

(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2021-519930

(P2021-519930A)

(43) 公表日 令和3年8月12日(2021.8.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 G O 4 3
GO 1 N 33/566 (2006.01)	GO 1 N 33/566	2 G O 4 5
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	4 C O 8 4
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2020-554847 (P2020-554847)	(71) 出願人	520383500
(86) (22) 出願日	平成31年4月1日 (2019.4.1)		アミロイディア スウェーデン アクチエ
(85) 翻訳文提出日	令和2年12月1日 (2020.12.1)		ボラグ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2019/058206		スウェーデン国、1 7 2 3 7 スンドビ
(87) 国際公開番号	W02019/192969		ュベリ、ロドプリンケン 1 エー
(87) 国際公開日	令和1年10月10日 (2019.10.10)	(74) 代理人	100080791
(31) 優先権主張番号	1805466.8		弁理士 高島 一
(32) 優先日	平成30年4月3日 (2018.4.3)	(74) 代理人	100136629
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		弁理士 鎌田 光宜
		(74) 代理人	100125070
			弁理士 土井 京子
		(74) 代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子
		(74) 代理人	100174296
			弁理士 當麻 博文

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミロイド関連疾患を診断する方法

(57) 【要約】

本発明は、一般に、アミロイド関連疾患を診断及び／又は予後診断する方法、アミロイド関連疾患を治療する方法、並びにアミロイド関連疾患を治療するための剤を同定する方法に加えて、関連する使用及びキットオブパーツに関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験体におけるアミロイド関連疾患を診断及び／又は予後診断する方法であって、

- 前記被験体由来の体液のサンプルを提供する工程と；
- 前記サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；

を含む方法。

【請求項 2】

前記体液が、血液、及び／又は脳脊髄液（CSF）、及び／又は唾液、及び／又は尿、及び／又は滑液、及び／又は糞便からなる群のうちの 1 つ以上である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記血液のサンプルが、全血、及び／又は血清、及び／又は血漿、及び／又は細胞溶解物、及び／又は赤血球、白血球、及び／又は血小板からなる群のうちの 1 つ以上である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記体液が、血漿及び／又は血清からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記体液が、血清から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

個々のアミロイド凝集体の増幅を含まない、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定が、蛍光分光法に基づく分析を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定が、蛍光相関分光法及び蛍光強度ゆらぎ分析（FIFFA）に基づく分析を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定が、蛍光相関分光法に基づく分析を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 10】

各被験体毎にアミロイドの分子／粒子／凝集体のサイズプロファイルを決定することができる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記血液のサンプルが、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）酵素及び／若しくは FAD 脂肪色素；並びに／又はピリジン性（NADH）酵素及び／若しくは NADH 脂肪色素からなる群のうちの 1 つ以上を含まない、請求項 2 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記個々のアミロイド凝集体が、アミロイドオリゴマー；アミロイドナノ凝集体；及び／又はアミロイド老人性凝集体；及び／又はアミロイド原線維；及び／又はアミロイド前原線維を含む群から選択される、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記個々のアミロイド凝集体が、約 20 以上のペプチド；例えば：約 30 以上；約 40 以上；約 50 以上；約 60 以上；約 70 以上；約 80 以上；約 90 以上；又は約 100 以上のペプチド、好ましくは、約 40 以上のペプチドを含む、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 14】

前記アミロイドナノ凝集体が、約 20 のタンパク質又はペプチド ~ 100, 000 のタンパク質又はペプチドを含む、請求項 12 又は 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記老人性アミロイド凝集体が、1, 000, 000 超のタンパク質又はペプチドを含む、請求項 12 又は 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記アミロイド原線維が、100, 000 超のペプチド又はタンパク質 ~ 1, 000, 000 のペプチド又はタンパク質を含む、請求項 12 又は 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記サンプルに検出剤を添加する工程を更に含む、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記決定が、前記検出剤の検出及び / 又は測定を含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記検出剤が、1 枚以上のベータ (β) シートを含む個々のアミロイド凝集体と結合及び / 又は会合及び / 又は反応する、請求項 17 又は 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記検出剤が、個々のアミロイド凝集体と結合及び / 又は会合及び / 又は反応したときに蛍光を発光する蛍光部分を含む、請求項 17 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記検出剤が、チオフラビン T (Th T)、及び / 又は A R C A M 1、及び / 又は五量体ホルミルチオフエン酢酸 (p F T A A)、及び / 又は 4 - (ジシアノビニル) - ジュロリジン (D C V J)、及び / 又は 1 - アミノ - 8 - ナフタレンスルホナート (A N S)、及び / 又はビス - A N S、及び / 又は 2 - [N - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - アミノ] - 4 - [2, 3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1, 3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン] - 1 - フェニル - キノリニウム (P i c o G r e e n) からなる群のうちの 1 つ以上である、請求項 17 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記アミロイド関連疾患が、前記 1 枚以上のベータ (β) シートを含む個々のアミロイド凝集体に関連する、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記アミロイド関連疾患が、アルツハイマー病；及び / 又はパーキンソン病；及び / 又はハンチントン病；及び / 又は筋萎縮性側索硬化症 (A L S)；及び / 又は 2 型糖尿病；及び / 又は全身性アミロイドーシス；及び / 又はプリオン病 (例えば、クロイツフェルト・ヤコブ病 (C J D))；及び / 又はアミロイド軽鎖アミロイドーシス；及び / 又は多発性骨髄腫；及び / 又は炎症；及び / 又は腎不全；及び / 又は白血球走化性因子 2 (L E C T 2) アミロイドーシス；及び / 又は多発ニューロパシーを伴うトランスサイレチン関連遺伝性アミロイドーシス (家族性アミロイド多発ニューロパシー (F A P) 又は S k e l l e f t e s j u k a n としても知られている)；及び / 又は血液透析関連アミロイドーシス；及び / 又は脳アミロイドアンギオパシー；及び / 又は家族性内蔵アミロイドーシス；及び / 又は原発性皮膚アミロイドーシス；及び / 又は脳アミロイドアンギオパシー；及び / 又はプロラクチノーマ；及び / 又は家族性角膜アミロイドーシス；及び / 又は心房の老人性アミロイド；及び / 又は甲状腺髄様がん；及び / 又は医薬品インスリン誘発性アミロイドーシスを含む群から選択される 1 つ以上である、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記アルツハイマー病が、主観的認知障害；軽度認知障害；アルツハイマー病；及び血管性認知症を伴うアルツハイマー病を含む群から選択される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

10

20

30

40

50

前記アミロイド関連疾患が、アルツハイマー病であり、前記個々のアミロイド凝集体が、アミロイドベータ (β) ペプチド (β ペプチド)、例えば、 β 40 及び / 又は β 42 及び / 又は β 43 を含む、請求項 23 又は 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズの決定が、個々のアミロイド凝集体分解能において行われる、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズの決定が、時間分解検出を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 28】

前記時間分解検出が、蛍光相関分光法 (FCS) を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

蛍光相関分光法 (FCS) によって検出される蛍光が、前記個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズを表す、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記蛍光が、蛍光の対照レベルよりも高い蛍光レベルを有する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記蛍光が、蛍光の対照レベルよりも約 2 倍以上高い、好ましくは約 5 倍以上高い蛍光レベルを有する、請求項 30 に記載の方法。

20

【請求項 32】

前記蛍光の対照レベルが、前記サンプル中の蛍光のバックグラウンドレベルである、請求項 30 又は 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記蛍光の対照レベルが、蛍光相関分光法 (FCS) 中に測定された蛍光の平均レベルである、請求項 30 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記サンプルが、約 30 マイクロリットル (μ l) ~ 約 300 マイクロリットル (μ l) の体積を有する、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 35】

前記決定に基づいて、前記アミロイド関連疾患の診断及び / 又は予後診断を提供する工程を更に含む、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量が、1つの個々のアミロイド凝集体である場合、前記アミロイド関連疾患の診断及び / 又は予後診断が提供される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記サンプル中の前記個々のアミロイド凝集体の存在及び / 若しくは量及び / 若しくは濃度が、対照サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 若しくは量及び / 若しくは濃度よりも多い場合 ; 並びに / 又は

40

前記サンプル中の前記個々のアミロイド凝集体のサイズが、対照サンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズよりも大きい場合、前記アミロイド関連疾患の診断及び / 又は予後診断が提供される、請求項 35 又は 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記サンプル中の前記個々のアミロイド凝集体の存在及び / 若しくは量及び / 若しくは濃度が、対照サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 若しくは量及び / 若しくは濃度及び / 若しくはサイズよりも約 20 % 以上多い、好ましくは約 50 % 以上多い ; 並びに / 又は

前記サンプル中の前記個々のアミロイド凝集体のサイズが、対照サンプル中の個々のア

50

ミロイド凝集体のサイズよりも約 20 % 以上大きい、好ましくは約 50 % 以上大きい、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記対照サンプルが、アミロイド関連疾患を有しない 1 以上の対照被験体由来の体液サンプルを含む、請求項 37 又は 38 に記載の方法。

【請求項 40】

間隔をおいて、例えば 2 回以上繰り返される、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

前記方法を繰り返す間の期間が、1 日間以上である、請求項 40 に記載の方法。

10

【請求項 42】

前記被験体及び / 又は前記対照被験体が、げっ歯類（例えば、マウス及び / 又はラット及び / 又はハムスター及び / 又はモルモット及び / 又はスナネズミ及び / 又はウサギ）；及び / 又はイヌ科動物（例えば、イヌ）；及び / 又はネコ科動物（例えば、ネコ）；霊長類（例えば、ヒト及び / 又はサル及び / 又は類人猿）；及び / 又はウマ科動物（例えば、ウマ）；及び / 又はウシ科動物（例えば、ウシ）；及び / 又はイノシシ科動物（例えば、ブタ）を含む群のうちの 1 つ以上である、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

前記被験体に対する前記アミロイド関連疾患の治療を選択及び / 又は提供する工程を更に含む、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 44】

被験体におけるアミロイド関連疾患を治療する方法であって、

- 前記被験体由来の体液のサンプルを提供する工程と；
 - 前記サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズを決定する工程と；
 - 前記決定に基づいて、前記被験体を前記アミロイド関連疾患を有すると同定する工程と；
 - 前記被験体に対する前記アミロイド関連疾患の治療を選択及び / 又は提供する工程と；
- を含む方法。

30

【請求項 45】

前記治療が、前記アミロイド関連疾患の治療を前記被験体に施すことを含む、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

アミロイド関連疾患を治療するための剤を同定する方法であって、

- 試験被験体由来の体液の第 1 のサンプルを提供する工程と；
 - 前記第 1 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズを決定する工程と；
 - 剤を前記被験体に投与する工程と；
 - 前記試験被験体由来の体液の第 2 のサンプルを提供する工程と；
 - 前記第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズの決定を、前記第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズの決定と比較する工程と；
 - 前記比較に基づいて、前記剤を前記アミロイド関連疾患を治療するためのものと同定する工程と；
- を含む方法。

40

【請求項 47】

前記試験被験体が、げっ歯類（例えば、マウス及び / 又はラット及び / 又はハムスター

50

及び／又はモルモット及び／又はスナネズミ及び／又はウサギ)；及び／又はイヌ科動物(例えば、イヌ)；及び／又はネコ科動物(例えば、ネコ)；霊長類(例えば、ヒト及び／又はサル及び／又は類人猿)；及び／又はウマ科動物(例えば、ウマ)；及び／又はウシ亜科動物(例えば、ウシ)；及び／又はイノシシ亜科動物(例えば、ブタ)；及び／又は魚類(例えば、ゼブラフィッシュ)；及び／又は昆虫(例えば、キイロショウジョウバエ)；及び／又は両生類(例えば、アフリカツメガエル)；及び／又は爬虫類；及び／又は線虫(例えば、C．エレガンス)を含む群のうちの1つ以上である、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

前記試験被験体が、非ヒト、例えば、非ヒト哺乳類である、請求項46又は47に記載の方法。

10

【請求項49】

アミロイド関連疾患を治療するための剤を同定する方法であって、

- 試験流体由来の第1のサンプルを提供する工程と；
 - 前記第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；
 - 剤を前記試験流体に投与する工程と；
 - 前記試験流体由来の第2のサンプルを提供する工程と；
 - 前記第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；
 - 前記第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定を、前記第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定と比較する工程と；
 - 前記比較に基づいて、前記剤を前記アミロイド関連疾患を治療するためのものと同定する工程と；
- を含む方法。

20

【請求項50】

インビトロ及び／又はエキスピボで実施される、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

前記試験流体が、体液である、請求項49又は50に記載の方法。

30

【請求項52】

被験体におけるアミロイド関連疾患を診断及び／又は予後診断するための、前記被験体における個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定の使用。

【請求項53】

被験体におけるアミロイド関連疾患を診断及び／又は予後診断するための、時間分解検出の使用。

【請求項54】

アミロイド関連疾患を治療するための剤を同定するための、個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定の使用。

40

【請求項55】

アミロイド関連疾患を治療するための剤を同定するための、時間分解検出の使用。

【請求項56】

請求項1～51のいずれか一項に記載の方法及び／又は請求項52～55のいずれか一項に記載の使用のためのキットオブパーツ。

【請求項57】

添付の特許請求の範囲、明細書、実施例、及び図面を参照して本明細書に記載される、方法又は使用又はキットオブパーツ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

本発明は、一般に、アミロイド関連疾患を診断及び／又は予後診断する方法、アミロイド関連疾患を治療する方法、並びにアミロイド関連疾患を治療するための剤を同定する方法に加えて、関連する使用及びキットに関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

アミロイド関連疾患は、患者におけるアミロイドの原線維及び凝集体の存在及び蓄積を特徴とする。アミロイド関連疾患の周知の例は、アルツハイマー病、ハンチントン病、及びパーキンソン病である。これら疾患は、時に長期間にわたって患者の健康及び精神的な安定を悪化させることが多く、そして、多くの場合死に至る。アミロイド関連疾患の病態形成及び症状は、患者及びその家族にとって大きな精神的外傷を残すことが多い。アルツハイマー病は、世界中で認知症の最も一般的な原因である (Prince et al . , World Alzheimer Report 2016 . London , UK : 2016 and Alzheimer ' s Disease Facts and Figures . Alzheimer ' s Association . 2017) 。

10

【 0 0 0 3 】

アミロイド関連疾患の症状の治療及び管理の鍵は、早期診断、並びに疾患進行の明晰な予後診断である。しかし、アミロイド関連疾患は、緩徐に発症することが多く、疾患の初期バイオマーカーも知られていないため、患者は、通常、何らかの診断及び／又は予後診断を受ける前に疾患が確立してしまっている。場合によっては、バイオマーカーを用いて疾患を同定する方法が死後にしか実施できないこともあり、患者は恩恵が受けられない。これにより、患者が適時に適切な治療を受けることができるのが大幅に遅れ、健康に害を及ぼす。

20

【 0 0 0 4 】

従って、アミロイド関連疾患を早期に診断及び予後診断する方法の開発が必要とされている。

【 0 0 0 5 】

米国特許第 6 , 4 9 8 , 0 1 7 号には、タンパク質の沈着に関連する疾患を検出する方法が開示されている。この方法の重要な特徴は、典型的には検出される標的と同じ種類の化合物であるプローブを使用することである。プローブは、好適には、病的タンパク質沈着物を物理的及び／又は化学的手段 (例えば、超音波、界面活性剤) に供することによって得られる。プローブを、核として機能する疾患関連沈着物と併用することにより、測定されたシグナルを増幅させる重合プロセスが得られる。

30

【 0 0 0 6 】

国際公開第 2 0 1 6 / 0 4 0 9 0 A 1 号は、サンプル中の誤って折り畳まれた A β タンパク質の存在を決定するための方法論を提示している。この方法には、分析前に A β タンパク質を増幅させる工程を組み込むことが不可欠である。

【 0 0 0 7 】

Tiiman et al . (Biochemistry 2015 , 54 , 7203 - 7211) は、A β 凝集体の動態、より具体的には、構造化された A β 凝集体の時間依存的成長に関する。動態研究は、組み換え凍結乾燥 A β 42 を含むモデル溶液に対して行われる。

40

【 0 0 0 8 】

Guan et al . (ACS Chem. Neurosci . 2015 , 6 , 1503 - 1508) 及び国際公開第 2 0 1 7 / 0 0 4 5 6 0 号には、特に A β のタンパク質凝集体に会合したときに有用な分光学的特徴を有する新規蛍光マーカー (ARCAM - 1) が開示されている。ARCAM - 1 が A β 凝集体に会合したとき、未結合の ARCAM - 1 と比べて蛍光発光が著しく増加する。ARCAM - 1 の分光学的特性は、合成 A β 42 が組み込まれたモデル系を用いて評価される。

【 0 0 0 9 】

50

Wennmalm et al. (Anal. Chem. 2015, 87, 11700-11705) は、FRET 及び FCS (蛍光相関分光法) を提供することによって、高感度でアミロイドビート (beat) オリゴマーを検出するための系を提示している。合成の蛍光標識された $A\beta 40$ 及び $A\beta 42$ が、モデル物質として使用される。

【発明の概要】

【0010】

この背景に対して、本発明者らは、アミロイド関連疾患を早期に診断及び予後診断することができる新規方法を開発した。

【0011】

本発明者らによる開発は、患者における個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定することを含み、アミロイド関連疾患の患者に存在する個々のアミロイド凝集体が、血液又は脳脊髄液 (CSF) 等の患者の体液において同定され得るという驚くべき知見に基づいている。本発明者らは、疾患が確立され、他の公知の方法を使用して検出可能になる前にこれら個々のアミロイド凝集体をうまく同定することができること、そして、個々のアミロイド凝集体の検出によって、該疾患の高度に有効な診断及び／又は予後診断が得られることを見出した。本発明者らによる技術の更なる利点は、個々のアミロイド凝集体を低レベルで検出できることであるが、その理由は、アミロイド関連疾患の初期段階に低レベルのアミロイド関連疾患が存在することがあり、これが、早期の診断及び／又は予後診断の判定に役立つためである。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1。蛍光相関分光法 (FCS) のための機器の仕組みの概略図。A. 倒立共焦点顕微鏡における光学配置の概略図。入射レーザー光 (濃灰色) は、主ダイクロイックビームスプリッタによって反射され、対物レンズによってサンプルに鋭く集光されて、二重円錐状照明体積が生じる。入射レーザー光を吸収することができる照明体積中の分子は励起されるが、未結合の ThT 分子 (薄灰色のドット) 並びに小さなアミロイド形成性オリゴマー及びペプチド/タンパク質モノマー (濃灰色のドット) は蛍光を発せず、一方、ThT 反応性構造化アミロイド形成性オリゴマーは蛍光を発する (星)。弾性散乱入射光 (濃灰色) 及びスペクトル的に異なる蛍光 (薄灰色) は、対物レンズによって回収され、そして、弾性散乱光を反射し、入射/弾性散乱レーザー光よりも波長の長い蛍光はピンホールを通過させて検出器に入れる主ダイクロイックビームスプリッタによって分離される。B. 顕微鏡の対物レンズで入射レーザー光を集光することによってサンプル中で生じる二重円錐状照明体積の拡大図 (濃灰色) 及びそれから蛍光が検出される長楕円の形態の理想化された観察体素 (OVE) (薄灰色)。C. OVE を通過する蛍光分子/粒子によって放出される光子は、各検出された光子に対して電気パルスで応答するアバランシェ発光ダイオード (APD) 検出器によって検出される。特定の時間間隔、いわゆるビンニング時間中に検出された光子から生じる電気パルスの数は、所与の時点において測定された光強度に対応する。上記と同じ光学設定を使用して血清中の量子ドットの希釈懸濁液中で記録された蛍光強度ゆらぎの時系列をここに例示する。D. 電気シグナルをデジタルシグナル相関単位に変換し、対応する正規化自己相関関数 $G(\tau)$ をオンラインで計算して、実験的に導出された時間的自己相関曲線 (tACC) を得る。ここに示される tACC は、C. に示した時間トレースから導出されたものである。挿入図: チオフラビン T (ThT) の化学式 (上)。下: 水中 (黒色点線) 及びインスリンの構造化アミロイド形成性オリゴマーを含有する水溶液中 (灰色実線) における ThT の蛍光発光スペクトル。水中 (黒色点線) 及びインスリンアミロイド原線維の水溶液中 (灰色破線) における ThT の正規化された基底状態吸収スペクトルを小さな挿入図中に示す。Royal Society of Chemistry の許可を受けて Singh et al. 2015 から画像を再現した。

【図2】図2。血清の自己蛍光及び血清の ThT 蛍光の FCS 分析。A. ThT を含まない (黒色ドット) 及び ThT を含む (灰色丸) 血清中で記録された実験的 ACC、並びに

10

20

30

40

50

対応するベストフィット理論的 A F (実線) 。 T h T を含まない血清中での測定については、実験データにフィッティングさせることができた最も単純な理論モデルは、トリプレットなしの自由 3 D 拡散についての A F であった。フィッティングによって導出されたパラメータ値は、 $N = 300$ 及び $\tau_D = 55$ である。構造パラメータは、較正実験で求めた値で固定した、 $S_p = 5$ 。 T h T を含む血清中での測定については、実験データにフィッティングさせることができた最も単純な理論モデルは、トリプレットなしの 2 成分の自由 3 D 拡散についての A F であった。フィッティングによって導出されたパラメータ値は、 $N = 750$ 、 $\tau_{D1} = 40 \mu s$ 、 $\tau_{D2} = 100 ms$ 、 $y_1 = 0.94$ 、 及び $y_2 = 0.06$ である。構造パラメータは、較正実験で求めた値で固定した、 $S_p = 5$ 。 B . 同じ振幅に対して正規化された A . に示した時間的自己相関曲線、 $\tau = 10 \mu s$ における $G(\tau) = 1$ 。

【図 3】図 3。経時的に記録された血清 T h T における時間分解蛍光強度ゆらぎ。蛍光強度における明確に視認できるピークは、明るい T h T 反応性構造化アミロイド形成性オリゴマー、すなわち、ナノブランクが稀に通過することを反映している。

【図 4】図 4。患者及び対照群における T h T 反応性構造化アミロイド形成性オリゴマー凝集体の発生頻度。A . 患者群 (縞模様の濃灰色) 及び対照群 (濃灰色) における単一事象発生の平均頻度。エラーバーは、標準偏差 ($\pm SD$) を示す。B . 様々な診断群における単一事象発生の平均頻度。

【図 5】図 5。血清中の T h T 反応性構造化アミロイド形成性ナノブランクの濃度は、加齢と共に増加する。見かけ上健常対照 (黒色円) 及び患者 (灰色のドット) における年齢の関数としての単一事象発生の頻度。A D 患者から得られたデータは、薄灰色の線で囲まれている。濃灰色の線で囲まれた点は、胃バイパス手術を受けた患者由来である。線形回帰式の傾きは、 $(1.6 \pm 1.0) \times 10^{-5} s^{-1} 年^{-1}$ であり、切片は $(9.4 \pm 0.6) \times 10^{-4} s^{-1}$ である。調整された R 二乗値 $R^2_{adj} = 0.032$ は、この相関が非常に弱いことを示す。

【図 6】図 6。患者及び対照群における並進拡散時間、すなわち、T h T 反応性構造化アミロイド形成性オリゴマー凝集体のサイズ。患者群では特徴的な減衰時間がより長いことを示す (これは、この群において観察される構造化凝集体がより大きいことを示す) 、対照 (黒色ドット) 及び患者 (灰色丸) 群についての時間的自己相関曲線 ($tACCs$) 。

【図 7】図 7。臨床 C S F パラメータと血清中の単一事象発生の頻度との間の相関。A . C S F 中の $A\beta_{42}$ レベルの関数としての C S F 中の $A\beta_{42}$ レベルに対する全 T a u レベルの比。縁部が濃灰色である薄灰色のドットは、A D と診断された個体から得られたデータを示す。全てのグラフにおいて、点線は C S F 中の $A\beta_{42}$ レベルに基づく A D 診断について一般的に許容されている限度を示す、 $[A\beta_{42}] < 550 ng L^{-1}$ 。B . C S F 中の $A\beta_{42}$ レベルの関数としての血清中の単一事象発生の頻度。大きなドットは、A D と診断された個体から得られたデータを示し、一方、小さなドットは、A D と診断されなかった患者コホートにおける個体から得られたデータを示す。C . C S F 測定値と血清測定値との間の比較。薄灰色の軸及び記号は C S F 中の測定値に関し、C S F 中の $A\beta_{42}$ レベルの関数としての C S F 中の $A\beta_{42}$ レベルに対する全 T a u レベルの比を示す。濃灰色の縦軸及び記号は、血清中の測定値に関する。濃灰色の記号は、C S F 中の $A\beta_{42}$ レベルの関数としての血清中の単一事象発生の頻度を表す。多面的臨床評価に基づいて A D と診断された個体から得られたデータを大きなドットで表す。薄灰色の線で囲まれた点は、胃バイパス手術を受けた患者から得られた値を示す。

【図 8】図 S 1 (図 8) 。機器の較正。T h T アッセイと同じ光学設定を使用して、R h 6 G の $25 nM$ 水溶液中で記録された時間的自己相関曲線 (黒丸) 。O V E における平均分子数、 $N = 2.5$; 並進拡散時間、 $\tau = 24 \mu s$; 及び構造パラメータ $S_p = 7$ をフィッティングさせることによって得られた、自由三次元 (3 D) 拡散についての自己相関関数 (薄灰色) 。これら条件下では、R h 6 G についての 1 分子あたり 1 秒あたりの平均カウント数は、 $CPSM = (5.1 \pm 0.6) kHz$ であった。

【図 9】図 S 2 (図 9) 。単一事象発生頻度の分析から求められたフルオスフィアの拡散

時間は、時間的自己相関分析によって得られた値と実験誤差の範囲内で一致する。A．フルオスフィアの50 nM水懸濁液中で記録された蛍光強度ゆらぎ。B．フルオスフィアの50 pM水懸濁液中で記録された蛍光強度ゆらぎ。C．100 nmのフルオスフィアの50 nM又は50 pM水懸濁液中で記録された蛍光強度ゆらぎを分析することによって得られた、同じ振幅に対して正規化されたtACC、 $\tau = 10 \mu s$ における $G_n(\tau) = 1$ 。実線：100 nmのフルオスフィアの50 nM水懸濁液中で記録された、一連の10個の連続して取得された蛍光強度ゆらぎの測定値（各個々の測定は10 s持続）から得られた、正規化された平均tACC。一点鎖線：100 nmのフルオスフィアの50 pM水懸濁液中で3000 sにわたって記録された蛍光強度ゆらぎの時間的自己相関分析によって得られた、正規化されたtACC。点線：100 nmのフルオスフィアの50 pM水懸濁液中で記録された、300個の連続して取得された蛍光強度ゆらぎの測定値（各個々の測定は10 s持続）から得られた、正規化された平均tACC。破線：データ解析に記載の通り単一事象発生を同定した場合の、100 nmのフルオスフィアの50 pM水懸濁液中で記録された蛍光強度ゆらぎ（各個々の測定は10 s持続）を分析することによって得られた、正規化された平均tACC。一点鎖線、点線、及び破線のtACCは、異なるデータ解析手順を使用したことを除いて、同じサンプル中で実施した測定から得られた。正規化されたtACCが重複していることは、試験した全ての手順から実験誤差の範囲内で同じ結果が得られたことを示す。

10

【図10】図S3（図10）。単一事象発生 f_{SE0} の頻度は、 $c = 10 fM$ の希釈水懸濁液中の100 nmのフルオスフィアの実際の濃度に正比例する。回帰直線の傾きは (2.3 ± 0.3) であり、決定係数 $R^2 = 0.92$ である。

20

【図11】図S4（図11）。対照（黒色）及び患者（濃灰色）群についてのThTを含む血清中の単一事象発生の平均頻度を、対照（薄灰色）及び患者（縞模様の薄灰色）群についてのThTを含まない血清中の測定値と比較する対照実験。

【図12】図S5（図12）。見かけ上健常対照被験体のCSFにおけるThTアッセイ。A．ThT添加前（黒色）及びThT添加後（灰色）のCSFにおいて記録された経時的な蛍光強度ゆらぎ。B．対応する時間的自己相関曲線。

【図13】図S6（図13）。見かけ上健常対照被験体の唾液におけるThTアッセイ。A．ThT添加前（黒色）及びThT添加後（灰色）の唾液において記録された経時的な蛍光強度ゆらぎ。B．対応する時間的自己相関曲線。

30

【図14】図S7（図14）。見かけ上健常対照被験体の尿におけるThTアッセイ。A．ThT添加前（黒色）及びThT添加後（灰色）の尿において記録された経時的な蛍光強度ゆらぎ。B．対応する時間的自己相関曲線。

【図15】図15。金属フィルムを使用して透明融解石英基材上に構築されたゼプトリットル観察導波管を備える単一分子蛍光イメージングシステムの概略図。金属フィルムにおける1つのウェルを拡大する。（M J Levene, J Korlach, S W Turner, M Foquet, H G Craighead and W W Webb, Science vol. 299, No. 5607 (Jan. 31, 2003) pp. 682 - 686）。

【図16】図16。ゼプトリットル観察導波管の直径。A．直径50 nm及び深さ100 nmのゼプトリットル導波管についての、強度ゆらぎ（対数スケール）の三次元有限要素時間領域シミュレーション。金属材料は、Al（アルミニウム）である。B．ウェル直径の様々な直径についての $S(z)$ 曲線。C．有効観察体素サイズ（ V_{eff} ）及び平均して体積中に一分子が存在する対応する濃度（ $\langle N \rangle = 1$ ）（M J Levene, J Korlach, S W Turner, M Foquet, H G Craighead and W W Webb, Science vol. 299, No. 5607 (Jan. 31, 2003) pp. 682 - 686）。

40

【図17】図17。ゼプトリットル導波管アレイを備える融解石英カバーガラス。A．個々の実験についてアレイを単離するためのガセットで覆われているカバーガラス。B及びC．導波管のスケールの連続増加。D．個々のウェルの走査型電子顕微鏡画像。（M

50

J Levene, J Korlach, S W Turner, M Foquet, H G Craighead and W W Webb, Science vol. 299, No. 5607 (Jan. 31, 2003) pp. 682 - 686)。

