

(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2013-511734

(P2013-511734A)

(43) 公表日 平成25年4月4日(2013.4.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 O 1 H	4 H O 4 5
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	
<b>GO 1 N 33/577 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 O 1 D	
<b>GO 1 N 33/553 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/577 B	
<b>CO 7 K 14/47 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/553	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-540407 (P2012-540407)	(71) 出願人	505403119 プロビオドルグ エーゲー
(86) (22) 出願日	平成22年11月24日 (2010.11.24)		ドイツ連邦共和国 06120 ハルレ/ サアレ ウェインベルグウエグ 22
(85) 翻訳文提出日	平成24年7月18日 (2012.7.18)	(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(86) 国際出願番号	PCT/EP2010/068069	(72) 発明者	ハンス-ウルリクフ デムトフ ドイツ連邦共和国 06120 ハルレ/ サアレ アム ワルドランド 13エー
(87) 国際公開番号	W02011/064225	(72) 発明者	クラウディア ゴエトリッヒ ドイツ連邦共和国 06114 ハルレ/ サアレ スクヒルルエルストラッセ 6
(87) 国際公開日	平成23年6月3日 (2011.6.3)		
(31) 優先権主張番号	61/263, 861		
(32) 優先日	平成21年11月24日 (2009.11.24)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病又は軽度認知障害の診断のための新規診断方法

## (57) 【要約】

本発明は、バイオマーカーとしてオリゴマー状態のアミロイド の断片を使用する、アルツハイマー病の検出及び診断に関し、さらに生物学的試料中のオリゴマー状態のアミロイド の断片を測定するための新規方法に関する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アルツハイマー病及び軽度認知障害などの神経変性疾患を診断する又は監視する方法であって、被験対象由来の生物学的試料中のオリゴマー状態の標的アミロイド ペプチド(Aベータ又はA )を測定することを含み、以下の工程：

- (a) 生物学的試料中の標的A ペプチドの第1の濃度( $c_a$ )を測定すること；
- (b) 工程(a)から得られた標的A ペプチドを脱凝集すること；
- (c) 該脱凝集したA ペプチドの第2の濃度( $c_d$ )を測定すること；及び
- (d) 第2の濃度( $c_d$ )の値を第1の濃度( $c_a$ )の値で割った、 $c_d/c_a$ 比を決定すること；

を含むことを特徴とし、

ここで、 $c_d/c_a$ 比が1.5より低いことが、神経変性疾患の陽性診断を示す、前記方法。

## 【請求項 2】

前記脱凝集工程(b)が、アルカリの使用を含む、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 3】

前記工程(b)の脱凝集に使用されるアルカリが、500mMの水酸化ナトリウムなどの水酸化ナトリウムである、請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

前記脱凝集工程(b)が、メタノール、特に50%(v/v)メタノールなどの適当な溶媒の使用をさらに含む、請求項 2 又は 3 記載の方法。

## 【請求項 5】

前記脱凝集工程(b)が、インキュベーション工程を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 6】

前記脱凝集工程(b)が、室温で少なくとも2分間のインキュベーション工程を含む、請求項 5 記載の方法。

## 【請求項 7】

前記脱凝集工程(b)が、室温で少なくとも10分間のインキュベーション工程を含む、請求項 6 記載の方法。

## 【請求項 8】

1.3未満など、1.4よりも低い $c_d/c_a$ 比が、神経変性疾患の陽性診断を示す、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 9】

1.1未満など、1.2よりも低い $c_d/c_a$ 比が、神経変性疾患の陽性診断を示す、請求項 8 記載の方法。

## 【請求項 10】

前記標的A ペプチドが、配列番号13のA (3-38)のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 11】

前記標的A ペプチドが、配列番号19のA (11-38)のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 12】

前記標的A ペプチドが、その機能的等価物を含むA (x-y)であり、ここで、xが1、2、3、4、5、6、7、8、9、10及び11から選択される整数と定義され、かつyが38、39、40、41、42及び43から選択される整数と定義される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 13】

xが1、特に11など、1、2、3及び11から選択される整数である、請求項 10 記載の方法。

## 【請求項 14】

yが40、特に38など、38、40又は42から選択される整数である、請求項 10 記載の方法

10

20

30

40

50

。

## 【請求項 15】

前記標的A ペプチドが、その機能的等価物を含む配列番号1~24からなる群から選択される、請求項1~14のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 16】

前記標的A ペプチドが、その機能的等価物を含む配列番号2のA (1-40)である、請求項1~15のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 17】

前記標的A ペプチドが、その機能的等価物を含む配列番号1のA (1-42)である、請求項1~15のいずれか一項記載の方法。

10

## 【請求項 18】

前記標的A ペプチドが、その機能的等価物を含む配列番号2のA (1-40)及び配列番号1のA (1-42)を含む、請求項1~15のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 19】

前記標的A ペプチドが、その機能的等価物を含む配列番号13~24からなる群から選択される、請求項1~15のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 20】

前記標的A ペプチドが、その機能的等価物を含む配列番号13のA (3-38)である、請求項1~15及び19のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 21】

前記標的A ペプチドが、その機能的等価物を含む配列番号19のA (11-38)である、請求項1~15及び19のいずれか一項記載の方法。

20

## 【請求項 22】

前記標的A ペプチドのN-末端のグルタミン酸残基が、ピログルタミン酸に環化されている、請求項19~21のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 23】

前記標的A ペプチドが、その機能的等価物を含む配列番号1~6からなる群から選択され、アミノ酸位置1及び/又は7のアスパラギン酸残基が、イソアスパラートに変換されている、請求項1~15のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 24】

前記標的A ペプチドが、その機能的等価物を含む配列番号7~12からなる群から選択され、アミノ酸位置6のアスパラギン酸残基が、イソアスパラートに変換されている、請求項1~15のいずれか一項記載の方法。

30

## 【請求項 25】

前記標的A ペプチドが、その機能的等価物を含む配列番号13~18からなる群から選択され、アミノ酸位置5のアスパラギン酸残基が、イソアスパラートに変換されている、請求項1~15のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 26】

前記生物学的試料が、血液、血清、尿、脳脊髄液(CSF)、血漿、リンパ液、唾液、汗、胸水、滑液、涙液、胆汁、及び腓分泌物からなる群から選択される、請求項1~25のいずれか一項記載の方法。

40

## 【請求項 27】

前記生物学的試料が血漿である、請求項26記載の方法。

## 【請求項 28】

標的A ペプチドの濃度を測定する工程が、以下の工程：

- i) 生物学的試料を少なくとも2つの異なる捕捉抗体と接触させること；
- ii) 得られた免疫複合体を検出すること；
- iii) 該免疫複合体を破壊すること；及び
- iv) 捕捉されたA ペプチドを定量すること

を含む、請求項1~27のいずれか一項記載の方法。

50

## 【請求項 29】

前記少なくとも2つの異なる捕捉抗体が、それぞれ前記A ペプチドの異なるエピトープに特異的である、請求項 28 記載の方法。

## 【請求項 30】

前記捕捉抗体が、下記からなる群から選択される、請求項 28 又は 29 記載の方法：

- 3D6、エピトープ：1-5、  
 pAb-EL16、エピトープ：1-7、  
 2H4、エピトープ：1-8、  
 1E11、エピトープ：1-8、  
 20.1、エピトープ：1-10、 10  
 ウサギ抗A ポリクローナル抗体、エピトープ：1-14(Abcam)、  
 AB10、エピトープ：1-16、  
 82E1、エピトープ：1-16、  
 pAb1-42、エピトープ：1-11、  
 NAB228、エピトープ：1-11、  
 DE2、エピトープ：1-16、  
 DE2B4、エピトープ：1-17、  
 6E10、エピトープ：1-17、  
 10D5、エピトープ：3-7、  
 WO-2、エピトープ：4-10、 20  
 1A3、エピトープ 5-9、  
 pAb-EL21、エピトープ5-11、  
 310-03、エピトープ5-16、  
 ニワトリ抗ヒトA ポリクローナル抗体、エピトープ12-28(Abcam)、  
 ニワトリ抗ヒトA ポリクローナル抗体、エピトープ25-35(Abcam)、  
 ウサギ抗ヒトA ポリクローナル抗体、エピトープ:N-末端(ABR)、  
 ウサギ抗ヒトA ポリクローナル抗体(Anaspec)、  
 12C3、エピトープ10-16、  
 16C9、エピトープ10-16、  
 19B8、エピトープ9-10、 30  
 pAb-EL26、エピトープ:11-26、  
 BAM90.1、エピトープ:13-28、  
 ウサギ抗 -アミロイド(パン)ポリクローナル抗体、エピトープ:15-30(MBL)、  
 22D12、エピトープ:18-21、  
 266、エピトープ:16-24、  
 pAb-EL17;エピトープ:15-24、  
 4G8、エピトープ:17-24、  
 ウサギ抗A ポリクローナル抗体、エピトープ:22-35(Abcam)  
 G2-10;エピトープ:31-40、  
 ウサギ抗A 、aa 32-40ポリクローナル抗体(GenScript Corporation)、 40  
 EP1876Y、エピトープ:x-40、  
 G2-11、エピトープ:33-42、  
 16C11、エピトープ:33-42、  
 21F12、エピトープ:34-42、  
 1A10、エピトープ:35-40、及び  
 D-17ヤギ抗A 抗体、エピトープ:C-末端、  
 pyro-Glu Aベータ抗体、Probiodrug AG、  
 A 5-5-6、  
 A 6-1-6、  
 A 17-4-3、 50

A 24-2-3、

Pyro-Glu Aベータ抗体クローン2-48(モノクローナル、マウス); Synaptic Systems、  
Pyro-Glu Aベータ抗体(ポリクローナル、ウサギ); Synaptic Systems、  
Pyro-Glu Aベータ抗体クローン8E1(モノクローナル、マウス); Anawa、  
Pyro-Glu Aベータ抗体クローン8E1(モノクローナル、マウス); Biotrend、  
抗-ヒトアミロイド (N3pE)ウサギIgG(ポリクローナル、ウサギ); IBL、  
抗-ヒトA N3pE(8E1)マウスIgG Fab(モノクローナル、マウス); IBL、  
イソAsp抗体(T. Saidoのグループ)。

【請求項 3 1】

前記捕捉抗体が、3D6、BAN50、82E1、6E10、WO-2、266、BAM90.1、4G8、G2-10、1A10、  
BA27、11A5-B10、12F4、及び21F12からなる群から選択される、請求項 2 8 ~ 3 0 のい  
ずれか一項記載の方法。 10

【請求項 3 2】

下記の抗体ペアが、捕捉抗体として使用される、請求項 2 8 ~ 3 1 のいずれか一項記載  
の方法：

4G8及び11A5-B10、

3D6及び4G8、

6E10及び4G8、

82E1及び4G8、

4G8及び12F4、

4G8及び21F12、

3D6及び21F12、

6E10及び21F12、

BAN50及び4G8、

3D6及び11A5-B10、

3D6及び1A10、

3D6及びBA27、

6E10及び11A5-B10、

6E10及び1A10、

6E10及びBA27、

4G8及び11A5-B10、

4G8及び1A10、

4G8及びBA27、

4G8及び12F4、並びに

4G8及び21F12。 20

【請求項 3 3】

前記複合体の検出が、各捕捉抗体と特異的に反応する二次抗体を用いることによって実  
施される、請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれか一項記載の方法。 30

【請求項 3 4】

前記二次抗体が、抗マウス抗体又は抗ウサギ抗体である、請求項 3 3 記載の方法。 40

【請求項 3 5】

前記二次抗体が標識されている、請求項 3 3 又は 3 4 記載の方法。

【請求項 3 6】

前記二次抗体が磁気ビーズ上に固定されている、請求項 3 3 又は 3 4 記載の方法。

【請求項 3 7】

前記免疫複合体を担持する前記磁気ビーズが、磁気分離装置を用いて前記生物学的試料  
から分離される、請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 3 8】

前記免疫複合体の破壊が、50% (v/v)メタノール/0.5% (v/v)ギ酸の存在下で行なわれる  
、請求項 3 0 ~ 3 7 のいずれか一項記載の方法。 50

## 【請求項 39】

前記検出された免疫複合体が定量される、請求項 30 ~ 38 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 40】

前記捕捉されたA ペプチドが、サンドイッチELISA、アミロイド 1-40 HTRF(登録商標)アッセイ、Alphascreen(商標)アッセイ、マルチプレックスアッセイシステム、質量分析、及びウェスタンブロット解析からなる群から選択される定量手段によって定量される、請求項 30 ~ 39 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 41】

前記捕捉されたA ペプチドが、定量手段としてのサンドイッチELISAによって定量される、請求項 40 記載の方法。

10

## 【請求項 42】

前記サンドイッチELISAが、A (x-y)の完全なN-末端に特異的である第1の抗体；及びA (x-y)のアミノ酸yで終わるC-末端に特異的である検出抗体を含む、請求項 41 記載の方法。

## 【請求項 43】

前記サンドイッチELISAが、配列番号2のA (1-40)の完全なN-末端に特異的である第1の抗体；及び配列番号2のA (1-40)のアミノ酸40で終わるC-末端に特異的である検出抗体を含む、請求項 42 記載の方法。

## 【請求項 44】

前記サンドイッチELISAが、配列番号1のA (1-42)の完全なN-末端に特異的である第1の抗体；及び配列番号1のA (1-42)のアミノ酸42で終わるC-末端に特異的である検出抗体を含む、請求項 42 記載の方法。

20

## 【請求項 45】

前記サンドイッチELISAが、配列番号2のA (1-40)のC-末端に特異的である第1の抗体；及び配列番号2のA (1-40)のAsp-Ala-Gluで始まる完全なN-末端に特異的である検出抗体を含む、請求項 42 記載の方法。

## 【請求項 46】

前記サンドイッチELISAが、配列番号1のA (1-42)のC-末端に特異的である第1の抗体；及び配列番号1のA (1-42)のAsp-Ala-Gluで始まる完全なN-末端に特異的である検出抗体を含む、請求項 42 記載の方法。

30

## 【請求項 47】

前記サンドイッチELISAが、配列番号13~24からなる群から選択されるA 標的ペプチドの完全なN-末端に特異的である第1の抗体；及び該配列番号13~24からなる群から選択されるA 標的ペプチドのC-末端に特異的である検出抗体を含む、請求項 42 記載の方法。

## 【請求項 48】

前記サンドイッチELISAが、配列番号13のA (3-38)の完全なN-末端に特異的である第1の抗体；及び配列番号13のA (3-38)のアミノ酸38で終わるC-末端に特異的である検出抗体を含む、請求項 42 記載の方法。

## 【請求項 49】

前記サンドイッチELISAが、配列番号19のA (11-38)の完全なN-末端に特異的である第1の抗体；及び配列番号19のA (11-38)のアミノ酸38で終わるC-末端に特異的である検出抗体を含む、請求項 42 記載の方法。

40

## 【請求項 50】

前記配列番号13~24からなる群から選択されるA 標的ペプチドのN-末端が、ピログルタミン酸に環化されており、前記第1の抗体が、該配列番号13~24からなる群から選択される前記A 標的ペプチドのピログルタミン酸形態を特異的に検出する、請求項 47 ~ 49 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 51】

前記第1の抗体が固定されている、請求項 42 ~ 50 のいずれか一項記載の方法。

50

## 【請求項 5 2】

前記検出抗体が標識されている、請求項 4 2 ~ 5 1 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 5 3】

A (x-y)の定量のためのELISAキットが用いられる、請求項 4 2 記載の方法。

## 【請求項 5 4】

前記ELISAキットが、アミロイド- (1-40)(N)ELISA(ABL, JP27714) ; A [1-40]ヒトELISAキット(Invitrogen) ; ヒトアミロイドベータ(アミロイド-b)、aa 1-40 ELISAキット(Wako Chemicals USA, Inc.) ; 及びアミロイドベータ1-40 ELISAキット(The Genetics Company)からなる群から選択される、配列番号2のA (1-40)の定量のためのELISAキットである、請求項 5 3 記載の方法。

10

## 【請求項 5 5】

前記ELISAキットが、アミロイド- (1-42)(N)ELISA(ABL, JP27712) ; A [1-42]ヒトELISAキット(Invitrogen) ; ヒトアミロイドベータ(アミロイド- )、aa 1-42 ELISAキット(Wako Chemicals USA, Inc.) ; アミロイドベータ1-40 ELISAキット(The Genetics Company) ; INNOTEST(登録商標) -アミロイド(1-42)(Innogenetics)からなる群から選択される、配列番号1のA (1-42)の定量のためのELISAキットである、請求項 5 3 記載の方法。

## 【請求項 5 6】

アルツハイマー病の鑑別診断のための、請求項 1 ~ 5 5 のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 5 7】

アルツハイマー病の初期段階の診断のための、請求項 1 ~ 5 5 のいずれか一項記載の方法。

20

## 【請求項 5 8】

軽度認知障害の診断のための、請求項 5 7 記載の方法。

## 【請求項 5 9】

アルツハイマー病の診断のための、請求項 1 0 ~ 2 5 のいずれかに定義される標的Aペプチドなどのオリゴマー-A ペプチドの使用。

## 【請求項 6 0】

アルツハイマー病の鑑別診断のための、請求項 5 9 記載の使用。

## 【請求項 6 1】

アルツハイマー病の初期段階の診断のための、請求項 5 9 又は 6 0 記載の使用。

30

## 【請求項 6 2】

軽度認知障害の診断のための、請求項 6 1 記載の使用。

## 【請求項 6 3】

生物学的試料中のオリゴマー状態の標的アミロイド ペプチド(Aベータ又はA )を測定する方法であって、以下の工程：

(a) 生物学的試料中の標的A ペプチドの第1の濃度( $c_a$ )を測定すること；

(b) 工程(a)から得られた標的A ペプチドを脱凝集すること；

(c) 該脱凝集したA ペプチドの第2の濃度( $c_d$ )を測定すること；及び

(d) 第2の濃度( $c_d$ )の値を第1の濃度( $c_a$ )の値で割った、 $c_d/c_a$ 比を決定すること；

を含み、

40

ここで、 $c_d/c_a$ 比が1を上回ることが、オリゴマー-A の存在を示す、前記方法。

## 【請求項 6 4】

前記脱凝集工程(b)が、アルカリの使用を含む、請求項 6 5 記載の方法。

## 【請求項 6 5】

請求項 6 3 又は 6 4 記載のオリゴマー状態のアミロイド ペプチドを測定する方法が使用される、インビトロでアルツハイマー病を診断する方法。

## 【請求項 6 6】

アルツハイマー病などの神経変性疾患を診断するキットであって、適当なアルカリ及び請求項 1 ~ 5 5 のいずれか一項記載の方法に従い該キットを使用するための指示書を含む、前記キット。

50

## 【請求項 67】

アルツハイマー病などの神経変性疾患を有する、有する疑いのある、又はそれに罹患しやすい対象における治療の効果を監視する方法であって、被験対象由来の生物学的試料中の請求項 1 ~ 55 のいずれか一項に記載のオリゴマー状態の標的アミロイド ペプチド(Aベータ又はA )を測定することを含む、前記方法。

## 【請求項 68】

被験対象から2回以上採取された生物学的試料中のオリゴマー状態の標的アミロイドペプチドを測定することを含む、請求項 1 ~ 55 又は 67 のいずれか一項記載の診断又は監視方法。

## 【請求項 69】

前記2回以上採取された生物学的試料中のオリゴマー状態の標的アミロイド ペプチドのレベルを比較することを含む、請求項 68 記載の診断又は監視方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

(発明の分野)

本発明は、オリゴマー状態のアミロイド の断片のバイオマーカーとしての使用を伴うアルツハイマー病の検出及び診断に関し、さらに、生物学的試料中のオリゴマー状態のアミロイド の断片を測定するための新規の方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

(発明の背景)

アルツハイマー病は、認知症の最も一般的な形態であり、全認知症障害の中で約65~70%の罹患率を有する(Blennowらの文献, 2006)。平均寿命の延長に起因して、この疾患は、日本及び中国のような高度先進工業国、並びに米国及び欧州で特別な問題になっている。アルツハイマー患者の数は、2001年の2400万人から2040年には8100万人に増加すると推定されている(Ferriらの文献, 2005)。現在、全世界のAD患者の治療及び介護の費用は、年間約2500億米ドルに達する。

## 【0003】

散発型のアルツハイマー病の進行は比較的緩徐であり、この疾患は、最初の症状の発症後、通常約10~12年間持続する。現在、信頼できる早期のAD診断を行ない、それを認知症の他の形態と区別することは極めて困難である。90%を上回る信頼度の正確な診断は、この疾患の後期にのみ可能となる。それ以前は、アルツハイマー病の可能性があるか又はその可能性が高いことを予測することしかできず、その場合の診断は、Knopmanらの文献, 2001; Waldemarらの文献, 2007、又はDuboisらの文献, 2007による特定の基準の使用に頼っている。しかしながら、神経変性は、最初の臨床症状が認められる20~30年前に始まる(Blennowらの文献, 2006; Jellinger KAの文献, 2007)。臨床期の開始は、通常、いわゆる「軽度認知障害」(MCI)によって特徴付けられる。この場合、患者は、測定可能な認知欠陥を示すが、この欠陥は、明確な形での認知症疾患の診断を可能にするほど十分でない(Petersenらの文献, 1999; Chetkowらの文献, 2008)。MCIを有する多くの患者はADに典型的な神経病理学的変化を有するが、この変化は、ADの初期段階の可能性はあるが、確実ではないことを意味する(Scheffらの文献, 2006; Markesberyらの文献, 2006; Bouwmanらの文献, 2007)。しかしながら、アルツハイマー病に進行しないMCI症例が多数ある。こうした症例では、他の因子が認知欠陥の原因となっている(Saitoらの文献, 2007; Jichaらの文献, 2006、及びPetersenらの文献, 2006)。その状態の悪化を全く示さないか又はある種の改善すら示すMCI患者もいるが、ほとんどのMCI症例の場合、認知欠陥は臨床的認知症に進む。この転換の年率は、約10~19%である(Gauthierらの文献, 2006; Fischerらの文献, 2007)。現在、軽度認知障害の様々な亜型を識別することができる臨床的過程、神経心理学的過程、及び画像診断過程の組合せがある(Devanandraの文献, 2007; Rossiらの文献, 2007; Whitwellらの文献, 2007; Panzaらの文献, 2007)。しかしながら、認知症のさ

