(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

PCT

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. Juni 2008 (05.06.2008)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2008/064883 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2007/010331

(22) Internationales Anmeldedatum:
28. November 2007 (28.11.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2006 056 337.9
29. November 2006 (29.11.2006) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **B.R.A.H.M.S AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; Neuendorfstrasse 25, 16761 Hennigsdorf (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **BERGMANN, Andreas** [DE/DE]; Baumläuferweg 47, 12351 Berlin (DE). **ERNST, Andrea** [DE/DE]; Falkenseer Strasse 4, 16761 Hennigsdorf (DE). **HAMPEL, Harald** [DE/DE]; Westenriederstrasse 21, 80331 München (DE).

(74) Anwalt: **ANDRAE FLACH HAUG**; Balanstrasse 55, 81541 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:
— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)*

Veröffentlicht:
— *mit internationalem Recherchenbericht*
— *vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen*

(54) **Title:** *IN VITRO* METHOD FOR THE DIAGNOSIS AND EARLY DIAGNOSIS OF NEURODEGENERATIVE DISORDERS

(54) **Bezeichnung:** *IN VITRO* VERFAHREN ZUR DIAGNOSE UND FRÜHDIAGNOSE VON NEURODEGENERATIVEN ERKRANKUNGEN

(57) **Abstract:** *In vitro* method for the detection and early detection of, for the determination of the degree of severity of, and for the assessment of the course of and prognosis of neurodegenerative disorders, in which an immunodiagnostic determination method is used to determine the apolipoprotein C-I (Apo C-I) immunoreactivity in a serum or plasma sample from a patient suffering from subjective or objectively verifiable cognitive disorders.

(57) **Zusammenfassung:** *In vitro* Verfahren zur Erkennung und Früherkennung, zur Bestimmung des Schweregrads und zur Verlaufsbeurteilung und Prognose von neurodegenerativen Erkrankungen, bei dem man in einer Serum- oder Plasmaprobe eines Patienten, der an subjektiven oder objektiv nachweisbaren kognitiven Störungen leidet, mit Hilfe eines immundiagnostischen Bestimmungsverfahrens die Apolipoprotein C-I (Apo C-I) Immunreaktivität bestimmt.

WO 2008/064883 A1

In vitro Verfahren zur Diagnose und Frühdiagnose von neurodegenerativen Erkrankungen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues *in vitro* Verfahren für die Diagnose und insbesondere Frühdiagnose von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere von Demenzerkrankungen wie der Alzheimer Krankheit und deren Vorstufen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird dabei der Begriff "Diagnose" als Oberbegriff für medizinische Bestimmungen gebraucht, denen je nach dem klinischen Zustand des Patienten, bei dem die Bestimmung durchgeführt wird, unterschiedliche Fragestellungen zugrunde liegen können und die der Erkennung und im vorliegenden Falle insbesondere auch der Früherkennung, der Bestimmung des Schweregrads und der Verlaufsbeurteilung, auch der therapiebegleitenden Verlaufsbeurteilung, und der Prognose des zukünftigen Verlaufs einer Erkrankung dienen. Dabei ist im vorliegenden Zusammenhang von besonderer Bedeutung, dass eine Diagnose auch eine Negativdiagnose sein kann, bei der z.B. aufgrund der Nichtfeststellbarkeit einer bestimmten krankheitstypischen Biomarkerkonzentration in einer Blutprobe eines Patienten das Vorliegen einer bestimmten Erkrankung unwahrscheinlich gemacht wird.

Für die Negativdiagnose sind auch Biomarker von großem Wert, für die bei mehreren verschiedenen Krankheiten pathologisch veränderte Konzentrationen festgestellt werden können und die daher allein, für sich genommen, noch keine positive Diagnose einer spezielle Krankheit ermöglichen - obwohl sie in der Regel bei Hinzuziehung weiterer klinischer oder biochemischer Parameter auch für die Positivdiagnose entscheidend sein können.

Die Erkrankungen, um deren Diagnose es bei der vorliegenden Erfindung geht, sind sich eher langsam entwickelnde, chronische neurodegenerative Erkrankungen von nichtinfektiöser Ätiologie, insbesondere Demenz-Erkrankungen.

Als Demenz-Erkrankungen (Dementia) werden generell Krankheiten bezeichnet, für die ein gemeinsames Merkmal ist, dass erworbene intellektuelle Fähigkeiten, v.a. das Gedächtnis, und das normale Persönlichkeitsniveau als Folge von Hirnschädigungen beeinträchtigt sind. Demenzerkrankungen sind in der Regel sich relativ langsam entwickelnde Krankheiten von chronischem Charakter. Treten Demenzerscheinungen vor dem hohen Alter im mittleren Lebensalter auf, werden sie als präsenile Demenz-Erkrankungen bezeichnet. Bei Demenz-Erkrankugnen unterscheidet man auf der Basis der für sie typischen Symptome und hirnpathologischen Veränderungen insbesondere die folgenden Erkrankungen bzw. Gruppen von Erkrankungen:

Die **Alzheimer Demenz (AD)** (Alzheimer Krankheit; Morbus Alzheimer) ist die häufigste neurodegenerative Demenz-Erkrankung, macht 2/3 aller Demenzfälle aus und stellt auch das praktisch wichtigste Anwendungsgebiet für die vorliegende Erfindung dar. AD zeichnet sich durch drei wichtige, allerdings erst *post mortem* mit Sicherheit feststellbare pathologische Merkmale aus: die Bildung von Amyloid-Plaques und neurofibrillären Bündeln sowie den Verlust an Nervenzellen (Übersicht s. (1); Literaturangaben in der Beschreibung in Form von Zahlen beziehen sich auf die der Beschreibung

folgende Literaturliste). Amyloid-Plaques bestehen aus extraneuronalen Aggregaten des Amyloid-ß-Proteins, während die Neurofibrillenbündel hauptsächlich Tau-Protein und Neurofilamente enthalten. Es wird vermutet, dass die Plaque- und Neurofibrillenbildung die Ursache für das Absterben von Nervenzellen ist.

Die wichtigsten Symptome von AD sind zunehmende Merkfähigkeits- und Denkstörungen bei relativ lang anhaltender Gemütsansprechbarkeit, wobei diese Symptome von weiteren weniger spezifischen Störungen begleitet werden, die die Abgrenzung der AD von anderen Demenzformen erschweren.

Beobachtungen an AD-Patienten und Patienten, die im Laufe ihrer langjährigen klinischen Beobachtung AD entwickelten, führten zur Formulierung von Kriterien für gegeneinander abgrenzbare Patientengruppen, die die ganze Breite von

(a) Personen ohne subjektive und objektive kognitive Störungen (die im Rahmen der vorliegenden Anmeldung die Kontrollgruppe repräsentieren), über

(b) Patienten, die über subjektiv empfundene kognitive Leistungseinbußen klagen, bei denen jedoch keine kognitiven Defizite festgestellt werden können (im Rahmen der vorliegenden Anmeldung ist das die Gruppe der "SKS"-Patienten, wobei "SKS" für "subjektive kognitive Störungen" steht), weiter über

(c) Patienten, bei denen leichte kognitive Störungen feststellbar sind und bei denen dann, wenn keine anderen demenzverursachenden Erkrankungen vorliegen, die Diagnose "möglicherweise AD" ("mgl AD") gestellt wird (im Rahmen der vorliegenden Anmeldung ist das die Gruppe "LKS mgl AD", wobei "LKS" für "leichte kognitive Störungen" steht) bis hin

(d) zur Gruppe der Patienten mit dem typischen Bild erheblicher kognitiver Störungen, die schleichend begonnen haben und langsam progredieren, für die dann, wenn andere Demenz-Ursachen ausgeschlossen werden können, die Diagnose "wahrscheinlich AD" gestellt wird (im Rahmen der vorliegenden Anmeldung ist das die Gruppe "ws AD", wobei die Abkürzung für "wahrscheinlich Alzheimer" steht),

abdecken.

Bezüglich der Zuordnung von Patienten mit subjektiven und/-oder objektiven kognitiven Störungen zu verschiedenen Gruppen wird ergänzend verwiesen auf (2), (3), (4) und (5).

Die **Demenz mit Lewy-Körperchen** (dementia with lewy-bodies: DLB) ist nach der Alzheimer Demenz die zweithäufigste Ursache für eine demenzielle Erkrankung. Neuropathologisch ist die DLB durch das Auftreten von sogenannten Lewy-Körperchen im Hirnstamm und im Cortex charakterisiert. Diese Lewy--Körperchen bestehen überwiegend aus Aggregaten des präsynaptischen Proteins α-Synuclein und Ubiquitin. Die Lewy--Body-Pathologie kann in unterschiedlichem Ausmaß mit Alzheimer und Parkinson-typischen neuropathologischen Veränderungen assoziiert sein. So kommt es auch bei der DLB zur Bildung von beta-Amyloid und senilen Plaques, jedoch nicht zu Neurofibrillenbündeln (Übersicht s. (6)). Lewy-Körperchen sind auch im Gehirn von Patienten mit Morbus Parkinson vorhanden, wenn auch in einer unterschiedlichen Verteilung.

Kernsymptome von DLB sind eine progrediente kognitive Störung, Verwirrtheitsepisoden mit fluktuierender Aufmerksamkeits- und Bewusstseinslage, Parkinsonismus, häufige Stürze und Synkopen (anfallsartige, kurz dauernde Bewusstlosigkeit). Die Sensitivität und Spezifität der diagnostischen Kriterien zeigen durchgehend eine hohe Spezifität, aber zum Teil eine sehr niedrige Sensitivität. Das bedeutet, dass die DLB im klinischen Alltag häufig nicht diagnostiziert wird.

Die **Frontotemporale Demenz (FTD)** wird auch als Pick'sche Krankheit bezeichnet und macht ca. 20% der präsenilen Demenzerkrankungen aus. FTD ist teilweise genetisch bedingt und zählt zu den sogenannten Tauopathien, die sich durch eine Über- oder Unterexpression eines Tauprotein-Subtyps bzw. durch die Expression eines mutierten Tauproteins auszeichnen. Neuropathologisch kommt es zu einer lokalen Atrophie des frontalen und/oder temporalen Cortex sowie der Substantia Nigra und der Basalganglien. Dies hat unterschiedlich ausgeprägte Sprachstörungen, eine Wesensänderung sowie Verhaltensauffälligkeiten zur Folge. Insgesamt ist die FTD mit einer Sensitivität von 93% bei einer Spezifität von nur 23% unterdiagnostiziert, wobei die AD die häufigste Fehldiagnose darstellt.

Unter dem Begriff **vaskuläre Demenz (vascular dementia; VAD)** werden Erkrankungen zusammengefasst, bei denen eine Demenz durch Durchblutungsstörungen im Gehirn ausgelöst wird. Es gibt unterschiedliche Typen der VAD, von denen die Multi--Infarkt-Demenz (MID) und die subcorticale VAD (auch als Binswanger'sche Erkrankung bezeichnet) die häufigsten Formen darstellen.

Bei der Binswanger'schen Erkrankung handelt es sich um eine langsam progrediente demenzielle Entwicklung, die pathologisch durch cerebrovasculäre Läsionen in der weißen Hirnsubstanz charakterisiert ist. Klinisch resultiert dies in Verhaltensauffälligkeiten wie Agitation, Reizbarkeit, Depression und Euphorie sowie einer leichten Gedächtnisstörung.

Die Multi-Infarkt-Demenz entsteht allmählich als Folge von mehreren kleinen Schlaganfällen, auch als transiente ischämische Attacken (TIA) bezeichnet, die zum Untergang von Hirngewebe im Cortex und/oder subcortikalen Arealen führten. Die Schlaganfälle können auch gänzlich unbemerkt geblieben sein, die Demenz ist in diesem Falle die erste spürbare

Folge. Bei Vorliegen einer MID kommt es zur stufenweisen Abnahme kognitiver Fähigkeiten, verbunden mit schweren Depressionen, Stimmungsschwankungen und Epilepsie.

Eine Diagnose von Demenz-Erkrankungen erfolgt heutzutage überwiegend auf der Basis neuropsychologischer Untersuchungen und der Beobachtung der Krankheitsentwicklung und ihres Verlaufs, unter Heranziehung von Ausschlusskriterien für bestimmte Demenzformen. Diese Untersuchungen liefern in sehr vielen Fällen mehrdeutige Ergebnisse, die die o.g. Zahlen für die unterdiagnostizierten Demenzformen oder unrichtig diagnostizierten Fälle erklären. Die krankheitstypischen Gehirnveränderungen können an lebenden Patienten naturgemäß nicht direkt festgestellt werden, und apparatemedizinische Untersuchungen der Gehirnfunktionen mittels z.B. Computer- oder Magnetresonanz-Tomographie sind aufwändig und teuer.

Es wäre daher wünschenswert, die Erkennung und insbesondere Früherkennung von Demenzerkrankungen durch die Messung von aussagekräftigen Biomarkern, die mit Hilfe eines relativ einfachen Testverfahrens z.B. in einer Blutprobe (Serumprobe, Plasmaprobe) eines Patienten bestimmt werden können, ergänzen und dadurch erheblich verbessern zu können.

Für die Alzheimer-Diagnostik veröffentlichten das Ronald und Nancy Reagan Institut der Alzheimer Association und die NIA-Working Group Richtlinien für die Kriterien, die an einen idealen Biomarker zur Detektion der AD gestellt werden (7). Folgende Kriterien sollen im Idealfall durch den Biomarker erfüllt werden:

1. Er sollte hirnspezifisch sein und ein fundamentales Merkmal der Neuropathologie dieser Erkrankungen detektieren.
2. Die diagnostische Sensitivität und die Spezifität von mindestens 80% sollte gegeben sein.
3. Die krankheitsspezifische Veränderung des Biomarkers

sollte sich in einem möglichst frühen Stadium der Erkrankung manifestieren, um mit geeigneten Therapiemaßnahmen beginnen zu können (8).

Bis jetzt gibt es jedoch keinen in der Zirkulation (d.h. im Blut bzw. in Blutpräparaten wie Serum oder Plasma) eines Patienten nachweisbaren Biomarker, der im klinischen Alltag zur Verbesserung der Früh- und Differentialdiagnose von AD herangezogen werden könnte und alle o.g. Kriterien erfüllt. Aktuell werden verschiedene potentielle Markerkandidaten untersucht, darunter Inflammationsmarker wie IL-6 und TNFα, Marker für oxidativen Stress wie 3-Nitrotyrosin, sowie Marker, die mit charakteristischen pathologischen Veränderungen der AD assoziiert sind, wie Amyloid ß, das einen Hauptbestandteil der Amyloid-Plaques darstellt, und das Tau-Protein, das einen wesentlichen Bestandteil der Neurofibrillenbündel darstellt (vgl. die Übersicht in (7); (9)).

Es besteht ein aktueller Bedarf nach ergänzenden, valide Laborbefunde liefernden Untersuchungsmethoden, die auf einer Bestimmung von als Biomarker für Demenzerkrankungen, insbesondere für die Alzheimer Demenz (AD), geeigneten Substanzen in Blut- bzw. Plasmaproben beruhen und bei Patienten, bei denen der Verdacht auf Vorliegen einer Demenzerkrankung, insbesondere von AD, besteht, unterstützend für eine frühe Positivdiagnose und/oder für eine negative Ausschlussdiagnose geeignet sind.

Die vorliegende Erfindung stellt eine solche Untersuchungsmethode in Form eines *in vitro* Verfahrens zur Erkennung und Früherkennung, zur Bestimmung des Schweregrads und zur Verlaufsbeurteilung und Prognose von neurodegenerativen Erkrankungen bereit, bei dem man in einer Serum- oder Plasmaprobe eines Patienten, der an subjektiven oder objektiv nachweisbaren kognitiven Störungen leidet, mit Hilfe eines immundiagnostischen Bestimmungsverfahrens die Apo C-I-Immunreaktivität bestimmt, und bei dem man auf der Basis der

dafür gemessenen Konzentration Schlüsse hinsichtlich des Vorliegens einer neurodegenerativen Erkrankung oder einer für diese typischen Frühform davon oder hinsichtlich des Verlaufs der Erkrankung und/oder des Erfolgs der Bemühungen zu ihrer Abmilderung oder Verhinderung zieht.

Vorteilhafte bzw. bevorzugte Ausgestaltungen eines Verfahrens gemäß Anspruch 1 sind in den Unteransprüchen 2 bis 8 wiedergegeben.

Grundlage der vorliegenden Erfindung ist der experimentelle Befund, dass im Blut (Serum, Plasma) von Patienten mit kognitiven Störungen bis hin zur Diagnose "möglicherweise Alzheimer" oder "wahrscheinlich Alzheimer" im Vergleich mit Kontrollpersonen auf charakteristische Weise verminderte Konzentrationen des immunreaktiven Apo C-I gemessen werden.

Wenn im Rahmen der vorliegenden Anmeldung von "immunreaktivem Apo C-I" oder "immundiagnostisch bestimmbarem Apo C-I" gesprochen wird, wird damit ein Analyt definiert, wie er mit Hilfe eines Immunoassays, insbesondere eine Immunoassays, wie er im experimentellen Teil der vorliegenden Anmeldung bzw. in der deutschen Patentanmeldung DE 103 43 815 A1 der Anmelderin näher beschrieben wird, bestimmbar ist.

Wie in der genannten DE 103 43 815 A1 - auf deren gesamten Inhalt, soweit dieser die Assaydurchführung und die Diskussion zu den damit bestimmbaren Apo C-I Molekülen bzw. Apo C-I-Abkömmlingen betrifft, zur Ergänzung der Offenbarung der vorliegenden Anmeldung ausdrücklich Bezug genommen wird - erläutert wird, werden mit einem Immunoassay der genannten Art in Blut von gesunden Kontrollpersonen solche Apo C-I-Anteile bestimmt, die eine Bindefähigkeit gegenüber hydrophoben Molekülstrukturen bzw. hydrophoben Oberflächen aufweisen und die durch Umsetzung mit einem geeigneten Material für die hydrophobe Ausschlusschromatographie (z.B. Octylsepharose) aus der Probe entfernbar sind.

Das auf die beschriebene Weise bestimmbare Apo C-I bzw. der entsprechende Apo C-I-Abkömmling wird dabei auch als "freies Apolipoprotein C-I" bezeichnet. Es weist die Eigenschaften auf, aus einer Serum- oder Plasma-Probe (in PBS Verdünnung) heraus an hydrophobe Molekülstrukturen, z.B. die Octylreste eines hydrophoben Octylsepharose-Chromatographie-Materials, gebunden zu werden, von dem es unter typischen Bedingungen für die Elution von Proteinen, insbesondere mit verdünnter Essigsäure, eluiert werden kann. Die Verwendung des Begriffs "freies Apolipoprotein C-I" bedeutet jedoch nicht notwendigerweise, daß das durch hydrophobe Interaktionschromatographie abtrennbare Material in den Ursprungsproben völlig frei vorliegen muss. Assoziate bzw. Aggregate, auch mit Lipiden, die unter den Versuchsbedingungen beim Kontakt mit Octylsepharose unter Bindung des Apolipoproteins C-I an das Chromatographiermaterial aufgebrochen werden, sind ebenfalls als "freies Apolipoprotein C-I" im Sinne der Verwendung dieses Begriffs anzusehen.

Wie der genannten DE 103 43 815 A1 zu entnehmen ist, erkennt der genannte Immunoassay im Blut von Krebspatienten auch eine Apo C-I-Fraktion, die nicht an Octylsepharose bindet und deren Auftreten für Tumorerkrankungen charakteristisch zu sein scheint. Ggf. wäre daher im Rahmen der Gesamtdiagnose auf eine Demenzerkrankung bzw. auf deren Vorstufen unter Verwendung der bei der Bestimmung des immunreaktiven Apo C-I gewonnenen Messwerte auszuschließen, dass die Messwerte bei dem jeweiligen Patienten durch eine Krebserkrankung verfälscht werden. Das kann beispielsweise auf die in der DE 103 43 815 A1 beschriebene Weise erfolgen, indem man prüft, ob sich die gemessenen Konzentrationswerte durch einen Kontakt der Probe mit z.B. Octylsepharose verändern.

Das gemäß der vorliegenden Erfindung zu bestimmende immunreaktive Apo C-I umfasst neben Analyten, die das vollständige Peptid Apo C-I darstellen oder enthalten, auch "Apo C-I Abkömmlinge". Darunter sind insbesondere immunreaktive Apo

C-I-Fragmente und Aggregate zu verstehen, insbesondere solche, die sich in dem genannten Sandwich-Immunoassay wie das freie Protein Apolipoprotein C-I verhalten. Die "Abkömmlinge" können z.B. um einzelne Aminosäuren oder Aminosäuresequenzen verkürzte Apolipoprotein C-I-Moleküle sein, oder auch - z.B. durch Aggregation - sterisch oder konformationell veränderte vollständige Apolipoprotein C-I-Moleküle.

Dass auch die Bestimmung solcher Apo C-I-Abkömmlinge von der Erfindung umfasst sein soll, trägt den bekannten Tatsachen Rechnung, dass Immunoassays normalerweise nicht zwischen unterschiedlichen Analyten unterscheiden können, wenn die Unterschiede außerhalb der für die Antikörperbindung genutzten Molekülabschnitte liegen, d.h. im Falle eines Sandwich-Immunoassays in Endbereichen des erfassten Moleküls außerhalb der von den beiden Bindungsstellen für die Antikörper begrenzten Aminosäuresequenz. Ferner soll der weiteren bekannten Tatsache Rechnung getragen werden, dass dann, wenn peptidische Analyten in der Zirkulation auftreten, stets auch mit dem Auftreten ihrer Abbauprodukte in Form von Peptidfragmenten zu rechnen ist. Die Konzentrationen derartiger Fragmente sind in der Regel in etwa proportional zu der Konzentration des Ausgangspeptids, wobei die Konzentrationsunterschiede Stabilitätsunterschiede bzw. unterschiedliche Geschwindigkeiten des "Clearings" der Peptide bzw. Fragment durch weiteren proteolytischen Abbau oder durch Ausschleusung aus dem Kreislauf z.B. über die Nieren widerspiegeln.

Soweit in der Literatur eine Diskussion von Apo C-I im Zusammenhang mit der Alzheimer Krankheit gefunden werden kann, handelt es sich ausschließlich um Untersuchungen zur Apolipoprotein C-I Expression in Extrakten von Gehirngewebe Verstorbener, jedoch nicht in der Zirkulation lebender Patienten (vgl. 10). Angesichts der Existenz der Blut-Hirn-Schranke (blood-brain barrier, BBB), die einen Schrankeneffekt für den Übergang von z.B. proteinischen Substanzen

zwischen dem Gehirn und der Zirkulation ausübt, können aus Untersuchungen mit Gehirngewebeextrakten keine Schlüsse bezüglich des Auftretens bzw. der Konzentration von proteinischen Substanzen in der Zirkulation gezogen werden.

Soweit im Rahmen der in der DE 103 43 815 A1 beschriebenen chromatographischen Untersuchungen auch Fraktionen aus Seren von zwei Alzheimer-Patienten vermessen wurden, wurden keine statistisch signifikanten Ergebisse erhalten, die einen Schluss bezüglich eines Zusammenhangs zwischen der Konzentration des immunreaktiven Apo C-I und verschiedenen Stufen von Demenzerkrankungen bzw. der Alzheimer-Krankheit erlauben würden.

Die nachfolgend im experimentellen Teil beschriebenen Messergebnisse in EDTA-Plasmaproben von 60 augenscheinlich gesunden Normalpersonen (symptomfreien Kontrollen) und 196 Patienten mit leichten bis schweren kognitiven Störungen gemäß den eingangs beschrieben Gruppen (b) bis (d) ergab erstmals eine klare, diagnostisch signifikante Korrelation zwischen den für immunreaktives Apo C-I gefundenen Konzentrationen und der Schwere der Demenzsymptome in Form kognitiver Störungen, wobei die gemessenen Konzentrationen in signifikanter Weise mit der Schwere von AD-Vorstufen korrelierten und damit die klinische Unterscheidung der verschiedenen Patientengruppen widerspiegelten.

Die erfindungsgemäße Bestimmung von immunreaktivem Apo C-I im Rahmen der Diagnostik von neurodegenerativen Erkrankungen wird insbesondere als Messung vorgeschlagen, die die parallele Bestimmung physiologischer bzw. klinischer und neuropsychologischer Parameter und anderer Biomarker ergänzt und für differentialdiagnostische Zwecke verfeinert.

Das Verfahren wird daher bevorzugt im Rahmen einer Multiparameter-Bestimmung durchgeführt, bei der gleichzeitig mindestens ein weiterer für das jeweilige Krankheitsbild aus-

sagekräftiger biochemischer oder physiologischer Parameter bestimmt wird und bei der ein Messergebnis in Form eines Satzes von mindestens zwei Messgrößen gewonnen wird, der zur Feindiagnostik der neurodegenerativen Erkrankung ausgewertet wird.

Neben der Bestimmung des immunreaktiven Apo C-I kann z.B. wenigstens ein weiterer biochemischer Parameter bestimmt werden, der aus den Gruppen der natriuretischen Peptide, Entzündungsmediatoren, Komplementkomponenten, Cytokine, Chemokine, der Blutkoagulanzien und fibrinolytischen Faktoren, Akutphasenproteine und radikalischen Verbindungen ausgewählt ist. Als Co-Parameter sind insbesondere auch zu nennen diejenigen Parameter, die in den älteren deutschen Patentanmeldungen der Anmelderin mit den Aktenzeichen 10 2005 034 174.8 (midregionales Proadrenomedullin), 10 2005 036 094.7 (liquordiagnostische Bestimmung von Procalcitonin), 10 2006 027 818.6 und 10 2006 023 175.9 diskutiert werden sowie der Parameter CPS-1 (Carbamoylphosphat Synthetase 1), zu dem sich relevante Diskussionen im Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen in den Anmeldungen EP 05023420.2 und DE 10 2006 021 406.4 finden.

Es ist dabei vorgesehen, dass das erfindungsgemäße Verfahren auch als Simultanbestimmung mittels einer Chiptechnologie-Messvorrichtung oder einer immunchromatographischen Messvorrichtung erfolgen kann und die Auswertung der dabei ggf. erhaltenen komplexen Messergebnisse mit Hilfe eines geeigneten Computerprogramms erfolgen kann.

Obwohl die Untersuchungen bisher auf Plasmaproben von Patienten beschränkt waren, die Anzeichen von Vorstufen von AD zeigten bzw. für die die Diagnose "wahrscheinlich Alzheimer" gestellt worden war, gehen die Erfinder davon aus, dass - möglicherweise mit unterschiedlichen typischen Konzentrationsbereichen - auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere bei vaskulärer Demenz (VAD) und

Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB), charakteristische Veränderungen der Konzentrationen des immunreaktiven Apo C-I in Patientenplasmen feststellbar sein könnten.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Messergebnissen und einer Figur noch näher erläutert.

Figur 1 zeigt die Ergebnisse der Messung der Konzentrationen des immunreaktiven Apo C-I, wie sie mit dem im experimentellen Teil beschriebenen Sandwich-Immunoassay bestimmbar sind, und zwar in EDTA-Plasmen von 60 gesunden Kontrollpersonen, und von 196 Patienten mit kognitiven Störungen verschiedener Schwere, die den o.g. Gruppen (b), (c) und (d), d.h. den Gruppen "SKS" (50 Patienten), "LKS mgl AD" (46 Patienten) und "ws AD" (100 Patienten) entsprachen.

Experimenteller Teil

1. Apolipoprotein C-I-Immunoassay

Die direkte Messung von immundiagnostisch bestimmbarem Apo C-I in Plasma erfolgte mit dem gleichen Sandwich-Immunoassay, wie er bereits in der deutschen Patentanmeldung DE 103 43 815 A1 der Anmelderin beschrieben wird. Im einzelnen ist dieser Assay wie folgt aufgebaut:

Für die direkte immundiagnostische Bestimmung von Apolipoprotein C-I im Serum wurde aus den nachfolgend beschriebenen Bestandteilen ein Immunoassay vom Sandwich-Typ aufgebaut:

a) Coated Tubes: Polystyrolröhrchen (Greiner) wurden mit einem kommerziell erhältlichen polyklonalen affinitätsgereinigten Antikörper gegen Apolipoprotein C-I (Bezugsquelle: Acris Antibody, Bad Neuheim, Deutschland) beschichtet. Der Antikörper war nach Herstellerangaben durch Immunisierung von Kaninchen mit humanen Apo C-I erhalten und über eine Sepharose-Affinitätssäule mit humanem Apolipoprotein C-I aufgereinigt worden. Zur Beschichtung wurden 0,2 µg Antikörper in 300 µl PBS an Polystyrolröhrchen (Greiner, Deutschland) gebunden, die mit Schaf-Anti-Kaninchen IgG-Antikörper (Sigma) beschichtet waren. Die Bindung wurde nach 18 Stunden bei Raumtemperatur beendet. Anschließend wurden die Röhrchen 2 mal mit je 3 ml 0,5% Rinderserumalbumin (BSA) in PBS gewaschen. Nach ihrer Trocknung in Vakuum wurden die Röhrchen als Festphase für den Apolipoprotein C-I-Immunoassay verwendet.

b) Akridiniumester-markierter Antikörper: 100 µg eines anderen Antikörpers gegen humanes Apolipoprotein C-I (aus Kaninchen; Bezugsquelle: Academie Bio-Medical Company, Texas, USA) in 100 µl PBS wurden mit 10 µg Akridinium-NHS-Ester (in 10 µl Acetonitril) umgesetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Reinigung

des markierten Antikörpers unter Abtrennung unumgesetzter Bestandteile der Reaktionsmischung durch HPLC an SW 300 (Waters). Für seine Verwendung im Immunoassey wurde der markierte Antikörper in PBS mit 0,5% BSA und 1 mg/ml Kaninchen IgG zur Absättigung der Röhrchenwände auf ca. 1 Mio. RLU/300 µl (RLU = relative Lichteinheiten) eingestellt.

2. Durchführung der immundiagnostischen Bestimmung von Apolipoprotein C-I in Serum- bzw. Plasma-Proben

Serum- bzw. Plasmaproben wurden 1:10 000 mit PBS, 0,5% BSA verdünnt. Davon wurden jeweils 300 µl in die mit dem immobilisierten Antikörper beschichteten o.g. Röhrchen pipettiert und anschließend für 4 Stunden bei Raumtemperatur unter Schütteln (300 U/min auf einem Heidolph-Kreisschüttler) inkubiert. Der Röhrcheninhalt wurde anschließend mit PBS ausgewaschen (4-maliges Befüllen und Dekantieren mit jeweils 1 ml PBS), und an die Röhrchenwand gebundenes Apolipoprotein C-I wurde innerhalb von 20 Stunden bei Raumtemperatur und 300 U/min mit 300 µl je Röhrchen des akridiniumestermarkierten Anti-Apolipoprotein C-I-Antikörpers umgesetzt. Danach wurde ungebundener markierter Antikörper durch 5-maliges Waschen mit je 1 ml PBS entfernt, und die verbleibende Chemilumineszenz wurde auf bekannte Weise in einem Berthold Luminometer 952 T gemessen.

Zur Kalibrierung des Assays wurde ein synthetisches Apolipoprotein C-I verwendet. Eine typische Standardkurve, wie sie für den obigen Assay erhalten wird, ist in Fig. 3 der bereits genannten DE 103 43 815 A1 gezeigt.

3. Messung der Apo C-I-Immunreaktivität im Plasma von gesunden Kontrollen und Patienten mit kognitiven Störungen verschiedenen Schweregrads

Zur Ermittlung eines Bezugswerts für die Konzentration des immundiagnostisch bestimmbaren "freien" Apo C-I wurde eine

Messung in EDTA-Plasmen von 60 symptomfreien Kontrollpersonen durchgeführt, die weder Symptome kognitiver Störungen zeigten noch an irgendeiner anderen erkennbaren Erkrankung (Tumorerkrankungen; schwere Infektion oder Entzündung) litten, für die bekannt ist, dass sie die Apo C-I-Spiegel in der Zirkulation beeinflussen. Für die Kontrollgruppe wurde ein Mittelwert (Median) für die gemessene Apo C-I-Konzentration von 332 µg/ml ermittelt.

Als Patientenkollektiv dienten Patienten mit Demenzerscheinungen in Form kognitiver Störungen verschiedener Schwere, aufgrund derer eine Zuordnung der einzelnen Patienten zu einer der o.g. Gruppen (b), (c) bzw (d) erfolgt war.

Die gemessenen Konzentrationen an immunreaktivem Apo C-I im Plasma von gesunden Kontrollen und Patienten mit kognitiven Störungen sind in Figur 1 gezeigt.

Die ermittelten Zahlenwerte in Form der sog. Mediane für die verschiedenen Patientengruppen waren wie folgt:

	Median Kontrollen (n = 60)	Median SKS (n = 50)	Median LKS mgl AD (n = 46)	Median ws AD (n = 100)
Apo C-I (Angaben in µg/ml)	332,9	288,5	258,5	260,0

Die Konzentrationen des in Plasmen immundiagnostisch bestimmbaren Apo C-I, erkennbar an den Werten für die Mediane der verschiedenen Patientengruppen, sinken mit der Schwere der Symptome in der Richtung:

$$\text{Kontrollen} > \text{SKS} > \text{LKS mgl AD} \approx \text{ws AD}$$

klar ab.

Aus der bereits erwähnten älteren DE 103 43 815 A1 ist es bekannt, dass die messbaren Konzentrationen von Apo C-I auch bei anderen Krankheiten oder physiologischen Zuständen

Abweichungen von den bei Kontrollpersonen messbaren Werten zeigen; die meisten einschlägigen Erkrankungen wie z.B. Sepsis oder Tumoren sind jedoch klinisch in der Regel einfach diagnostisch von Demenzerkrankungen abgrenzbar und ihren evtl. Auswirkungen können daher bei der Stellung einer Diagnose angemessen berücksichtigt werden.

Obwohl Apo C-I somit daher kein gehirnspezifischer Parameter ist, eignet sich die Messung der Apo C-I-Immunreaktivität in der Zirkulation (Plasma, Serum) angesichts der o.g. Korrelationen sehr gut für Zwecke der unterstützenden AD-Frühdiagnostik.

Literatur

1. SELKOE D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiological Reviews 81: 741-766

2. Boetsch T., Stübner S. Auer S., Klinisches Bild, Verlauf und Prognose, Kapitel 5 in: Hampel, Padberg, Möller (Hrsg.), Alzheimer Demenz - Klinische Verläufe, diagnostische Möglichkeiten, moderne Therapiestrategien; WVG mbH Stuttgart 2003

3. Boetsch T., Operationalisierte Demenzdiagnostik, Kapitel 6.1 in: Hampel, Padberg, Möller (Hrsg.), Alzheimer Demenz - Klinische Verläufe, diagnostische Möglichkeiten, moderne Therapiestrategien; WVG mbH Stuttgart 2003

4. Reisberg B., Ferris S.H., de Leon M.J., Crook T., 1982, The global deterioration scale for assessment of primary degenerative dementia, Am J Psychiatry 139:1136-1139

5. McKhann G., Drachmann D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan E.M. 1984, Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ARDA work grop under the auspices of departement of health services task force on Alzheimer's disease, Neurology 24: 939-944

6. MCKEITH I. G. (2002). Dementia with lewy bodies. British Journal of Psychiatry 180: 144-147

7. FRANK R. A., GALASKO D., HAMPEL H., HARDY J., DE LEON M. J., MEHTA P. D., ROGERS J., SIEMERS E., TROJANOWSKI J. Q. (2003). Biological markers for therapeutic trials in Alzheimer's disease. Proceedings of the biological markers working group; NIA initiative on neuroimaging in Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging 24: 521-536

8. GROWDON J. H., SELKOE D. J., ROSES A., TROJANOWSKI J. Q., DAVIES P., APPEL S. et al. [Working Group Advisory Committee].(1998). Consensus report of the Working Group on Biological Markers of Alzheimer's Disease. [Ronald und Nancy Reagan Institute of the Alzheimer's Association and National Institute on Aging Working Group on Biological Biomarkers of Alzheimer's Disease]. Neurobiology of Aging 19: 109-116

9. TEUNISSEN C. E., DE VENTE J., STEINBUSCH H. W. M., DE BRUIJN C. (2002). Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid. Neurobiology of Aging 23:485-508

10. C. PETIT-TURCOTTE, S.M. STOHL, U. BEFFERT, J.S. COHN, N. AUMONT, M. TREMBLAY, D. DEA, LIN YANG, J. POIRIER, and N.S. SHACHTER (2001). Apolipoprotein C-I Expression in the Brain in Alzheimer's Disease, Neurobiology of Disease 8, 953-963.

Patentansprüche

1. *In vitro* Verfahren zur Erkennung und Früherkennung, zur Bestimmung des Schweregrads und zur Verlaufsbeurteilung und Prognose von neurodegenerativen Erkrankungen, bei dem man in einer Serum- oder Plasmaprobe eines Patienten, der an subjektiven oder objektiv nachweisbaren kognitiven Störungen leidet, mit Hilfe eines immundiagnostischen Bestimmungsverfahrens die Konzentration des immunreaktiven Apolipoproteins Apo C-I bestimmt, und bei dem man auf der Basis der gemessenen Konzentration Schlüsse hinsichtlich des Vorliegens einer neurodegenerativen Erkrankung oder einer für diese typischen Frühform davon oder hinsichtlich des Verlaufs der Erkrankung und/oder des Erfolgs der Bemühungen zu ihrer Abmilderung oder Verhinderung zieht.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das immundiagnostische Bestimmungsverfahren ein Immunoassay vom Sandwichtyp ist.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, die neurodegenerative Erkrankung eine Demenzerkrankung ist, die ausgewählt ist aus einer Gruppe, die die Alzheimer Demenz (AD), Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB), frontotemporale Demenz (FTD) und verschiedene Formen der vaskulären Demenz (VD) umfaßt.

4. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es im Rahmen der Alzheimer-Diagnostik zur Erkennung von Frühformen der Alzheimer Demenz (AD) durchgeführt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass es im Rahmen einer Multiparameter-Bestimmung durchgeführt wird, bei der gleichzeitig mindestens ein weiterer für das jeweilige Krankheitsbild aussagekräftiger

biochemischer oder physiologischer Parameter bestimmt wird und bei der ein Messergebnis in Form eines Satzes von mindestens zwei Messgrößen gewonnen wird, der zur Feindiagnostik der neurodegenerativen Erkrankung ausgewertet wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass im Rahmen der Multiparameter-Bestimmung neben der Bestimmung des immunreaktiven Apo C-I wenigstens ein weiterer biochemischer Parameter bestimmt wird, der aus den Gruppen der natriuretischen Peptide, Entzündungsmediatoren, Komplementkomponenten, Cytokine, Chemokine, der Blutkoagulanzien und fibrinolytischen Faktoren, Akutphasenproteine und radikalischen Verbindungen ausgewählt ist.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Multiparameter-Bestimmung als Simultanbestimmung mittels einer Chiptechnologie-Messvorrichtung oder mittels einer immunchromatographischen Messvorrichtung erfolgt.

8. Verfahren nach Anspruch einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Auswertung des komplexen Messergebnisses der Multiparameter-Bestimmung mit Hilfe eines Computerprogramms erfolgt.

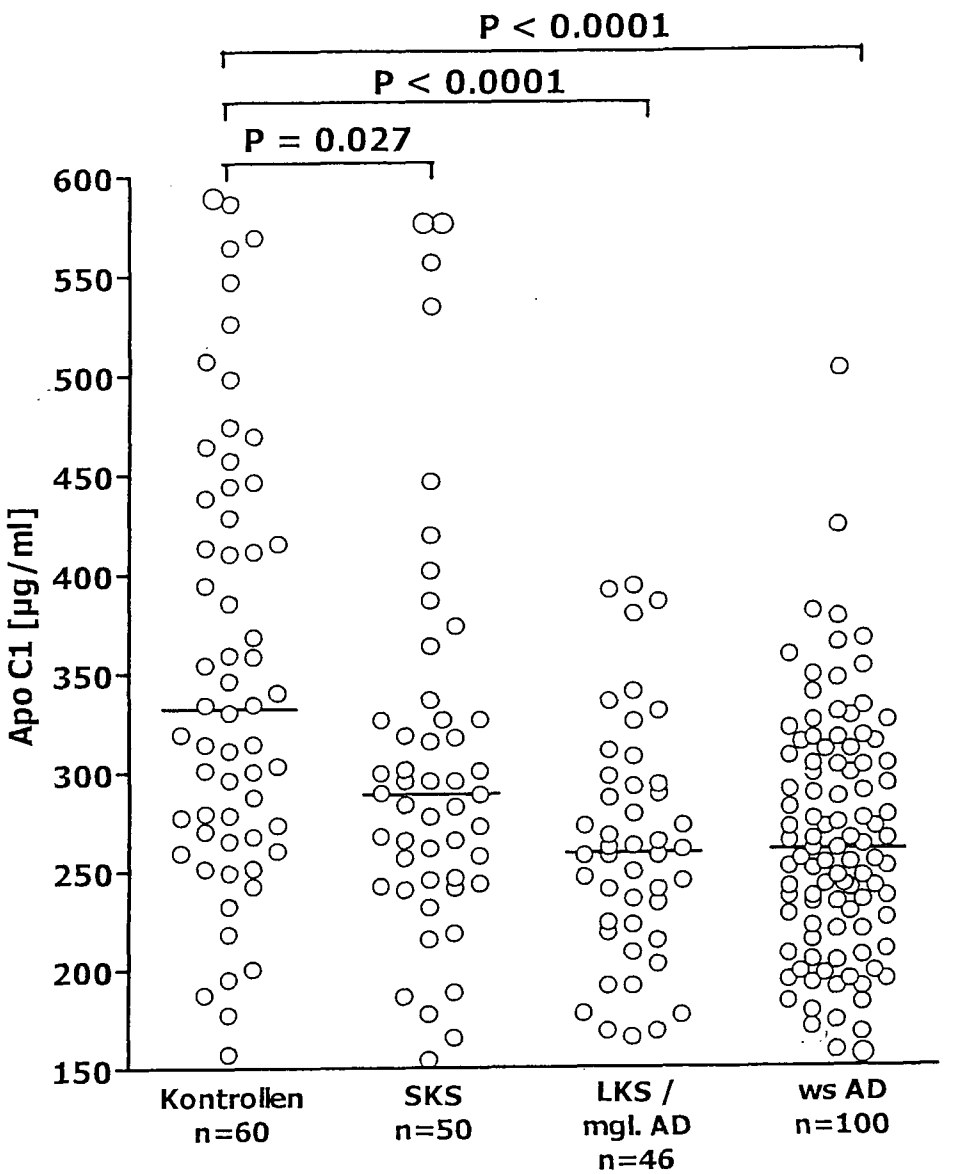

P < 0.0001
P < 0.0001
P = 0.027
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
Apo C1 [µg/ml]
Kontrollen n=60
SKS n=50
LKS / mgl. AD n=46
ws AD n=100

FIG. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/010331

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 103 43 815 A1 (BRAHMS AG [DE]) 14 April 2005 (2005-04-14) cited in the application abstract claims 1-10	1-8
A	KI CHANG-SEOK ET AL: "Genetic association of an apolipoprotein C-1 (APOC1) gene polymorphism with late-onset Alzheimer's disease" NEUROSCIENCE LETTERS, vol. 319, no. 2, 15 February 2002 (2002-02-15), pages 75-78, XP002471540 ISSN: 0304-3940 abstract	1-8

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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 document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 März 2008	04/04/2008

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Klee, Barbara

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/010331

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6 027 896 A (ROSES ALLEN D [US] ET AL) 22 February 2000 (2000-02-22) claims 1,9,20	1-8
A	SHI J ET AL: "Association between apolipoprotein CI HpaI polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in Chinese." ACTA NEUROLOGICA SCANDINAVICA, vol. 109, no. 2, February 2004 (2004-02), pages 140-145, XP002471541 ISSN: 0001-6314 abstract	1-8
P,A	EP 1 780 287 A (BRAHMS AG [DE]) 2 May 2007 (2007-05-02) claims 1-12	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2007/010331

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 10343815 A1	14-04-2005	CN 1856707 A	01-11-2006
		EP 1664789 A1	07-06-2006
		WO 2005038461 A1	28-04-2005
		JP 2007506075 T	15-03-2007
US 6027896 A	22-02-2000	NONE	
EP 1780287 A	02-05-2007	WO 2007048617 A1	03-05-2007

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2007/010331

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
G01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 103 43 815 A1 (BRAHMS AG [DE]) 14. April 2005 (2005-04-14) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Ansprüche 1-10	1-8
A	KI CHANG-SEOK ET AL: "Genetic association of an apolipoprotein C-1 (APOC1) gene polymorphism with late-onset Alzheimer's disease" NEUROSCIENCE LETTERS, Bd. 319, Nr. 2, 15. Februar 2002 (2002-02-15), Seiten 75-78, XP002471540 ISSN: 0304-3940 Zusammenfassung	1-8

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen [X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
5. März 2008	04/04/2008

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Klee, Barbara

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (April 2005)

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 6 027 896 A (ROSES ALLEN D [US] ET AL) 22. Februar 2000 (2000-02-22) Ansprüche 1,9,20	1-8
A	SHI J ET AL: "Association between apolipoprotein CI HpaI polymorphism and sporadic Alzheimer's disease in Chinese." ACTA NEUROLOGICA SCANDINAVICA, Bd. 109, Nr. 2, Februar 2004 (2004-02), Seiten 140-145, XP002471541 ISSN: 0001-6314 Zusammenfassung	1-8
P,A	EP 1 780 287 A (BRAHMS AG [DE]) 2. Mai 2007 (2007-05-02) Ansprüche 1-12	1-8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2007/010331

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 10343815 A1	14-04-2005	CN 1856707 A	01-11-2006
		EP 1664789 A1	07-06-2006
		WO 2005038461 A1	28-04-2005
		JP 2007506075 T	15-03-2007
US 6027896 A	22-02-2000	KEINE	
EP 1780287 A	02-05-2007	WO 2007048617 A1	03-05-2007