

(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2009-503524

(P2009-503524A)

(43) 公表日 平成21年1月29日(2009.1.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 H 0 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
CO 7 K 14/575 (2006.01)	CO 7 K 14/575 Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2008-524396 (P2008-524396)	(71) 出願人	501154389
(86) (22) 出願日	平成18年7月24日 (2006.7.24)		ベー・エル・アー・ハー・エム・エス・ア
(85) 翻訳文提出日	平成20年3月18日 (2008.3.18)		クティエンゲゼルシャフト
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/007272		ドイツ・D-16761・ヘーニッヒスト
(87) 国際公開番号	W02007/014667		ルフ・ノイエンドルフシュトラッセ・25
(87) 国際公開日	平成19年2月8日 (2007.2.8)	(74) 代理人	100064908
(31) 優先権主張番号	102005036094.7		弁理士 志賀 正武
(32) 優先日	平成17年8月1日 (2005.8.1)	(74) 代理人	100089037
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 渡邊 隆
		(74) 代理人	100108453
			弁理士 村山 靖彦
		(74) 代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経変性疾患の診断のための *in vitro* 方法

(57) 【要約】

神経変性疾患の検出、重篤さの測定、並びにモニター及び予後のための *in vitro* 方法であって、生理学的に不活性なプロアドレノメデュリン部分ペプチドの存在及び/または濃度を、神経変性疾患に罹患している患者、あるいはそのような疾患に罹患する疑いのある患者の生物学的流体で測定し、神経変性疾患の存在、過程、重篤さ、及び治療の成功についての結論を、特定の部分ペプチドの存在、及び/または見出された濃度、あるいは不存在に基づいて引き出すことを特徴とする方法。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

神経変性疾患の検出、重篤さの測定、並びにモニター及び予後のための *in vitro* 方法であって、生理学的に不活性なプロアドレノメデュリン部分ペプチドの存在及び/または濃度を、神経変性疾患に罹患している患者、あるいはそのような疾患に罹患する疑いのある患者の生物学的流体で測定し、神経変性疾患の存在、過程、重篤さ、及び治療の成功についての結論を、特定の部分ペプチドの存在、及び/または見出された濃度、あるいは不存在に基づいて引き出すことを特徴とする方法。

【請求項 2】

アッセイ方法が免疫診断アッセイ方法であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法

10

【請求項 3】

完全プレプロアドレノメデュリン（配列番号 1）のアミノ酸 45 - 92 を有する中領域プロアドレノメデュリン部分ペプチド（MR - プロ ADM；配列番号 2）が、患者の血漿において測定されることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記免疫診断アッセイ方法が、サンドイッチタイプの免疫アッセイであることを特徴とする、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記神経変性疾患が、アルツハイマー痴呆（AD）、レヴィー小体を有する痴呆（DLB）、前頭側頭型痴呆（FTD）、及び各種の形態の血管痴呆（VAD）から選択される初老期の痴呆であることを特徴とする、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

アルツハイマー痴呆の診断の一部として実施されることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

各臨床像に関連する少なくとも一つの更なる生化学的または生理学的なパラメーター情報が同時に測定され、測定された結果が神経変性疾患の細かい診断のために評価される少なくとも二つの測定された変数のセットの形態で得られるマルチパラメーター測定の一部として実施されることを特徴とする、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8】

プロアドレノメデュリン部分ペプチドの測定に加えて、前記マルチパラメーター測定の一部として、炎症メディエーター、補体成分、サイトカイン、ケモカイン、血液凝固成分及び線維素溶解性因子、急性期のタンパク質、並びにフリーラジカル化合物からなる群から選択される、少なくとも一つの更なる生化学的パラメーターが測定されることを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記マルチパラメーター測定が、チップテクノロジー測定装置または免疫クロマトグラフィ測定装置によって同時の測定として実施されることを特徴とする、請求項 7 または 8 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記マルチパラメーター測定の複雑な測定結果の評価が、コンピュータープログラムの補助で実施されることを特徴とする、請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、神経変性疾患、特に痴呆、例えばアルツハイマー病の診断のための新規な *in vitro* 方法に関する。

【0002】

本発明の文脈では、用語「診断」は、測定が実施される患者の临床上の状態に依存して

50

、各種の問題に基づいてよく、特に検出及び早期検出、重篤さの測定、及び治療の間のモニターを含むモニター、並びに疾患の更なる過程の予後のために機能する医学的測定のための一般用語として使用される。本発明の内容で特に重要なことは、診断が、疾患に典型的な特定の特徴が見出されないこと、例えば患者の血液サンプル中の関連疾患と関連するバイオマーカーの検出がなされないことに基づいて、特定の疾患の存在が信頼可能に排除されるネガティブ診断であることができるという点である。

