

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6509201号  
(P6509201)

(45) 発行日 令和1年5月15日(2019.5.15)

(24) 登録日 平成31年4月12日(2019.4.12)

(51) Int.Cl.

F I

<b>GO 1 N 33/68</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/68	Z N A
<b>GO 1 N 33/66</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/66	Z
<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	V
<b>GO 1 N 33/15</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/15	Z
<b>GO 1 N 33/50</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/50	Z

請求項の数 18 (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-517686 (P2016-517686)
(86) (22) 出願日	平成26年6月6日(2014.6.6)
(65) 公表番号	特表2016-527480 (P2016-527480A)
(43) 公表日	平成28年9月8日(2016.9.8)
(86) 国際出願番号	PCT/GB2014/051758
(87) 国際公開番号	W02014/195728
(87) 国際公開日	平成26年12月11日(2014.12.11)
審査請求日	平成29年6月5日(2017.6.5)
(31) 優先権主張番号	1310150.6
(32) 優先日	平成25年6月7日(2013.6.7)
(33) 優先権主張国	英国 (GB)

(73) 特許権者	505423678 エレクトロフォレティクス リミテッド イギリス国 WC 1 H 9 B B ロンドン マブレドン プレイス ハミルトン ハ ウス
(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(72) 発明者	マルコム アンドリュウ ワード イギリス国 KT 1 1 3 E P サリー コハム ダウンサイド ブリッジ ロード コヴェハム ハウス シー/オー エレ クトロフォレティクス リミテッド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経変性疾患に関連する方法及び組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者における神経変性疾患又は神経変性性認知症を段階分けするためのデータを取得する方法であって、

(i) 該被験者から得られたタンパク質含有試料において、クラスタリンの糖鎖付加断片の濃度、量、又は発現の程度を決定すること；及び

(ii) (i) で決定された該濃度、量、又は程度を、特定の神経変性疾患、認知症、若しくは疾患の段階を有する対照者、又は神経変性疾患を有しない若しくは神経変性性認知症を有しない対照者由来の基準と比較することを含み、

該クラスタリンの糖鎖付加断片が、64N又は 147N部位グリカンを含み、かつ

【化 1】

HN\*STGCLR (配列番号: 2) ; 及び

LAN\*LTQGEDQYYLR (配列番号: 7) ;

(ここで、「N\*」は、グリカン付着残基を示す)

からなる群から選択され、

該神経変性疾患又は神経変性性認知症が、アルツハイマー病(AD)又は軽度認知障害(MCI)である、前記方法。

【請求項 2】

10

20

前記クラスタリンの糖鎖付加断片が、

a) 64N\_SA1-(HexNAc-Hex)2-コア； 64N\_SA2-(HexNAc-Hex)2-コア； 64N\_SA1-(HexNAc-Hex)3-コア； 64N\_SA2-(HexNAc-Hex)3-コア； 64N\_SA1-(HexNAc-Hex)4-コア； 64N\_SA3-(HexNAc-Hex)3-コア； 64N\_SA2-(HexNAc-Hex)4-コア；及び 64N\_SA3-(HexNAc-Hex)4-コア；並びに

b) 147N\_SA1-(HexNAc-Hex)2-コア； 147N\_SA2-(HexNAc-Hex)2-コア； 147N\_SA1-(HexNAc-Hex)3-コア； 147N\_SA2-(HexNAc-Hex)3-コア； 147N\_SA1-(HexNAc-Hex)4-コア； 147N\_SA3-(HexNAc-Hex)3-コア； 147N\_SA2-(HexNAc-Hex)4-コア；及び 147N\_SA3-(HexNAc-Hex)4-コア

からなる群から選択されるグリカンを含む、請求項1記載の方法。

10

【請求項3】

前記クラスタリンの糖鎖付加断片が、4本鎖グリコフォームである、請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】

前記クラスタリンの糖鎖付加断片の濃度、量、又は発現の程度が、

(i) 該糖鎖付加断片の少なくとも1つの他のアイソフォーム及び/又はグリコフォームと比較して、又は該糖鎖付加断片のすべてのアイソフォーム及び/又はグリコフォームの合計と比較して；或いは

(ii) 該濃度、量、又は発現の程度の1以上の生の値を正規化して、正規化した合計スケールリングした測定値をもたらす、合計スケールリング方法を使用して決定される、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項5】

前記クラスタリンの糖鎖付加断片の4本鎖グリコフォームの濃度、量、又は発現の程度が、該糖鎖付加断片の1以上の、より少ない鎖付加数のグリコフォームと比較して、又は、該糖鎖付加断片のすべてのグリコフォームの合計と比較して決定される、請求項4記載の方法。

【請求項6】

前記クラスタリンの糖鎖付加断片の4本鎖グリコフォームの、該糖鎖付加断片のすべてのグリコフォームの合計に対する割合を決定することを含む、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項7】

配列

【化2】

HN\*STGCLR (配列番号: 2)

を含む又は該配列からなる前記クラスタリンの糖鎖付加断片の4本鎖グリコフォームを、該糖鎖付加断片のすべてのグリコフォームの合計の割合として定量化することを含む、請求項6記載の方法。

【請求項8】

前記対照者由来の基準における4本鎖グリコフォームの相対レベルと比較して、より低い前記被験者からの試料における4本鎖グリコフォームの相対レベルが、該被験者が、前記神経変性疾患又は神経変性性認知症を有する及び/又はより進行した段階の前記神経変性疾患又は神経変性性認知症を有すると予想されることを示す、請求項4～7のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項9】

前記より進行した段階の前記神経変性疾患又は神経変性性認知症が、比較的の高いレベルの海馬萎縮を含む、請求項8記載の方法。

【請求項10】

前記クラスタリンの糖鎖付加断片の、少なくとも2、3、4、又は少なくとも5種のアイソフォーム及び/又はグリコフォームの、濃度、量、又は発現の程度を決定することを含む

50

、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 1】

前記タンパク質含有試料が、血漿、血液細胞、血清、唾液、尿、脳脊髄液(CSF)、細胞擦過物、及び組織生検材料からなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 2】

前記クラスタリンの糖鎖付加断片が、

a)ゲル電気泳動；又は

b)LC-MS/MS、ここで、各グリコフォームの相対量が、選択反応モニタリング質量分析を使用する、同等の重同位体標識された基準グリコフォームに対する比較によって算出される

10

を使用して測定される、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 3】

前記クラスタリンの糖鎖付加断片が、

a)合計スクリーニングされる選択反応モニタリング(SRM)質量分析を使用して測定される；及び/又は

b)標識されない

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 4】

前記重同位体標識された基準グリコフォームが、

a)H、C、N、又はOの1以上の重同位体が前記グリコフォームのペプチド又は糖成分内で置換された合成糖ペプチドであるか；又は

b)同位体質量タグで標識されている濃縮された天然に存在するグリコフォームであり、ここで、該同位体質量タグは、H、C、N、又はOの1以上の重同位体を伴い、かつこうした質量タグは、前記グリコフォームのペプチド又は糖成分と反応することが可能である、請求項 1 2 記載の方法。

20

【請求項 1 5】

前記各グリコフォームの相対量が、同重体質量タグで標識された同等のグリコフォームに対する比較によって算出され、ここで、

(i)前記被験者から採取された組織又は体液の各試料を、同重体質量タグセットのあるメンバーで標識して、標識された分析試料を作製し；

30

(ii)濃縮されたグリコフォームの標準の基準パネルを、2から6の一定分量に分け、各一定分量を、該標識された分析試料と同じ同重体質量タグセットの追加のメンバーで別々に標識し、それぞれ独立に標識された該基準パネルの一定分量を事前に定義した割合で混合して、標準の基準混合物としての臨床上に意義のある濃度曲線を作製し；

(iii)等しい体積の該標識された分析試料と該標準の基準混合物を混合して、MSキャリアプレート試料を形成し；かつ

(iv)ステップ(iii)で調製したMSキャリアプレート試料を、質量分析によって分析する、請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 6】

前記同重体質量タグセットが、タンデム質量タグセットである、請求項 1 5 記載の方法

40

【請求項 1 7】

前記クラスタリンの糖鎖付加断片が、免疫学的測定法によって測定される、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 1 8】

前記免疫学的測定法が、ウェスタンブロットティング、又はELISAを含む、請求項 1 7 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

## 【0001】

## (発明の分野)

本発明は、アルツハイマー病を含めた神経変性疾患に関連する方法及び組成物に関する。具体的には、本発明は、通常状態における発現と比較して、アルツハイマー病状態において差次的に発現されるタンパク質アイソフォームを特定及び記載し、また、特に、アルツハイマー病と関連するタンパク質を特定及び記載する。さらに、本発明は、差次的に発現されるタンパク質アイソフォームを使用する、アルツハイマー病及び他の神経変性性認知症を含めた神経変性疾患の診断の方法を提供する。さらに、本発明は、アルツハイマー病及び他の神経変性性認知症を含めた神経変性疾患の予防及び治療のための化合物の特定及び治療的使用のための方法を提供する。

10

## 【背景技術】

## 【0002】

## (発明の背景)

認知症は、高齢者の公衆衛生上の大きな問題の一つであり、我々の高齢化人口では、世界中で、認知症を患うますます多くの患者が、保険制度に大きな経済的負担を負わせている。認知症を患う患者の半数以上は、アルツハイマー病(AD)を罹患する。ADの有病率及び発症率は、指数関数的に増大することが示されている。欧州でのADの有病率は、年齢60～69歳については0.3%、年齢70～79歳については3.2%、及び年齢80～89歳については10.8%である(Rocca, Hofmanらの文献、1991)。ADの発症後の生存期間は、約5から12年である(Friedlandの文献、1993)。

20

## 【0003】

アルツハイマー病(AD)、すなわち高齢者における認知症の最も一般的な原因は、それに対する治療法が現在存在しない、衰弱性の神経変性疾患である。これは、脳の一部、主に、記憶のコード化に関与する領域である海馬におけるニューロンを破壊する。アルツハイマー病は、認知機能及び機能的自律性の不可逆的な進行性の喪失を引き起こす。ADの初発徴候は、単なる物忘れと間違えられる可能性があるが、最終的にこの疾患と診断される人では、これらの初期徴候が、精神機能低下の、より重篤な症状に、容赦なく進行する。ADが発症するのにかかる時間は、人によって異なることとなるが、進行した徴候としては、重い記憶障害、混乱、言語障害、人格及び行動変化、及び判断力低下が挙げられる。ADを患う人は、非コミュニケーション的かつ敵対的になる可能性がある。この疾患が、深刻な認知症における経過の終わりに近づくと、患者は、自らの面倒を見られなくなり、しばしば、施設収容又は在宅での専門的介護を必要とする。ADと診断された後に何年間も生存する患者もいるが、診断後の平均余命は、8年である。

30

## 【0004】

従来、ADは、脳生検によって又は患者が死亡した後の剖検後に初めて、確定診断することができた。脳における特徴的な斑及び濃縮体病変部の存在を実証するこれらの方法は、依然として、ADの病理学的診断のための至適基準と考えられている。しかし、臨床現場では、脳生検が実施されることは稀であり、診断は、脳脊髄液及び血液中のApoE及びタウタンパク質又は $\beta$ -アミロイドペプチドなどの生化学的マーカーの測定を含めた、一連の神経学的、精神測定的、及び生化学的試験に依存する。

40

## 【0005】

バイオマーカーは、場合により、AD及び他の認知症を診断するための次のステップにおける鍵を有する可能性がある。ADのための診断検査に対する要件を満たす生物学的マーカーは、いくつかの利点を有するであろう。理想的な生物学的マーカーは、脳イメージング及び神経病理学的試験において認められる変性が存在しないうちに、AD症例を、疾患の非常に初期の段階で特定するものであろう。バイオマーカーは、できるだけ早期に治療を開始するための第1の指標であり得、また、新規治療法、特に、神経病理学的変化の発生の予防に焦点を合わせる治療法の有効性のスクリーニングにおいても非常に価値がある可能性がある。本発明の生物学的マーカーの反復測定はまた、疾患の発症及び進行を追いかけるのに有用であろう。

50

## 【 0 0 0 6 】

ADの病理学的特性に関連するマーカー;斑及び濃縮体(A 及びタウ)が、最も広く研究されている。研究によると最も有望なものは、A (1-40)、A (1-42)、及びタウ、又はADにおける両方のタンパク質の組み合わせのCSF濃度である。多くの研究では、CSFにおけるA (1-42)の減少が報告されているのに対し、全A タンパク質又はA (1-40)濃度は、変わらないままである( Ida, Hartmannらの文献、1996; Kanai, Matsubaraらの文献、1998; Andrea sen, Hesseらの文献、1999)。

## 【 0 0 0 7 】

CSFがそれほど望ましくない試料であること、また、アミロイド及びタウを含めたAD病態の「古典的」マーカーが他の流体中では確実に検出可能ではないことを認識して、血清及び血漿などの血液及び血液産物中のさらなるタンパク質マーカーを特定するためのいくつかの試みがなされている。通常状態での発現と比較して、AD状態において差次的に発現される、ある群の血液タンパク質は、WO2006/035237に記載されており、罹患者の脳におけるAD病態と以前から関連付けられているタンパク質クラスタリンが挙げられる。ADにおける潜在的バイオマーカーとしてのクラスタリンの値は、脳脊髄液(CSF)と血液との両方において、様々なグループによって探索されているが、しばしば矛盾した結果を伴っている。CSFクラスタリンレベルと脳において見られるクラスタリンレベルとの間の矛盾に対する一つの可能な解釈は、クラスタリンを測定するための免疫測定法に使用される抗体によって認識されるエピトープを隠すように働く可能性があるタンパク質糖鎖付加の影響である。実際、Nilselidら(2006)は、すべてのグリカン部分が、ELISAによる測定の前にクラスタリンから酵素的に除去された場合にのみ、ヒトCSF中のクラスタリンの正確な定量化が可能であることを実証した。彼らの研究では、クラスタリンの 及び 鎖に対する2種の特異的抗体によって測定されるクラスタリン量が、糖鎖除去後に約70%増大することが発見された。重要なことに、クラスタリンレベルは、男性のAD患者では、健全な男性対照と比較して、概して上昇したが、彼らの研究では、天然に糖鎖付加されたクラスタリンレベルのCSFレベル、又はエクスビボ糖鎖除去タンパク質のCSFレベルを測定するための診断的実用性を示すことができなかつた。さらに、彼らは、ADを患う女性と女性対照群との間のクラスタリンレベルに差がないことを発見した。著者らは、タンパク質の微小不均一性(糖鎖付加、リン酸化など)が疾患の診断又は予測的モニタリングにおける別の有用な標的であり得ることを示唆することによってこれと対抗するのではなく、AD群と対照群との間に、クラスタリン糖鎖付加レベルの全般的な差が存在しないことを結論づけた。

## 【 発明の概要 】

## 【 0 0 0 8 】

(発明の概要)

この不確実な技術と、CSFではなく血液を使用する最小侵襲診断検査を開発したいという望みを踏まえて、本発明者らは、驚いたことに、ヒト血漿中のクラスタリンの糖鎖付加が、高度に不均質であり、今までに40を超える様々なアイソフォームが特定されていることを示した。さらに、わずか8種という小サブセットの特定されたグリコフォームが、ADを患う患者と軽度認知障害を患う患者との間で常に変わずに調節される。さらに、これらの同一のグリコフォームのレベルは、個人の範囲内のADの重症度及び進行の速度を予測することができる。

## 【 0 0 0 9 】

本発明者らは、アルツハイマー病のためのいくつかの血漿バイオマーカーを以前に決定している(その内容が参照により本明細書に組み込まれるUS7,897,361を参照のこと)。しかし、彼らは、免疫測定法及び選択反応モニタリング実験が、二次元ゲル電気泳動(2DE)を使用して同じバイオマーカーについて得られた結果を、完全には再現しないことを発見した。本発明者らは、この違いが、検証実験では再現されなかつた特定の翻訳後事象に起因する可能性があるかどうかを調べた。

## 【 0 0 1 0 】

本発明者らは、驚いたことに、認知症の異なる形態及び病期において差次的に発現され

10

20

30

40

50

る、タンパク質の別のアイソフォーム、例えばグリコフォームが、翻訳後事象によって作り出されることを発見した。したがって、本発明者らは、認知症のためのより有力なバイオマーカーを特定しており、その結果、アルツハイマー病などの認知症の診断、予測、及びモニタリングのための、より上質な方法を提供することができる。

【0011】

特に、本発明者らは、大規模な翻訳後修飾(PTM)を有する、AD及び他の形態の認知症の診断及び予測的モニタリングに有用な血液タンパク質の例を、本明細書で提供し、ここでは、総タンパク質レベルの測定は、十分な診断能力を欠くのに対し、特定のアイソフォームの測定は、疾患の正確な診断及び予後評価を可能にする。

【0012】

概して、本発明は、認知症、具体的には軽度認知障害(MCI)(ADの認識された前駆症状)、AD、並びに単独の、及びアルツハイマー病を伴う混合型認知症としての、血管性認知症、レビー小体型認知症、及び前頭側頭型認知症を含む他の遅発型認知症を含めた、神経変性疾患の診断のための方法及び組成物に関する。

【0013】

本発明者らは、互いに及び/又は通常状態での発現と比較して、それぞれがMCI及びAD状態において差次的に発現される1以上のアイソフォームを有するタンパク質を特定及び記載している。

【0014】

タンパク質は、インピボでは、いくつかの異なる形態で存在し得る。これらの異なる形態は、選択的スプライシングによって;又は対立遺伝子間の変化、例えば一塩基多型(SNP)によって産生される可能性もあるし、糖鎖付加などの翻訳後事象の結果(グリコフォーム)である可能性もある。グリコフォームは、付着したグリカンの数又は型についてのみ異なる、タンパク質のアイソフォームである。

【0015】

本発明は、特定のタンパク質の1以上の異なるアイソフォーム(好ましくはグリコフォーム)の決定に関する。ここでは、前記1以上のアイソフォームは、神経変性疾患又は認知症(例えばMCI又はAD)を患う対象において、健常な(例えば、非認知症)対象よりも多い又は少ない程度で存在する。対象における1以上のアイソフォームのレベルを(基準レベルとの比較の有無にかかわらず)決定することによって、当業者が、神経変性疾患又は認知症、及び/又は前記神経変性疾患又は認知症のレベル、性質、及び程度を診断することが可能になる。

【0016】

本発明のすべての態様では、アイソフォームは、クラスタリン前駆体、アポリポタンパク質A-IV前駆体、アポリポタンパク質C-III前駆体、トランスサイレチン、ガレクチン7、補体C4前駆体、-2-マクログロブリン前駆体、Ig -1鎖C、ヒストン2B、Ig 鎖C領域、フィブリノゲン 鎖前駆体、補体因子H、インター- -トリプシン重鎖H4前駆体、補体C3前駆体、又は アクチン、ハプトグロビン前駆体、又は血清アルブミン前駆体アイソフォームからなる群から選択されるタンパク質バイオマーカーに由来する。

【0017】

好ましい実施態様では、タンパク質バイオマーカーは、-2-マクログロブリン前駆体、フィブリノゲン 鎖前駆体、補体因子H、クラスタリン、及びハプトグロビンからなる群から選択される。

【0018】

さらに好ましい実施態様では、タンパク質バイオマーカーは、クラスタリン(例えば、ヒト、マウス、又はラットクラスタリン、特に、UNIPROTアクセッション番号P10909で開示されたアミノ酸配列;配列番号:1を有するヒトクラスタリン)である。

【0019】

本発明の方法では、これらのバイオマーカーのいずれかが1つ又はそれ以上を使用することができることが理解されよう。例えば、いくつかのバイオマーカーを選択して、複数の

10

20

30

40

50

バイオマーカー(例えば、少なくともクラスタリン、及び任意に -2-マクログロブリン前駆体、フィブリノゲン鎖前駆体、補体因子H、及びハプトグロビン)を含むバイオマーカーパネルを作製することができる。

【0020】

本発明は、健康な対象と比較した場合に認知症対象において差次的な存在量を示す、タンパク質由来のアイソフォームの検出及び定量化に関するが、本発明者らは、クラスタリンに関する研究を通して本発明に至った。しかし、当業者には、本明細書に提供される例によって、本発明を、他の糖鎖付加タンパク質バイオマーカーを使用して実施することが可能になることが明らかであろう。

【0021】

すべての態様では、本発明の方法は、すべての形態の神経変性疾患又は認知症に、特に軽度認知障害(MCI)などのアルツハイマー病の前兆段階、並びに進行したアルツハイマー病に関して使用することができる。しかし、便宜上、本発明の以下の態様及び実施態様は、特にMCI及びADに関する。しかし、本発明の方法が、単独又は組み合わせで、一般に神経変性疾患又は認知症に、或いはMCI及びAD以外の特定の形態の認知症に、等しく関連し得ることが理解されよう。

【0022】

第1の態様では、本発明は、対象におけるアルツハイマー病などの神経変性疾患又は神経変性性認知症を診断又は評価する方法であって、前記対象からの組織試料又は体液試料中のタンパク質バイオマーカーの1以上の異なるアイソフォーム、好ましくはグリコフォームを検出することを含む前記方法を提供する。

【0023】

好ましくは、該方法は、(例えば、対象から単離、抽出、又は別途入手された試料に対して実施される)インビトロ方法である。

【0024】

好ましくは、タンパク質バイオマーカーは、アポリポタンパク質A-IV前駆体、アポリポタンパク質C-III前駆体、トランスサイレチン、ガレクチン7、補体C4前駆体、-2-マクログロブリン前駆体、Ig -1鎖C、ヒストン2B、Ig鎖C領域、フィブリノゲン鎖前駆体、補体因子H、インター-トリプシン重鎖H4前駆体、補体C3前駆体、クラスタリン前駆体、又はアクチン、ハプトグロビン前駆体、又は血清アルブミン前駆体アイソフォームからなる群から選択される。