【図18】図18。超並列蛍光相関分光法 (mpFCS) のための機器における光学配置の概略図。フィルタホイール (NDFW) に実装された様々な透過力を有する中性密度フィルタを使用して強度が制御される単一レーザービームは、拡大され (L1 及び L2)、ペリスコープアセンブリ (PA) を通して導かれ、単一レーザービームを 32×32 (1024) 本のビームの矩形アレイに分割するように設計された回折光学素子 (DOE) において焦点レンズ (L3) によって集光される。 32×32 個のレーザービームスポットの照明マトリックスが、顕微鏡の背面端子の画面に形成され、顕微鏡のリレーオブティクス (RO) によってロングパスダイクロイックミラー (LPDM) に、そして、対物レンズ (OBJ) を通してサンプルに導かれる。対物レンズによって収集された蛍光は、LPMD を通過し、単一光子アバランシェ発光ダイオード (SPAD カメラ) の場合一致する 2D アレイに導かれる。上：ローダミン 6G (Rh6G) の薄層及び 18.0 メガピクセルのデジタル一眼レフ (DSLR) カメラ (ナビゲーションカメラ) を使用して可視化された、顕微鏡の対物レンズの焦点面において生成された照明マトリックスの画像。中心にゼロ次回折ピークが見える (Vital M, Bronzi D, Krmpot AJ, Nikolic SN, Schmitt F-J, Junghans C, Tisa S, Friedrich T, Vukojevic V, Terenius L, Zappa F, Rigler R, A single-photon avalanche camera for fluorescence lifetime imaging microscopy and correlation spectroscopy. IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron. 2014 20: 344 - 353)。

【図19】図19。超並列蛍光相関分光法 (mpFCS) を使用した溶液中及び血清中のアミロイド形成性凝集体のサイズ分布の決定。A. 1024 個の観察体素における拡散時間マップ。B. 1024 個の観察体素全てにわたる拡散ヒストグラム。C. 反応開始の3時間後のアミロイド β_{1-42} ($A\beta_{42}$) ペプチドの水溶液 ($20 \mu\text{M}$ $A\beta_{42}$ 、 $10 \mu\text{M}$ ThT、室温 (

【0013】

【数1】

$RT \approx 21$

【0014】

) 中の1つの観察体積に記録された時系列。D. 血清サンプル中の1つの観察体素に記録された時系列。バックグラウンドよりも明確に視認できる蛍光強度バーストは、ThT 反応性ナノプラークの通過を反映している。

【図20】図20。単一事象発生 (f_{SEO}) の測定された頻度によって反映されたときの、アルツハイマー病 (AD) と診断された個体、軽度認知機能障害 (MCI) と診断された個体、及び見かけ上健常個体 (対照) の血清中の構造化 Th - T 反応性アミロイド形成性凝集体の量の差。箱髭図において、箱はデータの平均 (中央の実線) を標準偏差1個分上回る及び下回るものを示し、横破線は中央値を示し、髭の末端は $5 \sim 95\%$ の区間を与える。

【図21】図21。臨床 CSF パラメータと血清中の単一事象発生の頻度 (f_{SEO}) との間の相関。A. CSF 中の $A\beta_{42}$ レベルの関数としての CSF 中の $A\beta_{42}$ レベルに対する全 Tau レベルの比。縁部が濃灰色である薄灰色のドットは、AD と診断された個体から得られたデータを示す。薄灰色のドットは、MCI と診断された個体から得られたデータを示す。全てのグラフにおいて、縦点線は、CSF 中の $A\beta_{42}$ レベルに基づく AD 診断について一般的に許容されている限度を示す、 $[A\beta_{42}]_{550 \text{ ng l}^{-1}}$ 。B. CSF 中の $A\beta_{42}$ レベルの関数としての血清中の単一事象発生の頻度。縁部が黒色

である大きな濃灰色のドットは、A Dと診断された個体から得られたデータを示す。小さな濃灰色のドットは、M C Iと診断された患者コホートにおける個体から得られたデータを示す。横破線は、血清中の f_{SE0} のカットオフ値、 $f_{SE0} = 1.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ ($5.4 h^{-1}$)を示す。C . C S F測定値と血清測定値との間の比較。薄灰色の軸及び記号は、C S F中の測定値に関し、C S F中の $A\beta_{42}$ レベルの関数としてのC S F中の $A\beta_{42}$ レベルに対する全T a uレベルの比を示す。濃灰色の縦軸及び記号は、血清中の測定値に関する。濃灰色の記号は、C S F中の $A\beta_{42}$ レベルの関数としての血清中の単一事象発生の頻度を表す。多面的臨床評価に基づいてA Dと診断された個体から得られたデータを大きなドットで表す。B . 及びC . において薄灰色の円で囲まれた点は、M C Iと診断された胃バイパス手術を受けた患者から得られた値を示す。

10

【図22】図22。M C I及びA Dの個体におけるアミロイド形成性負荷に対する神経変性の寄与。C S F及び血液の分析データを組み合わせることによって、以下の通り神経変性及びアミロイド形成性負荷の程度に従って患者を4群に層別化することができた：I - 低神経変性 (l_{NDG}) かつ低アミロイド形成性負荷 (l_{AL})；II - 低神経変性 (l_{NDG}) かつ高アミロイド形成性負荷 (h_{AL})；III - 高神経変性 (h_{NDG}) かつ高アミロイド形成性負荷 (h_{AL})；IV - 高神経変性 (h_{NDG}) かつ低アミロイド形成性負荷 (l_{AL})。この分類によれば、低神経変性かつ高アミロイド形成性負荷を呈するM C Iの個体は、A Dを発症するリスクがある可能性がある。これら個体では、アミロイドベータの生理は崩壊するが、神経変性は依然として低い。

20

【発明を実施するための形態】

【0015】

従って、本発明の第1の態様は、被験体におけるアミロイド関連疾患を診断及び/又は予後診断する方法であって、

- 該被験体由来の体液のサンプルを提供する工程と；
 - 該サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び/又は量及び/又は濃度及び/又はサイズを決定する工程と；
- を含む方法を提供する。

【0016】

好ましくは、該方法は、該決定に基づいて該アミロイド関連疾患の診断及び/又は予後診断を提供する工程を更に含む。最も好ましくは、該決定に基づいて該アミロイド関連疾患の診断及び/又は予後診断を提供する工程は、該サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び/又は量及び/又は濃度及び/又はサイズを決定する工程の後に行われる。

30

【0017】

従って、本発明は、生存患者におけるアミロイド関連疾患を診断及び予後診断するための高度に有効な早期かつ非侵襲的な方法を提供し、これは、アミロイド関連疾患の治療効果の追跡にも適用可能である。該方法は、更に、アミロイド関連疾患の治療、並びにアミロイド関連疾患を治療するための剤の同定及び開発にも有用である。これら用途に特に有用なのは、本明細書に記載の方法を使用して、経時的に繰り返し同じ患者においてアミロイド凝集体のレベルを定期的に同定及び特性評価することができる点である。また、本発明は、本明細書に記載の方法に対応するキットを提供する。

40

【0018】

本発明の方法の追加の利点は、体液に対して実施されるので非侵襲的又は低侵襲的であり、従って、患者にとってそれほど不快ではない点である。更に、該方法は疾患の初期徴候を検出することができるので、死後だけではなく、生存患者に対しても実施することができる。このことから、生存患者における疾患進行をモニタリングするために、該方法を複数回繰り返すことも可能になる。

【0019】

用語「アミロイド関連疾患」は、医学分野の当業者に公知である。アミロイド関連疾患は、時にアミロイドーシスとも称され、被験体にアミロイドが蓄積する疾患を包含する。アミロイドは、互いに密着して凝集体を形成し、次に、合わさって原線維を形成する特定

50

のペプチド又は特定のタンパク質の多数のコピーの蓄積である。従って、原線維は、凝集体よりも大きな構造体であり得る。凝集体及び／又は原線維の形態では、ペプチド又はタンパク質は、もはやその生理学的機能を有しない。アミロイドの凝集体及び原線維が被験体の組織に蓄積した場合、多くの場合、その組織の機能が崩壊し、アミロイド関連疾患の病状を引き起こし得る。

【 0 0 2 0 】

「個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する」には、個々の凝集体を決定することが含まれる。決定は、凝集体の量又は濃度の合計を決定するのではなく、存在する全ての中で個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定することを含む。従って、請求される方法は、利用可能な場合、アミロイド原線維の総量及び／又は大きな群のみが検出される現行の方法とは異なる。本明細書で論じるとき、「個々のアミロイド凝集体」は、アミロイド関連疾患の初期バイオマーカーであり、これによって、早期の診断及び／又は予後診断が可能になる。

10

【 0 0 2 1 】

「個々のアミロイド凝集体」には、アミロイド関連疾患に関連する構造体であるか又は該構造体を形成するペプチド又はタンパク質の蓄積が含まれる。用語「個々のアミロイド凝集体」は、構造化されたアミロイド凝集体と称される場合もあり、これには、 β -プリーツシートを含むアミロイド凝集体等の規定の二次構造を有するアミロイド凝集体が含まれる。用語「アミロイド凝集体」は、アミロイド関連疾患に関連する構造体を形成することができる任意のペプチド又はタンパク質を指すために使用される。この用語は、時にアミロイド β ペプチド（アルツハイマー病に関連する構造体を形成する）を指すために当技術分野において使用されるが、本願の目的では、そのペプチドに限定されるものではない。

20

【 0 0 2 2 】

「ペプチド」は、一般に、2以上のアミノ酸であるが、約50以下のアミノ酸；例えば：約3～約50アミノ酸；約4～約50アミノ酸；約5～約50アミノ酸；約6～約50アミノ酸；約7～約50アミノ酸；約8～約50アミノ酸；約9～約50アミノ酸；約10～約50アミノ酸；約20～約50アミノ酸；約30～約50アミノ酸；又は約40～約50アミノ酸を含む分子であると考えられる。

30

【 0 0 2 3 】

「タンパク質」は、一般に、約50以上のアミノ酸；例えば：約60以上；約70以上；約80以上；約90以上；約100以上；約150以上；約200以上；約250以上；約300以上；約350以上；約400以上；約450以上；又は約500以上のアミノ酸を含む分子であると考えられる。

【 0 0 2 4 】

一実施形態では、個々のアミロイド凝集体は、非晶質アミロイド凝集体を含まない。「非晶質アミロイド凝集体」には、 β -プリーツシート構造を有しないアミロイド凝集体等の、明確な二次構造を有しないアミロイド凝集体が含まれる。

40

【 0 0 2 5 】

本発明は、一般に、個々のアミロイド凝集体の検出、及び個々のアミロイド凝集体の特性評価に関する。その検出及び特性評価は、「サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する」と記載され、それには、「サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを「同定及び／又は計算及び／又は検出する」ことが含まれる。

【 0 0 2 6 】

「サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在」を決定する」には、サンプル中に個々のアミロイド凝集体が存在するか否かを判定することが含まれる。以下で更に論じる通り、サンプルが患者由来の体液である場合かつ個々のアミロイド凝集体が患者の体液中に存在する場合、患者はアミロイド関連疾患と診断される。

50

【0027】

「サンプル中の個々のアミロイド凝集体の量を決定する」には、サンプル中の個々のアミロイド凝集体の総数を求めることが含まれる。以下で更に論じる通り、サンプルが患者由来の体液である場合、患者の体液中の個々のアミロイド凝集体の量が多いほど、アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断は悪くなる。

【0028】

「サンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズを決定する」には、個々のアミロイド凝集体中のペプチド数を求める、及び／又はサンプル中の個々のアミロイド凝集体の寸法を求める、及び／又はサンプル中の個々のアミロイド凝集体の測定値を求める、及び／又はサンプル中の個々のアミロイド凝集体の分子量を求めることが含まれる。以下で更に論じる通り、サンプルが患者由来の体液である場合、患者の体液中の個々のアミロイド凝集体のサイズが大きいほど、アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断は悪くなる。

10

【0029】

「サンプル中の個々のアミロイド凝集体の濃度を決定する」には、サンプル中の個々のアミロイド凝集体の相対量を特定することが含まれる。以下で更に論じる通り、サンプルが患者由来の体液である場合、患者の体液中の個々のアミロイド凝集体の濃度が高いほど、アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断は悪くなる。

【0030】

本発明の第1の態様の好ましい実施形態では、該方法は、以下の順に、

- 被験体由来の体液のサンプルを提供する工程と；
- 該サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；
- 該決定に基づいて、該アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断を提供する工程と；

20

を含む。

【0031】

追加の実施形態は、被験体におけるアミロイド関連疾患を診断及び／又は予後診断する方法であって、

- 該被験体由来の血漿及び／又は血清からなる群から選択されるサンプルを提供する工程と；
- 蛍光分光法、好適には蛍光相関分光法に基づく分析によって、該サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；

30

を含む方法に関する。

【0032】

用語「診断」及び「予後診断」は、医学分野の当業者に公知である。

【0033】

「診断」には、該方法を使用して、被験体がアミロイド関連疾患を有するか否かを特定することが含まれる。「予後診断」には、該方法を使用して、被験体においてアミロイド関連疾患がどれくらい早く進行する可能性があるか、並びに／又は被験体においてアミロイド関連疾患の症状及び／若しくは徴候がどれくらい重篤になる可能性があるか、並びに／又はアミロイド関連疾患に起因して被験体が死亡する可能性があるかどうか、並びに／又はアミロイド関連疾患に起因して被験体がいつ頃死亡する可能性があるか、並びに／又は被験体に以前投与された若しくは施されたアミロイド関連疾患の治療の有効性の評価、並びに／又は将来的に被験体に投与される若しくは施される可能性のあるアミロイド関連疾患の治療の有効性の可能性を特定することが含まれる。言い換えれば、予後診断には、被験体に以前投与された若しくは施されたアミロイド関連疾患の治療の有効性を追跡することが含まれる。

40

【0034】

アミロイド関連疾患の治療は、利用可能な場合、医学分野の当業者に公知である。

50

【0035】

「治療」には、アミロイド関連疾患の治療を意図する治療、並びに／又はアミロイド関連疾患の症状及び／若しくは徴候の数及び／若しくは重篤度の低減を意図する治療、並びに／又は対症療法的治療、並びに／又は実験的治療、及び／又は理学療法が含まれる。アミロイド関連疾患の具体的な治療については、本明細書で論じられる。

【0036】

一実施形態では、体液は、血液、及び／又は脳脊髄液（CSF）、及び／又は唾液、及び／又は尿、及び／又は滑液、及び／又は糞便を含む又はからなる群のうちの1つ以上である。好ましい実施形態では、体液は、血液を含む。別の好ましい実施形態では、体液は、唾液を含む。更に別の好ましい実施形態では、体液は、尿を含む。更なる実施形態では、体液は、血漿及び／又は血清から選択される。より更なる実施形態では、体液は、血清から選択される。別の実施形態では、体液は、血液細胞、具体的には、赤血球、白血球、及び血小板を含む。更なる実施形態によれば、血液細胞は、溶解していてもよい。

10

【0037】

本発明の特に驚くべき進歩は、血液、尿、滑液、糞便、及び／又は唾液の体液サンプルを使用してアミロイド関連疾患を診断する又は予後診断に達することができる点である。既に、公知の方法を使用しても、特に本明細書に記載のように、血液サンプルを使用してアミロイド関連疾患であるアルツハイマー病を診断することはできなかったことが研究によって示されている（Oh et al., *Neuromolecular medicine*, 2008; 10(3): 195-207及びToledo et al., *Alzheimer's research & therapy*, 2013; 5(2): 8）。しかし、個々のアミロイド凝集体を検出することによって、以前の方法で判明した問題が本発明では克服されるが、それは、個々のアミロイド凝集体がアミロイド関連疾患の有効な初期バイオマーカーであることが現在は示されているためである。尿、唾液、滑液、糞便、及びCSFのサンプルについては、これら体液中の個々のアミロイド凝集体の検出を、アルツハイマー病等のアミロイド関連疾患の診断又は予後診断において使用できることはこれまで示唆されていない。

20

【0038】

尿、唾液、糞便、及び血液の体液の具体的な利点は、尿、糞便、及び唾液のサンプルの提供に医療従事者の補助を必要とせず、低侵襲的方法を使用して被験体から提供され得る点である。

30

【0039】

本発明の目的のために体液サンプルをどのように提供することができるかは、医学分野の当業者に公知である。例えば、血液体液サンプルは、針を用いて静脈から血液を採取することによって、医療従事者により入手することができる。

【0040】

一実施形態では、血液サンプルは、全血；血清；血漿；血液細胞：赤血球、白血球、及び／又は血小板；血液細胞溶解物を含むか又はからなる群のうちの1つ以上である。

【0041】

被験体から採取された血液は、特に、血漿に懸濁している血液細胞を含む。血液細胞の主な種類は、赤血球、白血球、及び血小板である。実施形態によれば、血液から血液細胞を分離し、それによって血漿を得ることが好都合であり得る。更に、血漿から凝固因子を除去し、それによって血清を入手することができる。全血は、遠心分離によって分画することができる。遠心分離によって、全血は血漿及び赤血球に分画され、これら2つの画分の間に白血球及び血小板の薄層が生じる。分析されるサンプルとして全血をそのまま使用してもよいが、特定の場合、血液細胞を除去し、分析のためのサンプルとして血漿を使用することが好ましい場合がある。更に、血漿から任意の凝固因子を除去し、分析のために（サンプルとして）血清を使用することが望ましい場合もある。

40

【0042】

「細胞溶解物」には、赤血球、白血球、及び／又は血小板の細胞溶解物が含まれる。

50

【 0 0 4 3 】

血液の特定の成分（例えば、赤血球、白血球、及び／又は血小板）は、例えば、全血サンプルを遠心分離することを含む血液分画等、当技術分野において公知の方法を使用して単離することができる。

【 0 0 4 4 】

幾つかの状況では、FAD酵素及び脂肪色素、並びにNADH酵素及び脂肪色素は、自己蛍光するとき、方法の感度を低下させる場合がある。従って、方法を使用する前に体液サンプルからこれら分子を除去することには幾つかの利点があり得る。

【 0 0 4 5 】

一実施形態では、体液サンプルは、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）酵素及び／若しくはFAD脂肪色素；並びに／又はピリジン性（NADH）酵素及び／若しくはNADH脂肪色素を含むか又はからなる群のうちの1つ以上を含まない。

10

【 0 0 4 6 】

特定の実施形態では、血液サンプルは、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）酵素及び／若しくはFAD脂肪色素；並びに／又はピリジン性（NADH）酵素及び／若しくはNADH脂肪色素を含むか又はからなる群のうちの1つ以上を含まない。

【 0 0 4 7 】

特定の実施形態では、CSFサンプルは、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）酵素及び／若しくはFAD脂肪色素；並びに／又はピリジン性（NADH）酵素及び／若しくはNADH脂肪色素を含む又はからなる群のうちの1つ以上を含まない。

20

【 0 0 4 8 】

サンプルからフラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）酵素、FAD脂肪色素、ピリジン性（NADH）酵素、及び／又はNADH脂肪色素を除去する方法は、化学分野の当業者に公知である。例えば、FADは、Burch HB, Bessey OA, Lowry OH. Fluorometric Measurements of Riboflavin and its Natural Derivatives in Small Quantities of Blood Serum and Cells. J Biol Chem. 1948 175 (1) : 457 - 470に記載の通り、37 °Cで20時間以内に5%トリクロロ酢酸中でFMNに完全に加水分解される。

【 0 0 4 9 】

一実施形態では、個々のアミロイド凝集体は、アミロイドオリゴマー；アミロイドナノ凝集体；及び／又はアミロイド老人性凝集体；及び／又はアミロイド原線維；及び／又はアミロイド前原線維を含む群から選択される。好ましくは、個々のアミロイド凝集体は、アミロイドナノ凝集体である。これらアミロイド凝集体は、被験体においてアミロイド凝集体を形成しやすいペプチド及び／又はタンパク質の交差反応によって形成される。

30

【 0 0 5 0 】

アミロイドナノ凝集体は、アミロイドナノブランク又は構造化アミロイドナノブランクと称される場合もあり、例えば、 β -ブリーツシートの二次構造を含むもの等である。用語「アミロイドナノ凝集体」は、二量体及び三量体よりも多数のペプチドを含む（そして、構造化超分子集合体と記載される場合もある）が、アミロイド原線維又は老人性アミロイド凝集体（老人性ブランクとして知られている場合もある）をまだ形成していないことを示す。これらの区別は、生物学又は化学分野の当業者には理解されるであろう。

40

【 0 0 5 1 】

アミロイドオリゴマー及びアミロイド前原線維は、アミロイド原線維の成長中に観察される可溶性ペプチド集合体である。これらは、かなりの量の β -シート構造を含有するので、ThTに結合することができ、従って、ThT蛍光を生じさせることができる。アミロイドオリゴマー及びアミロイド前原線維は構造的に不均一な超分子集合体を含むが、典型的には、オリゴマーがより小さく、前原線維の形成に先行するとされている。更に、オリゴマーは、前原線維に特徴的な細長い輪状形状ではなく球状であることがより多いと考えられるとされている。前原線維における構造秩序の程度は、オリゴマーにみられるもの

50

と原線維にみられるものとの間の中間である。オリゴマー及び前原線維の分子量は、40～3000kDaの範囲である(Nichols et al. Biochemistry. 2015 54(13):2193-2204; Byron & Vestergaard Curr. Opin. Struct. Biol. 2015 35:76-86.)。

【0052】

アミロイド前原線維は、成長してアミロイド原線維になる、細長い又は輪状形状の細長い一本鎖状超分子集合体である。前原線維は、2～10nmの範囲の直径を有し、長さは約100～200nmである。アミロイド原線維は、長さ対直径比が高く、直径が10～100nmの範囲である分子の細長い複数鎖状集合体である。原線維は、老人性ブランクを生じさせ、これは、複雑に織り合わさった成熟した原線維からなる均一な構造体である(Nichols MR, Colvin BA, Hood EA, Paranjape GS, Osborn DC, Terrill-Userly SE. Biophysical comparison of soluble amyloid- β (1-42) protofibrils, oligomers, and protofilaments. Biochemistry. 2015 54(13):2193-2204. doi:10.1021/bi500957g; Byron O, Vestergaard B. Protein-protein interactions: a supra-structural phenomenon demanding trans-disciplinary biophysical approaches. Curr. Opin. Struct. Biol. 2015 35:76-86; Relini A. Amyloid like protofibrils with different physical properties. Bio-nanoimaging: Protein Misfolding and Aggregation, Vladimir Uversky and Yuri Lyubchenko Ed. 2013 Technology & Engineering.)。

10

20

【0053】

一実施形態では、個々のアミロイド凝集体は、1枚以上のベータ(β)シート(例えば、 β -ブリーツシート)を含む。生物学又は化学分野の当業者には公知であるように、ベータ(β)シートはタンパク質の二次構造であり、一般に、アミノ酸がねじれて引き伸ばされたものである。2枚以上のベータ(β)シートの会合は、例えば、アミロイド関連疾患に関連する個々のアミロイド凝集体を形成するためのペプチド蓄積のメディエーターであることが多い。

30

【0054】

一実施形態では、個々のアミロイド凝集体は、2-(4-(ジメチルアミノ)フェニル)-3,6-ジメチルベンゾ[d]チアゾール-3-イウムクロリド(チオフラビンT(ThT))によって結合され得る(Groenning, M. (2010) Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status. Journal of Chemical Biology 3, 1-18)。ThTは、ベータ(β)-シート構造に結合する分子であり、Sigma-Aldrichから入手可能である。

40

【0055】

一実施形態では、個々のアミロイド凝集体は、約20以上のペプチド又はタンパク質；例えば：約30以上；約40以上；約50以上；約60以上；約70以上；約80以上；約90以上；約100以上；約200以上；約300以上；約400以上；約500以上；約600以上；約700以上；約800以上；約900以上；約1,000以上；約2,000以上；約3,000以上；約4,000以上；約5,000以上；約6,000以上；約7,000以上；約8,000以上；約9,000以上；約10,000以上；約20,000以上；約30,000以上；約40,000以上；約50,000以上；

50

約 60,000 以上；約 70,000 以上；約 80,000 以上；約 90,000 以上；
約 100,000 以上；約 200,000 以上；約 300,000 以上；約 400,000
以上；約 500,000 以上；又は約 1,000,000 以上のペプチド又はタンパク
質、好ましくは、約 40 以上のペプチド又はタンパク質を含む。

【0056】

理解される通り、アミロイドナノ凝集体は、約 20 のタンパク質又はペプチド ~ 100
、000 のタンパク質又はペプチド、例えば：約 30 のタンパク質又はペプチド ~ 100
、000 のタンパク質又はペプチド；約 40 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000
のタンパク質又はペプチド；約 50 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパ
ク質又はペプチド；約 60 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質又は
ペプチド；約 70 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質又はペプチド
；約 80 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質又はペプチド；約 90
のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質又はペプチド；約 100 のタン
パク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質又はペプチド；約 200 のタンパク質
又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質又はペプチド；約 300 のタンパク質又はペ
プチド ~ 100,000 のタンパク質又はペプチド；約 400 のタンパク質又はペプチド
~ 100,000 のタンパク質又はペプチド；約 500 のタンパク質又はペプチド ~ 100
、000 のタンパク質又はペプチド；約 600 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000
のタンパク質又はペプチド；約 700 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパ
ク質又はペプチド；約 800 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質
又はペプチド；約 900 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質又は
ペプチド；約 1,000 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質又は
ペプチド；約 2,000 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質又はペ
プチド；約 3,000 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質又はペ
プチド；約 4,000 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質又はペ
プチド；約 5,000 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質又はペ
プチド；約 6,000 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質又はペ
プチド；約 7,000 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質又はペ
プチド；約 8,000 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質又はペ
プチド；約 9,000 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質又はペ
プチド；約 10,000 のタンパク質又はペプチド ~ 100,000 のタンパク質又はペ
プチド；約 40
のタンパク質又はペプチド ~ 約 1,000 のタンパク質又はペプチド；約 1,000 のタ
ンパク質又はペプチド ~ 約 2,000 のタンパク質又はペプチド；約 1,000 のタンパ
ク質又はペプチド ~ 約 3,000 のタンパク質又はペプチド；約 1,000 のタンパク質
又はペプチド ~ 約 4,000 のタンパク質又はペプチド；約 1,000 のタンパク質又は
ペプチド ~ 約 5,000 のタンパク質又はペプチド；約 1,000 のタンパク質又はペ
プチド ~ 約 6,000 のタンパク質又はペプチド；約 1,000 のタンパク質又はペ
プチド ~ 約 7,000 のタンパク質又はペプチド；約 1,000 のタンパク質又はペ
プチド ~ 約 8,000 のタンパク質又はペプチド；約 1,000 のタンパク質又はペ
プチド ~ 約 8,000 のタンパク質又はペプチド；又は約 1,000 のタンパク質又は
ペプチド ~ 約 10
、000 のタンパク質又はペプチドを含み得る。

【0057】

理解される通り、アミロイド原線維は、100,000 超のペプチド又はタンパク質 ~
1,000,000 のペプチド又はタンパク質、例えば：約 200,000 のペプチド又は
タンパク質 ~ 1,000,000 のペプチド又はタンパク質；約 300,000 のペ
プチド又はタンパク質 ~ 1,000,000 のペプチド又はタンパク質；約 400,000
のペプチド又はタンパク質 ~ 1,000,000 のペプチド又はタンパク質；又は約 500
、000 のペプチド又はタンパク質 ~ 1,000,000 のペプチド又はタンパク質を
含み得る。

【0058】

10

20

30

40

50

理解される通り、老人性アミロイド凝集体は、1,000,000超のペプチド又はタンパク質を含み得る。

【0059】

一実施形態では、該方法は、サンプルに検出剤を添加する工程を更に含む。

【0060】

好ましくは、「サンプルに検出剤を添加する」工程は、「サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する」工程の前に行われる。

【0061】

より好ましくは、「サンプルに検出剤を添加する」工程は、「サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する」工程の前に、そして、「被験体由来の体液のサンプルを提供する」工程の後に行われる。

【0062】

一実施形態では、検出剤は、個々のアミロイド凝集体と結合及び／又は会合及び／又は反応する。好ましくは、検出剤は、個々のアミロイド凝集体と結合及び／又は会合及び／又は反応し；それによって、該検出剤が検出可能になる及び／若しくは測定可能になる、又はより容易に検出可能になる及び／若しくはより容易に測定可能になる、並びに／又はより多くの測定可能なアウトプットを生じさせる。

【0063】

「検出剤が個々のアミロイド凝集体と結合する」には、検出剤が個々のアミロイド凝集体と分子結合（例えば、共有結合）を形成することが含まれる。

【0064】

「検出剤が個々のアミロイド凝集体と会合する」には、検出剤が個々のアミロイド凝集体と非共有結合性相互作用（例えば、静電相互作用、及び／又はパイ（ π ）-相互作用、及び／又はファンデルワールス相互作用、及び／又は疎水性相互作用）を形成することが含まれる。

【0065】

「検出剤が個々のアミロイド凝集体と反応する」には、検出剤が、機能を発揮するために、必ずしも個々のアミロイド凝集体と結合若しくは会合する、及び／又は個々のアミロイド凝集体と近接している必要はないことが含まれる。

【0066】

「検出剤が検出可能になる」には、個々のアミロイド凝集体の存在下で検出剤が結合及び／又は会合及び／又は反応したとき、検出剤の存在を同定又は検出できることが含まれる。言い換えれば、サンプルが個々のアミロイド凝集体を含まない場合、本明細書に記載の方法を使用して、検出剤の存在を同定することも検出することもできない。

【0067】

「検出剤が測定可能になる」には、個々のアミロイド凝集体の存在下で検出剤が結合及び／又は会合及び／又は反応したとき、検出剤の量を定量できる及び／又は検出剤の相対量若しくは相対レベルを評価できることが含まれる。検出剤の量又はレベルを使用して、個々のアミロイド凝集体の量及び／又は濃度及び／又はサイズを定量することができる。

【0068】

一実施形態では、決定は、検出剤の検出及び／又は測定を含む。誤解を避けるために、この決定は、「サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する」工程の一部として行ってもよい。

