

(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2015-514206

(P2015-514206A)

(43) 公表日 平成27年5月18日(2015.5.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	N
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 5 F
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 1 B
	GO 1 N 33/536	E

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁)

(21) 出願番号 特願2015-501035 (P2015-501035)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月20日 (2013. 3. 20)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年10月27日 (2014. 10. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2013/052206
 (87) 国際公開番号 WO2013/140349
 (87) 国際公開日 平成25年9月26日 (2013. 9. 26)
 (31) 優先権主張番号 RM2012A000103
 (32) 優先日 平成24年3月20日 (2012. 3. 20)
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)
 (31) 優先権主張番号 RM2012A000383
 (32) 優先日 平成24年8月2日 (2012. 8. 2)
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)

(71) 出願人 514238272
 ユニヴェルシタ デッリ ストゥーディ
 ディ ミラノ - ビコッカ
 イタリア国 イ - 20126 ミラノ
 、ミラノ、ピアッツァ デッアテネオ ノ
 オーヴォ 1
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ベータアミロイド抗体の検出に関する方法及びキット

(57) 【要約】

脳脊髄液のサンプル中の抗ベータアミロイドタンパク質抗体の定量化に関する *in vitro* での方法及びキットであって、a) 上記サンプルの上記抗体の量を、上記抗体を結合することが可能な高分子でコーティングした磁気マイクロビーズを用いて濃縮する工程、b) 工程 a) で得られた濃縮サンプルを、免疫酵素アッセイにより、又はラジオイムノアッセイにより分析する工程、c) 工程 b) で使用するのと同じアッセイを用いて、既知の力価を有する抗ベータアミロイドタンパク質抗体を含むサンプルを分析して、関連校正曲線を作成する工程を含む上記方法及びキット(ここで、既知の力価を有する上記抗体が、I g G 2 a 若しくは I g G b クラスに属するマウス抗体、又は I g G 2 b 若しくは I g G i クラスに属するヒト若しくはヒト化抗体である)。

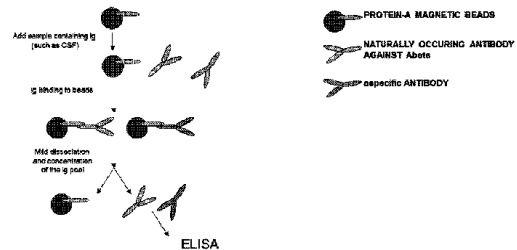


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脳脊髄液のサンプル中の抗ベータアミロイドタンパク質抗体の定量化に関する *in vitro* の方法であって、

a) 前記サンプルの前記抗体の量を、前記抗体を結合することが可能な高分子でコーティングした磁気マイクロビーズを用いて濃縮する工程、

b) 工程 a) で得られた濃縮サンプルを、免疫酵素アッセイにより、又はラジオイムノアッセイにより分析する工程、

c) 工程 b) で使用するのと同じアッセイを用いて、既知の力価を有する抗ベータアミロイドタンパク質抗体を含むサンプルを分析して、関連校正曲線を作成する工程であって、既知の力価を有する前記抗体が、I g G 2 a 若しくは I g G 2 b クラスに属するマウス抗体、又は I g G 2 b 若しくは I g G 1 クラスに属するヒト若しくはヒト化抗体である、上記工程

を含む、上記方法。

【請求項 2】

前記濃縮工程 a) が、前記マイクロビーズ上での前記脳脊髄液サンプルの吸収工程、及び前記マイクロビーズからの前記抗体の溶出工程を含み、

前記分析工程 b) が、

I) ベータアミロイドタンパク質及び / 又はそのアイソフォームでコーティングした固相を準備する工程、

II) 前記固相を、工程 a) から得られた濃縮材料とともにインキュベートし、このようにして前記固相上のベータアミロイドタンパク質への前記自己抗体の結合を可能にして、続いてすすいで、未結合の材料を除去する工程、

III) 工程 II) で得られた固相を、ヒト抗体を結合することが可能な、酵素又は放射性標識にコンジュゲートされたタンパク質とともにインキュベートし、続いてすすいで、前記未結合のコンジュゲート型タンパク質を除去する工程、

IV) 前記コンジュゲート型タンパク質のシグナルを検出する工程

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記濃縮工程 a) が、前記マイクロビーズ上での前記マイクロビーズからの前記抗体の溶出を伴わない前記脳脊髄液サンプルの吸収工程を含み、ここで、前記高分子がベータアミロイドタンパク質であり、

前記分析工程 b) が、

I) 工程 a) で得られた濃縮材料を、ヒト抗体を結合することが可能な、酵素又は放射性標識にコンジュゲートされたタンパク質とともにインキュベートし、続いてすすいで、前記未結合のコンジュゲート型タンパク質を除去する工程、

II) 前記コンジュゲート型タンパク質のシグナルを検出する工程

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

既知の力価を有する前記抗体が、4 G 8、6 E 1 0、G 2 - 1 1、3 D 6、m 2 6 6、ソラネズマブ、ポネズマブ、パピネオズマブ、ガンテネルマブ、B A N 2 4 0 1、B I I B 0 3 7、静脈内投与される免疫グロブリン (I V I G)、ガンマガード、オクタガム、ニューガム (N e w g a m) から選択される、請求項 1 から 3 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

既知の力価を有する前記抗体が、ベータアミロイドタンパク質の 1 位 ~ 2 8 位におけるアミノ酸配列に含まれるエピトープに特異的である、請求項 1 から 4 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

既知の力価を有する前記抗体が、ベータアミロイドタンパク質の 1 7 位 ~ 2 4 位におけ

10

20

30

40

50

るアミノ酸配列に相当するエピトープを認識する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記コンジュゲート型タンパク質が、Hrp にコンジュゲートされたプロテイン A、Hrp にコンジュゲートされたプロテイン G、コンジュゲート型ビオチン、コンジュゲート型ストレプトアビジン、Hrp 酵素にコンジュゲートされた抗体、又はアルカリホスファターゼ (ALP) にコンジュゲートされた抗体、又はベータガラクトシダーゼにコンジュゲートされた抗体、又は蛍光標識された分子にコンジュゲートされた抗体、又は発光分子にコンジュゲートされた抗体を含む群において選択される、酵素にコンジュゲートされたタンパク質である、請求項 1 から 6 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

放射性標識にコンジュゲートされた前記タンパク質が、I - 125、I - 131 又は I - 99 にコンジュゲートされたプロテイン G、I - 125、I - 131 又は I - 99 にコンジュゲートされた A、I - 125、I - 131 又は I - 99 にコンジュゲートされた抗 Ig G 抗体を含む群において選択される、請求項 1 から 6 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

アルツハイマー病の能動及び / 又は受動免疫処置をモニタリングする *in vitro* での方法であって、請求項 1 から 8 までのいずれか一項に記載の方法の工程が、前記処置の種々の時点で収集されたより多くの CSF サンプルに関して実施され、各サンプルから得られる定量化データが互いに比較されて、このようにして CSF 中のベータアミロイドタンパク質に対する抗体の濃度の時間経過を構築する上記方法。

【請求項 10】

前記サンプルそれぞれに関して、1 つ又は複数の内皮損傷マーカーの濃度を決定する工程を更に含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記内皮損傷マーカーが、組織因子経路阻害剤 (TFPI) である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

炎症及び血管原性浮腫 (CAA - ri) にも関連する脳アミロイド血管障害 (CAA) の、患者の CSF サンプルからの診断又は治療上のモニタリングに関する *in vitro* の方法であって、請求項 1 から 8 までのいずれか一項に記載の方法の工程、及び抗ベータアミロイドタンパク質抗体の決定された濃度を標準参照値と比較する更なる工程を含む上記方法。

【請求項 13】

前記標準参照値が、健常な個体及び CAA 又は CAA - ri を患う個体からの一連のサンプルの濃度を作成することにより得られる ROC 曲線により決定される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記参照値が、30 ~ 40 ng / mL を含む、請求項 12 又は 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記患者の CSF サンプル中の TFPI の濃度を決定して、決定された値を標準参照値と比較する更なる工程を含む、請求項 12 から 14 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

TFPI の前記標準参照値が、健常な個体及び CAA 又は CAA - ri を患う個体からの一連のサンプルの濃度を作成することにより得られる ROC 曲線により決定される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

TFPI の前記標準参照値が、0.70 ~ 0.90 ng / mL を含む、請求項 15 又は 16 に記載の方法。

【請求項 18】

10

20

30

40

50

放射線学的異常 (A R I A) の、患者の C S F サンプルからの診断又は治療上のモニタリングに関する *i n v i t r o* での方法であって、請求項 1 から 8 までのいずれか一項に記載の方法の工程、及び抗ベータアミロイドタンパク質抗体の決定された濃度を標準参照値と比較する更なる工程を含む上記方法。

【請求項 19】

前記患者の C S F サンプル中の T F P I の濃度を決定して、決定された値を標準参照値と比較する更なる工程を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

T F P I の前記標準参照値が、健常な個体及び C A A 又は C A A - r i を患う個体からの一連のサンプルの濃度を作成することにより得られる R O C 曲線により決定される、請求項 19 に記載の方法。

10

【請求項 21】

T F P I の前記標準参照値が、0.70 ~ 0.90 ng / mL を含む、請求項 19 又は 20 に記載の方法。

【請求項 22】

ベータアミロイドタンパク質の抗体の検出のためのキットであって、前記抗体を結合することが可能な高分子でコーティングした磁気マイクロビーズ、及びベータアミロイドタンパク質に対して既知の力価を有する抗体の 1 つ又は複数のアリコート (a l i q u o t s) を含み、既知の力価を有する前記抗体が、I g G 2 a 若しくは I g G 2 b クラスに属するマウス抗体、又は I g G 2 b 若しくは I g G 1 クラスに属するヒト抗体である上記キット。

20

【請求項 23】

ベータアミロイドタンパク質でコーティングした 1 つ又は複数の固相支持体、免疫酵素アッセイのための試薬の 1 つ又は複数のアリコート、並びに / 又はヒト抗体及び / 若しくは既知の力価を有する前記抗体を特異的に結合することが可能な、酵素にコンジュゲートされたタンパク質の 1 つ又は複数のアリコートを更に含む、請求項 22 に記載のキット。

【請求項 24】

T F P I タンパク質の免疫酵素計量のための試薬を更に含む、請求項 22 又は 23 に記載のキット。

【請求項 25】

T F P I タンパク質の免疫酵素計量のための前記試薬が、T F P I タンパク質に特異的な抗体でコーティングした 1 つ又は複数の固相支持体、及び / 又は標準曲線の構築のための標準物質、陽性対照及び陰性対照を含む、請求項 24 に記載のキット。

30

【請求項 26】

前記固相支持体が、T F P I タンパク質及び / 又はベータアミロイドタンパク質に特異的な抗体でコーティングされる、請求項 25 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書は、脳脊髄液のサンプル中の抗ベータアミロイドタンパク質抗体及び内皮損傷の決定 (バイオマーカー組織因子経路阻害剤、T F P I の計量による) に関する *i n v i t r o* での方法並びにキットに関する。

40

【背景技術】

【0002】

ベータ - A m i l o y d (A ベータ) 又はベータアミロイドタンパク質と称される 4 k D a のペプチドの脳及び脳血管の蓄積は、アルツハイマー病 (A D) における重要な神経病理学的事象として広く受け入れられている。A D の主な特徴は、実際には、主として A ベータ凝集体 (A ベータ 40 及び A ベータ 42) により形成されるアミロイド斑、並びにベータ及びガンマ - セクレターゼによるアミロイド前駆物質タンパク質 (A P P) のタンパク質分解により導かれる脳アミロイド血管障害とも称される血管レベルでの A ベータ堆

50

積である。

【0003】

様々なメカニズム、その中でも、有毒な凝集体クリアランス系の異常機能又は脳レベルでの細胞防御系の異常機能が、これらの蓄積の形成に関与し得ると思われる。「アミロイド修飾療法 (A ベータ - D M T)」と定義される治療上のアプローチ、特に能動及び受動免疫に基づいているものは、これらのメカニズムの考え得る回復及び増強に正確に基づいている。

【0004】

これらの療法の使用における強力な刺激は、トランスジェニック動物モデルにおける過去の証拠に続いて起こり、ここで、免疫は、ベータアミロイド斑の存在を防止し、また場合によっては低減させることが可能であることが実証されている。最初に、能動免疫アプローチは、ベータアミロイドタンパク質を投与することにより、及びそれにより、注射した抗原に対して誘導される自発的な内因性抗体生産を助長することにより、患者に行われた。ベータアミロイドタンパク質は、身体で偏在的に分布されており、また堆積及び循環レベルに関して、ある患者から別の患者まで極めて一様ではないという事実に加えて、この戦略により患者において抗体生産をモニタリングすることが不可能であることに起因して、これらの臨床試験は、急性髄膜脳炎のエピソードの発生に起因して、第1相又は第2相で中止された。

10

【0005】

医薬品製剤に関する顕著な進捗のおかげで、また抗ベータアミロイドタンパク質抗体の生産及び特徴付けの分野での科学的知見の顕著な進歩のおかげで、臨床 - 医薬品研究は今日、全身経路によるヒト化抗体の注射に基づく臨床試験にほぼ例外なく関与している。「受動」と称されるこの免疫技法は、循環抗体力価をより良好に制御し、また必要な場合には薬理的活性を仮説上は中断させることが可能であるという利点を伴う。

20

【0006】

実際には、これらの治療戦略のより大きな安全性にも関わらず、幾つかの副次的な危険性が存続し、その中でも最も関連性のあるものは、血管原性浮腫 (V E) の発症である。

【0007】

動物モデルでは、血管原性浮腫及び神経炎症性 (neuroinflammatory) 応答のようなこれらの有害な現象は、投与される抗体の治療用量に厳密に関連することが証明されている。現に、低投与量で処置した動物は、上述の有害な影響の発生を示さなかった。更に、情動不安の兆候を示し始めた動物において治療用量を減少させることにより、有害な影響自体を取り消すことができるという事実は特に興味深い。

30

【0008】

したがって、脳脊髄液 (C S F) 中に脳レベルで存在する抗体のレベル、即ち大脳区域に到達して、その結果として中枢の薬理的効果を有することを現に成功させた抗体のレベルを計量することが可能であることが重要である。C S F 中のかかるレベルの上昇を効果的に評価することが可能であるためには、非常に感度が高く、及び基底状態で、即ち処置前に自発的に存在する自己抗体の存在も検出することが可能な計量を利用することが重要である。更に、臨床研究及び薬理的試行から導かれるごく最近の証拠により、内皮損傷の多発性を有する対象又は脳血管危険因子 (例えば、A P O E 4 ハロタイプの存在) のキャリアは、3% ~ 5% 高い V E を発症する割合、その結果として更には死を被り得るため、療法を始める対象における脳血管障害の正確な状況を知ることは根本的なことであると知られている。

40

【0009】

ベータアミロイド堆積及び脳内皮損傷の存在を評価することが可能な一般的な技法は、P E T 及び M R I を用いた画像化技法である。しかしながら、これらの技法は非常に高価であり、臨床ルーチンでいまだに完全には確証及び承認されておらず、非常に有能なスタッフ及び特定の機器を要し、実際の生物学的応答を示さず、その結果として特殊なケースでのみ使用され、化学的 - 物理的研究を伴う。更に、これらの技法が、C S F 中に自発的

50

に存在する抗体（自己抗体）の濃度、又はそれらが処置後にどれだけ多く増加したか、又は、更には、脳血管障害とのそれらの関係性に関して何も示さないことは、指摘されなくてはならない。

【0010】

しかしながら、近年、かかる証拠が再検討されて、アルツハイマー協会研究ワークグループ（Alzheimer Association Research Workgroup）が、ARIAの概念、即ちFLAIRシーケンス（sequences）を使用した血管原性浮腫及び/又は溝滲出（sulcal effusion）の発症により表される「アミロイド関連画像化異常」（ARIA-E）、及びモノクローナル抗体バピネオズマブで処置し、続いて他の処置（例えばセマガセスタット及びソラネズマブを用いるような）でも確認されたアルツハイマー患者におけるエコーグラジエントにおけるT2*シーケンス（T2*-GRE）でのヘモジデリン堆積（ARIA-H）のシグナルのARIAの概念を定義した後に、更に大きな関連性を獲得した。

10

【0011】

このことは、これらのAD患者に存在するARIAと、脳アミロイド血管障害関連炎症（CAA-ri）を患う患者の非常に特定のサブクラスとの間で共有される多くの類似性を考慮すると、更に一層興味深いことがわかり、ここで、ベータアミロイドタンパク質に対する自己抗体による特定の自己免疫メカニズムは、これらの対象においては病原病理学的メカニズム及びARIA出現を明確に示すようである。しかしながら、今日に至るまで、AD及びCAA-riの両方においてARIAを明確に示す病原メカニズムは、依然として大部分が未知であることを重視しなくてはならない。今日に至るまで、急性期の的確な処置に重要なCAA-riの確定診断は、脳バイオプシー（即ち、研究により、病理学に特徴的な出血の多発性の増加を考慮すると、患者にとって非常に侵襲的及び危険である）、及び精密なNMR研究に関してのみ可能である。自己抗体は、疾患の急性期を特徴付け、またCSF中のそれらの濃度に直接関連される実際のメカニズムであることが結果的にわかるはずであり、したがって、本発明者らは明らかに、CAA-riの診断に関してはるかに危険性が少なく及び低侵襲的な代替的診断ツールを利用し得る。

20

【0012】

ベータアミロイドタンパク質に対して誘導される抗体の計量に関して、今日まで、Aベータ40タンパク質に対して誘導される自己抗体（即ち、血漿中で自然に発生するもの）の血漿計量に関する方法について記載しているNeurology journalで2001年に出版された文献（Du Yら）における事実上1つの研究が存在する。この方法は、単なるELISA方法論に専ら基づいており、AD及びダウン症を患う患者の血漿中のAベータタンパク質に対する抗体力価の計量に関して文献で見出され得る事実上唯一の方法を表す。

30

【0013】

しかしながら、今日に至るまで、健常な集団と比較してAD対象における血漿抗体力価の正確な分布を示す最終的な証拠は、依然として数少なく、及びはつきりしないままである。実際には、自己抗Aベータタンパク質抗体の血漿力価は、ある文献（Du Yら、Weksler MEら、Song MSら）によると減少されるようであり、他の文献（Hyman BTら、Baril Lら）によると変化がないようであり、又は、更には、更なる他の文献（Nath Aら）によると増加されるようである。

40

【0014】

このことは確かに真実であり、CSFレベルでの自己抗体計量に関して強調されている（Du Yら）。実際には、血漿中にも関わらず、抗体力価は、比較的直接的に計量するには十分高く、Du Yらにより記載される方法は、CSF中の計量に関しては、ほぼ無用であり、CSF中では、自己抗体は、極めて低い濃度で存在し、その結果としてDu Yらにより使用されるELISA方法論による十分な感度及び信頼性では計量不可能である。Du Yらによる2つの表題の論述セクションでは、同著者らは、非常に大量を要する場合には、血漿からのみ自己抗体を単離及び精製することができ、CSFからは自己抗

50

体を単離及び精製することができないことを明記している。

【0015】

特許出願である国際公開第2011009435号では、血漿、及び同様にCSFサンプル中の自己抗体の検出に関するELISA方法が記載されているが、CSF中の計量に関して、従来技術で記載されるものと比較して、この方法のより大きな感度を強調するデータを報告していない。

