

(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2014-507115

(P2014-507115A)

(43) 公表日 平成26年3月27日(2014.3.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 ZNAA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	4C093
GO1N 37/00 (2006.01)	GO1N 37/00 102	4C096
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 545A	4C188

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-541070 (P2013-541070)
 (86) (22) 出願日 平成23年11月28日 (2011.11.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年7月18日 (2013.7.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/062250
 (87) 国際公開番号 W02012/074933
 (87) 国際公開日 平成24年6月7日 (2012.6.7)
 (31) 優先権主張番号 61/417,701
 (32) 優先日 平成22年11月29日 (2010.11.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
 サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 チェン, マーク
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80-4990, サウス サン フラン
 シスコ, ディーエヌエー ウェイ 1,
 シー/オー ジェネンテック, インコ
 ーポレイテッド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経変性疾患又は障害を検出する方法

(57) 【要約】

神経変性疾患又は障害を同定し、診断し、予後予測する方法が提供される。また、ニューロンが危険性があるか又は神経変性を起こしているか決定する方法も提供される。方法は、遺伝子 *tbx6* 及び *d1eu2* の少なくとも一方が過剰発現しているか決定することを含む。

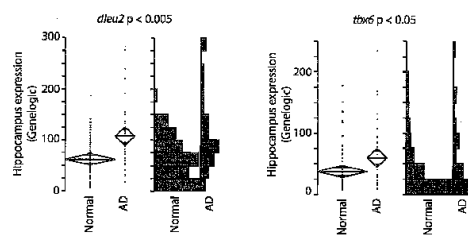


FIGURE 6

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象の神経変性障害を診断する方法であって、対象が遺伝子 t b x 6 及び d l e u 2 の少なくとも一方を参考試料での該遺伝子それぞれの発現レベルよりも高レベルで発現する細胞を有するか決定することを含み、該細胞の存在が、対象が神経変性障害を有することを示す、方法。

【請求項 2】

神経変性障害の治療を受ける対象の疾患をモニタリングする方法であって、対象が遺伝子 t b x 6 及び d l e u 2 の少なくとも一方を参考試料での該遺伝子それぞれの発現レベルよりも高レベルで発現する細胞を有するか決定することを含み、該細胞の存在が、対象が引き続き該神経変性障害の治療を必要とすることを示す、方法。

10

【請求項 3】

対象が神経変性障害を発症する素因を評価する方法であって、対象が遺伝子 t b x 6 及び d l e u 2 の少なくとも一方を参考試料での該遺伝子それぞれの発現レベルよりも高レベルで発現する細胞を有するか決定することを含み、該細胞の存在が、対象が神経変性障害を発症する素因を示す、方法。

【請求項 4】

細胞がニューロンである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 5】

方法が対象から生体試料を得ることをさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

【請求項 6】

生体試料が脳脊髄液、脳組織、全血、血漿及び血清からなる群より選ばれる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

対象が遺伝子 t b x 6 及び d l e u 2 の少なくとも一方を発現する細胞を有するかの決定がインピボで行われる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 8】

ニューロンが危険性がある及び / 又は神経変性を起こしているか決定する方法であって、ニューロンが遺伝子 t b x 6 および d l e u 2 の少なくとも一方を、神経変性を起こしていないニューロンでの各遺伝子の発現レベルよりも高レベルで発現しているか決定することを含み、遺伝子 t b x 6 および d l e u 2 の少なくとも一方の発現増加が、ニューロンが危険性がある及び / 又は神経変性を起こしていることを示す、方法。

30

【請求項 9】

遺伝子 t b x 6 および d l e u 2 の少なくとも一方の発現レベルが R N A 発現、タンパク質発現又はそれらの組合せに基づき決定される、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 10】

遺伝子 t b x 6 および d l e u 2 の少なくとも一方の発現が P C R 法、マイクロアレイチップ又はそれらの組合せを用いて決定される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

40

【請求項 11】

遺伝子 t b x 6 および d l e u 2 の少なくとも一方の発現が免疫測定法を用いて決定される、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 12】

免疫測定法が E L I S A である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

d l e u 2 の発現が P C R 法、マイクロアレイチップ又はそれらの組合せを用いて決定され t b x 6 の発現が免疫測定法を用いて決定される、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 つに記載の方法。

50

【請求項 14】

遺伝子 t b x 6 および d l e u 2 の少なくとも一方の発現が、磁気共鳴画像法 (M R I)、陽電子放出断層撮影 (P E T)、単一光子放出断層撮影 (S P E C T)、X 線コンピュータ断層撮影 (C T)、蛍光媒介分子断層撮影 (F M T)、蛍光反射率画像法 (F R I)、生物発光画像法 (B L I)、ガンマイメージング及び磁気共鳴分光法からなる群より選ばれる画像処理法を用いて決定される、請求項 1 ~ 4 及び 7 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 15】

t b x 6 及び d l e u 2 の両方の発現が決定される、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【請求項 16】

神経変性障害が、アルツハイマー病 (A D)、レビー小体認知症、ダウン症、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血 (D u t c h 型) ; グラム島パーキンソン認知症複合 ; 並びにアミロイド様タンパク質に基づくか又は関連の他の疾患、例えば進行性核上性麻痺、多発性硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、パーキンソン病、H I V 関連認知症、A L S (筋萎縮性側索硬化症)、成人発症糖尿病、老人性心アミロイドーシス、内分泌腫瘍、緑内障、アレキサンダー病、アルパース病、毛細血管拡張性運動失調症、バッテン病 (スピールマイヤー-フォークト-シューグレン-バッテン病としても知られる)、ウシ海綿状脳症 (B S E)、カナバン病、コケイン症候群、皮膚基底核変性症、ハンチントン病、ケネディ病、クラッペ病、マシャド・ジョゼフ病 (脊髄小脳失調症 3 型)、多系統萎縮症、神経ボレリア症、ペリツェウス・メルツパッヘル病、ピック病、原発性側索硬化症、プリオン病、レフサム病、サンドホフ病、シルダー病、悪性貧血後発の亜急性連合脊髄変性症、統合失調症、脊髄小脳失調症 (様々な特徴をもつ複数の型)、脊髄性筋萎縮症、スティーラー・リチャードソン・オルゼウスキー症候群、脊髄ろう、シャルコー・マリー・トゥース病、地中海熱、マックル・ウェルズ症候群、突発性骨髄腫、アミロイドポリニューロパチー、アミロイド心筋症、全身性老人性アミロイドーシス、アミロイドポリニューロパチー、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血、ダウン症、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー症、甲状腺の髄様癌、孤立性心房アミロイド、透析患者の₂-ミクログロブリンアミロイド、封入体筋炎、筋消耗性疾患の₂-アミロイド蓄積、ランゲルハンス島糖尿病 I I 型インスリノーマ及び他のアミロイドーシス関連疾患からなる群より選ばれる、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 つに記載の方法。

20

30

【請求項 17】

神経変性障害がアルツハイマー病 (A D) である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

遺伝子 t b x 6 および d l e u 2 の少なくとも一方の発現を検出するプローブ及びプローブの使用説明書を含み、対象が遺伝子 t b x 6 及び d l e u 2 を正常な参考試料での該遺伝子のそれぞれの発現レベルよりも高レベルで発現する細胞を有するか決定する、キット。

【請求項 19】

該細胞の存在が、対象が神経変性障害を有することを示す、請求項 18 に記載のキット。

40

【請求項 20】

該細胞の存在が、対象が引き続き該神経変性障害の治療を必要とすることを示す、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 21】

該細胞の存在が、対象が神経変性障害を発症する素因を示す、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 22】

該細胞の存在が、該細胞が神経変性を起こしているか又は素因があるかを示す、請求項 18 に記載のキット。

50

【請求項 23】

細胞がニューロンである、請求項 18 ~ 22 のいずれか 1 つに記載のキット。

【請求項 24】

プローブが標識されている、請求項 18 ~ 23 のいずれか 1 つに記載のキット。

【請求項 25】

プローブがポリヌクレオチド、抗体又はそれらの組合せからなる群より選ばれる、請求項 18 ~ 24 のいずれか 1 つに記載のキット。

【請求項 26】

抗体がモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、Fv 断片、Fab 断片、Fab' 断片及び F(ab')₂ 断片からなる群より選ばれる、請求項 25 に記載のキット。

10

【請求項 27】

ポリヌクレオチドがアンチセンスポリヌクレオチドである、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 28】

ポリヌクレオチドがペプチド核酸 (PNA) である、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 29】

プローブが脳標的化ペプチドに結合されている、請求項 18 ~ 28 のいずれか 1 つに記載のキット。

【請求項 30】

脳標的化ペプチドがインスリン、トランスフェリン、抗トランスフェリン受容体抗体又はそれらの断片からなる群より選ばれる、請求項 29 に記載のキット。

20

【請求項 31】

神経変性障害がアルツハイマー病 (AD)、レビー小体認知症、ダウン症、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血 (Dutch 型)；グアム島パーキンソン認知症複合；並びにアミロイド様タンパク質に基づくか又は関連の他の疾患、例えば進行性核上性麻痺、多発性硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、パーキンソン病、HIV 関連認知症、ALS (筋萎縮性側索硬化症)、成人発症糖尿病、老人性心アミロイドーシス、内分泌腫瘍、緑内障、アレキサンダー病、アルパーズ病、毛細血管拡張性運動失調症、バッテン病 (スピールマイヤー-フォークト-シューグレン-バッテン病としても知られる)、ウシ海綿状脳症 (BSE)、カナパン病、コケイン症候群、皮膚基底核変性症、ハンチントン病、ケネディ病、クラッペ病、マシャド・ジョゼフ病 (脊髄小脳失調症 3 型)、多系統萎縮症、神経ボレリア症、ペリツェウス・メルツパッヘル病、ピック病、原発性側索硬化症、プリオン病、レフサム病、サンドホフ病、シルダー病、悪性貧血後発の亜急性連合脊髄変性症、統合失調症、脊髄小脳失調症 (様々な特徴をもつ複数の型)、脊髄性筋萎縮症、スティール・リチャードソン・オルゼウスキー症候群、脊髄ろう、シャルコー・マリー・トゥース病、地中海熱、マックル・ウェルズ症候群、突発性骨髄腫、アミロイドポリニューロパチー、アミロイド心筋症、全身性老人性アミロイドーシス、アミロイドポリニューロパチー、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血、ダウン症、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー症、甲状腺の髄様癌、孤立性心房アミロイド、透析患者の α_2 -ミクログロブリンアミロイド、封入体筋炎、筋消耗性疾患の α_2 -アミロイド蓄積、ランゲルハンス島

30

40

【請求項 32】

神経変性障害がアルツハイマー病である、請求項 31 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本出願は、2010年11月29日に提出された米国特許仮出願第61/417,701号の優先権の利益を主張するものであり、該仮出願は、参照により本明細書に組み込まれる。

50

【0002】

(発明の分野)

神経変性疾患又は障害(例えばアルツハイマー病)を同定、診断、モニタリング及び予後予測する方法が提供される。

【背景技術】

【0003】

本発明は、アルツハイマー病などの神経変性疾患又は障害を診断し治療する方法及び組成物に関する。

【0004】

アルツハイマー病(AD)は、認知機能の消失と認知症をもたらす神経変性障害である。Rayら, Nat. Med. 13:1359-1362 (2007)。ADの物理的特徴は、異常なタウフィラメントとアミロイド(A β)繊維が蓄積して形成される神経原繊維変化(NFT)と老人斑からなる脳の病変の存在である。Shawら, Nat. Rev. 6:295-303 (2007)。プラーク蓄積の主因となるタンパク質にはアミロイド前駆体タンパク質(APP)と2種類のプレセニリン(プレセニリンIとII)が含まれる。ほとんどの細胞内で構造的に発現され異化されるアミロイド前駆体タンパク質(APP)が、 β セクレターゼ酵素で順次切断されると、39から43アミノ酸A β ペプチドが放出される。分解されたAPPは凝集してプラークになりやすい。特にA β (1-42)断片は、そのC末端の高疎水性のアミノ酸残基により凝集物を形成する傾向が強い。したがって、A β (1-42)断片はADにおける老人斑形成開始に主として関与しその原因となっていると考えられており、このため有力な病的ポテンシャルと考えられる。プラーク中のA β タンパク質の産生と蓄積の増加により神経細胞死がもたらされることが科学的に証明されており、これはADの発症と進行に寄与している。

10

20

【0005】

ADの症状は徐々に現れ、最初の兆候は軽微な忘れっぽさに過ぎないこともある。この段階で、個人は最近の出来事、活動、親しい人や物の名前を忘れることがあり、簡単な数学の問題が解けないこともある。疾患が進行すると、症状はより容易に認められ、AD本人や家族が医療の助けを必要とするほど深刻になる。AD中期の症状として、身づくろいなどの簡単な作業のやり方を忘れることがあり、話すことや理解すること、読み書きなどに問題が生じる。AD後期の患者は不安になったり攻撃的になることがあり、家を出て徘徊したり、最終的には総合ケアが必要になることもある。

30

【0006】

現在、確実にADを診断する唯一の方法は、個人の死後解剖で脳組織内のプラークや縮体を同定することである。したがって、患者の生存中は、医師はADの「可能性」または「高い可能性」という診断しかできない。現行の方法を使用して、医師は複数のツールを使ってAD診断を行いADの「高い可能性」の診断ができる。医師は、その人の健康全般、過去の病歴及び日常の活動を行うのに生じている困難について質問する。記憶、問題解決、注意、計数、言語などの行動試験により、認知性の変性に関する情報が得られ、血液、尿又は髄液、及び脳スキャンなどの医療検査によりさらに情報が得られる。

40

【0007】

個人がADと診断されるころには、ADはすでに何年も進行していると考えられている。実際に、ADなどの神経変性疾患の開始と進行を理解し、根底にあるニューロンを変性させるメカニズムを解明すれば、神経変性疾患及び障害の発症、進行及び診断を補助するバイオマーカー同定の一助となろう。従って、神経変性疾患及び障害を正確に診断するとともに、疾患の進行をモニタリングし、神経変性疾患及び障害を発症するリスクのある人を検出するバイオマーカーが依然として必要とされている。

【0008】

本明細書に引用の参照文献はすべて、特許出願及び特許公報も含めて、その全体を参照により組み込まれる。

【発明の概要】

50

【 0 0 0 9 】

本発明は、神経変性及びアルツハイマー病（AD）などの神経変性疾患又は障害の存在及び／又は程度に関連して発現する遺伝子の同定に少なくとも部分的に基づいて神経変性障害及び／又は障害を同定、診断、モニタリング及び予後予測する方法を提供する。

【 0 0 1 0 】

一態様では、本発明は、対象の神経変性障害を診断する方法であって、対象が遺伝子 *t b x 6* および *d l e u 2* の少なくとも一方を参考試料での各遺伝子の発現レベルよりも高レベルで発現する細胞を有するか決定することを含む方法を提供し、ここで該細胞の存在は、対象が該神経変性障害を有することを意味する。

【 0 0 1 1 】

一態様では、本発明は、神経変性障害の治療を受ける対象の疾患をモニタリングする方法を提供し、該方法は、対象が遺伝子 *t b x 6* および *d l e u 2* の少なくとも一方を参考試料での各遺伝子の発現レベルよりも高レベルで発現する細胞を有するか決定することを含み、ここで該細胞の存在は、対象が該神経変性障害の治療継続を必要とすることを意味する。

【 0 0 1 2 】

一態様では、本発明は、対象の神経変性障害を発症する素因を評価する方法を提供し、該方法は、対象が遺伝子 *t b x 6* および *d l e u 2* の少なくとも一方を参考試料での各遺伝子の発現レベルよりも高レベルで発現する細胞を有するか決定することを含み、ここで該細胞の存在は、対象が神経変性障害を発症する素因を有することを意味する。

【 0 0 1 3 】

一態様では、本発明は、ニューロンが危険性がある及び／又は神経変性を起こしているか決定する方法であって、ニューロンが遺伝子 *t b x 6* および *d l e u 2* の少なくとも一方を神経変性を起こしていないニューロンでの各遺伝子の発現レベルよりも高レベルで発現しているか決定することを含む方法を提供し、遺伝子 *t b x 6* および *d l e u 2* の少なくとも一方の発現増加はニューロンが危険性がある及び／又は神経変性を起こしていることを意味する。

【 0 0 1 4 】

当業者には自明であろうが、本発明のどの方法においても、遺伝子の発現増加の検出は神経変性障害の特徴（例えば存在、段階又は程度）を明確に示しうるが、遺伝子の発現増加の不検出もまたこの疾患の回帰的特徴を示し有用である。

【 0 0 1 5 】

本発明の一態様では、神経変性疾患又は障害は、アルツハイマー病（AD）、レビー小体認知症、ダウン症、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血（Dutch型）；グアム島パーキンソン認知症複合；並びにアミロイド様タンパク質に基づくか又は関連の他の疾患、例えば進行性核上性麻痺、多発性硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病、パーキンソン病、HIV関連認知症、ALS（筋萎縮性側索硬化症）、成人発症糖尿病、老人性心アミロイドーシス、内分泌腫瘍、緑内障、アレキサンダー病、アルパース病、毛細血管拡張性運動失調症、バッテン病（スピールマイヤー-フォークト-シューグレン-バッテン病としても知られる）、ウシ海綿状脳症（BSE）、カナバン病、コケイン症候群、皮膚基底核変性症、ハンチントン病、ケネディ病、クラッペ病、マシャド・ジョゼフ病（脊髄小脳失調症3型）、多系統萎縮症、神経ボレリア症、ペリツェウス・メルツパッヘル病、ピック病、原発性側索硬化症、プリオン病、レフサム病、サンドホフ病、シルダー病、悪性貧血後発の亜急性連合脊髄変性症、統合失調症、脊髄小脳失調症（特徴が異なる様々な型）、脊髄性筋萎縮症、スティール・リチャードソン・オルゼウスキー症候群、脊髄ろう、シャルコー・マリー・トゥース病、地中海熱、マックル・ウェルズ症候群、突発性骨髄腫、アミロイドポリニューロパチー、アミロイド心筋症、全身性老人性アミロイドーシス、アミロイドポリニューロパチー、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血、ダウン症、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー症、甲状腺の髄様癌、孤立性心房アミロイド、透析患者の₂-ミクログロブリンアミロイド、封入体筋炎、筋消耗性疾患の₂-アミロイド蓄