【0025】

好ましい実施態様では、タンパク質バイオマーカーは、-2-マクログロブリン前駆体、フィブリノゲン鎖前駆体、補体因子H、クラスタリン、及びハプトグロビンからなる群から選択される。

【0026】

さらに好ましい実施態様では、タンパク質バイオマーカーは、クラスタリン(例えば、UniProtアクセッション番号P10909で開示されたアミノ酸配列;配列番号:1を有するヒトクラスタリン)である。ヒト以外の種(例えば、他の哺乳類の種、例えば非ヒト霊長類、げっ歯類(例えばマウス又はラット)、実験動物など)からの同等のクラスタリン配列を、本発明において代わりに使うことができることが、当業者によって理解されるであろう。例えば、疾患のげっ歯類モデルにおける神経変性性認知症のための新規治療の有効性を決定するために本発明を使用する場合、適切なげっ歯類種の配列(例えば、マウスクラスタリン(UniProtアクセッション番号Q06890、配列バージョン1、1995年2月1日付け)、又はラットクラスタリン(UniProtアクセッション番号P05371、配列バージョン2、1994年2月1日付け))を使用するべきである。

【0027】

先に列挙したバイオマーカーのそれぞれについて、本発明は、対象のためのアイソフォームプロファイルを確立するために組み合わせで使用することができる、バイオマーカーパネル中の1以上のアイソフォームを提供する。このプロファイルを、基準プロファイル

10

20

30

40

50

、同一対象からあらかじめ取得したプロファイル、又は対照者から取得したプロファイルと比較することができる。

【0028】

すべての態様について、バイオマーカーパネルは、2以上、3以上、4以上、又は5以上のアイソフォームを含むことができる。

【0029】

すべての態様について、それぞれが異なるタンパク質マーカータンパク質(例えばクラスタリン及び $\alpha$ -2-マクログロブリン前駆体)に関連する、複数のバイオマーカーパネルを使用することができる。

【0030】

本発明によれば、被験者における神経変性疾患又は神経変性性認知症を診断又は評価するための方法であって、以下を含む前記方法が提供される：

(i)被験者から得られたタンパク質含有試料を提供することと；

(ii)クラスタリン前駆体；アポリポタンパク質A-IV前駆体；アポリポタンパク質C-III前駆体；トランスサイレチン；ガレクチン7；補体C4前駆体； $\alpha$ -2-マクログロブリン前駆体；IgG鎖C；ヒストン2B；IgG鎖C領域；フィブリノゲン鎖前駆体；補体因子H；インター- $\alpha$ -トリプシン重鎖H4前駆体；補体C3前駆体；又はアクチン；ハプトグロビン前駆体；及び血清アルブミン前駆体、又はこれらの断片からなる群から選択されるタンパク質バイオマーカーに由来する少なくとも1種の特定のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームの濃度、量、又は発現の程度を決定することと；

(iii)(ii)で決定された前記濃度、量、又は程度を、特定の神経変性疾患、認知症、又は疾患の段階を患う対照者、又は神経変性疾患を有しない若しくは神経変性性認知症を有しない対照者由来の基準と比較することと；

(iv)被験者におけるタンパク質バイオマーカーの少なくとも1種の特定のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームの、基準に対するレベルに基づいて、被験者の神経変性疾患又は神経変性性認知症の存在及び/又は段階に関する診断又は評価を行うこと。

【0031】

いくつかの場合では、少なくとも1種の特定のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームは、クラスタリン前駆体に由来する。具体的には、前記少なくとも1種の特定のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームは、以下を含むことができる：

ヒトクラスタリンのグリコフォーム；又は

ヒトクラスタリンアミノ酸配列の少なくとも5、6、7、8、9個、若しくは少なくとも10個の連続するアミノ酸を含む、ヒトクラスタリンの糖鎖付加断片。ここでは、前記断片は、N-結合型又はO-結合型グリカンを含む。本発明による使用が考慮されるヒトクラスタリンの特定の糖鎖付加断片としては、以下が含まれる：

【化1】

HN\*STGCLR (配列番号：2)；

KEDALN\*ETR (配列番号：3)；

KKEDALN\*ETR (配列番号：4)；

KKKEDALN\*ETR (配列番号：5)；

MLN\*TSSLLEQLNEQFNWVSR (配列番号：6)；

LAN\*LTQGEDQYYLR (配列番号：7)；及び

QLEEFNLN\*QSSPFYFWMWGDR (配列番号：8)；

ELPGVCN\*ETMMALWEECK (配列番号：9)；

LKELPGVCN\*ETMMALWEECKPCLK (配列番号：10)；

ここでは、「N\*」は、グリカン付着残基を示す。

## 【0032】

本発明によるいくつかの場合では、ヒトクラスタリンの前記糖鎖付加断片は、表3A、表3B、表3C、表5、表6、及び/又は表7に記載したクラスタリン糖ペプチドのいずれか1つから選択される。

## 【0033】

本発明によるいくつかの場合では、ヒトクラスタリンの前記糖鎖付加断片は、以下からなる群から選択される 64N-グリカンを含む：

64N\_SA1-(HexNAc-Hex)2-コア； 64N\_SA2-(HexNAc-Hex)2-コア； 64N\_SA1-(HexNAc-Hex)3-コア； 64N\_SA2-(HexNAc-Hex)3-コア； 64N\_SA1-(HexNAc-Hex)4-コア； 64N\_SA3-(HexNAc-Hex)3-コア； 64N\_SA2-(HexNAc-Hex)4-コア；及び 64N\_SA3-(HexNAc-Hex)4-コア。

10

## 【0034】

本発明によるいくつかの場合では、少なくとも1種の特定のタンパク質グリコフォームは、タンパク質バイオマーカーの4本鎖(tetra-antennary)グリコフォームである。

## 【0035】

本発明によるいくつかの場合では、少なくとも1種の特定のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームの濃度、量、又は発現の程度は、

(i)同じタンパク質の少なくとも1つの他のアイソフォーム及び/又はグリコフォームと比較して、又は同じタンパク質のすべてのアイソフォーム及び/又はグリコフォームの合計と比較して；

(ii)前記タンパク質バイオマーカーのうち1つ以外の基準タンパク質と比較して；或いは  
(iii)前記濃度、量、又は発現の程度の1以上の生の値を正規化して正規化された合計スケールリングした(sum-scaled)測定値をもたらす、合計スケールリング(sum-scaling)方法を使用して

20

決定される。特に、4本鎖グリコフォームのタンパク質バイオマーカーの濃度、量、又は発現の程度は、同じタンパク質の1以上の、より少ない鎖付加数のグリコフォーム(例えば、3本鎖又は2本鎖グリコフォーム)と比較して、又は、同じタンパク質のすべてのグリコフォームの合計と比較して決定することができる。

## 【0036】

ある種の場合では、本発明の方法は、タンパク質バイオマーカーの4本鎖グリコフォームの、同じタンパク質のすべてのグリコフォームの合計に対する割合を決定することを含む。

30

## 【0037】

ある種の場合では、本発明の方法は、配列

## 【化2】

HN\*STGCLR (配列番号：2)

を含む又は該配列からなるヒトクラスタリン糖タンパク質断片の4本鎖グリコフォームを、同じ糖タンパク質断片のすべてのグリコフォームの合計に対する割合として定量化することを含む。

## 【0038】

40

本発明の方法の、ある種の場合では、被験者からの試料における、対照者からの基準における4本鎖グリコフォームの相対レベルよりも低い相対レベルの4本鎖グリコフォームは、その被験者が、神経変性疾患又は認知症を有する、及び/又はより進行した段階の神経変性疾患又は認知症を有するか、又はこれを有すると予想されることを示す。特に、これは、対象が、比較的に高いレベルの海馬萎縮を有することを示すことができる。

## 【0039】

本発明によれば、神経変性疾患又は神経変性性認知症は、以下からなる群から選択することができる：アルツハイマー病(AD)、軽度認知障害(MCI)、血管性認知症、レビー小体型認知症、単独、又はADを伴う混合型認知症としての前頭側頭型認知症、パーキンソン病、及びハンチントン病。

50

## 【 0 0 4 0 】

ある種の場合では、本発明の方法は、少なくとも2、3、4、又は少なくとも5種の前記バイオマーカータンパク質のそれぞれの、少なくとも1種の特定のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームの濃度、量、又は発現の程度を決定することを含む。

## 【 0 0 4 1 】

ある種の場合では、本発明の方法は、タンパク質バイオマーカーの又はタンパク質バイオマーカーのそれぞれの、少なくとも2、3、4、又は少なくとも5種の、特定のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームの濃度、量、又は発現の程度を決定することを含む。

## 【 0 0 4 2 】

ある種の場合では、本発明によれば、タンパク質含有試料は、以下からなる群から選択される：血漿、血液細胞、血清、唾液、尿、脳脊髄液(CSF)、細胞擦過物、及び組織生検材料。

## 【 0 0 4 3 】

当業者は、特定のグリコフォームを含めた特定のタンパク質アイソフォームの量又は濃度を測定するために、様々な適切な技術が存在することを認識するであろう。これには、特定のアイソフォームの本発明のタンパク質による免疫化によって産生される非ヒト抗体の使用が含まれる。ここでは、こうした抗体は、診断用アイソフォーム、特にグリコフォームに対して必要とされる特異性を有する。特に、適切なグリカン構造を有する配列ID2~10の合成ペプチドの使用。こうしたペプチドは、天然には見られないので、天然に存在するクラスタリンの消化を介してエクスピボで、又はインピトロ合成化学の使用によって、調製しなければならない。

## 【 0 0 4 4 】

より具体的には、本明細書で意図されるのは、ゲル電気泳動又はLC-MS/MSを使用する測定を含む方法である。

## 【 0 0 4 5 】

いくつかの場合では、各グリコフォームの相対量は、選択反応モニタリング(Selected Reaction Monitoring)質量分析を使用する、同等の重同位体標識された基準グリコフォームに対する比較によって算出される。特に、重同位体標識された基準グリコフォームは、H、C、N、又は0の1以上の重同位体が前記グリコフォームのペプチド又は糖成分内で置換された合成糖ペプチドであり得る。

いくつかの場合では、重同位体標識された基準グリコフォームは、同位体質量タグで標識されている濃縮された天然に存在するグリコフォームである。ここでは、前記同位体質量タグは、H、C、N、又は0の1以上の重同位体を伴い、こうした質量タグは、前記グリコフォームのペプチド又は糖成分と反応することが可能である。

## 【 0 0 4 6 】

いくつかの場合では、各グリコフォームの相対量は、欧州特許第2,115,475号(その内容全体を参照により本明細書に組み込む)に概して開示される通りに、同重体質量タグで標識された同等のグリコフォームに対する比較によって算出される。ここでは、

(i)被験者から採取された組織又は体液の各試料を、同重体質量タグセットのあるメンバーで標識して、標識された分析試料を作製する；

(ii)濃縮されたグリコフォームの標準の基準パネルを、2から6の一定分量に分け、各一定分量を、標識された分析試料と同じ同重体質量タグセットの追加のメンバーで別々に標識し、それぞれ独立に標識された基準パネルの一定分量を、事前に定義した割合で混合して、標準の基準混合物としての臨床的に意義のある濃度曲線を作製する；

(iii)等しい体積の標識された分析試料と標準の基準混合物を混合して、MSキャリアプレート試料を形成する；かつ

(iv)ステップ(iii)で調製したMSキャリアプレート試料を、質量分析によって分析する。具体的には、同重体質量タグセットは、タンデム質量タグセットであり得る。

## 【 0 0 4 7 】

本発明によるある種の場合では、タンパク質含有試料は、以下からなる群から選択される：血漿、血液細胞、血清、唾液、尿、脳脊髄液(CSF)、細胞擦過物、及び組織生検材料。

【0048】

本発明によるある種の場合では、タンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームは、グリコフォームであり、合計スクリーニングされる選択反応モニタリング(SRM)質量分析を使用して測定される。

【0049】

本発明によるある種の場合では、タンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームは、標識されない。

【0050】

本発明によるある種の場合では、該方法は、試料をゲル電気泳動分離にかけることを含まない、及び/又は試料を免疫沈降による濃縮にかけることを含まない。

【0051】

本発明によるある種の場合では、タンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームは、グリコフォームであり、本質的に実施例6に記載した通りの方法によって測定される。

【0052】

本発明によるいくつかの場合では、少なくとも1種の特定のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームは、ウェスタンブロットティング又はELISAなどの免疫学的測定法によって測定することができる。

【0053】

本発明によるいくつかの場合では、該方法は、本明細書の表1A又は1Bに記載した通りの少なくとも5、6、7、8、9、又は少なくとも10種の糖ペプチドの相対的プロファイルを決定することを含む。特に、被験者からの試料中の前記糖ペプチドの相対的割合を、表1A内の「AVG\_A」及び/又は「AVG\_B」列に記載した通りの前記糖ペプチドの相対的割合と比較することができる。

【0054】

本発明によるいくつかの場合では、該方法は、表1A又は1Bに記載した保持時間、m/z値、及び/又は荷電状態値を参考にして、前記糖ペプチドの少なくとも一部分を特定することを含む。

【0055】

さらなる態様では、本発明は、複数の被験者を、該被験者の神経変性疾患又は認知症の段階及び/又は重症度に従って階層化するための方法であって、それぞれの被験者からの少なくとも1つの被検試料に対して、本発明の第1の態様に従う方法を実施することと；

それぞれの被験者におけるタンパク質バイオマーカーの少なくとも1種の特定のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームのレベルに基づいて、該被験者を、より進行した若しくはそれほど進行していない段階の神経変性疾患又は認知症に、又はより重篤な若しくはそれほど重篤でない神経変性疾患又は認知症に階層化することとを含む前記方法を提供する。特に、被験者を、該被験者の予測される海馬萎縮の程度に従って階層化することができる。

【0056】

したがって、本発明は、対象における神経変性状態を診断又は評価する方法であって、(i)認知症を有する疑いがある又は認知症と既に診断されている被験者から、関連組織又は体液の試料(ここでは、こうした試料は、バイオマーカーの1以上のタンパク質アイソフォームを含む)を得るステップと；

(ii)前記関連組織試料又は体液中の、前記バイオマーカーのためのバイオマーカーパネルにおける1以上のタンパク質アイソフォームを検出するステップと；

(iii)前記1以上のタンパク質アイソフォームの存在又は量を、特定の認知症若しくは疾患の段階を患う対照者又は認知症を有しない対照者から採取された同等の関連組織又は体液

10

20

30

40

50

試料の代表的な試料中の前記タンパク質アイソフォームのレベルと比較するステップと；  
 (iv) 対照者に対する、該被験者における1以上のアイソフォームの相対レベルに基づいて、  
 認知症の存在及び/又は段階に関する診断を行うステップと；  
 を含む前記方法を提供する。

【0057】

好ましくは、バイオマーカーパネルは、バイオマーカーの1以上のグリコフォームを含む。

【0058】

アイソフォーム、好ましくはグリコフォームの検出は、ゲル電気泳動を使用することによって、より好ましくはLC-MS/MSによって実施することができる。

10

【0059】

別の態様では、本発明は、ヒト又は動物対象における認知症、例えばMCI又はADの性質又は程度を決定する方法であって、前記対象からの組織試料又は体液試料中のタンパク質バイオマーカーの1以上のアイソフォームを検出することを含む前記方法を提供する。したがって、本発明の方法は、アルツハイマー病の、又はMCIからアルツハイマー病への疾患進行の進行をモニタリングする方法を包含する。予測的方法、例えば、MCIからアルツハイマー病への進行可能性の予測又はアルツハイマー病の期間又は重症度の可能性の予測も包含される。

【0060】

好ましくは、タンパク質バイオマーカーは、アポリポタンパク質A-IV前駆体、アポリポタンパク質C-III前駆体、トランスサイレチン、ガレクチン7、補体C4前駆体、 $\alpha$ -2-マクログロブリン前駆体、IgG $\gamma$ -1鎖C、ヒストン2B、IgG $\gamma$ 鎖C領域、フィブリノゲン鎖前駆体、補体因子H、インター- $\alpha$ -トリプシン重鎖H4前駆体、補体C3前駆体、クラスタリン前駆体、 $\alpha$ 2-アクトニン、ハプトグロビン前駆体、又は血清アルブミン前駆体アイソフォームからなる群から選択される。

20

【0061】

好ましい実施態様では、タンパク質バイオマーカーは、 $\alpha$ -2-マクログロブリン前駆体、フィブリノゲン鎖前駆体、補体因子H、クラスタリン、及びハプトグロビンからなる群から選択される。

【0062】

さらに好ましい実施態様では、タンパク質バイオマーカーは、クラスタリン(UNIPROTアクセス番号P10909；(配列番号:1)である。

30

【0063】

本発明の好ましい態様では、以下を含む方法が提供される：

- (a) 対象から組織の試料又は体液試料を得ることと；
- (b) 試料中のバイオマーカーの1以上のアイソフォームの、又はバイオマーカーの、濃度、存在、非存在、又は程度を決定することと；
- (c) この決定を、こうした決定と臨床情報との間の先の相関を参考にして、又は、非認知症対象に対して行われた決定を参考にして、認知症の性質又は程度と関連付けること。

【0064】

好ましい実施態様では、認知症の(例えばMCIからADへの)進行は、ある期間にわたる連続的決定によって決定することができ、異なる時点でのバイオマーカーの1以上のアイソフォームの濃度、存在、非存在、又は程度の間と比較が行われる。

40

【0065】

この決定は、こうした決定と対照患者における臨床情報との間の先の相関を参考にして、対象におけるADの性質又は程度と関連付けることができる。或いは、進行又は重症度の決定は、同一の対象から採取した、以前の試料中の前記タンパク質アイソフォームの濃度、量、又は発現の程度との比較によって行うことができる。こうした以前の試料は、今回の試験の日付の1週、1か月、3か月、より好ましくは6か月前に採取することができる。複数のこうした以前の試料が、長期的に比較され、かつタンパク質アイソフォーム発現の変

50

化の傾きが、認知機能低下の相関値として算出されることも、本発明の特徴である。

【0066】

好ましくは、バイオマーカーは、アポリポタンパク質A-IV前駆体、アポリポタンパク質C-III前駆体、トランスサイレチン、ガレクチン7、補体C4前駆体、 $\alpha$ -2-マクログロブリン前駆体、Ig G鎖C、ヒストン2B、Ig G鎖C領域、フィブリノゲン鎖前駆体、補体因子H、インター- $\alpha$ -トリプシン重鎖H4前駆体、補体C3前駆体、クラスタリン前駆体、又はアクチン、ハプトグロビン前駆体、又は血清アルブミン前駆体アイソフォームからなる群から選択される。

【0067】

好ましい実施態様では、バイオマーカーは、 $\alpha$ -2-マクログロブリン前駆体、フィブリノゲン鎖前駆体、補体因子H、クラスタリン、及びハプトグロビンからなる群から選択される。

10

【0068】

さらに好ましい実施態様では、バイオマーカーは、クラスタリン(UNIPROTアクセッション番号P10909;(配列番号:1)である。

【0069】

バイオマーカーパネルのタンパク質アイソフォームの決定されたレベルを、他の臨床的及び実験室的評価と共に使用して、MCI、AD、並びに血管性認知症、レビー小体型認知症、及び前頭側頭型認知症を含む単独の、及びアルツハイマー病を伴う混合型認知症としての他の遅発型認知症の診断の信頼度のレベルを高めることは、本発明のさらなる態様である。

20

【0070】

一実施態様では、障害の進行を、本発明の方法を使用することによって追跡して、障害の重症度、例えば、全体的な認知症重症度を決定することができる。別の実施態様では、本発明の方法を使用して、評価の時点までの障害の期間を決定することができる。

【0071】

この方法は、患者の認知症の型、例えば、アルツハイマー病を、当技術分野で利用可能な様々な型の予防的又は治療的治療と関連付け、それによって、患者が治療法に応答する可能性を向上させることを可能にする。

【0072】

いくつかの実施態様では、本発明の方法を実施するために、ある特定のタンパク質の1以上、2以上、又は3以上の異なるアイソフォームが、試料中で検出及び定量化される。さらに好ましい実施態様では、2種以上のタンパク質のアイソフォームが検出され、それによって、アルツハイマー病の性質又は程度の多タンパク質フィンガープリントが提供される。好ましくは、少なくとも4種の異なるタンパク質の1以上のアイソフォームが検出される。

30

【0073】

好都合には、本発明の方法において使用される患者試料は、組織試料又は尿、血液、血漿、血清、唾液、又は脳脊髄液試料などの体液試料であり得る。好ましくは、体液試料は、血液、血清、又は血漿試料である。列挙したものなどの体液の使用が好ましい。何故なら、これらは、対象から、より容易に入手することができるからである。これは、費用、容易さ、速さ、及び対象の健康という点で、明確な利点を有する。血液、血液産物(血漿又は血清など)、及び尿がまた、特に好ましい。

40

【0074】

特定の1以上のタンパク質のタンパク質アイソフォームを検出するステップの前に、試料から最も豊富なタンパク質を除去するための除去ステップを、又はバイオマーカーパネルに含まれるタンパク質の標的化濃縮を、いずれの場合にも例えば免疫捕捉又は一次元若しくは二次元ゲル電気泳動などの当技術分野で周知の方法を使用して行うことができる。