【0016】

したがって、CSFサンプル中の抗ベータアミロイドタンパク質抗体の計量に関して、主な問題は、存在する自己抗体が非常に低濃度のままであり、全てがゼロ（即ち、ブランク）と、校正曲線標準物質の1点目との間に全てが包含されることを実証可能であるほど低い値であり、即ち、背景ノイズと非常に容易に間違えられる。しかしながら、より一層効果的及び安全な治療抗体を特定する際の、医薬品産業及び一般的に研究の非常に重い責務にも関わらず、一般的にAD及びCAAを患う患者における脳レベルで自発的に発生する自己抗体の濃度に関して、ほとんど又は全く何も知られていないという証拠が関係している。今日まで続行されている論拠は、AD患者における抗体の存在の減少を前提とするということであり、その結果として病理学の減速を実証することが可能な治療抗体の全身経路による外因性投与にのみ、焦点が向けられている。今日に至るまで、動物ADモデルでは、かかる療法が脳レベルでAベータ堆積を現に減少させるという実証によってのみ、かかる証拠が支持されている。しかしながら、CSFレベルで非常に低濃度で存在する自己抗体を計量する際の技術的・実験的困難性に起因して、AD対象が療法前に抗体力価の減少を現に示すかどうかは、いまだ正確にはわかっておらず、とりわけ、どれだけ多くの治療抗体が、血液脳関門を通過することに現に成功しているか、その結果として脳区域で治療効果を有することに成功しているかはわかっておらず、又は更には治療投与中のそれらの濃度の動向、又はより一層重要なことには、放射線学的異常（ARIA）の出現中のそれらの濃度は知られていない。CAA-r iの急性期中に自然に生産される抗体のCSF濃度、免疫抑制療法後の抗体のCSF濃度、寛解期における症状の臨床的・放射線学的消散（resolution）に続く抗体のCSF濃度にも、同じことが当てはまる。

10

20

【0017】

したがって、CSFサンプル中に存在する抗ベータアミロイドタンパク質抗体の濃度を高感度で計量する方法及びキットを提供するという問題に非常に興味を抱かれる。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明の方法は、脳脊髄液のサンプル中に元々存在する抗ベータアミロイドタンパク質抗体を濃縮する工程の選択及び開発、並びに免疫酵素アッセイ又はラジオイムノアッセイにおける、このようにして濃縮された抗体の続く検出に基づいている。

【0019】

ベータアミロイドタンパク質に対して誘導される抗体を結合することが可能な、高分子で適切にコーティングした磁気マイクロビーズを用いて、濃縮サンプルが得られ、この濃度が極めて低い場合でさえも、そこから出発サンプル中に存在する抗体の濃度を定量的に検出することが可能であることを、本発明者らが発見した。マイクロビーズ上で濃縮する工程が、抗体濃度を決定するのに利用される免疫酵素アッセイ又はラジオイムノアッセイの感度の増加を決定することを、本発明者らは実証している。磁気性であるマイクロビーズは、マグネットを用いて容易に除去することができ、その結果としてサンプル損失を引き起こし得るデッドボリュームがない。

40

【0020】

また、本明細書中に記載される方法の特に有効な工程が開発されており、それは、発明を実施するための形態で詳細に記載されている。

【0021】

本発明の方法により最先端で初めて、能動及び/又は受動免疫療法による処置の下で対

50

象のCSF中に存在する抗体、一般的にはAベータ-DMTの実際の濃度を計量することができ、それにより療法のより有効なモニタリングを可能とし、また患者におけるARIA出現を防ぐことが可能となる。更にまた、処置前及び/又は診断スクリーニングとして、改善された治療上のカスタマイゼーションに沿って、考え得る療法に関する患者候補のCSF中に自発的に発生する抗体濃度を計量することができる。

【0022】

本発明の第1の目的は、脳脊髄液のサンプル中の抗ベータアミロイドタンパク質抗体の検出に関する*in vitro*での方法であって、

a) 上記サンプルの上記抗体の量を、上記抗体を結合することが可能な高分子でコーティングした磁気マイクロビーズを用いて濃縮する工程、

b) 工程a)で得られた濃縮サンプルを、免疫酵素アッセイにより、又はラジオイムノアッセイにより分析する工程

を含む上記方法である。

【0023】

本発明の別の目的は、CSFサンプル中の抗ベータアミロイドタンパク質抗体の定量化に関する*in vitro*での方法であって、

a) 上記サンプルの上記抗体の量を、上記抗体を結合することが可能な高分子でコーティングした磁気マイクロビーズを用いて濃縮する工程、

b) 工程a)で得られた濃縮サンプルを、免疫酵素アッセイにより、又はラジオイムノアッセイにより分析する工程、

c) 工程b)で使用するのと同じアッセイを用いて、既知の力価を有する抗ベータアミロイドタンパク質抗体を含むサンプルを分析して、関連校正曲線を作成する工程を含む上記方法である。

【0024】

本発明の更なる目的は、アルツハイマー病を患う患者のCSFサンプルから、アルツハイマー病の能動及び/又は受動免疫処置をモニタリングする*in vitro*での方法であって、請求項1から8までのいずれか一項に記載の工程を含む上記方法である。

【0025】

本発明の更に別の目的は、脳アミロイド血管障害(CAA)及びCAA関連の炎症、自己免疫並びに血管原性浮腫(CAA-ri)の、患者のCSFサンプルからの診断に関する*in vitro*での方法であって、請求項1から8までのいずれか一項に記載の工程を含む上記方法である。

【0026】

本発明の更に別の目的は、放射線学的異常(ARIA)の、患者のCSFサンプルからの診断又は治療上のモニタリングに関する*in vitro*での方法であって、請求項1から8までのいずれか一項に記載の方法の工程、及び抗ベータアミロイドタンパク質抗体の決定された濃度を標準参照値と比較する更なる工程を含む上記方法である。

【0027】

本発明の目的はまた、抗ベータアミロイドタンパク質抗体の検出のためのキットであって、上記抗体を結合することが可能な高分子でコーティングした磁気マイクロビーズ、ベータアミロイドタンパク質に対して既知の力価を有する抗体の1つ又は複数のアリコート(aliquots)を含む上記キットであり、それは、個別に使用される場合の個別のバイオマーカーの使用と比較して、より感度が高く、及びより特異的な診断、予後及びテルアグノスティック(teragnostic)ツールを提供するために、内皮損傷マーカーとしてのTFPIタンパク質及び相関される脳炎症現象の免疫酵素計量のための手段を任意に含むことができる。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】本発明の方法の実施形態によるサンプルを濃縮する工程a)の概略図。

【図2】本発明の方法の実施形態による免疫酵素アッセイによりサンプルを分析する工程

10

20

30

40

50

b) の概略図。

【図3】磁気マイクロビーズを用いたいかなる濃縮も実施せずに、同じ既知濃度 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ の A ベータに対する3つの市販されている異なる抗体クローン (The Genetics Company により分配されたクローン G2-11、Covance により分配されたクローン 6E10 及び 4G8) を分析することにより見出される吸光度 (OD) 間の比較を報告する。左側の欄では、背景技術に記載される ELISA 手順により試験した3つの市販の抗体に関する OD 値が報告されている。右側の欄は、本発明者らの新たな ELISA 方法により得ることが可能な OD 値を報告している。二次抗体として、ヤギで生産された Hrp コンジュゲート型抗ヒト IgG、(ヤギで生産された抗ヒト IgG (全分子) ペルオキシダーゼ抗体、SIGMA #A8667) 又は Hrp コンジュゲート型プロテイン A (Hrp にコンジュゲートされたプロテイン A、Millipore #18-160) を使用した。

【図4a】較正曲線。背景技術で教示されるものとは異なって、較正曲線用の抗体として抗体 G2-11 を、また二次抗体としてヤギで生産された Hrp コンジュゲート型抗ヒト IgG を利用している、背景技術に記載される ELISA 手順 (Contira、2010 年) を用いて得られた結果 (標準物質は、前富化 (enrichment) なしで使用した)。背景技術での方法を用いた較正曲線は、未処理サンプル、及び本発明者らにより記載される方法に従ってマイクロビーズを用いて濃縮した CSF の両方に関して、CSF サンプルの計量に関して十分に感度が高く、及び精密ではなかったことが理解され得る。実際に、CSF サンプルは非常に低い OD 値を示し、ゼロ (ブランク) と曲線の1点目との間に含まれる較正曲線の点内に収まり、即ち、実際の問題として全体的に測定不可能であることが観察され得る。

【図4b】較正曲線。較正曲線用の抗体として抗体 4G8 を、また二次抗体として Hrp コンジュゲート型プロテイン A を利用しているが、本発明者らにより実行され、及び背景技術には記載されていない検出のための試薬の特定の選択及び組合せを用いた結果 (曲線標準物質は常に、前富化なしで利用した)。図は、クローン 4G8 + prot A - HRP のどのような選択が、とりわけ、非常に低くて背景技術では使用不可能であると判明している標準物質の濃度値に関して、背景に記載される方法と比較してより高い感度を有するかを示している。更に、AD、CAA - ri を患う患者、及び対照から得られる CSF サンプルを分析することにより得られる典型的な値が報告されている。示される3つ全ての場合に関して、OD は、標準曲線の直線性範囲内に完璧に含まれる。

【図4c】較正標準物質の典型的な濃度及び関連吸光度値 (OD) である。1) 背景技術に記載される ELISA 手順 (G2-11 + 抗ヒト IgG - HRP、Contira、2010 年)、2) 本発明者らにより実行される ELISA (4G8 + prot A - HRP) を用いて得られる典型的な結果を示す。通常通りに、標準物質は、磁気ビーズによる富化プロセスを受けていない。図は、典型的な較正曲線に関して、本発明者らの新規 ELISA 方法が、CSF 中の抗 A ベータ抗体の定量化に期待される検出範囲 ($0.14 \sim 0.04 \mu\text{g}/\text{mL}$) でいかに超高感度であるかを判明しているかを示す。更に、 $0.134 \mu\text{g}/\text{mL}$ の同濃度で、抗体 G2-11 を用いた背景技術に記載される旧式 ELISA 方法と比較して、本発明者らの新たな ELISA 方法を用いて検出可能な OD 値が、背景技術に記載される ELISA 方法を用いて検出可能な 0.142 と比較して 1.072 であることが示される。このことは、本発明者らの新たな方法が、かかる濃度値に対して約 10 倍も感度が高いことを実証する。更に、全ての標準物質に関して、 $0.134 \mu\text{g}/\text{mL}$ よりも低い濃度を用いた場合、従来法は、いかなる未知の値もブランクと識別することが不可能であったことが観察される。

【図5】健常な対照 (CTL) 及び血管成分を伴わない神経変性病理学を患う他の患者 (神経変性対照) と比較した、アルツハイマー病 (AD) を患う患者からの CSF サンプルにおける TFP I 計量。結果は、Quantikine Human TFP I ELISA KIT - R & D Systems に記載される実験手順を修飾することにより得られた。特に、CSF 中の計量に関しても上記 KIT を利用するために、製造会社により提

供されるプロトコルを、アッセイ及び修飾した（使用した方法の説明は、実施例の部の例7で見られる）。図中で記述され得るように、44人のAD患者のCSF中のTFPI値は、30人の健常な対照及び5人の神経変性病理学（例えば、脳血管損傷との関連が報告されていない病理学である筋萎縮性側索硬化症）を患う対象の群と比較して有意に増加されることが判明した。

【図6】CAA-ri患者の核磁気共鳴フレーム（ケース6）。脳MRIコロナルFLAIRは、疾患の急性期中の皮質下白質の両側性病巣を示し（A）、症状の自然寛解を伴って3ヶ月後に低減し（B）、T2-スターシーケンス又はグラジエントエコーの軸方向セッションでの脳MR（白質における多重及び両側性の微小出血の存在を検出する）を示す（C）。コントラスト強調は、ガドリニウム注射後には存在しなかった（データは示していない）。

10

【図7】右側側頭葉のバイオプシー分析での神経病理学的証拠（ケース#6）。H&E（A、D）及びマッソントリクローム（B）染色は、内腔の低減を伴う軟髄膜及び実質血管床の肥厚を示す。更に、リンパ単球浸潤が、血管周囲腔で、及び血管床肥厚で強調された（CD45免疫染色、F）。血管床から出現した材料は、アミロイドタンパク質に典型的な光学特性及び染色（チオフラビンS処置後に黄色い蛍光、E）を伴ってタンパク質Aに関して、極めて免疫反応性であることが判明した（モノクローナル抗体4G8、C）。更に、抗A抗体は、神経原線維変化の非存在下で（データは示していない）、皮質ニューロピイル（neuropilum）を検出した（4G8、矢印、C）。更に、重篤なアストログリオシス及びマイクログリア活性化が、大脳皮質で、及び皮質下白色物質で見出された。バーは、A = 50 μmで表される。他の図は全て、同じ倍率度を有する。D、E及びFは、隣接する区域で実施された。

20

【図8】CSF中の抗A抗体の濃度。A) 健常な対象（CTL、n = 25）、脳アミロイド血管障害（CAA、n = 8）、多発性硬化症（MS、n = 14）、急性期中のCAA関連炎症（apCAA-ri、n = 10）及び寛解期におけるCAA-ri（rpCAA-ri、n = 7）のCSF中の抗A自己抗体の濃度。* p < 0.0001 apCAA-ri対CTL及びMS。§ p < 0.0025 apCAA-ri対CAA。# p < 0.0006 apCAA-ri対rpCAA-ri。値は、平均値 ± 標準偏差として表される。B) apCAA-ri及びrpCAA-ri患者における症状の寛解期の前及び後の抗体の動向の個別的表示（p = 0.0009）。ケース6及び8が図中で示され、症状の自発的寛解がいかなる医薬品処置も伴わずに観察された2人の患者を表している。

30

【図9】健常な対照で見出すことができる平均値に達するまでの各静脈内注射後（矢印）、及びステロイドを用いた経口処置中（線）のCAA-ri患者のCSF中の抗A抗体の経時的な漸減（点線は、健常な対照対象で見出すことができる平均値並びに上部平均値及び下部平均値の95%を表す）。

【図10】急性期中（apCAA-ri）中、及び症状の寛解期後（rpCAA-ri）の脳アミロイド血管障害関連炎症を患う患者（CAA-ri、n = 7）のCSF中のA40、A42、タウ及びP-181タウ濃度並びにレベルの関連経過。A) A40（p = 0.009、apCAA-ri対rpCAA-ri、p = 0.032 rpCAA-ri対CTL）、B) A42（p = 0.015、apCAA-ri対rpCAA-ri、p = 0.002、rpCAA-ri対CTL）、C) タウ（p = 0.004、apCAA-ri対rpCAA-ri、p = 0.012、apCAA-ri対CTL）、及びD) P-181タウ（p = 0.007、apCAA-ri対rpCAA-ri、p = 0.044、apCAA-ri対CTL）。ケース6及び8が図中に示され、症状の自然寛解がいかなる薬理的処置も伴わずに観察された2人の患者を表している（破線は、健常な対照対象で見出すことができる平均値並びに上部平均値及び下部平均値の95%を表す）。

40

【図11】10人のapCAA-riの総集団におけるA40（A、ピアソンr = 0.85、p = 0.002）及びA42（B、ピアソンr = 0.65、p = 0.042）の抗A抗体とリカー（liquor）（CSF）との間での強力な相関の存在の実証。実線及び破線は、それぞれ、回帰線及び95%信頼区間を表す）。

50

【図12】TFPIのCSF値。説明文：健常な対象、脳アミロイド血管障害（CAA、 $n = 8$ ）、筋萎縮性側索硬化症（OND）及びCAA関連炎症（CAA-ri、 $n = 10$ ）のCSF中のTFPI濃度。 $* p < 0.0001$ CTL対CAA-ri、CAA及びAD。値は、平均値±標準偏差として表される。

【図13】タウ、P-181タウのCSF値及びTFPI値を用いた関連相関分析。説明文：AD患者及び健常な対照のCSF中のタウ並びにP-181タウの値（上部の四画）。下部の四画は、TFPIのCSF濃度と、タウ及びP-181タウのCSF濃度との間に現れる相関について報告している（それぞれ、 $p < 0.0051$ 、 $r = 0.47$ 、 $p < 0.0041$ 、 $r = 0.49$ ）。

【図14】apCAA-ri及びrpCAA-ri中の患者のCSF中のTFPI値の動向。説明文：apCAA-ri及びrpCAA-ri患者における症状の寛解期の前及び後のCSF TFPIの動向の個別的表示（ $p = 0.01$ ）。（点線は、健常な対照対象で見出すことができる平均値並びに上部平均値及び下部平均値の95%を表す）。

【図15】図中で示されるように、アルツハイマー患者のCSF中に存在する抗A抗体のレベルを本発明の方法により評価して、遺伝的危険因子APOEε4の患者キャリア（APOE4キャリア）が、自発的に、及びA-DMAT投与後の両方で、APOE4キャリアによるARIAを発症するより大きな傾向を支持して、NON-APOE4キャリア患者（ $2.874 \text{ ng/mL} \pm 3.063$ 、 $p < 0.001$ ）と比較して、より大きな生理学的濃度の自己抗体（ $12.84 \text{ ng/mL} \pm 21.23$ ）を有することが観察された。

【発明を実施するための形態】

【0029】

本発明は、脳脊髄液のサンプル中の抗ベータアミロイドタンパク質抗体の検出用に意図される高感度方法を初めて提供する。

【0030】

本説明の最後まで、「ベータアミロイドタンパク質に対する抗体」とは、文献では、Aベータ、又は例えばAベータ40、Aベータ42、Aベータ43のようなそのアイソフォーム、又はその任意の考え得る切断形態、ラセミ形態若しくは異性体形態（例えば、Aベータ11-42、Aベータ17-42、Aベータ9-42、Aベータ1-28、Aベータ25-35、Aベータ10-20、又はより一般的にはAベータX-40若しくはAベータX-42）、又はそれら各々の各種モノマー、ダイマー若しくはオリゴマー、可溶性形態、不溶性形態、フィブリル形態又はプロトフィブリル形態のような文献中でAベータ又はそのアイソフォームとも称されるベータアミロイドタンパク質の任意の1つの部分を選択的に結合することが可能である任意の抗体を意味する。

【0031】

検出される抗体は、自己抗体、即ち、脳脊髄液が収集された患者の免疫系により生産される抗体、又は例えば患者に投与される治療上の使用のための抗体のような患者の免疫系により生産されない抗体（例えば、ソラネズマブ、ボネズマブ、バビネオズマブ、ガンテネルマブ、BAN2401、BIB037、静脈内投与される免疫グロブリン（IVI G（例えば、ガンマガード、オクタガム、ニューガム（Newgam））のような）であり得る。したがって、検出される抗体は、内因性及び外因性の両方であり得る。

【0032】

分析されるべき脳脊髄液（リカー、脳脊髄液、脊柱髄液（rachidial-spinal fluid）、頭蓋脊柱液（cephalorachidian fluid）（液体）とも称されるか、又は頭文字語CSFを用いる）は、CSF収集に一般的に使用される各種技法に従って得ることができる。すでに利用しているように、本発明による方法は、それぞれ、CSFサンプルの上記抗体の量を、上記抗体を結合することが可能な高分子でコーティングした磁気マイクロビーズを用いて濃縮する工程a）、及びこのようにして得られた濃縮サンプルを、免疫酵素アッセイにより、又はラジオイムノアッセイにより分析する工程b）の2つの工程を含む。

10

20

30

40

50

【0033】

a) 磁気マイクロビーズを用いて濃縮する工程

本明細書中に記載する方法に適した磁気マイクロビーズは、典型的に直径が0.5~500 μ mの様な粒子であり得る。その表面は、ベータアミロイドタンパク質に対して誘導される抗体を結合することが可能な高分子(例えば、プロテインG、プロテインA、ビオチン、ストレプトアビジン、Aベータタンパク質のいずれか1つの部分及び/又はそのアイソフォーム(例えば、Aベータ40、Aベータ42、Aベータ43のような)、又はその任意の考え得る切断形態、ラセミ形態若しくは異性体形態(例えば、Aベータ11-42、Aベータ17-42、Aベータ9-42、Aベータ1-28、Aベータ25-35、Aベータ10-20、又はより一般的には、AベータX-40若しくはA beta X-42)又はそれら各々の各種モノマー、ダイマー若しくはオリゴマー、可溶性形態、不溶性形態、フィブリル形態又はプロトフィブリル形態のような)でコーティングされる。

