

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6129868号  
(P6129868)

(45) 発行日 平成29年5月17日 (2017.5.17)

(24) 登録日 平成29年4月21日 (2017.4.21)

|                        |                    |
|------------------------|--------------------|
| (51) Int. Cl.          | F I                |
| GO 1 N 33/68 (2006.01) | GO 1 N 33/68       |
| GO 1 N 33/58 (2006.01) | GO 1 N 33/58 Z     |
| GO 1 N 27/62 (2006.01) | GO 1 N 27/62 Z NAV |

請求項の数 18 (全 34 頁)

|               |                               |           |   |
|---------------|-------------------------------|-----------|---|
| (21) 出願番号     | 特願2014-548837 (P2014-548837)  | (73) 特許権者 | 597025806<br>ワシントン・ユニバーシティ<br>Washington University<br>アメリカ合衆国63130ミズーリ州セント・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ |
| (86) (22) 出願日 | 平成24年12月19日 (2012.12.19)      | (74) 代理人  | 100081422<br>弁理士 田中 光雄  |
| (65) 公表番号     | 特表2015-505365 (P2015-505365A) | (74) 代理人  | 100084146<br>弁理士 山崎 宏   |
| (43) 公表日      | 平成27年2月19日 (2015.2.19)        | (74) 代理人  | 100122301<br>弁理士 富田 憲史  |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2012/070623             |           |   |
| (87) 国際公開番号   | W02013/096451                 |           |   |
| (87) 国際公開日    | 平成25年6月27日 (2013.6.27)        |           |   |
| 審査請求日         | 平成27年8月31日 (2015.8.31)        |           |   |
| (31) 優先権主張番号  | 61/577, 439                   |           |   |
| (32) 優先日      | 平成23年12月19日 (2011.12.19)      |           |   |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           |   |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病を診断するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A アミロイドーシスを検出するためのインビトロ方法であって、対象から得られた脳脊髄液 (CSF) 試料または血液試料の A 42 および少なくとも一つの他の A 変異体のインビボ相対ラベリングを測定することと、A 42 変異体の相対ラベリングの、他の A 変異体の相対ラベリングに対する比を算出することとを含み、1以外の比が A アミロイドーシスの存在を示すものである、方法。

【請求項 2】

各々の A 変異体の相対ラベリングが、  
(a) 標識アミノ酸投与後の対象から得られた CSF 試料または血液試料の標識 A 変異体の量および非標識 A 変異体の量を検出および質量分析により定量すること、および  
(b) 標識 A 変異体の非標識 A 変異体に対する比を算出すること、  
によって測定され、標識 A 変異体の非標識 A 変異体に対する比が、対象における該 A 変異体の相対ラベリングを表す、請求項 1 に記載のインビトロ方法。

【請求項 3】

試料が CSF 試料である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

各々の A 変異体の相対ラベリングが、標識成分投与開始後 10 時間で得られた CSF 試料から測定され、A 42 変異体の他の A 変異体に対する相対ラベリングの比が 1 より大きいことが、A アミロイドーシスの存在を示すものである、請求項 3 に記載の方法

。

## 【請求項 5】

A 42の他のA 変異体に対する相対ラベリングの比が、1.1以上であることが、A アミロイドーシスの存在を示す、請求項4に記載の方法。

## 【請求項 6】

各々のA 変異体の相対ラベリングが、標識成分投与開始後27時間で得られたCSF試料から測定され、A 42変異体の他のA 変異体に対する相対ラベリングの比が1より大きいことが、A アミロイドーシスの存在を示すものである、請求項3に記載の方法

。

## 【請求項 7】

試料が、血液試料である、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 8】

標識が、 $^2\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{33}\text{S}$ 、 $^{34}\text{S}$ 、および $^{36}\text{S}$ からなる群より選択される非放射性同位体である、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 9】

アミノ酸がロイシンであり、非放射性同位体が $^{13}\text{C}$ である、請求項8に記載の方法。

## 【請求項 10】

CSF試料または血液試料から標識タンパク質画分および非標識タンパク質画分を精製することをさらに含む、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 11】

タンパク質が免疫沈降によって分離される、請求項10に記載の方法。

## 【請求項 12】

対象がヒトである、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 13】

標識アミノ酸が、 $^{13}\text{C}_6$ -ロイシンまたは $^{13}\text{C}_6$ -フェニルアラニンである、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 14】

生産相またはクリアランス相の間の1以外の比が、A アミロイドーシスの存在を示すものである、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 15】

生産相の間の1.04以上の比が、A アミロイドーシスの存在を示すものである、請求項14に記載の方法。

## 【請求項 16】

クリアランス相の間の0.9以下の比が、A アミロイドーシスの存在を示すものである、請求項14に記載の方法。

## 【請求項 17】

各々のA 変異体の相対ラベリングが、標識成分投与開始後6、7、8、9または10時間で得られたCSF試料から測定され、A 42の他のA 変異体に対する相対ラベリングの比が1.2以上であることが、A アミロイドーシスの存在を示すものである、請求項3に記載の方法。

## 【請求項 18】

各々のA 変異体の相対ラベリングが、標識成分投与開始後23、24、25、26、27、28、29、30または31時間で得られた血液試料から測定され、A 42の他のA 変異体に対する相対ラベリングの比が0.9以下であることが、A アミロイドーシスの存在を示すものである、請求項7に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

政府の権利

本発明は、米国国立衛生研究所によって付与されたR-01-NS065667の下に

10

20

30

40

50

、政府の支援を受けてなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【0002】

発明の分野

本発明はA アミロイドーシスの診断方法および処置方法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

アルツハイマー病(AD)は認知症の最も一般的な原因であり、公衆衛生上も問題が大きくなりつつある。この疾患は、現在、米国では500万人を苦しめていると推定され、2050年には1300万人まで増加すると予測されている(Herbert et al. 2001, Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 15(4): 169-173)。ADは、他の中枢神経系(CNS)変性疾患と同様、タンパク質の生産、蓄積およびクリアランスの障害を特徴とする。ADでは、タンパク質・アミロイド-(A)の代謝調節不全が、疾患を持つ患者の脳にこのタンパク質が大量に集積すること、すなわちA アミロイドーシスによって示される。ADは、記憶、認知機能、そして最終的には自立性の喪失につながる。この疾患は、患者とその家族に、重い個人的および経済的負担を強いる。この疾患は重症であり、人口に占める有病率が増加しつつあることから、より良い処置を開発することは、喫緊の課題である。

【0004】

現在、症状を修飾する薬物治療がいくつか存在するが、疾患修飾的処置は存在しない。疾患修飾的処置は、おそらく、永久的な脳損傷が発生する前に施行されると、最も有効であるだろう。しかし、ADの臨床診断がなされる時点までに、既に広範なニューロン喪失が起こっている(Price et al. 2001, Arch. Neurol. 58(9): 1395-1402)。ADを発症するリスクのある個体を臨床症状が発生する前に診断する手段や、疾患の発生を防止またはその進行を遅らせる処置の効果を効果的に測定する手段は、現在のところ存在しない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

それゆえに、ADを発症するリスクのある人々を同定する方法が必要とされている。早期の同定と、A 生成を標的とする薬物の効果を測定する能力とは、ADの発生を防止しまたは遅延させ、薬物開発の努力を強化するのに、最も役立つであろう。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】6人の参加者に関して48時間にわたる血中の標識A (labeled A)パーセントを示すグラフである。9時間までにプラトーへの迅速な上昇が起こり、迅速なクリアランス速度を伴うことに注目されたい。

【0007】

【図2】6人の参加者に関して36時間にわたる血中の標識Aパーセント(青い丸)および12人の参加者におけるCSF中の標識Aパーセント(赤い四角)を示すグラフである。

【0008】

【図3】血液A動態がCNS A標識動態よりも速いことを示すグラフである。9時間にわたる静脈内ラベリング(labelling)の間およびその後、AD参加者から血液試料およびCSF試料を収集した。血漿Aラベリングは1時間以内に増加し、一方、CSF Aラベリングは5時間まで増加しなかった。高齢の参加者では、血液Aの半減期が2.1時間であり、CNS Aの半減期は11.6時間である。

【0009】

【図4】静脈内ラベリングの間およびその後の血液A動態を示す図である。A.9時間の静脈内ラベリングの間およびその後の、AD参加者および対照からの血液試料。ラベリ

10

20

30

40

50

ング相の間およびその後、AD群は最初の15時間にわたって標識Aを増加させた。BおよびC、標準化標識血漿A。標識血漿Aを各時間ごとに標識血漿ロイシンで標準化した(4Bには0~9時間を図示し、4Cには10~15時間を図示している)。ADでは対照と比較して、標準化標識Aの増加が、5時間から15時間まで認められる。

【0010】

【図5】経口ラベリング後の血中のA動態を示す図である。時刻ゼロに、単回経口量の標識ロイシンを、参加者に与えた。血液試料を48時間にわたって1時間毎に収集した。血漿標識Aを測定した。動態曲線を示す。その後の用量漸増経口ラベリング試験により、血漿Aは低用量の経口標識ロイシンで十分に標識できることが明らかになった。比較のために標識CSF A曲線を示す。著しく速い血液Aの半減期と、その後の二次的なクリアランス効果を測定するために取得された長時間にわたる時間経過とに注目されたい。

10

【0011】

【図6】Aトータル(A total)、A42、A40、およびA38変異体の経時的定量を示すグラフである。ADでは、特定A変異体の動態(例えばA42)が改変されうるので、標識A変異体の高感度かつ特異的な測定が可能になるように、新規な方法を開発した。パルス経口標識血漿試料からA変異体を免疫沈降させ、動態解析のために定量した(A)。標識A42が(認知機能が正常なこの参加者では)他のA変異体と比較して増大したピークと、より速いクリアランス(半減期約1時間)とを保持していたことに注目されたい。A変異体を定常状態IV標識CSF試料から同様に加工し、動態解析のために定量した(B)。認知機能が正常なこのPET PiB陰性参加者のCSFにおける、類似する代謝作用に注目されたい。

20

【0012】

【図7】12人のAD参加者(赤い三角)および12人の対照(青い丸)のCNSにおけるA動態を示す図である。標識A42および標識A40の量を測定し、群間で比較することで、両A種の生産速度およびクリアランス速度を測定した。エラーバーはSEMを示す。(A)標準化標識A42生産相。(B)A42クリアランス相。(C)標準化標識A40生産相。(D)A40クリアランス相。(E)A42およびA40の分率合成速度(fractional synthesis rate)。(F)A42およびA40の分率クリアランス速度。

30

【0013】

【図8】ADおよび対照におけるA生産のクリアランスに対する比をグラフで表した図である。A42生産速度のクリアランス速度に対する比は対照ではバランスがとれているが(0.95)、ADの人々では高い(1.35)。同様に、A40の生産対クリアランス比も、対照(0.99)と比較して、ADでは増加している(1.37)。平均±標準偏差がプロットされている(p<0.05 ANOVA)。

【0014】

【図9】平均CSF(A)およびA40(B)濃度をグラフで表した図である。予想どおり、CSF A42濃度はAD群では対照群より低かった(p<0.05)。平均±標準偏差がプロットされている。

40

【0015】

【図10】12人のAD参加者(赤い三角)および12人の対照(青い丸)のCNSにおける平均A動態の全時間経過をグラフで表した図である。平均ロイシン標準化標識A42(A)および平均ロイシン標準化標識A40(B)の時間経過を1~18時間について示す。A42(C)およびA40(D)の標識対非標識比の自然対数(ln)プロットを18~36時間について示す。

【0016】

【図11】 $^{13}\text{C}_6\text{-Leu} / ^{12}\text{C}_6\text{-Leu}$ のH:L比を経時的にプロットした2つのグラフである。(A)PIBでアミロイド沈着を持たない正常な人からの試料、および(B)アミロイド沈着陽性であるAD個体からの試料。

50

【0017】

【図12】50人のAD患者における ${}^1{}^3\text{C}_6\text{-Leu}/{}^1{}^2\text{C}_6\text{-Leu}$ のA<sub>42</sub>:A<sub>40</sub>H:L比を、経時的にプロットしたグラフである。

【0018】

【図13】10時間における ${}^1{}^3\text{C}_6\text{-Leu}/{}^1{}^2\text{C}_6\text{-Leu}$ のA<sub>42</sub>:A<sub>40</sub>H:L比の相対ラベリングを示すプロットである。

【0019】

【図14】さまざまなA<sub>42</sub>アイソフォームの相対ラベリング、 ${}^1{}^3\text{C}_6\text{-Leu}/{}^1{}^2\text{C}_6\text{-Leu}$ のH:L比を経時的に示すプロットである。

【0020】

【図15】動態トレーサー曲線の後端の中央部付近における同位体濃縮の比較によって、PIB群を著しく有意に識別できることを示す3つのグラフである。図15Aは、y軸上にグラフ化した23時間におけるA<sub>42</sub>標識パーセント/A<sub>40</sub>標識パーセントの比と、x軸上にグラフ化したPIB染色とを示す。0.9の閾比を破線で示す。図15Bは、y軸上にグラフ化した23時間および24時間におけるA<sub>42</sub>標識パーセント/A<sub>40</sub>標識パーセントの比の平均と、x軸上にグラフ化したPIB染色とを示す。0.9の閾比を破線で示す。図15Cは、 $k_{ex42}$ の10倍をA<sub>42</sub>とA<sub>40</sub>との不可逆的喪失に関する速度定数の比に加えた算出値( $10 \times k_{ex42} + \text{FTR}$ 比)を、PIB染色の関数としてプロットしたものを示す。1.75の閾比を破線で示す。MC+ = PETでPIB陽性であったPSEN1またはPSEN2変異を持つ患者；MC- = PETでPIB陰性であったPSEN1またはPSEN2変異を持つ患者；NC = ノンキャリア変異キャリア同胞対照。

【発明を実施するための形態】

【0021】

好ましい実施形態の詳細な説明

対象におけるA<sub>42</sub>アミロイドーシスを診断し、またはその進行もしくは処置をモニタリングする方法を開発した。本発明は、臨床的疾患の過程において早期になされる、またはADを発症するリスクのある患者で脳損傷および臨床症状が発生する前になされる、A<sub>42</sub>アミロイドーシスの検出の正確度、および疾患進行のモニタリングの正確度を、著しく向上させる。実施例で例証するように、本方法は、好都合なことに、侵襲的な脊髄カテーテルを使用せずに、血中のA<sub>42</sub>ダイナミクスを測定することを可能にする。加えて、本方法は、A<sub>42</sub>を標的とする疾患修飾性治療薬候補の特異的試験を可能にする。