【0003】

ネガティブ診断についての無視できない価値はまた、複数の各種の疾患において上昇した濃度で見出すことができるバイオマーカーであり、それ故、特定の疾患のポジティブ診断をそれ自体単独では可能にしないが、一般的にそれらは、更なる臨床上または生化学的なパラメーターの使用でのポジティブ診断のための決め手となり得る。

10

【0004】

本発明によって診断される疾患は、ゆっくりと進行していく非感染性の病因の慢性神経変性疾患、特に初老期の痴呆である傾向を有する。

【背景技術】

【0005】

痴呆は、共通の特徴が後天的な知能、特に記憶の損失、及び脳損傷の結果としての通常レベルの人格の損失である疾患として一般的に規定されている。痴呆は一般的に、慢性的な特徴の疾患に比較的ゆっくりと進行するものである。痴呆の症状が高齢前の中年の人に現れたら、それらは初老期の痴呆として称され、それらの典型的な症状と脳の病理学的な変化に基づいて、以下の四種の疾患または疾患の群の間で特に分類がなされる：

20

【0006】

アルツハイマー痴呆（AD）（アルツハイマー病）は、最も頻出の神経変性痴呆であり、痴呆の全てのケースの2/3を数える。ADは、アミロイドプラークの形成、神経原線維束の形成、及び神経細胞の損失という三種の重要な病理学的特徴によって分類される（概要として非特許文献19を参照）。アミロイドプラークは、アミロイド-タンパク質のニューロン外の凝集物からなり、神経原線維束は、タウ-タンパク質と神経線維を主に含む。プラークと神経原線維束の形成は、神経細胞の死の原因であると推測されている。

【0007】

ADの最も重要な症状は、比較的永久的な情動の反応性を有する記憶と知性の増大していく機能不全であり、これらの症状は、他の形態の痴呆からADを区別することを困難とする更により不特定のな混乱を伴う。

30

【0008】

レヴィー小体を有する痴呆（DLB）は、アルツハイマー痴呆に次いで二番目に痴呆の主たる原因となるものである（非特許文献11及び18）。神経病理学的に、DLBは、脳幹及び大脳皮質におけるレヴィー小体と称されるものの出現によって特徴づけされる。これらのレヴィー小体は、主にシナプス前タンパク質（ α -シヌクレイン）とユビキチンの凝集物からなる。レヴィー小体の病理は、アルツハイマー病とパーキンソン病に典型的な神経病理学的変化と異なる度合いに関連している。かくして、DLBにおいても、 α -アミロイドと老年プラークの形成が存在するが、神経原線維束は存在しない（概要として非特許文献6参照）。レヴィー小体はまた、異なる分布であったとしても、パーキンソン病を有する患者の脳にも存在する（概要として非特許文献19参照）。

40

【0009】

DLBの鍵となる症状は、進行性の認識障害、不安定な注意力と自覚を伴う混乱の出現、パーキンソン病、頻発する転倒と失神（短い発作的無意識）である。診断指標の感度及び特異性は、全体に高い特異性を示すが、ある場合に非常に低い感度を示す。これは、DLBがしばしば臨床上のルーチンであまり診断されていないことを意味する。

【0010】

前頭側頭型痴呆（FTD）はピック病とも称され、初老性痴呆の約20%を数える。F

50

T Dはある場合に遺伝的であり、タウオブシーとも称されるものであり、タウ-タンパク質の過剰発現または抑制発現によって、あるいは突然変異したタウ-タンパク質の発現によって区別される。神経病理学的症状は、前頭及び/または側頭皮質、及び黒質、及び脳底神経節の局所的萎縮である。これは、各種の段階の言語障害、人格の変化、挙動の異常を引き起こす。全体として、F T Dは93%の感度とわずか23%の特異性で診断されており、A Dが最も頻繁な誤診である。

【0011】

用語「血管痴呆」(V A D)は、痴呆が引き金となって脳の血流が破壊された疾患を包含する。各種のタイプのV A Dが存在し、その中では多不完全骨折痴呆(M I D)及び皮質下V A D(ピンスヴァンガー病とも称される)が最も頻繁な形態である。

10

【0012】

ピンスヴァンガー病は、白脳物質における脳血管性病変によって病理学的に特徴づけられるゆっくりと進行性の痴呆である。臨床的にこれは、挙動の異常、例えば興奮、癲癇、鬱及び多幸症、並びにわずかな記憶障害を引き起こす。

【0013】

多不完全骨折痴呆は、一過性虚血性侵襲(T I A)とも称される数回の小さな発作の結果として次第に生じ、それは大脳皮質及び/または皮質下領域における脳組織の破壊を導く。この発作は完全に無意識的であり続けても良く、この場合痴呆は第一の知覚可能な結果である。M I Dの存在では、重篤な鬱、気分の揺らぎ、及び癲癇と関連する認識能力の減少が徐々に生じる。

20

【0014】

痴呆の診断は今日では、精神神経学的な調査、及び疾患の発達の観察、特定形態の痴呆についての排除指標を使用する過程に基づいて主に実施されている。非常の多数の場合で、これらの調査は不明確な結果を与え、それは痴呆の診察された形態についての前述の数、及び不正確に診断された場合を説明している。疾患に典型的な大脳の変化は、生きている患者で直接的に確立することはもちろんできず、例えばX線撮影またはM R Iによる脳機能の技術的に医学的な調査が完成しているが高価である。

【0015】

アルツハイマー病の診断のために、Ronald and Nancy Reagan Institute of the Alzheimer's Association、及びNIA Working Groupは、A Dの検出のための理想的なバイオマーカーのセットである指標についてガイドラインを出版した(非特許文献7)。以下の指標が、バイオマーカーによって理想的には実現されるべきである:

30

1. 脳特異的であって、これらの疾患の神経病理学的な基本的特徴を検出すること。
2. 診断感度及び特異性が少なくとも80%であること。
3. バイオマーカーの疾患特異的变化が、適切な治療手段を開始できるようにするために、できるだけ疾患の早期の段階でそれ自体明白であること(非特許文献9)。

【0016】

しかしながら、A Dの早期の示差的診断のための十分な確かさを有する、血液または脳脊髄液において臨床上ルーチンで使用でき、全ての上述の指標を実現するバイオマーカーは今日まで存在していない。現在では、炎症マーカー、例えばI L - 6とT N F、及び酸化ストレスのためのマーカー、例えば3-ニトロチロシン、及びA Dの特徴的な病理学的変化と関連するマーカー、例えばアミロイド、及び神経原線維束の実質的な成分であるタウ-タンパク質を含む、各種の潜在的なマーカー候補が調査されている(非特許文献7の要約参照;非特許文献26)。

40

【非特許文献1】BEINFELD M. C. (1998). Prohormone and proneuropeptide processing . Recent progress and future challenges. Endocrine 8:1-5

【非特許文献2】BELTOWSKI J., JAMROZ A. (2004). Adrenomedullin - what do we know 10 years since its discovery? Polish Journal of Pharmacology 56: 5-27

【非特許文献3】BUNTON D. C, PETRIE M. C, HILLIER C, JOHNSON F., MCMURRAY J. J.V . (2004) . The clinical relevance of adrenomedullin: a promising profile? Pharma

50

cology & Therapeutics 103:179-201

【非特許文献4】CHU D. Q., SMITH D.M., BRAIN S.D. (2001). Studies of the microvascular effects of adrenomedullin and related Peptides. *Peptides* 22:1881-1886

【非特許文献5】ELSASSER T. H., KAHL S., MARTINEZ A., MONTUENGA L. M., PIO R., CUTTITTA F. (1999). Adrenomedullin Binding Protein in the Plasma of Multiple Species: Characterization by Radioligand Blotting. *Endocrinology* 140(10): 4908-4911

【非特許文献6】ENDO T. (2001) . A review of the biological properties and clinical implications of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP) , hypotensive and vasodilating peptides. *Peptides* 22:1693-1711

【非特許文献7】FRANK R. A., GALASKO D., HAMPEL H., HARDY J., DE LEON M. J., MEHTA P. D.; ROGERS J., SIEMERS E., TROJANOWSKI J. Q. (2003) . Biological markers for therapeutic trials in Alzheimer' s disease. Proceedings of the biological markers working group; NIA initiative on neuroimaging in Alzheimer' s disease. *Neurobiology of Aging* 24: 521-536

【非特許文献8】GELDMACHER D. S. (2004). Dementia with Lewy bodies: diagnosis and clinical approach. *Cleveland clinic Journal of Medicine* 71:789-800

【非特許文献9】GROWDON J. H., SELKOE D. J., ROSES A., TROJANOWSKI J. Q., DAVIES P., APPEL S. et al . [Working Group Advisory Committee] . (1998) . Consensus report of the Working Group on Biological Markers of Alzheimer' s Disease. [Ronald and Nancy Reagan Institute of the Alzheimer' s Association and National Institute on Aging Working Group on Biological Biomarkers of Alzheimer' s Disease] . *Neurobiology of Aging* 19: 109-116

【非特許文献10】ICHIKI Y., KITAMURA K., KANGAWA K., KAWAMOTO M., MATSUO H., ETO T. (1994) . Distribution and characterization of immunoreactive adrenomedullin in human tissue and plasma. *FEBS Letters* 338:6-10

【非特許文献11】KIS B., ABRAHAM CS., DELI M.A., KOBAYASHI H., WADAA., NIWA M., YAMASHITA H., UETA Y. (2001). Adrenomedullin in the cerebral circulation. *Peptides* 22:1825-1834

【非特許文献12】KITAMURA K., KANGAWA K., ISHIYAMA Y., WASHIMINE H., ICHIKI Y., KAWAMOTO M., MINAMINO N., MATSUO H., ETO T. (1994) . Identification and hypotensive activity of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP) . *FEBS Letters* 351 (1) : 35-37

【非特許文献13】KITAMURA K., KANGAWA K., ETO T. (2002). Adrenomedullin and PAMP: Discovery, Structures, and Cardiovascular Functions. *Microsc. Res . Tech.* 57: 3-13.