10

【0034】

高分子によるマイクロビーズのコーティングは、当業者に既知であるように、吸着又は結合により実施することができる。

【0035】

適切なマイクロビーズのタイプは、例えば、Invitrogen Dynal AS DynabeadsプロテインG、プロテインA又はプロテインA/G、MagSiproテインA及び/又はプロテインGビーズ、Millipore磁気ビーズ、Milenyi Biotec MACS(登録商標)テクノロジービーズ、又は上記に記載されるのと同じ特徴を有し、及び手動手順を用いても、全ての考え得るロボット化及び自動化プラットフォーム(例えば、Beckmann(登録商標)、Tecan(登録商標)、IDS(登録商標)、Xyris(登録商標)、Stratek(登録商標)、Hamilton(登録商標)、Roche(登録商標)、PerkinElmer(登録商標)により生産及び/又は販売される)によっても使用されることが可能な任意の他のタイプである。

20

【0036】

本発明のある実施形態では、ビーズとして、アガロースA/Gビーズ又はセファロースビーズも使用することができるが、しかしながらそれらは、自動化プラットフォームで容易に使用することが不可能であり、サンプルの幾らかの部分の考え得る損失を伴って、より少ない濃縮収率を付与し得る。

30

【0037】

ある実施形態では、分析されるべきCSFサンプルの少なくとも200 μ l、例えば400又は500 μ lの容量が、例えば同じ試験チューブ中で、サンプル及び適切な量のマイクロビーズ(例えば、75 μ l)を攪拌下で、サンプル中に存在する抗体をマイクロビーズに結合させるのに適した期間(例えば、30秒、40秒、50秒、60秒)インキュベートすることにより、マイクロビーズ上に吸着させる。

【0038】

吸着の工程後、従来技術を用いて、ピペット若しくは吸引によるように、所定の基質を損失せずに、又は自動化及びロボット化プラットフォームにより、上清を廃棄することが可能であるように、サンプル及びマイクロビーズを含有する試験チューブをマグネット付近に配置させる。上清は、続く免疫酵素アッセイ又はラジオイムノアッセイにおける対照材料として保管及び利用され得る。

40

【0039】

概して、マイクロビーズ上のサンプルの吸着の工程及び上清を廃棄する工程は、従来の技法に従って、洗浄緩衝液(例えば、PBS+ツイーンのような)によるマイクロビーズの1回又は複数の洗浄を先行させることができ、及び/又はそれらを追跡させることができる。

【0040】

上清を廃棄する際、及び望ましい場合には、マイクロビーズを適切に洗浄した際、結合

50

された抗体は、例えば、続く抗体検出のために適切なエピトープを遊離させる必要がある場合に、適切な溶出緩衝液を用いてマイクロビーズから溶出させることができる。

【0041】

マイクロビーズがプロテインA又はプロテインGでコーティングされている場合、溶出緩衝液は、pH3.2の0.1Mクエン酸塩を30~50µl含む容量で構成され得る。サンプルを溶出させる際、酸性pHは、濃塩基性緩衝液（例えば、1Mトリス塩基、pH9）で容易に中和される。中和緩衝液の添加は、溶出相で使用される酸性pHが、濃度が決定されるべきベータアミロイドタンパク質に対して誘導される抗体を変性し得ること、又は続く免疫酵素アッセイ中に偽陽性を発生させ得るそれらの人工産物を創出し得ることを回避するのに重要である。

10

【0042】

マイクロビーズが、ベータアミロイドタンパク質及び/又はそのアイソフォーム（例えば、Aベータ40、Aベータ42、Aベータ43のような）、又はその任意の考え得る切断形態、ラセミ形態若しくは異性体形態（例えば、Aベータ11-42、Aベータ17-42、Aベータ9-42、Aベータ1-28、Aベータ25-35、Aベータ10-20、又はより一般的には、AベータX-40又はAベータX-42）又はそれら各々の各種モノマー、ダイマー若しくはオリゴマー、可溶性形態、不溶性形態、フィブリル形態又はプロトフィブリル形態のような）でコーティングされ、その結果として分析されるべきCSFサンプル中に含有される抗ベータアミロイドタンパク質抗体のみを特異的に結合する代替的な実施形態では、マイクロビーズは、免疫酵素アッセイ又はラジオイムノアッセイを用いた分析の続く工程で、溶出工程を回避して、したがってより迅速で、より高感度で及びより高価でない方法で直接利用することができる。

20

【0043】

磁気マイクロビーズを用いて濃縮したサンプル（同じ事により溶出されるか、又は溶出されない）は続いて、b)免疫酵素アッセイにより、又はラジオイムノアッセイにより分析する第2の工程に付される。

【0044】

免疫酵素アッセイによる分析

上述するような工程a)溶出が実施される実施形態では、上記免疫酵素アッセイは、下記工程を提供する：

30

【0045】

I)ベータアミロイドタンパク質でコーティングした固相を準備する工程、

上記固相は、免疫酵素アッセイで、又はイムノアッセイで従来使用される固相（例えば、ウェルが上記で定義するようにベータアミロイドタンパク質でコーティングされて、1%ウシアルブミン、5%血清及び0.05%ツイーンを有するリン酸緩衝溶液（pH7.4）を用いた処理によるような、同様に従来の方法により背景ノイズを回避するように適正にブロックしたマイクロプレートのような）であり得る。

【0046】

ブロッキング溶液のインキュベーション時間は、当業者により容易に特定可能であり、例えば、約30、40、50、60、90分であり得る。未結合の材料を除去するために、固相は、適切な従来洗浄緩衝液（PBS+0.05%ツイーンのような）で一度又は複数すすぐことができる。

40

【0047】

II)上記固相を、工程a)から得られた濃縮材料とともにインキュベートする工程

工程II)では、磁気マイクロビーズを用いて濃縮したサンプルを固相に添加して、したがって、固相上でのベータアミロイドタンパク質及び/若しくはそのアイソフォーム（例えば、Aベータ40、Aベータ42、Aベータ43のような）、又はその任意の考え得る切断形態、ラセミ形態若しくは異性体形態（例えば、Aベータ11-42、Aベータ17-42、Aベータ9-42、Aベータ1-28、Aベータ25-35、Aベータ10-20、又はより一般的には、AベータX-40若しくはAベータX-42）又はそれら各

50

々の各種モノマー、ダイマー若しくはオリゴマー、可溶性形態、不溶性形態、フィブリル形態又はプロトフィブリル形態)への抗体の結合を可能にする。インキュベーション時間は、当業者により容易に特定可能であり、例えば、約30、40、50、60分、また最大一晩のインキュベーションであり得る。未結合の材料を除去するために、固相は、適切な従来の洗浄緩衝液(PBS+0.05%ツイーンのような)で一度又は複数回すすぐことができる。

【0048】

III)工程II)で得られた固相を、ヒト抗体を結合することが可能な酵素に、又は放射性標識にコンジュゲートさせたタンパク質とともにインキュベーションして、続いてすい

10

いで、上記未結合のコンジュゲート型タンパク質を除去する工程
免疫酵素アッセイが、本発明に従って実施される場合、酵素にコンジュゲートされたタンパク質は、例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)酵素にコンジュゲートされたプロテインA、Hrp酵素にコンジュゲートされたプロテインG、Hrp酵素に、又はアルカリホスファターゼ(ALP)に、又はベータガラクトシダーゼに、又は蛍光標識された分子に、又は任意の種のlqsに選択的に結合することが可能な発光分子(例えば、ルミノール)、更にはlqsを結合し、及び可視UVスペクトルで又は蛍光下で検出可能なシグナルを生じることが可能な任意の試薬にコンジュゲートされた抗体であり得、抗体及びコンジュゲート型タンパク質だけでなく、適切に官能基化されたナノ粒子又はリポソームもまた、利用することができる。

20

【0049】

代わってラジオイムノアッセイが使用される場合は、放射性標識にコンジュゲートされたタンパク質、例えば、I-125、I-131又はI-99にコンジュゲートされたGタンパク質、I-125、I-131又はI-99にコンジュゲートされたA、I-125、I-131又はI-99にコンジュゲートされた抗IgG抗体を利用することができる。

【0050】

したがって、サンプル中に存在する特異的な抗体はそれぞれ、放射性作用物質に結合して、インキュベーションの第2段階中に、抗原-抗体複合体は、沈殿剤により沈殿させてもよく(溶液中の場合)、又は適切な洗浄緩衝液で洗浄してもよい。

30

【0051】

IV)上記コンジュゲート型タンパク質のシグナルを検出する工程

免疫酵素アッセイの場合、過剰の未結合のコンジュゲート型タンパク質を除去するための洗浄後に、続いて標準的な技法に従って定量化することができるシグナルの発生を可能にするために、タンパク質にコンジュゲートされた酵素に基づく従来の手順に従って選択される適切な基質の溶液をウェルに添加する。シグナルは、例えば、酵素のタイプ及び使用される関連基質に応じて、適切なツールによる吸光度又は蛍光読取りにより定量化することができる。シグナル強度は、分析されるべきサンプル中に存在する抗体の量に比例する。

【0052】

ラジオイムノアッセイでは、遠心分離及び上清沈降(settling)後に、又は固相に付着している抗体を用いたRIA若しくはIRMAアッセイの場合での洗浄の工程後に、沈殿物の放射能を、ガンマカウンターによって計数する。放射能強度は、患者から得られるサンプル中に存在する特異的な抗体の濃度に比例する。続いて、抗体濃度は、較正曲線によって定量的に測定することができる。

40

【0053】

ある実施形態では、コンジュゲート型タンパク質は、ホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲートされたプロテインA(A-HRP)であり得る。背景技術で記載される免疫酵素アッセイでは、2つの異なる二次抗体が使用され、一方は、既知の力価を有するサンプルに関するもの(例えば、標準曲線を作成するのに使用されるもの、例えば抗マウスIgG抗体)であり、一方は、未知のサンプルに関するもの(抗ヒトIgG抗体)

50

である。本発明の方法におけるHRPコンジュゲート型プロテインAの使用は、通常マウス起源の既知の力価を有するサンプルに関するもの、及び分析されるべき未知のサンプルに関するもの両方の同じ検出系を有すること、抗体の種特異性により付与される感度の観点での差を防ぐこと、その結果としてヒト起源並びにマウス起源、ラット又は他の種のサンプルで使用可能であるように、上記方法をより万能にさせることの更なる利点を伴う。実際に、HRPコンジュゲート型プロテインAは、ヒト及びマウスIgGの両方に非常に特異的な様式で結合し、2つの異なる二次抗体を有するという問題（その結果として、種々の感度及び種特異性を生じる可能性があり、したがって標準曲線からの未知のサンプル濃度の外挿中に、より信頼性に乏しい結果をもたらす）を防ぐ。更に、プロテインA-HRPの選択は、シグナルを検出する工程IV)で、蛍光放出性基質を使用することを可能する（その結果として、必要となる場合には、例えば、HRPシグナルを増幅する赤外Amplex技術を利用することによって、吸光度放出性基質と比較してより高感度で）。

10

【0054】

本発明はまた、CSFサンプル中の抗ベータアミロイドタンパク質抗体の定量化に関する*in vitro*での方法に関する。

【0055】

CSF中のこれらの抗体の定量化を可能にする方法は、文献では知られておらず、かかる定量化は明らかに、診断及び予後の結果の両方に根本的に関連され、並びにアルツハイマー病及びCAAの処置に関する治療経過をモニタリングするためのものである。

【0056】

本発明の目的はまた、CSFサンプル中の抗ベータアミロイドタンパク質抗体の定量化に関する高感度の*in vitro*での方法であって、

a) 上記サンプルの上記自己抗体の量を、上記自己抗体を結合することが可能な高分子でコーティングした磁気マイクロビーズを用いて濃縮する工程、

b) 工程a)で得られた濃縮サンプルを、免疫酵素アッセイにより、又はラジオイムノアッセイにより分析する工程、

c) 工程b)で使用するのと同じアッセイを用いて、既知の力価を有する抗ベータアミロイドタンパク質抗体を含むサンプルを分析して、関連校正曲線を作成する工程を含む上記方法である。

20

【0057】

工程a)及びb)は、上述の実施形態のいずれか1つに従って実施することができる。

30

【0058】

本発明の方法によれば、工程c)では、ベータアミロイドタンパク質のいずれか1つの部分を選択的に結合することが可能な、既知の力価を有する抗体は、従来技術に従って校正曲線を作成するために工程b)で使用するのと同じ手順に従って分析される。

【0059】

例えば、既知の力価を有する抗体のより濃縮された溶液から開始して、逐次希釈に関連した校正曲線の様々な点を準備することができる。上記抗体は、既知の力価を有し、及びベータアミロイドタンパク質に特異的な、その結果としてベータアミロイドタンパク質の特異的なエピトープに対して誘導されるいずれか1つのモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、免疫学的に活性な抗体フラグメント（例えば、Fab、Fab2、scFv）であり得る。

40

【0060】

ある実施形態では、上記抗体又はそのフラグメントは、ベータアミロイドタンパク質のN-末端又は中心領域（アミノ酸配列1~28の内部のような）に含まれるエピトープに対して誘導させることができ、例えばそれは、そのアミノ酸配列に相当するか、又はアミノ酸1~5、1~16、17~24、13~28に含まれるエピトープを認識することができる。また、C末端領域（例えば、アミノ酸33~42又は33~40に含まれる配列）も認識を受けることができる。校正曲線の作成に使用することができる市販の抗体の例は、4G8、6E10、G2-11、3D6、m266、ソラネズマブ、ボネズマブ、バ

50

ピネオズマブ、ガンテネルマブ、B A N 2 4 0 1、B I I B 0 3 7、静脈内投与される免疫グロブリン (I V I G) (例えば、ガンマガード、オクタガム、ニューガム) である。

【 0 0 6 1 】

本発明の実現に関して、既知の力価を有する抗体は、任意の種に属する抗体、例えば、I g G 2 a 又は I g G b 2 クラスに属するマウス抗体、I g G クラスに属するヒト抗体又はヒト化抗体であり得る。ある実施形態では、このヒト又はヒト化抗体は、クラス I g G 2 a、I g G 2 b 又は O g G 1 のうちの 1 つに属することができる。較正曲線の作成のためのこれらのクラスに属する抗体の使用は、プロテイン A / G がそれらの F c 領域に関してより大きな親和性を有するため、二次抗体としてプロテイン A 又はプロテイン G を利用する場合には特に興味深いことがわかっている。

10

【 0 0 6 2 】

続いて、既知の濃度の抗体を用いて作成された較正曲線を使用して、未知の力価を有するサンプル中の抗体濃度を決定することができる。例えば、種々の濃度で既知の力価を有するサンプルを用いて得られる吸光度又は蛍光シグナルの読取りにより、当業者に既知の従来方法に従って分析される未知の力価の C S F サンプル中の抗体の濃度を外挿するための回帰曲線を作成することが可能となる。

【 0 0 6 3 】

したがって、ある実施形態では、本発明は、アルツハイマー病を患う患者における能動又は受動免疫療法に対する応答をモニタリングする *in vitro* での方法を提供することができる。

20

【 0 0 6 4 】

アルツハイマー病の処置に関する戦略の 1 つは、この疾患を患う患者の能動及び / 又は受動免疫である。能動免疫は、患者への A ベータペプチド (又はその類縁体) の投与を想定するのに対して、受動免疫は、ベータアミロイドタンパク質に対するヒト化抗体の投与を想定している。このタイプの療法で得られる治療上の効果をモニタリングすることが可能であるためには、処置前、処置後及び処置中の C S F 中の自己抗体の量を、極めて正確及び精密に計量することが必要であり得る。

【 0 0 6 5 】

臨床研究では、C S F 中の自己抗体計量は、臨床試験に対する候補物として適切な対象の選択に極めて有用であることが判明し、入院時のより良好な分類、及び試験中の患者自体のより良好なモニタリングを可能にし得る。予め及び / 又は治療上の方法を適用している間にかかる抗体を計量し得ることにより、脳レベル (C S F 中で) それらの薬理学的効果をモニタリングすることが可能となるだけでなく、治療戦略のモニタリングの改善に関する有用な情報を、かかるモニタリングから引き出すことも可能であり、より良好な処置カスタマイゼーション及び安全性を可能にする。かかるカスタマイゼーションは、例えば、C S F 中の抗体濃縮の経過に応じて、治療上の免疫処置の治療投与量を変更することにより実施され得る (今日までのメカニズムは、治療効果に關与するとみなしたが、A R I A のような有害な影響の考え得る出現にも關与するとみなした) 。

30

【 0 0 6 6 】

C S F 中の抗ベータアミロイドタンパク質抗体の検出及び計量は確かに、アルツハイマー病に対する処置の考え得る有効性をモニタリングして、それらの治療上の安全性を増加させる第 1 の基礎工程である。

40

【 0 0 6 7 】

したがって、本発明は、患者からの C S F サンプルから、アルツハイマー病の能動及び / 又は受動免疫処置の、及び一般に例えば A ベータ生産に關与するセクレターゼの阻害剤のような全ての A ベータ - D M T の、又はタウタンパク質に対して取り組まれる療法のモニタリングに關する *in vitro* での方法であって、上述の工程を含む上記方法を提供する。

【 0 0 6 8 】

したがって、本発明によるアルツハイマー病の能動及び / 又は受動免疫処置のモニタリ

50

ングに関する *in vitro* の方法は、例えば上記処置の種々の時点で収集される複数の CSF サンプルに関して実施される本明細書中に記載されるような発明の定量的方法の工程（その実施形態のいずれか1つに従う）を実施することを含む。例えば、サンプルは、免疫処置前、免疫処置中（*n*回）及び/又は免疫処置後に収集することができ、各サンプルに関して本発明の定量的方法により得られる定量化データは、互いと比較することができ、このようにして CSF 中のベータアミロイドタンパク質に対する抗体の濃縮に際して経過を構築する。

【0069】

本発明の定量的方法はまた、脳アミロイド血管障害（CAA及びCAA-riの両方）の診断に関する方法として、同様に例えばそれらのステロイド処置の有効性を評価するための、これらの病理学における治療経過のモニタリング用の有効なツールとしても利用することができる。

10

【0070】

脳アミロイド血管障害関連炎症（CCA-ri）は、特に脳血管Aベータ堆積の観点で、アルツハイマー疾患と多くの側面を共有する稀な病理学である。CAA-riを患う患者において、Aベータに対する自己免疫現象が、Aベータに対する抗体のレベルの考え得る急性上昇、場合によっては致死的上昇を伴って検出され得ることが実証されている（DiFrancescoら、2011年）。したがって、本発明の方法は、これらの対象において、RMNと関連して病理学を診断するのに極めて有用であり、それにより脳バイオプシーのような高侵襲性介入を回避する。

20

【0071】

本発明の更なる目的は、患者のCSFサンプルからの脳アミロイド血管障害関連炎症（CAA-ri）の診断又は治療上のモニタリングに関する *in vitro* の方法であって、上述の実施形態のいずれか1つの工程を含む上記方法である。

【0072】

診断の方法は、決定された濃度値を標準参照値（例えば、健常な個体の有意な組から得られる）と比較する工程を提供することができ、この域値を超えると、疾患が存在することを示している。

【0073】

抗A抗体の標準参照値又は閾（カットオフ）値は、例えば、健常な個体及びCAA-riを患う個体からのサンプルの（統計学的に有意な）組の濃度を作成することにより得られるROC（受信者動作特性）曲線により決定することができる。上記作成により、例えば、30~40 ng/mLの範囲、例えば32、33、34、22、35 ng/mLのような域値が決定された。