【0022】

I. 神経由来生体分子のインビボ代謝をモニタリングするための方法

本発明は、対象におけるアミロイド- (A<sub>42</sub>)タンパク質およびA<sub>42</sub>タンパク質変異体の弁別的動態に起因するA<sub>42</sub>アミロイドーシスを診断し、またはその進行もしくは処置をモニタリングするための方法を提供する。アルツハイマー病(AD)は、アミロイド-(A<sub>42</sub>)タンパク質およびA<sub>42</sub>タンパク質変異体の生産の増加、クリアランスの減少、またはその両方に起因する、中枢神経系(CNS)におけるアミロイド斑の蓄積(A<sub>42</sub>アミロイドーシス)を特徴とする消耗性疾患である。A<sub>42</sub>アミロイドーシスに関連する非限定的な例として、認知機能障害、行動変容、異常言語機能、情動調節不全、発作、神経系の構造または機能の障害、およびアルツハイマー病または脳アミロイド血管症の発症のリスクの増加を挙げることができる。

【0023】

いくつかの実施形態では、対象におけるA<sub>42</sub>変異体のレベルを、アミロイドーシスを持たない個体におけるそのA<sub>42</sub>変異体のレベルと比較することにより、当業者は、A<sub>42</sub>アミロイドーシスに関連する症状が発症する前に、対象におけるA<sub>42</sub>アミロイドーシスを診断することができるであろう。別の実施形態では、対象におけるA<sub>42</sub>変異体のレベルを、その対象におけるもう一つのA<sub>42</sub>変異体のレベルと比較することにより、当業者は、A<sub>42</sub>アミロイドーシスに関連する症状が発症する前に、その対象におけるA<sub>42</sub>アミロイドーシス

10

20

30

40

50

を診断することができるであろう。加えて、本発明は、対象における疾患修飾性治療薬の薬力学的効果の測定も可能にする。

【0024】

(a) A 変異体

本発明の方法は、1つまたは複数のA 変異体のインビボレベルを測定することを含む。本明細書において使用する用語「A 変異体」は、全A タンパク質、A 40、A 42、A 38、または他のA アイソフォームを指す。いくつかの実施形態では、標識A 変異体のインビボレベルを測定することによって、A 変異体のインビボレベルを測定することができる。インビボレベルの測定対象となりうるA 変異体の非限定的な例として、全A タンパク質、A 40、A 42、またはA 38を挙げることができる。ある実施形態では、標識A タンパク質のインビボレベルを測定することができる。もう一つの実施形態では、標識A 40のインビボレベルを測定することができる。さらにもう一つの実施形態では、標識A 42のインビボレベルを測定することができる。もう一つの実施形態では、標識A 38のインビボレベルを測定することができる

10

【0025】

別の実施形態では、A 変異体のインビボ相対ラベリングを測定することによって、A 変異体のインビボレベルを測定することができる。本明細書にいう「インビボ相対ラベリング (in vivo relative labeling)」とは、インビボで、標識された変異体のパーセントを指す。インビボ相対ラベリングの測定対象となりうるA 変異体の非限定的な例としては、A タンパク質、A 40、A 42、またはA 38を挙げることができる。ある実施形態では、A タンパク質のインビボ相対ラベリングを測定することができる。もう一つの実施形態では、A 40のインビボ相対ラベリングを測定することができる。さらにもう一つの実施形態では、A 42のインビボ相対ラベリングを測定することができる。もう一つの実施形態では、A 38のインビボ相対ラベリングを測定することができる。

20

【0026】

いくつかの実施形態では、対象において、2つ以上のA タンパク質またはA タンパク質変異体のインビボ相対ラベリングを、インビボで測定することができる。いくつかの実施形態では、A タンパク質とA 42のインビボ相対ラベリングを測定することができる。別の実施形態では、A タンパク質とA 40のインビボ相対ラベリングを測定することができる。さらに別の実施形態では、A タンパク質とA 38のインビボ相対ラベリングを測定することができる。さらなる実施形態では、A 40タンパク質とA 38のインビボ相対ラベリングを測定することができる。さらに別の実施形態では、A タンパク質とA 38のインビボ相対ラベリングを測定することができる。別の実施形態では、A タンパク質、A 42およびA 40のインビボ相対ラベリングを測定することができる。さらに別の実施形態では、A タンパク質、A 40およびA 38のインビボ相対ラベリングを測定することができる。さらに別の実施形態では、A タンパク質、A 42およびA 38のインビボ相対ラベリングを測定することができる。さらなる実施形態では、A 42、A 40およびA 38のインビボ相対ラベリングを測定することができる。好ましい実施形態では、A 42タンパク質とA 40のインビボ相対ラベリングを測定することができる。

30

40

【0027】

A のインビトロ消化産物 (例えばA<sub>6-16</sub>、A<sub>17-28</sub>) の測定を使って、A インビトロ消化産物を含むA タンパク質およびA 変異体のインビボ代謝を決定することは、当業者にはわかるであろう。いくつかの実施形態では、A のインビトロ消化産物 (例えばA<sub>6-16</sub>、A<sub>17-28</sub>) を測定することによって、1つまたは複数のA 変異体のインビボ相対ラベリングを測定することができる。

【0028】

(b) インビボ相対ラベリングの測定

A 変異体を、それが中枢神経系において合成される時にインビボで標識し、そのA

50

変異体のラベリングを経時的に測定することによって、A 変異体のインピボ相対ラベリングを測定することができる。これらの測定を使って、標識 A 変異体比またはパーセントを算出することができる

#### 【0029】

##### i . ラベリング成分 ( labeling moiety )

A 変異体は、それが中枢神経系において合成される時に、標識成分 ( labeled moiety ) を使って標識することができる。A 変異体の標識には数個の異なる成分を使用することができる。一般論として、本発明の方法において典型的に利用される 2 タイプのラベリング成分は、放射性同位体および非放射性 ( 安定 ) 同位体である。好ましい一実施形態では、非放射性同位体を使用し、質量分析によって測定することができる。好ましい安定同位体には、重水素  $^2\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{17}$  または  $^{18}\text{O}$ 、 $^{33}\text{S}$ 、 $^{34}\text{S}$ 、または  $^{36}\text{S}$  などがあるが、主要天然型として見出されるものよりも中性子が多いかまたは少ないかによって原子の質量を異なっている他のいくつかの安定同位体も有効であるだろうと考えられる。適切なラベル ( label ) は、一般に、検討中の生体分子の質量を、質量分析計でそれを検出することができるような形で、変化させるであろう。ある実施形態では、標識成分が非放射性同位体 ( 例えば  $^{13}\text{C}$  ) を含むアミノ酸である。あるいは、放射性同位体を使用して、標識生体分子を、質量分析計ではなく、シンチレーション計数器で測定することもできる。1 つまたは複数の標識成分を同時に、または逐次的に使用することができる。

#### 【0030】

A 変異体のラベルを提供するために数個のアミノ酸を使用しうることも、当業者には理解されるであろう。一般に、アミノ酸の選択は、次に挙げるようなさまざまな因子に基づく。( 1 ) そのアミノ酸が一般に A 変異体の少なくとも 1 つの残基中に存在する。( 2 ) そのアミノ酸は一般に、タンパク質合成の部位に迅速に到達することができ、血液脳関門の前後で迅速に平衡に達する。ロイシンは、CNS において合成される A 変異体などのタンパク質を標識するのに好ましいアミノ酸である。( 3 ) そのアミノ酸は、理想的には、達成されるラベリングのパーセントがより高くなるように、必須アミノ酸 ( 身体によって生産されないもの ) であることができる。非必須アミノ酸も使用することはできるが、測定の正確度はおそらく低下するであろう。( 4 ) そのアミノ酸ラベルは一般に、関心タンパク質の代謝に影響を及ぼさない ( 例えば極めて高用量のロイシンは筋代謝に影響を及ぼしうる )。そして、( 5 ) 所望のアミノ酸の入手可能性 ( すなわち、一部のアミノ酸は、他のアミノ酸よりはるかに高価であるか製造が難しい )。ある実施形態では、6 つの  $^{13}\text{C}$  原子を含有する  $^{13}\text{C}_6$ -フェニルアラニンを使って、A 変異体を標識する。好ましい一実施形態では、 $^{13}\text{C}_6$ -ロイシンを使って、A 変異体を標識する。

#### 【0031】

標識アミノ酸の商業的供給源は、非放射性同位体も放射性同位体も、数多くある。一般に、標識アミノ酸は、生物学的に生産するか、合成的に生産することができる。生物学的に生産されるアミノ酸は、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、または当該生物がタンパク質を生産するときにアミノ酸に組み込まれる他の同位体の濃縮混合物中で成長させた生物 ( 例えばケルプ / 海藻 ) から得ることができる。次に、アミノ酸を分離し、精製する。あるいは、アミノ酸を既知の合成化学プロセスで作製することもできる。

#### 【0032】

##### ii . 標識成分の投与

本発明の方法では、標識成分を対象に投与することができる。標識成分は、いくつかの方法で対象に投与することができる。好適な投与方法には、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、筋肉内、または経口などがある。好ましい一実施形態では、標識成分が静脈内注入によって投与される。もう一つの好ましい実施形態では、標識成分を経口摂取することができる。

#### 【0033】

標識成分は、選択した分析のタイプ ( 例えば定常状態またはボーラス / チェイス ) に応

10

20

30

40

50

じて、ある期間にわたってゆっくり投与するか、高用量単回投与として投与することができる。標識 A 変異体の定常状態レベルを達成するには、標識 A 変異体が高い信頼性で定量されうるように、一般にラベリング時間は十分な継続時間にすべきである。ある実施形態では、標識成分が標識ロイシンであり、標識ロイシンは 9 時間にわたって静脈内に投与される。もう一つの実施形態では、標識ロイシンが 12 時間にわたって静脈内に投与される。さらにもう一つの実施形態では、標識ロイシンが経口投与される。もう一つの実施形態では、標識ロイシンが、パルスラベリング用の単回ボラスとして、経口投与される。

#### 【 0 0 3 4 】

標識成分の量（または用量）はさまざまであることができ、また実際にさまざまであることは、当業者には理解されるであろう。一般に、量は、次に挙げる因子に依存する（また次に挙げる因子によって見積もられる）。（1）所望する分析のタイプ。例えば、血漿中に約 15% 標識ロイシンの定常状態を達成するには、10 分間で 2 mg / kg のプライムドボラス（primed bolus）の後に、9 時間にわたる約 2 mg / kg / 時が必要である。これに対し、定常状態が必要でないなら、標識ロイシンの高用量ボラス（例えば 1 グラムまたは 5 グラムの標識ロイシン）を与えることができる。（2）分析される A 変異体。例えば、A 変異体が迅速に生産されている場合、必要なラベリング時間は短くなり、必要なラベルも - おそらく 1 時間で 0.5 mg / kg 程度に - 少なくなってしまう。しかし大半の A 変異体は数時間 ~ 数日の半減期を有するので、0.5 mg / kg ~ 4 mg / kg で、4、9 または 12 時間の持続注入が使用される可能性が高いであろう。そして（3）ラベルの検出感度。例えば、ラベル検出の感度が増加するにつれて、必要なラベルの量は減少してしまう。

#### 【 0 0 3 5 】

2 つ以上のラベルを一人の対象で使用することは、当業者には理解されるであろう。これにより、同じ A 変異体の多重ラベリングが可能になり、異なる時点におけるその A 変異体の生産またはクリアランスに関する情報が得られるであろう。例えば、第 1 ラベルを初回期間にわたって対象に与えた後、薬理作用物質（薬物）を与え、次に第 2 ラベルを投与することができる。一般に、この対象から得られる試料の分析は、同じ対象における薬物の薬力学的効果を直接測定する、薬物投与前と薬物投与後の代謝の測定値を与えるであろう。

#### 【 0 0 3 6 】

あるいは、A 変異体のラベリングを増加させるため、ならびにより広範な A 変異体のラベリングを得るために、多重ラベルを同時に使用することもできる。

#### 【 0 0 3 7 】

##### i i i . 生物学的試料

本発明の方法では、標識 A 変異体のインビボ代謝を決定することができるように、対象から生物学的試料が得られる。好適な生物学的試料には、脳脊髄液（CSF）、血漿、血清、尿、唾液、汗、および涙などがあるが、これらに限定されるわけではない。本発明の一実施形態では、生物学的試料が CSF から採取される。代替的一実施形態では、生物学的試料が尿から収集される。好ましい実施形態では、生物学的試料が血液から収集される。本明細書にいう「血液」は、血漿または血清のどちらかを指す。

#### 【 0 0 3 8 】

脳脊髄液は、留置 CSF カテーテルを使って、または留置 CSF カテーテルを使わずに、腰椎穿刺によって得ることができる（経時的に複数回の収集を行うのであればカテーテルが好ましい）。血液は、静脈内カテーテルを使って、または静脈内カテーテルを使わずに、静脈穿刺によって収集し、当技術分野で知られている方法で加工することができる。尿は、簡単な採尿によって、またはより正確にはカテーテルを使って、収集することができる。唾液と涙は、標準的な医薬品適正製造基準（GMP）法を使った直接収集によって収集することができる。

#### 【 0 0 3 9 】

10

20

30

40

50

標識アミノ酸の投与後に1つまたは複数の試料を対象から収集することになる。当業者には理解されるであろうとおり、試料の数およびそれらをいつ採取するかは、一般に、次に挙げるようないくつかの因子に依存するであろう：分析のタイプ、投与のタイプ、関心対象のA 変異体、代謝の速度、検出のタイプなど。いくつかの実施形態において、本発明の方法では、当該対象に関するベースラインを得るために、第1生物学的試料が、ラベルの投与前に対象から採取される。

#### 【0040】

いくつかの実施形態では、血液またはCSFの試料が、36時間にわたって1時間毎に採取される。あるいは、試料を2時間毎に、またはそれより低い頻度で、採取してもよい。ある実施形態では、標識成分の投与の約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15時間後に、CSFの試料が採取される。もう一つの実施形態では、標識成分の投与の約9、10、または11時間後にCSFの試料が採取される。さらにもう一つの実施形態では、標識成分の投与の約20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、または36時間後にCSFの試料が採取される。さらにもう一つの実施形態では、標識成分の投与の約26、27または28時間後にCSFの試料が採取される。好ましい一実施形態では、標識成分の投与の約10時間後にCSFの試料が採取される。もう一つの好ましい実施形態では、標識成分の投与の約27時間後にCSFの試料が採取される。