10

20

30

40

50

らなる進行に関して、これらの亜型間に顕著な違いはない(Fischerらの文献, 2007)。したがって、初期段階で、好適には、その発症時に又はMCIの間に、アルツハイマー病の明確でかつ信頼できる診断を可能にする方法を開発することが最も重要である。

#### 【0004】

(先行技術のバイオマーカー)

アルツハイマー病のバイオマーカーは先行技術で既に記載されている。例えば、ADAS-cog、MMSE、DemTect、SKT、又は時計描画テストのような周知の心理テストとともに、バイオマーカーは、最初の診断の診断感度及び特異性を改善するだけでなく、疾患の進行を監視するとも考えられている。AD/MCIのバイオマーカーの開発の現状との関連で、将来の疾患を他の診断基準と関連付けることが提案された(Whitwellらの文献, 2007; Panzaらの文献, 2007; Hyman SEの文献, 2007)。バイオマーカーは、将来、古典的な神経-心理テストを支援するか又はそれにとって替わると考えられている。それらは、アルツハイマー病に対する薬剤の開発の代用マーカーとして非常に重要であるという共通の考えがある(Blennow Kの文献, 2004; Blennow Kの文献, 2005; Hampelらの文献, 2006; Lewczukらの文献, 2006; Irizarry MC, 2004)。

10

#### 【0005】

(構造バイオマーカー)

「磁気共鳴画像診断」(MRI)は、脳の変性萎縮の検出を可能にする画像診断法である(Barnes Jらの文献, 2007; Vemuriらの文献, 2008)。故に、内側側頭葉の萎縮(MTA)は、高齢患者の脳の海馬領域の変性による影響を受けやすく、これは、MRIによって非常に明確に可視化することができるが、アルツハイマー病に特異的ではない。軽度のMTAは、他の認知症でより高頻度に見られるわけではないが(Barkhofらの文献, 2007)、それは確かにMCIと相関する(Mevelらの文献, 2007)。このため、神経変性がアルツハイマー病であるのか又はアルツハイマー病の初期段階であるのかをMRIデータのみから判定するのは不可能である。さらなる画像診断法は、アミロイド沈着物上の検出分子(PIB)の蓄積を可視化する陽電子放出断層撮影法(PET)である。チオフラビンT-類似体( $^{11}\text{C}$ )PIBが、それぞれ、MCI又は軽度アルツハイマー病を有する患者の脳の特定の領域で次第に蓄積することが見出されている(Kemppainenらの文献, 2007; Klunkらの文献, 2004; Roweらの文献, 2007)。残念ながら、これは、認知症を有さない対象においても検出することができる(Pikeらの文献, 2007)。しかしながら、この現象がさらなる研究で確認されることになれば、これはおそらく、PETによるアミロイド沈着物の検出によってアルツハイマー病の前臨床段階の検出が可能になることを示すであろう。最もよく利用されるプロセスである、MRI及びPETの他に、アルツハイマー病のさらなる構造バイオマーカーが知られている: CBF-SPECT、CMRg1-PET(グルコース代謝プロトン分光法(H-1 MRS)、高磁場強度の機能的MRI、ボクセルに基づく形態計測法(voxel-based morphometry)、(fMRIによって検出される)内側基底側頭葉の増強された活性化、ミクログリア細胞の検出のための(R)-[ $^{11}\text{C}$ ]PK11195 PET(Huangらの文献, 2007; Kantarciらの文献, 2007; Petrellaらの文献, 2007; Hamalainenらの文献, 2007; Kircherらの文献, 2007; Krophollerらの文献, 2007)。

20

30

#### 【0006】

(CSFバイオマーカー)

老人斑は、アルツハイマー病の病理学的特徴の1つである。これらの斑は、主にA $\beta$  (1-42)ペプチドからなる(Attems J, 2005)。いくつかの研究では、MCI患者のCSFでの低レベルのA $\beta$  (1-42)がアルツハイマー病の進行において、その更なる進行と特異的に相関することを示した(Blennow及びHampelの文献, 2003; Hanssonらの文献, 2006及び2007)。CSFでの減少は、おそらく、脳におけるA $\beta$  (1-42)の凝集の増強によるものである(Faganらの文献, 2006; Princeらの文献, 2004; Strozzykらの文献, 2003)。別の可能性としては、CSFでのより低いレベルの検出をもたらす半可溶性A $\beta$  (1-42)オリゴマー(Walshらの文献, 2005)の出現である。特に、アルツハイマー病の初期段階では、A $\beta$  (1-42)の濃度の減少が検出されると同時に、CSF中のタウタンパク質及びホスホ-タウタンパク質の量の増加がそれぞれ検出され得る(Ewersらの文献, 2007; Lewczukらの文献, 2004)。バイオマーカーのよ

40

50

り良好な予測可能性を提供するために、通常、タウ/A (1-42)比を用いて、それを認知症を有さない高齢者の認知欠陥の予測と関連付けることが試みられる(Faganらの文献, 2007; Gustafsonらの文献, 2007; Hanssonらの文献, 2007; Liらの文献, 2007; Stomrudらの文献, 2007)、及びMCI患者(Hampelらの文献, 2004; Maccioniらの文献, 2006; Schonknechtらの文献, 2007)。A (1-42)、タウ、ホスホ-タウ-Thr231の生前のCSFレベルと死後の脳の組織病理学的変化とのさらなる相関がAD患者で検出された(Clarkらの文献, 2003; Burgerらの文献, 2006)。しかしながら、他の研究では、CSFバイオマーカーと、A (1-42)、APOE 4-アレルの場合の総タウ及びホスホ-タウ、剖検後の斑及びもつれの量(tangle load)との間に相関を検出することはできなかった(Engelborghsらの文献, 2007; Buergerらの文献, 2007)。興味深い側面が多施設研究で見出された。総タウ及びホスホ-タウ(181)のレベルの増加は、A (1-42)/A (1-40)の比の低下と相関するが、A (1-42)単独とは相関しないようである(Wiltfangらの文献, 2007)。しかしながら、CSFタウのレベルの増加は、どれもニューロンの喪失と関連するクロイツヘルト-ヤコブ病、脳梗塞、及び脳血管認知症のような他のCNS疾患でも検出された(Buergerらの文献, 2006(2); Biblらの文献, 2008)。さらに可能性のあるバイオマーカーは、MCIの指標としてのCSF中のBACE 1活性の増加である(Zhongらの文献, 2007)。BACE 1活性の増加が、A 産生の増加、したがって、ペプチドの凝集の増加をもたらすことも論じられている。アルツハイマー病は、神経炎症過程を伴うと考えられる。したがって、CSFの抗ミクログリア細胞抗体は、ADにおけるこれらの炎症過程の可能性のあるバイオマーカーである(McReaらの文献, 2007)。

10

20

## 【0007】

アルツハイマー病の早期診断を可能にすると考えられるバイオマーカーが多数あるにもかかわらず、信頼できる明確な診断を保証する単一のバイオマーカーは今のところない。これは、通常、ほとんどの研究が、それぞれのバイオマーカーと臨床診断との比較を使用するためである。より良いアプローチとは、バイオマーカーとアルツハイマー病の病理学的な原因との相関であろう。

## 【0008】

可能性あるアプローチは、A (1-40)及びA (1-42)が実際に好適な神経化学的認知症マーカーであるかどうかを明らかにするための、明確に特定され、定義された神経病理学的認知症疾患の免疫沈降されたCSF試料の反復解析であろう(Jellingerらの文献, 2008)。アルツハイマー病のこれまで知られていない新規のバイオマーカーを発見するために、通常、CSF試料を比較プロテオミクス解析で解析して感度が強化されたADの診断を行ない、他の変性認知症障害との識別も可能にする(Finehoutらの文献, 2007; Castanoらの文献, 2006; Zhangらの文献, 2005; Simonsenらの文献, 2007; Lescuyerらの文献, 2004; Abdiらの文献, 2006)。プロテオミクス解析の後、潜在的な新しいバイオマーカーは、その好適性及び病理学的原因との相関について詳細に解析しなければならない。プロテオミクス解析によって発見されたバイオマーカーの典型例は、多発性硬化症のバイオマーカーとしての切断されたシスタチンCである。このバイオマーカーは、後に、貯蔵アーティファクトであることが分かった(Iraniらの文献, 2006; Hanssonらの文献, 2007(2))。

30

## 【0009】

## (血漿バイオマーカー)

頻繁に用いられる血漿バイオマーカー、すなわち、A ペプチドの他に、さらなる炎症血漿マーカーが、認知症(Ravagliaらの文献, 2007; Engelhartらの文献, 2004)、及び特にアルツハイマー病(Mottaらの文献, 2007)の早期診断に用いられる。これらのすべては今なお議論されている。さらに可能性のあるバイオマーカーは、AD患者及び健康対象由来の血漿の比較プロテオミクス解析によっても発見された(Germanらの文献, 2007; Rayらの文献, 2007)。その特徴は、これらの生体分子が実際にアルツハイマー病に特異的であり、バイオマーカーとして適当であることを示すであろう。前述のどのバイオマーカーについても、その特異性又は安定性のいずれかを示す説得力のある又は好適なデータは得られていない。

40

## 【0010】

50

CSF中のアミロイド の解析とは対照的に、血漿中の好適なA バイオマーカーに関して今までに得られている結果は、信頼性がないか、又は明確性がない。いくつかの研究では、血漿中のA (1-42)/A (1-40)の比の減少と、認知健常者のそれぞれMCI又はアルツハイマー患者への転換の増加との間の相関が認められた(Graff-Radfordらの文献, 2007; van Oijenらの文献, 2006; Sundelofらの文献, 2008)。しかしながら、他の研究では、A (1-42)血漿レベルの低下は、MCIからADへの転換のマーカーである可能性がより高く(Songらの文献, 2007)、アルツハイマー病の場合に直面する、神経変性目的のマーカーとしては適さない(Pesaresiらの文献, 2006)ことが見出された。しかしながら、これらの研究の大半は、健康対照と孤発性アルツハイマー病を有する患者とのA 血漿レベルの違いを示していない(Fukumotoらの文献, 2003; Kosakaらの文献, 1997; Scheunerらの文献, 1996; Sobowらの文献, 2005; Tamaokaらの文献, 1996; Vandersticheleらの文献, 2000)。いくつかの研究は、血漿中のA のレベルが、脳で見られるようなレベルと相関せず(Faganらの文献, 2006; Freemanらの文献, 2007)、また、それがCSFで見られるレベルとも相関しないことも示した(Mehtaらの文献, 2001; Vandersticheleらの文献, 2000)。最近の研究で、A (1-40)及びA (1-42)についてCSFと血漿との間で相関が検出されたが、これは健康対照でしか見られなかった。この相関は、MCI及びADでは検出することができなかった。これは、脳内のA 沈着物によるCSF A と血漿A の間のバランスの破壊によって説明される(Giedraitisらの文献, 2007)。一般に、血漿A (1-42)レベルがMCI又はADの信頼できるバイオマーカーではないと考えられている(Blaskoらの文献, 2008; Mehtaらの文献, 2000; Brettschneiderらの文献, 2005)のに対し、血漿A (1-38)/A (1-40)比の減少は血管性認知症のバイオマーカーと考えられ、CSFマーカーの予測可能性に近づいている(Bibiらの文献, 2007)。

#### 【 0 0 1 1 】

これまで、A オリゴマーは、アルツハイマー病のバイオマーカーとして注目されてこなかった。しかし、これらは、神経変性過程の開始時において決定的役割を果たすと考えられている(Walsh及びSelkoeらの文献, 2007)。いくつかの研究において、神経毒性の影響は、8kDaのA 二量体から100kDaを超える前原線維の時点まで見られた(Lambertらの文献, 1998; Walshらの文献, 2002; Keayedらの文献, 2004; Clearyらの文献, 2005)。さらに、そのようなA オリゴマーは、ヒト体液(human liquor)に見い出されている(Pitschkeらの文献, 1998; Santosらの文献, 2007; Klyubinらの文献, 2008)。それらの神経毒性に加えて、オリゴマーはまた、ヒト試料中のA 濃度の測定に影響を及ぼす。オリゴマー化は、A ペプチドのC末端エピトープの遮蔽をもたらす(Roherらの文献, 2000)、C末端特異的ELISAによって検出されるA レベルの過小の見積もりを招く(Stenhらの文献, 2005)。したがって、試料中のA オリゴマーの存在は、ELISAシグナルを低下させる。これは、正確なA 濃度の測定において問題となり得るが、この事実は、生物学的試料中のオリゴマーの量及びオリゴマー化のレベルを測定する機会をも提供する。本明細書中に提示されるデータは、驚くべきことに、A オリゴマーの脱凝集の前及び後にELISAシグナルを測定することによって、A オリゴマーの含有量を間接的に測定することができることを示している。両値の比率は、それぞれヒト血漿における溶解性のA オリゴマーの濃度及びオリゴマーレベルを反映する。出願人らの本発明とは別に、ごく最近、類似のアプローチが発表された(Englundらの文献, 2009)。彼らは、非変性条件下でELISAによって、及び変性条件下でSDS-PAGE続くウェスタンブロット分析を用いて、A 1-42濃度を測定することによって、ヒトCSF試料中のA 1-42オリゴマー比を測定した。しかしながら、このオリゴマーレベルの間接的な測定方法は、いくつかの重大な問題を有する：

1. SDS-PAGEでは、A 1-42を十分に脱凝集することができない。出願人らの実験でも、SDSゲル上のバンドに反映されるA 三量体及び四量体が見られた。

2. ELISAで測定されたA 濃度とウェスタンブロットで測定されたA 濃度との比較は不完全である。

#### 【 0 0 1 2 】

別のより一般的なアプローチは、A オリゴマーの直接測定である。しかしながら、特

にオリゴマーの血漿A をバイオマーカーとして用いるそのような方法は、A ペプチドが非常に疎水性であるために、極めて確立するのが困難である。現在開示されているアッセイシステムは、ELISAシステムにおいて、A オリゴマー特異的抗体を使用している(Englundらの文献, 2007; Schupfらの文献, 2008)。しかしながら、そのようなオリゴマー特異的抗体に基づいたELISAの使用は、従来のA ELISAシステムと同様の問題を有する。該方法は、極めて不十分な分析感度しか達成せず、かつ検体とマトリックス、すなわち、血漿との間の極めて複雑な相互作用を伴う大きな問題と直面する。通常、A の定量化にはELISA又はELISA型システム(マルチプレックス)が使用され、近年では、血漿中のA オリゴマーにも使用されている。このような検出システムの特異化は、通常、不十分に分析されるだけであるか、又は完全に無視される。例えば、回収率のような重要な項目は、刊行物において、分析されないか、又は記載されていない。しかしながら、回収率は、血漿において生じるA ペプチド又はオリゴマーの完全な描写の提供に決め手となるものである。該研究間の相違もこれら回収率の違いに起因し得る。ELISA又はマルチプレックスシステムのさらなる重要な特徴は、その線形性である。したがって、血漿中の検体の測定された濃度は、非常に低い程度か又は全くない程度まで、測定に使用された希釈法にのみ依存すべきである。しかしながら、これは、血漿中のA の定量化について、ELISAとマルチプレックスシステムのいずれも可能ではない。したがって、1~20倍の希釈についての計算された血漿A (1-42)濃度間の相違は、同じ試料の1~2倍希釈より3倍高いものであった(Hanssonらの文献, 2008)。この例は単独で、いくつかの研究における血漿試料の異なる希釈の使用が、同物の比較を不可能とさせることを示している。

10

20

#### 【0013】

したがって、特に、血漿中のオリゴマーのA を高い信頼性で測定可能な新規方法を提供することが、本発明の目的である。本発明もまたA オリゴマーの間接的な測定を使用するが、先行技術と対照的に、どちらの値(変性状態及び非変性状態下)も、比較可能性を保証するために、A 特異的ELISAで測定される。A ペプチドを単量体及びオリゴマー形態に分離する最初の免疫沈降工程の後に、我々の新規脱凝集法が続くので、後続のELISAは、回収及び/又は線形性の問題による制限を受けない。

#### 【0014】

さらに、本発明は、信頼できる方法で測定することができ、かつアルツハイマー病の信頼できかつ明確な予測に使用することができる診断マーカーを提供することを目的とする。

30

#### 【発明の概要】

#### 【0015】

本発明の第1の態様によると、神経変性疾患、例えば、アルツハイマー病及び軽度認知障害を診断する又は監視する方法が提供され、該方法は、被験対象由来の生物学的試料中のオリゴマー状態の標的アミロイド ペプチド(Aベータ又はA )を測定することを含み、以下の工程：

- (a) 生物学的試料中の標的A ペプチドの第1の濃度( $c_a$ )を測定すること；
  - (b) 工程(a)から得られた標的A ペプチドを脱凝集すること；
  - (c) 該脱凝集したA ペプチドの第2の濃度( $c_d$ )を測定すること；及び
  - (d) 第2の濃度( $c_d$ )の値を第1の濃度( $c_a$ )の値で割った、 $c_d/c_a$ 比を決定すること；
- を含むことを特徴とし、ここで、 $c_d/c_a$ 比が1.5より低いことが、神経変性疾患の陽性診断を示す。

40

#### 【0016】

本発明の第2の態様によると、生物学的試料中のオリゴマー状態の標的アミロイド ペプチド(Aベータ又はA )を測定する方法が提供され、該方法は、以下の工程：

- (a) 生物学的試料中の標的A ペプチドの第1の濃度( $c_a$ )を測定すること；
- (b) 工程(a)から得られた標的A ペプチドを脱凝集すること；
- (c) 該脱凝集したA ペプチドの第2の濃度( $c_d$ )を測定すること；及び
- (d) 第2の濃度( $c_d$ )の値を第1の濃度( $c_a$ )の値で割った、 $c_d/c_a$ 比を決定すること；

50

を含み、

ここで、 $c_d/c_a$ 比が1を上回ることが、オリゴマーA の存在を示す。

【0017】

(定義)

本明細書中で使用される「オリゴマー」とは、限定された数の凝集されたA ペプチド単量体ユニットを指す。そのようなオリゴマーの例を挙げると、二量体、三量体及び四量体がある。用語「脱凝集」とは、オリゴマー形態のA ペプチドを単量体形態のA ペプチドに変換するプロセスを指す。

【0018】

本願の意味における「捕捉抗体」は、標的A ペプチドに結合する抗体を包含することが意図される。

10

【0019】

好適には、捕捉抗体は、高親和性で標的A ペプチドに結合する。好適には、捕捉抗体は、高親和性で標的A ペプチドに結合する。本発明との関連で、高親和性は、 $10^{-7}$ M以下の $K_D$ 値、好ましくは $10^{-8}$ M以下の $K_D$ 値、又はさらにより好ましくは $10^{-9}$ M~ $10^{-12}$ Mの $K_D$ 値を有する親和性を意味する。

【0020】

用語「抗体」は、最も広範な意味で使用され、かつ具体的には、それらが所望の生物学的活性を示す限りは、無傷のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷の抗体から形成された多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、及び抗体断片を対象としている。抗体は、例えばIgM、IgG(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、もしくはIgG4)、IgD、IgA、又はIgEであることができる。しかしながら、好適には、本抗体はIgMではない。「所望の生物学的活性」は、標的A ペプチドへの結合である。

20

【0021】

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、一般には無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、及びFv断片:ダイアボディ;単鎖抗体分子;並びに抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

【0022】

本明細書中で使用される用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体をいい、すなわちその集団を構成している個々の抗体は、少量で存在し得る可能性のある天然の突然変異以外は、同一である。モノクローナル抗体は、単一の抗原性部位に対する高度な特異性がある。さらに、典型的には様々な抗原決定基(エピトープ)に対する様々な抗体を含む「ポリクローナル抗体」調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の抗原決定基に対するものである。その特異性に加え、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンが夾雑しないハイブリドーマ培養により合成される点で、それらは有利であり得ることが多い。「モノクローナル」とは、抗体の実質的に均質な集団から得られるものとしての抗体の特徴を示すものであり、かつ任意の特定の方法による抗体産生を必要とするものと解釈されるべきではない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerらの文献(Nature, 256:495 (1975))で最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製することができるか、又は一般に周知の組換えDNA法によって作製することができる。「モノクローナル抗体」は、例えば、Clacksonらの文献(Nature, 352:624-628 (1991))及びMarksらの文献(J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991))に記載された技術を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

30

40

【0023】

モノクローナル抗体は、本明細書では特に、重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種に由来する抗体又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同であるが、この鎖(複数)の残りは、別の種に由来する抗体又は別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同である、キメラ抗体(免疫グロブリン)、さらには所望の生物学的活性を示す限り、そのような抗体の断片を含む。

50

## 【0024】

非ヒト(例えば、マウス)抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含む、キメラ免疫グロブリン、その免疫グロブリン鎖又は断片(例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、又は抗体の他の抗原結合性部分配列)である。大部分に関して、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)由来の残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット又はウサギなどの非ヒト種(ドナー抗体)のCDR由来の残基により置き換えられている、ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基が、対応する非ヒト残基により置き換えられている。さらにヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDR又はフレームワーク配列にも認められない残基を含むことができる。