30

【0074】

更に、抗ベータアミロイドタンパク質（例えば、ヒト化抗体バピネオズマブのような）によるアルツハイマー病の処置に関する臨床試験は、臨床研究で登録された対象の数名が、治療薬の投与後に血管原性浮腫（VE）を発症したことを強調した。したがって、VEは非常に重症の副作用であるように思われ、高用量の抗体で処置し、APOE-4対立遺伝子キャリアである対象ではより一般的に発生し、それが治療上のプロトコル中止及び再検査を招いた。抗Aベータ抗体投与と、VEとの間の病原性関連を説明するための仮説の1つは、CAA-riに関して同様に記載されるものに類似し得るメカニズムに従って、脳血管Aベータ堆積に対する、特に脳血管損傷に対する傾向を有する患者における異例の免疫応答であるようである。

40

【0075】

したがって、本発明は、アルツハイマー病の能動及び/又は受動免疫処置をモニタリングする方法であって、上述するようにCSF中の抗ベータアミロイド抗体の測定及び定量的比較の工程を含み、CSF中のTFPIもまた測定される上記方法を提供する。

【0076】

上記に類似して、本発明は、CAA及びCAA-riの診断に対する助長の、及びCA

50

A及びCAA - riの処置のモニタリングのための方法であって、上述するようにCSF中の抗ベータアミロイド抗体の測定及び定量的比較の工程、並びにCSF中のTFPIも測定される類似工程を含む上記方法を提供する。TFPIタンパク質は実際に、モニタリングされる患者のCSF中の経時的な増加が、アルツハイマーに対する療法中のVEリスクの増加を示し得る内皮損傷マーカーである。したがって、かかる増加の存在は、上述する極めて危険な副作用に関する警告灯であり得る。

【0077】

CAA及びCAA - riの診断方法はまた、TFPIの決定された濃度値が標準参照値と比較される工程を提供することができ、この域値を超えると、疾患が存在することを示す。また、TFPIの域(カットオフ)値は、例えば、健常な個体及びCAA - riを患う個体からのサンプルの(統計学的に有意な)組の濃度を作成することにより得られるROC(受信者動作特性)曲線により決定することができる。上記作成により、例えば、0.70~0.90 ng/mLの範囲、例えば0.75、0.80、0.82、0.85 ng/mLのような域値が決定された。

10

【0078】

本発明の定量的方法はまた、放射線学的異常(ARIA)の診断又は出現のモニタリングに関する方法として利用することができる。図15及び実験の部で示されるように、患者のCSF中のベータアミロイドタンパク質に対する自己抗体の濃度が、ARIAと一般的に称されるAD及びCAA - riに関連した放射線学的異常の発達に関連することを今回発見した。決定された濃度値を標準参照値(例えば、健常な個体の有意な組から得られる)と比較する工程を提供することができ、この域値を超えると、放射線学的異常(ARIA)が発症していることを示している。特に、上記方法は、より大きなAベータ堆積を有する人々のような高危険性対象、又はApoEイプシロン4遺伝子型キャリアにおいて、又は更には他の危険性要因(例えば、生体内皮損傷マーカーTFPIの濃度の増加)を伴う患者において使用することができる。アルツハイマーのような他の病理学におけるCAA - ri及びARIAの診断の方法の実施形態では、抗A抗体及びTFPIの両方の濃度が決定されて、上述するように域値と比較される。この実施形態では、両方のパラメータをモニタリングすることにより、ROC分析による診断予測及びカットオフの決定により実証されるように、100%感度及び診断特異性を得ることができた。

20

【0079】

CSF中のTFPI計量は、下記工程を含む免疫酵素アッセイ(例えば、ELISAサンドイッチのような)により実施することができる：

30

【0080】

I) ヒトTFPIに特異的な抗体でコーティングした固相を準備する工程

上記固相は、ヒトTFPIの配列全体、代替的配列、切断配列又は一部を認識する抗体でコーティングした免疫酵素アッセイ又はイムノアッセイで従来使用される固相であり得る。

【0081】

免疫後、背景ノイズを回避するために、固相は、1%ウシアルブミン、5%血清及び0.05%ツイーンを有するリン酸緩衝溶液(pH7.4)を用いた処理のような、同様に従来の方法により適正にブロックされる。

40

【0082】

ブロッキング溶液のインキュベーション時間は、当業者により容易に特定可能であり、例えば、約30、40、50、60、90分であり得る。未結合の材料を除去するために、固相は、適切な従来の洗浄緩衝液(PBS+0.05%ツイーンのような)で一度又は複数すすぐことができる。

【0083】

II) 上記固相を、分析されるべきCSFサンプルとともにインキュベートする工程

インキュベーション時間は、当業者により容易に特定可能であり、例えば、約30、40、50、60、90分であり得る。未結合の材料を除去するために、固相は、適切な従

50

来の洗浄緩衝液（PBS + 0.05% ツイーンのような）で一度又は複数すすぐことができる。

【0084】

III) 工程 I I) で得られた固相を、ヒト抗体を結合することが可能な、酵素又は放射性標識にコンジュゲートさせたタンパク質とともにインキュベートして、続いてすすいで、上記未結合のコンジュゲート型タンパク質を除去する工程

ELISA アッセイが、本発明に従って実施された場合、タンパク質は、例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）又はアルカリホスファターゼに（ALP）又はベータガラクトシダーゼのような酵素にコンジュゲートされ得る。

【0085】

IV) 上記コンジュゲート型タンパク質のシグナルを検出する工程

免疫酵素アッセイの場合、過剰の未結合のコンジュゲート型タンパク質を除去するための洗浄後に、続いて標準的な技法に従って定量化することができるシグナルの発生を可能にするために、タンパク質にコンジュゲートされた酵素に基づく従来の手順に従って選択される適切な基質の溶液をウェルに添加する。シグナルは、例えば、酵素のタイプ及び使用される関連基質に応じて、適切なツールによる吸光度又は蛍光読取りにより定量化することができる。シグナル強度は、分析されるべきサンプル中に存在する抗体の量に比例する。

【0086】

ラジオイムノアッセイでは、遠心分離及び上清沈降後に、又は固相に付着している抗体を用いたRIA若しくはIRMAアッセイの場合での洗浄の工程後に、沈殿物の放射能を、ガンマカウンターによって計数する。放射能強度は、患者から得られるサンプル中に存在する特異的な抗体の濃度に比例する。続いて、抗体濃度は、校正曲線によって定量的に測定することができる。

【0087】

ある実施形態では、本発明の方法は、CSF サンプル中に存在するタンパク質TFPI に対する抗体及び抗ベータアミロイドタンパク質抗体の同時定量化を提供する（CO-ELISA アッセイ）。

【0088】

この実施形態では、固相は、ベータアミロイドタンパク質、及びTFPI タンパク質に対して誘導される抗体の両方でコーティングされ、工程 i i i) で利用されるコンジュゲート型タンパク質は、ベータアミロイドタンパク質を結合するIg、及びTFPI の同時読取りを可能にするように種々の波長を保有すべきである。

【0089】

本発明の目的はまた、抗ベータアミロイドタンパク質の抗体の *in vitro* での検出のためのキットであって、上記抗体を結合することが可能な高分子でコーティングした磁気マイクロビーズ、ベータアミロイドタンパク質に対して既知の力価を有する抗体の1つ又は複数のアリコートを含む上記キットである。

【0090】

初めて、CSF サンプル中の抗ベータアミロイドタンパク質抗体を、精密及び超高感度な様式で検出するのに利用することができる有益なツールが提供される。

【0091】

本説明の最後まで、例えば上記で例示されるもののようなベータアミロイドタンパク質を特異的に結合することが可能な任意の抗体が、ここで特許請求されるキット中に含まれ得る。

【0092】

キットは、

- ベータアミロイドタンパク質でコーティングした1つ又は複数の固相支持体、例えば、ウェルがベータアミロイドタンパク質でコーティングされているELISA アッセイ用の1つ又は複数のマイクロプレート、

10

20

30

40

50

- 洗浄緩衝液、ブロッキング溶液、曲線の構築用の標準物質、任意の陽性対照及び陰性対照のような免疫酵素アッセイのための試薬の1つ又は複数のアリコート、
- ヒト抗体及び/又はキット中に含有される既知の力価を有する抗体を特異的に結合することが可能な、酵素にコンジュゲートされたタンパク質の1つ又は複数のアリコートを更に含むことができる。

【0093】

酵素にコンジュゲートされた上記タンパク質は、プロテインA - Hr p、プロテインG - Hr p、ヒト、マウス、ラット免疫グロブリン又は任意の他の種の免疫グロブリンの定常部を特異的に認識することが可能な二次抗体 - Hr p (又は、同じ蛍光性又は発光性タンパク質) であり得る。

10

【0094】

ある実施形態では、キットは、例えば、

- T F P I に特異的な、好ましくはモノクローナル抗体でコーティングした1つ又は複数の固相支持体、例えば、ウェルが上記抗体でコーティングされているE L I S A アッセイ用の1つ又は複数のマイクロプレート、
 - 洗浄緩衝液、ブロッキング溶液、曲線の構築用の標準物質、任意の陽性対照及び陰性対照のような免疫酵素アッセイのための試薬の1つ又は複数のアリコート、
 - T F P I 及び/又はキット中に含まれる既知の力価を有する標準物質を特異的に認識することが可能な、蛍光性又は発光性のいずれかである酵素にコンジュゲートされたタンパク質若しくは二次抗体の1つ又は複数のアリコート
- のようなT F P I タンパク質の免疫酵素計量のための手段を更に含むことができる。

20

【0095】

酵素にコンジュゲートされた上記タンパク質は、Hr pにコンジュゲートされたT F P I を認識する抗体であり得る。

【0096】

ある実施形態では、C S F サンプル中に存在するタンパク質T F P I に対する抗体及び抗ベータアミロイドタンパク質抗体の同時定量化のためのキットは、

- ベータアミロイドタンパク質及びT F P I に特異的なモノクローナル抗体の両方でコーティングした1つ又は複数の固相支持体、例えば、ウェルがベータアミロイドタンパク質、又はT F P I に関して上述した抗体でコーティングされているE L I S A アッセイ用の1つ又は複数のマイクロプレート、
- 洗浄緩衝液、ブロッキング溶液、曲線の構築用の標準物質、任意の陽性対照及び陰性対照のような免疫酵素アッセイのための試薬の1つ又は複数のアリコート、
- ヒトI g 及び/又はキット中に含まれる既知の力価を有する抗体を特異的に結合することが可能な、酵素にコンジュゲートされたタンパク質の1つ又は複数のアリコートを含む。

30

【0097】

キットのこの実施形態は、診断を容易にするために特異的な酵素の濃度を評価することを可能にするだけでなく、T F P I のような炎症性及び内皮損傷パラメータの初期モニタリングも可能にし、それにより、

40

1. 治療上の追跡をモニタリングするために、
 2. 合併症の兆候(時には、致死的でさえ)に先立って、関連の有害な現象に対して予防的に介入するために、
 3. 任意に、薬理学的処置の投与を中断するために、
 4. 非常に特異的な場合、例えばC A A - r i では、場合によっては脳バイオプシーによる研究を回避するために、
- 患者においてカスタマイズされた治療上の介入を可能にする。

【0098】

この説明で報告してきたことをより良好に説明することを目的とした実験及び実施例を、以下で報告する。かかる実施例はいかなる場合でも、この説明及び続く特許請求の範囲

50

を限定するものと解釈されるべきではない。

【0099】

本発明はまた、アルツハイマー病に関する療法及び/又はモニタリングの方法に関し、処置されるべき患者(単数又は複数)からの脳脊髄液のサンプル中の及び/又は本説明に従う処置における抗ベータアミロイドタンパク質抗体の定量化の1つ又は複数の工程を提供し、上記方法は、上記サンプルそれぞれに関して、1つ又は複数の内皮損傷マーカー(例えば、TFPIのような)の濃度が、本明細書中に記載されるCSFに適用される標準的な方法に従って決定される1つ又は複数の工程を任意に含む。

【0100】

脳脊髄液のサンプル中の抗ベータタンパク質抗体及び1つ又は複数の内皮損傷マーカー(例えば、TFPIのような)の定量化の方法に関連して上述したものは全て、本発明の療法及び/又は(予後)モニタリングの方法に当てはまる。

10

【実施例】

【0101】

(例1)磁気マイクロビーズを用いて濃縮するための手順

1)PBS(pH7.4+0.02%ツイーン)で二度、分析されるべき各サンプルに関してプロテインAにコンジュゲートされた磁気マイクロビーズ(Invitrogen Dynal AS Dynabeads(登録商標)プロテインG)75µlを洗浄する。

【0102】

2)洗浄した磁気マイクロビーズへ、患者からのCSF 200~500µlを含むサンプル容量を添加して、攪拌下で室温で40分間インキュベートする。

20

【0103】

3)マグネット中に磁気マイクロビーズを2分間置いて、別の試験チューブ中に上清を任意に保管する(それは、プロセス効率に関する対照として機能を果たす)。

【0104】

4)マグネットを除去して、クエン酸-リン酸緩衝液(pH5+0.02%ツイーン)500µlで洗浄して、二度繰り返す。

【0105】

5)続いて、pH3.1の0.1Mクエン酸30µlを、磁気マイクロビーズに添加することにより、溶出期に移る。

30

【0106】

6)2分間攪拌する。

【0107】

7)マグネット中にチューブを1分間置いて、1Mトリス塩基(pH9)(緩衝溶液)40µlを含有する透明な試験チューブ(Eppendorfポリプロピレン低親和性チューブ)中に上清を即座に移す。

【0108】

8)工程5)、6)を繰り返して、7)で使用したのと同じ試験チューブへ溶出物を添加する(総容量:100µl)。

40

【0109】

9)溶出物100µl全てをELISAに使用する。

【0110】

(例2)Aベータ42タンパク質によるマイクロプレートのコーティング

1)濃度1µg/µlになるように、Aベータ42タンパク質を1Mトリス塩基緩衝液(pH9)中に溶解させる。

【0111】

2)濃度0.01µg/µlになるように、50mM NaHCO₃(pH9.6)中でAベータのコーティング溶液を調製する。

【0112】

50

3) 氷上で1分間超音波処理して、1分間待機して、再び1分間超音波処理する。

【0113】

4) ELISAプレートウェル1つ当たりコーティング溶液100 μ lを添加する(最終濃度:1 μ g/ μ l)。

【0114】

5) 一晩インキュベートする。

【0115】

(例3) 免疫酵素的計量

1) 例2で記載するように実施したコーティングの翌日に、PBS+0.05% Tween (PBST) 200 μ l/ウェルによる3回の洗浄を実施する。

10

【0116】

2) 非特異的 (a s p e c i f i c) 結合を排除するために、PBST中に5%血清及び1%BSAを含む溶液を使用することにより、振動下で室温で1.5時間、ブロッキングを実施する。

【0117】

3) 1)で記載する洗浄工程を繰り返す。

【0118】

4) 一次抗体4G8 (Aベータタンパク質のアミノ酸部分17~24に対して誘導される)を含有する溶液100 μ lを添加して、標準曲線を作る。標準物質は、一次抗体の逐次希釈により実施される。CSF中の抗体計量に関する標準曲線に提唱される範囲は、0.24~0.03 μ g/mlである。ブランクとして使用されるべきウェル中には、PBS 100 μ lのみを添加する。更に、0.1Mクエン酸塩 (pH3.1) 60 μ l + 1Mトリス塩基 (pH9) 40 μ lを含む溶出物に関する更なるブランクが供給される。

20

【0119】

5) 実施例1で濃縮されるようなCSFサンプル100 μ lをウェルへ添加する。攪拌下で4で一晩放置する。

【0120】

6) 1)で記載される洗浄工程を繰り返す。

【0121】

7) 0.2 μ g/mlの濃度でプロテインA-HRPを含有する溶液100 μ lを添加する。攪拌下で室温で2時間放置する。

30

【0122】

8) 1)で記載される洗浄工程を繰り返す。

【0123】

9) ウェル1つ当たりTMB 100 μ lを添加する。暗所で室温で約5~10分間、インキュベートする。

【0124】

10) ウェル1つ当たり、酸性pHを有する溶液(例えば、0.5N HCl) 100 μ lを添加する。

【0125】

11) 450nmで各ウェルの吸光度を読取り、続いてブランク(標準物質も未知のサンプルも添加されなかったウェル)の値を差し引く。標準曲線からの未知のサンプルの外挿後に、初期希釈及び/又は濃縮計数に応じて値を調節する。

40

【0126】

(例4) ELISA標準物質及び試薬の調製

Aベータタンパク質(Aベータ40若しくはAベータ42、又はそれらの各々異なるオリゴマー形態)を含む抗原を、ELISAマイクロプレートのウェルの底部上に吸着(コーティング)させる。第1のインキュベーション中に、既知の濃度のマウス起源の抗Aベータ抗体を含む標準物質、対照及び分析されるべき未知のCSFサンプルを、Aベータを有するウェル中に分配させて、一晩インキュベートさせる。

50

【0127】

続いて、PBS緩衝液による洗浄後に、第1のインキュベーション中に特異的に結合した抗体に関する検出因子として機能を果たすHRPにコンジュゲートされたプロテインA (protA-HRP)を添加する。

【0128】

過剰の未結合のプロテインA-HRPを除去するための洗浄後に、続く吸光度読取りにより、又は場合によっては蛍光読取りにより定量化される染色の発色を可能にするために、基質溶液をウェルへ添加する。実際に、この染色された生成物の強度は、元のサンプル中に存在する抗Aベータ抗体の濃度に正比例し、既知の濃度で標準校正曲線から外挿される。

10

【0129】

(例5)比較試験

本発明者らは、本発明の方法の実施形態と比較して、Dodelら(2001年)若しくはContiら(2010年)の刊行物における一次抗体としてクローンG2-11、又はクローン3D6を使用する公開されているELISAの血漿計量に関する種々の感度を試験した。

【0130】

具体的に、どれが本発明者らのELISA方法に結び付けるのに最良であり得るかを特定するために、クローンG2-11、6E10及び4G8の抗体を一次抗体として試験した。

20

【0131】

既知の濃度(0.25 µg/mL)の抗Aベータ4G8抗体を有する溶液を試験することにより、本発明者らの新たなELISAが、曲線の最高点に関する吸光度の観点で、例えば従来公開されているクローンG2-11の使用と比較して、3.5倍感度が高いことが判明した(1.469対0.426)(図3を参照)。

【0132】

クローン4G8が最良の結果をもたらし、とりわけ新規検出系(プロテインA-HRP)と結び付けた場合に最良であることが判明した。

【0133】

例として、図3では、本発明の方法の実施形態(HRPにコンジュゲートされたプロテインAを使用することにより、右側の欄)と比較して、旧式ELISA(即ち、抗ヤギIgG(抗ヒトIgG(全分子)ペルオキシダーゼ抗体SIGMA#A8667)を用いた検出系を使用することにより)(左側の欄)を用いて、既知濃度の抗体を有する同じサンプルを計量することにより得られる吸光度(OD)に関する結果を示す表が報告されている。

30

【0134】

図4A及び図4Bは、低濃度の抗体を有するサンプルの検出における標準曲線の種々の感度を示す。実際に、本発明者らに記載されるようなマイクロビーズを用いて濃縮することの適切な処置後のAD患者、CAA-ri患者及び対照から得られるCSFの3個の異なるサンプルの計量は、背景技術に記載される方法を使用することにより総合的に有効でないことが判明したのに対して、本発明者らの新規ELISA方法(4G8+protA-HRP)は、非常に感度が高く、及び有効であることが判明した。実際に、CSF中の抗Aベータ抗体の計量に関して「超高感度な」方法としての本発明者らの新規技法の有効性の証拠として、分析した3つのサンプル全てが、標準校正曲線の直線範囲内に完全に収まった。

40

【0135】

更に、図4Cは、典型的な校正曲線に関して、本明細書中に記載される新規ELISA方法が、CSF中の抗Aベータ抗体の計量に関して期待される検出範囲(0.14~0.004 µg/mLの範囲)では、旧式ELISA方法と比較して、現に10倍も感度が高いことを示す。

