

(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2006-518199

(P2006-518199A)

(43) 公表日 平成18年8月10日(2006.8.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	2 G 0 4 5
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47 Z N A	4 B 0 2 4
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	4 H 0 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Y	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く		

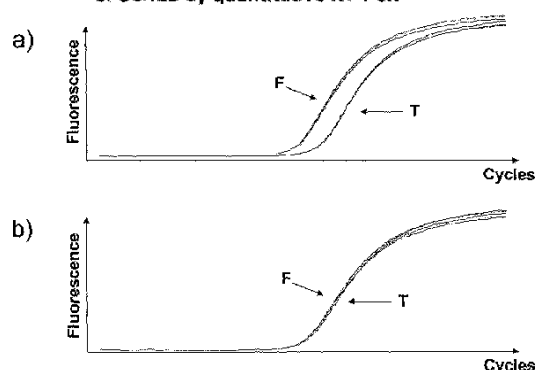
(21) 出願番号	特願2006-501697 (P2006-501697)	(71) 出願人	504087411
(86) (22) 出願日	平成16年2月2日 (2004.2.2)		エヴォテック ニューロサイエンス ゲ
(85) 翻訳文提出日	平成17年9月30日 (2005.9.30)		ゼルシャフト ミット ベシュレンクテル
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/000916		ハフツング
(87) 国際公開番号	W02004/070388		ドイツ連邦共和国 2 2 5 2 5 ハンブル
(87) 国際公開日	平成16年8月19日 (2004.8.19)		ク シュナッケンブルガリー 1 1 4
(31) 優先権主張番号	60/444,666	(74) 代理人	110000109
(32) 優先日	平成15年2月4日 (2003.2.4)		特許業務法人特許事務所サイクス
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	フォン デル カンマー ハイッツ
			ドイツ連邦共和国 2 2 6 0 7 ハンブル
			ク ヴェルビンドゥングスシュトラッセ
			6 デー
		(72) 発明者	ポールナー ヨハーネス
			ドイツ連邦共和国 2 2 1 7 5 ハンブル
			ク クヴァイテンヴェーク 1 1
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経変性疾患に対する SCN2B タンパク質の診断的かつ治療的使用

(57) 【要約】

本発明は、アルツハイマー病患者の特異的な脳領域における SCN2B をコードする遺伝子の差次的発現を開示する。この発見に基づいて、本発明は、被験者における神経変性疾患、特にアルツハイマー病を診断する、またはその予後を判定する、または被験者が前記疾患を発症するリスクが高いかどうかを決定する方法を提供する。さらに、本発明は、SCN2B 遺伝子および相当するその遺伝子産物を使用して、アルツハイマー病および関連する神経変性疾患を治療または予防するための治療的かつ予防的方法を提供する。神経変性疾患の調節剤をスクリーニングする方法も開示されている。

Verification of differential expression of SCN2B by quantitative RT-PCR



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者における神経変性疾患を診断する、またはその予後を判定する、または被験者が前記疾患を発症するリスクが高いかどうかを決定する方法であって：

前記被験者からの試料における、

(i) S C N 2 B をコードする遺伝子の転写産物、および / または

(i i) S C N 2 B をコードする遺伝子の翻訳産物、および / または

(i i i) 前記転写産物または翻訳産物の断片、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベルおよび / または活性を決定する段階と、前記レベルおよび / または前記活性を既知の疾患または健康状態を表す基準値と比較し、それによって前記被験者における前記神経変性疾患を診断する、またはその予後を判定する、または前記被験者が前記神経変性疾患を発症するリスクが高いかどうかを決定する段階と、を含む方法。

10

【請求項 2】

前記神経変性疾患がアルツハイマー病である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

被験者における神経変性疾患、特にアルツハイマー病を診断するための、またはその予後を判定するための、またはかかる疾患を発症する、被験者の傾向または素因を決定するためのキットであって、

(a) (i) S C N 2 B をコードする遺伝子の転写産物を選択的に検出する試薬、および (i i) S C N 2 B をコードする遺伝子の翻訳産物を選択的に検出する試薬からなる群から選択される、少なくとも 1 種類の試薬と、

20

(b) (i) 前記被験者からの試料において、S C N 2 B をコードする遺伝子の前記転写産物および / または前記翻訳産物のレベルまたは活性、または前記レベルおよび前記活性の両方を決定すること；(i i) 神経変性疾患、特にアルツハイマー病を診断する、またはその予後を判定すること、またはかかる疾患を発症する被験者の傾向または素因を決定すること；により、神経変性疾患、特にアルツハイマー病を診断する、またはその予後を判定するための、またはかかる疾患を発症する被験者の傾向または素因を決定するための説明書と、を備え、既知の健康状態を表す基準値と比較される前記転写産物および / または前記翻訳産物の異なるレベルまたは活性、または前記レベルおよび前記活性の両方；あるいは既知の健康状態を表す基準値と同様な、または等しい前記転写産物および / または前記翻訳産物のレベルまたは活性、または前記レベルおよび前記活性の両方によって、神経変性疾患、特にアルツハイマー病の診断または予後、あるいはかかる疾患を発症する高い傾向または素因が示される、キット。

30

【請求項 4】

(i) S C N 2 B をコードする遺伝子、および / または

(i i) S C N 2 B をコードする遺伝子の転写産物、および / または

(i i i) S C N 2 B をコードする遺伝子の翻訳産物、および / または

(i v) (i) ~ (i i i) の断片、または誘導体、または変異体

からなる群から選択される、少なくとも 1 種類の物質の活性および / またはレベルの修飾因子。

40

【請求項 5】

S C N 2 B をコードする非天然遺伝子配列、またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体を含む、組換え非ヒト動物であって、前記組換え非ヒト動物が：

(i) 前記遺伝子配列および選択マーカー配列を含有する遺伝子ターゲティング構築物を提供する段階と、

(i i) 非ヒト動物の幹細胞に前記ターゲティング構築物を導入する段階と、

(i i i) 非ヒト胚に前記非ヒト動物幹細胞を導入する段階と、

(i v) 偽妊娠非ヒト動物に前記胚を移植する段階と、

(v) 前記胚を臨月まで発達させる段階と、

(v i) そのゲノムが両方の対立遺伝子において前記遺伝子配列の修飾を含む、遺伝子

50

改変非ヒト動物を同定する段階と、

(v i i) 段階(v i)の遺伝子改変非ヒト動物を繁殖させて、そのゲノムが前記内因性遺伝子の修飾を含む遺伝子改変非ヒト動物を得る段階と、によって得ることが可能であり、前記破壊(disruption)によって、神経変性疾患または関連する疾患もしくは障害の症状を発症する素因を示す前記非ヒト動物が生じる、組換え非ヒト動物。

【請求項6】

(i) S C N 2 Bをコードする遺伝子、および/または

(i i) S C N 2 Bをコードする遺伝子の転写産物、および/または

(i i i) S C N 2 Bをコードする遺伝子の翻訳産物、および/または

(i v) (i) ~ (i i i)の断片、もしくは誘導体、もしくは変異体からなる群から 10
選択される1種または複数種の物質の、神経変性疾患、特にアルツハイマー病、または関連する疾患もしくは障害の修飾因子をスクリーニングするアッセイであって、

(a) 細胞を試験化合物と接触させる段階と、

(b) (i) ~ (i v)に記載の1種または複数種の物質の活性および/またはレベルを測定する段階と、

(c) 前記試験化合物と接触させていない対照細胞における(i) ~ (i v)に記載の1種または複数種の物質の活性および/またはレベルを測定する段階と、

(d) 段階(b)および(c)の細胞における物質のレベルおよび/または活性を比較する段階と、を含み、接触させた細胞における物質の前記活性および/または前記レベルの変化によって、試験化合物が前記疾患および障害の修飾因子であることが示される、ア 20
ッセイ。

【請求項7】

(i) S C N 2 Bをコードする遺伝子、および/または

(i i) S C N 2 Bをコードする遺伝子の転写産物、および/または

(i i i) S C N 2 Bをコードする遺伝子の翻訳産物、および/または

(i v) (i) ~ (i i i)の断片、もしくは誘導体、もしくは変異体からなる群から 選択される1種または複数種の物質の、神経変性疾患、特にアルツハイマー病、または関連する疾患もしくは障害の修飾因子をスクリーニングする方法であって、

(a) (i) ~ (i v)に記載の物質に関して、神経変性疾患または関連する疾患もしくは障害を発症する素因が与えられた、または既に発症している非ヒト試験動物に試験化合物を投与する段階と、 30

(b) (i) ~ (i v)に記載の1種または複数種の物質の活性および/またはレベルを測定する段階と、

(c) (i) ~ (i v)に記載の物質に関して、神経変性疾患または関連する疾患もしくは障害を発症する素因が与えられた、または既に発症している対応する(matched)非ヒト対照動物であり、かかる試験化合物がそれに投与されていない非ヒト動物における、(i)または(i v)に記載の1種または複数種の物質の活性および/またはレベルを測定する段階と、

(d) 段階(b)および(c)の非ヒト動物における物質の活性および/またはレベルを比較する段階と、を含み、非ヒト試験動物における物質の活性および/またはレベルの変化によって、試験化合物が前記疾患もしくは障害の修飾因子であることが示される、方法 40
。

【請求項8】

前記非ヒト試験動物および/または前記非ヒト対照動物が、天然S C N 2 B遺伝子転写制御因子ではない転写制御因子の制御下にて、S C N 2 B、またはその断片、もしくはその誘導体、もしくは変異体を発現する、組換え非ヒト動物である、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

化合物を試験するためのアッセイ、好ましくは複数の化合物をスクリーニングして、S C N 2 B翻訳産物、またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体への、前記化合物 50

の結合の程度を決定するアッセイであって：

(i) 前記 S C N 2 B 翻訳産物、またはその断片もしくは誘導体、もしくは変異体の液体懸濁液を複数の容器に添加する段階と、

(i i) 前記結合に関してスクリーニングすべき、検出可能な、特に 1 種類の蛍光標識化合物または複数種の蛍光標識化合物を前記複数の容器に添加する段階と、

(i i i) 前記 S C N 2 B 翻訳産物、またはその前記断片、もしくは誘導体、もしくは変異体と、前記の検出可能な、特に蛍光標識化合物 (1 種または複数種) とをインキュベートする段階と、

(i v) 前記 S C N 2 B 翻訳産物と、またはその前記断片、もしくは誘導体、もしくは変異体と結合した、好ましくは蛍光の量を測定する段階と、

10

(v) 前記化合物のうちの 1 種または複数種による、前記 S C N 2 B 翻訳産物、またはその前記断片、もしくは誘導体、もしくは変異体への結合の程度を決定する段階と、を含むアッセイ。

【請求項 1 0】

前記タンパク質分子が、神経変性疾患、好ましくはアルツハイマー病を検出するための診断標的として使用される、S C N 2 B、配列番号 1 をコードする遺伝子の翻訳産物、またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体である、タンパク質分子。

【請求項 1 1】

前記タンパク質分子が、神経変性疾患、好ましくはアルツハイマー病を予防または治療または改善する試薬または化合物のためのスクリーニング標的として使用される、S C N 2 B、配列番号 1 をコードする遺伝子の翻訳産物、またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体である、タンパク質分子。

20

【請求項 1 2】

被験者からの試料における細胞の病的状態を検出するための、免疫原と特異的に免疫反応性である抗体の使用であって、前記免疫原が、S C N 2 B、配列番号 1 をコードする遺伝子の翻訳産物、またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体である使用であり、前記細胞を前記抗体で免疫細胞化学的に染色することを含み、既知の健康状態を表す細胞と比較して前記細胞における染色の程度の変化、または染色パターンの変化から、前記細胞の病的状態が示される使用。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、被験者における神経変性疾患の進行を診断し、その予後を判定し、モニターする方法に関する。さらに、治療コントロールの方法および神経変性疾患の調節剤 (modulating agent) をスクリーニングする方法が提供される。本発明は、医薬組成物、キット、および組換え非ヒト動物モデルもまた開示する。

【0 0 0 2】

神経変性疾患、特にアルツハイマー病 (A D) は、強く衰弱させる影響を患者の生活に及ぼす。さらに、これらの疾患は、非常に大きな健康的、社会的、および経済的負担となる。A D は、すべての痴呆の症例の約 7 0 % を占める、最も一般的な神経変性疾患であり、年齢 6 5 歳を超える人口の約 1 0 %、8 5 歳を超える人口の 4 5 % まだが冒されている、おそらく最も破壊的な加齢性神経変性症状である (最近の評論として、Vickers ら, Progress in Neurobiology 2000, 60: 139-165 を参照のこと)。現在、米国、ヨーロッパ、および日本において、推定 1 2 0 0 万症例に達する。先進国において高齢者の数が人口学的に増加する (「ベビーブーマー」の高齢化) に従って、この状況は必然的に悪くなるだろう。A D に罹患している個人の脳に生じる神経病理学的な顕著な特徴は、アミロイド - β タンパク質で構成される老人斑、異常な糸状構造の出現と同時に起こる細胞骨格の変化および神経原線維変化の形成である。

40

【0 0 0 3】

アミロイド - β (A β) ペプチドは、様々な種類のプロテアーゼによってアミロイド前

50

駆タンパク質 (A β P) の切断によって産生される。セクレターゼ β / γ による切断によって、異なる長さの A β ペプチドが形成され、一般に、40 アミノ酸からなる、短く、より可溶性であり、ゆっくりと凝集するペプチド、および細胞外で急速に凝集し、特有のアミロイドプラークを形成する、長い 42 アミノ酸ペプチドが形成される (Selkoe, *Physiological Rev* 2001, 81: 741-66; Greenfieldら, *Frontiers Bioscience* 2000, 5: D72-83)。2 種類の、びまん性斑 (diffuse plaque) および老人斑 (neuritic plaque) を AD 患者の脳において検出することができ、後者は古典的であり、最も一般的な種類である。それらは主に、大脳皮質および海馬において見られる。老人斑は、直径 50 μ m ~ 200 μ m を有し、小膠細胞および星状膠細胞の死んだ神経細胞の不溶性の原線維アミロイド、断片、および他の成分、例えば神経伝達物質、アポリポタンパク質 E、グリコサミノグリカン、 α 1 - 抗キモトリプシンなどで構成される。脳における毒性 A β 沈着物の形成は、AD の経過の非常に初期に始まり、AD 症状につながるその後の破壊的プロセスに主要な役割を果たすと論じられている。AD の他の病理学的な顕著な特徴は、神経網の系 (neuropil thread) として記載されている神経原線維変化 (NFT) および異常神経突起である (Braak and Braak, *Acta Neuropathol* 1991, 82: 239-259)。NFT は、神経細胞の内部で出現し、互いの周りでより合わされた対らせん状のフィラメントを形成する、化学的に変化したタウタンパク質からなる。NFT が形成するにつれて、神経細胞の減少が認められる。前記神経細胞の減少は、微小管関連輸送系が原因であり得ると論じられている (Johnson and Jenkins, *J Alzheimers Dis* 1996, 1: 38-58; Johnson and Hartigan, *J Alzheimers Dis* 1999, 1: 329-351)。神経原線維変化の出現およびそれらの数の増加は、AD の臨床的重要度とかなり相関している (Schmittら, *Neurology* 2000, 55: 370-376)。

10

20

30

40

50

【0004】

AD は、記憶形成における初期の欠損と関連する進行性疾患であり、最終的には、より高い認知機能が完全に侵される。認知障害としては、とりわけ、記憶障害、失語症、失認および実行機能 (executive functioning) の低下が挙げられる。AD の病因の特有の特徴は、変性プロセスに対する、特定の脳の領域および神経細胞の分集団の選択的な脆弱性である。具体的には、疾患の進行中、側頭葉領域および海馬は初期に、かつより重度に影響を受ける。一方、前頭皮質、後頭皮質、および小脳内の神経細胞は大部分が損傷を受けていない状態のままであり、神経変性から保護されている (Terryら, *Annals of Neurology* 1981, 10: 184-92)。AD 発症の年齢は、50 年の範囲内で様々であり、早期発症型 AD は、年齢 65 歳未満のヒトに起こり、晩期発症型 AD は 65 歳を超えるヒトに起こる。すべての AD 症例のうち約 10% が、早期発症型 AD に罹患しており、わずか 1 ~ 2% が家族性、遺伝性症例である。現在、AD の治療法はなく、AD の進行を止めるのに有効な治療、または高い確率で生前に AD を診断する方法さえもない。AD を発症する素因を個体に与えるいくつかの危険因子、主に最も顕著には、アポリポタンパク質 E 遺伝子 (ApoE) の 3 つの異なる既存の対立遺伝子 (イプシロン 2、3、および 4) のイプシロン 4 対立遺伝子が同定されている (Strittmatterら, *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 1977-81; Roses, *Ann NY Acad Sci* 1998, 855: 738-43)。多型の血漿タンパク A β ApoE は、低密度リポタンパク質受容体に結合することによって、細胞間のコレステロールおよびリン脂質の輸送において役割を果たし、神経突起成長および再生において役割を果たすと思われる。更なる感受性遺伝子および疾患関連多型を検出する努力によって、ヒトの第 10 および第 12 染色体上の特定の領域および遺伝子が晩期発症型 AD と関連するという仮説が導かれている (Myersら, *Science* 2000, 290: 2304-5; Bertramら, *Science* 2000, 290: 2303; Scottら, *Am J Hum Genet* 2000, 66: 922-32)。

【0005】

第 21 染色体上のアミロイド前駆タンパク質 (APP)、第 14 染色体上のプレセニリン - 1、および第 1 染色体上のプレセニリン - 2 の遺伝子における遺伝的欠陥に起因している早期発症型 AD の稀な例はあるが、晩期発症型散発性 AD の優勢な形態は、今までに不明の病因に由来している。神経変性疾患の晩期発症および複合病因は、治療薬および診

断剤の開発に難題を投げかけている。潜在的な薬物標的および診断マーカーのプールを拡大することが重要である。したがって、本発明の目的は、神経疾患の病因への洞察を提供し、かつこれらの疾患の診断および治療法の開発に特に適している方法、材料、薬剤、組成物、および非ヒト動物モデルを提供することである。この目的は、独立した請求項の特徴によって解決されている。サブクレームは、本発明の好ましい実施形態を定義する。

【0006】

本発明は、アルツハイマー病のヒト脳試料における電位作動性ナトリウムチャンネルⅠ型βサブユニット(ベータ-2サブユニット、β2-サブユニット、β2またはSCN2B)をコードする遺伝子の差次的発現に基づく。したがって、SCN2B遺伝子および相当するその転写産物および/または翻訳産物は、ADで一般に認められる局所の選択的神経細胞変性において原因となる役割を有し得る。これらの開示内容に基づいて、本発明は、神経変性疾患、特にADの診断的評価および予後、ならびにその素因の同定に対して有用性を有する。さらに、本発明は、かかる疾患の治療を受ける患者を診断的にモニターする方法を提供する。

10

【0007】

電位作動性イオンチャンネルは、伝導(conducted)活動電位を発生させることによって重要な役割を果たす。カチオン(ナトリウム、カルシウム、カリウムイオン)およびアニオン(塩素イオン)のイオン伝導性膜チャンネルが記述されている(Lehmann-Hornら, Physiological Reviews 1999, 79: 1317-1358)。細胞膜を介したイオンの輸送によって、細胞網状構造全体にわたって電気インパルスが高速で伝達される。それによって、チャンネルは、機能上異なる3つの状態: 静止状態、活性状態、および不活性状態の間で切り換わる。静止状態と不活性状態のどちらも非伝導性であり、チャンネルは閉じている。膜電位が-60mV未満から増大するに従って、チャンネルはその孔を開き始める(つまり、活性化)。イオン(例えば、ナトリウム)の流入によって、活動電位が発生するまで、膜電位がさらに増大する。1ミリ秒以内に(つまり、急速な不活性化)または数秒から数分以内(つまり、緩慢な不活性化)に孔を閉じることによって、チャンネルは不活性化状態に迅速に戻る。イオンコンダクタンスは非常に選択的かつ効率的であり、そのため、記憶、運動および認知などのプロセスを微調整することができる(Lehmann-Hornら, Physiological Reviews 1999, 79: 1317-1358)。電位作動性イオンチャンネルの分子クローニングから、サブタイプの多様性が明らかになっており、特にナトリウムチャンネルの根底にある構造および機能についての理解が高められた(Nodaら, Nature 1986, 322: 826-828; Schallerら, Journal of Neuroscience 1995, 15: 3231-3242; Isomら, Neuron 1994, 12: 1183-1194; Isomら, Cell 1995, 83: 443-445)。

20

30

【0008】

電位作動性ナトリウムチャンネルは、約260kDaの孔形成α-サブユニット、およびヘテロメリック(heteromeric)複合体を形成する、2つの小さな補助的β-サブユニット、約36kDaのβ1および約33kDaのβ2で構成される。α-サブユニットおよび両方のβ-サブユニットは、高度にグリコシル化される(α、β1およびβ2それぞれに対して、約220kDa、約23kDa、約21kDaを有する脱グリコシル化サブユニット)。現在まで、β-サブユニットをコードする3つの異なる遺伝子が同定されている。β1-サブユニットはα-サブユニットと非共有結合するのに対して、β2-サブユニットはジスルフィド架橋によりα-サブユニットに共有結合する。β1-サブユニットと同様な第3のβ-サブユニットアイソフォーム(β3)が最近発見された(Morganら, Proceedings National Academy of Science USA 2000, 97: 2308-2313)。α-サブユニットは、ナトリウムチャンネル機能性に必要十分であると思われる。β-サブユニットは、不活性化の速度を加速することによって、Na⁺振幅ピーク電流を増加することによって、活性化速度を増加することによって、電位依存性を変えることによって、ナトリウムチャンネル機能を調節する(Pattonら, Journal Biological Chemistry 1994, 269: 17649-17655)。β2-サブユニットはβ1-サブユニットほど有効ではないと思われる。このように、どちらも、α-サブユニットの機能の調節に協力し得る。

40

50

【 0 0 0 9 】

ヒト $\beta 2$ - サブユニットは、タンパク質の成熟中に切断される、29アミノ酸のシグナルペプチド配列を有する糖タンパク質である。さらに、このタンパク質は、短い細胞内C末端セグメントと、1回膜貫通領域と、 α - サブユニットとのジスルフィド結合を形成することができる保存されたシステイン残基を含む、アミノ末端の大きな細胞外ドメインと、で構成される。 β - サブユニットは、細胞接着分子 (CAM)、例えばコンタクチンとの構造類似性を有する、免疫グロブリン様モチーフ、つまり免疫グロブリン様C2型ドメインを示す。したがって、 $\beta 2$ - サブユニットは、テネイシンCおよびテネイシンRなどの細胞外マトリックスと相互作用し得る (Isomら, Cell 1995, 83: 443-445)。神経細胞CAM (NCAM) およびミエリン結合糖タンパク質 (MAG) などの細胞接着分子は、 $\beta 2$ - サブユニットと同じ種類の免疫グロブリンの折りたたみを有する。 $\beta 2$ - サブユニットは、それらがCAMモチーフを特徴とする点から、および細胞表面膜を局所的に拡大する能力において、他の β - サブユニットと異なる。このように、ナトリウムチャネルの修飾因子であることに加えて、それらは、ナトリウムチャネルの発現に対して制御因子として細胞間接着相互作用において機能し、かつ原形質膜の特定の領域においてナトリウムチャネルの局在化および固定化を調節し得る。ヒト $\beta 2$ は、ミエリンタンパク質ゼロ (p0)、膜貫通型糖タンパク質および末梢神経ミエリンの主要な構成成分との類似性を有する (Eubanksら, Neuroreport 1997, 8: 2775-2779)。

【 0 0 1 0 】

SCN2B遺伝子のゲノム構造が1998年に報告された (GenBankアクセッション番号AF049496; AF049497; Bolinoら, European Journal of Human Genetics 1998, 6: 629-634; およびGenBankアクセッション番号AF049498; 完全なコード配列および相当するタンパク質配列)。マッピング研究によって、SCN2Bが染色体11q23に位置付けられた (Eubanksら, Neuroreport 1997, 8: 2775-2779)。SCN2Bは、186アミノ酸の成熟SCN2Bタンパク質、および29アミノ酸の推定シグナルペプチドを含む215アミノ酸のSCN2Bタンパク質をコードする、4個のエクソンおよび3個のイントロンを有する、約14kbのゲノムDNAにわたる (タンパク質配列および推定ドメイン: GenBankアクセッション番号O60939)。ヒトおよびラットSCN2Bタンパク質は、等しい長さであり、高度に保存されている (相同性89%および類似性93%)。

【 0 0 1 1 】

脳の4つのナトリウムチャネル、つまりSCN1A、SCN2A、SCN3A、およびSCN8Aは、中枢神経系において主な発現を示す。 $\beta 1$ および $\beta 2$ - サブユニット (それぞれ約2kbおよび約4kbの転写物) のmRNAは、広いが、特異な局所的発現パターンを有する。SCN1B遺伝子をコードする $\beta 1$ - サブユニットとは異なり、SCN2B遺伝子は中枢神経系のみに発現する。海馬傍回、皮質、顆粒層、および小脳のプルキンエ細胞において優勢な発現レベルが認められた。ラットの脳において、 $\beta 2$ の発現は、神経発生と並行して、胎児齢9日で始まり、軸索伸長およびシナプス形成に伴って急速に増加する (Isomら, Cell 1995, 83: 443-445)。

【 0 0 1 2 】

神経細胞ナトリウムチャネルのサブユニット遺伝子、SCN1AおよびSCN1Bに関して、熱性痙攣プラス (GEFS+) を伴う全身性てんかんを引き起こす、疾患の原因となる突然変異が同定されている。したがって、SCN2B遺伝子における変異によって、特発性全身性てんかんの共通のサブタイプがもたらされる結果にもなり得ることが推測される。ハウク (Haug) および共同研究者は、SCN2B遺伝子において新規な単一ヌクレオチド多型 (SNP) およびミスセンス突然変異 (Asn209Pro) を同定したが、かんしゃくにおける主要な感受性遺伝子としてSCN2B遺伝子を除外した (Haugら, Neuroreport 2000, 11: 2687-2689)。国際公開番号WO02/19966、WO02/087419、およびWO02/090532では、ナトリウムチャネル β - サブタイプを心血管疾患、炎症性疾患および筋疾患、癌およびかんしゃくに関連付けている。タンパク

質の相同性および染色体上の位置決定に基づいて、SCN2Bはまた、シャルコー・マリー・トゥース病(CMT4B)と呼ばれる、脱髄性の常染色体劣性運動および感覚神経障害に適した候補遺伝子であるとみなされている。しかしながら、この見解は、ボリノ(Bolino)および共同研究者によって意義が唱えられた(Bolinoら, European Journal of Human Genetics 1998, 6: 629-634)。それにもかかわらず、国際公開番号WO 01/79547では、脱髄疾患と関連する可能性があるSCN2B遺伝子における単一ヌクレオチド多型が述べられている。現在のところ、電位作動性イオンチャネルII型の $\beta 2$ -サブユニットとアルツハイマー病などの神経変性疾患との関連性について報告はない。

【0013】

ナトリウムチャネルは、神経障害の痛み、かんしゃく、および脳卒中を治療するための、局所麻酔薬、抗痙攣薬、抗不整脈薬としての様々な薬物の有用な標的である。多くの毒素、薬物、および無機カチオンが、中枢神経系関連の疾患においてナトリウムチャネルの α -サブユニットの遮断薬として医薬業界で使用されている。電位作動性イオンチャネルの阻害剤は、効力が弱く、比較的非特異的であり、それらの治療学的可能性が完全に開拓されていないにもかかわらず、既に市販されている。注目すべきことには、ナトリウムチャネルの β -サブユニットと相互作用する薬物は現在知られていない。したがって、 $\beta 2$ -サブユニットなどの電位作動性ナトリウムチャネルの選択的サブユニットに特異的な薬物を見出すことが望まれている。

【0014】

本発明は、アルツハイマー病患者からの脳試料における電位作動性ナトリウムチャネル β -2サブユニット($\beta 2$ -サブユニット、SCN2B)遺伝子発現の調節不全(dysregulation)を開示する。かかる調節不全は、年齢が一致する、健康な対照から得られた試料では認められない。現在まで、 $\beta 2$ -サブユニット遺伝子発現の調節不全と、アルツハイマー病および関連する神経変性疾患との関連性を実証する実験は記述されていない。同様に、 $\beta 2$ -サブユニット遺伝子における突然変異が、前記疾患と関連することは記述されていない。本発明で開示されているように、 $\beta 2$ -サブユニット遺伝子をアルツハイマー病と関連付けることによって、特に前記疾患を診断および治療する新規な方法が提供される。

【0015】

本明細書および特許請求の範囲で使用される単数形の「1つの(a)」、「1個の(an)」、「および「その(the)」は、指定がない限り、複数を含む。例えば、「(1つの)細胞」とは、複数の細胞なども含む。本明細書および特許請求の範囲で使用される「および/または」という用語は、この用語の前および後のフレーズが、代替として、または組み合わせで考えられるべきことを意味する。例えば、「レベルおよび/または活性の決定」という言い回しは、レベルのみ、または活性のみ、またはレベルと活性の両方が決定されることを示す。本明細書で使用される「レベル」という用語は、転写産物、例えばmRNA、または翻訳産物、例えばタンパク質またはポリペプチドのゲージ(gage)、尺度(measure)、量、または濃度を含むことを意味する。本明細書で使用される「活性」という用語は、転写産物または翻訳産物が生物学的効果をもたらす能力の尺度または生物活性分子のレベルの尺度として理解されるべきである。「活性」という用語は、酵素活性も意味する。本明細書で使用される「レベル」および/または「活性」という用語は、遺伝子発現レベルまたは遺伝子活性をさらに意味する。遺伝子発現は、遺伝子産物の産生を引き起こす転写および翻訳による、遺伝子中に含まれる情報の利用として定義することができる。「調節不全」とは、遺伝子発現のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションを意味するべきである。遺伝子産物は、RNAまたはタンパク質のいずれかを含み、遺伝子の発現の結果である。遺伝子産物の量は、遺伝子がどれほど活性であるかを測定するために使用することができる。本明細書および特許請求の範囲で使用される「遺伝子」という用語は、コード領域(エクソン)および非コード領域(例えば、プロモーターまたはエンハンサー、イントロン、リーダーおよびトレーラー配列)のどちらも含む。「ORF」という用語は「オープンリーディングフレーム」の頭字語であり、少なくとも1つの

読み枠に終止コドンを保有せず、したがって潜在的にアミノ酸の配列に翻訳することができる、核酸配列を意味する。「調節因子」は、誘導性および非誘導性プロモーター、エンハンサー、オペレーター、および遺伝子発現を操作および調節する他の要素を含む。本明細書で使用される「断片」という用語は、例えば、選択的スプライシングされた、または切り詰められた、または切断された転写産物または翻訳産物を含むことを意味する。本明細書で使用される「誘導體」という用語は、突然変異、RNA編集、または化学修飾、または別の方法で改変された転写産物、あるいは突然変異、または化学修飾、または別の方法で改変された翻訳産物を意味する。例えば、「誘導體」は、改変されたリン酸化、またはグリコシル化、またはアセチル化、脂質化などのプロセスによって、あるいは改変されたシグナルペプチド切断または他の種類の成熟切断によって生成される。これらのプロセスは、転写後に起こる。本発明および特許請求の範囲で使用される「修飾因子」という用語は、遺伝子、または遺伝子の転写産物、または遺伝子の翻訳産物のレベルおよび/または活性を変化または改変することができる分子を意味する。「修飾因子」は、遺伝子の転写産物または翻訳産物の生物活性を変化または改変することができることが好ましい。例えば、前記変調 (modulation) は、酵素活性の増加または減少、結合特性の変化、または遺伝子の前記翻訳産物の生物学的、機能的、または免疫学的特性の他の変化または改変であり得る。「作用物質 (agent)」、「試薬」または「化合物」という用語は、細胞、組織、体液に対して、または生体系の状況、または調べられたアッセイ系内で正または負の生物学的効果を有する、物質、化学物質、組成物または抽出物を意味する。それらは、標的のアゴニスト、アンタゴニスト、部分アゴニストまたは逆アゴニストであり得る。かかる作用物質、試薬、または化合物は、核酸、天然もしくは合成ペプチドまたはタンパク質複合体、または融合タンパク質であり得る。それらは、抗体、有機もしくは無機分子または組成物、小分子、薬物および前記作用物質のいずれかの組み合わせであってもよい。それらは、診断または治療の目的で試験するために使用することができる。「オリゴヌクレオチドプライマー」または「プライマー」という用語は、相補的塩基対のハイブリダイゼーションによって所定の標的ポリヌクレオチドにアニールすることができ、ポリメラーゼによって伸長することができる、短い核酸配列を意味する。それらは、特定の配列に特異的であるように選択されてもよいし、またはそれらはランダムに選択されてもよい。例えば、それらは、混合物中のすべての可能な配列をプライミングするだろう。本明細書で使用されるプライマーの長さは、10ヌクレオチド~80ヌクレオチドと様々である。「プローブ」は、本明細書に記載かつ開示されている核酸配列の短い核酸配列、またはそれと相補的な配列である。それらは、所定の配列の完全長配列、または断片、誘導體、アイソフォーム、または変異体 (variant) を含み得る。「プローブ」とアッセイされる試料とのハイブリダイゼーション複合体を同定することによって、その試料内の他の類似配列の存在を検出することが可能となる。本明細書で使用される「ホモログまたは相同性」とは、ヌクレオチドまたはペプチド配列と他のヌクレオチドまたはペプチド配列との関連性を説明するために当技術分野で使用されている用語であり、比較される前記配列間の同一性および/または類似性の程度によって決定される。当技術分野において、「同一性」および「類似性」という用語は、問い合わせ配列と、好ましくは同一種類の他の配列 (核酸またはタンパク質配列) とを互いにマッチングすることによって決定される、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列の関連性の程度を意味する。「同一性」および「類似性」を計算かつ決定するための、好ましいコンピュータプログラム法としては、限定されないが、GCG BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschulら, J. Mol. Biol. 1990, 215: 403-410; Altschulら, Nucleic Acids Res. 1997, 25: 3389-3402; Devereuxら, Nucleic Acids Res. 1984, 12: 387)、BLASTN 2.0 (Gish W., <http://blast.wustl.edu>, 1996-2002)、FASTA (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85: 2444-2448)、および最長のオーバーラップを有する1組のコンテイングを決定かつアラインするGCG Galign (Wilbur and Lipman, SIAM J. Appl. Math. 1984, 44: 557-567; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 1970, 48: 443-453) が挙げられる。本明細書で使用される「変異体 (variant)」という用語は、本発明

に開示されているポリペプチドおよびタンパク質に関して、それにおいて1つまたは複数のアミノ酸が、N末端および/またはC末端で、および/または本発明の天然ポリペプチドまたはタンパク質の天然アミノ酸配列内で付加および/または置換および/または欠失および/または挿入されているが、その本質的な特性を残している、いずれかのポリペプチドまたはタンパク質を意味する。さらに、「変異体」という用語は、より短いまたはより長いタイプのポリペプチドまたはタンパク質を含む。「変異体」は、電位作動性ナトリウムチャンネルβサブユニットタンパク質、特にSCN2B、配列番号1のアミノ酸配列と、少なくとも約80%の配列同一性、さらに好ましくは少なくとも約90%の配列同一性、最も好ましくは少なくとも約95%の配列同一性を有する配列も含む。配列番号1に示されるタンパク質分子の「変異体」は、例えば、非常に保存的な領域において保存的アミノ酸置換を有するタンパク質を含む。本発明の「タンパク質」および「ポリペプチド」は、SCN2B、配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質の変異体、断片および化学的誘導体を含む。それらは、天然から単離することができる、または組換え手段および/または合成手段によって産生することができるタンパク質およびポリペプチドを含むことができる。天然に存在するタンパク質またはポリペプチドとは、天然に存在する切断型または分泌型、天然に存在する変異型（例えば、スプライスパリアント）および天然に存在する対立遺伝子変異体（allelic variant）を意味する。「単離」という用語は、変化した、かつ/またはそれらの自然環境から取り除かれた、つまりそれらが通常存在する細胞または生体から単離された、あるいはそれらが自然界でそれと関連すると見出されている共存する構成要素から分離されるか、または本質的に精製された、分子または物質を意味するとみなされる。この概念はさらに、かかる分子をコードする配列が、それらがその天然状態では結合しない、ポリヌクレオチドに人の手によって結合することができることと、かかる分子を組換えおよび/または合成手段によって産生することができることを意味する。前記目的のために、これらの配列が当業者に公知の方法によって生体または非生体に導入されたとしても、これらの配列が前記生物にまだ存在するとしても、それでもなお、単離されていると見なされる。本発明において、「リスク」、「感受性」、および「素因」という用語は、神経変性疾患、好ましくはアルツハイマー病を発症する確率に関して使用される。「AD」という用語はアルツハイマー病を示す。本明細書で使用される「AD型神経病理学」とは、本明細書に記載され、かつ現況技術文献から一般的に知られているように、神経病理学的、神経生理学的、組織病理学的および臨床的に顕著な特徴を意味する（以下参照：Iqbal, Swaab, Winblad and Wisniewski, Alzheimer's Disease and Related Disorders (Etiology, Pathogenesis, and Therapeutics), Wiley & Sons, New York, Weinheim, Toronto, 1999; Scinto and Daffner, Early Diagnosis of Alzheimer's Disease, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2000; Mayeux and Christen, Epidemiology of Alzheimer's Disease: From gene to Prevention, Springer Press, Berlin, Heidelberg, New York, 1999; Younkin, Tanzi and Christen, Presenilins and Alzheimer's Disease, Springer Press, Berlin, Heidelberg, New York, 1998）。本発明による神経変性疾患または障害は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、ピック病、前頭側頭型痴呆、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、脳血管性痴呆、多系統萎縮症、嗜銀顆粒性痴呆および他のタウオパシー、および軽い認知障害を含む。神経変性プロセスを伴う他の疾患は、例えば、虚血性脳卒中、加齢性黄斑変性症、ナルコレプシー、運動ニューロン疾患、プリオン病、外傷性神経損傷および修復、および多発性硬化症である。

10

20

30

40

50

【0016】

一態様において、本発明は、被験者における神経変性疾患を診断する、またはその予後を判定する、または被験者が前記疾患を発症するリスクが高いかどうかを決定する方法を特徴とする。この方法は：前記被験者からの試料における（i）SCN2Bをコードする遺伝子の転写産物、および/または（ii）SCN2Bをコードする遺伝子の翻訳産物、および/または（iii）前記転写産物または翻訳産物の断片、または誘導体、または変異体のレベルまたは活性、または前記レベルおよび前記活性の両方を決定する段階と、前

記レベルおよび/または前記活性を既知の疾患または健康状態を表す基準値と比較し、それによって前記被験者における前記神経変性疾患を診断するか、またはその予後を判定するか、または前記被験者が前記神経変性疾患を発症するリスクが高いかどうかを決定する段階と、を含む。

【0017】

本発明は、本発明に開示される、核酸配列、またはその断片もしくは変異体に固有である、プライマーおよびプローブの作製および使用にも関する。オリゴヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブは、蛍光、生物発光、磁気、または放射性物質で特異的に標識することができる。本発明はさらに、適切な組み合わせで前記の特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを使用した、前記核酸配列、またはその断片もしくは変異体の検出および作製に関する。当業者によく知られている方法であるPCR分析を前記プライマーの組み合わせを用いて行い、核酸を含有する試料から前記の遺伝子特異的核酸配列を増幅することができる。かかる試料は、健康な被験者または疾患のある被験者から採取される。増幅した結果、特異的核酸産物が得られるかどうか、および異なる長さの断片が得られるかどうかは、神経変性疾患、特にアルツハイマー病の指標となり得る。このように、本発明は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病に関連する、検討すべき核酸配列を含有する所定の試料における遺伝子突然変異および単一ヌクレオチド多型の検出に有用な、全コード配列および遺伝子配列までの長さで少なくとも10塩基の核酸配列、オリゴヌクレオチドプライマー、およびプローブを提供する。この特徴は、迅速なDNAベースの診断試験の開発に、好ましくはキットのフォーマットにおいても有用性を有する。

10

20

【0018】

他の態様において、本発明は、被験者における神経変性疾患の進行をモニターする方法を特徴とする。前記被験者からの試料における(i)SCN2Bをコードする遺伝子の転写産物、および/または(ii)SCN2Bをコードする遺伝子の翻訳産物、および/または(iii)前記転写産物または翻訳産物の断片、または誘導体、または変異体のレベルまたは活性、または前記レベルおよび前記活性の両方が決定される。前記レベルおよび/または前記活性は、既知の疾患または健康状態を表す基準値と比較される。それによって前記被験者における前記神経変性疾患の進行がモニターされる。

【0019】

さらに他の態様において、本発明は、神経変性疾患の治療を評価する方法であって、前記疾患の治療を受けた前記被験者から採取した試料における(i)SCN2Bをコードする遺伝子の転写産物、および/または(ii)SCN2Bをコードする遺伝子の翻訳産物、および/または(iii)前記転写産物または翻訳産物の断片、または誘導体、または変異体のレベルまたは活性、または前記レベルおよび前記活性の両方を決定する段階を含む方法の特徴とする。前記レベル、または前記活性、または前記レベルおよび前記活性のどちらも、既知の疾患または健康状態を表す基準値と比較され、それによって前記神経変性疾患の治療が評価される。

30

【0020】

本明細書において特許請求される方法、キット、組換え非ヒト動物、分子、アッセイ、本発明の使用の好ましい実施形態では、ヒト電位作動性ナトリウムチャンネルβサブユニットタンパク質をコードする前記遺伝子は、Genbankアクセッション番号AF049498、AF049496、AF049497、AF107028、AX376000、およびGenbankデータベースからのESTのcDNA配列に相当するmRNA(配列番号2)から推論されたGenbankアクセッション番号O60939(タンパク質ID)、配列番号1によって表されるβ-2サブユニットタンパク質またはβ2-タンパク質とも呼ばれるヒト電位作動性ナトリウムチャンネルII型βサブユニット(SCN2B)をコードする遺伝子である。本発明において、SCN2Bは、配列番号1(Genbankアクセッション番号O60939)のタンパク質をコードする配列番号2の核酸配列も意味する。本発明において、その用語が本明細書で使用されているように、前記配列が「単離」される。さらに、本発明において、前記SCN2Bタンパク質をコードする遺伝

40

50

子は一般に、SCN2B遺伝子、または単にSCN2Bとも呼ばれ、SCN2Bのタンパク質は一般に、SCN2Bタンパク質、または単にSCN2Bとも呼ばれる。

【0021】

本明細書において特許請求される方法、キット、組換え非ヒト動物、分子、アッセイ、本発明の使用の他の好ましい実施形態において、前記神経変性疾患または障害はアルツハイマー病であり、前記被験者はアルツハイマー病に罹患している。

【0022】

本発明は、AD患者の特定の脳領域においてSCN2Bをコードする遺伝子の検出および差次的発現および調節を開示する。結果的に、SCN2B遺伝子およびその相当する転写産物および/または翻訳産物は、ADに通常認められる局所選択的神経細胞変性において原因となる役割を有する。その代わりとして、SCN2Bは、残存している神経細胞に神経保護機能を与える。これらの開示内容に基づいて、本発明は、神経変性疾患、特にADの診断的評価および予後、ならびにその素因の同定に有用性を有する。さらに、本発明は、かかる疾患の治療を受ける患者を診断的にモニターする方法を提供する。

10

【0023】

分析かつ測定すべき試料は、脳組織または他の組織、または体細胞を含む群から選択されることが好ましい。試料は、脳脊髄液または他の体液、例えば唾液、尿、血液、血清血漿、または粘液を含むことができる。本発明に従って、神経変性疾患の診断、予後判定、その疾患の進行のモニタリングまたはその疾患の治療の評価の方法は生体外(ex corpore)で行うことができることが好ましく、かかる方法は好ましくは、被験者または患者から除去、採取、または単離された試料、例えば体液または細胞に関する。

20

【0024】

他の好ましい実施形態において、前記基準値は、前記神経変性疾患に罹患していない被験者からの試料における(i)SCN2Bをコードする遺伝子の転写産物、および/または(ii)SCN2Bをコードする遺伝子の翻訳産物、および/または(iii)前記転写産物または翻訳産物の断片、または誘導体、または変異体のレベルまたは活性、または前記レベルおよび前記活性の両方の値である。

【0025】

好ましい実施形態において、前記被験者から採取された試料細胞、または組織、または体液における、SCN2Bをコードする遺伝子の転写産物、および/またはSCN2Bをコードする遺伝子の翻訳産物、および/またはその断片、またはその誘導体もしくは変異体のレベルまたは活性における、既知の健康状態を表す基準値に対する変化から、神経変性疾患、特にADの診断、または予後、またはそれに罹患する高いリスクが示される。

30

【0026】

好ましい実施形態において、被験者の試料から抽出されたRNAの逆転写により得られたcDNAからの前記遺伝子特異的配列を増幅するために、プライマーの組み合わせを使用した定量的PCR分析を用いて、SCN2B遺伝子の転写産物レベルの測定が被験者からの試料で行われる。

【0027】

前記遺伝子に特異的なプローブを用いたノーザンブロット法も適用することができる。チップベースのマイクロアレイ技術によって、転写産物を測定することがさらに好ましい。これらの技術は当業者には公知である(Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001; Schena M., Microarray Biochip Technology, Eaton Publishing, Natick, MA, 2000参照)。イムノアッセイの一例としては、国際公開番号WO 02 / 14543に開示かつ記載されている酸素活性の検出および測定が挙げられる。

40

【0028】

さらに、SCN2Bをコードする遺伝子の翻訳産物、および/または前記翻訳産物の断片、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベルおよび/または活性、および/または前記翻訳産物および/またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体の活性のレベルを、

