

(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2016-536598

(P2016-536598A)

(43) 公表日 平成28年11月24日(2016.11.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2GO41
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 J	2GO45
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V	4BO63
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4HO45
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 545A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-537050 (P2016-537050)
 (86) (22) 出願日 平成26年8月27日 (2014.8.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年4月11日 (2016.4.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2014/000849
 (87) 国際公開番号 WO2015/027276
 (87) 国際公開日 平成27年3月5日 (2015.3.5)
 (31) 優先権主張番号 2013903257
 (32) 優先日 平成25年8月27日 (2013.8.27)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

(71) 出願人 516060200
 シーアールシー・フォー・メンタル・ヘル
 ス・リミテッド
 CRC FOR MENTAL HEAL
 TH LTD
 オーストラリア3053ビクトリア州カー
 ルトン・サウス、バリー・ストリート16
 1番、レベル2
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史

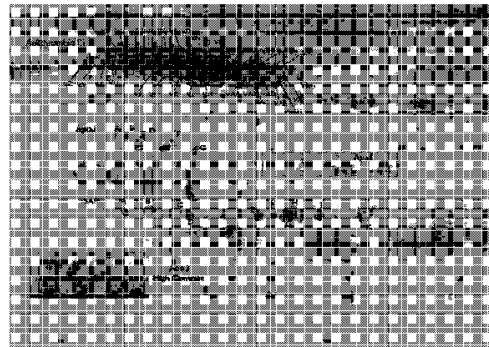
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経疾患のバイオマーカーを同定するための方法および神経疾患の診断

(57) 【要約】

本発明は、認知機能に影響し得る疾患のバイオマーカーを同定するための方法を提供する。本発明の方法により同定されるバイオマーカーを、哺乳動物が認知機能に影響し得る疾患を発症するかどうかを予測するために用いることができる。より特には、本発明は、哺乳動物における神経疾患を予測するバイオマーカーの同定ならびに神経疾患の診断、示差的診断および/または予後診断におけるこれらのバイオマーカーの使用に関する。提供される方法およびシステムにより、哺乳動物が神経疾患を発症する可能性があるかどうかの指示を提供するバイオマーカーの測定に基づく新皮質アミロイド量の評価および理論的予測が可能となる。

Figure 1:



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

神経疾患のバイオマーカーを同定する方法であって、

(a) 神経疾患について陽性である第 1 の試料から、ヘパリン結合親和性を有する第 1 の分子を単離する工程；および

(b) 神経疾患の既知のマーカーに対して、神経疾患のバイオマーカーとして第 1 の分子を検証する工程

を含む、前記方法。

【請求項 2】

単離された分子をバイオマーカーとして検証する工程が、

(a) 神経疾患について陽性である第 1 の試料において、ヘパリン結合親和性を有する第 1 の単離された分子のレベルを同定する工程；

(b) 第 1 の試料中に存在する神経疾患と診断された哺乳動物に特徴的であると以前に定義された別のバイオマーカーのレベルを同定する工程；

(c) 工程 (a) で同定された単離された分子のレベルと、工程 (b) で同定された他のバイオマーカーのレベルとを比較して、単離された分子のレベルと、他のバイオマーカーのレベルとの統計的に有意な関係を同定する工程；

(d) 対照から得られた第 2 の試料において工程 (a) ~ (c) を繰り返して、第 1 の試料において同定された関係が第 2 の試料において同定されるかどうかを決定する工程；

(e) 第 1 の試料において同定された関係が第 2 の試料において同定されない場合、第 1 の単離された分子が神経疾患のバイオマーカーであると結論付ける工程

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

(a) 第 1 の試料から、第 1 の単離された分子と関連する、ヘパリン結合親和性を有する第 2 の分子のレベルを単離および同定する工程、

(b) 第 1 および第 2 の単離された分子のレベルの間の比を作成する工程、

(c) 工程 (b) で作成された比と、第 1 の試料中に存在する神経疾患と診断された哺乳動物に特徴的であると以前に定義された別のバイオマーカーのレベルとを比較して、工程 (b) の比と他のバイオマーカーのレベルとの統計的に有意な関係を同定する工程、

(d) 対照から得られた第 2 の試料において工程 (a) ~ (c) を繰り返して、第 1 の試料において同定された関係が第 2 の試料において同定されるかどうかを決定する工程、

(e) 第 1 の試料において同定された関係が第 2 の試料において同定されない場合、前記比が神経疾患のバイオマーカーであると結論付ける工程

をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

神経疾患と診断された哺乳動物に特徴的であると以前に定義された他のバイオマーカーが、神経疾患に特徴的な新皮質アミロイドレベルである、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

神経疾患と診断された哺乳動物に特徴的であると以前に定義された他のバイオマーカーが脳において検出されるアミロイドベータの存在を特異的に認識する放射性トレーサーのレベルである、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

放射性トレーサーがピッツバーグ化合物 B (PiB)、フロルピラミン F-18、Floubetaben、Florbetapir、Flutematamol および NAV4694 を含む群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

他のバイオマーカーが PiB-PET SUV R スコアである、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

10

20

30

40

50

単離された分子が A と共に単離される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

第 1 の単離された分子または第 2 の単離された分子が、前記分子をヘパリンに結合させることにより単離される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

第 1 または第 2 の単離された分子がヘパリンセファロースカラムで単離される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

ヘパリン - セファロースカラムが、分子を単離するために約 pH 1.0 ~ 約 pH 11.0 で溶出される、請求項 10 に記載の方法。

10

【請求項 12】

ヘパリン - セファロースカラムが、分子を単離するために約 pH 8.0 で溶出される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

ヘパリン - セファロースカラムが、分子を単離するために約 pH 7.0 で溶出される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

少なくとも 1 つの第 1 の試料および対照試料が、ヘパリン結合親和性を有する分子を単離する前に高存在量タンパク質を除去するために予備処理される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 15】

分子のレベルが、2D-DIGE、多反応モニタリング質量分析(MRM-MS)などの質量分析(MS)、リアルタイム(RT)-PCR、核酸アレイ;ELISA、機能的アッセイ、酵素アッセイ、様々な免疫学的方法、またはキャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラフィー(TLC)、超拡散クロマトグラフィー、2次元液相電気泳動(2-D-LPE)もしくはゲル電気泳動およびドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)におけるその移動パターンなどの生化学的方法を含む群から選択される技術を用いて決定される、請求項 2 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

第 2 の分子が第 1 の分子のアイソフォームとして関連する、請求項 3 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 17】

神経疾患がアルツハイマー病またはパーキンソン病である、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

抗トロンピン I I I、血清アミロイド P、Apo J、ANT3_HUMAN 抗トロンピン I I I、APOH_HUMAN ベータ 2 糖タンパク質、FIBB_HUMAN フィブリノゲンベータ鎖、FIBA_HUMAN フィブリノゲンアルファ鎖、C9JC84_HUMAN フィブリノゲンガンマ鎖、ITH2_HUMAN インターアルファトリプシン阻害因子重鎖 H 2、HRG_HUMAN ヒスチジンリッチ糖タンパク質、BOUZ83_HUMAN 補体 C 4 ベータ鎖、CFAH_HUMAN 補体因子 H、HEP2_HUMAN ヘパリンコファクター 2、および E9PBC5_HUMAN 血漿カリクレイン重鎖もしくはアルファ - 1 - ミクログロブリンまたはそれらの天然の誘導体もしくはそのアイソフォームを含む群から選択される神経疾患の診断、示差的診断および / または予後診断のためのバイオマーカー。

40

【請求項 19】

神経疾患の診断、示差的診断および / または予後診断に用いられた場合に請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法によって同定されるバイオマーカー。

【請求項 20】

50

神経疾患がアルツハイマー病である、抗トロンピン I I I、血清アミロイド P、A p o J、A N T 3 _ H U M A N 抗トロンピン I I I、A P O H _ H U M A N ベータ 2 糖タンパク質、F I B B _ H U M A N フィブリノゲンベータ鎖、F I B A _ H U M A N フィブリノゲンアルファ鎖、C 9 J C 8 4 _ H U M A N フィブリノゲンガンマ鎖、I T I H 2 _ H U M A N インターアルファトリプシン阻害因子重鎖 H 2、H R G _ H U M A N ヒスチジンリッチ糖タンパク質、B 0 U Z 8 3 _ H U M A N 補体 C 4 ベータ鎖、C F A H _ H U M A N 補体因子 H、H E P 2 _ H U M A N ヘパリンコファクター 2、および E 9 P B C 5 _ H U M A N 血漿カリクレイン重鎖またはそれらの天然の誘導体もしくはそのアイソフォームを含む群から選択される請求項 1 8 または 1 9 に記載のバイオマーカー。

【請求項 2 1】

神経疾患がパーキンソン病である、アルファ - 1 - ミクログロブリンまたはその天然の誘導体もしくはそのアイソフォームである請求項 1 8 または 1 9 に記載のバイオマーカー。

【請求項 2 2】

アイソフォームまたはその天然の誘導体が、抗トロンピン I I I のアイソフォーム A、B、C もしくは J、血清アミロイド P (S A P) のアイソフォーム B、C、D、F、G、H もしくは J、または a p o J のアイソフォーム A、B、C、D、E、F もしくは G、アルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム A、B、C、D、E、F、G、H もしくは I を含む群から選択される、請求項 1 8 ~ 2 1 のいずれか一項に記載のバイオマーカー。

【請求項 2 3】

アイソフォームまたはその天然の誘導体が、A T I I I のアイソフォーム A、B、または J、S A P のアイソフォーム F、B または J、a p o J のアイソフォーム A、C、D、E、F または G、アルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム E または G を含む群から選択される、請求項 1 8 ~ 2 2 のいずれか一項に記載のバイオマーカー。

【請求項 2 4】

アイソフォームまたはその天然の誘導体が、

分子が A T I I I である場合、比が少なくともアイソフォーム A、B、C と J の間で作成される、適宜、比が A / J、B / J もしくは C / J の間で作成されるか；または

第 1 の分子が S A P である場合、比がアイソフォーム F と J の間で作成されるか；

分子が A p o J である場合、比がアイソフォーム A、B と D の間で作成されるか；または

分子がアルファ - 1 - ミクログロブリンである場合、比がアルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム E または G の間で作成される

ように選択される、請求項 1 8 ~ 2 3 のいずれか一項に記載のバイオマーカー。

【請求項 2 5】

対象における神経疾患の診断、示差的診断および / または予後診断のための請求項 1 8 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のバイオマーカーの使用。

【請求項 2 6】

神経疾患がアルツハイマー病またはパーキンソン病である、請求項 2 5 に記載の使用。

【請求項 2 7】

患者における神経疾患の診断、示差的診断および / または予後診断のための方法であって、

(a) 患者から第 1 の試料を取得する工程；

(b) 第 1 の試料から、ヘパリン結合親和性を有する分子を単離および同定する工程であり、前記分子は、前記試料から請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法に従って神経疾患のためのバイオマーカーとして検証される、工程；

(c) 患者が、工程 b) で同定されたバイオマーカーのレベルに基づいて神経疾患と診断される、示差的に診断される、および / または予後診断されるかどうかを決定する工程を含む、前記方法。

10

20

30

40

50

【請求項 28】

患者における神経疾患の診断、示差的診断および/または予後診断のための方法であって、

- (a) 患者から試料を取得する工程；
- (b) 試料から、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法に従って検証された少なくとも 2 つの関連する形態のバイオマーカーを単離および同定する工程；
- (c) 工程 (b) に由来するバイオマーカーのレベルを決定する工程；
- (d) 工程 (b) で同定された 2 つの関連する形態のバイオマーカーのレベル間の比を作成する工程；
- (e) 哺乳動物が、参照比と比較した比の値に基づいて神経疾患と診断される、示差的に診断される、および/または予後診断されるかどうかを、工程 (d) で作成された比から結論付ける工程を含む、前記方法。

10

【請求項 29】

患者における神経疾患の診断、示差的診断および/または予後診断のための方法であって、

- (a) 患者から第 1 の試料を取得する工程；
- (b) ヘパリン結合親和性を有する第 1 および第 2 のバイオマーカーのレベルを、第 1 の試料から単離および同定する工程であり、第 1 および第 2 のバイオマーカーは関連しており、第 1 および第 2 のバイオマーカーは請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の神経疾患のためのバイオマーカーとして検証される、工程；
- (c) 第 1 および第 2 のバイオマーカーのレベルの間の比を作成して、作成比を提供する工程；
- (d) 対照から得られた第 2 の試料において工程 (b) ~ (c) を繰り返して、参照比を提供する工程；
- (e) 第 1 の試料において同定された作成比と、第 2 の試料において同定された参照比とを比較する工程；
- (f) 作成比と参照比との差異に基づいて神経疾患状態を結論付ける工程を含む、前記方法。

20

【請求項 30】

哺乳動物における神経疾患の進行をモニタリングする方法であって、

- (a) 神経疾患について以前に評価された哺乳動物から得られたさらなる試料において、哺乳動物において以前に評価された請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載のヘパリン結合親和性を有する少なくとも 2 つの関連する形態のバイオマーカーのレベルを定量化する工程；
- (b) 工程 (a) における少なくとも 2 つの形態の関連するバイオマーカーのレベル間の比を作成して、作成比を提供する工程；
- (c) 工程 (b) の作成比と、神経疾患と診断された哺乳動物に特徴的であると以前に定義された参照比とを比較する工程であり、参照比は、少なくとも 1 つの対照哺乳動物から得られた試料において工程 (a) の同じ関連するバイオマーカーのレベルを定量化した後に作成され、少なくとも 1 つの対照哺乳動物は、神経疾患について陽性または陰性であってもよい、工程；および
- (d) 工程 (b) の作成比を、少なくとも 1 つの対照哺乳動物について神経疾患に特徴的であると以前に定義された範囲の参照比と相関させることによって、神経疾患について以前に評価された哺乳動物の神経疾患状態が変化したかどうかを、工程 (c) における比較から結論付ける工程を含む、前記方法。

30

40

【請求項 31】

参照比が、より早い期間から哺乳動物から得られた試料において工程 (a) の同じ関連するバイオマーカーのレベルを定量化した後に作成される、請求項 30 に記載の方法。

50

【請求項 3 2】

神経疾患を発症するリスクがある哺乳動物を階層化または同定するための方法であって

(a) 哺乳動物から得られた試料において、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載のヘパリン結合親和性を有する少なくとも 2 つの関連する形態のバイオマーカーのレベルを定量化する工程；

(b) 工程 (a) における少なくとも 2 つの関連する形態のバイオマーカーのレベルの間の比を作成して、作成比を提供する工程；

(c) 工程 (b) の比と、神経疾患と診断された哺乳動物に特徴的であると以前に定義された参照比とを比較する工程であり、参照比は、少なくとも 1 つの対照哺乳動物から得られた試料において工程 (a) の同じ関連するバイオマーカーのレベルを定量化した後に作成される、工程；

(d) 工程 (b) の作成比を、少なくとも 1 つの対照哺乳動物について神経疾患に特徴的であると以前に定義された範囲の参照比と関連させることによって、哺乳動物が神経疾患と診断される、示差的に診断される、および / または予後診断されるかどうかを、工程 (c) における比較から結論付ける工程；ならびに

(e) 工程 (d) の結論に基づいて、哺乳動物において示差的に診断された、および / または予後診断された神経疾患の重症度に基づいて異なるクラスの神経疾患に哺乳動物を選別する工程

を含む、前記方法。

【請求項 3 3】

神経疾患と関連するバイオマーカーと相互作用する、および / またはその発現もしくは活性をモジュレートする薬剤をスクリーニングするための方法であって、

(a) 本明細書に記載のヘパリン結合親和性を有するバイオマーカーまたはバイオマーカーの一部を、薬剤と接触させる工程；

(b) 少なくとも 2 つの関連する形態のバイオマーカーのレベルを定量化する工程；

(c) 工程 (b) における少なくとも 2 つの関連する形態のバイオマーカーのレベルの間の比を作成して、作成比を提供する工程；

(d) 工程 (c) の比と、薬剤の非存在下でバイオマーカーに特徴的であると以前に定義された参照比とを比較する工程であり、参照比は、薬剤の非存在下で工程 (b) の同じ関連するバイオマーカーのレベルを定量化した後に作成される、工程；

(e) 工程 (c) の作成比を、バイオマーカーに特徴的であると以前に定義された範囲の参照比と関連させることにより、薬剤が神経疾患と関連するバイオマーカーと相互作用する、および / またはその発現もしくは活性をモジュレートするかどうかを、工程 (d) における比較から結論付ける工程

を含む、前記方法。

【請求項 3 4】

神経疾患がアルツハイマー病またはパーキンソン病である、請求項 2 7 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

バイオマーカーが、抗トロンピン I I I、血清アミロイド P、A p o J、A N T 3 _ H U M A N 抗トロンピン I I I、A P O H _ H U M A N ベータ 2 糖タンパク質、F I B B _ H U M A N フィブリノゲンベータ鎖、F I B A _ H U M A N フィブリノゲンアルファ鎖、C 9 J C 8 4 _ H U M A N フィブリノゲンガンマ鎖、I T I H 2 _ H U M A N インターアルファトリプシン阻害因子重鎖 H 2、H R G _ H U M A N ヒスチジンリッチ糖タンパク質、B 0 U Z 8 3 _ H U M A N 補体 C 4 ベータ鎖、C F A H _ H U M A N 補体因子 H、H E P 2 _ H U M A N ヘパリンコファクター 2、および E 9 P B C 5 _ H U M A N 血漿カリクレイン重鎖またはそれらの天然の誘導体もしくはそのアイソフォームを含む群から選択され、神経疾患がアルツハイマー病である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

バイオマーカーがアルファ - 1 - ミクログロブリンまたはその天然の誘導体もしくはそのアイソフォームであり、神経疾患がパーキンソン病である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 7】

アイソフォームまたはその天然の誘導体が、抗トロンピン I I I のアイソフォーム A、B、C もしくは J、血清アミロイド P (S A P) のアイソフォーム B、C、D、F、G、H もしくは J、a p o J のアイソフォーム A、B、C、D、E、F もしくは G、またはアルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム A、B、C、D、E、F、G、H もしくは I を含む群から選択される、請求項 3 4 または 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 8】

アイソフォームまたはその天然の誘導体が、A T I I I のアイソフォーム A、B、もしくは J、S A P のアイソフォーム F、B もしくは J、a p o J のアイソフォーム A、C、D、E、F もしくは G、アルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム E もしくは G を含む群から選択される、請求項 3 4 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 3 9】

アイソフォームまたはその天然の誘導体が、
分子が A T I I I である場合、比が少なくともアイソフォーム A、B、C と J の間で、適宜、A / J、B / J もしくは C / J の間で作成されるか；または

第 1 の分子が S A P である場合、比がアイソフォーム F と J の間で作成されるか；または

分子が A p o J である場合、比がアイソフォーム A、B と D の間で作成されるか；

20

分子がアルファ - 1 - ミクログロブリンである場合、比がアルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム E または G の間で作成される

ように選択される、請求項 3 4 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 0】

神経疾患のバイオマーカーを同定するためのキットであって、

(a) 神経疾患について陽性である哺乳動物から得られた試料から、ヘパリン結合親和性を有する分子を単離するための第 1 の成分；

(b) 対象が高アミロイド量と関連する神経疾患を有することを示す可能性があるバイオマーカーのレベルを決定するための試薬を含む、神経疾患のバイオマーカーとして単離された分子を検証するための第 2 の成分

30

を含む前記キット。

【請求項 4 1】

患者における神経疾患を診断するためのキットであって、

(a) 患者試料から、ヘパリン結合親和性を有する分子を単離するための第 1 の成分

(b) 対象が高アミロイド量と関連する神経疾患を有することを示す可能性があるバイオマーカーのレベルを決定するための試薬を含む、患者が神経疾患と診断されるかどうかを決定するための第 2 の成分

を含む前記キット。

【請求項 4 2】

第 1 の成分がヘパリンセファロースカラムである、請求項 4 0 または 4 1 に記載のキット。

40

【請求項 4 3】

第 2 の成分が、抗トロンピン I I I のアイソフォーム A、B、C もしくは J、血清アミロイド P (S A P) のアイソフォーム B、C、D、F、G、H もしくは J、a p o J のアイソフォーム A、B、C、D、E、F、もしくは G、またはアルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム A、B、C、D、E、F、G、H もしくは I を含む群から選択されるアイソフォームまたはその天然の誘導体のレベルを定量化するための試薬を含む、請求項 4 1 または 4 2 に記載のキット。

【請求項 4 4】

神経疾患がアルツハイマー病またはパーキンソン病である、請求項 4 1 ~ 4 3 のいずれ

50

か一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、バイオマーカーの発見に関する。特に、本発明は、神経疾患の同定のためのバイオマーカーを提供する。より特には、本発明は、神経疾患のバイオマーカーを同定する方法ならびに神経疾患の診断、示差的診断および/または予後診断のためのバイオマーカーの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

神経疾患の発症および進行は、社会に対して大きな感情的および財政的負担をかける。

【0003】

パーキンソン病(PD)は、西洋において625人に約1人が罹患する一般的な神経変性疾患である。この数字は、80歳を超える集団では4%に上昇する。高齢者集団に関しては、PDの管理は、神経学者および一般医にとって、医療業務のますます重要で能力が試される側面である可能性がある。

【0004】

アルツハイマー病(AD)は、オーストラリアにおいては全ての認知症のうちの最も一般的なものであり、死因の第3位である。アルツハイマー病の財政的コストは、オーストラリアにおいては年に40億ドルを超えると見積もられるが、世界では認知症のコストは6000億ドルを超えると見積もられている。

【0005】

PDなどの他の神経疾患と同様、アルツハイマー病はゆっくりと進行し、症状が現れるのに何年もかかることがあるため、この疾患の臨床診断は難しいプロセスである。従って、アルツハイマー病の臨床診断は、通常、記憶および認知機能が患者の日常生活に影響する点まで低下した後の疾患の比較的後期に行われる。

【0006】

アルツハイマー病のための唯一の確定診断は、剖検時の組織学的検査によるものである。

【0007】

死後の診断は別として、現在利用できる分子的診断アプローチはたったの2つである。第1に、ポジトロン放射断層撮影(PET)は、脳におけるアミロイド斑に結合するマーカーをイメージングするために用いられ、第2はA β 、全Tauおよびリン酸化Tauタンパク質の測定を含む、脳脊髄液(CSF)の評価である。しかしながら、PETおよびCSFは、幅広い臨床業務における使用にとって実行可能ではないと考えられる。

【0008】

ADをイメージングするために、アミロイド沈着物に対する高い親和性および血液脳関門を通過する高い浸透性を示すアミロイドイメージング剤および放射性トレーサーとして、チオフラビンTの一連の非荷電誘導体が開発されてきた。チオフラビンによって示されるこれらのアミロイドイメージング剤の広範囲に及ぶインビトロ(in vitro)およびインビボ(in vivo)試験により、それらがポジトロン放射断層撮影試験中に検出可能なものに典型的な濃度でアミロイド沈着物に特異的に結合することが示唆される。

【0009】

最良に検証されたこれらのアミロイドイメージング剤は、アミロイド結合色素チオフラビンTのアナログである、ピツパーグ化合物B(PiB)である。アルツハイマー病におけるPiB-ポジトロン放射断層撮影(PiB-PET)試験により、PiBのアミロイド斑との強固な皮質結合が示された。これは、おそらく究極の判断基準と考えられる、有望な早く、かつ正確な検出マーカーを提供する。近年、Avid Radiopharmaceuticals Pty Ltd(Philadelphia)により製造され

10

20

30

40

50

る AV - 45 (フロルピラミン F - 18) (別に F - 18 AV - 45 としても知られる)、Floubetaben、Florbetapir、Flutematamol および NAV4694 などの他の化合物が、アミロイドベータを標的とする PiB の類似する機能性に基づいて調査されている。

【 0010 】

PiB 放射性トレーサーシグナルまたはアウトプットを、アミロイドベータのレベルと関連させたいいくつかの研究があり、これは PiB 陽性および PiB 陰性の用語をもたらした。典型的には、PiB アウトプット、またはトレーサーの取込みの正規化により、対象間および対象内比較を行うことができる。臨床業務においては、放射性用量および患者の質量または体積 [別に標準摂取率 (standard uptake value) (SUV) としても知られる] に関する正規化が実施される。この正規化はまた、標準摂取率比 (SUVR) を提供するための (通常は) 罹患していない小脳に関する標準化も含む。これは、高い新皮質量 (PiB 陽性) のものと、低い量 (PiB 陰性) のものとを識別するための閾値の決定をもたらした。

10

【 0011 】

アルツハイマー病のための診断試験として、ピッツバーグ化合物 B (Pittsburgh Compound - B) ポジトロン放射断層撮影 (PiB - PET) イメージングの使用は、高い特異度を提供する。しかしながら、約 20 分の ^{11}C - PiB の半減期のため、各患者は、新しく合成された化合物を必要とし、このイメージング技術の使用をサイクロトロンなどの、包括的放射化学基盤を装備した設備に限定する。 ^{11}C の短い半減期は、 ^{18}F を用いて合成されるフッ素化合物の組込みによって一部対処することができる。しかしながら、置き換えるための長寿命の放射性リガンドの欠如および PiB - PET イメージングに関する患者あたりの高いコスト (一人当たり 2000 ~ 3000 ドル) により、一般医にとって PiB - PET の臨床的利用性は限られている。

20

【 0012 】

脳脊髄液 (CSF) 中のバイオマーカーは、イメージングによる診断が実施されたいいくつかの神経疾患の確認評価を提供することがわかっている。従って、アルツハイマー病などの神経疾患のためのバイオマーカーの研究は、一般に、脳脊髄液 (CSF) に着目してきた。実際、超リン酸化 tau およびアミロイドベータ 1 - 42 (A $_{1-42}$) の CSF レベルは、MCI からアルツハイマー病への転換を予測することが示されている。

30

【 0013 】

CSF を用いる欠点は、それが試料を取得するために侵襲的な腰椎穿刺を必要とすることである。煩わしいことに加えて、CSF の取得は患者にとって多くの有害な転帰をもたらす可能性がある。これらの制限を考慮すれば、多数の個体から反復的に CSF を取得することは非常に困難である。

【 0014 】

従って、アルツハイマー病などの神経疾患またはパーキンソン病などの他の神経疾患の早く、かつ経済的な実現可能な予後診断および / または診断を提供することができる改良されたシステムが必要である。

【 0015 】

そのようなシステムは、検出可能な臨床指標の描写の前に初期段階の予後診断および / または診断を達成する際に臨床医への支援を提供することができる。さらに、臨床試験を受けているアルツハイマー病およびパーキンソン病に関する疾患修飾療法 (disease modifying therapy) に関して、リスクのある個体において初期段階で疾患の特徴を検出することができるバイオマーカーを同定する社会的および経済的な義務があり、従って、抗アルツハイマー病療法または抗パーキンソン病療法を、疾患の負担が軽度であり、それが機能的および不可逆的な認知欠損を防止するか、または遅延させることができる時に投与することができる。

40

【 0016 】

文献、活動、材料、デバイス、論文などの考察は、単に本発明に関する文脈を提供する

50

目的で本明細書に含まれる。これらの事柄のいずれか、または全部は、本出願の各請求項の優先日の前に存在したという理由で先行技術の基礎の一部を形成したか、または本発明と関連する分野における共通一般知識であったと示唆または指摘されるものではない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

神経疾患のためのバイオマーカー、特に、好ましくは臨床症状が生じる前に疾患の開始を示すバイオマーカーを同定する方法が必要である。神経疾患の早期同定は、早期介入によって疾患進行を遅延させるのに役立ち得る。

【課題を解決するための手段】

【0018】

従って、本発明のある態様において、

(a) 神経疾患について陽性である第1の試料から、ヘパリン結合親和性を有する第1の分子を単離すること；および

(b) 単離された分子を、神経疾患のバイオマーカーとして検証することを含む、神経疾患のバイオマーカーを同定する方法が提供される。

【0019】

本発明は、ヘパリン結合親和性を有する分子の単離および同定ならびに神経疾患のバイオマーカーとしてのこれらの分子の検証に関する。ヘパリン結合親和性を有する分子の単離は、必要であり、バイオマーカー検証を阻害する高い存在量の分子の影響を低下させる。ヘパリン結合親和性を有する分子のサブセットが神経疾患の検証されたバイオマーカーとの高い相関を示し、PiB / PETなどの神経疾患の良好に確立された予測因子との高い相関をさらに示すことが、本発明者らによって現在見出されている。

【0020】

従って、本発明の方法を実施する際に、バイオマーカーとしてのヘパリン結合親和性を有する単離された分子の検証は、

(a) 神経疾患について陽性である第1の試料中のヘパリン結合親和性を有する第1の単離された分子のレベルを同定する工程；

(b) 第1の試料中に存在する神経疾患と診断された哺乳動物に特徴的であると以前に定義された別のバイオマーカーのレベルを同定する工程；

(c) 工程(a)で同定された単離された分子のレベルと、工程(b)で同定された他のバイオマーカーのレベルとを比較して、単離された分子のレベルと、他のバイオマーカーのレベルとの統計的に有意な関係を同定する工程；

(d) 対照から得られた第2の試料において工程(a) ~ (c)を繰り返して、第1の試料において同定された関係が第2の試料において同定されるかどうかを決定する工程；

(e) 第1の試料において同定された関係が第2の試料において同定されない場合、ヘパリン結合親和性を有する第1の単離された分子が神経疾患のバイオマーカーであると結論付ける工程

をさらに含む。

【0021】

本特許請求される方法は、ヘパリン結合親和性を有する単離された分子のレベルと、神経疾患に特徴的であると以前に定義された別のバイオマーカーのレベルとの間の関係を同定することを求めるものである。本特許請求される方法を実施する際に、単離された分子のレベルと、神経疾患に特徴的であると以前に定義された別のバイオマーカーのレベルとを比較することにより、ある関係が同定される。関係の同定は、単離された分子のレベルもまた神経疾患のバイオマーカーであってもよいことを示す。対照試料に対して比較した場合、これをさらに確認することができる。

【0022】

本特許請求される方法を実施する際に、同定された任意の関係を、対照試料において同じ分析を実施することによってそれが神経疾患を示すか、または神経疾患にとって独特で

10

20

30

40

50

あるかどうかを決定するために評価する必要がある。従って、単離された分子とバイオマーカーのレベルを対照試料において同定し、そのレベルを比較して、関係が対照試料において同定されるかどうかを決定する。関係が対照試料において同定されない場合、これは、単離された分子が神経疾患のバイオマーカーである可能性があることを示す。

【0023】

従って、別の実施形態においては、本特許請求される方法は、

(a) 第1の試料から、第1の単離された分子と関連する、ヘパリン結合親和性を有する第2の分子のレベルを単離および同定する工程、

(b) 第1および第2の単離された分子のレベルの間の比を作成する工程、

(c) 工程b)で作成された比と、第1の試料中に存在する神経疾患と診断された哺乳動物に特徴的であると以前に定義された別のバイオマーカーのレベルとを比較して、工程b)の比と、他のバイオマーカーのレベルとの統計的に有意な関係を同定する工程、

(d) 対照から得られた第2の試料において工程(a)~(c)を繰り返して、第1の試料において同定された関係が第2の試料において同定されるかどうかを決定する工程、

(e) 第1の試料において同定された関係が第2の試料において同定されない場合、前記比が神経疾患のバイオマーカーであると結論付ける工程をさらに含む。

【0024】

好ましくは、神経疾患の決定のための関連する形態のバイオマーカーは、一例においては、複数のアイソフォームで存在するタンパク質であってよい。従って、分子(例えば、第1および第2の)は、アイソフォームとして関連するのが好ましい。

【0025】

本発明の別の態様においては、アルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)、レビイ小体認知症(DLB)、多発脳梗塞性認知症(MID)、血管性認知症(VD)、統合失調症および/または抑鬱症を含む群から選択される神経疾患の診断、示差的診断および予後診断を可能とする、神経疾患のためのバイオマーカーが提供される。

【0026】

最も好ましくは、ADのためのバイオマーカーは、抗トロンピンIIII、血清アミロイドP、apoJ、ANT3_HUMAN抗トロンピンIIII、APOH_HUMANベータ2糖タンパク質、FIBB_HUMANフィブリノゲンベータ鎖、FIBA_HUMANフィブリノゲンアルファ鎖、C9JC84_HUMANフィブリノゲンガンマ鎖、ITH2_HUMANインターアルファトリプシン阻害因子重鎖H2、HRG_HUMANヒスチジンリッチ糖タンパク質、BOUZ83_HUMAN補体C4ベータ鎖、CFAH_HUMAN補体因子H、HEP2_HUMANヘパリンコファクター2、およびE9PBC5_HUMAN血漿カリクレイン重鎖またはその天然の誘導体もしくはそのアイソフォームを含む群から選択される。最も好ましくは、ADのためのバイオマーカーは、抗トロンピンIIIIまたはその天然の誘導体もしくはそのアイソフォームである。好ましくは、アイソフォームはATIIIのBまたはJである。

【0027】

最も好ましくは、PDのためのバイオマーカーは、アルファ-1-ミクログロブリン[アルファ-1-ミクログロブリン/ピクニン前駆体(AMB P)のアミノ酸20~203]またはその天然の誘導体もしくはそのアイソフォームである。好ましくは、アルファ-1-ミクログロブリンのアイソフォームは、EおよびGである。

【0028】

本発明の別の態様においては、

(a) 患者から第1の試料を取得する工程；

(b) 第1の試料から、ヘパリン結合親和性を有する分子を単離および同定する工程であり、前記分子は、本明細書に記載の神経疾患のためのバイオマーカーとして検証される、工程；

(c) 工程b)で同定された分子のレベルに基づいて、患者が神経疾患を有すると診断さ

10

20

30

40

50

れる、示差的に診断される、および/または予後診断されるかどうかを決定する工程を含む、患者における神経疾患の診断、示差的診断および/または予後診断のための方法が提供される。

【0029】

別の態様においては、

(a) 患者から試料を取得する工程；
 (b) 試料から、本明細書に記載の方法に従って検証された少なくとも2つの関連する形態のバイオマーカーを単離および同定する工程；
 (c) 工程(b)に由来するバイオマーカーのレベルを決定する工程；
 (d) 工程(b)で同定された2つの関連する形態のバイオマーカーのレベルの間の比を作成する工程；
 (e) 哺乳動物が、参照比と比較した比の値に基づいて神経疾患を有すると診断される、示差的に診断される、および/または予後診断されるかどうかを、工程(d)で作成された比から結論付ける工程を含む、患者における神経疾患の診断、示差的診断および/または予後診断のための方法が提供される。

10

【0030】

従って、本発明はさらに、本明細書に記載されるように同定された、哺乳動物が神経起源の疾患を有するか、もしくはそれを発症する可能性があるかどうかを決定するため、または認知機能低下について哺乳動物を評価するために用いることができる、バイオマーカーならびにその天然の誘導体およびアイソフォームの使用に関する。

20

【0031】

本発明に関連があると考えられる神経疾患は、特に限定されるものではないが、アルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)、レヴィ小体認知症(DLB)、多発脳梗塞性認知症(MID)、血管性認知症(VD)および/または抑鬱症を含むものである。本発明の方法の使用により診断される、示差的に診断される、および/または予後診断され得る好ましい疾患は、ADまたはPDである。

【0032】

本発明のさらに好ましい実施形態においては、本方法は、

(a) 患者から第1の試料を取得する工程；
 (b) 第1の試料から、ヘパリン結合親和性を有する第1および第2のバイオマーカーのレベルを単離および同定する工程であり、第1および第2のバイオマーカーは関連しており、第1および第2のバイオマーカーは本明細書に記載される神経疾患のためのバイオマーカーとして検証される、工程；
 (c) 第1および第2のバイオマーカーのレベルの比を作成して、作成比を提供する工程；
 (d) 対照から得られた第2の試料において工程(b)~(c)を繰り返して、参照比を提供する工程；
 (e) 第1の試料において同定された作成比と、第2の試料において同定された参照比とを比較する工程；
 (f) 作成比と参照比との差異に基づいて神経疾患の状態を結論付ける工程をさらに含む。

30

40

【0033】

本発明の方法において、抗トロンピンIII、血清アミロイドP、apoJ(クラステリン)、アルファ-1-ミクログロブリンまたはその天然の誘導体もしくはそのアイソフォームなどの1つまたは複数の神経疾患と関連する少なくとも2つのバイオマーカーを、哺乳動物の神経疾患状態を指摘するための比の作成において定量する。

【0034】

本発明のさらなる態様においては、哺乳動物における神経疾患の進行をモニタリングするための方法；神経疾患を発症するリスクのある哺乳動物を階層化もしくは同定するため

50

の方法；ならびに神経疾患と関連するバイオマーカーと相互作用する、および/またはその発現もしくは活性をモジュレートする薬剤をスクリーニングするための方法が提供される。

【0035】

さらなる態様において、本発明は、哺乳動物における、1つもしくは複数の神経疾患の診断および/もしくは予後診断のため、または1つもしくは複数の神経疾患を発症するリスクのある哺乳動物を同定するために用いることができるキットを提供する。

【0036】

本発明の他の態様は、本発明の特定の実施形態の以下の説明を再検討すれば当業者には明らかとなるであろう。

【0037】

用語「含む (comprise)」、「含む (comprises)」、「含む (comprised)」または「含む (comprising)」が本明細書において(特許請求の範囲を含む)用いられる場合、それらは記述された特徴、整数、工程または構成要素の存在を特定するものであり、1つまたは複数の他の特徴、整数、工程もしくは構成要素、またはその群の存在を除外するのではないと解釈されるべきである。

【0038】

本発明の態様および利点のさらなる理解のために、添付の図面と共に、以下の詳細な説明を参照するべきである。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】図1は、本出願を通じて用いられる暫定的な命名法と共にタンパク質分析物の2Dゲル分析を示す。抗トロンピンIIIは、強調された抗トロンピンIIIシリーズ(A-AH)における全ての変異体を指すために「AT」と省略され、抗トロンピンIIIおよび他のタンパク質に由来する全ての可能な変異体を含む。「ApoJ」とは、関連する、強調され、同定されていないタンパク質変異体A~Gを指す。「SAP」とは、関連する、強調された血清アミロイドタンパク質変異体A~Kを指す。

【図2】図2は、2-DGE試験を示す。臨床分類-抗トロンピンIIIアイソフォームAとJとの平均比の比較は、ADと対照との高い有意差を示す。抗トロンピンIIIの最も塩基性のアイソフォームAとアイソフォームJとの比は、認知的に正常な個体と比較して軽度の認知機能障害およびアルツハイマー病と臨床的に診断された患者において有意に上昇している(ANOVA Tukeyポストホック、平均±std dev)。

【図3】図3は、PiB-SUVR-ATIIIA/J比血漿(t検定、平均±std dev)による分類を示す。AIBL試験(A)に含まれる73の対象の脳における、ピツパーグ化合物B(PiB)ポジトロン放射断層撮影(PET)に関する抗トロンピンIIIアイソフォームと標準摂取率比(SUVR)との相関。

【図4】MARS14 枯渇後の6つのRPサブ画分からの代表的なゲル画像。矢印はADプールにおけるタンパク質変化を示す。

【図5】整列されていないF2多重ゲルの偽色画像オーバーレイ。Hptの3つの鎖を右上の画像において卵形で示す。

【図6】A. 低ApoE4含有プールおよびB. 高ApoE4含有プールを代表する多重ゲル画像からの詳細。±1ACTアイソフォームは34kDaのApoE4プロキシスポットと相関し、これらの画像の右手下側角に示される。回帰分析相関：a-p=0.012、R²=0.45；b-p=0.002、R²=0.61；c-p=0.003、R²=0.56；d-p=0.002、R²=0.61；e-p=0.007、R²=0.51；f-p=0.003、R²=0.58。±1ACTスポットはいずれも、プールされた実験においてHCからADを有意に識別しなかった。対照プールからADを有意に識別した±1ATスポット(3.3倍、p<0.02)を、下側の画像に示す。

【図7】右側の表に性特異的变化と共に示される無傷の、および切断されたVDBP。A. 無傷(上のスポットトレイン)および切断されたVDBP(A、B、C)。無傷のVD

10

20

30

40

50

B Pスポットを飽和させ、早熟分析からマスクした。B . 切断されたV D B P (A ~ M) 。 C . 切断されたV D B P (A ~ E) 。

【図8】ADバイオマーカー(A T I I I , A p o J およびS A P) はP D 血漿において上昇しない。

【図9】A p o J はA と相関する。

【図10】アルファ - 1 - ミクログロブリン(A M B P) のレベルは、パーキンソン病血漿において上昇する。対照(n = 3 7) 試料とP D (n = 4 4) 試料との間のA M B P のレベル(左上の平均、S T D E V) は、P D 血漿において有意に上昇する(p < 0 . 0 0 0 1) 。破線は、個体がP D を有すると考えられるカットオフ値を示す。A M B P レベルのR O C 分析を、右上に示す。下の図面は、A M B P レベルと、臨床統合パーキンソン病評価尺度(U P D R S) との相関である。統計分析を、P r i s m v 5 . 0 f を用いて行った。用いた統計的検定は、t 検定であった。0 . 0 5 より大きいp 値を、有意と考えた。アイソフォームE の強度を、この図面に示す。同様の結果がA M B P のアイソフォームG について得られる。

10

【図11】A M B P の2 D スポットマップ。

【図12】P D と対照との比1 9 3 / 1 6 6 (G / E) の比較。破線は、検定の8 0 % 特異度を表し、カットオフ値での個体は5 . 0 のオッズ比を有する(n = 3 1 対照 n = 5 1 P D) 。

【発明を実施するための形態】

【0040】

20

表の説明

表1は、ADバイオマーカーのR O C 分析の概要を示す。

表2は、ADと対照、対照とC R P アイソフォームとの間の変化に関する試験対象患者基準を満たす少なくとも1つのアイソフォームを有していたタンパク質を示す。ハプトグロビンを、非還元複合体の分取ゲルから同定した。N S - 有意でない。

表3は、質量分析を用いて発見された脳アミロイドのためのバイオマーカーを示す。

【0041】

本発明は、哺乳動物から得られた試料から、ヘパリン結合親和性を有する分子を単離することにより、認知機能低下を予測する神経疾患の診断、示差的診断および/または予後診断のためのバイオマーカーを同定する方法を提供する。これらのバイオマーカーは、アミロイド量と関連し、これと相関する。本発明において同定されるバイオマーカーを用いて、脳中のアミロイドを診断するか、または脳中のアミロイドレベルの変化を検出することができる。一度同定されたら、そのマーカーを、脳中のアミロイドに関する高効率診断または予後診断試験において用いることができる。

30

【0042】

従って、本発明の態様においては、神経疾患のバイオマーカーを同定する方法であって、

(a) 神経疾患について陽性である第1の試料から、ヘパリン結合親和性を有する第1の分子を単離すること；および

(b) 単離された分子を、神経疾患のバイオマーカーとして検証することを含む、方法が提供される。

40

【0043】

本発明は、ヘパリン結合親和性を有する分子の単離および同定ならびに神経疾患のバイオマーカーとしてのこれらの分子の検証に関する。ヘパリン結合親和性を有する分子の単離は、必要であり、バイオマーカー検証を阻害する高存在量の分子の影響を低下させる。ヘパリン結合親和性を有する分子のサブセットが神経疾患の検証されたバイオマーカーとの高い相関を示し、P i B / P E T などの神経疾患の良好に確立された予測因子との高い相関をさらに示すことが、本発明者らによって現在見出されている。

【0044】

当業者によって理解されるように、バイオマーカーは、特定の哺乳動物、または患者、

50

または対象または個体の生物学的状態の指示因子として見なされる。「哺乳動物」、「患者」、「対象」または「個体」などの用語はまた、文脈において、本発明において互換的に用いることができる用語でもありと考えられる。さらに、用語「個体」および「対象」は、バイオマーカーの存在について検査または分析され、神経疾患の状態の決定において評価される同じ試験対象を指すように互換的に用いることができると考えられる。

【0045】

さらに、バイオマーカーは、個々の分子である必要はない。バイオマーカーは単一の分子であってもよいが、それは複数の分子であってもよい。バイオマーカーを複数の分子と考える場合、バイオマーカーは分子間の関係の表示と関連してもよい。例えば、関係は比であってもよい。さらに、複数の分子は、神経疾患を示す分子シグナチャーを表してもよい。より特には、シグナチャーは複数のタンパク質またはタンパク質アイソフォームの発現レベルにより定義することができる。

10

【0046】

バイオマーカーを、例えば、哺乳動物における治療的介入に対する正常な生物学的プロセス、病理学的プロセス、または薬理的応答の指標として客観的に測定し、評価することができる特定の特徴であるとさらに見なすことができる。しばしば、単一のバイオマーカーの使用が、哺乳動物が神経疾患を有するか、または神経疾患が存在しないかを完全に決定することができない場合、2つ以上のバイオマーカーの存在および/または非存在が、哺乳動物に関する生物学的状態の適切な誘導にとって必要であり得る。

【0047】

バイオマーカーは、単独で、または組み合わせて、哺乳動物がある表現型状態または別のものに属する相対的リスクの尺度も提供することができる。従って、バイオマーカーは、哺乳動物が疾患を発症する（予後）、疾患を有する（診断）または薬物の治療有効性 [セラノスティック (theranostic)] および薬物毒性を確認する可能性を示すのに従来通り有用である。

20

【0048】

また、バイオマーカーは、必ずしも限定されるものではないが、哺乳動物または対照集団に由来する試料中のレベル（例えば、濃度、発現および/または活性）が、生物学的状態、例えば、神経疾患の診断を示す生物試料中に存在するタンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび/または代謝物を含むとも考えられる。さらに、本発明の方法内に企図されるバイオマーカーはまた、必ずしも限定されるものではないが、免疫グロブリン、ペプチド、mRNA、DNA、低分子非コードRNA、miRNA、消化されたタンパク質断片、酵素、脂質、代謝物、炭水化物、グリコシル化ポリペプチド、および金属を含んでもよい。

30

【0049】

本特許請求される方法は、新皮質アミロイドの増加と関連する神経疾患におけるバイオマーカーを同定することができる。本発明の好ましい実施形態においては、本発明に関連があると考えられる神経疾患は、特に限定されるものではないが、アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、レヴィ小体認知症 (DLB)、多発脳梗塞性認知症 (MID)、血管性認知症 (VD)、統合失調症および/または抑鬱症を含むものである。本発明の方法の使用によるADおよびPDなどの神経疾患の診断および予後診断が特に望ましい。また、同定および/または単離されたバイオマーカーが脳におけるPiB量を反映することも望ましい。

40

【0050】

本特許請求される方法を実施する際に、分子はそのヘパリン結合親和性、そのヘパリンに対する親和性またはヘパリンに結合する分子とのその会合に基づいて単離される。本発明の文脈においては、取得すること、抽出すること、精製することおよび除去されるなどの用語は、単離することという用語と同義である。さらに、「ヘパリン結合親和性」または「ヘパリンに対する親和性」などの用語は、本発明において互換的に用いることができる用語であると考えられる。本発明の文脈においては、親和性は、それらの会合または結

50

合を惹起する分子間の引力または力と定義される。従って、本特許請求される方法により単離される分子は、ヘパリンに対するそのような引力を有する。従って、ヘパリン結合親和性を有する分子は、ヘパリンと直接会合するか、またはヘパリンに引き付けられた他の分子と会合する、結合する、もしくは複合体化する分子を含む。

【0051】

出願人は、ヘパリンに対する親和性を有する分子が、限定されるものではないが、アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）、レヴィ小体認知症（DLB）、多発脳梗塞性認知症（MID）、血管性認知症（VD）、統合失調症および/または抑鬱症などの神経疾患を示すことができると同定した。より好ましくは、分子は、ADおよび/またはPDを示すことができる。従って、これらの分子は、これらの神経疾患のためのバイオマーカーとして提供することができる。

10

【0052】

以下の説明は、一般に、ADおよびPDに関するものである。しかしながら、本明細書に記載の方法は、他の神経疾患およびこれらの神経疾患のためのバイオマーカーの同定にも同等に適用可能である。

【0053】

分子のヘパリン結合親和性は、非ヘパリン結合分子の混合物もしくは試料またはヘパリンに対する親和性を有さない分子から特定の分子を選出するか、または単離するために用いられる。従って、本発明の文脈においては、分子は、ヘパリンに対する親和性を有さない分子の試料または混合物から単離されるのに十分なヘパリン結合親和性を有するだけでよい。

20

【0054】

ヘパリン結合親和性を有する分子の単離において、分子はヘパリンに非共有または共有的に結合することができる。例として、ヘパリンを、ヘパリンに対する親和性を有さない分子を試料中に残すそのヘパリン結合親和性に基づいて試料から分子を選択または単離するために固定することができる。他の例においては、ヘパリン結合親和性を有する分子を、抗体、ペプチドアレイ、分子インプリンティング、または化学的親和性マトリックスを用いることによって単離することができる。

【0055】

当業者によって理解されるように、固定されたヘパリンの形式は広く変化してもよい。例えば、ヘパリンを、被覆された表面上に固定するか、またはクロマトグラフィー樹脂中に含有させることができる。

30

【0056】

分子を、固定されたヘパリンとのその会合もしくは結合によって単離するか、またはヘパリンに引き付けられた別の分子に会合、結合もしくは複合体化させることができる。あるいは、固定されたヘパリンは、大容量陽イオン交換体として作用し得る。この使用は、ヘパリンの多数の硫酸陰イオン基を利用するものである。これらの基は、全体として正電荷を有する分子またはタンパク質を捕捉すると予想される。ヘパリンに対するその親和性に基づいて分子を単離するための方法および装置は、当業者には公知である。好ましくは、ヘパリンに対する親和性を有する分子を結合させるための遊離ヘパリンを提供する装置またはアッセイが、本特許請求される方法において用いられる。より好ましくは、ヘパリン-セファロース精製カラムがヘパリン結合親和性を有する分子を単離するために用いられる。

40

【0057】

分子はヘパリンに結合した後、変化したpHもしくは塩濃度などの様々な緩衝条件の使用と共に、または塩もしくはpH勾配などの勾配の使用によりヘパリンから選択的に解離させることができる。

【0058】

当業者であれば理解できるように、単離されたタンパク質を、カラムのpHを変化させることによって、ヘパリン-セファロース精製カラムを用いて試料から選択的に単離する

50

ことができる。従って、別の態様において、ヘパリン - セファロースカラムを、少なくとも約 pH 3、少なくとも約 pH 4、少なくとも約 pH 5、少なくとも約 pH 6、少なくとも約 pH 7、少なくとも約 pH 8、少なくとも約 pH 9、少なくとも約 pH 10 で溶出させる。より好ましくは、ヘパリンセファロースカラムを、pH 6 ~ pH 8 で、より好ましくは pH 7 または pH 8 で溶出させる。

【0059】

あるいは、ヘパリンを、試料中に溶解し、試料中でヘパリン結合親和性を有する分子に選択的に結合させることができる。次いで、ヘパリンに結合した分子のその後の精製を用いて、試料からこれらの分子を単離することができる。次いで、単離された分子を、そのレベルを同定する前にヘパリンから選択的に解離させることができる。

10

【0060】

当業者であれば理解できるように、親和性は、少なくとも2つの分子間の非共有的分子間相互作用によって影響され得る。従って、解離定数を用いて、ある分子とヘパリンとの間の親和性（すなわち、ある分子がどれくらい緊密にヘパリンに会合または結合するか）を記述することができる。従って、変化する程度のヘパリン結合を示す分子を、潜在的なバイオマーカーとして単離することができる。

【0061】

あるいは、特許請求される発明を実施する際に、ヘパリン結合ドメインなどの公知のヘパリン結合領域の配列をコードする分子に基づいて、分子を単離することができる。例えば、そのような選択肢において、ヘパリン結合ドメインを指向するPCRプライマーを、そのような領域を含有するか、またはコードする分子を増幅するように設計することができる。これらの分子を精製および分析して、その発現レベルを決定することができる。

20

【0062】

当業者であれば理解できるように、ヘパリンは、主要な糖単位として2-O-スルホ-L-イズロン酸、2-デオキシ-2-スルファミノ-6-O-スルホ-D-グルコース、D-グルクロン酸、2-アセタミド-2-デオキシ-D-グルコース、およびL-イズロン酸を有する直鎖状陰イオン性多糖の混合物である。これらの糖単位の存在および頻度は、ヘパリンが抽出される組織源に応じて変化する。しかしながら、本発明の実施は、ヘパリンの特定のアイソフォーム、サブタイプまたは種に限定されることを意図されない。従って、本発明の文脈において用いられるヘパリンを、様々な種に由来する様々な細胞または組織試料から単離および精製することができる。あるいは、ヘパリンを、培養細胞から取得することができる。あるいは、ヘパリンは半合成または合成のものであってもよい。

30

【0063】

別の好ましい実施形態においては、第1の試料を予備処理して、ヘパリン結合親和性を有する分子を単離する前にプロテオミック分析を阻害する高存在量のタンパク質の影響を除去または低減することができる。例として、試料を、試料から少なくとも最も豊富なタンパク質を除去する、複数の親和性除去システム-14 (MARS) で処理することができる。次いで、これは、潜在的なバイオマーカーのヘパリン結合親和性を用いる改善された富化プロセスを提供する。

40

【0064】

本発明において用いられる試料は、生物学的試料であることが企図される。本発明の文脈においては、試料を哺乳動物から取得することができる。試料は、限定されるものではないが、血液（全血を含む）、血漿、血清、血液溶解物、リンパ液、滑液、髄液、尿、脳脊髄液、精液、糞便、痰、粘液、羊水、涙液、嚢胞液、汗腺分泌物、胆汁、乳汁、涙または唾液からなる群から選択される様々な生物学的材料を含んでもよい。好ましくは、生物学的試料は、血液（全血を含む）、血漿、または血清である。

【0065】

さらに、当業者であれば、本特許請求される方法を、DNA、RNAおよび/またはタンパク質を含有する任意の取得された生物学的材料において用いることができることを知

50

っている。

【0066】

より好ましくは、単離される分子は、免疫グロブリン、ペプチド、mRNA、低分子非コードRNA、miRNA、DNA、消化されたタンパク質断片、酵素、代謝物、炭水化物、グリコシル化されたポリペプチド、または金属からなる群から選択される。

【0067】

本発明の方法を介して検査される哺乳動物は、ヒト哺乳動物または非ヒト哺乳動物であってもよい。非ヒト哺乳動物は、必ずしも限定されると考えられるものではないが、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、サル、ウサギ、野ウサギ、イヌ、ネコ、マウスまたはラットであってもよい。一実施形態においては、哺乳動物は霊長類である。好ましい実施形態においては、哺乳動物はヒトであり、より好ましくは、哺乳動物はヒト成人である。

10

【0068】

また、本発明の方法を、例えば、バイオマーカー同定のインビボモデルにおける使用のために、ヒト疾患を表す動物モデルにおいて用いることもできる。そのような実施形態においては、動物モデルにおける動物は、マウス、ラット、サル、ウサギ、両生類、魚類、ミミズ、またはハエである。

【0069】

神経疾患のバイオマーカーを同定する本特許請求される方法を実施する際に、哺乳動物から得られた試料は、神経疾患について陽性であるか、または潜在的に陽性である。好ましくは、臨床および/または分子診断を用いて、試料が得られた哺乳動物が神経疾患について陽性であることを確認することができる。これは、認知的に正常であるが、脳中のアミロイド量（好ましくは、PETイメージングにより決定される）などの神経疾患を示すマーカーのレベルの変化を示す哺乳動物を含む。これらの哺乳動物は、神経疾患について潜在的に陽性であり、本発明の範囲に含まれる。

20

【0070】

哺乳動物が神経疾患について陽性であるか、または潜在的に陽性であるかどうかを決定するために用いられる臨床決定は、必ずしも限定されるものではないが、記憶および/または心理試験、言語機能障害および/または他の重要な認知障害（失行、計算不能症および左右識別障害など）の評価、判断機能低下および一般問題解決困難の評価、進行性の消極性から顕著な動揺までの人格変化の評価を含む評価に関連すると考えられることが当業者には理解される。

30

【0071】

さらに、高新皮質アミロイドの存在を確認するためのアミロイド量またはアミロイドレベルの決定などの、哺乳動物の疾患状態の陽性の診断を、正当ならば検証または確認することができる。互換的に用いられることが多い、アミロイド量もしくはアミロイドレベル、またはアミロイドおよびアミロイド断片の存在という用語は、（老人）斑の主要構成要素であるアミロイド-ベータペプチドである、脳に沈着した脳アミロイドベータ（A またはアミロイド- ）の濃度またはレベルを指す。

【0072】

また、哺乳動物を、PETおよびMRIなどのイメージング技術を用いて、またはPETと共に用いられる場合、PiBなどの診断ツールを援用して（そうでなければPiB-PETとも呼ばれる）、神経疾患について陽性であると確認することもできる。好ましくは、神経疾患について陽性である哺乳動物は、PiB陽性である。より好ましくは、哺乳動物は、高い新皮質アミロイド量（PiB陽性）と一致する標準摂取率比（SUVR）を有する。例えば、現在の実務は、SUVRに関するものであり、1.5は脳中の高レベルを反映し、1.5以下は脳中の低レベルの新皮質アミロイド量を反映し得る。当業者であれば、高レベルまたは低レベルの新皮質アミロイド量と考えられるものを決定することができる。当業者であれば理解できるように、哺乳動物を、CSFに由来するアミロイドベータおよびタウを測定することにより、神経疾患について陽性であることを確認することもできる。

40

50

【0073】

神経疾患のバイオマーカーを同定するために、ADおよびPDなどの神経疾患と診断された患者から得られる陽性と同定された、また、アミロイドレベルも決定することができた試料のライブラリーから、試料を取得することができる。好適なライブラリーは、The Australian Imaging, Biomarker and Lifestyle (AIBL) Flagship study of AgingまたはThe Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI)を含んでもよい。

【0074】

現在まで、AIBLは、ニューロイメージング、バイオマーカー、精神測定、および生活スタイル因子などの4つの次元にわたって約1,112人のボランティアを評価することを含んでいた。AIBL試験は、8年の期間にわたって18カ月間隔で血液採取を行う長期試験である。それは、アミロイドイメージング剤、ピッツバーグ化合物B (PiB)を用いるポジトロン放射断層撮影 (PET)を含む世界で最大の試験である。AIBLが他の同様の試験を超える1つの利点は、血液試料の採取および保存 (液体N2)のための標準化された手順である。これは変化した採取および保存プロトコルを有するか、または-20で試料を保存する他の試験と比較して有意な利点である。AIBL試験は、AD、軽度認知障害 (MCI)、および障害がない年齢適合対照対象からの良好に特性評価された血液試料の豊富な資源を提供し、ADおよびPDの診断のために用いることができるバイオマーカーの発見のための優れた資源を提供する。

10

20

【0075】

ADNIは、血液、脳脊髄液、磁気共鳴イメージング (MRI)およびポジトロン放射断層撮影 (PET)イメージングからのバイオマーカーの使用を検証するために設計されたADの試験である。ADNIは、AIBLと同様、参加者上で長期的血液試料および一連の神経精神測定データを収集してきた。

【0076】

当業者であれば理解できるように、単離された分子は、そのレベルが、単独で、もしくは組み合わせて、統計的に関連すると考えられる場合、または他の以前に特性評価されたバイオマーカーとのその関係が表現型状態を識別する場合、バイオマーカーとして検証される。特定の分子が偶然にバイオマーカーとして同定された確率が所定の値よりも小さい場合、疾患状態を決定するための同定されたバイオマーカーの有用性は統計的に有意であると考えられる。そのような確率を算出する方法は、バイオマーカーのレベルを比較するために用いられる正確な方法に依存する。

30

【0077】

従来 of t 検定などの、有意に変化するバイオマーカーを同定するためのいくつかの統計検定がある。しかしながら、一般に、SAMまたはPrediction Analysis of Microarray (PAM) (<http://www-statstanford.edu/.about.tibs/PAM/index.html>)、またはRandom Forestsなどの、より洗練された技術を用いることがより好都合であり、適切であり、および/または正確であり得る。そのような統計的有意性について評価するための一般的な検定としては、特に、t 検定、ANOVA、Kruskal-Wallis、Wilcoxon、Mann-Whitneyおよびオッズ比が挙げられる。

40

【0078】

本発明の方法を実施する際に、一実施形態においては、ヘパリン結合親和性を有する単離された分子の検証は、神経疾患について陽性であるか、または潜在的に陽性である試料間のヘパリン結合親和性を有する単離された分子のレベルにおける統計的有意差と、対照とを比較することを含んでもよい。

【0079】

従って、別の実施形態においては、本発明の方法を実施する際に、ヘパリン結合親和性を有する単離された分子をバイオマーカーとして検証することは、

50

(a) 神経疾患について陽性であるか、または潜在的に陽性である第 1 の試料におけるヘパリン結合親和性を有する第 1 の単離された分子のレベルを同定する工程；
(b) 第 1 の試料中に存在する神経疾患と診断された哺乳動物に特徴的であると以前に定義された別のバイオマーカーのレベルを同定する工程；
(c) 工程 (a) で同定された単離された分子のレベルと、工程 (b) で同定された他のバイオマーカーのレベルとを比較して、単離された分子のレベルと、他のバイオマーカーのレベルとの統計的に有意な関係を同定する工程；
(d) 対照から得られた第 2 の試料において工程 (a) ~ (c) を繰り返して、第 1 の試料において同定された関係が第 2 の試料において同定されるかどうかを決定する工程；
(e) 第 1 の試料において同定された関係が第 2 の試料において同定されない場合、ヘパリン結合親和性を有する第 1 の単離された分子が神経疾患のバイオマーカーであると結論付ける工程
をさらに含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 0 】

本特許請求される方法を実施する際に、単離された分子およびバイオマーカーのレベルを同定しなければならない。当業者には理解できるように、単離された分子または以前に同定されたバイオマーカーのレベル（例えば、濃度、発現および/または活性）を定性化または定量化することができる。好ましくは、単離された分子またはバイオマーカーのレベルを、DNA、RNA、脂質、炭水化物、金属またはタンパク質発現のレベルとして定量する。この好ましい実施形態においては、本発明は、神経疾患と診断された哺乳動物にとって特徴的であると以前に定義されたバイオマーカーのレベルとの統計的に有意な関係を有するその対応する発現レベルに基づいて、単離された分子をバイオマーカーとして検証することを求めるものである。

【 0 0 8 1 】

多数の定性化および定量化技術を用いて、単離された分子およびバイオマーカーのレベルを同定することができることが明らかである。これらの技術は、2D-DIGE、多反応モニタリング質量分析(MRM-MS)などの質量分析(MS)、リアルタイム(RT)-PCR、核酸アレイ；ELISA、機能的アッセイ、酵素アッセイ、様々な免疫学的方法、またはキャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラフィー(TLC)、超拡散クロマトグラフィー、2次元液相電気泳動(2-D-LPE)もしくはゲル電気泳動におけるその移動パターンなどの生化学的方法を含んでもよい。ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は、複雑な混合物からタンパク質を分離するための広く用いられているアプローチである。

【 0 0 8 2 】

しかしながら、単離された分子およびバイオマーカーのレベルを同定するために用いられる適切な技術は分子の特徴に依存することが、当業者には明らかである。例えば、単離された分子がタンパク質である場合、2D-DIGEまたは質量分析を用いて、単離された分子のレベルを定量することができる。

【 0 0 8 3 】

好ましくは、バイオマーカーのレベルの定量化を、1または2次元(2-D)構成で実施することができる。あまり複雑でないタンパク質調製物については、1次元のSDS-PAGEがより単純であるため、2-Dゲルよりも好ましい。好ましい実施形態においては、第1の次元においては等電点電気泳動(IEF)を含み、第2の次元においてはSDS-PAGEを含む2-Dゲル電気泳動が用いられ、電荷およびサイズによるバイオマーカーの分離をもたらす。

【 0 0 8 4 】

バイオマーカーのレベルの決定を、例えば、バイオマーカーがポリペプチドであった場合、2-Dゲル電気泳動上などでのその等電点(pI)およびその分子量(MW)に基づくバイオマーカーの特性評価に従うことによって行うこともできる。この例においては、

試料中に存在するバイオマーカーの量を、2-Dゲル上でのポリペプチドスポットの強度を測定することなどによる、視覚的分析によって決定することができる。

【0085】

一例においては、バイオマーカーがポリヌクレオチドバイオマーカーであった場合、バイオマーカーの量を評価するために、当業者であればRT-PCRなどの定量技術を考えられる限りで用いることができる。別の例においては、特定のバイオマーカーがポリペプチドまたはタンパク質であった場合、バイオマーカーのレベルを、ポリペプチドバイオマーカーに特異的なタグ付抗体などの二次検出試薬を用いるELISA技術により決定することができる。

【0086】

バイオマーカーがタンパク質である非限定例においては、タンパク質またはタンパク質アイソフォームのレベルを、イムノアッセイにより検出することもできる。当業者であれば、イムノアッセイは、抗原（すなわち、タンパク質またはタンパク質アイソフォーム）に特異的に結合する抗体を用いるアッセイと見なすことができる。かくして、イムノアッセイは、抗体へのタンパク質またはタンパク質アイソフォームの特異的結合の検出を特徴とする。タンパク質またはタンパク質アイソフォームを検出するためのイムノアッセイは、競合的または非競合的であってもよい。非競合的イムノアッセイは、捕捉された分析物（すなわち、タンパク質またはタンパク質アイソフォーム）の量が直接測定されるアッセイである。競合的アッセイにおいては、試料中に存在する分析物（すなわち、タンパク質またはタンパク質アイソフォーム）の量は、試料中に存在する分析物（すなわち、タンパク質またはタンパク質アイソフォーム）によって捕捉剤（すなわち、抗体）から置き換えられた（または競合除去された）添加された（外因性）分析物の量を測定することによって間接的に測定される。

【0087】

競合アッセイの一例においては、既知量の（外因性）タンパク質またはタンパク質アイソフォームを試料に添加した後、試料を抗体と接触させる。抗体に結合した添加された（外因性）タンパク質またはタンパク質アイソフォームの量は、外因性タンパク質またはタンパク質アイソフォームが添加される前の試料中のタンパク質またはタンパク質アイソフォームの濃度に反比例する。別のアッセイにおいては、例えば、抗体を、それらが固定される固相基質に直接結合させることができる。次いで、これらの固定された抗体は、試験試料中に存在する対象のタンパク質またはタンパク質アイソフォームを捕捉する。他の免疫学的方法としては、限定されるものではないが、液体またはゲル沈降反応、免疫拡散（単一または二重）、凝集アッセイ、免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ウェスタンブロット、リボソームイムノアッセイ、補体固定アッセイ、免疫放射定量測定アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイまたはイムノPCRが挙げられる。

【0088】

あるいは、第2の測定プロセスを、所与の試料中のバイオマーカーの決定のために用いることができることが企図される。例えば、バイオマーカーが酵素的特性を有するタンパク質である場合、おそらく酵素活性の測定をバイオマーカーのレベルの決定において用いることができる。同様に、バイオマーカーがポリペプチドであった場合、バイオマーカーのレベルを、ポリペプチドをコードするmRNAの尺度により作製することができると考えられる。また、定性データを、一次測定値から誘導または取得することもできる。

【0089】

あるいは、単離された分子がmiRNAである場合、RT-PCRを用いることができる。好ましい例においては、単離された分子はタンパク質であり、その発現は2D DGEを用いて測定される。この好ましい実施形態においては、分子は、分子の発現レベルを定量する前に、アミン反応性またはチオール反応性双性蛍光色素Z dyeを用いて標識される。

【0090】

10

20

30

40

50

試料中に存在するバイオマーカーを定量して、個々の多色示差的ゲル中電気泳動 (D G E) を用いることによりレベルを得ることができる。2 - Dゲル上での D G E 検出は、それが各ゲル上での内部標準の含有によってゲル間の変動の問題を回避し、はるかに少ないゲルを用いて実行することができるという利点を有する。さらに、従来の 2 - Dゲルと同程度に多くのタンパク質を単一の試料から分解することができる技術は少ない。

【 0 0 9 1 】

単離された分子のレベルを定量する際に、ヘパリン結合親和性を有する分子の単離の前または後に、試料を処理して 2 Dゲルおよび質量分析などの定量アッセイに関する精度を改善することができる。ヘパリンセファロースカラムからの富化されたタンパク質を、限定されるものではないが、トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィン (T C E P) および 4 - ビニルピリジンなどの還元剤およびアルキル化剤を用いて還元およびアルキル化した後、トリプシンを用いて酵素的消化 (好ましくは、約 3 7 で一晩) を行うことができる。多反応モニタリングのためのペプチドを、MS データ、S k y l i n e 資源ならびに限定されるものではないが、a p o E、a p o J、抗トロンピン I I I、血清アミロイド P、フィブリノゲンおよび A などのヘパリン結合親和性を有するペプチドの定量測定のためのペプチド遷移を用いて決定することができる。これらのタンパク質に加えて、アクチン、ゲルソリンおよび a p o E などの他のものを測定することができる。

10

【 0 0 9 2 】

S k y l i n e は、定量的 M S の開発にとって好適であるペプチドの迅速な選択を補助するソフトウェア資源である。消化されたタンパク質を連続希釈し、検出限界、イオン化効率、再現性およびクロマトグラフィー挙動を、n a n o - L C - M R M (Q - t r a p 6 5 0 0、A B S c i e x) を用いて決定する。定量アッセイのために、ペプチドを、アイソトープ標識されたリシンまたはアルギニンアミノ酸を用いて合成することができる。アイソトープ標識されたペプチド (重いペプチド) を、1 3 C および 1 5 N で標識して、8 ~ 1 0 D a の質量シフトをもたらすことができる。質量分析装置は、質量の差異に基づいて、そうでなければ同一のペプチドを分解することができる。重いペプチドは、試料中のペプチドと化学的に同一であるため、真の内部標準として働く ; これは、M R M - M S の主な利点の 1 つである。アミノ酸分析を用いて、ペプチド濃度を決定する。

20

【 0 0 9 3 】

理論によって限定されるものではないが、本発明は、ヘパリン結合親和性を有する分子のレベルが、同じ神経疾患を有しないと決定された哺乳動物から得られた試料中の同じ分子のレベルと比較した場合、神経疾患を有すると決定された哺乳動物から得られた試料中で変化するという知見に基づくものである。さらに、これらの変化は、神経疾患と診断された哺乳動物にとって特徴的であると以前に定義されたバイオマーカーのレベルと相関する。

30

【 0 0 9 4 】

従って、特許請求される方法を実施する際に、単離された分子のレベルを、高新皮質アミロイドの存在と相関する既知のバイオマーカーと比較することができる。好ましくは、この比較は、脳中のアミロイドベータの存在を特異的に認識する放射性トレーサーのレベルを用いて行われる。そのような放射性トレーサーは、ピッツバーグ化合物 B (P i t s b u r g C o m p o u n d B) (P i B) またはフロルピラミン F - 1 8 であってもよい。より好ましくは、比較は、神経疾患に特徴的である P i B - P E T レベルを用いて行われる。

40

【 0 0 9 5 】

神経疾患と診断された哺乳動物に特徴的であるバイオマーカーはまた、神経疾患状態を有する試料に由来するバイオマーカーの予め決定された比 (参照比) であってもよい。例えば、比較を、1 . 5 より大きい S U V R または当業者によって決定される高いか、もしくは低いアミロイド量を反映する任意の他の決定された値を用いて行うことができる。この量を超えるアミロイド量を高い、および低いと考えることができ、それを低いと考えることができる。しかしながら、この適用はこの値に限定されない。

50

【0096】

あるいは、単離された分子のレベルを、限定されるものではないが、アミロイド ペプチド、タウ、ホスホ - タウ、シヌクレイン、Rab3a、および神経系 (neural thread) タンパク質などの、神経疾患の1つまたは複数のさらなる公知のバイオマーカーのいずれかのレベルと比較することができる。さらに、比較を、生物試料のセットが得られた臨床認知症評価 (CDR) または体格指数などの臨床バイオマーカー値に対して行うことができる。

【0097】

本発明の方法の実施において理解されるように、比較は、神経疾患に特徴的な単一のバイオマーカーに必ずしも限定されない。比較におけるさらなるバイオマーカーの含有は、偽陽性バイオマーカー同定のリスクを軽減することができる。従って、特許請求される方法の好ましい特徴において、神経疾患に特徴的なさらなるバイオマーカーを、単離された分子のレベルと比較して、関係を同定することもできることが企図される。

10

【0098】

本特許請求される方法は、ヘパリン結合親和性を有する単離された分子のレベルと、神経疾患に特徴的であると以前に定義された別のバイオマーカーのレベルとの関係を同定することを求めるものである。本特許請求される方法を実施する際に、単離された分子のレベルと、神経疾患に特徴的であると以前に定義された別のバイオマーカーのレベルとを比較することにより、関係が同定される。関係の同定は、単離された分子のレベルが、神経疾患のバイオマーカーでもあり得ることを示す。対照試料に対して比較した場合、これをさらに確認することができる。

20

【0099】

関係を対照比較から理解することができる。例えば、単離された分子のレベルは、既知のバイオマーカーに関して類似するか、または関連する規模または方向で変化してもよい。好ましくは、関係は、相関である。当業者であればデータセット間の相関を同定するための特定の手段および方法を知っているが、相関方法の例としては、Pearsonの相関ならびにSpearmanおよびKendallのタウなどの順位相関係数が挙げられる。さらに、相関は、線形である必要はなく、または直線関係を規定する必要もない。関係はまた、非線形であってもよく、データセットでグラフ的に分析する時に明らかであってもよい。

30

【0100】

より特には、本発明の方法は、哺乳動物の新皮質中の、ベータアミロイドなどのアミロイドおよび/またはアミロイド断片の存在の増大との関係または相関に基づいて単離された分子をバイオマーカーとして検証することを求めるものである。

【0101】

より特には、本発明は、PiB - PET試験またはAV - 45測定から得られた測定値とのその関係または相関に基づいて単離された分子をバイオマーカーとして検証する。PiB - PET試験はまた、アミロイドおよび/またはアミロイド断片の存在の減少と相関する高PiB対低PiBに関してアミロイドおよび/またはアミロイド断片の存在の増大を定義することもできる。好ましくは、本特許請求される方法を実施する際に、および単離された分子をバイオマーカーとして検証する際に、単離された分子のレベルは、高いPiB測定値と相関する。

40

【0102】

本特許請求される方法を実施する際に、同定される任意の関係を評価して、対照試料において同じ分析を実施することにより、それが神経疾患を示すか、または神経疾患にとって独特なものであるかを決定する必要がある。従って、単離された分子およびバイオマーカーのレベルを対照試料中で同定し、そのレベルを比較して、関係が対照試料において同定されるかどうかを決定する。関係が対照試料において同定されない場合、これは、単離された分子が神経疾患のバイオマーカーである可能性があることを示す。

【0103】

50

単離された分子が神経疾患のバイオマーカーであるかどうかを結論付けるためには、神経疾患について陽性である試料において同定された関係は、対照試料においては同定されないか、または存在しない。従って、その関係は、神経疾患について陽性である哺乳動物から得られた試料を示し、対照試料を示さない。

【0104】

概して、本特許請求される方法を実施する際に、実験試料から得られた結果を、対照試料に対して比較する。本発明の文脈においては、実験試料は、神経疾患について陽性である哺乳動物から得られた試料を表す。

【0105】

対照試料は、神経疾患について陽性または陰性である生物試料であってもよい。しかしながら、当業者であれば理解できるように、対照試料は、それが、単離された分子を神経疾患のバイオマーカーとして検証するための必要な比較を提供しなければならない点で実験試料によって決まる。例えば、実験試料が神経疾患について陽性である場合、対照試料は、理想的には神経疾患について陰性である。神経疾患について陰性である場合、対照試料は神経疾患の症状を有さない健康な哺乳動物に由来するものであってもよい。あるいは、対照試料は、別の神経疾患を有する哺乳動物に由来するものであってもよい。例えば、ATバイオマーカーを検証する場合、対照試料はPD試料であってもよい。

10

【0106】

さらに、実験試料および対照試料は、実験群および対照群を形成する複数の試料からなってもよい。従って、単離された分子をバイオマーカーとして検証する際に、第1の単離された分子および他のバイオマーカーのレベルを、実験群を含む試料群および対照群を含む別の試料群において同定することができる。実験群および対照群に関する試料のサイズは等しいものである必要はない。

20

【0107】

さらに、対照群は、試料が実験群から区別される限り、同じ試料を含む必要はない。例えば、対照群は、神経疾患を有さない健康な哺乳動物および対照群とは別の神経疾患を有する哺乳動物に由来する試料からなってもよい。例えば、実験群はPDを有する哺乳動物に由来する試料を含有してもよく、対照群は神経疾患を有さない健康な哺乳動物に由来する試料およびADを有する哺乳動物に由来する試料を含有してもよい。

【0108】

本発明者らは、比を提供する、神経疾患について陽性である哺乳動物から得られた試料中でのヘパリン結合親和性を有するさらなる単離された分子のレベルの比較が、神経疾患のバイオマーカーを提供することができることを見出した。これらのバイオマーカーは、個々の分子のレベルの使用と比較した場合、神経疾患を診断する際に増大した特異度および感度を有してもよい。

30

【0109】

従って、別の実施形態においては、本特許請求される方法は、
(a) 第1の試料から、第1の単離された分子と関連する、ヘパリン結合親和性を有する第2の分子のレベルを単離および同定する工程、
(b) 第1および第2の単離された分子のレベルの間の比を作成する工程、
(c) 工程b)で作成された比と、第1の試料中に存在する神経疾患と診断された哺乳動物に特徴的であると以前に定義された別のバイオマーカーのレベルとを比較して、工程b)の比と、他のバイオマーカーのレベルとの統計的に有意な関係を同定する工程、
(d) 対照から得られた第2の試料において工程(a)~(c)を繰り返して、第1の試料において同定された関係が第2の試料において同定されるかどうかを決定する工程、
(e) 第1の試料において同定された関係が第2の試料において同定されない場合、前記比が神経疾患のバイオマーカーであると結論付ける工程
をさらに含む。

40

【0110】

本発明において考慮される通り、神経疾患のバイオマーカー比の検証は、少なくとも1

50

つの単離された分子のレベルを測定すること、そのレベルを、少なくとも1つの他の関連する単離された分子のレベルと相関させること、および次の数的関係を決定することを含む。

【0111】

次いで、前記比を、神経疾患に特徴的であると以前に定義されたバイオマーカーのレベルと比較して、関係を同定する。続いて、この関係を対照試料において評価して、比が神経疾患のバイオマーカーであるかどうかを結論付ける。

【0112】

本特許請求される方法において、第2の分子または第2の単離された分子などの関連する形態の分子は、ある程度の類似性を有するものである、同じ起源分子から誘導することができる、および/または第1の分子もしくは第1の単離された分子などの別の分子との共有される特性もしくは属性のため、一緒にグループ化することができる。例えば、ポリペプチドの文脈においては、疾患状態を示す関連するバイオマーカーは、同じ親分子に基づくか、またはそれから誘導されるポリペプチド（例えば、転写後のDNA、もしくは翻訳後のmRNAなどの同じポリヌクレオチドからコードされる、または酵素的切断などの翻訳後改変）を含んでもよい。

10

【0113】

従って、哺乳動物における神経疾患の存在に関して特定の生物学的状態を示すものと認識される関連する形態の分子は、互いに関連すると見られるが、当業界で公知の手段によってその検出を可能にすることができるある程度の変動を有するものである。好ましくは、神経疾患の決定のための関連する形態のバイオマーカーは、一例においては、複数のアイソフォーム中に存在するタンパク質であってもよい。従って、分子（例えば、第1および第2の）はアイソフォームとして関連するのが好ましい。

20

【0114】

当業界で用いられる場合、タンパク質アイソフォームとは、同じ遺伝子によりコードされるが、その等電点（pI）もしくは分子量（MW）、またはその両方などの特定の属性に関して差異を有するポリペプチドの変異体を指す。本明細書で用いられるタンパク質アイソフォームは、予想された/野生型ポリペプチドと、その任意の天然の変異体との両方を含むとさらに考えられる。そのようなアイソフォームは、そのアミノ酸組成における差異のため生じてもよく（例えば、選択的mRNAもしくはプレmRNAプロセッシング、例えば、選択的スプライシングもしくは限定的タンパク質分解の結果として）、さらに、またはあるいは、示差的翻訳後改変（例えば、グリコシル化、アシル化、リン酸化）から生じてもよく、または代謝的に変化してもよい（例えば、断片化される）。アイソフォームは、単独で、または組み合わせて存在してもよく、またはAなどの別の分子と複合体化してもよい。

30

【0115】

タンパク質アイソフォームはまた、タンパク質アイソフォームと類似するか、または同一の機能を有するポリペプチドを含んでもよいが、そのタンパク質アイソフォームのアミノ酸配列と類似するか、もしくは同一であるアミノ酸配列を含むか、またはそのタンパク質アイソフォームのものと類似するか、もしくは同一である構造を有する必要は必ずしもないことが企図され得る。

40

【0116】

本明細書で用いられる場合、ポリペプチドのアミノ酸配列は、それが以下の基準：（a）ポリペプチドがタンパク質アイソフォームのアミノ酸配列と少なくとも30%（より好ましくは、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも99%）同一であるアミノ酸配列を有する；（b）ポリペプチドが、タンパク質アイソフォームの少なくとも5アミノ酸残基（より好ましくは、少なくとも10アミノ酸残基、少なくとも15アミノ酸残基、少なくとも20アミノ酸残基、少なく

50

とも25アミノ酸残基、少なくとも40アミノ酸残基、少なくとも50アミノ酸残基、少なくとも60アミノ酸残基、少なくとも70アミノ酸残基、少なくとも80アミノ酸残基、少なくとも90アミノ酸残基、少なくとも100アミノ酸残基、少なくとも125アミノ酸残基、もしくは少なくとも150アミノ酸残基)をコードするヌクレオチド配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によりコードされるか；または(c)ポリペプチドが、タンパク質アイソフォームをコードするヌクレオチド配列と少なくとも30% (より好ましくは、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%)同一であるヌクレオチド配列によりコードされる、のうちの少なくとも1つを満たす場合、タンパク質アイソフォームのものと「類似する」か、または関連する。本明細書で用いられる場合、タンパク質アイソフォームのものと類似する構造を有するポリペプチドは、そのタンパク質アイソフォームのものと類似する二次、三次または四次構造を有するポリペプチドを指す。ポリペプチドの構造を、限定されるものではないが、X線結晶解析、核磁気共鳴、および結晶電子顕微鏡観察などの、当業者には公知の方法によって決定することができる。

10

20

30

40

50

【0117】

従って、複数の関連する形態の分子が存在する場合、これらのものを、同じ特定の親分子から誘導される多数のアイソフォームであることと見ることができる、および/または同じ親分子との高い程度の類似性を有することができることと企図され得る。本発明において提供されるバイオマーカーはいずれも、その遺伝子およびタンパク質同義語をも含むと考えられる。

【0118】

分子の比を決定する様式の例においては、2つの個々の分子を画像分析により定量化し、2Dゲルからの特定のタンパク質スポットの強度の測定を提供する。そのような例においては、分子レベルの定量化されたレベルに基づく比を、
(分子1のレベル/分子2のレベル) = 分子の比
として表すことができる。

【0119】

次いで、調査される哺乳動物から得られる分子レベルの比を、神経疾患と診断された哺乳動物に特徴的であると定義された以前に決定されたバイオマーカーと比較して、理想的には比の間の統計的に有意な関係を同定することができる。

【0120】

バイオマーカーを検証するため、またはそれを診断剤もしくは予後診断剤として使用するために本発明の方法を適用する際に、哺乳動物における神経疾患の存在または性質に関する臨床的な、またはほぼ臨床的な決定を、検証されたバイオマーカーのレベルまたは比に基づいて行うことができると考えられる。しかしながら、臨床決定は、確定診断に関して結論的なものであっても、またはなくてもよい。当業者であれば、診断が、可能性のある疾患または障害を決定または同定することを試みるプロセス、およびこのプロセスによって到達した意見を指すことを理解できる。

【0121】

さらに、バイオマーカーの診断能力を特徴付ける際に、当業者はバイオマーカーに関する診断カットオフを算出することができる。このカットオフは、値、レベルまたは範囲であってもよい。診断カットオフは、可能性のある疾患または障害を決定または同定することを試みるプロセスを補助する値、レベルまたは範囲を提供するべきである。

【0122】

例えば、バイオマーカーのレベルは、そのレベルが診断カットオフよりも上である場合、疾患にとって診断的であってもよい。あるいは、当業者であれば理解できるように、バイオマーカーのレベルは、そのレベルが診断カットオフよりも下である場合、疾患にとって診断的であってもよい。

【 0 1 2 3 】

それぞれの潜在的なバイオマーカーに関する診断カットオフを、当業者には公知のいくつかの統計分析ソフトウェアプログラムを用いて誘導することができる。例として、診断カットオフを決定する一般的な技術は、正常な個体の平均を決定すること、ならびに例えば、規定の感度および特異度の値を用いる $\pm 2SD$ および / または ROC 分析を用いることを含む。典型的には、80%を超える感度および特異度が許容されるが、これはそれぞれの疾患状況に依存する。診断カットオフの定義は、試験が開発されたものと異なる臨床設定において用いられる場合、再誘導する必要があるが、これを達成するために、対照個体を測定して、平均 $\pm SD$ を決定する。当業者であれば、対照個体から得られた測定値の外側にあるか、またはそれから離れた $\pm 2D$ を用いて、正常範囲の外側の個体を同定することができることを理解できる。正常範囲の外側にある個体は、疾患について陽性であると考えられることができる。次いで、新しい臨床設定において得られた値を、歴史上の値と比較して、古い診断基準が統計検定によって判定されるように依然として適用可能であるかどうかを決定することができる。疾患状態を有することが知られる個体もまた、分析に含有させることができる。疾患状態と対照状態の試料の両方が利用可能である状況では、選択された感度および特異度、典型的には80%を示すROC分析方法を選択して、疾患を示す診断値を決定することができる。また、診断カットオフの決定を、当業者には公知の統計モデルを用いて決定することもできる。

10

【 0 1 2 4 】

また、尤度比は受信者操作特性 (ROC) 分析から得られ、以下のように算出される：
尤度比 = 感度 / (1.0 - 特異度)。

20

【 0 1 2 5 】

比は、所与の値を有する個体が何倍多く疾患を有する可能性があるかを示すものである。例えば、ある人が3の尤度比を有する場合、彼らは試験で陰性を示したある人よりも疾患を有する可能性が3倍高い。同様に、バイオマーカーに適用される通り、高い尤度比は、マーカーが神経疾患のためのバイオマーカーである可能性が高いことを示す。

【 0 1 2 6 】

同様に、本発明の方法により同定されたバイオマーカーを、神経疾患の予後診断における補助を提供するのに用いることができ、神経疾患の存在、または性質に関する前臨床決定の評価を行うのを補助すると考えられる。これは、哺乳動物が神経疾患を発症する有意に増大した確率を有することを見出すことを指すと考えられる。

30

【 0 1 2 7 】

本発明の方法により同定されたバイオマーカーを、神経疾患の存在の予後評価を提供する際に当業界で公知の神経疾患の臨床評価の他の方法と組み合わせて用いることもできることが企図される。

【 0 1 2 8 】

神経疾患を有すると疑われる哺乳動物の疾患状態の確定診断を、PETおよびMRIなどのイメージング技術などによるか、または例えば、PETと共に用いられる場合、PiBなどの診断ツールを援用して(そうでなければPiB-PETと呼ばれる)、正当ならば検証または確認することができる。

40

【 0 1 2 9 】

試料において同定された第1および第2の単離された分子を、A、アミロイド前駆体タンパク質、セルピンファミリーのタンパク質の任意のメンバー、リボタンパク質ファミリーの任意のメンバー、または急性期炎症応答と関連するタンパク質を含む群から選択することができる。しかしながら、第2の単離された分子は、第1の単離された分子の関連する形態である。好ましくは、哺乳動物に由来する試料において同定された第1または第2の単離された分子を、抗トロンピンIII、血清アミロイドP、apoJ、アルファ-1-ミクログロブリン、ANT3__HUMAN抗トロンピンIII、APOH__HUMANベータ2糖タンパク質、FIBB__HUMANフィブリノゲンベータ鎖、FIBA__HUMANフィブリノゲンアルファ鎖、C9JC84__HUMANフィブリノゲンガンマ鎖

50

、 I T I H 2 __ H U M A N インターアルファトリプシン阻害因子重鎖 H 2、 H R G __ H U M A N ヒスチジンリッチ糖タンパク質、 B 0 U Z 8 3 __ H U M A N 補体 C 4 ベータ鎖、 C F A H __ H U M A N 補体因子 H、 H E P 2 __ H U M A N ヘパリンコファクター 2、 および E 9 P B C 5 __ H U M A N 血漿カリクレイン重鎖またはそれらの天然の誘導体もしくはそのアイソフォームを含む群から選択することができる。好ましくは、アイソフォームまたはその天然の誘導体は、抗トロンピン I I I のアイソフォーム A、 B、 C もしくは J、血清アミロイド P (S A P) のアイソフォーム B、 C、 D、 F、 G、 H もしくは J、 a p o J のアイソフォーム A、 B、 C、 D、 E、 F もしくは G またはアルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム A、 B、 C、 D、 E、 F、 G、 H もしくは I を含む群から選択される。より好ましくは、アイソフォームは、 A T I I I のアイソフォーム A、 B もしくは J、 S A P のアイソフォーム F、 B もしくは J または a p o J のアイソフォーム A、 C、 D、 E、 F もしくは G、アルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム E もしくは G を含む群から選択される。

10

【 0 1 3 0 】

あるいは、第 1 または第 2 の単離された分子は、 A と複合体化する。この選択肢においては、好ましくは、第 2 の単離された分子は、 A と共に、またはそれとの複合体にある、抗トロンピン I I I、血清アミロイド P、 a p o J、アルファ - 1 - ミクログロブリン、 A N T 3 __ H U M A N 抗トロンピン I I I、 A P O H __ H U M A N ベータ 2 糖タンパク質、 F I B B __ H U M A N フィブリノゲンベータ鎖、 F I B A __ H U M A N フィブリノゲンアルファ鎖、 C 9 J C 8 4 __ H U M A N フィブリノゲンガンマ鎖、 I T I H 2 __ H U M A N インターアルファトリプシン阻害因子重鎖 H 2、 H R G __ H U M A N ヒスチジンリッチ糖タンパク質、 B 0 U Z 8 3 __ H U M A N 補体 C 4 ベータ鎖、 C F A H __ H U M A N 補体因子 H、 H E P 2 __ H U M A N ヘパリンコファクター 2、 および E 9 P B C 5 __ H U M A N 血漿カリクレイン重鎖またはそれらの天然の誘導体もしくはそのアイソフォームを含む群から選択される。好ましくは、アイソフォームまたはその天然の誘導体は、抗トロンピン I I I のアイソフォーム A、 B、 C もしくは J、血清アミロイド P (S A P) のアイソフォーム B、 C、 D、 F、 G、 H もしくは J、 a p o J のアイソフォーム A、 B、 C、 D、 E、 F もしくは G またはアルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム A、 B、 C、 D、 E、 F、 G、 H もしくは I を含む群から選択される。より好ましくは、アイソフォームは、 A T I I I のアイソフォーム A、 B もしくは J、 S A P のアイソフォーム F、 B もしくは J または a p o J のアイソフォーム A、 C、 D、 E、 F もしくは G、アルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム E もしくは G を含む群から選択される。

20

30

【 0 1 3 1 】

本発明の別の態様においては、アルツハイマー病 (A D)、パーキンソン病 (P D)、レヴィ小体認知症 (D L B)、多発脳梗塞性認知症 (M I D)、血管性認知症 (V D)、統合失調症および / または抑鬱症を含む群から選択される神経疾患の診断、示差的診断および予後診断を行うことができる、神経疾患のためのバイオマーカーが提供される。好ましくは、バイオマーカーは、アルツハイマー病 (A D) またはパーキンソン病 (P D) の診断、示差的診断および予後診断を行うことができる。バイオマーカーを、 A、アミロイド前駆体タンパク質、セルピファミリーのタンパク質の任意のメンバー、リポタンパク質ファミリーの任意のメンバー、または急性期炎症応答と関連するタンパク質を含む群から選択することができる。しかしながら、第 2 の単離された分子は、第 1 の単離された分子の関連する形態である。好ましくは、哺乳動物に由来する試料において同定された第 1 または第 2 の単離された分子を、抗トロンピン I I I、血清アミロイド P、 a p o J、アルファ - 1 - ミクログロブリン、 A N T 3 __ H U M A N 抗トロンピン I I I、 A P O H __ H U M A N ベータ 2 糖タンパク質、 F I B B __ H U M A N フィブリノゲンベータ鎖、 F I B A __ H U M A N フィブリノゲンアルファ鎖、 C 9 J C 8 4 __ H U M A N フィブリノゲンガンマ鎖、 I T I H 2 __ H U M A N インターアルファトリプシン阻害因子重鎖 H 2、 H R G __ H U M A N ヒスチジンリッチ糖タンパク質、 B 0 U Z 8 3 __ H U M A N 補体 C 4 ベータ鎖、 C F A H __ H U M A N 補体因子 H、 H E P 2 __ H U M A N ヘパリンコファクター

40

50

2、および E9PBC5 __ HUMAN 血漿カリクレイン重鎖またはそれらの天然の誘導体もしくはそのアイソフォームを含む群から選択することができる。好ましくは、アイソフォームまたはその天然の誘導体は、抗トロンピン I I I のアイソフォーム A、B、C もしくは J、血清アミロイド P (SAP) のアイソフォーム B、C、D、F、G、H もしくは J、apo J のアイソフォーム A、B、C、D、E、F もしくは G または アルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム A、B、C、D、E、F、G、H もしくは I を含む群から選択される。より好ましくは、アイソフォームは、A T I I I のアイソフォーム A、B もしくは J、SAP のアイソフォーム F、B もしくは J または apo J のアイソフォーム A、C、D、E、F もしくは G、アルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム E もしくは G を含む群から選択される。

10

【0132】

最も好ましくは、AD のためのバイオマーカーは、抗トロンピン I I I、血清アミロイド P、apo J、アルファ - 1 - ミクログロブリンまたはそれらの天然の誘導体もしくはそのアイソフォームを含む群から選択される。最も好ましくは、AD のためのバイオマーカーは、抗トロンピン I I I またはその天然の誘導体もしくはそのアイソフォームである。好ましくは、アイソフォームは、A T I I I の B または J である。

【0133】

最も好ましくは、PD のためのバイオマーカーは、アルファ - 1 - ミクログロブリンまたはその天然の誘導体もしくはそのアイソフォームである。好ましくは、アルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォームは、アイソフォーム E または G である。

20

【0134】

様々な実施形態において、神経疾患を予後診断するか、またはその診断を補助するための本特許請求される方法により同定される検証されたバイオマーカーおよび / または臨床マーカーにより達成される感度は、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 71%、少なくとも約 72%、少なくとも約 73%、少なくとも約 74%、少なくとも約 75%、少なくとも約 76%、少なくとも約 77%、少なくとも約 78%、少なくとも約 79%、少なくとも約 80%、少なくとも約 81%、少なくとも約 82%、少なくとも約 83%、少なくとも約 84%、少なくとも約 85%、少なくとも約 86%、少なくとも約 87%、少なくとも約 88%、少なくとも約 89%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95% である。様々な実施形態においては、神経疾患を予後診断するか、またはその診断を補助するための方法におけるバイオマーカーのセットの使用により達成される特異度は、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 71%、少なくとも約 72%、少なくとも約 73%、少なくとも約 74%、少なくとも約 75%、少なくとも約 76%、少なくとも約 77%、少なくとも約 78%、少なくとも約 79%、少なくとも約 80%、少なくとも約 81%、少なくとも約 82%、少なくとも約 83%、少なくとも約 84%、少なくとも約 85%、少なくとも約 86%、少なくとも約 87%、少なくとも約 88%、少なくとも約 89%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95% である。様々な実施形態においては、神経疾患を予後診断するか、またはその診断を補助するための方法における検証されたバイオマーカーから達成される全体の精度は、少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 71%、少なくとも約 72%、少なくとも約 73%、少なくとも約 74%、少なくとも約 75%、少なくとも約 76%、少なくとも約 77%、少なくとも約 78%、少なくとも約 79%、少なくとも約 80%、少なくとも約 81%、少なくとも約 82%、少なくとも約 83%、少なくとも約 84%、少なくとも約 85%、少なくとも約 86%、少なくとも約 87%、少なくとも約 88%、少なくとも約 89%、少なくとも約 90%、少なくとも約 91%、少なくとも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95% である。いくつかの実施形態においては、感度および / または特異度は、神経疾患の臨床診断に対して測定される。

30

40

50

【0135】

第1の分子を神経疾患のバイオマーカーとして検証する際に、第1と第2の分子のレベルの間で比を作成することができる。好ましくは、この比は、第2の分子が第1の分子の関連する形態である場合、第1の分子のアイソフォームの間で作成される。第1の分子が抗トロンピンII I、血清アミロイドP、apo J、アルファ-1-ミクログロブリン、ANT3__HUMAN抗トロンピンII I、APOH__HUMANベータ2糖タンパク質、FIBB__HUMANフィブリノゲンベータ鎖、FIBA__HUMANフィブリノゲンアルファ鎖、C9JC84__HUMANフィブリノゲンガンマ鎖、ITIH2__HUMANインターアルファトリプシン阻害因子重鎖H2、HRG__HUMANヒスチジンリッチ糖タンパク質、BOUZ83__HUMAN補体C4ベータ鎖、CFAH__HUMAN補体因子H、HEP2__HUMANヘパリンコファクター2、およびE9PBC5__HUMAN血漿カリクレイン重鎖またはそれらの天然の誘導体もしくはそのアイソフォームを含む群から選択される場合、比は、抗トロンピンII IのアイソフォームA、B、CもしくはJ、血清アミロイドP(SAP)のアイソフォームB、C、D、F、G、HもしくはJ、apo JのアイソフォームA、B、C、D、E、FもしくはGまたはアルファ-1-ミクログロブリンのアイソフォームA、B、C、D、E、F、G、HもしくはIを含む群から選択されるアイソフォームの間で作成される。より好ましくは、アイソフォームは、ATII IのアイソフォームA、BもしくはJ、SAPのアイソフォームF、BもしくはJまたはapo JのアイソフォームA、C、D、E、FもしくはG、またはアルファ-1-ミクログロブリンのアイソフォームEもしくはGを含む群から選択される。

10

20

【0136】

好ましくは、第1の分子がATII Iである場合、比は、限定されるものではないが、A/J、B/JまたはC/Jなどの、少なくともアイソフォームA、B、CとJの間で作成される。

【0137】

好ましくは、第1の分子がSAPである場合、比は、好ましくはアイソフォームFとJの間で作成される。

【0138】

好ましくは、第1の分子がapo Jである場合、比は、好ましくはアイソフォームA、BとDの間で作成される。

30

【0139】

好ましくは、第1の分子がアルファ-1-ミクログロブリンである場合、比は、好ましくはアルファ-1-ミクログロブリンのアイソフォームEまたはGの間で作成される。

【0140】

本発明の別の態様においては、

- (a) 患者から第1の試料を取得する工程；
- (b) 第1の試料から、ヘパリン結合親和性を有する分子を単離および同定し、前記分子を本明細書に記載の神経疾患のためのバイオマーカーとして検証する工程；
- (c) 工程(b)で同定された分子のレベルに基づいて、患者が神経疾患を有すると診断される、示差的に診断される、および/または予後診断されるかどうかを決定する工程を含む、患者における神経疾患の診断、示差的診断および/または予後診断のための方法が提供される。

40

【0141】

さらに別の態様においては、

- (a) 患者から試料を取得する工程；
- (b) 試料から、本明細書に記載の方法に従って検証された少なくとも2つの関連する形態のバイオマーカーを単離および同定する工程；
- (c) 工程(b)からバイオマーカーのレベルを決定する工程；
- (d) 工程(b)で同定された2つの関連する形態のバイオマーカーのレベルの間の比を作成する工程；

50

(e) 参照比と比較した比の値に基づいて、哺乳動物が神経疾患を有すると診断される、示差的に診断される、および/または予後診断されるかどうかを、工程(d)で作成された比から結論付ける工程

を含む、患者における神経疾患の診断、示差的診断および/または予後診断のための方法が提供される。

【0142】

従って、本発明は、本明細書に記載のように同定された、哺乳動物が神経起源の疾患を有するか、もしくは発症する可能性があるかどうかを決定するため、または認知機能低下について哺乳動物を評価するために用いることができるバイオマーカーならびにその天然の誘導体およびアイソフォームの使用にさらに関する。特に、本発明は、哺乳動物の新皮質における、ベータアミロイドなどのアミロイドおよび/またはアミロイド断片の存在の増大との関係を有する神経疾患の診断、示差的診断および/または予後診断にとって有用である。より特には、本発明は、PiB-PE T試験またはAV-45測定から得られた測定値と相関する方法を提供する。

10

【0143】

本発明の方法はまた、神経疾患について哺乳動物を評価するために予備スクリーニングまたは予後診断様式で用いることもでき、正当ならば、さらなる確定診断を、例えば、PiB-PE Tを用いて行うことができる。さらに、本発明の方法により同定されるバイオマーカーは、以前に検証された診断試験、特に、PiB-PE T評価を用いる臨床評価のための患者を選択するのに有用であってもよい。

20

【0144】

本発明に関連があると考えられる神経疾患は、特に限定されるものではないが、アルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)、レビイ小体認知症(DLB)、多発脳梗塞性認知症(MID)、血管性認知症(VD)および/または抑鬱症を含むものである。本発明の方法の使用により診断する、示差的に診断する、および/または予後診断することができる好ましい疾患は、ADまたはPDである。

【0145】

本発明の方法を適用する際に、哺乳動物における神経疾患の存在または性質に関する臨床決定またはほぼ臨床決定を行うことができ、これは確定診断に関して結論的なものであっても、またはなくてもよいと考えられる。当業者であれば、診断とは、可能性のある疾患または障害を決定または同定することを試みるプロセス、およびこのプロセスによって到達される意見を指すことを理解できる。

30

【0146】

同様に、本発明の方法は、神経疾患の予後診断における補助を提供する際に用いることができ、神経疾患の存在、または性質に関する前臨床決定の評価を行うのを補助すると考えられる。これは、哺乳動物が神経疾患を発症する有意に増大した確率を有すると見出すことを指すと考えられる。

【0147】

当業者であれば、神経疾患の存在についての臨床決定は、必ずしも限定されるものではないが、記憶および/または心理試験、言語機能障害および/または他の重要な認知障害(失行、計算不能症および左右識別障害など)の評価、判断機能低下および一般問題解決困難の評価、進行性の消極性から顕著な動揺までの人格変化の評価を含む評価に関連すると考えられることを理解できる。本発明の方法はまた、神経疾患の存在の予後的評価を提供する際に当業界で公知の神経疾患の臨床評価の他の方法と組み合わせて用いることもできることが企図される。

40

【0148】

神経疾患を有すると疑われる哺乳動物の疾患状態の確定診断を、PE TおよびMRIなどのイメージング技術などによるか、または例えば、PE Tと共に用いられる場合、PiBなどの診断ツールを援用して(そうでなければPiB-PE Tと呼ばれる)、正当ならば検証または確認することができる。従って、本発明の方法を、予備スクリーニングまた

50

は予後診断様式で用いて、神経疾患について哺乳動物を評価することができ、正当ならば、さらなる確定診断を、例えば、P i B - P E Tを用いて行うことができる。

【0149】

本発明は、特定のバイオマーカーのレベルまたは相関が、同じ神経疾患を有しないと決定された哺乳動物から得られた試料における同じバイオマーカーのレベルまたは相関と比較した場合に神経疾患を有すると決定された哺乳動物から得られた試料において有意に変化するという知見に基づくものである。

【0150】

本発明の方法により検査される、診断される、示差的に診断される、または予後診断される哺乳動物は、ヒト哺乳動物または非ヒト哺乳動物であってもよい。非ヒト哺乳動物は、必ずしも限定されると考えられないが、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、サル、ウサギ、野ウサギ、イヌ、ネコ、マウスまたはラットである。一実施形態においては、哺乳動物は霊長類である。好ましい実施形態においては、哺乳動物はヒトであり、より好ましくは、哺乳動物はヒト成人である。

【0151】

本発明の方法の適用における特定の対象となるバイオマーカーは、抗トロンピンI I I、血清アミロイドP、a p o J（クラステリン）、アルファ-1-ミクログロブリン、A N T 3 _ H U M A N抗トロンピンI I I、A P O H _ H U M A Nベータ2糖タンパク質、F I B B _ H U M A Nフィブリノゲンベータ鎖、F I B A _ H U M A Nフィブリノゲンアルファ鎖、C 9 J C 8 4 _ H U M A Nフィブリノゲンガンマ鎖、I T I H 2 _ H U M A Nインターアルファトリプシン阻害因子重鎖H 2、H R G _ H U M A Nヒスチジンリッチ糖タンパク質、B 0 U Z 8 3 _ H U M A N補体C 4ベータ鎖、C F A H _ H U M A N補体因子H、H E P 2 _ H U M A Nヘパリンコファクター2、およびE 9 P B C 5 _ H U M A N血漿カリクレイン重鎖またはそれらの天然の誘導体もしくはそのアイソフォームから誘導することができる、またはそれと類似する関連する形態のバイオマーカーである。好ましくは、アイソフォームまたはその天然の誘導体は、抗トロンピンI I IのアイソフォームA、B、CもしくはJ、血清アミロイドPのアイソフォームB、C、D、F、G、HもしくはJ、a p o JのアイソフォームA、C、D、E、FもしくはGまたはアルファ-1-ミクログロブリンのアイソフォームA、B、C、D、E、F、G、HもしくはIを含む群から選択される。好ましくは、抗トロンピンI I I、血清アミロイドP、a p o J（クラステリン）、アルファ-1-ミクログロブリンのタンパク質およびアイソフォームまたはそれらの天然の誘導体もしくはそのアイソフォームが、本発明の方法に従って用いられる。

【0152】

神経疾患の存在の評価を提供する際に、試料は問い合わせのために哺乳動物から得られる。本発明の実施において理解される試料とは、一般に、生物材料の任意の供給源、例えば、体液、脳抽出物、末梢血またはバイオマーカーの存在の問い合わせのために得ることができる生物材料の他の任意の供給源を指す。

【0153】

従って、これは、例えば、哺乳動物から取得することができ、予後診断、診断またはモニタリング様式で用いることができる様々な試料型を含んでもよい。これらのものとしては、必ずしも限定されるものではないが、血液（全血を含む）、血漿、血清、血液溶解物、リンパ液、滑液、髄液、尿、脳脊髄液、精液、糞便、痰、粘液、羊水、涙液、嚢胞液、汗腺分泌物、胆汁、乳汁、涙または唾液が挙げられる。バイオマーカーについて問い合わせることができる試料のさらなる例としては、培養された細胞、組織、細菌およびウイルスの培地上清ならびに細胞、組織、細菌またはウイルスから得られる溶解物が挙げられる。細胞および組織を、上記の任意の単細胞型または多細胞型生物から誘導することができる。

【0154】

好ましくは、バイオマーカーを本発明の実施において決定する試料は、哺乳動物から得

られる生物試料である。本発明のより好ましい実施形態においては、試料は哺乳動物に由来する血液である。

【0155】

血液試料は、例えば、血小板、リンパ球、多形核細胞、マクロファージ、赤血球などの血液中に存在する様々な細胞型を含んでもよく、全血または当業者には周知のその画分の誘導体を含んでもよい。かくして、血液試料はまた、様々な分画形態の血液を含むか、または特定のアッセイにおける保存または加工を容易にするために添加される様々な希釈剤または界面活性剤を含んでもよい。そのような希釈剤および界面活性剤は当業者には周知であり、様々なバッファー、保存剤などを含む。これは、試薬を用いる処理、可溶化、またはある特定の成分（タンパク質もしくはポリヌクレオチドなど）の富化などの、その調

10

【0156】

本発明の方法を用いて神経疾患の存在について哺乳動物を評価する際に、試料中のバイオマーカーのレベルを得るために、哺乳動物に由来する試料中の少なくとも1つのバイオマーカーの量の定量化が必要である。

【0157】

バイオマーカーのレベルを決定する前に、試料は、本明細書に記載のようにヘパリン結合親和性を有するバイオマーカーとして作用する分子を同定するために加工される。本発明者らは、ヘパリン結合親和性を有する分子を測定して、神経疾患を診断する、示差的に診断する、または予後診断することができると同定した。一度、本明細書に記載のように、分子が同定され、バイオマーカーとして決定されたら、そのバイオマーカーまたは分子を分析して、哺乳動物が神経疾患を有するかどうかを決定することができる。

20

【0158】

一般に、特定のバイオマーカーのレベルは、問い合わせられる試料中の特定のバイオマーカーの量に対する参照であると考えられる。例えば、バイオマーカーのレベルを、一次測定技術により決定および定量することができ、それはバイオマーカー自体の量または濃度の直接的測定値であってもよい。従って、バイオマーカーの量を、哺乳動物に由来する試料中の特定の分子の数を検出することにより評価することができる。バイオマーカーまたは分子のレベルを、本明細書に記載のように決定することができる。

【0159】

従って、神経疾患と関連するバイオマーカーを、当業者には公知の任意の方法によって検出し、可能である場合、定量することができると考えられる。これらの方法は、本明細書に記載される。

30

【0160】

別の態様において、

(a) 患者から第1の試料を取得する工程、

(b) 第1の試料から、ヘパリン結合親和性を有する第1および第2のバイオマーカーのレベルを単離および同定する工程であり、第1および第2のバイオマーカーは関連しており、第1および第2のバイオマーカーが本明細書に記載の神経疾患のためのバイオマーカーとして検証される、

40

(c) 第1および第2の単離された分子のレベルの間の比を作成して、作成比を提供する工程、

(d) 対照から得られた第2の試料において工程(b)~(c)を繰り返して、参照比を提供する工程、

(e) 第1の試料において同定された作成比と、第2の試料において同定された参照比とを比較する工程、

(f) 作成比と参照比との差異に基づいて神経疾患状態を結論付ける工程

を含む、患者における神経疾患の診断、示差的診断および/または予後診断のための方法が提供される。

【0161】

50

哺乳動物が神経疾患を発症する可能性があるかどうかを認識する能力は、試料中の少なくとも2つの特定の関連する形態のバイオマーカーのそれぞれのレベルの定量、および比較を、哺乳動物の新皮質アミロイド量の指示を与えるように行うことができるという本発明者らによる同定から得られる。

【0162】

本発明において定量および比較されるバイオマーカーは、同じ試料から取得することができるバイオマーカーである。従って、同じ試料に由来するバイオマーカーレベルを比較することによる、少なくとも2つの関連する形態のバイオマーカーのこの同時的比較によって、相対的比較が行われ、バイオマーカーレベルの内部検証が確保される。これは、哺乳動物間に存在し得る、試料中のバイオマーカーレベルの内部標準化と見なすことができるバイオマーカーのレベル間のサンプル間変動性などの側面を除去すると見られる。

10

【0163】

少なくとも2つの関連する形態のバイオマーカーのそれぞれのレベルを比較することによって、比を作成することができる。この比を、2つを超える関連する形態のバイオマーカーから作成することができる。それらを、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9または10の関連する形態のバイオマーカーから作成することができる。次いで、特定のバイオマーカー間で作成される比を用いて、例えば、参照比を提供するのと類似する様式で得られた対照哺乳動物に由来する比に対してさらに比較することにより、哺乳動物が神経疾患を有するか、または神経疾患が存在しないかどうかを予後診断的または診断的に評価することができる。

20

【0164】

当業者であれば、用語「比」または「複数の比」が、評価されるバイオマーカーのレベルの間の関係および検査されるバイオマーカーのレベルの相対割合の差異を明示的に示す関係を指すことを理解できると考えられる。そのようなものとして、比または複数の比という用語は、第2のバイオマーカーのレベルと比較した場合の1つのバイオマーカーの相対レベルまたは比例レベルを表す。

【0165】

従って、例として、ある形態の関連するバイオマーカーと別の関連する形態のバイオマーカーのレベル間の関係または比は、親形態のバイオマーカーのレベルと、親バイオマーカーから誘導されるその後の断片のレベルとの差異であってもよい。一例においては、これは、親バイオマーカーの総レベルと、一例においては、全タンパク質および酵素的消化の下でそれから切断されるポリペプチド断片などの、その親バイオマーカーに由来する切断された断片のレベルとの差異と関連してもよい。好ましくは、関連する形態のバイオマーカーのレベル間の比は、タンパク質アイソフォーム間の関係であってよく、親タンパク質およびその親タンパク質から誘導されるアイソフォームの総量との差異である。好ましい実施形態においては、比は、抗トロンピンII I、血清アミロイドP、apo J（クラステリン）、アルファ-1-ミクログロブリン、ANT3_HUMAN抗トロンピンII I、APOH_HUMANベータ2糖タンパク質、FIBB_HUMANフィブリノゲンベータ鎖、FIBA_HUMANフィブリノゲンアルファ鎖、C9JC84_HUMANフィブリノゲンガンマ鎖、ITH2_HUMANインターアルファトリプシン阻害因子重鎖H2、HRG_HUMANヒスチジンリッチ糖タンパク質、BOUZ83_HUMAN補体C4ベータ鎖、CFAH_HUMAN補体因子H、HEP2_HUMANヘパリンコファクター2、およびE9PBC5_HUMAN血漿カリクレイン重鎖およびそれらの天然の誘導体を含む群から選択されるタンパク質から誘導されるアイソフォームと、親タンパク質である抗トロンピンII I、血清アミロイドP、apo J（クラステリン）、アルファ-1-ミクログロブリン、ANT3_HUMAN抗トロンピンII I、APOH_HUMANベータ2糖タンパク質、FIBB_HUMANフィブリノゲンベータ鎖、FIBA_HUMANフィブリノゲンアルファ鎖、C9JC84_HUMANフィブリノゲンガンマ鎖、ITH2_HUMANインターアルファトリプシン阻害因子重鎖H2、HRG_HUMANヒスチジンリッチ糖タンパク質、BOUZ83_HUMAN補体C4ベ

30

40

50

ータ鎖、C F A H __ H U M A N 補体因子H、H E P 2 __ H U M A N ヘパリンコファクター2、およびE 9 P B C 5 __ H U M A N 血漿カリクレイン重鎖またはそれらの天然の誘導体もしくはそのアイソフォームとの間のものである。好ましくは、アイソフォームまたはその天然の誘導体は、抗トロンピンI I IのアイソフォームA、B、CもしくはJ、血清アミロイドP (S A P)のアイソフォームB、C、D、F、G、HもしくはJ、a p o JのアイソフォームA、B、C、D、E、FもしくはGまたはアルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォームA、B、C、D、E、F、G、HもしくはIを含む群から選択される。より好ましくは、アイソフォームは、A T I I IのアイソフォームA、BもしくはJ、S A PのアイソフォームF、BもしくはJまたはa p o JのアイソフォームA、C、D、E、FもしくはG、アルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォームEもしくはGを含む群から選択される。

10

【0166】

好ましくは、分子がA T I I Iである場合、比は、限定されるものではないが、A / J、B / JまたはC / Jなどの少なくともアイソフォームA、B、CおよびJの間で作成される。

【0167】

好ましくは、分子がS A Pである場合、比は、好ましくはアイソフォームFとJの間で作成される。

【0168】

好ましくは、分子がA p o Jである場合、比は、好ましくはアイソフォームA、BおよびDの間で作成される。

20

【0169】

好ましくは、第1の分子がアルファ - 1 - ミクログロブリンである場合、比は、好ましくはアルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォームEまたはGの間で作成される。

【0170】

かくして、特定のバイオマーカーのレベルの測定に基づく作成比のシフトまたは変化は、比の作成において比較される少なくとも2つの形態のバイオマーカーの1つのレベルの増加または減少（全非存在を含む）によるなど、1つのバイオマーカーのレベルの変化により起こると予測することができる。

【0171】

哺乳動物が神経疾患を有するかどうかを識別することができる比を提供することができる本発明において同定されるバイオマーカーは、対照哺乳動物の様々な群から得られる試料中のバイオマーカー間に存在する比を評価した後、これを比較することによって初めて同定された。これにおいて、神経疾患を有する哺乳動物（陽性対照哺乳動物を代表すると考えられる）から得られる試料中の様々な形態のバイオマーカーの比を、神経疾患を有さない哺乳動物（陰性対照哺乳動物を代表すると考えられる）から得られる試料中の同じ形態のバイオマーカーの比と比較する。

30

【0172】

哺乳動物が神経疾患を有するか、または発症する可能性があることの指示は、新皮質アミロイド量のレベルが増加していないと決定された哺乳動物（陰性対照哺乳動物）と比較した場合、新皮質アミロイド量のレベルが増加した哺乳動物（陽性対照哺乳動物）に由来する試料における特定の形態の関連するバイオマーカーのレベルの評価に基づくものである。特定の関連するバイオマーカーの異なるレベルのこの評価は、哺乳動物における理論的新皮質アミロイド量に基づく予後診断試験の開発のため、診断試験のため、および/または神経疾患の示差的診断のための基礎である。

40

【0173】

哺乳動物が神経疾患を有するかどうかの評価を、バイオマーカーに関する診断カットオフおよび本明細書に記載のマーカーについて決定される尤度比により決定することができる。

【0174】

50

対照哺乳動物から得られる試料に由来する少なくとも2つの形態の関連するバイオマーカーの間の比を決定することにより、神経疾患状態に特徴的な比を作成し、参照比を提供することができる。関連するバイオマーカー間の比を定量および作成する際に、試料が最初に得られた対照哺乳動物の適切な選択に応じて、神経疾患の様々な段階または状態を示すことができる一連の比または一定範囲の比を得ることができると考えられる。従って、そのような評価から得られる比を、哺乳動物における特定の疾患状態に特徴的である以前に定義された比と見なすことができる。当業者であれば、所与のバイオマーカー比について、対照哺乳動物から神経疾患に罹患している哺乳動物を識別するのに好適なカットオフ値を確立する方法も知っている。

【0175】

対照哺乳動物から得られた試料に由来する関連する形態のバイオマーカーに関する比を決定する際に、この情報が一連の参照レベル範囲を作成しに行くことができることがさらに理解される。これらの参照レベル範囲は、対照哺乳動物から提供される比に基づいて哺乳動物の特定の疾患状態に特徴的であってもよい。従って、当業者であれば、比の好適な参照範囲、または対照哺乳動物もしくは神経疾患に罹患している哺乳動物に特徴的な範囲を、本発明の方法によって提供することもできることを理解できる。

【0176】

好ましくは、新皮質アミロイド量と関連する神経疾患の哺乳動物における診断および/または予後診断のための方法における使用のための比の作成は、哺乳動物に由来する試料中の少なくとも2つの関連する形態のバイオマーカーのレベルを測定すること、およびバイオマーカーのレベルの比を決定することにより提供される。特に、本発明の方法に従って定量されるバイオマーカーを、抗トロンピンII I、血清アミロイドP、apo J（クラステリン）、アルファ-1-ミクログロブリン、ANT3_HUMAN抗トロンピンII I、APOH_HUMANベータ2糖タンパク質、FIBB_HUMANフィブリノゲンベータ鎖、FIBA_HUMANフィブリノゲンアルファ鎖、C9JC84_HUMANフィブリノゲンガンマ鎖、ITH2_HUMANインターアルファトリプシン阻害因子重鎖H2、HRG_HUMANヒスチジンリッチ糖タンパク質、BOUZ83_HUMAN補体C4ベータ鎖、CFAH_HUMAN補体因子H、HEP2_HUMANヘパリンコファクター2、およびE9PBC5_HUMAN血漿カリクレイン重鎖またはそれらの天然の誘導体もしくはそのアイソフォームを含む群から選択することができる。好ましくは、ADについて、バイオマーカーは、抗トロンピンII I、血清アミロイドP、およびapo J（クラステリン）またはその天然の誘導体もしくはそのアイソフォームを含む群から選択される。PDについては、バイオマーカーは、アルファ-1-ミクログロブリンまたはその天然の誘導体もしくはそのアイソフォームであってもよい。好ましくは、アイソフォームまたはその天然の誘導体は、抗トロンピンII IのアイソフォームA、B、CもしくはJ、血清アミロイドP（SAP）のアイソフォームB、C、D、F、G、HもしくはJ、apo JのアイソフォームA、B、C、D、E、FもしくはGまたはアルファ-1-ミクログロブリンのアイソフォームA、B、C、D、E、F、G、HもしくはIを含む群から選択される。より好ましくは、アイソフォームは、ATIIIのアイソフォームA、BもしくはJ、SAPのアイソフォームF、BもしくはJまたはapo JのアイソフォームA、C、D、E、FもしくはG、アルファ-1-ミクログロブリンのアイソフォームEもしくはGを含む群から選択される。

【0177】

好ましくは、分子がATIIIである場合、比は、限定されるものではないが、A/J、B/JまたはC/Jなどの少なくともアイソフォームA、B、CおよびJの間で作成される。

【0178】

好ましくは、分子がSAPである場合、比は、好ましくはアイソフォームFとJの間で作成される。

【0179】

10

20

30

40

50

好ましくは、分子が A p o J である場合、比は、好ましくはアイソフォーム A、B および D の間で作成される。

【0180】

好ましくは、第1の分子がアルファ-1-ミクログロブリンである場合、比は、好ましくはアルファ-1-ミクログロブリンのアイソフォーム E または G の間で作成される。

【0181】

本発明において考慮されるように、比の作成は、少なくとも1つのバイオマーカーのレベルを測定すること、そのレベルと、少なくとも1つの他の関連するバイオマーカーのレベルとを比較すること、および次の数的関係を決定することを含む。かくして、バイオマーカー比は、例えば、さらなる検査を実施することができる出発点または同等の所定の比との相互参照を行うことができる点を提供することができるため、バイオマーカー比は本発明において考慮される様々な使用において広く適用可能である。測定されるバイオマーカーが同じ試料に由来するものである場合に正常化効果を提供する固有の能力のため、バイオマーカー比は、そのバイオマーカー比が個体間に存在し得る食い違いに対して脆弱ではないことを意味する。

【0182】

哺乳動物の神経疾患状態を示すと特徴付けられる参照比を、未知の神経疾患状態を有する哺乳動物における神経疾患の診断または予後診断において用いることができる。試料が未知の神経疾患状態を有する哺乳動物から採取され、特定の神経疾患または疾患状態に特徴的な比が作成される（作成比）場合、これは可能である。従って、哺乳動物に由来するこの作成比を、以前に定義された比（参照比）と比較して、未知の疾患状態の哺乳動物が疾患を有するかどうかの指示を提供することができる。かくして、前記哺乳動物に由来する作成比と、対照哺乳動物に由来する以前に定義された比（参照比）であるものとの相関は、疾患状態の可能性を示す。

【0183】

次いで、調査される哺乳動物から得られるバイオマーカーレベルの比を、調査される哺乳動物の疾患状態の診断的または予後診断的評価に達する対照に基づいて、以前に決定された参照比の範囲と比較することができる。次いで、予後診断または診断の下にある哺乳動物について得られる比を、この比の参照範囲と比較することもでき、この比較に基づいて、哺乳動物が罹患している神経疾患に関して結論を引き出すことができる。

【0184】

神経疾患状態を有する対照哺乳動物に由来するバイオマーカーの以前に決定された比（参照比）に基づいて、バイオマーカー間の比を用いて、哺乳動物に存在する新皮質アミロイドの量を予測するのを補助することもできる。従って、哺乳動物に由来する試料中のバイオマーカー比を、一定範囲の以前に決定された比と比較して、対象の哺乳動物における新皮質アミロイド量の予想されるレベルを外挿することもできる。哺乳動物に由来する試料中に存在するバイオマーカーの比に基づく新皮質アミロイド量の外挿されたレベルは、従って、診断された対照哺乳動物について得られた比と比較して哺乳動物の神経疾患状態を分類することができる。

【0185】

好ましくは、哺乳動物における神経疾患の存在または非存在の評価のための比の作成は、哺乳動物から得られた試料における、単独で、または組み合わせた、抗トロンピン I I I、血清アミロイド P、a p o J（クラスτεリン）、アルファ-1-ミクログロブリン、A N T 3 _ _ H U M A N 抗トロンピン I I I、A P O H _ _ H U M A N ベータ2糖タンパク質、F I B B _ _ H U M A N フィブリノゲンベータ鎖、F I B A _ _ H U M A N フィブリノゲンアルファ鎖、C 9 J C 8 4 _ _ H U M A N フィブリノゲンガンマ鎖、I T I H 2 _ _ H U M A N インターアルファトリプシン阻害因子重鎖 H 2、H R G _ _ H U M A N ヒスチジンリッチ糖タンパク質、B 0 U Z 8 3 _ _ H U M A N 補体 C 4 ベータ鎖、C F A H _ _ H U M A N 補体因子 H、H E P 2 _ _ H U M A N ヘパリンコファクター2、および E 9 P B C 5 _ _ H U M A N 血漿カリクレイン重鎖ならびにそれらの天然の誘導体もしくはそのアイソフォームを含

10

20

30

40

50

む群から選択されるタンパク質から誘導されるタンパク質およびアイソフォームのレベルの定量化により行う。特定の好ましい実施形態においては、抗トロンピン I I I、血清アミロイド P、a p o J（クラステリン）、アルファ - 1 - ミクログロブリンのタンパク質およびアイソフォームまたはそれらの天然の誘導体もしくはそのアイソフォームのレベルに基づく比の作成を用いて、哺乳動物が神経疾患を有するかどうかを診断および / または予後診断することができる。好ましくは、アイソフォームまたはその天然の誘導体は、抗トロンピン I I I のアイソフォーム A、B、C もしくは J、血清アミロイド P（S A P）のアイソフォーム B、C、D、F、G、H もしくは J、a p o J のアイソフォーム A、B、C、D、E、F もしくは G またはアルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム A、B、C、D、E、F、G、H もしくは I を含む群から選択される。より好ましくは、アイソフォームは、A T I I I のアイソフォーム A、B もしくは J、S A P のアイソフォーム F、B もしくは J または a p o J のアイソフォーム A、C、D、E、F もしくは G、アルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム E もしくは G を含む群から選択される。

10

【0186】

好ましくは、分子が A T I I I である場合、比は、限定されるものではないが、A / J、B / J または C / J などの少なくともアイソフォーム A、B、C および J の間で作成される。

【0187】

好ましくは、分子が S A P である場合、比は、好ましくはアイソフォーム F と J の間で作成される。

20

【0188】

好ましくは、分子が A p o J である場合、比は、好ましくはアイソフォーム A、B および D の間で作成される。

【0189】

好ましくは、第 1 の分子がアルファ - 1 - ミクログロブリンである場合、比は、好ましくはアルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム E または G の間で作成される。

【0190】

本発明の方法においては、抗トロンピン I I I、血清アミロイド P、a p o J（クラステリン）、アルファ - 1 - ミクログロブリン、A N T 3 __ H U M A N 抗トロンピン I I I、A P O H __ H U M A N ベータ 2 糖タンパク質、F I B B __ H U M A N フィブリノゲンベータ鎖、F I B A __ H U M A N フィブリノゲンアルファ鎖、C 9 J C 8 4 __ H U M A N フィブリノゲンガンマ鎖、I T I H 2 __ H U M A N インターアルファトリプシン阻害因子重鎖 H 2、H R G __ H U M A N ヒスチジンリッチ糖タンパク質、B 0 U Z 8 3 __ H U M A N 補体 C 4 ベータ鎖、C F A H __ H U M A N 補体因子 H、H E P 2 __ H U M A N ヘパリンコファクター 2、および E 9 P B C 5 __ H U M A N 血漿カリクレイン重鎖またはそれらの天然の誘導体もしくはそのアイソフォームを含む、1 つまたは複数の神経疾患と関連する少なくとも 2 つのバイオマーカーを、哺乳動物の神経疾患状態を示すための比の作成において定量化する。2 つのバイオマーカーの同時的評価による予測力を、少なくとも 1 つ（a d d l e a s t o n e）のさらなるバイオマーカーを追加することによって改善することができると考えられる。2 つを超えるバイオマーカーの適切な組合せの検出は、方法の特異度および感度を増大させることが多い。従って、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、または少なくとも 10 のバイオマーカーの組合せを、本発明の方法において検出することができる。

30

40

【0191】

従って、上記方法のいずれかにおいて、少なくとも 2 つのバイオマーカーの検出を、限定されるものではないが、アミロイド ペプチド、タウ、ホスホ - タウ、シヌクレイン、R a b 3 a、および神経系タンパク質などの、神経疾患のための 1 つまたは複数のさらなる公知のバイオマーカーの検出と適宜組み合わせ、哺乳動物が神経疾患を有するかどうかの予測評価を改善することができる。

50

【 0 1 9 2 】

本発明の方法の実施において理解されるように、神経疾患の予後の評価は変化することがあり、感度を増大させることができる場合には改善し得る。神経疾患の従来は、医療専門家には公知であり、認識され、使用される臨床神経心理学または行動評価などの任意の1つまたは複数の公知の臨床基準に従って決定または確認できる。

【 0 1 9 3 】

従って、少なくとも2つの関連する形態のバイオマーカーのレベルの定量化の後、哺乳動物における神経疾患を決定する特異度を潜在的に改善し得るさらなるバイオマーカーを追加することができることが企図される。例えば、本発明の予測能力または診断能力を、CDR（臨床認知症評価）または体格指数などの哺乳動物のさらなる臨床マーカー値から得られた追加データを含むことにより改善することができる。

10

【 0 1 9 4 】

従って、本発明の方法は、少なくとも2つの関連する形態の本明細書に記載のバイオマーカーの比を比較することをさらに考慮し、生物試料のセットが得られた個体のCDRまたは体格指数などの臨床マーカー値をさらに含んでもよい。

【 0 1 9 5 】

様々な実施形態においては、神経疾患の予後診断または診断補助のための方法におけるバイオマーカーおよび/または臨床マーカーのセットの使用により達成される感度は、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%である。様々な実施形態においては、神経疾患の予後診断または診断補助のための方法におけるバイオマーカーのセットの使用により達成される特異度は、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%である。様々な実施形態においては、神経疾患の予後診断または診断補助のための方法におけるバイオマーカーのセットの使用により達成される全体の精度は、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、少なくとも約73%、少なくとも約74%、少なくとも約75%、少なくとも約76%、少なくとも約77%、少なくとも約78%、少なくとも約79%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%である。いくつかの実施形態においては、感度および/または特異度は、神経疾患の臨床診断に対して測定される。

20

30

40

【 0 1 9 6 】

本発明のさらなる態様において、哺乳動物における神経疾患の進行をモニタリングするための方法であって、

(a) 神経疾患について以前に評価された哺乳動物から得られたさらなる試料において、哺乳動物において以前に評価されたヘパリン結合親和性を有する少なくとも2つの関連する形態のバイオマーカーのレベルを定量化する工程；

50

(b) 工程 (a) における少なくとも 2 つの形態の関連するバイオマーカーのレベル間の比を作成して、作成比を提供する工程；

(c) 工程 (b) の作成比と、神経疾患と診断された哺乳動物に特徴的であると以前に定義された参照比とを比較する工程であり、参照比は、少なくとも 1 つの対照哺乳動物から得られた試料において工程 (a) の同じ関連するバイオマーカーのレベルを定量化した後に作成され、少なくとも 1 つの対照哺乳動物は、神経疾患について陽性または陰性であってもよい、工程；および

(d) 工程 (b) の作成比を、少なくとも 1 つの対照哺乳動物について神経疾患に特徴的であると以前に定義された範囲の参照比と関連させることによって、神経疾患について以前に評価された哺乳動物の神経疾患状態が変化したかどうかを、工程 (c) における比較から結論付ける工程

を含む、前記方法が提供される。

【0197】

任意の 1 つまたは複数のバイオマーカーのレベルの変化を、哺乳動物の新皮質アミロイド量の任意の変化について評価するのに有用であり得る比を決定する際にさらに用いることができる。従って、哺乳動物に由来する試料中のバイオマーカーのレベルのモニタリングにおいて、長期間にわたって哺乳動物における神経疾患の存在についてモニタリングするか、または哺乳動物における疾患進行を追跡することが可能である。

【0198】

従って、哺乳動物に由来する生物試料に由来する任意の 1 つまたは複数のこれらのバイオマーカーのレベルの変化を用いて、認知機能を評価する、神経疾患を診断するか、またはその予後診断もしくは診断を補助する、および/あるいは患者における神経疾患をモニタリングする（例えば、哺乳動物における疾患進行を追跡する、および/または哺乳動物における医学的もしくは外科的療法の効果を追跡する）ことができる。

【0199】

バイオマーカーのレベルの変化は、対照哺乳動物と比較した、ある特定の神経疾患を有する哺乳動物における検査下でのバイオマーカーの出現もしくは消失または検査下でのバイオマーカーの増加もしくは減少と関連することが企図される。さらに、それは同じ哺乳動物について以前に採取された試料と比較したレベルの変化とも関連すると企図され得る。

【0200】

バイオマーカーのレベルを、1 つより多い時点で哺乳動物から取得することもできることが企図される。そのような連続的サンプリングは、哺乳動物における神経疾患の進行のモニタリングと関連する本発明の方法により実現可能であると考えられる。連続的サンプリングを、毎月、年 4 回（すなわち、3 カ月毎）、半年毎、1 年毎、2 年毎、またはそれ以下の頻度などの任意の所望の予定表上で実施することができる。測定されたレベルと所定の比との比較を、新しい試料が測定される各時点で実行するか、またはレベルに関するデータをより低い頻度の分析のために保持することができる。

【0201】

本発明のさらなる態様において、神経疾患を発症するリスクがある哺乳動物を階層化または同定するための方法であって、

(a) 哺乳動物から得られた試料において、本明細書に記載のヘパリン結合親和性を有する少なくとも 2 つの関連する形態のバイオマーカーのレベルを定量化する工程；

(b) 工程 (a) における少なくとも 2 つの関連する形態のバイオマーカーのレベルの間の比を作成して、作成比を提供する工程；

(c) 工程 (b) の比と、神経疾患と診断された哺乳動物に特徴的であると以前に定義された参照比とを比較する工程であり、参照比は、少なくとも 1 つの対照哺乳動物から得られた試料において工程 (a) の同じ関連するバイオマーカーのレベルを定量化した後に作成される、工程；

(d) 工程 (b) の作成比を、少なくとも 1 つの対照哺乳動物について神経疾患に特徴的で

10

20

30

40

50

あると以前に定義された範囲の参照比と相関させることによって、哺乳動物が神経疾患と診断される、示差的に診断される、および/または予後診断されるかどうかを、工程 c) における比較から結論付ける工程 ; ならびに

(e) 工程 d) の結論に基づいて、哺乳動物において示差的に診断された、および/または予後診断された神経疾患の重症度に基づいて異なるクラスの神経疾患に哺乳動物を選別する工程

を含む、前記方法が提供される。

【 0 2 0 2 】

従って、任意の 1 つまたは複数の形態の関連するバイオマーカーのレベルの変化を用いて、哺乳動物を階層化する (すなわち、神経疾患の推定診断を有するか、または神経疾患と診断された哺乳動物を、異なるクラスの疾患に選別する) ことができる。哺乳動物の階層化は、典型的には、神経疾患に特徴的な特性に基づく哺乳動物の異なるクラスまたは階層への選別を指すと考えられる。例えば、神経疾患を有する哺乳動物の集団の階層化は、疾患の重症度に基づいて哺乳動物を割り当てることを含む。

10

【 0 2 0 3 】

さらに、任意の 1 つまたは複数の関連するバイオマーカーのレベルの変化における評価を、神経疾患を発症するリスクがあり得る哺乳動物を同定する様式として用いることができる。哺乳動物が神経疾患を発症する可能性があると同定されたら、神経疾患を発症する素因を停止させるか、または減弱させることができる場合、それらを評価すべき潜在的な治療的介入としてさらに考慮することができると考えられる。神経疾患の進行または発症における介入の有効性を、神経疾患状態を示す比を作成するために用いられる関連するバイオマーカーの間の比の変化についてモニタリングすることにより可能とすることができる。

20

【 0 2 0 4 】

本発明の方法を、治療モニタリングとも呼ばれる、哺乳動物に投与された療法の効果のモニタリング、および患者管理のためにさらに用いることができる。上記のように同定され、1 つまたは複数の神経疾患と関連するバイオマーカーのレベルの変化を用いて、薬物処置に対する哺乳動物の応答を評価することもできる。このように、処置の開始後に哺乳動物におけるバイオマーカーのレベルおよび比を検査することにより、新しい処置レジメンを開発することもできる。

30

【 0 2 0 5 】

さらなる態様において、本発明は、神経疾患と関連するバイオマーカーと相互作用する、および/またはその発現もしくは活性をモジュレートする薬剤をスクリーニングするための方法であって、

(a) 本明細書に記載のヘパリン結合親和性を有するバイオマーカーまたはバイオマーカーの一部を、薬剤と接触させる工程 ;

(b) 少なくとも 2 つの関連する形態のバイオマーカーのレベルを定量化する工程 ;

(c) 工程 (b) における少なくとも 2 つの関連する形態のバイオマーカーのレベルの間の比を作成して、作成比を提供する工程 ;

(d) 工程 c) の比と、薬剤の非存在下でバイオマーカーに特徴的であると以前に定義された参照比とを比較する工程であり、参照比は、薬剤の非存在下で工程 (b) の同じ関連するバイオマーカーのレベルを定量化した後に作成される、工程 ;

40

(e) 工程 c) の作成比を、バイオマーカーに特徴的であると以前に定義された範囲の参照比と相関させることにより、薬剤が神経疾患と関連するバイオマーカーと相互作用する、および/またはその発現もしくは活性をモジュレートするかどうかを、工程 d) における比較から結論付ける工程

を含む、前記方法が提供される。

【 0 2 0 6 】

潜在的な治療分子と見られる薬剤は、必ずしも限定されるものではないが、核酸 (D N A または R N A)、炭水化物、脂質、タンパク質、ペプチド、低分子および他の薬物を含

50

んでもよいことが企図される。また、薬剤を、生物ライブラリー、空間的にアドレス可能な平行固相もしくは液相ライブラリー、または合成ライブラリー法などの、当業界で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数の好適な手法のいずれかを用いて取得することもできる。例えば、ライブラリー化合物を、溶液中で、ビーズ、チップ、細菌、胞子、プラスミド、またはファージ上で提供することができる。

【0207】

作成比に影響する任意の1つまたは複数のバイオマーカーのレベルの変化を、医学的もしくは外科的療法の効果または神経疾患を処置することを求める際の治療薬介入の有効性を追跡する様式として評価することもできる。

【0208】

かくして、本発明の方法は、例えば、神経疾患のためのある特定の療法の評価のために臨床試験をモニタリングするのを補助することができる。例えば、化合物を、神経疾患を有する哺乳動物におけるバイオマーカーのレベルを、対照哺乳動物において見出されるレベルにまで正常化するその能力について試験することができる。処置される哺乳動物において、化合物を、対照哺乳動物に見られるレベルまたはそれに近いレベルにバイオマーカーのレベルを維持するその能力について試験することができる。

【0209】

本発明のさらなる態様において、例えば、医師および研究者が、哺乳動物において神経疾患を特性評価および/または定量化するために用いることができるコンピュータソフトウェアプログラムなどの、システムの形態での本明細書に記載の方法の実施が提供される。

【0210】

従って、例えば、医師および研究者が、対象または対象群について神経疾患を特性評価および/または定量化するために用いることができるコンピュータソフトウェアプログラムなどの、システムの形態での本明細書に記載の方法の実施が提供される。

【0211】

哺乳動物が神経疾患を発症するかどうかを評価するための本発明の方法は、上記の方法を実施することができる任意のデバイスを用いて実施できると考えられる。用いることができるデバイスの例としては、必ずしも限定されるものではないが、あらゆる型のコンピュータなどの電子計算デバイスが挙げられる。本出願に記載される方法がコンピュータ中で実施される場合、本方法の工程を実行するためのコンピュータを構成するのに用いることができるコンピュータプログラムを、そのコンピュータプログラムを含有することができる任意のコンピュータで読取り可能な媒体中に含有させることができる。用いることができるコンピュータで読取り可能な媒体の例としては、限定されるものではないが、ディスク、CD-ROM、DVD、ROM、RAM、ならびにその他のメモリおよびコンピュータ記憶デバイスが挙げられる。本方法の工程を実行するためのコンピュータを構成するのに用いることができるコンピュータプログラムを、電子ネットワーク、例えば、インターネット、ワールドワイドウェブ、イントラネット、または他のネットワーク上に提供することもできる。

【0212】

一例においては、本明細書に記載の方法を、プロセッサと、本出願に記載の方法の工程をシステムに実行させるためのプログラムコード手段を含むコンピュータで読取り可能な媒体とを含むシステム中で実施することができる。プロセッサは、本方法の実施にとって必要とされる操作を実行することができる任意のプロセッサであってもよい。プログラムコード手段は、システム中で実施した場合、システムに本出願に記載の方法の工程を実行させることができる任意のコードであってもよい。プログラムコード手段の例としては、限定されるものではないが、C++、Java、もしくはFortranなどの高レベルコンピュータ言語で書かれた本出願に記載の方法を実行するための命令；アセンブリ言語などの低レベルコンピュータ言語で書かれた本出願に記載の方法を実行するための命令；またはコンパイルおよびリンクされた機械語などのコンピュータで実行可能な形態の本

10

20

30

40

50

出願に記載の方法を実行するための命令が挙げられる。

【0213】

関連バイオマーカーの検出により作成されるデータを、プログラム可能なデジタルコンピュータを使用して分析することができる。コンピュータプログラムは、検出されるバイオマーカーの数、および適宜、シグナルの強度またはレベルおよび検出されるそれぞれのバイオマーカーの決定される分子量を示すデータを分析する。データ分析は、バイオマーカーのシグナル強度またはレベルを決定する工程、および所定の統計分布から逸脱するデータを除去する工程を含んでもよい。例えば、いくつかの参照に対してそれぞれのピークの高さを算出することにより、観察されるピークを正規化することができる。参照は、スケールを0に設定したエネルギー吸収分子などの、装置および化学物質により生成されたバックグラウンドノイズであってもよい。

10

【0214】

バイオマーカーレベルの分析は、少なくとも2つのバイオマーカーのレベルと、所定の予測比または関連する値もしくは比のセットのものとを比較することをさらに含んでもよい。一実施形態においては、関連する比のセットは、本明細書に記載の方法に従って得られる。コンピュータ処理を用いて、バイオマーカーレベルの分析に分類分析またはアルゴリズムを容易に適用することができる。例えば、神経疾患の疾患分類と相関する本明細書に記載のバイオマーカーレベルを反映する参照3D等高線プロットを作成することができる。任意の所与の哺乳動物について、比較可能な3Dプロットを作成し、そのプロットを参照3Dプロットと比較して、対象が神経疾患を示すバイオマーカー比を有するかどうかを決定することができる。分類ツリー分析などの分類分析は、グラフ表示に特に適しており、解釈が容易であるため、バイオマーカーレベルを分析するのに適している。しかしながら、異なる哺乳動物から、または参照試料および哺乳動物からの複数のバイオマーカーレベルを比較し、本明細書に記載のような哺乳動物の疾患分類を示す出力を提供する任意のコンピュータに基づくアプリケーションを用いることができることが理解される。コンピュータは、得られるデータを、表示のための様々な形式に変換することができる。

20

【0215】

また、哺乳動物における神経疾患状態を示し、対照哺乳動物から誘導されるバイオマーカーの比をシステムに入力して、哺乳動物における新皮質アミロイド量のレベルを予測するためのモデルを作成することもできると考えられる。従って、哺乳動物における新皮質アミロイド量に関する理論値を決定して、前記哺乳動物における神経疾患の状態または可能性のある状態を予測するのを補助することができる。

30

【0216】

状態を正確に予測する診断または予後診断モデルまたは試験の力は、一般に、アッセイの感度、アッセイの特異度またはROC（受信者操作特性）曲線下の面積として測定される。感度は、陽性であると試験により予測される真陽性のパーセンテージであるが、特異度は陰性であると試験により予測される真陰性のパーセンテージである。ROC曲線は、特異度の関数としての試験の感度を提供する。ROC曲線下面積が大きいほど、試験の予測値はより強力になる。試験の有用性の他の有用な尺度は、陽性予測値および陰性予測値である。陽性予測値は、陽性として試験される実際の陽性のパーセンテージである。陰性予測値は、陰性として試験される実際の陰性のパーセンテージである。

40

【0217】

ROC法は、ある特定のマーカーがある人を割り当てられたクラスに正確に分類することができる基準を定義するための精度の測定のための手段として主に用いられてきた。ROC分析は複数の転帰を提供し、その1つは、モデル性能を評価するための有用な尺度である曲線下面積（AUC）である。

【0218】

神経疾患の存在または非存在は、従って、試料中の少なくとも2つの形態の関連するバイオマーカーのレベルを取得すること、次いで、その値を作成されたモデルに入力することによってその値を統計分析にかけること、および予測新皮質アミロイド量を取得するこ

50

とによって決定することもできる。次いで、予測新皮質アミロイド量は、予測新皮質アミロイド量が、例えば、高いか、または低いかどうかに基づいて、対象を、神経疾患の特定のリスクレベルと関連付けることができる。

【0219】

本発明の方法を用いるシステムの適用の例において、それぞれの対象について、哺乳動物に関する情報（例えば、年齢、性別）を、少なくとも2つの関連する形態のバイオマーカーの定量されたレベルと共に入力する。あるいは、アッセイされる哺乳動物に由来する試料を、個体に由来する2つの関連する形態のバイオマーカーのレベルの測定および定量化を行うことができるシステムに提供する。次いで、ソフトウェアは、神経疾患と診断された哺乳動物に特徴的であると定義される予測比と比較した、哺乳動物に由来する2つの関連するバイオマーカーの定量されたレベルに基づくスコアを算出することができる。

10

【0220】

このシステムのさらなる例においては、システムはアッセイされる哺乳動物に関する理論的アミロイド量を戻すことができ、それはまた、アッセイされる哺乳動物の理論的アミロイド量と、P i B 状態が以前に実施された対照哺乳動物に由来する参照レベルとを比較することにより、哺乳動物がP i B 陽性またはP i B 陰性であるとの指示を戻すこともできる。

【0221】

次いで、スコアリングまたはP i B 陽性もしくはP i B 陰性状態を用いて、哺乳動物の疾患状態のさらなる診断を助ける、処置の有効性を評価する（処置が有効である場合、スコアは下がるべきである）、または哺乳動物群の平均スコアを算出して、新しい療法または群の特異的な特徴（例えば、遺伝子突然変異）を試験することができる。

20

【0222】

さらなる例においては、処置の有効性を、特定の対象上で測定されたS U V Rスコアの低下によって評価することができる。当業者であれば、S U V Rスコアのこの低下は、神経疾患に向かう哺乳動物の進行を反映することを理解できる。それは、単一の時点での哺乳動物の定量的な、またはほぼ定量的な評価を提供し、所与の対象、または集団上での疾患進行のモニタリングを可能とする。

【0223】

哺乳動物におけるアミロイド量を、参照比と比較した場合に前記哺乳動物に由来する2つの関連する形態のバイオマーカーから作成された比の比較により得られるP i Bスコアと関連させることもできる。当業者であれば、アミロイド量がS U V Rスコアに対して正規化されることを理解できる。さらなる例において、S U V Rスコアは、所定の値よりも大きいか、または小さくてもよく、算出された新皮質アミロイド量に基づいてアッセイされた哺乳動物における神経疾患の可能性のある状態を示してもよく、対照哺乳動物に由来する生物試料に由来するバイオマーカーの比較により得られる対照哺乳動物に由来する測定された参照比に基づくものである。

30

【0224】

そのような例においては、所定の値より小さいS U V Rスコアは健康な人に対応し、所定の値か、またはそれより高いS U V Rスコアは神経疾患を有する可能性があるか、または発症する可能性があると考えられる人に対応してもよい。このさらなる例においては、S U V Rスコアはまた、年齢、性別などの対象の人口統計を考慮に入れてもよい。さらなる例においては、S U V R閾値は、データの測定または変換のための適切な環境に応じて、より小さいものであってもよいことが想定され得る。

40

【0225】

従って、本発明の方法を、哺乳動物に由来する試料に由来する少なくとも2つの関連する形態のバイオマーカーのレベルを定量化すること、2つの関連する形態のバイオマーカー間の比を得ること、およびシステムにおけるこれらのものを、対照哺乳動物に由来する規定の比または既知の神経状態を示す試料から作成された参照比と比較することにより、哺乳動物における神経疾患の進行をモニタリングするためのシステムにおいて適用するこ

50

とができる。例えば、その哺乳動物に由来する比の減少または増加は、哺乳動物における神経疾患の進行（例えば、重症度の増大）を示すか、または示唆する。一例においては、哺乳動物の神経疾患状態のモニタリングを、2つの関連する形態のバイオマーカの値の測定によってモニタリングして、神経疾患状態が、S U V Rより大きいもの（陽性の神経疾患状態の可能性を示す）からS U V Rより小さいもの（正常または陰性の神経疾患状態ではない可能性を示す）への変化などの、実際の、予測された、または理論的なS U V Rスコアにより確認される（*as ascertained*）かどうかを決定することができる。さらなる例においては、哺乳動物における神経疾患の状態をモニタリングして、神経疾患状態が、S U V Rより小さいもの（正常または陰性の神経疾患状態ではない可能性を示す）から、S U V Rより大きいもの（陽性の神経疾患状態の可能性を示す）に変化するよう

10

【0226】

さらなる態様においては、本発明は、1つもしくは複数の神経疾患の哺乳動物における診断および/もしくは予後診断のため、または1つもしくは複数の神経疾患を発症するリスクがある哺乳動物を同定するために用いることができるキットを提供する。

【0227】

従って、本発明は、哺乳動物における神経疾患の診断もしくは予後診断のために、神経疾患を発症するリスクがある哺乳動物を同定するために、または神経疾患を有する哺乳動物に投与される療法の効果をモニタリングするために、本発明の方法に従って用いることができるキットを提供する。

20

【0228】

考えられるキットは、必ずしも限定されるものではないが、本発明のバイオマーカに特異的であるポリペプチド、タンパク質、および/またはオリゴヌクレオチドを含んでもよい試薬のパネルを含んでもよい。従って、キットの試薬を用いて、対象が高いアミロイド量と関連する神経疾患を有することを示す可能性があるバイオマーカのレベルを決定することができる。例えば、検査下で本明細書に記載の方法により同定されるタンパク質またはタンパク質アイソフォームバイオマーカを認識する任意の抗体を用いることができることが想定される。

【0229】

好ましくは、本発明の方法を実行するためのキットは、個体における新皮質アミロイドベータ量の存在を検出またはモニタリングするための試薬のパネルを含み、用いられる試薬は、本発明の方法に従って比を得るために少なくとも2つの形態の関連するバイオマーカのレベルを決定することができる。そのような診断キットは、神経疾患を有する哺乳動物に投与される療法の効果のモニタリングのためにさらに用いることができる。

30

【0230】

好ましい実施形態においては、本発明は、神経疾患の哺乳動物におけるスクリーニング、診断または予後診断のための方法における使用のための試薬のキットであって、キットが哺乳動物に由来する試料中での少なくとも1つのバイオマーカのレベルを定量化するための試薬のパネルを提供し、バイオマーカが抗トロンピンII I、血清アミロイドP、*apoJ*（クラスτεリン）、アルファ-1-ミクログロブリン、*ANT3_HUMAN* 抗トロンピンII I、*APOH_HUMAN* ベータ2糖タンパク質、*FIBB_HUMAN* フィブリノゲンベータ鎖、*FIBA_HUMAN* フィブリノゲンアルファ鎖、*C9JC84_HUMAN* フィブリノゲンガンマ鎖、*ITH2_HUMAN* インターアルファトリプシン阻害因子重鎖H2、*HRG_HUMAN* ヒスチジンリッチ糖タンパク質、*BOUZ83_HUMAN* 補体C4ベータ鎖、*CFAH_HUMAN* 補体因子H、*HEP2_HUMAN* ヘパリンコファクター2、および*E9PBC5_HUMAN* 血漿カリクレイン重鎖またはその天然の誘導体もしくはそのアイソフォームを含む群から選択される、前記キットを提供する。好ましくは、アイソフォームまたはその天然の誘導体は、抗トロンピンII IのアイソフォームA、B、CもしくはJ、血清アミロイドP（*SAP*）のアイソフォームB、C、D、F、G、HもしくはJ、*apoJ*のアイソフォームA、B、C、D、

40

50

E、FもしくはGまたはアルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム A、B、C、D、E、F、G、HもしくはIを含む群から選択される。より好ましくは、アイソフォームは、A T I I Iのアイソフォーム A、BもしくはJ、S A Pのアイソフォーム F、BもしくはJまたは a p o Jのアイソフォーム A、C、D、E、FもしくはG、アルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム EもしくはGを含む群から選択される。

【0231】

患者は分析のための試料を提供することが想定される。試料を、本発明に従って加工し、ヘパリン結合親和性を有する分子を試料中で単離および同定することができる。好ましくは、抗トロンピン I I I、血清アミロイド P、a p o J (クラスτεリン)、アルファ - 1 - ミクログロブリン、A N T 3 __ H U M A N抗トロンピン I I I、A P O H __ H U M A Nベータ2糖タンパク質、F I B B __ H U M A Nフィブリノゲンベータ鎖、F I B A __ H U M A Nフィブリノゲンアルファ鎖、C 9 J C 8 4 __ H U M A Nフィブリノゲンガンマ鎖、I T I H 2 __ H U M A Nインターアルファトリプシン阻害因子重鎖 H 2、H R G __ H U M A Nヒスチジンリッチ糖タンパク質、B 0 U Z 8 3 __ H U M A N補体 C 4 ベータ鎖、C F A H __ H U M A N補体因子 H、H E P 2 __ H U M A Nヘパリンコファクター2、および E 9 P B C 5 __ H U M A N血漿カリクレイン重鎖、またはその天然の誘導体もしくはそのアイソフォームを含む群から選択されるバイオマーカーを分析することができる。対照試料を、同じ方法を用いて患者試料と同時に加工することができる。バイオマーカーのレベルを、本発明に従って決定および分析することができる。特に、バイオマーカーのアイソフォーム間の比を決定することができる。好ましくは、この比を、抗トロンピン I I I、血清アミロイド P、a p o J (クラスτεリン)、アルファ - 1 - ミクログロブリン、A N T 3 __ H U M A N抗トロンピン I I I、A P O H __ H U M A Nベータ2糖タンパク質、F I B B __ H U M A Nフィブリノゲンベータ鎖、F I B A __ H U M A Nフィブリノゲンアルファ鎖、C 9 J C 8 4 __ H U M A Nフィブリノゲンガンマ鎖、I T I H 2 __ H U M A Nインターアルファトリプシン阻害因子重鎖 H 2、H R G __ H U M A Nヒスチジンリッチ糖タンパク質、B 0 U Z 8 3 __ H U M A N補体 C 4 ベータ鎖、C F A H __ H U M A N補体因子 H、H E P 2 __ H U M A Nヘパリンコファクター2、および E 9 P B C 5 __ H U M A N血漿カリクレイン重鎖、またはその天然の誘導体もしくはそのアイソフォームのアイソフォーム間で決定する。より好ましくは、この比を、抗トロンピン I I Iのアイソフォーム A、B、CもしくはJ、血清アミロイド P (S A P)のアイソフォーム B、C、D、F、G、HもしくはJ、a p o Jのアイソフォーム A、B、C、D、E、FもしくはGまたはアルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム A、B、C、D、E、F、G、HもしくはIを含む群から選択されるアイソフォームまたはその天然の誘導体の間で決定する。より好ましくは、アイソフォームは、A T I I Iのアイソフォーム A、BもしくはJ、S A Pのアイソフォーム F、BもしくはJまたは a p o Jのアイソフォーム A、C、D、E、FもしくはG、アルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム EもしくはGを含む群から選択される。

【0232】

好ましくは、分子が A T I I Iである場合、比は、限定されるものではないが、A / J、B / Jまたは C / Jなどの、少なくともアイソフォーム A、B、CとJの間で作成される。

【0233】

好ましくは、分子が S A Pである場合、比は、好ましくはアイソフォーム FとJの間で作成される。

【0234】

好ましくは、分子が a p o Jである場合、比は、好ましくはアイソフォーム A、BとDの間で作成される。

【0235】

好ましくは、第1の分子がアルファ - 1 - ミクログロブリンである場合、比は、好ましくはアルファ - 1 - ミクログロブリンのアイソフォーム EまたはGの間で作成される。

【0236】

参照試料と比較した患者試料の作成比値の比較により、1つまたは複数の神経疾患の哺乳動物における診断および/もしくは予後診断が可能となるか、または1つもしくは複数の神経疾患を発症するリスクがある哺乳動物を同定することが可能となる。

【実施例1】

【0237】

アルツハイマー病 (AD) のためのバイオマーカーの同定および検証

a) 富化

血漿は、入手可能な最も複雑なマトリックスの1つである。かくして、プロテオミクス分析を阻害する高存在量のタンパク質の影響を低減させる必要がある。ヘパリンセファロースカラムを用いる親和性精製を含むタンパク質富化の方法が開発された。タンパク質富化のこの技術は、アルブミン、ハプトグロビン IgG および補体 C3 などの高存在量タンパク質を除去するものである。富化プロセス全体で血漿中の総タンパク質の90%を超えるタンパク質を枯渇させる。このプロセスは再現性が高く (CV < 5%、データは示さない)、10 μL ほどの血漿でも行うことができる。

10

【0238】

b) 定量的2Dゲル電気泳動

本実施例は、血液中のタンパク質が脳の中で起こる病理学的変化を反映し得ることを示すものである。特に、本発明者らは、個体の血漿中のタンパク質が臨床症状の10~20年前に脳の中で起こるアミロイド蓄積を反映し得ることを示す。血漿からタンパク質を富化し、最近開発された Z dye (Professor Ed Dratz により提供される) を用いて2D示差的ゲル電気泳動を実施することにより、アミロイドの蓄積が示された。異なる等電点条件 (pH 3~11 & pH 4~7) を用いるいくつかの異なる分析を実施したところ、狭い pH 範囲 4.7~5.9 を用いた場合に診断マーカー; AT 患者における抗トロンピン III : A、apo J : A および血清アミロイド P (図1) ならびに PD 患者におけるアルファ-1-ミクログロブリン (図11) を測定するための最良の結果が得られることが示された。

20

【0239】

c) バイオマーカーは脳中のアミロイドと相関する

AIBL は、長期的に PiB - PET イメージングされた個体の最大のコホートの1つを有する。対応する PiB - PET スキャンと共に AIBL ベースラインコホートからの73の個体のプロテオームを分析した。プロテオミックデータを、標準摂取率比 (SUVR) と比較した。SUVR は、脳中の PiB の滞留を決定するために用いられる測定基準である。このデータベースにおいて、1.5 より大きい SUVR を示す個体は、高い脳アミロイドおよび AD の前駆症状を有すると考えられる。プロテオミック分析により、5% の偽発見率に関する補正後の ANOVA により 1.3 より大きい倍数変化および 0.05 未満の p 値を有する 30 を超える潜在的なバイオマーカーが得られた (原稿準備中)。タンパク質 apo J、抗トロンピン III および血清アミロイド P は、診断にとって最良の性能であり、全て、高アミロイド個体と低アミロイド個体との間で 1.3 ~ 2.3 の倍数変化 (p < 0.01) を示すいくつかのアイソフォームを有していた。このデータは、血漿バイオマーカーと PiB - PET SUVR との間の前例のない相関を示している (表1)。結果はまた、Apo J と A の純粋な血漿レベルとの相関も示す (図9)。

30

40

【0240】

d) 血漿タンパク質および潜在的なバイオマーカー

ヘパリンセファロース富化プロセス、感受性 Z dye (AIBL Dratz により提供される)、および AIBL からの試料の組合せは、抗トロンピン III、アポリポタンパク質 J (apo J)、および血清アミロイド P (表1) およびアルファ-1-ミクログロブリン (図10) を含む診断値を有するタンパク質の解明を可能にした。

【0241】

タンパク質を、質量分析 (LC - MS / MS、AB Sciex 5600 tripl

50

e TOFおよびマトリックス支援レーザー脱離飛行時間、MALDI-TOF、Bruker Ultraflex extreme I II)と組み合わせたインゲルトリプシン消化のための標準的なプロトコルを用いて同定した。2Dゲルからタンパク質を特性評価するプロセスの間に、ゲルソリン、アクチン、抗トロンピンI II、アルファ-1-ミクログロブリンおよびapoJ(クラスτεリンとしても知られる)がAと複合体化したアイソフォームを有することが発見された。Aを、質量分析、135~330の範囲のAに関するMasco tスコアを用いて直接的に配列決定した。40を超えるMasco tスコアは、陽性の同定を示す。Aとこれらのタンパク質との存在を、2つの独立した事例において検証した。重要なことに、診断マーカーであるapoJと抗トロンピンI IIは両方とも、Aと複合体化することがわかる。これは、これらのタンパク質がAのクリアランスに關与することと一致している。さらに、他のタンパク質と複合体化したAの存在は、ELISAなどの抗体に基づく技術による検出からAエピトープを塞ぐ。これは、血漿中のAを測定することにより見出される診断的有用性の欠如に寄与し得る。この分析方法は、A:バイオマーカー複合体を直接測定するものであり、エピトープ排除の問題を回避する。

10

20

30

40

50

【0242】

【表1】

表1:ROC分析の概要

診断マーカーの選択されたアイソフォーム	曲線下面積	感度%	特異度%	尤度比	診断カットオフ値 ±STDEV	倍数変化	Anovaのp値*	FIB-PETとの相関(r ²)	相関のp値
抗トロンピンI IIの比									
A/J	0.90	93	82	11.9	0.155 ± 0.14	2.6	<0.0001	0.45	<0.0001
B/J	0.90	86	90	8.35	0.4898 ± 0.31	2.9	<0.0001	0.44	<0.0001
C/J	0.89	84	79	4.1	0.938 ± 1.03	2.6	<0.0001	0.46	<0.0001
抗トロンピンI II I									
アイソフォームA	0.88	84	83	4.9	3825000 ± 1645000	1.7	6.00E-09	0.31	<0.0001
アイソフォームB	0.89	84	86	6.1	12830000 ± 5843000	1.7	6.00E-10	0.35	<0.0001
アイソフォームC	0.84	82	76	3.4	29210000 ± 11780000	1.5	2.00E-07	0.32	<0.0001
アイソフォームJ	0.84	77	83	4.5	23810000 ± 10310000	1.6	6.00E-09	0.33	<0.0001
ApoJ									
アイソフォームA	0.70	66	62	1.7	81018 ± 33833	1.3	0.008	0.04	0.11
アイソフォームB	0.63	63	69	2.1	105753 ± 37195	1.2	>0.05	0.02	0.2
アイソフォームC	0.82	74	83	4.3	238691 ± 116244	1.6	<0.0001	0.33	<0.0001
アイソフォームD	0.84	79	83	4.6	185909 ± 97834	1.8	<0.0001	0.45	<0.0001
アイソフォームE	0.86	79	83	4.6	173064 ± 87740	1.7	<0.0001	0.48	<0.0001
アイソフォームF	0.81	77	79	3.7	79396 ± 32621	1.5	>0.05	0.42	<0.0001
アイソフォームG	0.75	70	66	2.1	111869 ± 52827	1.4	0.0001	0.23	<0.0001
ApoJアイソフォームの比									
B/D	0.8	72	69	2.3	0.625 ± 0.2	-1.4	<0.001	0.32	<0.0001
A/D	0.79	81	76	3.4	0.488 ± 0.17	-1.3	<0.05	0.25	<0.0001
血清アミロイドP									
アイソフォームB	0.80	79	72	2.8	672213 ± 318585	-1.7	<0.001	0.23	<0.0001
アイソフォームF	0.75	81	65	2.2	513019 ± 230702	-1.5	<0.01	0.17	<0.001
平均アイソフォームFおよびアイソフォームB	0.74	75	68	2.4	518703				
ApoJ E/血清アミロイドP	0.82	77	82	4.3	0.36				

感度% = 脳アミロイドについて陽性の正確に同定された個体のパーセンテージ
 特異度% = 脳アミロイドについて陰性の正確に同定された個体のパーセンテージ
 尤度比は脳中にアミロイドを有する確率を示す
 *T u k e y のポスト検定に関するANOVA

【実施例2】

【0243】

脳における血漿バイオマーカー (apo J、抗トロンピンI II Iおよび血清アミロイドP) とアミロイド沈着との関係の決定ならびに潜在的なバイオマーカーの同定

血漿中のタンパク質は、脳中のアミロイド量を反映し、従って、脳アミロイドが蓄積するにつれて変化すると提唱されている。病的には、最終的にアルツハイマー病をもたらすプロセスは、臨床兆候が生じる約15年前に始まる。本発明者らは、脳中のアミロイドの存在を反映する、血漿中のタンパク質シグナチャーを発見した。さらに、これらのバイオマーカーは、高い脳アミロイドを有する個体を診断する能力を示す(表1)。

【0244】

A) 試料の採取および加工

i) 試料

試料を、神経疾患について陽性である参加者または対照から取得する。個体を、脳中のアミロイド量を反映するピッツバーグ化合物 B (PiB) ポジトロン放射断層撮影 (PET) 標準摂取率比 (SUV_R、高い > 1.5 < 低い) に基づいて分離する。

【0245】

全血を、静脈穿刺により一晩絶食した参加者から採取した。試料を数回反転させ、血漿調製の前に室温で約 15 分間、実験室オービタルシェーカー上でインキュベートした。全血を、プロスタグランジン E1 (PGE1) (Sapphire Biosciences、33.3 ng/mL) をチューブに予め添加した、2つの Sarstedt s-monovette、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) K3E (01.1605.008) 7.5 mL チューブ中に採取した (使用前に 4 で保存)。

10

【0246】

次いで、全血を 15 mL のポリプロピレンチューブ中に混合し、ブレーキを用いずに 200 x g、20 で 10 分間回転させた。上清 (血小板に富む血漿) を新鮮な 15 mL チューブに注意深く移し、境界面の 5 mm 周辺を除去して、赤血球ペレットが動揺しないことを確保した。次いで、血小板に富む血漿を、ブレーキを用いて 800 x g、20 で 15 分間回転させた。次いで、血小板枯渇した血漿を 1 mL の Nunc cryobank ポリプロピレンチューブ (Thermo Scientific) 中に、0.25 mL アリコートでアリコートし、すぐにドライアイス上のラックに移した後、アッセイに必要なまで液体窒素蒸気タンクに移した。

【0247】

20

i i) ヘパリン結合親和性を有する分子の単離

材料:

HiTrap Heparin HP 1 mL (GE Healthcare Life Sciences)

バッファー A: 50 mM TRIS pH 8.0、20 mM NaCl

バッファー B: 50 mM TRIS pH 8.0、1.5 M NaCl。

【0248】

45 μ L の EDTA 血漿を、180 μ L のバッファー A と混合した。200 μ L の混合物を、0.5 mL/min で HiTrap Heparin HP 1 mL カラム (ヘパリンセファロースカラム) 上にロードした。カラムを 5 倍カラム容量のバッファー A (0.5 mL/min) で洗浄した。タンパク質 (分析物) を、1 ステップ勾配を用いて 100% のバッファー B にカラムから溶出させた後、4 倍カラム容量のバッファー B (100% のバッファー B の最終洗浄に向かう各洗浄中の増大する勾配) で洗浄した (1 mL/min)。バッファー B を用いる各洗浄後のカラムから溶出した材料を、1つの 1.5 ~ 2 mL 画分中に収集した。タンパク質の溶出を、280 nm での吸光度を用いてモニタリングした。バッファー B でカラムを 4 回洗浄した後、カラムを 5 倍カラム容量のバッファー A で平衡化させた。平衡化後、次の 200 μ L の試料 (180 μ L のバッファー A と混合した 45 μ L の EDTA 血漿) をカラムに添加した。

30

【0249】

i i i) 溶出した材料の加工

40

(a) 還元、アルキル化および沈降

10 mM の TCEP [トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン、Pierce 結合破壊剤中性 pH 5.0 0.1 M] および 20 mM の 4-ビニルピリジン (Sigma) を、ヘパリンセファロースカラムから溶出したタンパク質画分に添加した。次いで、タンパク質画分を室温で 1 時間、揺らしながらインキュベートした。インキュベーション後、4 倍容量の冷アセトンを追加した [例えば、2 mL 画分 + 8 mL 冷アセトン (Sigma HPLC 等級)]。

【0250】

アセトンを含む画分を、反転により簡潔に混合した後、-20 で一晩 (16 ~ 20 時間) インキュベートした。一晩インキュベートした後、試料を 4 で 30 min、ス

50

ウィング型ローター中、4 で遠心分離した。次いで、アセトンをデカンテーションにより除去し、残存するタンパク質ペレットを0.5~1 mLのアセトンで洗浄した。次いで、アセトンをデカンテーションにより除去し、ペレットを室温で約15分間、層流フード中で空気乾燥した。

【0251】

次いで、25 μ Lの8 M尿素 (GE Healthcare)、4% CHAPS (3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸、Sigma) を、乾燥したタンパク質ペレットに添加し、ペレットが溶解するまで試料をボルテックスした。試料を、2000 x gで5~10秒間遠心分離した後、-20 で保存した。

【0252】

(b) 2Dゲル分析

再懸濁されたタンパク質ペレット試料を、氷上で約1時間解凍し、製造業者の説明書 (Sigma) に従ってBradfordアッセイを用いてタンパク質濃度を決定した。20~75 μ gのタンパク質を0.5 nモルのアミン反応性蛍光色素 (Z dyeまたはCy dye) を用いて室温で30分間標識した。50 mMリシンを添加し、室温で15分間インキュベートすることにより、反応をクエンチした。次いで、標識されたタンパク質を、0.5%両性電解質 (pH 4.7~5.9、BioRad) を含有する再水和バッファー (7 M尿素、2 Mチオウレア、2% CHAPS、微量のプロモフェノールブルー) 中に希釈した。

【0253】

希釈された試料を、室温で一晩の受動的再水和により、乾燥等電点ストリップ (24 cm ReadyStrip IPG、BioRad) 上にロードした。次いで、ストリップを合計90~110 kWhにわたって泳動した。泳動後、ストリップを-20 で保存した。次いで、凍結したストリップを室温に持って行き、6 M尿素、4%ドデシルセファロースナトリウム (SDS)、30%グリセロール、50 mM TRIS pH 8.8を用いて2回平衡化させた (各洗浄は室温で15分間のインキュベーションからなっていた)。次いで、ストリップを、色素の前部がゲルの底部になるまで、大規模フォーマット (24 cm) の11% SDS-ポリアクリルイミドゲル電気泳動を用いて第2のSDS次元において泳動した。

【0254】

(c) ゲルイメージング

ゲルを、Typhoon 9500 (GE Healthcare) を用いてイメージングした。ゲル画像を加工し、製造業者の説明書に従ってProgenesisプログラム (NonLinear dynamics、v4.5) を用いて、タンパク質スポットの存在量を比較した。Anova統計検定を用いて、タンパク質間に有意差があるかどうかを決定した。0.05未満のp値は、有意な変化であると考えられる。PiB-PETにより決定された脳中のアミロイド量のため、どのタンパク質が変化したかを決定するために、1.5を超えるSUVRを有する個体と、1.5未満のPiB-PETを有する対照個体とを比較した。

【0255】

最近開発されたZ dye (共同研究者Professor Ed Dratzにより提供された) を用いて2D示差的ゲル電気泳動を実施することにより、アミロイドの蓄積を示すことができる。異なる等電点条件 (pH 3~11 & pH 4~7) を用いるいくつかの異なる分析を実施したところ、狭いpH範囲4.7~5.9を用いた場合、診断マーカー; 抗トロンビンIII:A、apoJ:A および血清アミロイドPを測定するための最良の結果が得られることが示された (図1)。

【0256】

(d) マーカーとPiB/PETとの相関

高PiB-PET対低PiB-PETにおいて有意に変化することが見出されたタンパク質のレベルを、個体のPiB-PET SUVR値に対してグラフ化して、相関が存在

10

20

30

40

50

するかどうかを決定した。

【0257】

(e) AD / PDのためのマーカーとしてのマーカーの検証

パーキンソン病患者から上記のように採取された血漿の分析により、マーカーはアルツハイマー病に特異的であると決定された。10人のPD患者からの血漿を加工および分析し(上記の試料の採取および加工に記載のように)、健康な対照と比較した。タンパク質が低PiB - PETと比較して高PiB - PET AD患者において有意に変化することが見出され、高PiB - PET PD患者において有意な変化が観察されなかった場合、マーカーはADに特異的であると考えられた。

【0258】

(f) PD血漿に対するADのためのマーカーとしてのマーカーの検証

パーキンソン病患者から上記のように採取された血漿の分析により、マーカーはアルツハイマー病に特異的であると決定された。PD患者からの血漿を加工および分析し(上記の試料の採取および加工に記載のように)、PD血漿に由来するマーカー(ATII、ApoJおよびSAP)を比較した。AD血漿中ではこれらのマーカーの有意な変化があったが、これらの同じADマーカーはPD血漿中では上昇しなかった(図8)。

【0259】

B) ADに対する決定されたバイオマーカー

(i) 血清アミロイドP(SAP)

血清アミロイドPは、アミロイドフィブリルに結合することが知られるタンパク質であり、AD斑および神経原線維変化などのアミロイド沈着の普遍的成分である。本明細書に記載のデータは、PiB - PET - SUVRとの負の相関を示し(表1)、脳中のアミロイドが多いほど、血漿中の血清アミロイドPは少なく、以前の報告と一致することを示している。

【0260】

個々のSAPアイソフォームとPiB - PET SUVRとの比較はまた、PiB - PET SUVRとの強力な有意な相関を示した(表1)。79%の感度および72%の特異度を示すROC曲線が、アイソフォームBについて観察された; 81%の感度および65%の特異度を示すROC曲線がアイソフォームFについて観察された(表1)。

【0261】

さらに、 672213 ± 318585 の診断強度カットオフ値がアイソフォームBについて観察された。従って、 672213 を超えるSAPアイソフォームBスポット強度を示す個体は、ADを有する可能性が2.9倍高い。 515019 ± 230702 の診断強度カットオフ値がアイソフォームFについて観察された。従って、 515019 を超えるSAPアイソフォームFスポット強度を示す個体は、ADを有する可能性が2.2倍高い。

【0262】

SAPアイソフォームBとアイソフォームFとの比の比較により、PiB - PET SUVRとの強力な有意な相関が示された。75%の感度および68%の特異度を示すROC曲線が観察された(表1)。さらに、 518703 の診断カットオフ比が観察された。従って、 518703 を超えるSAPアイソフォーム比を示す個体はADを有する可能性が2.4倍高い(表1)。

【0263】

SAP(アイソフォームB)スポット強度とApoJ(アイソフォームE)スポット強度との比を用いた場合、ADと対照との分離がさらにより顕著になる。

【0264】

SAPアイソフォーム(B)とApoJアイソフォームEとの比の比較により、PiB - PET SUVRとの強力な有意な相関が示された。77%感度および82%特異度を示すROC曲線が観察された(表1)。さらに、 0.36 の診断カットオフ比が観察される。従って、 0.36 を超えるSAPアイソフォーム比を示す個体は、ADを有する可能

10

20

30

40

50

性が4.3倍高い(表1)。

【0265】

(ii) 抗トロンピンIII (ATIII)

抗トロンピンIIIは、トロンピンの生理学的阻害因子であり、線維素溶解および凝集プロセスの重要な成分である。抗トロンピンIIIとADの役割に関する調査は限定的であった。本明細書に記載のデータは、初めて、抗トロンピンIIIの血漿レベルがADにおいて上昇し、脳中のアミロイドの沈着と相関することを示す(表1)。また、抗トロンピンIIIがA β に結合することができることも初めて示される。

【0266】

ATIIIアイソフォームの強度レベルを、高PiB AD患者からの試料において評価し、低PiBの対照におけるATIIIアイソフォームの強度レベルと比較した。このプロテオミク分析により、ATIII (アイソフォームA)は低PiB対照と比較して高PiB AD患者において1.7倍高いことが同定された(p値 = 6.00×10^{-9}) (表1)。プロテオミク分析により、高PiB AD患者におけるATIIIアイソフォームB (1.7倍増加; p値 = 6.00×10^{-10})、C (1.5倍増加; p値 = 2.00×10^{-7})およびATIII J (1.6倍増加; p値 = 6.00×10^{-9})は低PiBの対照と比較して高いことも同定された(表1)。

【0267】

また、ATIIIアイソフォームの強度レベルを、総ATIIIスポット強度と比較して、タンパク質発現比を得た。この比較により、抗トロンピンIII塩基性アイソフォームと総ATIIIスポット強度との比が、認知機能が正常である個体と比較して、軽度の認知障害(MCI)およびADと臨床的に診断された患者において有意に上昇することが示された(図2および図3)。

【0268】

ATIIIアイソフォームAタンパク質強度とATIIIアイソフォームJタンパク質強度との比を用いた場合、ADと対照との分離がさらにより顕著になる(表1)。診断剤としてのATIII (アイソフォームA)とATIII (アイソフォームJ)単独の相関は、アイソフォームAおよびアイソフォームJについて、それぞれ0.88および0.84から、アイソフォームA/J比について0.9までの改善を示すROC分析により証明される通り改善する(表1)。

【0269】

診断剤としてのATIII (アイソフォームB)とATIII (アイソフォームJ)単独の相関も、アイソフォームAおよびアイソフォームJについて、それぞれ0.89および0.84から、アイソフォームB/J比について0.9までの改善を示すROC分析により証明される通り改善する(表1)。

【0270】

同様に、診断剤としてのATIII (アイソフォームC)とATIII (アイソフォームJ)単独の相関は、アイソフォームCおよびアイソフォームJについて、それぞれ0.84および0.84から、アイソフォームC/J比について0.89までの改善を示すROC分析により証明される通り改善する(表1)。

【0271】

さらに、診断剤としてのATIII (アイソフォームA、BおよびC)とATIII (アイソフォームJ)単独の相関は、それぞれ、アイソフォームA、BおよびCについて、0.88、0.89および0.84およびアイソフォームJについて、0.84から、アイソフォームA、B、C/J比について0.8966までの改善を示すROC分析により証明される通り改善する(表1)。

【0272】

(iii) ApoJ (クラステリン)

ゲノムワイド関連試験により、apoJをコードする遺伝子であるクラステリンの単一ヌクレオチド多型が、ADと関連することが示された。しかしながら、Silajdzic et al.

10

20

30

40

50

は、a p o Jの血漿レベルは上昇せず、診断値を提供しないと報告している。文献における相違は、疾患特異的タンパク質を富化することがA Dにおける血漿a p o Jの本発明者らの理解に対して有する影響を示している。このデータは、a p o J（アイソフォームA、B、C、DおよびE）を測定する場合、a p o Jの診断値がR O C分析において最良に捕捉されることを示している（表1）。

【0273】

従って、本発明者らは、A Dにおけるアミロイド蓄積に関する早期診断試験のための基礎を確立することができる3つの血漿バイオマーカを見出した。2 Dゲルおよび質量分析を用いる研究により、抗トロンピンI I Iおよびa p o J（図9）を血漿中に見出すことができ、A に結合することが示された。P i B - P E Tイメージングは、脳におけるアミロイド量を報告する。

10

【実施例3】

【0274】

A l z h e i m e r ' s D i s e a s e N e u r o i m a g i n g I n i t i a t i v e（A D N I、U S A）からの独立試料を用いる診断マーカの精度の相互検証

同定されたバイオマーカは、独立国際コホートにおいて脳中のアミロイドに関する診断精度を維持する。血漿バイオマーカは、それらが脳中の高いアミロイド（1.5より大きいS U V R）を示す個体を予測することができることを示す。臨床実務への診断試験の翻訳に対する重要な工程は、いくつかの国際コホートにおける検証である。バイオマーカを相互検証する第1の工程として、診断精度をA D N I試験において試験することができる。

20

【0275】

A D N Iは、800のP i B - P E Tイメージングされた個体および血漿を提供する。採血およびP i B - P E TイメージングのためのプロトコールはA I B Lにより用いられるものとは異なり、参加者のライフスタイルおよび遺伝的因子はA I B Lコホートと比較して変化するため、これはバイオマーカの妥当性および強固性を試験する。

【0276】

a) 血漿試料

これらの試料を6つの別々の出荷でA D N Iから出荷して（次いで、150試料/出荷のバイオマーカを抽出することができる）、出荷中に試料を喪失するリスクを最小化することができる。試料をカタログ化し、分析まで-80 で保存した。タンパク質を上記のように加工した。試料を2 Dゲルプロトコールおよび上記のようなM R M - M Sアッセイを用いて測定することができる。これにより、A I B Lからの2 DゲルおよびM R M - M Sの結果と、A D N Iのものとの直接的な比較が可能になる。

30

【0277】

b) 統計分析

受信者操作特性分析を、P r i s m v . 5 . 0 bを用いて行う。全ての2 Dゲル統計分析を、偽発見率の補正および一元配置A N O V Aを含むP r o g e n e s i sソフトウェア（非線形力学）を用いて行った。さらなる統計分析および支援は、A I B Lの一部である生物統計支援チームにより提供された。A I B L生物統計チームは、年齢、アミロイド量の変化、遺伝子型、および臨床神経心理測定基準などのモデリング変数を含む。

40

【実施例4】

【0278】

診断試験の使用

この診断試験の臨床使用は、以下の説明に概略されるように行うことができる。

【0279】

シナリオ1 - 臨床使用

脳中のアミロイドの存在について試験される対象は、症状を有している必要はないが、脳中のアミロイドの存在は60~70歳の年齢の集団の10~20%に存在するため、この年齢にある可能性がある（Rowe et al. 2010、Braak et al. 1996、Sugihara, 1995、D

50

avies 1998)。かくして、患者は、臨床症状がないか、または認知障害もしくは自覚的記憶症状もしくは認知性能における他の欠陥を有する60歳を超える年齢で診療所に提示する。抗凝固剤EDTAを用いて個体から採血し、分析のために血漿を回収する。実施例2に上記されたプロセスを用いて分析を実施し、1つまたは複数のバイオマーカーを測定する。特定のタンパク質アイソフォームと各バイオマーカーの総レベルの比を、標準的な対照範囲と比較する。試験が、個体が脳中のアミロイドの存在について陽性であると示す場合、いくつかの選択肢が利用可能である：

- a. イメージング技術または脳脊髄液試験により脳中のアミロイドの存在を確認するために個体を参照する。
- b. 実行可能な処置が利用可能である場合、個体は処方された処置を有することができる。
- c. 症状は存在するが、試験は陰性である場合、他の形態の認知症を試験することができる。

【0280】

シナリオ2 - 治療試験

アミロイドの蓄積は、臨床症状を呈する15～20年前に脳中に生じ始め(Rowe et al. 2010)、疾患を検出することができるのが早いほど、アルツハイマー病の開始を防止する機会が多くなる。次いで、バイオマーカー試験は、新しい療法の有効性を試験するために脳中にアミロイドを有する個体を選択するための費用効果的な方法を表す。

【0281】

シナリオ3 - パーキンソン病

パーキンソン病または他の運動障害と一致する症状を有することが疑われる個体は、抗凝固剤としてEDTAを用いて採取された血液試料を有する。血漿中に存在するバイオマーカーを、本出願に記載のプロセスを用いて測定し、PD特異的バイオマーカーのレベルを正常範囲と比較することができる。

【0282】

シナリオ4 - バイオマーカー発見

本出願に記載のプロセスを適用して、他の神経変性疾患の生物学的マーカーを発見することができる。そうすることを望む人であれば、本出願に概略されるプロトコールに従い、神経疾患試料と正常対照とを比較して、適切なバイオマーカーを決定することができる。

【0283】

実施例6

血漿タンパク質のディーププロテオミクス(deep-proteomic)スクリーンは、MARS14カラムを用いるアルツハイマー病のためのバイオマーカーを示す - 比較例

加齢に関するオーストラリア人のイメージングおよびバイオマーカーライフスタイル(AIBL)主要試験を用いて、マーカーを検索し、AD病理の機構を解明した。血漿タンパク質を免疫枯渇させ、スペクトル分解された蛍光色素(ZdyeSTM)を用いる2次元SDS-PAGEの前に予備分画して、ADおよび健康な対照の血漿プロテオームを比較した。最近開発されたZdyeを用いて、無傷のタンパク質アイソフォームおよびその切断生成物のプロテオミクススクリーンを行った。

【0284】

この試験において、N=72の推定散在性AD患者およびN=72の健康な対照の性別を一致させたコホートの初期スクリーンからのプールされた血漿試料を用いた。

【0285】

材料および方法

免疫枯渇およびサブ分画化

エチレンジアミン四酢酸血漿の3つの独立したプールを、実施例2に概略されたように、男性のAD(mAD)、女性のAD(fAD)、男性の健康な対照(mHC)および女

10

20

30

40

50

性の健康な対照 (f H C) のそれぞれについて N = 12 の対象から調製した。プールされた血漿試料を、製造業者の説明書に従って複数の親和性除去システム (M A R S) 14 カラム (M A R S - 14、4.6 x 100 mm、A g i l e n t) を用いて免疫枯渇させた。流出物である低存在量タンパク質を収集し、C 18 カラム (A g i l e n t h i g h - r e c o v e r y m a c r o - p o r o u s 4.6 mm X 50 mm) を用いて6つのサブ画分に分画した。

【0286】

サブ画分を凍結乾燥し、2つのスペクトル分解された蛍光色素 (Z d y e L L C) を用いて標識化のために再懸濁した。フォワードおよびリバース標識化を用いて、色素の偏りを防止した。標識された試料を、24 cm の pH 3 ~ 11 の I m m o b i l i n e (商標) D r y s t r i p s (G E H e a l t h c a r e) および 11% アクリルアミドゲル上で分解した。ゲルを、T y p h o o n (商標) T r i o スキャナー (G E H e a l t h c a r e) を用いて蛍光についてスキャンした。偽色画像を、I m a g e Q u a n t ソフトウェア (G E H e a l t h c a r e) を用いて生成した。ゲル画像ファイルを、加工、アラインメントおよび分析のために P r o g e n e s i s S a m e S p o t s ソフトウェア (非線形力学) 中にインポートした。

10

【0287】

対象のタンパク質の同定

変化するタンパク質変異体を同定するために、対象のスポットを、インゲル消化 (S i g m a - A l d r i c h プロテオミクス等級ブタトリプシン) のために、分画されたタンパク質の分析または分取ゲルから手動で切り出した。

20

【0288】

結果

ヒト血漿のディーププロテオミクス調査

免疫枯渇および RP サブ分画化戦略により、2 D G E による比較のために6つのサブ画分のタンパク質を生成した。6つの RP サブ画分のそれぞれの代表的な分析ゲル画像を、図 4 に示す。1 より多い画分中に溶出したタンパク質を構成する総スポット計数を 10% で補正した後、約 3,400 個のユニークな変異体をこの方法により分析することが見積もられた。これを、M A R S - 14 免疫枯渇したが、分画されていない血漿から調製されたゲル中の約 610 個のスポットと比較する。大きくは異なる疎水性を有する多くの同時に移動する高 MW ポリペプチドは RP - H P L C により分離され、ゲルの分析における相互干渉を低減するため、サブ画分の数と共にタンパク質スポットの量の大まかに直線的な増加が生じる。さらに、RP - H P L C はタンパク質を富化し、より少ない存在量の種を、共有的タンパク質色素標識反応においてより重度に標識することができる。

30

【0289】

上記の試験対象患者基準を満たしたスポットを、表 3 に列挙し、図 4 中に矢印で示す。

【0290】

試験対象患者基準に従って対照から A D を識別した 8 つのタンパク質の変異体、サブユニットまたは切断生成物を同定した：

- (i) 亜鉛 2 - 糖タンパク質 (Z A G)、
- (i i) ヒスチジンリッチ糖タンパク質 (H R G) 断片、
- (i i i) ハプトグロビン (H p t)、
- (i v) ビタミン D 結合タンパク質 (V D B P)、
- (v) 補体因子 I (C F I)、
- (v i) インター - トリプシン阻害因子 (I T H I)、
- (v i i) - 1 抗トリプシン (- 1 A T) および
- (v i i i) アポリポタンパク質 E (A p o E)。

40

【0291】

【表 2】

タンパク質 (変異体)	受託番号#	RP ID	MW (kDa)	全コホート		男性コホート		女性コホート		MS	Mascol プログラム	コメント
				A/D倍率変化	p値	A/D倍率変化	p値	A/D倍率変化	p値			
亜鉛α2-糖タンパク質 (ZAG)	P25311	1a	40	1.9倍に上昇	<0.05	NS	NS	NS	NS	2	NS	最も基本的な糖型
亜鉛α2-糖タンパク質 (ZAG)	P25311	1b	40	1.5倍に上昇	<0.05	NS	NS	NS	NS	2	111/4	最も基本的な糖型
亜鉛α2-糖タンパク質 (ZAG)	P25311	1c	40	1.3倍に上昇	0.06	NS	NS	NS	NS	2	232/6	NSであるが有意傾向
ヒスチジンリッチ糖タンパク質 (HRG)	P04196	1d	-35	1.7倍に上昇	<0.02	NS	NS	2.9 up	<0.002	2	161/4	推定切断生成物
固定されていないシリーズ	n/a	1e	-40	1.5倍に下降	<0.05	NS	NS	NS	NS	-	n/a	低存在量種
ハプトグロビン (H p t) 重鎖	P00738	2a	40	2.0倍に上昇	<0.01	NS	NS	2.2 up	<0.02	2	238/13	変異体の合計
ハプトグロビン (H p t) 中鎖	P00738	2b	16	NS	NS	NS	NS	NS	NS	2	*	HptのNS変化サブユニット
ハプトグロビン (H p t) 軽鎖	P00738	2c	9	2.4倍に上昇	<0.02	NS	NS	NS	NS	2	*	変異体の合計
ビタミンD結合タンパク質 (VDBP)	P02774	3b	-50	NS	NS	図 1-F 3 b および図 6 A を参照						切断生成物
ビタミンD結合タンパク質 (VDBP)	P02774	3c	-40	NS	NS	図 1-F 3 c および図 6 B を参照						複数の切断生成物
ビタミンD結合タンパク質 (VDBP)	P02774	3d	-10	NS	NS	図 1-F 3 d および図 6 C を参照						複数の切断生成物
インターαトリプシン阻害因子重鎖 (ITH4)	Q14624	3e	-12	1.3倍に上昇	<0.05	NS	NS	NS	NS	3	428/5	C末端切断生成物
補体因子 I (CFI)	P05156	3f	-53	NS	NS	2.5 up	<0.01	2.6 down	<0.02	2	64/2	推定切断生成物
補体因子 I (CFI)	P05156	3g	-53	NS	NS	2.0 up	<0.001	2.4 down	<0.03	2	78/2	推定切断生成物
補体因子 I (CFI)	P05156	3h	-53	NS	NS	3.6 up	0.056	3.1 down	<0.03	2	127/4	推定切断生成物
補体因子 I (CFI)	P05156	3i	-53	NS	NS	4.0 up	<0.1	3.1 down	0.038	2	69/1	NSであるが有意傾向
インターαトリプシン阻害因子重鎖 (ITH4)	Q14624	4a	-40	1.3倍に上昇	<0.02	1.5 up	<0.02	NS	NS	3	890/14	N末端切断生成物
C反応性結合タンパク質 (CRP)	P02741	4b	25	3.2倍に上昇	0.19	NS	NS	NS	NS	1	96/2	有意でない変化
C反応性結合タンパク質 (CRP)	P02741	4c	25	2.9倍に上昇	0.09	NS	NS	NS	NS	1	NS	有意でない変化
C反応性結合タンパク質 (CRP)	P02741	4d	25	2.4倍に上昇	0.18	NS	NS	NS	NS	1	NS	有意でない変化
C反応性結合タンパク質 (CRP)	P02741	4e	25	2.2倍に上昇	0.06	NS	NS	NS	NS	1	NS	NSであるが有意傾向
α1-抗トリプシン (α1AT)	P01009	5a	-47	3.3	<0.02	NS	NS	NS	NS	2	86/3	
アポリポタンパク質 (ApoE)	P02649	5b	34	1.5倍に上昇	<0.02	NS	NS	NS	NS	2	149/7	エプシロン 4 プロキシ

表 2: 潜在的マーカーの分析

10

20

【 0 2 9 2 】

本実施例は、A Dのための異なるセットのバイオマーカーを、本発明のヘパリン - セファロースカラム手法と比較して血漿試料を免疫枯渇させ、サブ分画化するために M A P - 1 4 を用いるプロセスから得ることができることを示す。M A R S - 1 4 カラムは、枯渇のために血清アルブミン、トランスフェリン、ハプトグロビン、I g G、I g A、1-抗トリプシン、フィブリノゲン、2-マクログロブリン、1-酸糖タンパク質、補体 C 3、I g M、アポリポタンパク質 A I、アポリポタンパク質 A I I およびトランスサイレチンを標的とする。

【 0 2 9 3 】

実施例 7

パーキンソン病におけるバイオマーカー発見 - アルファ - 1 - ミクログロブリン

全試料を、上記の実施例に記載のように加工した。

【 0 2 9 4 】

この試験の目標は、ヘパリン結合を用いるバイオマーカーワークフローを適用して、パーキンソン病 (P D) のための診断用血液に基づくバイオマーカーを発見することであった。タンパク質アルファ - 1 - ミクログロブリン (A M B P、A M B P 遺伝子のアミノ酸 2 0 ~ 2 0 3) は、上記のヘパリンセファロース富化プロセスを用いた場合、P D 血漿中で上昇することが見出された。A M B P のレベルは、P D の重症度と共に増加する (図 1 0) 。

【 0 2 9 5 】

2 Dゲル分析を用いた場合、アルファ - 1 - ミクログロブリンのためのマーカーが明らかである (図 1 1) 。この図面はまた、アルファ - 1 - ミクログロブリンの様々なアイソフォームも示す。

【 0 2 9 6 】

比の分析を、本明細書に記載のように行った。アルファ - 1 - ミクログロブリンの 2 つのアイソフォーム G および E の比は、それがアイソフォーム単独よりも良好な診断精度を有することを示す (図 1 0 は、アイソフォーム E のみの R O C 分析を示す) 。R O C 分析により、0 . 8 6 (9 5 % C I 0 . 7 8 ~ 0 . 9 4) の曲線下面積および 0 . 0 0 0 1 未満の p 値が得られる。しかしながら、P D と対照とのスポット数またはアイソフォーム

30

40

50

193 / 166 (G / E) の比の比較を、図 12 に示す。破線は、試験の 80 % の特異度を表し、カットオフ値にある個体は 5 . 0 のオッズ比を有する (n = 31 の対照、 n = 51 の PD) 。

【 0297 】

実施例 8

アルツハイマー病の認知症状が起こる前の脳におけるアミロイドの検出のためのバイオマーカー

(i) 試料の調製

EDTA 血漿試料を、PET イメージングにより評価された場合に脳アミロイドについて陰性であったか、または脳アミロイドについて陽性であった認知的に正常な個体から、実施例 1 に記載のように収集した (n = 6 の陰性および n = 7 の陽性) 。 400 μ L の媒体からなるヘパリンセファロース HP (GE l i f e s c i e n c e s) のミニスピнкаラムを用いて、試料をタンパク質富化した。試料を、実施例 2 に記載のようにバッファ A で希釈した。タンパク質を、実施例 2 に記載のようにヘパリンセファロースから溶出させた。

10

【 0298 】

試料を、上記の実施例に記載のように調製した。しかしながら、この点での唯一の相違は、ミニスピнкаラムと、予備包装されたカラムおよび HPLC との使用であった。

【 0299 】

固体尿素を、ヘパリンセファロースから溶出したタンパク質に添加して、最終濃度 8 M の尿素を達成した。タンパク質を、10 mM ジチオトレイトールで還元 (1 h、37) した後、40 mM ヨードアセタミドでアルキル化 (1 h、37) した。次いで、試料を 50 mM 重炭酸アンモニウム pH 8 で 8 倍希釈し (例えば、100 μ L の試料 + 700 μ L のバッファ) 、プロテオミクス等級のトリプシンを 1 : 100 の比 (トリプシン : タンパク質) で添加し、静置して 37 で一晩消化した。最終濃度 1 % となるようにギ酸を添加することにより消化を停止させた。次いで、製造業者の説明書 (Waters、1 c c) に従って C18 固相抽出カートリッジを用いて、ペプチドを脱塩した。次いで、脱塩したペプチドを遠心減圧濃縮装置中で乾固まで濃縮した。液体クロマトグラフィー分析の直前に、ペプチドを 3 % アセトニトリルと共に水中の 0 . 1 % ギ酸に再懸濁した。500 ng のペプチドを、Q E x a c t i v e p l u s と組み合わせた Thermo S c i e n t i f i c E a s y - n L C 1000 HPLC システム上で分析した。

20

30

【 0300 】

(i i) ペプチド分離

最初に、試料を、800 bar の最大圧力設定で Thermo A c c l a i m P e p M a p C18 捕捉逆相カラム (75 μ m x 2 c m の n a n o v i p e r、3 μ m の粒径) 上にロードした。35 で 75 μ m x 25 c m の P e p M a p R S L C C18 (2 μ m の粒径) E a s y - S p r a y C o l u m n を用いる勾配溶出のために移動相としてバッファ A (水中の 0 . 1 % ギ酸) およびバッファ B (アセトニトリル中の 0 . 1 % ギ酸) を用いて、300 nL / 分で分離を達成した。

【 0301 】

ペプチド溶出は、3 ~ 8 % アセトニトリル勾配を 10 min 用いた後、10 ~ 40 % アセトニトリル勾配を 30 min 用いた。95 % アセトニトリル洗浄および再平衡化を含む、総獲得時間は 62 分であった。C18 カラムから溶出したペプチドを、n a n o E S I を介して質量分析計に導入し、Q - E x a c t i v e P l u s 装置 (Thermo F i s h e r S c i e n t i f i c、W a l t h a m、M A、U S A) を用いて分析した。電子スプレー電圧は 1 . 8 kV であり、イオン導入管温度は 320 であった。割り付けられていない種および + 1 電荷種を含まない上から 15 のデータ依存的 MS2 獲得方法を用いて、70000 の質量分解能 (m / z 200) で m / z 400 ~ 1600 の範囲にわたって O r b i t r a p 質量分析装置中で完全 MS スキャンを獲得した。標的の値は 3 . 0 0 E + 0 6 であった。2 以上の電荷状態を有する 15 の最も強いピークを、1 .

40

50

4 m/z の単離ウィンドウを用いて単離し、27% の正規化衝突エネルギーを用いて HCD 衝突セル中で断片化した。タンデム質量スペクトルを、m/z 200 で 17, 500 の質量分解能を有する Orbitrap 質量分析装置中で獲得した。自動獲得対照標的値は、 2.0×10^5 に設定した。イオン選択閾値は 2.00×10^4 計数に設定した。最大許容イオン蓄積時間は完全 MS スキャンについては 30 ms であり、タンデム質量スペクトルについては 50 であった。全ての実験について、力学的排除時間は 10 s に設定した。

【0302】

(iii) ペプチド分析

データベース検索を、最初是非冗長ヒットデータベースに対する検索のために SEQUEST HT を用いて、Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。また、対応する逆転データベースに対するデータベース検索を実施して、ペプチド同定の偽発見率 (FDR) を評価した。SEQUEST HT 検索パラメータは、前駆体のイオン質量許容差 10 ppm および生成物のイオン質量許容差 0.08 m/z 単位を含んでいた。システインカルバミドメチル化を固定修飾として設定したが、M 酸化、C 末端アミド化および脱アミド化 (NQ) のなればに N 末端の Gln から ピロ - Glu を可変修飾として設定した。全てのデータベース検索について、2 回までの間違っただ切断を示すトリプシン消化を、消化パラメータについて特定した。示差分析を、A 対 B の示差実験モデルと共に、SEIVE 2.1 (Thermo Fisher) を用いて行った。

【0303】

(iv) 結果

脳アミロイドについて陰性の 6 つの健康な対照 (PET イメージングにより決定) と、脳アミロイドについて陽性の 7 つの認知的に正常な対照とのこの比較は、本発明のヘパリンセファロースタンパク質富化を用いることにより、健康な対照の脳におけるアミロイド量のため、バイオマーカーが上昇することが示されたということを示す。以前の文献は、対照と AD 患者との比較に注目してきた。

【0304】

結果を、表 3 に示す。

【0305】

10

20

30

【表 3】

表3:質量分析を用いて発見された脳アミロイドのためのバイオマーカー

説明	ペプチド	比	標準偏差	P値
ANT3_HUMAN抗トロンビンIII	4	1.2	0.19	2.41E-03
APOH_HUMANベータ2糖タンパク質1	9	1.3	0.18	8.16E-06
FIBB_HUMANフィブリノゲンベータ鎖	8	1.3	0.10	2.64E-08
FIBA_HUMANフィブリノゲンアルファ鎖	3	1.6	0.43	1.85E-07
C9JC84_HUMANフィブリノゲンガンマ鎖	2	1.3	0.36	1.28E-02
ITIH2_HUMANインターアルファトリプシン阻害因子重鎖H2	7	1.3	0.25	2.23E-04
HRG_HUMANヒスチジンリッチ糖タンパク質	6	1.5	0.28	1.41E-07
B0UZ83_HUMAN補体C4ベータ鎖	5	1.3	0.24	1.60E-03
CFAH_HUMAN補体因子H	4	1.3	0.23	2.47E-03
HEP2_HUMANヘパリンコファクター2	4	1.3	0.25	3.06E-04
E9PBC5_HUMAN Plasma血漿カリクレイン重鎖	2	1.7	0.71	1.52E-03

【0306】

表3において、タンパク質の名称の後に、測定されたトリプシンペプチドの数、タンパク質存在量の変化、その変化の標準偏差およびt検定からのp値が記載される。所与のタンパク質について分析されたそれぞれ個々のペプチドの変化から、比を平均した。1.0より大きい比は、タンパク質存在量の増加を示す。

【0307】

タンパク質の比に関して、データは、これらのものが潜在的に診断的であることを示す。これらの潜在的なバイオマーカーは、高い脳アミロイドを有する個体において変化する。かくして、比は、バイオマーカーの診断能力を改善し、MSからのこのデータを、例えば、抗トロンビンIIIなどの1つのバイオマーカーからの2つのペプチドの比の測定を用いてさらに分析することができる。同じタンパク質からの2つのペプチドの比の使用は、試料の保存および取り扱いを制御するための多くの利点を有する。

【0308】

これは、タンパク質またはペプチドの分離前の試料の加工におけるヘパリンセファロースの使用は、アルツハイマー病の認知症状が生じる前でも、ADのための高感度診断剤の基礎を形成することができる潜在的な診断バイオマーカーへのアクセスを提供することを示す。

【0309】

このデータは、いくつかはDGEとMSなどの両方の技術の間で同じであるバイオマーカー（すなわち、抗トロンビンIII）を発見するための異なるプロテオミクス技術[質量分析(MS)]を示す。従って、これは、ATIIIがADのための診断マーカーとしての可能性を示すことを検証する。

【0310】

10

20

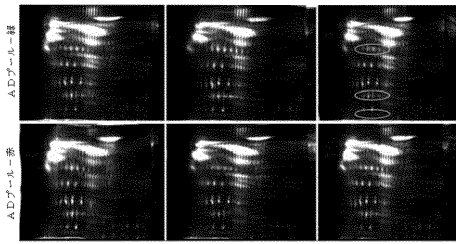
30

40

50

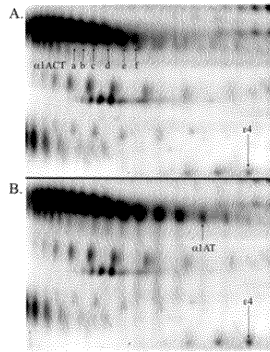
【 図 5 】

Figure 5:



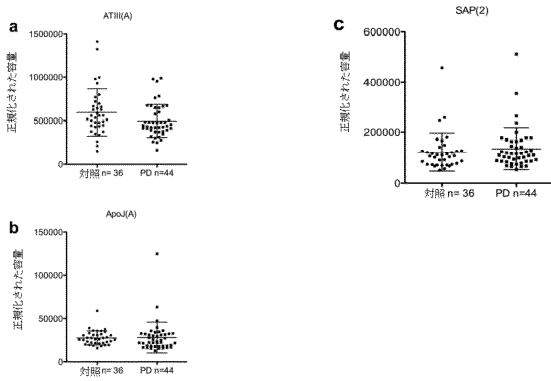
【 図 6 】

Figure 6



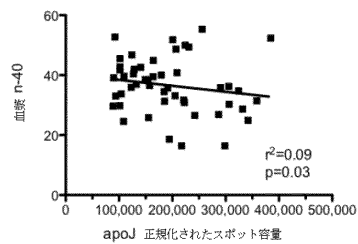
【 図 8 】

Figure 8:



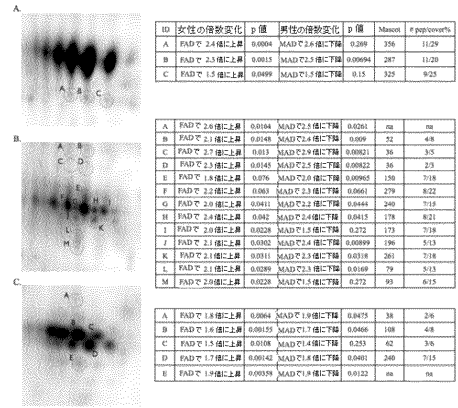
【 図 9 】

Figure 9:



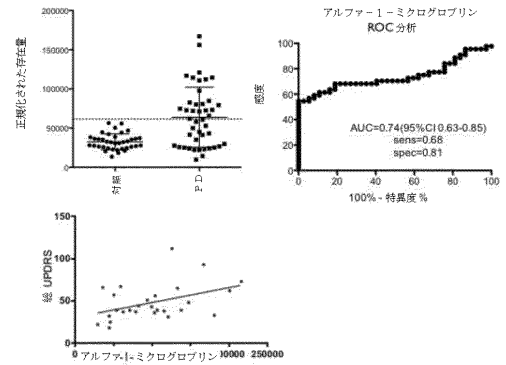
【 図 7 】

Figure 7



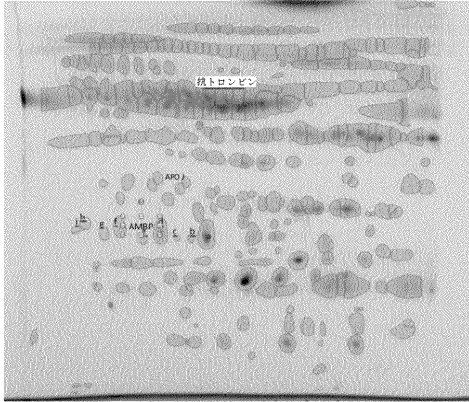
【 図 10 】

Figure 10:



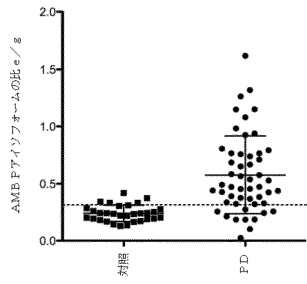
【 図 1 1 】

Figure 11:



【 図 1 2 】

Figure 12:



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2014/000849
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/68 (2006.01) C40B 30/04 (2006.01) A61B 5/00 (2006.01)		
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)		
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 practicable, search terms used) Google, google patents, pubmed, espacenet; CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE via STN; X-FULL via EPOQUE: Roberts, Drazt, heparin, chromatography, binding, affinity, biomarker, diagnosis, validation, neurological, alzheimers, parkinsons, and like terms		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Documents are listed in the continuation of Box C		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" 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 17 November 2014		Date of mailing of the international search report 17 November 2014
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaaustralia.gov.au		Authorised officer Felix White AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262832565

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/AU2014/000849

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including
2. Claims Nos.:
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:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Box for Details

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. 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.:
4. 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.:
1-17, 27-34, 40 (in full), 42-44 (in part)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation).		PCT/AU2014/000849
DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Yu, H.-L. et al "Aberrant profiles of native and oxidized glycoproteins in Alzheimer plasma" Proteomics, 2003, vol. 3, pps 2240-2248 Whole document, in particular Abstract, 2.1, 2.3, 2.8, Table 3, Figs 1, 3, 6 p. 2240-2241	1-2, 8-13, 15, 27, 34, 40, 42, 44 1-17, 27-34, 40, 42-44
X Y	WO 2002/008449 A2 (THE SIR MORTIMER B. DAVIS-JEWISH GENERAL HOSPITAL) 31 January 2002 Example 8, Claim 7 As above	1-2, 8-13, 15, 17, 27, 34, 40, 42, 44 14
X Y	US 5705401 A (MASTERS et al) 06 January 1998 Claims, col 9 lines 32-40, col 13, Table 1 As above	1-3, 8-13, 15-17, 27-34, 40, 42, 44 14
A	Nishiyama, E. et al "Serum amyloid P component level in Alzheimer's disease", Dementia, 1996, vol. 7, pps 256-259 Abstract	
Y A	Lista, S. et al "Biological and methodical challenges of blood-based proteomics in the field of neurological research" Progress in Neurobiology, 2013, vol. 101-102, pps 18-34 4. Sources of Analytical Bias, p. 26 et seq	14
Y	Johnstone, D. et al "Multivariate Protein Signatures of Pre-Clinical Alzheimer's Disease in the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) Plasma Proteome Dataset" PLoS One, 2012, vol 7, e34341 Whole document	1-17, 27-34, 40, 42-44
Y	Llano, D. A. et al "Evaluation of Plasma Proteomic Data for Alzheimer Disease State Classification and for the Prediction of Progression From Mild Cognitive Impairment to Alzheimer Disease" Alzheimer Disease and Associated Disorders, July-September 2013, vol 27, pps 233-243 Whole document, in particular p. 236 r.h. column	1-17, 27-34, 40, 42-44
X	Janciauskiene, S. et al, "Inhibition of Alzheimer β -Peptide Fibril Formation by Serum Amyloid P Component" Journal of Biological Chemistry, 1995, vol. 270, pps 26041-26044 p. 26041	40, 42-44
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/AU2014/000849
Supplemental Box	
<p>Continuation of: Box III This Authority considers that the present application comprises the following distinct inventive concepts:</p> <p>Invention 1: Claims 1-7, 27-34, 40 (in full), 42-44 (in part) – method and kit for identifying biomarkers, characterised by isolating a heparin binding protein and then validating it as a candidate biomarker for neurological disease.</p> <p>Invention 2: Claim 18, (in part) – a biomarker for the diagnosis or prognosis of neurological disease, method and kits for using that biomarker to diagnose or prognose the disease, where the biomarker is antithrombin III. This also extends to claims 19-26, 35-39 and 41-44 insofar as they relate to antithrombin III.</p> <p>Invention 3: Claim 18 (in part) – as invention 2 but for serum amyloid P</p> <p>Inventions 4-15: Claim 18 (in part) – as invention 2 but for each of the other proteins listed in claim 18</p> <p><i>Nature of the invention</i></p> <p>The present specification discloses methods for validating biomarkers for neurological diseases. The methods appear to be principally characterised by treatment with heparin to remove non-heparin binding contaminants prior to validation. Proteins which bind heparin are then validated as potential biomarkers for neurological diseases in view of known markers. A number of biomarkers validated in this way are also disclosed for diagnosis or prognosis of neurological disease.</p> <p>The description indicates at [56] "Isolating molecules with a heparin binding affinity is necessary and reduces the influence of the high abundant molecules that interfere with biomarker validation. It has now been found by the inventors that a subset of molecules with a heparin binding affinity show a high correlation with validated biomarkers of neurological diseases"</p> <p>It appears from this disclosure that heparin binding is a step used during marker validation to remove interfering molecules. There is no suggestion that heparin binding is associated with neurological diseases at a mechanistic level.</p> <p>Furthermore it appears that heparin binding per se is not related to biomarker status.</p> <p><i>Claim construction, clarity and support.</i></p> <p>Under the PCT claim construction conventions, markers isolated or identified by a given method are not limited to that particular method, but are considered to be markers per se. Therefore the limitation of e.g. claim 19 does not import any patentable weight under the PCT.</p> <p><i>"Markush" group considerations</i></p> <p>According to so-called Markush practice, an invention relating to a group of chemical compounds can be unified if they have a common property, and either share a significant structural element or belong to a recognised class of chemical compounds.</p> <p>The group "proteins with heparin binding ability" have a common property. However they are not considered to share any significant structural element. Heparin binding ability is found over a wide range of structurally and functionally diverse proteins, and is not restricted to particular sequence motifs.</p> <p>Furthermore, according to the guidance in the PCT Administrative Instructions "the words "recognized class of chemical compounds" mean that there is an expectation from the knowledge in the art that members of the class will behave in the same way in the context of the claimed invention. In other words, each member could be substituted one for the other, with the expectation that the same intended result would be achieved".</p> <p>The heading "heparin binding proteins" does not satisfy the criterion of "belonging to a recognized class of chemical compounds in the art to which the invention pertains" because not all heparin binding compounds can be used interchangeably in the context of the claimed invention.</p> <p>Therefore the compounds of inventions 2-15 are not considered to be a unified "Markush" group. Furthermore, since none of inventions 2-15 require a step of heparin binding to the biomarker, all of inventions 2-15 lack unity with invention 1 <i>a priori</i>.</p> <p><i>Lack of unity a posteriori</i></p> <p>Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2009)</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/AU2014/000849
Supplemental Box	
<p>Notwithstanding the above analysis, a number of citations have already disclosed association of heparin binding proteins with neurological diseases (as well as D1-D3 cited in Box V).</p> <p>D4 discloses that that serum amyloid P is down-regulated in Alzheimer's disease patients (see abstract). This is the same relationship disclosed for SAP in the present specification.</p> <p>D5 discloses that amyloid precursor protein in circulatory fluid can be used for assaying for Alzheimer's disease (see e.g. abstract). APP interacts with heparin.</p> <p>Therefore in light of these disclosures the concept of "validation and diagnosis of neurological diseases with heparin binding proteins" cannot provide a unifying "special technical feature" and all of the inventions identified above lack unity.</p> <p><i>Response to arguments</i></p> <p>In the letter dated 29 October 2014, the applicant argued that claims 27-39 should be grouped with invention 1 because they refer to the method of claim 17. This is found partially persuasive. Claims 27-34 refer to the use of biomarkers validated by the method of claims 1-17. However claims 35-39 refer to specific biomarkers corresponding to inventions 2-15. Therefore claims 35-39 are more appropriately grouped in inventions 2-15. Since no search has been carried out for these specific biomarkers, it is not possible to report on claims 35-39, particularly in regard to inventive step.</p>	
Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2009)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/AU2014/000849	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2002/008449 A2	31 January 2002	AU 7951501 A	05 Feb 2002
		CA 2417134 A1	31 Jan 2002
		EP 1303537 A2	23 Apr 2003
		EP 1303537 B1	27 Sep 2006
		JP 2004504366 A	12 Feb 2004
		US 2004033563 A1	19 Feb 2004
		US 7105485 B2	12 Sep 2006
US 5705401 A	06 January 1998	AU 2926392 A	15 Jun 1993
		AU 669493 B2	13 Jun 1996
		AU 701954 B2	11 Feb 1999
		AU 5059896 A	11 Jul 1996
		CA 2123211 A1	27 May 1993
		EP 0613560 A1	07 Sep 1994
		EP 0613560 B1	21 Oct 1998
		EP 0613560 B2	21 Jun 2006
		JP H07503316 A	06 Apr 1995
		JP 3277211 B2	22 Apr 2002
		US 2004265847 A1	30 Dec 2004
		WO 9310459 A1	27 May 1993
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)			

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
G 0 1 N	27/447	(2006.01)	G 0 1 N	27/447	3 0 1 A	
C 1 2 Q	1/56	(2006.01)	C 1 2 Q	1/56		
C 0 7 K	14/745	(2006.01)	C 0 7 K	14/745		
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47		

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. J A V A

(72)発明者 ブレイン・ロバーツ

オーストラリア 3 0 5 2 ビクトリア州パークビル、ロイヤル・パレイド 3 0 番

(72)発明者 エドワード・エイ・ドラッツ

アメリカ合衆国 5 9 7 1 7 モンタナ州ボーズマン、ケミストリー・アンド・バイオケミストリー・ビルディング、ピー・オー・ボックス 1 7 3 4 0 0

(72)発明者 スコット・ラフーン

アメリカ合衆国 5 9 7 1 5 モンタナ州ボーズマン、サウス・エイス・アベニュー 1 0 3 ・ 1 / 2 番、アパートメント・エイ

F ターム(参考) 2G041 CA01 FA12 GA09 KA01 LA08

2G045 AA25 CA26 DA36 DA37 DA40 FA11 FB01 FB03 FB05 FB06

4B063 QA07 QQ03 QQ36 QQ97 QR48

4H045 AA10 AA30 CA42 DA56 DA89 EA50

专利名称(译)	鉴定神经疾病的生物标志物和诊断神经疾病的方法		
公开(公告)号	JP2016536598A	公开(公告)日	2016-11-24
申请号	JP2016537050	申请日	2014-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	CRC心理健康		
申请(专利权)人(译)	海伯爵海四心理保健品有限公司		
[标]发明人	ブレインロパーツ エドワードエイドラッツ スコットラフーン		
发明人	ブレイン・ロパーツ エドワード・エイ・ドラッツ スコット・ラフーン		
IPC分类号	G01N33/68 G01N30/88 G01N27/62 G01N33/53 G01N33/543 G01N27/447 C12Q1/56 C07K14/745 C07K14/47		
CPC分类号	G01N33/6896 A61B5/0071 A61B5/4076 A61B5/4082 A61B5/4088 G01N2333/4709 G01N2500/04 G01N2800/2821 G01N2800/2835 G01N2800/50 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/68 G01N30/88.J G01N27/62.V G01N33/53.D G01N33/543.545.A G01N27/447.301.A C12Q1/56 C07K14/745 C07K14/47		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/FA12 2G041/GA09 2G041/KA01 2G041/LA08 2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA40 2G045/FA11 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB06 4B063/QA07 4B063/QQ03 4B063/QQ36 4B063/QQ97 4B063/QR48 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/CA42 4H045/DA56 4H045/DA89 4H045/EA50		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	2013903257 2013-08-27 AU		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了鉴定可影响认知功能的疾病的生物标志物的方法。通过本发明的方法鉴定的生物标志物可用于预测哺乳动物是否会发展出可影响认知功能的疾病。更具体地，本发明涉及预测哺乳动物中神经系统疾病的生物标志物的鉴定，以及这些生物标志物在神经系统疾病的诊断，鉴别诊断和/或预后中的用途。所提供的方法和系统允许基于生物标志物的测量来评估和评估新皮层淀粉样蛋白水平，所述生物标志物提供了哺乳动物是否可能发展为神经系统疾病的指示。

Figure 1:

