

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-72313

(P2018-72313A)

(43) 公開日 平成30年5月10日(2018.5.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573 A	4 B 0 5 0
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 C	
C 1 2 N 9/04 (2006.01)	C 1 2 N 9/04 C	

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L 外国語出願 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2017-80646 (P2017-80646)	(71) 出願人	517134618 バイオーステム・バイオテック・カンパニー・リミテッド Bio-Stem Biotech Co., Ltd. 台湾260イーラン・カウンティ、イーラン・シティ、メイジョウ・ファースト・ロード、ナンバー14-3
(22) 出願日	平成29年4月14日 (2017.4.14)	(74) 代理人	100101454 弁理士 山田 卓二
(31) 優先権主張番号	15/335,036	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜
(32) 優先日	平成28年10月26日 (2016.10.26)	(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病の診断方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、アルツハイマー病(AD)のリスク検出、診断、予後およびモニタリングのための方法に関する。

【解決手段】方法は、(1)被験者からのサンプル中のグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のレベルを測定するステップ；および(2)サンプル中のGAPDHのレベルを、2つ以上のGAPDHのAD基準レベルと比較するステップ；を含む。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験者におけるアルツハイマー病(AD)の診断またはADリスクの検出のための方法であって、以下のステップ：

(1)ADを有さないコントロールグループならびにアルツハイマー病の異なるステージおよびタイプを有する被験者を有するADグループを含む被験者のベースラインセットからサンプルを採取するステップ；

(2)ベースラインサンプル中の単一のバイオマーカーとして、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のベースラインセットのベースラインレベルを測定するステップ；

(3)試験セット中のGAPDHのベースラインレベルに基づいて試験セット中のGAPDHについての1つ以上のAD基準レベルを決定するステップ；

(4)GAPDHのレベルについてテストサンプルを測定するステップ；および

(5)試験サンプル中のGAPDHのレベルが、ステップ(3)で決定されたAD基準レベルよりも高い場合、試験サンプルがADに対して陽性であるか、またはリスクを有することを決定するステップ；

を含む方法。

【請求項 2】

サンプルが、血液、尿、または唾液サンプルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

サンプルが、血漿サンプルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

GAPDHについてのAD基準レベルが、約380 ng/dL ~ 約720 ng/dLであり；ここで、被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約720 ng/dLより高い場合、アルツハイマー病と診断され；被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約380 ng/dLより低い場合、アルツハイマー病のリスクが低いと診断され；および被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約380 ng/dL ~ 約720 ng/dLである場合、アルツハイマー病のリスクが高いと診断される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

GAPDHについてのAD基準レベルが、すべての被験者からのサンプルの特異度データおよびGAPDHレベルの統計データに従って決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

GAPDHについてのAD基準レベルが、回帰分析によって決定される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

サンプル中のGAPDHのレベルが、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットによって決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

それを必要とする被験者における、アルツハイマー病(AD)に対する陽性またはリスクを試験するための方法であって、以下のステップ：

(1)被験者からのサンプル中のグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のレベルを測定するステップ；および

(2)被験者からのサンプル中のGAPDHのレベルを、GAPDHについての1つ以上のAD基準レベルと比較すること；および

(3)サンプル中のGAPDHのレベルが、GAPDHについてのAD基準レベルよりも高い場合、サンプルが、ADに対して陽性であるか、またはリスクを有すると決定するステップ；

を含む方法。

【請求項 9】

サンプルが、血漿サンプルである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

10

20

30

40

50

GAPDHについてのAD基準レベルが、約380 ng/dL～約720 ng/dLである、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約720 ng/dLより高い場合、アルツハイマー病と診断され；被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約380 ng/dLより低い場合、アルツハイマー病のリスクが低いと診断され；および被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約380 ng/dL～約720 ng/dLである場合、アルツハイマー病のリスクが高いと診断される、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

サンプル中のGAPDHのレベルが、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットによって決定される、請求項8に記載の方法。

10

【請求項13】

それを必要とする被験者からのサンプルにおける、アルツハイマー病(AD)に対する陽性またはリスクを試験するための請求項8に記載の方法を実行するための試験キットであって、

GAPDHの試験装置上に存在するレベルに比例する信号レベルを生成するようにそれぞれ構成された複数の試験装置；および

試験装置上のGAPDHのレベルを読み取るように構成された読み取り装置；を含む、キット。

【請求項14】

試験装置のそれぞれからのレベルが、ADに対して陽性を示すGAPDHの基準レベルより高い場合、陽性という結果を示すように構成された読み取り装置、請求項13に記載のキット。

20

【請求項15】

読み取り装置が、ADに対する異なるリスクを示すGAPDHの基準レベルに基づいて、ADに対する異なるリスクを示すように構成された、請求項13に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルツハイマー病(AD)のリスク検出、診断、予後およびモニタリングのための方法に関する

30

【背景技術】

【0002】

アルツハイマー病(AD)は、最も一般的な型式の認知症である。アルツハイマー病は神経変性疾患に分類され、その原因と進行はほとんど理解されていない。病気の過程は、脳の斑やもつれに関連していると思われる。最も一般的な初期症状は、短期記憶の喪失 - 最近の出来事を思い出すことが困難となることである。

【0003】

これまでのところ、ADの標準的な診断試験がないため、診断は、AD患者によって提供された臨床情報および神経学的検査の所見に基づいて行われる。通常、ADの診断は、患者の行動および思考能力を評価するためのテストによって確認され、可能な場合は、しばしば脳スキャンが行われる。しかしながら、決定的な診断のためには脳組織の検査が必要である。ADを評価する従来の方法は、非特異的であるか、または高価であり、たとえば、機能的自律の規模を調べるための機能評価アンケート(FAQ)の形式の心理テストであるミニメンタルステート検査(MMSE)(Tombaugh, The mini-mental state examination: a comprehensive review. J. Am. Geriatr. Soc. 40, 922-935, 1992)；脳脊髄液中のタウおよびアミロイド-濃度の浸潤試験(Wangら、Proteomic analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer disease identifies GAPDH as a detergent-insoluble paired helical filament tau binding protein. FASEB J. 19, 869-871, 2005)；非常に高価な神経画像検査、特にコンピュータ断層撮影(CT)(Haydelら、Indications for computed tomography i

40

50

n patients with minor head injury. N. Engl. J. Med. 343, 100-105, 2000)が挙げられる。

【0004】

WO2013153461は、アルツハイマー病およびパーキンソン病のリスク検出、診断、予後およびモニタリングのための唾液中の特定のバイオマーカーによる方法を開示し、ここで、バイオマーカーは、cTnI、ミオグロビン、MMP-9、MMP-8、MMP-2、sICAM-1、ミエロペルオキシダーゼ[MPO]、IL-4、および/またはIL-5; B-型ナトリウム利尿ペプチド[BNP]、IL-1a、IL-11、IL-10、TNF-a、IFN- γ 、VEGF、インスリン、GLP-1(活性)、GLP-1(総)、TREM1、ロイコトリエンE4、Akt1、A β -40、A β -42、Fasリガンド、PSA、G-CSF、MIP-1a、IL-22、IL-8、IL-21、IL-15、IL-6、IL-7、GM-CSF、IL-2、IL-12、IL-17a、IL-1 β 、MCP、IL-32またはRANTES、アポリポタンパク質AI、DおよびE、虚血修飾アルブミン (IMA)、フィブロネクチン、s. アルファ-アミラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、組織因子活性、MCP-1、sVCAM-1、sCD-40、インスリン様増殖因子I(IGF-I)、およびIGF-IIの2つ以上を含む。