10

## 【0025】

これらの修飾は、抗体性能をさらに純化しかつ最適化するために行われる。概してヒト化抗体は、少なくとも1つの、及び典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、ここで、全て又は実質的に全てのCDR領域は、非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、かつ全て又は実質的に全てのFR領域は、ヒト免疫グロブリン配列のFR領域である。ヒト化抗体は、任意に、免疫グロブリン定常領域(Fc)の、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部も含む。さらなる詳細に関しては、Jonesらの文献、Nature, 321:522-525(1986)、Reichmannらの文献、Nature, 332:323-329(1988)、及びPrestaの文献、Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596(1992)を参照されたい。ヒト化抗体は、抗体の抗原結合領域が関心対象の抗原によるマカクザルの免疫化により産生された抗体に由来するPrimatized(商標)抗体、又は「ラクダ化」抗体を含む。

20

## 【0026】

「単鎖Fv」又は「sFv」抗体断片は、抗体のV<sub>H</sub>ドメイン及びV<sub>L</sub>ドメインを含み、ここでこれらのドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在する。一般に、Fvポリペプチドは、V<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、このリンカーによって、sFvは、抗原結合のための望ましい構造を形成することができる。sFvの総説については、Pluckthunの文献、「モノクローナル抗体の薬理学(The Pharmacology of Monoclonal Antibody)」, 第113巻, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, ニューヨーク, 269-315頁(1994)を参照されたい。

## 【0027】

用語「ダイアボディ」は、その断片が、同じポリペプチド鎖内の軽鎖可変ドメイン(V<sub>D</sub>)に接続された重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)を含む、2つの抗原結合部位を伴う小型の抗体断片(V<sub>H</sub>-V<sub>D</sub>)をいう。同じ鎖上の2つのドメインを対合させるには短すぎるリンカーを使用することにより、これらのドメインは、別の鎖の相補ドメインと対合するように強制され、かつ2つの抗原結合部位を形成する。ダイアボディは、Hollingerらの文献、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)でより十分に説明されている。

30

## 【0028】

「単離された」抗体は、同定されかつその天然の環境の成分から分離及び/又は回収されたものである。その天然の環境の夾雑成分は、この抗体の診断的又は治療的使用を妨げる物質であり、かつこれは、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性又は非タンパク質性溶質を含むことができる。適当な実施態様では、抗体は、(1)Lowry法で決定したときに抗体の95重量%を上回るまで、及び最も好ましくは99重量%を上回るまで、(2)スピニングカップシーケネーター(spinning cup sequenator)の使用により、N-末端又は内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、又は(3)クマーシーブルーもしくは好適には銀染色を用いる還元もしくは非還元条件下のSDS-PAGEによって均質になるまで精製される。単離された抗体は組換え細胞内のインサイチュの抗体を含む。というのは、抗体の天然環境の少なくとも1つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程によって調製される。

40

## 【0029】

本明細書中で使用される表現「細胞」、「細胞株」、及び「細胞培養物」は、互換的に

50

使用され、かつそのような表記は全て子孫を含む。したがって、語句「形質転換体」及び「形質転換された細胞」は、継代(transfer)された数とは関係なく、それらから派生した初代の対象細胞及び培養物を含む。全ての子孫は、故意の又は故意でない突然変異のために、DNA含有量が正確には同一でないことがあり得ることも理解される。最初に形質転換された細胞でスクリーニングされたものと同じ機能又は生物学的活性を有する突然変異体子孫が含まれる。はっきりと区別できる表記が意図される場合、これは文脈から明からになるであろう。

【0030】

本明細書中で使用される用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、互換性があり、かつペプチド結合により連結されたアミノ酸で構成された生体分子を意味すると定義される。

10

【0031】

本明細書中で使用される用語「ある(a、an及びthe)」は、「1以上」を意味するように定義され、かつ文脈が不適切でない限りは、複数を含む。

【0032】

「アミロイド、A、又は-Aミロイド」は、当技術分野で認識された用語であり、アミロイドタンパク質及びペプチド、アミロイド前駆体タンパク質(APP)、ならびにそれらの修飾物、断片、及び任意の機能的等価物をいう。特に、本明細書中で使用されるアミロイドとは、APPのタンパク質分解的切断によって産生される任意の断片を意味するが、とりわけ、アミロイド病理に関与又は関連する断片を意味し、これには、限定するものではないが、配列番号3のA(1-38)、配列番号2のA(1-40)、及び配列番号1のA(1-42)が含まれる。

20

【0033】

本発明の文脈において、「アミロイドの断片」とは、配列番号13のコアアミロイド断片A(3-38)を含む全てのアミロイドペプチドである。本発明の目的により好適なものは、配列番号19のコアアミロイド断片A(11-38)を含む全てのアミロイドペプチドである。そのような、配列番号19のA(11-38)のアミノ酸配列を含むA断片は、特にA(x-y)断片であり、これは、アルツハイマー病及び軽度認知障害などの神経変性疾患の結果として対象において蓄積することが示されている。

30

ここで、

xは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10及び11から選択される整数と定義される。

好ましくは、xは1、2、3及び11から選択される整数である。

より好ましくは、xは1である。

さらにより好ましくは、xは11である。

yは、38、39、40、41、42及び43から選択される整数と定義される。

好ましくは、yは38、40又は42、例えば、40又は42である。

より好ましくは、yは40である。

さらにより好ましくは、yは38である。

【0034】

A(x-y)断片に適当な例は、下記のものである：

40

A(1-38) (配列番号3)、

A(1-39) (配列番号4)、

A(1-40) (配列番号2)、

A(1-41) (配列番号5)、

A(1-42) (配列番号1)、

A(1-43) (配列番号6)、

A(2-38) (配列番号7)、

A(2-39) (配列番号8)、

A(2-40) (配列番号9)、

A(2-41) (配列番号10)、

50

- A (2-42) (配列番号11)、
- A (2-43) (配列番号12)、
- A (3-38) (配列番号13)、
- A (3-39) (配列番号14)、
- A (3-40) (配列番号15)、
- A (3-41) (配列番号16)、
- A (3-42) (配列番号17)、
- A (3-43) (配列番号18)、
- A (11-38) (配列番号19)、
- A (11-39) (配列番号20)、
- A (11-40) (配列番号21)、
- A (11-41) (配列番号22)、
- A (11-42) (配列番号23)、及び
- A (11-43) (配列番号24)。

10

## 【0035】

「機能的等価物」は、本発明によって記載されているような検出のための方法又は診断のための方法を受けよう選択された患者群で天然に生じ得るA (x-y)の全ての突然変異体又は変異体を包含する。より具体的には、本発明の文脈での「機能的等価物」は、A (x-y)の機能的等価物とその突然変異体又は変異体であり、かつアルツハイマー病で蓄積することが示されていることを意味する。機能的等価物は、それぞれのA (x-y)ペプチドと比較して、30以下、例えば20、例えば10、特に5、及び特に2、又は1つだけの突然変異を有する。機能的等価物は突然変異した変異体も包含し、それには、例として、アミノ酸Asp-Ala-Gluで始まり、それぞれ、Gly-Val-Val及びVal-Ile-Alaで終わる全てのA ペプチドが含まれる。

20

## 【0036】

本文脈での特に有用な等価物はA (1-40)(配列番号2)及びA (1-42)(配列番号1)のものであり、これらは、Irieらの文献、2005によって記載されているもの、すなわち、A の鳥取型、フラマン型、オランダ型、イタリア型、北極型、及びアイオワ型突然変異である。機能的等価物は、スウェーデン型、オーストリア型、フランス型、ドイツ型、フロリダ型、ロンドン型、インディアナ型、及びオーストラリア型変異体のような -又は -セクレターゼ切断部位に隣接する突然変異を有するアミロイド前駆体タンパク質に由来するA ペプチドも包含する(Irieらの文献、2005)。

30

## 【0037】

「修飾アミロイド、A 又は -アミロイド」とは、アミロイド タンパク質及びペプチド、アミロイド 前駆体タンパク質(APP)、断片並びにその機能的等価物の様々なアミノ酸部位における全ての修飾を包含する。本文脈で有用なものは、前記アミロイド ペプチド及びタンパク質、アミロイド 前駆体タンパク質(APP)、断片、及び機能的等価物のN-末端及び/又はC-末端での修飾である。特に、グルタミン及びグルタミン酸残基での修飾、例えば、N末端のグルタミン又はグルタミン酸残基のピログルタミン酸への環化などが有用である。本発明の適当な例は、N末端がグルタミン酸残基で始まり、該N末端のグルタミン酸残基がピログルタミン酸に修飾される配列番号13~24のアミロイド ペプチドである。例えば、アスパラギン酸のイソアスパラギン酸への変換のようなアスパラギン酸残基での修飾、も有用である。本発明の適当な例は、アミノ酸位置1及び/又は7のアスパラギン酸残基がイソアスパラート(isoaspartate)に変換される配列番号1~6のアミロイド ペプチドである。さらに適当な例は、アミノ酸位置6のアスパラギン酸残基がイソアスパラートに変換される配列番号7~12のアミロイド ペプチドである。さらに適当な例は、アミノ酸位置5のアスパラギン酸残基がイソアスパラートに変換される配列番号13~18のアミロイド ペプチドである。

40

## 【0038】

「サンドイッチELISA」は、通常、検出しようとするタンパク質の異なる免疫原性部分

50

、又はエピトープに各々結合することができる2つの抗体の使用を含む。サンドイッチアッセイでは、被験試料検体は、固体支持体に固定された第1の抗体によって結合させられ、その後、第2の抗体が検体に結合し、その結果、不溶性の3つの部分からなる複合体を形成する。第2の抗体それ自体は、検出可能部分で標識されていてもよいし(直接サンドイッチアッセイ)、又は検出可能部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定されてもよい(間接サンドイッチアッセイ)。例えば、サンドイッチアッセイの1つの適当なタイプは、ELISAアッセイであり、その場合、検出可能部分は酵素である。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】二価免疫沈降システムは捕捉効率を改善する。(A)様々な抗体組合せの使用によるCyp18溶液及びヒト血漿からのA<sub>1-40</sub>の回収(B)二価捕捉システムの概略図(網掛け:4G8抗体、灰色:x-40抗体、黒色:磁気ビーズにコンジュゲートされた抗マウス抗体)。

【図2】ヒト血漿由来のオリゴマー状態のA<sub>1-40</sub>ペプチドの測定。脱凝集後に測定した濃度と脱凝集なしに測定した濃度との比は、オリゴマー状態のA<sub>1-40/42</sub>を反映する。

【図3】DemTectテスト。DemTectスケールによるAD患者及び健康対象(第I群:18~30歳;第II群:31~45歳;第III群:46~65歳)の分類の違いの結果の平均値(平均±SD)。

【図4】ミニメンタルステートテスト(Mini-Mental-State Test)。ミニメンタルステートテストによるAD患者及び健康対象(第I群:18~30歳;第II群:31~45歳;第III群:46~65歳)の分類の違いの結果の平均値(平均±SD)。

【図5】時計描画テスト。時計描画テストによるAD患者及び健康対象(第I群:18~30歳;第II群:31~45歳;第III群:46~65歳)の分類の違いの結果の平均値(平均±SD)。

【図6】オリゴマー状態の平均値、AD群対対照群のT-検定。<sup>\*\*</sup>T-検定、 $p < 0.01$ ; <sup>\*\*\*</sup>T-検定、 $p < 0.001$

【図7】血漿中の全オリゴマー量の反映としてのオリゴマー状態のA<sub>1-40</sub>+A<sub>1-42</sub>。

【発明を実施するための形態】

【0040】

(発明の詳細な説明)

本発明の第1の態様によると、神経変性疾患、例えば、アルツハイマー病及び軽度認知障害を診断する又は監視する方法が提供され、該方法は、被験対象由来の生物学的試料中のオリゴマー状態の標的アミロイドペプチド(A<sub>β</sub>又はA<sub>β</sub>)を測定することを含み、以下の工程:

- 生物学的試料中の標的A<sub>β</sub>ペプチドの第1の濃度( $c_a$ )を測定すること;
- 工程(a)から得られた標的A<sub>β</sub>ペプチドを脱凝集すること;
- 該脱凝集したA<sub>β</sub>ペプチドの第2の濃度( $c_d$ )を測定すること;及び
- 第2の濃度( $c_d$ )の値を第1の濃度( $c_a$ )の値で割った、 $c_d/c_a$ 比を決定すること;

を含むことを特徴とし、

ここで、 $c_d/c_a$ 比が1.5より低いことが、神経変性疾患の陽性診断を示す。

【0041】

驚くべきことに、本明細書に提示されたデータは、オリゴマー状態のA<sub>β</sub>が、対照患者と比較した場合に、アルツハイマー病患者で顕著に低下したことを示した。したがって、オリゴマー状態のA<sub>β</sub>は、アルツハイマー病の信頼でき、かつ明確な予測となると考えられる。 $(c_d/c_a)$ 比1.0は、試料中にオリゴマーがないことを示す。より高い $c_d/c_a$ 比(すなわち、 $> 1.0$ の比率)は、試料中のより多くの量のオリゴマーを反映しているか、又はより密集したオリゴマー(エピトープの接触性が低い)を反映している。1.5よりも低い $c_d/c_a$ 比(すなわち、1.0と1.5の間の比率)、例えば、1.4未満、1.3未満、1.2未満、1.1未満又は1.05未満では、アルツハイマー病などの神経変性疾患の陽性診断を示すことが見出された。

【0042】

本発明の別の実施態様によると、神経変性疾患、例えば、アルツハイマー病及び軽度認知障害を診断する又は監視する方法が提供され、該方法は、被験対象由来の生物学的試料

中のオリゴマー状態の標的アミロイド ペプチド(Aベータ又はA )を測定することを含み、以下の工程：

- (a) 生物学的試料中の標的A ペプチドの第1の濃度( $c_a$ )を測定すること；
- (b) 工程(a)から得られた標的A ペプチドを脱凝集すること；
- (c) 該脱凝集したA ペプチドの第2の濃度( $c_d$ )を測定すること；及び
- (d)  $c_d$ と $c_a$ の値を合計すること；

を含むことを特徴とし、

ここで、 $c_d$ と $c_a$ の合計の値が3.0より低いことが、神経変性疾患の陽性診断を示す。

【0043】

$c_d$ と $c_a$ の合計が、2.9未満、2.8未満、2.7未満、2.6未満、2.5未満、2.4未満又は2.3未満では、アルツハイマー病などの神経変性疾患の陽性診断を示すことが見出された。

10

【0044】

大半の研究で、工程(a)及び(c)での標的A ペプチドの濃度は、捕捉抗体及び検出抗体からなるサンドイッチELISAシステムで測定した。抗体(150kDa)のサイズと比較すると、単量体のA ペプチド(4.5kDa)は非常に小さい。ペプチドの凝集性のために、それらは、オリゴマー、原線維といえるほどの前原線維を形成する傾向がある。このような凝集体内部では、A 単量体は密集しており、結果として、立体障害又はエピトープの非接触性のために、全ての単量体に検出抗体を結合することはできない。検出されるオリゴマーのA 濃度は、単量体のそれより低い。これは、血漿及びCSF中のA レベルのそれぞれの過小の見積もりを招くであろう。測定濃度と実際の濃度との相違は、オリゴマーの量とその密集性に依存する。逆に、A 凝集の量、又はより正確には負荷を受けるエピトープは、オリゴマーの存在下で検出された濃度と、オリゴマーを単量体に完全に脱凝集した後の濃度とを比較することによって測定することができる。該方法の原理を図2に示す。

20

【0045】

一実施態様において、脱凝集工程(b)は、アルカリの使用を含む。さらなる実施態様において、工程(b)の脱凝集に使用されるアルカリは、水酸化ナトリウム、例えば、500mMの水酸化ナトリウムである。アルカリ、特に水酸化ナトリウムなどの強アルカリを使用する利点は、より効果的な脱凝集が達成されることにある。例えば、観察可能な量の二量体、三量体又は四量体を含まない、高比率の単量体が得られる。

【0046】

一実施態様において、脱凝集工程(b)は、メタノールなどの適当な溶媒、例えば、50%(v/v)のメタノールの使用をさらに含む。

30

【0047】

一実施態様において、脱凝集工程(b)は、インキュベーション工程を含む。さらなる実施態様において、該インキュベーション工程は、室温で少なくとも2分間のインキュベーションを含む。さらなる実施態様において、該インキュベーション工程は、室温で少なくとも10分間のインキュベーションを含む。

【0048】

A ペプチドは、アミロイド前駆体タンパク質(APP)から酵素 -及び -セクレターゼによる連続的な切断の後に遊離する。 -セクレターゼによる切断は、主にA (1-40)及びA (1-42)ペプチドの生成をもたらすだけでなく、主に位置38又は43で終了する。これは、そのC-末端が異なり、かつ凝集、原線維形成、及び神経毒性の異なる効力を示す。また、 -セクレターゼによる切断は、異なるN-末端を生成する。ペプチド及び他の酵素による後続の修飾は、例えば、位置2、3、4及び11で始まるA ペプチドなどの主要な種をもたらす。一方、位置3及び11のグルタミン酸で始まる種は、ピログルタミン酸に変換することができ、これらのペプチドは特に疎水性であり、急速に凝集する傾向がある(Schillingらの文献, 2004; Picciniらの文献, 2005; Schillingらの文献, 2006; Schlenzigらの文献, 2009)。このようなA のC-末端及びN-末端の異形は、A (1-40)及びA (1-42)ペプチドの機能的等価物としての役割を果たす。

40

【0049】

50

したがって、本発明は、オリゴマー状態のA (x-y)ペプチド(ここで、x及びyは上記に定義したものである)の測定方法を提供する。

【0050】

したがって、上記方法の一実施態様によると、測定されるオリゴマー状態の標的A ペプチドは、下記からなる群から選択される：

- A (1-38) (配列番号3)、
- A (1-39) (配列番号4)、
- A (1-40) (配列番号2)、
- A (1-41) (配列番号5)、
- A (1-42) (配列番号1)、
- A (1-43) (配列番号6)、
- A (2-38) (配列番号7)、
- A (2-39) (配列番号8)、
- A (2-40) (配列番号9)、
- A (2-41) (配列番号10)、
- A (2-42) (配列番号11)、
- A (2-43) (配列番号12)、
- A (3-38) (配列番号13)、
- A (3-39) (配列番号14)、
- A (3-40) (配列番号15)、
- A (3-41) (配列番号16)、
- A (3-42) (配列番号17)、
- A (3-43) (配列番号18)、
- A (11-38) (配列番号19)、
- A (11-39) (配列番号20)、
- A (11-40) (配列番号21)、
- A (11-41) (配列番号22)、
- A (11-42) (配列番号23)、及び
- A (11-43) (配列番号24)。

10

20

30

【0051】

特定の実施態様において、測定されるオリゴマー状態の標的A ペプチドは、A (1-40) (配列番号2)である。

【0052】

特定の実施態様において、測定されるオリゴマー状態の標的A ペプチドは、A (1-42) (配列番号1)である。

【0053】

特定の実施態様において、測定されるオリゴマー状態の標的A ペプチドは、A (1-40) (配列番号2)及びA (1-42) (配列番号1)である。本明細書中に提示したデータは、A (1-40)ペプチドとA (1-42)ペプチドとの合計の適合性を示しており、ここで、両方のオリゴマー状態の合計が、診断の有意性を向上させることが示された。

40

【0054】

特定の実施態様において、測定されるオリゴマー状態の標的A ペプチドは、配列番号13~24から選択される少なくとも1つのA ペプチドであり、N-末端がグルタミン酸残基で始まるものである。

【0055】

特定の実施態様において、測定されるオリゴマー状態の標的A ペプチドは、A (3-38) (配列番号13)である。

【0056】

特定の実施態様において、測定されるオリゴマー状態の標的A ペプチドは、A (11-38) (配列番号19)である。

50

## 【0057】

さらなる特定の実施態様において、測定されるオリゴマー状態の標的A ペプチドは、配列番号13~24から選択される少なくとも1つのA ペプチドであり、これらのペプチドのN-末端のグルタミン酸残基が、ピログルタミン酸に環化される。

## 【0058】

さらなる特定の実施態様において、測定されるオリゴマー状態の標的A ペプチドは、配列番号1~6から選択される少なくとも1つのA ペプチドであり、アミノ酸位置1及び/又は7のアスパラギン酸残基が、イソアスパラートに変換される。

## 【0059】

より具体的には、測定されるオリゴマー状態の標的A ペプチドは、配列番号7~12から選択される少なくとも1つのA ペプチドであり、アミノ酸位置6のアスパラギン酸残基が、イソアスパラートに変換される。

10

## 【0060】

より具体的には、測定されるオリゴマー状態の標的A ペプチドは、配列番号13~18から選択される少なくとも1つのA ペプチドであり、アミノ酸位置5のアスパラギン酸残基が、イソアスパラートに変換される。

## 【0061】

オリゴマー状態のA を測定する該方法は、必ずしもアルツハイマー病などの神経変性疾患の診断に限定されない新規かつ創意的なアッセイに関する本発明のさらなる態様を構成することが理解されるであろう。したがって、本発明の第2の態様によると、生物学的試料中のオリゴマー状態の標的アミロイド ペプチド(Aベータ又はA )を測定する方法が提供され、該方法は、以下の工程：

20

- (a) 生物学的試料中の標的A ペプチドの第1の濃度( $c_a$ )を測定すること；
- (b) 工程(a)から得られた標的A ペプチドを脱凝集すること；
- (c) 該脱凝集したA ペプチドの第2の濃度( $c_d$ )を測定すること；及び
- (d) 第2の濃度( $c_d$ )の値を第1の濃度( $c_a$ )の値で割った、 $c_d/c_a$ 比を決定すること；

