

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-513480  
(P2005-513480A)

(43) 公表日 平成17年5月12日(2005.5.12)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

GO 1 N 33/53

F I

GO 1 N 33/53

D

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2003-555209 (P2003-555209)  
 (86) (22) 出願日 平成14年10月31日 (2002.10.31)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年8月9日 (2004.8.9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2002/001671  
 (87) 国際公開番号 W02003/054547  
 (87) 国際公開日 平成15年7月3日 (2003.7.3)  
 (31) 優先権主張番号 10/032, 229  
 (32) 優先日 平成13年12月20日 (2001.12.20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

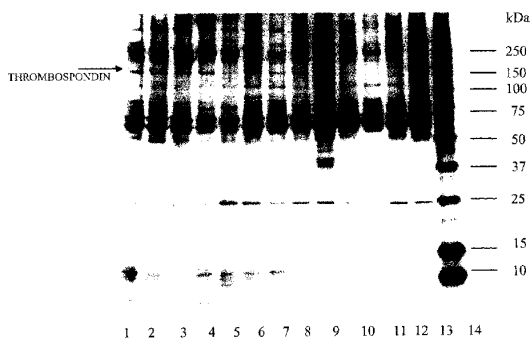
(71) 出願人 504198957  
 シン. クス ファーマ、インコーポレイテッド  
 カナダ国、エム9ダブリュー 1イー7  
 オンタリオ、トロント、マーマック ドライブ 1  
 (74) 代理人 100086461  
 弁理士 齋藤 和則  
 (74) 代理人 100086287  
 弁理士 伊東 哲也  
 (72) 発明者 ヤコブスキー、ジョージ  
 カナダ国、エルOジー 1ジェイO オンタリオ、ケトルビィ、キール ストリート  
 アール1 11725

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トロンボスポンジンを使用する痴呆の診断および治療

(57) 【要約】

MCI、およびアルツハイマー病 (AD) を含む種々の形態の痴呆を診断するための方法が開示されている。この方法は、体液中、好ましくは血液または血液産物中の生化学マーカー、特にトロンボスポンジンの存在を直接検出する工程を含む。検出は、トロンボスポンジンに対して特異的な抗体、あるいはトロンボスポンジン抗体に対する自己抗体を組込むイムノアッセイによって行われる。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

哺乳動物における痴呆を診断するための方法であって、  
前記哺乳動物から体液の試料を得る工程と、  
トロンボスポンジンを示すマーカーに特異的に結合する少なくとも 1 つの抗体と前記試料を接触させる工程と、  
前記試料中のトロンボスポンジンの存在を測定する工程と、  
トロンボスポンジンの存在を痴呆の発生と関連させる工程と、  
を含んでなる方法。

**【請求項 2】**

前記痴呆がアルツハイマー痴呆であって、  
哺乳動物における痴呆を診断するための請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記体液の試料が、血液または任意の血液産物である請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記試料の測定が、イムノアッセイ法によって行われる請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

痴呆の進行を診断およびモニタリングするための診断キットであって、  
トロンボスポンジンを示すマーカーに特異的である少なくとも 1 つの抗体であって、固体担体上に固定される能力がある前記抗体またはマーカーと、  
前記マーカーに結合する少なくとも 1 つの標識抗体とを含んでなり、  
それによってそれに特異的なマーカー、抗体、またはそれらの免疫学的に検出可能なフラグメントの存在を測定する少なくとも 1 つの分析が、体液の試料に関して行われるキット。

**【請求項 6】**

前記体液の試料が、血液または血液産物である請求項 5 に記載のキット。

**【請求項 7】**

診断およびモニタリングが、体液の単一の試料に関して行われる請求項 5 に記載のキット。

**【請求項 8】**

少なくとも 1 つの分析が体液の第 1 の試料に関して行われ、かつ少なくとももう 1 つの分析が体液の第 2 の試料に関して行われるように、診断およびモニタリングが体液の複数の試料に関して行われる請求項 5 に記載のキット。

**【請求項 9】**

体液の第 1 および第 2 の試料が、異なる期間で得られる請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

イムノアッセイの原理による痴呆を測定するための方法において、トロンボスポンジンに対する少なくとも 1 つの抗体、およびトロンボスポンジンまたは抗体に対する結合パートナーとともに血清または血漿試料がインキュベートされ、それによってトロンボスポンジンに対する抗体または結合パートナーのいずれかが測定可能な基で標識され、それによって形成された測定可能な基を含有する免疫複合体が分離され、かつ分離されまたは依然残存する相における測定可能な基が試料からのトロンボスポンジンの尺度として測定されることを特徴とする方法。

**【請求項 11】**

トロンボスポンジンに対する抗体、およびトロンボスポンジンに対する抗体と測定可能な基からの抱合体とともに試料がインキュベートされ、形成された免疫複合体が相分離によって分離され、かつ測定可能な基が相の 1 つにおいて測定されることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

トロンボスポンジンに対する抗体、およびトロンボスポンジンと測定可能な基の抱合体

10

20

30

40

50

とともに試料がインキュベートされ、形成された免疫複合体が相分離によって分離され、かつ測定可能な基が相の1つにおいて測定されることを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項13】

痴呆の測定のためのトロンボスポンジンに対する抗体の使用。

【請求項14】

痴呆の測定のためのトロンボスポンジン抗体に対する自己抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、トロンボスポンジンを使用する痴呆の診断および治療のための方法に関し、特にトロンボスポンジンの存在を定量化するための工程および装置、例えば、セントラルボまたはポイント・オブ・ケア免疫アッセイ、抗体を使用し、循環体液中のトロンボスポンジンの存在を測定し、それによって痴呆、特にアルツハイマー痴呆の診断を可能にする診断キットに関する。本発明はさらに、治療的介入の工程およびそれに関連した治療標的に関する。

