

(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2004-505609  
(P2004-505609A)

(43) 公表日 平成16年2月26日(2004.2.26)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B 0 5 0
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 B 0 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 39/395	4 B 0 6 4
A 6 1 P 25/28	A 6 1 K 48/00	4 B 0 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 302 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2001-572879 (P2001-572879)  
 (86) (22) 出願日 平成13年4月3日 (2001.4.3)  
 (85) 翻訳文提出日 平成14年10月3日 (2002.10.3)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/010908  
 (87) 国際公開番号 W02001/075454  
 (87) 国際公開日 平成13年10月11日 (2001.10.11)  
 (31) 優先権主張番号 60/194, 504  
 (32) 優先日 平成12年4月3日 (2000.4.3)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/253, 647  
 (32) 優先日 平成12年11月28日 (2000.11.28)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

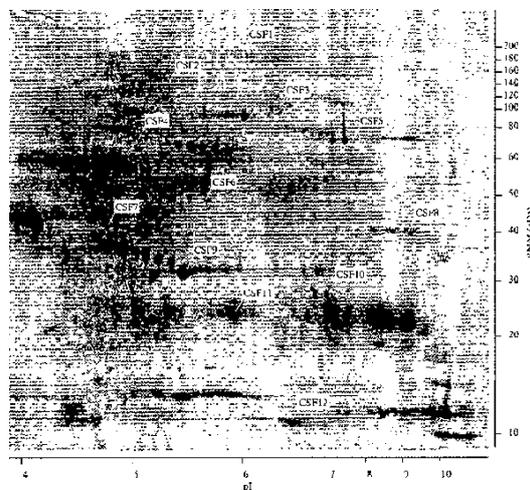
(71) 出願人 502220975  
 オックスフォード グリコサイエンス (ユーケー) リミテッド  
 イギリス, オクソン オーエックス14  
 4アールワイ, アビンドン, ミルトン パーク 86, ザ フォーラム  
 (71) 出願人 596082851  
 ファイザー・インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国、ニュー・ヨーク・100  
 17、ニュー・ヨーク、イースト・フォー  
 テイセカンド・ストリート・235  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸分子、ポリペプチド、ならびにアルツハイマー病の診断および処置を含むそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、アルツハイマー病のスクリーニング、診断または予後のため、アルツハイマー病の処置の有効性をモニターするため、ならびに薬物開発のための方法および組成物を提供する。脳脊髄液、血清または血漿の二次元電気泳動によって検出可能なアルツハイマー病関連特徴 (A F) が、記載される。本発明はさらに、脳脊髄液、血清または血漿において検出可能なアルツハイマー病関連タンパク質アイソフォーム (A P I)、単離された A P I を含む調製物、A P I に対して免疫特異的な交代、薬学的組成物、診断および治療方法、ならびにこれらを含むかまたはこれらに基づくキットをさらに提供する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

哺乳動物におけるアルツハイマー病のスクリーニング、診断または予後のための方法、アルツハイマー病を発症する危険のある哺乳動物を同定するための方法、および/あるいはアルツハイマー病を有する哺乳動物に施した治療の効果をモニターするための方法であって、該方法は、以下：

(a) 該哺乳動物由来の体液の試験サンプルを、二次元電気泳動によって分析して、特徴の二次元アレイを作製する工程であって、該アレイは、少なくとも1つの選択された特徴を含み、該特徴の相対存在比が、アルツハイマー病の存在、非存在、段階または重症度、あるいはアルツハイマー病の発症または経過を予測する、工程；および

(b) 該試験サンプル中の選択された各特徴の存在比を、アルツハイマー病を有さない1人以上の身体由来の体液中の選択された特徴の存在比、あるいはアルツハイマー病を有さない被験体における特徴についての予め決定された参照範囲、あるいは該試験サンプルにおける少なくとも1つの発現参照特徴 ( E R F ) での存在比と比較する工程、を包含する、方法。

10

**【請求項 2】**

前記体液が、脳脊髄液 ( C S F ) である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記方法が、アルツハイマー病のスクリーニングまたは診断のための方法であり、そして選択された少なくとも1つの特徴の前記相対存在比が、アルツハイマー病の存在または非存在に関連する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

**【請求項 4】**

前記方法が、アルツハイマー病を有する被験体に施した治療の効果をモニターするための方法であって、そして選択された少なくとも1つの特徴の前記相対存在比が、アルツハイマー病の重症度に関連する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記工程 ( b ) が、前記サンプルにおいて選択された各特徴の存在比を、アルツハイマー病を有さない1つ以上の哺乳動物由来の C S F において選択された特徴の存在比、またはアルツハイマー病を有さない哺乳動物における選択された特徴の予め決定された参照範囲と比較することを含む、請求項 2 に記載の方法。

30

**【請求項 6】**

前記工程 ( a ) が、以下：

## 【表 1】

AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6, AF-7, AF-8, AF-9, AF-10, AF-13, AF-14, AF-15, AF-16, AF-17, AF-18, AF-19, AF-20, AF-21, AF-22, AF-23, AF-24, AF-25, AF-26, AF-27, AF-28, AF-29, AF-30, AF-31, AF-32, AF-33, AF-34, AF-35, AF-36, AF-37, AF-38, AF-39, AF-40, AF-41, AF-42, AF-43, AF-44, AF-45, AF-46, AF-47, AF-48, AF-49, AF-50, AF-51, AF-52, AF-53, AF-54, AF-55, AF-56, AF-57, AF-58, AF-59, AF-60, AF-61, AF-62, AF-63, AF-64, AF-65, AF-66, AF-67, AF-68, AF-69, AF-70, AF-71, AF-72, AF-73, AF-74, AF-75, AF-76, AF-77, AF-78, AF-79, AF-80, AF-81, AF-82, AF-83, AF-84, AF-85, AF-86, AF-87, AF-88, AF-89, AF-90, AF-91, AF-92, AF-93, AF-94, AF-95, AF-96, AF-98, AF-99, AF-100, AF-101, AF-102, AF-103, AF-104, AF-105, AF-107, AF-108, AF-110, AF-111, AF-112, AF-114, AF-115, AF-116, AF-117, AF-118, AF-119, AF-121, AF-122, AF-123, AF-124, AF-125, AF-126, AF-127, AF-128, AF-129, AF-130, AF-131, AF-132, AF-133, AF-134, AF-137, AF-139, AF-140, AF-141, AF-142, AF-143, AF-144, AF-145, AF-146, AF-147, AF-148, AF-149, AF-150, AF-151, AF-152, AF-153, AF-154, AF-155, AF-156, AF-157, AF-159, AF-160, AF-161, AF-162, AF-163, AF-164, AF-165, AF-166, AF-167, AF-168, AF-169, AF-170, AF-171, AF-172, AF-173, AF-174, AF-175, AF-176, AF-177, AF-178, AF-179, AF-180, AF-181, AF-182, AF-183, AF-184, AF-185, AF-186, AF-187, AF-188, AF-189, AF-190, AF-191, または AF-191

10

20

のアルツハイマー病関連特徴 (AF) の 1 つ以上を定量的に検出することを含み、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記工程 (a) が、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) の後に、等電点電気泳動を含む、請求項 1、2 または 5 に記載の方法。

## 【請求項 8】

哺乳動物におけるアルツハイマー病のスクリーニング、診断または予後のための方法、アルツハイマー病を発症する危険のある哺乳動物を同定するための方法、あるいはアルツハイマー病を有する哺乳動物に施した治療の効果をモニターするための方法であって、該方法は、以下：

30

(a) 該哺乳動由来の脳脊髄液のサンプル中の、以下：

## 【表 2】

API-1, API-2, API-3, API-4, API-5, API-6,  
 API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15, API-16, API-17, API-  
 18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26, API-27,  
 API-28, API-30, API-33, API-34, API-35, API-36, API-37, API-38,  
 API-39, API-40, API-41, API-42, API-43, API-44, API-45, API-46,  
 API-47, API-48, API-49, API-50, API-51, API-52, API-53, API-54,  
 API-55, API-56, API-57, API-58, API-59, API-60, API-61, API-62,  
 API-63, API-64, API-65, API-66, API-67, API-68, API-69, API-70,  
 API-71, API-72, API-73, API-74, API-75, API-76, API-77, API-78,  
 API-79, API-80, API-81, API-82, API-83, API-84, API-85, API-86,  
 API-88, API-89, API-90, API-91, API-92, API-93, API-95, API-97,  
 API-98, API-99, API-101, API-102, API-103, API-104, API-107, API-  
 108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-116, API-118, API-  
 119, API-120, API-121, API-122, API-123, API-124, API-125, API-  
 126, API-127, API-128, API-130, API-131, API-132, API-134, API-  
 135, API-136, API-137, API-138, API-139, API-140, API-141, API-  
 142, API-143, API-144, API-145, API-146, API-147, API-148, API-  
 149, API-150, API-151, API-152, API-153, API-155, API-158, API-  
 159, API-160, API-161, API-162, API-163, API-165, API-166, API-  
 167, API-168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-173, API-  
 174, API-175, API-176, API-177, API-178, API-179, API-180, API-  
 181, API-182, API-183, API-184, API-185, API-186, API-187, API-  
 188, API-189, API-190, API-191, API-192, API-194, API-196, API-  
 197, API-198, API-199, API-200, API-201, API-202, API-210, API-  
 214, API-215, API-217, API-219, API-220, API-221, API-222, API-  
 223, API-224, API-225, API-232, API-233, API-234, API-237, API-  
 238, API-239, API-240, API-241, API-242, API-243, API-244, API-  
 245, API-246, API-247, または API-248

10

20

30

のアルツハイマー病関連タンパク質アイソフォーム (API) の少なくとも 1 つを定量的に検出する工程 ; および

(b) 該アイソフォームまたは工程 (a) において検出したアイソフォームのレベルまたは量を、コントロールと比較する工程、  
 を包含する、方法。

40

## 【請求項 9】

請求項 8 に記載の方法であって、ここで、前記定量的に検出する工程が、前記サンプルの少なくとも 1 つのアリコートを試験することを含み、該試験することが、以下 :

(a) 該アリコートを、予め選択された API に対して免疫特異的な抗体と接触させる工程 ;

(b) 該抗体と該アリコート中の少なくとも 1 つの種との間に生じる任意の結合を定量的に測定する工程 ; および

(c) 工程 (b) の結果を、コントロールと比較する工程、  
 を包含する、方法。

## 【請求項 10】

50

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記抗体がキメラである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記定量的に検出する工程が、複数の抗体を有する複数のアリコートをもつ、複数の予め選択された A P I の定量的検出について試験することを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記抗体がキメラである、請求項 1 2 に記載の方法。

10

【請求項 1 5】

調製物であって、以下：

【表 3】

API-1,

API-2, API-3, API-4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15,  
 API-16, API-17, API-18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26,  
 API-27, API-28, API-30, API-33, API-34, API-35, API-36, API-37, API-38, API-39,  
 API-40, API-41, API-42, API-43, API-44, API-45, API-46, API-47, API-48, API-49,  
 API-50, API-51, API-52, API-53, API-54, API-55, API-56, API-57, API-58, API-59,  
 API-60, API-61, API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67, API-68, API-69,  
 API-70, API-71, API-72, API-73, API-74, API-75, API-76, API-77, API-78, API-79,  
 API-80, API-81, API-82, API-83, API-84, API-85, API-86, API-88, API-89, API-90,  
 API-91, API-92, API-93, API-95, API-97, API-98, API-99, API-101, API-102, API-  
 103, API-104, API-107, API-108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-116,  
 API-118, API-119, API-120, API-121, API-122, API-123, API-124, API-125, API-  
 126, API-127, API-128, API-130, API-131, API-132, API-134, API-135, API-136,  
 API-137, API-138, API-139, API-140, API-141, API-142, API-143, API-144, API-  
 145, API-146, API-147, API-148, API-149, API-150, API-151, API-152, API-153,  
 API-155, API-158, API-159, API-160, API-161, API-162, API-163, API-165, API-  
 166, API-167, API-168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-173, API-174,  
 API-175, API-176, API-177, API-178, API-179, API-180, API-181, API-182, API-  
 183, API-184, API-185, API-186, API-187, API-188, API-189, API-190, API-191,  
 API-192, API-194, API-196, API-197, API-198, API-199, API-200, API-201, API-  
 202, API-210, API-214, API-215, API-217, API-219, API-220, API-221, API-222,  
 API-223, API-224, API-225, API-232, API-233, API-234, API-237, API-238, API-  
 239, API-240, API-241, API-242, API-243, API-244, API-245, API-246, API-247, または  
 API-248.

20

30

40

から選択される単離されたアルツハイマー関連タンパク質アイソフォーム ( A P I ) のうち少なくとも 1 つを含む、調製物。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載の調製物、他の試薬、および使用のための指示書を含む、キット。

【請求項 1 7】

複数の前記調製物を含む、請求項 1 6 に記載のキット。

【請求項 1 8】

50

単離されたヒトタンパク質を含む調製物であって、該タンパク質は、質量分析法によって決定される場合に、PGLGMの部分配列を有するトリプシン消化ペプチドを含む、調製物。

【請求項19】

単離されたヒトタンパク質を含む調製物であって、該タンパク質は、質量分析法によって決定される場合に、GPLGMの部分配列を有するトリプシン消化ペプチドを含む、調製物。

【請求項20】

単離されたヒトタンパク質を含む調製物であって、該タンパク質は、質量分析法によって決定される場合に、PGLGFの部分配列を有するトリプシン消化ペプチドを含む、調製物。

10

【請求項21】

単離されたヒトタンパク質を含む調製物であって、該タンパク質は、質量分析法によって決定される場合に、GPLGFの部分配列を有するトリプシン消化ペプチドを含む、調製物。

【請求項22】

単離されたヒトタンパク質を含む調製物であって、該タンパク質は、質量分析法によって決定される場合に、PGIGMの部分配列を有するトリプシン消化ペプチドを含む、調製物。

【請求項23】

単離されたヒトタンパク質を含む調製物であって、該タンパク質は、質量分析法によって決定される場合に、GPIGMの部分配列を有するトリプシン消化ペプチドを含む、調製物。

20

【請求項24】

単離されたヒトタンパク質を含む調製物であって、該タンパク質は、質量分析法によって決定される場合に、PGIGFの部分配列を有するトリプシン消化ペプチドを含む、調製物。

【請求項25】

単離されたヒトタンパク質を含む調製物であって、該タンパク質は、質量分析法によって決定される場合に、GPIGFの部分配列を有するトリプシン消化ペプチドを含む、調製物。

30

【請求項26】

前記トリプシン消化ペプチドが、1546.73Daの質量、および0DaのN末端質量、ならびに1076.63DaのC末端質量を有し、そして該質量が、100万分の100部以下の測定誤差を有する、請求項18、19、20、21、22、23、24または25のいずれか1項に記載の調製物。

【請求項27】

前記タンパク質が、質量分析法によって決定される場合に、HQVの部分配列を有するトリプシン消化ペプチドをさらに含む、請求項18、19、20、21、22、23、24または25に記載の調製物。

40

【請求項28】

前記タンパク質が、質量分析法によって決定される場合に、HQVの部分配列を有するトリプシン消化ペプチドをさらに含み、ここで、該トリプシン消化ペプチドが、1096.56Daの質量、および0DaのN末端質量、および733.50DaのC末端質量を有し、該質量が100万分の100部以下の測定誤差を有する、請求項18、19、20、21、22、23、24または25のいずれか1項に記載の調製物。

【請求項29】

単離されたヒトタンパク質を含む調製物であって、該タンパク質は、質量分析法によって決定される場合に、HQVの部分配列を有するトリプシン消化ペプチドを含む、調製物。

【請求項30】

50

前記トリプシン消化ペプチドが、1096.56 Daの質量、および0 DaのN末端質量、ならびに733.50 DaのC末端質量を有し、該質量が、100万分の100部以下の測定誤差を有する、請求項29に記載の調製物。

【請求項31】

前記タンパク質が、約6.80の等電点(pI)および約18,741の見掛け上の分子量(MW)を有する、請求項19、20、21、22、23、24、25、26、29または30のいずれか1項に記載の調製物。

【請求項32】

前記タンパク質の前記pIが、6.80の10%以内であり、そして前記MWが、18,741の10%以内である、請求項31に記載の調製物。

10

【請求項33】

前記タンパク質の前記pIが、6.80の5%以内であり、そして前記MWが、18,741の5%以内である、請求項31に記載の調製物。

【請求項34】

前記タンパク質の前記pIが、6.80の1%以内であり、そして前記MWが、18,741の1%以内である、請求項31に記載の調製物。

【請求項35】

抗体であって、以下：

【表4】

API-1, API-2, API-3, API-

20

4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15, API-16, API-17,  
API-18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26, API-27, API-28,  
API-30, API-33, API-34, API-35, API-36, API-37, API-38, API-39, API-40, API-41,  
API-42, API-43, API-44, API-45, API-46, API-47, API-48, API-49, API-50, API-51,  
API-52, API-53, API-54, API-55, API-56, API-57, API-58, API-59, API-60, API-61,  
API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67, API-68, API-69, API-70, API-71,  
API-72, API-73, API-74, API-75, API-76, API-77, API-78, API-79, API-80, API-81,  
API-82, API-83, API-84, API-85, API-86, API-88, API-89, API-90, API-91, API-92,  
API-93, API-95, API-97, API-98, API-99, API-101, API-102, API-103, API-104,  
API-107, API-108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-116, API-118, API-  
119, API-120, API-121, API-122, API-123, API-124, API-125, API-126, API-127,  
API-128, API-130, API-131, API-132, API-134, API-135, API-136, API-137, API-  
138, API-139, API-140, API-141, API-142, API-143, API-144, API-145, API-146,  
API-147, API-148, API-149, API-150, API-151, API-152, API-153, API-155, API-  
158, API-159, API-160, API-161, API-162, API-163, API-165, API-166, API-167,  
API-168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-173, API-174, API-175, API-  
176, API-177, API-178, API-179, API-180, API-181, API-182, API-183, API-184,

30

40

(表4の続き)

API-185, API-186, API-187, API-188, API-189, API-190, API-191, API-192, API-  
194, API-196, API-197, API-198, API-199, API-200, API-201, API-202, API-210,  
API-214, API-215, API-217, API-219, API-220, API-221, API-222, API-223, API-  
224, API-225, API-232, API-233, API-234, API-237, API-238, API-239, API-240,  
API-241, API-242, API-243, API-244, API-245, API-246, API-247, またはAPI-248

のアルツハイマー病関連タンパク質アイソフォーム(API)のうち1つに免疫特異的に

50

結合し得る、抗体。

【請求項 36】

モノクローナル抗体である、請求項 35 に記載の抗体。

【請求項 37】

キメラ抗体である、請求項 35 に記載の抗体。

【請求項 38】

前記 A P I の別のアイソフォームよりも高い親和性で該 A P I に結合する、請求項 35 または 36 に記載の抗体。

【請求項 39】

前記 A P I の任意の他のアイソフォームよりも高い親和性で該 A P I に結合する、請求項 35 に記載の抗体。 10

【請求項 40】

請求項 35 に記載の抗体、他の試薬、および使用のための指示書を含む、キット。

【請求項 41】

複数の前記抗体を含む、請求項 40 に記載のキット。

【請求項 42】

治療有効量の請求項 35 に記載の抗体および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項 43】

薬学的組成物であって、以下：

請求項 35 に記載の抗体の治療有効量のフラグメントまたは誘導体であって、該フラグメントまたは誘導体は、該抗体の結合ドメインを含む、フラグメントまたは誘導体；および薬学的に受容可能なキャリア、  
を含む、薬学的組成物。 20

【請求項 44】

アルツハイマー病を処置する方法であって、このような処置を必要とする被験体に、以下：

## 【表 5】

API-1, API-2, API-3, API-4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10,  
 API-14, API-15, API-16, API-17, API-18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24,  
 API-25, API-26, API-27, API-28, API-30, API-33, API-34, API-35, API-36, API-37,  
 API-38, API-39, API-40, API-41, API-42, API-43, API-44, API-45, API-46, API-47,  
 API-48, API-49, API-50, API-51, API-52, API-53, API-54, API-55, API-56, API-57,  
 API-58, API-59, API-60, API-61, API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67,  
 API-68, API-69, API-70, API-71, API-72, API-73, API-74, API-75, API-76, API-77,  
 API-78, API-79, API-80, API-81, API-82, API-83, API-84, API-85, API-86, API-88,  
 API-89, API-90, API-91, API-92, API-93, API-95, API-97, API-98, API-99, API-101  
 API-102, API-103, API-104, API-107, API-108, API-111, API-112, API-113, API-  
 114, API-116, API-118, API-119, API-120, API-121, API-122, API-123, API-124,  
 API-125, API-126, API-127, API-128, API-130, API-131, API-132, API-134, API-  
 135, API-136, API-137, API-138, API-139, API-140, API-141, API-142, API-143,  
 API-144, API-145, API-146, API-147, API-148, API-149, API-150, API-151, API-  
 152, API-153, API-155, API-158, API-159, API-160, API-161, API-162, API-163,  
 API-165, API-166, API-167, API-168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-  
 173, API-174, API-175, API-176, API-177, API-178, API-179, API-180, API-181,  
 API-182, API-183, API-184, API-185, API-186, API-187, API-188, API-189, API-  
 190, API-191, API-192, API-194, API-196, API-197, API-198, API-199, API-200,  
 API-201, API-202, API-210, API-214, API-215, API-217, API-219, API-220, API-  
 221, API-222, API-223, API-224, API-225, API-232, API-233, API-234, API-237,  
 API-238, API-239, API-240, API-241, API-242, API-243, API-244, API-245, API-  
 246, API-247, または API-248.

10

20

のアルツハイマー病関連タンパク質アイソフォーム (API) の 1 つをコードする、治療 30  
 有効量の核酸を投与する工程を包含する、方法。

## 【請求項 45】

アルツハイマー病を処置する方法であって、このような処置または予防を必要とする被験  
 体に、以下：

## 【表 6】

API-1, API-2, API-3, API-  
 4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15, API-16, API-17,

(表 6 の続き)

API-18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26, API-27, API-28,  
 API-30, API-33, API-34, API-35, API-36, API-37, API-38, API-39, API-40, API-41,  
 API-42, API-43, API-44, API-45, API-46, API-47, API-48, API-49, API-50, API-51,  
 API-52, API-53, API-54, API-55, API-56, API-57, API-58, API-59, API-60, API-61,  
 API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67, API-68, API-69, API-70, API-71,  
 API-72, API-73, API-74, API-75, API-76, API-77, API-78, API-79, API-80, API-81,  
 API-82, API-83, API-84, API-85, API-86, API-88, API-89, API-90, API-91, API-92,  
 API-93, API-95, API-97, API-98, API-99, API-101, API-102, API-103, API-104,  
 API-107, API-108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-116, API-118, API-  
 119, API-120, API-121, API-122, API-123, API-124, API-125, API-126, API-127,  
 API-128, API-130, API-131, API-132, API-134, API-135, API-136, API-137, API-  
 138, API-139, API-140, API-141, API-142, API-143, API-144, API-145, API-146,  
 API-147, API-148, API-149, API-150, API-151, API-152, API-153, API-155, API-  
 158, API-159, API-160, API-161, API-162, API-163, API-165, API-166, API-167,  
 API-168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-173, API-174, API-175, API-  
 176, API-177, API-178, API-179, API-180, API-181, API-182, API-183, API-184,  
 API-185, API-186, API-187, API-188, API-189, API-190, API-191, API-192, API-  
 194, API-196, API-197, API-198, API-199, API-200, API-201, API-202, API-210,  
 API-214, API-215, API-217, API-219, API-220, API-221, API-222, API-223, API-  
 224, API-225, API-232, API-233, API-234, API-237, API-238, API-239, API-240,  
 API-241, API-242, API-243, API-244, API-245, API-246, API-247, または API-248

10

20

のアルツハイマー病関連タンパク質アイソフォーム (API) の 1 つ以上の機能を阻害す  
 る、治療有効量の核酸または抗体を投与する工程を包含する、方法。

【請求項 46】

前記核酸が、API アンチセンス核酸またはリボザイムである、請求項 45 に記載の方法  
 。

30

【請求項 47】

API、API フラグメント、または API 関連ポリペプチドと相互作用する因子をスク  
 リーニングする方法であって、該方法は、以下：

(a) API、API の生物学的に活性な部分、または API 関連ポリペプチドを、該因  
 子と接触させる工程；および

(b) 該因子が、該 API、該 API フラグメント、または該 API 関連ポリペプチドと  
 相互作用するか否かを決定する工程、

を包含する、方法。

40

【請求項 48】

前記 API、前記 API フラグメント、または前記 API 関連ポリペプチドが、細胞によ  
 って発現される、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記細胞が、組換え API、組換え API フラグメント、または組換え API 関連ポリペ  
 プチドを発現する、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 50】

API または API 関連ポリペプチドの発現または活性を調節する因子についてスクリー  
 ニングする方法であって、該方法は、以下：

(a) API または API 関連ポリペプチドを発現する細胞の第 1 の集団を、候補因子

50

と接触させる工程；

(b) 該 A P I または該 A P I 関連ポリペプチドを発現する細胞の第 2 の集団を、コントロール因子と接触させる工程；および

(c) 該第 1 および第 2 の細胞集団における、該 A P I もしくは該 A P I 関連ポリペプチドまたは該 A P I もしくは該 A P I 関連ポリペプチドをコードする m R N A のレベルを比較する工程、あるいは該第 1 および第 2 の細胞集団における、細胞のセカンドメッセンジャーの誘導のレベルを比較する工程、

を包含する、方法。

【請求項 5 1】

前記 A P I または前記 A P I 関連ポリペプチド、前記 A P I または前記 A P I 関連ポリペプチドをコードする m R N A、あるいは前記細胞のセカンドメッセンジャーの前記レベルが、前記第 2 の細胞集団よりも前記第 1 の細胞集団において大きい、請求項 5 0 に記載の方法。

10

【請求項 5 2】

前記 A P I または前記 A P I 関連ポリペプチド、前記 A P I または前記 A P I 関連ポリペプチドをコードする m R N A、あるいは前記細胞のセカンドメッセンジャーの前記レベルが、前記第 2 の細胞集団よりも前記第 1 の細胞集団において小さい、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 3】

A P I または A P I 関連ポリペプチドの発現または活性を調節する因子をスクリーニングまたは同定する方法であって、該方法は、以下：

20

(a) スクリーニングすべき因子を、第 1 の哺乳動物または哺乳動物のグループに投与する工程；

(b) コントロール因子を、第 2 の哺乳動物または哺乳動物のグループに投与する工程；および

(c) 該第 1 および第 2 のグループにおける、該 A P I もしくは該 A P I 関連ポリペプチド、または該 A P I もしくは該 A P I 関連ポリペプチドをコードする m R N A の発現レベルを比較する工程、あるいは該第 1 および第 2 のグループにおける、細胞のセカンドメッセンジャーの誘導のレベルを比較する工程、

を包含する、方法。

30

【請求項 5 4】

前記哺乳動物が、アルツハイマー病またはダウン症候群のための動物モデルである、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記 A P I または前記 A P I 関連ポリペプチド、前記 A P I または前記 A P I 関連ポリペプチドをコードする m R N A、あるいは前記細胞のセカンドメッセンジャーの前記レベルが、前記第 2 のグループよりも前記第 1 のグループにおいて大きい、請求項 5 3 または 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記 A P I または前記 A P I 関連ポリペプチド、前記 A P I または前記 A P I 関連ポリペプチドをコードする m R N A、あるいは前記細胞のセカンドメッセンジャーの前記レベルが、前記第 2 のグループよりも前記第 1 のグループにおいて小さい、請求項 5 3 または 5 4 に記載の方法。

40

【請求項 5 7】

前記第 1 および第 2 のグループにおける、前記 A P I または前記 A P I 関連ポリペプチド、前記 A P I または前記 A P I 関連ポリペプチドをコードする m R N A、あるいは前記細胞のセカンドメッセンジャーの前記レベルが、正常なコントロール哺乳動物における、該 A P I または該 A P I 関連ポリペプチド、あるいは該 A P I または該 A P I 関連ポリペプチドをコードする該 m R N A のレベルとさらに比較される、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 8】

50

スクリーニングすべき前記因子の投与が、前記第1のグループにおける前記A P Iまたは前記A P I関連ポリペプチド、あるいは前記A P Iまたは前記A P I関連ポリペプチドをコードするm R N A、あるいは前記細胞のセカンドメッセンジャーのレベルを、前記第2のグループにおける該A P Iまたは該A P I関連ポリペプチドあるいは該m R N Aあるいは該細胞のセカンドメッセンジャーのレベルへと調節する、請求項53に記載の方法。

【請求項59】

前記哺乳動物が、アルツハイマー病を有するヒト被験体である、請求項53に記載の方法。

【請求項60】

A P IまたはA P I関連ポリペプチドと相互作用する因子をスクリーニングまたは同定する方法であって、該方法は、以下： 10

(a) スクリーニングすべき因子を、該A P Iまたは該A P I関連ポリペプチドと接触させる工程、および

(b) 存在する場合、該因子と該A P Iまたは該A P I関連ポリペプチドとの間の結合を定量的に検出する工程、  
を包含する、方法。

【請求項61】

A P IまたはA P I関連ポリペプチドの活性を調節する因子をスクリーニングまたは同定する方法であって、該方法は、以下：

(a) 第1のアリコートにおいて、スクリーニングすべき因子を、該A P Iまたは該A P I関連ポリペプチドと接触させる工程、および 20

(b) 該第1のアリコートにおける該A P Iまたは該A P I関連ポリペプチドの活性を、該候補因子の添加後に、コントロールアリコートにおける該A P Iまたは該A P I関連ポリペプチドの活性、あるいは予め決定した参照範囲と比較する工程、  
を包含する、方法。

【請求項62】

前記A P Iまたは前記A P I関連ポリペプチドが、組換えタンパク質である、請求項60または61に記載の方法。

【請求項63】

前記A P Iまたは前記A P I関連ポリペプチドが、固体支持体上に固定されている、請求項60または61に記載の方法。 30

【請求項64】

A P I - 1 1 1をコードするヌクレオチド配列、A P I - 1 1 2をコードするヌクレオチド配列、またはそれらの相補鎖にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

【請求項65】

A P I - 1 1 1の少なくとも10個連続したアミノ酸をコードするヌクレオチド、A P I - 1 1 2の少なくとも10個連続したアミノ酸をコードするヌクレオチド配列、またはそれらの相補鎖にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

【請求項66】

請求項64または65に記載の核酸分子を含む、ベクター。 40

【請求項67】

請求項66に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項68】

請求項64または65に記載の核酸分子を発現するように遺伝子操作された、宿主細胞。

【請求項69】

被験体におけるアルツハイマー病のスクリーニング、診断または予後のための方法、あるいは被験体に投与した抗アルツハイマー病剤または治療の効果をモニターするための方法であって、該方法は、以下：

(a) 以下

【表 7】

API-1, API-2, API-3,  
 API-4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10, API-14,  
 API-15, API-16, API-17, API-18, API-19, API-20, API-22,  
 API-23, API-24, API-25, API-26, API-27, API-28, API-30,  
 API-33, API-34, API-35, API-36, API-37, API-38, API-39,  
 API-40, API-41, API-42, API-43, API-44, API-45, API-46,  
 API-47, API-48, API-49, API-50, API-51, API-52, API-53,  
 API-54, API-55, API-56, API-57, API-58, API-59, API-60,

10

(表 7 の続き)

API-61, API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67,  
 API-68, API-69, API-70, API-71, API-72, API-73, API-74,  
 API-75, API-76, API-77, API-78, API-79, API-80, API-81,  
 API-82, API-83, API-84, API-85, API-86, API-88, API-89,  
 API-90, API-91, API-92, API-93, API-95, API-97, API-98,  
 API-99, API-101, API-102, API-103, API-104, API-107, API-  
 108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-116, API-118,  
 API-119, API-120, API-121, API-122, API-123, API-124, API-  
 125, API-126, API-127, API-128, API-130, API-131, API-132,  
 API-134, API-135, API-136, API-137, API-138, API-139, API-  
 140, API-141, API-142, API-143, API-144, API-145, API-146,  
 API-147, API-148, API-149, API-150, API-151, API-152, API-  
 153, API-155, API-158, API-159, API-160, API-161, API-162,  
 API-163, API-165, API-166, API-167, API-168, API-169, API-  
 170, API-171, API-172, API-173, API-174, API-175, API-176,  
 API-177, API-178, API-179, API-180, API-181, API-182, API-  
 183, API-184, API-185, API-186, API-187, API-188, API-189,  
 API-190, API-191, API-192, API-194, API-196, API-197, API-  
 198, API-199, API-200, API-201, API-202, API-210, API-214,  
 API-215, API-217, API-219, API-220, API-221, API-222, API-  
 223, API-224, API-225, API-232, API-233, API-234, API-237,  
 API-238, API-239, API-240, API-241, API-242, API-243, API-  
 244, API-245, API-246, API-247, または API-248

20

30

40

から選択される A P I をコードするヌクレオチド配列に相補的な 10 個以上連続したヌクレオチドを含む、少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドプローブを、該被験体由来の生物学的サンプルから得た R N A、または該 R N A からコピーした c D N A と接触させる工程であって、ここで、該接触させる工程が、存在する場合、該プローブの該ヌクレオチド配列へのハイブリダイズを可能にする条件下で起こる、工程；

( b ) 存在する場合、該プローブと該ヌクレオチド配列との間のハイブリダイゼーションを検出する工程；および

( c ) 存在する場合、工程 ( b ) において検出した該ハイブリダイゼーションを、コント

50

ロールサンプルにおいて検出した該ハイブリダイゼーション、または予め決定した参照範囲と比較する工程、  
を包含する、方法。

【請求項 70】

前記工程 (a) が、以下：

【表 8】

API-1, API-2

API-3, API-4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15, API-16,  
API-17, API-18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26, API-27,  
API-28, API-30, API-33, API-34, API-35, API-36, API-37, API-38, API-39, API-40,  
API-41, API-42, API-43, API-44, API-45, API-46, API-47, API-48, API-49, API-50,  
API-51, API-52, API-53, API-54, API-55, API-56, API-57, API-58, API-59, API-60,  
API-61, API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67, API-68, API-69, API-70,  
API-71, API-72, API-73, API-74, API-75, API-76, API-77, API-78, API-79, API-80,  
API-81, API-82, API-83, API-84, API-85, API-86, API-88, API-89, API-90, API-91,  
API-92, API-93, API-95, API-97, API-98, API-99, API-101, API-102, API-103, API-  
104, API-107, API-108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-116, API-118,  
API-119, API-120, API-121, API-122, API-123, API-124, API-125, API-126, API-  
127, API-128, API-130, API-131, API-132, API-134, API-135, API-136, API-137,  
API-138, API-139, API-140, API-141, API-142, API-143, API-144, API-145, API-  
146, API-147, API-148, API-149, API-150, API-151, API-152, API-153, API-155,  
API-158, API-159, API-160, API-161, API-162, API-163, API-165, API-166, API-  
167, API-168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-173, API-174, API-175,  
API-176, API-177, API-178, API-179, API-180, API-181, API-182, API-183, API-  
184, API-185, API-186, API-187, API-188, API-189, API-190, API-191, API-192,  
API-194, API-196, API-197, API-198, API-199, API-200, API-201, API-202, API-  
210, API-214, API-215, API-217, API-219, API-220, API-221, API-222, API-223,  
API-224, API-225, API-232, API-233, API-234, API-237, API-238, API-239, API-  
240, API-241, API-242, API-243, API-244, API-245, API-246, API-247またはAPI-248

10

20

30

から選択される A P I をコードするヌクレオチド配列に相補的な 10 個以上連続したヌクレオチドを含む、複数オリゴヌクレオチドプローブを、該被験体由来の生物学的サンプルから得られる R N A、または該 R N A からコピーされた c D N A と接触させることを含み、ここで、該接触が、存在する場合、該プローブの該ヌクレオチド配列へのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で起こる、請求項 69 に記載の方法。

40

【請求項 71】

前記工程 (a) が、前記ヌクレオチド配列を D N A アレイにハイブリダイズする工程を包含し、ここで、該アレイの 1 つ以上のメンバーが、異なる A P I をコードする複数のヌクレオチド配列に相補的な前記プローブである、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 72】

高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、C C N G G N Y T N G G N A T G の核酸配列にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

【請求項 73】

高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、G G N C C N Y

50

T N G G N A T G の核酸配列にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

【請求項 7 4】

高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、C C N G G N Y  
T N G G N T T Y の核酸配列にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

【請求項 7 5】

高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、G G N C C N Y  
T N G G N T T Y の核酸配列にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

【請求項 7 6】

高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、C C N G G N A  
T H G G N A T G の核酸配列にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

10

【請求項 7 7】

高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、C C N G G N A  
T H G G N T T Y の核酸配列にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

【請求項 7 8】

高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、G G N C C N A  
T H G G N A T G の核酸配列にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

【請求項 7 9】

高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、G G N C C N A  
T H G G N T T Y の核酸配列にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

【請求項 8 0】

前記核酸がまた、高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、  
C A Y C A R G T N の核酸配列にハイブリダイズする、請求項 7 2、7 3、7 4、7 5、  
7 6、7 7、7 8 または 7 9 のいずれか 1 項に記載の単離された核酸分子。

20

【請求項 8 1】

高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、C C C G G C C  
T G G G C A T G の核酸配列にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

【請求項 8 2】

高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、G G C C C C C  
T G G G C A T G の核酸配列にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

【請求項 8 3】

高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、C C C G G C C  
T G G G C T T C の核酸配列にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

30

【請求項 8 4】

高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、G G C C C C C  
T G G G C T T C の核酸配列にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

【請求項 8 5】

高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、C C C G G C A  
T C G G C A T G の核酸配列にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

【請求項 8 6】

高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、C C C G G C A  
T C G G C T T C の核酸配列にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

40

【請求項 8 7】

高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、G G C C C C A  
T C G G C A T G の核酸配列にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

【請求項 8 8】

高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、G G C C C C A  
T C G G C T T C の核酸配列にハイブリダイズする、単離された核酸分子。

【請求項 8 9】

前記核酸がまた、高ストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で、  
C A C C A G G T G の核酸配列にハイブリダイズする、請求項 8 1、7 9、8 0、8 1

50

、 82、83、84または85のいずれか1項に記載の単離された核酸分子。

【請求項90】

アルツハイマー病の処置のために有効な因子についてスクリーニングする方法であって、該方法は、以下：

(a) スクリーニングすべき因子の存在下で、PEDFを、PEDFについてのレセプターを発現する細胞の第1の集団と接触させる工程；

(b) コントロール因子の存在下で、PEDFを、該レセプターを発現する細胞の第2の集団と接触させる工程；

(c) 該PEDFの該第1および第2の細胞集団への結合を比較する工程、または該第1および第2の細胞集団における細胞のセカンドメッセンジャーの誘導のレベルを比較する工程、あるいは該第1および第2の細胞集団におけるPEDF媒介活性のレベルを比較する工程；ならびに

(d) アルツハイマー病モデル系におけるアルツハイマー病の臨床的特徴を減少するために、因子がPEDFの活性を調節し得る能力を試験する工程、を包含する、方法。

10

【請求項91】

前記PEDFまたは前記レセプター、あるいはその両方が、単離され、そして組換え的に産生される、請求項90に記載の方法。

【請求項92】

前記細胞が小脳顆粒細胞であり、そして前記PEDF媒介活性が、アポトーシス死からの未成熟小脳細胞の保護である、請求項90に記載の方法。

20

【請求項93】

前記細胞が網膜芽細胞腫または小脳顆粒細胞であり、そしてPEDFの該細胞への結合が比較される、請求項90に記載の方法。

【請求項94】

前記候補因子が、PEDFの少なくとも10個連続したアミノ酸を含む、請求項90に記載の方法。

【請求項95】

PEDFの結合パートナーへの結合を調節する因子をスクリーニングする方法であって、該方法は、以下：

30

(a) 候補因子の存在下で、PEDFを、該PEDF結合パートナーと接触させる工程；

(b) コントロール因子の存在下で、PEDFを、PEDF結合パートナーと接触させる工程；および

(c) 工程(a)における該PEDFの該結合パートナーへの該結合を、工程(b)における該PEDFの該結合パートナーへの該結合と比較する工程、

を包含する、方法。

【請求項96】

前記結合パートナーが、単離された80kDのPEDFレセプターである、請求項95に記載の方法。

【請求項97】

リボザイムまたはアンチセンス核酸であって、該リボザイムまたはアンチセンス核酸は、以下：

40

## 【表 9】

API-1,

API-2, API-3, API-4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15,  
 API-16, API-17, API-18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26,  
 API-27, API-28, API-30, API-33, API-34, API-35, API-36, API-37, API-38, API-39,  
 API-40, API-41, API-42, API-43, API-44, API-45, API-46, API-47, API-48, API-49,  
 API-50, API-51, API-52, API-53, API-54, API-55, API-56, API-57, API-58, API-59,  
 API-60, API-61, API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67, API-68, API-69,  
 API-70, API-71, API-72, API-73, API-74, API-75, API-76, API-77, API-78, API-79,  
 API-80, API-81, API-82, API-83, API-84, API-85, API-86, API-88, API-89, API-90,  
 API-91, API-92, API-93, API-95, API-97, API-98, API-99, API-101, API-102, API-  
 103, API-104, API-107, API-108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-116,  
 API-118, API-119, API-120, API-121, API-122, API-123, API-124, API-125, API-  
 126, API-127, API-128, API-130, API-131, API-132, API-134, API-135, API-136,  
 API-137, API-138, API-139, API-140, API-141, API-142, API-143, API-144, API-  
 145, API-146, API-147, API-148, API-149, API-150, API-151, API-152, API-153,  
 API-155, API-158, API-159, API-160, API-161, API-162, API-163, API-165, API-  
 166, API-167, API-168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-173, API-174,  
 API-175, API-176, API-177, API-178, API-179, API-180, API-181, API-182, API-  
 183, API-184, API-185, API-186, API-187, API-188, API-189, API-190, API-191,  
 API-192, API-194, API-196, API-197, API-198, API-199, API-200, API-201, API-  
 202, API-210, API-214, API-215, API-217, API-219, API-220, API-221, API-222,  
 API-223, API-224, API-225, API-232, API-233, API-234, API-237, API-238, API-  
 239, API-240, API-241, API-242, API-243, API-244, API-245, API-246, API-247,または  
 API-248.

10

20

30

のアルツハイマー病関連タンパク質アイソフォーム (API) のうちの1つをコードする  
 核酸を含む、リボザイムまたはアンチセンス核酸。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(1. 序論)

本発明は、アルツハイマー病に対する素因ならびにその発症および進行に関連するタンパ  
 ク質およびタンパク質アイソフォームの同定、ならびにそれをコードする遺伝子および核  
 酸分子の同定、および、例えば、臨床スクリーニング、診断、処置ならびに薬物スクリー  
 ニングおよび薬物開発のためのそれらの使用に関する。

40

【0002】

(2. 発明の背景)

アルツハイマー病 (AD) は、神経変性のますます一般的となっている形態であり、65  
 歳を超える人々の間の痴呆の全症例の約50~60%を占める。これは、現在、世界中で  
 推定1,500万人の人々を冒し、そしてその集団中の高齢の人々の相対的な増加に起因  
 して、その有病率は、今後20~30年にわたって増加するであろう。アルツハイマー病  
 は、進行性の障害であり、臨床的症状の発症から死亡まで約8.5年の平均期間を有する  
 。高等な精神機能に関連する脳領域における錐体ニューロンの死およびニューロンシナプ  
 スの損失は、その代表的な症候を生じ、これは、認知機能の全体的かつ進行的な障害によ  
 って特徴付けられる (Francisら、1999、J. Neurol. Neurosu

50

rg. Psychiatry 66:137-47)。現在、アルツハイマー病の診断は、以下を必要とする：注意深い医学的な病歴および身体の実験；詳細な神経学的および精神医学的試験；ADを装う内在する代謝疾患および医学的疾患を排除するための実験血液研究；精神状態の評価および正式の認知試験；ならびに脳のCTスキャンまたは磁気共鳴画像法（Growdon, JH., 1995, *Advances in the diagnosis of Alzheimer's disease*: Iqbal, K., Mortimer, J.A., Winblad, B., Wisniewski, H.M編、*Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*. New York, NY: John Wiley & Sons Inc. 1995:139-153)。これらの試験の時間消費的性質、それらの費用、およびそれらの患者に対する不便性に起因して、アルツハイマー病の陽性診断を導くかまたは鑑別診断からのADの排除を補助する、身体のサンプル中の物質（単数または複数）（例えば、脳脊髄液（CSF）、血液または尿のサンプル）の測定が非常に望ましい。CSFは脳を浴するので、そのタンパク質組成における変化は、この疾患に原因的または診断的に関連する脳タンパク質発現パターンにおける変更を、最も正確に示し得る。

#### 【0003】

アルツハイマー病についての現在の候補生物マーカーとしては、以下が挙げられる：（1）プレセニン1（PS1）遺伝子、プレセニン2（PS2）遺伝子およびアミロイド前駆体タンパク質（APP）遺伝子における変異；（2）アポリポタンパク質E（ApoE）の対立遺伝子の検出；ならびに（3）CSF中のアミロイド-ペプチド（A<sub>β</sub>）、タンパク質、およびニューロスレッド（neuronal thread）タンパク質（NTP）の濃度の変化。例えば、総説については、*Neurobiology of Aging* 19:109-116（1998）を参照のこと。PS1遺伝子、PS2遺伝子およびAPP遺伝子における変異は、早期発症の家族性アルツハイマー病を示す。しかし、早期発症の家族性アルツハイマー病は、比較的まれであり；現在、世界中でわずか120の家族しか、決定的変異を保持することが知られていない（*Neurobiology of Aging* 19:109-116（1998））。ApoEのe4対立遺伝子の検出は、後期発症および散発性形態のアルツハイマー病に相関することが示されている。しかし、e4単独は、アルツハイマー病の生物マーカーとして使用され得ない。なぜなら、e4は、アルツハイマー病に罹患していない多くの個体中に検出されており、そしてe4の非存在は、アルツハイマー病を排除しないからである（*Neurobiology of Aging* 19:109-116（1998））。

#### 【0004】

アルツハイマー病のCSF中のA<sub>β</sub>ペプチドA<sub>β</sub>42の減少およびタンパク質の増加は、アルツハイマー病の存在と相関することが示されている（*Neurobiology of Aging* 19:109-116（1998））。しかし、アルツハイマー病の生物マーカーとしてのA<sub>β</sub>42およびタンパク質の特異性および感度は、中程度である。例えば、診断的に情報を与えるCSFタンパク質のカットオフ値を決定することは困難であった。また、死後の被験体のCSF中のNTPレベルの上昇が、アルツハイマー病の存在と相関することが示されている（*Neurobiology of Aging* 19:109-116（1998））。従って、生存している被験体におけるアルツハイマー病の診断のための、高感度かつ特異的な生物マーカーを同定する必要性が存在する。

#### 【0005】

##### （3．発明の要旨）

本発明は、アルツハイマー病のスクリーニング、診断および処置のため、ならびにアルツハイマー病の処置のための薬物のスクリーニングおよび開発のための、方法および組成物を提供する。

#### 【0006】

本発明の第1の局面は、アルツハイマー病を同定するための方法を提供し、この方法は、

2次元電気泳動によってCSFのサンプルを分析して、少なくとも1つのアルツハイマー病に関連する特徴(AF)(例えば、本明細書中に開示される1以上のAF)の存在またはレベルあるいはそれらの任意の組み合わせを分析する工程を包含する。これらの方法はまた、臨床的スクリーニング、診断、治療結果のモニタリング、特定の治療的処置に対して応答する可能性が最もある患者の同定、薬物のスクリーニングおよび開発、ならびに薬物処置のための新しい標的の同定に適切である。

【0007】

本発明の第2の局面は、アルツハイマー病の診断のための方法を提供し、この方法は、CSFのサンプルにおいて、少なくとも1つのアルツハイマー病関連タンパク質アイソフォーム(Alzheimer's disease - Associated Protein Isoform)(API)(例えば、本明細書中に開示される1以上のAPI)の存在またはレベルあるいはそれらの任意の組み合わせを検出する工程を包含する。

10

【0008】

本発明の第3の局面は、API(例えば、本明細書中に開示されるAPI)に免疫特異的に結合し得る抗体(例えば、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびにキメラ(二重特異性(bispecific)抗体)を提供する。

【0009】

本発明の第4の局面は、単離されたAPI(すなわち、APIとは優位に異なる等電点または有意に異なる見掛けの分子量を有するタンパク質またはタンパク質アイソフォームを実質的に含まないAPI)を含む調製物を提供する。

20

【0010】

本発明の第5の局面は、上記で列挙された方法において使用され得、そして単一または複数の調製物あるいは抗体を、他の試薬、標識、基質(必要な場合)および使用するための指示書と一緒に含み得る、キットを提供する。キットは、疾患の診断のために使用され得るか、あるいは新規の診断剤および/または治療剤を同定するためのアッセイであり得る。

【0011】

本発明の第6の局面は、アルツハイマー病を処置する方法を提供し、この方法は、アルツハイマー病を有する被験体においてAPIの発現または活性(例えば、酵素活性または結合活性)あるいは両方を調節(例えば、上方調節または下方調節)する治療有効量の薬剤を、被験体に投与する工程を包含する。

30

【0012】

本発明の第7の局面は、API、APIアナログまたはAPI関連ポリペプチドの特徴(例えば、発現あるいは酵素活性または結合活性)を調節(例えば、上方調節または下方調節)する薬剤についてスクリーニングする方法を提供する。

【0013】

他の目的および利点は、以下の示す図面と合わせて以下の詳細な説明を検討して明らかとなる。

【0014】

(3. 発明の詳細な説明)

40

以下に詳述される本発明は、例えば、哺乳動物被験体におけるアルツハイマー病のスクリーニング、診断および処置に有用な、ならびに薬物スクリーニングおよび薬物開発に有用な、方法、組成物およびキットを提供する。本発明はまた、アルツハイマー病を処置または予防するための、哺乳動物被験体への治療組成物の投与を包含する。哺乳動物被験体は、非ヒト動物であり得るが、好ましくは、ヒト、より好ましくは、ヒト成体(すなわち、少なくとも21歳(より詳細には、少なくとも35歳、少なくとも50歳、少なくとも60歳、少なくとも70歳、または少なくとも80歳)のヒト被験体)である。開示を明瞭するためであり、そして限定目的ではないが、本発明は、CSFサンプルの分析に関して記載される。しかし、当業者が本発明の説明に基づいて理解するように、以下に記載のアッセイおよび技術は、他の型のサンプル(体液(例えば、血液、血清、血漿または唾液)

50

、アルツハイマー病を有するかまたは発症する危険性のある被験体由来の組織サンプル（例えば、脳生検のような生検）あるいはそれらのホモジネートを含む）に適用され得る。本発明の方法および組成物は、例えば、生存している被験体のスクリーニング、診断および処置に有用であるが、例えば、その同疾患を発症する危険性のある被験体の家族を同定するために、被験体の死後診断にも使用され得る。

【0015】

以下の定義は、本開示の検討を補助するために提供される。

【0016】

(3.1.定義)

「診断」とは、診断、予後、モニタリング、臨床試験の参加者の選択、および特定の治療処置に応答する可能性が最もある患者の同定をいう。「処置」とは、治療、予防（prevention）および予防（prophylaxis）をいう。

【0017】

「薬剤」とは、全て、本発明に従って、薬学的組成物および診断組成物を調製するために使用され得るか、化合物、核酸、ポリペプチド、フラグメント、アイソフォーム、またはこのような目的のために独立して使用され得る他の材料であり得る、全ての材料をいう。

【0018】

「APIアナログ」とは、APIと類似または同一の機能を保持するが、APIのアミノ酸配列と類似または同一のアミノ酸配列を必ずしも含む必要はないか、またはAPIの構造と類似または同一の構造を保持する、ポリペプチドをいう。本明細書中で使用される場合、ポリペプチドのアミノ酸配列は、それが、以下の基準の少なくとも1つを満足する場合には、APIのポリペプチドに「類似」する：(a)そのポリペプチドが、APIのアミノ酸配列に少なくとも30%（より好ましくは、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%）同一であるアミノ酸配列を有する；(b)そのポリペプチドが、APIの少なくとも5アミノ酸残基（より好ましくは、少なくとも10アミノ酸残基、少なくとも15アミノ酸残基、少なくとも20アミノ酸残基、少なくとも25アミノ酸残基、少なくとも40アミノ酸残基、少なくとも50アミノ酸残基、少なくとも60アミノ酸残基、少なくとも70アミノ酸残基、少なくとも80アミノ酸残基、少なくとも90アミノ酸残基、少なくとも100アミノ酸残基、少なくとも125アミノ酸残基、または少なくとも150アミノ酸残基）をコードするヌクレオチド配列にストリンジェント条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされる；または(c)そのポリペプチドが、APIをコードするヌクレオチド配列に少なくとも30%（より好ましくは、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%）同一であるヌクレオチド配列によってコードされる。本明細書中で使用される場合、APIの構造に「類似の構造」を有するポリペプチドとは、APIの二次構造、三次構造または四次構造に類似の二次構造、三次構造または四次構造を有するポリペプチドをいう。ポリペプチドの構造は、当業者に公知の方法（X線結晶学、核磁気共鳴、および結晶学的電子顕微鏡を含むが、これらに限定されない）によって決定され得る。

【0019】

「API融合タンパク質」とは、(i)API、APIフラグメント、API関連ポリペプチドまたはAPI関連ポリペプチドのフラグメントのアミノ酸配列、および(ii)異種ポリペプチド（すなわち、非API、非APIフラグメントまたは非API関連ポリペプチド）のアミノ酸配列を含むポリペプチドをいう。

【0020】

「APIホモログ」とは、APIのアミノ酸配列に類似のアミノ酸配列を含むが、API

と類似または同一の機能を必ずしも保持しないポリペプチドをいう。

【0021】

「APIオルソログ」とは、APIのアミノ酸配列に類似するアミノ酸配列を含み、そして(i i) APIの機能と類似または同一の機能を保持する、非ヒトポリペプチドをいう。

【0022】

「API関連ポリペプチド」とは、APIホモログ、APIアナログ、APIのアイソフォーム、APIオルソログ、またはそれらの任意の組み合わせをいう。

【0023】

「キメラ抗体」とは、異なる部分が異なる動物種由来の分子(例えば、ヒト免疫グロブリン定常領域およびマウスmAb由来の可変領域を有するキメラ抗体)をいう(例えば、Cabillyら、米国特許第4,816,567号;およびBossら、米国特許第4,816,397号(これらは、その全体が参考として本明細書中に援用される)を参照のこと)。

【0024】

「誘導体」とは、アミノ酸残基の置換、欠失または付加の導入によって変更された第2のポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをいう。誘導体ポリペプチドは、その第2のポリペプチドと類似または同一の機能を保持する。

【0025】

「フラグメント」とは、第2のポリペプチドのアミノ酸配列の少なくとも5アミノ酸残基(好ましくは、少なくとも10アミノ酸残基、少なくとも15アミノ酸残基、少なくとも20アミノ酸残基、少なくとも25アミノ酸残基、少なくとも40アミノ酸残基、少なくとも50アミノ酸残基、少なくとも60アミノ酸残基、少なくとも70アミノ酸残基、少なくとも80アミノ酸残基、少なくとも90アミノ酸残基、少なくとも100アミノ酸残基、少なくとも125アミノ酸残基、少なくとも150アミノ酸残基、少なくとも175アミノ酸残基、少なくとも200アミノ酸残基、または少なくとも250アミノ酸残基)のアミノ酸配列を含む、ペプチドまたはポリペプチドをいう。APIのフラグメントは、第2のポリペプチドの機能的活性を保持してもよく、保持しなくてもよい。

【0026】

「~倍の変化」は、「~倍の増加」および「~倍の減少」を含み、これは、第2のサンプル(またはサンプルセット)と比較した、第1のサンプルまたはサンプルセットにおけるAFの量の相対的な増加または減少、あるいはポリペプチド(例えば、API)の発現または活性の相対的な増加または減少をいう。AFまたはポリペプチドの~倍の変化は、当業者に公知の任意の技術によって測定され得るが、観察される増加または減少は、使用される技術に依存して変化する。好ましくは、~倍の変化は、本明細書中以下の実施例に記載にされるように決定される。

【0027】

「アイソフォーム」とは、同じ遺伝子によってコードされるが、pIまたはMVあるいは両方において異なる、ポリペプチドの改変体をいう。このようなアイソフォームは、それらのアミノ酸組成において異なり得(例えば、選択的mRNAまたはプレmRNAプロセシング(例えば、選択的スプライシングまたは限定されたタンパク質分解)の結果として)、そしてさらに、または代替的に、差示的な翻訳後修飾(例えば、グリコシル化、アシル化、リン酸化)から生じ得る。

【0028】

APIまたはAPI関連ポリペプチドの発現または活性に関して「調節する」とは、APIまたはAPI関連ポリペプチドの発現または活性の任意の変化(例えば、上方調節または下方調節)をいう。当業者は、本開示に基づいて、このような調節が当業者に公知のアクセシによって決定され得ることを理解する。

【0029】

「処置」とは、予防(prophylaxis)(予防(prevention))また

は患者が罹患している症例における弱質または疾患を治癒するために、患者に関する医薬の投与または医療手段の実行をいう。

【0030】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一性パーセントは、最適な比較の目的のために配列を整列し（例えば、配列の最良の整列化のために第1の配列にギャップが導入され得る）そしてそれらの対応する位置でのアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較することによって決定され得るかまたは一般的に決定される。「最良なアライメント」は、最も高い同一性パーセントを生じる2つの配列のアライメントである。同一性パーセントは、比較される配列における同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドの数によって決定される（すなわち、同一性% = 同一の位置の数 / 位置の総数 × 100）。

10

【0031】

2つの配列間の同一性パーセントの決定は、当業者に公知の数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。2つの配列を比較するための数学的アルゴリズムの例は、KarlinおよびAltschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2267-2268のアルゴリズムであり、これは、KarlinおよびAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877に記載のように改変されている。Altschulら (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラムは、このようなアルゴリズムに組み込まれている。BLASTヌクレオチド検索を、NBLASTプログラム、スコア = 100、ワード長 = 12を用いて実行し、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を獲得し得る。BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラム、スコア = 50、ワード長 = 3を用いて実行され、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を獲得し得る。比較目的のためにギャップが導入されたアライメントを得るために、Gapped BLASTを、Altschulら (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載されるように利用し得る。あるいは、PSI-Blastを用いて、分子間の距離関係を検出する繰り返しの検索を実行し得る（同書）。BLAST、Gapped BLASTおよびPSI-Blastプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメーターを使用し得る。http://www.ncbi.nlm.nih.gov.を参照のこと。

20

30

【0032】

配列を比較するために利用される数学的アルゴリズム別の例は、MyersおよびMiller, CABIOS (1989)のアルゴリズムである。GCG配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）は、このようなアルゴリズムを組み込んでいる。当該分野で公知の配列分析のための他のアルゴリズムとしては、TorellisおよびRobotti (1994) Comput. Appl. Biosci., 10:3-5;に記載のようなADVANCEおよびADAM;およびPearsonおよびLipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8に記載のFASTAが挙げられる。FASTAにおいては、k-tupが、検索の感度および速度を設定する制御オプションである。

40

【0033】

脳脊髄液 (CSF) とは、Physiological Basis of Medical Practice (J. B. West 編、Williams および Wilkins, Baltimore, MD 1985) に記載のような、中枢神経系の大半を取り囲む液体をいう。CSFには、脳室CSFおよび腰椎CSFが含まれる。

【0034】

(5.1. アルツハイマーに関連する特徴 (AF))

本発明の1つの局面において、アルツハイマー病のスクリーニング、処置または診断のために1以上のアルツハイマーに関連する特徴 (Alzheimer's Disease - Associated Features) (AF) の発現を検出または定量するため

50

に、2次元電気泳動を使用して、被験体（好ましくは、生存している被験体）由来のCSFを分析する。本明細書中で使用される場合、「2次元電気泳動」（2D-電気泳動）は、等電点電気泳動、その後の変性電気泳動を含む技術を意味し；これは、複数の分離されたタンパク質を含む2次元（2D-ゲル）を生じる。好ましくは、変性電気泳動の工程は、ドデシル硫酸ナトリウムの存在下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を使用する。国際出願番号97GB3307（WO98/23950として公開されている）および米国特許出願第08/980,574号（両方とも1997年12月1日に出願され、これらの各々は、特に23～35頁のプロトコルに関連して、その全体が参考として本明細書中に援用される）に記載のような、非常に正確で、かつ自動化可能な方法および装置（「the Preferred Technology」）が、特に好ましい。手短かに言うと、the Preferred Technologyは、生物学的サンプル中の生体分子（例えば、タンパク質（糖タンパク質を含む））の同定、選択および特徴付けのための、効率的なコンピューター支援方法および装置を提供する。2次元アレイは、それらの電気泳動移動度および等電点に従って、2次元ゲル上で生体分子を分離することによって生成される。アレイのコンピューター作成デジタルプロフィールが作成され、これは、この2次元アレイ中に検出された複数の生体分子の正体、見かけの分子量、等電点、および相対量を提示し、これによって、複数の生物学的サンプル由来のプロフィールのコンピューターによる比較、および目的の分離されたタンパク質のコンピューター援用切り出しが可能になる。

10

**【0035】**

20

蛍光標識したタンパク質を検出するための特定のスキュナは、WO96/36882およびDavid A. Basijiの博士論文（表題「Development of a High-throughput Fluorescence Scanner Employing Internal Reflection Optics and Phase-sensitive Detection (Total Internal Reflection, Electrophoresis)」、University of Washington (1997)、Dissertation Abstracts Internationalの第58巻/12-B、6686頁）（それらの各々の内容は、参考として本明細書中に援用される）に記載される。これらの文献は、高速での自動化された一体型の操作に特別に設計された画像スキュナを記載する。このスキュナは、蛍光色素または銀染色で染色されたゲルを画像化し得、そして蛍光体スクリーンを保存し得る。Basijiの論文は、レーザー散乱または均一な蛍光に起因してベースラインノイズから変調された蛍光を識別するための、位相感応検出システムを提供するが、このスキュナはまた、非位相感応モードで操作され得る。この位相感応検出能力は、従来の蛍光画像化システムと比較して、装置の感度を1オーダー以上上昇する。この上昇された感度は、上流の装置にロードするサンプル調製物を減少し、一方、増強された画像の質によって、そのプロセスの下流の画像分析が単純化される。

30

**【0036】**

より非常に好ましいスキュナは、Apollo 2スキュナ（Oxford Glycosciences, Oxford, UK）であり、これは、上記のスキュナの改変されたバージョンである。Apollo 2スキュナにおいて、ゲルは、スキュナを通して、正確な親ねじ（lead-screw）駆動システム上に輸送される。これは、Basijiの論文に記載されるベルト駆動システム上にガラスプレートを重ねることよりも好ましい。なぜなら、これは、画像化光学を通してゲルを正確に輸送する再現可能な手段を提供するからである。

40

**【0037】**

Apollo 2スキュナにおいて、ゲルは、既知の位置にガラスプレートを堅く保持する3つのアライメントストップに対して固定される。これを上記の正確な輸送システムと組み合わせて行うことによって、ゲルの絶対位置が、予測および記録され得る。これは、ゲル上の各特徴の座標が、より正確に決定され、そして所望の場合に、その特徴を切り出

50

すための切断口ポットに連結されることを保証する。A p o l l o 2 スキャナにおいて、ゲルを保持するキャリアは、画像位置を補正するための使用される、4つの内蔵蛍光マーカーを有する。これらのマーカーは、スキヤニングが正確に実行されたことを確かめる、精度管理特徴である。

【0038】

B a s i j i の論文に記載されるスキャナと比較して、A p o l l o 2 スキャナの光学成分は反転される。A p o l l o 2 スキャナにおいて、レーザー、ミラー、導波管および他の光学成分は、スキャンされるガラスプレートの上にある。B a s i j i の論文に記載されるスキャナは、下部にこれらの成分を有する。A p o l l o 2 スキャナにおいて、ガラスプレートは、スキャナゲルのサイド下方にマウントされ、それ故、光路長は、ガラスプレートを通ったままである。これを行うことによって、ガラスプレートから離れ得るゲルの任意の粒子は、光学内よりもむしろ装置の基部に落ちる。これは、このシステムの機能性に影響を及ぼさず、その信頼性を増加する。

10

【0039】

A p o l l o 3 スキャナは、さらにより好ましい。ここでは、シグナル出力は、いかなるピーク飽和もシグナルの平方根符号化も伴わずに、16ビットデータにデジタル化される。補償アルゴリズムもまた、スキヤニングビームの路に沿って検出感度における任意の変動を補正するために適用されている。この変動は、光学における異常および導波管にわたる補正効率における差異に起因する。較正は、平均蛍光を用いてパースペクスプレートを使用して行われる。このプレートのスキャンから受けるデータを使用して、各ピクセルレベルから標的レベルまでシグナルを増加するために必要とされる増倍因子を決定する。次いで、これらの因子を、ゲルの引き続くスキャンにおいて使用し、任意の内部光学変動を除去する。

20

【0040】

「特徴」とは、2Dゲル中に検出されるスポットをいい、そして用語「アルツハイマー病に関連する特徴」(A F)とは、アルツハイマー病を有さない被験体由来のサンプル(例えば、C S Fのサンプル)と比較して、アルツハイマー病を有する被験体由来のサンプル(例えば、C S Fのサンプル)中に差示的存在する特徴をいう。本明細書中で使用される場合、特徴(または以下に定義されるような、A P Iのタンパク質アイソフォーム)は、その特徴、アイソフォームまたはA P Iを検出するための方法(例えば、2D電気泳動またはイムノアッセイ)が、第1のサンプルと第2のサンプルに適用された場合に異なるシグナルを与える場合に、第2のサンプルに対して第1のサンプル中に「差示的存在する」。特徴、アイソフォームまたはA P Iは、その検出の方法が、その特徴、アイソフォームまたはA P Iが第2のサンプルよりも第1のサンプル中で多いことを示す場合か、またはその特徴、アイソフォームまたはA P Iが、第1のサンプル中で検出可能でありかつ第2のサンプル中で実質的に検出不可能である場合、第2のサンプルに対して第1のサンプルにおいて「増加している」。反対に、特徴、アイソフォームまたはA P Iは、その検出の方法が、その特徴、アイソフォームまたはA P Iが第2のサンプルよりも第1のサンプル中で少ないことを示す場合か、またはその特徴、アイソフォームまたはA P Iが、第1のサンプル中で検出不可能でありかつ第2のサンプル中で検出可能である場合、第2のサンプルに対して第1のサンプルにおいて「減少している」。

30

40

【0041】

特に、2つのサンプル中の特徴の相対量は、2つの工程において、その正規化されたシグナルに関連して決定される。第1に、サンプル中の特徴の検出の際に得られるシグナルは、例えば、以下の適切なバックグラウンドパラメーターに対して正規化される：(a)分析されるサンプル中の総タンパク質(例えば、ゲル上にロードされた総タンパク質)；(b)試験される被験体の集団中の、the Preferred Technologyの変動性の限界内の発現参照特徴(Expression Reference Feature)(E R F)(すなわち、その量が実質的に不変である特徴)(例えば、以下に開示されるE R F)、またはより好ましくは、(c)サンプル中の全てのタンパク質の各々

50

の合計として検出される総シグナル。

【0042】

第2に、1つのサンプルまたはサンプルセットにおける特徴についての正規化されたシグナルを、第2のサンプル(またはサンプルセット)に対して第1のサンプル(またはサンプルセット)において「差示的に存在する」特徴を同定するために、別のサンプルまたはサンプルセットにおける同じ特徴に対する正規化されたシグナルと比較する。

【0043】

本発明の局面に従って、本明細書中に開示されるAFは、アルツハイマー病を有さない被験体由来のCSFサンプルに対して、アルツハイマー病を有する被験体由来のCSFサンプルを比較することによって同定された。アルツハイマー病を有さない被験体には、既知の疾患または状態を有さない被験体(正常な被験体)およびアルツハイマー病以外の疾患(神経学的疾患および神経変性疾患を含む)を有する被験体が含まれる。

10

【0044】

AFの2つのグループは、the Preferred Technologyの方法および装置によって同定された。第1のグループは、アルツハイマー病を有さない被験体のCSFと比較した場合に、アルツハイマー病を有する被験体のCSF中で減少されるAFからなる。これらのAGは、表Iに提供されるような、見かけの分子量(MW)および等電点(pI)によって記載される。

【0045】

表I. アルツハイマー病を有する被験体のCSFにおいて減少されたAF

20

【0046】

【表10】

(a) 主群分析からのデータ

AF#	~倍の増加 <sup>3</sup>	PI	MW (Da)	P値 <sup>*</sup>
AF-1	1.41	4.79	150081	0.001695 <sup>(1)</sup>
AF-2	1.34	4.28	21349	0.000133 <sup>(1)</sup>
AF-3	1.47	8.10	34846	0.000083 <sup>(1)</sup>
AF-4	1.56	4.38	21160	0.001192 <sup>(1)</sup>
AF-5	1.51	7.34	36554	0.000010 <sup>(1)</sup>
AF-6	1.46	4.91	29812	0.000003 <sup>(1)</sup>
AF-7	1.24	4.25	20787	0.003558 <sup>(1)</sup>
AF-8	1.44	4.93	187927	0.002221 <sup>(1)</sup>
AF-9	1.34	5.21	136768	0.000799 <sup>(1)</sup>
AF-10	1.30	5.19	17694	0.000400 <sup>(1)</sup>
AF-13	1.37	6.01	184530	0.000100 <sup>(1)</sup>
AF-14	1.52	4.72	63166	0.009387 <sup>(1)</sup>
AF-15	1.38	4.47	38970	0.000437 <sup>(1)</sup>
AF-16	1.22	5.19	46876	0.000697 <sup>(1)</sup>
AF-17	1.38	5.82	50294	0.000126 <sup>(1)</sup>
AF-18	1.30	4.87	49219	0.020661 <sup>(1)</sup>
AF-19	1.24	4.82	12454	0.00146 <sup>(1)</sup>
AF-20	1.30	4.43	16818	0.000322 <sup>(1)</sup>
AF-21	1.30	5.40	141094	0.000560 <sup>(1)</sup>
AF-22	1.36	4.93	133773	0.011000 <sup>(1)</sup>
AF-23	1.21	4.50	32473	0.000209 <sup>(4)</sup>
AF-24	1.20	5.31	46663	0.000871 <sup>(1)</sup>
AF-25	1.19	5.68	36700	0.00251 <sup>(1)</sup>
AF-26	1.31	8.11	32305	0.002204 <sup>(1)</sup>
AF-27	1.26	5.33	141371	0.010447 <sup>(1)</sup>
AF-28	1.06	5.13	158568	0.000100 <sup>(1)</sup>

10

20

30

(表1のつぎ)

AF#	~倍の濃度*	pI	MW (Da)	p値*
AF-29	1.27	9.22	47059	0.000028 <sup>(1)</sup>
AF-30	1.13	5.67	48057	0.000100 <sup>(1)</sup>
AF-31	1.15	6.07	91258	0.012712 <sup>(4)</sup>
AF-32	1.15	6.17	48958	0.008321 <sup>(4)</sup>
AF-33	1.06	4.41	42104	0.000126 <sup>(1)</sup>
AF-34	1.14	4.54	145408	0.017268 <sup>(4)</sup>
AF-35	1.22	5.21	18623	0.001094 <sup>(1)</sup>
AF-36	1.17	5.78	14416	0.010744 <sup>(1)</sup>
AF-37	1.29	6.91	33523	0.000087 <sup>(1)</sup>
AF-38	1.18	6.47	29535	0.002759 <sup>(1)</sup>
AF-39	1.30	7.50	35510	0.002858 <sup>(1)</sup>
AF-40	1.22	7.29	38617	0.001187 <sup>(1)</sup>
AF-41	1.11	5.85	17345	0.016690 <sup>(4)</sup>
AF-42	1.10	5.04	18662	0.002252 <sup>(1)</sup>
AF-43	1.13	9.83	14065	0.003303 <sup>(1)</sup>
AF-44	1.10	6.63	102328	0.020753 <sup>(4)</sup>
AF-45	1.09	6.04	46998	0.031910 <sup>(4)</sup>
AF-46	1.09	4.71	19802	0.008437 <sup>(4)</sup>
AF-47	1.09	5.99	49664	0.002187 <sup>(1)</sup>
AF-48	1.32	5.32	122332	0.006582 <sup>(1)</sup>
AF-49	1.07	6.94	27576	0.010068 <sup>(4)</sup>
AF-50	1.07	6.82	71337	0.035409 <sup>(4)</sup>
AF-51	1.04	5.70	34388	0.006156 <sup>(4)</sup>
AF-76	1.11	5.59	45537	0.001973 <sup>(1)</sup>
AF-149	1.15	4.82	190721	0.003541 <sup>(1)</sup>
AF-150	1.24	6.87	157592	0.000100 <sup>(1)</sup>
AF-152	1.09	5.04	81703	0.002800 <sup>(1)</sup>
AF-154	1.06	5.03	67307	0.000100 <sup>(1)</sup>
AF-155	1.38	9.21	64021	0.000070 <sup>(1)</sup>
AF-156	9.75	4.36	58083	0.001568 <sup>(1)</sup>
AF-159	1.18	5.08	52008	0.000100 <sup>(1)</sup>

10

20

30

40

(表) のつぎ

AF#	~倍の減少*	PI	MW (Da)	P値*
AF-160	1.06	5.76	45729	0.004123 <sup>(1)</sup>
AF-162	1.23	5.47	38663	0.001073 <sup>(1)</sup>
AF-163	1.39	4.45	34879	0.001228 <sup>(1)</sup>
AF-164	1.51	5.00	33485	0.01179 <sup>(1)</sup>
AF-169	1.00	8.00	34362	0.000004 <sup>(1)</sup>
AF-170	1.38	5.41	31886	0.005600 <sup>(1)</sup>
AF-172	1.53	6.71	28747	0.01051 <sup>(1)</sup>
AF-173	10.91	7.67	27476	0.003738 <sup>(1)</sup>
AF-174	1.03	4.67	27811	0.002423 <sup>(1)</sup>
AF-175	1.03	5.33	24936	0.044270 <sup>(1)</sup>
AF-176	1.15	4.86	22248	0.012144 <sup>(1)</sup>
AF-177	1.14	4.63	21103	0.006564 <sup>(1)</sup>
AF-178	1.08	6.03	22247	0.05097 <sup>(1)</sup>
AF-181	1.21	5.72	16336	0.004745 <sup>(1)</sup>
AF-183	1.44	10.36	11160	0.000270 <sup>(1)</sup>
AF-184	1.08	5.31	48769	0.004689 <sup>(1)</sup>
AF-186	2.76	4.71	29693	0.002446 <sup>(1)</sup>
AF-187	2.09	4.93	154156	0.000750 <sup>(1)</sup>
AF-188	1.35	5.52	39355	0.007175 <sup>(1)</sup>
AF-189	1.29	6.79	30719	0.000377 <sup>(1)</sup>
AF-190	1.26	5.29	29663	0.000178 <sup>(1)</sup>
AF-191	1.12	5.31	46663	0.000654 <sup>(1)</sup>

\*得られたp値を計算するために使用した統計学的技術は、各p値についての脚注によって示される。これらの群分析のために使用した統計学的技術は、(1) 直線モデル(年齢および性別について制御する); (2) 分類ツリー; (3) ロジスティック回帰モデルおよび(4) 縦方向の分析。

#ここに報告される倍の変化は、年齢および性別について調整する前に計算された変化である。

10

20

30

(表1のつぎ)

(b) プールしたゲルの分析からのデータ

AF#	~倍の減少*	pI	MW (Da)
AF-78	2.80	5.59	158937
AF-79	2.62	5.52	142378
AF-80	2.78	5.56	142378
AF-81	2.60	5.43	78299
AF-82	7.25	6.69	74838
AF-83	4.07	6.81	71920
AF-84	4.44	6.94	73402
AF-85	16.77	7.10	73878
AF-86	4.86	5.24	67676
AF-87	4.17	5.95	64179
AF-88	6.48	5.36	66979
AF-89	2.64	5.39	65155
AF-90	4.81	7.61	62945
AF-91	3.10	8.16	56352
AF-92	2.63	6.18	50860
AF-93	6.33	6.28	49268
AF-94	11.17	4.38	45882
AF-95	9.28	5.60	46036
AF-96	11.07	4.43	44966
AF-98	5.51	6.72	44664

10

20

30

(表1のつづき)

AF#	~倍の減少*	pI	MW (Da)
AF-99	10.1	5.92	44365
AF-100	15.39	6.08	44068
AF-101	9.82	4.47	44216
AF-102	3.14	6.02	44216
AF-103	3.57	5.93	42722
AF-104	22.78	5.09	42184
AF-105	4.11	5.19	42184
AF-107	13.3	7.26	33226
AF-108	19.0	7.54	33136
AF-110	9.21	5.39	28237
AF-111	14.85	5.68	27835
AF-112	2.60	6.00	20681
AF-114	8.98	6.80	18741
AF-115	2.85	6.04	17422
AF-116	6.85	6.68	14031
AF-117	2.90	4.65	13983
AF-118	15.19	6.94	11739
AF-119	16.27	7.23	11699

#これらの特徴は、平均強度で少なくとも2倍の差異（すなわち、アルツハイマー病のCSFと正常CSFとの間に少なくとも2の倍変化閾値）を有することに基いて有意である差別的な存在を有するものとして同定された。

第2群は、アルツハイマー病に罹患していない被験体のCSFと比較して、アルツハイマー病に罹患する被験体のCSFにおいて増加したAFからなる。これらのAFは、表IIに提供されるように見かけの分子量（MW）および等電点（pI）によって記載され得る。

【0047】

【表11】

表 II. アルツハイマー病に罹患している試験体のCSFにおいて増加したAF

(a) 主群分析からのデータ

AF#	増加倍数	pI	MW (Da)	p 値 *
AF-52	2.81	6.30	32573	0.000009 <sup>(4)</sup>
AF-53	1.80	5.84	45302	0.016106 <sup>(4)</sup>
AF-54	1.76	5.12	17520	0.003235 <sup>(1)</sup>
AF-55	1.29	8.10	12361	0.000482 <sup>(1)</sup>
AF-56	1.49	8.56	52128	0.005771 <sup>(1)</sup>
AF-57	1.46	6.30	68549	0.000274 <sup>(1)</sup>
AF-58	1.40	5.01	14507	0.01182 <sup>(1)</sup>
AF-59	1.37	6.74	33401	0.001351 <sup>(1)</sup>
AF-60	1.38	5.39	33873	0.009818 <sup>(1)</sup>
AF-61	1.34	6.76	54345	バッグ樹4 分析 <sup>(2)</sup>
AF-62	1.31	6.60	31004	0.000027 <sup>(1)</sup>
AF-63	1.24	5.97	14897	0.10696 <sup>(1)</sup>
AF-64	1.20	6.67	68119	0.000731 <sup>(1)</sup>
AF-65	1.22	7.19	58620	0.005833 <sup>(4)</sup>
AF-66	1.09	10.05	30092	0.000100 <sup>(1)</sup>
AF-67	1.21	5.02	13735	0.006391 <sup>(4)</sup>

10

20

AF#	増加倍数	pI	MW (Da)	p 値 *
AF-68	1.21	9.06	35351	0.003575 <sup>(1)</sup>
AF-69	1.19	5.01	46760	0.005125 <sup>(4)</sup>
AF-70	1.19	8.91	38789	0.021552 <sup>(4)</sup>
AF-71	1.20	6.44	68579	0.003848 <sup>(1)</sup>
AF-72	1.15	5.00	43788	0.014917 <sup>(4)</sup>
AF-73	1.19	5.21	31615	0.000008 <sup>(1)</sup>
AF-74	1.14	6.19	51934	0.054917 <sup>(1)</sup>
AF-75	1.12	5.03	33671	0.002399 <sup>(1)</sup>
AF-77	1.09	6.41	32196	0.035148 <sup>(4)</sup>
AF-151	1.13	5.28	137531	バッグ樹 1 分析 <sup>(2)</sup>
AF-153	1.23	9.85	69630	0.004906 <sup>(1)</sup>
AF-157	1.70	4.99	55449	0.006272 <sup>(1)</sup>
AF-161	1.00	5.18	44404	0.000600 <sup>(1)</sup>
AF-165	1.88	7.17	34230	0.000035 <sup>(1)</sup>
AF-166	1.20	8.54	33657	0.000009 <sup>(1)</sup>
AF-167	1.31	5.69	33621	0.005400 <sup>(1)</sup>
AF-168	1.00	7.66	33920	0.000013 <sup>(1)</sup>
AF-171	1.10	4.98	29658	0.004242 <sup>(1)</sup>
AF-179	1.64	5.26	20115	ステップワイズ 分析 <sup>(1)</sup>
AF-180	1.62	6.17	16255	0.005047 <sup>(1)</sup>
AF-182	1.37	4.89	13651	0.005380 <sup>(1)</sup>
AF-185	6.00	5.32	40323	0.005520 <sup>(1)</sup>
AF-192	1.04	5.38	62756	0.000213 <sup>(1)</sup>

\* 所定のp値を計算するために使用される統計的技術は、各p値に対して脚注によって示される。これらの群分析に使用される統計的技術は、(1)年齢および性別を統制する線形モデル；(2)分類樹；(3)対数抑制モデルならびに(4)縦断的分析であった。  
# ここで報告された倍数変化は、年齢および性別に対する補正の前に計算されたものである。

(b) プールされたゲル分析からのデータ

AF#	増加倍数	pI	MW (Da)
AF-121	11.7	5.42	105108

10

20

30

40

AF#	増加倍数	pI	MW (Da)
AF-122	2.20	5.27	71060
AF-123	6.35	7.31	64933
AF-124	6.86	7.47	64736
AF-125	2.34	4.77	61297
AF-126	48.84	4.11	60374
AF-127	6.79	4.98	59649
AF-128	2.36	6.60	57865
AF-129	2.90	5.29	54625
AF-130	2.94	5.08	51880
AF-131	5.19	6.54	50944
AF-132	3.41	4.72	47414
AF-133	3.08	5.12	44068
AF-134	2.34	5.00	43516
AF-137	4.41	4.98	36855
AF-139	4.11	5.00	34295
AF-140	110.32	6.80	32080
AF-141	3.58	7.50	28440
AF-142	2.66	6.75	27279
AF-143	5.68	7.44	26066
AF-144	2.71	6.56	20744
AF-145	4.43	4.76	18069
AF-146	2.18	4.94	12790
AF-147	2.29	4.81	12790
AF-148	5.04	5.32	11382

10

20

30

# これらの特性は、アルツハイマーのCSFと正常なCSFとの間の平均強度において少なくとも2倍の差異（つまり、少なくとも2の倍数変化閾値）を有することを基礎として有意な差異の存在を有すると同定された。

任意の所定のAFについて、アルツハイマー病に罹患していない被験体由来のCSFの分析で得られるシグナルと比較してアルツハイマー病に罹患する被験体由来のCSFの分析で得られるシグナルは、使用される特定の分析プロトコールおよび検出技術に依存する。従って、当業者は、本記載に基づいて、任意の研究室が、使用する分析プロトコールおよび検出技術に従ってアルツハイマー病に罹患していない被験体における任意のAFに対する適切な参照範囲を達成し得ることを理解する。特に、アルツハイマー病に罹患していることが既知の被験体由来の少なくとも1つの陽性コントロールCSFサンプルまたはアルツハイマー病に罹患していないことが既知の被験体由来の少なくとも1つの陰性コントロールCSFサンプル（そして、より好ましくは陽性コントロールサンプルと陰性コントロールサンプルとの両方）は、分析される試験サンプルの各バッチに含まれる。1つの実施形態において、特性の発現レベルは、バックグラウンド値と比較して決定され、イメージの

40

50

近位領域から得られるシグナルのレベルとして規定され、このイメージは、(a)問題の特定の特性に対して等しい領域であり；そして(b)実質的に認識可能なタンパク質特性を含まない。

【0048】

好ましい実施形態において、被験体（例えば、アルツハイマー病に罹患すると推測されるか、または罹患していることが既知である被験体）のCSFにおいてAFに関連するシグナルは、同じ2Dゲルにおいて検出される1つ以上の発現参考特性（Expression Reference Features）（ERF）に関して正規化される。当業者にとって明らかなように、このようなERFは、技術およびプロトコル（例えば、好ましい技術）を使用して異なるサンプルを比較することによってたやすく決定され得る。適切なERFは、以下の表に記載されるものを含む（しかし、これらに限定されない）。

10

【0049】

【表12】

表 III 発現参考特性

ERF#	pI	MW (Da)
ERF-1	5.94	18860
ERF-2	6.04	47450

20

当業者がたやすく理解するように、所定の特性またはタンパク質アイソフォームの測定されたMWおよびpIは、2D電気泳動の各工程およびランドマークマッピングに使用される正確なプロトコルに依存してある程度変化する。本明細書で使用される場合、用語「MW」および「pI」は、それぞれ、以下の第6節に確認される参考プロトコルに注意深く従って測定される特性またはタンパク質アイソフォームの見かけの分子量（ダルトン）および見かけの等電点を意味すると定義される。参考プロトコルに従い、そしてサンプルが2重またはより多数の複製で作動される場合、AFまたはAPIの測定された平均pIにおける変化は、典型的に3%未満であり、そしてAFまたはAPIの測定された平均MWにおける変化は、典型的に5%未満である。当業者が参考プロトコルとは異なることを所望する場合、校正実験が、(a)参考プロトコルによって、および(b)発散によって検出されるような各AFまたはタンパク質アイソフォームのMWおよびpIを比較するために実施されるべきである。

30

【0050】

本発明のAFは、例えば、検出、処置、診断、または薬物開発または薬学的産物に使用され得る。本発明の1つの実施形態において、被験体（例えば、アルツハイマー病に罹患していると推測される被験体）由来のCSFは、以下：

【0051】

【化1】

AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6, AF-7, AF-8, AF-9, AF-10,  
 AF-13, AF-14, AF-15, AF-16, AF-17, AF-18, AF-19, AF-20, AF-21, AF-22, AF-23,  
 AF-24, AF-25, AF-26, AF-27, AF-28, AF-29, AF-30, AF-31, AF-32, AF-33, AF-34,  
 AF-35, AF-36, AF-37, AF-38, AF-39, AF-40, AF-41, AF-42, AF-43, AF-44, AF-45,  
 AF-46, AF-47, AF-48, AF-49, AF-50, AF-51, AF-76, AF-78, AF-79, AF-80, AF-81,  
 AF-82, AF-83, AF-84, AF-85, AF-86, AF-87, AF-88, AF-89, AF-90, AF-91, AF-92,  
 AF-93, AF-94, AF-95, AF-96, AF-98, AF-99, AF-100, AF-101, AF-102, AF-103,  
 AF-104, AF-105, AF-107, AF-108, AF-110, AF-111, AF-112, AF-114, AF-115, AF-  
 116, AF-117, AF-118, AF-119, AF-149, AF-150, AF-152, AF-154, AF-155, AF-156,  
 AF-159, AF-160, AF-162, AF-163, AF-164, AF-169, AF-170, AF-172, AF-173, AF-  
 174, AF-175, AF-176, AF-177, AF-178, AF-181, AF-183, AF-184, AF-186, AF-187,  
 AF-188, AF-189, AF-190, AF-191

10

の任意の適切な組合せにおいて1つ以上のAFの定量的検出について2D電気泳動によっ  
 て分析される。アルツハイマー病に罹患していない被験体（例えば、コントロールサンプ  
 ルまたは予め決定された参考範囲）由来のCSFと比較して、被験体由来のCSFにおけ  
 る1つ以上のこのようなAFの任意の適切な組合せにおいて減少した数度は、アルツハイ  
 マー病の存在を示す。

20

【0052】

本発明の別の実施形態において、被験体由来のCSFは、1つ以上の次のAF：

【0053】

【化2】

AF-52,

AF-53, AF-54, AF-55, AF-56, AF-57, AF-58, AF-59, AF-60, AF-61, AF-62, AF-63,  
 AF-64, AF-65, AF-66, AF-67, AF-68, AF-69, AF-70, AF-71, AF-72, AF-73, AF-74,  
 AF-75, AF-77, AF-121, AF-122, AF-123, AF-124, AF-125, AF-126, AF-127, AF-  
 128, AF-129, AF-130, AF-131, AF-132, AF-133, AF-134, AF-137, AF-139, AF-140,  
 AF-141, AF-142, AF-143, AF-144, AF-145, AF-146, AF-147, AF-148, AF-151, AF-  
 153, AF-157, AF-161, AF-165, AF-166, AF-167, AF-168, AF-171, AF-179, AF-180,  
 AF-182, AF-185, AF-192.

30

の定量的検出について2D電気泳動によって分析される。アルツハイマー病に罹患してい  
 ない被験体（例えば、コントロールサンプルまたは予め決定された参考範囲）由来のCS  
 Fと比較して、被験体由来のCSFにおける1つ以上のこのようなAFの任意の適切な組  
 合せにおいて増加した数度は、アルツハイマー病の存在を示す。

40

【0054】

なお別の実施形態において、被験体由来のCSFは、(a)その減少した数度がアルツハ  
 イマー病の存在を示す1つ以上のAF：

【0055】

【化3】

すなわち AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6, AF-7, AF-8, AF-9, AF-10, AF-13, AF-14, AF-15, AF-16, AF-17, AF-18, AF-19, AF-20, AF-21, AF-22, AF-23, AF-24, AF-25, AF-26, AF-27, AF-28, AF-29, AF-30, AF-31, AF-32, AF-33, AF-34, AF-35, AF-36, AF-37, AF-38, AF-39, AF-40, AF-41, AF-42, AF-43, AF-44, AF-45, AF-46, AF-47, AF-48, AF-49, AF-50, AF-51, AF-76, AF-78, AF-79, AF-80, AF-81, AF-82, AF-83, AF-84, AF-85, AF-86, AF-87, AF-88, AF-89, AF-90, AF-91, AF-92, AF-93, AF-94, AF-95, AF-96, AF-98, AF-99, AF-100, AF-101, AF-102, AF-103, AF-104, AF-105, AF-107, AF-108, AF-110, AF-111, AF-112, AF-114, AF-115, AF-116, AF-117, AF-118, AF-119, AF-149, AF-150, AF-152, AF-154, AF-155, AF-156, AF-159, AF-160, AF-162, AF-163, AF-164, AF-169, AF-170, AF-172, AF-173, AF-174, AF-175, AF-176, AF-177, AF-178, AF-181, AF-183, AF-184, AF-186, AF-187, AF-188, AF-189, AF-190, AF-191

10

またはそれらの任意の適切な組合せ、および ( b ) その増加した数度がアルツハイマー病の存在を示す 1 つ以上の A F :

【 0 0 5 6 】

【 化 4 】

20

すなわち AF-52, AF-53, AF-54, AF-55, AF-56, AF-57, AF-58, AF-59, AF-60, AF-61, AF-62, AF-63, AF-64, AF-65, AF-66, AF-67, AF-68, AF-69, AF-70, AF-71, AF-72, AF-73, AF-74, AF-75, AF-77, AF-121, AF-122, AF-123, AF-124, AF-125, AF-126, AF-127, AF-128, AF-129, AF-130, AF-131, AF-132, AF-133, AF-134, AF-137, AF-139, AF-140, AF-141, AF-142, AF-143, AF-144, AF-145, AF-146, AF-147, AF-148, AF-151, AF-153, AF-157, AF-161, AF-165, AF-166, AF-167, AF-168, AF-171, AF-179, AF-180, AF-182, AF-185, AF-192.

またはそれらの任意の適切な組合せ、の定量的検出について 2 D 電気泳動によって分析される。 30

【 0 0 5 7 】

本発明のなお別の実施形態において、被験体由来の C S F は、 1 つ以上の次の A F :

【 0 0 5 8 】

【 化 5 】

AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6, AF-7, AF-8, AF-9, AF-10, AF-13, AF-14, AF-15, AF-16, AF-17, AF-18, AF-19, AF-20, AF-21, AF-22, AF-23, AF-24, AF-25, AF-26, AF-27, AF-28, AF-29, AF-30, AF-31, AF-32, AF-33, AF-34, AF-35, AF-36, AF-37, AF-38, AF-39, AF-40, AF-41, AF-42, AF-43, AF-44, AF-45, AF-46, AF-47, AF-48, AF-49, AF-50, AF-51, AF-52, AF-53, AF-54, AF-55, AF-56, AF-57, AF-58, AF-59, AF-60, AF-61, AF-62, AF-63, AF-64, AF-65, AF-66, AF-67, AF-68, AF-69, AF-70, AF-71, AF-72, AF-73, AF-74, AF-75, AF-76, AF-77, AF-78, AF-79, AF-80, AF-81, AF-82, AF-83, AF-84, AF-85, AF-86, AF-87, AF-88, AF-89, AF-90, AF-91, AF-92, AF-93, AF-94, AF-95, AF-96, AF-98, AF-99, AF-100, AF-101, AF-102, AF-103, AF-104, AF-105, AF-107, AF-108, AF-110, AF-111, AF-112, AF-114, AF-115, AF-116, AF-117, AF-118, AF-119, AF-121, AF-122, AF-123, AF-124, AF-125, AF-126, AF-127, AF-128, AF-129, AF-130, AF-131, AF-132, AF-133, AF-134, AF-137, AF-139, AF-140, AF-141, AF-142, AF-143, AF-144, AF-145, AF-146, AF-147, AF-148, AF-149, AF-150, AF-151, AF-152, AF-153, AF-154, AF-155, AF-156, AF-157, AF-159, AF-160, AF-161, AF-162, AF-163, AF-164, AF-165, AF-166, AF-167, AF-168, AF-169, AF-170, AF-171, AF-172, AF-173, AF-174, AF-175, AF-176, AF-177, AF-178, AF-179, AF-180, AF-181, AF-182, AF-183, AF-184, AF-186, AF-187, AF-188, AF-189, AF-190, AF-191, AF-185, AF-192

10

20

の定量的検出について 2 D 電気泳動によって分析され、ここで、1 つ以上の発現参考特性 ( E R F ) に対する A F の比は、アルツハイマー病が存在することを示す。特定の実施形態において、コントロールサンプルまたは参考範囲における A F / E R F 比と比較した試験されるサンプルにおける 1 つ以上の A F / E R F 比における減少は、アルツハイマー病の存在を示す；

30

【 0 0 5 9 】

【 化 6 】

AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5,  
AF-6, AF-7, AF-8, AF-9, AF-10, AF-13, AF-14, AF-15, AF-16, AF-17, AF-18, AF-19, AF-20, AF-21, AF-22, AF-23, AF-24, AF-25, AF-26, AF-27, AF-28, AF-29, AF-30, AF-31, AF-32, AF-33, AF-34, AF-35, AF-36, AF-37, AF-38, AF-39, AF-40, AF-41, AF-42, AF-43, AF-44, AF-45, AF-46, AF-47, AF-48, AF-49, AF-50, AF-51, AF-76, AF-78, AF-79, AF-80, AF-81, AF-82, AF-83, AF-84, AF-85, AF-86, AF-87, AF-88, AF-89, AF-90, AF-91, AF-92, AF-93, AF-94, AF-95, AF-96, AF-98, AF-99, AF-100, AF-101, AF-102, AF-103, AF-104, AF-105, AF-107, AF-108, AF-110, AF-111, AF-112, AF-114, AF-115, AF-116, AF-117, AF-118, AF-119, AF-149, AF-150, AF-152, AF-154, AF-155, AF-156, AF-159, AF-160, AF-162, AF-163, AF-164, AF-169, AF-170, AF-172, AF-173, AF-174, AF-175, AF-176, AF-177, AF-178, AF-181, AF-183, AF-184, AF-186, AF-187, AF-188, AF-189, AF-190, AF-191

40

は、本目的に適切な A F である。別の特定の実施形態において、アルツハイマー病の存在を検出する手段として、試験サンプルにおける 1 つ以上の A f を測定し得、そしてそれら

50

を E R F と比較する。従って、コントロールサンプルまたは参考範囲中の A F / E R F 比と比較して、試験サンプル中の 1 つ以上の A F / E R F 比における増加はアルツハイマー病の存在を示す；

【 0 0 6 0 】

【 化 7 】

AF-52, AF-53, AF-54, AF-55, AF-56, AF-57,  
 AF-58, AF-59, AF-60, AF-61, AF-62, AF-63, AF-64, AF-65, AF-66, AF-67, AF-68,  
 AF-69, AF-70, AF-71, AF-72, AF-73, AF-74, AF-75, AF-121, AF-122, AF-123, AF-  
 124, AF-125, AF-126, AF-127, AF-128, AF-129, AF-130, AF-131, AF-132, AF-133, 10  
 AF-134, AF-137, AF-139, AF-140, AF-141, AF-142, AF-143, AF-144, AF-145, AF-  
 146, AF-147, AF-148, AF-151, AF-153, AF-157, AF-161, AF-165, AF-166, AF-167,  
 AF-168, AF-171, AF-179, AF-180, AF-182, AF-185, AF-192

は、本目的に適切な A F である。

【 0 0 6 1 】

本発明のさらなる実施形態において、被験体由来の C S F は、( a ) コントロールサンプル中の A F / E R F 比と比較して、試験サンプル中の減少した A F / E R F 比がアルツハイマー病の存在を示す、1 つ以上の A F ；

【 0 0 6 2 】

【 化 8 】

すなわち AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6, AF-7, AF-8, AF-9, AF-10, AF-13, AF-14,  
 AF-15, AF-16, AF-17, AF-18, AF-19, AF-20, AF-21, AF-22, AF-23, AF-24, AF-25,  
 AF-26, AF-27, AF-28, AF-29, AF-30, AF-31, AF-32, AF-33, AF-34, AF-35, AF-36,  
 AF-37, AF-38, AF-39, AF-40, AF-41, AF-42, AF-43, AF-44, AF-45, AF-46, AF-47,  
 AF-48, AF-49, AF-50, AF-51, AF-76, AF-77, AF-78, AF-79, AF-80, AF-81, AF-82,  
 AF-83, AF-84, AF-85, AF-86, AF-87, AF-88, AF-89, AF-90, AF-91, AF-92, AF-93,  
 AF-94, AF-95, AF-96, AF-98, AF-99, AF-100, AF-101, AF-102, AF-103, AF-104, 30  
 AF-105, AF-107, AF-108, AF-110, AF-111, AF-112, AF-114, AF-115, AF-116, AF-  
 117, AF-118, AF-119, AF-149, AF-150, AF-152, AF-154, AF-155, AF-156, AF-159,  
 AF-160, AF-162, AF-163, AF-164, AF-169, AF-170, AF-172, AF-173, AF-174, AF-  
 175, AF-176, AF-177, AF-178, AF-181, AF-183, AF-184, AF-186, AF-187, AF-188,  
 AF-189, AF-190, AF-191

またはそれらの任意の適切な組合せ；( b ) コントロールサンプル中の A F / E R F 比と比較して、試験サンプル中の増加した A F / E R F 比がアルツハイマー病の存在を示す 1 40  
 つ以上の A F ；

【 0 0 6 3 】

【 化 9 】

すなわち AF-52, AF-53, AF-54,

AF-55, AF-56, AF-57, AF-58, AF-59, AF-60, AF-61, AF-62, AF-63, AF-64, AF-65,  
AF-66, AF-67, AF-68, AF-69, AF-70, AF-71, AF-72, AF-73, AF-74, AF-75, AF-77,  
AF-121, AF-122, AF-123, AF-124, AF-125, AF-126, AF-127, AF-128, AF-129, AF-  
130, AF-131, AF-132, AF-133, AF-134, AF-137, AF-139, AF-140, AF-141, AF-142,  
AF-143, AF-144, AF-145, AF-146, AF-147, AF-148, AF-151, AF-153, AF-157, AF-  
161, AF-165, AF-166, AF-167, AF-168, AF-171, AF-179, AF-180, AF-182, AF-185,  
AF-192.

10

またはそれらの任意の適切な組合せ、の定量的検出について2D電気泳動によって分析される。

【0064】

好ましい実施形態において、被験体由来のCSFは、多数のAFの定量的検出について分析される。

【0065】

(5.2 アルツハイマー病関連タンパク質アイソフォーム(API))

本発明の別の局面において、被験体由来のCSFは、1つ以上のアルツハイマー病関連タンパク質アイソフォーム(API)の定量的検出について分析される(例えば、アルツハイマー病のスクリーニング、処置もしくは診断のためまたは薬学的産物の開発のため)。当該分野で周知のように、所定のタンパク質は、アミノ酸組成の異なる(例えば、オルタナティブmRNAまたはpre-mRNAプロセッシング(例えば、選択的スプライシングまたは限定されたタンパク質分解)の結果としてか、あるいは異なる翻訳後修飾(例えば、グリコシル化、リン酸化、アシル化)の結果として、あるいはその両方の結果として)1つ以上の改変体形態(アイソフォーム)として発現され得、その結果、同一アミノ酸配列のタンパク質はそのpI、MW、またはその両方が異なり得る。「アルツハイマー病関連タンパク質アイソフォーム」とは、アルツハイマー病に罹患していない被験体由来のCSFと比較してアルツハイマー病に罹患する被験体由来のCSFに特異的に存在するタンパク質アイソフォームをいう。

20

30

【0066】

APIの2つの群は、AFのアミノ酸配列決定によって本明細書中に記載される。APIは、単離され、タンパク質分解に供され、そしてこの場合、好ましい技術の方法および装置を使用して質量分析法によって分析された(好ましい技術は代表として示されるが本発明の制限ではないことが理解される)。当業者は、質量分析法および/またはタンデム質量分析法によって種々のスペクトル解析法およびデータベース探索ツールを使用して解析されたタンパク質由来の配列情報を同定し得る。これらの方法およびツールのいくつかの例は、Swiss Institute of Bioinformaticsウェブサイト(<http://www.expasy.ch/>)およびEuropean Molecular Biology Laboratoryウェブサイト([www.mann-emb](http://www.mann-embl-heidelberg.de/Services/PeptideSearch/) 40  
.embl-heidelberg.de/Services/PeptideSearch/)で見出され得る。APIの同定は、SEQUEST探索プログラム(Engら、1994, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5: 976-989)を使用して以下の実施例に記載されるようなトリプシンの消化ペプチドの解釈されないタンデム質量スペクトルを用いて実行された。

【0067】

第1群は、アルツハイマー病に罹患していない被験体のCSFと比較して、アルツハイマー病に罹患している被験体のCSFにおいて減少したAPIからなる。トリプシンを使用するタンパク質分解によってこれらのAPIから生成され、そしてタンデム質量分析法およびSEQUESTプログラムを使用するデータベース探索によって同定されるペプチド

50

のアミノ酸配列は、対応する pI および MW に加えて表 IV に列挙される。1 つの API について、タンデム質量分析法由来の部分的配列情報は、いずれの公知の公開データベースにも記載されていないことがわかった。この API は、表 IV 中に「新規」として列挙され、そして以下の実施例に記載されるようにこの API のトリプシンペプチドの MS / MS スペクトルを手動で解釈することから誘導される部分的アミノ酸配列情報は、表 IX に提供される。

【 0 0 6 8 】

【 表 1 3 】

表 IV. アルツハイマー病に罹患している被験体の CSF において減少した API

AF#	API#	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	pI	MW(Da)
AF-1	API-47	EDYICYAR, GKPPPSFSWTR, QPEYAVVQR	4.79	150081
AF-1	API-242	IIMLFTDGGEEER, FVVTDGGITR	4.79	150081
AF-2	API-1	SGELEQEEER, EEEEEMAVVPQGLFR	4.28	21349
AF-3	API-48	LVNIYDSMPLR, VIVVWNNIGEK, YLELFQR	8.10	34846
AF-5	API-49	DCSGVSLHLTR	7.34	36554
AF-6	API-2	TEAYLEAIR	4.91	29812
AF-8	API-194	DGNPFYFTDHR	4.93	187927
AF-9	API-3	AETYEGVYQCTAR	5.21	136768
AF-10	API-50	FWDYLR, GEVQAMLGQSTEELR KVEQAVETEPEPELR SELEEQLTPVAEETR	5.19	17694
AF-10	API-51	VNSDGGGLVALR	5.19	17694
AF-13	API-4	HYDGSYSTFGER, VGFYESDVMGR, LPPNVVEESAR	6.01	184530
AF-14	API-52	ADLSGITGAR, EIGELYLPK	4.72	63166
AF-14	API-243	FEDGVLDPDYPR	4.72	63166
AF-15	API-53	ELDESLQVAER	4.47	38970
AF-15	API-244	TEVQLEHLR	4.47	38970
AF-16	API-54	EGPVLILGR	5.19	46876
AF-17	API-5	EPGEFALLR, TALASGGVLDASGDYR, YEAAPDPR, VAMHLVCPDR	5.82	50294
AF-18	API-55	IVIGMDVAASEFYR, LGAEVYHTLK	4.87	49219
AF-18	API-245	VEQATQAIPMER	4.87	49219
AF-21	API-6	LSPYVNYSFR,	5.40	141094

10

20

30

40

AF#	API#	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	pI	MW(Da)
		AETYEGVYQCTAR, GKPPPSFSWTR, IDGDTIIFSNVQER		
AF-22	API-56	EGLDLQVLEDSGR, LICSELNGR, RTMRDQDTGK	4.93	133773
AF-22	API-57	YIFHNFMER, SPEQQETVLDGNLIIR, NGIDIYSLTVDSR, ILDDLSPR	4.93	133773
AF-23	API-7	IPTTFENGR	4.50	32473
AF-23	API-8	EDEEEEEGENYQK, GEAGAPGEEDIQGPTK, HLEEPGETQNAFLNER	4.50	32473
AF-24	API-9	EGPVLILGR, IVQFSPSGK, NNLVIFHR	5.31	46663
AF-25	API-10	ASSIIDELFQDR	5.68	36700
AF-26	API-14	TMLLQPAGSLGYSYSYR, APEAQVSVQPNFQQDK	8.11	32305
AF-27	API-15	WLQGSQELPR	5.33	141371
AF-27	API-58	LSPYVNYSFR, AETYEGVYQCTAR, GKPPPSFSWTR, IDGDTIIFSNVQER, NALGAIHHTISVR	5.33	141371
AF-28	API-16	IALVITDGR	5.13	158568
AF-28	API-59	ALYLQYTDETFR, QSEDSTFYLGFR, GAYPLSIEPIGVR	5.13	158568
AF-29	API-196	LVGGPMDASVEEEGVR ALDFAVGEYK	9.22	47059
AF-30	API-17	LAAAVSNFGYDLYR, TSLEDFYLDEER	5.67	48057
AF-31	API-60	YIETDPANR, AGALNSNDAFVLK, HVVPNEVVVQR	6.07	91258
AF-32	API-18	EPGEFALLR, TALASGGVLDASGDYR, VAMHLVCPSPR	6.17	48958
AF-34	API-61	TGLEAISNHK, FFEEDPNK	4.54	145408

10

20

30

40

AF#	API#	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	pI	MW(Da)
AF-35	API-62	QQTEWQSGQR, SELEEQLTPVAEETR	5.21	18623
AF-37	API-19	DVIATDKEDVAFK, ENFSCLTR, FVEGLPINDFSR, EVGVYEALK	6.91	33523
AF-38	API-63	LSELIQPLPLER, LVHGGPCDK, EKPGVYTNVCR, YTNWIKK	6.47	29535
AF-39	API-64	CSVFYGAPSK	7.50	35510
AF-39	API-65	LVNIYDSMPLR, YLELFQR	7.50	35510
AF-40	API-20	ITWSNPPAQGAR, VGGVQSLGGTGALR, IGADFLAR, NFGLYNER, HIYLLPSGR	7.29	38617
AF-41	API-22	LEGEACGVYTPR	5.85	17345
AF-42	API-66	LIVHNGYCDGR	5.04	18662
AF-43	API-67	LGPLVEQGR, LEEQAQQIR	9.83	14065
AF-43	API-68	LVGGPMDASVEEEGVR	9.83	14065
AF-44	API-69	EELLPAQDIK	6.63	102328
AF-44	API-70	GCPTTEEGCGER, AASGTQNNVLR	6.63	102328
AF-45	API-23	ALYYDLISSPDIHGTYK, ELLDVTAPQK, LAAAVSNFGYDLYR, TSLEDFYLDEER	6.04	46998
AF-46	API-24	THPHFVIPYR	4.71	19802
AF-46	API-197	QSLEASLAETEGR, YENEVALR	4.71	19802
AF-46	API-198	YEELQQTAGR	4.71	19802
AF-47	API-25	EPGEFALLR, TALASGGVLDASGDYR, YEAAVPDPR, VAMHLVCPSR	5.99	49664
AF-48	API-71	YLELESSGHR, AFLFQESPR	5.32	122332
AF-49	API-26	GLVSWGNI PCGSK, EKPGVYTNVCR	6.94	27576

10

20

30

40

AF#	API#	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	pi	MW(Da)
		DSCQGDSSGGPLVCGDHLR		
AF-49	API-27	TMLLQPAGSLGYSYSR	6.94	27576
AF-50	API-72	NVPLPVIAELPPK	6.82	71337
AF-50	API-73	CFEPQLLR, EQPPSLTR	6.82	71337
AF-50	API-199	YWNDCEPPDSR, DSPVLIDFFEDTER, GGEGTG YFVDFSVR	6.82	71337
AF-50	API-200	VYLFDFPEGK, CISYSSER	6.82	71337
AF-51	API-28	ASSIIDELFQDR	5.70	34388
AF-51	API-30	SADTLWDIQK, LKDDEVAQLK, LIAPVAEEEEATVPNNK	5.70	34388
AF-76	API-86	EGPVLILGR, NNLVIFHR	5.59	45537
AF-79	API-201	LPPNVVEESAR	5.52	142378
AF-81	API-88	LVESGGGLVQPGGSLR	5.43	78299
AF-81	API-202	GEASVCVEDWESGDR, VSSQNIQDFPSVLR	5.43	78299
AF-82	API-89	LLEACTFHSAK, HSTVLENLPDK	6.69	74838
AF-83	API-90	DQYELLCR, QMDFELLCQNGAR, IECVSAENTEDCIAK, SPDFQLFSSSHGK, GSNFQWNQLQGK, CGLVPVLAENYK, WCTISNQEANK, FDQFFGEGCAPGSQR, EPVDNAENCHLAR, WCAIGHEETQK, HSTVLENLPDK	6.81	71920
AF-84	API-91	DNPQTHYYAVAVVK, DQYELLCR, QMDFELLCQNGAR, VTCVAEELLK, WCTISNQEANK, EPVDNAENCHLAR, FDQFFGEGCAPGSQR, HSTVLENLPDK	6.94	73402
AF-85	API-92	IPIEDGSGEVVLSR	7.10	73878

10

20

30

40

AF#	API#	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	pI	MW(Da)
AF-85	API-93	DQYELLCR, FDQFFGEGCAPGSQR, SPDFQLFSSSHGK, EPVDNAENCHLAR, CGLVPVLAENYK, HSTVLENLPDK	7.10	73878
AF-87	API-95	ECCHGDLLECADDR, IYEATLEDCCAK, LGEYGFQNALIVR, DVFLGTFLYEYSR, FQPLVDEPK	5.95	64179
AF-89	API-97	GYTQQLAFR, AGDFLEANYMNLQR	5.39	65155
AF-90	API-98	LPLEYSYGEYR	7.61	62945
AF-91	API-99	LFEELVR, DPVQEAWAEDVDLR, GIFPVLCK, GDYPLEAVR	8.16	56352
AF-100	API-101	LSCAEDYLSLVNLR, LGEYGFQNALIVR, YICENQDTISTK, CCTESLVNR, DVFLGTFLYEYSR, HPDYSVSLLLR	6.08	44068
AF-103	API-102	INHGILYDEEK, EIMENYNIALR, ITCTEEGWSPTPK	5.93	42722
AF-104	API-103	YVMLPVADQEK	5.09	42184
AF-105	API-104	GSPAINVAVHVFR	5.19	42184
AF-107	API-107	ITVVDALHEIPVK, DNLAIQTR	7.26	33226
AF-107	API-210	KLVVENVDVLTQMR	7.26	33226
AF-108	API-108	GYCAPGMECVK, GTCEQGPSIVTPPK, AGAAAGGPGVSGVCVCK	7.54	33136
AF-114	API-111 API-112	表IXを参照のこと	6.80	18741
AF-117	API-113	KVEQAVETEPEPELR, SELEEQLTPVAEETR	4.65	13983
AF-119	API-114	GTFATLSELHCDK, VVAGVANALAHK, LLVVYPWTQR	7.23	11699

10

20

30

40

AF#	API#	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	pI	MW(Da)
AF-149	API-214	VEEVKPLEGR	4.82	190721
AF-150	API-144	GPPGPPGGVVVR, VEVLGDLR	6.87	157592
AF-152	API-146	FTFEYSR, FTDSENVQER	5.04	81703
AF-152	API-147	VIALINDQR	5.04	81703
AF-152	API-148	TATSEYQTFNPR, ELLESYIDGR	5.04	81703
AF-154	API-150	QEDDLANINQWVK, LCQDLGPGAFR	5.03	67307
AF-154	API-151	DVVLTTTFVDDIK, AIEDYINEFSVR	5.03	67307
AF-154	API-152	WLQGSQELPR	5.03	67307
AF-155	API-215	LVGGPMDASVEEEGVR, ALDFAVGEYNK	9.21	64021
AF-156	API-153	DQDGEILLPR	4.36	58083
AF-159	API-158	TSLEDFYLDEER	5.08	52008
AF-159	API-159	EPGEFALLR, TALASGGVLDASGDYR	5.08	52008
AF-159	API-160	YYTVFDR, QVFGAATK	5.08	52008
AF-163	API-165	IPTTFENGR, CPNPPVQENFDVVK, NILTSNNIDVK, NPNLPPETVDSLK	4.45	34879
AF-163	API-166	GEAGAPGEEDIQGPTK	4.45	34879
AF-164	API-167	ELDESLQVAER, FMETVAEK, EILSVDCSTNNPSQAK	5.00	33485
AF-169	API-173	LGQYASPTAK, GSFEFPVGDVAVSK, EELVYELNPLDHR	8.00	34362
AF-170	API-174	ELDESLQVAER	5.41	31886
AF-170	API-175	GSPAINVAVHVFR, AADDTWEPFASGK	5.41	31886
AF-170	API-176	SWFEPLVEDMQR, LGADMEDVCGR, LEEQAAQIR, SELEEQLTPVAEETR, AATVGSLLAGQPLQER	5.41	31886
AF-172	API-179	GPCWCVDR, HLDSVLQQLQTEVYR	6.71	28747

10

20

30

40

AF#	API#	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	pI	MW(Da)
AF-172	API-180	KPNLQVFLGK, GLVSWGNIPOGSK, EKPGVYTNVCR, DSCQGDSSGGPLVCGDHLR	6.71	28747
AF-173	API-181	SNLDEDIAEENIVSR, NEQVEIR	7.67	27476
AF-174	API-182	SVTEQGAELSNEER	4.67	27811
AF-175	API-183	APEAQVSVQPNFQQDK, TMLLQPAGSLGYSYSYR, AQQFTEDTIVFLPQTDK	5.33	24936
AF-176	API-184	TMLLQPAGSLGYSYSYR, AQQFTEDTIVFLPQTDK	4.86	22248
AF-178	API-185	LPFVINDGK	6.03	22247
AF-178	API-217	TMLLQPAGSLGYSYSYR, AQQFTEDTIVFLPQTDK, APEAQVSVQPNFQQDK	6.03	22247
AF-178	API-219	TQQFTEDAIVFLPQTDK	6.03	22247
AF-181	API-187	HVGDLGNVTADK, GDGPVQGIINFEQK	5.72	16336
AF-183	API-189	LVGGPMDASVEEEGVR, ALDFAVGEYNK	10.36	11160
AF-184	API-190	ELLDTVTAPQK, TSLEDFYLDEER	5.31	48769
AF-186	API-238	IPTTFENGR	4.71	29693
AF-187	API-239	QPEYAVVQR	4.93	154156
AF-190	API-240	ELDVLQGR, NNYMYAR	5.29	29663

10

20

30

第2群は、アルツハイマー病に罹患していない被験体のCSFと比較して、アルツハイマー病に罹患している被験体のCSFにおいて増加したAPIを含む。トリプシンを使用するタンパク質分解によってこれらのAPIから生成され、そしてタンデム質量分析法およびSEQUESTプログラムを使用するデータベース探索によって同定されるペプチドのアミノ酸配列は、対応するpIおよびMWに加えて表Vに列挙される。

【0069】

【表14】

表 V. アルツハイマー病に罹患している被験体のCSFにおいて増加したAPI

AF#	API#	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	pI	MW (Da)
AF-52	API-74	GLQDEDGYR,	6.30	32573

40

AF#	API#	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	pI	MW (Da)
		FACYYPR		
AF-53	API-33	AVMDDFAAFVEK, YICENQDSISSK	5.84	45302
AF-54	API-221	SELEEQLTPVAEETR	5.12	17520
AF-55	API-34	LVGGPMDASVEEEGVR, ALDFAVGEYNK	8.10	12361
AF-56	API-75	NYCGLPGEYWLGNLK, IRPFFPQQ, LESDVSAQMEYCR, DNDGWLTSDPR	8.56	52128
AF-56	API-246	AGALNSNDAFVLK, TGAQELLR	8.56	52128
AF-57	API-35	MTLDDFR	6.30	68549
AF-57	API-76	VFLDCCNYITELR	6.30	68549
AF-57	API-222	QSLEASLAETEGR	6.30	68549
AF-58	API-77	KVEQAVETEPEPELR	5.01	14507
AF-59	API-36	TSLEDFYLDEER	6.74	33401
AF-60	API-37	GEVQAMLGQSTEELR, KVEQAVETEPEPELR, SELEEQLTPVAEETR,	5.39	33873
AF-61	API-78	QELSEAEQATR, TIYTPGSTVLYR, IPIEDGSGEVLSR	6.76	54345
AF-62	API-38	GLQDEDGYR, ITQVLHFTK, FACYYPR	6.60	31004
AF-63	API-79	IWDVVEK, QPVPGQQMTLK, EVDVSVWVDVK, DSCVGSLLVK	5.97	14897
AF-64	API-80	DFDFVPPVVR, SNLDEDIAEENIVSR, IPIEDGSGEVLSR	6.67	68119
AF-65	API-81	CLVNLIEK, FLCTGGVSPYADPNTCR	7.19	58620
AF-65	API-223	VGDTLNLNLR	7.19	58620
AF-66	API-82	VFLDCCNYITELR, FISLGEACK	10.05	30092
AF-66	API-83	LVGGPMDASVEEEGVR, ALDFAVGEYNK	10.05	30092
AF-67	API-39	AADDTWEPFASGK	5.02	13735
AF-68	API-84	LISWYDNEFGYSNR,	9.06	35351

10

20

30

40

AF#	API#	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	pI	MW (Da)
		VPTANVSVDLTCR,		
AF-68	API-85	ISYQSSSTEER	9.06	35351
AF-69	API-40	TQVNTQAEQLR, ALVQQMEQLR	5.01	46760
AF-69	API-247	VLSLAQEQVGG SPEK, AEMADQAAAWLTR, QGSFQGGFR	5.01	46760
AF-70	API-41	LVMGIPTFGR, EGDGSCFPDALDR, FSNTDYAVGYMLR, GNQWVG YDDQESVK, QHFTTLIK	8.91	38789
AF-70	API-224	DAIPEDLPPLTADFAEDK, YLVEIAR	8.91	38789
AF-71	API-42	VFLDCCNYITELR, SNLDEIIAEENIVSR, GYTQQLAFR	6.44	68579
AF-72	API-43	IDQTVEELR, TQVNTQAEQLR, ALVQQMEQLR, LEPYADQLR	5.00	43788
AF-73	API-44	AADDTWEPFASGK	5.21	31615
AF-74	API-45	GECQAEGVLFQGGDR, YYCFQGNQFLR	6.19	51934
AF-74	API-248	TIYTPGSTVLYR, TVMVNIENPEGIPVK	6.19	51934
AF-75	API-46	ELDESLQVAER, EILSVDCSTNNPSQAK	5.03	33671
AF-75	API-225	LGPLVEQGR, AATVGS LAGQPLQER	5.03	33671
AF-121	API-116	DNCCILDER, YEASILTHDSSIR, TSTADYAMFK, VAQLEAQCQEPCK, VELEDWNGR, YLQEIYNSNNQK, RLDGSVDFK,	5.42	105108
AF-123	API-118	GLIDEVNQDFTNR, ADSGEGDFLAEGGGVR	7.31	64933
AF-124	API-119	GLIDEVNQDFTNR, ESSSHHPGIAEFPSR	7.47	64736

10

20

30

40

AF#	API#	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	pI	MW (Da)
AF-125	API-120	SGNENGEFYLR	4.77	61297
AF-126	API-121	DQDGEILLPR, DCQPGLCCAFQR	4.11	60374
AF-126	API-122	DQDGEILLPR	4.11	60374
AF-127	API-123	SLDFTELDVAEEK, ALQDQLVLVAAK	4.98	59649
AF-128	API-124	LNMGITDLQGLR, VGDTLNLNLR	6.60	57865
AF-129	API-125	KLCMAALK, ELPEHTVK, THLPEVFLSK, HLSLLTTLNLR, FEDCCQEK, LPEATPTELAK, VGSQYAAAYGEK, YTFELSR, LCDNLSTK	5.29	54625
AF-129	API-126	SLDFTELDVAEEK, DPTFIPAPIQAK	5.29	54625
AF-130	API-127	LQSLFDSPDFSK, LAAAVSNFGYDLYR, TSLEDFYLDEER	5.08	51880
AF-130	API-128	EPGEFALLR, TALASGGVLDASGDYR, VAMHLVCPSR	5.08	51880
AF-132	API-130	DHAVDLIQK, TEQWSTLPPETK, VLSLAQEQVGGSPK, QGSFQGGFR, ADGSYAAWLSR, AEMADQASAWLTR	4.72	47414
AF-133	API-131	TQVNTQAEQLR, LEPYADQLR	5.12	44068
AF-134	API-132	LEPYADQLR	5.00	43516
AF-137	API-134	ELDESLQVAER, KYNELLK	4.98	36855
AF-137	API-135	AQLGDLPWQVAIK, VFSLQWGEVK	4.98	36855
AF-137	API-232	LGPIEAIQK	4.98	36855
AF-137	API-233	LGPLVEQGR, LEEQAAQIR	4.98	36855
AF-137	API-234	KMEENEK	4.98	36855

10

20

30

40

AF#	API#	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	pI	MW (Da)
AF-139	API-136	ELDESLQVAER, IDSLEENDR, EDALNETRESETKLK, EILSVDCSTNNPSQAK, TLLSNLEEAK	5.00	34295
AF-139	API-137	SELEEQLTPVAEETR, AATVGS LAGQPLQER	5.00	34295
AF-140	API-138	GLQDEDGYR, FACYYPR	6.80	32080
AF-141	API-139	LLEVPEGR, TNFDNDIALVR	7.50	28440
AF-142	API-140	SNLDEDIIEENIVSR, VELLHNPAFCSLATTK	6.75	27279
AF-142	API-141	LSELIQPLPLER,	6.75	27279
AF-143	API-142	LLIYWASTR, SGTASVVCLLNNFYPR,	7.44	26066
AF-144	API-143	EVDSGNDIYGNPIK, SDGSCAWYR	6.56	20744
AF-151	API-145	AETYEGVYQCTAR, GKPPPSFSWTR, IDGDTIIFSNVQER	5.28	137531
AF-153	API-149	LNMGITDLQGLR, VGDTLNLNLR	9.85	69630
AF-157	API-155	EPGEFALLR, TALASGGVLDASGDYR, YEAAPDPR	4.99	55449
AF-161	API-161	IDQTVVELR, TQVNTQAEQLR, SLAPYAQDTQEK, ALVQOMEQLR, LEPYADQLR, RVEPYGENFNK	5.18	44404
AF-161	API-162	TSLEDFYLDEER	5.18	44404
AF-161	API-163	AVFPSIVGR, SYELPDGQVITIGNER, AGFAGDDAPR, GYSFTTTAER, QEYDESGPSIVHR, VAPEEHPVLLTEAPLNPK	5.18	44404
AF-165	API-168	EELVYELNPLDHR, EPFLSCCQFAESLR	7.17	34230
AF-166	API-169	GLCVATPVQLR,	8.54	33657

10

20

30

40

AF#	API#	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	pl	MW (Da)
		EELVYELNPLDHR		
AF-167	API-170	ASSIIDELFQDR, TLLSNLEEAK	5.69	33621
AF-167	API-171	GEVQAMLGQSTEELRLEEQ AQQIR, SELEEQLTPVAEETR	5.69	33621
AF-168	API-237	ALEESNYELEGK	7.66	33920
AF-168	API-172	GSFEFPVGDVASK, GLCVATPVQLR, EELVYELNPLDHR, EPFLSCCQFAESLR	7.66	33920
AF-171	API-177	TMLLQPAGSLGYSYSR, AQGFTEDTIVFLPQTDK	4.98	29658
AF-171	API-178	GSPAINVAVHVFR, AADDTWEPFASGK	4.98	29658
AF-179	API-186	LIVHNGYCDGR, QEELCLAR, FSGTWYAMAK	5.26	20115
AF-180	API-220	CSVFYGAPSK, GLQDEDGYR	6.17	16255
AF-182	API-188	AADDTWEPFASGK	4.89	13651
AF-185	API-191	VGIVSGWGR	5.32	40323
AF-185	API-192	SGNENGEFYLR, ADQVCINLR	5.32	40323

10

20

当業者は、本発明の記載に基づいて、所定のAPIは、表IVまたはVの中のAPIについて提供されたデータに基づいて記載され得ることを理解する。このAPIは、そのAPIについて記載されるペプチド配列を含むタンパク質（好ましくは、そのAPIについて記載されるペプチド配列の複数の、より好ましくはペプチド配列の全てを含む）であり、そしてそのAPIについて記載されたほぼその値のpI（好ましくは、記載された値の約10%以内、より好ましくは約5%以内、なおより好ましくは約1%以内）であり、そしてそのAPIについて記載されたほぼその値のMWを有する（好ましくは、記載された値の約10%以内、より好ましくは約5%以内、なおより好ましくは約1%以内）。

30

【0070】

1つの実施形態において、被験体からのCSFが、以下のAPIの1つ以上の定量的な検出について分析される：

【0071】

【化10】

40

API-1, API-2, API-3, API-4, API-5, API-6,  
 API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15, API-16, API-17, API-18, API-19,  
 API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26, API-27, API-28, API-30, API-47,  
 API-48, API-49, API-50, API-51, API-52, API-53, API-54, API-55, API-56, API-57,  
 API-58, API-59, API-60, API-61, API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67,  
 API-68, API-69, API-70, API-71, API-72, API-73, API-86, API-88, API-89, API-90,  
 API-91, API-92, API-93, API-95, API-97, API-98, API-99, API-101, API-102, API-  
 103, API-104, API-107, API-108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-144,  
 API-146, API-147, API-148, API-150, API-151, API-152, API-153, API-158, API-  
 159, API-160, API-165, API-166, API-167, API-173, API-174, API-175, API-176,  
 API-179, API-180, API-181, API-182, API-183, API-184, API-185, API-187, API-  
 189, API-190, API-194, API-196, API-197, API-198, API-199, API-200, API-201,  
 API-202, API-210, API-214, API-215, API-217, API-219, API-238, API-239, API-  
 240, API-242, API-243, API-244, API-245

10

20

またはそれらの任意の適切な組み合わせ。ここで、アルツハイマー病を罹患していない被験体からのCSF（例えば、コントロールサンプルまたは先に決定された参照範囲）に比較して、被験体からのCSFにおけるAPI（またはそれらの任意の適切な組み合わせ）の減少した量は、アルツハイマー病の存在を示す。

【0072】

本発明の別の実施形態において、被験体からのCSFが、以下のAPIの1つ以上の定量的な検出について分析される：

【0073】

【化11】

30

API-33, API-34, API-35,  
 API-36, API-37, API-38, API-39, API-40, API-41, API-42, API-43, API-44, API-45,  
 API-46, API-74, API-75, API-76, API-77, API-78, API-79, API-80, API-81, API-82,  
 API-83, API-84, API-85, API-116, API-118, API-119, API-120, API-121, API-122,  
 API-123, API-124, API-125, API-126, API-127, API-128, API-130, API-131, API-  
 132, API-134, API-135, API-136, API-137, API-138, API-139, API-140, API-141,  
 API-142, API-143, API-145, API-149, API-155, API-161, API-162, API-163, API-  
 168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-177, API-178, API-186, API-188,  
 API-191, API-192, API-220, API-221, API-222, API-223, API-224, API-225, API-  
 232, API-233, API-234, API-237, API-246, API-247, API-248,

40

またはそれらの任意の適切な組み合わせ。ここで、アルツハイマー病を罹患していない被験体からのCSF（例えば、コントロールサンプルまたは先に決定された参照範囲）に比較して、被験体からのCSFにおけるAPI（またはそれらの任意の適切な組み合わせ）の増加した量は、アルツハイマー病の存在を示す。

【0074】

さらなる実施形態において、被験体由来のCSFは、(a) 1つ以上のAPIまたはこれ

50

らの任意の組み合わせ（これらの減少した量は、アルツハイマー病の存在を示す）、すなわち：

【 0 0 7 5 】

【 化 1 2 】

API-1, API-2, API-3, API-4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15, API-16, API-17, API-18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26, API-27, API-28, API-30, API-47, API-48, API-49, API-50, API-51, API-52, API-53, API-54, API-55, API-56, API-57, API-58, API-59, API-60, API-61, API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67, API-68, API-69, API-70, API-71, API-72, API-73, API-86, API-88, API-89, API-90, API-91, API-92, API-93, API-95, API-97, API-98, API-99, API-101, API-102, API-103, API-104, API-107, API-108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-144, API-146, API-147, API-148, API-150, API-151, API-152, API-153, API-158, API-159, API-160, API-165, API-166, API-167, API-173, API-174, API-175, API-176, API-179, API-180, API-181, API-182, API-183, API-184, API-185, API-187, API-189, API-190, API-194, API-196, API-197, API-198, API-199, API-200, API-201, API-202, API-210, API-214, API-215, API-217, API-219, API-238, API-239, API-240, API-242, API-243, API-244, API-245;

10

20

および（b）1つ以上のAPIまたはこれらの任意の組み合わせ（これらの増加した量は、アルツハイマー病を示す）、すなわち：

【 0 0 7 6 】

【 化 1 3 】

API-33, API-34, API-35, API-36, API-37, API-38, API-39, API-40, API-41, API-42, API-43, API-44, API-45, API-46, API-74, API-75, API-76, API-77, API-78, API-79, API-80, API-81, API-82, API-83, API-84, API-85, API-116, API-118, API-119, API-120, API-121, API-122, API-123, API-124, API-125, API-126, API-127, API-128, API-130, API-131, API-132, API-134, API-135, API-136, API-137, API-138, API-139, API-140, API-141, API-142, API-143, API-145, API-149, API-155, API-161, API-162, API-163, API-168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-177, API-178, API-186, API-188, API-191, API-192, API-220, API-221, API-222, API-223, API-224, API-225, API-232, API-233, API-234, API-237, API-246, API-247, API-248.

30

40

の定量的な検出について、分析される。

【 0 0 7 7 】

なおさらなる実施形態において、被験体からのCSFが、1つ以上のAPIおよび1つ以上の以前に公知のアルツハイマー病のバイオマーカー（例えば、tau、NTP、A2）の定量的検出について分析される。この実施形態に従って、コントロールまたは参照範囲に対する各APIおよび公知のバイオマーカーの量は、被験体がアルツハイマー病を有するか否かを示す。

【 0 0 7 8 】

50

好ましくは、A P Iの量は、発現参照タンパク質アイソフォーム（E R P I）に対して規格化される。E R P Iは、E R Fの部分的な配列アミノ酸配列の特徴付けによって同定され得、これらは上に記載され、そしてこのことは、例えば、好ましい技術の方法および装置を使用して達成され得る。E R P Iの部分的アミノ酸配列が、表V Iに提供される。

【0079】

【表15】

表 VI

ERPI#	ERF#	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列
ERPI-1	ERF-2	ELLDTVTAPQK, LAAAVSNFGYDLR, TSLEDFYLDEER, ALYYDLISSPDIHGTYK

10

20

30

40

50

上に示されるように、本明細書中に記載されるA P Iは、以前に未知のタンパク質、ならびに、既知のタンパク質のアイソフォームを含み、ここで、これらのアイソフォームは、以前には、アルツハイマー病と関連しているとは、知られていなかった。それぞれのA P Iについて、本発明は、さらに以下を提供する：(a)単離されたA P Iを含む、調製物；(b)A P Iの1つ以上のフラグメントを含む調製物；および(c)これらのA P I、これらのフラグメント、またはこれらのA P Iおよびフラグメントの両方に結合する抗体。本明細書中で使用される場合、A P Iは、それが実質的に他のタンパク質が存在しない調製物、すなわち、存在する全タンパク質の10%未満（特に5%未満、より好ましくは1%未満）が、タンパク質を混入している調製物中に存在する場合、「単離されている」。別のタンパク質は、2D電気泳動によって決定されるように、単離されたA P Iのp IまたはMWとは有意に異なるp IまたはMWを有するタンパク質またはタンパク質アイソフォームである。本明細書中で使用される場合、「有意に異なる」p IまたはMWは、他のタンパク質が、参照プロトコルに従って実施される、2D電気泳動でのA P Iから分離されることを可能にするものをいう。

【0080】

1つの実施形態において、表I VまたはVに同定されるアミノ酸配列を有するペプチドを含む単離されたタンパク質が提供され、このタンパク質は、そのA P Iについて表I VまたはVに同定される値の10%以内（特に5%以内、より特に1%以内）のp IおよびMWを有する。

【0081】

本発明のA P Iは、当業者に公知の任意の方法によって、定性的にまたは定量的に検出され得、この方法には、本明細書中に記載される好ましい技術、キナーゼアッセイ、酵素アッセイ、結合アッセイおよび他の機能的アッセイ、免疫アッセイ、ならびにウエスタンプロットが挙げられるがこれらに限定されない。1つの実施形態において、A P Iは、それらのMWおよびp Iによって2Dゲルで分離され、そしてこのゲルを染色することによって、可視化される。1つの実施形態において、A P Iは、蛍光色素を用いて染色され、そして蛍光スキャナーを用いて画像化される。Sypro Red (Molecular Probes, Inc, Eugene, Oregon)は、この目的のために適切な色素である。好ましい蛍光色素は、ピリジニウム、4-[2-[4-(ジペンチルアミノ)-2-トリフルオロメチルフェニル]エチニル]-1-(スルホブチル)-内部塩である。米国特許出願番号09/412,168(1999年10月5日出願)(これは、その全体が、本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。

【0082】

あるいは、A P Iは、免疫アッセイにおいて検出され得る。1つ実施形態において、免疫アッセイは、A P Iが存在する場合に免疫特異的結合が生じる条件下で、サンプルを

抗 A P I 抗体に接触し、そしてこの抗体による任意の免疫特異的結合の量を検出または測定することによって、実施される。抗 A P I 抗体は、本明細書中に記載される方法および技術によって生成され得る。当該分野で公知のこのような抗体の例が、表 V I I に記載される。表 V I I に示されるこれらの抗体は、A P I 自体がファミリーメンバーであるタンパク質に結合することが既に知られている。特に、抗 A P I 抗体は、同じタンパク質の他のアイソフォームよりも、むしろ A P I に優先的に結合する。特定の実施形態において、抗 A P I 抗体は、この A P I に、同じタンパク質の他のアイソフォームと比較して、少なくとも 2 倍大きい親和性、より特異的には少なくとも 5 倍大きい親和性、なおより好ましくは少なくとも 10 倍大きい親和性で結合する。

【 0 0 8 3 】

A P I は、ゲルから適切な膜（例えば、P V D F 膜）に移動させられ、そして続いて適切なアッセイにおいて、プローブされる。この適切なアッセイとしては、競合アッセイ系および非競合アッセイ系（ウエスタンブロットのような技術を使用する）ならびに本明細書中に記載されるような抗 A P I 抗体（例えば、表 V I I に同定される抗体、または本発明の記載に基づいて当業者に理解されるような目的の A P I に対して惹起された抗 A P I 抗体）を使用する「サンドイッチ」イムノアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。これらの免疫ブロットは、同じ遺伝子によってコードされる他のアイソフォーム由来の A P I を免疫特異的に分化させるために必要とされる選択性を提示するこれらの抗 A P I 抗体を同定するために使用され得る。

【 0 0 8 4 】

（表 V I I . A P I または A P I 関連ポリペプチドを認識する公知の抗体）

【 0 0 8 5 】

【 表 1 6 】

API 番号 抗体	抗体	製造者	カタログ 番号
API-1	Chromogranin A	BIODESIGN INTERNATIONAL	M54219M
API-3	ANTI-Human CD56 ANTIGEN (NEURAL CELL ADHESION MOLECULE)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CBL159
API-4	α-V	DAKO - 1998 CATALOGUE	A0033
API-6	ANTI-Human CD56 ANTIGEN (NEURAL CELL ADHESION MOLECULE)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CBL159

10

20

30

表 16 丁 a 続き

API-7	Apolipoprotein D, Clone: 35C6, Mab anti-Human, paraffin, IH/WB	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA457
API-10	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
API-15	Monoclonal mouse anti-human IgA1	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK1A2-2B5
API-16	Monoclonal anti Human Collagen Type VI	BIODESIGN INTERNATIONAL	M22090M
API-22	RABBIT anti-human INSULIN GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN 2	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-IGFBP2abr
API-28	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
API-30	Lactic Dehydrogenase (LDH) (H-subunit), Clone: HH-17, Mab anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BYA- 8019-1
API-33	Albumin, Human, Chicken anti-	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-028-02
API-34	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
API-37	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-38	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-39	Transferrin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
API-40	Apolipoprotein A (HDL), Plasminogen absorbed, Sheep anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	ACL- 20078A
API-42	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
API-43	Apolipoprotein A (HDL), Plasminogen absorbed, Sheep anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	ACL- 20078A
API-44	Transferrin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
API-45	Hemopexin, Beta-1, Rabbit anti-Human, precipitating	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
API-46	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
API-47	ANTI-Human CD56 ANTIGEN (NEURAL CELL ADHESION MOLECULE)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CBL159

10

20

30

[表 16] の続き

API-50	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-52	Alpha-1-Antichymotrypsin, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 145/2
API-53	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRGAbG
API-55	Monoclonal anti-Neuron Specific Enolase	BIODESIGN INTERNATIONAL	M37403M
API-58	ANTI-Human CD58 ANTIGEN (NEURAL CELL ADHESION MOLECULE)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CBL159
API-60	Geisolin, plasma + cytoplasmic, Sheep anti-	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4828-8210
API-62	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-64	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-66	Retinol Binding Protein, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 163/2
API-67	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-69	Complement Factor B, C3 proactivator, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 488/2
API-72	イノ	DAKO - 1998 CATALOGUE	A0475
API-74	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-75	Fibrinogen, Fibrin I, B-beta chain (BB 1-42), Clone: 18C6, Mab anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	NYB- 18C6
API-76	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
API-77	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-78	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
API-79	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
API-80	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02

10

20

30

[表 16] 抗体

API-81	Complement Factor B, C3 proactivator, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 466/2
API-82	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
API-84	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	BIODESIGN INTERNATIONAL	H86504M
API-90	Monoclonal mouse anti-lactoferrin	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK4L2-LF2B8
API-92	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
API-93	Monoclonal mouse anti-lactoferrin	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK4L2-LF2B8
API-96	Albumin, Human, Chicken anti-	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-026-02
API-97	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
API-98	C8 Complement, Goat anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BMD- G35
API-101	Albumin, Human, Chicken anti-	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-026-02
API-102	Factor H (Complement), Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-066-02
API-103	Goat anti-Haptoglobin	BIODESIGN INTERNATIONAL	L15320G
API-104	Transferrin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
API-113	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clones: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-118	Monoclonal anti-human Fibrinogen	BIODESIGN INTERNATIONAL	N77190M
API-119	Monoclonal anti-human Fibrinogen	BIODESIGN INTERNATIONAL	N77190M
API-123	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
API-124	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-128	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
API-130	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-131	Apolipoprotein A (HDL), Plasminogen absorbed, Sheep anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	ACL- 20078A

10

20

30

[表 16] の続き

API-132	Apolipoprotein A (HDL), Plasminogen absorbed, Sheep anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	ACL-20076A
API-134	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CLUSTRCabG
API-136	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CLUSTRCabG
API-137	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM-5029
API-138	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS-01-032-02
API-140	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS-01-001-02
API-142	Kappa Chain, Mab anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BMD-021D
API-143	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 2 (TIMP2) (NO X w/TIMP1), Clone: 3A4, Mab anti-Human, paraffin, IH	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED-CLA488
API-145	ANTI-Human CD56 ANTIGEN (NEURAL CELL ADHESION MOLECULE)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CBL159
API-149	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS-01-032-02
API-150	Sheep anti-Alpha 2 Antiplasmin	BIODESIGN INTERNATIONAL	K90038C
API-161	Apolipoprotein A (HDL), Plasminogen absorbed, Sheep anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	ACL-20076A
API-165	Apolipoprotein D, Clone: 36C6, Mab anti-Human, paraffin, IH/WB	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED-CLA457
API-167	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CLUSTRCabG
API-168	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS-01-032-02
API-169	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS-01-032-02
API-170	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CLUSTRCabG
API-171	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM-5029
API-172	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS-01-032-02

10

20

30

〔表 16〕 抗体

API-173	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-174	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
API-175	Transferrin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
API-178	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-178	Transferrin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
API-179	IGFBP6 (M-20)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-6008
API-181	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
API-182	Rabbit anti-14-3-3B (Broadly Reactive)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-1433BNabr
API-186	Retinol Binding Protein, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 183/2
API-187	Anti-Superoxide Dismutase (Cu/Zn-SOD) IgG fraction (POLYCLONAL)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-SODabg
API-188	Transferrin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
API-189	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
API-191	Goat anti-Haptoglobin	BIODESIGN INTERNATIONAL	L15320G
API-194	ANTI-HUMAN CD56 ANTIGEN (NEURAL CELL ADHESION MOLECULE)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CBL159
API-196	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
API-201	<i>Spa</i>	DAKO - 1998 CATALOGUE	A0033
API-215	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
API-220	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-221	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-223	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02

10

20

30

表 16 ]の続き

API-225	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti- Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-233	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti- Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-238	Apolipoprotein D, Clone: 36C6, Mab anti-Human, paraffin, IH/WB	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- GLA457
API-239	ANTI-Human CD56 ANTIGEN (NEURAL CELL ADHESION MOLECULE)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CBL159

10

1つの実施形態において、組織切片 ( s e c t i o n ) における抗体の結合を使用して、API局在または1以上のAPIのレベルを検出し得る。特定の実施形態において、APIに対する抗体を使用して、被験体からの組織サンプル (例えば、脳生検) をAPIのレベルについてアッセイし得る。ここで、APIの実質的に変化したレベルは、アルツハイマー病を示す。本明細書中で使用される場合、「実質的に変化したレベル」は、アルツハイマー病のない被験体におけるレベルまたは参照レベルと比較して、増加したかまたは減少したレベルを意味する。所望される場合、この比較は、アルツハイマー病に罹患されていない身体の一部から得られた、同一の被験体からの一致したサンプルで実施され得る。

20

## 【0086】

任意の適切な免疫アッセイを使用して、APIを検出し得る。これは、以下の技術を使用する競合アッセイ系および非競合アッセイ系を限定せずを含む：例えば、ウエスタンブロット、放射免疫アッセイ、ELISA (酵素免疫測定法)、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降アッセイ、免疫拡散アッセイ、凝集 ( a g g l u t i n a t i o n ) アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射分析アッセイ、蛍光免疫アッセイおよびプロテインA免疫アッセイ。

30

## 【0087】

例えば、APIは、2工程サンドイッチアッセイによって、流体サンプル (例えば、CSF、血液、尿または組織ホモジネート) 中に検出され得る。第1の工程において、捕獲試薬 (例えば、抗API抗体) を使用して、APIを捕獲する。当該分野において公知のこのような抗体の例は、表VIIに示される。捕獲試薬は、必要に応じて固相上に固定化される。第2の工程において、直接的にかまたは間接的に標識した検出試薬を使用して、捕獲されたAPIを検出する。1つの実施形態において、検出試薬はレクチンである。レクチンは、APIと同一のコアタンパク質を有する他のアイソフォームに対してか、または抗体によって認識される抗原性決定基を共有する他のタンパク質に対してよりも、APIに対して優先的に結合するというこの目的のために使用され得る。好ましい実施形態において、選択されたレクチンは、APIと同一のコアタンパク質を有する他のアイソフォームに対してか、または抗体によって認識される抗原性決定基を共有する他のタンパク質に対してよりも、少なくとも2倍より高い親和性、より好ましくは、少なくとも5倍より高い親和性、なおさらに好ましくは、少なくとも10倍より高い親和性でAPIに結合する。本明細書の記載に基づいて、所定のAPIを検出するために適切なレクチンは、例えば、Gabius H - J & Gabius S (編) 1993、Lectins and Glycobiology (158 ~ 174頁) (これは、その全体が参考として本明細書中に援用される) 中のSumarら、Lectins as Indicators of Disease - Associated Glycoformsの158 ~ 159

40

50

ページの表 I に列挙されるレクチンの 1 以上を試験する際の、当該分野において周知の方法を使用して当業者によって容易に同定され得る。所望のオリゴ糖特異性を有するレクチンは、例えば、2Dゲルにおいて、ニトロセルロース膜のような適切な固体基質に転写した後の2Dゲルのレプリカにおいて、または抗体による捕獲に続く2工程アッセイにおいて、APIを検出するためのそれらの能力によって同定され得る。代替の実施形態において、検出試薬は、抗体（例えば、他の翻訳後修飾を免疫特異的に検出する抗体（例えば、リン酸化したアミノ酸に免疫特異的に結合する抗体））である。このような抗体の例としては、ホスホチロシンに結合するもの（BD Transduction Laboratories, カタログ番号 P11230-050 / P111230-150; P11120; P38820; P39020）、ホスホセリンに結合するもの（Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, カタログ番号 61-8100）、およびホスホスレオニンに結合するもの（Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, カタログ番号 71-8200、13-9200）が挙げられる。

#### 【0088】

所望される場合、APIをコードする遺伝子、関連遺伝子（例えば、配列相同性を有する遺伝子）、または関連核酸配列もしくはサブ配列（相補性配列を含む）はまた、ハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用され得る。APIをコードするヌクレオチド、または少なくとも8ヌクレオチド、好ましくは少なくとも12ヌクレオチド、および最も好ましくは少なくとも15ヌクレオチドを含むそのサブ配列は、ハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。ハイブリダイゼーションアッセイは、APIをコードする遺伝子の異常な発現に関連する、状態、障害、または疾患状態の検出、処置、診断、またはモニタリングのために、あるいは、アルツハイマー病を示唆する兆候または症状を有する被験体の差示的診断のために使用され得る。特に、このようなハイブリダイゼーションアッセイは、ハイブリダイゼーションが生じ得るような条件下で、核酸を含む被験体サンプルを、APIをコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズし得る核酸プローブに接触させる工程、および生じた任意のハイブリダイゼーションを検出または測定する工程を包含する方法によって実施され得る。ヌクレオチドは、以下に記載されるようなアルツハイマー病を有する被験体の治療のために使用され得る。

#### 【0089】

本発明はまた、抗API抗体を含む診断キットを提供する。さらに、このようなキットは、必要に応じて以下の1以上を含む：（1）診断、予後、治療的モニタリングまたはこれらの適用の適切な任意の組み合わせのために抗API抗体を使用するための指導書；（2）抗体に対する、標識された結合パートナー；（3）その上に抗API抗体が固定化される固相（例えば、試薬ストリップ）；ならびに（4）診断的使用、予後的使用もしくは治療的使用、あるいはこれらの適切な任意の組み合わせに対する、規制当局の認可を示す標識または挿入物。抗体に対する、標識された結合パートナーが提供されない場合、抗API抗体自体は、検出可能なマーカー（例えば、化学発光部分、酵素部分、蛍光部分または放射活性部分）で標識され得る。

#### 【0090】

本発明はまた、APIをコードするRNAにハイブリダイズし得る核酸プローブを含むキットを提供する。特定の実施形態において、キットは、1以上の容器中に、適切な反応条件下で（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（例えば、Innisら、1990、PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CAを参照のこと）、Qレプリカーゼを使用するリガーゼ連鎖反応（欧州特許番号320,308号を参照のこと）、環状プローブ反応、または当該分野において公知の他の方法によって）、APIをコードする核酸の少なくとも一部の増幅をプライムし得る1対のプライマー（例えば、各々6~30ヌクレオチドの範囲のサイズ、より好ましくは10~30ヌクレオチド、およびさらにより好ましくは10~20ヌクレオチド）を含む。

#### 【0091】

複数の A P I、または A P I 各々をコードする複数の核酸を検出し得るキットがまた、提供される。キットは、予め決定された量の単離された A P I タンパク質もしくは A P I をコードする核酸（例えば、標準またはコントロールとして使用するための）を、必要に応じてさらに含み得る。

【0092】

（5.3 A P I および A P I クラスターを同定するための統計的技術）

単一変量 (uni-variate) 差示的分析道具（例えば、倍数変化 (fold change)、ウィルコクソン順位和 (sum) 検定および t 検定）は、アルツハイマー病に診断的に関連する個々の A F または A P I を同定する際に、または疾患プロセスを調節する個々の A P I を同定する際に有用である。しかし、この疾患プロセスが、単離物における個々の A F および A P I よりもむしろ、A F または A P I の適切な組み合わせに関連する（および A P I の適切な組み合わせによって調節されるべき）ことは、当業者には明白である。このような A F および A P I の適切な組み合わせを発見するための戦略は、個々の A F および A P I を発見するためのものとは異なる。このような場合において、個々の A F および A P I の各々が、ある変数と認識され得、そして疾患は、これらの変数の相互作用によって生じる、連結した (joint) 多変量 (multi-variate) 効果として認識され得る。

10

【0093】

以下の工程は、好ましい技術 (Preferred Technology) によって生成されるデータからマーカーを同定するために使用され得る。

20

【0094】

第1工程は、アルツハイマー病との顕著な関連を個々に示す A F および A P I の収集を同定することである。同定された個々の A F または個々の A P I と A D との間の関連は、個々の A F および A P I が診断的に使用される場合に所望されるように、A F および A P I の収集が高度に顕著である必要はない。上記の試験（倍数変化、ウィルコクソン順位和 (sum) 検定など）のいずれもが、この段階で使用され得る。一旦、A F または A P I の適切な収集が同定されたら、クラスターを同定し得る高性能な多変量分析を使用して、アルツハイマー病と関連する顕著な多変量を見積もり得る。

【0095】

線形判別分析 (LDA) は、このような手順の1つである。これは、変数（すなわち、A F または A P I）のクラスターとアルツハイマー病との間の有意な関連を検出するために使用され得る。LDA を実施する際に、重みのセットは、各変数（すなわち、A F または A P I）に関連する。その結果、重みと変数の測定された値との線形組み合わせは、アルツハイマー病を有する被験体とアルツハイマー病のない被験体との間を判別することによって疾患状態を同定し得る。LDA に対する増大は、モデルの判別力を最適化するために変数の逐次封入 (stepwise inclusion)（または除去）を可能にする。従って、LDA の結果は、A F および A P I のクラスターであり、これは、薬学的生成物の診断、処置または発達について使用され得る。LDA の他の増強された変化（例えば、Flexible Discriminant Analysis）は、疾患のない状態から疾患状態を判別するために、変数の非線形組み合わせの使用を可能にする。判別分析の結果は、ホック後試験 (post-hoc test) によって、そして分類ツリーのような代替的技術を使用する分析を反復することによって立証され得る。

30

40

【0096】

A F または A P I のさらなるカテゴリーは、ある群のサンプル（例えば、病気の被験体からのサンプル）における A F および A P I の特徴存在パーセント (percentage feature presence) を、別の群のサンプル（例えば、コントロール被験体からのサンプル）における A F および A P I の特徴存在パーセントと比較することによる定性的測定によって同定され得る。A F および A P I の「特徴存在パーセント」は、サンプル群におけるサンプルのパーセンテージであり、ここで、A F または A P I は、選択された検出方法によって検出可能である。例えば、A F が病気の被験体からのサンプル

50

の95%において検出可能な場合、そのサンプル群におけるそのAFの特徴存在パーセントは、95%である。病気でない被験体からのサンプルの5%のみが同一のAFの検出可能なレベルを有する場合、被験体のサンプルにおけるそのAFの検出は、その被験体がアルツハイマー病のようであることを示唆する。

【0097】

(5.4 臨床研究における使用)

本発明の診断法および組成物は、例えば、アルツハイマー病に対する治療を評価するための臨床研究をモニタリングする工程を援助し得る。1つの実施形態において、化合物は、アルツハイマー病を有する被験体におけるAFまたはAPIのレベルをアルツハイマー病のない被験体において見出されるレベルにまで回復させる人の能力、または処置された被験体(例えば、コリンエステラーゼインヒビターで処置された後)においてアルツハイマー病のない被験体において見られるレベルでかまたは近いレベルでAFまたはAPIのレベルを維持するためのその能力について試験される。1以上のAFまたはAPIのレベルは、アッセイされ得る。

10

【0098】

別の実施形態において、本発明の方法および組成物を使用して、アルツハイマー病を有する個体を同定するための臨床研究にエントリーするために個体をスクリーニングし得；次いで、すでにアルツハイマー病を有する個体は、研究から排除され得るかまたは処置または分析のための別々の一団に置かれ得る。所望される場合、候補を同時にスクリーニングして、レーヴィ小体症および/もしくは老人性痴呆または他の公知の標準的なアルツハイマー病を有する個体を同定し得；これらのスクリーニングのための手順は、当該分野において周知である(HardingおよびHalliday, 1998, Neuro-pathol. Appl. Neurobiol. 24: 195-201)。

20

【0099】

(5.5 APIの精製)

特定の局面において、本発明は、単離された哺乳動物API、好ましくはヒトAPI、および抗原性決定基を含む(すなわち、抗体によって認識され得る)かまたはさもなくば機能的に活性であるそのフラグメント、ならびに、前述のものをコードする核酸配列を提供する。本明細書中で使用される場合、「機能的に活性」は、全長(野生型)APIに関連する機能的な活性(例えば、API基質またはAPI結合パートナーに結合すること、抗原性(抗API抗体に結合すること)、免疫原性、酵素活性など)の1以上を示す物質をいう。

30

【0100】

特定の実施形態において、本発明は、少なくとも5アミノ酸、少なくとも10アミノ酸、少なくとも50アミノ酸、または少なくとも75アミノ酸を含む、APIのフラグメントを提供する。APIの領域のいくらかまたは全てを欠くフラグメントはまた、このようなフラグメントを含むタンパク質(例えば、融合タンパク質)同様に提供される。前述のものをコードする核酸が、提供される。

【0101】

一旦、API、APIの一部、またはAPIの前駆体をコードする組換え核酸が単離されると、その遺伝子産物は、分析され得る。これは、所定の産物の物理的特性または機能的特性に基づくアッセイ(例えば、産物の放射活性標識に続くゲル電気泳動による分析、免疫アッセイなど)によって達成され得る。

40

【0102】

本明細書中で同定されるAPIは、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィー、アフィニティカラムクロマトグラフィー、およびサイジングカラムクロマトグラフィー)、遠心分離、差示的可溶性を含む標準的方法によって、またはタンパク質の精製について標準的な他の任意の方法によって単離かつ精製され得る。

【0103】

あるいは、一旦、APIをコードする組換え核酸が同定されると、APIの全アミノ酸配

50

列は、組換え核酸に含まれる遺伝子コード領域のヌクレオチド配列から推定され得る。結果として、タンパク質は、当該分野において公知の標準的な化学法によって合成され得る（例えば、Hunkapillerら、1984、Nature 310:105-111を参照のこと）。

【0104】

別の代替的な実施形態において、ネイティブなAPIは、上記のような標準法（例えば、イムノアフィニティ精製）によって天然の供給源より精製され得る。

【0105】

好ましい実施形態において、APIは、上記の好ましい技術によって単離され得る。予備規模での実行について、Westermeyer, 1993, Electrophoresis in Practice (VCH, Weinheim, Germany), 197~209頁（その全体が本明細書中に参考として援用される）に記載される方法に従う、2以下のpH単位のpH範囲を有する狭い範囲の「ズームゲル」は、等電的工法に好ましい；この改変は、大量の標的タンパク質をゲル上にロードさせ得、これによりゲルから回収され得る単離されたAPIの量を増加させ得る。予備規模での実行に対してこの方法で使用される場合、好ましい技術は、典型的には、単一の実行における単離されたAPIの100ngまでを提供し、そして1000ngまでを提供し得る。ゲル等電的集束を利用する分離戦略のいずれにおいてもズームゲルが使用され得ることは、当業者には明白である。

【0106】

従って、本発明は、単離されたAPI、単離されたAPI関連ポリペプチド、およびAPIまたはAPI関連ポリペプチドの単離された誘導體またはフラグメントを提供し；前述のものいずれもが、組換えDNA技術または化学合成法によって生成され得る。

【0107】

（5.6 APIをコードするDNAの単離）

APIをコードする遺伝子のクローニングについての特定の実施形態は、実施例によって以下に示されるが、限定ではない。

【0108】

本発明のヌクレオチド配列（DNAおよびRNAを含み、APIもしくはそのフラグメントをコードする配列を含む）、またはAPI関連ポリペプチドは、当該分野において公知の方法（例えば、慣用的化学的手法またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅）を使用して合成され得る。本発明のヌクレオチド配列はまた、例えば、cDNAライブラリー、ゲノムライブラリーまたは発現ライブラリーのスクリーニングによって、APIホモログまたはAPIオルソログをコードする遺伝子の同定およびクローニングを可能にする。

【0109】

例えば、PCR技術によってAPIをコードする遺伝子をクローニングするために、アンカーされた縮重オリゴヌクレオチド（または、たいがいのオリゴヌクレオチドのセット）は、同一のタンパク質の一部として同定される全てのAPIペプチドフラグメントについて設計され得る。種々の条件下でのPCR反応は、関連するcDNAおよび1以上の種からのゲノムDNA（例えば、脳組織由来かまたは免疫系の細胞由来）を用いて実施され得る。ベクタレット（vectorette）反応はまた、上記のオリゴヌクレオチド（好ましくは、ネステッド（nested）である）を使用して任意の利用可能なcDNAおよびゲノムDNAに対して実施され得る。ベクタレットPCRは、1つのみのプライマーの配列が公知であるような状況での、特定のDNAフラグメントの増幅を可能にする方法である。従って、配列情報が一端でのみ利用可能である場合に、PCRの適用をDNAのストレッチまで拡張する。（Arnold C, 1991, PCR Methods Appl. 1(1):39-42; Dyer KD, Biotechniques, 1995, 19(4):550-2）。ベクタレットPCRは、ゲノムライブラリーのプールまたはcDNAライブラリーのプールをテンプレートとして使用して、例えば、APIペプチドフラグメントをコードする、アンカーされた縮重オリゴヌクレオチド（または、たい

がいのオリゴヌクレオチド)であるプローブを用いて実施され得る。

【0110】

アンカーされた縮重オリゴヌクレオチド(または、たいがいのオリゴヌクレオチド)は、全てのAPIペプチドフラグメントについて設計され得る。これらのオリゴヌクレオチドは、標識され得、そしてcDNAライブラリーおよびゲノムDNAライブラリーを含むフィルター上にハイブリダイズされ得る。同一のタンパク質からの異なるペプチドに対するオリゴヌクレオチドは、同一のメンバーのライブラリーをしばしば同定する。cDNAライブラリーおよびゲノムDNAライブラリーは、任意の適切または所望の哺乳動物種(例えば、ヒト)から得られ得る。

【0111】

本発明のAPIまたはAPIフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列は、例えば、他のタンパク質をコードする遺伝子の相補性ストレッチと選択的にハイブリダイズするその能力について有用である。適用に依存して、種々のハイブリダイゼーション条件は、APIをコードするヌクレオチドの配列に、少なくとも約30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは99%同一、または100%同一であるヌクレオチド配列を得るために使用され得る。

【0112】

高度な選択性について、比較的ストリンジェントな条件(例えば、低塩条件または高温条件)は、二重鎖を形成するために使用され得る。本明細書中で使用される場合、「高度にストリンジェントな条件」は、65にて0.5M NaHPO<sub>4</sub>、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1mM EDTA中でのフィルター結合DNAに対するハイブリダイゼーション、および68にて0.1xSSC/0.1%SDS中での洗浄を意味する(Ausubel F. M.ら編、1989、Current Protocols in Molecular Biology、第1巻、Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New Yorkの2.10.3頁;その全体が本明細書中に参考として援用される)。いくつかの適用について、二重鎖形成のための弱いストリンジェントな条件が必要とされる。本明細書中で使用される場合、「中程度にストリンジェントな条件」は、42にて0.2xSSC/0.1%SDS中での洗浄を意味する(Ausubelら、1989、前出)。ハイブリダイゼーション条件はまた、漸増量のホルムアルデヒドの添加によってよりストリンジェントにして、ハイブリッド二重鎖を不安定にし得る。従って、特定のハイブリダイゼーション条件は、容易に操作され得、そして一般に所望の結果に依存して選択される。一般には、50%ホルムアミド存在下での便利なハイブリダイゼーション温度は:APIをコードする遺伝子のフラグメントに95~100%同一であるプローブについては42、90~95%同一性については37、そして70~90%同一性については32である。

【0113】

ゲノムライブラリーの調製において、DNAフラグメントが作製され、その中のいくつかは、APIの一部または全体をコードする。DNAフラグメントを調製するための任意の適切な方法が、本発明において用いられ得る。例えば、DNAは種々の制限酵素を用いて特定の部位で切断され得る。あるいは、DNAをフラグメント化するために、マンガネーゼの存在下でDNAseが用いられ得るか、またはDNAは、例えば、超音波破碎により物理的に剪断され得る。次いで、DNAフラグメントは、標準的技術(アガロースおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィーならびにスクロース勾配遠心分離が挙げられるがこれらに限定されない)により、大きさに従って分離され得る。次いで、DNAフラグメントは、適切なベクター(プラスミド、コスミド、バクテリオファージまたはT4、および酵母人工染色体(YAC)が挙げられるがこれらに限定されない)に挿入され得る(例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed

10

20

30

40

50

., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D. M. (ed), 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, IRL Press, Ltd, Oxford, U.K. Vol I, II; Ausubel F. M. et al., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol I, Green Publishing Associates, Inc., および John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照のこと)。ゲノムライブラリーは、標識されたプローブへの核酸ハイブリダイゼーションによりスクリーニングされ得る (Benton および Davis, 1977, Science 196, : 180; Grunstein および Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 3961)。

【0114】

本明細書に基づき、ゲノムライブラリーは、当該分野で周知の最適なアプローチを用いて、APIの任意のペプチドのアミノ酸配列に対応する標識された縮重オリゴヌクレオチドプローブを用いてスクリーニングされ得る。用いられる任意のプローブは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも20ヌクレオチド、少なくとも25ヌクレオチド、少なくとも30ヌクレオチド、少なくとも40ヌクレオチド、少なくとも50ヌクレオチド、少なくとも60ヌクレオチド、少なくとも70ヌクレオチド、少なくとも80ヌクレオチド、少なくとも90ヌクレオチド、または少なくとも100ヌクレオチドである。好ましくは、プローブは、10ヌクレオチド以上、より好ましくは15ヌクレオチド以上である。

【0115】

上記の表IVおよびVにおいて、本明細書中で開示されるいくつかのAPIは、配列が公的に公知である遺伝子によりコードされる以前に同定されたタンパク質のアイソフォームに対応する。このような遺伝子をスクリーニングするために、この遺伝子またはその相補体に相補的な任意のプローブが用いられ得；好ましくは、このプローブは、10ヌクレオチド以上、より好ましくは15ヌクレオチド以上である。SWISS-PROTおよびtrEMBLデータベース (Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) および European Bioinformatics Institute (EBI) により維持されており、<http://www.expasy.ch/>において利用可能である) およびGenBankデータベース (National Institute of Health (NIH) により維持されており、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>において利用可能である) は、表IVおよびVにおいて以下の登録番号の下でAPIについて列挙されたアミノ酸配列を含むタンパク質配列を提供し、そして各配列は、本明細書中で参考として援用される。

【0116】

(表VIIII. API、API関連タンパク質、またはERPIをコードするヌクレオチド配列)

【0117】

【表17】

10

20

30

40

AF#	API#	固定された配列の 登録番号
AF-1	API-47	O15179
AF-1	API-242	AAF03259
AF-2	API-1	P10845
AF-3	API-48	Q9UBQ6
AF-5	API-49	P19021
AF-6	API-2	P47888
AF-8	API-194	AAB60937
AF-9	API-3	O15179
AF-10	API-50	P02649
AF-10	API-51	P55290
AF-13	API-4	P01023
AF-14	API-82	P01011
AF-14	API-243	P04004
AF-15	API-53	P10909
AF-15	API-244	AAC50896
AF-16	API-54	P19021
AF-17	API-5	O43505
AF-18	API-55	P09104
AF-18	API-245	P51693
AF-21	API-6	O15179
AF-22	API-56	O94985
AF-22	API-57	AAD05198
AF-23	API-7	P05090
AF-23	API-8	P05060
AF-24	API-9	P19021
AF-25	API-10	P10909
AF-26	API-14	P41222
AF-27	API-15	P20758
AF-27	API-58	O15179
AF-28	API-16	Q04857

10

20

30

(表Ⅳ 続き)

AF-28	API-59	P00450
AF-29	API-196	P01034
AF-30	API-17	P36955
AF-31	API-60	P06396
AF-32	API-18	Q43505
AF-34	API-61	Q14800
AF-35	API-62	P02649
AF-37	API-19	P40925
AF-38	API-63	Q92676
AF-39	API-64	P01028
AF-39	API-65	Q9UBQ6
AF-40	API-20	P17174
AF-41	API-22	P18065
AF-42	API-66	P02753
AF-43	API-67	P02649
AF-43	API-68	P01034
AF-44	API-69	P00751
AF-44	API-70	P10643
AF-45	API-23	P36955
AF-46	API-24	P05067
AF-46	API-197	P13645
AF-46	API-198	P13647
AF-47	API-25	Q43505
AF-48	API-71	Q99435
AF-49	API-26	Q92876
AF-49	API-27	P41222
AF-50	API-72	P01871
AF-50	API-73	P00748
AF-50	API-199	P04196

10

20

30

(表四 系統)

AF-50	API-200	AAC34741
AF-51	API-28	P10909
AF-51	API-30	P07195
AF-52	API-74	P01028
AF-53	API-33	P02766
AF-54	API-221	P02649
AF-55	API-34	P01034
AF-56	API-75	P02675
AF-56	API-246	P06396
AF-57	API-35	P35527
AF-57	API-76	P01024
AF-57	API-222	P13645
AF-58	API-77	P02649
AF-59	API-36	P36955
AF-60	API-37	P02649
AF-61	API-78	P01024
AF-62	API-38	P01028
AF-63	API-79	P01024
AF-64	API-80	P01024
AF-65	API-81	P00751
AF-65	API-223	P01028
AF-66	API-82	P01024
AF-66	API-83	P01034
AF-67	API-39	P02766
AF-68	API-84	P04406
AF-68	API-85	P04279
AF-69	API-40	P06727
AF-69	API-247	CAB89302
AF-70	API-41	P36222

10

20

30

(表四 系表)

AF-70	API-224	229552 (gb)
AF-71	API-42	P01024
AF-72	API-43	P06727
AF-73	API-44	P02766
AF-74	API-45	P02790
AF-74	API-248	P01024
AF-75	API-46	P10909
AF-75	API-225	P02649
AF-76	API-86	P19021
AF-79	API-201	P01023
AF-81	API-88	AAA52900
AF-81	API-202	AAC48775
AF-82	API-89	P09571
AF-83	API-90	P09571
AF-84	API-91	P09571
AF-85	API-92	P01024
AF-85	API-93	P09571
AF-87	API-95	P08835
AF-89	API-97	P01024
AF-90	API-98	P07358
AF-91	API-99	S64635
AF-100	API-101	P08835
AF-103	API-102	Q03591
AF-104	API-103	P06866
AF-105	API-104	P02766
AF-107	API-107	Q16270
AF-107	API-210	BAA25513
AF-108	API-108	O88812
AF-117	API-113	P02649

10

20

30

(表四系表)

AF-119	API-114	P02023
AF-121	API-116	P04469
AF-123	API-118	P02671
AF-124	API-119	P02671
AF-125	API-120	Q12805
AF-126	API-121	O43532
AF-126	API-122	AAF02676
AF-127	API-123	P01019
AF-128	API-124	P01028
AF-129	API-125	P02774
AF-129	API-126	P01019
AF-130	API-127	P36955
AF-130	API-128	O43505
AF-132	API-130	P01028
AF-133	API-131	P06727
AF-134	API-132	P06727
AF-137	API-134	P10909
AF-137	API-135	P05156
AF-137	API-232	Q9Y6R4
AF-137	API-233	P02649
AF-137	API-234	P33176
AF-139	API-136	P10909
AF-139	API-137	P02649
AF-140	API-138	P01028
AF-141	API-139	P09871
AF-142	API-140	P01024
AF-142	API-141	Q92876
AF-143	API-142	751423A
AF-144	API-143	P16035

10

20

30

(表四系統)

AF-149	API-214	AAB60937
AF-150	API-144	Q02246
AF-151	API-145	O15179
AF-152	API-146	P43652
AF-152	API-147	P51693
AF-152	API-148	P00734
AF-153	API-149	P01028
AF-154	API-150	P08697
AF-154	API-151	P02748
AF-154	API-152	P01877
AF-155	API-215	P01034
AF-156	API-153	AF177396
AF-157	API-155	O43505
AF-159	API-158	P36955
AF-159	API-159	O43505
AF-159	API-160	P07339
AF-161	API-161	P06727
AF-161	API-162	P36955
AF-161	API-163	P02570
AF-163	API-165	P05090
AF-163	API-166	P05060
AF-164	API-167	P10909
AF-165	API-168	P01028
AF-166	API-169	P01028
AF-167	API-170	P10909
AF-167	API-171	AAD02505
AF-168	API-237	P13645
AF-168	API-172	P01028
AF-169	API-173	P01028

10

20

30

(表四 系表)

AF-170	API-174	P10909
AF-170	API-175	P02766
AF-170	API-176	AAD02505
AF-171	API-177	P41222
AF-171	API-178	P02766
AF-172	API-179	P24592
AF-172	API-180	AAD51475
AF-173	API-181	P01024
AF-174	API-182	P29361
AF-175	API-183	P41222
AF-176	API-184	P41222
AF-178	API-185	P47971
AF-178	API-217	P41222
AF-178	API-219	Q29562
AF-179	API-186	P02753
AF-180	API-220	P01028
AF-181	API-187	P00441
AF-182	API-188	P02766
AF-183	API-189	P01034
AF-184	API-190	P36955
AF-185	API-191	P00737
AF-185	API-192	Q12805
AF-186	API-238	P05090
AF-187	API-239	O15179
AF-190	API-240	NP_055108 (gb)
AF-192	API-241	P19021
ERF-2	ERPI-1	P36955

10

20

30

所定のAPIのアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするヌクレオチド配列が既知でない場合、縮重プローブが、スクリーニングのために用いられ得る。表IXにおいて、縮重セットのプローブがAPI-111およびAPI-112のために提供される。表IXに列挙される部分的なアミノ酸配列は、APIのトリプシン消化ペプチドのタンデム質量分析の手動での解析により獲得された。本発明においてペプチドを配列決定するために用いられたタンデム質量分析法において、以下の対のアミノ酸配列は、お互いに区別され得ない：ロイシンおよびイソロイシン；および特定の環境下で、フェニルアラニンおよび酸化したメチオニン。本明細書中で用いられる場合、「質量分析により決定された」アミノ酸配列は、示された位置で、示された対のアミノ酸の一方かまたは他のメンバーを含むアミノ酸配列のセットをいう。例えば、アミノ酸配列P[L/I]Aは、アミノ酸配列PLAおよびPIAを示す。当業者に明らかであるように、n個の示された対を含む配列は、2n個のアミノ酸配列を示す。表IXにおいて、各々の可能性のあるアミノ酸配列は、質量分析により決定された各配列について列挙され、そして各々の可能性のあるアミノ酸配列に対して好ましく、そして完全な縮重セットのプローブが提供される。

40

【0118】

(表IX. APIのアミノ酸配列およびプローブ)

50

【 0 1 1 9 】

【 表 1 8 】

AF#	API#	質量分析により決定されたトリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列				好ましい アミノ酸配列	系 アミノ酸配列
		一価プロトン化ペプチドの質量 (Da)*	部分アミノ酸配列	N末端質量 (Da)*	C末端質量 (Da)*		
AF-114	API-111	1097.57	HQV	0	733.50	CACCAGGT G	CAYCARGT N
AF-114	API-112	1547.74	PQLGM	0	1076.63	CCCGGCCT GGGCATG	CCNGGNYT NGGNATG
AF-114	API-112	1547.74	PGLGF	0	1076.63	CCCGGCCT GGGCTTC	CCNGGNYT NGGNITY
AF-114	API-112	1547.74	PGIGM	0	1076.63	CCCGGCAT CGGCATG	CCNGGNAT HGGNATG
AF-114	API-112	1547.74	PGIGF	0	1076.63	CCCGGCAT CGGCTTC	CCNGGNAT HGGNTTY
AF-114	API-112	1547.74	GPLGM	0	1076.63	GGCCCCCT GGGCATG	GGNCCNYT NGGNATG
AF-114	API-112	1547.74	GPLGF	0	1076.63	GGCCCCCT GGGCTTC	GGNCCNYT NGGNITY
AF-114	API-112	1547.74	GPJGM	0	1076.63	GGCCCCAT CGGCATG	GGNCCNAT HGGNATG
AF-114	API-112	1547.74	GPIGF	0	1076.63	GGCCCCAT CGGCTTC	GGNCCNAT HGGNTTY

10

20

\* 質量分析により決定された質量は、100パーセント未満（ppm）以下の質量測定誤差を有する。z ppmの質量測定誤差を有する所定の測定された質量Mについて、質量測定誤差は、 $(M \times z \div 1000000)$  で算出され得る。

【 0 1 2 0 】

本明細書中で用いられる場合、「一価のプロトン化されたペプチドの質量」は、質量分析により測定された一価のプロトン化されたトリプシン消化ペプチドの質量であり（100 ppm以下の測定誤差を有する）、水分子（H<sub>2</sub>O）および一価プロトン（H<sup>+</sup>）が附加されたペプチドの構成アミノ酸残基の総質量に対応する。本明細書中で用いられる場合、「アミノ酸残基」は、一般的な構造：NH-CHR-CO-ならびに以下の記号、元素組成および単一同位体質量を有するアミノ酸残基をいう。

30

【 0 1 2 1 】

(アミノ酸残基の元素組成および単一同位体質量)

【 0 1 2 2 】

【 表 1 9 】

アミノ酸	記号	エレメントの 組成	単一同位体 質量 (Da)
アラニン	A	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO	71.037114
アルギニン	R	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O	156.10111
アスパラギン	N	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	114.042927
アスパラギン酸	D	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	115.026943
カルボキシアミド	C	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	160.03065
システイン <sup>1</sup>	E	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	129.042593
グルタミン酸	Q	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	128.058577
グルタミン	G	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NO	57.021464
グリシン	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> N <sub>2</sub> O	137.058912
ヒスタジン	I	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO	113.084064
イソロイシン	L	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO	113.084064
ロイシン	K	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	128.094963
リジン	M	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> NOS	131.040485
メチオニン	M*	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	147.035340
酸化メチオニン	F	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO	147.068414
フェニルアラニン	P	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> NO	97.052764
プロリン	S	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	87.032028
セリン	T	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	101.047678
スレオニン	W	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O	186.079313
トリプトファン	Y	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	163.063328
チロシン	V	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO	99.068414

10

20

<sup>1</sup> 全てのシステインは、本発明者らの生産プロセスの間、カルボキシアミン誘導体に修飾されている。

#### 【0123】

本明細書中で用いられる場合、「トリプシン消化ペプチド」は、酵素トリプシンを用いたタンパク質の処理を通して生成されたペプチドである。トリプシンは、リジン (L y s) とアルギニン (A r g) 残基のカルボキシ側を特異的に切断し、その結果、生成するトリプシン消化ペプチドは、ペプチドフラグメントがタンパク質のC末端から獲得されない限り、C末端アミノ酸としてL y sまたはA r gを有するはずである。同様に、トリプシン消化ペプチドのN末端アミノ酸の直前にあるアミノ酸もまた、ペプチドがタンパク質のN末端から獲得されない限り、L y sまたはA r gであるはずである。トリプシン消化ペプチドの質量は、水分子 (H<sub>2</sub>O) の付加されたペプチドの構成アミノ酸残基の総質量に対応する。本明細書中で用いられる場合、「部分配列」は、ペプチドのタンデム質量分析の解釈から決定されたトリプシン消化ペプチド中のアミノ酸配列である。本明細書中で用いられる場合、「N末端質量」は、ペプチドの部分配列の開始からN末端に延びるトリプシン消化ペプチドの部分の質量分析 (100 ppm以下の測定の誤差を有する) により測定された質量である。これは、ペプチドの部分配列からN末端に延びる構成アミノ酸残基の総質量に対応する中間質量 (n e u t r a l m a s s) である。本明細書中で用いられる場合、「C末端質量」は、ペプチドの部分配列の終了からC末端に延びるトリプシン消化ペプチドの部分の質量分析 (100 ppm以下の測定の誤差を有する) により測定された質量である。この質量は、水分子 (H<sub>2</sub>O) および一価プロトン (H<sup>+</sup>) が付加されたペプチドの部分配列の終了からC末端に延びる構成アミノ酸残基の総質量に対応する。前出の表IXにおいて、好ましい縮重セットのプロープは、G C G S e q W e b<sup>T M</sup> 配列分析ソフトウェア (W e b<sup>T M</sup> バージョン1.1、W i s c o n s i n P a c k a g e V e r s i o n 10の一部、G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p I n c.) において用いられるようなG C Gヌクレオチド両義性暗号 (N u c l e o t i d e A m b i g u i t y C o d e) を用いて記載される。これらのヌクレオチド両義性コードは以下の意味を有する。

30

40

50

【 0 1 2 4 】

【 表 2 0 】

G C G暗号	意味
A	A
C	C
G	G
T	T
U	T
M	AまたはC
R	AまたはG
W	AまたはT
S	CまたはG
Y	CまたはT
K	GまたはT
V	AまたはCまたはG
H	AまたはCまたはT
D	AまたはGまたはT
B	CまたはGまたはT
X	GまたはAまたはTまたはC
N	GまたはAまたはTまたはC

10

20

G C Gは、I U P A C - I U Bにより提案されたアミノ酸暗号およびヌクレオチド両義性暗号に対する文字暗号を使用する。これらの暗号は、E M B L、G e n B a n k、およびP I Rデータベースにより用いられる暗号と互換性がある。I U P A C, C o m m i s s i o n o n N o m e n c l a t u r e o f O r g a n i c C h e m i s t r y . A G u i d e t o I U P A C N o m e n c l a t u r e o f O r g a n i c C o m p o u n d s ( R e c o m m e n d a t i o n s 1 9 9 3 ), B l a c k w e l l S c i e n t i f i c p u b l i c a t i o n s , 1 9 9 3を参照のこと。

30

【 0 1 2 5 】

ライブラリーがスクリーニングされる場合、目的のA P IをコードするインサートD N Aまたはそのフラグメントを有するクローンは、対応するセットの縮重オリゴヌクレオチドプローブ（またはそれらの相補体）の1つ以上のメンバーとハイブリダイズする。このようなオリゴヌクレオチドプローブとゲノムライブラリーとのハイブリダイゼーションは、当該分野で公知の方法を用いて実施される。例えば、上記の縮重セットのオリゴヌクレオチドプローブまたはそれらの相補体の1つとの（あるいは、このようなセットまたはその相補体の任意のメンバーとの）ハイブリダイゼーションは、上述のような高度にストリンジェントな条件または中程度にストリンジェントな条件下で実施され得るか、または2 x S S C、1 . 0 % S D S中で5 0にて実施され得、そして前述の高度にストリンジェントなハイブリダイゼーションまたは中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーションのための洗浄条件を用いて洗浄され得る。

40

【 0 1 2 6 】

本発明のなお別の局面において、A P I全体、A P Iのフラグメント、A P I関連タンパ

50

ク質、またはA P I 関連タンパク質のフラグメント、もしくは前述のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含むクローンもまた、発現ライブラリーをスクリーニングすることにより獲得され得る。例えば、関連する供給源由来のDNAは単離され、そして無作為のフラグメントが作製され、そして発現ベクター（例えば、バクテリオファージ、プラスミド、ファージミド、またはコスミド）中に連結され、その結果、ベクター中に挿入された配列は、ベクターが導入された宿主細胞により発現され得る。次いで、種々のスクリーニングアッセイが用いられ、発現されたA P I またはA P I 関連ポリペプチドについて選択され得る。1つの実施形態において、種々の本発明の抗A P I 抗体が用いられ、当該分野で公知の方法を用いて所望のクローンが同定され得る。例えば、HarlowおよびLane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Appendix IVを参照のこと。ライブラリー由来のコロニーまたはプラークは抗体と接触させられて、抗体と結合するこれらのクローンが同定される。

10

**【0127】**

1つの実施形態において、A P I、A P Iのフラグメント、A P I 関連ポリペプチド、またはA P I 関連ポリペプチドのフラグメントをコードするDNAを含むコロニーまたはプラークは、Olsvick et al., 29th ICAAC, Houston, Tex., 1989（本明細書中で参考として援用される）に従い、DYNA Beadsを用いて検出され得る。抗A P I 抗体は、トシル化DYNA Beads M280に架橋され、次いでこれらの抗体含有ビーズは、組換えポリペプチドを発現するコロニーまたはプラークと接触させられる。A P I またはA P I 関連ポリペプチドを発現するコロニーまたはプラークは、ビーズに結合するコロニーまたはプラークのいずれかとして同定される。

20

**【0128】**

あるいは、抗A P I 抗体は、安定な支持体（例えば、シリカまたはCelite（登録商標）樹脂）に非特異的に固定され得る。次いでこの材料は、本明細書中に記載されるようなA P I タンパク質またはA P I 関連ポリペプチドを発現する細菌コロニーに吸着させるために用いられ得る。

**【0129】**

別の局面において、P C R 増幅が用いられ、ゲノムDNAからA P I の全体またはその一部をコードする実質的に純粋なDNA（すなわち、不純物の核酸を実質的に含まないDNA）が単離され得る。好ましくは、このようなDNAは、少なくとも95%純粋、より好ましくは少なくとも99%純粋である。本明細書中に開示されるA P I のペプチド配列に対応するオリゴヌクレオチド配列、縮重配列またはその他の配列が、プローブとして用いられ得る。

30

**【0130】**

P C R は、例えば、Perkin-Elmer CetusサーマルサイクラーおよびTaqポリメラーゼ（Gene Amp（登録商標）またはAmpli Taq DNAポリメラーゼ）を用いて実施され得る。P C R 反応における使用のためにいくつかの異なる縮重プライマーを合成することを選択し得る。P C R 反応を開始する際に用いられるハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーを変更し、縮重プライマーとDNAにおける対応する配列との、より大きな程度かまたはより小さい程度のヌクレオチド配列の類似性を可能にすることもまた可能である。A P I をコードする配列のセグメントの好適な増幅の後、このセグメントは、分子的にクローニングされ、配列決定され、そしてプローブとして用いられて完全なゲノムクローンを単離し得る。前述のように、これは、順に、遺伝子の完全なヌクレオチド配列の決定、その発現の分析、および機能分析のためのそのタンパク質産物の生成を可能にする。

40

**【0131】**

A P I をコードするこれらの遺伝子はまた、核酸ハイブリダイゼーション、続くインビト

50

口での翻訳による mRNA の選択により同定され得る。この手順において、フラグメントは、ハイブリダイゼーションにより相補的な mRNA を単離するために用いられる。このような DNA フラグメントは、利用可能な、別の種（例えば、マウス、ヒト）の API をコードする精製された DNA を示し得る。単離された mRNA の単離された生成物のインビトロでの翻訳産物の免疫沈降分析または機能性アッセイ（例えば、インビトロでの凝集能；レセプターへの結合）は、その mRNA を同定し、それにより、所望の配列を含む相補的な DNA フラグメントを同定する。さらに、特定の mRNA は、細胞から単離されたポリゾームの、API を特異的に認識する固定された抗体への吸着により選択され得る。API をコードする放射標識された cDNA は、テンプレートとして（吸着されたポリゾームから）選択された mRNA を用いて合成され得る。次いで、放射標識された mRNA または cDNA はプローブとして用いられ、他のゲノム DNA フラグメント間から API をコードする DNA フラグメントを同定し得る。

10

**【0132】**

API をコードするゲノム DNA の単離の代替として、既知の配列からの遺伝子配列自体の化学的な合成、または API をコードする mRNA に対する cDNA の作製が挙げられるがこれらに限定されない。例えば、API をコードするゲノムの cDNA クローニングのための RNA は、API を発現する細胞から単離され得る。本明細書中から、当業者は、他の方法が用いられ得、そしてこれらは本発明の範囲内に含まれることを理解する。

**【0133】**

任意の適切な真核生物細胞は、API をコードする遺伝子の分子クローニングのための核酸供給源として用いられ得る。API をコードする核酸配列は、脊椎動物、哺乳動物、霊長類、ヒト、ブタ、ウシ、ネコ、サル、ウマ、イヌ、またはマウス供給源から単離され得る。DNA は、クローン化された DNA（例えば、DNA「ライブラリー」）から当該分野において公知の標準的な手順によるか、化学合成によるか、cDNA クローニングによるか、所望の細胞から精製されたゲノム DNA またはそのフラグメントのクローニングにより獲得され得る（例えば、Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D. M. (ed), 1985, *DNA Cloning: A Practical Approach*, MR L Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, II を参照のこと）。ゲノム DNA から得られたクローンは、コード領域に加えて調節領域およびイントロ DNA 領域を含み得；cDNA から得られたクローンは、エキソン配列のみを含む。

20

30

**【0134】**

同定および単離された遺伝子または cDNA は、次いで、任意の適切なクローニングベクターに挿入され得る。当該分野で公知の多くのベクター-宿主系が用いられ得る。当業者は、選択されるベクター系が、用いられる宿主細胞に適合するべきであることを理解する。このようなベクターとして、誘導体のようなバクテリオファージ、PBR322 または pUC プラスミド誘導体もしくは Bluescript ベクター (Stratagene) のようなプラスミド、あるいはアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、またはレトロウイルスのような改変されたウイルスが挙げられるがこれらに限定されない。クローニングベクターへの挿入は、例えば、相補的な粘着末端を有するクローニングベクターへ DNA フラグメントを連結することにより達成され得る。しかし、DNA をフラグメント化するために用いられた相補的な制限部位が、クローニングベクターに存在しない場合、DNA 分子の末端は、酵素的に改変され得る。あるいは、所望の任意の部位は、DNA 末端にヌクレオチド配列（リンカー）を連結することにより生成され得；これらの連結されたリンカーは、制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードする特定の化学的に合成されたオリゴヌクレオチドを含み得る。代替の方法において、切断されたベクターおよび API をコードする遺伝子は、ホモポリマーテイリングにより改変され得る。組換え分子は、形質転換、トランスフェクション、感染、エレクトロポレーションなどにより宿主細胞に導入さ

40

50

れ得、その結果、遺伝子配列の多くのコピーが作製され得る。

【0135】

特定の実施形態において、APIをコードする単離された遺伝子を組み込んだ組換えDNA分子、cDNA、または合成DNA配列を用いた宿主細胞の形質転換は、複数のコピーの遺伝子の生成を可能にする。従って、この遺伝子は、形質転換体を増殖させ、その形質転換体から組換えDNA分子を単離することにより（必要な場合、単離された組換えDNAから挿入された遺伝子を回収することにより）、多量に獲得され得る。

【0136】

本発明のヌクレオチド配列は、ネイティブのAPIと実質的に同一のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、機能的に等価なアミノ酸を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、API、APIのフラグメント、API関連ポリペプチド、またはAPP I関連ポリペプチドのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0137】

特定の実施形態において、API関連ポリペプチドをコードする単離された核酸分子は、1つ以上のヌクレオチド置換、付加、または欠失をAPIのヌクレオチド配列に導入することにより作製され、その結果、1つ以上のアミノ酸置換、付加、または欠失がコードされるタンパク質に導入され得る。当業者に公知の標準的な技術が用いられて、変異（例えば、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発が挙げられる）を導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換が、1つ以上の予想される非必須アミノ酸残基で成される。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の電荷を有する側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられる置換である。類似の電荷を有する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で規定されている。これらのファミリーとして、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非電荷極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。あるいは、変異は、コード配列の全てかまたは一部に沿って無作為に導入され得（例えば、飽和変異誘発（saturation mutagenesis）によって）、そして得られる変異体は、生物学的活性についてスクリーニングされて、活性を保持する変異体が同定され得る。変異誘発の後、コードされるタンパク質が発現され得、そしてタンパク質の活性が決定され得る。

【0138】

（5.7 APIをコードするDNAの発現）

API、APIアナログ、API関連ペプチド、または前述のいずれかのフラグメントもしくは他の誘導体をコードするヌクレオチド配列は、適切な発現ベクター（すなわち、挿入されたタンパク質コード配列の転写および翻訳のために必要なエレメントを含むベクター）に挿入され得る。必要な転写および翻訳シグナルはまた、APIをコードするネイティブの遺伝子またはその隣接領域、あるいはAPI関連ポリペプチドをコードする遺伝子またはその隣接領域により供給され得る。種々の宿主ベクター系が、本発明において、タンパク質コード配列を発現させるために用いられ得る。これらとして、ウイルス（例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルスなど）で感染させた哺乳動物細胞系；ウイルス（例えば、バキュロウイルス）で感染させた昆虫細胞系；酵母ベクターを含む酵母のような微生物；またはバクテリオファージ、DNA、プラスミドDNA、またはコスミドDNAで形質転換された細菌が挙げられるがこれらに限定されない。ベクターの発現エレメントは、その長さおよび特異性において変化する。用いられる宿主-ベクター系に依存して、多くの適切な転写および翻訳エレメントのいずれか1つが用いられ得る。特定の実施形態

10

20

30

40

50

において、ヒト遺伝子をコードするヌクレオチド配列（またはヒトAPIの機能的に活性な部分をコードするヌクレオチド配列）が発現される。なお別の実施形態において、APIの領域を含むAPIのフラグメントが発現される。

【0139】

ベクターへのDNAフラグメントの挿入について以前に記載された任意の方法が用いられ、適切な転写および翻訳制御シグナルおよびタンパク質コード領域からなるキメラ遺伝子を含む発現ベクターが構築され得る。これらの方法として、インビトロ組換えDNAおよび合成技術ならびにインビボ組換え（遺伝子組換え）が挙げられ得る。APIまたはそのフラグメントをコードする核酸配列の発現は、第2の核酸配列により調節され得、その結果、APIまたはフラグメントは組換えDNA分子で形質転換された宿主において発現される。例えば、APIの発現は、当該分野で公知の任意のプロモーターまたはエンハンサーエレメントにより制御され得る。APIまたはAPI関連ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を制御するために用いられるプロモーターとして、SV40初期プロモーター領域（Bernois *et al.*, 1981, *Nature* 290:304-310）、ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復に含まれるプロモーター（Yamamoto, *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-797）、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-1445）、メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Brinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42）、テトラサイクリン（Tet）プロモーター（Gossen *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551）；  
 -ラクタマーゼプロモーター（Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731）またはtacプロモーター（DeBoer, *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25；「Useful proteins form recombinant bacteria」, *Scientific American*, 1980, 242:74-94もまた参照のこと）のような原核生物発現ベクター；ノパリンシンターゼプロモーター領域（Herrera-Estrella *et al.*, *Nature* 303:209-213）またはカリフラワーモザイクウイルス35S RNAプロモーター（Gardner, *et al.*, 1981, *Nucl. Acids Res.* 9:2871）を含む植物発現ベクター、および光合成酵素リブ्रोスニリン酸カルボキシラーゼのプロモーター（Herrera-Estrella *et al.*, 1984, *Nature* 310:115-120）；Gal4プロモーター、ADC（アルコールデヒドロゲナーゼ）プロモーター、PGK（ホスホグリセロールキナーゼ）プロモーター、アルカリホスファターゼプロモーターのような酵母または他の真菌類由来のプロモーターエレメント、および組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において用いられる以下の動物転写制御領域：膵臓腺房細胞において活性なエラスターゼI遺伝子制御領域（Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-646；Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409；MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515）；膵臓細胞において活性なインシュリン遺伝子制御領域（Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122）、リンパ系細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-658；Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-538；Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell Biol.* 7:1436-1444）、精巢、乳房、リンパ節、および肥胖細胞において活性なマウス哺乳動物腫瘍ウイルス制御領域（Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-495）、肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域（Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276）、肝臓にお

いて活性な フェトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1639 - 1648; Hammer et al., 1987, Science 235: 53 - 58); 肝臓において活性な 1 - 抗トリプシン遺伝子制御領域 (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1: 161 - 171)、骨髄性細胞において活性な グロブリン遺伝子生業領域 (Mogram et al., 1985, Nature 315: 338 - 340; Kollias et al., 1986, Cell 46: 89 - 94); 脳におけるオリゴ樹状細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readhead et al., 1987, Cell 48: 703 - 712); 骨格筋において活性なミオシン軽鎖 2 遺伝子制御領域 (Sani, 1985, Nature 314: 283 - 286); 神経細胞において活性なニューロン特異的エノラーゼ (NSE) (Morelli et al., 1999, Gen. Virol. 80: 571 - 83); 神経細胞において活性な脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遺伝子制御領域 (Tabuchi et al., 1998, Biochem. Biophys. Res. Com. 253: 818 - 823); 星状細胞において活性な神経膠原繊維酸性タンパク質 (GFAP) プロモーター (Gomes et al., 1999, Braz J Med Biol Res 32(5): 619 - 631; Morelli et al., 1999, Gen. Virol. 80: 571 - 83) および視床下部において活性な性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御領域 (Mason et al., 1986, Science 234: 1372 - 1378) が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0140】

特定の実施形態において、APIコード核酸、1つ以上の複製起点、および必要に応じて1つ以上の選択マーカー (例えば、抗生物質耐性遺伝子) に作動可能に連結されたプロモーターを含むベクターが用いられる。

#### 【0141】

特定の実施形態において、発現構築物は、3つの pGEX ベクター (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ発現ベクター; Smith および Johnson, 1988, Gene 7: 31 - 40) の各々の EcoRI 制限部位への API または API 関連ポリペプチドコード配列のサブクローニングにより作製される。これは、正確なリーディングフレーム中のサブクローン由来の API 産生または API 関連ポリペプチドを可能にする。

#### 【0142】

哺乳動物宿主細胞において、多くのウイルスベースの発現系が用いられ得る。発現ベクターとしてアデノウイルスが用いられる場合、APIコード配列または API 関連ポリペプチドコード配列は、アデノウイルス転写/翻訳制御複合体 (例えば、後期プロモーターおよび三部リーダー配列 (tripartite leader sequence) に連結され得る。次いで、このキメラ遺伝子は、インビトロまたはインビボ組換えによりアデノウイルスゲノムに挿入され得る。ウイルスゲノムの非必須領域 (例えば、E1 または E3 領域) における挿入は、生存能を有し、そして感染宿主において抗体分子を発現し得る組換えウイルスを生じる (例えば、Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 355 - 359 を参照のこと)。特定の開始シグナルはまた、挿入された抗体コード配列の効果的な翻訳に必要とされ得る。これらのシグナルとして、ATG 開始コドンおよび隣接配列が挙げられる。さらに、開始コドンは、インサート全体の翻訳を保証するために所望のコード配列のリーディングフレームと同調していなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然および合成性の両方の、種々の起源のシグナルおよびコドンであり得る。発現の有効性は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写終結因子などの包含により増強され得る (Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153: 51 - 544 を参照のこと)。

#### 【0143】

API または API 関連ポリペプチドをコードする遺伝子のインサートを含む発現ベクタ

ーは、例えば、3つの遺伝的アプローチ：(a) 核酸ハイブリダイゼーション、(b) 「マーカー」遺伝子機能の存在または非存在、および(c) 挿入された配列の発現、により同定され得る。第1のアプローチにおいて、発現ベクターに挿入されたAPIをコードする遺伝子の存在は、APIをコードする挿入遺伝子に相同な配列を含むプローブを用いる核酸ハイブリダイゼーションにより検出され得る。第2のアプローチにおいて、組換えベクター/宿主系は、ベクター中でAPIをコードする遺伝子の挿入により引き起こされる特定の「マーカー」遺伝子機能(例えば、チミジンキナーゼ活性、抗生物質に対する活性、形質転換表現型、バキュロウイルスにおける閉塞体(occlusion body)形成など)の存在または非存在に依存して同定および選択され得る。例えば、APIをコードする遺伝子は、ベクターのマーカー遺伝子配列内に挿入される。APIインサートをコードする遺伝子を含む組換え体はマーカー遺伝子機能の非存在により同定され得る。第3のアプローチにおいて、組換え体発現ベクターは、組換え体により発現される遺伝子産物(すなわち、API)をアッセイすることにより同定され得る。このようなアッセイは、例えば、インビトロアッセイ系におけるAPIの物理的または機能的特性(例えば、抗API抗体との結合)に基づき得る。

10

## 【0144】

さらに、宿主細胞株が選択され得、これは挿入された配列の発現を調節するか、または所望される特定の様式での遺伝子産物を改変およびプロセッシングする。特定のプロモーターからの発現は、特定のインデューサーの存在下で上昇し得る；従って、遺伝子操作されたAPIまたはAPI関連のポリペプチドの発現が制御され得る。さらに、異なる宿主細胞は、翻訳および翻訳後プロセッシングおよび改変(例えば、タンパク質のグリコシル化、リン酸化)についての特徴的なかつ特異的なメカニズムを有する。適切な細胞株または宿主系が選択されて発現される外来タンパク質の所望の改変およびプロセッシングを確実にする。例えば、細菌系における発現は、グリコシル化されていない産物を産生し、そして酵母における発現は、グリコシル化された産物を産生する。遺伝子産物の一次転写、グリコシル化、およびリン酸化の適切なプロセッシングのための細胞機構を有する真核生物宿主細胞が使用され得る。このような哺乳動物宿主細胞としては、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、WI38、そして特に、例えば、SK-N-AS、SK-N-FI、SK-N-DZヒト神経芽細胞腫(Sugimotoら、1984、J. Natl. Cancer Inst. 73:51-57)、SK-N-SHヒト神経芽細胞腫(Biochim. Biophys. Acta、1982、704:450-460)、Daoyヒト小脳髄芽細胞腫(Heら、1992、Cancer Res. 52:1144-1148)、DBTRG05MG神経膠芽腫細胞(glioblastoma cells)(Kruseら、1992、In vitro Cell. Dev. Biol. 28A:609-614)、IMR-32ヒト神経芽細胞腫(Cancer Res.、1970、30:2110-2118)、1321N1ヒト星状細胞腫(Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1977、74:4816)、MOG-G-CCMヒト星状細胞腫(Br. J. Cancer、1984、49:269)、U87MGヒト神経膠芽腫-星状細胞腫(Acta Pathol. Microbiol. 第二版、1968、74:465-486)、A172ヒト神経膠芽腫(Olopadeら、1992、Cancer Res. 52:2523-2529)、C6ラット神経膠腫細胞(glioma cells)(Bendaら、1968、Science 161:370-371)、Neuro-2aマウス神経芽細胞腫(Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1970、65:129-136)、NB41A3マウス神経芽細胞腫(Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1962、48:1184-1190)、SCPヒツジ脈絡叢(Bolinら、1994、J. Virol. Methods 48:211-221)、G355-5、PG-4ネコ正常星状細胞(Hapalaら、1985、J. Virol. 53:827-833)、Mpfケナガイタチ脳(Trowbridgeら、1982、In vitro 18:952-960)のような神経細胞株、ならびに、例えば、CTX-TNA2ラット正常皮質脳(Rada

20

30

40

50

nyら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6467-6471) (例えば、CRL7030およびHs578Bstなど)のような正常細胞株が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、異なるベクター/宿主発現系が、プロセシング反応を異なる程度まで生じ得る。

#### 【0145】

長期にわたる高収率の組換えタンパク質産生のために安定な発現が好ましい。例えば、差動的に発現されるか、または経路 (pathway) の遺伝子タンパク質を安定に発現する細胞株が操作され得る。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを使用するよりも、宿主細胞は、適切な発現制御エレメント (例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など) および選択マーカーによって制御されたDNAで形質転換され得る。外来DNAの導入に続いて、操作された細胞は、富化培地中で1~2日間増殖させられ得、次いで選択培地に置き換えられる。組換えプラスミド中の選択マーカーは、選択に対する耐性を与え、細胞がプラスミドをその細胞の染色体に安定に組み込み、そして病巣 (これは、次にクローン化され、そして細胞株にまで拡大される) を形成するまで増殖することを可能にする。この方法は、差動的に発現されるか、または経路の遺伝子タンパク質を発現する細胞株を操作するために有利に利用され得る。このように操作された細胞株は、差動的に発現されるか、または経路の遺伝子タンパク質の内因性の活性に影響する化合物のスクリーニングおよび評価において特に有用であり得る。

#### 【0146】

多数の選択系が使用され得、これらとして、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (Wiglerら、1977、Cell 11:223)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska & Szybalski、1962、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowyら、1980、Cell 22:817) の遺伝子が挙げられるが、これらには限定されず、これらはそれぞれ tk-細胞、hgp rt-細胞または aprt-細胞において使用され得る。また、代謝拮抗物質耐性が、dhfr 遺伝子 (これは、メトトレキサートに対する耐性を与える) (Wiglerら、1980、Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hareら、1981、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt 遺伝子 (これは、ミコフェノール酸に対する耐性を与える) (Mulligan & Berg、1981、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo 遺伝子 (これは、アミノグリコシド G-418 に対する耐性を与える) (Colbierre-Garapinら、1981、J. Mol. Biol. 150:1); ならびに hyg ro 遺伝子 (これは、ヒグロマイシンに対する耐性を与える) (Santerreら、1984、Gene 30:147) について選択の基礎として使用され得る。

#### 【0147】

他の実施形態において、API、フラグメント、アナログ、または誘導体は、融合タンパク質産物もしくはキメラタンパク質産物 (ペプチド結合を介して異種タンパク質配列に連結したタンパク質、フラグメント、アナログ、または誘導体を含む) として発現され得る。例えば、本発明のポリペプチドは、免疫グロブリンの定常領域 (IgA、IgE、IgG、IgM)、またはそれらの部分 (CH1、CH2、CH3、もしくはそれらの任意の組合せおよびそれらの部分) と融合され得、キメラポリペプチドを生じる。このような融合タンパク質は、精製を容易にし、インビボでの半減期を増加し、免疫系に対する上皮バリアを横切る抗原の送達を増強する。インビボでの半減期の増加および精製を容易にすることが、ヒトCD4ポリペプチドの最初の2つのドメインおよび哺乳動物免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域の種々のドメインからなるキメラタンパク質について示されている。例えば、EP 394,827; Traunecckerら、Nature、331:84-86 (1988) を参照のこと。免疫系に対する上皮バリアを横切る抗原の増強された送達は、IgGフラグメントまたはFcフラグメントのようなFcRn結合パートナーに結合体化された抗原 (例えば、インシュリン) について実証されている (例えば

10

20

30

40

50

、PCT公開WO 96/22024および同WO 99/04813を参照のこと)。

【0148】

API、APIのフラグメント、APIに関連するポリペプチド、またはAPIに関連するポリペプチドのフラグメントをコードする核酸は、エピトープタグ(例えば、血球凝集素タグ(「HA」)またはフラグタグ(flag tag))に融合されて発現されたポリペプチドの検出および精製を補助し得る。例えば、Janknechtらによって記載された系は、ヒト細胞株で発現された変性していない融合タンパク質の容易な精製を可能にする(Janknechtら、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897)。

【0149】

API融合タンパク質は、当該分野で公知の方法によって、所望のアミノ酸配列をコードする適切な核酸配列を、適切なコードフレームにおいてお互いに連結すること(ligating)、および当該分野で一般的に知られている方法によってキメラ産物を発現することによって作製され得る。あるいは、API融合タンパク質は、タンパク質合成技術によって(例えば、ペプチド合成機の使用によって)作製され得る。

【0150】

cDNAおよびゲノム配列の両方が、クローン化され、そして発現され得る。

【0151】

(5.8 APIのドメイン構造)

本発明によって提供されるいくつかのAPIのドメインは、当該分野で公知であり、そして科学文献に記載されている。さらに、APIのドメインは、当業者に公知の技術を使用して同定され得る。例えば、APIの1以上のドメインは、1以上の次のプログラムを使用することによって同定され得る: ProDom、TMpred、およびSAPS。ProDomは、ポリペプチドのアミノ酸配列と収集されたドメインのデータベースを比較する(例えば、<http://www.toulouse.inra.fr/prodom.html>; Corpet F., Gouzy J. & Kahn D., 1999, Nucleic Acids Res., 27:263-267を参照のこと)。TMpredは、ポリペプチドの膜貫通領域およびその方向を予測する。このプログラムは、TMbase(天然に存在する膜貫通タンパク質のデータベース)(例えば、[http://www.chemnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.chemnet.org/software/TMPRED_form.html); Hofmann & Stoffel. (1993)「TMbase - A database of membrane spanning proteins segments」Biol. Chem. Hoppe-Seyler 347, 166を参照のこと)の統計学的解析に基づくアルゴリズムを使用する。SAPSプログラムは、電荷-クラスター(charge-cluster)、繰り返し、親水性領域、組成ドメイン(compositional domain)のような統計学的に有意な特徴についてポリペプチドを解析する(例えば、Brendelら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2002-2006を参照のこと)。従って、当業者は、本明細書に基づいて、酵素的活性または結合活性を有するAPIのドメインを同定し得、そしてさらに、このようなドメインをコードするヌクレオチド配列を同定し得、次いで、これらのヌクレオチド配列は、APIの酵素的活性または結合活性を保持するAPIフラグメントの組換え発現のために使用され得る。

【0152】

当業者は、本明細書に基づいて、酵素的活性または結合活性を有するAPIのドメインを同定し得、そしてさらにこのようなドメインをコードするヌクレオチド配列を同定し得る。次いで、これらのヌクレオチド配列は、APIの酵素的活性または結合活性を保持するAPIフラグメントの組換え発現のために使用され得る。

【0153】

1つの実施形態において、APIは、同定された既知のポリペプチドのドメインに十分に類似のアミノ酸配列を有する。本明細書中で使用される場合、用語「機能的に類似」は、

10

20

30

40

50

第一のアミノ酸配列または第一のヌクレオチド配列が、一般的な構造ドメインもしくは一般的な機能的活性あるいはその両方を有するか、またはコードするように、第二のアミノ酸配列または第二のヌクレオチド配列に同一かもしくは等価な（例えば、類似の側鎖を有する）アミノ酸残基もしくはヌクレオチドを十分な数含む第一のアミノ酸配列または第一のヌクレオチド配列を言う。

【0154】

A P I ドメインは、当業者に周知の技術を使用してその機能について評価され得る。例えば、ドメインは、そのキナーゼ活性またはDNAに結合するその能力について、当業者に周知の技術を使用して評価され得る。キナーゼ活性は、例えば、基質をリン酸化するポリペプチドの能力を測定することによって評価され得る。DNA結合活性は、例えば、電気泳動度シフトアッセイ（electromobility shift assay）において、DNA結合エレメントに結合するポリペプチドの能力を測定することによって評価され得る。好ましい実施形態において、A P I のドメインの機能は、表IXに同定される参考文献（補遺）の1以上に記載されたアッセイを使用して決定される。

10

【0155】

（5.9 A P I に対する抗体の生成）

本発明によると、A P I、A P I アナログ、A P I 関連のタンパク質もしくはフラグメントまたは前記の任意の誘導体が、免疫原として使用されて、このような免疫原に免疫特異的に結合する抗体を生成し得る。このような免疫原は、上記方法を含む任意の簡便な手段によって単離され得る。本発明の抗体として、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体もしくはキメラ抗体、単鎖抗体、F a b フラグメントおよびF（a b'）フラグメント、F a b 発現ライブラリーによって生成されたフラグメント、抗イディオタイプ（抗-I d）抗体、ならびに上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子および免疫学的に活性な免疫グロブリン分子の部分、すなわち、抗原に特異的に結合する抗原結合部位を含む分子を言う。本発明の免疫グロブリン分子は、任意のクラスのもの（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D および I g A）または免疫グロブリン分子のサブクラスのものであり得る。

20

【0156】

1つの実施形態において、A P I をコードする遺伝子の遺伝子産物を認識する抗体が調製され得る。例えば、これらのA P I および/またはアイソホームを認識する抗体として、以下を認識する抗体が挙げられる：A P I - 1、A P I - 3、A P I - 4、A P I - 6、A P I - 7、A P I - 10、A P I - 15、A P I - 16、A P I - 22、A P I - 28、A P I - 30、A P I - 33、A P I - 34、A P I - 37、A P I - 38、A P I - 39、A P I - 40、A P I - 42、A P I - 43、A P I - 44、A P I - 45、A P I - 46、A P I - 47、A P I - 50、A P I - 52、A P I - 53、A P I - 55、A P I - 58、A P I - 60、A P I - 62、A P I - 64、A P I - 66、A P I - 67、A P I - 69、A P I - 72、A P I - 74、A P I - 75、A P I - 76、A P I - 77、A P I - 78、A P I - 79、A P I - 80、A P I - 81、A P I - 82、A P I - 84、A P I - 90、A P I - 92、A P I - 93、A P I - 95、A P I - 97、A P I - 98、A P I - 101、A P I - 102、A P I - 103、A P I - 104、A P I - 113、A P I - 118、A P I - 119、A P I - 123、A P I - 124、A P I - 126、A P I - 130、A P I - 131、A P I - 132、A P I - 134、A P I - 136、A P I - 137、A P I - 138、A P I - 140、A P I - 142、A P I - 143、A P I - 145、A P I - 149、A P I - 150、A P I - 161、A P I - 165、A P I - 167、A P I - 168、A P I - 169、A P I - 170、A P I - 171、A P I - 172、A P I - 173、A P I - 174、A P I - 175、A P I - 176、A P I - 178、A P I - 179、A P I - 181、A P I - 182、A P I - 186、A P I - 188、A P I - 189、A P I - 191、A P I - 194、A P I - 196、A P I - 201、A P I - 215、A P I - 220、A P I - 221、

30

40

50

A P I - 2 2 3、A P I - 2 2 5、もしくはA P I - 2 3 3。特定の抗体がすでに公知であり、そして上の表V I Iに示されるような市販の供給源から購入し得る。別の実施形態において、当業者に公知の方法を使用して、A P I、A P Iアナログ、A P I関連ポリペプチドまたは上記いずれかの誘導體もしくはフラグメントを認識する抗体を生成し得る。

【0157】

本発明の1つの実施形態において、A P Iの特異的ドメインに対する抗体が生成され得る。特定の実施形態において、A P Iの親水性フラグメントが、抗体生成のための免疫原として使用される。

【0158】

抗体の生成において、所望の抗体についてのスクリーニングは、当該分野で公知の技術（例えば、E L I Z A（酵素結合免疫吸着アッセイ））によって達成され得る。例えば、A P Iの特異的なドメインを認識する抗体を選択するために、このようなドメインを含むA P Iフラグメントに結合する生成物について生じたハイブリドーマをアッセイし得る。第一のA P Iホモログに特異的には結合するが、第二のA P Iホモログには特異的に結合しない（または、より弱く（l e s s a v i d l y）結合する）抗体を選択するために、第一のA P Iにポジティブに結合し、第二のA P Iホモログに結合しない（または結合が減少している）ことに基づいて選択し得る。同様に、A P Iに特異的に結合するが、同じタンパク質の異なるアイソホーム（例えば、A P Iと同一のコアペプチドを有する異なる糖形態（g l y c o f o r m））には特異的に結合しない（またはより弱く結合する）抗体を選択するために、A P Iにポジティブに結合し、異なるアイソホーム（例えば、異なる糖形態）には結合しない（または結合が減少している）ことに基づいて選択し得る。従って、本発明は、A P Iの異なるアイソホーム（単数または複数）（例えば、糖形態）よりも、A P Iに対してより高い親和性（詳細には少なくとも2倍、より詳細には少なくとも5倍、なおより詳細には少なくとも10倍高い親和性）で結合する抗体（特に、モノクローナル抗体）を提供する。

10

20

【0159】

本発明の方法において使用され得るポリクローナル抗体は、免疫された動物の血清由来の抗体分子の異種集団である。画分されていない免疫血清がまた使用され得る。当該分野で公知の種々の手順が、A P I、A P Iのフラグメント、A P I関連ポリペプチド、またはA P I関連ポリペプチドのフラグメントに対するポリクローナル抗体の生成のために使用され得る。特定の実施形態において、A P IまたはA P I関連ポリペプチドのエピトープに対するウサギポリクローナル抗体が、得られ得る。例えば、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の生成のために、種々の宿主動物（ウサギ、マウス、ラットなどが挙げられるが、これらに限定されない）が、ネイティブなまたは合成（すなわち、組換え）バージョンのA P I、A P Iのフラグメント、A P I関連ポリペプチド、またはA P I関連ポリペプチドのフラグメントを注射することによって免疫され得る。このような免疫化に適切な単離されたA P Iは、発見技術（例えば、本明細書中に記載の好ましい技術）の使用によって得られ得る。A P Iがゲル電気泳動によって精製される場合、A P Iはポリアクリルアミドゲルからの事前の抽出ありかまたは抽出なしで免疫化のために使用され得る。宿主の種に依存して、種々のアジュバンドが、免疫学的応答を増強するために使用され得る。このようなアジュバンドとして、完全フロイントアジュバンドもしくは不完全フロイントアジュバンド、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、およびアジュバンド（例えば、B C G（b a c i l l e C a l m e t t e - G u e r i n）またはc o r y n e b a c t e r i u m p a r v u m）が挙げられるが、これらに限定されない。さらなるアジュバンドがまた、当該分野で周知である。

30

40

【0160】

A P I、A P Iのフラグメント、A P I関連ポリペプチド、またはA P I関連ポリペプチドのフラグメントに対するモノクローナル抗体（m A b）の調製のために、培養における

50

連続的な細胞株による抗体分子の生成を提供する任意の技術が使用され得る。例えば、KohlerおよびMilsteinによって最初に開発されたハイブリドーマ技術(1975, Nature 256:495-497)、ならびにトリオーマ(tioma)技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら、1983、Immunology Today 4:72)、およびヒトモノクローナル抗体を生成するためのEBVハイブリドーマ技術(Coleら、1985、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 77-96頁)。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDを含む任意の免疫グロブリンのクラスおよびその任意のサブクラスのものであり得る。本発明のmAbを生成するハイブリドーマは、インビトロまたはインビボで培養され得る。本発明のさらなる実施形態において、モノクローナル抗体は、公知の技術(PCT/US90/02545、本明細書中で参考として援用される)を使用する無菌動物で生成され得る。

#### 【0161】

モノクローナル抗体として、ヒトモノクローナル抗体およびキメラモノクローナル抗体(例えば、ヒト-マウスキメラ)が挙げられるが、これらに限定されない。ヒト化抗体は、1以上の相補性決定領域(CDR)およびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有するヒトではない種由来の抗体分子である(例えば、Queen、米国特許第5,585,089号(これは、その全体が参考として本明細書中に援用される)を参照のこと)。

#### 【0162】

キメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で公知の組換えDNA技術(例えば、PCT公開番号WO 87/02671;欧州特許出願第184,187号;欧州特許出願171,496号;欧州特許出願173,494号;PCT公開番号WO 86/01533;米国特許第4,816,567号;欧州特許出願第125,023号;Betterら、1988、Science 240:1041-1043;Liuら、1987、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443;Liuら、1987、J. Immunol. 139:3521-3526;Sunら、1987、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218;Nishimuraら、1987、Canc. Res. 47:999-1005;Woodら、1985、Nature 314:446-449;および、Shawら、1988、J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559;Morrisson、1985、Science 229:1202-1207;Oira、1986、Bio/Techniques 4:214;米国特許第5,225,539号;Jonesら、1986、Nature 321:552-525;Verhoeyanら(1988) Science 239:1534;およびBeidlerら、1988、J. Immunol. 141:4053-4060に記載の方法を使用して)によって生成され得る。

#### 【0163】

完全ヒト抗体(ヒト抗原材料からのみ誘導される抗体)は、ヒト被験体の治療的処置に特に所望される。このような抗体は、トランスジェニックマウス(これは、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子を発現し得ないが、ヒト重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子を発現し得る)を使用して生成され得る。このトランスジェニックマウスは、通常の様式で選択された抗原(例えば、本発明のAPIの全てまたは一部)を使用して免疫される。この抗原に対するモノクローナル抗体は、従来ハイブリドーマ技術を使用して得られ得る。トランスジェニックマウスによって保有されるヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化の間に再配列し、そして続いてクラススイッチおよび体細胞変異を受ける。従って、このような技術を使用して、治療的に有用なIgG、IgA、IgMおよびIgE抗体を生成し得る。ヒト抗体を生成するためのこの技術の概要について、LonbergおよびHuszar(1995、Int. Rev. Immunol. 13:65-93)を参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を生成するためのこの技術ならびにこ

のような抗体を生成するためのプロトコルの詳細な議論について、例えば、米国特許第5,625,126;米国特許第5,633,425号;米国特許第5,569,825号;米国特許第5,661,016号;および米国特許第5,545,806号を参照のこと。さらに、企業(例えば、Abgenix, Inc. (Freemont, CA)およびGenpharm (San Jose, CA))は、上記に類似の技術を使用して選択された抗原に対するヒト抗体を生成するために従事し得る。

【0164】

選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「誘導(された)選択(guided selection)」と呼ばれる技術を使用して生成され得る。このアプローチにおいて、選択された非ヒトモノクローナル抗体(例えば、マウス抗体)を使用して、同一のエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択を誘導(guide)し得る。(Jesperら(1994) *Biototechnology* 12:899-903)。

【0165】

本発明の抗体はまた、当該分野で公知の種々のファージディスプレイ法を使用して生成され得る。ファージディスプレイ法において、機能的抗体ドメインは、これらをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面上に示される。詳細には、このようなファージを使用してレパートリー抗体ライブラリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー(例えば、ヒトまたはマウス)から発現される抗体結合ドメインを示し得る。目的の抗原を結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、例えば、標識された抗原または固体表面またはビーズに結合もしくは捕捉された抗原を使用して、抗原を用いて選択または同定され得る。これらの方法において使用されるファージは、代表的には線維状ファージであり、これは、Fab、Fv、またはジスルフィドで安定化されたFv抗体ドメイン(ファージ遺伝子IIIまたはファージ遺伝子VIIのタンパク質のいずれかに組換え融合されている)を有するファージから発現されたFd結合ドメインおよびM13結合ドメインを含む。本発明の抗体を作製するために使用され得るファージディスプレイ方法として、以下に開示される方法が挙げられる: Brinkmanら、*J. Immunol. Methods* 182:41-50(1995); Amesら、*J. Immunol. Methods* 184:177-186(1995); Kettleboroughら、*Eur. J. Immunol.* 24:952-958(1994); Persicら、*Gene* 187:9-18(1997); Burtonら、*Advances in Immunology* 57:191-280(1994); PCT出願番号PCT/GB91/01134; PCT公開WO 90/02809; 同WO 91/10737; 同WO 92/01047; 同WO 92/18619; 同WO 93/11236; 同WO 95/15982; 同WO 95/20401; ならびに米国特許第5,698,426号; 同第5,223,409号; 同第5,403,484号; 同第5,580,717号; 同第5,427,908号; 同第5,750,753号; 同第5,821,047号; 同第5,571,698号; 同第5,427,908号; 同第5,516,637号; 同第5,780,225号; 同第5,658,727号; 同第5,733,743号および同第5,969,108号; これらのそれぞれは、その全体が参考として本明細書中で援用される。

【0166】

上の参考文献において記載されるように、このファージを選択した後、ファージ由来の抗体コード領域は、単離され得、そして全抗体(ヒト抗体または任意の他の所望される抗原結合フラグメントを含む)を生成するために使用され、そして任意の所望される宿主(例えば以下に記載されるような哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、および細菌を含む)において発現される。例えば、Fab、Fab'およびF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを組換え生成するための技術は、以下に開示されるような当該分野で公知の方法を使用して利用され得る: PCT公開WO 92/22324; Mullinaxら、*BioTechniques* 12(6):864-869(1992); および Sawaiら、*AJRI* 34:26-34(1995); ならびに Betterら、*Science* 2

40 : 1041 - 1043 (1988) (これらの参考文献は、その全体が参考として援用される)。

【0167】

本発明の単鎖 F v s および A P I に対する抗体を生成するために使用され得る適切な技術の例として、以下に記載される技術が挙げられる：米国特許第 4,946,778 号および同第 5,258,498 号；H u s t o n ら、M e t h o d s i n E n z y m o l o g y 203 : 4688 (1991)；S h u ら、P N A S 90 : 7995 - 7999 (1993)；ならびに S k e r r a ら、S c i e n c e 240 : 1038 - 1040 (1988)。

【0168】

本発明はさらに、二重特異性抗体の使用を提供し、この二重特異性抗体は、当該分野で公知の方法によって作製され得る。全長二重特異性抗体の従来生成は、2つの鎖が異なる特異性を有する2つの免疫グロブリンの重鎖 - 軽鎖対の同時発現に基づく (M i l l s t e i n ら、1983, N a t u r e 305 : 537 - 539)。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の無作為な組合せのために、これらのハイブリドーマ (クアドローマ (q u a d r o m a)) は、1つのみが正確な二重特異性構造を有する10の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成する。正確な分子の精製 (これは、通常アフィニティークロマトグラフィ工程により行われる) は、むしろ複雑であり、生成物の収率は低い。同様の手順が、W O 93 / 08829 (1993年5月13日公開) および T r a u n e c k e r ら、1991, E M B O J . 10 : 3655 - 3659 に開示されている。

【0169】

異なる、より好ましいアプローチに従って、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン (抗体 - 抗原結合部位) が、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。この融合は、少なくともヒンジ領域、C H 2 領域、および C H 3 領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合であることが好ましい。軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域 (C H 1) が、融合物の少なくとも1つに存在することが好ましい。免疫グロブリン重鎖融合物をコードする D N A、および所望である場合には、免疫グロブリン軽鎖が、別個の発現ベクターに挿入され、そしてこれらは適切な宿主生物に同時にトランスフェクトされる。これは、この構築で使用される不等比の3つのポリペプチド鎖が、最適収率を提供する実施形態において、この3つのポリペプチドフラグメントの相互割合の調整に大きな柔軟性を提供する。しかし、少なくとも2つのポリペプチド鎖が同じ比で発現されることが、高収率を生じるか、またはこの比が特に重要でない場合に、2つまたは3つ全てのポリペプチド鎖のコード配列を1つの発現ベクターに挿入することが可能である。

【0170】

本アプローチの好ましい実施形態において、二重特異性抗体は、一方の腕のハイブリッド免疫グロブリン (第一の結合特異性を有する)、および他方の腕にハイブリッド免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対 (第二の結合特異性を提供する) から構成される。二重特異性分子の1/2のみにおける免疫グロブリン軽鎖の存在が容易な分離方法を提供するために、この非対称構造が、所望されない免疫グロブリン鎖の組み合わせから所望の二重特異性化合物を分離することを容易にすることが見出された。このアプローチは、1994年3月3日に公開された W O 94 / 04690 に開示されている。二重特異性抗体を生成するためのさらなる詳細については、例えば、S u r e s h ら、M e t h o d s i n E n z y m o l o g y、1986、121 : 210 を参照のこと。

【0171】

本発明は、抗 A P I 免疫グロブリン分子の機能的に活性なフラグメント、誘導体またはアナログを提供する。機能的に活性なとは、このフラグメント、誘導体またはアナログが、抗 - 抗イディオタイプ抗体 (すなわち、三次抗体) (これは、このフラグメント、誘導体、またはアナログが誘導される抗体によって認識されるのと同じ抗原を認識する) を惹起し得ることを意味する。特に好ましい実施形態において、免疫グロブリン分子のイディオタイプの抗原性は、フレームワークおよび抗原を特異的に認識する C D R 配列に対して C 末

10

20

30

40

50

端に存在するCDR配列の欠失によって増強され得る。どのCDR配列が抗原に結合するかを決定するために、CDR配列を含む合成ペプチドが、当該分野で公知の適切な任意の結合アッセイによる抗原を用いる結合アッセイにおいて使用され得る。

**【0172】**

本発明は、 $F(ab')_2$  フラグメントおよびFabフラグメントのような抗体フラグメントを提供するが、これらに限定されない。特異的なエピトープを認識する抗体フラグメントは、公知の技術によって生成され得る。 $F(ab')_2$  フラグメントは、可変領域、軽鎖定常領域および重鎖CH1ドメインからなり、そしてこれらは、抗体分子のペプシン消化によって生成される。Fabフラグメントは、 $F(ab')_2$  フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生成される。本発明はまた、本発明の抗体の重鎖および軽鎖二量体、もしくはそれらの任意の最小フラグメント（例えば、Fvsもしくは単鎖抗体(SCA)）（例えば、米国特許第4,946,778号；Bird、1988、Science 242:423-42；Houstonら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883；およびWardら、1989、Nature 334:544-54に記載されるような）、または本発明の抗体と同一の特異性を有する任意の他の分子を提供する。単鎖抗体は、アミノ酸架橋を介するFv領域の重鎖フラグメントと軽鎖フラグメントとの連結によって形成され、単鎖ポリペプチドを生じる。E. coli中に機能的なFvフラグメントを組み立てるための技術が使用され得る（Skerraら、1988、Science 242:1038-1041）。

10

20

**【0173】**

他の実施形態において、本発明は、本発明の免疫グロブリンの融合タンパク質（または、その機能的に活性なフラグメント）を提供し、ここで例えば、免疫グロブリンは、この免疫グロブリンではない別のタンパク質（またはその部分、好ましくは、そのタンパク質の少なくとも10、20または50のアミノ酸）のアミノ酸配列に対してN末端もしくはC末端のいずれかで、共有結合（例えば、ペプチド結合）を介して融合される。好ましくは、この免疫グロブリンまたはそのフラグメントは、定常ドメインのN末端で他のタンパク質に共有結合される。上記のように、このような融合タンパク質は、精製を容易にし得、インビボでの半減期を増加し得、そして免疫系に対する内皮バリアを横切る抗原の送達を高め得る。

30

**【0174】**

本発明の免疫グロブリンは、アナログおよび誘導体を含み、これらはいずれも改変されている（すなわち、任意の分子型の共有結合によって（このような共有結合が免疫特異的結合を害さない限り））。例えば、限定ではないが、免疫グロブリンの誘導体およびアナログとして、例えば、グリコシル化、アセチル化、ペグ化（pegylation）、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解性切断、細胞性リガンドまたは他のタンパク質への結合などによってさらに改変された誘導体およびアナログが挙げられる。多数の化学的な改変のいずれかが、公知の技術（特定の化学的切断、アセチル化、ホルミル化などが挙げられるが、これらに限定されない）によって行われ得る。さらに、アナログまたは誘導体は、1以上の非古典的なアミノ酸または非天然のアミノ酸を含み得る。

40

**【0175】**

上記抗体は、本発明のAPIの局在化および活性に関連する当該分野で公知の方法において、例えば、これらのタンパク質を画像化するため、適切な生理学的サンプル中のこれらのレベルを測定するため、診断的方法などにおいて使用され得る。

**【0176】**

（5.10 抗体の発現）

本発明の抗体は、抗体の合成のための当該分野で公知の任意の適切な方法、詳細には、化学的合成、または組換え発現によって生成され得、好ましくは、組換え発現技術によって生成される。

50

## 【0177】

抗体、またはそのフラグメント、誘導体もしくはアナログの組換え発現は、この抗体をコードする核酸の構築が必要である。抗体のヌクレオチド配列が既知である場合には、抗体をコードする核酸が、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドから構築され得る（例えば、Kutmeierら、1994、BioTechniques 17:242に記載のように）。これは、簡単には、抗体をコードする配列の部分を含むオーバーラッピングオリゴヌクレオチドを合成する工程、これらのオリゴヌクレオチドをアニーリングおよび連結する工程、そして次いで、PCRによって連結されたオリゴヌクレオチドを増幅する工程を包含する。

## 【0178】

あるいは、抗体をコードする核酸が、抗体をクローニングすることによって得られ得る。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンが利用可能ではないが、抗体分子の配列が既知である場合、この抗体をコードする核酸が、適切な供給源（例えば、抗体cDNAライブラリー、またはこの抗体を発現している任意の組織または細胞から生成されたcDNAライブラリー）から、配列の3'末端および5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するPCR増幅によってか、または特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングによって、得られ得る。

## 【0179】

特定の抗原を特異的に認識する抗体分子（またはこのような抗体をコードする核酸をクローニングするためのcDNAライブラリーのための供給源）が利用可能でない場合、特定の抗原に特異的な抗体が、当該分野で公知の任意の方法（例えば、ウサギのような動物を免疫して、ポリクローナル抗体、またはより好ましくはモノクローナル抗体を生成すること）によって生成され得る。あるいは、少なくとも抗体のFab部分をコードするクローンは、Fab発現ライブラリー（例えば、Huseら、1989、Science 246:1275-1281に記載のような）を特定の抗原に結合するFabフラグメントのクローンについてスクリーニングすることによってか、または抗体ライブラリーをスクリーニングすることによって得られ得る（例えば、Clacksonら、1991、Nature 352:624; Haneら、1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937）。

## 【0180】

一旦、少なくとも抗体分子の可変領域をコードする核酸が得られると、この核酸は、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含むベクターに導入され得る（例えば、PCT公開WO 86/05807; PCT公開WO 89/01036; および米国特許第5,122,464号を参照のこと）。完全な抗体分子の発現を可能にする核酸を用いて同時に発現するための完全な軽鎖または重鎖を含むベクターもまた利用可能である。次いで、抗体をコードする核酸を使用して、スルフヒドリル基を含まないアミノ酸残基との鎖内ジスルフィド結合に關与する可変領域の1以上のシステイン残基を置換（または欠失）するために必要な核酸の置換、または欠失を導入し得る。このような改変は、ヌクレオチド配列に特定の変異または欠失を導入するための当該分野で公知の任意の方法（例えば、化学的変異誘発、インビトロでの部位特異的変異誘発（Hutchinsonら、1978、J. Biol. Chem. 253:6551）、PCTに基づく方法など）によって行われ得る。

## 【0181】

さらに、適切な生物学的活性のヒト抗体分子由来の遺伝子と共に適切な抗原特異性のマウス抗体分子由来の遺伝子をスプライシングすることによる、「キメラ抗体」の産生のために発展した技術が使用され得る（Morrissonら、1984、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neubergerら、1984、Nature 312:604-608; Takedaら、1985、Nature 314:452-454）。上記のように、キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種由来である分子（例えば、マウスmAb由来の可変領域およびヒト抗体定常領域（例えば、ヒト化抗体

10

20

30

40

50

)を有する分子)である。

【0182】

一旦、本発明の抗体分子をコードする核酸が得られると、抗体分子の産生のためのベクターは、当該分野で周知の技術を用いる組換えDNA技術によって産生される。従って、抗体分子配列を含む核酸の発現によって本発明のタンパク質を調製するための方法が、本明細書中に記載される。当業者に周知の方法を使用して、抗体分子コード配列ならびに適切な転写および翻訳の制御シグナルを含む発現ベクターを構築し得る。これらの方法としては、例えば、インビボ組換えDNA技術、合成技術およびインビボ遺伝子組換えが挙げられる。例えば、Sambrookら(1990、Molecular Cloning, A Laboratory Manual第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor, NY)およびAusubelら(編、1998、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY)に記載される技術を参照のこと。

【0183】

発現ベクターは、従来の技術によって宿主細胞に転移され、次いでこのトランスフェクトされた細胞は、本発明の抗体を産生するための従来の技術によって培養される。

【0184】

本発明の組換え抗体を発現するために使用される宿主細胞は特に、全組換え抗体分子発現のために、細菌細胞(例えば、Escherichia coli)または好ましくは、真核生物細胞のいずれかであり得る。特に、ベクター(例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要な中間初期遺伝子プロモーターエレメント)と共に、哺乳動物細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO))は、抗体のための有効な発現系である(Foeckingら、1986、Gene 45:101; Cockettら、1990、Bio/Technology 8:2)。

【0185】

種々の宿主-発現ベクター系は、本発明の抗体分子を発現するのに利用され得る。このような宿主-発現系は、ビヒクルを提供し、このビヒクルによって、目的のコード配列が産生され得、引き続いて精製され得るだけでなく、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換するかまたはトランスフェクトする場合、インサイチュで本発明の抗体分子を発現し得る細胞もまた提供する。これらとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: 抗体コード配列を含む組換えバクテリオファージDNA発現ベクター、プラスミドDNA発現ベクターまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌(例えば、E. coli、B. subtilis)のような微生物; 抗体コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母(例えば、Saccharomyces、Pichia); 抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)で感染させた昆虫細胞系; 組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV; タバコモザイクウイルス、TMV)で感染させたか、または抗体コード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)で形質転換した、植物細胞系; あるいは、哺乳動物細胞のゲノム由来のプロモーター(例えば、メタロチオネンプロモーター)または哺乳動物ウイルス由来のプロモーター(例えば、アデノウイルス後期プロモーター; ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)を含む組換え発現構築物を含む哺乳動物細胞系(例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3細胞)。

【0186】

細菌系において、多数の発現ベクターが、発現される抗体分子について意図される用途に依存して有利に選択され得る。例えば、このような多量のタンパク質が産生される場合、抗体分子を含有する薬学的組成物の生成のために、容易に精製された高レベルの融合タンパク質産物の発現を指向するベクターが望ましくあり得る。このようなベクターとしては以下が挙げられるがこれらに限定されない: E. coli発現ベクターpUR278(Rutherfordら、1983、EMBO J. 2:1791)(ここで、抗体コード配列が、

lac Zコード領域を有インフレームでベクターに個々に結合され得、その結果、融合タンパク質が産生される) ; pINベクター (Inouye & Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509) など。pGEXベクターを使用して、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) を用いて、融合タンパク質として外来性ポリペプチドもまた発現させ得る。一般的に、このような融合タンパク質は、可溶性であり、そしてマトリクスグルタチオン-アガロースビーズへの吸着および結合、引き続き遊離グルタチオンの存在下での溶離によって、溶解細胞から容易に精製され得る。pGEXベクターは、トロンピンまたはXa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計され、その結果、クローン化標的遺伝子産物がGST部分から放出され得る。

10

**【0187】**

昆虫系において、サインカリフォルニア核多面性ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) (AcNPV) が、外来性遺伝子を発現するためのベクターとして使用される。このウイルスは、*Spodoptera frugiperda*細胞中で増殖する。抗体コード配列は、ウイルスの非本質的な領域 (例えば、多面性遺伝子) 内に個々のクローン化されて、AcNPVプロモーター (例えば、多面性プロモーター) の制御下で配置され得る。哺乳動物宿主細胞において、多数のウイルススペースの発現系 (例えば、アデノウイルス発現系) が利用され得る。

20

**【0188】**

上記のように、挿入した配列の発現を調節するか、または所望な特定の様式における遺伝子産物を改変およびプロセッシングする宿主細胞株は、本記載に基づいて選択され得る。タンパク質産物のこのような改変 (例えば、グリコシル化) およびプロセッシング (例えば、切断) は、タンパク質の機能のために重要であり得る。

**【0189】**

組換え抗体の長期間の高収率産生のために、安定な発現が好ましい。例えば、目的の抗体を安定に発現する細胞株は、細胞を発現ベクターでトランスフェクトすることによって産生され得る。この発現ベクターは、抗体のヌクレオチド配列および選択マーカー (例えば、ネオマイシンまたはハイグロマイシン) のヌクレオチド配列を含み、かつこの選択マーカーの発現について選択される。このような操作される細胞株は、直接的または間接的に抗体分子と相互作用する化合物のスクリーニングおよび評価の際に特に有用であり得る。

30

**【0190】**

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増加され得る (総説については、BebbingtonおよびHentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, 第3巻 (Academic Press, New York, 1987) を参照のこと)。抗体を発現するベクター系におけるマーカーが増幅可能な場合、宿主細胞の培養物に存在するインヒビターのレベルの増加は、マーカー遺伝子のコピーの数を増加させる。増幅した領域が抗体遺伝子と関連しているため、抗体の産生もまた増加される (Crouseら、1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257)。

40

**【0191】**

宿主細胞は、本発明の2つの発現ベクター (重鎖由来のポリペプチドをコードする第一のベクターおよび軽鎖由来のポリペプチドをコードする第二のベクター) で同時トランスフェクトされ得る。これら2つのベクターは、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの等しい発現を可能にする同一の選択マーカーを含み得る。あるいは、重鎖ポリペプチドおよび軽鎖ポリペプチドの両方をコードする単一ベクターが、使用され得る。このような状況下において、軽鎖は、過剰な毒性遊離重鎖を回避するように重鎖の前に配置されなけれ

50

ばならない (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197)。重鎖および軽鎖についてのコード配列は、cDNAまたはゲノムDNAを含み得る。

#### 【0192】

一旦、本発明の抗体分子が、組換え的に発現されると、それは抗体分子の精製のための当該分野で公知の任意の方法（例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、プロテインAまたは特定の抗原を用いるアフィニティークロマトグラフィー、およびサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、差次的な溶解性、またはタンパク質の精製についての他の任意の標準的な方法）によって精製され得る。

#### 【0193】

あるいは、任意の融合タンパク質が発現される融合タンパク質に特異的な抗体を用いて容易に精製され得る。例えば、Janknechtらによって記載される系は、ヒト細胞株において発現される非変性融合タンパク質をただちに精製することを可能にする (Janknechtら、1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897)。この系において、目的の遺伝子は、ワクシニア組換えプラスミドにサブクローン化され、その結果、遺伝子のオープンリーディングフレームは、6つのヒスチジン残基からなるアミノ末端タグに翻訳的に融合される。このタグは、融合タンパク質についてのマトリクス結合止引として作用する。組換えワクシニアウイルスで感染させた細胞からの抽出物は、Ni<sup>2+</sup>ニトリロ酢酸アガロースカラムに充填され、そしてヒスチジンタグ化タンパク質は、イミダゾール含有緩衝液で選択的に溶出される。

#### 【0194】

##### (5.11 結合体化抗体)

好ましい実施形態において、抗API抗体またはそのフラグメントは、診断分子または治療分子に結合体化される。例えば、この抗体を、診断に、または所定の処理レジメンの効力を決定するために使用し得、検出は、抗体を検出可能な物質に結合することによって容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射活性核種、（陽子放出断層撮影法における使用のための）ポジトロン放出金属、および非放射活性常磁性金属イオンが挙げられる。一般的に、本発明に従って診断剤としての使用のために抗体に結合され得る金属イオンについての米国特許第4,741,900号を参照のこと。適切な酵素としては、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子団の例としては、ストレプトアビジン、アビジンおよびビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドおよびフィコエリトリンが挙げられ；適切な発光物質としては、ルミノールが挙げられ；適切な生物発光物質としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ；ならびに、適切な放射活性核種としては、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>111</sup>Inおよび<sup>99</sup>Tcが挙げられる。

#### 【0195】

抗API抗体またはそのフラグメントは、治療剤または医薬品に結合されて、所定の生物学的応答を改変し得る。治療剤または薬物部分は、古典的な化学的治療剤に限定されると解釈されない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質としては、例えば、毒素（例えばアブリン、リシンA、シュドモナス外毒素、またはジフテリア毒素）；タンパク質（例えば、腫瘍壊死因子、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\beta$ -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲンアクチベーター、血栓症薬もしくは抗脈管形成薬（例えば、アンジオスタチンもしくはエンドスタチン）；または生物学的応答改変剤（例えばリンホカイン、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-6 (IL-6)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、神経発育因子 (NGF)、または他の増殖

10

20

30

40

50

因子)が挙げられ得る。

【0196】

このような治療部分を抗体に結合する技術は、周知であり、例えば、Arnonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeldら(編)、243-56頁(Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」、Controlled Drug Delivery(第二版)、Robinsonら(編)、623-53頁(Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe、10「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」、Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications、Pincheraら(編)、475-506頁(1985);「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy、Baldwinら(編)、303-16頁(Academic Press 1985)、およびThorpeら、20「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」、Immunol. Rev. 62: 119-58(1982)を参照のこと。これらの参考文献は、その全体が参考として本明細書中で援用される。

【0197】

あるいは、抗体は、Segalにより米国特許第4,676,980号に記載されるように、二次抗体に結合され、抗体ヘテロ結合体を形成し得る。

【0198】

単独または細胞毒因子および/もしくはサイトカインと組合せて投与される抗体(その抗体に結合する治療部分を有するまたは有さない)は、治療剤として使用され得る。

【0199】

(5.12 アルツハイマー病の診断)  
 本発明に従って、アルツハイマー病を患うと疑われるか、またはアルツハイマー病を患うことが知られている被験体から得られた適切な試験サンプル(例えば、脳脊髄液(CSF)、血清、血漿または尿)が、診断のために使用され得る。1つの実施形態において、(アルツハイマー病でない被験体由来の)コントロールサンプルまたは以前に決定された参照範囲と比較して、試験サンプル中の1つ以上のAFもしくはAPI(またはそれらの任意の組み合わせ)の減少したアバンドランスは、アルツハイマー病の存在を示す;この目的に適切なAFおよびAPIは、上で詳細に記載されるように、表IおよびIVにおいてそれぞれ同定される。本発明の別の実施形態において、コントロールサンプルまたは以前に決定された参照範囲と比較して、試験サンプル中の1つ以上のAFもしくはAPI(また40はそれらの任意の組み合わせ)の増加した量は、アルツハイマー病の存在を示す;この目的に適切なAFおよびAPIは、上で詳細に記載されるように、表IIおよびVにおいてそれぞれ同定される。別の実施形態において、コントロールサンプルまたは以前に決定された参照範囲と比較して、試験サンプル中の1つ以上のAFもしくはAPI(またはそれらの任意の組み合わせ)の相対的な量は、アルツハイマー病(例えば、家族性または散发性のアルツハイマー病)のサブタイプを示す。なお別の実施形態において、コントロールサンプルまたは以前に決定された参照範囲と比較して、試験サンプル中の1つ以上のAFもしくはAPI(またはそれらの任意の組み合わせ)の相対的な量は、アルツハイマー病の程度または重篤度を示す。前述の方法のいずれかにおいて、本明細書中で記載される1つ以上のAPIの検出は、アルツハイマー病についての1つ以上のさらなる生物マーカー50

(アポプリポrotein E (apoplipoprotein) (ApoE)、アミロイド - ペプチド (A)、および中性のスレドタンパク質 (NTP) が挙げられるが、これらに限定されない) の検出と必要に応じて組み合わせられる。当該分野において適切な任意の方法は、AFおよびAPIのレベルを測定するために用いられ得、この方法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: 本明細書中で記載される好ましい技術、キナーゼアッセイ、APIを検出および/または可視化するための免疫アッセイ (例えば、ウエスタンブロットの免疫沈降、続くドデシル硫酸ナトリウムポリアシルアミドゲル電気泳動、免疫細胞化学など)。APIが公知の機能を有する場合において、その機能についてのアッセイを使用してAPI発現を測定し得る。さらなる実施形態において、コントロールサンプルまたは以前に決定された参照範囲と比較して、表IVにおいて同定される試験サンプル中の1つ以上のAPI (またはそれらの任意の組み合わせ) をコードするmRNAの減少した量は、アルツハイマー病の存在を示す。なおさらなる実施形態において、コントロールサンプルまたは明らかに決定された参照範囲と比較して、表Vにおいて同定される試験サンプル中の1つ以上のAPI (またはそれらの任意の組み合わせ) をコードするmRNAの増加した量は、アルツハイマー病の存在を示す。任意の適切なハイブリダイゼーションアッセイを使用して、APIをコードするmRNAを検出および/または可視化することによって (例えば、ノーザンアッセイ、ドットブロット、インサイチュハイブリダイゼーションなど)、API発現を検出し得る。

10

#### 【0200】

本発明の別の実施形態において、APIに特異的に結合する標識化抗体、それらの誘導体およびアナログを、診断目的のために (例えば、アルツハイマー病を検出、診断またはモニタリングするために) 使用し得る。好ましくは、アルツハイマー病は、動物において、より好ましくは、哺乳動物において、最も好ましくは、ヒトにおいて検出される。

20

#### 【0201】

##### (5.13 スクリーニングアッセイ)

本発明は、APIに結合するか、あるいはAPIの発現またはAPIの活性に対して刺激効果または阻害効果を有する因子 (例えば、化学化合物、タンパク質またはペプチド) を同定するための方法を提供する。本発明はまた、API関連ポリペプチドまたはAPI融合タンパク質に結合するか、あるいはAPI関連ポリペプチドまたはAPI融合タンパク質の発現または活性に対して刺激効果または阻害効果を有する、因子、候補化合物または試験化合物を同定する方法を提供する。これらの因子、候補化合物または試験化合物の例としては、核酸 (例えば、DNAおよびRNA)、糖質、脂質、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子およびタンパク質の薬物が挙げられるがこれらに限定されない。因子は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数の適切なアプローチのいずれかを使用して得られ得、これらのライブラリーには、以下が挙げられる: 生物学的ライブラリー; 空間的にアクセス可能な平行固相もしくは溶液相ライブラリー; 逆重畳を要する合成ライブラリー法; 「1ピース1化合物」ライブラリー法; およびアフィニティクロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法。生物学的ライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチは、ペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である (Lam, 1997, Anticancer Drug Des. 12: 145; 米国特許第5, 738, 996号; および同第5, 807, 683号 (これらの各々が、その全体が本明細書中で参考として援用される))。

30

40

#### 【0202】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当該分野において、例えば以下に見出され得る: DeWittら、1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6909; Erbら、1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422; Zuckermannら、1994, J. Med. Chem. 37: 2678; Choら、1993, Science 261: 1303; Carrellら、1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Car

50

e l l 5、1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; および Gallop 5、1994, *J. Med. Chem.* 37: 1233 (これらの各々が、その全体が本明細書中で参考として援用される)。

【0203】

化合物のライブラリーは、例えば、溶液中で(例えば、Houghten、1992, *Bio/Techniques* 13: 412~421)、あるいはビーズ上(Lam、1991, *Nature* 354: 82~84)、チップ上(Fodor、1993, *Nature* 364: 555~556)、細菌(米国特許第5,223,409号)、孢子(米国特許第5,571,698号;同第5,403,484号;および同第5,233,409号)、プラスミド(Cullis、1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865~1869)またはファージ上(ScottおよびSmith、1990, *Science* 249: 386~390; Devlin、1990, *Science* 249: 404~406; Cwirlla 5、1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6378~6382; および Felici、1991, *J. Mol. Biol.* 222: 301~310 (これらの各々が、その全体が本明細書中で参考として援用される))において示され得る。

10

【0204】

1つの実施形態において、API、APIフラグメント(例えば、機能的に活性なフラグメント)、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメント、またはAPI融合タンパク質と相互作用する(すなわち、結合する)因子は、細胞ベースアッセイ系において同定される。この実施例に従って、API、APIのフラグメント、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメント、またはAPI融合タンパク質を発現する細胞は、候補化合物またはコントロール化合物と接触され、そして候補化合物がAPIと相互作用する能力が決定される。所望ならば、このアッセイを使用して、複数の候補化合物(例えば、ライブラリー)をスクリーニングし得る。例えば、細胞は、原核生物起源(例えば、*E. coli*)または真核生物起源(例えば、酵母または哺乳動物)の細胞であり得る。さらに、これらの細胞は、API、APIのフラグメント、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメント、またはAPI融合タンパク質を発現するために内因的または遺伝学的に操作される、API、APIのフラグメント、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメント、またはAPI融合タンパク質を発現し得る。いくつかの実施形態において、API、APIのフラグメント、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメント、またはAPI融合タンパク質もしくは候補化合物は、例えば、(32P、35S、125Iのような)放射活性標識または(フルオロセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン(*allophycocyanin*)、*o*-フタルアルデヒド(*o-phthaldehyde*)またはフルオレサミンのような)蛍光標識を用いて、APIと候補化合物との間の相互作用の標識を可能にするように検出される。候補化合物が直接的または間接的にAPI、APIのフラグメント、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメント、またはAPI融合タンパク質と相互作用する能力は、当業者に公知の方法によって決定され得る。例えば、候補化合物とAPI、APIのフラグメント、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメント、またはAPI融合タンパク質との間の相互作用は、フローサイトメトリ、シンチレーションアッセイ、免疫沈降またはウエスタンブロット分析によって決定され得る。

20

30

40

【0205】

別の実施形態において、API、APIフラグメント(例えば、機能的に活性なフラグメント)、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメント、またはAPI融合タンパク質と相互作用する(すなわち、結合する)因子は、無細胞アッセイ系において同定される。この実施例に従って、ネイティブもしくは組換えのAPIもしくはそのフラグメント、またはネイティブもしくは組換えのAPI関連ポリペプチドもしくはそのフラグメント、またはAPI融合タンパク質もしくはそのフラグメントは、候補化合物ま

50

たはコントロール化合物と接触され、そして候補化合物がAPIもしくはAPI関連ポリペプチド、またはAPI融合タンパク質と相互作用する能力が決定される。所望ならば、このアッセイを使用して、複数の候補化合物（例えば、ライブラリー）をスクリーニングし得る。好ましくは、API、APIのフラグメント、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメント、またはAPI融合タンパク質は、例えば、API、APIのフラグメント、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメント、またはAPI融合タンパク質を、それを特異的に認識しかつそれと結合する固定化抗体と接触させることによって、またはAPI、APIのフラグメント、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメント、またはAPI融合タンパク質の精製された調製物を、タンパク質に結合するように設計された表面と接触させることによって、初めに固定化される。API、APIのフラグメント、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメント、またはAPI融合タンパク質は、部分的または完全に精製され得るか（例えば、部分的または完全に他のポリペプチドがない）、あるいは細胞溶解物の一部であり得る。さらに、API、APIのフラグメント、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメントは、APIもしくはその生物学的に活性な部分、またはAPI関連ポリペプチドおよびドメイン（例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）を含む融合タンパク質であり得る。あるいは、API、APIのフラグメント、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメント、またはAPI融合タンパク質は、当該分野で周知の技術（例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals; Rockford, IL）を使用してビオチン化され得る。候補化合物がAPI、APIのフラグメント、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメント、またはAPI融合タンパク質と相互作用する能力は、当業者に公知の方法によって決定され得る。

10

20

**【0206】**

別の実施形態に従って、細胞ベースのアッセイ系を使用して、タンパク質（例えば、酵素またはその生物学的に活性な部分）に結合するかまたはその活性を改変する因子を同定する。このタンパク質は、APIの産生または分解を担うか、またはAPIの翻訳後改変を担う。一次スクリーニングにおいて、複数の化合物（例えば、ライブラリー）は、(i) API、APIのアイソフォーム、API相同体、API関連ポリペプチド、API融合タンパク質、または前述のいずれかの生物学的に活性なフラグメント；および(ii) API、APIアイソフォーム、API相同体、API関連ポリペプチド、API融合タンパク質、またはフラグメントの産生、分解、または翻訳後改変を調節する化合物を同定するための、API、APIアイソフォーム、API相同体、API関連ポリペプチド、API融合タンパク質、またはフラグメントのプロセッシングを担うタンパク質、を天然にまたは組換え的に発現する細胞と接触される。所望の場合、一次スクリーニングにおいて同定される化合物は、次いで、目的の特定のAPIを天然にまたは組換え的に発現する細胞に対する二次スクリーニングにおいてアッセイされ得る。候補化合物がAPI、アイソフォーム、相同体、API関連ポリペプチド、またはAPI融合タンパク質の産生、分解、または翻訳後改変を調節する能力は、当業者に公知の方法（フローサイトメトリ、シンチレーションアッセイ、免疫沈降およびウエスタンブロット分析が挙げられるがこれらに限定されない）によって決定され得る。

30

40

**【0207】**

別の実施形態において、API、APIフラグメント、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメント、またはAPI融合タンパク質と競合的に相互作用する（すなわち、結合する）因子は、競合的結合アッセイにおいて同定される。この実施例に従って、API、APIフラグメント、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメント、またはAPI融合タンパク質を発現する細胞は、候補化合物、ならびにAPI、APIフラグメント、API関連ポリペプチド、API関連ポリペプチドのフラグメント、またはAPI融合タンパク質と相互作用することが公知の化合物と接触される；次いで、候補化合物がAPI、APIフラグメント、API関連ポリペプチド、A P

50

I 関連ポリペプチドのフラグメント、または A P I 融合タンパク質と競合的に相互作用する能力が決定される。あるいは、A P I、A P I フラグメント、A P I 関連ポリペプチド、または A P I 関連ポリペプチドのフラグメントと競合的に相互作用する（すなわち、結合する）因子は、A P I、A P I フラグメント、A P I 関連ポリペプチド、A P I 関連ポリペプチドのフラグメント、または A P I 融合タンパク質を、候補化合物、ならびに A P I、A P I 関連ポリペプチドもしくは A P I 融合タンパク質と相互作用することが公知の化合物と接触させることによる無細胞アッセイ系において同定される。上述のように、候補化合物が A P I、A P I のフラグメント、A P I 関連ポリペプチド、A P I 関連ポリペプチドのフラグメント、または A P I 融合タンパク質と相互作用する能力は、当業者に公知の方法によって決定され得る。これらの細胞ベースまたは無細胞のアッセイを使用して、複数の候補化合物（例えば、ライブラリー）をスクリーニングし得る。 10

#### 【0208】

別の実施形態において、A P I または A P I 関連ポリペプチドの発現を改変する（すなわち、アップレギュレートまたはダウンレギュレートする）因子は、A P I または A P I 関連ポリペプチドを発現する細胞（例えば、原核生物起源または真核生物起源の細胞）を候補化合物またはコントロール化合物（例えば、リン酸緩衝液生理食塩水（P B S））と接触させ、A P I、A P I 関連ポリペプチドまたは A P I 融合タンパク質、A P I をコードする m R N A または A P I 関連ポリペプチドをコードする m R N A の発現を決定することによって、同定される。候補化合物の存在下で、選択された A P I、A P I 関連ポリペプチド、A P I をコードする m R N A または A P I 関連ポリペプチドをコードする m R N A の発現レベルは、候補化合物の非存在下（例えば、コントロール化合物の存在下）で、A P I、A P I 関連ポリペプチド、A P I をコードする m R N A または A P I 関連ポリペプチドをコードする m R N A の発現レベルと比較される。次いで、候補化合物は、この比較に基づいて A P I または A P I 関連ポリペプチドの発現の調節因子として同定され得る。例えば、A P I または m R N A の発現が、候補化合物の非存在下よりも候補化合物の存在下におけるほうが有意に高い場合、候補化合物は、A P I または m R N A の発現の刺激因子として同定される。あるいは、A P I または m R N A の発現が、候補化合物の非存在下よりも候補化合物の存在下におけるほうが有意に低い場合、候補化合物は、A P I または m R N A の発現の阻害因子として同定される。A P I またはそれをコードする m R N A の発現レベルは、本記述に基づいて当業者に公知の方法によって決定され得る。例えば、m R N A 発現は、ノーザンブロット分析または R T - P C R によって評価され得、そしてタンパク質レベルは、ウェスタンブロット分析によって評価され得る。 20 30

#### 【0209】

別の実施形態において、A P I または A P I 関連ポリペプチドの活性を改変する因子は、A P I または A P I 関連ポリペプチドを含む調製物、または A P I または A P I 関連ポリペプチドを発現する細胞（例えば、原核生物細胞または真核生物細胞）を含有する調製物を候補化合物またはコントロール化合物と接触させ、試験化合物が A P I または A P I 関連ポリペプチドの活性を改変する（例えば、刺激するまたは阻害する）能力を決定することによって、同定される。A P I または A P I 関連ポリペプチドの活性は、A P I または A P I 関連ポリペプチド（例えば、細胞内 C a <sup>2+</sup>、ジアシルグリセロール、I P <sub>3</sub> など）の細胞シグナル伝達経路の誘導を検出するか、適切な基質上の標的の触媒活性または酵素活性を検出するか、レポーター遺伝子（例えば、A P I または A P I 関連ポリペプチドに応答性である調節エレメント、および検出可能なマーカー（例えば、ルシフェラーゼ）をコードする核酸に作動可能に連結される調節エレメント）の誘導を検出するか、あるいは、本記載に基づいて、当業者に公知の技術がこれらの活性を測定するために使用される場合（米国特許第 5, 401, 639 号（これは、その全体が参考として援用される）を参照のこと）、細胞応答（例えば、細胞分化または細胞増殖）を検出することによって、評価され得る。次いで、候補因子は、コントロール化合物と候補化合物の効果を比較することによって、A P I または A P I 関連ポリペプチドの活性の調節因子として同定され得る。適切なコントロール化合物としては、リン酸緩衝液生理食塩水（P B S）および通常 40 50

の食塩水 (NS) が挙げられる。

【0210】

別の実施形態において、APIまたはAPI関連ポリペプチドの発現、活性または発現と活性との両方を改変する(すなわち、アップレギュレートまたはダウンレギュレートする)因子が、動物モデルにおいて同定される。適切な動物の例としては、マウス、ラット、ウサギ、サル、モルモット、イヌおよびネコが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、使用される動物(例えば、ヒト家族性アルツハイマー病(FAD) - アミロイド前駆体(APP)を発現する動物、ヒト野生型APPを過剰発現する動物、 - アミロイド1-42(A)を過剰発現する動物、FADプレセニリン-1(PS-1)を発現する動物)は、アルツハイマー病のモデルを表す。例えば、Higgins, LS, 1999, Molecular Medicine Today 5:274-276を参照のこと。本実施例に従って、試験化合物またはコントロール化合物は、適切な動物に(例えば、経口的、直腸的または非経口的に(例えば、腹腔内にまたは静脈内に))投与され、そしてAPIまたはAPI関連ポリペプチドの発現、活性または発現と活性との両方に対する効果が決定される。APIまたはAPI関連ポリペプチドの発現の変化は、本記載に基づいて、上記の任意の適切な方法によって評価され得る。

10

【0211】

なお別の実施形態において、APIまたはAPI関連ポリペプチドを、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイにおいて「ベイトタンパク質」として使用して、APIまたはAPI関連ポリペプチドに結合するかまたはこれらと相互作用する他のタンパク質を同定する(例えば、米国特許第5,283,317号; Zervosら(1993) Cell 72:223-232; Maduraら、1993 J. Biol. Chem. 268:12046-12054; Bartelら、(1993) Bio/techniques 14:920-924; Iwabuchiら、(1993) Oncogene 8:1693-1696; およびPCT公開第WO94/10300を参照のこと)。当業者が理解するように、このような結合タンパク質はまた、本発明のAPIによるシグナル(例えば、本発明のAPIを含むシグナル伝達経路の上流または下流エレメントとして)の伝達に関与するようである。

20

【0212】

当業者が理解するように、表Xは、API、APIアナログ、API関連ポリペプチドまたは前述のいずれかのフラグメントの酵素活性または結合活性の検出または定量化についての適切なアッセイを記載する科学刊行物を列挙する。このような参考文献の各々は、本明細書中でその全体が援用される。好ましい実施形態において、表Xに参照されるアッセイを、本明細書中で記載されるスクリーニングおよびアッセイに使用して、例えば、API、APIアナログもしくはAPI関連ポリペプチド、前述のいずれかのフラグメント、またはAPI融合タンパク質の活性を改変する(またはそれらの発現と活性との両方を改変する)因子についてスクリーニングするかまたはそれらを同定する。

30

【0213】

(表X)

【0214】

【表21】

40

API	参考文献
API-39, API-44, API-178, API-188	Structural Biology 7, 312-321, 2000 J. Am. Chem. Soc. 122, 2178-2192, 2000
API-76 API-78 API-79 API-80 API-82 API-140	Clin Chem 1993 Feb 39:2 309-12 J Immunol Methods 1987 Aug 24 102:1 7-14
API-38 API-74 API-105 API-124 API-130 API-138 API-169 API-172	J Clin Lab Immunol 1986 Dec 21:4 201-7
API-123 API-126	Neuroendocrinology 1992 Mar 55:3 308-16
API-186	J Chromatogr 1991 Jul 5 567:2 369-80; Clin Chem 1989 Apr 35:4 582-6
API-52	J Chromatogr 1987 Dec 18 411: 498-501 Eisei Shikenjo Hokoku 1972 90: 89-92 Analyst 1990 Aug 115:8 1143-4
API-182	Biochem J 1997 Mar 1 322 (Pt 2): 455-60; Biochem Soc Trans 1997 Nov 25:4 S591; Biochim Biophys Acta 1986 Oct 10 888:3 325-31 <a href="http://www.promega.com">http://www.promega.com</a>

10

20

30

本発明は、上述のスクリーニングアッセイによって同定される新規薬剤および明細書中に記述されるような処置のためのその使用をさらに提供する。

【 0 2 1 5 】

( 5 . 1 4 A P I の 治 療 的 使 用 )

40

本発明は治療的薬剤の投与による種々の疾患および障害の処置または予防を提供する。この種の薬剤は以下を含むがこれに限定されない：A P I、A P I アナログ、A P I 関連ポリペプチドおよびそれらの（フラグメントを含む）誘導体；前述のものに対する抗体；A P I、A P I アナログ、A P I 関連ポリペプチドおよびそれらのフラグメントをコードする核酸；A P I または A P I 関連ポリペプチドをコードする遺伝子に対するアンチセンス核酸；ならびに A P I または A P I 関連ポリペプチドをコードする遺伝子のモジュレーター（例えば、アゴニストおよびアンタゴニスト）。本発明の重要な特徴は、アルツハイマー病に關与する A P I をコードする遺伝子の同定である。アルツハイマー病は、アルツハイマー病を有するアルツハイマー病被験体の C S F において減少する 1 以上の A P I の機能または発現を促進する治療用化合物の投与によって、またはアルツハイマー病を有する

50

被験体のCSFにおいて増加する1以上のAPIの機能または発現を減少する治療用化合物の投与によって、処置され得るか（例えば、症状を改善するためにまたは発症もしくは進行を遅らせるために）、または予防され得る。

【0216】

1つの実施形態において、APIに各々特異的に結合する1以上の抗体が、単独でまたは1以上のさらなる治療用化合物もしくは処置と組み合わせて投与される。このような治療用化合物または処置の例として、タクリン、ドンペジル(donepezil)、-トコフェロール、セレジリン(selegiline)、NSAID、エストロゲン置換療法、フィゾスチグミン、リバスチグミン(rivastigmine)、ヘパスチグミン(hepastigmine)、メトリホナート、ENA-713、イチョウ抽出物(ginkgo biloba extract)、フィゾスチグミン、アムリジン(amridin)、タルサクジリン(talsaclidine)、ジフロシロン(zifrosilone)、エプタスチグミン、メタンシルホニルクロライド、ネフィルアセタム(nefiracetam)、ALCAR、タルサチジン(talsachidine)、キサノメリン(xanomeline)、ガラントミン、およびプロペントフィリン(propentofylline)が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0217】

好ましくは、抗体のような生物学的製品は投与される被験体に同種異系である。好ましい実施形態では、ヒトAPIまたはヒトAPI関連ポリペプチド、ヒトAPIまたはヒトAPI関連ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、あるいはヒトAPIまたはヒトAPI関連ポリペプチドに対する抗体は、治療（例えば、症状を改善するためにまたは発症もしくは進行を遅らせるために）または予防のためにヒト被験体に投与される。

20

【0218】

(5.14.1 アルツハイマー病の処置および予防)

アルツハイマー病は、アルツハイマー病を有する疑いのある被験体もしくは有することが知られている被験体またはアルツハイマー病が進行するおそれのある被験体への、アルツハイマー病を有さない被験体のCSFと比較してアルツハイマー病を有する被験体のCSF中に差次的に存在する、1以上のAPIのレベルもしくは活性（すなわち、機能）または1以上のAFのレベルを調節する（すなわち、増加させたり減少させたりする）薬剤の投与に従う投与によって、処置または予防され得る。1つの実施形態において、アルツハイマー病は、アルツハイマー病を有する疑いのある被験体もしくは有することが知られている被験体またはアルツハイマー病が進行するおそれのある被験体への、アルツハイマー病を有する被験体のCSFにおいて減少している、1以上のAPIのレベルもしくは活性（すなわち、機能）または1以上のAFのレベルをアップレギュレートする（すなわち、増加させる）薬剤の投与に従う投与によって、処置される。別の実施形態において、アルツハイマー病を有する被験体のCSFにおいて増加する、1以上のAPIのレベルもしくは活性（すなわち、機能）または1以上のAFのレベルをアップレギュレートする薬剤が投与される。この種の化合物の例として、API、APIフラグメントおよびAPI関連ポリペプチド；API、APIフラグメントおよびAPI関連ポリペプチドをコードする核酸（例えば、遺伝子治療に使用するための）；および酵素活性を有するこれらのAPIもしくはAPI関連ポリペプチドに対する、その酵素活性を調節することが公知の化合物または分子が挙げられるが、これらに限定されない。使用し得る他の化合物（例えば、APIアゴニスト）は、上述もしくは以前に定義または記載されたように、インビトロアッセイを用いて同定され得る。

30

40

【0219】

アルツハイマー病はまた、アルツハイマー病を有する疑いのある被験体もしくは有することが知られている被験体またはアルツハイマー病が進行するおそれのある被験体への、アルツハイマー病を有する被験体のCSFにおいて増加している、1以上のAPIのレベルもしくは活性または1以上のAFのレベルをダウンレギュレートする化合物の投与によって、処置または予防される。別の実施形態において、アルツハイマー病を有する被験体の

50

C S Fにおいて減少する、1以上のA P Iのレベルもしくは活性または1以上のA Fのレベルをダウンレギュレートする化合物が投与される。この種の化合物の例としては、A P Iアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、A P Iに対する抗体、およびA P Iの酵素活性を阻害する化合物が挙げられるが、これらに限定されない。他の有用な化合物（例えば、A P Iアンタゴニストおよび低分子A P Iアンタゴニスト）はインビトロアッセイを用いて同定され得る。

【0220】

好ましい実施形態において、個々の被験体の必要に応じて、治療または予防を合わせる。従って、特定の実施形態において、1以上のA P Iのレベルもしくは機能または1以上のA Fのレベルを促進する化合物が、アルツハイマー病を有する疑いのある被験体もしくは有することが知られている被験体（この被験体において、前述の1以上のA P Iのレベルもしくは機能または前述の1以上のA Fのレベルがコントロールもしくは正常な参照範囲と比較して存在しないかもしくは減少している）に治療的または予防的に投与される。さらなる実施形態において、1以上のA P Iのレベルもしくは機能または1以上のA Fのレベルを促進する化合物が、アルツハイマー病を有する疑いのある被験体もしくは有することが知られている被験体（この被験体において、前述の1以上のA P Iのレベルもしくは機能または前述の1以上のA Fのレベルがコントロールもしくは参照範囲と比較して増加している）に治療的または予防的に投与される。さらなる実施形態において、1以上のA P Iのレベルもしくは機能または1以上のA Fのレベルを減少させる化合物が、アルツハイマー病を有する疑いのある被験体もしくは有することが知られている被験体（この被験体において、前述の1以上のA P Iのレベルもしくは機能または前述の1以上のA Fのレベルがコントロールもしくは参照範囲と比較して増加している）に治療的または予防的に投与される。さらなる実施形態において、1以上のA P Iのレベルもしくは機能または1以上のA Fのレベルを減少させる化合物が、アルツハイマー病を有する疑いのある被験体もしくは有することが知られている被験体（この被験体において、前述の1以上のA P Iのレベルもしくは機能または前述の1以上のA Fのレベルがコントロールもしくは参照範囲と比較して減少している）に治療的または予防的に投与される。このような化合物の投与に起因するA P I機能もしくはレベル、またはA Fレベルにおける変化は、例えば、サンプル（例えば、C S F、血液または尿のサンプルまたは生検組織のような組織サンプル）を得ることによって、そしてインビトロで前述のA Fのレベルまたは前述のA P Iのレベルもしくは活性、またはA P Iをコードするm R N Aのレベルあるいは前述の任意の組み合わせをアッセイすることによって容易に検出され得る。このようなアッセイは、本明細書中で記載されるように化合物の投与前および投与後に実施され得る。

【0221】

本発明の化合物としては、アルツハイマー病のA P IもしくはA Fプロフィールを正常に向かって回復する任意の化合物（例えば、低有機分子、タンパク質、ペプチド、抗体、核酸など）（ただし、このような化合物は、アセチルコリンエステラーゼ（A C h E）インヒビター（例えば、タクリン、ドンベジル（donepezil）、リバスタグミン（rivastigmine）、ヘパスタグミン（hepastigmine）、メトリホナート（Metrigonate）、フィゾスタグミン、アムリジン（Amridin）、タルサクジリン（Talsacclidine）、K A - 6 7 2、フペルジン（Huperzine）、P - 1 1 0 1 2、P - 1 1 1 4 9、ジフロシロン（Zifrosilone）、エプタスタグミン、メタンシルホニルクロライド、およびS - 9 9 7 7）、アセチルコリンレセプターアゴニスト（例えば、ネフィルアセタム（Nefiracetam）、L U - 2 5 1 0 9、およびN S 2 3 3 0）、ムスカリン性レセプターアゴニスト（例えば、S B - 2 0 2 0 6、タルサチジン（Talsachidine）、A F - 1 0 2 5 B、およびS R - 4 6 5 5 9 A）、ニコチン性（nicotonic）コリン作用性レセプターアゴニスト（例えば、A B T - 4 1 8）、アセチルコリンモジュレーター（例えば、F K S - 5 0 8およびガラントミン（galanthamine））またはプロペントフィリン（propentofylline）ではない）化合物が挙げられるが、これらに限

10

20

30

40

50

定されない。

【0222】

(5.14.2 遺伝子治療)

別の実施形態において、API、APIフラグメント、API関連ポリペプチドまたはAPI関連ポリペプチドのフラグメントをコードする配列を含む核酸が、遺伝子治療によってAPI機能を促進するために投与される。遺伝子治療は、被験体への発現される核酸または発現可能な核酸の投与を表す。この実施形態において、核酸はそのコードされたポリペプチドを産生し、そしてそのポリペプチドはAPI機能を促進することによって治療効果を媒介する。

【0223】

本発明に基づいて、当該分野で入手可能な遺伝子治療に関する任意の適切な方法を使用し得る。

【0224】

遺伝子治療の方法の一般的な総説としては、Goldspiehlら, 1993, *Clinical Pharmacy* 12: 488 - 505; WuおよびWu, 1991, *Biotherapy* 3: 87 - 95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573 - 596; Mulligan, 1993, *Science* 260: 926 - 932; ならびにMorganおよびAnderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191 - 217; May, 1993, *TIBTECH* 11(5): 155 - 215を参照のこと。本発明において使用され得る組換えDNA技術の分野で一般的に公知の方法が、Ausubelら編集, 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; およびKriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NYに記載されている。

【0225】

特定の局面において、この化合物はAPIもしくはフラグメントまたはそれらのキメラタンパク質をコードする核酸を含み、この核酸は、APIもしくはフラグメントまたはそれらのキメラタンパク質を適切な宿主中で発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸はAPIコード領域に対して作動可能に連結したプロモーターを有し、このプロモーターは、誘導的または構成的（そして、必要に応じて、組織特異的である）である。別の特の実施形態において、APIコード配列および任意の他の所望の配列が、ゲノム中の所望の部位での相同組換えを促進する領域に隣接し、このようにしてAPI核酸の染色体内発現を提供する核酸分子が使用される（KollerおよびSmithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8932 - 8935; Zijlstraら, 1989, *Nature* 342: 435 - 438）。

【0226】

核酸の被験体への送達は、被験体が核酸または核酸-運搬ベクターに直接暴露される場合には、直接的であり得る；このアプローチはインビボ遺伝子治療として公知である。あるいは、細胞が最初に核酸によってインビトロで形質転換され、次いで被験体に移植される場合、核酸の被験体への送達は間接的であり得、これは「エキソビボ遺伝子治療」として公知である。

【0227】

別の実施形態において、核酸はインビボで直接投与され、コードされた産物を産生するために発現される。これは当該分野で公知の多くの方法のうち任意の方法、（例えば、適切な核酸発現ベクターの一部として、構築することによって、および細胞内になるように投与することによって（例えば、欠損または弱毒化レトロウイルスベクターあるいは他のウイルスベクターを使用する感染によって、米国特許4,980,286号を参照のこと；裸のDNAの直接注射によって；微粒子衝撃の使用によって、例えば、遺伝子銃；*Bio-Listric*, Dupont；脂質、細胞表面レセプターまたはトランスフェクト剤でコ

10

20

30

40

50

ートすることによって；リポソーム、微粒子またはマイクロカプセルでカプセル化することによって；核に入ることが公知のペプチドに連結してそれを投与することによって；レセプター媒介エンドサイトーシスの対象となるリガンドに連結して、それを投与することによって（例えば、WuおよびWu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432を参照のこと））によって達成され得、これらはレセプターを特異的に発現する細胞型を標的とするために使用され得る。別の実施形態において、リガンドがエンドソームを破壊するためのフソジェニック (fusogenic) ウイルスペプチドを含む核酸-リガンド複合体が形成され得、核酸がリソソーム分解を回避することを可能にする。さらに別の実施形態において、核酸は細胞特異的な取り込みおよび発現のために、特異的レセプターを標的化することによってインビボで標的にされ得る（例えば、PCT公報WO92/06180 1992年4月16日付(Wuら)；WO92/22635 1992年12月23日付(Wilsonら)；WO92/20316 1992年11月26日付(Findeisら)；WO93/14188 1993年7月22日付(Clarkera), WO93/20221 1993年10月14日付(Young)を参照のこと）。あるいは、核酸は、相同組換えによって、細胞内に導入され、発現のための宿主細胞DNA内に組み入れられ得る(KollerおよびSmithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935; Zijlstraら, 1989, Nature 342: 435-438)。

10

## 【0228】

さらなる実施形態において、APIをコードする核酸を含むウイルスベクターが使用される。例えば、レトロウイルスベクターが使用され得る(Millerら, 1993, Meth. Enzymol. 217: 581-599を参照のこと)。これらのレトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムのパッケージングおよび宿主細胞DNAへの組み込みに必要でないレトロウイルス配列を欠失するように改変された。遺伝子治療において使用されるべきAPIをコードする核酸はベクター内でクローン化され、被験体への遺伝子の送達を促進する。レトロウイルスについてのさらなる詳細はBoesenら, 1994, Biotherapy 6: 291-302に見い出され得、これは、化学療法に対してさらに耐性の幹細胞を作製するために、造血幹細胞へmdr1遺伝子を送達するためのレトロウイルスベクターの使用を記載している。遺伝子治療におけるレトロウイルスベクターの使用を説明する他の参考文献は以下である: Clowesら, 1994, J. Clin. Invest. 93: 644-651; Kiemら, 1994, Blood 83: 1467-1473; SalmonおよびGunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4: 129-141; ならびにGrossmanおよびWilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3: 110-114。

20

30

## 【0229】

アデノウイルスは、遺伝子治療に使用され得る他のウイルスベクターである。アデノウイルスは遺伝子を気道上皮に送達するために特に魅力的なビヒクルである。アデノウイルスは、気道上皮に自然に感染し、ここで軽い疾患を引き起こす。アデノウイルスに基づく送達系に対する他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉である。アデノウイルスは、非分裂細胞に感染可能であるという利点を有する。KozarskyおよびWilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3: 499-503は、アデノウイルスに基づく遺伝子治療の総説を示している。Boutら, 1994, Human Gene Therapy 5: 3-10は、アカゲザルの気道上皮に遺伝子を移入するためのアデノウイルスベクターの使用を示している。遺伝子治療におけるアデノウイルスの使用の他の例は、Rosenthalら, 1991, Science 252: 431-434; Rosenfeldら, 1992, Cell 68: 143-155; Mastrangeliら, 1993, J. Clin. Invest. 91: 225-234; PCT公報WO94/12649号; およびWangら, 1995, Gene Therapy 2: 775-78

40

50

3に見い出され得る。

【0230】

アデノ随伴ウイルス(AAV)はまた、遺伝子治療における使用について提唱されている(Walshら, 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289-300; 米国特許第5,436,146号)。

【0231】

遺伝子治療に対する別の適切なアプローチは、電気穿孔法、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、またはウイルス感染のような方法によって、組織培養物中で細胞に遺伝子に移すことを含む。通常、移入の方法は、細胞への選択可能なマーカーの移入を含む。次いで、細胞は、これらの移された遺伝子を取り込み、かつこの遺伝子を発現している細胞を単離するために選択下に置かれる。次いで、これらの細胞は被験体に送達される。

10

【0232】

この実施形態において、核酸は、得られた組換え細胞のインピボでの投与の前に細胞へ導入される。このような導入は、当該分野で公知の以下に挙げられる任意の方法によって実施され得るが、これらに限定されない：トランスフェクション、電気穿孔法、微量注入、核酸配列を含むウイルスベクターもしくはバクテリオファージベクターによる感染、細胞融合、染色体媒介の遺伝子移入、マイクロセル媒介の遺伝子移入、スフェロプラスト融合など。外来遺伝子の細胞への導入のための多くの技術が、当該分野で公知であって(例えば、LoefflerおよびBehr, 1993, Meth. Enzymol. 217: 599-618; Cohenら, 1993, Meth. Enzymol. 217: 618-644; Cline, 1985, Pharmac. Ther. 29: 69-92を参照のこと)、そして、本発明に基づき(ただし、レシピエント細胞の必要な発達機能および生理学的機能が破壊されない限り)使用され得る。核酸を細胞へと安定に移入するための技術が、核酸が細胞によって発現可能であり、好ましくはその細胞の子孫によって遺伝性でかつ発現可能であるように、提供されるべきである。

20

【0233】

得られた組換え細胞は、当該分野で公知の種々の方法によって被験体に送達され得る。好ましい実施形態において、上皮細胞が例えば皮下に注射される。別の実施形態において、組換え皮膚細胞は、被験体上の植皮として適用される。組換え血液細胞(例えば、造血幹細胞または前駆細胞)は、好ましくは静脈内に投与される。使用のために想定される細胞の量は、所望の効果、被験体の状態などに依存し、そして当業者によって決定され得る。

30

【0234】

核酸が遺伝子治療の目的のために導入され得る細胞は、任意の所望な、入手可能な細胞型を含み、この細胞型の例としては、ニューロン細胞、グリア細胞(例えば、稀突起膠細胞または星状細胞)、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、筋細胞、肝細胞;血液細胞(例えば、Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球);種々の幹細胞または前駆細胞、特に造血幹細胞または前駆細胞(例えば、骨髄、臍帯血、末梢血または胎児肝臓から得られるような)が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0235】

好ましい実施形態において、遺伝子治療に使用される細胞は、処置される被験体に対して自系である。

【0236】

組換え細胞が遺伝子治療に使用される実施形態において、APIをコードする核酸は、細胞またはそれらの子孫によって発現可能であるように細胞へ導入され、次いで組換え細胞は治療効果のためにインピボで投与される。特定の実施形態において、幹細胞または前駆細胞が使用される。単離され、かつインピボで維持され得る任意の幹細胞または前駆細胞は、本発明のこの実施形態に従って使用され得る(例えば、PCT公報WO94/08598号、1994年4月28日付;StempleおよびAnderson, 1992

50

, Cell 71:973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Biol. 21A:229; ならびに Pittelkow および Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771 を参照のこと)。

【0237】

別の実施形態において、遺伝子治療の目的で導入される核酸は、コード領域に作動可能に連結された誘導性プロモーターを含み得、その結果、転写の適切な誘導物質の有無を制御することによって核酸の発現を制御することが可能である。

【0238】

API をコードする DNA の直接注入はまた、例えば、米国特許第 5,589,466 号に記述される技術に従って実施され得る。これらの技術は「裸の DNA」(すなわち、適切なキャリア以外にはリポソームも、細胞も、あらゆる他の任意の材料も存在しない、単離された DNA 分子)の注入を含む。タンパク質をコードしかつ適切なプロモーターに作動可能に連結された DNA の注入によって、注入部位の近くの細胞におけるタンパク質の産生および注入された DNA によってコードされたタンパク質に対する被験体の免疫反応の誘発が生じる。好ましい実施形態において、(a) API をコードする DNA および (b) プロモーターを含む裸の DNA は、API に対する免疫反応を誘発するために被験体に注入される。

10

【0239】

(5.14.3 アルツハイマー病を処置するための API の阻害)

本発明の 1 つの実施形態において、アルツハイマー病は、アルツハイマー病を有さない被験体の CSF と比較してアルツハイマー病を有する被験体の CSF において増大する 1 以上の API のレベルおよび/または機能を拮抗する(阻害する)化合物の投与によって処置または予防される。この目的に有用な化合物として抗 API 抗体(ならびにそれらの結合領域を含むフラグメントおよび誘導體)、API のアンチセンスまたはリボザイムの核酸、ならびに相同組換えによって内因性の API 機能を「ノックアウトする」ために使用される機能障害性の API をコードする核酸が挙げられるが、これらに限定されない(例えば、Capecci, 1989, Science 244:1288-1292 を参照のこと)。API 機能を阻害する他の化合物は、公知のインビトロアッセイ(例えば、試験化合物が、API の別のタンパク質もしくは結合パートナーに対する結合を阻害する能力または公知の API 機能を阻害する能力についてのアッセイ)の使用によって同定され得る。好ましくは、このような阻害はインビトロでまたは細胞培養内でアッセイされるが、遺伝的アッセイも使用され得る。「好ましい技術」もまた、化合物の投与前または投与後に、API のレベルを検出するのに使用され得る。好ましくは、適切なインビトロアッセイまたはインビボアッセイは、以下により詳細に記述されるように、特定の化合物の効果およびその投与が罹患組織の処置のために指示されるかどうかを決定するために利用される。

20

30

【0240】

特定の実施形態において、API 機能を阻害する化合物は、アルツハイマー病を有さない被験体の CSF または所定の基準範囲の CSF と比較して上昇した CSF レベルまたは API の機能的活性(例えば、正常レベルまたは所望のレベルを超える)が検出された被験体に治療的にまたは予防的に投与される。上に概略が説明されるように、API レベルまたは機能における上昇を測定するために当該分野における標準的な方法が使用され得る。好ましい API インヒビター組成物は低分子(例えば、1000 ダルトン以下の分子)を含む。このような低分子は、本明細書中に記載されるスクリーニング法によって同定され得る。

40

【0241】

(5.14.4 API のアンチセンス調節)

さらなる実施形態において、API 発現は API アンチセンス核酸の使用によって阻害される。本発明は、API またはその一部をコードする遺伝子または cDNA に対してアンチセンスである少なくとも 6 個のヌクレオチドを含む核酸の治療的または予防的な使用を

50

提供する。本明細書中で使用される場合、A P I 「アンチセンス」核酸とは、A P I をコードするR N A (好ましくはm R N A) の一部分に対する何らかの配列相補性によってハイブリダイズ可能な核酸を表す。アンチセンス核酸は、A P I をコードするm R N A のコード領域および/または非コード領域に対して相補性であり得る。このようなアンチセンス核酸は、A P I 発現を阻害する化合物としての有用性を有し、アルツハイマー病の処置または予防に使用され得る。

【0242】

本発明のアンチセンス核酸は、二本鎖もしくは一本鎖のオリゴヌクレオチド、R N A もしくはD N A、またはそれらの改変体もしくは誘導体であり、そして細胞に対して直接投与され得るが、または外因性の導入された配列の転写によって細胞内で産生され得る。

10

【0243】

本発明は、治療有効量のA P I アンチセンス核酸、および薬学的に受容可能なキャリア、ビヒクルまたは希釈剤を含む製薬学的組成をさらに提供する。

【0244】

別の実施形態において、本発明は、本発明のA P I アンチセンス核酸を含む有効量の組成物を有する細胞に提供することを含む、原核生物の細胞または真核生物の細胞内のA P I 核酸配列の発現を阻害するための方法を提供する。

【0245】

A P I アンチセンス核酸およびそれらの使用を、以下に詳細に記載する。

【0246】

20

(5.14.5 A P I アンチセンス核酸)

A P I アンチセンス核酸は、少なくとも6ヌクレオチドのものであり、好ましくは6~約50オリゴヌクレオチドの範囲にあるオリゴヌクレオチドである。特定の局面において、そのオリゴヌクレオチドは、少なくとも10ヌクレオチド、少なくとも15ヌクレオチド、少なくとも100ヌクレオチド、または少なくとも200ヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、D N A もしくはR N A またはそれらのキメラ混合物もしくは誘導体もしくは改変体であり得、そして一本鎖または二本鎖であり得る。オリゴヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格で修飾され得る。オリゴヌクレオチドは、ペプチドのような他の付加された基；細胞膜(例えば、L e t s i n g e r ら、1989, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 86:6553-6556; L e m a i t r e ら、1987, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 84:648-652; P C T 公開番号W O 88/09810(1988年12月15日に公開)を参照のこと)または血液脳関門(例えば、P C T 公開番号W O 89/10134(1988年4月25日に公開)を参照のこと)を横切った輸送を促進する薬剤；ハイブリダイゼーション誘発切断剤(例えば、K r o l ら、1988, B i o T e c h n i q u e s 6:958-976を参照のこと)またはインターカレート剤(例えば、Z o n , 1988, P h a r m . R e s . 5:539-549を参照のこと)を含み得る。

30

【0247】

本発明の特定の局面において、好ましくは一本鎖D N A のA P I アンチセンスオリゴヌクレオチドが提供される。オリゴヌクレオチドは、当該分野で一般的に公知の置換基を用いて、その構造上の任意の位置で修飾され得る。

40

【0248】

A P I アンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下の修飾された塩基部分のうち、任意の適切なものを含み得る：例えば、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、-D-ガラクトシルキューオシン(beta-D-galactosylqueosine)、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチ

50

ルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、β - D - マンノシルキエオシン (beta - D - mannosylqueosine)、5 - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、ワイブトキソシン (wybutoxosine)、プソイドウラシル (pseudouracil)、キエオシン (queosine)、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキソ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w, 2, 6 - ジアミノプリン、および他の塩基アナログ。

10

## 【0249】

別の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1個の修飾された糖部分(例えば、以下の糖部分の1つ: アラビノース、2 - フルオロアラビノース、キシロース、およびヘキソース)を含む。

## 【0250】

さらに別の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、以下の修飾されたリン酸骨格の少なくとも1つを含む: ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホラミドチオエート、ホスホルアミデート (phosphoramidate)、ホスホルジアミデート (phosphordiamidate)、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、ホルムアセタール、またはホルムアセタールのアナログ。

20

## 【0251】

さらに別の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、β - アノマーオリゴヌクレオチドである。β - アノマーオリゴヌクレオチドは、通常のβ - ユニットとは対照的に、鎖が互いに平行に走っている特異的二本鎖ハイブリッドを、相補的なRNAと形成する (Gautierら, 1987, Nucl. Acids Res. 15: 6625 - 6641)。

## 【0252】

オリゴヌクレオチドは別の分子(例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤、輸送剤、またはハイブリダイゼーション誘発切断剤)に結合し得る。

## 【0253】

本発明のオリゴヌクレオチドは、当該分野で公知の標準的な方法によって(例えば、自動DNA合成機(例えば、Biosearch, Applied Biosystemsなどから市販される)の使用によって)合成され得る。例として、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドは、Steinらの方法(1988, Nucl. Acids Res. 16: 3209)によって合成され得、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドは、制御された細孔ガラスポリマー支持体の使用によって調製され得る (Sarinら, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7448 - 7451)。

30

## 【0254】

別の実施形態において、本発明のAPIアンチセンス核酸は、外因性配列からの転写によって細胞内に産生される。例えば、ベクターは、細胞によって取り込まれるようにインピボで導入され得、この細胞内でベクターまたはその一部は転写され、本発明のアンチセンス核酸(RNA)を産生する。このようなベクターは、APIアンチセンス核酸をコードする配列を含む。このようなベクターは、転写されて所望のアンチセンスRNAを産生し得る限り、エピソーム性のみであり得、または染色体に組込まれ得る。このようなベクターは、当該分野で標準的な組換えDNA技術によって構築され得る。ベクターは、哺乳動物の細胞内での複製および発現に使用される、プラスミド、ウイルス、または当該分野で公知の他のものであり得る。APIアンチセンスRNAをコードする配列の発現は、哺乳動物の細胞(好ましくはヒトの細胞)で作用する、当該分野で公知の任意のプロモーターによって発現され得る。このようなプロモーターは、誘導的または構成的であり得る。このようなプロモーターの例は上に概略が説明されている。

40

50

## 【0255】

本発明のアンチセンス核酸は、A P Iをコードする遺伝子（好ましくはA P Iをコードするヒト遺伝子）のR N A転写物の少なくとも一部に対して相補性の配列を含む。しかし、完全な相補性が好ましいけれども、必要とはされない。本明細書中で示す「R N Aの少なくとも一部に対して相補性の」配列とは、ストリンジェントな条件下（例えば、7%ドデシル硫酸ナトリウム（S D S）、1 m M E D T A中、65 でハイブリダイゼーションして、0.1 x S S C / 0.1% S D S中68 で洗浄することを含む非常にストリンジェントな条件、または0.2 x S S C / 0.1% S D S中42 で洗浄することを含む中程度にストリンジェントな条件）で、R N Aとハイブリダイゼーションして安定な二重鎖を形成し得る十分な相補性を有する配列を意味する；二本鎖A P Iアンチセンス核酸の場合には、二重鎖D N Aの一本鎖がこのように試験され得るか、または三重鎖形成がアッセイされ得る。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度およびアンチセンス核酸の長さの両方に依存する。一般的に、ハイブリダイズする核酸が長いほど、それを組み得てかつ安定な二重鎖（または場合によっては三重鎖）を依然として形成するA P IをコードするR N Aとの塩基ミスマッチが多くなる。当業者は、ハイブリダイズした複合体の融点を決定するための標準的な手順の使用によって、ミスマッチの許容範囲を確認し得る。

10

## 【0256】

（5.14.6 A P Iアンチセンス核酸の治療的使用）

アルツハイマー病を有する疑いのある被験体またはアルツハイマー病に苦しむ被験体のC S Fにおいて標的A P Iが過剰に発現する場合、A P Iアンチセンス核酸はアルツハイマー病を処置または予防するために使用され得る。好ましい実施形態において、一本鎖D N AアンチセンスA P Iオリゴヌクレオチドが使用される。

20

## 【0257】

A P IをコードするR N Aを発現または過剰発現する細胞型は、当該分野で公知の種々の方法によって同定され得る。このような細胞型として、白血球（例えば、好中球、マクロファージ、単球）および常在細胞（例えば、星状細胞、グリア細胞、ニューロン細胞、および上皮細胞）が挙げられるが、これらに限定されない。このような方法として、A P I特異的核酸とのハイブリダイゼーション（例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、ドットプロットハイブリダイゼーション、インサイチュハイブリダイゼーションによる）、インビトロでこの細胞型由来のR N AがA P Iへと翻訳される能力の観察、免疫アッセイなどが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい局面において、被験者由来の一次組織は、処置の前にA P I発現について、例えば、免疫細胞化学によってまたはインサイチュハイブリダイゼーションによってアッセイされ得る。

30

## 【0258】

薬学的に受容可能なキャリア、ビヒクルまたは希釈剤中のA P Iアンチセンス核酸を有効量含む本発明の薬学的組成物は、アルツハイマー病を有する被験体に投与され得る。

## 【0259】

アルツハイマー病の処置において有効なA P Iアンチセンス核酸の量は、標準的な臨床技術によって決定され得る。

## 【0260】

特定の実施形態において、1以上のA P Iアンチセンス核酸を含む薬学的組成物は、リボソーム、微粒子、またはマイクロカプセルを介して投与される。本発明の種々の実施形態において、このような組成物は、A P Iアンチセンス核酸の持続放出を達成するために使用され得る。

40

## 【0261】

（5.14.7 阻害性リボザイムおよび三重らせんアプローチ）

別の実施形態において、アルツハイマー病の症状は、周知の遺伝子「ロックアウト」法、リボザイム法または三重らせん法と併用してA P Iをコードする遺伝子配列を使用してA P Iの遺伝子発現を減少させることによって、A P IまたはA P I活性のレベルを減少させることにより改善され得る。このアプローチにおいて、リボザイム分子または三重らせ

50

ん分子は、APIをコードする遺伝子の活性、発現または合成を調節するために使用され、従ってアルツハイマー病の症状を改善するために使用される。このような分子は、変異体もしくは非変異体の標的遺伝子の発現を減少させるまたは阻害するために設計され得る。このような分子の産生および使用のための技術は、当業者に周知である。

【0262】

APIをコードする遺伝子mRNA転写物を触媒的に切断するように設計されたリボザイム分子は、標的遺伝子mRNAの翻訳を阻止し、それゆえ遺伝子産生物の発現を阻止するために使用され得る（例えば、PCT国際公開WO90/11364、1990年10月4日公開；Sarverら、1990、Science 247:1222-1225を参照のこと）。

10

【0263】

リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒することが可能な酵素的なRNA分子である（総説については、Rossi、1994、Current Biology 4、469-471を参照のこと）。リボザイムの作用機構は、相補的な標的RNAに対するリボザイム分子の配列特異的なハイブリダイゼーション、続いてヌクレオチド鎖内切断性（endonucleolytic）の切断事象を含む。リボザイム分子の構成は、標的遺伝子mRNAに対して、相補的な1以上の配列を含まなければならず、かつmRNA切断の原因となる周知の触媒的配列を含まなければならない。この配列としては、例えば、本明細書中で参考としてその全体が援用される、米国特許第5、093、246号を参照のこと。

20

【0264】

APIをコードするmRNAを破壊するのに、部位特異的認識配列でmRNAを切断するリボザイムが使用され得るが、ハンマーヘッド型リボザイムの使用が好ましい。ハンマーヘッド型リボザイムは、標的mRNAと相補的な塩基対を形成する隣接領域によって指示された位置で、mRNAを切断する。標的mRNAが、以下の2塩基配列（5'-UG-3'）を有することが唯一の必要条件である。ハンマーヘッド型リボザイムの構築および産生は、当該分野で周知であり、各々本明細書中で参考としてその全体が援用される、Myers、1995、Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference、VCH Publishers、New York、（特に833頁の図4を参照のこと）なら

30

【0265】

好ましくは、リボザイムは、切断認識部位が、APIをコードするmRNAの5'末端の近くに位置するように（すなわち、効率を向上させ、機能的でないmRNA転写物が分子内に蓄積するのを最小限にするために）操作される。

【0266】

本発明のリボザイムとしてはまた、RNAエンドリボヌクレアーゼ（本明細書、以下では「Cech型リボザイム」）（例えば、Tetrahymena thermophila中で天然に発生するもの（IVSまたはL-19 IVS RNAとして公知）ならび

40

【0267】

50

アンチセンスアプローチにおけるように、このリボザイムは改変されたオリゴヌクレオチド（例えば、改良された安定性、標的化など）から構成され得、そしてインビボでAPIを発現する細胞に送達されるべきである。送達の好ましい方法としては、強力な構成的 *pol III* プロモーターまたは *pol I* プロモーターの制御下で、このリボザイムを「コードする」DNA構築物を使用する工程を包含し、従ってトランスフェクト細胞は、十分な量のリボザイムを産生し、このAPIをコードする内因性mRNAを破壊し、そして翻訳を阻害する。アンチセンス分子と違いリボザイムは触媒的であるので、より低い細胞内濃度が、有効性のために必要とされる。

#### 【0268】

内因性API発現はまた、標的化された相同組換えを使用してAPIをコードする遺伝子もしくはこのような遺伝子のプロモーターを不活化することによってか、または「ノックアウト」することによって、減少され得る（例えば、Smithiesら、1985、*Nature* 317:230~234; ThomasおよびCapecci、1987、*Cell* 51:503~512; Thompsonら、1989、*Cell* 5:313~321; ならびにZijlstraら、1989、*Nature* 342:435~438（これらのそれぞれはその全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。例えば、内因性遺伝子（APIをコードする遺伝子のコード領域またはAPIをコードする遺伝子の調節領域のいずれか）に相同であるDNAに隣接する非機能的API（または完全に関係のないDNA配列）をコードする変異遺伝子が、選択マーカーおよび/またはネガティブ選択マーカーを用いてかまたは用いられずに使用され、インビボでこの標的遺伝子が発現する細胞をトランスフェクトし得る。標的化された相同組換えを介するDNA構築物の挿入は、この標的遺伝子の不活化を生じる。このようなアプローチは、ES細胞（胚性幹細胞）に対する改変を使用して不活化した標的遺伝子を有する動物子孫を産生する農業の分野において特に適切である（例えば、ThomasおよびCapecci、1987、ならびにThompson、1989、上述を参照のこと）。しかし、このアプローチはヒトにおける使用において適用され得る（ただし、適切なウイルスベクターを使用してインビボで必要な部位に、組換えDNA構築物が直接的に投与されるかまたは標的化される）。

#### 【0269】

あるいは、APIをコードする遺伝子の内因性発現は、この遺伝子の調節領域（すなわち、遺伝子プロモーターおよび/またはエンハンサー）に相補的なデオキシリボヌクレオチド配列を標的化し、身体中での標的化細胞においてAPIをコードする遺伝子の転写を阻害する三重らせん構造を形成し得るすることによって減少され得る（一般に、Helene、1991、*Anticancer Drug Des.* 6(6)、569~584; Heleneら、1992、*Ann. N. Y. Acad. Sci.*、660、27~36; およびMaher、1992、*Bioassays* 14(12)、807~815を参照のこと）。

#### 【0270】

本発明において転写の阻害のための三重らせん形成において使用される核酸分子は、一本鎖であり、そしてデオキシヌクレオチドから構成されるべきである。これらのオリゴヌクレオチドの塩基組成は、Hoogsteen塩基対形成規定を介して三重らせん形成を促進するように設計されなければならない。これは一般に、二重鎖の一方の鎖上に存在するプリンまたはピリミジンのいずれかの大きなストレッチを必要とする。ヌクレオチド配列は、ピリミジンベースであり得、これは生じる三重らせんの3つの関連する鎖を横切ってTATおよびCGC+三重鎖を生じる。このピリミジンリッチな分子は、この鎖に平行する方向で二重鎖の一本鎖のプリンリッチな領域に相補的な塩基を提供する。さらに、例えばG残基の伸長を含むピリミジンリッチである核酸が選択され得る。これらの分子は、GC対がリッチであるDNA二重鎖と三重らせんを形成し、ここでこのプリン残基の多くは、この標的二重鎖の一本鎖上に位置し、三重鎖における3本の鎖を通してGGC三重鎖を生じる。

10

20

30

40

50

## 【0271】

あるいは、三重らせん形成のために標的化され得る潜在的な配列は、いわゆる「スイッチバック」核酸分子を作製することによって増加され得る。スイッチバック分子は、交互の5'-3'、3'-5'様式において合成され、その結果、これらは二重鎖の第1の1つの鎖と塩基対を形成し次いでもう一方と形成し、二重鎖の1つの鎖上に存在するプリンまたはピリミジンのいずれかの大きなストレッチについての必要性を排除する。

## 【0272】

1つの実施形態において、本明細書中に記載されるアンチセンス分子、リボザイム分子または三重らせん分子が、変異体遺伝子発現の阻害に利用される場合、この技術は、APIの正常な遺伝子対立遺伝子によって生成されるmRNAの転写(三重らせん)もしくは翻訳(アンチセンス、リボザイム)を効率的に減少または抑制し得るので、存在するAPIの濃度が正常な表現型に必要とされるよりも低くあり得るという状況が生じ得る、ということが可能である。このような場合において、APIをコードする遺伝子の活性の実質的な正常レベルを維持することを確実にするために、遺伝子治療を使用して、正常な遺伝子活性を示しそしてアンチセンス、リボザイムまたは三重らせん処置が利用されるか否かに影響を受けやすい配列を含まないAPIをコードしそして発現する核酸分子を、細胞中に導入し得る。あるいは、この遺伝子が細胞外タンパク質をコードする例において、正常APIは、API活性の必要レベルを維持するために共に投与され得る。

10

## 【0273】

本発明のアンチセンスRNAおよびDNA、リボザイム、ならびに三重らせん分子は、上記のようなDNA分子およびRNA分子の合成について当該分野で公知の任意の方法によって調製され得る。これらには、当該分野で周知のオリゴデオキシリ-ボヌクレオチドおよびオリゴリボヌクレオチドの化学的合成技術(例えば、固相ホスホルアミダイト化学合成など)が挙げられる。あるいは、RNA分子は、アンチセンスRNA分子をコードするDNA配列のインビトロおよびインビボでの転写によって生成され得る。このようなDNA配列は、適切なRNAポリメラーゼプロモーター(例えば、T7ポリメラーゼプロモーターまたはSP6ポリメラーゼプロモーターなど)を取り込む種々広範なベクター中に取り込まれ得る。あるいは、使用されるプロモーターに依存してアンチセンスRNAを構成的または誘導的に合成するアンチセンスcDNA構築物が、細胞株中に安定に導入され得る。

20

30

## 【0274】

## (5.15 治療的または予防的化合物についてのアッセイ)

本発明はまた、アルツハイマー病の処置または予防のための化合物の効果を同定するかまたは証明するために、薬学的生成物の発見において使用するためのアッセイを提供する。薬剤は、アルツハイマー病を有さない患者において見出されるレベルに向かってアルツハイマー病を有する被験体におけるAFもしくはAPIレベルを回復する能力か、またはアルツハイマー病の実験動物モデルにおいて同様の変化を生成する能力についてアッセイされ得る。アルツハイマー病を有さない患者において見出されるレベルに向かってアルツハイマー病を有する被験体におけるAFもしくはAPIレベルを回復し得るか、またはアルツハイマー病の実験動物モデルにおいて同様の変化を生成し得る化合物は、さらなる薬物発見のためのリード化合物としてか、あるいは治療的に使用され得る。AF発現およびAPI発現は、好ましい技術、免疫アッセイ、ゲル電気泳動および続く視覚化、API活性の検出、または本明細書中で教示されるかもしくは当業者に公知の任意の他の方法によってアッセイされ得る。このようなアッセイを使用して、AFまたはAPIの存在量が臨床的疾患の代理マーカーとして役立つ場合、臨床的モニタリングまたは薬物開発において候補薬物をスクリーニングし得る。

40

## 【0275】

種々の実施形態において、インビトロアッセイが、患者の障害に關与する代表的な細胞型の細胞を用いて実行され、化合物がこのような細胞型に対して所望の効果を有するか否かを決定し得る。

50

## 【0276】

治療において使用される化合物は、ヒトにおいて試験する前に、適切な動物モデル系（ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギなどが挙げられるがこれらに限定されない）において試験され得る。インビボ試験について、ヒトに投与する前に、当該分野で公知の任意の動物モデル系が使用され得る。アルツハイマー病の動物モデルの例としては、ヒト家族性アルツハイマー病（FAD） - アミロイド前駆体（APP）を発現する動物、ヒト野生型APPを過剰発現する動物、 - アミロイド1-42（A $\beta$ ）を過剰発現する動物、FADプレセニン-1（PS-1）を発現する動物が挙げられるが、これらに限定されない（例えば、Higgins, LS, 1999、Molecular Medicine Today 5:274~276を参照のこと）。さらに、ダウン症候群につ

10

10

20

20

このトランスジェニック動物は哺乳動物であり、より好ましくはこのトランスジェニック動物はマウスである。

## 【0277】

1つの実施形態において、APIの発現を調節する試験化合物は、APIを発現する、非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、サル、ウサギおよびモルモット）、好ましくは、アルツハイマー病またはダウン症候群の非ヒト動物モデルにおいて同定される。この実施形態に従って、試験化合物またはコントロール化合物が動物に投与され、そして1以上のAPIの発現に対する試験化合物の効果が決定される。API（または複数のAPI）の発現を変化させる試験化合物は、試験化合物で処置した動物または動物群における選択されたAPI（またはAPIをコードするmRNA）のレベルと、コントロール化合物で処置

30

30

した動物または動物群におけるこのAPIまたはmRNAのレベルとを比較することにより同定され得る。当業者に公知の技術を用いて、mRNAおよびタンパク質レベルを決定し得る（例えば、インサイチュハイブリダイゼーション）。この動物は、試験化合物の効果をアッセイするために屠殺されてもよいし、屠殺されなくてもよい。

## 【0278】

別の実施形態において、APIまたはその生物学的に活性な部分の活性を調節する試験化合物は、APIを発現する、非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、サル、ウサギおよびモルモット）、好ましくは、アルツハイマー病またはダウン症候群の非ヒト動物モデルにおいて同定される。この実施形態に従って、試験化合物またはコントロール化合物が動物に投与され、そしてAPIの活性に対する試験化合物の効果が決定される。API（または複数のAPI）の発現を変化させる試験化合物は、コントロール化合物で処置した動物および試験化合物で処置した動物をアッセイすることにより同定され得る。APIの活性は、APIの細胞性第2メッセンジャー（例えば、細胞内Ca<sup>2+</sup>、ジアシルグリセロール、IP3など）の誘導を検出するか、APIまたはその結合パートナーの触媒活性または酵素活性を検出するか、レポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼまたは緑色蛍光タンパク質のような検出可能なマーカーをコードする核酸に作動可能に連結された本発明のAPIに応答する調節エレメント）の誘導を検出するか、または細胞応答（例えば、細胞分化または細胞増殖）を検出することによりアッセイされ得る。当業者に公知の技術を利用して、APIの活性における変化を検出し得る（例えば、その全体が本明細書中に参考として援用される、米国特許第5,401,639号を参照のこと）。

40

40

50

## 【0279】

なお別の実施形態において、A P I（または複数のA P I）のレベルまたは発現を調節する試験化合物は、アルツハイマー病またはダウン症候群を有するヒト被験体、好ましくは、軽度から重度までのアルツハイマー病を有するヒト被験体、最も好ましくは、軽度のアルツハイマー病を有するヒト被験体において同定される。この実施形態に従って、試験化合物またはコントロール化合物は、ヒト被験体に投与され、そしてA P I発現に対する試験化合物の効果は、生物学的サンプル（例えば、C S F、血清、血漿または尿）においてA P IまたはA P Iをコードするm R N Aの発現を分析することにより決定される。A P Iの発現を変化させる試験化合物は、コントロール化合物で処置した被験体または被験体群におけるA P IまたはA P Iをコードするm R N Aのレベルと、試験化合物で処置した被験体または被験体群におけるA P IまたはA P Iをコードするm R N Aのレベルとを比較することにより同定され得る。あるいは、A P Iの発現の変化は、試験化合物の投与前および投与後の被験体または被験体群におけるA P IまたはA P Iをコードするm R N Aのレベルを比較することにより同定され得る。当業者に公知の任意の適切な技術を用いて、生物学的サンプルを得て、そしてm R N Aまたはタンパク質発現を分析し得る。例えば、本明細書中に記載の好ましい技術が、A P Iのレベルにおける変化を評価するために用いられ得る。

10

## 【0280】

別の実施形態において、A P I（または複数のA P I）の活性を調節する試験化合物は、アルツハイマー病またはダウン症候群を有するヒト被験体、好ましくは、軽度から重度までのアルツハイマー病を有するヒト被験体、最も好ましくは、軽度のアルツハイマー病を有するヒト被験体において同定される。この実施形態において、試験化合物またはコントロール化合物がヒト被験体に投与され、そしてA P Iの活性に対する試験化合物の効果は決定される。A P Iの活性を変化させる試験化合物は、コントロール化合物で処置した被験体由来の生物学的サンプルと、試験化合物で処置した被験体由来のサンプルとを比較することにより同定され得る。あるいは、A P Iの活性の変化は、試験化合物の投与前および投与後の被験体または被験体群におけるA P Iの活性を比較することにより同定され得る。A P Iの活性は、生物学的サンプル（例えば、C S F、血清、血漿または尿）においてA P Iの細胞シグナル伝達経路（例えば、細胞内C a<sup>2+</sup>、ジアシルグリセロール、I P 3など）の誘導を検出するか、A P Iまたはその結合パートナーの触媒活性または酵素活性を検出するか、または細胞応答（例えば、細胞分化または細胞増殖）を検出することにより評価され得る。当業者に公知の技術を用いて、A P Iの第2メッセンジャーの誘導における変化または細胞応答の変化を検出し得る。例えば、R T - P C Rを用いて、細胞性第2メッセンジャーの誘導における変化を検出し得る。

20

30

## 【0281】

特定の実施形態において、コントロール被験体（例えば、アルツハイマー病を有さないヒト）において検出されたレベルに向かってA P Iのレベルまたは発現を変化させる薬剤は、さらなる試験用途または治療用途のために選択される。別の好ましい実施形態において、コントロール被験体（例えば、アルツハイマー病を有さないヒト）において見出された活性に向かってA P Iの活性を変化させる試験化合物は、さらなる試験用途または治療用途のために選択される。

40

## 【0282】

別の実施形態において、アルツハイマー病と関連する1以上の症状の重篤度を低減する試験化合物は、アルツハイマー病またはダウン症候群を有するヒト被験体、好ましくは、軽度から重度までのアルツハイマー病を有するヒト被験体、最も好ましくは、軽度のアルツハイマー病を有するヒト被験体において同定される。この実施形態に従って、試験化合物またはコントロール化合物は、被験体に投与され、そしてアルツハイマー病の1以上の症状に対する試験化合物の効果は決定される。1以上の症状を低減する試験化合物は、コントロール化合物で処置された被験体と、試験化合物で処置された被験体とを比較することにより同定され得る。アルツハイマー病に精通した医師に公知の技術を用いて、試験化合

50

物が、アルツハイマー病と関連する1以上の症状を低減するか否かを決定し得る。例えば、アルツハイマー病を有する被験体における記憶を高めるか、または混乱を低減する試験化合物は、アルツハイマー病を有する被験体を処置するために有益である。

【0283】

好ましい実施形態において、アルツハイマー病を有するヒトにおいてアルツハイマー病に関連する1以上の症状の重篤度を低減する薬剤が、さらなる試験用途または治療用途のために選択される。

【0284】

(5.16 治療組成物および予防組成物ならびにそれらの使用)

本発明は、有効量の本発明の薬剤を被験体に投与する工程を包含する処置の方法を提供する。好ましい局面において、化合物は、実質的に精製される(例えば、化合物の効果を制限するか、または所望でない副作用を生じる物質を実質的に含まない)。この被験体は、好ましくは、動物(ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどのような動物が挙げられるが、これらに限定されない)であり、そして好ましくは、哺乳動物であり、そして最も好ましくは、ヒトである。特定の実施形態において、非ヒト哺乳動物が被験体である。

10

【0285】

化合物が核酸を含む場合に用いられ得る処方物および投与方法は、上記のとおりである；さらなる適切な処方物および投与経路は、以下に記載される。

【0286】

種々の送達系が公知であり、そして本発明の化合物を投与するために用いられ得る(例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセルにおけるカプセル化、この化合物を発現し得る組換え細胞、レセプター媒介性エンドサイトーシス(例えば、Wu and Wu 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432を参照のこと)、レトロウイルスベクターまたは他のベクターの一部としての核酸の構築など)。導入方法は、経腸的または非経口的であり得、そして皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻内、硬膜上(硬膜外)、および経口の経路が挙げられるが、これらに限定されない。この化合物は、任意の従来からの投与により、例えば、注入またはボラス注射により、上皮または粘膜皮膚内層(例えば、口腔粘膜、直腸粘膜および腸粘膜など)を介した吸収により投与され得、そして他の生物学的に活性な薬剤とともに投与され得る。投与は、全身または局所的であり得る。さらに、本発明の薬学的組成物を任意の適切な経路(脳室内および硬膜下腔内(intrathecal)注射を含む)により中枢神経系に導入することは望ましくあり得る；脳室内注射は、例えば、リザーバ(Ommayaリザーバ)に付属された、脳室内カテーテルにより容易にされ得る。肺投与もまた、例えば、吸入器またはネブライザの使用、およびエアロゾル化薬剤を有する処方物により、用いられ得る。

20

30

【0287】

特定の実施形態において、本発明の薬学的組成物を処置の必要な領域に局所的に投与することは望ましくあり得る；このことは、例えば(制限によらず)、外科手術の間の局所的注入、局所的適用(例えば、注射による)、カテーテルにより、またはインプラントにより達成され得る。このインプラントは、多孔性、非多孔性、またはゼラチン様物質である(シナラスティック膜のような膜または繊維を含む)。1つの実施形態において、投与は、CSFへ、または神経変性の部位(もしくはより前の部位)に、またはCNS組織への直接注射によってであり得る。

40

【0288】

別の実施形態において、この化合物は、小胞(特にリポソーム)において送達され得る(Langer, 1990, Science 249: 1527-1533; Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, 同書, pp. 317-327を参照のこと；一般的には、同書を参照のこと)。

50

## 【0289】

なお別の実施形態において、この化合物は、徐放系において送達され得る。1つの実施形態において、ポンプが用いられ得る (Langer, 前出; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88: 507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574を参照のこと)。別の実施形態において、ポリマー材料が用いられ得る (Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61を参照のこと; Levy et al., 1985, Science 228: 190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25: 351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71: 105もまた参照のこと)。なお別の実施形態において、徐放系は、治療標的 (すなわち、脳) の近位に配置され得、従って、全身用量のうちの特定の割合のみを要する (例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 前出、第2巻、pp 115 - 138 (1984)を参照のこと)。

10

20

## 【0290】

他の適切な徐放系は、Langer (1990, Science 249: 1527 - 1533) による総説において議論される。

## 【0291】

別の実施形態において、本発明の化合物がタンパク質をコードする核酸である場合、この核酸は、インピボで投与されて、適切な核酸発現ベクターの一部として構築し、そしてこれが細胞内にあるように投与することにより (例えば、レトロウイルスベクターの使用 (米国特許第4, 980, 286号を参照のこと) により、または直接注射により、または微粒子ボンバードメント (例えば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont) の使用により、脂質もしくは細胞表面レセプターもしくはトランスフェクト薬剤でのコーティングにより、または核に入ることが公知のホメオボックス様ペプチドに連結して投与することにより (例えば、Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864 - 1868を参照のこと) により、など) そのコードされたタンパク質の発現が促進され得る。あるいは、核酸は、細胞内に導入され得、そして相同組換えによる発現のために宿主細胞DNA内に組み込まれ得る。

30

## 【0292】

本発明はまた、薬学的組成物を提供する。このような組成物は、治療有効量の薬剤、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。好ましい実施形態において、用語「薬学的に受容可能な」は、合衆国政府または州政府の監督官庁により認可を受けているか、あるいは動物における使用のための、より具体的にはヒトにおける使用のための米国薬局方または他の一般に認識される薬局方において列挙されていることを意味する。用語「キャリア」とは、希釈剤、アジュバント、賦形剤、または小胞 (これらとともに、治療剤が投与される) をいう。このような薬学的なキャリアは、例えば、水および油のような滅菌液体 (石油、動物、植物または合成起源の油 (例えば、落花生油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油など) を含む) であり得る。薬学的組成物が静脈内に投与される場合は、水が好ましいキャリアである。生理食塩水および水性デキストロスおよびグリセロール溶液はまた、液体キャリアとして、特に注射溶液のために用いられ得る。適切な薬学的賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チヨーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナト

40

50

リウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。所望であれば、この組成物はまた、微量の湿潤剤または乳化剤、またはpH緩衝剤を含み得る。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐放処方物などの形態をとり得る。この組成物は、伝統的な結合剤およびトリグリセリドなどのキャリアとともに坐剤として処方され得る。経口処方物は、標準的なキャリア（例えば、薬学等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなど）を含み得る。適切な薬学的キャリアの例は、E. W. Martinによる「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載される。このような組成物は、被験体への適切な投与のための形態を提供するように、適切な量のキャリアとともに、治療有効量の化合物（好ましくは、精製された形態において）を含む。この処方物は、投与様式に適しているべきである。

10

#### 【0293】

好ましい実施形態において、この組成物は、ヒトへの静脈内投与に適合した薬学的組成物として慣用的手順に従って処方される。代表的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張性水性緩衝液の溶液である。必要な場合、この組成物はまた、注射部位における疼痛を和らげるために、可溶化剤および局所麻酔剤（例えば、リドカイン）を含み得る。一般に、成分は、密閉容器中の乾燥した凍結乾燥粉末または無水濃縮物として（例えば、活性薬剤の量を示すアンプルもしくは小袋（sachette）として）単位投薬形態で別々か、または一緒に混合してかのいずれかで供給される。組成物が注入により投与される場合、これは滅菌の製薬等級の水または生理食塩水を含む注入ボトルで分散され得る。組成物が注射により投与される場合、注入用滅菌水または生理食塩水のアンプルは、この成分が投与前に混合され得るように提供され得る。

20

#### 【0294】

本発明の化合物は、中性または塩形態として処方され得る。薬学的に受容可能な塩としては、遊離アミノ基（例えば、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するもの）で形成される塩、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するもののような遊離カルボキシル基で形成される塩が挙げられる。

30

#### 【0295】

アルツハイマー病の処置において有効な本発明の化合物の量は、本記載に基づく標準的な臨床技術により決定され得る。さらに、インビトロアッセイは、必要に応じて、最適投薬範囲の同定を補助するために用いられ得る。処方物に用いられる正確な用量はまた、投与経路、および疾患または障害の重篤度に依存し、そして医師の判定および各被験体の環境に従って決定されるべきである。しかし、静脈内投与の適切な投薬範囲は、一般に、体重1kgあたり約20~500μgの活性化合物である。鼻内投与のための適切な投薬範囲は、一般に、約0.01pg/kg体重~1mg/kg体重である。有効用量は、インビトロまたは動物モデル試験系から誘導される用量応答曲線から推定され得る。

40

#### 【0296】

坐剤は、一般に、重量で0.5%~10%の範囲の活性成分を含む；経口処方物は、好ましくは、10%~95%の活性成分を含む。

#### 【0297】

本発明はまた、本発明の薬学的組成物の1以上の成分が充填された1以上の容器を含む薬学的バックまたはキットを提供する。医薬品または生物製剤の製造使用または販売を規制する政府当局により定められた形式の通知が、必要に応じてこのような容器に付随し得る。この通知は、(a)ヒト投与のための製造、使用または販売の、機関による認可、(b)使用のための指示、またはその両方を反映する。

#### 【0298】

(6. 実施例：アルツハイマー病におけるCSFにおいて差次的に発現されるタンパク質

50

の同定)

以下の例示的かつ非限定的な手順を用いて、(a)アルツハイマー病を有する148の被験体、(b)これらのアルツハイマー病の被験体の60家族の構成員、および(c)32の無関連コントロールに由来するCSFサンプルにおけるタンパク質を、等電点電気泳動、続いてSDS-PAGEにより分離し、そして分析した。同じ被験体から、連続サンプルを経時的に得た。以下に記載の手順のパート6.1.1から6.1.9(6.1.9を含む)を「参考プロトコル」としてここで示す。

#### 【0299】

(6.1.材料および方法)

(6.1.1.サンプル調製)

タンパク質アッセイ(Pierce BCA Cat # 23225)を、受け取り時の各CSFサンプルに対して行った。タンパク質分離の前に、タンパク質分離を高めかつ簡単にし、そして目的のタンパク質を妨害し得るかまたは目的のタンパク質の分析を制限し得るタンパク質を除去することにより分析を容易にするために、各サンプルを特定のタンパク質の選択的枯渇のために処理した。1999年6月1日出願の国際特許出願番号PCT/GB99/01742(その全体が本明細書中に参考として援用され、特に3頁および6ページを参照のこと)。

#### 【0300】

CSFからのアルブミン、ハプトグロビン、トランスフェリンおよび免疫グロブリンG(IgG)の除去(「CSF枯渇」)を、アフィニティークロマトグラフィー精製工程により達成し、ここでサンプルを、アルブミン、ハプトグロビンおよびトランスフェリンの選択的除去のための固定化抗体、ならびに免疫グロブリンGの選択的除去のためのプロテインGを含む一連の「Hi-Trap」カラムに通した。直列アセンブリで2つのアフィニティークラムを、Hi-Trapカラムに含まれるプロテインG-セファロース(プロテインGセファロースHi-Trapカラム(1ml)Pharmacia Cat. No. 17-0404-01)に抗体をカップリングすることにより調製した。このことは、以下の溶液をカラムを通して順番に循環させることにより行った:(1)ダルベッコのリン酸緩衝化生理食塩水(Gibco BRL Cat. No. 14190-094);(2)濃縮抗体溶液;(3)200mM炭酸ナトリウム緩衝液(pH8.35);(4)架橋溶液(200mM炭酸ナトリウム緩衝液(pH8.35)、20mMジメチルピメリデート);および(5)500mMエタノールアミン、500mM NaCl。ついで、第3の(非誘導化)プロテインG Hi-Trapカラムを、直列カラムアセンブリの下端に接続した。

#### 【0301】

クロマトグラフィー手順を、Aktas Fast Protein Liquid Chromatography(FPLC)システムを用いて自動化し、その結果、一連の7回までの作動を連続的に行うことができた。サンプルを、一連の3つのHi-Trapカラムに通過させ、ここで、アフィニティークロマトグラフィー媒体が、上記のタンパク質を選択的に結合し、それにより、サンプルから上記のタンパク質を除去する。画分(代表的には1チューブあたり3ml)を、カラムローディングおよび洗浄段階の間にカラムから溶出した非結合物質について回収し(「フロースルー画分」)、そして結合タンパク質をImmunopure Gentle Ag/Ab Elution Buffer(Pierce Cat. No. 21013)を用いた段階溶出により溶出した(「結合/溶出画分」)。非結合物質を含む溶出液をプールした各分において回収し、遠心限外濾過により脱塩/濃縮し、そして2D PAGEによるさらなる分析を待つために保存した。

#### 【0302】

約300μgの総タンパク質を含む枯渇CSFの容量をアリコートにわけ、そして等量の10%(w/v)SDS(Fluka 71729)、2.3%(w/v)ジチオスレイトール(BDH 443852A)を添加した。サンプルを95°Cで5分間加熱し、次いで、20°Cに冷却した。次いで、125μlの以下の緩衝液をサンプルに添加した:

10

20

30

40

50

8 M 尿素 (BDH 452043w)  
 4% CHAPS (Sigma C3023)  
 65 mM ジチオスレイトール (DTT)  
 2% (v/v) Resolytes 3.5-10 (BDH 44338 2x)。

【0303】

この混合物を攪拌し、そして13000 rpmで5分間、15 で遠心分離し、そして上清を等電点電気泳動により分析した。

【0304】

(6.1.2. 等電点電気泳動)

等電点電気泳動 (IEF) を製造業者の説明書に記載される手順に従って、Immobiline 10  
 (登録商標) Dry Strip Kit (Pharmacia BioTech)  
 ) を用いて行った。Immobiline (登録商標) Dry Strip Kit, Pharmacia, #18-1038-63, Edition AB (その全体が本明細書  
 中に参考として援用される) の説明書を参照のこと。Immobilized pH G  
 rradient (IPG) ストリップ (18 cm, pH 3~10 の非線形ストリップ; Pharmacia Cat. #17-1235-01) を、Immobiline Dr  
 y Strip Users Manual に記載のように、8 M 尿素、2% (w/v)  
 CHAPS、10 mM DTT、2% (v/v) Resolytes 3.5~10 の溶  
 液中、20 で一晩再水和した。IEF については、50 µl の上清 (上記のように調製  
 した) をストリップにロードし、カップローディングユニットをストリップの塩基性末端 20  
 に配置した。次いで、ロードしたゲルを鉱油 (Pharmacia 17-3335-0  
 1) で覆い、そして以下のプロフィールに従って、Pharmacia EPS3500  
 XL 電源装置 (Cat 19-3500-01) を用いてストリップに直ぐに印加した：  
 初期電圧 = 300 V、2 時間

3 時間かけて 300 V から 3500 V の線形傾斜  
 3500 V で 19 時間維持。

【0305】

処理の全ての段階について、電流限界を 12 のゲルについて 10 mA に設定し、そしてワ  
 ット限界を 5 W に設定した。温度を作動の間中、20 に維持した。

【0306】

(6.1.3. ゲル平衡化および SDS-PAGE)

最後の 19 時間の工程の後、ストリップを直ぐに外し、そして以下の組成物の第 1 の溶液  
 に 20 で 10 分間浸漬した：6 M 尿素；2% (w/v) DTT；2% (w/v) SDS  
 ；30% (v/v) グリセロール (Fluka 49767)；0.05 M Tris  
 /HCl, pH 6.8 (Sigma Cat T-1503)。このストリップを、第 1  
 の溶液から取り出し、そして以下の組成を有する第 2 の溶液に 20 で 10 分間浸漬した  
 ：6 M 尿素；2% (w/v) ヨードアセトアミド (Sigma I-6125)；2%  
 (w/v) SDS；30% (v/v) グリセロール；0.05 M Tris/HCl, p  
 H 6.8。第 2 の溶液から取り出した後、このストリップを、以下に特定される改変を伴  
 って、Hochstrasser et al., 1988, Analytical B 40  
 iochemistry 173:412-423 (その全体が本明細書中に参考として  
 援用される) に従って、SDS-PAGE の支持されたゲル上にロードした。

【0307】

(6.1.4. 支持されたゲルの調製)

ゲルを、以下の寸法の 2 つのガラスプレートの間に入れた：23 cm 幅 × 24 cm 長 (後  
 る側プレート)；23 cm 幅 × 24 cm 長 (中心部 19 cm において 2 cm の深さのノッ  
 チ) (前側プレート)。SDS-PAGE ゲルの共有結合を促進するために、後ろ側プレ  
 ートを、エタノール中の -メタクリル-オキシプロピルトリメトキシシランの 0.4%  
 溶液 (Bind Silane<sup>T M</sup>; Pharmacia Cat. #17-1330-0  
 1) で処理した。前側プレートを、Repel Silane<sup>T M</sup> Pharmacia 50

Cat. # 17-1332-01で処理して、ゲルの接着を減少させた。過剰な試薬を水で洗浄することにより除去し、そしてこれらのプレートを乾燥させた。この段階でゲルの識別およびプレートのコーティングされた面を識別するためのマーカーの両方として、接着バーコードをゲルマトリックスと接触させないように、適切な位置に後ろ側プレートに接着した。

#### 【0308】

乾燥したプレートを、13のゲルを収容する能力を有するキャストボックスに組み立てた。各サンドイッチの頂部プレートおよび底部プレートを、1mm厚さのスペーサー、2.5cm幅により間隔を空けた。サンドイッチをアセテートシートで挟み込んで、ゲルの重合後のサンドイッチの分離を容易にした。次いで、キャストボックスを、Hochstrasser et al., (前出)に従って行った。

#### 【0309】

9~16%の線形ポリアクリルアミド勾配をキャストし、Angelique gradient casting system (Large Scale Biology)を用いて、前側プレートにおけるノッチのレベルの2cm下の点まで広げた。ストック溶液は以下のとおりであった。アクリルアミド(水中40%)は、Serva (Cat. # 10677)製であった。架橋剤は、総開始モノマー含有量の2.6%(w/w)の濃度のPDA (BioRad 161-0202)であった。ゲル緩衝液は、0.375M Tris/HCl, pH 8.8であった。重合触媒は、0.05%(v/v)TEMED (BioRad 161-0801)であり、開始剤は、0.1%(w/v)APS (BioRad 161-0700)であった。SDSは、ゲル中に含めず、濃縮ゲルも用いなかった。キャストゲルを20で一晩重合させ、次いで、密封ポリエチレンバッグ中で6mlのゲル緩衝液とともに4で保存し、4週間以内に用いた。

#### 【0310】

##### (6.1.5 SDS-PAGE)

0.5%(w/v)アガロース溶液(Fluka Cat 05075)をランニング緩衝液(微量のプロモフェノールブルーを補充した、0.025M Tris、0.198Mグリシン(Fluka 50050)、1%(w/v)SDS)中で調製した。このアガロース懸濁液を、このアガロースが溶解するまで攪拌しながら、70まで加熱した。この支持された2次元ゲルの上層を、このアガロース溶液で満たし、そして平衡化したストリップをこのアガロース中に配置し、そして、このゲルがこの2次元ゲルと密に接触するまで、パレットナイフを用いて穏やかに軽く叩いた。このゲルを、Amersham, 1995, Electrophoresis 16:1255~1267(これは本明細書中でその全体が参考として援用される)に記載されるように、2次元ランニングタンク中に配置した。このタンクを、緩衝液のレベルを2次元ゲルの領域の上層より僅かに高くなるまでランニング緩衝液(上述)で満たした。この2次元ゲルは、ポリアクリルアミドを含み、活性ゲル領域を効果的に冷却することを達成する。ランニング緩衝液を、このゲルで形成された上層の緩衝液画分に加え、次いで、電圧を、 Consort E-833電源を使用して速やかにゲルにかけた。1時間、このゲルを20mA/ゲルで電気泳動させた。ワット数限界を、6つのゲルを含むタンクに対して150Wに設定し、この電圧限界を600Vに設定した。1時間後、次いで、このゲルを、このプロモフェノールブルーの線がゲルの底から0.5cmとなるまで、前と同じ電圧限界およびワット数限界を用いて40mA/ゲルで電気泳動させ、この緩衝液の温度を、流動の最中16に維持した。ゲルは、2連で電気泳動しなかった。

#### 【0311】

##### (6.1.6 染色)

電気泳動の実施の完了の際に、このゲルを、固定のため、速やかにタンクから取り除いた。ゲルカセットの上層プレートを、注意深く除去し、このゲルを底のプレートに結合させたままにしておいた。次いで、この付着したゲルを伴った底のプレートを、染色装置中に配置した。この染色装置は、12のゲルを収容し得る。このゲルを固定剤溶液中に完全に

浸した。この固定剤溶液は、40% (v/v) エタノール (BDH 28719), 10% (v/v) 酢酸 (BDH 100016X), 50% (v/v) 水 (MilliQ Millipore) であり、ゲル上を連続的に循環した。一晩のインキュベーション後、この固定剤をタンクから排液し、そしてこのゲルを、7.5% (v/v) 酢酸, 0.05% (w/v) SDS, 92.5% (v/v) 水に、30分間浸すことにより、プライムした。次いで、このプライム化溶液を、排液し、そしてこのゲルを、ピリジニウムの染色化溶液 (4 - [2 - [4 - (ジベンチルアミノ) - 2 - トリフルオロメチルフェニル] エテニル] - 1 - (スルホブチル) - 内塩 (inner salt)) 中に4時間完全に浸すことによって染色した。この染色化溶液は、この色素のストック溶液 (DMSO中の2 mg/ml) を、7.5% (v/v) 酢酸水溶液で希釈して、最終濃度を1.2 mg/lとして調製した; この染色化溶液を、使用する前に、0.4 μmフィルター (Duro pore) を通して吸引濾過を行った。

10

## 【0312】

(6.1.7ゲルの画像化)

コンピュータ読取り可能出力を、前出の5.1節に記載のように、蛍光染色したゲルをApollo 2スキャナー (Oxford-Glycosciences, Oxford, UK) を用いて画像化することによって作製した。このスキャナーは、4つの統合蛍光マーカー (M1、M2、M3、M4と記す) を備えたゲルキャリアを有する。これらのマーカーは、画像の形状を修正するために使用され、そしてスキャニングが正確に実施されることを確認する品質制御機能である。

20

## 【0313】

スキャニングのために、このゲルを染色液から取り除き、水でリンスし、短時間で空気乾燥し、そしてApollo 2で画像化した。画像化後、このゲルを微量体積の染色化溶液を含んだポリエチレン容器中に密閉し、次いで4で保存した。

## 【0314】

(6.1.8 データのデジタル解析)

このデータを、米国出願第08/980,574号 (WO 98/23950として公開) の第5.4節および第5.5節 (参考として本明細書中に援用される) に記載されるように、より詳細には以下に記載されるように、処理した。

## 【0315】

スキャナーからの出力を、初めにMELANIE (登録商標) II 2D PAGE解析プログラム (リリース2.2、1997、BioRad Laboratories, Hercules, California, カタログ番号; 170~7566) を使用して処理し、レジストレーションポイント M1、M2、M3、およびM4を自動検出し; 画像を自動クロップ (すなわち、ゲル境界 (例えば、参照フレーム) の外側に位置するスキャンされた画像の領域に由来するシグナルを除去) し; ゴミに起因するアーティファクトを除外し; 形状の検出および定量化を行い; そして画像ファイルをGIF形式で作製した。以下パラメータを用いて、特徴を検出した:

30

スムース (Smooths) = 2

ラプラシアン閾値 (Laplacian threshold) 50

40

部分閾値 (Partials threshold) 1

サチュレーション (Saturation) = 100

ピーク性 (Peakedness) = 0

最小周囲 (Minimum Perimeter) = 10

(6.1.9 pI値およびMW値の割り当て)

ランドマーク (Landmark) 同定を使用して、画像中で検出した特徴のpIおよびMWを決定する。12個のランドマーク特徴 (CSF1~CSF12で記す) を、プールしたサンプルから得た標準的なCSF画像中で同定した。これらのランドマーク特徴は図1で確認され、そして、表XI中で確認される、pI値および/またはMW値を割り当てた。

50

(表 X I . 本研究で使用したランドマーク特徴)

【 0 3 1 6 】

【表 2 2】

名前	pl	MW (Da)	名前	pl	MW (Da)
CSF1	5.96	185230	CSF7	4.78	41340
CSF2	5.39	141700	CSF8	9.2	40000
CSF3	6.29	100790	CSF9	5.5	31900
CSF4	5.06	71270	CSF10	6.94	27440
CSF5	7.68	68370	CSF11	5.9	23990
CSF6	5.67	48090	CSF12	6.43	10960

10

これらのランドマークのうち可能な限り多くのものを、データセットの各ゲル画像中で同定した。次いで、この研究ゲル中の各特徴に、p I 値を、最も近い2つのランドマークに対する線形内挿または線形外挿によって割り当て (MELANIE (登録商標) - I Iソフトウェアを使用した)、そしてMW値を、最も近い2つのランドマークに対する線形内挿または線形外挿によって割り当てた (MELANIE (登録商標) - I Iソフトウェアを使用した)。

20

【 0 3 1 7 】

( 6 . 1 . 1 0 第 1 のマスター画像との一致 )

画像を編集して、ゴミのような大きなアーティファクトを除去し、大きな異常 (例えば、タンパク質特徴の染み) を有するか、または大部分の強度特徴より多くの同定を可能にするには低すぎる読み込み (loading) 強度もしくは低すぎる画像全体の強度であるか、または特徴の正確な検出を可能にするには乏しすぎる解像度である、画像を排除した。次いで、画像を、全サンプルセットからの、1つの共通な画像と対にすることによって比較した。この共通の画像、「第1のマスター画像」を、タンパク質のロード (最大特徴検出と一貫した最大ロード)、十分に解像されたミオグロビン領域、(ミオグロビンを内部標準として使用した)、および一般的に画像の質に基づいて選択した。さらに、第1のマスター画像を、解析に含まれる全画像のうちで一般に代表的であるような画像であるように選択した。(第1のマスターゲルを研究するゲルの代表であると判別するプロセスは、以下に記載された方法によって再度確認され、そして第1のマスターゲルが代表的でないものと見出される場合、これは排除され、そしてこのプロセスを、代表な第1のマスターゲルを見出すまで、繰り返した)。

30

【 0 3 1 8 】

共通のタンパク質特徴が、第1のマスター画像と別個の以下に記載のような研究ゲル画像の各々との間で対にされるように、残りの研究ゲル画像の各々を別個に、この第1のマスター画像に対して一致させた。

40

【 0 3 1 9 】

( 6 . 1 . 1 1 サンプル間の交差一致 )

差示的に発現された特徴を同定する目的で、多数のサンプルの統計的な解析を推し進めるために、各研究ゲルの形状を、このタンパク質特徴パターンと第1のマスターのタンパク質特徴パターンとの間の最大アライメントに対して、以下のように調節した。研究ゲル画像の各々を、複数解像度ワーピング (multi-resolution warping) 手順を使用して第1のマスター画像の形状へと別個に変換した。この手順は、画像の形状を、1つのサンプル別のサンプルへの電気泳動分離プロセスの物理パラメータの僅かな変化によってもたらされた歪みに対して修正する。観測された変化は、見出された歪みが

50

単純な形状的歪みではなく、むしろ円滑な流れであり、局所的なスケールおよび大域的なスケールの両方の変位を伴う。

#### 【0320】

複数解像度モデリングにおける基礎的な原理は、滑らかなシグナルを、「スケール空間」を通じた展開としてモデリングし得ることである。この「スケール空間」のなかでは、連続的なより微細なスケールにおける詳細を、より低い解像度近似に加え、より高い解像シグナルを得る。この型のモデルは、ベクトルの流動場 (flow field) (参照画像上の各ピクセル位置で定義される) に対して適用され、そして任意の滑らかさ (smoothness) の流れを比較的少ない自由度を用いてモデリングすることを可能にする。各画像を、初めに、初めの画像から誘導したスタック画像またはピラミッド画像に変形する (reduce) が、全てのレベルにおける各方向において解像度において2倍だけスムース化または変形され (ガウスピラミッド)、そして対応する異なった画像をまた、各レベルで算出し、スムース化された画像とその前駆物 (progenitor) との間の差異 (ラプラスピラミッド) を表現する。従って、このラプラス画像 (Laplacian images) は、異なるスケールにおける画像の詳細を表現する。

10

#### 【0321】

任意の2つの所定の画像間の歪みを評価するために、このピラミッドにおけるレベル7 (すなわち、解像度における、7回の連続した変形の後に) で計算を実施した。ラプラス画像を、両方向の隣接するグリッド位置間で50%の重なりを伴って16×16ピクセルのグリッドへとセグメント化し、そして参照画像および試験画像上にある対応するグリッド正方形の間の相互相関を算出した。次いで、歪みの変位を、相関行列中の最大値の位置により得た。特定のレベルで全ての歪みを計算した後、これらをピラミッドにおける次のレベルへ組み込み、試験画像に対し適用し、そして次いで、歪みに対するさらなる修正を次のスケールで算出した。

20

#### 【0322】

このワーブプロセスによって、第1のマスター画像と他のサンプルに対する画像との間の共通の特徴の良好なアライメントを生じる。MELANIE (登録商標) II 2D PAGE 解析プログラムを使用して、第1のマスター画像と他の画像のそれぞれとの間での、約500~700の一致した特徴の対を計算し、そして記録する。このプログラムの精度を、上述の様式における画像アライメントにより有意に増強した。精度を尚さらに改善するために、全ての対形成を、MelView対話式エディティングプログラムを用いて最終的に目視により調べ、そして残りの位認識可能な程度に不正確な対を除去した。このような認識可能に不正確な対の数は、(同じ生物学的サンプルの繰り返し解析によって測定された) Preferred Technologyの全再現性を超えた場合、第1のマスターゲルであるとして選択されたゲルを、第1のマスターゲルとしてはたらくには不十分な研究ゲルの代表として判別した。この場合、第1のマスターゲルとして選択されたゲルを拒絶し、そして異なるゲルを第1のマスターゲルとして選択し、そしてこのプロセスを繰り返した。

30

#### 【0323】

次いで、全ての画像を、複合マスター画像 (composite master image) を作製するために一緒に加え、そして全ての構成成分画像の、全てのゲル特徴の位置および形態を、上述の複合マスターに対して重ね合わせた。

40

#### 【0324】

一旦、全ての初期対を算出し、修正し、そして保存すると、第2のパスを実施し、これによって、もとの (ワーブされていない) 画像を、第1のマスターの形状に対して2回目に変換し、今回は対になったゲルの特徴の重心によって規定された複数のタイポイントのスムース補間によって算出された流動場を使用した。従って、複合マスター画像を、その特徴記述子を用いて第1のマスター画像を初期化することによって生成した。各画像を第1のマスター形状中へ変換する場合、これは、複合マスター画像中へデジタル的にピクセル毎に加算され、そして上記で概略した手順によって対となっていない特徴を、流動場の修

50

正を使用してマスター形状に対して調整されたこれらの重心を用いて、同様に複合マスター画像記述へと加算した。

【0325】

処理の最終段階を、この複合マスター画像およびこの特徴記述子（ここで、共通の形状へ変換されたこの研究中の全ての画像から全ての特徴を表す）に対して適用した。これら特徴を、これらの間の重複の度合いに従って、連結したセットまたは「クラスタ」へと一緒にグループ化した。次いで、各クラスタに、固有の識別指標である、分子クラスタ指標（MCI）を与えた。

【0326】

MCIは、異なる画像上の一致した特徴のセットを同定する。従って、MCIは、異なるサンプルでの2D分離における等価な位置において抽出した、タンパク質を示す。 10

【0327】

（6.1.12. プロフィールの構築）

最終複合マスター画像に対する、この研究における全ての成分ゲルの一致の後、各特徴の強度を、測定して、そして記憶した。この解析の最後の結果は、デジタルプロフィールの生成である。このデジタルプロフィールは、同定した各々の特徴に対して、以下を含む：1) 複合マスター画像中の対応する特徴に関連した固有の同定コード（MCI）、2) ゲル中の特徴のx座標、y座標、3) AFの等電点（pI）、4) AFの見かけの分子量（MW）、5) シグナル値、6) 先行した測定の各々についての、標準偏差、および7) 各特徴のMCIを、この特徴が一致したマスターゲルに結びつける方法。Laboratory Information Management System (LIMS)の効力によって、このMCIプロフィールは、これが生成されて現実に貯蔵されたゲルに対して追跡可能であり、その結果、ゲルのプロフィールデータベースのコンピュータ解析によって同定されたタンパク質を検索し得る。LIMSはまた、このプロフィールから、もとのサンプルまた患者にまでたどることを可能にする。 20

【0328】

（6.1.13. プロフィールの示差的解析）

各サンプルセット（アルツハイマーのCSFおよび正常なCSF）中のプールされたゲルデータに対して、これらのプロフィールを解析して、これらのプロフィール中に示差的に存在する特徴を同定し、そして選択した。次いで、これらの選択した特徴を、アルツハイマーのプールされたゲル特徴のセットの中へ整理した。次いで、各特徴のセットの一致する特徴を、アルツハイマーCSFと正常なCSFとの間の平均的な強度において、少なくとも2倍の差異を示す特徴を同定するために比較した。示差的に存在する特徴を、アルツハイマー病関連特徴（AF）として同定した。 30

【0329】

（6.1.14. プロフィールの統計的解析）

MCIデータを、2つの形態の統計モデルで表現した：1) 所定のゲルに対する総タンパク質体積の割合（PCTVOL）および2) 絶対体積、これはゲル上にロードした総体積によってスケール化した（VOL）。MCIが特定のゲル上に現れなかった場合、値0が、PCTVOLとVOLに代入される。殆どの解析に対して、MCIを統計的モデルにおいて考慮するために、（以下に記載のような）解析される診断グループのうちの少なくとも1つにおける、少なくとも75%のゲルにおいて、MCIが、PCTVOLおよびVOLについてゼロでない値を有する必要があった。 40

【0330】

以下のように特定される補足的な統計ストラテジーを使用して、マスターグループにおけるMCIから、AFを同定した。

【0331】

（I）グループ解析

これらの解析の目的は、異なる臨床的診断を有する個体からゲルの間での差異を特徴づけることであった。この診断グループは、以下である： 50

- 1) 検死確認されたもの ( A D ) 対 これらの第 1 のサンプル中の正常なコントロール ( N C O )、
- 2) 疾患発症 3 年以内の初期サンプルを伴った痴呆アルツハイマー型 ( D A T ) 対 N C O、および
- 3) 痴呆の臨床的診断なしで、アルツハイマー型の痴呆であると診断された個体の 1 親等の親戚の、最近のサンプル ( N C F ) 対 N C O。

## 【 0 3 3 2 】

以下の統計的技術を、グループ解析において使用した：

## ( 1 ) 線形モデル

D A T グループ 対 N C O グループを、このボリュームのランクに関して比較した、年齢および性別に対して制御する線形モデル。 10

## 【 0 3 3 3 】

## ( 2 ) 分類樹

分類樹を、予測子としての M C I ボリュームおよび応答としての臨床診断と共に使用した。このアルゴリズムは、応答変数に従ってデータを均質なセットへと分割する予測子における「分岐点」を探す。この樹の所定の節に対して全ての可能な分岐を評価した後に、多項尤度モデル ( m u l t i n o m i a l l i k e l i h o o d m o d e l ) に従って、ずれにおける変化を最大化する分岐点を選択する。樹モデルを、もとのデータおよびもとのデータのブートストラップサンプル ( 置換えを用いたサンプリング ) からのデータの両方に対して適合させる。この統計検定は、所定の M C I が、もとのデータの樹またはブートストラップサンプルの樹のいずれかにおいて診断を決定するために重要な「分岐点」であると判明するか否かに関与する。 20

## 【 0 3 3 4 】

## ( 3 ) ロジスティック回帰モデル

ロジスティック回帰モデルを使用して、A D である確率をモデル化した。種々の M C I のボリュームを、説明的変数 ( e x p l a n a t o r y v a r i a b l e s ) として使用した。逐次的手順を使用して、5 つの M C I を選択した。

## 【 0 3 3 5 】

グループ解析に基づく包含のための基準：

上述の解析の全てからの情報を使用して、以下の M C I を選択した： 30

1. 所定の解析に対して最も小さい p 値を有する 5 ~ 6 の M C I
2. 2 つ以上の解析に対する最も小さい 1 0 0 の p 値の中に現れた M C I
3. 分類樹中の重要な分岐点として現れた M C I
4. 所望の分布特性を有する M C I

## ( I I ) 長期的解析

この長期的解析の目的は、M M S E M ( M M S E 評価基準、C D R 評価基準、および G D S 評価基準 ) の組み合わせによって測定した場合の疾患状態における変化に関連した A F を同定することであった。2 つ以上のサンプルを伴った D A T 被験体をこれらの解析において使用した。

## 【 0 3 3 6 】

長期的解析において用いられた、2 つのモデルが存在した。第 1 のモデルでは、この目的は、ボリュームにおける変化が、M M S E M における変化と有意に相関する A F を同定することであった。各 A F に対して、M M S E M を、年齢および被験体について調節後のボリュームのランクに関して回帰させた。グループ解析のいずれかの上位 1 0 0 位において、0 . 0 5 未満の p 値を有し、かつアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションに関してグループ解析と一貫性がある A F を、含めた。 40

## 【 0 3 3 7 】

第 2 のモデルの目的は、A F に対する、被験体の第 1 のサンプルにおけるボリュームが、第 1 のサンプルの時点後の「期間の疾患進行速度の重要な予測子である A F を同定することであった。はじめに、単純な線形回帰モデルを使用して、各被験体に関する M M S E M 50

に基づいた進行速度を評価した。12以上の初期MMSEMを有し、かつ最初のサンプルと最後のサンプルとの間が4ヶ月より長い被験体のみを使用した。さらに、最初のサンプルの最初の3年以内のサンプルのみが、使用された。次いで、回帰モデリングおよび分割サンプル確認 (split sample validation) を使用して、有意なAFを同定した。より具体的には、被験体を、最初に無作為に2つのグループに分割した。各グループについて、各被験体の最初のサンプルからのボリュームのランクを使用した、段階的重み付け最小自2 (stepwise weighted least-squares; WLS) 回帰を使用して、進行速度を予測するための、最良の5つのAFを選択した。AFが1つのグループにおいて上位5位に入り、そして他のグループにおいて含まれるときに同じ符号をともなった傾きの推定値を生じた場合、これを包めた。さらに、

10

【0338】

(6.1.15 選択されたタンパク質の回収および分析)

AFにおけるタンパク質を、ロボットを利用して切り出し、そして処理してトリプシン消化ペプチド (tryptic digest peptides) を生成した。トリプシン消化ペプチドを、PerSeptive Biosystems Voyager-DE<sup>TM</sup> STR Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) 質量分析計を使用した質量分析法によって分析し、そして選択されたトリプシン消化ペプチドを、(nanoflow<sup>TM</sup> エレクトロスプレー Z-スプレー供給源を備えた Micro

mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) 質量分析計 (Micromass, Altrincham, U.K.) を使用したタンデム質量分析法 (MS/MS) によって分析した。APIの部分アミノ酸配列決定および同定のために、トリプシン消化ペプチドの未解釈のタンデム質量スペクトルを、SEQUEST 検索プログラム (Engら、1994, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5: 976-989) バージョン v. C. 1 を用いて検索した。データベース同定のための基準は、以下を含んでいた: トリプシンの切断特異性; データベースから返答されたペプチド中のaイオン、bイオンおよびyイオンの組の検出; ならびにカルバミドメチル化 (carbamidomethylation) を説明する、全てのCys残基についての質量増分。検索したデータベースは、National Centre for B

io technology Information (NCBI) によって維持されている、非冗長データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> でアクセス可能である) 中にあるタンパク質エントリーから構築された、データベースであった。SEQUESTプログラムを使用し、スペクトル-スペクトル相関を通して、タンパク質の同定した後、MALDI-TOF質量分析計で検出された質量を、同定されたタンパク質の中のトリプシン消化ペプチドに対して割り当てた。SEQUESTプログラムを使用し、トリプシン消化ペプチドの未解釈のMS/MSスペクトルの検索を通して、タンパク質が同定できなかった場合、このペプチドのタンデム質量スペクトルを、当該分野で公知の方法を使用して、手動で解釈した。(ペプチドイオンの低エネルギー断片化質量スペクトルの解釈については、Gaskellら、1992、Rapid Commu

n. Mass Spectrom. 6: 658-662を参照のこと。)

20

30

40

(6.2 結果)

これらの初期の実験によって、正常なCSFと比較したとき、アルツハイマー病のCSFにおいて減少した117個の特徴、およびアルツハイマー病のCSFにおいて増加した64個の特徴を同定した。これらのAFの詳細は、表Iおよび表IIにおいて提供される。各AFは、正常CSFと比較した場合、アルツハイマー病のCSFに示差的に存在した。いくつかの好ましいAFについて (AF-1、AF-2、AF-3、AF-4、AF-5、AF-6、AF-7、AF-8、AF-9、AF-10、AF-13、AF-14、AF-15、AF-16、AF-17、AF-19、AF-20、AF-21、AF-23、AF-24、AF-25、AF-26、AF-28、AF-29、AF-30、AF-

50

32、AF-33、AF-35、AF-37、AF-38、AF-39、AF-40、AF-42、AF-43、AF-46、AF-47、AF-48、AF-51、AF-54、AF-55、AF-56、AF-57、AF-59、AF-60、AF-62、AF-64、AF-65、AF-66、AF-67、AF-68、AF-69、AF-71、AF-73、AF-75、AF-76、AF-149、AF-150、AF-152、AF-153、AF-154、AF-155、AF-156、AF-157、AF-159、AF-160、AF-161、AF-162、AF-163、AF-165、AF-166、AF-167、AF-168、AF-169、AF-170、AF-171、AF-173、AF-174、AF-177、AF-180、AF-181、AF-182、AF-183、AF-184、AF-185、AF-186、AF-187、AF-188、AF-189、AF-190、AF-191、AF-192)、差は非常に有意であり ( $p < 0.01$ )、そして特定の非常に好ましいAF (AF-2、AF-3、AF-5、AF-6、AF-9、AF-10、AF-13、AF-15、AF-16、AF-17、AF-20、AF-21、AF-23、AF-24、AF-28、AF-29、AF-30、AF-33、AF-37、AF-52、AF-55、AF-57、AF-62、AF-64、AF-66、AF-73、AF-150、AF-154、AF-155、AF-159、AF-161、AF-165、AF-166、AF-168、AF-169、AF-183、AF-187、AF-189、AF-190、AF-191、AF-192) について、この差はさらに尚、有意であった ( $p < 0.001$ )。

10

20

30

40

50

#### 【0339】

部分アミノ酸配列を、これらのAFにおいて示差的に存在するAPIについて、決定した。これらのAPIの詳細を、表IVおよびVで提供する。公開されたデータベースのコンピュータ検索によって、少なくとも1つのAPIを同定した。このAPIに対して、この部分アミノ酸配列およびこのようなペプチド配列をコードする任意のオリゴヌクレオチドのいずれもが、調べたどの公開データベースにも記載されてなかった。

#### 【0340】

(7. 実施例：アルツハイマー病の診断および処置)

以下の実施例によって、アルツハイマー病についてのスクリーニング、処置、または診断のための、本発明のAPIの使用を例示する。以下の実施例はまた、アルツハイマー病を処置または予防するための、本発明のAPIのモジュレーター (アゴニストまたはアンタゴニスト) の使用を例示する。

#### 【0341】

色素上皮由来因子 (PEDF) は、胚形成発生において網膜色素上皮細胞によって合成され、そして分泌される、神経栄養性タンパク質である。色素上皮誘導因子 (PEDF) は、RPE細胞と神経網膜 (neural retina) との間の細胞外マトリックスに存在することが示されている。これは、ニューロン分化を誘導し、そして血清除去 (serum withdrawal) またはグルタミン酸細胞傷害 (glutamate cytotoxicity) によって引き起こされる変性からの、中枢神経系のニューロンの生存を促進する。PEDFは、未熟であり、成熟していない小脳細胞をアポトーシス死から保護し、このような細胞にとっての生存因子として作用し、ならびにこれらをグルタミン酸細胞傷害および過酸化水素細胞傷害から保護することが示されている。PEDFは、グリコサミノグリカンに、ならびに網膜芽細胞腫および小脳顆粒細胞の表面上に存在する80 kDaレセプターに結合する。80 kDaレセプターに結合するPEDFの、ならびにPEDF活性は、PEDFを認識する抗体によって、およびPEDFの44アミノ酸フラグメント (アミノ酸78~121) によって遮断され得る。

#### 【0342】

分子量33,401 kDaであり、そしてpIが6.74である、PEDFのアイソフォームの発現は、本明細書中で、アルツハイマー病ではない被験体のCSFと比較した場合に、アルツハイマー病を有する被験体の脳脊髄液 (CSF) において有意に増加したことを示した。従って、CSF中のPEDFの定量的な検出を使用して、アルツハイマー病を

診断し得、アルツハイマー病の進行を決定し得、または、アルツハイマー病に対する治療有効性をモニターし得る。

【0343】

本発明の1つの実施形態において、PEDFの発現、PEDFの活性、またはPEDFの発現および活性の両方を調節（すなわち、アップレギュレートまたはダウンレギュレート）する化合物を、アルツハイマー病の処置を必要としているかまたはその予防のために被験体に対して投与する。PEDFの発現、PEDFの活性、またはPEDFの発現および活性の両方を調節する抗体は、この目的のため適切である。さらに、PEDFの全部もしくは一部をコードする核酸、またはPEDFの全部もしくは一部に相補的な核酸を、投与し得る。PEDF、またはPEDFポリペプチドのフラグメントもまた、投与され得る。

10

【0344】

本発明はまた、PEDFの発現またはPEDFの活性を調節するさらなる化合物を同定するためのスクリーニングアッセイを提供する。インビトロでPEDFの発現を調節する化合物を、試験化合物で処理した細胞内のPEDFの発現とコントロール化合物（例えば、生理食塩水）で処理した細胞内のPEDFの発現とを比較することによって、同定し得る。PEDFの発現の検出方法は、当該分野で公知であり、そしてPEDF RNAのレベルを（例えば、ノーザンブロット分析またはRT-PCRによって）測定することおよびPEDFタンパク質を（例えば、イムノアッセイまたはウエスタンブロット分析によって）測定することを包含する。PEDFの活性を調節する化合物を、試験化合物がPEDFの機能をアゴナイズするか、またはアンタゴナイズする能力（例えば、この神経栄養活性または80kDaレセプターへの結合）と、コントロール化合物（例えば、生理食塩水）がPEDFの同じ機能を阻害する能力とを比較することによって、同定し得る。PEDFレセプターへのPEDF結合またはPEDF活性を調節し得る化合物は、アルツハイマー病の処置として有用な化合物のさらなる開発のために適切な化合物として同定される。

20

【0345】

PEDFとそのレセプターとの間の結合は、例えば、PEDFと、PEDFレセプターを発現していることが既知な細胞とを接触させ、そしてPEDFと細胞表面レセプターとの間の結合の度合いをアッセイすることによって、または無細胞アッセイ（すなわち、PEDFおよびPEDFレセプターが単離されており、好ましくは組換え的に作製された、アッセイ）においてPEDFとそのレセプターを接触させ、そしてPEDFとそのレセプターとの間の結合の度合いをアッセイする工程によって決定し得る。このようなアッセイの使用を通して、候補化合物を、PEDFの、そのレセプターへの結合をアゴナイズするか、またはアンタゴナイズする能力に対して試験し得る。

30

【0346】

PEDFの発現またはPEDF活性に影響を与える、インビトロで同定される化合物を、アルツハイマー病およびダウン症候群の動物モデルにおいてか、またはアルツハイマー病を有する被験体において、インビボで試験し得て、これらの治療的効力を決定し得る。

【0347】

本発明は、本願書に記載の特定の実施形態に関して、限定されるべきではなく、これらの実施形態は本発明の個々の局面の単なる例示として意図される。本発明の範囲内にある機能的に等価な方法および装置は、本明細書中で列挙されたものに加えて先に述べた記述および添付の図面から、当業者にとっては明らかである。このような改変および変形は、特許請求の範囲の内にあることが意図される。各参考文献、特許および本明細書中で引用された特許出願の内容は、本明細書中で全体が参考として援用される。

40

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、正常なCSFの2次元電気泳動から得られた画像である。これには、CSF1~CSF12と名付けた12個の目印となる特徴を識別するために注釈を付し、そしてこれは、本発明の1つの局面の1つの実施形態を示す。

50

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
11 October 2001 (11.10.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/75454 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68  
Ledyard, CT 06339 (US). ROHLFF, Christian [GB/GB]; 19 Rewley Road, Oxford OX1 2RA (GB). SILBER, B., Michael [US/US]; 104 Randi Drive, Madison, CT 06443 (US). STIGER, Thomas, R. [US/US]; 93 Castle Hill Road, Pawcatuck, CT 06379 (US). SUNDERLAND, P., Trey [US/US]; 4718 Camberland Avenue, Chevy Chase, MD 20815 (US). TOWNSEND, Robert, Reid [GB/GB]; 2 Outlands Road, Oxford OX2 0EU (GB). WHITE, Frost [US/US]; 65 Homestead Road, Ledyard, CT 06339 (US). WILLIAMS, Stephen, A. [GB/US]; 114 Colony Road, Groton, CT 06340 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/10908
- (22) International Filing Date: 3 April 2001 (03.04.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/194,504 3 April 2000 (03.04.2000) US  
60/253,647 28 November 2000 (28.11.2000) US
- (74) Agent: JACKSON, David, A.; Klauber & Jackson, 411 Hackensack Avenue, Hackensack, NJ 07601 (US).
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:  
US 60/194,504 (CON)  
Filed on 3 April 2000 (03.04.2000)
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Applicants (for all designated States except US): OXFORD GLYCOSCIENCES (UK) LTD. [GB/GB]; The Forum, 86 Milton Park, Abingdon, Oxfordshire OX14 4RY (GB). PFIZER INC. [US/US]; 234 East 42nd Street, New York, NY 10017 (US).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): DURHAM, Kathryn, L. [US/US]; 94 Glenwood Avenue, New London, CT 06320 (US). FRIEDMAN, David, L. [US/US]; 368 Bartlett Drive, Madison, CT 06443 (US). HERATH, Herath, Mudiyaaselage, Athula, Chandrasiri [GB/GB]; 53 Foster Road, Abingdon OX14 1YW (GB). KIMMEL, Lida, H. [US/US]; 55 Bokum Road, Chester, CT 06412 (US). PAREKH, Rajesh, Bhikhu [GB/GB]; Alchester House, Langford Lane, Near Wendlebury OX6 0NS (GB). POTTER, David, M. [US/US]; 33 Chriswood Trace,
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/75454 A2

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULES, POLYPEPTIDES AND USES THEREFOR, INCLUDING DIAGNOSIS AND TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

(57) Abstract: The present invention provides methods and compositions for screening, diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease, for monitoring the effectiveness of Alzheimer's disease treatment, and for drug development. Alzheimer's Disease-Associated Features (AFs), detectable by two-dimensional electrophoresis of cerebrospinal fluid, serum or plasma are described. The invention further provides Alzheimer's Disease-Associated Protein Isoforms (APIs) detectable in cerebrospinal fluid, serum or plasma, preparations comprising isolated APIs, antibodies immunospecific for APIs, pharmaceutical compositions, diagnostic and therapeutic methods, and kits comprising or based on the same.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

NUCLEIC ACID MOLECULES, POLYPEPTIDES AND USES THEREFOR,  
INCLUDING DIAGNOSIS AND TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

5

## 1. INTRODUCTION

The present invention relates to the identification of proteins and protein isoforms that are associated with predisposition to Alzheimer's Disease and its onset and development, and of genes and nucleic acid molecules, encoding the same, and to their use for *e.g.*, clinical screening, diagnosis, treatment, as well as for drug screening and drug development.

10

## 2. BACKGROUND OF THE INVENTION

Alzheimer's Disease (AD) is an increasingly prevalent form of neurodegeneration that accounts for approximately 50 % - 60 % of the overall cases of dementia among people over 65 years of age. It currently affects an estimated 15 million people worldwide and owing to the relative increase of elderly people in the population its prevalence is likely to increase over the next 2 to 3 decades. Alzheimer's disease is a progressive disorder with a mean duration of around 8.5 years between onset of clinical symptoms and death. Death of pyramidal neurons and loss of neuronal synapses in brains regions associated with higher mental functions results in the typical symptomology, characterized by gross and progressive impairment of cognitive function (Francis et al., 1999, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 66:137-47). Currently, a diagnosis of Alzheimer's disease requires a careful medical history and physical examination; a detailed neurological and psychiatric examination; laboratory blood studies to exclude underlying metabolic and medical illnesses that masquerade as AD; a mental status assessment and formal cognitive tests; and a computed tomographic scan or magnetic resonance image of the brain (Growdon, JH., 1995, *Advances in the diagnosis of Alzheimer's disease*. In: Iqbal, K., Mortimer, JA., Winblad, B., Wisniewski, HM eds *Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*. New York, NY: John Wiley & Sons Inc. 1995:139-153). Due to the time consuming nature of these tests, their expense, and their inconvenience to patients, it would be highly desirable to measure a substance or substances in body samples, such as samples of cerebrospinal fluid (CSF), blood or

20

25

30

WO 01/75454

PCT/US01/10908

urine, that would lead to a positive diagnosis of Alzheimer's disease or that would help to exclude AD from the differential diagnosis. Since the CSF bathes the brain, changes in its protein composition may most accurately reveal alterations in brain protein expression patterns that are causatively or diagnostically linked to the disease.

5 Current candidate biomarkers for Alzheimer's disease include: (1) mutations in presenilin 1 (PS1), presenilin 2 (PS2) and amyloid precursor protein (APP) genes; (2) the detection of alleles of apolipoprotein E (ApoE); and (3) altered concentrations of amyloid  $\beta$ -peptides (A $\beta$ ), tau protein, and neuronal thread protein (NTP) in the CSF. See, e.g., *Neurobiology of Aging* 19:109-116 (1998) for a review.

10 Mutations in PS1, PS2 and APP genes are indicative of early-onset familial Alzheimer's disease. However, early-onset familial Alzheimer's disease is relatively rare; only 120 families worldwide are currently known to carry deterministic mutations (*Neurobiology of Aging* 19:109-116 (1998)). The detection of the e4 allele of ApoE has been shown to correlate with late-onset and sporadic forms of

15 Alzheimer's disease. However, e4 alone cannot be used as a biomarker for Alzheimer's disease since e4 has been detected in many individuals not suffering from Alzheimer's disease and the absence of e4 does not exclude Alzheimer's disease (*Neurobiology of Aging* 19:109-116 (1998)).

A decrease in the A $\beta$  peptide A $\beta$ 42 and an increase in tau protein in the CSF of Alzheimer's disease have been shown to correlate with the presence of Alzheimer's disease (*Neurobiology of Aging* 19:109-116 (1998)). However, the specificity and sensitivity of A $\beta$ 42 and tau protein as biomarkers of Alzheimer's disease are modest. For example, it has been difficult to determine a cutoff level of CSF tau protein that is diagnostically informative. Also, elevated levels of NTP in the CSF of postmortem

25 subjects has been shown to correlate with the presence of Alzheimer's disease (*Neurobiology of Aging* 19:109-116 (1998)). Therefore, a need exists to identify sensitive and specific biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease in living subjects.

### 30 3. SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides methods and compositions for screening, diagnosis and treatment of Alzheimer's disease and for screening and development of drugs for treatment of Alzheimer's disease.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

- A first aspect of the invention provides methods for identification of Alzheimer's disease that comprise analyzing a sample of CSF by two-dimensional electrophoresis to detect the presence or level of at least one Alzheimer's Disease-Associated Feature (AF), *e.g.*, one or more of the AFs disclosed herein, or any combination thereof. These methods are also suitable for clinical screening, prognosis, monitoring the results of therapy, for identifying patients most likely to respond to a particular therapeutic treatment, drug screening and development, and identification of new targets for drug treatment.
- A second aspect of the invention provides methods for diagnosis of Alzheimer's disease that comprise detecting in a sample of CSF the presence or level of at least one Alzheimer's Disease-Associated Protein Isoform (API), *e.g.*, one or more of the APIs disclosed herein or any combination thereof.
- A third aspect of the invention provides antibodies, *e.g.*, monoclonal and polyclonal and chimeric (bispecific) antibodies capable of immunospecific binding to an API, *e.g.*, an API disclosed herein.
- A fourth aspect of the invention provides a preparation comprising an isolated API, *i.e.*, an API substantially free from proteins or protein isoforms having a significantly different isoelectric point or a significantly different apparent molecular weight from the API.
- A fifth aspect of the invention provides kits that may be used in the above recited methods and that may comprise single or multiple preparations, or antibodies, together with other reagents, labels, substrates, if needed, and directions for use. The kits may be used for diagnosis of disease, or may be assays for the identification of new diagnostic and/or therapeutic agents.
- A sixth aspect of the invention provides methods of treating Alzheimer's disease, comprising administering to a subject a therapeutically effective amount of an agent that modulates (*e.g.*, upregulates or downregulates) the expression or activity (*e.g.* enzymatic or binding activity), or both, of an API in subjects having Alzheimer's disease.
- A seventh aspect of the invention provides methods of screening for agents that modulate (*e.g.*, upregulate or downregulate) a characteristic of, *e.g.*, the expression or the enzymatic or binding activity, of an API, an API analog, or an API-related polypeptide.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

Other objects and advantages will become apparent from a review of the ensuing detailed description taken in conjunction with the following illustrative drawing.

5           2.    BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURE

Figure 1 is an image obtained from 2-dimensional electrophoresis of normal CSF, which has been annotated to identify twelve landmark features, designated CSF1 to CSF12, and which are illustrative of an embodiment of an aspect of the present invention.

10

          3.    DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention described in detail below provides methods, compositions and kits useful, *e.g.*, for screening, diagnosis and treatment of Alzheimer's disease in a mammalian subject, and for drug screening and drug development. The invention also encompasses the administration of therapeutic compositions to a mammalian subject to treat or prevent Alzheimer's disease. The mammalian subject may be a non-human mammal, but is preferably human, more preferably a human adult, *i.e.* a human subject at least 21 (more particularly at least 35, at least 50, at least 60, at least 70, or at least 80) years old. For clarity of disclosure, and not by way of limitation, the invention will be described with respect to the analysis of CSF samples. However, as one skilled in the art will appreciate, based on the present description the assays and techniques described below can be applied to other types of samples, including a body fluid (*e.g.* blood, serum, plasma or saliva), a tissue sample from a subject at risk of having or developing Alzheimer's disease (*e.g.* a biopsy such as a brain biopsy) or homogenate thereof. The methods and compositions of the present invention are useful, such as for example, screening, diagnosis and treatment of a living subject, but may also be used for postmortem diagnosis in a subject, for example, to identify family members of the subject who are at risk of developing the same disease.

20

The following definitions are provided to assist in the review of the instant disclosure.

30           3.1.   DEFINITIONS

WO 01/75454

PCT/US01/10908

"Diagnosis" refers to diagnosis, prognosis, monitoring, selecting participants in clinical trials, and identifying patients most likely to respond to a particular therapeutic treatment. "Treatment" refers to therapy, prevention and prophylaxis.

"Agent" refers to all materials that may be used to prepare pharmaceutical and diagnostic compositions, or that may be compounds, nucleic acids, polypeptides, fragments, isoforms, or other materials that may be used independently for such purposes, all in accordance with the present invention.

"API analog" refers to a polypeptide that possesses similar or identical function(s) as an API but need not necessarily comprise an amino acid sequence that is similar or identical to the amino acid sequence of the API, or possess a structure that is similar or identical to that of the API. As used herein, an amino acid sequence of a polypeptide is "similar" to that of an API if it satisfies at least one of the following criteria: (a) the polypeptide has an amino acid sequence that is at least 30% (more preferably, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95% or at least 99%) identical to the amino acid sequence of the API; (b) the polypeptide is encoded by a nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to a nucleotide sequence encoding at least 5 amino acid residues (more preferably, at least 10 amino acid residues, at least 15 amino acid residues, at least 20 amino acid residues, at least 25 amino acid residues, at least 40 amino acid residues, at least 50 amino acid residues, at least 60 amino acid residues, at least 70 amino acid residues, at least 80 amino acid residues, at least 90 amino acid residues, at least 100 amino acid residues, at least 125 amino acid residues, or at least 150 amino acid residues) of the API; or (c) the polypeptide is encoded by a nucleotide sequence that is at least 30% (more preferably, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95% or at least 99%) identical to the nucleotide sequence encoding the API. As used herein, a polypeptide with "similar structure" to that of an API refers to a polypeptide that has a similar secondary, tertiary or quaternary structure as that of the API. The structure of a polypeptide can be determined by methods known to those skilled in the art, including but not limited to, X-ray crystallography, nuclear magnetic resonance, and crystallographic electron microscopy.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

"API fusion protein" refers to a polypeptide that comprises (i) an amino acid sequence of an API, an API fragment, an API-related polypeptide or a fragment of an API-related polypeptide and (ii) an amino acid sequence of a heterologous polypeptide (*i.e.*, a non-API, non-API fragment or non-API-related polypeptide).

5 "API homolog" refers to a polypeptide that comprises an amino acid sequence similar to that of an API but does not necessarily possess a similar or identical function as the API.

"API ortholog" refers to a non-human polypeptide that (i) comprises an amino acid sequence similar to that of an API and (ii) possesses a similar or identical  
10 function to that of the API.

"API-related polypeptide" refers to an API homolog, an API analog, an isoform of API, an API ortholog, or any combination thereof.

"Chimeric Antibody" refers to a molecule in which different portions are derived from different animal species, such as those having a human immunoglobulin constant region and a variable region derived from a murine mAb. (See, *e.g.*, Cabilly  
15 et al., U.S. Patent No. 4,816,567; and Boss et al., U.S. Patent No. 4,816,397, which are incorporated herein by reference in their entirety.)

"Derivative" refers to a polypeptide that comprises an amino acid sequence of a second polypeptide which has been altered by the introduction of amino acid residue  
20 substitutions, deletions or additions. The derivative polypeptide possess a similar or identical function as the second polypeptide.

"Fragment" refers to a peptide or polypeptide comprising an amino acid sequence of at least 5 amino acid residues (preferably, at least 10 amino acid residues, at least 15 amino acid residues, at least 20 amino acid residues, at least 25 amino acid  
25 residues, at least 40 amino acid residues, at least 50 amino acid residues, at least 60 amino acid residues, at least 70 amino acid residues, at least 80 amino acid residues, at least 90 amino acid residues, at least 100 amino acid residues, at least 125 amino acid residues, at least 150 amino acid residues, at least 175 amino acid residues, at least 200 amino acid residues, or at least 250 amino acid residues) of the amino acid  
30 sequence of a second polypeptide. The fragment of an API may or may not possess a functional activity of the a second polypeptide.

"Fold change" includes "fold increase" and "fold decrease" and refers to the relative increase or decrease in abundance of an AF or the relative increase or decrease in expression or activity of a polypeptide (*e.g.* an API) in a first sample or

WO 01/75454

PCT/US01/10908

sample set compared to a second sample (or sample set). An AF or polypeptide fold change may be measured by any technique known to those of skill in the art, albeit the observed increase or decrease will vary depending upon the technique used.

Preferably, fold change is determined herein as described in the Examples *infra*.

5 "Isoform" refers to variants of a polypeptide that are encoded by the same gene, but that differ in their pI or MW, or both. Such isoforms can differ in their amino acid composition (*e.g.* as a result of alternative mRNA or premRNA processing, *e.g.* alternative splicing or limited proteolysis) and in addition, or in the alternative, may arise from differential post-translational modification (*e.g.*,  
10 glycosylation, acylation, phosphorylation).

"Modulate" in reference to expression or activity of an API or an API-related polypeptide refers to any change, *e.g.*, upregulation or downregulation, of the expression or activity of the API or an API-related polypeptide. Those skilled in the art, based on the present disclosure, will understand that such modulation can be  
15 determined by assays known to those of skill in the art.

"Treatment" refers to the administration of medicine or the performance of medical procedures with respect to a patient, for either prophylaxis (prevention) or to cure the infirmity or malady in the instance where the patient is afflicted.

The percent identity of two amino acid sequences or of two nucleic acid  
20 sequences can be or is generally determined by aligning the sequences for optimal comparison purposes (*e.g.*, gaps can be introduced in the first sequence for best alignment with the sequence) and comparing the amino acid residues or nucleotides at corresponding positions. The "best alignment" is an alignment of two sequences which results in the highest percent identity. The percent identity is determined by  
25 the number of identical amino acid residues or nucleotides in the sequences being compared (*i.e.*, % identity = # of identical positions/total # of positions x 100).

The determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm known to those of skill in the art. An example of a mathematical algorithm for comparing two sequences is the algorithm of  
30 Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modified as in Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. The NBLAST and XBLAST programs of Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 have incorporated such an algorithm. BLAST nucleotide searches can be performed with the NBLAST program, score = 100, wordlength = 12 to obtain nucleotide sequences

WO 01/75454

PCT/US01/10908

homologous to a nucleic acid molecules of the invention. BLAST protein searches can be performed with the XBLAST program, score = 50, wordlength = 3 to obtain amino acid sequences homologous to a protein molecules of the invention. To obtain gapped alignments for comparison purposes, Gapped BLAST can be utilized as described in Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Alternatively, PSI-Blast can be used to perform an iterated search which detects distant relationships between molecules (Id.). When utilizing BLAST, Gapped BLAST, and PSI-Blast programs, the default parameters of the respective programs (e.g., XBLAST and NBLAST) can be used. See <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

10 Another example of a mathematical algorithm utilized for the comparison of sequences is the algorithm of Myers and Miller, CABIOS (1989). The ALIGN program (version 2.0) which is part of the GCG sequence alignment software package has incorporated such an algorithm. Other algorithms for sequence analysis known in the art include ADVANCE and ADAM as described in Torellis and Robotti (1994) 15 Comput. Appl. Biosci., 10 :3-5; and FASTA described in Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8. Within FASTA, ktup is a control option that sets the sensitivity and speed of the search.

Cerebrospinal fluid (CSF) refers to the fluid that surrounds the bulk of the central nervous system, as described in Physiological Basis of Medical Practice (J.B. 20 West, ed., Williams and Wilkins, Baltimore, MD 1985). CSF includes ventricular CSF and lumbar CSF.

#### 5.1 Alzheimer's Disease-Associated Features (AFs)

In one aspect of the invention, two-dimensional electrophoresis is used to 25 analyze CSF from a subject, preferably a living subject, in order to detect or quantify the expression of one or more Alzheimer's Disease-Associated Features (AFs) for screening, treatment or diagnosis of Alzheimer's disease. As used herein, "two-dimensional electrophoresis" (2D-electrophoresis) means a technique comprising isoelectric focusing, followed by denaturing electrophoresis; this generates a two- 30 dimensional gel (2D-gel) containing a plurality of separated proteins. Preferably, the step of denaturing electrophoresis uses polyacrylamide electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). Especially preferred are the highly accurate and automatable methods and apparatus ("the Preferred Technology") described in International Application No. 97GB3307 (published as [WO 98/23950](#)) and in U.S.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

Application No. 08/980,574, both filed December 1, 1997, each of which is incorporated herein by reference in its entirety with particular reference to the protocol at pages 23-35. Briefly, the Preferred Technology provides efficient, computer-assisted methods and apparatus for identifying, selecting and characterizing biomolecules (e.g. proteins, including glycoproteins) in a biological sample. A two-dimensional array is generated by separating biomolecules on a two-dimensional gel according to their electrophoretic mobility and isoelectric point. A computer-generated digital profile of the array is generated, representing the identity, apparent molecular weight, isoelectric point, and relative abundance of a plurality of biomolecules detected in the two-dimensional array, thereby permitting computer-mediated comparison of profiles from multiple biological samples, as well as computer aided excision of separated proteins of interest.

A particular scanner for detecting fluorescently labeled proteins is described in WO 96/36882 and in the Ph.D. thesis of David A. Basiji, entitled "Development of a High-throughput Fluorescence Scanner Employing Internal Reflection Optics and Phase-sensitive Detection (Total Internal Reflection, Electrophoresis)", University of Washington (1997), Volume 58/12-B of Dissertation Abstracts International, page 6686, the contents of each of which are incorporated herein by reference. These documents describe an image scanner designed specifically for automated, integrated operation at high speeds. The scanner can image gels that have been stained with fluorescent dyes or silver stains, as well as storage phosphor screens. The Basiji thesis provides a phase-sensitive detection system for discriminating modulated fluorescence from baseline noise due to laser scatter or homogeneous fluorescence, but the scanner can also be operated in a non-phase-sensitive mode. This phase-sensitive detection capability would increase the sensitivity of the instrument by an order of magnitude or more compared to conventional fluorescence imaging systems. The increased sensitivity would reduce the sample-preparation load on the upstream instruments while the enhanced image quality simplifies image analysis downstream in the process.

A more highly preferred scanner is the Apollo 2 scanner (Oxford Glycosciences, Oxford, UK), which is a modified version of the above described scanner. In the Apollo 2 scanner, the gel is transported through the scanner on a precision lead-screw drive system. This is preferable to laying the glass plate on the

WO 01/75454

PCT/US01/10908

belt-driven system that is described in the Basiji thesis, as it provides a reproducible means of accurately transporting the gel past the imaging optics.

In the Apollo 2 scanner, the gel is secured against three alignment stops that rigidly hold the glass plate in a known position. By doing this in conjunction with the above precision transport system, the absolute position of the gel can be predicted and recorded. This ensures that co-ordinates of each feature on the gel can be determined more accurately and communicated, if desired, to a cutting robot for excision of the feature. In the Apollo 2 scanner, the carrier that holds the gel has four integral fluorescent markers for use to correct the image geometry. These markers are a quality control feature that confirms that the scanning has been performed correctly.

In comparison to the scanner described in the Basiji thesis, the optical components of the Apollo 2 scanner have been inverted. In the Apollo 2 scanner, the laser, mirror, waveguide and other optical components are above the glass plate being scanned. The scanner described in the Basiji thesis has these components underneath. In the Apollo 2 scanner, the glass plate is mounted onto the scanner gel side down, so that the optical path remains through the glass plate. By doing this, any particles of gel that may break away from the glass plate will fall onto the base of the instrument rather than into the optics. This does not affect the functionality of the system, but increases its reliability.

Still more preferred is the Apollo 3 scanner, in which the signal output is digitized to the full 16-bit data without any peak saturation or without square root encoding of the signal. A compensation algorithm has also been applied to correct for any variation in detection sensitivity along the path of the scanning beam. This variation is due to anomalies in the optics and differences in collection efficiency across the waveguide. A calibration is performed using a perspex plate with an even fluorescence throughout. The data received from a scan of this plate are used to determine the multiplication factors needed to increase the signal from each pixel level to a target level. These factors are then used in subsequent scans of gels to remove any internal optical variations.

"Feature" refers to a spot detected in a 2D gel, and the term "Alzheimer's Disease-Associated Features" (AF) refers to a feature that is differentially present in a sample (*e.g.* a sample of CSF) from a subject having Alzheimer's disease compared with a sample (*e.g.* a sample of CSF) from a subject free from Alzheimer's disease. As used herein, a feature (or a protein isoform of API, as defined *infra*) is

WO 01/75454

PCT/US01/10908

"differentially present" in a first sample with respect to a second sample when a method for detecting the feature, isoform or API (e.g., 2D electrophoresis or an immunoassay) gives a different signal when applied to the first and second samples.

A feature, isoform or API is "increased" in the first sample with respect to the second if the method of detection indicates that the feature, isoform or API is more abundant in the first sample than in the second sample, or if the feature, isoform or API is detectable in the first sample and substantially undetectable in the second sample.

Conversely, a feature, isoform or API is "decreased" in the first sample with respect to the second if the method of detection indicates that the feature, isoform or API is less abundant in the first sample than in the second sample or if the feature, isoform or API is undetectable in the first sample and detectable in the second sample.

Particularly, the relative abundance of a feature in two samples is determined in reference to its normalized signal, in two steps. First, the signal obtained upon detecting the feature in a sample is normalized by reference to a suitable background parameter, e.g., (a) to the total protein in the sample being analyzed (e.g., total protein loaded onto a gel); (b) to an Expression Reference Feature (ERF) i.e., a feature whose abundance is substantially invariant, within the limits of variability of the Preferred Technology, in the population of subjects being examined, e.g. the ERFs disclosed below, or (c) more preferably to the total signal detected as the sum of each of all proteins in the sample.

Secondly, the normalized signal for the feature in one sample or sample set is compared with the normalized signal for the same feature in another sample or sample set in order to identify features that are "differentially present" in the first sample (or sample set) with respect to the second.

In accordance with an aspect of the present invention, the AFs disclosed herein have been identified by comparing CSF samples from subjects having Alzheimer's disease against CSF samples from subjects free from Alzheimer's disease. Subjects free from Alzheimer's disease include subjects with no known disease or condition (normal subjects) and subjects with diseases (including neurological and neurodegenerative diseases) other than Alzheimer's disease.

Two groups of AFs have been identified through the methods and apparatus of the Preferred Technology. The first group consists of AFs that are decreased in the CSF of subjects having Alzheimer's disease as compared with the CSF of subjects

WO 01/75454

PCT/US01/10908

free from Alzheimer's disease. These AFs can be described by apparent molecular weight (MW) and isoelectric point (pI) as provided in Table I.

Table I. AFs Decreased in CSF of Subjects Having Alzheimer's Disease

5 (a) Data from Mastergroup Analysis

AF#	Fold Decrease <sup>a</sup>	pI	MW (Da)	p value*
AF-1	1.41	4.79	150081	0.001695 <sup>(3)</sup>
AF-2	1.34	4.28	21349	0.000133 <sup>(3)</sup>
AF-3	1.47	8.10	34846	0.000083 <sup>(3)</sup>
AF-4	1.56	4.38	21160	0.001192 <sup>(3)</sup>
AF-5	1.51	7.34	36554	0.000010 <sup>(3)</sup>
AF-6	1.46	4.91	29812	0.000003 <sup>(3)</sup>
AF-7	1.24	4.25	20787	0.003558 <sup>(3)</sup>
AF-8	1.44	4.93	187927	0.002221 <sup>(3)</sup>
AF-9	1.34	5.21	136768	0.000799 <sup>(3)</sup>
AF-10	1.30	5.19	17694	0.000400 <sup>(3)</sup>
AF-13	1.37	6.01	184530	0.000100 <sup>(3)</sup>
AF-14	1.52	4.72	63166	0.009387 <sup>(3)</sup>
AF-15	1.38	4.47	38970	0.000437 <sup>(3)</sup>
AF-16	1.22	5.19	46876	0.000697 <sup>(3)</sup>
AF-17	1.38	5.82	50294	0.000126 <sup>(3)</sup>
AF-18	1.30	4.87	49219	0.020661 <sup>(3)</sup>
AF-19	1.24	4.82	12454	0.00146 <sup>(3)</sup>
AF-20	1.30	4.43	16818	0.000322 <sup>(3)</sup>
AF-21	1.30	5.40	141094	0.000560 <sup>(3)</sup>
AF-22	1.36	4.93	133773	0.011000 <sup>(3)</sup>
AF-23	1.21	4.50	32473	0.000209 <sup>(6)</sup>
AF-24	1.20	5.31	46663	0.000871 <sup>(3)</sup>
AF-25	1.19	5.68	36700	0.00251 <sup>(3)</sup>
AF-26	1.31	8.11	32305	0.002204 <sup>(3)</sup>
AF-27	1.26	5.33	141371	0.010447 <sup>(3)</sup>
AF-28	1.06	5.13	158568	0.000100 <sup>(3)</sup>

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF#	Fold Decrease <sup>#</sup>	pI	MW (Da)	p value*
AF-29	1.27	9.22	47059	0.000028 <sup>(1)</sup>
AF-30	1.13	5.67	48057	0.000100 <sup>(1)</sup>
AF-31	1.15	6.07	91258	0.012712 <sup>(6)</sup>
AF-32	1.15	6.17	48958	0.008321 <sup>(6)</sup>
AF-33	1.06	4.41	42104	0.000126 <sup>(1)</sup>
AF-34	1.14	4.54	145408	0.017268 <sup>(6)</sup>
AF-35	1.22	5.21	18623	0.001094 <sup>(1)</sup>
AF-36	1.17	5.78	14416	0.010744 <sup>(1)</sup>
AF-37	1.29	6.91	33523	0.000087 <sup>(1)</sup>
AF-38	1.18	6.47	29535	0.002759 <sup>(1)</sup>
AF-39	1.30	7.50	35510	0.002858 <sup>(1)</sup>
AF-40	1.22	7.29	38617	0.001187 <sup>(1)</sup>
AF-41	1.11	5.85	17345	0.016690 <sup>(6)</sup>
AF-42	1.10	5.04	18662	0.002252 <sup>(1)</sup>
AF-43	1.13	9.83	14065	0.003303 <sup>(1)</sup>
AF-44	1.10	6.63	102328	0.020753 <sup>(6)</sup>
AF-45	1.09	6.04	46998	0.031910 <sup>(6)</sup>
AF-46	1.09	4.71	19802	0.008437 <sup>(6)</sup>
AF-47	1.09	5.99	49664	0.002187 <sup>(1)</sup>
AF-48	1.32	5.32	122332	0.006582 <sup>(1)</sup>
AF-49	1.07	6.94	27576	0.010068 <sup>(6)</sup>
AF-50	1.07	6.82	71337	0.035409 <sup>(6)</sup>
AF-51	1.04	5.70	34388	0.006156 <sup>(6)</sup>
AF-76	1.11	5.59	45537	0.001973 <sup>(1)</sup>
AF-149	1.15	4.82	190721	0.003541 <sup>(1)</sup>
AF-150	1.24	6.87	157592	0.000100 <sup>(1)</sup>
AF-152	1.09	5.04	81703	0.002800 <sup>(1)</sup>
AF-154	1.06	5.03	67307	0.000100 <sup>(1)</sup>
AF-155	1.38	9.21	64021	0.000070 <sup>(1)</sup>
AF-156	9.75	4.36	58083	0.001568 <sup>(1)</sup>
AF-159	1.18	5.08	52008	0.000100 <sup>(1)</sup>

WO 01/75454

PCT/US01/10948

AF#	Fold Decrease <sup>#</sup>	pI	MW (Da)	p value*
AF-160	1.06	5.76	45729	0.004123 <sup>(3)</sup>
AF-162	1.23	5.47	38663	0.001073 <sup>(3)</sup>
AF-163	1.39	4.45	34879	0.001228 <sup>(3)</sup>
AF-164	1.51	5.00	33485	0.01179 <sup>(3)</sup>
AF-169	1.00	8.00	34362	0.000004 <sup>(1)</sup>
AF-170	1.38	5.41	31886	0.005600 <sup>(3)</sup>
AF-172	1.53	6.71	28747	0.01051 <sup>(3)</sup>
AF-173	10.91	7.67	27476	0.003738 <sup>(3)</sup>
AF-174	1.03	4.67	27811	0.002423 <sup>(3)</sup>
AF-175	1.03	5.33	24936	0.044270 <sup>(3)</sup>
AF-176	1.15	4.86	22248	0.012144 <sup>(3)</sup>
AF-177	1.14	4.63	21103	0.006564 <sup>(3)</sup>
AF-178	1.08	6.03	22247	0.05097 <sup>(3)</sup>
AF-181	1.21	5.72	16336	0.004745 <sup>(1)</sup>
AF-183	1.44	10.36	11160	0.000270 <sup>(3)</sup>
AF-184	1.08	5.31	48769	0.004689 <sup>(3)</sup>
AF-186	2.76	4.71	29693	0.002446 <sup>(1)</sup>
AF-187	2.09	4.93	154156	0.000750 <sup>(3)</sup>
AF-188	1.35	5.52	39355	0.007175 <sup>(1)</sup>
AF-189	1.29	6.79	30719	0.000377 <sup>(3)</sup>
AF-190	1.26	5.29	29663	0.000178 <sup>(1)</sup>
AF-191	1.12	5.31	46663	0.000654 <sup>(3)</sup>

\* The statistical technique used to calculate a given p value is indicated by a footnote for each p value. The statistical techniques used for these group analyzes were (1) a linear model, controlling for age and gender; (2) classification trees; (3) a logistic regression model and (4) longitudinal analysis.  
<sup>#</sup> Fold changes reported here are those calculated before adjustment for age and gender.

5

## (b) Data from Pooled Gel Analysis

AF#	Fold Decrease <sup>#</sup>	pI	MW (Da)
AF-78	2.80	5.59	158937
AF-79	2.62	5.52	142378
AF-80	2.78	5.56	142378
AF-81	2.60	5.43	78299

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF#	Fold Decrease <sup>a</sup>	pI	MW (Da)
AF-82	7.25	6.69	74838
AF-83	4.07	6.81	71920
AF-84	4.44	6.94	73402
AF-85	16.77	7.10	73878
AF-86	4.86	5.24	67676
AF-87	4.17	5.95	64179
AF-88	6.48	5.36	66979
AF-89	2.64	5.39	65155
AF-90	4.81	7.61	62945
AF-91	3.10	8.16	56352
AF-92	2.63	6.18	50860
AF-93	6.33	6.28	49268
AF-94	11.17	4.38	45882
AF-95	9.28	5.60	46036
AF-96	11.07	4.43	44966
AF-98	5.51	6.72	44664
AF-99	10.1	5.92	44365
AF-100	15.39	6.08	44068
AF-101	9.82	4.47	44216
AF-102	3.14	6.02	44216
AF-103	3.57	5.93	42722
AF-104	22.78	5.09	42184
AF-105	4.11	5.19	42184
AF-107	13.3	7.26	33226
AF-108	19.0	7.54	33136
AF-110	9.21	5.39	28237
AF-111	14.85	5.68	27835
AF-112	2.60	6.00	20681
AF-114	8.98	6.80	18741
AF-115	2.85	6.04	17422
AF-116	6.85	6.68	14031

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF#	Fold Decrease*	pI	MW (Da)
AF-117	2.90	4.65	13983
AF-118	15.19	6.94	11739
AF-119	16.27	7.23	11699

\* These features were identified as having a differential presence that is significant on the basis of having at least a 2-fold difference in mean intensity (i.e. a fold change threshold of at least 2) between Alzheimer's CSF and normal CSF.

- 5 The second group consists of AFs that are increased in the CSF of subjects having Alzheimer's disease as compared with the CSF of subjects free from Alzheimer's disease. These AFs can be described by apparent molecular weight (MW) and isoelectric point (pI) as provided in Table II.

10 Table II. AFs Increased in CSF of Subjects Having Alzheimer's Disease

(a) Data from Mastergroup Analysis

AF#	Fold Increase#	pI	MW (Da)	p value*
AF-52	2.81	6.30	32573	0.000009 <sup>(6)</sup>
AF-53	1.80	5.84	45302	0.016106 <sup>(6)</sup>
AF-54	1.76	5.12	17520	0.003235 <sup>(1)</sup>
AF-55	1.29	8.10	12361	0.000482 <sup>(1)</sup>
AF-56	1.49	8.56	52128	0.005771 <sup>(1)</sup>
AF-57	1.46	6.30	68549	0.000274 <sup>(1)</sup>
AF-58	1.40	5.01	14507	0.01182 <sup>(1)</sup>
AF-59	1.37	6.74	33401	0.001351 <sup>(1)</sup>
AF-60	1.38	5.39	33873	0.009818 <sup>(1)</sup>
AF-61	1.34	6.76	54345	Bag Tree 4 Analysis <sup>(2)</sup>
AF-62	1.31	6.60	31004	0.000027 <sup>(1)</sup>
AF-63	1.24	5.97	14897	0.10696 <sup>(1)</sup>
AF-64	1.20	6.67	68119	0.000731 <sup>(1)</sup>
AF-65	1.22	7.19	58620	0.005833 <sup>(6)</sup>
AF-66	1.09	10.05	30092	0.000100 <sup>(1)</sup>
AF-67	1.21	5.02	13735	0.006391 <sup>(6)</sup>

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF#	Fold Increase#	pI	MW (Da)	p value*
AF-68	1.21	9.06	35351	0.003575 <sup>(1)</sup>
AF-69	1.19	5.01	46760	0.005125 <sup>(4)</sup>
AF-70	1.19	8.91	38789	0.021552 <sup>(4)</sup>
AF-71	1.20	6.44	68579	0.003848 <sup>(1)</sup>
AF-72	1.15	5.00	43788	0.014917 <sup>(4)</sup>
AF-73	1.19	5.21	31615	0.000008 <sup>(3)</sup>
AF-74	1.14	6.19	51934	0.054917 <sup>(3)</sup>
AF-75	1.12	5.03	33671	0.002399 <sup>(1)</sup>
AF-77	1.09	6.41	32196	0.035148 <sup>(4)</sup>
AF-151	1.13	5.28	137531	Bag Tree 1 Analysis <sup>(2)</sup>
AF-153	1.23	9.85	69630	0.004906 <sup>(1)</sup>
AF-157	1.70	4.99	55449	0.006272 <sup>(3)</sup>
AF-161	1.00	5.18	44404	0.000600 <sup>(1)</sup>
AF-165	1.88	7.17	34230	0.000035 <sup>(1)</sup>
AF-166	1.20	8.54	33657	0.000009 <sup>(1)</sup>
AF-167	1.31	5.69	33621	0.005400 <sup>(1)</sup>
AF-168	1.00	7.66	33920	0.000013 <sup>(1)</sup>
AF-171	1.10	4.98	29658	0.004242 <sup>(1)</sup>
AF-179	1.64	5.26	20115	Stepwise Analysis <sup>(1)</sup>
AF-180	1.62	6.17	16255	0.005047 <sup>(1)</sup>
AF-182	1.37	4.89	13651	0.005380 <sup>(1)</sup>
AF-185	6.00	5.32	40323	0.005520 <sup>(1)</sup>
AF-192	1.04	5.38	62756	0.000213 <sup>(1)</sup>

\* The statistical technique used to calculate a given p value is indicated by a footnote for each p value. The statistical techniques used for these group analyzes were (1) a linear model, controlling for age and gender; (2) classification trees; (3) a logistic regression model and (4) longitudinal analysis.  
# Fold changes reported here are those calculated before adjustment for age and gender.

5

## (b) Data from Pooled Gel Analysis

AF#	Fold Increase#	pI	MW (Da)
AF-121	11.7	5.42	105108

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF#	Fold Increase#	pI	MW (Da)
AF-122	2.20	5.27	71060
AF-123	6.35	7.31	64933
AF-124	6.86	7.47	64736
AF-125	2.34	4.77	61297
AF-126	48.84	4.11	60374
AF-127	6.79	4.98	59649
AF-128	2.36	6.60	57865
AF-129	2.90	5.29	54625
AF-130	2.94	5.08	51880
AF-131	5.19	6.54	50944
AF-132	3.41	4.72	47414
AF-133	3.08	5.12	44068
AF-134	2.34	5.00	43516
AF-137	4.41	4.98	36855
AF-139	4.11	5.00	34295
AF-140	110.32	6.80	32080
AF-141	3.58	7.50	28440
AF-142	2.66	6.75	27279
AF-143	5.68	7.44	26066
AF-144	2.71	6.56	20744
AF-145	4.43	4.76	18069
AF-146	2.18	4.94	12790
AF-147	2.29	4.81	12790
AF-148	5.04	5.32	11382

# These features were identified as having a differential presence that is significant on the basis of having at least a 2-fold difference in mean intensity (i.e. a fold change threshold of at least 2) between Alzheimer's CSF and normal CSF.

- 5 For any given AF, the signal obtained upon analyzing CSF from subjects having Alzheimer's disease relative to the signal obtained upon analyzing CSF from subjects free from Alzheimer's disease will depend upon the particular analytical protocol and detection technique that is used. Accordingly, those skilled in the art

WO 01/75454

PCT/US01/10908

will understand that any laboratory, based on the present description, can establish a suitable reference range for any AF in subjects free from Alzheimer's disease according to the analytical protocol and detection technique in use. In particular, at least one positive control CSF sample from a subject known to have Alzheimer's disease or at least one negative control CSF sample from a subject known to be free from Alzheimer's disease (and more preferably both positive and negative control samples) are included in each batch of test samples analyzed. In one embodiment, the level of expression of a feature is determined relative to a background value, which is defined as the level of signal obtained from a proximal region of the image that (a) is equivalent in area to the particular feature in question; and (b) contains no substantial discernable protein feature.

In a preferred embodiment, the signal associated with an AF in the CSF of a subject (*e.g.*, a subject suspected of having or known to have Alzheimer's disease) is normalized with reference to one or more Expression Reference Features (ERFs) detected in the same 2D gel. As will be apparent to one of ordinary skill in the art, such ERFs may readily be determined by comparing different samples using techniques and protocols such as the Preferred Technology. Suitable ERFs include (but are not limited to) that described in the following table.

20 Table III Expression Reference Features

ERF#	pI	MW (Da)
ERF-1	5.94	18860
ERF-2	6.04	47450

As those of skill in the art will readily appreciate, the measured MW and pI of a given feature or protein isoform will vary to some extent depending on the precise protocol used for each step of the 2D electrophoresis and for landmark matching. As used herein, the terms "MW" and "pI" are defined, respectively, to mean the apparent molecular weight in Daltons and the apparent isoelectric point of a feature or protein isoform as measured in careful accordance with the Reference Protocol identified in Section 6 below. When the Reference Protocol is followed and when samples are run in duplicate or a higher number of replicates, variation in the measured mean pI of an AF or API is typically less than 3% and variation in the measured mean MW of an AF

WO 01/75454

PCT/US01/10908

or API is typically less than 5%. Where the skilled artisan wishes to diverge from the Reference Protocol, calibration experiments should be performed to compare the MW and pI for each AF or protein isoform as detected (a) by the Reference Protocol and (b) by the divergent.

- 5 The AFs of the invention can be used, for example, for detection, treatment, diagnosis, or the drug development or pharmaceutical products. In one embodiment of the invention, CSF from a subject (*e.g.*, a subject suspected of having Alzheimer's disease) is analyzed by 2D electrophoresis for quantitative detection of one or more of the following AFs: AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6, AF-7, AF-8, AF-9, AF-10,
- 10 AF-13, AF-14, AF-15, AF-16, AF-17, AF-18, AF-19, AF-20, AF-21, AF-22, AF-23, AF-24, AF-25, AF-26, AF-27, AF-28, AF-29, AF-30, AF-31, AF-32, AF-33, AF-34, AF-35, AF-36, AF-37, AF-38, AF-39, AF-40, AF-41, AF-42, AF-43, AF-44, AF-45, AF-46, AF-47, AF-48, AF-49, AF-50, AF-51, AF-76, AF-78, AF-79, AF-80, AF-81, AF-82, AF-83, AF-84, AF-85, AF-86, AF-87, AF-88, AF-89, AF-90, AF-91, AF-92,
- 15 AF-93, AF-94, AF-95, AF-96, AF-98, AF-99, AF-100, AF-101, AF-102, AF-103, AF-104, AF-105, AF-107, AF-108, AF-110, AF-111, AF-112, AF-114, AF-115, AF-116, AF-117, AF-118, AF-119, AF-149, AF-150, AF-152, AF-154, AF-155, AF-156, AF-159, AF-160, AF-162, AF-163, AF-164, AF-169, AF-170, AF-172, AF-173, AF-174, AF-175, AF-176, AF-177, AF-178, AF-181, AF-183, AF-184, AF-186, AF-187,
- 20 AF-188, AF-189, AF-190, AF-191 in any suitable combination. A decreased abundance of one or more in any suitable combination of such AFs in the CSF from the subject relative to CSF from a subject or subjects free from Alzheimer's disease (*e.g.*, a control sample or a previously determined reference range) indicates the presence of Alzheimer's disease.
- 25 In another embodiment of the invention, CSF from a subject is analyzed by 2D electrophoresis for quantitative detection of one or more of the following AFs: AF-52, AF-53, AF-54, AF-55, AF-56, AF-57, AF-58, AF-59, AF-60, AF-61, AF-62, AF-63, AF-64, AF-65, AF-66, AF-67, AF-68, AF-69, AF-70, AF-71, AF-72, AF-73, AF-74, AF-75, AF-77, AF-121, AF-122, AF-123, AF-124, AF-125, AF-126, AF-127, AF-
- 30 128, AF-129, AF-130, AF-131, AF-132, AF-133, AF-134, AF-137, AF-139, AF-140, AF-141, AF-142, AF-143, AF-144, AF-145, AF-146, AF-147, AF-148, AF-151, AF-153, AF-157, AF-161, AF-165, AF-166, AF-167, AF-168, AF-171, AF-179, AF-180, AF-182, AF-185, AF-192. An increased abundance of said one or more in any suitable combination of such AFs in the CSF from the subject relative to CSF from a

WO 01/75454

PCT/US01/10908

subject or subjects free from Alzheimer's disease (*e.g.*, a control sample or a previously determined reference range) indicates the presence of Alzheimer's disease.

In yet another embodiment, CSF from a subject is analyzed by 2D electrophoresis for quantitative detection of (a) one or more AFs or any suitable combination of them, whose decreased abundance indicates the presence of Alzheimer's Disease, *i.e.*, AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6, AF-7, AF-8, AF-9, AF-10, AF-13, AF-14, AF-15, AF-16, AF-17, AF-18, AF-19, AF-20, AF-21, AF-22, AF-23, AF-24, AF-25, AF-26, AF-27, AF-28, AF-29, AF-30, AF-31, AF-32, AF-33, AF-34, AF-35, AF-36, AF-37, AF-38, AF-39, AF-40, AF-41, AF-42, AF-43, AF-44, AF-45, AF-46, AF-47, AF-48, AF-49, AF-50, AF-51, AF-76, AF-78, AF-79, AF-80, AF-81, AF-82, AF-83, AF-84, AF-85, AF-86, AF-87, AF-88, AF-89, AF-90, AF-91, AF-92, AF-93, AF-94, AF-95, AF-96, AF-98, AF-99, AF-100, AF-101, AF-102, AF-103, AF-104, AF-105, AF-107, AF-108, AF-110, AF-111, AF-112, AF-114, AF-115, AF-116, AF-117, AF-118, AF-119, AF-149, AF-150, AF-152, AF-154, AF-155, AF-156, AF-159, AF-160, AF-162, AF-163, AF-164, AF-169, AF-170, AF-172, AF-173, AF-174, AF-175, AF-176, AF-177, AF-178, AF-181, AF-183, AF-184, AF-186, AF-187, AF-188, AF-189, AF-190, AF-191 and (b) one or more AFs or any combination of them, whose increased abundance indicates the presence of Alzheimer's Disease *i.e.*, AF-52, AF-53, AF-54, AF-55, AF-56, AF-57, AF-58, AF-59, AF-60, AF-61, AF-62, AF-63, AF-64, AF-65, AF-66, AF-67, AF-68, AF-69, AF-70, AF-71, AF-72, AF-73, AF-74, AF-75, AF-77, AF-121, AF-122, AF-123, AF-124, AF-125, AF-126, AF-127, AF-128, AF-129, AF-130, AF-131, AF-132, AF-133, AF-134, AF-137, AF-139, AF-140, AF-141, AF-142, AF-143, AF-144, AF-145, AF-146, AF-147, AF-148, AF-151, AF-153, AF-157, AF-161, AF-165, AF-166, AF-167, AF-168, AF-171, AF-179, AF-180, AF-182, AF-185, AF-192.

In yet another embodiment of the invention, CSF from a subject is analyzed by 2D electrophoresis for quantitative detection of one or more of the following AFs: AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6, AF-7, AF-8, AF-9, AF-10, AF-13, AF-14, AF-15, AF-16, AF-17, AF-18, AF-19, AF-20, AF-21, AF-22, AF-23, AF-24, AF-25, AF-26, AF-27, AF-28, AF-29, AF-30, AF-31, AF-32, AF-33, AF-34, AF-35, AF-36, AF-37, AF-38, AF-39, AF-40, AF-41, AF-42, AF-43, AF-44, AF-45, AF-46, AF-47, AF-48, AF-49, AF-50, AF-51, AF-52, AF-53, AF-54, AF-55, AF-56, AF-57, AF-58, AF-59, AF-60, AF-61, AF-62, AF-63, AF-64, AF-65, AF-66, AF-67, AF-68, AF-69, AF-70, AF-71, AF-72, AF-73, AF-74, AF-75, AF-76, AF-77, AF-78, AF-79, AF-80, AF-

WO 01/75454

PCT/US01/0908

81, AF-82, AF-83, AF-84, AF-85, AF-86, AF-87, AF-88, AF-89, AF-90, AF-91, AF-92, AF-93, AF-94, AF-95, AF-96, AF-98, AF-99, AF-100, AF-101, AF-102, AF-103, AF-104, AF-105, AF-107, AF-108, AF-110, AF-111, AF-112, AF-114, AF-115, AF-116, AF-117, AF-118, AF-119, AF-121, AF-122, AF-123, AF-124, AF-125, AF-126, 5 AF-127, AF-128, AF-129, AF-130, AF-131, AF-132, AF-133, AF-134, AF-137, AF-139, AF-140, AF-141, AF-142, AF-143, AF-144, AF-145, AF-146, AF-147, AF-148, AF-149, AF-150, AF-151, AF-152, AF-153, AF-154, AF-155, AF-156, AF-157, AF-159, AF-160, AF-161, AF-162, AF-163, AF-164, AF-165, AF-166, AF-167, AF-168, AF-169, AF-170, AF-171, AF-172, AF-173, AF-174, AF-175, AF-176, AF-177, AF-10 178, AF-179, AF-180, AF-181, AF-182, AF-183, AF-184, AF-186, AF-187, AF-188, AF-189, AF-190, AF-191, AF-185, AF-192, wherein the ratio of the one or more AFs relative to an Expression Reference Feature (ERF) indicates that Alzheimer's disease is present. In a specific embodiment, a decrease in one or more AF/ERF ratios in a sample being tested relative to the AF/ERF ratios in a control sample or a reference 15 range indicates the presence of Alzheimer's disease; AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6, AF-7, AF-8, AF-9, AF-10, AF-13, AF-14, AF-15, AF-16, AF-17, AF-18, AF-19, AF-20, AF-21, AF-22, AF-23, AF-24, AF-25, AF-26, AF-27, AF-28, AF-29, AF-30, AF-31, AF-32, AF-33, AF-34, AF-35, AF-36, AF-37, AF-38, AF-39, AF-40, AF-41, AF-42, AF-43, AF-44, AF-45, AF-46, AF-47, AF-48, AF-49, AF-50, AF-51, AF-20 76, AF-78, AF-79, AF-80, AF-81, AF-82, AF-83, AF-84, AF-85, AF-86, AF-87, AF-88, AF-89, AF-90, AF-91, AF-92, AF-93, AF-94, AF-95, AF-96, AF-98, AF-99, AF-100, AF-101, AF-102, AF-103, AF-104, AF-105, AF-107, AF-108, AF-110, AF-111, AF-112, AF-114, AF-115, AF-116, AF-117, AF-118, AF-119, AF-149, AF-150, AF-152, AF-154, AF-155, AF-156, AF-159, AF-160, AF-162, AF-163, AF-164, AF-169, 25 AF-170, AF-172, AF-173, AF-174, AF-175, AF-176, AF-177, AF-178, AF-181, AF-183, AF-184, AF-186, AF-187, AF-188, AF-189, AF-190, AF-191 are suitable AFs for this purpose. In another specific embodiment, one may measure one or more AFs in a test sample, and compare them to an ERF, as a method for detecting the presence of Alzheimer's disease. Thus, an increase in one or more AF/ERF ratios in a test 30 sample relative to the AF/ERF ratios in a control sample or a reference range indicates the presence of Alzheimer's disease; AF-52, AF-53, AF-54, AF-55, AF-56, AF-57, AF-58, AF-59, AF-60, AF-61, AF-62, AF-63, AF-64, AF-65, AF-66, AF-67, AF-68, AF-69, AF-70, AF-71, AF-72, AF-73, AF-74, AF-75, AF-121, AF-122, AF-123, AF-124, AF-125, AF-126, AF-127, AF-128, AF-129, AF-130, AF-131, AF-132, AF-133,

WO 01/75454

PCT/US01/0908

AF-134, AF-137, AF-139, AF-140, AF-141, AF-142, AF-143, AF-144, AF-145, AF-146, AF-147, AF-148, AF-151, AF-153, AF-157, AF-161, AF-165, AF-166, AF-167, AF-168, AF-171, AF-179, AF-180, AF-182, AF-185, AF-192 are suitable AFs for this purpose.

- 5 In a further embodiment of the invention, CSF from a subject is analyzed by 2D electrophoresis for quantitative detection of (a) one or more AFs, or any suitable combination of them, whose decreased AF/ERF ratio(s) in a test sample relative to the AF/ERF ratio(s) in a control sample indicates the presence of Alzheimer's Disease, *i.e.*, AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6, AF-7, AF-8, AF-9, AF-10, AF-13, AF-14,
- 10 AF-15, AF-16, AF-17, AF-18, AF-19, AF-20, AF-21, AF-22, AF-23, AF-24, AF-25, AF-26, AF-27, AF-28, AF-29, AF-30, AF-31, AF-32, AF-33, AF-34, AF-35, AF-36, AF-37, AF-38, AF-39, AF-40, AF-41, AF-42, AF-43, AF-44, AF-45, AF-46, AF-47, AF-48, AF-49, AF-50, AF-51, AF-76, AF-77, AF-78, AF-79, AF-80, AF-81, AF-82, AF-83, AF-84, AF-85, AF-86, AF-87, AF-88, AF-89, AF-90, AF-91, AF-92, AF-93,
- 15 AF-94, AF-95, AF-96, AF-98, AF-99, AF-100, AF-101, AF-102, AF-103, AF-104, AF-105, AF-107, AF-108, AF-110, AF-111, AF-112, AF-114, AF-115, AF-116, AF-117, AF-118, AF-119, AF-149, AF-150, AF-152, AF-154, AF-155, AF-156, AF-159, AF-160, AF-162, AF-163, AF-164, AF-169, AF-170, AF-172, AF-173, AF-174, AF-175, AF-176, AF-177, AF-178, AF-181, AF-183, AF-184, AF-186, AF-187, AF-188,
- 20 AF-189, AF-190, AF-191; (b) one or more AFs, or any combination of them, whose increased AF/ERF ratio(s) in a test sample relative to the AF/ERF ratio(s) in a control sample indicates the presence of Alzheimer's Disease, *i.e.*, AF-52, AF-53, AF-54, AF-55, AF-56, AF-57, AF-58, AF-59, AF-60, AF-61, AF-62, AF-63, AF-64, AF-65, AF-66, AF-67, AF-68, AF-69, AF-70, AF-71, AF-72, AF-73, AF-74, AF-75, AF-77,
- 25 AF-121, AF-122, AF-123, AF-124, AF-125, AF-126, AF-127, AF-128, AF-129, AF-130, AF-131, AF-132, AF-133, AF-134, AF-137, AF-139, AF-140, AF-141, AF-142, AF-143, AF-144, AF-145, AF-146, AF-147, AF-148, AF-151, AF-153, AF-157, AF-161, AF-165, AF-166, AF-167, AF-168, AF-171, AF-179, AF-180, AF-182, AF-185, AF-192.
- 30 In a preferred embodiment, CSF from a subject is analyzed for quantitative detection of a plurality of AFs.

## 5.2 Alzheimer's Disease-Associated Protein Isoforms (APIs)

WO 01/75454

PCT/US01/10908

In another aspect of the invention, CSF from a subject, is analyzed for quantitative detection of one or more Alzheimer's Disease-Associated Protein Isoforms (APIs), *e.g.* for screening, treatment or diagnosis of Alzheimer's Disease or for development of pharmaceutical products. As is well known in the art, a given protein may be expressed as one or more variants forms (isoforms) that differ in amino acid composition (*e.g.* as a result of alternative mRNA or premRNA processing, *e.g.* alternative splicing or limited proteolysis) or as a result of differential post-translational modification (*e.g.*, glycosylation, phosphorylation, acylation), or both, so that proteins of identical amino acid sequence can differ in their pI, MW, or both. "Alzheimer's Disease -Associated Protein Isoform" refers to a protein isoform that is differentially present in CSF from a subject having Alzheimer's disease compared with CSF from a subject free from Alzheimer's disease.

Two groups of APIs are described herein by the amino acid sequencing of AFs. APIs were isolated, subjected to proteolysis, and analyzed by mass spectrometry using in this instance the methods and apparatus of the Preferred Technology, it being understood that the preferred technology is set forth as representative but not restrictive of the invention. One skilled in the art can identify sequence information from proteins analyzed by mass spectrometry and/or tandem mass spectrometry using various spectral interpretation methods and database searching tools. Examples of some of these methods and tools can be found at the Swiss Institute of Bioinformatics web site at <http://www.expasy.ch/>, and the European Molecular Biology Laboratory web site at [www.mann.embl-heidelberg.de/Services/PeptideSearch/](http://www.mann.embl-heidelberg.de/Services/PeptideSearch/). Identification of APIs was performed using the SEQUEST search program (Eng et al., 1994, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5:976-989) with uninterpreted tandem mass spectra of tryptic digest peptides as described in the Examples, *infra*.

The first group comprises of APIs that are decreased in the CSF of subjects having Alzheimer's disease as compared with the CSF of subjects free from Alzheimer's disease. The amino acid sequences of peptides produced from these APIs by proteolysis using trypsin and identified by tandem mass spectrometry and database searching using the SEQUEST program are listed in Table IV, in addition to their corresponding pIs and MWs. For one API, the partial sequence information derived from tandem mass spectrometry was not found to be described in any known public database. This API is listed as 'NOVEL' in Table IV, and the partial amino

WO 01/75454

PCT/US01/10908

acid sequence information derived from manually interpreting the MS/MS spectrum of tryptic peptides of this API as described in the Example *infra*, is given in Table IX.

Table IV. APIs Decreased in CSF of Subjects having Alzheimer's disease

AF#	API#	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	pI	MW(Da)
AF-1	API-47	EDYICYAR, GKPPPSFSWTR, QPEYAVVQR	4.79	150081
AF-1	API-242	IIMLFTDGGGER, FVVTDDGGITR	4.79	150081
AF-2	API-1	SGELEQEER, EEEEEMAVVPOGLFR	4.28	21349
AF-3	API-48	LVNIYDSMPLR, VIVWNNIGEK, YLELFQR	8.10	34846
AF-5	API-49	DCSGVSLHLTR	7.34	36554
AF-6	API-2	TEAYLEAIR	4.91	29812
AF-8	API-194	DGNPFYFDHR	4.93	187927
AF-9	API-3	AETYEGVYQCTAR	5.21	136768
AF-10	API-50	FWDYLR, GEVQAMLGQSTEELR KVEQAVETEPEPELR SELEEQLTPVAEETR	5.19	17694
AF-10	API-51	VNSDQGLVALR	5.19	17694
AF-13	API-4	HYDGSYSTFGER, VGFYESDVMGR, LPPNVVEESAR	6.01	184530
AF-14	API-52	ADLSGITGAR, EIGELYLPK	4.72	63166
AF-14	API-243	FEDGVLDPDYPR	4.72	63166
AF-15	API-53	ELDESLQVAER	4.47	38970
AF-15	API-244	TEVQLEHLR	4.47	38970
AF-16	API-54	EGPVLILGR	5.19	48876
AF-17	API-5	EPGEFALLR, TALASGGVLDASGDYR, YEAAVDPDR, VAMHLVCPDR	5.82	50294
AF-18	API-55	IVIGMDVAASEFYR, LGAEVYHTLK	4.87	49219
AF-18	API-245	VEQATQAIPIER	4.87	49219
AF-21	API-6	LSPYVNYSTR	5.40	141094

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF#	API#	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	pI	MW(Da)
		AETYESVYQCTAR, GKPPPSFSWTR, IDGDTIIFSNVQER		
AF-22	API-56	EGLDLQVLEDSGR, LICSELNQR, RTMRDQDTGK	4.93	133773
AF-22	API-57	YIFHFMER, SPEQQETVLDGNLIIR, NGIDIYSLTVDSR, ILDDLSPR	4.93	133773
AF-23	API-7	IPTTFENGR	4.50	32473
AF-23	API-8	EDEEEEGENYQK, GEAGAPGEEDIQGPVK, HLEEPGETQNAFLNER	4.50	32473
AF-24	API-9	EGPVLILGR, IVQFSPSGK, NNLVIFHR	5.31	46663
AF-25	API-10	ASSIIDELFQDR	5.68	36700
AF-26	API-14	TMLLQVAGSLGSYSYR, APEAQSVVQPNFQQDK	8.11	32305
AF-27	API-15	WLQGSQELPR	5.33	141371
AF-27	API-58	LSPYVNYSTR, AETYESVYQCTAR, GKPPPSFSWTR, IDGDTIIFSNVQER, NALGAIHHTISVIR	5.33	141371
AF-28	API-16	IALVITDGR	5.13	158568
AF-28	API-59	ALYLQYTDTEFR, QSEDSTFYLGER, GAYPLSIEPIGVR	5.13	158568
AF-29	API-196	LVGGPMDASVEEEGVR ALDFAVGEYVK	9.22	47059
AF-30	API-17	LAAAVSNFGYDLYR, TSLEDFYLDEER	5.67	48057
AF-31	API-60	YIETDPANR, AGALNSNDAFVLK, HVVVNEVVVQR	6.07	91258
AF-32	API-18	EPGEFALLR, TALASGGVLDASGDYR, VAMHLVCPNR	6.17	48958
AF-34	API-61	TGLEAISNPK, FFEEDPNK	4.54	145408

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF#	API#	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	pI	MW(Da)
AF-35	API-62	QQTEWQSGQR, SELEEQLTPVAEETR	5.21	18623
AF-37	API-19	DVIATDKEDVAFK, ENFSCLTR, FVEGLPINDFSR, EVGVYEALK	6.91	33523
AF-38	API-63	LSELIQPLPLER, LVHGGPCDK, EKPGVYTNVCR, YTNWVQK	6.47	29535
AF-39	API-64	CSVIFYGAPSK	7.50	35510
AF-39	API-65	LVNIYDSMPLR, YLELFQR	7.50	35510
AF-40	API-20	ITWSNPPAQQGAR, VGVQVSLGGTGALR, IGADFLAR, NFGLYNER, HIYLLPSGR	7.29	38617
AF-41	API-22	LEGEACGVYTPR	5.85	17345
AF-42	API-66	LIVHNGYCDGR	5.04	18662
AF-43	API-67	LGPLVEQGR, LEEQAQQR	9.83	14065
AF-43	API-68	LVGGPMDASVEEEGVR	9.83	14065
AF-44	API-69	EELLPAQDIK	6.63	102328
AF-44	API-70	GCPTTEGCGER, AASGTQNNVLR	6.63	102328
AF-45	API-23	ALYYDLISSPDHGTYS, ELDVTVPQK, LAAAVSNFGYDLYR, TSLEDFYLDEER	6.04	46998
AF-46	API-24	THPHFVIPPYR	4.71	19802
AF-46	API-197	QSLEASLAETEGR, YENEVALR	4.71	19802
AF-46	API-198	YEELQQTAGR	4.71	19802
AF-47	API-25	EPGEFALLR, TALASGGVLDASGDYR, YEAAVDPPR, VAMHLVCPSPR	5.99	49664
AF-48	API-71	YLELESSGHR, AFLFQESPR	5.32	122332
AF-49	API-26	GLVSWGNIPCGSK, EKPGVYTNVCR	6.94	27576

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF#	API#	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	pI	MW(Da)
		DSQQGDSGGPLVCGDHLR		
AF-49	API-27	TMLLQPAGSLGSYSYR	6.94	27576
AF-50	API-72	NVPLFVIAELPPK	6.82	71337
AF-50	API-73	CFEPQLLR, EQPPSLTR	6.82	71337
AF-50	API-199	YWNDCPPDSR, DSPVLIDFFEDTER, GEGTG YFVDFSVR	6.82	71337
AF-50	API-200	VYLFDFPEGK, CISYSSER	6.82	71337
AF-51	API-28	ASSIDELFQDR	5.70	34388
AF-51	API-30	SADTLWDIQK, LKDDEVAQLK, LIAPVAEEEEATVPNNK	5.70	34388
AF-76	API-86	EGPVLILGR, NNLIVFHR	5.59	45537
AF-79	API-201	LPPNVVEESAR	5.52	142378
AF-81	API-88	LVEGGGLVQPGGSLR	5.43	78299
AF-81	API-202	GEASVCVEDWESGDR, VSSQNIQDFPSVLR	5.43	78299
AF-82	API-89	LLEACTFHSAK, HSTVLENLPDK	6.69	74838
AF-83	API-90	DQYELLCR, QMDFELLCQNGAR, IECVSAENTEDCIAK, SPDFQLFSSSHGK, GSNFQWNQLQGGK, CGLVPVLAENYK, WCTISNQEANK, FDQFFGEGCAGGSQR, EPVDNAENCHLAR, WCAIGHEETQK, HSTVLENLPDK	6.81	71920
AF-84	API-91	DNPQTHYYAVAVVK, DQYELLCR, QMDFELLCQNGAR, VTCVAEELLK, WCTISNQEANK, EPVDNAENCHLAR, FDQFFGEGCAGGSQR, HSTVLENLPDK	6.94	73402
AF-85	API-92	IPIEDGSGEVLSR	7.10	73878

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF#	API#	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	pI	MW(Da)
AF-85	API-93	DQYELLCR, FDQFFGEGCAPGSQR, SPDFOLFSSSHGK, EPVDNAENCHLAR, CGLVPVLAENYK, HSTVLENLPDK	7.10	73878
AF-87	API-95	ECCHGDLLECADDR, IYEATLECCAK, LGEYGFQNALIVR, DVFLGTFLYEYSR, FQPLVDEPK	5.95	64179
AF-89	API-97	GYTQQLAFR, AGDFLEANYMNLQR	5.39	65155
AF-90	API-98	LPLEYSYGEYR	7.61	62945
AF-91	API-99	LFEELVR, DPVQEAWAEDVDLR, GIFPVLCR, GDYPLEAVR	8.16	56352
AF-100	API-101	LSCAEDYLSLVLNR, LGEYGFQNALIVR, YICENQDTISTK, CCTESLVNR, DVFLGTFLYEYSR, HPDYSVSLLLR	6.08	44068
AF-103	API-102	INHGILYDEEK, EIMENYNIALR, ITCTEEGWSPTFK	5.93	42722
AF-104	API-103	YVMLPVADQEK	5.09	42184
AF-105	API-104	GSPAINVAVHVFR	5.19	42184
AF-107	API-107	ITVVDALHEIPVK, DNLAIQTR	7.26	33226
AF-107	API-210	KLVVENVDVLTQMR	7.26	33226
AF-108	API-108	GYCAPMECVK, GTCEQGPSIVTPPK, AGAAAGPGVSGVCVCK	7.54	33136
AF-114	API-111 API-112	See Table IX	6.80	18741
AF-117	API-113	KVEQAVETEPEPELR, SELEEQLTPVAEETR	4.65	13983
AF-119	API-114	GTFATLSELHCDK, VVAGVANALAHK, LLVYYPWTQR	7.23	11699

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF#	API#	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	pI	MW(Da)
AF-149	API-214	VEEVKPLEGR	4.82	190721
AF-150	API-144	GPPGPPGGVVVR, VEVLAGDLR	6.87	157592
AF-152	API-146	FTFEYSR, FTDSENVQCER	5.04	81703
AF-152	API-147	VIALINDQR	5.04	81703
AF-152	API-148	TATSEYQTFNPR, ELLESYIDGR	5.04	81703
AF-154	API-150	QEDDLANINQWVK, LCQDLGPGAFR	5.03	67307
AF-154	API-151	DVVLTTTFVDDIK, AIEDYINEFSVR	5.03	67307
AF-154	API-152	WLQGSQELPR	5.03	67307
AF-155	API-215	LVGGPMDASVEEGR, ALDFAVGEYVK	9.21	64021
AF-156	API-153	DQDGEILLPR	4.36	58083
AF-159	API-158	TSLEDFYLDEER	5.08	52008
AF-159	API-159	EPGEFALLR, TALASGGVLDASGDYR	5.08	52008
AF-159	API-160	YYTVFDR, QVFGAETK	5.08	52008
AF-163	API-165	IPTTFENGR, CPNPPVQENFDVVK, NILTSNNIDVK, NPNLPPETVDSLK	4.45	34879
AF-163	API-166	GEAGAPGEEDIQGPTK	4.45	34879
AF-164	API-167	ELDES LQVAER, FMETVAEK, EILSVDCSTNNPSQAK	5.00	33485
AF-169	API-173	LGQYASPTAK, GSFEPVGDVASK, EELVYELNPLDHR	8.00	34362
AF-170	API-174	ELDES LQVAER	5.41	31886
AF-170	API-175	GSPAINVAHVHFR, AADDTWEPFASGK	5.41	31886
AF-170	API-176	SWFEPLVEDMQR, LGADMEDVCGR, LEEQAQQIR, SELEEQLTPVAEETR, AATVGLAGQPLQER	5.41	31886
AF-172	API-179	GPCWCVDR, HLDSVLQQLQTEVYR	6.71	28747

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF#	API#	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	pI	MW(Da)
AF-172	API-180	KPNLQVFLGK, GLVSWGNIPCGSK, EKPGVYTNVCR, DSCQGDGSGGPLVCGDHLR	6.71	28747
AF-173	API-181	SNLDEIIAEENIVSR, NEQVEIR	7.67	27476
AF-174	API-182	SVTEQGAELSNEER	4.67	27811
AF-175	API-183	APEAQVSVQPNFQQDK, TMLLQPAGSLGSYSYR, AQGFTEITIVFLPQTDK	5.33	24936
AF-176	API-184	TMLLQPAGSLGSYSYR, AQGFTEITIVFLPQTDK	4.86	22248
AF-178	API-185	LPFVINDGK	6.03	22247
AF-178	API-217	TMLLQPAGSLGSYSYR, AQGFTEITIVFLPQTDK, APEAQVSVQPNFQQDK	6.03	22247
AF-178	API-219	TQGFTEITIVFLPQTDK	6.03	22247
AF-181	API-187	HVGD LGNVTADK, GDGPVQGIINFEQK	5.72	16336
AF-183	API-189	LVGGPMDASVEEEGVR, ALDFAVGEYK	10.36	11160
AF-184	API-190	ELLDTVTAPQK, TSLEDFYLDEER	5.31	48769
AF-186	API-238	IPTTFENGR	4.71	29693
AF-187	API-239	QPEYAVVQR	4.83	154156
AF-190	API-240	ELDVLQGR, NNYMYAR	5.29	29663

- The second group comprises APIs that are increased in the CSF of subjects having Alzheimer's disease as compared with the CSF of subjects free from Alzheimer's disease. The amino acid sequences of peptides produced from these APIs by proteolysis using trypsin and identified by tandem mass spectrometry and database searching using the SEQUEST program are listed in Table V, in addition to their corresponding pIs and MWs.

10 Table V. APIs Increased In CSF of Subjects Having Alzheimer's Disease

AF#	API#	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	pI	MW (Da)
AF-52	API-74	GLQDEDGYR,	6.30	32573

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF#	API#	Amino Acid Sequences of Trypic Digest Peptides	pI	MW (Da)
		FACYYPK		
AF-53	API-33	AVMDDFAAFVEK, YICENQDSISSK	5.84	45302
AF-54	API-221	SELEEQLTPVAEETR	5.12	17520
AF-55	API-34	LVGGPMDASVEEEGVR, ALDFAVGEYK	8.10	12361
AF-56	API-75	NYGGLPGEYWLGNLK, IRPFFPQQ, LESDVSAQMEYCR, DNDGWLTSDPR	8.56	52128
AF-56	API-246	AGALNSNDAFVLK, TGAQELLR	8.56	52128
AF-57	API-35	MTLDDFR	6.30	68549
AF-57	API-76	VFLDCCNYITELR	6.30	68549
AF-57	API-222	QSLEASLAETEGR	6.30	68549
AF-58	API-77	KVEQAVETEPEPELR	5.01	14507
AF-59	API-36	TSLEDFYLDEER	6.74	33401
AF-60	API-37	GEVQAMLGQSTEELR, KVEQAVETEPEPELR, SELEEQLTPVAEETR	5.39	33873
AF-61	API-78	QELSEAEQATR, TIYTPGSTVLYR, IPIEDGSGEVLSR	6.76	54345
AF-62	API-38	GLQDEDGYR, ITQVLHFTK, FACYYPK	6.60	31004
AF-63	API-79	IWDVVEK, QPVPGQMTLK, EVDVADSVWVDVK, DSCVGSLLVVK	5.97	14897
AF-64	API-80	DFDFVPPVVR, SNLDEDIAEENIVSR, IPIEDGSGEVLSR	6.67	68119
AF-65	API-81	CLVNLIEK, FLCTGGVSPYADPNTCR	7.19	58620
AF-65	API-223	VGDTLNLLNR	7.19	58620
AF-66	API-82	VFLDCCNYITELR, FISLGEACK	10.05	30092
AF-66	API-83	LVGGPMDASVEEEGVR, ALDFAVGEYK	10.05	30092
AF-67	API-39	AADDTWEPFASGK	5.02	13735
AF-68	API-84	LISWYDNEFGYSNR	9.06	35351

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF#	API#	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	pI	MW (Da)
		VPTANVSVVLTGR,		
AF-68	API-95	ISYQSSSTEER	9.06	35351
AF-69	API-40	TQVNTQAEQLR, ALVQQMEQLR	5.01	48760
AF-69	API-247	VLSLAQEQVGGSPK, AEMADQAAWLTR, QGSFQGGFR	5.01	48760
AF-70	API-41	LVMGIPTFGR, EGDGSQFFDALDR, FSNTDYAVGYMLR, GNQWVGYDDQESVK, QHFTTLIK	8.91	38789
AF-70	API-224	DAIPEDLPPLTADFAEDK, YLYEIAIR	8.91	38789
AF-71	API-42	VFLDCCNYITELR, SNLDEDIAEENIVSR, GYTQQLAFR	6.44	68579
AF-72	API-43	IDQTVLEELR, TQVNTQAEQLR, ALVQQMEQLR, LEPYADQLR	5.00	43788
AF-73	API-44	AADDTWEPFASGK	5.21	31615
AF-74	API-45	GECQAEGLVFFQGDGDR, YYCFQGNQFLR	6.19	51934
AF-74	API-248	TIYTPGSTVLYR, TVMVNIENPEGIPVK	6.19	51934
AF-75	API-46	ELDESLQVAER, EILSVCSTNNPSQAK	5.03	33671
AF-75	API-225	LGPLVEQGR, AATVGLAGQQLQER	5.03	33671
AF-121	API-116	DNCCILDER, YEASILTHDSSIR, TSTADYAMFK, VAQLEAQCQEPCK, VELEDWNGR, YLQEIYNSNQK, RLDGSVDFK,	5.42	105108
AF-123	API-118	GLIDEVNDFTNR, ADSGEGDFLAEGGGVR	7.31	64933
AF-124	API-119	GLIDEVNDFTNR, ESSSHHPGIAEFPSSR	7.47	64736

WO 01/75454

PCT/US01/0908

AF#	API#	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	pI	MW (Da)
AF-125	API-120	SGNENGEFYLR	4.77	61297
AF-126	API-121	DQDGEILLPR, DCQPGLCCAFQR	4.11	60374
AF-126	API-122	DQDGEILLPR	4.11	60374
AF-127	API-123	SLDFTELDVAEEK, ALQDQLVLVAAK	4.98	58649
AF-128	API-124	LNMGITDLQGLR, VGDTLNLNLR	6.60	57865
AF-129	API-125	KLCMAALK, ELPEHTVK, THLPEVFLSK, HLSLITLTSNR, FEDCCQEK, LPEATPTELAK, VCSQYAYGEEK, YTFELSR, LCDNLSTK	5.29	54625
AF-129	API-126	SLDFTELDVAEEK, DPTFIPAPIQAK	5.29	54625
AF-130	API-127	LQSLFSDSPDFSK, LAAAVSNFGYDLYR, TSLEDFYLDEER	5.08	51880
AF-130	API-128	EPGEFALLR, TALASGGVLDASGDYR, VAMHLVCPFSR	5.08	51880
AF-132	API-130	DHAVDLIQK, TEQWSTLPPETK, VLSLAQEQVGGSPK, QGSFQGGFR, ADGSYAAWLSR, AEMADQASAWLTR	4.72	47414
AF-133	API-131	TQVNTQAEQLR, LEPYADQLR	5.12	44068
AF-134	API-132	LEPYADQLR	5.00	43516
AF-137	API-134	ELDESLSQVAER, KYNELLK	4.98	36855
AF-137	API-135	AQLGDLPWQVAIK, VFSLQWGEVK	4.98	36855
AF-137	API-232	LGPIEAIQK	4.98	36855
AF-137	API-233	LGPLVEQGR, LEEQAQQIR	4.98	36855
AF-137	API-234	KMEENEK	4.98	36855

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF#	API#	Amino Acid Sequences of Trypic Digest Peptides	pI	MW (Da)
AF-139	API-136	ELDESLOVAER, IDSLLENDR, EDALNRESETKLK, EILSVD CSTNNPSQAK, TLLSNLEEK	5.00	34295
AF-139	API-137	SELEEQLTPVAEETR, AATVGLAGQPLQER	5.00	34295
AF-140	API-138	GLQDEGGYR, FAQYYPR	6.80	32080
AF-141	API-139	LLEVPEGR, TNFDNDIALVR	7.50	28440
AF-142	API-140	SNLDEDIACENIVSR, VELLHNPFCSLATTK	6.75	27279
AF-142	API-141	LSELIQPLPLER,	6.75	27279
AF-143	API-142	LLIYWASTR, SGTASVVCLLNNFYPR,	7.44	26066
AF-144	API-143	EVDSGNDIYGNPIK, SDGSCAWYR	6.56	20744
AF-151	API-145	AETYEGVYQCTAR, GKPPPSFSWTR, IDGDTIIFSNVQER	5.28	137531
AF-153	API-149	LNMGITDLQGLR, VGDTLNLLNR	9.85	69630
AF-157	API-155	EPGEFALLR, TALASGGVLDASGDYR, YEAAVPDPR	4.99	55449
AF-161	API-161	IDQTVLEELR, TQVNTQAEQLR, SLAPYAQDTQEK, ALVQQMEQLR, LEPYADQLR, RVEPYGENFNK	5.18	44404
AF-161	API-162	TSLEDFYLDEER	5.18	44404
AF-161	API-163	AVFPSIVGR, SYELPDGQVITIGNER, AGFAGDDAPR, GYSFTTTAER, QEYDESGFSIVHR, VAPEEHPVLLTEAPLNPK	5.18	44404
AF-165	API-168	EELVYELNPLDHR, EPFLSCCQFAESLR	7.17	34230
AF-166	API-169	GLCVATPVQLR,	8.54	33657

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF#	API#	Amino Acid Sequences of Trypic Digest Peptides	pI	MW (Da)
		EELVYELNPLDHR		
AF-167	API-170	ASSIDELFQDR, TLLSNLEEK	5.69	33621
AF-167	API-171	GEVQAMLGQSTEELRLEEQ AQQIR, SELEEQLTPVAEETR	5.69	33621
AF-168	API-237	ALEESNYELEGK	7.66	33920
AF-168	API-172	GSFFFPVGDVSK, GLCVATPVQLR, EELVYELNPLDHR, EPFLSCCQFAESLR	7.66	33920
AF-171	API-177	TMLLQPAGSLGSYSYR, AQGFTEDTIVFLPQTDK	4.98	29658
AF-171	API-178	GSPAINVAVHVFR, AADDTWEPFASGK	4.98	29658
AF-179	API-186	LIVHNGYCDGR, QEELCLAR, FSGTWYAMAK	5.26	20115
AF-180	API-220	CSVFGAPSK, GLQDEDEGYR	6.17	16255
AF-182	API-188	AADDTWEPFASGK	4.89	13651
AF-185	API-191	VGYVSGWGR	5.32	40323
AF-185	API-192	SGNENGEFYLR, ADQVCINLR	5.32	40323

Those skilled in the art will understand, based upon the present description, that a given API can be described according to the data provided for that API in Table IV or V. The API is a protein comprising a peptide sequence described for that API (preferably comprising a plurality of, more preferably all of, the peptide sequences described for that API) and has a pI of about the value stated for that API (preferably within about 10%, more preferably within about 5% still more preferably within about 1% of the stated value) and has a MW of about the value stated for that API (preferably within about 10%, more preferably within about 5%, still more preferably within about 1% of the stated value).

In one embodiment, CSF from a subject is analyzed for quantitative detection of one or more of the following APIs: API-1, API-2, API-3, API-4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15, API-16, API-17, API-18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26, API-27, API-28, API-30, API-47,

WO 01/75454

PCT/US01/10908

API-48, API-49, API-50, API-51, API-52, API-53, API-54, API-55, API-56, API-57,  
 API-58, API-59, API-60, API-61, API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67,  
 API-68, API-69, API-70, API-71, API-72, API-73, API-86, API-88, API-89, API-90,  
 API-91, API-92, API-93, API-95, API-97, API-98, API-99, API-101, API-102, API-  
 5 103, API-104, API-107, API-108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-144,  
 API-146, API-147, API-148, API-150, API-151, API-152, API-153, API-158, API-  
 159, API-160, API-165, API-166, API-167, API-173, API-174, API-175, API-176,  
 API-179, API-180, API-181, API-182, API-183, API-184, API-185, API-187, API-  
 189, API-190, API-194, API-196, API-197, API-198, API-199, API-200, API-201,  
 10 API-202, API-210, API-214, API-215, API-217, API-219, API-238, API-239, API-  
 240, API-242, API-243, API-244, API-245 or any suitable combination of them,  
 wherein a decreased abundance of the API or APIs (or any suitable combination of  
 them) in the CSF from the subject relative to CSF from a subject or subjects free from  
 Alzheimer's disease (*e.g.*, a control sample or a previously determined reference  
 15 range) indicates the presence of Alzheimer's disease.

In another embodiment of the invention, CSF from a subject is analyzed for  
 quantitative detection of one or more of the following APIs: API-33, API-34, API-35,  
 API-36, API-37, API-38, API-39, API-40, API-41, API-42, API-43, API-44, API-45,  
 API-46, API-74, API-75, API-76, API-77, API-78, API-79, API-80, API-81, API-82,  
 20 API-83, API-84, API-85, API-116, API-118, API-119, API-120, API-121, API-122,  
 API-123, API-124, API-125, API-126, API-127, API-128, API-130, API-131, API-  
 132, API-134, API-135, API-136, API-137, API-138, API-139, API-140, API-141,  
 API-142, API-143, API-145, API-149, API-155, API-161, API-162, API-163, API-  
 168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-177, API-178, API-186, API-188,  
 25 API-191, API-192, API-220, API-221, API-222, API-223, API-224, API-225, API-  
 232, API-233, API-234, API-237, API-246, API-247, API-248, or any suitable  
 combination of them, wherein an increased abundance of the API or APIs (or any  
 suitable combination of them) in CSF from the subject relative to CSF from a subject  
 or subjects free from Alzheimer's disease (*e.g.*, a control sample or a previously  
 30 determined reference range) indicates the presence of Alzheimer's disease.

In a further embodiment, CSF from a subject is analyzed for quantitative  
 detection of (a) one or more APIs, or any suitable combination of them, whose  
 decreased abundance indicates the presence of Alzheimer's disease, *i.e.*, API-1, API-  
 2, API-3, API-4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15, API-

WO 01/75454

PCT/US01/10908

16, API-17, API-18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26, API-  
 27, API-28, API-30, API-47, API-48, API-49, API-50, API-51, API-52, API-53, API-  
 54, API-55, API-56, API-57, API-58, API-59, API-60, API-61, API-62, API-63, API-  
 64, API-65, API-66, API-67, API-68, API-69, API-70, API-71, API-72, API-73, API-  
 5 86, API-88, API-89, API-90, API-91, API-92, API-93, API-95, API-97, API-98, API-  
 99, API-101, API-102, API-103, API-104, API-107, API-108, API-111, API-112,  
 API-113, API-114, API-144, API-146, API-147, API-148, API-150, API-151, API-  
 152, API-153, API-158, API-159, API-160, API-165, API-166, API-167, API-173,  
 API-174, API-175, API-176, API-179, API-180, API-181, API-182, API-183, API-  
 10 184, API-185, API-187, API-189, API-190, API-194, API-196, API-197, API-198,  
 API-199, API-200, API-201, API-202, API-210, API-214, API-215, API-217, API-  
 219, API-238, API-239, API-240, API-242, API-243, API-244, API-245; and (b) one  
 or more APIs, or any suitable combination of them, whose increased abundance  
 indicates the presence of Alzheimer's disease, *i.e.*, API-33, API-34, API-35, API-36,  
 15 API-37, API-38, API-39, API-40, API-41, API-42, API-43, API-44, API-45, API-46,  
 API-74, API-75, API-76, API-77, API-78, API-79, API-80, API-81, API-82, API-83,  
 API-84, API-85, API-116, API-118, API-119, API-120, API-121, API-122, API-123,  
 API-124, API-125, API-126, API-127, API-128, API-130, API-131, API-132, API-  
 134, API-135, API-136, API-137, API-138, API-139, API-140, API-141, API-142,  
 20 API-143, API-145, API-149, API-155, API-161, API-162, API-163, API-168, API-  
 169, API-170, API-171, API-172, API-177, API-178, API-186, API-188, API-191,  
 API-192, API-220, API-221, API-222, API-223, API-224, API-225, API-232, API-  
 233, API-234, API-237, API-246, API-247, API-248.

In yet a further embodiment, CSF from a subject is analyzed for quantitative  
 25 detection of one or more APIs and one or more previously known biomarkers of  
 Alzheimer's disease (*e.g.*, tau, NTP, A $\beta$ 2). In accordance with this embodiment, the  
 abundance of each API and known biomarker relative to a control or reference range  
 indicates whether a subject has Alzheimer's disease.

Preferably, the abundance of an API is normalized to an Expression Reference  
 30 Protein Isoform (ERPI). ERPIs can be identified by partial amino acid sequence  
 characterization of ERFs, which are described above, and which may be  
 accomplished using *e.g.* the methods and apparatus of the Preferred Technology. The  
 partial amino acid sequences of an ERPI is presented in Table VI.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

Table VI

ERPI#	ERF#	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides
ERPI-1	ERF-2	ELLDTVTAPQK, LAAAVSNFGYDLYR, TSLEDFYLDEER, ALYYDLISSPDJHGTYK

As shown above, the APIs described herein include previously unknown proteins, as well as isoforms of known proteins where the isoforms were not previously known to be associated with Alzheimer's disease. For each API, the present invention additionally provides: (a) a preparation comprising the isolated API; (b) a preparation comprising one or more fragments of an API; and (c) antibodies that bind to said API, to said fragments, or both to said API and to said fragments. As used herein, an API is "isolated" when it is present in a preparation that is substantially free of other proteins, *i.e.*, a preparation in which less than 10% (particularly less than 5%, more particularly less than 1%) of the total protein present is contaminating protein(s). Another protein is a protein or protein isoform having a significantly different pI or MW from those of the isolated API, as determined by 2D electrophoresis. As used herein, a "significantly different" pI or MW is one that permits the other protein to be resolved from the API on 2D electrophoresis, performed according to the Reference Protocol.

In one embodiment, an isolated protein is provided, that comprises a peptide with the amino acid sequence identified in Table IV or V for an API, said protein having a pI and MW within 10% (particularly within 5%, more particularly within 1%) of the values identified in Table IV or V for that API.

The APIs of the invention can be qualitatively or quantitatively detected by any method known to those skilled in the art, including but not limited to the Preferred Technology described herein, kinase assays, enzyme assays, binding assays and other functional assays, immunoassays, and western blotting. In one embodiment, the APIs are separated on a 2-D gel by virtue of their MWs and pIs and are visualized by staining the gel. In one embodiment, the APIs are stained with a fluorescent dye and imaged with a fluorescence scanner. Sypro Red (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon) is a suitable dye for this purpose. A preferred fluorescent dye is Pyridinium, 4-[2-[4-(dipentylamino)-2-trifluoromethylphenyl]

WO 01/75454

PCT/US01/10908

ethenyl]-1-(sulfobutyl)-, inner salt. See U.S. Application No. 09/412,168, filed on October 5, 1999, which is incorporated herein by reference in its entirety.

Alternatively, APIs can be detected in an immunoassay. In one embodiment, an immunoassay is performed by contacting a sample with an anti-API antibody under conditions such that immunospecific binding can occur if the API is present, and detecting or measuring the amount of any immunospecific binding by the antibody. Anti-API antibodies can be produced by the methods and techniques described herein; examples of such antibodies known in the art are set forth in Table VII. These antibodies shown in Table VII are already known to bind to the protein of which the API is itself a family member. Particularly, the anti-API antibody preferentially binds to the API rather than to other isoforms of the same protein. In a particular embodiment, the anti-API antibody binds to the API with at least 2-fold greater affinity, more particularly at least 5-fold greater affinity, still more preferably at least 10-fold greater affinity, than to said other isoforms of the same protein.

APIs can be transferred from a gel to a suitable membrane (*e.g.* a PVDF membrane) and subsequently probed in suitable assays that include, without limitation, competitive and non-competitive assay systems using techniques such as western blots and "sandwich" immunoassays using anti-API antibodies as described herein, *e.g.*, the antibodies identified in Table VII, or others raised against the APIs of interest as those skilled in the art will appreciate based on the present description. The immunoblots can be used to identify those anti-API antibodies displaying the selectivity required to immuno-specifically differentiate an API from other isoforms encoded by the same gene.

25 Table VII. Known Antibodies That Recognize APIs or API-Related Polypeptides

Protein family of which API is a member	Antibody	Manufacturer	Cat. No.
API-1	Chromogranin A	BIODESIGN INTERNATIONAL	M54219M
API-3	ANTI-Human CD56 ANTIGEN (NEURAL CELL ADHESION MOLECULE)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CBL159
API-4	Gel	DAKO - 1998 CATALOGUE	A0033
API-5	ANTI-Human CD56 ANTIGEN (NEURAL CELL ADHESION MOLECULE)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CBL159

WO 01/75454

PCT/US01/10908

API-7	Apolipoprotein D, Clone: 38C6, Mab anti-Human, paraffin, IH/WB	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA457
API-10	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
API-15	Monoclonal mouse anti-human IgA1	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK1A2-2B5
API-16	Monoclonal anti Human Collagen Type VI	BIODESIGN INTERNATIONAL	M22080M
API-22	RABBIT anti-human INSULIN GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN 2	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-IGFBP2abr
API-28	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
API-30	Lactic Dehydrogenase (LDH) (H-subunit), Clone: HH-17, Mab anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BYA- 6019-1
API-33	Albumin, Human, Chicken anti-	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-026-02
API-34	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
API-37	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 6029
API-38	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-39	Transthyretin, Prealbuminm, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
API-40	Apolipoprotein A (HDL), Plasminogen absorbcd, Sheep anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	ACL- 20076A
API-42	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
API-43	Apolipoprotein A (HDL), Plasminogen absorbcd, Sheep anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	ACL- 20076A
API-44	Transthyretin, Prealbuminm, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
API-45	Hemopexin, Beta-1, Rabbit anti-Human, precipitating	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- R-HHPX
API-46	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
API-47	ANTI-Human CD56 ANTIGEN (NEURAL CELL ADHESION MOLECULE)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CBL169

WO 01/75454

PCT/US01/10908

API-50	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-52	Alpha-1-Antichymotrypsin, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 145/2
API-53	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
API-55	Monoclonal anti-Neuron Specific Enolase	BIODESIGN INTERNATIONAL	M37403M
API-58	ANTI-Human CD58 ANTIGEN (NEURAL CELL ADHESION MOLECULE)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-OBL169
API-60	Gelsolin, plasma + cytoplasmic, Sheep anti-	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210
API-62	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-64	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-66	Retinol Binding Protein, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 163/2
API-67	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-69	Complement Factor B, C3 proactivator, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 466/2
API-72	Gel	DAKO - 1998 CATALOGUE	AD475
API-74	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-75	Fibrinogen, Fibrin I, B-beta chain (B6 1-42) Clone: 18C6, Mab anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	NYB- 18C6
API-76	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
API-77	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-78	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
API-79	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
API-80	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02

WO 01/75454

PCT/US01/0908

API-81	Complement Factor B, C3 proactivator, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 466/2
API-82	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
API-84	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	BIODESIGN INTERNATIONAL	H86504M
API-80	Monoclonal mouse anti-lactoferrin	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK4L2-LF2B8
API-82	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
API-83	Monoclonal mouse anti-lactoferrin	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK4L2-LF2B8
API-95	Albumin, Human, Chicken anti-	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-026-02
API-97	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
API-98	C8 Complement, Goat anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BMD- G35
API-101	Albumin, Human, Chicken anti-	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-026-02
API-102	Factor H (Complement), Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-066-02
API-103	Goat anti-Haptoglobin	BIODESIGN INTERNATIONAL	L15320G
API-104	Transferrin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
API-113	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-118	Monoclonal anti-human Fibrinogen	BIODESIGN INTERNATIONAL	N77190M
API-119	Monoclonal anti-human Fibrinogen	BIODESIGN INTERNATIONAL	N77190M
API-123	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
API-124	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-126	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
API-130	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-131	Apolipoprotein A (HDL), Plasminogen absorbed, Sheep anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	ACL- 20076A

WO 01/75454

PCT/US01/10908

API-132	Apolipoprotein A (HDL), Plasminogen absorbed, Sheep anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	ACL- 20076A
API-134	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CLUSTRCabG
API-136	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CLUSTRCabG
API-137	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-138	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-140	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
API-142	Kappa Chain, Mab anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BMD- 021D
API-143	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 2 (TIMP2) (NO X w/TIMP1), Clone: 3A4, Mab anti-Human, paraffin, IH	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA498
API-145	ANTI-Human CD58 ANTIGEN (NEURAL CELL ADHESION MOLECULE)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CBL159
API-149	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-150	Sheep anti-Alpha 2 Antiplasmin	BIODESIGN INTERNATIONAL	K90038C
API-161	Apolipoprotein A (HDL), Plasminogen absorbed, Sheep anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	ACL- 20076A
API-166	Apolipoprotein D, Clone: 36C6, Mab anti-Human, paraffin, IH/WB	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA457
API-167	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CLUSTRCabG
API-168	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-169	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-170	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CLUSTRCabG
API-171	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-172	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02

WO 01/75454

PCT/US01/10908

API-173	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-174	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CLUSTRCabG
API-175	Transferrin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
API-176	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-178	Transferrin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
API-179	IGFBP6 (M-20)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 99/99	sc-6008
API-181	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
API-182	Rabbit anti-14-3-3B (Broadly Reactive)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-1433BNabr
API-186	Retinol Binding Protein, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 163/2
API-187	Anti-Superoxide Dismutase (Cu/Zn-SOD) IgG fraction (POLYCLONAL)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-SODabg
API-188	Transferrin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
API-189	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
API-191	Goat anti-Haptoglobin	BIODESIGN INTERNATIONAL	L16320G
API-194	ANTI-Human CD66 ANTIGEN (NEURAL CELL ADHESION MOLECULE)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CBL159
API-196	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
API-201	Gel	DAKO - 1998 CATALOGUE	A0033
API-215	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
API-220	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
API-221	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
API-223	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02

WO 01/75454

PCT/US01/10908

API-225	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM-5029
API-233	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM-5029
API-238	Apolipoprotein D, Clone: 3B06, Mab anti-Human, paraffin, IH/WB	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED-CL4457
API-239	ANTI-Human CD56 ANTIGEN (NEURAL CELL ADHESION MOLECULE)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CBL159

In one embodiment, binding of antibody in tissue sections can be used to detect API localization or the level of one or more APIs. In a specific embodiment, antibody to an API can be used to assay a tissue sample (*e.g.*, a brain biopsy) from a subject for the level of the API where a substantially changed level of API is indicative of Alzheimer's disease. As used herein, a "substantially changed level" means a level that is increased or decreased compared with the level in a subject free from Alzheimer's disease or a reference level. If desired, the comparison can be performed with a matched sample from the same subject, taken from a portion of the body not affected by Alzheimer's disease.

Any suitable immunoassay can be used to detect an API, including, without limitation, competitive and non-competitive assay systems using techniques such as western blots, radioimmunoassays, ELISAs (enzyme linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoprecipitation assays, precipitin reactions, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, agglutination assays, complement-fixation assays, immunoradiometric assays, fluorescent immunoassays and protein A immunoassays.

For example, an API can be detected in a fluid sample (*e.g.*, CSF, blood, urine, or tissue homogenate) by means of a two-step sandwich assay. In the first step, a capture reagent (*e.g.*, an anti-API antibody) is used to capture the API. Examples of such antibodies known in the art are set forth in Table VII. The capture reagent can optionally be immobilized on a solid phase. In the second step, a directly or indirectly labeled detection reagent is used to detect the captured API. In one embodiment, the detection reagent is a lectin. A lectin can be used for this purpose that preferentially binds to the API rather than to other isoforms that have the same core protein as the

WO 01/75454

PCT/US01/0908

API or to other proteins that share the antigenic determinant recognized by the antibody. In a preferred embodiment, the chosen lectin binds to the API with at least 2-fold greater affinity, more preferably at least 5-fold greater affinity, still more preferably at least 10-fold greater affinity, than to said other isoforms that have the same core protein as the API or to said other proteins that share the antigenic determinant recognized by the antibody. Based on the present description, a lectin that is suitable for detecting a given API can readily be identified by those skilled in the art using methods well known in the art, for instance upon testing one or more lectins enumerated in Table I on pages 158-159 of Sumar et al., *Lectins as Indicators of Disease-Associated Glycoforms*, In: Gabius H-J & Gabius S (eds.), 1993, *Lectins and Glycobiology*, at pp. 158-174 (which is incorporated herein by reference in its entirety). Lectins with the desired oligosaccharide specificity can be identified, for example, by their ability to detect the API in a 2D gel, in a replica of a 2D gel following transfer to a suitable solid substrate such as a nitrocellulose membrane, or in a two-step assay following capture by an antibody. In an alternative embodiment, the detection reagent is an antibody, e.g., an antibody that immunospecifically detects other post-translational modifications, such as an antibody that immunospecifically binds to phosphorylated amino acids. Examples of such antibodies include those that bind to phosphotyrosine (BD Transduction Laboratories, catalog nos.: P11230-050/P11230-150; P11120; P38820; P39020), those that bind to phosphoserine (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, catalog no. 61-8100) and those that bind to phosphothreonine (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, catalog nos. 71-8200, 13-9200).

If desired, a gene encoding an API, a related gene (e.g. a gene having sequence homology), or related nucleic acid sequences or subsequences, including complementary sequences, can also be used in hybridization assays. A nucleotide encoding an API, or subsequences thereof comprising at least 8 nucleotides, preferably at least 12 nucleotides, and most preferably at least 15 nucleotides can be used as a hybridization probe. Hybridization assays can be used for detection, treatment, diagnosis, or monitoring of conditions, disorders, or disease states, associated with aberrant expression of genes encoding APIs, or for differential diagnosis of subjects with signs or symptoms suggestive of Alzheimer's disease. In particular, such a hybridization assay can be carried out by a method comprising contacting a subject's sample containing nucleic acid with a nucleic acid probe

WO 01/75454

PCT/US01/10908

capable of hybridizing to a DNA or RNA that encodes an API, under conditions such that hybridization can occur, and detecting or measuring any resulting hybridization. Nucleotides can be used for therapy of subjects having Alzheimer's disease, as described below.

5           The invention also provides diagnostic kits, comprising an anti-API antibody. In addition, such a kit may optionally comprise one or more of the following: (1) instructions for using the anti-API antibody for diagnosis, prognosis, therapeutic monitoring or any suitable combination of these applications; (2) a labeled binding partner to the antibody; (3) a solid phase (such as a reagent strip) upon which the anti-  
10 API antibody is immobilized; and (4) a label or insert indicating regulatory approval for diagnostic, prognostic or therapeutic use or any suitable combination thereof. If no labeled binding partner to the antibody is provided, the anti-API antibody itself can be labeled with a detectable marker, *e.g.*, a chemiluminescent, enzymatic, fluorescent, or radioactive moiety.

15           The invention also provides a kit comprising a nucleic acid probe capable of hybridizing to RNA encoding an API. In a specific embodiment, a kit comprises in one or more containers a pair of primers (*e.g.*, each in the size range of 6-30 nucleotides, more preferably 10-30 nucleotides and still more preferably 10-20 nucleotides) that under appropriate reaction conditions can prime amplification of at  
20 least a portion of a nucleic acid encoding an API, such as by polymerase chain reaction (see, *e.g.*, Innis et al., 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CA), ligase chain reaction (see EP 320,308) use of Q $\beta$  replicase, cyclic probe reaction, or other methods known in the art.

Kits are also provided which allow for the detection of a plurality of APIs or a  
25 plurality of nucleic acids each encoding an API. A kit can optionally further comprise a predetermined amount of an isolated API protein or a nucleic acid encoding an API, *e.g.*, for use as a standard or control.

### 5.3 Statistical Techniques for Identifying APIs and API Clusters

30           Uni-variate differential analysis tools, such as fold changes, wilcoxon rank sum test and t-test, are useful in identifying individual AFs or APIs that are diagnostically associated with Alzheimer's disease or in identifying individual APIs that regulate the disease process. However, those skilled in the art will appreciate that the disease process is associated with a suitable combination of AFs or APIs (and to

WO 01/75454

PCT/US01/10908

be regulated by a suitable combination of APIs), rather than individual AFs and APIs in isolation. The strategies for discovering such suitable combinations of AFs and APIs differ from those for discovering individual AFs and APIs. In such cases, each individual AF and API can be regarded as one variable and the disease can be regarded as a joint, multi-variate effect caused by interaction of these variables.

The following steps can be used to identify markers from data produced by the Preferred Technology.

The first step is to identify a collection of AFs or APIs that individually show significant association with Alzheimer's disease. The association between the identified individual AFs or individual APIs and AD need not be as highly significant when a collection of AFs and APIs as is desirable when an individual AF or API is used as a diagnostic. Any of the tests discussed above (fold changes, wilcoxon rank sum test, etc.) can be used at this stage. Once a suitable collection of AFs or APIs has been identified, a sophisticated multi-variate analysis capable of identifying clusters can then be used to estimate the significant multivariate associations with Alzheimer's disease.

Linear Discriminant Analysis (LDA) is one such procedure, which can be used to detect significant association between a cluster of variables (*i.e.*, AFs or APIs) and Alzheimer's disease. In performing LDA, a set of weights is associated with each variable (*i.e.*, AF or API) so that the linear combination of weights and the measured values of the variables can identify the disease state by discriminating between subjects having Alzheimer's disease and subjects free from Alzheimer's disease. Enhancements to the LDA allow stepwise inclusion (or removal) of variables to optimize the discriminant power of the model. The result of the LDA is therefore a cluster of AFs or APIs which can be used for diagnosis, treatment or development of pharmaceutical products. Other enhanced variations of LDA, such as Flexible Discriminant Analysis permit the use of non-linear combinations of variables to discriminate a disease state from a state in which there is no disease. The results of the discriminant analysis can be verified by post-hoc tests and also by repeating the analysis using alternative techniques such as classification trees.

A further category of AFs or APIs can be identified by qualitative measures by comparing the percentage feature presence of an AF or API of one group of samples (*e.g.*, samples from diseased subjects) with the percentage feature presence of an AF or API in another group of samples (*e.g.*, samples from control subjects). The

WO 01/75454

PCT/US01/10908

"percentage feature presence" of an AF or API is the percentage of samples in a group of samples in which the AF or API is detectable by the detection method of choice. For example, if an AF is detectable in 95 percent of samples from diseased subjects, the percentage feature presence of that AF in that sample group is 95 percent. If only 5 percent of samples from non-diseased subjects have detectable levels of the same AF, detection of that AF in the sample of a subject would suggest that it is likely that the subject has Alzheimer's disease.

#### 5.4 Use in Clinical Studies

10 The diagnostic methods and compositions of the present invention can assist in monitoring a clinical study, *e.g.* to evaluate therapies for Alzheimer's disease. In one embodiment, chemical compounds are tested for their ability to restore AF or API levels in a subject having Alzheimer's disease to levels found in subjects free from Alzheimer's disease or, in a treated subject (*e.g.* after treatment with a cholinesterase inhibitor), to preserve AF or API levels at or near levels seen in subjects free from Alzheimer's disease. The levels of one or more AFs or APIs can be assayed.

15 In another embodiment, the methods and compositions of the present invention are used to screen individuals for entry into a clinical study to identify individuals having Alzheimer's disease; individuals already having Alzheimer's disease can then be excluded from the study or can be placed in a separate cohort for treatment or analysis. If desired, the candidates can concurrently be screened to identify individuals with Lewy Body disease and/or senile dementia or other known measured of Alzheimer's disease; procedures for these screens are well known in the art (Harding and Halliday, 1998, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 24:195-201).

25

#### 5.5 Purification of APIs

In particular aspects, the invention provides isolated mammalian APIs, preferably human APIs, and fragments thereof which comprise an antigenic determinant (*i.e.*, can be recognized by an antibody) or which are otherwise functionally active, as well as nucleic acid sequences encoding the foregoing. "Functionally active" as used herein refers to material displaying one or more functional activities associated with a full-length (wild-type) API, *e.g.*, binding to an API substrate or API binding partner, antigenicity (binding to an anti-API antibody), immunogenicity, enzymatic activity and the like.

30

WO 01/75454

PCT/US01/10908

In specific embodiments, the invention provides fragments of an API comprising at least 5 amino acids, at least 10 amino acids, at least 50 amino acids, or at least 75 amino acids. Fragments lacking some or all of the regions of an API are also provided, as are proteins (*e.g.*, fusion proteins) comprising such fragments.

5 Nucleic acids encoding the foregoing are provided.

Once a recombinant nucleic acid which encodes the API, a portion of the API, or a precursor of the API is identified, the gene product can be analyzed. This can be achieved by assays based on the physical or functional properties of the given product, including, for example, radioactive labeling of the product followed by

10 analysis by gel electrophoresis, immunoassay, etc.

The APIs identified herein can be isolated and purified by standard methods including chromatography (*e.g.*, ion exchange, affinity, and sizing column chromatography), centrifugation, differential solubility, or by any other standard technique for the purification of proteins.

15 Alternatively, once a recombinant nucleic acid that encodes the API is identified, the entire amino acid sequence of the API can be deduced from the nucleotide sequence of the gene coding region contained in the recombinant nucleic acid. As a result, the protein can be synthesized by standard chemical methods known in the art (*e.g.*, see Hunkapiller et al., 1984, Nature 310:105-111).

20 In another alternative embodiment, native APIs can be purified from natural sources, by standard methods such as those described above (*e.g.*, immunoaffinity purification).

In a preferred embodiment, APIs are isolated by the Preferred Technology described *supra*. For preparative-scale runs, a narrow-range "zoom gel" having a pH  
25 range of 2 pH units or less is preferred for the isoelectric step, according to the method described in Westemeier, 1993, Electrophoresis in Practice (VCH, Weinheim, Germany), pp. 197-209 (which is incorporated herein by reference in its entirety); this modification permits a larger quantity of a target protein to be loaded onto the gel, and thereby increases the quantity of isolated API that can be recovered  
30 from the gel. When used in this way for preparative-scale runs, the Preferred Technology typically provides up to 100 ng, and can provide up to 1000 ng, of an isolated API in a single run. Those of skill in the art will appreciate that a zoom gel can be used in any separation strategy which employs gel isoelectric focusing.

The invention thus provides an isolated API, an isolated API-related

WO 01/75454

PCT/US01/10908

polypeptide, and an isolated derivative or fragment of an API or an API-related polypeptide; any of the foregoing can be produced by recombinant DNA techniques or by chemical synthetic methods.

5           5.6    Isolation of DNA Encoding an API

Particular embodiments for the cloning of a gene encoding an API, are presented below by way of example and not of limitation.

10           The nucleotide sequences of the present invention, including DNA and RNA, and comprising a sequence encoding an API or a fragment thereof, or an API-related polypeptide, may be synthesized using methods known in the art, such as using conventional chemical approaches or polymerase chain reaction (PCR) amplification. The nucleotide sequences of the present invention also permit the identification and cloning of the gene encoding an API homolog or API ortholog including, for example, by screening cDNA libraries, genomic libraries or expression libraries.

15           For example, to clone a gene encoding an API by PCR techniques, anchored degenerate oligonucleotides (or a set of most likely oligonucleotides) can be designed for all API peptide fragments identified as part of the same protein. PCR reactions under a variety of conditions can be performed with relevant cDNA and genomic DNAs (*e.g.*, from brain tissue or from cells of the immune system) from one or more species. Also vectorette reactions can be performed on any available cDNA and genomic DNA using the oligonucleotides (which preferably are nested) as above. Vectorette PCR is a method that enables the amplification of specific DNA fragments in situations where the sequence of only one primer is known. Thus, it extends the application of PCR to stretches of DNA where the sequence information is only available at one end. (Arnold C, 1991, PCR Methods Appl. 1(1):39-42; Dyer KD, Biotechniques, 1995, 19(4):550-2). Vectorette PCR may be performed with probes that are, for example, anchored degenerate oligonucleotides (or most likely oligonucleotides) coding for API peptide fragments, using as a template a genomic library or cDNA library pools.

20           Anchored degenerate oligonucleotides (and most likely oligonucleotides) can be designed for all API peptide fragments. These oligonucleotides may be labelled and hybridized to filters containing cDNA and genomic DNA libraries. Oligonucleotides to different peptides from the same protein will often identify the same members of the library. The cDNA and genomic DNA libraries may be

WO 01/75454

PCT/US01/10908

obtained from any suitable or desired mammalian species, for example from humans.

Nucleotide sequences comprising a nucleotide sequence encoding an API or API fragment of the present invention are useful, for example, for their ability to hybridize selectively with complementary stretches of genes encoding other proteins.

5 Depending on the application, a variety of hybridization conditions may be employed to obtain nucleotide sequences at least about 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% or 99% identical, or 100% identical, to the sequence of a nucleotide encoding an API.

For a high degree of selectivity, relatively stringent conditions are used to  
10 form the duplexes, such as low salt or high temperature conditions. As used herein, "highly stringent conditions" means hybridization to filter-bound DNA in 0.5 M NaHPO<sub>4</sub>, 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA at 65°C, and washing in 0.1xSSC/0.1% SDS at 68°C (Ausubel F.M. et al., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley &  
15 Sons, Inc., New York, at p. 2.10.3; incorporated herein by reference in its entirety.) For some applications, less stringent conditions for duplex formation are required. As used herein "moderately stringent conditions" means washing in 0.2xSSC/0.1% SDS at 42°C (Ausubel et al., 1989, *supra*). Hybridization conditions can also be rendered  
20 more stringent by the addition of increasing amounts of formamide, to destabilize the hybrid duplex. Thus, particular hybridization conditions can be readily manipulated, and will generally be chosen depending on the desired results. In general, convenient hybridization temperatures in the presence of 50% formamide are: 42°C for a probe which is 95 to 100% identical to the fragment of a gene encoding an API, 37°C for 90 to 95% identity and 32°C for 70 to 90% identity.

25 In the preparation of genomic libraries, DNA fragments are generated, some of which will encode parts or the whole of an API. Any suitable method for preparing DNA fragments may be used in the present invention. For example, the DNA may be cleaved at specific sites using various restriction enzymes. Alternatively, one may use DNase in the presence of manganese to fragment the DNA, or the DNA can be  
30 physically sheared, as for example, by sonication. The DNA fragments can then be separated according to size by standard techniques, including but not limited to agarose and polyacrylamide gel electrophoresis, column chromatography and sucrose gradient centrifugation. The DNA fragments can then be inserted into suitable

WO 01/75454

PCT/US01/10908

vectors, including but not limited to plasmids, cosmids, bacteriophages lambda or T4, and yeast artificial chromosome (YAC). (See, e.g., Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D.M. (ed.), 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, II; Ausubel F.M. et al., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & sons, Inc., New York). The genomic library may be screened by nucleic acid hybridization to labeled probe (Benton and Davis, 1977, Science 196:180; Grunstein and Hogness, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3961).

10 Based on the present description, the genomic libraries may be screened with labeled degenerate oligonucleotide probes corresponding to the amino acid sequence of any peptide of the API using optimal approaches well known in the art. Any probe used is at least 10 nucleotides, at least 15 nucleotides, at least 20 nucleotides, at least 25 nucleotides, at least 30 nucleotides, at least 40 nucleotides, at least 50 nucleotides, 15 at least 60 nucleotides, at least 70 nucleotides, at least 80 nucleotides, or at least 100 nucleotides. Preferably a probe is 10 nucleotides or longer, and more preferably 15 nucleotides or longer.

In Tables IV and V above, some APIs disclosed herein correspond to isoforms of previously identified proteins encoded by genes whose sequences are publicly 20 known. To screen such a gene, any probe may be used that is complementary to the gene or its complement; preferably the probe is 10 nucleotides or longer, more preferably 15 nucleotides or longer. The SWISS-PROT and trEMBL databases (held by the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) and the European Bioinformatics Institute (EBI) which are available at <http://www.expasy.ch/>) and the GenBank 25 database (held by the National Institute of Health (NIH) which is available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) provide protein sequences comprising the amino acid sequences listed for the APIs in Tables IV and V under the following accession numbers and each sequence is incorporated herein by reference:

30 Table VIII. Nucleotide sequences encoding APIs, API Related Proteins, or ERPIs

AF#	API#	Accession Numbers of Identified Sequences
AF-1	API-47	O15179

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF-1	API-242	AAF03259
AF-2	API-1	P10645
AF-3	API-48	Q9UBQ6
AF-5	API-49	P19021
AF-6	API-2	P47868
AF-8	API-194	AAB60937
AF-9	API-3	O15179
AF-10	API-50	P02649
AF-10	API-51	P55290
AF-13	API-4	P01023
AF-14	API-52	P01011
AF-14	API-243	P04004
AF-15	API-53	P10909
AF-15	API-244	AAC50896
AF-16	API-54	P19021
AF-17	API-5	O43505
AF-18	API-55	P09104
AF-18	API-245	P51693
AF-21	API-6	O15179
AF-22	API-56	O94985
AF-22	API-57	AAD05198
AF-23	API-7	P05090
AF-23	API-8	P05060
AF-24	API-9	P19021
AF-25	API-10	P10909
AF-26	API-14	P41222
AF-27	API-15	P20758
AF-27	API-58	O15179
AF-28	API-16	Q04857

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF-28	API-59	P00450
AF-29	API-196	P01034
AF-30	API-17	P36955
AF-31	API-60	P06396
AF-32	API-18	O43505
AF-34	API-61	Q14800
AF-35	API-62	P02649
AF-37	API-19	P40925
AF-38	API-63	Q92876
AF-39	API-64	P01028
AF-39	API-65	Q9UBQ6
AF-40	API-20	P17174
AF-41	API-22	P18065
AF-42	API-66	P02753
AF-43	API-67	P02649
AF-43	API-68	P01034
AF-44	API-69	P00751
AF-44	API-70	P10643
AF-45	API-23	P36955
AF-46	API-24	P05067
AF-46	API-197	P13645
AF-46	API-198	P13647
AF-47	API-25	O43505
AF-48	API-71	Q99435
AF-49	API-26	Q92876
AF-49	API-27	P41222
AF-50	API-72	P01871
AF-50	API-73	P00748
AF-50	API-199	P04196

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF-50	API-200	AAC34741
AF-51	API-28	P10909
AF-51	API-30	P07195
AF-52	API-74	P01028
AF-53	API-33	P02768
AF-54	API-221	P02649
AF-55	API-34	P01034
AF-56	API-75	P02675
AF-56	API-246	P06396
AF-57	API-35	P35527
AF-57	API-76	P01024
AF-57	API-222	P13645
AF-58	API-77	P02649
AF-59	API-36	P36955
AF-60	API-37	P02649
AF-61	API-78	P01024
AF-62	API-38	P01028
AF-63	API-79	P01024
AF-64	API-80	P01024
AF-65	API-81	P00751
AF-65	API-223	P01028
AF-66	API-82	P01024
AF-66	API-83	P01034
AF-67	API-39	P02766
AF-68	API-84	P04406
AF-68	API-85	P04279
AF-69	API-40	P06727
AF-69	API-247	CAB89302
AF-70	API-41	P36222

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF-70	API-224	229552 (gb)
AF-71	API-42	P01024
AF-72	API-43	P06727
AF-73	API-44	P02766
AF-74	API-45	P02790
AF-74	API-248	P01024
AF-75	API-46	P10909
AF-75	API-225	P02649
AF-76	API-86	P19021
AF-79	API-201	P01023
AF-81	API-88	AAA52900
AF-81	API-202	AAC48775
AF-82	API-89	P09571
AF-83	API-90	P09571
AF-84	API-91	P09571
AF-85	API-92	P01024
AF-85	API-93	P09571
AF-87	API-95	P08835
AF-89	API-97	P01024
AF-90	API-98	P07358
AF-91	API-99	S64635
AF-100	API-101	P08835
AF-103	API-102	Q03591
AF-104	API-103	P06866
AF-105	API-104	P02766
AF-107	API-107	Q16270
AF-107	API-210	BAA25513
AF-108	API-108	O88812
AF-117	API-113	P02649

WO 01/75454

PCT/US01/0908

AF-119	API-114	P02023
AF-121	API-116	P04469
AF-123	API-118	P02671
AF-124	API-119	P02671
AF-125	API-120	Q12805
AF-126	API-121	O43532
AF-126	API-122	AAF02676
AF-127	API-123	P01019
AF-128	API-124	P01028
AF-129	API-125	P02774
AF-129	API-126	P01019
AF-130	API-127	P36955
AF-130	API-128	O43505
AF-132	API-130	P01028
AF-133	API-131	P06727
AF-134	API-132	P06727
AF-137	API-134	P10909
AF-137	API-135	P05156
AF-137	API-232	Q9Y6R4
AF-137	API-233	P02649
AF-137	API-234	P33176
AF-139	API-136	P10909
AF-139	API-137	P02649
AF-140	API-138	P01028
AF-141	API-139	P09871
AF-142	API-140	P01024
AF-142	API-141	Q92876
AF-143	API-142	751423A
AF-144	API-143	P16035

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF-149	API-214	AAB60937
AF-150	API-144	Q02246
AF-151	API-145	O15179
AF-152	API-146	P43652
AF-152	API-147	P51693
AF-152	API-148	P00734
AF-153	API-149	P01028
AF-154	API-150	P08697
AF-154	API-151	P02748
AF-154	API-162	P01877
AF-155	API-215	P01034
AF-156	API-153	AF177396
AF-157	API-155	O43505
AF-159	API-158	P36955
AF-159	API-159	O43505
AF-159	API-160	P07339
AF-161	API-161	P06727
AF-161	API-162	P36955
AF-161	API-163	P02570
AF-163	API-165	P05090
AF-163	API-166	P05060
AF-164	API-167	P10909
AF-165	API-168	P01028
AF-166	API-169	P01028
AF-167	API-170	P10909
AF-167	API-171	AAD02505
AF-168	API-237	P13645
AF-168	API-172	P01028
AF-169	API-173	P01028

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF-170	API-174	P10909
AF-170	API-175	P02766
AF-170	API-176	AAD02505
AF-171	API-177	P41222
AF-171	API-178	P02766
AF-172	API-179	P24592
AF-172	API-180	AAD51475
AF-173	API-181	P01024
AF-174	API-182	P29361
AF-175	API-183	P41222
AF-176	API-184	P41222
AF-178	API-185	P47971
AF-178	API-217	P41222
AF-178	API-219	Q29562
AF-179	API-186	P02753
AF-180	API-220	P01028
AF-181	API-187	P00441
AF-182	API-188	P02766
AF-183	API-189	P01034
AF-184	API-190	P36955
AF-185	API-191	P00737
AF-185	API-192	Q12805
AF-186	API-238	P05090
AF-187	API-239	O15179
AF-190	API-240	NP_055108 (gb)
AF-192	API-241	P19021
ERF-2	ERPI-1	P36955

When no nucleotide sequence is known that encodes a protein comprising an amino acid sequence of a given API, degenerate probes can be used for screening. In

WO 01/75454

PCT/US01/10908

Table IX, a degenerate set of probes is provided for API-111 and API-112. The partial amino acid sequences listed in Table IX were derived from manual interpretation of the tandem mass spectra of tryptic digest peptides of the API. In the method of tandem mass spectroscopy used for sequencing peptides in the present invention, the following pairs of amino acids could not be distinguished from each other: leucine and isoleucine; and, under certain circumstances, phenylalanine and oxidized methionine. As used herein, an amino acid sequence "as determined by mass spectrometry" refers to the set of amino acid sequences containing at the indicated positions, one or other member of the designated pairs of amino acids. For example, the amino acid sequence P[L/I]A indicates the amino acid sequences PLA and PIA. As will be obvious to one of skill in the art, a sequence containing n designated pairs indicates 2n amino acid sequences. In Table IX, each possible amino acid sequence is listed for each sequence determined by mass spectroscopy, and preferred and fully degenerate sets of probes for each possible amino acid sequence are provided.

Table IX. Amino Acid Sequences and Probes for APIs

API#	API#	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides as Determined by Mass Spectrometry				Preferred Probes	Degenerate Probes
		Mass of singly protonated peptide (Da)*	Partial sequence	N-terminal Mass (Da)*	C-terminal Mass (Da)*		
AF-114	API-111	1097.57	HQV	0	733.50	CACCAGGT G	CAYCARGT N
AF-114	API-112	1547.74	PGLGM	0	1076.63	CCCGGCCT GGCATG	CCNGGNYT NGGNATG
AF-114	API-112	1547.74	PGLGF	0	1076.63	CCCGGCCT GGCTTC	CCNGGNYT NGGNITY
AF-114	API-112	1547.74	PGIGM	0	1076.63	CCCGGCAT CGGCATG	CCNGGNAT HGGNATG
AF-114	API-112	1547.74	PGIGF	0	1076.63	CCCGGCAT CGCTTC	CCNGGNAT HGGNITY
AF-114	API-112	1547.74	GPLGM	0	1076.63	GGCCOCCT GGCATG	GGNCCNYT NGGNATG
AF-114	API-112	1547.74	GPLGF	0	1076.63	GGCCOCCT GGCTTC	GGNCCNYT NGGNITY
AF-114	API-112	1547.74	GPIGM	0	1076.63	GGCCCAT CGGCATG	GGNCCNAT HGGNATG
AF-114	API-112	1547.74	GPIGF	0	1076.63	GGCCCAT	GGNCCNAT

WO 01/75454

PCT/US01/10908

						CGGCTTC	HGGNTTY
--	--	--	--	--	--	---------	---------

\*The masses determined by mass spectrometry have an error of mass measurement of 100 parts-per-million (ppm) or less. For a given measured mass,  $M$ , having an error of mass measurement of  $z$  ppm, the error of mass measurement can be calculated as  $(M \times z \div 1000000)$ .

- 5 As used herein, the "mass of the singly protonated peptide" is the mass of the singly protonated tryptic digest peptide measured by mass spectrometry (having an error of measurement of approximately 100 parts-per-million or less) and corresponds to the total mass of the constituent amino acid residues of the peptide with the addition of a water molecule ( $H_2O$ ) and a single proton ( $H^+$ ). As used herein, an
- 10 "amino acid residue" refers to an amino acid residue of the general structure:  $-NH-CHR-CO-$  and which have the following symbols, elemental compositions and monoisotopic masses:

Amino acid residue elemental compositions and monoisotopic masses

Amino Acid	Symbol	Elemental Composition	Monoisotopic mass (Da)
Alanine	A	$C_3H_5NO$	71.037114
Arginine	R	$C_6H_{12}N_4O$	156.10111
Asparagine	N	$C_4H_6N_2O_2$	114.042927
Aspartic Acid	D	$C_4H_5NO_3$	115.026943
Carboxyamido Cysteine <sup>1</sup>	C	$C_2H_4N_2O_2S$	160.03065
Glutamic Acid	E	$C_5H_7NO_3$	129.042593
Glutamine	Q	$C_5H_8N_2O_2$	128.058577
Glycine	G	$C_2H_3NO$	57.021464
Histadine	H	$C_6H_7N_3O$	137.058912
Isoleucine	I	$C_6H_{11}NO$	113.084064
Leucine	L	$C_6H_{11}NO$	113.084064
Lysine	K	$C_6H_{12}N_2O$	128.094963
Methionine	M	$C_5H_9NOS$	131.040485
Oxidised Methionine	M*	$C_5H_9NO_2S$	147.035340
Phenylalanine	F	$C_9H_8NO$	147.068414
Proline	P	$C_5H_7NO$	97.052764
Serine	S	$C_3H_5NO_2$	87.032028
Threonine	T	$C_4H_7NO_2$	101.047678
Tryptophan	W	$C_{11}H_{10}N_2O$	186.079313
Tyrosine	Y	$C_9H_8NO_2$	163.063328
Valine	V	$C_5H_9NO$	99.068414

15 <sup>1</sup>All Cysteines are modified to the carboxyamido derivative during our production process.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

As used herein "tryptic digest peptides" are peptides produced through treatment of the protein with the enzyme trypsin. Trypsin cleaves specifically at the carboxyl side of lysine (Lys) and arginine (Arg) residues, so that the tryptic digest peptides generated should have a Lys or Arg as the C-terminal amino acid, unless the peptide fragment was obtained from the C-terminal of the protein. Similarly, the amino acid directly preceding the N-terminal amino acid of the tryptic digest peptides should also be a Lys or Arg, unless the peptide was obtained from the N-terminal of the protein. The mass of a tryptic digest peptide corresponds to the total mass of the constituent amino acid residues of the peptide with the addition of a water molecule (H<sub>2</sub>O). As used herein, the "partial sequence" is an amino acid sequence within the tryptic digest peptide determined from the interpretation of the tandem mass spectrum of the peptide. As used herein, the "N-terminal mass" is the mass measured by mass spectrometry (having an error of measurement of approximately 100 parts-per-million or less) of the portion of the tryptic digest peptide extending from the start of the partial sequence to the N-terminus of the peptide. This is a neutral mass corresponding to the total mass of the constituent amino acid residues extending from the partial sequence to the N-terminus of the peptide. As used herein, the "C-terminal mass" is the mass measured by mass spectrometry (having an error of measurement of approximately 100 parts-per-million or less) of the portion of the tryptic digest peptide extending from the end of the partial sequence to the C-terminus of the peptide. This mass corresponds to the total mass of the constituent amino acid residues extending from the end of the partial sequence to the C-terminus of the peptide with the addition of a water molecule (H<sub>2</sub>O), and a single proton (H<sup>+</sup>).

In Table IX, *supra*, the preferred and degenerate sets of probes are described using GCG Nucleotide Ambiguity Codes as employed in GCG SeqWeb™ sequence analysis software (SeqWeb™ version 1.1, part of Wisconsin Package Version 10, Genetics Computer Group, Inc.). These Nucleotide Ambiguity Codes have the following meaning:

30

<i>GCG Code</i>	<i>Meaning</i>
A	A
C	C
G	G
T	T
U	T

35

WO 01/75454

PCT/US01/10908

	M	A or C
	R	A or G
	W	A or T
5	S	C or G
	Y	C or T
	K	G or T
	V	A or C or G
	H	A or C or T
10	D	A or G or T
	B	C or G or T
	X	G or A or T or C
	N	G or A or T
		or C

15

GCG uses the letter codes for amino acid codes and nucleotide ambiguity proposed by IUPAC-IUB. These codes are compatible with the codes used by the EMBL, GenBank, and PIR databases. See IUPAC, Commission on Nomenclature of Organic Chemistry. A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds

20

(Recommendations 1993), Blackwell Scientific publications, 1993.

When a library is screened, clones with insert DNA encoding the API of interest or a fragment thereof will hybridize to one or more members of the corresponding set of degenerate oligonucleotide probes (or their complement).

Hybridization of such oligonucleotide probes to genomic libraries is carried out using

25

methods known in the art. For example, hybridization with one of the above-

mentioned degenerate sets of oligonucleotide probes, or their complement (or with

any member of such a set, or its complement) can be performed under highly stringent

or moderately stringent conditions as defined above, or can be carried out in 2X SSC,

1.0% SDS at 50°C and washed using the washing conditions described *supra* for

30

highly stringent or moderately stringent hybridization.

In yet another aspect of the invention, clones containing nucleotide sequences

encoding the entire API, a fragment of an API, an API-related polypeptide, or a

fragment of an API-related polypeptide or any of the foregoing may also be obtained

by screening expression libraries. For example, DNA from the relevant source is

35

isolated and random fragments are prepared and ligated into an expression vector

(*e.g.*, a bacteriophage, plasmid, phagemid or cosmid) such that the inserted sequence

in the vector is capable of being expressed by the host cell into which the vector is

then introduced. Various screening assays can then be used to select for the expressed

WO 01/75454

PCT/US01/10908

API or API-related polypeptides. In one embodiment, the various anti-API antibodies of the invention can be used to identify the desired clones using methods known in the art. See, for example, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Appendix IV.

5 Colonies or plaques from the library are brought into contact with the antibodies to identify those clones that bind antibody.

In an embodiment, colonies or plaques containing DNA that encodes an API, a fragment of an API, an API-related polypeptide, or a fragment of an API-related polypeptide can be detected using DYNA Beads according to Olsvick et al., 29th  
10 ICAAC, Houston, Tex. 1989, incorporated herein by reference. Anti-API antibodies are crosslinked to tosylated DYNA Beads M280, and these antibody-containing beads are then contacted with colonies or plaques expressing recombinant polypeptides. Colonies or plaques expressing an API or API-related polypeptide are identified as any of those that bind the beads.

15 Alternatively, the anti-API antibodies can be nonspecifically immobilized to a suitable support, such as silica or Celite® resin. This material is then used to adsorb to bacterial colonies expressing the API protein or API-related polypeptide as described herein.

In another aspect, PCR amplification may be used to isolate from  
20 genomic DNA a substantially pure DNA (*i.e.*, a DNA substantially free of contaminating nucleic acids) encoding the entire API or a part thereof. Preferably such a DNA is at least 95% pure, more preferably at least 99% pure. Oligonucleotide sequences, degenerate or otherwise, that correspond to peptide sequences of APIs disclosed herein can be used as primers.

25 PCR can be carried out, *e.g.*, by use of a Perkin-Elmer Cetus thermal cycler and Taq polymerase (Gene Amp® or AmpliTaq DNA polymerase). One can choose to synthesize several different degenerate primers, for use in the PCR reactions. It is also possible to vary the stringency of hybridization conditions used in priming the PCR reactions, to allow for greater or lesser degrees of nucleotide sequence similarity  
30 between the degenerate primers and the corresponding sequences in the DNA. After successful amplification of a segment of the sequence encoding an API, that segment may be molecularly cloned and sequenced, and utilized as a probe to isolate a complete genomic clone. This, in turn, will permit the determination of the gene's complete nucleotide sequence, the analysis of its expression, and the production of its

WO 01/75454

PCT/US01/10908

protein product for functional analysis, as described *infra*.

The gene encoding an API can also be identified by mRNA selection by nucleic acid hybridization followed by *in vitro* translation. In this procedure, fragments are used to isolate complementary mRNAs by hybridization. Such DNA  
5 fragments may represent available, purified DNA encoding an API of another species (*e.g.*, mouse, human). Immunoprecipitation analysis or functional assays (*e.g.*, aggregation ability *in vitro*; binding to receptor) of the *in vitro* translation products of the isolated products of the isolated mRNAs identifies the mRNA and, therefore, the  
10 complementary DNA fragments that contain the desired sequences. In addition, specific mRNAs may be selected by adsorption of polysomes isolated from cells to immobilized antibodies that specifically recognize an API. A radiolabelled cDNA encoding an API can be synthesized using the selected mRNA (from the adsorbed polysomes) as a template. The radiolabelled mRNA or cDNA may then be used as a  
15 probe to identify the DNA fragments encoding an API from among other genomic DNA fragments.

Alternatives to isolating genomic DNA encoding an API include, but are not limited to, chemically synthesizing the gene sequence itself from a known sequence or making cDNA to the mRNA which encodes the API. For example, RNA for  
20 cDNA cloning of the gene encoding an API can be isolated from cells which express the API. Those skilled in the art will understand from the present description that other methods may be used and are within the scope of the invention.

Any suitable eukaryotic cell can serve as the nucleic acid source for the molecular cloning of the gene encoding an API. The nucleic acid sequences encoding the API can be isolated from vertebrate, mammalian, primate, human, porcine,  
25 bovine, feline, avian, equine, canine or murine sources. The DNA may be obtained by standard procedures known in the art from cloned DNA (*e.g.*, a DNA "library"), by chemical synthesis, by cDNA cloning, or by the cloning of genomic DNA, or fragments thereof, purified from the desired cell. (See, *e.g.*, Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory  
30 Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D.M. (ed.), 1985, DNA Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, II.) Clones derived from genomic DNA may contain regulatory and intron DNA regions in addition to coding regions; clones derived from cDNA will contain only exon sequences.

The identified and isolated gene or cDNA can then be inserted into any

WO 01/75454

PCT/US01/10908

5 suitable cloning vector. A large number of vector-host systems known in the art may be used. As those skilled in the art will appreciate, the vector system chosen should be compatible with the host cell used. Such vectors include, but are not limited to, bacteriophages such as lambda derivatives, plasmids such as PBR322 or pUC plasmid  
10 derivatives or the Bluescript vector (Stratagene) or modified viruses such as adenoviruses, adeno-associated viruses or retroviruses. The insertion into a cloning vector can be accomplished, for example, by ligating the DNA fragment into a cloning vector which has complementary cohesive termini. However, if the complementary restriction sites used to fragment the DNA are not present in the  
15 cloning vector, the ends of the DNA molecules may be enzymatically modified. Alternatively, any site desired may be produced by ligating nucleotide sequences (linkers) onto the DNA termini; these ligated linkers may comprise specific chemically synthesized oligonucleotides encoding restriction endonuclease recognition sequences. In an alternative method, the cleaved vector and the gene  
20 encoding an API may be modified by homopolymeric tailing. Recombinant molecules can be introduced into host cells via transformation, transfection, infection, electroporation, etc., so that many copies of the gene sequence are generated.

In specific embodiments, transformation of host cells with recombinant DNA molecules that incorporate the isolated gene encoding the API, cDNA, or synthesized  
25 DNA sequence enables generation of multiple copies of the gene. Thus, the gene may be obtained in large quantities by growing transformants, isolating the recombinant DNA molecules from the transformants and, when necessary, retrieving the inserted gene from the isolated recombinant DNA.

The nucleotide sequences of the present invention include nucleotide  
30 sequences encoding amino acid sequences with substantially the same amino acid sequences as native APIs, nucleotide sequences encoding amino acid sequences with functionally equivalent amino acids, nucleotide sequences encoding APIs, a fragments of APIs, API-related polypeptides, or fragments of API-related polypeptides.

In a specific embodiment, an isolated nucleic acid molecule encoding an API-related polypeptide can be created by introducing one or more nucleotide  
substitutions, additions or deletions into the nucleotide sequence of an API such that one or more amino acid substitutions, additions or deletions are introduced into the encoded protein. Standard techniques known to those of skill in the art can be used to

WO 01/75454

PCT/US01/10908

introduce mutations, including, for example, site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Preferably, conservative amino acid substitutions are made at one or more predicted non-essential amino acid residues. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a side chain with a similar charge. Families of amino acid residues having side chains with similar charges have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (*e.g.*, lysine, arginine, histidine), acidic side chains (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (*e.g.*, glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (*e.g.*, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (*e.g.*, threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (*e.g.*, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Alternatively, mutations can be introduced randomly along all or part of the coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for biological activity to identify mutants that retain activity. Following mutagenesis, the encoded protein can be expressed and the activity of the protein can be determined.

#### 5.7 Expression of DNA Encoding APIs

The nucleotide sequence coding for an API, an API analog, an API-related peptide, or a fragment or other derivative of any of the foregoing, can be inserted into an appropriate expression vector, *i.e.*, a vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted protein-coding sequence. The necessary transcriptional and translational signals can also be supplied by the native gene encoding the API or its flanking regions, or the native gene encoding the API-related polypeptide or its flanking regions. A variety of host-vector systems may be utilized in the present invention to express the protein-coding sequence. These include but are not limited to mammalian cell systems infected with virus (*e.g.*, vaccinia virus, adenovirus, etc.); insect cell systems infected with virus (*e.g.*, baculovirus); microorganisms such as yeast containing yeast vectors; or bacteria transformed with bacteriophage, DNA, plasmid DNA, or cosmid DNA. The expression elements of vectors vary in their strengths and specificities. Depending on the host-vector system utilized, any one of a number of suitable transcription and translation elements may be used. In specific embodiments, a nucleotide sequence

WO 01/75454

PCT/US01/10908

encoding a human gene (or a nucleotide sequence encoding a functionally active portion of a human API) is expressed. In yet another embodiment, a fragment of an API comprising a domain of the API is expressed.

Any of the methods previously described for the insertion of DNA fragments into a vector may be used to construct expression vectors containing a chimeric gene consisting of appropriate transcriptional and translational control signals and the protein coding sequences. These methods may include *in vitro* recombinant DNA and synthetic techniques and *in vivo* recombinants (genetic recombination). Expression of nucleic acid sequence encoding an API or fragment thereof may be regulated by a second nucleic acid sequence so that the API or fragment is expressed in a host transformed with the recombinant DNA molecule. For example, expression of an API may be controlled by any promoter or enhancer element known in the art. Promoters which may be used to control the expression of the gene encoding an API or an API-related polypeptide include, but are not limited to, the SV40 early promoter region (Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310), the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787-797), the herpes thymidine kinase promoter (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445), the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42), the tetracycline (Tet) promoter (Gossen et al., 1995, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:5547-5551); prokaryotic expression vectors such as the  $\beta$ -lactamase promoter (Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731), or the tac promoter (DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25; see also "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242:74-94); plant expression vectors comprising the nopaline synthetase promoter region (Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213) or the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter (Gardner, et al., 1981, Nucl. Acids Res. 9:2871), and the promoter of the photosynthetic enzyme ribulose biphosphate carboxylase (Herrera-Estrella et al., 1984, Nature 310:115-120); promoter elements from yeast or other fungi such as the Gal 4 promoter, the ADC (alcohol dehydrogenase) promoter, PGK (phosphoglycerol kinase) promoter, alkaline phosphatase promoter, and the following animal transcriptional control regions, which exhibit tissue specificity and have been utilized in transgenic animals: elastase I gene control region which is active in pancreatic acinar cells (Swift et al., 1984, Cell

WO 01/75454

PCT/US01/10908

38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); insulin gene control region which is active in pancreatic beta cells (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122), immunoglobulin gene control region which is active in lymphoid cells (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell Biol. 7:1436-1444), mouse mammary tumor virus control region which is active in testicular, breast, lymphoid and mast cells (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495), albumin gene control region which is active in liver (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276), alpha-fetoprotein gene control region which is active in liver (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58; alpha I-antitrypsin gene control region which is active in the liver (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171), beta-globin gene control region which is active in myeloid cells (Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94; myelin basic protein gene control region which is active in oligodendrocyte cells in the brain (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); myosin light chain-2 gene control region which is active in skeletal muscle (Sani, 1985, Nature 314:283-286); neuronal-specific enolase (NSE) which is active in neuronal cells (Morelli et al., 1999, Gen. Virol. 80:571-83); brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene control region which is active in neuronal cells (Tabuchi et al., 1998, Biochem. Biophysic. Res. Com. 253:818-823); glial fibrillary acidic protein (GFAP) promoter which is active in astrocytes (Gomes et al., 1999, Braz J Med Biol Res 32(5):619-631; Morelli et al., 1999, Gen. Virol. 80:571-83) and gonadotropic releasing hormone gene control region which is active in the hypothalamus (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

25 In a specific embodiment, a vector is used that comprises a promoter operably linked to an API-encoding nucleic acid, one or more origins of replication, and, optionally, one or more selectable markers (*e.g.*, an antibiotic resistance gene).

In a specific embodiment, an expression construct is made by subcloning an API or an API-related polypeptide coding sequence into the EcoRI restriction site of each of the three pGEX vectors (Glutathione S-Transferase expression vectors; Smith and Johnson, 1988, Gene 7:31-40). This allows for the expression of the API product or API-related polypeptide from the subclone in the correct reading frame.

In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems may be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, the API coding

WO 01/75454

PCT/US01/10908

sequence or API-related polypeptide coding sequence may be ligated to an adenovirus transcription/translation control complex, *e.g.*, the late promoter and tripartite leader sequence. This chimeric gene may then be inserted in the adenovirus genome by *in vitro* or *in vivo* recombination. Insertion in a non-essential region of the viral genome  
5 (*e.g.*, region E1 or E3) will result in a recombinant virus that is viable and capable of expressing the antibody molecule in infected hosts. (*e.g.*, see Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359). Specific initiation signals may also be required for efficient translation of inserted antibody coding sequences. These signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. Furthermore, the initiation  
10 codon must be in phase with the reading frame of the desired coding sequence to ensure translation of the entire insert. These exogenous translational control signals and initiation codons can be of a variety of origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of appropriate transcription enhancer elements, transcription terminators, etc. (see Bittner et al.,  
15 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544).

Expression vectors containing inserts of a gene encoding an API or an API-related polypeptide can be identified, for example, by three general approaches: (a) nucleic acid hybridization, (b) presence or absence of "marker" gene functions, and (c) expression of inserted sequences. In the first approach, the presence of a gene  
20 encoding an API inserted in an expression vector can be detected by nucleic acid hybridization using probes comprising sequences that are homologous to an inserted gene encoding an API. In the second approach, the recombinant vector/host system can be identified and selected based upon the presence or absence of certain "marker" gene functions (*e.g.*, thymidine kinase activity, resistance to antibiotics,  
25 transformation phenotype, occlusion body formation in baculovirus, etc.) caused by the insertion of a gene encoding an API in the vector. For example, if the gene encoding the API is inserted within the marker gene sequence of the vector, recombinants containing the gene encoding the API insert can be identified by the absence of the marker gene function. In the third approach, recombinant expression  
30 vectors can be identified by assaying the gene product (*i.e.*, API) expressed by the recombinant. Such assays can be based, for example, on the physical or functional properties of the API in *in vitro* assay systems, *e.g.*, binding with anti-API antibody.

In addition, a host cell strain may be chosen which modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific

WO 01/75454

PCT/US01/10908

fashion desired. Expression from certain promoters can be elevated in the presence of certain inducers; thus, expression of the genetically engineered API or API-related polypeptide may be controlled. Furthermore, different host cells have characteristic and specific mechanisms for the translational and post-translational processing and modification (e.g., glycosylation, phosphorylation of proteins). Appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the desired modification and processing of the foreign protein expressed. For example, expression in a bacterial system will produce an unglycosylated product and expression in yeast will produce a glycosylated product. Eukaryotic host cells which possess the cellular machinery for proper processing of the primary transcript, glycosylation, and phosphorylation of the gene product may be used. Such mammalian host cells include but are not limited to CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, and in particular, neuronal cell lines such as, for example, SK-N-AS, SK-N-FI, SK-N-DZ human neuroblastomas (Sugimoto et al., 1984, *J. Natl. Cancer Inst.* 73: 51-57), SK-N-SH human neuroblastoma (*Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 704: 450-460), Daoy human cerebellar medulloblastoma (He et al., 1992, *Cancer Res.* 52: 1144-1148) DBTRG-05MG glioblastoma cells (Kruse et al., 1992, *In vitro Cell. Dev. Biol.* 28A: 609-614), IMR-32 human neuroblastoma (*Cancer Res.*, 1970, 30: 2110-2118), I321N1 human astrocytoma (*Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1977, 74: 4816), MOG-G-CCM human astrocytoma (*Br. J. Cancer*, 1984, 49: 269), U87MG human glioblastoma-astrocytoma (*Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1968, 74: 465-486), A172 human glioblastoma (Olopade et al., 1992, *Cancer Res.* 52: 2523-2529), C6 rat glioma cells (Benda et al., 1968, *Science* 161: 370-371), Neuro-2a mouse neuroblastoma (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1970, 65: 129-136), NB41A3 mouse neuroblastoma (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1962, 48: 1184-1190), SCP sheep choroid plexus (Bolin et al., 1994, *J. Virol. Methods* 48: 211-221), G355-5, PG-4 Cat normal astrocyte (Haapala et al., 1985, *J. Virol.* 53: 827-833), Mpf ferret brain (Trowbridge et al., 1982, *In vitro* 18: 952-960), and normal cell lines such as, for example, CTX TNA2 rat normal cortex brain (Radany et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6467-6471) such as, for example, CRL7030 and Hs578Bst. Furthermore, different vector/host expression systems may effect processing reactions to different extents.

For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is preferred. For example, cell lines which stably express the differentially expressed or pathway gene protein may be engineered. Rather than using expression

WO 01/75454

PCT/US01/10908

vectors which contain viral origins of replication, host cells can be transformed with DNA controlled by appropriate expression control elements (e.g., promoter, enhancer, sequences, transcription terminators, polyadenylation sites, etc.), and a selectable marker. Following the introduction of the foreign DNA, engineered cells may be  
5 allowed to grow for 1-2 days in an enriched medium, and then are switched to a selective medium. The selectable marker in the recombinant plasmid confers resistance to the selection and allows cells to stably integrate the plasmid into their chromosomes and grow to form foci which in turn can be cloned and expanded into cell lines. This method may advantageously be used to engineer cell lines which  
10 express the differentially expressed or pathway gene protein. Such engineered cell lines may be particularly useful in screening and evaluation of compounds that affect the endogenous activity of the differentially expressed or pathway gene protein.

A number of selection systems may be used, including but not limited to the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler, et al., 1977, Cell 11:223),  
15 hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026), and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy, et al., 1980, Cell 22:817) genes can be employed in tk-, hgprt- or aprt- cells, respectively. Also, antimetabolite resistance can be used as the basis of selection for dhfr, which confers resistance to methotrexate (Wigler, et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA  
20 77:3567; O'Hare, et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, which confers resistance to mycophenolic acid (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, which confers resistance to the aminoglycoside G-418 (Colberre-Garapin, et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1); and hygromycin (Santnerre, et al., 1984, Gene 30:147) genes.

In other embodiments, the API, fragment, analog, or derivative may be expressed as a fusion, or chimeric protein product (comprising the protein, fragment, analog, or derivative joined via a peptide bond to a heterologous protein sequence). For example, the polypeptides of the present invention may be fused with the constant domain of immunoglobulins (IgA, IgE, IgG, IgM), or portions thereof (CH1, CH2,  
30 CH3, or any combination thereof and portions thereof) resulting in chimeric polypeptides. Such fusion proteins may facilitate purification, increase half-life *in vivo*, and enhance the delivery of an antigen across an epithelial barrier to the immune system. An increase in the half-life *in vivo* and facilitated purification has been shown for chimeric proteins consisting of the first two domains of the human CD4-

WO 01/75454

PCT/US01/10908

polypeptide and various domains of the constant regions of the heavy or light chains of mammalian immunoglobulins. See, e.g., EP 394,827; Traunecker et al., Nature, 331:84-86 (1988). Enhanced delivery of an antigen across the epithelial barrier to the immune system has been demonstrated for antigens (e.g., insulin) conjugated to an FcRn binding partner such as IgG or Fc fragments (see, e.g., PCT publications WO 96/22024 and WO 99/04813).

Nucleic acids encoding an API, a fragment of an API, an API-related polypeptide, or a fragment of an API-related polypeptide can be fused to an epitope tag (e.g., the hemagglutinin ("HA") tag or flag tag) to aid in detection and purification of the expressed polypeptide. For example, a system described by Janknecht et al. allows for the ready purification of non-denatured fusion proteins expressed in human cell lines (Janknecht et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897).

An API fusion protein can be made by ligating the appropriate nucleic acid sequences encoding the desired amino acid sequences to each other by methods known in the art, in the proper coding frame, and expressing the chimeric product by methods commonly known in the art. Alternatively, an API fusion protein may be made by protein synthetic techniques, e.g., by use of a peptide synthesizer.

Both cDNA and genomic sequences can be cloned and expressed.

#### 5.8 Domain Structure of APIs

Domains of some of the APIs provided by the present invention are known in the art and have been described in the scientific literature. Moreover, domains of an API can be identified using techniques known to those of skill in the art. For example, one or more domains of an API can be identified by using one or more of the following programs: ProDom, TMpred, and SAPS. ProDom compares the amino acid sequence of a polypeptide to a database of compiled domains (see, e.g., <http://www.toulouse.inra.fr/prodom.html>; Corpet F., Gouzy J. & Kahn D., 1999, Nucleic Acids Res., 27:263-267). TMpred predicts membrane-spanning regions of a polypeptide and their orientation. This program uses an algorithm that is based on the statistical analysis of TMbase, a database of naturally occurring transmembrane proteins (see, e.g., [http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html); Hofmann & Stoffel. (1993) "TMbase - A database of membrane spanning proteins segments." Biol. Chem. Hoppe-Seyler 347,166). The SAPS program analyzes polypeptides for statistically significant features like charge-clusters, repeats,

WO 01/75454

PCT/US01/10908

hydrophobic regions, compositional domains (see, e.g., Brendel et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2002-2006). Thus, based on the present description, those skilled in the art can identify domains of an API having enzymatic or binding activity, and further can identify nucleotide sequences encoding such domains. These nucleotide sequences can then be used for recombinant expression of an API fragment that retains the enzymatic or binding activity of the API.

Based on the present description, those skilled in the art can identify domains of an API having enzymatic or binding activity, and further can identify nucleotide sequences encoding such domains. These nucleotide sequences can then be used for recombinant expression of API fragments that retain the enzymatic or binding activity of the API.

In one embodiment, an API has an amino acid sequence sufficiently similar to an identified domain of a known polypeptide. As used herein, the term "functionally similar" refers to a first amino acid or nucleotide sequence which contains a sufficient number of identical or equivalent (e.g., with a similar side chain) amino acid residues or nucleotides to a second amino acid or nucleotide sequence such that the first and second amino acid or nucleotide sequences have or encode a common structural domain or common functional activity or both.

An API domain can be assessed for its function using techniques well known to those of skill in the art. For example, a domain can be assessed for its kinase activity or for its ability to bind to DNA using techniques known to the skilled artisan. Kinase activity can be assessed, for example, by measuring the ability of a polypeptide to phosphorylate a substrate. DNA binding activity can be assessed, for example, by measuring the ability of a polypeptide to bind to a DNA binding element in an electrophoresis mobility shift assay. In a preferred embodiment, the function of a domain of an API is determined using an assay described in one or more of the references identified in Table IX, *infra*.

#### 5.9 Production of Antibodies to APIs

According to the invention an API, API analog, API-related protein or a fragment or derivative of any of the foregoing may be used as an immunogen to generate antibodies which immunospecifically bind such an immunogen. Such immunogens can be isolated by any convenient means, including the methods described above. Antibodies of the invention include, but are not limited to

WO 01/75454

PCT/US01/10908

polyclonal, monoclonal, bispecific, humanized or chimeric antibodies, single chain antibodies, Fab fragments and F(ab') fragments, fragments produced by a Fab expression library, anti-idiotypic (anti-Id) antibodies, and epitope-binding fragments of any of the above. The term "antibody" as used herein refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin molecules, *i.e.*, molecules that contain an antigen binding site that specifically binds an antigen. The immunoglobulin molecules of the invention can be of any class (*e.g.*, IgG, IgE, IgM, IgD and IgA.) or subclass of immunoglobulin molecule.

In one embodiment, antibodies that recognize gene products of genes encoding APIs may be prepared. For example, antibodies that recognize these APIs and/or their isoforms include antibodies recognizing API-1, API-3, API-4, API-6, API-7, API-10, API-15, API-16, API-22, API-28, API-30, API-33, API-34, API-37, API-38, API-39, API-40, API-42, API-43, API-44, API-45, API-46, API-47, API-50, API-52, API-53, API-55, API-58, API-60, API-62, API-64, API-66, API-67, API-69, API-72, API-74, API-75, API-76, API-77, API-78, API-79, API-80, API-81, API-82, API-84, API-90, API-92, API-93, API-95, API-97, API-98, API-101, API-102, API-103, API-104, API-113, API-118, API-119, API-123, API-124, API-126, API-130, API-131, API-132, API-134, API-136, API-137, API-138, API-140, API-142, API-143, API-145, API-149, API-150, API-161, API-165, API-167, API-168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-173, API-174, API-175, API-176, API-178, API-179, API-181, API-182, API-186, API-188, API-189, API-191, API-194, API-196, API-201, API-215, API-220, API-221, API-223, API-225, or API-233. Certain antibodies are already known and can be purchased from commercial sources as shown in Table VII above. In another embodiment, methods known to those skilled in the art are used to produce antibodies that recognize an API, an API analog, an API-related polypeptide, or a derivative or fragment of any of the foregoing.

In one embodiment of the invention, antibodies to a specific domain of an API are produced. In a specific embodiment, hydrophilic fragments of an API are used as immunogens for antibody production.

In the production of antibodies, screening for the desired antibody can be accomplished by techniques known in the art, *e.g.* ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). For example, to select antibodies which recognize a specific domain of an API, one may assay generated hybridomas for a product which binds to an API fragment containing such domain. For selection of an antibody that

WO 01/75454

PCT/US01/10908

specifically binds a first API homolog but which does not specifically bind to (or binds less avidly to) a second API homolog, one can select on the basis of positive binding to the first API homolog and a lack of binding to (or reduced binding to) the second API homolog. Similarly, for selection of an antibody that specifically binds  
5 an API but which does not specifically bind to (or binds less avidly to) a different isoform of the same protein (such as a different glycoform having the same core peptide as the API), one can select on the basis of positive binding to the API and a lack of binding to (or reduced binding to) the different isoform (*e.g.*, a different glycoform). Thus, the present invention provides an antibody (particularly a  
10 monoclonal antibody) that binds with greater affinity (particularly at least 2-fold, more particularly at least 5-fold still more particularly at least 10-fold greater affinity) to an API than to a different isoform or isoforms (*e.g.*, glycoforms) of the API.

Polyclonal antibodies which may be used in the methods of the invention are heterogeneous populations of antibody molecules derived from the sera of immunized  
15 animals. Unfractionated immune serum can also be used. Various procedures known in the art may be used for the production of polyclonal antibodies to an API, a fragment of an API, an API-related polypeptide, or a fragment of an API-related polypeptide. In a particular embodiment, rabbit polyclonal antibodies to an epitope of  
20 an API or an API-related polypeptide can be obtained. For example, for the production of polyclonal or monoclonal antibodies, various host animals can be immunized by injection with the native or a synthetic (*e.g.*, recombinant) version of an API, a fragment of an API, an API-related polypeptide, or a fragment of an API-related polypeptide, including but not limited to rabbits, mice, rats, etc. Isolated APIs  
25 suitable for such immunization may be obtained by the use of discovery techniques, such as the preferred technology described herein. If the API is purified by gel electrophoresis, the API can be used for immunization with or without prior extraction from the polyacrylamide gel. Various adjuvants may be used to enhance the immunological response, depending on the host species, including, but not limited  
30 to, complete or incomplete Freund's adjuvant, a mineral gel such as aluminum hydroxide, surface active substance such as lysolecithin, pluronic polyol, a polyanion, a peptide, an oil emulsion, keyhole limpet hemocyanin, dinitrophenol, and an adjuvant such as BCG (*bacille Calmette-Guerin*) or *corynebacterium parvum*. Additional adjuvants are also well known in the art.

For preparation of monoclonal antibodies (mAbs) directed toward an API, a

WO 01/75454

PCT/US01/10908

fragment of an API, an API-related polypeptide, or a fragment of an API-related polypeptide, any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture may be used. For example, the hybridoma technique originally developed by Kohler and Milstein (1975, Nature 256:495-497),  
5 as well as the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72), and the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (Cole et al., 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Such antibodies may be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, IgD and any subclass thereof.  
10 The hybridoma producing the mAbs of the invention may be cultivated *in vitro* or *in vivo*. In an additional embodiment of the invention, monoclonal antibodies can be produced in germ-free animals utilizing known technology (PCT/US90/02545, incorporated herein by reference).

The monoclonal antibodies include but are not limited to human monoclonal  
15 antibodies and chimeric monoclonal antibodies (e.g., human-mouse chimeras). Humanized antibodies are antibody molecules from non-human species having one or more complementarily determining regions (CDRs) from the non-human species and a framework region from a human immunoglobulin molecule. (See, e.g., Queen, U.S. Patent No. 5,585,089, which is incorporated herein by reference in its entirety.)

20 Chimeric and humanized monoclonal antibodies can be produced by recombinant DNA techniques known in the art, for example using methods described in PCT Publication No. WO 87/02671; European Patent Application 184,187; European Patent Application 171,496; European Patent Application 173,494; PCT Publication No. WO 86/01533; U.S. Patent No. 4,816,567; European Patent  
25 Application 125,023; Better et al., 1988, Science 240:1041-1043; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Canc. Res. 47:999-1005; Wood et al., 1985, Nature 314:446-449; and Shaw et al., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison, 1985, Science 229:1202-  
30 1207; Oi et al., 1986, Bio/Techniques 4:214; U.S. Patent 5,225,539; Jones et al., 1986, Nature 321:552-525; Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534; and Beidler et al., 1988, J. Immunol. 141:4053-4060.

Completely human antibodies (antibodies derived solely from human antigenic material) are particularly desirable for therapeutic treatment of human

WO 01/75454

PCT/US01/10908

subjects. Such antibodies can be produced using transgenic mice which are incapable of expressing endogenous immunoglobulin heavy and light chains genes, but which can express human heavy and light chain genes. The transgenic mice are immunized in the normal fashion with selected antigens, *e.g.*, all or a portion of an API of the invention. Monoclonal antibodies directed against the antigen can be obtained using conventional hybridoma technology. The human immunoglobulin transgenes harbored by the transgenic mice rearrange during B cell differentiation, and subsequently undergo class switching and somatic mutation. Thus, using such a technique, it is possible to produce therapeutically useful IgG, IgA, IgM and IgE antibodies. For an overview of this technology for producing human antibodies, see Lonberg and Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). For a detailed discussion of this technology for producing human antibodies and human monoclonal antibodies and protocols for producing such antibodies, see, *e.g.*, U.S. Patent 5,625,126; U.S. Patent 5,633,425; U.S. Patent 5,569,825; U.S. Patent 5,661,016; and U.S. Patent 5,545,806. In addition, companies such as Abgenix, Inc. (Freemont, CA) and Genpharm (San Jose, CA) can be engaged to provide human antibodies directed against a selected antigen using technology similar to that described above.

Completely human antibodies which recognize a selected epitope can be generated using a technique referred to as "guided selection." In this approach a selected non-human monoclonal antibody, *e.g.*, a mouse antibody, is used to guide the selection of a completely human antibody recognizing the same epitope. (Jespers et al. (1994) *Biotechnology* 12:899-903).

The antibodies of the present invention can also be generated using various phage display methods known in the art. In phage display methods, functional antibody domains are displayed on the surface of phage particles which carry the polynucleotide sequences encoding them. In a particular, such phage can be utilized to display antigen binding domains expressed from a repertoire or combinatorial antibody library (*e.g.*, human or murine). Phage expressing an antigen binding domain that binds the antigen of interest can be selected or identified with antigen, *e.g.*, using labeled antigen or antigen bound or captured to a solid surface or bead. Phage used in these methods are typically filamentous phage including fd and M13 binding domains expressed from phage with Fab, Fv or disulfide stabilized Fv antibody domains recombinantly fused to either the phage gene III or gene VIII protein. Phage display methods that can be used to make the antibodies of the present

WO 01/75454

PCT/US01/10908

invention include those disclosed in Brinkman et al., *J. Immunol. Methods* 182:41-50 (1995); Arnes et al., *J. Immunol. Methods* 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic et al., *Gene* 187 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994); PCT Application No.

5 PCT/GB91/01134; PCT Publications WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; and U.S. Patent Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 and 5,969,108; each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

10 As described in the above references, after phage selection, the antibody coding regions from the phage can be isolated and used to generate whole antibodies, including human antibodies, or any other desired antigen binding fragment, and expressed in any desired host, including mammalian cells, insect cells, plant cells, yeast, and bacteria, *e.g.*, as described in detail below. For example, techniques to  
15 recombinantly produce Fab, Fab' and F(ab')<sub>2</sub> fragments can also be employed using methods known in the art such as those disclosed in PCT publication WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992); and Sawai et al., *AJRI* 34:26-34 (1995); and Better et al., *Science* 240:1041-1043 (1988) (said references incorporated by reference in their entireties).

20 Examples of suitable techniques which can be used to produce single-chain Fvs and antibodies against APIs of the present invention include those described in U.S. Patents 4,946,778 and 5,258,498; Huston et al., *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu et al., *PNAS* 90:7995-7999 (1993); and Skerra et al., *Science* 240:1038-1040 (1988).

25 The invention further provides for the use of bispecific antibodies, which can be made by methods known in the art. Traditional production of full length bispecific antibodies is based on the coexpression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, where the two chains have different specificities (Milstein et al., 1983, *Nature* 305:537-539). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy  
30 and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of 10 different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. Purification of the correct molecule, which is usually done by affinity chromatography steps, is rather cumbersome, and the product yields are low. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829, published 13 May 1993, and in Traunecker

WO 01/75454

PCT/US01/10908

et al., 1991, EMBO J. 10:3655-3659 .

According to a different and more preferred approach, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light chain binding, present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance.

In a preferred embodiment of this approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. It was found that this asymmetric structure facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations, as the presence of an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule provides for a facile way of separation. This approach is disclosed in WO 94/04690 published March 3, 1994. For further details for generating bispecific antibodies see, for example, Suresh et al., Methods in Enzymology, 1986, 121:210.

The invention provides functionally active fragments, derivatives or analogs of the anti-API immunoglobulin molecules. Functionally active means that the fragment, derivative or analog is able to elicit anti-anti-idiotypic antibodies (*i.e.*, tertiary antibodies) that recognize the same antigen that is recognized by the antibody from which the fragment, derivative or analog is derived. Specifically, in a preferred embodiment the antigenicity of the idiotype of the immunoglobulin molecule may be enhanced by deletion of framework and CDR sequences that are C-terminal to the CDR sequence that specifically recognizes the antigen. To determine which CDR

WO 01/75454

PCT/US01/10908

sequences bind the antigen, synthetic peptides containing the CDR sequences can be used in binding assays with the antigen by any suitable binding assay known in the art.

The present invention provides antibody fragments such as, but not limited to, 5 F(ab')<sub>2</sub> fragments and Fab fragments. Antibody fragments which recognize specific epitopes may be generated by known techniques. F(ab')<sub>2</sub> fragments consist of the variable region, the light chain constant region and the CH1 domain of the heavy chain and are generated by pepsin digestion of the antibody molecule. Fab fragments are generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')<sub>2</sub> fragments. The 10 invention also provides heavy chain and light chain dimers of the antibodies of the invention, or any minimal fragment thereof such as Fvs or single chain antibodies (SCAs) (*e.g.*, as described in U.S. Patent 4,946,778; Bird, 1988, Science 242:423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; and Ward et al., 1989, Nature 334:544-54), or any other molecule with the same specificity as the antibody 15 of the invention. Single chain antibodies are formed by linking the heavy and light chain fragments of the Fv region via an amino acid bridge, resulting in a single chain polypeptide. Techniques for the assembly of functional Fv fragments in *E. coli* may be used (Skerra et al., 1988, Science 242:1038-1041).

In other embodiments, the invention provides fusion proteins of the 20 immunoglobulins of the invention (or functionally active fragments thereof), for example in which the immunoglobulin is fused via a covalent bond (*e.g.*, a peptide bond), at either the N-terminus or the C-terminus to an amino acid sequence of another protein (or portion thereof, preferably at least 10, 20 or 50 amino acid portion of the protein) that is not the immunoglobulin. Preferably the immunoglobulin, or 25 fragment thereof, is covalently linked to the other protein at the N-terminus of the constant domain. As stated above, such fusion proteins may facilitate purification, increase half-life *in vivo*, and enhance the delivery of an antigen across an epithelial barrier to the immune system.

The immunoglobulins of the invention include analogs and derivatives that are 30 either modified, *i.e.*, by the covalent attachment of any type of molecule as long as such covalent attachment that does not impair immunospecific binding. For example, but not by way of limitation, the derivatives and analogs of the immunoglobulins include those that have been further modified, *e.g.*, by glycosylation, acetylation, pegylation, phosphorylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking

WO 01/75454

PCT/US01/10908

groups, proteolytic cleavage, linkage to a cellular ligand or other protein, etc. Any of numerous chemical modifications may be carried out by known techniques, including, but not limited to specific chemical cleavage, acetylation, formylation, etc.

5 Additionally, the analog or derivative may contain one or more non-classical or unnatural amino acids.

The foregoing antibodies can be used in methods known in the art relating to the localization and activity of the APIs of the invention, *e.g.*, for imaging these proteins, measuring levels thereof in appropriate physiological samples, in diagnostic methods, etc.

10

#### 5.10 Expression Of Antibodies

The antibodies of the invention can be produced by any suitable method known in the art for the synthesis of antibodies, in particular, by chemical synthesis or by recombinant expression, and are preferably produced by recombinant expression techniques.

15

Recombinant expression of antibodies, or fragments, derivatives or analogs thereof, requires construction of a nucleic acid that encodes the antibody. If the nucleotide sequence of the antibody is known, a nucleic acid encoding the antibody may be assembled from chemically synthesized oligonucleotides (*e.g.*, as described in 20 Kutmeier et al., 1994, *BioTechniques* 17:242), which, briefly, involves the synthesis of overlapping oligonucleotides containing portions of the sequence encoding antibody, annealing and ligation of those oligonucleotides, and then amplification of the ligated oligonucleotides by PCR.

20

Alternatively, the nucleic acid encoding the antibody may be obtained by 25 cloning the antibody. If a clone containing the nucleic acid encoding the particular antibody is not available, but the sequence of the antibody molecule is known, a nucleic acid encoding the antibody may be obtained from a suitable source (*e.g.*, an antibody cDNA library, or cDNA library generated from any tissue or cells expressing the antibody) by PCR amplification using synthetic primers hybridizable to the 3' and 5' ends of the sequence or by cloning using an oligonucleotide probe 30 specific for the particular gene sequence.

25

30

If an antibody molecule that specifically recognizes a particular antigen is not available (or a source for a cDNA library for cloning a nucleic acid encoding such an antibody), antibodies specific for a particular antigen may be generated by any

WO 01/75454

PCT/US01/10908

method known in the art, for example, by immunizing an animal, such as a rabbit, to generate polyclonal antibodies or, more preferably, by generating monoclonal antibodies. Alternatively, a clone encoding at least the Fab portion of the antibody may be obtained by screening Fab expression libraries (*e.g.*, as described in Huse et al., 1989, *Science* 246:1275-1281) for clones of Fab fragments that bind the specific antigen or by screening antibody libraries (See, *e.g.*, Clackson et al., 1991, *Nature* 352:624; Hane et al., 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4937).

Once a nucleic acid encoding at least the variable domain of the antibody molecule is obtained, it may be introduced into a vector containing the nucleotide sequence encoding the constant region of the antibody molecule (see, *e.g.*, PCT Publication WO 86/05807; PCT Publication WO 89/01036; and U.S. Patent No. 5,122,464). Vectors containing the complete light or heavy chain for co-expression with the nucleic acid to allow the expression of a complete antibody molecule are also available. Then, the nucleic acid encoding the antibody can be used to introduce the nucleotide substitution(s) or deletion(s) necessary to substitute (or delete) the one or more variable region cysteine residues participating in an intrachain disulfide bond with an amino acid residue that does not contain a sulfhydryl group. Such modifications can be carried out by any method known in the art for the introduction of specific mutations or deletions in a nucleotide sequence, for example, but not limited to, *chemical mutagenesis*, *in vitro* site directed mutagenesis (Hutchinson et al., 1978, *J. Biol. Chem.* 253:6551), PCT based methods, etc.

In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855; Neuberger et al., 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314:452-454) by splicing genes from a mouse antibody molecule of appropriate antigen specificity together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used. As described *supra*, a chimeric antibody is a molecule in which different portions are derived from different animal species, such as those having a variable region derived from a murine mAb and a human antibody constant region, *e.g.*, humanized antibodies.

Once a nucleic acid encoding an antibody molecule of the invention has been obtained, the vector for the production of the antibody molecule may be produced by recombinant DNA technology using techniques well known in the art. Thus, methods for preparing the protein of the invention by expressing nucleic acid containing the

WO 01/75454

PCT/US01/10908

antibody molecule sequences are described herein. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct expression vectors containing an antibody molecule coding sequences and appropriate transcriptional and translational control signals. These methods include, for example, *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. See, for example, the techniques described in Sambrook et al. (1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) and Ausubel et al. (eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

10 The expression vector is transferred to a host cell by conventional techniques and the transfected cells are then cultured by conventional techniques to produce an antibody of the invention.

The host cells used to express a recombinant antibody of the invention may be either bacterial cells such as *Escherichia coli*, or, preferably, eukaryotic cells, especially for the expression of whole recombinant antibody molecule. In particular, mammalian cells such as Chinese hamster ovary cells (CHO), in conjunction with a vector such as the major intermediate early gene promoter element from human cytomegalovirus is an effective expression system for antibodies (Foecking et al., 1986, *Gene* 45:101; Cockett et al., 1990, *Bio/Technology* 8:2).

20 A variety of host-expression vector systems may be utilized to express an antibody molecule of the invention. Such host-expression systems represent vehicles by which the coding sequences of interest may be produced and subsequently purified, but also represent cells which may, when transformed or transfected with the appropriate nucleotide coding sequences, express the antibody molecule of the invention *in situ*. These include but are not limited to microorganisms such as bacteria (*e.g.*, *E. coli*, *B. subtilis*) transformed with recombinant bacteriophage DNA, plasmid DNA or cosmid DNA expression vectors containing antibody coding sequences; yeast (*e.g.*, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformed with recombinant yeast expression vectors containing antibody coding sequences; insect cell systems infected with recombinant virus expression vectors (*e.g.*, baculovirus) containing the antibody coding sequences; plant cell systems infected with recombinant virus expression vectors (*e.g.*, cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or transformed with recombinant plasmid expression vectors (*e.g.*, Ti plasmid) containing antibody coding sequences; or mammalian cell systems (*e.g.*, COS, CHO,

WO 01/75454

PCT/US01/10908

BHK, 293, 3T3 cells) harboring recombinant expression constructs containing promoters derived from the genome of mammalian cells (*e.g.*, metallothionein promoter) or from mammalian viruses (*e.g.*, the adenovirus late promoter; the vaccinia virus 7.5K promoter).

5 In bacterial systems, a number of expression vectors may be advantageously selected depending upon the use intended for the antibody molecule being expressed. For example, when a large quantity of such a protein is to be produced, for the generation of pharmaceutical compositions comprising an antibody molecule, vectors which direct the expression of high levels of fusion protein products that are readily  
10 purified may be desirable. Such vectors include, but are not limited, to the *E. coli* expression vector pUR278 (Ruther et al., 1983, *EMBO J.* 2:1791), in which the antibody coding sequence may be ligated individually into the vector in frame with the lac Z coding region so that a fusion protein is produced; pIN vectors (Inouye & Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, *J.*  
15 *Biol. Chem.* 24:5503-5509); and the like. pGEX vectors may also be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption and binding to a matrix glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. The pGEX vectors are designed to include thrombin  
20 or factor Xa protease cleavage sites so that the cloned target gene product can be released from the GST moiety.

In an insect system, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes. The virus grows in *Spodoptera frugiperda* cells. The antibody coding sequence may be cloned individually into non-  
25 essential regions (for example the polyhedrin gene) of the virus and placed under control of an AcNPV promoter (for example the polyhedrin promoter). In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems (*e.g.*, an adenovirus expression system) may be utilized.

As discussed above, a host cell strain may be chosen based on the present  
30 description which modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific fashion desired. Such modifications (*e.g.*, glycosylation) and processing (*e.g.*, cleavage) of protein products may be important for the function of the protein.

For long-term, high-yield production of recombinant antibodies, stable

WO 01/75454

PCT/US01/10908

expression is preferred. For example, cells lines that stably express an antibody of interest can be produced by transfecting the cells with an expression vector comprising the nucleotide sequence of the antibody and the nucleotide sequence of a selectable (*e.g.*, neomycin or hygromycin), and selecting for expression of the  
5 selectable marker. Such engineered cell lines may be particularly useful in screening and evaluation of compounds that interact directly or indirectly with the antibody molecule.

The expression levels of the antibody molecule can be increased by vector amplification (for a review, see Bebbington and Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)). When a marker in the vector  
10 system expressing antibody is amplifiable, increase in the level of inhibitor present in culture of host cell will increase the number of copies of the marker gene. Since the amplified region is associated with the antibody gene, production of the antibody will  
15 also increase (Crouse et al., 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257).

The host cell may be co-transfected with two expression vectors of the invention, the first vector encoding a heavy chain derived polypeptide and the second vector encoding a light chain derived polypeptide. The two vectors may contain  
20 identical selectable markers which enable equal expression of heavy and light chain polypeptides. Alternatively, a single vector may be used which encodes both heavy and light chain polypeptides. In such situations, the light chain should be placed  
before the heavy chain to avoid an excess of toxic free heavy chain (Proudfoot, 1986, *Nature* 322:52; Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197). The coding  
sequences for the heavy and light chains may comprise cDNA or genomic DNA.

Once the antibody molecule of the invention has been recombinantly  
25 expressed, it may be purified by any method known in the art for purification of an antibody molecule, for example, by chromatography (*e.g.*, ion exchange chromatography, affinity chromatography such as with protein A or specific antigen, and sizing column chromatography), centrifugation, differential solubility, or by any  
30 other standard technique for the purification of proteins.

Alternatively, any fusion protein may be readily purified by utilizing an antibody specific for the fusion protein being expressed. For example, a system described by Janknecht et al. allows for the ready purification of non-denatured fusion  
proteins expressed in human cell lines (Janknecht et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

WO 01/75454

PCT/US01/10908

USA 88:8972-897). In this system, the gene of interest is subcloned into a vaccinia recombination plasmid such that the open reading frame of the gene is translationally fused to an amino-terminal tag consisting of six histidine residues. The tag serves as a matrix binding domain for the fusion protein. Extracts from cells infected with recombinant vaccinia virus are loaded onto Ni<sup>2+</sup> nitriloacetic acid-agarose columns and histidine-tagged proteins are selectively eluted with imidazole-containing buffers.

#### 5.11 Conjugated Antibodies

In a preferred embodiment, anti-API antibodies or fragments thereof are conjugated to a diagnostic or a therapeutic molecule. The antibodies can be used, for example, for diagnosis or to determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be facilitated by coupling the antibody to a detectable substance. Examples of detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, radioactive nuclides, positron emitting metals (for use in positron emission tomography), and nonradioactive paramagnetic metal ions. See generally U.S. Patent No. 4,741,900 for metal ions which can be conjugated to antibodies for use as diagnostics according to the present invention. Suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, beta-galactosidase, or acetylcholinesterase; suitable prosthetic groups include streptavidin, avidin and biotin; suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride and phycocerythrin; suitable luminescent materials include luminol; suitable bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin; and suitable radioactive nuclides include <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In and <sup>99</sup>Tc.

An anti-API antibodies or fragments thereof can be conjugated to a therapeutic agent or pharmaceutical product to modify a given biological response. The therapeutic agent or drug moiety is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the drug moiety may be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for example, a toxin such as abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, or diphtheria toxin; a protein such as tumor necrosis factor,  $\alpha$ -interferon,  $\beta$ -interferon, nerve growth factor, platelet derived growth factor, tissue plasminogen activator, a thrombotic agent or an anti-angiogenic agent, *e.g.*, angiostatin or endostatin; or, a biological response modifier

such as a lymphokine, interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), nerve growth factor (NGF) or other growth factor.

Techniques for conjugating such therapeutic moiety to antibodies are well known, see, *e.g.*, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982). These references are incorporated herein in their entirety.

Alternatively, an antibody can be conjugated to a second antibody to form an antibody heteroconjugate as described by Segal in U.S. Patent No. 4,676,980.

An antibody with or without a therapeutic moiety conjugated to it can be used as a therapeutic that is administered alone or in combination with cytotoxic factor(s) and/or cytokine(s).

#### 5.12 Diagnosis of Alzheimer's Disease

In accordance with the present invention, suitable test samples, *e.g.*, of cerebrospinal fluid (CSF), serum, plasma or urine obtained from a subject suspected of having or known to have Alzheimer's disease can be used for diagnosis. In one embodiment, a decreased abundance of one or more AFs or APIs (or any combination of them) in a test sample relative to a control sample (from a subject or subjects free from Alzheimer's disease) or a previously determined reference range indicates the presence of Alzheimer's disease; AFs and APIs suitable for this purpose are identified in Tables I and IV, respectively, as described in detail above. In another embodiment of the invention, an increased abundance of one or more AFs or APIs (or any combination of them) in a test sample compared to a control sample or a previously determined reference range indicates the presence of Alzheimer's disease; AFs and

WO 01/75454

PCT/US01/10908

APIs suitable for this purpose are identified in Tables II and V, respectively, as described in detail above. In another embodiment, the relative abundance of one or more AFs or APIs (or any combination of them) in a test sample compared to a control sample or a previously determined reference range indicates a subtype of Alzheimer's disease (*e.g.*, familial or sporadic Alzheimer's disease). In yet another embodiment, the relative abundance of one or more AFs or APIs (or any combination of them) in a test sample relative to a control sample or a previously determined reference range indicates the degree or severity of Alzheimer's disease. In any of the aforesaid methods, detection of one or more APIs described herein may optionally be combined with detection of one or more additional biomarkers for Alzheimer's disease including, but not limited to apolipoprotein E (ApoE), amyloid  $\beta$ -peptides ( $A\beta$ ), tau and neural thread protein (NTP). Any suitable method in the art can be employed to measure the level of AFs and APIs, including but not limited to the Preferred Technology described herein, kinase assays, immunoassays to detect and/or visualize the API (*e.g.*, Western blot, immunoprecipitation followed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, immunocytochemistry, etc.). In cases where an API has a known function, an assay for that function may be used to measure API expression. In a further embodiment, a decreased abundance of mRNA encoding one or more APIs identified in Table IV (or any combination of them) in a test sample relative to a control sample or a previously determined reference range indicates the presence of Alzheimer's disease. In yet a further embodiment, an increased abundance of mRNA encoding one or more APIs identified in Table V (or any combination of them) in a test sample relative to a control sample or previously determined reference range indicates the presence of Alzheimer's disease. Any suitable hybridization assay can be used to detect API expression by detecting and/or visualizing mRNA encoding the API (*e.g.*, Northern assays, dot blots, in situ hybridization, etc.).

In another embodiment of the invention, labeled antibodies, derivatives and analogs thereof, which specifically bind to an API can be used for diagnostic purposes, *e.g.*, to detect, diagnose, or monitor Alzheimer's disease. Preferably, Alzheimer's disease is detected in an animal, more preferably in a mammal and most preferably in a human.

#### 5.13 Screening Assays

WO 01/75454

PCT/US01/10908

The invention provides methods for identifying agents (*e.g.*, chemical compounds, proteins, or peptides) that bind to an API or have a stimulatory or inhibitory effect on the expression or activity of an API. The invention also provides methods of identifying agents, candidate compounds or test compounds that bind to an API-related polypeptide or an API fusion protein or have a stimulatory or inhibitory effect on the expression or activity of an API-related polypeptide or an API fusion protein. Examples of agents, candidate compounds or test compounds include, but are not limited to, nucleic acids (*e.g.*, DNA and RNA), carbohydrates, lipids, proteins, peptides, peptidomimetics, small molecules and other drugs. Agents can be obtained using any of the numerous suitable approaches in combinatorial library methods known in the art, including: biological libraries; spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries; synthetic library methods requiring deconvolution; the "one-bead one-compound" library method; and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library approach is limited to peptide libraries, while the other four approaches are applicable to peptide, non-peptide oligomer or small molecule libraries of compounds (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12:145; U.S. Patent No. 5,738,996; and U.S. Patent No.5,807,683, each of which is incorporated herein in its entirety by reference).

Examples of methods for the synthesis of molecular libraries can be found in the art, for example in: DeWitt et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909; Erb et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann et al., 1994, *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho et al., 1993, *Science* 261:1303; Carrell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; and Gallop et al., 1994, *J. Med. Chem.* 37:1233, each of which is incorporated herein in its entirety by reference.

Libraries of compounds may be presented, *e.g.*, presented in solution (*e.g.*, Houghten, 1992, *Bio/Techniques* 13:412-421), or on beads (Lam, 1991, *Nature* 354:82-84), chips (Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556), bacteria (U.S. Patent No. 5,223,409), spores (Patent Nos. 5,571,698; 5,403,484; and 5,223,409), plasmids (Cull et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869) or phage (Scott and Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Devlin, 1990, *Science* 249:404-406; Cwirla et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382; and Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:301-310), each of which is incorporated herein in its entirety by reference.

In one embodiment, agents that interact with (*i.e.*, bind to) an API, an API

WO 01/75454

PCT/US01/10908

fragment (*e.g.*, a functionally active fragment), an API-related polypeptide, a fragment of an API-related polypeptide, or an API fusion protein are identified in a cell-based assay system. In accordance with this embodiment, cells expressing an API, a fragment of an API, an API-related polypeptide, a fragment of an API-related polypeptide, or an API fusion protein are contacted with a candidate compound or a control compound and the ability of the candidate compound to interact with the API is determined. If desired, this assay may be used to screen a plurality (*e.g.*, a library) of candidate compounds. The cell, for example, can be of prokaryotic origin (*e.g.*, *E. coli*) or eukaryotic origin (*e.g.*, yeast or mammalian). Further, the cells can express the API, fragment of the API, API-related polypeptide, a fragment of the API-related polypeptide, or an API fusion protein endogenously or be genetically engineered to express the API, fragment of the API, API-related polypeptide, a fragment of the API-related polypeptide, or an API fusion protein. In some embodiments, the API, fragment of the API, API-related polypeptide, a fragment of the API-related polypeptide, or an API fusion protein or the candidate compound is labeled, for example with a radioactive label (such as <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S or <sup>125</sup>I) or a fluorescent label (such as fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, o-phthaldehyde or fluorescamine) to enable detection of an interaction between an API and a candidate compound. The ability of the candidate compound to interact directly or indirectly with an API, a fragment of an API, an API-related polypeptide, a fragment of an API-related polypeptide, or an API fusion protein can be determined by methods known to those of skill in the art. For example, the interaction between a candidate compound and an API, a fragment of an API, an API-related polypeptide, a fragment of an API-related polypeptide, or an API fusion protein can be determined by flow cytometry, a scintillation assay, immunoprecipitation or western blot analysis.

In another embodiment, agents that interact with (*i.e.*, bind to) an API, an API fragment (*e.g.*, a functionally active fragment) an API-related polypeptide, a fragment of an API-related polypeptide, or an API fusion protein are identified in a cell-free assay system. In accordance with this embodiment, a native or recombinant API or fragment thereof, or a native or recombinant API-related polypeptide or fragment thereof, or an API-fusion protein or fragment thereof, is contacted with a candidate compound or a control compound and the ability of the candidate compound to interact with the API or API-related polypeptide, or API fusion protein is determined.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

If desired, this assay may be used to screen a plurality (*e.g.* a library) of candidate compounds. Preferably, the API, API fragment, API-related polypeptide, a fragment of an API-related polypeptide, or an API-fusion protein is first immobilized, by, for example, contacting the API, API fragment, API-related polypeptide, a fragment of an API-related polypeptide, or an API fusion protein with an immobilized antibody which specifically recognizes and binds it, or by contacting a purified preparation of the API, API fragment, API-related polypeptide, fragment of an API-related polypeptide, or an API fusion protein with a surface designed to bind proteins. The API, API fragment, API-related polypeptide, a fragment of an API-related polypeptide, or an API fusion protein may be partially or completely purified (*e.g.*, partially or completely free of other polypeptides) or part of a cell lysate. Further, the API, API fragment, API-related polypeptide, a fragment of an API-related polypeptide may be a fusion protein comprising the API or a biologically active portion thereof, or API-related polypeptide and a domain such as glutathione-S-transferase. Alternatively, the API, API fragment, API-related polypeptide, fragment of an API-related polypeptide or API fusion protein can be biotinylated using techniques well known to those of skill in the art (*e.g.*, biotinylation kit, Pierce Chemicals; Rockford, IL). The ability of the candidate compound to interact with an API, API fragment, API-related polypeptide, a fragment of an API-related polypeptide, or an API fusion protein can be determined by methods known to those of skill in the art.

In another embodiment, a cell-based assay system is used to identify agents that bind to or modulate the activity of a protein, such as an enzyme, or a biologically active portion thereof, which is responsible for the production or degradation of an API or is responsible for the post-translational modification of an API. In a primary screen, a plurality (*e.g.*, a library) of compounds are contacted with cells that naturally or recombinantly express: (i) an API, an isoform of an API, an API homolog an API-related polypeptide, an API fusion protein, or a biologically active fragment of any of the foregoing; and (ii) a protein that is responsible for processing of the API, API isoform, API homolog, API-related polypeptide, API fusion protein, or fragment in order to identify compounds that modulate the production, degradation, or post-translational modification of the API, API isoform, API homolog, API-related polypeptide, API fusion protein or fragment. If desired, compounds identified in the primary screen can then be assayed in a secondary screen against cells naturally or

WO 01/75454

PCT/US01/10908

recombinantly expressing the specific API of interest. The ability of the candidate compound to modulate the production, degradation or post-translational modification of an API, isoform, homolog, API-related polypeptide, or API fusion protein can be determined by methods known to those of skill in the art, including without limitation, 5 flow cytometry, a scintillation assay, immunoprecipitation and western blot analysis.

In another embodiment, agents that competitively interact with (*i.e.*, bind to) an API, API fragment, API-related polypeptide, a fragment of an API-related polypeptide, or an API fusion protein are identified in a competitive binding assay. In accordance with this embodiment, cells expressing an API, API fragment, API-related 10 polypeptide, a fragment of an API-related polypeptide, or an API fusion protein are contacted with a candidate compound and a compound known to interact with the API, API fragment, API-related polypeptide, a fragment of an API-related polypeptide or an API fusion protein; the ability of the candidate compound to competitively interact with the API, API fragment, API-related polypeptide, fragment 15 of an API-related polypeptide, or an API fusion protein is then determined. Alternatively, agents that competitively interact with (*i.e.*, bind to) an API, API fragment, API-related polypeptide or fragment of an API-related polypeptide are identified in a cell-free assay system by contacting an API, API fragment, API-related polypeptide, fragment of an API-related polypeptide, or an API fusion protein with a 20 candidate compound and a compound known to interact with the API, API-related polypeptide or API fusion protein. As stated above, the ability of the candidate compound to interact with an API, API fragment, API-related polypeptide, a fragment of an API-related polypeptide, or an API fusion protein can be determined by methods known to those of skill in the art. These assays, whether cell-based or cell-free, can 25 be used to screen a plurality (*e.g.*, a library) of candidate compounds.

In another embodiment, agents that modulate (*i.e.*, upregulate or downregulate) the expression of an API, or an API-related polypeptide are identified by contacting cells (*e.g.*, cells of prokaryotic origin or eukaryotic origin) expressing the API, or API-related polypeptide with a candidate compound or a control 30 compound (*e.g.*, phosphate buffered saline (PBS)) and determining the expression of the API, API-related polypeptide, or API fusion protein, mRNA encoding the API, or mRNA encoding the API-related polypeptide. The level of expression of a selected API, API-related polypeptide, mRNA encoding the API, or mRNA encoding the API-related polypeptide in the presence of the candidate compound is compared to the

WO 01/75454

PCT/US01/10908

level of expression of the API, API-related polypeptide, mRNA encoding the API, or mRNA encoding the API-related polypeptide in the absence of the candidate compound (*e.g.*, in the presence of a control compound). The candidate compound can then be identified as a modulator of the expression of the API, or an API-related polypeptide based on this comparison. For example, when expression of the API or mRNA is significantly greater in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as a stimulator of expression of the API or mRNA. Alternatively, when expression of the API or mRNA is significantly less in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as an inhibitor of the expression of the API or mRNA. The level of expression of an API or the mRNA that encodes it can be determined by methods known to those of skill in the art based on the present description. For example, mRNA expression can be assessed by Northern blot analysis or RT-PCR, and protein levels can be assessed by western blot analysis.

In another embodiment, agents that modulate the activity of an API or an API-related polypeptide are identified by contacting a preparation containing the API or API-related polypeptide, or cells (*e.g.*, prokaryotic or eukaryotic cells) expressing the API or API-related polypeptide with a test compound or a control compound and determining the ability of the test compound to modulate (*e.g.*, stimulate or inhibit) the activity of the API or API-related polypeptide. The activity of an API or an API-related polypeptide can be assessed by detecting induction of a cellular signal transduction pathway of the API or API-related polypeptide (*e.g.*, intracellular Ca<sup>2+</sup>, diacylglycerol, IP<sub>3</sub>, etc.), detecting catalytic or enzymatic activity of the target on a suitable substrate, detecting the induction of a reporter gene (*e.g.*, a regulatory element that is responsive to an API or an API-related polypeptide and is operably linked to a nucleic acid encoding a detectable marker, *e.g.*, luciferase), or detecting a cellular response, for example, cellular differentiation, or cell proliferation as the case may be, based on the present description, techniques known to those of skill in the art can be used for measuring these activities (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,401,639, which is incorporated in its entirety herein by reference). The candidate agent can then be identified as a modulator of the activity of an API or API-related polypeptide by comparing the effects of the candidate compound to the control compound. Suitable control compounds include phosphate buffered saline (PBS) and normal saline (NS).

In another embodiment, agents that modulate (*i.e.*, upregulate or

WO 01/75454

PCT/US01/10908

downregulate) the expression, activity or both the expression and activity of an API or API-related polypeptide are identified in an animal model. Examples of suitable animals include, but are not limited to, mice, rats, rabbits, monkeys, guinea pigs, dogs and cats. Preferably, the animal used represent a model of Alzheimer's disease (*e.g.*, animals that express human familial Alzheimer's disease (FAD)  $\beta$ -amyloid precursor (APP), animals that overexpress human wild-type APP, animals that overexpress  $\beta$ -amyloid 1-42 (BA), animals that express FAD presenillin-1 (PS-1). See, *e.g.*, Higgins, LS, 1999, *Molecular Medicine Today* 5:274-276. In accordance with this embodiment, the test compound or a control compound is administered (*e.g.*, orally, rectally or parenterally such as intraperitoneally or intravenously) to a suitable animal and the effect on the expression, activity or both expression and activity of the API or API-related polypeptide is determined. Changes in the expression of an API or API-related polypeptide can be assessed by any suitable method described above, based on the present description.

In yet another embodiment, an API or API-related polypeptide is used as a "bait protein" in a two-hybrid assay or three hybrid assay to identify other proteins that bind to or interact with an API or API-related polypeptide (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,283,317; Zervos et al. (1993) *Cell* 72:223-232; Madura et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) *Bio/Techniques* 14:920-924; Iwabuchi et al. (1993) *Oncogene* 8:1693-1696; and PCT Publication No. WO 94/10300). As those skilled in the art will appreciate, such binding proteins are also likely to be involved in the propagation of signals by the APIs of the invention as, for example, upstream or downstream elements of a signaling pathway involving the APIs of the invention.

As those skilled in the art will appreciate, Table X enumerates scientific publications describing suitable assays for detecting or quantifying enzymatic or binding activity of an API, an API analog, an API-related polypeptide, or a fragment of any of the foregoing. Each such reference is hereby incorporated in its entirety. In a preferred embodiment, an assay referenced in Table X is used in the screens and assays described herein, for example, to screen for or to identify an agent that modulates the activity of (or that modulates both the expression and activity of) an API, API analog, or API-related polypeptide, a fragment of any of the foregoing or an API fusion protein.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

Table X

API	References
API-39, API-44, API-178, API-188	Structural Biology 7, 312-321, 2000 J. Am. Chem. Soc. 122, 2178-2192, 2000
API-76 API-78 API-79 API-80 API-82 API-140	Clin Chem 1993 Feb 39:2 309-12 J Immunol Methods 1987 Aug 24 102:1 7-14
API-38 API-74 API-105 API-124 API-130 API-138 API-169 API-172	J Clin Lab Immunol 1986 Dec 21:4 201-7
API-123 API-126	Neuroendocrinology 1992 Mar 55:3 308-16
API-186	J Chromatogr 1991 Jul 5 567:2 369-80; Clin Chem 1989 Apr 35:4 582-6
API-52	J Chromatogr 1987 Dec 18 411: 498-501 Eisei Shikenjo Hokoku 1972 90: 89-92 Analyst 1990 Aug 115:8 1143-4
API-182	Biochem J 1997 Mar 1 322 ( Pt 2): 455-60; Biochem Soc Trans 1997 Nov 25:4 S591; Biochim Biophys Acta 1986 Oct 10 888:3 325-31 <a href="http://www.promega.com">http://www.promega.com</a>

This invention further provides novel agents identified by the above-described screening assays and uses thereof for treatments as described herein.

5 5.14 Therapeutic Uses Of APIs

The invention provides for treatment or prevention of various diseases and disorders by administration of a therapeutic agent. Such agents include but are not limited to: APIs, API analogs, API-related polypeptides and derivatives (including fragments) thereof; antibodies to the foregoing; nucleic acids encoding APIs, API analogs, API-related polypeptides and fragments thereof; antisense nucleic acids to a gene encoding an API or API-related polypeptide; and modulator (*e.g.*, agonists and antagonists) of a gene encoding an API or API-related polypeptide. An important feature of the present invention is the identification of genes encoding APIs involved in Alzheimer's disease. Alzheimer's disease can be treated (*e.g.* to ameliorate symptoms or to retard onset or progression) or prevented by administration of a therapeutic compound that promotes function or expression of one or more APIs that are decreased in the CSF of Alzheimer's disease subjects having Alzheimer's disease, or by administration of a therapeutic compound that reduces function or expression of one or more APIs that are increased in the CSF of subjects having Alzheimer's disease.

In one embodiment, one or more antibodies each specifically binding to an API are administered alone or in combination with one or more additional therapeutic compounds or treatments. Examples of such therapeutic compounds or treatments include, but are not limited to, tacrine, donepezil,  $\alpha$ -tocopherol, selegeline, NSAIDs, estrogen replacement therapy, physostigmine, rivastigmine, hepastigmine, metrifonate, ENA-713, ginkgo biloba extract, physostigmine, amridin, talsaclidine, zifrosilone, eptastigmine, methanesulfonyl chloride, nefiracetam, ALCAR, talsachidine, xanomeline, galanthamine, and propentofylline.

Preferably, a biological product such as an antibody is allogeneic to the subject to which it is administered. In a preferred embodiment, a human API or a human API-related polypeptide, a nucleotide sequence encoding a human API or a human API-related polypeptide, or an antibody to a human API or a human API-related polypeptide, is administered to a human subject for therapy (*e.g.* to ameliorate symptoms or to retard onset or progression) or prophylaxis.

## 5.14.1 Treatment And Prevention Of Alzheimer's Disease

Alzheimer's disease can be treated or prevented by administration to a subject suspected of having or known to have Alzheimer's disease or to be at risk of developing Alzheimer's disease following administration of an agent that modulates (*i.e.*, increases or decreases) the level or activity (*i.e.*, function) of one or more APIs or the level of one or more AFs that are differentially present in the CSF of subjects having Alzheimer's disease compared with CSF of subjects free from Alzheimer's disease. In one embodiment, Alzheimer's disease is treated by administering to a subject suspected of having or known to have Alzheimer's disease or to be at risk of developing Alzheimer's disease following administration of an agent that upregulates (*i.e.*, increases) the level or activity (*i.e.*, function) of one or more APIs or the level of one or more AFs that are decreased in the CSF of subjects having Alzheimer's disease. In another embodiment, an agent is administered that upregulates the level or activity (*i.e.*, function) of one or more APIs or the level of one or more AFs that are increased in the CSF of subjects having Alzheimer's disease. Examples of such a compound include but are not limited to: APIs, API fragments and API-related polypeptides; nucleic acids encoding an API, an API fragment and an API-related polypeptide (*e.g.*, for use in gene therapy); and, for those APIs or API-related polypeptides with enzymatic activity, compounds or molecules known to modulate that enzymatic activity. Other compounds that can be used, *e.g.*, API agonists, can be identified using *in vitro* assays, as defined or described above or earlier.

Alzheimer's disease is also treated or prevented by administration to a subject suspected of having or known to have Alzheimer's disease or to be at risk of developing Alzheimer's disease of a compound that downregulates the level or activity of one or more APIs or the level of one or more AFs that are increased in the CSF of subjects having Alzheimer's disease. In another embodiment, a compound is administered that downregulates the level or activity of one or more APIs or the level of one or more AFs that are decreased in the CSF of subjects having Alzheimer's disease. Examples of such a compound include, but are not limited to, API antisense oligonucleotides, ribozymes, antibodies directed against APIs, and compounds that inhibit the enzymatic activity of an API. Other useful compounds *e.g.*, API antagonists and small molecule API antagonists, can be identified using *in vitro* assays.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

In a preferred embodiment, therapy or prophylaxis is tailored to the needs of an individual subject. Thus, in specific embodiments, compounds that promote the level or function of one or more APIs, or the level of one or more AFs, are therapeutically or prophylactically administered to a subject suspected of having or known to have Alzheimer's disease, in whom the levels or functions of said one or more APIs, or levels of said one or more AFs, are absent or are decreased relative to a control or normal reference range. In further embodiments, compounds that promote the level or function of one or more APIs, or the level of one or more AFs, are therapeutically or prophylactically administered to a subject suspected of having or known to have Alzheimer's disease in whom the levels or functions of said one or more APIs, or levels of said one or more AFs, are increased relative to a control or to a reference range. In further embodiments, compounds that decrease the level or function of one or more APIs, or the level of one or more AFs, are therapeutically or prophylactically administered to a subject suspected of having or known to have Alzheimer's disease in whom the levels or functions of said one or more APIs, or levels of said one or more AFs, are increased relative to a control or to a reference range. In further embodiments, compounds that decrease the level or function of one or more APIs, or the level of one or more AFs, are therapeutically or prophylactically administered to a subject suspected of having or known to have Alzheimer's disease in whom the levels or functions of said one or more APIs, or levels of said one or more AFs, are decreased relative to a control or to a reference range. The change in API function or level, or AF level, due to the administration of such compounds can be readily detected, *e.g.*, by obtaining a sample (*e.g.*, a sample of CSF, blood or urine or a tissue sample such as biopsy tissue) and assaying *in vitro* the levels of said AFs or the levels or activities of said APIs, or the levels of mRNAs encoding said APIs, or any combination of the foregoing. Such assays can be performed before and after the administration of the compound as described herein.

The compounds of the invention include but are not limited to any compound, *e.g.*, a small organic molecule, protein, peptide, antibody, nucleic acid, etc. that restores the Alzheimer's disease API or AF profile towards normal with the proviso that such compound is not an acetylcholinesterase (AChE) inhibitor (*e.g.*, tacrine, donepezil, rivastigmine, heparstigmine, Metrigonate, physostigmine, Amridin, Talsaclidine, KA-672, Huperzine, P-11012, P-11149, Zifrositone, Eptastigmine, Methanesulfonyl chloride, and S-9977), an acetylcholine receptor agonist (*e.g.*,

WO 01/75454

PCT/US01/10908

Nefiracetam, LU-25109, and NS2330), a muscarinic receptor agonist (*e.g.*, SB-20206, Talsachidine, AF-1025B, and SR-46559A), a nicotonic cholinergic receptor agonist (*e.g.*, ABT-418), an acetylcholine modulator (*e.g.*, FKS-508 and Galantamine) or propentofylline.

5

#### 5.14.2 Gene Therapy

In another embodiment, nucleic acids comprising a sequence encoding an API, an API fragment, API-related polypeptide or fragment of an API-related polypeptide, are administered to promote API function by way of gene therapy. Gene therapy refers to the administration of an expressed or expressible nucleic acid to a subject. In this embodiment, the nucleic acid produces its encoded polypeptide and the polypeptide mediates a therapeutic effect by promoting API function.

10

Any suitable methods for gene therapy available in the art can be used according to the present invention.

15

For general reviews of the methods of gene therapy, see Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260:926-932; and Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; May, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215. Methods commonly known in the art of recombinant DNA technology which can be used in the present invention are described in Ausubel et al. (eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; and Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY.

20

In a particular aspect, the compound comprises a nucleic acid encoding an API or fragment or chimeric protein thereof, said nucleic acid being part of an expression vector that expresses an API or fragment or chimeric protein thereof in a suitable host. In particular, such a nucleic acid has a promoter operably linked to the API coding region, said promoter being inducible or constitutive (and, optionally, tissue-specific). In another particular embodiment, a nucleic acid molecule is used in which the API coding sequences and any other desired sequences are flanked by regions that promote homologous recombination at a desired site in the genome, thus providing for intrachromosomal expression of the API nucleic acid (Koller and Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, *Nature* 342:435-438).

30

Delivery of the nucleic acid into a subject may be direct, in which case the

WO 01/75454

PCT/US01/10908

subject is directly exposed to the nucleic acid or nucleic acid-carrying vector; this approach is known as *in vivo* gene therapy. Alternatively, delivery of the nucleic acid into the subject may be indirect, in which case cells are first transformed with the nucleic acid *in vitro* and then transplanted into the subject, known as “*ex vivo* gene therapy”.

5 In another embodiment, the nucleic acid is directly administered *in vivo*, where it is expressed to produce the encoded product. This can be accomplished by any of numerous methods known in the art, *e.g.*, by constructing it as part of an appropriate nucleic acid expression vector and administering it so that it becomes  
10 intracellular, *e.g.*, by infection using a defective or attenuated retroviral or other viral vector (see U.S. Patent No. 4,980,286); by direct injection of naked DNA; by use of microparticle bombardment (*e.g.*, a gene gun; Biolistic, Dupont); by coating with lipids, cell-surface receptors or transfecting agents; by encapsulation in liposomes, microparticles or microcapsules; by administering it in linkage to a peptide which is  
15 known to enter the nucleus; or by administering it in linkage to a ligand subject to receptor-mediated endocytosis (see, *e.g.*, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), which can be used to target cell types specifically expressing the receptors. In another embodiment, a nucleic acid-ligand complex can be formed in which the ligand comprises a fusogenic viral peptide to disrupt endosomes, allowing the nucleic  
20 acid to avoid lysosomal degradation. In yet another embodiment, the nucleic acid can be targeted *in vivo* for cell specific uptake and expression, by targeting a specific receptor (see, *e.g.*, PCT Publications WO 92/06180 dated April 16, 1992 (Wu et al.); WO 92/22635 dated December 23, 1992 (Wilson et al.); WO92/20316 dated  
November 26, 1992 (Findeis et al.); WO93/14188 dated July 22, 1993 (Clarke et al.),  
25 WO 93/20221 dated October 14, 1993 (Young)). Alternatively, the nucleic acid can be introduced intracellularly and incorporated within host cell DNA for expression, by homologous recombination (Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438).

In a further embodiment, a viral vector that contains a nucleic acid encoding  
30 an API is used. For example, a retroviral vector can be used (see Miller et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599). These retroviral vectors have been modified to delete retroviral sequences that are not necessary for packaging of the viral genome and integration into host cell DNA. The nucleic acid encoding the API to be used in gene therapy is cloned into the vector, which facilitates delivery of the gene into a subject.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

More detail about retroviral vectors can be found in Boessen et al., 1994, *Biotherapy* 6:291-302, which describes the use of a retroviral vector to deliver the *mdr1* gene to hematopoietic stem cells in order to make the stem cells more resistant to chemotherapy. Other references illustrating the use of retroviral vectors in gene therapy are: Clowes et al., 1994, *J. Clin. Invest.* 93:644-651; Kiem et al., 1994, *Blood* 83:1467-1473; Salmons and Gunzberg, 1993, *Human Gene Therapy* 4:129-141; and Grossman and Wilson, 1993, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114.

Adenoviruses are other viral vectors that can be used in gene therapy. Adenoviruses are especially attractive vehicles for delivering genes to respiratory epithelia. Adenoviruses naturally infect respiratory epithelia where they cause a mild disease. Other targets for adenovirus-based delivery systems are liver, the central nervous system, endothelial cells, and muscle. Adenoviruses have the advantage of being capable of infecting non-dividing cells. Kozarsky and Wilson, 1993, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 present a review of adenovirus-based gene therapy. Bout et al., 1994, *Human Gene Therapy* 5:3-10 demonstrated the use of adenovirus vectors to transfer genes to the respiratory epithelia of rhesus monkeys. Other instances of the use of adenoviruses in gene therapy can be found in Rosenfeld et al., 1991, *Science* 252:431-434; Rosenfeld et al., 1992, *Cell* 68:143-155; Mastrangeli et al., 1993, *J. Clin. Invest.* 91:225-234; PCT Publication WO94/12649; and Wang, et al., 1995, *Gene Therapy* 2:775-783.

Adeno-associated virus (AAV) has also been proposed for use in gene therapy (Walsh et al., 1993, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300; U.S. Patent No. 5,436,146).

Another suitable approach to gene therapy involves transferring a gene to cells in tissue culture by such methods as electroporation, lipofection, calcium phosphate mediated transfection, or viral infection. Usually, the method of transfer includes the transfer of a selectable marker to the cells. The cells are then placed under selection to isolate those cells that have taken up and are expressing the transferred gene. Those cells are then delivered to a subject.

In this embodiment, the nucleic acid is introduced into a cell prior to administration *in vivo* of the resulting recombinant cell. Such introduction can be carried out by any method known in the art, including but not limited to transfection, electroporation, microinjection, infection with a viral or bacteriophage vector containing the nucleic acid sequences, cell fusion, chromosome-mediated gene

WO 01/75454

PCT/US01/10908

transfer, microcell-mediated gene transfer, spheroplast fusion, etc. Numerous techniques are known in the art for the introduction of foreign genes into cells (see, e.g., Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618; Cohen et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; Cline, 1985, Pharmac. Ther. 29:69-92) and may be used in accordance with the present invention, provided that the necessary developmental and physiological functions of the recipient cells are not disrupted. The technique should provide for the stable transfer of the nucleic acid to the cell, so that the nucleic acid is expressible by the cell and preferably heritable and expressible by its cell progeny.

10 The resulting recombinant cells can be delivered to a subject by various methods known in the art. In a preferred embodiment, epithelial cells are injected, e.g., subcutaneously. In another embodiment, recombinant skin cells may be applied as a skin graft onto the subject. Recombinant blood cells (e.g., hematopoietic stem or progenitor cells) are preferably administered intravenously. The amount of cells  
15 envisioned for use depends on the desired effect, the condition of the subject, etc., and can be determined by one skilled in the art.

Cells into which a nucleic acid can be introduced for purposes of gene therapy encompass any desired, available cell type, and include but are not limited to neuronal cells, glial cells (e.g., oligodendrocytes or astrocytes), epithelial cells, endothelial  
20 cells, keratinocytes, fibroblasts, muscle cells, hepatocytes; blood cells such as T lymphocytes, B lymphocytes, monocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils, megakaryocytes, granulocytes; various stem or progenitor cells, in particular hematopoietic stem or progenitor cells, e.g., as obtained from bone marrow, umbilical cord blood, peripheral blood or fetal liver.

25 In a preferred embodiment, the cell used for gene therapy is autologous to the subject that is treated.

In an embodiment in which recombinant cells are used in gene therapy, a nucleic acid encoding an API is introduced into the cells such that it is expressible by the cells or their progeny, and the recombinant cells are then administered *in vivo* for  
30 therapeutic effect. In a specific embodiment, stem or progenitor cells are used. Any stem or progenitor cells which can be isolated and maintained *in vitro* can be used in accordance with this embodiment of the present invention (see e.g. PCT Publication WO 94/08598, dated April 28, 1994; Stemple and Anderson, 1992, Cell 71:973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229; and Pittelkow and Scott, 1986, Mayo

WO 01/75454

PCT/US01/10908

Clinic Proc. 61:771).

In another embodiment, the nucleic acid to be introduced for purposes of gene therapy may comprise an inducible promoter operably linked to the coding region, such that expression of the nucleic acid is controllable by controlling the presence or  
5 absence of the appropriate inducer of transcription.

Direct injection of a DNA coding for an API may also be performed according to, for example, the techniques described in United States Patent No. 5,589,466.

These techniques involve the injection of "naked DNA", *i.e.*, isolated DNA molecules in the absence of liposomes, cells, or any other material besides a suitable carrier.

10 The injection of DNA encoding a protein and operably linked to a suitable promoter results in the production of the protein in cells near the site of injection and the elicitation of an immune response in the subject to the protein encoded by the injected DNA. In a preferred embodiment, naked DNA comprising (a) DNA encoding an API and (b) a promoter are injected into a subject to elicit an immune response to the API.  
15

#### 5.14.3 Inhibition Of APIs To Treat Alzheimer's disease

In one embodiment of the invention, Alzheimer's disease is treated or prevented by administration of a compound that antagonizes (inhibits) the level(s) and/or function(s) of one or more APIs which are elevated in the CSF of subjects  
20 having Alzheimer's disease as compared with CSF of subjects free from Alzheimer's disease. Compounds useful for this purpose include but are not limited to anti-API antibodies (and fragments and derivatives containing the binding region thereof), API antisense or ribozyme nucleic acids, and nucleic acids encoding dysfunctional APIs that are used to "knockout" endogenous API function by homologous recombination  
25 (see, *e.g.*, Capecchi, 1989, Science 244:1288-1292). Other compounds that inhibit API function can be identified by use of known *in vitro* assays, *e.g.*, assays for the ability of a test compound to inhibit binding of an API to another protein or a binding partner, or to inhibit a known API function. Preferably such inhibition is assayed *in vitro* or in cell culture, but genetic assays may also be employed. The Preferred  
30 Technology can also be used to detect levels of the API before and after the administration of the compound. Preferably, suitable *in vitro* or *in vivo* assays are utilized to determine the effect of a specific compound and whether its administration is indicated for treatment of the affected tissue, as described in more detail below.

In a particular embodiment, a compound that inhibits an API function is

WO 01/75454

PCT/US01/10908

administered therapeutically or prophylactically to a subject in whom an increased CSF level or functional activity of the API (*e.g.*, greater than the normal level or desired level) is detected as compared with CSF of subjects free from Alzheimer's disease or a predetermined reference range. Methods standard in the art can be employed to measure the increase in an API level or function, as outlined above. Preferred API inhibitor compositions include small molecules, *i.e.*, molecules of 1000 daltons or less. Such small molecules can be identified by the screening methods described herein.

#### 10 5.14.4 Antisense Regulation of APIs

In a further embodiment, API expression is inhibited by use of API antisense nucleic acids. The present invention provides the therapeutic or prophylactic use of nucleic acids comprising at least six nucleotides that are antisense to a gene or cDNA encoding an API or a portion thereof. As used herein, an API "antisense" nucleic acid refers to a nucleic acid capable of hybridizing by virtue of some sequence complementarity to a portion of an RNA (preferably mRNA) encoding an API. The antisense nucleic acid may be complementary to a coding and/or noncoding region of an mRNA encoding an API. Such antisense nucleic acids have utility as compounds that inhibit API expression, and can be used in the treatment or prevention of Alzheimer's disease.

The antisense nucleic acids of the invention are double-stranded or single-stranded oligonucleotides, RNA or DNA or a modification or derivative thereof, and can be directly administered to a cell or produced intracellularly by transcription of exogenous, introduced sequences.

25 The invention further provides pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of an API antisense nucleic acid, and a pharmaceutically-acceptable carrier, vehicle or diluent.

In another embodiment, the invention provides methods for inhibiting the expression of an API nucleic acid sequence in a prokaryotic or eukaryotic cell comprising providing the cell with an effective amount of a composition comprising an API antisense nucleic acid of the invention.

API antisense nucleic acids and their uses are described in detail below.

#### 5.14.5 API Antisense Nucleic Acids

WO 01/75454

PCT/US01/10908

The API antisense nucleic acids are of at least six nucleotides and are preferably oligonucleotides ranging from 6 to about 50 oligonucleotides. In specific aspects, the oligonucleotide is at least 10 nucleotides, at least 15 nucleotides, at least 100 nucleotides, or at least 200 nucleotides. The oligonucleotides can be DNA or RNA or chimeric mixtures or derivatives or modified versions thereof and can be single-stranded or double-stranded. The oligonucleotide can be modified at the base moiety, sugar moiety, or phosphate backbone. The oligonucleotide may include other appended groups such as peptides; agents that facilitate transport across the cell membrane (see, e.g., Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556; Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; PCT Publication No. WO 88/09810, published December 15, 1988) or blood-brain barrier (see, e.g., PCT Publication No. WO 89/10134, published April 25, 1988); hybridization-triggered cleavage agents (see, e.g., Krol et al., 1988, BioTechniques 6:958-976) or intercalating agents (see, e.g., Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549).

In a particular aspect of the invention, an API antisense oligonucleotide is provided, preferably of single-stranded DNA. The oligonucleotide may be modified at any position on its structure with substituents generally known in the art.

The API antisense oligonucleotide may comprise any suitable of the following modified base moieties, e.g. 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hypoxanthine, xantine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (v), wybutosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid (v), 5-methyl-2-thiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)w, 2,6-diaminopurine, and other base analogs.

In another embodiment, the oligonucleotide comprises at least one modified sugar moiety, e.g., one of the following sugar moieties: arabinose, 2-fluoroarabinose, xylulose, and hexose.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

In yet another embodiment, the oligonucleotide comprises at least one of the following modified phosphate backbones: a phosphorothioate, a phosphorodithioate, a phosphoramidothioate, a phosphoramidate, a phosphordiamidate, a methylphosphonate, an alkyl phosphotriester, a formacetal, or an analog of formacetal.

In yet another embodiment, the oligonucleotide is an  $\alpha$ -anomeric oligonucleotide. An  $\alpha$ -anomeric oligonucleotide forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual  $\beta$ -units, the strands run parallel to each other (Gautier et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6625-6641).

The oligonucleotide may be conjugated to another molecule, e.g., a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, or hybridization-triggered cleavage agent.

Oligonucleotides of the invention may be synthesized by standard methods known in the art, e.g., by use of an automated DNA synthesizer (such as are commercially available from Biosearch, Applied Biosystems, etc.). As examples, phosphorothioate oligonucleotides may be synthesized by the method of Stein et al. (1988, Nucl. Acids Res. 16:3209), and methylphosphonate oligonucleotides can be prepared by use of controlled pore glass polymer supports (Sarin et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7448-7451).

In another embodiment, the API antisense nucleic acid of the invention is produced intracellularly by transcription from an exogenous sequence. For example, a vector can be introduced *in vivo* such that it is taken up by a cell, within which cell the vector or a portion thereof is transcribed, producing an antisense nucleic acid (RNA) of the invention. Such a vector would contain a sequence encoding the API antisense nucleic acid. Such a vector can remain episomal or become chromosomally integrated, as long as it can be transcribed to produce the desired antisense RNA. Such vectors can be constructed by recombinant DNA technology standard in the art. Vectors can be plasmid, viral, or others known in the art, used for replication and expression in mammalian cells. Expression of the sequence encoding the API antisense RNA can be by any promoter known in the art to act in mammalian, preferably human, cells. Such promoters can be inducible or constitutive. Examples of such promoters are outlined above.

The antisense nucleic acids of the invention comprise a sequence complementary to at least a portion of an RNA transcript of a gene encoding an API,

WO 01/75454

PCT/US01/10908

preferably a human gene encoding an API. However, absolute complementarity, although preferred, is not required. A sequence "complementary to at least a portion of an RNA," as referred to herein, means a sequence having sufficient complementarity to be able to hybridize under stringent conditions (*e.g.*, highly stringent conditions comprising hybridization in 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA at 65°C and washing in 0.1xSSC/0.1% SDS at 68°C, or moderately stringent conditions comprising washing in 0.2xSSC/0.1% SDS at 42°C) with the RNA, forming a stable duplex; in the case of double-stranded API antisense nucleic acids, a single strand of the duplex DNA may thus be tested, or triplex formation may be assayed. The ability to hybridize will depend on both the degree of complementarity and the length of the antisense nucleic acid. Generally, the longer the hybridizing nucleic acid, the more base mismatches with an RNA encoding an API it may contain and still form a stable duplex (or triplex, as the case may be). One skilled in the art can ascertain a tolerable degree of mismatch by use of standard procedures to determine the melting point of the hybridized complex.

#### 5.14.6 Therapeutic Use Of API Antisense Nucleic Acids

The API antisense nucleic acids can be used to treat or prevent Alzheimer's disease when the target API is overexpressed in the CSF of subjects suspected of having or suffering from Alzheimer's disease. In a preferred embodiment, a single-stranded DNA antisense API oligonucleotide is used.

Cell types which express or overexpress RNA encoding an API can be identified by various methods known in the art. Such cell types include but are not limited to leukocytes (*e.g.*, neutrophils, macrophages, monocytes) and resident cells (*e.g.*, astrocytes, glial cells, neuronal cells, and ependymal cells). Such methods include, but are not limited to, hybridization with an API-specific nucleic acid (*e.g.*, by Northern hybridization, dot blot hybridization, in situ hybridization), observing the ability of RNA from the cell type to be translated *in vitro* into an API, immunoassay, etc. In a preferred aspect, primary tissue from a subject can be assayed for API expression prior to treatment, *e.g.*, by immunocytochemistry or in situ hybridization.

Pharmaceutical compositions of the invention, comprising an effective amount of an API antisense nucleic acid in a pharmaceutically acceptable carrier, vehicle or diluent can be administered to a subject having Alzheimer's disease.

The amount of API antisense nucleic acid which will be effective in the

WO 01/75454

PCT/US01/10908

treatment of Alzheimer's disease can be determined by standard clinical techniques.

In a specific embodiment, pharmaceutical compositions comprising one or more API antisense nucleic acids are administered via liposomes, microparticles, or microcapsules. In various embodiments of the invention, such compositions may be used to achieve sustained release of the API antisense nucleic acids.

#### 5.14.7 Inhibitory Ribozyme And Triple Helix Approaches

In another embodiment, symptoms of Alzheimer's disease may be ameliorated by decreasing the level of an API or API activity by using gene sequences encoding the API in conjunction with well-known gene "knock-out," ribozyme or triple helix methods to decrease gene expression of an API. In this approach ribozyme or triple helix molecules are used to modulate the activity, expression or synthesis of the gene encoding the API, and thus to ameliorate the symptoms of Alzheimer's disease. Such molecules may be designed to reduce or inhibit expression of a mutant or non-mutant target gene. Techniques for the production and use of such molecules are well known to those of skill in the art.

Ribozyme molecules designed to catalytically cleave gene mRNA transcripts encoding an API can be used to prevent translation of target gene mRNA and, therefore, expression of the gene product. (See, *e.g.*, PCT International Publication WO90/11364, published October 4, 1990; Sarver et al., 1990, *Science* 247:1222-1225).

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. (For a review, see Rossi, 1994, *Current Biology* 4, 469-471). The mechanism of ribozyme action involves sequence specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by an endonucleolytic cleavage event. The composition of ribozyme molecules must include one or more sequences complementary to the target gene mRNA, and must include the well known catalytic sequence responsible for mRNA cleavage. For this sequence, see, *e.g.*, U.S. Patent No. 5,093,246, which is incorporated herein by reference in its entirety.

While ribozymes that cleave mRNA at site specific recognition sequences can be used to destroy mRNAs encoding an API, the use of hammerhead ribozymes is preferred. Hammerhead ribozymes cleave mRNAs at locations dictated by flanking regions that form complementary base pairs with the target mRNA. The sole requirement is that the target mRNA have the following sequence of two bases: 5'-

WO 01/75454

PCT/US01/10908

UG-3'. The construction and production of hammerhead ribozymes is well known in the art and is described more fully in Myers, 1995, Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, New York, (see especially Figure 4, page 833) and in Haseloff and Gerlach, 1988, Nature, 334, 585-591, each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

Preferably the ribozyme is engineered so that the cleavage recognition site is located near the 5' end of the mRNA encoding the API, *i.e.*, to increase efficiency and minimize the intracellular accumulation of non-functional mRNA transcripts.

The ribozymes of the present invention also include RNA endoribonucleases (hereinafter "Cech-type ribozymes") such as the one that occurs naturally in *Tetrahymena thermophila* (known as the IVS, or L-19 IVS RNA) and that has been extensively described by Thomas Cech and collaborators (Zaug, et al., 1984, Science, 224, 574-578; Zaug and Cech, 1986, Science, 231, 470-475; Zaug, et al., 1986, Nature, 324, 429-433; published International patent application No. WO 88/04300 by University Patents Inc.; Been and Cech, 1986, Cell, 47, 207-216). The Cech-type ribozymes have an eight base pair active site which hybridizes to a target RNA sequence whereafter cleavage of the target RNA takes place. The invention encompasses those Cech-type ribozymes which target eight base-pair active site sequences that are present in the gene encoding the API.

As in the antisense approach, the ribozymes can be composed of modified oligonucleotides (*e.g.*, for improved stability, targeting, etc.) and should be delivered to cells that express the API *in vivo*. A preferred method of delivery involves using a DNA construct "encoding" the ribozyme under the control of a strong constitutive pol III or pol II promoter, so that transfected cells will produce sufficient quantities of the ribozyme to destroy endogenous mRNA encoding the API and inhibit translation. Because ribozymes, unlike antisense molecules, are catalytic, a lower intracellular concentration is required for efficacy.

Endogenous API expression can also be reduced by inactivating or "knocking out" the gene encoding the API, or the promoter of such a gene, using targeted homologous recombination (*e.g.*, see Smithies, et al., 1985, Nature 317:230-234; Thomas and Capecchi, 1987, Cell 51:503-512; Thompson et al., 1989, Cell 5:313-321; and Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438, each of which is incorporated by reference herein in its entirety). For example, a mutant gene encoding a non-functional API (or a completely unrelated DNA sequence) flanked by DNA

WO 01/75454

PCT/US01/10908

homologous to the endogenous gene (either the coding regions or regulatory regions of the gene encoding the API) can be used, with or without a selectable marker and/or a negative selectable marker, to transfect cells that express the target gene *in vivo*. Insertion of the DNA construct, via targeted homologous recombination, results in  
5 inactivation of the target gene. Such approaches are particularly suited in the agricultural field where modifications to ES (embryonic stem) cells can be used to generate animal offspring with an inactive target gene (*e.g.*, see Thomas and Capecchi, 1987 and Thompson, 1989, *supra*). However, this approach can be adapted for use in humans provided the recombinant DNA constructs are directly administered  
10 or targeted to the required site *in vivo* using appropriate viral vectors.

Alternatively, the endogenous expression of a gene encoding an API can be reduced by targeting deoxyribonucleotide sequences complementary to the regulatory region of the gene (*i.e.*, the gene promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the gene encoding the API in target cells in the  
15 body. (See generally, Helene, 1991, *Anticancer Drug Des.*, 6(6), 569-584; Helene, et al., 1992, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660, 27-36; and Maher, 1992, *Bioassays* 14(12), 807-815).

Nucleic acid molecules to be used in triplex helix formation for the inhibition of transcription in the present invention should be single stranded and composed of  
20 deoxynucleotides. The base composition of these oligonucleotides must be designed to promote triple helix formation via Hoogsteen base pairing rules, which generally require sizeable stretches of either purines or pyrimidines to be present on one strand of a duplex. Nucleotide sequences may be pyrimidine-based, which will result in TAT and CGC+ triplets across the three associated strands of the resulting triple  
25 helix. The pyrimidine-rich molecules provide base complementarity to a purine-rich region of a single strand of the duplex in a parallel orientation to that strand. In addition, nucleic acid molecules may be chosen that are purine-rich, for example, contain a stretch of G residues. These molecules will form a triple helix with a DNA duplex that is rich in GC pairs, in which the majority of the purine residues are  
30 located on a single strand of the targeted duplex, resulting in GGC triplets across the three strands in the triplex.

Alternatively, the potential sequences that can be targeted for triple helix formation may be increased by creating a so called "switchback" nucleic acid molecule. Switchback molecules are synthesized in an alternating 5'-3', 3'-5' manner,

WO 01/75454

PCT/US01/10908

such that they base pair with first one strand of a duplex and then the other, eliminating the necessity for a sizeable stretch of either purines or pyrimidines to be present on one strand of a duplex.

In one embodiment, wherein the antisense, ribozyme, or triple helix molecules described herein are utilized to inhibit mutant gene expression, it is possible that the technique may so efficiently reduce or inhibit the transcription (triple helix) or translation (antisense, ribozyme) of mRNA produced by normal gene alleles of an API that the situation may arise wherein the concentration of API present may be lower than is necessary for a normal phenotype. In such cases, to ensure that substantially normal levels of activity of a gene encoding an API are maintained, gene therapy may be used to introduce into cells nucleic acid molecules that encode and express the API that exhibit normal gene activity and that do not contain sequences susceptible to whatever antisense, ribozyme, or triple helix treatments are being utilized. Alternatively, in instances whereby the gene encodes an extracellular protein, normal API can be co-administered in order to maintain the requisite level of API activity.

Antisense RNA and DNA, ribozyme, and triple helix molecules of the invention may be prepared by any method known in the art for the synthesis of DNA and RNA molecules, as discussed above. These include techniques for chemically synthesizing oligodeoxyri-bonucleotides and oligoribonucleotides well known in the art such as for example solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, RNA molecules may be generated by *in vitro* and *in vivo* transcription of DNA sequences encoding the antisense RNA molecule. Such DNA sequences may be incorporated into a wide variety of vectors that incorporate suitable RNA polymerase promoters such as the T7 or SP6 polymerase promoters. Alternatively, antisense cDNA constructs that synthesize antisense RNA constitutively or inducibly, depending on the promoter used, can be introduced stably into cell lines.

#### 5.15 Assays For Therapeutic Or Prophylactic Compounds

The present invention also provides assays for use in discovery of pharmaceutical products in order to identify or verify the efficacy of compounds for treatment or prevention of Alzheimer's disease. Agents can be assayed for their ability to restore AF or API levels in a subject having Alzheimer's disease towards levels found in subjects free from Alzheimer's disease or to produce similar changes

WO 01/75454

PCT/US01/10908

in experimental animal models of Alzheimer's disease. Compounds able to restore AF or API levels in a subject having Alzheimer's disease towards levels found in subjects free from Alzheimer's disease or to produce similar changes in experimental animal models of Alzheimer's disease can be used as lead compounds for further drug  
5 discovery, or used therapeutically. AF and API expression can be assayed by the Preferred Technology, immunoassays, gel electrophoresis followed by visualization, detection of API activity, or any other method taught herein or known to those skilled  
10 in the art. Such assays can be used to screen candidate drugs, in clinical monitoring or in drug development, where abundance of an AF or API can serve as a surrogate marker for clinical disease.

In various embodiments, *in vitro* assays can be carried out with cells representative of cell types involved in a subject's disorder, to determine if a compound has a desired effect upon such cell types.

Compounds for use in therapy can be tested in suitable animal model systems  
15 prior to testing in humans, including but not limited to rats, mice, chicken, cows, monkeys, rabbits, etc. For *in vivo* testing, prior to administration to humans, any animal model system known in the art may be used. Examples of animal models of Alzheimer's disease include, but are not limited to, animals that express human familial Alzheimer's disease (FAD)  $\beta$ -amyloid precursor (APP), animals that  
20 overexpress human wild-type APP, animals that overexpress  $\beta$ -amyloid 1-42 ( $\beta$ A), animals that express FAD presenilin-1 (PS-1) (see, *e.g.*, Higgins, LS, 1999, *Molecular Medicine Today* 5:274-276). Further, animal models for Down syndrome (*e.g.*, TgSOD1, TgPFKL, TgS100 $\beta$ , TgAPP, TgEts2, TgHMG14, TgMNB, Ts65Dn, and Ts1Cje (see, *e.g.*, Kola et al., 1999, *Molecular Medicine Today* 5:276-277) can be  
25 utilized to test compounds that modulate AF or API levels since the neuropathology exhibited by individuals with Down syndrome is similar to that of Alzheimer's disease. It is also apparent to the skilled artisan that, based upon the present disclosure, transgenic animals can be produced with "knock-out" mutations of the gene or genes encoding one or more APIs. A "knock-out" mutation of a gene is a  
30 mutation that causes the mutated gene to not be expressed, or expressed in an aberrant form or at a low level, such that the activity associated with the gene product is nearly or entirely absent. Preferably, the transgenic animal is a mammal, more preferably, the transgenic animal is a mouse.

In one embodiment, test compounds that modulate the expression of an API

WO 01/75454

PCT/US01/10908

are identified in non-human animals (*e.g.*, mice, rats, monkeys, rabbits, and guinea pigs), preferably non-human animal models for Alzheimer's disease or Downs syndrome, expressing the API. In accordance with this embodiment, a test compound or a control compound is administered to the animals, and the effect of the test compound on expression of one or more APIs is determined. A test compound that alters the expression of an API (or a plurality of APIs) can be identified by comparing the level of the selected API or APIs (or mRNA(s) encoding the same) in an animal or group of animals treated with a test compound with the level of the API(s) or mRNA(s) in an animal or group of animals treated with a control compound.

10 Techniques known to those of skill in the art can be used to determine the mRNA and protein levels, for example, in situ hybridization. The animals may or may not be sacrificed to assay the effects of a test compound.

In another embodiment, test compounds that modulate the activity of an API or a biologically active portion thereof are identified in non-human animals (*e.g.*, mice, rats, monkeys, rabbits, and guinea pigs), preferably non-human animal models for Alzheimer's disease or Downs syndrome, expressing the API. In accordance with this embodiment, a test compound or a control compound is administered to the animals, and the effect of a test compound on the activity of an API is determined. A test compound that alters the activity of an API (or a plurality of APIs) can be identified by assaying animals treated with a control compound and animals treated with the test compound. The activity of the API can be assessed by detecting induction of a cellular second messenger of the API (*e.g.*, intracellular Ca<sup>2+</sup>, diacylglycerol, IP<sub>3</sub>, etc.), detecting catalytic or enzymatic activity of the API or binding partner thereof, detecting the induction of a reporter gene (*e.g.*, a regulatory element that is responsive to an API of the invention operably linked to a nucleic acid encoding a detectable marker, such as luciferase or green fluorescent protein), or detecting a cellular response (*e.g.*, cellular differentiation or cell proliferation).

25 Techniques known to those of skill in the art can be utilized to detect changes in the activity of an API (*see, e.g.*, U.S. Patent No. 5,401,639, which is incorporated herein in its entirety by reference).

30

In yet another embodiment, test compounds that modulate the level or expression of an API (or plurality of APIs) are identified in human subjects having Alzheimer's disease or Downs syndrome, preferably those having mild to severe Alzheimer's disease and most preferably those having mild Alzheimer's disease. In

WO 01/75454

PCT/US01/10908

accordance with this embodiment, a test compound or a control compound is administered to the human subject, and the effect of a test compound on API expression is determined by analyzing the expression of the API or the mRNA encoding the same in a biological sample (*e.g.*, CSF, serum, plasma, or urine). A test compound that alters the expression of an API can be identified by comparing the level of the API or mRNA encoding the same in a subject or group of subjects treated with a control compound to that in a subject or group of subjects treated with a test compound. Alternatively, alterations in the expression of an API can be identified by comparing the level of the API or mRNA encoding the same in a subject or group of subjects before and after the administration of a test compound. Any suitable techniques known to those of skill in the art can be used to obtain the biological sample and analyze the mRNA or protein expression. For example, the Preferred Technology described herein can be used to assess changes in the level of an API.

In another embodiment, test compounds that modulate the activity of an API (or plurality of APIs) are identified in human subjects having Alzheimer's disease or Downs syndrome, preferably those having mild to severe Alzheimer's disease and most preferably those with mild Alzheimer's disease. In this embodiment, a test compound or a control compound is administered to the human subject, and the effect of a test compound on the activity of an API is determined. A test compound that alters the activity of an API can be identified by comparing biological samples from subjects treated with a control compound to samples from subjects treated with the test compound. Alternatively, alterations in the activity of an API can be identified by comparing the activity of an API in a subject or group of subjects before and after the administration of a test compound. The activity of the API can be assessed by detecting in a biological sample (*e.g.*, CSF, serum, plasma, or urine) induction of a cellular signal transduction pathway of the API (*e.g.*, intracellular Ca<sup>2+</sup>, diacylglycerol, IP<sub>3</sub>, etc.), catalytic or enzymatic activity of the API or a binding partner thereof, or a cellular response, for example, cellular differentiation, or cell proliferation. Techniques known to those of skill in the art can be used to detect changes in the induction of a second messenger of an API or changes in a cellular response. For example, RT-PCR can be used to detect changes in the induction of a cellular second messenger.

In a particular embodiment, an agent that changes the level or expression of an API towards levels detected in control subjects (*e.g.*, humans free from Alzheimer's

WO 01/75454

PCT/US01/10908

disease) is selected for further testing or therapeutic use. In another preferred embodiment, a test compound that changes the activity of an API towards the activity found in control subjects (*e.g.*, humans free from Alzheimer's disease) is selected for further testing or therapeutic use.

5 In another embodiment, test compounds that reduce the severity of one or more symptoms associated with Alzheimer's disease are identified in human subjects having Alzheimer's disease or Down's syndrome, preferably subjects having mild to severe Alzheimer's disease and most preferably subjects with mild Alzheimer's disease. In accordance with this embodiment, a test compound or a control compound  
10 is administered to the subjects, and the effect of a test compound on one or more symptoms of Alzheimer's disease is determined. A test compound that reduces one or more symptoms can be identified by comparing the subjects treated with a control compound to the subjects treated with the test compound. Techniques known to physicians familiar with Alzheimer's disease can be used to determine whether a test  
15 compound reduces one or more symptoms associated with Alzheimer's disease. For example, a test compound that enhances memory or reduces confusion in a subject having Alzheimer's disease will be beneficial for treating subjects having Alzheimer's disease.

In a preferred embodiment, an agent that reduces the severity of one or more  
20 symptoms associated with Alzheimer's disease in a human having Alzheimer's disease is selected for further testing or therapeutic use.

#### 5.16 Therapeutic and Prophylactic Compositions and Their Use

The invention provides methods of treatment comprising administering to a  
25 subject an effective amount of an agent of the invention. In a preferred aspect, the compound is substantially purified (*e.g.*, substantially free from substances that limit its effect or produce undesired side-effects). The subject is preferably an animal, including but not limited to animals such as cows, pigs, horses, chickens, cats, dogs, etc., and is preferably a mammal, and most preferably human. In a specific  
30 embodiment, a non-human mammal is the subject.

Formulations and methods of administration that can be employed when the compound comprises a nucleic acid are described above; additional appropriate formulations and routes of administration are described below.

Various delivery systems are known and can be used to administer a

WO 01/75454

PCT/US01/10908

compound of the invention, *e.g.*, encapsulation in liposomes, microparticles, microcapsules, recombinant cells capable of expressing the compound, receptor-mediated endocytosis (see, *e.g.*, Wu and Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432), construction of a nucleic acid as part of a retroviral or other vector, etc. Methods of introduction can be enteral or parenteral and include but are not limited to intradermal, intramuscular, intraperitoneal, intravenous, subcutaneous, intranasal, epidural, and oral routes. The compounds may be administered by any convenient route, for example by infusion or bolus injection, by absorption through epithelial or mucocutaneous linings (*e.g.*, oral mucosa, rectal and intestinal mucosa, etc.) and may be administered together with other biologically active agents. Administration can be systemic or local. In addition, it may be desirable to introduce the pharmaceutical compositions of the invention into the central nervous system by any suitable route, including intraventricular and intrathecal injection; intraventricular injection may be facilitated by an intraventricular catheter, for example, attached to a reservoir, such as an Ommaya reservoir. Pulmonary administration can also be employed, *e.g.*, by use of an inhaler or nebulizer, and formulation with an aerosolizing agent.

In a specific embodiment, it may be desirable to administer the pharmaceutical compositions of the invention locally to the area in need of treatment; this may be achieved, for example, and not by way of limitation, by local infusion during surgery, topical application, *e.g.*, by injection, by means of a catheter, or by means of an implant, said implant being of a porous, non-porous, or gelatinous material, including membranes, such as sialastic membranes, or fibers. In one embodiment, administration can be by direct injection into CSF or at the site (or former site) of neurodegeneration or to CNS tissue.

In another embodiment, the compound can be delivered in a vesicle, in particular a liposome (see Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; see generally *ibid.*)

In yet another embodiment, the compound can be delivered in a controlled release system. In one embodiment, a pump may be used (see Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). In another embodiment, polymeric materials can be used (see *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and

WO 01/75454

PCT/US01/10908

Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; see also Levy et al., 1985, Science 228:190; Doring et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; 5 Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105). In yet another embodiment, a controlled release system can be placed in proximity of the therapeutic target, *i.e.*, the brain, thus requiring only a fraction of the systemic dose (see, *e.g.*, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Other suitable controlled release systems are discussed in the review by 10 Langer (1990, Science 249:1527-1533).

In another embodiment where the compound of the invention is a nucleic acid encoding a protein, the nucleic acid can be administered *in vivo* to promote expression of its encoded protein, by constructing it as part of an appropriate nucleic acid expression vector and administering it so that it becomes intracellular, *e.g.*, by use of a 15 retroviral vector (see U.S. Patent No. 4,980,286), or by direct injection, or by use of microparticle bombardment (*e.g.*, a gene gun; Biolistic, Dupont), or coating with lipids or cell-surface receptors or transfecting agents, or by administering it in linkage to a homeobox-like peptide which is known to enter the nucleus (see *e.g.*, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Alternatively, a nucleic acid 20 can be introduced intracellularly and incorporated within host cell DNA for expression, by homologous recombination.

The present invention also provides pharmaceutical compositions. Such compositions comprise a therapeutically effective amount of an agent, and a pharmaceutically acceptable carrier. In a particular embodiment, the term 25 "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the therapeutic is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and 30 oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water is a preferred carrier when the pharmaceutical composition is administered intravenously. Saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions can also be employed as liquid carriers, particularly for injectable solutions. Suitable pharmaceutical excipients

WO 01/75454

PCT/US01/10908

include starch, glucose, lactose, sucrose, gelatin, malt, rice, flour, chalk, silica gel, sodium stearate, glycerol monostearate, talc, sodium chloride, dried skim milk, glycerol, propylene, glycol, water, ethanol and the like. The composition, if desired, can also contain minor amounts of wetting or emulsifying agents, or pH buffering agents. These compositions can take the form of solutions, suspensions, emulsion, tablets, pills, capsules, powders, sustained-release formulations and the like. The composition can be formulated as a suppository, with traditional binders and carriers such as triglycerides. Oral formulation can include standard carriers such as pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate, etc. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin. Such compositions will contain a therapeutically effective amount of the compound, preferably in purified form, together with a suitable amount of carrier so as to provide the form for proper administration to the subject. The formulation should suit the mode of administration.

In a preferred embodiment, the composition is formulated in accordance with routine procedures as a pharmaceutical composition adapted for intravenous administration to human beings. Typically, compositions for intravenous administration are solutions in sterile isotonic aqueous buffer. Where necessary, the composition may also include a solubilizing agent and a local anesthetic such as lidocaine to ease pain at the site of the injection. Generally, the ingredients are supplied either separately or mixed together in unit dosage form, for example, as a dry lyophilized powder or water free concentrate in a hermetically sealed container such as an ampoule or sachette indicating the quantity of active agent. Where the composition is to be administered by infusion, it can be dispensed with an infusion bottle containing sterile pharmaceutical grade water or saline. Where the composition is administered by injection, an ampoule of sterile water for injection or saline can be provided so that the ingredients may be mixed prior to administration.

The compounds of the invention can be formulated as neutral or salt forms. Pharmaceutically acceptable salts include those formed with free amino groups such as those derived from hydrochloric, phosphoric, acetic, oxalic, tartaric acids, etc., and those formed with free carboxyl groups such as those derived from sodium, potassium, ammonium, calcium, ferric hydroxides, isopropylamine, triethylamine, 2-ethylamino ethanol, histidine, procaine, etc.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

The amount of the compound of the invention which will be effective in the treatment of Alzheimer's disease can be determined by standard clinical techniques based on the present description. In addition, *in vitro* assays may optionally be employed to help identify optimal dosage ranges. The precise dose to be employed in the formulation will also depend on the route of administration, and the seriousness of the disease or disorder, and should be decided according to the judgment of the practitioner and each subject's circumstances. However, suitable dosage ranges for intravenous administration are generally about 20-500 micrograms of active compound per kilogram body weight. Suitable dosage ranges for intranasal administration are generally about 0.01 pg/kg body weight to 1 mg/kg body weight. Effective doses may be extrapolated from dose-response curves derived from *in vitro* or animal model test systems.

Suppositories generally contain active ingredient in the range of 0.5% to 10% by weight; oral formulations preferably contain 10% to 95% active ingredient.

The invention also provides a pharmaceutical pack or kit comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the pharmaceutical compositions of the invention. Optionally associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, which notice reflects (a) approval by the agency of manufacture, use or sale for human administration, (b) directions for use, or both.

#### 6. EXAMPLE: IDENTIFICATION OF PROTEINS DIFFERENTIALLY EXPRESSED IN THE CSF IN ALZHEIMER'S DISEASE

Using the following exemplary and non-limiting procedure, proteins in CSF samples from (a) 148 subjects having Alzheimer's disease, (b) 60 family members of these Alzheimer's disease subjects, and (c) 32 unrelated controls were separated by isoelectric focusing followed by SDS-PAGE and analyzed. From some subjects, serial samples were taken over time. Parts 6.1.1 to 6.1.9 (inclusive) of the procedure set forth below are hereby designated as the "Reference Protocol".

#### 6.1. MATERIALS AND METHODS

##### 6.1.1 Sample Preparation

WO 01/75454

PCT/US01/10908

A protein assay (Pierce BCA Cat # 23225) was performed on each CSF sample as received. Prior to protein separation, each sample was processed for selective depletion of certain proteins, in order to enhance and simplify protein separation and facilitate analysis by removing proteins that may interfere with or limit analysis of proteins of interest. See International Patent Application No. PCT/GB99/01742, filed June 1, 1999, which is incorporated by reference in its entirety, with particular reference to pages 3 and 6.

Removal of albumin, haptoglobin, transferrin and immunoglobulin G (IgG) from CSF ("CSF depletion") was achieved by an affinity chromatography purification step in which the sample was passed through a series of 'Hi-Trap' columns containing immobilized antibodies for selective removal of albumin, haptoglobin and transferrin, and protein G for selective removal of immunoglobulin G. Two affinity columns in a tandem assembly were prepared by coupling antibodies to protein G-sepharose contained in Hi-Trap columns (Protein G-Sepharose Hi-Trap columns (1 ml) Pharmacia Cat. No. 17-0404-01). This was done by circulating the following solutions sequentially through the columns: (1) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Gibco BRL Cat. No. 14190-094); (2) concentrated antibody solution; (3) 200 mM sodium carbonate buffer, pH 8.35; (4) cross-linking solution (200 mM sodium carbonate buffer, pH 8.35, 20 mM dimethylpimelimidate); and (5) 500 mM ethanolamine, 500 mM NaCl. A third (un-derivatised) protein G Hi-Trap column was then attached to the lower end of the tandem column assembly.

The chromatographic procedure was automated using an Akta Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) System such that a series of up to seven runs could be performed sequentially. The samples were passed through the series of 3 Hi-Trap columns in which the affinity chromatography media selectively bind the above proteins thereby removing them from the sample. Fractions (typically 3 ml per tube) were collected of unbound material ("Flowthrough fractions") that eluted through the column during column loading and washing stages and of bound proteins ("Bound/Eluted fractions") that were eluted by step elution with Immunopure Gentle Ag/Ab Elution Buffer (Pierce Cat. No. 21013). The eluate containing unbound material was collected in fractions which were pooled, desalted/concentrated by centrifugal ultrafiltration and stored to await further analysis by 2D PAGE.

A volume of depleted CSF containing approximately 300 µg of total protein was aliquoted and an equal volume of 10% (w/v) SDS (Fluka 71729), 2.3% (w/v)

WO 01/75454

PCT/US01/10908

dithiothreitol (BDH 443852A) was added. The sample was heated at 95°C for 5 mins, and then allowed to cool to 20°C. 125µl of the following buffer was then added to the sample:

- 8M urea (BDH 452043w )
- 5 4% CHAPS (Sigma C3023)
- 65mM dithiothreitol (DTT)
- 2% (v/v) Resolytes 3.5-10 (BDH 44338 2x)

This mixture was vortexed, and centrifuged at 13000 rpm for 5 mins at 15°C, and the supernatant was analyzed by isoelectric focusing.

10

#### 6.1.2 Isoelectric Focusing

Isoelectric focusing (IEF), was performed using the Immobiline® DryStrip Kit (Pharmacia BioTech), following the procedure described in the manufacturer's instructions, see Instructions for Immobiline® DryStrip Kit, Pharmacia, # 18-1038-63,

- 15 Edition AB (incorporated herein by reference in its entirety). Immobilized pH Gradient (IPG) strips (18cm, pH 3-10 non-linear strips; Pharmacia Cat. # 17-1235-01) were rehydrated overnight at 20°C in a solution of 8M urea, 2% (w/v) CHAPS, 10mM DTT, 2% (v/v) Resolytes 3.5-10, as described in the Immobiline DryStrip Users Manual. For IEF, 50µl of supernatant (prepared as above) was loaded onto a strip,
- 20 with the cup-loading units being placed at the basic end of the strip. The loaded gels were then covered with mineral oil (Pharmacia 17-3335-01) and a voltage was immediately applied to the strips according to the following profile, using a Pharmacia EPS3500XL power supply (Cat 19-3500-01):

- 25 Initial voltage = 300V for 2 hrs
- Linear Ramp from 300V to 3500V over 3hrs
- Hold at 3500V for 19hrs

- 30 For all stages of the process, the current limit was set to 10mA for 12 gels, and the wattage limit to 5W. The temperature was held at 20°C throughout the run.

#### 6.1.3 Gel Equilibration and SDS-PAGE

WO 01/75454

PCT/US01/10908

After the final 19hr step, the strips were immediately removed and immersed for 10 mins at 20°C in a first solution of the following composition: 6M urea; 2% (w/v) DTT; 2% (w/v) SDS; 30% (v/v) glycerol (Fluka 49767); 0.05M Tris/HCl, pH 6.8 (Sigma Cat T-1503). The strips were removed from the first solution and

5 immersed for 10 mins at 20°C in a second solution of the following composition: 6M urea; 2% (w/v) iodoacetamide (Sigma I-6125); 2% (w/v) SDS; 30% (v/v) glycerol; 0.05M Tris/HCl, pH 6.8. After removal from the second solution, the strips were loaded onto supported gels for SDS-PAGE according to Hochstrasser et al., 1988, Analytical Biochemistry 173: 412-423 (incorporated herein by reference in its

10 entirety), with modifications as specified below.

#### 6.1.4 Preparation of supported gels

The gels were cast between two glass plates of the following dimensions: 23cm wide x 24cm long (back plate); 23cm wide x 24cm long with a 2cm deep notch in the

15 central 19cm (front plate). To promote covalent attachment of SDS-PAGE gels, the back plate was treated with a 0.4% solution of  $\gamma$ -methacryl-oxypropyltrimethoxysilane in ethanol (BindSilane™; Pharmacia Cat. # 17-1330-01). The front plate was treated with (RepelSilane™ Pharmacia Cat. # 17-1332-01) to reduce adhesion of the gel. Excess reagent was removed by washing with water, and the plates were allowed to

20 dry. At this stage, both as identification for the gel, and as a marker to identify the coated face of the plate, an adhesive bar-code was attached to the back plate in a position such that it would not come into contact with the gel matrix.

The dried plates were assembled into a casting box with a capacity of 13 gel sandwiches. The top and bottom plates of each sandwich were spaced by means of

25 1mm thick spacers, 2.5 cm wide. The sandwiches were interleaved with acetate sheets to facilitate separation of the sandwiches after gel polymerization. Casting was then carried out according to Hochstrasser et al., *op. cit.*

A 9-16% linear polyacrylamide gradient was cast, extending up to a point 2cm below the level of the notch in the front plate, using the Angelique gradient casting

30 system (Large Scale Biology). Stock solutions were as follows. Acrylamide (40% in water) was from Serva (Cat. # 10677). The cross-linking agent was PDA (BioRad 161-0202), at a concentration of 2.6% (w/w) of the total starting monomer content. The gel buffer was 0.375M Tris/HCl, pH 8.8. The polymerization catalyst was 0.05%

WO 01/75454

PCT/US01/10908

(v/v) TEMED (BioRad 161-0801), and the initiator was 0.1% (w/v) APS (BioRad 161-0700). No SDS was included in the gel and no stacking gel was used. The cast gels were allowed to polymerize at 20°C overnight, and then stored at 4°C in sealed polyethylene bags with 6ml of gel buffer, and were used within 4 weeks.

5

#### 6.1.5 SDS-PAGE

A solution of 0.5% (w/v) agarose (Fluka Cat 05075) was prepared in running buffer (0.025M Tris, 0.198M glycine (Fluka 50050), 1% (w/v) SDS, supplemented by a trace of bromophenol blue). The agarose suspension was heated to 70°C with stirring, until the agarose had dissolved. The top of the supported 2nd D gel was filled with the agarose solution, and the equilibrated strip was placed into the agarose, and tapped gently with a palette knife until the gel was intimately in contact with the 2nd D gel. The gels were placed in the 2nd D running tank, as described by Amess et al., 1995, Electrophoresis 16: 1255-1267 (incorporated herein by reference in its entirety). The tank was filled with running buffer (as above) until the level of the buffer was just higher than the top of the region of the 2nd D gels which contained polyacrylamide, so as to achieve efficient cooling of the active gel area. Running buffer was added to the top buffer compartments formed by the gels, and then voltage was applied immediately to the gels using a Consort E-833 power supply. For 1 hour, the gels were run at 20mA/gel. The wattage limit was set to 150W for a tank containing 6 gels, and the voltage limit was set to 600V. After 1 hour, the gels were then run at 40mA/gel, with the same voltage and wattage limits as before, until the bromophenol blue line was 0.5cm from the bottom of the gel. The temperature of the buffer was held at 16°C throughout the run. Gels were not run in duplicate.

25

#### 6.1.6 Staining

Upon completion of the electrophoresis run, the gels were immediately removed from the tank for fixation. The top plate of the gel cassette was carefully removed, leaving the gel bonded to the bottom plate. The bottom plate with its attached gel was then placed into a staining apparatus, which can accommodate 12 gels. The gels were completely immersed in fixative solution of 40% (v/v) ethanol (BDH 28719), 10% (v/v) acetic acid (BDH 100016X), 50% (v/v) water (MilliQ-Millipore), which was continuously circulated over the gels. After an overnight

WO 01/75454

PCT/US01/10908

incubation, the fixative was drained from the tank, and the gels were primed by immersion in 7.5% (v/v) acetic acid, 0.05% (w/v) SDS, 92.5% (v/v) water for 30 mins. The priming solution was then drained, and the gels were stained by complete immersion for 4 hours in a staining solution of Pyridinium, 4-[2-[4-(dipentylamino)-2-trifluoromethylphenyl] ethenyl]-1-(sulfobutyl)-, inner salt, prepared by diluting a stock solution of this dye (2mg/ml in DMSO) in 7.5% (v/v) aqueous acetic acid to give a final concentration of 1.2 mg/l; the staining solution was vacuum filtered through a 0.4µm filter (Duropore) before use.

#### 10 6.1.7 Imaging of the gel

A computer-readable output was produced by imaging the fluorescently stained gels with the Apollo 2 scanner (Oxford Glycosciences, Oxford, UK) described in section 5.1, *supra*. This scanner has a gel carrier with four integral fluorescent markers (Designated M1, M2, M3, M4) that are used to correct the image geometry and are a quality control feature to confirm that the scanning has been performed correctly.

For scanning, the gels were removed from the stain, rinsed with water and allowed to air dry briefly, and imaged on the Apollo 2. After imaging, the gels were sealed in polyethylene bags containing a small volume of staining solution, and then stored at 4°C.

#### 6.1.8 Digital Analysis of the Data

The data were processed as described in U.S. Application Serial No. 08/980,574, (published as WO 98/23950) at Sections 5.4 and 5.5 (incorporated herein by reference), as set forth more particularly below.

The output from the scanner was first processed using the MELANIE® II 2D PAGE analysis program (Release 2.2, 1997, BioRad Laboratories, Hercules, California, Cat. # 170-7566) to autodetect the registration points, M1, M2, M3 and M4; to autocrop the images (*i.e.*, to eliminate signals originating from areas of the scanned image lying outside the boundaries of the gel, *e.g.* the reference frame); to filter out artifacts due to dust; to detect and quantify features; and to create image files in GIF format. Features were detected using the following parameters:

Smooths =2

WO 01/75454

PCT/US01/10908

Laplacian threshold 50

Partials threshold 1

Saturation = 100

Peakedness = 0

5 Minimum Perimeter = 10

## 6.1.9 Assignment of pI and MW Values

Landmark identification was used to determine the pI and MW of features detected in the images. Twelve landmark features, designated CSF1 to CSF12, were identified in a standard CSF image obtained from a pooled sample. These landmark features are identified in Figure 1 and were assigned the pI and/or MW values identified in Table XI.

Table XI. Landmark Features Used In This Study

Name	pI	MW (Da)	Name	pI	MW (Da)
CSF1	5.96	185230	CSF7	4.78	41340
CSF2	5.39	141700	CSF8	9.2	40000
CSF3	6.29	100730	CSF9	5.5	31900
CSF4	5.06	71270	CSF10	6.94	27440
CSF5	7.68	68370	CSF11	5.9	23990
CSF6	5.67	48090	CSF12	6.43	10960

As many of these landmarks as possible were identified in each gel image of the dataset. Each feature in the study gels was then assigned a pI value by linear interpolation or extrapolation (using the MELANIE®-II software) to the two nearest landmarks, and was assigned a MW value by linear interpolation or extrapolation (using the MELANIE®-II software) to the two nearest landmarks.

## 6.1.10 Matching With Primary Master Image

WO 01/75454

PCT/US01/10908

Images were edited to remove gross artifacts such as dust, to reject images which had gross abnormalities such as smearing of protein features, or were of too low a loading or overall image intensity to allow identification of more than the most intense features, or were of too poor a resolution to allow accurate detection of features. Images were then compared by pairing with one common image from the whole sample set. This common image, the "primary master image", was selected on the basis of protein load (maximum load consistent with maximum feature detection), a well resolved myoglobin region, (myoglobin was used as an internal standard), and general image quality. Additionally, the primary master image was chosen to be an image which appeared to be generally representative of all those to be included in the analysis. (This process by which a primary master gel was judged to be representative of the study gels was rechecked by the method described below and in the event that the primary master gel was seen to be unrepresentative, it was rejected and the process repeated until a representative primary master gel was found.)

Each of the remaining study gel images was individually matched to the primary master image such that common protein features were paired between the primary master image and each individual study gel image as described below.

#### 6.1.11 Cross-matching Between Samples

To facilitate statistical analysis of large numbers of samples for purposes of identifying features that are differentially expressed, the geometry of each study gel was adjusted for maximum alignment between its pattern of protein features, and that of the primary master, as follows. Each of the study gel images was individually transformed into the geometry of the primary master image using a multi-resolution warping procedure. This procedure corrects the image geometry for the distortions brought about by small changes in the physical parameters of the electrophoresis separation process from one sample to another. The observed changes are such that the distortions found are not simple geometric distortions, but rather a smooth flow, with variations at both local and global scale.

The fundamental principle in multi-resolution modeling is that smooth signals may be modeled as an evolution through 'scale space', in which details at successively finer scales are added to a low resolution approximation to obtain the high resolution

WO 01/75454

PCT/US01/10908

signal. This type of model is applied to the flow field of vectors (defined at each pixel position on the reference image) and allows flows of arbitrary smoothness to be modeled with relatively few degrees of freedom. Each image is first reduced to a stack, or pyramid, of images derived from the initial image, but smoothed and reduced  
5 in resolution by a factor of 2 in each direction at every level (Gaussian pyramid) and a corresponding difference image is also computed at each level, representing the difference between the smoothed image and its progenitor (Laplacian pyramid). Thus the Laplacian images represent the details in the image at different scales.

To estimate the distortion between any 2 given images, a calculation was  
10 performed at level 7 in the pyramid (*i.e.* after 7 successive reductions in resolution). The Laplacian images were segmented into a grid of 16x16 pixels, with 50% overlap between adjacent grid positions in both directions, and the cross correlation between corresponding grid squares on the reference and the test images was computed. The distortion displacement was then given by the location of the maximum in the  
15 correlation matrix. After all displacements had been calculated at a particular level, they were interpolated to the next level in the pyramid, applied to the test image, and then further corrections to the displacements were calculated at the next scale.

The warping process brought about good alignment between the common features in the primary master image, and the images for the other samples. The  
20 MELANIE® II 2D PAGE analysis program was used to calculate and record approximately 500-700 matched feature pairs between the primary master and each of the other images. The accuracy of this program was significantly enhanced by the alignment of the images in the manner described above. To improve accuracy still further, all pairings were finally examined by eye in the MelView interactive editing  
25 program and residual recognizably incorrect pairings were removed. Where the number of such recognizably incorrect pairings exceeded the overall reproducibility of the Preferred Technology (as measured by repeat analysis of the same biological sample) the gel selected to be the primary master gel was judged to be insufficiently representative of the study gels to serve as a primary master gel. In that case, the gel  
30 chosen as the primary master gel was rejected, and different gel was selected as the primary master gel, and the process was repeated.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

All the images were then added together to create a composite master image, and the positions and shapes of all the gel features of all the component images were super-imposed onto this composite master as described below.

5       Once all the initial pairs had been computed, corrected and saved, a second pass was performed whereby the original (unwarped) images were transformed a second time to the geometry of the primary master, this time using a flow field computed by smooth interpolation of the multiple tie-points defined by the centroids of the paired gel features. A composite master image was thus generated by initialising the primary master image with its feature descriptors. As each image was  
10 transformed into the primary master geometry, it was digitally summed pixel by pixel into the composite master image, and the features that had not been paired by the procedure outlined above were likewise added to the composite master image description, with their centroids adjusted to the master geometry using the flow field correction.

15       The final stage of processing was applied to the composite master image and its feature descriptors, which now represent all the features from all the images in the study transformed to a common geometry. The features were grouped together into linked sets or "clusters", according to the degree of overlap between them. Each cluster was then given a unique identifying index, the molecular cluster index (MCI).

20       An MCI identifies a set of matched features on different images. Thus an MCI represents a protein or proteins eluting at equivalent positions in the 2D separation in different samples.

#### 6.1.12. Construction of Profiles

25       After matching all component gels in the study to the final composite master image, the intensity of each feature was measured and stored. The end result of this analysis was the generation of a digital profile which contained, for each identified feature: 1) a unique identification code relative to corresponding feature within the composite master image (MCI), 2) the x, y coordinates of the features within the gel,  
30 3) the isoelectric point (pI) of the AFs, 4) the apparent molecular weight (MW) of the AFs, 5) the signal value, 6) the standard deviation for each of the preceding measurements, and 7) a method of linking the MCI of each feature to the master gel to

WO 01/75454

PCT/US01/10908

which this feature was matched. By virtue of a Laboratory Information Management System (LIMS), this MCI profile was traceable to the actual stored gel from which it was generated, so that proteins identified by computer analysis of gel profile databases could be retrieved. The LIMS also permitted the profile to be traced back to an  
5 original sample or patient.

#### 6.1.13. Differential Analysis of the Profiles

For the pooled gel data within each sample set (Alzheimer's CSF and normal CSF), the profiles were analyzed to identify and select those features differentially  
10 present in the profiles. These selected features were then assembled into an Alzheimer's pooled gel feature set. Matching features of each feature set were then compared to identify those features showing at least a 2-fold difference in mean intensity between Alzheimer's CSF and normal CSF. Differentially present features were identified as Alzheimer's Disease Associated Features (AFs).

15

#### 6.1.14. Statistical Analysis of the Profiles

The MCI data was represented in statistical models in two forms: 1) percent of total protein volume for a given gel (PCTVOL) and 2) absolute volume, scaled by the total volume loaded on the gel (VOL). A value of 0 was entered for PCTVOL and  
20 VOL if an MCI did not appear on a particular gel. For most analyzes, in order for an MCI to be considered in the statistical model, it had to have non-zero values for PCTVOL and VOL in at least 75% of gels in at least one of the diagnosis groups in the analysis (described below).

The complementary statistical strategies specified below were used to identify  
25 AFs from the MCIs within the mastergroup.

##### (I) Group Analysis

The purpose of these analyses was to characterize differences among gels from individuals with different clinical diagnoses. The diagnosis groups were 1) autopsy-confirmed (AD) vs. normal controls (NCO) at their first sample, 2) Dementia  
30 Alzheimer's type (DAT) with an initial sample within 3 years of disease onset vs.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

NCO, and 3) last sample of first-degree relatives of individuals diagnosed with dementia of Alzheimer's type without a clinical diagnosis of dementia (NCF) vs. NCO.

The following statistical techniques were used in the group analyses:

(1) Linear model

5 A linear model controlling for age and gender that compared a DAT group vs the NCO group with regard to the rank of the volume.

(2) Classification trees

Classification trees were used with the MCI volumes as predictors, and clinical diagnosis as the response. The algorithm looks for 'split points' in the predictors that partition the data into homogeneous sets according to the response variable. After  
10 evaluating all possible splits for a given node of the tree, the split is chosen that maximizes the change in deviance according to a multinomial likelihood model. Tree models were fit to both the original data and data from bootstrap samples of the original data (sampling with replacement). The statistical test involved whether a  
15 given MCI proved to be an important 'split point' to determine diagnosis, either in the original data tree or a bootstrap sample tree.

(3) Logistic regression model

A logistic regression model was used to model the probability of being AD. The volumes of the various MCI's were used as the explanatory variables. A stepwise  
20 procedure was used to select 5 MCI's.

Criteria for inclusion based on the group analyses:

Information from all of the above described analyses were used to select MCI's that:

1. Were among the 5-6 MCI's with the smallest p-value for a given analysis
- 25 2. Appeared in the smallest 100 p-values for 2 or more analysis
3. Appeared as an important split-point in a classification tree
4. Had desired distributional properties

(II) Longitudinal Analysis

WO 01/75454

PCT/US01/10908

The purpose of the longitudinal analyses was to identify AF's associated with changes in disease state as measured by the MMSEM, a combination of the MMSE, CDR, and GDS assessment measures. DAT subjects with two or more samples were used in these analyses.

5 There were two models employed in the longitudinal analyses. In the first, the goal was to identify AF's for which changes in volume were significantly correlated with changes in the MMSEM. For each AF, MMSEM was regressed on the rank of the volume after controlling for age and subject. AF's with p-values less than 0.05, in the top 100 of any of the group analyses, and consistent with the group analyses in  
10 terms of up or down regulation were included.

The goal of the second model was to identify AF's for which volume in a subject's first sample was a significant predictor of disease progression rate during the period following the time of the first sample. First, a simple linear regression model was used to estimate a progression rate based on the MMSEM for each subject. Only  
15 subjects with an initial MMSEM greater than or equal to 12 and with greater than four months between the first and last samples were used. In addition, only samples within the first three years of the first sample were used. Regression modeling and split-sample validation were then used to identify significant AF's. More specifically, subjects were first randomly divided into two groups. For each group, stepwise  
20 weighted least-squares (WLS) regression using the rank of volume from each subject's first sample was used to select the five best AF's for predicting progression rate. If an AF was in the top five in one group and yielded a slope estimate with the same sign when included in the other group, it was included. In addition, the top five AF's from a stepwise WLS on both groups combined were included.

25

#### 6.1.15 Recovery and analysis of selected proteins

Proteins in AFs were robotically excised and processed to generate tryptic digest peptides. Tryptic peptides were analyzed by mass spectrometry using a PerSeptive Biosystems Voyager-DE<sup>TM</sup> STR Matrix-Assisted Laser Desorption  
30 Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometer, and selected tryptic peptides were analyzed by tandem mass spectrometry (MS/MS) using a Micromass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) mass spectrometer (Micromass, Altrincham,

WO 01/75454

PCT/US01/10908

U.K.) equipped with a nanoflow<sup>TM</sup> electrospray Z-spray source. For partial amino acid sequencing and identification of APIs uninterpreted tandem mass spectra of tryptic peptides were searched using the SEQUEST search program (Eng et al., 1994, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5:976-989), version v.C.1. Criteria for database identification included: the cleavage specificity of trypsin; the detection of a suite of a, b and y ions in peptides returned from the database, and a mass increment for all Cys residues to account for carbamidomethylation. The database searched was database constructed of protein entries in the non-redundant database held by the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) which is accessible at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Following identification of proteins through spectral-spectral correlation using the SEQUEST program, masses detected in MALDI-TOF mass spectra were assigned to tryptic digest peptides within the proteins identified. In cases where no proteins could be identified through searching with uninterpreted MS/MS spectra of tryptic digest peptides using the SEQUEST program, tandem mass spectra of the peptides were interpreted manually, using methods known in the art. (In the case of interpretation of low-energy fragmentation mass spectra of peptide ions see Gaskell et al., 1992, Rapid Commun. Mass Spectrom. 6:658-662).

## 6.2 RESULTS

These initial experiments identified 117 features that were decreased and 64 features that were increased in Alzheimer's disease CSF as compared with normal CSF. Details of these AFs are provided in Tables I and II. Each AF was differentially present in Alzheimer's disease CSF as compared with normal CSF. For some preferred AFs (AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6, AF-7, AF-8, AF-9, AF-10, AF-13, AF-14, AF-15, AF-16, AF-17, AF-19, AF-20, AF-21, AF-23, AF-24, AF-25, AF-26, AF-28, AF-29, AF-30, AF-32, AF-33, AF-35, AF-37, AF-38, AF-39, AF-40, AF-42, AF-43, AF-46, AF-47, AF-48, AF-51, AF-54, AF-55, AF-56, AF-57, AF-59, AF-60, AF-62, AF-64, AF-65, AF-66, AF-67, AF-68, AF-69, AF-71, AF-73, AF-75, AF-76, AF-149, AF-150, AF-152, AF-153, AF-154, AF-155, AF-156, AF-157, AF-159, AF-160, AF-161, AF-162, AF-163, AF-165, AF-166, AF-167, AF-168, AF-169, AF-170, AF-171, AF-173, AF-174, AF-177, AF-180, AF-181, AF-182, AF-183, AF-184, AF-185, AF-186, AF-187, AF-188, AF-189, AF-190, AF-191, AF-192) the difference was highly significant ( $p < 0.01$ ), and for certain highly preferred AFs (AF-2, AF-3,

WO 01/75454

PCT/US01/10908

AF-5, AF-6, AF-9, AF-10, AF-13, AF-15, AF-16, AF-17, AF-20, AF-21, AF-23, AF-24, AF-28, AF-29, AF-30, AF-33, AF-37, AF-52, AF-55, AF-57, AF-62, AF-64, AF-66, AF-73, AF-150, AF-154, AF-155, AF-159, AF-161, AF-165, AF-166, AF-168, AF-169, AF-183, AF-187, AF-189, AF-190, AF-191, AF-192), the difference was still  
5 more significant ( $p < 0.001$ ).

Partial amino acid sequences were determined for the differentially present APIs in these AFs. Details of these APIs are provided in Tables IV and V. Computer searches of public databases identified at least one API for which neither the partial amino acid sequence, nor any oligonucleotide encoding such a peptide sequence, was  
10 described in any public database examined.

#### 7. EXAMPLE: DIAGNOSIS AND TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE

The following example illustrate the use of an API of the invention for  
15 screening, treatment or diagnosis of Alzheimer's disease. The following example also illustrates the use of modulators (*e.g.*, agonist or antagonists) of an API of the invention to treat or prevent Alzheimer's disease.

Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is a neurotrophic protein synthesized and secreted by retinal pigment epithelial cells in early embryogenesis and  
20 has been shown to be present in the extracellular matrix between the RPE cells and the neural retina. It induces neuronal differentiation and promotes survival of neurons of the central nervous system from degeneration caused by serum withdrawal or glutamate cytotoxicity. PEDF has been shown to protect immature but not mature cerebellar cells from apoptotic death, acting as a survival factor for such cells, as well  
25 as protecting them against glutamate and hydrogen peroxide toxicity. PEDF binds to glycosaminoglycans and to an 80 kDa receptor present on the surface of retinoblastoma and cerebellar granule cells. PEDF binding to the 80 kDa receptor, as well as PEDF activity, may be blocked by antibodies recognizing PEDF, and by a 44 amino acid fragment (amino acids 78-121) of PEDF.

30 The expression of an isoform of PEDF with a molecular weight of 33,401 kDa and pI of 6.74 has been shown herein to be significantly increased in the cerebrospinal fluid (CSF) of subjects having Alzheimer's disease as compared with the CSF of

WO 01/75454

PCT/US01/10908

subjects free from Alzheimer's disease. Thus, quantitative detection of PEDF in CSF can be used to diagnose Alzheimer's disease, determine the progression of Alzheimer's disease or monitor the effectiveness of a therapy for Alzheimer's disease.

5 In one embodiment of the invention, compounds that modulate (*i.e.*, upregulate or downregulate) the expression, activity or both the expression and activity of PEDF are administered to a subject in need of treatment or for prophylaxis of Alzheimer's disease. Antibodies that modulate the expression, activity or both the expression and activity of PEDF are suitable for this purpose. In addition, nucleic acids coding for all or a portion of PEDF, or nucleic acids complementary to all or a portion of PEDF, 10 may be administered. PEDF, or fragments of the PEDF polypeptide may also be administered.

The invention also provides screening assays to identify additional compounds that modulate the expression of PEDF or activity of PEDF. Compounds that modulate the expression of PEDF *in vitro* can be identified by comparing the expression of 15 PEDF in cells treated with a test compound to the expression of PEDF in cells treated with a control compound (*e.g.*, saline). Methods for detecting expression of PEDF are known in the art and include measuring the level of PEDF RNA (*e.g.*, by northern blot analysis or RT-PCR) and measuring PEDF protein (*e.g.*, by immunoassay or western blot analysis). Compounds that modulate the activity of PEDF can be identified by 20 comparing the ability of a test compound to agonize or antagonize a function of PEDF, such as its neurotrophic activity or its binding to the 80 kDa receptor, to the ability of a control compound (*e.g.*, saline) to inhibit the same function of PEDF. Compounds capable of modulating PEDF binding to its receptor or PEDF activity are identified as compounds suitable for further development as a compound useful for the treatment of 25 Alzheimer's disease.

Binding between PEDF and its receptor can be determined by, for example, contacting PEDF with cells known to express the PEDF receptor and assaying the extent of binding between PEDF and the cell surface receptor, or by contacting PEDF with its receptor in a cell-free assay, *i.e.*, an assay where the PEDF and PEDF receptor 30 are isolated, and, preferably, recombinantly produced, and assaying the extent of binding between PEDF and its receptor. Through the use of such assays, candidate compounds may be tested for their ability to agonize or antagonize the binding of PEDF to its receptor.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

Compounds identified *in vitro* that affect the expression or activity of PEDF can be tested *in vivo* in animal models of Alzheimer's disease or Downs syndrome, or in subjects having Alzheimer's disease, to determine their therapeutic efficacy.

The present invention is not to be limited in terms of the particular  
5 embodiments described in this application, which are intended as single illustrations of individual aspects of the invention. Functionally equivalent methods and apparatus within the scope of the invention, in addition to those enumerated herein, will be apparent to those skilled in the art from the foregoing description and accompanying drawings. Such modifications and variations are intended to fall within the scope of  
10 the appended claims. The contents of each reference, patent and patent application cited in this application is hereby incorporated by reference in its entirety.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

## WE CLAIM:

1. A method for screening, diagnosis or prognosis of Alzheimer's disease in a mammal, for identifying a mammal at risk of developing Alzheimer's disease, and/or for monitoring the effect of therapy administered to a mammal having  
5 Alzheimer's disease, said method comprising:
  - (a) analyzing a test sample of body fluid from the mammal by two  
dimensional electrophoresis to generate a two-dimensional array of  
features, said array comprising at least one chosen feature whose  
relative abundance correlates with the presence, absence, stage or  
10 severity of Alzheimer's disease or predicts the onset or course of  
Alzheimer's disease; and
  - (b) comparing the abundance of each chosen feature in the test sample  
with the abundance of that chosen feature in body fluid from one or  
more persons free from Alzheimer's disease, or with a previously  
15 determined reference range for that feature in subjects free from  
Alzheimer's disease, or with the abundance at least one Expression  
Reference Feature (ERF) in the test sample.
2. The method of claim 1, wherein the body fluid is cerebrospinal fluid (CSF).  
20
3. The method of claim 1 or claim 2, wherein said method is for screening or  
diagnosis of Alzheimer's disease and the relative abundance of at least one chosen  
feature correlates with the presence or absence of Alzheimer's disease.
- 25 4. The method of claim 1 or claim 2, wherein said method is for monitoring  
the effect of therapy administered to a subject having Alzheimer's disease and the  
relative abundance of at least one chosen feature correlates with the severity of  
Alzheimer's disease.
- 30 5. The method of claim 2, wherein step (b) comprises comparing the  
abundance of each chosen feature in the sample with the abundance of that chosen

WO 01/75454

PCT/US01/10908

feature in CSF from one or more mammals free from Alzheimer's disease or with a previously determined reference range for that chosen feature in mammals free from Alzheimer's disease.

5           6. The method of claim 1 or claim 2, wherein step (a) comprises quantitatively detecting one or more of the following Alzheimer's Disease-Associated Features (AFs): AF-1, AF-2, AF-3, AF-4, AF-5, AF-6, AF-7, AF-8, AF-9, AF-10, AF-13, AF-14, AF-15, AF-16, AF-17, AF-18, AF-19, AF-20, AF-21, AF-22, AF-23, AF-24, AF-25, AF-26, AF-27, AF-28, AF-29, AF-30, AF-31, AF-32, AF-33, AF-34, AF-35, AF-36, AF-37, AF-38, AF-39, AF-40, AF-41, AF-42, AF-43, AF-44, AF-45, AF-46, AF-47, AF-48, AF-49, AF-50, AF-51, AF-52, AF-53, AF-54, AF-55, AF-56, AF-57, AF-58, AF-59, AF-60, AF-61, AF-62, AF-63, AF-64, AF-65, AF-66, AF-67, AF-68, AF-69, AF-70, AF-71, AF-72, AF-73, AF-74, AF-75, AF-76, AF-77, AF-78, AF-79, AF-80, AF-81, AF-82, AF-83, AF-84, AF-85, AF-86, AF-87, AF-88, AF-89, AF-90, AF-91, AF-92, AF-93, AF-94, AF-95, AF-96, AF-98, AF-99, AF-100, AF-101, AF-102, AF-103, AF-104, AF-105, AF-107, AF-108, AF-110, AF-111, AF-112, AF-114, AF-115, AF-116, AF-117, AF-118, AF-119, AF-121, AF-122, AF-123, AF-124, AF-125, AF-126, AF-127, AF-128, AF-129, AF-130, AF-131, AF-132, AF-133, AF-134, AF-137, AF-139, AF-140, AF-141, AF-142, AF-143, AF-144, AF-145, AF-146, AF-147, AF-148, AF-149, AF-150, AF-151, AF-152, AF-153, AF-154, AF-155, AF-156, AF-157, AF-159, AF-160, AF-161, AF-162, AF-163, AF-164, AF-165, AF-166, AF-167, AF-168, AF-169, AF-170, AF-171, AF-172, AF-173, AF-174, AF-175, AF-176, AF-177, AF-178, AF-179, AF-180, AF-181, AF-182, AF-183, AF-184, AF-185, AF-186, AF-187, AF-188, AF-189, AF-190, AF-191, or AF-191.

25

7. The method according to claim 1, 2, or 5, wherein step (a) comprises isoelectric focussing followed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

30           8. A method for screening, diagnosis or prognosis of Alzheimer's disease in a mammal for identifying a mammal at risk of developing Alzheimer's disease, or for monitoring the effect of therapy administered to a mammal having Alzheimer's disease, said method comprising;

WO 01/75454

PCT/US01/0908

- (a) quantitatively detecting, in a sample of cerebrospinal fluid from the mammal, at least one of the following Alzheimer's Disease-Associated Protein Isoforms (APIs): API-1, API-2, API-3, API-4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15, API-16, API-17, API-18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26, API-27, API-28, API-30, API-33, API-34, API-35, API-36, API-37, API-38, API-39, API-40, API-41, API-42, API-43, API-44, API-45, API-46, API-47, API-48, API-49, API-50, API-51, API-52, API-53, API-54, API-55, API-56, API-57, API-58, API-59, API-60, API-61, API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67, API-68, API-69, API-70, API-71, API-72, API-73, API-74, API-75, API-76, API-77, API-78, API-79, API-80, API-81, API-82, API-83, API-84, API-85, API-86, API-88, API-89, API-90, API-91, API-92, API-93, API-95, API-97, API-98, API-99, API-101, API-102, API-103, API-104, API-107, API-108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-116, API-118, API-119, API-120, API-121, API-122, API-123, API-124, API-125, API-126, API-127, API-128, API-130, API-131, API-132, API-134, API-135, API-136, API-137, API-138, API-139, API-140, API-141, API-142, API-143, API-144, API-145, API-146, API-147, API-148, API-149, API-150, API-151, API-152, API-153, API-155, API-158, API-159, API-160, API-161, API-162, API-163, API-165, API-166, API-167, API-168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-173, API-174, API-175, API-176, API-177, API-178, API-179, API-180, API-181, API-182, API-183, API-184, API-185, API-186, API-187, API-188, API-189, API-190, API-191, API-192, API-194, API-196, API-197, API-198, API-199, API-200, API-201, API-202, API-210, API-214, API-215, API-217, API-219, API-220, API-221, API-222, API-223, API-224, API-225, API-232, API-233, API-234, API-237, API-238, API-239, API-240, API-241, API-242, API-243, API-244, API-245, API-246, API-247, or API-248; and
- (b) comparing the level or amount of said isoform or isoforms detected in step (a) with a control.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

9. The method according to claim 8, wherein the step of quantitatively detecting comprises testing at least one aliquot of the sample, said testing comprising:
- (a) contacting the aliquot with an antibody that is immunospecific for a preselected API;
  - 5 (b) quantitatively measuring any binding that has occurred between the antibody and at least one species in the aliquot; and
  - (c) comparing the results of step (b) to a control.
10. The method according to claim 9, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
11. The method according to claim 9, wherein the antibody is chimeric.
12. The method according to claim 9, wherein the step of quantitatively detecting comprises testing a plurality of aliquots with a plurality of antibodies for quantitative detection of a plurality of preselected APIs.
13. The method according to claim 12, wherein the antibodies are monoclonal antibodies.
14. The method according to claim 12, wherein the antibodies are chimeric.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

15. A preparation comprising at least one of the following isolated Alzheimer's Disease-Associated Protein Isoform (API) said API selected from API-1, API-2, API-3, API-4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15, API-16, API-17, API-18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26, API-27, API-28, API-30, API-33, API-34, API-35, API-36, API-37, API-38, API-39, API-40, API-41, API-42, API-43, API-44, API-45, API-46, API-47, API-48, API-49, API-50, API-51, API-52, API-53, API-54, API-55, API-56, API-57, API-58, API-59, API-60, API-61, API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67, API-68, API-69, API-70, API-71, API-72, API-73, API-74, API-75, API-76, API-77, API-78, API-79, API-80, API-81, API-82, API-83, API-84, API-85, API-86, API-88, API-89, API-90, API-91, API-92, API-93, API-95, API-97, API-98, API-99, API-101, API-102, API-103, API-104, API-107, API-108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-116, API-118, API-119, API-120, API-121, API-122, API-123, API-124, API-125, API-126, API-127, API-128, API-130, API-131, API-132, API-134, API-135, API-136, API-137, API-138, API-139, API-140, API-141, API-142, API-143, API-144, API-145, API-146, API-147, API-148, API-149, API-150, API-151, API-152, API-153, API-155, API-158, API-159, API-160, API-161, API-162, API-163, API-165, API-166, API-167, API-168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-173, API-174, API-175, API-176, API-177, API-178, API-179, API-180, API-181, API-182, API-183, API-184, API-185, API-186, API-187, API-188, API-189, API-190, API-191, API-192, API-194, API-196, API-197, API-198, API-199, API-200, API-201, API-202, API-210, API-214, API-215, API-217, API-219, API-220, API-221, API-222, API-223, API-224, API-225, API-232, API-233, API-234, API-237, API-238, API-239, API-240, API-241, API-242, API-243, API-244, API-245, API-246, API-247, or API-248.

16. A kit comprising the preparation of claim 15, other reagents, and directions for use.

17. The kit of Claim 16 comprising a plurality of said preparations.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

18. A preparation comprising an isolated human protein, said protein comprising a tryptic digest peptide having the following partial sequence as determined by mass spectrometry: PGLGM.
- 5 19. A preparation comprising an isolated human protein, said protein comprising a tryptic digest peptide having the following partial sequence as determined by mass spectrometry: GPLGM.
- 10 20. A preparation comprising an isolated human protein, said protein comprising a tryptic digest peptide having the following partial sequence as determined by mass spectrometry: PGLGF.
- 15 21. A preparation comprising an isolated human protein, said protein comprising a tryptic digest peptide having the following partial sequence as determined by mass spectrometry: GPLGF.
- 20 22. A preparation comprising an isolated human protein, said protein comprising a tryptic digest peptide having the following partial sequence as determined by mass spectrometry: PGIGM.
23. A preparation comprising an isolated human protein, said protein comprising a tryptic digest peptide having the following partial sequence as determined by mass spectrometry: GPIGM.
- 25 24. A preparation comprising an isolated human protein, said protein comprising a tryptic digest peptide having the following partial sequence as determined by mass spectrometry: PGIGF.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

25. A preparation comprising an isolated human protein, said protein comprising a tryptic digest peptide having the following partial sequence as determined by mass spectroscopy: GPIGF.
- 5           26. The preparation according to any one of claims 18, 19, 20, 21, 22, 23, 23 or 25, wherein the tryptic digest peptide has a mass of 1546.73 Da, and an N-terminal mass of 0 Da, and a C-terminal mass of 1076.63 Da, said masses having an error of measurement of 100 parts-per-million or less.
- 10           27. The preparation according to any one of claims 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 or 25, wherein the protein further comprising a tryptic digest peptide having the following partial sequence as determined by mass spectrometry: HQV.
- 15           28. The preparation according to any one of claims 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 or 25, wherein the protein further comprising a tryptic digest peptide having the following partial sequence as determined by mass spectrometry: HQV, wherein the tryptic digest peptide has a mass of 1096.56 Da, and an N-terminal mass of 0 Da, and a C-terminal mass of 733.50 Da, said masses having an error of measurement of 100 parts-per-million or less.
- 20           29. A preparation comprising an isolated human protein, said protein comprising a tryptic digest peptide having the following partial sequence as determined by mass spectroscopy: HQV.
- 25           30. The preparation according to claim 29 wherein the tryptic digest peptide has a mass of 1096.56 Da, and an N-terminal mass of 0 Da, and a C-terminal mass of 733.50 Da, said masses having an error of measurement of 100 parts-per-million or less.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

31. The preparation according to any one of claims 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 29 or 30, wherein the protein has an isoelectric point (pI) of about 6.80 and an apparent molecular weight (MW) of about 18,741.
- 5 32. The preparation according to claim 31, wherein the pI of the protein is within 10% of 6.80 and the MW is within 10% of 18,741.
33. The preparation according to claim 31, wherein the pI of the protein is within 5% of 6.80 and the MW is within 5% of 18,741.
- 10 34. The preparation according to claim 31, wherein the pI of the protein is within 1% of 6.80 and the MW is within 1% of 18,741.
35. An antibody capable of immunospecific binding to one of the following  
15 Alzheimer's Disease-Associated Protein Isoforms (APIs): API-1, API-2, API-3, API-4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15, API-16, API-17, API-18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26, API-27, API-28, API-30, API-33, API-34, API-35, API-36, API-37, API-38, API-39, API-40, API-41, API-42, API-43, API-44, API-45, API-46, API-47, API-48, API-49, API-50, API-51,  
20 API-52, API-53, API-54, API-55, API-56, API-57, API-58, API-59, API-60, API-61, API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67, API-68, API-69, API-70, API-71, API-72, API-73, API-74, API-75, API-76, API-77, API-78, API-79, API-80, API-81, API-82, API-83, API-84, API-85, API-86, API-88, API-89, API-90, API-91, API-92, API-93, API-95, API-97, API-98, API-99, API-101, API-102, API-103, API-104,  
25 API-107, API-108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-116, API-118, API-119, API-120, API-121, API-122, API-123, API-124, API-125, API-126, API-127, API-128, API-130, API-131, API-132, API-134, API-135, API-136, API-137, API-138, API-139, API-140, API-141, API-142, API-143, API-144, API-145, API-146, API-147, API-148, API-149, API-150, API-151, API-152, API-153, API-155, API-158, API-159, API-160, API-161, API-162, API-163, API-165, API-166, API-167,  
30 API-168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-173, API-174, API-175, API-176, API-177, API-178, API-179, API-180, API-181, API-182, API-183, API-184,

WO 01/75454

PCT/US01/10908

API-185, API-186, API-187, API-188, API-189, API-190, API-191, API-192, API-194, API-196, API-197, API-198, API-199, API-200, API-201, API-202, API-210, API-214, API-215, API-217, API-219, API-220, API-221, API-222, API-223, API-224, API-225, API-232, API-233, API-234, API-237, API-238, API-239, API-240,  
5 API-241, API-242, API-243, API-244, API-245, API-246, API-247, or API-248.

36. The antibody of claim 35, which is a monoclonal antibody.

37. The antibody of claim 35, which is a chimeric antibody.

10

38. The antibody of claim 35 or 36, which binds to the API with greater affinity than to another isoform of the API.

39. The antibody of claim 35, which binds to the API with greater affinity than  
15 to any other isoform of the API.

40. A kit comprising the antibody of claim 35, other reagents, and directions for use.

20 41. The kit of claim 35 comprising a plurality of said antibodies.

42. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an antibody of claim 35 and a pharmaceutically acceptable carrier.

25 43. A pharmaceutical composition comprising:  
a therapeutically effective amount of a fragment or derivative of an antibody of claim 35, said fragment or derivative containing the binding domain of the antibody; and

WO 01/75454

PCT/US01/10908

a pharmaceutically acceptable carrier.

44. A method of treating Alzheimer's disease comprising administering to a subject in need of such treatment a therapeutically effective amount of a nucleic acid encoding one of the following Alzheimer's Disease-Associated Protein Isoforms (APIs): API-1, API-2, API-3, API-4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15, API-16, API-17, API-18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26, API-27, API-28, API-30, API-33, API-34, API-35, API-36, API-37, API-38, API-39, API-40, API-41, API-42, API-43, API-44, API-45, API-46, API-47, API-48, API-49, API-50, API-51, API-52, API-53, API-54, API-55, API-56, API-57, API-58, API-59, API-60, API-61, API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67, API-68, API-69, API-70, API-71, API-72, API-73, API-74, API-75, API-76, API-77, API-78, API-79, API-80, API-81, API-82, API-83, API-84, API-85, API-86, API-88, API-89, API-90, API-91, API-92, API-93, API-95, API-97, API-98, API-99, API-101, API-102, API-103, API-104, API-107, API-108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-116, API-118, API-119, API-120, API-121, API-122, API-123, API-124, API-125, API-126, API-127, API-128, API-130, API-131, API-132, API-134, API-135, API-136, API-137, API-138, API-139, API-140, API-141, API-142, API-143, API-144, API-145, API-146, API-147, API-148, API-149, API-150, API-151, API-152, API-153, API-155, API-158, API-159, API-160, API-161, API-162, API-163, API-165, API-166, API-167, API-168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-173, API-174, API-175, API-176, API-177, API-178, API-179, API-180, API-181, API-182, API-183, API-184, API-185, API-186, API-187, API-188, API-189, API-190, API-191, API-192, API-194, API-196, API-197, API-198, API-199, API-200, API-201, API-202, API-210, API-214, API-215, API-217, API-219, API-220, API-221, API-222, API-223, API-224, API-225, API-232, API-233, API-234, API-237, API-238, API-239, API-240, API-241, API-242, API-243, API-244, API-245, API-246, API-247, or API-248.

45. A method of treating Alzheimer's disease comprising administering to a subject in need of such treatment or prevention a therapeutically effective amount of a nucleic acid or antibody that inhibits the function of one or more of the following Alzheimer's Disease-Associated Protein Isoforms (APIs): API-1, API-2, API-3, API-4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15, API-16, API-17,

WO 01/75454

PCT/US01/10908

API-18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26, API-27, API-28,  
API-30, API-33, API-34, API-35, API-36, API-37, API-38, API-39, API-40, API-41,  
API-42, API-43, API-44, API-45, API-46, API-47, API-48, API-49, API-50, API-51,  
API-52, API-53, API-54, API-55, API-56, API-57, API-58, API-59, API-60, API-61,  
5 API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67, API-68, API-69, API-70, API-71,  
API-72, API-73, API-74, API-75, API-76, API-77, API-78, API-79, API-80, API-81,  
API-82, API-83, API-84, API-85, API-86, API-88, API-89, API-90, API-91, API-92,  
API-93, API-95, API-97, API-98, API-99, API-101, API-102, API-103, API-104,  
API-107, API-108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-116, API-118, API-  
10 119, API-120, API-121, API-122, API-123, API-124, API-125, API-126, API-127,  
API-128, API-130, API-131, API-132, API-134, API-135, API-136, API-137, API-  
138, API-139, API-140, API-141, API-142, API-143, API-144, API-145, API-146,  
API-147, API-148, API-149, API-150, API-151, API-152, API-153, API-155, API-  
158, API-159, API-160, API-161, API-162, API-163, API-165, API-166, API-167,  
15 API-168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-173, API-174, API-175, API-  
176, API-177, API-178, API-179, API-180, API-181, API-182, API-183, API-184,  
API-185, API-186, API-187, API-188, API-189, API-190, API-191, API-192, API-  
194, API-196, API-197, API-198, API-199, API-200, API-201, API-202, API-210,  
API-214, API-215, API-217, API-219, API-220, API-221, API-222, API-223, API-  
20 224, API-225, API-232, API-233, API-234, API-237, API-238, API-239, API-240,  
API-241, API-242, API-243, API-244, API-245, API-246, API-247, or API-248.

46. The method of claim 45, wherein the nucleic acid is an API antisense  
nucleic acid or ribozyme.

25

47. A method of screening for agents that interact with an API, an API  
fragment, or an API-related polypeptide, said method comprising:

- (a) contacting an API, a biologically active portion of an API, or an  
API-related polypeptide with said agent; and
- 30 (b) determining whether or not the said agent interacts with the  
API, the API fragment, or the API-related polypeptide.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

48. The method of claim 47, wherein the API, the API fragment, or the API-related polypeptide is expressed by cells.

49. The method of claim 47, wherein the cells express a recombinant API, a recombinant API fragment, or a recombinant API-related polypeptide.

50. A method of screening for agents that modulate the expression or activity of an API or an API-related polypeptide comprising:

- 10 (a) contacting a first population of cells expressing an API or an API-related polypeptide with a candidate agent;
- (b) contacting a second population of cells expressing said API or said API-related polypeptide with a control agent; and
- 15 (c) comparing the level of said API or said API-related polypeptide or mRNA encoding said API or said API-related polypeptide in the first and second populations of cells, or comparing the level of induction of a cellular second messenger in the first and second populations of cells.

51. The method of claim 50, wherein the level of said API or said API-related polypeptide, mRNA encoding said API or said API-related polypeptide, or said cellular second messenger is greater in the first population of cells than in the second population of cells.

52. The method of claim 50, wherein the level of said API or said API-related polypeptide, mRNA encoding said API or said API-related polypeptide, or said cellular second messenger is less in the first population of cells than in the second population of cells.

53. A method of screening for or identifying agents that modulate the expression or activity of an API or an API-related polypeptide comprising:

WO 01/75454

PCT/US01/10908

- (a) administering an agent to be screened to a first mammal or group of mammals;
- (b) administering a control agent to a second mammal or group of mammals; and
- 5 (c) comparing the level of expression of the API or the API-related polypeptide or of mRNA encoding the API or the API-related polypeptide in the first and second groups, or comparing the level of induction of a cellular second messenger in the first and second groups.

10

54. The method of claim 53, wherein the mammals are animal models for Alzheimer's disease or Downs Syndrome.

15 55. The method of claim 53 or 54, wherein the level of expression of said API or said API-related polypeptide, mRNA encoding said API or said API-related polypeptide, or of said cellular second messenger is greater in the first group than in the second group.

20 56. The method of claim 53 or 54, wherein the level of expression of said API or said API-related polypeptide, mRNA encoding said API or said API-related polypeptide, or of said cellular second messenger is less than in the first group than in the second group.

25 57. The method of claim 53, wherein the levels of said API or said API-related polypeptide, mRNA encoding said API or said API-related polypeptide, or of said cellular second messenger in the first and second groups are further compared to the level of said API or said API-related polypeptide or said mRNA encoding said API or said API-related polypeptide in normal control mammals.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

58. The method of claim 53, wherein administration of said agent to be screened modulates the level of said API or said API-related polypeptide, or said mRNA encoding said API or said API-related polypeptide, or said cellular second messenger in the first group towards the levels of said API or said API-related polypeptide or said mRNA or said cellular second messenger in the second group.
59. The method of claim 53, wherein said mammals are human subjects having Alzheimer's disease.
60. A method of screening for or identifying agents that interact with an API or an API-related polypeptide, comprising
- (a) contacting an agent to be screened with the API or the API-related polypeptide, and
  - (b) quantitatively detecting binding, if any, between the agent and the API or the API-related polypeptide.
61. A method of screening for or identifying agents that modulate the activity of an API or an API-related polypeptide, comprising
- (a) in a first aliquot, contacting an agent to be screened with the API or the API-related polypeptide, and
  - (b) comparing the activity of the API or the API-related polypeptide in the first aliquot after addition of the candidate agent with the activity of the API or the API-related polypeptide in a control aliquot, or with a previously determined reference range.
62. The method according to claim 60 or 61, wherein the API or the API-related polypeptide is recombinant protein.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

63. The method according to claim 60 or 61, wherein the API or the API-related polypeptide is immobilized on a solid phase.
64. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes to a nucleotide sequence encoding API-111, a nucleotide sequence encoding API-112, or their complements.
65. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes to a nucleotide sequence encoding at least 10 consecutive amino acids of API-111 a nucleotide sequence encoding at least 10 consecutive amino acids of API-112, or their complements.
66. A vector comprising the nucleic acid molecule of claim 64 or 65.
67. A host cell comprising the vector of claim 64.
68. A host cell genetically engineered to express the nucleic acid molecule of claim 64 or 65.
69. A method for screening, diagnosis or prognosis of Alzheimer's disease in a subject or for monitoring the effect of an anti-Alzheimer's disease drug or therapy administered to a subject, comprising:
- (a) contacting at least one oligonucleotide probe comprising 10 or more consecutive nucleotides complementary to a nucleotide sequence encoding an API chosen from API-1, API-2, API-3, API-4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15, API-16, API-17, API-18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26, API-27, API-28, API-30, API-33, API-34, API-35, API-36, API-37, API-38, API-39, API-40, API-41, API-42, API-43, API-44, API-45, API-46, API-47, API-48, API-49, API-50, API-51, API-52, API-53, API-54, API-55, API-56, API-57, API-58, API-59, API-60,

WO 01/75454

PCT/US01/0908

- 5 API-61, API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67,  
API-68, API-69, API-70, API-71, API-72, API-73, API-74,  
API-75, API-76, API-77, API-78, API-79, API-80, API-81,  
API-82, API-83, API-84, API-85, API-86, API-88, API-89,  
API-90, API-91, API-92, API-93, API-95, API-97, API-98,  
API-99, API-101, API-102, API-103, API-104, API-107, API-  
108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-116, API-118,  
10 API-119, API-120, API-121, API-122, API-123, API-124, API-  
125, API-126, API-127, API-128, API-130, API-131, API-132,  
API-134, API-135, API-136, API-137, API-138, API-139, API-  
140, API-141, API-142, API-143, API-144, API-145, API-146,  
API-147, API-148, API-149, API-150, API-151, API-152, API-  
153, API-155, API-158, API-159, API-160, API-161, API-162,  
15 API-163, API-165, API-166, API-167, API-168, API-169, API-  
170, API-171, API-172, API-173, API-174, API-175, API-176,  
API-177, API-178, API-179, API-180, API-181, API-182, API-  
183, API-184, API-185, API-186, API-187, API-188, API-189,  
API-190, API-191, API-192, API-194, API-196, API-197, API-  
198, API-199, API-200, API-201, API-202, API-210, API-214,  
20 API-215, API-217, API-219, API-220, API-221, API-222, API-  
223, API-224, API-225, API-232, API-233, API-234, API-237,  
API-238, API-239, API-240, API-241, API-242, API-243, API-  
244, API-245, API-246, API-247, or API-248 with an RNA  
25 obtained from a biological sample from the subject or with  
cDNA copied from the RNA wherein said contacting occurs  
under conditions that permit hybridization of the probe to the  
nucleotide sequence if present;
- (b) detecting hybridization, if any, between the probe and the  
nucleotide sequence; and
- 30 (c) comparing the hybridization, if any, detected in step (b) with the  
hybridization detected in a control sample, or with a previously  
determined reference range.

70. The method of claim 69, wherein step (a) comprises contacting a plurality

WO 01/75454

PCT/US01/10908

of oligonucleotide probes comprising 10 or more consecutive nucleotides complementary to a nucleotide sequence encoding an API chosen from API-1, API-2, API-3, API-4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15, API-16, API-17, API-18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26, API-27, 5 API-28, API-30, API-33, API-34, API-35, API-36, API-37, API-38, API-39, API-40, API-41, API-42, API-43, API-44, API-45, API-46, API-47, API-48, API-49, API-50, API-51, API-52, API-53, API-54, API-55, API-56, API-57, API-58, API-59, API-60, API-61, API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67, API-68, API-69, API-70, API-71, API-72, API-73, API-74, API-75, API-76, API-77, API-78, API-79, API-80, 10 API-81, API-82, API-83, API-84, API-85, API-86, API-88, API-89, API-90, API-91, API-92, API-93, API-95, API-97, API-98, API-99, API-101, API-102, API-103, API-104, API-107, API-108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-116, API-118, API-119, API-120, API-121, API-122, API-123, API-124, API-125, API-126, API-127, API-128, API-130, API-131, API-132, API-134, API-135, API-136, API-137, 15 API-138, API-139, API-140, API-141, API-142, API-143, API-144, API-145, API-146, API-147, API-148, API-149, API-150, API-151, API-152, API-153, API-155, API-158, API-159, API-160, API-161, API-162, API-163, API-165, API-166, API-167, API-168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-173, API-174, API-175, API-176, API-177, API-178, API-179, API-180, API-181, API-182, API-183, API-20 184, API-185, API-186, API-187, API-188, API-189, API-190, API-191, API-192, API-194, API-196, API-197, API-198, API-199, API-200, API-201, API-202, API-210, API-214, API-215, API-217, API-219, API-220, API-221, API-222, API-223, API-224, API-225, API-232, API-233, API-234, API-237, API-238, API-239, API-240, API-241, API-242, API-243, API-244, API-245, API-246, API-247, or API-248 25 with an RNA obtained from a biological sample from the subject or with cDNA copied from the RNA wherein said contacting occurs under conditions that permit hybridization of the probe to the nucleotide sequence if present.

71. The method of claim 69, wherein step (a) includes the step of hybridizing 30 the nucleotide sequence to a DNA array, wherein one or more members of the array are the probes complementary to a plurality of nucleotide sequences encoding distinct APIs.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

72. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes under highly stringent conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
CCNGGNYTNGGNATG.
- 5 73. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes under highly stringent conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
GGNCCNYTNGGNATG.
74. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes under highly stringent  
10 conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
CCNGGNYTNGGNNTTY.
75. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes under highly stringent  
15 conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
GGNCCNYTNGGNNTTY.
76. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes under highly stringent  
20 conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
CCNGGNATHGGNATG.
77. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes under highly stringent  
conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
CCNGGNATHGGNNTTY.
- 25 78. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes under highly stringent conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
GGNCCNATHGGNATG.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

79. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes under highly stringent conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
GGNCCNATHGGNTTY.

5 80. The isolated nucleic acid molecule according to any one of claims 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78 or 79, wherein the nucleic acid also hybridizes under highly stringent conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
CAYCARGTN.

10

81. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes under highly stringent conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
CCCGGCCTGGGCATG.

15 82. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes under highly stringent conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
GGCCCCCTGGGCATG.

20 83. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes under highly stringent conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
CCCGGCCTGGGCTTC.

25 84. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes under highly stringent conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
GGCCCCCTGGGCTTC.

WO 01/75454

PCT/US01/10908

85. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes under highly stringent conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
CCCGGCATCGGCATG.
- 5 86. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes under highly stringent conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
CCCGGCATCGGCTTC.
- 10 87. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes under highly stringent conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
GGCCCCATCGGCATG.
- 15 88. An isolated nucleic acid molecule that hybridizes under highly stringent conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
GGCCCCATCGGCTTC.
- 20 89. The isolated nucleic acid molecule according to any one of claims 81, 79, 80, 81, 82, 83, 84 or 85, wherein the nucleic acid also hybridizes under highly stringent conditions or moderately stringent conditions to the following nucleic acid sequence:  
CACCAGGTG.
90. A method of screening for agents effective for the treatment of Alzheimer's disease comprising:
- 25 (a) contacting PEDF with a first population of cells expressing a receptor for PEDF in the presence of an agent to be screened;
- (b) contacting PEDF with a second population of cells expressing said receptor in the presence of a control agent;

WO 01/75454

PCT/US01/10908

- 5 (c) comparing the binding of said PEDF to the first and second populations of cells, or comparing the level of induction of a cellular second messenger in the first and second populations of cells, or comparing the level of a PEDF mediated activity in the first and second population of cells; and
- (d) testing for the ability of agents able to modulate the activity of PEDF to decrease clinical features of Alzheimer's disease in an Alzheimer's disease model system.

10 91. The method of claim 90 wherein the PEDF or the receptor, or both, are isolated and recombinantly produced.

15 92. The method of claim 90, wherein the cells are cerebellar granule cells and the PEDF mediated activity is protection of immature cerebellar cells from apoptotic death.

93. The method of claim 90, wherein the cells are retinoblastoma or cerebellar granule cells and the binding of PEDF to the cells is compared.

20 94. The method of claim 90, wherein the candidate agent comprises at least 10 consecutive amino acids of PEDF.

95. A method of screening for agents that modulate the binding of PEDF to a binding partner comprising:

- 25 (a) contacting PEDF with the PEDF binding partner in the presence of a candidate agent;
- (b) contacting PEDF with a PEDF binding partner in the presence of a control agent; and

WO 01/75454

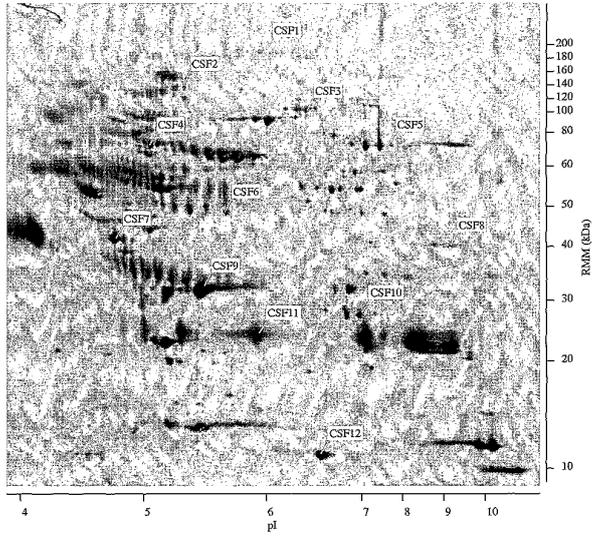
PCT/US01/10908

- (c) comparing the binding of said PEDF to the binding partner in step (a) to the binding of said PEDF to the binding partner in step (b).

5 96. The method of claim 95 wherein the binding partner is an isolated 80 kD PEDF receptor.

97. A ribozyme or antisense nucleic acid comprising a nucleic acid encoding one of the following Alzheimer's Disease-Associated Protein Isoforms (APIs): API-1,  
10 API-2, API-3, API-4, API-5, API-6, API-7, API-8, API-9, API-10, API-14, API-15,  
API-16, API-17, API-18, API-19, API-20, API-22, API-23, API-24, API-25, API-26,  
API-27, API-28, API-30, API-33, API-34, API-35, API-36, API-37, API-38, API-39,  
API-40, API-41, API-42, API-43, API-44, API-45, API-46, API-47, API-48, API-49,  
API-50, API-51, API-52, API-53, API-54, API-55, API-56, API-57, API-58, API-59,  
15 API-60, API-61, API-62, API-63, API-64, API-65, API-66, API-67, API-68, API-69,  
API-70, API-71, API-72, API-73, API-74, API-75, API-76, API-77, API-78, API-79,  
API-80, API-81, API-82, API-83, API-84, API-85, API-86, API-88, API-89, API-90,  
API-91, API-92, API-93, API-95, API-97, API-98, API-99, API-101, API-102, API-  
103, API-104, API-107, API-108, API-111, API-112, API-113, API-114, API-116,  
20 API-118, API-119, API-120, API-121, API-122, API-123, API-124, API-125, API-  
126, API-127, API-128, API-130, API-131, API-132, API-134, API-135, API-136,  
API-137, API-138, API-139, API-140, API-141, API-142, API-143, API-144, API-  
145, API-146, API-147, API-148, API-149, API-150, API-151, API-152, API-153,  
API-155, API-158, API-159, API-160, API-161, API-162, API-163, API-165, API-  
25 166, API-167, API-168, API-169, API-170, API-171, API-172, API-173, API-174,  
API-175, API-176, API-177, API-178, API-179, API-180, API-181, API-182, API-  
183, API-184, API-185, API-186, API-187, API-188, API-189, API-190, API-191,  
API-192, API-194, API-196, API-197, API-198, API-199, API-200, API-201, API-  
202, API-210, API-214, API-215, API-217, API-219, API-220, API-221, API-222,  
30 API-223, API-224, API-225, API-232, API-233, API-234, API-237, API-238, API-  
239, API-240, API-241, API-242, API-243, API-244, API-245, API-246, API-247, or  
API-248.

**FIGURE 1**



## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
11 October 2001 (11.10.2001)

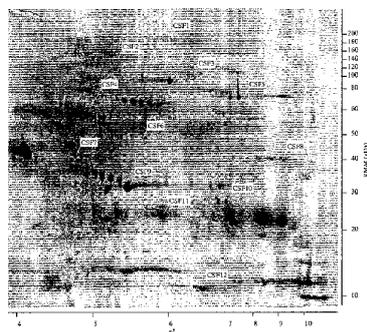
PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/075454 A3

- (51) International Patent Classification: **G01N 33/68**, 4RY (GB), **PFIZER INC.** [US/US]; 234 East 42nd Street, New York, NY 10017 (US); 33/561, C07K 1447, A61P 25/28
- (21) International Application Number: PCT/US01/10908 (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): **DURHAM, Kathryn, L.** [US/US]; 94 Glenwood Avenue, New London, CT 06320 (US). **FRIEDMAN, David, L.** [US/US]; 368 Bartlett Drive, Madison, CT 06443 (US). **HERATH, Herath, Mudiyansele, Athula, Chandrasiri** [GB/GB]; 53 Foster Road, Abingdon OX14 1YW (GB). **KIMMEL, Lida, H.** [US/US]; 55 Bekum Road, Chester, CT 06412 (US). **PAREKH, Rajesh, Bhikhu** [GB/GB]; Alchester House, Langford Lane, Near Wendlebury OX6 0NS (GB). **POTTER, David, M.** [US/US]; 33 Christwood Trace, Ledyard, CT 06339 (US). **ROHLFF, Christian** [GB/GB]; 19 Rewley Road, Oxford OX1 2RA (GB). **SILBER, B., Michael** [US/US]; 104 Randi Drive, Madison, CT 06443 (US). **STIGER, Thomas, R.** [US/US]; 93 Castle Hill Road, Pawcatuck, CT 06379 (US). **SUNDERLAND, P., Trey** [US/US]; 4718 Cumberland Avenue, Chevy Chase, MD 20815 (US). **TOWNSEND, Robert, Reid** [GB/GB]; 2 Otlands Road, Oxford OX2 0EU (GB). **WHITE, Frost** [US/US]; 65 Homestead Road, Ledyard, CT 06339 (US).
- (22) International Filing Date: 3 April 2001 (03.04.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/194,504 3 April 2000 (03.04.2000) US  
60/253,647 28 November 2000 (28.11.2000) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:  
US 60/194,504 (CON)  
Filed on 3 April 2000 (03.04.2000)
- (71) Applicants (for all designated States except US): **OXFORD GLYCOSCIENCES (UK) LTD.** [GB/GB]; The Forum, 86 Milton Park, Abingdon, Oxfordshire OX14

[Continued on next page]

(54) Title: DIAGNOSIS AND TREATMENT OF ALZHEIMER'S DISEASE



(57) Abstract: The present invention provides methods and compositions for screening, diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease, for monitoring the effectiveness of Alzheimer's disease treatment, and for drug development. Alzheimer's Disease-Associated Features (AFs), detectable by two-dimensional electrophoresis of cerebrospinal fluid, serum or plasma are described. The invention further provides Alzheimer's Disease-Associated Protein Isoforms (APIs) detectable in cerebrospinal fluid, serum or plasma, preparations comprising isolated APIs, antibodies immuno-specific for APIs, pharmaceutical compositions, diagnostic and therapeutic methods, and kits comprising or based on the same.

WO 01/075454 A3

WO 01/075454 A3 

**WILLIAMS, Stephen, A.** [GB/US]; 114 Colony Road,  
Groton, CT 06340 (US).

patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European  
patent (AT, BI, CH, CY, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,  
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(74) **Agent: JACKSON, David, A.**; Klauber & Jackson, 411  
Hackensack Avenue, Hackensack, NJ 07601 (US).

(81) **Designated States (national):** AU, AG, AI, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

**Published:**  
— with international search report

(88) **Date of publication of the international search report:**  
8 May 2003

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GI, GM,  
KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In: International Application No. PCT/US 01/10908
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/68 G01N33/561 C07K14/47 A61P25/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EMBL, EP0-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 40748 A (NEUROMARK ;HARRINGTON MICHAEL G (US)) 17 September 1998 (1998-09-17) abstract claims 1-10	1-5,7
X	US 5 429 947 A (MERRIL CARL R ET AL) 4 July 1995 (1995-07-04) abstract; claims 1-5 column 4, line 13 - line 52	1-5,7
X	US 5 811 310 A (DAVIES PETER ET AL) 22 September 1998 (1998-09-22) abstract figure 1 claims 3-5	1-5,7
	---	
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 January 2002		Date of mailing of the international search report 17. 05. 02
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5918 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gundlach, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/US 01/10908
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 36062 A (WANG BO ;KENWRICK SUSAN JANE (GB); SMITHKLINE BEECHAM PLC (GB); TE) 20 August 1998 (1998-08-20) SEQ ID NO:2 abstract; claims 1-24 ---	15-17, 35-43,97
X	DATABASE EMBL [Online] ID/AC: 015179, 1 January 1998 (1998-01-01) WANG, B. ET AL.: "NRCAM Protein" XP002185769 cited in the application abstract ---	15-17, 35-43,97
X	LANE R P ET AL: "CHARACTERIZATION OF A HIGHLY CONSERVED HUMAN HOMOLOG TO THE CHICKEN NEURAL CELL SURFACE PROTEIN BRAVO/NR-CAM THAT MAPS TO CHROMOSOME BAND 7Q31" GENOMICS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, US, vol. 35, no. 3, 1 August 1996 (1996-08-01), pages 456-465, XP001036703 ISSN: 0888-7543 the whole document ---	15-17, 35-43,97
X	WO 99 55380 A (PACIFIC NORTHWEST CANCER FOUND) 4 November 1999 (1999-11-04) abstract; claim 20 page 90, line 6 - line 21 page 91, line 3 - line 9 ---	8-17, 35-63, 69-71,97
X	WO 96 32959 A (ACORDA THERAPEUTICS) 24 October 1996 (1996-10-24) abstract page 36, line 14 - line 23 -----	8-17, 35-63, 69-71,97

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 01/10908

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
- 3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

see additional sheet

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-17, 35-63, 69-71, 97 all partially

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US 01/10908

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: Claims 1-17,35-63,69-71,  
97 (all partially)

Diagnosis of Alzheimer's Disease using NrCAM as marker

Inventions 2-439: 1-97 (all partially)

Diagnosis of Alzheimer's Disease using one of the proteins  
AF-2 to AF-191 or API-1 to Api-46 or Api-48 to API-248 as  
marker

International Application No. PCT/US 01/10908

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 44-46 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

-----

Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.  
F/US 01/10908

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9840748	A	17-09-1998	AJ 6465798 A WO 9840748 A1	29-09-1998 17-09-1998
US 5429947	A	04-07-1995	AU 4536993 A WO 9325911 A1	04-01-1994 23-12-1993
US 5811310	A	22-09-1998	AU 711140 B2 AU 4523596 A CA 2208329 A1 EP 0796279 A1 JP 10511943 T WO 9620218 A1 AT 157774 T AU 718732 B2 AU 3518897 A AU 7121191 A AU 8185494 A CA 2037105 A1 DE 69127487 D1 DE 69127487 T2 EP 0444856 A2 JP 4216464 A	07-10-1999 19-07-1996 04-07-1996 24-09-1997 17-11-1998 04-07-1996 15-09-1997 20-04-2000 04-12-1997 10-10-1991 08-06-1995 27-08-1991 09-10-1997 08-01-1998 04-09-1991 06-08-1992
WO 9836062	A	20-08-1998	CA 2243984 A1 EP 0910641 A1 WO 9836062 A1 JP 11507845 T	20-08-1998 28-04-1999 20-08-1998 13-07-1999
WO 9955380	A	04-11-1999	AU 3762699 A CA 2328992 A1 WO 9955380 A1	16-11-1999 04-11-1999 04-11-1999
WO 9632959	A	24-10-1996	AU 718508 B2 AU 5557296 A CA 2218599 A1 CZ 9703301 A3 EA 970323 A1 EP 0821591 A1 HU 9900060 A2 JP 11504211 T NO 974811 A PL 322947 A1 SK 142497 A3 TR 9701203 T1 TR 9801650 T2 WO 9632959 A1 US 5792743 A	13-04-2000 07-11-1996 24-10-1996 15-04-1998 30-04-1998 04-02-1998 28-04-1999 20-04-1999 19-12-1997 02-03-1998 06-08-1999 21-03-1998 22-03-1999 24-10-1996 11-08-1998

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/18	A 6 1 P 25/28	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/18	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 6
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 9/00	C 1 2 N 9/00	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 27/447	G 0 1 N 27/62	V
G 0 1 N 27/62	G 0 1 N 33/15	Z N A Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 27/26	3 1 5 H
	G 0 1 N 27/26	3 0 1 A
	G 0 1 N 27/26	3 2 5 E
	C 1 2 N 5/00	A

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

(74) 代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72) 発明者 ダラム, キャスリン エル.

アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 3 2 0, ニュー ロンドン, テムズ ストリート 9 6

(72) 発明者 フリードマン, デイビッド エル.

アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 4 4 3, マディソン, パートレット ドライブ 3 6 8

(72) 発明者 ヘラス, ヘラス マディヤンセラジ アスラ チャンドラシリ

イギリス国 オーエックス14 4アールワイ, オックスフォードシャー, アビンドン, ミルトン  
パーク 8 6, ザ フォーラム

(72) 発明者 キメル, リダ エイチ.

アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 4 1 2, チェスター, ボカム ロード 5 5

(72) 発明者 パレク, ラジェシュ ビクフ

イギリス国 オーエックス14 4アールワイ, オックスフォードシャー, アビンドン, ミルトン  
パーク 8 6, ザ フォーラム

(72) 発明者 ポッター, デイビッド エム.

アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 3 4 0, グロトン, ミッシェル レーン 2 0 0, ナ  
ンバー 1 0 6

(72) 発明者 ロールフ, クリスチャン

イギリス国 オーエックス14 4アールワイ, オックスフォードシャー, アビンドン, ミルトン  
パーク 8 6, ザ フォーラム

(72) 発明者 シルバー, ビー. マイケル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 1, パロ アルト, フルトン ストリート 1 0  
1 8

- (72)発明者 スティガー, トーマス アール.  
 アメリカ合衆国 コネチカット 06379, ポーカタック, キャッスル ヒル ロード 9  
 3
- (72)発明者 サンダーランド, ピー. トレイ  
 アメリカ合衆国 メリーランド 20815, シェビー チェイス, カンバーランド アベニ  
 ュー 4718
- (72)発明者 タウンゼンド, ロバート レイド  
 イギリス国 オーエックス14 4アールワイ, オックスフォードシャー, アビンドン, ミルトン  
 パーク 86, ザ フォーラム
- (72)発明者 ホワイト, ダブリュー. フロスト  
 アメリカ合衆国 コネチカット 06339, リダイアード, ホームステッド ロード 65
- (72)発明者 ウィリアムズ, スティーブン エイ.  
 アメリカ合衆国 コネチカット 06378, ストーンングトン, イースト ネック ロード  
 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA21 BA30 CA04 DA02 EA04 GA11 HA01  
 4B050 CC03 DD11 LL01 LL03  
 4B063 QA18 QA19 QQ21 QQ43 QR32 QR55 QS16 QS34  
 4B064 AG27 CA19 CC24 DA13  
 4B065 AA90X AA99Y AB01 BA02 CA46  
 4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01 BA22 CA53 DC50 ZA162  
 4C085 AA13 AA14 BB11 DD62 DD63 DD88  
 4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 ZA16  
 4H045 AA11 CA40 DA75 DA76 EA50 FA74