【0075】

本明細書に記載した通りのタンパク質アイソフォームのいずれかが、正常試料又は組織

50

中で、認知症、例えば、MCI又はADを患う対象からの試料又は組織に対して、差次的に発現される(すなわち発現の増大又は低下を示す)可能性がある、又は、独自に存在する又は存在しない可能性がある。タンパク質のすべてのタンパク質アイソフォームが、個々の対象内で差次的に発現されることが必要ではないことや、任意のそれぞれの試験において見られる差次的に発現されるタンパク質アイソフォームの数及び同一性が、異なる対象間で、及び個々の対象について時間と共に、変動することとなることが、当業者に理解されるべきである。タンパク質アイソフォームの特定のサブセットを、診断、予測、及び疾患期間の推定などの様々な目的に使用することができる。各タンパク質については、確実な決定を提供するために、最小数の差次的に発現されるタンパク質アイソフォームが必要とされる。好ましい実施態様では、最低1種のタンパク質アイソフォーム、より好ましくは少なくとも2種、最も好ましくは3種以上のタンパク質アイソフォームが、差次的に発現される。前記1種、2種、3種以上のアイソフォームは、すべて単一のタンパク質のアイソフォームであり得る、又は、2種以上のタンパク質のアイソフォームであり得る。

10

## 【0076】

好ましくは、差次的に発現されるタンパク質アイソフォームの少なくとも1つは、発現後に2つの異なる 及び 鎖(結合してヘテロ二量体を形成する)にプロセッシングされる、糖タンパク質クラスタリン(UNIPROTアクセッション番号P10909;(配列番号:1))のアイソフォーム、又はそのタンパク質分解性断片である。ここでは、前記クラスタリンタンパク質又はタンパク質分解性断片は、少なくとも1つのN-結合型又はO-結合型グリカン構造を含む。

## 【0077】

20

本発明に従って検出される1以上のアイソフォームが、ヒトクラスタリンの差次的に糖鎖付加されたアイソフォームを含むことが最も好ましい。特に、本発明者らは、MCI、AD、及び他の認知症において、グリカン鎖状成分の切断及び/又は完全除去が差次的に起こることを思いがけず発見した。クラスタリン上の特定の鎖状形態のN-結合型グリカンが、海馬萎縮のレベル、すなわちAD及びMCIにおける疾患重症度の周知のマーカーと関連することも、本発明の特徴である。

## 【0078】

選択されたタンパク質の1以上のタンパク質アイソフォームを検出するための方法は、当技術分野で周知であり、質量分析、免疫-質量分析、ウェスタンブロットティング又はELISAなどの免疫測定法、レクチン親和性免疫測定法、ゲル電気泳動、二次元ゲル電気泳動、及び等電点電気泳動(iso-electric focusing)が含まれ得る。

30

## 【0079】

したがって、様々な方法によって、クラスタリン上のグリカン構造の測定を実施することができる。二次元ゲル電気泳動では、グリカン構造内の糖基の付加又は除去が、クラスタリンの見かけの分子質量と等電点電気泳動点との両方に影響を与え、ゲル内のスポットの「トレイン(train)」をもたらすこととなる。こうしたスポットのトレインは、当業者に周知である。例の目的で、認知症を患う疑いがある対象からの血漿タンパク質を、二次元ゲル電気泳動にかける。2次元目の完了後、ゲルを、タンパク質又は糖選択的な色素で染色して、個々のタンパク質スポット又は糖タンパク質スポットをそれぞれ明らかにする。一般的に、ゲル全体の画像を、CCDカメラを使用して取り込み、SameSpots(Non-Linear Dynamics社、UK)などの市販品として入手可能なソフトウェアを使用して、染色強度に基づき、各スポットの相対存在量を算出する。クラスタリンアイソフォームを含むスポットのトレインは、基準ゲルとの比較によって特定することができる。或いは、スポットを、ゲルから切り出して、質量分析を使用してタンパク質を特定することができる。最終的に、様々なクラスタリンアイソフォームに相当する各スポットの相対存在量を決定し、診断及び/又は予測的アイソフォームのレベルを、AD、MCI、又は他の認知症に相当することが公知であるものと比較する。

40

## 【0080】

したがって、本発明は、対象における認知症、特にアルツハイマー病を診断する方法であって、前記対象から得られた体液試料中のクラスタリンのアイソフォーム(Swiss-PROT

50

アクセッション番号(SPN)P10909;(配列番号:1))を検出することを含む前記方法を提供する。ここでは、前記アイソフォームの相対存在量の変化が、前記対象における認知症の指標である。前記アイソフォームの相対存在量は、検出された濃度又は存在量を、少なくとも1か月、少なくとも2か月、少なくとも3か月、少なくとも6か月、少なくとも1年、少なくとも2年、又は少なくとも5年前に採取した、同じ対象からの先の試料における同じアイソフォームの濃度又は存在量と比較することによって、或いは、検出された濃度又は存在量を、基準試料(前記基準試料は、好都合にはデータベースを形成することができる)からの同じアイソフォームの濃度又は存在量と比較することによって;或いは、検出された濃度又は存在量を、非認知症対照者から得られた試料からの同じアイソフォームの濃度又は存在量と比較することによって決定することができる。

10

## 【0081】

好ましくは、クラスタリンに関しては、表1A又は1Bから、1以上のアイソフォームが選択される。より好ましくは、表1A又は1Bから、2以上、3以上、4以上、5以上、10以上、又は20以上のアイソフォームが選択される。さらに好ましい実施態様では、クラスタリンの1以上のアイソフォームは、シアル酸付加された形態の糖ペプチド

## 【化3】

HN\*STGCLR (配列番号: 2)

である。

## 【0082】

さらなる実施態様では、本発明は、液体クロマトグラフィータンデム質量分析(LC-MS/MS)によって、クラスタリンの特定のN-結合型及び/又はO-結合型グリカン構造を検出するための方法を提供する。任意に、すべてのアイソフォームのクラスタリンタンパク質は、免疫沈降又はイムノアフィニティークロマトグラフィーなどの方法において、非修飾タンパク質骨格のある領域を認識する抗体を使用して、生体組織又は流体試料、例えば、血漿試料から濃縮される。

20

## 【0083】

こうしたクラスタリン特異的抗体は、当技術分野で周知である。或いは、一般的にコムギ胚芽凝集素などのレクチンを使用するレクチン親和性沈降又はレクチン親和性クロマトグラフィーを使用して、特定のグリコフォームの濃縮を実施することができる。濃縮後に、この濃縮されたタンパク質画分を、トリプシン又はAsp-Nなどの酵素を使用するタンパク分解性消化にかけることによって、天然に存在するクラスタリンを変化させ、その後、質量分析計を連結した逆相液体クロマトグラフィーによって、ペプチド断片の分離を行う。質量分析の分析中に、MS1サーベイスキャンにおいて、各クラスタリンペプチドの存在量を決定する。次いで、各ペプチドを、質量分析計内での断片化にかけて、ペプチド骨格を破壊し、付着したグリカンを放出させる。いずれの場合にも、放出された断片の正確な質量を、MS2スキャンにおいて決定し、ペプチド配列及びグリカン構造を明らかにするために使用することができる。したがって、各クラスタリンアイソフォームの相対定量を得て、特定の形態の認知症、疾患進行の段階、又は非認知症対照と関連する公知の量の各アイソフォームと比較することができる。

30

40

## 【0084】

さらに好ましい実施態様では、認知症を有する疑いがある又は認知症と既に診断されている対象から採取された組織又は体液の試料に、タンパク質アイソフォームを表す同位体的に又は同重体的に標識された糖タンパク質(1種又は複数)及び/又は糖ペプチドの基準パネルが添加された後、LC-MS/MSによるその後の分析が行われる。

## 【0085】

あるこうした態様では、特定の糖ペプチドは、TMT-SRM手法(その内容全体が参照により本明細書に組み込まれるByersらの文献、J.Proteomics 73:231-239に開示される通り)を使用して定量化され、それによって、多目的ドナー試料、例えば血漿試料から調製されたクラスタリンの異なるアイソフォームの濃縮された調製物を含む基準パネルに対する、分

50

析物の内在量が測定され、重い(heavy)TMT試薬で標識される。この「重い」基準は、軽い(light)TMT試薬で標識された、認知症を有する疑いがある又は認知症と既に診断されている対象から採取された組織又は体液の試料から調製された、同様に調製された濃縮された内在性クラスタリンに添加される。

**【 0 0 8 6 】**

次いで、この重い基準と軽い内在性クラスタリンとの混合物を、LC-MS/MSにかけ、同等の重い及び軽い親及び娘イオンの相対存在量(いわゆるSRM遷移)(それぞれ、MS/MS実験において観察される連続的フラグメントイオンからのグリカン単位の連続的喪失を表す)を算出する。適切な場合には、測定値m/z 366.14及びm/z 657.24の遷移も含まれるであろう。これらのイオンは、それぞれ、ヘキソース-N-アセチルヘキソサミン、[Hex-HexNAc]<sup>+</sup>、及びN-アセチルノイラミン酸-ヘキソース-N-アセチルヘキソサミン[NeuAc-Hex-HexNAc]<sup>+</sup>に関連しており、一般的に、糖ペプチドを含有するN-結合型炭水化物の衝突誘起解離中に生み出される。したがって、各SRM遷移に対する軽いTMT/重いTMTの比率は、関連する糖ペプチドの相対存在量に正比例する。次いで、測定したレベルを、AD、MCI、又は他の認知症を患う対象、及び/又は非認知症対照者から採取される適切な組織又は体液に見られる関連するアイソフォームについての公知の基準レベルと比較して、疾患の状態又は進行の速度の診断及び/又は予測ができる。

**【 0 0 8 7 】**

基準パネルが、同重体的に標識された糖ペプチドを含むこと、また、基準パネル中に2以上の異なる濃度の各糖ペプチドが含まれることが特に好ましい。タンデム質量タグ(Theermo Scientific社、UK)などの、いかなる同重体タンパク質又は糖のタグも使用することができる。このいわゆるTMTキャリブレーション方法の原理は、その内容が本明細書に完全に組み込まれる欧州特許第2115475号に開示されている。

**【 0 0 8 8 】**

代替実施態様では、本発明は、クラスタリンの主要なグリコフォームペプチドの選択反応モニタリングの使用を提供する。ここでは、定量化は、関連しない基準ペプチドによって提供される。この方法では、強いSRMシグナルを提供し、かつクラスタリングリコフォームペプチドのイオン化及び検出を妨害しないペプチドを、クラスタリングリコペプチド(glycopeptide)の調製後に、各患者試料に添加することができる。次いで、この混合物を、SRM方法にかけ、クラスタリングリコフォームペプチド遷移の相対ピーク面積を、基準ペプチドのものと比較して、相対的又は絶対的定量化をもたらす。

**【 0 0 8 9 】**

本発明によって例示される別のSRM方法では、混合物に添加される基準ペプチドは存在しない。こうした方法では、各糖鎖付加ペプチド(分析物)の生の積分ピーク面積の値が、定量化のために使用されるが、合計スケールリングを使用して最初に正規化される。合計スケールリングは、実験バイアスを除去するための数学的手法である(Robinsonらの文献、2010; Paulsonらの文献、2013; 及びDe Liveraらの文献、2012を参照のこと)。このプロセスは、所与の試料において測定されるすべての分析物についての強度値を合計することと、次いで、すべての試料にわたる中央値を算出することを含む。次いで、この中央値を、各合算値で割って、補正率を出し、次いで、これを元々の強度値に掛けて、正規化された合計スケールリングした測定値をもたらす。

**【 0 0 9 0 】**

高萎縮と低萎縮との間の中央値を算出した。等分散片側分布t検定を使用して、p値を算出した。さらに、log 2比も算出して、各糖鎖付加ペプチドに関する高萎縮と低萎縮との間の変動を提供した。糖ペプチド高萎縮/低萎縮log 2比は、高萎縮/低萎縮log2の中央値である。

**【 0 0 9 1 】**

さらなる態様では、本発明は、マーカートンパク質パネルのすべてのタンパク質アイソフォームに関する糖ペプチド保持時間、前駆体質量、及び診断用断片化質量のデータベースを提供する。こうしたデータベースの例を、表1A又は1Bに提供する。好ましくは、デー

10

20

30

40

50

データベースは、FTMS及び/又はQTOF機器上で収集される高質量精度MS及びMS/MSスペクトルのスペクトルライブラリも含む。

【0092】

さらなる態様では、本発明は、神経変性疾患又は神経変性性認知症の治療の有効性を決定する方法であって、先に記載した実施態様のいずれかによって、治療前に、及び治療中又は治療後に少なくとも1回、少なくとも1種のタンパク質バイオマーカーの1以上のアイソフォームのレベルを決定することを含み、ここでは、前記アイソフォーム(1又は複数)のレベルが安定であり続けるか、又はより正常なレベルに戻ることによって、治療の成功が実証される、前記方法を提供する。これは、神経変性性認知症のための実験的治療の評価において、例えばヒト臨床試験において、特に有益である。本発明のこの態様の代替実施態様では、前記アイソフォーム(1又は複数)のモニタリングを使用して、個々の患者のための最適な治療の選択を支援することができる。ここでは、疾患バイオマーカープロファイルの進化の継続が、現在の治療の失敗及び代替治療を提供する必要性を示す。

10

【0093】

さらなる態様では、本発明は、制御部分と記憶部分とを含む神経変性性認知症スコア算出装置と、情報通信端末装置とを含む、神経変性性認知症決定システムを提供する。前記装置は、ネットワークを通じて互いに通信的に接続されている。ここでは、情報通信端末装置は、以下を含み：

1a)対象の測定されたグリコフォームプロファイルデータを神経変性性認知症スコア算出装置に送信する、クラスタリンググリコフォームプロファイルデータ送信ユニット；及び

20

1b)神経変性性認知症スコア算出装置から送信された対象の神経変性性認知症スコアの評価結果を受信する、評価結果受信ユニット；

かつ、制御部分は、以下を含む：

2a)情報通信端末装置からの対象のクラスタリンググリコフォームプロファイルデータを受信する、クラスタリンググリコフォームプロファイルデータ受信ユニット；

2b)対象のクラスタリンググリコフォームプロファイルデータと、記憶装置に保存された基準クラスタリンググリコフォームプロファイルデータ記録との適合の近似性を決定する、クラスタリンググリコフォームプロファイル照合ユニット；

2c)クラスタリンググリコフォームプロファイル照合ユニットによって算出された適合の近似性に基づいて、対象の神経変性性認知症スコアを決定する、神経変性性認知症スコア決定ユニット；及び

30

2d)神経変性性認知症スコア決定ユニットによって得られた対象の神経変性性認知症スコアを、情報通信端末装置に送信する、決定結果-送信ユニット。

【0094】

いくつかの場合では、前記クラスタリンググリコフォームプロファイルは、表1A又は1Bに記載した通りの少なくとも5、6、7、8、9、又は少なくとも10種の糖ペプチドの、対象の試料、例えば血漿試料における相対的割合を含む。

【0095】

さらなる態様では、本発明は、神経変性疾患又は認知症に対する治療有効性について評価されることとなる薬剤を特定する方法であって、被検薬剤の存在下と被検薬剤の非存在下で、 $-N$ -アセチル-グルコサミニダーゼを適切な基質と接触させることと、被検薬剤の存在下と非存在下で $-N$ -アセチル-グルコサミニダーゼ活性の速度又は程度を比較することを含む前記方法を提供する。ここでは、 $-N$ -アセチル-グルコサミニダーゼ活性を阻害する被検薬剤が、神経変性性認知症に対する治療有効性について評価されることとなる薬剤と特定される。特に、この方法は、ヒトクラスタリタンパク質又はその糖鎖付加断片の4本鎖グリコフォームの認知症誘導性のグリカン刈り込み(pruning)を減少又は阻止する能力について、被検薬剤を評価することをさらに含むことができる。

40

【0096】

本発明のさらなる態様では、疾患に活性がある、グリコトランスフェラーゼ(glycotransferase)及びグリコシダーゼなどのタンパク質修飾酵素を特定する方法が提供される。こ

50

うした酵素は、新規の治療用標的として働くことができ、また、疾患の診断及び予測的モニタリングのための代替手段を提供することができる。

【0097】

したがって、人工の糖ペプチド又はグリコトランスフェラーゼ基質に対する、認知症を有する疑いがある対象から採取された組織又は体液の試料中に存在するグリコシダーゼ又はグリコトランスフェラーゼの活性の測定を含む、認知症の存在又は病期の診断の方法が提供される。ここでは、糖ペプチドの基質又はグリコトランスフェラーゼの基質上の鎖状グリカン構造の切断又は完全除去が検出される。

【0098】

いくつかの循環性の糖タンパク質は、認知症と関連することが公知である(Nuutinen, Suuronenらの文献、2009; Sato, Endoの文献、2010; Butterfield, Owenらの文献、2011)。CSF中のクラスタリンが、例えば、アミロイドタンパク質クリアランスの機構と関連付けられているのに対して、細胞内クラスタリンは、ニューロン中の有毒なアミロイドに反応して、細胞内シグナル伝達を仲介すると考えられている(Killick, Ribeらの文献、2012)。N-結合型糖鎖付加の型及び程度の変化は、タンパク質の機能及び安定性に影響を与えることが公知であり、循環性のクラスタリングリコフォームの分布の変化は、アルツハイマー病におけるアミロイドなどの凝集したタンパク質の除去におけるその機能にかなり影響を与えることができる。

【0099】

したがって、本発明のさらなる態様では、-N-アセチル-グルコサミニダーゼの阻害剤の投与によって、神経変性疾患又は認知症を治療する方法が提供される。こうした阻害剤は、グリカン鎖(antenna)の喪失を介して、機能性の糖タンパク質の「老化の促進」を予防し、こうした糖タンパク質がその正常な機能を保持することを可能にする。したがって、本発明はまた、認知症と診断された対象への、治療量の-N-アセチル-グルコサミニダーゼの阻害剤の投与によって、神経変性性認知症を治療する方法を提供する。関連態様では、本発明は、哺乳類対象における神経変性疾患又は認知症の治療の方法における使用のための-N-アセチル-グルコサミニダーゼの阻害剤を提供する。

【0100】

本発明を、ここで、添付の図面を参照することによって、限定ではなく例示という目的で、より詳細に説明することとする。この開示が与えられれば、多くの同等の改変及び変形が、当業者には明らかであろう。したがって、記載した本発明の例示的实施態様は、例示的であり限定的ではないとみなされる。本発明の範囲を逸脱せずに、記載した実施態様に対する様々な変更を行うことができる。本明細書に引用したすべての文書を、参照によって明示的に組み込む。

【図面の簡単な説明】

【0101】

(図面の簡単な説明)

【図1】図1は、2DEにおける理論上の及び実際のクラスタリングリコフォーム分布である。パネルA-クラスタリン及び鎖の数理モデリング。4本鎖構造についての別のシリーズを、同様にモデル化することができる(図示せず)。パネルB-免疫沈降させたタンパク質の2DEスポット。異なる16個のスポットを分析し、完全にシアル酸付加されたN-グリカンが、16スポットのすべてにおいて、各糖鎖付加部位で、最も豊富な構造であった。様々なゲルスポットに対して認められるpIのシフトは、鎖及びシアル酸の数の変化を介する糖鎖付加によって引き起こされる可能性が最も高い。

【図2】図2は、2DEゲル上の16スポットにおいて検出された、4種のクラスタリンペプチド(ペプチドA: 配列番号:2; ペプチドB: 配列番号:11; ペプチドC: 配列番号:7; ペプチドD: 配列番号:10)のそれぞれのグリコフォームの、表による表示である。

【図3】図3は、N結合型炭水化物からの特定のグリカン単位の除去に関連する2DE座標の変化を示すベクトル図である。

【図4】図4は、NA3基質(Dextra-UK社、カタログ番号:C1124)の構造である。分子量=2006

10

20

30

40

50

.82Da、化学式: $C_{76}H_{127}N_5O_{56}$ 。

【図5】図5は、 $m/z$  1003.87での二重荷電分子イオンと、関連するナトリウム及びカリウムカチオンの存在を示す、損なわれていないNA3基質のESI-TOFスペクトルである。

【図6】図6は、 $m/z$  1050.74、分子量3149.22Daのクラスタリン糖ペプチドについての $[M+3H]^3+$ 分子イオンのMS/MSスペクトルである。フラグメントイオンによって、グリカンの構造が推定できるようになり、 $m/z$  574.47でのフラグメントイオンは、[ペプチド+HexNac]<sup>+</sup>部分に相当する。したがって、「裸の」ペプチドの配列は、

【化4】

HN\*STGCLR (配列番号: 2)

10

であり、完全にシアル酸付加された2本鎖グリカン構造、 $SA_2-(HexNac-Hex)_2$ が、アスパラギン残基(N\*)と付着されている。

【図7】図7は、低萎縮の場合には観察されるが高萎縮では観察されない、2つのシアル酸付加された形態の4本鎖糖ペプチド

【化5】

HN\*STGCLR (配列番号: 2)

についての分子イオンを示す質量スペクトルである。

【図8】図8は、低及び高レベルの海馬萎縮を伴う8人の個人内の、4本鎖グリコフォームの相対的割合である。

【図9】図9は、発見コホート(Discovery Cohort)由来の有意に調節されたクラスタリン 64N糖ペプチド A) 64N\_SA1-(HexNac-Hex)2-コア;B) 64N\_SA2-(HexNac-Hex)2-コア;C) 64N\_SA1-(HexNac-Hex)3-コア;D) 64N\_SA2-(HexNac-Hex)3-コア;E) 64N\_SA3-(HexNac-Hex)3-コア;及び F) 64N\_SA3-(HexNac-Hex)4-コア の箱ひげ図を示す(Orbitrap Fusion)。

20

【図10】図10は、再現コホート由来の有意に調節されたクラスタリン 64N糖ペプチド A) 64N\_SA1-(HexNac-Hex)2-コア;B) 64N\_SA1-(HexNac-Hex)3-コア;及び C) 64N\_SA2-(HexNac-Hex)3-コア の箱ひげ図を示す(Orbitrap Fusion)。