10

20

30

40

50

積、ランゲルハンス島糖尿病 I I 型インスリノーマ及び他のアミロイドーシス関連疾患である。

【0016】

一態様では、本発明は、対象が遺伝子 t b x 6 及び d l e u 2 の少なくとも一方を参考試料での各遺伝子の発現レベルより高レベルで発現する細胞を有するか決定することが、遺伝子 t b x 6 及び d l e u 2 の少なくとも一方の R N A 及び / 又はタンパク質発現レベルを決定することを含む方法を提供する。本発明の特定の例では、t b x 6 の発現はタンパク質の発現または R N A の発現レベルに基づき、d l e u 2 の発現は R N A の発現レベルに基づいて決定される。本発明の別の例では、t b x 6 と d l e u 2 両方の発現レベルが決定される。

10

【0017】

一態様では、本発明は、対象が遺伝子 t b x 6 及び d l e u 2 の少なくとも一方を参考試料での各遺伝子の発現レベルより高レベルで発現する細胞を有するか決定することが、該対象から生体試料を得ることをさらに含む方法を提供する。本発明の特定の例では、生体試料は、全血、血漿又は血清を含む血液、尿、脳脊髄液、脳組織（例えば組織診）、涙及び唾液からなる群より選ばれる。

【0018】

別の態様では、本発明は、対象が遺伝子 t b x 6 及び d l e u 2 の少なくとも一方を参考試料での各遺伝子の発現レベルより高レベルで発現する細胞を有するか決定することが、インビボで行われ、対象から生体試料を採取する必要がない方法を提供する。例えば、方法は、対象に検出可能な量又は効果的な量の標識プローブを投与し、遺伝子 t b x 6 及び d l e u 2 の少なくとも一方を検出することを含む。

20

【0019】

対象が遺伝子 t b x 6 及び d l e u 2 の少なくとも一方を参考試料での各遺伝子の発現レベルより高レベルで発現する細胞を有するか決定する本発明の方法のステップは、限定ではないが、R N A の発現を検出するアッセイや、免疫組織化学アッセイを含む様々なインビトロアッセイフォーマットで実施できる。本発明の特定の例では、遺伝子 t b x 6 及び d l e u 2 の少なくとも一方の発現は、P C R 法、マイクロアレイチップ又は免疫測定法（例えば E L I S A ）により、又は複数の方法を組み合わせて決定される。

【0020】

対象が遺伝子 t b x 6 及び d l e u 2 の少なくとも一方を参考試料での各遺伝子の発現レベルより高レベルで発現する細胞を有するかをインビボで、生体試料を得ずに決定する本発明の方法のステップは、限定ではなく、ガンマイメージング、磁気共鳴画像法（M R I ）、磁気共鳴分光法、蛍光分光法、陽電子放出断層撮影（P E T ）、単一光子放出断層撮影（S P E C T ）、X 線コンピューター断層撮影（C T ）、蛍光媒介分子断層撮影（F M T ）、蛍光反射率画像法（F R I ）、生物発光画像法（B L I ）を含む様々な画像処理法を使用して決定されうる。

30

【0021】

対象が遺伝子 t b x 6 及び d l e u 2 の少なくとも一方を参考試料での各遺伝子の発現レベルより高レベルで発現する細胞を有するか決定する本発明の方法のステップは、標識プローブを使用して決定されうる。本発明の方法で使用するプローブとして、限定ではなく、ポリヌクレオチド、抗体又はこれらの組合せが挙げられる。本発明の特定の例では、ポリヌクレオチドプローブは、アンチセンスポリヌクレオチド及び / 又はペプチド核酸（P N A ）プローブである。本発明の方法で使用する抗体として、限定ではなく、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、F v 断片、F a b 断片、F a b ' 断片及び F (a b ') 2 断片が挙げられる。

40

【0022】

本発明の方法の他の実施態様では、本発明の方法で使用するプローブは、脳標的化ペプチドに結合される。特定の態様では、脳標的化ペプチドは、担体媒介輸送又は受容体媒介細胞輸送を介し、血液脳関門（B B B ）を通過しての輸送を可能にする。このような脳

50

標的化ペプチドの例として、限定ではなく、インスリン、トランスフェリン又はインスリン受容体、トランスフェリン受容体、レプチン受容体、GLUT1グルコース輸送体、MCT1乳酸輸送体、LAT1大型中性アミノ酸輸送体及びCNT2アデノシン輸送体などの血液脳関門(BBB)の輸送受容体に結合する受容体特異性ペプチド模倣抗体が挙げられる。

【0023】

本発明の方法で使用するプローブは、本明細書に記載の、例えば放射性核種、放射性同位体又は同位体及び蛍光色素などの標識を備えうる。標識をプローブに組み込んでも、付着させても、結合させてもよい。

【0024】

別の実施態様では、本発明は、対象が遺伝子tbx6及びdleu2の少なくとも一方を正常な参考試料での各遺伝子の発現レベルより高レベルで発現する細胞を有するか決定するための、遺伝子tbx6及びdleu2の少なくとも一方の発現を検出する標識プローブとプローブの使用指示書を含むキットを提供する。特定の実施態様では、キットは、診断、モニタリング及び/又は患者が神経変性疾患及び/又は障害を発症する素因の評価に使用される。他の実施態様では、キットは、ニューロンが危険性がある及び/又は神経変性を起こしているか決定するのに使用される。

【0025】

他の実施態様では、キットは、ポリヌクレオチド、抗体又はこれらの組合せからなる群より選ばれる標識プローブを含む。特定の態様では、抗体プローブは、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、Fv断片、Fab断片、Fab'断片及びF(ab')₂断片からなる群より選ばれる。別の態様では、プローブは、アンチセンスポリヌクレオチド又はペプチド核酸(PNA)である。他の態様では、本発明に記載のとおり、プローブは標識されている及び/又は脳標的化ペプチドが結合されている。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】実施例1に記載の実施実験の模式図であり、Campenotチャンバーを使用し、ニューロンの体性(細胞体)と軸索の環境が分けられている。

【図2】実施例1に記載の実験の結果を示すグラフである。具体的には、ニューロンをチャンバー内で培養し、細胞体部分は阻害剤の存在又は非存在下でNGFを含み、軸索部分は阻害剤の存在又は非存在下でNGF消退に供した。以下の阻害剤を使用した：上皮成長因子受容体キナーゼ阻害剤AG555(ErbB^AG⁵⁵⁵)；p38MAPキナーゼ阻害剤SB239(p38MAPK^SB²³⁹)；転写阻害剤アクチノマイシンD(転写^Ac^tD)；及びGSK3阻害剤SB415(GSK3^SB⁴¹⁵)。図2に示すように、アクチノマイシンDとSB415の両方がニューロンの細胞体部分に投与されたとき軸索変性を防止した(細胞体阻害)が、軸索に直接投与されたときは同じ保護効果が得られなかった(細胞体阻害)。加えて、AG555とSB239は、軸索に直接投与すると軸索変性を防止したが、細胞体に直接投与したときは同じ保護効果が得られなかった。

【図3】選択的に軸索が消失しているニューロンの時系列マイクロアッセイ実験の結果である。上段のパネルは、実施例2に記載の実験の模式図である。軸索変性を受け12時間でdleu2もtbx6もニューロン内で上方制御されている。dleu2とtbx6の発現増加はGSK3阻害剤GSK3.ARAの存在下培養されたニューロンでは観察されない。

【図4】実施例3に記載のdleu2及びtbx6のノックダウン実験の結果を示す。ニューロン内でこれらの遺伝子をノックダウンすると、NGF消退後、軸索変性が低減された。

【図5】実施例3に記載のdleu2及びtbx6のノックダウン実験の結果を示す。ニューロン内でこれらの遺伝子をノックダウンすると、構成的活性型のGSK3変異体、GSK3S9Aの存在下、軸索変性が低減された。

【図6】アルツハイマー病(AD)と診断されたヒト対象の脳の正常なヒト患者と比較し

10

20

30

40

50

た海馬部分の t b x 6 及び d l e u 2 の発現プロットである。

【発明を実施するための形態】

【0027】

他に断らない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本発明が属する業界の当業者が通常理解するのと同じ意味を有する。Singletonら, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2版, J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994)及びMarch, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4版, John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992)は、当業者にとって本出願で使用される多くの用語の一般的な手引きとなる。

【0028】

発明者らは、神経変性疾患又は障害の診断、神経変性疾患又は障害の予後予測及び患者の神経変性疾患又は障害のモニタリング（例えばAD患者の疾患進行の追跡であり、AD患者の医学療法の効果を追跡するのに有用でありうる）に有用な生化学マーカーを発見した。加えて、生化学マーカーは、神経変性を起こす危険性のあるニューロンの同定にも有用である。本発明の方法で使用するバイオマーカーは、例えば血液、脳脊髄液及び/又は脳組織などの患者の生体試料中に存在する。

【0029】

(定義)

本明細書で交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」という用語は、任意長のヌクレオチドポリマーを指し、DNA及びRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド又は塩基、及び/又はこれらのアナログ、又はDNA又はRNAポリメラーゼによりポリマーに組み込まれうる任意の基質でありうる。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドなどの修飾されたヌクレオチド及びそのアナログを含みうる。存在するならば、ヌクレオチド構造の修飾は、ポリマー会合の前又は後に行われうる。ヌクレオチド配列は、非ヌクレオチドコンポーネントに妨げられうる。ポリヌクレオチドは、標識コンポーネントを結合するなど、重合後もさらに修飾されうる。他の種類の修飾として、例えば、「キャップ」、1または複数の天然ヌクレオチドをアナログで置換、例えば無電荷結合（例えばメチルホスホン酸、ホスホトリエステル、ホスホアミデート（phosphoamidates）、カバメート（cabamates）他）や電荷結合（例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート他）などのヌクレオチド間修飾、例えばタンパク質（例えばヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリリジン他）などのペンダント部分を含むもの、インターカレーターを有するもの（例えばアクリジン、ソラレン他）、キレーターを含むもの（例えば金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属他）、アルキレーターを含むもの、修飾された結合を含むもの（例えばアルファアノマー核酸他）、並びに非修飾のポリヌクレオチド（類）が挙げられる。さらに、通常糖類に存在するヒドロキシル基はどれでも、例えば、ホスホネート基、リン酸基で置換されてもよく、標準的な保護基で保護されてもよく、又は追加のヌクレオチドとのさらなる結合に備えて活性化されてもよく、又は個体の基体上に結合させてもよい。5'及び3'末端のOHは、リン酸化されるか又はアミン若しくは1~20の炭素原子の有機キャップ基部分で置換されてもよい。他のヒドロキシルはまた、誘導体化されて標準的な保護基になってもよい。ポリヌクレオチドはまた、例えば2'-O-メチル-2'-O-アリル、2'-フルオロ-又は2'-アジド-リボース、炭素環式糖アナログ、アルファ-アノマー糖、アラビノース、キシロース又はリキソースなどのエピマー糖、フラノース糖、セドヘブツロース、非環式アナログ及びメチルリボシドなどの非塩基性ヌクレオシドアナログなどを含む、当業界で一般に知られるリボース又はデオキシリボース糖のアナログ形態を含みうる。1または複数のホスホジエステル結合は、代替の結合基で置換されうる。これらの代替の結合基として、限定ではなく、リン酸基がP(O)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、(O)NR₂(「アミデート」)、P(O)R、P(O)OR'、COまたはCH₂(「ホルムアセタール」)で置換された実施態様が挙げられ、ここで各RとR'は独立してH、エーテル(-O-)結合を含みうる置換もしくは未置換のアルキル(1~2

10

20

30

40

50

0 C)、アリアル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニルまたはアラリジル (araldyl) である。ポリヌクレオチド中の全ての結合が同一である必要はない。先の記述は、本明細書で引用される RNA および DNA を含む全てのポリヌクレオチドに適用される。

【0030】

本明細書で使用される「オリゴヌクレオチド」は、単鎖の合成ポリヌクレオチドを意味し、一般に、ただし必ずしもそうではないが、その長さは250ヌクレオチド長未満である。「オリゴヌクレオチド」と「ポリヌクレオチド」という用語は互いに排他的ではない。上記のポリヌクレオチドの記述は、オリゴヌクレオチドにも等しく全て適用できる。

【0031】

「プライマー」という用語は、通常、核酸にハイブリダイズでき、通常はフリーの3'-OH基を供与することにより相補的核酸の重合を可能にする、短い単鎖ポリヌクレオチドを意味する。

【0032】

「アレイ」又は「マイクロアレイ」という用語は、ハイブリダイズ可能なアレイ要素、好ましくはポリヌクレオチドプローブ (例えばオリゴヌクレオチド) を基板上に整列配置したものを指す。基板は、ガラススライドなどの個体基板、又はニトロセルロース膜などの半個体基板でよい。

【0033】

「増幅」という用語は、参考核酸配列又はその相補鎖の1または複数の複製を産生する方法を指す。増幅は、線形でも級数的 (例えばPCR) でもよい。「複製」は、必ずしも鋳型配列に対する完全な配列相補性又は同一性を意味しない。例えば、複製は、デオキシイノシン、意図的な配列変更 (ハイブリダイズ可能だが完全に鋳型に対し相補的ではない配列を有するプライマーにより導入された配列変更など) 及び/又は増幅の途中に生ずる配列エラーなどのヌクレオチドアナログを含みうる。

【0034】

「検出」という用語は、直接的及び間接的検出を含む、任意の検出手段を包含する。

【0035】

「発現上昇」又は「上昇レベル」は、神経変性障害に罹患していない個人 (ら) 及び/又は所定の閾値などのコントロールに対する患者の mRNA 又はタンパク質の発現増加を意味する。

【0036】

対象または第1試料 (例えば患者から採取した生体試料) の遺伝子又はバイオマーカーの発現/量が、第2試料 (例えばコントロール試料又は参考試料) のレベル「よりも高」レベルであるのは、患者又は第1試料の遺伝子又はバイオマーカーの発現レベル/量が、第2試料の遺伝子又はバイオマーカーの発現レベル/量の少なくとも約1.5倍、1.75倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍又は10倍の場合である。

【0037】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者ならば容易に決定でき、通常は、プローブ長、洗浄温度及び塩濃度などに依存する実験的計算である。一般に、適切なアニーリングにはプローブ長が長いほど高温が必要とされ、プローブ長が短ければ低温を要する。ハイブリダイゼーションは通常、相補鎖がその融解温度より低温の環境に存在するとき変性DNAが再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列の高い相同性を所望するならば、使用されうる相対的温度も高くなる。結果として、相対温度が高ければ、反応条件がよりストリンジェントになる可能性があり、温度が低ければ、さほどストリンジェントではない、ということになる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーに関するさらなる詳細と説明は、Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995) を参照されたい。

【0038】

10

20

30

40

50

本発明で定義される「ストリンジェントな条件」又は「高ストリンジェンシー条件」は、以下のものにより同定されうる：(1)低いイオン強度と高い洗浄温度を使用するもの、例えば0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、50°C；(2)ハイブリダイゼーションの間、ホルムアミドなどの変性剤、例えば、50%(v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%ポリビニルピロリドン/50mM、pH6.5のリン酸ナトリウムバッファーと750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウム、42を使用するもの；又は(3)50%ホルムアミド、5×SSC(0.75MのNaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×デンハルト液、超音波処理したサケ精子DNA(50µg/ml)、0.1%SDS及び10%デキストラン硫酸を使用する溶液中一晩42°Cでハイブリダイゼーション、0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中42°Cで10分洗浄後、EDTA含有0.1×SSCからなる高ストリンジェンシー洗浄10分、55。

【0039】

「中程度にストリンジェントな条件」は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989の記載により同定することができ、上述のものよりもストリンジェント度が低い洗浄液及びハイブリダイゼーション条件(例えば温度、イオン強度及び%SDS)が含まれる。中程度にストリンジェントな条件の一例は、20%ホルムアミド、5×SSC(150mMのNaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルト液、10%デキストラン硫酸及び20mg/mlの変性切断サケ精子DNAを含む溶液中37で一晩インキュベーション後、フィルターを1×SSC中約37~50で洗浄する。当業者であれば、プローブ長などのファクターに応じて温度、イオン強度などをいかに調節するか識別できよう。

【0040】

「バイオマーカー」又は「生化学マーカー」という用語は、本明細書では一般に、遺伝子、タンパク質、炭水化物構造又は糖脂質を包含する分子を意味し、哺乳動物の組織や細胞内またはその上で発現すると、標準的な方法(又は本明細書に開示の方法)により検出でき、哺乳動物の組織や細胞の神経変性に対する感受性を予測、診断及び/又は予後予測する。加えて、本明細書で使用する「バイオマーカー」は、例えば患者の病理状態の指標を意味し、インビトロ又は患者又は患者から採取した生体試料のインビボで検出されうる。

【0041】

「神経変性疾患」及び「神経変性障害」という用語は、最も広範囲に使用され、神経変性及び/又は機能障害を伴う全ての疾患、病態を包含し、限定ではなく、末梢神経障害、筋萎縮性側索硬化症(ALS、ルーゲーリック病を含む)などの運動神経障害、ベル麻痺及び脊髄性筋萎縮症又は麻痺を伴う様々な疾患；及び他のヒト神経変性疾患、例えばアルツハイマー病(AD)、レビー小体認知症、ダウン症、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血(Dutch型)；グアム島パーキンソン認知症複合、進行性核上性麻痺、多発性硬化症、てんかん、クロイツフェルト・ヤコブ病、神経性難聴、メニエール病、パーキンソン病、HIV関連認知症、成人発症糖尿病、老人性心アミロイドーシス、内分泌腫瘍、緑内障、アレキサンダー病、アルパーズ病、毛細血管拡張性運動失調症、バッテン病(スピールマイヤー-フォークト-シューグレン-バッテン病としても知られる)、ウシ海綿状脳症(BSE)、カナバン病、コケイン症候群、皮膚基底核変性症、ハンチントン病、ケネディ病、クラッペ病、マシャド・ジョゼフ病(脊髄小脳失調症3型)、多系統萎縮症、神経ボレリア症、ペリツェウス・メルツパッヘル病、ピック病、原発性側索硬化症、プリオン病、レフサム病、サンドホフ病、シルダー病、悪性貧血後発の亜急性連合脊髄変性症、統合失調症、脊髄小脳失調症(特徴が異なる様々な型)、脊髄性筋萎縮症、スティーラー・リチャードソン・オルゼウスキー症候群、脊髄ろう、シャルコー・マリー・トゥース病、地中