を含み、

ここで、 $c_d/c_a$ 比が1を上回ることが、オリゴマーA の存在を示す。

## 【0062】

一実施態様において、脱凝集工程(b)は、上記に定義されるアルカリの使用を含む。

30

## 【0063】

一実施態様において、工程(a)及び(c)における標的A ペプチドの第1及び第2の濃度を測定する方法は、下記を含む：

- i) 生物学的試料を少なくとも2つの異なる捕捉抗体と接触させること；
- ii) 得られた免疫複合体を検出すること；
- iii) 該免疫複合体を破壊すること；及び
- iv) 捕捉されたA ペプチドを定量化すること。

## 【0064】

一実施態様において、該定量化工程(iv)は、A 特異的ELISAにおける分析を含む。さらなる実施態様において、該A 特異的ELISAは、サンドイッチELISAである。一実施態様において、工程(a)及び(c)はどちらも、A 特異的ELISAでの分析を含む。この実施態様は、工程(a)及び(c)で得られた第1及び第2の濃度間の許容比較可能性の利点を提供する。

40

## 【0065】

一実施態様において、生物学的試料は、血液、血清、尿、脳脊髄液(CSF)、血漿、リンパ液、唾液、汗、胸水、滑液、涙液、胆汁、及び腓分泌物からなる群から選択される。さらなる実施態様では、生物学的試料は血漿である。

## 【0066】

生物学的試料は、当業者に周知の方法で患者から得ることができる。特に、血液試料は対象から得ることができ、該血液試料は、従来法によって、血清と血漿に分離することができる。生物学的試料が得られる対象は、アルツハイマー病に罹患している疑いがある、

50

アルツハイマー病を発症するリスクがある、及び/又は任意の他の種類の認知症のリスクがあるか、もしくはそれを有することが疑われる。

【0067】

特に、それは、軽度認知障害(MCI)を有する、及び/又はアルツハイマー病の初期段階にあることが疑われる対象である。

【0068】

本方法は、当技術分野で公知の方法に優るいくつかの利点を有する。すなわち、本発明の方法は、初期段階のアルツハイマー病を検出するために、並びに疾患の発症及び進行の初期段階でアルツハイマー病と他のタイプの認知症とを識別するために用いることができる。1つの考えられる初期段階は軽度認知障害(MCI)である。当技術分野で現在知られている方法では、アルツハイマー病の初期段階の明確でかつ信頼できる診断を行なうことは不可能であり、特に、該初期段階においてアルツハイマー病の発症と他の形態の認知症とを識別することは不可能である。これは、特に、MCIに罹患した患者の場合に当てはまる。

【0069】

対照的に、本発明によって提供される方法は、アルツハイマー病の鑑別診断に好適である。特に、本発明は、オリゴマー状態の標的A ペプチドを、上記の対象のいずれかから得られる生物学的試料中で再現性高く検出することができる方法を提供する。本発明の方法の高い再現性は、工程(c)で後に使用される方法と同一である最初の免疫沈降工程(工程(a))において、少なくとも2つの異なる捕捉抗体を用いることによって達成される。一実施態様において、これらの少なくとも2つの異なる捕捉抗体は、A 標的ペプチドの異なるエピトープに関する。

【0070】

一実施態様において、生物学的試料は血漿である。

【0071】

上述の「A 標的ペプチド」は、上記で定義したA (x-y)を包含する。

【0072】

本発明によって克服されなければならなかった具体的な問題は、使用しようとするバイオマーカーが、アルツハイマー病の初期段階、例えば、軽度認知障害の間に変化することである。本発明の発明者らは、オリゴマー状態の標的A ペプチドを信頼できるやり方で測定することができることを示し、また、実際に、オリゴマー状態のA (x-y)が早期発症性アルツハイマー病の診断に特に好適であることも初めて明らかとなった。

【0073】

工程(a)及び(c)での標的A ペプチドの第1及び第2の濃度を測定する方法は、具体的に以下の工程を含む：

i) 生物学的試料を免疫沈降工程で少なくとも2つの異なる捕捉抗体と接触させること。

該生物学的試料を前述の少なくとも2つの異なる捕捉抗体と接触させた後、該少なくとも2つの異なる捕捉抗体と標的A ペプチドとの間で免疫複合体が形成される。この工程は、全長A (x-y)(式中、xは1である)を特異的に単離する役割を果たすのではなく、むしろ、特に、位置38、40及び/又は位置42で終わる、全てのA 種を捕捉し、分離する役割を果たす。

ii) 次に、この複合体を二次抗体によって検出する。好適には、該二次抗体は磁気ビーズに固定されている。該磁気ビーズとともに、該免疫複合体は、磁気分離装置を用いて、体液(血漿/血清、CSFなど)から容易に分離することができる。

iii) 該免疫複合体を該ビーズから溶出させる。好適には、該溶出工程は、該免疫複合体を担持する該ビーズを、50%メタノール/0.5%ギ酸を含む溶液中、室温で1時間インキュベートすることによって行なわれる。それによって、全ての分子間相互作用が破壊され、該生物学的試料から単離された全てのA ペプチド分子が、該溶液中の該ビーズから放出される。

iv) 放出され、単離されたA ペプチドを、次の工程で、例えば、全長A (x-y)を特異的に検出するサンドイッチELISAによって定量化する。ここで、この工程における全長A

10

20

30

40

50

(x-y)とは、最も好適にはA (1-40)及びA (1-42)を意味する。

【 0 0 7 4 】

本文脈で好適な、考えられる免疫沈降用の抗体は下記であるが、本発明はその具体的な実施例によって制限されない：

3D6、エピトープ:1-5(Elan Pharmaceuticals, Innogenetics)  
 pAb-EL16、エピトープ:1-7  
 2H4、エピトープ:1-8(Covance)  
 1E11、エピトープ:1-8(Covance)  
 20.1、エピトープ:1-10(Covance, Santa Cruz Biotechnology)  
 ウサギ抗-A ポリクローナル抗体、エピトープ:1-14(Abcam) 10  
 AB10、エピトープ:1-16(Chemicon/Upstate - Milliporeの1部門)  
 82E1、エピトープ:1-16(IGL)  
 pAb1-42、エピトープ:1-11  
 NAB228、エピトープ:1-11(Covance, Sigma-Aldrich, Cell Signaling, Santa Cruz Biotechnology, Zymed/Invitrogen)  
 DE2、エピトープ:1-16(Chemicon/Upstate - Milliporeの1部門)  
 DE2B4、エピトープ:1-17(Novus Biologicals, Abcam, Accurate, AbD Serotec)  
 6E10、エピトープ:1-17(Signet Covance, Sigma-Aldrich)  
 10D5、エピトープ:3-7(Elan Pharmaceuticals)  
 WO-2、エピトープ:4-10(The Genetics Company) 20  
 1A3、エピトープ5-9(Abbottec)  
 pAb-EL21、エピトープ5-11  
 310-03、エピトープ5-16(Abcam, Santa Cruz Biotechnology)  
 ニワトリ抗ヒトA ポリクローナル抗体、エピトープ12-28(Abcam)  
 ニワトリ抗ヒトA ポリクローナル抗体、エピトープ25-35(Abcam)  
 ウサギ抗ヒトA ポリクローナル抗体、エピトープ:N-末端(ABR)  
 ウサギ抗ヒトA ポリクローナル抗体(Anaspec)  
 12C3、エピトープ10-16(Abbottec, Santa Cruz Biotechnology)  
 16C9、エピトープ10-16(Abbottec, Santa Cruz Biotechnology)  
 19B8、エピトープ9-10(Abbottec, Santa Cruz Biotechnology) 30  
 pAb-EL26、エピトープ:11-26  
 BAM90.1、エピトープ:13-28(Sigma-Aldrich)  
 ウサギ抗 -アミロイド(パン)ポリクローナル抗体、エピトープ:15-30(MBL)  
 22D12、エピトープ:18-21(Santa Cruz Biotechnology)  
 266、エピトープ:16-24(Elan Pharmaceuticals)  
 pAb-EL17;エピトープ:15-24  
 4G8、エピトープ:17-24(Covance)  
 ウサギ抗A ポリクローナル抗体、エピトープ:22-35(Abcam)  
 G2-10;エピトープ:31-40(The Genetics Company)  
 ウサギ抗-A 、aa 32-40ポリクローナル抗体(GenScript Corporation) 40  
 EP1876Y、エピトープ:x-40(Novus Biologicals)  
 G2-11、エピトープ:33-42(The Genetics Company)  
 16C11、エピトープ:33-42(Santa Cruz Biotechnology)  
 21F12、エピトープ:34-42(Elan Pharmaceuticals, Innogenetics)  
 1A10、エピトープ:35-40(IGL)  
 D-17ヤギ抗A 抗体、エピトープ:C-末端(Santa Cruz Biotechnology)。

【 0 0 7 5 】

免疫沈降用の特定の抗体は、下記のものである：

3D6(Elan)、BAN50(Takeda)、82E1(IGL)、6E10(Covance)、WO-2(The Genetics Company)  
 、266(Elan)、BAM90.1(Sigma)、4G8(Covance)、G2-10(The Genetics Company)、1A10(IGL) 50

)、BA27(Takeda)、11A5-B10(Millipore)、12F4(Millipore)、21F12(Elan)。

【 0 0 7 6 】

A N3pE特異的抗体の例は、下記のものである：

- PCT/EP2009/058803に記載されるPyro-Glu Aベータ抗体A 5-5-6(Deposit No. DSM ACC 2923)、A 6-1-6(Deposit No. DSM ACC 2924)、A 17-4-3(Deposit No. DSM ACC 2925)、及びA 24-2-3(Deposit No. DSM ACC 2926)(モノクローナル、マウス)；Probiodrugs AG
- Pyro-Glu Aベータ抗体クローン2-48(モノクローナル、マウス)；Synaptic Systems
- Pyro-Glu Aベータ抗体(ポリクローナル、ウサギ)；Synaptic Systems
- Pyro-Glu Aベータ抗体クローン8E1(モノクローナル、マウス)；Anawa
- Pyro-Glu Aベータ抗体クローン8E1(モノクローナル、マウス)；Biotrend
- 抗-ヒトアミロイド (N3pE)ウサギIgG(ポリクローナル、ウサギ)；IBL
- 抗-ヒトA N3pE(8E1) マウスIgG Fab(モノクローナル、マウス)；IBL。

10

【 0 0 7 7 】

A イソAsp1特異的抗体の例は、下記のものである：

- 抗ヒトA イソAsp1抗体(ポリクローナル、ウサギ)；Saido TCらの文献，Neurosci Lett. (1996) 13；215(3):173-6に開示。

【 0 0 7 8 】

免疫沈降用の特定の抗体ペアは、下記のものである：

- 4G8及び11A5-B10、3D6及び4G8、6E10及び4G8、82E1及び4G8、4G8及び12F4、4G8及び21F12、3D6及び21F12、6E10及び21F12、BAN50及び4G8、3D6及び11A5-B10、3D6及び1A10、3D6及びBA27、6E10及び11A5-B10、6E10及び1A10、6E10及びBA27、4G8及び11A5-B10、4G8及び1A10、4G8及びBA27、4G8及び12F4、4G8及び21F12。

20

【 0 0 7 9 】

A N3pE特異的抗体の例は、下記のものである：

- PCT/EP2009/058803に記載されるPyro-Glu Aベータ抗体A 5-5-6(Deposit No. DSM ACC 2923)、A 6-1-6(Deposit No. DSM ACC 2924)、A 17-4-3(Deposit No. DSM ACC 2925)、及びA 24-2-3(Deposit No. DSM ACC 2926)(モノクローナル、マウス)；Probiodrugs AG
- Pyro-Glu Aベータ抗体クローン2-48(モノクローナル、マウス)；Synaptic Systems
- Pyro-Glu Aベータ抗体(ポリクローナル、ウサギ)；Synaptic Systems
- Pyro-Glu Aベータ抗体クローン8E1(モノクローナル、マウス)；Anawa
- Pyro-Glu Aベータ抗体クローン8E1(モノクローナル、マウス)；Biotrend
- 抗-ヒトアミロイド (N3pE)ウサギIgG(ポリクローナル、ウサギ)；IBL
- 抗-ヒトA N3pE(8E1) マウスIgG Fab(モノクローナル、マウス)；IBL。

30

【 0 0 8 0 】

A イソAsp1特異的抗体の例は、下記のものである：

- 抗ヒトA イソAsp1抗体(ポリクローナル、ウサギ)；Saidoらの文献，1996。

【 0 0 8 1 】

上に示した抗体以外に、免疫沈降に好適な他の全てのアミロイドベータ特異的抗体(モノクローナル及びポリクローナル)を濃度測定法に用いることができる(さらなる好適な抗体は、例えば、www.alzforum.orgから取得することができる)。異なるエピトープを有する2つ、3つ、又はそれより多くの異なる抗体の使用は、良好な捕捉効率にとって決定的である。A ペプチドの免疫沈降に対する2以上の抗体タイプの使用は、協調的かつ驚くほど相乗的な結合効果(結合力)をもたらし、これにより、非常に高い捕捉効率を達成することが最終的に可能になる(図1参照)。

40

【 0 0 8 2 】

工程ii)における二次抗体は、捕捉抗体の宿主抗体タイプに対して特異的である。適当な二次抗体は、抗マウス抗体及び抗ウサギ抗体である。

【 0 0 8 3 】

工程iii)における複合体と磁気ビーズとのインキュベーションの後、ビーズを洗浄バッファで洗浄してもよい(本発明の実施例を参照されたい)。洗剤又は非特異的結合を防ぐ

50

他の添加物を含む洗浄バッファーをこの工程に用いることができる。洗浄バッファーの非限定的な例は、下記のものである：

- 10mg/ml サイクロフィリン18(Cyp 18)及び0.05% Tween-20を含むD-PBS、
- PBS + 0.05% Tween-20、
- TBS + 0.05% Tween-20、
- PBS + 1% (w/v) BSA + 0.05% Tween-20、
- TBS + 1% (w/v) BSA + 0.05% Tween-20、並びに
- Pierce ELISAブロッカー (Tween-20を含む)。

【0084】

工程iv)におけるビーズからの免疫複合体の溶出後、溶液を希釈バッファーに希釈する。表面及び固定された第1のELISA抗体との非特異的相互作用を防ぐことができる任意の希釈バッファーをこの工程に用いることができる。希釈バッファーの非限定的な例は、下記のものである：

- EIAバッファー (IBL 1-40(N) ELISAキットの希釈バッファー)、
- PBS + 1% (w/v) BSA + 0.05% Tween-20、
- TBS + 1% (w/v) BSA + 0.05% Tween-20、及び
- Pierce ELISAブロッカー (Tween-20を含む)。

【0085】

全長A (1-40)を定量することができるELISAキットは市販されている。本発明の方法におけるA (1-40)の定量のための好適なELISAキットは、例えば、アミロイド- (1-40)(N) ELISA (IBL, JP27714) ; A [1-40]ヒトELISAキット (Invitrogen) ; ヒトアミロイドベータ (アミロイド- )、aa 1-40 ELISAキット (Wako Chemicals USA, Inc.) ; アミロイドベータ1-40 ELISAキット (The Genetics Company) である。

【0086】

全長A (1-42)を定量することができるELISAキットも市販されている。本発明の方法におけるA (1-42)の定量のための好適なELISAキットは、例えば、アミロイド- (1-42)(N) ELISA (IBL, JP27712) ; A [1-42]ヒトELISAキット (Invitrogen)、ヒトアミロイドベータ (アミロイド- )、aa 1-42 ELISAキット (Wako Chemicals USA, Inc.)、アミロイドベータ1-40 ELISAキット (The Genetics Company)、INNOTEST (登録商標) -アミロイド(1-42)(Innogenetics) である。

【0087】

濃度測定法は、A (1-40)又はA (1-42)用の例示的な上述の市販ELISAキットに限定されない。全長A (1-40)又はA (1-42)用の多くのさらなるサンドイッチELISAが先行技術で利用可能であり得るか、又は当業者によって開発され得る。これら全ての全長A 1-40又はA 1-42サンドイッチELISAもまた、濃度測定法によって包含されるものとし、通常、A (1-40)及び/又はA (1-42)の完全なN-末端、並びにアミノ酸40又は42で終わるC-末端にそれぞれ特異的な、捕捉抗体及び検出抗体の好適なペアを含むべきである。

【0088】

そのような全長A (1-40)サンドイッチELISAは、A (1-40)のC-末端を特異的に認識する第1の固定された抗体、及びA (1-40)の完全なN-末端を特異的に認識する第2の標識された検出抗体を含むことができる。

【0089】

全長A (1-42)サンドイッチELISAは、A (1-42)のC-末端を特異的に認識する第1の固定された抗体、及びA (1-42)の完全なN-末端を特異的に認識する第2の標識された検出抗体を含むことができる。

【0090】

全長A (1-40)サンドイッチELISAはまた、A (1-40)の完全なN-末端を特異的に認識する第1の固定された抗体及びA (1-40)のC-末端を特異的に認識する第2の標識された検出抗体を含むことができる。

【0091】

10

20

30

40

50

全長A (1-42)サンドイッチELISAはまた、A (1-42)の完全なN-末端を特異的に認識する第1の固定された抗体、及びA (1-42)のC-末端を特異的に認識する第2の標識された検出抗体を含むことができる。

【0092】

濃度測定法における使用のための好適なA (1-40/42)N-末端特異的抗体は、例えば、3D6(Elan)、WO-2(The Genetics Company)、82E1(ABL)、BAN-50(Takeda)である。多くのさらなるA (1-40/42)N-末端特異的抗体が先行技術で利用可能であり得るか、又は当業者によって開発され得る。これら全てのA (1-40/42)N-末端特異的抗体もまた、濃度測定法によって包含される。

【0093】

好適なA (1-40)C-末端特異的抗体は、例えば、G2-10(The Genetics Company) ; 11A5-B10(Millipore) ; 1A10(ABL) ; BA27(Takeda) ; EP1876Y(Novus Biologicals)である。多くのさらなるA (1-40)C-末端特異的抗体が先行技術で利用可能であり得るか、又は当業者によって開発され得る。これら全てのA (1-40)C-末端特異的抗体もまた、濃度測定法によって包含される。

【0094】

好適なA (1-42)C-末端特異的抗体は、例えば、G2-11(The Genetics Company) ; 12F4(Millipore) ; 抗ヒトA (38-42)ウサギIgG(ABL) ; 21F12(Elan) ; BC05(Takeda) ; 16C11(Santa Cruz Biotechnology)である。多くのさらなるA (1-42)C-末端特異的抗体が先行技術で利用可能であり得るか、又は当業者によって開発され得る。これら全てのA (1-42)C-末端特異的抗体もまた、濃度測定法によって包含される。

【0095】

一実施態様によると、検出抗体は標識されている。

診断用途のために、検出抗体は、通常、検出可能部分で標識されている。多くの標識が利用可能であり、それらは、通常、以下のカテゴリーに分類することができる：

(a) 放射性同位体、例えば、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、及び $^{131}\text{I}$ 。抗体は、例えば、「免疫学最新プロトコル(Current Protocols in Immunology)」, 第1巻及び第2巻, Gutigenら編, Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs., (1991)に記載されている技術を用いて放射性同位体で標識することができ、放射能は、シンチレーションカウンティングを用いて測定することができる。

(b) 蛍光標識、例えば、希土類キレート(ユーロピウムキレート)又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、リサミン、フィコエリスリン、並びにテキサスレッドが利用可能である。蛍光標識は、例えば、「免疫学最新プロトコル(Current Protocols in Immunology)」(前掲)に開示されている技術を用いて、抗体にコンジュゲートすることができる。蛍光は、蛍光光度計を用いて定量することができる。

(c) 様々な酵素-基質標識が利用可能である。酵素は一般に、様々な技術を用いて測定することができる発色基質の化学的变化を触媒する。例えば、酵素は、基質の色の变化を触媒することができ、この変化は、分光光度法によって測定することができる。あるいは、酵素は、基質の蛍光又は化学発光を変化させることができる。蛍光の変化を定量するための技術は上に記載されている。化学発光基質は、化学反応によって電子的に励起されるようになり、その後(例えば、化学発光計を用いて)測定可能な光を放出することができるか、又は蛍光受容体にエネルギーを供与することができる。酵素的標識の例は、ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ;米国特許第4,737,456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRPO)などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、0-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ(例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環オキシダーゼ(例えば、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどを含む。酵素を抗体にコンジュゲートさせるための技術は、O'Sullivanらの文献、「酵素イムノアッセイにおけ

10

20

30

40

50

る使用のための酵素-抗体コンジュゲートの調製方法(Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay)」、Methods in Enzym.(Langone & H. Van Vunakis編), Academic Press, New York, 73:147-166(1981)に記載されている。

【0096】

酵素-基質の組合せの例は、例えば、下記のものを含む：

- (i) セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRPO)と、基質としての水素ペルオキシダーゼ、ここで、この水素ペルオキシダーゼは、色素前駆体(例えば、オルトフェニレンジアミン(OPD)又は3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩(TMB))を酸化する；
- (ii) アルカリホスファターゼ(AP)と、発色基質としてのパラ-ニトロフェニルホスフェート；及び
- (iii) -D-ガラクトシダーゼ(-D-Gal)と、発色基質(例えば、p-ニトロフェニル-D-ガラクトシダーゼ)又は蛍光基質4-メチルウンベリフェリル-D-ガラクトシダーゼ。

10

【0097】

他の多くの他の酵素-基質の組合せが、当業者に利用可能である。

- (d) 検出抗体用の別の考えられる標識は、短いヌクレオチド配列である。その場合は、濃度をRT-PCRシステム(Imperacer(商標), Chimera Biotech)で測定する。

