 G_o，G_s，G_i，G_z 和 G_q 组成的组。

20 32. 权利要求 30 的方法，其中所述药剂与和 G_{oA} 和/或 G_{oB} 相互作用的 PS-1 和/或 PS-2 的 C-末端尾和/或其他胞质结构域发生相互作用。

33. 权利要求 30 的方法，其中所述药剂抑制在表达 PS-1 和/或 PS-2 的细胞中的酪氨酸激酶的 Src 家族成员的活性。

用于治疗神经变性疾病和阿尔茨海默病以及改善正常记忆的方法和组合物

5 相关申请的交叉引用

本申请要求申请日为 2006 年 3 月 31 日的美国临时专利申请 60/788,524 的优先权, 该申请以引用的方式在此并入。

关于联邦政府资助研究的声明

10 在美国国立卫生研究院颁发的基金 No.AG07888, NS027580, 和 NS044768 的资助下, 美国政府在本发明中可能享有一些权利。

技术领域

15 本发明总的涉及神经变性疾病的治疗, 更具体地涉及一组早老素/G-蛋白/c-src 结合多肽以及设计成调节产生 β 淀粉样蛋白(A β)所需的多肽的生理性相互作用的小分子药物。

背景技术

20 早老素(PS)蛋白是普遍存在的多处发生的膜内在蛋白, 它的功能之一与神经变性疾病如阿尔茨海默病(AD)和唐氏综合症(DS)的发展有关。AD 是一种人中枢神经系统的变性疾病, 其特征是在中年到老年时出现逐步的记忆损伤和认知能力和智力的降低。该疾病伴随着各种神经病理学特征, 其中主要是在脑中存在淀粉样斑以及神经元的神经原纤维变性。这种疾病的病因复杂, 尽管在约 10%的 AD 病例中, 其病因看似为家族性的, 25 作为常染色体的显性性状进行遗传。在 AD 的这些遗传形式中, 存在至少 4 种不同的基因, 它们中的一些突变体使得对这种疾病产生遗传性的易感

性。载脂蛋白 E (ApoE)基因的 $\epsilon 4$ (Cys112Arg) 等位基因多形性与在生命晚期发作的病例中的相当大一部分的 AD 有关。已发现在 65 岁以前发病的家族性病例中的很小一部分与在染色体 21 上的 β 淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) 基因中的突变相关。与早期发作 AD 的病例中的较大部分相关的第 3 个基因座最近被定位到染色体 14q24.3 上。可遗传的早期发作的 AD 中的大部分(70-80%)定位至染色体 14 并看似由蛋白早老素-1 (PS1)内的超过 20 种不同氨基酸取代中的 1 种所致。在染色体 1 上的一种较为少见的类似的有患 AD 危险的基因座对蛋白早老素-2 (PS-2, 与 PS-1 高度同源)进行编码。基于 mRNA 的检测, 早老素表现为普遍存在的表达的蛋白, 这说明它们通常是许多细胞类型所需要的管家蛋白 (housekeeping proteins)。

早老素 1 是一种 43-45 kDa 的多肽, 而早老素 2 是一种 53-55 kDa 的多肽。早老素是存在于对洗涤剂敏感的高分子量复合物中的内在蛋白内膜蛋白。除了早老素之外, 还知道该复合物的三种蛋白成分。

这些相互作用的蛋白的功能可以影响 β -APP 对 PS 的特异性细胞间结合, 但至今还没发现这 3 种蛋白发生了突变的家族性的阿尔茨海默病(FAD)病例。早老素 1 的错义突变表现出破坏 β -连锁蛋白 (β -catenin) 的稳定性并导致有缺陷的胞内运输。因此, 在早老素多肽和能够特异性结合到早老素上的蛋白之间的相互作用可在发展期间控制早老素多肽的正常的和突变形式的具体作用。

发明内容

本法提供了用于识别调节早老素活性的试剂的方法和组合物。因此, 这里提供的方法和组合物可通过下列方式来调节脑中 $A\beta$ 的产生 (1): 干扰 β -APP 的细胞外 N-末端结构域与 PS-1 或 PS-2 的结合; 或 (2) 通过使用小的拟肽类 (peptidomimetic) 分子, 或抗体分子的小片段作为抑制剂, 该抗体分子的小片段针对在 β -APP 或 PS 分子的相互作用表面上的表位。

在一种实施方式中, 提供了一种识别调节早老素 G-蛋白偶联的受体 (GPCR) 活性的药剂的方法。该方法包括 a) 将早老素, 或其片段与 G-蛋白在允许 G-蛋白结合至早老素的条件下进行接触; b) 在进行 a) 之前, 与

a) 同时, 或在 a) 之后, 将早老素, 或其片段与一种药剂接触; c) 对早老素介导的对 G-蛋白的结合进行监控; 以及 d) 确定该药剂是否对早老素和 G-蛋白的结合进行调节, 从而鉴别出对早老素 G-蛋白偶联的受体(GPCR) 活性进行调节的药剂。在一些方面, 调节是通过抑制早老素对 G-蛋白的结合进行的。在另一些方面, 调节是通过活化早老素对 G-蛋白的结合进行的。早老素可以是早老素-1 (PS-1)或早老素-2 (PS-2)。G-蛋白可以是 G_o , G_s , G_i , G_z 或 G_q 。

10 在一些方面, 该药剂包括天然或合成的多肽或寡肽, 拟肽类, 小有机分子, 多糖, 脂质, 脂肪酸, 多核苷酸, RNAi 或 siRNA, asRNA, 或寡核苷酸。

这里提供的方法可在离体或体内进行。在一些方面, 方法进一步包括在将早老素和 G-蛋白进行接触之前, 与之同时, 或在其之后将早老素和 β -APP 进行接触。

15 在另一种实施方式中, 提供了一种确认对早老素介导的 Src 蛋白激酶活性进行调节的药剂的方法。该方法包括 a) 将早老素, 或其片段与 β -APP 在允许 β -APP 结合至早老素的条件下进行接触; b) 在进行 a) 之前, 与 a) 同时, 或在 a) 之后, 将早老素, 或其片段与一种药剂接触; c) 对早老素介导的 Src 蛋白激酶活性进行监控; 以及 d) 确定该药剂是否对早老素介导的 Src 蛋白激酶活性进行调节。

20 这里还提供了用于治疗神经变性疾病的组合物和方法, 特别是一组早老素/G-蛋白/c-src 结合多肽以及设计成调节产生 β 淀粉样蛋白(A β)所需的多肽的生理性相互作用的小分子药物, 其中寡肽是阿尔茨海默病(AD)中的主要神经毒性剂。其目标是将脑中的 A β 量降低到显著降低 AD 中的神经毒性, 或延缓其发生, 或降低疾病的严重性的程度, 以及用于调节阿尔茨海默病的信号转导和发展并提高记忆的方法。

25 本发明还提供了用抑制 PS-1 或 PS-2 与 G-蛋白 G_{oA} 和 G_{oB} 之间相互作用的小分子药剂来抑制 A β 产生的方法。我们已发现 PS-1 或 PS-2 的胞质的 C-末端和其他结构域为 G_{oA} 和/或 G_{oB} 与 PS 的相互作用位点, 这种

G_0 -PS 的胞内结合是随后 $A\beta$ 产生所需的, 并假设 $A\beta$ 的产生是通过这种结合过程的下游结果进行。

本发明同样也提供了一种抑制 $A\beta$ 产生的方法, 其通过将表达 PS-1 和/或 PS-2 的细胞与干涉结合至 G_0 的 PS-1 和/或 PS-2 的下游结果例如磷脂酶 C 进行 G_0 活化的药剂进行接触。

本发明还提供了一种抑制 $A\beta$ 产生的方法, 是通过使用经选择而干扰酪氨酸激酶的 Src 家族成员活性的小分子, 肽或抗体来达成。

本发明进一步提供了一种对在细胞培养物体系中抑制 $A\beta$ 产生的抑制剂的测定方法, 其中细胞培养物体系由表达了 β -APP 但不表达 PS 的第一种转染的细胞类型与表达了 PS 但不表达 β -APP 的第二种细胞类型混合组成。加到该混合的细胞培养物中的药剂的抑制效果可通过(a) G_{0A} 和 G_{0B} 与 PS-1 和 PS-2 的相互作用; 或 (b) 酪氨酸激酶的 Src 家族; 或 (c) β APP 的 N-末端结构域与 PS-1 和/或 PS-2 的 N-末端结构域的相互作用的几种可能的下游效应的活性来测量。

在另一方面, 本发明提供了一种改善研究对象的认知性功能和/或记忆的方法。该方法包括施用抑制 PS-1 和/或 PS-2 与 G-蛋白, G_{0A} 和 G_{0B} 的相互作用的药剂。在一种方法中, 该药剂与和 G_{0A} 和/或 G_{0B} 发生相互作用的 PS-1 和/或 PS-2 的 C-末端尾部和/或其他胞质结构域相互作用。该药剂也可干扰结合至 G_0 的 PS-1 和/或 PS-2 的下游结果, 例如用磷脂酶 C 进行 G_0 活化。在另一种方法中, 该药剂在表达 PS-1 和/或 PS-2 的细胞中抑制酪氨酸激酶的 Src 家族成员的活性。在各种情况下, 该药剂是与对照的研究对象相比以达到改善认知功能和/或记忆保持的量进行施用的。

附图说明

图 1 是出了为确定 PS-1 是否为 GPCR 的代表性研究。为确定 G_0 是否与 PS-1 发生相互作用, 对采自不同细胞培养物的提取物以及必要的对照进行了分析。在每个泳道, 特定的细胞提取物首先用针对 PS-1 的单克隆 Ab (MAb) 进行免疫沉积; 然后免疫沉积物溶解并进行 SDS-PAGE 电泳, 而所

得凝胶用针对 G_{0A} 的抗体(该抗体识别 G_{0A} 和 G_{0B})进行蛋白印迹分析(West Blot)。泳道 1 是未转染的 ES ($PS-1^{-}/PS-2^{-}$)细胞提取物对照。如所预期,该提取物显示 G_{0A} (或 G_{0B})未与针对 PS-1 的 Ab 发生免疫沉积。泳道 2 是 ES 细胞提取物,所述 ES 细胞首先仅用 PS-1 进行了转染,而没用 G_{0A} 进行转染。未观察到 G_{0A} 蛋白带;这是另一个对照实验。泳道 3 是用 PS-1 和 G_{0A} 进行了转染的 ES 细胞的提取物。在该提取物中, G_{0A} 与 PS-1 一同发生免疫沉积,表明 PS-1 结合至 G_{0A} 而不是 G_{0B} 。如果没有 C-末端“尾”(泳道 4), (其从细胞膜伸出进入水性的细胞内空间)的 PS-1 与 G_{0A} 一同被转染到 ES 双裸细胞(泳道 6), 则很少或没有 G_{0A} 与无尾 PS-1 一同发生免疫沉积,从而表明 PS-1 的 C-末端结构域是结合至 PS-1 的 G_{0A} 的主要的区域。

图 2 示出了与图 1 类似的实验的蛋白印迹分析,不同之处是采用 PS-2 而不是 PS-1。泳道 2 和 4 显示出与无尾的 PS-1 不同,无尾的 PS-2 仍然结合 G_{0A} (和 G_{0B}),从而 G_{0A} 和 G_{0B} 的结合位点不局限于 PS-2 的 C-末端结构域,对 PS-1,也是如此(图 1)。泳道 1 是未转染的 ES ($PS-1^{-}/PS-2^{-}$)。泳道 2 是 PS-2 + G_{0A} 。泳道 3 是无尾的 PS-2 + G_{0A} 。泳道 4 是 PS-2 + G_{0B} 。泳道 5 是无尾的 PS-2 + G_{0B} 。

图 3 涉及显示 G_{0A} 对 PS-1 结合的独立方式。GTP 的一种类似物 [^{35}S]-GTP γ S 形成连接至 G-蛋白的活性位点的共价键,这被与百日咳毒素 (PTX)的在先反应所阻碍。在泳道 2 中,到与针对 PS-1 的抗体免疫沉积的 G_{0A} 中的 ^{35}S -掺入出现了 8 倍的增加,而到 G_{0B} 的 ^{35}S -掺入没有增加(泳道 4)。因此,PS-1 结合至 G_{0A} (其已与 [^{35}S]-GTP γ S 发生反应)以确认其作为 G-蛋白(泳道 2),且 PS-1 也以较 G_{0A} 低的程度结合至 G_{0B} (泳道 4)。 ^{35}S 对 G_{0A} 和 G_{0B} 的结合被先前用 PTX 的处理所阻碍(泳道 3 和 5)。

图 4 描绘 ^{35}S GTP γ S 掺入到用 PS-2 和 G-蛋白 G_{0A} 的 cDNA 转染的 ES 细胞提取物中。

设计以下两个实验,以确定鼠 PS 是否在正常鼠脑中为活体内 GPCR。图 5 示出了用对 PS-1 的单克隆抗体可发生免疫沉积的鼠脑的提取物中 ^{35}S -GTP γ S 的掺入。

图6示出了在可用针对PS-2的单克隆抗体进行免疫沉积的鼠脑提取物中的³⁵S-GTPγS掺入。故鼠脑中的内源性PS-1和PS-2为GPCR。

图7示出了对固定的细胞进行的免疫荧光显微标记, a) 对未转染的、固定非渗透的DAMI细胞用对人PS-1 N-末端结构域的第一大鼠Mab #1563和FITC缀合的抗-大鼠IgG二抗(绿色)双免疫荧光显微标记显示出内源性PS-1氨基末端结构域的细胞表面的免疫标记。板2显示出当用对β-APP细胞外结构域的Mab #348以及TRITC-缀合的抗-大鼠IgG二抗(红色)标记时, 相同的细胞不表达适量的细胞表面β-APP。板3显示出在板1和2中的细胞的诺马斯基(Nomarski)图像。b) β-APP-转染的固定但未渗透的DAMI细胞的双免疫荧光显微标记显示出, 当用针对β-APP细胞外结构域的Mab #348以及TRITC-缀合的二抗(红色, 板2)标记时, 细胞表面表达的β-APP。板1和3, 如图7a那样处理的相同细胞。c) PS-1-转染的固定但未渗透的DAMI细胞当用与在a中描述的同一种一抗和二抗进行标记时, 显示出细胞表面PS-1的高度表达(板1), 但未显示出β-APP的高度表达(板2)。板3显示出在板1和2中的细胞的诺马斯基(Nomarski)图像。这些实验表明, 用PS-1对DAMI细胞的转染不会引起β-APP的细胞表面表达。d) β-APP-转染的固定但未渗透的ES细胞的免疫荧光显微标记, 对PS-1和PS-2为双裸。当用针对β-APP细胞外结构域的Mab #348和TRITC-缀合的二抗(红色, 板2)时, 细胞显示出细胞表面表达的β-APP。板1显示出用针对人PS-1 N-末端结构域的第一大鼠Mab #1563和FITC缀合的适合的二抗标记的结果, 其指示出如所预期在ES双裸细胞表面上不存在PS-1的缺乏。板3显示出在板1和2中的细胞的诺马斯基(Nomarski)图像。e) 未转染的固定但未渗透的ES细胞的免疫荧光显微标记, 该ES细胞是PS-1和PS-2双裸的。当用针对β-APP细胞外结构域的Mab #348和TRITC-缀合的二抗(红色, 板2)标记时, 细胞显示出细胞表面表达的外源性鼠β-APP。板1和3如d中那样标记; 在这些未转染的ES细胞中未观察到对PS-1的细胞表面标记(板1, 绿色)条, 20μm。

图8示出了在将仅表达β-APP的转染的ES细胞与仅表达PS-1的转染的DAMI细胞进行混合后的几分钟内, 在混合的细胞培养物中出现短暂的

蛋白酪氨酸磷酸化作用的过程, 这通过对细胞提取物 ELISA 分析检测出。这些活性的峰值出现在混合(a)后的~8-10 分钟。在有 25 μ g 纯化的可溶 β -APP (b)或 25 μ g 纯化的融合至 FLAG (c)的 PS-1 的 N-末端结构域的肽的存在下进行相同的实验, 未出现在(a)观察到的增加。然而, 加入 25 μ g 纯化的融合至 FLAG (c)的 PS-1 的 N-末端非特异性结构域的肽导致在蛋白酪氨酸激酶活性上出现与(a)非常类似的短暂增加。

图 9 是为确定在图 6 中的酪氨酸磷酸化酶活性的性质所进行的实验。用合成的肽进行 Src 家族激酶测定。a 和 b: 混合后分别转染的 DAMI 细胞与 β -APP:PS-1 发生的相互作用, 其为时间的函数。对 β -APP: PS-1 (a) 与对照 pcDNA3:PS-1 (b)两种相互作用, Src 激酶活性是使用 Src 家族底物肽 {Iys19}cdc2 (6-20)-NH₂ (黑色柱条)和对照肽 {lys19Phe15 }cdc2 (6-20)NH₂ (白色柱条) 和 {Iys19ser14val12 }cdc2 (6-20) NH₂ (灰色柱条)进行进行测定的。c 和 d: 混合后用分别转染的 DAMI 细胞与 β -APP: PS-2 发生的相互作用作为时间的函数。对 β -APP: PS-2 (c)与对照 pcDNA3:PS-2 (d)两种相互作用, Src 激酶活性是使用 Src 家族底物肽 {Iys19}cdc2 (6-20)-NH₂ (黑色柱条) 以及对照肽 {lys19Phe15 }cdc2 (6-20)NH₂ (白色柱条) 和 {Iys19ser14val12 }cdc2 (6-20) NH₂ (灰色柱条)进行测定的。

图 10. 酪氨酸激酶活性的抑制。用 ELISA 显示了分别用 β -APP 和 PS-1 在有 10 μ g/ml 的除莠霉素 A (a)和 10 nM PP2 (b)存在和不存在下转染的 DAMI 细胞的酪氨酸激酶活性, 其为混合后时间的函数。

图 11 示出了 β -APP: PS-1 细胞间相互作用: 混合细胞提取物中的 C-Src 活性。a. 蛋白免疫印迹分析。与分别转染的 DAMI 细胞的混合物的 β -APP: PS-1 相互作用。用来自与其中 β -APP-转染的 DAMI 细胞与 PS-1-转染的 DAMI 细胞混合 0-12 分钟的第一抗-Ptyr 多克隆抗体 (板 1) 和抗- pp60c-src 单克隆抗体(板 2)进行的蛋白免疫印迹分析。板 3: 用 pp60c-src 抗体对对照 pp60c-src 蛋白进行的抗体标记。板 4: 来自于其中 β -APP-转染的 ES 双裸细胞与 PS-1-转染的 DAMI 细胞相互作用实验的第一抗-Ptyr 抗体进行如板 1 的蛋白免疫印迹分析。b. 离体磷酸化的蛋白的放射自显影。被分别转染的 β -APP 和 PS-1 DAMI 细胞培养物混合物混合后 0-12 分钟时

的提取物首先用针对 c-Src 的抗体进行免疫沉积, 然后用 $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP 进行离体磷酸化。自体磷酸化反应物进行 SDS-PAGE 后放射自显影。

图 12 示出了 β -APP:PS-2 细胞间相互作用:混合细胞提取物中的 C-Src 活性。a. 蛋白免疫印迹分析。在分别转染和混合的 DAMI 细胞提取物中的 β -APP:PS-2 相互作用为混合后时间的函数。板 1 和 2: 除在与 β -APP 发生细胞间相互作用中 PS-2-转染的 DAMI 细胞代替 PS-1-转染的细胞且细胞混合 1-20 分钟之外, 与图 9a 相同。b. 离体磷酸化的蛋白的放射自显影。提取物与 a 部分中相同。除 PS-2-转染的 DAMI 细胞代替 PS-1-转染的细胞在细胞间与 β -APP 发生相互作用, 与图 5b 相同。