【0069】

「検出剤の検出」には、検出剤の存在が検出又は同定されることが含まれる。「検出剤の測定」には、検出剤の量の定量及び／又は検出剤の相対量若しくは相対レベルの評価が含まれる。検出剤の量又はレベルを使用して、個々のアミロイド凝集体の量及び／又は濃度及び／又はサイズを定量することができる。

【0070】

10

20

30

40

50

一実施形態では、検出剤は、1枚以上の β -シートを含む個々のアミロイド凝集体と結合及び/又は会合及び/又は反応する。

【0071】

一実施形態では、検出剤は、蛍光部分及び/又は生物発光部分を含む。生物学及び/又は化学分野の当業者は、用語「蛍光部分」及び「生物発光部分」に包含されるものを理解するであろう。

【0072】

一実施形態では、検出剤は、蛍光部分を含み、個々のアミロイド凝集体と結合及び/又は会合及び/又は反応したときに蛍光を発生させる又は放出する。

【0073】

好ましい実施形態では、蛍光剤を含む検出剤を添加し、検出剤からの蛍光の測定及び/又は検出を使用して、サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び/又は量及び/又は濃度及び/又はサイズを決定する。

【0074】

更に別の実施形態では、検出剤は、生物発光部分を含み、個々のアミロイド凝集体と結合及び/又は会合及び/又は反応したときに生物発光を発生させる又は放出する。

【0075】

一実施形態では、検出剤は、チオフラビンT (ThT)、及び/又はARCAM1、及び/又は五量体ホルミルチオフエン酢酸 (pFTAA)、及び/又は4-(ジシアノピニル)-ジュロリジン (DCVJ)、及び/又は1-アミノ-8-ナフタレンスルホナート (ANS)、及び/又はビス-ANS、及び/又は2-[N-ビス-(3-ジメチルアミノプロピル)-アミノ]-4-[2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン]-1-フェニル-キノリニウム (PicoGreen)を含むか又はからなる群のうちの1つ以上である。好ましくは、検出剤は、チオフラビンT (ThT)及び/又はARCAM1を含む。より好ましくは、検出剤は、チオフラビンT (ThT)を含む。

【0076】

ARCAM1は、アリアルシアノアミドであり、これは、ベータ(β)-シートに結合する (Guan et al., 2015, ACS Chemical Neuroscience, 6:1503-1508)。

【0077】

一実施形態では、検出剤は、チオフラビンT (ThT)、及び/又はARCAM1、及び/又は五量体ホルミルチオフエン酢酸 (pFTAA)、及び/又は4-(ジシアノピニル)-ジュロリジン (DCVJ)、及び/又は1-アミノ-8-ナフタレンスルホナート (ANS)、及び/又はビス-ANS、及び/又は2-[N-ビス-(3-ジメチルアミノプロピル)-アミノ]-4-[2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン]-1-フェニル-キノリニウム (PicoGreen)の変異体又は誘導体又は修飾体を含むか又はからなる群のうちの1つ以上である。

【0078】

一実施形態では、アミロイド関連疾患は、個々のアミロイド凝集体、好ましくは、1枚以上のベータ(β)-シートを含む個々のアミロイド凝集体と関連する。

【0079】

「アミロイド関連疾患が個々のアミロイド凝集体と関連する」には、アミロイド関連疾患が、個々のアミロイド凝集体の存在及び/又は蓄積によって引き起こされるか又は悪化することが含まれる。

【0080】

一実施形態では、アミロイド関連疾患は、アルツハイマー病；及び/又はパーキンソン病；及び/又はハンチントン病；及び/又は筋萎縮性側索硬化症 (ALS)；及び/又は2型糖尿病；及び/又は全身性アミロイドーシス；及び/又はプリオン病 (例えば、クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD))；及び/又はアミロイド軽鎖アミロイドーシス；及

10

20

30

40

50

び／又は多発性骨髄腫；及び／又は炎症；及び／又は腎不全；及び／又は白血球走化性因子2（LECT2）アミロイドーシス；及び／又は多発ニューロパシーを伴うトランスサイレチン関連遺伝性アミロイドーシス（家族性アミロイド多発ニューロパシー（FAP）又はSkellleftesjukánとしても知られている）；及び／又は血液透析関連アミロイドーシス；及び／又は脳アミロイドアンギオパシー；及び／又は家族性内蔵アミロイドーシス；及び／又は原発性皮膚アミロイドーシス；及び／又は脳アミロイドアンギオパシー；及び／又はプロラクチノーマ；及び／又は家族性角膜アミロイドーシス；及び／又は心房の老人性アミロイド；及び／又は甲状腺髄様がん；及び／又は医薬品インスリン誘発性アミロイドーシスを含む群から選択される1つ以上である。前述の疾患は、医学分野の当業者に公知である。

10

【0081】

好ましい実施形態では、アミロイド関連疾患は、アルツハイマー病である。

【0082】

別の好ましい実施形態では、アミロイド関連疾患は、パーキンソン病である。

【0083】

更に別の実施形態では、アミロイド関連疾患は、ハンチントン病である。

【0084】

更に別の実施形態では、アミロイド関連疾患は、筋萎縮性側索硬化症（ALS）である。

20

【0085】

アルツハイマー病は、経時的に緩徐に発症し、通常平均余命が診断後3～9年間である、慢性神経変性疾患である。しかし、アルツハイマー病の診断は、疾患の信頼できる初期マーカーが存在していないので、非常に遅くなる場合が多い。現在、診断は、短期記憶消失等、多くの場合かなり軽微で観察することが困難な行動症状を呈する患者に依る。現行の方法に基づくと、患者がどれくらい早く増悪する可能性があるかについての予後診断を提供することもかなり困難である。従って、アルツハイマー病を早期に診断し、信頼できる予後診断を提供することができる有効な方法が特に必要とされている。本発明は、本発明者らが有効な診断マーカー及び予後診断を評価するための信頼できるマーカーを提供することを証明した、個々のアミロイド凝集体を検出することによってこの問題を解決する。

30

【0086】

同様に、パーキンソン病、ハンチントン病、及びALSは、行動症状を使用して診断され、有効な初期診断及び予後診断マーカーのない慢性疾患である。本明細書に記載の全てのアミロイド関連疾患と同様に、パーキンソン病、ハンチントン病、及びALSを早期に診断し、信頼できる予後診断を提供することができる有効な方法が特に必要とされている。本発明は、本発明者らが有効な診断マーカー及び予後診断を評価するための信頼できるマーカーを提供することを証明した、個々のアミロイド凝集体を検出することによってこの問題を解決する。

【0087】

一実施形態では、アルツハイマー病は、主観的認知障害；軽度認知障害；アルツハイマー病；及び血管性認知症を伴うアルツハイマー病を含む群から選択される。これらの種類のアルツハイマー病は、医学分野の当業者に公知である。

40

【0088】

主観的記憶障害としても知られている主観的認知障害（SCI）は、記憶障害を含む認知能力の悪化を有するが、標準的な試験によってその悪化を検証することができない被験体に関する。客観的認知機能不全又は鬱病の非存在下では、SCIは、正常老化における一般的な遷移段階であるとみなされることがある。

【0089】

初発認知症又は単独記憶障害としても知られている軽度認知機能障害（MCI）は、被験体の年齢に基づいて予測されるものを超えた認知障害の発病及び発展を含むが、日常の

50

活動を妨げるほど重篤ではない脳機能症状である。MCIは、正常老化と認知症との間の遷移段階として生じる場合もある。MCIの原因は不明であるので、予防法も治療法も存在しない。米国では、MCIは、American ICD-10-CM医療診断コードにおいてG31.84に指定されている。

【0090】

アルツハイマー病(AD)は、脳の大脳皮質における神経細胞及び神経連絡の不可逆的な破壊、並びに脳量の著しい喪失を特徴とする進行性神経変性疾患である。その結果、経時的に悪化する認知症症状が生じる。最終的に、この疾患は、被験体が日常の作業を行うことができず、常にケアを受けなければ生きることができなくなるほど重篤になる。根底にある生化学的变化について多くのことが知られているが、ADの原因は未だ不明であり、現在ADの治療法は存在していない。本明細書で論じる通り、早期にADを診断するための信頼できるバイオマーカーも、信頼できる疾患進行のバイオマーカーも存在していない。ADの治療に一般的に使用される治療剤は、疾患の進行を減速させ、幾つかの症状及び/又は徴候を緩和するが、患者を治癒させはしない。

【0091】

混合型認知症としても知られている血管性認知症を伴うアルツハイマー病は、AD及び血管性認知症、すなわち、脳への血液供給の低減によって引き起こされる認知崩壊の両方を含む、遭遇することの多い併存疾患である。血管性認知症症状を伴うアルツハイマー病では、記憶及び言語の障害、集中力及び注意力の喪失、論理的思考及び判断の障害、視覚認知の問題等の認知症の症状は、二重の原因によって増強される。

【0092】

一実施形態では、個々のアミロイド凝集体は、アミロイドベータ(β)ペプチド(β ペプチド)(例えば、ベータ(β)40及び/又はベータ(β)42及び/又はベータ(β)43);及び/又はアミロイド軽鎖;及び/又は血清アミロイドAタンパク質(SAA);及び/又は白血球走化性因子2(LECT2);及び/又はトランスサイレチン;及び/又はベータ(β)2ミクログロブリン;及び/又はアミリン;及び/又はプリオンタンパク質;及び/又はシスタチンC(CST3);及び/又はアポリポタンパク質A1(APOA1);及び/又はフィブリノーゲンアルファ鎖(FGA);及び/又はリゾチーム(LYZ);及び/又はオンコスタチン-M特異的受容体サブユニットベータ(OSMR);及び/又は内在性膜タンパク質2B(ITM2B);及び/又はプロラクチン;及び/又はケラトエピテリン;及び/又は心房性ナトリウム利尿因子;及び/又はカルシトニン;及び/又はハンチンチン;及び/又はアルファ(α)-シヌクレイン;及び/又はインスリンを含むリストから選択される1つ以上のペプチド又はタンパク質を含む。

【0093】

一実施形態では、アミロイド関連疾患はアルツハイマー病であり、個々のアミロイド凝集体はアミロイドベータ(β)ペプチド、例えば、 β 40及び/又は β 42及び/又は β 43を含む。好ましい実施形態では、アミロイド関連疾患はアルツハイマー病であり、個々のアミロイド凝集体は β 40及び β 42を含む。別の好ましい実施形態では、アミロイド関連疾患はアルツハイマー病であり、個々のアミロイド凝集体は β 40を含む。更に別の好ましい実施形態では、アミロイド関連疾患はアルツハイマー病であり、個々のアミロイド凝集体は β 42を含む。追加の別の実施形態では、アミロイド関連疾患はアルツハイマー病であり、個々のアミロイド凝集体は β 40及び/若しくは β 42のみを含むか、又は他のペプチド及び/若しくはタンパク質との共凝集体である。

【0094】

本発明の様々な実施形態では、

- アミロイド関連疾患はアミロイド軽鎖アミロイドーシスであり、個々のアミロイド凝集体はアミロイド軽鎖を含む;並びに/又は
- アミロイド関連疾患は多発性骨髄腫であり、個々のアミロイド凝集体はアミロイド軽鎖を含む;並びに/又は
- アミロイド関連疾患は炎症であり、個々のアミロイド凝集体は血清アミロイドAタ

10

20

30

40

50

ンパク質 (S A A) を含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患は白血球走化性因子 2 (L E C T 2) アミロイドーシスであり、個々のアミロイド凝集体は白血球走化性因子 2 (L E C T 2) を含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患は腎不全であり、個々のアミロイド凝集体は白血球走化性因子 2 (L E C T 2) を含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患は多発ニューロパシーを伴うトランスサイレチン関連遺伝性アミロイドーシス (家族性アミロイド多発ニューロパシー (F A P) 又は S k e l l e f t e s j u k a n としても知られている) であり、個々のアミロイド凝集体はトランスサイレチンを含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患は家族性アミロイド多発ニューロパシー (F A P) であり、個々のアミロイド凝集体はトランスサイレチンを含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患は血液透析関連アミロイドーシスであり、個々のアミロイド凝集体はベータ (β) 2 ミクログロブリンを含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患は 2 型糖尿病であり、個々のアミロイド凝集体はアミリンを含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患はプリオン病であり、個々のアミロイド凝集体はプリオンタンパク質を含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患は脳アミロイドアンギオパシーであり、個々のアミロイド凝集体はシスタチン C (C S T 3) を含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患は家族性内蔵アミロイドーシスであり、個々のアミロイド凝集体はアポリポタンパク質 A 1 (A P O A 1)、及び / 若しくはフィブリノーゲンアルファ鎖 (F G A)、及び / 若しくはリゾチーム (L Y Z) を含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患は原発性皮膚アミロイドーシスであり、個々のアミロイド凝集体はオンコスタチン - M 特異的受容体サブユニットベータ (O S M R) を含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患は脳アミロイドアンギオパシーであり、個々のアミロイド凝集体は内在性膜タンパク質 2 B (I T M 2 B) を含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患はプロラクチノーマであり、個々のアミロイド凝集体はプロラクチンを含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患は家族性角膜アミロイドーシスであり、個々のアミロイド凝集体はケラトエピテリンを含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患は心房の老人性アミロイドであり、個々のアミロイド凝集体は心房性ナトリウム利尿因子を含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患は甲状腺髄様がんであり、個々のアミロイド凝集体はカルシトニンを含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患はハンチントン病であり、個々のアミロイド凝集体はハンチンチンを含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患はパーキンソン病であり、個々のアミロイド凝集体はアルファ (α) - シヌクレインを含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患は医薬品インスリン誘発性アミロイドーシスであり、個々のアミロイド凝集体はインスリンを含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患は筋萎縮性側索硬化症 (A L S) であり、個々のアミロイド凝集体は銅 - 亜鉛スーパーオキシドジスムターゼ 1 (S O D 1) を含む ; 並びに / 又は

- アミロイド関連疾患は全身性アミロイドーシスであり、個々のアミロイド凝集体はモノクローナル免疫グロブリン (I g) 軽 (L) 鎖若しくは L 鎖断片を含む。

【0095】

アミロイド凝集体は主に一種類のペプチド又はタンパク質を含み得る (例えば、アミロイド関連疾患がアミロイド軽鎖アミロイドーシスであるとき、個々のアミロイド凝集体は主にアミロイド軽鎖を含み得る) が、幾つかの状況では、アミロイド凝集体は、追加の種類のパプチド及び / 又はタンパク質を含んでいてもよいことが理解される。

10

20

30

40

50

【0096】

一実施形態では、（特に、アミロイド関連疾患がアルツハイマー病である場合）該方法は、更に、

- サンプル中のTauタンパク質の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；

- 該決定に基づいて、アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断を提供する工程と；

を含む。

【0097】

Tauは、神経変性のマーカーであり、アルツハイマー病の診断及び予後診断において使用することができ、脳脊髄液（CSF）、血清、唾液、及び尿等の体液中で検出することができる（Hei-Nga Chan, Di Xu, See-Lok Ho, Man Shing Wong ORCID logo* and Hung-Wing Li, Ultra-sensitive detection of protein biomarkers for diagnosis of Alzheimer's disease. Chem. Sci., 2017, 8, 4012-4018）。個々のアミロイド凝集体に関する本明細書に記載の方法をTauに関する本明細書に記載の方法と組み合わせる場合のように、一般に、バイオマーカーの同定を組み合わせると診断及び予後診断の方法を改善することができる。

【0098】

一実施形態では、Tauタンパク質は、リン酸化Tauタンパク質である。

【0099】

Tauタンパク質の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する一実施形態では、該方法は、五量体ホルミルチオフェン酢酸（pFTAA）等のTauの存在下で結合及び／又は会合及び／又は反応する更なる検出剤を添加する工程を更に含む。

【0100】

pFTAAを使用してTauを検出する方法は、Brelstaff及び共同研究者によって記載されている（Brelstaff et al. Front Neurosci. 2015 May 29; 9:184）。Tauタンパク質の検出に関する追加の指針は、Chan et al., 2017（Hei-Nga Chan, Di Xu, See-Lok Ho, Man Shing Wong ORCID logo* and Hung-Wing Li, Ultra-sensitive detection of protein biomarkers for diagnosis of Alzheimer's disease. Chem. Sci., 2017, 8, 4012-4018）に見出すことができる。

【0101】

一実施形態では、個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定は、個々のアミロイド凝集体分解能において行われる。

【0102】

「個々のアミロイド凝集体分解能」には、該方法がサンプル中の単一のアミロイド凝集体を検出及び／若しくは測定すること（すなわち、該方法が、サンプル中の多数の個々のアミロイド凝集体を同時には検出及び／若しくは測定しない）、及び／又は該方法がサンプル中の各個々のアミロイド凝集体を検出及び／若しくは測定することが含まれる。あるいは、「個々のアミロイド凝集体分解能」は、「単一粒子分解能」又は「単一分子分解能」と称される場合もある。

【0103】

一実施形態では、個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定は、時間分解検出を含む。言い換えれば、個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定は、時間分解検出を使用して行われる。「時間分解検出」法は、化学分野の当業者に周知であり、本明細書の実施例に詳細に

記載される。実施例で論じられる通り、時間分解検出は、本明細書に記載の方法で使用するのに特に有効である。

【0104】

一実施形態では、該方法は、蛍光相関分光法に基づく分析手段を包含し、この場合、観察体素において観察される分子／粒子／凝集体の数は、個々の分子／粒子／凝集体が測定されるシグナルに実質的に寄与できる程度に十分に少ない。体素における分子／粒子／凝集体の数は、好ましくは、約1000未満、約500未満、約100未満、例えば、約50未満、約25未満であるはずである。体素において観察される分子／粒子／凝集体の数は、特に、観察体素のサイズ（体積）及び溶液中の凝集体の濃度の関数である。観察体素における分子／粒子／凝集体の数が増加するにつれて、個々の凝集体の測定されるシグナルに対する寄与が低下する。体素における凝集体が多いと、個々の凝集体の測定されるシグナルに対する相関性は低く、最終的には、ゼロになる。しかし、分子／粒子／凝集体の数が少ない場合、観察体素を通る個々の分子／粒子／凝集体の通過が観察される。この場合、測定されるシグナルは、従って、単一事象発生（seo）と称される場合もある。

10

【0105】

また、凝集体は高い蛍光収率を有することも有利であり、これは、検出化合物単独では蛍光を発しない／弱い蛍光しか発しないが、高い蛍光収率を有する包含化合物を得るために対象となる個々のアミロイド凝集体と会合することができる検出剤を有することが好ましいことを示す。高い蛍光収率を有する検出剤は、より低いエネルギーレベルに戻ったときに多数の光子を提供することができる。蛍光相関分光法に基づく分析は、単一光子感度を有する検出器を含むことが更に有益である。

20

【0106】

実施形態によれば、分析の前にアミロイドペプチド（タンパク質）、アミロイドモノマー、アミロイドマルチマー、アミロイド凝集体、アミロイド巨大凝集体等の任意のアミロイド性化合物を増幅させる必要はない。具体的には、単一分子（粒子）分解能を提供する分析技術を実行する場合、アミロイド性実体を更に増幅させる必要はない。従って、単一分子分解能蛍光分光法等の蛍光分光分析を含む本発明の方法では、アミロイド増幅工程を実行する必要はない。

【0107】

より更なる実施形態によれば、該方法は、非標的アミロイドの分子／ペプチド／タンパク質／凝集体（アミロイド実体）を使用する必要がない、又は標的アミロイドの分子／ペプチド／タンパク質／凝集体と非標的アミロイドの分子／凝集体とを混合することを含む工程を含む必要がない。非標的アミロイド実体は、分析される体液に由来するものではない任意のアミロイド実体又は分析される体液由来の操作されたアミロイド実体を含む。非標的アミロイド実体の例としては、組み換え的に形成されたアミロイド実体、又は（分析される体液中にみられるアミロイド実体から生じ得る）病的沈着物に由来するアミロイド実体が挙げられる。非標的アミロイド実体と標的アミロイド実体との混合によって集塊（重合）が誘導されて、凝集したアミロイドの量が増幅する。

30

【0108】

従って、実施形態は、被験体におけるアミロイド関連疾患を診断及び／又は予後診断する方法であって、

40

- 該被験体由来の体液のサンプルを提供する工程と；
- 該サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；

を含み、

非標的アミロイド実体（非標的アミロイドの分子及び／又はペプチド及び／又はタンパク質及び／又は凝集体）を使用する必要がない方法に関する。

【0109】

時間分解検出では、「個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する」工程は、サンプル全体に対して同時には行われぬ。その代わ

50

り、サンプルの1つの画分を1回に測定し、単位時間にわたって多数のサンプルの画分を測定する。幾つかの実施形態では、測定されるサンプルの画分は、下記の通り「観察体素」である。時間分解検出を使用するとき、サンプルの画分内に存在する個々のアミロイド凝集体のみが測定及び／又は検出される。従って、個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズは、個々のアミロイド凝集体が検出及び／若しくは測定されるサンプル画分の頻度に基づいて、並びに／又は個々のアミロイド凝集体の特徴に基づいて決定される。理解される通り、「時間分解検出」は、マイクロ秒以下の分解能を有する光子計数と定義することができる。

【0110】

従って、一実施形態では、「サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する」工程は、サンプル中（例えば、サンプルの画分中）の個々のアミロイド凝集体の頻度（例えば、発生頻度）を決定することを含み、この場合、該方法は、時間分解検出を使用して行われる。

10

【0111】

この実施形態では、個々のアミロイド凝集体の頻度が高いほど、個々のアミロイド凝集体の量及び／又は濃度が多くなる。測定頻度の概念については本明細書で説明され（特に、実施例において）、本明細書に記載の本発明の各態様に適用可能である。

【0112】

更なる実施形態では、サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定は、単位時間における個々のアミロイド凝集体の頻度を決定することを含む。

20

【0113】

幾つかの実施形態では、個々のアミロイド凝集体の頻度は、単一事象発生（ f_{SEO} ）の頻度と称される。単一事象発生（ f_{SEO} ）とアミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断との関連を表1に例示する。単一事象発生は、個々のアミロイド凝集体の検出と同等である。一実施形態では、単一事象発生（ f_{SEO} ）の頻度は、個々のアミロイド凝集体の濃度に比例し得る。関連する実施形態では、単一事象発生（ f_{SEO} ）の頻度は、単位時間あたりの単一事象発生の平均数として計算される。

【0114】

一実施形態では、単位時間は、約0.05マイクロ秒（ μs ）以上；例えば、約0.1 μs 以上；約0.15 μs 以上；約0.2 μs 以上；約0.25 μs 以上；約0.3 μs 以上；約0.35 μs 以上；約0.4 μs 以上；約0.45 μs 以上；約0.5 μs 以上；約0.6 μs 以上；約0.7 μs 以上；約0.8 μs 以上；約0.9 μs 以上；約1 μs 以上；約1.5 μs 以上；約2 μs 以上；約2.5 μs 以上；約3 μs 以上；約4 μs 以上；約5 μs 以上；約6 μs 以上；約7 μs 以上；約8 μs 以上；約9 μs 以上；約10 μs 以上；約20 μs 以上；約30 μs 以上；約40 μs 以上；約50 μs 以上；約60 μs 以上；約70 μs 以上；約80 μs 以上；約90 μs 以上；約0.1ミリ秒以上；約0.2ミリ秒以上；約0.3ミリ秒以上；約0.4ミリ秒以上；約0.5ミリ秒以上；約0.6ミリ秒以上；約0.7ミリ秒以上；約0.8ミリ秒以上；約0.9ミリ秒以上；約1ミリ秒以上；約2ミリ秒以上；約3ミリ秒以上；約4ミリ秒以上；約5ミリ秒以上；約6ミリ秒以上；約7ミリ秒以上；約8ミリ秒以上；約9ミリ秒以上；約10ミリ秒以上；約20ミリ秒以上；約30ミリ秒以上；約40ミリ秒以上；約50ミリ秒以上；約60ミリ秒以上；約70ミリ秒以上；約80ミリ秒以上；約90ミリ秒以上；約0.1秒以上；約0.2秒以上；約0.3秒以上；約0.4秒以上；約0.5秒以上；約0.6秒以上；約0.7秒以上；約0.8秒以上；約0.9秒以上；約1秒以上；約2秒以上；約3秒以上；約4秒以上；約5秒以上；約6秒以上；約7秒以上；約8秒以上；約9秒以上；約10秒以上；約20秒以上；約30秒以上；約40秒以上；約50秒以上；約60秒以上；約120秒以上；約180秒以上；約240秒以上；約300秒以上；約360秒以上；約420秒以上；約480秒以上；約540秒以上；約600秒以上；約1200秒以上；約1800秒以上；約2400秒以上；約3000秒以上；又は約3600秒以上、

30

40

50

好ましくは、約 $0.2 \mu s$ 以上又は $3,000$ 秒以上である。

【0115】

一実施形態では、個々のアミロイド凝集体の頻度（例えば、単一事象発生（ f_{SEO} ）の頻度）が、約 0.1 以上；例えば：約 0.2 以上；約 0.3 以上；約 0.4 以上；約 0.5 以上；約 0.6 以上；約 0.7 以上；約 0.8 以上；約 0.9 以上；約 1 以上；約 1.1 以上；約 1.2 以上；約 1.3 以上；約 1.4 以上；約 1.5 以上；約 1.6 以上；約 1.7 以上；約 1.8 以上；約 1.9 以上；約 2 以上；約 2.2 以上；約 2.4 以上；約 2.6 以上；約 2.8 以上；約 3 以上；約 3.2 以上；約 3.4 以上；約 3.6 以上；約 3.8 以上；約 4 以上；約 4.2 以上；約 4.4 以上；約 4.6 以上；約 4.8 以上；約 5 以上；約 5.5 以上；約 6 以上；約 6.5 以上；約 7 以上；約 7.5 以上；約 8 以上；約 8.5 以上；約 9 以上；約 9.5 以上；又は約 10 以上、好ましくは、約 1.5 以上である場合、アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断が提供される。

10

【0116】

更なる実施形態では、個々のアミロイド凝集体の頻度（例えば、単一事象発生（ f_{SEO} ）の頻度）が、約 $0.1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；例えば：約 $0.2 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $0.3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $0.4 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $0.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $0.6 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $0.7 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $0.8 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $0.9 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $1.1 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $1.2 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $1.3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $1.4 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $1.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $1.6 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $1.7 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $1.8 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $1.9 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $2 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $2.2 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $2.4 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $2.6 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $2.8 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $3 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $3.2 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $3.4 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $3.6 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $3.8 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $4 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $4.2 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $4.4 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $4.6 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $4.8 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $5.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $6 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $6.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $7 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $7.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $8 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $8.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $9 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；約 $9.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上；又は約 $10 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上、好ましくは、約 $1.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ 以上である場合、アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断が提供される。

20

30

【0117】

好ましい実施形態では、サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定は、約 50 分間以上の単位時間における個々のアミロイド凝集体の頻度を決定することを含み、単一事象発生（ f_{SEO} ）の頻度が約 1.5 （例えば、 $1.5 \times 10^{-3} s^{-1}$ ）以上である場合、アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断が提供される。

40

【0118】

一実施形態では、単一事象発生（ f_{SEO} ）及び減衰時間、すなわち、拡散時間（ τ_D ）の特徴は、それぞれ、個々のアミロイド凝集体の量及びサイズと比例し得る。単一事象発生（ f_{SEO} ）の特徴には、単一事象発生のシグナル（又は強度）が含まれる。減衰時間の特徴には、拡散時間（ τ_D ）の強度が含まれる。

【0119】

拡散時間の分布から、分子／粒子／凝集体のサイズのプロファイルを各個々について決定することができる。サイズの分布は、疾患状態に反映され得、疾患進行についての情報を提供することができる。

【0120】

一実施形態では、単一事象発生（ f_{SEO} ）の減衰時間又は拡散時間（ τ_D ）が増加し

50

た場合、アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断が提供される。

【0121】

単一事象発生（例えば、1つずつ個々の構造化可溶性アミロイド凝集体の通過）を観察することによって、アミロイド凝集体が観察体素を通過するのにかかる時間を分析することが可能になる（例えば、個々の蛍光強度バーストの幅を分析するために）。構造化可溶性凝集体が大きいほど、その動きは緩徐になり、バーストは広くなる。構造化可溶性アミロイド凝集体が観察体素を通過するのにかかる平均時間を決定するために、時間的自己相関を使用してシグナルを解析し、時間的自己相関曲線（ $tACC$ ）を導出する。 $tACC$ の特徴的な減衰時間は、小さな構造化可溶性アミロイド凝集体については短く、大きな構造化可溶性アミロイド凝集体については長い。

10

【0122】

従って、一実施形態では、「サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する」工程は、特に、该方法が個々のアミロイド凝集体の頻度を決定することを含む場合、時間的自己相関曲線（ $tACC$ ）を提供することを含む。 $tACC$ を提供する（又は導出する）方法についての更なる説明は、実施例に提供される。

【0123】

図6に提示するデータ解析は、2つの群について記録された $tACC$ 間の特徴的な減衰時間において明らかな差を示し、患者群では減衰時間が顕著に長い。正規化された $tACC$ の評価は、分析される系が複雑ではなく、かつサイズが均一な粒子を含有するのではなく、異なるサイズの粒子の混合物を含有することを示す。対照群におけるアミロイド凝集体（ ThT に結合している）の平均拡散時間は約5msであり、患者群における粒子の平均拡散時間は約15msである。これは、アミロイド凝集体における分子量の差が、2つの群間で約2.7倍であることを示す。従って、患者群は、より多数のナノブランクに加えて、血清中により大きな ThT 活性構造化凝集体を保有している可能性がある。

20

【0124】

一実施形態では、1つ以上の対照サンプル（以下に記載の通り、このような1つ以上のサンプルは1以上の対照被験体に由来する）と比較したときにサンプルにおける減衰時間（特に $tACC$ の減衰時間）が長い場合、アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断が提供される。