【非特許文献14】MCKEITH I. G. (2002). Dementia with lewy bodies. *British Journal of Psychiatry* 180: 144-147

【非特許文献15】MEERAN K., O'SHEA D., UPTON P. D., SMALL C. J., GHATEI M. A., BYFIELD P. H., BLOOM S. R. (1997). Circulating adrenomedullin does not regulate systemic blood pressure but increases plasma prolactin after intravenous infusion in humans : a pharmacokinetic study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82:95-100

【非特許文献16】MORGENTHALER N. G., STRUCK J., ALONSO C, BERGMANN A. (2005) . Measurement of mid regional proadrenomedullin (MR-proADM) in plasma with an immunoluminometric assay. (*Clinical Chemistry*, 2005; in press)

【非特許文献17】M. GARY NICHOLLS, JOHN G. LAINBURY, LYNLEY K. LEWIS, DAVID O. MCGREGOR, A. MARK RICHARDS, RICHARD W. TROUGHTON, TIMOTHY G. YANDLE (2001) . Bioactivity of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in man. *Peptides* 22 1745-1732.

【非特許文献18】SATO F., TAKAHASHI K., MUR-AKAMI O., TOTSUNE K., SONE M., OHN

10

20

30

40

50

EDA M., ABE K., MIURA Y., HAYASHI Y., SASANO H. (1995) . Adrenomedullin in human brain, adrenal glands and tumor tissues of pheochromocytoma, ganglioneuroblastoma and neuroblastoma . Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 80(5) : 1750-2

【非特許文献 19】SELKOE D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiological Reviews 81: 741-766

【非特許文献 20】STROUD R. M., WALTER P. (1999). Signal sequence recognition and protein targeting. Current Opinion Structure Biology 9:754-9

【非特許文献 21】STRUCK J., CHEN T., MORGENTHALER N. G., BERGMANN A. (2004) . Identification of an adrenomedullin precursor fragment in plasma of sepsis patients. Peptides 25: 1369-1372

【非特許文献 22】SUGO S., MINAMINO N., KANGAWA K., MIYAMOTO K., KITAMURA K., SAKATA J., ETO T., MATSUO H. (1994). Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. Biochemical and Biophysical Research Communication 201 (3) :1160-6

【非特許文献 23】TARKOWSKI E. (2002). Cytokines in dementias. Current Drug Targets - Inflammation and Allergy 1: 193-200

【非特許文献 24】TARKOWSKI E., LILJEROTH A. M., MINTHON L., TARKOWSKI A., WALLIN A., BLENNOW K. (2003). Cerebral pattern of pro- and anti-inflammatory cytokines in dementias. Brain Research Bulletin 61: 255-260

【非特許文献 25】TAYLOR M. M., SAMSON W. K. (2001). Adrenomedullin and central cardiovascular regulation. Peptides 22:1803-1807

【非特許文献 26】TEUNISSEN C. E., DE VENTE J., STEINBUSCH H. W. M., DE BRUIJN C. (2002) . Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid. Neurobiology of Aging 23:485-508

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

明白な実験室の発見を与え、痴呆、特にアルツハイマー痴呆 (AD) のためのバイオマーカーとして適切である、血液または血漿サンプル中の物質の測定に基づき、痴呆、特に AD の存在が疑われる患者においてポジティブ診断及び/またはネガティブ排除診断に適している調査のための予備的方法について現在必要性が存在している。

【課題を解決するための手段】

【0018】

本発明は、神経変性疾患の検出のための、重篤さの測定のための、並びにモニター及び予後のための *in vitro* 方法の形態のそのような調査方法を提供し、生理学的に不活性なプロアドレノメデュリン部分ペプチドの存在及び/または濃度を、神経変性疾患に罹患している患者、あるいはそのような疾患に罹患する疑いのある患者の生物学的流体で測定し、神経変性疾患の存在、過程、重篤さ、及び治療の成功についての結論を、特定の部分ペプチドの存在、及び/または見出された濃度、あるいは不存在に基づいて引き出すものである。

【0019】

請求項 1 に係る方法の有利なまたは好ましい発展型は、従属請求項 2 から 10 に記載されている。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

本発明は、最初により詳細に説明された既知の形態の初老期の痴呆が、痴呆の発達、症状、及び過程について必須であると考慮される炎症工程及び内皮損傷を各種の度合いで伴うという発見を適用することにより、痴呆の診断を改良するための本発明者らによる考察に基づき、それが神経変性疾患が神経炎症性疾患としても考慮できる理由である。