50

【0136】

実際に、本発明は、 $0.18 \sim 0.03 \mu\text{g}/\text{mL}$ の曲線直線範囲において抗体濃度を検出することが可能な較正曲線を示すのに対して、抗体G2-11を用いる背景技術で記載される旧式ELISA方法は、はるかに高い濃度でサンプルを定量化することが可能であることがわかり、したがってCSF中では有効ではない。

【0137】

吸光度の観点で、 $0.134 \mu\text{g}/\text{mL}$ の同等濃度では、背景技術で記載されるELISA方法で検出可能な 0.142 と比較して、本発明者らの新規ELISA方法で検出可能なOD値は 1.072 であり、即ち約10倍感度も高いことが推論され得るのに対して、 $0.134 \mu\text{g}/\text{mL}$ よりも低い標準物質全てに関しては、先の方法は、いかなる値もブランクと識別することが不可能であった。

10

【0138】

更に、本発明者らは、マトリックス効果により付与される本発明者らの考え得る干渉を試験及び除外した。実際に、未処理のCSF及びマイクロビーズを用いた濃縮後のCSFは、Aベータタンパク質が吸着されず、及びいずれにせよブランクに匹敵するELISAウェルの吸光度と一致した吸光度値を戻した。

【0139】

同様に、AベータコーティングによるHRP-コンジュゲート型プロテインAの干渉の欠如に関して試験して、確認した。更に、予めの富化段階は、背景低減の観点でも有用であることが判明し、低い値を「ブランク」として明らかに戻した（旧式ELISAを用いた場合の 1.11 と比較して、吸光度 0.077 ）。次に、正常圧水頭症のような対照対象のCSF中の抗Aベータ42自己抗体を計量するのに不可欠な最小容量（ここで、抗体濃度は、生理学的に最も低い予測可能なもののうちの1つであるべきである）を試験した。対照における濃縮段階に利用されるCSF容量は、 $400 \sim 500 \mu\text{l}$ であった。

20

【0140】

続いて、上記初期CSF容量 $500 \mu\text{l}$ を、プロテインAとコンジュゲートされた磁気マイクロビーズ $75 \mu\text{l}$ で処理して、 0.1M クエン酸溶液（ $\text{pH} 3.2$ ） $60 \mu\text{l}$ で溶出させて（CSF Ig特異的富化の段階）、Ig自然状態を保存するために、緩衝溶液（ 1M トリス塩基、 $\text{pH} 9$ ） $40 \mu\text{l}$ を即座に添加した。次に、得られた容量全体（ $100 \mu\text{l}$ ）を、本発明者らが発明した超高感度ELISA計量に利用した。

30

【0141】

したがって、濃縮計数により調節された対照対象におけるAベータタンパク質に対する自己抗体の平均濃度は、約 $16 \text{ng}/\text{ml}$ であることがわかった。

【0142】

（例6）ある実施形態による方法の精度パラメータ及び回収試験

アッセイ内精度パラメータ、即ち、繰り返される読取りに関して匹敵する値を戻す同じマイクロプレート内部の可変性を、先の例1、例2及び例3で記載される手順の正確な再現によりアッセイした。

【0143】

アッセイ内精度（3人の対象に由来するCSFの3つの異なるサンプルの三重での計量により得られる平均値）= $CV = 3.27\%$ 。

40

【0144】

アッセイ間精度パラメータ、即ち異なる日数で実施した複数のアッセイ中の繰り返される読取りに関して匹敵する値を戻す方法可変性を、先の例1、例2及び例3で記載される手順の正確な再現によりアッセイした。

【0145】

アッセイ間精度（同じ患者に由来するCSFの同じサンプルの、5つの異なるELISAで7回繰り返した計量により得られる平均値）= $CV = 3.69\%$ 。

【0146】

更に、磁気マイクロビーズを用いて濃縮する単独工程のアッセイ内精度は、連続した日

50

数で実施した同じサンプルの3つの異なる富化を用いて試験し(即ち、実施例1で記載される手順の正確な再現により)、-20で凍結させて、続いて実施例2)及び3)で記載する手順の正確な再現後に同じELISAで計量した(=CV 2.33%)。

【0147】

回収試験(例1)、2)及び3)で記載されるように全ての富化工程に付されるCSF 500µl中の0.125µg/mlの抗体4G8の添加(スパイク)により実施される)は、98%であることがわかった。

【0148】

陰性対照として、例1)「磁気マイクロビーズを用いて濃縮するための手段」の3)で記載されるように得られる上清(廃棄)を試験した。その手順は、0に等しい濃度値、即ちブランクに等しい濃度値に毎度戻す実施した試験全て(20回を超えて繰り返した試験)に関して100%有効であることがわかった。

10

【0149】

最終的に、検査の特異性も、ELISAプレートの幾つかのウェルを、標準校正曲線に利用されるのと同じ濃度で(ここでは、Aベータ42は、組換えAベータ42(Anaspect)、即ち、Aベータ42タンパク質を作り上げるのと同じアミノ酸を正確に含む)、しかし、オープンオーダーでは1Mトリス塩基緩衝液(pH9)中でコーティングすることにより試験した(上記を参照)。上述の試験により、Aベータ40及びAベータ42に対して本発明者らの方法の100%特異性という証拠として、上記ウェルではシグナルは検出不可能であることが実証された。

20

【0150】

(例7)AD患者からのCSFサンプル中のTFPIの免疫酵素アッセイによる測定
この特定の実施例では、TFPIに特異的なマウス抗体でコーティングした96ウェルプレートを含む免疫酵素アッセイELISA(Quantikine Human TFPI ELISA-R&D Systems)を使用した。例えばTFPIの種々の切断形態又はアイソフォームに特異的な種々のELISAは、社内で構築され得る。具体的に、本キットは、TFPI計量に関しては市販されていない。したがって、その特異性及び感度(結果は示していない)を承認した後に、本発明者らは、製造業者により示されるプロトコルを修飾することにより下記の通りに進めた:

【0151】

1)供給される標準物質を、標準曲線を構築するのに供給される適切な希釈剤で希釈して(製造業者の指示に従って)、その後、その希釈剤は、未知の値のサンプルを外挿するのに役立つ。

30

【0152】

2)キット中に供給される希釈剤緩衝液100µlを各ウェル中へ添加した。

【0153】

3)1:2で希釈した標準物質又はサンプル(CSF)50µlを即座に添加した。

【0154】

4)室温で2時間インキュベートした。

【0155】

5)洗浄緩衝液300µlを用いて、4回の洗浄を行い、プロットング紙上にプレートを逆さにして、毎度液体を完全に排除した。

40

【0156】

6)二次抗体(コンジュゲート、キット中に供給される)200µlを添加して、室温で120分間インキュベートした。

【0157】

7)洗浄緩衝液300µlを用いて、4回の洗浄を行い、プロットング紙上にプレートを逆さにして、毎度液体を完全に排除した。

【0158】

8)基質溶液(キット中に供給される基質溶液)200µlを添加して、暗所で室温で

50

30分間インキュベートした。

【0159】

9) 停止溶液50 μ lを各ウェルへ添加した。色彩は青色から黄色になった。即座に、450nmでの吸光度を読み取った。続いて、サンプル吸光度に2(サンプルを希釈した係数)を乗じた。

【0160】

8 CAA-ri発症における抗A 自己抗体関与に関連した研究

8.1 材料及び方法 患者の登録

CAA-riを患う10人の患者(イタリア人7名、ブラジルから2ケース、日本から1名)に由来するCSFサンプルを、国際共同研究を通じて募集した。文献中で既知の臨床的及び神経画像の特徴に基づいて(但し、抗A 自己抗体のCSF濃度に関しては盲検で)、推定CAA-ri診断を実施した。

10

【0161】

CAA-ri患者は全て、神経錯乱、痙攣及び限局的神経障害を含む急性又は亜急性神経学的症状を示した。急性期中に評価される脳磁気共鳴は、血管原性浮腫(FLAIRシグナス)及び大脳皮質全体にわたってより多く散在したマイクロビーズの存在(T2*-GRE)と一致した白質炎症の兆候を示した。更に、ケース5及び6はまた、脳血管周囲のA 堆積及び神経炎症の兆候を示す定位脳バイオプシーにより確認された。APOE遺伝子型分析は、各募集センターで採用される標準的な手順に従って、全ての対象に対して実施した。

20

【0162】

CAA-ri患者からのCSFサンプルは、疾患の急性期中に収集され(apCAA-ri)、即座に-20で保管した。7人の患者からのCSFアリコート、ステロイド処置後にも収集した(rpCAA-ri)のに対して、ケース6及び8に関しては、CSFサンプルは、症状の自然寛解後にも、したがって任意の薬理的処置の非存在下で収集した。

【0163】

脳アミロイド血管障害の存在に関するが、神経炎症の兆候を伴わない対照対象として、本発明者らは、非炎症性CAA(ボストン基準、Knudsen 2001年に従って診断した)を患う8人の患者からCSFを収集した。自己免疫及び炎症性であるが、CAAに相関される疾患の対照群として、本発明者らは、McDonaldの基準に従って診断される陽性のオリゴクローナルバンド(OCB+)を伴う多発性硬化症(MS)を患う14人の未処置の(naive)患者を抱えた。非CAA、非炎症性対照として、本発明者らは、12人の正常圧水頭症対象、及び転換性障害を伴う13人の患者に由来する25個のCSFを包含した。

30

【0164】

CSF収集、並びにA₄₀、A₄₂、タウ及びP-181タウ計量モード

CSFは全て、L4/L5又はL3/L4椎骨レベルでの腰部穿刺により収集して、ポリプロピレンチューブ中にそれぞれ0.5mLアリコートへと分割して、分析時まで即座に-20で保管した。CSF中に存在する細胞、グルコース及び総タンパク質の計数を評価した。A₄₀、A₄₂、タウ及びP-181タウ濃度は、製造業者の指示書に従って、市販のELISAキット(それぞれ、Millipore及びInnogenetics)により評価した。

40

【0165】

抗A 自己抗体計量

自己抗体計量に関して、本明細書中に記載する脳脊髄液のサンプル中の抗ベータアミロイドタンパク質抗体の定量化に関する*in vitro*での方法が使用された。上記方法により、A₄₀に対して自然に生産される抗体の濃度は、磁気ビーズを用いた前富化、続くELISA方法による抗体計量により評価した。ELISA技法の感度を増加させるために、総IgG含有量を富化するように、磁気ビーズを用いた前処理により、サンプルを濃

50

縮した。簡潔に述べると、CSF約200~300 μ lを、プロテインGとコンジュゲートさせた磁気ビーズ(DynebeadsプロテインG)とともに、連続攪拌下で室温(r.t.)で40分間インキュベートして、0.1Mクエン酸塩(pH3.1)によるわずかな酸性化により溶出させた。磁気富化後に、本発明者らの新規ELISA方法により、溶出物を直接試験した。96ウェルプレートのウェルは、50mM炭酸緩衝液(pH9.6)中に溶解させたA42(Phoenix Pharmaceuticals、ベルモント、CA、USA)(1pg/ウェル)で、4で一晚コーティングした。次に、プレートをPBS/0.05% Tween20(PBST)で洗浄して、PBST中の5% FCS、1% BSAで室温で90分間ブロックして、再度洗浄した。標準曲線の生成のため、マウスで生産され、及びAベータのN末端に関して選択的な抗ヒトA42抗体(クローン4G8、Covance)を、逐次希釈により種々の濃度(0.4 μ g/ml~0.03 μ g/ml)で利用した。続いて、サンプル及び標準物質を負荷した後、ELISAプレートを4で一晚インキュベートした。翌日、ウェルをPBSTで洗浄して、HRPコンジュゲート型プロテインA(Millipore)とともに、室温で2時間インキュベートした。次に、プレートをTBSTで再び洗浄して、暗所で10分間TMBとともにインキュベートした。停止溶液の添加後に、450nmでの吸光度を、マイクロプレートリーダー(BIORAD Model 550)を使用することにより読み取った。自己抗体濃度は、標準曲線から外挿した。

10

【0166】

サンプルは全て、盲検で、診断を知る操作者なしで分析した。磁気ビーズによる富化のプロセスの品質管理として、ビーズによるIgGの総欠乏を確認するために、上清(プロセス廃棄物)全てを試験した。ヒトAに対するELISA特異性は、ペプチド1 μ gのコーティングにより、組換えA1~42ペプチド(ANASPEC、フレモント、CA、USA)に対する交差反応性の排除により検証された。CSFマトリックス中の抗A抗体回収は、ELISAの標準曲線を生成するために使用される種々の濃度の濃度の市販の抗体4G8のスパイク試験により評価して、98%回収率が得られた。アッセイ内精度は、変動計数(CV)3.3%であることが判明し、アッセイ間精度は、CV3.7%であることが判明した。

20

【0167】

統計学的分析

統計学的分析は、GraphPad-Prismソフトウェア(Prism 3.0、GraphPad Software, Inc.)を用いて実施した。群間の差を評価するために、一元配置分散分析検定を使用した後、チューキー多重比較検定を行うか、又は対応のないt検定を、正規性検定を通過したデータ群の分析に使用した。対応のあるt検定を使用して、臨床的寛解前及び後の抗体濃度における差を評価した。p<0.05を有する値は有意であるとみなした。連続変数は、平均値 \pm 標準偏差(MEAN \pm SD)として表される。

30

【0168】

8.2 結果、患者の特徴及び病理組織学的分析

年齢は、異なる群の対象間で同等であることがわかった：健常な対照(59.0歳 \pm 20.0)、CAA(59.6歳 \pm 11.4)、MS(52.5歳 \pm 12.2)、CAA-ri(68.5歳 \pm 5.6)。男性/女性の数は、健常な対照12/13、CAA5/3、MS11/3、CAA-ri3/7であることがわかった。

40

【0169】

CAA-ri患者の社会人口的分析を表1に報告する一方で、全てのCAA-ri患者の臨床的特徴及び採用した薬理学的処置をこれ以降で報告する。

【0170】

ケース1：進行性行動障害及び認知症。メチルプレドニゾロン1g/日で5日間処置。わずかな有益性を伴う。

【0171】

50

ケース 2：進行性認識低下及び全身発作。メチルプレドニゾン 1 g / 日で 5 日間、続いて 1 g / 週で 7 週間処置。緩やかな臨床的改善を伴う。

【 0 1 7 2 】

ケース 3：記憶の進行性喪失及び気分障害。デキサメタゾン 2 4 m g / 日で 2 0 日間処置。これまでに記載されるように顕著な臨床的改善を伴う。

【 0 1 7 3 】

ケース 4：急速及び進行性左側不全麻痺及び見当識障害。デキサメタゾン 2 4 m g / 日で 1 ヶ月間処置、続いて肺炎の発症に起因して中断。その後、感染合併症により死亡。

【 0 1 7 4 】

ケース 5：部分的同側性発作を伴う進行性左側片側症候群。最初はメチルプレドニゾン 1 g / 日で 3 日間、6 回処置、続くメチルプレドニゾンによる経口療法。これまでに記載されるように顕著な臨床的改善。

【 0 1 7 5 】

ケース 6：進行性認識低下及び精神錯乱。いかなる薬理的処置も伴わない症状の自然寛解。

【 0 1 7 6 】

ケース 7：緩やかな一過性認識低下。いかなる薬理的処置も伴わない症状の自然寛解。

【 0 1 7 7 】

ケース 8：一過性精神錯乱。いかなる薬理的処置も伴わない症状の自然寛解。

【 0 1 7 8 】

ケース 9：一過性精神錯乱及び全身発作。プレドニゾン 8 0 m g / 日で 1 0 日間処置。症状の寛解を伴う。

【 0 1 7 9 】

ケース 1 0：進行性認識低下及びパーキンソン症。デキサメタゾン 1 2 m g / 日で 1 5 日間処置、続いてもう 2 週間、漸減。いかなる有意な改善も伴わない。

【 0 1 8 0 】

【 表 1 】

表 1. CAA-ri 患者の社会人口的特徴及び臨床的特徴

患者 #	性別 (M/F)	年齢 (a.o.)	APOE	国	処置	rpCAA-ri CSF 再収集
1	F	68	ε3/ε4	ブラジル	I.V:ステロイド	あり
2	M	62	ε3/ε3	ブラジル	I.V:ステロイド	あり
3	M	68	ε4/ε4	イタリア	I.V:ステロイド	あり
4	F	76	試験せず	イタリア	I.V:ステロイド	あり
5	M	56	ε3/3ε	日本	I.V:ステロイド	あり
6	M	71	ε3/3ε	イタリア	処置なし	あり
7	M	72	ε4/ε4	イタリア	処置なし	なし
8	F	72	ε3/3ε	イタリア	処置なし	あり
9	M	71	ε4/ε4	イタリア	経口ステロイド	なし
10	M	67	ε4/ε4	イタリア	I.V:ステロイド	なし

【 0 1 8 1 】

A P O E、即ちアポリポタンパク質 E ; a . o .、疾患発症時の年齢 ; r p C A A - r i、寛解期の脳アミロイド血管障害を伴う患者。

【 0 1 8 2 】

10

20

30

40

【表 2】

以下で報告する表2は、CAA-ri 患者の社会人口的特徴及び臨床的特徴をより詳細に示す。

ケース#	年齢 性別	APOE	臨床的側面		神経放射線学的側面					
			急性期 (発症から LQR 収集)	処置	寛解 (発症から LQR 収集)	急性期			寛解	
						ARIA-E (FLAIR)	C.E.	ARIA-H (T2*-GRE)		ARIA-E (FLAIR)
1	68/F	ε3/ε4	気分障害、認識減衰、動揺 (10 m.)	MPS 1g/d IV 5 d	認識減衰及び動揺の低減 (11 m.)	なし	> 70	ほとんど 低減せず	なし	変化なし
2	62/M	ε3/ε3	認識減衰、幻視、 GTC クリーゼ (6 m.)	MPS 1g/ IV 5 d	認識減衰、幻覚及び クリーゼの低減 (7 m.)	なし	> 130	ほとんど 低減せず	なし	変化なし
3	68/M	ε4/ε4	記憶喪失、気分障害 (4 m.)	DMX 24 mg/d IV 20 d	記憶喪失及び気分障害の低減 (7 m.)	なし	> 200	低減	なし	変化なし
4	76/F	N/A	左側半身麻痺、認識減衰 (2 m.)	DMX 24 mg/d IV 30 d	半身麻痺及び認識減衰の ほぼ全体的な寛解 (4 m.)	あり、 軟髄膜	26	非常に低減	なし	変化なし
5	56/M (バイオプシー)	ε3/ε3	部分的クリーゼにおける 左側知覚鈍麻 (3 m.)	MPS 1 g/d IV 3 d-6回	過敏性障害及びクリーゼの寛 解 (7 m.)	あり、 軟髄膜	なし	非常に低減	なし	なし
6	71/M (バイオプシー)	ε3/ε3	認識障害及び精神錯乱 (5 m.)	なし	認識障害及び混乱のほぼ 全体的な寛解 (8 m.)	あり、溝 軟髄膜	N/A	非常に低減	なし	50
7	72/M	ε4/ε4	認識減衰 (2 m.)	なし	認識減衰のほぼ全体的な寛解 (N/A)	1つのみ、溝	55	非常に低減	なし	変化なし
8	72/F	ε3/ε3	GTC クリーゼにおける 穏やかな認識減衰 (2 m.)	なし	認識減衰のほぼ全体的な 寛解、クリーゼ消失 (5 m.)	なし	50	ほとんど 低減せず	なし	変化なし
9	71/M	ε4/ε4	GTC クリーゼ及び 一過性認識減衰 (1 m.)	PRD 80 mg/d 経口 15 d	認識減衰のほぼ全体的な 寛解、クリーゼ消失 (N/A)	最小、 軟髄膜	> 500	低減	なし	変化なし
10	67/M	ε4/ε4	見当識障害、認識減衰、 断節言語、表情豊かな顔 (3 m.)	DMX 32 mg/d IV 15d	行動的症候の低減、変化の ないハイパーキンソン症候 (N/A)	顕著、 軟髄膜	10	低減	なし	変化なし