图 13 示出了 β -APP:PS-2 细胞间相互作用:混合细胞提取物中的 Lyn 和 Fyn 活性。a 和 b. 蛋白免疫印迹分析: β -APP:PS-2 相互作用。采用第一抗-Lyn 多克隆抗体 (a, 板 1) 和抗-Fyn 多克隆抗体 (b, 板 1) 的蛋白免疫印迹分析, 其为 β -APP-转染的 DAMI 细胞与 PS-2-转染的 DAMI 细胞经 0-20 分钟混合而制备提取物的同一实验。未观察到 Lyn 或 Fyn 蛋白浓度随时间而改变。板 2: 对照 Lyn (a)和 Fyn (b)蛋白用它们相应的抗体 c 和 d 的抗体标记。离体磷酸化的蛋白: β -APP:PS-2 相互作用的放射自显影。 β -APP 和 PS-2 混合转染的细胞在混合 0-20 分钟后的提取物首先用抗体 Lyn (c)或 Fyn (d)免疫沉积, 接着用 $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP 离体磷酸化。

离体磷酸化产物进行 SDS-PAGE, 然后放射自显影。

图 14 描述了 PS 的细胞内结构域。

图 15 显示了细胞间 β -APP:PS 相互作用对 $\text{A}\beta$ 产生的影响。

发明内容

这里使用的单数形式“一”, “和”, “该”, 除非在上下文中清楚地有所另指之外, 包括复数的对象。因此, 举例来说, “一蛋白”包括多个这样的蛋白, 而“该细胞”包括本领域技术人员已知的一个或多个细胞, 等等。

除非另外定义, 这里使用的技术和科学术语具有与本公开所属领域技术人员一般的理解的含义相同的含义。尽管这里对例举的方法, 装置和

材料作出描述，然而与这里描述的方法和材料相似或等同的方法和材料可用于实施揭露的方法和组合物。

对在以上和在文本全部范围内讨论的公开出版物，仅取它们在本申请申请日之前揭露的内容。这里所述的文字不应解释为由于在先公开而承认发明人不享有限于这些公开的在先权利。

本发明部分基于各种 G-蛋白偶联的受体(GPCR)的相互作用，以及它们的下游效应物，蛋白激酶活性和钙稳态。GPCR 包括人基因组中最大基因家族的一个，并介导大量不同的由神经递质，荷尔蒙，趋化因子，以及许多其他分子调节的细胞功能。及时地对 GPCR 信号转导进行解偶联对维持 GPCR-介导的生理功能的合适性和完整性至关重要。这种解偶联主要是通过一小得多的基因家族来介导，目前有 7 个 GPCR 激酶(GRKs)成员。几个 GRK 成员对巨大数目的 GPCR 进行调节的特异性以依赖激动剂的方式调控。换句话说，GRKs 优先结合至激动剂占据的 GPCR 并将其磷酸化来从相应的 G-蛋白中解偶联受体，这一过程被称之为同源脱敏。基于结构上的相似性，7 种已知的 GRK 成员被划分为 4 个亚族 (GRK1, GRK2/3, GRK4/5/6 和 GRK7)，GRK2/3 和 GRK5/6 普遍分布于包括脑在内的地方。GRK2 以及可能存在的 GRK5 的调节失常被认为存在与慢性心力衰竭，心肌缺血，和高血压，以及其他心血管疾病的发病机理中，其中对 GRKs 展开了深入的研究。不能通过 GRK1 视紫质信号进行脱敏可导致受光体细胞死亡，并被认为造成色素性视网膜炎的发生。此外，GRK2 水平的提高已被认为与鸦片类成瘾有关。然而，除了这些之外，GRKs 在许多其他可能与 GPCR 失调有关的病理状况如 AD 中的作用几乎还无人探索过。

由于 GPCR 位于细胞膜上，GRK 在质膜上或在细胞溶质中的保留物理地影响了它接近和结合至 GPCR。在静息细胞中，GRK4 亚族成员 (包括 GRK4/5/6) 与质膜紧密结合 (文献 10)，而 GRK2 亚族成员 (GRK2/3) 主要是存在于细胞溶质中，并在细胞被 GPCR 激动剂刺激时转运到细胞膜上。然而，在活跃的细胞中，GRKs 的亚细胞定位看似由细胞膜对细胞溶质中 GRK-结合因子的内容和容量决定。磷脂，尤其是磷脂酰肌醇-4,5-双磷酸看似在 GRKs 附着细胞膜并结合 GPCR 中发挥作用，而磷脂酰丝氨酸(PS)可

能也可增强 GRK2 在细胞膜上对 GPCR 的结合。在另一方面, 钙/钙调蛋白和其他的钙-结合的蛋白, 以及肌动蛋白, 辅肌动蛋白等也导致细胞溶质中的隔离 GRKs 和抑制 GRKs 结合至 GPCR。

在 AD 的脑中明显的细胞膜改变, 异常的肌醇磷脂代谢, 破坏的钙稳态和紊乱的细胞骨架蛋白均可影响 GRKs 的亚细胞分布。此外, 作为 AD 发病机理重要的疏水性肽, β 淀粉样蛋白的增加已显示出减少了细胞膜的磷脂酰肌醇-4, 5-双磷酸并增加了 $[Ca^{2+}]_i$ 。

有证据显示 PS-1 和 PS-2 的 7-TM 结构 (类似视紫红质的结构), 引起对 PS-1 和 PS-2 是否属于蛋白中 G-蛋白偶联的受体超家族进行检验, 而这些受体超家族均具有基本相同的结构。尽管 PS 并不显示出与到目前检验的大约 1,000 个 GPCR 任何一个具有任何显著的氨基酸同源性, 但事实上所有的这些 GPCR 的均是 7-TM 内在蛋白, 其中许多显示出与其他不具有序列同源性, 使得 PS 分子也是 GPCR 成为可能。PS 的 GPCR 活性通过使用 N141 I -PS-2 突变来确认。该突变, 与窝瓦德裔 (Volga German) 家族中的 PAD 相连, 导致 PC-12 细胞以百日咳毒素 (PTx) 敏感的方式死亡。其他研究指出, 在 PS-1 的 39 个氨基酸残基羧基-端结构域内 (位于细胞膜内 PS-1 的几乎所有拓扑模型中的细胞质内), 存在脑 G_o 蛋白的一特异性结合和调节结构域。PS-1 的这个离体结合至 G_o 的结构域也显示出与另外两个其他的 GPCR 蛋白, D2-多巴胺能的, 和 5HT-1B 受体, 以及 G-蛋白活化寡肽, 肥大(细胞)脱粒肽的 G-结合结构域具有一些局部的氨基酸序列同源性。

本公开证实了 G-蛋白 G_o 结合全长的 PS-1, 并被百日咳毒素所抑制。此外, 只有 G_{oA} 结合至 PS-1, G_{oB} 不发生结合。用 PS-1 的无尾构建物对 ES 裸细胞进行的转染证实了大多数的结合发生在 PS-1 的羧基端尾。然而, 这些结果也指出, 其他的细胞质环区域可能参与结合, 这是因为在无尾 PS-1 存在的情况下发生非常少量的结合。本公开证实了 G-蛋白不仅结合至 PS-1, 而且还结合至 PS-2, 且对于 PS-2 而言, 除了 G_{oA} 的结合外, G_{oB} 还结合至完整的 PS-2, 这在 PS-1 中是没有的。当用无尾的 PS-2 替代全长 PS-2 时, 仍存在这种结合。这些结果表明, G_{oB} 在细胞质结构域结合

PS-2, 而不是在 C-尾处结合。 ^{35}S -GTP γ S-标记的 $G\alpha_{0A}$ (不是 $G\alpha_{0B}$) 对 PS-1 的结合出现超过 700% 的增加。对于 PS-2, 出现了类似的超过基线水平的 ^{35}S -GTP γ S-标记的 $G\alpha_{0A}$ 结合 700% 的增加, 以及在 ^{35}S -GTP γ S-标记的 $G\alpha_{0B}$ 上出现 ~300% 的增加。用 PTx 进行处理抑制了 ^{35}S -GTP γ S 向 G_{0A} 和 G_{0B} 两者中的掺入。

因此, G_{0A} 对 PS-1 和 PS-2 两者的结合看似以相同的速率进行, 而在相同实验条件下, G_{0B} 对 PS-2 的结合小于观察到的 G_{0A} 的一半。这些数据证实了 G-蛋白偶联到 PS-1 和 PS-2 的功能性结果并进一步将两种早老素蛋白表征为 G-蛋白偶联的受体(GPCRs)。

GPCRs 根据它们的序列同源性和结构特征而分为三个主要家族。家族 1 是最大的, 占有所有 GPCRs 中的 90%。这个家族中的成员具有短短氨基末端细胞外结构域并在 7-TM 结构域内若干保守的氨基酸基序。家族 1 GPCRs 的“标志”是在 TM-III 和第 2 个细胞内环的接合处的一保守的三肽 DRY 序列, 其在 G-蛋白偶联中扮演着关键的角色。PS-1 和 PS-2 没有包括 DRY 序列的保守的家族 1 的基序, 且不可能属于该组。家族 2 的成员分享一较长的细胞外结构域并被大的肽配体如胰高血糖素和肠促胰液素所活化。家族 3 的成员包括代谢型谷氨酸受体(mGluRs), γ -氨基丁酸 B (GABA_B)受体和细胞外的阳离子-传感 Ca^{2+} 受体, 并具有起到配体结合结构域作用的大的细胞外结构域。这个家族被认为是利用不同的细胞内结构域和机制来进行 G-蛋白的信号转导。存在于家族 1 GPCRs 中的保守的氨基酸部分和 DRY 序列在家族 3 中为非保守的, 且认为导致在蛋白中发生构象变化的分子事件中家族 1 和家族 3 的 GPCRs 的成员之间有一定的差别。

PS-1 和 PS-2 与家族 3 GPCRs 的共同特征看似多于与其他两个家族--两者均具有大的细胞外结构域(N-末端, 在 TM VI 和 VII 之间的亲水性环)这一家族 3 GPCRs 的特征。在家族 3 GPCRs 中的配体结合看似完全通过细胞外结构域, 通常为氨基末端结构域进行。PS-1 或 PS-2 的 N-末端结构域足以胜任 PS-1 或 PS-2 分别离体结合至 β -APP 这一提议的配体和 PS GPCR 活化的可能激动剂。家族 3 成员中的一些形成同源二聚体, 通常由二硫键通过细胞外 Cys 残基形成。众所周知, PS-1 和 PS-2 在细胞膜中是

以二聚体形式存在。并且，两者均在它们的细胞外结构域(7-TM 结构)中具有 Cys 残基，然而不知道这些是否形成二硫键并参与蛋白的二聚中。家族 3 GPCRs 都具有第 3 个细胞间环作为最短的环，且其在每种类型中为保守的。类似的，在 PS-1 和 PS-2 中的第 3 个细胞内环为最短的环，由完全保守的序列 KYLPEW (SEQ ID NO:1)组成。家族 3 GPCRs 的一些成员通过它们的羧基端 PDZ 结合结构域与细胞内 PDZ-结构域蛋白如 Homer 直接发生相互作用。在 PS-1 的羧基端尾存在一 PDZ 结合结构域，而该 PS-1 的羧基端尾已显示出结合至数种 PDZ 蛋白。

对 A β 产生机理的研究中涉及了在一个细胞表面上的 β -APP 与在另一个细胞表面上的 PS-1 或 PS-2 的细胞-细胞相互作用。本发明指出， β 淀粉样蛋白前体蛋白 β -APP 和 PS-1 或 2 通常可为细胞间信号系统的组成。 β -APP 的一种或多种形式可通过分别从它们的细胞膜突出的细胞外结构域特异性地结合至 PS-1 或 PS-2。体内的这种结合诱发对正常的神经生理或发育重要的细胞间信号转导事件。这种跨细胞的分子结合的副产物即载体形成过程，细胞内化，和蛋白水解的退化开始，从而导致 A β 的形成和细胞释放以及它在脑结构域内的缓慢累积。

PS 可在细胞表面进行表达并具有 7-TM 结构，且 PS-1 和 PS-2 参与特异性的与 β -APP 的细胞-细胞相互作用；该 β -APP : PS 介导的细胞间相互作用导致酪氨酸激酶活性的短暂增高和蛋白酪氨酸磷酸化作用的短暂增强。并且，A β 产生的至少主要部分需要这种 β -APP : PS 介导的细胞-细胞相互作用。 β -APP 和 PS 之间的细胞间相互作用也可激活 G-蛋白对 PS 的结合。(目前已有足够的证据证明这蛋白酪氨酸激酶和 G-蛋白信号转导通道之间存在交叉)。

如果由 PS 引起的 G_o 活化最终影响到 A β 产生，则这些最后研究的可能结果可形成用于 AD 的药物疗法，其用到适当设计的 PS-G_o 特异性结合的抑制剂。

因此，PS-1, PS-2 和 APP 看似在细胞内信号转导中担任着角色。对这三种蛋白研究的主要焦点是它们在 β -APP 经蛋白水解形成 A β 片段中分别担任的角色，该过程直接或间接地涉及到 PS 蛋白。此外， β -APP 在一种

细胞表面以及 PS-1 (或 PS-2)在另一种细胞表面上的一种或多种形式可以是细胞间信号转导系统的特异性配体和受体组成,并在正常的生理中担任着角色。本公开提供了的证据显示 β -APP 对 PS 蛋白的细胞间表面结合在正常生理条件下发挥作用,起到在粘附细胞中的一个或可能的两个中诱发信号转导过程,最终导致对有机体而言有意义发育结果。

这一提议是基于果蝇眼睛发育中在前-R7 和 R8 细胞之间的模拟细胞间信号转导。在果蝇中,在前-R7 细胞表面上的 I 类单-TM 跨膜蛋白 Sevenless (SEV) (类似于 β -APP) 特异地结合 7-TM Bride of Sevenless (BOSS) 蛋白 (类似于 PS-1 或 PS-2)。如在这里其他处所描述的,PS 蛋白为 7-TM 拓扑,而不是广泛接受的 8-TM 拓扑。这里,信号转导要求 SEV 蛋白的细胞质结构域的酪氨酸激酶活性被活化。 β -APP 和 PS 蛋白均不是蛋白酪氨酸激酶且如果涉及酪氨酸激酶磷酸化,则在这里的情况下细胞质结构域的另一间接活性必须提供下游信号。最初进行的实验是用于检测这种可能的细胞间蛋白酪氨酸磷酸化信号转导事件。发现当用 β -APP 瞬间转染培养的 DAMI (人原巨核细胞) 细胞与用 PS-1 或 PS-2 转染的 DAMI 细胞混合时,在混合后数分钟内,细胞提取物表现出蛋白酪氨酸激酶活性和蛋白底物的磷酸酪氨酸(P-Tyr)修饰上出现显著的短暂增加,这种对照中,或者含有特异性 β -APP:PS 结合的抑制剂的细胞混合物中没有出现。这种信号转导的下游结果不同,这取决于是否 PS-1 或 PS-2 参与了对 β -APP 的细胞间结合,由于显示出增强的酪氨酸磷酸化作用的蛋白谱图在两种情况下不同,表明这两种同源性很高的 PS 蛋白的生物化学功能之间而不是它们的丰余之间存在截然区别。

本公开通过使用衍生自 PS-1^{-/-}, PS-2^{-/-} 双裸鼠的胚胎干(ES) 细胞,这里称为 ES 双裸细胞,其在对照实验中未转染,或用 β -APP 进行转染,的生物学途径。在后一种情况中, β -APP 转染的 ES 细胞与 PS-1-或 PS-2-转染的 DAMI 细胞混合; DAMI 细胞在它们的表面不会表达显著量的内源性 β -APP。因此,在这种混合的细胞培养体系中, β -APP 转染的 ES 双裸细胞仅起到细胞表面表达的 β -APP 的源的作用,而 PS-转染的 DAMI 细胞是细胞表面表达的 PS 的唯一来源。如果 β -APP : PS 特异性信号转导事件中这

个系统中发生，则可能是在两种细胞类型之间的分泌相互作用的结果。在本研究中，发现了这样的相互作用。

由 β -APP : PS 细胞间结合导致的 P_{Tyr} 蛋白修饰上的增加涉及待确定的蛋白酪氨酸激酶。有证据显示，信号转导伴随着 Src 家族酪氨酸激酶活性的短暂升高，并已确认了介导在 β -APP 和 PS-1，而不是和 PS-2 的细胞间信号转导的 Src 家族成员个体为 pp60c-src。与之不同的是， β -APP:PS-2 信号转导涉及 Src 家族成员 Lyn。这些信号转导事件影响正常的生理。例如，它们可能与 β -APP 裸鼠发育过程中遭遇的生理学缺陷有关。

激酶的 Src 家族与癌症，免疫系统缺陷和骨的再建疾病有关。对此的综述参见 Thomas and Brugge, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997, 13, 513; Lawrence and Niu, *Pharmacol. Ther.* 1998, 77, 81; Tatosyan and Mizenina, *Biochemistry (Moscow)* 2000, 65, 49-58; Boschelli 等人, *Drugs of the Future* 2000, 25(7), 717.

Src 家族的成员包括以下哺乳动物中的 8 种激酶: Src, Fyn, Yes, Fgr, Lyn, Hck, Lck, 和 Blk。它们是分子量在 52-62 kD 的非受体蛋白激酶。所有的激酶均以享有共同的结构组织为特征，其包括六个截然不同的功能结构域: Src 同源结构域 4 (SH4)，单一结构域, SH3 结构域, SH2 结构域, 催化结构域 (SH1)，以及一 C-末端调节域。Tatosyan 等人, *Biochemistry (Moscow)* 2000, 65, 49-58。

基于公开的研究，Src 激酶被认为是各种人疾病的潜在治疗靶。缺乏 Src 的鼠由于破骨细胞使得骨的再吸收降低而发生骨胳石化症，或骨积累。这表明由异常高度骨再吸收导致的骨质疏松症是通过抑制 Src 得到治疗。Soriano 等人, *Cell* 1992, 69, 551 和 Soriano 等人, *Cell* 1991, 64, 693。

对关节炎骨破坏的抑制已通过患类风湿症的滑膜细胞和破骨细胞中过度表达 CSK 获得。Takayanagi 等人, *J. Clin. Invest.* 1999, 104, 137. CSK, 或 C-末端的 Src 激酶发生磷酸化，从而抑制 Src 的催化活性。这意味着 Src 抑制可预防在患类风湿性关节炎的患者中出现特征性的关节损坏。Boschelli 等人, *Drugs of the Future* 2000, 25 (7), 717。

Src 还在乙型肝炎病毒的复制中扮演角色。由病毒编码的转录因子 HBx 在一病毒繁殖所需的步骤中激活 Src。Klein 等人, EMBO J. 1999, 18, 5019, 和 Klein 等人, Mol. Cell. Biol. 1997, 17, 6427.

5 多项研究已将 Src 表达与癌症如结肠癌, 乳癌, 肝和胰腺癌, 某些 B- 细胞白血病和淋巴瘤联系在一起。Talamonti 等人, J. Clin. Invest. 1993, 91, 53; Lutz 等人, Biochem. Biophys. Res. 1998 243, 503; Rosen 等人, J. Biol. Chem. 1986, 261, 13754; Bolen 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987, 84, 2251; Masaki 等人, Hepatology 1998, 27, 1257; Biscardi 等人, Adv. Cancer Res. 1999, 76, 61; Lynch 等人, Leukemia 1993, 7, 1416. 另外, 在卵巢和结肠
10 肿瘤细胞中表达的反义 Src 已显示出抑制肿瘤的生长。Wiener 等人, Clin. Cancer Res., 1999, 5, 2164; Staley 等人, Cell Growth Diff. 1997, 8, 269.

其他的 Src 家族激酶也是潜在的治疗靶。Lck 在 T-细胞信号转导中扮演着角色。缺少 Lck 基因的鼠难以发育出胸腺细胞。Lck 作为 T-细胞信号转导的正向激活剂的功能表明 Lck 抑制剂可用于治疗自体免疫的疾病如类
15 风湿性关节炎。Molina 等人, Nature, 1992, 357, 161. Hck, Fgr 和 Lyn 已被确认为作为在骨髓白细胞中的整联蛋白信号转导的重要介体。Lowell 等人, J. Leukoc. Biol., 1999, 65, 313. 这些激酶介体的抑制因而而用于治疗炎症。Boschelli 等人, Drugs of the Future 2000, 25(7), 717.