【0021】

かくしてアルツハイマー病は、補体因子、急性期のタンパク質、及び炎症後サイトカインのような各種の炎症性タンパク質の関与を有する脳における慢性の局所的炎症反応の出現によって、それ自体特徴づけられる（非特許文献26）。

【0022】

炎症工程はまた、血管痴呆（VAD）の起源において役割を果たす。TNF、TGF、IL-6、及びGM-CSF（顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子）のレベルは、VADを有する患者において実質的に上昇する（非特許文献23及び24）。

【0023】

DLBでも、炎症工程は役割を果たすようである。かくして、DLBを有する患者の脳における活性化ミクログリア細胞の数が増大し、TNFのような炎症後サイトカインは、小脳扁桃及び海馬のような脳の特定の領域で過剰発現する。

10

【0024】

他方で、FTD患者の脳における炎症反応の出現を単独で示すものはわずかしが存在しない

【0025】

(i) 神経炎症工程が、血流破壊、特に脳の微小循環系の破壊を導くという仮説から、(ii) この度合いで、心臓組織の血流破壊または微小循環系の破壊と関連する心臓血管疾患との類似性が存在するという仮説から、並びに(iii) 強力な血管拡張剤であるアドレノメデュリンの増大した形成自体が、そのような心臓血管疾患で検出可能であることから、最後に(iv) 中領域の生理学的に不活性なプレアドレノメデュリン部分ペプチド(MR-プロADM; 配列番号2)の濃度を測定する本出願人の新規な免疫アッセイの補助で、アドレノメデュリンの形成または生理学的放出を信頼できる臨床上有効な形態で測定する可能性を利用することから開始して、本発明者は、痴呆を有する患者、特にアルツハイマー痴呆が高い可能性で診断された患者、さもなければ増大したアドレノメデュリン生産と関連する未知の疾患に罹患している患者の場合でも、血漿中に前述の中領域プロアドレノメデュリン部分ペプチド(MR-プロADM)の増大した濃度が検出できるかどうかという疑問を調べた。

20

【0026】

以下の実施例で記載される、見かけ上健康な正常患者とアルツハイマー患者のEDTA血漿サンプルの測定結果は、中領域アドレノメデュリン部分ペプチド(MR-プロADM; 配列番号2)について見出された濃度と、「恐らくアルツハイマー病」の診断を導く痴呆症状の存在との間に明らかな診断上有意な相関関係を与えた。

30

【0027】

今日まで、アルツハイマー患者の血漿サンプルに対する調査に限られてはいるが、本発明者らは、恐らく各種の典型的な相関範囲で、患者の血漿中のMR-プロADMの特徴的な増大が、他の神経炎症性痴呆形態、特に血管痴呆(VA)及びレヴィー小体を有する痴呆(DLB)の場合でも検出可能であろうと推測する。この推測は更に、脳脊髄液(CSF)中のバイオマーカープロカルシトニンの濃度の本出願人によるより最近の測定によってもサポートされ、これは前記疾患の免疫診断学的に認識可能な関係を説明している(2005年8月21日の特許出願DE 10 2005 034 174.8を参照)。

40

【0028】

患者の血漿中のMR-プロADM濃度についての実施例で記載された測定で使用されたアッセイ方法は、非競合的免疫発光サンドイッチアッセイに基づき、それは本出願人のWO 2004/090546 A1(またはEP 1 488 209 A1)、特に実施例の第5及び6段落、並びに非特許文献21により詳細に記載されている。患者のサンプル中のアドレノメデュリンの測定の問題に関する一般的主張、並びにWO 2004/090546 A1及び非特許文献21におけるアッセイを実施するための説明は、本願における主張を補充するために参考としてここに取り込まれる。

【0029】

50

アドレノメデュリン (ADM) は、52 アミノ酸からなり、185 アミノ酸を含むより長い前駆体ペプチド (配列番号 1) から生合成されて形成されるペプチドホルモンである。他のペプチドホルモンの場合と同様に、アドレノメデュリンの生合成は、膜 (ゴルジ) 結合リボソームでのプレホルモンとして最初に生ずる。シグナルペプチダーゼによる 21 アミノ酸からなる疎水性 N 末端シグナル配列の除去、及び ER のルーメンでの残余のプロペプチドのホールディングの後、ゴルジ装置でプロペプチドがベシクルに実装され、細胞膜に輸送される (非特許文献 20)。輸送の間で、一般的に二塩基性アミノ酸配列でのプロホルモンコンベルターゼにより、プロペプチドの成熟ホルモンへのプロセッシングが生じる (非特許文献 1)。各種の刺激を介して、生理学的に活性な成熟ペプチド (ペプチドホルモン) が、細胞外空間または血漿内に放出される。放出の後、成熟活性ペプチドは通常、タンパク質分解によって迅速に不活性化され、及び / またはそのレセプターに結合することにより循環から除去される。それ故それらは一般的に、短い生理学的な半減期を有する。かくして血漿中でわずか 22 分の半減期が ADM について測定された (非特許文献 15)。