【0098】

標識は、抗体と間接的にコンジュゲートされている場合もある。当業者であれば、これを達成するための様々な技術を知っているであろう。例えば、抗体をビオチンとコンジュゲートさせることができ、上述の3つの幅広いカテゴリーの標識のいずれかをアビジンとコンジュゲートさせることができるし、又はその逆も可能である。ビオチンはアビジンと選択的に結合し、そのため、この間接的な方法で、標識を抗体とコンジュゲートさせることができる。あるいは、標識と抗体との間接的コンジュゲーションを達成するために、抗体を小さいハプテン(例えば、ジゴキシン)とコンジュゲートさせ、上述の異なるタイプの標識のうちの1つを抗ハプテン抗体(例えば、抗ジゴキシン抗体)とコンジュゲートさせる。このようにして、標識と抗体との間接的コンジュゲーションを達成することができる。

20

【0099】

本発明で使用される抗体を、任意の既知のアッセイ方法、例えば、競合結合アッセイ、直接的及び間接的サンドイッチアッセイ、並びに免疫沈降アッセイで利用することができる。Zolaの文献、「モノクローナル抗体 技術マニュアル(Monoclonal Antibodies A Manual of Techniques)」, pp.147-158(CRC Press, Inc., 1987)。

30

【0100】

競合結合アッセイは、限定された量の抗体との結合を被験試料検体と競合する標識された標準の能力に依存する。被験試料中のA ペプチドの量は、抗体に結合するようになる標準の量に反比例する。結合するようになる標準の量を決定しやすくするために、抗体は、通常、競合の前後に不溶化され、その結果、抗体に結合している標準及び検体を未結合のままの標準及び検体から好都合に分離することができる。

【0101】

ヒトにおけるA (1-40)濃度の解析のために、以下の全ての体液を用いることができる：血液、脳脊髄液(CSF)、尿、リンパ液、唾液、汗、胸水、滑液、房水、涙液、胆汁、腓分泌物。

40

【0102】

血液試料を用いて、本発明者らにより、新規の方法が確立された(本発明の実施例を参照されたい)。しかしながら、本方法は、血液試料に限定されるものとみなされるべきではない。本方法は、CSF、脳抽出物、及び尿試料、並びに他の全てのヒト体液、例えば、上で述べたものを同じように用いて、利用することもできる。特に好ましいのは、血漿試料である。

【0103】

免疫組織化学的解析のために、組織試料は、新鮮なものもしくは凍結されたものであ

50

てもよく、又はパラフィンに包埋され、例えば、ホルマリンなどの防腐剤を用いて固定されたものであってもよい。

【0104】

サンドイッチELISAシステムは、本発明の工程(a)及び(c)におけるA 濃度測定のための1つの特定の実施態様であるが、他の濃度測定法を使用することができることは、理解されるであろう。

A の濃度測定のための好適な方法は、下記である。

【0105】

(1. アミロイド 1-40 HTRF(登録商標)アッセイ(CisBio Bioassays))

このアッセイ原理はTR-FRETをベースにしている。これは、時間分解蛍光とフェルスター共鳴エネルギー転移を組み合わせたものである。通常のスンドイッチELISAと同様に、A (1-40)は2つの抗体によって結合される。しかしながら、これらの抗体は、この場合は、表面に結合されず、相互作用は溶液中で生じる。両方の抗体は蛍光団で標識されている。これら2つの蛍光団が生体分子相互作用によって集合したとき、励起中に供与体蛍光団によって捕捉されたエネルギーの一部がFRETを介して受容体蛍光団に転移され、それが結果として励起される。この受容体蛍光団の蛍光が測定される。計測シグナルは、FRETの量、したがって、溶液中のA (1-40)の量と相関する。

同様に、同等の原理に基づいたLilly社のAlphascreen (商標)アッセイを使用することもできる。

【0106】

(2. マルチプレックスアッセイシステム)

マルチプレックスアッセイシステムはいくつかの製造業者から入手可能であり、かつ本分野において周知で、広く用いられている。本発明の方法における使用に好適な例は、INNO-BIA血漿A 形態アッセイ(Innogenetics)である。このアッセイは、xMAP(登録商標)技術(xMAPはLuminex社の登録商標である)を用いる、血漿中のヒト -アミロイド形態A (1-42)及びA (1-40)、又はA (X-42)及びA (X-40)の同時定量のための多重パラメータビーズに基づく十分に標準化されたイムノアッセイである。

【0107】

このアッセイシステムは、最大100個の異なる検体を並行して定量することができる。この方法の基盤は、マイクロスフェア又はビーズと呼ばれる、小さな球状ポリスチロール粒子である。ELISA及びウェスタンブロットと同様に、これらのビーズは、生化学的検出のための固相としての役割を果たす。これらのビーズは色分けされており、そのため、100個の異なるビーズ種類を区別することができる。各ビーズ種類は、マイクロスフェア表面に固定された(例えば、A (1-40)に対する)1つの特異的な抗体を有する。A (1-40)濃度が増加する場合は、より多くのペプチド分子がこの種類のビーズによって結合される。検体の結合の検出は、緑色の光を発する別の蛍光色素で標識された第2の抗A (1-40)抗体によって行なわれる。試料は、FACS解析と同じように操作される。マイクロスフェアは、流体力学的絞り込みによって単数化され、レーザーに基づく検出システムによって解析される。これにより、緑色蛍光に基づく定量を行ない、結合した検体をビーズの特異的な着色によって同定することができる。このようにして、1つの試料中で複数の検体の濃度を決定することができる。

【0108】

(3. 質量分析による定量)

- A (1-40)の定量のために、SELDI-TOF質量分析も用いた(Simonsenらの文献, 2007(2))。

- 免疫沈降及びMALDI-TOF質量分析を用いたA ペプチドの定量的解析。<sup>15</sup>N標識標準A ペプチドを較正に用いる(Gelfanovaらの文献, 2007)。

【0109】

(4. ウェスタンブロット解析)

ウェスタンブロット解析を伴う2D-ゲル電気泳動法は、A ペプチドを定量するための好

10

20

30

40

50

適な方法であり得る (Sergeantらの文献, 2003 ; Casasらの文献, 2004)。

【0110】

(診断キット)

便宜上、本発明の方法で使用される抗体を、キット、すなわち、所定の量の試薬と診断アッセイを実施するための指示書とを包装して組み合わせたものとして提供することができる。

【0111】

したがって、本発明のさらなる態様によると、適当なアルカリ及び本明細書中で定義された方法に従い前記キットを使用するための指示書を含む、アルツハイマー病などの神経変性疾患を診断するためのキットが提供される。

10

【0112】

一実施態様において、該キットは、本明細書中で定義される少なくとも2つの異なる捕捉抗体をさらに含む。

【0113】

抗体が酵素で標識されている場合、キットは、その酵素が必要とする基質及び補因子 (例えば、検出可能な発色団又は蛍光団を提供する基質前駆体)を含む。さらに、他の添加剤、例えば、安定化剤、バッファー(例えば、ブロックバッファー又は溶解バッファー)などが含まれていてもよい。アッセイの感度を実質的に最適化する試薬の溶液中濃度を提供するために、様々な試薬の相対量を幅広く変化させることができる。特に、試薬は、溶解時に適切な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含む、通常凍結乾燥された乾燥粉末として提供することができる。

20

【0114】

本発明の診断キットは、アミロイド関連の疾患及び状態、例えば、アルツハイマー病の検出及び診断に特に有用である。

【0115】

(使用)

本発明の方法は、オリゴマーの標的A ペプチド、特に、A (1-40)、A (1-42)、A (3-38)及び/又はA (11-38)、又はその機能的等価物を信頼できる形で検出し、定量することを初めて可能にする。特に、本発明は、特に疾患の初期段階でのアルツハイマー病の鑑別診断に好適な血漿バイオマーカーとしてのオリゴマーのA (1-40)、A (1-42)、A (3-38)及び/又はA (11-38)を提供する。

30

【0116】

したがって、一実施態様において、本発明は、特に、疾患の初期段階でのアルツハイマー病の鑑別診断などのアルツハイマー病の診断のための、オリゴマー状態のアミロイドペプチドの測定方法の使用に関する。好適には、アルツハイマー病の初期段階は、軽度認知障害である。

【0117】

さらなる実施態様において、本発明は、特に、疾患の初期段階でのアルツハイマー病の鑑別診断などのアルツハイマー病の診断のための、オリゴマーのA 標的ペプチドの使用に関する。好適には、アルツハイマー病の初期段階は、軽度認知障害である。

40

【0118】

特に、アルツハイマー病の診断に用いるオリゴマーのA 標的ペプチドは、本発明による方法を用いて検出され、定量される。

【0119】

さらなる実施態様において、A 標的ペプチドは、上記で定義されるA (x-y)、又はその機能的等価物である。

【0120】

本発明の方法はまた、アルツハイマー病などの神経変性疾患の所与の治療の効果を監視するための工業的用途を有する。したがって、本発明のさらなる態様によると、被験対象由来の生物学的試料中の本明細書で定義されるオリゴマー状態の標的アミロイド ペプチ

50

ド(Aベータ又はA )を測定することを含む、アルツハイマー病などの神経変性疾患を有する、有する疑いのある、又はそれに罹患しやすい対象における治療の効果を監視する方法が提供される。

【0121】

一実施態様において、生物学的試料は、被験対象から2回以上採取される。さらなる実施態様において、該方法は、被験対象から2回以上採取された生物学的試料中に存在するオリゴマー状態の標的アミロイド ペプチド(Aベータ又はA )のレベルを比較することをさらに含む。一実施態様において、該方法は、被験試料中に存在するオリゴマー状態の標的アミロイド ペプチド(Aベータ又はA )のレベルを、治療に先立って前記対象から採取した1つ以上の試料、及び/又は治療の初期段階の前記対象から採取した1つ以上の試料中に存在する量と比較することをさらに含む。一実施態様において、該方法は、オリゴマー状態の標的アミロイド ペプチド(Aベータ又はA )のレベルを、1つ以上の対照と比較することをさらに含む。

10

【0122】

本発明を以下の実施例によってさらに説明するが、これは、いかなる点においても決して本発明を限定するものとみなされるべきではなく、本発明は、本明細書とともに添付される特許請求の範囲によってのみ、その範囲が定義される。

【実施例】

【0123】

(本発明の実施例)

20

(1. 材料及び方法)

(1.1 患者及び健康対照)

ADの臨床診断を有する患者及び健康対照をCRO(GALMED GmbH)を介して採用した。研究前の検査で、研究の参加者全員の神経心理学的機能をいくつかの心理テスト(DemTect、ミニメンタルステートテスト、時計描画テスト)で試験した。

【0124】

(DemTectテスト)

DemTectスケールは、5つの短い下位テスト(10単語のリストの反復、数字の変換、意味的単語の流暢性課題、逆方向数唱、単語リストの遅延再生)を含む認知症についての簡易スクリーニングテストである(Kesslerらの文献, 2000)。素点を変換して年齢及び教育に依存しない得点を出し、「認知症が疑われる」(8点以下)、「軽度認知障害」(9~12点)、及び「年齢相応」(13~18点)に分類する。

30

【0125】

(MMSE)

ミニメンタルステート検査(MMSE)又はFolsteinテストは、認知を評価するために用いられる30点の簡易アンケートテストである(表1参照)。それは、認知症についてスクリーニングするために医療で一般に用いられる。約10分間で、それは、計算力、記憶、及び見当識を含む様々な機能を試験する。それは、Folsteinらの文献, 1975によって紹介され、少しの修正を施され広く用いられている。

40

【0126】

MMSEは、以下のいくつかの領域の簡単な質問及び問題を含む：試験の時間及び場所、単語リストの反復、計算力、言語使用及び理解、並びに基本的な運動能力。例えば、ある質問では、2つの五角形の図を書き写すことが求められる(次表参照)。(30点中)27点以上の得点はいずれも事実上正常である。これ未満では、20~26点は軽度の認知症を示し、10~19点は中等度の認知症を示し、10点未満は重度の認知症を示す。正常値も教育の程度及び年齢について補正される。低い得点から極めて低い得点は、認知症の存在と密接に関連するが、他の精神障害もMMST検査での異常所見をもたらすことがある。

【0127】

【表1】

表1：ミニメンタルステート検査

項目	質問	満点	得点
1) 見当識	a) 今日は(何年)/(何月)/(何日)ですか。 今日は何曜日ですか。 今の(季節)は何ですか?	5	10
	b) ここは何町/何市ですか。 ここは(何郡)/(何地方)ですか。 ここは(何の建物)で、(何階)ですか。	5	
2) 記憶力 (Registration)	あなたの記憶をテストしたいと思います。 (3つの一般的な物品の名前を挙げる:「ボール、車、人」)私が言った単語を繰り返してもらえますか。 (1単語につき1点) (3つ全て思い出すまで最大6回繰り返す)	3	20
3) 注意力 及び 計算	a) 100から順に7を引き、そのたびに答える。 5つ答えたらやめる。(93-86-79-72-65) あるいは、 b) 「World」という単語を逆唱させる。 (D.L.R.O.W)	5	
4) 想起	先ほどあなたに言ってもらった3つの単語は何でしたか。 (記憶力テストの時にこれら全ての物品が思い出されなかった場合は、このテストをとばす)	3	30
5) 言葉による命名 反復	(時計を見せながら)これは何ですか。 (鉛筆を見せながら)これは何ですか。 これから言うことを繰り返してください。 「言い訳しない(no ifs, ands or buts)」。	2	
			1
6) 読字 書取り	(「目を閉じてください」というカードを見せるか、又はそう書いて) 次の文章を読んで、その指示に従ってください。 何か短い文章を書いてください。	1	40
7) 3段階の 命令	(紙を示して)この紙を左手に(又は右手に)持ってください。それを半分に折り畳んでください。それを床の上に置いてください。	3	40
8) 構築	この図形を書き写してください。 	1	
合計得点		30	

## 【0128】

(時計描画テスト)

時計の採点は、Shulmannらの文献、1986が用いた尺度の変法をベースにした。円は全て予め描かれており、対象に対する指示は、「11時10分を正しい位置に配置する」ことであった。採点システム(表2参照)の範囲は1点~6点であり、より高い得点は、より多くの間違いとより多くの障害を反映する。この採点システムは、経験的に導かれ、臨床診療に基

づいて修正される。必然的に、このシステムには個々の判断に任される余地がかなり残されるが、高水準の評価者間の信頼度を有するのに十分な簡易さがある。本発明者らの研究は、3つの主要な要素の分析に役立つ。これらは、時計描画テストと認知機能の他の評価基準との横断的比較;時計描画テストの経時的な長期的記載、及び時計描画テストの悪化と施設への収容決定との関係性を含む。

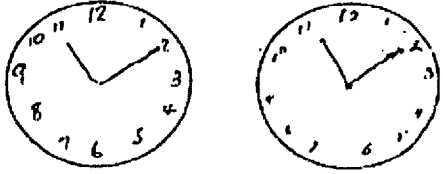
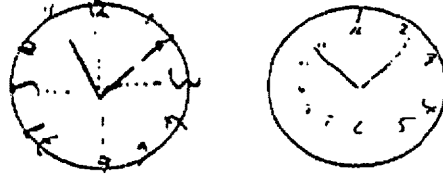
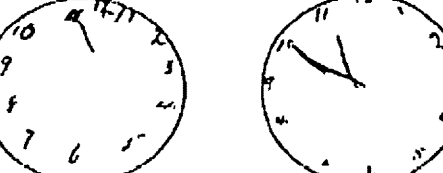
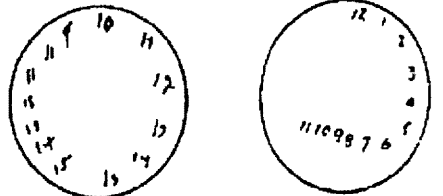
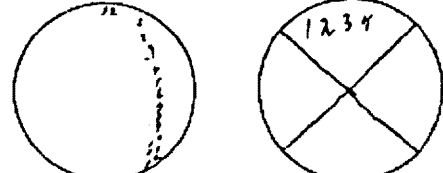
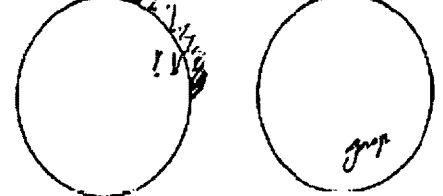
【0129】

研究前の検査後、全ての参加者からの採血を用いて、2週間後に研究を開始した。3ヵ月間隔の1年間に渡って、全ての参加者は、センターを訪れ、心理試験を行い、血液試料を採取した。該研究は、「Arztammer Sachsen-Anhalt」の倫理委員会で認可されている。全ての患者又はその近親者及び対照者から該研究の参加についてインフォームドコンセントを得た。

【0130】

【表 2】

表 2：時計描画テスト

<p>1. 問題なし</p>		
<p>2. 軽度の視空間誤り</p> <p>例</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 時間の間隔に軽度の障害がある</li> <li>- 円の外に時間を描く</li> <li>- 数字を書きながらページの向きを変えるので、いくつかの数字が逆さまに見える</li> <li>- 間隔を正しく定めるために線(スポーク)で区切る</li> </ul>		10
<p>3. 視空間構成は問題ないか、又はごくわずかな逸脱しか示さないのに、11時10分を不正確に表示する</p> <p>例</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 長針が10を指す</li> <li>- 「11時10分」と書く</li> <li>- 時間の表示ができない</li> </ul>		20
<p>4. 11時10分を正確に表示することができないほどの中等度の時間の視空間構成異常</p> <p>例</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 間隔がやや不正確である</li> <li>- 数字を省く</li> <li>- 固執-円を描き続けるか、又は12を通り越して、13、14、15などと続ける</li> <li>- 左右を逆にする-反時計回りに数字を書く</li> <li>- 書字障害-数字を正確に書くことができない</li> </ul>		30
<p>5. 4に記載したような重度の構成異常</p>		
<p>6. 時計の表示が適切でない。重度のうつ病又は他の精神病的状態を除く</p> <p>例</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 全く時計を描こうとしない</li> <li>- 全く時計らしく見えない</li> <li>- 単語又は名前を書く</li> </ul>		40

【 0 1 3 1 】

(1.2 血液試料)

ヒトのA 1-40及び/又はA 1-42濃度の分析に関して、以下の体液の全てを使用できる：血液、脳脊髄液、尿、リンパ液、唾液、汗、胸水、滑液、房水、涙液、胆汁、及び膈分

泌物。

【0132】

血液試料を使用して新規方法を確立した。これは、さらにCSF、脳抽出物、及び尿試料、続いて他のヒト体液に使用することができる。

【0133】

ADバイオマーカーの決定用の血液試料を、下記の3本のポリプロピレンチューブに回収した：

1. EDTA血漿用のカリウム-EDTAを含むもの(Sarstedt Monovette, 02.1066.001)
2. ヘパリン血漿用のLi-ヘパリンを含むもの(Sarstedt Monovette, 02.1065.001)
3. 血清用のブランク(Sarstedt Monovette, 02.1063.001)。

10

【0134】

静脈穿刺によるか、又は挿入された前腕静脈留置カニューレからの反復採血によって、全試料を回収した。(上の第1.1章に記載したような)時間スケジュールに従って血液を回収した。それを1550g(3000rpm)にて4分で10分間遠心分離して、血漿を得た。血漿又は血清をピペティングして除去し、1本の5mlポリプロピレンクライオチューブ(Carl-Roth, E295.1)に充填し、-80℃で凍結保存した。試料は採血後1時間以内に遠心分離した。研究プロトコルに従い血漿又は血清のチューブに、適切なラベル付けをすることが、CROの義務であった。

【0135】

(1.3実験室的方法)

野生型A<sub>1-40</sub>突然変異体もこの方法によって定量することができる。該突然変異体は、アミノ酸Asp-Ala-Gluで始まり、Gly-Val-Valで終わる全てのアミロイドペプチドを含む。突然変異A<sub>1-40</sub>の例は、鳥取型、フラマン型、オランダ型、イタリア型、北極型、及びアイオワ型である(Irieらの文献, 2005)。

20

【0136】

該A<sub>1-40</sub>アッセイはまた、野生型A<sub>1-40</sub>を産生するA<sub>1-40</sub>配列以外の突然変異を示す別の家族性アルツハイマー病にも使用することができる。下記の家族性アルツハイマー病の例も該アッセイに適している：スウェーデン型、オーストリア型、フランス型、ドイツ型、フロリダ型、ロンドン型、インディアナ型、及びオーストラリア型(Irieらの文献, 2005)。

30

【0137】

野生型A<sub>1-42</sub>の突然変異体もまた、この方法で定量することができる。該突然変異体は、アミノ酸Asp-Ala-Gluで始まり、Val-Ile-Alaで終わる全てのアミロイドペプチドを含む。突然変異A<sub>1-42</sub>の例は、鳥取型、フラマン型、オランダ型、イタリア型、北極型、及びアイオワ型である(Irieらの文献, 2005)。

【0138】

該A<sub>1-42</sub>アッセイはまた、野生型A<sub>1-42</sub>を産生するA<sub>1-42</sub>配列以外の突然変異を示す別の家族性アルツハイマー病にも使用することができる。下記の家族性アルツハイマー病の例も該アッセイに適している：スウェーデン型、オーストリア型、フランス型、ドイツ型、フロリダ型、ロンドン型、インディアナ型、及びオーストラリア型(Irieらの文献, 2005)。

40

【0139】

(免疫沈降)

(4mlの血漿を含む)EDTA血漿試料(ヘパリン血漿、血清でもよい)を融解し、2mlポリプロピレンチューブ(Eppendorf, 0030120.094)に1mlずつ分注した。1錠のプロテアーゼ阻害剤(Roche, コンプリートミニプロテアーゼ阻害剤カクテル, 11836153001)を1mlのD-PBS(Invitrogen, 14190-094)に溶解させた。25µlのプロテアーゼ阻害剤溶液を1mlのEDTA血漿に添加した。各試料の1本のチューブを除く、全てのアリコート凍結させ、-80℃で再び保存した。これら血漿のチューブに10µlの10% Tween-20を添加した(spiked)。各チューブに、2.5µgの抗アミロイド(17-24)抗体4G8(Millipore, MAB1561)、2.5µgの抗アミロイ