GSK-3 活性也与阿尔茨海默病相关。该病毒特征在于存在已知的 β 淀粉样肽以及形成细胞内的神经元纤维束缠结。神经元纤维束缠结含有超磷酸化的 Tau 蛋白, 其中 Tau 在异常位点被磷酸化。已发现 GSK-3 对细胞和动物模型内的异常位点进行磷酸化。并且, 已发现 GSK-3 的抑制阻止 Tau 在细胞中被超磷酸化[Lovestone 等人, Curr. Biol., 4, 1077-86 (1994); 和 Brownlees 等人, Neuroreport 8, 3251-55 (1997); Kaytor and Orr, Curr. Opin. Neurobiol., 12, 275-8 (2000)]。在过表达 GSK3 的转基因鼠中, 观察到了
25 显著增加的 Tau 的超磷酸化和神经元的异常的形态(Lucas 等人, EMBO J, 20:27-39 (2001))。活性的 GSK3 在预缠结的神经元的细胞质中累积, 从而导致 AD 患者脑中出现神经元纤维束缠结(Pei 等人, J Neuropathol Exp

Neurol, 58, 1010-19 (1999))。因此,对 GSK-3 的抑制减缓或停止了神经元纤维束缠结的产生,从而对阿尔茨海默病进行治疗或降低其严重程度。

GSK-3 在阿尔茨海默病中扮演着角色的证据得以在离体中示出。参见 Aplin 等人 (1996), J Neurochem 67:699; Sun 等人 (2002), Neurosci Lett 5 321:61(GSK3b 对 β 淀粉样前体蛋白(APP) 的细胞质结构域进行磷酸化并且 GSK3b 抑制作用降低了 APP-转染的细胞中 Ab40 和 Ab42 的分泌); Takashima 等人 (1998), PNAS 95:9637; Kirschenbaum 等人 (2001), J Biol Chem 276:7366 (GSK3b 与早老素-1 复合并将其磷酸化,早老素-1 与从 APP 合成 Ab 过程中的 γ -分泌酶活性相关); Takashima 等人 (1998), Neurosci 10 Res 31:317 (通过 Ab (25-35)对 GSK3b 的活化增强了在海马神经元中的 tau 的磷酸化作用。这一结果提供了在 Ab 和为另一种 AD 的病理学标志的由超磷酸化的 tau 构成的神经元纤维束缠结之间的联系; Takashima 等人 (1993), PNAS 90:7789 (对 GSK3b 表达或活性的阻碍防止了 Ab-诱发的皮层的和海马结构的主要培养物的神经元-退化); Suhara 等人 (2003), 15 Neurobiol Aging. 24:437 (细胞内的 Ab42 对内皮的细胞有毒,其是通过干涉依赖 Akt/GSK-3b 信号转导机制的活化产生毒的); De Ferrari 等人(2003) MoI Psychiatry 8:195' (锂保护 N2A 细胞和主要的海马结构神经元不受 Ab 原纤维诱发的细胞毒性的影响,并减少了 β -连环蛋白的核转运/去稳定); 和 Pigino 等人, J Neurosci, 23:4499, 2003 (在阿尔茨海默的早老素 1 中的突 20 变可使 GSK-3 活性失调和升高,其反过来又减少神经元中的轴突运输。随之带来的在受影响的神经元中的轴突运输上的减少可最终导致神经变性。)

GSK-3 在阿尔茨海默病中扮演着角色的证据得以在活体内示出。参见 Yamaguchi 等人 (1996), Acta Neuropathol 92:232; Pei 等人 (1999), J 25 Neuropath Exp Neurol 58:1010 (GSK3b 免疫活性在 AD 脑的易受感染的区域内升高); Hernandez 等人(2002), J Neurochem 83:1529 (GSK3b 条件性过度表达的转基因鼠表现出与那些在 AD 的转基因 APP 鼠模型中类似的认知缺陷); De Ferrari 等人 (2003) MoI Psychiatry 8:195 (慢性锂治疗解救了由海马结构内注射 Ab 原纤维引起的神经变性和行为上的损伤(MORRIS 水迷

官)); McLaurin 等人, Nature Med, 8:1263, 2002 (在 AD 的转基因模型中用 Ab 进行免疫减低了 AD-样的神经病理和空间记忆损伤) ; 以及 Phiel 等人 (2003) Nature 423:435 (GSK3 通过直接抑制 AD tg 鼠中的 γ 分泌酶来调节 β 淀粉样肽的产生)。

- 5 如近来在 Pigino, G., 等人, Journal of Neuroscience (23:4499, 2003) 中描述的, 早老素-1 和驱动蛋白-1 也是 GSK-3 的底物并与 GSK-3 在阿尔茨海默病中扮演着角色的另一种机制相关。发现 GSK3 β 对驱动蛋白-1 轻链进行磷酸化, 这导致驱动蛋白-1 从结合于细胞膜的细胞器中释放, 引起快速顺行性轴突传递的减少。PS-1 中的突变可使 GSK-3 活性失调和升高,
- 10 其反过来减少神经元中的轴突运输。随之带来的在受影响的神经元中的轴突运输上的减少可最终导致神经变性。

在 β -APP-提呈和 PS-提呈细胞之间的特异性粘附可具有不同的生理学后果, 一种是与这些蛋白的正常功能相关的跨细胞 (近分泌) 信号转导过程, 另一种最终导致 β -APP 发生蛋白质水解而形成 A β , 从而成为阿尔茨

15 海默病的病理, 以上这些都得到了本发明的支持。在该体系中的邻分泌相互作用的证据是用培养的 DAMI 细胞获得的, 这些细胞是用 β -APP, 或用 PS-1 或 PS-2 进行了适当的转染; 特异性的 β -APP: PS 介导的细胞-细胞相互作用引起蛋白酪氨酸激酶活性快速且短暂的增加以及在大多数情况下的一种粘附细胞中, 或有可能在两种粘附细胞中的蛋白酪氨酸磷酸化作用

20 快速且短暂的增强。使用 DAMI 细胞是因为, 这些细胞通常在细胞表面不表达大量的内源 β -APP, 并因为它们容易从细胞下层机械脱离。这样, 通过用 β -APP 转染 ES 双裸细胞, 可制备只表达表面 β -APP 但不表达 PS 的细胞, 并且通过用 PS-1 或 PS-2 转染 DAMI 细胞, 在表面产生表达 PS 蛋白但不显著的 β -APP 的另外的细胞。

- 25 如同结果中所示的, 在这些转染的细胞间进行的混合实验清楚地揭露了在 β -APP 和 PS 之间的特异的信号转导 (图 5), 这是由邻分泌相互作用所致; 即涉及在一个细胞表面的细胞膜结合的 PS 与另一个细胞表面的 β -APP 的反应。该相互作用被可溶的 β -APP (β -APP 的外质的结构域) 以及

被融合到 FLAG 上的 PS-1 的 N-末端结构域两者所特异地抑制, 显示出 β -APP 和 PS 的相互作用的双特异性。

这种信号转导的下游结果是否相同取决于是否 PS-1 或 PS-2 参与了对 β -APP 的细胞间结合。被酪氨酸磷酸化修饰的蛋白的谱图是否相同取决于是否 PS-1 或 PS-2 参与了对 β -APP 的细胞间结合。本发明在此确认了 c-Src 是一种当 β -APP 和 PS-1 发生细胞间相互作用时在磷酸化作用上出现主要短暂增加的蛋白, 然而在 β -APP 与 PS-2 发生细胞-细胞相互作用时, 观察到的 Src 家族激酶活性增加中却不涉及 c-Src。对于后者, Src 激酶家族成员 Lyn 似乎是所涉及的主要的(或至少是主要的一种)Src 激酶。总的来说, 这些结果表明这两种同源性很高的 PS 蛋白具有截然不同的信号转导机制, 其可导致不同的而非冗余的生理功能。

本发明证实了在 β -APP 与 PS-1 或 PS-2 之间的近分泌信号转导导致迅速而短暂的酪氨酸激酶的活化, 其在这两种 PS 蛋白之间是不同的。然而, 这些蛋白本身均不是酪氨酸激酶, 且似乎包括了 Src 家族激酶活性的间接活化中的一些类型。通常, 酪氨酸激酶的 Src 家族的成员可使用各种不同的分子机制通过结合至受体或其他蛋白而被间接活化。Src 酪氨酸激酶可通过结合至特定受体而被调节, 且它们反过来又调节受体的功能活性。C-Src 或 Lyn 可在 β -APP 分别与 PS-1 或 PS-2 发生结合后被募集。募集意味着信号转导复合物在体内的细胞-细胞接触位点瞬间形成, 一串联的磷酸化事件开始运行; 其可形成发育的后果。对 Src 中与 β -APP: PS-1 复合物相关联所必须的结构域的确证将对 β -APP: PS-1 信号转导复合物的组装和活化产生有价值的信息, 并且指明在 β -APP: PS-1 复合物与激酶间的相互作用是否是直接的或间接的。已知 β -APP 和 PS-1 均不会在胞质酪氨酸残基上被磷酸化, 所以通过 c-Src 的 SH2 结构域进行的直接结合由于该结构域仅在磷酸化的酪氨酸残基处进行结合, 故不可能发生。

然而, 直接结合也可通过 Src 的 SH3 结构域发生。SH3 结构域识别含核心 P-X-X-P 的富脯氨酸序列, 其中 X 表示任何的氨基酸。配体识别在两个相反取向中的一个的 SH3 结合表面。在 1 型取向中结合的肽与一致序列 R-X-L-P-X-Z-P 相符, 其中 Z 通常是疏水或 Arg 残基(Kay 等人, 2000)。有

有趣的是, PS-1 和 PS-2 均在胞质羧基端域 (PS-1 的残基 432-436 以及 PS-2 的残基 412-416) 具有保守的 1 型 SH3 结合位点(LPALP), 但这些 SH3 结合位点的同一性并不能解释 PS-1 和 PS-2 通过 β -APP 产生的不同的活化。

在各种生物应答的调节中涉及酪氨酸磷酸化作用, 并且在介导这些应答中涉及到酪氨酸激酶是由不同的蛋白所构成。在由 Src 激酶所结合的受体调节的粘附事件中涉及 Src 激酶, 且其中参与了调节细胞-细胞和细胞-基质相互作用的多受体通道后被激活。 β -APP:PS 信号转导在正常的生理机能发育中可能扮演着重要的角色看似是可能的。这种信号转导是否是在 A β 产生过程中额外所需的早期步骤可通过确定近分泌酪氨酸磷酸化作用对 A β 产生的抑制效果来进行实验研究。

现有技术中已知许多抑制 GPCR 相互作用的药剂。此外, 现有技术中还不知道一些激酶 (例如 c-src, fln 等) 抑制剂可用于本发明的方法中。用于治疗 AD 的在药理学上可接受的载体中含有这类药剂的组合物也涵盖在本发明中。

GPCRs 享有共同的结构基序。通常, 这些受体具有 7 个 22-24 个疏水氨基酸之间的序列, 其形成 7 个 α 螺旋, 其中的每一个跨越细胞膜 (每个跨越通过编号确认, 即跨膜-1 (TM-1), 跨膜-2 (TM-2) 等)。这些跨膜螺旋由在细胞膜外部的, 或“细胞外”侧上的跨膜-2 和跨膜-3, 跨膜-4 和跨膜-5, 跨膜-6 和跨膜-7 (它们分别被称之为“细胞外”域 1, 2 和 3 (EC-1, EC-2 和 EC-3)) 之间的氨基酸链连接。这些跨膜螺旋还由在细胞膜内部的, 或“细胞内”侧上的跨膜-1 和跨膜-2, 跨膜-3 和跨膜-4, 跨膜-5 和跨膜-6 (它们分别被称之为“细胞内”域 1, 2 和 3 (IC-1, IC-2 和 IC-3)) 之间的氨基酸链连接。受体的“羧基”(“C”)末端位于细胞之内的细胞内的空间, 而受体的“氨基”(“N”)末端位于细胞之外的细胞外的空间。

一般而言, 当配体与受体结合时 (通常称之为受体的“活化”), 则在细胞内结构域将发生构象的改变, 使得在细胞内结构域和细胞内“G-蛋白”之间的偶联发生。已有报道称 GPCRs 对 G 蛋白而言是“混杂的”, 即 GPCR 可与不止一个的 G 蛋白发生相互作用。参见 Kenakin, T., 43 Life Sciences 1095 (1988)。尽管存在其他的 G 蛋白, 目前已确认的 G 蛋白有 G_q , G_s , G_i , G_z

和 G_0 。内源的偶联了 G-蛋白的配体-活化的 GPCR 开始信号转导级联过程（称之为“信号转导”。在正常条件下，信号转导最终导致细胞活化或细胞抑制。IC-3 环以及受体的羧基末端被认为与 G 蛋白产生相互作用。

受体活化的 G 蛋白结合至细胞膜的内侧表面。它们由 $G\alpha$ 和密切结合的 $G\beta\gamma$ 亚单位组成。当配体使 G 蛋白偶联的受体活化时，它诱发了受体中的构象改变（形状改变），此时 G 蛋白可与受体结合。然后 G 蛋白从 $G\alpha$ 亚单位释放出它结合的 GDP，并结合新的分子 GTP。这种交换引发 $G\alpha$ 亚单位， $G\beta\gamma$ 二聚体以及受体的解离。然后， $G\alpha$ -GTP 和 $G\beta\gamma$ 均可活化不同的信号转导级联（或第二种信使通道）和效应物蛋白，而受体能够对下一个 G 蛋白进行活化。 $G\alpha$ 亚单位通过它内在的酶活性最终将连接的 GTP 水解成 GDP，使其与 $G\beta\gamma$ 重新结合并开始新一轮循环。

鸟嘌呤核苷酸-结合蛋白 G_0 ("o" 表示其他)的 α 亚单位介导在各种不同受体和效应物之间的信号转导。已从脑组织库中分离出两种形式的 G_0 亚单位。这两种形式， $G_{0A}\alpha$ 和 $G_{0B}\alpha$ （也称为 G_{0A} 和 G_{0B} ）是选择性剪接的产物。 $G_{0A}\alpha$ 转录物存在与各种组织中，但在脑中最为富集。 $G_{0B}\alpha$ 转录物在脑和睾丸中出现最高水平的表达。

特异性的 GPCR 筛选测定技术是本领域技术人员所知晓的。例如，一旦采用“通用”G 蛋白-偶联的受体分析（即选出为激动剂，部分激动剂，或反向激动剂的化合物的分析）确认出候选化合物，则优选进行进一步筛选以确认该化合物已知受体位点产生相互作用。例如，用“通用”分析确认的化合物可能不会与受体结合，而仅仅从细胞内结构域“解偶联”G 蛋白。

G_s 刺激酶腺苷酸环化酶。另一方面， G_i (和 G_z 和 G_o)抑制这种酶。腺苷酸环化酶催化 ATP 向 cAMP 转化，因此与 G_s 偶联的组成性激活的 GPCRs 与 cAMP 的细胞水平的增加有关。另一方面，与 G_i (或 G_z , G_o)偶联的组成性激活的 GPCRs 与 cAMP 的细胞水平的降低有关。一般性描述参见 "Indirect Mechanisms of Synaptic Transmission," Chpt . 8, From Neuron To Brain (3rd Ed.) Nichols, J. G. et al eds . Sinauer Associates, Inc. (1992)。因此检测 cAMP 的分析可被用来确定例如一候选化合物是否是对受体的反向激动剂（即该化合物将降低 cAMP 的水平）。现有技术中已知的各种测量

cAMP 的方法均可采用；最优选的方法依赖于在基于 ELISA 形式中的抗-cAMP 抗体的使用。可采用的另外一种类型的分析是全细胞第二信使报道分子系统分析。基因上的启动子驱动被特定基因编码的蛋白质表达的进行。环状 AMP 通过促进 cAMP-应答的 DNA 结合蛋白或转录因子(CREB),
5 其随后结合至位于被称为 cAMP 应答元件的特定位点的启动子来驱动基因表达。报道分子系统可构建成具有一启动子, 其在报道分子基因之前含多个 cAMP 应答元件, 例如 β -半乳糖苷酶或荧光素酶。因此, 组成性激活的 G_s -连接的受体导致 cAMP 的累积, 其随后激活基因和报道分子蛋白的表达。然后, 报道分子蛋白如 β -半乳糖苷酶或荧光素酶可使用标准的生物化学分析进行检测。
10

G_q 和 G_o 与酶磷脂酶 C 的活化有关, 这种酶使磷脂 PIP_2 水解, 释放出两种细胞内信使: 二酰基甘油 (DAG)和 1,4,5-三磷酸肌醇(IP_3)。 IP_3 在累积上的增加与 G_q - 和 G_o -结合的受体的活化有关。一般性叙述参见"Indirect Mechanisms of Synaptic Transmission," Chpt . 8, From Neuron To Brain (3rd
15 Ed.) Nichols, J. G. et al eds . Sinauer Associates, Inc. (1992)。检测 IP_3 累积的分析可被用来确定一种候选化合物是否为如 G_q - 或 G_o -结合的受体的反向激动剂(即这种化合物将降低 IP_3 的水平)。 G_q -结合的受体也可用 API 报道分子分析来检查, 这是由于 G_q -依赖的磷脂酶 C 导致含 API 元素的基因发生活化; 因此, 活化的 G_q -结合的受体将见证这种基因表达上的增加, 从而反向激动剂将见证这种表达的降低, 而激动剂将见证这种表达的增加。
20 用于进行这种检测的测定可从商业渠道获得的。

术语“药剂”或“测试化合物”或“候选药物”或“调节剂”或这里使用的语法上的等同物描述了任何的天然或合成的分子, 例如蛋白质, 寡肽(例如约 5~约 25 个氨基酸的长度, 优选约 10~20 或 12~18 个氨基酸的长度, 25 优选为 12, 15 或 18 个氨基酸的长度), 小的有机分子, 多糖, 脂质, 脂肪酸, 多核苷酸, RNAi 或 siRNA, asRNA, 寡核苷酸等。药剂是可在分析中进行测试以确认该药剂具有调节早老素活性能力的任何分子。药剂可以是测试化合物库的形式, 例如为一提供足够大的多样性的组合库或随机库。药剂任意的连接至一融合伴侣, 例如靶向化合物, 救援化合物, 二聚

化合物，稳定用化合物，可寻址的化合物，或其他功能部分。一般而言，具有有用性能的新的化学实体是通过对具有期望性能或活性，如抑制活性的测试化合物（称为“先导化合物”）进行确认，产生各种先导化合物，以及评价这些不同化合物的性质和活性来产生的。通常，高通量筛选（HTS）方法被用于这种分析。

采用表达或活性的“抑制剂”，“激活剂”，和“调节剂”这样的是分别指抑制的，活化的，或调节的分子，它们通过离体和体内的用于表达或活性的测定得以确认，例如配体，激动剂，拮抗剂，以及它们的同源物和拟态物。术语“调节剂”包括抑制剂和激活剂。抑制剂是结合至早老素，部分地或完全阻碍刺激或酶活性，降低，阻止，延缓活化，失活，脱敏，或下调其酶活的药剂，例如拮抗剂。激活剂是结合至早老素，刺激，增加，开放，活化，促进，增强活化或酶活性，使早老素敏感性增加，或对其进行上调的药剂，例如激动剂。调节剂包括天然的和合成的配体，拮抗剂，激动剂，小的化学分子等。确认抑制剂和激活剂的测定包括如在有无早老素存在下，对细胞使用假定的调节剂化合物，然后确定对早老素活性的功能性影响。包含用可能的激活剂，抑制剂或调节剂处理过的早老素的样品或分析物与无抑制剂，激活剂或调节剂对照样品做比较来检查影响的程度。对照样品（未用调节剂处理的）的相对活性值设为 100%。当早老素的活性值相对于对照为约 80%，任选为 50%或 25-1%时，获得的是抑制。当早老素的活性值相对于对照为约 110%，任选为 150%，任选为 200-500%，或 1000-3000%或更高时，获得的是活化。

“激动剂”是指结合至本发明的多肽或多核苷酸的药剂，其刺激，增加，促进，增强活化，使本发明的多肽或多核苷酸对活性或表达敏感性增加，或对其进行上调节。

“拮抗剂”是指抑制本发明的多肽或多核苷酸表达，或结合至本发明的多肽或多核苷酸，部分地或完全阻碍刺激，降低，阻止，延缓活化，失活使本发明的多肽或多核苷酸，脱敏，或对其进行下调节的药剂。