10

20

30

40

50

【0030】

アドレノメデュリンは、副腎、膵臓、心房、肺、小腸 (非特許文献 10)、及び脳 (非特許文献 18) における血管内皮細胞 (非特許文献 22) によって高濃度で発現されている。ADM は各種の生物学的活性を有する (より最近の概要は非特許文献 2 に見出されるはずである)。かくして ADM は、血圧の減少、より大きいナトリウム排出、及び腎臓血流の増大を導く。ADM はまた、下垂体による ACTH (副腎皮質刺激ホルモン) の分泌と、胃腸粘膜による HCL 分泌を阻害する。更に ADM は、グラム陽性細菌及びグラム陰性細菌に対する抗菌特性を有する。

【0031】

ADM のプレプロアドレノメデュリン前駆体 (配列番号 1) は、ADM 自体に加えて、更にセグメントまたは部分ペプチドを含み、それらは更なる活性ペプチド、プロアドレノメデュリン N 末端 20 ペプチド (PAMP) を含み、それは同様に低血圧特性、即ち血圧低減特性を有する (非特許文献 12)。あまり詳細に調査されていない C 末端部分ペプチドはアドレノテンシンと称され、33 アミノ酸を含み (プレプロ ADM のアミノ酸 153 - 185 ; 例えば非特許文献 21 の記載参照)、今日までの発見によれば同様に血管作用性である (血管拡張剤)。

【0032】

ADM 自体の分析測定の可能性は、その短い半減期、そのオートクリンまたはパラクリン作用、及び ADM 結合タンパク質によるホルモンのマスキングとその極端に物理的な特性 (血管の表面への接着) により負に影響する。それ故、ルーチンの目的に適した患者の血中の ADM の信頼可能で再生産可能な直接的測定は不可能である。

【0033】

血液または血漿バイオマーカーの測定による ADM の形成または放出の信頼可能な測定のためのブレイクスルーは、適切なプロ ADM 断片である前述のプレプロ ADM 45 - 92 または MR - プロ ADM (配列番号 2 ; WO 2004/090546 A1 または非特許文献 21 も参照) が血中に存在し、活性なプロ ADM ペプチド ADM 及び PAMP の最も重要な化学量数比で形成されるが、明白な再生産可能な形態で免疫アッセイによってその定量が可能であるために、不活性で安定であるという発見に由来した。

【0034】

本願で報告された、アルツハイマー患者における MR - プロ ADM の測定可能な血漿濃度の有意な増大の結果は、増大した MR - プロ ADM 血漿濃度として測定可能な増大した ADM 生産が、病理的な内皮損傷または微小循環系に対する損傷の場合に一般的に観察されるはずであるという作業仮説の確認として解釈できる。痴呆は、脳の微小循環系の損傷を構成する一方で、心臓組織は、心臓血管疾患の場合に影響する。

【0035】

ところで、心臓血管疾患 (心不全) を有する 20 の患者の比較的小さな群に基づいて見

出され、WO 2004/090546に示された測定可能なMR - プロADM血漿濃度の有意な増大は、慢性心不全（CHF：消化性心不全）を有する232の患者のより大きな群でのより徹底的な調査で完全に確認された。かくして、 0.12 nmol/l の機能的なアッセイ感度（アッセイ内CV < 20%）を有するWO 2004/090546に従ったサンドイッチアッセイにより検出された、患者の測定可能なMR - プロADM濃度は、各心不全の重篤さと明らかに相関できた。健康なコントロール患者（264名）におけるMR - プロADMの血漿濃度についての平均値が、 $0.33 \pm 0.07 \text{ nmol/l}$ （ 0.10 から 0.64 nmol/l の値の範囲）として測定された一方で、消化性心不全に罹患している患者の平均値は、 $0.8 \pm 0.55 \text{ nmol/l}$ であり、疾患の重篤さで増大した（NVHA分類によってクラスI、II、III、及びIVとして分類された； nmol/l 単位の平均MR - プロADM濃度は、クラスI： 0.41 ± 0.15 ；クラスII： 0.61 ± 0.31 ；クラスIII： 0.77 ± 0.44 ；クラスIV： 1.35 ± 0.77 ）。MR - プロADM値の増大は、心不全に罹患している患者の生存の期待に対する強力な予後マーカーであることが分かった（MR - プロADM値の増大は、 0.1 nmol/l 当たり1.181のハザード比で生存の機会の減少のための予後マーカーであると分かった、 $p < 0.0001$ ）。