10

20

30

40

50

海熱、マックル・ウェルズ症候群、突発性骨髄腫、アミロイドポリニューロパチー、アミロイド心筋症、全身性老人性アミロイドーシス、アミロイドポリニューロパチー、アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカー症、甲状腺の髄様癌、孤立性心房アミロイド、透析患者の α_2 -ミクログロブリンアミロイド、封入体筋炎、筋消耗性疾患の α_2 -アミロイド蓄積、ランゲルハンス島糖尿病II型インスリノーマ及び他のアミロイドーシス関連疾患を包含する。

【0042】

「末梢神経障害」は、末梢神経に影響を及ぼす神経変性障害であり、運動、感覚、感覚運動又は自律神経の機能障害の1またはそれらの組合せとしてもっとも多く顕現する。末梢神経障害は、例えば遺伝的に獲得される場合もあれば、全身性疾患の結果生じる場合や、神経毒性剤（例えば抗悪性腫瘍薬）などの毒性剤や産業や環境汚染物質により誘発される場合がある。「末梢感覚神経障害」の特徴は、末梢感覚神経の変性であり、突発性の場合があり、例えば、以下の結果生じうる：糖尿病（糖尿病性神経障害）、癌の細胞分裂阻害剤治療（例えばビンクリスチン、シスプラチン、メトトレキサート、3'-アジド-3'-デオキシミジン又はタキサン、例えばパクリタキセル [タキソール（登録商標）、Bristol-Myers Squibb Oncology, ニュージャージー州プリンストン] 及びドセタキセル [TAXOTERE（登録商標）、Rhone-Poulenc Rorer, フランス アントニー] などの化学療法剤治療）、アルコール依存、後天性免疫不全症候群（AIDS）又は遺伝的素因。遺伝的に獲得される末梢神経障害の例として、レフサム病、クラッペ病、異染性白質ジストロフィー、ファブリー病、デジェリン・ソッタス病、無リポタンパク白血症及びシャルコー・マリー・トゥース病（CMT）（腓骨筋萎縮症又は遺伝性運動感覚神経ニューロパチー（HMSN）としても知られる）が挙げられる。末梢神経障害のほとんどの種類は、ゆっくりと、数か月又は数年かけて発症する。臨床分野では、このような神経障害を慢性と呼ぶ。急激に数日間で発症する末梢神経障害もあり、急性と呼ばれている。末梢神経障害は通常感覚神経と運動神経の両方に影響を及ぼすので、混合型の感覚・運動神経障害をもたらすが、純粋な感覚神経障害と運動神経障害も知られている。

10

20

【0043】

本明細書で使用される「診断」という用語は、神経変性障害（例えばAD）の同定などの、分子若しくは病理状況、疾患又は状態の同定又は分類を指す。

【0044】

本明細書で使用される「予後」という用語は、神経変性障害に起因する疾患症状の見込みを予測することを指す。本明細書で使用される「予測」という用語は、薬物又は一式の薬物に対する患者の応答が良好か不良かの見込みを指す。一実施態様では、予測はそれらの応答の範囲に関する。一実施態様では、予測は、患者が例えば特定の治療薬での治療後、再発せずどのくらいの期間生存するか又は改善するか、及び/又はその可能性に関する。本発明の予測方法を臨床で使用し、任意特定の患者に最適な治療様式を選択し治療を決定することができる。本発明の予測方法は、例えば所与の治療薬の投与又は組合せ、外科的介入、ステロイド治療などを含む所与の治療レジメンなどの治療レジメンに患者が良好に応答する見込みがあるか、又は治療レジメン後、患者が長期生存する見込みがあるかを予測する有益なツールである。

30

40

【0045】

本明細書では、「治療」は、治療対象の個人又は細胞の自然な経過を変更しようとする臨床的介入を指し、臨床病理の期間の前又はその間実施されうる。治療の望ましい効果として、疾患症状の発生又は再発の防止、疾患の任意の直接的又は間接的病理結果の減少、疾患進行速度の低下、疾患状態の回復又は緩和、及び寛解又は予後の改善が挙げられる。一部の実施態様では、本発明の方法は、疾患又は障害の発症を遅滞させる試みに有用である。

【0046】

「効果的な量」は、所望の治療、診断又は予防結果を得るのに効果的な、必要用量及び期間での量を意味する。

50

【0047】

「個人」、「対象」又は「患者」は脊椎動物である。特定の実施態様では、脊椎動物は哺乳動物である。哺乳動物としては、限定ではなく、霊長類（ヒト及び非ヒト霊長類を含む）と齧歯類（例えばマウスやラット）が挙げられる。特定の実施態様では、哺乳動物はヒトである。

【0048】

「コントロール対象」は、神経変性障害（例えばAD）に罹患していないと診断された健康な対象を指し、神経変性障害（例えばAD）関連のいかなる兆候や症状も有さない。コントロール対象はまた、ADなどの神経変性障害の家族歴のない健康な対象でありうる。

10

【0049】

本明細書で使用する「試料」という用語は、例えば物理的、生化学的、化学的及び/又は生理学的特徴に基づいて特徴づけられる及び/又は同定される細胞の及び/又は分子の実体を含む、目的の対象から得た又は由来の組成物を指す。例えば、「疾患試料」という語句とその変化形は、特徴づけられる細胞の及び/又は分子の実体を含むことが予想される又はわかっている、目的の対象から得られた任意の試料を意味する。

【0050】

「組織」又は「細胞試料」は、対象又は患者から得られた同種の細胞の集合を意味する。組織源または細胞試料源は、新鮮な、冷凍及び/又は保存された器官の個体の組織、組織試料、生検又は吸引物；血液又は血液の任意の成分；脳脊髄液、羊水、腹水又は間質液などの体液；対象の妊娠期間又は発生の任意の時点の細胞でありうる。組織試料はまた、初代又は培養細胞または細胞株（例えばニューロン）でありうる。組織または細胞試料は、疾患組織/器官から得られうる。組織試料は、自然な状態で組織に自然に混合されることはない保存料、抗凝固剤、バッファー、固定剤、栄養剤、抗生物質などの化合物を含みうる。

20

【0051】

「参考試料」、「参考細胞」、「参考組織」、「コントロール試料」、「コントロール細胞」又は「コントロール組織」は、本明細書では、本発明の方法を使用して同定しようとしている疾患又は疾病に罹患していないことがわかっているか又はそう考えられるソースから得られた試料、細胞又は組織を指す。参考試料、参考細胞、参考組織、コントロール試料、コントロール細胞又はコントロール組織は、本発明の方法を使用して疾患又は疾病が同定されている対象又は患者の体の健康な部分から得てもよい。参考試料、参考細胞、参考組織、コントロール試料、コントロール細胞又はコントロール組織は、あるいは、本発明の方法を使用して疾患又は疾病が同定されている対象又は患者ではない個人の体の健康な部分から得てもよい。「参考試料」、「参考細胞」、「参考組織」、「コントロール試料」、「コントロール細胞」又は「コントロール組織」の遺伝子発現レベルはまた、神経変性疾患又は障害に罹患していない母集団から得られた平均値レベルとして予め決定してもよいが、場合によっては、参考レベルは神経変性疾患又は障害の患者を含む個人の集団の平均値又は中央値レベルでありうる。

30

【0052】

本明細書の目的では、組織試料「切片」は、組織試料の一部又は一片、例えば組織試料から切り取った薄片又は細胞を意味する。本発明に含まれる方法では組織試料の同一切片が形態レベル・分子レベルで解析されるか又はタンパク質と核酸の両方において解析されることが理解されている前提で、本発明に従って複数の組織試料切片が採取され解析に供されうることを理解されたい。

40

【0053】

「互いに関連させる（する）」又は「相関の」は、なんらかの方法で、第1の解析又はプロトコルの成果及び/又は結果を第2の解析又はプロトコルの成果及び/又は結果と比較することを意味する。例えば、第1の解析又はプロトコルの結果を使用して第2のプロトコルを実施することや、及び/又は第1の解析又はプロトコルの結果を使用

50

して第2の解析又はプロトコールを実施すべきか決定することがある。遺伝子発現の解析又はプロトコールの実施態様に関しては、遺伝子発現の解析又はプロトコールの結果を使用して特定の治療レジメンを実施すべきか決定することができる。

【0054】

特定の治療薬又は治療オプションに対する「耐性増加」という用語は、本発明との関係で使用される場合は、薬物の標準用量又は標準治療プロトコールに対する応答低下を意味する。

【0055】

特定の治療薬又は治療オプションに対する「感受性低下」という用語は、本発明との関係で使用される場合は、薬剤の標準用量又は標準治療プロトコールに対する応答低下を意味し、応答低下は薬剤の用量又は治療の強度を上げることにより（少なくとも部分的に）補われうる。

【0056】

「患者応答」又は「応答」は、患者の利益を指す任意の評価項目を使用して評価することができ、限定ではなく、以下のものが挙げられる：（1）疾患の進行の遅滞及び完全停止を含む、ある程度の疾患進行の阻害；（2）疾患のエピソード及び/又は症状の数の減少；（3）病変サイズの減少；（4）近隣の末梢器官及び/又は組織への疾患細胞の浸潤の阻害（例えば、低減、遅滞又は完全停止）；（5）疾患拡大の阻害（すなわち、低減、遅滞又は完全停止）；（6）自己免疫応答の低下、これにより必須ではないが病変の縮退や消失をもたらす；（7）障害関連の1または複数の症状のある程度の軽減；（8）治療後の無病提示の長期化；及び/又は（9）治療後の所与の時点での死亡率低下。

【0057】

「遺伝子サイン」という用語は、「遺伝子発現サイン」と交換可能に使用され、その発現が、特定の分子的、病理的、組織的及び/又は臨床的特徴により特徴づけられる、例えばADなどの神経変性障害を指示する、1つの遺伝子又は遺伝子の組合せを意味する。特定の実施態様では、遺伝子サインを有する1または複数の遺伝子の発現は、コントロール対象のものとは比べて増加している。

【0058】

「タンパク質サイン」という用語は、「タンパク質発現サイン」と交換可能に使用され、その発現が、特定の分子的、病理的、組織的及び/又は臨床的特徴により特徴づけられる、例えばADなどの神経変性障害を指示する、1つのタンパク質又はタンパク質の組合せを意味する。特定の実施態様では、タンパク質サインを有する1または複数のタンパク質の発現は、コントロール対象のものとは比べて増加している。

【0059】

「抗体」（Ab）と「免疫グロブリン」（Ig）は、類似の構造的特徴を有する糖タンパク質を意味する。抗体は特定の抗原に結合する特異性を示すが、免疫グロブリンは、抗体及び他の抗原特異性を一般にもたない抗体様分子の両方を含む。後者のポリペプチドは、例えば、リンパ系では低濃度で産生され、ミエロームでは高濃度で産生される。

【0060】

「抗体」と「免疫グロブリン」という用語は、最も広義に交換可能に使用され、モノクローナル抗体（例えば完全長又はインタクトなモノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、一価抗体、多価抗体、多特異性抗体（例えば、所望の生物学的活性を示すかぎり二特異性抗体）を包含し、特定の抗体断片も含みうる（後に詳述する）。抗体は、キメラ、ヒト、ヒト化及び/又は親和性成熟抗体でありうる。

【0061】

「全長抗体」、「インタクトな抗体」及び「全抗体」は、本明細書では交換可能に使用され、実質的にインタクトな形状を意味するが、以下に記載の抗体断片は意味しない。該用語は特に、Fc領域を含む重鎖を有する抗体を意味する。

【0062】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部を含み、好ましくは、その抗原結合領域を

10

20

30

40

50

含む。抗原断片の例として、F a b、F a b'、F (a b')₂ 及び F v 断片；二重特異性抗体；直鎖抗体；単鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多特異性抗体が挙げられる。

【 0 0 6 3 】

抗体をパインで消化すると、「F a b」断片と呼ばれる、それぞれ1つの抗原結合部位をもつ2つの同一の抗原結合断片と、残りの「F c」断片が得られ、F c断片は容易に結晶化する能力を有することがその名称に反映されている。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有し、さらに抗原に架橋結合する能力のあるF (a b')₂断片が得られる。

【 0 0 6 4 】

「F v」は、完全な抗原結合部位を含む最小の抗体断片である。一実施態様では、2本鎖のF v種は、強固に非共有的に会合する重鎖1本と軽鎖1本の可変ドメインの二量体からなる。1つのF vの6個のCDRは協働して抗体に抗原結合特異性を与える。しかし、1つの可変ドメイン（又は抗原に特異的なCDRを3つしかもたないF vの半分）であっても、全体的な結合部位よりも低親和性ではあるが、抗原を識別し結合する能力を有する。

【 0 0 6 5 】

F a b断片は、重鎖と軽鎖の可変ドメインを含み、さらに軽鎖の定常領域と重鎖の第1の定常ドメイン（CH1）も含む。F a b断片と違い、F a b'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1または複数のシステインを含む残基数個が重鎖CH1領域のカルボキシ末端側に付加されている。定常ドメインのシステイン残基（単数又は複数）が遊離チオール基を有するF a b'を、本明細書ではF a b' - S Hと称する。F (a b')₂抗体断片はもともと、間にヒンジのシステインを有するF a b'断片の対として産生された。抗体断片の他の化学的カップリングも知られている。

【 0 0 6 6 】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体集団から得られた抗体を指す。すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少数で存在しうる起こりうる変異（例えば自然に生じる変異）を除いて同一である。従って、「モノクローナル」という修飾語は、抗体の特徴として、別々の抗体の混合体ではないことを意味する。特定の実施態様では、このようなモノクローナル抗体は典型的には標的を結合するポリペプチド配列を有する抗体を含み、この標的結合ポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列から1つの標的結合ポリペプチド配列を選択することを含むプロセスにより得られた。例えば、選択のプロセスとして、例えばハイブリドーマクローン、ファージクローン又は組換えDNAクローンのプールなどの複数のクローンからの特定のクローンを選択しうる。選択された標的結合配列をさらに改変して、例えば、標的との親和性を改善する、標的結合配列をヒト化する、細胞培養での生産を改善する、インビボでの免疫原性を低減する、多特異性抗体を作製するなどが可能であり、改変された標的結合配列を有する抗体もまた本発明のモノクローナル抗体であることを理解されたい。様々な決定基（エピトープ）に対する様々な抗体を典型的に含むポリクローナル抗体の調製物と違って、モノクローナル抗体調製物のモノクローナル抗体はそれぞれ抗原上の単一の決定基に対する。モノクローナル抗体調製物は、その特異性に加えて、典型的には他の免疫グロブリンに汚染されないという利点を有する。

【 0 0 6 7 】

「モノクローナル」という修飾語は、抗体が実質的に均質な抗体集団から得られたことを意味するのであって、何らかの特定の方法により抗体が産生されると解釈してはならない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、様々な手法で作製でき、例えば、ハイブリドーマ法（例えばKohlerら、Nature, 256: 495 (1975); Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2版、1988); Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)のHammerlingら）；組換えDNA法（例えば米国特許第4,816,567号参照）、ファージディスブ

10

20

30

40

50

レイ法（例えばClacksonら, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marksら, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhuら, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Leeら, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); Leeら, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004)を参照)及びヒト抗体又はヒト免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリンの遺伝子座又は遺伝子を部分的に又は全て有する動物のヒト様抗体を産生する方法（例えば国際公開第98/24893号; 国際公開第96/34096号; 国際公開第96/33735号; 国際公開第91/10741号; Jakobovitsら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovitsら, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemannら, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); 米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 同第5,661,016号; Marksら, *Bio. Technology* 10: 779-783 (1992); Lonbergら, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwildら, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996) および Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)を参照)が挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 8 】

本明細書のモノクローナル抗体は特に、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の種由来又は特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか相同性を有し、その鎖（単数又は複数）の残りの部分は別の種由来又は別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか相同性を有する「キメラ」抗体を含み、所望の生物学的活性を呈するかぎりこれらの抗体の断片も含む（米国特許第4,816,567号; 及びMorrisonら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6855-9855 (1984)）。

【 0 0 6 9 】

「ヒト化」された形態の非ヒト（例えばマウス）抗体は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含むキメラ抗体である。一実施態様では、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、レシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性及び/又は能力を有するマウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域で置換されている。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）の残基が対応する非ヒト残基で置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見られない残基を含みうる。これらの改変を行い抗体の能力をさらに洗練してよい。一般に、ヒト化抗体は、実質的に1つ又は典型的には2つの可変ドメインの全てを有し、ここで全て又は実質的に全ての超可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全て又は実質的に全てのFRはヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリンの、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域（Fc）の少なくとも一部分を含みうる。さらなる詳細については、Jonesら, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmannら, *Nature* 332:323-329 (1988); 及びPresta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)を参照されたい。また、以下のレビュー文献とその参照文献も参考されたい: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle 及び Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)。

【 0 0 7 0 】

「ヒト抗体」は、ヒト産生抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を含み及び/又は本明細書に開示のヒト抗体を作製する手法のいずれかを使用して作製されている。このような手法には、ファージディスプレイライブラリー（例えばMarksら, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) 及び Hoogenboomら, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991)）などのヒト由来のコンビナトリアルライブラリーのスクリーニング; ヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株を使用してのヒトモノクローナル抗体産生（例えば Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeurら, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 55-93 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及び Boernerら, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)参照); 及び内因性免疫グロブリン産生の非存在下、ヒト抗体の全種を産生する能力のある遺伝子導入動物（例えばマウス）でのモ

ノクローナル抗体の産生（例えばJakobovitsら, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90: 2551 (1993); Jakobovitsら, Nature, 362: 255 (1993); Bruggermannら, Year in Immunol., 7: 33 (1993)参照）が挙げられる。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト動物由来の抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除く。