50

ド (x-42)抗体12F4(Millipore, 05-831)、及び2.5 µgの抗アミロイド (x-40)抗体11A5-B10(Millipore, 05-799)を添加した。

【0140】

免疫沈降用の他の考え得る抗体は、上記に定義される。これら記載した抗体に加え、免疫沈降に適した全ての他のアミロイド 特異的抗体(モノクローナル及びポリクローナル)をこの方法に使用することができる(www.alzforum.org参照)。異なるエピトープを有する2つ、3つ、又はそれより多くの異なる抗体の使用は、良好な捕捉効率にとって決定的である。A ペプチドの免疫沈降に対する2以上の抗体タイプの使用は、協調的な結合効果(結合力)をもたらし、これにより、非常に高い捕捉効率を達成する(図1参照)。

【0141】

全ての血漿チューブをオーバーヘッドシェーカーにて4 で一晩インキュベートした。アミロイド -抗体複合体の固定のために、100 µlの抗マウス磁気ビーズ(Invitrogen, 112-02D)を各1mlの血漿試料に用いた。磁気ビーズ上にコンジュゲートされたこれらの特殊な抗マウス抗体の代わりに、他の全ての抗マウス抗体又は抗宿主抗体(宿主:上に記載した一次抗体の起源)を用いることができる。これらの抗体は、例えば、ビオチン-ストレプトアビジン相互作用、トシル活性化表面、エポキシ活性化表面、アミン表面、又はカルボキシル表面などの様々なコンジュゲーション戦略によっていくつかのマトリックス(カラムマトリックス及びビーズマトリックス)上に固定することができる。使用前に、100 µlのビーズをもとのボトルから2mlチューブに移し、1mlのPBSで3回洗浄した。洗浄後、ビーズを200 µlのPBSに再懸濁した。血漿チューブを2000 × gで30秒間遠心分離した。上清を抗マウス磁気ビーズを含むチューブに移した。チューブをオーバーヘッドシェーカーにて4

【0142】

翌日、チューブを磁気分離装置内に置き、ビーズをチューブ壁に引き付けさせた。約1分後、上清を慎重に除去し、ビーズを10mg/mlのサイクロフィリン18及び0.05%のTween-20を含む500 µlのD-PBSで2回洗浄した。

【0143】

洗剤又は非特異的結合を防ぐ他の添加物を含む他の洗浄バッファーをこの工程に用いることができる。洗浄バッファーの例は、下記のものである:

- PBS + 0.05% Tween-20、
- TBS + 0.05% Tween-20、
- Pierce ELISAブロッカー(Tween-20を含む)。

【0144】

(捕捉されたアミロイド の溶出及び脱凝集)

最後の洗浄工程の後、溶液を取り除き、チューブを磁気分離装置から取り外し、100 µlの50% (v/v)メタノール/0.5% (v/v)ギ酸を各チューブに添加し、軽く振ってビーズを再懸濁させた。全てのチューブを室温で1時間インキュベートした。その後、チューブを再び磁気分離装置内に置き、各チューブからの溶出液40 µlを440 µlのEIA緩衝液(IBL 1-40/42(N)ELISAキットの希釈緩衝液)と混合した。希釈した試料のpHを、16 µlの400mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、400mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0を用いて、EIA緩衝液のpHに合わせた。これらの試料から、脱凝集なしの濃度を測定した。脱凝集のために、各チューブから溶出液50 µlを新しいチューブに移し、20 µlの50% (v/v)メタノール/500mMのNaOHを各チューブに混合した。脱凝集を室温で10分間行った。その後、各脱凝集チューブからの40 µlを440 µlのEIA緩衝液(IBL 1-40/42(N)ELISAキットの希釈緩衝液)と混合した。希釈した試料のpHを、10 µlの0.85% (v/v)H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>を用いて調整した。これらの試料から、脱凝集後の濃度を測定した。

製造元IBLの特殊なELISA希釈緩衝液の代わりに、表面及び捕捉抗体と非特異的相互作用を起こさない全ての別の希釈緩衝液を、この工程に使用することができる。希釈緩衝液の例は、下記のものである:

- PBS + 1% (w/v) BSA + 0.05% Tween-20、
- TBS + 1% (w/v) BSA + 0.05% Tween-20、

10

20

30

40

50

- Pierce ELISAブロッカ- (Tween-20を含む)。

【0145】

(溶出したアミロイド ペプチドの定量)

ペプチド濃度(それぞれ脱凝集を伴うもの、及び伴わないもの)の測定は、IBL 1-40(N)ELISAキット( IBL, JP27714)及びIBL 1-42(N) ELISAキット( IBL, JP27712)を用いて実施した。

この特殊なA 1-40ELISAの代わりに、全長A 1-40を検出することができる他の全ての市販品を用いることができる。

【0146】

市販のELISAキットの例は、下記のものである：

ヒトAベータ、aa1-40 ELISAキット Invitrogen

ヒトアミロイドベータ(アミロイド-b)、(aa1-40 ELISAキット) Wako Chemicals USA, Inc.

アミロイドベータELISAキット The Genetics Company。

【0147】

独自のA 1-40 ELISAは、A 1-40の完全なN-末端及びアミノ酸40位で終わるC-末端に特異的な、一対の捕捉抗体及び検出抗体からなる。

【0148】

考え得るN-末端特異的抗体は、下記のものである：

3D6(Elan Pharmaceuticals)

WO-2(The Genetics Company)

1-40(N)検出抗体( IBL)

BAN50(Takeda Chemicals Industries)。

【0149】

考え得るC-末端特異的抗体は、下記のものである：

G2-10(The Genetics Company)

11A5-B10(Millipore)

1A10( IBL)

ウサギ抗-ベータ-アミロイド、aa32-40ポリクローナル抗体(GenScript Corporation)

EP1876Y、エピトープ：x-40(Novus Biologicals)

【0150】

そのような独自の全長A 1-40サンドイッチELISAは、A 1-40のC-末端を特異的に認識する固定化された一次抗体、及びA 1-40の完全なN-末端を特異的に認識する標識された二次検出抗体を含み得る。また、全長A 1-40サンドイッチELISAは、A 1-40の完全なN-末端を特異的に認識する固定化された一時抗体、及びA 1-40のC-末端を特異的に認識する標識された二次検出抗体を含むことができ、特にこのタイプのA 1-40サンドイッチELISAが想定される。

【0151】

この特殊なA 1-42ELISAの代わりに、全長A 1-42を検出することができる他の全ての市販品を用いることができる。

【0152】

市販のELISAキットの例は、下記のものである：

ヒトAベータ、aa1-40 ELISAキット Invitrogen

ヒトアミロイドベータ(アミロイド-b)、(aa1-42 ELISAキット) Wako Chemicals USA, Inc.

アミロイドベータ1-42 ELISAキット The Genetics Company

ベータ-アミロイド1-42 ELISAキット(SIGNET) Covance

INNOTEST(登録商標) -アミロイド(1-42) Innogenetics

【0153】

独自のA 1-40ELISAは、A 1-42の完全なN-末端及びアミノ酸40位で終わるC-末端に特

10

20

30

40

50

異的な、一対の捕捉抗体及び検出抗体からなる。

【 0 1 5 4 】

考え得るN-末端特異的抗体は、下記のものである：

3D6(Elan Pharmaceuticals)

WO-2(The Genetics Company)

1-40(N) 検出抗体 (IBL)

BAN50(Takeda Chemicals Industries)。

【 0 1 5 5 】

考え得るC-末端特異的抗体は、下記のものである：

G2-11(The Genetics Company)

16C11(Santa Cruz Biotechnology)

21F12(Elan Pharmaceuticals, Innogenetics)

BC05(Takeda Chemicals Industries)。

10

【 0 1 5 6 】

そのような独自の全長A 1-42サンドイッチELISAは、A 1-42のC-末端を特異的に認識する固定化された一次抗体、及びA 1-42の完全なN-末端を特異的に認識する標識された二次検出抗体を含み得る。また、全長A 1-42サンドイッチELISAは、A 1-42の完全なN-末端を特異的に認識する固定化された一時抗体、及びA 1-42のC-末端を特異的に認識する標識された二次検出抗体を含むことができ、特にこのタイプのA 1-42サンドイッチELISAが想定される。

20

【 0 1 5 7 】

希釈した試料(それぞれ脱凝集を伴うもの、及び伴わないもの)をELISAプレートに適用した(ウェル当たり100 µl、反復測定)。ELISA標準をキットから取り出し、製造元の指示プロトコルに従って溶解させ、希釈した。全ての試料及び濃度標準の適用後、ELISAプレートを4 で18時間インキュベートした。翌日、ELISAを製造元の指示プロトコルに従って発色させた。

【 0 1 5 8 】

比色反応を停止させた後、各ウェル中の吸光度をプレートリーダー(TECAN Sunrise)を用いて450nmで測定し、550nmの吸光度で補正した。

【 0 1 5 9 】

補正された450nmでの吸光度を、対応する標準ペプチド濃度に対してプロットすることによって、標準曲線の決定を行なった。この曲線を、Origin 7.0(Microcal)を用いて、4-パラメータ方程式(式1)を用いて、フィッティングした。

30

【 数 1 】

$$\text{式 1} \quad y = \frac{A1 - A2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A2,$$

40

ここで、yは測定された吸光度を、xは対応する濃度を表す。

【 0 1 6 0 】

各試料のELISAに対するA (1-40)及びA (1-42)濃度の計算は、式2を用いて、応分吸光度値に基づいて行った。

【 数 2 】

$$\text{式 2} \quad x = x_0 \cdot \sqrt[p]{\frac{A1 - y}{y - A2}}$$

【 0 1 6 1 】

50

脱凝集を伴わず測定した血漿試料中の濃度を測定するために、算出した濃度を、12.4倍のEIA緩衝液希釈(pH調整を含む)、及び免疫沈降の(1mlから100 $\mu$ lへの)0.1倍の濃度効果によって補正した。脱凝集を伴い測定した血漿試料中の濃度を測定するために、算出した濃度を、12.25倍のEIA緩衝液希釈(pH調整を含む)、溶出試料に20 $\mu$ lの50%(v/v)メタノール/500mMのNaOHを添加することによる1.4倍の希釈、及び免疫沈降の(1mlから100 $\mu$ lへの)0.1倍の濃度効果によって補正した。測定された血漿A (1-40/42)濃度(それぞれ脱凝集を伴うもの、及び伴わないもの)をpg/mlで表した。

【0162】

(算出及び統計解析)

各血漿試料について、下記の4つのパラメータを測定した：

10

1. A (1-40)濃度(脱凝集を伴う)
2. A (1-40)濃度(脱凝集を伴わない)
3. A (1-42)濃度(脱凝集を伴う)
4. A (1-42)濃度(脱凝集を伴わない)。

【0163】

これらのデータから、下記の比率を算出した：

オリゴマー状態のA (1-40) = A<sub>1-40(脱凝集を伴う)}/A<sub>1-40(脱凝集を伴わない)}</sub></sub>

オリゴマー状態のA (1-42) = A<sub>1-42(脱凝集を伴う)}/A<sub>1-42(脱凝集を伴わない)}</sub>。</sub>

【0164】

血漿のオリゴマー状態のA (1-40)及びA (1-42)の、アルツハイマー病の陽性の臨床診断の存在との関連を、スチューデントのt-検定を用いて検討した。

20

【0165】

(2. 結果)

(2.1 人口統計学的特徴)

全体で、30名の健康対照及び15名のAD患者の、45名の方が本研究に参加した。血漿Aに対する年齢の影響の可能性を観察するために、対照の人を幅広い年齢にわたって選択し、3つの群に亜分類した。第I群は、18~30歳の対象を含み、第II群は、31~45歳の対象を含み、第III群は、46~65歳の対象を含む。人口統計学的特徴を表3に示す。

【0166】

## 【表3】

表3 人口統計学的特徴

	健康対照			AD 患者
	第I群 (18-30)	第II群 (31-45)	第III群 (46-65)	
数	10	10	10	15
ベースライン 時の年齢 (平均± SDEV)	25.8 ± 2.9	38.4 ± 4.7	54 ± 6.9	79.13 ± 7.09
身長、cm (平均± SDEV)	175.5 ± 11.6	175.1 ± 7.2	167.5 ± 10.9	168.4 ± 10.34
体重、kg (平均± SDEV)	71.33 ± 11.8	71.36 ± 13.5	75.81 ± 13.3	72.00 ± 12.31
性別(% 女性)	50	50	50	40

10

20

## 【0167】

(2.2 心理テスト)

神経心理学的機能の評価のために、参加者全員が、DemTect、ミニメンタルステートテスト、及び時計描画テストを実施した。これらのテストは、研究前、並びに研究の開始から3カ月後、6カ月後、9カ月後、及び12カ月後に行なわれた。

30

## 【0168】

(DemTectテスト)

素点を変換して年齢及び教育に依存しない得点を出し、「認知症が疑われる」(8点以下)、「軽度認知障害」(9~12点)、及び「年齢相応」(13~18点)に分類する。全往診についてのテスト結果を図3に示す。図3の結果は、患者と比較すると健康対象の3つの群との間に明確な違いがあることを示している。

## 【0169】

(ミニメンタルステートテスト)

27点以上(30点中)の得点はいずれも事実上正常である。これ未満では、20~26点は軽度の認知症を示し、10~19点は中等度の認知症を示し、10点未満は重度の認知症を示す。正常値も教育の程度及び年齢について補正される。低い得点から極めて低い得点は、認知症の存在と密接に相関するが、他の精神障害もMMST検査での異常所見をもたらすことがある。テスト結果を図4に示す。図4の結果は、患者と比較すると健康対象の3つの群との間に明確な違いがあることを示している。

40

## 【0170】

(時計描画テスト)

採点システムの範囲は1点~6点であり、より高い得点は、より多くの間違いとより多くの障害を反映する。この採点システムは、経験的に導かれ、臨床診療に基づいて修正される。必然的に、このシステムには個々の判断に任される余地がかなり残されるが、高水準

50

の評価者間の信頼度を有するのに十分な簡易さがある。

【0171】

本研究は、3つの主要な要素の分析に役立つ。これらは、時計描画テストと認知機能の他の評価基準との横断的比較、時計描画テストの経時的な長期的記載、及び時計描画テストの悪化と施設への収容決定との関係性を含む。該テストの結果を図5に示す。図5の結果は、患者と比較すると健康対象の3つの群との間に明確な違いがあることを示している。

【0172】

(2.3 血漿オリゴマー状態のA (1-40)及びA (1-42))

A (1-40/42)濃度(それぞれ脱凝集を伴う及び伴わない)を、T0+9カ月シリーズのEDTA血漿中で測定した。2つの重大な有害事象、AD患者番号34及び35が亡くなったため、13のAD試料のみがCROにより研究に手渡された。T0+9シリーズのさらなる試料を用いて、新しい免疫沈降法を最適化し、確立した。全体では、最適化された最終的な方法を11個のAD試料及び26個の対照試料を用いて試験した。測定された濃度を表4に示す。

【0173】

【表4】

表4

血漿オリゴマー状態のAβ(1-40)及びAβ(1-42)(T0+9カ月シリーズ)

全4群についての平均値及び平均の標準誤差を算出した。T-検定について、AD群と各々単一の対照群とを比較した。表4におけるオリゴマー状態の値を、本発明の方法に従い算出し、 $C_d / C_a$ 比を提示した。

AD群			対照群 18-30			対照群 31-45			対照群 46-65		
オリゴマー状態			オリゴマー状態			オリゴマー状態			オリゴマー状態		
対象	Aβ1-40	Aβ1-42	対象	Aβ1-40	Aβ1-42	対象	Aβ1-40	Aβ1-42	対象	Aβ1-40	Aβ1-42
Nr. 10	1.259	1.075	Nr. 09	1.176		Nr. 13	1.532	1.281	Nr. 02	1.297	1.229
Nr. 11	1.060	0.846	Nr. 27	1.052	1.308	Nr. 15	1.272	1.242	Nr. 08	1.149	
Nr. 14	1.065	1.220	Nr. 32	1.562	1.277	Nr. 17	1.173	1.190	Nr. 12	1.112	1.553
Nr. 16	1.090	1.276	Nr. 36	1.591	1.246	Nr. 18	1.372	1.209	Nr. 19	1.374	1.250
Nr. 20	1.086	1.055	Nr. 37	1.206	1.230	Nr. 25	1.030	1.178	Nr. 21	1.242	1.203
Nr. 22	1.251	1.084	Nr. 40	1.287	1.138	Nr. 28	1.409	1.264	Nr. 23	1.257	1.108
Nr. 26	1.152	1.154	Nr. 41	1.151	1.810	Nr. 29	1.580	1.383	Nr. 24	1.250	1.211
Nr. 30	1.114	1.055	Nr. 42	1.259	1.091	Nr. 31	1.376	1.254	Nr. 33	1.662	1.171
Nr. 39	1.233	1.037	Nr. 44	1.217	1.084	Nr. 38	1.559	1.353			
Nr. 43		0.814									
Nr. 45	1.166										
平均	1.148	1.062	平均	1.278	1.273	平均	1.367	1.262	平均	1.293	1.246
SEM	0.024	0.046	SEM	0.061	0.082	SEM	0.061	0.023	SEM	0.060	0.054
T-検定 AD群対 対照群				0.054	0.031		0.003	0.002		0.028	0.020

【0174】

全ての対照群についてのオリゴマー状態のA (1-42)に関して、AD群との比較から有意な値の増加が得られた。オリゴマー状態のA (1-40)の比較により、同様の結果が得られた。18~30の群だけは、あえなくその有意性を外れた。

【0175】

AD群の全試料に対する全対照試料のオリゴマー状態A (1-40)及びA (1-42)を評価した(図6)。オリゴマー状態A (1-40)及びA (1-42)はそれぞれ、健常対照と比較すると、AD患者では顕著に減少した。オリゴマー状態A (1-40)及びA (1-42)のp値について、それぞれ0.0074及び0.00067が得られた。

【0176】

使用した方法は、試料中のA (1-40)又はA (1-42)ホモオリゴマーの量を測定することはできず、試料中の単量体のA (1-40)及びA (1-42)と比較した、溶解性の凝集体内のA (1-40)及びA (1-42)ペプチドの量を提示する。この事実のために、A (1-40)とA (1-42)との値の合計は、AD患者及び健康対照の血漿中のA オリゴマーの全体量を反映する(図7)。

## 【 0 1 7 7 】

オリゴマー状態の値の合計は、T-検定のp値をさらに改善したが、試料の量は、A (1-40)及びA (1-42)のそれぞれの単回の評価と比較して低下した。

## 【 0 1 7 8 】

## (3. 考察)

本明細書中に示した結果は、オリゴマー状態のA 1-40及びA 1-42の減少が、アルツハイマー病の陽性の臨床診断と関連することを示している。両方のオリゴマー状態の合計(A 1-40 + A 1-42)は、有意性を向上させる( $p = 1.41e-4$ )。これまで、文献において少数の同等の研究だけが存在する。1つの研究では、軽度ADが発症した者における経過観察の間に、原線維A 42の血漿レベルが低下することが第2の評価によって示され(Schupfらの文献, 2008)、このことは、出願人らのデータを支持する。しかしながら、前原線維A 42の血漿レベルは、全参加者(1125人の高齢者)の34%で検出可能なだけであった。この事実は、繊維形態のA 42を用いたマウスの免疫化によって産生されたモノクローナル抗体(クローン13C3)を使用するこのアッセイの有用性を制限する。13C3抗体の特性化は、前原線維A 42への良好な親和性をもたらすが、単量体のA 42にも親和性を与え(Schupfらの文献, 2008; 支持情報)、これは、測定された前原線維A 42レベルを事実とは異なるものにし得る。したがって、オリゴマー又は前原線維特異的抗体に基づいたこれらアッセイシステムの用法は、検出抗体が、アミロイド のより大きな分子の凝集体に専ら特異的でない場合は、妨害される。別の研究(Xiaらの文献, 2009)では、サンドイッチELISAにおいて、オリゴマーのA の検出のために、捕捉及び検出用に同じ抗体を使用した。したがって、検出は、A 構体が、同一の捕捉及び検出抗体が利用可能な少なくとも2つの露出した同じエピトープのコピーを含む場合にのみ可能である(EI-Agnatらの文献, 2000; Howlettらの文献, 1999)。Xia及び共同研究者らは、オリゴマーのA の血漿レベルが、 $p$ 値 $< 0.05$ で増加することを見出した。これは、本明細書で示される知見とは相反することである。しかしながら、この研究において、健常対照の30%及びAD患者の52%においてのみ、オリゴマーのA が検出可能であり、これは、このアッセイの有用性を制限している。

## 【 0 1 7 9 】

どちらの研究も同じ問題を示している。凝集したアミロイド は、全試料で検出できないということである。該問題は、単純なサンドイッチELISAによる非効率的で、信頼性のないアミロイドペータの回収率に起因している可能性がある。本発明において、二価の捕捉システムが、試料からの全てのA 分子の完全な回収を保証し、これが、本アッセイをより信頼性のあるものにさせる。ごく最近の出版物は、オリゴマーのアミロイド の間接的な定量化を使用する方法を示している(Englundらの文献, 2009)。この研究では、CSF試料を分析し、変性及び非変性条件下でA (1-42)レベルを定量化し、CSF試料におけるA 42オリゴマー比を算出した。健康対照と比較してAD及びMCI試料において、比率が増加することが見出された。しかしながら、このアッセイは、変性及び非変性A 42の異なる定量化方法の使用によって制限される。非変性条件では、A 42濃度は通常のサンドイッチELISAで測定される。上記のように、そのような単純なサンドイッチELISAは、回収率に関する問題を有し得る。変性条件では、A 42濃度はSDS-PAGE、続くウェスタンブロット分析で測定される。この方法の決定的問題は、A (1-42)構体は2%SDSでは完全に脱凝集することはできないという事実である。本出願人らの実験でも、SDS-PAGEにおいてA (1-42)の三量体及び四量体種が見られる。このバックグラウンドに対して、補正されたA (1-42)単量体の定量化は非常に疑わしいものである。さらに、この事実は、ELISAで測定された濃度との比較、及び後続の両値の比率の算出を非常に不完全なものにさせる。

## 【 0 1 8 0 】

これまで、アミロイド のオリゴマー又は前原線維の定量化のための発表された全ての方法は、重大な問題を示していた。それらは、ヒト血漿及びCSFのそれぞれの分析に適用可能なものみに制限される。本発明は、これら問題を克服し、ヒト血漿におけるA 凝集体の信頼できる検出を示している。

## 【 0 1 8 1 】

10

20

30

40

50

(参考文献)

【化 1】

**Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H.** Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006 Jul 29;368(9533):387-403

**Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M**

Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005 Dec 17;366(9503):2112-7

**Knopman DS, DeKosky ST, Cummings JL, Chui H, Corey-Bloom J, Relkin N, Small GW, Miller B, Stevens JC.** Practice parameter: diagnosis of dementia (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2001 May 8;56(9):1143-53

**Waldemar G, Dubois B, Emre M, Georges J, McKeith IG, Rossor M, Scheltens P, Tariska P, Winblad B; EFNS.** Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline.