10

【0036】

本発明は、測定結果及び図面を参考にして、以下でより詳細に説明される。

【実施例】

【0037】

20

アッセイの記載

血漿中の中領域プロADM45 - 92（MR - プロADM；配列番号2）の測定を、WO 2004/090546または対応のEP 1 488 209 A1の実施例、あるいは非特許文献21または非特許文献16に実質的に記載された免疫発光サンドイッチアッセイによって実施した。

【0038】

特に、 $10 \mu\text{l}$ のサンプル/キャリブレーター及び $200 \mu\text{l}$ のトレーサー（標識一次抗体）を、二次抗体で被覆されたチューブ内に導入し、攪拌しながら（ $170 - 300 \text{ rpm}$ ）室温（ $18 - 24$ ）で2時間インキュベートした。その後、液相を捨て、 1 ml のLUMitest洗浄溶液（B.R.A.H.M.S Aktiengesellschaft, Hennigsdorf, Germany）で四回チューブを洗浄した。

30

【0039】

コントロール測定では、EDTA血漿よりも血清で実質的により低い値が得られ、ヘパリン血漿とシトレート血漿もまた、別の較正を必要とする逸脱した値を与えるため、MR - プロADMはEDTA血漿で測定されるべきであることが見出された。

【0040】

健康なコントロールと、恐らくアルツハイマー痴呆に罹患している患者の血漿中のMR - プロADMの測定

MR - プロADMの濃度についての参照値を測定するため、神経変性疾患にも、ADMまたはプロADM部分ペプチドの上昇した測定値を与えることが既知であるいずれかの他の認識可能な疾患（心臓血管疾患；重篤な感染症または炎症）にも罹患していない264名の健康なコントロール患者のEDTA血漿で測定を実施した。コントロール群については、 $0.33 \pm 0.07 \text{ nmol/l}$ （ 0.10 から 0.64 nmol/l の範囲）のMR - プロADMの平均値が測定された。年齢群に従ったコントロール患者の評価では、 38.3 ± 13.9 歳の年齢群について 0.337 nmol/l の平均値が得られ、 69.0 ± 4.8 歳の選択年齢群については、 0.392 nmol/l の平均値が得られた（図1参照）。

40

【0041】

痴呆の兆候を有し、「恐らくアルツハイマー痴呆」と診断されている患者は、患者群として機能した。 0.614 nmol/l の値が、患者群の平均値として得られた。

【0042】

50

健康なコントロールと恐らくアルツハイマー痴呆を有する患者の血漿中の測定されたMR - プロADM濃度が図1に示されている。

【0043】

MR - プロADM濃度は、恐らくアルツハイマー痴呆を有する患者で実質的に増大する。ここでアルツハイマー患者は、95% (38.3 ± 13.9歳のより若い健康なコントロールに基づいて) または82% (69.0 ± 4.9歳の年齢がマッチした健康なコントロールに基づいて) の特異性、且つ89%の感度で、健康なコントロールと区別できる。

【0044】

血漿中のMR - プロADM濃度として測定される増大したADM生産が、痴呆の場合だけでなく、他の疾患(敗血症; 心臓血管疾患/心不全; しかしながら一般的に、これらは痴呆とは臨床的に容易に区別できる)でも観察され、それ故MR - プロADMは脳特異的なパラメーターではないが、MR - プロADMの測定は、AD患者での高い特異性と感度のため、ADポジティブ診断をサポートする目的に、特にネガティブ診断(排除診断)に非常に適しており、ADに罹患している疑いのある患者の血漿中のMR - プロADM濃度は、ADの診断を非常に高い可能性で除外する。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】 図1は、健康なコントロール患者のEDTA血漿におけるMR - プロADM濃度の測定の結果を示し、評価は二種類の年齢群、及び「恐らくアルツハイマー痴呆」と診断された患者に基づいて実施されている。

10

20

【図1】

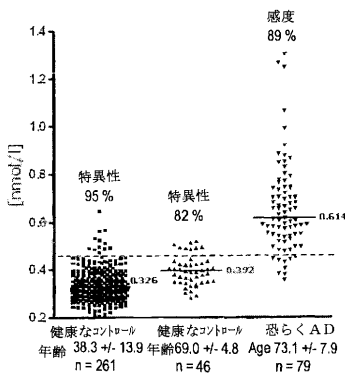


Figure 1

【配列表】

2009503524000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/EP2006/007272
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. GOIN33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) GOIN		
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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/090546 A (B R A H M S AG [DE]; BERGMANN ANDREAS [DE]; STRUCK JOACHIM [DE]) 21 October 2004 (2004-10-21) cited in the application the whole document	1-4,7-10
A	FRANK RICHARD A ET AL: "Biological markers for therapeutic trials in Alzheimer's disease Proceedings of the biological markers working group; NIA initiative on neuroimaging in Alzheimer's disease." NEUROBIOLOGY OF AGING, vol. 24, no. 4, July 2003 (2003-07), pages 521-536, XP002406248 ISSN: 0197-4580 cited in the application the whole document	1-10
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 8 November 2006		Date of mailing of the international search report 02/01/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Döpfer, Klaus-Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/007272