10

#### 【0041】

ある実施形態では、標識成分の投与の約1、2、3、4、5、6、7、8、または9時間後に血液試料が採取される。もう一つの実施形態では、標識成分の投与の約5、6、7、8、9、10、11、または12時間後に血液試料が採取される。さらにもう一つの実施形態では、標識成分の投与の約17、18、19、20、21、22、23、24、25、または26時間後に血液試料が採取される。

20

#### 【0042】

一般に、生産相中に得られた生物学的試料は、A 変異体の合成の速度を決定するために使用することができ、クリアランス相中に採取された生物学的試料は、A 変異体のクリアランス速度を決定するために使用することができる。CSFの場合、生産相は典型的にはラベリング後、最初の12時間にあり、一方、クリアランス相は、典型的には、ラベリングの24~36時間後である。血液の場合、生産相は典型的にはラベリング後、最初の3時間であり、一方、クリアランス相は、典型的には、ラベリング後、約4~約10時間である。代替の一実施形態では、タンパク質合成速度およびクリアランス速度に応じて、1時間から数日または数週間の間隔を空けて、試料を採取することができる。

30

#### 【0043】

##### iv. 検出

本発明では、生物学的試料中の標識A の量および非標識A の量を検出することができる。標識および非標識A を検出するための好適な方法は、それを標識するために使用する標識成分のタイプに応じて異なることができ、また実際に異なるであろう。標識成分が非放射標識アミノ酸である場合、検出方法は、典型的には、非標識タンパク質に対する標識タンパク質の質量の変化を検出するのに足る感度を持たなければならない。好ましい一実施形態では、標識A と非標識A の間の質量の相違を検出するために、質量分析が使用される。ある実施形態では、ガスクロマトグラフィー質量分析が使用される。代替の一実施形態では、MALDI-TOF質量分析が使用される。好ましい一実施形態では、高分解能タンデム質量分析が使用される。

40

#### 【0044】

A を生物学的試料中の他のタンパク質および生体分子から分離するために、追加の技法を利用してもよい。一例として、A を質量分析法で分析する前に、A を単離、精製するために、免疫沈降を使用することができる。あるいは、クロマトグラフィー機構を持つ質量分析計を使って、免疫沈降なしでタンパク質を単離した後、A をそのまま測定してもよい。例示的一実施形態では、A を免疫沈降させてから、エレクトロスプレーイオ

50

ン化源を装備したタンデムMSと接続された液体クロマトグラフィーシステム(LC-ESI-タンデムMS)によって分析する。

【0045】

本発明では、同じ生物学的試料中の複数のA変異体を同時に測定することもできる。すなわち、非標識Aの量と標識Aの量の両方を、複数のA変異体について、個別にまたは同時に検出し、測定することができる。したがって本発明は、A変異体の合成およびクリアランスの変化を大規模にスクリーニングするため(すなわちプロテオミクス/メタボロミクス)の有用な方法を提供し、ADの基礎にある病態生理に關与するA変異体を検出し、測定するための高感度な手段を提供する。

【0046】

v. A変異体の相対ラベリングの比

生物学的試料中の標識および非標識A変異体の量を使って、試料中のA変異体の相対ラベリングを決定することができる。本発明によれば、試料中のA変異体の相対ラベリングとは、試料中の標識A変異体の非標識A変異体に対する比である。生物学的試料中のA変異体の相対ラベリングが、対象における該A変異体の代謝に正比例することは、当業者にはわかるであろう。

【0047】

(c)相対ラベリングの比および診断

本発明の方法は、あるA変異体の相対ラベリングの、もう一つのA変異体の相対ラベリングに対する比を算出することを含みうる。任意の2つのA変異体の相対ラベリングが、所与の試料において類似している場合、前記2つのA変異体の相対ラベリングの比が約1になりうることは、当業者にはわかるであろう。逆に、所与の試料において、いずれか1つのA変異体の相対ラベリングが、他のA変異体の相対ラベリングとは異なる場合、その生物学的試料における前記A変異体のもう一つのA変異体に対する相対ラベリングの比は、1ではない数字(すなわち1より大きい数字または1より小さい数字)になりうる。

【0048】

実施例において例証するように、本発明者らは、健常対象におけるA変異体の相対ラベリングは、所与の時点において採取された所与の試料において類似していることを発見した。それゆえに、健常対象における任意のA変異体の他の任意のA変異体に対する相対ラベリングの比は、約1であろう。驚いたことに、本発明者らは、所与の時間に採取された所与の試料において、Aアミロイドーシスを持つ対象におけるA42の相対ラベリングが、他のA変異体の相対ラベリングとは異なることも発見した。それゆえに、Aアミロイドーシスを持つ対象では、A42の他の任意のA変異体に対する相対ラベリングの比が、1ではない数字になるであろう。言い換えると、ある対象において、A42の他の任意のA変異体に対する相対ラベリングの比が約1であることは、Aアミロイドーシスが存在しないことを示す。逆に、ある対象において、A42の他の任意のA変異体に対する相対ラベリングの比が1以外であることは、Aアミロイドーシスの存在を示す。

【0049】

いくつかの実施形態では、Aタンパク質のA42に対する相対ラベリングの比を測定することができる。別の実施形態では、A42のAタンパク質に対する相対ラベリングの比を測定することができる。さらに別の実施形態では、Aタンパク質のA40に対する相対ラベリングの比を測定することができる。さらなる実施形態では、A40のAタンパク質変異体に対する相対ラベリングの比を測定することができる。さらに別の実施形態では、Aタンパク質のA38に対する相対ラベリングの比を測定することができる。別の実施形態では、A38のAタンパク質変異体に対する相対ラベリングの比を測定することができる。さらなる実施形態では、A40のA38に対する相対ラベリングの比を測定することができる。さらなる実施形態では、A38のA40に対する相対ラベリングの比を測定することができる。さらなる実施形態では、A42の

10

20

30

40

50

A 38に対する相対ラベリングの比を測定することができる。別の実施形態では、A 38のA 42に対する相対ラベリングの比を測定することができる。いくつかの実施形態では、A 40のA 42に対する相対ラベリングの比を測定することができる。好ましい実施形態では、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比を測定することができる。

【0050】

実施例において説明するように、約4時間～約22時間の時点で採取したCSF試料では、A アミロイドーシスを持つ対象におけるA 42の相対ラベリングが、他のA 変異体の相対ラベリングより高いであろう。それゆえに、約4時間～約17時間の時点で採取したCSF試料では、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が、約1より大きいであろう。いくつかの実施形態では、約4時間～約22時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が約1より大きいことが、A アミロイドーシスの存在を示す。別の実施形態では、約4時間～約17時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が約1より大きいことが、A アミロイドーシスの存在を示す。ある実施形態では、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17時間またはそれ以上の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が約1より大きいことが、A アミロイドーシスの存在を示す。もう一つの実施形態では、約8、9、10、11、12時間またはそれ以上の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が約1より大きいことが、A アミロイドーシスの存在を示す。好ましい一実施形態では、約10時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が約1より大きいことが、A アミロイドーシスの存在を示す。

【0051】

いくつかの実施形態では、約4時間～約22時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が、約1.04、1.05、1.06、1.07、1.08、1.09、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4またはそれ以上であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。別の実施形態では、約4時間～約17時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が、約1.01、1.02、1.03、1.04、1.05、1.06、1.07、1.08、1.09、1.1、1.2、1.3、1.4、または1.5であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。さらに別の実施形態では、約4時間～約22時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が、約1.09、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、または2であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。さらなる実施形態では、約4時間～約22時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が、約1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、または3.0であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。別の実施形態では、約4時間～約22時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が、約2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4またはそれ以上であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。

【0052】

いくつかの実施形態では、約6時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が約1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0またはそれ以上であることは、A アミロイドーシスの存在を

10

20

30

40

50

示す。別の実施形態では、約6時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が約1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5またはそれ以上であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。さらに別の実施形態では、約6時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が約1.4、1.41、1.42、1.43、1.44、1.45、1.46、1.47、1.48、1.49、1.5、1.51、1.52、1.53、1.54、1.55、1.56、1.57、1.58、1.59、1.6、1.61、1.62、1.63、1.64、1.65、1.66、1.67、1.68、1.69、1.7、1.71、1.72、1.73、1.74、1.75、1.76、1.77、1.78、1.79、1.8、1.81、1.82、1.83、1.84、1.85、1.86、1.87、1.88、1.89、1.9、1.91、1.92、1.93、1.94、1.95、1.96、1.97、1.98、1.99、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5またはそれ以上であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。

#### 【0053】

いくつかの実施形態では、約7時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が約1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0またはそれ以上であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。別の実施形態では、約7時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が約1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5またはそれ以上であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。さらに別の実施形態では、約7時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が約1.4、1.41、1.42、1.43、1.44、1.45、1.46、1.47、1.48、1.49、1.5、1.51、1.52、1.53、1.54、1.55、1.56、1.57、1.58、1.59、1.6、1.61、1.62、1.63、1.64、1.65、1.66、1.67、1.68、1.69、1.7、1.71、1.72、1.73、1.74、1.75、1.76、1.77、1.78、1.79、1.8、1.81、1.82、1.83、1.84、1.85、1.86、1.87、1.88、1.89、1.9、1.91、1.92、1.93、1.94、1.95、1.96、1.97、1.98、1.99、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5またはそれ以上であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。

#### 【0054】

いくつかの実施形態では、約8時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が約1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5またはそれ以上であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。別の実施形態では、約8時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が約1.2、1.21、1.22、1.23、1.24、1.25、1.26、1.27、1.28、1.29、1.3、1.31、1.32、1.33、1.34、1.35、1.36、1.37、1.38、1.39、1.4、1.41、1.42、1.43、1.44、1.45、1.46、1.47、1.48、1.49、1.5、1.51、1.52、1.53、1.54、1.55、1.56、1.57、1.58、1.59、1.6、1.61、1.62、1.63、1.64、1.65、1.66、1.67、1.68、1.69、1.7、1.71、1.72、1.73、1.74、1.75、1.76、1.77、1.78、1.79、1.8、1.81、1.82、1.83、1.84、1.85、1.86、1.87、1.88、1.89、1.9、1.91、1.92、1.93、1.94、1.95、1.96、1.97、1.98、1.99、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5またはそれ以上であることは、A アミロイドーシスの存在を示す

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 5 】

いくつかの実施形態では、約 9 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が約 1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5 またはそれ以上であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。別の実施形態では、約 9 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が約 1.2、1.21、1.22、1.23、1.24、1.25、1.26、1.27、1.28、1.29、1.3、1.31、1.32、1.33、1.34、1.35、1.36、1.37、1.38、1.39、1.4、1.41、1.42、1.43、1.44、1.45、1.46、1.47、1.48、1.49、1.5、1.51、1.52、1.53、1.54、1.55、1.56、1.57、1.58、1.59、1.6、1.61、1.62、1.63、1.64、1.65、1.66、1.67、1.68、1.69、1.7、1、1.72、1.73、1.74、1.75、1.76、1.77、1.78、1.79、1.8、1.81、1.82、1.83、1.84、1.85、1.86、1.87、1.88、1.89、1.9、1.91、1.92、1.93、1.94、1.95、1.96、1.97、1.98、1.99、2、2.1、2.1、2.3、2.4、2.5 またはそれ以上であることは、A アミロイドーシスの存在を示す

10

## 【 0 0 5 6 】

いくつかの好ましい実施形態では、約 10 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が約 1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2 またはそれ以上であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。別の好ましい実施形態では、約 10 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が約 1.2、1.21、1.22、1.23、1.24、1.25、1.26、1.27、1.28、1.29、1.3、1.31、1.32、1.33、1.34、1.35、1.36、1.37、1.38、1.39、1.4、1.41、1.42、1.43、1.44、1.45、1.46、1.47、1.48、1.49、1.5、1.51、1.52、1.53、1.54、1.55、1.56、1.57、1.58、1.59、1.6、1.61、1.62、1.63、1.64、1.65、1.66、1.67、1.68、1.69、1.7、1、1.72、1.73、1.74、1.75、1.76、1.77、1.78、1.79、1.8、1.81、1.82、1.83、1.84、1.85、1.86、1.87、1.88、1.89、1.9、1.91、1.92、1.93、1.94、1.95、1.96、1.97、1.98、1.99、2 またはそれ以上であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。さらに別の好ましい実施形態では、約 10 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が約 1.25、1.26、1.27、1.28、1.29、1.3、1.31、1.32、1.33、1.34、1.35、1.36、1.37、1.38、1.39、1.4、1.41、1.42、1.43、1.44、1.45、1.46、1.47、1.48、1.49、1.5、1.51、1.52、1.53、1.54、1.55、1.56、1.57、1.58、1.59、1.6、1.61、1.62、1.63、1.64、1.65、1.66、1.67、1.68、1.69、または 1.7 であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。さらに別の好ましい実施形態では、約 10 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が約 1.3、1.31、1.32、1.33、1.34、1.35、1.36、1.37、1.38、1.39、1.4、1.41、1.42、1.43、1.44、1.45、1.46、1.47、1.48、1.49、1.5、1.51、1.52、1.53、1.54、1.55、1.56、1.57、1.58、1.59、1.6、1.61、1.62、1.63、1.64、1.65 であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。

20

30

40

## 【 0 0 5 7 】

50

実施例において説明するように、約 22 時間～約 32 時間の時点で採取した C S F 試料において、A アミロイドーシスを持つ対象における A 42 変異体の相対ラベリングは、他の A 変異体の相対ラベリングよりも低いであろう。それゆえに、約 22 時間～約 32 時間の時点で採取した C S F 試料における A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比は、約 1 未満であろう。

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態では、約 22 時間～約 32 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が、約 1 未満であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。ある実施形態では、約 22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、もしくは 32 時間またはそれ以上の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が約 1 未満であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。もう一つの実施形態では、約 25、26、27、28、29 時間またはそれ以上の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が約 1 未満であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。さらにもう一つの実施形態では、約 23、24、25、26、27、28、29、30、31 時間またはそれ以上の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が約 1 未満であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施形態では、約 23 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が約 1 未満であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。ある実施形態では、約 23 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が、約 0.9、0.89、0.88、0.87、0.86、0.85、0.84、0.83、0.82、0.81、0.8、0.79、0.78、0.77、0.76、0.75、0.74、0.73、0.72、0.71、0.7、0.69、0.68、0.67、0.66、0.65、0.64、0.63、0.62、0.61、0.6、0.59、0.58、0.57、0.56、0.55、0.54、0.53、0.52、0.51、0.5、0.49、0.48、0.47、0.46、0.45、0.44、0.43、0.42、0.41、0.4、0.39、0.38、0.37、0.36、0.35、0.34、0.33、0.32、0.31、0.3、0.29、0.28、0.27、0.26、0.25、0.24、0.23、0.22、0.21、0.2、0.1、またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。もう一つの実施形態では、約 23 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が、約 0.9、0.89、0.88、0.87、0.86、0.85、0.84、0.83、0.82、0.81、0.8、0.79、0.78、0.77、0.76、0.75、0.74、0.73、0.72、0.71、0.7、0.69、0.68、0.67、0.66、0.65、0.64、0.63、0.62、0.61、0.6、0.59、0.58、0.57、0.56、0.55、0.54、0.53、0.52、0.51、0.5 またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。