“小的有机分子”是指天然的或合成的有机分子，其具有的分子量大于约 50 道尔顿，且小于 2500 道尔顿，优选小于 2000 道尔顿，优选在约 100 ~ 约 1000 道尔顿之间，更优选择约 200 ~ 约 500 道尔顿之间。

“确定功能性影响”是指对增加或降低受早老素间接或直接影响的参数的化合物进行的测定，例如测量如早老素与 G-蛋白或 β -APP 相互作用的物理的和化学的或表型的影响。这样的功能性影响可通过本领域技术人员知晓的任何方法进行测量，例如在蛋白质的光谱（例如荧光，吸收，折射率）上的改变，流体动力学的（例如形状），色谱的，或溶解性质；测量蛋白质的可诱导标记物或转录激活；测量结合活性或结合测定，例如结合至抗体；测量配体结合亲和力上的变化；测量钙内流；测量本发明的多肽的酶产物的积累或底物的耗尽；酶活性上的改变，测量本发明多肽的蛋白质水平上的改变；测量 RNA 的稳定性；G-蛋白结合；GPCR 磷酸化或去磷酸化；tau 磷酸化或去磷酸化；信号转导，例如受体-配体相互作用，第二信使浓度（例如 cAMP, IP3, 或细胞内 Ca^{2+} ）；例如通过化学发光，荧光，比色反应，抗体结合，可诱导标记物，和配体结合测定确认下游或报道分子基因表达（CAT, 荧光素酶, β -gal, GFP 等）。此外， β -APP 结合至早老素以及 $\text{A}\beta$ 的产生也可用来确定对早老素活性的功能性影响。术语“ β 淀粉样肽”是指从 β 淀粉样前体蛋白 (APP) 加工而成的 β 淀粉样肽。最常见的肽包括 β 淀粉样肽 1-40, 1-42, 11-40 和 11-42。其他不是最常见的 β 淀粉样肽被描述为 x-42, 其中 x 在 2-10 和 12-17 之间，以及 1-y, 其中 y 在 24-39 和 41。出于描述和技术方面考虑，“x”的值为 2-17，“y”的值为 24-41。

用这里提供的方法确认的药剂可以为治疗或预防目的施用来治疗与淀粉样原纤维形成，聚集或沉积相关的疾病，而不管临床环境。本发明的化合物可起到调节与淀粉样蛋白相关疾病的病程，其利用到以下机制中的任何一种，例如这样的机制不限于以下的例子：减缓淀粉样原纤维形成或沉积速率；减轻淀粉样蛋白沉积程度；抑制，减少，或预防淀粉样原纤维形成；抑制淀粉样蛋白引起的炎症；加强从如脑中对淀粉样蛋白的清除；或保护细胞不受淀粉样蛋白引起的（低聚物或原纤维）毒性的毒害。

淀粉样蛋白沉积的“调节”包括如上定义的抑制和对淀粉样蛋白沉积或原纤维形成的促进。因此，术语“调节”意在包括预防或停止淀粉样蛋白形成或累积，抑制或减慢进一步的淀粉样蛋白在正经历淀粉样变性的研究对象体内的聚集，例如是已经出现淀粉样蛋白聚集，以及减少或逆转在正经历淀粉样变性的研究对象体内的淀粉样蛋白的聚集；以及增加淀粉样蛋白的沉积，例如增加淀粉样蛋白在体内或离体中的沉积速率和量。增加淀粉样蛋白的化合物可用于淀粉样变性的动物模型中，例如使得在较短时间在动物体内形成出淀粉样蛋白沉积或者选定的期间内增加淀粉样蛋白沉积成为可能。增加淀粉样蛋白的化合物可用于对体内，如在动物模型中抑制淀粉样变性的化合物的筛选，细胞分析和离体分析淀粉样变性。这类化合物例如可用于提供对化合物的更快或更敏感的分析。在一些情况下，增加淀粉样蛋白的化合物也可处于治疗目的地施用，例如增加淀粉样蛋白在脑的血管腔内而不是在脑的血管壁上沉积以预防CAA。对淀粉样蛋白聚集的调节是根据未接受治疗的研究对象或根据在治疗前的接受治疗的研究对象来确定的。

淀粉样蛋白沉积的“抑制”包括防止或停止淀粉样蛋白的形成，例如淀粉样变性，从脑中清除可溶性的A β ，在患淀粉样变性的研究对象如已有淀粉样蛋白沉积的研究对象中抑制或减缓进一步的淀粉样蛋白沉积，以及减少或逆转在有淀粉样蛋白沉积的研究对象中的淀粉样原纤维形成或沉积。对淀粉样蛋白沉积的抑制是根据未接受治疗的研究对象或根据在治疗前的接受治疗的研究对象确定，或例如通过临床可测定的改善确定，例如在研究对象有脑部的粉样变性的情况下，例如阿尔茨海默病的患者或脑部淀粉样蛋白血管病的患者，认知功能的稳定或防止认知功能的进一步下降（即防止，减缓，或停止疾病发展），或如A β 的浓度或者CSF中的tau这样的参数的改进。

这里使用的对研究对象的“治疗”包括向研究对象应用或施用含通过本发明的方法确认的药剂的组合物，或将本发明的组合物向研究对象的细胞或组织应用或使用，该研究对象患有与 β 淀粉样蛋白相关的疾病或病症，出现了这种就并或病症的症状，或有患者这种疾病或病症的风险（或易患

这种疾病或病症)，治疗的目的在于治疗，治愈，减轻，缓解，改变，修补，改善，改进，或影响这种疾病或病症，这种疾病或病症的症状，或这种疾病或病症的风险（或易患这种疾病或病症）。术语“治疗”是指在治疗或减轻损伤，病状或疾病中取得的任何成功的指示，包括任何客观或主观参数，例如消除；减轻；症状的减弱或使研究对象更能耐受损伤，病状或疾病；减慢恶化或衰退的速度；是恶化的终点处研究对象的虚弱程度较低；改善研究对象的身体或精神上的健康；或者在一些情况下，防止痴呆产生。对症状的治疗或减轻可基于客观和主观参数；包括身体检查或精神评估的结果。例如本发明的方法通过减慢认知下降的速度或程度而成功地治疗了研究对象的痴呆症。

尽管家族的或散发型的阿尔茨海默病是指老龄人群中发现的主要痴呆症，也发现了其他类型的痴呆症。这些包括但不限于：与皮克病相关的额颞叶变性，血管性痴呆，路易体类型的老年性痴呆，发生额萎缩的帕金森病痴呆，进行性核上性麻痹和皮质基底节变性以及与阿尔茨海默病相关的唐氏综合症。在海绵样脑病变中如 CJD，羊瘙痒病和 BSE 中也看到到蚀斑形成。本发明涉及对这类神经变性疾病，特别是那些涉及毒害神经的蛋白质蚀斑如淀粉样蚀斑的治疗。

唐氏综合征是一种严重的人疾病，其发病率为每 800 个新生儿中有 1 例。它是与受感染的个体体内存在额外的染色体 21（三体 21）相关。 β 淀粉样前体蛋白(β -APP)基因是在染色体 21 上被编码，这一位置与唐氏综合症的位点非常靠近。患唐氏综合征的所有患者，如果他们存活超过 40 年，则会发展出与阿尔茨海默病类似的痴呆症并在他们的脑中出现 $A\beta$ 沉积。因此，有很好的理由认为 $A\beta$ 的过度生产与在 AD 和唐氏综合症中出现的痴呆症有着直接的联系。因此，对用于改善 AD 症状的治疗性药剂性质的确认也将对改善唐氏综合症症状有用。

“痴呆症”是指由于器官的或心理的因素造成的一般性精神衰退；其特征有定向力障碍，记忆，判断力和智力受损，以及表面情感不稳。这里的痴呆症包括血管性痴呆，缺血性血管痴呆（IVD），额颞叶痴呆症(FTD)，

路易体痴呆，阿尔茨海默痴呆等。在老年人中最为常见的痴呆症形式是阿尔茨海默病（AD）。

表达“轻-中度”或“早期”AD 在这里被用作非晚期 AD 的同义词，其中疾病的迹象或症状不严重。患“轻-中度”或“早期”AD 的研究对象可由有经验的神经病学家或临床医师确诊。在一种实施方式中，患“轻-中度”AD 的研究对象是使用简易智能状态检查（MMSE）确诊的。这里，“中-重度”或“晚期”AD 是指晚期 AD，且疾病的迹象或症状显著。这样的研究对象可由有经验的神经病学家或临床医师确诊。患这种形式的 AD 的研究对象可能不再对采用胆碱酯酶抑制剂的治疗产生应答，并且可出现显著降低的乙酰胆碱水平。在一种实施方式中，患中-重度 AD 的研究对象是使用简易智能状态检查（MMSE）确诊的。“家族性的 AD”是一种由遗传缺陷导致的遗传形式的 AD。AD 或痴呆症的“症状”包括研究对象经历的任何病态的现象或在结构，功能或感觉上偏离正常以及 AD 或痴呆症的迹象。

可从治疗或预防角度施用一种药剂来治疗与淀粉样原纤维形成，聚集或沉积有关的疾病。本发明的药剂可作用以减轻原纤维形成过程；抑制由 β 样淀粉蛋白诱发的神经变性或细胞毒素；抑制 β 样淀粉蛋白诱发的炎症；增强从脑中清除 β 样淀粉蛋白；或有利于 $A\beta$ 进行更好的分解代谢。

药剂可通过直接作用于脑 $A\beta$ ，例如通过维持其处于非原纤维形式或有利于它从脑中清除而有效控制 β 样淀粉蛋白沉积。该化合物可减缓 APP 加工；可通过巨噬细胞或神经元细胞增加 $A\beta$ 原纤维的降解；或可通过活化的小神经胶质来减少 $A\beta$ 的产生。这些药剂还可防止脑中的 $A\beta$ 与细胞表面发生相互作用从而预防神经毒性，神经变性，或炎症。

用这里提供的方法确认的药剂可用于治疗阿尔茨海默病（例如散发的或家族的 AD）。该药剂也可用于预防地或治疗地对其他临床出现的 β 样淀粉蛋白沉积，如在唐氏综合征个体中以及在患脑淀粉样血管病（“CAA”），遗传的脑出血，或早期阿尔茨海默病的患者进行治疗。

该药剂可用于治疗轻度认知障碍。轻度认知障碍（“MCI”）这种症状的特征是在思考技能上出现的轻度但可测量的损害，这与痴呆症的存在并不存在必然联系。MCI 经常在阿尔茨海默病发生之前出现，但这也不绝对。

此外,异常的 APP 和 β 样淀粉蛋白在肌肉纤维中的积累被认为涉及散发型包涵体肌炎(IBM)的发病(Askanas, V., et al. (1996) Proc . Natl. Acad. Sci . USA 93: 1314-1319; Askanas, V. 等人 (1995) Current Opinion in Rheumatology 7: 486-496)。因此,用这里提供的方法确认的药剂可用来预防或治疗 β 样淀粉蛋白异常沉积在非神经位置的疾病,例如通过将该化合物输送至肌肉纤维来治疗 IBM。

此外,已发现 $A\beta$ 与被称之为玻璃疣的异常的细胞外沉积有关,玻璃疣沿患老年黄斑变性(ARMD)个体的视网膜色素上皮细胞的基底面累积。ARMD 是导致老年人中引起不可逆视力丧失的原因。认为 $A\beta$ 沉积可能是导致视网膜色素上皮细胞萎缩,玻璃疣发生,以及 ARMD 发病的的局部炎症事件的重要因素(Johnson, 等人 , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(18), 11830-5 (2002))。

因此,本发明总的涉及在研究对象(优选为人)中治疗或预防与淀粉样蛋白相关疾病的方法,包括向研究对象施用治疗量的由本发明在这里提供的方法确认的药剂或化合物,从而减少或抑制淀粉样原纤维的形成或沉积,神经变性,或细胞毒性。在另一种实施方式中,本发明涉及在研究对象(优选为人)中治疗或预防与淀粉样蛋白相关疾病的方法,包括向研究对象施用治疗量的由这里描述的方法确认的化合物,从而使患脑部淀粉样变性,如阿尔茨海默病,唐氏综合征或脑淀粉样血管病患者的认知功能得以改善或稳定或者防止,减缓,或停止其在认知功能上的进一步的衰退。这些化合物也可改善这些研究对象日常生活的质量。

本发明进一步涉及含有用于治疗与淀粉样蛋白相关疾病的药剂的药物组合物,以及生产这种药物组合物的方法。

一般而言,通过这里提供的方法确认的药剂可由本领域技术人员知道的任何方法进行制备。本发明的药剂可与适合的溶剂配制成溶液或形成无溶剂的形式(例如冻干的形式)。在本发明的另一方面,可将实施本发明所必须的药剂和缓冲剂可包装成试剂盒。该试剂盒可根据这里描述的方法供商业使用,且可包括使用本发明方法的教导。另外的试剂盒组成可包括酸,碱,缓冲剂,无机盐,溶剂,抗氧化剂,防腐剂,或金属螯合剂。额

外的试剂盒组分是以纯组分，或包含一种或多种额外的试剂盒组分的水溶液或有机溶液的形式存在。试剂盒组分中的任何一种或所有的均任选进一步包含缓冲剂。

该治疗药剂也可通过肠胃外，腹膜腔内，脊柱内，或脑内施用。分散液可在丙三醇，液态乙二醇，以及它们的混合物和油中制备。在普通的储存和使用条件下，这些制剂可含有防腐剂来防止微生物的生长。

为了以非肠胃外施用的方法施用治疗性药剂，有必要用防止药剂失活的材料对其进行包衣或与这种材料进行共施用。例如，治疗性药剂可含在适合的载体，如脂质体或稀释剂中向研究对象施用。药学上可接受的稀释剂包括盐水和水性缓冲溶液。脂质体包括水包油包水 CFR 乳液以及传统的脂质(Strejan 等人, J. Neuroimmunol. 7, 27 (1984))。

适合注射的药物组合物包括无菌水溶液(其中是水溶性的)或悬浮液和用于临时配制无菌可注射溶液或悬浮液的无菌粉末。在所有情况下，组合物必须是无菌的且必须具有能容易注射的可流动程度。其中生产和储存条件下必须是稳定的，且必须对抗微生物如细菌和真菌的污染而保存。

适合的药学上可接受的载体包括但不限于，不产生免疫原的适于通过口腔，肠胃外，鼻，粘膜，经皮，血管内(IV)，动脉内(IA)，肌肉内(IM)，和皮下(SC)途径施用的药用佐剂，例如磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

载体可以是溶剂或悬浮介质，其中含有如水，乙醇，多元醇(例如丙三醇，丙二醇，和液体乙二醇等)，它们的适合的混合物，以及植物油。适合的流度例如可通过使用包衣如卵磷脂，在分散液情况下通过维持所需的粒子尺寸以及通过使用表面活性剂来维持。可通过各种抗菌和抗真菌剂如对羟苯甲酸酯，三氯叔丁醇，苯酚，抗坏血酸，硫柳汞等来防止微生物作用。在许多情况下，在组合物中包括等渗剂包括如糖，氯化钠，或多元醇如甘露醇和山梨糖醇。可注射组合物的长效吸收可通过在组合物中加入延迟吸收的药剂如单硬脂酸铝或凝胶来实现。

无菌的可注射溶液可通过将需要量的治疗药剂渗入适合溶剂中并按需要加入上面提到的一种成分或成分的组合，然后进行过滤消毒。一般而言，分散液是通过将治疗药剂渗入无菌载体中制备的，无菌载体含有无菌

分散介质和所需的来自上面提及其他成分。在用无菌粉末制备无菌可注射溶液的情况下，制备方法有真空干燥和获得活性成分（即治疗药剂）的冷冻干燥，加上来自先前获得的其无菌过滤的溶液中任何额外的期望成分。

治疗药剂可以通过口服施用，例如与惰性稀释剂或可吸收的可食用载体一同施用。治疗药剂和其他成分也可含在硬或软壳凝胶胶囊中，压制成片剂，或直接混入研究对象的日常饮食中。对于口服施用治疗药剂而言，治疗药剂中可渗入赋形剂，并以可吸收的片剂，含化片，片剂，胶囊，酏剂，悬浮剂，糖浆，糯米纸囊剂等形式使用。当然，治疗药剂在组合物和制剂中的百分比是可以变动的。在这种可用于治疗的组合物中的治疗药剂的量是能够获得适当的剂量。

将肠胃外的组合物配制成有利于施用的剂剂量单位形式和统一剂量尤显优势。这里使用的剂量单位形式是指适于作为待治疗研究对象用的单位剂量的物理上分离的单位；每一单位含有预先经计算与所学药物载体联合使用产生期望治疗效果的预定量的治疗药剂。本发明的剂量单位形式的说明取决于以及直接依赖于（a）治疗药剂的独特特性和期望获得的特殊治疗效果，以及（b）现有技术中制成这种治疗药剂来治疗研究对象中的淀粉样蛋白沉积的内在限制。

因此，本发明包括药物制剂，其含有通过这里描述的方法确认的药剂，包括其药学上可接受的盐，其存在于药学上可接受的用于气溶胶，口服和肠胃外施用的载体。另外，本发明还包括这种药剂，或其盐，其经冻干且可重新构建形成药学上可接受的制剂进行施用，通过静脉，肌肉，或皮下注射。施用也可是皮内的或经皮的。

根据本发明，药剂以及其药学上可接受的盐可口腔施用或以固体形式而吸入，或者以溶液，悬浮液或乳液形式而肌肉或静脉内施用。或者，药剂或盐也可作为脂质体悬浮液而通过吸入，静脉内或肌肉内施用。

还提供了适合作为通过吸入的气溶胶施用的药物制剂。这些制剂含有期望药剂，或其盐，或该药剂或盐的多个固体颗粒的溶液或悬浮液。该期望的制剂可置于小室内并使其成雾状。雾化可通过压缩空气或通过超声能形成多个含药剂或其盐的液滴或固体颗粒来实现。液滴或固体颗粒的粒子

尺寸应当在约 0.5~约 5 微米的范围。固体颗粒可通过以现有技术已知方式如微粉化来加工固体药剂或其盐来获得的。固体颗粒或液滴的尺寸例如在约 1~约 2 微米。对此,可采用商用的雾化器来实现该目标。

5 适合作为气溶胶施用的药物制剂可采取液体的形式,制剂将包含水溶性的药剂,或其盐,它们存在与含水的载体中。可以有表面活性剂存在来降低制剂的表面张力从而在雾化时形成在期望尺寸范围内的液滴。

10 经口的组合物也包括液体溶液,乳化液,悬浮液等。适合于制备这种组合物的药学上可接受的载体是现有技术中已知的。用于糖浆,酏剂,乳液和悬浮液的典型载体组分包括乙醇,丙三醇,丙二醇,聚乙二醇,液态蔗糖,山梨糖醇和水。对于悬浮液,典型的悬浮剂包括甲基纤维素,羧甲基纤维素钠,西黄蓍胶,和藻酸钠;典型的润湿剂包括卵磷脂和聚山梨醇酯 80;以及典型的防腐剂包括对羟基苯甲酸甲酯和苯甲酸钠。经口的液体组合物也可含有一种或多种如上揭露的如增甜剂,香料和着色剂的成分。

15 药物组合物也可用传统方法进行包衣,通常采用依赖于 pH 或时间的包衣,从而使受试药剂在胃肠道内以接近期望的局部施用释放,或者不同的时间来释放,从而延长期望的作用。这样的剂量形式通常包括但不限于邻苯二甲酸乙酸纤维素,聚醋酸乙烯苯二甲酸酯,羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯,乙基纤维素,蜡,和虫胶中的一种或多种。

20 用于获得系统输送受试药剂的其他组合物包括舌下,口腔和鼻剂量形式。这类组合物通常含有一种或多种可溶的填料物质如蔗糖,山梨糖醇和甘露醇;以及粘合剂如金合欢树胶,微晶纤维素,羧甲基纤维素和羟丙基甲基纤维素。上面揭露的助流剂,润滑剂,增甜剂,着色剂,抗氧化剂和香料也可包含在内。

