

(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2017-500562

(P2017-500562A)

(43) 公表日 平成29年1月5日(2017.1.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2GO45
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4BO29
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	4BO50
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	4HO45
CO 7 K 14/47 (2006.01)	CO 7 K 14/47 ZNA	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-538603 (P2016-538603)	(71) 出願人	505423678
(86) (22) 出願日	平成26年12月12日 (2014.12.12)		エレクトロフォレティクス リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成28年8月9日 (2016.8.9)		イギリス国 KT11 3EP サリー
(86) 国際出願番号	PCT/GB2014/053692		コバム ダウンサイド ブリッジ ロード
(87) 国際公開番号	W02015/087087		コヴェハム ハウス
(87) 国際公開日	平成27年6月18日 (2015.6.18)	(71) 出願人	500532757
(31) 優先権主張番号	1322094.2		キングス カレッジ ロンドン
(32) 優先日	平成25年12月13日 (2013.12.13)		KINGS COLLEGE LONDON
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		N
			イギリス国, WC2R 2LS ロンドン
			, ストランド (番地なし)
		(74) 代理人	100097456
			弁理士 石川 徹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病に関するバイオマーカー及び方法

(57) 【要約】

高齢者における認知症の最も一般的な原因であるアルツハイマー病は、現時点では不治である衰弱性の神経変性疾患である。かつては、ADは、脳の生検によって又は患者が死亡した後の剖検の際にのみ明確に診断することができた。脳内の特徴的なプラーク及び濃縮体病変の存在を実証するこれらの方法は、依然として、ADの病理学的診断のゴールドスタンダードと考えられている。しかし、臨床的状況では、脳の生検は、めったに行われず、診断は、一連の神経学的検査、心理測定的検査、並びに脳脊髄液及び血液中のApoE及びタウタンパク質又は - アミロイドペプチドなどの生化学的マーカーの測定を含む生化学的検査に依存している。本発明は、正常状態におけるそれらの発現と比べ疾患状態において差次的に発現されているマーカーのパネルを明らかにし且つ説明し、並びに神経認知障害に関連したマーカーのパネルを特に同定及び説明している。かかるバイオマーカーパネルは、臨床試験における、及び恐らくは臨床実践における、CSFの分子マーカーとPET撮像などの、更により特異的であるがしかしより侵襲的で高価なアプローチに対し、初期の記憶障害の患者を選別する上でかなりの価値がある。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

トランスサイレチン(TTR)、クラスタリン、シスタチンC(CST3)、 α -1-酸性糖タンパク質(A1AcidG)、細胞間接着分子1(ICAM1)、補体C4(CC4)、色素上皮由来因子(PEDF)及び α 1抗トリプシン(A1AT)のマーカークラスタリンから本質的になる、バイオマーカーパネル。

【請求項 2】

前記パネルが、RANTES(発現分泌された活性化正常T細胞の調節物質)及びアポリポタンパクC-III(ApoC3)のマーカークラスタリンを更に含む、請求項1記載のバイオマーカーパネル。

【請求項 3】

前記パネルが、プラスミノゲン活性化抑制因子タイプ1(PAI-1)、C-反応性タンパク質(CRP)、カテプシンD(CTSD)及びアポリポタンパクE(ApoE)のマーカークラスタリンを更に含む、請求項2記載のバイオマーカーパネル。 10

【請求項 4】

前記パネルが、 α -2-マクログロブリン(A2M)、血清アミロイドP成分(SAP)、終末糖化産物特異的受容体(sRAGE)、神経特異的エノラーゼ(NSE)、補体因子H(CFH)、アミロイド(A β)前駆体タンパク質(AB40又はA β 40)、セルロプラスミン、神経細胞接着分子(NCAM)、ApoA1、A β 42、BDNF、 α -2-ミクログロブリン(B2M)、及びVCAM-1からなる群から選択されるマーカークラスタリンの1種以上を更に含む、請求項3記載のバイオマーカーパネル。

【請求項 5】

前記パネルが、ApoE ϵ 4対立遺伝子の存在(ApoE遺伝子型)を更に含む、請求項1~4のいずれか一項記載のバイオマーカーパネル。 20

【請求項 6】

対象における神経認知障害の進行及び/又は予後を決定する方法であって、該対象から得られた組織試料及び/又は体液試料中の、請求項1~5のいずれか一項記載のバイオマーカーパネルのマーカークラスタリンを検出することを含む、前記方法。

【請求項 7】

前記方法が：

a)試験時点で、神経認知障害又はそれらの症状を有する該対象から得られた組織試料又は体液試料を提供すること；

b)請求項1~5のいずれか一項記載のバイオマーカーパネルの該マーカークラスタリンの量又は濃度を決定すること； 30

c)試験時点での試料中のバイオマーカーパネルの該マーカークラスタリンの量又は濃度を、参照値と比較すること；を含み、

ここでこの試験時点は、進行及び/又は予後の方法が実行される時点に対応し；並びに、ここで該試料中の該タンパク質の量又は濃度は、該対象における神経認知障害の進行及び/又は予後の指標である、請求項6記載の方法。

【請求項 8】

前記試料中の該マーカークラスタリンの量又は濃度が、神経認知疾患の進行及び/又は予後の指標である、請求項6又は7のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

前記神経認知障害の性質又は程度が決定される、請求項6~8のいずれか一項記載の方法。 40

【請求項 10】

前記神経認知障害が、軽度認知障害(MCI)、アルツハイマー病(AD)、血管性認知症、レビー小体型認知症、前頭側頭認知症又はそれらの組合せからなる群から選択される、請求項6~9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

前記神経認知障害が、MCI又はADである、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

前記神経認知疾患の進行及び/又は予後が、MCIの進行及び/又は予後である、請求項10又 50

は11記載の方法。

【請求項13】

前記神経認知疾患の進行及び/予後が、ADの進行及び/予後である、請求項10又は11記載の方法。

【請求項14】

前記神経認知障害の進行が、MCIからADへの進展である、請求項10又は11記載の方法。

【請求項15】

前記進展が、12ヶ月以下にわたり決定される、請求項14記載の方法。

【請求項16】

対象における神経認知障害を診断又は評価する方法であって、該対象から得られた組織試料及び/又は体液試料中の請求項1~5のいずれか一項記載のバイオマーカーパネルのマーカーを検出することを含む、前記方法。

10

【請求項17】

前記方法が：

a) 試験時点で、神経認知障害又はそれらの症状を有する該対象から得られた組織試料又は体液試料を提供すること；

b) 請求項1~5のいずれか一項記載のバイオマーカーパネルの該マーカーの量又は濃度を決定すること；

c) 試料中のバイオマーカーパネルの該マーカーの量又は濃度を、参照値と比較すること；を含む、

20

ここでこの試験時点は、診断方法が実行される時点に対応し；並びに、ここで該試料中の該マーカーの量又は濃度は、該対象における神経認知障害の存在又は非存在の指標である、請求項16記載の方法。

【請求項18】

前記試料中の該マーカーの量又は濃度が、神経認知障害の指標である、請求項17記載の方法。

【請求項19】

前記神経認知障害の性質又は程度が決定される、請求項18記載の方法。

【請求項20】

前記神経認知障害が、軽度認知障害(MCI)、アルツハイマー病(AD)、血管性認知症、レビー小体型認知症、前頭側頭認知症又はそれらの組合せからなる群から選択される、請求項17~19のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項21】

前記神経認知障害が、MCI又はADである、請求項20記載の方法。

【請求項22】

前記神経認知疾患が、ADである、請求項21記載の方法。

【請求項23】

前記神経認知疾患が、MCIである、請求項21記載の方法。

【請求項24】

前記試料中の該タンパク質の量又は濃度の変化が、MCIを有する対象におけるADへの進行の指標であり、ここでMCIからADへの進行は、12ヶ月以下の期間にわたって生じる、請求項21記載の方法。

40

【請求項25】

前記試料中の該マーカーの量又は濃度の変化が、該対象における脳萎縮の存在又は範囲の指標である、請求項17記載の方法。

【請求項26】

神経認知障害を伴う対象から採取された試料中のバイオマーカーパネルの該マーカーの量又は濃度が、神経認知障害を軽減するのに最も適切かつ有効な療法を予測し並びにその療法の成果をモニタリングするために使用される、請求項6~25のいずれか一項記載の方法。

50

【請求項 27】

前記バイオマーカパネルのマーカが、a)該マーカの各々への1種以上の結合要素の使用によるか、又は、b)試料中の該マーカの各々に特異的な自己抗体の検出によるか、又はc)質量分析によるか、あるいはa)、b)及びc)の任意の組合せにより検出される、請求項6～26のいずれか一項記載の方法。

【請求項 28】

前記試料が、固体支持体上に固定されている、請求項27記載の方法。

【請求項 29】

前記バイオマーカパネルのマーカが、2Dゲル電気泳動を使用し検出される、請求項6～26のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 30】

神経認知障害を治療するための薬剤をスクリーニングする方法であって：

(a)神経認知障害又はそれらの症状を有する対象から得られた又はこれを代表する組織試料又は体液試料を提供することであって、ここで対象及び/又は試料は、スクリーニングされる薬剤により治療されていること；

(b)治療された対象及び/又は試料由来の若しくはこれを代表する試料中の、請求項1～5のいずれか一項記載のバイオマーカパネルのマーカの量又は濃度を決定すること；並びに

(c)前記薬剤が、治療された対象及び/又は試料中のバイオマーカパネルのマーカの量又は濃度へ影響を及ぼすかどうかを決定すること；を含む、前記方法。

20

【請求項 31】

前記薬剤により治療されない対象と比べた、この薬剤により治療される対象中のバイオマーカパネルのマーカの量又は濃度が、この薬剤が神経認知障害の治療において有用であり得ることの指標である、請求項30記載の方法。

【請求項 32】

前記工程(a)の前に、健常な個体、重症度又は進行が異なる神経認知障害を有する患者、及びこの薬剤により治療されていない神経認知障害を有する患者に由来する1種以上の対照試料中のバイオマーカパネルのマーカの濃度又は量を決定する工程を更に含む、請求項30又は31のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 33】

前記薬剤が、対照に比べバイオマーカパネルのマーカの量又は濃度の経時的変化を防止又は遅延する場合に、選択される、請求項30～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項 34】

前記バイオマーカパネルの該マーカの量又は濃度が：

(a)正常対象及び神経認知障害の症状を有する対象；並びに/又は

(b)この薬剤で治療されていない神経認知障害の症状を有する対象及びこの薬剤で治療されている神経認知障害の症状を伴う対象；

から得られた、又はこれらを代表する試料中で決定される、請求項30～33のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 35】

前記神経認知障害又はそれらの症状を有する対象が、神経認知障害を伴うヒト対象である、請求項30～34のいずれか一項記載の方法。

【請求項 36】

前記対象が、神経認知障害の非-ヒト動物モデルである、請求項30～34のいずれか一項記載の方法。

【請求項 37】

前記神経認知障害が、ADである、請求項30～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項 38】

前記対象が、変異体アミロイド前駆体タンパク質(APP)トランスジェニックマウス、プレセニン-1(PS-1)トランスジェニックマウス、二重遺伝子導入APP/PS-1トランスジェニ

50

ックマウス、及びノ又はグリコーゲン合成酵素キナーゼトランスジェニックマウスであり、並びに正常対象が、野生型マウスである、請求項30～34及び請求項36～37のいずれか一項記載の方法。

【請求項39】

前記組織又は体液の試料が、尿、血液、血漿、血清、唾液又は脳脊髄液の試料である、請求項6～38のいずれか一項記載の方法。

【請求項40】

組織試料又は体液試料中のバイオマーカーパネルのマーカの検出のための試薬を含むキットであり、ここで該バイオマーカーパネルが、請求項1～5のいずれか一項に記載されている、前記キット。

10

【請求項41】

前記キットが、バイオマーカーパネルのマーカースに特異的に結合する1種以上の結合要素を更に含む、請求項40記載のキット。

【請求項42】

前記1種以上の結合要素が、一次抗体であり、ここで各一次抗体は、バイオマーカーパネルの異なるマーカースに特異的に結合する、請求項41記載のキット。

【請求項43】

前記キットが、一次抗体に特異的に結合する1種以上の二次抗体を更に含む、請求項42記載のキット。

【請求項44】

前記二次抗体が、標識されている、請求項43記載のキット。

20

【請求項45】

前記キットが、バイオマーカーパネルのマーカの対照試料を更に含む、請求項40～44のいずれか一項記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、アルツハイマー病などの神経認知障害において、正常状態と比べ、差次的に発現されるマーカースのパネルに関する。更に本発明は、マーカースのパネルを使用する、神経認知障害の進行、予後及び診断の方法を提供する。なお更に本発明は、マーカースのパネルを使用し、神経認知障害の予防及び治療のための薬剤を同定する方法を提供する。

30

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

認知症は、高齢者の重大な公衆衛生問題の一つであり、我々の高齢人口における認知症患者の数の増加は、世界中の健康制度に、重大な財政負担を課している。認知症患者の半数を上回る人数が、アルツハイマー病(AD)を有する。ADの罹患率及び発生数は、急激な増加を示してきた。ヨーロッパにおけるADの罹患率は、60～69歳について0.3%、70～79歳について3.2%、及び80～89歳について10.8%である。AD発症後の生存期間は、およそ5～12年である。

40

【0003】

ADは、高齢集団における最も一般的な神経変性障害であり；通常、65歳を超えたヒトが罹患し、且つ認知力及び機能の絶え間なく進行する低下を生じる。現在のところ不治である。それは、脳の一部、主として、記憶の符号化に關与している領域である海馬の神経を破壊する。アルツハイマー病は、認知機能及び機能自律性の不可逆的な進行性喪失を引き起こす。ADの最初期の徴候は、単純な物忘れと間違えられることがあるが、最終的に該疾患を有すると診断される人においては、これらの初期徴候は、精神機能低下の、より重篤な症状に容赦なく進行する。ADが発症するのにかかる時間は、人によって変わるが、進行した徴候として、重篤な記憶障害、錯乱、言語障害、人格変化及び行動変化、並びに判

50

断力の衰えが挙げられる。AD患者は、話し好きでなくなり(non-communicative)、非友好的になることがある。この疾患は、その進行が深刻な認知症に帰するので、患者は、自身のケアができず、施設収容又は家庭環境における専門家のケアを必要とすることが多い。一部の患者は、ADと診断を受けた後、長年生存し得るが、診断後の平均余命は、8年である。

【0004】

かつては、ADは、脳の生検によって又は患者が死亡した後の剖検の際にのみ明確に診断することができた。脳内の特徴的なプラーク及び濃縮体病変の存在を実証するこれらの方法は、依然として、ADの病理学的診断のゴールドスタンダードと考えられている。しかし、臨床的状況では、脳の生検は、めったに行われず、診断は、一連の神経学的検査、心理測定的検査、並びに脳脊髄液及び血液中のApoE及びタウタンパク質又は - アミロイドペプチドなどの生化学的マーカーの測定を含む生化学的検査に依存している。

10

【0005】

バイオマーカーは、AD及び他の認知症を診断するための次の段階において鍵を握る可能性がある。ADの診断検査のための必要条件を満たすマーカーは、いくつかの利点を有するであろう。理想的なマーカーは、脳撮像及び神経病理学的検査において変性が観察される前の、疾患の非常に初期の段階で、AD症例を同定するものであろう。バイオマーカーは、可能な限り早期に治療を開始するための第一の指標であり得、かつ、新規治療法の、特に神経病理学的変化の発生を防止することに焦点が当てられている治療法の有効性をスクリーニングする際にも極めて役立つ。マーカーはまた、この疾患の発生のフォローアップにおいても有用であろう。

20

【0006】

プラーク及び濃縮体(各々、A 及びタウ)などのADの病理学的特徴に関連したマーカーが、最も広範に研究されている。最も有望であるのは、ADにおけるポリペプチド断片A (1-40)、A (1-42)及びタウ、又は両方のタンパク質の組合せの脳脊髄液(CSF)濃度の研究に由来する。多くの研究は、CSF中のA (1-42)の減少を報告しているが、総A タンパク質又はA (1-40)濃度は依然変化しないことを報告している。

【0007】

CSF試料は余り望ましくないという認識から、血液並びに血清及び血漿などの血液産物中のタンパク質マーカーを同定するいくつかの努力がなされている。AD状態において、それらの正常状態における発現と比べ、差次的に発現されるかかる血液タンパク質群は、WO 2006/035237に説明されている。これらのタンパク質は、新規の診断検査及び予後検査の開発において有用であることが判明しているが、アルツハイマー病及び関連した認知症の患者の診断及び予後モニタリングにおいて優れた感度及び/又は特異度で実行され得る更なるマーカーのパネルの発見及び検証が、依然必要である。

30

【発明の概要】

【0008】

(発明の概要)

従って第一の態様において、本発明は、トランスサイレチン(TTR)、クラスタリン、シスタチンC(CST3)、 -1-酸性糖タンパク質(A1AcidG)、細胞間接着分子1(ICAM1)、補体C4(CC4)、色素上皮由来因子(PEDF)及び 1抗トリプシン(A1AT)のマーカーから本質的になる、バイオマーカーパネルを提供する。

40

【0009】

一実施態様において、本パネルは、RANTES(発現分泌された活性化正常T細胞の調節物質(regulated on activation, normal T cell expressed and secreted))、及びアポリポタンパクC-III(ApoC3)のマーカーを更に含む。

【0010】

本パネルは、プラスミノーゲン活性化抑制因子タイプ1(PAI-1)、C-反応性タンパク質(CRP)、カテプシンD(CTSD)及びアポリポタンパクE(ApoE)のマーカーを更に含み得、並びに任意に、本パネルは、 -2-マクログロブリン(A2M)、血清アミロイドP成分(SAP)、終末糖

50

化産物特異的受容体(sRAGE)、神経特異的エノラーゼ(NSE)、補体因子H(CFH)、アミロイド(A4)前駆体タンパク質(AB40又はA 40)、セルロプラスミン、神経細胞接着分子(NCAM)、ApoA1、A 42、BDNF、 α -2-ミクログロブリン(B2M)、及びVCAM-1からなる群から選択されるマーカーの1種以上を更に含むことができる。

【0011】

更なる実施態様において、本バイオマーカーパネルは、ApoE 4対立遺伝子の存在(ApoE 4遺伝子型)を更に含むことができる。

【0012】

第二の態様において、本発明は、対象における神経認知障害の進行及び/又は予後を決定する方法であって、該対象から得られた組織試料及び/又は体液試料中の、本明細書に規定したバイオマーカーパネルのマーカーを検出することを含む方法を提供する。

10

【0013】

この第二の態様の一実施態様において、本方法は：

a)試験時点で、神経認知障害又はそれらの症状を有する該対象から得られた組織試料又は体液試料を提供すること；

b)本明細書に規定したバイオマーカーパネルの該マーカーの量又は濃度を決定すること；

c)試験時点での試料中のバイオマーカーパネルの該マーカーの量又は濃度を、参照値と比較すること；を含み、

ここでこの試験時点は、進行及び/又は予後の方法が実行される時点に対応し；並びに、ここで該試料中の該タンパク質の量又は濃度は、該対象における神経認知障害の進行及び/又は予後の指標である。

20

【0014】

好ましくは、該試料中の該マーカーの量又は濃度は、神経認知疾患の進行及び/又は予後の指標であり、並びに/又は神経認知障害の性質又は程度が決定される。

【0015】

神経認知障害は、軽度認知障害(MCI)、アルツハイマー病(AD)、血管性認知症、レビー小体型認知症、前頭側頭認知症又はそれらの組合せであることができる。

【0016】

好ましくは、神経認知障害は、MCI又はADであり、並びに神経認知疾患の進行及び/予後は、MCI又はADの進行及び/又は予後であるか、あるいは神経認知障害の進行は、MCIからADへの進展である。

30

【0017】

より好ましくは、この進展は、12ヶ月以下にわたり決定される。

【0018】

本発明の第三の態様において、対象における神経認知障害を診断又は評価する方法であって、該対象から得られた組織試料及び/又は体液試料中の本明細書に規定したバイオマーカーパネルのマーカーを検出することを含む方法が提供される。

【0019】

この第三の態様の一実施態様において、本方法は：

a)試験時点で、神経認知障害又はそれらの症状を有する該対象から得られた組織試料又は体液試料を提供すること；

b)本明細書に規定したバイオマーカーパネルの該マーカーの量又は濃度を決定すること；

c)試料中のバイオマーカーパネルの該マーカーの量又は濃度を、参照値と比較すること；を含み、

ここでこの試験時点は、診断方法が実行される時点に対応し；並びに、ここで該試料中の該マーカーの量又は濃度は、該対象における神経認知障害の存在又は非存在の指標である。

40

【0020】

50

好ましくは、該試料中の該マーカの量又は濃度は、神経認知障害の指標であり、並びに / 又は神経認知障害の性質又は程度が決定される。

【0021】

神経認知障害は、軽度認知障害(MCI)、アルツハイマー病(AD)、血管性認知症、レビー小体型認知症、前頭側頭認知症又はそれらの組合せであることができる。

【0022】

好ましくは、神経認知障害は、MCI又はADである。

【0023】

この方法の一実施態様において、該試料中の該タンパク質の量又は濃度の変化は、MCIを有する対象におけるADへの進行の指標であり、ここでMCIからADへの進行は、12ヶ月以下の期間にわたって生じる。

【0024】

別の実施態様において、該試料中の該マーカの量又は濃度の変化は、該対象における脳萎縮の存在又は範囲の指標である。

【0025】

更に別の実施態様において、神経認知障害を伴う対象から採取された試料中のバイオマーカーパネルの該マーカの量又は濃度は、神経認知障害を軽減するのに最も適切かつ有効な療法を予測し且つその療法の成果をモニタリングするために使用される。

【0026】

別の実施態様において、該バイオマーカーパネルのマーカは、a)該マーカの各々への1種以上の結合要素の使用によるか、又は、b)試料中の該マーカの各々に特異的な自己抗体の検出によるか、又は、c)質量分析によるか、あるいはa)、b)及びc)の任意の組合せにより検出される。好ましくは、この試料は、固体支持体上に固定されている。

【0027】

更に別の実施態様において、バイオマーカーパネルのマーカは、2Dゲル電気泳動を使用し検出される。

【0028】

第四の態様において、本発明は、神経認知障害を治療するための薬剤をスクリーニングする方法であって：

(a)神経認知障害又はそれらの症状を有する対象から得られた又はこれを代表する組織試料又は体液試料を提供することであって、ここで対象及び / 又は試料は、スクリーニングされる薬剤により治療されていること；

(b)治療された対象及び / 又は試料由来の若しくはこれを代表する試料中の、本明細書に規定したバイオマーカーパネルのマーカの、量又は濃度を決定すること；並びに

(c)前記薬剤が、治療された対象及び / 又は試料中のバイオマーカーパネルのマーカの量又は濃度へ影響を及ぼすかどうかを決定すること；を含む方法が提供される。

【0029】

この第四の態様の一実施態様において、この薬剤により治療されない対象と比べ、この薬剤により治療される対象中のバイオマーカーパネルのマーカの量又は濃度は、この薬剤が神経認知障害の治療において有用であり得ることの指標である。

【0030】

別の実施態様において、この方法は、前記工程(a)の前に、健常な個体、重症度又は進行が異なる神経認知障害有する患者、及びこの薬剤により治療されていない神経認知障害を有する患者由来の1以上の対照試料中のバイオマーカーパネルのマーカの濃度又は量を決定する工程を更に含む。

【0031】

更に別の実施態様において、この薬剤は、対照に比べバイオマーカーパネルのマーカの量又は濃度の経時的变化を防止又は遅延する場合に、選択される。

【0032】

更なる実施態様において、該バイオマーカーパネルのマーカの量又は濃度は：

10

20

30

40

50

(a) 正常対象及び神経認知障害の症状を有する対象；並びに / 又は

(b) この薬剤で治療されていない神経認知障害の症状を有する対象及びこの薬剤で治療されている神経認知障害の症状を伴う対象：から得られた、又はこれを代表する試料中で決定される。

【0033】

好ましくは、神経認知障害又はそれらの症状を有する対象は、神経認知障害を伴うヒト対象又は神経認知障害の非-ヒト動物モデルである。より好ましくは、神経認知障害は、ADである。

【0034】

一部の実施態様において、対象は、変異体アミロイド前駆体タンパク質(APP)トランスジェニックマウス、プレセニン-1(PS-1)トランスジェニックマウス、二重遺伝子導入APP/PS-1トランスジェニックマウス、及び / 又はグリコーゲン合成酵素キナーゼトランスジェニックマウスであり、並びに正常対象は、野生型マウスである。

【0035】

本発明の方法の実施態様において、組織又は体液の試料は、好ましくは尿、血液、血漿、血清、唾液又は脳脊髄液の試料である。

【0036】

第五の態様において、本発明は、組織試料又は体液試料中のバイオマーカーパネルのマーカの検出のための試薬を含むキットを提供し、ここで該バイオマーカーパネルは、本明細書に規定されている。

【0037】

一実施態様において、キットは、バイオマーカーパネルのマーカースに特異的に結合する1種以上の結合要素を更に含む。

【0038】

好ましくは、この1種以上の結合要素は、一次抗体であり、ここで各一次抗体は、バイオマーカーパネルの異なるマーカースに特異的に結合し、且つより好ましくは、キットは、この一次抗体に特異的に結合する1種以上の二次抗体を更に含む。

【0039】

任意に、この二次抗体は、標識されている。

【0040】

別の実施態様において、キットは、バイオマーカーパネルのマーカの対照試料を更に含む。

【発明を実施するための形態】

【0041】

(詳細な説明)

(定義)

用語「神経認知障害」は、「神経認知疾患」と同義語として本明細書において使用し、且つ全ての関連する認知症及び神経認知障害の主な代表例であるアルツハイマー病(AD)を含むが、これらに限定されるものではない。従って、MCIとADの間の進行を明確に特定しない限りは、ADの言及は、単独で及びアルツハイマー病との混合型認知症として、軽度認知障害(MCI)(認識されたADへの前駆症状)、並びに血管性認知症、レビー小体型認知症、及び前頭側頭認知症を含む他の遅れて発症する認知症への言及と同等と受け取ることができる。これはまた、対象へ与えられた具体的な診断もいい、あるいは具体的診断が、現在の臨床評価尺度に従い医療実践者により未だ正式なものとされていない、その神経認知障害の症状も含むことがある。現在、この疾患状態は、発端から現在までの疾患の期間(より長い期間はより重度な疾患と等しい)及び臨床評価尺度により評価される。これらの評価尺度は、記憶及び他の認知に関する臨床試験、機能(日常生活の能力)に関する臨床試験、及び全般的重症度の臨床評価を含む。AD及び他の認知症及び神経認知障害の可能性のある療法の試験は、現在これらの尺度に対し評価されている。FDA及び他の規制機関は、これらの評価尺度の一部として、認知及び全般的機能の両方を要求している。全般的認知機

10

20

30

40

50

能低下評価尺度(GDS)は、そのような全般的機能の測定の一つである。これは、標準化された重症度判定基準のセットに対する、認知及び機能を含む重症度の評価により評価される。

【0042】

用語「バイオマーカーパネル」は、用語「マーカーパネル」と互換的に本明細書において使用し、且つ翻訳後修飾を含む、同定されたタンパク質の生物学的に関連のある形全てを含む。例えば、バイオマーカーパネル内のタンパク質は、グリコシル化された形、リン酸化された形、多量体化された形、断片化された形又は前駆体形で存在することができる。これは、cDNA、mRNA及びそれらの断片などの、このようなタンパク質をコード化している遺伝子から生じる、デオキシリボ核酸(DNA)産物及びリボ核酸(RNA)産物を更に含む。

10

【0043】

用語「関連組織」は、脳機能に関連した任意の組織、特にADにおいて影響を受けた組織を意味する。

【0044】

用語「組織又は体液試料」又は「組織又は体液試料の代表」は、マーカーの検出が実行され得る任意の組織又は体液を意味し、並びに例えば、血液、血清、血漿、CSF、初代細胞培養物又は関連組織からの生検を含む。

【0045】

用語「対象」は、ヒト及び非-ヒト動物対象を含む。

【0046】

本明細書において使用する用語「差次的発現」とは、マーカーの転写及び/又は発現における定性的差異及び定量的差異の両方をいい、並びにマーカーは、正常対照及び罹患対象からの試料中に異なるレベルで存在することができることを指摘している。この用語は更に、組織又は体液試料中のマーカー発現の少なくとも1種の認識可能な差異をいう。これは、組織又は体液試料中のマーカー発現の定量的に測定可能、半定量的に推定可能又は定性的に検出可能な差異であることができる。

20

【0047】

用語「差次的に発現されたマーカー」(又はDEM)とは、正常な状態の組織又は体液中では強力に発現され、且つADの組織においては余り強力ではなく発現されるか若しくは全く発現されないマーカーをいう。反対に、これは、ADの組織においては強力に発現され、並びに正常組織においては余り強力ではなく発現されるか若しくは全く発現されないことがある。更に、発現は、マーカーが比較している試料間で何らかの認識できる変化を受ける場合に、差次的と見なされることができる。

30

【0048】

用語差次的に発現されたマーカー(DEM)は、「フィンガープリントタンパク質」、「標的タンパク質」又は「パスウェイ(pathway)タンパク質」を含む。

【0049】

本明細書において使用する「フィンガープリントタンパク質」とは、ADに罹患したことが疑われる患者の状態をモニタリング又は評価するために、その発現を、単独で又は他のDEMと一緒に使用することができる、DEMを意味する。これらのタンパク質は、通常組合せて、特に4種以上を組合せて使用されるので、これらは「フィンガープリントタンパク質」と便宜上称されるが、これらが時には、この目的のために単独で、あるいはわずかに1種の若しくは2種の他のタンパク質と一緒に使用される可能性を棄損することはない。このような1種又は複数のフィンガープリントタンパク質は、例えば、ADの特定の型を診断し、結果的にそれに関する具体的治療を指摘するために、使用することができる。

40

【0050】

本明細書において使用する「標的タンパク質」とは、そのレベル又は活性が、AD又は他の認知症及び神経認知障害を軽減するための治療により調整され得るDEPを意味する。患者における標的タンパク質のレベル又は活性の調整は、例えば、標的タンパク質、それと相互作用する別のタンパク質若しくは遺伝子、又はこれと反作用するか若しくは減少する

50

物質、例えば該タンパク質に対する抗体、該タンパク質の競合的阻害剤、又は対応する遺伝子の転写若しくは翻訳のプロセスでこれと作用する物質を、投与することにより達成され得る。

【0051】

本明細書において使用する「パスウェイタンパク質」とは、脳機能の調節に関与した少なくとも1種の他のタンパク質と又は遺伝子と相互作用することができるタンパク質を意味する。この用語は、DEPそれ自身ではなく、DEPが相互作用するタンパク質に関するものであるが、しかしパスウェイタンパク質は、別のDEPであることができる。

【0052】

更に「フィンガープリントタンパク質」は、また「標的タンパク質」又は「パスウェイタンパク質」であることができ、及びその逆も当てはまることを、本明細書において意図している。

10

【0053】

本明細書において使用する用語「検出可能な」とは、本明細書記載の技術を使用し検出することができる、マーカーの転写及び/又は発現のパターンをいう。

【0054】

用語「対照」とは、神経認知障害又は疾患とは診断されず、これらのいかなる症状も呈さない、ヒト又は非-ヒト対象から得られた、組織試料又は体液試料をいう。

【0055】

用語「単離された」は、本明細書を通じて、場合に応じて、マーカー、抗体又はポリヌクレオチドが、それが自然に生じ得る環境とは異なる物理的環境において存在することを意味する。

20

【0056】

用語「治療する」、「治療している」、「治療」、「予防する」、「予防している」、「予防」又は「軽減」は、治療的治療、予防的治療、及び対象が障害を発症させるリスク又は他のリスク因子を減少する適用を含む。治療は、障害の完全な治癒を必要とせず、且つ1以上の症状又は基礎となるリスク因子の減少を包含している。治療はまた、疾患の進行の遅延を含み、且つ1つ以上の薬物又は食物の投与、及び/又は食事若しくは運動などの他の因子を含むことができる。

【0057】

本明細書において使用する用語「診断」は、患者における障害の存在(existence)若しくは存在(presence)、非存在若しくは不在、又は確率に関する何らかの情報の提供を含む。これは、それと結びつけて経験されるか又は経験し得る障害又は症状の種類又は分類に関する情報の提供を更に含む。これは、例えば、障害の重症度の診断を含むことができる。これは、障害の医学的経過の予後、例えば、その持続期間、重症度及びMCIからADへの又は他の認知症への進行の過程を包含している。

30

【0058】

用語「効能」は、所定の介入(例えば、薬物、医療機器、手術手技など)の有益な変化に関する能力を示している。効能が確立されたならば、その介入は恐らく、それが比較された他の利用可能な介入と少なくとも同じ程度良好である。用語「効能」及び「有効性」は、本明細書において互換的に使用する。

40

【0059】

用語「含む」は、対象が、列挙された全ての要素を含むが、任意に、追加の、名前を挙げていない要素も含むこと(すなわち開放(open))を指す。

【0060】

本明細書において使用する用語「及び/又は」は、2つの特定された特徴又は成分の各々の、他方を伴う又は伴わない具体的開示としてとりあげられるべきである。例えば、「A及び/又はB」は、各々が個別に本明細書において記述されるように、(i)A、(ii)B、並びに(iii)A及びBの各々の具体的開示としてとりあげられるべきである。

【0061】

50

別に文脈が指示しない限りは、先に記述した特徴/用語の定義は、本発明の特定の態様又は実施態様のいずれかに限定されず、本明細書記載の全ての態様及び実施態様に同等に適用される。

【0062】

(バイオマーカーパネル及びそれらの使用方法)

本発明は、正常状態における互いの及び/又はそれらの発現に比べ、MCI及びADなどの神経認知障害において差次的に発現されるマーカーのバイオマーカーパネルに関する。これらのパネルは、神経認知障害の検出及び評価を改善することを可能にする。

【0063】

本発明のバイオマーカーパネルは、トランスサイレチン(TTR)、クラスタリン、シスタチンC(CST3)、 α -1-酸性糖タンパク質(A1AcidG)、細胞間接着分子1(ICAM1)、補体C4(CC4)、色素上皮由来因子(PEDF)及び α 1抗トリプシン(A1AT)のマーカーから本質的になる。

10

【0064】

本バイオマーカーパネルは、RANTES(発現分泌された活性化正常T細胞の調節物質)、及びアポリポタンパクC-III(ApoC3)のマーカーを更に含むことができる。

【0065】

本バイオマーカーパネルは、プラスミノゲン活性化抑制因子タイプ1(PAI-1)、C-反応性タンパク質(CRP)、カテプシンD(CTSD)及びアポリポタンパクE(ApoE)のマーカーも更に含むことができる。

【0066】

加えて、本バイオマーカーパネルは、 α -2-マクログロブリン(A2M)、血清アミロイドP成分(SAP)、終末糖化産物特異的受容体(sRAGE)、神経特異的エノラーゼ(NSE)、補体因子H(CFH)、アミロイド β (A β)前駆体タンパク質(AB40又はA β 40)、セルロプラスミン、神経細胞接着分子(NCAM)、ApoA1、A β 42、BDNF、 α -2-ミクログロブリン(B2M)、及びVCAM-1からなる群から選択されるマーカーの1種以上を更に含むことができる。

20

【0067】

一実施態様において、本バイオマーカーパネルは、任意にApoE ϵ 4対立遺伝子の存在(ApoE ϵ 4遺伝子型)と組合せた、トランスサイレチン(TTR)、クラスタリン、シスタチンC(CST3)、 α -1-酸性糖タンパク質(A1AcidG)、細胞間接着分子1(ICAM1)、補体C4(CC4)、色素上皮由来因子(PEDF)及び α 1抗トリプシン(A1AT)のマーカーから本質的になる。ApoE ϵ 4対立遺伝子の存在は、遺伝子マーカーとして検出可能な ϵ 4対立遺伝子の遺伝子の存在、並びに特異的ApoE ϵ 4のタンパク質の存在(S112R及びH158R)の両方を含む。

30

【0068】

別の実施態様において、本バイオマーカーパネルは、トランスサイレチン(TTR)、クラスタリン、シスタチンC(CST3)、 α -1-酸性糖タンパク質(A1AcidG)、細胞間接着分子1(ICAM1)、補体C4(CC4)、色素上皮由来因子(PEDF)及び α 1抗トリプシン(A1AT)のマーカーから本質的になり、ここで本バイオマーカーパネルは、任意にApoE ϵ 4対立遺伝子の存在(ApoE ϵ 4遺伝子型)と組合せた、RANTES(発現分泌された活性化正常T細胞の調節物質)、及びアポリポタンパクC-III(ApoC3)を更に含む。

【0069】

更に別の実施態様において、本バイオマーカーパネルは、トランスサイレチン(TTR)、クラスタリン、シスタチンC(CST3)、 α -1-酸性糖タンパク質(A1AcidG)、細胞間接着分子1(ICAM1)、補体C4(CC4)、色素上皮由来因子(PEDF)及び α 1抗トリプシン(A1AT)、RANTES(発現分泌された活性化正常T細胞の調節物質)、及びアポリポタンパクC-III(ApoC3)のマーカーから本質的になり、ここで本バイオマーカーパネルは、任意にApoE ϵ 4対立遺伝子の存在(ApoE ϵ 4遺伝子型)と組合せた、プラスミノゲン活性化抑制因子タイプ1(PAI-1)、C-反応性タンパク質(CRP)、カテプシンD(CTSD)及びアポリポタンパクE(ApoE)の群から選択されるマーカーの1種以上を更に含む。

40

【0070】

更なる実施態様において、本バイオマーカーパネルは、トランスサイレチン(TTR)、ク

50

ラスタリン、シスタチンC(CST3)、 α -1-酸性糖タンパク質(A1AcidG)、細胞間接着分子1(ICAM1)、補体C4(CC4)、色素上皮由来因子(PEDF)及び α 1抗トリプシン(A1AT)、RANTES(発現分泌された活性化正常T細胞の調節物質)、アポリポタンパクC-III(ApoC3)、プラスミノーゲン活性抑制因子タイプ1(PAI-1)、C-反応性タンパク質(CRP)、カテプシンD(CTSD)及びアポリポタンパクE(ApoE)のマーカークラスタから本質的になり、ここで本バイオマーカーパネルは、任意にApoE ϵ 4対立遺伝子の存在(ApoE遺伝子型)と組合せた、 α -2-マクログロブリン(A2M)、血清アミロイドP成分(SAP)、終末糖化産物特異的受容体(sRAGE)、神経特異的エノラーゼ(NSE)、補体因子H(CFH)、アミロイド β (A β)前駆体タンパク質(AB40又はA β 40)、セルロプラスミン、神経細胞接着分子(NCAM)、ApoA1、A β 42、BDNF、 α -2-ミクログロブリン(B2M)、及びVCAM-1の群から選択されるマーカークラスタの1種以上を更に含む。

10

【 0 0 7 1 】

本発明のバイオマーカーパネルのタンパク質は、下記表1Aに示している。
表1A：本試験において調べたタンパク質の概要

【表 1】

タンパク質名	方法	試験デザイン	報告された知見	参考文献
α -2-マクログロブリン (A2M)	2-DGE; LC-MS/MS	AD 対対照	↑ AD	Hyeら、2006
血清アミロイドP成分 (SAP)	2-DGE; LC-MS/MS	AD 対対照	↑ AD	Hyeら、2006
補体因子H (CFH)	2-DGE; LC-MS/MS	AD 対対照	↑ AD	Hyeら、2006; Cutlerら、2008
補体C4 (CC4)	2-DGE; LC-MS/MS	AD 対対照	↓ AD	Hyeら、2006
アポリポタンパクE (ApoE)	2-DGE; LC-MS/MS 及び ELISA	PiB PET 関連	↑ A β 脳領域	Thambisettyら、2010
クラスタリン	2-DGE; LC-MS/MS 及び ELISA	低対高脳萎縮	↑ 高萎縮	Thambisettyら、2011
アポリポタンパク (ApoA1)	2-DGE; LC-MS/MS	SCD 対 FCD	↑ FCD	Thambisettyら、2011
トランスサイレチン (TTR)	2-DGE; LC-MS/MS 及び ELISA	SCD 対 FCD	↓ FCD	Velayudhanら、2012
セルロプラスミン	2-DGE; LC-MS/MS	AD 対対照	↓ AD	Hyeら、2006
アミロイド β (A β) 前駆体タンパク質 (AB40) (A β 40)	ELISA	AD 対対照	↑ AD	Mehtara、2001, Mayeuxら、2003
アミロイド β タンパク質1-42 断片 (A β 42)	ELISA	AD 対対照	↓ AD	Hampelら、2010, Blennowら、2001
α -1-酸性糖タンパク質 (A1AcidG)	ELISA	AD 対対照	↓ AD	Roherら、2010
α 1抗トリプシン (A1AT)	ELISA	AD 対対照	↑ AD	Nielsenら、2007; Sunら、2003
アポリポタンパク C-III (Apo C3)	Luminex	ϵ 4担体対非担体	↓ AD	Songら、2012
脳由来神経栄養因子 (BDNF)	ELISA	MRI 関連	↑ 年齢に関連した白質萎縮	Driscollら、2011
	ELISA	AD 対対照	↓ AD	Aisara、2010
	ELISA	AD 対対照	↓ AD	Laskeら、2006
β -2-ミクログロブリン	Luminex		↑ AD	Wilsonら、2012
カテプシンD	ウェスタンブロット	AD 対対照	↓ AD	Urbanelliら、2008
C-反応性タンパク質 (CRP)	比濁分析検出	SCD 対 FCD	↑ FCD	Locascioら、2008
シスタチンC	免疫比濁アッセイ	AD 対対照	↓ AD	Zhongら、2013;
	ELISA	AD 対対照	変化なし	Sundelöfら、2010
細胞間接着分子1 (ICAM-1)	IHC	AD 対対照	↑ AD	Frohmanら、1991
神経細胞接着分子 (NCAM)	ELISA	AD 対対照	↓ AD	Aisara、2010