【 0 0 6 0 】

いくつかの実施形態では、約 24 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が約 1 未満であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。ある実施形態では、約 24 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が、約 0.9、0.89、0.88、0.87、0.86、0.85、0.84、0.83、0.82、0.81、0.8、0.79、0.78、0.77、0.76、0.75、0.74、0.73、0.72、0.71、0.7、0.69、0.68、0.67、0.66、0.65、0.64、0.63、0.62、0.61、0.6、0.59、0.58、0.57、0.56、0.55、0.54、0.53、0.52、0.51、0.5、0.49、0.48、0.47、0

. 4 6、0 . 4 5、0 . 4 4、0 . 4 3、0 . 4 2、0 . 4 1、0 . 4、0 . 3 9、0 . 3 8、0 . 3 7、0 . 3 6、0 . 3 5、0 . 3 4、0 . 3 3、0 . 3 2、0 . 3 1、0 . 3、0 . 2 9、0 . 2 8、0 . 2 7、0 . 2 6、0 . 2 5、0 . 2 4、0 . 2 3、0 . 2 2、0 . 2 1、0 . 2、0 . 1、またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。もう一つの実施形態では、約 2 4 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 4 2 の A 4 0 に対する相対ラベリングの比が、約 0 . 9、0 . 8 9、0 . 8 8、0 . 8 7、0 . 8 6、0 . 8 5、0 . 8 4、0 . 8 3、0 . 8 2、0 . 8 1、0 . 8、0 . 7 9、0 . 7 8、0 . 7 7、0 . 7 6、0 . 7 5、0 . 7 4、0 . 7 3、0 . 7 2、0 . 7 1、0 . 7、0 . 6 9、0 . 6 8、0 . 6 7、0 . 6 6、0 . 6 5、0 . 6 4、0 . 6 3、0 . 6 2、0 . 6 1、0 . 6、0 . 5 9、0 . 5 8、0 . 5 7、0 . 5 6、0 . 5 5、0 . 5 4、0 . 5 3、0 . 5 2、0 . 5 1、0 . 5 またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。

10

【 0 0 6 1 】

いくつかの実施形態では、約 2 5 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 4 2 の A 4 0 に対する相対ラベリングの比が約 1 未満であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。ある実施形態では、約 2 5 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 4 2 の A 4 0 に対する相対ラベリングの比が、約 0 . 9、0 . 8 9、0 . 8 8、0 . 8 7、0 . 8 6、0 . 8 5、0 . 8 4、0 . 8 3、0 . 8 2、0 . 8 1、0 . 8、0 . 7 9、0 . 7 8、0 . 7 7、0 . 7 6、0 . 7 5、0 . 7 4、0 . 7 3、0 . 7 2、0 . 7 1、0 . 7、0 . 6 9、0 . 6 8、0 . 6 7、0 . 6 6、0 . 6 5、0 . 6 4、0 . 6 3、0 . 6 2、0 . 6 1、0 . 6、0 . 5 9、0 . 5 8、0 . 5 7、0 . 5 6、0 . 5 5、0 . 5 4、0 . 5 3、0 . 5 2、0 . 5 1、0 . 5、0 . 4 9、0 . 4 8、0 . 4 7、0 . 4 6、0 . 4 5、0 . 4 4、0 . 4 3、0 . 4 2、0 . 4 1、0 . 4、0 . 3 9、0 . 3 8、0 . 3 7、0 . 3 6、0 . 3 5、0 . 3 4、0 . 3 3、0 . 3 2、0 . 3 1、0 . 3、0 . 2 9、0 . 2 8、0 . 2 7、0 . 2 6、0 . 2 5、0 . 2 4、0 . 2 3、0 . 2 2、0 . 2 1、0 . 2、0 . 1、またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。もう一つの実施形態では、約 2 5 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 4 2 の A 4 0 に対する相対ラベリングの比が、約 0 . 9、0 . 8 9、0 . 8 8、0 . 8 7、0 . 8 6、0 . 8 5、0 . 8 4、0 . 8 3、0 . 8 2、0 . 8 1、0 . 8、0 . 7 9、0 . 7 8、0 . 7 7、0 . 7 6、0 . 7 5、0 . 7 4、0 . 7 3、0 . 7 2、0 . 7 1、0 . 7、0 . 6 9、0 . 6 8、0 . 6 7、0 . 6 6、0 . 6 5、0 . 6 4、0 . 6 3、0 . 6 2、0 . 6 1、0 . 6、0 . 5 9、0 . 5 8、0 . 5 7、0 . 5 6、0 . 5 5、0 . 5 4、0 . 5 3、0 . 5 2、0 . 5 1、0 . 5 またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。

20

30

【 0 0 6 2 】

いくつかの実施形態では、約 2 6 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 4 2 の A 4 0 に対する相対ラベリングの比が約 1 未満であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。ある実施形態では、約 2 6 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 4 2 の A 4 0 に対する相対ラベリングの比が、約 0 . 9、0 . 8 9、0 . 8 8、0 . 8 7、0 . 8 6、0 . 8 5、0 . 8 4、0 . 8 3、0 . 8 2、0 . 8 1、0 . 8、0 . 7 9、0 . 7 8、0 . 7 7、0 . 7 6、0 . 7 5、0 . 7 4、0 . 7 3、0 . 7 2、0 . 7 1、0 . 7、0 . 6 9、0 . 6 8、0 . 6 7、0 . 6 6、0 . 6 5、0 . 6 4、0 . 6 3、0 . 6 2、0 . 6 1、0 . 6、0 . 5 9、0 . 5 8、0 . 5 7、0 . 5 6、0 . 5 5、0 . 5 4、0 . 5 3、0 . 5 2、0 . 5 1、0 . 5、0 . 4 9、0 . 4 8、0 . 4 7、0 . 4 6、0 . 4 5、0 . 4 4、0 . 4 3、0 . 4 2、0 . 4 1、0 . 4、0 . 3 9、0 . 3 8、0 . 3 7、0 . 3 6、0 . 3 5、0 . 3 4、0 . 3 3、0 . 3 2、0 . 3 1、0 . 3、0 . 2 9、0 . 2 8、0 . 2 7、0 . 2 6、0 . 2 5、0 . 2 4、0 . 2 3、0 . 2 2、0 . 2 1、0 . 2、0 . 1、またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。もう一つの実施形態では、約 2 6 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 4 2 の A 4 0 に対する相対ラベリングの比が、約 0 . 9、0 . 8 9、0 . 8 8、

40

50

0.87、0.86、0.85、0.84、0.83、0.82、0.81、0.8、0.79、0.78、0.77、0.76、0.75、0.74、0.73、0.72、0.71、0.7、0.69、0.68、0.67、0.66、0.65、0.64、0.63、0.62、0.61、0.6、0.59、0.58、0.57、0.56、0.55、0.54、0.53、0.52、0.51、0.5またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。

【0063】

いくつかの実施形態では、約28時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が約1未満であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。ある実施形態では、約28時間の時点で採取したCSF試料において、A

42のA 40に対する相対ラベリングの比が、約0.9、0.89、0.88、0.87、0.86、0.85、0.84、0.83、0.82、0.81、0.8、0.79、0.78、0.77、0.76、0.75、0.74、0.73、0.72、0.71、0.7、0.69、0.68、0.67、0.66、0.65、0.64、0.63、0.62、0.61、0.6、0.59、0.58、0.57、0.56、0.55、0.54、0.53、0.52、0.51、0.5、0.49、0.48、0.47、0.46、0.45、0.44、0.43、0.42、0.41、0.4、0.39、0.38、0.37、0.36、0.35、0.34、0.33、0.32、0.31、0.3、0.29、0.28、0.27、0.26、0.25、0.24、0.23、0.22、0.21、0.2、0.1、またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。もう一つの実施形態では、約28時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が、約0.9、0.89、0.88、0.87、0.86、0.85、0.84、0.83、0.82、0.81、0.8、0.79、0.78、0.77、0.76、0.75、0.74、0.73、0.72、0.71、0.7、0.69、0.68、0.67、0.66、0.65、0.64、0.63、0.62、0.61、0.6、0.59、0.58、0.57、0.56、0.55、0.54、0.53、0.52、0.51、0.5またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。

【0064】

いくつかの実施形態では、約29時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が約1未満であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。ある実施形態では、約29時間の時点で採取したCSF試料において、A

42のA 40に対する相対ラベリングの比が、約0.9、0.89、0.88、0.87、0.86、0.85、0.84、0.83、0.82、0.81、0.8、0.79、0.78、0.77、0.76、0.75、0.74、0.73、0.72、0.71、0.7、0.69、0.68、0.67、0.66、0.65、0.64、0.63、0.62、0.61、0.6、0.59、0.58、0.57、0.56、0.55、0.54、0.53、0.52、0.51、0.5、0.49、0.48、0.47、0.46、0.45、0.44、0.43、0.42、0.41、0.4、0.39、0.38、0.37、0.36、0.35、0.34、0.33、0.32、0.31、0.3、0.29、0.28、0.27、0.26、0.25、0.24、0.23、0.22、0.21、0.2、0.1、またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。もう一つの実施形態では、約29時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が、約0.9、0.89、0.88、0.87、0.86、0.85、0.84、0.83、0.82、0.81、0.8、0.79、0.78、0.77、0.76、0.75、0.74、0.73、0.72、0.71、0.7、0.69、0.68、0.67、0.66、0.65、0.64、0.63、0.62、0.61、0.6、0.59、0.58、0.57、0.56、0.55、0.54、0.53、0.52、0.51、0.5またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 5 】

いくつかの実施形態では、約 30 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が約 1 未満であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。ある実施形態では、約 30 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が、約 0.9、0.89、0.88、0.87、0.86、0.85、0.84、0.83、0.82、0.81、0.8、0.79、0.78、0.77、0.76、0.75、0.74、0.73、0.72、0.71、0.7、0.69、0.68、0.67、0.66、0.65、0.64、0.63、0.62、0.61、0.6、0.59、0.58、0.57、0.56、0.55、0.54、0.53、0.52、0.51、0.5、0.49、0.48、0.47、0.46、0.45、0.44、0.43、0.42、0.41、0.4、0.39、0.38、0.37、0.36、0.35、0.34、0.33、0.32、0.31、0.3、0.29、0.28、0.27、0.26、0.25、0.24、0.23、0.22、0.21、0.2、0.1、またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。もう一つの実施形態では、約 30 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が、約 0.9、0.89、0.88、0.87、0.86、0.85、0.84、0.83、0.82、0.81、0.8、0.79、0.78、0.77、0.76、0.75、0.74、0.73、0.72、0.71、0.7、0.69、0.68、0.67、0.66、0.65、0.64、0.63、0.62、0.61、0.6、0.59、0.58、0.57、0.56、0.55、0.54、0.53、0.52、0.51、0.5、またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。

10

20

## 【 0 0 6 6 】

いくつかの実施形態では、約 31 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が約 1 未満であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。ある実施形態では、約 31 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が、約 0.9、0.89、0.88、0.87、0.86、0.85、0.84、0.83、0.82、0.81、0.8、0.79、0.78、0.77、0.76、0.75、0.74、0.73、0.72、0.71、0.7、0.69、0.68、0.67、0.66、0.65、0.64、0.63、0.62、0.61、0.6、0.59、0.58、0.57、0.56、0.55、0.54、0.53、0.52、0.51、0.5、0.49、0.48、0.47、0.46、0.45、0.44、0.43、0.42、0.41、0.4、0.39、0.38、0.37、0.36、0.35、0.34、0.33、0.32、0.31、0.3、0.29、0.28、0.27、0.26、0.25、0.24、0.23、0.22、0.21、0.2、0.1、またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。もう一つの実施形態では、約 31 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が、約 0.9、0.89、0.88、0.87、0.86、0.85、0.84、0.83、0.82、0.81、0.8、0.79、0.78、0.77、0.76、0.75、0.74、0.73、0.72、0.71、0.7、0.69、0.68、0.67、0.66、0.65、0.64、0.63、0.62、0.61、0.6、0.59、0.58、0.57、0.56、0.55、0.54、0.53、0.52、0.51、0.5、またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。

30

40

## 【 0 0 6 7 】

好ましい実施形態では、約 27 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が約 1 未満であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。好ましい一実施形態では、約 27 時間の時点で採取した C S F 試料において、A 42 の A 40 に対する相対ラベリングの比が、約 0.9、0.89、0.88、0.87、0.86、0.85、0.84、0.83、0.82、0.81、0.8、0

50

. 79、0.78、0.77、0.76、0.75、0.74、0.73、0.72、0.71、0.7、0.69、0.68、0.67、0.66、0.65、0.64、0.63、0.62、0.61、0.6、0.59、0.58、0.57、0.56、0.55、0.54、0.53、0.52、0.51、0.5、0.49、0.48、0.47、0.46、0.45、0.44、0.43、0.42、0.41、0.4、0.39、0.38、0.37、0.36、0.35、0.34、0.33、0.32、0.31、0.3、0.29、0.28、0.27、0.26、0.25、0.24、0.23、0.22、0.21、0.2、0.1、またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。もう一つの好ましい実施形態では、約27時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が、約0.9、0.89、0.88、0.87、0.86、0.85、0.84、0.83、0.82、0.81、0.8、0.79、0.78、0.77、0.76、0.75、0.74、0.73、0.72、0.71、0.7、0.69、0.68、0.67、0.66、0.65、0.64、0.63、0.62、0.61、0.6、0.59、0.58、0.57、0.56、0.55、0.54、0.53、0.52、0.51、0.5またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。

10

## 【0068】

好ましい一実施形態では、約27時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が約1未満であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。さらにもう一つの好ましい実施形態では、約27時間の時点で採取したCSF試料において、A 42のA 40に対する相対ラベリングの比が、約0.7、0.6、0.5、0.4、または約0.3であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。

20

## 【0069】

約1時間～約32時間の時点で採取した血液試料において、A アミロイドーシスを持つ対象におけるA 42変異体の相対ラベリングは、他のA 変異体の相対ラベリングより高いであろう。それゆえに、約1時間～約32時間の時点で採取した血液試料において、A 42の、もう一つのA 変異体に対する相対ラベリングの比は、約1より大きいであろう。いくつかの実施形態では、約1時間～約32時間の時点で採取した血液試料において、A 42の、もう一つのA 変異体に対する相対ラベリングの比が、約1より大きく、A アミロイドーシスの存在を示しうる。ある実施形態では、約1時間～約4時間、例えば約1、2、3、または4時間またはそれ以上の時点で採取した血液試料において、A 42の、もう一つのA 変異体に対する相対ラベリングの比が約1より大きく、A アミロイドーシスの存在を示しうる。もう一つの実施形態では、約10分、15分、30分、1時間、90分、2時間、2.5時間、3時間、または3.5時間の時点で採取した血液試料において、A 42の、もう一つのA 変異体に対する相対ラベリングの比が約1より大きく、A アミロイドーシスの存在を示しうる。さらにもう一つの実施形態では、約10分～60分、30分～90分、60分～2時間、90分～2.5時間、または2時間～3時間の間に採取した血液試料において、A 42の、もう一つのA 変異体に対する相対ラベリングの比が約1より大きく、A アミロイドーシスの存在を示しうる。

30

40

## 【0070】

いくつかの実施形態では、ラベリング後、約0～約3時間の間に採取した血液試料において、A 42の、あるA 変異体に対する相対ラベリングの比が、約1.04、1.05、1.06、1.07、1.08、1.09、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4またはそれ以上であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。別の実施形態では、約0～約3時間の間に採取した血液試料において、A 42の、あるA 変異体に対する相対ラベリングの比が、約1.01、1.02、1.03、1.04、1.05、1.06、1.07、1.08、1.09、1.1、1.