25 本发明的组合物也可局部施用于研究对象,例如通过在研究对象的表皮或上皮组织上直接涂上或展开组合物,或通过“贴片”进行经皮施用。这类组合物包括如乳液,霜,溶液,凝胶和固体。这些局部用组合物可含有有效量,通常是至少约 0.1%,甚或是约 1%~约 5%的本发明的药剂。局部施用的适合的载体通常以连续膜的形式留置于皮肤上,并可防由汗或水

的浸入而被除去。通常，载体的本性是有机的，并能够在其中分散或溶解治疗药剂。载体可包括药学上可接受的润滑剂，乳化剂，增稠剂，溶剂等。

下面提供的工作实施例对本公开为示意性而非限制性的。在这些实施例中采用的科学方法的各种参数值下面做了详细描述并为在广泛意义上
5 实施本公开提供指导。

实施例

实施例 1

10 从 UMR cDNA Resource Center, Rolla, MO 购得在 pcDNA3 中 G-蛋白质 $G\alpha_A$ 和 $G\alpha_B$ 的 cDNAs。按已描述那样通过 PCR 在 pcDNA3 中克隆全长人 PS-1 和 PS-2 cDNAs。PS-1 和 PS-2 的无尾构建物在 pcDNA3 中构建，pcDNA3 中仅紧随最后的 TM-结构域的 PS-1 或 PS-2 的胞质结构域被删除（该构建物包含 PS-1 的氨基酸 1-430 以及 PS-2 的氨基酸 1-410）。

15 细胞培养物：ES (PS-1^{-/-}/PS-2^{-/-}) 细胞根据公开的方案进行培养。

转染：ES (PS-1^{-/-}/PS-2^{-/-}) 用 15 μ g 的全长人 PS-1 或 PS-2 的 pcDNA 以及期望的 G-蛋白质的 cDNA 采用脂质转染胺 (Invitrogen) 方法进行瞬间转染。简言之，脂质体转染胺-DNA 溶液置于室温下 30 分钟，与足够的无血清的介质混合并加入到细胞中，细胞质 37 $^{\circ}$ C 的 CO₂ 恒温箱中温育 5 小时，
20 然后向介质中补充血清，且在转染后 12-24 小时收获细胞。

免疫沉淀：转染后 24 小时，除去培养基，将细胞刮在 200 μ l 的缓冲提取缓冲液中。通过超声法来制备全细胞提取物，使用的是 Smine 等人（50mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 1mM EDTA, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, 60 mM 辛基糖苷和蛋白酶抑制剂）的溶解条件。使用对 PS-1 的大环
25 (MAB5232) 或 PS-2 的大环 (MA1-754) 的单克隆抗体来对 100 μ g 的各提取物进行免疫沉淀。然后，免疫沉淀的蛋白质在 12% SDS PAGE 上被分离并转移至膜。然后进行对 G-蛋白 G_o 的抗体 (K-20, sc-387, 购自 Santa Cruz

Biotechnology, 亲和纯化的; 这种多克隆抗体识别 G_{oA} 和 G_{oB})的蛋白印迹分析杂交。

5 蛋白印迹分析杂交: 将在负载缓冲液(50 mM Tris, pH 6.8, 0.1 M DTT, 2% SDS, 0-1%溴酚蓝, 10%丙三醇)中的免疫沉淀的蛋白质煮沸 5 分钟, 在 SDS-PAGE (12%)凝胶上电泳分离, 并将蛋白质转移到硝化纤维素滤膜上。滤膜用第一多克隆兔 G-蛋白抗体进行温育, 然后用辣根过氧化物酶-缀合的羊抗-兔 IgG 进行温育。结合至滤膜上的过氧化物酶活性通过化学发光检测。

10 G-蛋白 G_o 对 PS-1 ES ($PS-1^{-}/PS-2^{-}$)细胞的结合被全长人 PS-1 的 cDNA 和 G-蛋白 G_{oA} 或 G_{oB} 的 cDNA 瞬间转染 (UMR GDNA Resource Center, Rolla, MO)的 cDNA 上。转染后 24 小时, 通过超声法来制备全细胞提取物, 使用的是 Smine 等人 (50mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 1mM EDTA, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, 60 mM 辛基糖苷和蛋白酶抑制剂) 的溶解条件。使用对在 7-TM 模型中处于细胞外的大环(Mab # 5232, Chemicon, 其中
15 先前发表的工作中使用过)的单克隆抗体来对 100 μ g 的各提取物进行免疫沉淀。然后, 免疫沉淀的蛋白质在 12% SDS PAGE 上被分离并转移至膜。然后进行对 PS-1 和 G_o (K-20, sc-387, 购自 Santa Cruz Biotechnology, 亲和纯化的; 这种多克隆抗体识别 G_{oA} 和 G_{oB})抗体的蛋白印迹分析杂交。

20 G-蛋白 G_o 对 PS-2:ES ($PS-1^{-}/PS-2^{-}$)细胞的结合被全长人 PS-2 cDNA 和 G-蛋白 G_{oA} 或 G_{oB} cDNA (UMR GDNA Resource Center, Rolla, MO)瞬间转染。转染后 24 小时, 通过超声法来制备全细胞提取物, 使用的是 Smine 等人 (50mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 1mM EDTA, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, 60 mM 辛基糖苷和蛋白酶抑制剂) 的溶解条件。使用对 PS-2 的大环的鼠单克隆抗体 (MA1 -754, 购 Affinity BioReagents)来对 100 μ g 的各
25 提取物进行免疫沉淀。然后, 免疫沉淀的蛋白质在 12% SDS PAGE 上被分离并转移至细胞膜。然后进行对 PS-2 和 G_o 抗体的蛋白印迹分析杂交。

百日咳毒素处理: PTx 助剂与 10 mM DTT 在 37 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟使其转化成它的酶活跃形式。在用 PS-1 或 PS-2 以及 G-蛋白 cDNA 对 ES 细胞转染 5 小时后, 将 500 ng/ml 的活化的 PTx 在 1 mM NAD, 2 mM $MgCl_2$ 和

1 mM EDTA 存在下加入培养基中的细胞中，并在 5% CO₂ 存在下在 37°C 温育细胞 12 小时。然后收获细胞并按如下所述检验 [³⁵S] GTPγS 掺入。

GTPγS 结合：收获细胞并通过超声法在溶解缓冲液（50mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 1mM EDTA, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, 60 mM 辛基糖苷, 1×蛋白酶抑制剂混合物）中溶解蛋白质。100μg 的蛋白质与等体积的缓冲液 B (50mM HEPES/NaOH pH 7.4, 40μM GDP, 50mM MgCl₂, 100mM NaCl) 在 200μl 体积中混合。用 50 nM [³⁵S] GTPγS (1250 Ci/mmol) 使反应开始，并在室温下进行温育 60 分钟，然后通过加入 20μl 的 10×停止缓冲液(100 mM Tris-Hcl, pH 8, 25mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 20 mM GTP) 来终止反应。然后用抗-PS-1 环单克隆抗体(5 μl)对样品进行免疫沉淀。将该抗体-蛋白质复合物在室温下结合至蛋白质 A/G 琼脂糖上 90 分钟并用清洗缓冲液 1 (50 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM EDTA, pH 8.0, 1% Triton X-100 1×蛋白酶抑制剂混合物, 150 mM NaCl 和 60 mM 辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷)清洗两次，并分别用漂洗缓冲液 2(50 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM EDTA, pH 8.0, 0.5% Triton X-100, 1×蛋白酶抑制剂混合物和 50 mM NaCl)和 3(50 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM EDTA, pH 8.0 和 1×蛋白酶抑制剂混合物)清洗一次。然后将洗过的琼脂糖小珠悬浮于闪烁液(CytoScint, ICN) (5 ml)中并在 Beckman Coulter LS 6000 SC 闪烁计数器中计数 3 分钟。

当 100μg 用全长人 PS-1 和 G-蛋白 G_{α_{0A}} 或 G_{α_{0B}} 的 cDNAs 共转染的 ES (PS-1^{-/-}/PS-2^{-/-}) 细胞提取物用对 PS-1 的大亲水环的 Mab 免疫沉淀后，用 G₀ 的亲纯化的多克隆抗体（其识别 G_{0A} 和 G_{0B} 两种同种型）进行蛋白印迹分析杂交时，仅 PS-1/G_{0A} 共转染的细胞给出~45kDa 的 G₀ 的有力信号（图 1，泳道 3），说明是 G_{0A} 而不是 G_{0B} 结合至 PS-1。对照的未转染的细胞或单独用 PS-1 转染的细胞在经相同处理的蛋白印迹分析中没显示出 G₀ 带（图 1）。

G-蛋白 G₀ 对 PS-1 胞质羧基端的结合确认。在 pcDNA3 中构建出 PS-1 的无尾构建物，在 pcDNA3 中仅紧靠最后 TM-结构域的 PS-1 的胞质结构域被删除（该构建物包含氨基酸 1-430）。该构建物被用于转染 ES (PS-1^{-/-}/PS-2^{-/-}) 细胞。已发现无尾的 PS-1 插入细胞膜并在细胞表面被表达。

在与上面描述的全长 PS-1 相同的策略中, ES (PS-1^{-/-}/PS-2^{-/-})被无尾 PS-1 和 G-蛋白 G α_{oA} 或 G α_{oB} 的 cDNAs 共转染。然后细胞提取物用 PS-1 环 Mab # 5232 进行免疫沉淀, 在 SDS PAGE 上分离并用 G $_o$ 的抗体进行蛋白印迹分析。

- 5 100 μ g 用无尾 PS-1 和 G-蛋白 G α_{oA} 或 G α_{oB} 的 cDNAs 共转染的 ES (PS-1^{-/-}/PS-2^{-/-})细胞提取物用对 PS-1 的大亲水环的 Mab 免疫沉淀后用 G $_o$ 的亲纯化的多克隆抗体 (其识别 G $_{oA}$ 和 G $_{oB}$ 两种同种型) 进行蛋白印迹分析杂交时。检测到了结合 (图 1, 泳道 6), 说明早先确认为结合结构域的羧基端 39 氨基酸不构成 PS-1 对 G $_{oA}$ 的完整结合域。而 G $_{oB}$ 对无尾 PS-1
- 10 未显示出结合 (图 1, 泳道 7)。

使用无尾构建物来消除与 PS-1 结合的 G $_{oA}$ 主要部分带来的结果显示出一一些 PS-1:G $_{oA}$ 对包括 PS-1 尾以外的另外结构域的结合的特异性。它们还排除了 G $_{oA}$ 可能结合至 PS-1 β -分泌酶复合物这种用 PS-1 抗体进行免疫沉淀了的其他组分的可能性。

- 15 进行了另外的研究来探明 G-蛋白 G $_o$ 对完整 PS-2 的结合。被确认为结合结构域的 39 氨基酸 PS-1 的 C-末端结构域在 PS-2 的 C-末端尾是完全保守的。因此, 认为 PS-2 的 C-末端结构域也应与 G α_o 发生结合。与 PS-1 相同, G $_o$ 显示出对 PS-2 的结合, 但两者存在截然不同的差别。识别 G $_{oA}$ 和 G $_{oB}$ 两者的 G $_o$ 抗体在用 PS-2 和 G $_{oA}$ 以及 PS-2 和 G $_{oB}$ cDNAs 共转染的细胞
- 20 提取物的 PS-2 免疫沉淀物的蛋白印迹分析中显示出双带。据推测, 该双带可能代表 G $_o$ 的两种同种型对 PS-2 的结合 (图 3, 泳道 2 和 4)。对比之下, PS-1 并不结合至 G $_{oB}$ (图 1, 泳道 4) 并且在使用相同 G $_o$ 抗体的蛋白印迹分析仅显示出单带 (图 1, 泳道 3)。

- 对 G-蛋白 G $_o$ 对 PS-2 的胞质羧基端的结合进行了研究。对 PS-1, 在
- 25 pcDNA3 中构建出 PS-1 的无尾构建物, 在 pcDNA3 中仅紧靠最后 TM-结构域的 PS-1 的胞质结构域被删除 (该构建物包含氨基酸 1-410)。该构建物被用于转染 ES (PS-1^{-/-}/PS-2^{-/-})细胞, 并显示出插入细胞膜并在细胞表面被表达 (图 2)。在与上面描述的全长 PS-1 和 PS-2 相同的策略中, ES (PS-1^{-/-}/PS-2^{-/-})被无尾 PS-2 和 G-蛋白 G α_{oA} 或 G α_{oB} 的 cDNAs 共转染。然

后细胞提取物用 PS-2 环 Mab # MA1-754 进行免疫沉淀，在 SDS PAGE 上分离并用 G_o 的抗体进行蛋白印迹分析。

当与 G_{oA} 共表达的无尾 PS-2 用 PS-2 Mab 进行免疫沉淀并用抗 G_o 抗体进行蛋白印迹分析时，与 PS-1 的结果一样，带强度出现减弱，但带并没有完全消失。在另一方面， G_{oB} /PS-2 CO-共转染样品中的带强度对无尾样品没有改变，这说明 G_{oB} 在细胞内结构域而不是羧基端尾结合至 PS-2 (图 3, 泳道 3 和 5)。因此，PS-1 和 PS-2 不仅通过它们所结合的 G_o 同种型相区别，而且还通过在 PS-1 和 PS-2 上的相互不同源的结合位点相区别。因此，对 PS-1 和 PS-2 的功能研究看似将给出十分不同的结果，即 PS-1 和 PS-2 不仅仅是功能上冗余的蛋白质。

对 PS 介导的 $G_{\alpha_{oA}}$ 和 $G_{\alpha_{oB}}$ PS-1 以及 G-蛋白 G_{oA} 和 G_{oB} 的功能性活化进行了另外的研究。早先的研究使用了 GTP 水解和 GTP γ S 结合作为评价 G_o 与 PS-1 的羧基末端结合的几种独立方法中的一种。然而，他们使用了在 PS-1 的 C-末端内的残基 429-467 的合成的肽以及三种对照肽来进行此分析。该方法在另一方面是通过分析 35 S-GTP γ S 整合到细胞提取物来评价共转染的细胞中 G-蛋白 G_{oA} 和 G_{oB} 结合完整 PS-1 和 PS-2 的功能性后果。

35 S-GTP γ S 对用 PS-1 和 G-蛋白 G_{oA} 的 cDNAs 共转染的 ES 细胞提取物的掺入为对照的未转染的 ES (PS $^{-/-}$) 细胞获得的值得 700% 以上 (图 4, 泳道 2)。这一增加在用 PS-1 和 G_{oA} 的 cDNAs 转染的细胞首先用 PTx 处理的情况下未观察到 (图 4, 泳道 3)，表明在毒素存在下显示出对功能的抑制。在另一方面，用 PS-1 和 G_{oB} 的 cDNAs 转染的细胞未显示出有 35 S-GTP γ S 掺入 (图 4, 泳道 4)，这与早先无 G_{oB} 结合至 PS-1 的结果相符。

与 PS-1 相同，PS-2 当与 G_{oA} 共表达且分析 35 S-GTP γ S 结合时显示出在 35 S-GTP γ S 结合上比未转染的对照 ES (PS $^{-/-}$) 提取物出现大于 700% 的增加 (图 4, 泳道 2)。这在 PTx 存在时被抑制 (图 4, 泳道 3)。与 PS-1 的情况不同， G_{oB} 对 PS-2 的结合在 35 S-GTP γ S 掺入中显示出增加。这一新发现与这里提供的其他数据相符，表明 G_{oB} 结合至 PS-2 而非 PS-1。在 35 S-GTP γ S 掺入中的增加比在 G_{oA} 中观察到的增加小 (约 300%) (图 4, 泳

道4)。这一增加在PTx存在时被抑制。图4中所示的结果代表至少3个独立实验。

实施例 2

5 ES PS 双裸细胞被隔夜培养和涂平板。用全长人 β -APP cDNA 的 pcDNA3 构建物根据生产商的协议采用脂质转染胺 (Invitrogen)法对细胞进行转染。培养 DAMI 细胞, 并用 pcDNA3 或全长人 PS-1 或 PS-2 cDNA 的 pcDNA3 构建物进行转染。

亲和纯化的多克隆兔抗-Ptyr 抗体(Maher 等人, 1985)被用于蛋白印迹
10 分析, 这是由 Dr. Elena Pasquale 提供的馈赠物。在 ELISA 分析中使用了鼠单克隆抗-Ptyr 抗体(4G10; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)。对人 pp60c-src 的鼠单克隆抗体(抗-Src, 克隆 GD11)和对 Lyn 的兔多克隆抗体(抗-Lyn)购自 Upstate Biotechnology。对 Fyn 的兔多克隆抗体(抗-Fyn, sc-16) 购自 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA。针对 PS-2 的 N-末端结构域的第一大鼠抗-人 PS-1 单克隆抗体 MAb #1563 购自 Chemicon International,
15 Temecula, CA。它由融合至 GST 的人 PS-1 的 N-末端结构域(残基 21-80)融合蛋白质抗原部分产生。针对人 B-APP 细胞外结构域的第一鼠单克隆抗体 MAb #348 购自 Chemicon International。

异硫氰酸荧光素(FITC) -缀合的亲和纯化的羊抗-鼠 IgG 和四甲基若丹
20 明 B 异硫氰酸酯(tetramethyl rhodamine B isothiocyanate) (TRITC) -缀合的亲和纯化的驴抗-鼠 IgG 二抗购自 Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA。免疫荧光标记的转染的和未转染的 DAMI 细胞用在 PBS 中的 4%的多聚甲醛固定 10 分钟, 且不经透化而使用。室温下细胞用含有 PS-1 的抗血清(1:200 稀释), 以及 1%BSA 的 PBS 中的 β -APP (1:500 稀释) 的悬浮液中
25 标记 30 分钟。通过离心用 PBS 洗涤 3 次后, 将细胞重新悬浮于 1% BSA/PBS 中, 并用适合的荧光二抗温育。温育在室温下进行 20 分钟, 之后, 用 PBS 洗涤细胞, 并在有封固剂(Vector Laboratories, Burlingame, CA)存在下封固到载玻片。

免疫荧光显微镜法使用 60 倍物镜的油浸进行操作。载片用异硫氰酸荧光素和四甲基若丹明 B 异硫氰酸酯滤膜和 Zeiss 透视镜 III 仪器, 或用诺马斯基 (Nomarski) 光学器件观察。

5 PS-1 和 PS-2 的 N-末端结构域的通过 PCR 获得并克隆进 FLAG 表达载体 (Scientific Imaging Systems, IBI 13100) 的 Tth 111 I 和 Xho-1 位点, 以产生有 FLAG 连接在 PS-1 的 N-末端或 PS-2 的 N-末端融合蛋白质。这两种 FLAG-融合蛋白质独立地在 DH5 α 细菌中生长并根据生产商的协议进行亲和纯化。纯化后的重组蛋白质用对 FLAG 和 PS-1 或 PS-2 的 N-末端结构域的抗体通过蛋白印迹分析检验。

10 DAMI :ES 细胞:相等数目 (0.5×10^6 /ml) 的 β -APP 695 (Selkoe and Podlisny, 2002)-转染的 ES 双裸细胞和 PS-1 转染的 DAMI 细胞中 37 °C 下共培养, 培养的时间在 0-20 分钟内变动。

15 图 7 中所示实验之后的所有实验 (除图 9a, 板 4 外) 均仅用适合的转染的 DAMI 细胞进行。相等数目 (0.5×10^6 /ml) 的 β -APP 转染的 DAMI 细胞和 PS-1 或 PS-2 转染的 DAMI 细胞在室温下完全按照 Dewji 和 Singer, 1998 中的描述轻轻混合。在对照实验中, 单独用 pcDNA3 转染的 DAMI 细胞代替 β -APP 转染的细胞。

20 混合后在 1-20 分钟之间的几个时刻, 迅速对每个细胞混合物的试样量进行离心分离, 除去培养基, 并将细胞沉淀悬浮于 200 μ l 提取缓冲液 (50mM Tris, pH 8.0/150mM NaCl/0.5% Nonidet-P40) 中, 该缓冲液含蛋白酶抑制剂 (1mM 4- (2-氨基乙基) 苯磺酰氟盐酸盐 (AEBSF) / 1μ g/ml 抗蛋白酶/0.1 μ g/ml 胃蛋白酶抑制剂 A/0.1 μ g/ml 亮抑蛋白酶肽) 和磷酸酶抑制剂正钒酸钠 (0.1mM)。混合物用三次 20 秒间隔进行超声, 然后进行离心分离。这些提取的上清液随后用于如下所描述的蛋白印迹分析和 ELISA 分析。