【0071】

「親和性成熟」抗体とは、1または複数のCDRに1または複数の改変を有する結果、これらの改変を有さない親抗体と比較して、抗原に対する親和性が改善された抗体を指す。一実施態様では、親和性成熟抗体は、標的抗原に対し、ナノモル又はさらにピコモルの親和性を有する。親和性成熟抗体は当業者に公知の方法で産生される。Marksら Bio/Technology 10:779-783 (1992) は、VH及びVLドメインシャッフリングによる親和性成熟を記述している。ランダムな変異原性HVR及び/又はフレームワーク残基がBarbasら Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994); Schierら Gene 169:147-155 (1995); Yeltonら J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jacksonら, J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); 及び Hawkinsら, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992) に記載されている。

10

【0072】

抗体の「エフェクター機能」は、抗体のFc領域（天然配列のFc領域又はアミノ酸配列バリエーションFc領域）に起因し、抗体のイソタイプにより異なる生物学的活性を意味する。抗体のエフェクター機能の例として、限定ではなく、C1q結合及び補体依存性細胞傷害（CDC）；Fc-受容体結合；抗体依存性細胞傷害（ADCC）；食作用；細胞表面受容体の下方制御（例えばB細胞受容体）；及びB細胞活性化が挙げられる。

20

【0073】

「Fc受容体」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を記述する。いくつかの実施態様では、FcRは、天然ヒトFcRである。いくつかの実施態様では、FcRは、IgG抗体（ガンマ受容体）を結合し、FcRI、FcRII及びFcRIIIサブクラスの受容体を包含し、アレルバリエーション及びそれらの受容体のオルタナティブスプライス形も含む。FcRII受容体は、細胞質ドメインにおいて本質的に異なるが類似のアミノ酸配列を有するFcRIIA（「活性化受容体」）とFcRIIB（「抑制受容体」）を包含する。活性化受容体FcRIIAは、免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）を細胞質ドメインに含有する。抑制受容体FcRIIBは、免疫受容抑制性チロシンモチーフ（ITIM）を細胞質ドメインに含有する（例えば、Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)参照）。FcRは、例えば、Ravetch and KinoshitaのAnnu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capelら, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及びde Haasら, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)に概説されている。将来同定されるものも含めて他のFcRも本発明では「FcR」という用語に包含される。

30

【0074】

「Fc受容体」という用語又は「FcR」は、母体のIgGの胎児への受け渡し（Guyerら, J. Immunol. 117:587 (1976) 及びKimら, J. Immunol. 24:249 (1994)）及び免疫グロブリンの恒常性調節を担う新生児の受容体FcRnも含む。FcRnへの結合を測定する方法が知られている（例えばGhetie and Ward., Immunol. Today 18(12):592-598 (1997); Ghetieら, Nature Biotechnology, 15(7):637-640 (1997); Hintonら, J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004); 国際公開第2004/92219号 (Hintonら)を参照）。

40

【0075】

インビボでのヒトFcRnへの結合と、ヒトFcRn高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えばトランスジェニックマウスやヒトFcRnを発現する遺伝子導入されたヒト細胞株、又はバリエーションFc領域を含むポリペプチドが投与された霊長類などで測定できる。国際公開第2000/42072号 (Presta) は、FcRとの結合が改善又は減少した抗体バリエーションを記述している。Shieldsら J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)も参照されたい。

【0076】

「Fc領域を有する抗体」という用語は、Fc領域を有する抗体を指す。Fc領域のC

50

末端のリジン（EU番号付けシステムによれば残基447）は、例えば抗体の精製中に又は抗体をコードする核酸の組換え操作により除去されてもよい。従って、本発明によるFc領域を有する抗体を含む組成物は、K447を有する抗体、全てK447が除去された抗体、又はK447残基を有する抗体と有さない抗体の混合を含みうる。

【0077】

「ヒトエフェクター細胞」は、1または複数のFcRを発現し、エフェクター機能を発揮する白血球である。特定の実施態様では、細胞は、少なくともFcRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を発揮する。ADCCを媒介するヒト白血球の例として、末梢血単核球（PBMC）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞傷害性T細胞及び好中球が挙げられる。エフェクター細胞は、例えば血液などの天然源から単離されうる。

10

【0078】

「結合親和性」は一般に、分子（例えば抗体）の1つの結合部位とその結合相手（例えば抗原）の間の非共有結合的相互作用の総合的な強度を指す。他に断りがない限り、本明細書では、「結合親和性」とは、結合対（例えば抗体と抗原）の間の1：1の相互作用を反映する内在性の結合親和性を指す。分子Xとその相手Yの親和性は、一般に、解離定数（Kd）で表すことができる。親和性は、本明細書に記載のものも含めて当分野では既知の一般的な方法で測定できる。低親和性抗体は一般に抗原とゆっくり結合し、容易に解離する傾向があるが、高親和性は一般に抗原と速やかに結合し、長時間結合を維持する傾向がある。結合親和性測定の様々な方法が当分野で知られている。

【0079】

本明細書で使用される「標識」という用語は、検出可能な化合物又は組成物を指す。標識は、典型的には、核酸プローブ又は抗体などの試薬に直接又は間接的に結合又は融合され、それが結合又は融合された試薬の検出を容易にする。標識はそれ自体が検出可能でもよく（例えば放射性同位体標識又は蛍光標識）、又は酵素標識の場合は、検出産物となる基質化合物又は組成物の化学的変更を触媒しうる。

20

【0080】

「単離された」核酸、ポリペプチド又は抗体などの生体分子は、その天然環境の少なくとも1つの構成成分から同定され、分離され及び/又は回収されたものである。

【0081】

本明細書における「約」値又はパラメーターの言及は、その値又はパラメーターそのものを指す実施態様を包含（及び記述）する。例えば、「約X」に言及する記述は、「X」の記述を包含する。

30

【0082】

「薬学的製剤」という用語は、その医薬の生物学的活性が有効となりうる形態であって、その製剤を投与される対象にとって忍容不能な毒性のある追加の成分を含まない無菌調製物を指す。

【0083】

「無菌」製剤は、無菌又はあらゆる微生物とその胞子を含まない製剤である。

【0084】

「添付文書」は、治療又は診断用の製品又は医薬の市販用パッケージに通例として同封される使用説明書を指すのに用いられ、適応、用途、用法、用量、禁忌、その製品と併用される他の治療又は診断用製品に関する情報及び/又はこのような治療又は診断用製品の使用に関する警告などが記載される。

40

【0085】

「キット」は、少なくとも1つの試薬、例えば本発明のバイオマーカー遺伝子又はタンパク質を特異的に検出するプローブを含む、任意の製造品（例えばパッケージ又は容器）を指す。特定の実施態様では、製造品は、本発明の方法を実施するユニットとして販売促進され、流通し、又は販売される。

【0086】

「に対し応答性が悪い」という表現は、対象や患者に以前投与された1または複数の医

50

薬に対する反応に関し、このような医薬の投与に際し治療中の疾病のいかなる治療の兆候も又は適切な治療の兆候を示さなかったか、該医薬に対し臨床的に忍容不能な高度の毒性を示したか、又はこのような医薬を最初に投与された後治療の兆候が維持されなかった対象や患者を記述し、治療という語は、本明細書に定義されるこの文脈において使用される。「応答性が悪い」という語句は、以前投与された医薬に対し耐性及び/又は抵抗性を有する患者の記述を包含し、対象又は患者が投薬中の医薬を受けている間は改善しており、対象又は患者が該医薬のレジメンを終了後12か月以内(例えば6か月以内)に改善しているが、もはや応答性が悪い状況を包含する。1または複数の医薬に対し応答性が悪いとは、このように、その医薬で以前又は現在治療を受けた後も引き続き活動性疾患を有する対象を包含する。例えば、ある患者は、応答性が悪い医薬での約1か月から3か月の治療後、活動性疾患を有することがある。このような応答性は、目的とする疾患の治療に熟練した医師により評価されうる。

10

【0087】

本発明の方法で使用するバイオマーカーの「量」や「レベル」は、生体試料中で検出可能なレベルである。これらは当業者には周知の方法で測定可能であり、本明細書にも開示されている。

【0088】

「発現のレベル」又は「発現レベル」という用語は、一般に交換可能に使用され、一般に生体試料中のポリヌクレオチド、アミノ酸産物又はタンパク質の量を意味する。「発現」とは一般に遺伝子がコードする情報が細胞に存在し機能する構造に変換されるプロセスを意味する。従って、本明細書では、遺伝子の「発現」は、ポリヌクレオチドに転写、タンパク質に翻訳、又は翻訳後のタンパク質の修飾も意味しうる。転写されたポリヌクレオチド、翻訳されたタンパク質又は翻訳後修飾タンパク質の断片も、オルタナティブスプライシングで生じた転写産物又は分解された転写産物から生じた転写産物由来であれ、翻訳後のタンパク質プロセッシング(例えばタンパク質分解)由来であれ、発現されたとみなされるべきである。「発現された遺伝子」は、mRNAとしてのポリヌクレオチドに転写された後タンパク質に翻訳されるもの、転写されてRNAになったがタンパク質には翻訳されないもの(例えば運搬、非翻訳RNA(ncRNA)及びリボソームRNA(rRNA))を包含する。

20

【0089】

本発明の方法で使用するバイオマーカー

本発明の方法で使用するバイオマーカーとして、例えば遺伝子tbx6及びdlx2の発現産物(例えばタンパク質、mRNA、ncRNA又は他のポリヌクレオチド)が挙げられる。

30

【0090】

Tbx6は、T-box転写因子6又はT-boxタンパク質6としても知られる、発生プロセスに關与する転写調節因子である。その全体を本明細書に組み込まれるUnitProtKB/Swiss Prot Entry Number 095947を参照されたい。Tbx6はT-box遺伝子ファミリーのメンバーであり、ヒトでは16p12-q12の染色体上の位置を有する。その全体を本明細書に組み込まれるYiら, Genomics 55:10-20 (1999)を参照されたい。

40

【0091】

T-box6タンパク質は、436アミノ酸長であり、1つのT-boxDNA結合ドメインを含む。UnitProtKB/Swiss Prot Entry Number 095947を参照されたい。Tbx6の天然バリエーションが存在することが知られ、例えばアミノ酸162でのGLYからSERの置換、アミノ酸178でのSERからPHEへの置換及びアミノ酸179でのPROからSERへの置換がある。同上。tbx6のいくつかの配列が、GenBankに寄託され、受託番号AJ007989(mRNA)及びCAA07812.1(翻訳); BC026031(mRNA)及びAAH26031.1(翻訳); AJ010279(ゲノムDNA)及びCAB37938.1(翻訳)を有し、これらはすべてその全体を本明細書に組み込まれる。

【0092】

50

D l e u 2 は、ポリアデニル化されスプライスされた、長さ 1 . 0 ~ 1 . 8 k b の長い非翻訳 R N A (n c R N A) をコードする。その全体を本明細書に組み込まれる Klein ら, Cancer Cell 17: 28-40 (2010年 1 月) を参照されたい。n c R N A は L E U 2 としても知られる。UnitProtKB/Swiss Prot Entry Number 043262。d l e u 2 の機能は未解明であるが、n c R N A のこのクラスの他のメンバーは、X 染色体の不活性化又は活性化、インプリンティング及び転写活性化 / 遺伝子発現の調節などの機能を有する。Klein ら, Cancer Cell 17: 28-40 (2010年 1 月)。D l e u 2 は、ヒト染色体領域 1 3 q 1 4 の遺伝子クラスターに d l e u 1 とマイクロ R N A の m i R - 1 5 a / 1 6 - 1 とともに存在する。同上。d l e u 2 / m i R - 1 5 a / 1 6 - 1 遺伝子座が成熟 B 細胞の拡張において役割を果たしていることが示されている。同上。さらに、この遺伝子座は、B 細胞において腫瘍抑制因子の働きをし、マウスでこの遺伝子座が欠失すると B 細胞慢性リンパ性白血病 (C L L) 関連の表現型につながる。同上。

10

【 0 0 9 3 】

5 5 アミノ酸の仮想タンパク質は n c R N A にコードされうる。UnitProtKB/Swiss Prot Entry Number 043262 参照。d e l u 2 のいくつかの配列が、GenBank に寄託され、受託番号 Y15228 (mRNA) 及び CAA75516.1 (翻訳); CH471075 (ゲノム DNA) 及び EAX08851.1 (翻訳); BC017819 (mRNA) 及び AAH17819.1 (翻訳); BC022282 (mRNA) 及び AAH22282.1 (翻訳); BC030971 (mRNA) 及び AAH30971.1 (翻訳) これらはすべてその全体を本明細書に組み込まれる。同上。

【 0 0 9 4 】

当分野で知られる他の神経変性バイオマーカーを、t b x 6 及び / 又は d l e u 2 と併用で本発明の方法に使用してよい。追加の神経変性バイオマーカーとして、例えば以下のものが挙げられる: アミロイド- (A)、アミロイド前駆体タンパク質 (A P P)、タウ、プレセニン 1 (P S 1)、プレセニン 2 (P S 2)、アポリポタンパク質 E (アポ E)、ニューロン系状タンパク質 (N T P)、 β -抗肝トリプシン、 β -セクレターゼ、C D 5 9、C 反応性タンパク質、C 1 q、8 - ヒドロキシ - デオキシグアニン、グルタミン合成酵素、グリア線維酸性タンパク質 (G F A P)、I L - 6 受容体複合体、カリクレイン、メラノトランスフェリン、ニューロフィラメントタンパク質、ニトロチロシン、オキシステロール、スルファチド、シナプシスマーカー、S 1 0 0 及び他の神経変性バイオマーカーが米国特許出願公報第 2010/0255485 号; 同第 2010/0167947 号; 同第 2010/0159486 号; 同第 2010/0124756 号; 同第 2009/0239241 号; 同第 2008/0261226 号; 同第 2008/0220449 号; 同第 2008/0026405 号; 同第 2005/0244890 号; 同第 2005/0221348 号; 米国特許第 4, 728, 605 号, 同第 5, 874, 312 号, 同第 6, 027, 896 号, 同第 6, 114, 133 号, 同第 6, 130, 048 号, 同第 6, 210, 895 号, 同第 6, 358, 681 号, 同第 6, 451, 547 号, 同第 6, 461, 831 号, 同第 6, 465, 195 号, 同第 6, 475, 161 号, 及び同第 6, 495, 335 号に記載されている。追加の神経変性バイオマーカーとして、Fahnestock ら, J. Neural. Transm. Suppl. 62:241-52 (2002); Masliah ら, Neurobiol. Aging 16(4):549-56 (1995); Power ら, Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 12(2):167-70 (2001); 及び Burbach ら, J. Neurosci. 24(10):2421-30 (2004) に記載のものが挙げられる。

20

30

【 0 0 9 5 】

当業者であれば、本発明に提供される情報並びに当分野の情報に基づき、神経変性バイオマーカーを標的とする、本発明の方法に使用されるプローブをいかに構築するか理解されよう。

40

【 0 0 9 6 】

一般的な手法

本発明の実施には、他に断りがないかぎり、当分野の技術の範囲内である分子生物学 (組換え手法を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学及び免疫学の一般的な手法を使用する。このような手法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 版 (Sambrook ら, 1989); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987); Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Current P

50

rotocols in Molecular Biology (F. M. Ausubelら編, 1987, 及び定期更新); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullisら編, 1994)などの文献に十分説明されている。

【0097】

本発明で使用するプライマー、オリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドは当分野で周知の標準的な手法により生成されうる。

【0098】

試料は、限定ではなく例えば外科的切除、吸引又は生検などを含む当分野で周知の様々な手順により獲得できる。組織は新鮮な組織又は冷凍組織でよい。一実施態様では、試料はパラフィンなどの中で固定され包埋される。組織試料は一般的な方法で固定(すなわち保存)されうる。当業者であれば、固定液が、試料の組織染色又はそれ以外の解析の目的に応じて決定されることを理解されよう。また、当業者であれば、固定時間は組織試料のサイズと使用する固定液によることを理解されよう。

【0099】

遺伝子発現レベルの検出

以下に述べるように、試料中のバイオマーカの発現は、その多くは当分野で周知であり、熟練した当業者には理解される、例えば、限定ではなく、免疫組織化学的及び/又はウエスタン解析、ELISA、ELIFA、インサイチュハイブリダイゼーション、免疫沈降、分子結合アッセイ、マイクロアレイ解析、蛍光活性化細胞分取(FACS)ノーザン解析及び/又はmRNAやncRNAなどのRNAのPCR解析などの定量アッセイ、並びに遺伝子及び/又は組織アレイ解析により実施されうる様々なアッセイの任意のものを含む数々の方法により解析されうる。遺伝子及び遺伝子産物の状態を評価する典型的なプロトコールが、例えば、Ausubelら編, 1995, Current Protocols in Molecular Biologyのユニット2(ノーザンプロット法)、4(サザンプロット法)、15(免疫プロット法)及び18(PCR解析)に記載されている。

【0100】

哺乳動物組織又は細胞試料のバイオマーカの発現を検出する追加の方法として、試料をバイオマーカと結合する抗体、反応性の高いその断片又はバイオマーカタンパク質の抗原結合領域を含む組換えタンパク質と接触させた後、試料中の抗体、その断片又は組換えタンパク質の結合を検出することが挙げられる。

【0101】

本発明の特定の実施態様では、試料中のバイオマーカの発現は、免疫組織化学及び染色プロトコールを使用して検査される。組織切片の免疫組織化学的染色は、試料中のタンパク質の存在を評価又は検出する信頼できる方法とされている。免疫組織化学(「IHC」)的手法は、通常は発色法又は蛍光法により、抗体を使用して細胞抗原をインサイチュで調査し視覚化する。

【0102】

試料調製には、哺乳動物の組織又は細胞試料(例えばヒト脳の組織試料)が使用されうる。試料の例として、限定ではなく、組織生検、脳組織生検、血液、肺からの吸引液、痰、リンパ液などが挙げられる。遺伝子又は遺伝子産物は、疾患組織又は他の体試料、例えば脳組織(生検)、脳脊髄液、全血、血漿又は血清を含む血液、尿、唾液、涙などから検出できる。特定の例では、個々の細胞や細胞型は、限定ではないが、単離されたニューロンでありうる。試料は、限定ではなく例えば外科的切除、吸引又は生検などを含む当分野で周知の様々な手順により獲得できる。組織は新鮮な組織又は冷凍組織でよい。一実施態様では、試料はパラフィンなどの中で固定され包埋される。組織試料は一般的な方法で固定(すなわち保存)されうる。対象由来の生体試料は当分野で公知の方法で得られうる。組織生検は、代表的な疾患組織片を得るのにしばしば利用される。あるいは、細胞は目的の疾患細胞を含むとわかっている又は含むと考えられる組織/体液として間接的にも得られうる。試料調製には、哺乳動物(典型的にはヒト対象)由来の組織または細胞試料が使用されうる。