50

2、1.3、1.4、または1.5であって、A アミロイドーシスの存在を示す。さらに別の実施形態では、約0～約4時間の間に採取した血液試料において、A 42の、あるA 変異体に対する相対ラベリングの比が、約1.09、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、または2であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。さらなる実施形態では、約0～約3時間の間に採取した血液試料において、A 42の、あるA 変異体に対する相対ラベリングの比が、約1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、または3.0であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。別の実施形態では、約0～約3時間の間に採取した血液試料において、A 42の、あるA 変異体に対する相対ラベリングの比が、約2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4またはそれ以上であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。

10

## 【0071】

いくつかの実施形態では、約4.5時間～約10時間の間に採取した血液試料において、A 42の、もう一つのA 変異体に対する相対ラベリングの比が約1未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。ある実施形態では、ラベリング後、約4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、もしくは32時間またはそれ以上の時点で採取した血液試料において、A 42の、もう一つのA 変異体に対する相対ラベリングの比が、約1未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。もう一つの実施形態では、約4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、もしくは9.5時間またはそれ以上の時点で採取した血液試料において、A 42の、もう一つのA 変異体に対する相対ラベリングの比が、約1未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。

20

## 【0072】

いくつかの実施形態では、ラベリング後、約5～約9時間の間に採取した血液試料において、A 42の、あるA 変異体に対する相対ラベリングの比が、約1未満であることは、A アミロイドーシスの存在を示す。ある実施形態では、約5～約9時間の時点で採取した血液試料において、A 42の、あるA 変異体に対する相対ラベリングの比が、約0.9、0.89、0.88、0.87、0.86、0.85、0.84、0.83、0.82、0.81、0.8、0.79、0.78、0.77、0.76、0.75、0.74、0.73、0.72、0.71、0.7、0.69、0.68、0.67、0.66、0.65、0.64、0.63、0.62、0.61、0.6、0.59、0.58、0.57、0.56、0.55、0.54、0.53、0.52、0.51、0.5、0.49、0.48、0.47、0.46、0.45、0.44、0.43、0.42、0.41、0.4、0.39、0.38、0.37、0.36、0.35、0.34、0.33、0.32、0.31、0.3、0.29、0.28、0.27、0.26、0.25、0.24、0.23、0.22、0.21、0.2、0.1、またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。もう一つの実施形態では、約5～約9時間の時点で採取した血液試料において、A 42の、あるA 変異体に対する相対ラベリングの比が、約0.9、0.89、0.88、0.87、0.86、0.85、0.84、0.83、0.82、0.81、0.8、0.79、0.78、0.77、0.76、0.75、0.74、0.73、0.72、0.71、0.7、0.69、0.68、0.67、0.66、0.65、0.64、0.63、0.62、0.61、0.6、0.59、0.58、0.57、0.56、0.55、0.54、0.53、0.52、0.51、0.5またはそれ未満であって、A アミロイドーシスの存在を示しうる。

30

40

## 【0073】

例示的一実施形態では、対象に標識ロイシンを投与し、36時間にわたって定期的に1つまたは複数の生物学的試料を収集することによって、A 42およびA 40のインピボ相対ラベリングが測定される。生物学的試料は血漿またはCSFから収集することがで

50

きる。生物学的試料中の標識および非標識 A 42 の量は、典型的には、免疫沈降と、それに続く LC - ESI - タンデム MS とによって決定される。A 42 および A 40 の相対ラベリングを決定するために、これらの測定から、標識 A 42 の、非標識 A 40 に対する比を算出することができる。次に、所与の生物学的試料において、A 42 の相対ラベリングの、A 40 の相対ラベリングに対する比を算出することができる。所与の試料における A 42 の相対ラベリングの、A 40 の相対ラベリングに対する比が、1 以外であることは、A 42 アミロイドーシスの存在を示す。

#### 【0074】

II. 神経学的疾患および神経変性疾患を診断しまたはその進行もしくは処置をモニタリングするためのキット

10

本発明は、対象における2つの A 42 変異体の相対ラベリングの比を測定することによって A 42 アミロイドーシスを診断しまたはその進行もしくは処置をモニタリングするためのキットを提供する。一般にキットは、標識アミノ酸、標識アミノ酸を投与するための手段、生物学的試料を経時的に収集するための手段、および2つの A 42 変異体の相対ラベリングの比を算出することができるように、標識タンパク質の非標識タンパク質に対する比を検出し、決定するための説明書を含む。2つの A 42 変異体の相対ラベリングの比が約1であることは、A 42 アミロイドーシスが存在しないことを示し、一方、2つの A 42 変異体の相対ラベリングの比が1以外であることは、A 42 アミロイドーシスが存在しないことをしめす。これらの比較は、医師が、AD の出現を予測し、AD の発生を診断し、A 42 アミロイドーシスの進行をモニタリングし、または A 42 アミロイドーシスの処置の有効性を検証

20

#### 【0075】

定義

別段の定義がある場合を除き、本明細書において使用される技術用語および科学用語は全て、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されている意味を有する。当業者は、本発明において使用される用語の多くについて、その一般的定義を、次に挙げる参考文献に見ることができる：Singleton による「Dictionary of Microbiology and Molecular Biology」(第2版、1994)；「The Cambridge Dictionary of Science and Technology」(Walker 編、1988)；「The Glossary of Genetics」第5版、R. Rieger による(編)、Springer Verlag (1991)；および Hale & Marham 「The Harper Collins Dictionary of Biology」(1991)。本明細書において使用する以下の用語は、別段の明記がある場合を除き、それらに割り当てられた意味を有する

30

#### 【0076】

「同位体」とは、核の原子番号は同じであるが、含有する中性子の数が異なるために質量数が異なっている、所与の元素の全ての形態を指す。非限定的な一例として、 $^{12}\text{C}$  と  $^{13}\text{C}$  はどちらも炭素の安定同位体である。

40

#### 【0077】

「遅延時間」は、一般に、生体分子が最初に標識された時点から標識生体分子が検出されるまでの時間の遅延を指す。

#### 【0078】

「代謝」は、生体分子の合成、輸送、分解、修飾、またはクリアランス速度の任意の組み合わせを指す。

#### 【0079】

「代謝指数」は、関心生体分子の分率合成速度 (FSR) および分率クリアランス速度 (FCR) を含む測定値を指す。正常個体と罹患個体からの代謝指数の比較は、神経学的

50

疾患または神経変性疾患の診断またはモニタリングに役立つ。

【0080】

「神経由来細胞」には、例えばニューロン、アストロサイト、ミクログリア、脈絡叢細胞、上皮細胞、他のグリア細胞など、血液脳関門内の全ての細胞が含まれる。

【0081】

「定常状態」は、指定の期間において測定されるパラメータの変化が有意でない状態を指す。

【0082】

「合成速度」は、関心生体分子が合成される速度を指す。

【0083】

代謝トレーサー研究において、「安定同位体」とは、最も存在量が多い天然同位体より存在量が少ない非放射性同位体である。

【0084】

本明細書にいう「対象」は、中枢神経系を有する生きた生物を意味する。特に対象は哺乳動物である。好適な対象には、研究動物、伴侶動物、農用動物、および動物園動物などが含まれる。好ましい対象はヒトである。

【実施例】

【0085】

本発明の好ましい実施形態を実証するために、以下に実施例を挙げる。

【0086】

実施例1．血液におけるA $\beta$ の代謝回転

アミロイド $\beta$  (A $\beta$ )がADにおいて中心的役割を果たすこと、より具体的には、毒性型のA $\beta$ の蓄積とコンフォメーション変化がAD病理発生の主要な一因であることは、遺伝学的研究、生化学的研究、および動物モデル研究によって、強く裏付けられている。

【0087】

生きているヒトの中枢神経系におけるA $\beta$ 代謝を直接測定するための先駆的アプローチが最近開発された。この方法では、参加者を研究病院の病室に入院させ、1時間毎に血液試料と脳脊髄液とを得ることができるよう、2本のIVカテーテルと1本の腰椎脊髄カテーテルとを設置する必要がある。この方法を使って、ヒト脳および脳脊髄液(CSF)ではA $\beta$ が迅速な代謝(8~10時間の半減期)を有することが、最近の研究によって実証されている。本発明者らは、最近、ADの疾患修飾的処置候補である $\beta$ -セクレターゼ阻害剤の用量関連効果を測定し、ヒト中枢神経系におけるA $\beta$ の生産の直接阻害を実証した。加えて、極めて軽度のADを持つ患者でさえ、同齡対照群と比較して、中枢神経系にA $\beta$ 代謝障害を持つことが、予備データによって示唆されている。

【0088】

これらの知見はADの原因の理解および処置の開発にとって重要であるが、血液内の標識A $\beta$ を測定するための方法が今まではなかったため、血液A $\beta$ ダイナミクスはよくわかっていない。そのような方法が利用可能になれば、A $\beta$ の生理(および病態生理)が、脳におけるA $\beta$ 生産、血液および脳脊髄液への輸送、ならびに血液からのクリアランスの定量的尺度として、より良く理解されるであろう。血液標識A $\beta$ アッセイにより、侵襲的な脊髄カテーテルを使わずに、A $\beta$ の生理および病態生理を測定することが可能になると共に、ADに関する診断検査の大規模調査およびA $\beta$ を標的とする疾患修飾性治療薬候補の特異的試験が可能になるだろう。

【0089】

標識血液A $\beta$ を測定するために安定同位体ラベリング動態免疫沈降-質量分析アプローチを開発した。これにより、ヒトにおける血液A $\beta$ の生産、コンパートメント間の輸送、およびクリアランス速度を測定することが可能になる。

【0090】

血液/血漿A $\beta$ の半減期は、CNS/CSFにおける半減期とは明確に異なり、生産において(in production)2~3時間の $t_{1/2}$ である(図1)。これはC

10

20

30

40

50

S Fで測定される9～10時間の半減期とは対照的である(Bateman et al. 2006)。図1のために、対象に標識アミノ酸( $^{13}\text{C}_6$ ロイシン; 2 mg/kgで10分間のプライムド注入(primed infusion)後に、2 mg/kg/時間で8時間50分にわたる、9時間の注入)を投与し、次に0～15時間は1時間毎に、35時間までは奇数時間毎に、そして36時間および48時間の時点で、血液試料を採取した。合計28個の試料を採取した。試料は凍結保存した。次に、試料を融解し、プロテアーゼ阻害剤カクテルを加えた。試料を遠心分離し、次に、各時点において、2つの血漿試料からプールのした(合計2 ml)。次に、後述のように、A を試料から免疫沈降した。

1日目:

1. 試料を氷上でゆっくり融解する(約1時間)。
2. 融解したら、20  $\mu\text{l}$ のコンプリート・プロテアーゼ・インヒビター(Complete Protease Inhibitors)を加える。
3. 粒状物を除去するために、Allegra遠心機中、4 で、15分間、14,000 RPMで遠心分離する。
4. 2つの試料からの上清をプールする(15 mlチューブに2 ml)。
5. 培地標準(media standards)を希釈する-50  $\mu\text{l}$ を2 ml PBSに。
6. 0.02%アジドを含む1 x PBSでHJ5.1(A 特異的抗体)ビーズを2回洗浄する。最後に50%ビーズスラリーにする。
7. 220  $\mu\text{l}$ の5 M塩酸グアニジン溶液を加える。
8. 20  $\mu\text{l}$ のTween-20(PBS中5%、最終0.05%用)を加える。
9. 5  $\mu\text{l}$ のISTD(N15-A 40/42)を加える。
10. 30  $\mu\text{l}$ の抗体ビーズ(約20 ngのA に十分な50%スラリー)を加える。
11. 4 で終夜インキュベートする。

2日目:

12. ビーズを4500 RPMで5分間遠心分離する。
13. 上清を新しいチューブに取り出し、保存する(血漿のみ)。
14. 1 mlの0.5 M塩酸グアニジン溶液を加える。
15. 10  $\mu\text{l}$ の5% (最終0.05%用) Tween-20を加える。
16. 再懸濁したら、ビーズを1.5 ml Axygenチューブに移す。
17. ビーズを4500 RPMで5分間遠心分離する。
18. クリンピペットチップ(crimped pipette tip)を使用し、アスピレーター減圧システムを使って、上清を捨てる。
19. ビーズを次のとおり2回洗浄する:
  - a. 1 mlの1 x AmBiCですすぐ
  - b. 4500 RPMで5分間
  - c. 上清を捨てる
  - d. 1 mlの1 x AmBiCですすぐ
  - e. 4500 RPMで5分間
  - f. 上清を捨て、ビーズを乾燥する。
20. 50  $\mu\text{l}$ (ビーズ体積)の98%ギ酸(溶離溶液)を加え、ビーズを4500 RPMで2分間遠心分離し、上清をクリンピフィルターゲルローディングチップ(crimped filter gel loading tip)で取り出し、1.5 ml Axygenチューブに入れる。
21. ギ酸を除去するために溶離溶液をスピードバックで1時間乾燥した(37、60分、60分)。
22. HPLC用水で、25 mM AmBiC溶液を調製する。
23. 1 mlの25 mM AmBiC溶液をトリプシンに加えて、最終濃度を20 ng/ $\mu\text{l}$ にする。