25 对细胞提取物中的蛋白酪氨酸激酶的 Src 家族进行分析。底物肽 { [Lys19] cdc2 (6-20) -NH₂ } 和对照肽 { [Lys19Ser14Val12] cdc2 (6-20) } 以及 { [Lys19Phe15] cdc2 (6-20) } 购自 Upstate Biotechnology Inc。Src 激酶活性在与 (β -APP 或 pcDNA3 转染的) 的 DAMI 细胞 和 PS-1-转染细胞的提取物中测量; 以及用与 PS-2-转染的细胞混合的 β -APP 或 pcDNA3 转染的细

胞, 使用所有的3种肽测量。包含对照的实验在反应混合物中无底物的情况下进行。

底物肽(1.5mM, 10 μ l), Src 激酶反应缓冲液(100mM Tris-HCl, pH 7.2, 125 mM MgCl₂, 25 mM MnCl₂, 2 mM EGTA, 0.25 mM 正钒酸钠, 2mM DTT) 5 (10 μ l), 10 μ l Src 激酶(每次分析 2-20 U 纯化的酶或 10 - 200 μ g 蛋白质裂解产物, 以及用 Mn²⁺/ATP 混合物(10 μ l) 稀释的[γ -³²P]ATP (NEN Dupont, Boston, MA), 在 30⁰C 下温育 15-20 分钟。

将等份上述提取上清液(100 μ g 蛋白质/泳道)在加样缓冲液(50 mM Tris, pH 6.8, 0.1 M DTT, 2% SDS, 0.1%溴酚蓝, 10%丙三醇)中沸腾 5 分钟, 10 在 SDS-PAGE (10%)凝胶上电泳分离, 并将蛋白质转移到硝化纤维素滤膜上。滤膜与第一多克隆兔抗- P_{tyr} 抗体一同温育后, 与辣根过氧化物酶-缀合的羊抗-兔 IgG 温育。滤膜结合的过氧化物酶用化学发光检测。

细胞裂解产物在提取缓冲液中制备, 并在 4⁰C 下通过微离心分离 15 分钟澄清。

15 提取物用 4 μ g 对 c-Src, Lyn 或 Fyn 为特异性的抗体进行温育, 然后用蛋白-A 或 G 琼脂糖凝胶(40 μ l 浆液) 温育。在含 300 mM NaCl 的 RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1%脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 1%抑肽酶, 25 μ M 亮抑蛋白酶肽)中洗抗原抗体-蛋白-A (或-G) 琼脂糖凝胶复合物 3 次, 用含 10 mM NaCl 的 RIPA 洗一次, 用 40 mM Tris-HCl, 20 pH 7.2 洗两次, 以及用含 25mM HEPES, pH 6.9, 3 mM MnCl₂ 和 200 μ M 正钒酸钠的激酶缓冲液洗一次。

根据出版的手册 (Zisch 等人, 1998)在 40 μ l 含 5 μ Ci [g³²P] ATP (3000Ci/mmol)的激酶缓冲液 (25 mM Hepes, pH 6.9, 3 mM MnCl₂ 和 200 μ M 正钒酸钠)中在 37⁰C 下反应 30 分钟。反应珠用激酶缓冲液洗 3 次, 25 并重新悬浮于 75 μ l SDS 凝胶加样缓冲液(250mM Tris- HCl, pH 6.8, 4% SDS, 10% 2-巯基乙醇, 0.02%溴酚蓝和 75%丙三醇)中。将自身磷酸化反应物进行 SDS-PAGE, 随后将蛋白质转移到 PVDF 膜上进行放射自显影。

ELISAs 蛋白酪氨酸激酶活性通过酶联免疫吸附测定(ELISA)使用酪氨酸激酶试剂盒(Upstate Biotechnology)进行测定。含聚(Glu4-Tyr)的串联重复

序列的生物素化的底物肽与转染的混合细胞的提取物的上清液在有非放射的 ATP 和 Mn^{2+}/Mg^{2+} 辅因子混合物存在下根据生产商的协议混合不同的时间(20 μ g 蛋白质/孔)。使用缀合至辣根过氧化物酶的磷酸酪氨酸特异地鼠单克隆抗体(4G10) 通过 ELISA 检测磷酸化的底物。

5 在未转染的和 PS-1-转染的 DAMI 细胞中缺少 β -APP 的细胞表面表达。由于最初的一些研究基于的主张是 DAMI 细胞在用 PS-1 转染后，在它们的表面仅持续表达可忽略量的 β -APP，以下的实验是首次进行的。处于固定但不可渗透的状态的未转染的和 PS-1-转染的 DAMI 细胞进行 β -APP 和 PS-1 的双免疫荧光标记。如早先所公开的 (Querfurth and Selkoe, 1994)，
10 未转染的固定的不可渗透的 DAMI 细胞在细胞表面不表达显著量的 β -APP (图 6a, 板 2)，而用 β -APP 的 pcDNA3 构建物转染的 DAMI 细胞中固定的不可渗透到细胞中显示出相当程度的细胞表面表达 (图 5b, 板 2)。然而，图 6a 和 6b, 板 1 显示出未转染的固定的不可渗透的 DAMI 细胞表达内源性细胞表面 PS-1。在图 5c, 板 1 中，这种 PS-1 的细胞-表面表达在固定的
15 不可渗透的 PS-1-转染的细胞中增强。图 5c, 板 2 中显示出用 PS-1 转染的 DAMI 细胞相对于在未转染的细胞中可忽略的水平 (图 5a, 板 2) 而言，没有显著增加了 β -APP 的细胞表面表达。图 2d, 板 2 显示出在用 β -APP 转染的 ES 双裸固定的不可渗透的细胞中的 β -APP 的细胞表面表达，但不是 PS-1 表达 (图 5d, 板 1)。

20 正如预期那样，用未转染的固定的不可渗透的 ES 双裸细胞时，无细胞-表面 PS-1 标记 (图 5e, 板 1)，但有少量的内源性 β -APP 的表面表达 (图 5e, 板 2)。这些结果证实了在 β -APP-转染的 ES 双裸细胞与 PS-转染的 DAMI 细胞之间的相互作用中，只有 ES 细胞表达细胞表面 β -APP，而不表达 PS；而只有 PS-转染的 DAMI 细胞在细胞表面表达 PS，而不表
25 达 β -APP。如果 β -APP: PS 相互作用发生在细胞混合之后，则其将仅是细胞-细胞相互作用的结果。

另外，这里提供的数据表明，特异性的 β -APP: PS 细胞间信号转导导致酪氨酸激酶活性的增加。用 β -APP 转染的 ES 双裸细胞与用 PS-1 转染的 DAMI 细胞混合，并在 0-20 分钟内共培养的不同时间，其中使用了确

保细胞-细胞接触的细胞密度。然后对细胞提取物进行 ELISA 分析以测量蛋白酪氨酸激酶活性。图 6a 示出了这些共培养物在蛋白酪氨酸激酶活性上产生迅速而短暂的增加，这与早先描述的当 PS-1-转染的 DAMI 细胞与 β -APP-转染的 DAMI 细胞混合时(Dewji 和 Singer, 1998)的情况在程度和动力学上相似。当在 25 μ g 纯化的杆状病毒来源的可溶性 β -APP (β -APP 的细胞外结构域) (图 6b) 或 25 μ g 融合至 PS-1 的 N-末端结构域的 FLAG 报道分子的融合肽 (图 6c) 的存在下进行与图 6a 中的相同的相互作用时，没有导致在蛋白酪氨酸激酶活性上的增加。在另一方面，在 25 μ g 融合至 PS-2 的 N-末端结构域的 FLAG 报道分子的融合肽 (图 6d) 的存在下相同的 β -APP:PS-1 共培养物未抑制 P_{tyr} 形成 (图 2d)。这些结果清楚地说明了几点：1) 可溶性 β -APP 自身不会激发 PS-1-转染的 DAMI 细胞来显示酪氨酸激酶活性；需要在转染的 ES 细胞膜中的完整 β -APP。相反方面，可溶性 β -APP 抑制由膜结合的 β -APP 产生的活性，表明膜结合的 β -APP 在激活中被具体涉及；2) PS-1 的 N-末端结构域本身不能够激活 β -APP-转染的细胞来显示出酪氨酸激酶活性。需要完整的 PS-1 分子在它的 DAMI 细胞膜中。但是 PS-1 (不是 PS-2) 的 N-末端结构域对共培养物的活化形成抑制，这说明在 PS-1 转染的 DAMI 细胞上的膜结合的 PS-1 也在相互作用中被具体涉及；3) 可溶性 β -APP 和 PS-1 的 N-末端结构域的 FLAG-融合蛋白这些抑制剂的蛋白质本性确保了它们对活 DAMI 和 ES 细胞的细胞膜的不可渗透性，从而证明仅细胞表面 β -APP 和 PS-1 的外部结构与涉及到信号转导事件 (即信号转导是近分泌类型的) 的产生中。这些结果提供了有力的证据来确定在 β -APP 和 PS 之间可发生近分泌的相互作用。

另外，这还证明了 PS-1 的 N-末端结构域被暴露在细胞外表面，这与 PS 蛋白质的 7-TM 拓扑一致，但与 PS 的 N-末端结构域位于细胞内的 8-TM 模型的预测不符。

这里提供的另外的数据指明 β -APP:PS-1 和 β -APP:PS-2 细胞间信号转导可通过酪氨酸激酶的 Src 家族成员介导。由 β -APP:PS 细胞间结合引起的 P_{tyr} 变异的增加涉及一种或多种需要被确认的蛋白酪氨酸激酶。由于 β -APP 和 PS 蛋白质均不含这种激酶活性位点，因此这些蛋白质的胞质结

构域的间接活性，如胞质酪氨酸激酶对这些结构域的直接或间接的结合可能在下游信号中被涉及。由于几个胞质酪氨酸激酶已在 Src 基因家族内鉴定，Src 家族蛋白酪氨酸激酶使用底物肽 [Iys19] cdc2 (6-20) -NH₂ (KVEKIGTYGVVKK) 在混合的转染细胞的细胞提取物中测定。cdc2 (6-20) 中的 Tyr 19 被 lys 取代后，这种肽成为 Src 家族激酶的有效底物。包括 v-Src 和 c-Src, c-Yes, Lck, Lyn 和 Fyn 在内的所有被测试的 Src 家族激酶均显示出对该底物具有强的活性。还使用了两种对照肽：在第一种肽中，[Iys19ser14val12] cdc2 (6-20) NH₂ (KVEKIGVGSYGVVKK)，glu12 和 thr14 分别被 val 和 ser 取代，从而导致所得肽在 Src 家族酪氨酸激酶底物的有效性的显著降低。其他的肽 [Iys19phe15] cdc2 (6-20)NH₂ (KVEKIGEGTFGVVKK) 应当不会被酪氨酸激酶磷酸化，但含有 ser/thr 激酶 (thr 14) 的潜在靶。

在诱发 β -APP: PS-1 相互作用的 β -APP-转染的 DAMI 细胞和用 PS-1-转染的 DAMI 细胞的共培养物的提取物以及相应的缺少 β -APP (pcDNA3 : PS-1) 的对照，其 Src 家族激酶活性测量的结果示于图 7a 和 b 中。使用三种肽，对诱发 β -APP:PS-2 相互作用的转染的 DAMI 细胞混合物以及对照 pcDNA3:PS-2 与转染的 DAMI 细胞的混合提取物，用这三种肽获得了类似的结果，如图 7c 和 d 中所示。对每种 β -APP:PS 细胞混合物，其中 [Iys19] cdc2 (6-20)NH₂ 被用作 Src 家族激酶底物，获得了相比对照肽活性增加的时间历程，这与酪氨酸激酶活性的 ELISA 结果平行。对于 β -APP:PS-1 相互作用 (图 7a)，Src 家族激酶活性在 8 分钟时达到峰值，在 12 分钟内返回基线水平，确认了早先的 ELISA 结果，即酪氨酸激酶活性是细胞混合后的时间函数。当对对照 pcDNA3:PS-1 (图 7b) 混合的细胞使用相同的底物时，没有观察到显著的增加。对与诱发 β -APP:PS-2 相互作用的细胞混合物 (图 7c)，如酪氨酸激酶活性的 ELISA 结果中，用底物肽 [Iys19] cdc2 (6-20) NH₂ 在混合后的 9 和 16 分钟观察到的两个清晰的活性峰。

对于缺少 β -APP，pcDNA3:PS-2 (图 7d) 的相应的对照，未观察到 Src 激酶活性相较于背景的显著增加。这些结果表明，早先在 β -APP-与

PS-1-转染的细胞混合物，或 β -APP-与 PS-2-转染的细胞混合物中观察到的酪氨酸激酶活性的增加涉及 Src 酪氨酸激酶家族中的一个或多个成员。

在 Src 家族激酶和酪氨酸激酶的特异性抑制剂存在下对酪氨酸激酶活性的抑制。Src 激酶家族涉及 β -APP:PS 细胞间信号转导经 β -APP:PS-1 混合细胞相互作用的提取物的 ELISA 得到进一步证实，其中 ELISA 是在有 5 无酪氨酸激酶的特异性抑制剂（除莠霉素 A）和 Src 家族激酶的特异性抑制剂（PP2）存在下进行的。图 8a 示出在 10 μ g/ml 除莠霉素 A 存在下，在混合 β -APP-转染的 DAMI 细胞和 PS-1-转染的 DAMI 细胞后的 8-10 分钟，酪氨酸激酶活性的增加被完全抑制。在 10nM PP2 存在下（图 8b）进行的 10 相同实验也类似地显示出对酪氨酸激酶活性的抑制。

下面提供与 c-Src 涉及于 β -APP: PS-1 细胞间信号转导相关的另外的数据。为了确认涉及 β -APP: PS-1 细胞间信号转导中的 Src 家族成员的同源性，我们开始研究 pp60c-Src。在这一邻分泌相互作用中，表观分子量为 58 和 60 kDa 的两个主要蛋白质带，其与 c-Src 的双带在大小上类似，经历了瞬 15 间的 P_{tyr} 变异。当 PS-1-t 转染的 DAMI 细胞与 β -APP-转染的 DAMI 细胞混合物的提取物经 SDS16 PAGE 和用抗-P_{tyr} 或抗-c-Src 抗体进行免疫印迹分析时，两种抗体均与这两个带反应（图 9a，板 1-3）。该图中用抗-P_{tyr} 抗体进行了免疫印迹的板 1 酪氨酸磷酸化上出现短暂增加，在细胞混合后的 8-10 分钟磷酸化最大。在板 2 中，用 c-Src 抗体进行了免疫印迹的相同 20 提取物未显示出随时间发生改变，说明 c-Src 蛋白质浓度在它的 P_{tyr} 水平增加期间保持不变。观察到的一个重要方面是当用 β -APP 转染的 ES 双裸细胞（因而仅表达 β -APP，而不表达 PS-1 或 2）与用 PS-1 转染的 DAMI 细胞（因而仅表达 PS-1，而不表达细胞表面 β -APP）混合时，p60 c- Src 蛋白质和一个或两个另外的蛋白质在混合后的类似时间点 P_{tyr} 修饰经历了 25 短暂的增加（图 9a，板 4），这在与 PS-1-转染的 DAMI 细胞混合 β -APP-转染的 DAMI 细胞中观察到（图 9a，板 1）。因此，P_{tyr} 修饰结果与 PS-1 相关，而不与表达它的细胞类型相关（对 PS-2 见下面的描述）。

为了进一步检验是否 c-Src 为在 β -APP: PS-1 相互作用中经历了短暂酪氨酸磷酸化作用的酪氨酸激酶家族成员，进行了以下实验（自身磷酸化），

其中在混合后不同时刻取的混合的转染 DAMI 细胞提取物用抗-c-src 抗体处理，随后用蛋白-G 琼脂糖凝胶珠处理。然后，向珠上加入 γ^{32} PATP，随后，该蛋白质从珠上溶解，并进行 SDS17 PAGE 和放射自显影。图 9b 中的结果显示在细胞混合后 8-10 分钟出现磷酸化作用最大化的几条瞬间带，这一时间过程与类似提取物中 P_{tyr} 的出现对应（图 9a，板 1）。这些带中突出的一个是对应于 c-Src 的双带，从而证实了 c-Src 在 β -APP: PS-1 细胞间相互作用中被瞬间活化。

对图 9b 中的其他磷酸化的带的同一性未知。并不是所有的这些均由酪氨酸磷酸化作用所致；一些丝氨酸或苏氨酸激酶可能结合至与特异性抗 -pc-Src 进行免疫反应的 c-Src 上。Lyn 而非 Fyn 涉及 β -APP: PS-2 细胞间信号转导下游。当 β -APP:PS-2 细胞间相互作用用适合的转染 DAMI 细胞混合物进行时，完全不同的一组蛋白质是修饰 P_{tyr} 而不是 β -APP: PS-1 系统。尽管带由在 50-66kDa 的 Try 抗体检测，但它们不对应于蛋白质印迹上的 c-Src（图 11a，板 11）。另外，当 β -APP:PS-2 混合的细胞提取物首先用 c-Src 抗体进行免疫沉淀，然后离体进行免疫沉淀物的自磷酸化，在较早的时刻（混合后 8-10 分钟）未见磷酸化的显著增强（图 10b）。

然而，在较晚的时刻，c-Src 明显可在这些样品中被磷酸化，表明这归因于确认的 β -APP:PS-2 信号转导中的第二个靠后峰的增加（图 10b）。用分子量在 53-59 kDa 范围的除 c-Src 外的其他激酶来研究 Src 激酶家族其他成员的可能的参与。Lyn (Mwt 53/56 kDa) 和 Fyn (Mwt 59 kDa) 是两种被检验的候选 Src 激酶。

图 11a 中所示的用抗-Lyn 抗体进行的蛋白质印迹杂交结果显示，当发生 β -APP: PS-2 细胞间相互作用时，Lyn 蛋白质浓度没有改变，但在用抗 Lyn 抗体进行提取物免疫沉淀和沉淀物的离体自磷酸化后，观察到在 8-9, 17-18 分钟时 Lyn 的瞬间磷酸化的活性峰，以及其他的磷酸化的带（图 11c）。Lyn 经历瞬间磷酸化的模式与 β -APP:PS- 2 相互作用的蛋白质印迹分析和 ELISAs 中看到的 P_{tyr} 的增加类似（图 11c）。另一方面，Fyn 在用抗-Fyn 抗体进行免疫沉淀后于相同提取物中未表现出离体的自磷酸化（图 11d），也未随时间而改变它的浓度（图 11b）。

实施例 3

以下数据证明 G-蛋白结合至在鼠额叶皮层提取物中的内源性 PS-1 和 PS-2。在 GTP γ S 溶解/提取缓冲液[50 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1% Triton-X100, 60 mM 辛基糖苷, 1 \times 蛋白酶抑制剂混合物 (1 μ M 苯甲磺酰氟, 1 ug/mL 抗蛋白酶, 0.1 ug/mL 胃蛋白酶抑制剂 A, 0.1 ug/mL 亮抑蛋白酶肽)]中制成 20%野生鼠前额的匀浆。对未处理的, PTX 处理的以及 PS-1 和 PS-2 免疫耗竭的提取物测量 [35 S]GTP γ S 结合。

对未处理的样品, 在 GTP γ S 溶解/提取缓冲液中将 100 μ g 提取物配成 100 μ L, 并与等体积的 GTP γ S 缓冲液 B (50 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 40 μ M GDP, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl)混合至总体积为 200 μ L。反应用 50 nM [35 S] GTP γ S (1250 Ci/mMol; Perkin Elmer)开始并置室温下温育 60 分钟。通过加入 10X 停止缓冲液(100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 20 mM GTP)来终止反应。

对 PTX 处理过的样品, 在 GTP γ S 溶解/提取缓冲液中将 100 μ g 提取物配成 100 μ L, 并在 PTX 缓冲液(20 mM HEPES pH 8.0, 1mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM NAD)存在下用 500 ng/mL 活化的 PTX 处理。样品在 30⁰C 中温育 12 小时。然后将 PTX 处理的样品与等体积的 GTP γ S 缓冲液 B 混合并通过如上所述的 [35 S] GTP γ S 分析。