病理組織学的分析

図6で報告するように、CAA-ri診断は、2人の患者において免疫組織学的に確認された。免疫抑制剤で処置していない患者であるケース#6に関して、脳血管周囲のA堆積及びCAA-riに典型的な神経炎症の兆候の存在が確認された。ケース#5は、Sakaguchiら(2010年)で過去に報告されているように、バイオプシー分析におけるCAA-riの病理学的写真の存在がすでに確認されている。

【0184】

抗A 自己抗体のCSF計量

図8aで示されるように、急性期中のCAA-riを患う患者のCSF中の抗A 自己抗体濃度(52.8 ng/mL ± 21.9)は、健常な対照(18.1 ng/mL ± 5.7、 $p < 0.0001$)、非炎症性CAA対照(24.0 ng/mL ± 6.6、 $p < 0.0025$)及びMS患者(19.7 ng/mL ± 2.5、 $p < 0.0001$)と比較して有意に増加することが判明した。更に、CAA-ri患者の自己抗体の濃度は、病理学的寛解期後に正常な値(即ち、対照に匹敵する)に戻ることが判明した(14.5 ng/mL ± 8.8、 $p < 0.0006$ (apCAA-riに対して))。対照群とCAA又はrpCAA-riの間には、統計学的に有意な差は出現しなかった(図8a)。更に、ステロイド療法処置後、及び症状の自然寛解後(即ち、処置なしで)の両方で、抗体濃度の同じ低減が観察されたという事実は注目に値する。実際に、ケース1~5は、(静脈内)ステロイド処置後に抗体低減を示したのに対して、ケース6及び8に関しては、抗体濃度の減少は自発的であることがわかった。図8bは、ケースごとに示されるCSF中の抗体の濃度の寛解前/後の減少の特定の傾向を示す。

10

20

【0185】

ステロイド処置中の抗A 抗体の時間経過

脳バイオプシーにより診断が確認された患者#5における抗A 抗体の濃度の変化の時間経過をモニタリングした。図9で示されるように、抗体濃度は、疾患の急性期中の第1の計量と比較して、対照対象で検出可能な濃度レベルに到達するまで、ステロイドの各IV投与後に進行性低減を示した。各CSF収集に対して状況から得られる本発明者らのMRI研究を同様に確認した場合に、抗体低減はまた、臨床像の並行的な改善に続く。

【0186】

A 40、A 42、タウ及びP-181タウの動向

apCAA-ri及びrpCAA-ri患者におけるA 40、A 42、タウ並びにP-181タウのCSFプロフィールを比較した。apCAA-ri群におけるA 40及びA 42濃度は、rpCAA-ri群と比較して有意に高いことが判明し(それぞれ、2107.0 pg/mL ± 446.4対1202.0 pg/mL ± 618.3、 $p = 0.009$ 、及び640.0 pg/mL ± 338.3対234.5 pg/mL ± 168.8、 $p = 0.015$)、健常な対照で検出可能なレベルに達し(それぞれ、1864.0 pg/mL ± 669.2、 $p = 0.032$ 、及び747.0 pg/mL ± 342.2、 $p = 0.002$ (rpCAA-riに対して))、また文献中に存在するデータと合致した。apCAA-ri患者におけるタウ(335.9 pg/mL ± 312.7)は、図5bに示されるように、rpCAA-ri(85.2 pg/mL ± 70.0、 $p = 0.0041$)及び健常な対照(131.4 pg/mL ± 115.4、 $p = 0.012$)と比較して高いことがわかった。apCAA-ri期中のP-181タウ(47.0 pg/mL ± 30.5)は、rpCAA-ri(22.8 pg/mL ± 7.6、 $p = 0.007$)及び対照(29.0 pg/mL ± 16.1、 $p = 0.044$)と比較して高いことがわかった。apCAA-ri及びrpCAA-ri中のそれぞれ個々の患者に関するA 40、A 42、タウ並びにP-181タウの濃度の動向を、図10a、10b、10c及び10dで報告する。

30

40

【0187】

抗A 抗体の濃度と、それぞれA 40及びA 42のCSFレベルとの間の相関関係

apCAA-riにおける相関分析は、図11で表されるように、抗体の濃度と、A

50

40 ($r = 0.85$ 、 $p = 0.002$) 及び A 42 ($r = 0.65$ 、 $p = 0.042$) の循環形態との間で明白な相関を示した。

【0188】

アルツハイマー対象のCSF中の自己抗体の生理学的レベル

図15で示されるように、アルツハイマー患者のCSF中に存在する抗A抗体のレベルを評価して、遺伝的危険因子APOE4の患者キャリア(APOE4キャリア)が、自発的に、及びAベータ-DMT投与後の両方で、ARIAを発現するそれらのより大きな傾向を支持して、APOE4非キャリア患者($2.874 \text{ ng/mL} \pm 3.063$ 、 $p < 0.001$)と比較してより高い生理学的濃度の抗体を有する($12.84 \text{ ng/mL} \pm 21.23$)ことを観察した。

10

【0189】

8.3 考察

CAA-riの原因病理論は依然として未知のままであるが、炎症プロセスを招くメカニズムは、CNS中に存在するタンパク質Aに対する自己免疫反応に続発するようである。散発的な観察は、これらの観察が個々の臨床ケースのみで行われ、及び抗A抗体の濃度の計量は広い誤差の余地がある旧式の方法で実施されたにも関わらず、A堆積部位における特異的CD4+T細胞の動員及びCSF中の抗A抗体の増加を伴って、この仮説を裏付ける傾向にある。

【0190】

近年、ADにおいても、同様の推測が進んでいるが、この病理学でさえ、自己抗A抗体の計量は、乏しく及び相反する結果を招いており、まさにCSF中の抗体計量における技術的な実験の困難性により、主に血漿レベルに制限されている。現に、AD患者における抗A自己抗体の計量は、ある著者らに関しては低減されたことが判明しており、他者らに関しては変化がないことが判明し、更には別の研究では増加したことが判明している。上述するように、この相反する結果の主な問題は、上述の研究の設計及び力に関連した問題以外には、ヒトCSF中のこれらの抗体の非常に低濃度に起因した。

20

【0191】

抗体の濃度及び計量に関して本明細書中に記載される方法により、本発明者らは、10人の患者を含むケース記録において、CAA-riの過程でこれらの抗A抗体の直接的な関与を確認するのに初めて成功した。更に、抗体濃度が、臨床的及び放射線学的寛解期中に、「正常である」とみなすことができるレベル、即ち対照中に存在するレベルに匹敵するレベルに達するまで、健常な対照対象、MS対象及び非炎症性CAAを患う患者と比較して、疾病の急性期中に現に増加することを本発明者らは実証した。

30

【0192】

更に、ステロイド処置中に抗A抗体の時間経過を追跡することにより、疾患の急性期の決定における抗A抗体の濃度の上昇の特別な役割の更なる証拠として、本発明者らは、療法後だけでなく、自然寛解後にもその減少を実証した。この事象は薬理的処置の非特異的な効果に続発されず、疾患進行に厳密に相関されることを、本発明者らが決定的に証明し得るように、このことは特に関連がある。この証拠は、OCB+MSにより表される非CAA相関自己免疫及び炎症性疾患を患う患者において抗A抗体の増加の非存在により更に支持される。

40

【0193】

全体として、本明細書に開示されるデータは、CAA-riの病因は、抗A自己抗体により直接媒介されるAタンパク質に対する特異的な自己免疫プロセスにより引き起こされるという概念を強力に支持している。

【0194】

更に、同じ病原メカニズムは、バピネオズマブと称されるAに対して誘導されるモノクローナル抗体を用いた臨床試験で登録したAD患者の約5~10%で見出すことができる可逆性血管原性浮腫(進行中に治療上のプロトコルの中断さえも伴う有害な影響)の決定において基本となり得る。したがって、ARIA-E(血管原性浮腫を示唆するアミロ

50

イド関連放射線学的（画像）異常）と称されるシーケンスを用いたMRI研究により得られる最近の証拠により、パピネオズマブで処置した患者の最大17%が臨床的相関物の非存在下でさえ、並びに治療投与量及び血管危険因子APOE 4の存在に直接関係して、VEの兆候を示すことが強調された。

【0195】

支持して、Schroeterらは、PDAPPマウスにおける受動免疫が、微小出血の発生率と厳密に関連し、血管周囲レベルで限局的A β 堆積に限定されることを更に実証した。この現象がどのようにして、CAAの度合いに密接に関連し得るか、及び抗A β 抗体の用量の濃度により調節され得る（及び、調節可能である）ことが明らかなのである。このことは、「安全である」とみなすことができる値内でその濃度を維持することが可能な、投与される抗A β 抗体の濃度の適切な調節が、VE（ARIA）及び内皮損傷のような列挙した有害な影響を被ることなく、脳及び脳血管レベルでのA β 堆積を排除し得るか、又は少なくとも遅延し得ることを、このことは意味し得る。

10

【0196】

更に、AD及びCAAにより共有される病原的影響は、パピネオズマブを用いた臨床試験中のAD患者のCNSからのA β タンパク質の実証されるクリアランスにより強調され、実質堆積形態及び/又は血管形態から循環形態までの、特に処置の第1期中及びアミロイド斑の完全消失前の大規模ドレナージ（drainage）を示唆した。このことは、本発明者らが、CAA-riを患う患者において観察したことと完璧に合致しており、ここでは、A β 40及びA β 42の循環レベルが、健全な対照において検出可能なレベルに、及びapCAA-ri対象に匹敵することが判明した一方で、上記レベルは、更にAD患者において一般的に検出可能な濃度に達するまで、疾患の寛解期中に有意に低減されるように戻る。同様に、軸索変性用のマーカー（タウ及びP-181タウ）は、抗A β 自己抗体の劇的な増加とともに、CAA-riで増えることがわかり、続いてrpCAA-riでは健全な対照の範囲内に戻る。このことは、抗A β 抗体が、単にCAA-riの急性期中の主な関与物質（actor）であるだけでなく、CSF中のA β 40及びA β 42のレベルの増加は、かかる抗体が作用して、斑及び/又は血管からA β を除去するメカニズムであるが、アミロイドタンパク質のレベルと抗体自体のレベルとの間で検出可能な強力な相関により更に支持されるメカニズムであるようであることを決定的に証明している。更に、ハプロタイプAPOE 4の患者キャリアの高い罹患率は、ADに関してもこれまでに記載されているように、内皮損傷に対する傾向に対するこれらの患者のより大きな感受性を更に強化する。A β に対する受動免疫に関して進行中の臨床試験で向けられた高い期待を考慮して、考え得る最も安全及び最も有効な様式で臨床試験の有益な効果全てを保証するためには、CAA及びADにより共有される病原性メカニズムのより良好な理解が基本である。この状況で、CAA-riは、パピネオズマブによる処置中にVEを示したAD対象で検出可能な病態生理学的メカニズムの自発的ヒトモデルを表し得る。

20

30

【0197】

本発明者らのデータは、CAA-ri中に現れる炎症反応に基づく病原性メカニズムの理解、開示、更にはアミロイド前駆物質タンパク質の異常プロセッシング並びにCAA及びADのようなCNS中のA β 堆積に相関される全ての病理学の処置に対する興味深い視点への有意な工程を表す。続いて、CSF中の抗A β 抗体の計量に関する本発明者らの新規方法から予測できる結果は、これらの病理学の基礎となる病原性メカニズムの研究に関しての、及び新たなアミロイド修飾療法の有効性をモニタリングするための次世代の及び到達可能なモデルの確証を導き得る。

40

【0198】

更に、本発明者らの考察を発端として、抗アミロイド抗体の計量（本発明者らが発明した技法に従って）と、関連MRIデータ（ARIA特定に適した配列を用いて）とを相関させ、またベータアミロイドタンパク質の堆積をPETと、例えば患者の脳におけるC11ピッツバーグ化合物Bに対するPETデータと相関させる今後の研究を推測することが可能であり、それにより脳ベータアミロイドタンパク質の除去及び堆積に関するin vivo

50

i v oでの有意な考察を直接得る。

【0199】

最終的に、C A A - r iの最終的な診断が依然として、脳バイオプシーのような高侵襲性及び危険な方法の使用を必要とするため、C S F中の抗A 自己抗体濃度の計量に関する本発明者らの方法の使用が、臨床的放射線学的証拠に関連して、診断を支持して有効及び代替的なバイオマーカーとしてじきに提唱され得ることを本発明者らは望んでいる。

【0200】

9 内皮損傷に関する指数としてのC S F中のT F P Iレベルの計量

アルツハイマー病 (A D、 $0.84 \text{ ng/mL} \pm 0.19$) 及び脳アミロイド血管障害関連炎症 (C A A - r i、 $1.10 \text{ ng/mL} \pm 0.38$) を患う患者のC S F中のT F P Iレベルの研究は、健常な対照対象 (C T L、 $0.48 \text{ ng/mL} \pm 0.29$) の群、筋萎縮性側索硬化症を伴う患者のような血管の合併症を伴わない神経変性疾患を患う対照 (O N D、 $0.30 \text{ ng/mL} \pm 0.15$) の群、及び炎症性成分を伴わない脳アミロイド血管障害を患う患者 (C A A、 $1.04 \text{ ng/mL} \pm 0.57$) の群で検出可能なレベルと比較して拡張された。

10

【0201】

図12から推論され得るように、A D、C A A及びC A A - r i患者におけるT F P I濃度は、内皮損傷の存在を特定する際の本発明者らのバイオマーカーの有効性だけでなく、同様にアミロイド脳血管堆積レベルとのそれらの考え得る直接的な相関の証拠として、C T L及びO N Dの両方に関して有意に増加されることがわかった (それぞれ、 $p < 0.001$) 。

20

【0202】

実際に、分析される患者の3つのカテゴリー (A D、C A A及びC A A - r i) 全てが、実質レベル及び脳血管レベルの両方で強力なベータアミロイド堆積により病理学的に特徴付けられる。

【0203】

更に、T F P Iがアミロイド堆積 (C A A) の度合いに続発するニューロン死に関する指数 (それぞれ、 $p < 0.0051$ 、 $r = 0.47$ 、 $p < 0.0041$ 、 $r = 0.49$) を表し得るという証拠として、T F P Iはまた、患者A Dにおける神経変性及び軸索損傷に関するマーカー、タウ及びP - 181タウに直接相関されることがわかった (図13) 。

30

【0204】

C T L及びA Dの臨床的及び社会人口的数据を表2で報告するのに対して、C A A及びC A A - r i患者の各々の値は、表1及び表2ですでに報告した。

【0205】

【表3】

表3. CSF中のTFPIの計量に利用される、AD患者及び関連する対照の社会人口的特徴。

変数	対照 n=30	AD n=44
年齢(歳)	70.7 ± 12.0	71.9 ± 7.3
性別(F/M)	17/13	22/22
調節 MMSE	28.6 ± 1.9	21.7 ± 6.6#
ApoE4(%キャリア)	23.0	50.0*
TFPI(ng/mL)	0.48 ± 0.29	0.84 ± 0.19*
タウ(pg/mL)	131.6 ± 104.7	743.8 ± 457.6*
P-181タウ(pg/mL)	24.92 ± 14.76	65.28 ± 30.34*
Aペータ42	866.1 ± 209.1	428.4 ± 170.5*
関連指数	0.51 ± 0.07	0.56 ± 0.2
BBB損傷の指数	7.0 ± 4.7	8.0 ± 6.5

* p<0.0001(CTLに対する)、#p<0.05(CTLに対する)。MMSE、ミニメンタルステート検査試験。BBB、脳血液関門。

【0206】

10. CAA-ri患者のCSF中のTFPI濃度の計量

疾患の寛解期中でのCAA-ri患者のCSF中の抗A抗体の濃度における減少の動向を検出して(図8b)、本発明者らは、かかる動向がまた、それらの内皮損傷バイオマーカーTFPIについても確認されるかどうかを確認した。

【0207】

図14で見られ得るように、TFPI値は、これまでに記載される作用メカニズムの更なる証拠として、自己抗体に関してこれまでに見出されたのと同じ動向を正確に追跡する(p=0.013、apCAA-ri対rpCAA-ri)。即ち、自己抗体は、Aタンパク質を除去することにより疾患の急性期中に作動し(図10a及び10b)、治療上の免疫を受けたAD患者におけるVE(ARIA)の出現中に推測され得るものと類似して、apCAA-ri中に検出可能な高い抗体濃度により引き起こされる全ての可能性において血管及び実質Aの迅速な除去に起因して有害な現象を誘発する。

【0208】

かかる証拠は全体として、TFPIが、神経変性疾患におけるアミロイド堆積の結果生じる新規有効内皮損傷バイオマーカーとして、またCAA-riのような疾患の自発的モデルにおいて、及びAD又は一般に疾患修飾療法における免疫試行中の治療作用の追跡のため、抗A抗体によるA除去の結果生じる内皮損傷に関する指数として、利用することができることを実証している。

【0209】

11. ROC分析及びカットオフ決定による診断予測(predictivity)の分析

最終分析として、疾患の診断を行うための本発明者らのマーカーの有効性を評価するために、本発明者らに利用可能なCAA-riを患う10人の患者と比較して、25人の健康な対照に対する提唱されるバイオマーカーの両方(抗A抗体及びTFPI)に関するROCの比較により、統計学的予測試験を実施した。

【0210】

本発明者らは、2つのモデルを用いて行動した：

1) 個々のバイオマーカーに関する予測を確定するためのROC(受信者動作特性)曲線分析

バイオマーカー1: 抗A抗体

この試験は、apCAA-ri患者のCSF中の抗A抗体の計量が、病理学を識別す

10

20

30

40

50

る際に高度に予測的であることを、本発明者らが実証するのを可能にした（AUC = 0.97）。分析から、抗体濃度の観点で、カットオフ値を定義することが更に可能であり、それ以下では、対象はCAA-riを患うとは分類されない。試験による100%感度及び90%特異性の組に関して上記カットオフは、34.22 ng/ml未満であることが判明した。

【0211】

バイオマーカー2：TFPI

この試験は、apCAA-ri患者のCSF中のTFPIの計量が、病理学を識別する際に高度に予測的であることを、本発明者らが実証するのを可能にした（AUC = 0.99）。分析から、TFPI濃度の観点で、カットオフ値を定義することが更に可能であり、それ以下では、対象はCAA-riを患うとは分類されない。試験による100%感度及び89%特異性の組に関して上記カットオフは、0.82 ng/ml未満であることが判明した。

10

【0212】

2) 両方のROC曲線を併用して利用することによる予測分析

同じ患者においてバイオマーカー1及びバイオマーカー2に関して検出可能な値を併用して考慮に入れる分析により、100%に近い感度及び特異性が見出され、2つのバイオマーカーの併用した使用により、CAA-ri患者と健常な対象を識別するためのほぼ絶対的な能力が可能となることを確認した。簡潔に述べると、TFPIのレベル及び抗A抗体のレベルを併用して評価することにより、問題となるケース記録が、より多い数のケースに関して、必ず拡大及び再確認されなくてはならないことを含めるが、高度に予測的な診断試験を提供することが可能であり、その結果としてCAA-riの確定診断に依然として本質的である脳バイオプシーに代替して、有効診断ツールとして適している。

20

【0213】

性別、年齢、タウ及びP-181タウのような、試験に影響を及ぼし得る他の考え得る変数を本発明者らが考慮した多変量分析後にも、特異性及び感度の同じ値が検出された。

【0214】

(参考文献)

Y. Du, R. Dodel, H. Hampel, K. Buerger, S. Lin, B. Eastwood, K. Bales, F. Gao, H.J. Moeller, W. Oertel, M. Farlow, S. Paul, アルツハイマー病におけるアミロイドペータペプチド抗体のレベルの低減(Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease), *Neurology* 57(5) (2001) 801-805.

M.E. Weksler, N. Relkin, R. Turkenich, S. LaRusse, L. Zhou, P. Szabo, アルツハイマー病を患う患者は、健常な高齢個体よりも低レベルの血清抗アミロイドペプチド抗体を有する(Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals), *Exp. Gerontol.* 37(7) (2002) 943-948.

M.S. Song, I. Mook-Jung, H.J. Lee, J.Y. Min, M.H. Park, 高齢の韓国人患者における血清抗アミロイドペータ抗体及びアルツハイマー病(Serum anti-amyloid-beta antibodies and Alzheimer disease in elderly Korean patients), *J. Int. Med. Res.* 35(3) (2007) 301-306.

B.T. Hyman, C. Smith, I. Buldyrev, C. Whelan, H. Brown, M.X. Tang, R. Mayeux, アミロイドペータに対する自己抗体及びアルツハイマー病(Autoantibodies to amyloid-beta and Alzheimer disease), *Ann. Neurol.* 49(6) (2001) 808-810.

L. Baril, L. Nicolas, B. Croisile, P. Crozier, C. Hessler, A. Sassolas, J.B. McCormick, E. Trannoy, アルツハイマー病を患う患者及び対照対象からの抹消血におけるAペータペプチドに対する免疫応答(Immune response to Abeta-peptides in peripheral blood from patients with Alzheimer disease and control subjects), *Neuroci. Lett.* 355 (2004) 226-230.

A. Nath, E. Hall, M. Tuzova, M. Dobbs, M. Jons, C. Anderson, J. Woodward, Z. Guo, W. Fu, R. Kryscio, D. Wekstein, C. Smith, W.R. Markesbery, M.P. Mattson, アミロイドペータペプチド(Aペータ)に対する自己抗体がアルツハイマー疾患では増加され、Aペータ抗体は、Aペータ神経毒性を増強し得る:疾患病因に関する推測及びワクチン開発 (Autoantobodies to amyloid betapeptide (Abeta) are increased in Alzheimer disease patients and Abeta antibodies can enhance Abeta neurotoxicity: implications for disease pathogenesis and vaccine development), *Neuromol. Med.* 3 (2003) 29-39.

Dodel R, Hampel H, Depboylu C, Lin S, Gao F, Schock S, Jäckel S, Wei X, Buerger K, Höft C, Hemmer B, Möller HJ, Farlow M, Oertel WH, Sommer N, Du Y. アミロイドペータペプチドに対するヒト抗体:アルツハイマー病に関する潜在的処置 (Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer disease). *Ann Neurol.* 2002 Aug;52(2):253-6.

Di Francesco JC, Brioschi M, Brighina L, Ruffmann C, Saracchi E, Costantino G, Galimberti G, Conti E, Curtò NA, Marzorati L, Remida P, Tagliavini F, Savoirdo M, Ferrarese C, CAA関連炎症を有する患者のCSF中の抗Aβ自己抗体:ケース報告 (Anti-Aβ autoantibodies in the CSF of a patient with CAA-related inflammation: a case report). *Neurology.* 2011 Mar 1;76(9):842-4.

Conti E, Galimberti G, Piazza F, Raggi ME, Ferrarese C. ダウン症患者からの血漿中の可溶性APPアルファ、Aペータ1-42、及び抗Aペータ1-42抗体の増加 (Increased soluble APPalpha, Abeta 1-42, and anti-Abeta 1-42 antibodies in plasma from Down syndrome patients). *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2010;24:96-100.

10

20

30

40

【 図 6 】

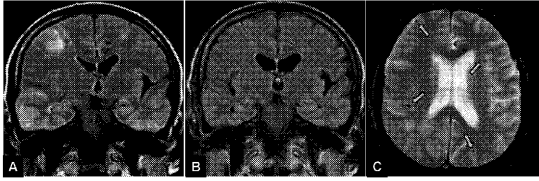


Figure 6

【 図 7 】

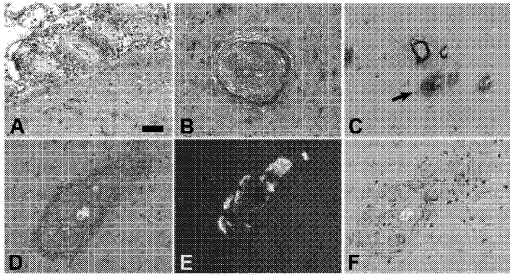


Figure 7

【 図 12 】

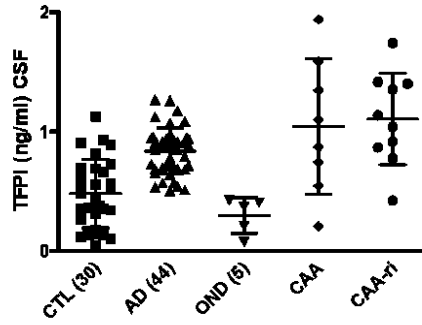


Figure 12

【 図 14 】

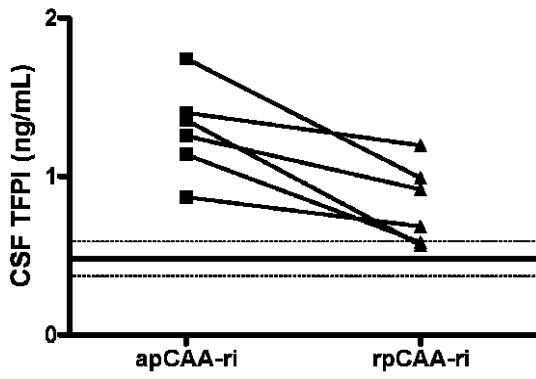
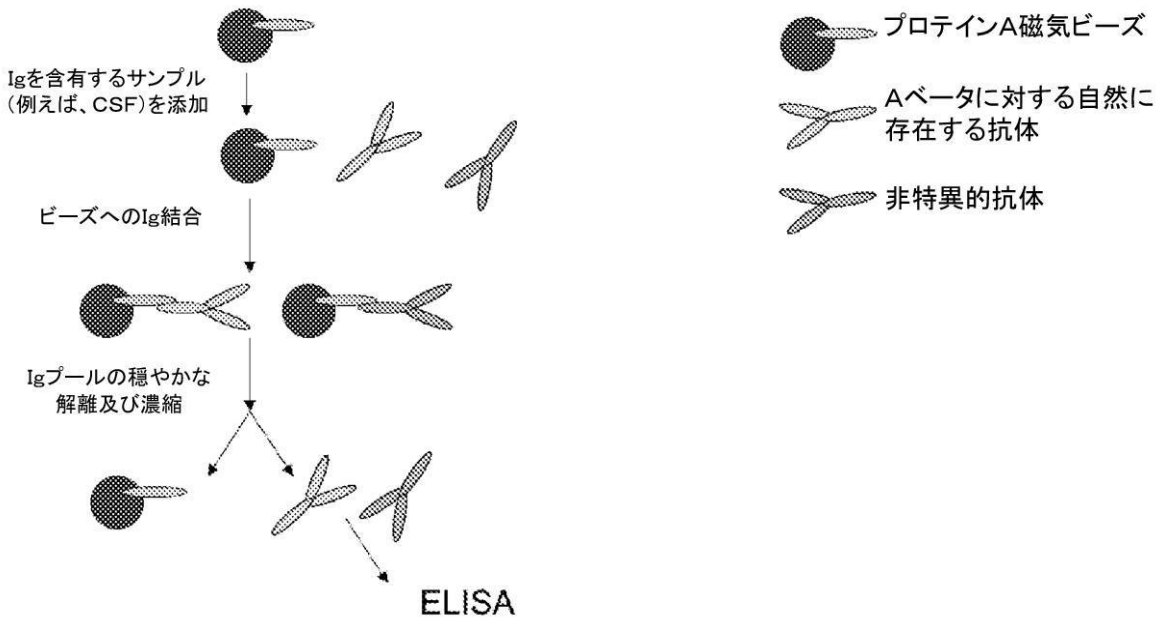


Figure 14

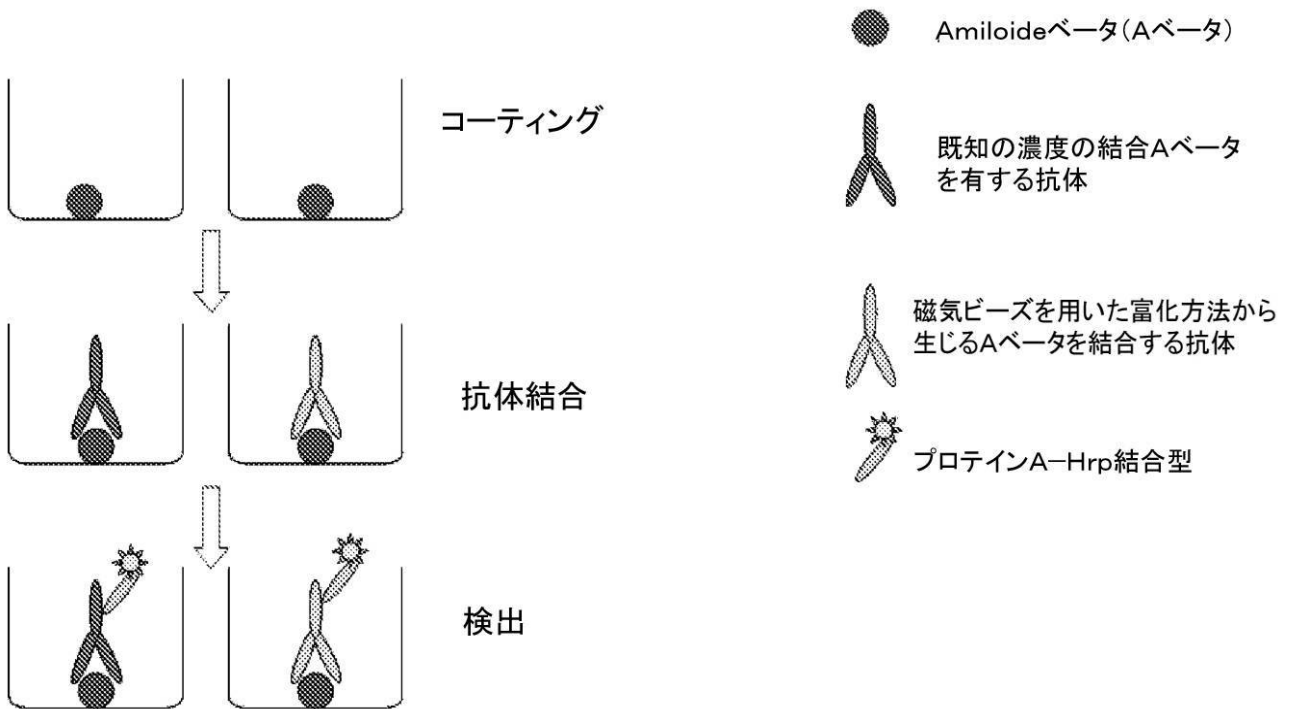
【 図 1 】

前富化工程:磁気ビーズ免疫沈降



【 図 2 】

ELISA



【図3】

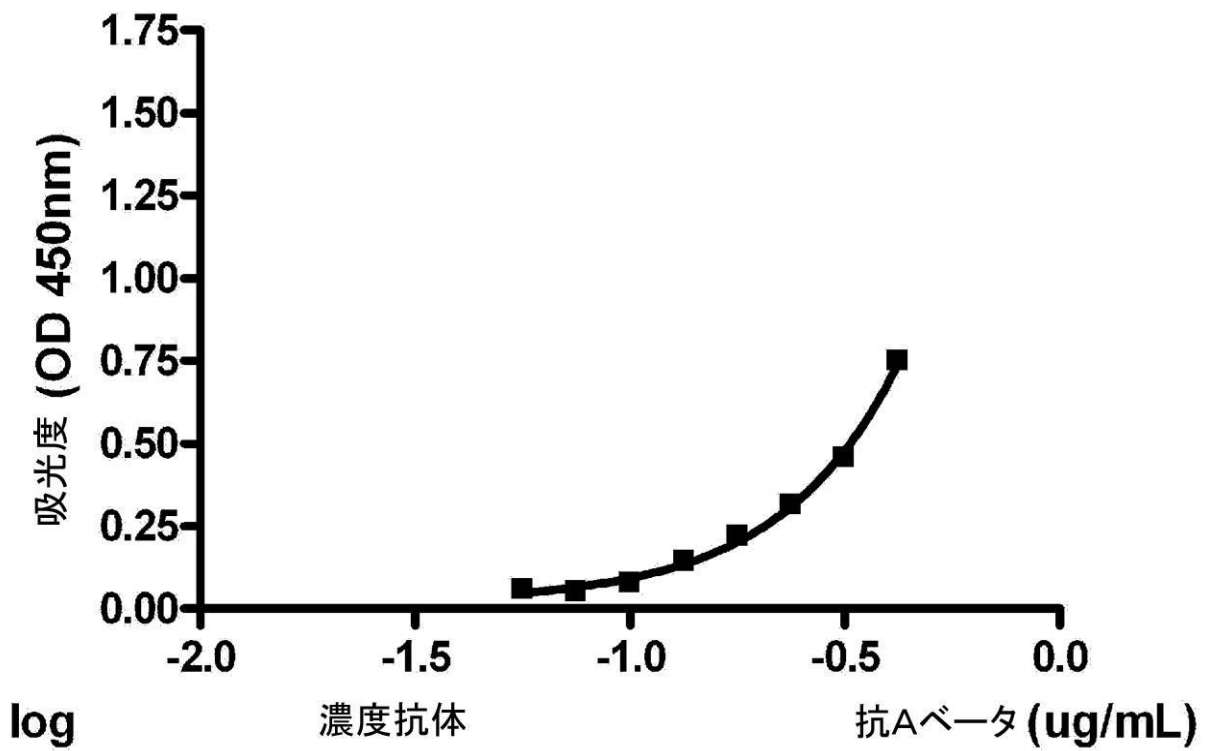
Hrp結合型抗ヒトIgG

Hrp結合型プロテインA

G2-11	0,426	0,0125
6E10	1,415	0,8625
4G8	1,416	1,469

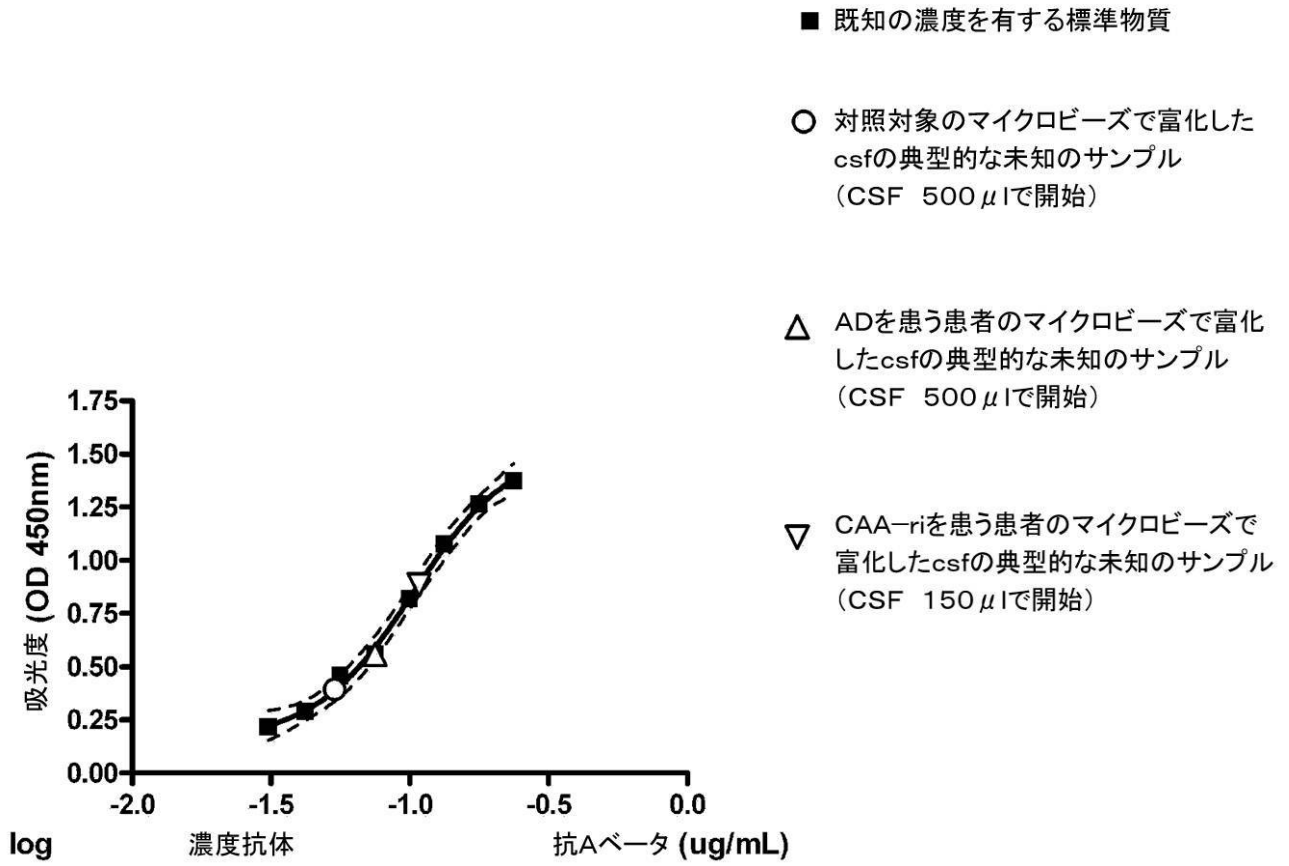
【図4A】

背景技術で記載されるELISAによる得られた較正曲線
(G2-11 + 抗ヒトIgG-HRP、Contiら、2010年)



【 図 4 B 】

本発明者らにより実施されるELISA方法、及び磁気ビーズによる富化後に得ることが可能な3つの典型的な値により得られる較正曲線(CSF)



点線は、回帰直線の95%信頼区間を表す

【図 4 C】

下記を用いて得られる較正標準物質の典型的な濃度及びそれらの吸光度値：

1) 背景技術で記載されるELISA手順(G2-11+抗ヒトIgG-HRP、Coniら、2010年)

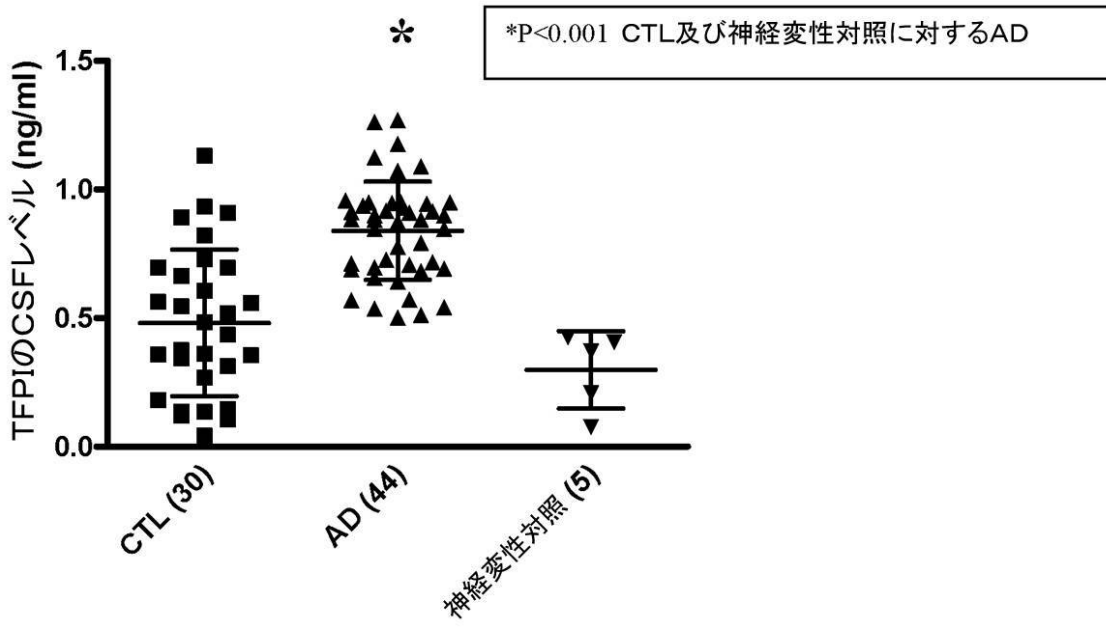
ug/mL 標準物質	OD (450nm)
0,422	0,751
0,316	0,457
0,237	0,315
0,178	0,219
0,134	0,142
0,100	0,078
0,075	0,053
0,056	0,059
ブランク	0,108