10

20

30

40

50

24. 10  $\mu$ l の 25 mM AmB i C 溶液にタンパク質を再懸濁する。
25. 消化のためにビーズに 10  $\mu$ l の 20 ng /  $\mu$ l トリプシン溶液を加える。
26. インキュベーター中、37 で終夜 (16 時間) 消化する。
- 3 日目 :
27. 試料の短い遠心分離を行って、凝縮物をチューブの底に沈降させる。
28. 消化産物に 2  $\mu$ l のギ酸を加える (タンパク質を沈殿させるため)。
29. 試料のラックをボルテックスに載せ、30 秒間混合する。
30. トリプシン消化物を Allegra 遠心機中、4 で 15 分間、14,000 RPM で遠心分離する。
31. オートサンプラーバイアルに移し、次に、スピードバックを使って試料を遠沈し、  
冷蔵庫内で 4 に保つ。

10

## 【0091】

次に試料を、以下に述べるように質量分析によって分析した。

## 【0092】

A 1 - 42 のアミノ酸配列は D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V I A (配列番号 1)、A 1 - 40 は D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G V V (配列番号 2)、および A 1 - 38 は D A E F R H D S G Y E V H H Q K L V F F A E D V G S N K G A I I G L M V G G (配列番号 3) である。トリプシンのようなプロテアーゼで消化すると、さらに小さな 4 つのペプチドが、A 1 - 5 D A E F R (配列番号 4)、A 6 - 16 H D S G Y E V H H Q K (配列番号 5)、A 17 - 28 L V F F A E D V G S N K (配列番号 6)、および A 29 - 42 G A I I G L M V G G V V I A (配列番号 7) として生成する。これらのペプチドのうち、ロイシンラベリングによる S I L K 技術 (S t a b l e I s o t o p e L a b e l i n g K i n e t i c s - B a t e m a n e t . a l 2009) を使った定量に関連するのは、2 つだけである。なぜなら、それらの配列はインピボで標識されうるロイシン残基を含むからである。これらのペプチドは A 17 - 28 L V F F A E D V G S N K (配列番号 6) と A 29 - 42 G A I I G L M V G G V V I A (配列番号 7) であるが、本発明者らは A 17 - 28 L V F F A E D V G S N K (配列番号 6) ペプチドだけを使用する。なぜなら、これは血中の A の総量を表し、より高いシグナルを生じるからである。もちろん、血中の c 末端フラグメント (A 29 - 42 G A I I G L M V G G V V I A (配列番号 7) または A 29 - 40 G A I I G L M V G G V V (配列番号 8) ) または n 末端フラグメントを定量することも、同様に有用でありうる。一般に、血液において A を標識し、そのラベルを定量するには、任意のアミノ酸ラベルを使用することができ、任意のエンドプロテアーゼを使用することができる (または全く使用しなくてもよい)。血液 A 代謝は、アルツハイマー病またはアルツハイマー病への素因を示す A 代謝の不均衡を直接反映しうる。

20

30

## 【0093】

実験は、ナノフロー E S I 源およびナノ - 2 D 液体クロマトグラフィー (N a n o L C - 2 D) と連結した T S Q V a n t a g e 質量分析計で行った。試料をオートサンプラートレイ中、4 の温度に維持した。延伸チップ (p u l l e d t i p) に A c e 5 C 18 A R カラム充填材 (M A C - M O D A n a l y t i c a l、ペンシルバニア州チャップフォード) を 15 cm 充填した手製のナノカラム (150 mm 直径) に試料を注入した。ペプチドを N a n o 2 D - L C (E k s i g e n t , I n c . U l t r a N a n o L C - 2 D) により、1 mL / 分の流速で分離した。溶媒 A は 0.1% ギ酸 / 水、溶媒 B は 0.1% ギ酸 / アセトニトリルとした。勾配は、10 分間で 15% B から 25% B の後、5 分間で 25% B から 95% B とし、次に、2 分間で 15% B まで漸減し、カラムを 3 分間再平衡化している間に、オートサンプラーに次の注入用試料を採取させた。

40

## 【0094】

T S Q V a n t a g e 質量分析計 (M S) は、ペプチドによる調整で最適化されたパ

50

ラメータで、1.2 kVのスプレー電圧を使って、正イオンモードで操作した。データはマルチプルリアクションモニタリング(MRM)モードで取得した。このMRM実験では、ペプチドの質量をまず、1次元目で、すなわちMS1として検出した。定量はMS1を使って行われるが、この技法には、多くのペプチドが同じインタクト質量(intact mass)を持つ血液などの極めて複雑なマトリックスではとりわけ、特異性の欠如という問題がある。ペプチドイオンをフラグメント化し、質量分析計で検出した。この2次元目のMSフラグメント化(MS2)により、ユニークなフラグメントが得られた。特定プリカーサー質量とユニークフラグメントイオンとの組み合わせを使って、定量すべきペプチドを選択的にモニタリングした。この場合は、A 17-28を定量するために複数のフラグメントイオン(リアクションとも呼ばれる)を選択的にモニタリングして、ユニークなMRM実験とした。A 17-28は、電荷質量比(charge to mass ratio)が内在性ペプチドに関して663.340およびラベル組込みペプチドに関して666.340であるプリカーサー質量(MS1)を持つ。MS2フラグメント化後に、それらのフラグメントイオンを3つずつモニタリングした。モニタリングしたフラグメントイオン(トランジションイオンともいう)は、819.38、966.45および1113.52の質量電荷比を有する。MRM実験で検出を行い、測定器制御ソフトウェアであるXcaliburによって処理された単一クロマトグラフィーピークとしてプロットした。

【0095】

結果を図2に記載する。血液では、9時間までにプラトーへの迅速な上昇が起こり、迅速なクリアランス速度を伴うが、CSFでは18時間またはそれ以上までプラトーに達しないことに注目されたい。また、CSF A と比較してはるかに迅速な血液A のクリアランスにも注目されたい。血液では、20時間から30時間(ピーク約26時間)に、標識A の2つ目のピークも存在しうる。

【0096】

実施例2. A 血中動態

血液A 動態を決定するために、血漿中の<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-ロイシン標識A を測定するための方法を開発した。動物モデルにおける先行研究では、CNSと比較して末梢ではA の代謝回転が速いことが実証されている。新しい方法には、低アトモル(10<sup>-18</sup>)域の定量レベルを持つ最新の質量分析計が必要であった。血液A 動態の最初の測定をCSF A 動態と比較して図3に示す。

【0097】

これらの結果は、血液A 動態がCNS A 動態とは異なることを実証しており、CNSと身体の両方におけるA の形成、輸送、および分解の速度を算出するために、マルチコンパートメントモデルで利用することができる。

【0098】

血液A の動態をADと対照とで比較するために、本発明者らは、12人のAD参加者および8人の対照参加者からの血液試料で標識血漿A を測定し、図4に示すように比較した。

【0099】

はるかに速い代謝回転率を有する血液A 動態に関して重要な追加動態情報を得るために、そしてまた、可能性としてADと対照とをより良く区別するために、代替的な経口パルスラベリングプロトコルを開発した(図5)。パルスラベリングではA の輸送およびクリアランスに関する追加情報が得られ、A 輸送のモデルを区別することができる二次的な遅いクリアランス速度の評価が可能になる。さらに、パルス経口ラベリング法は単回経口飲料として簡易化されているので、血液A 動態検査を処置治験のための臨床検査として、または診断検査として、簡単に実施することが可能になる。

【0100】

ADにおいてユニークに変化する具体的A 変異体(例えばA 42)の理解を深めるために、本発明者らは、同じ試料中のA c末端変異体を測定するための方法を開発

10

20

30

40

50

した(図6)。この新規な定量的アプローチにより、同じ試料中の主要A 変異体を評価することができる。

【0101】

実施例3．アルツハイマー病におけるCNS - アミロイドのクリアランスの減少

アルツハイマー病(AD)は、可溶性および不溶性 - アミロイド(A )の量が、アミロイド斑では主にA 42の形態で、またアミロイド血管症では主にA 40の形態で、増加することを特徴とする。アミロイド仮説は、モノマー、オリゴマー、不溶性フィブリル、中枢神経系(CNS)中のプラークなど、さまざまな形態でA の量の増加をもたらすA の生産とクリアランスとの不均衡が、ADを引き起こすとしている(1)。次に、高レベルなA は、最終的にはアルツハイマー型の進行性臨床認知症として発現するニューロン損傷およびニューロン死につながる事象のカスケードを開始する(2)。

10

【0102】

ADのまれな症例では、遺伝子変異がA の生産を増加させる(3)。しかし、それよりはるかに一般的な遅発型「散発性」ADにおけるA 調節不全はあまりよくわかっていない。遅発型ADの場合、考えうるA 生産量増加の機序には、 または - セクレターゼ活性の変化が含まれる。あるいは、A のクリアランス障害も、ApoE4との相互作用、タンパク質分解の低減によるA の異化の減少、血液脳関門を横切る輸送の障害、または脳脊髄液(CSF)輸送の障害によって、遅発型ADを引き起こしうる。

【0103】

ADにおけるA の生産およびクリアランスを測定するために、本発明者らは、ヒトCNS A の生産とクリアランスを測定するための方法を開発し(4)、症候性ADを持つ個体および認知機能が正常な人におけるA 42とA 40の生産速度およびクリアランス速度を比較することで、どちらか一方または両方がADにおいて変化しているかどうかを決定した。

20

【0104】

本発明者らは、生産相(5時間~14時間)およびクリアランス相(24時間~36時間)について、標識A 42およびA 40の平均時間経過結果をプロットした(図7)。生産速度およびクリアランス速度を各参加者について算出し、群ステータス(group status)によって比較した(AD対対照)。平均A 42生産速度は、対照群(6.7%/時間)とAD群(6.6%/時間)との間で異ならず(P=0.96)、A 40生産速度も群間で異ならなかった(対照群では6.8%/時間およびAD群では6.8%/時間; P=0.98)。A 42の平均クリアランス速度は、認知機能が正常な対照と比較して、AD個体のほうが遅く(5.3%/時間対7.6%/時間、P=0.03)、A 40の平均クリアランス速度も同様だった(AD個体の5.2%/時間に対して対照群の7.0%/時間; P=0.01)。

30

【0105】

A の生産速度とクリアランス速度とのバランスを、ADと対照とで決定するために、本発明者らは生産のクリアランスに対する比を測定した(図8)。A 42の生産速度のクリアランス速度に対する比は、認知機能が正常な参加者では釣り合っていたが(0.95)、AD参加者ではクリアランスが減少しているため、A 42生産対クリアランス比には不均衡が存在した(1.35)。同様に、本発明者らは、A 40生産対クリアランス比にも、認知機能が正常な参加者における比(0.99)と比較して、ADでは不均衡を観察した(1.37)。

40

【0106】

A の生産とクリアランスを測定する技法は、A 生成を標的とする薬物の効果を測るために使用されて、生産の減少を実証している(5)。本発明者らは、遅発型ADが、A 42とA 40の両方のクリアランスの30%の悪化と関連していることを見出した。これは、ADの発症においては、A クリアランスの機序が決定的に重要であることを示している(6)。A クリアランス速度の30%の減少に基づいて見積もると、ADでは脳A が約10年以上蓄積することが示唆される。A 40とA 42のクリアランス障

50

害は、柔組織アミロイド斑におけるA<sub>40</sub>およびA<sub>42</sub>の沈着、ならびにAD症例の約80%での脳アミロイド血管症におけるA<sub>40</sub>の著しい沈着という先の知見と合致している(7)。

#### 【0107】

この研究の限界として、参加者の数が比較的少ないこと(各群12人)と、A<sub>42</sub>クリアランス障害のADとの因果関係を証明できないことが挙げられる。CNS A<sub>42</sub>クリアランスの減少に加えて、CSF A<sub>42</sub>濃度も、ADでは、対照と比べて減少している(図9)。総合すると、これらは、脳からCSFへのA<sub>42</sub>クリアランス(流出)の減少と合致しうる。しかし、CSF A<sub>42</sub>の濃度減少と、標識A<sub>42</sub>のCNSクリアランスの減少との間の関係は(図10)、完全にはわかっていない。さらなる可能性として、CSFにおける2つ以上のA<sub>42</sub>プール、酵素結合免疫吸着アッセイでは検出されないCSF中のA<sub>42</sub>のプール(例えばオリゴマー)、またはA<sub>42</sub>生産の増加と柔組織からCSFへの流出障害との複合が挙げられる。全体として、これらの結果は、対照における代謝と比較してADにおけるA<sub>42</sub>の代謝の障害を示唆している。

#### 【0108】

##### 実施例3に関する材料と方法

研究参加者はワシントン大学アルツハイマー病研究センター(Washington University Alzheimer's Disease Research Center)から登録された。組み入れ基準は年齢>60歳、認知機能が正常(臨床認知症評価またはCDR0)、最軽度AD(CDR0.5)または軽度AD(CDR1)とした。除外基準は、他の認知症の一次診断、または脳卒中、出血性素因、抗凝固、および活動性感染過程を含む重大な医学的併存症とした。口頭と書面による十分なインフォームドコンセントを全ての参加者から得た。24人の参加者を臨床評価し、最軽度~軽度のアルツハイマー型認知症(n=12、平均年齢77±7.3歳、範囲61~85; アポリポプロテインE(ApoE)遺伝子型4/4 n=2、3/4 n=4、3/3 n=5、2/3 n=1; 性別、男性9人、女性3人)、または認知機能正常(n=12、平均年齢70.6歳±6.2、範囲65~84; ApoE遺伝子型3/4 n=6、3/3 n=5、2/3 n=1; 性別、男性4人、女性8人)と評価した。CSF試料採取後に3人の被験者に頭痛があり、1人はブラッドパッチを必要とした。1人の参加者は、夜間に既存の錯乱を起こしたので、試験を中断した。