10

20

30

40

神経特異的 エノラーゼ (NSE)	電気化学発光アッセイ	AD 対対照	変化なし	Chavesら、2010;
	免疫放射アッセイ	AD 対対照	↑AD	Blennowら、1994
プラスミノゲン 活性抑制因子-1 (PAI-1)	ELISA	AD 対対照	↑AD	Suttonら、1994; Akenamiら、1997
色素上皮由来因子 (PEDF)	2-DGE; LC-MS/MS	AD 対対照	↑AD	Castanoら、2006
RANTES	Q-RT-PCR	AD 対対照	↓AD	Kesterら、2011
			↑AD	Tripathyら、2011; Reynoldsら、2007
血管細胞 接着分子1 (VCAM-1)	ELISA	AD 対対照	↑AD	Zulianiら、2008
終末糖化産物 特異的受容体 (sRAGE)	ELISA	AD 対対照	↓AD	Emanueleら、2005
	ELISA	AD 対 MCI	↓MCI	Chidoniら、2008

10

20

略語：PiB PET関連、フィラデルフィア化合物Bポジトロン放出断層撮影；2-DGE、二次元ゲル電気泳動；LC-MS/MS、液体クロマトグラフィータンデム質量分析；ELISA、酵素結合免疫吸着アッセイ；Q-RT-PCR、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応；IHC、免疫組織化学；SCD、緩やかな認知能低下；FCD、急激な認知能低下

【 0 0 7 2 】

これらのタンパク質に関する参照配列は、表1Bに従い配列番号:1~27において提供される。

表1B：配列相関表

30

【表 2】

タンパク質	配列番号:
トランスサイレチン (TTR)	1
クラスタリン	2
シスタチンC (CST3)	3
α -1-酸性糖タンパク質 (AlAcidG)	4
細胞間接着分子1 (ICAM 1)	5
補体C4 (CC4)	6
色素上皮由来因子 (PEDF)	7
α 1抗トリプシン (A1AT)	8
RANTES	9
アポリポタンパクC-III (ApoC3)	10
プラスミノーゲン活性抑制因子-1 (PAI-1)	11
C-反応性タンパク質 (CRP)	12
カテプシンD (CTSD)	13
アポリポタンパクE (ApoE)	14
α -2-マクログロブリン (A2M)	15
血清アミロイドP成分 (SAP)	16
神経特異的エノラーゼ (NSE)	17
補体因子H (CFH)	18
アミロイド β (A β)前駆体タンパク質 (AB40 又は A β 40)	19
セルロプラスミン	20
神経細胞接着分子 (NCAM)	21
ApoA1	22
BDNF	23
β -2-ミクログロブリン (B2M)	24
VCAM-1	25
終末糖化産物特異的受容体 (sRAGE)	26
A β 42	27

10

20

30

【0073】

任意の個々の対象において、本バイオマーカーパネル内のタンパク質の配列は、参照配列又は参照配列の対立遺伝子若しくは天然の変種であることができる。

40

【0074】

対立遺伝子又は天然の変種は、参照配列とその完全長にわたり、80%以上、90%以上、95%以上又は98%以上の配列同一性を有することができる。配列同一性は、アルゴリズムGAP (Genetics Computer Group, Madison, WI) を参照し普通に規定することができる。GAPは、マッチの数を最大化し、且つギャップの数を最小化するように2つの完全配列を整列するために、Needleman and Wunschアルゴリズムを使用する。一般にデフォルトパラメータを使用し、ギャップクリエーションペナルティ = 12及びギャップイクステンションペナルティ = 4である。GAPの使用が好ましいが、一般にデフォルトのパラメータを利用し、他のアルゴリズム、例えばBLAST⁶³、FASTA⁶⁴、又はSmith-Watermanアルゴリズム、又はTBLASTNプログラム⁶³を使用することができる。

50

【0075】

対立遺伝子又は天然の変種は、1個以上のアミノ酸の付加、欠失、置換及びノ又は挿入により、参照配列と異なることができる。例えば、対立遺伝子又は天然の変種は、1個以上のアミノ酸、例えば、最大2個、最大5個のアミノ酸、最大10個のアミノ酸、又は最大20個のアミノ酸の付加、欠失又は置換により、本明細書記載の参照配列(例えば、配列番号: 1~27)と異なることができる。本明細書に規定した天然の変種はまた、リン酸化及びグリコシル化などの、翻訳後修飾を含む。

【0076】

本明細書記載のパネル内の一部のマーカーの発現は、対照対象と比べ神経認知障害の対象において増加されることがあるか、又は対照対象と比べ神経認知障害の対象において特有に存在することがある。本明細書記載のパネル内の他のマーカーの発現は、対照対象と比べ神経認知障害の対象において減少することがあるか、又は対照対象と比べ神経認知障害の対象において特有に存在しないことがある。表1は、本明細書に開示されたタンパク質の発現は、疾患対象、対、対照対象において、増加又は減少するかどうかを示している。

10

【0077】

本明細書記載のバイオマーカーパネルは、軽度認知障害及びADなどの神経認知障害の進行のモニタリング、ADなどの神経認知障害の素因、ADなどの神経認知障害の診断、並びに例えば臨床試験時の薬剤の効能のモニタリング、及びADなどの神経認知障害の治療に関する臨床評価を受けている患者のモニタリングに利用することができる。本明細書記載のバイオマーカーパネルは、神経認知障害の治療に関する確定及びノ又は選択を補助するために、その障害の性質又は程度を正確に規定するために使用することができる。

20

【0078】

例えば、ADは、進行性、潜行性の発症、認知機能のうち2つ以上の欠損、及び認知症を説明し得る何らかの他の疾患の不在により特徴づけられる。

【0079】

記憶障害に加え、見当識障害、注意持続期間不良、及び失語が存在することがある。日常生活活動の減退が、並びに恐らく同じく知覚障害及び人格の変化も存在する可能性がある。行動上の症状は、妄想、攻撃性、激越、怒り、徘徊、幻覚及び睡眠障害を含む。

30

【0080】

見当識、描記(registration)、計算力及び注意力、想起、言語、及び視空間認知機能を評価する簡単な試験を、初期診断に使用することができる。

【0081】

標準のCT又はMRIによる構造の撮像も、使用することができる。通常は造影剤を使わない頭部CT走査で十分であるが、脳血管疾患のリスクがある高血圧又は糖尿病を有する患者には、MRIが好ましい。

【0082】

ADは、神経原線維変化(tangle)及び老人斑を示すことにより、剖検又は脳生検により組織学的確認することができる。

40

【0083】

AD又は他の神経認知障害のリスクのある個体の確定は、軽度認知障害(MCI)の診断に関連することができる。(MCI)は、正常加齢と認知症の間の一過性の状態であることができる。様々な型のMCIが、存在する。記憶に加え、認知機能の複数の領域に認識機能障害が存在することがある。一部の症例においては、記憶は正常であるが、認知機能のいくつかの他の領域が異常である。

【0084】

健忘型MCIは、AD発症のリスクのある状態であるように見える。健忘型機能障害は、自覚的記憶の愁訴により規定される。これらの患者は、年齢が合致する対等者と比べた場合に、公式の試験において患者の年齢及び教育について記憶成績が貧弱である。全般的認知機能及び日常生活活動を行う能力は、全体的に正常でなければならない。健忘型MCIは、

50

海馬萎縮、内側側頭葉における神経原線維変化、及び脳脊髄液(CSF)中のタウの上昇したレベルに関連している。

【0085】

特に、本発明は、対象から得られた組織試料及び/又は体液試料中の、本明細書に規定したバイオマーカーパネルのマーカーを検出することを含む、該対象における神経認知障害の進行及び/又は予後を決定する方法を提供する。

【0086】

好ましいことに、この方法は、インビトロ法である。

【0087】

詳細には、この方法は：

a) 試験時点で、神経認知障害又はそれらの症状を有する該対象から得られた組織試料又は体液試料を提供すること；

b) 該バイオマーカーパネルのマーカーの量又は濃度を決定すること；

c) 試験時点での試料中の該バイオマーカーパネルのマーカーの量又は濃度を、参照値と比較すること：を含み、

ここでこの試験時点は、進行及び/又は予後の方法が実行される時点に対応し；並びに、ここで該試料中の該タンパク質の量又は濃度は、該対象における神経認知障害の進行及び/又は予後の指標であり、並びにここでバイオマーカーパネルは、任意にApoE 4対立遺伝子の存在(ApoE遺伝子型)と組合せた、トランスサイレチン(TTR)、クラスタリン、シスタチンC(CST3)、 α -1-酸性糖タンパク質(A1AcidG)、細胞間接着分子1(ICAM1)、補体C4(C4)、色素上皮由来因子(PEDF)及び 1抗トリプシン(A1AT)のマーカーから本質的になる。

【0088】

この参照値は、対照患者におけるかかる決定と臨床情報の間の既知の又は予め決定された相関関係を参照し、本試験が実行される患者と同様の患者の大規模スクリーニングから得ることができる。例えば、参照値は、対象と年齢及び性別が類似した対照対象、例えば健常者(すなわち認知症でない)などにおける該マーカーの発現の濃度、量又はレベルの比較により、決定することができる。あるいは、参照値は、112位及び158位の突然変異の存在又は非存在が、比較されるべき参照を表す、ApoE 4対立遺伝子の存在のような、文献において認めることができる値である。加えて、参照値は、試験時点に先行する1以上の時点で、同じ対象から得ることができる。そのようなより早期の試料は、試験時点の日付よりも、1週間以上、1ヶ月以上、3ヶ月以上前に、最も好ましくは6ヶ月以上前に採取することができる。一部の実施態様において、複数の早期の試料を、長期にわたる様式(longitudinal manner)で比較することができ、且つマーカー発現の変化の勾配は、認知能低下の相関として計算することができる。

【0089】

神経認知障害は、軽度認知障害(MCI)、アルツハイマー病(AD)、血管性認知症、レビー小体型認知症、前頭側頭認知症又はそれらの組合せからなる群から選択され得る。

【0090】

好ましくは、神経認知障害は、MCI又はADであり、並びに神経認知疾患の進行及び/予後は、MCI又はADの進行及び/又は予後である。

【0091】

好ましい実施態様において、本方法は：

a) 試験時点で、神経認知障害又はそれらの症状を有する該対象から得られた組織試料又は体液試料を提供すること；

b) 該バイオマーカーパネルのマーカーの量又は濃度を決定すること；

c) 試験時点での試料中の該バイオマーカーパネルのマーカーの量又は濃度を、参照値と比較すること：を含み、

ここでこの試験時点は、進行及び/又は予後の方法が実行される時点に対応し；並びに、ここで該試料中の該タンパク質の量又は濃度は、該対象におけるMCIのADへの進展の指

10

20

30

40

50

標であり、並びにバイオマーカーパネルは、任意にApoE 4対立遺伝子の存在(ApoE遺伝子型)と組合せた、トランスサイレチン(TTR)、クラスタリン、シスタチンC(CST3)、 α -1-酸性糖タンパク質(A1AcidG)、細胞間接着分子1(ICAM1)、補体C4(CC4)、色素上皮由来因子(PEDF)及び α 1抗トリプシン(A1AT)のマーカーから本質的になる。

【0092】

好ましくは、この進展は、12ヶ月以下にわたり決定される。

【0093】

より好ましくは、バイオマーカーパネルはまた、RANTES(発現分泌された活性化正常T細胞の調節物質)及びアポリポタンパクC-III(ApoC3)も含む。

【0094】

MCIのADへの進展に関する本試験において誘導される参照値は、以下の通りである：トランスサイレチン222 μ g/ml；クラスタリン402 μ g/ml；シスタチンC 3.21 μ g/ml； α -1-酸性糖タンパク質768.3 μ g/ml；細胞間接着分子1 99.72ng/ml；補体C4 78.5 μ g/ml；色素上皮由来因子10.7 μ g/ml； α 1抗トリプシン9.5 μ g/ml；RANTES 33.8ng/ml；及び、アポリポタンパクC-III 105.5 μ g/ml。

【0095】

特に、これらのマーカーの少なくとも一部の濃度が、下記である場合に、MCIのADへの進展を予想することができる：トランスサイレチン(<)222 μ g/ml未満；クラスタリン(>)402 μ g/ml超；シスタチンC(<)3.21 μ g/ml未満； α -1-酸性糖タンパク質(>)768.3 μ g/ml超；細胞間接着分子1(<)99.72ng/ml未満；補体C4(>)78.5 μ g/ml超；色素上皮由来因子(>)10.7 μ g/ml超； α 1抗トリプシン(<)9.5 μ g/ml未満；RANTES(<)33.8ng/ml未満；及び、アポリポタンパクC-III(<)105.5 μ g/ml未満。

【0096】

加えて、このバイオマーカーパネル内の全てではないマーカーが、個々の対象内で差次的に発現されることがある。任意の個々の試験において認められる差次的に発現されたマーカーの数及びアイデンティティは、異なる対象間で及び経時的に個々の対象から採取された試料間で変動するであろう。各サブセットパネル内で、最低数の差次的に発現されたタンパク質が、確実な決定を提供するために、必要とされ得る。例えば、パネル内の3種以上のタンパク質、好ましくは4種以上、及びより好ましくはパネル内の5種以上、6種以上、7種以上、又は8種以上のタンパク質が、個々の対象において差次的に発現され得る。

【0097】

一つの好ましい実施態様において、対象における神経認知障害の進行及び/又は予後を決定する方法は、該対象から得られた組織試料及び/又は体液試料中のバイオマーカーパネルのマーカーを検出することを含み、この方法は：

a)試験時点で、神経認知障害又はそれらの症状を有する該対象から得られた組織試料又は体液試料を提供すること；

b)該バイオマーカーパネルのマーカーの量又は濃度を決定すること；

c)試験時点での試料中の該バイオマーカーパネルのマーカーの量又は濃度を、参照値と比較すること：を含み、

ここでこの試験時点は、進行及び/又は予後の方法が実行される時点に対応し；並びに、ここで該試料中の該タンパク質の量又は濃度は、該対象における神経認知障害の進行及び/又は予後の指標であり、並びにここでバイオマーカーパネルは、ApoE 4対立遺伝子の存在(ApoE遺伝子型)と組合せた、トランスサイレチン(TTR)、クラスタリン、シスタチンC(CST3)、 α -1-酸性糖タンパク質(A1AcidG)、細胞間接着分子1(ICAM1)、補体C4(CC4)、色素上皮由来因子(PEDF)、 α 1抗トリプシン(A1AT)、RANTES(発現分泌された活性化正常T細胞の調節物質)、及びアポリポタンパクC-III(ApoC3)のマーカーから本質的になり；ここで、神経認知障害の進行及び/又は予後は、MCIからADへの進展であり；並びに、ここで本方法は、インビトロ方法である。

【0098】

より好ましくは、この対象はヒトであり；更により好ましくは、この試料は、血液、血

10

20

30

40

50

漿又は血清である。

【0099】

最も好ましい実施態様は、ヒト対象におけるMCIからADの進行及び/又は予後を決定するインビトロ方法であり、これは、試験時点で、該ヒト対象から得られた血液試料中の、ApoE 4対立遺伝子の存在(ApoE遺伝子型)と組合せた、トランスサイレチン(TTR)、クラスタリン、シスタチンC(CST3)、 α -1-酸性糖タンパク質(A1AcidG)、細胞間接着分子1(ICAM1)、補体C4(CC4)、色素上皮由来因子(PEDF)、 α 1抗トリプシン(A1AT)、RANTES(発現分泌された活性化正常T細胞の調節物質)、及びアポリポタンパクC-III(ApoC3)のマーカの濃度を決定することを含み；ここで、少なくとも3種以上のマーカが、以下のそれらの濃度を有する場合、そのヒト対象は、試験時点から12ヶ月以内にMCIからADへと進展される：トランスサイレチン(<)222 μ g/ml未満；クラスタリン(>)402 μ g/ml超；シスタチンC(<)3.21 μ g/ml未満； α -1-酸性糖タンパク質(>)768.3 μ g/ml超；細胞間接着分子1(<)99.72ng/ml未満；補体C4(>)78.5 μ g/ml超；色素上皮由来因子(>)10.7 μ g/ml超； α 1抗トリプシン(<)9.5 μ g/ml未満；RANTES(<)33.8ng/ml未満；及び、アポリポタンパクC-III(<)105.5 μ g/ml未満。

10

【0100】

本明細書記載のバイオマーカーパネルのマーカはまた、断片として存在することもできる。好ましい断片は、長さが、アミノ酸50未満、100未満、150未満、200未満、250未満、300未満、350未満、400未満、500未満、600未満、700未満、800未満、900未満、1000未満、1100未満、1200未満、1300未満、1400未満、1500未満、1600未満、1700未満、1800未満、1900未満又は2000未満である。

20

【0101】

試料中のマーカの量又は濃度は、神経認知疾患の進行及び/又は予後の指標である。

【0102】

あるいは、神経認知障害の性質又は程度を、決定することができる。

【0103】

本発明は、該対象から得られた組織試料及び/又は体液試料中の、本明細書に規定したバイオマーカーパネルのマーカを検出することを含む、対象における神経認知障害を診断又は評価する方法を更に含む。

30

【0104】

特にこの方法は：

a)試験時点で、神経認知障害又はそれらの症状を有する該対象から得られた組織試料又は体液試料を提供すること；

b)該バイオマーカーパネルのマーカの量又は濃度を決定すること；

c)試料中の該バイオマーカーパネルのマーカの量又は濃度を、参照値と比較すること；を含み、

ここでこの試験時点は、診断方法が実行される時点に対応し；並びに、ここで該試料中の該マーカの量又は濃度は、該対象における神経認知障害の存在又は非存在の指標であり；ここでバイオマーカーパネルは、任意にApoE 4対立遺伝子の存在(ApoE遺伝子型)と組合せた、トランスサイレチン(TTR)、クラスタリン、シスタチンC(CST3)、 α -1-酸性糖タンパク質(A1AcidG)、細胞間接着分子1(ICAM1)、補体C4(CC4)、色素上皮由来因子(PEDF)及び α 1抗トリプシン(A1AT)のマーカから本質的になる。

40

【0105】

好ましくは、このバイオマーカーパネルは、任意にApoE 4対立遺伝子の存在(ApoE遺伝子型)と組合せた、RANTES(発現分泌された活性化正常T細胞の調節物質)、及びアポリポタンパクC-III(ApoC3)を更に含む。

【0106】

あるいは、このバイオマーカーパネルは、トランスサイレチン(TTR)、クラスタリン、シスタチンC(CST3)、 α -1-酸性糖タンパク質(A1AcidG)、細胞間接着分子1(ICAM1)、補体C4(CC4)、色素上皮由来因子(PEDF)及び α 1抗トリプシン(A1AT)、RANTES(発現分泌された活

50

性化正常T細胞の調節物質)、及びアポリポタンパクC-III(ApoC3)のマーカ―から本質的になり、並びに任意にApoE 4対立遺伝子の存在(ApoE遺伝子型)と組合せた、プラスミノーゲン活性抑制因子タイプ1(PAI-1)、C-反応性タンパク質(CRP)、カテプシンD(CTSD)及びアポリポタンパクE(ApoE)の群から選択される1以上のマーカ―を更に含む。

【0107】

更なる実施態様において、バイオマーカ―パネルは、トランスサイレチン(TTR)、クラスタリン、シスタチンC(CST3)、 α -1-酸性糖タンパク質(A1AcidG)、細胞間接着分子1(ICAM1)、補体C4(CC4)、色素上皮由来因子(PEDF)及び α 1抗トリプシン(A1AT)、RANTES(発現分泌された活性化正常T細胞の調節物質)、アポリポタンパクC-III(ApoC3)、プラスミノーゲン活性抑制因子タイプ1(PAI-1)、C-反応性タンパク質(CRP)、カテプシンD(CTSD)及びアポリポタンパクE(ApoE)のマーカ―から本質的になり、並びに任意にApoE 4対立遺伝子の存在(ApoE遺伝子型)と組合せた、 α -2-マクログロブリン(A2M)、血清アミロイドP成分(SAP)、終末糖化産物特異的受容体(sRAGE)、神経特異的エノラーゼ(NSE)、補体因子H(CFH)、アミロイド(A4)前駆体タンパク質(AB40又はA β 40)、セルロプラスミン、神経細胞接着分子(NCAM)、ApoA1、A β 42、BDNF、 α -2-ミクログロブリン(B2M)、及びVCAM-1の群から選択されるマーカ―の1種以上を更に含む。

10

【0108】

この方法の一実施態様において、該試料中の該マーカ―の量又は濃度は、神経認知障害の指標であり、及び/若しくは神経認知障害の性質又は程度が決定され得る。

【0109】

神経認知障害は、軽度認知障害(MCI)、アルツハイマー病(AD)、血管性認知症、レビー小体型認知症、前頭側頭認知症又はそれらの組合せからなる群から選択され得る。

20

【0110】

好ましくは、神経認知障害は、MCI又はADである。より好ましくは、該試料中の該タンパク質の量又は濃度の変化は、MCIを有する対象におけるADへの進行の指標であり、ここでMCIからADへの進行は、12ヶ月未満の期間にわたって起こる。

【0111】

本明細書記載の方法は、対象における神経認知障害の型又は亜型を、当該技術分野において利用可能な予防的又は治療的処置の異なる型と互いに関連付けることを可能にし、これによりこの療法に対する対象の可能性のある反応を増強する。

30

【0112】

特に、神経認知障害の対象から採取された試料中の該バイオマーカ―パネルのマーカ―の量又は濃度は、神経認知障害を軽減するために最も適切且つ有効な療法を予測し、且つその療法の成果をモニタリングするために使用される。

【0113】

本発明の方法において使用される試料は、尿、血液、血漿、血清、唾液又は脳脊髄液試料などの、組織試料又は体液試料であることができる。好ましくは、試料は、血液、血清又は血漿試料である。列挙されたもののような体液は、対象から比較的容易に得ることができるので、これの使用が好ましい。これは、経費、簡便さ、速度及び対象の快適さ(well being)の観点において、明らかな利点を有する。血液、血清及び血漿などの血液産物、並びに尿が、特に好ましい。

40

【0114】

本明細書記載の方法による評価又は診断後、対象は、例えば、認知試験及び/又はポジトロン放出断層撮影(PET)走査などの脳撮像の、更なる試験を受けることができる。

【0115】

この障害の経時的な進行は、障害の重症度(例えば、全般的認知症重症度)を決定するために、本発明の方法を用いて、追跡することができる。

【0116】

本発明に従うバイオマーカ―パネルは、臨床試験の一部として又は標準の臨床管理において治療を受けている患者において認知能低下の他の臨床評価と組合せて又はその代わ

50

りに、使用することができる。

【0117】

一実施態様において、バイオマーカーパネルは、ミニメンタルステート検査(MMSE)及びAD評価尺度認知機能尺度(ADAS-Cog)などの、臨床評価の代替として有用であることができる。

【0118】

一実施態様において、バイオマーカーパネルは、クラスタリン、RANTES、NSE、TTR、VCAM-1及びSAP；又はNCAM、sRAGE及びICAMの予後的バイオマーカーの1種以上を含むことができ；並びに、試料中の該予後的バイオマーカーの量は、対象のMMSE成績及び/又は対象におけるADの重症度、進行若しくは予後の指標であることができる。これらのバイオマーカーパネルは、例えば、臨床試験の一部として又は標準の臨床管理において治療を受けている患者においてMMSEと組合せて又はその代わりに、使用することができる。

10

【0119】

一他の実施態様において、バイオマーカーパネルは、予後的バイオマーカーAPOA1、A1AT、ApoC3、BDNF、AB40、PAI-1及びNSEの1種以上を含み得、並びに試料中の該予後的バイオマーカーの量は、対象のADAS-Cog成績及び/又は対象におけるADの重症度、進行若しくは予後の指標である。バイオマーカーパネルは、例えば、臨床試験の一部として又は標準の臨床管理において治療を受けている患者においてADAS-Cogと組合せて又はその代わりに、使用することができる。

【0120】

あるいは、該試料中の該マーカーの量又は濃度の変化は、該対象における脳萎縮の存在又は範囲の指標である。萎縮バイオマーカーの試料中の量又は濃度は、対象における脳萎縮の存在又は範囲の指標であることができる。このようなバイオマーカーパネルは、例えば、臨床試験の一部として又は標準の臨床管理において治療を受けている患者において脳撮像と組合せて又はその代わりに、使用することができる。

20

【0121】

バイオマーカーパネルの個別のマーカーは、対象における特定の脳領域内の萎縮の存在又は範囲を決定する上で有用であることができる。

【0122】

例えば、MCIを有する対象において(下記表4参照)：

30

・個別のマーカークラスタリン及び/又はRANTESは、脳室容積を評価する上で有用であることができる。これらのマーカーの試料中の量又は濃度は、対象の脳室容積の指標である；

・個別のマーカークラスタリン及び/又はNSEは、平均海馬容積(LHV)を評価する上で有用であることができる。これらのマーカーの試料中の量又は濃度は、対象の左海馬容積(LHV)の指標である；

・個別のマーカークラスタリンは、右嗅内皮質容積(REC)を評価する上で有用であることができる。このマーカーの試料中の量又は濃度は、対象の右嗅内皮質容積(REC)の指標である；

・個別のマーカートランスサイレチンは、左嗅内皮質容積(LEC)を評価する上で有用であることができる。これらのマーカーの試料中の量又は濃度は、対象の左嗅内皮質容積(LEC)の指標である；

40

・個別のマーカークラスタリン及び/又はトランスサイレチンは、嗅内皮質厚さ(ECT)を評価する上で有用であることができる。これらのマーカーの試料中の量又は濃度は、対象の左右両方の脳半球の嗅内皮質厚さ(ECT)の指標である。個別のマーカークラスタリン及び/又はNSE及び/又はRANTESは、全脳容積を評価する上で有用であることができる。該萎縮バイオマーカーの試料中の量又は濃度は、対象の左右両方の脳半球の全脳容積の指標である。

【0123】

例えば、ADを有する対象において(下記表4参照)：

50

・個別のマーカ-A1AT及び/又はNSEは、脳室容積を評価する上で有用であることができる。これらのマーカの試料中の量又は濃度は、対象の脳室容積の指標である；

・個別のマーカ-BDNF及び/又はApoC3及び/又はApoA1及び/又はApoEは、平均海馬容積を評価する上で有用であることができる。これらのマーカの試料中の量又は濃度は、対象の平均海馬容積の指標である；

・個別のマーカ-ApoC3及び/又はApoEは、平均嗅内容積を評価する上で有用であることができる。これらのマーカの試料中の量又は濃度は、対象の平均嗅内容積の指標である；

・個別のマーカ-ApoC3及び/又はApoA1及び/又はApoE及び/又はトランスサイレチンは、平均嗅内皮質厚さ(ECT)を評価する上で有用であることができる。これらのマーカの試料中の量又は濃度は、対象の嗅内皮質厚さ(ECT)の指標である；

・個別のマーカ-ApoE及び/又はApoA1及び/又はA 40は、全脳容積を評価する上で有用であることができる。該萎縮バイオマーカの試料中の量又は濃度は、対象の左右両方の脳半球中の全脳容積の指標である。

【0124】

本明細書記載のバイオマーカパネルは、正常状態、対、疾患状態においてその発現が調整される、すなわち量的に増加又は減少されるマーカを含む。正常状態、対、疾患状態において発現が異なる程度は、標準の特徴決定技法を介して視覚化するのに十分な大きさであることのみを必要とする。バイオマーカパネルの差次的に発現されたマーカの検出及び定量の方法は、当該技術分野において周知であり、且つ任意の好適な方法を、利用することができる。

【0125】

一実施態様において、バイオマーカパネルのマーカは、例えば、ELISAアッセイ又はウェスタンブロットにおいて、そのマーカに特異的な抗体などの結合要素を用いて検出することができる。

【0126】

本明細書記載のバイオマーカパネル内の個別のマーカの1以上のエピトープを特異的に認識することが可能である抗体の産生に関連した方法は、当該技術分野において公知である。このような抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(mAb)、ヒト化又はキメラ抗体、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、Fab発現ライブラリーにより産生された断片、抗イディオタイプ(anti-Id)抗体、及び先のいずれかのエピトープ-結合断片を含み得るが、これらに限定されるものではない。このような抗体は、AD治療法の一部として利用することができる、及び/又はそれにより患者が、バイオマーカパネル内の個別のマーカの量、濃度若しくは発現について試験される診断技術の一部として使用することができる。

【0127】

抗体産生に関して、様々な宿主動物は、差次的に発現された又はパスウェイタンパク質、又はそれらの一部の注射により、免疫化することができる。このような宿主動物は、いくつか名前を挙げるとウサギ、マウス及びラットを含むことができるが、これらに限定されるものではない。様々なアジュバントを使用し、宿主種に応じ、免疫応答を増強することができる、これは、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、キーホールリンペット・ヘモシアミン、ジニトロフェノール、並びにBCGカルメット・フェリン桿菌)及びコリネバクテリウム・バルブムのような潜在的に有用なヒトアジュバントなどの活性物質を含む。

【0128】

ポリクローナル抗体は、標的タンパク質、又はそれらの抗原性機能性誘導体などの抗原により免疫化された動物の血清に由来した抗体分子の不均一集団である。ポリクローナル抗体の産生のために、前述のものなどの宿主動物を、同じく前述のアジュバントを補充された、差次的に発現された又はパスウェイタンパク質の注射により、免疫化することができる。

10

20

30

40

50

【0129】

モノクローナル抗体は、特定の抗原に対する抗体の均質な集団であるが、これは、培養物中の連続細胞株による抗体分子の産生を提供する任意の技法により得ることができる。これらは、Kohler及びMilsteinのハイブリドーマ技法(1975, Nature 256: 495-497; 及び米国特許第4,376,110号)、ヒト細胞ハイブリドーマ技法(Kosborらの文献、1983, Immunology Today 4: 72; Coleらの文献、1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030)、並びにEBV-ハイブリドーマ技法(Coleらの文献、1985, 「モノクローナル抗体及び癌療法(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)」、Alan R. Liss社、77-96頁)を含むが、これらに限定されるものではない。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及びそれらの任意のサブクラスを含む、任意の免疫グロブリンクラスのものであることができる。本発明のmAbを産生するハイブリドーマは、インビトロ又はインビボにおいて培養することができる。インビボにおける高力価のmAbの産生は、現時点で好ましい産生方法となっている。

10

【0130】

加えて、適切な生物活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と一緒にした適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子のスプライシングによる、「キメラ抗体」の作製のために開発された技法(Morrisonらの文献、1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-6855; Neubergerらの文献、1984, Nature 312: 604-608; Takedaらの文献、1985, Nature 314: 452-454)を、使用することができる。キメラ抗体は、マウスmAbに由来する可変領域とヒト免疫グロブリン定常領域を有するもののように、その中の異なる部分が、異なる動物種に由来する分子である。

20

【0131】

あるいは、単鎖抗体の作製を説明する技法(米国特許第4,946,778号; Birdの文献、1988, Science 242: 423-426; Hustonらの文献、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; 及び、Wardらの文献、1989, Nature 334: 544-546)は、差次的に発現された又はパスウェイタンパク質-単鎖抗体を作製するように、改変され得る。単鎖抗体は、Fv領域の重鎖及び軽鎖断片をアミノ酸橋を介して連結し、単鎖ポリペプチドを生じることにより、形成される。

【0132】

特異的エピトープを認識する抗体断片は、公知の技術により作出することができる。例えば、このような断片は、抗体分子のペプシン消化により作製され得るF(ab')₂断片、及びF(ab')₂断片のジスルフィド橋の還元により作出され得るFab断片を含むが、これらに限定されるものではない。代わりに、所望の特異性を持つモノクローナルFab断片の迅速且つ容易な同定を可能にするために、Fab発現ライブラリーを構築することができる(Huseらの文献、1989, Science 246: 1275-1281)。

30

【0133】

本明細書記載の方法の一部の実施態様において、試料は、分析のための固体支持体上に固定されることができる。バイオマーカパネル内の個別のマーカに特異的な抗体などの結合要素などが、平面又は微粒子ビーズなどの固体支持体上に固定され、並びに、パネル内のマーカが、固定された抗体などの、固定された結合要素により捕獲される、抗体サンドイッチ技法を利用することができる。その後捕獲されたマーカは、シグナル発生物質(酵素、蛍光タグ、放射標識など)により直接標識され得る二次抗体などの第二の結合要素を使用し、検出されるか、又は更なる増幅(酵素、発蛍光団、放射標識など)により標識された二次抗体、ストレプトアビジン/ビオチン系)を使用し、検出することができる。他の方法は、試料の一次元又は二次元(2D)ゲル電気泳動を含むが、これらに限定されるものではない。このような方法には、ウェスタンブロットなどの技術を使用する固体表面への移行、並びにそれに続くADバイオマーカに特異的な抗体を使用する検出が続く。

40

【0134】

他の実施態様において、バイオマーカへの自己抗体を、健常対象、ADの患者又は代表からの試料を使用する、先に説明したウェスタンブロット法を用い、次に健常対象中では

50

なく試料中に存在するマーカーに特異的な自己-抗体の存在を検出することにより、検出することができる。

【0135】

非-抗体結合要素の例は、アプタマーである。アプタマーの例は、核酸アプタマー及びペプチドアプタマーを含む。

【0136】

あるいは、これらのマーカーは、とりわけ、2Dゲル電気泳動の銀染色、又はLS/MS/MS、MALDI-TOF、SELDI-TOF及びTMT-SRMを含む質量分析技術により検出することができる。それにより発現の差を可視化することができるその他のこのような標準特徴決定技法は、当業者に周知である。これらは、分画の連続するクロマトグラフィー分離及びピーク比較、

10

【0137】

キャピラリー電気泳動、マイクロチップを含むマイクロチャンネルネットワークを使用する分離、SELDI分析及びqPST分析を含む。

【0138】

クロマトグラフィーによる分離は、文献に記載されるように高速液体クロマトグラフィーによって実施でき、クロマトグラムは、分離の時間に対する280nmの光の吸光度のプロットの形態で得られる。次いで、不完全に分解されたピークを生じる物質を、再度クロマトグラフィーに付すなどする。

20

【0139】

キャピラリー電気泳動は、例えば、BeckmanによりそのP/ACE 5000システムと共に提供される文献「Total CE Solutions」などの、多くの文献に説明された技術である。この技術は、小さいキャピラリーチューブ内に含有される試料中に電氣的ポテンシャルを印加することに依存する。このチューブは、帯電した表面、例えば、負に帯電したケイ酸塩ガラスを有する。反対に帯電したイオン(この場合には、正のイオン)は、表面に引きつけられ、次いで、表面と同じ極性の適当な電極(この場合には、陽極)へと移動する。この試料の電気浸透流(EOF)において、正イオンは、最も早く移動し、それに非帯電物質及び負帯電したイオンが続く。従って、タンパク質は、それらの荷電に従って本質的に分離される。

30

【0140】

マイクロチャンネルネットワークはキャピラリーと同様に機能し、ポリマー物質のフォトアブレーションにより形成することができる。この技術において、UVレーザーが、例えばポリエチレンテレフタレート又はポリカーボネートなどの適当なUV吸収特性を有するポリマー上に急激に照射される高エネルギー光パルスを生成するのに使用される。入射光子は、閉じ込められた空間で化学結合を切断し、内圧の上昇、小さな爆発及びアブレートされた物質の排出をもたらし、後にマイクロチャンネルを形成する空隙を残す。マイクロチャンネル物質は、キャピラリー電気泳動同様に、EOFに基づく分離を達成する。マイクロチャンネル物質は、マイクロチップの形態に適応でき、各チップはそれ自体に試料インジェクター、分離カラム、及び電気化学検出器を有する：J.S. Rossierらの文献、1999、Electrophoresis 20: p. 727-731を参照されたい。

40

【0141】

また、ProteinChip技術と組み合わせた表面エンハンス型レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(SELDI-TOF-MS)は、マーカーをプロファイリングする迅速で高感度の手段を提供し、2次元ゲル電気泳動と相補的な方式の代替法として、使用することができる。ProteinChipシステムは、タンパク質試料がチップの表面化学(例えば、アニオン性、カチオン性、疎水性、親水性など)に選択的に結合することができるアルミニウムのチップからなる。結合したマーカーは、続いてモル過剰なエネルギー吸収性小分子とともに共結晶化される。続いてチップは、N2 320 nm UVレーザーの短強度パルスにより分析され、飛行時間型質量分析によりタンパク質が分離され、検出される。ある実験内の各群のスペクトルプロファイルを比較し、関心の対象となる任意のピークは、マーカーの同一性を確立するために、以下に記載される技術を用いて更に分析することができる。

50

Scientific社、Rockford、USA)技術を、本明細書記載のバイオマーカーパネルのタンパク質などの、マーカーを検出するために使用することができる。簡潔に説明すると、比較する試料中のタンパク質は、任意に消化され、安定同位体タグで標識され、質量分析で定量される。この方法において、異なる試料中の等価なタンパク質の発現は、タンデム質量分析実験における断片化の間のそれぞれの同位体ピークの強度、又はTMT(登録商標)試薬から放出されるレポーターイオンの強度を比較することにより、直接的に比較することができる。

【0142】

本明細書記載のバイオマーカーパネルのマーカーの検出には、試料からの最も豊富なタンパク質を除去する枯渇工程が先行することができる。血清/血漿のタンパク質組成物の大半は、ただ数種のタンパク質からなる。例えば、濃度35~50mg/mlで存在するアルブミンは、総タンパク質含量のおよそ54%を表し、IgGは他に16%を上乗せする。対照的に、疾患に反応して変化する、例えば組織漏出の結果として変化するタンパク質は、10ng/mlで循環することができる。この非常に動的な範囲のタンパク質濃度は、重大な分析における課題を表し、且つこの問題点を克服するために、複数のアフィニティ枯渇カラムを使用し、最も高度に豊富なタンパク質(例えば、5、6、7、8、9又は10種の最も高度に豊富なタンパク質)を除去する。より多くの出発物質を使用することができ、且つ高度に豊富な分子からの干渉がより少ないので、これは、より少ない存在量範囲の変化の検出を可能にする。このような枯渇戦略は、任意の検出法の前に、適用することができる。

【0143】

本方法は、神経認知障害の治療に関して有効な療法を決定することを更に含むことができる。例えば、バイオマーカーパネル内のマーカーの量又は濃度は、特定の療法又は治療に反応する又は反応しない対象の指標であることができる。

【0144】

本発明の一実施態様において、本バイオマーカーパネルは、神経認知障害の対象の組織試料又は体液試料中のバイオマーカーパネル内の個別のマーカーの量又は濃度を使用し、神経認知障害を軽減するために最も適切且つ有効な療法を予測する方法において、有用であることができる。別の実施態様において、このような方法は、神経認知障害を治療するための薬剤の使用を更に含むことができ、ここでこの薬剤は、神経認知障害の発症又は進行を防止するために、神経認知障害におけるバイオマーカーパネルのマーカーレベルの疾患-関連した変化を、正常状態において認められる方向に、減少、遅延又は停止する。好ましくは、このマーカーの発現は、正常状態の発現に回復される。本明細書記載のバイオマーカーパネルのマーカーの発現のモニタリングは、治療の進行及び/又は効能の指標であることができる。