30

【0125】

一実施形態では、サンプル中のアミロイド凝集体の分子量が、1つ以上の対照サンプル（以下に記載の通り、このような1つ以上のサンプルは1以上の対照被験体に由来する）と比較したときに約2倍以上大きい；例えば：約3倍以上大きい；約4倍以上大きい；約5倍以上大きい；約6倍以上大きい；約7倍以上大きい；約8倍以上大きい；約9倍以上大きい；約10倍以上大きい；約11倍以上大きい；約12倍以上大きい；約13倍以上大きい；約14倍以上大きい；約15倍以上大きい；約16倍以上大きい；約17倍以上大きい；約18倍以上大きい；約19倍以上大きい；約20倍以上大きい；約21倍以上大きい；約22倍以上大きい；約23倍以上大きい；約24倍以上大きい；約25倍以上大きい；約26倍以上大きい；約27倍以上大きい；約28倍以上大きい；約29倍以上大きい；又は約30倍以上大きい、好ましくは、約2.7倍以上大きい場合、アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断が提供される。

40

【0126】

一実施形態では、減衰時間（すなわち、拡散時間（ τ_D ））（特に、 $tACC$ の減衰時間）が約6ms以上；例えば：約7ms以上；約8ms以上；約9ms以上；約10ms以上；約11ms以上；約12ms以上；約13ms以上；約14ms以上；約15ms以上；約16ms以上；約17ms以上；約18ms以上；約19ms以上；又は約20ms以上、好ましくは、約15ms以上である場合、アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断が提供される。

【0127】

50

別の実施形態では、個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定は、全内部蛍光顕微鏡観察（TIRF）；及び／又は画像相関分光法；及び／又は酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）；及び／又は超並列蛍光相関分光法（mpFCS）を含む。言い換えれば、個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定は、全内部蛍光顕微鏡観察（TIRF）；及び／又は画像相関分光法；及び／又は酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）；及び／又は超並列蛍光相関分光法（mpFCS）を用いて行われる。好ましくは、個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定は、全内部反射蛍光顕微鏡観察（TIRF）及び画像相関分光法を含む。

【0128】

蛍光相関分光法は、単一の粒子／凝集体／分子の分解能を提供する好適な方法論である。単一分子分解能をうまく達成するためには、好適な検出器によって検出される観察体素が小さいことが重要である。観察体素が小さいほど、所与の瞬間に存在する／観察される粒子の数が少ない。従って、シグナル対バックグラウンド比は、観察体素サイズの減少とともに改善される。小さな観察体素を達成するための1つの選択肢は、サンプルと検出器との間の光学経路に特定の配置の光学素子、例えば、共焦点顕微鏡における共役焦点面配置を有することである。このようにして得られた共焦点観察体素の体積は、約 10^{-11} リットルよりも小さく、典型的には、約 10^{-13} ～約 10^{-16} リットルである。図1～14は、共焦点光学配置を使用して得られたデータを例示する。

【0129】

全内部反射（TIR）の実現によって、更により小さな観察体素を達成することができる。TIRを提供するための1つの代替案は、光学素子の後方焦点面に集光して、光学素子の（主な）光軸に対して角度をなす典型的には平行な出射光を生成することである。光学素子の後方焦点面における入射光の集束の位置に依存して、出射光の光学素子の光軸に対する角度は変化する。光学素子は、好適には、対物レンズである。出射光のTIRを提供するための対物レンズは、好適には約0.9超、約1.0超、約1.1超、約1.2超の高い開口数を有することが好ましい。開口数は、最高約2.0であってよい。

【0130】

非常に小さな観察体素を提供するための更なる可能性は、誘導放出抑制（STED）光学配置の実現である。ここでは、特定の波長及び明確な強度プロファイルの光（中心に強度最小値を有する）を使用して、蛍光が発せられる体積を低減する（Mueller et al. Biophys. J. 2011 101(7):1651-1660 doi:10.1016/j.bpj.2011.09.006.）。

【0131】

非常に小さな観察体素を提供するための更に別の可能性は、スペクトルのUV-VIS領域からの電磁放射線を本質的に遮断することができる材料の薄層が沈着している透明基材の実現である（図15及び16）。電磁放射線遮断能を有する薄層は、透明基材にまで至る複数の開口部を有して、有効にウェルを形成する（図17）。開口部の寸法は、衝突電磁放射線から生じるエバネッセント場のみが進行することができるようなものである。全内部反射なしにエバネッセント場が生成される現象は、ウェルの寸法、例えばその直径が、入射光の波長よりも小さい場合に生じる。典型的には、開口部は、衝突光の波長よりも小さな直径を有する透明基材によって限定される円形状のウェル底部に一致する円形状を有する。ウェル底部の面積に依存して、体素をzeptolリットル（ 10^{-21} リットル）まで小さくすることができる。約30～80nmのウェル底部の直径から、約 10×10^{-21} リットル～約 100×10^{-21} リットル以下の体素が生じる（図17b、c）。好ましくは円形に成形された複数のウェルを含む電磁放射線遮断薄層を有するこれら基材は、zeptolリットル導波管と称される場合もある。電磁放射線遮断材料は、蛍光分光法で使用するのに好適な電磁放射線を本質的に遮断することができる任意の好適な材料であってよい。好適な電磁放射線遮断材料は、蒸着プロセスに適した金属である。電磁放射線遮断層は、幾つかの異なる金属の層を含み得る。時に、金属層（複数可）を透明基材により

10

20

30

40

50

うまく固定する目的で、透明基材と主（一次）金属層との間に第２の金属層が配置される。金属の例としては、任意の所与の波長で透過率を著しく低下させる金属が挙げられる。好適な金属は、アルミニウム、クロム、金である。特定の金属の層の厚さは、金属及び波長の関数である。二重金属層の例は、金と透明基材との間にクロムが位置するクロム - 金属層である。透明基材は、好適には、融解石英等の二酸化ケイ素含有材料である。ゼプトリットル導波管は、典型的には、ナノサイズの複数のウェルを有する。ゼプトリットル導波管は、数百万個のナノウェルを有し得る。各ナノウェルは、各別々の単一光子計数ピクセルが導波管の各ナノウェルに整列するように、（場合により）単一光子アバランシェ発光ダイオードのアレイと整列させてもよい。従って、ゼプトリットル導波管の実現は、蛍光相関分光法の領域における前代未聞のシグナル対ノイズ比及び超並列化の能力を提供する。

10

【 0 1 3 2 】

共焦点体素を使用する蛍光相関分光法は、光の入射ビームを光ビームのアレイ（複数の光ビーム）に分割することができる光学素子の実現によって並列化することができる。ビームを分割するための好適な光学素子は、回折光学素子（DOE）である。図 18 は、回折光学素子（DOE）を含む超並列蛍光相関分光法（mpFCS）のための機器における光学配置を示す。DOE は、高開口数対物レンズを通過した後、サンプル中に 1024 の共焦点体素を提供する光ビームのアレイ（ここでは 32×32 ）を提供する。DOE は、任意の好適な数の二次ビームを提供するように構成されてもよい。好適な DOE を用いると、約 10,000 以下の個々のビーム、約 100,000 以下、そして、更には 100 20 万以下の個々のビームを容易に提供することができる。更に、多重共焦点配置を使用することによって、測定時間を著しく、例えば 3000 s（図 1 ~ 14）から 60 s（図 18 及び 19）に短縮することができ、拡散時間の分布（図 19 C）を効率的に導出することができる。次に、これにより、各個々について、高い統計的確実性で、分子 / 粒子 / 凝集体のサイズ分布プロファイルを決定することが可能になる。これは、どのくらい疾患が進行しているかを判定するため及び / 又はどのくらい疾患が進行するかを予測するために大変有益である。

20

【 0 1 3 3 】

全内部反射蛍光（TIRF）顕微鏡観察；及び / 又は画像相関分光法；及び / 又は酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、及び / 又は超並列蛍光相関分光法（mpFCS）の方法は、物理学 / 物理化学分野の当業者には公知である。

30

【 0 1 3 4 】

一実施形態では、時間分解検出は、蛍光相関分光法（FCS）を含み、これは、データを解析するために時間的自己相関分析を使用している。言い換えれば、時間分解検出は、蛍光相関分光法（FCS）を使用して実行される。「蛍光相関分光法（FCS）」は、化学分野の当業者に公知である蛍光を検出するために使用される方法であり、本明細書の実施例で詳細に説明される。実施例で論じられる通り、蛍光相関分光法（FCS）は、本発明の方法で使用するのに特に有効である。

【 0 1 3 5 】

一実施形態では、FCS は、マルチプレックス FCS である。マルチプレックス FCS は、1 超のサンプルを同時に測定できるようにすることによってより多くのサンプルを測定することを可能にし、従って、方法の処理量を増加させるので有利である。

40

【 0 1 3 6 】

一実施形態では、蛍光相関分光法（FCS）によって検出される蛍光は、個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズを表す。好ましい実施形態では、該方法は、蛍光部分を含む検出剤をサンプルに添加する工程を更に含み、該蛍光部分によって発せられる蛍光は、蛍光相関分光法（FCS）によって検出され、個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズを表す。

【 0 1 3 7 】

一実施形態では、個々のアミロイド凝集体の頻度は、蛍光強度ゆらぎ分析（FIFA）

50

を使用して計算される。F I F A は、単位時間あたりのピーク（すなわち、個々のアミロイド凝集体）数として計算することができ、該ピークは、以下で論じる通り、対照サンプル、例えば「サンプル中の蛍光の対照レベル」の少なくとも標準偏差 2 個分又は 5 個分よりも大きい強度を有する（好ましくは、少なくとも対照サンプルの標準偏差の 5 倍大きい）。

【0138】

一実施形態では、サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／若しくは量及び／若しくは濃度が、対照サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／若しくは量及び／若しくは濃度よりも多い場合；並びに／又は

該サンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズが、対照サンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズよりも大きい場合、該アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断が提供される。

【0139】

本発明の一部として使用するのに好適な対照サンプルは、生物学又は医学分野の当業者に公知であり、本明細書に概説する対照が挙げられるが、これらに限定されない。幾つかの実施形態では、対照サンプルは、1 以上の対照被験体由来の対照サンプル；インビトロ対照サンプル；陰性対照サンプル；及びサンプル中の蛍光の対照レベルを含むか又はからなるリストから選択される 1 つ以上である。

【0140】

「対照被験体」には、アミロイド関連疾患を有しない被験体が含まれる。本発明の方法では、対照被験体は、年齢及び／又は性別が一致してよい。好ましくは、対照被験体は、被験体と比較したときに年齢及び／又は性別が一致している。「年齢及び／又は性別が一致している」には、全員が同じ又は同様の年齢及び／又は性別になるように対照被験体を選択することが含まれる。本発明の方法のために適切な対照被験体を選択する方法は、医学分野の当業者に公知である。

【0141】

「インビトロ対照サンプル」には、個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズが既知であるように研究室で調製された対照サンプルが含まれる。このようなインビトロ対照サンプルを生成する方法は、化学分野の当業者に公知であり、例えば、個々のアミロイド凝集体を形成することができるペプチド及びタンパク質モノマーの生成は、固相合成を使用して行ってもよい。

【0142】

「陰性対照サンプル」には、対照サンプルを体液サンプルから取り分け、検出剤が添加されていない対照サンプルに対して本明細書に記載の方法を行うことが含まれる。例えば、体液サンプルを 2 つ（以上の）体積に分割し、第 1 の体積を検出剤が添加された「体液のサンプル」とし、第 2 の体積を検出剤が添加されていない「陰性対照サンプル」とする。従って、この対照サンプルは、方法の実験条件下におけるサンプルについてのバックグラウンド読み取り値を提供する。

【0143】

本明細書で論じる通り、本発明の特に好ましい実施形態は、時間分解検出及び蛍光を使用してサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定することである。この方法を使用して、本明細書に記載の方法の対象である体液の同じサンプルにおける蛍光の対照（又はバックグラウンド）レベルを決定することができ、これについては以下で更に論じる。

【0144】

一実施形態では、サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度は、対照サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズよりも約 20 % 以上多い；例えば：約 25 % 以上多い；約 30 % 以上多い；約 35 % 以上多い；約 40 % 以上多い；約 45 % 以上多い；約 50 % 以上多い；約 55 % 以上多い；約 60 % 以上多い；約 65 % 以上多い；約 70 % 以上多い；約 75 % 以上多

い；約 80 % 以上多い；約 85 % 以上多い；約 90 % 以上多い；約 95 % 以上多い、好ましくは、約 50 % 以上多い、及び / 又は

サンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズは、対照サンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズよりも約 20 % 以上大きい；例えば：約 25 % 以上大きい；約 30 % 以上大きい；約 35 % 以上大きい；約 40 % 以上大きい；約 45 % 以上大きい；約 50 % 以上大きい；約 55 % 以上大きい；約 60 % 以上大きい；約 65 % 以上大きい；約 70 % 以上大きい；約 75 % 以上大きい；約 80 % 以上大きい；約 85 % 以上大きい；約 90 % 以上大きい；約 95 % 以上大きい、好ましくは、約 50 % 以上大きい。

【0145】

サンプル中の個々のアミロイド凝集体が対照サンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズよりも「大きい」というとき、サンプル中の個々のアミロイド凝集体が、対照サンプル中にみられる凝集体よりも凝集体 1 個あたりのペプチドがより多い及び / 又は高分子量を有することが含まれる。

【0146】

一実施形態では、サンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズは、対照サンプル中の個々のアミロイド凝集体の分子量の約 10 倍以上；例えば：分子量の約 11 倍以上；分子量の約 12 倍以上；分子量の約 13 倍以上；分子量の約 14 倍以上；分子量の約 15 倍以上；分子量の約 16 倍以上；分子量の約 17 倍以上；分子量の約 18 倍以上；分子量の約 19 倍以上；分子量の約 20 倍以上；分子量の約 21 倍以上；分子量の約 22 倍以上；分子量の約 23 倍以上；分子量の約 24 倍以上；分子量の約 25 倍以上；分子量の約 26 倍以上；分子量の約 27 倍以上；分子量の約 28 倍以上；分子量の約 29 倍以上；分子量の約 30 倍以上；分子量の約 35 倍以上；分子量の約 40 倍以上；分子量の約 45 倍以上；又は対照サンプル中の個々のアミロイド凝集体の分子量の約 50 倍以上、好ましくは、対照サンプル中の個々のアミロイド凝集体の分子量の約 27 倍以上である。

【0147】

一実施形態では、サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 若しくは量及び / 若しくは濃度は、対照サンプル中よりも約 2 倍以上多い；例えば、対照サンプル中よりも約 3 倍以上多い；約 4 倍以上多い；約 5 倍以上多い；約 6 倍以上多い；約 7 倍以上多い；約 8 倍以上多い；約 9 倍以上多い；約 10 倍以上多い、好ましくは、対照サンプル中よりも約 5 倍以上多い；並びに / 又はサンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズは、対照サンプル中よりも約 2 倍以上大きい；例えば、対照サンプル中よりも約 3 倍以上大きい；約 4 倍以上大きい；約 5 倍以上大きい；約 6 倍以上大きい；約 7 倍以上大きい；約 8 倍以上大きい；約 9 倍以上大きい；約 10 倍以上大きい、好ましくは、対照サンプル中よりも約 5 倍以上大きい。

【0148】

一実施形態では、サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 若しくは量及び / 若しくは濃度は、対照サンプル中よりも標準偏差約 2 個分以上多い；例えば、対照サンプル中よりも標準偏差約 3 個分以上多い；標準偏差約 4 個分以上多い；約 5 倍以上多い；標準偏差約 6 個分以上多い；標準偏差約 7 個分以上多い；標準偏差約 8 個分以上多い；標準偏差約 9 個分以上多い；標準偏差約 10 個分以上多い、好ましくは、対照サンプル中よりも標準偏差約 5 個分以上多い；並びに / 又は

サンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズは、対照サンプル中よりも標準偏差約 2 個分以上大きい；例えば、対照サンプル中よりも標準偏差約 3 個分以上大きい；標準偏差約 4 個分以上大きい；約 5 倍以上大きい；標準偏差約 6 個分以上大きい；標準偏差約 7 個分以上大きい；標準偏差約 8 個分以上大きい；標準偏差約 9 個分以上大きい；標準偏差約 10 個分以上大きい、好ましくは、対照サンプル中よりも標準偏差約 5 個分以上大きい。

【0149】

一実施形態では、サンプル中の個々のアミロイド凝集体の量及び / 又は濃度が多いほど、より深刻であると診断される及び / 又はより深刻であると予後診断される。

【0150】

10

20

30

40

50

一実施形態では、サンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズが大きいほど、より深刻であると診断される及び／又はより深刻であると予後診断される。

【0151】

診断及び／又は予後診断の文脈における「深刻」には、アミロイド関連疾患の発症及び／若しくは進行が急速に進行する可能性が高いこと、並びに／又は被験体がまもなくアミロイド関連疾患の1つ以上の症状を示す可能性があること、並びに／又は被験体がアミロイド関連疾患の重篤な症状を示すであろうこと、並びに／又は被験体がまもなく死亡する可能性があることが含まれる。

【0152】

一実施形態では、個々のアミロイド凝集体のサイズは、平均サイズである。

10

【0153】

生物学及び／又は統計学分野の当業者は、個々のアミロイド凝集体の平均サイズについて理解し、計算することができる。「平均サイズ」には、平均(mean)がアベレージ平均(average mean)であることが含まれる。

【0154】

当業者に理解される通り、本発明の方法で使用される体液サンプルの種類が、検出可能な個々のアミロイド凝集体のサイズをある程度決定づけ得る。例えば、体液サンプルとしての尿の場合、検出可能な個々のアミロイド凝集体の最大サイズは、糸球体濾過に起因するサイズ制限によって限定され得る。

【0155】

20

本発明の方法では、対照サンプルは、アミロイド関連疾患を有していない1以上の対照被験体；例えば：約2以上の対照被験体；約3以上の対照被験体；約4以上の対照被験体；約5以上の対照被験体；約6以上の対照被験体；約7以上の対照被験体；約8以上の対照被験体；約9以上の対照被験体；約10以上の対照被験体；約11以上の対照被験体；約12以上の対照被験体；約13以上の対照被験体；約14以上の対照被験体；約15以上の対照被験体；約16以上の対照被験体；約17以上の対照被験体；約18以上の対照被験体；約19以上の対照被験体；約20以上の対照被験体；約25以上の対照被験体；約30以上の対照被験体；約35以上の対照被験体；約40以上の対照被験体；約45以上の対照被験体；約50以上の対照被験体；約60以上の対照被験体；約70以上の対照被験体；約80以上の対照被験体；約90以上の対照被験体；約100以上の対照被験体に由来する体液サンプル、好ましくは約30以上の対照被験体に由来する体液サンプルを含み得る。

30

【0156】

一実施形態では、2以上の対照被験体が存在する場合、対照サンプルは、2以上の対照被験体における個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの平均(好ましくは、アベレージ平均)である。

【0157】

蛍光の測定及び／又は検出を使用してサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する一実施形態では、対照サンプルは、「サンプル中の蛍光の対照レベル」(例えば、「全体的なシグナル」)であり、蛍光(すなわち、蛍光シグナル)は、サンプル中の蛍光の対照レベルよりも高い蛍光のレベルを有する。言い換えれば、蛍光の対照レベルよりも高い蛍光のレベルは、個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを表す。

40

【0158】

幾つかの実施形態では、「蛍光のレベル」は、蛍光のピーク(すなわち、シグナルの標準偏差の5倍よりも大きい蛍光の測定値)、例えば、サンプル中の蛍光の対照レベルを上回る検出可能な蛍光のピークである。

【0159】

一実施形態では、該方法は、サンプル中の蛍光の対照レベルを検出及び／又は測定する工程、例えば、蛍光変動を検出及び／又は測定する工程を含む。一実施形態では、「サン

50

ブル中の蛍光の対照レベルを検出及び／又は測定する」工程は、「サンプルに検出剤を添加する」工程の前に行われる。

【0160】

一実施形態では、蛍光は、蛍光の対照レベルよりも約2倍以上高い；例えば、蛍光の対照レベル（例えば、「全体的なシグナル」）よりも約3倍以上；約4倍以上；約5倍以上；約6倍以上；約7倍以上；約8倍以上；約9倍以上；約10倍以上高い、好ましくは、蛍光の対照レベル（例えば、「全体的なシグナル」）よりも約5倍以上高い蛍光のレベル（例えば、蛍光のピーク）を有する。

【0161】

一実施形態では、蛍光は、蛍光の対照レベルよりも標準偏差約2個分以上高い；例えば、蛍光の対照レベル（例えば、「全体的なシグナル」）よりも標準偏差約3個分以上；標準偏差約4個分以上；標準偏差約5個分以上；標準偏差約6個分以上；標準偏差約7個分以上；標準偏差約8個分以上；標準偏差約9個分以上；標準偏差約10個分以上高い、好ましくは、蛍光の対照レベル（例えば、「全体的なシグナル」）よりも標準偏差約5個分以上高い蛍光のレベル（例えば、蛍光のピーク）を有する。

10

【0162】

本明細書で論じる通り、一実施形態では、蛍光の対照レベルは、サンプル中の蛍光のバックグラウンドレベルであり、これは、蛍光のバックグラウンドレベルの分散又はベースラインシグナル（これは全体的なシグナルと称される場合もある）と称される場合もある。生物学分野の当業者には理解される通り、体液のサンプルは特定のレベルの自己蛍光を有し得、これは、体液サンプル間で異なる場合がある。この例は、本願の図3に提供される。蛍光のバックグラウンドレベルは、約132.5 kHzに起伏のある線であり、蛍光のピークは、これを上回る約150 kHzにある。この具体例では、これら蛍光のピークは、個々のアミロイド凝集体を表すものであり、そのシグナルは、蛍光のバックグラウンドレベルの標準偏差の約5倍よりも高い。検出剤からの蛍光を検出及び／又は測定するとき、自己蛍光のバックグラウンドレベルを考慮することが時に必要であり、蛍光のバックグラウンドレベルを上回る検出及び／又は測定された蛍光は、サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを表す。

20

【0163】

時間分解検出を使用する一実施形態では、サンプル中の蛍光の対照レベルは、時間分解検出のベースラインシグナル又は蛍光のバックグラウンドレベルの分散である。この具体的な実施形態では、ベースラインシグナル又は蛍光のバックグラウンドレベルの分散は、任意の個々のアミロイド凝集体を含まない体液のサンプルの画分（複数可）における時間分解検出測定値（複数可）又はサンプルの全体的なシグナルであり得る。全体的なシグナルは、時間分解検出の過程において測定される蛍光測定値である。従って、ベースラインシグナル又は蛍光のバックグラウンドレベルの分散は、時間分解検出の単位時間全体にわたって提供され得る。

30

【0164】

一実施形態では、ベースラインシグナル又は蛍光のバックグラウンドレベルの分散を上回る蛍光の各ピーク（例えば、単一事象発生（ f_{SEO} ））は、個々のアミロイド凝集体を示す（好ましくは、蛍光のピークは、全体的なシグナルよりも少なくとも標準偏差5個分高い）。言い換えれば、ベースラインシグナル又は蛍光のバックグラウンドレベルの分散を上回る蛍光の各ピーク（例えば、単一事象発生（ f_{SEO} ））は、頻度1を表し、2つのピークは頻度2を表す等である。特に好ましい実施形態では、蛍光のピーク（例えば、単一事象発生（ f_{SEO} ））は、個々のアミロイド凝集体を示すベースラインシグナル又は蛍光のバックグラウンドレベルの分散（例えば、全体的なシグナル）を上回る蛍光のレベルの急激かつ一時的な上昇である。

40

【0165】

一実施形態では、蛍光の対照レベル（例えば、ベースラインシグナル又は蛍光のバックグラウンドレベルの分散は、時間分解検出（例えば、蛍光相関分光法（FCS））の単位

50

時間全体にわたって測定された蛍光の平均レベル、好ましくはアベレージ平均である。

【 0 1 6 6 】

好ましい実施形態では、蛍光は、ベースラインシグナル又は蛍光のバックグラウンドレベルの分散よりも約 2 倍以上高い；例えば、蛍光のバックグラウンドレベルの分散（例えば、全体的なシグナル）よりも約 3 倍以上；約 4 倍以上；約 5 倍以上；約 6 倍以上；約 7 倍以上；約 8 倍以上；約 9 倍以上；約 10 倍以上高い、好ましくは、ベースラインシグナル又は蛍光のバックグラウンドレベルの分散（例えば、全体的なシグナル）よりも約 5 倍以上高い蛍光のピークを有する。

【 0 1 6 7 】

好ましい実施形態では、蛍光は、ベースラインシグナル又は蛍光のバックグラウンドレベルの分散よりも標準偏差約 2 個分以上高い；例えば、蛍光のバックグラウンドレベルの分散（例えば、全体的なシグナル）よりも標準偏差約 3 個分以上；標準偏差約 4 個分以上；標準偏差約 5 個分以上；標準偏差約 6 個分以上；標準偏差約 7 個分以上；標準偏差約 8 個分以上；標準偏差約 9 個分以上；標準偏差約 10 個分以上高い、好ましくは、ベースラインシグナル又は蛍光のバックグラウンドレベルの分散（例えば、全体的なシグナル）よりも標準偏差約 5 個分以上高い蛍光のピークを有する。

【 0 1 6 8 】

一実施形態では、サンプルは、約 30 マイクロリットル (μL) ~ 約 300 マイクロリットル (μL) の体積を有する。

【 0 1 6 9 】

一実施形態では、サンプルは、約 500 マイクロリットル (μL) 以下；例えば、約 490 マイクロリットル (μL) 以下；約 480 マイクロリットル (μL) 以下；約 470 マイクロリットル (μL) 以下；約 460 マイクロリットル (μL) 以下；約 450 マイクロリットル (μL) 以下；約 440 マイクロリットル (μL) 以下；約 430 マイクロリットル (μL) 以下；約 420 マイクロリットル (μL) 以下；約 410 マイクロリットル (μL) 以下；約 400 マイクロリットル (μL) 以下；約 390 マイクロリットル (μL) 以下；約 380 マイクロリットル (μL) 以下；約 370 マイクロリットル (μL) 以下；約 360 マイクロリットル (μL) 以下；約 350 マイクロリットル (μL) 以下；約 340 マイクロリットル (μL) 以下；約 330 マイクロリットル (μL) 以下；約 320 マイクロリットル (μL) 以下；約 310 マイクロリットル (μL) 以下；約 300 マイクロリットル (μL) 以下；約 290 マイクロリットル (μL) 以下；約 280 マイクロリットル (μL) 以下；約 270 マイクロリットル (μL) 以下；約 260 マイクロリットル (μL) 以下；約 250 マイクロリットル (μL) 以下；約 240 マイクロリットル (μL) 以下；約 230 マイクロリットル (μL) 以下；約 220 マイクロリットル (μL) 以下；約 210 マイクロリットル (μL) 以下；約 200 マイクロリットル (μL) 以下；約 190 マイクロリットル (μL) 以下；約 180 マイクロリットル (μL) 以下；約 170 マイクロリットル (μL) 以下；約 160 マイクロリットル (μL) 以下；約 150 マイクロリットル (μL) 以下；約 140 マイクロリットル (μL) 以下；約 130 マイクロリットル (μL) 以下；約 120 マイクロリットル (μL) 以下；約 110 マイクロリットル (μL) 以下；約 100 マイクロリットル (μL) 以下；約 90 マイクロリットル (μL) 以下；約 80 マイクロリットル (μL) 以下；約 70 マイクロリットル (μL) 以下；約 60 マイクロリットル (μL) 以下；約 50 マイクロリットル (μL) 以下；約 40 マイクロリットル (μL) 以下；約 30 マイクロリットル (μL) 以下；約 20 マイクロリットル (μL) 以下；又は約 10 マイクロリットル (μL) 以下の体積を有する。好ましい実施形態では、サンプルは、150 マイクロリットル (μL) 以下の体積を有する。別の好ましい実施形態では、サンプルは、200 マイクロリットル (μL) 以下の体積を有する。

【 0 1 7 0 】

時間分解検出（例えば、蛍光相関分光法 (FCS)）を使用して該方法を行うとき、実施例に説明する通り、サンプルを処理して観察体素 (OVE) 等の画分にしてい。

【0171】

一実施形態では、画分（例えば、観察体素）は、約1マイクロリットル（ μL ）以下；例えば、約0.1マイクロリットル（ μL ）以下；約0.01マイクロリットル（ μL ）以下；約0.001マイクロリットル（ μL ）以下；約0.0001マイクロリットル（ μL ）以下；約0.00001マイクロリットル（ μL ）以下；約0.000001マイクロリットル（ μL ）以下；約0.0000001マイクロリットル（ μL ）以下；約0.00000001マイクロリットル（ μL ）以下；約1フェムトリットル（ fL ）以下；約0.1フェムトリットル（ fL ）以下；約0.2フェムトリットル（ fL ）以下；約0.3フェムトリットル（ fL ）以下；約0.4フェムトリットル（ fL ）以下；約0.5フェムトリットル（ fL ）以下；約0.6フェムトリットル（ fL ）以下；約0.7フェムトリットル（ fL ）以下；約0.8フェムトリットル（ fL ）以下；約0.9フェムトリットル（ fL ）以下；約0.01フェムトリットル（ fL ）以下；約0.001フェムトリットル（ fL ）以下；又は約0.0001フェムトリットル（ fL ）以下、好ましくは、約0.2フェムトリットル（ fL ）以下の体積を有する。実施形態によれば、観察体積は、約 10^{-20} リットル～約 10^{-22} リットル、例えば、zeptoliterの範囲であってよい。

10

【0172】

一実施形態では、該方法は、個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度を決定している間、サンプルを循環させるためにフローセルを使用することを含む。フローセルは、顕微鏡分野の当業者に公知の装置である。時間分解検出を行っている間、フローセルを使用して、装置を通してサンプルを循環させることができる。この方法では、遭遇するナノブランクの頻度を増加させることができ、凝集体が自由に拡散するのを待つのではなく、流れによってその運動を推進する。測定を効率化することができ、従って、分析時間が短縮されるので、これは有利であり得る。記載の方法に好適な例示的なフローセルは、Warner Instruments - US (www.warneronline.com) から入手することができ、例えば、RC-30HV及びRC-30WAチャンバーである。

