

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6879905号
(P6879905)

(45) 発行日 令和3年6月2日(2021.6.2)

(24) 登録日 令和3年5月7日(2021.5.7)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 33/53 (2006.01)
GO 1 N 27/447 (2006.01)GO 1 N 33/53 V
GO 1 N 33/53 U
GO 1 N 27/447 3 O 1 A

請求項の数 13 (全 39 頁)

(21) 出願番号 特願2017-513509 (P2017-513509)
 (86) (22) 出願日 平成27年9月9日 (2015.9.9)
 (65) 公表番号 特表2017-526930 (P2017-526930A)
 (43) 公表日 平成29年9月14日 (2017.9.14)
 (86) 國際出願番号 PCT/EP2015/070603
 (87) 國際公開番号 WO2016/038084
 (87) 國際公開日 平成28年3月17日 (2016.3.17)
 審査請求日 平成30年9月5日 (2018.9.5)
 (31) 優先権主張番号 62/048,745
 (32) 優先日 平成26年9月10日 (2014.9.10)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73) 特許権者 513144626
アッヴィ・ドイチュラント・ゲー・エム・
ペー・ハー・ウント・コー・カーナー・
ドイツ国、65189・ビースバーデン、
マインツァー・シュトラーゼ・81
(74) 代理人 110001173
特許業務法人川口國際特許事務所
(72) 発明者 バルクホルン、シュテファン
ドイツ、67061・ルートヴィヒスハ
ーフェン、クノルシュトラーゼ、アッヴィ
・ドイチュラント・ゲー・エム・ペー・ハ
ー・ウント・コー・カーナー・ゲー氣付

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RGMa断片ベース診断アッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多発性硬化症に対する治療の必要な被験者における、多発性硬化症に対する治療の有効性を判定するためのデータを提供するための方法であって、

(a) 前記被験者からの体液サンプル中の少なくとも一のヒトRGMa断片のレベルを、

(a1) 少なくとも一のヒトRGMa断片を含む、前記被験者から得られた体液サンプルを提供するステップと、

(a2) 前記サンプルをキャプチャー結合タンパク質に接触させるステップと、ここで、前記キャプチャー結合タンパク質は、前記少なくとも一のヒトRGMa断片に結合して、キャプチャー結合タンパク質 - RGMa断片複合体を形成する、

(a3) 前記サンプルを検出結合タンパク質に接触させるステップと、ここで、前記検出結合タンパク質は、前記キャプチャー結合タンパク質と相互作用して、検出結合タンパク質 - キャプチャー結合タンパク質 RGMa断片複合体を形成する、

(a4) 前記サンプル中の前記少なくとも一のヒトRGMa断片を検出し定量するステップと、ここで、前記少なくとも一のヒトRGMa断片は、18kDaのRGMa断片、30kDaのRGMa断片及び40kDaのRGMa断片からなる群から選択される、を含む方法により測定するステップと；

(b) 前記少なくとも一の断片のレベルが対照レベルと比較して高い場合、前記治療は多発性硬化症の治療に無効であると判定し、前記少なくとも一の断片のレベルが前記対照

10

20

レベルと比較して低い場合、前記治療は多発性硬化症の治療に有効であると判定するためには、前記被験者からのサンプル中の前記少なくとも一のヒト R G M a 断片のレベルを、前記少なくとも一のヒト R G M a 断片の前記対照レベルと比較するステップとを含む、方法。

【請求項 2】

前記少なくとも一のヒト R G M a 断片の対照レベルは、多発性硬化症に罹患しているが、多発性硬化症に対する治療を受けたことがない被験者中の前記少なくとも一のヒト R G M a 断片のレベルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

多発性硬化症を罹患している被験者の再生促進薬物治療のモニタリング又は多発性硬化症に罹患している被験者に対する治療レジメンの最適化のためのデータを提供するための方法であって、10

(a) 被験者から得られた第 1 のサンプル中の少なくとも一のヒト R G M a 断片の第 1 のレベルを、請求項 1 に記載の (a 1) ~ (a 4) による方法を用いて測定するステップと、ここで、第 1 のサンプルは、前記被験者が薬物治療を始める前またはその間の時点で前記被験者から採取される、

(b) 前記少なくとも一のヒト R G M a 断片の第 1 のレベルと比較した前記少なくとも一のヒト R G M a 断片の第 2 のレベルの低下が検出された場合、前記薬物治療レジメンが多発性硬化症の治療に有効であると判定し、前記少なくとも一のヒト R G M a 断片の第 1 のレベルと比較した前記少なくとも一のヒト R G M a 断片の第 2 のレベルの無変化又は上昇が検出された場合、該薬物治療レジメンが多発性硬化症の治療に無効であると判定するために、ステップ (a) より後の時点で、前記被験者から得られた第 2 のサンプル中の少なくとも一のヒト R G M a 断片の第 2 のレベルを請求項 1 に記載の (a 1) ~ (a 4) による方法を用いて測定するステップと20

を含む、方法。

【請求項 4】

少なくとも二のヒト R G M a 断片が検出され、前記少なくとも二のヒト R G M a 断片は、30 kDa 及び 40 kDa のサイズを有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

少なくとも三のヒト R G M a 断片が検出され、前記少なくとも三のヒト R G M a 断片は 18 kDa、30 kDa 及び 40 kDa のサイズを有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。30

【請求項 6】

ステップ (a 1) の前に、前記少なくとも一のヒト R G M a 断片がゲル電気泳動を用いて分離される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

ステップ (a 2) の前に、前記少なくとも一のヒト R G M a 断片を膜に固定化してウェスタンプロッティング膜を作成するステップと、

ステップ (a 2) において、前記ウェスタンプロッティング膜を前記キャプチャー結合タンパク質に接触させるステップと、ここで、前記キャプチャー結合タンパク質は前記ウェスタンプロッティング膜上に固定化した前記少なくとも一のヒト R G M a 断片に結合して、キャプチャー結合タンパク質 - R G M a 断片複合体を形成するステップと40

ステップ (a 3) において、前記ウェスタンプロッティング膜を検出結合タンパク質に接触させるステップと、ここで、前記検出結合タンパク質は前記キャプチャー結合タンパク質と相互作用して、検出結合タンパク質 - キャプチャー結合タンパク質 R G M a 断片複合体を形成する、

をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記少なくとも一のヒト R G M a 断片は、可溶性 R G M a 断片である、請求項 1 ~ 7 の50

いずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ(a 2)においてゲル上で R G M a タンパク質標準を前記サンプル中の前記タンパク質と同時に分離するステップと、

前記少なくとも一のヒト R G M a 断片を前記分離した R G M a タンパク質標準と比較して、前記断片を定量化するステップと、ここで、前記 R G M a タンパク質標準は、組換え R G M 断片の勾配であり、前記勾配は、 1 0 、 2 5 、 5 0 、 1 0 0 及び 2 0 0 p g / m L の R G M a タンパク質標準を含む、

をさらに含む、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記キャプチャー結合タンパク質は、 R G M a 選択的抗体である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記治療は、トリアムシノロンアセトニド(T C A)、フマル酸ジメチル、フィンゴリモド、ラキニモド、- インターフェロン、コパキソン、ダクリズマブ、アレムツズマブ、リツキシマブ、またはその組合せの少なくとも一を含む、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記治療は、トリアムシノロンアセトニド(T C A)を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記サンプルは、脳脊髄液、血液、血清または血漿を含む、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、サンプル中の R G M a 断片を検出し、測定するためのアッセイ、及び神経変性疾患を患っている被験者の治療の判定、最適化、予測及びモニタリングにおける前記アッセイの使用に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

多発性硬化症(M S)は中枢神経系の慢性炎症性疾患である。ガドリニウムを適用する現在利用されている M R I 技術は疾患過程で生ずる各種病巣を可視化し、生物学的マーカーとして役立つ。しかしながら、脳脊髄液(C S F)及びタンパク質の研究は疾患の進行、慢性炎症、及び髄腔内遅放性ステロイド適用のような治療に対する応答の相互作用に対する更なる洞察を与える。

【 0 0 0 3 】

軸索再生のプロセスは多発性硬化症の臨床成果を改善する。ミエリン及びグリア構造中の幾つかの再生インヒビター、すなわちミエリン結合糖タンパク質、 N o g o A 、 O M g p (希突起膠細胞ミエリン糖タンパク質) の存在が公知である。 1 つの更なるインヒビターは反発性誘導分子 A (R G M a) であり、これはニューロン再生及び機能回復をも妨げる。 R G M a は、神経突起伸張の強力なインヒビターであり、 C N S 外傷または炎症後のニューロン再生及び機能回復を阻害する重要な因子として現れるグリコシリホスファチジルイノシトール(G P I)アンカー型糖タンパク質である。 R G M a は膜結合型可溶性形態で存在し、これらは神経突起伸長を阻害する。 R G M a は外傷性脳損傷または虚血性卒中を患っているヒトの C N S ミエリン、新鮮病巣及び成熟瘢痕組織に局在化している。

【 0 0 0 4 】

脳及び脊髄中に存在している R G M a 及びその断片は神経変性を促進し、神経再生を阻害し得る。 R G M a は神経線維の再生及びニューロンの変性に影響を与える。 E L I S A ベースアッセイが再生活性の阻害を同定すべく R G M a 種を検出するために使用されてき

10

20

30

40

50

た。しかしながら、これらのアッセイはサイズの異なる RGMa 断片を区別することができず、通常各種 RGMa 断片を検出するために必要な高感度のレベルを示さない。加えて、ELISA ベースアッセイは体液中のタンパク質量が少ないために RGMa を検出することができない。より高い感度を有し、RGMa 断片を検出し、区別することができ、RGMa 断片を MS または他の神経変性疾患を患っている患者における高い機能回復及び再生と相關させることができる診断アッセイが必要とされている。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、サンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片を検出し、定量化する方法に関する。この方法は、(a) 被験者から少なくとも 1 個の RGMa 断片を含むサンプルを得るステップと、(b) サンプルをキャプチャー結合タンパク質と接触させるステップと、ここで、キャプチャー結合タンパク質 - RGMa 断片複合体を形成する、(c) サンプルを検出結合タンパク質と接触させるステップと、ここで、検出結合タンパク質は、キャプチャー結合タンパク質と相互作用して、検出結合タンパク質 - キャプチャー結合タンパク質 RGMa 断片複合体を形成する、(d) サンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片を検出し、定量化するステップとを含む。少なくとも 1 個の RGMa 断片は、約 1 kDa ~ 約 65 kDa のサイズを有する RGMa 断片であり得る。RGMa 断片は、10 kDa、18 kDa、20 kDa、30 kDa、40 kDa、50 kDa または 65 kDa のサイズを有し得る。RGMa 断片は、18 kDa の RGMa 断片、30 kDa の RGMa 断片及び 40 kDa の RGMa 断片からなる群から選択され得る。ステップ (b) の前に、ゲル電気泳動を用いて、少なくとも 1 個の RGMa 断片を分離してもよい。少なくとも 2 個の RGMa 断片を検出し得る。少なくとも 2 個の RGMa 断片は、30 kDa 及び 40 kDa のサイズを有し得る。少なくとも 3 個の RGMa 断片を検出し得る。少なくとも 3 個の RGMa 断片は、18 kDa、30 kDa 及び 40 kDa のサイズを有し得る。少なくとも 1 個の RGMa 断片は、可溶性 RGMa 断片であり得る。RGMa 断片のサイズは SDS-PAGE により測定され得る。SDS-PAGE は 4 ~ 15 % であり得る。キャプチャー結合タンパク質は、RGMa 選択的抗体であり得る。抗体は、ビオチン化 RGMa 選択的抗体であり得る。検出結合タンパク質は、四価アビジンであり、検出可能標識は、ビオチン化ホースラディッシュペルオキシダーゼであり得る。少なくとも 1 個の RGMa 断片は、ペルオキシダーゼ染色キットを用いて検出され得る。RGMa 断片は、ヒト RGMa 断片であり得る。方法サンプルは脳脊髄液、血液、血清、または血漿を含み得る。

【0006】

本発明は、サンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片を検出し、定量化する方法に関する。この方法は、(a) 被験者から少なくとも 1 個の RGMa 断片を含むサンプルを得るステップと、(b) サンプルをキャプチャー結合タンパク質と接触させるステップと、ここで、キャプチャー結合タンパク質は、少なくとも 1 個の RGMa 断片に結合して、キャプチャー結合タンパク質 - RGMa 断片複合体を形成する、(c) サンプルを検出結合タンパク質と接触させるステップと、ここで、検出結合タンパク質は、キャプチャー結合タンパク質と相互作用して、検出結合タンパク質 - キャプチャー結合タンパク質 RGMa 断片複合体を形成する、(d) サンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片を検出し、定量化するステップとを含む。少なくとも 1 個の RGMa 断片は約 1 kDa ~ 約 65 kDa のサイズを有する RGMa 断片であり得る。RGMa 断片は 10 kDa、18 kDa、20 kDa、30 kDa、40 kDa、50 kDa または 65 kDa のサイズを有し得る。RGMa 断片は 18 kDa の RGMa 断片、30 kDa の RGMa 断片及び 40 kDa の RGMa 断片からなる群から選択され得る。ステップ (b) の前に、ゲル電気泳動を用いて、少なくとも 1 個の RGMa 断片を分離してもよい。方法は更に、ステップ (b) の前に、少なくとも 1 個の RGMa 断片を膜に固定化してウェスタンプロッティング膜を生成し；ステップ (b) においてウェスタンプロッティング膜をキャプチャー結合タンパク質と接触させるステップと、ここで、キャプチャー結合タンパク質は、ウェスタンプロッテ

10

20

30

40

50

イング膜上に固定化した少なくとも1個のRGMa断片に結合して、キャプチャー結合タンパク質-RGMa断片複合体を形成するステップ(c)においてウェスタンプロッティング膜を検出結合タンパク質と接触させるステップと、ここで、検出結合タンパク質は、キャプチャー結合タンパク質と相互作用して、検出結合タンパク質-Capturing protein結合タンパク質RGMa断片複合体を形成することを含む。少なくとも2個のRGMa断片は、30kDa及び40kDaのサイズを有し得る。少なくとも3個のRGMa断片を検出し得る。少なくとも3個のRGMa断片は18kDa、30kDa及び40kDaのサイズを有し得る。少なくとも1個のRGMa断片は可溶性RGMa断片であり得る。RGMa断片のサイズはSDS-PAGEにより測定され得る。SDS-PAGEは4~15%であり得る。膜は、ニトロセルロース膜であり得る。キャプチャー結合タンパク質は、RGMa選択的抗体であり得る。抗体は、ビオチン化RGMa選択的抗体であり得る。検出結合タンパク質は、四価アビジンであり、検出可能標識は、ビオチン化ホースラディッシュペルオキシダーゼであり得る。ペルオキシダーゼ染色キットを用いて、少なくとも1個のRGMa断片が検出され得る。RGMa断片は、ヒトRGMa断片であり得る。方法サンプルは脳脊髄液、血液、血清、または血漿を含み得る。

【0007】

本発明は、サンプル中の少なくとも1個のRGMa断片を検出し、定量化する方法に関する。この方法は、(a)被験者から少なくとも1個のRGMa断片を含むサンプルを得るステップと、(b)サンプルをキャプチャー結合タンパク質と接触させるステップと、ここで、キャプチャー結合タンパク質は、少なくとも1個のRGMa断片に結合して、キャプチャー結合タンパク質-RGMa断片複合体を形成する、(c)サンプルを検出結合タンパク質と接触させるステップと、ここで、検出結合タンパク質は、キャプチャー結合タンパク質と相互作用して、検出結合タンパク質-Capturing protein結合タンパク質RGMa断片複合体を形成する、(d)サンプル中の少なくとも1個のRGMa断片を検出し、定量化するステップとを含む。少なくとも1個のRGMa断片は約1kDa~約65kDaのサイズを有するRGMa断片であり得る。RGMa断片は10kDa、18kDa、20kDa、30kDa、40kDa、50kDaまたは65kDaのサイズを有し得る。RGMa断片は18kDaのRGMa断片、30kDaのRGMa断片及び40kDaのRGMa断片からなる群から選択され得る。ステップ(b)の前に、ゲル電気泳動を用いて、少なくとも1個のRGMa断片を分離してもよい。方法は、ステップ(b)の前に、少なくとも1個のRGMa断片を膜に固定化してウェスタンプロッティング膜を作成させるステップと、ステップ(b)においてウェスタンプロッティング膜をキャプチャー結合タンパク質と接触させるステップと、ここで、キャプチャー結合タンパク質は、ウェスタンプロッティング膜上に固定化した少なくとも1個のRGMa断片に結合して、キャプチャー結合タンパク質-RGMa断片複合体を形成する、ステップ(c)においてウェスタンプロッティング膜を検出結合タンパク質と接触させるステップと、ここで、検出結合タンパク質は、キャプチャー結合タンパク質と相互作用して、検出結合タンパク質-Capturing protein結合タンパク質RGMa断片複合体を形成するステップとをさらに含む。少なくとも2個のRGMa断片を検出し得る。少なくとも2個のRGMa断片は、30kDa及び40kDaのサイズを有し得る。少なくとも3個のRGMa断片を検出し得る。少なくとも3個のRGMa断片は18kDa、30kDa及び40kDaのサイズを有し得る。少なくとも1個のRGMa断片は可溶性RGMa断片であり得る。方法は、ステップ(b)においてゲル上でサンプル中のタンパク質と同時にRGMaタンパク質標準を分離するステップと、(g)少なくとも1個のRGMa断片を分離したRGMaタンパク質標準と比較して、断片を定量化するステップとをさらに含む。RGMaタンパク質標準は組換えRGMa断片の勾配であり得る。勾配は、RGMaタンパク質標準10、25、50、100及び200pg/mLを含み得る。RGMa断片のサイズはSDS-PAGEにより測定され得る。SDS-PAGEは4~15%であり得る。膜は、ニトロセルロース膜であり得る。キャプチャー結合タンパク質は、RGMa選択的抗体であり得る。抗体は、ビオ

10

20

30

40

50

チジン化 R G M a 選択的抗体であり得る。検出結合タンパク質は、四価アビジンであり、検出可能標識は、ビオチン化ホースラディッシュペルオキシダーゼであり得る。ペルオキシダーゼ染色キットを用いて、少なくとも 1 個の R G M a 断片が検出され得る。R G M a 断片は、ヒト R G M a 断片であり得る。方法サンプルは脳脊髄液、血液、血清、または血漿を含み得る。

【 0 0 0 8 】

本発明は、神経変性疾患に対する治療が必要な被験者における神経変性疾患に対する治療の有効性の判定方法に関する。この方法は、(a) 被験者からのサンプル中の少なくとも 1 個の R G M a 断片のレベルを、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて測定するステップと、(b) 被験者からのサンプル中の少なくとも 1 個の R G M a 断片のレベルを少なくとも 1 個の R G M a 断片の対照レベルと比較するステップと、ここで、少なくとも 1 個の断片のレベルが対照レベルと比較して高い場合、治療は、神経変性疾患の治療において無効であると判定され、少なくとも 1 個の断片のレベルが対照レベルと比較して同一であるかまたは低い場合、治療は、神経変性疾患の治療において有効であると判定されることを含み得る。少なくとも 1 個の R G M a 断片の対照レベルは、神経変性疾患にかかっているが、神経変性疾患に対する治療を受けたことがない被験者中の少なくとも 1 個の R G M a 断片のレベルであり得る。治療は、神経回復薬、神経保護薬、または神経再生薬を含み得る。治療は、トリアムシノロンアセトニド (T C A) 、テクフィデラ / B G - 1 2 (フマル酸ジメチル) 、ジレニア (フィンゴリモド) 、ラキニモド、 - インターフェロン、コパキソン、ダクリズマブ、アレムツズマブ、リツキシマブ、またはその組合せの少なくとも 1 つを含み得る。治療は、トリアムシノロンアセトニド (T C A) を含み得る。少なくとも 2 個の R G M a 断片を検出し得る。少なくとも 2 個の R G M a 断片は、 3 0 k D a 及び 4 0 k D a のサイズを有し得る。少なくとも 3 個の R G M a 断片を検出し得る。少なくとも 3 個の R G M a 断片は 1 8 k D a 、 3 0 k D a 及び 4 0 k D a のサイズを有し得る。神経変性疾患または障害は、多発性硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、ティ - サックス病、ニーマン - ピック病、ゴーシュ病、ハーラー症候群、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、特発性炎症性脱髓疾患、ビタミン B 1 2 欠乏症、橋中心髓鞘崩壊症、脊髄ろう、横断性脊髄炎、デピック病、進行性多巣性白質脳症、視神経炎、脊髄損傷、外傷性脳損傷、卒中、縁内障、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性、または白質ジストロフィーであり得る。神経変性疾患または障害は、多発性硬化症であり得る。R G M a 断片は、ヒト R G M a 断片であり得る。方法サンプルは脳脊髄液、血液、血清、または血漿を含み得る。

【 0 0 0 9 】

本発明は、神経変性疾患に対する治療が必要な被験者における、神経変性疾患に対する治療の有効性の判定方法に関する。この方法は、(a) 被験者からのサンプル中の少なくとも 1 個の R G M a 断片のレベルを、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて測定するステップと、(b) 被験者からのサンプル中の少なくとも 1 個の R G M a 断片のレベルを、少なくとも 1 個の R G M a 断片の対照レベルと比較するステップとを含み、ここで、少なくとも 1 個の断片のレベルが対照レベルと比較して高い場合、治療は神経変性疾患の治療において無効であると判定され、少なくとも 1 個の断片のレベルが対照レベルと比較して同一であるかまたは低い場合、治療は神経変性疾患の治療において有効であると判定される。方法は神経変性疾患の治療が必要な被験者に対して、神経変性疾患の治療に有効であると判定された治療を施行し続けることをさらに含む。少なくとも 1 個の R G M a 断片の対照レベルは、神経変性疾患にかかっているが、神経変性疾患に対する治療を受けたことがない被験者中の少なくとも 1 個の R G M a 断片のレベルであり得る。治療は、神経回復薬、神経保護薬、または神経再生薬を含み得る。治療はトリアムシノロンアセトニド (T C A) 、テクフィデラ / B G - 1 2 (フマル酸ジメチル) 、ジレニア (フィンゴリモド) 、ラキニモド、 - インターフェロン、コパキソン、ダクリズマブ、アレムツズマブ、リツキシマブ、またはその組合せの少なくとも 1 つを含み得る。治療はトリアムシノロンアセトニド (T C A) を含み得る。少なくとも 2 個の R G M a 断片を検出し得

10

20

30

40

50

る。少なくとも 2 個の RGMa 断片は、30 kDa 及び 40 kDa のサイズを有し得る。少なくとも 3 個の RGMa 断片を検出し得る、少なくとも 3 個の RGMa 断片は 18 kDa、30 kDa 及び 40 kDa のサイズを有し得る。神経変性疾患または障害は、多発性硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、ティ・サックス病、ニーマン・ピック病、ゴーシエ病、ハーラー症候群、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、特発性炎症性脱髓鞘疾患、ビタミン B₁₂欠乏症、橋中心髓鞘崩壊症、脊髄ろう、横断性脊髄炎、デビック病、進行性多巣性白質脳症、視神経炎、脊髄損傷、外傷性脳損傷、卒中、縁内障、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性、または白質ジストロフィーであり得る。神経変性疾患または障害は、多発性硬化症であり得る。RGMa 断片は、ヒト RGMa 断片であり得る。方法サンプルは脳脊髄液、血液、血清、または血漿を含み得る。

10

【0010】

本発明は、神経変性疾患を患っている被験者の治療に対する応答性の予測方法に関する。この方法は、(a) 被験者からのサンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片のレベルを、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて測定するステップと、(b) 被験者からのサンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片のレベルを少なくとも 1 個の RGMa 断片の対照レベルと比較するステップと；(c) サンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片のレベルが対照レベルと比較して低い場合、被験者の治療に対する応答性の予測を与えるステップとを含む。治療は神経回復薬、神経保護薬、または神経再生薬を含み得る。治療はトリアムシノロンアセトニド(TCA)、テクフィデラ/BG-12(フル酸ジメチル)、ジレニア(フィンゴリモド)、ラキニモド、-インターフェロン、コパキソン、ダクリズマブ、アレムツズマブ、リツキシマブ、またはその組合せの少なくとも 1 つを含み得る。治療はトリアムシノロンアセトニド(TCA)を含み得る。少なくとも 2 個の RGMa 断片を検出し得る。少なくとも 2 個の RGMa 断片は、30 kDa 及び 40 kDa のサイズを有し得る。少なくとも 3 個の RGMa 断片を検出し得る。少なくとも 3 個の RGMa 断片は 18 kDa、30 kDa 及び 40 kDa のサイズを有し得る。神経変性疾患または障害は、多発性硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、ティ・サックス病、ニーマン・ピック病、ゴーシエ病、ハーラー症候群、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、特発性炎症性脱髓鞘疾患、ビタミン B₁₂欠乏症、橋中心髓鞘崩壊症、脊髄ろう、横断性脊髄炎、デビック病、進行性多巣性白質脳症、視神経炎、脊髄損傷、外傷性脳損傷、卒中、縁内障、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性、または白質ジストロフィーであり得る。神経変性疾患または障害は、多発性硬化症であり得る。RGMa 断片は、ヒト RGMa 断片であり得る。方法サンプルは脳脊髄液、血液、血清、または血漿を含み得る。

20

【0011】

本発明は、神経変性疾患を患っている被験者の治療に対する応答性の予測方法に関する。この方法は、(a) 被験者からのサンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片のレベルを、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて測定するステップと (b) 被験者からのサンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片のレベルを少なくとも 1 個の RGMa 断片の対照レベルと比較するステップと；(c) サンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片のレベルを対照レベルと比較して低い場合、被験者の治療に対する応答性の予測を与えるステップとを含む。方法は治療に対して応答すると予測された被験者に対して治療を施行することをさらに含む。治療は、神経回復薬、神経保護薬、または神経再生薬を含み得る。治療はトリアムシノロンアセトニド(TCA)、テクフィデラ/BG-12(フル酸ジメチル)、ジレニア(フィンゴリモド)、ラキニモド、-インターフェロン、コパキソン、ダクリズマブ、アレムツズマブ、リツキシマブ、またはその組合せの少なくとも 1 つを含み得る。治療はトリアムシノロンアセトニド(TCA)を含み得る。少なくとも 2 個の RGMa 断片を検出し得る。少なくとも 2 個の RGMa 断片は、30 kDa 及び 40 kDa のサイズを有し得る。少なくとも 3 個の RGMa 断片を検出し得る。少なくとも 3 個の RGMa 断片は 18 kDa、30 kDa 及び 40 kDa のサイズを有し得る。神経変性疾患または障害は、多発性硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、ティ・サックス病、ニーマン・ピック病、ゴーシエ病、ハーラー症候群、ハンチントン病、筋萎

30

40

50

縮性側策硬化症、特発性炎症性脱髓疾患、ビタミンB12欠乏症、橋中心髓鞘崩壊症、脊髓ろう、横断性脊髓炎、デビック病、進行性多巣性白質脳症、視神経炎、脊髓損傷、外傷性脳損傷、卒中、縁内障、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性、または白質ジストロフィーであり得る。神経変性疾患または障害は、多発性硬化症であり得る。RGMa断片は、ヒトRGMa断片であり得る。方法サンプルは脳脊髄液、血液、血清、または血漿を含み得る。

【0012】

本発明は、神経変性疾患を患っている被験者の治療方法に関する。この方法は、(a)被験者からのサンプル中の少なくとも1個のRGMa断片のレベルを、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法を用いて測定するステップと、(b)被験者からのサンプル中の少なくとも1個のRGMa断片のレベルを少なくとも1個のRGMa断片の対照レベルと比較するステップと；(c)断片のレベルが対照レベルと比較して高い場合、被験者に対して治療レジメンを投与するステップとを含む。治療は神経回復薬、神経保護薬、または神経再生薬を含み得る。治療はトリアムシノロンアセトニド(TCA)、テクフィデラ/BG-12(フル酸ジメチル)、ジレニア(フィンゴリモド)、ラキニモド、-インターフェロン、コパキソン、ダクリズマブ、アレムツズマブ、リツキシマブ、またはその組合せの少なくとも1つを含み得る。治療はトリアムシノロンアセトニド(TCA)を含み得る。少なくとも2個のRGMa断片を検出し得る。少なくとも2個のRGMa断片は、30kDa及び40kDaのサイズを有し得る。少なくとも3個のRGMa断片を検出し得る。少なくとも3個のRGMa断片は18kDa、30kDa及び40kDaのサイズを有し得る。神経変性疾患または障害は、多発性硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、ティ-サックス病、ニーマン-ピック病、ゴーシュ病、ハーラー症候群、ハンチントン病、筋萎縮性側策硬化症、特発性炎症性脱髓疾患、ビタミンB12欠乏症、橋中心髓鞘崩壊症、脊髓ろう、横断性脊髓炎、デビック病、進行性多巣性白質脳症、視神経炎、脊髓損傷、外傷性脳損傷、卒中、縁内障、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性、または白質ジストロフィーであり得る。神経変性疾患または障害は、多発性硬化症であり得る。RGMa断片は、ヒトRGMa断片であり得る。方法サンプルは脳脊髄液、血液、血清、または血漿を含み得る。

【0013】

本発明は、神経変性疾患を患っている被験者に対する治療レジメンの最適化方法に関する。この方法は、(a)被験者から得られた第1サンプル中の少なくとも1個のRGMa断片の第1レベルを請求項1～20のいずれか1項に記載の方法を用いて測定するステップと、ここで、第1サンプルは、被験者が治療レジメンを始める前またはその間の時点で被験者から採取される；(b)ステップ(a)より後の時点で被験者から得られた第2サンプル中の少なくとも1個のRGMa断片の第2レベルを測定するステップと、ここで、少なくとも1個のRGMa断片の第2レベルが少なくとも1個のRGMa断片の第1レベルと比較して低いことは当該治療レジメンが神経変性疾患に対して治療効果を有していることを示し；(c)被験者からの第1サンプル中の少なくとも1個のRGMa断片のレベルを請求項1に記載の方法を用いて測定するステップと、(d)被験者からのサンプル中の少なくとも1個のRGMa断片のレベルを、少なくとも1個のRGMa断片の対照レベルと比較するステップと；(e)サンプル中の少なくとも1個のRGMa断片のレベルが対照レベルと比較して低い場合、被験者の治療に対する応答性の予測を与えるステップとを含む。治療レジメンは、神経回復治療レジメンであり得る。神経回復治療レジメンの成功率を向上させ得る。治療レジメンは、神経保護治療レジメンであり得る。神経保護治療レジメンの成功率を向上させ得る。少なくとも2個のRGMa断片を検出し得る。少なくとも2個のRGMa断片は、30kDa及び40kDaのサイズを有し得る。少なくとも3個のRGMa断片を検出し得る。少なくとも3個のRGMa断片は18kDa、30kDa及び40kDaのサイズを有し得る。神経変性疾患または障害は、多発性硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、ティ-サックス病、ニーマン-ピック病、ゴーシュ病、ハーラー症候群、ハンチントン病、筋萎縮性側策硬化症、特発性炎症性脱髓疾患、ビタ

10

20

30

40

50

ミンB12欠乏症、橋中心髄鞘崩壊症、脊髄ろう、横断性脊髄炎、デビック病、進行性多巣性白質脳症、視神経炎、脊髄損傷、外傷性脳損傷、卒中、縁内障、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性、または白質ジストロフィーであり得る。神経変性疾患または障害は、多発性硬化症であり得る。RGMa断片は、ヒトRGMa断片であり得る。方法サンプルは脳脊髄液、血液、血清、または血漿を含み得る。

【0014】

本発明は、神経変性疾患を患っている被験者の再生促進薬物治療のモニタリング方法に関する。この方法は、(a)被験者から得られた第1サンプル中の少なくとも1個のRGMa断片の第1レベルを請求項1～21のいずれか1項に記載の方法を用いて測定するステップと、ここで、第一サンプルは、被験者が薬物治療を始める前またはその間の時点で被験者から採取される、(b)ステップ(a)の後の時点で被験者から得られた第2サンプル中の少なくとも1個のRGMa断片の第2レベルを測定するステップと、ここで、少なくとも1個のRGMa断片の第2レベルが少なくとも1個のRGMa断片の第1レベルと比較して低いことは薬物治療レジメンが神経変性疾患に対して治療効果を有していることを示し、少なくとも1個のRGMa断片の第2レベルが少なくとも1個のRGMa断片の第1レベルと比較して高いことは薬物治療レジメンが神経変性疾患に対して治療効果を有していないことを示し；(c)薬物治療レジメンが神経変性疾患に対して治療効果を有していない場合、別の治療を被験者に対して施行するステップとを含む。少なくとも2個のRGMa断片を検出し得る。少なくとも2個のRGMa断片は、30kDa及び40kDaのサイズを有し得る。少なくとも3個のRGMa断片は18kDa、30kDa及び40kDaのサイズを有し得る。神経変性疾患または障害は、多発性硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、ティ・サックス病、ニーマン・ピック病、ゴーシェ病、ハーラー症候群、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、特発性炎症性脱髓疾患、ビタミンB12欠乏症、橋中心髄鞘崩壊症、脊髄ろう、横断性脊髄炎、デビック病、進行性多巣性白質脳症、視神経炎、脊髄損傷、外傷性脳損傷、卒中、縁内障、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性、または白質ジストロフィーであり得る。神経変性疾患または障害は、多発性硬化症であり得る。RGMa断片は、ヒトRGMa断片であり得る。方法サンプルは脳脊髄液、血液、血清、または血漿を含み得る。

【0015】

本発明は、神経変性疾患に対する治療効果についての化合物のスクリーニング方法に関する。この方法は、(a)細胞を含むサンプル中の少なくとも1個のRGMa断片の第1レベルを請求項1～21のいずれか1項に記載の方法を用いて測定するステップと、(b)サンプルを化合物と接触させるステップと；(c)ステップ(b)より後の時点で被験者から得られた第2サンプル中の少なくとも1個のRGMa断片の第2レベルを測定するステップと、ここで、少なくとも1個のRGMa断片の第2レベルが少なくとも1個のRGMa断片の第1レベルと比較して低いことは該化合物が神経変性疾患に対して治療効果を有していることを示し、少なくとも1個のRGMa断片の第2レベルが少なくとも1個のRGMa断片の第1レベルと比較して高いことは該化合物が神経変性疾患に対して治療効果を有していないことを示し；(d)治療効果を有するとして同定された化合物を選択するステップとを含む。少なくとも2個のRGMa断片を検出し得る。少なくとも2個のRGMa断片は、30kDa及び40kDaのサイズを有し得る。少なくとも3個のRGMa断片は18kDa、30kDa及び40kDaのサイズを有し得る。神経変性疾患または障害は、多発性硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、ティ・サックス病、ニーマン・ピック病、ゴーシェ病、ハーラー症候群、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、特発性炎症性脱髓疾患、ビタミンB12欠乏症、橋中心髄鞘崩壊症、脊髄ろう、横断性脊髄炎、デビック病、進行性多巣性白質脳症、視神経炎、脊髄損傷、外傷性脳損傷、卒中、縁内障、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性、または白質ジストロフィーであり得る。神経変性疾患または障害は、多発性硬化症であり得る。RGMa断片は、ヒトRGMa断片であり得る。方法サンプルは脳脊髄液、血液、血清、または血漿を含み得る。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】18、30及び40kDaの断片(a, b, c, 実線の矢印)を生成するプロタンパク質変換酵素SKI-1及びフーリンによるRGMaの切断を示す。

【図2】進行性MS患者のCSF中に存在するRGMa断片を示す。

【図3A】TCA治療中に即時応答した17人の患者の臨床データを改善されたEDSSで示す。データはすべて平均値±SEM(平均値の標準誤差)として示す; * = p < 0.05; ** = p < 0.01; *** = p < 0.001; * = 事後解析からのp値の有意差レベル; I = 第1回TCA投与前のベースライン; II = 第2回TCA投与前; III = 第3回TCA投与前; IV = 第4回TCA投与前; V = 第5回TCA投与前; VI = 第6回TCA投与前。
10

【図3B】TCA治療中に即時応答した17人の患者の臨床データを改善された歩行距離で示す。データはすべて平均値±SEM(平均値の標準誤差)として示す; * = p < 0.05; ** = p < 0.01; *** = p < 0.001; * = 事後解析からのp値の有意差レベル; I = 第1回TCA投与前のベースライン; II = 第2回TCA投与前; III = 第3回TCA投与前; IV = 第4回TCA投与前; V = 第5回TCA投与前; VI = 第6回TCA投与前。

【図3C】TCA治療中に即時応答した17人の患者の臨床データを改善された歩行速度で示す。データはすべて平均値±SEM(平均値の標準誤差)として示す; * = p < 0.05; ** = p < 0.01; *** = p < 0.001; * = 事後解析からのp値の有意差レベル; I = 第1回TCA投与前のベースライン; II = 第2回TCA投与前; III = 第3回TCA投与前; IV = 第4回TCA投与前; V = 第5回TCA投与前; VI = 第6回TCA投与前。
20

【図4A】TCA適用の反復に対して即時応答しない8人の患者の臨床データを改善のないEDSSで示す。データはすべて平均値±SEM(平均値の標準誤差)として示す。I = 第1回TCA投与前のベースライン; II = 第2回TCA投与前; III = 第3回TCA投与前; IV = 第4回TCA投与前; V = 第5回TCA投与前。

【図4B】TCA適用の反復に対して即時応答しない8人の患者の臨床データを改善のない歩行距離で示す。データはすべて平均値±SEM(平均値の標準誤差)として示す。I = 第1回TCA投与前のベースライン; II = 第2回TCA投与前; III = 第3回TCA投与前; IV = 第4回TCA投与前; V = 第5回TCA投与前。
30

【図4C】TCA適用の反復に対して即時応答しない8人の患者の臨床データを改善のない歩行速度(図4C)で示す。データはすべて平均値±SEM(平均値の標準誤差)として示す。I = 第1回TCA投与前のベースライン; II = 第2回TCA投与前; III = 第3回TCA投与前; IV = 第4回TCA投与前; V = 第5回TCA投与前。

【図5A】TCA治療に対する即時応答者の脳脊髄液中のRGMa濃度(40kDa)の変化を示す。データはすべて平均値±SEMとして示す; * = p < 0.05; ** = p < 0.01; *** = p < 0.001; * = 事後解析からのp値の有意差レベル; I = 第1回TCA投与前のベースライン; II = 第2回TCA投与前; III = 第3回TCA投与前; IV = 第4回TCA投与前。
40

【図5B】TCA治療に対する即時応答者の脳脊髄液中のRGMa濃度(30kDa)の変化を示す。データはすべて平均値±SEMとして示す; * = p < 0.05; ** = p < 0.01; *** = p < 0.001; * = 事後解析からのp値の有意差レベル; I = 第1回TCA投与前のベースライン; II = 第2回TCA投与前; III = 第3回TCA投与前; IV = 第4回TCA投与前。

【図5C】TCA治療に対する即時応答者の脳脊髄液中のタンパク質濃度の変化を示す。データはすべて平均値±SEMとして示す; * = p < 0.05; ** = p < 0.01; *** = p < 0.001; * = 事後解析からのp値の有意差レベル; I = 第1回TCA投与前のベースライン; II = 第2回TCA投与前; III = 第3回TCA投与前; IV = 第4回TCA投与前。
50

【図6】TCA適用に対して即時応答した17人の患者から採取したRGMa CSFレベルのデンシトメトリー分析についての3つの代表的ウェスタンプロットをヒストグラムで示す。

【図7A】TCA治療に対して即時応答しないMS患者の脳脊髄液中のRGMa濃度(40kDa)を示す。データはすべて平均値±SEMとして示す; * = p < 0.05; ** = p < 0.01; *** = p < 0.001; * = 事後解析からのp値の有意差レベル; I = 第1回TCA投与前のベースライン; II = 第2回TCA投与前; III = 第3回TCA投与前; IV = 第4回TCA投与前。

【図7B】TCA治療に対して即時応答しないMS患者の脳脊髄液中のRGMa濃度(30kDa)を示す。データはすべて平均値±SEMとして示す; * = p < 0.05; ** = p < 0.01; *** = p < 0.001; * = 事後解析からのp値の有意差レベル; I = 第1回TCA投与前のベースライン; II = 第2回TCA投与前; III = 第3回TCA投与前; IV = 第4回TCA投与前。

【図7C】TCA治療に対して即時応答しないMS患者の脳脊髄液中のタンパク質濃度を示す。データはすべて平均値±SEMとして示す; * = p < 0.05; ** = p < 0.01; *** = p < 0.001; * = 事後解析からのp値の有意差レベル; I = 第1回TCA投与前のベースライン; II = 第2回TCA投与前; III = 第3回TCA投与前; IV = 第4回TCA投与前。

【図8】TCA適用に対して即時応答しない8人の患者から採取したRGMa CSFレベルのデンシトメトリー分析についての3つの代表的ウェスタンプロットをヒストグラムで示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明は、RGMa断片のレベルを分析し、被験者の神経変性疾患に対する治療レジメンが必要な被験者における、神経変性疾患に対する治療レジメンを判定し、最適化し、予測し、モニターするためのアッセイに関する。RGMa断片ベース診断アッセイは具体的サイズの特定RGMa断片を検出するために使用され得る。内因性及び組換えRGMa断片の免疫検出は、神経変性疾患を患っているかまたはその症状を呈している被験者における治療を判定し、最適化し、予測し、モニターするために使用され得る。RGMa断片ベース診断アッセイは、CSF、血液、血清及び血漿のようなヒト体液中に存在している可溶性再生抑制RGMa断片の濃度を少量用いて定量的に測定する。この診断アッセイは高感度(ヒト材料中の低ピコグラム(pg)量のRGMaを検出)を与える。RGMaタンパク質標準と組み合わせて多発性硬化症のような神経変性疾患を患っている患者の体液中のRGMa濃度を同定するための定量ツールである。加えて、このアッセイはRGMaの別の断片を区別し、疾患の進行中にこれらの断片のパターンシフトをモニターすることができる。従って、神経回復薬物トライアルにおける患者層化のための手段、再生促進薬に対して積極的に応答し得る患者を追跡するための手段、前記トライアルにおける非応答者を同定するための手段、神経回復治療作戦を最適化するための手段、及び神経回復薬アプローチの成功率を向上させるための手段を与えるので、この方法は全RGMTンパク質のみを調べる現在のテクノロジーに比して優れている。

【0018】

本セクションで使用されているセクションの見出し及びこの中の全開示内容は系統立ての目的のみであり、限定的と意図されない。

【0019】

1. 定義

別段の定めがない限り、本明細書中で使用されているすべての技術用語及び科学用語は、当業者が通常理解しているのと同じ意味を有する。矛盾する場合、定義を含めた本明細書が支配する。好ましい方法及び材料が以下に記載されているが、本明細書中に記載されているものと類似または均等の方法及び材料が本発明の実施または試験の際に使用され得る。本明細書中に挙げられているすべての刊行物、特許出願明細書、特許文献及び他の文

10

20

30

40

50

献は全文を参照により組み入れる。本明細書中に開示されている材料、方法及び例は例示に過ぎず、限定的と意図されない。

【0020】

本明細書中で使用されている単数形“a”、“a n”及び“t h e”は文脈上そうでないとする明確な指示がない限り、複数形を含む。本明細書中の数値の範囲を列挙する場合もその間にある各数値は同一の精度で明示的に意図される。例えば、範囲6～9の場合には6及び9に加えて数値7及び8が考えられ、範囲6.0～7.0の場合には数値6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9及び7.0が明示的に意図される。

【0021】

「または」の使用は、特に言及のない限り「及び／または」を意味する。更に、用語「含む（i n c l u d i n g）」及び「有する（h a v i n g）」、並びにこれらの用語の他の形、例えば“i n c l u d e s”、“i n c l u d e d”、“h a s”及び“h a v e”は限定的でない。

【0022】

明細書及び特許請求の範囲中で使用されている場合、次の用語は以下の意味を有する：

本明細書中で使用されている用語「対照被験者」は健康な被験者、すなわち多発性硬化症（M S）のような神経変性疾患の臨床兆候または症状を有していない被験者を意味する。対照被験者は、M Sの兆候または症状が他の方法で不検出であると臨床的に評価されており、その評価にはルーチンの身体検査及び／または臨床検査が含まれ得る。本明細書中で使用されている「対照群」は対照被験者または健康被験者の群、すなわちM Sのような神経変性疾患の臨床兆候または症状を持たない被験者の群を指す。

【0023】

本明細書中で使用されている「サンプル」、「生体サンプル」、「試験サンプル」、「標本」、「被験者からのサンプル」及び「患者サンプル」は互換可能に使用され得、血液、組織、尿、血清、血漿、羊水、脳脊髄液、胎盤細胞または組織、内皮細胞、白血球または単球のサンプルであり得る。サンプルは患者から入手したまま直接使用しても、または本明細書中で検討されているかまたは当業界で公知である幾つかの方法でサンプルの特徴を修飾するために、例えば濾過、蒸留、抽出、濃縮、遠心、干渉成分の不活化、試薬の添加等により前処理してもよい。

【0024】

本明細書中で使用されている用語「被験者」、「患者」または「方法における被験者」は互換可能に脊椎動物を意味し、脊椎動物には哺乳動物（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、家兔、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット及びマウス）、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザルまたはアカゲザルのようなサル、チンパンジー）、及びヒトが含まれるが、これらに限定されない。幾つかの実施形態では、被験者はヒトまたは非ヒトであり得る。幾つかの実施形態では、被験者はM Sのような神経変性疾患を発症するリスクがあるかまたはそのリスクがあると疑われている、または既に発症しているヒト被験者であり得る。

【0025】

本明細書中で使用されている用語「治療する（t r e a t）」、「治療した（t r e a t e d）」、または「治療する（t r e a t i n g）」は、対象者が望ましくない生理的状態、障害または疾患を鈍化させる（緩和する）、または有利なまたは望ましい臨床結果を得る治療を指す。本発明の目的のために、有利なまたは望ましい臨床結果には、症状の緩和；状態、障害または疾患の程度の減少；状態、障害または疾患の状態の安定化（すなわち、悪化せず）；状態、障害または疾患の発症の遅れまたは進行の遅延；状態、障害または疾患状態の緩和；及び検出できるかまたは検出できない（部分的または全体的）寛解、或いは状態、障害または疾患の強化または改善が含まれるが、これらに限定されない。治療には、治療を受けていない場合の予想される生存と比較して延長した生存も含まれる。

10

20

30

40

50

【0026】

本明細書中に別段の定めがない限り、本開示に関連して使用されている科学及び技術用語は当業者が通常理解している意味を有する。例えば、本明細書中に記載されている細胞及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、タンパク質及び核酸化学、及びハイブリダイゼーションに関連して使用されている専門用語及び技術は当業界で公知であり、通常使用されているものである。用語の意味及び範囲は明確でなければならない。しかしながら、潜在的な曖昧さがある場合には、本明細書中に記載されている定義が辞書または外部の定義に優先する。更に、文脈上別段の指定がない限り、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含む。

【0027】

10

2. RGMa断片ベース診断アッセイ

本発明は、サンプル中のRGMa断片を定量化し、検出するための診断アッセイに関する。RGMaはRGMa断片であり得る。診断アッセイは少なくとも1個のRGMa断片を定量化し、検出し得る。RGMaは、47アミノ酸(aa)シグナル配列、121aa

N末端プロセグメント、256成熟領域及び26aa C末端プロセグメントを含む450aa プレプロタンパク質として合成される。N末端プロセグメントはRGDトリペチド及び分子のたった2個の可能性あるN連結グリコシル化部位を含む。成熟セグメントはフォン・ビルブランド因子ドメインに対して構造相同性を有する省略短縮ドメインを示す。タンパク質分解プロセッシングがアスパラギン酸-プロリン結合で起こり、予測32kDa成熟領域が生ずる。GPIアンカー-RGMaタンパク質は、フーリン及びプロタンパク質変換酵素SKI-1により多数の膜結合型可溶性断片にプロセッシングされ、このプロセッシングはその適切なインビオ機能のために必要である。

20

【0028】

RGMaに対する受容体はネオゲニンであると報告されている。RGM-Aは骨形成タンパク質補助受容体であり、BMP-2、BMP-4、BMP-5及びBMP-6に結合し得ることも判明している。RGMaの幾つかの異なる断片は、そのニューロン受容体ネオゲニンに結合することにより神経突起伸長抑制機能を発揮する。ネオゲニンは免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、4個のN末端免疫グロブリン様ドメイン(Ig)、6個のフィプロネクチンIII型(FNIII)ドメイン、貫膜ドメイン及びC末端内部ドメインからなる。2個の異なるRGMa断片のN末端(30kDa)及びC末端断片(40kDa)は、配列相同性を欠くにもかかわらずネオゲニンの同一FNIIIドメイン(ドメイン3-4)に結合する。RGMa断片はインビトロで神経突起伸長を抑制することが判明している。脊髄損傷モデルにおいてRGMa活性をポリクローナルRGMa抗体で中和すると長距離軸索再生が生じ、機能回復が改善された。脳卒中モデルでは、RGMaをダウンレギュレーションすると、神経保護が生じ、軸索誘導及び細胞分化における基本的役割のために公知であるネオゲニンを介して作用する機能回復が強化された。ヒトCSF中の2個の再生抑制性RGMa断片(30及び40kDa)の存在から、これらのタンパク質が進行性MS患者における再生失敗及び神経変性に寄与することが示唆される。MS患者では、RGMaは脳及び脊髄中で未熟及び成熟樹状細胞により発現する。RGMaはCD68陽性マクロファージ及びCD4陽性Tリンパ球上で発現するので、免疫系において、例えばミクログリア細胞上またはT細胞応答の調節においても役割を有し得る。脳では、活性化ミクログリア細胞はその表面上でRGMaを発現し、ミクログリアRGMa発現が低下するとインビトロ及びインビオの両方で軸索成長が高まる。加えて、RGMa遺伝子はMS患者及び実験的自己免疫脳脊髄炎で誘導したあるラットの緊張で疾患関連遺伝子として同定された。

30

【0029】

40

診断アッセイは、被験者から少なくとも1個のRGMa断片を含むサンプルを入手し；サンプルをキャプチャー結合タンパク質と接触させ、ここで、キャプチャー結合タンパク質は、少なくとも1個のRGMa断片と結合して、キャプチャー結合タンパク質-RGMa断片複合体を形成する、サンプルを検出結合タンパク質と接触させ、ここで、検出結合

50

タンパク質は、キャプチャーコンビネーションタンパク質と相互作用して、検出結合タンパク質 - キャプチャーコンビネーションタンパク質 RG Ma 断片複合体を形成する、サンプル中の少なくとも 1 個の RG Ma 断片を検出し、定量化することを含む。少なくとも 1 個の RG Ma 断片は約 1 kDa ~ 約 65 kDa のサイズを有し得る。少なくとも 1 個の RG Ma 断片は約 10 kDa 、約 18 kDa 、約 20 kDa 、約 30 kDa 、約 40 kDa 、約 50 kDa または約 65 kDa のサイズを有し得る。少なくとも 1 個の RM Ga 断片は 18 kDa の RG Ma 断片、30 kDa の RG Ma 断片及び 40 kDa の RG Ma 断片からなる群から選択され得る。少なくとも 1 個の RG Ma 断片はサンプルの他の成分、例えば異なるサイズを有する他の RG Ma 断片から分離され得る。幾つかの実施形態では、アッセイはゲル電気泳動、カラムクロマトグラフィーや質量分光法のような分離技術を用いてサイズに応じて断片を分離することを含む。

10

【0030】

a. RG Ma 断片

RG Ma を診断アッセイにより検出する。RG Ma は RG Ma 断片であり得る。アッセイは少なくとも 1 個の RG Ma 断片を検出し得る。

【0031】

RG Ma は、N 末端アミノ酸 168 で N 末端ドメイン内で 2 個のプロテアーゼのプロタントパク質変換酵素 SKI - 1 及びフーリンにより切断されて、機能的に活性なタンパク質及び 18 、 30 及び 40 kDa の活性断片が生ずる（図 1 ）。 30 kDa 断片はジスルフイド結合（ S - S ）を介して膜結合型 C 末端 40 kDa 断片にリンクしている。 C 末端（矢印、シェディング） GPI アンカードメイン内で切断すると、 RG Ma の可溶性形態を形成する 3 個の断片が遊離する。切断が C 末端でシェダーゼ及び GPI アンカーを切断する酵素により起こると、これらの断片の可溶性形態が生ずる。膜アンカー形態のように、これら 3 個の可溶性断片（ 18 kDa = 末端切断型 N 末端ドメイン , 30 kDa = N 末端ドメイン , 40 kDa = C 末端ドメイン ）はすべて神経突起伸長及び再生インヒビターとして活性である。

20

【0032】

RG Ma 断片ベース診断アッセイは、約 1 kDa ~ 約 65 kDa のサイズを有する少なくとも 1 個の RG Ma 断片を検出し得る。RG Ma 断片は約 1 kDa 、約 2 kDa 、約 3 kDa 、約 4 kDa 、約 5 kDa 、約 6 kDa 、約 7 kDa 、約 8 kDa 、約 9 kDa 、約 10 kDa 、約 11 kDa 、約 12 kDa 、約 13 kDa 、約 14 kDa 、約 15 kDa 、約 16 kDa 、約 17 kDa 、約 18 kDa 、約 19 kDa 、約 20 kDa 、約 21 kDa 、約 22 kDa 、約 23 kDa 、約 24 kDa 、約 25 kDa 、約 26 kDa 、約 27 kDa 、約 28 kDa 、約 29 kDa 、約 30 kDa 、約 31 kDa 、約 32 kDa 、約 33 kDa 、約 34 kDa 、約 35 kDa 、約 36 kDa 、約 37 kDa 、約 38 kDa 、約 39 kDa 、約 40 kDa 、約 41 kDa 、約 42 kDa 、約 43 kDa 、約 44 kDa 、約 45 kDa 、約 46 kDa 、約 47 kDa 、約 48 kDa 、約 49 kDa 、約 50 kDa 、約 51 kDa 、約 52 kDa 、約 53 kDa 、約 54 kDa 、約 55 kDa 、約 56 kDa 、約 57 kDa 、約 58 kDa 、約 59 kDa 、約 60 kDa 、約 61 kDa 、約 62 kDa 、約 63 kDa 、約 64 kDa 、約 65 kDa 、またはその組合せであり得る。

30

【0033】

RG Ma 断片ベース診断アッセイは、少なくとも 1 個の RG Ma 断片、少なくとも 2 個の RG Ma 断片、少なくとも 3 個の RG Ma 断片、少なくとも 4 個の RG Ma 断片、少なくとも 5 個の RG Ma 断片、少なくとも 6 個の RG Ma 断片、または少なくとも 7 個の RG Ma 断片を検出し得る。RG Ma 断片ベース診断アッセイは、10 kDa の RG Ma 断片、18 kDa の RG Ma 断片、20 kDa の RG Ma 断片、30 kDa の RG Ma 断片、40 kDa の RG Ma 断片、50 kDa の RG Ma 断片、65 kDa の RG Ma 断片、またはその組合せを検出し得る。例えば、RG Ma 断片ベース診断アッセイは、10 kDa の RG Ma 断片； 18 kDa の RG Ma 断片； 20 kDa の RG Ma 断片； 30 kDa

40

50

の RGMa 断片； 40 kDa の RGMa 断片； 50 kDa の RGMa 断片； 65 kDa の RGMa 断片； 10 kDa の RMGa 断片及び 18 kDa の RGMa 断片； 10 kDa の RMGa 断片及び 20 kDa の RGMa 断片； 10 kDa の RMGa 断片及び 30 kDa の RGMa 断片； 10 kDa の RMGa 断片及び 40 kDa の RGMa 断片； 10 kDa の RMGa 断片及び 50 kDa の RGMa 断片； 10 kDa の RMGa 断片及び 60 kDa の RGMa 断片； 18 kDa の RMGa 断片及び 20 kDa の RGMa 断片； 18 kDa の RMGa 断片及び 30 kDa の RGMa 断片； 18 kDa の RMGa 断片及び 40 kDa の RGMa 断片； 18 kDa の RMGa 断片及び 50 kDa の RGMa 断片； 18 kDa の RMGa 断片及び 60 kDa の RGMa 断片； 20 kDa の RMGa 断片及び 30 kDa の RGMa 断片； 20 kDa の RMGa 断片及び 40 kDa の RGMa 断片； 20 kDa の RMGa 断片及び 50 kDa の RGMa 断片； 20 kDa の RMGa 断片及び 60 kDa の RGMa 断片； 30 kDa の RMGa 断片及び 40 kDa の RGMa 断片； 30 kDa の RMGa 断片及び 50 kDa の RGMa 断片； 30 kDa の RMGa 断片及び 60 kDa の RGMa 断片； 40 kDa の RMGa 断片及び 50 kDa の RGMa 断片； 40 kDa の RMGa 断片及び 60 kDa の RGMa 断片； 50 kDa の RMGa 断片及び 60 kDa の RGMa 断片； 10 kDa の RGMa 断片及び少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、または少なくとも 6 個の 18 kDa の RGMa 断片、20 kDa の RGMa 断片、30 kDa の RGMa 断片、40 kDa の RGMa 断片、50 kDa の RGMa 断片または 65 kDa の RGMa 断片； 18 kDa の RGMa 断片及び少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、または少なくとも 6 個の 10 kDa の RGMa 断片、20 kDa の RGMa 断片、30 kDa の RGMa 断片、40 kDa の RGMa 断片、50 kDa の RGMa 断片または 65 kDa の RGMa 断片； 20 kDa の RGMa 断片及び少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、または少なくとも 6 個の 10 kDa の RGMa 断片、18 kDa の RGMa 断片、30 kDa の RGMa 断片、40 kDa の RGMa 断片、50 kDa の RGMa 断片または 65 kDa の RGMa 断片； 30 kDa の RGMa 断片及び少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、または少なくとも 6 個の 10 kDa の RGMa 断片、18 kDa の RGMa 断片、20 kDa の RGMa 断片、40 kDa の RGMa 断片、50 kDa の RGMa 断片または 65 kDa の RGMa 断片； 40 kDa の RGMa 断片及び少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、または少なくとも 6 個の 10 kDa の RGMa 断片、18 kDa の RGMa 断片、18 kDa の RGMa 断片、20 kDa の RGMa 断片、30 kDa の RGMa 断片、50 kDa の RGMa 断片または 65 kDa の RGMa 断片； 50 kDa の RGMa 断片及び少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、または少なくとも 6 個の 10 kDa の RGMa 断片； 65 kDa の RGMa 断片及び少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、または少なくとも 6 個の 10 kDa の RGMa 断片、18 kDa の RGMa 断片、18 kDa の RGMa 断片、20 kDa の RGMa 断片、30 kDa の RGMa 断片、50 kDa の RGMa 断片または 65 kDa の RGMa 断片； 65 kDa の RGMa 断片及び少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、または少なくとも 6 個の 10 kDa の RGMa 断片、18 kDa の RGMa 断片、20 kDa の RGMa 断片、30 kDa の RGMa 断片、40 kDa の RGMa 断片または 65 kDa の RGMa 断片； 50 kDa の RGMa 断片及び少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、または少なくとも 6 個の 10 kDa の RGMa 断片、18 kDa の RGMa 断片、20 kDa の RGMa 断片、30 kDa の RGMa 断片、40 kDa の RGMa 断片または 50 kDa の RGMa 断片を検出し得る。 RGMa 断片ベース診断アッセイは、18 kDa の RGMa 断片、30 kDa の RGMa 断片及び 40 kDa の RGMa 断片が以下に検討する抗 RGMa 抗体のようなキャプチャーコンビネーションタンパク質に対する結合エピトープ部位を保持している限り、これら 3 個の断片を検出し得る。

【0034】

b . 断片検出

被験者からのサンプル中の RGMa 断片は、該断片を分離し、その断片のサイズを測定するための各種手段により検出され、定量化され得る。断片は、RGMa 断片に特異的に結合するキャプチャーコンビネーションタンパク質、例えば抗 RGMa 抗体のような RGMa 断片結合タンパク質を用いて検出され得る。キャプチャーコンビネーションタンパク質は、検出可能標識を有し得、または検出可能標識を有する検出結合タンパク質により認識される。検出可能標識に

より RGMa 断片を同定できる。

【0035】

幾つかの実施形態では、RGMa 断片は SDS-PAGE / ウエスタンプロッティング分析を用いて同定、サイズ分け及び定量化され得る。幾つかの実施形態では、RGMa 断片はカラムクロマトグラフィー技術を用いて同定、サイズ分け及び定量化され得る。幾つかの実施形態では、RGMa 断片は質量分析法を用いて同定、サイズ分け及び定量化され得る。

【0036】

キャプチャー結合タンパク質は、抗 RGMa 抗体、例えばビオチン化 RGMa 選択的抗体 (BAF2459 R&D Systems)、または米国特許出願公開 Nos. 2004/0102376、2010/0028340、2011/0135664、2013/0330347 及び 2014/0023659 に記載されている RGMa 抗体であり得る。RGMa 断片に結合する抗体は、ABC ペルオキシダーゼ染色キット (Pierce; 32020) または高感度 ECL 溶液 (Thermo Scientific, SuperSignal West Femto Chemiluminescence Substrate, 34094) とインキュベートした後可視化され、VersaDocイメージヤー (BioRad) を用いてスキャンされ得る。体液中の組換え RGMa (R&D Systems, 2459-RM-050) 及び 1 個の RGMa 断片のバンド強度を定量化するために Quantity One Version 4.6.9 (BioRad) が使用され得る。

【0037】

(1) SDS-PAGE / ウエスタンプロッティング

RGMa 断片ベース診断アッセイは、少なくとも 1 個の RGMa 断片を膜に固定化してウエスタンプロッティング膜を作成させるステップと、ウエスタンプロッティング膜をキャプチャー結合タンパク質と接触させるステップと、ここで、キャプチャー結合タンパク質は、ウエスタンプロッティング膜上に固定化した少なくとも 1 個の RGMa 断片に結合して、キャプチャー結合タンパク質 - RGMa 断片複合体を形成する、ウエスタンプロッティング膜を検出結合タンパク質と接触させるステップと、ここで、検出結合タンパク質は、キャプチャー結合タンパク質と相互作用して、検出結合タンパク質 - キャプチャー結合タンパク質 RGMa 断片複合体を形成するステップとをさらに含み得る。

【0038】

RGMa タンパク質標準マーカーを使用し、サンプルと同時に SDS-PAGE を用いて分離し得る。少なくとも 1 個の RGMa 断片結合強度を RGMa タンパク質標準マーカーと比較して、RGMa 断片のサイズを測定し、及び / または少なくとも 1 個の RGMa 断片の量を定量化する。RGMa タンパク質標準は組換え RGMa 断片の勾配であり得る。幾つかの実施形態では、組換え RGMa 断片の勾配は、10、25、50、100 及び 200 pg/mL を含む。SDS-PAGE は 5% ~ 25% アクリルアミドを有し得る。幾つかの実施形態では、SDS-PAGE は 4 ~ 15% アクリルアミド勾配ゲルであり得る。膜は、ニトロセルロースまたは PVDF 膜であり得る。

【0039】

3. RGMa 断片ベース診断アッセイの使用方法 - 診断、予測、または治療 / 予防治療の効果の評価

本発明では、RGMa 断片ベース診断アッセイの使用方法も提供する。方法は、その必要がある被験者からサンプル入手することを含む。方法は、被験者から得たサンプル中の少なくとも 1 個の上記 RGMa 断片の存在及び / またはレベルを検出するために RGMa 断片ベース診断アッセイを利用する。被験者は神経変性疾患を患っているかそのリスクを有し得る。

【0040】

方法は、神経変性疾患に対する治療または治療レジメンの有効性を判定するために RGMa 断片ベース診断アッセイを利用する。他の実施形態では、方法は、神経変性疾患を患

10

20

30

40

50

っている被験者の治療または治療レジメンに対する応答性を予測するために R G M a 断片ベース診断アッセイを利用する。幾つかの実施形態では、方法は、治療または治療レジメンを被験者に投与すべきかを判定するために R G M a 断片ベース診断アッセイを利用する。もっと他の実施形態では、方法は、神経変性疾患を患っている被験者に対する治療または治療レジメンを最適化するために R G M a 断片ベース診断アッセイを利用する。幾つかの実施形態では、方法は、神経変性疾患を患っている被験者の治療または治療レジメンをモニターするために R G M a 断片ベース診断アッセイを使用し得る。他の実施形態では、方法は、神経変性疾患に対して治療上有効である化合物をスクリーニングするために R G M a 断片ベース診断アッセイを利用する。

【0041】

10

a . 神経変性疾患

R G M a は、慢性疾患の神経変性及び進行と再生の間の相互作用のモジュレーターとして役割を発揮し得る。神経変性疾患は R G M a の存在が疾患に関係している、すなわち R G M a 活性が有害である疾患であり得る。例えば、R G M a は虚血損傷ヒト脳組織中、外傷性脳損傷を患っているヒトの病巣中、A D 患者のプラーカ領域中、パーキンソン病患者の黒質中、及び M S 患者中に見られた。神経変性疾患または障害は、多発性硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、ティ - サックス病、ニーマン - ピック病、ゴーシュ病、ハーラー症候群、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、特発性炎症性脱髓鞘疾患、ビタミン B₁₂欠乏症、橋中心髓鞘崩壊症、脊髄ろう、横断性脊髄炎、デビック病、進行性多巣性白質脳症、視神経炎、脊髄損傷のような C N S に対する外傷性損傷、外傷性脳損傷、虚血性脳卒中のよう卒中、線内障、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性及び白質ジストロフィーであり得る。

20

【0042】

(1) 多発性硬化症

多発性硬化症 (M S) は、脳内及び脳と身体間の情報の流れを分断する中枢神経系の身体障害性疾患である。 M S は、身体の免疫系の異常応答が脳、脊髄、網膜及び視神経から構成される中枢神経系 (C N S) に向けられている免疫媒介プロセスを伴う。この疾患は、その進行、及び炎症病巣のその顕著な大脳及び脊髄局在に関して各種サブタイプにより特徴づけられる。前記サブタイプには、再発寛解型 M S (R R M S) 、二次性進行型 M S (S P M S) 、一次性進行型 M S (P P M S) 及び進行再発型 M S (P R M S) が含まれる。

30

【0043】

R R M S は、しばしば再発、再燃または憎悪と呼ばれる悪化する神経機能の明確に規定された発作の後、その間に症状が部分的または完全に改善され、疾患の明らかな進行がない部分的または完全回復期間 (寛解) により特徴づけられる。 S P M S は M S の二次相として特徴づけられ、当初 R R M S 疾患経過を有していた個人で生ずる。 S P M S にかかっている個人は、疾患が次第に R R M S で見られる炎症プロセスから神経損傷または損失により特徴づけられるより着実に進行する相に徐々に変化するので、炎症に起因する再発を経験し続けることも、しないこともある。 P P M S は明確な再発または寛解期間なく神経機能の着実な悪化により特徴づけられる。 P P M S にかかっている個人はたまの停滞期または一時的な回復があるが、進行は続いている長期間にわたって変わり得る進行速度を有している。 P R M S は、 P R M S にかかっている個人が R R M S にかかっている人が経験するようなたまの回復に加えて、非常に初期から神経機能の着実な悪化を経験する点で P P M S に類似している。

40

【0044】

用語「最初の臨床症状」 (C I S) は、少なくとも 24 時間続き、中枢神経系の 1 つ以上の部位における炎症及び脱髓に起因している神経症状の第 1 エピソードを表すために使用される。 C I S は、人が 1 つの病巣に起因する 1 つの神経兆候または症状を経験する単発性、または人が 2 つ以上の場所の病巣に起因する 2 つ以上の兆候または症状を経験する多発性であり得る。 C I S を経験した人は M S を発症することも、しないこともある。長

50

期間には、多くの患者は最後には神経変性を有する進行性くすぶり型慢性炎症性プロセスに至る。

〔 0 0 4 5 〕

M S を患っているかまたは患っていると疑われる被験者は総合障害度評価スコア（ E D S S ）及び / または最大歩行距離及び / または歩行速度の評価を用いて評価または診断され得る。幾つかの実施形態では、低い E D S S スコア、増加した歩行距離及び / または低下した歩行速度を有する被験者は治療または治療レジメンが該被験者に対して有効であることを示し得る。

【 0 0 4 6 】

例えば、被験者のEDSSスコアが治療前の被験者のEDSSスコアと比較して少なくとも約0.1、少なくとも約0.2、少なくとも約0.3、少なくとも約0.4、少なくとも約0.5、少なくとも約0.6、少なくとも約0.7、少なくとも約0.8、少なくとも約0.9、少なくとも約1.0、少なくとも約2.0、少なくとも約3.0、少なくとも約4.0、少なくとも約5.0、または少なくとも約6.0低いことは、治療または治療レジメンが神経変性疾患に有効であることを示す。

【 0 0 4 7 】

10

20

30

40

50

20 m ~ 約 125 m、約 250 m ~ 約 750 m、約 250 m ~ 約 700 m、約 250 m ~ 約 650 m、約 250 m ~ 約 600 m、約 250 m ~ 約 550 m、約 250 m ~ 約 500 m、約 250 m ~ 約 450 m、約 250 m ~ 約 400 m、約 250 m ~ 約 350 m、約 250 m ~ 約 300 m、約 300 m ~ 約 750 m、約 300 m ~ 約 700 m、約 300 m ~ 約 650 m、約 300 m ~ 約 600 m、約 300 m ~ 約 550 m、約 300 m ~ 約 500 m、約 300 m ~ 約 450 m、約 300 m ~ 約 400 m、約 300 m ~ 約 350 m、約 350 m ~ 約 750 m、約 350 m ~ 約 700 m、約 350 m ~ 約 650 m、約 350 m ~ 約 600 m、約 350 m ~ 約 550 m、約 350 m ~ 約 500 m、約 350 m ~ 約 450 m、約 350 m ~ 約 400 m、約 400 m ~ 約 750 m、約 400 m ~ 約 700 m、約 400 m ~ 約 650 m、約 400 m ~ 約 600 m、約 400 m ~ 約 550 m、約 400 m ~ 約 500 m、約 400 m ~ 約 450 m、約 400 m ~ 約 400 m、約 450 m ~ 約 650 m、約 450 m ~ 約 600 m、約 450 m ~ 約 550 m、約 450 m ~ 約 500 m、約 450 m ~ 約 450 m、約 450 m ~ 約 400 m、約 450 m ~ 約 350 m、約 450 m ~ 約 300 m、約 450 m ~ 約 250 m、約 450 m ~ 約 200 m、約 450 m ~ 約 150 m、約 450 m ~ 約 100 m、約 450 m ~ 約 50 m、約 450 m ~ 約 0 m、約 500 m ~ 約 600 m、約 500 m ~ 約 550 m、約 500 m ~ 約 500 m、約 500 m ~ 約 450 m、約 500 m ~ 約 400 m、約 500 m ~ 約 350 m、約 500 m ~ 約 300 m、約 500 m ~ 約 250 m、約 500 m ~ 約 200 m、約 500 m ~ 約 150 m、約 500 m ~ 約 100 m、約 500 m ~ 約 50 m、約 500 m ~ 約 0 m、約 550 m ~ 約 600 m、約 550 m ~ 約 550 m、約 550 m ~ 約 500 m、約 550 m ~ 約 450 m、約 550 m ~ 約 400 m、約 550 m ~ 約 350 m、約 550 m ~ 約 300 m、約 550 m ~ 約 250 m、約 550 m ~ 約 200 m、約 550 m ~ 約 150 m、約 550 m ~ 約 100 m、約 550 m ~ 約 50 m、約 550 m ~ 約 0 m、約 600 m ~ 約 700 m、約 600 m ~ 約 650 m、約 600 m ~ 約 600 m、約 600 m ~ 約 550 m、約 600 m ~ 約 500 m、約 600 m ~ 約 450 m、約 600 m ~ 約 400 m、約 600 m ~ 約 350 m、約 600 m ~ 約 300 m、約 600 m ~ 約 250 m、約 600 m ~ 約 200 m、約 600 m ~ 約 150 m、約 600 m ~ 約 100 m、約 600 m ~ 約 50 m、約 600 m ~ 約 0 m、約 650 m ~ 約 700 m、約 650 m ~ 約 650 m、約 650 m ~ 約 600 m、約 650 m ~ 約 550 m、約 650 m ~ 約 500 m、約 650 m ~ 約 450 m、約 650 m ~ 約 400 m、約 650 m ~ 約 350 m、約 650 m ~ 約 300 m、約 650 m ~ 約 250 m、約 650 m ~ 約 200 m、約 650 m ~ 約 150 m、約 650 m ~ 約 100 m、約 650 m ~ 約 50 m、約 650 m ~ 約 0 m、約 700 m ~ 約 750 m、約 700 m ~ 約 700 m、約 700 m ~ 約 650 m、約 700 m ~ 約 600 m、約 700 m ~ 約 550 m、約 700 m ~ 約 500 m、約 700 m ~ 約 450 m、約 700 m ~ 約 400 m、約 700 m ~ 約 350 m、約 700 m ~ 約 300 m、約 700 m ~ 約 250 m、約 700 m ~ 約 200 m、約 700 m ~ 約 150 m、約 700 m ~ 約 100 m、約 700 m ~ 約 50 m、約 700 m ~ 約 0 m、約 750 m ~ 約 800 m、約 750 m ~ 約 750 m、約 750 m ~ 約 700 m、約 750 m ~ 約 650 m、約 750 m ~ 約 600 m、約 750 m ~ 約 550 m、約 750 m ~ 約 500 m、約 750 m ~ 約 450 m、約 750 m ~ 約 400 m、約 750 m ~ 約 350 m、約 750 m ~ 約 300 m、約 750 m ~ 約 250 m、約 750 m ~ 約 200 m、約 750 m ~ 約 150 m、約 750 m ~ 約 100 m、約 750 m ~ 約 50 m、約 750 m ~ 約 0 m、または約 650 m ~ 約 700 m 増加したことは、治療または治療レジメンが被験者における神経変性疾患に有効であることを示す。被験者の歩行距離が少なくとも約 1 m、少なくとも約 2 m、少なくとも約 3 m、少なくとも約 4 m、少なくとも約 5 m、少なくとも約 10 m、少なくとも約 15 m、少なくとも約 20 m、少なくとも約 25 m、少なくとも約 30 m、少なくとも約 35 m、少なくとも約 40 m、少なくとも約 45 m、少なくとも約 50 m、少なくとも約 55 m、少なくとも約 60 m、少なくとも約 65 m、少なくとも約 70 m、少なくとも約 75 m、少なくとも約 80 m、少なくとも約 85 m、少なくとも約 90 m、少なくとも約 95 m、少なくとも約 100 m、少なくとも約 105 m、少なくとも約 110 m、少なくとも約 115 m、少なくとも約 120 m、少なくとも約 125 m、少なくとも約 130 m、少なくとも約 135 m、少なくとも約 140 m、少なくとも約 145 m、少なくとも約 150 m、少なくとも約 155 m、少なくとも約 160 m、少なくとも約 165 m、少なくとも約 170 m、少なくとも約 175 m、少なくとも約 180 m、少なくとも約 185 m、少なくとも約 190 m、少なくとも約 195 m、または少なくとも約 200 m 増加したことは、治療または治療レジメンが被験者における神経変性疾患に有効であることを示す。

【0048】

例えば、被験者の歩行速度 (s / 8 m) が少なくとも約 30 s / 8 m ~ 少なくとも約 10 s / 8 m、少なくとも約 25 s / 8 m ~ 少なくとも約 10 s / 8 m、少なくとも約 20 s / 8 m ~ 少なくとも約 10 s / 8 m、少なくとも約 15 s / 8 m ~ 少なくとも約 10 s / 8 m、少なくとも約 30 s / 8 m ~ 少なくとも約 15 s / 8 m、少なくとも約 25 s / 8 m ~ 少なくとも約 15 s / 8 m、少なくとも約 30 s / 8 m ~ 少なくとも約 20 s / 8 m、少なくとも約 25 s / 8 m ~ 少なくとも約 20 s / 8 m、または少なくとも約 30 s / 8 m ~ 少なくとも約 25 s / 8 m 増加したことは、治療または治療レジメンが被験者における神経変性疾患に有効であることを示す。被験者が約 30 . 0 s / 8 m 未満、約 25 . 0 s / 8 m 未満、約 20 . 0 s / 8 m 未満、約 15 . 0 s / 8 m 未満、約 14 . 5 s / 8 m 未満、約 14 . 0 s / 8 m 未満、約 13 . 5 s / 8 m 未満、約 13 . 0 s / 8 m 未満、約 12 . 9 s / 8 m 未満、約 12 . 8 s / 8 m 未満、約 12 . 7 s / 8 m 未満、約 12 . 6 s / 8 m 未満、約 12 . 5 s / 8 m 未満、約 12 . 4 s / 8 m 未満、約 12 . 3 s / 8 m 未満、約 12 . 2 s / 8 m 未満、約 12 . 1 s / 8 m 未満、約 12 . 0 s / 8 m 未満、約 11 . 9 s / 8 m 未満、約 11 . 8 s / 8 m 未満、約 11 . 7 s / 8 m 未満、約 11 . 6 s / 8 m 未満、約 11 . 5 s / 8 m 未満、約 11 . 4 s / 8 m 未満、約 11 . 3 s / 8 m 未満、約 11 . 2 s / 8 m 未満、約 11 . 1 s / 8 m 未満、約 11 . 0 s / 8 m 未満、約 10 . 5 s / 8 m 未満、約 10 . 0 s / 8 m 未満、約 9 . 5 s / 8 m 未満、約 9 . 0 s / 8 m 未満、約 8 . 5 s / 8 m 未満、約 8 . 0 s / 8 m 未満、約 7 . 5 s / 8 m 未満、約 7 . 0 s / 8 m 未満、約 6 . 5 s / 8 m 未満、約 6 . 0 s / 8 m 未満、約 5 . 5 s / 8 m 未満、約 5 . 0 s / 8 m 未満、約 4 . 5 s / 8 m 未満、約 4 . 0 s / 8 m 未満、約 3 . 5 s / 8 m 未満、約 3 . 0 s / 8 m 未満、約 2 . 5 s / 8 m 未満、約 2 . 0 s / 8 m 未満、約 1 . 5 s / 8 m 未満、約 1 . 0 s / 8 m 未満、約 0 . 5 s / 8 m 未満、約 0 . 0 s / 8 m 未満、または少なくとも約 30 s / 8 m 増加したことは、治療または治療レジメンが被験者における神経変性疾患に有効であることを示す。

m未満、または約8.0 s / 8 m未満の歩行速度を有していることは、治療または治療レジメンが被験者の神経変性疾患に有効であることを示す。

【0049】

例えば、被験者が8 m歩行するのに要する時間が少なくとも約0.5秒、少なくとも約1秒、少なくとも約2秒、少なくとも約3秒、少なくとも約4秒、少なくとも約5秒、少なくとも約6秒、少なくとも約7秒、少なくとも約8秒、少なくとも約9秒、少なくとも約10秒、少なくとも約11秒、少なくとも約12秒、少なくとも約13秒、少なくとも約14秒、少なくとも約15秒、少なくとも約16秒、少なくとも約17秒、少なくとも約18秒、少なくとも約19秒、少なくとも約20秒、少なくとも約21秒、少なくとも約22秒、少なくとも約23秒、少なくとも約24秒、または少なくとも約25秒だけ短いことは、治療または治療レジメンが被験者における神経変性疾患に有効であることを示す。

10

【0050】

b . 対照 / 基準レベル

対照サンプルを含めることが望ましいことがある。対照サンプルは上記した被験者からのサンプルと同時に分析され得る。被験者サンプルから得た結果は対照サンプルから得た結果と比較し得る。標準曲線を用意し得、これと生体サンプルについてのアッセイ結果を比較し得る。標準曲線は、アッセイ単位、すなわち化学発光標識を使用する場合、化学発光シグナル強度の関数としてマーカーレベルを与える。複数のドナーから採取したサンプルを用いて、標準曲線は正常健康組織または治療を受けたことのないMS組織中のRGMa断片の対照レベルに対して用意され得る。

20

【0051】

よって、上記にてらして、試験サンプル中のRGMa断片の存在、量または濃度の測定方法を提供する。方法は、(1) RG Ma断片について試験サンプルをウェスタンプロット分析により、例えばRG Ma断片上のエピトープに結合する少なくとも1つのキャプチャーアンチ体、及びキャプチャーアンチ体またはキャプチャーアンチ体に対するエピトープとは異なるRG Ma断片上のエピトープに結合し、場合により検出可能標識を含む少なくとも1つの検出抗体を使用することによりアッセイすることを含む。方法は更に、(2) 試験サンプル中のRG Ma断片の存在、量または濃度の直接または間接指標として検出可能標識により生じたシグナルをキャリブレーター中のRG Ma断片の存在、量または濃度の直接または間接指標として生じたシグナルと比較することを含む。キャリブレーターは場合により、キャリブレーターの各々が一連の他のキャリブレーターとRG Ma断片の濃度だけ異なる一連のキャリブレーターの一部であり、そうであることが好ましい。

30

【0052】

(1) 基準レベル

本明細書中に記載されている方法は、(1) 神経変性疾患を患っている被験者に対する治療または治療レジメンの有効性を同定し、判定する；(2) 神経変性疾患を患っている被験者の治療または治療レジメンに対する応答性を予測する；(3) 神経変性疾患を患っている被験者に対して治療または治療レジメンを与える；(4) 神経変性疾患を患っている被験者に対する治療または治療レジメンを最適化する；(5) 神経変性疾患を患っている被験者に対する再生促進薬物治療または治療レジメンをモニターする；及び(6) 化合物を神経変性疾患に対する治療効果についてスクリーニングするために被験者のRG Ma断片の基準レベルを使用する。

40

【0053】

通常、所定または基準レベルがベンチマークとして使用され得、このベンチマークに対して試験サンプルをRG Ma断片（例えば、18 kDaのRG Ma断片、30 kDaのRG Ma断片及び/または40 kDaのRG Ma断片）についてアッセイしたときに得られる結果を評価する。通常、比較する際、所定レベルはアライドの存在、量または濃度を具体的指標を有するMSの特定段階またはエンドポイントと連係または関連させ得るように特定のアッセイを適切な条件で十分な回数実施することにより得られる。典型的には、

50

所定レベルは基準被験者（または、被験者の集団）のアッセイで得られる。基準被験者は神経疾患にかかっていない正常または健康被験者のような対照被験者、またはMS被験者のような神経疾患にかかっている被験者であり得る。MS被験者は、MSに対する治療を受けているかまたは受けていないMSの特定段階または前段階（すなわち、RRMS、SPMS、PPMS、PRMSまたはCIS）を有する被験者である。基準群の基準集団は対照群またはMS群であり得る。MS群には、MSの特定段階または前段階（すなわち、RRMS、SPMS、PPMS、PRMSまたはCIS）を有するMS被験者、及び／またはMSにかかっているが、MSに対する治療を受けない被験者が含まれ得る。基準レベルは治療または治療レジメンを被験者に投与する前の被験者のRGMa断片レベルであり得る。

10

【0054】

特に、治療応答性について使用される所定レベルに関して、上記したRGMa断片の量または濃度は「変化なし」、「有利」（または、「有利に変化した」）、または「不利」（または、「不利に変化した」）であり得る。「高い」または「上昇した」は、試験サンプル中の量または濃度が典型的または正常レベルまたは範囲（例えば、所定レベル）、例えば対照群またはMS群で見られる典型的または正常レベルよりも高いかまたは大きいこと、または別の基準レベルまたは範囲（例えば、前のまたはベースラインサンプル）よりも高いかまたは大きいことを指す。「高い」または「上昇した」は、試験サンプル中の量または濃度が治療を開始する前の被験者で見られるレベルまたは範囲よりも高いかまたは大きいことをも指し得る。用語「低い」または「減少した」は、試験サンプル中の量または濃度が典型的または正常レベルまたは範囲（例えば、所定レベル）、例えば対照群またはMS群で見られる典型的または正常レベル以下またはそれ未満であること、または別の基準レベルまたは範囲（例えば、前のまたはベースラインサンプル）以下またはそれ未満であることを指す。用語「低い」または「減少した」は、試験サンプル中の量または濃度が治療を開始する前の被験者で見られるレベルまたは範囲以下またはそれ未満であることをも指す。用語「変化した」は、サンプル中の量または濃度が典型的または正常レベルまたは範囲（例えば、所定レベル）、例えば対照群またはMS群で見られる典型的または正常レベルに比べて、または別の基準レベルまたは範囲（例えば、前のまたはベースラインサンプル）に比べて変化していることを指す。

20

【0055】

上記したRGMa断片についての典型的または正常レベルまたは範囲、または別の基準レベルまたは範囲（例えば、前のまたはベースラインサンプル）は標準プラクティスに従って規定される。所謂変化したレベルまたは変化は、典型的または正常レベルまたは範囲、または基準レベルまたは範囲と比較して、実験誤差またはサンプル分散により説明することができない正味変化があるときに生じると見なされ得る。幾つかの実施形態では、具体的サンプルで測定されたレベルを所謂正常被験者、すなわち対照被験者からの類似サンプルで測定したレベルまたはレベルの範囲と比較する。これに関連して、「正常な」（時に「対照」または「健康な」）被験者はMS不検出の個人であり、「正常な」患者または集団は例えば検出できないMSを示すものである。「見かけ正常な被験者」はRGMa断片（例えば、18kDaのRGMa断片、30kDaのRGMa断片及び／または40kDaのRGMa断片）をまだ評価していないか評価しているものである。アナライトのレベルは、アナライトが通常不検出である（例えば、正常レベルは0、または正常集団の約25～約75パーセンタイルの範囲内である）が、試験サンプル中で検出されるときに、及びアナライトが試験サンプル中に正常レベルよりも多く存在しているときに「高い」と言われる。幾つかの実施形態では、具体的サンプルで測定されたレベルをMS被験者からの類似サンプル、または治療を開始する前の被験者から採取した前のまたはベースラインサンプル中で測定したレベルまたはレベルの範囲と比較する。

40

【0056】

幾つかの実施形態では、基準レベルがMSに対する治療を受けたかまたは受けていないMS被験者におけるRGMa断片レベルである場合、RGMa断片（例えば、18kDa

50

の R G M a 断片、 3 0 k D a の R G M a 断片及び / または 4 0 k D a の R G M a 断片) の基準レベルより高いレベルは被験者が治療または治療レジメンに応答しないと同定し、治療が M S の治療のために有効でないと同定する。 R G M a 断片 (例えば、 1 8 k D a の R G M a 断片、 3 0 k D a の R G M a 断片及び / または 4 0 k D a の R G M a 断片) の基準レベルと同等またはそれ以下のレベルは被験者が治療または治療レジメンに対して応答すると同定し、または治療が M S の治療のために有効であると同定する。

【 0 0 5 7 】

幾つかの実施形態では、対照、ベースライン、または前のレベルまたは範囲と比較したサンプル中の相対的 R G M a 断片レベルの変化は、被験者が治療または治療レジメンに応答すると同定し、または治療が M S の治療のために有効であると同定する。幾つかの実施形態では、被験者から採取したサンプル中の相対的 R G M a 断片レベルが対照、前またはベースラインサンプル中の R G M a 断片レベルと比較して約 1 0 0 % 未満、約 9 5 % 未満、約 8 5 % 未満、約 8 0 % 未満、約 7 5 % 未満、約 7 0 % 未満、約 6 5 % 未満、約 5 5 % 未満、約 5 0 % 未満、約 4 5 % 未満、約 4 0 % 未満、約 3 5 % 未満、約 3 0 % 未満、約 2 5 % 未満、約 2 0 % 未満、約 1 5 % 未満、約 1 0 % 未満、または約 5 % 未満であることは、被験者が治療または治療レジメンに応答するかまたは応答すると予測されると同定し、または治療が M S の治療のために有効であると同定する。

【 0 0 5 8 】

c . サンプル

R G M a 断片ベース診断アッセイの方法は被験者から 1 つ以上のサンプルを得ることを含み得る。 1 つ以上のサンプルは脳脊髄液 (C S F) サンプルであり得る。他の実施形態では、 1 つ以上のサンプルは任意のソース、例えば組織、血液、血漿、唾液、つば、粘液、汗、尿、尿道スワブ、頸管スワブ、尿生殖器または肛門スワブ、結膜スワブ、眼液 (o c u l a r l e n s f l u i d) 、または脳脊髄液から採取し得る。 1 つ以上のサンプルは、 (i) 被験者から得たまま直接、または (i i) 1 つ以上のサンプルの特性を修飾するために前処理した後使用し得る。よって、 1 つ以上のサンプルは、例えば血液からの血漿または血清の調製、細胞の破壊、固体材料からの液体材料の調製、粘性流体の希釈、液体の濾過、試薬の添加、核酸の精製、タンパク質の精製等により前処理され得る。

【 0 0 5 9 】

サンプルは治療または治療レジメンを被験者に投与する前またはその後の各種時点で採取され得る。例えば、サンプルは治療または治療レジメンの被験者への投与の 1 日前、 0 日前、 1 日後、 2 日後、 3 日後、 4 日後、 5 日後、 6 日後、 7 日後、 8 日後、 9 日後、または 1 0 日後に採取され得る。

【 0 0 6 0 】

d . 他のバイオマーカーとの組合せ

本明細書中に記載されている方法は、 (1) 神経変性疾患を患っている被験者に対する治療または治療レジメンの有効性を同定し、判定する； (2) 神経変性疾患を患っている被験者の治療または治療レジメンに対する応答性を予測する； (3) 神経変性疾患を患っている被験者に対して治療または治療レジメンを与える； (4) 神経変性疾患を患っている被験者に対する治療または治療レジメンを最適化する； (5) 神経変性疾患を患っている被験者に対する再生促進薬物治療または治療レジメンをモニターする；及び (6) 化合物を神経変性疾患に対する治療効果についてスクリーニングするために、 R G M a 断片ベース診断アッセイを別のバイオマーカーと組み合わせて使用することを含み得る。幾つかの実施形態では、バイオマーカーは M S のバイオマーカー、例えば N O G O A 、 N o g o 受容体 (N g R) に対するリガンド、 N O G O 受容体、希突起膠細胞ミエリン糖タンパク質 (O M g p) 、ミエリン塩基性タンパク質 (M B P) 、ニューロフィラメント (N f) 、成長関連タンパク質 3 (G A P - 4 3) ；オステオポンチン；インターロイキン 1 7 、インターロイキン 6 、インターフェロン 及び T N F - であり得る。幾つかの実施形態では、 R G M a 断片のレベルの変化と共に M S のバイオマーカーのレベルの変化、すなわち上昇または低下は治療または治療レジメンが有効であるかを示す。

10

20

30

40

50

【0061】

e. 治療レジメン

R G M a 断片ベース診断アッセイの使用方法は、神経変性疾患に対する治療または治療レジメンにおいて使用され得る。治療または治療レジメンには、神経再生薬、神経保護薬、またはその組合せを含めた神経回復薬が含まれ得る。神経回復は、シナプス強度の変化、シナプス活性のシフト、サイレストシナプスの活性化、抑制性シナプスのサイレンシングによる機能不全ニューロンネットワークの補正を包含する。神経回復は神経再生プロセスを含む。神経再生は、損傷線維の再成長により、損傷線維路または健康な隣接非損傷路の側枝発芽、再成長後の新しいシナプスの形成、及び後の新しいミエリンシートのもっと後の形成による損傷されたニューロンネットワークの修復である。神経保護は、ニューロンの損失を停止または少なくとも遅らすことによる疾患の進行及び二次的損傷を予防または遅延するためのニューロン構造及び／または機能の相対的保存である。10

【0062】

治療または治療レジメンには、コルチコステロイド、例えばトリアムシノロンアセトニド（T C A）；テクフィデラ／B G - 1 2（フマル酸ジメチル）、ジレニア（フィンゴリモド）、ラキニモド、ダクリズマブ、アレムツズマブ、リツキシマブ、プレドニゾロン；メチルプレドニゾロン；アザチオプリン；シクロホスファミド；シクロスボリン；メトトレキサート；4 - アミノピリジン；チザニジン；インターフェロン 1 a (AVONEX；Biogen)；インターフェロン 1 b (BETASERON；Chiron/Berlex)；インターフェロン - n 3 (Interferon Sciences/Fujimoto)、インターフェロン (Alfa Wassermann/J & J)、インターフェロン 1 A - I F (Serono/Inhale Therapeutics)、ペグインターフェロン 2 b (Enzon/Schering-Plough)、コポリマー-1 (Cop-1；コパキソン；Teva Pharmaceutical Industries, Inc.)；高压酸素；静注用免疫グロブリン；クラドリビン；他のヒトサイトカイン、または増殖因子及びその受容体、例えばTNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-23、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-1 1、GM-CSF、FGF 及びPDGFに対する抗体またはアンタゴニスト；細胞表面分子、例えばCD2、CD3、CD4、CD5、CD19、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90、またはそのリガンドに対する抗体、ナタリズマブ、物質、例えばメトトレキサート、シクロスボリン、FK506、ラバマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、テリフルノミド、レフルノミド、グラチラマー酢酸塩、ジレニア（フィンゴリモド）、ミトキサントロン、ペグインターフェロン - 1 a、フマル酸ジメチル、NSAID、例えばイブプロフェン、コルチコステロイド、例えばプレドニゾロン、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓薬、補体阻害剤、アドレナリン作用薬、炎症性サイトカイン、例えばTNF またはIL-1によるシグナリングと干渉する物質（例えば、IRAK、NIK、IKK、p38 またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL-1 変換酵素阻害剤、TACE阻害剤、T細胞シグナリング阻害剤、例えばキナーゼ阻害剤、メタロプロテアーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6 - メルカプトプリン、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体及びその誘導体（例えば、可溶性p55 またはp75 TNF受容体、s i L - 1 R I、s i L - 1 R I I、s i L - 6 R）、抗炎症性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-13 及びTGF）30、またはその組合せが含まれ得る。治療または治療レジメンには、プロ再生性R G M a 抗体が含まれ得る。プロ再生性R G M a 抗体は、米国特許出願公開No s. 2004 / 0102376、2010 / 0028340、2011 / 0135664、2013 / 0330347 及び2014 / 0023659に記載されている。40

【0063】

治療には、更に治療薬、造影剤、細胞傷害性物質、血管形成抑制剤；キナーゼ阻害剤；共刺激分子ブロッカー；細胞接着分子ブロッカー；抗サイトカイン抗体またはその機能性50

断片；メトトレキサート；シクロスボリン；ラパマイシン；FK 506；検出可能標識またはリポーター；TNFアンタゴニスト；抗リウマチ薬；筋弛緩薬、睡眠薬、非ステロイド抗炎症薬（NSAID）、鎮痛薬、麻酔薬、鎮静薬、局所麻酔薬、神経筋プロッカー、抗微生物薬、抗乾癬薬、コルチコステロイド、蛋白同化ステロイド、エリスロポエチン、免疫治療薬、免疫グロブリン、免疫抑制薬、成長ホルモン、ホルモン補充薬、放射性医薬品、抗うつ薬、抗精神薬、刺激薬、喘息治療薬、-アゴニスト、吸入用ステロイド、エピネフリンまたはアナログ、サイトカイン、サイトカインアンタゴニスト、抗酸化剤のような神経保護薬、ラジカルスカベンジャー、フェニトインのような抗痙攣薬、貧血治療薬エリスロポエチン、またはその組合せが含まれ得る。

【0064】

10

(1) TCA

神経変性疾患の治療または治療レジメンは、トリアムシノロンアセトニド治療であり得る。トリアムシノロンアセトニド（TCA = VOLON A）と呼ばれるデポ剤コルチコステロイドの髄腔内適用がMS患者で使用され得る。多数のTCA研究は、治療患者において低下したEDSS（総合障害度評価スコア）、増加した歩行距離及び低下した歩行速度で有意な改善を示した。しかしながら、MS患者のこの改善された機能回復についての根本的な分子メカニズムは完全に不明であった。

【0065】

前の非盲検観察トライアルは、原発性及び続発性進行性MS患者において、特に脊髄症状を被っているときの徐放性ステロイドのトリアムシノロンアセトニド（TCA）の繰返し髄腔内適用効果を記載していた。臨床的に、TCA治療に対して3種の応答：（I）患者は4～6回のTCAの一連の適用中に即時の改善を報告し得る；（II）数回TCA注射後に疾患症状が遅れて改善；または（III）効果なしである。TCA治療に対するこれら3つの挙動応答パターンの生化学的及び薬理学的理由は詳細に知られていない。上肢及び下肢機能の明らかな即時強化を有する患者ではフリー・ラジカルのCSF合成が少ないことが判明した。通常、フリー・ラジカルは組織破壊を媒介し、各種CSFタンパク質の産生を調節する能力を有している。徐放性ステロイドのトリアムシノロンアセトニドの反復髄腔適用は進行性多発性硬化症患者において有利であり得る。

20

【0066】

f. 神経変性疾患に対する治療有効性の判定方法

30

RGMa断片ベース診断アッセイの使用方法は、神経変性疾患に対する治療の必要な被験者における、神経変性疾患に対する治療または治療レジメンの有効性を判定するための方法において使用され得る。判定方法は、被験者から得たサンプル中の少なくとも1個のRGMa断片のレベルの測定を含み得る。判定は、サンプル中の少なくとも1個のRGMa断片の存在及び/またはレベルを検出または測定するためにRGMa断片ベース診断アッセイを使用することを含み得る。

【0067】

判定方法は、少なくとも1個のRGMa断片のレベルを少なくとも1個のRGMa断片の対照レベルと比較することを含み得る。少なくとも1個のRGMa断片のレベルが少なくとも1個のRGMa断片の対照レベルと比較して高い場合、治療または治療レジメンは、神経変性疾患の治療において無効であると判定され得る。治療または治療レジメンが神経変性疾患の治療において無効である判定されたときには、方法は無効の治療または治療レジメンとは異なる治療または治療レジメンを被験者に対して施行することをも含み得る。

40

【0068】

少なくとも1個のRGMa断片のレベルが少なくとも1個のRGMa断片の対照レベルと比較して低い場合、治療または治療レジメンは、神経変性疾患において有効であると判定され得る。治療または治療レジメンが神経変性疾患の治療において有効である判定されたときには、方法は有効な治療または治療レジメンを被験者に対して投与し続けることをも含み得る。

50

【 0 0 6 9 】**g . 神経変性疾患を患っている被験者の治療に対する応答性の予測方法**

R G M a 断片ベース診断アッセイの使用方法は、神経変性疾患を患っている被験者の治療に対する応答性を予測する方法において使用され得る。方法は、被験者から得たサンプル中の少なくとも 1 個の R G M a 断片のレベルを測定することを含み得る。測定は、サンプル中の少なくとも 1 個の R G M a 断片の存在及び / またはレベルを検出または測定するために R G M a 断片ベース診断アッセイを使用することを含み得る。

【 0 0 7 0 】

予測方法は、少なくとも 1 個の R G M a 断片のレベルを少なくとも 1 個の R G M a 断片の対照レベルと比較することをも含み得る。予測方法は更に、少なくとも 1 個の R G M a 断片のレベルが R G M a 断片の対照レベルと比較して低い場合、被験者の治療または治療レジメンに対する応答性の予測を与えることをも含み得る。応答性の予測を与える場合、予測方法は被験者に対して治療または治療レジメンを投与することをも含み得る。10

【 0 0 7 1 】**h . 神経変性疾患を患っている被験者の治療方法**

R G M a 断片ベース診断アッセイの使用方法は、神経変性疾患を患っている被験者の治療方法において使用され得る。方法は、被験者から得たサンプル中の少なくとも 1 個の R G M a 断片のレベルを測定することを含み得る。測定は、サンプル中の少なくとも 1 個の R G M a 断片の存在及び / またはレベルを検出または測定するために R G M a 断片ベース診断アッセイを使用することを含み得る。20

【 0 0 7 2 】

方法は、少なくとも 1 個の R G M a 断片のレベルを少なくとも 1 個の R G M a 断片の対照レベルと比較することをも含み得る。方法は更に、少なくとも 1 個の R G M a 断片のレベルが R G M a 断片の対照レベルと比較して高い場合、治療または治療レジメンを被験者に対して投与することを含み得る。

【 0 0 7 3 】**i . 神経変性疾患を患っている被験者に対する治療レジメンの最適化方法**

R G M a 断片ベース診断アッセイの使用方法は、神経変性疾患を患っている被験者に対する治療または治療レジメンの最適化方法において使用され得る。方法は、被験者から得られた第 1 サンプル中の少なくとも 1 個の R G M a 断片の第 1 レベルを測定することを含み得る。第 1 サンプルは、被験者が治療または治療レジメンを始める前またはその間の時点で採取し得る。方法は、被験者から得られた第 2 サンプル中の少なくとも 1 個の R G M a 断片の第 2 レベルを測定することをも含み得る。第 2 サンプルは第 1 時点より後の時点で被験者から得られ得る。第 2 サンプルは、第 1 サンプルを採取してから少なくとも約 1 時間後、少なくとも約 2 時間後、少なくとも約 3 時間後、少なくとも約 4 時間後、少なくとも約 5 時間後、少なくとも約 6 時間後、少なくとも約 7 時間後、少なくとも約 8 時間後、少なくとも約 9 時間後、少なくとも約 10 時間後、少なくとも約 12 時間後、少なくとも約 24 時間後、少なくとも約 2 日後、少なくとも約 3 日後、少なくとも約 4 日後、少なくとも約 5 日後、少なくとも約 4 日後、少なくとも約 5 日後、少なくとも約 2 週間後、少なくとも約 1 ヶ月後、または少なくとも約 1 年後に採取し得る。第 1 及び第 2 レベルの測定は、それぞれのサンプル中の少なくとも 1 個の R G M a 断片の存在及び / またはレベルを検出または測定するために R G M a 断片ベース診断アッセイを使用することを含み得る。30

【 0 0 7 4 】

少なくとも 1 個の R G M a 断片の第 2 レベルが少なくとも 1 個の R G M a 断片の第 1 レベル未満の場合、治療または治療レジメンは、神経変性疾患に対して有効であり得、治療レジメンを変更しない。少なくとも 1 個の R G M a 断片の第 2 レベルが少なくとも 1 個の R G M a 断片の第 1 レベルと同等またはそれ以上の場合、治療または治療レジメンは、神経変性疾患に対して有効でないことがあり、治療レジメンを変更する。40

【 0 0 7 5 】

j . 神経変性疾患を患っている被験者の再生促進薬物治療のモニタリング方法

R G M a 断片ベース診断アッセイの使用方法は、神経変性疾患を患っている被験者の再生促進薬物治療のモニタリング方法において使用され得る。方法は、被験者から得た第1サンプル中の少なくとも1個のR G M a 断片の第1レベルを測定することを含み得る。第1サンプルは、被験者が治療または治療レジメンを始める前またはその間の時点で採取し得る。方法は、被験者から得た第2サンプル中の少なくとも1個のR G M a 断片の第2レベルを測定することをも含み得る。第2サンプルは、第1時点よりも後の時点で被験者から得られ得る。第2サンプルは、第1サンプルを採取してから少なくとも約1時間後、少なくとも約2時間後、少なくとも約3時間後、少なくとも約4時間後、少なくとも約5時間後、少なくとも約6時間後、少なくとも約7時間後、少なくとも約8時間後、少なくとも約9時間後、少なくとも約10時間後、少なくとも約12時間後、少なくとも約24時間後、少なくとも約2日後、少なくとも約3日後、少なくとも約4日後、少なくとも約5日後、少なくとも約4日後、少なくとも約5日後、少なくとも約2週間後、少なくとも約1ヶ月後、または少なくとも約1年後に採取し得る。第1及び第2レベルの測定は、それぞれのサンプル中の少なくとも1個のR G M a 断片の存在及び／またはレベルを検出または測定するためにR G M a 断片ベース診断アッセイを使用することを含み得る。

【0076】

少なくとも1個のR G M a 断片の第2レベルが少なくとも1個のR G M a 断片の第1レベルと比較して低いことは治療または治療レジメンが神経変性疾患に対して治療効果を有することを示し得る。治療または治療レジメンが神経変性疾患に対して治療上有効であると判定される場合、モニタリング方法は治療上有効な治療または治療レジメンを被験者に対して投与し続けることを含み得る。

【0077】

少なくとも1個のR G M a 断片の第2レベルが少なくとも1個のR G M a 断片の第1レベルと比較して高いことは治療または治療レジメンが神経変性疾患に対して治療効果を有さないことを示し得る。治療または治療レジメンが神経変性疾患に対して治療上有効ではないと判定される場合、モニタリング方法は治療上無効な治療または治療レジメンとは異なる治療または治療レジメンを被験者に投与することを含み得る。

【0078】

k . 神経変性疾患に対する治療効果についての化合物のスクリーニング方法

R G M a 断片ベース診断アッセイの使用方法は、神経変性疾患に対して治療効果を有する化合物のスクリーニング方法において使用され得る。例えば、R G M a 断片ベース診断アッセイは神経再生性臨床薬候補、神経可塑性を強化する臨床薬候補、または髓鞘再生を促進する臨床薬候補を評価するために使用され得る。方法は、細胞を含むサンプル中の少なくとも1個のR G M a 断片の第1レベルを測定することを含み得る。方法は、サンプルを化合物と接触させることをも含み得る。方法は更に、サンプル中の少なくとも1個のR G M a 断片の第2レベルを測定することを含み得る。第2レベルは、サンプルを化合物と接触させてから少なくとも約1時間後、少なくとも約2時間後、少なくとも約3時間後、少なくとも約4時間後、少なくとも約5時間後、少なくとも約6時間後、少なくとも約7時間後、少なくとも約8時間後、少なくとも約9時間後、少なくとも約10時間後、少なくとも約12時間後、少なくとも約24時間後、少なくとも約2日後、少なくとも約3日後、少なくとも約4日後、少なくとも約5日後、少なくとも約2週間後、少なくとも約1ヶ月後、または少なくとも約1年後に測定され得る。第1及び第2レベルの測定は、それぞれのサンプル中の少なくとも1個のR G M a 断片の存在及び／またはレベルを検出または測定するためにR G M a 断片ベース診断アッセイを使用することを含み得る。

【0079】

少なくとも1個のR G M a 断片の第2レベルが少なくとも1個のR G M a 断片の第1レベルと比較して低いことは化合物が神経変性疾患に対して治療効果を有することを示し得る。少なくとも1個のR G M a 断片の第2レベルが少なくとも1個のR G M a 断片の第1

レベルと比較して高いことは化合物が神経変性疾患に対して治療効果を有さないことを示し得る。

【0080】

4. 方法を実施するためのキット

本発明は、上記した方法を実施するために使用され得るキットを提供する。キットは、(1)被験者から単離した生体サンプル中のRGMa断片、例えば18kDaのRGMa断片、30kDaのRGMa断片及び/または40kDaのRGMa断片の各々のレベルを定量化するためにRGMa断片のいずれか、例えば18kDaのRGMa断片、30kDaのRGMa断片及び/または40kDaのRGMa断片の各々に特異的に結合し得る試薬、及び(2)RGMa断片、例えば18kDaのRGMa断片、30kDaのRGMa断片及び/または40kDaのRGMa断片の各々の基準レベルを示す基準標準を含み得、少なくとも1個の試薬は適当なマーカーに特異的に結合し得る少なくとも1つの抗体を含む。キットは、少なくとも1個のRGMa断片に特異的に結合し得る試薬、生体サンプル中の各バイオマーカーの濃度を定量化するための試薬、及び生体サンプル中のRGMa断片(すなわち、18kDaのRGMa断片、30kDaのRGMa断片及び/または40kDaのRGMa断片)の基準レベルを示す基準標準を含み得る。キット、MSの少なくとも1個の追加バイオマーカー、例えばNOGO-A、NOGO受容体、OMgp、MBP、Nf、GAP-43、オステオポンチン、インターロイキン17、インターロイキン6、インターフェロン 及びTNF- に特異的に結合し得る少なくとも1つの試薬(すなわち、抗体)、及び存在する場合、MSの少なくとも1つの追加バイオマーカーの基準レベルを示す基準標準をさらに、含み得る。10

【0081】

キットは抗体及び該抗体を投与するための手段を含み得る。キットは、キットを使用し、分析、モニタリングまたは治療を実施するための指示書をさらに含み得る。

【0082】

キットは1つ以上の容器、例えばバイアルまたはボトルをも含み得、各容器は別々の試薬を含有している。キットは、分析、モニタリング、治療、または本明細書中に記載されている方法をどのように実施または解釈するかを記載している説明書をさらに含み得る。

【0083】

例えば、キットは、試験サンプルを18kDaのRGMa断片、30kDaのRGMa断片及び/または40kDaのRGMa断片についてウェスタンプロット分析によりアッセイするための指示書を含み得る。指示書は紙の形態、またはコンピューター読み取り可能な形態、例えばディスク、CD、DVD等の形態であり得る。抗体は、18kDaのRGMa断片、30kDaのRGMa断片及び/または40kDaのRGMa断片キャップチャーリー抗体、及び/または18kDaのRGMa断片、30kDaのRGMa断片及び/または40kDaのRGMa断片検出抗体(検出可能標識で標識されている抗体を意味する)であり得る。例えば、キットは少なくとも1個のRGMa断片に特異的に結合する少なくとも1つのキャップチャーリー抗体を含み得る。キットはキャップチャーリー抗体に対するコンジュゲート抗体(例えば、検出可能標識で標識されている抗体)(すなわち、18kDaのRGMa断片、30kDaのRGMa断片及び/または40kDaのRGMa断片に特異的に結合するキャップチャーリー抗体に対するコンジュゲート抗体)をも含み得る。代替的または追加的に、キットは、例えば精製されており、場合により凍結乾燥されているキャリブレーターまたは対照(例えば、18kDaのRGMa断片、30kDaのRGMa断片及び/または40kDaのRGMa断片)、及び/またはアッセイを実施するための少なくとも1つの容器(例えば、既に抗-18kDaのRGMa断片、30kDaのRGMa断片及び/または40kDaのRGMa断片モノクローナル抗体で被覆されていてもよいチューブ、マイクロタイタープレートまたはストリップ)、及び/またはバッファー、例えば濃厚溶液、検出可能標識(例えば、酵素標識)に対する基質溶液、またはストップ溶液として用意され得るアッセイバッファーまたは洗浄バッファーを含み得る。好ましくは、キットは、アッセイを実施するために必要なすべての成分、すなわち試薬、標準、バッファー304050

一、希釈剤等を含む。指示書は 18 kDa の RGMA 断片、30 kDa の RGMA 断片及び / または 40 kDa の RGMA 断片を定量化する目的で標準曲線または基準標準を作成するための指示書をも含み得る。

【0084】

前に示唆したように、キット中に用意されている抗体、例えば 18 kDa の RGMA 断片、30 kDa の RGMA 断片及び / または 40 kDa の RGMA 断片に対して特異的な組換え抗体は、検出可能標識、例えば蛍光体、放射活性部分、酵素、ビオチン / アビジン標識、発色団、化学発光標識等を配合し得る。または、キットは抗体または抗体を検出するための試薬（例えば、検出抗体）を標識するための試薬、及び / またはアナライトまたはアナライトを検出するための試薬を標識するための試薬を含み得る。抗体、キャリブレーター及び / または対照を別々の容器中に用意するか、または適切なアッセイフォーマット、例えばマイクロタイタープレートに予め分配してもよい。10

【0085】

場合により、キットは品質管理成分（例えば、感度パネル、キャリブレーター、及びボジティブ対照）を含む。品質管理試薬の作成は当業界で公知であり、各種免疫診断製品のインサートシートに記載されている。感度パネル部材は場合によりアッセイ性能特性を確認するために使用され、更に場合によりウェスタンプロットキット試薬及びアッセイの標準化の完全性の有用な指標である。

【0086】

キットは場合により、診断アッセイを実施し、または品質管理評価を容易にするために必要な他の試薬、例えばバッファー、塩、酵素、酵素補因子、基質、検出試薬等をも含み得る。他の成分、例えばバッファー及び試験サンプルの単離及び / または処理のための溶液（例えば、前処理試薬）をキットに配合することもできる。キットは更に 1 つ以上の他の対照を配合し得る。キットの 1 つ以上の成分が凍結乾燥されていてもよく、この場合キットは更に凍結成分を再構成するのに適している試薬を含み得る。20

【0087】

場合により、キットの各種成分は必要に応じて適当な容器、例えばマイクロタイタープレート中に用意されている。キットは、サンプルを保持または保存するための容器（例えば、血液サンプルのための容器またはカートリッジ）をさらに含み得る。適切な場合には、キットは場合により、試薬または試験サンプルの作成を容易にする反応容器、混合容器、及び他の成分をも含み得る。キットは試験サンプルの入手を助ける 1 つ以上の器具、例えば針、ピペット、鉗子、計量スプーン等をも含み得る。30

【0088】

検出可能標識が少なくとも 1 つのアクリニジウム化合物である場合、キットは少なくとも 1 つのアクリジニウム - 9 - カルボキサミド、少なくとも 1 つのアクリジニウム - 9 - カルボキシレートアリールエステル、またはその組合せを含み得る。検出可能標識が少なくとも 1 つのアクリジニウム化合物である場合、キットは過酸化水素源、例えばバッファー、溶液及び / または少なくとも 1 つの塩基性溶液をも含み得る。

【0089】

所望により、キットは固相、たとえば磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、セル、膜、足場分子、フィルム、濾紙、石英結晶、ディスクまたはチップを含み得る。キットは、検出抗体として機能する抗体のような抗体であり得るかまたは抗体にコンジュゲートされる検出可能標識をも含み得る。検出可能標識は、例えば酵素、オリゴヌクレオチド、ナノ粒子、化学発光物質、蛍光団、蛍光クエンチャーチャー、化学発光クエンチャーチャー、またはビオチンであり得る直接標識であり得る。キットは場合により標識を検出するために必要な追加試薬を含み得る。40

【0090】

所望により、キットは更に、別のアナライトについて試験サンプルをアッセイするために 1 つ以上の成分を単独で、または指示書と組み合わせて含み得、前記アナライトはバイオマーカー、例えば NOGO-A、NOGO 受容体、OMgp、MBP、NF、GAP-50

43、オステオポンチン；インターロイキン17、インターロイキン6、インターフェロン 及びTNF-αのようなMSのバイオマーカーであり得る、アナライトの例には、18kDaのRGMa断片、30kDaのRGMa断片及び/または40kDaのRGMa断片、並びに本明細書中で検討されているかまたは当業界で公知の他のアナライト及びバイオマーカーが含まれるが、これらに限定されない。幾つかの実施形態では、18kDaのRGMa断片、30kDaのRGMa断片及び/または40kDaのRGMa断片について試験サンプルをアッセイするための1つ以上の成分により、18kDaのRGMa断片、30kDaのRGMa断片及び/または40kDaのRGMa断片の存在、量または濃度を測定することができる。サンプル、例えば血清サンプルは18kDaのRGMa断片、30kDaのRGMa断片及び/または40kDaのRGMa断片についてTOF-MS及び内部標準を用いてアッセイされ得る。

10

【0091】

本明細書中に開示されている本発明の方法の他の適当な修飾及び改変は容易に適用され且つ自明であり、本発明の範囲、または本明細書中に開示されている態様及び実施形態を逸脱することなく適当な均等物を用いてなされ得ることは当業者にとって容易に分かるであろう。本発明を詳細に説明してきたが、本発明は本発明の幾つかの態様及び実施形態を例示するためにのみ意図されている以下の実施例を参照することにより明白に理解され、発明の範囲を限定するものと見なすべきではない。本明細書中に挙げられているすべての雑誌論文、米国特許及び公開明細書の開示内容はその全文を参照により本明細書に組み入れる。

20

【実施例】

【0092】

本発明は以下の非限定的実施例により説明される複数の態様を有する。

【0093】

[実施例1]

材料及び方法

被験者 25人のMS患者（年齢：50±1.64 [平均値±SEM, 才]）を研究した。平均MS期間は14.02±1.71 [年]であった。被験者には、14人の女性及び11人の男性を含めた。被験者には、13人の二次性進行性 [8人の女性、5人の男性] 及び12人の原発性進行性 [6人の女性、6人の男性] を含めた。除外基準は、憎悪の急性発症または症状の最近明らかに高まった進行であった。

30

【0094】

計画 TCA適用後、CSF及び脊髄中のTCAの拡散を助け、容易にするために少なくとも6時間ベッドに止まるように命じられた。腰椎穿刺を非外傷性スプロット針を用いて実施した。既存の免疫系調節性薬物治療は安定した状態を保っていた。痙攣抑制治療は変えなかった。総合障害度評価スコア (EDSS) 評点、最大歩行距離及び歩行速度評価をベースライン時、及び10mlの食塩液に溶解させた40mgのトリアムシノロンアセトニド (TCA) を投与後毎日、最長第4回TCA適用まで実施した。

【0095】

CSFサンプリング及びCSF分析 隅腔内TCA適用前にCSFを採取した。約1mlのCSFのアリコートを滅菌エッペンドルフチューブ中に集め、直ちに凍結し、-20°Cで保存した。RGMa測定を第1回TCA適用前のベースライン時 (モーメントI)、及びTCA注射後毎日 (モーメントII、III、IV及びV) 実施した。タンパク質濃度はNanoDropアナライザー (Thermo Scientific) を用いる測定により調べた。

40

【0096】

ウェスタンプロット分析 CSF RGMaレベルをウェスタンプロッティング及び免疫検出 (Schaffarla, J Neurochem, 107:418-431 (2008)) により分析した。簡単に説明すると、10μlの各CSFサンプルを10μlのSDS充填染料 (Life Technologies) と混合し、95°Cで10分間イ

50

ンキュベートした。これらのサンプルの $10\ \mu l$ を SDS - PA - Gels (Life Technologies) を用いて分離し、ニトロセルロース膜に移した。抗 RGMa 抗体 (R&D Systems, BAF2459) 及び二次試薬の超高感度 ABC ペルオキシダーゼ染色キット (Pierce, 32050) を用いて免疫染色した後、膜を発光試薬 (Thermo Scientific, SuperSignal West Femto Chemiluminescence Substrate, 34094) とインキュベートした。

【0097】

バンド強度分析 バンド強度を Quantity One Version 4.6.9 (Biorad) を用いて測定した。簡単に説明すると、バンド分析クイックガイド中の “Frame lanes...” を選択し、レーンの数を選んだ。最後に、レーンを “Add / Adjust Anchors” ツールを用いて調節し、当該バンドを “Detect Bands...” ツールを用いて手動で検出した。“All Lane Report” を用いて、トレース強度 $\times\ mm$ を検出し、分析のために使用した。患者毎に、モーメント I を 100% として計算し、モーメント II、III 及び IV をモーメント I に対するパーセントで関連づけた。これらのパーセントの平均をグラフにプロットし、統計解析を GraphPad Prism 5において ANOVA とボンフェローニ多重比較検定を用いて行った。

【0098】

検査結果の統計評価の手順：25人の患者すべての CSF を臨床スコアとは独立して RGMa 発現についてウェスタンプロッティングにより分析した。等量の CSF を同一容量中の RGMa レベルを比較するためにウェスタンプロッティングによる分析のために充填した。この群の 25人の患者すべての CSF 中の 30 kDa 及び 40 kDa バンドをデンシトメーター測定により分析した。臨床データを観察インターバル中即時応答者及び非即時非応答者に分類した。

【0099】

統計 このパイロットトライアルの探索的解析のために反復測定デザインの ANCOVA を使用した。共変量は MS 期間、MS タイプ、性別及び年齢であった。事後解析はベースラインに対するテューキー多重比較検定を用いて行った。統計解析は GraphPad Prism 5 ソフトウェアを用いて実施した。

【0100】

[実施例 2]

MS 患者の脳脊髄液中の RGMa

RGMa 断片が MS を患っている患者の脳脊髄液中に存在しているかを調べるために、ヒト CSF サンプルのゲル電気泳動、ウェスタンプロット、及び RGMa 特異的抗体を用いる免疫検出を実施例 2 に記載されているように実施した。図 1 は、ヒト CSF 中の上記した RGMa 断片すべての存在を示す (Key and Lah, Cell Adhesion & Migration 6:2, 85-90 (2012) から改変)。RGMa 特異的抗体を用いて免疫検出すると、約 40、30 及び 18 kDa のサイズを有する 3 つの断片が検出された。TCA = 進行性 MS 患者の髄腔内治療のために使用したデポ剤コルチコステロイドのトリアムシノロンアセトニド。I ~ III、IV、V はそれぞれ第 1 回、第 2 回、第 3 回、第 4 回及び第 5 回 TCA 治療前。

【0101】

[実施例 3]

多発性硬化症患者におけるトリアムシノロンアセトニドの効果

多くの一般的な薬物は MS の疾患進行を遅らすが、MS 患者の機能回復を高めない。実験は、脳脊髄液中の RGMa レベルと共に、1 日おきの 4 回のトリアムシノロン適用の効果を立証するために実施した。25人の進行性多発性硬化症患者において臨床評価をベースライン時及びトリアムシノロン投与後毎日実施した。TCA を患者に投与する前に、CSF の 1 ~ 2 ml アリコートを採取した。各トリアムシノロン適用前に RGMa 濃度をウ

10

20

30

40

50

エスタンプロット分析により測定し、定量化した。患者は、疾患活動性に応じて通常 T C A の 4 ~ 6 回適用を受けた。

【 0 1 0 2 】

応答者の臨床データ 17人の患者（10人の男性、7人の女性；年齢：52.18 ± 2.04, M S 期間：15.74 ± 1.92）は治療後改善した。これらの患者の E D S S スコア（ $F = 8.55$ ； $p < 0.009$ [図 3 A]）は低下し、最大歩行距離は増加し（ $F = 3.64$ ； $p = 0.01$ [図 3 B]）、歩行速度は向上した（ $F = 3.42$ ； $p < 0.01$ [図 3 C]）。3人の患者は車椅子に束縛されており、彼らのデータは歩行能力の解析に含めなかった。

【 0 1 0 3 】

即時応答しなかった患者の臨床データ 8人の患者（1人の男性、7人の女性；年齢：45.38 ± 2.04；M S 期間：10.38 ± 3.24）は観察期間中即時応答しなかった。E D S S スコア（ $F = 1$ ；n s [図 4 A]）、最大歩行距離（ $F = 1.52$ ；n s [図 4 B]）及び歩行速度（ $F = 0.021$ ；n s [図 4 C]）に有意な変化はなかった。6人の患者は T C A 適用から 3 週間以内に遅れた改善を報告した。

【 0 1 0 4 】

通常、すべての参加者で重篤な副作用は現れなかった。全分析で共変数の影響は見られなかった。

【 0 1 0 5 】

検査結果 応答者 このコホートでは R G M a レベルが低下した。低下は、40 kDa 形態（ $F = 9.12$ ； $p < 0.0001$ [図 5 A]）よりも 30 kDa（ $F = 3.82$ ； $p < 0.05$ [図 5 B]）であまりはっきりしなかった。タンパク質 C S F 濃度の有意な変化はなかった（ $F = 2.77$ ；n s [図 5 C]）。図 6 は 3 つの代表的ウェスタンプロットを示す。

【 0 1 0 6 】

即時応答しない患者 C S F 中の R G M a の両形態（30 kDa： $F = 2.98$ ；n s [図 7 B]；40 kDa： $F = 0.84$ ；n s [図 7 A]）及びタンパク質含量（ $F = 2.86$ ；n s [図 7 C]）に有意な変化は見られなかった。図 8 はこの群の 3 つの代表的ウェスタンプロットを示す。

【 0 1 0 7 】

17人の患者では、多発性硬化症の臨床スコアが改善し、最大歩行距離及び歩行速度が改善した。これらの応答者では R G M a レベルが低下した。残りの患者は迅速な臨床効果も、R G M a 濃度の低下も示さなかった。R G M a の低下は進行性多発性硬化症患者におけるトリアムシノロンによる再生及び機能回復を反映し得る。タンパク質濃度は応答者と非応答者の間で異なっていなかった。両コホートにおいてそれぞれ両者間の C S F 中の細胞数の相対的变化はなかった。

【 0 1 0 8 】

T C A 適用を反復すると、調べた R G M a 断片のすべての濃度の低下が引き起こされた。驚くことに、C S F 中の可溶性 R G M a 断片の T C A に起因する減少は機能改善を示した患者で観察され、R G M a 断片が M S 患者の成果を評価するために使用され得ることを示している。このことは、T C A で治療した M S 患者の別の群は R G M a 断片 C S F 濃度の低下を示さず、機能も回復しなかったという第 2 の観察によりさらに補強される。

【 0 1 0 9 】

上記した詳細説明及び添付の実施例は単なる例示であり、添付の特許請求の範囲によってのみ規定される発明の範囲及びその均等物に対する限定としてとられるべきではないと理解されたい。

【 0 1 1 0 】

開示されている実施形態の各種改変及び修飾は当業者に自明であろう。このような改変及び修飾には、非限定的に本発明の化学構造、置換基、誘導体、中間体、合成、組成物、製剤または使用方法が含まれるが、これらは発明の趣旨及び範囲を逸脱することなく加え

10

20

30

40

50

得る。

【0111】

網羅のために、本発明の各種態様を以下の番号を付した条項に記載する：

条項1 . サンプル中の少なくとも1個のRGMa断片を検出し、定量化する方法であつて、前記方法は、(a)被験者から少なくとも1個のRGMa断片を含むサンプルを得るステップと、(b)サンプルをキャプチャー結合タンパク質と接触させるステップと、ここで、キャプチャー結合タンパク質は、少なくとも1個のRGMa断片に結合して、キャプチャー結合タンパク質 - RG Ma断片複合体を形成する、(c)サンプルを検出結合タンパク質と接触させるステップと、ここで、検出結合タンパク質は、キャプチャー結合タンパク質と相互作用して、検出結合タンパク質 - キャプチャー結合タンパク質 RG Ma断片複合体を形成する、(d)サンプル中の少なくとも1個のRGMa断片を検出し、定量化するステップとを含む前記方法。 10

【0112】

条項2 . 少なくとも1個のRGMa断片は約1kDa～約65kDaのサイズを有するRGMa断片である、条項1に記載の方法。

【0113】

条項3 . RG Ma断片は、10kDa、18kDa、20kDa、30kDa、40kDa、50kDまたは65kDaのサイズを有する、条項1または2に記載の方法。 20

【0114】

条項4 . RG Ma断片は18kDaのRG Ma断片、30kDaのRG Ma断片及び40kDaのRG Ma断片からなる群から選択される、条項1～3のいずれか1項に記載の方法。 20

【0115】

条項5 . ステップ(b)の前に、電気泳動を用いて、少なくとも1個のRG Ma断片をゲル分離する、条項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【0116】

条項6 . ステップ(b)の前に、少なくとも1個のRG Ma断片を膜に固定化してウェスタンプロッティング膜を作成させるステップと、ステップ(b)においてウェスタンプロッティング膜をキャプチャー結合タンパク質と接触させるステップと、ここで、キャプチャー結合タンパク質は、ウェスタンプロッティング膜上に固定化した少なくとも1個のRG Ma断片に結合して、キャプチャー結合タンパク質 - RG Ma断片複合体を形成する、ステップ(c)においてウェスタンプロッティング膜を検出結合タンパク質と接触させるステップと、ここで、検出結合タンパク質は、キャプチャー結合タンパク質と相互作用して、検出結合タンパク質 - キャプチャー結合タンパク質 RG Ma断片複合体を形成するステップをさらに含む、条項5に記載の方法。 30

【0117】

条項7 . 少なくとも2個のRG Ma断片を検出する、条項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【0118】

条項8 . 少なくとも2個のRG Ma断片は、30kDa及び40kDaのサイズを有する、条項7に記載の方法。 40

【0119】

条項9 . 少なくとも3個のRG Ma断片を検出する、条項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【0120】

条項10 . 少なくとも3個のRG Ma断片は、18kDa、30kDa及び40kDaのサイズを有する、条項9に記載の方法。

【0121】

条項11 . 少なくとも1個のRG Ma断片は、可溶性RG Ma断片である、条項1～10のいずれか1項に記載の方法。 50

【0122】

条項12. ステップ(b)においてゲル上でサンプル中のタンパク質と同時にRGMaタンパク質標準を分離するステップと、(g)少なくとも1個のRGMa断片を分離したRGMaタンパク質標準と比較して断片を定量化するステップとをさらに含む、条項5～11のいずれか1項に記載の方法。

【0123】

条項13. RGMaタンパク質標準は組換えRGMa断片の勾配である、条項12に記載の方法。

【0124】

条項14. 勾配は、RGMaタンパク質標準10、25、50、100及び200p¹⁰g / mLを含む、条項13に記載の方法。

【0125】

条項15. RGMa断片のサイズをSDS-PAGEにより測定する、条項1～14のいずれか1項に記載の方法。

【0126】

条項16. SDS PAGEは4～15%である、条項15に記載の方法。

【0127】

条項17. 膜は、ニトロセルロース膜である、条項6～16のいずれか1項に記載の方法。

【0128】

条項18. キャプチャー結合タンパク質は、RGMa選択的抗体である、条項1～17のいずれか1項に記載の方法。

【0129】

条項19. 抗体は、ビオチン化RGMa選択的抗体である、条項18に記載の方法。

【0130】

条項20. 検出結合タンパク質は、四価アビジンであり、検出可能標識は、ビオチン化ホースラディッシュペルオキシダーゼである、条項19に記載の方法。

【0131】

条項21. ペルオキシダーゼ染色キットを用いて、少なくとも1個のRGMa断片を検出する、条項20に記載の方法。

【0132】

条項22. 神経変性疾患に対する治療の必要な被験者における、神経変性疾患に対する治療の有効性の判定方法であって、前記方法は、(a)被験者からのサンプル中の少なくとも1個のRGMa断片のレベルを条項1～21のいずれか1項に記載の方法を用いて測定するステップと、(b)被験者からのサンプル中の少なくとも1個のRGMa断片のレベルを少なくとも1個のRGMa断片の対照レベルと比較するステップと、ここで、少なくとも1個の断片のレベルが対照レベルと比較して高い場合、治療は神経変性疾患の治療に無効であると判定され、少なくとも1個の断片のレベルが対照レベルと比較して同一であるかまたは低い場合、治療は神経変性疾患の治療に有効であると判定されることを含む前記方法。

【0133】

条項23. 神経変性疾患に対する治療の必要な被験者に対して神経変性疾患の治療に有効であると判定された治療を施行し続けることをさらに含む、条項22に記載の方法。

【0134】

条項24. 少なくとも1個のRGMa断片の対照レベルは神経変性疾患にかかっているが、神経変性疾患に対する治療を受けたことがない被験者中の少なくとも1個のRGMa断片のレベルである、条項22または23に記載の方法。

【0135】

条項25. 神経変性疾患を患っている被験者の治療に対する応答性の予測方法であって、前記方法は、(a)被験者からのサンプル中の少なくとも1個のRGMa断片のレベ

10

20

30

40

50

ルを、条項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて測定するステップ、(b) 被験者からのサンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片のレベルを少なくとも 1 個の RGMa 断片の対照レベルと比較するステップと ; (c) サンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片のレベルが対照レベルと比較して低い場合、被験者の治療に対する応答性の予測を与えるステップとを含む、前記方法。

【 0136 】

条項 26 . 治療に応答すると予測された被験者に対して該治療を施行することをさらに含む、条項 25 に記載の方法。

【 0137 】

条項 27 . 神経変性疾患を患っている被験者の治療方法であって、前記方法は、(a) 被験者からのサンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片のレベルを、条項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて測定するステップと、(b) 被験者からのサンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片のレベルを少なくとも 1 個の RGMa 断片の対照レベルと比較するステップと ; (c) 断片のレベルが対照レベルと比較して高い場合、被験者に対して治療レジメンを投与するステップとを含む前記方法。 10

【 0138 】

条項 28 . 治療は、神経回復薬、神経保護薬、または神経再生薬を含む、条項 22 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 0139 】

条項 29 . 治療は、トリアムシノロンアセトニド (TCA) 、テクフィデラ / BG - 12 (フマル酸ジメチル) 、ジレニア (フィンゴリモド) 、ラキニモド、 - インターフェロン、コパキソン、ダクリズマブ、アレムツズマブ、リツキシマブ、またはその組合せの少なくとも 1 つを含む、条項 22 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【 0140 】

条項 30 . 治療は、トリアムシノロンアセトニド (TCA) を含む、条項 26 ~ 29 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0141 】

条項 31 . 神経変性疾患を患っている被験者に対する治療レジメンの最適化方法であって、(a) 被験者から得られた第 1 サンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片の第 1 レベルを、条項 1 ~ 20 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて測定するステップ、ここで、第一サンプルは、被験者が治療レジメンを始める前またはその間の時点で被験者から採取される、(b) ステップ (a) より後の時点で被験者から得られた第 2 サンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片の第 2 レベルを測定するステップと、ここで、少なくとも 1 個の RGMa 断片の第 1 レベルと比較した少なくとも 1 個の RGMa 断片の第 2 レベルの低下は該治療レジメンが神経変性疾患に対して治療効果を有していることを示し ; (c) 被験者からの第 1 サンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片のレベルを条項 1 に記載の方法を用いて測定するステップと、(d) 被験者からのサンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片のレベルを、少なくとも 1 個の RGMa 断片の対照レベルと比較するステップと ; (e) サンプル中の少なくとも 1 個の RGMa 断片のレベルが対照レベルと比較して低い場合、被験者の治療に対する応答性の予測を与えるステップとを含む前記方法。 30

【 0142 】

条項 32 . 治療レジメンは、神経回復治療レジメンである、条項 31 に記載の方法。

【 0143 】

条項 33 . 神経回復治療レジメンの成功率を向上させる、条項 32 に記載の方法。

【 0144 】

条項 34 . 治療レジメンは、神経保護治療レジメンである、条項 31 に記載の方法。

【 0145 】

条項 35 . 神経保護治療レジメンの成功率を向上させる、条項 34 に記載の方法。

【 0146 】

条項 36 . 神経変性疾患を患っている被験者の再生促進薬物治療のモニタリング方法 50

であって、(a) 被験者から得られた第1サンプル中の少なくとも1個のRGMa断片の第1レベルを条項1～21のいずれか1項に記載の方法を用いて測定するステップと、ここで、第1サンプルは、被験者が薬物治療を始める前またはその間の時点で被験者から採取される(b)ステップ(a)より後の時点で被験者から得られた第2サンプル中の少なくとも1個のRGMa断片の第2レベルを測定するステップと、ここで、少なくとも1個のRGMa断片の第1レベルと比較した少なくとも1個のRGMa断片の第2レベルの低下は、該薬物治療レジメンが神経変性疾患に対して治療効果を有していることを示し、少なくとも1個のRGMa断片の第1レベルと比較した少なくとも1個のRGMa断片の第2レベルの上昇は、該薬物治療レジメンが神経変性疾患に対して治療効果を有していないことを示し；(c)薬物治療レジメンが神経変性疾患に対して治療効果を有していない場合、被験者に対して別の薬物治療を施行するステップとを含む前記方法。

【0147】

条項37. 神経変性疾患に対する治療効果についての化合物のスクリーニング方法であって、前記方法は、(a)細胞を含むサンプル中の少なくとも1個のRGMa断片の第1レベルを条項1～21のいずれか1項に記載の方法を用いて測定するステップと、(b)サンプルを化合物と接触させるステップと；(c)ステップ(b)より後の時点で被験者から得られた第2サンプル中の少なくとも1個のRGMa断片の第2レベルを測定するステップと、ここで、少なくとも1個のRGMa断片の第1レベルと比較した少なくとも1個のRGMa断片の第2レベルの低下は、該化合物が神経変性疾患に対して治療効果を有していることを示し、少なくとも1個のRGMa断片の第1レベルと比較した少なくとも1個のRGMa断片の第2レベルの上昇は、該化合物が神経変性疾患に対して治療効果を有していないことを示し；(d)治療効果を有すると同定された化合物を選択するステップとを含む前記方法。

【0148】

条項38. 少なくとも2個のRGMa断片を検出する、条項22～37のいずれか1項に記載の方法。

【0149】

条項39. 少なくとも2個のRGMa断片は、30kDa及び40kDaのサイズを有する、条項38に記載の方法。

【0150】

条項40. 少なくとも3個のRGMa断片を検出する、条項22～37のいずれか1項に記載の方法。

【0151】

条項41. 少なくとも3個のRGMa断片は18kDa、30kDa及び40kDaのサイズを有する、条項40に記載の方法。

【0152】

条項42. 神経変性疾患または障害は、多発性硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー病、ティ・サックス病、ニーマン・ピック病、ゴーシェ病、ハーラー症候群、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、特発性炎症性脱髓疾患、ビタミンB12欠乏症、橋中心髓鞘崩壊症、脊髄ろう、横断性脊髄炎、デビック病、進行性多巣性白質脳症、視神經炎、脊髄損傷、外傷性脳損傷、卒中、縁内障、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性、または白質ジストロフィーである、条項22～41のいずれか1項に記載の方法。

【0153】

条項43. 神経変性疾患または障害は、多発性硬化症である、条項22～42のいずれか1項に記載の方法。

【0154】

条項44. RGMa断片はヒトRGMa断片である、条項1～43のいずれか1項に記載の方法。

【0155】

条項45. サンプルは脳脊髄液、血液、血清または血漿からなる、条項1～44のい

10

20

30

40

50

すれか 1 項に記載の方法。

【図 1】

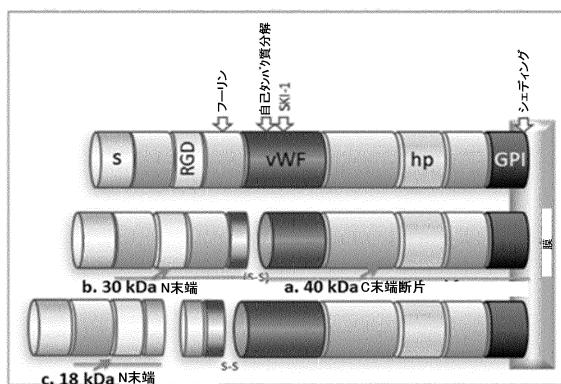


FIG. 1

【図 2】

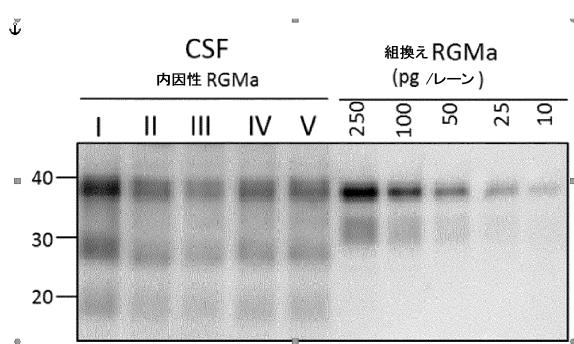


FIG. 2

【図 3 A】

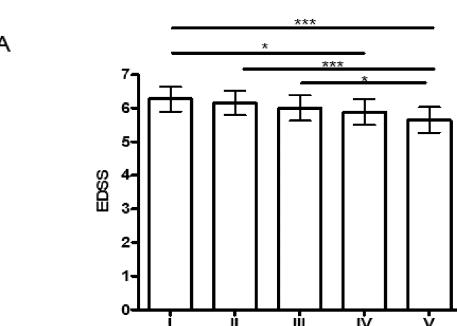


FIG. 3A

【図 3 B】

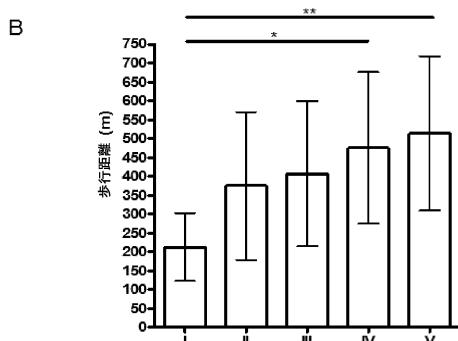


FIG. 3B

【図 3 C】

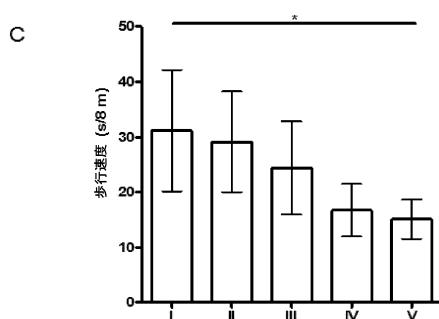


FIG. 3C

【図 4 A】

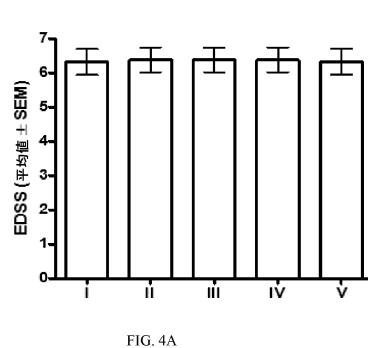


FIG. 4A

【図 4 B】

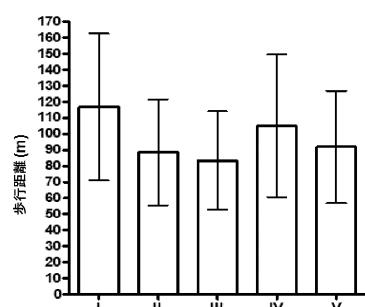


FIG. 4B

【図 4 C】

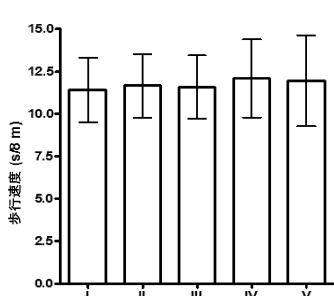


FIG. 4C

【図 5 B】

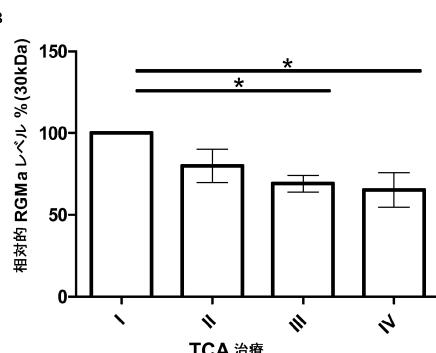
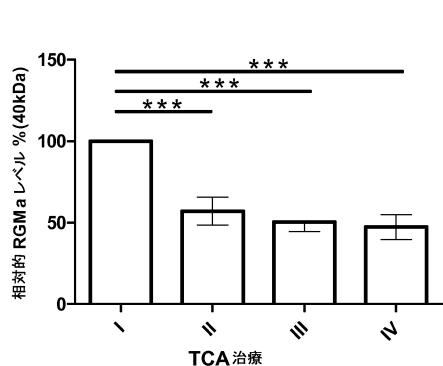


FIG. 5A-B

【図 5 A】



【図 5 C】

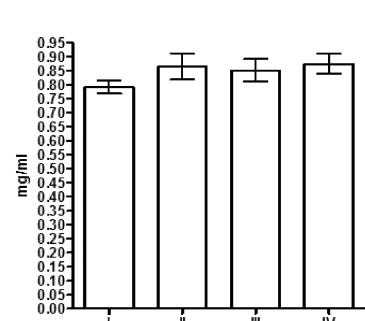


FIG. 5C

【図 6】

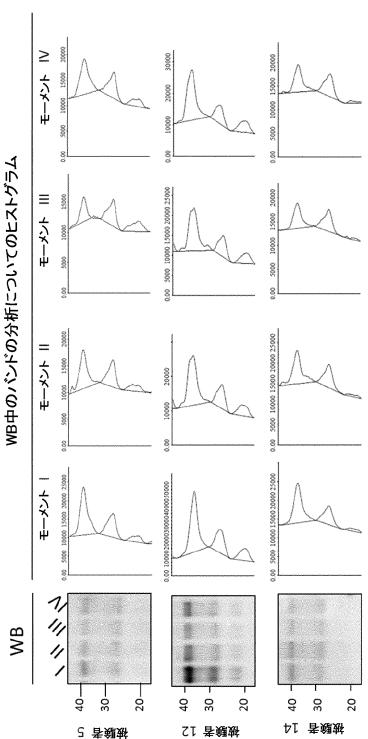
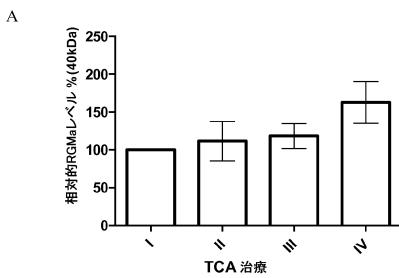


FIG. 6

【図 7 A】



【図 7 B】

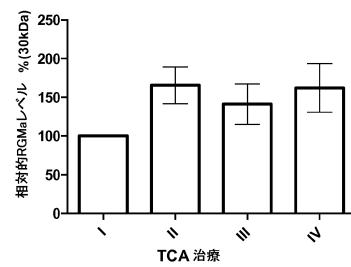


FIG. 7A-B

【図 7 C】

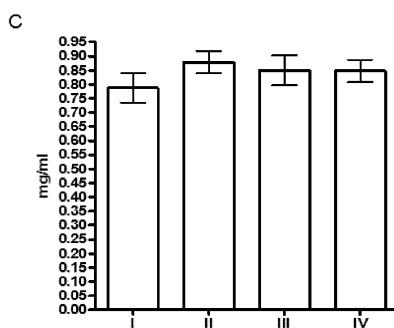


FIG. 7C

【図 8】

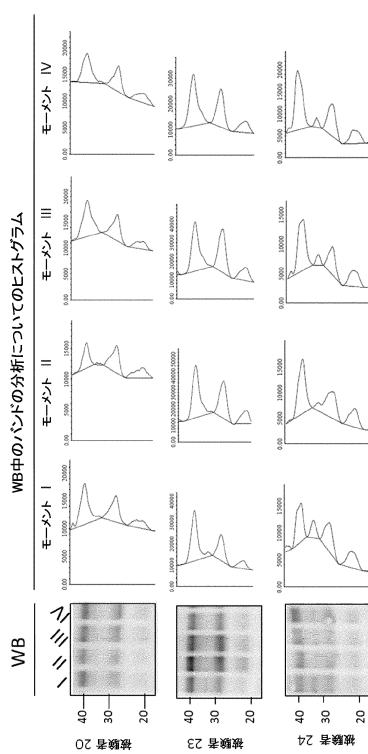


FIG. 8

フロントページの続き

- (72)発明者 ミュラー , ベルンハルト・クラウス
ドイツ国、6 7 0 6 1 ・ルートヴィヒスハーフェン、クノルシュトラーセ、アッヴィ・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー・ウント・コー・カー・ゲー気付
- (72)発明者 シュミット , マルティン
ドイツ国、6 7 0 6 1 ・ルートヴィヒスハーフェン、クノルシュトラーセ、アッヴィ・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー・ウント・コー・カー・ゲー気付
- (72)発明者 シュトリービンガー・アンドレーアス
ドイツ国、6 7 0 6 1 ・ルートヴィヒスハーフェン、クノルシュトラーセ、アッヴィ・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー・ウント・コー・カー・ゲー気付

審査官 三好 貴大

- (56)参考文献 国際公開第2 0 1 1 / 0 7 1 0 5 9 (WO , A 1)
特表2 0 0 4 - 5 2 5 8 7 5 (JP , A)
国際公開第2 0 1 3 / 1 1 2 9 2 2 (WO , A 1)
米国特許出願公開第2 0 1 3 / 0 2 3 6 4 7 7 (US , A 1)
TASSEW, N.G. et al. , SKI-1 and Furin Generate Multiple RGMa Fragments that Regulate Axonal Growth , Developmental Cell , 2 0 1 2 年 2 月 1 4 日 , Vol. 22, No. 2 , pp. 391-402
HATA, K. et al. , RGMa inhibition promotes axonal growth and recovery after spinal cord injury , The Journal of Cell Biology , 2 0 0 6 年 4 月 1 0 日 , Vol. 173, No. 1 , pp. 47-58
NOHRA, R. et al. , RGMA and IL21R show association with experimental inflammation and multiple sclerosis , Genes and Immunity , 2 0 1 0 年 , Vol. 11 , pp. 279-293
MURAMATSU, R. et al. , RGMa modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis , Nature medicine , 2 0 1 1 年 , Vol. 17, No. 4 , pp. 488-495

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)