

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-528247

(P2014-528247A)

(43) 公表日 平成26年10月27日(2014.10.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B024
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4B063
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	
	C12N 15/00 F	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁)

(21) 出願番号 特願2014-534811 (P2014-534811)
 (86) (22) 出願日 平成24年10月5日 (2012.10.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年5月30日 (2014.5.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/059137
 (87) 国際公開番号 W02013/052922
 (87) 国際公開日 平成25年4月11日 (2013.4.11)
 (31) 優先権主張番号 61/543,416
 (32) 優先日 平成23年10月5日 (2011.10.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503310224
 ブランシェット・ロックフェラー・ニュー
 ロサイエンス・インスティテュート
 アメリカ合衆国、ウェスト・バージニア州
 26505、モーガンタウン、エイト・
 メディカル・センター・ドライブ (番地
 なし)
 (71) 出願人 513283855
 アルコン、ダニエル・エル、
 アメリカ合衆国、メリーランド州 208
 17、ベセスダ、セブン・ロックス・コー
 ト 2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経変性状態の刺激誘発性ゲノムプロファイルマーカー

(57) 【要約】

本発明の開示は、神経変性状態、たとえばアルツハイマー病などの診断方法であって、対象由来の細胞試料を少なくとも1種の刺激、たとえばタンパク質および/または多糖混合物、プロテインキナーゼC活性化因子、Aオリゴマー、薬剤およびそれらの組み合わせと接触させることと；細胞試料での少なくとも1種の遺伝子の発現を検出することを含む、方法に関する。方法は、細胞試料での少なくとも1種の遺伝子の発現を対照細胞での少なくとも1種の同一遺伝子の発現と比較することと；対象が神経変性状態（たとえば、アルツハイマー病）を有するか否かを決定することとをさらに含んでもよく、対照細胞での少なくとも1種の同一遺伝子の発現と比較した細胞試料での少なくとも1種の遺伝子の発現の変化が、対象が神経変性状態（たとえば、アルツハイマー病）を有することを示す。

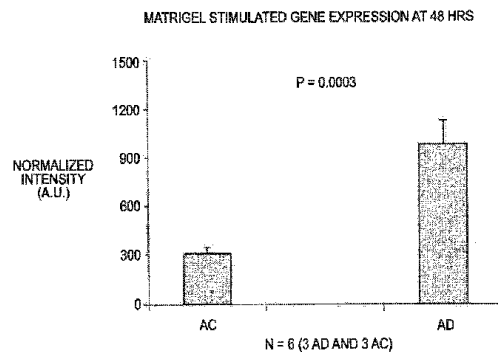


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

神経変性状態の診断が必要な対象における神経変性状態の診断方法であって、
対象由来の細胞試料を少なくとも 1 種の刺激と接触させることと；
細胞試料での少なくとも 1 種の遺伝子の発現を検出することと

を含む、方法。

【請求項 2】

細胞試料での少なくとも 1 種の遺伝子の発現を対照細胞での少なくとも 1 種の同一遺伝子の発現と比較することと；

対象が神経変性状態を有するか否かを決定することと

をさらに含み、

少なくとも 1 種の刺激による対照細胞での少なくとも 1 種の同一遺伝子の発現と比較した細胞試料での少なくとも 1 種の遺伝子の発現の変化が、対象が神経変性状態を有することを示す、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

少なくとも 1 種の刺激がタンパク質混合物、多糖混合物、プロテインキナーゼ C 活性化因子、A オリゴマー、薬剤、およびそれらの組み合わせから選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

タンパク質混合物、多糖混合物、またはそれらの組み合わせが細胞外基質調製物を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

タンパク質混合物、多糖混合物またはそれらの組み合わせがラミニン、コラーゲン、エンタクチン、ヘパリンサルフェートプロテオグリカン、エンタクチン/ニドゲン、マトリックスメタロプロテインナーゼ、プラスミノゲン活性化因子、増殖因子、およびそれらの任意の組み合わせから選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

タンパク質混合物、多糖混合物またはそれらの組み合わせが少なくとも 1 種の基底膜タンパク質を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

細胞外基質調製物が腫瘍または癌細胞から調製される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

腫瘍細胞が E H S マウス肉腫である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

タンパク質混合物、多糖混合物またはそれらの組み合わせが可溶化された形態である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 10】

細胞試料が末梢細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

末梢細胞が皮膚細胞、血液細胞、口腔内粘膜細胞および脳脊髄液由来の細胞から選択される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

皮膚細胞が繊維芽細胞または上皮細胞である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

対照細胞での少なくとも 1 種の同一遺伝子の発現と比較した細胞試料での少なくとも 1 種の遺伝子の発現の変化が増加である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 14】

少なくとも 1 種の遺伝子が E F E M P 1、BDNF、FGF 18、IGFBP 5、HAS 1、CDH 2、CAPG、MMP 12、MAPK1、TNFRSF 19、PPAPDC

10

20

30

40

50

1 A、DUSP2、CRIP2、PPP1CBおよびEDNRBから選択される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

対照細胞での少なくとも1種の同一遺伝子の発現と比較した細胞試料での少なくとも1種の遺伝子の発現の変化が減少である、請求項2に記載の方法。

【請求項16】

少なくとも1種の遺伝子がEGR2、MAP2、HLA-C、CADM1、COL23A1、BDKRB2、APOEおよびNRG3から選択される、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

対照細胞での少なくとも1種の同一遺伝子の発現と比較した細胞試料での少なくとも1種の遺伝子の発現の変化が増加および減少の組み合わせである、請求項2に記載の方法。

【請求項18】

増加した発現を示す少なくとも1種の遺伝子がEFEMP1、BDNF、FGF18、IGFBP5、HAS1、CDH2、CAPG、MMP12、MAPK1、TNFRSF19、PPAPDC1A、DUSP2、CRIP2、PPP1CBおよびEDNRBから選択され、減少した発現を示す少なくとも1種の遺伝子がEGR2、MAP2、HLA-C、CADM1、COL23A1、BDKRB2、APOEおよびNRG3から選択される、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

変化がマイクロアレイによって測定される、請求項2に記載の方法。

【請求項20】

マイクロアレイが細胞試料および対照細胞を含むアレイである、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

マイクロアレイが細胞試料および対照細胞に由来の核酸を含むアレイである、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

核酸がcDNAである、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

変化がポリメラーゼ連鎖反応によって測定される、請求項2に記載の方法。

【請求項24】

ポリメラーゼ連鎖反応がリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

神経変性状態がアルツハイマー病、パーキンソン病、認知症および老化から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項26】

アルツハイマー病が孤発性アルツハイマー病、初期段階アルツハイマー病および若年発症アルツハイマー病から選択される、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

神経変性状態の診断が1種以上のさらなる診断法を使用して確認される、請求項1に記載の方法。

【請求項28】

少なくとも1種の刺激が2種以上の刺激を含み、2種以上の刺激が細胞試料と同時にまたは経時的に接触される、請求項1に記載の方法。

【請求項29】

神経変性状態の診断が必要な対象における神経変性状態の診断方法であって、対象由来の細胞試料を少なくとも1種の刺激と接触させることと；

細胞試料での少なくとも1種の遺伝子の発現と対照細胞での少なくとも1種の同一遺伝

10

20

30

40

50

子の発現を検出することと；

細胞試料での少なくとも1種の遺伝子の発現を対照細胞での少なくとも1種の同一遺伝子の発現と比較することと；

対象が神経変性状態を有するか否かを決定することとを含み、

少なくとも1種の刺激による対照細胞での少なくとも1種の同一遺伝子の発現と比較した細胞試料での少なくとも1種の遺伝子の発現の変化が、対象が神経変性状態を有することを示す、方法。

【請求項30】

対照細胞での少なくとも1種の同一遺伝子の発現と比較した細胞試料での少なくとも1種の遺伝子の発現の変化が増加、減少、またはそれらの組み合わせである、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

増加した発現を示す少なくとも1種の遺伝子がEFEMP1、BDNF、FGF18、IGFBP5、HAS1、CDH2、CAPG、MMP12、MAPK1、TNFRSF19、PPAPDC1A、DUSP2、CRIP2、PPP1CBおよびEDNRBから選択され、減少した発現を示す少なくとも1種の遺伝子がEGR2、MAP2、HLA-C、CADM1、COL23A1、BDKRB2、APOEおよびNRG3から選択される、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

対照細胞が神経変性状態のない個体由来である、請求項29に記載の方法。

【請求項33】

対照細胞が、年齢が一致する対照細胞である、請求項29に記載の方法。

【請求項34】

少なくとも1種の刺激がタンパク質混合物、多糖混合物、プロテインキナーゼC活性化因子、Aオリゴマー、薬剤、およびそれらの組み合わせから選択される、請求項29に記載の方法。

【請求項35】

少なくとも1種の刺激が2種以上の刺激を含み、2種以上の刺激が細胞試料と同時にまたは経時的に接触される、請求項29に記載の方法。

【請求項36】

神経変性状態を治療または予防するための1種以上の候補薬物の開発に有用な化合物のスクリーニング方法であって、

化合物を、細胞外基質調製物を含む培地中で培養した神経変性状態細胞試料と接触させることと；

神経変性状態細胞試料での少なくとも1種の遺伝子の発現を検出することと；

神経変性状態細胞試料での少なくとも1種の遺伝子の発現を、化合物と接触させることなく細胞外基質調製物を含む培地中で培養した対照神経変性状態細胞での少なくとも1種の同一遺伝子の発現と比較することと

を含み；

対照神経変性状態細胞での少なくとも1種の同一遺伝子の発現と比較した神経変性状態細胞試料での少なくとも1種の遺伝子の発現の変化が、化合物が神経変性状態を治療または予防するための1種以上の候補薬物の開発に有用であることを示す、方法。

【請求項37】

対照神経変性状態細胞での少なくとも1種の同一遺伝子の発現と比較した神経変性状態細胞試料での少なくとも1種の遺伝子の発現の変化が増加、減少、またはそれらの組み合わせである、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

減少した発現を示す少なくとも1種の遺伝子がEFEMP1、BDNF、FGF18、IGFBP5、HAS1、CDH2、CAPG、MMP12、MAPK1、TNFRSF

10

20

30

40

50

19、PPAPDC1A、DUSP2、CRIP2、PPP1CBおよびEDNRBから選択され、増加した発現を示す少なくとも1種の遺伝子がEGR2、MAP2、HLA-C、CADM1、COL23A1、BDKRB2、APOEおよびNRG3から選択される、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

細胞外基質調製物、および神経変性状態のない少なくとも1つの個体由来の対照細胞を含む、神経変性状態を診断するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【発明の概要】

【0001】

本願は、合衆国法典第35巻第119条の下、2011年10月5日に出願された米国仮出願第61/543,416号の優先権の利益を主張するものであり、その出願の内容は、参照によりその全体が本願に援用されるものとする。

【0002】

本出願の開示は、刺激誘発性遺伝子発現プロファイルを使用する、神経変性状態、たとえばアルツハイマー病などの診断方法に関する。

【0003】

アルツハイマー病(AD)は、記憶と認知機能の進行性減退によって特徴づけられる神経変性障害である。500万人以上のアメリカ人がこの進行性の不治の病にかかって生活していると推定されている。アルツハイマー病は脳細胞を破壊し、記憶喪失や、生活の質を低下させる、思考および行動に関する問題を引き起こす。ADには既知の完治する方法はないが、症状に対して治療を行うことにより、ADに罹患している何百万の人々の生活の質とその家族の生活の質を改善することができる。ADの早期診断によって、患者は生活の質を最大化する選択を行ない、かつ将来に対する計画を立てる時間が与えられ、未知の問題についての心配が和らげられ、患者が治療から恩恵を受けるよりよい機会が得られる。

【0004】

ADの複雑性は、早期のスクリーニングに大きな課題を提起する。症状の診断前にADを予測するか、ADを早期に高い信頼性で診断する生物学的マーカーは、ADを検査し治療する上で大きな影響を与え得る。また長期の前駆症状段階、アルツハイマー病以外の他の認知症(非ADD)との共存症およびADの多因子的性質は、正確な診断に対してより一層の課題を提起している。

【0005】

したがって、当技術分野においてアルツハイマー病を診断する改良方法が必要とされている。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】図1は、ADに罹患している対象由来の繊維芽細胞(左側の棒)と年齢を平均した対照対象(「AC」)由来の繊維芽細胞(右側の棒)をBDマトリゲル(BD Matrigel)(商標)で48時間刺激した後の腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー19(TNFRSF-19)遺伝子の発現レベル(マイクロアレイデータ)を示す。

【図2】図2は、48時間BDマトリゲル(商標)によって刺激した場合と、BDマトリゲル(商標)による刺激を実施しなかった場合の、ADおよびAC対象におけるTNFRSF-19遺伝子の発現レベル(PCR分析による)を示す。

【図3】図3は、48時間BDマトリゲル(商標)によって刺激した、ADおよびAC対象におけるTNFRSF-19遺伝子の発現レベル(PCR分析による)を示す。

【図4】図4は、正常および癌細胞でのTNFRSF-19遺伝子の組織特異的発現を示す。

【0007】

[説明]

10

20

30

40

50

本発明の開示は、神経変性状態、たとえばアルツハイマー病の診断方法であって、対象由来の細胞試料を少なくとも1種の刺激、たとえばタンパク質および/または多糖混合物、プロテインキナーゼC活性化因子、A β オリゴマー(A β SPD)、薬剤、ならびにそれらの組み合わせと接触させることと；細胞試料での少なくとも1種の遺伝子の発現を検出することを含む、方法を対象とする。方法は、細胞試料での少なくとも1種の遺伝子の発現を対照細胞での少なくとも1種の同一遺伝子の発現と比較することと；対象が神経変性状態(アルツハイマー病)を有するか否かを決定することとをさらに含んでもよく、対照細胞での少なくとも1種の同一遺伝子の発現と比較した細胞試料での少なくとも1種の遺伝子の発現の変化が、対象が神経変性状態(アルツハイマー病)を有することを示す。

10

【0008】

本開示の特定の側面を以下により詳しく記載する。本出願で使用され、ここで明確化されている用語および定義は、本発明の開示内の意味を表わすものとする。ここで言及されている特許および科学文献は、参照によってここに援用されるものとする。ここで提供されている用語および定義は、参照によって援用されている用語および/または定義と矛盾する場合、前者が優先する。

【0009】

単数形の「a」「an」および「the」は、文脈が指示しない限り、複数への言及を含んでいる。

20

【0010】

用語「神経変性状態」とは、ニューロンの死を含む、ニューロンの構造または機能の進行性喪失をもたらす状態を意味する。状態としては、限定されるものではないが、進行性認知症症候群、たとえば、アルツハイマー病、レビー小体型認知症、筋萎縮；姿勢運動系障害症候群、たとえば、パーキンソン病、多発症状萎縮、トゥレット症候群；進行性失調症候群、たとえば、大脳皮質運動失調；筋無力症または萎縮がゆっくりと進行する症候群、たとえば、筋萎縮性側索硬化症(ALS)；および老化が挙げられる。

【0011】

用語「アルツハイマー病」または「AD」とは、A β および/または神経原線維変化が中枢神経系の細胞に最終的に蓄積する任意の状態を意味し、その蓄積は、他の疾患または状態、たとえばCAAに起因し得ないものである。ADは、家族性発現の遺伝性であってもよいし、孤発性のものであってもよい。ここで用いる場合、ADは、家族性、孤発性、ならびに、表現型の発現に基づくそれらの中間およびサブグループを含む。さらに、この用語は、ダウン症候群の対象におけるA β の発生を含む。

30

【0012】

用語「孤発性AD」とは、生涯の後期に、通常約65歳以降に発症し、ADの家族歴、またはADの危険因子であると同定された遺伝子における変異を伴わないADを意味する。

【0013】

用語「若年発症」とは、約65歳以下の人に発症するADを意味する。若年発症としては、限定されるものではないが、家族性ADが挙げられる。

40

【0014】

「家族性AD」とは、プレセニリン-1遺伝子(PSEN-1)、プレセニリン-2遺伝子(PSEN-2)；アミロイドベータ前駆体タンパク質(APP)をコードしている遺伝子、および/またはアポリポタンパク質E(APOE)をコードしている遺伝子における遺伝性突然変異を伴うADを意味する。

【0015】

「初期段階AD」とは、中程度の認知低下の症状、たとえば、記憶喪失または混乱を伴うADの段階を意味する。記憶喪失または他の認知低下は顕著であるが、まだ人はそれを補うことができ、自立して機能し続けることができる。この段階は、機能評価別病期(Functional Assessment Staging)(FAST)分類の第4段階と相関するか、the D

50

diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders, 4th Edition (DSM-IV-TR) (the American Psychiatric Associationより刊行)、NINCDS-ADRDA、またはMMSEで定義されている判定基準による軽度ADと関連する。

【0016】

「軽度認知障害(MCI)」は、正常な加齢による認知変化とADの間の移行段階を意味する。MCIを有する対象には、対象の年齢および教育から予測される認知障害を上回る障害があるが、対象の日常的活動を著しく妨げることはない。MCIの人は、記憶、言語、または他の精神機能の機能障害をもっているもよい。MCIの対象全員がADを発症するとは限らない。ここで用いる場合、MCIの対象は、ADを発症するリスクがあると

10

【0017】

ADに関する別の危険因子は、加齢、PSEN-1、PSEN-2、APPおよびAPOEにおける突然変異である。

【0018】

ここで使用する場合、用語「対象」は、哺乳動物を意味する。一態様では、対象はヒトである。

【0019】

ここで使用する「健常対象」は、神経変性状態、たとえばADに相対的なものである。すなわち、この健常対象はADを発症しておらず、特定の疾患に罹患していると診断されておらず、疾患が進行するリスクはない。

20

【0020】

「末梢組織」とは、神経外胚葉に由来しない組織を意味し、具体的に、身体の嗅上皮、舌、皮膚(真皮および/または表皮を含む)、ならびに粘膜層が挙げられる。ここで使用する用語「差次的に発現した」または「差次的発現」とは、2つの試料、対照試料と試験試料における細胞成分の変化の測定を意味する。細胞成分は、対照と比較して実験でアップレギュレートされ得るか、対照試料と比較して実験でダウンレギュレートされ得るかのいずれかである。

【0021】

ここで使用する場合、「発現レベルの検出」という語句は、発現レベルを定量する方法、ならびに、目的の遺伝子が少しでも発現しているか否かを測定する方法を含む。検出は、定性的であっても定量的であってもよい。一態様では、差次的発現は統計学的に有意である。

30

【0022】

ここで使用する場合、「アップレギュレートする」または「アップレギュレーション」とは、任意の機序、たとえば限定されるものではないが、転写、翻訳の増加および/または転写物もしくはタンパク質産物の安定性の増加などを介した、ベースラインまたは対照の状態と比較した遺伝子または遺伝子産物の量または活性の上昇を検出することを意味する。検査細胞における発現の増加は、対照細胞における対応する遺伝子が刺激によって変化しないか、刺激に応答してダウンレギュレートされるかのいずれかの状況を含む。

40

【0023】

ここで使用する場合、「ダウンレギュレートする」または「ダウンレギュレーション」とは、任意の機序、たとえば限定されるものではないが、転写、翻訳の減少および/または転写物もしくはタンパク質産物の安定性の低下などを介した、ベースラインまたは対照の状態と比較した遺伝子または遺伝子産物の量または活性の低下を検出することを意味する。検査細胞における発現の低下は、対照細胞における対応する遺伝子が刺激によって変化しないか、刺激に応答してアップレギュレートされるかのいずれかの状況を含む。

【0024】

「遺伝子発現における変化」とは、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

50

ヨンの検出を意味する。

【0025】

用語「マイクロアレイ」または「核酸マイクロアレイ」とは、基板に結合した複数の核酸のコレクションであって、複数のそれぞれの結合核酸へのハイブリダイゼーションが別々に検出可能なものを意味する。基板は、固体または多孔質であってもよく、平面状または非平面状であってもよく、単一型 (unitary) または分散型 (distributed) であってもよい。マイクロアレイまたは核酸マイクロアレイは、S chena (ed.), DNA Microarray: A Practical Approach (Practical Approach Series), Oxford University Press (1999); Nature Genet. 21(1) (suppl.): 1-60 (1999); S chena (ed.), Microarray Biochip: Tools and Technology, Eaton Publishing Company/BioTechniques Books Division (2000) においてそのように呼ばれるすべての装置を含む。これらのマイクロアレイは、とりわけ、Brenner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US A 2000; 97(4): 1665-1670で開示されている、複数の核酸が単一型の平面状基板上ではなく、複数のビーズ上に配置されている、基板に結合した複数の核酸のコレクションを含む。

10

【0026】

用語「約」および「およそ」とは、一般に、測定 of 所定の特質または精度で測定された量に対して容認され得る程度の誤差を意味する。典型的には、誤差の程度の例としては、所定の値または値の範囲の20パーセント (%) 以内であり、好ましくは10%以内であり、さらに好ましくは5%以内である。あるいは、生物学的系では特に、用語「約」および「およそ」とは、所定の値の絶対値の桁の範囲内にある値を意味し、好ましくは5倍以内、さらに好ましくは2倍以内にある値を意味する。ここで示した数量は、特に言及しない限り、概算値であり、明確に記載されていない場合、用語「約」または「およそ」を意味し得る。

20

【0027】

一態様において、本発明の開示は、神経変性状態 (AD) の発症または罹患が疑われる対象由来の細胞 (「細胞試料」) の少なくとも1種の刺激による応答での遺伝子発現レベルにおいて、同じ刺激で刺激した後の正常対照細胞 (「対照細胞」) における同一遺伝子の発現と比較した差異を検出することによって神経変性状態、たとえばADを診断する方法を提供する。一態様では、対照細胞は、年齢が一致する対照の対象に由来し、細胞試料と同じ刺激で刺激される。

30

【0028】

本発明の別の態様では、刺激された細胞試料における、刺激された対照細胞と比較して増加した遺伝子発現 (アップレギュレーション) は、神経変性状態 (AD) の存在を示す。他の側面では、刺激された細胞試料における、刺激された対照細胞と比較して減少した遺伝子発現 (ダウンレギュレーション) は、神経変性状態 (AD) の存在を示す。第3の側面では、刺激された細胞試料における、刺激された対照細胞と比較して増加した遺伝子発現がないことは、神経変性状態 (AD) の存在を示す。第4の側面では、刺激された細胞試料における、刺激された対照細胞と比較して減少した遺伝子発現がないことは、神経変性状態 (AD) の存在を示す。

40

【0029】

別の態様では、本発明の開示は、遺伝子発現における差次的変化を検出することによって初期段階ADを診断する方法を提供する。特定の態様では、ここで記載した方法は、アルツハイマーの病態または認知症を、他の形態の認知症、たとえば、前頭側頭骨変性認知症 (たとえば、ピック病、大脳皮質基底核神経節変性症、および前頭側頭骨認知症)、ハンチントン病、クロイツフェルトヤコブ病、パーキンソン病、脳血管疾患、頭部外傷、ならびに物質乱用に付随するものと区別するために用いることができる。

50

【0030】

さらなる態様では、本発明の開示は、同一患者から別の機会に採取した2種以上の試料に本方法を適用することによって、疾患の進行を評価する方法を提供する。この態様は、第1の試料の採取後で次の試料の採取前に投与された任意のAD治療の効果を評価するために用いることもできる。例としての評価可能なAD治療としては、Namenda（登録商標）（メマンチン）、Ariccept（登録商標）（ドナパジル）およびRazadyne（登録商標）（ガランタミン）、Exelon（登録商標）（リバスチグミン）が挙げられる。

【0031】

本発明の開示は、ここで開示した方法に従って、遺伝子の差次的発現に基づいて試験薬剤の効果を評価することによって、ADの治療または予防のための治療用物質をスクリーニングする方法をさらに提供する。

10

【0032】

別の態様では、本発明の開示は、ここで開示した診断方法を実施するためのキットを提供する。表1は、対照細胞と比較してAD細胞においてアップレギュレートされることが確認された遺伝子のGenBankアクセッション番号を提供する。表2は、対照細胞と比較してAD細胞においてダウンレギュレートされることが確認された遺伝子のGenBankアクセッション番号を提供する。

【0033】

たとえば、TNFRSF-19またはTNF-19受容体遺伝子は、ここでは、BDマトリゲル（商標）による刺激の際にAD細胞においてアップレギュレートされる。TNFRSF-19（TROY、TAJまたはTRADEとしても知られている）は、ニューロンで発現され、軸索成長に関与するTNFファミリーのオファン受容体である。これは、細胞外ドメインおよび伸長した細胞質ドメインを有する348アミノ酸の推定上の膜結合タンパク質である。TNFRSF19の遺伝子記号情報を表4に記載する。

20

【0034】

TNFRSF-19は、JNKカスケード、アポトーシス、I- κ Bキナーゼ/NF- κ Bカスケード腫瘍壊死因子媒介性シグナル経路の制御に関連している。他のTNF受容体とは異なり、TNFRSF-19は、免疫応答経路で機能を果たしているようには見えない。これまでのところ、ADに関与する新しい細胞経路を同定するための刺激誘発性全ゲノム発現手法の可能性を示す、TNFRSF-19アップレギュレーションとADとの関係については文献で報告されていない。

30

【0035】

別の態様では、ここで開示した診断方法は、表1および/または表2に示した少なくとも1種の遺伝子の対照試料と細胞試料における差次的発現を検出することを含む。

【0036】

別の態様では、ここで開示した診断方法は、表1および/または表2に示した少なくとも2種の遺伝子の対照試料と細胞試料における差次的発現を検出することを含む。

【0037】

別の態様では、ここで開示した診断方法は、表1および/または表2に示した少なくとも5種の遺伝子の対照試料と細胞試料における差次的発現を検出することを含む。

40

【0038】

別の態様では、ここで開示した診断方法は、表1および/または表2に示した少なくとも10種の遺伝子の対照試料と細胞試料における差次的発現を検出することを含む。

【0039】

別の態様では、ここで開示した診断方法は、表1および/または表2に示した少なくとも15種の遺伝子の対照試料と細胞試料における差次的発現を検出することを含む。

【0040】

生物学的試料

本発明の開示は、神経変性状態の進行のリスクの疑いがある（たとえば、ADまたはA

50

D罹患の疑いがある)対象由来の細胞を使用する神経変性状態、たとえば、アルツハイマー病を診断するための方法を提供する。ここで開示した方法では、対象から採取される細胞は、任意の生細胞を含む。一態様では、細胞は末梢組織由来であり、すなわち、非神経組織由来である。さらなる態様では、組織は皮膚、血液、粘膜、または脳脊髄液由来である。

【0041】

別の態様では、細胞は、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、またはリンパ球を含む造血性細胞である。さらなる態様では、細胞は皮膚上皮細胞、皮膚線維芽細胞、血液細胞または類粘膜細胞である。細胞は、新鮮細胞、培養細胞、または分析前に凍結した細胞であってもよい。一態様では、パンチ皮膚生検を用いて対象由来の皮膚線維芽細胞を得ることができる。皮膚線維芽細胞試料はまた、外科用の刃を使用することによって対象から得てもよい。これらの線維芽細胞は、直接分析されるか、または細胞培養条件に導入される。別の態様では、細胞はレーザーキャプチャー顕微解剖を用いた切除片から単離され、同一タイプの細胞の均質群を取得する。

10

【0042】

刺激

いくつかの態様では、ここで開示した少なくとも1種の刺激はタンパク質混合物、多糖混合物、プロテインキナーゼC(PKC)活性化因子、Aオリゴマー(ASPD)、薬剤、およびそれらの組み合わせから選択される。一態様では、少なくとも1種の刺激は2種以上の刺激を含み、2種以上の刺激は、細胞試料と同時にまたは経時的に接触される。

20

【0043】

少なくとも1種の刺激は、タンパク質および/または多糖混合物、たとえば、ゼラチン状タンパク質および/または多糖混合物を含む。たとえば、刺激は、ADに特異的な差次的遺伝子発現を誘導するタンパク質および/または多糖混合物中でAD細胞、AC細胞または非ADD細胞を培養することによって誘導することができる。

【0044】

いくつかの態様では、タンパク質および/または多糖混合物は、ラミニン、コラーゲン、エンタクチン、ヘパリンサルフェートプロテオグリカン、エンタクチン/ニドゲン、マトリックスメタロプロテインナーゼ、プラスミノゲン活性化因子、増殖因子、およびそれらの任意の組み合わせから選択される。いくつかの態様では、タンパク質および/または多糖混合物は少なくとも1種の基底膜タンパク質を含む。

30

【0045】

いくつかの態様では、タンパク質および/または多糖混合物は調製物を含む。いくつかの態様では、調製物は可溶化される。少なくとも1つの態様では、調製物は、腫瘍または癌細胞、たとえば、エンジェルプレス-ホーム-スワーン(EHS)マウス肉腫から抽出されており、細胞外マトリックス(ECM)タンパク質が豊富である。このような調製物は、たとえば、ラミニン、コラーゲンIV、ヘパリンサルフェートプロテオグリカン、およびエンタクチン/ニドゲンの少なくとも1つを含んでもよい。本発明の開示に適した非限定的な例はBDマトリゲル(商標)であり、これはEHSマウス肉腫細胞によって分泌されるゼラチン状タンパク質混合物に対する商品名(BD Biosciences)である。たとえば、BDマトリゲル(商標)の成分を表3に示す。この混合物は多くの組織で見出される複合細胞外環境に類似しており、細胞培養用基質として使用してもよい。BDマトリゲル(商標)は、ラミニン、コラーゲンIV、ヘパリンサルフェートプロテオグリカン、およびエンタクチン1を含む。37で、BDマトリゲル(商標)は重合し、哺乳動物細胞の基底膜に類似する生物学的に活性なマトリックス材料を生成する。

40

【0046】

本発明の開示のいくつかの態様では、調製物は、TGF-、上皮成長因子、インスリン様増殖因子、線維芽細胞増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子、および/または、腫瘍内に自然に発生していても、していなくてもよい他の増殖因子をさらに含む。いくつかの態様では、TGF-、上皮増殖因子、インスリン様増殖因子、線維芽細胞増殖因

50

子、組織プラスミノゲン活性化因子、および/または他の増殖因子は、腫瘍、たとえば、EHSマウス肉腫腫瘍内に自然に発生する。BDマトリゲル(商標)Matrix Growth Factor Reduced(GFR)は、たとえば、より厳密に定義されたゲル基質の基底膜調製物を必要とする用途に適していてもよい。いくつかの態様では、少なくとも1種の刺激はBDマトリゲル(商標)Matrix Growth Factor Reducedよりもより一層明確に定義されている基底膜調製物である。

【0047】

調製物は、正常と形質転換の両方の足場依存性上皮および他の細胞型が付着および分化するための効果的なECMタンパク質調製物を含んでいてもよい。例としての細胞型としては、限定されるものではないが、ニューロン、肝細胞、セルトリ細胞、ニワトリレンズ、および血管内皮細胞が挙げられる。ECMタンパク質調製物は、成体ラット肝細胞における遺伝子発現ならびにマウスおよびヒト乳腺上皮細胞における三次元培養に影響を及ぼしていてもよい。調製物は、たとえば、腫瘍細胞浸潤アッセイ用の基質、インビボでの末梢神経再生における支持体として供給されてもよく、かつ/またはインビトロとインビボの両方での血管形成研究用の基質を提供してもよい。ECMタンパク質はまた、インビボでの免疫不全マウス(immunosuppressed mice)におけるヒト腫瘍の増殖を支援していてもよい。

【0048】

本発明の開示のいくつかの態様では、ある量の冷蔵されたECMタンパク質は組織培養実験器具上に分注される。ここで使用されている用語「冷蔵」とは、室温未満の温度、たとえば、約15 未満、約10 未満、約5 未満、たとえば、約4 の温度を意味する。高い温度でインキュベートした場合、ECMタンパク質は自己組織化して実験器具の表面を被覆する薄膜を生成してもよい。ここで使用されている用語「高い」とは、室温より高い温度、たとえば、約20 、約25 、約30 、約35 よりも高い温度、たとえば、約37 の温度であって、ヒトの体温のおよその平均温度であることを意味する。

【0049】

いくつかの態様では、より多くの容量のECMタンパク質を用いて、細胞培養用の厚い三次元ゲルを生成する。たとえば、厚いゲルは、ゲルの表面から内部へ移動するように細胞を誘導するのに有用であってもよい。いくつかの態様では、この移動挙動は、腫瘍細胞の転移に関するモデルとして役立つ。いくつかの態様では、培養培地は、約1.0 mm ~ 約2.0 mmの厚さ、たとえば、約1.5 mmまたは約1.8 mmの層を含む。培養培地の量はまた、関係式の $V = (\pi r^2) h$ に従ってウェルプレート内容積(V)として表わすことができ、式中、hは層の厚さであり、rは半径である。いくつかの態様では、たとえば、培養培地の体積は、約400 μ l ~ 約800 μ lの範囲であってもよく、たとえば、 $r = 11.05$ ミリメートルで約700 μ lである。

【0050】

いくつかの態様では、ここで開示した少なくとも1種の刺激はプロテインキナーゼC(PKC)活性化因子を含む。PKC活性化因子は当技術分野で公知であり、たとえば、限定されるものではないが、ブラジキニン、ホルボールエステル、たとえば、ホルボール12-ミリステート13-アセテート(PMA)、ホルボール12,13-ジブチレート(PDBu)、ホルボール12,13-ジデカノエート(PDD)、ボンベシン、コレシストキニン、トロンピン、プロスタグランジンF_{2u}およびパソプレシンが挙げられる。他のPKC活性化因子としては、1,2-sn立体配置に様々な脂肪酸を有するジアシルグリセロールを含んでいる、天然および非天然のジアシルグリセロール(DAG)を含む。特定の態様では、DAGは不飽和脂肪酸を含む。一態様では、PKC活性化因子は大環状ラクトンであり、限定されるものではないが、プリオスタチン化合物のクラスおよびネリスタチン化合物のクラスのもものが挙げられる。他の態様では、PKC活性化因子はベンゾラクタムである。さらなる態様では、PKC活性化因子はピロリジノンである。特定の態様では、大環状ラクトンはプリオスタチンである。さらなる特定の態様では、プリオスタチンはプリオスタチン-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7、-8、-9、-10

10

20

30

40

50

、 - 11、 - 12、 - 13、 - 14、 - 15、 - 16、 - 17、または - 18である。

【0051】

いくつかの態様では、ここで開示した少なくとも1種の刺激は、プリオスタチンの類似体を含む。プリオスタチンの類似体は、一般にプリオログと称され、本発明の方法における使用に適する特定のあるクラスのPKC活性化因子である。プリオログは構造的に類似しているが、PKCに対する親和性は大きく異なる(0.25 nM ~ 10 μM)。プリオスタチン-1は、2つのピラン環と1つの6員環アセタールとを有するが、ほとんどのプリオログにおいては、プリオスタチン-1のピランの1つは、第2の6員アセタール環で置き換えられている。この修飾によって、プリオログの安定性はプリオスタチン-1と比べて、たとえば、強酸中または塩基中の両方で低下するが、生理学的pHではそれほど顕著ではない。プリオログはまた、プリオスタチン-1(988)と比べて分子量が小さく(約600~755の範囲)、その特性によって血液脳関門を越える輸送が促進される。様々なプリオログは、たとえば、米国特許出願公開第2008-0058396A1号として公開されている、米国特許出願第11/802723号に開示されている。

10

【0052】

他のクラスのPKC活性化因子は多価不飽和脂肪酸(「PUFA」)である。これらの化合物は神経系の必須成分であり、数多くの健康上の利点を有する。一般的に、PUFAは、膜流動性を増加させ、酸化して高度の生理活性を有する産物となり、炎症やホルモンの様々な作用を生じ、急速に分解され代謝される。炎症性の作用と迅速な代謝は、おそらくそれらの活性のある炭素-炭素二重結合の結果であろう。これらの化合物は、おそらくPS部位の結合によるPKCの強力な活性化因子であり得る。

20

【0053】

一態様では、PUFAはリノール酸(下記参照)から選択される。

【化1】



30

【0054】

別のクラスのPKC活性化因子は、PUFAおよびMUFA誘導体、特にシクロプロパン誘導体である。特定のシクロプロパン化PUFA、たとえば、DCPLA(すなわち、両方の二重結合にシクロプロパンを有するリノール酸)は、PKC- を選択的に活性化し得る。Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(50):34514-34521を参照されたい。さらに米国特許出願公開第2010/0022645A1を参照されたい。その親分子と同様に、PUFA誘導体は、PS部位に結合することによりPKCを活性化すると考えられる。

40

【0055】

シクロプロパン化脂肪酸は低い毒性を示し、脳に容易に取り込まれ、そこで、それらは長い半減期($t_{1/2}$)を示す。二重結合のシクロプロパン環への変換は、酸化と炎症性の副生成物への代謝を防止し、より大きなPKC活性化をもたらし得る剛性のより高いU字型3D構造を生成する。さらに、このU字型は、より大きなアイソフォーム特異性を生じ得る。たとえば、シクロプロパン化脂肪酸は、PKC- の強力かつ選択的な活性化を示し得る。

【0056】

シクロプロパン化のシモンズスミス反応は、二重結合をシクロプロパン基に変換する効率的な方法である。この反応は、カルベノイド中間体を介して作用し、親分子のシス立体構造を維持する。したがって、PKC活性化特性が増強されるとともに、他の分子、たと

50

例えば生物反応性のエイコサノイド、トロンボキサン、またはプロスタグランジンへの代謝が防止される。

【0057】

P K C 活性化脂肪酸の一つのクラスはオメガ - 3 P U F A 誘導体である。一態様では、オメガ - 3 P U F A 誘導体は、シクロプロパン化ドコサヘキサエン酸、シクロプロパン化エイコサペンタエン酸、シクロプロパン化ルメレン酸、シクロプロパン化パリナリン酸、およびシクロプロパン化リノレン酸 (C P 3 形態は下記参照) から選択される。

【化2】



10

【0058】

別のクラスの P K C 活性化脂肪酸はオメガ - 6 P U F A 誘導体である。一態様では、オメガ - 6 P U F A 誘導体は、シクロプロパン化リノール酸 (「 D C P L A 」 、 C P 2 形態は下記参照) 、

【化3】



20

【0059】

シクロプロパン化アリキドン酸 (arichidonic acid) 、シクロプロパン化エイコサジエン酸、シクロプロパン化ジホモ - ガンマ - リノレン酸、シクロプロパン化ドコサジエン酸、シクロプロパン化アドレン酸、シクロプロパン化カレンド酸、シクロプロパン化ドコサペンタエン酸、シクロプロパン化ジャカル酸、シクロプロパン化ピノレン酸、シクロプロパン化ポドカルブ酸、シクロプロパン化テトラコサテトラエン酸 (tetracosatetranoic acid) 、およびシクロプロパン化テトラコサペンタエン酸から選択される。

30

【0060】

ベルノール酸は天然に存在する化合物である。しかし、これはリノール酸のエポキシ誘導体であり、したがって、ここで使用される場合、オメガ - 6 P U F A 誘導体とみなされる。ベルノール酸に加えて、シクロプロパン化ベルノール酸 (下記参照) はオメガ - 6 P U F A 誘導体である。

【化4】



40

【0061】

別のクラスの P K C 活性化脂肪酸は、オメガ - 9 P U F A 誘導体である。一態様では、オメガ - 9 P U F A 誘導体は、シクロプロパン化エイコセン酸、シクロプロパン化ミード

50

酸、シクロプロパン化エルカ酸、およびシクロプロパン化ネルボン酸から選択される。

【0062】

さらに別のクラスのPKC活性化脂肪酸は、モノ不飽和脂肪酸（「M U F A」）誘導体である。一態様では、M U F A 誘導体は、シクロプロパン化オレイン酸（下記参照）

【化5】



10

【0063】

と、シクロプロパン化エライジン酸（下記参照）

【化6】



20

【0064】

から選択される。

【0065】

PKC活性化M U F A 誘導体は、エポキシ化化合物、たとえば、トランス-9,10-エポキシステアリン酸（下記参照）を含む。

【化7】



30

【0066】

別のクラスのPKC活性化脂肪酸はオメガ-5およびオメガ-7 P U F A 誘導体である。一態様では、オメガ-5およびオメガ-7 P U F A 誘導体は、シクロプロパン化ルーメン酸、シクロプロパン化アルファエロステアリン酸（alphaelostearic acid）、シクロプロパン化カタルプ酸、シクロプロパン化プニカ酸から選択される。

40

【0067】

別のクラスのPKC活性化因子は、脂肪酸アルコールおよびその誘導体、たとえば、シクロプロパン化P U F A とM U F A 脂肪酸アルコールである。これらのアルコールは、P S 部位に結合することによってPKCを活性化すると考えられる。これらのアルコールは、異なるクラスの脂肪酸から誘導することができる。

【0068】

一実施態様では、PKC活性化脂肪酸アルコールは、特に脂肪酸が上記で示されている、オメガ-3 P U F A、オメガ-6 P U F A、オメガ-9 P U F A、およびM U F A から誘導される。一態様では、脂肪酸アルコールは、シクロプロパン化リノレニルアルコール（C

50

P 3 形態は下記参照)、

【化 8】



【0069】

10

シクロプロパン化リノレイルアルコール (C P 2 形態は下記参照)、

【化 9】



【0070】

20

シクロプロパン化エライジンアルコール (下記参照)、

【化 10】



【0071】

30

シクロプロパン化 D C P L A アルコール、シクロプロパン化オレイルアルコールから選択される。

【0072】

別のクラスの P K C 活性化因子は、脂肪酸エステルおよびその誘導体、たとえば、シクロプロパン化 P U F A および M U F A 脂肪酸エステルである。一態様では、シクロプロパン化脂肪酸エステルは、オメガ - 3 P U F A、オメガ - 6 P U F A、オメガ - 9 P U F A、M U F A、オメガ - 5 P U F A、オメガ - 7 P U F A から誘導される。これらの化合物は、P S 部位での結合を介して P K C を活性化すると考えられる。このようなエステルの利点の 1 つは、それらが、一般に、その遊離酸対応物よりも安定的であると考えられることである。

【0073】

40

一態様では、オメガ - 3 P U F A から誘導される P K C 活性化脂肪酸エステルは、シクロプロパン化エイコサペンタエン酸メチルエステル (C P 5 形態は下記参照)

【化 11】

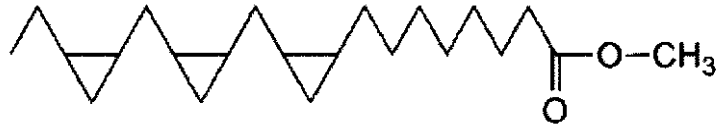


【0074】

50

およびシクロプロパン化リノレン酸メチルエステル（CP3形態は下記参照）

【化12】



10

【0075】

から選択される。

【0076】

別の態様では、オメガ-3 PUFAエステルは、DHA-CP6と脂肪族および芳香族アルコールのエステルから選択される。一態様では、エステルはシクロプロパン化ドコサヘキサエン酸メチルエステル（CP6形態は下記参照）である。

【化13】



20

【0077】

DHA-CP6は、実際には、10 nMの濃度で有効であることが示されていた。たとえば、米国特許出願公開第2010/0022645号を参照されたい。

【0078】

一態様では、オメガ-6 PUFAから誘導されるPKC活性化脂肪酸エステルは、シクロプロパン化アラキドン酸メチルエステル（CP4形態は下記参照）、

【化14】



30

【0079】

シクロプロパン化ベルノール酸メチルエステル（CP1形態は下記参照）、

【化15】



40

【0080】

およびベルノール酸メチルエステル（下記参照）

【化16】



【0081】

から選択される。

10

【0082】

特に興味深い1つのクラスのエステルはDCPLA (CP6 - リノール酸) 誘導体である。一態様では、DCPLAのエステルはアルキルエステルである。アルキル基は、一態様では、メチル、エチル、プロピル (たとえばイソプロピル)、およびブチル (たとえばtert-ブチル) エステルから選択されていてもよい。メチルエステル形態のDCPLA (「DCPLA-ME」) を下記に示す。

【化17】



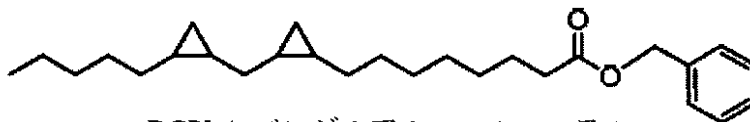
20

【0083】

別の態様では、DCPLAのエステルは、ベンジルアルコールから誘導される (下記に示す非置換ベンジルアルコールエステル)。さらに別の態様では、DCPLAのエステルは、芳香族アルコール、たとえば、天然酸化防止剤として用いられるフェノールおよび学習促進能力 (pro-learning ability) を有する天然フェノールから誘導される。いくつかの特定の例としては、エストラジオール、ブチル化ヒドロキシトルエン、レスベラトロール、ポリヒドロキシル化芳香族化合物、およびクルクミンが挙げられる。

30

【化18】



DCPLA-ベンジルアルコールエステル

【0084】

別のクラスのPKC活性化因子は、シクロプロパン化MUF Aから誘導される脂肪酸エステルである。一態様では、シクロプロパン化MUF Aエステルは、シクロプロパン化エライジン酸メチルエステル (下記参照)

40

【化 19】



【0085】

10

およびシクロプロパン化オレイン酸メチルエステル（下記参照）

【化 20】



20

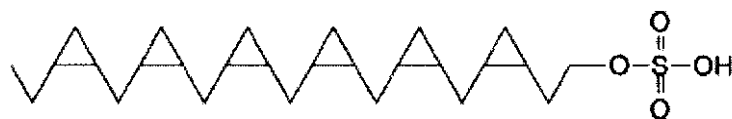
【0086】

から選択される。

【0087】

別のクラスのPKC活性化因子は、PUFA、MUFA、およびそれらの誘導体から誘導されるサルフェートおよびホスフェートである。一態様では、サルフェートはDCPLAサルフェートおよびDHAサルフェート（CP6形態は下記参照）から選択される。

【化 21】

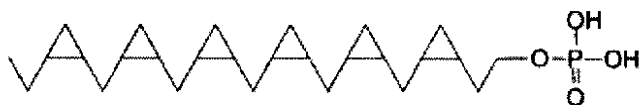


30

【0088】

一態様では、ホスフェートはDCPLAホスフェートおよびDHAホスフェート（CP6形態は下記参照）から選択される。

【化 22】



40

【0089】

PUFAとMUFA誘導体のさらなる態様は米国特許第8163800号に開示されており、これは参照によりここに援用するものとする。

【0090】

いくつかの態様では、ここで開示されている少なくとも1種の刺激は、A オリゴマー

50

(アミロスフェロイド (amyloshered)、A S P D) を含む。たとえば、A オリゴマーは、 $> 100 \text{ kDa}$ の分子量を有することができる。これらのオリゴマーは非常に有毒であることが報告されており、A D の脳において発見されたもの (N o u g u c h i ら、2009) との類似性を有していた。

【0091】

いくつかの態様では、ここで開示されている少なくとも1種の刺激は薬剤を含む。薬剤としては、限定されるものではないが、ブラジキニン、インスリン、ホルボールエステル (phobol ester)、リゾホスファチジルコリン、リポ多糖、アントラサイクリンダウノルピシン (anthracycline dannorubicin)、およびパナジルサルフェートが挙げられる。

【0092】

遺伝子発現プロファイリング

遺伝子発現は、ロースルーブット法、たとえば、ノーザンブロット法、インサイチュールハイブリダイゼーション、逆転写定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (R V Q - P C R) とリアルタイム P C R、およびハイスルーブット法、たとえば、マイクロアレイおよび差次的遺伝子発現検出用の S A G E の両方によって測定することができる。一態様では、検出は、自動的な、マイクロアレイ技術のようにハイスルーブット設定でコンピュータ化された機器を用いて行われる。

【0093】

一態様では、本発明の開示の方法は、マイクロRNA、cDNA または cRNA を含む、mRNA のような遺伝子転写物を検出することを提供する。転写物は、遺伝子のコーディング領域と非コーディング領域の両方からのものとして行うことができる。転写物は、細胞内インサイチュールで検出できるか、または、細胞から抽出された精製形態で検出できる。特定の態様では、核酸は細胞から単離精製され、次いで、遺伝子発現アッセイにおいて使用される。

【0094】

別の態様では、本発明の開示の方法は、遺伝子転写物から発現される、タンパク質産物またはそれらの一部を検出することを提供する。タンパク質に基づくアッセイとしては、ロースルーブット方法、たとえば、ウェスタンブロット法および E L I S A、ならびにハイスルーブットのタンパク質マイクロアレイが挙げられる。

【0095】

さらなる態様では、本発明の開示の方法は、検出されたタンパク質産物の活性または活性化状態、たとえば、所定のタンパク質のリン酸化を検出することをさらに含む。

【0096】

一態様では、2つの異なる細胞由来の遺伝子転写物 (たとえば、cDNA) を、マイクロアレイ上の公知の遺伝子転写物の結合部位にハイブリダイズするが、その1つは少なくとも1種の刺激で刺激された検査細胞であり、もう1つは、少なくとも1種の刺激で、好ましくは同じ刺激で刺激された、好ましくは同一細胞型の対照細胞である。2つのそれぞれの細胞型に由来する核酸は別々に標識し、それらを区別できるようにする。差次的に発現される転写物を評価するためのマイクロアレイの使用はよく知られている。たとえば、米国特許第6,973,388号を参照されたい。この技術は、典型的には、公知の c D N A 転写物を含むマイクロアレイの調製または購入、検査細胞からのRNAの抽出および標識化、試験RNAのアレイへのハイブリダイズ、シグナルの検出および可視化、結果に基づく統計学的分析の実施、ならびに、任意に、ロースルーブット技術を使用するマイクロアレイの結果の確認を含む。

【0097】

予め作製されているcDNAマイクロアレイは、たとえば、Affymetrix (登録商標) (Santa Clara, CA)、Agilent Technologies (登録商標) (Santa Clara, CA) およびAlphaGene (登録商標) (Woburn, MA) から市販されている。これらは、全ゲノムアレイおよび公知の遺伝子の標的サブセットを含む。

10

20

30

40

50

【0098】

別の態様では、遺伝子の差次的発現は、遺伝子発現連鎖解析 (SAGE) を用いて検出される。SAGE は、特異的 mRNA 転写物のごく一部が発現される回数を定量的に検出する (タグ)。SAGE のアウトプットは、短い配列タグのリストとそれが観察される回数である。マイクロアレイハイブリダイゼーションと遺伝子発現連鎖解析 (SAGE) 技術の間の主たる差異点は、後者が解析される配列を事前に知っておく必要がないということである。SAGE は、配列決定に基づく遺伝子発現プロファイリング技術である。

【0099】

一態様では、細胞試料は、1種以上の遺伝子の発現レベルにおける、対照細胞での同一遺伝子または遺伝子群の発現レベルと比較して確認可能な差異を示す。たとえば、差次的発現は定量的である。さらなる例では、検査細胞で検出された遺伝子発現レベルは、対照細胞と比較して約1倍、2倍、5倍、10倍および100倍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されている。

10

【0100】

本発明の開示のいくつかの態様では、遺伝子の発現レベルは、培養後約1時間、約1.5時間、約2時間、約2.5時間、約3時間、約5時間、約8時間、約10時間、約12時間、約24時間、約36時間、約48時間、約60時間、または約72時間、あるいはそれ以上で測定することができる。たとえば、図1は、BDマトリゲル (商標) で刺激した48時間後のADに罹患している対象由来の線維芽細胞 (左側の棒) と、年齢を平均した対照対象 (「AC」) 由来の線維芽細胞 (右側の棒) における腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー19 (TNFRSF-19) 遺伝子の発現レベル (マイクロアレイデータ) を示す。

20

【0101】

治療のためのスクリーニング方法

さらなる側面では、この開示は、ここで開示した診断試験を使用して神経変性状態 (AD) を治療または予防するための治療用物質をスクリーニングする方法に関する。この態様によれば、ここで開示した遺伝子発現において確認された差異を逆転または改善する化合物は、神経変性状態 (AD) の治療または予防に有用である可能性のある物質として同定および選択される。

【0102】

一態様では、スクリーニング方法は、ADであると診断された対象由来の細胞を、一定時間、試験化合物と接触させるステップと、続いて、細胞をここで開示した少なくとも1種の刺激と接触させるステップと、試験化合物が、本発明の開示の方法によって同定された遺伝子の差次的発現を、正常な対象由来の対照細胞で確認されたレベルの方へ変化させたか否かを検出するステップとを含む。

30

【0103】

一態様では、試験化合物と接触させる細胞は、本発明の開示の方法に従って神経変性状態 (AD) と診断された対象に由来する。

【0104】

キット

この開示はまた、ここで開示した診断方法を実施するのに有用な製品を含むキットに関する。キットはまた、1種以上の生検、たとえば、パンチ皮膚生検の実施に必要な器具、バッファおよび保存容器を含んでもよい。キットは、高密度オリゴヌクレオチドアレイ、アレイと一緒に使用するための試薬、シグナル検出およびアレイ処理器具、遺伝子発現データベースおよび解析およびデータベース管理ソフトウェアを含むことができる。キットはまた、神経変性状態 (AD) 診断に用いられる差次的発現遺伝子の同定に関する説明書を含んでもよい。

40

【0105】

上述したように、キットは、単一の診断試験、またはここで開示した試験の任意の組み合わせを含んでもよい。ここで開示した対照細胞と神経変性状態 (AD) 細胞との間

50

のすべての差異は、神経変性状態（AD）診断用の臨床試験および診断キットに関する基礎を築くとともに、ここで開示した神経変性状態（AD）を治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法の基礎を築く。

【0106】

組み合わせ診断方法

ここで開示した診断方法は、任意の別の診断方法と組み合わせで使用してもよいと思われる。例示的な方法としては、物理的および神経学的評価；バイオマーカー検出；および構造的（MRI、CT）および機能的脳画像（PET；FDG-PET）が挙げられる。

【0107】

一例として、本発明の開示の方法は、家族性ADに關与することが知られている遺伝子の突然変異の評価と組み合わせで使用することができる。ADを診断するさらなる方法は、Alkon et al. の米国特許第6,080,582号および同第6,300,085号に開示されており、これらの方法は、AD患者の細胞中のカリウムイオンチャネルの欠如、AD患者の細胞中で欠如しているカリウムイオンチャネルに特異的なカリウムチャネルブロッカーへの応答における、ADおよび非AD細胞中の細胞内カルシウムイオン濃縮の差異、ならびに、細胞内カルシウム放出活性化因子、たとえば、イノシトール-1,4,5-トリホスフェート（IP3）の活性化因子への応答における、AD細胞と非AD細胞の間の差異を検出する。さらなる診断方法はAlkon et al. の国際公開第2007/047029号に開示されているが、これは、PKC活性化因子で刺激した後の細胞中の特異的リン酸化されたMAPキナーゼタンパク質（Erk1/Erk2）の割合における変化を検出することによって、対象におけるADを診断することを目的とする。Zhao et al.、Neurobiol Dis. 2002 Oct; 11(I): 166-83を参照されたい。

10

20

【0108】

[実施例]

例1

3名のADと3名の年齢が一致する対照（AC）の皮膚繊維芽細胞の試料をこの遺伝子発現試験で使用した。年齢が一致する対照由来の繊維芽細胞は非AD認知症患者由来の繊維芽細胞と同様に、48時間後に小さくしかもかなりの数のコロニーを形成するが、AD患者由来の繊維芽細胞は大きく数の少ないコロニーを形成する。表1および2に示した多数の遺伝子は、BDマトリゲル（商標）により刺激した際に、AD細胞でアップレギュレートまたはダウンレギュレートされることが判明した。図1は、BDマトリゲル（商標）で刺激した48時間後の、ADに罹患している対象由来の繊維芽細胞（左側の棒）と、年齢を平均した対照対象（「AC」）由来の繊維芽細胞（右側の棒）における、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー19（TNFRSF-19）遺伝子の発現レベル（マイクロアレイデータ）を示す。示したように、TNFRSF-19遺伝子はACの事例と比べて、ADの事例において刺激されている。

30

【0109】

図2は、48時間BDマトリゲル（商標）により刺激したか、BDマトリゲル（商標）による刺激を行わなかった、ADおよびAC対象におけるTNFRSF-19遺伝子の発現レベル（PCR分析による）を示す。データは、各群につき、3名の年齢が一致する対照によって標準化した。AC1からAC6で示した棒とAD1からAD6で示した棒は、AC対象またはAD対象由来の新たに採取したものではない細胞から得られたデータを表わす。0025 M39 AC、0019 M33 AC、0055 M55 AC、および0065 M69 ADで示した棒は、新たに採取した生検繊維芽細胞から得られたデータを表わす。

40

【0110】

図3は、48時間BDマトリゲル（商標）により刺激した、ADおよびAC対象におけるTNFRSF-19遺伝子の発現レベル（PCR分析による）を示す。データはPCRによる各ゲルによって標準化した。AC1からAC6により示した棒と、AD1からAD

50

6で示した棒は、AC対象またはAD対象由来の新たに採取したものでない細胞から得られたデータを表わす。0025 M39 AC、0019 M33 AC、0055 M55 AC、および0065 M69 ADで示した棒は、新たに採取した生検繊維芽細胞から得られたデータを表わす。

【0111】

図4は、正常および癌細胞におけるTNFRSF-19遺伝子の組織特異的発現を示す。

【0112】

BDマトリゲル(商標)基底膜の調製: BDマトリゲル Matrix Growth Factor Reduced (BD Biosciences)を使用する30分前に氷上で4にて溶かした。すべてのピペット、チップおよび12ウェル培養プレートは、使用前に4まで予備冷却した。BDマトリゲル(商標) Matrix Growth Factor Reducedを、冷却ピペットを使用して均質に混合した。ゲルの固体状凝集物が混合物内に含まれていないようにすべきである。12ウェル培養プレートを使用前に30分間氷上に維持し、1ウェル当たり700 μ LのBDマトリゲル(商標) Matrix Growth Factor Reducedを加えた。細胞培養プレート表面上のゲルの均質性を倒立顕微鏡下で確認された。いかなる泡も回避されるべきである。12ウェルプレートを30分間37に置いた。皮膚繊維芽細胞の細胞懸濁液をBDマトリゲル(商標) Matrix Growth Factor Reducedの最上部に加えた。細胞の密度は約50細胞/mm³に調節した。

【0113】

BDマトリゲル(商標)マトリックスからの細胞の回収: 細胞凝集物は以下のようにして回収した。BDセルリカバリーソリューション(BD Cell Recovery Solution)(BD Biosciences)を使用して、BDマトリゲル(商標)マトリックスから細胞を回収した。まず、細胞培養培地を除去し、冷却PBSでBDマトリゲル(商標)マトリックス上の細胞層を3回洗浄した。35mm皿当たりリカバリーソリューション2mLであった。細胞凝集物/ゲル層を、氷上に置いた氷冷の50mLコニカルチューブへこすり取った。すべての物質を皿から回収するため、BDセルリカバリーソリューション2mLで1回すすぎ、チューブに移した。BDマトリゲル(商標)は、数回チューブを前後に振動させることにより完全に溶解させ、1時間、またはBDマトリゲル(商標)が完全溶解するまで氷上に維持した。氷上に約30分置いた後、細胞はチューブの底に沈殿した。これはゲルが溶解されたことを示す。細胞凝集物は、4で5分間200~300 \times Gで遠心分離にかけることによってチューブの底のペレットとして回収した。細胞ペレットは、氷冷PBS中に穏やかに再懸濁し、同一条件で遠心分離にかけることによって洗浄した。RNAを標準法に従って細胞凝集物から分離した。

【0114】

遺伝子発現プロファイリング: マイクロアレイ分析は、Human Whole Genome One Array(登録商標)v5(Phalanx Biotech, Palo Alto, CA)を使用して行った。RNAの品質および保全性は、Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)と、A260/A280の吸光度を利用して測定した。RINが>7.0であり、A260/280吸光度比が>1.8である高品質RNAだけをさらなる実験操作に利用した。RNAを二本鎖cDNAに変換し、アミノ-アリルUTPが含まれているインビトロでの転写を使用して増幅させ、aRNA産物をCy5(商標) NHSエステル(GEHLifesciences)と引き続き結合させた。断片化aRNAは、50で終夜、1 \times One Arrayハイブリダイゼーションバッファー(Phalanx Biotech)、0.01mg/mlのサケ精子DNA(Promega, Madison, WI, USA)を用いるHybBag混合系を使用して、0.025mg/mlの標識ターゲット濃度でハイブリダイズさせた。

【0115】

ハイブリダイゼーション後、アレイはOne Arrayプロトコルに従って洗浄した。各マイクロアレイの未加工の強度シグナルは、GenePix Pro (商標)ソフトウェアを使用して測定される、Molecular Dynamics (商標) Axon 4100A スキャナーを使用して取り込み、GPRフォーマットに保存した。次いで、それぞれの組の実験におけるすべてのマイクロアレイから得たデータを分析用のRosetta Resolver (Rosetta Biosoftware) に送った。試験は、Rosetta Resolver 専用のモデリング技術を使用し、技術的な反復測定を組み合わせ、統計分析を行うことにより実施した。

【0116】

結果：BDマトリゲル(商標)マトリックスでのインキュベーション48時間の凝集物形成後に差次的に発現されたすべての遺伝子を表1および2に示す。

【表1】

表1 刺激後の差次的に発現された活性化遺伝子

遺伝子記号	AD/AC の変化倍 率	*P値	説明
EFEMP1	6.917	0.00035	EGF含有フィブリン様細胞外マトリックスタンパク質1
#BDNF	7.831	0.00007	脳由来神経栄養因子
FGF18	3.067	0.00222	繊維芽細胞成長因子18
IGFBP5	9.681	<0.000003	インスリン様成長因子結合タンパク質5
HAS1	8.085	0.00003	ヒアルロン酸シンターゼ1
#CDH2	3.428	0.000001	カドヘリン2、タイプ1、N-カドヘリン(ニューロン)
CAPG	3.056	0.007074	キャッピングタンパク質(アクチンフィラメント)、ゲルゾリン状
MMP12	2.798	0.036324	マトリックスメタロペプチダーゼ12(マクロファージエラスターゼ)
#MAPK1	3.175	0.000007	MAPキナーゼ1
TNFRSF19	3.222	0.000314	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー19
PPAPDC1A	3.911	0.0229	1Aを含有するホスファチジン酸ホスファターゼのタイプ2ドメイン
DUSP2	6.720	<0.0000001	二重特異性ホスファターゼ2
CRIP2	3.923	0.00039	システインに富んだタンパク質2
PPP1CB	4.474	0.005376	プロテインフォスファターゼ1、触媒サブユニット、ベータアイソザイム
EDNRB	4.855	<0.0000001	8 エンドセリン受容体タイプB

10

20

30

40

【0117】

表1に示した#遺伝子はErkと関係がある。

【表 2】

表2 刺激後に差次的に発現された非活性化遺伝子

遺伝子記号	AD/AC の 変 化 倍 率	*P値	説明
EGR2	0.385	0.000328	初期増殖応答2
MAP2	0.294	0.015971	微小管結合タンパク質2
HLA-C	0.052	<0.000001	組織適合性主複合体、クラスI、C
CADM1	0.535	<0.000001	細胞接着分子1
COL23A1	0.161	<0.000001	コラーゲン、タイプXXIII、アルファ1
BDKRB2	0.682	0.000382	ブラジキニン受容体B2
APOE		<0.000001	アポリポタンパク質E
NRG3	0.054	<0.000001	ニューレグリン3

10

【 0 1 1 8 】

20

* 表 1 および 2 に示した P 値は 3 つの A D および 3 つの A C の事例から計算される。

【表 3 - 1】

表3 BDマトリゲル(商標)の組成物およびADにおけるシグナル伝達機序との関係

成分	副成分	シグナル伝達経路	AD経路との関係	参考文献	
成長因子	TGFβs	多官能価サイトカイン。リンパ球、単球、好中球および線維芽細胞に対して走化性として働く。血管新生を誘導する。細胞外マトリックス産生。	APP合成と加工、プラーク形成、アストログリアおよびミクログリアの活性化、およびニューロンのアポトーシスの制御。低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質発現を増加。ニューロン内Aβ蓄積、毒性を増加。	Tseng, et al., (2004). FEBS Lett. 562: 71-78. Harris-White, et al., (2004), J. Neurosci. Res. 77: 217- 228.	10
	FGF	FGF治療は、ECM分子の生産と遺伝子発現を調節する。	APPは、EGF受容体の発現を調節する。	Bellucci et al., (2007), Mol. Med. 13: 542-550.	20
	PDGF	血小板由来増殖因子	PDGFは、APPのβ-、γ-セクレターゼ媒介切断を調節する。	Gianni et al., (2004), J. Bio. Chem. 278: 9290-9297.	
	IGF	IGFシグナル伝達経路は、代謝、細胞増殖、および生存を調節する。	IGFは、AD発症機序におけるアポトーシスから細胞を保護する。	Niikura, T., J. Neurosc. (2001), 21: 1902-1910.	30

【表 3 - 2】

プロテアーゼ	772kDa MMP-2(ゲラチナーゼA)	72kDaのタンパク質分解酵素は、細胞-細胞および細胞-マトリックスおよび転移に関する細胞表面レクチンと相互作用する。	A β のインビトロでの分解。	Roher et al., (1994), Biochem. Biophys. Res. Commun. 205:1755-1761.	10
	92kDa MMP-9(プロゲラチナーゼB)	アストロサイト、ニューロン、ミクログリア、白血球およびマクロファージから遊離。コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、ラミニン、エラスチンおよびプロテオグリカン等を含むECM成分を分解する。	MMP-9は、細胞外アミロイド斑の近くで発見された。MMP-9は、AD患者の血漿中で上昇する。	Lorenzi et al., (2003), Neurochem. Int., 43: 191-196	20
	<u>ウロキナーゼ</u> (<u>urUokinase</u>)				30
	組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA)	tPAは血餅を溶解し、それは虚血防止に使用されてきた。	A β は、tPAに結合し、プラスミンの生産増加を引き起こす。	Kranenburg, et al., (2005), Neurosci. 131:877-886	30

【表 3 - 3】

豊富な成分	ラミニン	ラミニンは、ECM両端コラーゲンIVおよびプロテオグリカンの主要成分である。	神経突起伸長を促進。インテグリン受容体と結合することによる細胞接着活性。A β 線維形成およびA β 誘発細胞毒性の低下の阻害。	Drouet, et al., (1999), J. Neurochem.:73, 742-749. Morgan et al., (2002), Peptides 23: 1229-1240.	10
	コラーゲンIV型	構造タンパク質、重要なECM成分。	コラーゲンは、APPの分泌および蓄積の減少を引き起こし得る。	Kiuchi, et al., (2002), Life Sci. 70:1555-1564.	
	ヘパランサルフェートプロテオグリカン	共有結合したヘパランサルフェート鎖を介してECM分子に結合可能なAPPIに結合する。	LOAD繊維芽細胞においてダウンレギュレートされる。	Ca'ceres and Brandan, (1997), J. Cellular Biochem. 65:145-158	20
	ニドゲン/エンタクチン	基底膜の主要成分。パールカンはニドゲン、ラミニン/ニドゲン複合体、フィブロネクチン、フィブリン-2およびヘパリンに結合する。	まだ確立されていない。		30

【表 3 - 4】

他の成分	クラスタリン	A β と相互作用し、コレステロールと、ADで異常のある脳の脂質代謝を調節する。	ApoeJ(クラスタリン)はADの間に増加する。	Nuutinen, et al., (2009), Brain Res. Rev. 62: 89-104.
	トランスフェリン	ADにおけるトランスフェリン遺伝子多型、およびレビー小体型認知症	ADにおける低脳内トランスフェリンレベル	Fisher et al., (1997), Life Science 60: 227-227, 1997. Hussain, et al., (2002), Neurosci Lett. 317:13-6.
	アミラーゼ		ADにおけるM3-ムスカリンアゴニスト活性	Sramek et al., (1995), Prog. Neuro. Psychopharm. and Biol. Psychiatry:19: 85-91.

10

20

【表 4】

表4 TNFRSF19に関する遺伝子記号情報

承認記号	承認学名	ヌクレオチド配列	同物異名	染色体
TNFRSF19	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー19	GenBank:AB040434 EMBLDDBJ C RefSeq:NM_00120445 8 D CCDS:CCDS9301.1 C Vega:OTTHUMG00000 016568 C	TAJ-alpha, TROY, TAJ, TRADE	13q12.11-q12.3

30

40

【0119】

本発明の別の態様は、ここで開示した本発明の詳細および実施を考慮すれば当業者には明らかであろう。この詳細および例は単なる例示として考え、本発明の真の範囲および趣旨は、以下の特許請求の範囲によって示されているものとする。

【 図 1 】

図1

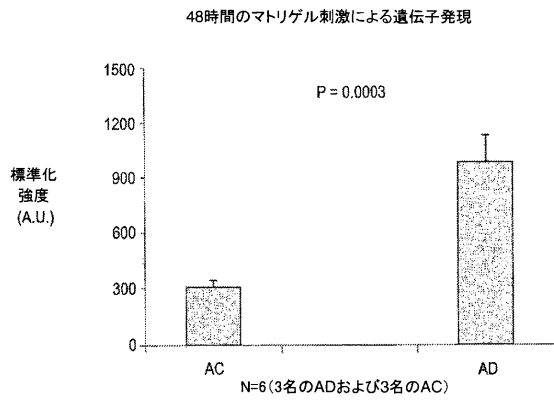


FIG. 1

【 図 2 】

図2

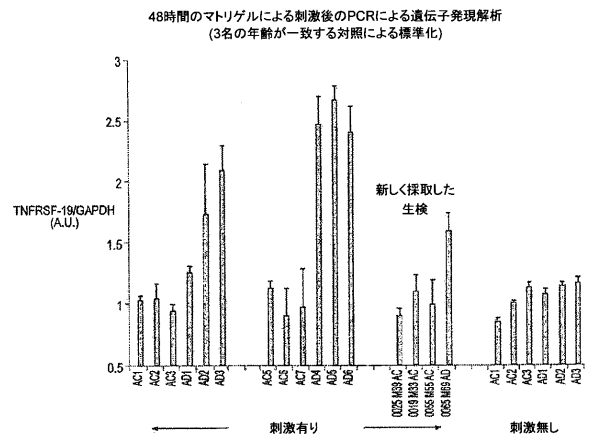


FIG. 2

【 図 3 】

図3

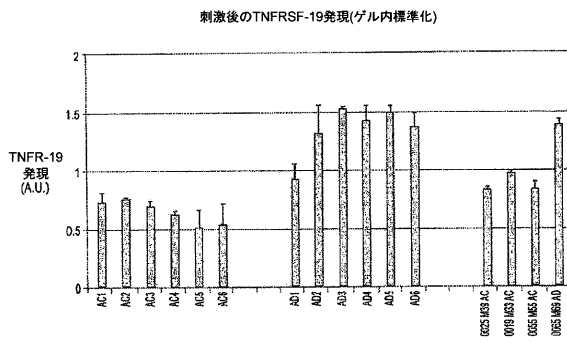


FIG. 3

【 図 4 】

図4

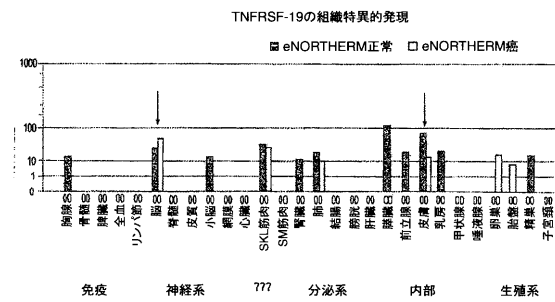


FIG. 4

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2012/059137

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/014588 A1 (BRNI NEUROSCIENCES INST [US]; ALKON DANIEL L [US]; KHAN TAPAN KUMAR [U] 4 February 2010 (2010-02-04)	1-3,5, 9-13,15, 17, 19-30, 32-35
Y	examples and claims; paragraphs [0035] - [0040], [0056] - [0058]	1-39
X	WO 2011/041761 A1 (BRNI NEUROSCIENCES INST; CHIRILA FLORIN VALENTIN [US]; KHAN TAPAN KUMA) 7 April 2011 (2011-04-07)	1-39
Y	paragraphs [0006], [0011], [0050], [0065], [0066], [0069]; claims 1-11	1-38
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
11 December 2012		20/12/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Nurmi, Jussi

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/059137

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 97/37228 A1 (UNIV BOSTON [US]; GILCHREST BARBARA A [US]; YAAR MINA [US]) 9 October 1997 (1997-10-09)	1-3, 9-11,13, 25,26, 28-30, 32,34,35
Y	page 11, line 10 - page 13, line 35; claims 1,2	1-39
X	----- EP 2 322 191 A2 (SNU R&DB FOUNDATION [KR]) 18 May 2011 (2011-05-18) example 4	39
X	----- KLEINMAN ET AL: "Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity", SEMINARS IN CANCER BIOLOGY, SAUNDERS SCIENTIFIC PUBLICATIONS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 15, no. 5, 1 October 2005 (2005-10-01), pages 378-386, XP005021947, ISSN: 1044-579X	39
Y	the whole document	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/059137

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010014588 A1	04-02-2010	EP 2326729 A1	01-06-2011
		JP 2011529344 A	08-12-2011
		US 2010021913 A1	28-01-2010
		WO 2010014588 A1	04-02-2010
WO 2011041761 A1	07-04-2011	CA 2776501 A1	07-04-2011
		CN 102741693 A	17-10-2012
		EP 2483684 A1	08-08-2012
		US 2011136144 A1	09-06-2011
		WO 2011041761 A1	07-04-2011
WO 9737228 A1	09-10-1997	AT 346303 T	15-12-2006
		AU 719038 B2	04-05-2000
		AU 2424597 A	22-10-1997
		CA 2250075 A1	09-10-1997
		DE 69736976 T2	18-10-2007
		EP 0890105 A1	13-01-1999
		JP 2000507828 A	27-06-2000
		US 6242416 B1	05-06-2001
		US 2002051988 A1	02-05-2002
		US 2004254110 A1	16-12-2004
		WO 9737228 A1	09-10-1997
		EP 2322191 A2	18-05-2011
KR 20100013512 A	10-02-2010		
US 2011150899 A1	23-06-2011		
WO 2010013934 A2	04-02-2010		

フロントページの続き

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

(71)出願人 314012021

カーン、タパン・ケー .

アメリカ合衆国、ウエスト・バージニア州 26505、モーガンタウン、ティンバーライン・ストリート 710

(74)代理人 100108855

弁理士 蔵田 昌俊

(74)代理人 100109830

弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100103034

弁理士 野河 信久

(74)代理人 100075672

弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100140176

弁理士 砂川 克

(72)発明者 アルコン、ダニエル・エル .

アメリカ合衆国、メリーランド州 20817、ベセスダ、セブン・ロックス・コート 2

(72)発明者 カーン、タパン・ケー .

アメリカ合衆国、ウエスト・バージニア州 26505、モーガンタウン、ティンバーライン・ストリート 710

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA09 HA12

4B063 QA19 QQ43 QQ53 QR32 QR55 QR77 QS34 QX02