【背景技術】

【0002】

認識障害は、社会的に関心が増している深刻な医療問題である。この疾患と関係している衰退を有効に停止させ、または逆転させる治療方法が開発されることが重要である。

一般に認められた基準によれば、痴呆の診断は、記憶障害のほかに複数の認識欠損の存在を必要とする。疾患の初期段階では、記憶障害が唯一の臨床所見であるが、この唯一の所見は痴呆の診断基準を満たすことはない。痴呆の診断を満たすには、認識障害が社会的または職業的機能が低下する程度であり、患者の正常な能力の減少を示す機能的障害を伴う必要がある。

【0003】

精神状態の程度を規定し、認識障害の程度に基づき患者の状態を分類化する診断追求型の種々のスケールが存在する。通常、簡易ポータブル知的状態質問表(SPMSEQ)、フォルシュタイン(Folstein)ミニ・メンタルステータス検査(MMSE)、または臨床的痴呆評価スケール(CDR)などの試験により認識障害が確認される。MMSEには、見当識、記憶、注意力および計算力、言語、命令に従う能力、読解力、文章力、および図形の複写能力が含まれる。注意すべきは、教育、職業、および文化的・背景因子がしばしばMMSEスコアに大きく影響を及ぼすことである。CDRは、痴呆の種々の段階を介して正常な機能から対象を分類化するように設計されたものである。

年齢関連性認識衰退は、他の認識機能を失うことのない記憶喪失によって特徴づけられる。年齢関連性認識減退に類似した障害は、世界保健機関のICD-10分類(国際疾病分類第10版)に「軽度認識異常」として記載されている。軽度認識異常の診断は、認識衰退が一時的に脳または全身の疾患に関連している場合になされうる。年齢関連性認識衰退は、正常範囲内で個人の年齢に示される認識変化を表す。年齢関連性認識衰退は、痴呆と関連した5つの広範囲の神経心理的領域、すなわち、記憶と学習、注意力と集中力、思考、言語、および視覚空間機能のうちの1つのみによって特徴づけられる。

【0004】

国際老年精神医学会の所見によれば、年齢関連性認識衰退の診断を行うには追加の基準が満たされなければならない。これらの基準としては、信頼すべき筋からの認識衰退の報告、少なくとも6か月間の緩徐な開始、およびMMSEなどの標準化神経心理学的試験の基準を下回る1つ以上の標準偏差のスコアが挙げられる。

「軽度認識障害」(MCI)なる用語は、場合によっては痴呆につながり、またはこれにつながらない状態を表している。少なくとも1つの試験により、軽度アルツハイマー病患者よりも急速な衰退ではないが、軽度認識障害患者が対照患者よりも認識機能の急速な衰退を示したことがわかる。軽度認識障害はしばしば、

10

20

30

40

50

痴呆、または年齢や教育的背景で考えられる程度を上回る程に他の認識機能の顕著な障害を伴わない軽度な近時記憶喪失によって特徴づけられる。

#### 【0005】

軽度認識障害とADとの関係の仮説は、生理学上の類似性に基づく。MCI患者はしばしば顕著な医学的側頭葉萎縮症を示すが、その他は高い脳脊髄および/または低いCSF-BBアミロイド(ABB)42濃度を有することが報告されており、これらはADに共通している老人斑と関係がある因子である。さらに、それぞれの症状間には遺伝的類似性が存在することが報告されている。例えば、家族性ADの最強の生理学的予測因子は、アポリタンパク質E遺伝子(ApoE)の存在でありうるとともに、E4対立遺伝子はAD患者およびMCI患者において過剰に示されている。これらの特徴により、ADの開始が潜行性であり、かつ徐々に進行性である経過をとるという事実と相まって、何か症状が現れる何年も前に神経病理が存在すると医師は考えるに至った。実際に、MCIがADの初期徴候である場合は、MCI患者の正確かつ早期の評価および治療は、アルツハイマー病の発症を含めてさらなる認識衰退を予防する可能性がある。

10

軽度認識異常、年齢関連性認識衰退、および軽度認識障害のそれぞれの定義ならびに区別が依然としてきわめて議論の余地があることは明らかである。しかし、米国食品医薬品局の諮問委員会は最近、「アルツハイマー病とは別の状態」である軽度認識障害が、特定の薬物が痴呆への進行も遅らせるかどうかに関係なく、新しい薬物療法の有効な標的であることを決定した。さらに、末梢・中枢神経系薬諮問委員会は、軽度認識障害患者の80%以上が毎年患者の10%~15%の割合で10年以内にアルツハイマー病を発症すると述べた。この所見により、一部の医療関係者が軽度認識障害を別個の状態ではなく早期アルツハイマー病とみなすことになるであろうことは間違いない。

20

#### 【0006】

研究文献は、多くのMCI患者がADに進行することを示している。ADを発症し始めるMCI患者の数に関する数字は変動するが、文献においてしばしば見られる割合は、軽度認識障害の診断とともに3年で40%までに達する。したがって、MCIの治療は、疾患関連性脳劣化を予防、遅延、または逆転もさせようという点で、医師にとってきわめて興味深いものである。