*Eur J Neurol*. 2007 Jan;14(1):e1-26.

**Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, Delacourte A, Galasko D, Gauthier S, Jicha G, Meguro K, O'brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P.** Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol*. 2007 Aug;6(8):734-46.

**Jellinger KA.** Alzheimer's disease. In: Gilman S, editor. *Neurobiology of Disease*. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2007. p. 69-82

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

10

20

30

40

**Chertkow H, Massoud F, Nasreddine Z, Belleville S, Joanette Y, Bocti C, Drolet V, Kirk J, Freedman M, Bergman H.** Diagnosis and treatment of dementia: 3. Mild cognitive impairment and cognitive impairment without dementia. *CMAJ*. 2008 May 6;178(10):1273-85

**Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ.** Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2006 Oct;27(10):1372-84

10

**Markesbery WR, Schmitt FA, Kryscio RJ, Davis DG, Smith CD, Wekstein DR.** Neuropathologic substrate of mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2006 Jan;63(1):38-46.

**Bouwman FH, Schoonenboom SN, van der Flier WM, van Elk EJ, Kok A, Barkhof F, Blankenstein MA, Scheltens P.** CSF biomarkers and medial temporal lobe atrophy predict dementia in mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2007 Jul;28(7):1070-4

20

**Saito Y, Murayama S.** Neuropathology of mild cognitive impairment. *Neuropathology*. 2007 Dec;27(6):578-84

**Jicha GA, Parisi JE, Dickson DW, Johnson K, Cha R, Ivnik RJ, Tangalos EG, Boeve BF, Knopman DS, Braak H, Petersen RC.** Neuropathologic outcome of mild cognitive impairment following progression to clinical dementia. *Arch Neurol*. 2006 May;63(5):674-81

30

**Petersen RC, Parisi JE, Dickson DW, Johnson KA, Knopman DS, Boeve BF, Jicha GA, Ivnik RJ, Smith GE, Tangalos EG, Braak H, Kokmen E.** Neuropathologic features of amnesic mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2006 May;63(5):665-72

40

**Gauthier S, Reisberg B, Zaudig M, Petersen RC, Ritchie K, Broich K, Belleville S, Brodaty H, Bennett D, Chertkow H, Cummings JL, de Leon M, Feldman H, Ganguli M, Hampel H, Scheltens P, Tierney MC, Whitehouse P, Winblad B; International Psychogeriatric Association Expert Conference on mild cognitive impairment.** Mild cognitive impairment. *Lancet*. 2006 Apr 15;367(9518):1262-70

10

**Fischer P, Jungwirth S, Zehetmayer S, Weissgram S, Hoenigschnabl S, Gelpi E, Krampla W, Tragl KH.** Conversion from subtypes of mild cognitive impairment to Alzheimer dementia. *Neurology*. 2007 Jan 23;68(4):288-91

**Devanand DP, Pradhaban G, Liu X, Khandji A, De Santi S, Segal S, Rusinek H, Pelton GH, Honig LS, Mayeux R, Stern Y, Tabert MH, de Leon MJ.** Hippocampal and entorhinal atrophy in mild cognitive impairment: prediction of Alzheimer disease. *Neurology*. 2007 Mar 13;68(11):828-36

20

**Rossi R, Geroldi C, Bresciani L, Testa C, Binetti G, Zanetti O, Frisoni GB.** Clinical and neuropsychological features associated with structural imaging patterns in patients with mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2007;23(3):175-83

30

**Whitwell JL, Petersen RC, Negash S, Weigand SD, Kantarci K, Ivnik RJ, Knopman DS, Boeve BF, Smith GE, Jack CR Jr.** Patterns of atrophy differ among specific subtypes of mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2007 Aug;64(8):1130-8

**Panza F, Capurso C, D'Introno A, Colacicco AM, Capurso A, Solfrizzi V.** Heterogeneity of mild cognitive impairment and other predementia syndromes in progression to dementia. *Neurobiol Aging*. 2007 Oct;28(10):1631-2; discussion 1633-4

40

**Hyman SE.** Can neuroscience be integrated into the DSM-V? *Nat Rev Neurosci*. 2007 Sep;8(9):725-32

**Blennow K.** Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx*. 2004 Apr;1(2):213-25

**Blennow K.** CSF biomarkers for Alzheimer's disease: use in early diagnosis and evaluation of drug treatment. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005 Sep;5(5):661-72

**Hampel H, Buerger K.** Biomarkers in blood and cerebrospinal fluid. In: Herholz K, Morris C, Perani D, editors. *The Dementias: Early Diagnosis and Evaluation*. New York: Taylor & Francis; 2006. p. 73-107

10

**Lewczuk P, Kornhuber J, Wiltfang J.** The German Competence Net Dementias: standard operating procedures for the neurochemical dementia diagnostics. *J Neural Transm*. 2006 Aug;113(8):1075-80

**Irizarry MC.** Biomarkers of Alzheimer disease in plasma. *NeuroRx*. 2004 Apr;1(2):226-34

20

**Barnes J, Foster J, Fox NC.** Structural magnetic resonance imaging-derived biomarkers for Alzheimer's disease. *Biomarkers Med*. 2007; 1: 79-92

**Vemuri P, Gunter JL, Senjem ML, Whitwell JL, Kantarci K, Knopman DS, Boeve BF, Petersen RC, Jack CR Jr.** Alzheimer's disease diagnosis in individual subjects using structural MR images: validation studies. *Neuroimage*. 2008 Feb 1;39(3):1186-97

30

**Barkhof F, Polvikoski TM, van Straaten EC, Kalaria RN, Sulkava R, Aronen HJ, Niinistö L, Rastas S, Oinas M, Scheltens P, Erkinjuntti T.** The significance of medial temporal lobe atrophy: a postmortem MRI study in the very old. *Neurology*. 2007 Oct 9;69(15):1521-7

40

**Mevel K, Desgranges B, Baron JC, Landeau B, De la Sayette V, Viader F, Eustache F, Chételat G.** Detecting hippocampal hypometabolism in Mild

Cognitive Impairment using automatic voxel-based approaches. *Neuroimage*. 2007 Aug 1;37(1):18-25

**Kemppainen NM, Aalto S, Wilson IA, Någren K, Helin S, Brück A, Oikonen V, Kailajärvi M, Scheinin M, Viitanen M, Parkkola R, Rinne JO.** PET amyloid ligand [11C]PIB uptake is increased in mild cognitive impairment. *Neurology*. 2007 May 8;68(19):1603-6

10

**Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergström M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausén B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Långström B.** Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol*. 2004 Mar;55(3):306-19

20

**Rowe CC, Ng S, Ackermann U, Gong SJ, Pike K, Savage G, Cowie TF, Dickinson KL, Maruff P, Darby D, Smith C, Woodward M, Merory J, Tochon-Danguy H, O'Keefe G, Klunk WE, Mathis CA, Price JC, Masters CL, Villemagne VL.** Imaging beta-amyloid burden in aging and dementia. *Neurology*. 2007 May 15;68(20):1718-25

**Pike KE, Savage G, Villemagne VL, Ng S, Moss SA, Maruff P, Mathis CA, Klunk WE, Masters CL, Rowe CC.** Beta-amyloid imaging and memory in non-demented individuals: evidence for preclinical Alzheimer's disease. *Brain*. 2007 Nov;130(Pt 11):2837-44

30

**Huang C, Eidelberg D, Habeck C, Moeller J, Svensson L, Tarabula T, Julin P.** Imaging markers of mild cognitive impairment: multivariate analysis of CBF SPECT. *Neurobiol Aging*. 2007 Jul;28(7):1062-9

40

**Kantarci K, Weigand SD, Petersen RC, Boeve BF, Knopman DS, Gunter J, Reyes D, Shiung M, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Tangalos EG, Jack CR Jr.** Longitudinal 1H MRS changes in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2007 Sep;28(9):1330-9

**Petrella JR, Wang L, Krishnan S, Slavin MJ, Prince SE, Tran TT, Doraiswamy PM.** Cortical deactivation in mild cognitive impairment: high-field-strength functional MR imaging. *Radiology*. 2007 Oct;245(1):224-35

**Hämäläinen A, Tervo S, Grau-Olivares M, Niskanen E, Pennanen C, Huuskonen J, Kivipelto M, Hänninen T, Tapiola M, Vanhanen M, Hallikainen M, Helkala EL, Nissinen A, Vanninen R, Soininen H.** Voxel-based morphometry to detect brain atrophy in progressive mild cognitive impairment. *Neuroimage*. 2007 Oct 1;37(4):1122-31

10

**Kircher TT, Weis S, Freymann K, Erb M, Jessen F, Grodd W, Heun R, Leube DT.** Hippocampal activation in patients with mild cognitive impairment is necessary for successful memory encoding. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007 Aug;78(8):812-8

20

**Kropholler MA, Boellaard R, van Berckel BN, Schuitemaker A, Kloet RW, Lubberink MJ, Jonker C, Scheltens P, Lammertsma AA.** Evaluation of reference regions for (R)-[(11)C]PK11195 studies in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007 Dec;27(12):1965-74

**Attems J.** Sporadic cerebral amyloid angiopathy: pathology, clinical implications, and possible pathomechanisms. *Acta Neuropathol*. 2005 Oct;110(4):345-59

30

**Blennow K, Hampel H.** CSF markers for incipient Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2003 Oct;2(10):605-13

**Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Londos E, Blennow K, Minthon L.** Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *Lancet Neurol*. 2006 Mar;5(3):228-34

40

**Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Andreasson U, Londos E, Minthon L, Blennow K.** Prediction of Alzheimer's disease using the CSF Abeta42/Abeta40 ratio in patients with mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2007;23(5):316-20

**Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, Lee SY, Dence CS, Shah AR, LaRossa GN, Spinner ML, Klunk WE, Mathis CA, DeKosky ST, Morris JC, Holtzman DM.** Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann Neurol.* 2006 Mar;59(3):512-9

10

**Prince JA, Zetterberg H, Andreasen N, Marcusson J, Blennow K.** APOE epsilon4 allele is associated with reduced cerebrospinal fluid levels of Abeta42. *Neurology.* 2004 Jun 8;62(11):2116-8

20

**Strozyk D, Blennow K, White LR, Launer LJ.** CSF Abeta 42 levels correlate with amyloid-neuropathology in a population-based autopsy study. *Neurology.* 2003 Feb 25;60(4):652-6

**Walsh DM, Klyubin I, Shankar GM, Townsend M, Fadeeva JV, Betts V, Podlisny MB, Cleary JP, Ashe KH, Rowan MJ, Selkoe DJ.** The role of cell-derived oligomers of Abeta in Alzheimer's disease and avenues for therapeutic intervention. *Biochem Soc Trans.* 2005 Nov;33(Pt 5):1087-90

30

**Ewers M, Buerger K, Teipel SJ, Scheltens P, Schröder J, Zinkowski RP, Bouwman FH, Schönknecht P, Schoonenboom NS, Andreasen N, Wallin A, DeBernardis JF, Kerkman DJ, Heindl B, Blennow K, Hampel H.** Multicenter assessment of CSF-phosphorylated tau for the prediction of conversion of MCI. *Neurology.* 2007 Dec 11;69(24):2205-12

40

**Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM.** Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. *Arch Neurol.* 2007 Mar;64(3):343-9.

**Gustafson DR, Skoog I, Rosengren L, Zetterberg H, Blennow K.** Cerebrospinal fluid beta-amyloid 1-42 concentration may predict cognitive decline in older women. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2007 May;78(5):461-4

**Li G, Sokal I, Quinn JF, Leverenz JB, Brodey M, Schellenberg GD, Kaye JA, Raskind MA, Zhang J, Peskind ER, Montine TJ.** CSF tau/Abeta42 ratio for increased risk of mild cognitive impairment: a follow-up study. *Neurology.* 2007 Aug 14;69(7):631-9

10

**Stomrud E, Hansson O, Blennow K, Minthon L, Londos E.** Cerebrospinal fluid biomarkers predict decline in subjective cognitive function over 3 years in healthy elderly. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2007;24(2):118-24

**Hempel H, Teipel SJ, Fuchsberger T, Andreasen N, Wiltfang J, Otto M, Shen Y, Dodel R, Du Y, Farlow M, Möller HJ, Blennow K, Buerger K.** Value of CSF beta-amyloid 1-42 and tau as predictors of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Mol Psychiatry.* 2004 Jul;9(7):705-10

20

**Maccioni RB, Lavados M, Guillón M, Mujica C, Bosch R, Farías G, Fuentes P.** Anomalously phosphorylated tau and Abeta fragments in the CSF correlates with cognitive impairment in MCI subjects. *Neurobiol Aging.* 2006 Feb;27(2):237-44

30

**Schönknecht P, Pantel J, Kaiser E, Thomann P, Schröder J.** Increased tau protein differentiates mild cognitive impairment from geriatric depression and predicts conversion to dementia. *Neurosci Lett.* 2007 Apr 6;416(1):39-42

**Clark CM, Xie S, Chittams J, Ewbank D, Peskind E, Galasko D, Morris JC, McKeel DW Jr, Farlow M, Weitlauf SL, Quinn J, Kaye J, Knopman D, Arai H, Doody RS, DeCarli C, Leight S, Lee VM, Trojanowski JQ.** Cerebrospinal fluid tau and beta-amyloid: how well do these biomarkers reflect autopsy-confirmed dementia diagnoses? *Arch Neurol.* 2003 Dec;60(12):1696-702

40

**Buerger K, Ewers M, Pirttilä T, Zinkowski R, Alafuzoff I, Teipel SJ, DeBernardis J, Kerkman D, McCulloch C, Soininen H, Hampel H.** CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain*. 2006 Nov;129(Pt 11):3035-41

**Engelborghs S, Sleegers K, Cras P, Brouwers N, Serneels S, De Leenheir E, Martin JJ, Vanmechelen E, Van Broeckhoven C, De Deyn PP.** No association of CSF biomarkers with APOEepsilon4, plaque and tangle burden in definite Alzheimer's disease. *Brain*. 2007 Sep;130(Pt 9):2320-6

10

**Buerger K, Alafuzoff I, Ewers M, Pirttilä T, Zinkowski R, Hampel H.** No correlation between CSF tau protein phosphorylated at threonine 181 with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain*. 2007 Oct;130(Pt 10):e82

20

**Wiltfang J, Esselmann H, Bibl M, Hüll M, Hampel H, Kessler H, Frölich L, Schröder J, Peters O, Jessen F, Luckhaus C, Perneczky R, Jahn H, Fiszer M, Maler JM, Zimmermann R, Bruckmoser R, Kornhuber J, Lewczuk P.** Amyloid beta peptide ratio 42/40 but not A beta 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF A beta 40 load. *J Neurochem*. 2007 May;101(4):1053-9

30

**Zhong Z, Ewers M, Teipel S, Bürger K, Wallin A, Blennow K, He P, McAllister C, Hampel H, Shen Y.** Levels of beta-secretase (BACE1) in cerebrospinal fluid as a predictor of risk in mild cognitive impairment. *Arch Gen Psychiatry*. 2007 Jun;64(6):718-26

**(2) Buerger K, Otto M, Teipel SJ, Zinkowski R, Blennow K, DeBernardis J, Kerkman D, Schröder J, Schönknecht P, Cepek L, McCulloch C, Möller HJ, Wiltfang J, Kretschmar H, Hampel H.** Dissociation between CSF total tau and tau protein phosphorylated at threonine 231 in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Aging*. 2006 Jan;27(1):10-5

40

**Bibl M, Mollenhauer B, Esselmann H, Schneider M, Lewczuk P, Welge V, Gross M, Falkai P, Kornhuber J, Wiltfang J.** Cerebrospinal fluid neurochemical phenotypes in vascular dementias: original data and mini-review. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2008;25(3):256-65

**McRae A, Martins RN, Fonte J, Kraftsik R, Hirt L, Miklossy J.** Cerebrospinal fluid antimicroglial antibodies in Alzheimer disease: a putative marker of an ongoing inflammatory process. *Exp Gerontol.* 2007 Apr;42(4):355-63

10

**Jellinger KA, Janetzky B, Attems J, Kienzl E.** Biomarkers for early diagnosis of Alzheimer disease: 'ALZheimer ASsociated gene'--a new blood biomarker? *J Cell Mol Med.* 2008 Aug;12(4):1094-117

**Finehout EJ, Franck Z, Choe LH, Relkin N, Lee KH.** Cerebrospinal fluid proteomic biomarkers for Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2007 Feb;61(2):120-9

20

**Castaño EM, Roher AE, Esh CL, Kokjohn TA, Beach T.** Comparative proteomics of cerebrospinal fluid in neuropathologically-confirmed Alzheimer's disease and non-demented elderly subjects. *Neurol Res.* 2006 Mar;28(2):155-63

**Zhang J, Goodlett DR, Quinn JF, Peskind E, Kaye JA, Zhou Y, Pan C, Yi E, Eng J, Wang Q, Aebersold RH, Montine TJ.** Quantitative proteomics of cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis.* 2005 Apr;7(2):125-33

30

**(1)Simonsen AH, McGuire J, Hansson O, Zetterberg H, Podust VN, Davies HA, Waldemar G, Minthon L, Blennow K.** Novel panel of cerebrospinal fluid biomarkers for the prediction of progression to Alzheimer dementia in patients with mild cognitive impairment. *Arch Neurol.* 2007 Mar;64(3):366-70

40

**Lescuyer P, Allard L, Zimmermann-Ivol CG, Burgess JA, Hughes-Frutiger S, Burkhard PR, Sanchez JC, Hochstrasser DF.** Identification of post-mortem

cerebrospinal fluid proteins as potential biomarkers of ischemia and neurodegeneration. *Proteomics*. 2004 Aug;4(8):2234-41

**Abdi F, Quinn JF, Jankovic J, McIntosh M, Leverenz JB, Peskind E, Nixon R, Nutt J, Chung K, Zabetian C, Samii A, Lin M, Hattan S, Pan C, Wang Y, Jin J, Zhu D, Li GJ, Liu Y, Waichunas D, Montine TJ, Zhang J.** Detection of biomarkers with a multiplex quantitative proteomic platform in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative disorders. *J Alzheimers Dis*. 2006 Aug;9(3):293-348

10

**Irani DN, Anderson C, Gundry R, Cotter R, Moore S, Kerr DA, McArthur JC, Sacktor N, Pardo CA, Jones M, Calabresi PA, Nath A.** Cleavage of cystatin C in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2006 Feb;59(2):237-47

20

**(2) Hansson SF, Simonsen AH, Zetterberg H, Andersen O, Haghighi S, Fagerberg I, Andréasson U, Westman-Brinkmalm A, Wallin A, Rübetschi U, Blennow K.** Cystatin C in cerebrospinal fluid and multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2007 Aug;62(2):193-6

**Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Chiappelli M, Montesi F, Tumini E, Mariani E, Licastro F, Patterson C.** Blood inflammatory markers and risk of dementia: The Conselice Study of Brain Aging. *Neurobiol Aging*. 2007 Dec;28(12):1810-20

30

**Engelhart MJ, Geerlings MI, Meijer J, Kiliaan A, Ruitenberg A, van Swieten JC, Stijnen T, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM.** Inflammatory proteins in plasma and the risk of dementia: the rotterdam study. *Arch Neurol*. 2004 May;61(5):668-72

40

**Motta M, Imbesi R, Di Rosa M, Stivala F, Malaguarnera L.** Altered plasma cytokine levels in Alzheimer's disease: correlation with the disease progression. *Immunol Lett*. 2007 Nov 30;114(1):46-51

**German DC, Gurnani P, Nandi A, Garner HR, Fisher W, Diaz-Arrastia R, O'Suilleabhain P, Rosenblatt KP.** Serum biomarkers for Alzheimer's disease: proteomic discovery. *Biomed Pharmacother.* 2007 Aug;61(7):383-9

**Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, Friedman LF, Galasko DR, Jutel M, Karydas A, Kaye JA, Leszek J, Miller BL, Minthon L, Quinn JF, Rabinovici GD, Robinson WH, Sabbagh MN, So YT, Sparks DL, Tabaton M, Tinklenberg J, Yesavage JA, Tibshirani R, Wyss-Coray T.** Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med.* 2007 Nov;13(11):1359-62