【0145】

バイオマーカーパネルはまた、ADなどの神経認知障害の治療におけるその有用性を決定するための、薬剤のスクリーニング方法において使用することもでき、この方法は：

(a)神経認知障害又はそれらの症状を有する対象から得られた又はこれを代表する組織試料又は体液試料を提供することであって、ここで対象及び/又は試料は、スクリーニングされる薬剤により治療されていること；

(b)治療された対象及び/又は試料由来の若しくはこれを代表する試料中の、本明細書に規定したバイオマーカーパネルのマーカーの、量又は濃度を決定すること；並びに

(c)前記薬剤が、治療された対象及び/又は試料中のバイオマーカーパネルのマーカーの量又は濃度へ影響を及ぼすかどうかを決定すること；を含む。

【0146】

好ましくは、このバイオマーカーパネルは、トランスサイレチン(TTR)、クラスタリン、シスタチンC(CST3)、 α -1-酸性糖タンパク質(A1AcidG)、細胞間接着分子1(ICAM1)、補体C4(CC4)、色素上皮由来因子(PEDF)及び α 1抗トリプシン(A1AT)のマーカーから本質的になり、任意にRANTES(発現分泌された活性化正常T細胞の調節物質)、アポリポタンパクC-III(ApoC3)、活性抑制因子タイプ1(PAI-1)、C-反応性タンパク質(CRP)、カテプシンD(CTSD

)、アポリポタンパクE(ApoE)、 α -2-マクログロブリン(A2M)、血清アミロイドP成分(SAP)、終末糖化産物特異的受容体(sRAGE)、神経特異的エノラーゼ(NSE)、補体因子H(CFH)、アミロイド(A β)前駆体タンパク質(AB40又はA β 40)、セルロプラスミン、神経細胞接着分子(NCAM)、ApoA1、A β 42、BDNF、 α -2-ミクログロブリン(B2M)、及びVCAM-1の群から選択される1種以上のマーカーを更に含む。

【0147】

より好ましくは、このパネルは、ApoE ϵ 4対立遺伝子の存在(ApoE遺伝子型)を更に含む。

【0148】

本明細書記載のバイオマーカーパネルを使用し、薬剤の、ADなどの神経認知障害又はそれらの1以上の症状を予防又は改善する能力を試験することができる。

10

【0149】

このような薬剤は、臨床試験においてヒト対象で試験することができる。本明細書記載のバイオマーカーパネル内のタンパク質の発現を健常個体において認められるレベルにまで回復する任意の薬剤は、ADなどの神経認知障害の治療、すなわちAD症状の軽減又はADの進行の遅延における使用の可能性がある。

【0150】

臨床試験時に、例えば、本明細書記載のバイオマーカーパネルのマーカーの量又は濃度は、試験される薬剤の存在又は非存在で決定することができる。この薬剤の効能は引き続き、得られた発現データを、正常状態での対応する公知の発現パターンに対し比較することができる。効能を示す薬剤は、バイオマーカーパネル内のマーカーの量又は濃度を、正常状態のそれにより密に類似するように変更するもの、又はバイオマーカーパネルの発現を安定化する、すなわち、疾患の進行を防止するものである。

20

【0151】

神経認知障害におけるバイオマーカーパネル内のマーカーの正常状態におけるそれらの発現と比べた検出もまた、臨床試験時に、ADなどの神経認知障害の治療に関する可能性のある薬剤の効能をモニタリングするために使用することができる。臨床試験時に、例えば、バイオマーカーパネル内のマーカーのレベル及び/又は活性は、試験される薬剤の存在又は非存在下で、関連する細胞及び/又は組織及び/又は体液において決定することができる。この薬剤の効能は、引き続き、得られたマーカーのレベル及び/又は活性のデータを、正常状態における細胞及び/又は組織及び/又は体液に関する対応する既知のレベル/活性と比較することができる。効能を示す薬剤は、対象からの細胞及び/又は組織試料及び/又は体液のバイオマーカーパネルの量又は濃度を、正常状態のそれにより密に類似するように変更するもの、又はパターンを安定化する、すなわち、疾患の進行を防止するものである。

30

【0152】

介入に関して、本明細書記載のバイオマーカーパネル内のマーカーの発現を、健常レベルに回復する又は部分的に回復する任意の治療は、ADなどの神経認知障害の治療的介入の候補とみなされるべきである。試験薬剤の用量は、用量-反応曲線を誘導することにより決定することができる。

40

【0153】

同様に、ADなどの神経認知障害の発症を防止するか又はより進行したADのレベルへの進行を防止することができる任意の治療は、ADの治療的介入の候補とみなされるべきである。

【0154】

加えて、ADなどの神経認知障害の、及び本明細書に記載されたものの動物モデルは、AD症状を治療することが可能である薬剤の同定に使用することができる。このような動物モデルは、このような障害の治療において有効であり得る薬物、医薬品、療法及び介入の同定において使用することができる。曝露に対する動物の反応は、マーカーの発現を評価し、且つこれを野生型マウスのそれと比較することにより、モニタリングすることができる。

50

。

【0155】

本明細書記載のバイオマーカーパネルのマーカーの量又は濃度は、神経認知障害の症状を改善するか、又は神経認知障害の進行を防止する薬剤の能力を評価するために、動物モデルシステムと一緒に利用することができる。例えば、本明細書記載のバイオマーカーパネルのマーカーの量又は濃度は、フィンガープリントプロファイルの一部を形成することができ、これはその後そのような評価において使用することができる。フィンガープリントプロファイルは、動物モデルシステム内の疾患状態について特徴づけることができる。引き続き、これらの既知のフィンガープリントプロファイルは、試験薬剤が、このようなフィンガープリントプロファイルを修飾し、且つこのプロファイルをより望ましいフィンガープリントにより密に類似させる作用を有することを確認するために、比較することができる。例えば、薬剤の投与は、ADモデルシステムのフィンガープリントプロファイルを、対照システムにより密に類似させることができるか、あるいはフィンガープリントプロファイルの更なる変化を防止することができる。あるいは、薬剤の投与は、対照システムのフィンガープリントプロファイルが、AD状態を模倣し始めることを引き起こし、これは例えば、関心対象の薬剤の更なる特徴決定において使用することができるか、又は追加の動物モデルの作製において使用することができる。

10

【0156】

本薬剤で治療されない対象と比較した、本薬剤で治療される対象における、本明細書記載のバイオマーカーパネルのマーカーの量又は濃度は、本薬剤が、神経認知障害の治療において有用であり得ることの指標である。

20

【0157】

神経認知障害の症状を有する対象及び正常対象における経時的なバイオマーカーパネル内のマーカーの濃度又は量の相違(divergence)を、決定することができる。

【0158】

本明細書記載のスクリーニング方法は、前記工程(a)の前に、健常な個体、重症度又は進行が異なる神経認知障害又はそれらの症状を有する患者、及びこの薬剤により治療されていない神経認知障害又はそれらの症状を有する患者に由来する1種以上の対照試料中のバイオマーカーパネルのマーカーの濃度又は量を決定する工程を更に含むことができる。

30

【0159】

薬剤の選択又は拒絶の工程は、対照に比べ神経認知障害の症状を有する治療された対象におけるバイオマーカーパネルのマーカーの濃度又は量が変化する程度に従う。好適な対照は、神経認知障害を伴わない年齢が類似した人々を含む。

【0160】

薬剤が、対照に比べバイオマーカーパネルのマーカーの濃度又は量の経時的变化を防止又は遅延する場合に、この薬剤が選択されることができる。

【0161】

好ましくは、薬剤が、バイオマーカーパネルのマーカーの量又は濃度をある正常対象のその方向へと変更する場合に、この薬剤が選択される。より好ましくは、薬剤が、バイオマーカーパネルのマーカーの量又は濃度をその正常対象のそれへと変更する場合に、この薬剤が選択される。

40

【0162】

経時的に採取された試料は、数週間、数ヶ月又は数年の間隔で採取されることができる。例えば、試料は、毎月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、6ヶ月、8ヶ月又は12ヶ月の間隔で採取されることができる。

【0163】

経時的な濃度又は量の変化は、その対象由来の試料中の濃度又は量の最初のレベルと比較した、及び/又は正常対象由来の試料中の濃度又は量のレベルと比較した、濃度又は量の増加又は減少であることができる。薬剤が、経時的な濃度又は量の変化を遅延又は停止する場合に、これは、選択されることができる。

50

【0164】

前述のスクリーニング法において、対象は：

- (a) 正常対象及びADなどの神経認知障害の症状を有する対象；並びに/又は
- (b) この薬剤で治療されていない神経認知障害の症状を有する対象及びこの薬剤で治療されている神経認知障害の症状を伴う対象；を含む。

【0165】

別の実施態様において、対象は：

- (a) 本薬剤で治療した及び治療していない正常対象；並びに、
 - (b) 本薬剤で治療した及び治療していない軽度認知障害(MCI)を有する対象；及び
 - (c) 本薬剤で治療した及び治療していないADなどの神経認知障害の症状を有する対象；
- の一方又は両方；を含むことができる。

10

【0166】

ADなどの神経認知障害の症状を有する対象は、神経認知障害を伴うヒト対象であることができる。

【0167】

前述のように、神経認知障害は、軽度認知障害(MCI)、認識されたADの前兆、及びADなどの認知症、並びに単独の及びアルツハイマー病を伴う混合型認知症としての、血管性認知症、レビー小体型認知症、及び前頭側頭認知症を含む他の晩期発症型認知症を含むことができる。

【0168】

アルツハイマー病は、軽度認知障害(MCI)などの前臨床期アルツハイマー病、並びに進行型ADを含む、任意の病期又は重症度のADであることができる。

20

【0169】

一実施態様において、ADなどの神経認知障害の症状を有する対象は、神経認知障害の非-ヒト動物モデルであることができる。好適なADの非-ヒト動物モデルは、当該技術分野において周知であり、且つ変異体アミロイド前駆体タンパク質(APP)トランスジェニックマウス、プレセニン-1(PS-1)トランスジェニックマウス、二重遺伝子導入APP/PS-1トランスジェニックマウス、及びグリコーゲン合成酵素キナーゼ(GSK)を過剰発現しているマウスである(Lucasらの文献、(2001) EMBO J. 20, p27-39参照)。この実施態様において、正常対象は、野生型マウスである。

30

【0170】

本明細書記載のスクリーニング法において使用することができる組織又は体液の試料は、例えば、脳組織、血液、血漿、血清、唾液又は脳脊髄液の試料である。

【0171】

本発明内には、本明細書記載のスクリーニング法を使用する薬物の同定、本薬剤の製造、単離又は入手、並びに薬剤の医薬組成物を提供するための許容し得る担体との製剤化の更なる工程を含む、医薬組成物の製造方法も包含している。

【0172】

AD症状は、少なくとも一部は、標的タンパク質の異常なレベルによるか、又は異常な活性を示す標的タンパク質の存在により、もたらされ得ることは、可能である。従って、このような標的タンパク質のレベル及び/又は活性の減少は、AD症状の改善をもたらすであろう。標的タンパク質遺伝子発現レベル又は標的タンパク質活性レベルの減少に関する技術は、本明細書において考察されている。

40

【0173】

あるいは、ADなどの神経認知障害の症状は、少なくとも一部は、標的タンパク質発現のレベルの不在若しくは減少、又は標的タンパク質の活性レベルの減少によりもたらされ得ることは、可能である。従って、標的タンパク質遺伝子発現及び/又はこのようなタンパク質の活性レベルの増加は、AD症状の改善をもたらすであろう。

【0174】

標的タンパク質遺伝子発現レベル又は標的タンパク質活性レベルの増加又は減少の作用

50

は、本明細書に記載するバイオマーカーのパネルを使用し、決定又はモニタリングすることができる。

【0175】

様々な技法を利用し、このような標的遺伝子及び/又はタンパク質の発現、合成、又は活性を阻害することができる。

【0176】

例えば、阻害活性を示す薬剤は、軽度認知障害又はADの症状を予防するために、本発明に従い使用することができる。このような分子は、ペプチド(例えば、標的タンパク質膜貫通受容体の可溶性細胞外部分を表すペプチドなど)、ホスホペプチド、小型の有機分子若しくは無機分子、又は抗体(例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、抗イディオタイプ抗体、キメラ抗体又は単鎖抗体、並びにFab、F(ab')₂及びFab発現ライブラリー断片、並びにそれらのエピトープ-結合断片を含む)を含み得るが、これらに限定されるものではない。

【0177】

標的タンパク質に特異的であり且つその活性と干渉するの両方である抗体を使用し、標的タンパク質機能を阻害することができる。望ましい場合、このような変異体標的産物の活性と干渉する、変異体標的タンパク質に特異的な抗体も使用することができる。

【0178】

標的遺伝子タンパク質が細胞内にあり、且つ全抗体が使用される場合、インターナライジング抗体が好ましいことがある。しかし、リポフェクチン又はリボソームを使用し、標的タンパク質エピトープに結合する抗体又はFab領域の断片を細胞へ送達することができる。抗体の断片が使用される場合、標的タンパク質の結合ドメインに結合する最小の阻害断片が、好ましい。例えば、標的タンパク質に結合する抗体の可変領域のドメインに対応するアミノ酸配列を有するペプチドを、使用することができる。このようなペプチドは、化学合成されるか、又は当該技術分野において周知の方法を使用する組換えDNA技術により作製されることができる(例えば、Creightonの文献、1983、前掲；及び、Sambrookらの文献、1989、前掲を参照されたい)。

【0179】

あるいは、細胞内標的タンパク質エピトープに結合する単鎖中和抗体も、投与されることができる。このような単鎖抗体は、例えば、Marascoらの文献に記載された技術などの技術を利用し、例えば、標的細胞集団(populating)内の単鎖抗体をコードしているヌクレオチド配列を発現することにより、投与することができる(Marasco, W.らの文献、1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893)。

【0180】

標的タンパク質が、細胞外であるか、又は膜貫通タンパク質である場合において、ペプチド投与に適している本明細書記載の任意の投与技術を、阻害標的タンパク質抗体を、それらの作用部位に効果的に投与するために利用することができる。

【0181】

更に、標的タンパク質遺伝子の発現を阻害するアンチセンス、siRNA及びリボザイム分子もまた、異常な標的タンパク質遺伝子活性を阻害するために、本発明に従い使用することができる；三重らせん分子は、異常な標的タンパク質遺伝子活性の阻害において利用することができる。アンチセンス、リボザイム及び三重らせん分子は、野生型の、又は適切ならば変異体のいずれかの標的タンパク質遺伝子活性を減少又は阻害するように、設計することができる。このような分子の作製及び使用に関する技術は、当業者に周知である。

【0182】

アンチセンスRNA及びDNA分子は、標的化されたmRNAへのハイブリダイズ及びタンパク質翻訳の防止により、mRNAの翻訳を直接ブロックするように作用する。アンチセンスDNAに関して、翻訳開始部位由来のオリゴデオキシ-リボヌクレオチド、例えば関心対象の標的遺伝子ヌクレオチド配列の-10~+10領域が、好ましい。

【0183】

10

20

30

40

50

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒することが可能である、酵素的RNA分子である。(総説については、Rossi, J.の文献、1994, Current Biology 4: 469-471を参照されたい)。リボザイムの作用機序は、リボザイム分子の相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリダイゼーション、それに続くエンドヌクレアーゼ的切断に関与している。リボザイム分子の組成物は、標的タンパク質mRNAに相補的な配列を1以上含まなければならず、且つmRNA切断に寄与する周知の触媒的配列を含まなければならない。この配列に関しては、米国特許第5,093,246号を参照されたい。従って本発明の範囲内で、標的タンパク質をコードしているRNA配列のエンドヌクレアーゼ的切断を特異的且つ効果的に触媒する、ハンマーヘッドモチーフリボザイム分子が、操作される。

【0184】

いずれか可能性のあるRNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、配列GUA、GUU及びGUCを含む、リボザイム切断部位に関して関心対象の分子を走査することにより、最初に同定される。一旦同定されると、標的タンパク質遺伝子の領域に対応し、切断部位を含む、15~20リボヌクレオチドの短いTNA配列が、そのオリゴヌクレオチド配列を不適切なものとすることがある二次構造などの予想される構造特徴について、評価され得る。候補配列の好適性はまた、リボヌクレアーゼ保護アッセイを使用し、それらの相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイズのし易さを試験することにより、評価され得る。

【0185】

RNA干渉(RNAi)は、サイレンシングされる遺伝子に対し配列が相同である二本鎖RNA(dsRNA)により開始される、動物及び植物における配列-特異的、転写後遺伝子サイレンシングのプロセスである。RNAiは、短い二本鎖RNA分子により媒介される(低分子干渉RNA又はsiRNA)。siRNAは、10-15bpの短いRNAオリゴヌクレオチドとして、又は引き続き切断されsiRNAを生じる比較的長いdsRNAとして、細胞へ導入され得る。RNAは、RNAとして細胞へ導入されるか、又はDNA若しくはRNAベクターから転写され得る。

【0186】

siRNA分子は、当該技術分野において公知の標準の固相又は液相合成技術を用いて、合成することができる。あるいは、siRNA分子又は比較的長いdsRNA分子は、好ましくは以下に説明されるようなベクター内に含まれる核酸配列の転写により、組換えにより作製することができる。

【0187】

別の代替は、細胞における短いヘアピンRNA分子(shRNA)の発現である。shRNAは、合成siRNAよりもより安定している。shRNAは、小さいループ配列により分離される短い逆方向反復配列からなる。1つの逆方向反復配列は、遺伝子標的に対して相補性である。次にshRNAは、siRNAへとプロセッシングされ、これは標的遺伝子mRNAを分解し、且つ発現を抑制する。shRNAは、ヒトH1又は7SKプロモーターなどの、RNAポリメラーゼIIIプロモーターの制御下で、shRNA配列をコードしているDNA構築体で、細胞をトランスフェクションすることにより、細胞内に作製される。あるいは、shRNAは、外因性に合成され、且つ細胞へ直接導入され得る。好ましくは、shRNA配列は、長さ40~100塩基であり、より好ましくは長さ40~70塩基である。ヘアピンのステムは、好ましくは長さ19~30塩基対である。このステムは、ヘアピン構造を安定化するために、G-U対形成を含むことができる。

【0188】

転写の阻害のための三重らせん形成に使用される核酸分子は、単一本鎖であり、デオキシヌクレオチドで構成されなければならない。これらのオリゴヌクレオチドの塩基組成は、フーグスティーン塩基対形成則を介し三重らせん形成を促進するようにデザインされなければならない。これは一般にプリン又はピリミジンのいずれかのかなり大きい配列部分が二重鎖の1本の鎖上に存在することを必要とする。ヌクレオチド配列は、ピリミジン-ベースであってよく、これは生じる三重らせんの3本の会合された鎖にわたってTAT及びCGC⁺トリプレットを生じるであろう。このピリミジン-リッチ分子は、その鎖に対し平行方向で二重鎖の1本鎖のプリン-リッチ領域に対し相補的な塩基を提供する。加えて核酸分子は、例えば、G残基の部分配列を含むプリン-リッチであるものを選択することができる。これ

10

20

30

40

50

らの分子は、プリン残基の大半は標的化された二重鎖の1本鎖上に配置されている、GC対が豊富なDNA二重鎖と、三重らせんを形成し、この三重鎖中の3本鎖にわたるGGCトリプレットを生じるであろう。

【0189】

あるいは、三重らせん形成のために標的化され得る可能性のある配列は、いわゆる「スイッチバック」核酸分子を作製することにより増加されることがある。スイッチバック分子は、交互の5'-3'、3'-5'様式により合成され、結果的にこれらは、二重鎖の第一の1本鎖と、次に他鎖と、塩基対形成し、二重鎖の1本鎖上に存在するプリン又はピリミジンのいずれかのかなり大きい配列部分の必要性を排除する。