アルツハイマー病は、アルツハイマー痴呆またはADとも呼ばれるが、記憶喪失および重篤な精神荒廃をひき起こす進行性の神経変性疾患である。ADの最終的な診断を提供するために使用可能な現在唯一の手段である脳組織の組織病理検査ではなく、痴呆性患者の生存期間中にADを明確に確認する手段を診断医は長らく求めてきた。ADは痴呆の最も一般的な形態であり、全痴呆の半数以上の割合を占め、4百万人ものアメリカ人および世界中で約1500万人の人々に影響を与えている。痴呆は軽度の記憶喪失と意識混濁で開始しうるが、時間とともに進行し、知的および社会的能力の重篤な障害に達する。65歳でのADの一般有病率は1~2%である。75歳では、この数字は7%に上昇し、85歳では18%である。65歳以上の全個人における痴呆の有病率は8%である。施設内居住者のうちの有病率は、どの年齢でも約50%である。

30

#### 【0007】

特に疾患の最終局面で介護者にかかる負担によってひき起こされるこの疾患の社会的影響は甚大である。実質的な経済上のコストは、支持療法および施設入院に大きく関係している。社会における急速に増大する高齢者比率は、AD患者の数が劇的に増大し、したがってADの早期の正確な診断および治療が世界的に主として重要な問題となっている。

40

個人がADの疑いがある場合、一部の推奨検査が行われる。すなわち(1)ミニメンタルステート検査(MMSE)(上記の通り)、(2)臨床検査-完全血球算定、甲状腺刺激ホルモン、血清電解質、血清カルシウム、および血清糖濃度の測定、(3)神経画像診断-最も一般的に使用されているのは、コンピュータ断層撮影(CT)であり、これには血管性痴呆(VaD)、腫瘍、正常圧水頭症、硬膜下血腫など痴呆の一部の原因の検出における役割があるが、これらが実施される。しかし、神経画像診断は、ADまたは他の皮質痴呆を正常な老化と区別することにおいてあまり有効ではない。プライマリーケアにお

50

いて、CTが非定型症例に限定されうることを示唆する人もいるが、ルーチンの検査を推奨する人もいる。磁気共鳴画像診断(MRI)は現在、痴呆の大部分の症例においてCTより有利な点を提供していない。

#### 【0008】

アルツハイマー病は痴呆の最も一般的な形態であり、症例の少なくとも60%の割合を占めるが、痴呆の正確な原因を測定するための診断手順は、80以上の異なる種類のうちで、良くても困難である。さらに、現在行われている検査は、ADを他の型の痴呆と鑑別することにおいて不十分である。

他の疾患分野と比較すると、痴呆の分野は、しばしば特定の治療法がなく、または使用可能な明らかに有効な療法がないため、診断の価値に関する問題を提起している。概略的に上述した痴呆関連疾患は現時点では治療しえないが、対症療法、例えば、アセチルコリンエステラーゼインヒビターなどの薬剤が存在し、これらはMCIまたはADの症状の進行を未然に防ぐ希望を与え、かつ認識および行動の改善が現在、米国食品医薬品局によって認可されている。他の薬剤、すなわち(1)ADにおける衰退を予防する薬剤-デスフェロキサミン(DESFERRIOXAMINE)、アルカー(ALCAR)、抗炎症剤、抗酸化剤、エストロゲン、(2)神経栄養因子:NGF、(3)ワクチン:シェンク(Schenk)等(非特許文献1)による最近最も興味深い報告が、AD用のワクチンの希望を提起しているが、これらが臨床試験の各段階にある。

したがって、種々の療法の特異性は、それらの成功を保証するために、MCIおよびADに対して払われる特別な注意とともに、痴呆に対する高度の感度を有する高性能の診断法を必要とする。

#### 【0009】

ADの診断に役立つ多数の検査が使用可能であるが、唯一真に存在する診断は、痴呆の病歴とともに死後脳組織の病理検査によってなされている。この診断は、臨床的痴呆と関連している脳組織中の神経原線維のもつれおよびneuritic(老人)斑の存在に基づく。老人斑は、通常無害のアミロイド-ベータと呼ばれるタンパク質で構成されている。ニューロンが死滅し始め、症状が発現する前に、斑沈着物が疾患過程の早い段階にニューロン間に形成する。神経原線維のもつれは、正常かつ対のらせん状フィラメントからなるニューロン間凝集体であり、おそらく数種類のタンパク質で構成されている。脳ニューロンの内部支持構造は、タウと呼ばれるタンパク質の正常な機能に依存する。アルツハイマー病において、タウタンパク質の糸は変化を受け、ねじれが生じるようになる。老人斑および神経原線維のもつれの神経組織病理学的確認および計数には、数箇所の脳部分の染色および顕微鏡検査が必要である。しかし、この方法の結果は大きく変動しうるとともに、時間がかかり、かつ労働集約的である。

#### 【0010】

MCI、アルツハイマー痴呆などの種々の認識異常の開始および/または進行を未然に防ぎ、かつ/または逆転させる現行および将来の医薬療法の能力を考えると、ADの早期診断は患者の介護をより良く成し遂げるために役立つであろう。かかる例としては、脳への血流を一時的に中断する小さな未発見の脳梗塞が挙げられる。臨床的にうつ状態の患者またはパーキンソン病患者も記憶違いを経験しうる。多くの高齢者は、さまざまな薬物治療を受けているが、副作用として、単独または併用で、認識上の課題を行う能力が低下する。

したがって、痴呆、特にADの早期鑑別のための診断法が提供されうる場合は、医師はこの疾患の病原における初期段階で適切な治療的介入を指示する能力の増大を達成するであろう。

#### 【0011】

ADに対する種々の生化学マーカーは周知であり、かかるマーカーを測定するための分析法は当技術分野で記述されている。本明細書中で用いられる「マーカー」、「生化学マーカー」、または「マーカータンパク質」なる用語は、その存在、不在、またはいわゆる「正常」レベルからの循環体液における変化が、痴呆を示す酵素、タンパク質、ポリペプ