#### 【0109】

参加者は午前7時にワシントン大学臨床研究部門(Washington University Clinical Research Unit)に入院した。2本の静脈内カテーテルと1本の腰椎髄腔内カテーテルとを、既述のように設置した(Bateman et al. 2006)。ベースライン血液試料およびCSF試料を収集した後、<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-ロイシンのプライムドボラスを2mg/kgで10分間かけて注入した後、残りの8時間50分は2mg/kg/時間で注入した。注入中と注入後に、CSF試料と血液試料とを合計36時間にわたって収集し、-70°Cで保存した。12時間後に、腰椎カテーテルを除去し、参加者を研究部門から退院させた。

#### 【0110】

全ての試料を盲検的に加工、測定し、データ結果と個々の分析は、参加者の疾患状態を明らかにする前に完了した。c末端特異的抗体21f12および2g3を使って、まずA<sub>42</sub>を、次にA<sub>40</sub>を、CSF試料から逐次的に免疫沈降させた。次に精製A<sub>42</sub>をトリプシンで消化し、これらのトリプシンフラグメントにおける<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-ロイシンの存在量を、既述のように、タンデム質量分析を使って定量した(8、9)。

#### 【0111】

<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-ロイシン標識培地濃縮標準およびCSF試料を、安定同位体ラベリングタンデム質量分析(SILT MS)法(10)により、SILTmass(11)を使って分析した。各タンデム質量分析スキャンをAFASTA配列データベースで検索してペプチドを同定し、スコアを割り当てた。SILTmassは、A<sub>42</sub>トリプシンフラグメ

10

20

30

40

50

ントの理論的 b イオンおよび y イオンと合致するタンデム質量分析イオンのシグナル強度を合計し、結果を pepXML ファイルの一部として保存した。次に、各被験者について一組の pepXML ファイルを分析して、総標識シグナル強度および非標識シグナル強度を分割することによって、標識 A の非標識 A に対する比を算出した。 $^{13}\text{C}_6$ -ロイシン標識 A パーセントは、天然同位体存在量 A 17-28 で割った  $^{13}\text{C}_6$ -ロイシン-A 17-28 の比として算出した。結果を、マイクロソフト・エクセルにエクスポートし、標準曲線の傾きおよびロイシンラベリング比 ( $^{13}\text{C}_6$ -Leu /  $^{12}\text{C}_6$ -Leu) によって標準化した (12)。

#### 【0112】

分率合成速度 (FSR) および分率クリアランス速度 (FCR) の算出は、認知症ステータスに関して盲検的に、既述のように行った (9)。算出と測定を行った後、各参加者の認知症ステータスを統計比較に使用した。認知機能が正常な群と AD 群との間の FSR と FCR の比較は両側 t 検定で行い、有意水準を  $p < 0.05$  に設定した (Graphpad 5.03)。

#### 実施例 3 の参考文献

1. J. Hardy, D. J. Selkoe, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353 (2002).
2. J. L. Cummings, Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 351, 56 (2004).
3. D. Scheuner et al., Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2, 864 (1996).
4. R. J. Bateman et al., Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nat. Med.* 12, 856 (2006).
5. R. J. Bateman et al., A gamma-secretase inhibitor decreases amyloid-beta production in the central nervous system. *Ann. Neurol.* 66, 48 (2009).
6. R. B. DeMattos et al., ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo. *Neuron* 41, 193 (2004).
7. R. J. Ellis et al., Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: the CERAD experience, Part XV. *Neurology* 46, 1592 (1996).
8. R. J. Bateman et al., *Ann Neurol*, (Mar 18, 2009).
9. R. J. Bateman et al., *Nat Med* 12, 856 (Jul, 2006).
10. R. J. Bateman, L. Y. Munsell, X. Che

10

20

30

40

50

n, D. M. Holtzman, K. E. Yarasheski, J Am Soc Mass Spectrom 18, 997 (Jun, 2007).  
 11. D. L. Elbert, K. G. Mawuenyega, E. A. Scott, K. R. Wildsmith, R. J. Bateman, J Proteome Res 7, 4546 (Oct 3, 2008).  
 12. K. E. Yarasheski, K. Smith, M. J. Rennie, D. M. Bier, Biol Mass Spectrom 21, 486 (Oct, 1992).

## 【0113】

実施例4．CNS試料ではA 42代謝が変化している

10

本発明者らによる遅発型アルツハイマー病A 42代謝の最新のデータ分析において、本発明者らは、A 42代謝のパターンが、他の変異体と比較して異なることを見出している。PIBでアミロイド沈着を持たない正常な個体(図11A)およびアミロイド沈着を持つことがPIBで示されたAD患者(図11B)から採取したCSF試料中のさまざまなA 42変異体について、相対ラベリング( $^{13}\text{C}_6\text{-Leu}/^{12}\text{C}_6\text{-Leu}$ のH:L比)を算出した。これらの結果は、A 42代謝がAD個体では変化していることを示している。A 42曲線のクリアランス部分は、一貫して変化しているように見える。

## 【0114】

同じ分析を拡大して50人のAD患者からのデータを含むようにした。相対ラベリング( $^{13}\text{C}_6\text{-Leu}/^{12}\text{C}_6\text{-Leu}$ のH:L比)をさまざまなA 42およびA 40変異体について算出し、CSF中での各時点について、CSFにおけるA 42:A 40相対ラベリングの比を、アミロイドステータス(PET PIBスキャン)によって群化した95%信頼区間帯と共に算出した(図12)。大半の時間で、群による著しく有意な差がある(6~15時間では高く、24~30時間では低い)ことに注目されたい。図12では、また個別にプロットした場合(図13)には、10時間および27時間が有意だった。

20

## 【0115】

実施例5．血液試料ではA 42代謝が変化している

50人のAD患者からの血液試料を使って実施例5の場合と同じ分析を行った。相対ラベリング( $^{13}\text{C}_6\text{-Leu}/^{12}\text{C}_6\text{-Leu}$ のH:L比)をさまざまなA 42およびA 40変異体について算出し、血液中での各時点について、血液におけるA 42:A 40相対ラベリングの比を、アミロイドステータス(PET PIBスキャン)によって群化した95%信頼区間帯と共に算出することができる。例えば図14参照。

30

## 【0116】

実施例6．SILK法を使ったさらなるインビボデータ

アミロイド(A $\beta$ )のSILKトレーサー曲線のいくつかの側面を要約する簡単な測定値が、ADを持つ患者、ADのリスクがある患者、またはADを持つと疑われる患者についての診断情報または予後情報を与えうるといふ仮説を立てた。上記の仮説を検証するために、A $\beta$  SILKトレーサー曲線の下降中に算出されたA 42ラベリングのパーセントの、A 40のパーセントに対する比に基づいて、3つの患者群間の識別を試みた。インビボSILK研究は、別段の注記がある場合を除き、別記のとおり(Bateman RJ et al. 2006 Nature Medicine 12(7): 856およびUS7892845)、PETでPIB陽性であるPSEN1またはPSEN2変異を持つ患者(MC+)、PETでPIB陰性であるPSEN1またはPSEN2変異を持つ患者(MC-)、ノンキャリア変異キャリア同胞対照(NC)で行った。簡単に述べると、被験者に同位体標識ロイシン( $^{13}\text{C}_6\text{-ロイシン}$ )を静脈内注入により9時間にわたって投与した。CSF試料(6mL/試料)を、標識アミノ酸の注入開始の23時間後および24時間後に収集した。標識および非標識A 42およびA 40の定量的測定値をタンデム質量分析によって得て、標識:非標識A 42および標識:非標識A 40の比を各時間について算出した。これらの比は、注入後23時間および24時間にお

40

50

ける各 A アイソフォームの標識パーセントを表す。

【0117】

これらの実験では、0.9未満の A<sub>42</sub> 標識パーセント / A<sub>40</sub> 標識パーセントの比は被験者を AD陽性と分類し、0.9を上回る A<sub>42</sub> 標識パーセント / A<sub>40</sub> 標識パーセントの比は被験者を AD陰性と分類するように、0.9の診断閾が設定された。注入の23時間後における A<sub>42</sub> 標識パーセント / A<sub>40</sub> 標識パーセントの比が、3つの患者群の間で弁別されるかどうかを決定するために、各患者について得られた比を P I B 染色に対してグラフ化した。図15Aでわかるように、この比に関する0.9という閾は、MC+被験者の大半を NC被験者から明確に弁別する(6/7のMC+被験者がこの閾より下にあり、一方、11/12のNC被験者がこの閾より上にあった)。MC-群内では、被験者の3/4がこの閾の下にあった。しかし、MC-群内の被験者がADの初期段階にあった可能性はある。同様に、23時間および24時間ラベリングパーセンテージの平均を、A<sub>42</sub>とA<sub>40</sub>との間の比として比較することもできる。注入の23時間および24時間後の A<sub>42</sub> 標識パーセント / A<sub>40</sub> 標識パーセントは3つの患者群の間で弁別された。各患者について得られた比を P I B 染色に対してグラフ化した。図15Bでわかるように、この尺度を使うと、7/7のMC+被験者が閾の下にあり、一方、11/12のNCが閾の上にある。MC-群については、2/4の被験者が閾の下にある。

10

【0118】

これらのデータは、完全な動態モデルからの結果を使用する簡単な尺度に匹敵しうる。この例では、交換コンパートメント(exchange compartment)への A<sub>42</sub> の進入速度を表すパラメータ  $k_{ex42}$  を10倍してから、A<sub>42</sub>とA<sub>40</sub>との不可逆的喪失に関する速度定数の比に加える。図15Cに示すように、1.75の閾は、6/7のMC+被験者が閾の上であり、12/12のNC被験者が閾の下にあることを示す。MC-群については、2/4の被験者が閾の下である。

20

【0119】

これらの実施例は、S I L Kトレーサー曲線のいくつかの側面を要約する簡単な尺度が、ADの診断に役立ちうることを示している。これは、A<sub>42</sub> 動態の変化を診断するには、短期間の C S F 収集で十分でありうることも示している。

【0120】

本発明を詳細に説明し終えたので、本願の特許請求の範囲に定義される本発明の範囲から逸脱することなく、変更および変形が可能であることは、明白であるだろう。ただし、本開示に照らして、開示されている具体的実施形態には多くの改変を加えることができ、それでもなお、本発明の要旨および範囲から逸脱することなく、匹敵するまたは類似する結果を得ることができ、それゆえに本明細書に記載する全ての事項は、例示であって限定ではないと解釈されるべきであることを、当業者は理解すべきである。

30

【 図 1 】

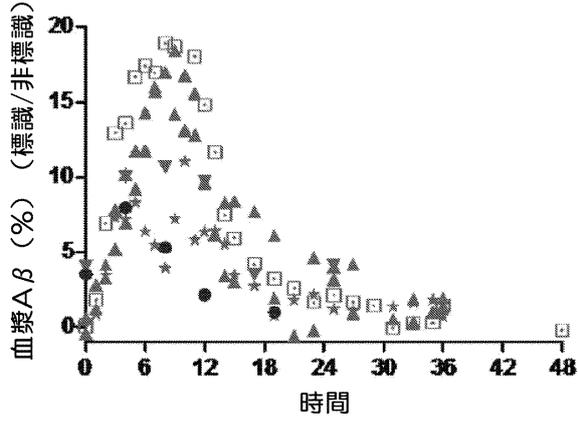


FIG. 1

【 図 2 】

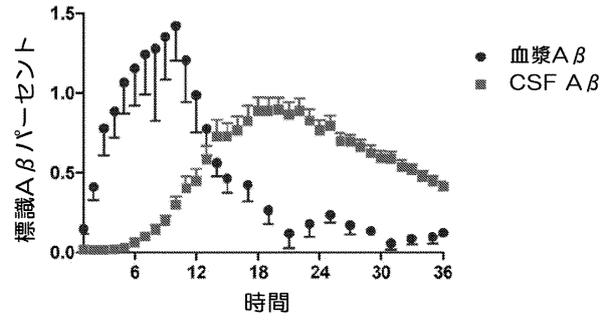


FIG. 2

【 図 3 】

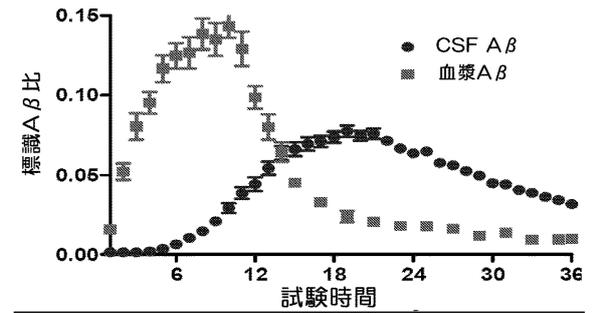


FIG. 3

【 図 4 】

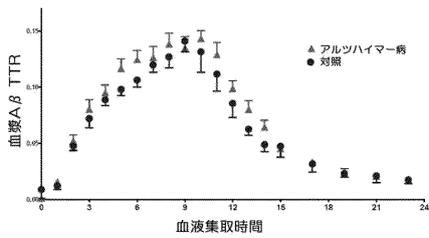


FIG. 4A

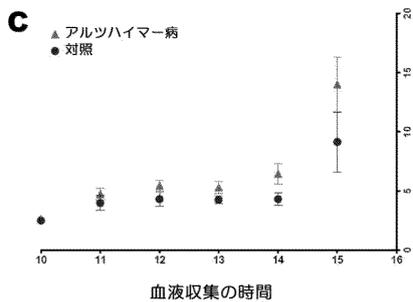
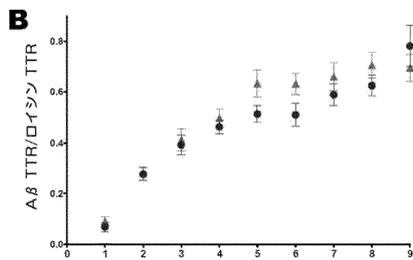