50

イムノアッセイ、活性アッセイおよび/または結合アッセイを用いて検出することができる。これらのアッセイでは、抗タンパク質抗体または抗タンパク質抗体に結合する二次抗体のいずれかに結合する、酵素、クロモ力学的 (chromodynamic)、放射性、磁気、または発光標識の使用によって、前記タンパク質分子と抗タンパク質抗体との結合の量を測定することができる。さらに他の高親和性リガンドを使用してもよい。使用することができるイムノアッセイとしては、例えば、E L I S A、ウェスタンブロット、および当業者に公知の他の技術が挙げられる (Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999 and Edwards R, Immunodiagnosics: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford; England, 1999参照)。これらすべての検出技術は、マイクロアレイ、タンパク質 - アレイ、抗体マイクロアレイ、組織マイクロアレイ、電子バイオチップまたはタンパク質 - チップベース技術のフォーマットに用いることもできる (Schena M., Microarray Biochip Technology, Eaton Publishing, Natick, MA, 2000参照)。

10

20

【0029】

好ましい実施形態において、前記被験者から採取した一連の試料における、(i) SCN2Bをコードする遺伝子の転写産物、および/または(ii) SCN2Bをコードする遺伝子の翻訳産物、および/または(iii)前記転写産物または翻訳産物の断片、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベルまたは活性、または前記レベルと前記活性の両方を、前記疾患の進行をモニターするために長期間にわたって比較する。他の好ましい実施形態において、前記被験者は、前記試料採取の1つまたは複数の前に治療を受ける。さらに他の好ましい実施形態において、前記レベルおよび/または活性は、前記被験者の前記治療前および後に決定される。

【0030】

他の態様において、本発明は、被験者における神経変性疾患、特にADを診断するか、またはその予後を判定するための、または神経変性疾患、特にADを発症する、被験者の傾向または素因を決定するためのキットであって、

(a) (i) SCN2Bをコードする遺伝子の転写産物を選択的に検出する試薬、および(ii) SCN2Bをコードする遺伝子の翻訳産物を選択的に検出する試薬からなる群から選択される、少なくとも1種類の試薬と、

(b) - 前記被験者からの試料において、SCN2Bをコードする遺伝子の前記転写産物および/または前記翻訳産物のレベルまたは活性、または前記レベルおよび前記活性の両方を決定すること；

- 神経変性疾患、特にADを診断する、またはその予後を判定すること、またはかかる疾患を発症する被験者の傾向または素因を決定すること；により、神経変性疾患、特にADを診断する、またはその予後を判定するための、またはかかる疾患を発症する被験者の傾向または素因を決定するための説明書と、を備え、既知の健康状態を表す基準値と比較される前記転写産物および/または前記翻訳産物の異なるレベルまたは活性、または前記レベルおよび前記活性の両方；あるいは既知の健康状態を表す基準値と同様な、または等しい前記転写産物および/または前記翻訳産物のレベルまたは活性、または前記レベルおよび前記活性の両方によって、神経変性疾患、特にADの診断または予後、あるいはかかる疾患を発症する傾向または素因の増加が示される、キットを特徴とする。本発明によるキットは、神経変性疾患、特にADを発症するリスクのある個体を同定するのに特に有用である。結果として、本発明によるキットは、疾患発症前に、その疾患の間に不可逆的損傷を受ける前に、早期の予防策または治療的介入のために、同定された個体を標的とする手段として役立つ。さらに、好ましい実施形態において、本発明において特徴とされるキットは、被験者における神経変性疾患、特にADの進行をモニターするのに、かつ前記被験者のかかる疾患の治療的処置の成功または失敗をモニターするのに有用である。

30

40

【0031】

他の態様において、本発明は、被験者において神経変性疾患、特にADを治療または予防する方法であって、(i) SCN2Bをコードする遺伝子、および/または(ii) S

50

C N 2 B をコードする遺伝子の転写産物、および / または (i i i) S C N 2 B をコードする遺伝子の翻訳産物、および / または (i v) (i) ~ (i i i) の断片、もしくは誘導体、もしくは変異体のレベル、または活性、または前記レベルおよび前記活性の両方に直接的または間接的に影響を及ぼす、治療有効量または予防有効量の作用物質 (1 種または複数種) を前記被験者に投与することを含む方法の特徴とする。前記作用物質は小分子を含むか、あるいはそれは、ペプチド、オリゴペプチド、またはポリペプチドも含み得る。前記ペプチド、オリゴペプチド、またはポリペプチドは、S C N 2 B タンパク質、をコードする遺伝子の翻訳産物、またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体のアミノ酸配列を含み得る。本発明に従って、神経変性疾患、特に A D を治療または予防するための作用物質は、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、またはポリヌクレオチドからなり得る。前記オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、センス方向またはアンチセンス方向のいずれかに、S C N 2 B タンパク質をコードする遺伝子のヌクレオチド配列を含み得る。

10

【 0 0 3 2 】

好ましい実施形態において、この方法は、前記作用物質 (1 種または複数種) を投与するための、遺伝子治療および / またはアンチセンス核酸技術のそれ自体既知の方法の適用を含む。一般に、遺伝子治療はいくつかのアプローチ：突然変異した遺伝子の分子置換、治療用タンパク質の合成で得られた新たな遺伝子の付加、および組換え発現法による、または薬物による内因性細胞遺伝子発現の調節を含む。遺伝子導入技術は詳細に記述されており (例えば、Behr, Acc Chem Res 1993, 26: 274-278 and Mulligan, Science 1993, 260: 926-931 参照)、直接的遺伝子導入技術、例えば細胞内への D N A の機械的微量注入ならびに生物学的ベクター (組換えウイルス、特にレトロウイルスのような) またはモデルリポソームを用いた間接的技術、またはポリカチオンでの D N A 共沈、化学的手段 (溶媒、洗剤、ポリマー、酵素) または物理的手段 (機械的、浸透性、熱性、電気ショック) による細胞膜摂動 (cell membrane perturbation) を用いたトランスフェクションに基づく技術が挙げられる。中枢神経系への出生後遺伝子導入が詳細に記述されている (例えば、Wolff, Curr Opin Neurobiol 1993, 3: 743-748 参照)。

20

【 0 0 3 3 】

特に、本発明は、アンチセンス核酸治療により神経変性疾患を治療または予防する方法、つまりアンチセンス核酸またはその誘導体を特定の重要な細胞に導入することにより、不適切に発現した、または欠陥のある遺伝子をダウンレギュレートする方法の特徴とする (例えば、Gillespie, DN&P 1992, 5: 389-395; Agrawal and Akhtar, Trends Biotechnol 1995, 13: 197-199; Crooke, Biotechnology 1992, 10: 882-6 参照)。ハイブリダイゼーション法を除いて、リボザイム、つまり疾患のメッセージを運ぶ R N A を破壊する、酵素として作用する R N A 分子の適用も記述されている (例えば、Barinaga, Science 1993, 262: 1512-1514 参照)。好ましい実施形態において、治療されるべき被験者はヒトであり、治療用のアンチセンス核酸またはその誘導体は、S C N 2 B をコードする遺伝子の転写物に対して作られる。中枢神経系、好ましくは被験者の脳の細胞をこのようにして治療することが好ましい。細胞侵入 (Cell penetration) は、アンチセンス核酸およびその誘導体の担体粒子への結合、または上述の技術など公知の方法によって行うことができる。治療用標的オリゴデオキシヌクレオチドを投与する方法は当業者にはよく知られている (例えば、Wickstrom, Trends Biotechnol 1992, 10: 281-287 参照)。場合によっては、単なる局所適用によって送達を行うことができる。その他のアプローチは、局所適用の細胞内発現に向けられている。この方法では、標的核酸の領域に相補的な R N A の合成を指示する組換え遺伝子で細胞が e x v i v o で形質転換される。細胞内に発現したアンチセンス R N A の治療的使用は手順上、遺伝子治療と同様である。R N A 干渉 (R N A i) として様々に知られている二本鎖 R N A の使用によって遺伝子の細胞内発現を調節する、最近開発された方法は、核酸治療のもう 1 つの有効なアプローチであり得る (Hannon, Nature 2002, 418: 244-251)。

30

40

【 0 0 3 4 】

50

他の好ましい実施形態において、適切な細胞、例えばCHO細胞またはHEK293細胞、または他の神経細胞経において電位作動性ナトリウムチャンネルSCN2Aまたは他の電位作動性ナトリウムチャンネルタンパク質と共発現するSCN2Bへの化合物および/または作用物質の作用を調査する方法が提供される。それによって、SCN2Aと、または他の電位作動性ナトリウムチャンネルタンパク質と共発現したSCN2Bによって仲介される、ナトリウム電流への化合物および/または作用物質の電気生理学的効果が調べられる。前記試験を行うために、ヒト遺伝子産物SCN2BをコードするcDNAを適切な発現ベクターにクローニングする。SCN2AをコードするcDNA (Genbankアクセッション番号AF327224~AF327246) または他の電位作動性ナトリウムチャンネルをコードするcDNAを他の適切な発現ベクターにクローニングする。好ましくは試薬のようなDMRIE-C (陽イオン性脂質1, 2 - ジミリステルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシエチルアンモニウムブロマイド - コレステロールのリポソーム形成) を使用して、上記のような適切な細胞系に前記プラスミドをトランスフェクトする。パッチクランプ実験を電圧固定モードで行うことができ (Hamillら, Pflugers Arch. 1981, 391: 85-100)、全細胞電流が記録され、得られたシグナルは、適切なソフトウェア、例えばPulse/Pulsefit (HEKA, Lambrecht, ドイツ) を使用して、増幅され、デジタル化され、保存かつ解析される。電流の「低下 (run-down)」または「上昇 (run-up)」 (Varnumら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90: 11528-11532) が依然として化合物および/または作用物質効果の評価には強すぎる場合には、前記電位作動性ナトリウムチャンネルの仲介電流についての研究は、非特異的な電流振幅変化を防ぐために、穿孔パッチクランプ法で行うことができる (Dartら, J. Physiol. 1995, 483: 29-39; Dinesh & Hablitz, Brain Res. 1990, 535: 318-322)。SCN2Aまたは他のナトリウムチャンネルタンパク質と共発現するSCN2Bに対する試験化合物の効果および可逆性を研究するための刺激プロトコルの一例が以下に示される。SCN2BをSCN2Aまたは他のナトリウムチャンネルと共に共発現する細胞は、例えば - 80 mV の保持電位で固定されるだろう。パルスサイクル速度は10秒である。化合物および/または作用物質の試験では、安定にトランスフェクトされた細胞を、例えば100ミリ秒間、例えば - 80 mV の保持電位から、例えば - 100 mV または - 120 mV に過分極させ、続いて、例えば - 60 mV ~ + 60 mV の試験電位に1秒間脱分極させることができる。試験パルスのピーク電流振幅が解析に使用されるだろう。この方法は、SCN2Aまたは他の電位作動性ナトリウムチャンネルと共発現されるSCN2Bの生物物理学的特性を開く、閉じる、活性化する、不活性化する、または修飾することができる化合物および/または作用物質を同定かつ試験するのに適している。このように同定かつ試験された電位作動性ナトリウムチャンネルの修飾因子は学習および記憶機能に影響する可能性があり、例えば神経変性疾患、特にアルツハイマー病の治療的アプローチに使用することができる。

10

20

30

40

50

【0035】

他の好ましい実施形態において、この方法は、前記被験者の中枢神経系、好ましくは脳に、ドナー細胞、または移植片拒絶を最小限に抑えるため、または低減するために処理されることが好ましいドナー細胞を移植することを含む方法であって、前記ドナー細胞が、前記作用物質 (1種または複数種) をコードする少なくとも1つの導入遺伝子を挿入することによって遺伝子改変される、方法を含む。前記導入遺伝子は、ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターによって運ばれる。導入遺伝子は、導入遺伝子をコードするDNAの非ウイルス性の物理的トランスフェクション、特に微量注入によってドナー細胞に挿入することができる。導入遺伝子の挿入は、電気穿孔法、化学的に仲介されるトランスフェクション、特にリン酸カルシウムトランスフェクション、またはリポソーム仲介トランスフェクションによって行うこともできる (Mc Celland and Pardee, Expression Genetics: Accelerated and High-Throughput Methods, Eaton Publishing, Natick, MA, 1999)。

【0036】

好ましい実施形態において、神経変性疾患、特にADを治療および予防するための前記

作用物質は、前記被験者に被験者細胞を導入することを含むプロセスであって、前記被験者細胞が、前記治療用タンパク質をコードするDNAセグメントを挿入するために *in vitro* で処理され、前記被験者細胞が前記被験者において治療有効量の前記治療用タンパク質を *in vivo* で発現するプロセスによって、前記被験者、好ましくはヒトに投与することができる治療用タンパク質である。前記DNAセグメントは、ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターによって *in vitro* で前記細胞に挿入することができる。

【0037】

本発明による治療法は、既に記載の細胞および遺伝子治療法のいずれかと組み合わせられる、治療的クローニング、移植、および胚幹細胞または胚生殖細胞および成体神経幹細胞を使用した幹細胞治療の適用を含む。幹細胞は、全能性または多能性である。それらは臓器特異的でもあり得る。疾患および/または損傷のある脳細胞または組織を修復する方法は、(i) 成体組織からドナー細胞を採取することを含む。これらの細胞の核は、遺伝物質がそれから除去されている、未受精卵細胞に移植される。胚幹細胞が、体細胞核導入を受けた細胞の胚盤胞段階から単離される。次いで、分化因子を使用することによって、幹細胞の、特殊 (specialized) 細胞型、好ましくは神経細胞への定方向の発達が生じるか (Lanzaら, Nature Medicine 1999, 9: 975-977)、または(ii) *in vitro* での増殖のために、中枢神経系または骨髄 (間葉幹細胞) から単離された成体幹細胞を精製し、続いてグラフトおよび移植するか、または(iii) 内因性神経幹細胞を直接誘導して、増殖させ、移行し、機能性神経細胞に分化させる (Peterson DA, Curr. Opin. Pharmacol. 2002, 2: 34-42)。成体の脳の胚中心には神経損傷または機能不全がないことから、成体神経幹細胞は、損傷または疾患のある脳組織の修復に大きな可能性を秘めている (Colman A, Drug Discovery World 2001, 7: 66-71)。

【0038】

好ましい実施形態において、本発明による治療または予防を受ける被験者は、ヒト、実験動物、例えばマウスまたはラット、家畜、または非ヒトの霊長類である。実験動物は、神経変性疾患のための非ヒト動物モデル、例えば、AD型神経病理学を有する遺伝子導入マウスおよび/またはノックアウトマウスである。

【0039】

他の態様において、本発明は、(i) SCN2Bをコードする遺伝子、および/または(ii) SCN2Bをコードする遺伝子の転写産物、および/または(iii) SCN2Bをコードする遺伝子の翻訳産物、および/または(iv) (i) ~ (iii) の断片、もしくは誘導体、もしくは変異体からなる群から選択される少なくとも1種類の物質の活性またはレベル、または前記活性および前記レベルの両方の修飾因子を特徴とする。

【0040】

その他の態様では、本発明は、前記修飾因子と、好ましくは薬剤担体とを含む医薬組成物を特徴とする。前記担体は、希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを意味し、それと共に修飾因子が投与される。

【0041】

他の態様では、本発明は、医薬組成物において使用される、(i) SCN2Bをコードする遺伝子、および/または(ii) SCN2Bをコードする遺伝子の転写産物、および/または(iii) SCN2Bをコードする遺伝子の翻訳産物、および/または(iv) (i) ~ (iii) の断片、もしくは誘導体、もしくは変異体からなる群から選択される少なくとも1種類の物質の活性またはレベル、または前記活性および前記レベルの両方の修飾因子を特徴とする。

【0042】

他の態様では、本発明は、神経変性疾患、特にADを治療または予防する薬物を製造するための、(i) SCN2Bをコードする遺伝子、および/または(ii) SCN2Bをコードする遺伝子の転写産物、および/または(iii) SCN2Bをコードする遺伝子の翻訳産物、および/または(iv) (i) ~ (iii) の断片、もしくは誘導体、もし