10

**Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, Boeve BF, Knopman DS, Ivnik RJ, Smith GE, Younkin LH, Petersen RC, Younkin SG.** Association of low plasma Abeta42/Abeta40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2007 Mar;64(3):354-62

20

**van Oijen M, Hofman A, Soares HD, Koudstaal PJ, Breteler MM.** Plasma Abeta (1-40) and Abeta (1-42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study. *Lancet Neurol.* 2006 Aug;5(8):655-60

**Sundelöf J, Giedraitis V, Irizarry MC, Sundström J, Ingelsson E, Rönnemaa E, Arnlöv J, Gunnarsson MD, Hyman BT, Basun H, Ingelsson M, Lannfelt L, Kilander L.** Plasma beta amyloid and the risk of Alzheimer disease and dementia in elderly men: a prospective, population-based cohort study. *Arch Neurol.* 2008 Feb;65(2):256-63

30

**Song MS, Mook-Jung I, Lee HJ, Min JY, Park MH.** Serum anti-amyloid-beta antibodies and Alzheimer's disease in elderly Korean patients. *J Int Med Res.* 2007 May-Jun;35(3):301-6

40

**Pesaresi M, Lovati C, Bertora P, Mailland E, Galimberti D, Scarpini E, Quadri P, Forloni G, Mariani C.** Plasma levels of beta-amyloid (1-42) in

Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2006 Jun;27(6):904-5

**Fukumoto H, Tennis M, Locascio JJ, Hyman BT, Growdon JH, Irizarry MC.** Age but not diagnosis is the main predictor of plasma amyloid beta-protein levels. *Arch Neurol*. 2003 Jul;60(7):958-64

10

**Kosaka T, Imagawa M, Seki K, Arai H, Sasaki H, Tsuji S, Asami-Odaka A, Fukushima T, Imai K, Iwatsubo T.** The beta APP717 Alzheimer mutation increases the percentage of plasma amyloid-beta protein ending at A beta42(43). *Neurology*. 1997 Mar;48(3):741-5

**Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S.** Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*. 1996 Aug;2(8):864-70

20

**Sobów T, Flirski M, Kłoszewska I, Liberski PP.** Plasma levels of alpha beta peptides are altered in amnesic mild cognitive impairment but not in sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2005;65(2):117-24

30

**Tamaoka A, Fukushima T, Sawamura N, Ishikawa K, Oguni E, Komatsuzaki Y, Shoji S.** Amyloid beta protein in plasma from patients with sporadic Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*. 1996 Sep 15;141(1-2):65-8

**Vanderstichele H, Van Kerschaver E, Hesse C, Davidsson P, Buyse MA, Andreasen N, Minthon L, Wallin A, Blennow K, Vanmechelen E.** Standardization of measurement of beta-amyloid (1-42) in cerebrospinal fluid and plasma. *Amyloid*. 2000 Dec;7(4):245-58

40

**Abdullah L, Paris D, Luis C, Quadros A, Parrish J, Valdes L, Keegan AP, Mathura V, Crawford F, Mullan M.** The influence of diagnosis, intra- and inter-person variability on serum and plasma Abeta levels. *Neurosci Lett.* 2007 Nov 27;428(2-3):53-8

**Freeman SH, Raju S, Hyman BT, Frosch MP, Irizarry MC.** Plasma Abeta levels do not reflect brain Abeta levels. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007 Apr;66(4):264-71

10

**Mehta PD, Pirttila T, Patrick BA, Barshatzky M, Mehta SP.** Amyloid beta protein 1-40 and 1-42 levels in matched cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer disease. *Neurosci Lett.* 2001 May 18;304(1-2):102-6

**Giedraitis V, Sundelöf J, Irizarry MC, Gårevik N, Hyman BT, Wahlund LO, Ingelsson M, Lannfelt L.** The normal equilibrium between CSF and plasma amyloid beta levels is disrupted in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2007 Nov 12;427(3):127-31

20

**Blasko I, Jellinger K, Kemmler G, Krampla W, Jungwirth S, Wichart I, Tragl KH, Fischer P.** Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine. *Neurobiol Aging.* 2008 Jan;29(1):1-11

30

**Mehta PD, Pirttilä T, Mehta SP, Sersen EA, Aisen PS, Wisniewski HM.** Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2000 Jan;57(1):100-5

**Brettschneider S, Morgenthaler NG, Teipel SJ, Fischer-Schulz C, Bürger K, Dodel R, Du Y, Möller HJ, Bergmann A, Hampel H.** Decreased serum amyloid beta (1-42) autoantibody levels in Alzheimer's disease, determined by a newly developed immuno-precipitation assay with radiolabeled amyloid beta (1-42) peptide. *Biol Psychiatry.* 2005 Apr 1;57(7):813-6

40

**Bibl M, Esselmann H, Mollenhauer B, Weniger G, Welge V, Liess M, Lewczuk P, Otto M, Schulz JB, Trenkwalder C, Kornhuber J, Wiltfang J.** Blood-based neurochemical diagnosis of vascular dementia: a pilot study. *J Neurochem.* 2007 Oct;103(2):467-74

**Walsh DM, Selkoe DJ.** A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem.* 2007 Jun;101(5):1172-84

10

**Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL.** Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 26;95(11):6448-53.

20

**Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ.** Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature.* 2002 Apr 4;416(6880):535-9.

**Kayed R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE, Glabe CG.** Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *J Biol Chem.* 2004 Nov 5;279(45):46363-6

30

**Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, Ashe KH.** Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci.* 2005 Jan;8(1):79-84.

**Pitschke M, Prior R, Haupt M, Riesner D.** Detection of single amyloid beta-protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy. *Nat Med.* 1998 Jul;4(7):832-4

40

**Santos AN, Torkler S, Nowak D, Schlittig C, Goerdes M, Lauber T, Trischmann L, Schaupp M, Penz M, Tiller FW, Böhm G.** Detection of amyloid-beta oligomers in human cerebrospinal fluid by flow cytometry and fluorescence resonance energy transfer. *J Alzheimers Dis.* 2007 Mar;11(1):117-25

**Klyubin I, Betts V, Welzel AT, Blennow K, Zetterberg H, Wallin A, Lemere CA, Cullen WK, Peng Y, Wisniewski T, Selkoe DJ, Anwyl R, Walsh DM, Rowan MJ.** Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J Neurosci.* 2008 Apr 16;28(16):4231-7

10

**Roher AE, Baudry J, Chaney MO, Kuo YM, Stine WB, Emmerling MR.** Oligomerization and fibril assembly of the amyloid-beta protein. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jul 26;1502(1):31-43

20

**Stenh C, Englund H, Lord A, Johansson AS, Almeida CG, Gellerfors P, Greengard P, Gouras GK, Lannfelt L, Nilsson LN.** Amyloid-beta oligomers are inefficiently measured by enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann Neurol.* 2005 Jul;58(1):147-50.

**Englund H, Sehlin D, Johansson AS, Nilsson LN, Gellerfors P, Paulie S, Lannfelt L, Pettersson FE.** Sensitive ELISA detection of amyloid-beta protofibrils in biological samples. *J Neurochem.* 2007 Oct;103(1):334-45.

30

**Schupf N, Tang MX, Fukuyama H, Manly J, Andrews H, Mehta P, Ravetch J, Mayeux R.** Peripheral Aβ subtypes as risk biomarkers of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 16;105(37):14052-7

40

**Englund H, Degerman Gunnarsson M, Brundin RM, Hedlund M, Kilander L, Lannfelt L, Pettersson FE.** Oligomerization partially explains the lowering of Aβ42 in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid. *Neurodegener Dis.* 2009;6(4):139-47. Epub 2009 Jun 12

**Hansson O, Zetterberg H, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Andreasson U, Londos E, Wallin A, Minthon L, Blennow K.** Evaluation of plasma Abeta(40) and Abeta(42) as predictors of conversion to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*. 2008 May 16. [Epub ahead of print]

**Kessler J, Calabrese P, Kalbe E, Berger F.** Ein neues Screening-Verfahren zur Unterstützung der Demenzdiagnostik. *Psycho* **26** 343-347 (2000)

10

**Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR.** "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975 Nov;12(3):189-98

**Shulman KI, Shedletsky R, Silver IL.** The challenge of time: Clock-drawing and cognitive function in the elderly. *Int J Geriatr Psychiatry* **1**, 135-140 (1986)

20

**Irie K, Murakami K, Masuda Y, Morimoto A, Ohigashi H, Ohashi R, Takegoshi K, Nagao M, Shimizu T, Shirasawa T.** Structure of beta-amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biosci Bioeng*. 2005 May;99(5):437-47

**(2) Simonsen AH, Hansson SF, Ruetschi U, McGuire J, Podust VN, Davies HA, Mehta P, Waldemar G, Zetterberg H, Andreasen N, Wallin A, Blennow K.** Amyloid beta 1-40 quantification in CSF: comparison between chromatographic and immunochemical methods. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2007;23(4):246-50

30

**Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, van der Kolk N, Vingtdoux V, van de Steeg E, Ret G, Canton T, Drobecq H, Clark A, Bonici B, Delacourte A, Benavides J, Schmitz C, Tremp G, Bayer TA, Benoit P, Pradier L.** Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal

40

truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol.* 2004 Oct;165(4):1289-300

**Gelfanova V, Higgs RE, Dean RA, Holtzman DM, Farlow MR, Siemers ER, Boodhoo A, Qian YW, He X, Jin Z, Fisher DL, Cox KL, Hale JE.** Quantitative analysis of amyloid-beta peptides in cerebrospinal fluid using immunoprecipitation and MALDI-Tof mass spectrometry. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2007 Jun;6(2):149-58.

10

**Sergeant N, Bombois S, Ghestem A, Drobecq H, Kostanjevecki V, Missiaen C, Watzet A, David JP, Vanmechelen E, Sergheraert C, Delacourte A.** Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *J Neurochem.* 2003 Jun;85(6):1581-91

20

**Xia W, Yang T, Shankar G, Smith IM, Shen Y, Walsh DM, Selkoe DJ.** A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring beta-amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2009 Feb;66(2):190-9.

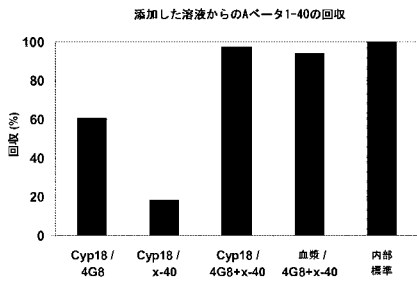
**El-Agnaf OM, Mahil DS, Patel BP, Austen BM.** Oligomerization and toxicity of beta-amyloid-42 implicated in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Jul 14;273(3):1003-7

30

**Howlett DR, Perry AE, Godfrey F, Swatton JE, Jennings KH, Spitzfaden C, Wadsworth H, Wood SJ, Markwell RE.** Inhibition of fibril formation in beta-amyloid peptide by a novel series of benzofurans. *Biochem J.* 1999 May 15;340 (Pt 1):283-9

【 図 1 】

A



B

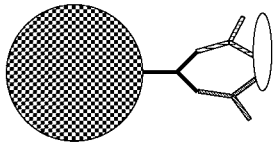


図 1

【 図 2 】

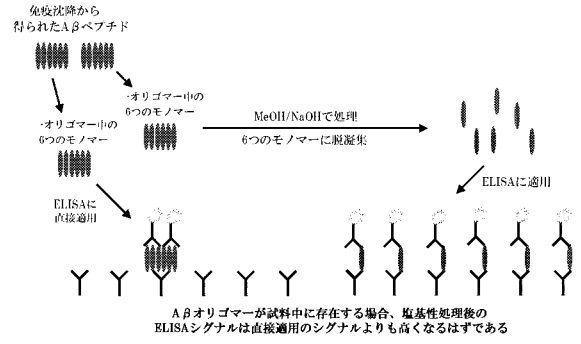


図 2

【 図 3 】

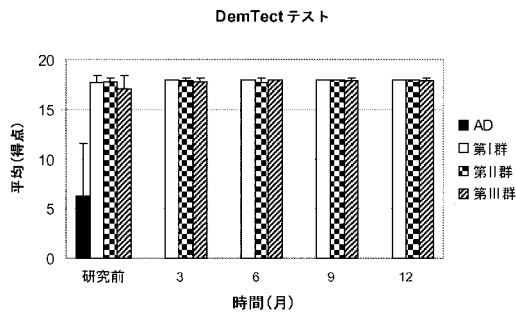


図 3

【 図 4 】

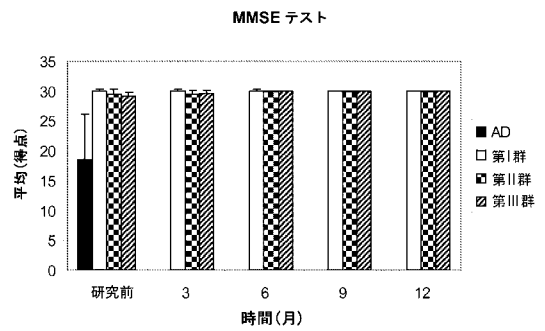


図 4

【 図 5 】

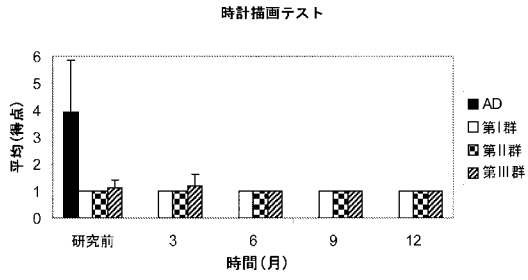


図 5

【 図 6 】

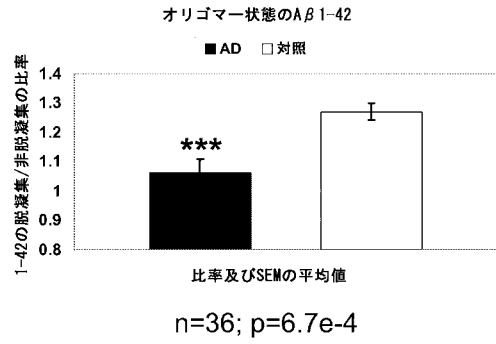
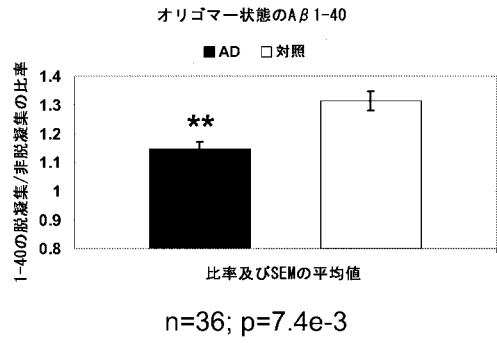


図 6

【 図 7 】

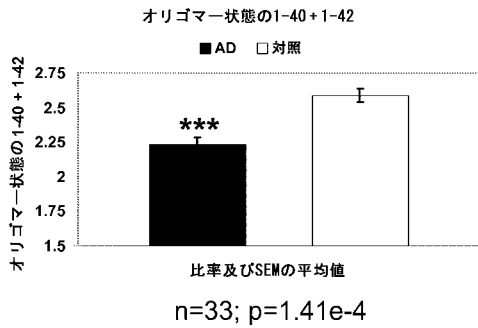


図 7

【配列表】

2013511734000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成24年11月21日(2012.11.21)

【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】

2013511734000001.app

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/EP2010/068069
<b>Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)</b>		
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)	
	<input checked="" type="checkbox"/>	on paper
	<input checked="" type="checkbox"/>	in electronic form
b.	(time)	
	<input checked="" type="checkbox"/>	in the international application as filed
	<input checked="" type="checkbox"/>	together with the international application in electronic form
	<input type="checkbox"/>	subsequently to this Authority for the purpose of search
2.	<input type="checkbox"/>	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:	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/068069

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K14/47 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VAN HELMOND Z ET AL: "Characterisation of two antibodies to oligomeric Abeta and their use in ELISAs on human brain tissue homogenates", JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHER B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 176, no. 2, 30 January 2009 (2009-01-30), pages 206-212, XP025803771, ISSN: 0165-0270, DOI: DOI:10.1016/J.JNEUMETH.2008.09.002 [retrieved on 2008-09-06] * abstract figure 4 ----- -/--	59-62
<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 document 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
31 January 2011		10/02/2011
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  Wiesner, Martina

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/068069

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XIA WEIMING ET AL: "A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring beta-amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with Alzheimer disease.", ARCHIVES OF NEUROLOGY FEB 2009 LNKD-PUBMED:19204155, vol. 66, no. 2, February 2009 (2009-02), pages 190-199, XP002619273, ISSN: 1538-3687 cited in the application figures 2,4	59-62
X	----- ENGLUND HILLEVI ET AL: "Oligomerization partially explains the lowering of Abeta42 in Alzheimer's disease cerebrospinal fluid", NEURODEGENERATIVE DISEASES, KARGER AG, BASEL, CH, vol. 6, no. 4, 1 August 2009 (2009-08-01), pages 139-147, XP008131216, ISSN: 1660-2854 cited in the application	59-63,65
Y	page 141, right-hand column, last paragraph - page 142, right-hand column, paragraph 2 page 146, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 1	1-58,64, 67-69
Y	----- GIEDRAITIS ET AL: "The normal equilibrium between CSF and plasma amyloid beta levels is disrupted in Alzheimer's disease", NEUROSCIENCE LETTERS, LIMERICK, IE, vol. 427, no. 3, 29 October 2007 (2007-10-29), pages 127-131, XP022318909, ISSN: 0304-3940, DOI: DOI:10.1016/J.NEULET.2007.09.023 * abstract figures 1,2	1-58,64, 67-69
X	----- BHASKAR KIRAN ET AL: "The PI3K-Akt-mTOR pathway regulates A $\beta$ oligomer induced neuronal cell cycle events", MOLECULAR NEURODEGENERATION, BIOMED CENTRAL LTD, LO, vol. 4, no. 1, 16 March 2009 (2009-03-16), page 14, XP021052327, ISSN: 1750-1326, DOI: DOI:10.1186/1750-1326-4-14 page 15, right-hand column, paragraph 3 page 27, right-hand column, paragraph 5	66

## 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 16/18 (2006.01) C 0 7 K 14/47 Z N A  
 C 0 7 K 16/18

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), 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, R S, 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, 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, I D, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 マルトイン クルエインスクフミドト  
 ドイツ連邦共和国 0 6 1 2 0 ハルレノサアレ ルウドウイグ ウウクヘレル ストラスセ 1  
 3

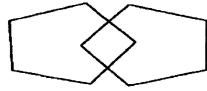
(72)発明者 ジェンス ウルリクフ ラフフエルド  
 ドイツ連邦共和国 0 6 3 1 7 ゲメインデ セエゲビエト マンスフェルデル ランド ガセマ  
 ンンエグ 4

Fターム(参考) 4H045 AA30 BA10 BA50 CA40 DA75 EA50 FA71

专利名称(译)	诊断阿尔茨海默病或轻度认知障碍的新诊断方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013511734A</a>	公开(公告)日	2013-04-04
申请号	JP2012540407	申请日	2010-11-24
[标]申请(专利权)人(译)	前体生物药物股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	Purobiodorugu AG		
[标]发明人	ハンスウルリクフデムトフ クラウディアゴエトリッヒ マルトインクルエインスクフミドト ジェンスウルリクフラフフェルト		
发明人	ハンス-ウルリクフ デムトフ クラウディア ゴエトリッヒ マルトイン クルエインスクフミドト ジェンス-ウルリクフ ラフフェルト		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/577 G01N33/553 C07K14/47 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/6896 C07K14/4711 G01N2800/2821		
FI分类号	G01N33/543.501.H G01N33/53.D G01N33/543.501.D G01N33/577.B G01N33/553 C07K14/47.ZNA C07K16/18		
F-TERM分类号	4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA71		
代理人(译)	石川 彻		
优先权	61/263861 2009-11-24 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本文提供了与神经变性疾病(例如阿尔茨海默病)的检测和诊断相关的方法,组合物和试剂盒。各方面使用淀粉样蛋白β片段的寡聚状态作为生物标志物,并且还涉及确定生物样品中淀粉样蛋白β片段的寡聚状态的新方法。

項目	質問	満点	得点
1) 見当識	a) 今日は何年/何月/何日ですか。 今日は何曜日ですか。 今の(季節)は何ですか?	5	
2) 記憶力 (Registration)	b) ここは何前/何年ですか。 ここは何(郡)/何地方ですか。 ここは何(の建物)で、何(何)ですか。 あなたの記憶をテストしたいと思います。 (3つ一般的な物品の名前を挙げる:「ボール、車、人」)私が言った単語を繰り返し返してもらえますか。 (1単語につき1点) (3つ全て思い出すまで最大6回繰り返し返す)	5	
3) 注意力 及び 計算	a) 100から順に7を引き、そのたびに答える。 5つ答えたらやめる。(93-86-79-72-65) あるいは、 b) 「World」という単語を逆唱させる。 {D.L.R.O.W}	3	
4) 想起	先ほどあなたに言ってもらった3つの単語は何でしたか。 (記憶力テストの時にこれら全ての物品が思い出されなかった場合は、このテストを中止)	5	
5) 言葉による命名 反復	(鉛筆を見せながら)これは何ですか。 (鉛筆を見せながら)これは何ですか。 これから言うことを繰り返し返してください。 「言い訳しない(no ifs, ands or buts)」。	2	
6) 読字 書取り	「目を閉じてください」というカードを見せるか、又はそう書いて、次の文章を読んで、その指示に従ってください。 何か短い文章を書いてください。	1	
7) 3段階の 命令	(紙を示して)この紙を左手に(又は右手に)持ってください。それを半分に折り畳んでください。それを床の上に置いてください。	1	
8) 構築	この図形を書き写してください。 	3	1
合計得点		30	