20

【0173】

一実施形態では、個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量が、1個以上の個々のアミロイド凝集体；例えば：約2個以上の個々のアミロイド凝集体；約3個以上の個々のアミロイド凝集体；約4個以上の個々のアミロイド凝集体；約5個以上の個々のアミロイド凝集体；約6個以上の個々のアミロイド凝集体；約7個以上の個々のアミロイド凝集体；約8個以上の個々のアミロイド凝集体；約9個以上の個々のアミロイド凝集体；約10個以上の個々のアミロイド凝集体；約15個以上の個々のアミロイド凝集体；約20個以上の個々のアミロイド凝集体；約25個以上の個々のアミロイド凝集体；約30個以上の個々のアミロイド凝集体；約50個以上の個々のアミロイド凝集体；約100個以上の個々のアミロイド凝集体；約200個以上の個々のアミロイド凝集体；約300個以上の個々のアミロイド凝集体；約400個以上の個々のアミロイド凝集体；約500個以上の個々のアミロイド凝集体；約1,000個以上の個々のアミロイド凝集体；約2,000個以上の個々のアミロイド凝集体；約3,000個以上の個々のアミロイド凝集体；約4,000個以上の個々のアミロイド凝集体；約5,000個以上の個々のアミロイド凝集体；又は約10,000個以上の個々のアミロイド凝集体である場合、アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断が提供される。

30

40

【0174】

一実施形態では、該方法は、間隔をおいて、例えば、2回以上、例えば、3回以上；4回以上；5回以上；6回以上；7回以上；8回以上；9回以上；10回以上；11回以上；12回以上；13回以上；14回以上；15回以上；16回以上；17回以上；18回以上；19回以上；20回以上；25回以上；30回以上；35回以上；40回以上；45回以上；回以上；又は50回以上繰り返される。

【0175】

50

経時的に該方法を繰り返すことによって、診断及び／又は予後診断を経時的に追跡することができ、それによって、診断及び／又は予後診断を見直し、修正することができる。従って、該方法を2回以上繰り返す場合、2回目及びそれ以降の繰り返しについては、決定に基づいてアミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断を提供する工程は、決定に基づいてアミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断を修正する工程であってもよい。

【0176】

一実施形態では、繰り返される本発明の第1の態様の方法間の期間は、1日間以上；例えば、約2日間以上；約3日間以上；約4日間以上；約5日間以上；約6日間以上；約1週間以上；約2週間以上；約3週間以上；約4週間以上；約1ヶ月間以上；約5週間以上；約6週間以上；約7週間以上；約8週間以上；約2ヶ月間以上；約3ヶ月間以上；約4ヶ月間以上；約5ヶ月間以上；約6ヶ月間以上；約7ヶ月間以上；約8ヶ月間以上；約9ヶ月間以上；約10ヶ月間以上；約11ヶ月間以上；約1年間以上；約2年間以上；約3年間以上；約4年間以上；約5年間以上；約6年間以上；約7年間以上；約8年間以上；約9年間以上；又は約10年間以上、好ましくは、約1ヶ月間以上である。

10

【0177】

一実施形態では、被験体及び／又は対照被験体は、げっ歯類（例えば、マウス及び／又はラット及び／又はハムスター及び／又はモルモット及び／又はスナネズミ及び／又はウサギ）；及び／又はイヌ科動物（例えば、イヌ）；及び／又はネコ科動物（例えば、ネコ）；霊長類（例えば、ヒト及び／又はサル及び／又は類人猿）；及び／又はウマ科動物（例えば、ウマ）；及び／又はウシ亜科動物（例えば、ウシ）；及び／又はイノシシ亜科動物（例えば、ブタ）；及び／又は非ヒト哺乳類を含む群のうちの1つ以上である。好ましくは、被験体はヒトであり、好ましくは、被験体及び対照被験体の両方がヒトである。

20

【0178】

実施形態では、被験体及び／又は対照被験体は生存している。好ましい実施形態では、被験体は生存している。

【0179】

一実施形態では、該方法は、被験体に対するアミロイド関連疾患の治療を選択及び／又は提供する工程を更に含む。

【0180】

「治療を選択及び／又は提供する」には、アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断に基づいて、その疾患に適切な治療を特定できることが含まれる。アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断に基づいて、医学分野の当業者は、適切な治療を選択及び／又は提供することができる。

30

【0181】

好ましくは、「被験体に対するアミロイド関連疾患の治療を選択及び／又は提供する」工程は、「決定に基づいてアミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断を提供する」工程の後に行われる。

【0182】

一実施形態では、治療は、アミロイド関連疾患の症状及び／若しくは徴候の数及び／若しくは重篤度を低減する、並びに／又はアミロイド関連疾患の原因を治療する；並びに／又は神経調節プロセスを改善する；並びに／又は神経伝達プロセスを改善する；並びに／又は個々のアミロイド凝集体の存在及び／若しくは量及び／若しくは濃度及び／若しくはサイズを減少させるものである。

40

【0183】

本明細書に開示する通り、治療には、対症療法的治療、及び／又は実験的治療、及び／又は理学療法が含まれる。

【0184】

一実施形態では、治療は、レボドパ（L-DOPA）；アセチルコリンエステラーゼ阻害剤（ACHEI、例えば、ドネペジル、ガランタミン、及びリバスチグミン）；N-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）阻害剤（例えば、メマンチン）；セクレターゼ1

50

(BACE1) 阻害剤；モノクローナル抗体（モノクローナル抗体アナログを含む）；及び／又はタファミジスを含む群から選択される１つ以上である。医学分野の当業者は、本明細書で論じる治療について精通しており、いつ選択及び／又は提供すべきかを理解している。

【0185】

ACHEI は、アセチルコリンエステラーゼ酵素がアセチルコリンを破壊するのを阻害し、それによって、神経伝達物質アセチルコリンの作用のレベル及び持続期間の両方を増大させる。NMDA 受容体アンタゴニストメマンチンは、損傷した細胞から放出されるグルタミン酸がそれに対して放出されている NMDA 受容体を部分的にブロックすることによって、学習及び記憶に関与する脳内の重要な神経伝達物質であるグルタミン酸の活性を制御する。タファミジス（商品名 Vyndaqel）は、トランスサイレチン（TTR）の正確に折り畳まれた四量体形態を安定化させ、それによって、疾患の個体内において TTR 凝集体が形成され、蓄積される速度を減速させる。モノクローナル抗体は、血液脳関門を通過することができ、可溶性アミロイドβ凝集体（具体的には、脳内の不溶性原線維）を選択的に標的とし、それによって、アミロイドβ凝集体の負荷を低減する。前臨床試験において、モノクローナル抗体アナログが、プラークを有するトランスジェニックマウス脳から Aβ をクリアランスできることが示されている（Sevigny et al., Nature 2016 537: 50 - 56 doi: 10.1038/nature19323）。

10

【0186】

好ましい実施形態では、アミロイド関連疾患はパーキンソン病であり、治療は L-DOPA を含む。

20

【0187】

別の好ましい実施形態では、アミロイド関連疾患は家族性アミロイド多発ニューロパシー（FAP）であり、治療はタファミジスを含む。

【0188】

更に別の好ましい実施形態では、アミロイド関連疾患はアルツハイマー病であり、治療は、セクレターゼ 1（BACE1）阻害剤及び／又はモノクローナル抗体（モノクローナル抗体アナログを含む）を含む。

【0189】

一実施形態では、セクレターゼ 1（BACE1）阻害剤は、ベルベセスタットを除く。

30

【0190】

一実施形態では、治療は、アミロイド関連疾患の治療を被験体に施すことを含む。好ましい実施形態では、「アミロイド関連疾患の治療を被験体に施す」工程は、「被験体に対するアミロイド関連疾患の治療を選択及び／又は提供する」工程の後に行われる。

【0191】

本発明の第 2 の態様は、被験体におけるアミロイド関連疾患を治療する方法であって、

- 該被験体由来の体液のサンプルを提供する工程と；
 - 該サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；
 - 該決定に基づいて、該被験体を該アミロイド関連疾患を有すると同定する工程と；
 - 該被験体に対する該アミロイド関連疾患の治療を選択及び／又は提供する工程と；
- を含む。

40

【0192】

本発明の第 1 の態様に関連して上に定義した特徴が、本発明の第 2 の態様の方法にも適用されることが理解されるであろう。例えば、本発明の第 1 の態様における「決定に基づいて、アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断を提供する」に関して論じた特徴は、「決定に基づいて、被験体をアミロイド関連疾患を有すると同定する」ために使用することができる。

【0193】

50

本発明の第２の態様の好ましい実施形態では、該方法は、以下の順に、

- 該被験体由来の体液のサンプルを提供する工程と；
 - 該サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；
 - 該決定に基づいて、該被験体を該アミロイド関連疾患を有すると同定する工程と；
 - 該被験体に対する該アミロイド関連疾患の治療を選択及び／又は提供する工程と；
- を含む。

【０１９４】

一実施形態では、治療は、アミロイド関連疾患の治療を被験体に施すことを含む。好ましい実施形態では、「アミロイド関連疾患の治療を被験体に施す」工程は、「被験体に対するアミロイド関連疾患の治療を選択及び／又は提供する」工程の後に行われる。

10

【０１９５】

本発明の第３の態様は、アミロイド関連疾患を治療するための剤を同定する方法であって、

- 被験体由来の体液の第１のサンプルを提供する工程と；
 - 該第１のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；
 - 剤を該被験体に投与する工程と；
 - 該被験体由来の体液の第２のサンプルを提供する工程と；
 - 該第２のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；
 - 該第１のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定を、該第２のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定と比較する工程と；
 - 該比較に基づいて、該剤を該アミロイド関連疾患を治療するためのものと同定する工程と；
- を含む方法を提供する。

20

【０１９６】

「剤をアミロイド関連疾患を治療するためのものと同定する」には、それまで同定されたことのない治療がアミロイド関連疾患を治療するのに有用であるかどうか；並びに／又はアミロイド関連疾患の症状及び／若しくは徴候の数及び／若しくは重篤度を低減するのに有用であるかどうか；並びに／又は神経調節プロセスを改善するのに有用であるかどうか；並びに／又は神経伝達プロセスを改善するのに有用であるかどうか；並びに／又は個々のアミロイド凝集体の存在及び／若しくは量及び／若しくは濃度及び／若しくはサイズを減少させるのに有用であるかどうかを判定することが含まれる。あるいは、「剤をアミロイド関連疾患を治療するためのものと同定する」には、被験体に対するアミロイド関連疾患の治療の有効性を判定することが含まれる。言い換えれば、被験体におけるアミロイド関連疾患の治療の有効性を追跡することが含まれる。

30

【０１９７】

本発明の第３の態様は、アミロイド関連疾患を治療するための剤を同定するインビボ法に関する。

40

【０１９８】

本発明の第１の態様及び／又は第２の態様に関連して上に定義した特徴が、本発明の第３の態様の方法にも適用されることが理解されるであろう。例えば、本発明の第１の態様における「決定に基づいて、アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断を提供する」に関して論じた特徴は、「比較に基づいて、剤をアミロイド関連疾患を治療するためのものと同定する」ために使用することができる。

【０１９９】

本発明の第３の態様の好ましい実施形態では、該方法は、以下の順に、

- 試験被験体由来の体液の第１のサンプルを提供する工程と；

50

- 該第 1 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズを決定する工程と ;
 - 剤を該被験体に投与する工程と ;
 - 該試験被験体由来の体液の第 2 のサンプルを提供する工程と ;
 - 該第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズを決定する工程と ;
 - 該第 1 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズの決定を、該第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズの決定と比較する工程と ;
 - 該比較に基づいて、該剤を該アミロイド関連疾患を治療するためのものと同定する工程と ;
- を含む。

10

【 0 2 0 0 】

一実施形態では、第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 若しくは量及び / 若しくは濃度が、第 1 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 若しくは量及び / 若しくは濃度よりも少ない場合、並びに / 又は

第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズが、第 1 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズよりも小さい場合、剤がアミロイド関連疾患を治療するためのものと同定される。

20

【 0 2 0 1 】

第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体が第 1 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズよりも「小さい」というとき、第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体が、第 1 のサンプル中にみられる凝集体よりも凝集体 1 個あたりのペプチドがより少ない又は低分子量を有することが含まれる。

【 0 2 0 2 】

理論に束縛されるものではないが、本発明者らは、剤の投与後に試験被験体がより少ない及び / 又はより小さい個々のアミロイド凝集体を有する場合、その剤が、アミロイド関連疾患の治療において役割を有する可能性があると考え。個々のアミロイド凝集体の数及び / 又はサイズの減少が大きいほど、アミロイド関連疾患の治療において剤がより有効である可能性がある。

30

【 0 2 0 3 】

一実施形態では、第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 若しくは量及び / 若しくは濃度は、第 1 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 若しくは量及び / 若しくは濃度及び / 若しくはサイズよりも約 2 0 % 以上少ない ; 例えば : 約 2 5 % 以上少ない ; 約 3 0 % 以上少ない ; 約 3 5 % 以上少ない ; 約 4 0 % 以上少ない ; 約 4 5 % 以上少ない ; 約 5 0 % 以上少ない ; 約 5 5 % 以上少ない ; 約 6 0 % 以上少ない ; 約 6 5 % 以上少ない ; 約 7 0 % 以上少ない ; 約 7 5 % 以上少ない ; 約 8 0 % 以上少ない ; 約 8 5 % 以上少ない ; 約 9 0 % 以上少ない ; 約 9 5 % 以上少ない、好ましくは、約 5 0 % 以上少ない ; 並びに / 又は

第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズは、第 1 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズよりも約 2 0 % 以上小さい ; 例えば : 約 2 5 % 以上小さい ; 約 3 0 % 以上小さい ; 約 3 5 % 以上小さい ; 約 4 0 % 以上小さい ; 約 4 5 % 以上小さい ; 約 5 0 % 以上小さい ; 約 5 5 % 以上小さい ; 約 6 0 % 以上小さい ; 約 6 5 % 以上小さい ; 約 7 0 % 以上小さい ; 約 7 5 % 以上小さい ; 約 8 0 % 以上小さい ; 約 8 5 % 以上小さい ; 約 9 0 % 以上小さい ; 約 9 5 % 以上小さい、好ましくは、約 5 0 % 以上小さい。

40

【 0 2 0 4 】

一実施形態では、第 1 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズは、第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の分子量の約 1 0 倍以上 ; 例えば : 約 1 1 倍以上 ; 分子量の約 1 2 倍以上 ; 分子量の約 1 3 倍以上 ; 分子量の約 1 4 倍以上 ; 分子量の約 1 5 倍以上 ; 分子量の約 1 6 倍以上 ; 分子量の約 1 7 倍以上 ; 分子量の約 1 8 倍以上 ; 分子量の約

50

19倍以上；分子量の約20倍以上；分子量の約21倍以上；分子量の約22倍以上；分子量の約23倍以上；分子量の約24倍以上；分子量の約25倍以上；分子量の約26倍以上；分子量の約27倍以上；分子量の約28倍以上；分子量の約29倍以上；分子量の約30倍以上；分子量の約35倍以上；分子量の約40倍以上；分子量の約45倍以上；又は第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の分子量の約50倍以上、好ましくは、第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の分子量の約27倍以上である。

【0205】

一実施形態では、第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／若しくは量及び／若しくは濃度は、第2のサンプル中よりも約2倍以上多い；例えば、第1のサンプル中よりも約3倍以上多い；約4倍以上多い；約5倍以上多い；約6倍以上多い；約7倍以上多い；約8倍以上多い；約9倍以上多い；約10倍以上多い、好ましくは、第2のサンプル中よりも約5倍以上多い；並びに／又は

第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズは、第2のサンプル中よりも約2倍以上大きい；例えば、第1のサンプル中よりも約3倍以上大きい；約4倍以上大きい；約5倍以上大きい；約6倍以上大きい；約7倍以上大きい；約8倍以上大きい；約9倍以上大きい；約10倍以上大きい、好ましくは、第2のサンプル中よりも約5倍以上大きい。

【0206】

一実施形態では、第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／若しくは量及び／若しくは濃度は、第2のサンプル中よりも標準偏差約2個分以上多い；例えば、第1のサンプル中よりも標準偏差約3個分以上多い；標準偏差約4個分以上多い；約5倍以上多い；標準偏差約6個分以上多い；標準偏差約7個分以上多い；標準偏差約8個分以上多い；標準偏差約9個分以上多い；標準偏差約10個分以上多い、好ましくは、第2のサンプル中よりも標準偏差約5個分以上多い；並びに／又は

第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズは、第2のサンプル中よりも標準偏差約2個分以上大きい；例えば、第1のサンプル中よりも標準偏差約3個分以上大きい；標準偏差約4個分以上大きい；約5倍以上大きい；標準偏差約6個分以上大きい；標準偏差約7個分以上大きい；標準偏差約8個分以上大きい；標準偏差約9個分以上大きい；標準偏差約10個分以上大きい、好ましくは、第2のサンプル中よりも標準偏差約5個分以上大きい。

【0207】

本発明の第1の態様に関して論じたのと同様に、一実施形態では、「第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する」及び／又は「第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する」は、単位時間における個々のアミロイド凝集体の頻度（例えば、単一事象発生（ f_{SEO} ））を決定することを含む。好ましい実施形態では、第1のサンプル及び第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の頻度を比較し、第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の頻度が第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の頻度よりも低い場合、剤を、アミロイド関連疾患を治療するためのものと同定する。

【0208】

一実施形態では、

- 試験被験体由来の体液の第1のサンプルを提供する工程；並びに

- 第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程；

を間隔をおいて繰り返し、

任意で、上記工程を2回以上、例えば、3回以上；4回以上；5回以上；6回以上；7回以上；8回以上；9回以上；10回以上；11回以上；12回以上；13回以上；14回以上；15回以上；16回以上；17回以上；18回以上；19回以上；20回以上；25回以上；30回以上；35回以上；40回以上；45回以上；回以上；又は50回以

10

20

30

40

50

上繰り返す。

【0209】

一実施形態では、

- 試験被験体由来の体液の第1のサンプルを提供する工程；並びに
- 第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程；

を間隔をおいて繰り返した場合、本発明の第3の態様の比較工程における第1のサンプルは、2個以上の第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの平均（好ましくは、アベレージ平均）である。

【0210】

一実施形態では、

- 試験被験体由来の体液の第1のサンプルを提供する工程；並びに
- 第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程；

を間隔をおいて繰り返した場合、繰り返した工程間の期間は、1時間以上；例えば、約2時間以上；約3時間以上；約4時間以上；約5時間以上；約6時間以上；約7時間以上；約8時間以上；約9時間以上；約10時間以上；約11時間以上；約12時間以上；約13時間以上；約14時間以上；約15時間以上；約16時間以上；約17時間以上；約18時間以上；約19時間以上；約20時間以上；約21時間以上；約22時間以上；約23時間以上；約1日間以上；約2日間以上；約3日間以上；約4日間以上；約5日間以上；約6日間以上；約1週間以上；約2週間以上；約3週間以上；約4週間以上；約1ヶ月間以上；約2ヶ月間以上；約3ヶ月間以上；約4ヶ月間以上；約5ヶ月間以上；約6ヶ月間以上；約7ヶ月間以上；約8ヶ月間以上；約9ヶ月間以上；約10ヶ月間以上；約11ヶ月間以上；又は約12ヶ月間以上である。

【0211】

一実施形態では、

- 試験被験体由来の体液の第2のサンプルを提供する工程；
- 第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程；並びに
- 第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定を、該第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定と比較する工程；

を間隔をおいて繰り返す、

任意で、上記工程を2回以上、例えば、3回以上；4回以上；5回以上；6回以上；7回以上；8回以上；9回以上；10回以上；11回以上；12回以上；13回以上；14回以上；15回以上；16回以上；17回以上；18回以上；19回以上；20回以上；25回以上；30回以上；35回以上；40回以上；45回以上；回以上；又は50回以上繰り返す。

【0212】

一実施形態では、

- 試験被験体由来の体液の第2のサンプルを提供する工程；
- 第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程；並びに
- 第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定を、該第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定と比較する工程；

を間隔をおいて繰り返した場合、本発明の第3の態様の比較工程における第2のサンプルは、2個以上の第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの平均（好ましくは、アベレージ平均）である。

【0213】

一実施形態では、

- 試験被験体由来の体液の第2のサンプルを提供する工程；
- 第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程；並びに

第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定を、該第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定と比較する工程；

を間隔をおいて繰り返した場合、繰り返した工程間の期間は、1時間以上；例えば、約2時間以上；約3時間以上；約4時間以上；約5時間以上；約6時間以上；約7時間以上；約8時間以上；約9時間以上；約10時間以上；約11時間以上；約12時間以上；約13時間以上；約14時間以上；約15時間以上；約16時間以上；約17時間以上；約18時間以上；約19時間以上；約20時間以上；約21時間以上；約22時間以上；約23時間以上；約1日間以上；約2日間以上；約3日間以上；約4日間以上；約5日間以上；約6日間以上；約1週間以上；約2週間以上；約3週間以上；約4週間以上；約1ヶ月間以上；約2ヶ月間以上；約3ヶ月間以上；約4ヶ月間以上；約5ヶ月間以上；約6ヶ月間以上；約7ヶ月間以上；約8ヶ月間以上；約9ヶ月間以上；約10ヶ月間以上；約11ヶ月間以上；又は約12ヶ月間以上である。

10

【0214】

好ましい実施形態では、

- 試験被験体由来の体液の第2のサンプルを提供する工程；
- 第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程；並びに

20

第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定を、該第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定と比較する工程；

を間隔をおいて繰り返した場合、試験被験体からの第2のサンプルの第1の提供は、試験被験体に剤を投与する工程の直後に行われる。

【0215】

一実施形態では、試験被験体は、げっ歯類（例えば、マウス及び／又はラット及び／又はハムスター及び／又はモルモット及び／又はスナネズミ及び／又はウサギ）；及び／又はイヌ科動物（例えば、イヌ）；及び／又はネコ科動物（例えば、ネコ）；霊長類（例えば、ヒト及び／又はサル及び／又は類人猿）；及び／又はウマ科動物（例えば、ウマ）；及び／又はウシ科動物（例えば、ウシ）；及び／又はイノシシ科動物（例えば、ブタ）；及び／又は魚類（例えば、ゼブラフィッシュ）；及び／又は昆虫（例えば、キイロショウジョウバエ）；及び／又は両生類（例えば、アフリカツメガエル）；及び／又は爬虫類；及び／又は線虫（例えば、C.エレガンス）を含む群のうちの1つ以上である。

30

【0216】

一実施形態では、試験被験体は、非ヒト、例えば、非ヒト哺乳類である。好ましい実施形態では、非ヒト哺乳類は、げっ歯類（例えば、マウス及び／又はラット及び／又はハムスター及び／又はモルモット及び／又はスナネズミ及び／又はウサギ）；及び／又はイヌ科動物（例えば、イヌ）；及び／又はネコ科動物（例えば、ネコ）；非ヒト霊長類（例えば、サル；及び／又は類人猿）；及び／又はウマ科動物（例えば、ウマ）；及び／又はウシ科動物（例えば、ウシ）；及び／又はイノシシ科動物（例えば、ブタ）を含む群のうちの1つ以上である。

40

【0217】

本発明の第4の態様は、アミロイド関連疾患を治療するための剤を同定する方法であって、

- 試験流体由来の第1のサンプルを提供する工程と；
- 該第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；

50

- 剤を該試験流体に投与する工程と；
- 該試験流体由来の第２のサンプルを提供する工程と；
- 該第２のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；
- 該第１のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定を、該第２のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定と比較する工程と；
- 該比較に基づいて、該剤を該アミロイド関連疾患を治療するためのものと同定する工程と；

を含む方法を提供する。

10

【０２１８】

本発明の第３の態様は、アミロイド関連疾患を治療するための剤を同定するインビトロ及び／又はエキスピボ法に関する。

【０２１９】

本発明の第１の態様及び／又は第２の態様及び／又は第３の態様に関連して上に定義した特徴が、本発明の第４の態様の方法にも適用されることが理解されるであろう。例えば、本発明の第１の態様における「決定に基づいて、アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断を提供する」に関して論じた特徴は、「比較に基づいて、剤を該アミロイド関連疾患を治療するためのものと同定する」ために使用することができる。同様に、本発明の第３の態様における「第１のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する」及び／又は「第２のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する」に関して論じた特徴は、本発明の第４の態様に使用することもできる。

20

【０２２０】

本発明の第４の態様の好ましい実施形態では、該方法は、以下の順に、

- 試験流体由来の第１のサンプルを提供する工程と；
- 該第１のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；
- 剤を該試験流体に投与する工程と；
- 該試験流体由来の第２のサンプルを提供する工程と；
- 該第２のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；
- 該第１のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定を、該第２のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定と比較する工程と；
- 該比較に基づいて、該剤を該アミロイド関連疾患を治療するためのものと同定する工程と；

を含む。

30

【０２２１】

理論に束縛されるものではないが、本発明者らは、剤の投与後に試験被験体がより少ない及び／又はより小さい個々のアミロイド凝集体を有する場合、その剤が、アミロイド関連疾患の治療において役割を有する可能性があると考える。個々のアミロイド凝集体の数及び／又はサイズの減少が大きいほど、アミロイド関連疾患の治療において剤がより有効である可能性がある。

40

【０２２２】

一実施形態では、

- 試験流体由来の第１のサンプルを提供する工程；並びに
- 該第１のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程；

を間隔をおいて繰り返し、

50

任意で、上記工程を2回以上、例えば、3回以上；4回以上；5回以上；6回以上；7回以上；8回以上；9回以上；10回以上；11回以上；12回以上；13回以上；14回以上；15回以上；16回以上；17回以上；18回以上；19回以上；20回以上；25回以上；30回以上；35回以上；40回以上；45回以上；回以上；又は50回以上繰り返す。

【0223】

一実施形態では、

- 試験流体由来の第1のサンプルを提供する工程；並びに
- 該第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；

10

を間隔をおいて繰り返した場合、本発明の第4の態様の比較工程における第1のサンプルは、2個以上の第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの平均（好ましくは、アベレージ平均）である。

【0224】

一実施形態では、

- 試験流体由来の第1のサンプルを提供する工程；並びに
- 該第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程；

20

を間隔をおいて繰り返した場合、繰り返した工程間の期間は、1時間以上；例えば、約2時間以上；約3時間以上；約4時間以上；約5時間以上；約6時間以上；約7時間以上；約8時間以上；約9時間以上；約10時間以上；約11時間以上；約12時間以上；約13時間以上；約14時間以上；約15時間以上；約16時間以上；約17時間以上；約18時間以上；約19時間以上；約20時間以上；約21時間以上；約22時間以上；約23時間以上；約1日間以上；約2日間以上；約3日間以上；約4日間以上；約5日間以上；約6日間以上；約1週間以上；約2週間以上；約3週間以上；約4週間以上；約1ヶ月間以上；約2ヶ月間以上；約3ヶ月間以上；約4ヶ月間以上；約5ヶ月間以上；約6ヶ月間以上；約7ヶ月間以上；約8ヶ月間以上；約9ヶ月間以上；約10ヶ月間以上；約11ヶ月間以上；又は約12ヶ月間以上である。

【0225】

一実施形態では、

30

- 試験流体由来の第2のサンプルを提供する工程；
 - 第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程；並びに
 - 第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定を、該第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定と比較する工程；
- を間隔をおいて繰り返す、

任意で、上記工程を2回以上、例えば、3回以上；4回以上；5回以上；6回以上；7回以上；8回以上；9回以上；10回以上；11回以上；12回以上；13回以上；14回以上；15回以上；16回以上；17回以上；18回以上；19回以上；20回以上；25回以上；30回以上；35回以上；40回以上；45回以上；回以上；又は50回以上繰り返す。

40

【0226】

一実施形態では、

- 試験流体由来の第2のサンプルを提供する工程；
- 第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程；並びに
- 第1のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定を、該第2のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定と比較する工程；

50

を間隔をおいて繰り返した場合、本発明の第 3 の態様の比較工程における第 2 のサンプルは、2 個以上のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズの平均（好ましくは、アベレージ平均）である。

【0227】

一実施形態では、

- 試験流体由来の第 2 のサンプルを提供する工程；
- 第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズを決定する工程；並びに
- 第 1 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体のアミロイドの存在及び / 又は量及び / 又は濃度アミロイドの決定を、該第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズの決定と比較する工程；

10

を間隔をおいて繰り返した場合、繰り返した工程間の期間は、1 時間以上；例えば、約 2 時間以上；約 3 時間以上；約 4 時間以上；約 5 時間以上；約 6 時間以上；約 7 時間以上；約 8 時間以上；約 9 時間以上；約 10 時間以上；約 11 時間以上；約 12 時間以上；約 13 時間以上；約 14 時間以上；約 15 時間以上；約 16 時間以上；約 17 時間以上；約 18 時間以上；約 19 時間以上；約 20 時間以上；約 21 時間以上；約 22 時間以上；約 23 時間以上；約 1 日間以上；約 2 日間以上；約 3 日間以上；約 4 日間以上；約 5 日間以上；約 6 日間以上；約 1 週間以上；約 2 週間以上；約 3 週間以上；約 4 週間以上；約 1 ヶ月間以上；約 2 ヶ月間以上；約 3 ヶ月間以上；約 4 ヶ月間以上；約 5 ヶ月間以上；約 6 ヶ月間以上；約 7 ヶ月間以上；約 8 ヶ月間以上；約 9 ヶ月間以上；約 10 ヶ月間以上；約 11 ヶ月間以上；又は約 12 ヶ月間以上である。

20

【0228】

好ましい実施形態では、

- 試験流体由来の第 2 のサンプルを提供する工程；
- 第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズを決定する工程；並びに
- 第 1 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズの決定を、該第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズの決定と比較する工程；

を間隔をおいて繰り返した場合、試験流体からの第 2 のサンプルの第 1 の提供は、試験流体に剤を投与する工程の直後に行われる。

30

【0229】

一実施形態では、該方法は、インビトロ及び / 又はエクスビボで実施される。

【0230】

一実施形態では、試験流体は、体液である。

【0231】

好ましい実施形態では、試験流体は、血液、及び / 又は脳脊髄液（CSF）、及び / 又は唾液、及び / 又は滑液、及び / 又は糞便、及び / 又は尿を含む又はからなる群のうちの 1 つ以上の体液であり、好ましくは血液である。

【0232】

別の実施形態では、試験流体は、インビトロ試験流体である。

40

【0233】

「インビトロ試験流体」には、試験流体が研究室で調製され、インビトロ試験流体の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズが既知であることが含まれる。