【0190】

本発明のアンチセンスRNA及びDNA、siRNA、リボザイム及び三重らせんの分子は、DNA及びRNA分子の合成に関する当該技術分野において公知の任意の方法により調製することができる。これらは、例えば固相ホスホロアミダイト化学合成などの、当該技術分野において周知の、オリゴデオキシリボヌクレオチド及びオリゴリボヌクレオチドを化学合成する技術を含む。あるいは、RNA分子は、アンチセンスRNA分子をコードしているDNA配列のインピット及びインピボ転写により作製され得る。このようなDNA配列は、T7又はSP6ポリメラーゼプロモーターなどの好適なRNAポリメラーゼプロモーターを組み込んでいる多種多様なベクターへ組み込まれることができる。あるいは、使用されるプロモーターに応じて構成性に誘導性のアンチセンスRNAを合成するアンチセンスcDNA構築体が、細胞株へ安定して導入されることができ。

【0191】

ADなどの神経認知障害を引き起こす標的タンパク質は、障害状況において過小発現されることがある。あるいは、標的タンパク質の活性は、減弱されることがあり、このことは症状の発生につながる。それにより標的タンパク質のレベルが、AD症状が予防又は改善されるレベルにまで増加され得る方法が、本明細書に説明されている。標的タンパク質活性のレベルは、例えば、存在する標的タンパク質のレベルの増加、又は存在する活性のある標的タンパク質のレベルの増加のいずれかにより、増加され得る。

【0192】

例えば、標的タンパク質は、AD症状を改善するのに十分なレベルで、そのような症状を示す患者に投与することができる。当業者は、本明細書記載のものなどの技術を利用し、正常な標的タンパク質の有効な、無毒の投与量の濃度をどのように決定するかを、容易に知っているであろう。

【0193】

更に、患者は、遺伝子置換療法により治療されることができ。標的タンパク質遺伝子機能を持つ正常な標的タンパク質の生成を指示する正常な標的タンパク質遺伝子又は遺伝子の一部の1以上のコピーは、非限定的にアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、及びレトロウイルスベクターを含むベクター、加えてリボソームなどのDNAを細胞へ導入する他の粒子を使用し、細胞へ挿入することができる。加えて、先に説明されたものなどの技術は、ヒト細胞への正常な標的タンパク質遺伝子配列の導入のために利用することができる。

【0194】

正常な標的タンパク質遺伝子配列を含む細胞、好ましくは自家細胞は、次に、AD症状の予防又は改善を可能にする位置で、患者へ導入又は再導入され得る。このような細胞置換技術は、例えば、標的タンパク質が分泌された細胞外タンパク質である場合に、好ましいことがある。

【0195】

抗体又は核酸抑制因子を投与する作用は、本明細書記載のバイオマーカーのパネルを使用し、決定又はモニタリングすることができる。

【0196】

(医薬品調製及び投与方法)

10

20

30

40

50

標的タンパク質の発現、合成及び/又は活性に影響を及ぼす薬剤は、ADなどの神経認知障害を予防又は治療又は改善するために、治療有効量で、患者へ投与することができる。治療有効量とは、症状の改善を生じるのに十分な化合物の量、あるいはそのような症状の改善を生じるタンパク質の濃度を発現するのに十分な核酸分子の量をいう。

【0197】

それが核酸分子、抗体、小型分子化合物又は細胞であるかどうかにかかわらず、薬剤の作用は、本明細書記載のバイオマーカーのパネルを用いて決定又はモニタリングすることができる。

【0198】

そのような薬剤の毒性及び治療的効能は、例えば、ED₅₀(集団の50%において治療的に有効な投与量)の決定、及び何らかの副作用のED₅₀(毒性 - TD₅₀)の決定など、細胞培養物又は実験動物における標準の薬学手法により決定することができる。毒性作用と治療的作用の間の投与量の比は、治療係数であり、これは比TD₅₀/ED₅₀として表現することができる。大きい治療指数を示す薬剤が好ましいが、毒性副作用を示すものに関しては、罹患した組織部位へそのような薬剤を標的化する送達システムを設計するために、感染していない細胞の損傷の可能性を最小化し、これにより副作用を軽減するよう、注意が払われるべきである。

【0199】

動物試験から得られたデータは、ヒトにおける使用のための用量範囲の公式化において使用することができる。そのような薬剤の用量は、毒性がほとんど又は全くないED₅₀を含む循環濃度の範囲内に収まることが好ましい。この用量は、使用される剤形及び利用される投与経路に応じて、この範囲内を変動することができる。

【0200】

本発明に従い使用するための医薬組成物は、1種以上の生理的に許容し得る担体又は賦形剤を使用する、従来の方法において製剤化されることができる。

【0201】

従って、これらの薬剤は、吸入若しくは吹送(口又は鼻のいずれかを通じて)による投与、又は経口、口腔内、非経口及び直腸投与のために製剤化することができる。

【0202】

経口投与に関して、本医薬組成物は、結合要素(例えば、化メイズデンブun、ポリビニルピロリドン又はヒドロキシプロピルメチル-セルロース); 充填剤(例えば、乳糖、微晶質セルロース又はリン酸水素カルシウム); 滑沢剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク又はシリカ); 崩壊剤(例えば、ジャガイモデンブun又はデンブunグリコール酸ナトリウム); 又は、湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム)などの、医薬として許容し得る賦形剤と共に、従来手段により調製される形状、例えば、錠剤又はカプセル剤の形状をとることができる。錠剤は、当該技術分野において周知の方法により被覆されてよい。経口投与のための液体調製品は、例えば、液剤、シロップ剤又は懸濁剤の形状をとることができるか、あるいは使用前に水又は他の好適なビヒクルで構成される乾燥製品として提供されることができる。このような液体調製品は、懸濁化剤(例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体又は食用硬化油脂); 乳化剤(例えば、レシチン又はアカシアゴム); 並びに、保存剤(例えば、p-ヒドロキシ安息香酸メチル若しくはプロピル又はソルビン酸)などの医薬として許容し得る添加剤と共に、従来手段により調製することができる。これらの調製品はまた、適宜、緩衝塩、香味料、着色料及び甘味料を含むこともできる。

【0203】

経口投与のための調製品は、活性物質の制御放出を生じるために、好適に製剤化されることができる。口腔内投与のために、本組成物は、従来方法で製剤化された、錠剤又は舐剤の形状をとることができる。

【0204】

吸入による投与に関して、本発明に従い使用される薬剤は、好都合なことに、例えばジ

10

20

30

40

50

クロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロ-テトラフルオロエタン、二酸化炭素又は他の好適な気体など好適な噴射剤の使用により、加圧バック又はネブライザーから提供されるエアロゾルスプレーの形状で送達される。加圧されたエアロゾルの場合、用量単位は、測定された量を送達するためのバルブを提供することにより、決定することができる。吸入器又は吹送器において使用するための例えばゼラチンの、カプセル及びカートリッジは、本化合物及び乳糖若しくはデンプンなどの好適な散剤基剤の粉末混合物を含むように製剤化することができる。

【0205】

本薬剤は、例えばボラス注射又は連続注入によるなどの注射による非経口的投与のために製剤化されることができる。注射用製剤は、添加した保存剤と共に、例えばアンプル又は多投与量容器などの、単位剤形で提供することができる。本組成物は、油性又は水性ビヒクル中の懸濁剤、液剤又は乳剤などそのような形状をとることができ、且つ懸濁化剤、安定化剤及び/又は分散剤などの製剤化物質を含むことができる。あるいは、活性成分は、使用前に、好適なビヒクル、例えば滅菌パイロジェンフリー水により構成される粉末形状であることができる。

10

【0206】

本薬剤はまた、例えばカカオバター又は他のグリセリドなどの従来の子剤基剤を含む、子剤又は停留浣腸などの直腸組成物で製剤化することもできる。

【0207】

先に説明した製剤に加え、本薬剤は、デポー調製品としても製剤化することができる。このような長期間作用する製剤は、例えば、皮下若しくは筋肉内への植え込み、又は筋肉内注射により投与することができる。従って、例えば、本化合物は、好適な高分子材料又は疎水性材料(例えば、許容し得る油分中のエマルジョンとして)又はイオン交換樹脂と共に、あるいはやや溶けにくい誘導体、例えば、やや溶けにくい塩として、製剤化することができる。

20

【0208】

本組成物は、望ましいならば、活性成分を含有する1以上の単位剤形を含むことができる、バック又はディスペンサー装置中で、提示することができる。バックは、例えば、プリスターバックなどの、金属箔又はプラスチックフィルムを含むことができる。バック又はディスペンサー装置には、投与に関する説明書が添付されることができる。

30

【0209】

(バイオマーカーパネル検出のためのキット)

本発明はまた、組織試料又は体液試料中の本明細書記載のバイオマーカーパネルのマーカーの検出のための試薬を含むキットを提供している。本バイオマーカーパネルは、トランスサイレチン(TTR)、クラスタリン、シスタチンC(CST3)、 α -1-酸性糖タンパク質(A1AcidG)、細胞間接着分子1(ICAM1)、補体C4(CC4)、色素上皮由来因子(PEDF)及び α 1抗トリプシン(A1AT)のマーカー、並びに任意にRANTES(発現分泌された活性化正常T細胞の調節物質)、アポリポタンパクC-III(ApoC3)、プラスミノゲン活性抑制因子タイプ1(PAI-1)、C-反応性タンパク質(CRP)、カテプシンD(CTSD)、アポリポタンパクE(ApoE)、 α -2-マクログロブリン(A2M)、血清アミロイドP成分(SAP)、終末糖化産物特異的受容体(sRAGE)、神経特異的エノラーゼ(NSE)、補体因子H(CFH)、アミロイド(A4)前駆体タンパク質(AB40又はA40)、セルロプラスミン、神経細胞接着分子(NCAM)、ApoA1、A β 42、BDNF、 α -2-ミクログロブリン(B2M)、及びVCAM-1の群から選択される1以上のマーカーから本質的になる。

40

【0210】

好ましくは、本パネルは、ApoE ϵ 4対立遺伝子の存在(ApoE遺伝子型)を更に含む。

【0211】

一実施態様において、本キットは、バイオマーカーパネルのマーカーに特異的に結合する1種以上の結合要素を更に含む。

【0212】

一つの特定の実施態様において、1種以上の結合要素は、一次抗体であり、各抗体は、

50

バイオマーカーパネルの異なる個別のマーカーに特異的に結合する。好ましくは、キットは、この一次抗体に特異的に結合する1種以上の二次抗体を更に含むことができる。二次抗体は、任意に標識され、例えば、蛍光標識されるか又はタグ付けされ得る。

【0213】

この結合要素は、アプタマー、オリゴヌクレオチド又は化学化合物であることができる。

【0214】

あるいは、キットは、選択されたマーカー及び質量分析法において使用するための好適な等級のタンパク質分解酵素を表す1種以上のペプチドを含むことができる。これらのペプチドは、合成ペプチドであることができ、且つ炭素、窒素、酸素及び/又は水素の重同位体を1つ以上含むことができる。例えば抗体などの結合要素は、アッセイプレート、ビーズ、マイクロスフェア又は粒子上に固定されることができる。任意にビーズ、マイクロスフェア又は粒子は、染色、タグ付け又は標識されてよい。

10

【0215】

本キットは、バイオマーカーパネルのマーカーの対照試料を更に含むことができる。

【0216】

本キットは、タグ付けした二次抗体の存在を検出するための1種以上の検出試薬を更に含むことができる。

【0217】

本キットの試薬は、外部環境からその内容物を保護する好適な容器中に密封されることができる。このようなキットは、使用説明書を含むことができる。

20

【0218】

本明細書記載の方法は、例えば、本明細書記載のバイオマーカーパネル、並びに/又は例えば抗体などの結合要素のような、バイオマーカーパネルの個別のマーカーに特異的に結合する試薬を含む、予め包装された診断キットを利用することにより、実行することができ、これは好都合なことに、例えば臨床的状況において、AD症状を示す患者を診断するために使用することができる。

【0219】

本明細書において言及された全ての文書、刊行物及び配列データベースエントリーは、全ての目的のためにそれらの全体が引用により本明細書中に組み込まれている。

30

【0220】

本発明の特定の態様及び実施態様は、実施例により、先に記載した図面及び表を参照し、ここで例示される。

【実施例】

【0221】

(実施例)

アルツハイマー病(AD)は、全ての関連する認知症及び神経認知障害の代表例として本明細書において例示されている。

【0222】

可能な限り早期にADを検出することは、疾患を変更する薬剤の試用を可能にする上で不可欠であり、且つこの目的のためにバイオマーカーの同定及び複製にかなりの努力が払われている。

40

【0223】

このようなバイオマーカーは現在、脳脊髄液(CSF)中のタウタンパク及びアミロイド(A)の測定、磁気共鳴画像法(MRI)を使用する萎縮の測定、並びにポジトロン放出断層撮影(PET)を使用するAの病理学的量(pathological load)の測定を含む。これらのアプローチは全て、有望であるが、分子造影は、今のところ比較的少数の施設で利用可能な高価な手法であり、腰椎穿刺はやや侵襲的である。更に両方の場合、反復測定は問題が多い。

【0224】

他方で血液(血漿)は、反復採取に適しているよりアクセスしやすい生体液である。ゲル

50

ベースのアプローチ(2-DGE及びLC-MS/MS)による症例対照試験デザインを使用し、2種のタンパク質(補体因子H(CFH)及び α -2-マクログロブリン)が、ADの潜在的マーカーとして認められ¹、その後これら両方が、独立したグループにより再現された²⁻³。本試験において、3種の他のタンパク質の変化、すなわち血清アミロイドP(SAP)、補体C4(CC4)、及びセルロプラスミンの変化が認められ、これらは全て、ADの病因に関係づけられている⁴⁻⁶。しかし、症例対照試験は、ADに存在するとされる長い前駆症状の病期が存在する場合には、問題が多い。このような場合において、外見上正常な対照の大きい割合で、本疾患過程が既に宿っており、従って末梢のバイオマーカーの疾患的特徴を既に有することがある。この症例対照デザインの限界を克服するために、疾患重症度の代替(海馬萎縮及び臨床進行)に関連したタンパク質が探され、クラスタリンが、これら両方の代理測定に関連したマーカーとして同定された⁷。この「中間形質(endophenotype)」発見アプローチに基づき、トランスサイレチン(TTR)及びアポリポタンパクA1(ApoA1)は、より速く衰弱するAD対象に関連し、並びに増加した血漿アポリポタンパクE(ApoE)レベルは、脳内の増加したA β 蓄積量に関連していることがわかった⁸⁻⁹。

【0225】

これらの観察は、ADに関連したバイオマーカーとして作用し得るセットにつながった。しかし、このような知見は、理想的には2つ以上のコホートソースから得られた試料を使用し、並びに多重化を可能とするプラットフォームを使用する、大規模試験における再現を必要としている。

【0226】

従って最初に、本疾患に関連したバイオマーカーの多重パネルが同定されることを必要とし；二番目に、MRIにおける萎縮の疾患中間形質測定及び臨床的重症度の特定された先験的転帰の変数を伴う大規模多施設コホートにおける血液-ベースのバイオマーカーのセットの検証が、確立されることを必要とし；並びに、第三に、規定された時間内での軽度認知障害の認知症への進展を予測する上で、疾患関連バイオマーカーの多重パネルの正確度の決定が認められることを必要としている。

【0227】

更に、正常対照デザインと比較された疾患症例は、対照における潜在性疾患のために、限定されたものであるので、このような反復試験は、転帰、疾患の中間形質又は疾患進行の予測などの臨床的に意味のある転帰として、成されるべきである。

【0228】

(方法)

(対象及び臨床分類)

AD、MCI及び高齢非認知症の対照からの血漿試料を、下記の3つの独立した試験から選定した。AddNeuroMed(ANM)、欧州の多施設試験¹⁰；Kings Health Partners-Dementia Case Register(KHP-DCR)、英国のクリニック及び集団ベースの試験、並びにGenetics AD Association(GenADA)、カナダを拠点にした多施設症例対照長期試験。ADほぼ確実(probable AD)の診断は、精神障害の診断と統計マニュアル(DSM-IV)、及び国立精神、コミュニケーション障害及び脳卒中研究所-アルツハイマー病関連障害協会(NINCDS-ADRDA)の判定基準に従って行った。軽度認知障害(MCI)は、Petersen判定基準に従い規定した¹¹。標準化された臨床評価は、認知に関して、ミニメンタルステート検査(MMSE)及びアルツハイマー病評価尺度認知機能尺度(ADAS-Cog)(ANM及びKHP-DCR試験のみ)、並びに重症度の全般的レベルに関して、臨床認知症評価法(CDR)(ANM及びKHP-DCR試験のみ)を含んだ。研究所の審査委員会は、書面によるインフォームド・コンセント又は代理人の同意が得られるという条件で、試験手順及び対象を承認した。

【0229】

対象1153名からの血漿試料を、試験した - ADが476名、MCIが225名及び認知症でない高齢対照が452名(表2)。APOE遺伝子型は、標準法¹²を用い、静脈血から決定した。

【0230】

表2：対象の人口統計学的属性

10

20

30

40

50

【表 3】

	対照	MCI		AD	有意性
		MCI _{nc}	MCI _c		
N	452	173	52	476	
年齢(歳)	75.6	76.3	76.2	77.0	P=0.012#
	(±6.3, 53-93)	(±5.7, 65-90)	(±6.9, 56-89)	(±6.4, 58-96)	
性別(女性、%)	55.6%	50.1%	49.1%	49.4%	P=0.277
APOE 遺伝子型 (%, e4+)	28%	35%	55%	59%	P<0.001#
MMSE	29.0	26.9	26.3	20.8	P<0.001*
	(±1.2, 22-30)	(±2.9, 0-30)	(±2.1, 18-30)	(±5.4, 0-30)	
CDR (ボックス内合計)	0.18	1.82	2.41	4.04	P<0.001*
	(±0.4, 0-3)	(±0.9, 0-4.5)	(±0.9, 0.5-5)	(±3.2, 0-20)	

略語：AD、アルツハイマー病；APOE、アポリポタンパクE；CDR、臨床認知症評価法；GDS、グローバル劣化尺度；MCI_{nc}、軽度認知障害非進展者；MCI_c、軽度認知障害進展者；MMSE、ミニメンタルステート検査。平均(±S.D、範囲)、ANOVAを行い、有意である場合は、Tukeyの事後検定比較を行った。*は、3群全てにわたり有意であり、#は、ADに比較した対照において有意である。

【0231】

(認知能低下)

認知的変化の勾配により決定される認知能低下は、3回の個別のMMSE評価で最低を有したAD対象(n=342)のサブセットについて計算した。線形混合効果モデルを、Rの‘nlme’パッケージを用いて作製した。共変数は、ベースライン時の年齢、性別、アポリポタンパクE(APOE)、4対立遺伝子の存在(ApoE遺伝子型)を含み、並びに教育年数を、低下率に対するそれらの作用について調べた。ベースライン時の年齢及び教育年数は、低下率に対する有意な作用を有し(p-値<0.05)、結果的に最終モデルにおける固定効果として含んだ。次に各試料に関して最終モデルから得られた勾配係数を、認知能変化率として使用し、1年毎のMMSEスコアの変化として規定した。

【0232】

(磁気共鳴画像法(MRI))

高解像度矢状断面3D T1-強調MPRAGE容積(ボクセルサイズ1.1×1.1×1.2mm³)及びアキシナルプロトン密度/T2-強調ファストスピンエコー画像を、1.5TのMRIスキャナーにおいて、先に報告した¹³対象476名(CTLの179名、MCIの123名及びADの174名)について獲得した。MPRAGE容積を、スキャナー間の互換性を確実にするため¹⁴に、ADNI試験のために特別にデザインされたカスタムパルスシーケンスを用いて獲得した。脳及び頭蓋全体の被写域は、先に公開された品質管理基準^{13,15}に従い全てのMR画像に必要とされた。画像解析は、FreeSurfer画像解析パイプライン(バージョン5.1.0)を使用し実行し、先に説明された様な¹⁶⁻¹⁷、局所の皮質厚と皮質下の容積測定を行った。このセグメンテーションアプローチは、イメージング-プロテオミクス試験における分析や¹⁸、ADバイオマーカー発見¹⁹のために先に使用された。各対象からの全ての容積測定値は、対象の頭蓋内容積により正規化し、他方で皮質厚測定値をそれらの生の形で使用した¹⁹。海馬容積、嗅内皮質容積及び脳室容積の測定値を、アルツハイマー病の重要なMRI中間形質として選択した。MCI群に関して海馬萎縮の評価のために、MRIデータを、それらの容積測定中央値を基に、高萎縮及び低萎縮へと階層化した。

【0233】

(免疫学的検定 - Luminex測定)

10

20

30

40

50

マルチ-分析物プロファイル(xMAP)技術を使用し、候補タンパク質(表6)を、且つ7つのMilliplexパネルを使用するLuminex 200 (Austin, TX)装置で、定量した。より詳細には：

【0234】

(Milliplexアッセイ)

7つのMILLIPLEX(登録商標)MAPマルチプレックスパネル(96ウェルプレートフォーマット；Millipore EMD)を使用した：ヒト神経変性パネル1(7-プレックス)カタログ番号HNDG1-36K、パネル2(6-プレックス)カタログ番号HNDG2-36K、パネル3-(10-プレックス)HNDG3-36K、パネル4(5-プレックス)HNDG4-36K、ヒト腎毒性パネル2(3-プレックス)カタログ番号HKT X2-38K、ヒト神経障害Magパネル1(12-プレックス)及びパネル2(4-プレックス)。

【0235】

(免疫検定プロトコール)

Luminex xMAP技術(Austin, TX)は、固相アプローチを使用し、複数のタンパク質を分析する。簡単に述べると、xMAP技術は、蛍光色素が2つの異なる比で挿入されたマイクロスフェアを使用する、フローサイトメトリー-ベースのプラットフォームである。理論上は、96-ウェルプレートの1ウェル当たり最大100アッセイの理論的多重化能を持つ、最大100種の異なる色のビーズを、作成することができる。捕獲抗体は、ビーズへ共有結合され、且つ免疫学的検定は、標準サンドイッチ免疫検定フォーマットにおいて試行した。

【0236】

血漿試料は、最初に、各Milliplexアッセイに関するプロトコールにおいて推奨されたように希釈した。各アッセイウェルは、最初に100 μ L洗浄緩衝液(1 \times L-WB)ですすぎ、その後試料を装加した。アッセイ緩衝液25 μ Lを、25 μ L対照又は試料のいずれかに添加し、引き続き25 μ Lビーズを添加し、各ウェル中の総容積を75 μ Lとした。アッセイプレートを、室温で2時間、又は軌道振盪機上で攪拌しながら一晩インキュベーションした。プレート中のビーズを、100 μ L洗浄緩衝液により3回洗浄し、25 μ Lビオチン標識された検出抗体と共に1時間インキュベーションした。25 μ L蛍光標識したレポーター(ストレプトアビジン-PE)分子を、検出抗体に、更に30分間添加した。最後にアッセイプレートを、100 μ L洗浄緩衝液により、3回洗浄し、ビーズを100 μ Lシース液中に懸濁した。全ての血漿試料を、2つ組でアッセイし、且つプールした血漿(Mastermix)試料を、プレート毎の高及び低QCに加え、陽性対照として含んだ。

【0237】

(データ品質チェック及び前処理)

各ウェル中の蛍光を、Luminex 200 (Austin,Tx)装置を用いて測定し、且つ結果を、Xponent 3.1 (Luminex)ソフトウェアで分析した。蛍光強度中央値(MFI)をエクスポートし、個別の試料の特徴を、MFI読み値から平均、標準偏差(SD)及び変動係数(CV%)を計算することにより、確認した。全ての処理されたデータ点を次に、Sigma Plot (Systat、バージョン12)へインポートした。5-パラメータロジスティック曲線フィッティング法を使用し、未知の血漿試料及びマスター混合物の濃度を計算した。いずれかの2つ組についてCV > 15%を記録した任意の個別の試料は、除外し；両方の2つ組が範囲外である場合は、両方のデータ点を除外した。

【0238】

次に個々の分析は、本アッセイ(31プレート；1148血漿試料)におけるそれらの成績に従いランク付けを適用することにより、品質について評価し、且つ以下の4つの判定基準を基にしたスコア化システムを使用し規定した：

判定基準1 標準曲線ランク：1 = 良好な品質 - 標準曲線上の線形部分内及び品質チェック(QC)範囲内。2 = 中等度の品質、標準曲線上の線形部分を越えて広がる、QCよりも高い又は低いいずれかにクラスター化、並びに3 = 品質不良、全く線形部分上ではない、低いQCを下回るか又は最高QCよりも高い。

判定基準2 QC1及びQC2に関するアッセイ内CV(%)、CV < 30%が受け容れられた(各QC値に関するポイント)。

判定基準3 本発明者らの研究室でプールした試料(マスター混合物)に対するアッセイ

10

20

30

40

50

間CV(%)、CV < 30%が受け容れられた。

判定基準4 標準曲線から信頼できるように内挿することができない試料として規定された欠測データ。1) 定量可能な範囲外のMFI値、2) 作製されるMFI値を生じない、技術的失敗。

【0239】

(データ前処理)

統計解析前に、本発明者らは、数多くの品質チェック(QC)を使用し、各アッセイの成績を試験した。蛍光強度中央値(MFI)は、Xponent 3.1 (Luminex社)を用いて測定し、且つ5-パラメータロジスティックフィットを用い、タンパク質濃度を概算するために、Sigma plot(Systat Software;バージョン12)へエクスポートした。簡単に述べると、前記4つの判定基準(標準曲線線形性、アッセイ内変動係数、参照試料に対するアッセイ間CV、及び欠測データの割合)を基にQCチェックを通過した全ての分析物を、更なる分析に進めた。

10

【0240】

(統計解析)

単変量統計解析を、SPSS 20(IBM)において行った。全ての生MFI測定値を、対数変換し、正規分布を得た。年齢、性別、血漿貯蔵期間(日)及びセンターを含む共変数を調べた。本発明者らは、大部分のタンパク質は、共変数により有意に影響され、従って値は、一般化線形回帰モデル(GLM)を使用し調節されたことを認めた。偏相関(APOE遺伝子型について調節)分析を行い、構造的MRI脳撮像又は認知評価のいずれかとの何らかの関係を認めた。全ての群にわたる臨床スコアの離散的性質のために、相関関係は群内で個別に行った。タンパク質はまた、ANCOVA(APOE遺伝子型について調節した)により、疾患表現型及び疾患状態(AD対CTL)とのそれらの関係について、個別に分析した。多重線形回帰を使用し、海馬容積の予測に必要とされるタンパク質の組合せを試験した。

20

【0241】

(分類解析)

クラス予測と属性選択のために、WEKA(ワイカト大学)を利用した。別に言及しない限りは、単純ベイズのシンプルアルゴリズムを、デフォルト設定で使用した。データセットを、75%トレーニング(train)及び25%テストへと無作為に分けた。属性選択は、トレーニングデータに関する最良優先探索法により、Classifier Subset Evaluatorを用いて行った。属性選択は5回反復して行い、属性を、各反復において観察された回数によりランク付けした。3回以上認められたタンパク質は、予測変数として取り上げた(表3)。何らかのクラスの不均衡は、WEKAのSynthetic Minority Oversampling Technique(SMOTE)を適用することにより、克服した。

30

【0242】

表3: 特徴選択において観察されたタンパク質

【表4】

タンパク質	特長選択において認められる回数	タンパク質	特長選択において認められる回数
トランスサイレチン	5	カテプシンD	1
クラスタリン	4	ApoE	1
シスタチン C	4	SAP	0
A1AcidG	4	セルロプラスミン	0
ICAM1	4	NCAM	0
CC4	4	NSE	0
PEDF	4	VCAM1	0
A1AT	4	A2M	0
APOE 遺伝子型	3	B2M	0
RANTES	3	BDNF	0
ApoC3	3	CFH	0
PAI-1	2	ApoA1	0
CRP	2	Ab40	0

10

20

【0243】

タンパク質は、タンパク質がその特長選択において認められる回数に従い、ランク付けし；太線で強調したタンパク質は、MCI進展に関する予測因子として取り上げた。

【0244】

(カットオフポイント分析)

完全なデータセット(n=169、MCI-進展者(MCI_c)及びMCI-非進展者(MCI_{nc}))に関する変換されないタンパク質濃度を、上位及び下位四分位範囲及びパーセンタイル順位を使用し、異なるカットオフポイントで、2値化した。3種のカットオフ濃度の最小値は、タンパク質毎に試験した。ロジスティック回帰分析を、個別のカットオフ濃度について行い、且つ進展予測の正確度に基づいて選択した。

30

【0245】

(結果)

(試験参加者)

3つのコホートからの参加者の人口統計学的属性及び臨床的特徴を、表2に示している。AD群は、わずかではあるが有意に対照よりも高齢であった(AD:平均77歳、対照:75歳、p=0.012)。APOE 4対立遺伝子の出現頻度は、対照よりも、MCI群及びAD群においてより高かった。

【0246】

(血漿タンパク質及び疾患病理)

予備分析は、2つのタンパク質のみが、ADと対照の間で有意差が認められたことを示した(ApoE: F=6.5、p<0.001; CFH: F=6.1、p<0.001)。しかし、偏相関分析を使用し、且つAPOEについて調節した後、本発明者らは、疾患群における脳領域の海馬、嗅内皮質、脳室及び全脳の容積の1以上のMRI測定値を使用し、萎縮と有意に関連している多数の血漿タンパク質を同定した(表4; セクションa及びb)。複数の試験を照合し、クラスタリン(MCI群: p<0.001)及びApoE(AD群; p=0.0014)のみが、有意であり続けた。

40

【0247】

表4: (a)MCI群及び(b)AD群における構造的脳MRI測定に関連して有意として同定されたタンパク質

【表 5】

(a) MCI 脳領域	タンパク質	相関関係*	有意性 (両側)	df
脳室容積	クラスタリン	0.23	0.01	115
	RANTES	-0.19	0.03	116
平均海馬容積	クラスタリン	-0.38	0.00	115
	NSE	0.22	0.02	116
右嗅内厚	クラスタリン	-0.22	0.02	115
左嗅内厚	トランス サイレチン	-0.20	0.04	109
全脳容積	クラスタリン	-0.25	0.01	118
	NSE	0.21	0.02	119
	RANTES	0.19	0.04	119

10

20

(b) AD 脳領域	タンパク質	相関関係*	有意性 (両側)	df
脳室容積	A1AT	0.24	0.01	119
	NSE	0.16	0.03	169
平均海馬容積	BDNF	-0.21	0.02	123
	ApoC3	-0.18	0.02	168
	ApoA1	-0.15	0.04	169
	ApoE	-0.15	0.05	169
平均嗅内容積	ApoC3	-0.204	0.01	168
	ApoE	-0.177	0.02	169
平均嗅内厚	ApoC3	-0.217	0.00	168
	ApoA1	-0.209	0.01	169
	ApoE	-0.198	0.01	169
	トランス サイレチン	-0.154	0.05	158
全脳容積	ApoE	-0.19	0.02	145
	ApoA1	-0.19	0.02	145
	A β 40	0.17	0.04	141

10

20

30

40

50

MRI：磁気共鳴画像法；* ピアソン相関係数。

【0248】

その後本発明者らは、海馬萎縮の代理により代表されるようなMCIの疾患発症前群において疾患病理を予測するタンパク質のセットを同定することを計画した。重回帰分析を使用し、6種のタンパク質(クラスタリン、RANTES、NSE、TTR、VCAM-1及びSAP)を、MCI群において、海馬容積の19.5% ($p=0.006$)を予測することができるものとして、同定した。AD群の萎縮に関連したタンパク質の異なる組合せが、認められた。線形回帰分析を使用し、AD群の7種のタンパク質(APOA1、A1AT、ApoC3、BDNF、A β 40、PAI-1及びNSE)を、海馬容積の11.9% ($p=0.039$)を予測することができるものとして、同定した。

【0249】

驚くべきことに、MCI群において、より大きい萎縮とクラスタリンの関係、並びにRANTES、NSE及びTTRレベルの減少の傾向が、認められた。予想外のことに、AD群のA1AT、NSE、ApoC3、ApoA1、ApoE、BDNFの血漿レベルは、萎縮が大きくなるにつれて増大した。

【0250】

(血漿タンパク質臨床認知力及び認知能低下)

これらのタンパク質と、試料採取時の認知力及び認知力の変化率により測定される疾患

重症度間の関係を、試験した。試料採取時のMCI群において、ApoE及びCRPの両方は、MMSEと負の相関関係にあった(ApoE : $r = -0.150$ 、 $p = 0.001$; CRP : $r = -0.186$ 、 $p = 0.007$)。

【0251】

試料採取時のAD群において、ApoE、CFH、NCAM、AB40、A1AcidG及びクラスタリンは全て、MMSEと負に相関した(ApoE : $r = -0.150$ 、 $p = 0.001$; CFH : $r = -0.104$ 、 $p = 0.026$; NCAM : $r = -0.114$ 、 $p = 0.014$; AB40 : $r = -0.161$ 、 $p = 0.001$; A1AcidG : $r = -0.135$ 、 $p = 0.004$; クラスタリン : $r = -0.135$ 、 $p = 0.004$)。

【0252】

更に、これらのタンパク質と長期のプロスペクティブMMSEの関係は、AD群において変化した。3種の新規タンパク質NCAM、sRAGE及びICAMは、MMSE認知力勾配と有意に関連していた。NCAM及びsRAGEは両方とも、MMSEの変化により測定される認知力低下率と負に相関した(NCAM : $r = -0.129$ 、 $p = 0.0018$; sRAGE : $r = -0.125$ 、 $p = 0.029$)のに対し、ICAMは、正に相関した(ICAM : $r = 0.108$ 、 $p = 0.047$)。

10

【0253】

(MCIからADへの疾患進展を予測するタンパク質バイオマーカー)

ADの推定マーカーとして先に同定された数多くのタンパク質は、MCIの疾患のみではなく疾患発症前状態においても、MRIにより又は認識機能障害の重症度により測定されたかどうかにかかわらず、疾患病理と相関された。これらのタンパク質は、病理的負荷を反映していると考えられ、従ってMCIなどの疾患発症前状態から臨床的認知症への進展を予測するマーカーであると考えられる。これを確認するために、トレーニングデータセットに関する特長選択、及びその後の関連試験セットを伴う、機械学習法を使用した(単純ベイズシンプル)。合計220種の試料を分析した($N = 220$; $MCI_{nc} = 169$ 及び $MCI_c = 51$)。MCIのADへの進展の平均時間は、375日であった($SD = 23$ 日)。10種のタンパク質(TTR、クラスタリン、シスタチンC、A1AcidG、ICAM1、CC4、PEDF、A1AT、RANTES、ApoC3)に加えAPOE遺伝子型が、最大の予測力を持つことが認められた(表3)。受信者操作特性曲線の曲線下面積は、ROC AUCとも称され、これは本試験セットから、0.78(タンパク質のみ)及び0.84(タンパク質+APOE遺伝子型)であった(表5)。正確度を試験するために、3種の異なる感度のカットオフポイント30%、50%及び85%を調べた。最適正確度は、感度85%で認められ、本試験は、特異度88%で正確度87%を達成した(表5の太字)。

20

【0254】

表5：完全データセットに関するROC曲線の特徴

30

【表6】

分類モデル	感度カットオフ(%)	SN %	SP %	PPV %	NPV %	ACC %	ROC
タンパク質+APOE	30	30.8	92.9	57.1	81.3	87.2	0.84
タンパク質のみ	30	30.8	92.9	57.1	81.3	87.2	0.78
タンパク質+APOE	50	53.9	88.1	58.3	86.1	80.0	0.84
タンパク質のみ	50	43.8	84.6%	53.9	78.6	72.7	0.78
タンパク質+APOE	85	84.6	88.1	68.8	94.9	87.2	0.84
タンパク質のみ	85	84.6	71.4	47.8	93.8	74.5	0.78

40

タンパク質及びAPOE分類子に関する感度(SN)、特異度(SP)、正の予測値(PPV)、負の予測値(NPV)、正確度(ACC)及びROC

【0255】

次に、構造的MRIデータを、MCI進展データにおいて認められた10種のマーカーと組み合わせると、分類の正確度を改善するかどうかを調べた。対象のサブセットに関するMRI脳測定値を、タンパク質データと組合せ、単純ベイズのアルゴリズムを適用した。この少数

50

データセットにおいて、3種の異なる感度カットオフで試験した場合に、タンパク質単独でも非常に良好に働いた(カットオフ：正確度；30%：83.33%、50%：80.56%、85%：69.44%)。MRIデータのみ追加は、2つのカットオフポイントで正確度をわずかに改善した(カットオフ：精度30%：86%；50%：83%)。しかし、感度85%のカットオフで、正確度は64%まで低下した。各分類子のROC曲線、感度、特異度、正及び負の予測値は、表6に示している。

【0256】

表6：タンパク質プラスMRI撮像データによるサブセットのROC曲線の特徴

【表7】

分類モデル	感度カットオフ(%)	SN%	SP%	PPV%	NPV%	ACC%	ROC
タンパク質+APOE+MRI	30	33.3	96.7	66.7	87.9	86.1	0.75
タンパク質のみ	30	33.3	93.3	50.0	87.5	83.3	0.82
MRIのみ	30	33.3	80.0	25.0	85.7	72.2	0.54
タンパク質+APOE+MRI	50	50.0	90.0	50.0	90.0	83.3	0.75
タンパク質のみ	50	50.0	86.7	42.9	89.7	80.6	0.82
MRIのみ	50	50.0	63.3	21.3	86.4	61.1	0.54
タンパク質+APOE+MRI	85	83.3	60.0	29.4	94.7	63.9	0.75
タンパク質のみ	85	83.3	66.7	33.3	95.2	69.4	0.82
MRIのみ	85	83.3	13.3	16.1	80.0	25.0	0.54

タンパク質及びAPOE分類子に関する感度(SN)、特異度(SP)、正の予測値(PPV)、負の予測値(NPV)、正確度(ACC)及びROC

【0257】

(MCIからADへを予測するタンパク質に関する濃度カットオフポイント)

個々のタンパク質のカットオフ値を、MCI進展モデルにおける特長選択により同定された10種のマーカーについて誘導した。これらは、以下であった：ApoC3 105.5ug/ml、TTR 222ug/ml、A1AT 9.5ug/ml、PEDF 10.7ug/ml、CC4 78.5ug/ml、ICAM-1 99.72ng/ml、RANTES 33.8ng/ml、A1AcidG 768.3ug/ml、シスタチンC 3.21ug/ml、クラスタリン40 2ug/ml。ロジスティック回帰分析を使用し、10種のマーカーのカットオフ濃度及びAPOE遺伝子型を試験し、完全データセットを使用する場合、全般的モデルでは、正確度は94.9%であり、感度は73.6%であり、特異度は94.9%であった。

【0258】

(考察)

データ-駆動した汎-プロテオミクス(pan-proteomic)アプローチを使用する先行する研究は、数多くのタンパク質を、診断マーカー¹、進行マーカー^{7,20}及び病理マーカー¹⁸として同定している。ハイスループット多重プラットフォームの出現は、そのような知見の再現を促進し、且つ臨床実践及び臨床試験における使用のためのハイスループット多重化マーカーの可能性を増やしている²¹⁻²³。ここで本発明者らは、これらの推定バイオマーカーのいずれが、初期の疾患状態に関連し、且つ予後マーカーとしての価値を有し得るかどうかを決定した。MRIを疾患病理の代替として使用し、疾患過程の初期(MCI)における又は確立された認知症におけるのいずれかの萎縮に関連した数多くのマーカーを認めた。

【0259】

インビボ病理に関する代理としてMRIを使用するこのアプローチは、疾患の推定マーカーとしてクラスタリンを同定するなど、バイオマーカー発見において有用であることが先に示されている⁷。

【0260】

10

20

30

40

50

しかし本試験において、驚くべきことに、クラスタリンに加え、RANTES、NSE及びトランスサイレチンは、MCI群における皮質の萎縮に関連しており、クラスタリンは評価した全ての脳領域において最強の相関関係を示していることがわかった。

【0261】

ケモカインリガンド5(CCL5)としても知られているRANTESは、白血球を炎症部位へ動員する能動的な役割を有することがわかっているタンパク質である。予想外に負の関係が、RANTESと脳室容積の間で認められ、このことは増大した病理により減少したレベルを示唆し；これは、神経変性における先の報告²⁴⁻²⁶とは相反している。理論に結びつけられることを欲するものではないが、ADにおいてではなくMCIのみにおいて、タンパク質RANTESと萎縮との関係は、疾患過程における初期の減少、それに続く後の増加によると考えられる。同様の知見が、他のタンパク質について先に報告されている²⁷。

10

【0262】

この異型の挙動は、驚くべきことに、神経特異的エノラーゼ(NSE)タンパク質についての病理との関係においても認められた。このタンパク質は、急性神経損傷の良い指標であると考えられ²⁸⁻²⁹、全ての研究ではないが、一部の先行する研究においては、ADと関連付けられている^{30,31}。対照的に、NSEと海馬及び全脳の容積の間の予想外の正の関連が、MCI対象において認められた。しかしAD群においては、脳室容積との正の関連が、代わりに認められた。この疾患発症前の萎縮との逆相関及びその後の疾患における萎縮との正の相関関係は、RANTESのように、NSEは、疾患の初期段階(すなわちMCI)においては減少し、確立されたADにおいては反発して上昇することを示唆している。確立されたADにおいては、MRIにおける萎縮により測定される病理に関連したタンパク質の異なるセットが、認められる。これらの数多くは、アポリポタンパク群(ApoE、ApoC3及びApoA1)に属する。これらのタンパク質は全て、海馬容積、嗅内皮質容積及び全脳容積と負に相関することがわかっている。ApoEはADの主要な感受性遺伝子であるという発見³²⁻³³により、神経変性障害におけるアポリポタンパクの役割は広範に研究されている。末梢系では、ApoEは、トリグリセリド、リン脂質及びコレステロールの細胞への輸送に役立つ³⁴。先のApoEに関する文献は、ADにおけるより低いApoEを報告している³⁵⁻³⁶一部のグループとは矛盾しており、また別のグループは、増加したレベルを示している³⁷⁻³⁸。この試験に由来するApoE血漿測定値が最近公表され、これはAPOE遺伝子型の作用を示している北アメリカにおけるアルツハイマー病脳画像診断先導的研究(NA-ADNI)からの知見³⁹と一致している。

20

30

【0263】

従ってこれは、本疾患の神経画像測定値に付随して、血漿中のマーカーのパネルは、初期の疾患の重症度のバイオマーカーパネルとして同定されることを、初めて示している。更に、試験試料採取の1年(12ヶ月)以内に、MCIからADへと疾患が進展することを予め予測することができる10種のマーカーのセットが、本明細書において明らかにされている。最終的には全ての進展者は所定時間でADへ進行するので、臨床的ADへと進行するであろうMCI対象のサブセットを早期に同定することは重要であるので、この時間フレームは極めて重大である。これらの結果は、血漿タンパク質は特にMCIからの進展の可能性のある予測因子として同定されている炎症タンパク質による早期疾患検出において役割を有し得るといふ他の研究^{23,40}からの更なる証拠により、裏付けられている。CSF(血漿ではない)マーカーの成績が、MRIとの組合せにより改善された先の研究⁴¹とは対照的に、MRIとタンパク質測定値との組合せは、予測力を改善しなかった。

40

【0264】

まとめると、多重タンパク質アッセイと結びつけた3つの大規模多施設コホートは、疾患病理を反映し且つ疾患進行を予測する血漿バイオマーカーパネルの検証につながる。このようなバイオマーカーパネルは、臨床試験及び恐らくは臨床実践においても、CSFの分子マーカーとPET撮像などの、更により特異的であるがしかしより侵襲的で高価なアプローチに対し、初期の記憶障害の患者を選別する上でかなりの価値がある。

(参考文献)

【化 1】

1. Hye A, Lynham S, Thambisetty M, Causevic M, Campbell J, Byers HL, et al. Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain*. 2006 Nov;129(Pt 11):3042-50.
2. Cutler P, Akuffo EL, Bodnar WM, Briggs DM, Davis JB, Debouck CM, et al. Proteomic identification and early validation of complement 1 inhibitor and pigment epithelium-derived factor: Two novel biomarkers of Alzheimer's disease in human plasma. *Proteomics Clinical applications*. 2008 Apr;2(4):467-77. 10
3. Akuffo EL, Davis JB, Fox SM, Gloger IS, Hosford D, Kinsey EE, et al. The discovery and early validation of novel plasma biomarkers in mild-to-moderate Alzheimer's disease patients responding to treatment with rosiglitazone. *Biomarkers*. 2008;13(6):618-36.
4. Kimura M, Asada T, Uno M, Machida N, Kasuya K, Taniguchi Y, et al. Assessment of cerebrospinal fluid levels of serum amyloid P component in patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*. 1999 Oct 1;273(2):137-9. 20
5. Kessler H, Pajonk FG, Meisser P, Schneider-Axmann T, Hoffmann KH, Suppryan T, et al. Cerebrospinal fluid diagnostic markers correlate with lower plasma copper and ceruloplasmin in patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2006 Nov;113(11):1763-9.
6. Mulder SD, Hack CE, van der Flier WM, Scheltens P, Blankenstein MA, Veerhuis R. Evaluation of intrathecal serum amyloid P (SAP) and C-reactive protein (CRP) synthesis in Alzheimer's disease with the use of index values. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2010;22(4):1073-9. 30
7. Thambisetty M, Simmons A, Velayudhan L, Hye A, Campbell J, Zhang Y, et al. Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease. *Archives of general psychiatry*. 2010 Jul;67(7):739-48.
8. Velayudhan L, Killick R, Hye A, Kinsey A, Guntert A, Lynham S, et al. Plasma transthyretin as a candidate marker for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2012;28(2):369-75. 40
9. Thambisetty M, Tripaldi R, Riddoch-Contreras J, Hye A, An Y, Campbell J, et al. Proteome-based plasma markers of brain amyloid-beta

deposition in non-demented older individuals. *J Alzheimers Dis.* 2010;22(4):1099-109.

10. Lovestone S, Francis P, Kloszewska I, Mecocci P, Simmons A, Soininen H, et al. AddNeuroMed--the European collaboration for the discovery of novel biomarkers for Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2009 Oct;1180:36-46.

11. Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Tangalos EG, Kokmen E. Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome. *Archives of neurology.* 1999 Mar;56(3):303-8. 10

12. Wenham PR, Price WH, Blandell G. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet.* 1991 May 11;337(8750):1158-9.

13. Simmons A, Westman E, Muehlboeck S, Mecocci P, Vellas B, Tsolaki M, et al. MRI measures of Alzheimer's disease and the AddNeuroMed study. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2009 Oct;1180:47-55.

14. Jack CR, Jr., Bernstein MA, Fox NC, Thompson P, Alexander G, Harvey D, et al. The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI): MRI methods. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI.* 2008 Apr;27(4):685-91. 20

15. Simmons A, Westman E, Muehlboeck S, Mecocci P, Vellas B, Tsolaki M, et al. The AddNeuroMed framework for multi-centre MRI assessment of Alzheimer's disease: experience from the first 24 months. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2011 Jan;26(1):75-82. 30

16. Westman E, Simmons A, Muehlboeck JS, Mecocci P, Vellas B, Tsolaki M, et al. AddNeuroMed and ADNI: similar patterns of Alzheimer's atrophy and automated MRI classification accuracy in Europe and North America. *NeuroImage.* 2011 Oct 1;58(3):818-28.

17. Westman E, Simmons A, Zhang Y, Muehlboeck JS, Tunnard C, Liu Y, et al. Multivariate analysis of MRI data for Alzheimer's disease, mild cognitive impairment and healthy controls. *NeuroImage.* 2011 Jan 15;54(2):1178-87. 40

18. Thambisetty M, Simmons A, Hye A, Campbell J, Westman E, Zhang Y, et al. Plasma biomarkers of brain atrophy in Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2011;6(12):e28527.

19. Westman E, Aguilar C, Muehlboeck JS, Simmons A. Regional magnetic resonance imaging measures for multivariate analysis in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Brain Topogr.* 2013 Jan;26(1):9-23.
20. Guntert A, Campbell J, Saleem M, O'Brien DP, Thompson AJ, Byers HL, et al. Plasma gelsolin is decreased and correlates with rate of decline in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD.* 2010;21(2):585-96. 10
21. Hu WT, Holtzman DM, Fagan AM, Shaw LM, Perrin R, Arnold SE, et al. Plasma multianalyte profiling in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Neurology.* 2012 Aug 28;79(9):897-905.
22. O'Bryant SE, Xiao G, Barber R, Huebinger R, Wilhelmsen K, Edwards M, et al. A blood-based screening tool for Alzheimer's disease that spans serum and plasma: findings from TARC and ADNI. *PloS one.* 2011;6(12):e28092. 20
23. Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, et al. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med.* 2007 Nov;13(11):1359-62.
24. Gangemi S, Basile G, Merendino RA, Epifanio A, Di Pasquale G, Ferlazzo B, et al. Effect of levodopa on interleukin-15 and RANTES circulating levels in patients affected by Parkinson's disease. *Mediators Inflamm.* 2003 Aug;12(4):251-3. 30
25. Grzybicki D, Moore SA, Schelper R, Glabinski AR, Ransohoff RM, Murphy S. Expression of monocyte chemoattractant protein (MCP-1) and nitric oxide synthase-2 following cerebral trauma. *Acta Neuropathol.* 1998 Jan;95(1):98-103.
26. Tripathy D, Thirumangalakudi L, Grammas P. RANTES upregulation in the Alzheimer's disease brain: a possible neuroprotective role. *Neurobiology of aging.* 2010 Jan;31(1):8-16.
27. Perrin RJ, Craig-Schapiro R, Malone JP, Shah AR, Gilmore P, Davis AE, et al. Identification and validation of novel cerebrospinal fluid biomarkers for staging early Alzheimer's disease. *PloS one.* 2011;6(1):e16032. 40

28. DeGiorgio CM, Gott PS, Rabinowicz AL, Heck CN, Smith TD, Correale JD. Neuron-specific enolase, a marker of acute neuronal injury, is increased in complex partial status epilepticus. *Epilepsia*. 1996 Jul;37(7):606-9.
29. Hatfield RH, McKernan RM. CSF neuron-specific enolase as a quantitative marker of neuronal damage in a rat stroke model. *Brain Res*. 1992 Apr 17;577(2):249-52.
30. Chaves ML, Camozzato AL, Ferreira ED, Piazenski I, Kochhann R, Dall'Igna O, et al. Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer's disease patients. *J Neuroinflammation*. 2010;7:6. 10
31. Blennow K, Wallin A, Ekman R. Neuron specific enolase in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for neuronal degeneration in dementia disorders? *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*. 1994;8(3):183-91.
32. Lewis TL, Cao D, Lu H, Mans RA, Su YR, Jungbauer L, et al. Overexpression of human apolipoprotein A-I preserves cognitive function and attenuates neuroinflammation and cerebral amyloid angiopathy in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 2010 Nov 19;285(47):36958-68. 20
33. Takechi R, Galloway S, Pallebage-Gamarallage MM, Wellington CL, Johnsen RD, Dhaliwal SS, et al. Differential effects of dietary fatty acids on the cerebral distribution of plasma-derived apo B lipoproteins with amyloid-beta. *Br J Nutr*. 2010 Mar;103(5):652-62. 30
34. Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *American journal of epidemiology*. 2002 Mar 15;155(6):487-95.
35. Gupta VB, Laws SM, Villemagne VL, Ames D, Bush AI, Ellis KA, et al. Plasma apolipoprotein E and Alzheimer disease risk: the AIBL study of aging. *Neurology*. 2011 Mar 22;76(12):1091-8.
36. Siest G, Bertrand P, Qin B, Herbeth B, Serot JM, Masana L, et al. Apolipoprotein E polymorphism and serum concentration in Alzheimer's disease in nine European centres: the ApoEurope study. ApoEurope group. *Clin Chem Lab Med*. 2000 Aug;38(8):721-30. 40
37. Darreh-Shori T, Forsberg A, Modiri N, Andreasen N, Blennow K, Kamil C, et al. Differential levels of apolipoprotein E and

butyrylcholinesterase show strong association with pathological signs of Alzheimer's disease in the brain in vivo. *Neurobiology of aging*. 2011 Dec;32(12):2320 e15-32.

38. Darreh-Shori T, Modiri N, Blennow K, Baza S, Kamil C, Ahmed H, et al. The apolipoprotein E epsilon4 allele plays pathological roles in AD through high protein expression and interaction with butyrylcholinesterase. *Neurobiology of aging*. 2011 Jul;32(7):1236-48.

39. Kiddle SJ, Thambisetty M, Simmons A, Riddoch-Contreras J, Hye A, Westman E, et al. Plasma based markers of [11C] PiB-PET brain amyloid burden. *PLoS One*. 2012;7(9):e44260.

40. Furney SJ, Kronenberg D, Simmons A, Guntert A, Dobson RJ, Proitsi P, et al. Combinatorial markers of mild cognitive impairment conversion to Alzheimer's disease--cytokines and MRI measures together predict disease progression. *J Alzheimers Dis*. 2011;26 Suppl 3:395-405.

41. Brys M, Glodzik L, Mosconi L, Switalski R, De Santi S, Pirraglia E, et al. Magnetic resonance imaging improves cerebrospinal fluid biomarkers in the early detection of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2009;16(2):351-62.

10

20

【手続補正書】

【提出日】平成28年9月1日(2016.9.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2017500562000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2014/053692		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 ADD.		
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) 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 practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VELAYUDHAN L ET AL: "Plasma transthyretin as a candidate marker of cognitive decline and severity in Alzheimer's disease", ALZHEIMER'S & DEMENTIA: THE JOURNAL OF THE ALZHEIMER'S ASSOCIATION, ELSEVIER, NEW YORK, NY, US, vol. 6, no. 4, 1 July 2010 (2010-07-01), pages S522-S523, XP027440213, ISSN: 1552-5260, DOI: 10.1016/J.JALZ.2010.05.1742 [retrieved on 2010-07-01] abstract; figures 1-2; table 2 ----- -/--	6-11,13, 15-22, 25,27-45
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *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) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*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 *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 *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 *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 March 2015		01/04/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fleitmann, J

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2014/053692

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Katie Lunnon ET AL: "A blood gene expression marker of early Alzheimer's disease", Journal of Alzheimer's disease : JAD, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 737-753, XP055174560, Netherlands DOI: 10.3233/JAD-2012-121363 Retrieved from the Internet: URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23042217 page 740, left-hand column, paragraph 2 -----	40,41
X	STEVEN JOHN KIDDLE ET AL: "Plasma Based Markers of [11C] PiB-PET Brain Amyloid Burden", PLOS ONE, vol. 7, no. 9, 24 September 2012 (2012-09-24), page e44260, XP055174368, DOI: 10.1371/journal.pone.0044260 abstract page 7, right-hand column, paragraph 3 - paragraph 5 -----	6-11,13, 16-22, 25-28, 30-45
X	SIMON J FURNEY ET AL: "Combinatorial markers of mild cognitive impairment conversion to Alzheimer's disease--cytokines and MRI measures together predict disease progression", JOURNAL OF ALZHEIMER'S DISEASE, vol. 26, no. Suppl. 3, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 395-405, XP055174595, NL ISSN: 1387-2877, DOI: 10.3233/JAD-2011-0044 page 397, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 5; tables 3,s1 abstract page 402, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1 -----	6-45
X,P	ABDUL HYE ET AL: "Plasma proteins predict conversion to dementia from prodromal disease", ALZHEIMER'S & DEMENTIA, vol. 10, no. 6, 1 November 2014 (2014-11-01), pages 799-807.e2, XP055174569, ISSN: 1552-5260, DOI: 10.1016/j.jalz.2014.05.1749 the whole document -----	6-45

3

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/GB2014/053692**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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.: 1-5
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(v) PCT - Presentation of information
A panel of biomarkers is considered the mere presentation of information and
ist therefore not patentable
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:
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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB2014/053692

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/81 (2006.01)	C 0 7 K 14/81	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 0 7 K 14/475 (2006.01)	C 0 7 K 14/475	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34	F
C 0 7 K 14/52 (2006.01)	C 0 7 K 14/52	
C 1 2 N 9/64 (2006.01)	C 1 2 N 9/64	Z
C 1 2 N 9/88 (2006.01)	C 1 2 N 9/88	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 マルコルム アンドリュウ ワード
イギリス国 ケイティー 1 1 3イーピー サリー コバム ダウンサイド ブリッジ ロード
コヴェハム ハウス シーノオー エレクトロフォレティクス リミテッド

(72)発明者 アブドル ヒエ
イギリス国 エスイー 5 8エーエフ ロンドン インスティテュート オブ サイカイエトリ
デ クレスピグニ パーク シーノオー キングス カレッジ ロンドン

(72)発明者 シモン ハロルド ラブストーン
イギリス国 エスイー 5 8エーエフ ロンドン インスティテュート オブ サイカイエトリ
デ クレスピグニ パーク シーノオー キングス カレッジ ロンドン

(72)発明者 リチャード ジェームス バトラー ドブソン
イギリス国 エスイー 5 8エーエフ ロンドン インスティテュート オブ サイカイエトリ
デ クレスピグニ パーク シーノオー キングス カレッジ ロンドン

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 CB03 CB07 DA13 DA36 FB03 FB05
4B029 AA07 BB15 BB16 BB17 CC01 CC08 FA12
4B050 DD11 LL03
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 CA42 DA01 DA21 DA50 DA56
DA86 DA89 EA50

专利名称(译)	阿尔茨海默病的生物标志物和方法		
公开(公告)号	JP2017500562A	公开(公告)日	2017-01-05
申请号	JP2016538603	申请日	2014-12-12
[标]申请(专利权)人(译)	电泳有限公司 伦敦国王学院		
申请(专利权)人(译)	电Foret的遗传学有限公司 伦敦大学国王学院		
[标]发明人	マルコルムアンドリユーワード アブドルヒエ シモンハロルドラブストーン リチャードジェームスバトラー ドブソン		
发明人	マルコルム アンドリユー ワード アブドル ヒエ シモン ハロルド ラブストーン リチャード ジェームス バトラー ドブソン		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C07K14/47 C07K14/81 C07K14/705 C07K14/475 C12M1/34 C07K14/52 C12N9/64 C12N9/88		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2800/2814 G01N2800/2821 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C07K14/47.ZNA C07K14/81 C07K14/705 C07K14/475 C12M1/34.F C07K14/52 C12N9/64.Z C12N9/88		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/ FB03 2G045/FB05 4B029/AA07 4B029/BB15 4B029/BB16 4B029/BB17 4B029/CC01 4B029/CC08 4B029/FA12 4B050/DD11 4B050/LL03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/ CA40 4H045/CA42 4H045/DA01 4H045/DA21 4H045/DA50 4H045/DA56 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA50		
代理人(译)	石川彻		
优先权	2013022094 2013-12-13 GB		
其他公开文献	JP2017500562A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

老年痴呆症最常见的病因是阿尔茨海默氏病，是一种目前无法治愈的使人衰弱的神经退行性疾病。过去，仅在患者死亡后通过脑活检或尸检才能明确诊断AD。这些证明脑中存在特征性斑块和缠结损伤的方法仍被认为是AD病理诊断的金标准。但是，在临床情况下，很少进行脑活检，诊断是一系列神经学检查，心理测验以及脑脊液和血液，例如ApoE和tau蛋白或β-淀粉样肽。依靠生化测试，包括测量生化指标 本发明鉴定并描述了与在正常状态下的表达相比在疾病状态下差异表达的一组标记，并且具体地鉴定和描述了与神经认知障碍相关的一组标记。有。这样的生物标志物组可以用于临床试验，并且可能用于临床实践中，用于具有更具体但更具侵入性和昂贵方法的早期记忆障碍的患者，例如CSF和PET成像的分子标志物。在选择上具有相当的价值。 [选择图]无

(5) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
GO 1 N 33/63 (2006.01)	GO 1 N 33/53	4 B O 2 9
GO 1 N 33/60 (2006.01)	GO 1 N 33/50	4 B O 5 0
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15	4 H O 4 5
CO 7 K 14/47 (2006.01)	CO 7 K 14/47	Z N A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-538603 (P2016-538603)	(71) 出願人	505423678
(86) (22) 出願日	平成26年12月12日 (2014.12.12)		エレクトロフォレティクス リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成28年8月9日 (2016.8.9)		イギリス国 K T I I 3 E P サリー
(86) 国際出願番号	PCT/GB2014/053682		コハム ダウンサイド ブリッジ ロード
(87) 国際公開番号	W02015/087087		コウエハム ハウス
(87) 国際公開日	平成27年6月18日 (2015.6.18)	(71) 出願人	500532757
(31) 優先権主張番号	1322094.2		キングス カレッジ ロンドン
(32) 優先日	平成25年12月13日 (2013.12.13)		K I N G S C O L L E G E L O N D O N
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		イギリス国, WC 2 R 2 L S ロンドン, ストランド (番地なし)
		(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病に関するバイオマーカー及び方法