10

【0005】

米国特許第9,012,237号は、特定のバイオマーカーを測定することによって、被験者におけるアルツハイマー病の診断方法またはアルツハイマー病を発症するリスクの決定方法を開示し、ここで、バイオマーカーは、脳由来神経栄養因子(BDNF)、インスリン様増殖因子-1(IGF-1)、腫瘍増殖因子-1(TGF- β 1)、血管内皮増殖因子(VEGF)、インターロイキン18(IL-18)、単球走化性タンパク質-1(MCP-1)から選ばれる少なくとも4つのバイオマーカーであり、IL-18および/またはMCP-1の増加、および/またはBDNF、IGF-1、VEGFおよび/またはTGF- β 1の減少は、ADの発症の存在またはリスクを示す指標となる。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ADの診断およびADリスクの決定のためのはるかに容易な方法を開発することが依然として望まれている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の概略

予期せぬことに、本発明において、AD患者由来のサンプル中のグリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のレベルが、アルツハイマー病の診断またはリスク検出のための単一のバイオマーカーとして役立つことが、見出されている。

30

【0008】

したがって、1つの態様において、本発明は、以下のステップを含む、被験者におけるアルツハイマー病(AD)の診断またはADリスクの検出のための方法を提供する：

(1)ADを有さないコントロールグループならびにアルツハイマー病の異なるステージおよびタイプを有する被験者を有するADグループを含む被験者のベースラインセットからサンプルを採取するステップ；

(2)ベースラインサンプル中の単一のバイオマーカーとして、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のベースラインセットのベースラインレベルを測定するステップ；

40

(3)試験セット中のGAPDHのベースラインレベルに基づいて試験セット中のGAPDHについてのAD基準レベルを決定するステップ；

(4)GAPDHのレベルについてテストサンプルを測定するステップ；および

(5)試験サンプル中のGAPDHのレベルが、ステップ(3)で決定されたAD基準レベルよりも高い場合、試験サンプルがADに対して陽性であるか、またはリスクを有することを決定するステップ。

【0009】

本発明の1つの実施態様において、サンプルは、血液、尿または唾液サンプルである。

50

特定の実施態様において、サンプルは、血漿サンプルである。

【0010】

本発明の1つの実施態様において、GAPDHについてのAD基準レベルは、約380 ng/dL ~ 約720 ng/dLであり；ここで、被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約720 ng/dLより高い場合、アルツハイマー病と診断され；被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約380 ng/dLより低い場合、アルツハイマー病のリスクが低いと診断され；および被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約380 ng/dL ~ 約720 ng/dLである場合、アルツハイマー病のリスクが高いと診断される。

【0011】

本発明において、GAPDHのレベルは、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットによって決定される。

10

【0012】

別の態様において、本発明は、以下のステップを含む、それを必要とする被験者におけるアルツハイマー病(AD)に対する陽性またはリスクを試験するための方法を提供する：

(1)被験者からの血漿サンプル中のグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のレベルを測定するステップ；および

(2)被験者からのサンプル中のGAPDHのレベルを、約380 ng/dLおよび約720 ng/dLの1つ以上のGAPDHのAD基準レベルと比較するステップ；および

(3)サンプル中のGAPDHのレベルが、GAPDHのAD基準レベルより高い場合、サンプルが、アルツハイマー病(AD)に対して陽性であるか、またはリスクを有すると決定するステップ。

20

【0013】

本発明の1つの実施態様では、サンプルは、血漿サンプルである。

【0014】

本発明の特定の1つの実施態様において、GAPDHについてのAD基準レベルは、約380 ng/dL ~ 約720 ng/dLであり；ここで、被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約720 ng/dLより高い場合、アルツハイマー病と診断され；被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約380 ng/dLより低い場合、アルツハイマー病のリスクが低いと診断され；および被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約380 ng/dL ~ 約720 ng/dLである場合、アルツハイマー病のリスクが高いと診断される。

【0015】

1つのさらなる実施態様において、本発明は、

GAPDHの試験装置上に存在するレベルに比例する信号レベルを生成するようにそれぞれ構成された複数の試験装置；および

試験装置上のGAPDHのレベルを読み取るように構成された読み取り装置；

を含む、アルツハイマー病(AD)に対する陽性またはリスクを試験するための本発明方法を実行するための試験キットを提供する。

30

【0016】

本開示の新規な概念の趣旨および範囲から逸脱することなく、その中での変形および変更が可能であるが、これらの態様および他の態様は、以下の図面とともに、好ましい実施態様の以下の説明から明らかになるであろう。

40

【0017】

本発明の上記の概要、ならびに以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むことにより、よりよく理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】コントロールおよびAD被験者の血漿サンプル中のGAPDHのレベルを示す；ここで、データは、上位四分位から下位四分位の箱として提示された；中央値は、箱内で平行に描かれる；ひげは、箱の側面の途中から、最小値と最大値へ伸びる；同じ箱内の異なる文字は有意差を示す($P < 0.05$)。

【図2A】ADの関連基準が、 > 378.74 ng/dLであることを示し、指定診断番号0および1は

50

それぞれ、ADを有さないコントロールおよびAD患者を示す。

【図2 B】ROC曲線下面積(AUC)が 0.944 ± 0.0219 であり、高い精度を示していることを表す；95%信頼区間(CI)の $0.877-0.981$ およびz統計値の 20.271 ($P < 0.0001$)は、感度86.4%および特異度90.6%に達することができる。

【図3】Y軸として特異度(%)の統計データ、およびX軸として血漿サンプル(ADD)中のGAPDHのレベルに従ってプロットされたROC曲線を提供する。

【図4】図3にて与えられたROC曲線から得られた回帰直線を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0019】

発明の記載

他に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【0020】

本明細書で使用される、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈上他に明確に指示されない限り、複数の指示対象を含む。したがって、たとえば、「サンプル(a sample)」への言及は、複数のそのようなサンプルおよび当業者に知られているその等価物を包含する。

【0021】

本発明は、それを必要とする被験者からのサンプル中のグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のレベルを決定することによるアルツハイマー病(AD)の診断方法を提供する。

【0022】

本明細書で使用される「診断」または「診断する」という用語は、本発明において、被験者が疾患、すなわちアルツハイマー病に罹患しているか否かを評価することを示す。当業者には理解されるように、そのような評価は、調査される被験者の100%にとって正しいとは言えないが、そうであることが好ましい。しかしながら、この用語は、被験者の統計学的に有意な部分が正確に評価され、したがって診断されることを必要とする。この用語には、アルツハイマー病またはその症状の個々の診断、ならびに被験者の連続的なモニタリングが含まれる。モニタリング、すなわち、さまざまな時点または年齢で、アルツハイマー病もしくはそれに付随する症状を有するかまたは有さない被験者を診断することは、アルツハイマー病に罹患していることが分かっている被験体のモニタリングおよびアルツハイマー病を発症する危険性があることが分かっている被験体のモニタリングを包含する。さらに、モニタリングを用いて、被験者が、成功裏に治療されるかどうか、あるいは、アルツハイマー病の少なくとも1つの症状が、ある治療によって時間とともに改善されるかどうかを決定することもできる。

【0023】

AD海馬のニトロ化の標的としてグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)が同定され、GAPDHの酸化機能障害は、AD脳における神経機能および神経変性の喪失に有意に寄与することができる。(Sultanaら、Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. Neurobiol. Dis. 22, 76-87, 2006.) GAPDHが、神経変性に重要な役割を果たしていることも報告された(Petrakら、Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. Proteomics 8, 1744-1749, 2008; Piechaczykら、Unusual abundance of vertebrate 3-phosphate dehydrogenase pseudogenes. Nature 312, 469-471, 1984)。しかしながら、これまで、GAPDHのレベルを測定することによるADの診断法は存在しなかった。

【0024】

本発明において、被験者からのサンプル中のGAPDHのレベルは、GAPDHを測定するための任意の公知のまたは従来の方法/キットによって決定されうる。本発明の1つの実施態様では、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットなど、GAPDHに特異的に結合する抗

10

20

30

40

50

体を使用するキットを使用することができる。本発明の1つの実施態様では、たとえば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットなど、GAPDHに特異的に結合する抗体を使用するキットを使用することができる。

【0025】

本明細書で使用される「バイオマーカー」という用語は、本明細書で言及される疾患または効果の指標として働く分子種を示す。前記分子種は、被験者のサンプルに見出されるヌクレオチド配列、アミノ酸配列、DNA、タンパク質、または代謝産物であり得るが、これらに限定されるものではない。

【0026】

本明細書で使用される「被験者」または「それを必要とする被験者」という用語は、アルツハイマー病の有無にかかわらず、任意の年齢の男性または女性の哺乳類、好ましくはヒトを意味する。

【0027】

用語「抗体」は、完全抗体、それらの結合特異性を依然として保持するその誘導体またはその機能的断片を示す。特に、GAPDHに特異的に結合する本発明の抗体。

【0028】

本明細書で使用される用語「サンプル」は、たとえば、血液、尿、唾液および組織流体サンプルなどの調査される被験者から得られたサンプルを示す。

【0029】

本発明によれば、アルツハイマー病(AD)の診断または被験者におけるADリスクの検出のための方法は、以下のステップを含む：

(1)被験者のベースラインセットからのサンプルを採取するステップであって、被験者のベースラインセットが、ADを有さない被験者からなるコントロールグループおよびアルツハイマー病の異なる段階およびタイプを有する被験者からなるADグループを含むステップ；

(2)ベースラインサンプル中のシングルバイオマーカーとして、グリセロアルデヒド3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)のベースラインセットのベースラインレベルを測定するステップ；

(3)試験セットにおけるGAPDHのベースラインレベルに基づいて、試験セット中のGAPDHについての1つ以上のAD基準レベルを決定するステップ；

(4)GAPDHのレベルについて、試験サンプルを測定するステップ；および

(5)試験サンプル中のGAPDHのレベルが、ステップ(3)で決定されたAD基準レベルよりも高い場合、試験サンプルが、ADに対して陽性であるか、またはのリスクを有すると決定するステップ。

【0030】

本発明によれば、サンプルは、血液、尿、唾液または任意の生理学的サンプルであってもよい。1つの特定の実施態様では、サンプルは血液サンプル、特に血漿サンプルである。

【0031】

一方、本発明は、それを必要とする被験者における、アルツハイマー病(AD)に対する陽性またはリスクを試験するための方法であって、以下のステップ：

(1)被験者からのサンプル中のグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)のレベルを測定するステップ；および

(2)被験者からのサンプル中のGAPDHのレベルを、GAPDHについての1つ以上のAD基準レベルと比較すること；および

(3)サンプル中のGAPDHのレベルが、GAPDHについてのAD基準レベルよりも高い場合、サンプルが、ADに対して陽性であるか、またはリスクを有すると決定するステップ；を含む方法を提供する。

【0032】

本発明において、GAPDHのレベルは、GAPDHに特異的に結合する抗体を用いるキットによ

10

20

30

40

50

って決定されうる。以下の実施例に示すように、GAPDHのレベルは、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットによって決定され、GAPDHについてのAD基準レベルは、すべての被験者からのサンプルの特異度データ(%)およびGAPDHレベルの統計データに従って、特に、特に特異度データおよびGAPDHレベルの回帰分析によって、決定される。

【0033】

実施例に示すように、GAPDHについてのAD基準レベルは、約380 ng/dL～約720 ng/dLであり；ここで、被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約720 ng/dLより高い場合、アルツハイマー病と診断され；被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約380 ng/dLより低い場合、アルツハイマー病のリスクが低いと診断され；および被験者からの試験サンプル中のGAPDHのレベルが、約380 ng/dL～約720 ng/dLである場合、アルツハイマー病のリスクが高いと診断される。この実施例では、GAPDHのレベルが、アルツハイマー病の診断またはリスク検出のための単一バイオマーカーとして使用されることが確認されている。

10

【0034】

本発明を以下の実施例によってさらに説明するが、これらの実施例は限定ではなく例示を目的として提供される。

【実施例】

【0035】

1. 材料および方法

1. 被験者

合計43人のAD患者(60-69歳(n=5、男性3、女性2)、70-79歳(n=18、男性9、女性9)および80-89歳(n=20、男性10、女性10))、ならびに合計37人の高齢者コントロール(70-79歳(n=20、男性11、女性9)および80-89歳(n=17、男性13、女性4))は、台北退役軍人総合病院のメモリクリニック(TVGH)の外来から採用された。臨床面接、身体検査、検査所見および画像検査(CTおよび/またはMRI)の結果に基づくAD患者の診断決定は、臨床コンセンサス会議で行われた。AD診断は、National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association(NINCDS-ADRDA)の基準に従って行われた(Froese, Cube law, condition factor and weight-length relationships: history, meta analysis and recommendations. J. Appl. Ichthyol. 22, 241-253, 2006)。全てのAD患者は、診断検査として神経学的検査、実験室試験および神経画像評価を受けた。高齢者コントロールは、外来診療所から採用された認知症愁訴のないボランティアであった。また、20-29歳の青年16名((n=16、男性8、女性8)は、国立イラン大学のキャンパスからのボランティアであった。

20

30

【0036】

2. サンプル

ヒト血漿サンプルをEDTA-2Na入りプラスチックシリンジで採取し、次いで、4℃、3000rpm、および30分間にて遠心分離してタンパク質上清を得た。血漿タンパク質を液体窒素中に滴下し、次いで、以下の分析のために-80℃で凍結した。酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を使用して、血漿中の特異的タンパク質レベルを定量した。市販の試薬は、ヒトGAPDH ELISAキット(DuoSet IC(登録商標)DYC5718、R&D Systems、USA)から入手した。キットを使用するためのプロトコルは、その指示書にしたがった。サンプルを、450nmの波長で、ELISAリーダー(SpectraMax(登録商標)M2 マイクロプレート・リーダー、Molecular Devices Inc.、カリフォルニア、USA)によって分析した。

40

【0037】

3. GAPDHレベルアッセイ

ELISA定量からの血漿GAPDHレベルを、ノンパラメトリックKruskal-Wallis試験(GraphPad Prism(登録商標)バージョン5.01(著作権)1992-2007 GraphPad Software Inc.)に付した。データを、下位四分位から上位四分位にボックスとして表示した。中央値は、箱内で平行に描かれる。ひげは、箱の側面の途中から、最小値と最大値へ伸びる。次に、我々は、血漿GAPDHからの高ADリスクおよび血漿Cyt C1からの自然老化の関連基準をそれぞれ特定

50

するために、ROC曲線統計法(MedCalc(登録商標)バージョン13.3.1.0、(著作権)1993-2014 MedCalc Software bvba)を使用する。ROC曲線下面積(AUC)は、おそらく1.0~0.5の間に位置する。AUCは、0.5~0.7で低い精度、0.7~0.9である程度の精度、および0.9以上で高い精度を表す。AUC=0.5である場合、その診断方法が完全に無効であり、診断値がないことを示す。AUC<0.5は、実際の状況に適合せず、実際にはほとんど発生しない。

【0038】

統計分析

2つのグループ間の比較を、スチューデントのt検定によって分析した。3つのグループ内の比較を、ANOVA試験によって分析した。患者の生存曲線の比較を、ログランク試験によって分析した。インビボの腫瘍生存度の比較を、フィッシャーの正確な試験によって分析した。P<0.05の値は、統計的に有意であると考えられた。

10

【0039】

II. 結果

20-29歳(n=16、男性8、女性8)の青年コントロールおよび70-79歳(n=20、男性11、女性9)および80-89歳(n=17、男性13、女性4)の高齢者コントロールおよび60-69歳(n=5、男性3、女性2)、70-79歳(n=18、男性9、女性9)および80-89歳(n=20、男性10、女性10)のAD患者からヒト血漿サンプルを採取した。データを、GraphPadプリズムバックモジュールを使用するノンパラメトリックKruskal-Wallis試験に付した。

【0040】

コントロールグループの血漿GADPHは、年齢および性別にかかわらず、AD患者のものよりもすべて有意に低かった(P<0.05)(箱ひげ図に基づく図1を参照)。収集されたすべてのデータを表1に示す。

20

【0041】

表1に示されるように、>718ng/dLである血漿GADPHの基準は、ADに対して100%の特異度を示した。血漿GADPHのレベルが0~378 ng/dLの範囲にある場合、それはAD状態のリスクが低いことを示した。ADへの関連基準の境界線は、378 ng/dLの血漿GADPHレベルであることが判明した。さらに、AD状態(>90%の特異度)のリスクが高い基準は、血漿GADPHのレベルが378.7~718 ng dLであると判定された。血漿GADPHレベルが高く、718 ng/dLである場合、特定のADについて100%確信性のある診断が決定された。ROCの統計的分析の後、この方法がADの状態を評価するために非常に正確であることが証明されている。

30

【0042】

表1：血漿GADPHレベルとADリスクとの相関関係

【表 1】

基準	感度	95% CI	特異度	95% CI	ADリスク
≥0	100.00	91.8 - 100.0	0.00	0.0 - 6.7	低
>70.472	100.00	91.8 - 100.0	45.28	31.6 - 59.6	低
>103.6066	97.67	87.7 - 99.9	45.28	31.6 - 59.6	低
>144.2486	97.67	87.7 - 99.9	52.83	38.6 - 66.7	低
>147.0755	95.35	84.2 - 99.4	52.83	38.6 - 66.7	低
>251.6232	95.35	84.2 - 99.4	75.47	61.7 - 86.2	低
>273.3577	93.02	80.9 - 98.5	75.47	61.7 - 86.2	低
>316.1778	93.02	80.9 - 98.5	83.02	70.2 - 91.9	低
>337.0781	88.37	74.9 - 96.1	83.02	70.2 - 91.9	低
>338.1439	88.37	74.9 - 96.1	84.91	72.4 - 93.3	低
>347.4587	86.05	72.1 - 94.7	84.91	72.4 - 93.3	低
>378.7396	86.05	72.1 - 94.7	90.57	79.3 - 96.9	高
>390.8812	83.72	69.3 - 93.2	90.57	79.3 - 96.9	高
>446.6771	83.72	69.3 - 93.2	92.45	81.8 - 97.9	高
>498.8583	74.42	58.8 - 86.5	92.45	81.8 - 97.9	高
>521.3342	74.42	58.8 - 86.5	94.34	84.3 - 98.8	高
>551.1322	69.77	53.9 - 82.8	94.34	84.3 - 98.8	高
>579.6789	69.77	53.9 - 82.8	96.23	87.0 - 99.5	高
>592.284	65.12	49.1 - 79.0	96.23	87.0 - 99.5	高
>594.6474	65.12	49.1 - 79.0	98.11	89.9 - 100.0	高
>702.3464	55.81	39.9 - 70.9	98.11	89.9 - 100.0	高
>717.9637	55.81	39.9 - 70.9	100.00	93.3 - 100.0	有り
>1126.84	0.00	0.0 - 8.2	100.00	93.3 - 100.0	有り

【0043】

ROC曲線の統計的分析に基づいて、ADについての血漿GAPDHの関連基準は、図2(A)に示すように、378.74 ng/dLを超えた。指定された診断番号0および1は、それぞれ、ADのないコントロールグループおよびAD患者を示した。ROC曲線下面積(AUC)は、 0.944 ± 0.0219 であり、高精度、0.877-0.981の95%信頼区間(CI)および20.271のz統計値($P < 0.0001$)を示し、図2(B)に示すように、約86.4%の感度および90.6%の特異度であった。

【0044】

さらに、Y軸としての特異度(%)の統計データ、およびX軸としての血漿サンプル中のGAPDHレベルに基づいて、受信者動作特性曲線(ROC曲線)を得た。ROC曲線を図3にプロットした。図3に示されたROC曲線の直線部分から、回帰直線 $y = 0.1554x + 31.879$ が得られた(図4参照)が、これは、5段階のADリスク指標によって分割される。5段階のADリスク指標の意味を表2に示す。

【0045】

表2：本発明方法による5段階の意味

10

20

30

40

【表 2】

ADリスク指標	意味
>5	アルツハイマー病と判定するための強い証拠
4~5	アルツハイマー病と判定するための中程度の証拠
3~4	アルツハイマー病と判定するための弱い証拠
2~3	アルツハイマー病を除外するための弱い証拠
1~2	アルツハイマー病を除外するための中程度の証拠
<1	アルツハイマー病を除外するための強い証拠

10

【0046】

本発明が属する技術分野における当業者は、本発明を、本明細書の記載に基づくより広い範囲まで、より詳しい説明を必要とせずにご利用できると考えられる。したがって、提供される説明および特許請求の範囲は、本発明の範囲を制限するものではなく、例示的な目的であると理解されるべきである。

【図 1】

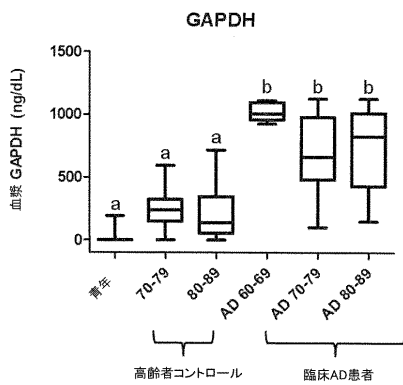


Figure 1

【図 2 A】

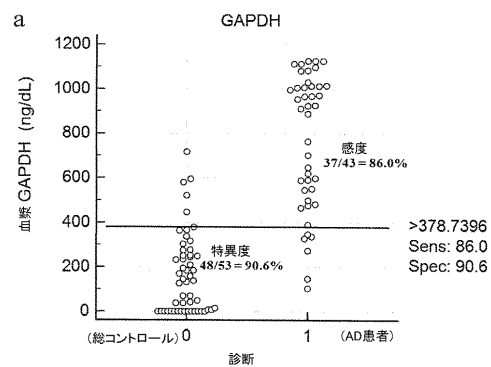


Figure 2(A)

【 図 2 B 】

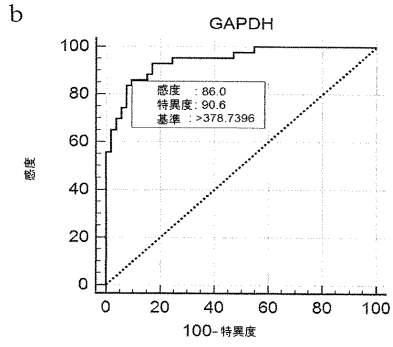


Figure 2(B)

【 図 4 】

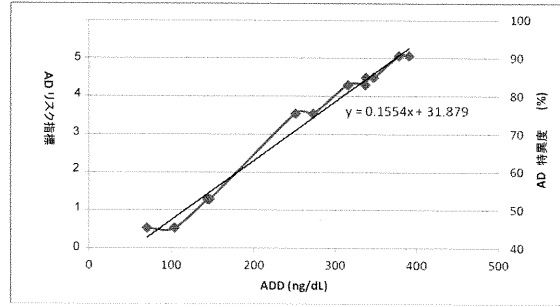


Figure 4

【 図 3 】

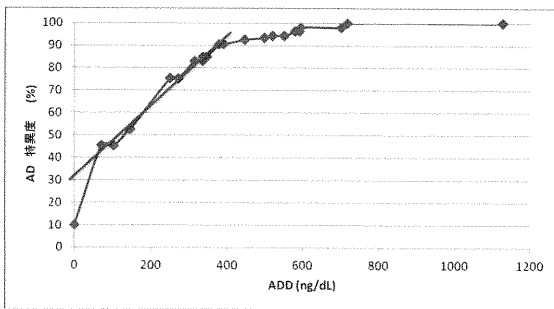


Figure 3

フロントページの続き

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(72)発明者 リン・チャイ - チン

台湾266イーラン・カウンティ、サンシン・タウンシップ、ダプー・フィフス・ロード、ナンバー175

(72)発明者 ツァイ・チェン - ウエイ

台湾116タイペイ・シティ、ウエンシャン・ディストリクト、ムージャー・ロード、セクション2、レイン109、ナンバー135、2フロア

Fターム(参考) 4B050 CC10 DD11 KK18 LL03

【外国語明細書】

Attorney Docket
LPIP Ref. ILU0002US

TITLE OF THE INVENTION

METHOD FOR DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S DISEASE

FIELD OF THE INVENTION

5 [0001] The present invention generally relates to a method for risk detection, diagnosis, prognosis and monitoring of Alzheimer's disease (AD).

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 [0002] Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia. Alzheimer's disease is classified as a neurodegenerative disorder, the cause and progression of which are poorly understood. The disease process appears to be associated with plaques and tangles in the brain. The most common early symptom is short term memory loss—difficulty in remembering recent events.

15 [0003] Until now, there are no standard diagnostic tests for AD, so the diagnosis rests on the clinical information provided by the AD patients and the findings of the neurological examination. Usually, the diagnosis of AD is confirmed by the tests for evaluating a patient's behavior and thinking abilities, often followed by a brain scan if available. However, an examination of brain tissue is required for a conclusive diagnosis. The traditional methods to assess AD are non-specific or expensive, including, for example, the Mini Mental State Examination (MMSE), which is a psychometric test in the form of a Functional Assessment
20 Questionnaire (FAQ) to examine the scale for functional autonomy (Tombaugh, The minimal state examination: a comprehensive review. *J. Am. Geriatr. Soc.* 40, 922-935, 1992); the invasive tests of tau and amyloid- β concentrations in cerebrospinal fluid (Wang *et al.*, Proteomic analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer disease identifies GAPDH as a detergent-insoluble paired helical filament tau binding protein. *FASEB J.* 19, 869-871, 2005);
25 a neuroimaging, particularly a computed tomography (CT), which is very expensive (Haydel *et al.*, Indications for computed tomography in patients with minor head injury. *N. Engl. J. Med.* 343, 100-105, 2000).

30 [0004] WO2013153461 discloses methods by specific biomarkers in saliva for risk detection, diagnosis, prognosis and monitoring of Alzheimer's and Parkinson's diseases, wherein the salivary biomarkers comprise two or more of cTnl, myoglobin, MMP-9, MMP-8, MMP-2, sICAM-1, myeloperoxidase [MPO], IL-4, and / or IL-5; B-type natriuretic peptide [BNP], IL-1a, IL-11, IL-10, TNF-a, IFN- γ , VEGF, insulin, GLP-1 (active), GLP-1 (total), TREM1, Leukotriene E4, Akt1, A β -40, A β -42, Fas ligand, PSA, G-CSF, MIP-1a, IL-22, IL-8, IL-21, IL-15, IL-6, IL-7, GM-CSF, IL-2, IL-12, IL-17a, IL-1 β , MCP, IL-32 or RANTES,

Attorney Docket
LPIP Ref. ILU0002US

apolipoproteins AI, D and E, ischemia-modified albumin (IMA), fibronectin, s. alpha-amylase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, tissue factor activity, MCP-1, sVCAM-1, sCD-40, insulin-like growth factor I (IGF- I), and IGF-II.

5 [0005] US9,012,237 discloses a method for diagnosing of Alzheimer's disease, or determining the risk of developing Alzheimer's disease in a subject by measuring specific biomarkers, wherein the biomarkers are at least four biomarkers selected from brain-derived neurotrophic factor (BDNF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), tumor growth factor beta 1 (TGF-beta 1), vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin 18 (IL-18), and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), and whereby an increase of IL-18, and/or MCP-1, 10 and/or the decrease of BDNF, IGF-1, VEGF and/or TGF-beta 1 is indicative for the presence or risk of development of AD.

[0006] It is still desired to develop a much easier method for diagnosis of AD and determination of the AD risk.

15 SUMMARY OF THE INVENTION

[0007] It is unexpectedly discovered in this invention that the level of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in a sample from an AD patient can serve as a single biomarker for diagnosis or risk detection of Alzheimer's disease.

20 [0008] Accordingly, in one aspect, the present invention provides a method for diagnosis of Alzheimer's disease (AD) or detection of AD risk in a subject, comprising the steps of:
(1) taking samples from a baseline set of subjects, wherein the baseline set of subjects comprises a control group having subjects without AD and AD group with subjects that have different stages and types of Alzheimer's disease;
(2) measuring baseline levels of a baseline set of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a single biomarker in the baseline samples; 25
(3) determining AD reference levels for GAPDH in the test set based on the baseline levels of GAPDH in the test set;
(4) measuring a test sample for levels of GAPDH; and
(5) determining the test sample is positive or risk for AD if the level of GAPDH in the test 30 sample is higher than the AD references levels as determined in step (3).

[0009] In one embodiment of the present invention, the sample is a blood, urine, or saliva sample. In a specific embodiment, the sample is a plasma sample.

35 [0010] In one embodiment of the invention, the AD reference levels for GAPDH are between about 380 ng/dL and about 720 ng/dL; wherein the level of GAPDH in a test sample from the subject being higher than about 720 ng/dL indicates a diagnosis of Alzheimer's

Attorney Docket
LPIP Ref. ILU0002US

disease; while the level of GAPDH in a test sample from the subject being less than about 380 ng/dL indicates a diagnosis of a low risk for Alzheimer's disease; and the level of GAPDH in a test sample from the subject being between about 380 ng/dL and about 720 ng/dL indicates a diagnosis of a high risk for Alzheimer's disease.

5 [0011] In the present invention, the level of GAPDH is determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit.

[0012] In another aspect, the invention provides a method to test for positive or risk for Alzheimer's disease (AD) in a subject in need thereof, comprising the steps of:

10 [0013] (1) measuring the level of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in a plasma sample from the subject, and

(2) comparing the level of GAPDH in the sample from the subject with one or more AD reference levels for GAPDH of about 380 ng/dL and about 720 ng/dL ; and

(3) determining the sample is positive or risk for AD if the level of GAPDH in the sample is higher than the AD references levels for GAPDH.

15 [0014] In one embodiment of the invention, the sample is a plasma sample.

[0015] In one particular embodiment of the invention, the AD references levels for GAPDH are between about 380 ng/dL and about 720 ng/dL, wherein the level of GAPDH in a sample from the subject being higher than about 720 ng/dL indicates a diagnosis of Alzheimer's disease; while the level of GAPDH in a sample from the subject being less than about 380 ng/dL indicates a diagnosis of a low risk for Alzheimer's disease; and the level of GAPDH in a sample from the subject being between about 380 ng/dL and about 720 ng/dL indicates a diagnosis of a high risk for Alzheimer's disease.

20 [0016] In one further aspect, the invention provides a test kit for performing the method of the invention to test for positive or risk for Alzheimer's disease (AD) comprising:
25 a plurality of test devices, each configured to produce a signal level proportional to a level present on the test device of GAPDH; and
a reader configured to read the levels of GAPDH on the test devices.

[0017] These and other aspects will become apparent from the following description of the preferred embodiment taken in conjunction with the following drawings, although variations and modifications therein may be affected without departing from the spirit and scope of the novel concepts of the disclosure.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

30 [0018] The foregoing summary, as well as the following detailed description of the invention, will be better understood when read in conjunction with the appended drawing. In
35 the drawings:

Attorney Docket
LPIP Ref. ILU0002US

[0019] Figure 1 shows the levels of GAPDH in plasma samples of the control and AD subjects, wherein data were presented as the box from the lower quartile to the upper quartile; the median is drawn parallel in the box; the whiskers stretch out from half-way up the sides of the box to the minimum and the maximum; different letters in the same box indicates a significant difference ($P < 0.05$).

[0020] Figure 2(A) shows that the associated criterion of AD is >378.74 ng/dL, wherein the designated diagnosis number of 0 and 1 indicates control without AD and AD subject, respectively.

[0021] Figure 2(B) shows that the area under the ROC curve (AUC) is 0.944 ± 0.0219 , indicating high accuracy; 0.877-0.981 of 95% confidence interval (CI) and 20.271 of z statistic ($P < 0.0001$), is able to reach 86.4% sensitivity and 90.6% specificity.

[0022] Figure 3 provides a ROC curve as plotted according to the statistic data of specificity(%) as Y-axis, and the levels of GAPDH in a plasma sample (ADD) as X-axis.

[0023] Figure 4 provides a regression line taken from the ROC curve given in Figure 3.

DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0024] Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by a person skilled in the art to which this invention belongs.

[0025] As used herein, the singular forms "a", "an", and "the" include plural referents unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to "a sample" includes a plurality of such samples and equivalents thereof known to those skilled in the art.

[0026] The present invention provides a method for diagnosis of Alzheimer's disease (AD) by determining the level of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in a sample from a subject in need thereof.

[0027] The term "diagnosis" or "diagnosing" as used herein refers to assessing whether a subject suffers from a disease or not, i.e., Alzheimer's disease in the present invention. As will be understood by those skilled in the art, such an assessment, although preferred to be, may not be correct for 100% of the investigated subjects. The term, however, requires that a statistically significant portion of subjects can be correctly assessed and, thus, diagnosed. The term includes individual diagnosis of Alzheimer's disease or its symptoms as well as continuous monitoring of a subject. Monitoring, i.e. diagnosing a subject with or without Alzheimer's disease or the symptoms accompanying it at various time points or age, includes monitoring of a subject known to suffer from Alzheimer's disease as well as monitoring of a subject known to be a risk of developing Alzheimer's disease. Furthermore, monitoring can

Attorney Docket
LPIP Ref. ILU0002US

also be used to determine whether a subject is treated successfully or whether at least symptoms of Alzheimer's disease can be ameliorated over time by a certain therapy.

[0028] Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were identified as the targets of nitration in AD hippocampus, and the oxidative dysfunction of GAPDH may significantly contribute to loss of neuronal function and neurodegeneration in AD brain.

(Sultana *et al.*, Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiol. Dis.* 22, 76-87, 2006.) It was also reported that GAPDH plays a critical role in neurodegeneration (Petрак *et al.*, Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 8, 1744-1749, 2008; Piechaczyk *et al.*, Unusual abundance of vertebrate 3-phosphate dehydrogenase pseudogenes. *Nature* 312, 469-471, 1984). However, there is no method for diagnosis of AD through the determination of the levels of GAPDH until now.

[0029] In the present invention, the level of GAPDH in a sample from the subject can be determined by any known or conventional method/kit for measuring GAPDH. In one embodiment of the invention, a kit using an antibody that specifically binds to GAPDH can be used, for example, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit.

[0030] The term "biomarker" as used herein refers to a molecular species which serves as an indicator for a disease or effect as referred to in this specification. Said molecular species can be, but is not limited to a nucleotide sequence, an amino acid sequence, DNA, a protein, or a metabolite which is found in a sample of a subject.

[0031] As used herein, the term "subject" or "subject in need thereof" refers to a mammal, preferably a human being, male or female, at any age, regardless of having Alzheimer's disease or not.

[0032] The term "antibody" refers to whole antibodies, their derivatives or functional fragments thereof which still retain their binding specificity. In particular, the antibody in the invention that specifically binds to GAPDH.

[0033] As used herein, the term "sample" refers to a sample obtained from a subject to be investigated, including, for example, a blood, urine, saliva and tissue fluid sample.

[0034] According to the present invention, the method for diagnosis of Alzheimer's disease (AD) or detection of AD risk in a subject, comprising the steps of:

(1) taking samples from a baseline set of subjects, wherein the baseline set of subjects comprises a control group having subjects without AD and AD group with subjects that have different stages and types of Alzheimer's disease;

(2) measuring baseline levels of a baseline set of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a single biomarker in the baseline samples;

Attorney Docket
LPIP Ref. ILU0002US

(3) determining one or more AD reference levels for GAPDH in the test set based on the baseline levels of GAPDH in the test set;

(4) measuring a test sample for levels of GAPDH; and

5 (5) determining the test sample is positive or risk for AD if the level of GAPDH in the test sample is higher than the AD references levels as determined in step (3).

[0035] According to the present invention, the sample may be a blood, urine, saliva or any physiological sample. In one particular embodiment, the sample is a blood sample, especially a plasma sample.

10 **[0036]** On the other hand, the present invention provides a method to test for positive or risk for Alzheimer's disease (AD) in a subject in need thereof, comprising the steps of:

(1) measuring the level of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in a sample from the subject, and

(2) comparing the level of GAPDH in the sample from the subject with one or more AD reference levels for GAPDH; and

15 (3) determining the sample is positive or risk for AD if the level of GAPDH in the sample is higher than the AD references levels for GAPDH.

[0037] In the present invention, the level of GAPDH may be determined by a kit using an antibody that specifically binds to GAPDH. As illustrated in the example below, the levels of GAPDH are determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit, and the AD reference levels for GAPDH are determined according to the statistic data of specificity data (%) and the GAPDH levels of samples from all subjects, particularly by a regression analysis of the specificity data and the GAPDH levels.

20 **[0038]** As shown in the example, the AD reference levels for GAPDH are between about 380 ng/dL and about 720 ng/dL; wherein the level of GAPDH in a test sample from the subject being higher than about 720 ng/dL indicates a diagnosis of Alzheimer's disease; while the level of GAPDH in a test sample from the subject being less than about 380 ng/dL indicates a diagnosis of a low risk for Alzheimer's disease; and the level of GAPDH in a test sample from the subject being between about 380 ng/dL and about 720 ng/dL indicates a diagnosis of a high risk for Alzheimer's disease. It is confirmed in the example that the level of GAPDH can be used as a single biomarker for diagnosis or risk detection of Alzheimer's disease.

30 **[0039]** The present invention is further illustrated by the following examples, which are provided for the purpose of demonstration rather than limitation.

[0040] Examples

35 **[0041] I. Materials and Methods**

Attorney Docket
LPIP Ref. ILU0002US

[0042] 1. Subjects

[0043] A total of 43 AD patients at the age of 60-69 (n = 5, male 3, female 2), 70-79 (n = 18, male -9, female 9) and 80-89 (n = 20, male 10, female 10), and 37 older controls at the age of 70-79 (n = 20, male 11, female 9) and 80-89 (n = 17, male 13, female 4) were recruited from the outpatient of the Memory Clinic of Taipei Veterans General Hospital (TVGH). Diagnostic determinations of AD patients based on the results of clinical interviews, physical examinations, laboratory findings and image investigations (CT and/or MRI) were made at a clinical consensus meeting. An AD diagnosis was made according to the criteria of National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke–Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA) (Froese, Cube law, condition factor and weight–length relationships: history, meta-analysis and recommendations. *J. Appl. Ichthyol.* 22, 241-253, 2006). All AD patients received neurological examinations, laboratory tests, and neuroimaging evaluation as diagnostic surveys. Older controls were volunteers without cognitive complaints, who were recruited from outpatient clinics. Also, the 16 young people at the age of 20-29 (n = 16, male 8, female 8) recruited were volunteers from the National Ilan University campus.

[0044] 2. Samples

[0045] Human plasma samples were collected by the containing EDTA-2Na plastic syringe and then centrifuged at 4°C, 3000 rpm, and 30 minutes to obtain the protein supernatant. The plasma proteins were dropped into the liquid nitrogen and then kept frozen at -80°C for the following analysis. The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was used to quantify the specific protein level in the plasma. The commercial reagents were purchased from the human GAPDH ELISA Kit (DuoSet IC® DYC5718, R&D Systems, USA). The protocols to use the kits were followed by their directions. The samples were analyzed by the ELISA reader (SpectraMax® M2 Microplate Reader, Molecular Devices Inc., California, USA) at the 450 nm of wavelength.

[0046] 3. GAPDH levels assay

[0047] The plasma GAPDH levels from the ELISA quantification were subjected to the nonparametric Kruskal-Wallis test (GraphPad Prism® Version 5.01, © 1992-2007 GraphPad Software Inc.). Data were presented as the box from the lower quartile to the upper quartile. The median is drawn parallel in the box. The whiskers stretch out from half-way up the sides of the box to the minimum and the maximum. Next, we use the ROC curve statistical methods (MedCalc® Version 13.3.1.0, © 1993-2014 MedCalc Software bvba) to identify the associated criterion of high AD risk from the plasma GAPDH and natural aging from the plasma Cyt C1, respectively. The area under the ROC curve (AUC) is possibly located

Attorney Docket
LPIP Ref. ILU0002US

between 1.0 and 0.5. The AUC has lower accuracy from 0.5 to 0.7, some accuracy from 0.7 to 0.9, and high accuracy above 0.9. When AUC = 0.5, it indicates that the diagnostic method is completely ineffective, no diagnostic value. AUC <0.5 does not meet the real situation rarely occurs in practice.

5 [0048] **Statistical analysis**

[0049] Comparisons between two groups were analyzed by Student's t-test. Comparisons within three groups were analyzed by ANOVA test. Comparison of patient survival curve was analyzed by Log-rank test. Comparison of *in vivo* tumorigenicity was analyzed by Fisher's exact test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

10 [0050] **II. Results**

[0051] The human plasma samples were collected from young controls at the age of 20-29 (n = 16, male 8, female 8), older controls at the age of 70-79 (n = 20, male 11, female 9) and 80-89 (n = 17, male 13, female 4), and AD patients at the age of 60-69 (n = 5, male 3, female 2), 70-79 (n = 18, male 9, female 9) and 80-89 (n = 20, male 10, female 10). The data
15 was subjected to the nonparametric Kruskal-Wallis test using the GraphPad prism pack module.

[0052] The plasma GAPDH of the control group, irrespectively of age and sex, was all significantly lower than those of AD patients ($P < 0.05$), see Figure 1, based on the box-and-whisker plot. All the data as collected are shown in Table 1.

20 [0053] As shown in Table 1, the criterion >718 ng/dL of plasma GAPDH showed 100% specificity to AD. When the level of plasma GAPDH was located in the range from 0 to 378 ng/dL, it indicated low risk of AD condition. The border line for the criterion of association to AD was found to be a 378 ng/dL level of plasma GAPDH. In addition, high risk of AD condition (>90% specificity) was determined to be where the level of plasma GAPDH was
25 between 378.7 and 718 ng/dL. Where the plasma GAPDH level was as high as 718 ng/dL, 100% confident diagnosis was decided for specific AD. After the statistical analysis of the ROC, the method has been proven to be highly accurate to assess the condition of AD.

Attorney Docket
LPIP Ref. ILU0002US

Table 1 The correlation between plasma GAPDH level and AD risk

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	AD risk
≥0	100.00	91.8 - 100.0	0.00	0.0 - 6.7	Low
>70.472	100.00	91.8 - 100.0	45.28	31.6 - 59.6	Low
>103.6066	97.67	87.7 - 99.9	45.28	31.6 - 59.6	Low
>144.2486	97.67	87.7 - 99.9	52.83	38.6 - 66.7	Low
>147.0755	95.35	84.2 - 99.4	52.83	38.6 - 66.7	Low
>251.6232	95.35	84.2 - 99.4	75.47	61.7 - 86.2	Low
>273.3577	93.02	80.9 - 98.5	75.47	61.7 - 86.2	Low
>316.1778	93.02	80.9 - 98.5	83.02	70.2 - 91.9	Low
>337.0781	88.37	74.9 - 96.1	83.02	70.2 - 91.9	Low
>338.1439	88.37	74.9 - 96.1	84.91	72.4 - 93.3	Low
>347.4587	86.05	72.1 - 94.7	84.91	72.4 - 93.3	Low
>378.7396	86.05	72.1 - 94.7	90.57	79.3 - 96.9	High
>390.8812	83.72	69.3 - 93.2	90.57	79.3 - 96.9	High
>446.6771	83.72	69.3 - 93.2	92.45	81.8 - 97.9	High
>498.8583	74.42	58.8 - 86.5	92.45	81.8 - 97.9	High
>521.3342	74.42	58.8 - 86.5	94.34	84.3 - 98.8	High
>551.1322	69.77	53.9 - 82.8	94.34	84.3 - 98.8	High
>579.6789	69.77	53.9 - 82.8	96.23	87.0 - 99.5	High
>592.284	65.12	49.1 - 79.0	96.23	87.0 - 99.5	High
>594.6474	65.12	49.1 - 79.0	98.11	89.9 - 100.0	High
>702.3464	55.81	39.9 - 70.9	98.11	89.9 - 100.0	High
>717.9637	55.81	39.9 - 70.9	100.00	93.3 - 100.0	Yes
>1126.84	0.00	0.0 - 8.2	100.00	93.3 - 100.0	Yes

5

10

15

Attorney Docket
LPIP Ref. ILU0002US

5 [0054] Based on the statistical analysis of the ROC curve, the associated criterion of
plasma GAPDH for AD was more than 378.74 ng/dL as shown in Figure 2(A). The
designated diagnosis number of 0 and 1 indicated the control group without AD and AD
patients, respectively. The area under the ROC curve (AUC) was 0.944 ± 0.0219 , indicating
high accuracy, 0.877-0.981 of 95% confidence interval (CI) and 20.271 of z statistic
($P < 0.0001$), indicated the sensitivity of about 86.4% and the specificity of 90.6% as shown in
10 Figure 2(B).

[0055] Furthermore, the receiver operating characteristic curve (ROC curve) was
obtained according to the statistic data of specificity(%) as Y-axis, and the GAPDH levels in
plasma samples as X-axis. The ROC curve was plotted as Figure 3. Taken from the linear
portion of the ROC curve given in Figure 3, a regression line, $y = 0.1554x + 31.879$, was
15 obtained, see Figure 4, which is divided by 5 grades of AD Risk indicators. The meanings of
the 5 grades of AD Risk indicators are given in Table 2.

Table 2 Meanings of 5 grades according to the method of the invention

AD Risk Indicator	Meanings
> 5	Strong evidence to rule in Alzheimer's disease
4 ~ 5	Moderate evidence to rule in Alzheimer's disease
3 ~ 4	Weak evidence to rule in Alzheimer's disease
2 ~ 3	Weak evidence to rule out Alzheimer's disease
1 ~ 2	Moderate evidence to rule out Alzheimer's disease
< 1	Strong evidence to rule out Alzheimer's disease

20 [0056] It is believed that a person of ordinary knowledge in the art where the present
invention belongs can utilize the present invention to its broadest scope based on the
descriptions herein with no need of further illustration. Therefore, the descriptions and
claims as provided should be understood as of demonstrative purpose instead of limitative in
any way to the scope of the present invention.

25

Attorney Docket
LPIP Ref. ILU0002US

CLAIMS

I/we claim:

1. A method for diagnosis of Alzheimer's disease (AD) or detection of AD risk in a subject, comprising the steps of:
 - 5 (1) taking samples from a baseline set of subjects, wherein the baseline set of subjects comprises a control group having subjects without AD and AD group with subjects that have different stages and types of Alzheimer's disease;
 - (2) measuring baseline levels of a baseline set of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a single biomarker in the baseline samples;
 - 10 (3) determining one or more AD reference levels for GAPDH in the test set based on the baseline levels of GAPDH in the test set;
 - (4) measuring a test sample for levels of GAPDH; and
 - (5) determining the test sample is positive or risk for AD if the level of GAPDH in the test sample is higher than the AD references levels as determined in step (3).
- 15 2. The method of claim 1, wherein the sample is a blood, urine, or saliva sample.
3. The method of claim 1, wherein the sample is a plasma sample.
4. The method of claim 3, wherein the AD reference levels for GAPDH are between about 380 ng/dL and about 720 ng/dL; wherein the level of GAPDH in a test sample from the subject being higher than about 720 ng/dL indicates a diagnosis of Alzheimer's disease; while the level of
20 GAPDH in a test sample from the subject being less than about 380 ng/dL indicates a diagnosis of a low risk for Alzheimer's disease; and the level of GAPDH in a test sample from the subject being between about 380 ng/dL and about 720 ng/dL indicates a diagnosis of a high risk for Alzheimer's disease.
5. The method of claim 1, wherein the AD reference levels for GAPDH are determined according
25 to the statistic data of specificity data and the GAPDH levels of samples from all subjects.
6. The method of claim 5, wherein the AD reference levels for GAPDH are determined by a regression analysis.
7. The method of claim 1, wherein the level of GAPDH in a sample is determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit.
- 30 8. A method to test for positive or risk for Alzheimer's disease (AD) in a subject in need thereof, comprising the steps of:
 - (1) measuring the level of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in a sample from the subject, and

Attorney Docket
LPIP Ref. ILU0002US

- (2) comparing the level of GAPDH in the sample from the subject with one or more AD reference levels for GAPDH; and
- (3) determining the sample is positive or risk for AD if the level of GAPDH in the sample is higher than the AD references levels for GAPDH.
- 5 9. The method of claim 8, wherein the sample is a plasma sample.
10. The method of claim 9, wherein the AD references levels for GAPDH are between about 380 ng/dL and about 720 ng/dL.
11. The method of claim 10, wherein the level of GAPDH in a sample from the subject being higher than about 720 ng/dL indicates a diagnosis of Alzheimer's disease; while the level of GAPDH in
10 a sample from the subject being less than about 380 ng/dL indicates a diagnosis of a low risk for Alzheimer's disease; and the level of GAPDH in a sample from the subject being between about 380 ng/dL and about 720 ng/dL indicates a diagnosis of a high risk for Alzheimer's disease.
12. The method of claim 8, wherein the level of GAPDH in a sample is determined by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit.
- 15 13. A test kit for performing the method of claim 8 to test for positive or risk for Alzheimer's disease (AD) in a sample from a subject in need thereof comprising:
a plurality of test devices, each configured to produce a signal level proportional to a level present on the test device of GAPDH; and
a reader configured to read the levels of GAPDH on the test devices.
- 20 14. The test kit of claim 13, wherein the reader is configured to indicate a positive result when the level from each of the test devices is higher than the reference level of GAPDH indicating positive for AD.
15. The test kit of claim 13, wherein the reader is configured to indicate different risks for AD based on the reference levels of GAPDH indicating the different risks for AD.

25

Attorney Docket
LPIP Ref. ILU0002US

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

The present invention is related to a method for risk detection, diagnosis, prognosis and monitoring of Alzheimer's disease (AD). The method comprises the steps of: (1) measuring the level of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in a sample from the
5 subject, and (2) comparing the level of GAPDH in the sample with two or more AD reference levels of GAPDH.

Attorney Docket
LPIP Ref. ILU0002US

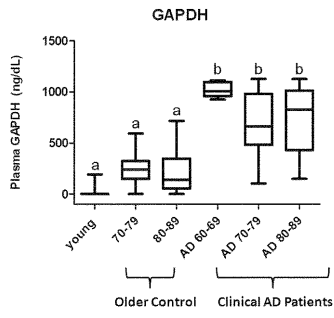


Figure 1

Attorney Docket
LPIP Ref. ILU0002US

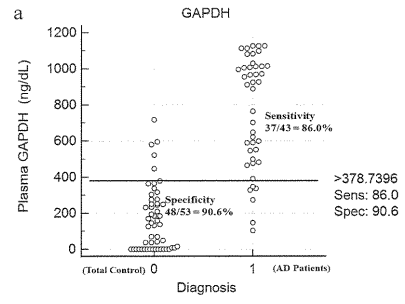


Figure 2(A)

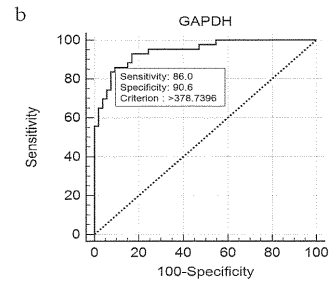


Figure 2(B)

Attorney Docket
LPIP Ref. ILU0002US

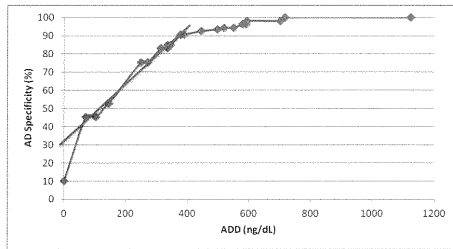


Figure 3

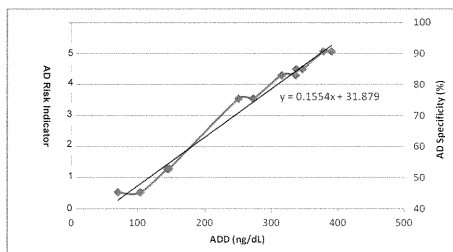


Figure 4

专利名称(译)	诊断阿尔茨海默病的方法		
公开(公告)号	JP2018072313A	公开(公告)日	2018-05-10
申请号	JP2017080646	申请日	2017-04-14
[标]发明人	リンチャイチン ツアイチエンウェイ		
发明人	リン・チャイ・チン ツアイ・チエン・ウェイ		
IPC分类号	G01N33/573 G01N33/536 C12N9/04		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2800/2821 C12Y102/01012 G01N33/573 G01N2333/90203 G01N2800/50		
FI分类号	G01N33/573.A G01N33/536.C C12N9/04.C		
F-TERM分类号	4B050/CC10 4B050/DD11 4B050/KK18 4B050/LL03		
代理人(译)	山田卓司 櫻井洋子		
优先权	15/335036 2016-10-26 US		
其他公开文献	JP6611753B2 JP2018072313A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明涉及阿尔茨海默病 (AD) 的风险检测, 诊断, 预后和监测方法。该方法包括以下步骤: (1) 测量来自受试者的样品中甘油醛3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 的水平;和 (2) 样品中GAPDH的水平为两个或更多。与GAPDH AD参考水平相比。【选择图表】无

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公開特許公報 (A)	(11) 特許出願公開番号 特開2018-72313 (P2018-72313A) (43) 公開日 平成30年5月10日 (2018.5.10)
(51) Int. Cl. G01N 33/573 (2006.01) G01N 33/536 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)	FI GO1N 33/573 GO1N 33/536 C12N 9/04	テーマコード (参考) 4B050
審査請求 未請求 請求項の数 15 OL 外国語出願 (全 27 頁)		
(21) 出願番号 特願2017-80646 (P2017-80646) (22) 出願日 平成29年4月14日 (2017.4.14) (31) 優先権主張番号 15/335,036 (32) 優先日 平成28年10月26日 (2016.10.26) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 517134618 バイオーステム・バイオテック・カンパニー・リミテッド Bio-Stem Biotech Co., Ltd. 台湾260イラン・カウンティ、イラン・シティ、メイジョウ・ファースト・ロード、ナンバー14-3 (74) 代理人 100101454 弁理士 山田 卓二 (74) 代理人 100062144 弁理士 青山 薫 (74) 代理人 100106518 弁理士 松谷 道子	最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病の診断方法		