【0234】

本発明の第 5 の態様は、例えば本明細書に定義する本発明の方法を使用して、被験体におけるアミロイド関連疾患を診断及び / 又は予後診断するための、被験体における個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度を決定するための使用を提供する。

【0235】

50

本発明の第 6 の態様は、例えば本明細書に定義する本発明の方法を使用して、被験体におけるアミロイド関連疾患を診断及び / 又は予後診断するための、時間分解検出の使用を提供する。

【 0 2 3 6 】

本発明の第 7 の態様は、例えば本明細書に定義する本発明の方法を使用して、アミロイド関連疾患を治療するための剤を同定するための、個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズを決定するための使用を提供する。

【 0 2 3 7 】

本発明の第 8 の態様は、例えば本明細書に定義する本発明の方法を使用して、アミロイド関連疾患を治療するための剤を同定するための、時間分解検出の使用を提供する。

10

【 0 2 3 8 】

本発明の第 1 の態様及び / 又は第 2 の態様及び / 又は第 3 の態様及び / 又は第 4 の態様に関連して上に定義した特徴が、本発明の第 5 の態様及び / 又は第 6 の態様及び / 又は第 7 の態様及び / 又は第 8 の態様の使用にも適用されることが理解されるであろう。

【 0 2 3 9 】

本発明の第 9 の態様は、例えば本明細書に定義する本発明の方法を使用する、本発明の第 1 の態様及び / 若しくは第 2 の態様及び / 若しくは第 3 の態様及び / 若しくは第 4 の態様の方法、並びに / 又は本発明の第 5 の態様及び / 若しくは第 6 の態様及び / 若しくは第 7 の態様及び / 若しくは第 8 の態様のうちのいずれか 1 つの使用のためのキットオブパーツを提供する。

20

【 0 2 4 0 】

一実施形態では、キットオブパーツは、

- 本明細書に記載の検出剤、好ましくは、チオフラビン T (T h T) ;
- 時間分解検出のための手段、例えば、蛍光相関分光法 (F C S) のための顕微鏡 ;

及び / 又は

- 対照サンプル

を含むか又はからなるリストのうちの 1 つ以上を含む。

【 0 2 4 1 】

本発明の第 9 の態様の一実施形態では、キットオブパーツは、説明書を含む。説明書は、本明細書に記載の使用及び / 又は方法及び / 又は組成物に関する記述的資料、教材、マーケティング資料、又は他の文書である。

30

【 0 2 4 2 】

キットの情報提供文書の形態は限定されない。情報は、様々なフォーマットで提供され得、印刷されたテキスト、コンピュータ可読文書、録画、若しくは録音、又は例えばインターネットにおける実質的な文書へのリンク若しくはアドレスを提供する情報が挙げられる。

【 0 2 4 3 】

好ましい実施形態では、キットオブパーツは、被験体におけるアミロイド関連疾患を診断及び / 若しくは予後診断するための並びに / 又はアミロイド関連疾患を治療する剤を同定するための説明書を含む。

40

【 0 2 4 4 】

次に、1 つ以上の非限定的な図面及び例を参照して本発明について説明する。

【 0 2 4 5 】

この明細書における見かけ上先に公開された文書の一覧又は考察は、必ずしも、該文書が現在の技術水準の一部又は技術常識であることを認めると解釈されるべきではない。

【 実施例 】

【 0 2 4 6 】

実施例 1 : 血清における分析

概要

フェムトリットル以下のサイズの観察体素においてチオフラビン T (T h T) 蛍光強度

50

ゆらぎの時間分解検出を使用することによって、見かけ上健常個体及びアルツハイマー病（AD）と診断された患者の血清中の非常に低レベルの小さな構造化アミロイド形成性ナノプラークを単一分子感度で検出することができた。小さな構造化アミロイド形成性ナノプラークに遭遇する頻度及びそのサイズは、対照被験体よりもADと診断された個体の血清中において著しく高かった。本発明者らによる試験の結果は、バルク蛍光ThT分光法とは異なり、時間分解ThT蛍光強度ゆらぎ分析では、血清中の小さな構造化アミロイド形成性ナノプラークの直接検出、定量、及びサイズ決定が可能であることを示す。この方法は、免疫ベースのプロープの使用にも放射性トレーサ、シグナル増幅、又はタンパク質分離技術の使用にも依存せず、末梢血循環（図1～11及び20～22）、脳脊髄液（図12）、唾液（図13）、及び尿（図14）を含む体液中の構造的に修飾されたタンパク質を迅速かつコスト効率よく早期に決定するための低侵襲的試験を提供する。

10

【0247】

略記

AD - アルツハイマー病；A β - アミロイド β ペプチド；CNS - 中枢神経系；CPSM - 1分子あたり1秒あたりのカウント数；CSF - 脳脊髄液；FCS - 蛍光相関分光法；FIFA - 蛍光強度ゆらぎ分析；軽度認知機能障害 - MCI；OVE - 観察体素；Rh6G - ローダミン6G；単一事象発生 - SEO；主観的認知障害 - SCI；tACC - 時間的自己相関曲線；ThT - チオフラビンT。

【0248】

序論

アルツハイマー病（AD）は、荒廃的神経変性病であり、世界中で認知症の最も一般的な原因である（1、2）。ADは、罹患した個体の生命維持に必要な知能を徐々に破壊し、認知能力を著しく低下させる。ADによって誘導される損傷の程度は、罹患した人が、最終的にはもはや自身の世話をすることができなくなり、残りの人生は常にケア及び支援を必要とするほどである。残念なことに、集中的な研究及び大きな社会的要求にもかかわらず、信頼できかつコスト効率のよいADの早期診断法は未だ揺籃期である。これは、新規薬物の開発の妨げにもなっており、現在ADの治療法は存在していない。

20

【0249】

更なる進展の主な障害は、AD発症の根底にある複雑な動的プロセスについての重要な基本的知見が欠けていることである。分子機序は未だ完全には理解されていないが、罹患した個体の中枢神経系（CNS）におけるアミロイドベータ（A β ）ペプチドの構造化凝集体への自己集合及びいわゆる老人性プラークへの蓄積を伴う、A β ペプチドの産生及びクリアランスの不均衡がADの極初期の徴候であることはよく知られている。この考えを考慮して、アミロイドカスケード仮説は、A β ペプチドの誤った折り畳み、凝集、及び沈着がADの主な原因であると提唱している（3）。A β ペプチドは、タンパク質分解プロセスを介してアミロイド前駆体タンパク質（APP）から誘導される39～42アミノ酸長のペプチドである。A β ペプチドの最も一般的な形態は、A β 40及びA β 42である（（4）に概説）。

30

【0250】

A β の凝集機序は、複雑である。該機序は、蛍光分光法及び蛍光相関分光法を含む様々な異なる分析技術を使用して調べられている（（5）及びその参考文献）。早くから、ペンゾチアゾール塩チオフラビンT（ThT）蛍光アッセイが、蛍光分光法及び顕微鏡観察によるアミロイド検出についての標準的な方法になっている（6、7）。より最近の研究に示されている通り、ひだ状の β シート二次構造を多く有するアミロイド形成性凝集体は、ThTに容易に結合し、そのスペクトル特性を著しく変化させて、吸収スペクトルをより長波長側にシフトさせ、蛍光量子収量を著しく増加させる（図1、挿入図）（8～12）。

40

【0251】

ADの診断法については、未だ激しい論争中である（13～16）。潜在的な患者の精神的退化が目立つ前に診断するために、信頼できるバイオマーカーが利用可能であること

50

が必要とされている(17)。A β に対する血清及びCSF自己抗体が有望であることが示されており、更なる研究が保証されている(18、19)が、これまでの結果は、特に楽観的な材料になるものではなかった。PET及び放射性トレーサを使用する脳イメージングは、>1mmのサイズの脳内におけるアミロイドの原線維沈着物を確実に映すであろう(20~22)。免疫化学的技術を使用した脳脊髄液(CSF)中のA β ペプチド(及びTauタンパク質)の含量の測定も信頼できると考えられる(23~25)。しかし、PET及びCSFの方法論は、侵襲的かつ高価である。トピックの概説(13、14)では、著者は、診断法として血漿中のA β を単に測定することの欠点を記載しており、血液検査をPET及びCSFの結果と相互に関連付けようとする試みは今までのところ説得力のあるものではないことを示している。2つの技術によって測定されるA β の構造状態が不均一かつ異なることが、恐らく実験を困難にしている理由の1つである：免疫化学的方法は、A β ペプチド(複数可)の可溶性形態を測定するが、一方、PET法は、脳内の沈降した不溶性ペプチド凝集体を測定する。両方ともがA β ペプチドの存在及び挙動に通じるものであったとしても、2種類の測定値の間に明らかな直接的関連は存在しない。追加のバイオマーカー方法論に基づく早期AD診断のための新規、非侵襲的、かつ信頼できる方法が明らかに切実に必要とされている。このような方法が存在しないことは、新規薬物の開発の妨げにもなっており、脳内のアミロイド負荷を低減することを目的とする新規治療法の開発は、経時的に繰り返し同じ個体において構造化アミロイド形成性凝集体のレベルを定期的に同定及び特性評価できる可能性に大きく依存している。

10

20

30

【0252】

ここで、本発明者らは、アミロイド感受性色素ThTで単に標識された血清の蛍光ベースの試験を提示する。この方法は、蛍光相関分光法(FCS)のための時間分解かつ高感度単一分子蛍光技術を使用する観察に基づく。本発明者らは、以前、ThTベースのFCSアッセイ(ThT-FCS)を使用して、インビトロにおける原線維形成プロセス中のA β ペプチド凝集体の不均一性及びターンオーバーについて研究した(5)。本研究において、本発明者らは、ADと診断された患者由来の血清と対照個体由来の血清との間に、患者の血清中に視認できる(本明細書ではナノブランクと命名した)ThT反応性構造化アミロイド形成性オリゴマー凝集体の数及びサイズにみられる著しい差が存在することを証明する。極度に小さな(<フェムトリットル)観察体積を通るこれら単一ナノブランク粒子の通過は、リアルタイムで観察し、カウントすることができる。ナノブランクの濃度に比例する通過数は、AD患者及び対照由来の血清において著しく異なる。

【0253】

材料及び方法

患者コホート及び倫理

見かけ上健常な献血者(対照群)及びプライマリ・ケア設定において検査した後Memory Clinic(Karolinska University Hospital, Huddinge)に付託された個体(患者コホート)から、インフォームドコンセントの際に血液サンプルを得た。血液サンプルの採取及び取り扱いは、ストックホルムの地域倫理委員会によって承認された(許可番号:2012/1019-31/1)。

40

【0254】

承認時、AD診断はまだ確立されておらず、患者は、AD症状の治療に通常使用されるコリンエステラーゼ阻害剤又はN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)受容体アンタゴニスト等の医薬物質を全く服用していなかった。しかし、高齢であることから、患者コホートの多くの個体が、加齢に関係する健康上の問題を抱えており、幾つかの処方薬を服用していた。詳細な人口統計及び他の関連する患者情報を表1に示す。

【0255】

【表 1 - 1】

表 1. 患者及び対照被験体の人口統計、薬物療法、及び診断

性別	年齢	カウント 速度 (kHz)	f_{SEO} (10^{-3} s^{-1})	MMS	CSF $\text{A}\beta_{42}$ (ng/l)	CSF 全 Tau (ng/l)	CSF リン酸化 Tau (ng/l)	診断	薬物療法	併存疾患
F	58	92	8.0	26	766	140	24	MCI*	抗うつ薬、シフロロール、 バラセタモール	胃バイパス、鬱病
M	61	269	1.0	21	281	617	83	AD	ASA、スタチン	一過性脳虚血発作 (2002)
F	61	255	5.4	24	338	234	33	AD	レバシリン、シムビコート	中状腺機能低下症
M	84	324	3.1	27	315	574	64	AD	トロンビル、 アムロジピン、 ロサルスタット	腎不全、 高血圧、 前立腺がん
F	65	232	2.3	25	684	610	83	AD	ロサルタン	高血圧
F	62	299	2.7	25	756	251	35	MCI	ハルドル、 ペンラフアタシン、 プロバパン、イモバン	鬱病、 全般的な不安障害、 喫煙者
M	64	465	3.0	29	1020	466	60	MCI	ベシケア、バルミコート、 アエリウス	喘息
F	64	334	1.3	24	457	356	46	早期 AD	レバシリン、 アダラート、 アレナット	肺がん (2000)、 原発性胆汁性肝硬変、 中状腺機能低下症、 レイノード症候群
M	58	109	1.7	30	822	188	31	SCI**	トストレック、 カベルゴリン	下垂体腺腫、 高プロラクチン血症
M	77	175	0.9	24	441	367	47	AD	薬物の服用なし	紅斑性狼瘡 (2014)、 乾癬
M	81	242	3.7	19	466	523	62	AD 及び血管 性認知症	経口血糖降下剤、 降圧剤	高血圧、腎不全、閉塞性虚脱 時無呼吸、2型糖尿病、痛風

10

20

30

40

【表 1 - 2】

M	82	103	1.7	23	679	524	59	AD及び血管性認知症	インスリン、スタチン	2型糖尿病
F	58	253	2.2	30	485	477	57	AD	薬物の服用なし	燃え尽き
F	66	196	1.6	30	328	326	37	早期AD	シタロプラム、ナゾロキゼン、スタチン、降圧剤	高血圧、一過性脳虚血発作、鬱病
F	77	169	1.4	24	543	450	60	AD及び血管性認知症	バントロック、カルシチエウ、サルレス、アセチルシステイン、ベットミガ	高血圧
F	58	211	0.3	26	1100	235	60	SCI	オメプラゾール、レバシリン、ASA、メトホルミン、オメプラゾール、サインバルタ	2型糖尿病、鬱病、肥満、甲状腺機能低下症
F	60	182	1.2	25	800	276	35	MCI	オメプラゾール、ラクツコース	鬱病、てんかん
M	77	171	1.0	25	423	924	96	AD	ASA、セロケン、アムロジピン、リビトール	高血圧、狭心症
F	48	160.5	4.0	17	294	554	49	AD	確定していない	確定していない
M	75	135.5	2.3	30	474	491	61	#	オメプラゾール、ASA、ペヘバン	一過性脳虚血発作
F	61	119	1.7	28	332	545	53	#	ロビッド	高コレステロール血症
F	56	111	2.8	23	428	1050	98	AD	確定していない	確定していない
F	68	109	1.5	30	450	541	58	#	オメプラゾール、経口血糖降下剤、スタチン	2型糖尿病、高脂血症

10

20

30

40

【表 1 - 3】

F	78	135.5	0.2	22	252	373	44	#	カルシチュウ、 アレナット	意義不明の単クロ ーン性高ガンマグ ロブリン血症、 骨粗鬆症
患者 $n_p = 24$ 15F:9 M	66 ± 10	202 ± 92	2.3 ± 1.7	25 ± 4	539 ± 236	462 ± 214	56 ± 20			
対照 $n_c = 33$ 17F:16 M	39 ± 15	155 ± 43	1.5 ± 1.2							

*MCCIー軽度認知機能障害
**SCIIー主観的認知障害
#データ解析時に診断が確定していない。一次データは、患者対対照の全体的な解析に含まれていた（図 4 A）。

採血、並びに血清、血漿、及び細胞溶解物サンプルの調製プロトコル

静脈穿刺用の真空管システム (BD Vacutainer (登録商標) チューブ、Becton, Dickinson and Company) を使用して上肢の浅静脈から血液を採取し、下記の通り処理して血清を得る。時間分解蛍光強度ゆらぎ分析 (FIFA) に供する前に ThT をサンプルに添加した。

【0257】

血清：血清を抽出するために、凝固プロセスを促進するためにチューブの内壁に噴霧された主な血餅活性化因子成分として SiO_2 を含む微粉化シリカ粒子を含有し、トロンビンは含有しない、Red BD Hemogard (商標) Closure を備える BD Vacutainer (登録商標) Plastic Serum チューブに 5 ml の血液を回収する。血液凝固を活性化するために、チューブを 180° 反転させ、元に戻すことを 5 ~ 6 回行い、血液を 60 分間凝固させる。その後、チューブを $2500 \times g$ で 10 分間遠心分離し、血餅の上方の上清、すなわち血清を、混濁度及び溶血の証拠について目視検査する。中等度の混濁度及び溶血は結果のアウトカムに影響を与えないことが別の対照実験で証明されてはいたものの (データは示さず)、濁った血清サンプル及び肉眼で確認できるピンク色に変色したサンプルは、更なる分析には供さなかった。

10

【0258】

即時使用する場合、 $200 \mu\text{l}$ の血清を 8 ウェルチャンバー付カバーガラス (Lab-Tek Chambered Coverglass, Thermo Scientific, USA) のウェルに分注し、最終濃度が $20 \mu\text{M}$ ThT になるように $1.6 \mu\text{l}$ の 2.5 mM ThT と混合し、下記の通り FIFA に供する。全ての実験をデュプリケートで行う。

20

【0259】

分析のアウトカムに対する短期血清保存の影響を評価するために、血清を懸濁させ、 $200 \mu\text{l}$ のアリコートをして 0.5 ml の Eppendorf Safe-Lock Centrifuge Tubes に移し、 -20°C で 2、4、又は 24 週間保存する。凍結融解サイクルは 1 回だけ許容した。

【0260】

血漿：血漿を抽出するために、血液 1 ml あたり抗凝固剤 K_3EDTA を 1.8 mg 含有する Lavender BD Hemogard (商標) Closure を備える BD Vacutainer (登録商標) Plastic K_3EDTA チューブに 5 ml の血液を回収して、 $\sim 7 \text{ mM}$ の EDTA 濃度を得る。高 EDTA 濃度 (10 mM 以下) が誘導期の長さにもインビトロ $\text{A}\beta$ ペプチド凝集プロセス中の蛍光成長曲線の傾きにも影響を及ぼさないことを示す (データは示さず) バルク ThT 蛍光分光測定に基づいて、この EDTA 濃度は $\text{A}\beta$ 凝集にも ThT アッセイにも干渉しない。チューブを穏やかに 180° 反転させ、元に戻すことを 10 回行い、60 分間沈降させる。その後、チューブを $2500 \times g$ で 10 分間遠心分離し、細胞層の上方の上清、すなわち血漿を、混濁度及び溶血の証拠について目視検査する。上記の通り、濁った血漿サンプル及び肉眼で確認できるピンク色に変色した血漿サンプルは廃棄し、更なる分析には供さなかった。即時使用する場合、 $200 \mu\text{l}$ の血漿を 8 ウェルチャンバー付カバーガラスのウェルに分注し、最終濃度が $20 \mu\text{M}$ ThT になるように $1.6 \mu\text{l}$ の 2.5 mM ThT と混合し、血清について記載したのと同じ手順に従って FIFA に供する。

30

40

【0261】

限られた実験セットにおいて、クエン酸バッファを使用することの利点を評価するために、Light Blue BD Hemogard (商標) Closure を備える BD Vacutainer (登録商標) CTAD チューブに血漿を回収する。EDTA 又はクエン酸血漿サンプル間の差は観察されなかった。

【0262】

細胞溶解物：血液細胞溶解物を調製するために、血漿を除去した後、Lavender BD Hemogard (商標) Closure を備える BD Vacutainer

50

(登録商標) Plastic K3 EDTAチューブの底部に残存する細胞ペレットに150 mM NaCl中1% Triton X-100を0.1 ml添加し;その内容物を2500×gで10分間遠心分離し、分析のために細胞溶解物を取り出す。即時分析する場合、200 μlの細胞溶解物を8ウェルチャンパー付カバーガラスのウェルに分注し、最終濃度が20 μM ThTになるように1.6 μlの2.5 mM ThTと混合し、血清について記載したのと同じ手順に従ってFIFAに供する。

【0263】

蛍光相関分光法(FCS)におけるショートバックグラウンド

蛍光相関分光法(FCS)は、希釈水溶液中の明るい蛍光分子を検出するための、最高の単一分子感度を有する定量分析法である(26~32)。FCSは、従来の機器設定において約 2×10^{-16} l ~ 10×10^{-16} lである非常に小さな体積における自発的蛍光強度ゆらぎの時系列を高時間分解能で観察することによって、単一分子感度を実現する。このような小さな体積では、1回に見る分子の数が少ないことによって、溶媒分子等の接近しやすい分子から生じるバックノイズが著しく低下する。従って、小さな観察体積を通る明るい蛍光分子の通過によって蛍光強度が顕著に変化し、これは容易に検出することができる。

10

【0264】

小さな観察体積を生成するために、FCS用の機器は、共焦点顕微鏡における光学素子の特定の配置を利用して、高開口数(NA)対物レンズを通して入射レーザー光をサンプルに鋭く集束し、焦点外の光を排除するために検出器の前の光学的共役面にピンホールを配置することによって、蛍光が検出される体積を更に低減する(図1A)。このように、観察体素(OVE)を通る分子の位置において微細なゆらぎが自発的に熱駆動されることから(図1C)、(非)平衡定常状態の周りに生じる蛍光強度ゆらぎを観察するのに十分な程度小さな微小OVEが生成される(図1B)。これらゆらぎを経時的に記録し、分析して、サンプル濃度を表すOVE内の平均分子数、及び平均移行時間、すなわち分子がOVEを通過するのに必要な時間、いわゆる、対象となる分子の拡散係数(D)によって、すなわち、所与の粘度の媒体中における該分子のサイズ及び形状によって定義される並進拡散時間(τ_D)に関する情報を抽出する(図1D)。

20

【0265】

様々な方法を使用して、FCS実験において記録された蛍光強度ゆらぎを分析することができる(28、30)。典型的には、時間的自己相関分析を適用して時間的自己相関曲線(tACC)を導出し、tACCの振幅からOVEにおける平均分子数を、そして、tACCの特徴的な減衰時間から拡散時間を読み取る(26、27、30)。時間的自己相関分析、並びにOVEにおける平均分子数及び調べた粒子の並進拡散係数を導出する方法の詳細については、「蛍光強度ゆらぎの時間的自己相関分析」に記載する。この試験では、機器の較正に時間的自己相関分析を使用するが、実際のデータ解析は、以下のデータ解析に記載の通り、単一事象発生の頻度を分析することによって実施される。この方法は、「100 nmのフルオスフィアの希釈水懸濁液を使用するデータ解析の検証」に詳細に記載するフルオスフィア($d = 100$ nm)の希釈水懸濁液の標準系列を使用して検証される。

30

40

【0266】

時間分解ThT蛍光強度ゆらぎ測定

C-Apochromat 40×、NA=1.2、水浸UV-VIS-IR対物レンズを備える倒立顕微鏡からなるConfocor 2システム(Carl Zeiss, Jena, Germany)を使用して、時間分解蛍光強度ゆらぎ測定を実施する。アルゴンレーザーの458 nmラインを使用してThT蛍光を励起する。対物レンズを通過することによって入射レーザー光がサンプルに強く集束され;対物レンズで測定されるレーザー強度は6 μWである。弾性散乱光及びスペクトル的に異なる蛍光は、同じ対物レンズを通して後方に集束され、HFT 458主ダイクロイックビームスプリッタを使用して分離される。発せられた光は、ピンホールを通過してシリコンアバランシェ発光ダイオード

50

検出器 (S P C M - A Q R - 1 X ; P e r k i n E l m e r , U S A) に入ることによって空間的に選別される。検出器の前方のピンホールサイズは、 $70\text{ }\mu\text{m}$ (1 A i r y) に設定した。

【 0 2 6 7 】

機器の較正：ローダミン 6 G (R h 6 G) の標準水溶液、 $10\sim 25\text{ nM}$ を機器の較正に使用する。この目的のために、時間的自己相関分析を適用した (「蛍光強度ゆらぎの時間的自己相関分析」に記載の通り) 。上記の通り T h T に使用したのと同じ光学設定を R h 6 G に使用し、一連の 10 回の連続測定においてシグナルを記録した (各測定は 10 s 持続) 。これら設定下で、R h 6 G の並進拡散時間は $\tau_{D, R h 6 G} = (24 \pm 2) \mu\text{s}$ ($n = 460$) であると求められ、1 分子あたり 1 秒あたりのカウント数 (C P M S) は $C P M S = (5.1 \pm 0.6) \text{ kHz}$ であり、構造パラメータは $S = 7$ であった (図 S 1) 。O V E サイズは、

10

【 0 2 6 8 】

【数 2】

$$V \approx 2.0 \times 10^{-16}$$

【 0 2 6 9 】

1 であると求められた。本発明者らの研究室で利用可能な個人的に改造した C o n f o r C o r 3 システムを使用して、F C S 測定を検証した (33) 。あるシステム又は他のシステムを使用して得られた測定のアウトカム間で有意な差は観察されなかった。

20

【 0 2 7 0 】

血清における測定：T h T 血清蛍光強度ゆらぎを、一連の 300 回の測定で記録し (各測定は 10 s 持続) 、合計 3000 s のランタイムを得た。すべての測定は、空調された室内において 20°C で実施した。下記の通りデータを評価した。

【 0 2 7 1 】

データ解析

O V E を通る T h T 反応性構造化アミロイド形成性ナノブランクの偶発的通過を反映している T h T 蛍光強度の稀なバーストを同定するために自動化単一事象計数分析を実施することにより、構造化アミロイド形成性ナノブランクが O V E を通過する頻度を求める。この目的のために、M a t l a b ソフトウェアを使用してプログラムを書いた。蛍光ピーク、すなわち「単一事象」は、全時系列の標準偏差 (S D) の 5 倍大きい値だけ全時系列の平均蛍光強度 $\langle F(t) \rangle$ と異なる蛍光強度の増加 $\Delta F(t)$ として定義される、 $\Delta F(t) = (F(t) - \langle F(t) \rangle) > 5 \times S D$ 。次いで、観察された蛍光ピーク数を全測定時間 (ここでは 3000 s) に対して正規化し、それによって得られた単一事象発生 ($f_{S E O}$) の頻度を s^{-1} で表し、サンプル間で比較する。

30

【 0 2 7 2 】

T h T 反応性構造化アミロイド形成性オリゴマー凝集体のサイズは、以下のように求める。全ての記録された時間トレースを時間的自己相関分析に供した。T h T 反応性構造化アミロイド形成性オリゴマー凝集体の通過が観察される時間トレースからは $t_{A C C}$ が得られたが、バックグラウンドシグナルしか含んでいなかった時間トレースは $t_{A C C}$ を全く示さなかったもので、更なる分析から除外した。次いで、全ての $t_{A C C}$ を同じ振幅に対して正規化し、 $\tau = 10\text{ }\mu\text{s}$ における $G(\tau) = 1$ 、患者群又は対照群の同じ群からの全ての $t_{A C C}$ を合わせて、それぞれ患者群及び対照群についての平均 $t_{A C C}$ を得た。次いで、 $t_{A C C}$ の特徴的な減衰時間の差からサイズの差を評価し、 $t_{A C C}$ の特徴的な減衰時間が長いほど、ナノブランクのサイズが大きい。

40

【 0 2 7 3 】

$f_{S E O}$ 及び T h T 反応性構造化アミロイド形成性オリゴマー凝集体のサイズを求めるための上記手順を、「 100 nm のフルオスフィアの希釈水懸濁液を使用するデータ解析の検証」に記載の通り、 100 nm のフルオスフィアの希釈水懸濁液を使用して検証した、図 S 2 及び S 3。これら対照実験は、提案されたアプローチを使用して拡散時間が正確

50

に求められること（図 S 2）、そして、校正曲線を用いて f_{SE0} から ThT 反応性構造化アミロイド形成性オリゴマー凝集体の濃度を評価できること（図 S 3）を確認する。

【0274】

時間分解 ThT 血清 F I F A を実施する研究者は、データ解析が完了するまで個々の診断について知らされなかった。同様に、診断は標準的な臨床試験を使用して確定され、時間分解 ThT 血清蛍光強度ゆらぎ分析の結果は、試験が完了し、コードが明らかになるまで、臨床家には知らされなかった。対照及び患者のコホートにおける平均 f_{SE0} 値が有意に異なるかどうかを評価するために、オンラインで利用可能な Graph Pad Software ツール (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm?Format=SD>) を使用して独立 t 検定分析を実施した。

10

【0275】

化学物質

全ての化学物質は、更に精製することなく使用し、以下の通り商業的供給元から購入した：ローダミン 6 G (Sigma - Aldrich)；チオフラビン T (Sigma - Aldrich)；カルボキシラート官能化量子ドット名のクリスタル、 $d = 20\text{ nm}$ 、 525 nm で発光極大 (Qdot (登録商標) 525 ITK (商標) Carboxyl Quantum Dots)、及び直径 $d = 100\text{ nm}$ の黄色 - 緑蛍光 (Ex/Em: $505/515$) カルボキシラート修飾ポリスチレンナノ/ミクロスフィア (FluoSpheres (登録商標) Size Kit #2) (Molecular Probes 製)。使用前に、フルオスフィア懸濁液を $30 \sim 60$ 分間超音波処理した。

20

【0276】

蛍光強度ゆらぎの時間的自己相関分析

時間的自己相関分析では、シグナル自己相似性分析を実施してデータにおける非ランダム性を検出し、そして、データがランダムではない場合には適切な時系列モデルを同定する。このプロセスの第 1 の工程として、いわゆる正規化強度自己相関関数 $G(\tau)$ を計算する：

【数 3】

$$G(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}, \quad (1)$$

30

【0277】

(式中、 $\langle F(t) \rangle$ は、全時系列にわたる平均蛍光強度であり； $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ は、時点 t で記録された蛍光強度のゆらぎであり； $\delta F(t+\tau) = F(t+\tau) - \langle F(t) \rangle$ は、後の時点 $t+\tau$ で記録された同じ時系列における蛍光強度のゆらぎであり； τ は、その間の時間差である)。

【0278】

次いで、正規化自己相関関数 $G(t)$ を、様々な時間差 τ の関数としてプロットして、自己相関曲線 ACC を得る。ランダムであるプロセスについては、全ての時間差値について

40

【0279】

【数 4】

$$G(t) \approx 1$$

【0280】

となる。ランダムではないプロセスについては、ACC は、 $\tau \rightarrow 0$ のときに $G(\tau)$ の最大限度値を有し、これは長い時間差では $G(\tau) = 1$ の値まで減少するが、このことは、蛍光シグナルの初期特性値とその時点の特性値との間の相関が失われていることを示す。蛍光分子の自由三次元 (3D) 並進拡散によって生じる蛍光強度ゆらぎの最も単純な場合