ブランクと識別不可能なOD値

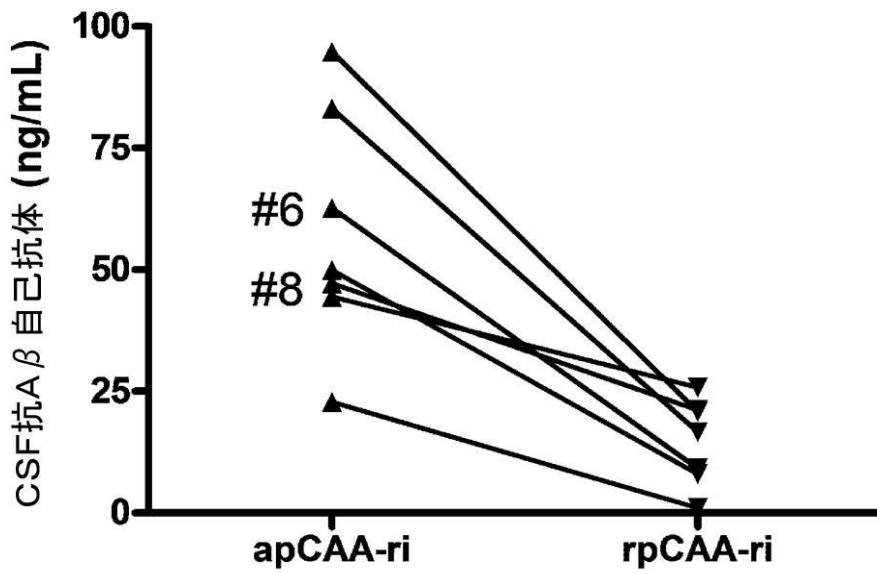
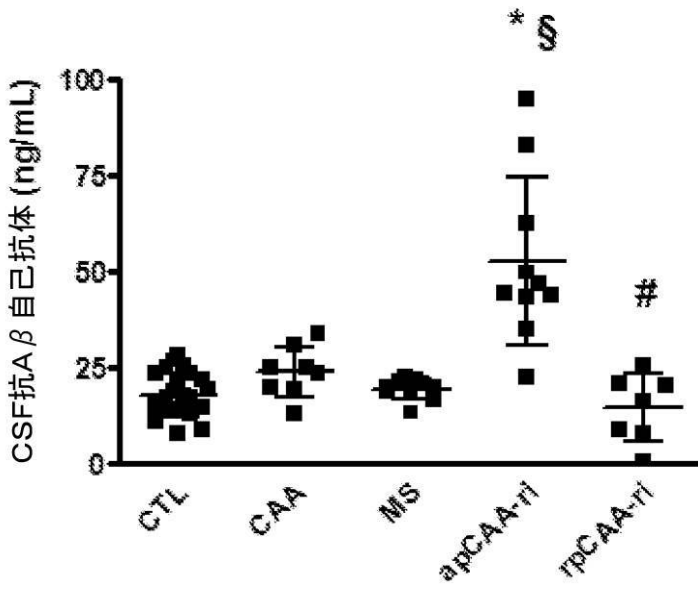
2) 本発明者らにより実施されるELISA手順(4G8+プロテインA-HRP)

ug/mL 標準物質	OD (450nm)
0,237	1,371
0,178	1,263
0,134	1,072
0,100	0,817
0,075	0,558
0,056	0,456
0,042	0,288
0,031	0,214
ブランク	0,077

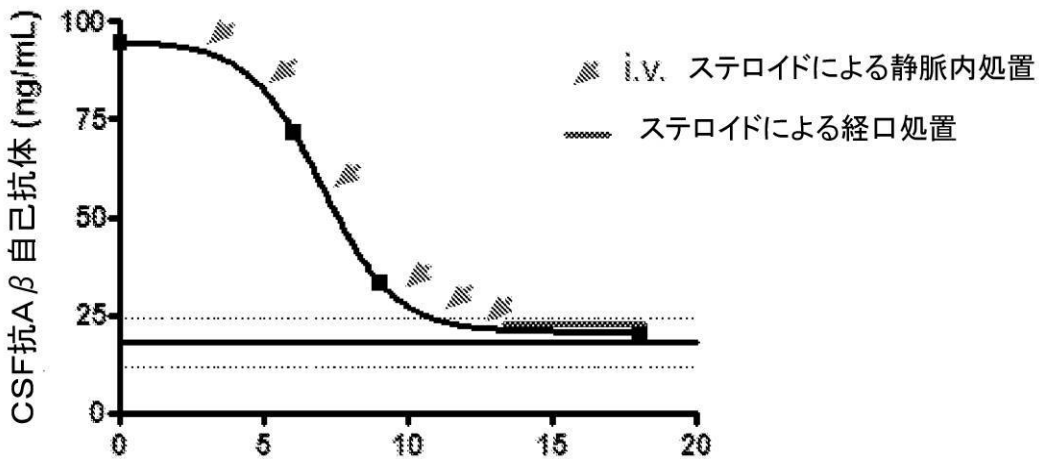
【 図 5 】



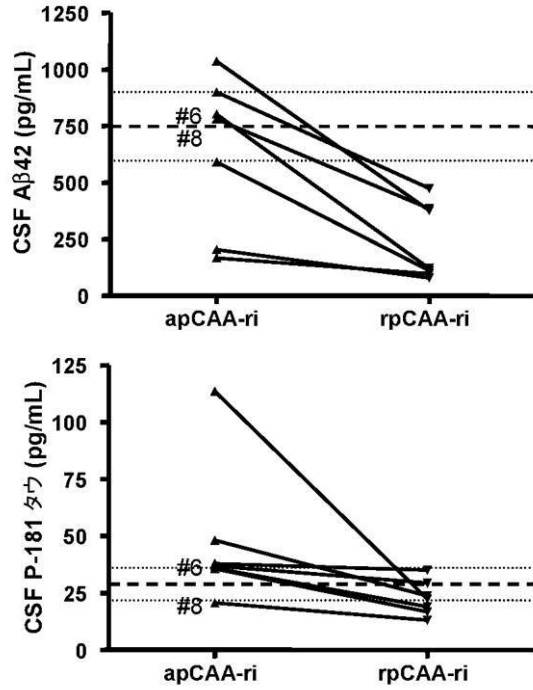
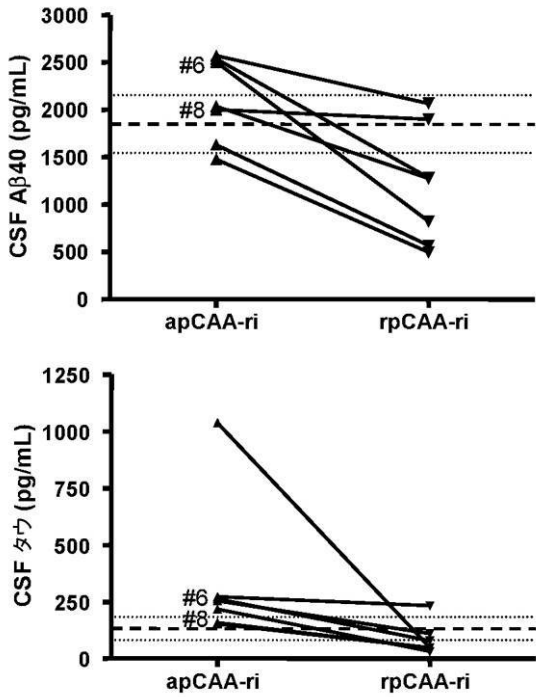
【 図 8 】



【 図 9 】

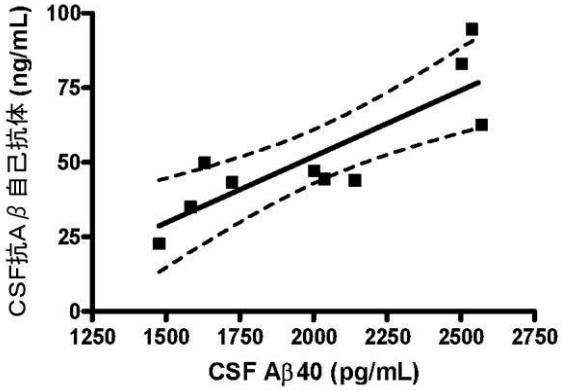


【 図 1 0 】

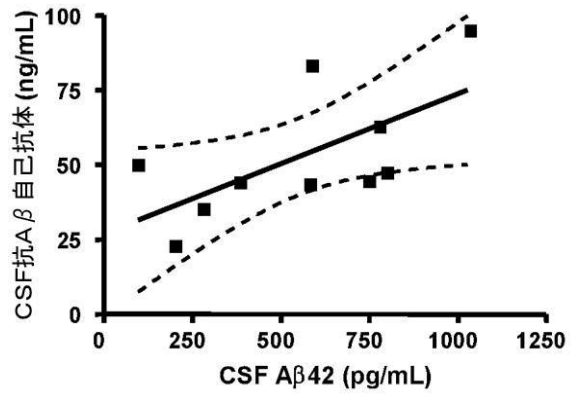


【 図 1 1 】

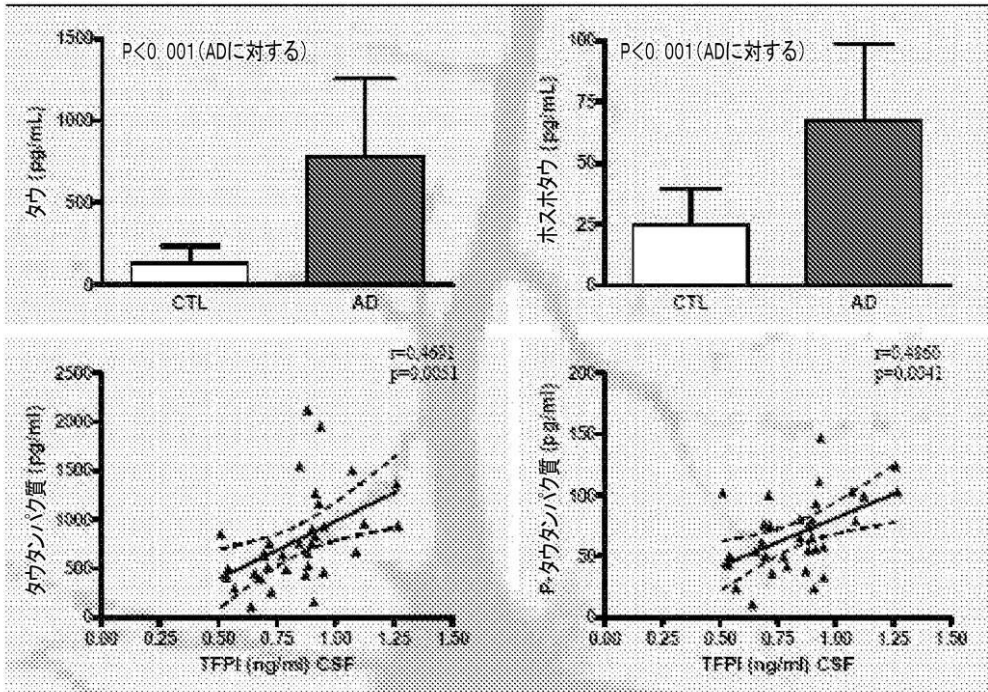
A)



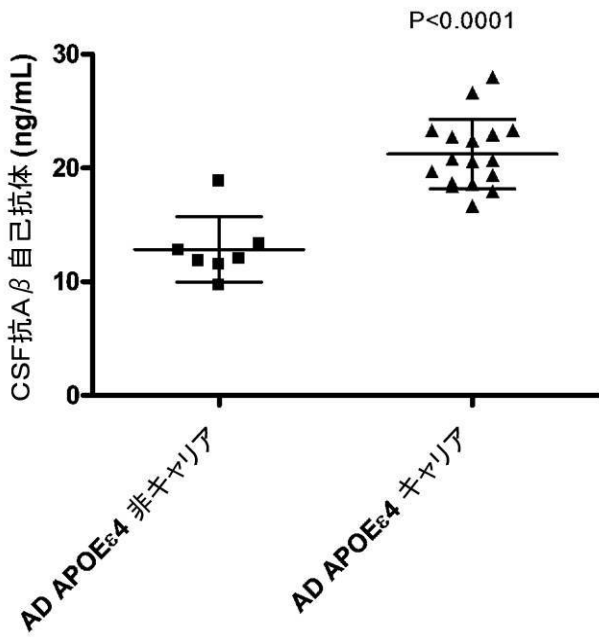
B)



【 図 1 3 】



【 図 1 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2013/052206

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/543 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, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/033046 A1 (PROBIODRUG AG [DE]; KLEINSCHMIDT MARTIN [DE]; GOETTLICH CLAUDIA [DE];) 24 March 2011 (2011-03-24) page 14, line 21 - page 15, line 10 page 9, paragraph 2 page 18, line 27 - line 31 page 21, line 9 - page 22, line 29 page 24, line 31 - page 25, line 7 -----	1-26
X	WO 2010/128139 A1 (GEORG AUGUST UNI GOETTINGEN ST [DE]; BAYER THOMAS [DE]; MARCELLO ANDRE) 11 November 2010 (2010-11-11)	1-26
Y	claims 1,10,12,13,16 page 5, line 35 - line 38 page 15, paragraph 2 page 18, paragraph 2 page 24, paragraph 3 - paragraph 4 ----- -/--	24-26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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
14 June 2013		28/06/2013
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 Gundlach, Björn

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2013/052206

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BRETTSCHNEIDER S ET AL: "Decreased serum amyloid beta1-42 autoantibody levels in Alzheimer's disease, determined by a newly developed immuno-precipitation assay with radiolabeled amyloid beta1-42 peptide", BIOLOGICAL PSYCHIATRY, ELSEVIER SCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 57, no. 7, 1 April 2005 (2005-04-01), pages 813-816, XP027734981, ISSN: 0006-3223 [retrieved on 2005-04-01] the whole document</p> <p>-----</p>	1-26
Y	<p>RICHARD D. HOLLISTER ET AL: "Immunohistochemical localization of tissue factor pathway inhibitor-1 (TFPI-1), a Kunitz proteinase inhibitor, in Alzheimer's disease", BRAIN RESEARCH, vol. 728, no. 1, 1 July 1996 (1996-07-01), pages 13-19, XP055041732, ISSN: 0006-8993, DOI: 10.1016/0006-8993(96)00384-8 abstract</p> <p>-----</p>	24-26
Y	<p>FABRIZIO PIAZZA ET AL: "Increased tissue factor pathway inhibitor and homocysteine in Alzheimer's disease", NEUROBIOLOGY OF AGING, vol. 33, no. 2, 1 February 2012 (2012-02-01), pages 226-233, XP055041731, ISSN: 0197-4580, DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.02.016 abstract</p> <p>-----</p>	24-26
A	<p>GRUDEN M A ET AL: "AUTOIMMUNE RESPONSES TO AMYLOID STRUCTURES OF ABETA(25-35) PEPTIDE AND HUMAN LYSOZYME IN THE SERUM OF PATIENTS WITH PROGRESSIVE ALZHEIMER'S DISEASE", DEMENTIA AND GERIATRIC COGNITIVE DISORDERS, KARGER, BASEL, CH, vol. 18, no. 2, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 165-171, XP008056285, ISSN: 1420-8008, DOI: 10.1159/000079197 the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2013/052206

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>IRINA PERDIVARA ET AL: "Glycosylation profiles of epitope-specific anti-beta-amyloid antibodies revealed by liquid chromatography-mass spectrometry", GLYCOBIOLOGY, OXFORD UNIVERSITY PRESS, US, vol. 19, no. 9, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 958-970, XP002621663, ISSN: 0959-6658, DOI: 10.1093/GLYCOB/CWP038 [retrieved on 2009-03-24] abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2013/052206

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011033046	A1	24-03-2011	CA 2774134 A1 24-03-2011 CN 102612653 A 25-07-2012 EP 2478365 A1 25-07-2012 JP 2013505438 A 14-02-2013 SG 179095 A1 27-04-2012 US 2011091910 A1 21-04-2011 WO 2011033046 A1 24-03-2011
WO 2010128139	A1	11-11-2010	NONE

 フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72)発明者 ピアッツァ、ファブリツィオ

イタリア国、モンツァ エ ブリアンツァ、モンツァ、ヴィア カドーレ 48、ウニヴェルシタ
 デッリ ストゥーディ ディ ミラノ - ビコッカ、ディパルティメント ディ ニューロサ
 イエンツェ エ テクノロジー バイオメディケ (ディエツネティビ) 気付

(72)発明者 フェッラレーゼ、カルロ

イタリア国、モンツァ エ ブリアンツァ、モンツァ、ヴィア カドーレ 48、ウニヴェルシタ
 デッリ ストゥーディ ディ ミラノ - ビコッカ、ディパルティメント ディ ニューロサ
 イエンツェ エ テクノロジー バイオメディケ (ディエツネティビ) 気付

专利名称(译)	用于检测抗β淀粉样蛋白抗体的方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2015514206A	公开(公告)日	2015-05-18
申请号	JP2015501035	申请日	2013-03-20
[标]申请(专利权)人(译)	海胆威赛西塔阿布鲁扫描两个老爹米兰双向Cocca		
申请(专利权)人(译)	Univerushita阿布鲁Sutudi米兰 - 比可卡		
[标]发明人	ピアッツァファブリツィオ フェッラレーゼカルロ		
发明人	ピアッツァ、ファブリツィオ フェッラレーゼ、カルロ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/536		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/34 G01N33/54326 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2821 G01N2800/2871 G01N2800/52 G01N33/564 G01N2333/4704 G01N2446/00		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.545.F G01N33/543.541.B G01N33/536.E		
优先权	102012902033669 2012-03-20 IT 102012902074820 2012-08-02 IT		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于定量脑脊液样品中抗-β淀粉样蛋白抗体的体外方法和试剂盒，包括以下步骤：a) 用涂有能够结合所述抗体的大分子的磁性微珠浓缩所述样品的所述抗体的量b) 通过免疫酶测定或放射免疫测定分析步骤a) 中获得的浓缩样品；c) 用步骤b) 中使用的相同测定法分析包含具有已知滴度的抗-β淀粉样蛋白抗体的样品并详细描述相关的校准曲线，其中所述具有已知滴度的抗体是属于IgG2a或IgG2b类的鼠抗体或属于IgG2b或IgG1类的人或人源化抗体。

患者 #	性別 (M/F)	年齢 (a.o.)	APOE	国	処置	rpCAA-ri CSF 再収集
1	F	68	ε3/ε4	ブラジル	I.V.ステロイド	あり
2	M	62	ε3/ε3	ブラジル	I.V.ステロイド	あり
3	M	68	ε4/ε4	イタリア	I.V.ステロイド	あり
4	F	76	試験せず	イタリア	I.V.ステロイド	あり
5	M	56	ε3/εε	日本	I.V.ステロイド	あり
6	M	71	ε3/εε	イタリア	処置なし	あり
7	M	72	ε4/ε4	イタリア	処置なし	なし
8	F	72	ε3/εε	イタリア	処置なし	あり
9	M	71	ε4/ε4	イタリア	経口ステロイド	なし
10	M	67	ε4/ε4	イタリア	I.V.ステロイド	なし