【図11】図11は、発見コホートと再現コホートの組み合わせ由来の有意に調節されたクラスタリン 64N糖ペプチド A) 64N\_SA1-(HexNac-Hex)2-コア;B) 64N\_SA2-(HexNac-Hex)2-コア;C) 64N\_SA1-(HexNac-Hex)3-コア;及び D) 64N\_SA2-(HexNac-Hex)3-コア の箱ひげ図を示す(Orbitrap Fusion)。

30

【図12】図12は、SRM分析(TSQ Vantage)による発見コホート由来の有意に調節されたクラスタリン 64N糖ペプチド A) 64N\_SA1-(HexNac-Hex)2-コア;B) 64N\_SA2-(HexNac-Hex)2-コア;C) 64N\_SA1-(HexNac-Hex)3-コア;D) 64N\_SA2-(HexNac-Hex)3-コア;及び E) 64N\_SA1-(HexNac-Hex)4-コア の箱ひげ図を示す。

【図13】図13は、アルブミン/IgG除去正常ヒト血漿のSDS-PAGE画像を示す。赤色のバーは、カットポイントを表し、番号は、クラスタリン糖ペプチドを特定するためのOrbitrap分析のために使用されるバンド番号を表す。

【図14】図14は、glyco-SRM方法を使用する、除去血漿由来のバンド番号4~9のトータルイオンクロマトグラム(TIC)を示す。8種のクラスタリン 64N糖ペプチドが、前駆体として働き( $m/z$  953.71、1050.74、1075.42、1172.45、1197.13、1269.49、1294.17、1391.53)、 $m/z$  366.14、574.56、及び657.24でのフラグメントイオンが、各前駆体に対する遷移イオンと定められた。

40

【図15】図15は、部位 64Nでの8種のグリコフォームの様々な保持時間及びピーク面積を提供する、バンド番号7のXICを示す。

【図16】図16は、SRM分析(TSQ Vantage)による発見コホートと検証コホートの組み合わせ由来の有意に調節されたクラスタリン 64N糖ペプチド A) 64N\_SA1-(HexNac-Hex)2-コア;B) 64N\_SA2-(HexNac-Hex)2-コア;C) 64N\_SA1-(HexNac-Hex)3-コア;D) 64N\_SA2-(HexNac-Hex)3-コア;E) 64N\_SA1-(HexNac-Hex)4-コア;F) 64N\_SA3-(HexNac-Hex)3-コア;G) 64N\_SA2-(HexNac-Hex)4-コア;及び H) 64N\_SA3-(HexNac-Hex)4-コアの箱ひげ図を示す

50

す。

【図17】図17は、表1A-クラスタリンGlycoModデータベースv1.0(対照血漿)(それぞれ配列番号:2~7及び10)を示す。

【図18】図18は、表1B-クラスタリンGlycoModデータベースv1.1(MCI/AD血漿)(それぞれ配列番号:2~7、9、10、及び8)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0102】

(詳細な説明)

本発明を説明する際には、以下の用語を用いることとし、これらは、下に示す通りに定義されるものとする。

【0103】

用語「対象」には、ヒト又は動物が含まれる。本発明のある種の実施態様によれば、対象は、ADと既に診断されている及び/又は軽度認知障害(MCI)と既に診断されている可能性がある。対象は、ヒトであることが好ましい。対象は、年齢が少なくとも60歳、任意に少なくとも70歳又は少なくとも80歳のヒトであり得る。

【0104】

用語「診断」には、本明細書で使用する場合、患者における障害の存在、非存在、又は可能性に関する何らかの情報の提供が含まれる。「診断」には、さらに、それに関連して経験される又は経験され得る障害又は症状の型又は分類に関する情報の提供が含まれる。これには、例えば、障害の重症度の診断が含まれ得る。これは、障害の医学的経過の予測、例えば、障害の期間、重症度、及びMCIからアルツハイマー病への進行の経過を包含する。

【0105】

現在、疾患状態は、発端から現在までの疾患の期間(より長い期間は、より重篤な疾患に相当する)及び臨床評価尺度によって評価されている。これらの評価尺度としては、記憶及び他の認知に関する臨床試験、機能(日常生活の能力)に関する臨床試験、及び全体的重症度の臨床評価が挙げられる。ADにおける潜在的治療法の治験は、現在、これらの尺度に対して評価されている。FDA及び他の医薬品承認組織は、これらの評価の一環として、認知と全体的機能の両方の尺度を必要とする。全般的認知症スケール(Global Dementia Scale)は、全体的機能のこうした尺度の一つである。これは、標準化された一連の重症度基準に対する認知及び機能を含めた重症度の後の評価によって評価される。

【0106】

用語「緩和する」は、アルツハイマー病に関して本明細書で使用する場合、1以上の望ましくない症状を軽減する、あらゆる形態、又はその効果を意味する。患者のアルツハイマー病のあらゆる改善は、用語「緩和」の範囲内である。改善は、疾患の進行を遅らせることも含むことができる。

【0107】

本明細書で使用する場合、AD「を評価すること」には、それに関連して経験される又は経験され得る疾患又は症状の型又は分類に関する情報の提供が含まれる。これには、具体的には、疾患の医学的経過の予測、例えば、疾患の期間、重症度、及び例えばMCI又はAD前駆症状から臨床期ADへの進行の経過及び速度が含まれる。これには、線維状アミロイド負荷、皮質及び海馬萎縮、及び神経原線維濃縮体の蓄積などの、ADに伴う脳病態の予測も含まれる。評価は、侵襲形態のAD及び/又は予後不良の評価であり得る。

【0108】

本明細書で使用する場合、「生体試料」とは、対象から単離又は入手した、任意の生物学的な液体、細胞、又は組織試料をいう。本発明によれば、「タンパク質含有試料」は、本明細書で定義する通りの任意の生体試料であり得る。生体試料は、いくつかの場合では、血漿、血液細胞、血清、唾液、尿、脳脊髄液(CSF)、又は組織生検材料を含むことができる。生体試料は、試料中に見られる少なくとも1種の対象のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームの量(例えば濃度)を決定する前に、保管(例えば冷凍)及び/又は

10

20

30

40

50

処理(例えば、細胞残屑又は混入物を除去するために)しておくことができる。

【0109】

(グリコフォーム分析の例-クラスタリン)

クラスタリン(アポリポタンパク質J;SP-40,40;TRPM-2;SGP-2;pADHC-9;CLJ;T64;GP III;XIP8)は、75~80kDaの、高度に保存されるジスルフィド結合されたヘテロ二量体の分泌型糖タンパク質であるが、核を標的にする切断形態も特定されている。このタンパク質は、上皮及び神経細胞を含めたいくつかの細胞型によって恒常的に分泌され、また、これは、血漿、母乳、尿、脳脊髄液、及び精液を含めた生理的流体中の主要タンパク質である。

【0110】

好ましくは、クラスタリンは、UniProtアクセッション番号P10909、配列バージョン1及びGI No.116533(配列番号:1)(その内容全体を参照によって本明細書に組み込む)に開示されているヒトクラスタリン配列に対する少なくとも70%、80%、90%、95%、99%、又は100%の同一性(前記ヒトクラスタリン配列の全長に対して算出される)を有するアミノ酸配列;又はこれらの断片(少なくとも5、10、15、20、30、50、100、150、200、250、300、350、400、425、又は449個の連続するアミノ酸を含む)を含む、又は該配列からなる。

10

【0111】

クラスタリン遺伝子の発現は、アルツハイマー病(AD)脳において有意に上昇し(Mayらの文献、1990)、血漿クラスタリンのレベルも、AD進行と相関することが示されている(Tham bisettyらの文献、2010)。本発明者らは、二次元ゲル電気泳動(2DE)を使用するADのためのバイオマーカー候補としてのいくつかの血漿クラスタリンアイソフォームを以前に特定

20

【0112】

しかし、免疫測定法、及び選択反応モニタリング(SRM)実験における非修飾ペプチドの使用は、2DEにおいて見られる変動を完全には再現しなかった。本発明者らは、この乖離が、おそらく、検証研究では再現されない特定の翻訳後事象の変化に起因するという仮説を立てた。クラスタリンは、高度に糖鎖付加された分泌タンパク質であり、また、糖鎖付加が、クラスタリンの生理的機能において重要な役割を果たす(Stuartらの文献、2007)ので、本発明者らは、血漿クラスタリンの詳細なプロファイリング、及び臨床的に分類される異質の対象、例えば、海馬の低又は高萎縮を伴う患者において観察される糖鎖付加プロファイルの比較によって、より有力なバイオマーカーアイソフォームを明らかにすることができることを提案した。

30

【0113】

血漿における -N-アセチル-グルコサミニダーゼ活性を示す、クラスタリングリコフォームに関する観察に導かれて、本発明者らはまた、定義された基質を使用してこの特異的活性を測定する、新規アッセイを考案した。

【実施例】

【0114】

(実施例1.血漿クラスタリンアイソフォームのゲル電気泳動分析)

(方法)

ヒトクラスタリンを、モノクローナル抗クラスタリン抗体(Millipore社)を使用する、アルブミン/IgG除去血漿からの免疫沈降(IP)によって濃縮した。免疫沈降させたタンパク質を、最初に品質対照としてウェスタンブロッティングによって分析し、次いで、二次元電気泳動(2DE)又はSDS-PAGEによって分離した。対象のスポット及び単一バンド(#3)を切り出し、還元し、アルキル化し、トリプシンでゲル内消化し、その後、質量分析(MS)による分析を行った。試料は、ナノフロー逆相クロマトグラフィー(EASY-nLC II、ThermoFisher Scientific社)及びTop20衝突誘起解離(CID)法(Orbitrap Velos、ThermoFisher Scientific社)を使用するLC-MS/MSによって分析した。糖ペプチドは、グリカン特異的なオキシニウムイオン断片の存在(MS/MSスペクトルにおいて、N-アセチルヘキソサミンすなわち[HexNAc]<sup>+</sup>についてm/z 204.08、ヘキソース-N-アセチルヘキソサミンすなわち[Hex-HexNAc]<sup>+</sup>についてm/z 366.14、及びN-アセチルノイラミン酸-ヘキソース-N-アセチルヘキソサミ

40

50

ン[NeuAc-Hex-HexNAc]<sup>+</sup>についてm/z 657.24)によって、手作業で特定した。

【0115】

(結果)

(2DEスポット)

最初に、数理モデリングを使用して、異なる 及び 鎖のための様々なクラスタリング  
グリコフォームの人為的なマップを作成した(図1A)。この手法をさらに改良したものを使用  
して、個々のクラスタリング関連グリコフォームを、単純な(x, y)座標を使用して分類した  
。このようにして、本発明者らは、個々の2DEスポットの内容を予測することができ、別  
々の座標が、複数のグリコフォームによって共有されることを実証することができた。し  
たがって、2DEスポットは、いくつかのグリコフォームを含有する複合混合物である可能  
性が高い。次いで、複雑なLC/MS/MSデータの解釈を助けるためにこの情報を使用し、続い  
て、いくつかのかなり有用な手がかりを提供した。

10

【0116】

最初に、それぞれの2DEスポット内の主な成分が、例外なく、4、3、又は2本鎖のいずれ  
かの構造である、常に完全にシアル酸付加された形態であることが明らかになった(図1B)  
。シアル酸の違いが、電気泳動中の別の形態の分離の主な原因であり、電荷の減少と同時  
に291Daが失われ、それによって、より塩基性の等電点へのシフトがもたらされることが  
、元々予想されていたので、これは、驚くべきことであった。しかし、LC/MS/MSの結果(  
図2)は、鎖の数の減少傾向を示唆しており、これは、2DEスポットの位置に対するより顕  
著な影響としての、鎖全体の連続的な除去を示唆していた。この現象を説明するために基  
本ベクトルを考案した(図3)。これによって、検出されたクラスタリンググリコフォームが  
、シアル酸単独の除去と、完全な鎖の除去との両方(それぞれ、別のノイロミニダーゼ(ne  
urominidase)と -N-アセチル-グルコサミニダーゼ活性を示唆している)を裏付ける証拠  
を、現在、実際に示すことが明らかになる。

20

【0117】

(実施例2-血漿中の特異的なn-アセチル-グルコサミニダーゼ活性を測定するための基質ア  
ッセイの設計)

二次元ゲル電気泳動で見える16種の異なるクラスタリングアイソフォームのグリカン分析  
の結果は、シアル酸及び鎖全体の逐次的除去を示した。切断されたグリコフォームのうち  
のいくつかは、AD及びMCIのバイオマーカー候補として以前に特定されたクラスタリンタ  
ンパク質スポットと関連するよう見えた。今までに、これらのクラスタリングアイソフォ  
ームの糖鎖付加の詳細な分析が実施されたことはなく、血漿クラスタリンにおける疾患に  
伴う修飾の大部分を、単一のグリコシダーゼ、すなわち -N-アセチル-グルコサミニダー  
ゼの活性によって説明することができることを発見したことは驚きであった。

30

【0118】

したがって、本発明者らは、特異的アッセイ方法を計画して、MCI、AD、又は他の認知  
症を有する疑いがある又はMCI、AD、又は他の認知症と既に診断されている対象から採取  
した組織又は体液試料における -N-アセチル-グルコサミニダーゼの活性を決定する。人  
工のグリカンNA3基質(図4)は、隣接している -N-アセチル-グルコサミンとマンノースサ  
ブユニットとの間の 1,2結合と 1,4結合の両方を含有しており、血漿における 1,2及  
び 1,4 N-アセチル-グルコサミニダーゼ活性を区別するのに好ましい基質である。この  
基質の分子量は、2006.82Daであり、[M+2H]<sup>2+</sup>イオンを、ESI-TOF質量分析計を使用してm/  
z 1003.8で検出する(図6)。

40

【0119】

認知症を有する疑いがある又は認知症と既に診断されている対象からの組織又は体液の  
適切な試料に、NA3基質を添加して、300~1,000pg/µlの最終濃度とし、37℃で4~24時間  
インキュベートする。次いで、被検試料を遠心分離して残屑を除去し、一定分量をLC-MS/  
MS分析にかける。2又は1本の鎖の喪失に相当する分子イオンの測定は、それぞれ、 1,2  
及び 1,4 N-アセチル-グルコサミニダーゼ活性を示す。

【0120】

50

(実施例3-クラスタリンのための独自の糖ペプチド基準リソースを作製するための、免疫沈降クラスタリンの分析:クラスタリンGlycoModデータベースv1.0)

代表的なプールされた臨床血漿試料を使用して、方法論を開発し、かつ、アミノ酸配列内の予想される糖鎖付加コンセンサス部位と関連する41種の異なるグリコフォームを含有する「観察に基づく」データベースを構築した。各糖ペプチドについて、分析物のm/z荷電状態及び保持時間(RT)を表にした(表1A参照)。糖ペプチドの曖昧でないアノテーションには、対応するMS/MSスペクトルにおける[ペプチド+HexNAc]<sup>+</sup>フラグメントイオンの検出、及び個々のグリカンサブユニットの連続的解離に関連するさらなるフラグメントイオンの解釈が必要であった。MS/MSスペクトルの例を示し(図7)、また、クラスタリンGlycoModデータベースの現行のバージョンを、表1Aに提供する。クラスタリンGlycoModデータベースの最新のバージョンを、表1Bに提供する。

10

【0121】

免疫沈降及びLC/MS/MSを使用して、本発明者らは、血漿クラスタリン中の6つの予想されるN-結合型糖鎖付加コンセンサス部位のうちの5つを包含する41種の糖ペプチドを特徴付けている。全部で41種の様々なN-結合型糖ペプチドが特徴付けられており、本明細書に列挙される。これらの5つの部位でのグリカン分布は、<15%のCVと一致しており(n=3、2つの血漿試料由来)、該方法の技術的及び生物学的再現性を示唆していた。

【0122】

本発明者らは、ヒト血漿クラスタリン(GlycoModデータベースv1.0)内の6つの予想されるN-結合型糖鎖付加部位のうちの5つを、以前に示している。当業者には、すべてのタンパク質バイオマーカーのすべてのN-結合型及びO-結合型部位をカバーするためのGlycoModデータベースの拡張が、本発明の範囲内であることが理解されるであろう。実際、本発明者らは、それに続いて、表1B(図18)(クラスタリンGlycoModデータベースのversion 1.1のクラスタリン糖ペプチド(MCI/AD血漿)を示す)に提示した通りに、ヒトクラスタリンにおける6番目のN-結合型部位のマッピングを完了している。

20

【0123】

(実施例4-低及び高萎縮を伴う個人を比較するための、免疫沈降クラスタリンの分析)

本発明者らは、非認知症対照と比較してADを患う患者の血漿中で差次的に調節される、クラスタリンのある種のアイソフォームを特定している。さらに、2DEゲル上のクラスタリンを含むある種のスポットが、海馬萎縮のレベルと相関するのに対して、さらに他のアイソフォームが、ADにおける疾患進行のその後の速度と相関することも示されている。

30

【0124】

本発明者らは、ADと既に診断されている低レベルの海馬萎縮を有する4人の対象から、また、ADと既に診断されている高い海馬萎縮を伴う4人の対象から、血漿試料を入手した。クラスタリンは、免疫沈降を使用して濃縮し、先に記載したLC-MS/MS方法にかけた。驚いたことに、彼らは、グリカン刈り込みの程度が、海馬萎縮と相関することを特定した。低レベルの海馬萎縮を伴う患者では、血漿クラスタリンの刈り込みの証拠はほとんどなかった。逆に、高レベルの海馬萎縮を伴う対象由来の血漿クラスタリンは、概して刈り込まれて、N-結合型グリカン内の1以上の完全鎖が除去された。

【0125】

一例として、低萎縮を伴う個人においてのみ、2つのシアル酸付加された形態の4本鎖糖ペプチド

40

【化6】

**HN\*STGCLR** (配列番号: 2)

が、m/z 1391及びm/z 1294.17で、三重荷電分子イオンとして観察される(図7)。したがって、これらの部分は、海馬萎縮の程度と一致する、潜在的な代替バイオマーカーである。

【0126】

LC-MS/MS方法によって観察されるすべてのN-結合型グリカンからのデータを使用して、本発明者らは、クラスタリン鎖のトリプシンペプチド

## 【化7】

HN\*STGCLR (配列番号: 2)

上のN-結合型糖鎖付加部位に関する全グリコフォームシグナルに基づいて、高レベルの海馬萎縮を伴う対象における、低レベルの海馬萎縮を伴う対象と比較した場合の4本鎖グリカンのレベルの一貫性のある低下を認識した(図8)。

## 【0127】

(実施例5-低及び高萎縮を伴う個人を比較するための、免疫沈降クラスタリンの検証分析)

クラスタリン糖鎖付加パターンの変化が、臨床試料の小コホート内の萎縮の程度と相関することを特定して、本発明者らは、既知のレベルの海馬萎縮を伴うアルツハイマー病患者の追加のコホートに対する、さらなる検証研究を実施した。さらなるバイオインフォマティクス手法をまた、グリコフォームプロファイルに基づくクラス分離に対するその影響について評価し、クラスタリンの追加の診断用グリコフォームを特定することを期待して、より高感度の新しい質量分析計を用いた。先行のデータでの相関を確実にするために、実施例4で使用した最初の4×4コホート(発見コホート)からの試料を、AD(n=10)及び照合される対照(n=10)からの20の新規試料の別のコホート(再現コホート)と共に、新しい方法を使用して再分析した。すべての試料の詳細を、表2に提供する。

試料コホートの詳細

表2. 4対4及び10対10コホートと関連する試料の詳細

【表 1】

研究 ID	疾患群	性別	年齢	平均 クラスタリン	平均海馬 ( $\times 10e-6$ )	萎縮
4.1	AD	女性	82	87	135	高い
4.2	MCI	男性	79	93	264	低い
4.3	MCI	男性	72	90	274	低い
4.4	MCI	男性	75	90	264	低い
4.5	AD	ND	ND	153	161	高い
4.6	AD	女性	78	84	164.5	高い
4.7	AD	男性	69	90	106.5	高い
4.8	MCI	女性	71	114	307.5	低い
10.1	AD	男性	79	154.32	111.5	高い
10.2	AD	女性	76	337.7	124.0	高い
10.3	AD	男性	77	422.11	125.5	高い
10.4	AD	男性	69	252.19	233.0	低い
10.5	AD	女性	87	322.05	238.0	低い
10.6	AD	男性	71	289.22	228.0	低い
10.7	AD	女性	70	253.82	234.2	低い
10.8	AD	男性	70	303.13	0.0	高い
10.9	AD	女性	83	530.31	136.5	高い
10.10	AD	女性	65	497.37	227.1	低い
10.11	AD	女性	77	404.6	235.5	低い
10.12	AD	女性	76	241.56	99.6	高い
10.13	AD	男性	76	300.21	109.5	高い
10.14	AD	女性	67	323.54	135.0	高い
10.15	AD	女性	72	280.5	228.0	低い
10.16	AD	女性	63	309.15	244.7	低い
10.17	AD	男性	83	423.18	127.0	高い
10.18	AD	女性	71	7147.63	237.4	低い
10.19	AD	女性	68	307.14	140.0	高い
10.20	AD	男性	79	351.02	237.5	低い

## 【 0 1 2 8 】

(方法)

クラスタリンを、先に記載した通りに各試料から濃縮した。関連するタンパク質バンドを切り出し、還元し、アルキル化し、トリプシンで消化した。精製後、クラスタリン消化物を、2つの一定分量に分け、それぞれを、ナノフロー高速液体クロマトグラフィーとOrbitrap Velos Pro又は超高速液体クロマトグラフィーとOrbitrap Fusion Tribrid LC-MS/M

10

20

30

40

50

Sシステム(すべてThermo Scientific社、Hemel Hempstead、UKの設備)によって試験した。データは、予想通り、表向きは類似であったが、Fusionに関しては、より多くの糖鎖付加クラスタリンペプチドを特定したため、Fusionデータセットに対して、その後の全ての分析を実施した。

【0129】

(バイオインフォマティクス)

Proteome Discovererソフトウェア(Thermo Scientific社)を使用して、質量分析計の生データを処理した。表1A及び1Bに記載した糖鎖付加クラスタリンペプチド及びその断片についてのイオン強度を、Excel(Microsoft社)スプレッドシートにエクスポートした。本発明者らは、合計スケールリング技術を用いてデータを正規化し、発見コホート、再現コホート、及び単一の群としての両コホートの分析の組み合わせにおける、高萎縮群と低萎縮群との間の中央値を比較することによって、各糖ペプチドについての有意値(p)を算出した。スチューデントのT検定を使用して、高萎縮と低萎縮との間で有意に変化するペプチド関連グリコフォームを特定し、各糖ペプチドについて片側p値を得た(表3A、3B、及び3Cを参照のこと)。

【0130】

(結果)

Orbitrap Fusion Tribrid上で、本発明者らのIP-LC/MS/MSワークフローを使用して、本発明者らは、適用範囲をクラスタリンの6個すべての公知のN-糖鎖付加部位：64N、81N、123N、64N、127N、及び147Nに拡大することができる。グリカン特異的断片を観察することによって、本発明者らはまた、6個すべての部位での様々な鎖構造を割り当てることができ、また、総イオン数に基づいて相対的定量化を実施することができた。全部で42種の異なるグリカン構造が検出された。ほとんどの糖鎖付加部位は、高レベルの海馬萎縮と低レベルの海馬萎縮との間でグリカン構造における変動を示さなかったのに対し、2つの部位- 64N及び147N-は、臨床群間の有意な変動を示した。発見コホート分析、再現コホート分析、及びコホート分析の組み合わせにおける臨床群間の有意な(p < 0.05)変化を示す特定のグリカン構造を、それぞれ、表3A、3B、及び3Cに示す。各糖ペプチドについての箱ひげ図を作成して、2群間で得られた分離を示した(図9~11)。

【0131】

興味深いことに、64N糖鎖付加部位

【化8】

HN\*STGCLR (配列番号: 2)

での6種のグリコフォームは、Orbitrap Fusion上で測定した場合、4つの高萎縮試料(アルツハイマー病)では、発見コホートの4つの低萎縮試料(軽度認知障害)と比較して有意に低下したことが判明した。これは、m/z 1391.54で三重荷電分子イオンとして観察される、シアル酸付加された形態の4本鎖糖ペプチドを含んでおり、これは、先のVelosデータ分析と一貫性があり、異なるLC-MS/MSプラットフォーム上で測定した場合に、軽度認知障害をアルツハイマー病と識別するための診断用マーカーとしてのこのグリコフォームの頑健性が裏付けられた。

【0132】

より大きな再現コホートでは、高萎縮試料において、64N糖ペプチドの3種のグリコフォームが有意に減少した。これらのグリコフォームとしては、スペクトルにおいてm/z 953.71、1075.42、1172.45で見られるSA1-(HexNAc-Hex)<sub>2</sub>、SA1-(HexNAc-Hex)<sub>3</sub>、及びSA2-(HexNAc-Hex)<sub>3</sub>グリコフォームが挙げられる。また、発見コホートにおける高萎縮患者では、これらのグリコフォームのすべてが減少したことがわかったので、これは、確認されたアルツハイマー病を患う患者における予測的バイオマーカーとしてのこれらのグリコフォームの実用性をさらに裏付ける。

【0133】

2つのコホートの結果を合わせると、本発明者らはさらに、部位64Nで見られるグリコ

10

20

30

40

50

フォームの変化が、萎縮と相関し、4種のグリコフォーム、例えば、それぞれ、m/z 953.71、1050.74、1075.42、及び1172.45でのSA1-(HexNAc-Hex)2、SA2-(HexNAc-Hex)2、SA1-(HexNAc-Hex)3、及びSA2-(HexNAc-Hex)3が、高萎縮に対して有意に減少することを認識した。

表3A クラスタリン糖ペプチドの有意な変化(4対4)

【表2】

M/Z (3+)	組成	p値	部位
953.71	SA1-(HexNAc-Hex)2- コア	0.016	β64N
1050.74	SA2-(HexNAc-Hex)2- コア	0.003	β64N
1075.42	SA1-(HexNAc-Hex)3- コア	0.009	β64N
1172.45	SA2-(HexNAc-Hex)3- コア	0.006	β64N
1269.49	SA3-(HexNAc-Hex)3- コア	0.017	β64N
1391.53	SA3-(HexNAc-Hex)4- コア	0.043	β64N
1297.54	SA2-(HexNAc-Hex)2- コア	0.044	β147N
1356.21	SA3-(HexNAc-Hex)3- コア	0.044	α64N

10

20

30

表3B クラスタリン糖ペプチドの有意な変化(9対10)

【表3】

M/Z (3+)	組成	p値	部位
953.71	SA1-(HexNAc-Hex)2- コア	0.035	β64N
1075.42	SA1-(HexNAc-Hex)3- コア	0.019	β64N
1172.45	SA2-(HexNAc-Hex)3- コア	0.043	β64N
1297.54	SA2-(HexNAc-Hex)2- コア	0.044	β147N
1137.14	SA2-(HexNAc-Hex)2- コア	0.016	α64N
1356.21	SA3-(HexNAc-Hex)3- コア	0.007	α64N

10

20

表3C クラスタリン糖ペプチドの有意な変化(13対14、組み合わせ)

【表4】

M/Z (3+)	組成	p値	部位
953.71	SA1-(HexNAc-Hex)2- コア	0.022	β64N
1050.74	SA2-(HexNAc-Hex)2- コア	0.022	β64N
1075.42	SA1-(HexNAc-Hex)3- コア	0.001	β64N
1172.45	SA2-(HexNAc-Hex)3- コア	0.019	β64N

30

40

## 【0134】

(結論)

Orbitrap Fusionの使用は、4個から6個のN-結合型部位まで、全グリコフォーム範囲を増大させた。いくつかの64N部位グリコフォームは、アルツハイマー病を患う患者の血漿では、軽度認知障害を患う個人と比較して、有意に減少する。これらのグリコフォームのうち4種は、高レベルの海馬萎縮を伴うアルツハイマー病患者においても減少する。合わせると、これは、アルツハイマー病のための診断及び予測的マーカーとしてのクラスタリンアイソフォームの実用性を裏付ける。

## 【0135】

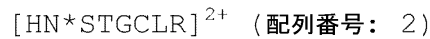
(実施例6-ヒト血漿中のクラスタリンの8種のグリコフォームのための選択反応モニタリン

50

グ(SRM)方法の開発及び予備試験)

本発明者らはまた、はるかに大きな数の臨床試料の範囲内での、より高いスループットの測定の準備を整えて、クラスタリンの特定の糖ペプチドを測定するための標的型選択反応モニタリング(SRM)方法を開発した。この新たに確立されたTSQ-SRMワークフローは、前駆体としてのクラスタリン 64N糖ペプチドの8種のグリコフォームと、遷移としてのm/z 366.14及びm/z 657.24での2種のグリカン特異的なオキシニウムイオン断片を使用した(表4参照)。さらに、部位特異的な情報の確定を提供する第3の遷移イオンとして働くための、

【化9】



10

(式中、N\*=アスパラギン残基+HexNacである)に相当するm/z 574.56でのペプチドイオンを含めた。それぞれの観察された遷移の詳細を、表4に提供する。

表4. TSQ分析のGlyco-SRM方法

【表5】

#	親	生成物	SRM 衝突 エネルギー	開始時間	停止時間	極性	トリガー	基準
1	953.712	366.140	30	0	30	+	100	なし
2	953.712	574.556	30	0	30	+	100	なし
3	953.712	657.235	30	0	30	+	100	なし
4	1050.744	366.140	33	0	30	+	100	なし
5	1050.744	574.556	33	0	30	+	100	なし
6	1050.744	657.235	33	0	30	+	100	なし
7	1075.423	366.140	34	0	30	+	100	なし
8	1075.423	574.556	34	0	30	+	100	なし
9	1075.423	657.235	34	0	30	+	100	なし
10	1172.454	366.140	37	0	30	+	100	なし
11	1172.454	574.556	37	0	30	+	100	なし
12	1172.454	657.235	37	0	30	+	100	なし
13	1197.134	366.140	38	0	30	+	100	なし
14	1197.134	574.556	38	0	30	+	100	なし
15	1197.134	657.235	38	0	30	+	100	なし
16	1269.487	366.140	41	0	30	+	100	なし
17	1269.487	574.556	41	0	30	+	100	なし
18	1269.487	657.235	41	0	30	+	100	なし
19	1294.165	366.140	42	0	30	+	100	なし
20	1294.165	574.556	42	0	30	+	100	なし
21	1294.165	657.235	42	0	30	+	100	なし
22	1391.532	366.140	45	0	30	+	100	なし
23	1391.532	574.556	45	0	30	+	100	なし
24	1391.532	657.235	45	0	30	+	100	なし

20

30

【0136】

先の研究(データは示さない)では、本発明者らは、事前の免疫沈降を用いずに、ヒト血清からクラスタリン糖ペプチドを抽出することができた。SRM方法によって提供される感度増大の可能性を考慮して、本発明者らは、クラスタリン濃縮のための、例えば臨床診断のために必要とされるであろう高スループット分析との適合性がより高いであろう、より直接的なgeLC方法を採用した。

40

【0137】

最初に、クラスタリンの位置を特定するために、一次元SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)実験において、正常ヒト血漿(Dade-Behring社、Germany)を、アルブミン及びIgG除去し、Laemml i緩衝液においてタンパク質を抽出し、SDS-PAGEにかけた。図13は、アルブミン/IgG除去血漿のGel-10分析を示す。10本すべてのバンドを切り出し、還元し、アルキル化し、トリプシン消化し、その後、Orbitrap Velos Pro上でMS分析を行った。クラスタリンの糖ペプチドを、バンド#5、#6、及び#7(大部分はバンド#7において見られ、45%のペプチド被覆率であった)のトリプシン消化物中で特定した(データは示さない)。

50

## 【 0 1 3 8 】

10本すべてのトリプシン消化したゲルバンドをまた、新たに開発したクラスタリンググリコフォームSRM方法を使用する分析にかけて、試料調製のためのgeLC方法の適合性を確認した。図14は、バンド#5、#6、及び#7においてクラスタリン糖ペプチドが見られたこと、また、クラスタリンの大部分は、バンド#7で特定されたことを示し、これらのglyco-SRM結果が、先のOrbitrap Velos Pro発見データと一致していることが示唆された。本発明者らは、SRMデータファイルを、8種の64N糖ペプチド前駆体の抽出イオンクロマトグラム(XIC)に対して試験した際に(図15)、これらの大部分が、7~8分の間に溶出することを決定することができた。その後、より複雑な方法が開発されるべきである場合、溶出時間の正確な特定によって、密接に関連する種の分離を改良するための、SRM又は溶出緩衝液の調整の、その後のスケジューリングが可能になる。合計スケールされる手法を使用するラベルフリー定量化のために、観察されたそれぞれの種についての積分ピーク面積を使用することができることが、本発明の方法の特有の利点である。さらに、このGel10-glyco-SRM方法は免疫沈降を必要とせず、かつクラスタリン糖ペプチドはTSQによって(Orbitrapによる1時間の代わりに)30分以内に検出することができるので、この新たに確立された方法は、クラスタリンの潜在的なバイオマーカー糖ペプチドを確認するためのより効率的かつ迅速な方式を提供する。同じ方法をまた、患者試料の臨床評価のために使用して、MCI及びアルツハイマー病の診断に役立てることができ、また、海馬萎縮及び認知機能低下の速度に関する予測的情報を提供することができる。同じSRM方法を、さらなる最適化をほとんど伴わずに、事前のSDS-PAGE分離の必要なしに、消化されたヒト血漿、血清、唾液、尿、又は脳脊髄液に適用することができることも理解されるであろう。

10

20

## 【 0 1 3 9 】

免疫沈降によってヒト血漿から濃縮したクラスタリンの分析のために、同じSRM方法を用いることも可能である。したがって、本発明者らの標的とされるバイオマーカー糖ペプチドをさらに確認するために、クラスタリングリコール-SRM方法を適用して、発見コホート由来の免疫沈降させたクラスタリンを評価した。予想通り、SRM方法は、より厳密な量的結果をもたらし、この改良された正確性によって、より高いレベルの海馬萎縮を伴うアルツハイマー病患者における特定のグリコフォームの減少に対する、より高い水準の有意性をもたらされた(表5)。全部で、64Nでの8種の観察された糖ペプチドのうちの5種が、高萎縮症例において有意に減少した。

30

## 【 0 1 4 0 】

個々のクラスタリンググリコフォームのSRM定量化についての箱ひげ図の選択を、図12に提供する。

表5 Gel10-glyco-SRM方法(4対4)を使用するクラスタリン糖ペプチドの有意な変化(発見コホート)

【表6】

m/z (3+)	組成	p値*	部位
953.71	SA1-(HexNAc-Hex)2- コア	0.0001	β64N
1050.74	SA2-(HexNAc-Hex)2- コア	0.0004	β64N
1075.42	SA1-(HexNAc-Hex)3- コア	0.0009	β64N
1172.45	SA2-(HexNAc-Hex)3- コア	0.012	β64N
1197.13	SA1-(HexNAc-Hex)4- コア	0.044	β64N

\*p値は、高萎縮群と低萎縮群との間の変化の有意性を示す。

【0141】

(実施例7-Gel10-glyco-SRMクラスタリンググリコフォーム選択反応モニタリングアッセイの検証研究)

実施例6で開発した8種のクラスタリン糖ペプチドGel10-glyco-SRMアッセイを、[高]レベルの海馬萎縮を伴う9症例及び[低]レベルの海馬萎縮を伴う10症例を含むアルツハイマー病患者血漿試料の検証コホートの分析に適用した。試料は、表2に記載した通りであった。試料調製及び分析方法はすべて、実施例6に記載した通りである。

【0142】

このコホート全体にわたって、3種の特定の64N部位特異的グリコフォームが、高レベルの海馬萎縮を伴う患者と、より低い速度の海馬萎縮を伴う患者との間の統計的に有意な差を示した(表6)。

表6-検証コホートにおけるGel10-glyco-SRMクラスタリンググリコフォームアッセイの性能

【表7】

m/z (3+)	組成	p値*	部位
953.71	SA1-(HexNAc-Hex)2- コア	0.000964891	β64N
1050.74	SA2-(HexNAc-Hex)2- コア	0.009457781	β64N
1172.45	SA2-(HexNAc-Hex)3- コア	0.006985634	β64N

\*p値は、高萎縮群と低萎縮群との間の変化の有意性を示す。

【0143】

発見コホートと検証コホートについての結果を合わせると、驚いたことに、8種すべてのグリコフォームが、低い海馬萎縮を伴う群と比較した場合の高萎縮群における濃度の低下について統計的有意性を獲得していた(表7)。これらの8種のクラスタリン糖ペプチドが患者の海馬体積に基づいて患者を区別する力は、アルツハイマー病の進行を診断及び予測

10

20

30

40

50

するための最小侵襲手段を提供し、また、パーキンソン病、ハンチントン病、及び前頭側頭型認知症を含めた神経損傷を引き起こすタンパク質の凝集を特徴とする他の神経変性疾患の分析に適用できることとなる。

表7-発見コホートと検証コホートの組み合わせにおける、Gel10-glyco-SRMとクラスタリンググリコフォームSRMの組み合わせた性能

【表8】

m/z (3+)	組成	p値*	部位
953.71	SA1-(HexNAc-Hex)2- コア	2.81311E-05	β64N
1050.74	SA2-(HexNAc-Hex)2- コア	5.67936E-10	β64N
1075.42	SA1-(HexNAc-Hex)3- コア	0.000662932	β64N
1172.45	SA2-(HexNAc-Hex)3- コア	8.03747E-08	β64N
1197.13	SA1-(HexNAc-Hex)4- コア	0.002226471	β64N
1269.49	SA3-(HexNAc-Hex)3- コア	0.001689634	β64N
1294.17	SA2-(HexNAc-Hex)4- コア	0.001327899	β64N
1391.53	SA3-(HexNAc-Hex)4- コア	0.009999	β64N

各糖ペプチドについての箱ひげ図を、図16に提供する(それぞれ、A~H)。

\*p値は、高萎縮群と低萎縮群との間の変化の有意性を示す。

【0144】

(結論)

ヒトクラスタリンの 64Nでの8種の特定のN-結合型糖ペプチドに対する高感度SRM方法は、高い海馬萎縮を伴うアルツハイマー病症例と、低い海馬萎縮を伴う軽度認知障害症例とを区別することができる。この方法は、それぞれの患者における特定のグリコフォームのレベルの検出に基づいて海馬萎縮を評価し、これを、特定のレベルの海馬萎縮に相当することが公知であるレベルと比較するための、定型化された臨床試験についての基礎を提供することができる。同じ方法を拡大して、あらゆる神経変性疾患の診断又は予測的バイオマーカーとして作用する、他の血漿タンパク質由来の他のクラスタリンペプチド、又は実際には(糖)ペプチドを組み込むことができる。

【0145】

(等価物)

前述の明細書は、当業者が本発明を実施できるようにするのに十分であると考えられる。本発明は、提供される実施例による範囲に限定されるべきではない。何故なら、実施例は、本発明の一態様の一つの実例と意図されるからであり、別の種における相同のタンパク質バイオマーカーへの適用を含めた他の機能的に等価の実施態様は、本発明の範囲内である。本明細書に示した及び記載したものに加えて、本発明の様々な改変は、前述の説明

から、当業者には明らかとなり、また、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれるであろう。本発明の利点及び目的は、本発明の各実施態様によって必ずしも網羅されない。

【0146】

本明細書に開示する、特許文献を含めたすべての参考文献を、あらゆる目的のために、特に本明細書で参照される開示のために、その全体を参照によって組み込む。

【0147】

【化10】

### 参考文献

- Andreasen, N., C. Hesse, et al. (1999). "Cerebrospinal fluid beta-amyloid(1-42) in Alzheimer disease: differences between early- and late-onset Alzheimer disease and stability during the course of disease." Arch Neurol **56**(6): 673-80. 10
- Bosman, G. J., I. G. Bartholomeus, et al. (1991). "Erythrocyte membrane characteristics indicate abnormal cellular aging in patients with Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **12**(1): 13-8. 20
- Butterfield, D. A., J. B. Owen (2011). "Lectin-affinity chromatography brain glycoproteomics and Alzheimer disease: insights into protein alterations consistent with the pathology and progression of this dementing disorder." Proteomics Clin Appl. **5**(1-2):50-6
- Friedland, R. P. (1993). "Epidemiology, education, and the ecology of Alzheimer's disease." Neurology **43**(2): 246-9. 30
- Ida, N., T. Hartmann, et al. (1996). "Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay." J Biol Chem **271**(37): 22908-14.
- Kanai, M., E. Matsubara, et al. (1998). "Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A beta1-40, and A beta1-42(43) in Alzheimer's disease: a study in Japan." Ann Neurol **44**(1): 17-26. 40
- Kawarabayashi, T., L. H. Younkin, et al. (2001). "Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease." J Neurosci **21**(2): 372-81.
- Killick, R., E. M. Ribe, et al. (2012). "Clusterin regulates  $\beta$ -amyloid toxicity via Dickkopf-1-driven 50

- induction of the wnt-PCP-JNK pathway." Mol Psychiatry. doi: 10.1038/mp.2012.163. [Epub ahead of print]
- Kosaka, T., M. Imagawa, et al. (1997). "The beta APP717 Alzheimer mutation increases the percentage of plasma amyloid-beta protein ending at A beta42(43)." Neurology **48**(3): 741-5.
- Kuo, Y. M., T. A. Kokjohn, et al. (2000). "Elevated abeta42 in skeletal muscle of Alzheimer disease patients suggests peripheral alterations of AbetaPP metabolism." Am J Pathol **156**(3): 797-805. 10
- Lindner, M. D., D. D. Gordon, et al. (1993). "Increased levels of truncated nerve growth factor receptor in urine of mildly demented patients with Alzheimer's disease." Arch Neurol **50**(10): 1054-60.
- Nuutinen T., T. Suuronen, et al. (2009) "Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease." Brain Res Rev. **61**(2):89-104. 20
- Pirttila, T., S. Mattinen, et al. (1992). "The decrease of CD8-positive lymphocytes in Alzheimer's disease." J Neurol Sci **107**(2): 160-5.
- Rocca, W. A., A. Hofman, et al. (1991). "Frequency and distribution of Alzheimer's disease in Europe: a collaborative study of 1980-1990 prevalence findings. The EURODEM-Prevalence Research Group." Ann Neurol **30**(3): 381-90. 30
- Sato, Y., T. Endo. (2010). "Alteration of brain glycoproteins during aging." Geriatr Gerontol Int **10** (Suppl. 1): 32-S40
- Scheuner, D., C. Eckman, et al. (1996). "Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the 40

presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease." Nat Med **2**(8): 864-70.

Ueno, I., T. Sakai, et al. (2000). "Analysis of blood plasma proteins in patients with Alzheimer's disease by two-dimensional electrophoresis, sequence homology and immunodetection." Electrophoresis **21**(9): 1832-45.

Robinson, M.D et al. (2010). "edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data" Bioinformatics **26**: 139-140.

Paulson et al. (2013). "Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys" Nature Methods **10**: 1200-1202.

De Livera et al. (2012). "Normalizing and Integrating Metabolomics Data" Anal. Chem. **84**(24): pp. 10768-10776.

Nilselid et al. (2006). "Clusterin in cerebrospinal fluid: Analysis of carbohydrates and quantification of native and glycosylated forms" Neurochemistry International **48**: 718-728.

本件出願は、以下の構成の発明を提供する。

(構成1)

被験者における神経変性疾患又は神経変性性認知症を診断又は評価するための方法であって、

(i)該被験者から得られたタンパク質含有試料を提供することと;

(ii)クラスタリン前駆体;アポリポタンパク質A-IV前駆体;アポリポタンパク質C-III前駆体;トランスサイレチン;ガレクチン7;補体C4前駆体; -2-マクログロブリン前駆体;Ig -1鎖C;ヒストン2B;Ig 鎖C領域;フィブリノゲン 鎖前駆体;補体因子H;インター- -トリプシン重鎖H4前駆体;補体C3前駆体; 又は アクチン;ハプトグロビン前駆体;及び血清アルブミン前駆体、又はこれらの断片からなる群から選択されるタンパク質バイオマーカーの濃度、量、又は発現の程度を決定することと;

(iii)(ii)で決定された前記濃度、量、又は程度を、特定の神経変性疾患、認知症、又は疾患の段階を患う対照者、又は神経変性疾患を有しない若しくは神経変性性認知症を有しない対照者由来の基準と比較することと;

(iv)該被験者におけるタンパク質バイオマーカーの少なくとも1種の特定のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームの、該基準に対するレベルに基づいて、該被験者の神経変性疾患又は神経変性性認知症の存在及び/又は段階に関する診断又は評価を行うこと

を含む前記方法。

(構成2)

前記少なくとも1種の特定のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームが、クラスタリン前駆体に由来する、構成1記載の方法。

(構成3)

前記少なくとも1種の特定のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームが、ヒトクラスタリンアミノ酸配列の少なくとも5、6、7、8、9個、若しくは少なくとも10個の連続するアミノ酸を含む、ヒトクラスタリンの糖鎖付加断片であって、N-結合型又はO-結合型グリカンを含む前記断片、又はヒトクラスタリンのグリコフォームを含む、構成2記載の方法。

10

(構成4)

ヒトクラスタリンの前記糖鎖付加断片が、  
【化11】

HN\*STGCLR (配列番号: 2);  
 KEDALN\*ETR (配列番号: 3);  
 KKEDALN\*ETR (配列番号: 4);  
 KKKEDALN\*ETR (配列番号: 5);  
 MLN\*TSSLLEQLNEQFNWVSR (配列番号: 6);  
 LAN\*LTQGEDQYYLR (配列番号: 7); 及び  
 QLEEFNL\*QSSPFYFMMWGDR (配列番号: 8);  
 ELPGVCN\*ETMMALWEECK (配列番号: 9);  
 LKELPGVCN\*ETMMALWEECKPCLK (配列番号: 10),

20

(ここでは、「N\*」は、グリカン付着残基を示す)  
からなる群から選択される、構成3記載の方法。

(構成5)

ヒトクラスタリンの前記糖鎖付加断片が、表3A、表3B、表3C、表5、表6、及び/又は表7に記載したクラスタリン糖ペプチドのいずれか1つから選択される、構成1から4のいずれか1記載の方法。

30

(構成6)

ヒトクラスタリンの前記糖鎖付加断片が、64N\_SA1-(HexNAc-Hex)2-コア; 64N\_SA2-(HexNAc-Hex)2-コア; 64N\_SA1-(HexNAc-Hex)3-コア; 64N\_SA2-(HexNAc-Hex)3-コア; 64N\_SA1-(HexNAc-Hex)4-コア; 64N\_SA3-(HexNAc-Hex)3-コア; 64N\_SA2-(HexNAc-Hex)4-コア; 及び 64N\_SA3-(HexNAc-Hex)4-コア からなる群から選択される 64N-グリカンを含む、構成1から5のいずれか1記載の方法。

(構成7)

前記少なくとも1種の特定のタンパク質グリコフォームが、前記タンパク質バイオマーカーの4本鎖グリコフォームである、構成1から6のいずれか1記載の方法。

40

(構成8)

前記少なくとも1種の特定のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームの濃度、量、又は発現の程度が、

(i) 同じタンパク質の少なくとも1つの他のアイソフォーム及び/又はグリコフォームと比較して、又は同じタンパク質のすべてのアイソフォーム及び/又はグリコフォームの合計と比較して;

(ii) 前記タンパク質バイオマーカーのうちの1つ以外の基準タンパク質と比較して; 或いは  
(iii) 該濃度、量、又は発現の程度の1以上の生の値を正規化して、正規化した合計スケールリングした測定値をもたらす、合計スケールリング方法を使用して

50

決定される、構成1から7のいずれか1記載の方法。

(構成9)

前記4本鎖グリコフォームのタンパク質バイオマーカーの濃度、量、又は発現の程度が、同じタンパク質の1以上の、より少ない鎖付加数のグリコフォーム(例えば、3本鎖又は2本鎖グリコフォーム)と比較して、又は、同じタンパク質のすべてのグリコフォームの合計と比較して決定される、構成8記載の方法。

(構成10)

4本鎖グリコフォームのタンパク質バイオマーカーの、同じタンパク質のすべてのグリコフォームの合計に対する割合を決定することを含む、構成1から9のいずれか1記載の方法。

10

(構成11)

配列

【化12】

HN\*STGCLR (配列番号: 2)

を含む又は該配列からなる前記ヒトクラスタリン糖タンパク質断片の4本鎖グリコフォームを、同じ糖タンパク質断片のすべてのグリコフォームの合計に対する割合として定量化することを含む、構成10記載の方法。

(構成12)

被験者からの試料における、対照者からの前記基準における4本鎖グリコフォームの相対レベルよりも低い相対レベルの4本鎖グリコフォームが、該被験者が、神経変性疾患又は認知症を有する及び/又はより進行した段階の神経変性疾患又は認知症を有すると予想されることを示す、構成9から11のいずれか1記載の方法。

20

(構成13)

前記より進行した段階の神経変性疾患又は認知症が、比較的の高いレベルの海馬萎縮を含む、構成12記載の方法。

(構成14)

前記神経変性疾患又は神経変性性認知症が、アルツハイマー病(AD)、軽度認知障害(MCI)、血管性認知症、レビー小体型認知症、単独の、又はADを伴う混合型認知症としての前頭側頭型認知症、パーキンソン病、及びハンチントン病からなる群から選択される、構成1から13のいずれか1記載の方法。

30

(構成15)

少なくとも2、3、4、又は少なくとも5種の前記バイオマーカータンパク質のそれぞれの、少なくとも1種の特定のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームの濃度、量、又は発現の程度を決定することを含む、構成1から14のいずれか1記載の方法。

(構成16)

前記タンパク質バイオマーカーの又は該タンパク質バイオマーカーのそれぞれの、少なくとも2、3、4、又は少なくとも5種の、特定のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームの、濃度、量、又は発現の程度を決定することを含む、構成1から15のいずれか1記載の方法。

40

(構成17)

前記タンパク質含有試料が、血漿、血液細胞、血清、唾液、尿、脳脊髄液(CSF)、細胞擦過物、及び組織生検材料からなる群から選択される、構成1から16のいずれか1記載の方法。

(構成18)

前記タンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームが、グリコフォームであり、かつ、ゲル電気泳動を使用して測定される、構成1から17のいずれか1記載の方法。

(構成19)

前記タンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームが、グリコフォームであり、かつ、LC-MS/MSを使用して測定される、構成1から17のいずれか1記載の方法。

50

(構成20)

各グリコフォームの相対量が、選択反応モニタリング質量分析を使用する、同等の重同位体標識された基準グリコフォームに対する比較によって算出される、構成19記載の方法。

(構成21)

前記タンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームが、グリコフォームであり、かつ、合計スケーリングされる選択反応モニタリング(SRM)質量分析を使用して測定される、構成1から17のいずれか1記載の方法。

(構成22)

前記タンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームが、標識されない、構成1から17又は21のいずれか1記載の方法。

10

(構成23)

前記試料をゲル電気泳動分離にかけることを含まない、及び/又は該試料を免疫沈降による濃縮にかけることを含まない、構成1から17、21、又は22のいずれか1記載の方法。

(構成24)

前記タンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームが、グリコフォームであり、かつ、本質的に実施例6に記載した通りの方法によって測定される、構成1から17、又は21から23のいずれか1記載の方法。

(構成25)

前記重同位体標識された基準グリコフォームが、H、C、N、又はOの1以上の重同位体が前記グリコフォームのペプチド又は糖成分内で置換された合成糖ペプチドである、構成20記載の方法。

20

(構成26)

前記重同位体標識された基準グリコフォームが、同位体質量タグで標識されている濃縮された天然に存在するグリコフォームであり、かつ、該同位体質量タグは、H、C、N、又はOの1以上の重同位体を伴い、かつこうした質量タグは、前記グリコフォームのペプチド又は糖成分と反応することが可能である、構成20記載の方法。

(構成27)

各グリコフォームの相対量が、同重体質量タグで標識された同等のグリコフォームに対する比較によって算出され、ここで、

30

(i)被験者から採取された組織又は体液の各試料を、同重体質量タグセットのあるメンバーで標識して、標識された分析試料を作製し;

(ii)濃縮されたグリコフォームの標準の基準パネルを、2から6の一定分量に分け、各一定分量を、該標識された分析試料と同じ同重体質量タグセットの追加のメンバーで別々に標識し、それぞれ独立に標識された該基準パネルの一定分量を事前に定義した割合で混合して、標準の基準混合物としての臨床的に意義のある濃度曲線を作製し;

(iii)等しい体積の該標識された分析試料と該標準の基準混合物を混合して、MSキャリアプレート試料を形成し;かつ

(iv)ステップ(iii)で調製したMSキャリアプレート試料を、質量分析によって分析する、構成19記載の方法。

40

(構成28)

前記同重体質量タグセットが、タンデム質量タグセットである、構成27記載の方法。

(構成29)

前記少なくとも1種の特定のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームが、免疫学的測定法によって測定される、構成1から17のいずれか1記載の方法。

(構成30)

前記免疫学的測定法が、ウェスタンブロットティングを含む、構成29記載の方法。

(構成31)

前記免疫学的方法が、ELISAを含む、構成29記載の方法。

(構成32)

50

表1A又は1Bに記載される少なくとも5、6、7、8、9、又は少なくとも10種の糖ペプチドの相対的プロファイルを決することを含む、構成1から28のいずれか1記載の方法。

(構成33)

前記被験者からの試料中の前記糖ペプチドの相対的割合が、表1A内の「AVG\_A」及び/又は「AVG\_B」列に記載した通りの前記糖ペプチドの相対的割合と比較される、構成32記載の方法。

(構成34)

表1A又は1Bに記載した保持時間、m/z値、及び/又は荷電状態値を参考にして、前記糖ペプチドの少なくとも一部分を特定することを含む、構成32又は33記載の方法。

(構成35)

複数の被験者を、該被験者の神経変性疾患又は認知症の段階及び/又は重症度に従って階層化するための方法であって、それぞれの被験者からの少なくとも1つの被検試料に対して、構成1から34のいずれか1記載の方法を実施することと;

該それぞれの被験者における前記タンパク質バイオマーカーの少なくとも1種の特定のタンパク質アイソフォーム及び/又はグリコフォームのレベルに基づいて、該被験者を、より進行した若しくはそれほど進行していない段階の神経変性疾患又は認知症に、又はより重篤な若しくはそれほど重篤でない神経変性疾患又は認知症に階層化することと

を含む前記方法。

(構成36)

前記被験者が、海馬萎縮の予測される程度に従って階層化される、構成35記載の方法。

(構成37)

制御部分と記憶部分とを含む神経変性性認知症スコア算出装置と、情報通信端末装置とを含む、神経変性性認知症決定システムであって、前記装置が、ネットワークを通じて互いに通信的に接続されており;

かつ、該情報通信端末装置が、

1a)対象の測定されたグリコフォームプロファイルデータを神経変性性認知症スコア算出装置に送信する、クラスタリンググリコフォームプロファイルデータ送信ユニット;及び  
1b)該神経変性性認知症スコア算出装置から送信された該対象の神経変性性認知症スコアの評価結果を受信する、評価結果受信ユニット;

を含み;

かつ、該制御部分が、

2a)該情報通信端末装置からの該対象のクラスタリンググリコフォームプロファイルデータを受信する、クラスタリンググリコフォームプロファイルデータ受信ユニット;  
2b)該対象のクラスタリンググリコフォームプロファイルデータと、該記憶装置に保存された基準クラスタリンググリコフォームプロファイルデータ記録との適合の近似性を決定する、クラスタリンググリコフォームプロファイル照合ユニット;  
2c)該クラスタリンググリコフォームプロファイル照合ユニットによって算出された適合の近似性に基づいて、該対象の神経変性性認知症スコアを決定する、神経変性性認知症スコア決定ユニット;及び

2d)該神経変性性認知症スコア決定ユニットによって得られた該対象の神経変性性認知症スコアを、該情報通信端末装置に送信する、決定結果送信ユニット

を含む、前記神経変性性認知症決定システム。

(構成38)

前記クラスタリンググリコフォームプロファイルが、表1A又は1Bに記載した通りの少なくとも5、6、7、8、9、又は少なくとも10種の糖ペプチドの、前記対象の血漿試料における相対的割合を含む、構成37記載のシステム。

(構成39)

神経変性疾患又は認知症に対する治療有効性について評価されることとなる薬剤を特定する方法であって、被検薬剤の存在下と被検薬剤の非存在下で、  
-N-アセチル-グルコサ

10

20

30

40

50

ミニダーゼを適切な基質と接触させることと、該被検薬剤の存在下と非存在下で -N-アセチル-グルコサミニダーゼ活性の速度又は程度を比較することとを含み、ここで、 -N-アセチル-グルコサミニダーゼ活性を阻害する被検薬剤が、神経変性性認知症に対する治療有効性について評価されることとなる薬剤として特定される、前記方法。

(構成40)

ヒトクラスタリンタンパク質又はその糖鎖付加断片の4本鎖グリコフォームの認知症誘導性のグリカン刈り込みを減少又は阻止する能力について、該被検薬剤を評価することをさらに含む、構成39記載の方法。

(構成41)

神経変性疾患又は認知症と診断された対象への、治療量の -N-アセチル-グルコサミニダーゼの阻害剤の投与によって、神経変性性認知症を治療する方法。

10

(構成42)

哺乳類対象における神経変性疾患又は認知症の治療の方法における使用のための -N-アセチル-グルコサミニダーゼの阻害剤。

(構成43)

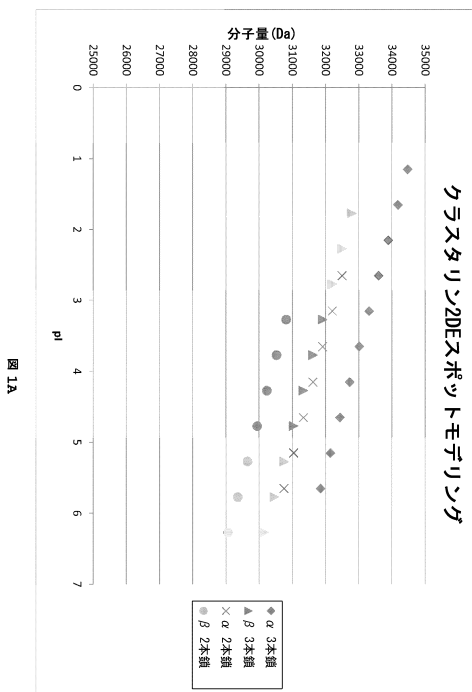
哺乳類対象における神経変性疾患又は神経変性性認知症の治療の有効性を決定する方法であって、構成1から34のいずれか1記載の方法によって、該対象の治療前に、及び該対象の治療中に又は治療後に少なくとも1回、少なくとも1種のタンパク質バイオマーカーの1以上のアイソフォーム及び/又はグリコフォームのレベルを決定することを含み、ここで、前記1以上のアイソフォーム及び/又はグリコフォームのレベルが安定であり続けるか、又はより正常なレベルに戻ることによって、治療の成功が実証される、前記方法。

20

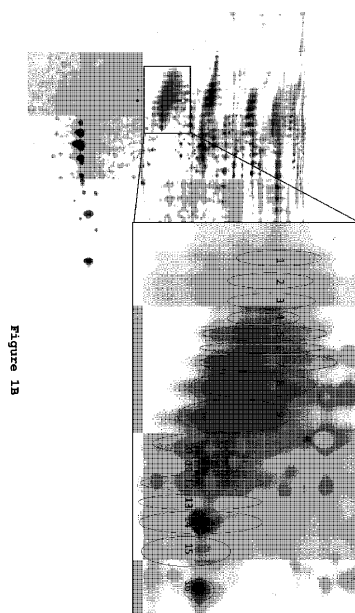
(構成44)

前記対象が、ヒト、マウス、又はラットである、構成43記載の方法。

【図1A】



【図1B】





【 図 7 】

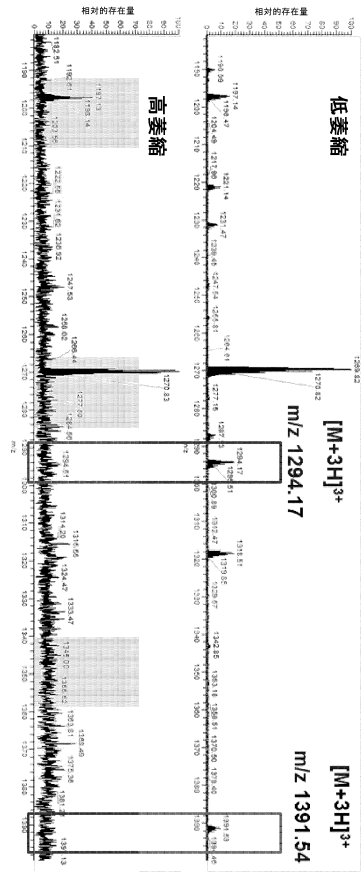


図 7

【 図 9 A 】

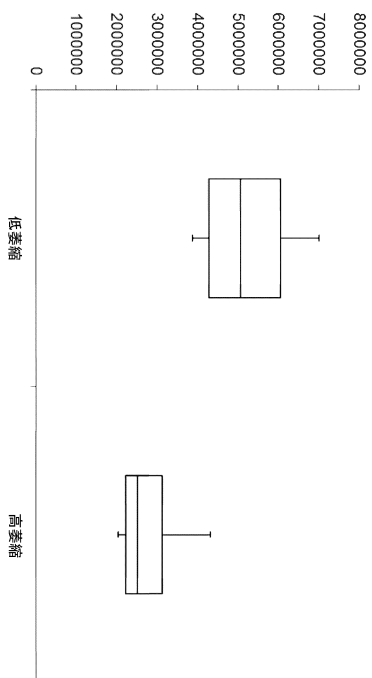


図 9A

【 図 6 】

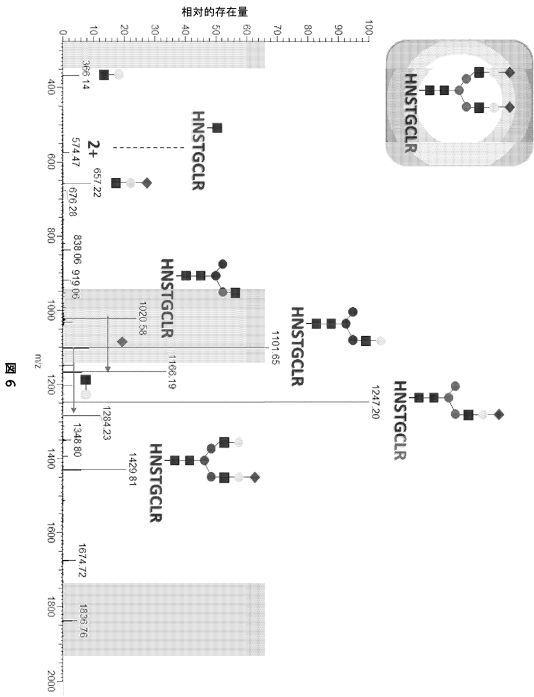


図 6

【 図 8 】

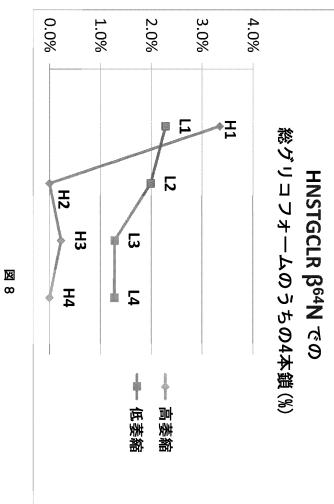
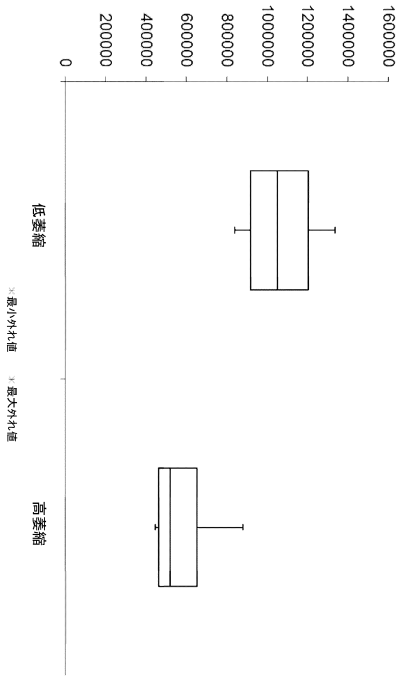


図 8

beta4N\_SMI-(HexNAc-Hex)2-C7

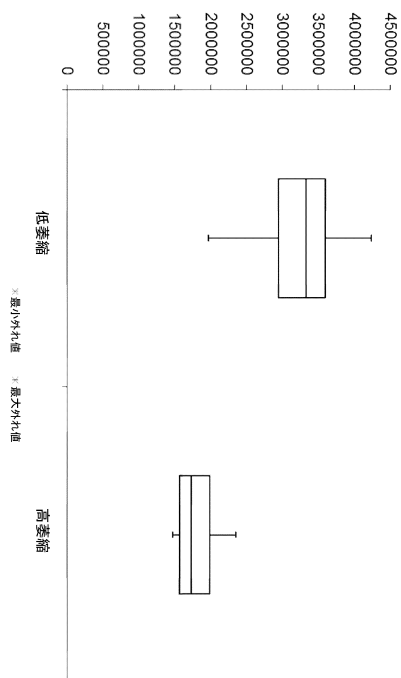
β44N\_SA1-(HexNAc-Hex)3-CT



【 9 C】

図 9C

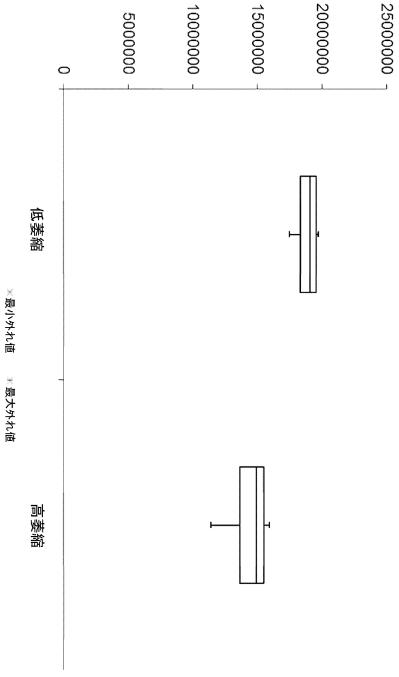
β44N\_SA3-(HexNAc-Hex)3-CT



【 9 E】

図 9E

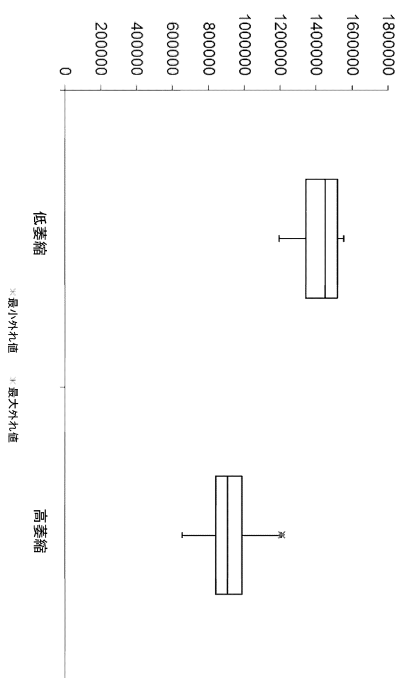
β44N\_SA2-(HexNAc-Hex)2-CT



【 9 B】

図 9B

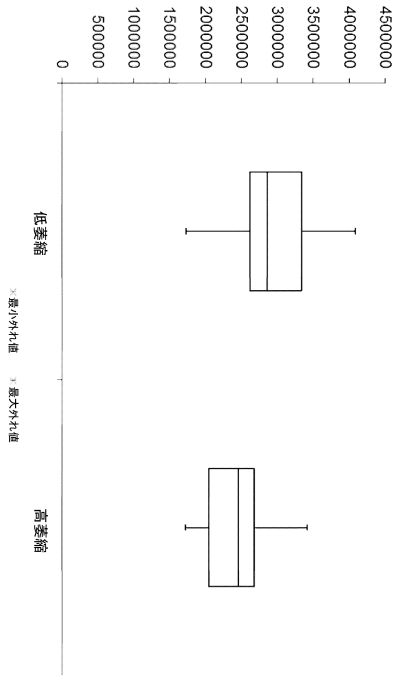
β44N\_SA2-(HexNAc-Hex)3-CT



【 9 D】

図 9D

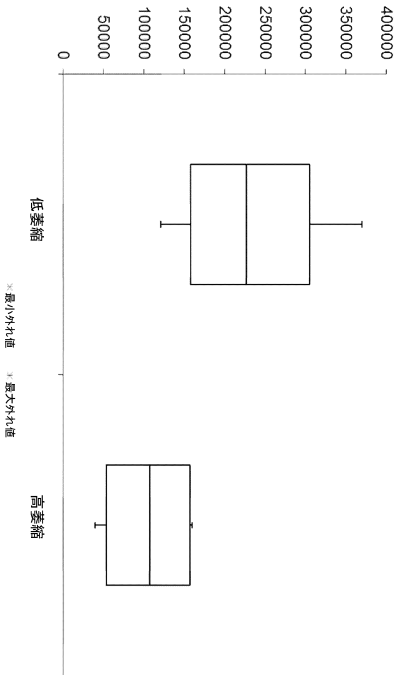
β64N\_SAI-(HexN&C-Hex) 2 - コマ



【 10 A】

図 10A

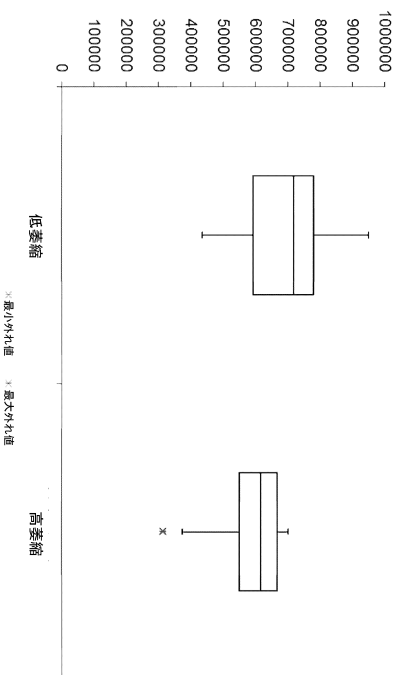
β64N\_SA3-(HexN&C-Hex) 4 - コマ



【 9 F】

図 9F

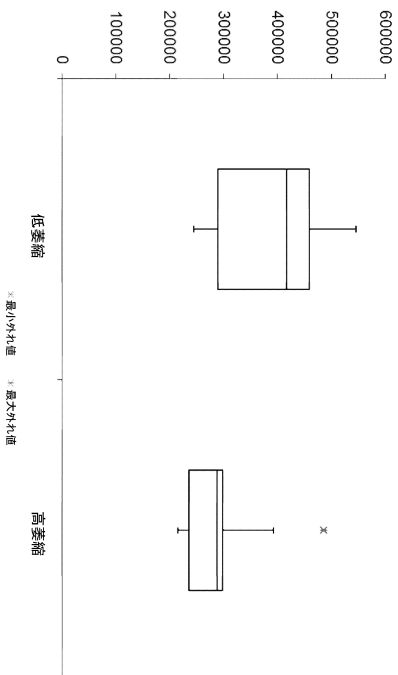
β64N\_SA2-(HexN&C-Hex) 3 - コマ



【 10 C】

図 10C

β64N\_SAI-(HexN&C-Hex) 3 - コマ



【 10 B】

図 10B

β64N\_SA2-(HexNAc-Hex) 2- 37

【 1 1 B】

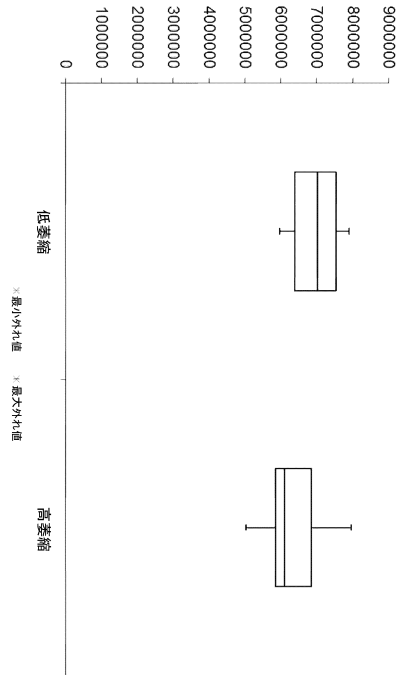


図 11B

β64N\_SA1-(HexNAc-Hex) 2- 37

【 1 1 A】

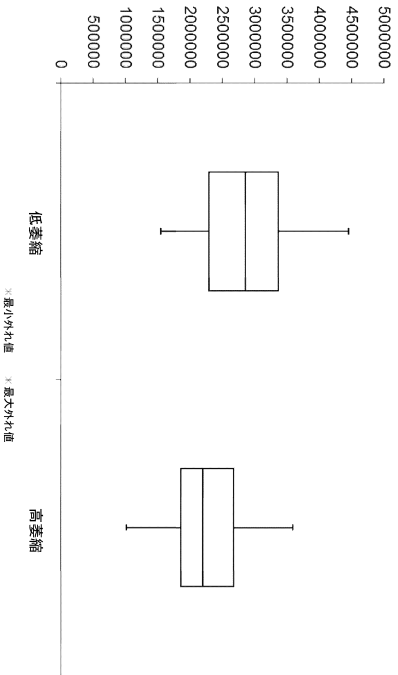


図 11A

β64N\_SA2-(HexNAc-Hex) 3- 37

【 1 1 D】

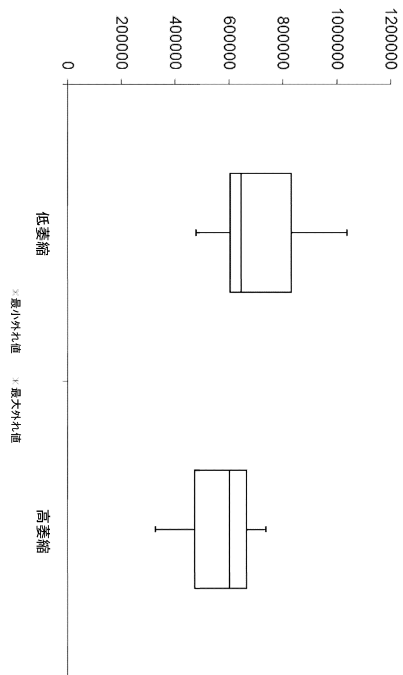


図 11D

β64N\_SA1-(HexNAc-Hex) 3- 37

【 1 1 C】

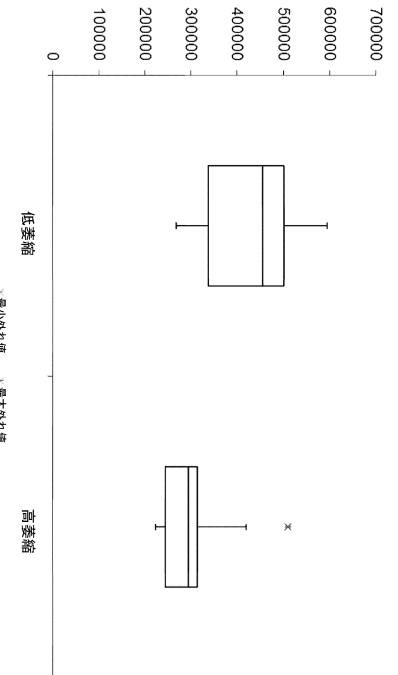
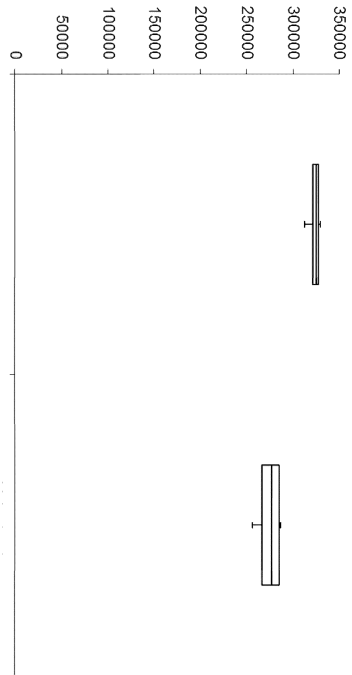


図 11C

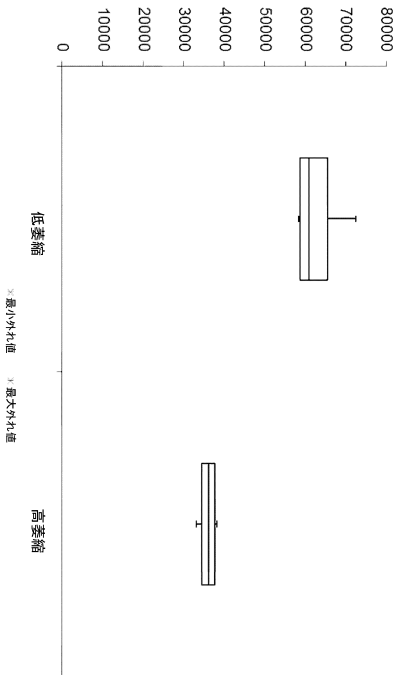
β64N\_SA2-(HexNAc-Hex) 2- ㉟



【 1 2 B】

図 12B

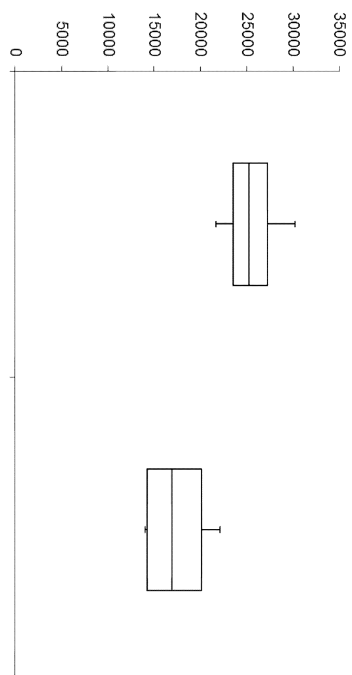
β64N\_SA1-(HexNAc-Hex) 2- ㉟



【 1 2 A】

図 12A

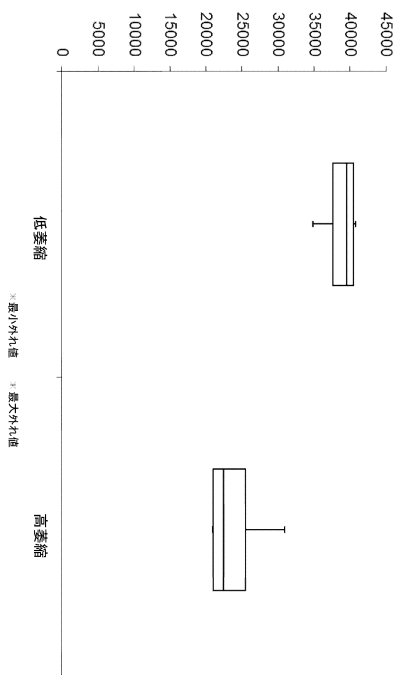
β64N\_SA2-(HexNAc-Hex) 3- ㉟



【 1 2 D】

図 12D

β64N\_SA1-(HexNAc-Hex) 3- ㉟



【 1 2 C】

図 12C

【 12 E】

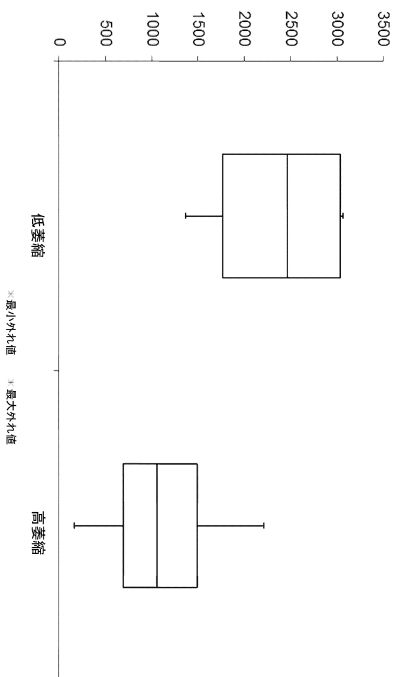


图 12E

【 14】

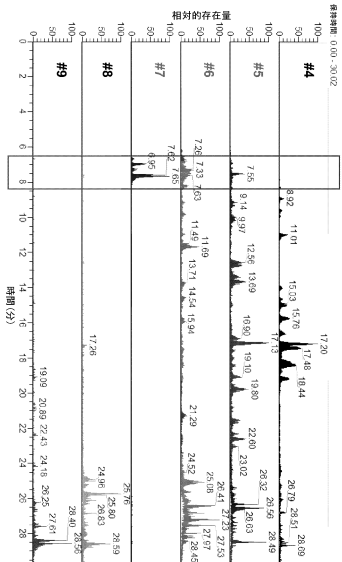


图 14

【 13】

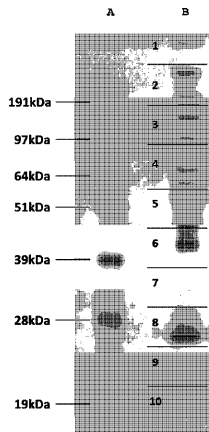


Figure 13

【 15】

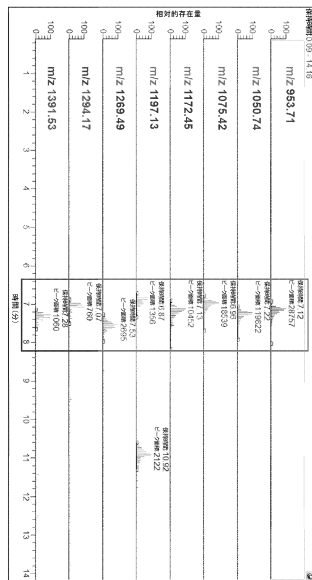


图 15

【 16 B】

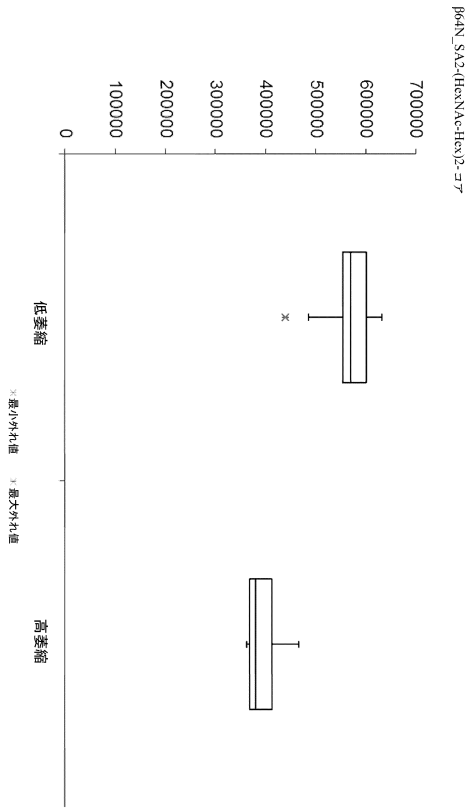


図 16B

【 16 D】

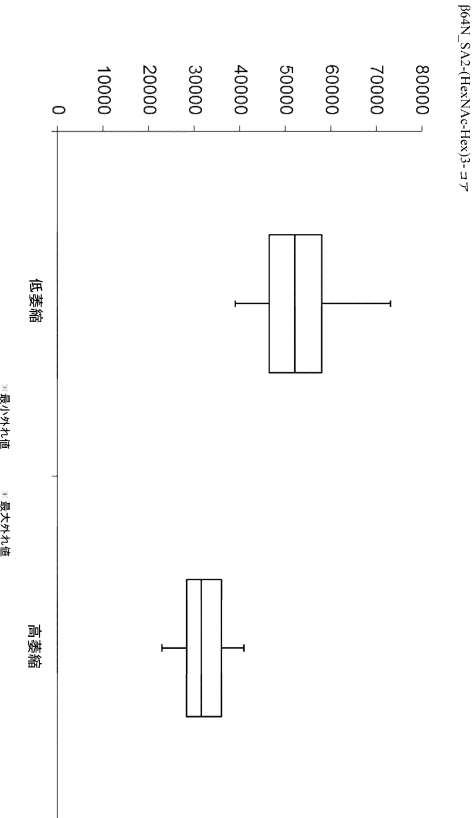


図 16D

【 16 A】

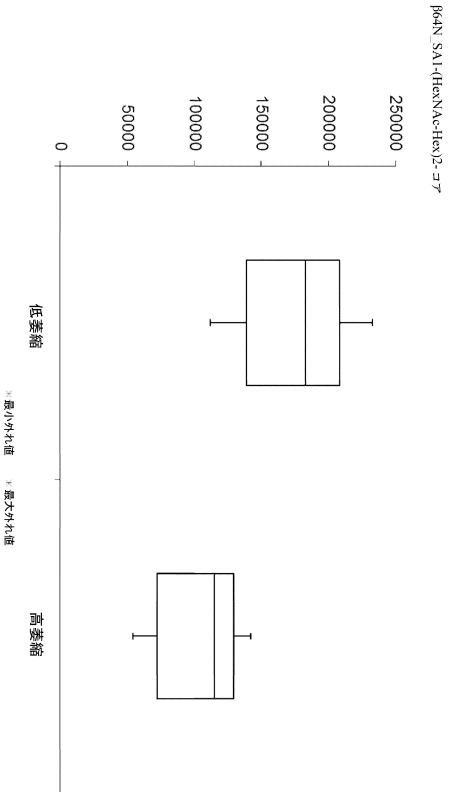


図 16A

【 16 C】

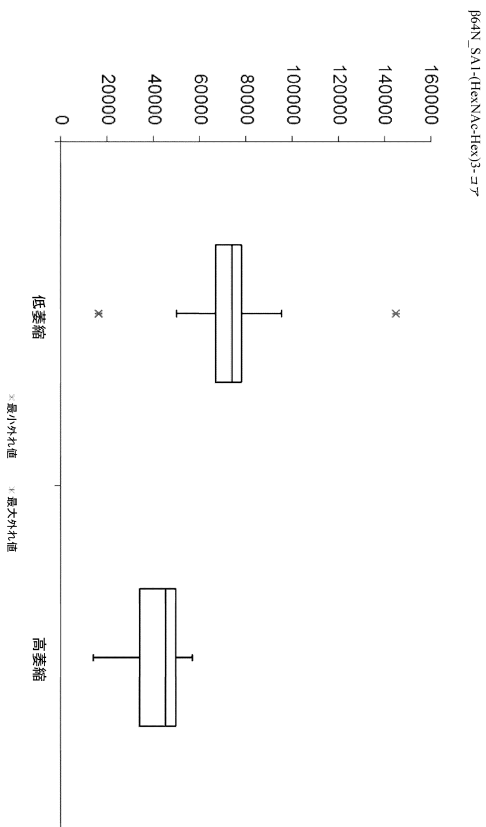


図 16C

【 16 F】

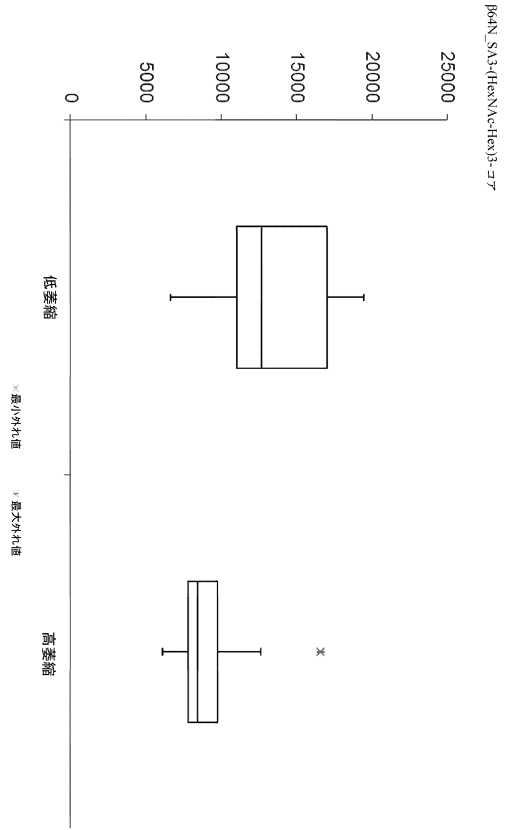


図 16F

【 16 H】

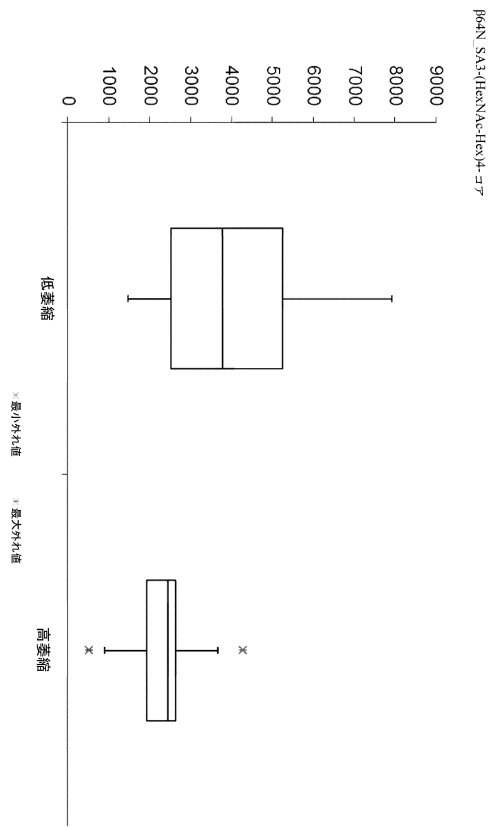


図 16H

【 16 E】

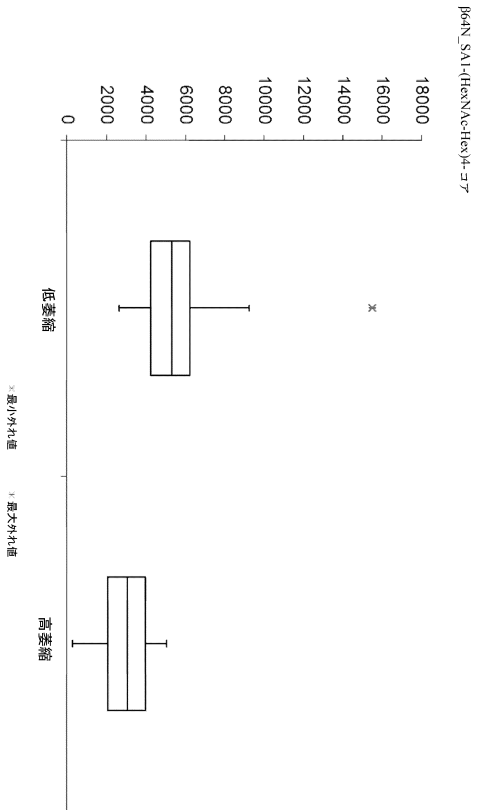


図 16E

【 16 G】

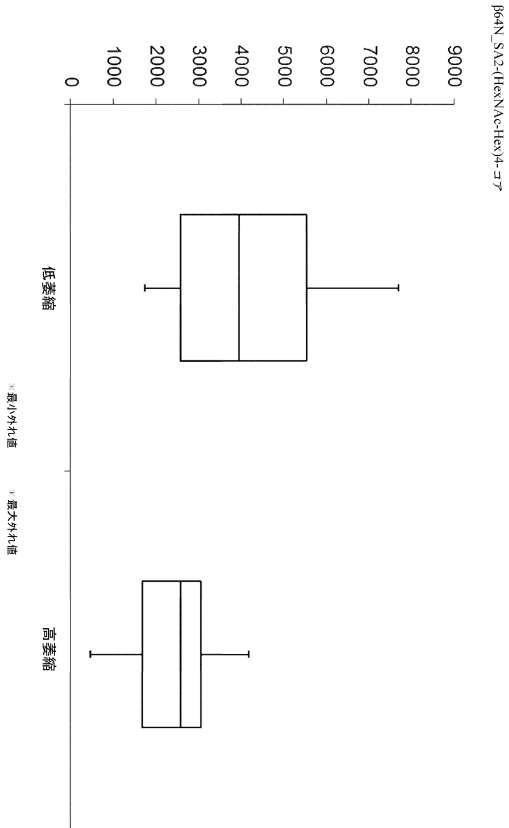


図 16G

【 図 17 】

表1A: クラスターリンGlycoModデータベースv1.0(対照血漿)

番号	糖ペプチド	平均保留時間(分)	m/z(荷電状態)	割合 (%)				
				AVG_A	CV_A	AVG_B	CV_B	CV_A vs. B
<b>HN*STGCLR (b64N)</b>								
1	SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	11.55	953.71(3+)	9.2	4.7	9.1	3.8	0.5
2	SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	11.35	1050.74(3+)	55.2	2.3	57.3	3.8	2.6
3	SA1-(HexNAc-Hex)3-コア	10.43	1075.42(3+)	11.7	17.5	8.7	27.2	20.7
4	DeoxyHex1-SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	10.95	1099.46(3+)	1.3	26.6	1.1	5.1	9.7
5	DeoxyHex1-SA1-(HexNAc-Hex)3-コア	11.68	1124.1(3+)	1.1	0.0	0.9	30.9	11.6
6	SA2-(HexNAc-Hex)3-コア	11.03	1172.45(3+)	8.5	6.1	11.0	3.2	18.6
7	SA1-(HexNAc-Hex)4-コア	10.34	1197.46(3+)	2.2	0.0	1.5	40.6	26.8
8	DeoxyHex1-SA2-(HexNAc-Hex)3-コア	11.10	1221.13(3+)	1.5	43.3	1.1	5.1	18.1
9	SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	12.11	1269.81(3+)	4.8	15.2	4.6	28.5	2.5
10	SA2-(HexNAc-Hex)4-コア	10.87	1294.49(3+)	2.6	12.5	2.6	22.3	1.8
11	DeoxyHex1-SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	11.93	1318.17(3+)	1.1	0.0	0.8	37.7	25.3
12	SA3-(HexNAc-Hex)4-コア	11.74	1391.19(3+)	0.9	38.5	1.5	40.6	35.4
<b>KEEDALN*ETR (g64N)</b>								
13	SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	14.11	1094.44(3+)	33.6	36.5	26.9	5.8	15.5
14	SA2-(HexNAc-Hex)3-コア	14.08	1216.48(3+)	8.0	20.1	11.1	21.8	22.5
15	DeoxyHex1-SA2-(HexNAc-Hex)3-コア	13.91	1264.84(3+)	5.6	13.5	2.4	38.2	56.2
16	SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	15.07	1313.51(3+)	28.7	22.2	41.8	16.0	26.4
17	DeoxyHex1-SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	14.88	1361.87(3+)	24.2	26.8	17.7	27.3	21.8
<b>KEEDALN*ETR (g64N)</b>								
18	SA1-(HexNAc-Hex)2-コア	16.57	1040.11(3+)	1.7	57.7	3.3	17.1	47.1
19	SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	14.56	1137.14(3+)	26.0	13.4	21.7	10.9	12.6
20	SA1-(HexNAc-Hex)3-コア	15.97	1161.82(3+)	3.7	14.3	6.1	11.8	34.6
21	SA1-(HexNAc-Hex)3-コア	14.56	1258.85(3+)	4.6	17.3	5.5	3.8	11.7
22	DeoxyHex1-SA2-(HexNAc-Hex)3-コア	14.36	1307.87(3+)	3.0	7.8	1.8	3.1	33.4
23	SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	14.49	1356.21(3+)	38.4	2.0	45.5	4.1	11.9
24	DeoxyHex1-SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	14.30	1404.9(3+)	24.9	3.8	16.0	5.0	30.6
<b>KEEDALN*ETR (g64N)</b>								
25	SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	19.08	1180.11(3+)	69.5	4.6	65.3	16.5	4.4
26	SA2-(HexNAc-Hex)3-コア	19.66	1301.82(3+)	30.5	10.6	34.7	31.0	9.2
<b>MLN*TSLLLEQLNEQFNWVSR (b127N)</b>								
27	SA1-(HexNAc-Hex)2-コア	26.97	1442.3(3+)	86.1	8.7	90.1	1.5	5.0
28	SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	29.85	1553.52(4+)	13.9	54.2	9.9	13.5	36.9
<b>LAN*ITQGEDQYLR (b147N)</b>								
29	SA1-(HexNAc-Hex)2-コア	25.38	1200.17(3+)	2.2	27.6	2.8	11.6	16.1
30	SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	26.35	1297.54(3+)	46.8	4.8	46.1	11.6	1.0
31	SA1-(HexNAc-Hex)3-コア	25.87	1322.22(3+)	0.6	50.8	0.5	12.4	21.4
32	DeoxyHex1-SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	26.23	1346.57(3+)	7.2	12.4	5.5	12.7	15.3
33	DeoxyHex1-SA1-(HexNAc-Hex)3-コア	27.18	1370.57(3+)	0.6	50.8	1.2	26.9	43.7
34	SA2-(HexNAc-Hex)3-コア	26.17	1419.25(3+)	2.8	4.1	4.0	1.5	23.6
35	DeoxyHex1-SA3-(HexNAc-Hex)2-コア	26.97	1443.04(3+)	11.3	22.3	8.5	46.3	20.3
36	DeoxyHex1-SA2-(HexNAc-Hex)3-コア	26.17	1467.93(3+)	2.2	27.6	1.8	11.4	12.9
37	SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	27.26	1516.62(3+)	13.7	4.8	23.1	14.1	36.1
38	DeoxyHex1-SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	27.08	1564.97(3+)	12.7	17.5	10.5	11.3	13.0
<b>LKELPGVCFETMMALWEECKPLK (a81N)</b>								
39	SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	30.39	1286.29(4+)	29.5	25.6	27.2	5.9	14.8
40	SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	31.09	1450.60(4+)	37.0	7.0	50.5	4.1	0.9
41	DeoxyHex1-SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	31.09	1487.36(4+)	33.5	15.4	22.2	5.0	10.3

図 17

【 図 18 】

表1B: クラスターリンGlycoModデータベースv1.1(MCI/AD血漿)

番号	クラスターリン糖ペプチド	m/z(荷電状態)
<b>HN*STGCLR (b64N)</b>		
1	SA1-(HexNAc-Hex)2-コア	953.71(3+)
2	SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	1050.74(3+)
3	SA1-(HexNAc-Hex)3-コア	1075.42(3+)
4	DeoxyHex1-SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	1099.46(3+)
5	DeoxyHex1-SA1-(HexNAc-Hex)3-コア	1124.10(3+)
6	SA2-(HexNAc-Hex)3-コア	1172.45(3+)
7	SA1-(HexNAc-Hex)4-コア	1197.46(3+)
8	DeoxyHex1-SA2-(HexNAc-Hex)3-コア	1221.13(3+)
9	SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	1269.81(3+)
10	SA2-(HexNAc-Hex)4-コア	1294.49(3+)
11	SA3-(HexNAc-Hex)4-コア	1391.19(3+)
<b>KEEDALN*ETR (g64N)</b>		
12	SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	1094.44(3+)
13	DeoxyHex1-SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	1143.13(3+)
14	SA2-(HexNAc-Hex)3-コア	1216.48(3+)
15	DeoxyHex1-SA2-(HexNAc-Hex)3-コア	1264.84(3+)
16	SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	1313.51(3+)
17	DeoxyHex1-SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	1361.87(3+)
<b>KEEDALN*ETR (g64N)</b>		
18	SA1-(HexNAc-Hex)2-コア	1040.11(3+)
19	SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	1137.14(3+)
20	SA1-(HexNAc-Hex)3-コア	1161.82(3+)
21	SA2-(HexNAc-Hex)3-コア	1258.85(3+)
22	DeoxyHex1-SA2-(HexNAc-Hex)3-コア	1307.87(3+)
23	SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	1356.21(3+)
24	DeoxyHex1-SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	1404.90(3+)
<b>KEEDALN*ETR (g64N)</b>		
25	SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	1180.11(3+)
<b>MLN*TSLLLEQLNEQFNWVSR (b127N)</b>		
26	SA1-(HexNAc-Hex)2-コア	1442.30(3+)
27	SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	1553.53(4+)
<b>LAN*ITQGEDQYLR (b147N)</b>		
28	SA1-(HexNAc-Hex)2-コア	1200.17(3+)
29	SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	1297.54(3+)
30	SA1-(HexNAc-Hex)3-コア	1322.22(3+)
31	DeoxyHex1-SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	1346.57(3+)
32	SA2-(HexNAc-Hex)3-コア	1419.25(3+)
33	DeoxyHex1-SA2-(HexNAc-Hex)3-コア	1467.93(3+)
34	SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	1516.62(3+)
35	DeoxyHex1-SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	1564.97(3+)
<b>LKELPGVCFETMMALWEECKPLK (a81N)</b>		
36	SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	1216.50(4+)
37	SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	1390.56(4+)
38	DeoxyHex1-SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	1427.33(4+)
<b>LKELPGVCFETMMALWEECKPLK (a81N)</b>		
39	SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	1286.55(4+)
40	SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	1451.11(4+)
41	DeoxyHex1-SA3-(HexNAc-Hex)3-コア	1487.37(4+)
<b>GLEEFLLQSSPFYFWWGOR (A123N)</b>		
42	SA2-(HexNAc-Hex)2-コア	1179.48(4+)

図 18

【 配列表 】

0006509201000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N	27/62 (2006.01)	G 0 1 N	27/62 V
G 0 1 N	30/72 (2006.01)	G 0 1 N	27/62 X
G 0 1 N	30/88 (2006.01)	G 0 1 N	30/72 C
C 1 2 Q	1/34 (2006.01)	G 0 1 N	30/88 J
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	C 1 2 Q	1/34
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
		C 0 7 K	14/47

(72)発明者 フイ チュング リアング  
イギリス国 KT11 3EP サリー コバム ダウンサイド ブリッジ ロード コヴェハム  
ハウス シー/オー エレクトロフォレティクス リミテッド

(72)発明者 イアン ヒューゴ ピケ  
イギリス国 KT11 3EP サリー コバム ダウンサイド ブリッジ ロード コヴェハム  
ハウス シー/オー エレクトロフォレティクス リミテッド

審査官 亀田 宏之

(56)参考文献 特表2008-514946(JP,A)  
特開2010-271078(JP,A)  
特表2014-517276(JP,A)  
国際公開第2005/114221(WO,A2)  
特表2016-527480(JP,A)  
Lamoureux Lise et al, Analysis of clusterin glycoforms in the urine of BSE-infected F1  
eckvieh-Simmental cows., Journal of Toxicology and environmental health, 2011年1  
1月 1日, vol.74, No.2-4, p138-145

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 6 8  
A 6 1 K 4 5 / 0 0  
A 6 1 P 2 5 / 0 0  
A 6 1 P 2 5 / 2 8  
C 1 2 Q 1 / 3 4  
G 0 1 N 2 7 / 6 2  
G 0 1 N 3 0 / 7 2  
G 0 1 N 3 0 / 8 8  
G 0 1 N 3 3 / 1 5  
G 0 1 N 3 3 / 5 0  
G 0 1 N 3 3 / 5 3  
G 0 1 N 3 3 / 6 6  
C 0 7 K 1 4 / 4 7

专利名称(译)	与神经变性疾病有关的方法和组合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP6509201B2</a>	公开(公告)日	2019-05-15
申请号	JP2016517686	申请日	2014-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	电泳有限公司		
申请(专利权)人(译)	电Foret的遗传学有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	电Foret的遗传学有限公司		
[标]发明人	マルコムアンドリユーワード フィチュングリアング イアンヒューゴピケ		
发明人	マルコム アンドリユー ワード フィ-チュング リアング イアン ヒューゴ ピケ		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/66 G01N33/53 G01N33/15 G01N33/50 G01N27/62 G01N30/72 G01N30/88 C12Q1/34 A61K45/00 A61P25/28 A61P25/00 C07K14/47		
CPC分类号	A61P25/00 A61P25/28 C12Q1/34 G01N33/6842 G01N33/6896 G01N2400/00 G01N2800/2814 G01N2800/2821 G01N2800/2835 G01N2800/60 G01N2333/775 G01N2440/38 G01N2458/15 G01N2800/28 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/68.ZNA G01N33/66.Z G01N33/53.V G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N27/62.V G01N27/62.X G01N30/72.C G01N30/88.J C12Q1/34 A61K45/00 A61P25/28 A61P25/00 C07K14/47		
代理人(译)	石川物		
优先权	2013010150 2013-06-07 GB		
其他公开文献	JP2016527480A5 JP2016527480A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了用于诊断或评估受试者的神经变性疾病的方法，该方法包括以下步骤：(i) 提供从受试者获得的含蛋白质的样品；(ii) Clusterin前体，载脂蛋白A-IV前体，载脂蛋白C-III前体，转甲状腺素蛋白，半乳糖凝集素7，补体C4前体，α-2-巨球蛋白前体，Igα-1链C，组蛋白2B；Igλ链C区；纤维蛋白原γ链前体；补体因子H；α间胰蛋白酶重链H4前体；补体C3前体；γ或β肌动蛋白；触珠蛋白前体；和血清白蛋白前体确定至少一种特定蛋白质同种型和/或衍生自选自下组的蛋白质生物标志物的糖型的浓度，量或表达程度；或(iii) 确定于(ii)将所述浓度，量或程度与来自患有特定神经变性疾病，痴呆或疾病阶段的对照受试者或来自未患有神经变性疾病或痴呆的对照受试者的参考进行比较并且(iv) 涉及受试者中神经变性疾病或痴呆的存在和/或阶段，其基于受试者中蛋白质生物标志物的至少一种特定蛋白质同种型和/或糖型相对于所述标准的水平。做出诊断或评估。还提供了用于这种方法的相关产品和系统。[选定图]图1A

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6509201号 (P6509201)
(45) 発行日 令和1年5月15日(2019.5.15)	(24) 登録日 平成31年4月12日(2019.4.12)	
(51) Int. Cl.	F I	
G01N 33/68 (2006.01)	G01N 33/68	ZNA
G01N 33/66 (2006.01)	G01N 33/66	Z
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	V
G01N 33/15 (2006.01)	G01N 33/15	Z
G01N 33/50 (2006.01)	G01N 33/50	Z
請求項の数 18 (全 51 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2016-517686(P2016-517686)	(73) 特許権者 505423678	
(89) (22) 出願日 平成28年6月6日(2014.6.6)	エレクトロフォレティクス リミテッド	
(63) 公表番号 特表2016-527480(P2016-527480A)	イギリス国 W C I H 9 B B ロンドン	
(43) 公表日 平成28年9月8日(2016.9.8)	マブレン プレイス ハミルトン ハ	
(86) 国際出願番号 PCT/GB2014/051758	ウス	
(87) 国際公開番号 WO2014/195728	(74) 代理人 100097456	
(87) 国際公開日 平成26年12月11日(2014.12.11)	弁理士 石川 徹	
(87) 審査請求日 平成29年6月5日(2017.6.5)	(72) 発明者	
(31) 優先権主張番号 1310150.6	マルコム アンドリユー ワード	
(32) 優先日 平成25年6月7日(2013.6.7)	イギリス国 K T I I 3 E P サリー	
(33) 優先権主張国 英国(GB)	コハム ダウンサイド ブリッジ ロード	
	コヴェンハム ハウス シー/オー エレ	
	クトフォレティクス リミテッド	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 神経変性疾患に関連する方法及び組成物		