10

20

30

40

50

チド、ペプチド、その異性体形態、その免疫学的に検出可能なフラグメント、または他の分子を指す。最も詳しくは、かかるマーカーは、痴呆関連性変化、例えば、AD病原の経過中に脳から放出されると説明されうる。かかるマーカーとしては、特に脳と関係がある特異なタンパク質またはそのイソ型が挙げられるが、これに限定されない。

痴呆の評価におけるバイオマーカーには多くの異なる潜在的使用法があり、各使用法は、異なるマーカーまたは一連のマーカーを含みうる。かかる使用法としては、ADまたはMCIを痴呆の他の原因と区別するマーカーの使用、老化の非病的な影響と痴呆との区別、臨床的症状が明らかになった後の疾患の進行のモニタリング、ADに対して用意された療法の有効性をモニタリングする代用物の使用、およびADのリスク評価因子として有用性のあるマーカーの単離、ならびに脳内で発生する最も初期の生物学的変化および疾患の進行とともに発生する他の変化の確認が挙げられるが、これらに限定されない。

理想としては、高度の感度と特異性ととも全要件を満たす単一のマーカーを単離することが好ましいが、これは無理な目標でありうる。個々のマーカーは、適用するという意味で臨床症状の型に対する感度、特異性、信頼性、および有効性によって評価される必要がある。しかし、ADを痴呆の他の原因と区別するのに弱いマーカーであっても、疾患過程の進行または治療に対する反応をモニタリングするためにすぐれたマーカーでありうる。

#### 【0012】

診断装置に関しては、バイオマーカーを使用する臨床評価およびポイント・オブ・ケア検査ならびにセントラルラボラトリー検査が、リスクを評価し、疾患の進行をモニタリングし、治療的介入を指導するための有用な手段である。診断手段としてのバイオマーカーの使用がもたらす利点としては、臨床診断の確実性の強化、痴呆の他の原因とADとの区別、および疾患の重篤度や進行速度の定量化が挙げられる。また、バイオマーカーを用いる検査は、迅速、非侵襲的、実行が容易であり、かつ安価であるべきである。

従来技術において欠けているのが何かといえば、比較的非侵襲的な方法、およびそのために痴呆の種々の形態、特に生存している患者のMCIおよびアルツハイマー痴呆を明確に診断する有効な装置である。また、発症するADのリスクを評価する明確な方法が大いに必要とされている。

(従来技術の説明)

#### 【0013】

米国特許第5,508,167号公報(特許文献1)において、ローゼス(Roses)等は、アポリポタンパク質E型4(ApoE4)イソ型またはApoE4をコード化するDNAの検出を含むADを診断するための方法を記載している。その方法では、血液試料を使用することができ、免疫化学アッセイによって分析される。血液試料は場合により還元剤と結合され、システイン残基におけるジスルフィド結合を対応する反応性スルフヒドリル基に還元する。ローゼスらはさらに、ApoE4イソ型の検出用キットを記載している。検査は、3つの主要なApoEイソ型のアミノ酸配列における差異に基づく。この検査は、痴呆に特異的ではなく、痴呆に対するマーカーとしてトロンボスポンジンの使用を示すこともない。

#### 【0014】

一般に、大部分の学術論文は、ADの主要な決定因子であると考えられているため、ペプチド、 $\beta$ -アミロイドに焦点が当る傾向がある。これは、家族性AD変異の一部の形態が、 $\beta$ -アミロイド、特に、短い形態よりも容易に凝集する長い形態(1~42)の過剰産生をもたらすという所見によって裏づけられる。ヘンズリー(Hensley)等(非特許文献2)は、その凝集状態下のペプチド $\beta$ -アミロイドによるフリーラジカル生成に基づく神経毒性を検査している。このペプチドの一部の合成フラグメントが、結果として生じる神経毒性について検査されている。酸素はラジカル生成およびグルタミン酸合成の要件であるとみられ、クレアチンキナーゼ酵素は酸化感受性バイオマーカーであるという事実に基づき、これらの酵素の不活性化は、これらフラグメント化 $\beta$ -アミロイド凝集体による生体分子に対する活性攻撃の指標として使用される。ブイー(Buee)等(マウ

10

20

30

40

50

ント・シナイ医学部、老人医学・成人発達学科)は、海馬および下側頭皮質での正常ヒト脳におけるトロンボスポンジンの免疫組織化学的局在を行った。アルツハイマー病患者におけるトロンボスポンジン染色の分布は、対照患者と同等であることがわかった。しかし、アルツハイマー病患者において、アルツハイマー病で攻撃されやすいとみられる錐体神経のサブセットが染色の減少を示した。この標識強度の減少は、早期変性の傾向があるニューロン集団をおそらくはターゲティングしていると理論化された。また、トロンボスポンジン染色は、アルツハイマー病における老人斑で明らかにされた。これらの結果は、トロンボスポンジンが神経変性および老人斑形成の過程において関与していることを示す。

【特許文献1】米国特許第5,508,167号公報

【非特許文献1】シェンク(Schenk)等、Nature、1999年(400)、pp.173~177 10

【非特許文献2】ヘンズリー(Hensley)等、Proc.Natl.Acad.Sci.、1994年(91)、pp.3270~3274

【発明の開示】

【0015】

本発明は、痴呆、例えば、アルツハイマー痴呆(AD)の診断のための方法に関し、特に、体液、特に、血液、血液産物、CSF、尿、唾液等におけるトロンボスポンジンの存在を検査することによって痴呆を診断するための方法に関する。本発明はさらに、特にアルツハイマー痴呆の診断に関係するトロンボスポンジンの存在を定量化するための工程に関する。より詳しくは、本発明は、トロンボスポンジンの存在によって証拠だてられる、種々の形態の痴呆、具体的にはアルツハイマー痴呆の診断を可能にする抗体を使用するイムノアッセイ法に関する。 20

本発明は、痴呆、特にアルツハイマー痴呆のマーカーとしてトロンボスポンジンの使用、体液中のトロンボスポンジンの存在を測定するための方法、および診断装置、例えば、アルツハイマー病を診断し、サブタイプに分け、かつモニタリングするためのELISAシステムに関する。本発明は、トロンボスポンジンが、おそらく脳から循環中へ放出され、アルツハイマー病に罹患した患者における脳外部の体液中で検出するという発見に基づく。

【0016】

トロンボスポンジンの種々のエピトープを認識するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体は、イムノアッセイにおいて使用することができ、ここでそれらは免疫反応の一部になり、モニタリングおよび/または定量化され、循環トロンボスポンジタンパク質または種々のイソ型、免疫フラグメント等を検出することができるが、本明細書中で記載されている通り、これらは疑わしい個人における疾患状態を示す。あるいは、トロンボスポンジタンパク質そのものをイムノアッセイにおいて使用し、かかる個人における循環自己抗体を検出する。アルツハイマー痴呆の発生は、特殊な生化学マーカーのレベルの認識によって特徴づけられるが、該レベルはMMSE検査によって定量化されるようにアルツハイマー痴呆症状の徴候に対応する。 30

【0017】

リスク評価検査として、MCIまたは関連痴呆の存在を示し、かつアルツハイマー痴呆の発症の前兆であると十分にみなされうる、かかるマーカーのレベルの認識は、熟練した医師に与えられる診断能力をさらに増大させる。 40

【0018】

したがって、本発明の目的は、痴呆、特にMCIおよびアルツハイマー病の明確な診断のための比較的侵襲的かつ高感度の方法を提供することである。

本発明の別の目的は、患者の少なくとも1つの体液を分析し、痴呆、例えば、AD対認識以上の他の形態の指標としてのトロンボスポンジンの存在を測定する工程を含む方法を提供することである。

本発明のさらに別の目的は、1つもしくはそれ以上の体液中のトロンボスポンジンの認識に有効なイムノアッセイを提供することである。 50

## 【 0 0 1 9 】

本発明のさらに別の目的は、比較的浸襲的であり、かつ体液、例えば、血液または任意の血液産物、CSF、尿、唾液などを含んでなる試料を使用して実行しうるイムノアッセイ、例えば、ポイント・オブ・ケアまたはセントラルラボ検査を含んでなる痴呆、例えば、MCIおよびADの診断のための検査キットを提供することである。

本発明の他の目的および利点は、本発明の説明および実施例、一部の実施形態を手段として記載されている添付の図面といっしょに挙げられた以下の記述から明らかになるであろう。図面は、本明細書の一部を構成し、本発明の例示的实施形態を含むとともに、その種々の目的および特徴を示す。

## 【 発明を実施するための最良の形態 】

10

## 【 0 0 2 0 】

最近、ケンタッキー大学のグループが、アミロイド症の過程は低分子量のヘパリンによって抑制されうることを見出した。これらのヘパリン分子は、ヘパリン硫酸プロテオグリカンに結合し、アミロイド形成の過程を鈍化させると考えられている。以前の報告は、高硫酸化グリコサミノグリカンが確認された全形態のアミロイド中に存在し、これらの分子は基底膜構造の基本的部分であり、アミロイド線維発生の開始点を提供しうることを示した。この点を考慮して、本発明人は、ADと対照の両方の血清中に存在する種々のヘパリン結合分子を比較することを試みた。

## 【 0 0 2 1 】

固定化ヘパリンビードを用いるバイオマーカー発見のためのヒト血清中ヘパリン硫酸プロテオグリカンの分画および濃縮のプロトコルが決定された。特定の理論に束縛されることは望まないが、ヘパリン硫酸プロテオグリカンは、アミロイド疾患におけるアミロイド沈着物中に確認されたため、線維形成において重要な役割を果たしうると理論化された。

20

材料：

固定化ヘパリンビード（ピアス（Pierce））。

1. 20 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 7.4。
2. 1.5 mL遠心分離管
3. 回転子

手順：

25  $\mu$ L血清試料を20 mMリン酸カリウム緩衝液、pH 7.4、500  $\mu$ Lで希釈する。混合し、使用するまで待機する。

30

4. ヘパリンビードの50  $\mu$ Lスラリーを1.5 mL管の中へピペットで取る。
5. ビードを水500  $\mu$ Lで1回、リン酸緩衝液500  $\mu$ Lで3回洗浄する（ビードを遠沈し、洗浄間の緩衝液を除去する）。
6. 試料をビードに添加し、冷所にて30分間、回転しながらインキュベートする。
7. 上清を回転させ、別の管に取り出す。
8. 結合緩衝液500  $\mu$ Lで少なくとも3回ビードを洗浄する。
9. 30  $\mu$ Lの2倍試料緩衝液を直接ビードに添加し、5分間煮沸する。
10. 上清を回転させ、1Dゲル電気泳動によって分析する。

ヘパリン共役アガロースビードをアフィニティーカラムとして使用し、ADおよび年齢マッチド対照血清試料中の全ヘパリン結合分子を注入する。

40

## 【 0 0 2 2 】

図1を参照すると、ヘパリンアフィニティーカラムによって濃縮されたヒト血清中のトロンボスポンジンレベルの分析が示されている。アフィニティーカラム精製試料を10~20%プレキャストトリシゲル（供給元インビトロジェン）上で溶解した。試料は以下の通りである。レーン1、AD120、レーン2、AD121、レーン3、AD182、レーン4、AD188、レーン5、ADH39、レーン6、ADH45、レーン7、ADH66、レーン8、ADC002、レーン9、N00759、レーン10、N00703、レーン11、N00871、レーン12、N00910、レーン13、N00911、レーン14、バイオラッド（BioRad）精密タンパク質マーカー。（ADはアルツハ

50

イマー病患者を指すが、Nは年齢マッチド正常ヒト血清を指す)。図1の矢印は、全AD試料において目立ち、年齢マッチド対照の大部分においては見られない180kDaバンドを示す。トリプシンで消化されたゲル中のこのバンドは、QSTARパルサー(Pulsar)I(MDSサイエックス(Sciex)質量分析によって配列決定された。トリプシンペプチドの5つの最も強いピークが配列決定され、これらのすべてがトロンボスポンジンにマッチする。矢印は、全AD試料において目立ち、年齢マッチド対照15例中11例においては見られない180kDaバンドを示す。図2からは、AD試料の全13例が陽性を示し、正常の11例が陰性を示し、年齢マッチド対照の4例が陰性を示し、痴呆が疑われることを確認しうる。次に図2を参照すると、アルツハイマー病患者および年齢マッチド対照のヒト血清中トロンボスポンジンレベルのウェスタンブロット分析が示されている。 10

#### 【0023】

各試料の血清2 $\mu$ lを10~20%トリシゲル上で溶解した。ゲルをニトロセルロース膜上に移し、5%脱脂粉乳、MBST(0.1%トゥイーン20(tween twenty))でブロックした。5%脱脂粉乳を含有するPBST中のマウス抗ヒトTSP-1モノクローナル抗体(トロンボスポンジン-1、Ab-11、ラボ・ビジョン・コーポレーション(Lab Vision Corporation)から入手可能)1 $\mu$ g/mLを使用した。種々の抗体フラグメントの使用も意図されている。HRPに抱合されたヤギ抗マウスAbを二次Ab(5%脱脂粉乳を含有するPBST中1:4000)として使用した。矢印は、全AD試料において目立ち、年齢マッチド対照15例中11例においては見られない180kDaバンドを示す。図2からは、AD試料の全13例が陽性を示し、正常の11例が陰性を示し、年齢マッチド対照の4例が陰性を示し、痴呆が疑われることを確認しうる。これらの結果は、トロンボスポンジンがアルツハイマー病の初期診断のマーカーとして使用しうることを示す。 20

#### 【0024】

本発明の方法により分析されるマーカーは、循環の中へ放出され、血液中または任意の血液産物中、例えば、血漿、血清、例えば、低張性緩衝剤、または界面活性剤、およびその希釈剤や調製剤での処理による細胞溶解血液、および他の体液、例えば、CSF、唾液、尿、リンパ液中などに存在しうる。別の好ましい実施形態では、CSF中のマーカーの存在が測定されうる。 30

AD患者の脳の老人斑密集部位は、高酸化ストレスの環境を表し、AD患者の脳におけるタンパク質が対照のものよりも酸化していることを示す。反応性小膠細胞は、脳中のオキシラジカル源として提案されている老人斑部位を広範囲に示す。

#### 【0025】

本発明の別の意図された実施形態では、進行中の分析のために適切な時期の1時点、または適切な時期の異なるいくつかの時点で患者から体液試料を採取することができる。通常、第1の試料は、痴呆の疑わしい症状の発現と同時に採取され、本発明により分析される。その後、発現後のある期間、例えば、第1の発現後約3~6か月に、第2の試料が採取され、本発明により分析される。データを用いて、ADを診断し、ADを除外し、またはADと非ADとの間の区別をすることができる。「試料」は、血液、CSF、尿、唾液などの体液を意味する。 40

トロンボスポンジンの存在は、それに対して特異的な抗体を使用し、そのそれぞれのマーカーに対する抗体の特異的結合を検出することによって測定される。本発明により測定されるトロンボスポンジンのレベルを測定する市販のものを含めて、適切な直接または間接のアッセイ法を使用することができる。これらのアッセイは、競合アッセイ、サンドイッチアッセイでありうるとともに、標識は、ラジオイムノアッセイ、蛍光または化学発光イムノアッセイ、またはイムノPCR技術など公知の標識からなる群より選択されうる。周知のイムノアッセイ法の広範な考察は、これらが当業者には周知であるため、ここでは不要である。S100Bについては、高橋(Takahashi)ら(Clin Chem、1999年、45(8)、p.1307)を参照。 50

## 【0026】

それに限定されないが、本実施例で使用されるイムノアッセイ法は、試料中のトロンボスポンジンレベルを測定するための二重抗体またはサンドイッチELISAを含みうる。この方法によれば、抗体の1つは、固相上に固定化されている「キャプチャー」抗体であり、他の抗体は、例えば、酵素で標識されている「検出」抗体である。検出抗体は、キャプチャー抗体に結合されたマーカータンパク質に結合し、サンドイッチ構造を形成する。マーカータンパク質標準物質を用いて、吸光度の標準または校正曲線対マーカータンパク質濃度を調製する。

トロンボスポンジンの存在を測定するために使用されるアッセイ法は、健常者において確認される正常値から疾患を証拠立てる人々における高レベル、すなわち正常を上回る2SD (= カットオフ) 以上の濃度範囲にわたって各タンパク質を測定しうるのに十分な感度を示すべきである。

10

## 【0027】

アッセイは、バッチモードでのアッセイを行うために好ましいマイクロタイタープレートフォーマットを含む種々のフォーマットで実行されうる。アッセイは、当技術分野で公知であるセントラルラボラトリーで維持されたものなど、自動分析器でも実行されうる。本発明により使用されうる別のアッセイフォーマットは、任意の場所でポイント・オブ・ケアで管理されうる迅速手動試験である。通常、かかる装置により、カットオフ以上または以下である結果、すなわち、半定量的結果が得られる。

本発明のタンパク質、トロンボスポンジンは、ラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫反応吸着測定法 (ELISA)、<sup>125</sup>I-「サンドイッチ」アッセイ、沈降反応、ゲル拡散免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、蛍光イムノアッセイ、タンパク質AまたはGイムノアッセイ、および免疫電気泳動アッセイを含むがこれらに限定されない当技術分野で周知の任意のイムノアッセイシステムで使用されうる。本発明によれば、トロンボスポンジンに対して産生されるモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体は、痴呆、特にAD患者を診断するために、血液、または血清、血漿などの血液産物、髄液または他の体液、例えば、唾液、尿、リンパ液などの試料に関するイムノアッセイで有用である。

20

## 【0028】

抗体は、任意の種類イムノアッセイで使用できる。これには、非競合型の2サイトサンドイッチアッセイと1サイトイムノアッセイの両方のほか、従来の競合結合アッセイが含まれる。あるいは、トロンボスポンジンは、その目標がトロンボスポンジン自己抗体の存在を測定することである適切なアッセイで使用できる。

30

検出の容易さ、およびその定量的性質のために特に好ましいのは、多くの変形が存在し、そのすべてが本発明によって意図されているサンドイッチまたは二重抗体アッセイである。例えば、典型的なサンドイッチアッセイでは、非標識抗体が、固相、例えば、マイクロタイター上に固定され、試験すべき試料が添加される。抗体-抗原複合体の形成を可能にする一定期間のインキュベーション後、検出可能な信号の誘発能があるレポーター分子で標識された第2の抗体が添加され、十分な時間のインキュベーションが継続され、異なる部位での抗原との結合を可能にし、結果として抗体-抗原標識抗体の複合体の形成がもたらされる。抗原の存在は、既知量の抗原を含有する対照試料との比較によって定量化されうる信号の観察によって測定される。

40

## 【0029】

要約すれば、本発明のコンセプトは、トロンボスポンジンに対する少なくとも1つの抗体、およびトロンボスポンジンまたは抗体の結合パートナーとともに血清または血漿試料がインキュベートされ、それによってトロンボスポンジンに対する抗体または結合パートナーのいずれかが測定可能な基で標識され、それによって形成された、測定可能な基を含有する免疫複合体が分離され、分離され、または依然として残存する相における測定可能な基が試料からのトロンボスポンジンの尺度として測定されることを特徴とするイムノアッセイの原理による、痴呆、特にMCIまたはアルツハイマー痴呆の測定のための工程に関する。この工程はさらに、試料が、トロンボスポンジンに対する抗体、およびトロンボ

50

スポンジンに対する抗体と測定可能な基からの抱合体とともにインキュベートされ、形成された免疫複合体が相分離によって分離され、かつ測定可能な基が各層の1つにおいて測定され、あるいは、試料が、トロンボスポンジンに対する抗体、およびトロンボスポンジンと測定可能な基の抱合体とともにインキュベートされ、形成された免疫複合体が相分離によって分離され、かつ測定可能な基が各相の1つにおいて測定されることを特徴とする。

【産業上の利用可能性】

【0030】

その最も広い文脈において、本発明は、痴呆、具体的にはMCIまたはアルツハイマー痴呆を測定するためのトロンボスポンジンに対する抗体またはトロンボスポンジン抗体に対する自己抗体の使用に対して行われる。

10

【0031】

本明細書において言及されたすべての特許および刊行物は、本発明が関連する当業者のレベルを示している。すべての特許および刊行物は、各個別の刊行物が参考によって援用されるように具体的かつ個別に示されているのと同程度に本明細書中で参考によって援用される。本発明の一部の形態が例示されているが、本明細書中に記載され、かつ示された特定の形態または配置に限定されないことを理解すべきである。種々の変更が本発明の範囲から逸脱することなくなされうるとともに、本発明が明細書および図面/図表に示され、かつ記載されたものに限定されるとみなすべきでないことが、当業者には明らかであろう。

20

【0032】

当業者は、本発明が目的を実行し、言及された目標および利点のほか、その中の固有のものを得るために十分に適合することを容易に理解するであろう。本明細書中に記載されたオリゴヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、生物学的関連化合物、方法、手順、および技法は現在、好ましい実施形態を代表し、例示が意図され、範囲の限定は意図されていない。本発明の趣旨の範囲内に包含され、添付の請求の範囲によって規定されているその中の変更および他の使用を、当業者は思いつくであろう。本発明は特定の好ましい実施形態とともに記載されているが、請求された発明にかかる特定の実施形態に過度に限定すべきではないことを理解すべきである。実際に、当業者には明らかである本発明を実施するための記載された形態の種々の変更が、以下の請求の範囲内で意図されている。

30

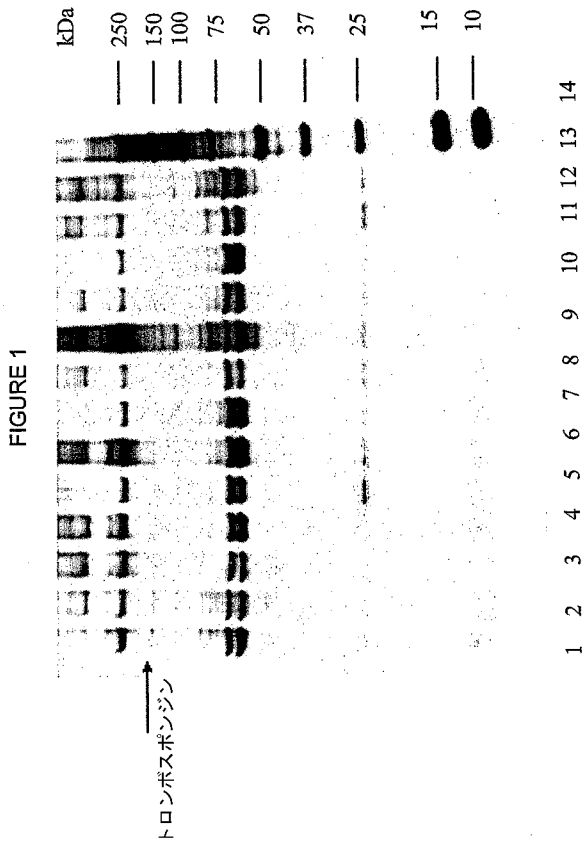
【図面の簡単な説明】

【0033】

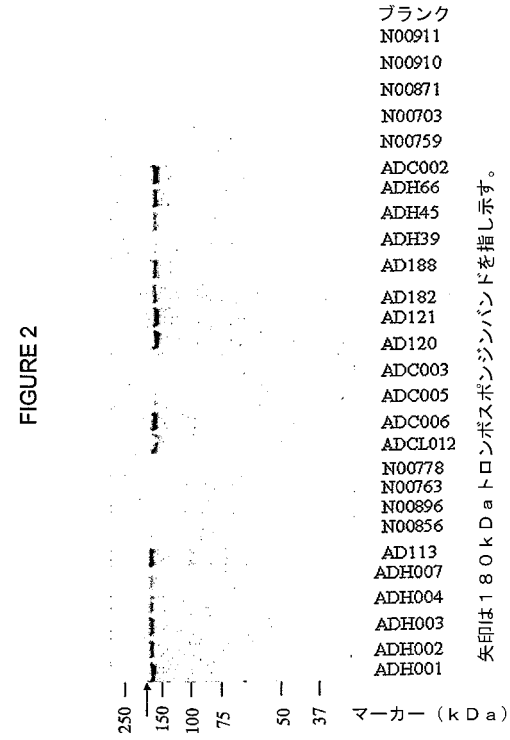
【図1】ヘパリンアフィニティーカラムによって強化されたヒト血清中トロンボスポンジン濃度の分析を示す図である。

【図2】アルツハイマー病および年齢マッチド対照のヒト血清中トロンボスポンジン濃度のウェスタンブロット分析を示す図である。

【 図 1 】



【 図 2 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inte   Application No PCT/CA 02/01671										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68												
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y	BUÉE LUC ET AL: "Immunohistochemical identification of thrombospondin in normal human brain and in Alzheimer's disease." AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 141, no. 4, 1992, pages 783-788, XP009013020 ISSN: 0002-9440 abstract page 783, column 2, last paragraph -page 784, column 1, paragraph 1 page 787, column 1, last paragraph ---	1-13										
Y	WO 98 07035 A (CIBA GEIGY AG ;GANU VISHWAS (US)) 19 February 1998 (1998-02-19) page 18, paragraph 1 page 5, paragraph 1 --- -/--	1-13										
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>*E* earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>*&amp;* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	*E* earlier document but published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.	*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*&* document member of the same patent family	*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
*E* earlier document but published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.											
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*&* document member of the same patent family											
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 2 July 2003		Date of mailing of the international search report 14/07/2003										
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bigot-Maucher, C										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten Application No  
PCT/CA 02/01671

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01 05422 A (KOLBE HANNO ;MALCUS CARINE (FR); PERRON HERVE (FR); SANTORO LYSE ( ) 25 January 2001 (2001-01-25) the whole document	1-14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CA 02/01671

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: -  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/CA 02 01671

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claim 1 relates to an extremely large number of possible compounds as markers indicative of thrombospondin. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only thrombospondin itself or autoantibodies thereto. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the markers indicative of thrombospondin as disclosed in the specification on p 9, para 2.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter:	Application No
PCT/CA	02/01671

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9807035	A	19-02-1998	AU 4298297 A	06-03-1998
			WO 9807035 A1	19-02-1998
			EP 0922225 A1	16-06-1999
			JP 2000517418 T	26-12-2000
WO 0105422	A	25-01-2001	FR 2797402 A1	16-02-2001
			AU 6576800 A	05-02-2001
			CA 2379336 A1	25-01-2001
			EP 1203239 A2	08-05-2002
			WO 0105422 A2	25-01-2001
			JP 2003509340 T	11-03-2003

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 チャン、リユーリン

カナダ国、エル7エイ 1ワイ5 オンタリオ、ブランプトン、テストン ストリート 30

专利名称(译)	血栓反应素治疗痴呆的临床研究		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005513480A</a>	公开(公告)日	2005-05-12
申请号	JP2003555209	申请日	2002-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	Shinkusu制药公司		
申请(专利权)人(译)	申方框制药公司		
[标]发明人	ヤコブスキー、ジョージ チャンリュウリン		
发明人	ヤコブスキー、ジョージ チャン、リュウリン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/68		
FI分类号	G01N33/53.D		
代理人(译)	斋藤和典 伊藤哲也		
优先权	10/032229 2001-12-20 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了用于诊断各种形式的痴呆的方法，包括MCI和阿尔茨海默氏病（AD）。该方法包括直接检测液体中，优选血液或血液制品中生化标志物，特别是血小板反应蛋白的存在的步骤。通过免疫测定进行检测，所述免疫测定包含对血小板反应蛋白特异的抗体或对血小板反应蛋白抗体的自身抗体。