【0103】

組織試料は、一般的な方法により固定（すなわち保存）されうる（例えばManual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology, 3版（1960）Lee G. Luna, H T (ASCP) 編, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, 編, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.を参照）。当業者であれば、固定液が、試料の組織染色又はそれ以外の解析の目的に応じて決定されることを理解されよう。また、当業者であれば、固定時間は組織試料のサイズと使用する固定液によることを理解されよう。例として、中性の緩衝ホルマリン、ブアン又はパラホルムアルデヒドを試料固定に使用してよい。

10

【0104】

一般に、試料をまず固定し、その後アルコール濃度を順次上げながら脱水し、パラフィン又は他の薄片作製用媒体で浸潤し包埋して組織試料を薄片にする。あるいは、組織から切片を切り取ったものを固定してよい。例として、組織試料は、一般的な方法によりパラフィン中で包埋し処理してよい（例えばManual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology, 前掲, 参照のこと）。使用されうるパラフィンの例として、限定ではなく、パラプラスト（Paraplast）、プロロイド（Broloid）及びティッシュメイ（Tissuemay）が挙げられる。組織試料が包埋されると、試料はマイクロームなどで切片にされうる（例えばManual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology, 前掲, 参照のこと）。この手順の例として、切片の厚みは約3ミクロンから約5ミクロンの範囲でありうる。切片が得られると、複数の標準的方法でスライドに接着させてよい。スライドの接着剤の例として、限定ではなく、シラン、ゼラチン、ポリリジンなどが挙げられる。例として、パラフィン包埋された試料は、正に帯電したスライド及び/又はポリリジンでコートされたスライドに接着させてよい。

20

【0105】

パラフィンを包埋材料として使用している場合、通常、組織切片を脱パラフィン化し、水に再度馴染ませる。組織切片は一般的な標準法により脱パラフィン化しうる。例えば、キシレンや、順次濃度を上げながらアルコールを使用してよい（例えばManual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology, 前掲, 参照のこと）。あるいは、Hemo-De7（CMS, テキサス州ヒューストン）などの市販の脱パラフィン化非有機剤を使用してよい。

30

【0106】

試料調製後、組織切片はIHCを利用して解析してよい。IHCは、形態学的染色法及び/又はインサイチュの蛍光ハイブリダイゼーションなどの追加の手法と組み合わせて実施されうる。直接的アッセイ又は間接的アッセイの2つの一般的なIHC法が利用可能である。第1のアッセイでは、抗体の標的抗原（例えばバイオマーカー）への結合が直接決定される。この直接的アッセイでは標識した試薬、例えば蛍光標識や酵素で標識された一次抗体などが使用され、他の抗体の相互作用なしに視覚化されうる。典型的な直接的アッセイでは、結合されていない一次抗体が抗原に結合し、次いで標識された二次抗体が一次抗体に結合する。二次抗体が酵素標識に結合する場所は発色基質又は蛍光発生基質が付加され、抗体を視覚化する。複数の二次抗体が一次抗体の異なるエピトープと反応しうるのでシグナル増幅が生じる。

40

【0107】

免疫組織化学で使用される一次及び/又は二次抗体は、典型的には、検出可能な部分で標識される。多くの標識が入手可能であり、一般に以下のカテゴリーに分類することができる：

(a) 放射性同位体、例えば³⁵S、¹⁴C、¹²⁵I、³H及び¹³¹I。抗体は、例えばCurrent Protocols in Immunology, Volumes 1及び2, Coligenら, Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991)に記載の手法を使用して放射性同位体で標識

50

することができ、放射活性は蛍光発光を計測して測定できる。

(b) コロイド金粒子。

(c) 蛍光標識。限定ではなく以下のものが挙げられる：希土類キレート（ユーロピウムキレート）、テキサスレッド、ローダミン、フルオレセイン、ダンシル、リサミン、ウンベリフェロン、フィコクリセリン（phycocrytherin）、フィコシアニン又は市販のSPECTRUM ORANGE⁷やSPECTRUM GREEN⁷などのフルオロフォア及び/又は上記の任意1又は複数の誘導体。蛍光標識は、例えばCurrent Protocols in Immunology, 前掲, に記載の手法を使用して抗体に結合させることができ、蛍光光度計を使用して蛍光を定量化できる。

(d) 様々な酵素 - 基質標識が入手可能であり、その一部が米国特許第4,275,149号で概説されている。酵素は一般に発色基質の化学的変更を触媒し、これは様々な手法を使用して測定される。例えば、酵素は基質の色の变化を触媒しうるが、これは分光光度的に測定されうる。あるいは、酵素は基質の蛍光や化学発光を変更しうる。化学発光基質は化学反応により電子的に励起されると、（例えばケミルミノメーターを使用して）測定可能な光を発するか、又は蛍光アクセプターにエネルギーを与える。酵素標識の例として、ルシフェラーゼ（例えばホタルルシフェラーゼや細菌ルシフェラーゼ；米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸脱水素酵素、ウレアーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRPO）などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ（例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素）、複素環オキシダーゼ（ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ）、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどが挙げられる。酵素を抗体に結合させる手法は、Methods in Enzym. (J. Langone & H. Van Vunakis編), Academic press, New York, 73:147-166 (1981)中のO'Sullivanら, "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay" に記載されている。

【0108】

酵素 - 基質の組合せの例として、例えば、(i) 西洋わさびペルオキシダーゼ（HRPO）と基質の水素ペルオキシダーゼであって、水素ペルオキシダーゼが色素前駆体を酸化する（例えばオルトフェニレンジアミン（OPD）又は3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩（TMB））；(ii) アルカリホスファターゼ（AP）と発色基質のパラ-ニトロフェニルリン酸；及び(iii) α -D-ガラクトシダーゼ（ α -D-Gal）と発色基質（例えばp-ニトロフェニル- α -D-ガラクトシダーゼ）又は蛍光発生基質（例えば4-メチルウンベリフェリル- α -D-ガラクトシダーゼ）が挙げられる。

【0109】

当業者には他の多くの酵素 - 基質の組合せが入手可能である。それらの一般的な概説は、米国特許第4,275,149号及び同第4,318,980号を参照されたい。標識は抗体と間接的に結合される場合もある。熟練者はこれを得る様々な手法を知っていよう。例えば、抗体をビオチンと結合させ、上述の4カテゴリーのうちいずれか1つをアビジンと結合させるか、又はその逆もありうる。ビオチンはアビジンを選択的に結合するので、標識は抗体と間接的に結合しうる。あるいは、標識と抗体の間接的な結合を得るには、抗体を低分子のハプテンと結合させ、上述した標識のうち1種類を抗ハプテン抗体と結合させる。こうして標識を抗体に間接的に結合させることができる。

【0110】

上述した試料の調製手順とは別に、IHCの前、間又は後に組織薄片をさらに処理することが望ましい場合がある。例えば、組織試料をクエン酸バッファー中で加熱するなどのエピトープ回収法が実施されうる（例えばLeongら Appl. Immunohistochem. 4(3):201 (1996) 参照）。

【0111】

随意のプロッキングのステップ後、組織切片を適切な条件下で十分な時間一次抗体に曝露し、一次抗体を組織試料中の標的タンパク質抗原に結合させる。これを獲得するための適切な条件は、ルーチンの実験により決定されうる。抗体の試料への結合度は、上述の検

10

20

30

40

50

出可能な標識のいずれかを使用して決定する。好ましくは、標識は、3,3'-ジアミノベンジジン色素原などの発色基質の化学的変更を触媒する酵素標識（例えばHRPO）である。好ましくは、酵素標識は、一次抗体に特異的に結合する抗体に結合される（例えば一次抗体はウサギポリクローナル抗体であり、二次抗体はヤギ抗ウサギ抗体である）。

【0112】

IHC解析で使用されるバイオマーカの発現を検出する抗体は、目的とするバイオマーカに主として結合するために生成された抗体でよい。抗バイオマーカ抗体は、モノクローナル抗体でよい。抗バイオマーカ抗体は、様々な市販品も含め当分野では容易に入手可能であり、当分野で既知のルーチンな技術を使用して生成することもできる。

【0113】

こうして調製した試料をマウントシカパーガラスで覆ってよい。次いで、例えば当分野でルーチンに使用される顕微鏡と染色強度基準を使用して、スライド評価を決定する。一例として、染色強度基準は以下のように評価されうる：

【表1】

表 1

染色パターン	スコア
細胞内の染色は観察されず。	0
10%よりも多くの細胞内にかろうじて染色が認められる。	1+
10%よりも多くの細胞内に弱～中程度の染色が観察される。	2+
10%よりも多くの細胞内に中～強程度の染色が観察される。	3+

【0114】

代替の方法では、試料を、抗体-バイオマーカ複合体を生成するのに十分な条件下で、そのバイオマーカに特異的な抗体と接触させてよく、次いで該複合体が検出される。バイオマーカの存在は、血漿や血清を含む広範な種類の組織や試料をアッセイするウェスタンブロット法やELISA法を含む複数の方法で検出できる。このようなアッセイフォーマットを使用する広範な免疫測定法が入手可能であり、例えば米国特許法第4,016,043号、同第4,424,279号及び同第4,018,653号などを参照されたい。これらには、非競合タイプのシングルサイト及び2サイト又は「サンドイッチ」アッセイと、従来の競合結合アッセイの両方が包含される。これらのアッセイはまた、標識抗体と標的バイオマーカの直接的な結合も含む。

【0115】

サンドイッチアッセイは、最も有用で一般的に使用されるアッセイの1つである。サンドイッチアッセイ法にはいくつかのバリエーションがあり、その全てが本発明に包含されるものとする。簡単に説明すると、典型的なフォワードアッセイでは、標識されていない抗体が個体基体上に固定化され、試験試料を、結合された分子と接触させる。抗体-抗原複合体を形成するのに十分な、適切な時間インキュベートした後、検出可能なシグナルを産生する能力のあるリポーター分子で標識された抗原特異二次抗体を加え、抗体-抗原標識抗体の別の複合体を形成するのに十分な時間インキュベートする。反応しなかった物質を全て洗い流し、抗原の存在をリポーター分子が産生したシグナルにより決定する。結果は、目視でシグナルを観察するだけの質的なものでもよいし、既知量のバイオマーカを含むコントロール試料との比較により定量化してもよい。

【0116】

フォワードアッセイのバリエーションには、試料と標識抗体の両方を同時に結合抗体に加える同時アッセイも含まれる。これらの手法は、後に明らかにする任意の軽微なバリエ

10

20

30

40

50

ーションも含め、当業者には公知である。典型的なフォワードサンドイッチアッセイでは、バイオマーカーに特異性を有する第1抗体は個体表面に共有結合的に又は受動的に結合される。個体表面は典型的にはガラス又はポリマーであり、最も一般的に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリビニルクロリド又はポリプロピレンである。個体支持体は、チューブ、ビーズ、マイクロプレートディスクの形態又は免疫測定を実施するのに適切な任意他の表面でありうる。結合の過程は当分野では公知であり、一般に架橋的な共有結合的結合又は物理的吸着からなり、ポリマー-抗体複合体は試験試料に備えて洗浄される。次いで試験試料の一定分量が固相複合体に加えられ、十分な時間（例えば2～40分又は都合によっては一晚）、適切な条件（例えば室温から40℃、例えば25℃から32℃）下でインキュベートして抗体中に存在する任意のサブユニットの結合を可能にする。インキュベーション後、抗体サブユニット固相は洗浄され、乾燥され、バイオマーカーの一部に特異的な二次抗体とインキュベートされる。二次抗体は、二次抗体と分子マーカーの結合を示すのに用いられるリポーター分子に連結される。

10

20

30

40

50

【0117】

代替の方法は、試料中の標的バイオマーカーを固定化し、次いで固定化した標的をリポーター分子で標識されうる又はされない特異的抗体に曝露することを伴う。標的の量とリポーター分子シグナルの強度にもよるが、結合された標的は抗体の直接的な標識により検出されうる。あるいは、第1抗体に特異的な第2標識抗体を標的-第1抗体複合体に曝露し、標的-第1抗体-第2抗体の三次複合体を生成する。この複合体は、リポーター分子が発するシグナルで検出される。本明細書で使用される「リポーター分子」とは、その化学的性質により、抗原に結合した抗体の検出を可能にする、解析的に同定可能なシグナルを提供する分子を意味する。このタイプのアッセイで最も一般的に使用されるリポーター分子は、酵素、フルオロフォア又は分子（すなわち放射性同位体）と化学発光分子を含む放射性核種のいずれかである。

【0118】

酵素免疫測定法の場合、酵素は、通常グルタルアルデヒド又は過ヨウ素酸などにより、第2抗体に結合される。しかし、容易に理解されようが、あらゆる種類の結合法が存在し、熟練者には容易に入手可能である。一般的に使用される酵素として、特に西洋わさびペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ及びアルカリホスファターゼが挙げられる。特定の酵素と共に使用される基質は、対応する酵素による加水分解後、検出可能な色の変化を発生させるために選ばれる。適切な酵素の例として、アルカリホスファターゼとペルオキシダーゼが挙げられる。また、上述の発色基質ではなく蛍光産物を生じる蛍光発生基質を使用してもよい。いずれの場合も、酵素標識抗体を第1抗体-分子マーカー複合体に加え、結合させ、余分な試薬を洗い流す。次いで、適切な基質を含む溶液を抗体-抗原-抗体の複合体に加える。基質は第2抗体と連結した酵素と反応し、質的な目視可能なシグナルを生じるが、これを通常は分光測定で定量化し、試料中に存在していたバイオマーカーの量を示してもよい。あるいは、フルオレセインやローダミンなどの蛍光化合物を抗体の結合能を変更することなく化学的に抗体に連結させてもよい。特定の波長の光で照射され活性化すると、蛍光色素で標識された抗体は光エネルギーを吸着し、分子内で興奮性への状態を誘導し、次いで光学顕微鏡で目視検出可能な特徴的な色の発光が生じる。酵素免疫測定法（EIA）と同様に、蛍光標識抗体は、第1抗体-分子マーカー複合体に結合する。結合しなかった試薬を洗い流した後、残った三次複合体を適切な波長の光に曝露し、観察された蛍光で目的とする分子マーカーの存在が示される。免疫蛍光法とEIA法はいずれも当分野で確立されている。しかし、放射性同位体、化学発光又は生物発光分子などの他のリポーター分子も使用してよい。

【0119】

上述の手法は、tbx6やdleu2などのバイオマーカーの発現の検出にも使用されうると考えられる。

【0120】

本発明の方法はさらに、組織又は細胞試料中の *t b x 6* mRNA や *d l e u 2* ncRNA などの ncRNA 及び / 又は mRNA の存在及び / 又は発現を検査するプロトコールも含む。細胞中の ncRNA 及び / 又は mRNA の評価方法は公知であり、例えば、相補的 DNA プロブを使用するハイブリダイゼーションアッセイ (標識されたバイオマーカーリボプロブを使用するインサイチュのハイブリダイゼーション、ノーザンプロット及び関連の手法など) 及び様々な核酸増幅アッセイ (バイオマーカーに特異的な相補的プライマーを用いた RT - PCR 及び、例えば分岐 DNA、S I S B A、T M A などの他の増幅タイプの検出法など) が挙げられる。

【 0 1 2 1 】

哺乳動物由来の組織や細胞は、好都合にもノーザンドットプロット又は PCR 解析を使用して、バイオマーカー mRNA 及び / 又は ncRNA がアッセイ可能である。例えば、定量 PCR アッセイなどの RT - PCR アッセイが当分野では公知である。本発明を説明する一実施態様では、生体試料中のバイオマーカー mRNA 及び / 又は ncRNA を検出する方法は、少なくとも 1 つのプライマーを使用して逆転写により試料由来の cDNA を産生し ; 産生された cDNA をバイオマーカーポリヌクレオチドをセンス及びアンチセンスのプライマーとして用いて増幅してバイオマーカー cDNA を増幅し ; 増幅されたバイオマーカー cDNA の存在を検出することを含む。加えて、このような方法は、生体試料中のバイオマーカー mRNA 及び / 又は ncRNA のレベルの決定を可能にする 1 または複数のステップを含んでよい (例えば、アクチンファミリーメンバーなどの「ハウスキーピング」遺伝子の mRNA 配列の比較コントロールのレベルを同時に検査する)。増幅された cDNA の配列が任意に決定されうる。

【 0 1 2 2 】

本発明の方法で使用するポリヌクレオチド又はその任意特定の部分の特異的な増幅を可能にするバイオマーカープライマー及びプライマー対、並びに本発明の方法で使用する核酸分子又はその任意の部分に選択的又は特異的にハイブリダイズするプロブ。プロブは、例えば放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤又は酵素などの検出可能なマーカーで標識されうる。このようなプロブとプライマーは、試料中のバイオマーカーポリヌクレオチドの存在を検出するため、及び細胞を発現するバイオマーカータンパク質を検出する方法として使用されうる。熟練者には理解されようが、非常に多くの様々なプライマーとプロブが、本明細書で提供される配列に基づいて調製可能であり、及び / 又はバイオマーカー mRNA 及び / 又は ncRNA の存在及び / 又はレベルを効果的に増幅、クローン及び / 又は決定するのに使用可能である。

