

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 586**

51 Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98951547 .3**
96 Fecha de presentación: **23.10.1998**
97 Número de publicación de la solicitud: **1025121**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.08.2000**

54 Título: **PÉPTIDOS CAPACES DE INHIBIR LA INTERACCIÓN ENTRE LAS PRESENLINAS Y EL PÉPTIDO BETA-AMILOIDE O SU PRECURSOR.**

30 Prioridad:
24.10.1997 FR 9713384
07.08.1998 US 95671 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.01.2012

73 Titular/es:
AVENTIS PHARMA S.A.
20, AVENUE RAYMOND ARON
92160 ANTONY, FR

72 Inventor/es:
CZECH, Christian;
MERCKEN, Luc;
PRADIER, Laurent y
REBOUL-BECQUART, Soline

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 372 586 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos capaces de inhibir la interacción entre las presenilinas y el péptido beta-amiloide o su precursor.

La presente invención se refiere a la elaboración de ensayos in vitro para poner de manifiesto moléculas y en particular pequeñas moléculas capaces de inhibir la interacción entre APP y el extremo N-Terminal de las Presenilinas.

El péptido amiloide A β , de 37 a 42 aminoácidos, es el principal componente proteico de las placas seniles características de la enfermedad de Alzheimer. Este péptido es producido por división de su precursor, la proteína precursora del péptido amiloide (APP). Las mutaciones en el gen del APP son responsables de ciertas formas familiares precoces de la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, la mayoría de estas formas están asociadas a la presencia de mutaciones en dos genes, presenilinas PS1 (inicialmente denominado S182) y PS2 (inicialmente STM2), recientemente identificados por clonación posicional (Hardy, 1.997). Estas formas son dominantes y estas anomalías corresponden todas a mutaciones de sentido falso a excepción de una convicción la delección de un exón. Las presenilinas son proteínas hidrófobas de membrana de aproximadamente 45-50 kDa de masa molecular y que presentan el 67% de identidad entre ellas. Son homólogas a dos proteínas de *C. elegans*, SPE4 y Sel-12, que están implicadas de manera indirecta respectivamente en el transporte intracelular y en la señalización de los receptores Notch. Sin embargo, la función fisiológica de las presenilinas aún se desconoce. La implicación en la enfermedad de Alzheimer, las dos proteínas aunque vecinas, permiten pensar que las presenilinas contribuyen a una vía fisiológica esencial en la etiología de esta patología.

La proteína PS1 comprende 467 aminoácidos y PS2 448. Las dos presentan la estructura de una proteína de membrana con 6 a 8 dominios transmembrana potenciales. Cada una de estas presenilinas está sujeta in vivo a una división proteolítica precisa que da como resultado dos fragmentos denominados generalmente fragmentos N(amino)- y C(carboxi)-terminales (Thinakaran et col., 1.996). Esta división ha sido cartografiada entre los restos 291 y 299 de PS1 (Podlisny et col., 1.997) y en una región homóloga de PS2. En general se entiende por fragmento N-terminal (N-ter), el fragmento de la posición 1 a aproximadamente 291 de PS1 y por fragmento C-terminal, el complemento. Aunque la topología exacta de las presenilinas en las membranas lipídicas no está claramente establecida, se ha propuesto que sus extremos N- y C-terminales [RC1], así como el gran bucle hidrófilo, están presentes en el compartimento citosólico (Doan et col, 1.996, véase el esquema de la figura 1).

Ahora se ha demostrado que las formas mutadas de las presenilinas inducen el aumento de la producción del péptido amiloide largo A β 1-42 con respecto al A β 1-40 tanto en los pacientes portadores (Scheuner et coll., 1.996), como en células transinfectadas (Borchelt et coll., 1.996) o en ratones transgénicos (Duff et coll: 1.996). El péptido amiloide A β , que forma las placas seniles, lesiones características de la patología, y sus diferentes formas proceden del catabolismo de la proteína precursora del amiloide, APP. En particular, se han descrito dos formas esenciales del péptido amiloide, una de cuarenta restos, A β 40, y la otra poseyendo dos restos suplementarios en su carboxi terminal, A β 42. In vitro, el péptido A β presenta fuertes propiedades de agregación que aumentan para la forma A β 42 y esta última parece formar efectivamente los primeros agregados detectables en la patología. Por otro lado, la forma A β 42 es producida específicamente después de traumatismo craneano en el hombre, lo que constituye uno de los factores de riesgo medioambientales mejor establecidos de la enfermedad de Alzheimer. Además, las formas genéticas precoces de la enfermedad asociadas a las mutaciones tanto en APP (hay seis) como ahora en las presenilinas 1 y 2, concurren todas en un aumento de la relación A β 42/A β 40. El conjunto de estos factores parece designar el A β 42 como el agente clave de la patología tanto en las formas genéticas como esporádicas de la enfermedad y la elucidación de su mecanismo de formación se ha vuelto una cuestión fundamental.

Con respecto a esto, se ha indicado la formación de complejo en la misma envoltura celular entre el precursor del péptido β -amiloide y PS1 o PS2 (Weidemann et al. 1.997, Xia et al., 1.997) sin embargo no se conoce la naturaleza precisa de los casos responsables de la producción del péptido β -amiloide y aún no se ha podido establecer ninguna relación entre el posible papel de estos complejos y la producción del péptido β -amiloide A β 42. Es importante sin embargo señalar que el péptido A β 42, pero no el A β 40, parece estar localizado en el retículo endoplasmático en las células neuronales (Hartmann et al., 1.997).

La presente invención resulta de la identificación y caracterización por la solicitante de regiones particulares de la presenilina 1 (PS1) y la presenilina 2 (PS2), así como regiones particulares del precursor del péptido β -amiloide (APP) implicadas en la formación de los complejos APP/PS1 y APP/PS2.

La presente invención deriva en particular de la evidencia de la capacidad de la región N-terminal hidrófila (aminoácidos 1-87) de la PS2 para reconocer diferentes dominios de APP. Deriva además de la evidencia de propiedades similares para la región N-terminal de PS1 (fragmento 1-213). Resulta igualmente de la demostración de la capacidad de los polipéptidos procedentes de las regiones de las presenilinas definidas anteriormente para inhibir la formación de los complejos entre APP y las presenilinas. Las presenilinas de la presente solicitud corresponden esencialmente a la presenilina 1 (PS1) y/o a la presenilina 2 (PS2).

La presente invención resulta además de la evidencia de la localización celular particular, no esperada, de las regiones en interacción con respecto a la membrana lipídica. Resulta más en particular del hecho de que estas

interacciones pueden tener lugar no solamente al nivel de membrana sino igualmente al nivel de la luz del retículo endoplasmático y en el compartimento extracelular. Esto es inesperado en la medida en que la región N-terminal de PS (implicada en la interacción) está considerada en general como que está localizada en el citoplasma en las condiciones estándar.

- 5 La caracterización de los dominios de interacción del APP y las presenilinas y la puesta en evidencia de las diferentes localizaciones celulares de estas interacciones permiten considerar la preparación de nuevos polipéptidos utilizables farmacéuticamente. Un primer objeto de la invención se refiere a un procedimiento de puesta en evidencia o inclinación de compuestos destinados al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer que comprende al menos una etapa de detección de la inhibición de la interacción entre el APP y un péptido que comprende la secuencia de los aminoácidos 1 a 213 de PS1 o la secuencia de aminoácidos 1 a 87 de PS2.

10 En el sentido de poder inhibir la interacción, se entiende que la presencia de polipéptidos de la invención y/o los ligandos y/o moléculas puestas en evidencia con ayuda del procedimiento de la invención, basta para inhibir al menos parcialmente dicha interacción entre una presenilina y/o su extremo N-Terminal y el precursor del péptido β -amiloide y/o el péptido β -amiloide y preferiblemente el péptido $A\beta_{1-12}$.

- 15 Se demuestra en los ejemplos de la presente solicitud que la inhibición de esta interacción con uno de los polipéptidos de la invención, conduce a la disminución de la producción del péptido amiloide intracelular $A\beta_{1-12}$. Esta consecuencia funcional está considerada pues para todo polipéptido de la invención y/o ligandos y/o moléculas puestas en evidencia con ayuda del procedimiento de la invención. Inhibir esta interacción y por tanto inhibir la producción de $A\beta_{1-12}$, representa por consiguiente un blanco terapéutico de elección en las enfermedades que implican esta forma de péptido amiloide.

20 Según un modo particular, los polipéptidos puestas en evidencia por la invención comprenden al menos una parte de la presenilina 2 (PS2) permitiendo la interacción con el precursor del péptido β -amiloide y/o el péptido β -amiloide. De manera preferida, los polipéptidos se caracterizan por que la parte de PS2 corresponde al fragmento N-terminal hidrófilo de PS2. Más preferiblemente, los polipéptidos comprenden toda o parte de la secuencia que corresponde a la secuencia SEC ID N°1 o una secuencia derivada de ésta.

25 Según otro modo de realización, los polipéptidos puestas en evidencia por la invención comprenden al menos una parte PS1 que permite la interacción con el precursor del péptido β -amiloide y/o el péptido β -amiloide. Más preferiblemente, los polipéptidos según la invención comprenden toda o parte de la secuencia que corresponde a la secuencia SEC ID N°2 o una secuencia derivada de ésta.

- 30 Según otro modo de realización los polipéptidos comprenden al menos las regiones de homología comunes que corresponden a las secuencias SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2.

35 Según otro modo de realización los polipéptidos puestas en evidencia por la invención comprenden al menos una parte del precursor del péptido β -amiloide (APP). Preferiblemente, los polipéptidos constan de una parte del APP menos la región que corresponde al péptido β -amiloide. Incluso más preferiblemente, los polipéptidos se caracterizan por que la parte del precursor del péptido β -amiloide comprende todo o parte del fragmento 1-596. Más preferiblemente, los polipéptidos constan de toda o parte de una secuencia elegida entre la secuencia que corresponde al fragmento 1-596 de la secuencia SEC ID N°3 o una secuencia derivada.

40 En el sentido de la presente invención, el término secuencia polipeptídica derivada designa toda secuencia polipeptídica que difiere de las secuencias polipeptídicas que corresponden a las secuencias presentadas en SEC ID N°1 o SEC ID N°2 o los fragmentos designados de la SEC ID N°3, obtenida por una o varias modificaciones de naturaleza genética y/o química, y que poseen la capacidad de inhibir al menos en parte la interacción entre la presenilina 1 o la presenilina 2 y el precursor del péptido β -amiloide y/o el péptido β -amiloide. Por modificación de la naturaleza genética y/o química se debe entender cualquier mutación, sustitución, delección, adición y/o modificación de uno o varios restos. Dichos derivados se pueden generar con finalidades diferentes, tales como principalmente la de aumentar la afinidad del péptido por su lugar de interacción, la de mejorar sus niveles de producción, la de aumentar su resistencia a proteasas, la de aumentar su eficacia terapéutica o reducir sus efectos secundarios o la de conferir nuevas propiedades farmacocinéticas y/o biológicas.

45 La invención se refiere igualmente a poner en evidencia o a aislamiento de compuestos no peptídicos o no exclusivamente peptídicos utilizables farmacéuticamente. Es posible en efecto, a partir de los restos polipeptídicos descritos en la presente solicitud, realizar moléculas que inhiben al menos parcialmente la interacción entre la presenilina 1 o la presenilina 2 y el precursor del péptido β -amiloide y/o el péptido β -amiloide, y que no sean exclusivamente peptídicos y compatibles con una utilización farmacéutica. Se puede considerar la utilización de polipéptidos tal como se ha descrito anteriormente, para la preparación de moléculas no peptídicas o no exclusivamente peptídicas, activas farmacológicamente, mediante la determinación de los elementos estructurales de estos polipéptidos que son importantes para su actividad y reproducción de estos elementos por estructuras no peptídicas o no exclusivamente peptídicas.

55 Los polipéptidos puestas en evidencia por la invención deben comprender secuencias que permitan una localización celular precisa con el fin de inhibir la interacción entre las presenilinas y el precursor del péptido β -amiloide y/o el

péptido β -amiloide. Preferentemente son los polipéptidos derivados de la SEC ID 1 y SEC ID 2 que comprenden secuencias de localización celular exógena y de manera incluso más preferida un polipéptido que comprende el extremo N-Terminal de PSI o de PS2. Entre estas secuencias se pueden citar las secuencias de péptido señal tales como la secuencia del péptido señal de IgkB, el péptido señal de APP, los péptidos señal de subunidades de los receptores nicotínicos de la acetilcolina musculares y centrales, etc...

Entre los polipéptidos particularmente interesantes se puede citar un polipéptido que comprende los 87 primeros restos del extremo N-Terminal de PS2 y el péptido señal de IgkB.

El objeto de la presente invención se refiere en particular a un procedimiento de identificación de compuestos capaces de modular o inhibir al menos en parte la interacción entre la presenilina 1 o la presenilina 2 y el precursor del péptido β -amiloide y/o el péptido β -amiloide. En particular, el procedimiento es utilizable como ensayo de cribado de moléculas para identificar dichos compuestos inhibidores.

Este ensayo se basa en particular en la detección de la inhibición de la interacción de una manera general entre las presenilinas (1 ó 2) y APP o el péptido $A\beta$ y de una manera particular entre el péptido $A\beta_{1-12}$ y el extremo N-Terminal de PS2. En efecto, con ayuda de proteínas marcadoras fijadas a las presenilinas o fragmentos de las mismas y sistemas de revelación apropiados y especialmente por inmunoprecipitación, utilización de cromóforos o fluoróforos, se ha hecho posible detectar una inhibición en la interacción de las proteínas o fragmentos de las mismas, previamente citadas. Dicho procedimiento comprende pues al menos una etapa de marcado de las presenilinas y/o de APP o fragmentos del mismo y una etapa de detección de la inhibición de la interacción o entre el péptido $A\beta_{1-12}$ y el extremo N-Terminal de las presenilinas y preferentemente PS2 o entre las proteínas completas APP y presenilinas.

Según un primer modo de realización del procedimiento, la evidenciación y/o identificación de dichos compuestos se realiza según las etapas siguientes:

- el péptido $A\beta_{1-12}$ es absorbido previamente sobre una membrana de nitrocelulosa por incubación.
- un extracto bacteriano que contiene todo o parte de una presenilina (PS1 o PS2) y ventajosamente el extremo N-Terminal, se añade a continuación para incubación con la molécula o una mezcla que contenga diferentes moléculas para ensayar
- Después de lavados, la interacción de la presenilina con el péptido $A\beta_{1-42}$ sobre el filtro de nitrocelulosa se pone en evidencia con ayuda de proteínas marcadoras de las presenilinas. Las moléculas buscadas inhiben la interacción y disminuyen pues la intensidad de la señal de las proteínas marcadoras.

Las proteínas marcadoras son ventajosamente a) la proteína fijadora de la etiqueta S, acoplada a fosfatasa alcalina o a un cromóforo fluorescente o b) un anticuerpo anti-PSNT es decir dirigido contra el extremo N-Terminal de una presenilina.

Según otro modo de realización del procedimiento, la búsqueda de nuevos compuestos se efectúa de la siguiente manera:

- el péptido $A\beta_{42}$ incubado previamente en una placa que contiene los pozos (formato de 96 pozos o superior)
- el extremo N-Terminal de una presenilina recombinante purificada se añade a continuación con la molécula o una mezcla que contiene diferentes moléculas para ensayar, para incubación
- Después de lavados, la interacción de la presenilina con el péptido $A\beta_{1-42}$ sobre la placa se pone en evidencia con ayuda de proteínas marcadoras de las presenilinas. La pérdida de interacción entre las presenilinas y el precursor del péptido β -amiloide y/o el péptido β -amiloide se detecta por espectrofotometría.

En el caso preciso de la utilización de la proteína fijadora de la etiqueta S acoplada a la fosfatasa alcalina como proteína marcadora, después de revelado con un substrato colorimétrico, la señal se detecta a 450 nm.

Según un modo de realización ventajoso y preferido del procedimiento, la puesta en evidencia y/o el aislamiento de compuestos capaces de modular o inhibir al menos en parte la interacción de una manera general entre la presenilina 1 o la presenilina 2 y el precursor del péptido β -amiloide y/o el péptido β -amiloide y de una manera particular entre el péptido $A\beta_{1-42}$ y el extremo N-Terminal de PS2, se realiza según las siguientes etapas:

- se pone en contacto una molécula o una mezcla que contiene diferentes moléculas con el péptido $A\beta_{1-42}$ sintetizado con una biotina y un brazo de 3 β Alaninas (o 3 lisinas) en su extremo N-terminal (más arriba de la posición 1)

- se incubaba la mezcla de reacción precedente con el extremo N-terminal de una presenilina purificada marcada con ayuda de un primer fluoróforo. Ventajosamente, el fluoróforo es el criptato de Europio
- se añade estreptavidina (que se fijará sobre la biotina del péptido biot-A β_{1-42}) acoplada a un segundo fluoróforo, capaz de ser excitado a la longitud de onda de emisión de un primer fluoróforo para que se beneficie de una transferencia de fluorescencia si los dos fluoróforos se encuentran muy próximos.
- la puesta en evidencia de nuevos compuestos que inhiban la interacción se detecta por fluorimetría a la longitud de onda de emisión del primer fluoróforo y/o midiendo la disminución de la señal a la longitud de onda de emisión del segundo fluoróforo

Según un modo particular, este segundo fluoróforo es la XL665 que es la aloficocianina reticulada químicamente para aumentar su fluorescencia a 665 nm (CisBiointernational). La pérdida de interacción es detectada por tanto por fluorimetría a la longitud de onda de emisión del primer fluoróforo y por disminución de la señal de la XL665 cuya longitud de onda de emisión es 665 nm.

Este procedimiento es bastante ventajoso pues permite poner de manifiesto directamente la interacción entre las presenilinas y APP y/o el péptido A β en fase líquida y homogénea y por consiguiente poner de manifiesto las moléculas inhibitoras de dicha interacción. En efecto, este procedimiento se basa en la transferencia de fluorescencia entre dos fluoróforos si estos dos cromóforos están cerca físicamente (por tanto en caso de interacción entre A β_{1-42} y la proteína recombinante). Según una variante preferida del procedimiento, el primer fluoróforo es el criptato de Europio, soportado por la proteína recombinante marcada (excitada a 337 nm) que reacciona con la estreptavidina-XL665 fijada sobre el péptido biot-A β y en particular el péptido biot-A β_{1-42} . Ventajosamente, la proteína marcada está constituida por el extremo N-Terminal de una u otra de las presenilinas (PSNT-K). La pérdida de la fluorescencia a 665 nm y el aumento de la fluorescencia a 620 nm característico del criptato de Europio indica una inhibición de la interacción entre las presenilinas o sus extremos N-Terminales y APP y/o el péptido A β por las moléculas buscadas.

Según una variante de este procedimiento, la molécula o la mezcla que contiene las diferentes moléculas se pueden poner en contacto primero con el extremo N-terminal de una presenilina purificada marcada con ayuda de criptato de Europio (PSNT-K) después con el péptido A β_{1-40} o A β_{1-42} que soporta una biotina y un brazo de 3 β Alaninas (o de 3 lisinas) en su extremo N-terminal. La puesta en evidencia de nuevas moléculas capaces de modular o inhibir al menos en parte la interacción entre la presenilina 1 o la presenilina 2 y el precursor del péptido β -amiloide y/o el péptido β -amiloide se hace igualmente, después de adición de la estreptavidina marcada en la XL665, por espectrofluorimetría según el procedimiento precedente y especialmente por lectura de la fluorescencia a 665 nm.

Según un último modo de realización del procedimiento de puesta en evidencia de compuestos que inhiban la interacción de una manera general entre las presenilinas (1 ó 2) y APP o el péptido A β y de una manera particular entre el péptido A β_{1-42} y el extremo N-Terminal de PS2 comprende las etapas siguientes:

- se pone en contacto una mezcla a) de lisados celulares que contienen toda o parte de una presenilina (PS1 o PS2) y ventajosamente el extremo N-Terminal, b) lisados celulares que contienen APP, lisados obtenidos a partir de células infectadas por virus y en particular baculovirus y c) la molécula o una mezcla que contiene diferentes moléculas para ensayar
- co-inmunoprecipitado con ayuda de anticuerpos apropiados y conocidos por el experto en la materia, proteínas solubilizadas y que corresponden a las presenilinas o a APP o el péptido A β
- la pérdida de co-inmunoprecipitación de las presenilinas y del APP se revela por ensayo de western con anticuerpos marcadores indicando que las moléculas ensayadas tienen la propiedad inhibitora buscada

En un modo particular, los procedimientos de la invención descritos anteriormente se adaptan a la puesta en evidencia y/o el aislamiento de ligandos, agonistas o antagonistas de la interacción entre las presenilinas y el precursor del péptido β -amiloide y/o el péptido β -amiloide.

La presente invención se refiere igualmente a la utilización de los polipéptidos definidos anteriormente para poner en evidencia ligandos de los polipéptidos pero sobre todo de los ligandos de las presenilinas, del precursor del péptido β -amiloide y/o del péptido β -amiloide, y preferentemente del péptido A β_{1-42} y/o del extremo N-Terminal de PS2, así como compuestos capaces de inhibir al menos la interacción entre una presenilina y el precursor del péptido β -amiloide y/o el péptido β -amiloide.

Otro objeto de la invención se refiere a la utilización como medicamento de un ligando o de un modulador identificado y/u obtenido según los procedimientos aquí descritos anteriormente. Tales ligandos o moduladores por su capacidad para interferir al nivel de la interacción entre las presenilinas y el precursor del péptido β -amiloide y/o el péptido β -amiloide pueden modular por tanto la producción de péptido amiloide A β_{1-42} y permitir tratar ciertas afecciones neurológicas y en especial la enfermedad de Alzheimer.

Otro objeto de la invención se refiere a la puesta a punto de un ensayo de interacción entre una presenilina y el precursor del péptido β -amiloide y/o el péptido β -amiloide, y preferentemente entre el péptido $A\beta_{1-42}$ y el extremo N-Terminal de PS2, caracterizado por que comprende al menos una etapa de transferencia de fluorescencia entre dos fluoróforos fijados a las moléculas precedentes y una etapa de revelación de la interacción medida por espectrofluorimetría. Como se mencionó precedentemente, este ensayo se utiliza igualmente para poner de manifiesto moléculas inhibitoras de dicha interacción, según el procedimiento de detección de inhibición de la interacción descrito en la presente solicitud.

La invención tiene por objeto además cualquier composición farmacéutica que comprenda como principio activo al menos un polipéptido puesto de manifiesto para la invención.

Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden utilizar para inhibir al menos en parte la interacción entre una presenilina y el precursor del péptido β -amiloide y/o el péptido β -amiloide. Se trata más preferentemente de composiciones farmacéuticas destinadas al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer.

Otro objeto de la presente invención es la utilización de polipéptidos puestos en evidencia por la invención para inhibir al menos en parte la interacción entre una presenilina y el precursor del péptido β -amiloide y/o el péptido β -amiloide y preferiblemente la utilización de estos polipéptidos para la obtención de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y especialmente la enfermedad de Alzheimer.

Para su utilización según la presente invención, los polipéptidos puestos en evidencia por la invención de una parte o toda la molécula capaz de inhibir al menos en parte la interacción entre una presenilina y el precursor del péptido β -amiloide y/o el péptido β -amiloide, las secuencias nucleicas correspondientes por otra parte, incluso se asocian preferiblemente vectores a uno o a los vehículos farmacéuticamente aceptables para ser formulados a la vista de administraciones por vía tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraocular, transdérmica, etc. Preferiblemente, se utilizan en una forma oral. Se puede considerar sin embargo la forma inyectable y se podrá formular en particular con disoluciones salinas (fosfato monosódico, disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio, etc., o mezclas de dichas sales), estériles, isotónicas o de composiciones secas, especialmente liofilizadas, que por adición según el caso de agua esterilizada o de suero fisiológico, permitan la constitución de solutos inyectables.

Las dosis de vector y en particular de virus utilizadas para la administración se pueden adaptar en función de diferentes parámetros y especialmente en función del sitio de administración considerado (órgano, tejido nervioso o muscular), del número de inyecciones, del gen que se vaya a expresar o incluso de la duración del tratamiento buscado. De manera general, los adenovirus recombinantes según la invención se formulan y administran en forma de dosis comprendidas entre 10^4 y 10^{14} pfu, y preferentemente 10^6 a 10^{10} pfu. El término pfu ("unidad formadora de placas") corresponde al poder infeccioso de una disolución de virus y se determina por infección de un cultivo celular apropiado y se mide generalmente después de 15 días, el número de halos de lisis de células infectadas. Las técnicas de determinación de la titulación pfu de una disolución viral están bien documentadas en la bibliografía.

La presente invención ofrece un medio eficaz para tratar las enfermedades para las que está implicada la interacción entre una presenilina y el precursor del péptido β -amiloide y/o el péptido β -amiloide y de manera preferida para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y especialmente la enfermedad de Alzheimer.

La presente invención se detallará más extensamente con ayuda de los ejemplos más adelante considerados de manera descriptiva y no limitante.

Lista de figuras

Figura 1:

A) Esquema de construcciones PS2 truncadas

B) Expresión en células COS 1.

Figura 2: Interacción de las formas truncadas de PS2 con APP.

Figura 3:

A) Interacción del término N segregado de PS2 (SecPS2NT) pero no de su forma citoplasmática (myc-PS2NT) y de APP extracelular.

B) Puesta en evidencia de la interacción SecPS2NT /APP pero no de myc -PS2NT /APP en medio extracelular.

Figura 4: Interacción de PS2 con las formas truncadas de APP:

- 5
- A) Interacción de PS2 con la forma SPA4CT de APP pero no con el dominio citoplasmático de APP (MC45F).
 - B) Interacción de PS2 con la forma C100 de APP

Figura 5: Interacción de PS1 y PS1DC2 con APP y su forma corta:

- A) Interacción de PS1 con la forma entera de APP y la forma truncada SPA4CT
- B) Interacción de la forma truncada de PS1 (PS1 Δ C2) con APP

10

Figura 6: Interacción de PS1 y de APP en células de insectos.

- A) Inmunoprecipitados anti-Histidina (etiqueta sobre PS1), revelación de APP
- B) Inmunoprecipitados anti-PS 1, revelación de APP
- C) Inmunoprecipitados anti-APP inverso, revelación de PS 1

Figura 7: Interacción de la forma segregada de PS2NT con el péptido A β en el medio extracelular.

15

Figura 8: Reconstitución de la interacción Ap/PS2Nt in vitro sobre filtro de nitrocelulosa.

- A) Dependencia de la dosis en función de la concentración de PS2Nt
- B) Dependencia de la dosis en función de la concentración de A β .

Figura 9: Interacción in vitro de formas completas de PS1 y APP.

- 20
- A) Inmunoprecipitados anti-Histidina
 - B) Inmunoprecipitados anti-PS 1

Figura 10: Desplazamiento por el extremo N-Terminal de PS2 precedido de un péptido señal (SecPS2NT) de la interacción entre PS1 y el fragmento SPA4CT

Figura 11: Interacción de PS2 NT con el péptido A β ₁₋₄₂ in vitro: puesta en evidencia por el ensayo en placas de 96 pozos (ELISA)

25

Figura 12: Interacción de PS2 NT con el péptido A β ₁₋₄₂ puesta en evidencia por el ensayo de transferencia de fluorescencia HTRF (Fluorescencia con Resolución Temporal homogénea).

Figura 13: El bloqueo de la interacción APP/PS1 con SecPS2NT conduce a la inhibición de la producción de péptido amiloide A β ₁₋₄₂ intracelular

- 30
- A) La puesta en evidencia del bloqueo de la interacción APP/PS1 con SecPS2NT conduce a la inhibición de la producción de péptido amiloide A β ₁₋₄₂ intracelular
 - B) Controla que la expresión de SecPS2NT no tiene influencia sobre la expresión de los diferentes transgenes

Figura 14: Detección de la interacción de PS2 con APP endógeno de células COS con ayuda del tratamiento farmacológico a la lactacistina

Figura 15: Interacción de PS2 y PS2 NT con una segunda región del APP, diferente del péptido A β .**Materiales y métodos****A/ MATERIALES****1. Construcciones que expresan las presenilinas.**

5 La obtención de vector de expresión (vector anfitrión, pcDNA3, *Invitrogen*) en células de mamífero de las proteínas humanas PS1 y PS2 se ha descrito precedentemente (Pradier et col., 1.996). Se han generado diversas delecciones sucesivas por el extremo C-term de PS2 (véase la Fig 1A). Las numeraciones se hacen a partir del codón de iniciación de PS2 como posición 1.

10 El fragmento de restricción HindIII del vector PS2 (de 5' no codificador, posición -55, en el sitio interno en la posición 1.080) ha sido purificado y puesto en ligadura con el vector pcDNA3 lineal por HindIII y es tratado con fosfatasa alcalina. La PS2 truncada así producida (PS2 Δ C1) se extiende desde el extremo N-terminal al resto 361 más 7 restos aportados por el extremo 3' y comprende por tanto los seis primeros dominios transmembrana y una gran parte del bucle hidrófilo (Fig 1A).

15 PS2 Δ C2 ha sido construido por digestión del plásmido PS2 por PstI (sitio interno en la posición 679) y ligadura con el fragmento PstI correspondiente a la parte 3' no codificadora del vector PS2. La proteína truncada PS2 Δ C2 se extiende desde la posición 1 al resto 228 de PS2 más 18 restos suplementarios aportados por el extremo 3'. Incluye los cuatro primeros dominios transmembrana de PS2.

Una construcción similar se ha efectuado para PS2 portando la mutación N141I, PS2 Δ C2*.

20 El fragmento de restricción HindIII (-55)/MscI(590) de la construcción PS2 Δ C2 se ha clonado a continuación en el vector pcDNA3 tratado por HindIII y cuyo extremo Apal se ha devuelto a verdadero extremo. Esta construcción PS2 Δ C3 se extiende desde el extremo N-term al resto 198 más 2 restos suplementarios que comprenden por tanto los tres primeros dominios transmembrana de PS2.

25 El fragmento de restricción de PS2 Δ C2, HindIII (-55)/NcoI(504) devuelto a verdaderos extremos en su extremo NcoI para tratar el fragmento Klenow de la ADN polimerasa ha sido clonado en el mismo vector pcDNA3 HindIII/(Apal verdadero extremo) para construir PS2 Δ C4 se extiende hasta el resto 168 de PS2 más 3 restos suplementarios.

La construcción del extremo N-terminal hidrófilo de PS2 se ha obtenido por amplificación de la secuencia PS2 con los oligonucleótidos ext5':

5'-CGGAATTCATCGATTCCACC ATGCTCACATTCATGGCC-3' (SEC ID4) (solapándose el ATG inicial, en negrita, e introduciéndose un sitio de restricción EcoRI, subrayado) y ext3':

30 5'-CCGCTCGAGTCATTGTGCGACCATGCTTCGCTCCGTTATTTGAGG-3' (SEC ID5) (introduciendo un codón de detección después del resto 90 de PS2 así como un sitio de restricción XhoI, subrayado).

Después de la clonación en el vector pCRII por el método TA cloning (*InVitrogen*), la conformidad del fragmento de PCR se ha verificado por secuenciación. Este fragmento (EcoRI/XhoI) se ha introducido a continuación en un vector pcDNA3 en fase con una secuencia correspondiente al epítipo myc en su extremo N-terminal: mycPS2Nter.

35 Para no prejuzgar la topología de PS2, se ha vuelto a clonar el mismo fragmento Nter en el vector pSectagB, en fase con la secuencia del péptido señal de IgkB para dirigir la segregación de la proteína pS2Nter: SecPS2-Nter.

El extremo C-term de PS2 ha sido construido de manera similar con ayuda del fragmento de restricción HindIII (1.080)/PstI (en 3' no codificador) reclonado en el vector pSecTagB HindIII/PstI, SecPS2Cter se extiende del resto 361 al extremo C-terminal o en el vector pcDNA3myc en fase con el epítipo myc.

40 Igualmente, se ha obtenido una construcción truncada de PS1. El vector pcDNA3-PS1 ha sido digerido por PflmI (situado en la posición 636 de la secuencia nucleica codificadora de PS1) y XhoI en la 3' no codificadora de la secuencia de PS1. Estos sitios han sido transformados en extremo verdadero por tratamiento en la T4 ADN polimerasa. El fragmento vector, purificado sobre gel de agarosa, ha sido ligado de nuevo sobre sí mismo para construir un vector de expresión de una PS1 truncada extendiéndose del N-ter de PS1 hasta el resto Ile213
45 (después del 5º dominio transmembrana) más 12 restos suplementarios. Esta construcción corresponde a la quimera Δ C2 y se denomina PS1 Δ C2.

2.Construcciones que expresan APP.

2.1 Construcciones APP

Las diferentes construcciones APP completo (isoforma 695) y SPA4CT (los 100 últimos restos del APP (aminoácido 597 a 695) precedidas de un péptido señal para inserción en la membrana) se han descrito precedentemente (Dyrks et coll., 1.993). Los vectores, para la expresión de C100 y del dominio citoplasmático del APP, se han obtenido de la siguiente manera: los ADNc correspondientes se han obtenido por amplificación enzimática del ADN (PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)) utilizando como cebo de síntesis, los oligonucleótidos siguientes: para el C100: los oligonucleótidos 8.172 y 8.181; para el dominio citoplasmático del APP: los oligonucleótidos 8.171 y 8.181.

Oligo 8172 5' CAAAGATCTGATGCAGAATTCCGACAT 3'(SEC ID6) que contiene:

- un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción BglII (subrayado)
- la secuencia codificadora para los aminoácidos 597-602 de APP (en negrita) [numeración de APP de 695 aminoácidos]

Oligo 8181 5' CAAGCGCCGCTCATCCGTTGTCATCGTCGTCCT

TGTAGTCTCCGTTCTGCATCTGCTC 3' (SEC ID 7) que contiene:

- un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción NotI (subrayado)
- la secuencia complementaria a la secuencia codificadora para los aminoácidos 691-695 de APP (en negrita) [numeración APP de 695 aminoácidos]
- la secuencia complementaria a la secuencia Asp-Tyr-Asp-Asp-Asp-Lys que corresponde al epítipo FLAG (en itálica).

Oligo 8171 5'CAAAGATCTAAGAAACAGTACACATCC 3'(SEC ID 8), que contiene :

- un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción (subrayado)
- la secuencia codificadora para los aminoácidos 650-655 de APP (en negrita) [numeración de APP de 695 aminoácidos]

Los productos de la amplificación enzimática del ADN han sido clonados en el vector pCRII. La secuencia nucleotídica se ha verificado por el método de los terminadores específicos de ADN.

Los ADNc se introducen a continuación por ligación en el plásmido de expresión derivado del plásmido pSV2 y que contiene, en el mismo ámbito de lectura, un epítipo MYC.

2.2. Construcción de formas solubles de APP: α -sAPP y β -sAPP.

Los ADNc correspondientes a las formas segregadas del APP que terminan en los sitios α - y β - de división se han obtenido por PCR.

El oligonucleótido 1:

5'-ccatcgatggctaCATCTTCACTTCAGAG-3' (SEC ID 9) introduce:

- un codón de detención (secuencia complementaria inversa subrayada) después de la posición 1.788 de APP que corresponde al sitio de división β
- y un sitio de restricción ClaI.

El oligonucleótido 2:

5'- ccatcgatggctaTTTTTGATGATGAACTTC -3' (SEC ID 10) introduce:

- un codón de detención (secuencia complementaria inversa subrayada) después de la posición 1.836 de APP que corresponde al sitio de división α
- y un sitio de restricción ClaI.

El oligonucleótido 3:

5'- **CCGTGGAGCTCCTCCCG** -3'(SEC ID 11), común para las dos formas, corresponde a la región 1.583 a 1.600 de APP incluyendo el sitio de restricción interna de APP SacI (subrayado).

5 El ADNc del APP ha sido amplificado por PCR utilizando los pares oligo3-oligo1 y oligo3-oligo2 para β -sAPP y α -sAPP respectivamente. Los productos de amplificación han sido subclonados como precedentemente en pCRII y las secuencias verificadas por secuenciación. Para cada uno, el fragmento de restricción SacI-ClaI ha sido purificado y reclonado en el vector de expresión APP (véase anteriormente) digerido también por SacI-ClaI para reemplazar la parte C-terminal de APP por los fragmentos C-terminales de β -sAPP y α -sAPP respectivamente y reconstituir las proteínas completas.

3. Construcciones baculovirus.

10 La obtención de vector de transferencia para baculovirus codificador para la proteína humana PS1 se ha realizado a partir de vector de expresión para células de mamíferos (Pradier et col, 1.996). El ADNc codificador para la proteína PS1 se ha extraído por una digestión por las enzimas de restricción XhoI y NotI, después se clona en el plásmido de transferencia pAcHTLB (proteína de fusión 6Histidinas) y pAcSG2 (proteína nativa). La obtención de baculovirus recombinante se efectúa según el protocolo del proveedor (Pharmingen) y consiste en cotransfectar 2×10^6
15 células de insectos (sf9) con 1 μ g de plásmido de transferencia que contiene el gen de interés y 0,5 μ g de ADN viral (Baculogold). Después de 5 días a 27°C, se rascan las células, después se centrifugan, se utiliza el sobrenadante como patrón vírico para la amplificación y la determinación del título vírico, se visualiza la expresión de la proteína por ensayo de western sobre el resto celular.

20 La obtención de baculovirus que expresa APP Humano (695) se ha descrito precedentemente (Essalmani et col, 1.996).

Para el estudio de expresión de PS1 y APP, se coinfectan las células sf9 a una M.O.I de 2 por los baculovirus que expresan APP humano (695), la proteína humana Presinilina 1 (PS1) o PS1 con una etiqueta 6 histidina en N terminal (6HisPS1), o la proteína de control de pseudomas putrida XylE con una etiqueta 6 histidina en N terminal (6HisXylE), después se solubiliza con un tampón Tris 10 mM, NaCl 130 mM, Tritón X100 1%, NP 40 1%, pH 7,5.

25 Las proteínas solubilizadas son inmunoprecipitadas por un anticuerpo antiHistidina (A), antiPS1 (1805)(B) o antiAPP (22C11) (C). La presencia de APP o de PS1 se ha realizado por ensayo western con el anticuerpo antiAPP aCT43(A), 22C11(B) o el anticuerpo antiPS1 95/23(C).

30 Las fracciones solubilizadas que contienen APP, PS1 o 6HisPS1 se mezclan, después se inmunoprecipitan en presencia de anticuerpos anti Histidinas o antiPS1 durante una noche a 4°C. La coimmunoprecipitación del APP se revela después de ensayo western con los anticuerpos aCT43 o 22C 11.

4. Los plásmidos

Los plásmidos utilizados según la invención son los siguientes:

- ADNpc es un plásmido comercial (InVitrogen) utilizado para la clonación y expresión en células de mamíferos de las secuencias PS1 y PS2 y de sus formas truncadas.
- 35 • pCRII es un plásmido comercial (InVitrogen), utilizado para la clonación de fragmentos de PCR
- pSecTagB es un plásmido comercial (InVitrogen), utilizado para la clonación y expresión en células de mamíferos de ADNc a las que se ha adicionado de nuevo la señal de secreción (péptido señal Ig κ).
- pSV2 es un plásmido comercial (Pharmacia), utilizado para la clonación y la expresión en células de mamíferos de ADNc.
- 40 • pAcHTLB es un plásmido comercial (Pharmingen), para la inserción de un epítipo (His)6 en los ADNc y la recombinación homóloga con baculovirus.
- pAcSG2 es un plásmido comercial (Pharmingen), para la recombinación homóloga con baculovirus.
- pET29a es un plásmido comercial (Novagene), para la expresión de ADNc en bacterias

B/ MÉTODOS

1. Transfección de las células

45 El método establecido para las células COS1 o las células CHO, consiste en utilizar un lipofectante en una relación de 1 para 8 (peso/peso) con respecto al ADN y un péptido sintético H1 (secuencia: KTPKKAKKPKTPKKAKKP) en la

misma proporción para optimizar la compactación del ADN y la eficacia de transfección. Este método se basa especialmente en la neutralización de cargas de los fosfatos del ADN por las cargas positivas del lipofectante.

5 Las células COS1 son cultivadas en incubadora a 37°C, 95% de humedad y 5% de CO₂ en el medio DMEM (Medio Dulbecco's Modified Eagle) que contiene 4,5 g/l de glucosa (Gibco-BRL) enriquecidos con 3% de L-Glutamina, 1% de penicilina-estreptomina y 10% de Suero Fetal Bovino.

La víspera a la transfección, las células se siembran a una densidad de 2,5 10⁶ células por caja de 100 mm. El día de la transfección se enjuagan las células 2 veces con PBS (Disolución Salina con Tampón de Fosfato) y una vez en OptiMEM (composición patentada; Gibco-BRL) para una habituación de al menos 15 minutos en incubadora.

10 Por caja equivalente de 100 mm, se añaden 8 µg de ADN plasmídico en total a 300 µl de OptiMEM y 64 µg de péptido H1. Después de haber sido sometido a vórtex vigorosamente durante 10 segundos, se esperan 5 minutos y se añade la lipofectamina (32 µl o 64 µg) diluida en 300 µl de OptiMEM a la mezcla precedente. Se somete vigorosamente de nuevo el conjunto a vórtex después se deja reposar 30 minutos. Se añaden cinco mililitros de OptiMEM por tubo y la mezcla sometida a vórtex se pone sobre las células (cuyo medio ha sido previamente aspirado). Las células se ponen entonces en incubadora durante 4 horas, al término de las cuales se reemplaza la
15 mezcla con medio completo.

2. Lisis de células y dosis de proteínas

Las células son lisadas lo más a menudo 48 horas después de la transfección (al máximo habitual de expresión). El tampón de lisis contiene 10 mM de Tris pH 7,5, 1 mM de AEDT, 1 % de Tritón X100, 1 % de NP40 y un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete®, Boehringer-Mannheim). Para cada placa, después de enjuagado con PBS, se
20 añaden 800 µl del tampón frío. Los lisados experimentan entonces ultrasonidos seguido por agitación con barra magnética a 4°C durante una noche. Una centrifugación de 30 minutos a 15.000 vueltas/min separa el residuo del sobrenadante. Las proteínas solubles se dosifican entonces según el estuche BCA (Pierce) para poder normalizar las experiencias siguientes.

3. Inmunoprecipitaciones

25 Los anticuerpos dirigidos contra el péptido del N-term de PS2, 95041, (Blanchard et coli., 1.997) y contra los veinte primeros aminoácidos de PS1 (Duff et coll., 1.996) se han obtenido en el conejo por inmunización con los péptidos sintéticos. Para la inmunoprecipitación, se diluyen 100 µg de proteínas en 400 µl de RIPA modificado (NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH 8,0, Tritón al 1 % X100 v/v, NP40 1% v/v). Se añaden treinta microlitros de suspensión de proteína A Sepharose (0,1% m/v en disolución de PBS) y 3 µl de anticuerpos. Se mezclan las suspensiones lentamente en un
30 agitador giratorio a 4°C durante una noche. El complejo de proteína A Sepharose se lava 3 veces con 0,5 ml de RIPA modificado y una vez con 0,5 ml de tampón de lavado « Lavado C » (Tris 10 mM pH 7,5).

4. Inmunotransferencia

Se desnaturalizan las muestras (lisados de células) en un volumen igual de tampón de sedimento (Tris 125 mM pH 6,8, SDS al 4% m/v, glicerol al 20%, Azul de Bromofenol al 0,02%, Ditiotretitol 50 mM) a 95°C durante 5 minutos.
35 Para el análisis de la expresión de las presenilinas, se desnaturalizan las muestras en presencia de urea 8 M y a 37 °C para evitar la agregación apropiada a las presenilinas a 95°C.

Las muestras se depositan sobre geles de Tris-Glicina (Novex), con un porcentaje de acrilamida diferente según el peso molecular que se va a discriminar. Se deposita igualmente un marcador de Peso Molecular (Broad Range, BioRad). La migración tiene lugar durante aproximadamente 2 horas a 100 Volts constantes en un tampón SDS 1X final (Novex). A continuación se transfiere el gel sobre una membrana de nitrocelulosa o de PVDF (Tampón de
40 transferencia 1X final (Novex) con 10% de metanol) durante 2 horas a 150 mA constantes.

Después de la transferencia, la membrana se bloquea durante 2 horas a temperatura ambiente en 50 ml de PBS-T (PBS con Tween al 0,5%) que contiene 2% de leche desnatada (Merck). El anticuerpo primario (diluido a la concentración óptima del orden del 1/1.000^o al 1/5.000^o, en PBS-T con o sin 2% de leche desnatada) se deja una
45 noche a 4°C. Después de un breve enjuague con PBS-T, se incuba la membrana 45 minutos en presencia del segundo anticuerpo (IgG anti-ratón o anti-conejo según el caso, acoplada a la peroxidasa de Raifort) diluida al 1/5.000^o en un tampón denominado «ECL» (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 0,1%).

Se enjuaga entonces la membrana 4 veces 15 minutos con tampón «ECL». Se puede revelar mediante el reactivo ECL (Amersham) constituido por 2 tampones de mezcla extemporáneamente en igual volumen. Se efectúan
50 diferentes exposiciones de película fotográfica (Hyperfilm ECL; Amersham) seguidas de un desarrollo.

5. Fijación in vitro de PS2 NT con el péptido Aβ Amiloide

5.1 Producción de la proteína recombinante PS2 NT en bacterias

- Para la creación de un vector de expresión bacteriano de PS2NT (aminoácidos 1 a 87), se ha amplificado ADNc de PS2 mediante PCR con los oligonucleótidos 3':(CCGCTCGAGTCATTGTCGACCATGCTTCGCTCCGTATTTGAGG) y 5' (CCGGAATTCATCGATTCCACCATGCTCACATTCATGGCC). El fragmento resultante se clona en pCRII y se confirma la secuencia. Este fragmento se subclona a continuación con el vector pET29a (Novagene) en fase con la secuencia de la etiqueta etiqueta-S. La proteína se ha producido en bacterias BL21A. Después de inducción con IPTG para 5 h, las bacterias se recuperan por centrifugación (10 min a 6.000 vueltas/min) y el residuo celular disuelto en tampón RIPA (volumen calculado multiplicando la DO del cultivo después de la inducción por el volumen de cultivo dividido por 23). Se han lisado las bacterias por ultrasonidos y se centrifuga el lisado a 13.000 vueltas/min durante 20 min a 4°C. Se ha utilizado el sobrenadante (extracto total) para los estudios de fijación.
- La proteína recombinante PS2NT también se ha purificado del extracto total sobre columna de Níquel (etiqueta poli-His aportada en el vector pET29a) como describe el proveedor (Novagene).

5.2 Ensayo de fijación PS2NT/Aβ42 sobre membrana de nitrocelulosa

- El péptido Aβ sintético (en disolución) se ha depositado sobre membrana de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell) utilizando un aparato dot-blot de 96 pozos. Después de depósito, se bloquea el filtro (reverso sitios no específicos de fijación de proteínas) con el reactivo de bloque de gelatina (Novagen) diluido a la 10⁴ en TBST. Después de bloqueo, se reemplaza el filtro sobre el aparato de dot-blot y se añade el extracto bacteriano PS2NT a los pozos para una incubación de 2 h a temperatura ambiente. Como control, se utiliza un extracto bacteriano que contiene el plásmido vacío pET29 sobre los pozos por duplicado. Se lava el filtro a continuación una vez con tampón RIPA, después se retira del aparato y se lava tres veces con PBST (15 min para cada lavado). La detección de la etiqueta etiqueta-S se efectúa a continuación como prescribe el proveedor (Novagen) con un sustrato colorimétrico. La cuantificación de la reacción colorimétrica (precipitado) se efectúa por escaneo óptico del filtro y cuantificación de la intensidad en cada pozo mediante el software Tina 2.1 (Raytest).

5.3 Ensayo de Interacción PS2NT/A β42 en formato ELISA

- Se incubó el péptido Aβ (1-40 y 1-42) sintético (100 μl, 2 μg/ml) durante la noche en placas de 96 pozos para fijación sobre el plástico. Se enjuagan las placas dos veces con PBS y se saturan los sitios de fijación no específicos por incubación con 5% (p/v) de Albúmina de Suero Bovino en PBS. La proteína recombinante purificada (según el protocolo descrito en 5.1), PS2NT, se añade diluida en tampón (25 mM Tris/HCl, pH 7,5, Tritón X-100 al 0,5%, NP40 al 0,5%) y se incuba durante 4 h, a temperatura ambiente. Después de dos enjuagues con PBS-Tween 0,5%, la proteína PS2NT retenida sobre la placa (en interacción con el péptido Aβ) se revela por incubación con la proteína fijadora de la Etiqueta-S acoplada a fosfatasa alcalina como precedentemente. La detección de la señal se efectúa en un espectrofotómetro a 450 nm.

5.4 Ensayo de Interacción PS2NT/Aβ1-42 en formato HTRF (Fluorescencia con Resolución Temporal).

- La proteína purificada PS2NT (producida según el protocolo descrito en 5.1) se ha marcado con ayuda del fluoróforo criptato de Europio (PS2NT-K). Los péptidos Aβ₁₋₄₀ y Aβ₁₋₄₂ se han sintetizado con una biotina y un brazo espaciador de 3 βAlaninas (o de 3 lisinas) en su extremo N-terminal (más arriba de la posición 1 de los péptidos Aβ) y dos Argininas (R) en su extremo C-terminal para facilitar la síntesis, péptidos biot-3K-Aβ_{40RR} y biot-3K-Aβ_{42RR}.

- La reacción de interacción de PS2NT-K con biot-Aβ₄₀ o biot-Aβ₄₂ se efectúa en un tampón de HEPES 10 mM, pH=7,2, que contiene NaCl 150 mM, AEDT 3,4 mM y CHAPS 3 mM (detergente). La proteína PS2NT marcada (conc. final 6 nM o 40 μl de disolución inicial a 15 nM) se incuba con el péptido biot-Aβ₄₀ o biot-Aβ₄₂ (conc. final 2 μM o 40 μl de disolución inicial a 5 μM y 20 μl de tampón) durante 10 min., seguido por adición de estreptavidina marcada a la XL665 (XL665 es una alofococianina reticulada, CisBio International) a la concentración de 8 μg/ml (o 100 μl de disolución inicial a 16 μg/ml) en un tampón HEPES 100 mM pH=7,0 que contiene KF 400 mM, AEDT 133 mM y BSA 1 g/l. La reacción se incuba, o 4 h a temperatura ambiente o 24 h a 4°C y se leen las placas en un contador Packard Discovery que mide por una parte la emisión del criptato de Europio a 620 nm después de excitación a 337 nm y por otra parte la emisión de la XL665 a 665 nm después de transferencia de la fluorescencia a 620 nm por el criptato de Europio sobre la XL665. La formación del complejo XL665-estreptavidina/biot-Aβ₄₂/PS2NT-criptato conduce a una transferencia de fluorescencia del criptato hacia la XL665 que se mide a 665 nm por el contador. En ausencia de formación de un complejo XL665-estreptavidina/biot-Aβ₄₂/PS2NT-criptato, el criptato de Europio presenta fluorescencia a 620 nm.

Ejemplos

Ejemplo 1. Interacción entre APP y PS2 y cartografía de la zona de Interacción sobre PS2.

Este ejemplo tiene como finalidad determinar la zona de interacción sobre PS2 y poner en evidencia una interacción entre dicha región y APP.

La interacción entre las proteínas APP y PS2 en células de mamífero se ejemplifica en la figura 2. El lisado de células COS transfectadas con PS2 y APP está sometido a una inmunoprecipitación con un anticuerpo dirigido contra el N-term de PS2 (95041, Blanchard et col., 1.997). Se analiza a continuación el inmunoprecipitado por inmunotransferencia con un anticuerpo contra APP. El APP es detectado claramente en los inmunoprecipitados de células cotransfectadas con APP y PS2 pero no en ausencia de PS2 (Fig 2, pista 6 con respecto a la pista 7) como se describió precedentemente (Weidemann et col., 1.997). Para cartografiar la zona de interacción entre estas dos proteínas, se han construido diversas formas truncadas de PS2. Para conservar la topología de membrana de PS2 determinada en general por la parte N-term de las proteínas de membrana, se producen truncamientos progresivos del extremo C-term de PS2 que terminan después de diversos dominios transmembrana TM6 (PS2 Δ C1), TM4 (PS2 Δ C2), TM3 (PS2 Δ C3) y TM2 (PS2 Δ C4), esquema Fig 1A. El extremo N-term hidrófilo (87 residuos) de PS2 se ha construido también en forma citoplasmática (secuencia nativa) o en forma segregada por inserción del péptido señal de la cadena Igk. La expresión de estas diferentes formas se ejemplifica en la figura 1B, revelada con ayuda del anticuerpo anti-PS2 (95041). Las construcciones que poseen dominios hidrófobos presentan además bandas que corresponden a las formas monómeras de los pesos moleculares esperados (que forman aquí dobletes próximos), formas dímeros y agregados de altos pesos moleculares típicos de PS2 (Fig 1B, pistas 3-5). En particular para PS2 completo, sólo estos agregados son detectables en esta figura mientras la forma monómera no es detectable (pista 6). Las dos construcciones del N-term hidrófilo de PS2: mycPS2Nt y SecPS2Nt dan lugar a bandas de los pesos moleculares esperados (Fig 1B, pistas 1 y 2.). La construcción SecPS2Nt es segregada igualmente en el medio extracelular (Fig 3B, pista 2) mientras que la construcción mycPS2Nt es citoplasmática.

Estas construcciones se han cotransfectado individualmente con APP. La fracción detergente - soluble de los lisados celulares se ha inmunoprecipitado con el anticuerpo dirigido contra el N-term de PS2 y se han analizado estos inmunoprecipitados por inmunotransferencias. Como con la PS2 completa, el APP es detectable en los inmunoprecipitados con todas las formas truncadas de PS2, PS2 Δ C2 a PS2 Δ C4 (Fig 2, pistas 3-5) que demuestran la interacción entre APP y las formas que contienen el N-term de PS2. Esta interacción con el APP se conserva con la construcción N-term de PS2 en su forma segregada (Fig 2, pista 2) demostrando que el anclaje de PS2Nt en la membrana lipídica no es necesario para esta interacción. Por contraste, la forma citoplasmática mycPS2NT no reacciona con APP (Fig 2, pista 1).

La experiencia inversa de inmunoprecipitación por un anticuerpo anti-APP y la detección por el anticuerpo N-term de PS2 ha permitido confirmar la interacción entre el APP y SecPS2Nt en condiciones experimentales diferentes.

En el medio de cultivo de células cotransfectadas con APP y SecPS2Nt, una interacción entre estas dos proteínas se demuestra igualmente por coimmunoprecipitación (Fig 3A, pista 4 y Fig 3B, pista 3). La forma mycPS2NT no reacciona con APP en el medio (Fig 3B, pista 2). La presencia de esta interacción en el medio, demuestra que el complejo APP/PS2Nt es relativamente estable durante el proceso de secreción.

Ejemplo 2. Interacción entre APP y PS2 y cartografía de la zona de interacción sobre APP.

Este ejemplo tiene como finalidad determinar la zona de interacción sobre APP y poner en evidencia una interacción entre dicha región y la presenilina 2.

A tal efecto, las formas truncadas de APP se han utilizado para delimitar la zona de interacción sobre el APP. Se ha utilizado una construcción que comprende los 100 últimos restos del APP bajo el control o no de un péptido de secreción (SPA4CT y C100, Dyrks et col.,1.993) y una construcción que comprende solamente el dominio citoplasmático (los 45 últimos restos del APP) y su presencia detectada con ayuda de un anticuerpo dirigido contra el dominio citoplasmático del APP (α CT43, Stephens et Austen, 1.996). En las células cotransfectadas con PS2, se ha podido poner en evidencia una interacción de SPA4CT pero no del dominio citoplasmático del APP con PS2 (Fig 4A, comparar pistas 4 y 5). La interacción de PS2 con la construcción C100 (sin señal de secreción) también se ha podido demostrar (Fig 4B, pista 7). Incluso asociando el dominio citoplasmático del APP a la membrana en una construcción quimérica con el receptor alfa de IL2, no se ha podido observar ninguna interacción con PS2. Este ejemplo demuestra que existe una interacción con SPA4CT (restos 597 a 695 de APP) pero no con el dominio citoplasmático (restos 651 a 695) que indica por tanto que sobre el APP, la región del A β (restos 597 a 637) y el resto del segmento transmembrana (hasta el resto 650) son suficientes para la interacción con PS2.

Ejemplo 3. Interacción de PS1 con APP y cartografía inicial

Este ejemplo tiene como finalidad determinar la zona de interacción sobre PS1 y validar la interacción entre dicha región y APP.

Por analogía con los resultados obtenidos para PS2 (ejemplos 1 y 2), el estudio de interacción de PS1 con APP se ha realizado en el mismo sistema celular COS1. Después de coimmunoprecipitación con un anticuerpo dirigido contra los últimos 20 aminoácidos de PS1 (Duff et col., 1.996), el SPA4CT, el fragmento C-terminal de APP, se ha podido detectar en los precipitados (Fig. 5A, pista 4). El APP también reacciona con PS1. Igualmente, la forma truncada de PS1, PS2 Δ C2(1-213), reacciona con APP (Fig 5B. pista 4). Estos proporcionados primero nos permiten

considerar que las regiones de interacción entre APP y PS1 deben ser vecinas de las ejemplificadas precedentemente con PS2.

Para verificar la validez y la generalidad de esta interacción PS1/APP, se ha utilizado un sistema celular diferente, en el que las células de insectos se han infectado por baculovirus recombinantes que expresan la PS1 con o sin etiqueta His6 y APP (c.f. Materiales y métodos). El estudio de los lisados celulares ha permitido detectar el APP en los inmunoprecipitados antiHis6 (para la PS1-His6, Fig 6A, pista 4) o antiPS1 (para la PS1 con o sin His6, Fig 6B, pistas 4 y 5) cuando las células son coinfectadas con los dos tipos de virus recombinantes pero no cuando se expresa una sola proteína (pistas 1, 2 y 3 correspondientes). A la inversa, en los inmunoprecipitados anti-APP, las proteínas PS1-His6 y PS1 son detectables (Fig 6C, pistas 4 y 5) para las dobles infecciones. Esta experiencia permite confirmar la interacción en el sentido inverso con diferentes anticuerpos.

Ejemplo 4. Interacción de A β y PS2 en células

Dado que la región de interacción entre el APP y la PS2 implica sobre el APP, una región que incluye el péptido amiloide (de 595 a 635) y sobre la PS2, su dominio N-term hidrófilo, se ha demostrado en este ejemplo que esta última interacciona directamente con el péptido amiloide (A β) producido por las células. La expresión de SPA4CT (que corresponde a los 100 últimos restos de APP precedidos de un péptido señal) en células COS conduce a una fuerte producción del péptido amiloide, en parte ya que SPA4CT es considerado como el precursor biológico del A β . Las células COS se han transfectado con SPA4CT sólo, SPA4CT y SecPS2Nt o con SecPS2Nt sólo. Los medios extracelulares correspondientes se han inmunoprecipitado con el anticuerpo antiPS2 y el péptido A β se ha detectado gracias al anticuerpo específico W02 (Nida et al. (1.996) J. Biol. Chem. 271, 32.908-914) (Fig 7). El péptido A β se identifica solamente para células cotransfectadas con SecPS2Nt y SPA4CT como una banda de débil intensidad (Fig 7, pista 1) pero no con los controles individuales (Pistas 2 y 3). Por otro lado, también se detecta una banda suplementaria a aproximadamente 40 kDa de manera específica para las células doblemente transfectadas. Después de lavado del filtro y detección con el anticuerpo PS2, parece que una banda del mismo peso molecular es igualmente PS2-inmunoreactiva (Fig 7, pista 4). Esta banda se presenta también para las células transfectadas con SecPS2Nt como se espera. Así, en las células doblemente transfectadas, esta banda representa un complejo SDS-estable entre SecPS2Nt y A β , pudiendo confirmar la interacción entre estas dos entidades. La escasa diferencia de masa aportada por el péptido A β (4kDa) explicaría que no hubiera diferencia de tamaño detectable con las células transfectadas con SecPS2Nt solamente. Los resultados de estas experiencias permiten concluir que la forma segregada de PS2 (secPS2Nt) interacciona con el péptido A β (restos 597-637 de APP695).

Ejemplo 5. Reconstitución de la interacción de A β y PS2Nt en ensayo in vitro sobre membranas de nitrocelulosa

Este ejemplo tiene como finalidad demostrar la reconstitución de la interacción PS2Nt-APP(A β) in vitro.

Para confirmar la interacción entre el péptido A β y PS2Nt (extremo N-terminal de PS2), se ha desarrollado un ensayo de fijación in vitro. Se ha construido una proteína de fusión PS2Nt que porta el péptido etiqueta/marcador S (etiqueta-S) en su extremo N-terminal y se ha expresado en bacterias. Los péptidos A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ se han depositado sobre membranas de nitrocelulosa que se han incubado en presencia de un extracto bacteriano que expresa la proteína PS2Nt. La etiqueta-S se ha revelado a continuación mediante la proteína fijadora de la etiqueta-S acoplada a fosfatasa alcalina y mediante reacción colorimétrica. La proteína etiqueta-S-PS2Nt se fija bien sobre los péptidos A β en este ensayo in vitro (Fig 8A). Como controles, los duplicados se han incubado en presencia de un extracto bacteriano que no expresa más que el péptido S que es utilizado como nivel de fijación no específica sobre el péptido A β (formas 1-40 y 1-42). Las diluciones seriales del extracto bacteriano permiten establecer que esta fijación depende de la dosis y es saturable. En esta experiencia, la fijación parece ser más importante sobre el A β ₁₋₄₂ que sobre el A β ₁₋₄₀ con sin embargo una cierta variabilidad. Por ejemplo, la fijación de PS2Nt depende de la dosis de A β depositada sobre la membrana, mientras que A β ₁₋₄₀ y A β ₁₋₄₂ presentan valores de fijación equivalentes.

Este ejemplo proporciona pues una demostración de la reconstitución de la interacción PS2Nt-APP(A β) in vitro entre A β sintético y la PS2NT de origen bacteriano. Dado que las mutaciones patológicas de PS2 conducen a un aumento de la relación A β ₁₋₄₂/A β ₁₋₄₀ producida en numerosos sistemas y que por otro lado, hay interacción física entre PS2 y APP, parece que esta interacción física podría estar implicada en la producción del péptido A β ₁₋₄₂. Así, la inhibición de esta interacción constituye una aproximación terapéutica extremadamente original para la enfermedad de Alzheimer.

Ejemplo 6. Ensayo de interacción A β 42/PS2NT en formato de 96 pozos (tipo ELISA). Fig 11

El ejemplo 5, proporciona resultados que demuestran la interacción directa entre el péptido A β y la proteína PS2NT sobre membrana de nitrocelulosa. Este ejemplo tiene por finalidad confirmar las informaciones del ejemplo 5 y describir la puesta en evidencia de la interacción en un formato de placas de 96 pozos. El péptido A β (A β 40 o A β 42)

- se fija por incubación sobre placas de plástico de 96 pozos. Se incuban las placas a continuación con la proteína PS2NT recombinante. Después de enjuagues, la detección de la interacción (A β /PS2NT) se hace por fijación de la proteína fijadora de la etiqueta-S en los pozos y revelado colorimétrico. Se fija PS2NT de manera dependiente de la dosis sobre el péptido A β 1-42 (Fig 11) pero no sobre el péptido A β 1-40 o sobre el péptido de secuencia inversa A β 40-1, ni sobre ningún otro péptido amiloidogénico, la amilina. Las cantidades de péptidos A β 1-42 o A β 1-40 fijadas sobre las placas son idénticas como se verifica por inmunodetección). La constante de fijación de PS2NT sobre A β 42 es de 0,18 μ M. La especificidad de PS2NT para la forma A β 42 del péptido con respecto a A β 40 sólo se había sugerido en el ejemplo 5. Este ejemplo establece de esta especificidad que es perfectamente reproducible en el presente ensayo.
- 10 Este formato de ensayo de interacción A β 42/PS2NT permite pues considerar fácilmente un ensayo de cribado de moléculas que inhiban esta interacción.

Ejemplo 7. Ensayo de Interacción A β 42/ PS2NT en formato HTRF

En los ejemplos 5 y 6, la interacción directa entre el péptido A β 42 y la proteína PS2NT se ha demostrado por una parte sobre una membrana de nitrocelulosa y por otra parte sobre placas de 96 pozos (tipo ELISA).

- 15 Este ejemplo tiene como finalidad confirmar estas informaciones y describir la puesta en evidencia de la interacción en fase líquida/homogénea utilizando la técnica de transferencia de fluorescencia.

El principio de ensayo descrito en Matériels et Méthodes (5.4) se basa en la transferencia de fluorescencia. La proteína recombinante PS2NT marcada con criptato de Europio (PS2NT-K) interacciona con el péptido biot-A β 42 como lo muestra la figura 12 (barra N° 3). Esta señal disminuye y por tanto la interacción PS2NT-K/biot-A β 42 se desplaza por un exceso de PS2NT no marcado (CI50=400 nM). La señal de fluorescencia detectada es estable en el tiempo: de 4 h a temperatura ambiente a 24 h a 4°C (según las condiciones elegidas, descritas en Matériels et Methodes).

25 Esta interacción depende de la dosis para el péptido biot-A β 42 (zona de linealidad de la señal de 0 a 2,5 μ M) y para PS2NT-K (zona de linealidad de la señal de 0 a 7,5 nM). Como lo indica la figura 12, barra N° 5, no hay interacción de PS2NT-K con el péptido biot-A β 40 que aporta un elemento suplementario de especificidad. La especificidad de PS2NT para la forma A β 42 del péptido con respecto a A β 40 que no había sido más que sugerida en el ejemplo 5 se confirma entonces en el ejemplo 6 y el presente ejemplo.

Este ensayo HTRF de interacción entre PS2NT y A β 42 (reflejando la interacción APP/PS en células) permite por tanto la identificación de moléculas químicas que inhiban esta interacción mediante un cribado a alto flujo.

30 **Ejemplo 8. Reconstitución de la interacción APP/PS1 in vitro**

Este ejemplo tiene como finalidad demostrar que la interacción entre las proteínas completas APP y PS1 puede ser recreada a partir de lisados celulares diferentes, mezclados de manera única para poner en evidencia la interacción.

35 El sistema de expresión del baculovirus permite la expresión de grandes cantidades de proteínas recombinantes, los lisados de las células infectadas individualmente para cada uno de los tres virus se han utilizado como fuente de proteínas APP, PS1 y PS1-His6. Las fracciones solubilizadas que contienen APP, PS1 o 6HisPS1 se mezclan, después se inmunoprecipitan en presencia de anticuerpos anti Histidinas o antiPS1 durante una noche a 4°C. El APP es detectado claramente en los inmunoprecipitados (Fig 9A, pista 3 y Fig 9B, pista 3) demostrando que la interacción APP con PS1-His o PS1 es reconstituida in vitro por incubación de dos proteínas. El APP sólo parece precipitar débilmente mediante anticuerpos anti-PS1 (Fig 9B, pista 1) pero no con anticuerpo anti-His que confirma la especificidad de la interacción en ese caso. Estos resultados permiten poner a punto un ensayo de interacción in-vitro de dos proteínas completas APP y PS1.

Ejemplo 9. SecPS2Nt bloquea la interacción de APP y PS1 en células transinfectadas.

45 Se ha demostrado en los ejemplos precedentes que APP interacciona con PS1 de manera parecida a PS2 y que para este último, basta la construcción SecPS2Nt en la interacción con APP. Este ejemplo tiene como finalidad evaluar si la fijación de SecPS2Nt sobre el APP puede bloquear la interacción con PS1 de manera cruzada (heteróloga). En el sistema COS1, el SPA4CT (que corresponde a los últimos 100 restos de APP precedidos de un péptido señal) se puede detectar en los inmunoprecipitados anti-PS1 de células que expresan SPA4CT y PS1 p o PS1 mutante, PS1*, (Fig 10A. pistas 1 y 2). Además, cuando SecPS2NT se cotransfecta igualmente, la señal SPA4CT casi desaparecería en los inmunoprecipitados anti-PS1 (Fig 10A, pistas 3 y 4). Después de inmunoprecipitación anti-PS1, los sobrenadantes (fracción no asociada a la proteína A sepharosa) han experimentado una segunda inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-PS2. El SPA4CT se detecta claramente en las células cotransfectadas con PS1 y SecPS2Nt (Fig 10B, pistas 3 y 4) que demuestra que en estas células, el SecPS2Nt fijándose, ha desplazado la fijación de SPA4CT sobre PS1. Esta experiencia nos permite por tanto concluir que SecPS2Nt es una molécula capaz no solamente de fijarse sobre APP, sino también de desplazar la

fijación de APP sobre PS1 y probablemente PS2. SecPS2Nt puede servir por tanto en células de cebo para bloquear la interacción de APP con las dos presenilinas, PS1 y PS2. En efecto, los resultados de la cartografía de la interacción PS1/APP, confirman que las zonas de interacción puestas en juego son similares a las de PS2.

Ejemplo 10. El bloqueo de la interacción APP/PS1 conduce a la inhibición de la producción del péptido amiloide A β 42 intracelular.

El ejemplo precedente demuestra que la expresión de SecPS2NT puede bloquear la interacción entre APP y PS1 o PS1 mutante. El presente ejemplo analiza las consecuencias de esta inhibición sobre la producción del péptido amiloide, en particular de estas dos formas A β 40 y A β 42. En efecto, se ha descrito precedentemente en la bibliografía que las mutaciones patológicas de las presenilinas (PS1 o PS2) conducían a un aumento de la relación de la forma larga del péptido A β , forma A β 42, sobre la forma A β 40. relación A β 42/A β 40 (Borchelt et coll. 1.996 y para revisión Hardy, 1.997).

SPA4CT se ha coexpresado con PS1 wt (Fig 13A, pistas 1 y 3) o con PS1 mutante (Fig 13A, pistas 2 y 4) o en ausencia (pistas 1 y 2) o en presencia de SecPS2NT (pistas 3 y 4). Los lisados celulares y los medios acondicionados de las células han sido analizados para la producción del péptido amiloide. Las formas A β 40 y A β 42 se han analizado por inmunoprecipitación con anticuerpos que reconocen específicamente los extremos C-terminales A β 40 (FCA3340) o A β 42 (FCA3542, Barelli et coll., 1.997) y los inmunoprecipitados analizados por inmunotransferencia con un anticuerpo que reconoce las dos formas. En los lisados celulares, la expresión de PS1 mutante conduce bien a un aumento de la producción de A β 42 (1,5 a 2 veces) y sus formas multiméricas con respecto a PS1wt y poca variación de los niveles de A β 40 (comparar Fig 13 A, pistas 1 y 2, paneles A β 42 y A β 40 lisados celulares) como se espera. En presencia de SecPS2NT, los niveles de A β 42 (y multímeros) se reducen considerablemente (Fig 13A, pistas 3 y 4) tanto con PS1 wt como PS1 mutante. En el medio extracelular, los niveles de A β 42 parecen disminuir también pero de manera menos importante. No hay variación de los niveles de péptido amiloide A β 40 entre las diferentes condiciones lo que demuestra que el efecto sobre A β 42 es específico y no es debido a una modificación global de los niveles de expresión. Esto se confirma por análisis de la expresión de diferentes genes transfectados: SPA4CT, SecPS2NT y PS1 (Fig 13B). En este ejemplo, se ha demostrado por tanto que inhibir la interacción PS1/APP con el dominante genético SecPS2NT conduce a una disminución de los niveles de producción de A β 42 intracelulares tanto con PS 1 mutante como con PS1 wt. En relación al papel principal acordado para el A β 42 en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, este ejemplo aporta la demostración de que la inhibición de la interacción APP/PS representa por tanto una criba terapéutica importante tanto para las formas genéticas como para las formas esporádicas de la enfermedad.

Ejemplo 11. Detección de la interacción de PS2 con APP endógeno de las células COS con ayuda de un tratamiento farmacológico.

Este ejemplo tiene como finalidad demostrar que los resultados obtenidos en los ejemplos precedentes (estos resultados en células, corresponden a la sobreexpresión de dos parejas de la interacción APP y PS (PS1 o PS2)) son igualmente válidos con proteínas no sobreexpresadas o endógenas. En efecto, la fuerte sobreexpresión de dos proteínas podría conducir a un artefacto de interacción. En este ejemplo se ha perseguido la detección de la interacción en las condiciones no implicando la sobreexpresión simultánea de dos parejas.

Las células COS expresan el APP de manera endógena a pesar de los bajos niveles. Las células COS se han cotransfectado por tanto con solamente PS2. Los lisados celulares se han analizado por inmunoprecipitación con el anticuerpo dirigido contra el péptido del N-term de PS2 y se revela por inmunotransferencia con anticuerpo anti-APP, WO2. El panel superior de la figura 14 muestra que la transfección con PS2 sólo no permite detectar la interacción con APP endógeno por coimmunoprecipitación (Fig 14, pista 1).

Por otro lado, como la interacción APP/PS conduce a la producción del péptido amiloide A β 42 (ejemplo precedente), por tanto al catabolismo del APP, al nivel del retículo endoplasmático, el proteasoma que es el sistema de degradación proteolítico en este compartimento celular podría estar implicado. Se ha analizado el efecto de la lactacistina, un inhibidor selectivo del proteasoma. Después de incubación de las células transfectadas con PS2 en presencia de lactacistina, el APP endógeno de las células COS puede ser puesto en evidencia claramente en los inmunoprecipitados PS2 (Fig 14, pista 5, banda a 110 kDa). Esta Interacción con el APP endógeno presenta las mismas características que proteasoma ya que puede ser desplazado por el dominante genético SecPS2NT (Fig 14, pistas 6 y 7) con un efecto dependiente de la dosis. En efecto, la pista 7 muestra que a una dosis moderada de SecPS2NT, siempre está visible una banda de débil intensidad correspondiente al APP endógeno. A una dosis más importante SecPS2NT (pista 6), la banda correspondiente al APP endógeno aparece muy débilmente y demuestra el carácter dependiente de la dosis. Siempre está presente una señal residual débil de APP (banda de aproximadamente 110 kDa) y es debida al complejo entre APP y SecPS2NT que es segregado rápidamente (ya que SecPS2NT no tiene más dominios transmembrana de anclaje) y por tanto no se acumula intracelularmente.

La Figura 14 (panel medio e inferior) muestra que el tratamiento con lactacistina no afecta a los niveles de APP totales tanto celulares como segregados. En efecto, las bandas que corresponden a los niveles de expresión de APP

son casi constantes en intensidad. La especificidad del efecto de la lactacistina se ha demostrado así sobre la subpoblación de APP en interacción con PS2.

5 Por estos resultados, se ha podido demostrar que la interacción APP/PS2 se puede detectar con el APP endógeno de las células COS si se inhibe el proteasoma. Además, estos resultados demuestran que la interacción APP/PS2 se puede detectar en condiciones menos artificiales. Sin embargo esta interacción es muy débil. También, para obtener una detección más marcada se ha recurrido o a un inhibidor de degradación proteolítica en el presente ejemplo o a la sobreexpresión de dos parejas en los ejemplos precedentes. Este ejemplo demuestra por tanto que los resultados obtenidos en los ejemplos precedentes con sobreexpresión en células de dos parejas de la interacción (APP y PS1 o PS2) son igualmente valiosos con proteínas no sobreexpresadas o endógenas.

10 **Ejemplo 12. PS2 interacciona con un segundo segmento de APP, distinto de A β .**

Este ejemplo tiene como finalidad demostrar que otro segmento de APP interacciona con PS2.

15 Se ha demostrado precedentemente que SecPS2NT interacciona en el medio extracelular con las formas segregadas de APP (Fig 3A, pista 4). Las formas segregadas del APP son liberadas después de división o en el sitio β (posición 595), correspondiendo al comienzo del péptido A β , o en el sitio α (posición 612) en el seno de este péptido. Estos resultados sugieren que PS2NT interacciona también con una región N-term del APP diferente de A β . Se han construido formas truncadas de APP, por inserción de un codón de detección en los sitios β (β -sAPP) y α (α -sAPP) y se han ensayado. PS2 completo y SecPS2NT interaccionan eficazmente con α -sAPP (Fig 15, pistas 3 y 5) y β -sAPP (Fig 15, pistas 4 y 6). Estos resultados establecen que un segmento de APP comprendido entre la posición 1 y 595 (y por tanto distinto del A β) es igualmente capaz de interaccionar con PS2 y PS2NT. Estos resultados permiten además confirmar que la interacción PS2NT/APP puede tener lugar en ausencia de anclaje en la membrana de dos parejas y en el compartimento luminal (o extracelular) de la célula.

20

Referencias

- Doan et col. (1.996) Protein topology of presenilin1. *Neuron* 17:1.023-1.030.
- Thinakaran et col., (1.996) Endoproteolysis of Presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron* 17:181-190.
- 5 • Podlisny et col., (1.997) Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue. *Neurobiology of Disease* 3:325-337.
- Pradier, L., Czech, C., Mercken, L., Revah, F. y Imperato, A. (1.996) Biochemical characterization of presenilins (S182 and STM2) proteins. *Neurobiol. Aging* 17: S137
- 10 • Scheuner et coll. (1.996) Secreted amyloid b-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Med.* 2: 864-870.
- Dyrks, T., Dyrks, E., Mönning, U., Urmoneit, B., Turner, J. y Beyreuther, K. (1.993) Generation of bA4 from the amyloid protein precursor and fragment thereof *FEBS Lett.* 335: 89-93.
- 15 • Weidemann, A., Paliga, K., Dürrwang, U., Czech, C., Evin, G., Masters, C., & Beyreuther, K. (1.997). Formation of stable complexes between two Alzheimer's disease gene products: Presenilin-2 and b-Amyloid precursor protein. *Nature Medicine* 3: 328-332
- Blanchard, V., Czech, C., Bonici, B., Clavel, N., Gohin, M., Dalet, K., Revah, F., Pradier, L., Imperato, A. y S. Moussaoui. (1.997) Immunohistochemical analysis of presenilin 2 expression in the mouse brain: distribution pattern and co-localization with presenilin 1 protein. *Brain Res.* 758: 209-217.
- 20 • Borchelt, D. R., Thinakaran, G., Eckman, C., Lee, M. K., Davenport, F., Ratovitsky, T., Prada, C.-M., Kim, G., Seekins, S., Yager, D., Slunt, H. H., Wang, R., Seeger, M., Levey, A. I., Gandy, S. E., Copeland, N. G., Jenkins, N., Price, D. L., Younkin, S. G. y S. Sisodia (1.996) Familial Alzheimer's diseaselinked presenilin 1 variants elevate Ab1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17: 1.005-1.013
- 25 • Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C.-M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L; Harigaya, Y., Yager, D., Morgan, D., Gordon, M. N., Holcomb, L., Refolo, L., Zenk, B., Hardy, J. y S. Younkin (1.996) Increased amyloid-b42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383: 710-713.
- Hardy, J. (1.997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends in Neurosci.* 20: 154-159.
- Stephens, D. J. y B. M. Austen (1.996) Metabolites of the b-amyloid precursor protein generated by b-secretase localise to the Trans-Golgi Network and late endosome in 293 cells. *J. Neurosci. Res* 46: 211-225.
- 30 • Essalmani, R., Guillaume, J.-M., Mercken, L., y Octave, J.-N. (1.996). Baculovirus-Infected Cells Do not Produce the Amyloid Peptide of Alzheimer's Disease from its Precursor. *FEBS Lett.* 389: 157-161.
- 35 • Barelli et coll., (1.997), Characterization of new policlonal antibodies specific for 40 and 42 amino acid-long amyloid β peptides : their use to examine the cell biology of presenilins and the immunohistochemistry of sporadic Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy cases. *Mo/ecu/ar Medecine* 3: 695-707.

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIONES GENERALES:

(i) SOLICITANTE:

(A) NOMBRE: RHONE-POULENC RORER

5 (B) CALLE: 20 Avenue Raymond Aron

(C) CIUDAD: Antony

(E) PAÍS: FRANCIA

(F) CÓDIGO POSTAL: 92.165

(H) TELEFAX: 01.55.71.72.91

10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Péptidos capaces de inhibir la interacción entre las presenilinas y el precursor del péptido beta-amiloide y ensayo de interacción para la búsqueda de moléculas inhibidoras de dicha interacción.

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 11

(iv) FORMA LEGIBLE EN ORDENADOR:

15 (A) TIPO DE SOPORTE: Disquete

(B) ORDENADOR: PC compatible con IBM

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PatentIn Release nº 1.0, Versión 1.30 (OEB)

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEC ID Nº: 1:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 261 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: doble

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) EMPLAZAMIENTO:1..261

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 1:

ATG CTC ACA TTC ATG GCC TCT GAC AGC GAG GAA GAA GTG TGT GAT GAG	48
Met Leu Thr Phe Met Ala Ser Asp Ser Glu Glu Val Cys Asp Glu	
1 5 10 15	
CGG ACG TCC CTA ATG TCG GCC GAG AGC CCC ACG CCG CGC TCC TGC CAG	96
Arg Thr Ser Leu Met Ser Ala Glu Ser Pro Thr Pro Arg Ser Cys Gln	
20 25 30	
GAG GGC AGG CAG GGC CCA GAG GAT GGA GAG AAT ACT GCC CAG TGG AGA	144
Glu Gly Arg Gln Gly Pro Glu Asp Gly Glu Asn Thr Ala Gln Trp Arg	
35 40 45	
AGC CAG GAG AAC GAG GAG GAC GGT GAG GAG GAC CCT GAC CGC TAT GTC	192
Ser Gln Glu Asn Glu Glu Asp Gly Glu Glu Asp Pro Asp Arg Tyr Val	
50 55 60	
TGT AGT GGG GTT CCC GGG CGG CCG CCA GGC CTG GAG GAA GAG CTG ACC	240
Cys Ser Gly Val Pro Gly Arg Pro Pro Gly Leu Glu Glu Glu Leu Thr	
65 70 75 80	
CTC AAA TAC GGA GCG AAG CAT	261
Leu Lys Tyr Gly Ala Lys His	
85	

5

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEC ID Nº: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 243 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

10 (C) NÚMERO DE CADENAS: doble

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

15 (ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) EMPLAZAMIENTO:1..243

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 2:

ES 2 372 586 T3

ATG ACA GAG TTA CCT GCA CCG TTG TCC TAC TTC CAG AAT GCA CAG ATG	48
Met Thr Glu Leu Pro Ala Pro Leu Ser Tyr Phe Gln Asn Ala Gln Met	
1 5 10 15	
TCT GAG GAC AAC CAC CTG AGC AAT ACT GTA CGT AGC CAG AAT GAC AAT	96
Ser Glu Asp Asn His Leu Ser Asn Thr Val Arg Ser Gln Asn Asp Asn	
20 25 30	
AGA GAA CGG CAG GAG CAC AAC GAC AGA CGG AGC CTT GGC CAC CCT GAG	144
Arg Glu Arg Gln Glu His Asn Asp Arg Arg Ser Leu Gly His Pro Glu	
35 40 45	
CCA TTA TCT AAT GGA CGA CCC CAG GGT AAC TCC CGG CAG GTG GTG GAG	192
Pro Leu Ser Asn Gly Arg Pro Gln Gly Asn Ser Arg Gln Val Val Glu	
50 55 60	
CAA GAT GAG GAA GAA GAT GAG GAG CTG ACA TTG AAA TAT GGC GCC AAG	240
Gln Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Thr Leu Lys Tyr Gly Ala Lys	
65 70 75 80	
CAT	243
His	

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEC ID N°: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2.088 pares de bases

5 (B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: doble

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

10 (iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) EMPLAZAMIENTO:1..2088

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 3:

ES 2 372 586 T3

ATG CTG CCC GGT TTG GCA CTG CTC CTG CTG GCC GCC TGG ACG GCT CGG	48
Met Leu Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Trp Thr Ala Arg	
1 5 10 15	
GCG CTG GAG GTA CCC ACT GAT GGT AAT GCT GGC CTG CTG GCT GAA CCC	96
Ala Leu Glu Val Pro Thr Asp Gly Asn Ala Gly Leu Leu Ala Glu Pro	
20 25 30	
CAG ATT GCC ATG TTC TGT GGC AGA CTG AAC ATG CAC ATG AAT GTC CAG	144
Gln Ile Ala Met Phe Cys Gly Arg Leu Asn Met His Met Asn Val Gln	
35 40 45	
AAT GGG AAG TGG GAT TCA GAT CCA TCA GGG ACC AAA ACC TGC ATT GAT	192
Asn Gly Lys Trp Asp Ser Asp Pro Ser Gly Thr Lys Thr Cys Ile Asp	
50 55 60	
ACC AAG GAA GGC ATC CTG CAG TAT TGC CAA GAA GTC TAC CCT GAA CTG	240
Thr Lys Glu Gly Ile Leu Gln Tyr Cys Gln Glu Val Tyr Pro Glu Leu	
65 70 75 80	
CAG ATC ACC AAT GTG GTA GAA GCC AAC CAA CCA GTG ACC ATC CAG AAC	288
Gln Ile Thr Asn Val Val Glu Ala Asn Gln Pro Val Thr Ile Gln Asn	
85 90 95	
TGG TGC AAG CGG GGC CGC AAG CAG TGC AAG ACC CAT CCC CAC TTT GTG	336
Trp Cys Lys Arg Gly Arg Lys Gln Cys Lys Thr His Pro His Phe Val	
100 105 110	
ATT CCC TAC CGC TGC TTA GTT GGT GAG TTT GTA AGT GAT GCC CTT CTC	384
Ile Pro Tyr Arg Cys Leu Val Gly Glu Phe Val Ser Asp Ala Leu Leu	
115 120 125	
GTT CCT GAC AAG TGC AAA TTC TTA CAC CAG GAG AGG ATG GAT GTT TGC	432
Val Pro Asp Lys Cys Lys Phe Leu His Gln Glu Arg Met Asp Val Cys	
130 135 140	
GAA ACT CAT CTT CAC TGG CAC ACC GTC GCC AAA GAG ACA TGC AGT GAG	480
Glu Thr His Leu His Trp His Thr Val Ala Lys Glu Thr Cys Ser Glu	
145 150 155 160	
AAG AGT ACC AAC TTG CAT GAC TAC GGC ATG TTG CTG CCC TGC GGA ATT	528
Lys Ser Thr Asn Leu His Asp Tyr Gly Met Leu Leu Pro Cys Gly Ile	
165 170 175	
GAC AAG TTC CGA GGG GTA GAG TTT GTG TGT TGC CCA CTG GCT GAA GAA	576
Asp Lys Phe Arg Gly Val Glu Phe Val Cys Cys Pro Leu Ala Glu Glu	
180 185 190	
AGT GAC AAT GTG GAT TCT GCT GAT GCG GAG GAG GAT GAC TCG GAT GTC	624
Ser Asp Asn Val Asp Ser Ala Asp Ala Glu Glu Asp Asp Ser Asp Val	
195 200 205	
TGG TGG GGC GGA GCA GAC ACA GAC TAT GCA GAT GGG AGT GAA GAC AAA	672

ES 2 372 586 T3

Trp	Trp	Gly	Gly	Ala	Asp	Thr	Asp	Tyr	Ala	Asp	Gly	Ser	Glu	Asp	Lys	
	210					215					220					
GTA	GTA	GAA	GTA	GCA	GAG	GAG	GAA	GAA	GTG	GCT	GAG	GTG	GAA	GAA	GAA	720
Val	Val	Glu	Val	Ala	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	
225					230					235					240	
GAA	GCC	GAT	GAT	GAC	GAG	GAC	GAT	GAG	GAT	GGT	GAT	GAG	GTA	GAG	GAA	768
Glu	Ala	Asp	Asp	Asp	Glu	Asp	Asp	Glu	Asp	Gly	Asp	Glu	Val	Glu	Glu	
				245					250					255		
GAG	GCT	GAG	GAA	CCC	TAC	GAA	GAA	GCC	ACA	GAG	AGA	ACC	ACC	AGC	ATT	816
Glu	Ala	Glu	Glu	Pro	Tyr	Glu	Glu	Ala	Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Ser	Ile	
			260					265						270		
GCC	ACC	ACC	ACC	ACC	ACC	ACC	ACA	GAG	TCT	GTG	GAA	GAG	GTG	GTT	CGA	864
Ala	Thr	Glu	Ser	Val	Glu	Glu	Val	Val	Arg							
		275					280						285			
GTT	CCT	ACA	ACA	GCA	GCC	AGT	ACC	CCT	GAT	GCC	GTT	GAC	AAG	TAT	CTC	912
Val	Pro	Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Thr	Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Lys	Tyr	Leu	
	290					295					300					
GAG	ACA	CCT	GGG	GAT	GAG	AAT	GAA	CAT	GCC	CAT	TTC	CAG	AAA	GCC	AAA	960
Glu	Thr	Pro	Gly	Asp	Glu	Asn	Glu	His	Ala	His	Phe	Gln	Lys	Ala	Lys	
305					310					315					320	
GAG	AGG	CTT	GAG	GCC	AAG	CAC	CGA	GAG	AGA	ATG	TCC	CAG	GTC	ATG	AGA	1008
Glu	Arg	Leu	Glu	Ala	Lys	His	Arg	Glu	Arg	Met	Ser	Gln	Val	Met	Arg	
				325					330					335		
GAA	TGG	GAA	GAG	GCA	GAA	CGT	CAA	GCA	AAG	AAC	TTG	CCT	AAA	GCT	GAT	1056
Glu	Trp	Glu	Glu	Ala	Glu	Arg	Gln	Ala	Lys	Asn	Leu	Pro	Lys	Ala	Asp	
			340					345					350			
AAG	AAG	GCA	GTT	ATC	CAG	CAT	TTC	CAG	GAG	AAA	GTG	GAA	TCT	TTG	GAA	1104
Lys	Lys	Ala	Val	Ile	Gln	His	Phe	Gln	Glu	Lys	Val	Glu	Ser	Leu	Glu	
		355				360						365				
CAG	GAA	GCA	GCC	AAC	GAG	AGA	CAG	CAG	CTG	GTG	GAG	ACA	CAC	ATG	GCC	1152
Gln	Glu	Ala	Ala	Asn	Glu	Arg	Gln	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	His	Met	Ala	
	370					375						380				
AGA	GTG	GAA	GCC	ATG	CTC	AAT	GAC	CGC	CGC	CGC	CTG	GCC	CTG	GAG	AAC	1200
Arg	Val	Glu	Ala	Met	Leu	Asn	Asp	Arg	Arg	Arg	Leu	Ala	Leu	Glu	Asn	
385					390					395					400	
TAC	ATC	ACC	GCT	CTG	CAG	GCT	GTT	CCT	CCT	CGG	CCT	CGT	CAC	GTG	TTC	1248
Tyr	Ile	Thr	Ala	Leu	Gln	Ala	Val	Pro	Pro	Arg	Pro	Arg	His	Val	Phe	
				405						410				415		
AAT	ATG	CTA	AAG	AAG	TAT	GTC	CGC	GCA	GAA	CAG	AAG	GAC	AGA	CAG	CAC	1296
Asn	Met	Leu	Lys	Lys	Tyr	Val	Arg	Ala	Glu	Gln	Lys	Asp	Arg	Gln	His	
			420					425					430			
ACC	CTA	AAG	CAT	TTC	GAG	CAT	GTG	CGC	ATG	GTG	GAT	CCC	AAG	AAA	GCC	1344
Thr	Leu	Lys	His	Phe	Glu	His	Val	Arg	Met	Val	Asp	Pro	Lys	Lys	Ala	
		435					440					445				
GCT	CAG	ATC	CGG	TCC	CAG	GTT	ATG	ACA	CAC	CTC	CGT	GTG	ATT	TAT	GAG	1392
Ala	Gln	Ile	Arg	Ser	Gln	Val	Met	Thr	His	Leu	Arg	Val	Ile	Tyr	Glu	
	450					455					460					
CGC	ATG	AAT	CAG	TCT	CTC	TCC	CTG	CTC	TAC	AAC	GTG	CCT	GCA	GTG	GCC	1440

ES 2 372 586 T3

Arg 465	Met	Asn	Gln	Ser	Leu 470	Ser	Leu	Leu	Tyr	Asn 475	Val	Pro	Ala	Val	Ala 480		
GAG Glu	GAG Glu	ATT Ile	CAG Gln	GAT Asp 485	GAA Glu	GTT Val	GAT Asp	GAG Glu	CTG Leu 490	CTT Leu	CAG Gln	AAA Lys	GAG Glu	CAA Gln 495	AAC Asn	1488	
TAT Tyr	TCA Ser	GAT Asp 500	GAC Asp	GTC Val	TTG Leu	GCC Ala	AAC Asn	ATG Met 505	ATT Ile	AGT Ser	GAA Glu	CCA Pro	AGG Arg 510	ATC Ile	AGT Ser	1536	
TAC Tyr	GGA Gly	AAC Asn 515	GAT Asp	GCT Ala	CTC Leu	ATG Met	CCA Pro 520	TCT Ser	TTG Leu	ACC Thr	GAA Glu	ACG Thr	AAA Lys 525	ACC Thr	ACC Thr	1584	
GTG Val	GAG Glu	CTC Leu 530	CTT Leu	CCC Pro	GTG Val	AAT Asn 535	GGA Gly	GAG Glu	TTC Phe	AGC Ser	CTG Leu 540	GAC Asp	GAT Asp	CTC Leu	CAG Gln	1632	
CCG Pro 545	TGG Trp	CAT His	TCT Ser	TTT Phe 550	GGG Gly	GCT Ala	GAC Asp	TCT Ser	GTG Val	CCA Pro 555	GCC Ala	AAC Asn	ACA Thr	GAA Glu	AAC Asn 560	1680	
GAA Glu	GTT Val	GAG Glu	CCT Pro	GTT Val 565	GAT Asp	GCC Ala	CGC Arg	CCT Pro	GCT Ala 570	GCC Ala	GAC Asp	CGA Arg	GGA Gly	CTG Leu 575	ACC Thr	1728	
ACT Thr	CGA Arg	CCA Pro	GGT Gly 580	TCT Ser	GGG Gly	TTG Leu	ACA Thr	AAT Asn 585	ATC Ile	AAG Lys	ACG Thr	GAG Glu	GAG Glu 590	ATC Ile	TCT Ser	1776	
GAA Glu	GTG Val	AAG Lys 595	ATG Met	GAT Asp	GCA Ala	GAA Glu	TTC Phe 600	CGA Arg	CAT His	GAC Asp	TCA Ser	GGA Gly 605	TAT Tyr	GAA Glu	GTT Val	1824	
CAT His 610	CAT His	CAA Gln	AAA Lys	TTG Leu	GTG Val	TTC Phe 615	TTT Phe	GCA Ala	GAA Glu	GAT Asp 620	GTG Val	GGT Gly	TCA Ser	AAC Asn	AAA Lys	1872	
GGT Gly 625	GCA Ala	ATC Ile	ATT Ile	GGA Gly 630	CTC Leu	ATG Met	GTG Val	GGC Gly	GGT Gly	GTT Val 635	GTC Val	ATA Ile	GCG Ala	ACA Thr	GTG Val 640	1920	
ATC Ile	GTC Val	ATC Ile	ACC Thr 645	TTG Leu	GTG Val	ATG Met	CTG Leu	AAG Lys	AAG Lys 650	AAA Lys	CAG Gln	TAC Tyr	ACA Thr	TCC Ser 655	ATT Ile	1968	
CAT His	CAT His	GGT Gly 660	GTG Val	GTG Val	GAG Glu	GTT Val	GAC Asp 665	GCC Ala	GCT Ala	GTC Val	ACC Thr	CCA Pro	GAG Glu 670	GAG Glu	CGC Arg	2016	
CAC His	CTG Leu	TCC Ser 675	AAG Lys	ATG Met	CAG Gln	CAG Gln	AAC Asn 680	GGC Gly	TAC Tyr	GAA Glu	AAT Asn 685	CCA Pro	ACC Thr	TAC Tyr	AAG Lys	2064	
TTC Phe 690	TTT Phe	GAG Glu	CAG Gln	ATG Met	CAG Gln	AAC Asn 695	TAG *									2088	

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEC ID N°: 4: oligo

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 38 pares de bases

5

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: simple

- (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO
- 5 (ix) CARACTERÍSTICAS:
- (A) NOMBRE/CLAVE: -
- (B) EMPLAZAMIENTO:1..38
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 4:
- CGGAATTCATCGATTCCACCATGCTCACATTCATGGCC 38
- 10 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEC ID N°: 5: oligo
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 43 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) NÚMERO DE CADENAS: simple
- 15 (D) CONFIGURACIÓN: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO
- (ix) CARACTERÍSTICAS:
- 20 (A) NOMBRE/CLAVE: -
- (B) EMPLAZAMIENTO:1..43
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 5:
- CCGCTCGAGTCATTGTGCGACCATGCTTCGCTCCGTATTTGAGG 43
- (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEC ID N°: 6: oligo 8172
- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 27 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) NÚMERO DE CADENAS: simple

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

5 (ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: -

(B) EMPLAZAMIENTO:1..27

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 6:

CAAAGATCTGATGCAGAATTCCGACAT 27

10 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEC ID Nº: 7: oligo 8181

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 59 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: simple

15 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(ix) CARACTERÍSTICAS:

20 (A) NOMBRE/CLAVE: -

(B) EMPLAZAMIENTO:1..59

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 7:

CAAGCGGCCGCTCATCCCTTGTCATCGTCGTCCTTGAGTCTCCGTTCTGCATCTGCTC 59

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEC ID Nº: 8: oligo 8171

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: simple

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

5 (ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: -

(B) EMPLAZAMIENTO:1..27

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 8:

CAAAGATCTAAGAAACAGTACACATCC 27

10 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEC ID N°: 9: oligo

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 29 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: simple

15 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(ix) CARACTERÍSTICAS:

20 (A) NOMBRE/CLAVE: -

(B) EMPLAZAMIENTO:1..29

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 9:

ccatcgatggctaCATCTTCACTTCAGAG 29

(2) INFORMACIONES SOBRE LA SEC ID N°: 10: oligo

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 31 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: simple

(D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

5 (ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: -

(B) EMPLAZAMIENTO:1..31

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 10:

ccatcgatggctaTTTTTGATGATGAACTTC 31

10 (2) INFORMACIONES SOBRE LA SEC ID Nº: 11:oligo

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: nucleótido

(C) NÚMERO DE CADENAS: simple

15 (D) CONFIGURACIÓN: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) CADENA COMPLEMENTARIA: NO

(ix) CARACTERÍSTICAS:

20 (A) NOMBRE/CLAVE: -

(B) EMPLAZAMIENTO:1..17

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 11:

CCGTGGAGCTCCTCCCG 17

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Procedimiento para poner en evidencia o para aislamiento de compuestos destinados al tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, que comprende al menos una etapa de detección de la inhibición de la interacción entre el APP y un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos 1 a 213 de PS1 o la secuencia de aminoácidos 1 a 87 de PS2.
- 2.** Procedimiento para poner en evidencia o para aislamiento de compuestos capaces de inhibir al menos en parte la interacción entre una presenilina y el péptido β -amiloide, caracterizado por que comprende al menos una etapa de marcado de las presenilinas o los fragmentos de las mismas y una etapa de detección de la inhibición de la interacción entre el péptido $A\beta_{1-42}$ y el extremo N-terminal de las presenilinas.
- 10 **3.** Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que la presenilina es PS2.
- 4.** Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el extremo N-terminal de la presenilina es la parte 1-87 de la PS2.
- 15 **5.** Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
- el péptido $A\beta_{1-42}$ es absorbido previamente sobre una membrana de nitrocelulosa por incubación.
 - se añade un extracto bacteriano que contiene todo o parte de una presenilina para incubación con la molécula o una mezcla que contiene diferentes moléculas para ensayar
- 20 - la interacción de la presenilina con el péptido $A\beta_{1-42}$ sobre el filtro de nitrocelulosa se pone en evidencia con ayuda de proteínas marcadoras de las presenilinas.
- 6.** Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que una de las proteínas marcadoras es la proteína fijadora de la etiqueta-S, acoplada a la fosfatasa alcalina.

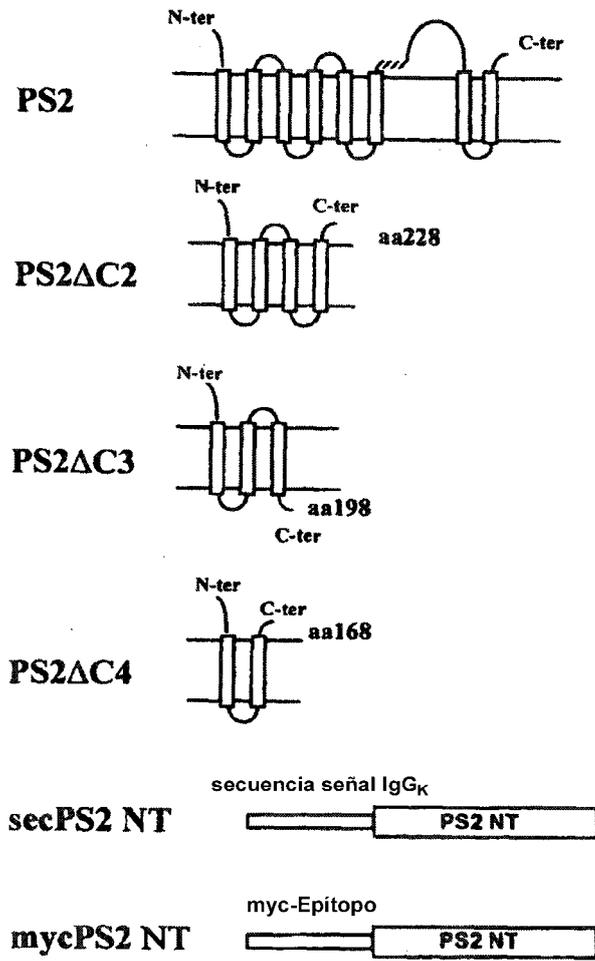


Figura 1A

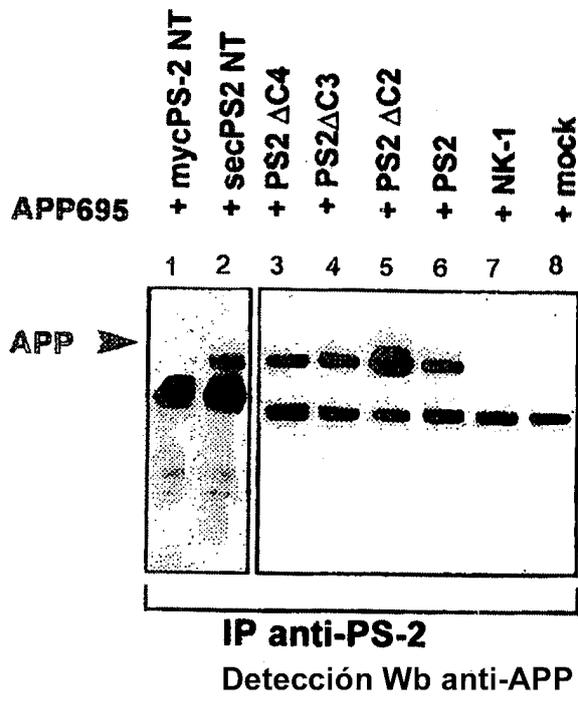


Figura 2.

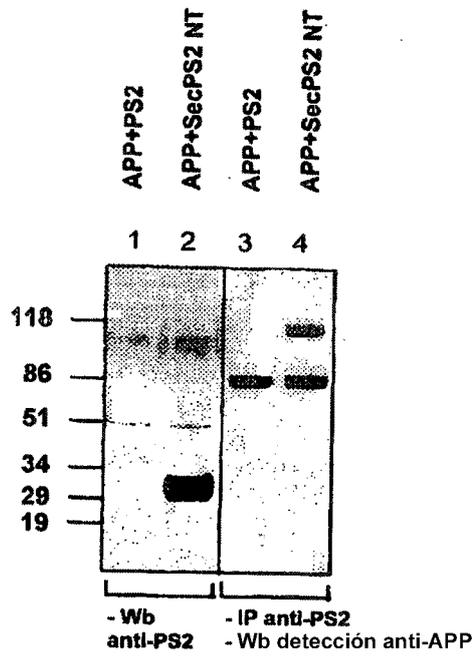


Figura 3A

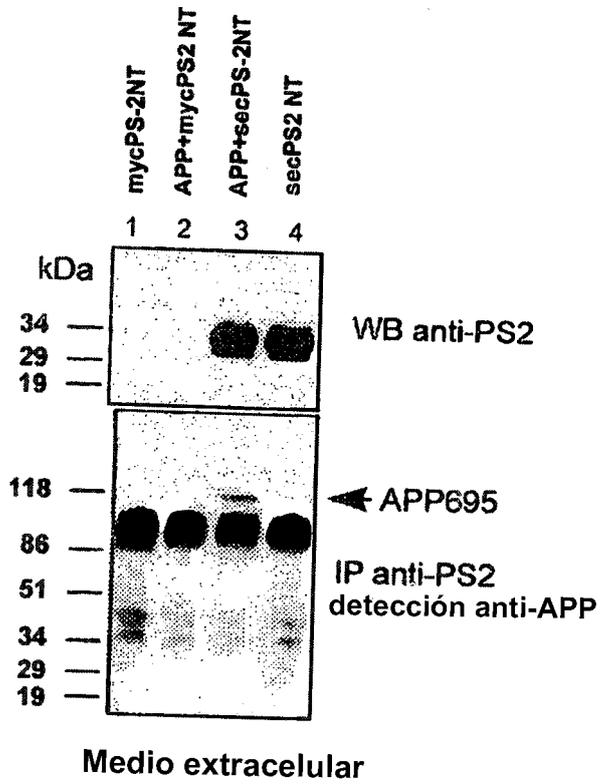


Figura 3B

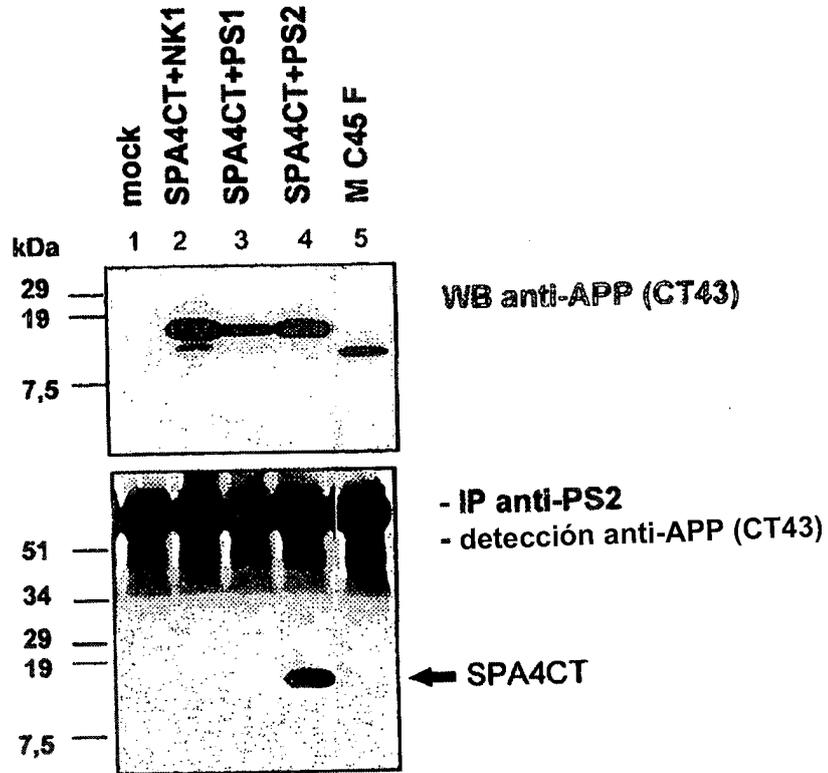


Figura 4A

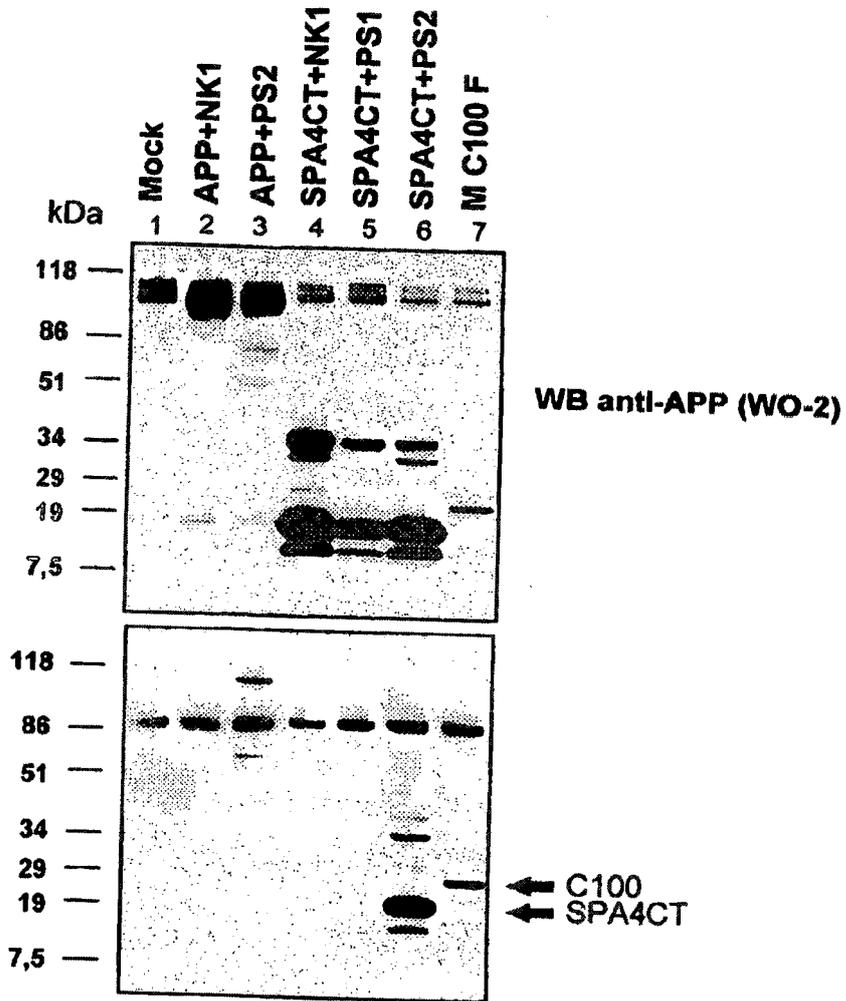


Figura 4B

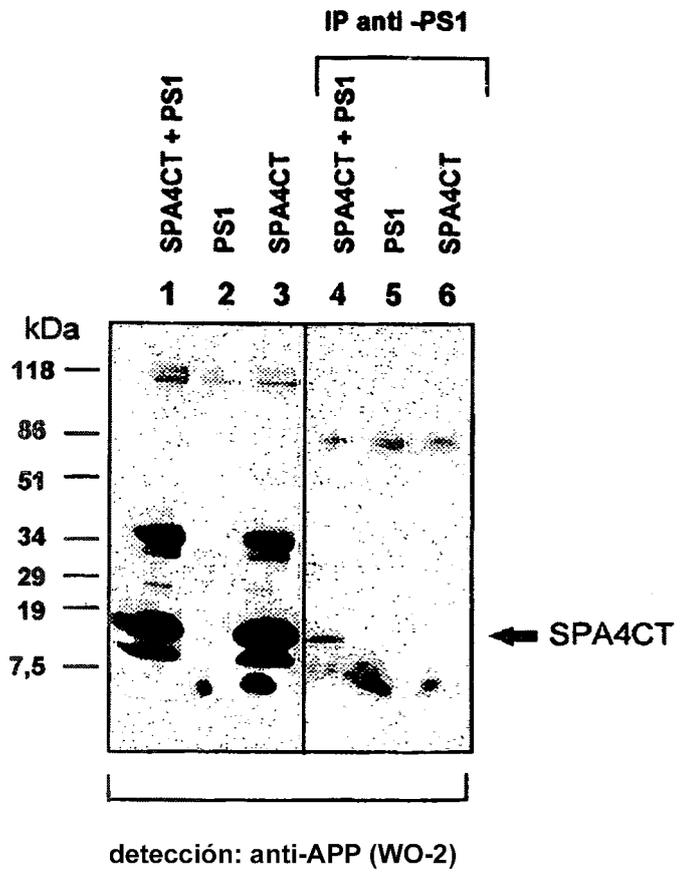


Figura 5A

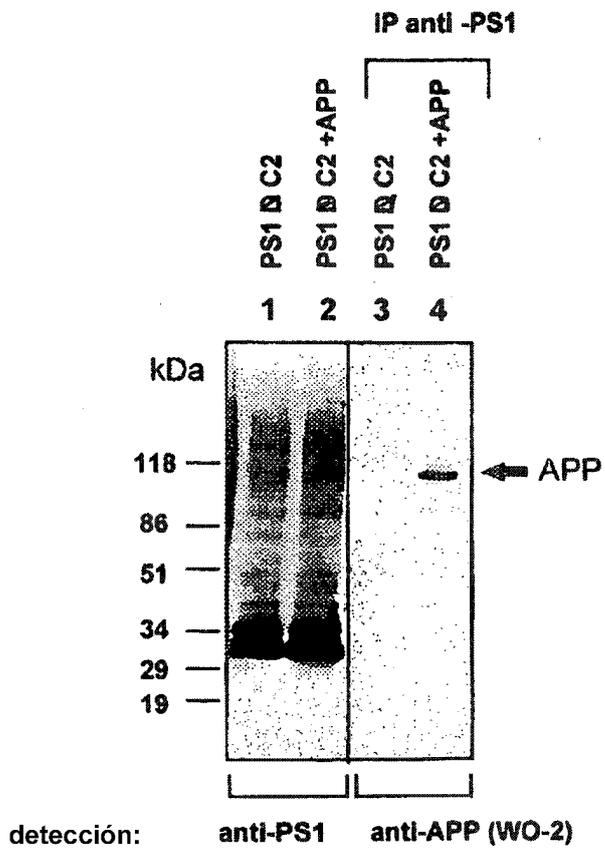


Figura 5B

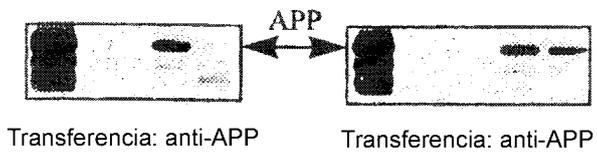
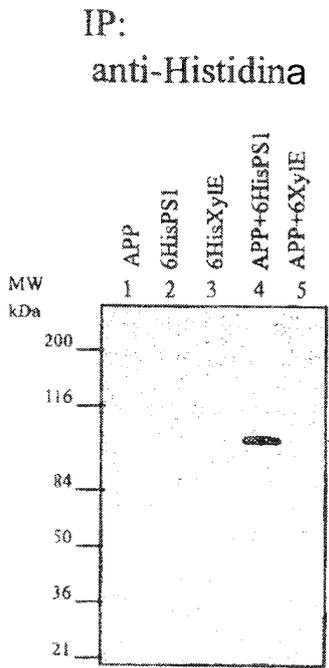


Figura 6A

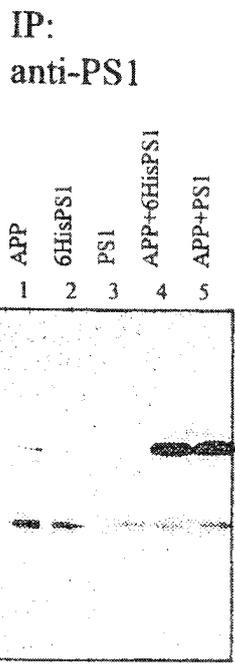


Figura 6B

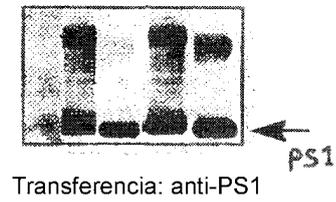
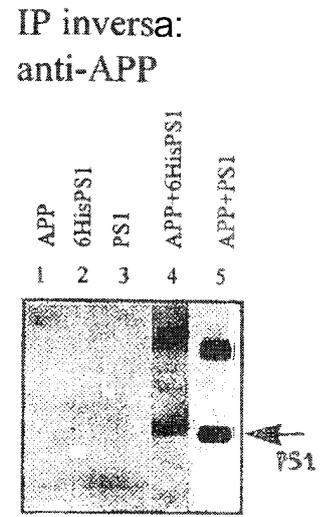


Figura 6C

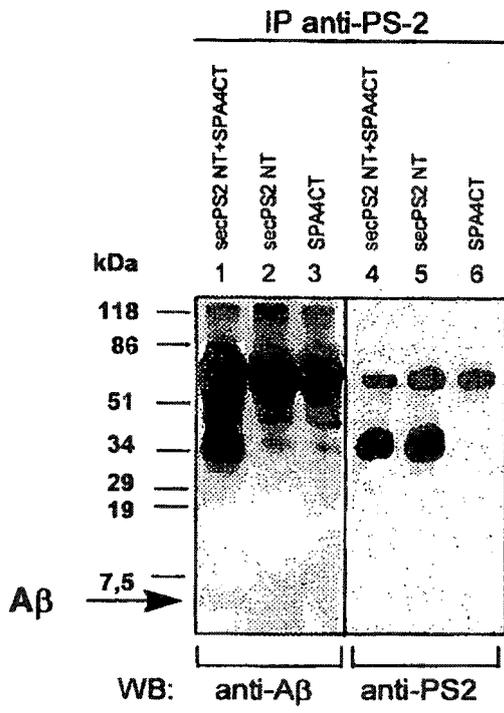


Figura 7

Dependencia de la dosis en función de la concentración de PS2NT

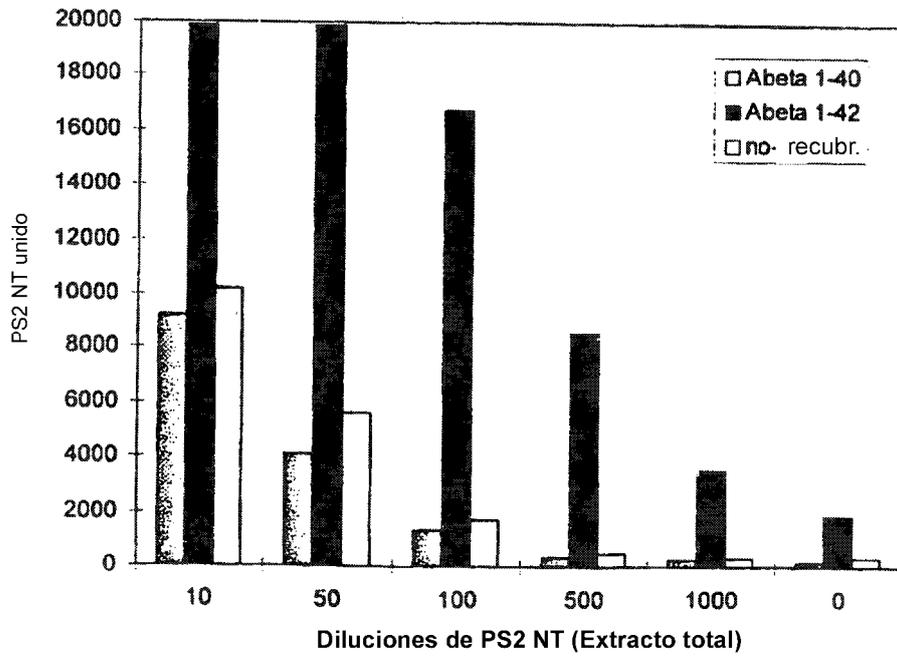


Figura 8A

Dependencia de la dosis en función de la concentración de A β

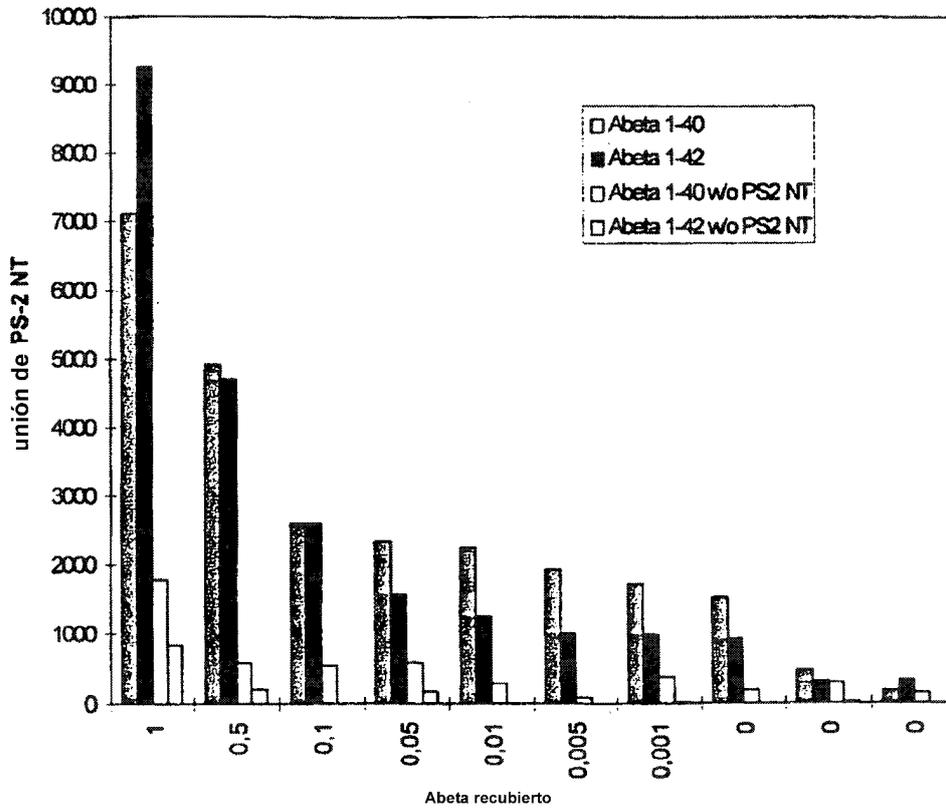
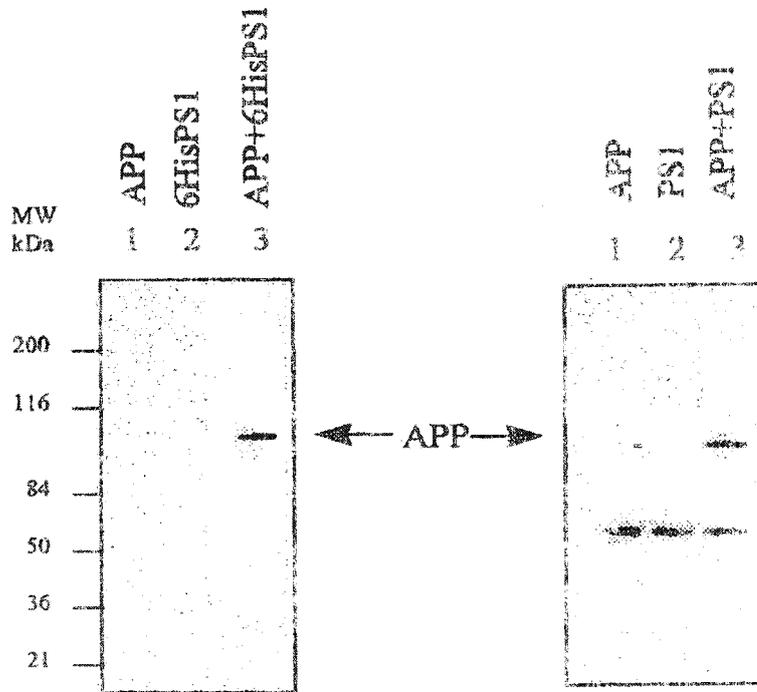


Figura 8B

IP: anti-Histidina

IP: anti-PS1

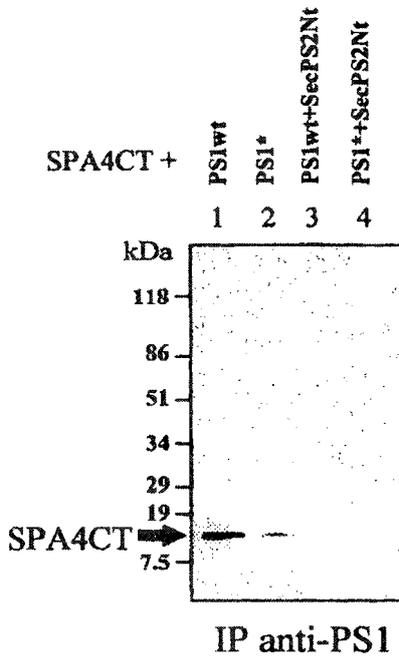


Transf.: anti-APP(α CT43)

Transf.: anti-APP(22C11)

Figura 9A

Figura 9B



WB WO2 (antiA β)

Figura 10A

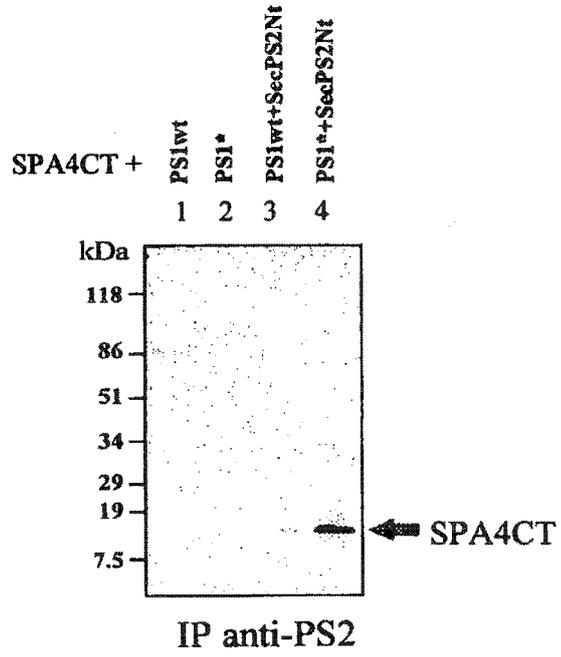


Figura 10B

INTERACCIÓN PS2NT/ β amiloide

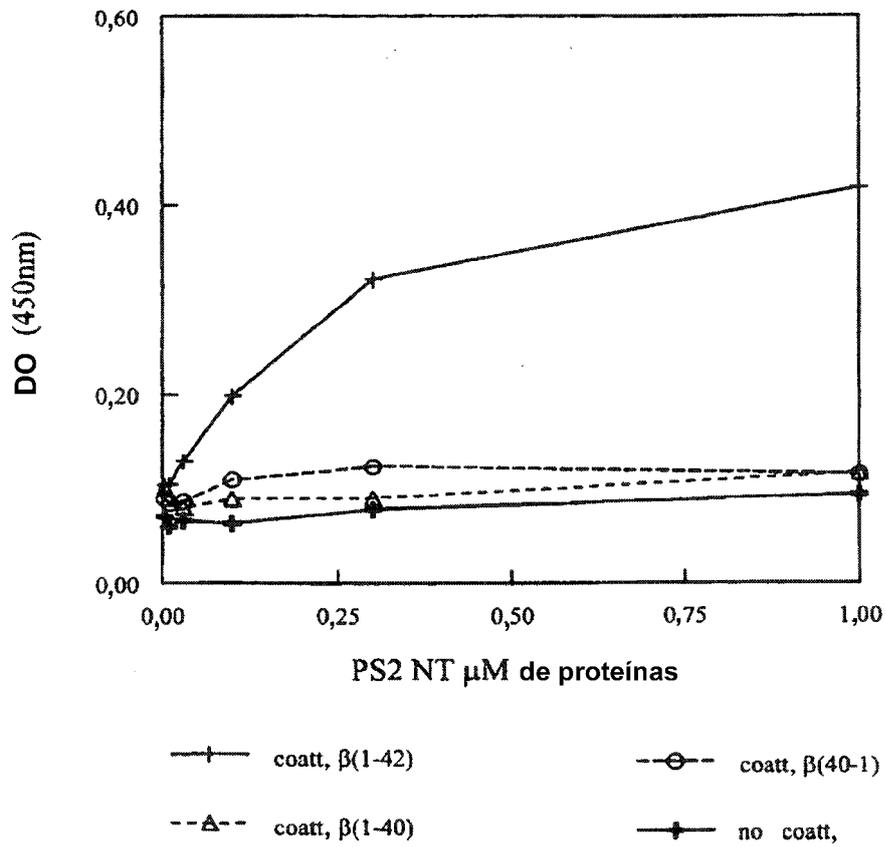


Figura 11

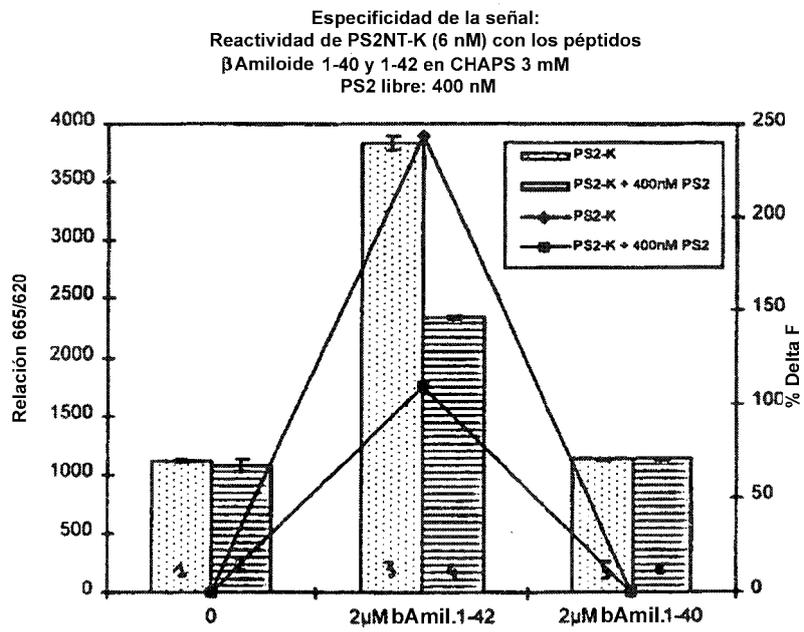


Figura 12

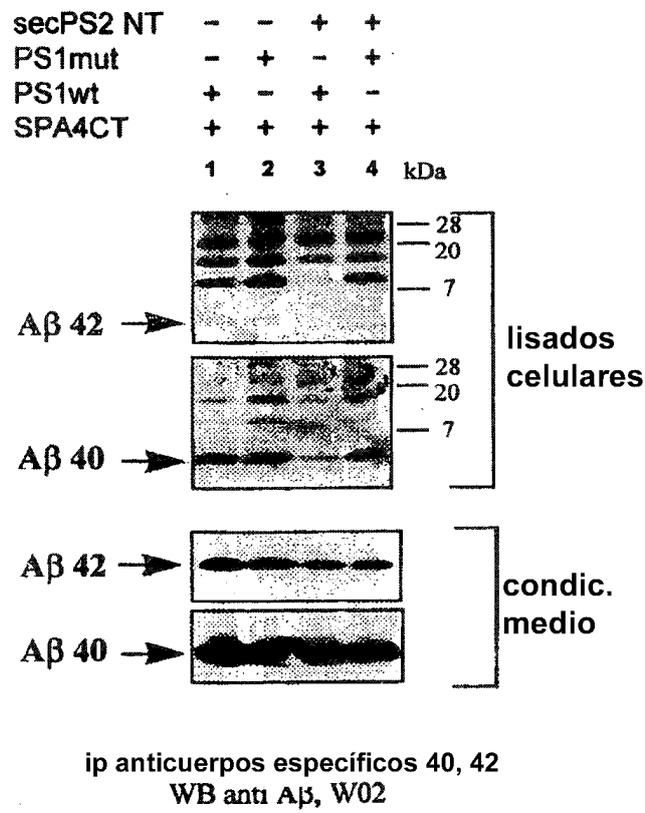


Figura 13A

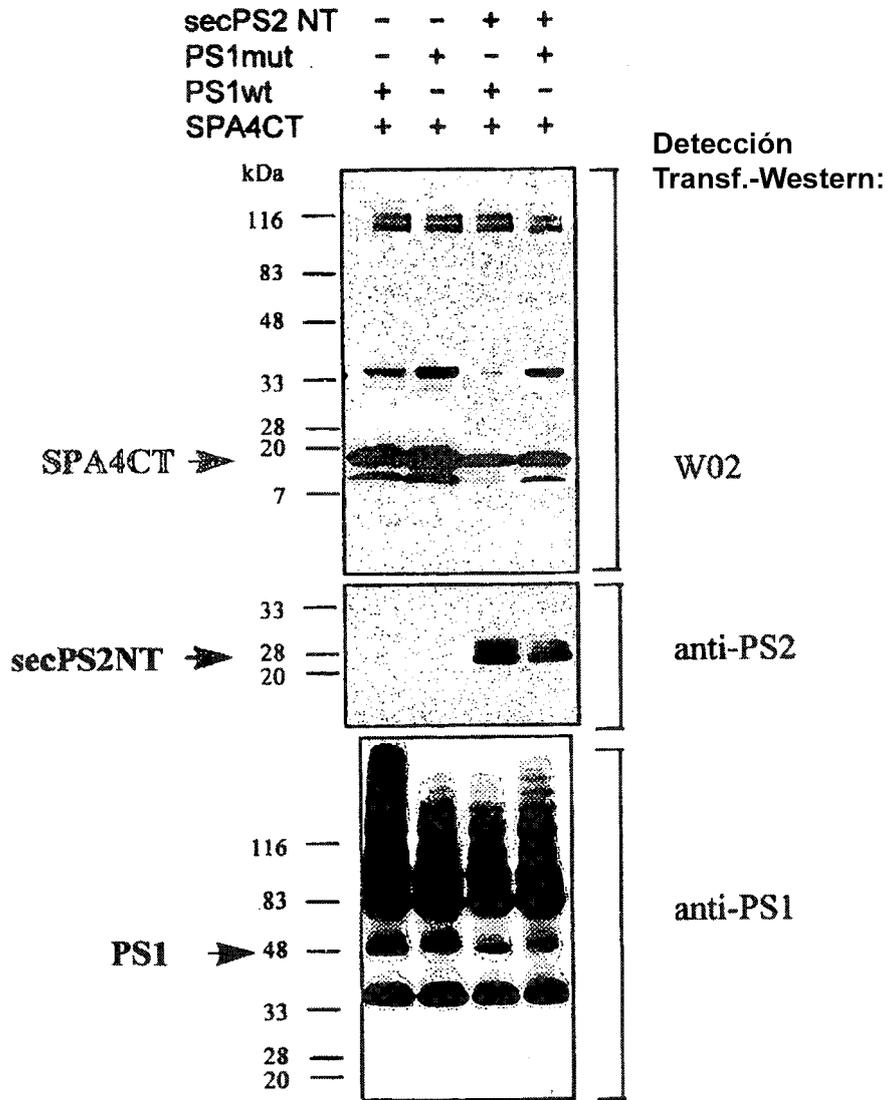


Figura 13B

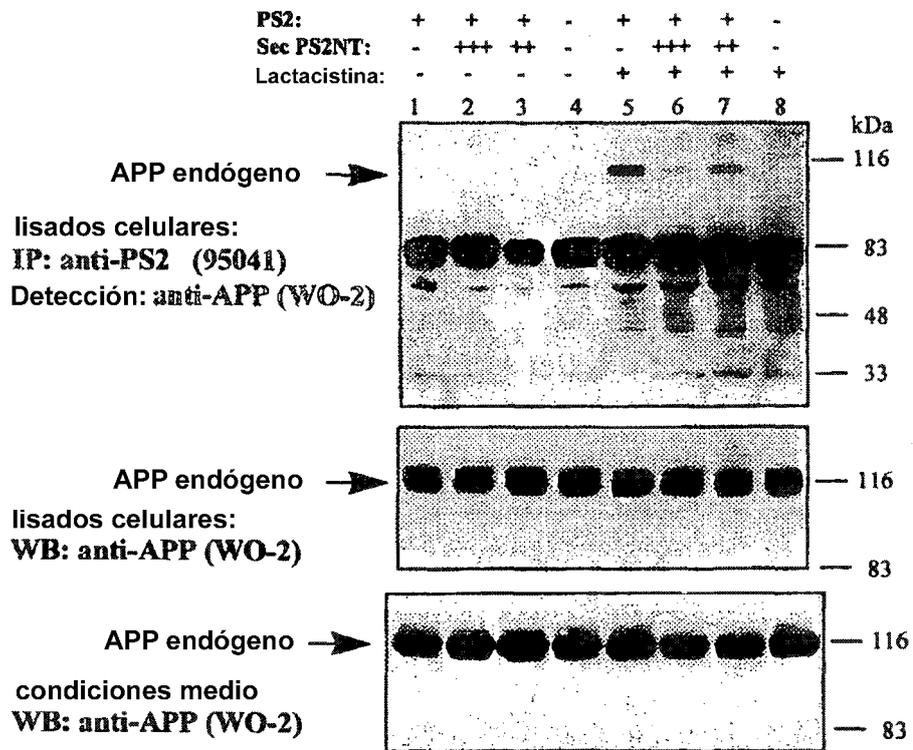


Figura 14

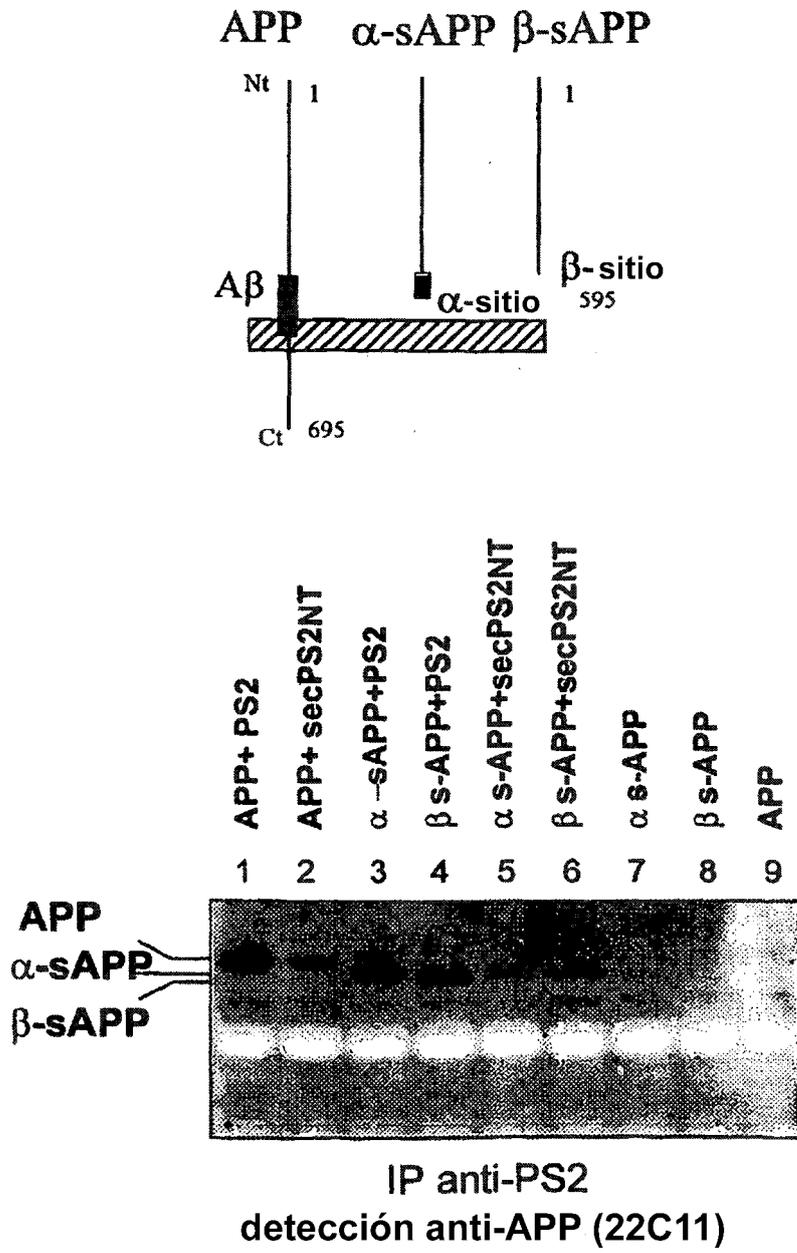


Figura 15