FIG. 4

【 図 5 】

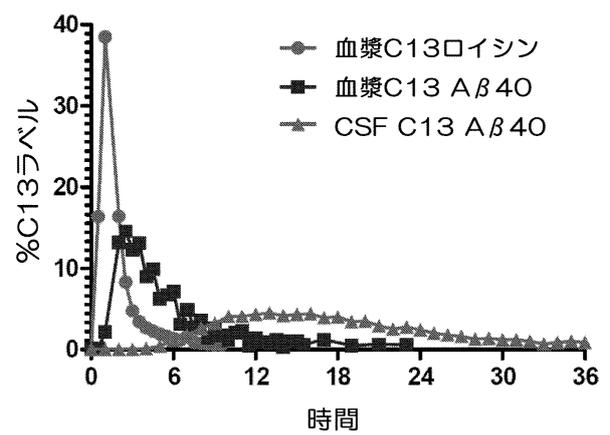


FIG. 5

【 図 6 】

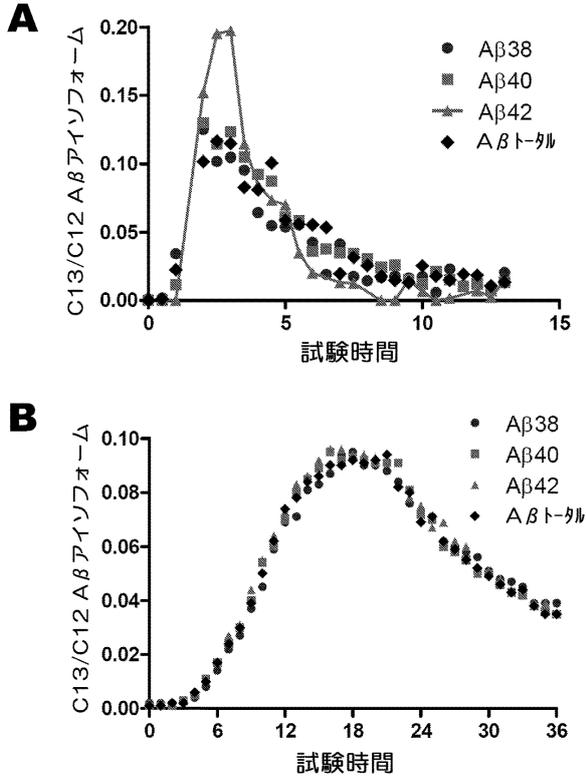


FIG. 6

【 図 8 】

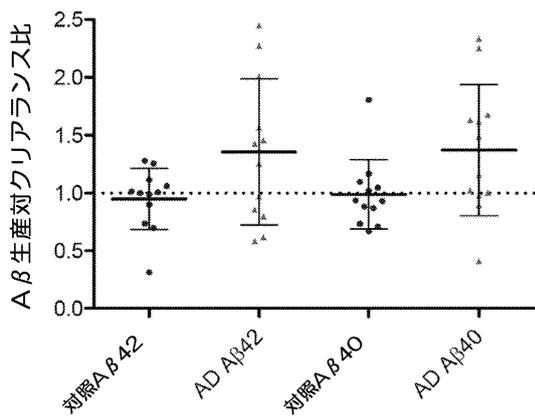


FIG. 8

【 図 7 】

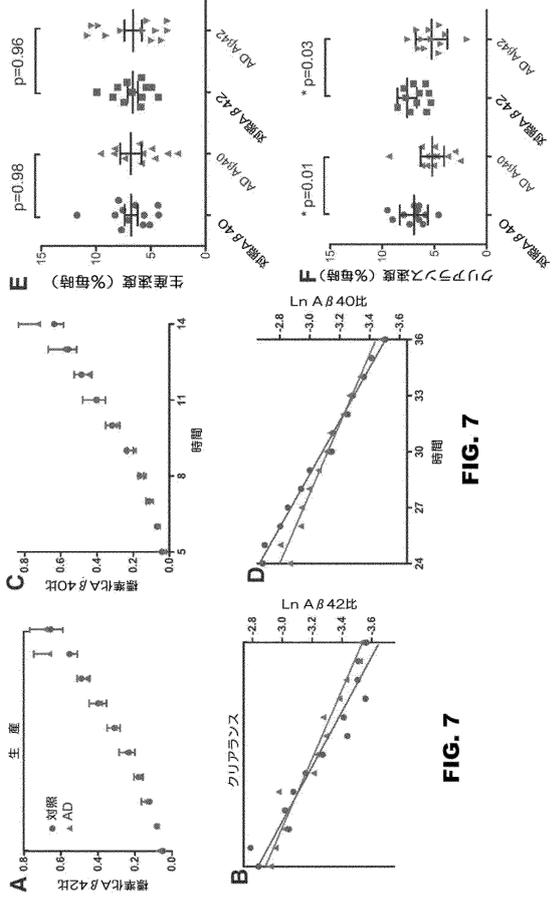


FIG. 7

FIG. 7

【 図 9 】

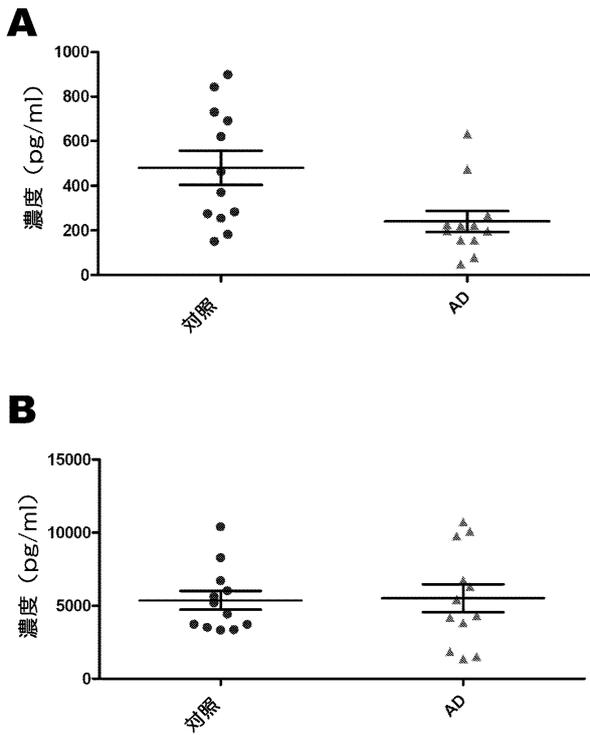
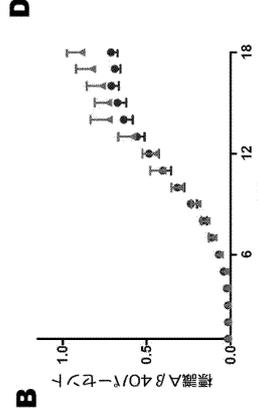
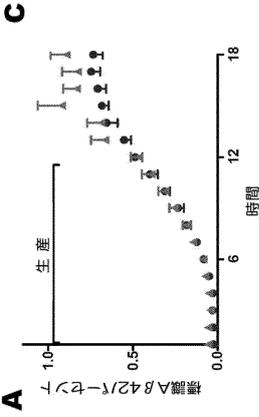
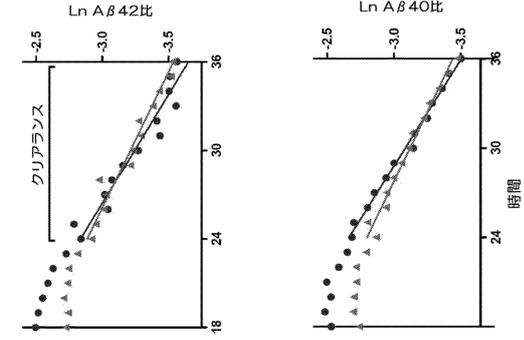


FIG. 9

FIG. 7

【 図 1 0 】



【 図 1 1 】

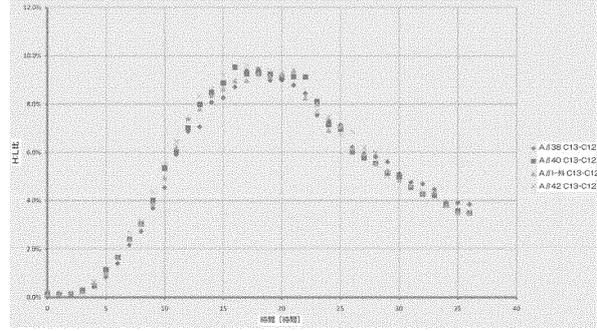


FIG. 10

FIG. 11A

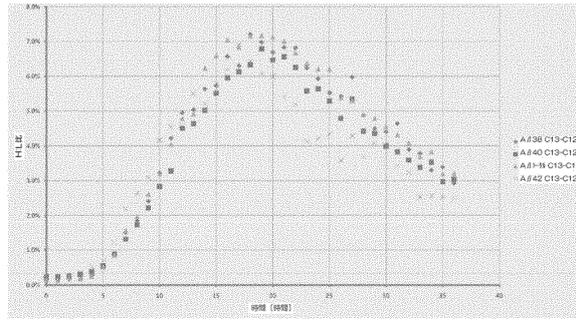


FIG. 10

FIG. 11B

【 図 1 2 】

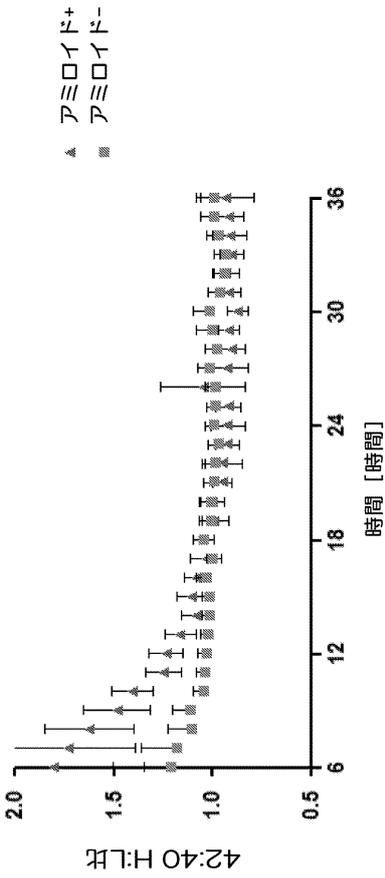


FIG. 12

【 図 1 3 】

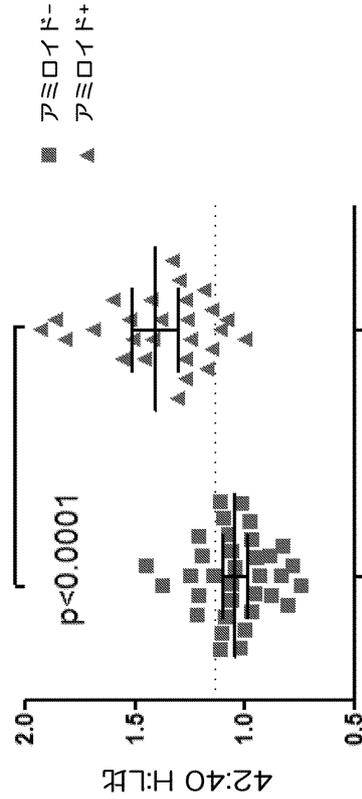


FIG. 13

【 図 14 】

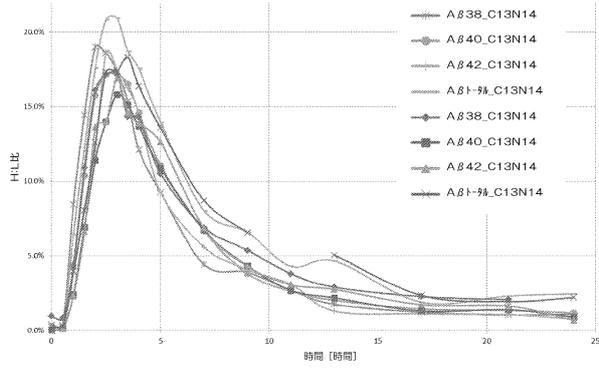


FIG. 14

【 図 15 】

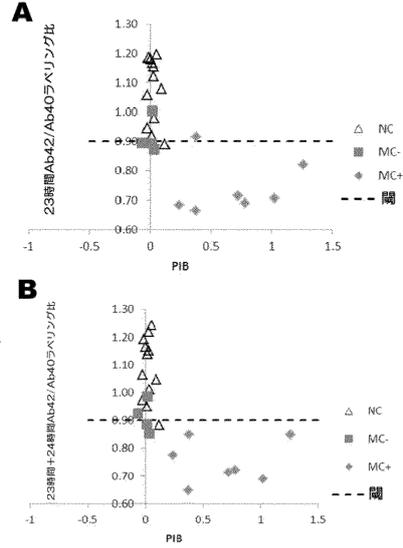


FIG. 15

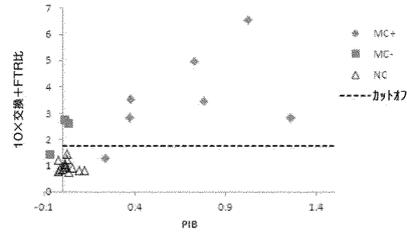


FIG. 15C

【 配列表 】

0006129868000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 デイビッド・ホルツマン  
アメリカ合衆国 6 3 1 3 0 ミズーリ州セント・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ
- (72)発明者 ランドール・ベイトマン  
アメリカ合衆国 6 3 1 3 0 ミズーリ州セント・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ
- (72)発明者 カワシ・ジー・マウエンイエガ  
アメリカ合衆国 6 3 1 3 0 ミズーリ州セント・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 特表 2 0 0 8 - 5 3 8 8 1 1 ( J P , A )  
特表 2 0 1 3 - 5 3 2 2 7 7 ( J P , A )  
米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 1 4 2 7 6 6 ( U S , A 1 )  
特表 2 0 1 0 - 5 0 2 9 3 8 ( J P , A )  
特表 2 0 0 5 - 5 1 7 9 0 4 ( J P , A )  
LAME Mary E, Quantitation of amyloid beta peptides A 1-38, A 1-40, and A 1-42 in human cerebrospinal fluid by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Anal Biochem, 2 0 1 1 年, Vol.419 No.2, Page.133-139  
SANCHEZ Laia, A 40 and A 42 Amyloid Fibrils Exhibit Distinct Molecular Recycling Properties, J Am Chem Soc, 2 0 1 1 年, Vol.133 No.17, Page.6505-6508  
松原悦朗, アルツハイマー病では、脳から髄液へのA クリアランスが障害されている, 臨床神経学, 2 0 0 4 年, Vol.44 No.12, Page.1025  
遠山育夫, アルツハイマー病におけるベータアミロイドペプチドのクリアランス機構, 老年期痴呆研究会誌, 2 0 1 0 年, Vol.15, Page.82-84  
松原悦朗, アルツハイマー病は全身性A クリアランス障害か?, 日本神経学会総会プログラム・抄録集, 2 0 0 7 年, Vol.48th, Page.148  
Randall J Bateman et al., Human amyloid- synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo, nature medicine, 2 0 0 6 年 6 月 2 5 日, Vol.12, No.7, P.856-861

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 6 8

G 0 1 N 2 7 / 6 2

G 0 1 N 3 3 / 5 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )