

(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2004-527754

(P2004-527754A)

(43) 公表日 平成16年9月9日(2004.9.9)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D 4 B O 6 4
CO 7 K 16/40	CO 7 K 16/40	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	4 H O 4 5
C 1 2 P 21/08	GO 1 N 33/566	
GO 1 N 33/566	GO 1 N 33/573	A
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-585955 (P2002-585955)	(71) 出願人	501429195 シンエックス・ファルマ・インコーポレーテッド カナダ国 オンタリオ エム9ダブリュ 1イー7 トロント マーマックドライブ 1 6354 Viscount Road, Mississauga, Ontario L4V 1H3, Canada
(86) (22) 出願日	平成14年4月24日 (2002. 4. 24)	(74) 代理人	100079119 弁理士 藤村 元彦
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月24日 (2003. 10. 24)	(74) 代理人	100114568 弁理士 北島 恒之
(86) 国際出願番号	PCT/CA2002/000563	(74) 代理人	100109036 弁理士 永岡 重幸
(87) 国際公開番号	W02002/088706		
(87) 国際公開日	平成14年11月7日 (2002. 11. 7)		
(31) 優先権主張番号	09/842, 079		
(32) 優先日	平成13年4月25日 (2001. 4. 25)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	09/971, 740		
(32) 優先日	平成13年10月4日 (2001. 10. 4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー型痴呆の鑑別診断処理及びその装置

(57) 【要約】

アルツハイマー病 (A D) の診断方法が開示される。方法は、血液または血液製剤が望ましい体液において、具体的にはヒトグルタミン合成酵素である生化学マーカーの存在を直接検出することを含む。検出はヒトグルタミン合成酵素に特異な抗体を免疫学的検定法によって組み込む。さらに、 A D 性痴呆と非 A D 性痴呆とを識別する方法が開示される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳類のアルツハイマー型痴呆を診断し識別する方法であって、
前記哺乳類から体液検体を採取するステップと、
アルツハイマー病の生化学マーカーに特異的に結合する少なくとも 1 つの抗体に前記検体を接触させるステップと、
前記検体中の前記生化学マーカーの存在を判定するステップと、
前記生化学マーカーの存在をアルツハイマー型痴呆の発現と関連付けるステップと、
を含む方法。

【請求項 2】

痴呆を示す臨床症状を示す哺乳類においてアルツハイマー型痴呆を非 A D 型痴呆と識別する方法であって、
前記哺乳類から体液検体を採取するステップと、
アルツハイマー病の生化学マーカーに対して特異的結合特性を有する少なくとも 1 つの抗体に前記検体を接触させるステップと、
前記検体中の前記生化学マーカーのレベルを測定するステップと、
前記生化学マーカーの前記測定したレベルをアルツハイマー型痴呆及び非アルツハイマー型痴呆を示す統計的有意水準と関連付けるステップと、
を含み、
それによって A D 型痴呆と非 A D 型痴呆とが鑑別診断されることを特徴とする方法。

【請求項 3】

前記生化学マーカーがヒトグルタミン合成酵素であることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記体液検体が血液または血液製剤であることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 5】

前記抗体がヒト G S に対して特異的な少なくとも 1 つの単クローン抗体であることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 6】

前記検体の前記測定が免疫学的検定技術によることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 7】

アルツハイマー型痴呆の進行の診断及び観察用診断キットであって、
アルツハイマー型痴呆を示す少なくとも 1 つのマーカーに対して特異的である少なくとも 1 つの抗体を含み、前記抗体又はマーカーは固定票上で固定されており、
前記キットは前記マーカーに結合される少なくとも 1 つの標識を付された抗体をさらに含み、
それによってマーカー、それに対して特異的な抗体、又はそれらの免疫学的に検出可能な断片の存在を判定する少なくとも 1 つの分析が体液検体で実施されることを特徴とするキット。

【請求項 8】

前記マーカーはヒトグルタミン合成酵素であり、前記抗体はそれに対して特異的な少なくとも 1 つの単クローン抗体であることを特徴とする請求項 7 記載のキット。

【請求項 9】

前記体液検体は血液または血液製剤であることを特徴とする請求項 7 記載のキット。

【請求項 10】

診断及び観察が単一の体液検体について実施されることを特徴とする請求項 7 記載のキット。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

診断及び観察が複数の体液検体について実施され、少なくとも1つの分析が第1の体液検体で実施され、少なくとももう1つの分析が第2の体液検体で実施されることを特徴とする請求項7記載のキット。

【請求項12】

前記第1及び第2の体液検体は異なる期間に採取されることを特徴とする請求項11記載のキット。

【請求項13】

寄託番号PTA-3339下でアメリカンタイプカルチャコレクションに寄託されているハイブリドーマ細胞株1G3。

【請求項14】

寄託番号PTA-3339下でアメリカンタイプカルチャコレクションに寄託されているハイブリドーマ細胞株1G3から作成された単クローン抗体。

10

【請求項15】

寄託番号PTA-3339下でアメリカンタイプカルチャコレクションに寄託されているハイブリドーマ細胞株1G3から作成された単クローン抗体を用いて検体中のヒトグルタミン合成酵素を検出する方法であって、前記検体を前記単クローン抗体に接触させて前記検体中の前記グルタミン合成酵素と前記単クローン抗体との間に免疫反応を生じさせるステップと、前記免疫反応を検出するステップと、を含む方法。

【請求項16】

寄託番号PTA-3340下でアメリカンタイプカルチャコレクションに寄託されているハイブリドーマ細胞株5G4。

20

【請求項17】

寄託番号PTA-3340下でアメリカンタイプカルチャコレクションに寄託されているハイブリドーマ細胞株5G4から作成された単クローン抗体。

【請求項18】

寄託番号PTA-3340下でアメリカンタイプカルチャコレクションに寄託されているハイブリドーマ細胞株5G4から作成された単クローン抗体を用いて検体中のヒトグルタミン合成酵素を検出する方法であって、前記検体を前記単クローン抗体に接触させて前記検体中の前記グルタミン合成酵素と前記単クローン抗体との間に免疫反応を生じさせるステップと、前記免疫反応を検出するステップと、を含む方法。

30

【請求項19】

少なくとも1つの動物宿主においてヒトグルタミン合成酵素に対して作成された多クローン抗体。

【請求項20】

ヒトグルタミン合成酵素又は免疫学的に検出可能なその断片に特異的に結合する抗体。

【請求項21】

単クローン抗体である請求項20記載の抗体。

【請求項22】

多クローン抗体である請求項20の抗体。

【請求項23】

抗体の断片である請求項20記載の抗体。

40

【請求項24】

請求項20記載の抗体を含む診断キット。

【請求項25】

アルツハイマー型痴呆の進行の診断及び観察用診断キットであって、アルツハイマー型痴呆を示す少なくとも1つの脳関連マーカーに対して特異的であるヒトグルタミン合成酵素に対して作成された少なくとも1つの抗体を含み、前記抗体又はマーカーは固定票上で固定されており、前記キットは前記マーカーに結合する少なくとも1つの標識を付された抗体をさらに含み、

50

それによって、前記マーカー、それに特異的な抗体、又はそれらの免疫学的に検出可能な断片の存在を判定する少なくとも1つの分析が体液検体で実施されることを特徴とするキット。

【請求項26】

アルツハイマー型痴呆の進行の診断及び観察用キットであって、
アルツハイマー型痴呆を示す少なくとも1つの脳関連マーカーに対して特異的であるヒトグルタミン合成酵素に対して作成された少なくとも1つの抗体を含み、前記抗体又はマーカーは固定票上で固定されており、
前記キットは前記マーカーに結合する少なくとも1つの標識を付された抗体をさらに含み、

10

それによって前記マーカー、それに特異的な抗体、又はそれらの免疫学的に検出可能な断片の存在を判定する少なくとも1つの分析が血液検体又は血液製剤検体で実施されることを特徴とするキット。

【請求項27】

アルツハイマー型痴呆の進行の診断及び観察用診断キットであって、
アルツハイマー型痴呆を示す少なくとも1つの脳関連マーカーに対して特異的であるヒトグルタミン合成酵素に対して作成された少なくとも1つの単クローン抗体を含み、前記抗体又はマーカーは固定票上で固定されており、
前記キットは前記マーカーに結合する少なくとも1つの標識を付された抗体をさらに含み、

20

それによって前記マーカー、それに特異的な抗体、又はそれらの免疫学的に検出可能な断片の存在を判定する少なくとも1つの分析が体液検体で実施されることを特徴とするキット。

【請求項28】

アルツハイマー型痴呆の進行の診断及び観察用診断キットであって、
アルツハイマー型痴呆を示す少なくとも1つの脳関連マーカーに対して特異的であるヒトグルタミン合成酵素に対して作成された少なくとも1つの単クローン抗体を含み、前記抗体又はマーカーは固定票上で固定されており、
前記キットは前記マーカーに結合する少なくとも1つの標識を付された抗体をさらに含み、

30

それによって前記マーカー、それに特異的な抗体、又はそれらの免疫学的に検出可能な断片の存在を判定する少なくとも1つの分析が血液検体又は血液製剤検体で実施されることを特徴とするキット。

【請求項29】

アルツハイマー型痴呆の進行の診断及び観察用診断キットであって、
脳関連ヒトグルタミン合成酵素に対して特異的であるヒトグルタミン合成酵素に対して作成された少なくとも1つの抗体を含み、前記抗体又は脳関連ヒトグルタミン合成酵素は固定票上で固定されており、
前記キットは前記脳関連ヒトグルタミン合成酵素に結合する少なくとも1つの標識を付された抗体をさらに含み、

40

それによってヒトグルタミン合成酵素、それに特異的な抗体、又はそれらの免疫学的に検出可能な断片の存在を判定する少なくとも1つの分析が体液検体で実施されることを特徴とするキット。

【請求項30】

アルツハイマー型痴呆の進行の診断及び観察用診断キットであって、
脳関連ヒトグルタミン合成酵素に対して特異的である少なくとも1つの抗体を含み、前記抗体又は脳関連ヒトグルタミン合成酵素は固定票上で固定されており、
前記キットは前記ヒトグルタミン合成酵素に結合する少なくとも1つの標識を付された抗体をさらに含み、

それによってヒトグルタミン合成酵素、それに特異的な抗体、又はそれらの免疫学的に検

50

出可能な断片の存在を判定する少なくとも1つの分析が血液検体又は血液製剤検体で実施されることを特徴とするキット。

【請求項31】

アルツハイマー型痴呆の進行の診断及び観察用診断キットであって、
約44kDaの重量を有する単量体脳関連ヒトグルタミン合成酵素に対して特異的である
少なくとも1つの抗体を含み、前記抗体又は脳関連ヒトグルタミン合成酵素は固定票上で
固定されており、
前記キットは前記ヒトグルタミン合成酵素に結合する少なくとも1つの標識を付された抗
体をさらに含み、
それによって約44kDaの重量を有する単量体脳関連ヒトグルタミン合成酵素、それに
特異的な抗体、又はそれらの免疫学的に検出可能な断片の存在を判定する少なくとも1つ
の分析が体液検体で実施されることを特徴とするキット。

10

【請求項32】

アルツハイマー型痴呆の進行の診断及び観察用診断キットであって、
約44kDaの重量を有する単量体脳関連ヒトグルタミン合成酵素に対して特異的である
少なくとも1つの抗体を含み、前記抗体又は脳関連ヒトグルタミン合成酵素は固定票上で
固定されており、
前記キットは前記ヒトグルタミン合成酵素に結合する少なくとも1つの標識を付された抗
体をさらに含み、
それによって約44kDaの重量を有する単量体脳関連ヒトグルタミン合成酵素、それに
特異的な抗体、又はそれらの免疫学的に検出可能な断片の存在を判定する少なくとも1つ
の分析が血液検体又は血液製剤検体で実施されることを特徴とするキット。

20

【請求項33】

アルツハイマー型痴呆の進行の診断及び観察用診断キットであって、
約44kDaの重量を有する単量体脳関連ヒトグルタミン合成酵素に対して特異的である
少なくとも1つの単クローン抗体を含み、前記抗体又は脳関連ヒトグルタミン合成酵素は
固定票上で固定されており、
前記キットは前記ヒトグルタミン合成酵素に結合する少なくとも1つの標識を付された抗
体をさらに含み、
それによって約44kDaの重量を有する単量体脳関連ヒトグルタミン合成酵素、それに
特異的な抗体、又はそれらの免疫学的に検出可能な断片の存在を判定する少なくとも1つ
の分析が体液検体で実施されることを特徴とするキット。

30

【請求項34】

アルツハイマー型痴呆の進行の診断及び観察用診断キットであって、
約44kDaの重量を有する単量体脳関連ヒトグルタミン合成酵素に対して特異的である
少なくとも1つの単クローン抗体を含み、前記抗体又は脳関連ヒトグルタミン合成酵素は
固定票上で固定されており、
前記キットは前記ヒトグルタミン合成酵素に結合する少なくとも1つの標識を付された抗
体をさらに含み、
それによって約44kDaの重量を有する単量体脳関連ヒトグルタミン合成酵素、それに
特異的な抗体、又はそれらの免疫学的に検出可能な断片の存在を判定する少なくとも1つ
の分析が血液検体又は血液製剤検体で実施される方法。

40

【請求項35】

哺乳類のアルツハイマー型痴呆及びその進行を診断し識別する方法であって、
前記哺乳類から体液検体を採取するステップと、
S-100タンパク質のベータイソ型、ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)、及びグ
ルタミン合成酵素又は免疫学的に検出可能なその断片から成るグループから選択される少
なくとも1つの生化学マーカータンパク質に対して特異的結合特性を有する抗体から成る
グループから選択される少なくとも1つの抗体又は抗体の断片に前記検体を接触させるス
テップと、を含み、前記抗体は固定票上で固定されることが可能であり、

50

前記方法は少なくとも1つの標識を付された抗体に前記検体をさらに接触させるステップをさらに含み、前記標識を付された抗体の各々は前記選択された生化学マーカートンパク質の1つに対して親和性を有することを特徴としており、それによって前記マーカの各々、それに特異的な抗体、又はそれらの免疫学的に検出可能な断片の存在を判定し計測する少なくとも1つの分析が体液検体で実施され、前記検体中の前記各選択された生化学マーカートンパク質の存在を判定し、前記選択された生化学マーカートンパク質のそれぞれの存在をアルツハイマー型痴呆の発現と関連付けることを特徴とする方法。

【請求項36】

痴呆を示す臨床症状を示す哺乳類においてアルツハイマー型痴呆を非AD型痴呆と識別する方法であって、

前記哺乳類から体液検体を採取するステップと、

S-100タンパク質のベータイソ型、ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)、及びグルタミン合成酵素(GS)又は免疫学的に検出可能なその断片から成るグループから選択される少なくとも1つの生化学マーカートンパク質に対して特異的結合特性を有する抗体から成るグループから選択される少なくとも1つの抗体又は抗体の断片に前記検体を接触させるステップと、を含み、前記抗体は固定票上で固定されることが可能であり、前記方法は、前記検体中の前記選択された生化学マーカートンパク質のレベルを測定するステップと、

前記選択された生化学マーカートンパク質の前記測定したレベルをアルツハイマー型痴呆及び非アルツハイマー型痴呆を示す統計的有意水準に関連付けるステップと、をさらに含み、それによってAD型痴呆と非AD型痴呆とが鑑別診断されることを特徴とする方法。

【請求項37】

前記少なくとも1つの生化学マーカートンパク質がヒトグルタミン合成酵素であることを特徴とする請求項35または36記載の方法。

【請求項38】

前記体液検体が血液または血液製剤であることを特徴とする請求項35または36記載の方法。

【請求項39】

前記少なくとも1つの抗体がヒトGSに対して特異的である単クローン抗体であることを特徴とする請求項35または36記載の方法。

【請求項40】

前記検体の前記計測が免疫学的検定技術によるものであることを特徴とする請求項35または36記載の方法。

【請求項41】

アルツハイマー型痴呆の進行の診断及び観察用診断キットであって、

3つの異なるマーカートンパク質の各々に対して特異的であって、固定票上で固定され得る1つから3つの抗体を含み、

a. 第1のマーカートンパク質がS100のベータイソ型であり、第1抗体または抗体の断片がそれに対して特異的であり、

b. 第2のマーカートンパク質がニューロン特異的エノラーゼであって、第2抗体または第2抗体の断片がそれに対して特異的であり、

c. 第3のマーカートンパク質がグルタミン合成酵素(GS)であって、第3の抗体または第3の抗体の断片がそれに対して特異的である、ことを特徴とし、

前記キットは、

d. 1つから3つの標識を付された抗体から、前記マーカートンパク質の1つに結合している前記標識を付された抗体の各々と、

e. 前記3つのマーカートンパク質の各々を前記マーカートンパク質のそれぞれの固有しきい値と比較して、正常レベルより上の少なくともおよそ2標準偏差の統計的に明らか

なその濃度の存在を判定する手段と、

をさらに含み、

それによって、少なくとも1つのマーカー、それに特異的な抗体、又はそれらの免疫学的に検出可能な断片の存在を判定する少なくとも1つの分析が体液検体で実施され、前記3つのマーカーを比較する前記ステップがアルツハイマー型痴呆の発生を確認することを特徴とするキット。

【請求項42】

前記第3のマーカータンパク質はヒトグルタミン合成酵素であり、前記抗体または抗体の断片はそれに対して特異的な少なくとも1つの単クローン抗体であることを特徴とする請求項41記載のキット。

10

【請求項43】

前記体液検体が血液又は血液製剤であることを特徴とする請求項41記載のキット。

【請求項44】

前記診断及び観察が単一の体液検体で実施されることを特徴とする請求項41記載のキット。

【請求項45】

前記診断及び観察が複数の体液検体で実施され、少なくとも1つの分析が第1の体液検体で実施され、少なくとももう1つの分析が第2体液検体で実施されることを特徴とする請求項41記載のキット。

【請求項46】

前記第1及び第2の体液検体は異なる時期に採取されることを特徴とする請求項45記載のキット。

20

【請求項47】

グルタミン合成酵素検出用の前記抗体は、寄託番号PTA-3340下でアメリカンタイプカルチャコレクションに寄託されているハイブリドーマ細胞株5G4から作成された単クローン抗体または抗体の断片であることを特徴とする請求項35記載のアルツハイマー型痴呆及びその進行の診断及び識別方法。

【請求項48】

グルタミン合成酵素検出用の前記抗体は、寄託番号PTA-3340下でアメリカンタイプカルチャコレクションに寄託されているハイブリドーマ細胞株5G4から作成された単クローン抗体または抗体の断片であることを特徴とする請求項36記載の痴呆を示す臨床症状を示す哺乳類においてアルツハイマー型痴呆と非アルツハイマー型痴呆とを識別する方法。

30

【請求項49】

グルタミン合成酵素検出用の前記抗体は、寄託番号PTA-3340下でアメリカンタイプカルチャコレクションに寄託されているハイブリドーマ細胞株5G4から作成された単クローン抗体または抗体の断片であることを特徴とする請求項41記載のアルツハイマー型痴呆の進行の診断及び観察用診断キット。

【請求項50】

グルタミン合成酵素検出用の前記抗体は、寄託番号PTA-3339下でアメリカンタイプカルチャコレクションに寄託されているハイブリドーマ細胞株1G3から作成された単クローン抗体または抗体の断片であることを特徴とする請求項35記載のアルツハイマー型痴呆及びその進行の診断及び識別方法。

40

【請求項51】

グルタミン合成酵素検出用の前記抗体は、寄託番号PTA-3339下でアメリカンタイプカルチャコレクションに寄託されているハイブリドーマ細胞株1G3から作成された単クローン抗体または抗体の断片であることを特徴とする請求項36記載の痴呆を示す臨床症状を示す哺乳類においてアルツハイマー型痴呆と非アルツハイマー型痴呆とを識別する方法。

【請求項52】

50

グルタミン合成酵素検出用の前記抗体は、寄託番号 P T A - 3 3 3 9 下でアメリカンタイプカルチャコレクションに寄託されているハイブリドーマ細胞株 1 G 3 から作成された単クローン抗体または抗体の断片であることを特徴とする請求項 4 1 記載のアルツハイマー型痴呆の進行の診断及び観察用診断キット。

【請求項 5 3】

前記哺乳類がヒトであることを特徴とする請求項 3 5 記載の方法。

【請求項 5 4】

前記哺乳類がヒトであることを特徴とする請求項 3 6 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

10

【0 0 0 1】

本発明はアルツハイマー型痴呆 (A D) の診断方法に関する。特に本発明は、アルツハイマー型痴呆に関する少なくとも 1 つの生化学マーカーの存在を定量化する処理に関する。さらに具体的には、本発明は特有の抗体を利用する治療時の免疫学的検定法に関し、アルツハイマー型痴呆対非アルツハイマー型痴呆の鑑別診断を可能にする。

【発明の背景】

【0 0 0 2】

アルツハイマー病は、アルツハイマー型痴呆または A D と呼ばれ、進行性神経変性障害であり、記憶障害及び重大な精神機能低下を引き起こす。診断医は、頭脳組織の組織病理学検査に反対して、痴呆性患者の生存期間中に、決定的に A D を特定する手段を切望してきた。組織病理学検査は A D の最終的な診断を下すことが可能な現在唯一の手段である。A D は痴呆の最も良くある形態であり、全痴呆の半分以上を数え、4 万人のアメリカ人及び世界中で 1 5 0 万人近くの人々が冒されている。痴呆は軽い記憶障害及び混乱状態から始まるが、知的能力及び社会的能力の深刻な障害に至る時に進む。6 5 歳での A D 罹患率は 1 % から 2 % の間である。7 5 歳までにその数字は 7 % に上昇し、8 5 歳までに 1 8 % となる。6 5 歳を越える全ての人々における痴呆の罹患率は 8 % である。施設に居住する人々では、罹患率はあらゆる年齢層で約 5 0 % である。

20

【0 0 0 3】

この病気の社会的影響は大きなものであり、とりわけ病気の最終局面において介護者が負う負担が原因となる。実質的な経済費用は対症療法及び施設への入院に主として関係する。社会における高齢者の急増は A D に罹患する人の数が飛躍的に増加することを意味する。それゆえ、A D の早期の正確な診断及び治療法を発見することが世界的に重要な問題になってきている。

30

【0 0 0 4】

ある人に A D の疑いがあるとき、いくつかの推奨検査が行われる。

(1) 簡易精神状態鑑定 (M M S E) - 質疑応答 (F A Q) の形式で機能自律性の程度を検査する診察室での精神測定検査、(2) 臨床検査 - 完全血球算定、甲状腺刺激ホルモン、血清電解質、血清カルシウム、及び血清グルコース値の測定、(3) 神経結像 - 最も一般的に用いられるのはコンピュータ断層撮影法 (C T) であり、血管性痴呆 (V a D)、腫瘍、正常圧水頭症、又は硬膜下血腫などの痴呆のある種の原因を検出する役割を有する。しかしながら、神経結像は、A D または他の皮質痴呆を通常の老化と区別することにおいてほとんど効果がない。初期治療の設定において、C T は非定型の患者に限定され得ると提案する人もいるが、型通りのスキャニングを推奨する人もいる。磁気共鳴映像法 (M R I) は、今のところたいの痴呆の場合において C T を上回る何等の利点ももたらさない。

40

【0 0 0 5】

アルツハイマー痴呆は痴呆の最も良くある形式であって症例の少なくとも 6 0 % を数えるが、痴呆の正確な原因を判定する診断手順は、8 0 を越える異なる種類にあって、いくらくよく見ても難しいものである。さらに、現在行われている検査は A D を他の型の痴呆と区別するのに不十分である。

50

【0006】

他の疾病領域と比較して、痴呆分野は診断の価値について問題を提起する。なんとなれば、今のところ可能な何等の治療剤や有効治療がないからである。痴呆において、全ての他の医薬部門においてみられるように、診断の確実性は患者の治療に重大な影響を与える。現在の所ADは治療できないが、対処療法が可能であり、認識及び行動の一時的な改善のために最初に投与される薬（アセチルコリネステラス抑制剤）がU.S.フード・アンド・ドラッグアドミニストレーション社に現在認可されている。他の薬は臨床試験の様々な段階にある。（1）ADにおける衰退を防げる薬 - デスフェリオキサミン、ALCAR、抗炎症薬、老化防止剤、エストロゲン、（2）神経栄養因子：NGF、（3）ワクチン：シェンク氏その他による近年最も刺激的な報告書（ネイチャー誌1999年；400：173-7）においてAD用ワクチンの見込みが取り上げられている。 10

【0007】

このように様々な治療の特異性によって、治療法の成功を保証するために、ADに対して高感度である高度な診断方法が必要とされている。

【0008】

現在のところ、AD診断を助ける数々の可能な検査がある。しかしながら、唯一の真の既存の診断は、痴呆の病歴に関連して死後の脳組織の病理学検査によって成される。この診断は、神経原線維変化及び老人斑が脳組織に存在することに基づいていて、臨床痴呆と相関関係がある。老人斑はアミロイドベータと呼ばれる通常無害のタンパク質で構成される。ニューロンが死に始め症状が進展するより前に、血小板の沈着物が疾患過程の早い時期にニューロン間にできる。神経原線維変化は正常で対になった糸状体から成るニューロン内集合体であり、いくつかの異なるタンパク質から構成されていると思われる。脳ニューロンの内部支持構造はタウと呼ばれるタンパク質の正常機能に依存する。アルツハイマー病では、タウタンパク質の繊維が繊維にねじれを引き起こす交替を被る。神経組織病理学的識別並びに神経症斑及び神経原線維変化の計数にはいくつかの脳の部分の染色及び顕微鏡検査を必要とする。しかしながら、この方法の結果は、広範囲に変化し、時間がかかり、かつ大きな労働力を要する。 20

【0009】

アルツハイマー型痴呆の初期及び/または進行を食い止めかつ/または改善する現在と将来の両方の薬理的治療の能力を考えると、ADの早期診断は患者の介護をよりよく行うことに役立つだろう。非AD型痴呆がAD型痴呆と間違われるケースが多くある。係る例には、脳に流れる血液を一時的に遮断する小さな気付かれない発作が含まれる。臨床的には鬱病患者やパーキンソン病の人々も記憶の欠落を経験し得る。多くの高齢者は様々な投薬を受けており、副作用として、単独で又は連動して、それらの人々の認知作業遂行能力を損なう。 30

【0010】

よって、ADを早期に弁別する診断技術が提供されると、医者はより一層の能力を実現してこの病気の病因の初期段階で適正な治療法を処方するだろう。

【0011】

ADに対する様々な生化学マーカーは公知であり、かかるマーカーの判定のための分析技術が先行技術において開示されてきた。ここに用いられたように、用語「マーカー」、「生化学マーカー」、又は「マーカータンパク質」は酵素、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、その同位体、その免疫学的検出可能断片、又はAD病因の過程で脳から放出される他の分子のいずれかを言う。係るマーカーは、特に脳に関係する特有のタンパク質またはそのイソ型を含むが、これらに限定されない。 40

【0012】

グルタミン合成酵素（GS）は、脳損傷の後に過剰に発現するアンモニア及びグルタミン酸の代謝調整に関与する星状細胞固有酵素として認知されている（ノーレンベルグ及びマルチネックス・ヘルナンデス氏による「Brain Res」1979年、161：303）。グルタミン合成酵素の臨床上の役割に関するいくつかの研究が報告されている。ガンナーセ 50

ン及びヘイリー氏(「Proc Natl Acad Sci」、1992年、89:11949)は39個のAD脳脊髄液(CSF)検体のうち38個において単量体GSタンパク質を発見した。チュマニ氏その他(「Arch Neurol」、1999年、56(10):1241)は、AD患者の腰椎CSFにおけるGSの濃度がはっきりとしかし非特定の(即ち、VaD、統合失調症、及びALSでも増加する)に増加するということを説明している。1244頁の左側コラムで、チュマニ氏はGSは血清中に発見されなかったと述べている。

【0013】

ニューロン特異的ガンマエノラーゼ(NSE)及びS100Bタンパク質は、脳内に豊富にあり、脳損傷の範囲を判断するための有用なマーカーでもある。NSEはニューロン損傷に対し、S100Bは星状細胞損傷に対する。脳皮質領域からのNSEタンパク質及びS100Bタンパク質の濃度は酵素免疫測定吸着法(ELISA)を用いて検査されてきた。AD患者の前頭皮質におけるこれらのタンパク質のレベルは、明らかに増加されるということが発見された(カトウ氏その他による「J Mol Neurosci」、1991年、3(2):95)。S100Bを過剰発現する活性化星状細胞はADのアミロイド斑に緊密に結びつけて考えられてきた(シェン氏その他による「J Neurosci Res」、1994年、39:398、ムラク氏その他による「J Neuropathol Exp Neurol」、1996年、55:273)。

10

【0014】

AD鑑定におけるバイオマーカーに対しては多くの様々な潜在的な使用法がある。各々の使用法は異なる1つのマーカー又は1組のマーカーを含むだろう。係る使用法にはADと痴呆の他の原因とを区別するマーカーの使用法が含まれるが、これに限定されない。即ち、老化による非病理学的影響と痴呆とを区別すること、臨床的症狀が顕著になった後の病気の進行を観察すること、ADに対する来るべき治療の効果を観察するための代用物の利用、及びADに対するリスク評価要因として有用性を有するマーカーを分離すること、及び脳内で起きる初期の生物学的変化及び病気の進行につれて起きる他の変化の両方を識別すること、が含まれる。単一のマーカーを分離して高度の感度及び特異性ですべての要件を実行することが望ましく理想的である。しかしながら、これは実状にそぐわないゴールであるかもしれない。個々のマーカーは、適用される予定の臨床症状のタイプに対する感度、特異性、及び有効性によって評価されることが必要である。あるマーカーは痴呆の別の原因とADとを区別するのが得意でないが、それでも疾患過程の進行または治療への反応を観察することに優れたマーカーであるだろう。

20

30

【0015】

診断装置に関して、生物製剤マーカーを利用する臨床評価及び治療時の検査の使用がリスクを評価し、病気の進行を観察し、治療行為を導くための有用なツールである。診断ツールとして生物製剤マーカーの使用から生まれる利点には、臨床的診断の確実性を高めること、痴呆の他の原因とADとを区別すること、及び病気の重症度及び進行の速度を分類することが含まれる。さらに、生物製剤マーカーを用いる試験は、迅速で、非侵襲的で、実行するのに容易であって、かつ費用のかからないものでなければならない。

【0016】

先行技術に不足していることは、比較的非侵襲性であって、その結果生存している患者のアルツハイマー型痴呆を明確に診断することに有効な方法及びそのための装置である。さらに、ADを進行の危険性を評価する明確な方法が大いに必要とされている。

40

【先行技術の説明】

【0017】

ヘイリー氏による米国特許第5,445,937号はアルツハイマー病の診断方法及び他の病気の診断及び鑑別手段を開示する。これは、病気特異的生化学マーカー、グルタミン合成酵素(GS)、及びそのそれぞれの光親近性標識またはGSの結合部位でGSに対して特異的な標識付けされた抗体を用いて成される。第937号特許は、髄液(CSF)を検査して光親近性標識、または標識付けされた抗体、ヌクレオチド結合タンパク質の存在を検出することに注目し、続いて起こるレベルをADの存在に関係付ける。ヘイリー氏は

50

係る方法を実行する様々な免疫学的検定技術を開示している。ヘイリー氏は検体として血液を用いる診断方法の予言的な有用性に関し仮定をたて、単クローン抗体及び/または多クローン抗体が免疫学的検定が開発されるとさらに提案した。そうは言っても彼は、実行して何れを減じることでもできなかった。よって、第937号特許は髄液を利用する診断試験を開示することだけに有益である。髄液の検体を得ることは患者にかなり不愉快である侵襲性技術を伴い、実施するには長時間を要する。さらに、ヘイリー氏によって提案された唯一の多クローン抗体及び/または単クローン抗体は、ここで今開示されるようなGSのヒト組み換え型に対して、羊の脳のGSへの特異性を有するものである。

【0018】

米国特許第5,508,167号において、ロゼス氏その他はアポリポタンパク質Eタイプ4 (ApoE4) イソ型またはDNAコード化ApoE4に関係するAD診断方法を開示する。この方法は血清検体を用いることができ、免疫化学的検定法によって分析される。血清検体は随意に還元剤と結びつけられて、システイン残基におけるジスルフィド結合を対応する活性スルフヒドリル基に分解する。ロゼス氏その他はApoE4イソ型の検出用キットをさらに開示する。この検査は三大ApoEイソ型のアミノ酸配列差に基づいている。この検査はヒトGSに対して特異的でなく、AD型痴呆対非AD型痴呆を区別して診断することに敏感でもない。

【0019】

チュマニ氏その他(「Arch. Neurol.」、1999年、56、1241乃至1246頁)はCSFにおけるGSレベル及び血清検査を検査し、GSがAD診断における有用な生化学マーカーであるかどうかを判定する。分析はELISAにより、羊の脳のGSに対して示されたビオチン標識単クローン抗体が利用される。GS濃度の正常範囲は、人間のCSFにおいて4pg/mLであり、人間の血清において36pg/mLと報告されている。

AD患者のCSF検体は 20 ± 12 pg/mLの平均GS濃度レベルで上昇し、 13 ± 13 pg/mLでALS患者であり、平均上昇レベル 13 ± 7 pg/mLで血管性痴呆(VaD)患者である。血管性痴呆患者及びALS患者はわずかに低い増加を示す。AD患者は血清中に 111 ± 53 pg/mLの平均レベルが測定される。しかしながら、筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者及び血管性痴呆患者も血清中にそれぞれ 116 ± 62 pg/mLと 72 ± 59 pg/mLの平均上昇レベルを示す。よって、AD型痴呆に関する明確な診断、又はADと非AD型痴呆との間の鑑別診断はこれらの検定法から説明されないだろう。

【0020】

ガンナーセンとヘイリー(「Proc. Natl. Acad. Sci.」、1992年、89、11949乃至11953頁)は、健常対照被験者や他の病気を有する対照群のCSFにおいてではなくAD患者のCSFにおいて検出されたGSの証拠を示す。考慮される他の病気はてんかん、ALS、及びパーキンソン病である。AD患者に加えてALSまたはピック病の患者は、GSがADに特異的であることを示す肯定的な結果を示すが、一方ALS患者は肯定的な結果を示さない。他の刊行物と同様に、非ヒトGSに対する抗体がGS検出のために利用される。

【0021】

概して、ほとんどの技術論文がペプチド、 β -アミロイドに注目する傾向がある。なんとすれば、それがADの主要な決定因子であると仮定されているからである。このことは家族性AD変異体のある形が β -アミロイド、特に短形よりも容易に凝集する長形(I-42)の生産過剰という結果になるという観察によって裏付けられる。ヘンスリー氏その他(「Proc. Natl. Acad. Sci.」、1994年、91、3270乃至3274頁)は凝集状態におけるペプチド β -アミロイドによって遊離基族に基づく神経毒性を検査する。ペプチドのいくつかの合成断片が結果として生じる神経毒性に対して検査される。酸素が基族に対する要件であると思われ、グルタミン合成酵素及びクレアチンキナーゼ・エンザイムが酸化感受性バイオマーカーであるという事実に基づく、これらの酵素の不活性化が、これらの断片化された β -アミロイド会合体による生体分子への能動的攻撃の指標として

利用される。

【発明の概要】

【0022】

本発明はアルツハイマー型痴呆（AD）の診断方法に関する。特にアルツハイマー型痴呆を他の型の痴呆と区別して診断する方法に関し、特に血液、血液製剤、尿、唾液などの体液においてアルツハイマー病に対する特定の生化学マーカーの存在を検査することによる。本発明はさらにアルツハイマー型痴呆に関する少なくとも1つの生化学マーカーの存在を定量化する処理に関する。さらに詳しくは、本発明は治療時の免疫学的検定に関し、固有の抗体を利用してアルツハイマー型痴呆対非アルツハイマー型痴呆の鑑別診断を可能にする。

10

【0023】

本発明はアルツハイマー病を診断し、サブタイプ分けし、観察する多くの方法及びELISAシステムに関する。本発明はS100B、NSE、及びGSタンパク質は脳から放出され、脳外の体液中で検出され得るといふ発見に基づいている。

【0024】

ヒトGS組み替え体の生成及び精製が説明される。これらのGSタンパク質は、単クローン抗体または多クローン抗体を生成するために用いられて、次には免疫学的検定において用いられ得るかもしれない。免疫学的検定において抗体は免疫反応に入り、観察され、かつ/または定量化されて、疑わしい個体において循環GSタンパク質を検出する。代わりに、GSタンパク質自身が免疫学的検定において用いられてかかる個体における循環抗体を検出してもよい。アルツハイマー型痴呆の発生は体液中の特定の生化学マーカーのレベルの認知によって特徴付けられ、そのレベルは、MMSE検査によって定量化されるようにアルツハイマー型痴呆の症状の兆候に対応する。リスク評価試験として、アルツハイマー型痴呆の進行を示すかかるマーカーのレベルの認知は熟練開業医に提供される診断能力をさらに増強する。

20

【0025】

従って、比較的非侵襲性でかつ高感度のアルツハイマー病の明確な診断方法を提供することが本発明の目的である。

【0026】

患者の少なくとも1の体液の分析を含む方法を提供してAD対非AD型痴呆の少なくとも1つのマーカーの存在を判定することが本発明のさらなる目的である。

30

【0027】

本発明による方法によって識別されるような、ニューロン関連のタンパク質に特異的な抗体を提供することが本発明のさらなる目的である。

【0028】

1以上の人間の体液におけるニューロン特異タンパク質の認知に効果的な免疫学的検定法を提供することが本発明のまたさらなる目的である。

【0029】

ヒトグルタミン合成酵素に特異的な精製された単クローン抗体を提供することが本発明のまた別の目的である。

40

【0030】

血液または血液製剤から成る検体を利用して実行され得る非侵襲性治療検査から成るAD診断用検査キットを提供することが本発明のまたさらなる目的である。

【0031】

本発明の他の目的及び利点は、図及び説明として、本発明のいくつかの実施例を示す添付図面に関係して取り込まれた以下の説明から明らかになるだろう。図面はこの明細書の一部を成し、本発明の模範的实施例を含み、その様々な目的及び特徴を説明する。

【発明を実施するための形態】

【0032】

本発明の方法に従って分析されるマーカーは血液循環中に放出され、例えば低張緩衝液又

50

は浄化剤、希釈物及びその製剤で処理を施された血液又は血漿、血清、細胞化された血液などの血液製剤、及びCSF、唾液、尿、リンパ液などの他の体液において存在するかもしれない。別の好適実施例において、CSFにおけるマーカーの濃度が測定されるかもしれない。

【0033】

用語「正常値よりも高い」及び「カットオフよりも高い」は、脳事象、即ち脳の変性や萎縮が進行中でない正常人において観察されるマーカーのレベルより高いマーカーのレベルに言及するために用いられる。いくつかのマーカーについて、マーカーの大変低いレベルが個体の血液中に普通に現れるかもしれない。本発明に従って分析された他のマーカーについて、検出可能なレベルが血液中に普通に現れるかもしれない。それゆえ、これらの用語は正常人において検出される正常レベルよりも著しく高いレベルを示す。用語「著しく」または「統計的に有意な」は統計的優位性を言い、正常またはより高いマーカー濃度よりも大きい2標準偏差(SD)を一般的に意味する。マーカータンパク質に対する分析を実行する評価方法は、マーカーのレベルを検出することができる感度でなくてはならない。マーカーのレベルは当該濃度範囲を超えて現れ、また大いに特異的でなければならない。

10

【0034】

診断ツールとして価値を評価されて比較される3つのマーカーは、脳事象の間に脳内の特定の細胞が損傷を受けるときにこれらの細胞によって放出されるタンパク質である。例えばタンパク質などであるこれらのマーカーは、そのままの形であり得るし、若しくは、例えばタンパク質分解によって生じる免疫学的に検出可能なタンパク質の断片であるかもしれない。「免疫学的に検出可能な」ことは、マーカーの断片に検定法によって用いられた抗体の試薬によって明確に認知されるエピトープが含まれることを意味する。

20

【0035】

本発明の方法に従って分析されるマーカーは特定の細胞型である。酵素エノラーゼは解糖経路において2ホスホグリセリン酸塩及びホスホエノールピルビン酸塩の相互転化を触媒する。酵素は各々が別個の遺伝子の生成物である3つのイソプロテイン中に存在する。遺伝子座はENO1、ENO2、及びENO3を指定される。ENO1の遺伝子産物は非ニューロンエノラーゼ(NNEまたは)であって、様々な哺乳類の細胞組織中に広く分布する。ENO2の遺伝子産物は筋肉特異エノラーゼ(MSEまたは)であって、主として心臓及び横紋筋に限局される。一方、ENO3遺伝子の産物はニューロン特異エノラーゼ(NSEまたは)であり、ニューロン及び神経内分泌細胞内で主として検出される。自然酵素は、3つの免疫学的に異なるサブユニット、及び から成るホモ又はヘテロ二量体イソ型として検出される。各サブユニット(、及び)はそれぞれ16 kDa、44 kDa、46 kDaの分子量を有する。

30

【0036】

及び エノラーゼイソ型は、ニューロン特異エノラーゼとして指定されており、各々が80,000ダルトンまでの分子量を有する。CSF及び血液中のNSE濃度が脳損傷(例えば脳卒中や頭部外傷)後に高くなり、損傷を受けた脳組織からのCSF及び血液循環中へのNSEの放出は脳組織への損傷範囲に反映するということが示されてきた。NSEは48時間までの生物学的半減期を有する。

40

【0037】

S100タンパク質は、脳の灰白質、主として星状膠細胞及びシュワン細胞において主に検出される細胞質酸性カルシウム結合タンパク質である。該タンパク質は、いくつかのホモ二量体イソ型又は2つの免疫学的に異なるサブユニットであるA1(MW10,400ダルトン)及びB(MW10,500ダルトン)から成るヘテロ二量体イソ型に存在する。中枢神経系(CNS)において、ホモ二量体S100B-B(21,000ダルトン)及びヘテロ二量体S100A1-B(20,900ダルトン)はS100総量の95%を越えて構成している(磯部氏その他による「Biochem Int」、1983年、6;419、ジンマー氏その他による「Brain Res Bull」、1995年、37;417)。S100B

50

の高率が脳内で検出されるので、多くの研究において脳損傷のマーカーとしてこのタンパク質が検査されてきた。S 1 0 0 Bの生物学的半減期は1 1 3分である（ウスイ氏その他による「Clin Chem」、1 9 8 9年、3 5 : 1 9 4 2）。S 1 0 0 B血中濃度を繰り返し計測することは神経障害の原因を観察するのに有用である。

【 0 0 3 8 】

グルタミン合成酵素（GS）は遍在酵素であり、窒素源としてアンモニアを用いてグルタミンへのグルタミン酸塩のATP依存転化を触媒する。GSは肝臓、筋肉、腎臓、及び脳内に高濃度で存在する（デ・グート氏その他による「Biochim Biophys Acta」、1 9 8 7年、9 0 8 : 2 3 1）。人間の脳内のGSは、潜在的神経毒グルタミン酸塩及びアンモニアのグルタミンへの転化を経てニューロンを保護することに関与する星状細胞特異酵素である。

10

【 0 0 3 9 】

GSの2価陽イオン部位はGSの酸化に対して非常に敏感にする。

【 0 0 4 0 】

AD患者の脳の老人斑高密度領域は高酸化的ストレス環境を意味し、AD患者の脳内のそのタンパク質は対照物のタンパク質よりもより酸化されている。老人斑とともに広範囲に現れる反応性小神経膠細胞は脳内のオキシラジカルの原因として提案されている。

【 0 0 4 1 】

GSの3つの異なるタイプが公知である。即ち、GS I、GS I I、GS I I Iである。GS I及びGS I I Iの遺伝子はバクテリアにおいて検出された。ヒトGS遺伝子はGS I Iタイプに属する（ブラウン氏その他による「J Mol Evol」、1 9 9 4年、3 8 : 5 6 6）。脳内のGSは3 6 0, 0 0 0乃至4 0 0, 0 0 0ダルトンの分子量とともに8量体構造として存在すると考えられる（チュマニ氏その他による「Immunol Meth」、1 9 9 5年、1 8 8 : 1 5 5）。しかしながら、血液循環において、タンパク質はモノマー形式でMW 4 4 ± 1 k D aを有すると考えられる（ボクシャ氏その他による「J Neurochem」、2 0 0 0年、7 5 : 2 5 7 4）。GSの高濃度がAD患者から腰椎CSFにおいて報告された（ガンナーセンとヘイリー氏による「Proc Natl Acad Sci USA」、1 9 9 2年、8 9 : 1 1 9 4 9、チュマニ氏その他による「Arch Neurol」、1 9 9 9年、5 6 : 1 2 4 1）。

20

【 0 0 4 2 】

CSFにおける高GS濃度に至る正確なメカニズムは不明のままである。反応性アストロサイトにおけるGSの過剰発現及びそれに続く細胞外液への放出が提案されている（チュマニ氏その他による「Arch Neurol」、1 9 9 9年、5 6 : 1 2 4 1）。

30

【 0 0 4 3 】

本発明のさらなる検討された実施例において、体液検体は継続中の分析に対して1時点で、若しくは異なったいくつかの時点で患者から採取されるかもしれない。概して、最初の検体はADの発現し得る症状が現れしだい患者から採取され、本発明に従って分析される。続いて、例えば最初の発現後約3 - 6ヶ月などの発現後のいくつかの期間後、第2検体が本発明に従って採取され分析される。データはADを診断し、ADを阻止し、AD型痴呆と非AD型痴呆との間の識別のために用いられ得る。

40

【 0 0 4 4 】

患者の体液中で検出された3つの特異マーカーのうちのいずれか1つ又は全てのレベルは単一の検体から測定されたが、1つ又はより多くの個別のマーカーが1つの検体中で測定され得る。「検体」は血液又はCSFなどの体液を意味する。全てのマーカーは1つの検定装置で、若しくは、同じ検体のアリコートが用いられ得るケースにおいて各マーカーに対して別個の検定装置を用いて、測定され得る。分析が単一の分析装置又は別個の装置において行われるかどうかに関係なく、同じ単一の検体において3つのマーカーまでの各々が計測され、単一の検体に同時に現れる各々のマーカーのレベルが用いられて意味のあるデータを与え得ることが望ましい。

【 0 0 4 5 】

50

各々のマーカーの存在は、マーカーのそれぞれに対して特異な抗体を用いて、各々の抗体のそのそれぞれのマーカーへの特異的結合を検出して測定される。適切な直接又は間接の検定方法が用いられ、市販されて本発明に従って測定される特定のマーカーのそれぞれのレベルを測定する検定方法を含むかもしれない。検定法は競合アッセイ、サンドイッチアッセイであるかもしれない。その標識は放射免疫測定、蛍光または化学発光分析免疫検定、又は免疫PCR技術などの公知の標識群から選択されるかもしれない。公知の免疫検定技術の広範囲に及ぶ論考はここでは必要でない。なんとなれば、これらは当業者に公知だからである。S100B検定法については高橋氏その他を参照せよ(「Clin Chem」、1999年、45(8):1307)。

【0046】

検体中のマーカータンパク質のレベルを測定する二抗体またはサンドイッチ・イライザから成る免疫検定法を、これに限定はされないが、この例においては用いた。この方法によると、抗体の一方は、固相上に固定化されている「捕獲」抗体であり、もう一方は例えば酵素を示す標識をつけた「検出」抗体である。検出抗体は捕獲抗体に結合したマーカータンパク質に結合してサンドイッチ構造を形成する。3つのマーカーの各々の検定法に対して、マーカータンパク質基準が用いられて吸光対マーカータンパク質濃度の基準又は校正曲線を作成する。この方法は重要である。なんとなれば、好適実施例の利点に加えて、付加マーカーであるNSE及びS100Bはそれぞれ、ニューロンの進行中の破壊を知らせること及び脳内の深刻な事象を監視することに関与するからである。

【0047】

マーカータンパク質を測定するために用いられる検定方法は、十分な感度を示して、各々のタンパク質を正常人において検出される正常値から病気の人々における高レベルまで、即ち正常及びそれより高い濃度範囲を越える2SD(=切り捨て)の濃度範囲で測定し得るべきである。GSタンパク質に対しては、切り捨てで0.022ng/ml、NSE=8.34ng/ml、及びS100B=0.02ng/mlである。

【0048】

検定法は様々な形式で実行され、バッチモードで検定法を実行することが望ましいマイクロタイター・プレート形式を含むかもしれない。検定法は、公知技術である自動分析器で実行されるかもしれない。本発明に従って用いられ得る別の検定形式は、いかなる治療場所でも処理され得る手動の簡易検査である。概して、係る装置は、切り上げ又は切り捨てした結果、即ち半定量的な結果を設けるだろう。

【0049】

rhGSの発現及び単クローン抗体の分離

ヒトグルタミン合成酵素(ヒト組み替え型GSまたはrhGS)に対する特有結合特性を備えた抗体を分離するために、rhGSのcDNAをATCCから購入した。rhGSのオープン・リーディング・フレーム(ORF)の全体はpET28a(NdeI/ShoI)におけるPCR及びサブクローニングによって得られた。構成はrhGS ORFのN末端で多ヒスチジン標識を含み、C末端で付加的な配列を含まなかった。タンパク質はリストローム氏その他(「Biochem J」、1997年、328:159)によって開示された技術に従って大腸菌BL21(DE3)へ発現させられる。尿素/アルカリ処理から成る不溶性発現生成物の可溶化同様に粗製細胞抽出物の準備がモリーノ氏その他(「J Comp Neurol」、1994年、350:260)による方法に従って実施された。アフィニティー精製が供給者の提案に従ってNi-NTAクロマトグラフィーによって実施された。

【0050】

単クローン抗体の作成:

本発明の単クローン抗体はポリエチレン・グリコール(PEG)媒介細胞溶解法によって作成された。

【0051】

免疫細胞の作成: Balb/c系の複数マウス、即ちカナダ国ケベック州セント・コン

10

20

30

40

50

スタント市チャールズ・リバー・カナダの生後7 - 9週のメスからのH - 2^dハプロタイプを備えた菌株が、最初の注入に対する完全フロインドアジュバント (F C A) 及び、その後2 - 4週間間隔を空けたそれに続く注入に対するフロイント不完全アジュバント (F I A) におけるいずれとも等しいG Sの25 - 100 μ gの量で乳化されたr h G Sで免疫性を与えられた。免疫性を与えられた複数マウスは、p H 7 . 4のリン酸塩緩衝化生理食塩水緩衝液 (P B S) において静脈内及び / 又は腹膜組織内のいずれかへの最後の免疫付与の後3 - 4日で死んだ。

【0052】

ハイブリドーマの作成 : G Sタンパク質及びS p 2 / 0細胞で免疫性を与えられた複数マウスからの脾臓細胞が、フューラー、S A、高橋、Mアンドハレル、J G R (「単クローン抗体の作成 (Preparation of Monoclonal Antibodies)」、インディアナ州 : サスベル F、ブレント B、キングストン R、その他、e d s、「分子生物学における最新手順 (Current Protocols in Molecular Biology)」、ニューヨーク、グリーンパブリッシング・アソシエーツ、1987年、ユニット11)によって開示された方法に従って、42% P E Gの存在下で溶融された。結果として生じた溶融細胞はH A T選択培地の中で懸濁され、フューラー氏その他 (上記参照を参照せよ) によって開示されたように、支持細胞、即ち腹腔滲出細胞 (P E C) を前もって接種された4つの96ウェルプレート上に培養される。

10

【0053】

G S特異抗体分泌ハイブリドーマ検査 :

20

ハイブリドーマ培地の検査が2つの方法で実施された。(1) 固相E L I S A法 - E L I S A検査 - 1 : 密集ハイブリドーマ培養上清が、100 mMのp H 9 . 6炭酸緩衝液に2 μ g / mlでr h G Sを被膜した96ウェルマイクロタイタープレート (N U N C社 M u x i S o r p、G I B C O B R L社) に追加された。過剰結合部位はp H 7 . 4のP B Sにおいてウシ血清アルブミン (B S A) によって阻害された。0 . 05% トウイン20 (W B) を含むP B Sでプレートを洗浄した後に、単クローン抗体を含む100 μ L培養上清は37 で1時間固定化抗原で培養された。洗浄後、ペルオキシダーゼ共役ヤギ (goat) 抗マウスI g G (Jackson ImmunoResearch Lab, Inc.、ペンシルヴァニア州ウェスト・グラブ) が加えられ、軌道攪拌器上で室温 (R T) で30分間培養された。洗浄後、T M B基質溶液 (シグマ) が加えられた。暗闇の中でR Tで5分間培養された後、反応は1 M H 2 S O 4で停止し、光学的濃度は450 n_m と読み取れた。選択された陽性の培地はフューラー氏その他 (上記参照を参照せよ) によって開示されたような限界希釈法によるクローン作成を条件とした。E L I S A検査及びクローン作成手順は、培地の安定度及びクローン化が得られるまで繰り返された。(2) E L I S A検査 - 2 : 第2の方法では、ハイブリドーマ培養上清における単クローン抗体がE L I S Aプレートの固相上で固定化されたヤギ抗マウスI g G_{Fc} (Jackson ImmunoResearch社) 経由で捕捉された。37 で1時間の培養後、プレートは方法1についてと同様に洗浄された。次に、0 . 5% B S Aを有するP B Sにおいて1 / 2000希釈で希釈されたビオチン化G S (製造者の勧告に従ってベーリンガー・マンハイム (Boehringer Mannheim) 社からのビオチン標識キットを用いて作成した) が各々のウェルに加えられた。攪拌器上でR Tで30分間培養後、プレートは洗浄され、10,000分の1でH R P共役ストレプトアビジン (ベーリンガー・マンハイム社) が加えられてR Tで30分間培養された。洗浄後、T M B基質溶液が加えられ、反応が方法1についてと同様に読みとられた。

30

40

【0054】

E L I S A検定法を展開するために、1 G 3及び5 G 4として指定されている2つのクローンが選択された。これらのクローンはブダペスト条約に基づいて、2001年4月25日、20110 - 2209バージニア州マナッサス市ユニバーシティ・ブルバード10801のアメリカンタイプカルチャコレクション (American Type Culture Collection) に、それぞれ受け入れ番号P T A - 3339及びP T A - 3340下で預託された。37 C F R 1 . 808に基づいて、預託物の公共の可用性に課されたすべての制限は特許付与に

50

関して取り消し不能に移転されるだろう。

【0055】

単クローン抗体の作成：

GS特異単クローン抗体は腹水を用いて作成される。腹水は、pH 7.4の0.25 - 0.5 mlのPBSで1 - 5 × 10⁶ハイブリドーマ細胞を腹膜内に注入することによってあらかじめ0.25 mlプリスタンで処理したBALB/cマウスにおいて作成された。10から14日後、腹水が収集された。腹水からの単クローン抗体は、公知の手順を用いて、アフィニティー・カラム（Gタンパク質、AVIDAL）上で精製された。生成された単クローン抗体は免疫化学的研究に対して用いられた。

【0056】

多クローン抗体作成及び精製

ヤギはフロインドアジュバントにおいて乳化された精製rhGS 250 - 500 µgの筋肉注射及び/または皮下注射で隔週に免疫性を与えられた。滴定濃度は半サンドウィッチELISA法によって血清を検査することによって定期的に観察された。次にGSに特異的な多クローン抗体（PAb）が、組み替え型GSに結合した臭化シアン活性化セファロース-4B（ファーマシア社）を用いて、アフィニティー精製によってヤギの血清から精製された。精製された多クローン抗体は、限外ろ過によって濃縮され20倍で保存された10 mMのpH 7.4 PBSで透析された。

【0057】

生体検体における診断分析検査及びGSの検出

本発明の別の目的は、アルツハイマー病に冒されている個々人からGSを検出する診断分析検査において用いられる試薬を提供することである。

【0058】

本実施例の1つの形態において、本発明のGSはADに冒されている個々人の検出のための免疫学的検定における抗原として用いられるだろう。タンパク質、即ち本発明のGSは、以下を含むがこれらに限定されない従来技術において公知の免疫学的測定装置で用いられるかもしれない。即ち、放射免疫測定法、酵素免疫測定法（ELISA）、「サンドウィッチ」検定法、沈降反応、ゲル拡散免疫拡散法、凝集反応、蛍光免疫学的検定、AまたはGタンパク質免疫測定法及び免疫電気泳動法である。本発明に基づくと、ヒトGSに対して作成された単クローン又は多クローン抗体は、血液又は、血清、血漿などの血液製剤、脊髄液又は例えば唾液、尿、リンパ液などの他の体液などの検体上の免疫学的検定においてADに冒された患者を診断するのに有効である。アルツハイマー型痴呆は、ヒトグルタミン合成酵素に対して特異的である個々の又は結合した単一の単クローン抗体又は複数の単クローン抗体を利用して診断されるだろう。

【0059】

抗体はいかなるタイプの免疫学的検定においても用いられ得る。このことは、従来の結合タンパク競合測定法はもちろん、2部位サンドウィッチ検定法及び非競合型単部位免疫検定法の両方を含む。

【0060】

検出の容易さ及び単純さ、及びその定量的性質のために、多くの変化形が存在しそのすべてが本発明によって意図されているサンドウィッチ法又は2重抗体法が特に望ましい。例えば、代表的なサンドウィッチ法において、標識を付されていない抗体は、例えば、マイクロタイター・プレートなどの固相上で固定され、検査されるべき検体が追加される。抗体-抗原錯体の形成を可能にするある培養時間の後に、検出信号を含み得るリポーター分子の標識を付された第2抗体が追加され、培養が継続されて異なる部位で抗原と結合する十分な時間が可能になり、結果として抗原-抗体-標識を付された抗体の形成となる。抗原の存在は信号を観察し公知の抗体量を含む対照実験検体と比較して定量化されて判定される。

【0061】

臨床研究：

10

20

30

40

50

予想観察試験的研究が3つの高齢者用医療機関で行われた。研究では、診療機関に来て、簡易精神状態鑑定(MMSE)検査及び他の所定の検査が行われた38人の患者が評価された。これらの患者たちの内、24人はADと診断され、14人はAD以外の他の型の痴呆と診断された。アルツハイマー型痴呆を示す患者の平均年齢は約79歳で、54歳から87歳の年齢幅にあった。簡易精神状態鑑定(MMSE)の成績が記録された。血液検体が採取され、凝固後、検体は遠心分離されて、血清のアリコートが凍結され、S100、NSE、及びGS分析が行われるまで70で保存された。

【0062】

実験対照には、153人の健康な献血者(18-87歳の年齢幅、年齢の中央値71.03歳±9.95歳)を含み、その血液検体が用いられてS100、NSE、及びGSの濃度に対する参照値が決定された。

10

【0063】

アルツハイマー病は進行性疾患の経過として認識され、基礎的新皮質において始まり、海馬に広がり、最終的には全ての皮層領域を冒す。病気進行中に寛解はない(ブラク及びブラク氏による「Neurobiol Aging」、1997年、18(4):351)。このことは、ADは疾患過程であって単に老化産物でないと言うことを示す。NSEはADに対して特異性は有さないが、マーカーはニューロンの進行中の破壊の指標として寄与する。ヒトGSに対してここに開示される単クローン抗体を利用すると、ADに対する的確で敏感で特異的な検査法が、タンパク質が非CSF体液において分析されるときに可能になる。これは、マーカーが非ヒトGSに特異的であり、血清又は他の非CSF体液から決定的なデータが何等抽出され得なかった従来技術の検査法とは異なる。S100は感度を有さないが有効なマーカーであって、ADの目標母集団である年輩者の間の共通事象である脳内の重大事象(例えば、TIA、脳卒中、虚血事象に至る低酸素症、その他)を観察する。

20

【0064】

全ての参照値は平均±2SDとして報告されている。3つのマーカーに対する参照値は、GS=0.022ng/ml、NSE=8.34ng/ml、及びS100=0.02ng/mlである。

【0065】

S100及びNSEのレベルは、それぞれカナダ国オンタリオ州ミシサーガのシン-Xファーマ株式会社から市販されているSMART S100及びSMART NSE ELISA検査キットを用いて分析された。GS検査法のために、抗体試薬及び較正器(即ち、組み替え型ヒトGS)がシン-Xファーマ社で製造され、ELISA検査法が上記で説明したように展開された。

30

【0066】

図3の僅差棒グラフは年齢に基づいて分類された健康体のGSタンパク質の血中濃度の分析を示す。興味深いことに、60代の個々体は他のより若い年齢のグループに比較して明らかに血液中にGSのより高いレベルを示している。しかしながら、70+の個人の血清中の平均GSレベルは20代及び40代において観察された平均GSレベルと同様に低下する。同様のパターンがS100タンパク質で観察される。他方、NSE血中濃度の年齢構成は他の2つのマーカーと異なり、明らかにより高濃度が14歳から40歳の年齢層において観察された。これら3つのタンパク質の血中濃度は性別に関係がなかった。特定の論理と結びつけられることを望まなかったが、60代の高GS(及び/またはS100)を有する人々が実際既に脳損傷が進行しつつあると仮定された。70代の係る個人は「患者」に分類され、残りのいわゆる「健康な」個人は健康に関してうまくあてはまって、これらのたんぱく質マーカーの低レベルを示す。よって、60代の年齢層におけるGSレベルに焦点をあてることが高リスク評価研究用診断として特に価値があるということが結論付けられた。

40

【0067】

24個のMMSEに基づくAD血清検体のうち、20個は軽度のAD症例だった。4個は

50

中程度だった(図1を参照せよ)。3つのマーカー、即ち、GS、NSE、及びS100Bの感度はそれぞれ100%、33%、及び8%だった。GSレベルはADの感度、即ちMMSEの成績と密接な相関関係がある。一方、同様の相関関連はNSEで観察されない。S100の感度は大変低い、しかしながら、このマーカーが上昇すると、深刻な事象による脳内の星状細胞の進行中の損傷の標識となるかもしれない。

【0068】

14個の非AD型痴呆検体のうち、ただ1個の検体だけがGSとS100との両方において高レベルを示している。一方、7個の検体はカットオフレベルより高いNSE濃度を示す(図2参照)。このことはGS及びS100がADに対して極めて特異的なマーカーであることを示す。

10

【0069】

この明細書中で挙げたすべての特許及び刊行物は、本発明が関連する技術の当業者のレベルを示す。全ての特許及び刊行物は、各々の刊行物が具体的にかつ個別に指示されて参照として組み込まれるているかのように、同程度に参照されることによってここに組み込まれている。本発明のある形式が説明されるが、ここに説明され示された特定の形式又は各部分の配置に限定されないということが理解されるべきである。様々な変化形が本発明の目的から乖離することなく成され、本発明は本明細書及び図面において示され説明されたことに限定されて考えられるべきでない、ということが当業者に明らかだろう。

【0070】

当業者は、本発明が目的を達成し、そこで特有のものだけでなく記載した結果及び利点を得ることによく適合するということを示す。ここに記載したオリゴヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、生物学的に関係する化合物、方法、手順、及び技術は、好適実施例を目下代表し、模範的であることが意図されており、目的を制限することは意図されていない。本発明の精神の範囲内に包含され添付の請求項の目的によって定義される本発明における変化形及び他の使用法を、当業者は思いつくだらう。本発明は特定の好適実施例に関連して説明されているが、請求項に係る発明は係る特定の実施例に必要以上に限定されるべきでないということが理解されるべきである。事実、本発明を実行するために記載した形態の様々な変化形は当業者に明らかであって以下の請求項の目的の範囲内にあることが意図される。

20

【図面の簡単な説明】

30

【0071】

【図1】アルツハイマー型痴呆にかかっていると臨床的に判断された一団の患者の血液中のGS、NSE、及びS100に対する統計的有効数字の比較である。

【図2】非アルツハイマー型痴呆にかかっていると臨床的に判断された一団の患者の血液におけるGS、NSE、及びS100に対する統計的有効数字の比較である。

【図3】正常人における老化に関するGSの僅差棒グラフを示す。

【 図 1 】

AD抗体(血清)

Sync-X コード	年齢	性別	S100B (ng/ml) カットオフ=0.02	NSE (ng/ml) カットオフ=3.34	GS (ng/ml) カットオフ=0.022	病歴、診断	MMSE	20-30- 軽度 10-19 中等度 0-9 重度
ADH-011	66	M	0.010	9.065	0.058	22 軽度 AD		
ADH-012	79	M	0.008	4.253	0.023	14 中等度 AD		
ADH-013	76	M	0.005	6.166	0.068	17 中等度 AD		
ADH-014	85	F	0.009	4.784	0.162	17 中等度 AD		
ADH-015	81	M	0.011	8.608	0.058	25 軽度 AD		
ADH-016	83	F	0.009	14.679	0.077	22 軽度 AD		
ADH-017	84	F	0.015	10.724	0.092	22 軽度 AD		
ADH-018	87	F	0.011	4.651	0.042	21 軽度 AD		
ADH-019	74	F	0.010	6.211	0.131	22 軽度 AD		
ADH-020	74	M	0.004	3.504	0.035	25 軽度 AD		
ADH-021	77	M	0.006	1.888	0.045	20 軽度 AD		
ADH-022	84	M	0.010	4.784	0.049	23 軽度 AD		
ADH-023	79	M	0.009	7.698	0.052	27 軽度 AD		
ADH-024	87	M	0.014	8.699	0.071	20 中等度 AD		
ADH-025	75	F	0.009	5.853	0.036	21 軽度 AD		
ADH-026	79	F	0.006	6.750	0.043	24 軽度 AD		
ADH-027	81	M	0.005	3.284	0.048	23 軽度 AD		
ADH-028	34	M	0.006	4.121	0.022	21 軽度 AD / poss.VaD		
ADH-029	82	F	0.004	12.969	0.080	23 軽度 AD		
ADH-030	81	F	0.009	4.563	0.048	24 軽度 AD		
ADH-031	83	F	0.009	16.316	0.067	20 軽度 AD		
ADH-032	84	F	0.017	3.460	0.029	24 軽度 AD		
ADH-033	87	F	0.020	2.628	0.067	21 軽度 AD		
ADH-034	74	F	0.022	9.111	0.070	22 軽度 AD		
			8 %	33 %	100 %			

【 図 2 】

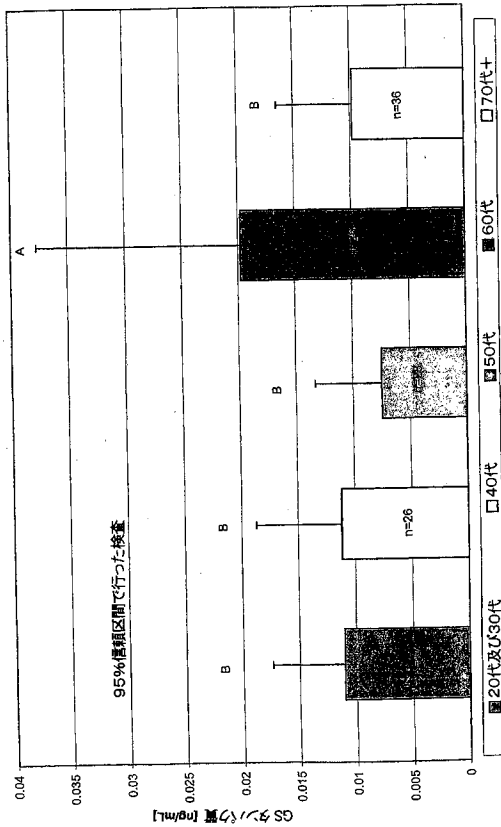
非AD型痴呆対照実験

DC-1 Sync-X コード	年齢	性別	S100B (ng/ml) カットオフ=0.02	NSE (ng/ml) カットオフ=3.34	GS (ng/ml) カットオフ=0.022	病歴、診断
DC-001	86	M	0	3.816	0.019	軽度痴呆
DC-002	69	M	0	3.816	0.008	軽度痴呆(AS)、アムネチ
DC-003	74	F	0	28.097	0.010	重度痴呆(AS)
DC-004	52	M	0	5.831	0.003	VaD
DC-005	61	F	0.007	6.220	0.016	FTD、進行性言語障害
DC-006	75	M	0.015	5.261	0.011	VaD、申比認知機能低下症
ADH-009	86	F	0.009	4.386	0.02	痴呆 - 型不明
ADH-037	78	M	0.008	10.585	0.042	LBD
AD-042	78	M	0.001	8.146	0.015	16 中等度 VaD
AD-069	86	F	0.002	15.731	0.015	25 軽度 VaD
AD-078	56	M	0.004	17.589	0.010	21 軽度 FTD
AD-082	72	F	0.017	24.562	0.019	26 軽度 MCI
AD-084	51	F	0.011	10.515	0.006	4 重度 FTD
AD-086	67	F	0.025	32.101	0.013	20 軽度 CBD
特異性			93 %	50 %	93 %	

MCI: 軽度認知機能障害、CBD: 大脳皮質基底核性症、FTD: 前頭側頭型痴呆、VaD: 血管性痴呆
LBD 又はDLBD: レウィー小体痴呆

【 図 3 】

経時的グルタミン合成酵素レベル



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
7 November 2002 (07.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/088706 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/48
- (21) International Application Number: PCT/CA02/00563
- (22) International Filing Date: 24 April 2002 (24.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09/842,079 25 April 2001 (25.04.2001) US
09/971,740 4 October 2001 (04.10.2001) US
- (71) Applicant: SYN-X PHARMA, INC. [CA/CA]; 6354 Viscount Road, Mississauga, Ontario L4V 1H3 (CA).
- (72) Inventors: JACKOWSKI, George; 17725 Keele Street R1, Kettleby, Ontario L0G 1J0 (CA). TAKAHASHI, Miyoko; 65 Franklin Avenue, North York, Ontario M2N 1B8 (CA).
- (74) Agent: SINGLEHURST, John, C.; Finlayson & Singlehurst, 70 Gloucester Street, Ottawa, Ontario K2P 0A2 (CA).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HK, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: PROCESS FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S DEMENTIA AND DEVICE THEREFOR

AD samples (Serum)

SW-X CODE	Age	Sex	ST66B (µg/ml) Case=000	NSE (µg/ml) Case=000	GS (µg/ml) Case=002	History, Diagnosis : MMSE 20-30= mild 10-19 moderate 0-9 severe
ADH-011	66	M	0.010	9.665	0.058	22 mild AD
ADH-012	39	M	0.508	1.243	0.023	14 moderate AD
ADH-013	76	M	0.005	6.166	0.068	17 moderate AD
ADH-014	85	F	0.009	4.784	0.182	17 moderate AD
ADH-015	81	M	0.011	8.668	0.058	25 mild AD
ADH-016	83	F	0.009	14.679	0.077	22 mild AD
ADH-017	84	F	0.013	10.724	0.092	25 mild AD
ADH-018	87	F	0.011	4.661	0.092	21 mild AD
ADH-019	74	F	0.010	6.211	0.131	22 mild AD
ADH-020	74	M	0.004	13.504	0.035	25 mild AD
ADH-021	77	M	0.006	1.888	0.045	28 mild AD
ADH-022	84	M	0.010	4.784	0.049	23 mild AD
ADH-023	79	M	0.009	7.668	0.052	27 mild AD
ADH-024	87	M	0.014	8.669	0.071	20 moderate AD
ADH-025	75	F	0.009	3.833	0.036	21 mild AD
ADH-026	79	F	0.006	6.790	0.043	24 mild AD
ADH-027	81	M	0.005	12.284	0.048	23 mild AD
ADH-028	74	M	0.006	4.121	0.022	21 mild AD / poss VaD
ADH-029	82	F	0.004	12.969	0.080	23 mild AD
ADH-030	81	F	0.009	4.563	0.048	24 mild AD
ADH-031	83	F	0.009	16.216	0.067	20 mild AD
ADH-032	84	F	0.017	3.460	0.029	24 mild AD
ADH-033	87	F	0.020	2.628	0.067	21 mild AD
ADH-034	74	F	0.022	5.111	0.079	22 mild AD
Sensitivity			8 %	33 %	100 %	

(57) Abstract: A method for diagnosing Alzheimer's disease (AD) is disclosed. The method involves directly detecting the presence of a biochemical marker, specifically human glutamine synthetase, in bodily fluid, preferably blood or a blood product. The detection is by an immunoassay incorporating an antibody specific to human glutamine synthetase. In addition, a method for distinguishing between AD and non-AD dementia is disclosed.



WO 02/088706 A2

WO 02/088706 A2 

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

1

**PROCESS FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF
ALZHEIMER'S DEMENTIA AND DEVICE THEREFOR**

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a method for the diagnosis of Alzheimer's dementia (AD). The invention particularly relates to a process for quantifying the presence of at least one biochemical marker associated with Alzheimer's dementia. More particularly, the invention relates to a point-of-care immunoassay which utilizes unique antibodies to enable the differential diagnosis of Alzheimer's versus non-Alzheimer's forms of dementia.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Alzheimer's disease, also referred to as Alzheimer's dementia or AD is a progressive neurodegenerative disorder that causes memory loss and serious mental deterioration.

Diagnosticians have long sought a means to definitively identify AD during the lifetime of demented patients, as opposed to histopathological examination of brain tissue, which is the only present means available for rendering an ultimate diagnosis of AD. AD is the most common form of dementia, accounting for more than half of all dementias and affecting as many as 4 million Americans and nearly 15 million people worldwide. Dementia may start with slight memory loss and confusion, but advances with time reaching severe impairment of intellectual and social abilities. At age 65, the community prevalence of AD is between 1-2 %. By age 75, the figure rises to 7 %, and by age 85 it is 18 %. The prevalence of dementia in all individuals over age 65 is 8 %. Of those residing in institutions, the prevalence is about 50 %, at any age.

The social impact of this disease is enormous, caused by the burden placed on caregivers, particularly in the latter stages of the disease. The substantial economic costs are largely related to supportive care and institutional admission. The rapidly increasing proportion of elderly people in society means that the number of individuals affected with AD will grow dramatically, therefore finding an early accurate diagnosis and a cure for AD is becoming an issue of major importance world wide.

When an individual is suspected of AD, several recommended tests are performed :

(1) Mini Mental State Examination (MMSE) – an office-based psychometric test in the form

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

2

of a Functional Assessment Questionnaire (FAQ) to examine the scale for functional autonomy, (2) Laboratory tests – complete blood count, measurement of thyroid stimulating hormone, serum electrolytes, serum calcium and serum glucose levels, (3) Neuroimaging – most commonly used is computed tomography (CT) which has a role in detecting certain

5 causes of dementia such as vascular dementia (VaD), tumor, normal pressure hydrocephalus or subdural hematoma. However, neuroimaging is less effective in distinguishing AD or other cortical dementias from normal aging. In primary care settings, some suggest that CT could be limited to atypical cases, but others recommend routine scanning. Magnetic resonance imaging (MRI) currently offers no advantage over CT in most cases of dementia.

10 While Alzheimer's is the most common form of dementia, accounting for at least 60 % of cases, diagnostic procedures for determining the exact cause of dementia, among more than 80 different species, is difficult at best. Furthermore, the currently performed tests are inadequate in differentiating AD from other types of dementia.

In comparison to other disease areas, the field of dementia raises questions concerning

15 the value of diagnosis, since there is currently no cure or effective therapy available. In dementia, as in all other branches of medicine, the certainty of a diagnosis has an important impact on the management of the patient. While AD cannot be cured at present time, there is symptomatic treatment available and the first drugs (acetylcholinesterase inhibitors) for the temporary improvement of cognition and behavior are now licensed by the U.S. Food and

20 Drug Administration. Other drugs are at different stages of clinical trials: (1) Drugs to prevent decline in AD – DESFERRIOXAMINE, ALCAR, anti-inflammatory drugs, antioxidants, estrogen, (2) Neurotrophic Factors : NGF, (3) Vaccine : the recent most exciting report by Schenk et al. (Nature 1999;400:173-7) raises the hope of a vaccine for AD.

The specificity of the various therapies thus require sophisticated diagnostic

25 methodologies, having a high degree of sensitivity for AD, in order to insure their success.

Currently there are a multitude of tests available which aid in the diagnosis of AD. However, the only true existing diagnosis is made by pathologic examination of postmortem brain tissue in conjunction with a clinical history of dementia. This diagnosis is based on the presence in brain tissue of neurofibrillary tangles and of neuritic (senile) plaques, which have

30 been correlated with clinical dementia. Neuritic plaques are made up of a normally harmless protein called amyloid-beta. Before neurons begin to die and symptoms develop, plaque

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

3

deposits form between neurons early on in the disease process. The neurofibrillary tangles are interneuronal aggregates composed of normal and paired helical filaments and presumably consist of several different proteins. The internal support structure for brain neurons depends on the normal functioning of a protein called tau. In Alzheimer's disease, threads of tau protein undergo alterations that cause them to become twisted. The neurohistopathologic identification and counting of neuritic plaques and neurofibrillary tangles requires staining and microscopic examination of several brain sections. However, the results of this methodology can widely vary and is time-consuming and labor-intensive.

Given the ability of both current and prospective pharmacological therapies to forestall and/or reverse the onset and/or progress of Alzheimer's dementia, an early diagnosis of AD will assist to better manage the care of patients. There are many cases where non-AD dementia could be confused with AD dementia. Such examples include small, undetected strokes which temporarily interrupt blood flow to the brain. Clinically depressed patients or those with Parkinson's disease can also experience lapses in memory. Many older people are on a variety of medications which as a side effect may, alone or in conjunction, impair their ability to perform cognitive tasks.

Thus, if diagnostic techniques for the early differentiation of AD could be provided, physician's would achieve an enhanced ability to prescribe appropriate therapeutic intervention at an early stage in the pathogenesis of this disease.

Various biochemical markers for AD are known and analytical techniques for the determination of such markers have been described in the art. As used herein the term "marker" "biochemical marker" or "marker protein" refers to any enzyme, protein, polypeptide, peptide, isomeric form thereof, immunologically detectable fragments thereof, or other molecule that is released from the brain during the course of AD pathogenesis. Such markers include, but are not limited to, any unique proteins or isoforms thereof that are particularly associated with the brain.

Glutamine synthetase (GS) is recognized as an astrocyte-specific enzyme involved in the regulation of ammonia and glutamate metabolism that is over-expressed following brain injury (Norenberg and Martinex-Hernandez, Brain Res 1979;161:303). A few studies on the clinical role of glutamine synthetase have been reported: Gunnarsen and Haley (Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:11949) found monomeric GS protein in 38 of 39 AD cerebrospinal

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

4

fluid (CSF) samples, Tumani et al. (Arch Neurol 1999;56(10):1241) describe that the concentration of GS in lumbar CSF of patients with AD is increased significantly but nonspecifically (i.e. also increased in VaD, schizophrenia and ALS). On p.1244, the left-hand column, Tumani states that GS was not found in serum.

5 Neuron-specific gamma-enolase (NSE $\gamma\gamma$) and S100B proteins, abundant in the brain, are also useful markers for assessing the extent of brain damage : NSE $\gamma\gamma$ for neuronal damage and S100B for astrocyte damage. Concentrations of NSE and S100B proteins from cerebrocortical regions have been examined by means of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The levels of these proteins in frontal cortex of AD patients were found to be
10 significantly elevated (Kato et al. J Mol Neurosci, 1991;3(2):95). Activated astrocytes over-expressing S100B have been intimately associated with the neuritic β -amyloid plaques of AD (Sheng et al. J Neurosci Res, 1994;39:398, Mrak et al. J Neuropathol Exp Neurol 1996;55:273).

There are a number of different potential uses for biomarkers in AD evaluation, and
15 each use could involve a different marker or set of markers. Such uses may include, but are not limited to, the use of a marker to distinguish AD from other causes of dementia; distinguishing dementia from the non-pathological effects of aging; monitoring the progress of the disease after clinical symptoms become apparent; utilization of a surrogate to monitor the efficacy of the forthcoming therapies for AD; and isolating markers which have utility as
20 risk assessment factors for AD; and identifying both the earliest biological changes occurring in the brain and other changes that occur as the disease progresses. Ideally, it would be preferable to isolate a single marker to fulfill all requirements with a high degree of sensitivity and specificity, however this may be an unreasonable goal. Any individual marker needs to be assessed by sensitivity, specificity, reliability and validity for the type of clinical
25 situation to which it is meant to apply. A marker which is poor at distinguishing AD from other causes of dementia, could nevertheless be an excellent marker for monitoring the progression of the disease process or the response to therapy.

With regard to diagnostic devices, the clinical evaluation and use of point-of-care tests utilizing biological markers are valuable tools for evaluating risk, monitoring disease
30 progression and guiding therapeutic interventions. The advantages which flow from the use of biological markers as diagnostic tools include strengthening the certainty of the clinical

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

5

diagnosis, distinguishing AD from other causes of dementia, and quantifying the severity of the disease and rate of progression. In addition, tests using biological markers should be rapid, non-invasive, simple to perform and inexpensive.

What is lacking in the art is a relatively non-invasive method and device therefore effective for definitively diagnosing Alzheimer's dementia in living patients. Additionally, a definitive method of assessing the risk of developing AD is greatly needed.

DESCRIPTION OF THE PRIOR ART

U.S. Patent No. 5,445,937 to Haley teaches a method for the diagnosis of Alzheimer's disease, as well as a means for the diagnosis and differentiation of other diseases. This is done by use of a disease-specific biochemical marker, glutamine synthetase (GS) and its respective photoaffinity label, or labeled antibody specific for GS, at GS's binding site. The '937 patent focuses on examining cerebrospinal fluid (CSF) to detect the presence of a photoaffinity labeled, or labeled antibody, nucleotide binding protein and correlates the subsequent level with the presence of AD. Haley teaches a variety of immunoassay techniques to accomplish such a method. While Haley hypothesizes regarding the prophetic utility of diagnostic methods which use blood as a sample and further suggests that a monoclonal and/or polyclonal antibody immunoassay could be developed, he nevertheless fails to reduce either to practice. Thus, the '937 patent is only useful in teaching a diagnostic test which utilizes cerebrospinal fluid. Obtaining a sample of cerebrospinal fluid entails invasive techniques quite uncomfortable to a patient and requires a lengthy period of time to accomplish. In addition, the only polyclonal and/or monoclonal antibodies suggested by Haley are those having a specificity to sheep brain GS as opposed to a human recombinant form of GS as instantly disclosed herein.

In U.S. Pat. No. 5,508,167, Roses et al. describe methods for diagnosing AD involving the detection of an apolipoprotein E type 4 (ApoE4) isoform or DNA encoding ApoE4. The methods can use blood samples and are analyzed by an immunochemical assay. The blood sample is optionally combined with a reducing agent to reduce the disulfide bond in cysteine residues to the corresponding reactive sulfhydryl groups. Roses et al. further describes a kit for detection of the ApoE4 isoform. The test is based on the differences in the amino acid sequences of the three major ApoE isoforms. The test is not specific for human

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

6

GS nor does it have sensitivity in differentially diagnosing AD versus non-AD dementia.

Tumani et al. (Arch. Neurol., (1999) 56, pp1241-1246) examine the levels of GS in CSF and the examination of serum in order to determine whether GS is a useful biochemical marker in the diagnosis of AD. Analysis is by an ELISA utilizing a biotin-labeled

5 monoclonal antibody directed against sheep brain GS. Normal ranges of GS concentration are reported as 4 pg/mL in human CSF and 36 pg/mL in human serum. The samples of CSF in AD patients are elevated with a mean level of GS concentration of 20 ± 12 pg/mL, with ALS patients at 13 ± 13 pg/mL, and vascular dementia (VaD) patients at a mean elevated level 13 ± 7 pg/mL. Vascular dementia and ALS patients show a slightly lower increase.

10 Patients with AD are measured with mean levels of 111 ± 53 pg/mL in serum. However, patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and vascular dementia also present with mean elevated levels at 116 ± 62 pg/mL and 72 ± 59 pg/mL in serum, respectively. Thus, no definitive diagnosis regarding AD dementia or differential diagnosis between AD versus non-AD dementia could be elucidated from these assays.

15 Gunnarsen and Haley (Proc. Natl. Acad. Sci. (1992) 89, pp11949-11953) provides evidence of GS detected in CSF of patients with AD but not in that of healthy control subjects or controls with other diseases. The other diseases under consideration are epilepsy, ALS, and Parkinson's. Patients with ALS or Pick's disease in addition to AD do show positive results, meanwhile ALS patients do not show positive results, indicating GS is specific to
20 AD. As with other publications, antibodies raised against non-human GS are utilized for detection of GS.

Generally, most scientific papers tend to focus on the peptide, β -amyloid, since it is postulated to be a major determinant of AD. This is supported by the observation that certain forms of familial AD mutations result in the over production of β -amyloid, particularly the
25 longer form (1-42) which aggregates more readily than the shorter form. Hensley et al. (Proc. Natl. Acad. Sci., (1994), 91, pp3270-3274) examine the neurotoxicity based on free radical generation by the peptide β -amyloid in its aggregation state. Several synthetic fragments of the peptide are tested for resulting neurotoxicity. Based on the fact that oxygen seems to be a requirement for radical generation and glutamate synthetase and creatine kinase enzymes are
30 oxidation-sensitive biomarkers, the inactivation of these enzymes are utilized as indicators of active attack on biological molecules by these fragmented β -amyloid aggregates.

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

7

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a method for the diagnosis of Alzheimer's dementia (AD), particularly to a method for diagnosing and differentiating Alzheimer's dementia from other forms of dementia by testing for the presence of specific biochemical markers for
5 Alzheimer's disease in bodily fluids, particularly in blood, blood products, urine, saliva and the like. The invention further relates to a process for quantifying the presence of at least one biochemical marker associated with Alzheimer's dementia. More particularly, the invention relates to a point-of-care immunoassay which utilizes unique antibodies to enable the differential diagnosis of Alzheimer's versus non-Alzheimer's forms of dementia.

10 The present invention relates to methods and ELISA system for diagnosing, subtyping and monitoring Alzheimer's disease. The invention is based on the discovery that S100B, NSE $\gamma\gamma$ and GS proteins are released from the brain and can be detected in body fluids outside the brain.

The generation and purification of recombinant human GS are described. These GS
15 proteins may be used to generate monoclonal or polyclonal antibodies that, in turn, can be used in immunoassays, wherein they enter into an immunoreaction which can be monitored and/or quantified to detect circulating GS protein in suspected individuals. Alternatively, the GS protein themselves may be used in immunoassays to detect circulating autoantibodies in such individuals. The occurrence of Alzheimer's dementia is characterized by the recognition
20 of levels of a particular biochemical marker in bodily fluid, said levels correlating to the manifestation of Alzheimer's dementia symptoms as quantified by MMSE testing. As a risk assessment test, the recognition of levels of such markers which are indicative of the development of Alzheimer's dementia further augments the diagnostic capability afforded to the skilled practitioner.

25 Accordingly, it is an objective of the instant invention to provide a relatively non-invasive and highly sensitive method for the definitive diagnosis of Alzheimer's disease.

It is a further objective of the invention to provide a method which includes analysis of at least one body fluid of a patient to determine the presence of at least one marker indicative of AD vs non-AD dementia.

30 It is a further objective of the instant invention to provide antibodies specific to neuronal related proteins, as identified by the method of the current invention.

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

8

It is a still further objective of the instant invention to provide an immunoassay effective for the recognition of neuronal specific proteins in one or more human bodily fluids.

It is yet another objective of the instant invention to provide a purified monoclonal antibody specific for human glutamine synthetase.

It is a still further objective of the invention to provide a test kit for the diagnosis of AD comprising a non-invasive point-of-care test which can be performed utilizing a sample comprising blood or any blood product.

Other objects and advantages of this invention will become apparent from the following description taken in conjunction with the accompanying figures wherein are set forth, by way of illustration and example, certain embodiments of this invention. The figures constitute a part of this specification and include exemplary embodiments of the present invention and illustrate various objects and features thereof.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 is a comparison of statistically significant values for GS, NSE and S100 in the blood of a cohort of patients clinically evaluated as suffering from a form of Alzheimer's dementia; Figure 2 is a comparison of statistically significant values for GS, NSE and S100 in the blood of a cohort of patients clinically evaluated as suffering from a form of non-Alzheimer's dementia;

Figure 3 depict box whisker plots of GS relative to age in healthy individuals.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The markers which are analyzed according to the method of the invention are released into the circulation and may be present in the blood or in any blood product, for example plasma, serum, cytolized blood, e.g. by treatment with hypotonic buffer or detergents and dilutions and preparations thereof, and other body fluids, e.g. CSF, saliva, urine, lymph, and the like. In another preferred embodiment the concentration of the markers in CSF may be measured.

The terms "above normal" and "above cut-off" are used to refer to a level of a marker

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

9

that is greater than the level of the marker observed in normal individuals who are not undergoing a cerebral event, i.e. brain degeneration or atrophy. For some markers, very low levels of the marker may be present normally in an individual's blood. For other markers analyzed according to the invention, detectable levels may be present normally in blood.

5 Therefore, these terms indicate a level that is significantly above the normal level found in healthy individuals. The term "significantly" or "statistically significant" refers to statistical significance and generally means a two standard deviation (SD) above normal, or higher, concentration of the marker. The assay method by which the analysis for any marker protein is carried out must be sensitive to be able to detect the level of the marker which is present
10 over the concentration range of interest and also must be highly specific.

The three markers which were compared to evaluate their value as a diagnostic tool are proteins which are released by specific cells in the brain as these cells become damaged during a cerebral event. These markers, e.g. proteins, can be either in their native form or they may be immunologically detectable fragments of the proteins resulting, for example, by
15 proteolytic breakdown. By "immunologically detectable" is meant that the marker fragments contain an epitope which is specifically recognized by antibody reagents used in the assay.

The markers analyzed according to the method of the invention are cell type specific. The enzyme enolase catalyzes the interconversion of 2-phosphoglycerate and phosphoenolpyruvate in the glycolytic pathway. The enzyme exists in three isoproteins each
20 the product of a separate gene. The gene loci have been designated ENO1, ENO2 and ENO3. The gene product of ENO1 is the non-neuronal enolase (NNE or α), which is widely distributed in various mammalian tissues. The gene product of ENO2 is the muscle specific enolase (MSE or β) which is localized mainly in the cardiac and striated muscle, while the product of the ENO3 gene is the neuronal specific enolase (NSE or γ) which is largely found
25 in the neurons and neuroendocrine cells. The native enzymes are found as homo- or heterodimeric isoforms composed of three immunologically distinct subunits, α , β and γ . Each subunit (α , β and γ) has a molecular weight of 16 kDa, 44 kDa and 46 kDa respectively.

The $\alpha\gamma$ and $\gamma\gamma$ enolase isoforms, which have been designated as neuron specific enolase each have a molecular weight of ~80,000 Dalton. It has been shown that NSE
30 concentration in CSF and blood increases after brain injury (e.g. stroke, head trauma), and the release of NSE from damaged cerebral tissue into the CSF and blood circulation reflects the

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

10

extent of damage to cerebral tissue. NSE has a biological half-life of ~48 hours.

The S100 protein is a cytoplasmic acidic calcium-binding protein found predominantly in the gray matter of the brain, primarily in astroglial and Schwann cells. The protein exists in several homodimeric or heterodimeric isoforms consisting of two immunologically distinct subunits, A1 (MW 10,400 Dalton) and B (MW 10,500 Dalton). In the central nervous system (CNS), homodimer S100 B-B (21,000 Dalton) and heterodimer S100 A1-B (20,900 Dalton) constitute over 95 % of the total S100 (Isobe et al. *Biochem Int* 1983;6:419, Zimmer et al. *Brain Res Bull* 1995;37:417). Since a high percentage of S100B is found in the brain, a number of studies have examined this protein as a marker of cerebral injury. The biological half life of S100B is 113 minutes (Usui et al. *Clin Chem* 1989;35:1942). Repeated measurements of S100B serum levels are useful to monitor the course of neurologic damage.

Glutamine synthetase (GS) is a ubiquitous enzyme that catalyzes the ATP-dependent conversion of glutamate to glutamine using ammonia as the nitrogen source. GS is present at high concentrations in liver, muscle, kidney and brain (De Groot et al. *Biochim Biophys Acta* 1987;908:231). GS in the human brain is an astrocyte-specific enzyme involved in protecting neurons via converting the potentially neurotoxic glutamate and ammonia into glutamine.

The divalent cation site of GS renders it extremely sensitive to oxidation.

Senile plaque-dense regions of the brain of patients with AD represent environments of elevated oxidative stress and that protein in the brain of patients with AD is more oxidized than that of controls. Reactive microglia extensively present with senile plaque regions have been proposed as a source of oxyradicals in the brain.

Three distinct types of GS have been known : GSI, GSII and GSIII. Genes for GSI and GSIII have been found in bacteria. The human GS gene belongs to the GSII type (Brown et al. *J Mol Evol* 1994;38:566). GS in the brain is thought to exist as an octameric structure with a molecular weight of 360,000 – 400,000 Daltons (Tumani et al. *J Immunol Meth* 1995;188:155). However, in blood circulation the protein is thought to be in the monomeric form with MW 44 ± 1 kDa (Boksha et al. *J Neurochem* 2000;75:2574). High concentrations of GS were reported in lumbar CSF from AD patients (Gunnarsen and Haley, *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11949, Tumani et al. *Arch Neurol* 1999;56:1241).

The exact mechanisms leading to increased GS concentration in CSF remain

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

11

unknown. Over expression of GS in reactive astrocytes and subsequent release into the extracellular space was proposed (Tumani et al, Arch Neurol 1999;56:1241).

In a further contemplated embodiment of the invention, body fluid samples may be taken from a patient at one point in time or at different points in time for ongoing analysis.

5 Typically, a first sample is taken from a patient upon presentation with possible symptoms of AD and analyzed according to the invention. Subsequently, some period of time after presentation, for example, about 3 - 6 months after the first presentation, a second sample is taken and analyzed according to the invention. The data can be used to diagnose AD, rule out AD, distinguish between AD and non-AD dementia.

10 The level of any one or all of the three specific markers of interest found in the patient's body fluid were measured from one single sample, although one or more individual markers can be measured in one sample. By "sample" is meant a body fluid such as blood or CSF. All the markers can be measured with one assay device or by using a separate assay device for each marker in which case aliquots of the same sample can be used. It is preferred
15 to measure each of up to the three markers in the same single sample, irrespective of whether the analyses are carried out in a single analytical device or in separate devices so that the level of each marker simultaneously present in a single sample can be used to provide meaningful data.

The presence of each marker is determined using antibodies specific for each of the
20 markers and detecting specific binding of each antibody to its respective marker. Any suitable direct or indirect assay method may be used, including those which are commercially available to determine the level of each of the specific markers measured according to the invention. The assays may be competitive assays, sandwich assays, and the label may be selected from the group of well-known labels such as radioimmunoassay, fluorescent or
25 chemiluminescence immunoassay, or immunoPCR technology. Extensive discussion of the known immunoassay techniques is not required here since these are known to those of skilled in the art. See Takahashi et al. (Clin Chem 1999;45(8):1307) for S100B assay.

Although not limited thereto, the immunoassay method used in the instant examples comprised a double antibody or sandwich ELISA for measuring the level of the marker
30 proteins in the sample. According to this method, one of the antibodies is a "capture" antibody which is immobilized onto a solid-phase, and the other is a "detector" antibody

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

12

which is labeled with, for example, an enzyme. The detector antibody binds to marker protein bound to the capture antibody to form a sandwich structure. For each assay of the three markers, marker protein standards are used to prepare a standard or calibration curve of absorbance vs marker protein concentration. This method is of importance since, in addition to the advantages of the preferred embodiment, the added markers, NSE and S100B, assist in indicating an on-going destruction of neurons and monitoring acute events in the brain, respectively.

The assay methods used to measure the marker proteins should exhibit sufficient sensitivity to be able to measure each protein over a concentration range from normal values found in healthy persons to elevated levels in sick people, i.e. 2SD above normal (= cut-off) and higher. For the GS protein, the cut-off= 0.022 ng/ml, NSE = 8.34 ng/ml and S100B = 0.02 ng/ml.

The assay may be carried out in various formats, including a microtiter plate format which is preferred for carrying out the assays in a batch mode. The assays may also be carried out in automated analyzers which are well known in the art. Another assay format which can be used according to the invention is a rapid manual test which can be administered at the point-of-care at any location. Typically, such devices will provide a result which is above or below a cut-off, i.e. a semiquantitative result.

Expression of rhGS and isolation of monoclonal antibody:

20 In order to isolate an antibody with specific binding properties for human Glutamine Synthetase (human recombinant GS or rhGS) cDNA of the rhGS was purchased from ATCC. The full length of the rhGS open reading frame (ORF) was obtained by PCR and sub-cloning in pET28a (*NdeI/ShoI*). The construct included a poly-histidine tag at the N-termini of the rhGS ORF and no extra sequence at the C-termini. The protein was expressed into 25 *Escherichia coli* BL21 (DE3) following techniques described by Listrom et al. (Biochem J 1997;328:159). The preparation of crude cellular extract as well as solubilization of insoluble expression products consisting in urea/alkali treatment was achieved following the method of Moreno et al. (J Comp Neurol 1994;350:260). Affinity purification was performed by Ni-NTA chromatography following the supplier's recommendations.

30 Preparation of Monoclonal Antibody:

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

13

The monoclonal antibody of the present invention was produced by the polyethylene glycol (PEG) mediated cell fusion method.

Preparation of immunocytes: Balb/c mice, a strain with H-2^d haplotype from Charles River Canada, St. Constant, Quebec, Canada, female, 7 – 9 week old, were immunized with the
5 rhGS emulsified in an equal volume of either Freund's complete adjuvant (FCA) for the first injection and then in Freund's incomplete adjuvant (FIA) for subsequent injections at 2 – 4 weeks intervals with 25 – 100 µg of GS. Immunized mice were sacrificed 3 – 4 days after the final immunization, given either intravenously and/or intraperitoneally, in phosphate buffered saline buffer (PBS), pH 7.4.

10 **Preparation of hybridoma:** Spleen cells from the mice immunized with the GS protein and the Sp2/0 cells were fused in the presence of 42 % PEG according to the method described by Fuller, SA, Takahashi, M and Hurrell, JGR (Preparation of Monoclonal Antibodies: In:
Susubel F, Brent B, Kingston R., et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology. New York: Greene Publishing Associates, 1987: Unit 11). The resulting fused cells were
15 suspended in the HAT selection medium and plated onto four 96-well plates which were pre-seeded with feeder cells, peritoneal exudate cells (PEC), as described by Fuller et al. (see above reference).

Screening of GS-specific antibody-secreting hybridomas :

The screening of hybridoma cultures were carried out in two methods. (1) Solid-
20 phase ELISA – Screening ELISA -1: Confluent hybridoma culture supernatants were added to 96-well microtiter plates (NUNC MaxiSorp, GIBCO BRL) coated with rhGS at 2 µg/ml in 100 mM carbonate buffer, pH 9.6. The excess binding sites were blocked by bovine serum albumin (BSA) in PBS, pH 7.4. After washing the plate with PBS containing 0.05 % Tween
25 20 (WB), 100 µL culture supernatants containing the monoclonal antibodies were incubated with the immobilized antigen for 1 hour at 37°C. After washing, peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Lab, Inc., West Grove, Pa.) was added and incubated for 30 minutes at room temperature (RT) on a orbital shaker. After washing, TMB substrate solution (Sigma) was added. After 5 minutes incubation at RT in dark, the reaction was stopped with 1 M H₂SO₄ and optical density was read at 450 nm. Selected positive
30 cultures were subjected to cloning by the limiting dilution method as described by Fuller et al. (see above reference). ELISA screening and cloning procedures were repeated until culture

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

14

stability and clonality were obtained. (2) Screening ELISA-2 : In the second method, monoclonal antibodies in the hybridoma culture supernatant were captured via goat anti-mouse IgG₁ (Jackson ImmunoResearch) immobilized on the solid-phase of ELISA plate. After 1 hour incubation at 37°C, the plate was washed as for method-1. Then biotinylated GS (prepared using Biotin Labeling Kit from Boehringer Mannheim following the manufacturer's recommendation) diluted 1/2000 dilutions in PBS with 0.5 % BSA was added to each well. After 30 minutes incubation at RT on a shaker, plate was washed and HRP-conjugated streptavidin (Boehringer Mannheim) at 1/10,000 was added and incubated for 30 minutes at RT. After washing, TMB substrate solution was added and reaction was read as
5
10 for method-1.

To develop an ELISA assay, two clones designated as 1G3 and 5G4 were selected. These clones were deposited, in accordance with the Budapest Treaty, with the American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 on April 25, 2001 under Accession Number PTA-3339 and PTA-3340, respectively. In accordance with
15 37 CFR 1.808, the depositors assure that all restrictions imposed on the availability to the public of the deposited materials will be irrevocable removed upon the granting of a patent.
Production of monoclonal antibody:

The GS-specific monoclonal antibody was produced using ascites. Ascites were produced in Balb/c mice previously treated with 0.25 ml pristane by injecting
20 intraperitoneally with $1 - 5 \times 10^6$ hybridoma cells in 0.25 - 0.5 ml PBS, pH 7.4. Ten to 14 days later, ascites were collected. The monoclonal antibody from ascites was purified on affinity column (Protein G, AVIDAL), using known procedures. The purified monoclonal antibody was used for immunochemical studies.

Polyclonal antibody production and purification:

25 Goats were immunized with biweekly 250 - 500 µg intramuscular and/or subcutaneous injections of purified rhGS emulsified in Freund's adjuvant. Titer was monitored routinely by screening serum by a half-sandwich ELISA. Polyclonal antibodies (PAb) specific for GS were subsequently purified from goat serum by affinity purification using cyanogen bromide activated sepharose-4B (Pharmacia) coupled to recombinant GS.
30 The purified polyclonal antibodies were dialyzed against 10 mM PBS, pH 7.4, concentrated by ultrafiltration and stored at -20 °C.

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

15

Diagnostic Assays and Detection of GS in Biological Samples:

Another purpose of the present invention is to provide reagents for use in diagnostic assays for the detection of GS from individuals suffering from Alzheimer's disease.

In one mode of this embodiment, GS of the present invention may be used as antigens
5 in immunoassays for the detection of those individuals suffering from AD. The protein, GS of the present invention may be used in any immunoassay system known in the art including, but not limited to: radioimmunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), "sandwich" assays, precipitin reactions, gel diffusion immunodiffusion assay, agglutination assay, fluorescent immunoassays, protein A or G immunoassays and immunoelectrophoresis
10 assays. According to the present invention, monoclonal or polyclonal antibodies produced against human GS are useful in an immunoassay on samples of blood or blood products such as serum, plasma or the like, spinal fluid or other body fluid, e.g. saliva, urine, lymph, and the like, to diagnose patients with AD. Alzheimer's dementia may be determined by utilizing a single monoclonal antibody or a plurality of monoclonal antibodies, singly or combined,
15 which are specific against human glutamine synthetase.

The antibodies can be used in any type of immunoassay. This includes both the two-site sandwich assay and the single site immunoassay of the non-competitive type, as well as in traditional competitive binding assays.

Particularly preferred, for ease and simplicity of detection, and its quantitative nature,
20 is the sandwich or double antibody assay of which a number of variations exist, all of which are contemplated by the present invention. For example, in a typical sandwich assay, unlabeled antibody is immobilized on a solid phase, e.g. microtiter plate, and the sample to be tested is added. After a certain period of incubation to allow formation of an antibody-antigen complex, a second antibody, labeled with a reporter molecule capable of inducing a
25 detectable signal, is added and incubation is continued to allow sufficient time for binding with the antigen at a different site, resulting with a formation of a complex of antibody-antigen-labeled antibody. The presence of the antigen is determined by observation of a signal which may be quantitated by comparison with control samples containing known amounts of antigen.

30 Clinical Studies:

A prospective observational pilot study was carried out at three geriatric clinics. The

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

16

study evaluated 38 patients who came to the clinic, wherein Mini Mental State Examination (MMSE) examination and other routine tests were given. Of those, 24 were diagnosed as AD and 14 with other types of dementia other than AD. The mean age of the patients presenting with Alzheimer's dementia was approximately 79 years with an age range of from 54 to 87 years. Mini Mental State Examination score (MMSE) was recorded. Blood sample was obtained, and after clotting, the sample was centrifuged and aliquots of serum were frozen and stored at 70°C until analysis for S100, NSE and GS was performed.

Control subjects included 153 healthy blood donors (age range from 18 - 87 years: median age 71.03 ± 9.95 years) whose blood samples were used to determine reference values for concentrations of S100, NSE and GS.

Alzheimer's disease is recognized as a progressive disease process which begins in the basal neocortex, spreads to the hippocampus, and eventually invades all cortical areas. There is no remission in the disease course (Braak and Braak, *Neurobiol Aging* 1997;18(4):351). This indicates that AD is a disease process and not simply a product of aging. AD pathogenesis involves steady and progressive destruction of neurons. Although NSE does not have specificity for AD, the marker contributes as an indicator of on-going destruction of neurons. Utilizing the monoclonal antibody instantly disclosed for human GS, an elegant, sensitive and specific assay for AD is made possible when the protein is analyzed in non-CSF bodily fluids. This is unlike prior art assays, wherein the markers were specific to non-human GS, and no definitive data could be derived from sera or any other non-CSF bodily fluid. S100 does not have the sensitivity, but it is a useful marker to monitor acute events in the brain (e.g. TIA, stroke, hypoxia leading to ischemic events, etc) which are common events among older individuals who are the target population of AD.

All reference values are reported as mean + 2SD. The reference values for the three markers are: GS = 0.022 ng/ml, NSE = 8.34 ng/ml and S 100 = 0.02 ng/ml.

The levels of S100 and NSE were analyzed using SMART S100 and SMART NSE ELISA assay kit, respectively, available from Syn-X Pharma Inc., Mississauga, Ont, CANADA. For the GS assay, antibody reagents and calibrator (i.e. recombinant human GS) were produced at Syn-X Pharma, and ELISA assay was developed as described above.

The box whisker plots in Fig. 3 depict the analysis of serum concentrations of GS protein in healthy individuals categorized on the basis of age. Interestingly, the individuals in

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

17

their 60's show significantly higher levels of GS in blood in comparison to the other younger age groups. However, the mean GS level in blood of individuals 70+ go down similarly to those observed in their 20's and 40's. A similar pattern is observed with S100 protein. On the other hand, age distribution of NSE serum concentration is different from the other two markers in which significantly higher concentrations were observed in the age group of 14 to 40 years. There was no relationship of serum levels of these three proteins to sex. While not wishing to be bound by any particular theories, it was hypothesized that those in their 60's with elevated GS (and/or S100) are indeed already developing brain deterioration, and such individuals in their 70's become classified as "patients" and remaining so-called "healthy" individuals are well fit health-wise and show low levels of these protein markers. Thus, it was concluded that focusing upon GS levels in the 60's age group is especially valuable as a diagnostic for risk-assessment studies.

Of the 24 MMSE-based AD serum samples, 20 were mild AD cases, and 4 were moderate (See Figure 1). The sensitivity of the three markers, i.e. GS, NSE and S100B were 100%, 33% and 8% respectively. The GS level correlates well with the severity of AD, i.e. MMSE score, while similar correlation is not observed with NSE. The sensitivity of S100 is very low, however, when this marker is elevated it may be an indication of ongoing destruction of astrocytes in the brain due to acute events.

Of the 14 non-AD dementia samples, only one sample shows an elevated level in both GS and S100, while 7 samples exhibit a concentration of NSE above the cut-off level (Figure 2). This indicate GS and S100 to be highly specific markers for AD.

All patents and publications mentioned in this specification are indicative of the levels of those skilled in the art to which the invention pertains. All patents and publications are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication was specifically and individually indicated to be incorporated by reference. It is to be understood that while a certain form of the invention is illustrated, it is not to be limited to the specific form or arrangement of parts herein described and shown. It will be apparent to those skilled in the art that various changes may be made without departing from the scope of the invention and the invention is not to be considered limited to what is shown and described in the specification and drawings.

One skilled in the art will readily appreciate that the present invention is well adapted

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

18

to carry out the objects and obtain the ends and advantages mentioned, as well as those inherent therein. The oligonucleotides, peptides, polypeptides, biologically related compounds, methods, procedures and techniques described herein are presently representative of the preferred embodiments, are intended to be exemplary and are not intended as
5 limitations on the scope. Changes therein and other uses will occur to those skilled in the art which are encompassed within the spirit of the invention and are defined by the scope of the appended claims. Although the invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described
10 modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in the art are intended to be within the scope of the following claims.

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

19

CLAIMS

What is claimed is:

Claim 1. A method for diagnosing and differentiating Alzheimer's dementia in a mammal comprising:

obtaining a sample of body fluid from said mammal;
contacting said sample with at least one antibody which specifically binds to a biochemical marker of Alzheimer's disease;
determining a presence of said biochemical marker in said sample; and
correlating the presence of said biochemical marker with the occurrence of Alzheimer's dementia.

Claim 2. A method for distinguishing Alzheimer's dementia from non-AD dementia in a mammal exhibiting clinical manifestations indicative of dementia, comprising:

obtaining a sample of a body fluid from said mammal;
contacting said sample with at least one antibody having specific binding properties for a biochemical marker of Alzheimer's disease;
measuring a level of said biochemical marker in said sample; and
correlating said measured level of said biochemical marker with statistically significant levels indicative of Alzheimer's and non-Alzheimer's dementia;
whereby a differential diagnosis between AD and non-AD dementia is determined.

Claim 3. A method as in claim 1 or 2, wherein said biochemical marker is human glutamine synthetase.

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

20

Claim 4. A method as in claim 1 or 2, wherein said sample of body fluid is blood or any blood product.

Claim 5. A method as in claim 1 or 2, wherein said antibody is at least one monoclonal antibody specific for human GS.

Claim 6. A method as in claim 1 or 2, wherein said measuring of said sample is by an immunoassay technique.

Claim 7. A diagnostic kit for diagnosing and monitoring the progression of Alzheimer's dementia comprising:

at least one antibody which is specific for at least one marker indicative of Alzheimer's dementia, said antibody or marker immobilized on a solid support;
and at least one labeled antibody, which binds to said marker;
whereby at least one analysis to determine a presence of a marker, an antibody specific thereto, or their immunologically detectable fragments, is carried out on a sample of a body fluid.

Claim 8. The kit of claim 7 wherein said marker is human glutamine synthetase and said antibody is at least one monoclonal antibody specific therefore.

Claim 9. A kit as in claim 7 wherein said sample of body fluid is blood or a blood product.

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

21

Claim 10. A kit as in claim 7 wherein diagnosing and monitoring is carried out on a single sample of body fluid.

Claim 11. A kit as in claim 7 wherein diagnosing and monitoring is carried out on multiple samples of body fluid; such that at least one analysis is carried out on a first sample of body fluid and at least another analysis is carried out on a second sample of body fluid.

Claim 12. A kit as in claim 11 wherein said first and second samples of body fluid are obtained at different time periods.

Claim 13. A hybridoma cell line 1G3 deposited with American Type Culture Collection under Accession Number PTA-3339.

Claim 14. A monoclonal antibody produced from hybridoma cell line 1G3 deposited with American Type Culture Collection under Accession Number PTA-3339.

Claim 15. A method of detecting human glutamine synthetase in a sample using a monoclonal antibody produced from hybridoma cell line 1G3, deposited with American Type Culture Collection under Accession Number PTA-3339, which comprises contacting the sample with the monoclonal antibody to effect an immunoreaction between the glutamine synthetase in the sample and the monoclonal antibody; and detecting the immunoreaction.

Claim 16. A hybridoma cell line 5G4, deposited with American Type Culture Collection under Accession Number PTA-3340.

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

22

Claim 17. A monoclonal antibody produced from hybridoma cell line 5G4 deposited with American Type Culture Collection under Accession Number PTA-3340.

Claim 18. A method of detecting human glutamine synthetase in a sample using a monoclonal antibody produced from hybridoma cell line 5G4, deposited with American Type Culture Collection under Accession Number PTA-3340, which comprises contacting the sample with the monoclonal antibody to effect an immunoreaction between the glutamine synthetase in the sample and the monoclonal antibody; and detecting the immunoreaction.

Claim 19. Polyclonal antibodies produced against human glutamine synthetase in at least one animal host.

Claim 20. An antibody that specifically binds human glutamine synthetase or immunologically detectable fragments thereof.

Claim 21. The antibody of claim 20 that is a monoclonal antibody.

Claim 22. The antibody of claim 20 that is a polyclonal antibody.

Claim 23. The antibody of claim 20 that is an antibody fragment.

Claim 24. A diagnostic kit comprising the antibody of claim 20.

Claim 25. A diagnostic kit for diagnosing and monitoring the progression of Alzheimer's dementia comprising:

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

23

at least one antibody produced against human glutamine synthetase which is specific for at least one brain associated marker indicative of Alzheimer's dementia, said antibody or marker immobilized on a solid support;

and at least one labeled antibody, which binds to said marker;

whereby at least one analysis to determine a presence of said marker, an antibody specific thereto, or their immunologically detectable fragments, is carried out on a sample of a body fluid.

Claim 26. A diagnostic kit for diagnosing and monitoring the progression of Alzheimer's dementia comprising:

at least one antibody produced against human glutamine synthetase which is specific for at least one brain associated marker indicative of Alzheimer's dementia, said antibody or marker immobilized on a solid support;

and at least one labeled antibody, which binds to said marker;

whereby at least one analysis to determine a presence of said marker, an antibody specific thereto, or their immunologically detectable fragments, is carried out on a sample of blood, or any blood product .

Claim 27. A diagnostic kit for diagnosing and monitoring the progression of Alzheimer's dementia comprising:

at least one monoclonal antibody produced against human glutamine synthetase which is specific for at least one brain associated marker indicative of Alzheimer's dementia, said antibody or marker immobilized on a solid support;

and at least one labeled antibody, which binds to said marker;

whereby at least one analysis to determine a presence of said marker, an antibody

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

24

specific thereto, or their immunologically detectable fragments, is carried out on a sample of a body fluid.

Claim 28. A diagnostic kit for diagnosing and monitoring the progression of Alzheimer's dementia comprising:

at least one monoclonal antibody produced against human glutamine synthetase which is specific for at least one brain associated marker indicative of Alzheimer's dementia, said antibody or marker immobilized on a solid support;

and at least one labeled antibody, which binds to said marker;

whereby at least one analysis to determine a presence of said marker, an antibody specific thereto, or their immunologically detectable fragments, is carried out on a sample of blood, or any blood product .

Claim 29. A diagnostic kit for diagnosing and monitoring the progression of Alzheimer's dementia comprising:

at least one antibody produced against human glutamine synthetase which is specific for brain associated human glutamine synthetase, said antibody or brain associated human glutamine synthetase immobilized on a solid support;

and at least one labeled antibody, which binds to said human glutamine synthetase;

whereby at least one analysis to determine a presence of human glutamine synthetase, an antibody specific thereto, or their immunologically detectable fragments, is carried out on a sample of a body fluid.

Claim 30. A diagnostic kit for diagnosing and monitoring the progression of Alzheimer's dementia comprising:

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

25

at least one antibody which is specific for brain associated human glutamine synthetase, said antibody or brain associated human glutamine synthetase immobilized on a solid support;

and at least one labeled antibody, which binds to said human glutamine synthetase;

whereby at least one analysis to determine a presence of human glutamine synthetase, an antibody specific thereto, or their immunologically detectable fragments, is carried out on a sample of blood or any blood product.

Claim 31. A diagnostic kit for diagnosing and monitoring the progression of Alzheimer's dementia comprising:

at least one antibody which is specific for monomeric brain associated human glutamine synthetase having a weight of about 44 kDa, said antibody or brain associated human glutamine synthetase immobilized on a solid support;

and at least one labeled antibody, which binds to said human glutamine synthetase;

whereby at least one analysis to determine a presence of monomeric brain associated human glutamine synthetase having a weight of about 44 kDa, an antibody specific thereto, or their immunologically detectable fragments, is carried out on a sample of a body fluid.

Claim 32. A diagnostic kit for diagnosing and monitoring the progression of Alzheimer's dementia comprising:

at least one antibody which is specific for monomeric brain associated human glutamine synthetase having a weight of about 44 kDa, said antibody or brain associated human glutamine synthetase immobilized on a solid support;

and at least one labeled antibody, which binds to said human glutamine synthetase;

whereby at least one analysis to determine a presence of monomeric brain associated

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

26

human glutamine synthetase having a weight of about 44 KDa, an antibody specific thereto, or their immunologically detectable fragments, is carried out on a sample of blood or any blood product.

Claim 33. A diagnostic kit for diagnosing and monitoring the progression of Alzheimer's dementia comprising:

at least one monoclonal antibody which is specific for monomeric brain associated human glutamine synthetase having a weight of about 44 kDa, said antibody or brain associated human glutamine synthetase immobilized on a solid support;

and at least one labeled antibody, which binds to said human glutamine synthetase;

whereby at least one analysis to determine a presence of monomeric brain associated human glutamine synthetase having a weight of about 44 kDa, an antibody specific thereto, or their immunologically detectable fragments, is carried out on a sample of a body fluid.

Claim 34. A diagnostic kit for diagnosing and monitoring the progression of Alzheimer's dementia comprising:

at least one monoclonal antibody which is specific for monomeric brain associated human glutamine synthetase having a weight of about 44 kDa, said antibody or brain associated human glutamine synthetase immobilized on a solid support;

and at least one labeled antibody, which binds to said human glutamine synthetase;

whereby at least one analysis to determine a presence of monomeric brain associated human glutamine synthetase having a weight of about 44 kDa, an antibody specific thereto, or their immunologically detectable fragments, is carried out on a sample of blood or any blood product.

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

27

Claim 35. A method for diagnosing and differentiating Alzheimer's dementia and the progression thereof in a mammal comprising:

obtaining a sample of body fluid from said mammal;

contacting said sample with at least one antibody or antibody fragment selected from the group consisting of antibodies which have specific binding properties for at least one biochemical marker protein selected from the group consisting of the beta isoform of S-100 protein, neuron specific enolase (NSE), and glutamine synthetase (GS) or immunologically detectable fragments thereof, said antibodies capable of being immobilized on a solid support;

further contacting said sample with at least one labeled antibody, wherein each of said labeled antibodies have an affinity for one of said selected biochemical marker proteins,

whereby at least one analysis to determine and measure a presence of each of said markers, an antibody specific thereto, or their immunologically detectable fragments, is carried out on a sample of a body fluid;

determining a presence of each said selected biochemical marker proteins in said sample; and

correlating the presence of each of said selected biochemical marker proteins with the occurrence of Alzheimer's dementia.

Claim 36. A method for distinguishing Alzheimer's dementia from non-AD dementia in a mammal exhibiting clinical manifestations indicative of dementia, comprising:

obtaining a sample of a body fluid from said mammal;

contacting said sample with at least one antibody or antibody fragment selected from the group consisting of antibodies which have specific binding properties for at least one biochemical marker protein selected from the group consisting of the beta isoform of S-100

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

28

protein, neuron specific enolase (NSE), and glutamine synthetase (GS) or immunologically detectable fragments thereof, said antibodies capable of being immobilized on a solid support;

measuring a level of said selected biochemical marker protein in said sample; and correlating said measured level of said selected biochemical marker protein with statistically significant levels indicative of Alzheimer's and non-Alzheimer's dementia; whereby a differential diagnosis between AD and non-AD dementia is determined.

Claim 37. A method as in claim 35 or 36, wherein said at least one biochemical marker protein is human glutamine synthetase.

Claim 38. A method as in claim 35 or 36, wherein said sample of body fluid is blood or any blood product.

Claim 39. A method as in claim 35 or 36, wherein said at least one antibody is a monoclonal antibody specific for human GS.

Claim 40. A method as in claim 35 or 36, wherein said measuring of said sample is by an immunoassay technique.

Claim 41. A diagnostic kit for diagnosing and monitoring the progression of Alzheimer's dementia comprising:

from one to three antibodies which are specific for each of three different marker proteins, said antibodies capable of being immobilized on a solid support, wherein

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

29

- a. a first marker protein is the beta isoform of S100 protein and a first antibody or antibody fragment is specific therefor,
- b. a second marker protein is neuron specific enolase and a second antibody or antibody fragment is specific therefor,
- c. a third marker protein is glutamine synthetase (GS) and a third antibody or antibody fragment is specific therefor,
- d. from one to three labeled antibodies, each of said labeled antibodies binding to one of said marker proteins, and
- e. means for comparing each of said three marker proteins to specific threshold values of each of said marker proteins to determine the presence of statistically significant concentrations thereof of at least about two standard deviations above normal levels;
- whereby at least one analysis to determine a presence of at least one marker, an antibody specific thereto, or their immunologically detectable fragments, is carried out on a sample of a body fluid;
- wherein said step of comparing said three markers confirms the occurrence of Alzheimer's dementia.

Claim 42. The kit of claim 41 wherein said third marker protein is human glutamine synthetase and said antibody or antibody fragment is at least one monoclonal antibody specific therefor.

Claim 43. A kit as in claim 41 wherein said sample of body fluid is blood or any blood product.

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

30

Claim 44. A kit as in claim 41 wherein said diagnosing and monitoring is carried out on a single sample of body fluid.

Claim 45. A kit as in claim 41 wherein said diagnosing and monitoring is carried out on multiple samples of body fluid; such that at least one analysis is carried out on a first sample of body fluid and at least another analysis is carried out on a second sample of body fluid.

Claim 46. A kit as in claim 45 wherein said first and second samples of body fluid are obtained at different time periods.

Claim 47. The method for diagnosing and differentiating Alzheimer's dementia and the progression thereof in accordance with claim 35 wherein:

said antibody for detecting glutamine synthetase is a monoclonal antibody or antibody fragment produced from hybridoma cell line 5G4 deposited with American Type Culture Collection under Accession Number PTA-3340.

Claim 48. The method for distinguishing Alzheimer's dementia from non-AD dementia in a mammal exhibiting clinical manifestations indicative of dementia in accordance with claim 36 wherein:

said antibody for detecting glutamine synthetase is a monoclonal antibody or antibody fragment produced from hybridoma cell line 5G4 deposited with American Type Culture Collection under Accession Number PTA-3340.

Claim 49. The diagnostic kit for diagnosing and monitoring the progression of

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

31

Alzheimer's dementia in accordance with claim 41 wherein:

said antibody for detecting glutamine synthetase is a monoclonal antibody or antibody fragment produced from hybridoma cell line 5G4 deposited with American Type Culture Collection under Accession Number PTA-3340.

Claim 50. The method for diagnosing and differentiating Alzheimer's dementia and the progression thereof in accordance with claim 35 wherein:

said antibody for detecting glutamine synthetase is a monoclonal antibody or antibody fragment produced from hybridoma cell line 1G3 deposited with American Type Culture Collection under Accession Number PTA-3339.

Claim 51. The method for distinguishing Alzheimer's dementia from non-AD dementia in a mammal exhibiting clinical manifestations indicative of dementia in accordance with claim 36 wherein:

said antibody for detecting glutamine synthetase is a monoclonal antibody or antibody fragment produced from hybridoma cell line 1G3 deposited with American Type Culture Collection under Accession Number PTA-3339.

Claim 52. The diagnostic kit for diagnosing and monitoring the progression of Alzheimer's dementia in accordance with claim 41 wherein:

said antibody for detecting glutamine synthetase is a monoclonal antibody or antibody fragment produced from hybridoma cell line 1G3 deposited with American Type Culture Collection under Accession Number PTA-3339.

WO 02/088706

PCT/CA02/00563

32

Claim 53. The method of claim 35 wherein said mammal is a human.

Claim 54. The method of claim 36 wherein said mammal is a human.

FIGURE I
AD samples (Serum).

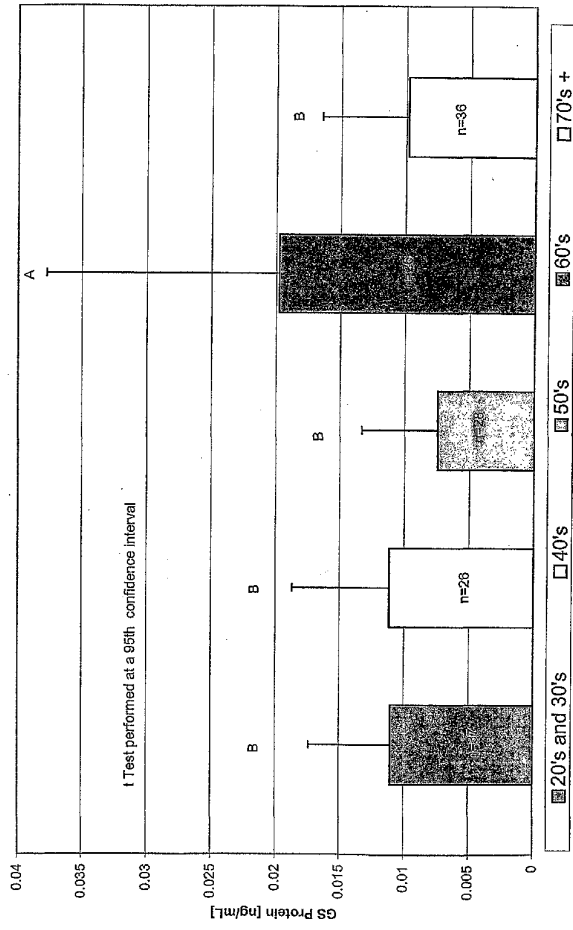
Syn-X CODE	Age	Sex	SI100B (ng/ml) Cut-off=0.02	NSE (ng/ml) Cut-off=8.34	GS (ng/ml) Cut-off=0.022	History, Diagnosis : MMSE	20-30-mild 10-19 moderate 0-9 severe
ADH-011	66	M	0.010	9.065	0.058	22	mild AD
ADH-012	79	M	0.008	4.253	0.023	14	moderate AD
ADH-013	76	M	0.005	6.166	0.068	17	moderate AD
ADH-014	85	F	0.009	4.784	0.162	17	moderate AD
ADH-015	81	M	0.011	8.608	0.058	25	mild AD
ADH-016	83	F	0.009	14.679	0.077	22	mild AD
ADH-017	84	F	0.015	10.724	0.092	22	mild AD
ADH-018	87	F	0.011	4.651	0.042	21	mild AD
ADH-019	74	F	0.010	6.211	0.131	22	mild AD
ADH-020	74	M	0.004	3.504	0.035	25	mild AD
ADH-021	77	M	0.006	1.888	0.045	20	mild AD
ADH-022	84	M	0.010	4.784	0.049	23	mild AD
ADH-023	79	M	0.009	7.698	0.052	27	mild AD
ADH-024	87	M	0.014	8.699	0.071	20	moderate AD
ADH-025	75	F	0.009	5.853	0.036	21	mild AD
ADH-026	79	F	0.006	6.750	0.043	24	mild AD
ADH-027	81	M	0.005	3.284	0.048	23	mild AD
ADH-028	54	M	0.006	4.121	0.022	21	mild AD / poss VaD
ADH-029	82	F	0.004	12.969	0.080	23	mild AD
ADH-030	81	F	0.009	4.563	0.048	24	mild AD
ADH-031	83	F	0.009	16.316	0.067	20	mild AD
ADH-032	84	F	0.017	3.460	0.029	24	mild AD
ADH-033	87	F	0.020	2.628	0.067	21	mild AD
ADH-034	74	F	0.022	9.111	0.070	22	mild AD
Sensitivity			8 %	33 %	100 %		

FIGURE 2
Non-AD Dementia Controls

DC-1 Syn-X CODE	Age	Sex	S100B (ng/ml) Cut-off=0.02	NSE (ng/ml) Cut-off=8.34	CS (ng/ml) Cut-off=0.022	History, Diagnosis
DC-001	86	M	0	3.816	0.019	mild dementia
DC-002	69	M	0	3.816	0.008	mild dementia (AS), Angina
DC-003	74	F	0	28.097	0.010	severe dementia (AS)
DC-004	52	M	0	5.831	0.003	ValD
DC-005	61	F	0.007	6.220	0.016	FTD, progressive speech problem
DC-006	75	M	0.015	5.261	0.011	ValD, Hypothyroidism
ADH-009	86	F	0.009	4.386	0.02	Dementia - type unknown
ADH-037	78	M	0.008	10.585	0.042	LBD
AD-042	78	M	0.001	8.146	0.015	16 moderate ValD
AD-069	86	F	0.002	15.731	0.015	25 mild ValD
AD-078	56	M	0.004	17.589	0.010	21 mild FTD
AD-082	72	F	0.017	24.562	0.019	26 mild MCI
AD-084	51	F	0.011	10.515	0.006	4 severe FTD
AD-086	67	F	0.025	32.101	0.013	20 mild CBD
Specificity			93 %	50 %	93 %	

MCI : mild cognitive impairment, CBD : corticobasal degeneration, FTD : fronto-temporal dementia, ValD : vascular dementia
LBD or DLBD : dementia with Lewy bodies

FIGURE 3
GLUTAMINE SYNTHETASE LEVELS WITH AGE



【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 November 2002 (07.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/088706 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68, 33/573, C07K 16/40, C12N 5/12
- (21) International Application Number: PCT/CA02/00563
- (22) International Filing Date: 24 April 2002 (24.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09/842,079 25 April 2001 (25.04.2001) US
09/971,740 4 October 2001 (04.10.2001) US
- (71) Applicant: SYN.X PHARMA, INC. [CA/CA]; 1 Marmac Drive, Toronto, Ontario M9W 1E7 (CA).
- (72) Inventors: JACKOWSKI, George, 17725 Keele Street R1, Kettleby, Ontario L0G 1J0 (CA); TAKAHASHI, Miyoko, 65 Franklin Avenue, North York, Ontario M2N 1B8 (CA).
- (74) Agent: SINGLEHURST, John, C.; Finlayson & Singlehurst, 70 Gloucester Street, Ottawa, Ontario K2P 0A2 (CA).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
before the expiration of the time limit for amending the claims, and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 24 April 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/088706 A3

(54) Title: PROCESS FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S DEMENTIA AND DEVICE THEREFOR

(57) Abstract: A method for diagnosing Alzheimer's disease (AD) is disclosed. The method involves directly detecting the presence of a biochemical marker, specifically human glutamine synthetase, in bodily fluid, preferably blood or a blood product. The detection is by an immunoassay incorporating an antibody specific to human glutamine synthetase. In addition, a method for distinguishing between AD and non-AD dementia is disclosed.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA 02/00563
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 G01N33/573 C07K16/40 C12N5/12		
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) IPC 7 G01N C07K C12N		
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) BIOSIS, EPO-Internal, MEDLINE, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	TAKAHASHI MIYOKO ET AL: "Immunoassay for serum glutamine synthetase in serum: Development, reference values, and preliminary study in dementias." CLINICAL CHEMISTRY, vol. 48, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 375-378, XP001121876 ISSN: 0009-9147 the whole document --- -/-	1-54
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 principles or theory underlying the invention
E earlier document not 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		*S* 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 30 January 2003		Date of mailing of the international search report 12/02/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 16 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 549-2044, Tx: ST 651 epo.nl, Fax: (+31-70) 549-3016		Authorized officer Thumb, W

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2002)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern PCT/CA 02/00563
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TUMANI HAYRETTIN ET AL: "Glutamine synthetase in cerebrospinal fluid, serum, and brain: A diagnostic marker for Alzheimer disease?" ARCHIVES OF NEUROLOGY, vol. 56, no. 10, October 1999 (1999-10), pages 1241-1246, XP002227900 ISSN: 0003-9942 cited in the application the whole document ---	1-12, 20, 21, 24, 36, 37, 39, 40, 54
X	BOKSHA IRINA S ET AL: "Glutamine synthetase and glutamine synthetase-like protein from human brain: Purification and comparative characterization." JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 75, no. 6, December 2000 (2000-12), pages 2574-2582, XP002227901 ISSN: 0022-3042 page 2575 -page 2576 page 2578, column 1, paragraph 4 page 2577, column 2, paragraph 3 ---	19, 20, 22, 23, 25, 26, 29-32
Y	---	27, 28, 33, 34
X	WO 00 52476 A (SKYE PHARMATECH INCORPORATED) 8 September 2000 (2000-09-08) page 12, line 17 - line 25 page 16, line 19 - line 24 ---	41, 43-46
Y	US 5 445 937 A (THE UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH FOUNDATION) 29 August 1995 (1995-08-29) cited in the application the whole document column 23, paragraph 4 - paragraph 6 ---	1-54
Y	GUNNERSSEN D ET AL: "DETECTION OF GLUTAMINE SYNTHETASE IN THE CEREBROSPINAL FLUID OF ALZHEIMER DISEASED PATIENTS: A POTENTIAL DIAGNOSTIC BIOCHEMICAL MARKER" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, WASHINGTON, US, vol. 89, no. 24, 15 December 1992 (1992-12-15), pages 11949-11953, XP000384420 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document ---	1-54
	---	-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern application No PCT/CA 02/00563
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TUMANI H ET AL: "Purification and immunocharacterization of human brain glutamine synthetase and its detection in cerebrospinal fluid and serum by a sandwich enzyme immunoassay" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 188, no. 1, 15 December 1995 (1995-12-15), pages 155-163, XP004020947 ISSN: 0022-1759 abstract	1-54
A	LISTRON CHAD D ET AL: "Expression, purification, and characterization of recombinant human glutamine synthetase." BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 328, no. 1, 15 November 1997 (1997-11-15), pages 159-163, XP002227902 ISSN: 0264-6021 abstract	1-54
A	KATO K ET AL: "Concentrations of several proteins characteristic of nervous tissue in cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease." JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE: MN. UNITED STATES 1991, vol. 3, no. 2, 1991, pages 95-99, XP009004174 ISSN: 0895-8696 cited in the application abstract table 1	35-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International Application No. PCT/CA 02/00563
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 1-6, 35-40, 47, 48, 50, 51, 53, 54 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 1, 2, 4, 6, 7, 9-12 (partially) because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p>	
<p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claim(s) 1-6, 35-40, 47, 48, 50, 51, 53, 54 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 1-6, 35-40, 47, 48, 50, 51, 53, 54

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by surgery ("...obtaining a sample of body fluid from said mammal...")(Claims 1-6, 35-40, 47, 48, 50, 51, 53, 54)

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1, 2, 4, 6, 7, 9-12 (partially)

Present claims 1, 2, 4, 6, 7, 9-12 relate to a marker defined by reference to a desirable characteristic or property, namely being a biochemical marker of Alzheimer's disease. The claims cover all possible markers having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such markers. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the biochemical markers by reference to desired property, i.e. being specific for Alzheimer's disease. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to glutamine synthetase, S100 protein and neuronal specific enolase.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Intern. Application No PCT/CA 02/00563	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	Publication date	Publication date
WO 0052476	A	08-09-2000	AU 2788400 A	21-09-2000	
			BR 0008317 A	29-01-2002	
			WO 0052476 A1	08-09-2000	
			CN 1339108 T	06-03-2002	
			EP 1155325 A1	21-11-2001	
			JP 2002538463 A	12-11-2002	
			US 6235489 B1	22-05-2001	
US 5445937	A	29-08-1995	US 5272055 A	21-12-1993	
			AU 687116 B2	19-02-1998	
			AU 8098994 A	08-05-1995	
			CA 2173993 A1	27-04-1995	
			EP 0728216 A1	28-08-1996	
			JP 9504611 T	06-05-1997	
			WO 9511314 A1	27-04-1995	
			AT 209360 T	15-12-2001	
			AU 669872 B2	27-06-1996	
			AU 3324593 A	28-07-1993	
			CA 2125787 A1	08-07-1993	
			DE 69232221 D1	03-01-2002	
			EP 1120654 A2	01-08-2001	
			EP 0646243 A1	05-04-1995	
			JP 7508094 T	07-09-1995	
			JP 3228421 B2	12-11-2001	
			NZ 246469 A	26-10-1995	
			WO 9312755 A2	08-07-1993	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/573	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/577	C 1 2 N 5/00	B

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ジャコウスキー ジョージ
 カナダ国 オンタリオ州 エル0ジー アイジェイ0 ケトルバイ キールストリート アールアイ 17725

(72) 発明者 タカハシ ミヨコ
 カナダ国 オンタリオ州 エム2エヌ アイビー8 ノースヨーク フランクリンアヴェニュー 65

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 CC30 CE12 DA13
 4B065 AA91X AA93Y AB05 AC14 BA08 BA24 BC50 BD14 CA25 CA46
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA75 DA76 EA50 FA71 FA72 GA26

专利名称(译)	阿尔茨海默型痴呆的鉴别诊断及其装置		
公开(公告)号	JP2004527754A	公开(公告)日	2004-09-09
申请号	JP2002585955	申请日	2002-04-24
申请(专利权)人(译)	新-X制药有限公司		
[标]发明人	ジャコウスキー ジョージ タカハシ ミヨコ		
发明人	ジャコウスキー ジョージ タカハシ ミヨコ		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/40 C12N5/10 C12P21/08 G01N33/48 G01N33/566 G01N33/573 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 C07K16/40 C07K2317/20 G01N33/573 G01N2333/4709 G01N2333/4727 G01N2333/9015 G01N2333/988 G01N2800/2821		
FI分类号	G01N33/53.D C07K16/40 C12P21/08 G01N33/566 G01N33/573.A G01N33/577.B C12N5/00.B		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CC30 4B064/CE12 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/BA24 4B065/BC50 4B065/BD14 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/GA26		
代理人(译)	藤村元彦 北島 恒之		
优先权	09/842079 2001-04-25 US 09/971740 2001-10-04 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种诊断阿尔茨海默病 (AD) 的方法。该方法涉及直接检测体液，优选血液或血液制品中生化标志物，特别是人谷氨酰胺合成酶的存在。通过包含对人谷氨酰胺合成酶特异的抗体的免疫测定进行检测。另外，公开了一种用于区分AD和非AD痴呆的方法。

				特許2004-52775 (P2004-52775 (43)公表日 平成16年9月9日(2004.9
(5) Int. Cl. 7	FI			テーマコード (参考)
G01N 33/53	GO1N 33/53	D		4B064
C07K 16/40	CO7K 16/40			4B065
C12N 5/10	C12P 21/08			4H045
C12P 21/08	GO1N 33/566			
G01N 33/566	GO1N 33/573	A		
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 65 頁) 最終頁に			
(2) 出願番号	特願2002-585955 (P2002-585955)	(7) 出願人	501429195	
(6) (2) 出願日	平成14年4月24日 (2002.4.24)		シンエックス・ファルマ・インコーポレ	
(8) 翻訳文提出日	平成15年10月24日 (2003.10.24)		テッド	
(6) 国際出願番号	PCT/CA2002/000563		カナダ国 オンタリオ エム9ダブリュ	
(67) 国際公開番号	W02002/088706		イー7 トロント マーマックドライ	
(67) 国際公開日	平成14年11月7日 (2002.11.7)		1	
(31) 優先権主張番号	09/842,079		6354 Viscount Road	
(32) 優先日	平成13年4月25日 (2001.4.25)		Mississauga, Ontario	
(33) 優先権主張国	米国 (US)		L4V 1H3, Canada	
(31) 優先権主張番号	09/971,740	(74) 代理人	100079119	
(32) 優先日	平成13年10月4日 (2001.10.4)		弁理士 藤村 元彦	
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114568	
			弁理士 北島 恒之	
		(74) 代理人	100109036	
			弁理士 永岡 重幸	
				最終頁に続く