50

では、A C C は 1 つの特徴的な減衰時間を有し、これは、分子が O V E を通過するのにかかる平均時間を表す、すなわち、並進拡散時間 (τ_D) と等しい。 $t = 0$ における $G(t)$ の限度値は、O V E における平均分子数 (N) に反比例しており、従って、その濃度を表す (26、27)。

【 0 2 8 1 】

N 及び τ_D 値を抽出するために、理論的自己相関関数 ($A F_t$) を使用して実験的に得られた A C C をフィッティングさせる。例えば、サンプル中に 1 つの蛍光種が存在し、一重項状態と三重項状態との間の遷移が、観察された蛍光に影響を与える唯一の分子内プロセスである場合、A C C は、以下の $A F_t$ を使用して記載することができる：

【 数 5 】

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right) \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{S^2} \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}} \cdot \left[1 + \frac{T}{1-T} \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_D}\right)\right]. \quad (2)$$

【 0 2 8 2 】

式 (2) 中、 N は、O V E における分子の平均数であり； S は、構造パラメータとも呼ばれる空間パラメータであり、

【 数 6 】

$$S = \frac{\omega_z}{\omega_{xy}}$$

【 0 2 8 3 】

(式中、 ω_{xy} 及び ω_z は、それぞれ O V E の $1/e^2$ 放射方向及び軸方向半径であり； τ は、時間差であり； τ_D は、並進拡散時間であり； T は、三重項状態における分子の平均平衡画分であり、 τ_T は、項間交差及び三重項減衰についての速度定数に関連する三重項相関時間である。

【 0 2 8 4 】

O V E の空間的特性は、機器の較正測定において実験的に求められる。較正は、濃度及び並進拡散係数が既知である参照蛍光色素の標準溶液を使用して実施する。標準溶液について記録された実験的に導出される A C C に、全てのパラメータが自由に変動することができるように自己相関関数 (2) をフィッティングさせ、フィッティングによって N 、 τ_D 、 S^2 、 T 、及び τ_T の値を求める。参照色素についての並進拡散係数 D の既知の値及び τ_D の決定値を使用して、O V E の放射方向半径を以下から求めることができ：

【 数 7 】

$$\tau_D = \frac{\omega_{xy}^2}{4D}, \quad (3)$$

【 0 2 8 5 】

軸方向半径 ω_z は、構造パラメータ S^2 から求めることができる。全ての更なる測定について、構造パラメータ値は、較正測定において求められる値に固定される。

【 0 2 8 6 】

本発明者らによるシステムでは、水中 R h 6 G の標準溶液を機器の較正に使用した (図 S 1)。

【 0 2 8 7 】

1 0 0 n m のフルオスフィアの希釈水懸濁液を使用するデータ解析の検証

既知の濃度 $1 f M$ c $5 0 n M$ のフルオスフィア ($d = 1 0 0 n m$) の希釈水懸濁液を使用して拡散時間決定手順を検証し (図 S 2)、単一事象をカウントすることによって、すなわち単一事象発生 f_{SE0} の頻度を求めることによって濃度を検証した (図 S 3)

。

10

20

30

40

50

【0288】

血清における自己蛍光測定。

T h T を含まない血清を、得られた結果に対する確率的誤差の影響を評価するための対照として使用した（図 S 4）。分かる通り、T h T を含まない血清中でも時折蛍光強度ピークが検出されるが（薄灰色及び縞模様の薄灰色）、その平均発生頻度は T h T を含む血清よりも有意に低く（黒色及び濃灰色）；対照及び患者群においてこれらピークが発生する頻度に差はなく；標準偏差は平均よりも大きく、このことは、確率的誤差の平均値がゼロと有意には異なることを示唆している（図 S 4）。

【0289】

結果

血清自己蛍光及び血清 T h T 蛍光

血清は、様々なクラスの化学化合物の複雑な水性混合物であり、そのうち脂質（トリグリセリドの形態）及びタンパク質（アルブミン及び免疫グロブリン）が最も大量に存在する。血清を構成する化合物の多くは、天然に蛍光性であり、458 nm で光を吸収し、例えば、フラビン（F A D）及びピリジン性（N A D H）の補酵素及び脂肪色素である。結果として、血清は自己蛍光を示し、また、振幅 $A_{\text{血清}} = (0.003 \pm 0.002)$ 及び単一の特徴的な減衰時間 $\tau_{\text{血清}} = (55 \pm 15) \mu s$ の明確な t A C C を生じさせる（図 2 A、黒色）。これら実験データにフィッティングさせることができた最も単純な理論的モデルは、三重項なしの自由 3 D 拡散についての自己相関関数であった（27における A F 1）。R h 6 G を用いた機器の較正によって求められた値に固定した構造パラメータ、 $S_p = 5$ を保持すると、フィッティングによって導出されるパラメータ値は、 $N = 300$ 及び $\tau_D = 55 \mu s$ である。

【0290】

T h T を血清に添加すると、幾つかの重要な差が観察される。最も顕著には、t A C C の振幅が顕著に減少し（ $A_{T h T} = (0.0014 \pm 0.0007)$ ）、長い特徴的な減衰時間を有する 1 つ以上の成分の小さいが識別可能な寄与が観察される（図 2 A、灰色）。従って、これら実験データにフィッティングさせることができた最も単純な理論的モデルは、三重項なしの 2 成分の自由 3 D 拡散についての自己相関関数であった（27における A F 3）。ベストフィッティング自己相関関数から導出されるパラメータ値は、 $N = 750$ 、 $\tau_{D1} = 40 \mu s$ 、 $\tau_{D2} = 100 ms$ 、 $y_1 = 0.94$ 、及び $y_2 = 0.06$ である。構造パラメータは、較正実験で求めた値で固定した、 $S_p = 5$ 。フィッティングにより導出された第 1 の成分の特徴的な減衰時間 $\tau_{D1} = 40 \mu s$ は、T h T を含まない血清における特徴的な減衰時間 $\tau_D = 55 \mu s$ と非常に類似しており；同じ振幅に対して正規化された A C C が密接に重複することを示す実験的知見と一致している、 $\tau = 10 \mu s$ において $G(\tau) = 1$ （図 2 B）。

【0291】

T h T 添加時に O V E において観察可能な分子の平均数が増加することを示す A C C の振幅の減少は、T h T を添加しなければ視認できない T h T 反応性実体が視認できるようになることと一致している。C h a u h a n ら（34）及び G r i f f i n ら（35）によるバルク蛍光分光法によって、血清中の T h T 蛍光を詳細に特性評価した。浮選分画を使用して、G r i f f i n らは、血清中の T h T 反応性の約 94% が血清の非 a p o B 含有画分に関連していることを示すことができ、ベースライン T h T 血清蛍光に主に寄与するものとして水溶性血清アルブミンの糖化物及び他の化学付加物を同定した（35）。著しく長い拡散時間を有する第 2 の成分の出現が観察されたことは、非常に低レベルで存在する大きな T h T 反応性実体が可視化されること、ひいては、第 2 の成分の振幅は比較的小さいことと一致している。

【0292】

既に公開されている結果（34、35）に基づいて予測される通り、平均血清 T h T 蛍光強度は個体間で顕著なばらつきを示した（表 1）。しかし、バルク T h T 蛍光分光法による以前の所見とは対照的に、患者 $C R_p = (202 \pm 92) k H z$ と対照群 $C R_c =$

10

20

30

40

50

155 ± 43) kHz との間の平均カウント速度値は、両側 P 値 $P = 0.0126$ から明らかである通り、有意に異なっていた。

【0293】

ThT 蛍光強度におけるゆらぎの時間分解検出から、OVE を通る ThT 反応性アミロイド形成性構造化ナノブランクの通過が明らかになる

ThT 血清蛍光の時間分解検出から、時系列の標準偏差 (SD) よりも 5 倍よりも大きい値だけ平均蛍光強度と異なる蛍光強度に非常によく同定可能なピークが稀に発生することが明らかになる、 $(F(t) - \langle F(t) \rangle) > 5 \times SD$ (図 3)。既に示されている通り、本発明者らはこれらピークを「単一事象」と呼ぶ。

【0294】

これら突発が、電氣的妨害も OVE を通じた小さな気泡又は塵粒の偶発的通過も反映しておらず、ThT 反応性アミロイド形成性構造化ナノブランクの通過を反映していることを確認するために、ThT を含まない血清中で対照測定を実施した。分かる通り (「血清における自己蛍光測定」における図 S4)、ThT を添加する前にも時折蛍光強度ピークが検出されるが、その平均発生頻度は ThT を含む血清よりも有意に低く；対照及び患者のサンプルにおいてこれらピークが発生する頻度に差はなく；標準偏差は平均よりも大きく、このことは、確率的誤差の平均値がゼロと有意には異なることを示唆している。

【0295】

従って、本発明者らは、血清中の構造化ナノブランクの濃度の直接的尺度として、蛍光強度バーストの発生、すなわち単一事象の発生及び「単一事象発生の頻度」(f_{SEO}) と呼ばれるその出現頻度を提示する。

【0296】

AD 患者の血清中の単一事象発生の頻度は、見かけ上健常な対照の血清中よりも高い

材料及び方法に記載の通り計算した単一事象発生の頻度：データ解析の小区分は、患者群 $f_{SEOp} = (2.3 \pm 1.7) \times 10^{-3} s^{-1}$ と対照群 $f_{SEOc} = (1.5 \pm 1.2) \times 10^{-3} s^{-1}$ との間で異なる。独立 t 検定分析によって求められた両側 P 値、 $P = 0.0418$ は、患者群と対照群との間の単一事象発生頻度の差が統計的に有意であることを示唆している (図 4A)。コードを明らかにし、臨床診断に基づいて患者をサブグループに分類した後も、AD 患者 $f_{ADSEOp} = (2.5 \pm 1.5) \times 10^{-3} s^{-1}$ と対照群 $f_{SEOc} = (1.5 \pm 1.2) \times 10^{-3} s^{-1}$ との間の差は統計的に有意なままである、 $P = 0.0420$ (図 4B)。

【0297】

本発明者らによる分析は、単一事象発生の頻度が $(1.6 \pm 1.0) \times 10^{-5} s^{-1}$ 年⁻¹ の傾き及び $(9.4 \pm 0.6) \times 10^{-4} s^{-1}$ の切片で増加する (図 5、実線) ことから明らかである通り、構造化アミロイド形成性ナノブランクの血清濃度が加齢と共に若干増加すること示す。しかし、調整された R 二乗値 $R^2_{adj} = 0.032$ は、この相関が非常に弱いことを示す。実際のところ、同じデータセットは、傾きゼロの線形回帰でフィッティングさせることができ、切片が $(1.3 \pm 0.2) \times 10^{-3} s^{-1}$ であり、残差平方和 (RSS) の値は、ベストフィット線形回帰 $RSS_{1r} = 66.7$ よりも傾きゼロの線形回帰 $RSS_{z-s1r} = 30.2$ の方が低い。

【0298】

AD 患者の血清中の ThT 反応性アミロイド形成性構造化ナノブランクのサイズは、見かけ上健常な対照の血清中よりも大きい

材料及び方法：データ解析に記載の通り実施した時間的自己相関分析は、2 つの群について記録された tACC 間で特徴的な減衰時間の明らかな差を示し、患者群では減衰時間が顕著に長い (図 6)。正規化された tACC の評価は、分析される系が複雑であり、サイズが均一な粒子を含有するのではなく、非常に異なるサイズの粒子の混合物を含有することを示す。対照群における ThT 活性粒子の平均拡散時間は約 5 ms であり、患者群における粒子の平均拡散時間は約 15 ms であり、これは、球状分子の場合、2 つの群間の分子量の差が約 27 倍であることに相当する。明らかに、患者群は、より多数のナノブ

10

20

30

40

50

ークに加えて、血清中により大きなThT活性構造化凝集体を保有する。

【0299】

血清中の時間分解ThT蛍光強度ゆらぎ分析に対するCSFにおける臨床アウトプット

本発明者らは、血清における時間分解ThT F I F Aによって得られた結果を、アミロイドベータペプチドの42アミノ酸形態($A\beta_{42}$)のCSFレベル及びtauタンパク質の全CSFレベル($t\text{-Tau}$)を含む脳脊髄液(CSF)における確立されている生化学的バイオマーカーを使用して得られた結果と比較した。この比較は、時間分解ThT血清F I F Aによって得られた結果が、CSF生化学的分析によって得られた結果と明らかに一致することを示す(図7)。CSF中の $A\beta_{42}$ レベルに基づくAD診断についての一般的に許容されている限度は、 $< 550 \text{ ng l}^{-1}$ である(36)。図7に提示するデータに基づいて、本発明者らは、血清における $f_{SE0} > 1.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の限度がADの指標であることを示唆する。

10

【0300】

考察

アミロイド原線維及び構造化アミロイド形成性オリゴマーの存在下において、ThTは、遊離色素とは顕著に異なる蛍光励起及び発光スペクトルを取得する(図1、挿入図)(8~12)。この蛍光変化は、一般的に、ThTのアミロイド形成性構造との相互作用に特異的であると考えられ、ネイティブなタンパク質モノマー又は非晶質凝集体への結合時には誘導されない(6、7)。この特性に起因して、蛍光顕微鏡によって組織アミロイド沈着物を可視化するためにThTが広く使用されており(37~39)；ThT同族体は、陽電子放射断層撮影法(PET)及び単一光子放射断層撮影(SPECT)を使用するインビボイメージングのための基剤であり(40~42)；ThTは、インビトロにおける精製タンパク質及びペプチドからのアミロイド原線維形成の時系列をモニタリングするために、古典的なバルク蛍光分光法によるタンパク質凝集の基礎研究において不可欠である(5、43、44)。

20

【0301】

古典的バルクThT蛍光分光法は、 $A\beta$ 凝集体の動態の基礎研究にとって非常に重要であるが(43)、この方法も重大な制約を有している。最も顕著には、古典的なバルクThT蛍光分光法は、サンプル中に存在する全ての $A\beta$ 凝集体状態にわたってThT蛍光シグナルを平均化すること、及び典型的には約1~10sであるシグナル積分時間でThT蛍光強度を時間的に平均化することを含む。このような測定条件下では、稀なアミロイド形成性構造化凝集体から生じるシグナルの寄与が小さすぎて、バックグラウンドと区別することができない。従って、アミロイドの関与する疾患の生物医学的診断におけるバルクThT蛍光分光法の有用性は、限定されることが示されている(34、35)。

30

【0302】

バルクThT蛍光分光法とは対照的に、フェムトリットル以下のOVEにおけるThT蛍光強度ゆらぎの時間分解検出は、このような平均化を含まないので(5)、OVEを通るThT活性構造化アミロイド形成性凝集体の通過を正確に同定することができる(図3)。従って、本発明者らは、ThT血清蛍光強度ゆらぎの時間分解検出を使用する血清中の構造化アミロイド形成性凝集体の検出を初めて報告する。更に、本発明者らは、AD診断と、血清AD中でThT反応性構造化アミロイド形成性凝集体が生じる平均頻度との間に正の相関があることを証明する(図4及び7)。ADを発症するリスクのある個体を早期に同定するためのこの方法の能力はまだ確立されていないが、本発明者らの結果は、免疫ベースのプロープの使用にも放射性トレーサ、シグナル増幅、又はタンパク質分離技術の使用にも依存しない、単一分子感度を有するこの新規方法が、末梢血循環、CSF(図S5)だけでなく、唾液及び尿等の他のよりアクセスしやすい生体液中(それぞれ図S6、S7)でも構造的に修飾されたタンパク質を迅速かつコスト効率よく早期に決定するための低侵襲的試験を提供し得ることを明らかに示している。

40

【0303】

最も頻繁に使用される酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、デジタルELISA

50

、サンドイッチ E L I S A (4 5 、 4 6) サンドイッチ E L I S A (4 7) 等の方法、及び最近 A n d r e a s s o n ら (4 8) によって概説された関連する方法、及び免疫沈降 - 質量分析法 (I P - M S) (4 9) の結果を確認するために使用することができる免疫ベースのアッセイは、いずれも、抗体 - 抗原反応の特異性及び感度に関連する共通の固有の制約を有している (5 0 ~ 5 2) 。 A β 免疫ベースのアッセイの場合、幾つか例を挙げると、典型的には以下の困難さに遭遇する：過剰に存在するモノマー A β が、抗体の結合部位を占有する場合があります、それによって、A β オリゴマーの検出を妨げる (5 3) ； p 3 ペプチド及び A P P プロセシングの非アミロイド形成経路に由来する A β 異化ペプチドによる干渉が、結果の解釈に不確実性を与える場合がある (5 4) ；シグナル増幅及び検出用の物質が本質的に不安定であり、酵素の非存在下でさえもシグナルを生成する場合がある (4 8) 。ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) 、 2 D - P A G E 、液体クロマトグラフィー (L C) 、質量分析 (M S) 、マトリクス支援レーザー脱離イオン化 - 飛行時間型 (M A L D I - T O F) 質量分析法、エレクトロスプレーイオン化 (E S I) 質量分析法、液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析法 (L C - M S / M S) 、及び関連技術を使用するプロテオミクスアプローチは、高い感度及び特異性で対象となる分子を直接特性評価し、それによって、貴重な情報を提供する (5 5) 。しかし、ダイナミックレンジの制限から生体液等の複雑な混合物中の低含量のタンパク質を検出することが困難である、インタクトなより大きなタンパク質を測定することができない、及びサンプル調製手順が複雑であることからこれら技術は複雑である (5 6) 。結果として、プロテオミクス研究で発見された C S F バイオマーカーで、これまでに臨床に到達したものはない (5 7) 。

【 0 3 0 4 】

まとめると、C S F 及び血漿の生化学分析に臨床的に使用されている現在利用可能な免疫ベースの方法では、A D 患者の C S F 及び血漿中で A β 4 2 の濃度が低下することが示されることを強調したい (2 3 、 3 6 、 4 9 、 5 8 ~ 6 0) 。これは、K l a v e r ら (5 3) 及びその中に引用されている参考文献で論じられている通り、抗体は主としてモノマー A β ペプチドを認識するが、凝集によって A β ペプチドが免疫化学では認識されにくい状態になるという事実に起因している可能性が高い。対照的に、本発明者らの方法は、脳内にみられる原線維中に存在する実際のアミロイド状態に対応する血清中の T h T 活性状態を測定する。明らかに、図 7 に提示するデータから分かるように、2 種類の所見はいずれも患者の A D 病態と相関しているが、本発明者らの方法は、情報を引き出すために単純な血液検査に依存する。提案した方法の定量限界は、4 0 を超える A β モノマーを含む構造化凝集体について対抗の単一分子感度に到達する、他に類を見ないものである。更に、提案した方法では、病期 (早期対後期) の貴重な指標及び疾患進行の信頼性の高い予測因子となり得る構造化凝集体のサイズ分布を決定することも可能である。

【 0 3 0 5 】

実施例 2 : C S F における分析

添加剤を全く使用せずにポリプロピレンチューブ内において - 8 0 で保存した脳脊髄液 (C S F) アリコート 0 . 5 m l を使用した。サンプルを室温で 6 0 分間解凍した。その後、各ウェルに T h T 水溶液を 1 0 μ l 含有する 8 ウェルチャンバー付カバーガラスにアリコート 2 0 0 μ l を移した。数回分注 / 吸い込みを行うことによってサンプルを穏やかに混合し、分析に供した。分析はデュープリケートで実施した。

【 0 3 0 6 】

実施例 3 : 尿における分析

見かけ上健常なドナー由来の朝起きてすぐの中間尿試料を、尿保存剤を全く使用せずに滅菌容器に回収した。試料を室温で 6 0 分間沈降させた。その後、各ウェルに T h T 水溶液を 1 0 μ l 含有する 8 ウェルチャンバー付カバーガラスにアリコート 2 0 0 μ l を移した。数回分注 / 吸い込みを行うことによってサンプルを穏やかに混合し、分析に供した。分析はデュープリケートで実施した。

【 0 3 0 7 】

10

20

30

40

50

実施例 4 : : 唾液における分析

朝、朝食の 2 時間後、及び朝の衛生行動後に見かけ上健常なドナーから唾液サンプルを採取した。この時間中、ドナーは水しか摂取しなかった。サンプル採取の直前に脱イオン水で流すことによって口内をおおまかに清浄化した後、自然に流れる唾液 2 ml を受動的にサンプリングし（吸引なし）、氷浴に浸漬している滅菌容器に回収した。回収後、各ウェルに T h T 水溶液を 10 μ l 含有する 8 ウェルチャンバー付カバーガラスにアリコート 200 μ l を移した。数回分注 / 吸い込みを行うことによってサンプルを穏やかに混合し、15 分間加温にし、分析に供した。分析はデュープリケートで実施した。

【 0 3 0 8 】

参考文献

1. Prince, M., Comas - Herrera, A., Knapp, M., Guerchet, M., and Karagiannidou, M. (2016) World Alzheimer Report 2016. London, UK
2. (2017) Alzheimer's Disease Facts and Figures. in Alzheimer's & dementia, Alzheimer's Association.
3. Selkoe, D. J., and Hardy, J. (2016) EMBO molecular medicine 8, 595 - 608
4. Wallin, C., Luo, J., Jarvet, J., Warmlander, K. T. S., and Graslund, A. (2017 in press) Israel J. Chem. 57
5. Tiiman, A., Jarvet, J., Graslund, A., and Vukojevic, V. (2015) Biochemistry 54, 7203 - 7211
6. Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., and Takeda, T. (1989) Analytical biochemistry 177, 244 - 249
7. LeVine, H., 3rd. (1999) Methods in enzymology 309, 274 - 284
8. Biancalana, M., and Koide, S. (2010) Biochimica et biophysica acta 1804, 1405 - 1412
9. Wolfe, L. S., Calabrese, M. F., Nath, A., Blaho, D. V., Miranker, A. D., and Xiong, Y. (2010) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 16863 - 16868
10. Freire, S., de Araujo, M. H., Al - Soufi, W., and Novo, M. (2014) Dyes Pigment. 110, 97 - 105
11. Singh, P. K., Mora, A. K., and Nath, S. (2015) Chemical communications 51, 14042 - 14045
12. Kuznetsova, I. M., Sulatskaya, A. I., Maskevich, A. A., Uversky, V. N., and Turoverov, K. K. (2016) Analytical chemistry 88, 718 - 724
13. Oh, E. S., Troncoso, J. C., and Fangmark Tucker, S. M. (2008) Neuromolecular medicine 10, 195 - 207
14. Toledo, J. B., Shaw, L. M., and Trojanowski, J. Q. (2013) Alzheimer's research & therapy 5, 8

15. O'Bryant, S.E., Mielke, M.M., Rissman, R.A., Lista, S., Vanderstichele, H., Zetterberg, H., Lewczuk, P., Posner, H., Hall, J., Johnson, L., Fong, Y.L., Luthman, J., Jeromin, A., Batrla-Utermann, R., Villarreal, A., Britton, G., Snyder, P.J., Henriksen, K., Grammas, P., Gupta, V., Martins, R., Hampel, H., and Biofluid Based Biomarker Professional Interest, A. (2017) *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 13, 45 - 58 10
16. Blennow, K. (2017) *Neurology and therapy* 6, 15 - 24
17. Counts, S.E., Ikononovic, M.D., Mercado, N., Vega, I.E., and Mufson, E.J. (2017) *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 14, 35 - 53
18. DeMarshall, C.A., Nagele, E.P., Sarkar, A., Acharya, N.K., Godsey, G., Goldwaser, E.L., Kosciuk, M., Thayasivam, U., Han, M., Belinka, B., Nagele, R.G., and Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. (2016) *Alzheimer's & dementia* 3, 51 - 62 20
19. Wu, J., and Li, L. (2016) *Journal of biomedical research* 30, 361 - 372
20. Saint-Aubert, L., Lemoine, L., Chiotis, K., Leuzy, A., Rodriguez-Vieitez, E., and Nordberg, A. (2017) *Molecular neurodegeneration* 12, 19 30
21. Garibotto, V., Herholz, K., Boccardi, M., Picco, A., Varrone, A., Nordberg, A., Nobili, F., Ratib, O., and Geneva Task Force for the Roadmap of Alzheimer's, B. (2017) *Neurobiology of aging* 52, 183 - 195
22. Chiotis, K., Saint-Aubert, L., Boccardi, M., Gietl, A., Picco, A., Varrone, A., Garibotto, V., Herholz, K., Nobili, F., Nordberg, A., and Geneva Task Force for the Roadmap of Alzheimer's, B. (2017) *Neurobiology of aging* 52, 214 - 227 40
23. Andreasen, N., Sjogren, M., and Blennow, K. (2003) *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* 4, 147 - 155
24. Hu, W.T., Watts, K.D., Shaw, L.M., Howell, J.C., Trojanowski, J.Q., Basra, S., Glass, J.D., Lah, J.J., and Levey, A.I. (2015) *Annals of clinical and translational neurology* 2 50

, 131 - 139

25. Lewczuk, P., Lelental, N., Spitzer, P., M
aler, J. M., and Kornhuber, J. (2015) Journal
of Alzheimer's disease : JAD 43, 183 - 191

26. Elson, E. L. (2001) Traffic 2, 789 - 796

27. Vukojevic, V., Pramanik, A., Yakovleva,
T., Rigler, R., Terenius, L., and Bakalkin, G.
(2005) Cellular and molecular life scienc
es : CMLS 62, 535 - 550

28. Rigler, R. (2010) Biochemical and biop 10
hysical research communications 396, 170 -
175

29. Elson, E. L. (2011) Biophysical journal
101, 2855 - 2870

30. Elson, E. L. (2013) Methods in enzymolo
gy 518, 11 - 41

31. Rigler, R., and Widengren, J. (2017) Eur
opean biophysics journal : EBJ

32. Elson, E. L. (2017) Methods

33. Vukojevic, V., Heidkamp, M., Ming, Y., Jo 20
hansson, B., Terenius, L., and Rigler, R. (200
8) Proceedings of the National Academy of
Sciences of the United States of Americ
a 105, 18176 - 18181

34. Chauhan, A., Pirttila, T., Chauhan, V. P.
, Mehta, P., and Wisniewski, H. M. (1998) Journ
al of the neurological sciences 154, 159 -
163

35. Griffin, M. D., Wilson, L. M., Mok, Y. F., J 30
anuszewski, A. S., Wilson, A. M., Karschikus,
C. S., Romas, E., Lee, A. B., Godfrey, T., Wong, M
, Clemens, L., Jenkins, A. J., and Howlett, G.
J. (2010) Clinical biochemistry 43, 278 - 286

36. Tapiola, T., Alafuzoff, I., Herukka, S. K.
, Parkkinen, L., Hartikainen, P., Soininen, H
, and Pirttila, T. (2009) Archives of neuro
logy 66, 382 - 389

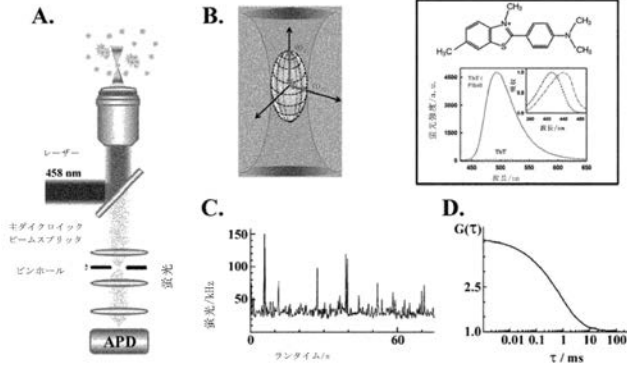
37. Sole-Domenech, S., Sjoval, P., Vukojev 40
ic, V., Fernando, R., Codita, A., Salve, S., Bog
danovic, N., Mohammed, A. H., Hammarstrom, P.,
Nilsson, K. P., LaFerla, F. M., Jacob, S., Bergg
ren, P. O., Gimenez-Llort, L., Schalling, M., T
erenius, L., and Johansson, B. (2013) Acta ne
uropathologica 125, 145 - 157

38. Horrocks, M. H., Lee, S. F., Gandhi, S., Ma
gdalinou, N. K., Chen, S. W., Devine, M. J., Tosa
tto, L., Kjaergaard, M., Beckwith, J. S., Zette
rberg, H., Iljina, M., Cremades, N., Dobson, C.
M., Wood, N. W., and Klenerman, D. (2016) ACS c
hemical neuroscience 7, 399 - 406 50

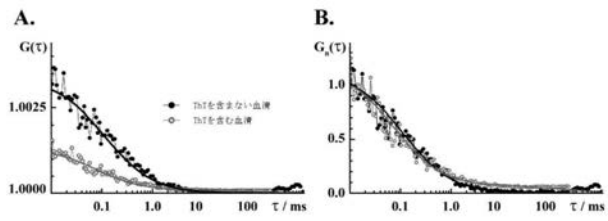
39. Groenning, M. (2010) Journal of chemical biology 3, 1 - 18
40. Mathis, C. A. , Mason, N. S. , Lopresti, B. J. , and Klunk, W. E. (2012) Seminars in nuclear medicine 42, 423 - 432
41. Svedberg, M. M. , Rahman, O. , and Hall, H. (2012) Nuclear medicine and biology 39, 484 - 501
42. Svedberg, M. M. , Hellstrom-Lindhahl, E. , Rahman, O. , and Hall, H. (2012) Amyloid Imaging PET Ligands as Biomarkers for Alzheimer's Disease, Preclinical Evaluation in Positron Emission Tomography - Current Clinical and Research Aspects (Hsieh, C. - H. ed. , InTech, Rijeka, Croatia 10
43. Cohen, S. I. , Linse, S. , Luheshi, L. M. , Hellstrand, E. , White, D. A. , Rajah, L. , Otzen, D. E. , Vendruscolo, M. , Dobson, C. M. , and Knowles, T. P. (2013) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 9758 - 9763 20
44. Lindgren, M. , and Hammarstrom, P. (2010) The FEBS journal 277, 1380 - 1388
45. Chang, L. , Rissin, D. M. , Fournier, D. R. , Piech, T. , Patel, P. P. , Wilson, D. H. , and Duffy, D. C. (2012) Journal of immunological methods 378, 102 - 115
46. Rissin, D. M. , Kan, C. W. , Campbell, T. G. , Howes, S. C. , Fournier, D. R. , Song, L. , Piech, T. , Patel, P. P. , Chang, L. , Rivnak, A. J. , Ferrell, E. P. , Randall, J. D. , Provuncher, G. K. , Walt, D. R. , and Duffy, D. C. (2010) Nature biotechnology 28, 595 - 599 30
47. Holtta, M. , Hansson, O. , Andreasson, U. , Hertze, J. , Minthon, L. , Nagga, K. , Andreasen, N. , Zetterberg, H. , and Blennow, K. (2013) PLoS one 8, e66381
48. Andreasson, U. , Blennow, K. , and Zetterberg, H. (2016) Alzheimer's & dementia 3, 98 - 102 40
49. Nakamura, A. , Kaneko, N. , Villemagne, V. L. , Kato, T. , Doecke, J. , Dore, V. , Fowler, C. , Li, Q. X. , Martins, R. , Rowe, C. , Tomita, T. , Matsuzaki, K. , Ishii, K. , Ishii, K. , Arahata, Y. , Iwamoto, S. , Ito, K. , Tanaka, K. , Masters, C. L. , and Yanagisawa, K. (2018) Nature 554, 249 - 254
50. Reverberi, R. , and Reverberi, L. (2007) Blood transfusion = Trasfusione del sangue 5, 227 - 240
51. Schiettecatte, J. , Anckaert, E. , and Sm 50