くは変異体からなる群から選択される少なくとも１種類の物質の活性またはレベル、または前記活性および前記レベルの両方の修飾因子の使用を提供する。

【００４３】

一態様において、本発明は、治療有効量または予防有効量の前記医薬組成物で満たされた１つまたは複数の容器を備えたキットも提供する。

【００４４】

他の態様において、本発明は、SCN2Bをコードする非天然遺伝子配列、またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体を含む、組換え非ヒト動物を特徴とする。前記組換え非ヒト動物の作製は、(i)前記遺伝子配列および選択マーカー配列を含有する遺伝子ターゲティング構築物を提供する段階と、(ii)非ヒト動物の幹細胞に前記ターゲティング構築物を導入する段階と、非ヒト胚に前記非ヒト動物幹細胞を導入する段階と、(iv)偽妊娠非ヒト動物に前記胚を移植する段階と、(v)前記胚を臨月まで発達させる段階と、(vi)そのゲノムが両方の対立遺伝子において前記遺伝子配列の修飾を含む、遺伝子改変非ヒト動物を同定する段階と、(vii)段階(vi)の遺伝子改変非ヒト動物を繁殖させて、そのゲノムが前記内因性遺伝子の修飾を含む遺伝子改変非ヒト動物を得る段階と、を含み、前記遺伝子が、誤発現されるか、または過小発現されるか、または過剰発現され、かつ前記破壊または改変によって、神経変性疾患、特にADと同様な神経病理学の症状を発症する素因を示す前記非ヒト動物が得られる。かかる動物を作製かつ構築する方法および技術は当業者には公知である(例えば、Capecchi, Science 1989, 244: 1288-1292; Hoganら, Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1994 and Jackson and Abbott, Mouse Genetics and Transgenetics: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, England, 1999参照)。神経変性疾患、特にADを研究するための動物モデルとして、かかる組換え非ヒト動物を利用することが好ましい。かかる動物は、神経変性疾患、特にアルツハイマー病を治療するための診断学および治療学の開発において、化合物、作用物質および修飾因子をスクリーニングし、試験し、かつバリデートするのに有用である。好ましい実施形態において、前記組換え非ヒト動物は、SCN2Bタンパク質をコードする非天然遺伝子配列、またはその断片、もしくは誘導体、またはその変異体を含む。

10

20

30

【００４５】

他の態様において、本発明は、神経変性疾患、特にAD、または関連する疾患および障害の修飾因子であって、(i)SCN2Bをコードする遺伝子、および/または(ii)SCN2Bをコードする遺伝子の転写産物、および/または(iii)SCN2Bをコードする遺伝子の翻訳産物、および/または(iv)(i)~(iii)の断片、もしくは誘導体、もしくは変異体からなる群から選択される１種または複数種の物質の修飾因子をスクリーニングするアッセイを特徴とする。このスクリーニング法は、(a)細胞を試験化合物と接触させる段階と、(b)(i)~(iv)に記載の１種または複数種の物質の活性またはレベル、またはその活性およびレベルの両方を測定する段階と、(c)前記試験化合物と接触させていない対照細胞における前記物質の活性またはレベル、またはその活性およびレベルの両方を測定する段階と、(d)段階(b)および(c)の細胞における物質のレベルを比較する段階と、を含み、接触させた細胞における前記物質の活性および/またはレベルの変化によって、試験化合物が前記疾患および障害の修飾因子であることが示される。

40

【００４６】

その他の一態様において、本発明は、神経変性疾患、特にAD、または関連する疾患および障害の修飾因子であって、(i)SCN2Bをコードする遺伝子、および/または(ii)SCN2Bをコードする遺伝子の転写産物、および/または(iii)SCN2Bをコードする遺伝子の翻訳産物、および/または(iv)(i)~(iii)の断片、もしくは誘導体、もしくは変異体からなる群から選択される１種または複数種の物質の修飾因子のスクリーニングアッセイであって、(a)神経変性疾患または関連する疾患もしくは

50

は障害を発症する素因が与えられた、または既に発症している非ヒト試験動物に試験化合物を投与する段階と、(b)(i)~(iv)に記載の1種または複数種の物質の活性および/またはレベルを測定する段階と、(c)前記症状を発症する素因が等しく与えられた、または前記症状を既に発症している対応する(matched)非ヒト対照動物であり、かかる試験化合物がそれに投与されていない非ヒト動物における前記物質の活性および/またはレベルを測定する段階と、(d)段階(b)および(c)の動物における物質の活性および/またはレベルを比較する段階と、を含み、非ヒト試験動物における物質の活性および/またはレベルの変化によって、試験化合物が前記疾患および障害の修飾因子であることが示される、スクリーニングアッセイを特徴とする。

【0047】

10

好ましい実施形態において、前記非ヒト試験動物および/または前記非ヒト対照動物は、天然SCN2B遺伝子転写制御因子ではない転写制御因子の制御下にて、SCN2Bをコードする遺伝子、またはその断片、またはその誘導体、または変異体を発現する、組換え非ヒト動物である。

【0048】

他の実施形態において、本発明は、(i)上述のスクリーニングアッセイの方法によって神経変性疾患の修飾因子を同定する段階と、(ii)修飾因子と薬剤担体とを混合する段階と、を含む、薬物を製造する方法を提供する。しかしながら、前記修飾因子は、他の種類のスクリーニングアッセイによっても同定可能である。

【0049】

20

他の態様において、本発明は、SCN2Bをコードする遺伝子の翻訳産物、またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体と、リガンドとの結合を阻害するための、化合物を試験するための、好ましくは複数の化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。前記スクリーニングアッセイは、(i)前記SCN2B翻訳産物、またはその断片もしくは誘導体の液体懸濁液を複数の容器に添加する段階と、(ii)前記阻害のために、スクリーニングすべき化合物(1種または複数種)を前記複数の容器に添加する段階と、(iii)検出可能なリガンド、好ましくは蛍光標識リガンドを前記容器に添加する段階と、(iv)前記SCN2B翻訳産物、またはその前記断片、もしくは誘導体、もしくは変異体と、前記化合物(1種または複数種)と、前記検出可能なリガンド、好ましくは蛍光標識リガンドをインキュベートする段階と、(v)前記SCN2B翻訳産物と、またはその前記断片、もしくは誘導体、もしくは変異体と結合する、好ましくは蛍光の量を測定する段階と、(vi)前記化合物のうちの1種または複数種による、前記SCN2B翻訳産物、またはその前記断片、もしくは誘導体、もしくは変異体への前記リガンドの結合の阻害の程度を決定する段階と、を含む。前記SCN2B翻訳産物、またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体を人工リポソームに再構成して、相当するプロテオリポソームを産生し、リガンドと前記SCN2B翻訳産物との結合の阻害を決定することが好ましい。洗浄剤からSCN2B翻訳産物をリポソームに再構成する方法が詳述されている(Schwarzら, Biochemistry 1999, 38: 9456-9464; Krivosheev and Usanov, Biochemistry -Moscow 1997, 62: 1064-1073)。蛍光標識リガンドを利用する代わりに、一部の態様では、当業者に公知の他の検出可能な標識、例えば放射性標識を使用し、しかるべくそれを検出することが好ましい。前記方法は、新規な化合物を同定するのに、ならびにSCN2Bをコードする遺伝子の遺伝子産物、またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体へのリガンドの結合を阻害するそれらの能力において改善された、または最適化された化合物を評価するのに、有用であり得る。担体粒子の使用に基づくこの場合における、蛍光結合アッセイの一例が、国際公開番号WO00/52451に開示かつ記述されている。他の例は、国際公開番号WO02/01226に記載の競合アッセイ法である。本発明のスクリーニングアッセイに好ましいシグナル検出法が、以下の国際公開番号WO96/13744、WO98/16814、WO98/23942、WO99/17086、WO99/34195、WO00/66985、WO01/59436、WO01/59416に記載されている。

50

【0050】

他の一実施形態では、本発明は、(i) 上述の阻害的結合アッセイによって、リガンドと、SCN2Bをコードする遺伝子の遺伝子産物との結合の阻害剤として化合物を同定する段階と、(ii) その化合物を薬剤担体と混合する段階と、を含む、薬物を製造する方法を提供する。しかしながら、前記化合物は、他の種類のスクリーニングアッセイによっても同定可能である。

【0051】

他の態様において、本発明は、SCN2Bをコードする遺伝子の翻訳産物、またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体に前記化合物が結合する程度を決定するために、化合物を試験する、好ましくは、複数の化合物をスクリーニングするアッセイを特徴とする。前記スクリーニングアッセイは、(i) 前記SCN2B翻訳産物、またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体の液体懸濁液を複数の容器に添加する段階と、(ii) 前記結合についてスクリーニングされるべき、1種類の検出可能な、好ましくは蛍光標識された化合物、または複数種の検出可能な、好ましくは蛍光標識された化合物を前記複数の容器に添加する段階と、(iii) 前記SCN2B翻訳産物、または前記のその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体、および前記の検出可能な、好ましくは蛍光標識された化合物(1種または複数種)をインキュベートする段階と、(iv) 前記SCN2B翻訳産物、または前記のその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体と結合した、好ましくは蛍光の量を測定する段階と、(v) 前記SCN2B翻訳産物、または前記のその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体への前記化合物の1種または複数種による結合の程度を決定する段階と、を含む。この種類のアッセイでは、蛍光標識を使用することが好ましい。しかしながら、他の種類の検出可能な標識も使用することができる。この種類のアッセイにおいても、本発明に記載の人工リポソームに、SCN2B翻訳産物またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体を再構成することが好ましい。前記アッセイは、新規な化合物の同定、ならびにSCN2B翻訳産物、またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体に結合するそれらの能力において改善された、または最適化された化合物の評価に有用である。

【0052】

他の一実施形態では、本発明は、(i) 上述の結合アッセイによって、SCN2Bの遺伝子産物に対する結合剤(binder)としての化合物を同定する段階と、その化合物を薬剤担体と混合する段階と、を含む、薬物を製造する方法を提供する。しかしながら、前記化合物は、他の種類のスクリーニングアッセイによっても同定可能である。

【0053】

他の実施形態において、本発明は、本明細書に特許請求されるスクリーニングアッセイによる方法のいずれかによって得られる薬物を提供する。他の一実施形態では、本発明は、本明細書に特許請求されるスクリーニングアッセイによる方法のいずれかによって得られる薬物を提供する。

【0054】

本発明は、配列番号1で示されるタンパク質分子を特徴とし、前記タンパク質分子は、神経変性疾患、好ましくはアルツハイマー病を検出するための診断標的として使用される、SCN2Bをコードする遺伝子の翻訳産物、またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体である。

【0055】

本発明はさらに、配列番号1に示されるタンパク質分子を特徴とし、前記タンパク質分子は、神経変性疾患、好ましくはアルツハイマー病を予防、または治療、または改善する試薬または化合物のスクリーニング標的として使用される、SCN2Bをコードする遺伝子の翻訳産物、またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体である。

【0056】

本発明は、免疫原と特異的に免疫反応性である抗体を特徴とし、前記免疫原は、SCN2B、配列番号1をコードする遺伝子の翻訳産物、またはその断片、もしくは誘導体、も

しくは変異体である。その免疫原は、前記遺伝子の翻訳産物の免疫原性もしくは抗原エピトープまたは部分を含み、翻訳産物の前記免疫原性または抗原性部分はポリペプチドであり、かつ前記ポリペプチドは動物における抗体応答を誘発し、かつ前記ポリペプチドは前記抗体によって免疫特異的に結合される。抗体を作製する方法は当技術分野でよく知られている (Harlowら, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988参照)。本明細書で使用される「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、組換え抗体、抗イディオタイプ抗体、ヒト化抗体、または単鎖抗体、ならびにその断片など、当技術分野で公知のすべての形態の抗体を包含する (Dubel and Breitling, *Recombinant Antibodies*, Wiley-Liss, New York, NY, 1999)。本発明の抗体は、例えば、酵素イムノアッセイ (例えば、酵素免疫測定法、E L I S A)、ラジオイムノアッセイ、化学発光イムノアッセイ、ウェスタンブロット、免疫沈降および抗体マイクロアレイなどの現況技術に基づく様々な診断および治療法において有用である (Harlow and Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999 and Edwards R., *Immunodiagnosics: A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, England, 1999参照)。これらの方法は、S C N 2 B 遺伝子の翻訳産物、またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体の検出を含む。

10

【0057】

本発明の好ましい実施形態において、前記抗体は、被験者からの試料中の細胞の病的状態を検出するのに使用することができ、前記細胞を前記抗体で免疫細胞化学的に染色することを含み、既知の健康状態を表す細胞と比較して前記細胞における染色の程度の変化、または染色パターンの変化から、前記細胞の病的状態が示される。好ましくは、病的状態は、神経変性疾患、特に A D に関する。細胞の免疫細胞化学染色は、当技術分野でよく知られている多くの様々な実験法によって行うことができる。しかしながら、抗体結合の検出に自動化された方法を適用することが好ましく、その方法では、細胞の染色程度の決定、または細胞の細胞 (cellular) 染色または細胞内 (subcellular) 染色の決定、または細胞表面上での、または細胞器官および細胞の中の他の細胞内構造の間での抗原の位相分布の決定が、米国特許第 6 1 5 0 1 7 3 号に記載の方法に従って行われる。

20

【0058】

本発明の他の特徴および利点は、図面および実施例の以下の説明から明らかであり、それらは単なる実例であり、その開示内容の残り部分を決して制限するものではない。

30

【0059】

図 1 は、A D における神経細胞減少および変性に対する選択的な脆弱性を有する脳領域を図示する。主に、下側頭葉、嗅内皮質、海馬、および扁桃体内の神経細胞は、A D における変性プロセスを受けやすい (Terryら, *Annals of Neurology* 1981, 10: 184-192)。これらの脳領域は大部分は、学習および記憶機能の処理に参与する。それと対照的に、前頭皮質、後頭皮質、および小脳内の神経細胞は、大部分が損傷を受けていない状態のままであり、A D における神経変性プロセスから守られている。A D 患者および健康な、年齢が一致する対照個体の前頭皮質 (F)、側頭皮質 (T) および海馬 (H) からの脳組織を本明細書に開示される実施例に使用した。実例としての目的のために、正常な健康な脳の画像を S t r a n g e による出版物から選び取った (*Brain Biochemistry and Brain Disorders*, Oxford University Press, Oxford, 1992, p.4)。

40

【0060】

図 2 は、蛍光ディファレンシャルディスプレイスクリーンにおける S C N 2 B をコードする遺伝子の差次的発現の最初の同定を開示する。この図は、大きな調製用蛍光ディファレンシャルディスプレイゲルのクリッピングを示す。健康な対照被験者 2 名および A D 患者 6 名の前頭皮質 (F) および側頭皮質 (T) からの P C R 産物を変性ポリアクリルアミドゲル上に 2 通りで添加した (左から右)。相当する一塩基アンカー (one-base-anchor) オリゴヌクレオチドおよび特異的な C y 3 標識ランダムプライマーを用いて、個々の c D N A を増幅することによって、P C R 産物を得た。矢印は、移動位置を示し、そこに A

50

D患者の側頭皮質から誘導されるシグナルと比較される、前頭皮質から誘導されるSCN2Bをコードする遺伝子の転写産物のシグナルの強度の有意な差が存在する。その差次的発現は、AD患者の前頭皮質と比較される、側頭皮質におけるSCN2B遺伝子転写のダウンレギュレーションを反映する。健康な非AD対照被験者の側頭皮質および前頭皮質から得られるシグナルを互いに比較した場合には、シグナル強度の差、つまり発現レベルの変化は検出できない。

【0061】

図3および図4は、2つの異なるセットのプライマー対、プライマーセットA(図3)とプライマーセットB(図4)を使用して、定量的RT-PCR分析によってAD脳組織におけるヒトSCN2B遺伝子の差次的発現の検証を示す。AD患者(図3a; 4a)および年齢が一致する健康な対照個体(図3b; 4b)の前頭皮質(F)および側頭皮質(T)から収集したRNA試料からのRT-PCR産物の定量化を、ライトサイクラー迅速熱サイクル技術(LightCycler rapid thermal cycling technique)によって行った。それらの遺伝子発現レベルの有意な差を示さない、1セットの標準遺伝子の合わせた平均値にデータを規準化した。前記セットの標準遺伝子は、リボソームタンパク質S9、トランスフェリン受容体、GAPDH、サイクロフィリンBおよびβ-アクチンに対する遺伝子からなった。図は、その蛍光によって測定される増幅物質の量に対してサイクル数をプロットすることによって、増幅の速度論を図示する。反応の対数期中、正常な対照個体の前頭皮質および側頭皮質の両方からのSCN2B cDNAの増幅速度論は近接しており(図3b; 4b: 矢印)、それに対してADにおいては(図3a; 4a: 矢印)、分析された2つの脳領域におけるSCN2Bの差次的発現を示す、相当する曲線の有意な分離があることに留意されたい。

10

20

【0062】

図5は、プライマーセットAを用いた定量的RT-PCR分析による、AD脳組織におけるヒトSCN2B遺伝子の差次的発現を示す。AD患者(図5a)の前頭皮質(F)および海馬(H)から採取されたRNA試料からのRT-PCR産物の定量化を、ライトサイクラー迅速熱サイクル技術によって行った。同様に、年齢が一致する健康な対照個体の試料を比較した(図5b)。それらの遺伝子発現レベルの有意な差を示さない1セットの標準遺伝子の合わせた平均値にデータを正規化した。前記セットの標準遺伝子は、サイクロフィリンB、リボソームタンパク質S9、トランスフェリン受容体、GAPDH、およびβ-アクチンに対する遺伝子からなった。図は、その蛍光によって測定される増幅物質の量に対してサイクル数をプロットすることによって、増幅の速度論を図示する。反応の対数期中、正常な対照個体の前頭皮質および海馬の両方からのSCN2B cDNAの増幅速度論は近接しており(図5b: 矢印)、それに対してアルツハイマー病においては(図5a: 矢印)、相当する曲線の有意な分離があり、分析されたそれぞれの脳領域におけるSCN2Bをコードする遺伝子の差次的発現、好ましくは海馬に対する前頭皮質におけるヒトSCN2B遺伝子の転写産物、またはその断片、もしくは誘導体、もしくは変異体の調節不全が示されていることに留意されたい。

30

【0063】

図6は、配列番号1; SCN2Bタンパク質のアミノ酸配列を開示する。完全長ヒトSCN2Bタンパク質は215アミノ酸を含む。

40

【0064】

図7は、配列番号2、Genbankヒトゲノムデータベースにおいて見出される重複ヒトヌクレオチド配列断片の重複する大きなセットのアセンブリから得られるコンセンサス配列によって表される4903ヌクレオチドを含む、ヒトSCN2B cDNAのヌクレオチド配列を示す(図10参照)。

【0065】

図8は、配列番号3、ディファレンシャルディスプレイにより同定され、得られた、99bpのSCN2B cDNA断片のヌクレオチド配列を図示する(5'から3'方向の配列)。

50

【 0 0 6 6 】

図 9 は、ヒト S C N 2 B c D N A のヌクレオチド配列、配列番号 2 への配列番号 3 の配列アラインメントを示す。

【 0 0 6 7 】

図 1 0 は概略的に、S C N 2 B コンセンサス c D N A 配列、G e n B a n k アクセス番号 A F 0 4 9 4 9 8、A F 1 0 7 0 2 8、A X 3 7 6 0 0 0、H S U 8 7 5 5 5 に基づく、およびそれから誘導される延長および補正されたコンセンサス配列、および示される他の E S T 配列断片、および S C N 2 B をコードする遺伝子に対するプライマーを用いた P C R 増幅から得られる配列 (e n s - P C R 1、e n s - P C R 2) を構成する、ゲノムデータベース配列断片からの配列番号 2 のアセンブリを図示する。プライマーセッ
10
ト D (e n s - P C R 1、配列番号 2 のヌクレオチド 3 2 0 4 ~ 4 1 8 2 位の配列) : 5 ' - T G A G C G A G T C A A G C C C A T C T G G - 3 ' および 5 ' - C C A A A G C C A G T T C C A A G G C A C C T C - 3 ' ; プライマーセット C (e n s - P C R 2、配列番号 2 のヌクレオチド 2 1 3 8 ~ 3 2 3 0 位の配列) : 5 ' - G G G A A G C A G A G G T T G C A G T G A A C - 3 ' および 5 ' - C A T T T C C A G A T G G G C T T G A C T C G C T C - 3 ' 。

【 0 0 6 8 】

図 1 1 は、配列番号 3 の S C N 2 B c D N A との模式的アラインメントを示す。開いた長方形は、S C N 2 B オープンリーディングフレームを表し、細い棒は 5 ' および 3 ' 非翻訳領域 (U T R) を表す。
20

【 0 0 6 9 】

図 1 2 は、S C N 2 B のアミノ酸 1 7 9 ~ 2 1 5 位に相当するペプチドに対して産生される、親和性の精製ウサギポリクローナル抗 S C N 2 B 抗血清 (緑色のシグナル) で標識されたヒト中心前回からの切片を図示する。S C N 2 B の免疫活性が脳皮質 (C T) および白質 (W M) のどちらにも認められた (図 1 2 a、低倍率)。神経プロセスを飾る S C N 2 B 免疫活性の点状パターン (樹状突起棘様) および神経細胞体のより弱く、かつ拡散した免疫活性が認められた (図 1 2 b、高倍率)。図 1 2 c は、グリア細胞体および神経繊維の点状免疫活性を示す。青色のシグナルは、D A P I で染色された核を示す。

【 0 0 7 0 】

図 1 3 の表は、内部参照番号 P 0 1 0、P 0 1 1、P 0 1 2、P 0 1 4、P 0 1 6、P
30
0 1 7、P 0 1 9、P 0 2 6、P 0 3 1、P 0 3 8、P 0 4 0、P 0 4 1、P 0 4 2、P 0 4 6、P 0 4 7 により本明細書で同定された A D 患者 1 5 名 (0 . 2 9 ~ 0 . 9 8 倍)、および内部参照番号 C 0 0 5、C 0 0 8、C 0 1 1、C 0 1 2、C 0 1 4、C 0 2 0、C 0 2 2、C 0 2 4、C 0 2 5、C 0 2 6、C 0 2 7、C 0 2 8、C 0 2 9、C 0 3 0、C 0 3 1、C 0 3 2、C 0 3 3、C 0 3 4、C 0 3 5 により本明細書で同定された、年齢が一致する健康な対照個体 1 9 名 (0 . 5 9 ~ 2 . 1 5 倍) における前頭皮質に対する側頭皮質での S C N 2 B 遺伝子発現レベルを示す。プライマー対セット A を使用して、定量的 R T - P C R 分析を行った。示される値は本明細書に記載の式によって計算される (以下参照)。散布図によって、対照試料 (点) および A D 患者試料 (三角形) それぞれにおける、側頭と前頭皮質とのレギュレーション比の個々の対数値、l o g (比 I T / I F)
40
が視覚化されている

【 0 0 7 1 】

図 1 4 における表は、内部参照番号 P 0 1 0、P 0 1 1、P 0 1 2、P 0 1 4、P 0 1
6、P 0 1 7、P 0 1 9 により本明細書で同定された A D 患者 7 名 (0 . 2 0 ~ 0 . 9 1 倍)、および内部参照番号 C 0 0 5、C 0 0 8、C 0 1 1、C 0 1 2、C 0 1 4 により本明細書で同定された、年齢が一致する健康な対照個体 5 名 (0 . 4 8 ~ 1 . 4 8 倍) における前頭皮質に対する側頭皮質での S C N 2 B 遺伝子発現レベルを示す。プライマー対セット B を使用して、定量的 R T - P C R 分析を行った。示される値は本明細書に記載の式によって計算される (以下参照)。散布図によって、対照試料 (点) および A D 患者試料 (三角形) それぞれにおける、側頭と前頭皮質とのレギュレーション比の個々の対数値、
50

$\log$ (比 IT / IF) が視覚化されている。

【0072】

図15における表は、内部参照番号P010、P011、P012、P014、P016、P019により本明細書で同定されたアルツハイマー秒患者6名(0.48~10.87倍)、および内部参照番号C004、C005、C008により本明細書で同定された、年齢が一致する健康な対照個体3名(0.77~1.26倍)におけるSCN2B遺伝子についての前頭皮質に対する海馬での遺伝子発現レベルを示す。プライマー対セットAを使用して、定量的RT-PCR分析を行った。示される値は本明細書に記載の式によって計算される(以下参照)。散布図によって、対照試料(点)およびAD患者試料(三角形)それぞれにおける、海馬と前頭皮質とのレギュレーション比の個々の対数値、 $\log$ (比 HC / IF) が視覚化されている。 10

【実施例】

【0073】

実施例I:

(i) ADの患者からの脳組織の解剖

AD患者および年齢が一致する対照被験者からの脳組織を死後6時間以内に採取し、直ぐにドライアイスで凍結した。診断を病理組織学的に確認するために、各組織からの試料切片をパラホルムアルデヒドで固定した。差次的発現分析のための脳領域を同定し(図1参照)、RNA抽出が行われるまで-80で保存した。

【0074】

(ii) 全mRNAの単離:

製造元のプロトコルに従ってRNeasyキット(Qiagen社)を使用して、全RNAを死後脳組織から抽出した。正確なRNA濃度およびRNA品質をAgilent 2100バイオアナライザー(Agilent Technologies社)を使用してDNA LabChipシステムで決定した。作製されたRNAをさらに品質試験するために、つまり部分的な分解を排除し、DNA混入について試験するために、特異的に設計されたイントロンGAPDHオリゴヌクレオチドおよびゲノムDNAを基準対照として使用して、製造元のプロトコル(Roche社)に記載のライトサイクラー技術を用いて融解曲線を作成した。

【0075】

(iii) 蛍光ディファレンシャルディスプレイ(FDD)による差次的に発現された遺伝子のcDNA合成および同定:

異なる組織における遺伝子発現の変化を同定するために、改変かつ改善されたディファレンシャルディスプレイ(DD)スクリーニング法を用いた。本来のDDスクリーニング法は当業者には公知である(Liang and Pardee, Science 1995, 267:1186-7)。この技術では、RNAの2つのRNAの集団を比較し、1つの集団では発現するが、他の集団では発現しない遺伝子のクローンを得る。いくつかの試料を同時に分析し、アップレギュレートされた遺伝子とダウンレギュレートされた遺伝子のどちらも同じ実験において同定することができる。DD法におけるいくつかの段階を調整かつ洗練し、かつ技術的パラメーターを改良することによって、例えば重複性を高めること、全RNAの逆転写のための最適化された試薬および条件を評価すること、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)およびその産物の分離を最適化することによって、高い再現性かつ高感度な結果を得ることができる技術が開発された。適用かつ改善された技術はvon der Kammerらによって詳細に記述されている(Nucleic Acids Research 1999, 27: 2211-2218)。特異的に設計された64個のプライマー1セットを開発し(標準セット)、すべての可能性のあるRNA種の統計学的に包括的な分析を達成した。さらに、その方法を改良して、蛍光標識プライマーの使用に基づく、調製用DDスラブゲル技術を生み出した。本発明において、アルツハイマー病患者および年齢が一致する対照被験者の、注意深く選択された死後脳組織(前頭および側頭皮質)からのRNA集団を比較した。DD分析の出発原料として、上述の(ii)のように抽出された全RNAを使用した。各0.5mM dNTP、Sensis 40

cript (商標) 逆転写酵素 1 μ l および 1 $\times$ RT バッファー (Qiagen 社)、10 U RNase 阻害剤 (Qiagen 社)、および 1 μ M の 1 塩基アンカーオリゴヌクレオチド HT₁₁A、HT₁₁G または HT₁₁C のいずれかを含有する反応 20 μ l 中で、等量の RNA 0.05 μ g をそれぞれ、cDNA へと転写した (Liang ら, Nucleic Acids Research 1994, 22: 5763-5764; Zhao ら, Biotechniques 1995, 18:842-850)。逆転写を 37 で 60 分間行い、最後の変性段階は 93 で 5 分間行った。最終容積 20 μ l で、Cy3 標識ランダム DD プライマーのうちのいずれか 1 つ (1 μ M)、1 $\times$ GeneAmp PCR バッファー (Applied Biosystems 社)、1.5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems 社)、2 μ M dNTP - ミックス (dATP、dGTP、dCTP、dTTP, Amersham Pharmacia Biotech 社)、5% DMSO (Sigma 社)、1 U AmpliTaq DNA ポリメラーゼ (Applied Biosystems 社) と共に、相当する 1 塩基アンカーオリゴヌクレオチド (1 μ M) を使用して、得られた cDNA 2 μ l をそれぞれ、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) にかけた。PCR 条件を以下のように設定した: 1 ラウンドは、変性のために 94 で 30 秒間行い、1 / 秒で 40 に冷却し、低いストリンジェンシーでプライマーをアニーリングするために 40 で 4 分間行い、1 / 秒で 72 まで加熱し、伸長のために 72 で 1 分間行った。このラウンドに続いて、39 回の高ストリンジェンシーのサイクルを行った: 94 で 30 秒行い、続いて 1 / 秒で 60 に冷却し、60 で 2 分間行い、1 / 秒で 72 まで加熱し、72 で 1 分間行った。72 で 5 分間の最終段階を最後のサイクルに加えた (PCR サイ클ー: MultiCycler PTC 200, MJ Research 社)。DNA ローディングバッファー 8 μ l を PCR 産物 プレパレート (preparation) 20 μ l に添加し、5 分間変性させ、ゲル上に添加するまで、氷上に維持した。3.5 μ l それぞれをスラブゲルシステム (Hitachi Genetic Systems 社) において、厚さ 0.4 mm の 6% ポリアクリルアミド (Long Ranger) / 7 M 尿素シーケンシングゲル上で 2000 V、60 W、30 mA にて 1 時間 40 分の間分離した。電気泳動が完了した後、適切な FMBIO II 分析 8.0 ソフトウェアを使用して、FMBIO II 蛍光スキャナー (Hitachi Genetic Systems 社) でゲルをスキャンした。実物大の写真を印刷し、差次的に発現したバンドをマークし、ゲルから除去し、1.5 ml 容器に移し、滅菌水 200 μ l でオーバーレイし、抽出されるまで -20 で維持した。 30

【0076】

ディファレンシャルディスプレイ産物の溶出および再増幅: H₂O 200 μ l 中で 10 分間沸騰させ、氷上で冷却し、-20 でエタノール (Merck 社) およびグリコーゲン / 酢酸ナトリウム (Merck 社) を使用して、上清液から一晩沈殿させ、続いて 13.000 rpm にて 4 で 25 分間遠心分離することによって、差次的な (differential) バンドをゲルから抽出した。ペレットを氷冷のエタノール (80%) で 2 回洗浄し、10 mM トリス (pH 8.3) (Merck 社) に再懸濁し、0.025 μ m の VSWP 膜 (Millipore 社) 上に 10% グリセロール (Merck 社) に対して室温で 1 時間透析した。最初のラウンドが 94 で 5 分間行われ、続いて 94 で 45 秒、60 で 45 秒、1 / 秒で 45 分間 70 に上昇させる 15 サイクル、および 72 で 5 分間の最終段階を除いては、同一の条件下にてディファレンシャルディスプレイ PCR (上記参照) に使用される相当するプライマー対を含有する PCR 混合物 25 μ l 中で 15 回の高ストリンジェンシーのサイクルによって再増幅するために、得られたプレパレート (preparation) を鋳型として使用した。 40

【0077】

ディファレンシャルディスプレイ産物のクローニングおよびシーケンシング: 再増幅された cDNA を DNA LabChip システム (Agilent 2100 バイオアナライザー, Agilent Technologies 社) を用いて分析し、pCR-Blunt II - TOPO ベクターにライゲートし、製造元の説明書 (Zero Blunt TOPO PCR クローニングキット, Invitrogen 社) に従って Top 1 50

0 F'大腸菌細胞に形質転換した。クローン化cDNA断片を市販のシーケンシング設備によってシーケンスした。ヒトSCN2B遺伝子についてのかかる蛍光ディファレンシャルディスプレイ実験の結果を図2に示す。

【0078】

(iv) 定量的RT-PCRによる差次的発現の確認：

ライトサイクラー技術(Roche社)を用いて、SCN2Bをコードする遺伝子の差次的発現の決定的な裏付けを行った。この技術は、ポリメラーゼ連鎖反応に対する迅速な熱サイクル、ならびに増幅中の蛍光シグナルのリアルタイム測定を特徴とし、したがって、終点読取りではなく速度論的(kinetic)読取りを用いることによって、RT-PCR産物を非常に正確に定量化することができる。側頭皮質からのSCN2B cDNAと前頭皮質からのSCN2B cDNAとの比、および海馬からのSCN2B cDNAと前頭皮質からのSCN2B cDNAとの比がそれぞれ決定された(相対的定量化)。

10

【0079】

最初に、標準曲線を作製し、CN2Bをコードする遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCRの効率を決定した。

プライマーセットA：

5' - G A C T G C T G G G A T G T A T C T G C T T T - 3' ,

5' - T T G T C G C C A G T A G A C C C A A A C - 3' 。

プライマーセットB：

5' - C C A A G G C T G G G A A A T G A G G - 3' ,

5' - C A A G G G C A A C T G G G A G A G T T C - 3' 。

20

【0080】

ライトサイクラー・ファストスタートDNAマスターSYBRグリーンIミックス(LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I mix)(FastStart Taq DNAポリメラーゼ、反応バッファー、dTTPの代わりにdUTPとのdNTP混合物、SYBRグリーンI染料、1mM MgCl₂; Roche社を含有する)、0.5μMプライマー、cDNA希釈液シリーズ2μl(ヒト全脳のcDNA最終濃度40、20、10、5、1および0.5ng; Clontech社)を含有し、かつ使用するプライマーに応じて、さらに3mM MgCl₂を含有する容積20μl中にて、PCR増幅(95で1秒、56で5秒、72で5秒)を行った。融解曲線の分析から、約86.5で単一ピークが示され、可視のプライマーダイマーは認められなかった。PCR産物の質およびサイズをDNA LabChipシステム(Agilent 2100バイオアナライザー, Agilent Technologies社)で決定した。プライマーセットAでは期待サイズ(expected size)82bpでの、プライマーセットBでは期待サイズ84bpでの単一ピークが試料の電気泳動図において認められた。類似の手法において、PCRプロトコルを適用し、定量化のための参照標準として選択された1セットの参照遺伝子のPCR効率を決定した。本発明において、かかる参照遺伝子5つの平均値を決定した：

(1) サイクロフィリンB；MgCl₂を除いては(3mMではなく、さらに1mM MgCl₂を添加した)、特異的なプライマー5' - A C T G A A G C A C T A C G G G C C T G - 3' および5' - A G C C G T T G G T G T C T T T G C C - 3' を使用した。融解曲線分析から、約87で単一ピークが示され、可視のプライマーダイマーは認められなかった。PCR産物のアガロースゲル分析から、期待サイズ(62bp)の単一バンドが示された。(2) リボソームタンパク質S9(RPS9)；特異的なプライマー5' - G G T C A A A T T T A C C C T G G C C A - 3' および5' - T C T C A T C A A G C G T C A G C A G T T C - 3' を使用した(3mMではなく、さらに1mM MgCl₂を添加した)。融解曲線分析から、約85で単一ピークが示され、可視のプライマーダイマーは認められなかった。PCR産物のアガロースゲル分析から、期待サイズ(62bp)の単一バンドが示された。(3) β-アクチン；特異的なプライマー5' - T G G A A C G G T G A A G G T G A C A - 3' および5' - G G C A A G G G A C T T C C T G T A A - 3' を使用した。融解曲線分析から、約87で単一ピークが示され、可視のプラ

30

40

50

イマーダイマーは認められなかった。PCR産物のアガロースゲル分析から、期待サイズ（142bp）の単一バンドが示された。（4）GAPDH；特異的なプライマー5'-CGTCATGGGTGTGAACCATG-3'および5'-GCTAAGCAGTTTGGTGGTGCAG-3'を使用した。融解曲線分析から、約83℃で単一ピークが示され、可視のプライマーダイマーは認められなかった。PCR産物のアガロースゲル分析から、期待サイズ（81bp）の単一バンドが示された。（5）トランスフェリン受容体TRR；特異的なプライマー5'-GTCGCTGGTTCAGTTTCGTGATT-3'および5'-AGCAGTTTGGCTGTTGTACCTCTC-3'を使用した。融解曲線分析から、約83℃で単一ピークが示され、可視のプライマーダイマーは認められなかった。PCR産物のアガロースゲル分析から、期待サイズ（80bp）の単一バンドが示された。

10

【0081】

値を計算するために、最初にSCN2Bをコードする遺伝子および5つの参照標準遺伝子についての閾値サイクル値Ctに対して、cDNA濃度の対数をプロットした。標準曲線（つまり、線形回帰）の傾きおよび切片をすべての遺伝子について計算した。第2段階では、前頭皮質および側頭皮質からのcDNA、および前頭皮質および海馬からのcDNAをそれぞれ、並行して分析し、サイクロフィリンBに正規化した。Ct値を測定し、相当する標準曲線を用いて全脳cDNA（ng）に変換した：

$$10^{((Ct \text{ 値} - \text{切片}) / \text{傾き})} [\text{全脳 cDNA (ng)}]$$

【0082】

20

前頭皮質および側頭皮質のSCN2B cDNAの値、および前頭皮質および海馬のSCN2B cDNAの値をそれぞれ、サイクロフィリンBに正規化し、その比を次式に従って計算した：

【数1】

$$\text{比} = \frac{\text{SCN2B側頭皮質 [ng]} / \text{サイクロフィリンB側頭皮質 [ng]}}{\text{SCN2B前頭皮質 [ng]} / \text{サイクロフィリンB前頭皮質 [ng]}}$$

【数2】

$$\text{比} = \frac{\text{SCN2B海馬 [ng]} / \text{サイクロフィリンB海馬 [ng]}}{\text{SCN2B前頭皮質 [ng]} / \text{サイクロフィリンB前頭皮質 [ng]}}$$

30

【0083】

第3の段階において、参照標準遺伝子のセットを並行して分析し、個々の脳試料それぞれの参照標準遺伝子の発現レベルの、側頭皮質と前頭皮質との比の平均値、および海馬と前頭皮質との比の平均値を決定した。サイクロフィリンを段階2および段階3において分析し、一方の遺伝子と他方の遺伝子との比が異なる実施において一定のままであったことから、単一の遺伝子だけに正規化するのではなく、参照標準遺伝子のセットの平均値にSCN2Bの値を正規化することが可能であった。すべてのハウスキーピング遺伝子の平均値からのサイクロフィリンBの偏差によって、上記で示されるそれぞれの比を割ることによって計算を行った。SCN2B遺伝子についてのかかる定量的RT-PCR分析の結果を図3、4、および5に示す。

40

【0084】

（v）免疫組織化学：

ヒト脳におけるSCN2Bの免疫蛍光染色では、ドナーの死後の中心前回から凍結切片をクリオスタット（Leica CM3050S）を用いて作製し、アセトン中で室温にて10分間固定した。PBS中で洗浄した後、切片をブロッッキングバッファー（PBS中の10%正常ヤギ血清、0.2%Triton X-100）と共に30分間ブレインキ

50

ュベートし、次いで親和性の精製ウサギ抗SCN2B抗血清（ブロッキングバッファー中で1:20~1:40に希釈；S-6811, Sigma社）と共に4で一晩インキュベートした。0.1% Triton X-100/PBS中で3回すすいだ後、切片をFITC-結合ヤギ抗ウサギIgG抗血清（1%BSA/PBS中で1:150に希釈）と共に室温で2時間インキュベートし、次いで再度、PBS中で洗浄した。PBS中の5μM DAPIと共に切片を3分間インキュベートすることによって、核の染色を行った（青色のシグナル）。ヒト脳におけるリボフスチンの自己蛍光をブロックするために、70%エタノール中の1%ズダンブラックBで室温にて2~10分間処理し、続いて70%エタノール、蒸留水およびPBS中に浸漬した。「Vectra shield」封入剤（Vector Laboratories社, カリフォルニア州バーリングヘム）を用いて、切片をカバーガラスで覆い、倒立顕微鏡（IX81, Olympus Optical社）で観察した。適切なソフトウェア（AnalySis, Olympus Optical社）でデジタル画像を取り込んだ。

10

【図面の簡単な説明】

【0085】

【図1】図1は、ADにおける神経細胞減少および変性に対する選択的な脆弱性を有する脳領域を図示する。

【図2】図2は、蛍光ディファレンシャルディスプレイスクリーンにおけるSCN2Bをコードする遺伝子の差次的発現の最初の同定を開示する。

【図3】図3は、2つの異なるセットのプライマー対、プライマーセットAを使用して、定量的RT-PCR分析によってAD脳組織におけるヒトSCN2B遺伝子の差次的発現の検証を示す。

20

【図4】図4は、2つの異なるセットのプライマー対、プライマーセットBを使用して、定量的RT-PCR分析によってAD脳組織におけるヒトSCN2B遺伝子の差次的発現の検証を示す。

【図5】図5は、プライマーセットAを用いた定量的RT-PCR分析による、AD脳組織におけるヒトSCN2B遺伝子の差次的発現を示す。

【図6】図6は、配列番号1；SCN2Bタンパク質のアミノ酸配列を開示する。完全長ヒトSCN2Bタンパク質は215アミノ酸を含む。

【図7-1】図7は、配列番号2、Genbankヒトゲノムデータベースにおいて見出される重複ヒトヌクレオチド配列断片の重複する大きなセットのアセンブリから得られるコンセンサス配列によって表される4903ヌクレオチドを含む、ヒトSCN2B cDNAのヌクレオチド配列を示す。

30

【図7-2】図7は、配列番号2、Genbankヒトゲノムデータベースにおいて見出される重複ヒトヌクレオチド配列断片の重複する大きなセットのアセンブリから得られるコンセンサス配列によって表される4903ヌクレオチドを含む、ヒトSCN2B cDNAのヌクレオチド配列を示す。

【図8】図8は、配列番号3、ディファレンシャルディスプレイにより同定され、得られた、99bpのSCN2B cDNA断片のヌクレオチド配列を図示する（5'から3'方向の配列）。

40

【図9】図9は、ヒトSCN2B cDNAのヌクレオチド配列、配列番号2への配列番号3の配列アラインメントを示す。

【図10】図10は概略的に、SCN2BコンセンサスcDNA配列、GenBankアクセッション番号AF049498、AF107028、AX376000、HSU87555に基づく、およびそれから誘導される延長および補正されたコンセンサス配列、および示される他のEST配列断片、およびSCN2Bをコードする遺伝子に対するプライマーを用いたPCR増幅から得られる配列（ens-PCR1、ens-PCR2）を構成する、ゲノムデータベース配列断片からの配列番号2のアセンブリを図示する。

【図11】図11は、配列番号3のSCN2B cDNAとの模式的アラインメントを示す。開いた長方形は、SCN2Bオープンリーディングフレームを表し、細い棒は5'お

50

よび 3' 非翻訳領域 (UTR) を表す。

【図 1 2】図 1 2 は、SCN2B のアミノ酸 179 ~ 215 位に相当するペプチドに対して産生される、親和性の精製ウサギポリクローナル抗 SCN2B 抗血清 (緑色のシグナル) で標識されたヒト中心前回からの切片を図示する。

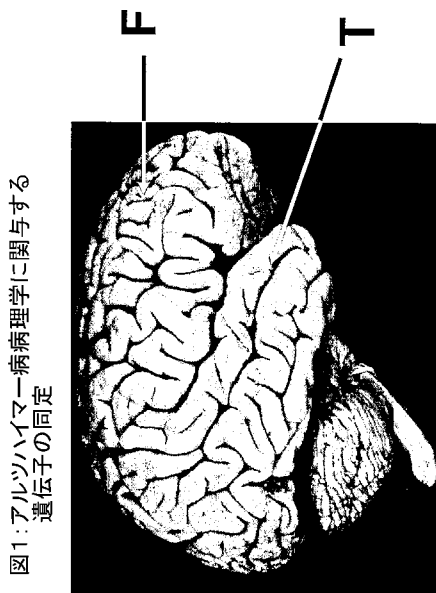
【図 1 3】図 1 3 は、年齢が一致する健康な対照個体 19 名 (0.59 ~ 2.15 倍) における前頭皮質に対する側頭皮質での SCN2B 遺伝子発現レベルを示す。

【図 1 4】図 1 4 は、年齢が一致する健康な対照個体 5 名 (0.48 ~ 1.48 倍) における前頭皮質に対する側頭皮質での SCN2B 遺伝子発現レベルを示す。

【図 1 5】図 1 5 は、アルツハイマー病患者 6 名 (0.48 ~ 10.87 倍)、および年齢が一致する健康な対照個体 3 名 (0.77 ~ 1.26 倍) における SCN2B 遺伝子についての前頭皮質に対する海馬での遺伝子発現レベルを示す。

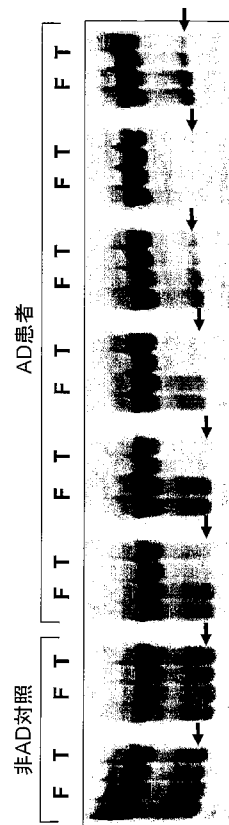
10

【図 1】



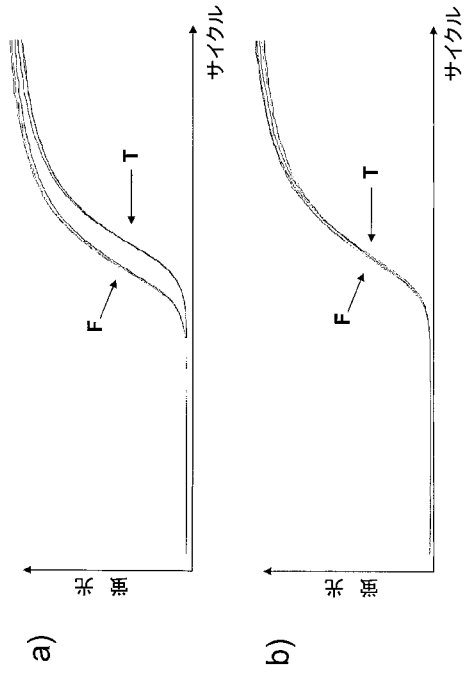
【図 2】

図2: 蛍光ディフアレンシャルディスプレイスクリーンにおける差次的に発現した遺伝子の同定



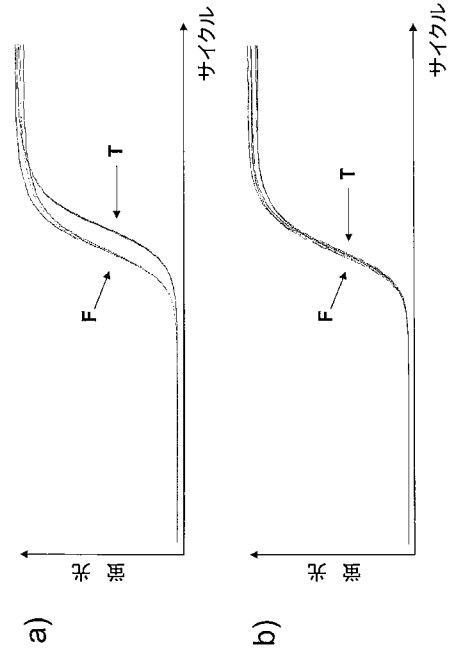
【 図 3 】

図3: 定量的RT-PCRによるSCN2Bの差次的発現の検証



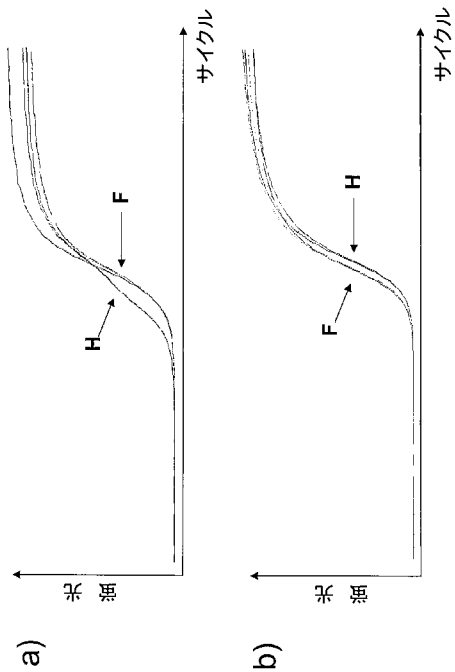
【 図 4 】

図4: 定量的RT-PCRによるSCN2Bの差次的発現の検証



【 図 5 】

図5: 定量的RT-PCRによるSCN2Bの差次的発現の検証



【 図 6 】

図6: 配列番号1: ヒトSCN2Bタンパク質のアミノ酸配列

長さ: 215 aa

```

1  MHRDAWLPRP AFSLTGLSLF FSLVPPGRSM EVIVPATLNV LINGSARLPC
51  TPNSCYTVNH KQFSLNWTYQ ECNNCSEEMF LQFRMKIINL KLERFQDRVE
101 FSGNPISKYDV SVMLRNQVQE DEGIYNCYIM NPPDRHRGKG KHLQVLMEE
151 PPERDSTVAV IVGASVGGFL AVVILVLMVV KCVRRKKEQK LSTDDLKTEE
201 EGKTDGEGNP DDGAK

```

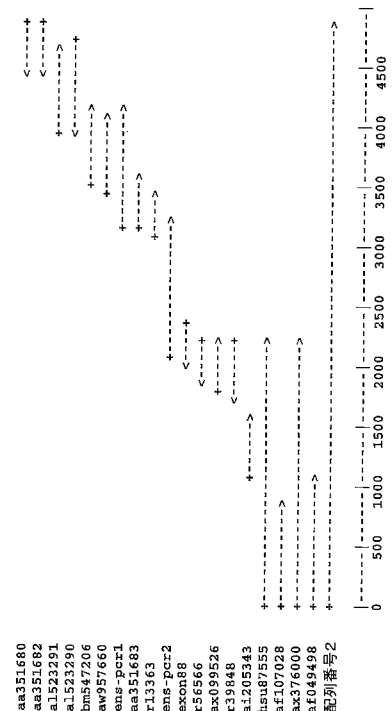


図 13

【 図 1 3 】

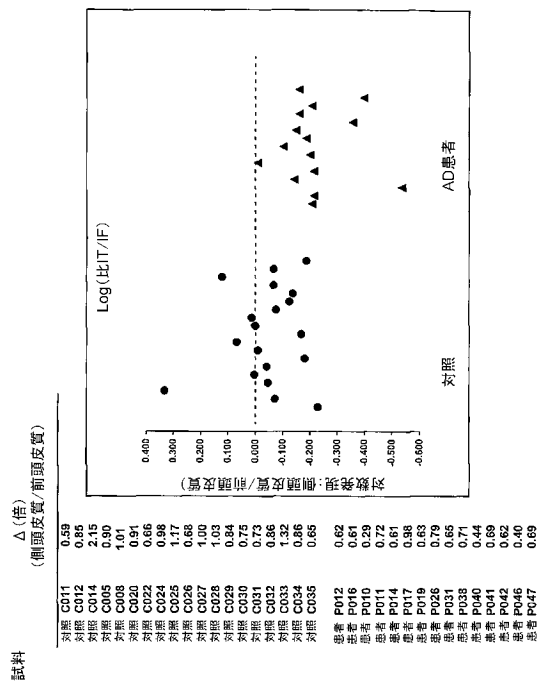


図 11: SCN2B cDNA、配列番号2と配列番号3との模式的アラインメント

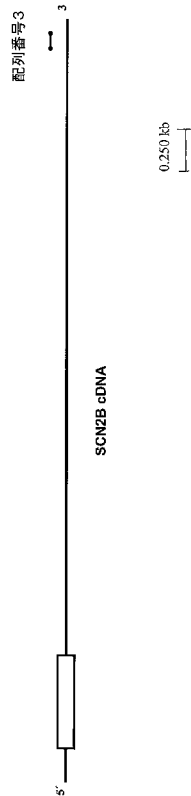


図 14

【 図 1 4 】

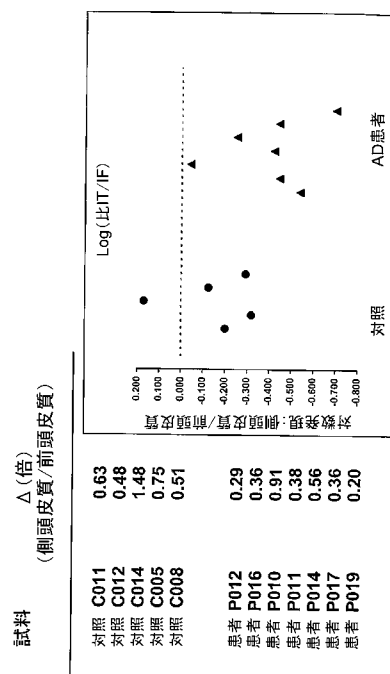


図 12: 抗SCN2B抗血清およびDAPIで標識されたヒト中心前回切片の画像

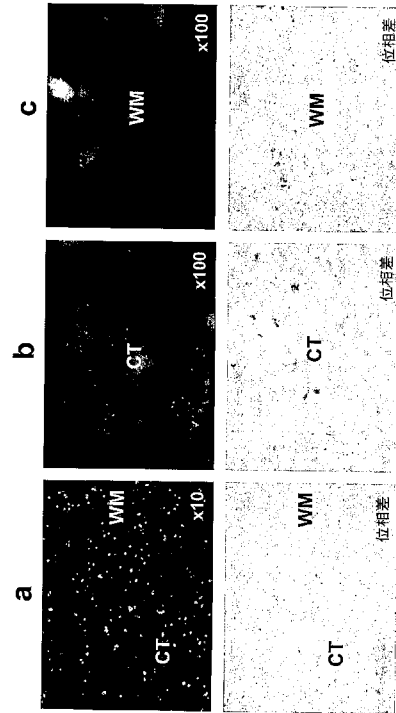
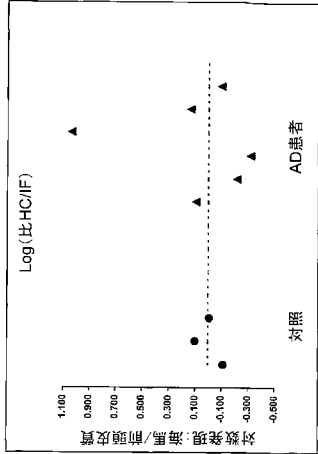


図 15

試料
△ (倍)
(海馬/前頭皮質)

対照 C005	0.77
対照 C008	1.26
対照 C004	0.98
患者 P012	1.24
患者 P016	0.61
患者 P010	0.48
患者 P011	10.87
患者 P014	1.37
患者 P019	0.80



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/000916

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/127584 A1 (BAKER KEVIN P ET AL) 12 September 2002 (2002-09-12) figures 67,68 page 5, column 2, paragraph 16 - page 6, column 1, paragraph 1 page 47, column 1, paragraph 6 - column 2, paragraph 2 -----	5,11
X	WO 00/12711 A (INCYTE PHARMA INC) 9 March 2000 (2000-03-09)	1-3,10, 11
Y	MECHP-15 (SEQ ID NO's: 15 and 33) = SCN2B page 9, line 22 - line 25 page 44, line 15 - page 47, line 20 -----	1-3,5-12
Y	WO 02/084297 A (EVOTEC NEUROSCIENCES GMBH) 24 October 2002 (2002-10-24) the whole document -----	1-3,5-12
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 June 2004

Date of mailing of the international search report

07 07 2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gunster, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PCT/EP2004/000916

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 03/060525 A (EVOTEC NEUROSCIENCES GMBH) 24 July 2003 (2003-07-24) the whole document	1-3,5-12
A	----- DWORAKOWSKA B ET AL: "ION CHANNELS-RELATED DISEASES" ACTA BIOCHIMICA POLONICA, vol. 47, no. 3, 2000, pages 685-703, XP001022116 ISSN: 0001-527X page 686, column 1, paragraph 4 - page 689, column 1, paragraph 1 -----	1-3,5-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2004/000916

Box 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:

2. ☒ Claims Nos.: **4**
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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 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:

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2004/ 000916

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 11.2

Claims Nos.: 4

Present claim 4 relates to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that it is a modulator of SCN2B activity.

The claim covers all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 84 EPC and disclosure within the meaning of Article 83 EPC for none of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claim also lacks clarity (Article 84 EPC). An attempt is made to define a compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has not been carried out for claim 4.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP2004/000916

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002127584 A1	12-09-2002	US 2004043927 A1	04-03-2004
		US 2003166104 A1	04-09-2003
		US 2003166105 A1	04-09-2003
		US 2003166106 A1	04-09-2003
		US 2003166188 A1	04-09-2003
		US 2003073169 A1	17-04-2003
		US 2003166107 A1	04-09-2003
		US 2003032101 A1	13-02-2003
		US 2003082767 A1	01-05-2003
		US 2003032102 A1	13-02-2003
		US 2003166108 A1	04-09-2003
		US 2003166109 A1	04-09-2003
		US 2003027262 A1	06-02-2003
		US 2003104538 A1	05-06-2003
		US 2003170793 A1	11-09-2003
		US 2003170794 A1	11-09-2003
		US 2003170795 A1	11-09-2003
		US 2003032103 A1	13-02-2003
		US 2003022293 A1	30-01-2003
		US 2003166110 A1	04-09-2003
		US 2003040053 A1	27-02-2003
		US 2003166111 A1	04-09-2003
		US 2003211572 A1	13-11-2003
		US 2003068679 A1	10-04-2003
		US 2003027263 A1	06-02-2003
		US 2003170796 A1	11-09-2003
		US 2003096351 A1	22-05-2003
		US 2003032104 A1	13-02-2003
		US 2003073170 A1	17-04-2003
		US 2003027264 A1	06-02-2003
		US 2003017540 A1	23-01-2003
		US 2003027265 A1	06-02-2003
		US 2003166112 A1	04-09-2003
		US 2003032105 A1	13-02-2003
		US 2003032106 A1	13-02-2003
		US 2003166113 A1	04-09-2003
		US 2003027266 A1	06-02-2003
		US 2003166114 A1	04-09-2003
		US 2003008352 A1	09-01-2003
		US 2003166115 A1	04-09-2003
		US 2003082715 A1	01-05-2003
		US 2003166117 A1	04-09-2003
		US 2003013153 A1	16-01-2003
		US 2003022294 A1	30-01-2003
		US 2003027267 A1	06-02-2003
		US 2003027268 A1	06-02-2003
		US 2003073171 A1	17-04-2003
		US 2003166118 A1	04-09-2003
		US 2003027269 A1	06-02-2003
WO 0012711 A	09-03-2000	AU 6137699 A	21-03-2000
		CA 2341148 A1	09-03-2000
		WO 0012711 A2	09-03-2000
		EP 1117781 A2	25-07-2001
		JP 2003520565 T	08-07-2003
WO 02084297 A	24-10-2002	WO 02084297 A1	24-10-2002
		EP 1379882 A1	14-01-2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/000916

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03060525 A	24-07-2003	WO 03060525 A1	24-07-2003

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 33/48 (2006.01)		G 0 1 N 33/48		P
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00		A
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)		C 1 2 Q 1/02		
A 0 1 K 67/027 (2006.01)		A 0 1 K 67/027		

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

(72) 発明者 ハーネス ヨゼフ

スロバキア 8 4 1 0 7 プレアティスラヴァ イーヴェ エイスネロヴァ 1 3

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB20 BB25 FB03 FB12

4B024 AA11 CA02 CA04 CA09

4B063 QA18 QQ43 QR62 QR77 QS25

4H045 AA10 AA30 BA10 CA45 EA50

专利名称(译)	SCN2B蛋白在神经退行性疾病中的诊断和治疗用途		
公开(公告)号	JP2006518199A	公开(公告)日	2006-08-10
申请号	JP2006501697	申请日	2004-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	埃沃技术神经科学顺GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tsungu		
申请(专利权)人(译)	埃沃技术神经科学顺GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	フォンデルカンマーハインツ ポールナーヨハーネス ハーネスヨゼフ		
发明人	フォン デル カンマー ハイנטツ ポールナー ヨハーネス ハーネス ヨゼフ		
IPC分类号	C12Q1/68 C07K14/47 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/48 C12N15/09 C12Q1/02 A01K67/027 C07K14/705 G01N33/68		
CPC分类号	C07K14/705 C07K14/4711 G01N33/6872 G01N33/6896 G01N2500/04		
FI分类号	C12Q1/68.A C07K14/47.ZNA G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.Y G01N33/48.P C12N15/00.A C12Q1/02 A01K67/027		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/BB25 2G045/FB03 2G045/FB12 4B024/AA11 4B024/CA02 4B024/CA04 4B024/CA09 4B063/QA18 4B063/QQ43 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA45 4H045/EA50		
优先权	60/444666 2003-02-04 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了SCN2B编码基因在阿尔茨海默病患者的特定脑区中的差异表达。基于该发现，本发明提供了一种用于诊断或确定受试者中神经变性疾病，特别是阿尔茨海默病的预后的方法，或用于确定受试者是否具有发展所述疾病的高风险的方法。。此外，本发明提供了使用SCN2B基因及其相应基因产物治疗或预防阿尔茨海默病和相关神经变性疾病的治疗和预防方法。还公开了筛选神经变性疾病调节剂的方法。

Verification of differential expression of SCN2B by quantitative RT-PCR