【 0 1 2 3 】

本発明の方法は、マイクロアレイ法により、組織又は細胞試料中の *t b x 6* 及び *d l e u 2* mRNA 及び ncRNA などの mRNA 及び / 又は ncRNA を検査又は検出するプロトコールを含みうる。核酸マイクロアレイを使用して、試験及びコントロール組織試料由来の試験及びコントロール mRNA 及び / 又は ncRNA 試料が逆転写され、標識されて cDNA プロブが産生される。次いで、プロブを固体支持体に固定化した核酸のアレイとハイブリダイズさせる。アレイは、そのアレイの各メンバーの配列と位置がわかるように配列される。例えば、特定の疾患状態で発現する可能性のある遺伝子の選択物を個体支持体上に並べてよい。標識プロブと特定のアレイメンバーのハイブリダイゼーションは、そのプロブが由来する試料がその遺伝子を発現することを意味する。疾患組織の遺伝子発現差異解析は、有益な情報を提供しうる。マイクロアレイ技術は、核酸ハイブリダイゼーション法と計算技術を利用して、単一の実験内で多数の遺伝子の mRNA 発現プロファイルを評価する (例えば 2001 年 10 月 11 日発行の国際公開第 01/75166 号参照 ; アレイ作製に関する記述については例えば米国特許第 5,700,637 号、米国特許第 5,445,934 号及び米国特許第 5,807,522 号、Lockart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996); Cheung, V. G. ら, Nature Genetics 21(Suppl):15-19 (1999) を参照)。DNA マイクロアレイは、ガラス又は他の基板上に直接合成されるか又はスポットされる遺伝子断片を含む小型アレイである。通常何千という遺伝子が 1 枚のアレイで表示される。典型的なマイク

ロアレイ実験は次のステップを伴う：（１）試料から単離されたRNA由来の蛍光標識標的を調製、（２）標識標的をマイクロアレイにハイブリダイゼーション、（３）アレイの洗浄、染色及びスキャニング、（４）スキャン画像の解析、（５）遺伝子発現プロフィールの生成。現在２つの主要なDNA断片マイクロアレイが使用されている：オリゴヌクレオチド（通常25から70量体）アレイとcDNAから調製されたPCR産物を含む遺伝子発現アレイ。アレイ形成では、オリゴヌクレオチドは、事前に作製し表面にスポットしてもよいし、表面に直接合成してもよい（インサイチュ）。アフィメトリクス社GeneChipTMシステムは、ガラス表面に直接オリゴヌクレオチドを合成して作製されたアレイを備えた市販のマイクロアレイシステムの一例である。

【0124】

選択されたバイオマーカーの発現は、遺伝子欠失又は遺伝子増幅により評価してもよい。遺伝子欠失又は遺伝子増幅は、当分野で知られる多様なプロトコルのいずれで測定してもよく、例えば、適切に標識したプローブを用いての、mRNA及び/又はncRNAの転写を定量化する一般的なサザンプロット法、ノーザンプロット法（Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)）、ドットプロット法（DNA解析）若しくはインサイチュのハイブリダイゼーション（例えばFISH）、又は適切に標識したプローブを用いての細胞遺伝学的方法又は比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）などがある。例として、これらの方法を用いてバイオマーカー遺伝子の欠失又は増幅を検出してよい。

【0125】

インビボ検出

一態様では、本発明の方法で使用するプローブは、インビボ画像処理に適した量又は用量で患者に投与される。一般に、本発明の方法で使用するのに必要なプローブの量は、患者留意事項により変化しうる。このような留意事項として、例えば、年齢、プロトコル、症状、性別、疾患の程度、体重、禁忌、併用療法などが挙げられる。画像処理用のプローブの例示的な量は、これらの留意事項に基づき、当分野の医師により決定、調節又は変更されうる。例えば、本発明の方法で使用するプローブを含む患者への単位投与量は、 $1 \times 10^{-15} \text{ g / kg}$ から 10 g / kg まで変化してよく、好ましくは $1 \times 10^{-15} \text{ g / kg}$ から 1.0 g / kg まで変化してよい。さらに、本発明の方法で使用するプローブを含む単位投与量はまた、 $1 \mu\text{Ci / kg}$ から 10 mCi / kg でよく、好ましくは 0.1 mCi / kg である。本発明の方法で使用するプローブの用量はまた、 $0.001 \mu\text{g / kg}$ から $10 \mu\text{g / kg}$ まで変化してよく、好ましくは $0.01 \mu\text{g / kg}$ から $1.01 \mu\text{g / kg}$ まで変化してよい。本発明の方法で使用する、点眼薬として対象に投与されるプローブの効果的な量はまた、当業者により調節又は変更されうる。

【0126】

本発明の方法では、患者へのプローブ投与は、局所的又は全身的に静脈内、動脈内、くも膜下腔内（髄液を介して）又は眼内などで達成されうる。投与はまた、皮内又は腔内でもよい。

【0127】

一態様では、本発明の方法で使用するプローブが標的に結合するのに十分な時間の経過後、対象の検査部位を、磁気共鳴分光法（MRS）、磁気共鳴分光画像法（MRI）、陽電子放出断層撮影（PET）、単一光子放出断層撮影（SPECT）、平面シンチレーション画像処理又はそれらの組合せ並びに本明細書に記載の任意の新たな画像処理モダリティー又はその他などのルーチンの画像処理法又はモダリティーで診断する。厳密なプロトコルは、患者固有の因子に応じて、並びに投与方法及び使用されるプローブ又は検出可能マーカーの種類に応じて必然的に変化するが、具体的な手順の決定は熟練者にとってルーチンであろう。

【0128】

本発明の方法で使用するプローブはまた、注射可能な組成物として投与してよいが、公知の薬物送達系、例えば、経口、直腸、非経口（静脈内、筋肉内又は皮下）、大槽内、腔

10

20

30

40

50

内、腹腔内、局所（散剤、軟膏又は滴剤）に、又は頬側若しくは鼻腔の噴霧剤として、並びに点眼薬として処方してもよい。典型的な投与組成物は、本発明の方法で使用するプローブの薬学的に許容される担体を含みうる。薬学的に許容される担体として、例えば水溶液や、塩、保存料及びバッファーなどを含む非毒性賦形剤などの担体が挙げられ、これらはRemington's Pharmaceutical Sciences, 15版 Easton: Mack Publishing Co., pp. 140 5-1412及び1461-1487 (1975)並びにThe National Formulary XIV., 14版 Washington: American Pharmaceutical Association (1975) に記載されている。

【0129】

一態様では、本発明の方法で使用するプローブは、本明細書に記載のバイオマーカーにインビボで（例えば好ましくは又は特異的に）結合することに加え、血液脳関門（BBB）を通過することができ、適切な用量レベルで非毒性であり、良好な効果持続期間を有するものである。

10

【0130】

当分野では既知の複数の血液脳関門を越えて分子を輸送するアプローチがあり、これには限定ではなく、物理的方法、脂質ベースの方法、幹細胞ベースの方法、及び受容体とチャネルベースの方法が含まれる。

【0131】

血液脳関門を越えてプローブを輸送する物理的方法として、限定ではなく、血液脳関門全体を回避する方法又は血液脳関門に開口を作る方法が挙げられる。回避する方法として、限定ではなく、脳内への直接的な注射（例えばPapanastassiouら, Gene Therapy 9: 39 8-406 (2002)参照）、間質内輸液/対流強化輸送（例えばBoboら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994)参照）及び脳内に送達装置を移植する（例えばGillら, Nature Med. 9: 589-595 (2003)参照；及び Gliadel WafersTM, Guildford Pharmaceutical）などが挙げられる。関門に開口を作る方法として、限定ではなく、超音波（例えば米国特許公報2002/0038086号参照）、浸透圧（例えば高張マンニトールの投与による（Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, Vols 1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989)）、例えばブラジキニンや透過剤A-7による透過処理（例えば米国特許番号第5,112,596号, 同第5,268,164号, 同第5,506,206号及び同第5,686,416号参照）及びプローブをコードする遺伝子を含むベクターを用いての血液脳関門にまたがるニューロンの遺伝子導入（例えば米国特許出願公報第2003/0083299号参照）が

20

30

【0132】

血液脳関門を越えてプローブを輸送する脂質ベースの方法として、限定ではなく、血液脳関門の血管内皮の受容体に結合する抗体結合断片に連結されたりリポソームにプローブを被包する（例えば米国特許出願公報第2002/0025313号参照）及びプローブを低密度の脂質タンパク粒子（例えば米国特許出願公報第2004/0204354号参照）又はアポリポタンパク質E（例えば米国特許出願公報第2004/0131692号参照）が挙げられる。

【0133】

血液脳関門を越えてプローブを輸送する幹細胞ベースの方法は、目的とするプローブを発現するように神経前駆細胞（NPC）を遺伝子操作し、次いで治療を受ける個人の脳に幹細胞を移植することを伴う。Behrstockら Gene Ther. 15 Dec. 2005 オンライン先行出版（齧歯類及び霊長類モデルの脳に移植すると神経栄養因子GDNFが減少したパーキンソン病の症状を発現する遺伝子操作されたNPCを報告）を参照されたい。

40

【0134】

血液脳関門を越えてプローブを輸送する受容体とチャネルベースの方法として、限定ではなく、グルココルチコイドブロッカーを使用して血液脳関門の透過性を増大（例えば米国特許出願公開第2002/0065259号, 同第2003/0162695号及び同第2005/0124533号参照）；カリウムチャネル活性化（例えば米国特許出願公開第2005/0089473号参照）、ABC薬物輸送体の阻害（例えば米国特許出願公開第2003/0073713号参照）；トランスフェリンで抗体を被覆及び1または複数のトランスフェリン受容体の活性を調節（例えば米国特許出願

50

公開第2003/0129186号参照)、及び抗体のカチオン化(例えば米国特許第5,004,697号参照)が挙げられる。

【0135】

加えて、本発明の方法で使用するプローブは、脳標的化ペプチドと結合されるか会合されうる。本明細書で使用される「脳標的化ペプチド」は、通常はBBBを通して輸送される(例えば担体媒介輸送又は受容体媒介輸送)タンパク質(例えばリガンド又はペプチド模倣抗体)である。このような脳標的化ペプチドの非限定的な例として、インスリンやトランスフェリンが挙げられる。追加の脳標的化ペプチドとして、受容体特異的ペプチド模倣抗体またはその断片が挙げられ、これらは、インスリン受容体、トランスフェリン受容体、レプチン受容体、GLUT1グルコース輸送体、MCT1乳酸輸送体、LAT1大型中性アミノ酸輸送体及びCNT2アデノシン輸送体などのBBBを越えての輸送を促進する受容体に結合する。

10

【0136】

特定の態様では、本発明の方法で使用するプローブは、ペプチド核酸(PNA)であり、内部でポリヌクレオチドが脳標的化ポリペプチドと結合または会合されている。

【0137】

本発明の方法で使用するバイオマーカーの位置は、プローブの調製と投与において考慮されうる。結合する標的が細胞内分子である場合、本発明の特定の実施態様ではプローブを細胞内の結合標的が位置する場所に導入する。一実施態様では、本発明のプローブは細胞内で発現可能であり、例えば細胞内抗体である。本明細書で使用される「細胞内抗体」という用語は、抗体又はその抗原結合部分に関し、細胞内で発現され、例えばMarasco, Gene Therapy 4: 11-15 (1997); Kontermann, Methods 34: 163-170 (2004); 米国特許第6,004,940号及び同第6,329,173号; 米国特許出願公開第2003/0104402号, 及びPCT国際出願公開第2003/077945号に記載されるように標的分子と選択的に結合する能力がある。細胞内抗体を生成する遺伝子治療の利用については、例えば1996年3月14日に公開された国際公開第96/07321号も参照されたい。

20

【0138】

プローブの細胞内発現は、所望のプローブをコードする核酸を標的細胞に導入することにより達成されうる。プローブの全部又は一部をコードする1または複数の核酸を標的細胞に送達して、細胞内標的バイオマーカーに結合する能力のある1または複数のプローブが発現されるようにしてもよい。核酸を細胞に導入する任意の標準的な方法を使用してよく、限定ではなく、微量注入法、パリスティックインジェクション法、電気穿孔法、カルシウムリン酸沈殿法、リボソーム及び目的とする核酸を輸送するレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス又はワクシニアベクターを用いての遺伝子導入などが挙げられる。

30

【0139】

特定の実施態様では、核酸(ベクターに含まれてもよい)は、インビボの方法で患者の細胞に導入してよい。インビボ送達の一例では、核酸は、患者に、例えば神経変性疾患又は障害の場合その部位に直接注入される。インビボ送達の別の例では、核酸はウイルスベクター(例えばアデノウイルス、単純ヘルペスウイルスI型又はアデノ関連ウイルスなど)や、脂質ベースシステム(脂質媒介の遺伝子転写に有用な脂質は、例えばDOTMA、DOPE及びDC-Chol)を用いた遺伝子導入を使用して細胞に導入される。特定の遺伝子マーキング及び遺伝子治療のプロトコルの概説は、Andersonら, Science 256:808-813 (1992)及び国際公開第93/25673号及びこれらの引用文献を参照されたい。

40

【0140】

本発明は、MRS、MRI、PET又はSPECTなどの非侵襲性神経画像処理法又はモダリティーとの併用で、インビボの遺伝子発現を定量化するのに使用されるプローブを利用する。本発明の方法はまた、バイオマーカー遺伝子発現のベースラインを設けるために患者の画像診断を行うことを伴う。例示的な本発明の方法は、治療後少なくとも1回の患者の画像診断セッションを含む。一態様では、本発明の方法は、少なくとも1つの治療

50

薬での治療の前と後に患者を画像診断することを含みうる。インビボの画像処理もまた、治療中任意の時点で行われうる。

【0141】

本発明の方法で使用するプローブは、画像処理又は検出用に標識されうる（すなわち、マークされうる又はタグを付けられうる）。任意適切な標識（放射標識又はタグ）がバイオマーカープローブの検出に使用されうる。

【0142】

バイオマーカープローブ検出の例示的手法として、シンチグラフィ、放射性シンチグラフィ（radioscintigraphy）、磁気共鳴画像法（MRI）、化学発光、近赤外線発光、SPECT、コンピューター断層撮影法（CTスキャン）、陽電子放出断層撮影法（PET）又はこれらの組合せが挙げられる。検出と関連手法は当業者には理解されよう。

10

【0143】

インビボ画像処理の目的では、検出機器の種類は、所与の検出可能マーカーを選択する要因である。例えば、放射性同位体及び ^{18}F 又は ^{123}I は、本発明の方法のインビボ画像処理に適している。使用される機器の種類はまた、放射性核種又は安定な同位体の選択を導く。一態様では、選ばれた放射性核種は、所与の種類で検出可能な減衰の種類を有していなければならない。さらに、放射性核種の半減期などの他の要件も、インビボ画像処理で検出可能なマーカーを選択する際には考慮される。画像処理法は当分野では知られており、当業者であれば、本発明の方法で使用する適切な検出可能なマーカーを選択できよう。

20

【0144】

検出可能なマーカーの半減期は、標的に最大量取り込まれた時点でまだ検出可能であるよう十分に長期でなければならないが、対象が有害な放射線を維持しない程度に短期でなければならない。本発明の方法で使用するプローブは、放出された適切な波長のガンマ線照射が検出される、ガンマイメージングを使用して検出されうる。一般的なガンマイメージングの方法として、限定ではなく、SPECT及びPETが挙げられる。好ましくは、SPECT検出では、選択される検出可能なマーカーは粒子を放出しないが、 $140\sim 300\text{keV}$ の範囲で多数の光子を産生する。PET検出では、検出可能なマーカーは、ポジトロンを放出する ^{18}F などの放射性核種であり、消滅して形成される2つの 511keV のガンマ線がPETカメラで検出されうる。

30

【0145】

一態様では、インビボ画像処理に有用な本発明の方法で使用するプローブが対象に投与される。プローブは、MRS、MRI、PET、SPECT及び/又はこれらの組合せなどの非侵襲性画像処理法に使用される。本発明の方法で使用するプローブは、当分野で知られる一般的な有機化学の手法を使用するMRS/MRIのプローブを得るために ^{19}F 又は ^{13}C で標識されうる。March, J., *Advanced Organic Chemistry: I Reactions, Mechanisms, and Structure* (3版, 1985); Morrison and Boyd, *Organic Chemistry* (6版, 1992)。本発明の方法で使用するプローブはまた、当分野で公知の手法によりPET用に ^{18}F 、 ^{11}C 、 ^{75}Br 又は ^{76}Br で放射標識されてもよく、これはFowler, J. and Wolf A.によりPositron Emission Tomography and Autoradiography (Phelps, M., Mazziotta, J., and Schelbert, H. 編) pp. 391-450 (Raven Press, NY 1986)に記載されている。本発明の方法で使用するプローブはまた、当分野で知られる複数の手法の任意のものにより、SPECT用に ^{123}I で標識されてもよい。Kulkarni, *Int. J. Rad. Appl. & Inst.*, (Part B) 18: 647 (1991)。

40

【0146】

当業者に通常理解される標識、検出可能な標識、放射標識、タグ、マーカー、検出可能なマーカー、トレーサー、放射トレーサー又は同等の用語は、画像処理及び/又はアッセイ（例えば同定、診断、評価、検出及び/又は定量化）に適した任意の置換成分（基、部分、位置）を表しうる。例えば、本発明の方法で使用するプローブは、放射性シンチグラフィ、磁気共鳴画像法（MRI）、アッセイ、化学発光、近赤外線発光、蛍光、分光法

50

、ガンマイメージング、磁気共鳴画像法、磁気共鳴分光法、蛍光分光法、SPECT、コンピュータ断層撮影（CT scan）、陽電子放出断層撮影（PET）を介するインビボ又はインビトロの検出に適した標識、放射標識、タグ、マーカー、検出可能なマーカー、トレーサー、放射トレーサー又は同等の用語を含みうる。適切な標識、放射標識、タグ、マーカー、検出可能なマーカー、トレーサー、放射トレーサー又は同等の用語は当業者には知られており、例えば、放射性同位体、放射性核種、同位体、蛍光の基、ピオチン（ストレプトアビジン複合体形成と共に）又は光親和性の基が含まれる。本発明の方法で使用するプローブの標識、検出可能な標識、放射標識、タグ、マーカー、検出可能なマーカー、トレーサー、放射トレーサーは、 ^{131}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{123}I 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 ^{11}C 、 ^{75}Br 、 ^{13}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{76}Br を含みうる。「光親和性基」又は「光親和性標識された」は、本発明の方法で使用するプローブの置換基を意味してもよく、適切な波長での光分解により活性化され、そこに会合したマクロ分子と架橋的光化学反応できる。光親和性基の一例は、ベンゾフェノン置換基である。

【0147】

適切な放射性同位体は当業者には知られており、例えば、（塩素、フッ素、臭素及びヨウ素などの）ハロゲンの同位体及びテクネチウムやインジウムを含む金属が含まれる。例示的な標識、放射標識、タグ、マーカー、検出可能なマーカー、トレーサー、放射トレーサーはまた、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{32}F 、 ^{35}S 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{124}I 、 ^{19}F 、 ^{75}Br 、 ^{13}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{76}Br も含みうる。本発明の方法で使用するプローブは、直接的に（すなわち、標識を本発明の化合物に直接組み込んで）又は間接的に（すなわち、標識を本発明の化合物にキレート剤を介して組み込み、ここでキレート剤は該化合物に組み込まれている）標識（放射標識、タグ、マーク、検出可能なマーク、トレース又は放射トレース）されうる。さらに、プローブの標識は、追加の置換成分（基、部分、位置）又は存在する任意の置換成分の代替の置換成分として本発明の化合物に含めてよい。標識、検出可能な標識、放射標識、タグ、マーカー、検出可能なマーカー、トレーサー、放射トレーサーは、本発明の方法で使用するプローブのいずれの置換成分（基、部分、位置）に出現してもよい。

【0148】

一態様では、標識は同位体でも非同位体でもよい。同位体標識では、本発明の方法で使用するプローブにすでに存在する置換成分（基、部分、位置）を、放射性同位体又は同位体で置換（交換）してよい。非同位体標識では、放射性同位体又は同位体を、すでに存在する基と置換（交換）せずに、本発明の方法で使用するプローブに加えてよい。

【0149】

加えて、本発明の方法で使用するプローブは、ジアゾニウムヨウ素を介する直接的なジアゾ化アミノ誘導体のヨウ素化（Greenbaum, F., Am. J. Pharm., 108: 17 (1936)）により、又は、その後当分野で公知の複数の方法によりヨード化合物に変換されうる、不安定なジアゾ化アミンを安定なトリアゼンに変換することにより、若しくは非放射性ハロゲン化前駆体を安定なトリ-アルキルすず誘導体に変換することにより、限定ではないが ^{131}I 、 ^{125}I 又は ^{123}I などの任意適当な放射性ヨウ素同位体で標識されうる。Satyamurthy and Barrio, J. Org. Chem., 48: 4394 (1983), Goodmanら, J. Org. Chem., 49: 2322 (1984), Mathisら, J. Label. Comp. and Radiopharm., 1994: 905; Chumpraditら, J. Med. Chem., 34: 877 (1991); Zhuangら, J. Med. Chem., 37: 1406 (1994); Chumpraditら, J. Med. Chem., 37: 4245 (1994)。例えば、本発明の化合物の安定な形態又は誘導体は、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 又は ^{18}F を含有するハロゲン化剤と反応されうる。

【0150】

本発明の方法で使用するプローブは、テクネチウム-99m (^{99}mTc)などの既知の金属の検出可能なマーカーで放射標識してもよい。このような金属イオンを結合するリガンドを導入するために本発明の方法で使用するプローブの置換基を変更することは、当業者であれば必要以上に実験を行わずとも可能である。 ^{99}mTc などの検出可能なマ-

10

20

30

40

50

カーを含むプローブの調製は当分野では公知である。Zhuangら, Nuclear Medicine & Biology, 26(2): 217 (1999); Oyaら, Nuclear Medicine & Biology, 25(2): 135 (1998); Homら, Nuclear Medicine & Biology, 24(6): 485 (1997)。

【0151】

一態様では、本発明の方法は、インビボ画像処理と分光法を目的とする核磁気共鳴 (NMR) 分光法により検出可能な同位体で標識されたプローブを使用してよい。磁気共鳴分光法で特に有用な元素として、 ^1H 、 ^{19}F 及び ^{13}C が挙げられる。本発明の方法で使用するプローブを調製するのに適切な検出可能なマーカには、ベータエミッター、ガンマエミッター、ポジトロンエミッター及びX線エミッターも含まれる。さらに、例示的な検出可能なマーカとして、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{123}I 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{75}Br 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 及び ^{76}Br が挙げられる。本発明の方法で使用するプローブを視覚化する任意一般的な方法又は検出可能なマーカが当業者に使用され理解されうる。

10

【0152】

参考試料中のバイオマーカの発現レベル

遺伝子 $t b x 6$ 及び $d l e u 2$ の少なくとも1の測定レベルとの比較に使用される参考試料の発現レベルは、実施される本発明の方法に依存する。神経変性疾患又は障害の診断法では、「参考試料」の発現レベルは、典型的には、神経変性疾患又は障害に罹患していない母集団から得られた平均値レベルなどの所定の参考レベルであるが、場合によっては、参考レベルは神経変性疾患又は障害患者を含む個人の集団から得られた平均値又は中央値レベルでありうる。場合によっては、所定の参考レベルは、同年齢の母集団から得られた (例えば平均又は中央) レベルに由来する。

20

【0153】

神経変性疾患又は障害をモニタリングする方法 (例えば神経変性疾患又は障害患者の神経変性疾患又は障害の進行を診断する又は診断を補助する方法) では、参考レベルは、神経変性疾患又は障害に罹患していない母集団、神経変性疾患又は障害と診断されている母集団などの所定のレベルであってもよいし、場合によっては、参考レベルは神経変性疾患又は障害の患者を含む個人の集団の平均値又は中央値レベルでありうる。あるいは、参考レベルは、特定の患者の病歴参考レベルでありうる (例えば、同じ個人由来の、ただし過去のある時点でのサンプルから得られた $t b x 6$ レベル)。場合によっては、所定の参考レベルは、同年齢の母集団から得られた (例えば平均値又は中央値) レベルに由来する。

30

【0154】

(参考値が得られうる) 同年齢の母集団は、試験される個人と同年齢であるのが理想だが、およそ同年齢の母集団も許容される。およそ同年齢の母集団は、試験される個人の年齢の1、2、3、4又は5歳以内か、試験される個人の年齢を包含する異なる年齢群であってもよい。およそ同年齢の母集団は、2、3、4、5、6、7、8、9又は年間隔 (例えば、62歳の個人の参考値源となる「5年間隔」群は、58~62歳の個人、59~63歳の個人、60~64歳の個人、61~65歳の個人又は62~66歳の個人を含みうる) でありうる。

40

【0155】

しかし、当業者であれば、参考試料中のバイオマーカの発現レベルは本明細書に記載のいかなる方法でも決定されることが理解されよう。

【0156】

$t b x 6$ 及び / 又は $d l e u 2$ のレベル比較

測定値と参考値を比較するプロセスは、目的のバイオマーカの測定値及び参考値の種類に適切な任意一般的な方法で実施されうる。 $t b x 6$ 及び / 又は $d l e u 2$ の発現レベルの測定又は決定は、量的又は質的測定法を使用して実施してよく、測定値と参考値の比較モードは、使用する測定技術により変化しうる。例えば、定量比色分析アッセイを使用して遺伝子発現レベルを測定する場合、染色された反応産物の強度を目視で比較してもよいし、染色された反応産物の濃度測定又は光度測定の測定値のデータを比較して (例えば測

50

定装置から得られる棒グラフなどの数値データやグラフデータで比較)、レベルを比較してよい。方法で使用される測定値又は決定値は定量値でもよく、使用される検出法に依存する。

【0157】

キット

本明細書に記載される又は示される用途に使用されるキットや製造品も提供される。このようなキットは、バイアル、チューブなどの1または複数の容器手段を密に閉じこめるよう区画化された運搬手段を含んでよく、容器手段はそれぞれ方法で使用される別々の要素の1つを含む。例えば、容器手段の1つは、検出可能に標識されているか、又は標識されうるプローブを含みうる。このようなプローブは、遺伝子発現サインの1または複数の遺伝子を含むポリヌクレオチドに特異的なポリヌクレオチドでありうる。キットが核酸ハイブリダイゼーションを利用して標的核酸を検出する場合、キットは、標的核酸配列を増幅するヌクレオチド(単数又は複数)の入った容器及び/又はビオチン結合タンパク質などの、リポーター分子に結合されたアビジン又はストレプトアビジンなどの、酵素、蛍光又は放射性同位体の標識などのリポーター手段を有する容器を有しうる。

10

【0158】

キットは、典型的には上述の容器及びバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ及び使用上の指示を記載した添付文書を含む商業的及びユーザーの視点から望ましい物を含む1または複数の他の容器を含む。容器には、その内容物が特定の治療又は非治療用途に使用されることを示すラベルをつけてよく、上述したようなインビボ又はインビトロの使用上の指示を表示してもよい。キットの他の任意の内容物として、1または複数のバッファー(例えばブロックバッファー、洗浄バッファー、基質バッファーなど)、酵素標識により化学的に変更される基質(例えば色素原)などの他の試薬、エピトープ回収溶液、コントロール試料(陽性及び/又は陰性コントロール)、コントロールスライド(単数又は複数)などが挙げられる。

20

【実施例】

【0159】

以下は本発明の方法及び組成物の実施例である。上記の一般的な記載を前提として、様々な他の実施態様が実施されることが理解される。

【0160】

実施例1 局所の変性に関する阻害剤の特徴

軸索の変性は、神経系の発達中の剪定と神経変性疾患の両方の特徴である。この活動性の過程を調節する分子機構は解明され始めたばかりである。軸索変性を調節する追加の経路を同定するために、不偏小分子スクリーンを実施し、神経成長因子(NGF)消退後軸索変性を阻害する様々な経路の調節因子を同定した。

30

【0161】

スクリーンでいくつかのキナーゼが軸索変性の調節因子として同定され、以下に記載のさらなる機構的研究により、軸索または細胞体のいずれかの区画に個別のキナーゼの機能を限局した。

【0162】

Campanotチャンパーを用いることで体性と軸索性の環境の分離を可能にし、局所変性の誘導を可能にする以下の実験を実施した(図1及び例えばZweifelら, Nat. Rev. Neurosci. 6(8):615-625, 2005参照)。このようなチャンパー内では軸索変性が局所化されアポトーシスなしで進行する。

40

【0163】

材料と方法

テフロンデバイダー(Tyler Research)を水で洗浄し、グリースを残さず拭き取った。次いでデバイダーを一晩Nochromix(Godax Laboratories)/硫酸に浸し、蒸留したオートクレーブ水(SQウォーター)で5回すすぎ、30分煮沸し、空気乾燥してから使用した。

50

【0164】

マウスラミニン（無菌濾過水中 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ；Invitrogen）をPDLコートした 35mm ディッシュ（BD Biosciences）に加え、 37°C で1時間インキュベートした後SQUOターで2回すすいだ。ディッシュを真空乾燥してからラミナーフード内で15分間空気乾燥した。調製したディッシュを次いでピンレーキ（Tyler Research）で傷つけた。傷つけた跡全体にNGFを含む 50 マイクロリットルのNBM+MC溶液を加えた。NBM+MC溶液は次のように作製した： 1750mg のメチルセルロースを 480ml のNeurobasal（Invitrogen）と混合し、 4.5ml のペニシリン/ストレプトマイシン、 7.5ml のL-グルタミン、 10ml のB-27無血清サプリメント（Invitrogen）を加えた。溶液を室温で1時間、 4°C で一晩、さらに室温で1時間混ぜた。次いで溶液を滅菌濾過し、使用する前に $50\text{ng}/\text{ml}$ のNGF（Roche）を加えた。高減圧グリース（VWR）を解剖鏡下で各テフロンデバイダーに加えた。ラミニンコートしたPDLディッシュを反転させ、跡のついていない領域に小ようじでさらに圧力をかけてテフロンデバイダー上に落とした。ディッシュを 37°C で1時間インキュベートした。 500 マイクロリットルのNBM+MC（ $50\text{ng}/\text{ml}$ NGF）溶液を両側の区画それぞれに加え、中央セルスロットの前にグリースパリアを加えた。

10

【0165】

フリーのE13.5脊髄をマウス胚から切除し、NBM+MC（ $25\text{ng}/\text{ml}$ NGF）溶液に入れた。DRGをタングステン針で脊髄から除去した。NBM+MCで潤滑したP200ピペットを用いてDRGを 1.5ml 管に入れた。DRGをテーブルトップ型遠心分離器に30秒間供し沈渣させた。上澄みを捨て、 0.05% のトリプシン/EDTA（コールド）を添加した。沈渣をピペットを用いて再度溶解し、常時攪拌しながら（ 650RPM ） 37°C で15分インキュベートした。試料を再度遠心分離し、上澄みを捨てた。沈渣を温かいNBM+MC（ $50\text{ng}/\text{ml}$ NGF）溶液中再び懸濁し、火炎処理したガラスピペットで20回突き砕き、火で穴開けした（fire-bored）ガラスピペットでさらに20回突き砕いた。試料をさらに遠心分離し、得られた沈渣を 0.5ml のNBM+MC（ $50\text{ng}/\text{ml}$ NGF）溶液中懸濁した。細胞を希釈し最終濃度 2.5×10^6 細胞/ ml とした。細胞懸濁液を22ゲージ針を用いて 1ml シリンジにロードした。Campenotデバイダーの中央スロットにシリンジを用いて充填した（少なくとも体積 $50\mu\text{l}$ まで）。Campenotチャンパーを一晩 37°C でインキュベートした。中央区画に 2.5ml のNGF+MC（ $50\text{ng}/\text{ml}$ NGF）溶液を加え、グリースゲートを除去した。3日後、外側の培地（細胞体の区画）を 2.5ml のNBM+MC培地（ $25\text{ng}/\text{ml}$ NGF）で入れ替えた。

20

30

【0166】

培養5日後、軸索区画を温めたNBM+MC（NGFなし）溶液中3回洗浄した。3回目の洗浄後、 $500\mu\text{l}$ のNBM+MC（NGFなし）溶液を 0.5% DMSO又は1種類の阻害剤のいずれかと組合せて軸索区画に加えた。細胞体区画を 0.5% DMSOまたは阻害剤のいずれかを含む 2.5ml のNBM+MC培地（ $25\text{ng}/\text{ml}$ NGF）と入れ替えた。 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗NGF抗体を軸索区画に加えた。別の軸索区画はコントロールとしてNGF中に維持した。

40

【0167】

軸索では28時間のNGF欠乏後、細胞体では25時間のNGF欠乏後、 8% PFA/ 30% スクロース溶液を1:1希釈で培地に直接加え、30分インキュベートした。テフロンデバイダーを、添加から15分後に除去した。免疫染色前にシステムを 2.5ml のPBSで1回洗浄した。ニューロンをPBS中 5% BSA/ 0.2% トリトンで30分ブロックした。一次抗体Tuj1（Covance）を 2% BSA含有のPBS中最終希釈1:1000に加え、 4°C で一晩インキュベートした。ディッシュをPBSで1回洗浄した。二次抗体（Alexa488ヤギ抗マウス抗体（Invitrogen））を最終希釈1:200で 2% BSAを含むPBS中に加え、室温で1時間インキュベートした。ディッシュをPBSで2回洗浄し、 $22 \times 22\text{mm}$ のカバーガラス（VWR）を $350\mu\text{l}$ のフルオロマウント

50

G (Electron Microscopy Sciences) と共に加えた。ニューロンを蛍光顕微鏡の使用により視覚化した。

【0168】

軸索を上皮成長因子受容体 (EGFR) キナーゼ阻害剤 AG555 (ErbB^AAG⁵⁵₅₅) (EMB Biosciences) 又は p38MAPキナーゼ阻害剤 SB239 (p38MAPK^BSB²³⁹) (EMB Biosciences) に曝露すると、NGF欠乏軸索の変性は減少した。一方、細胞体区画のAG555とSB239処理では変性を回避できなかった。細胞体を転写阻害剤 Act^D (転写^Act^D) (Sigma) 又はグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 (GSK-3) 阻害剤 SB415 (SK3^SB⁴¹⁵) (Sigma) で処理すると、NGF欠乏による軸索変性は軸索で減少した。しかし、同じ阻害剤を軸索に直接投与しても、NGF欠乏による軸索変性は回避されなかった。これらの結果は、局所的な軸索変性のシグナリングは欠失した軸索セグメントに限定されず、細胞体に投与した場合最も効果的な阻害剤もあれば、軸索に投与した場合最も効果的な阻害剤もあることを示唆している。これらの結果を定量化し図2に示す。

10

【0169】

実施例2 軸索変性に関するGSK-3調節遺伝子を同定するマイクロアッセイ

上記記載の実験に基づき、グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3 (GSK-3) が、細胞体で特に作用して遠位の軸索変性を調節する遺伝的軸索変性プログラムの調節因子として同定された。GSK3調節軸索変性遺伝子を同定するために、選択的ニューロン欠失が起きているニューロンに対し、GSK-3阻害のある又はない時系列マイクロアレイ分析を実施した。

20

【0170】

簡単に説明すると、ニューロンを単離し、上述のようにCampenotチャンバー内で培養した。Campenotチャンバーは、非ニューロン細胞による汚染を低減するために50µMの5-フルオロ-2'-デオキシウリジン/ウリジン (いずれもSigma) を培地に加えてセットアップした。5日目に、両軸索区画をNGFフリーの培養液で3回洗浄し、4回目の洗浄で、NGF (コントロール) 又はNGF抗体 (50µg/ml) (911, Genetech) を含む培地と入れ替えた。外側の区画を30µMのGSK3阻害剤ARA (EMD Biosciences) 又は0.3% DMSOを含む培地と入れ替えた。NGFで培養した又は6時間若しくは12時間NGFが欠乏していた、GSK3 ARA処理をした又はしていないニューロンからRNAを抽出した。RNAをトリゾール (登録商標) (Invitrogen) で処理した後、RNeasy (登録商標) マイクロキット取扱説明書の付表Cに記載のとおり、DNase I処理 (Qiagen) を用いてRNeasy (登録商標) マイクロキットプロセッシングを行った。各条件で、1回の増幅に5つのAgilent Whole Mouse Genomeマイクロアッセイチップを使用した。

30

【0171】

マイクロアッセイ解析では、2つの遺伝子tbx6及びdleu2を、軸索変性が起きているニューロンで過剰発現していると同定した。前述したように、Tbx6は転写因子をコードし、dleu2は長い非翻訳RNAをコードする。図3に示すように、dleu2及びtbx6はいずれもNGF欠乏12時間でニューロンに過剰発現する。しかし、これらの遺伝子の過剰発現は、GSK3 ARA阻害剤の添加に伴いどの時点でも観察されなかった。

40

【0172】

実施例3 tbx6及びdleu2ノックダウンは軸索変性を減少させる

軸索変性におけるdleu2及びtbx6の役割をさらに評価するために、ノックダウン実験を行った。実験では、siRNAを用いてNGF欠乏を受けているニューロン中のdleu2及びtbx6の発現を減少させた。

【0173】

簡単に説明すると、E13.5マウスのDRGをトリプシン消化後分離した。dleu2及びtbx6のsiRNA3種類をそれぞれ試験した。以下のsiRNAを使用した：

50

sidleu2.1:センス (5' -GAUAGGCGAUUAAGGUUUUATT-3') (配列番号 1)
 アンチセンス (5' -UUCAGCUGUGUGAUCCUAGGG-3') (配列番号 2)
 sidleu2.2:センス (5' -CGGGAAUCAAACAAGUCUATT-3') (配列番号 3)
 アンチセンス (5' -UAGACUUGUUUGAUUCCCGTT-3') (配列番号 4)
 sidleu2.3:センス (5' -GAAACACGAUACUUCUUGATT-3') (配列番号 5)
 アンチセンス (5' -UCAAGAAGUAUCGUGUUUCTG-3') (配列番号 6)
 sitbx6.1:センス (5' -GAAGAAACUACAACAUGUATT-3') (配列番号 7)
 アンチセンス (5' -UACAUGUUGUAGUUUCUUCTG-3') (配列番号 8)
 sitbx6.2:センス (5' -CCUGAUUUGGAUACUUCUATT-3') (配列番号 9)
 アンチセンス (5' -UAGAAGUAUCCAAAUCAGGGT-3') (配列番号 10)
 sitbx6.3:センス (5' -CUAGGAUCACACAGCUGAATT-3') (配列番号 11)
 アンチセンス (5' -UUCAGCUGUGUGAUCCUAGGG-3') (配列番号 12)

10

【0174】

S i R N A は、96 ウェル Amaxaヌクレオフェクターシステム (Lonza) を用いて細胞に送達した。約 20 万個の細胞に、マウスベシクニューロンキット (Lonza) を用いて 600 ng の R N A をヌクレオフェクトした。細胞は、ラミニンでコートされた (5 μg / ml ; Invitrogen) 96 ウェル P D L プリコート BD Biocoat プレート (BD Biosciences) にウェル当たり 25,000 細胞の密度で蒔いた。細胞を 25 ng / ml の N G F を加えた N 3 / F 1 2 中一晩成長させた後、N G F 抗体 (25 μg / ml) を加えて 20 時間 N G F を欠乏させた。細胞を P F A / スクロースで固定し、チューブリンを標識した。

20

【0175】

自動連続軸索長測定は以下のように行った。黒の 96 ウェル BD Biocoat プレートを、2 × ピニングでレーザーベースと画像ベースのフォーカス使用、4 × 対物レンズの ImageXpress (登録商標) Micro (Molecular Devices) で画像処理した。露光時間は 200 ミリ秒であった。ウェル 1 個は、MetaExpress でつなぎ合わせた 9 枚の画像からなった。各ウェルは「血管新生チューブ長」プラグインで解析した。「セット当たりのチューブ長」又は「連続軸索長」の等価物を 3 ~ 24 ウェルで平均した。

【0176】

N G F 消退後、軸索は通常 20 時間以内に変性する。図 4 に示すように、s i R N A に伴い d l e u 2 及び t b x 6 の発現が減少すると、N G F 消退後、軸索変性が減少する。これらのデータは、N G F 消退において d l e u 2 及び t b x 6 が軸索変性を誘発したことを示している。

30

【0177】

同様の実験を構造的活性型 G S K 3 (G S K 3 S 9 A) の存在下で実施した。G S K 3 S 9 A の過剰発現により、軸索変性が生じる。t b x 6 及び d l e u 2 の上方制御は G S K 3 に依存するので、t b x 6 及び d l e u 2 のノックダウンを行って、ノックダウンにより G S K 3 活性の下流で軸索変性をブロック可能か実験した。

【0178】

簡単に説明すると、海馬 / 皮質組織を E19 Sprague Dawley ラット胚 (Charles River) から除去し、トリプシン消化後分離した。Nbactiv4 (登録商標) 培地 (Brainbits) 中 2 万個の生の細胞を 96 ウェル P D L プリコート Biocoat プレート (BD Biosciences) の各ウェルに蒔いた。培養 5 日後、構造的活性型 G S K 3 (S 9 A) 又は空ベクター ; プールした s i R N A (t b x 6 又は d l e u 2 の 3 種類の s i R N A を上述した) ; 及びマーカーとしての G F P で遺伝子導入された。発現 1 及び 3 日後 (6 ~ 8 D I V) 、細胞を P F A / スクロースで固定し、G F P 一次抗体 (Invitrogen) に続いて Alexa フルオロ - 4 8 8 二次 (Invitrogen) で標識した。

40

【0179】

図 5 に示すように、d l e u 2 及び t b x 6 のノックダウンにより、G S K 3 活性に起因する軸索変性を防御できる。これらのデータは、G S K 3 が、軸索変性のために d l e u 2 及び t b x 6 を上方制御することを含む転写プログラムを調節する、という説を支持し

50

ている。実際、p38MAPキナーゼ阻害剤の存在下、軸索が局所的にNGFを12時間欠乏すると、d1eu2及びtbx6の発現はいずれもNGFの存在下で観察されるのと同レベルに低減する。これらのデータは、p38MAPキナーゼが、d1eu2及びtbx6を含む軸索変性転写プログラムでGSKの上流にありうることを支持している。

【0180】

実施例4 AD及びPD患者におけるtbx6及びd1eu2遺伝子発現解析

時系列マイクロアッセイ解析で、2つの遺伝子tbx6及びd1eu2が軸索変性が起きているニューロンで過剰発現すると同定された。これらの遺伝子産物が神経変性疾患において役割を果たしているか決定するために、疾患患者の脳試料を検査し、tbx6及びd1eu2の発現を測定した。

10

【0181】

ヒトtbx6及びd1eu2遺伝子の発現を、遺伝子発現情報を含む商標データベース(GeneExpress(登録商標), Gene Logic Inc., メリーランド州ゲイサースバーグ)を用いて解析した。GeneExpress(登録商標)データベースをマイクロアレイプロフィールレビューアを用いてグラフ解析した。図6は、ヒトAD患者由来の脳の海馬部分におけるtbx6及びd1eu2遺伝子発現を、正常な非疾患患者と比較したグラフである。グラフのX軸の目盛りは、ハイブリダイゼーションシグナル強度に基づく遺伝子発現レベルを示す。図6では、正常なカウンターパートに対し、疾患患者の脳組織ではtbx6及びd1eu2遺伝子発現が増加していることが示されるが、このことは、これらの遺伝子がヒトAD及びPD疾患に関与しており、従ってADのバイオマーカーであることを示唆している。

20

【図1】

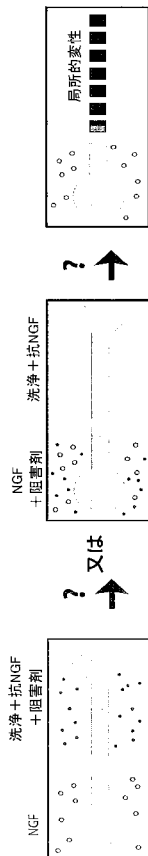


FIGURE 1

【図2】

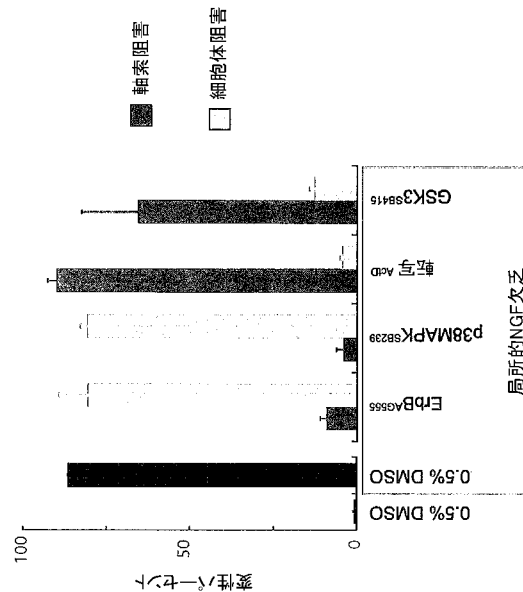
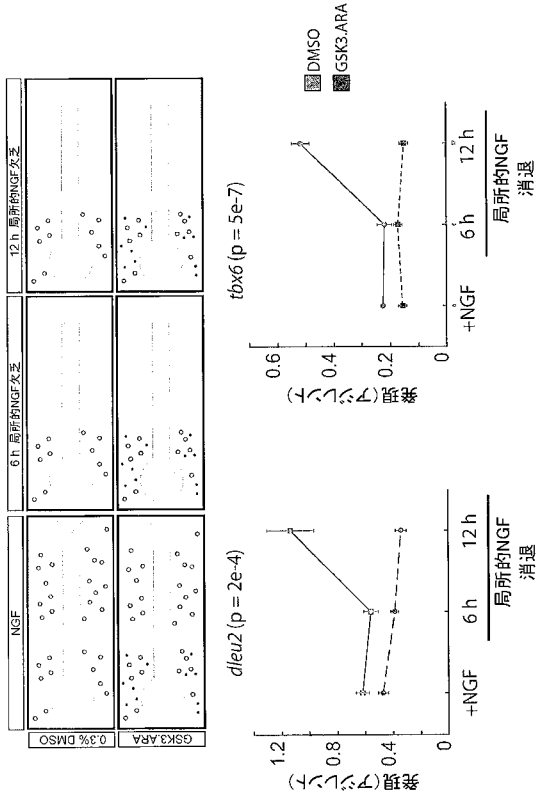


FIGURE 2

【 図 3 】



【 図 4 】

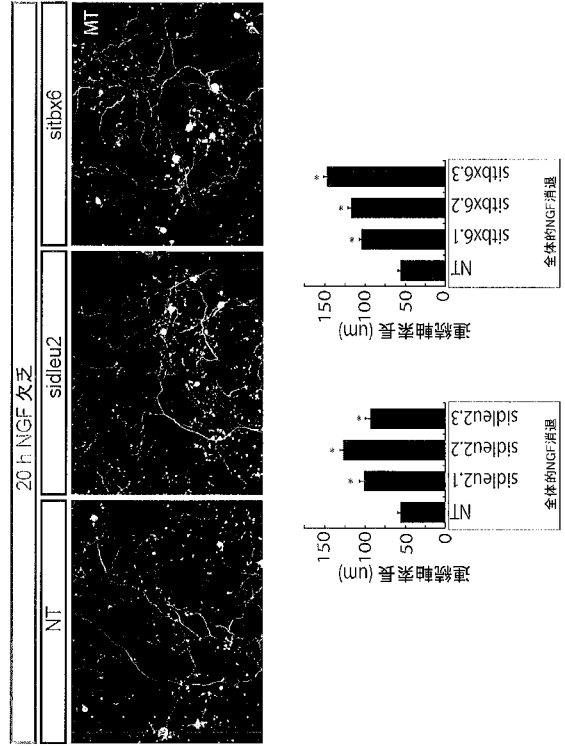


FIGURE 3

FIGURE 4

【 図 5 】

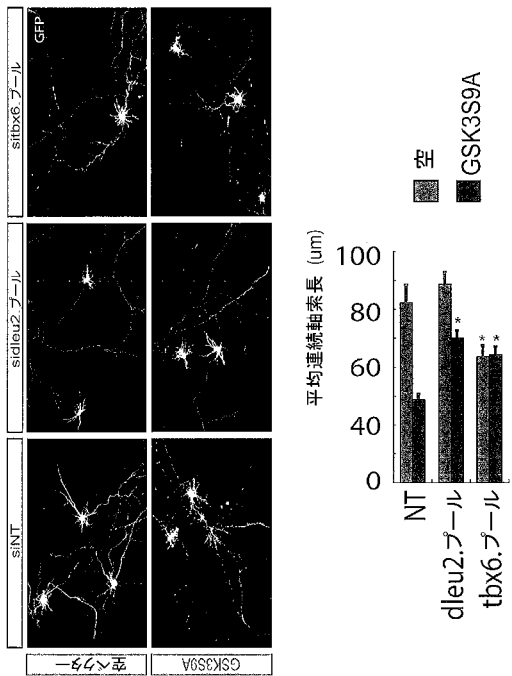


FIGURE 5

【 図 6 】

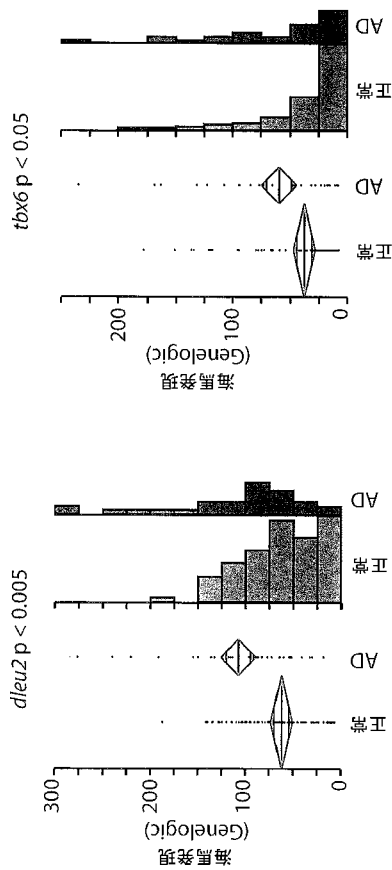


FIGURE 6

【配列表】

2014507115000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2011/062250
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/68 (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) EPODOC, WPI, MEDLINE, HCAPLUS, EMBASE, BIOSIS: tbox6, dleu2, neurodegeneration, Alzheimer and like terms PubMed: biomarker alzheimer Espacenet: (Inventor Name: Mark Chen or Ryan Watts) and (Applicant: Genentech or Title/Abstract keyword: Alzheimer)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/076939 A2 (UNIVERSITY OF KENTUCKY RESEARCH FOUNDATION) 25 August 2005 See the whole document, particularly Web Table 5 (9) and (35) and Example 1	1-32
L	TATAR, C. L. et al., 'Increased <i>Pip1</i> gene expression leads to massive microglial cell activation and inflammation throughout the brain', ASN Neuro, August 2010, Vol. 2, No. 4, pages 219-231 Used to establish <i>a posteriori</i> lack of unity. See the whole document, particularly the paragraph spanning pages 219-220	
A	BARBER, R. C., 'Biomarkers for early detection of Alzheimer disease', The Journal of the American Osteopathic Association, September 2010, Vol. 110, No. 9, Suppl. 8, pages S10-S15 See the whole document	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the 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 13 February 2012		Date of mailing of the international search report 17 February 2012
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999		Authorized officer JONATHAN KONRAD AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : +61 2 6283 2601

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2011/062250
--

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
- The sequence listing was not used for searching or examination purposes.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2011/062250
--

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:

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 I

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.:

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. PCT/US2011/062250
--

Supplemental Box I

(To be used when the space in any of Boxes I to IV is not sufficient)

Continuation of Box No: III

This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups:

- Claims 1-32 (all in part). The feature of a method of diagnosing a neurodegenerative disorder in a subject by detecting an overexpression of *tbx6* is specific to this group of claims.
- Claims 1-32 (all in part). The feature of a method of diagnosing a neurodegenerative disorder in a subject by detecting an overexpression of *dleu2* is specific to this group of claims.

PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.

When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention.

In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to all of the claimed inventions and which provides a technical relationship among them is a method of diagnosing a neurodegenerative disorder in a subject by detecting overexpression of a gene. However this feature does not make a contribution over the prior art because it is disclosed in:

TATAR, C. L. et al., 'Increased *Pip1* gene expression leads to massive microglial cell activation and inflammation throughout the brain', *ASN Neuro*, August 2010, Vol. 2, No. 4, pages 219-231

The citation discloses that the overexpression of the gene *Pip1* in rodents causes axonal degeneration and models Pelizaeus-Merzbacher disease (see the whole document, particularly the paragraph spanning pages 219-220).

Therefore in the light of this document this common feature cannot be a special technical feature. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied *a posteriori*.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2011/062250

This Annex lists the known "A" publication level 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 Cited in Search Report	Patent Family Member
WO 2005076939	NONE

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

END OF ANNEX

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I			テーマコード(参考)
A 6 1 B 5/055 (2006.01)	A 6 1 B	5/05	3 8 0	
A 6 1 B 6/03 (2006.01)	A 6 1 B	6/03	3 6 0 B	
G 0 1 T 1/161 (2006.01)	G 0 1 T	1/161	D	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, 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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. テフロン

(72) 発明者 ワッツ, ライアン, ジェー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 - 4 9 9 0, サウス サン フランシスコ, デ
ィーエヌイー ウェイ 1, シーノオー ジェネンテック, インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20 HA11
4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35
QR55 QR62 QS25 QS32 QX01
4C093 AA22 FF00
4C096 AD14
4C188 EE02 FF04 FF07 KK32

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2014507115A5	公开(公告)日	2015-01-15
申请号	JP2013541070	申请日	2011-11-28
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	チェンマーク ワッツライアンジェー		
发明人	チェン, マーク ワッツ, ライアン, ジェー.		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/543 A61B5/055 A61B6/03 G01T1/161		
CPC分类号	G01N33/6896 A61B6/032 A61B6/037 A61B6/501 C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N2800/28 G01N2800/50 G01N2800/56		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.D G01N37/00.102 G01N33/543.545.A A61B5/05.380 A61B6/03.360.B G01T1/161.D		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063 /QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QX01 4C093/AA22 4C093 /FF00 4C096/AD14 4C188/EE02 4C188/FF04 4C188/FF07 4C188/KK32		
优先权	61/417701 2010-11-29 US		
其他公开文献	JP2014507115A		

摘要(译)

提供了鉴定, 诊断和预测神经变性疾病或病症的方法。还提供了用于确定神经元是否处于风险中或正在经历神经变性的方法。该方法包括确定基因tbx6和dieu2中的至少一个是否过表达。