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TEUNISSEN C E ET AL: "Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid" NEUROBIOLOGY OF AGING, vol. 23, no. 4, July 2002 (2002-07), pages 485-508, XP002406249 ISSN: 0197-4580 cited in the application the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2006/007272

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004090546 A	21-10-2004	AT 312342 T	15-12-2005
		CN 1759319 A	12-04-2006
		DE 10316583 A1	28-10-2004
		EP 1488209 A1	22-12-2004
		ES 2250959 T3	16-04-2006
		JP 2006523302 T	12-10-2006
		MX PA05010827 A	09-03-2006

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/007272

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G01N33/68		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 2004/090546 A (B R A H M S AG [DE]; BERGMANN ANDREAS [DE]; STRUCK JOACHIM [DE]) 21. Oktober 2004 (2004-10-21) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-4,7-10
A	FRANK RICHARD A ET AL: "Biological markers for therapeutic trials in Alzheimer's disease Proceedings of the biological markers working group; NIA initiative on neuroimaging in Alzheimer's disease." NEUROBIOLOGY OF AGING, Bd. 24, Nr. 4, Juli 2003 (2003-07), Seiten 521-536, XP002406248 ISSN: 0197-4580 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-10
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
8. November 2006		02/01/2007
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HW Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Döpfer, Klaus-Peter

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2006/007272

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>TEUNISSEN C E ET AL: "Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid" NEUROBIOLOGY OF AGING, Bd. 23, Nr. 4, Juli 2002 (2002-07), Seiten 485-508, XP002406249 ISSN: 0197-4580 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p>	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2006/007272

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2004090546 A	21-10-2004	AT 312342 T	15-12-2005
		CN 1759319 A	12-04-2006
		DE 10316583 A1	28-10-2004
		EP 1488209 A1	22-12-2004
		ES 2250959 T3	16-04-2006
		JP 2006523302 T	12-10-2006
		MX PA05010827 A	09-03-2006

フロントページの続き

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

(72)発明者 アンドレアス・ベルクマン

ドイツ・D - 1 2 3 5 1 ・ベルリン・バウムロイファーヴェーク・4 7

(72)発明者 アンドレア・エルンスト

ドイツ・D - 1 6 7 6 1 ・ヘンニヒスドルフ・ファルケンセーレ・シュトラッセ・4

(72)発明者 ハラルト・ハンペル

ドイツ・D - 8 0 3 3 1 ・ミュンヘン・ヴェステンリーデルシュトラッセ・2 1

Fターム(参考) 4H045 BA10 BA20 CA40 DA30 EA20

专利名称(译)	Invitro诊断神经退行性疾病的方法		
公开(公告)号	JP2009503524A	公开(公告)日	2009-01-29
申请号	JP2008524396	申请日	2006-07-24
[标]申请(专利权)人(译)	布拉姆斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	裴埃尔啊她IMS股份公司		
[标]发明人	アンドレアスベルクマン アンドレアエルンスト ハラルトハンベル		
发明人	アンドレアス・ベルクマン アンドレア・エルンスト ハラルト・ハンベル		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C07K14/575		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2333/575 G01N2800/2814 G01N2800/2821 Y10S436/811 Y10S436/815		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.521 C07K14/575.ZNA		
F-TERM分类号	4H045/BA10 4H045/BA20 4H045/CA40 4H045/DA30 4H045/EA20		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	102005036094 2005-08-01 DE		
其他公开文献	JP5005690B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种检测，确定神经退行性疾病的严重性以及监测和预后的体外方法。在患有神经退行性疾病或怀疑患有这种疾病的患者的生物体液中确定生理上无活性的肾上腺髓质素原（proADM）部分肽，特别是中部区域proADM部分肽的存在和/或浓度。根据生物样品中特定部分肽的存在和/或浓度，得出有关神经退行性疾病治疗的存在，进程，严重性或成功的结论。

【 図 1 】

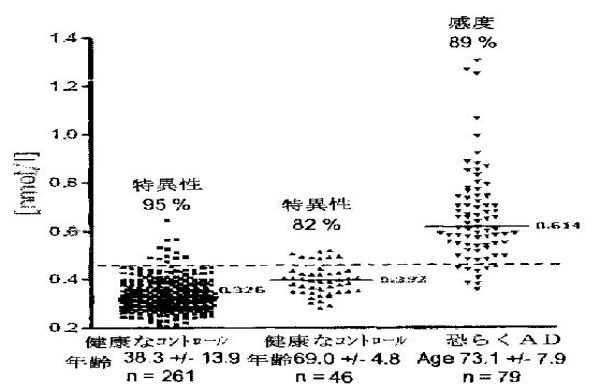


Figure 1