- itz, J. (2012) Interferences in Immunoassay s. in Advances in Immunoassay Technology (Chiu, N. H. L., and Christopoulos, T. K. eds.), InTech, Rijeka, Croatia
52. Saiki, H. (2012) Detection Curb. in Trends in Immunolabelled and Related Techniques (Abuelzein, E. ed., InTech, Rijeka, Croatia
53. Klaver, A. C., Patrias, L. M., Finke, J. M., and Loeffler, D. A. (2011) Journal of neuroscience methods 195, 249 - 254 10
54. Hunter, S., and Brayne, C. (2017) Journal of negative results in biomedicine 16, 1
55. Lundstrom, S. L., Zhang, B., Rutishauser, D., Aarsland, D., and Zubarev, R. A. (2017) Scientific reports 7, 41929
56. Hirsch, J., Hansen, K. C., Burlingame, A. L., and Matthay, M. A. (2004) American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology 287, L1 - 23 20
57. Portelius, E., Brinkmalm, G., Pannee, J., Zetterberg, H., Blennow, K., Dahlen, R., Brinkmalm, A., and Gobom, J. (2017) Expert review of proteomics 14, 1007 - 1020
58. Lin, Y. T., Cheng, J. T., Yao, Y. C., Juo, L. O., Y. K., Lin, C. H., Ger, L. P., and Lu, P. J. (2009) Journal of Alzheimer's disease : JAD 18, 907 - 918
59. Janelidze, S., Stomrud, E., Palmqvist, S., Zetterberg, H., van Westen, D., Jeromin, A., Song, L., Hanlon, D., Tan Hehir, C. A., Baker, D., Blennow, K., and Hansson, O. (2016) Scientific reports 6, 26801 30
60. Nitsch, R. M., Rebeck, G. W., Deng, M., Richardson, U. I., Tennis, M., Schenk, D. B., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., Wurtman, R. J., Hyman, B. T., and et al. (1995) Annals of neurology 37, 512 - 518
61. Vital M, Bronzi D, Krmpot AJ, Nikolic SN, Schmitt F-J, Junghans C, Tisa S, Friedrich T, Vukojevic V, Terenius L, Zappa F, Rigler R, A single-photon avalanche camera for fluorescence lifetime imaging microscopy and correlation spectroscopy. IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron. 2014 20:344 - 353 40
62. M J Levene, J Korlach, S W Turner, M F oquet, H G Craighead and W W Webb, Science vol. 299, No. 5607 (Jan. 31, 2003) pp. 682 - 686)

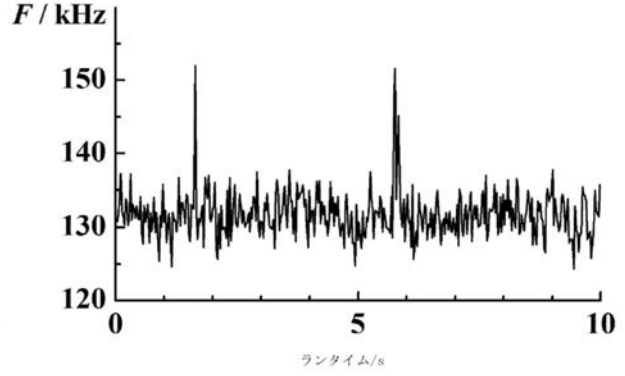
【図 1】



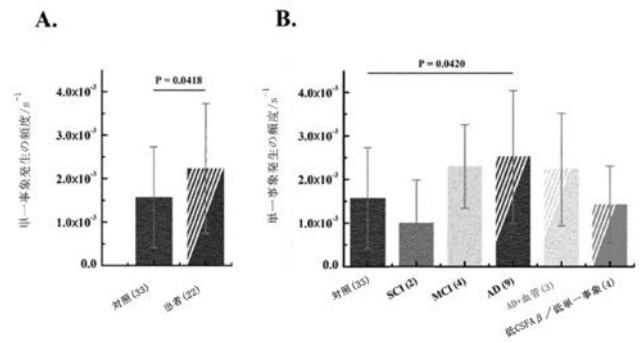
【図 2】



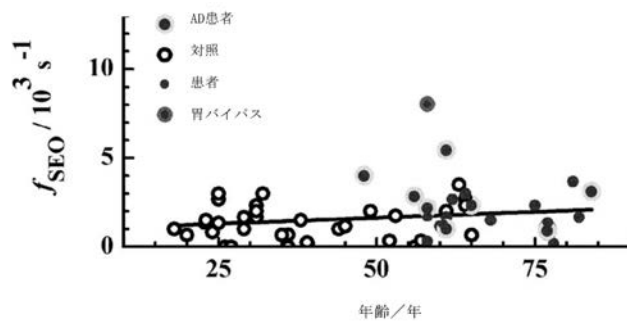
【図 3】



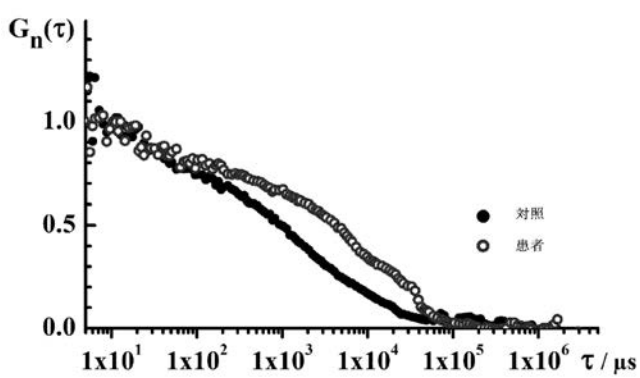
【図 4】



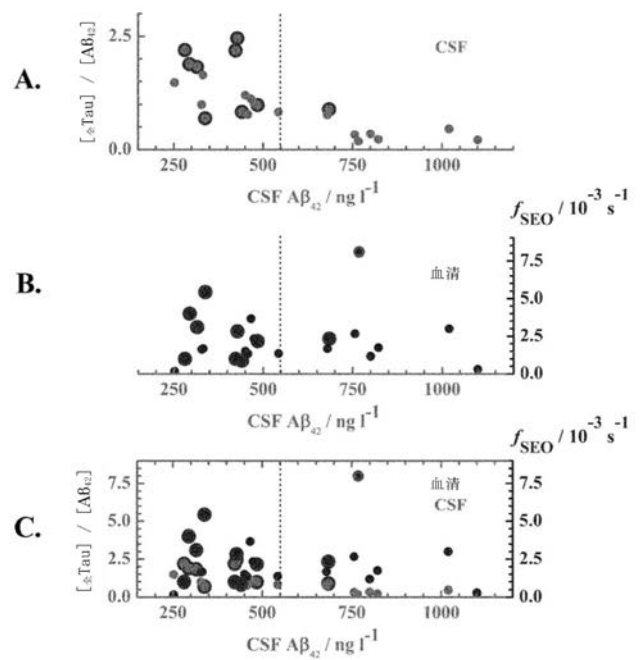
【図 5】



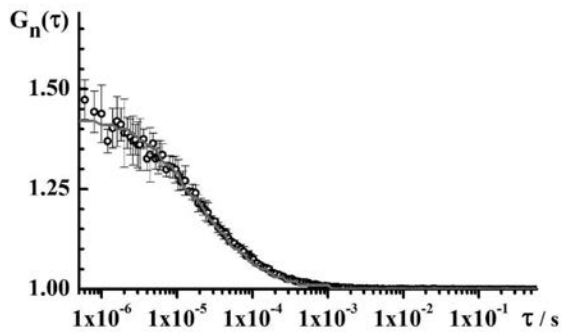
【図 6】



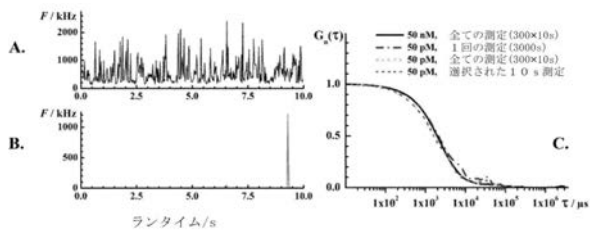
【図 7】



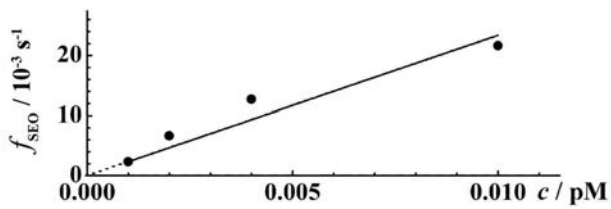
【図 8】



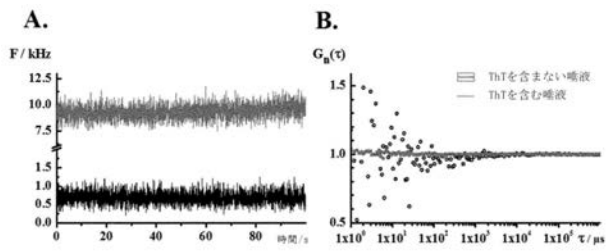
【図 9】



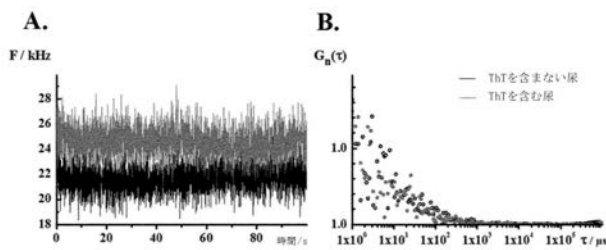
【図 10】



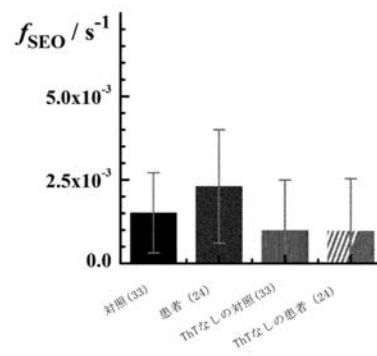
【図 13】



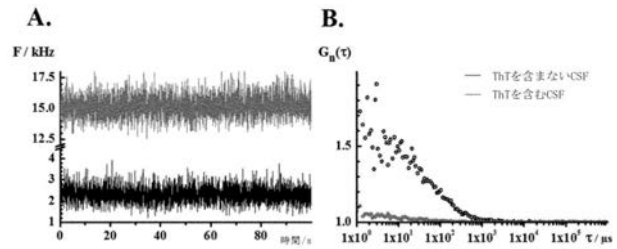
【図 14】



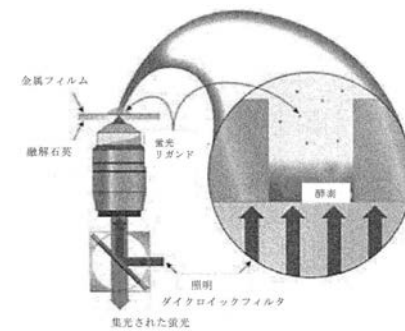
【図 11】



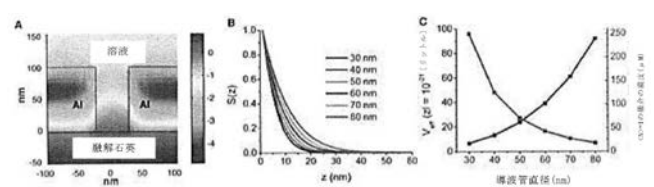
【図 12】



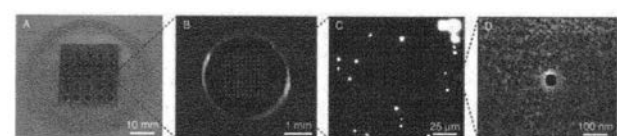
【図 15】



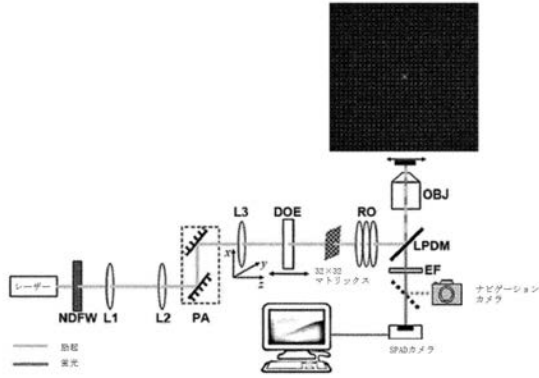
【図 16】



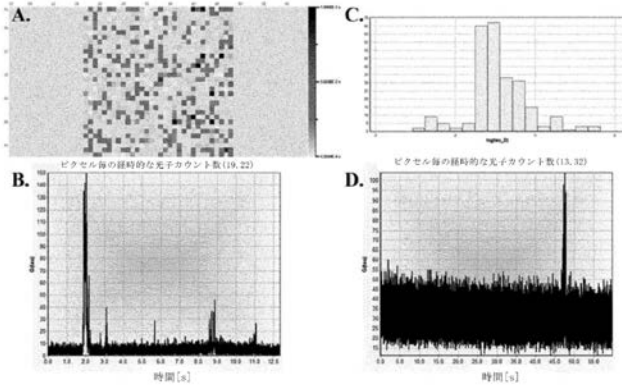
【図 17】



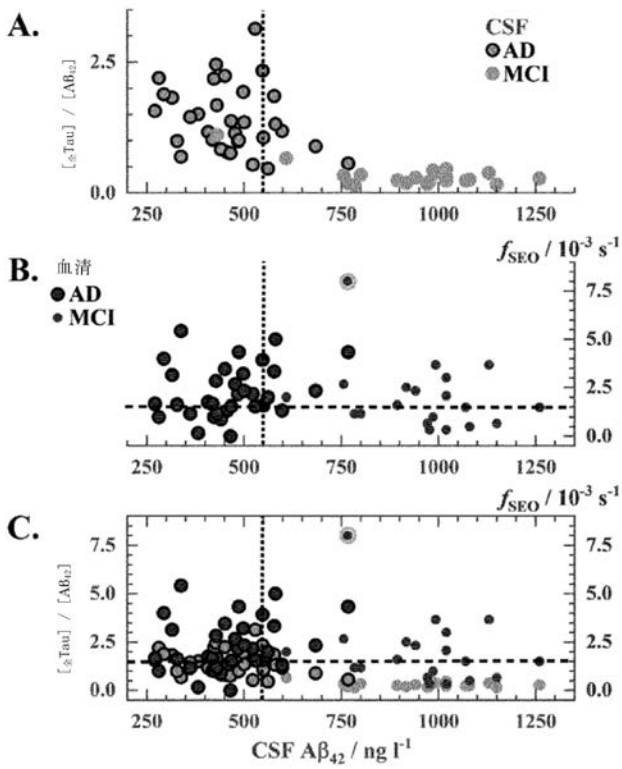
【図 18】



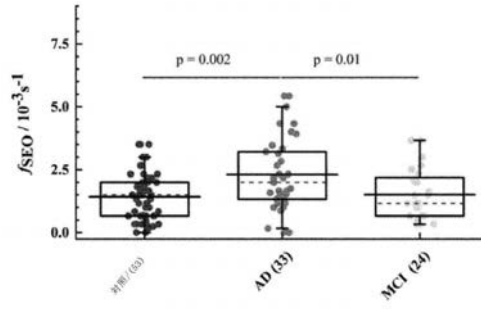
【図 19】



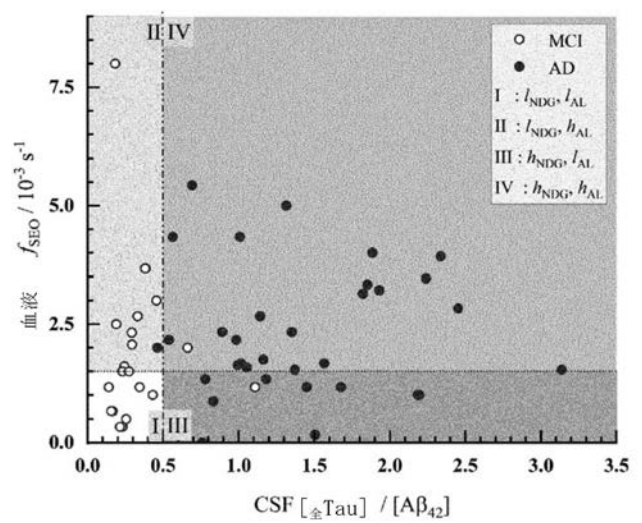
【図 21】



【図 20】



【図 22】



【手続補正書】

【提出日】令和2年2月3日(2020.2.3)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体におけるアミロイド関連疾患を診断及び／又は予後診断する方法であって、アミロイド関連疾患が個々のアミロイド凝集体に関連し、前記方法が、

- ・ 前記被験体由来の体液のサンプルを提供する工程と、
- ・ 前記サンプルに検出剤を添加し、前記検出剤が、個々のアミロイド凝集体と結合及び／又は会合及び／又は反応する工程と、
- ・ 前記サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；

を含み、

前記サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定が、蛍光相関分光法（FCS）及び蛍光強度ゆらぎ分析（FIFA）を含む時間分解検出に基づく分析を含み、前記方法が、個々のアミロイド凝集体の増幅を含まない、方法。

【請求項 2】

非標的アミロイドの分子／ペプチド／タンパク質／凝集体（アミロイド実体）を使用する必要がない、又は標的アミロイドの分子／ペプチド／タンパク質／凝集体と非標的アミロイドの分子／凝集体とを混合することを含む工程を含む必要がない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記体液が、血液、及び／又は脳脊髄液（CSF）、及び／又は唾液、及び／又は尿、及び／又は滑液、及び／又は糞便からなる群のうちの 1 つ以上である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記血液のサンプルが、全血、及び／又は血清、及び／又は血漿、及び／又は細胞溶解物、及び／又は赤血球、白血球、及び／又は血小板からなる群のうちの 1 つ以上である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記体液が、血漿及び／又は血清からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記体液が、血清から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

各被験体毎にアミロイドの分子／粒子／凝集体のサイズプロファイルを決定することができる、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記血液のサンプルが、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）酵素及び／若しくは FAD 脂肪色素；並びに／又はピリジン性（NADH）酵素及び／若しくは NADH 脂肪色素からなる群のうちの 1 つ以上を含まない、請求項 4 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記検出剤が、個々のアミロイド凝集体と結合及び／又は会合及び／又は反応したときに蛍光を発光する蛍光部分を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記検出剤が、チオフラビン T (ThT)、及び/又は ARCAM1、及び/又は五量体ホルミルチオフェン酢酸 (pFTAA)、及び/又は 4 - (ジシアノビニル) - ジュロリジン (DCVJ)、及び/又は 1 - アミノ - 8 - ナフタレンスルホナート (ANS)、及び/又はビス - ANS、及び/又は 2 - [N - ビス - (3 - ジメチルアミノプロピル) - アミノ] - 4 - [2, 3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1, 3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン] - 1 - フェニル - キノリニウム (PicoGreen) からなる群のうちの 1 つ以上である、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記個々のアミロイド凝集体が、アミロイドオリゴマー；アミロイドナノ凝集体；及び/又はアミロイド老人性凝集体；及び/又はアミロイド原線維；及び/又はアミロイド前原線維を含む群から選択される、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記個々のアミロイド凝集体が、約 20 以上のペプチド；例えば：約 30 以上；約 40 以上；約 50 以上；約 60 以上；約 70 以上；約 80 以上；約 90 以上；又は約 100 以上のペプチド、好ましくは、約 40 以上のペプチドを含む、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記アミロイドナノ凝集体が、約 20 のタンパク質又はペプチド ~ 100, 000 のタンパク質又はペプチドを含む、請求項 11 又は 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記老人性アミロイド凝集体が、1, 000, 000 超のタンパク質又はペプチドを含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

個々のアミロイド凝集体が、1 枚以上のベータ (β) シートを含み、前記検出剤が、1 枚以上のベータ (β) シートを含む個々のアミロイド凝集体と結合及び/又は会合及び/又は反応する、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記アミロイド関連疾患が、アルツハイマー病；及び/又はパーキンソン病；及び/又はハンチントン病；及び/又は筋萎縮性側索硬化症 (ALS)；及び/又は 2 型糖尿病；及び/又は全身性アミロイドーシス；及び/又はプリオン病 (例えば、クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD))；及び/又はアミロイド軽鎖アミロイドーシス；及び/又は多発性骨髄腫；及び/又は炎症；及び/又は腎不全；及び/又は白血球走化性因子 2 (LECT2) アミロイドーシス；及び/又は多発ニューロパシーを伴うトランスサイレチン関連遺伝性アミロイドーシス (家族性アミロイド多発ニューロパシー (FAP) 又は Skelleftesjukandとしても知られている)；及び/又は血液透析関連アミロイドーシス；及び/又は脳アミロイドアンギオパシー；及び/又は家族性内蔵アミロイドーシス；及び/又は原発性皮膚アミロイドーシス；及び/又は脳アミロイドアンギオパシー；及び/又はプロラクチノーマ；及び/又は家族性角膜アミロイドーシス；及び/又は心房の老人性アミロイド；及び/又は甲状腺髄様がん；及び/又は医薬品インスリン誘発性アミロイドーシスを含む群から選択される 1 つ以上である、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記アルツハイマー病が、主観的認知障害；軽度認知障害；アルツハイマー病；及び血管性認知症を伴うアルツハイマー病を含む群から選択される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記アミロイド関連疾患が、アルツハイマー病であり、前記個々のアミロイド凝集体が、アミロイドベータ (β) ペプチド (β ペプチド)、例えば、β 40 及び/又は β 42 及び/又は β 43 を含む、請求項 16 又は 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定が、個々のアミロイド凝集体分解能において行われる、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記サンプル中の前記個々のアミロイド凝集体の存在及び／若しくは量及び／若しくは濃度が、対照サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／若しくは量及び／若しくは濃度よりも多い場合；並びに／又は

前記サンプル中の前記個々のアミロイド凝集体のサイズが、対照サンプル中の個々のアミロイド凝集体のサイズよりも大きい場合、前記アミロイド関連疾患の診断及び／又は予後診断が提供される、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

被験体におけるアミロイド関連疾患を治療する方法であって、アミロイド関連疾患が個々のアミロイド凝集体に関連し、

前記方法が、

- ・ 前記被験体由来の体液のサンプルを提供する工程と、
- ・ 前記サンプルに検出剤を添加し、前記検出剤が、個々のアミロイド凝集体と結合及び／又は会合及び／又は反応する工程と、

- ・ 前記サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と、

- ・ 前記決定に基づいて、前記被験体を前記アミロイド関連疾患を有すると同定する工程と；

を含み、

前記サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定が、蛍光相関分光法（FCS）及び蛍光強度ゆらぎ分析（FIFA）を含む時間分解検出に基づく分析を含み、前記方法が、個々のアミロイド凝集体の増幅を含まない、方法。

【請求項 22】

前記治療が、前記アミロイド関連疾患の治療を前記被験体に施すことを含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

アミロイド関連疾患を治療するための剤を同定する方法であって、

- ・ 試験被験体由来の体液の第 1 のサンプルを提供する工程と；
- ・ 前記第 1 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；

- ・ 剤を前記被験体に投与する工程と；

- ・ 前記試験被験体由来の体液の第 2 のサンプルを提供する工程と；

- ・ 前記第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズを決定する工程と；

- ・ 前記第 1 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定を、前記第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定と比較する工程と；

- ・ 前記比較に基づいて、前記剤を前記アミロイド関連疾患を治療するためのものと同定する工程と；

を含み、アミロイド関連疾患が個々のアミロイド凝集体に関連し、前記方法が、前記サンプルに検出剤を添加し、前記検出剤が個々のアミロイド凝集体と結合及び／又は会合及び／又は反応することを更に含み、前記サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び／又は量及び／又は濃度及び／又はサイズの決定が、蛍光相関分光法（FCS）及び蛍光強度ゆらぎ分析（FIFA）を含む時間分解検出に基づく分析を含み、前記方法が、個々のアミロイド凝集体の増幅を含まない、方法。

【請求項 24】

アミロイド関連疾患を治療するための剤を同定する方法であって、

- ・ 試験流体由来の第 1 のサンプルを提供する工程と；
- ・ 前記第 1 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズを決定する工程と；
- ・ 剤を前記試験流体に投与する工程と；
- ・ 前記試験流体由来の第 2 のサンプルを提供する工程と；
- ・ 前記第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズを決定する工程と；
- ・ 前記第 1 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズの決定を、前記第 2 のサンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズの決定と比較する工程と；
- ・ 前記比較に基づいて、前記剤を前記アミロイド関連疾患を治療するためのものと同定する工程と；

を含み、

アミロイド関連疾患が個々のアミロイド凝集体に関連し、前記方法が、前記サンプルに検出剤を添加し、前記検出剤が個々のアミロイド凝集体と結合及び / 又は会合及び / 又は反応することを更に含み、前記サンプル中の個々のアミロイド凝集体の存在及び / 又は量及び / 又は濃度及び / 又はサイズの決定が、蛍光相関分光法 (F C S) 及び蛍光強度ゆらぎ分析 (F I F A) に基づく分析を含み、前記方法が、個々のアミロイド凝集体の増幅を含まない、方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/058206

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/50 G01N33/68
ADD.

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)

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ANN TIIMAN ET AL: "Heterogeneity and Turnover of Intermediates during Amyloid-[beta] (A[beta]) Peptide Aggregation Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy", BIOCHEMISTRY, vol. 54, no. 49, 3 December 2015 (2015-12-03), pages 7203-7211, XP055584465, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00976 cited in the application the whole document ----- -/--	1-52

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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

"E" earlier application or patent 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

2 May 2019

Date of mailing of the international search report

17/05/2019

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Hinchliffe, Philippe

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/058206

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PITSCHKE M ET AL: "DETECTION OF SINGLE AMYLOID BETA-PROTEIN AGGREGATES IN THE CEREBROSPINAL FLUID OF ALZHEIMER'S PATIENTS BY FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY", NATURE MEDICINE, NATURE PUB. CO, NEW YORK, vol. 4, no. 7, 1 July 1998 (1998-07-01), pages 832-834, XP001073409, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/NM0798-832 see discussion and methods all on column 1 of p.834 -----	1-52
X	US 2016/077110 A1 (JARA CLAUDIO SOTO [US] ET AL) 17 March 2016 (2016-03-17) paragraph [0006] -----	1-52
X	WO 2008/030973 A2 (UNIV TEXAS [US]; ESTRADA LISBELL [US]; SOTO CLAUDIO [US]) 13 March 2008 (2008-03-13) page 12; claims 24,30 -----	1-52

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/058206

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2016077110 A1	17-03-2016	US 2016077110 A1	17-03-2016
		WO 2016040903 A1	17-03-2016

WO 2008030973 A2	13-03-2008	CA 2662863 A1	13-03-2008
		EP 2074222 A2	01-07-2009
		US 2008118938 A1	22-05-2008
		WO 2008030973 A2	13-03-2008

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 P 25/28 (2006.01) A 6 1 P 25/28
A 6 1 K 45/00 (2006.01) A 6 1 K 45/00

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

(特許庁注 : 以下のものは登録商標)

1 . T R I T O N

2 . M A T L A B

(74) 代理人 100137729

弁理士 赤井 厚子

(74) 代理人 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72) 発明者 ヴコイエヴィク、ヴラダナ

スウェーデン国、 1 7 2 3 7 スンドビュベリ、ロドプリンケン 1 エー

(72) 発明者 グラスルンド、アストリッド

スウェーデン国、 1 9 1 4 4 ソレントウーナ、セーデルヴェーゲン 5

(72) 発明者 ヤーヴェト、ユリ

スウェーデン国、 1 7 4 4 5 スンドビュベリ、パリショイデン 6 2

(72) 発明者 ティイマン、アン

スウェーデン国、 1 7 1 6 2 ソルナ、ヨアン エンバーグス ヴァグ 7

(72) 発明者 リグラー、ルドルフ

スウェーデン国、 1 8 2 6 0 ユルスホルム、スヴェアヴェーゲン 1 0 ベー

(72) 発明者 テレニウス、ラース

スウェーデン国、 7 5 3 1 2 ウブサラ、キルコガーズガタン 2 9 アー

(72) 発明者 ワームランダー、セバスチャン

スウェーデン国、 1 1 8 4 7 ストックホルム、クヴァルンガタン 1 0 ベー

F ターム (参考) 2G043 AA01 BA16 EA01 FA03 LA01 NA01

2G045 AA02 AA13 AA16 AA22 AA24 AA25 AA40 CA02 CA11 CA24

CA25 CA26 CB01 CB03 CB04 CB07 DA36 DA80 FA12 FA14

FA16 FA19 FA23 FA26 FA27 FA37 FB01 FB02 FB03 FB12

FB13 GC15 JA01 JA07

4C084 AA17 AA30 NA20 ZA161 ZA162