鼠额叶皮层提取物用 PS-1 和 PS-2 的多克隆抗体 (各 10 μ L) 的混合物在 4⁰C 免疫沉淀过夜以耗尽 S-1 和 PS-2 样品。加入蛋白 A 琼脂糖(20 μ L 浆液/100 μ g 蛋白质), 样品在 4⁰C 翻滚摇动 2 小时。在高速下离心分离 PS-抗体-蛋白 A 复合物 5 分钟。回收上清液, 取 100 μ g 等份按所述进行 [35 S] GTP γ S 测定。

GTP γ S 反应后, 加入 5 μ L 抗- PS-1 或抗- PS-2 单克隆抗体, 并将样品置于 4⁰C 过夜。抗体-蛋白质复合物结合至 20 μ L 蛋白 A/G 琼脂糖 (Pharmacia), 样品在 4⁰C 翻滚摇动 2 小时。琼脂糖珠用清洗缓冲液 1 (50 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM EDTA, pH 8.0, 1% Triton-X100, 1 \times 蛋白酶抑制剂混合物)洗 3 次, 且用清洗缓冲液 2 (50 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM EDTA, pH

8.0, 0.5% Triton- X100, 1×蛋白酶抑制剂混合物)和3(50 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM EDTA, pH 8.0, 1×蛋白酶抑制剂混合物) 各洗一次。然后将洗过的琼脂糖珠悬浮于 5 mL 的闪烁液(CytoScint, ICN)中, 并置 Beckman Coulter LS 6000 SC 闪烁计数器上计数 3 分钟。

5 图 12 示出了 $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ 掺入可与 PS-1 的单克隆抗体免疫沉淀的鼠脑提取物中, 表明 $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ -结合的 G-蛋白与内源性 PS-1 形成共沉积。这一掺入比在通过两种 PS 蛋白的多克隆抗体处理而事先耗尽 PS-1 和 PS-2 的提取物中发现的掺入多 80%, 从而说明了 G-蛋白: PS-1 结合的特异性。用 PTx 处理后将 $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ 掺入抑制了 60%。

10 图 13 示出了鼠脑提取物中 $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ 的掺入, 鼠脑提取物可与 PS-2 的单克隆抗体免疫沉淀, 表明 $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ -结合的 G-蛋白与内源性 PS-2 形成共沉积。这一掺入比在通过两种 PS 蛋白的多克隆抗体处理而事先耗尽 PS-1 和 PS-2 的提取物中发现的掺入的要多 85%, 从而说明了 G-蛋白: PS-2 结合的特异性。用 PTx 处理将 $^{35}\text{S-GTP}\gamma\text{S}$ 掺入抑制了 55%。这些结果证明
15 了特异性的 PTx-敏感的 G-蛋白偶联至内源性的鼠脑 PS-1 和 PS-2。

对应于细胞内环 1 的前 16 个氨基酸序列[ic1 (1-16)], 细胞内环 1 剩余的 16 个氨基酸序列[ic1(17-32)], 全部的细胞内环 2 (ic2) 序列, 全部的细胞内环 3 (ic3) 序列, PS-1 和 PS-2 的胞质 C-末端尾的前 20 个氨基酸序列 (C1-20)和胞质 C-末端尾的剩余的 19 个氨基酸序列(C21-39)将被合成并用
20 HPLC 纯化至纯度>90%。图 14 示出了 PS 的细胞内结构域。表 1 给出了可从这些结构域合成的序列。此外, 合成了 20 个氨基酸的对照肽, 其中肽 C1-20 的序列可被错义。这个肽是确认的 PS-1 上 G_o 结合域的 39 个氨基酸序列的一部分。

表 1

	PS-1 胞质肽	PS-2 胞质肽
ic1 (1-16)	KSVSFYTRKDGQLIYT	KSVRFYTEKNGQLIYT
ic1(17-32)	PFTEDTETVGQRALHS	TFTEDTPSVGQRLNS
ic2	VFKTYNVAVD	EVLKTYNVAMD

ic3	MALVFIKYLPE	(与 PS-1 的 ic3 相同)
C (1-20)	KKALPALPISITFGLVYFA	KKALPALPISITFGLIFYFS
C (21-39)	TDYLVQPFMDQLAFHQFYI	TDNLVRPFMDTLASHQLYI

实施例 4

本研究证明了 PS-1 的 GPCR 功能调节着 A β 的产生。在研究 PS-GPCR 功能中的一个主要问题是确定可从 PS 引发 G-蛋白活性的 PS 特异性配体，
5 该配体细胞间结合 PS。本研究调查了是否是三部分的配体-受体-G-蛋白体系引起 A β 的产生。在该体系中，通过配体(β -APP)结合对 PS 的活化可导致 G-蛋白在胞质结构域内结合至 PS。

为了研究是否 G-蛋白对 PS-1 或 PS-2 的结合影响从 β -APP 产生 A β ，
种百日咳毒素(PTx)存在或不存在下进行了 β -APP 和 PS-1 的细胞-细胞相互
10 作用的实验。PTx 是 G-蛋白 G_o活化的特异性抑制剂。如果 PS 的 GPCR 功能与从 β -APP:PS 细胞间结合产生 A β 有关，则当 PTx 存在时，A β 的产生应当被抑制。

使用上面描述的方法用取自 β -APP^{-/-}鼠 (细胞表达 PS-1 且不产生 β -APP 的鼠)的 PS-1 转染的原代成纤维细胞与 β -APP-转染的 ES (PS^{-/-})细胞
15 (细胞产生 β -APP 且不表达 PS 的细胞)在 ³⁵S-蛋氨酸存在下发生相互作用，进行 β -APP:PS-1 介导的细胞-细胞相互作用。在这些转染的细胞进行共培养 24 小时后，在蛋白酶抑制剂存在下收获样品。对细胞进行超声，且 100 μ g 的全细胞提取物与 A β 的抗体(6E10)进行免疫沉淀，使免疫沉淀的样品通过 Bicene-Tris 凝胶电泳。通过对干凝胶进行放射自显影而使 A β
20 带显现。在 500ng/mlPTx 存在下进行相同的实验。按如下所述对培养的细胞处理 12 小时。PTx 处理的对照，用仅含 ATP 和 NAD 的 PTx 缓冲液温育培养的细胞。在这些条件下，G_o的活化和 A β 水平应当不受影响。

图 15 示出了这些研究的结果。泳道 1 示出了表达 β -APP 的 ES (PS^{-/-})
细胞与表达 PS-1 的成纤维细胞(β -APP^{-/-})进行共培养的结果。泳道 2 示出了
25 用于泳道 1 中的组分在 PTx 和 PTx 缓冲液(NAD + ATP)存在下的结果。

泳道 3 示出了用于泳道 1 中的组分在仅 PTX 缓冲液(NAD + ATP), 而无 PTx 存在下的结果。泳道 4 示出了表达无尾 β -APP 的 ES (PS-/-)细胞与表达无尾 PS-1 的成纤维细胞(β -APP-/-)进行共培养的结果。泳道 5 示出了用于泳道 4 中的组分在 PTx 存在下的结果。泳道 6 示出了野生型的表达 β -APP 的 ES (PS-/-)细胞与表达无尾 PS-1 的成纤维细胞(β -APP-/-)进行共培养的结果。

结果表明 PTx 毒素抑制从 β -APP 和 PS-1 的细胞间相互作用产生 A β (以上的泳道 1 和 2)。泳道 3 示出了在仅存在 PTx 缓冲液而没有 PTx 时 A β 的产生没有受抑制。泳道 4 和 6 示出了当 PS-1 的胞质羧基末端结构域这一早先被认为是 PS-1 上的对 G_o 的结合结构域不存在时, 无 A β 产生。

这里提供的数据指出 β -APP 是 PS-1 的配体, 二者结合后激活它的 GPCR 活性。该数据还指出 PS-1 的 GPCR 功能在 β -APP 与 PS-1 发生细胞间相互作用后从 β -APP 产生 A β 有关。这些结果进一步指出调节 PS-1 的 GPCR 活性也对 A β 的产生进行了调节。因此, 调节 PS-1 的 GPCR 活性的药剂也将调节 A β 的产生。

对共培养实验, ES (PS^{-/-}) 和 β -APP (^{-/-})细胞以 1×10^7 细胞/25cm² 种入烧瓶中并用适合的 cDNAs 转染。转染 5 小时后, 用 β -APP 转染的 ES (PS-1^{-/-}/PS-2^{-/-})细胞通过温和的胰蛋白酶化作用分离, 用含热失活的渗析的 FCS(10% v/v)的无 met 的培养基洗 2 次, 并以 0.33×10^7 细胞/ml 重新悬浮于该培养基中。类似地, 取自 β -APP 敲除鼠的原代成纤维细胞用 PS-1 或 PS-2 共转染, 并以 1×10^7 细胞/25cm² 种盘。转染的细胞用无蛋氨酸的培养基洗 2 次, 并留在 3 ml 无 met 的培养基中。

将 β -APP 转染的 ES (PS-1^{-/-}/PS-2^{-/-})细胞 (1×10^7 细胞/3 ml 无 met 的培养基) 加入 PS-1-转染的 β -APP 敲除细胞中。细胞密度确保几乎所有的细胞均与其他的细胞相接触。加入 ³⁵S-met(66 μ Ci/ml; 1175Ci/mmol, NEN), 温育培养物 24 小时。在进行 PTx 处理的实验中, 在该阶段合适的反应条件下向培养物中加入 500ng/ml PTx 并温育 24 小时。然后除去培养基, 刮擦收获细胞。在干冰上冷冻前向培养基中加入蛋白酶抑制剂混合物。向细胞沉淀中加入 100 μ l 含蛋白酶抑制剂(1mM 4- (2-氨基乙基) 苯磺酰氟盐酸盐

(AEBSF) / $\mu\text{g/ml}$ 抗蛋白酶/0.1 $\mu\text{g/ml}$ 胃蛋白酶抑制剂 A/0.1 $\mu\text{g/ml}$ 亮抑蛋白酶肽)的提取缓冲液(50mM Tris, pH 8.0 / 150mM NaCl / 0.5%乙基苯基聚乙二醇(Nonidet-P40), 样品在干冰上快速冷冻。

PTx 助剂(Biomol Research Laboratories)用 10 mM DTT 在 37°C 温育 10 分钟而将其转化为具有酶活性的形式。用 PS-1 或 PS-2 和 G-蛋白的 cDNAs 转染 ES 细胞 5 小时后, 在 1 mM NAD, 1 mM ATP, 2 mM MgCl₂ 和 1 mM EDTA 存在下, 向培养基中的细胞中加入 500 ng/ml 活化的 PTx。在 5% CO₂ 存在下在 37°C 温育细胞 18 小时。

使用细胞沉淀在冰上进行了 3 次每次脉冲 20 秒的超声制备全细胞提取物。蛋白质浓度根据 Lowry 的方法进行确定。

使用 100 μg 细胞提取物进行免疫沉淀, 该细胞提取物在 4°C 与 2 μg A β 特异的单克隆抗体 6E10 (Senetek)在翻滚转动旋转器中被隔夜免疫沉淀, 单克隆抗体 6E10 产生于 A β (Senetek)的残基 1-17。然后加入 40 μl 蛋白 G 琼脂糖凝胶 (Pharmacia) 浆液并在室温下翻滚混合 1 小时。抗原-抗体-蛋白 G 琼脂糖凝胶复合物用下面每种缓冲液洗一次: 缓冲液 1(10mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, pH 8.0, 0.65M NaCl, 1% NP-40), 缓冲液 2(10mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, pH 8.0, 0.75% NP-40), 和缓冲液 3 (10mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, pH 8.0, 0.1% NP-40)。洗过的复合物在 bicene-tris 样品缓冲液中沸腾 10 分钟并置 bicene-tri 凝胶进行 SDS PAGE。

含有 8M 的尿素的 Bicene-tris 凝胶(15%T/5%C)浇注并流动。然后用 5% 戊二醛的 0.4M 硼酸钠/磷酸钠缓冲液固定凝胶 30 分钟, 并用溶于甲醇-乙酸中的考马斯蓝 G250 染色 1 小时。染色后, 凝胶准备用于放射自显影。

脱色的凝胶用乙醇 (30%) 和丙三醇(5%)处理 30 分钟, 并用 Amplify (Amersham)浸渍 30 分钟, 80°C 下真空干燥并在 -70°C 暴露于 X-Omat 膜 4-5 天。

尽管上面已描述了多种实施方式和特征, 本领域技术人员将理解上述实施方式和特征的改变和变形可在不脱离由本发明后附权利要求所定义的公开内容和范围的教导下做出。所附的附录是对本发明作进一步描述而非限制本发明。

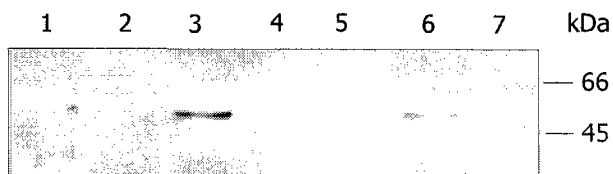


图 1

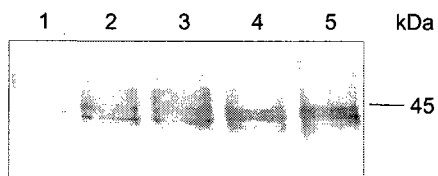


图 2

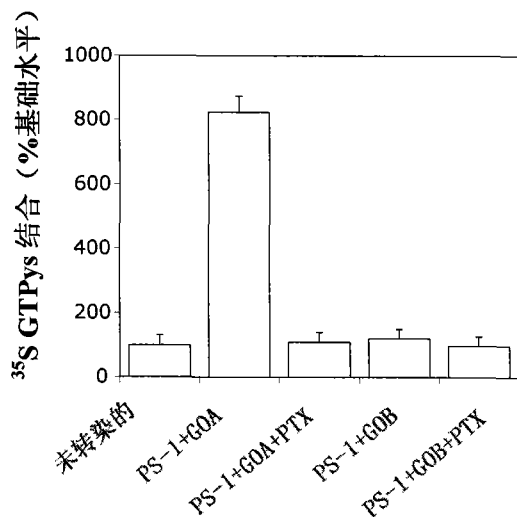


图 3

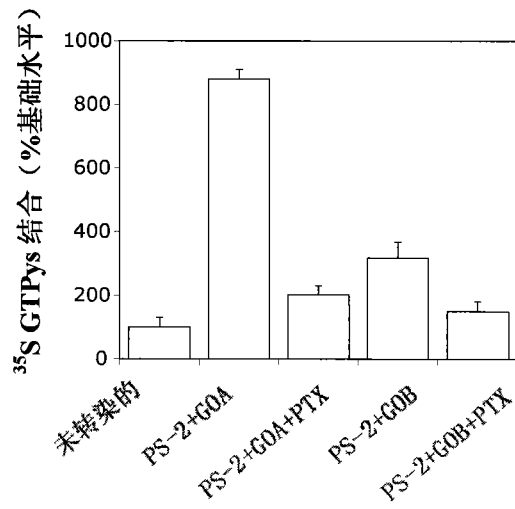


图 4

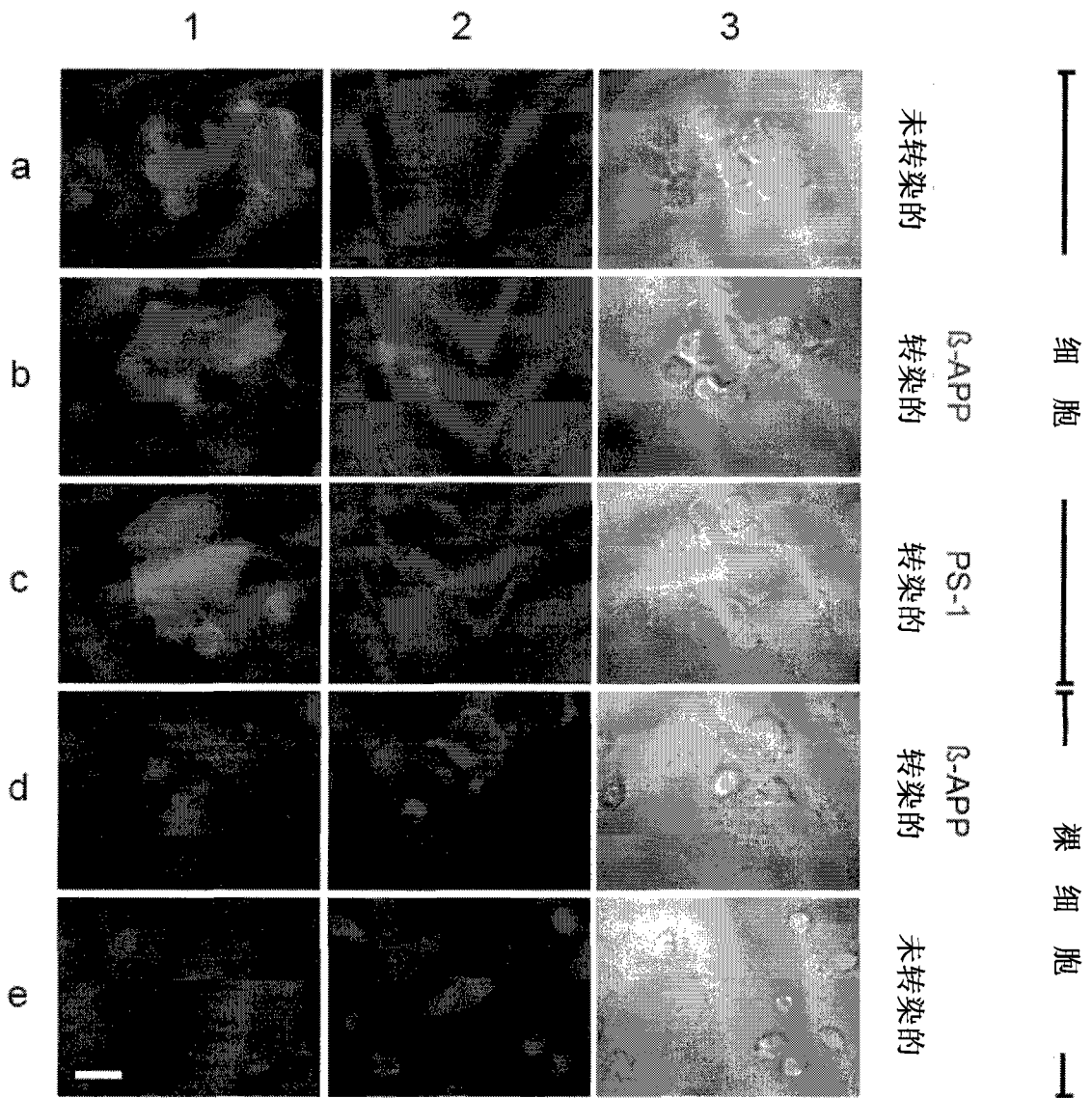


图 5

β -APP-转染的 ES-裸细胞与 PS-1-转染的 DAMI
细胞混合物的提取物

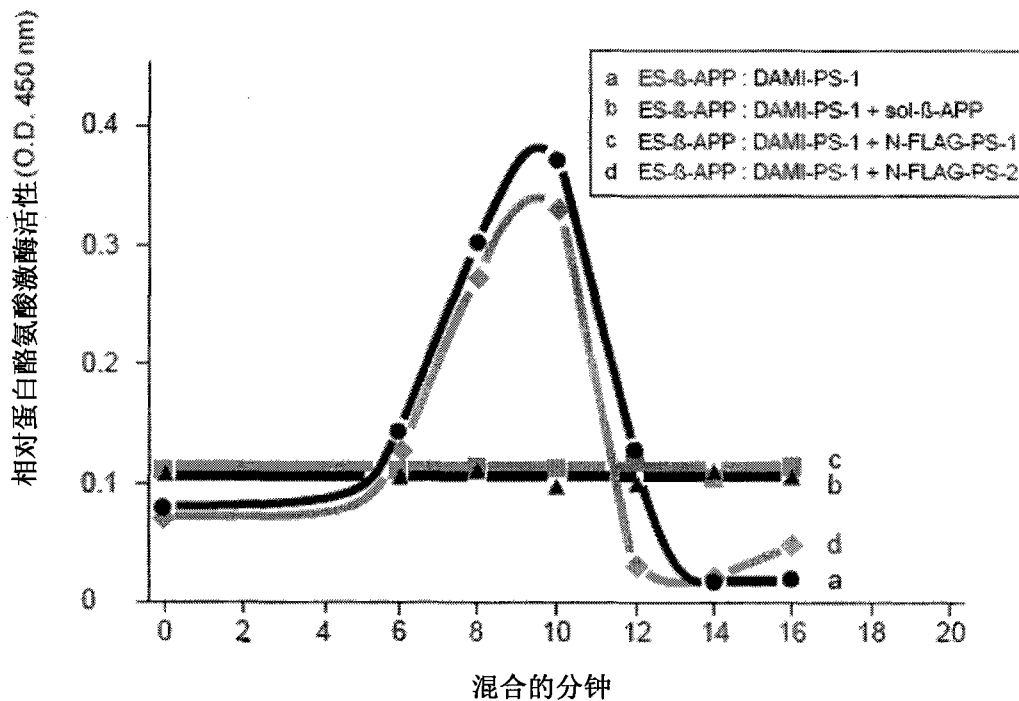
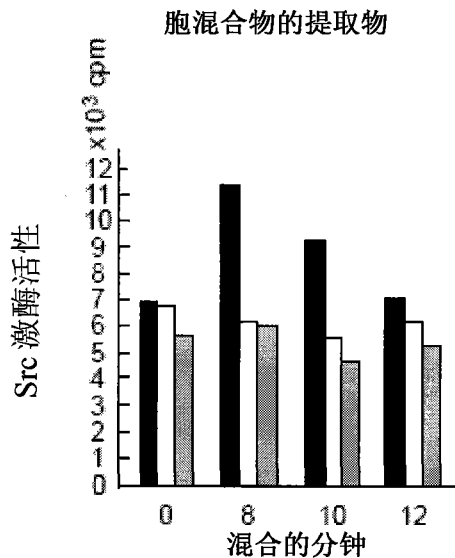
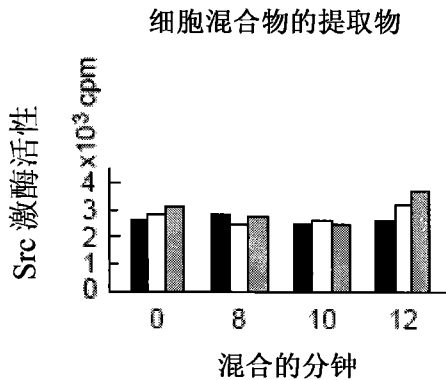


图 6

a β -APP-转染的 DAMI 细胞与 PS-1-转染的 DAMI 细胞混合物的提取物

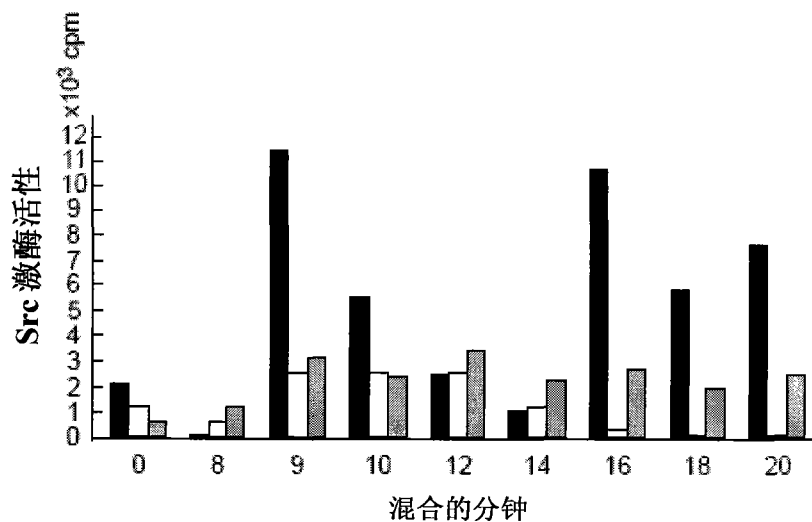


b pcDNA3-转染的 DAMI 细胞与 PS-1-转染的 DAMI 细胞混合物的提取物

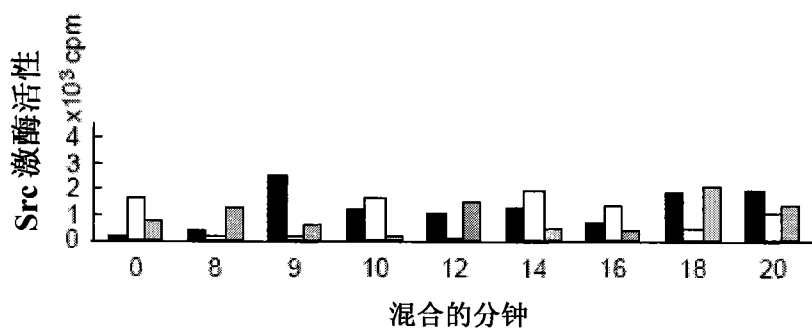


- [Lys19]cdc2(6-20)-NH₂
- [Lys19 Phe15]cdc2(6-20)-NH₂
- ▒ [Lys19 Ser14 Val12]cdc2(6-20)-NH₂

图 7 (a, b)

c β -APP-转染的 DAMI 细胞与 PS-2-转染的 DAMI 细胞混合物的提取物

d pcDNA3-转染的 DAMI 细胞与 PS-2-转染的 DAMI 细胞混合物的提取物



- [Lys19]cdc2(6-20)-NH₂
- [Lys19 Phe15]cdc2(6-20)-NH₂
- ▒ [Lys19 Ser14 Val12]cdc2(6-20)-NH₂

图 7 (c, d)

β -APP 转染的 DAMI 细胞与 PS-1-转染的 DAMI 细胞混合物的提取物

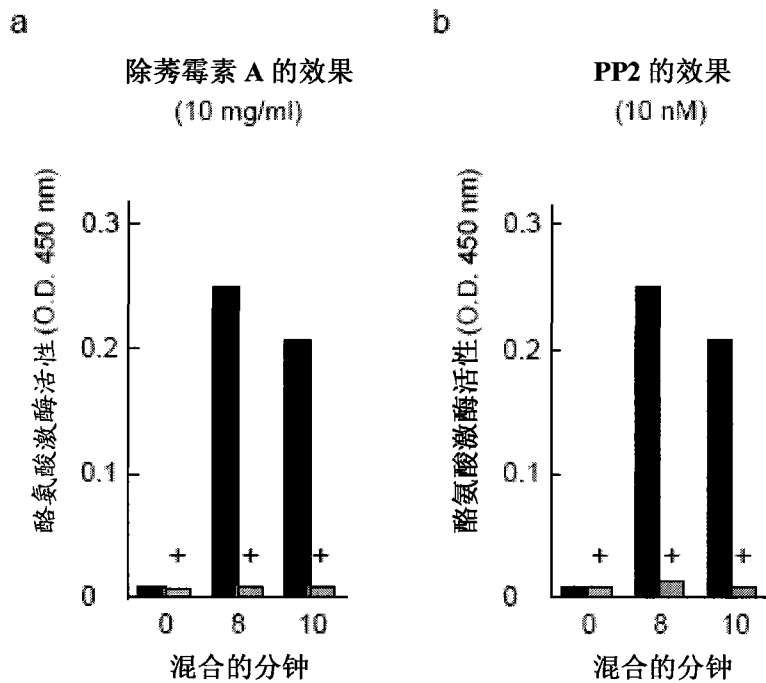
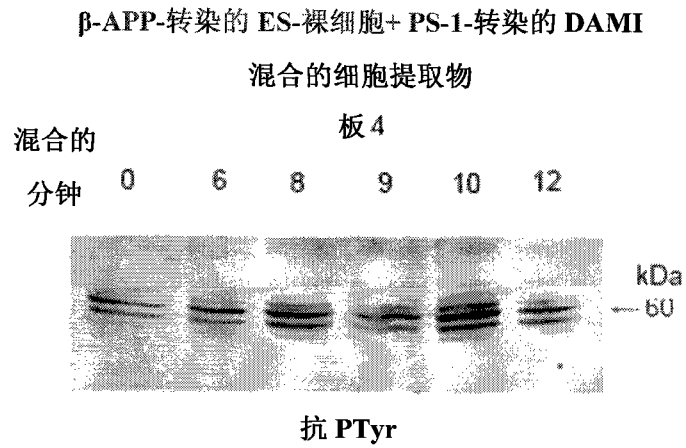
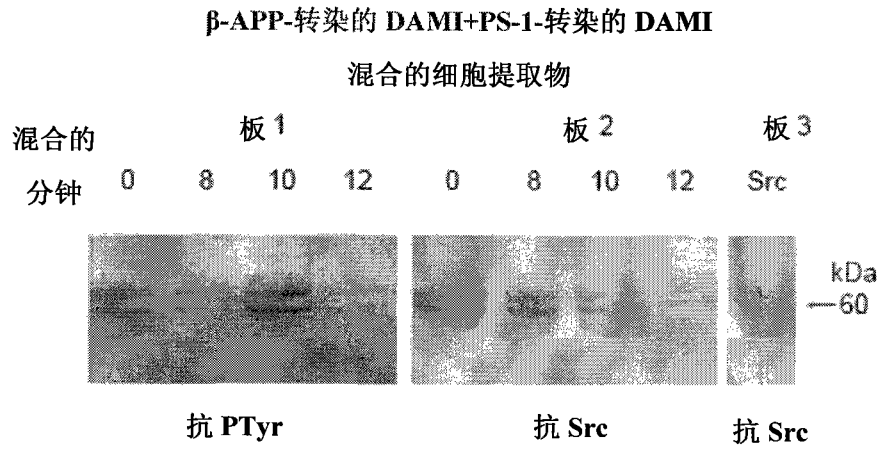


图 8

a 蛋白质印迹杂交



b 抗-Src 处理后的离体磷酸化

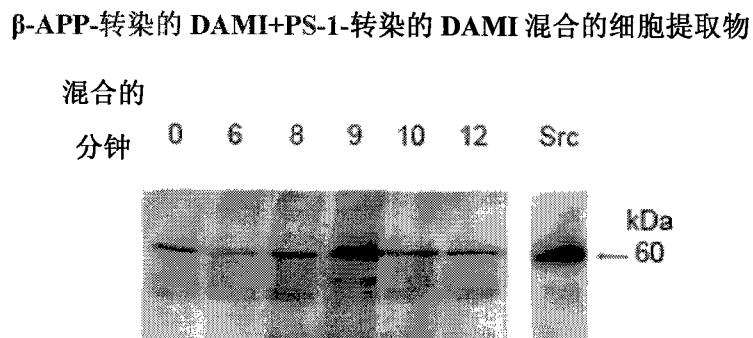
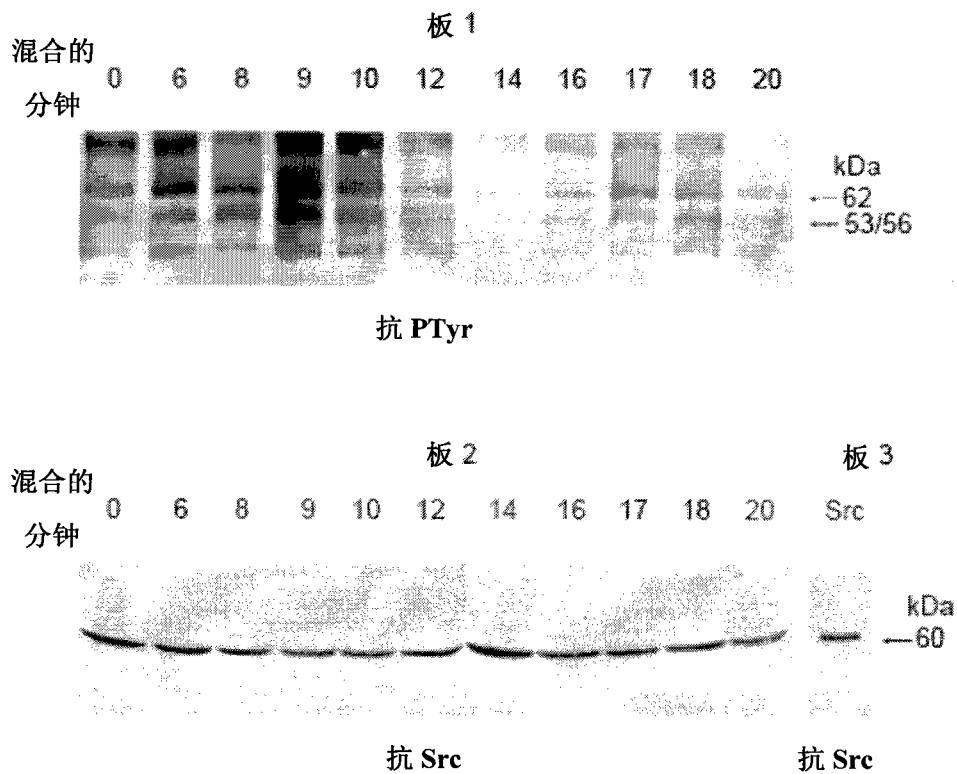


图 9

β -APP-转染的 DAMI+PS-2-转染的 DAMI 混合的细胞提取物

a 蛋白质印迹杂交



b 抗-Src 处理后的离体磷酸化

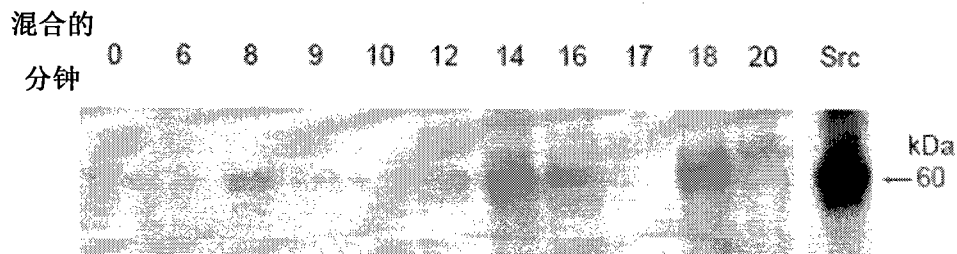
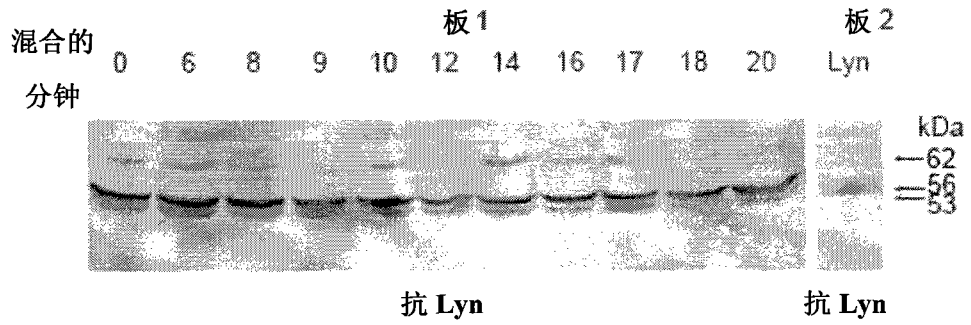


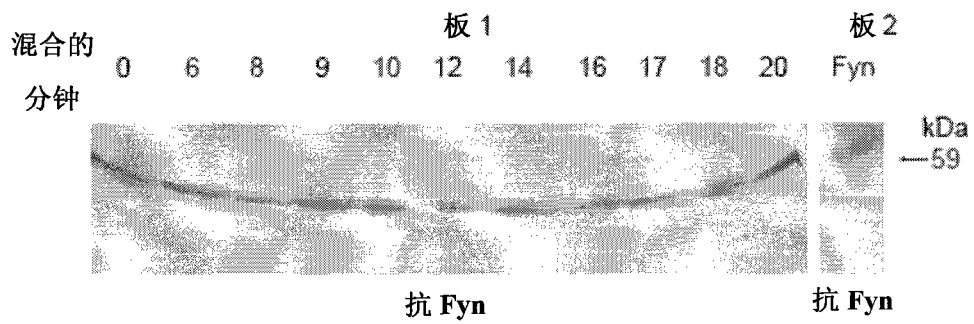
图 10

β -APP-转染的 DAMI+PS-2-转染的 DAMI 混合的细胞提取物

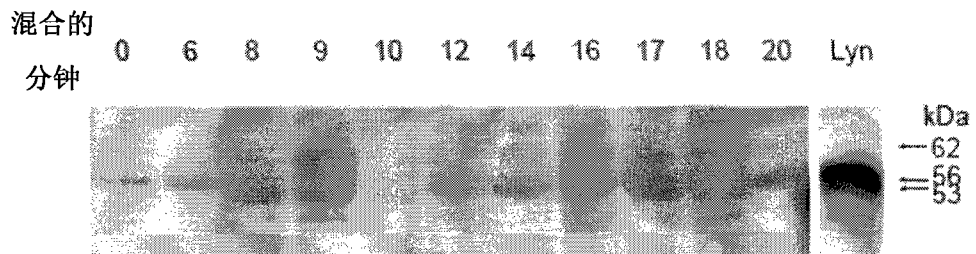
a 蛋白质印迹杂交



b 蛋白质印迹杂交



c 抗-Lyn 处理后的离体磷酸化



d 抗-Fyn 处理后的离体磷酸化



图 11

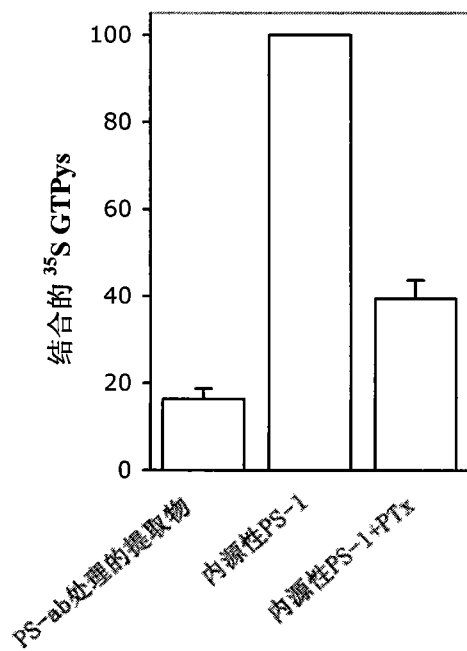


图 12

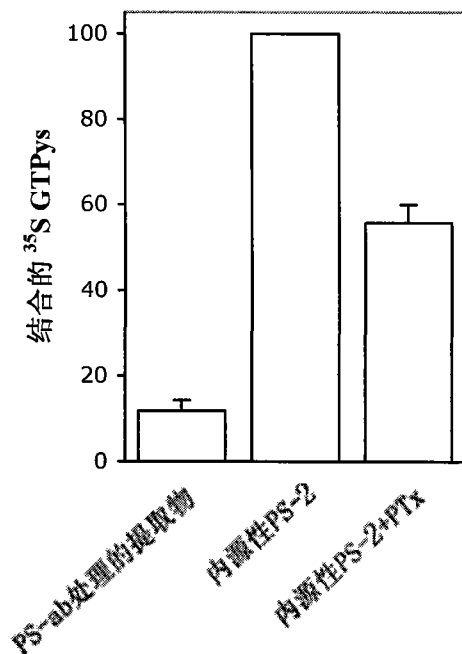


图 13

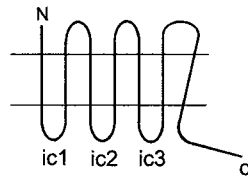


图 14

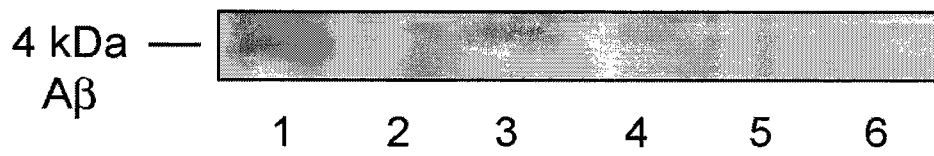


图 15