

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-519583

(P2022-519583A)

(43)公表日 令和4年3月24日(2022.3.24)

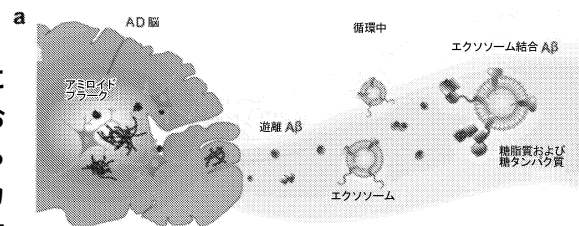
(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G 0 1 N 33/68	Z N A 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全52頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-544901(P2021-544901)	(71)出願人	507335687
(86)(22)出願日	令和2年1月30日(2020.1.30)		ナショナル ユニヴァーシティ オブ
(85)翻訳文提出日	令和3年9月6日(2021.9.6)		シンガポール
(86)国際出願番号	PCT/IB2020/050764		シンガポール・119077・シンガポ
(87)国際公開番号	WO2020/157705		ール・ローワー・ケント・リッジ・ロー
(87)国際公開日	令和2年8月6日(2020.8.6)		ド・21
(31)優先権主張番号	10201900940Y	(71)出願人	520182947
(32)優先日	平成31年1月31日(2019.1.31)		ナショナル ユニバーシティ ホスピタル
(33)優先権主張国・地域又は機関	シンガポール(SG)		(シンガポール) プライベート リミテ
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL (SINGAPORE) PTE LTD
			シンガポール共和国 シンガポール 119228, #13-00, 1イー ケント 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 神経変性疾患を検出する方法

(57)【要約】

本開示は、概して、神経学の分野に関する。具体的には、本開示は、対象の神経変性疾患を検出する方法、および該対象を治療する方法に関する。方法は、対象から採取された試料中のエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルを検出する工程を含み、基準と比較して増加したエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルは、対象が神経変性疾患に罹患していることを示す。アミロイドーシスまたは神経変性疾患を発症するリスクのある対象を検出するための方法、対象のアミロイドーシスまたは神経変性疾患を検出し、かつ治療するための方法、ならびに試料中のバイオマーカーの凝集状態を決定する方法も、記載される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象の神経変性疾患またはアミロイドーシスを検出する方法であって、
対象から採取された試料中のエクソソーム結合凝集バイオマーカのレベルを検出する工程

を含み、

基準と比較して増加したエクソソーム結合凝集バイオマーカのレベルが、対象が神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患していることを示す、方法。

【請求項 2】

前記バイオマーカが、 $A\beta$ 、APP、 α -Syn、タウ、APOE、SOD1、TDP-43、バスマン、および／またはフィブロネクチンからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

10

【請求項 3】

エクソソーム結合バイオマーカの分子サブタイプのレベルを検出する工程を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

$A\beta$ の分子サブタイプが、 $A\beta 42$ 、 $A\beta 40$ 、 $A\beta 39$ 、または $A\beta 38$ である、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

バイオマーカが、前原線維凝集体である、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

CD63、CD9、CD81、ALIX、TSG101、フロチリン-1、フロチリン-2、LAMP-1、HSP70、HSP90、RNA、およびDNAからなる群より選択されるエクソソームバイオマーカを検出する工程

20

をさらに含み、

前記エクソソームバイオマーカが、前記エクソソーム結合バイオマーカと共局在している、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

NCAM、L1CAM、CHL-1、およびIRS-1からなる群より選択される神経細胞バイオマーカを検出する工程

をさらに含み、

前記神経細胞バイオマーカが、前記エクソソーム結合バイオマーカと共局在している、請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 8】

神経変性疾患が、アルツハイマー病、軽度認知障害、認知症、血管性認知症、血管性軽度認知障害、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、進行性核上性麻痺、および／またはタウオパシーからなる群より選択される、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

神経変性疾患が、アルツハイマー病および軽度認知障害からなる群より選択される、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 10】

神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患している対象を治療する工程を含む、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

試料が、組織生検、血液、血漿、血清、または脳脊髄液である、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

脳撮像研究とさらに相互に関連づけられる、請求項1～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項 13】

神経変性疾患またはアミロイドーシスを発症するリスクのある対象を検出する方法であっ

50

て、

対象から採取された試料中のエクソソーム結合凝集バイオマーカのレベルを検出する工程

を含み、

基準と比較して増加したエクソソーム結合凝集バイオマーカのレベルが、対象が神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患していることを示す、方法。

【請求項 14】

対象の神経変性疾患またはアミロイドーシスを検出し、かつ治療する方法であって、以下の工程：

(a) 対象から採取された試料中のエクソソーム結合凝集バイオマーカのレベルを検出する工程であって、基準と比較して増加したエクソソーム結合凝集バイオマーカのレベルが、対象が神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患していることを示す、工程；および

10

(b) 神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患している対象を治療する工程を含む、方法。

【請求項 15】

試料中のバイオマーカの凝集状態を決定する方法であって、

試料中のエクソソーム結合バイオマーカのレベルを検出する工程

を含み、

基準と比較して増加したエクソソーム結合バイオマーカのレベルが、バイオマーカの凝集度の指標となる、方法。

20

【請求項 16】

エクソソーム結合バイオマーカのレベルを検出する工程の前に、試料をエクソソーム集団に接触させる工程を含む、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

試料中の凝集バイオマーカが、非凝集バイオマーカと比較して、エクソソームに優先的に結合する、請求項 15 または 16 記載の方法。

【請求項 18】

試料が対象から採取される、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

30

基準と比較して増加したバイオマーカの凝集度が、対象の神経変性疾患またはアミロイドーシスの指標となる、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患している対象を治療する工程を含む、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

前記治療する工程が、治療有効量の 1 つもしくは複数の薬物、またはそれらの組み合わせを対象に投与することを含む、請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

薬物が、コリンエステラーゼ阻害剤、NMDA 受容体アンタゴニスト、コリンエステラーゼ阻害剤と NMDA 受容体アンタゴニストとの組み合わせ、BACE1 阻害剤、抗体、タンパク質凝集阻害剤、プロテアソーム阻害剤、小分子、遺伝子治療、抗タウ薬、またはそれらの組み合わせから選択される、請求項 21 記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2019 年 1 月 31 日に提出された METHOD OF DETECTING A NEURODEGENERATIVE DISEASE という名称のシンガポール特許仮出願第 10201900940Y 号の優先権を主張するものである。

50

【0002】

分野

本開示は、概して、神経学の分野に関する。具体的には、本開示は、対象のアミロイドーシスまたは神経変性疾患を検出する方法、ならびに該対象を観察し、かつ治療する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

表面プラズモン共鳴（SPR）検知は、生体分子間の、たとえば抗体と抗原との相互作用を特徴づけるのに、検査室で広く用いられている技法である。この技法は、典型的には、リガンドキャプチャー分子を金属表面に固定化すること、およびリガンドがキャプチャー分子に結合したときの屈折率の変化を測定することを基本とする。この技法は標識いらずの技法であり、分子間の相互作用の高感度な測定に、特殊なタグまたは色素を使用する必要がない。現在、認知症、肝炎、糖尿病、および癌といった種々の病態をもつ患者の診断用に検査室で使えるよう開発が進んでいる。

【0004】

認知症は、21世紀の公衆衛生の危機である。重度の認知症、アルツハイマー病（AD）の最も一般的な形態は、進行性の、記憶および認知機能の喪失を特徴とする。罹患した人には、セルフケア、社会的および職業的機能に著しい制約がみられる。しかし、こうした本格的な臨床症状が現れるずっと前から、ADの分子的特徴が顕現し、進む場合がある。それらには、細胞外アミロイド β （A β ）プラークおよび細胞内タウ神経原線維変化が含まれる。この神経病理は複雑かつ進行性であるため、疾患改変治療の成功には早期の検出および介入が欠かせないと考えられている。

【0005】

ところが、現在のADの診断および疾患観察は主観的であり、かつ後期に実施される。それらは、公表基準（published criteria）を用いる臨床的・神経心理学的査定によりなされている。そうしたアプローチは、症状が微妙であり、かつさまざまな他の障害とかなり重なっている初期の段階では特に、感度および特異性に欠ける。脳脊髄液測定および陽電子放射断層撮影法（PET）による脳のアミロイドプラーク撮像などの新たな分子診断アッセイの開発が進んでいるが、これらの検査は侵襲的な腰椎穿刺を必要とするため、または広く臨床適用するにはあまりにも高価であるため、制約に直面している。その結果、初期の診断および疾患観察を支援するためのADの血清バイオマーカーを見つけることに、非常に高い関心が寄せられている。

【0006】

したがって、上記の問題の1つまたは複数を克服する、または少なくとも軽減する必要がある。

【発明の概要】

【0007】

本明細書では、対象のアミロイドーシスまたは神経変性疾患を検出する方法、ならびに該対象を観察し、かつ治療する方法を開示する。

【0008】

一局面では、対象のアミロイドーシスまたは神経変性疾患を検出する方法が提供され、該方法は、

対象から採取された試料中のエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルを検出する工程

を含み、基準と比較して増加したエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルは、対象が神経変性疾患に罹患していることを示す。

【0009】

一局面では、アミロイドーシスまたは神経変性疾患を発症するリスクのある対象を検出する方法が提供され、該方法は、

10

20

30

40

50

対象から採取された試料中のエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルを検出する工程

を含み、基準と比較して増加したエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルは、対象が神経変性疾患に罹患していることを示す。

【0010】

一局面では、対象のアミロイドーシスまたは神経変性疾患を検出し、かつ治療する方法が提供され、該方法は、以下の工程：

(a)対象から採取された試料中のエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルを検出する工程であって、基準と比較して増加したエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルは、対象が神経変性疾患に罹患していることを示す、工程；および

10

(b)神経変性疾患に罹患している対象を治療する工程を含む。

【0011】

一局面では、試料中のバイオマーカーの凝集状態を決定する方法が提供され、該方法は、試料中のエクソソーム結合バイオマーカーのレベルを検出する工程

を含み、基準と比較して増加したエクソソーム結合バイオマーカーのレベルは、バイオマーカーの凝集度の指標となる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

次に、本発明のいくつかの態様を、添付の図面を参照しながら、単なる非限定例として記載していく。

20

【0013】

【図1-1】図1：循環エクソソーム結合A β 分析用APEXプラットフォーム。(a)エクソソームはA β タンパク質と結合する。AD脳病理に見られるアミロイドプラークの主成分、A β タンパク質は、細胞外スペースへと放出される。エクソソームは、哺乳類細胞から盛んに分泌されるナノスケールの細胞外膜小胞である。エクソソームはその表面の糖タンパク質および糖脂質によって、放出されたA β タンパク質と結合することができる。(b)エクソソーム結合A β の透過型電子顕微鏡写真。神経細胞(SH-SY5Y)由来のエクソソームをA β 42凝集体で処理し、A β 42特異性抗体を介して金ナノ粒子(10 nm)で標識した。ナノ粒子は黒い点として見えている(赤い矢印で示す)。(c)APEXアッセイの概略。ナノスケールの高感度なプロファイリングを可能にするために、まずはエクソソームをプラズモンナノセンサーに免疫捕捉する(増幅前)。インサイチューの酵素的増幅により、不溶性光付着物を、センサーに結合したエクソソーム上に局在形成させる(増幅後)。この付着は、分子共局在分析に関し空間的に画定され、かつSPRシグナル増強に関し屈折率を変化させる。なお、酵素的増幅を補完するために、ナノセンサーを(酵素活性から離れて)裏面照射して、分析安定性を実現する。この付着の結果、ナノセンサーを透過した光の赤方偏移が得られる。(d)APEX増幅による透過スペクトル変化の代表的概略。特異的エクソソーム結合(前)、およびその後の増幅プロファイリング(後)を、APEXプラットフォームにより透過スペクトルシフト($\Delta\lambda$)として観察した。a.u.：任意単位。(e)アルツハイマー病(AD)、軽度認知障害(MCI)の患者、および認知障害ではない(NCI)対照の血液試料中のエクソソーム結合A β を、APEXプラットフォームを用いて測定した。この血液測定値と、対応する脳アミロイドプラーク沈着のPET撮像との相関をとった。(f)APEXマイクロアレイの写真。各センサーチップは、複合的測定用に、均一に製造されたプラズモン格子でできた6 x 10個の検知素子を含む。センサーの製造、特徴決定、および設計最適化については、それぞれ図7~10を参照されたい。

30

40

【図1-2】図1-1の説明を参照のこと。

【図2】APEXシグナル増幅および複合的プロファイリング。(a)段階的なAPEX透過スペクトル変化。一連の操作、つまりセンサーへの抗体(抗CD63)結合、エクソソーム結合、酵素標識、および酵素的付着を実施し、結果としてのスペクトルシフトを観察した

50

。酵素標識は有意な変化をもたらさなかったが、付着物の形成は、およそ400%のシグナル増強（****P < 0.0001、n.s.: 有意差なし、スチューデントのt検定）をもたらした。（b）APEXシグナル増幅と光付着物の面積範囲との比較。面積範囲の増加を、走査型電子顕微鏡（SEM）分析により決定した（****P < 0.0001、スチューデントのt検定）。すべてのデータをシグナル増幅前のものに対し正規化した。挿入図（右）は、APEX増幅の前および後のセンサー結合エクソソームのSEM画像を示す。（c）裏面照射を用いた有限差分時間領域シミュレーション。APEXセンサー設計は裏面照射により強化された電磁場の生成を可能にするが、金担持ガラス設計はそうではない。裏面照射は、（センサー上面で生じる）酵素活性が入射光に直接晒されるのを最小限化する。矢印は、照射の入射方向を示す。（d）APEX増幅動態のリアルタイムセンサーグラム。濃度の異なる光基質（3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド; 高:1 mg/ml、低:0.01 mg/ml）を用いて増幅効率を観測した。すべてのデータを、IgGアイソトープ対照抗体を用いて実施した陰性対照に対し正規化した。（e）APEX、ELISA、およびウェスタンブロッティングの検出感度の比較。増幅前および後のAPEX検出限界（点線）を、既知量のエクソソームの滴定およびそれらのCD63シグナルの測定により決定した。（f）APEXアッセイの標的タンパク質測定特異性。アミロイドβ（Aβ42）、アミロイド前駆タンパク質（APP）、アルファ-シヌクレイン（α-syn）、L1の近縁ホモログ（CHL1）、インスリン受容体基質1（IRS-1）、神経細胞接着分子（NCAM）、およびタウタンパク質に関するアッセイを開発した。すべてのアッセイで特異的な検出が実証された。ヒートマップシグナルはアッセイ（行）を正規化した。すべての測定を三つ組で実施し、a、b、d、およびeではデータを平均±標準偏差で示す。

【図3-1】図3：Aβ凝集体とエクソソームとの優先的結合。（a）Aβタンパク質凝集の概略。クラスターリングの度合いを変え、濾過法を用いて、小さいAβ42凝集体と大きいAβ42凝集体とをそれぞれ調製した。（b）Aβタンパク質凝集体の特徴決定。（左）透過型電子顕微鏡写真が、調製されたAβ42凝集体の球状形態を示した。（右）動的光散乱分析により、異なるサイズの調製物の単峰サイズ分布を確認した。（c）エクソソーム-Aβ結合分析の概略。Aβ42凝集体（小vs.大）をAPEXセンサーに固定化し、等濃度の神経細胞（SH-SY5Y）由来エクソソームで処理して、結合動態を決定した。すべてのエクソソーム結合データを、センサーに固定化されたそれぞれのAβ42凝集体表面積に対し正規化した（詳細は「方法」を参照されたい）。（d）エクソソーム結合動態のリアルタイムセンサーグラム。同様のサイズのウシ血清アルブミン（BSA）対照凝集体（図13参照）と比較して、エクソソームは、より強力にAβ42凝集体と結合した。重要なことに、エクソソームは、より小さいAβ42凝集体との結合親和性（左）と比較して、より大きいAβ42凝集体とののはるかに強い親和性（右）を実証した。y軸上のスケールの違いに注意されたい。すべての結合親和性（KD）は、正規化エクソソーム結合データから、かつBSA対照に対して相対的に決定した。KD（小）/KD（大）=5.27。（e）さまざまな細胞外小胞とAβ42凝集体との結合の差。小胞は、種々の細胞起源、つまり神経細胞、グリア細胞、内皮細胞、単球、赤血球、血小板、および上皮細胞にそれぞれに由来し、等濃度で結合分析に用いられた。最初に、APEXプラットフォームを用いて、各小胞とAβ42機能化センサーとの直接の結合を測定した（直接）。次に、各細胞起源について、結合した小胞の起源特異性マーカー（細胞起源特異性マーカー）または汎エクソソームマーカー（すなわち、CD63、汎エクソソームマーカー）を標識し、関連のAPEXシグナル増幅を測定した。すべての測定をIgGアイソトープ対照抗体に対して相対化し、三つ組で実施した。eではデータを平均±標準偏差で示す。

【図3-2】図3-1の説明を参照のこと。

【図3-3】図3-1の説明を参照のこと。

【図4】循環エクソソーム結合Aβと脳撮像との臨床的相関。（a）臨床被験者らの代表的な復元PET脳画像であり、脳アミロイドプラーク負荷が増加していくのがわかる。特定脳領域の標準化取込値比SUVRを、平均小脳灰色物質強度に対して相対的に正規化して、脳アミロイドプラーク負荷を決定した。（b）異なる循環Aβ42集団と、大域平均PET

10

20

30

40

50

脳撮像 ($n = 72$) との相関。APEXアッセイを用いて、アルツハイマー病 (AD)、軽度認知障害 (MCI) の患者、ならびに認知障害ではない (NCI)、血管性認知症 (VaD) の、および血管性軽度認知障害 (VMCI) の対照被験者の血液試料中の、エクソソーム結合 $A\beta 42$ (左)、非結合 $A\beta 42$ (中央)、ならびに全 $A\beta 42$ (右) 由来のシグナルをそれぞれ測定した。脳アミロイドプラークの大域撮像データとの相関をとると、非結合 $A\beta 42$ 集団の測定値 (中央、 $R^2 = 0.0193$) または全 $A\beta 42$ の測定値 (右、 $R^2 = 0.1471$) と比較して、エクソソーム結合 $A\beta 42$ の測定値が最も相関が高い (左、 $R^2 = 0.9002$) ことが実証された。(c) さまざまな臨床群 ($n = 84$) の区別に関する異なる循環 $A\beta 42$ 集団の分析。循環エクソソーム結合 $A\beta 42$ のAPEX測定値 (左) だけが、AD臨床群同士 (ADとMCI) を、また他の健常対照 (NCI) および臨床対照 (VaD、VMCI、および急性脳卒中) から、区別できた。非結合 $A\beta 42$ の測定値 (中央) も全 $A\beta 42$ の測定値 (右) も、異なる臨床群間の統計学的有意性を示さなかった ($**P < 0.01$ 、 $***P < 0.0001$ 、n.s.: 有意差なし、スチューデントのt検定)。すべての測定をIgGアイソトープ対照抗体に対して相対化し、三つ組で実施した。b~cではデータを平均±標準偏差で示す。

10

【図5】神経細胞から放たれる細胞外小胞の特徴決定。(a) 細胞からの、ナノスケールの細胞外小胞の活発な放出を示す、神経細胞 (SH-SY5Y) の走査型電子顕微鏡像。(b) 放出された小胞の高倍率画像。(c) ナノ粒子トラッキング分析により決定されたおよそ150 nmの平均直径を示す細胞外小胞の単峰サイズ分布。(d) 小胞ライセートのウェスタンブロッティング分析。小胞を溶解させ、エクソソームマーカー (LAMP 1、ALIX、HSP90、HSP70、CD63、フロチリン1、TSG101)、神経細胞マーカー (NCAM)、ならびにリポタンパク質 (APOE) および他の膜コンパートメントのマーカー (カルネキシン、GRP94) などの陰性マーカーについて免疫プロットした。(e) 異なるサイズの金ナノ粒子を用いた二重免疫標識 (CD63、20 nm; $A\beta 42$ 、5 nm) の透過型電子顕微鏡写真で、エクソソーム結合 $A\beta$ の存在を示す、同じ小胞上の両マーカーの共局在を確認した。

20

【図6】APEX増幅産物。(a) エクソソームが抗CD63抗体を介しセンサーに捕捉されている増幅前、および (b) 増幅後のAPEXセンサーの走査型電子顕微鏡像であり、増幅後は、可溶性基質 (3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド) から不溶性光付着物が局在成長しているのがわかる。結果としてのAPEXシグナル増幅は、局在付着物による面積範囲の増加と高い相関があった。

30

【図7】APEXマイクロアレイセンサーの大量製造。APEXセンサーはすべて、8インチのシリコン (Si) ウエハ上に製造した。製造工程には以下が含まれる: (1) 熱酸化により10 nmの二酸化ケイ素 (SiO_2) 層を作製し、低圧化学的気相成長 (LPCVD) により145 nmの窒化ケイ素 (Si_3N_4) をウエハに堆積させた。(2) フォトレジストで被覆した後、深紫外線 (DUV) リソグラフィーを実施して、レジストにナノホールアレイパターンを画定した。このパターンを、反応イオンエッチング (RIE) により、 Si_3N_4 膜に転写した。(3) フォトレジストを除去した後、プラズマ援用化学的気相成長 (PECVD) により SiO_2 の薄い保護層 (100 nm) をウエハの表側に堆積させた。光透過を可能にするために、ウエハの裏側にフォトレジストをスピンコートした; 検知エリアの画定にリソグラフィー法を用いた。(4) RIEにより Si_3N_4 および SiO_2 をエッチングした後、水酸化カリウム (KOH) および水酸化テトラメチルアンモニウム (TMAH) でSiのエッチングを行った。(5) エッチング後、希釈フッ化水素 (DHF) (1:100) を用いて保護 SiO_2 層を除去した。(6) Ti/Au (10 nm/100 nm) を Si_3N_4 膜に堆積させた。

40

【図8】APEXマイクロアレイセンサーの特徴決定。(a) APEXマイクロアレイセンサーチップの大規模製造を示す8インチウエハの写真。各ウエハは、 > 2000 の検知素子からなる。(b) APEXセンサーの非常に均一なナノホールの走査型電子顕微鏡像。挿入図はナノホール格子の拡大図である。

【図9】段階的なスペクトル変化。APEXセンサーを、(a) エクソソーム捕捉用の抗CD63抗体、または (b) アイソトープ対照抗体のいずれかと結合させた。APEX増幅前に、

50

すべてのセンサーを神経細胞株 (SH-SY5Y) 由来の等濃度のエクソソームで処理した。どのセンサーも同程度の抗体による表面機能化 (抗体結合体) を示したが、エクソソーム結合およびAPEX増幅のそれぞれと関連する有意なスペクトルシフトが実証されたのは、抗CD63機能化センサーだけであった。なお、エクソソーム結合が存在しない対照センサーでは、APEX増幅は微々たるスペクトル変化しか誘導しなかった。a.u.: 任意単位。

【図10】APEXセンサー性能の最適化。(a) 裏面照射したセンサー性能の比較。ナノホール直径が異なるAPEXセンサーのSPR透過強度、スペクトルピークの半値全幅 (FWHM)、および検出感度を比較した。すべてのセンサーを裏側から照射して、APEX酵素的増幅を補完した。最適なAPEX設計は、ナノホールの直径が230 nmであり、窒化ケイ素膜に載った厚さ100 nmの金属膜において450 nmの規則正しい周期性のパターンを有する。この二層プラズモン構造が、裏面照射によるSPR励起に対応している。(b) 増加する屈折率に対する最適化センサーの透過スペクトルの変化。屈折率の増加は、透過スペクトルの変化を誘導し、共鳴ピークをより長い波長へとシフトさせた。(c) スペクトルシフトは、増加する屈折率との線形相関を示した。(d) APEXの再現性および反復性。同じ試料でAPEX酵素的増幅を実施し、異なるユーザー、センサーチップ、および測定時間で測定した。測定値は、次の分析変動係数を示した: 群間 = 2.76%、群内 = 4.14%、全体 = 4.59%。すべての測定を三つ組以上で実施し、(a) ではデータを平均±標準偏差で示す。a.u.: 任意単位、n.s.: 有意差なし、スチューデントのt検定。

【図11】APEXワークフローおよび増幅効率。(a) (小胞外および小胞内) タンパク質およびmiRNAを検出するAPEXワークフロー。(b) 異なる分子標的に関するAPEX増幅効率。次の標的に関するAPEXシグナルを取得した: 小胞外タンパク質、A β 42タンパク質; 小胞内タンパク質、ヒートショックタンパク質90; miRNA、miRNA-9。すべてのシグナルを、光基質添加前のシグナルに対し正規化して、増幅率を決定した。測定は三つ組で実施し、(b) ではデータを平均±標準偏差で示す。

【図12】大きいA β 凝集体が集まった線維構造物。調製した大きいA β 42凝集体を2時間インキュベートした後、アミロイド原線維が観測された。形成した構造物を抗A β 42抗体を介し金ナノ粒子 (15 nm) で免疫標識し、透過型電子顕微鏡法により特徴決定した。

【図13】BSA対照凝集体の調製。(a) BSAタンパク質凝集の概略。加熱の持続時間を変えて、小さいBSA対照凝集体と大きいBSA対照凝集体とをそれぞれ調製した。(b) BSAタンパク質凝集体の特徴決定。BSA凝集体の流体力学的直径を動的光散乱分析により決定した。どちらの凝集体も、単峰サイズ分布を示した。小さい凝集体は、およそ15 nmの直径を有し、大きい凝集体はおよそ100 nmの直径を有する。

【図14-1】図14: さまざまな細胞起源から単離された細胞外小胞。(a) 神経細胞 (SH-SY5Y)、(b) グリア細胞 (GLI36)、(c) 内皮細胞 (HUVEC)、(d) 単球 (THP-1)、(e) 赤血球、(f) 血小板、(g) 前立腺起源の上皮細胞 (PC-3)、および (h) 卵巣起源の上皮細胞 (SK-OV-3) からそれぞれ細胞外小胞を得た。すべての小胞を、ナノ粒子トラッキング分析により特徴決定した。

【図14-2】図14-1の説明を参照のこと。

【図15】異なる循環A β 集団のAPEX測定。(a) 臨床血漿試料中の異なる循環A β 集団の特徴決定をするAPEXアッセイ構成。エクソソーム結合A β 42集団および全A β 42集団は未変性血漿から測定し、非結合A β 42集団は血漿濾液から検出した。(b) フィブロネクチンとエクソソーム結合A β 42とをインキュベートしても、APEXシグナルには微々たる変化しかなかった。(c) 陰性対照 (APOEリポタンパク質とA β 42タンパク質、ヒト血清アルブミン/HSA) は、微々たるシグナルしか示さず、APEXアッセイがエクソソーム結合A β 42に特異的であることが実証された。すべての測定を三つ組で実施し、データを平均±標準偏差で示す。

【図16】臨床試料中のA β 集団の特徴決定。(a) エクソソーム結合A β 42集団。未変性血漿試料から直接A β 42を濃縮し、捕捉されたA β 42におけるエクソソームマーカー (CD63、CD81、およびCD9) および神経細胞マーカー (NCAM、L1CAM、およびC

10

20

30

40

50

HL-1) の共局在シグナルの相対レベルを測定した。すべてのマーカーを検出できたが、試験した臨床試料全体で最も高発現だったマーカーは、CD63であった。(b) 非結合A β 42集団の特徴決定用の血漿濾液。非結合A β 42集団を評価するために、膜濾過(サイズカットオフ = 50 nm、Nuclepore、Whatman)を用いて小胞を含まない血漿濾液を調製した。ナノ粒子トラッキング分析により決定すると、濾液は微々たる小胞数しか示さなかった。(c) 血漿濾液はエクソソームマーカー(CD63)および神経細胞マーカー(NCAM)についても微々たるシグナルしか示さず、濾過によりエクソソームが効率的に除去されたことが実証された。アルツハイマー病(AD)、軽度認知障害(MCI)、および認知障害ではない(NCI)健常対照。すべての測定を三つ組で実施し、データを平均±標準偏差で示す。

10

【図17】エクソソーム結合A β 42と局所性脳アミロイド負荷との相関。特定脳領域、つまりAD初期の帯状領域およびAD後期の後頭領域の撮像SUV_Rを決定した。エクソソーム結合A β 42のAPEX測定値は、AD後期領域の撮像データ(b、 $R^2 = 0.6863$)よりも、AD初期領域の撮像データ(a、 $R^2 = 0.8808$)と、より一致していた。アルツハイマー病(AD、n = 17)、軽度認知障害(MCI、n = 18)、血管性認知症(VaD、n = 9)、血管性軽度認知障害(VMCI、n = 12)、認知障害ではない健常対照(NCI、n = 16)。すべての測定を三つ組で実施し、データを平均±標準偏差で示す。

【図18】診断の異なる臨床被験者のPET撮像の比較。臨床診断の異なる患者(n = 72):AD(n = 17)、MCI(n = 18)、NCI(n = 16)、VaD(n = 9)、およびVMCI(n = 12)の脳アミロイドプラーク負荷のPET撮像を実施した。大域平均プラーク沈着の標準化取込値比(SUV_R)は、AD臨床群同士(ADとMCI)を、また他の健常対象(NCI)および臨床対照(VaDおよびVMCI)からも、区別できた。(**P < 0.01、***P < 0.0001、スチューデントのt検定)。

20

【図19A】臨床試料中の細胞外小胞。(a) ナノ粒子トラッキング分析により測定した、臨床診断の異なる被験者(AD = 17、MCI = 18、NCI = 16、VaD = 9、VMCI = 12、および急性脳卒中 = 12)由来の血液試料の細胞外小胞の代表的な分析。臨床血液試料(n = 84)の(b)小胞サイズおよび(c)小胞濃度の比較。小胞サイズも濃度も、臨床診断の異なる試料間で有意差がないことに注意されたい(n.s.:有意差なし、スチューデントのt検定)。

30

【図19B】図19Aの説明を参照のこと。

【図19C】図19Aの説明を参照のこと。

【図20-1】図20: APEXアッセイ技術、センサー設計、および製造の比較。

【図20-2】図20-1の説明を参照のこと。

【図21】(a) デンプン形成タンパク質の凝集の阻害を示す。(b) 動的光散乱分析により、デンプン形成タンパク質を阻害剤ありまたはなしでインキュベートしたときの単峰サイズ分布、およびサイズ差を確認した。(c) エクソソーム結合動態のリアルタイムセンサーグラム。エクソソームは、(阻害剤処理した)より小さいA β 42凝集体と比較して、(無処理の)より大きいA β 42凝集体に対する親和性のほうがはるかに強いことが実証された。

【図22】エクソソーム結合動態のリアルタイムセンサーグラムを示す。同様のサイズのウシ血清アルブミン(BSA)対照凝集体と比較して、エクソソームは、デンプン形成タンパク質(たとえばA β 、APP、 α -Syn、IRS-1、タウ、APOE、SOD1、TDP-43、バース、フィブロネクチン)凝集体とより強力に結合した。

40

【図23】標的miRNA分子を測定する、APEXアッセイの特異性を示す。miR-9、miR-15b、miR-29b、miR-29c、miR-107、miR-146a、およびmiR-181cのアッセイを開発した。すべてのアッセイで特異的な検出が実証された。ヒートマップシグナルはアッセイ(行)を正規化した。

【発明を実施するための形態】

【0014】

詳細な説明

50

本明細書では、神経変性疾患を検出する方法、およびその処置方法を開示する。

【0015】

一局面では、膜支持層上の導電層を含むセンサーチップが提供され、複数のアパーチャーが該導電層および該膜支持層を貫通しており、該複数のアパーチャーは、該導電層および／または該膜支持層の照射により表面プラズモン共鳴が生じるように配置されている。

【0016】

一態様では、多層の構造化材料（導電金属および支持基板）の設計が、プラズモンカップリングを可能にする。この設計は表面プラズモン共鳴の二方向励起に対応でき、（上からおよび下からの）二方向の照射によるSPR性能は同等である。

【0017】

「導電層」という用語は、本明細書で用いる場合、光波などの電磁エネルギーで励起されると表面プラズモン共鳴を示す導電材料であり得る。導電材料は、たとえば金属の導電材料を指し得る。そのような金属の導電材料は、貴金属、アルカリ金属、遷移金属、および合金など、どのような金属でもよい。導電材料の例としては、限定ではないが、金、ロジウム、パラジウム、銀、白金、オスmium、イリジウム、チタン、アルミニウム、銅、リチウム、ナトリウム、カリウム、ニッケル、金属合金、酸化インジウムスズ、酸化アルミニウム亜鉛、酸化ガリウム亜鉛、窒化チタン、およびグラフェンが挙げられる。一態様では、導電材料は、金、銀、アルミニウム、ナトリウム、インジウム、またはチタンである。金属は、そのままの形態でもよいし、保護および強化材料の追加層で被覆されていてもよい。

【0018】

導電材料は、およそ100ナノメートル（nm）～3000 nmの波長を含む光学領域（紫外～可視～赤外スペクトル）で有意な散乱強度を示す場合、「光学的に観測可能」であり得る。導電材料は、人間の目で検出できる、すなわち可視スペクトルであるおよそ380 nm～750 nmの波長帯で有意な散乱強度を示す場合、「視覚的に観測可能」であり得る。

【0019】

一態様では、膜支持層は、構造化膜支持層である。

【0020】

一態様では、膜支持層は、窒化ケイ素または二酸化ナトリウムである。他の支持材としては、結合多層プラズモン構造が形成するようパターン形成され得る基板が挙げられる。

【0021】

導電層および膜支持層を貫通する複数のアパーチャーの直径および周期性を変えて、異なる共鳴波長およびエバネッセント波侵入を実現することができる。

【0022】

複数のアパーチャーには、対称的な円形穴、空間異方性の形状、たとえば、楕円形、スリットが含まれ、また、三角形、四角形、長方形、または多角形のあらゆるアパーチャーも含まれる。種々の形状の穴の組み合わせも用いることができる。アパーチャーは、約1500 nm未満、約1400 nm未満、約1300 nm未満、約1200 nm未満、約1100 nm未満、約1000 nm未満、約900 nm未満、約800 nm未満、約700 nm未満、約600 nm未満、約500 nm未満、約450 nm未満、約400 nm未満、約350 nm未満、約300 nm未満、約250 nm未満、約240 nm未満、約230 nm未満、約220 nm未満、約210 nm未満、約200 nm未満、約190 nm未満、約180 nm未満、約170 nm未満、約160 nm未満、約150 nm未満、約140 nm未満、約130 nm未満、約120 nm未満、約110 nm未満、約100 nm未満、約90 nm未満、約80 nm未満、約70 nm未満、約60 nm未満、約50 nm未満、約40 nm未満、約30 nm未満、約20 nm未満、または約10 nm未満の寸法または直径を有し得る。

【0023】

一態様では、アパーチャーは、約150 nm～約450 nmの寸法または直径を有し得る。

一態様では、アパーチャーは、150 nm、160 nm、170 nm、180 nm、190 nm、200 nm、210 nm、220 nm、230 nm、240 nm、250 nm、260 nm、270 nm、

10

20

30

40

50

280 nm、290 nm、300 nm、310 nm、320 nm、330 nm、340 nm、350 nm、360 nm、370 nm、380 nm、390 nm、400 nm、410 nm、420 nm、430 nm、440 nm、450 nm、またはそれらの間のどこか、からなる群より選択される寸法または直径を有する。一態様では、アパーチャーは穴であって、230 nmの直径を有する。

【0024】

「周期性」という用語は、アパーチャーの、センサーチップ上の位置決めによる、規則正しい間隔での繰り返しまたは反復を指す場合がある。したがって「周期的」という用語は、アパーチャーの互いに対する規則正しい所定のパターンを指す。

【0025】

表面プラズモン共鳴センサーチップは、周期的なアパーチャーのアレイを含み得る。この規則正しい周期性は、共鳴波長およびエバネッセント波侵入の厳しい制御を可能にし得る。一態様では、アパーチャーは、約250 nm～約650 nmの周期性を有する。一態様では、アパーチャーは、250 nm、260 nm、270 nm、280 nm、290 nm、300 nm、310 nm、320 nm、330 nm、340 nm、350 nm、360 nm、370 nm、380 nm、390 nm、400 nm、410 nm、420 nm、430 nm、440 nm、450 nm、460 nm、470 nm、480 nm、490 nm、500 nm、510 nm、520 nm、530 nm、540 nm、550 nm、560 nm、570 nm、580 nm、590 nm、600 nm、610 nm、620 nm、630 nm、640 nm、および650 nm、またはそれらの間のどこか、からなる群より選択される周期性を有する。一態様では、アパーチャーは、450 nmの周期性を有する。

【0026】

一態様では、アパーチャーは、照射で生じる表面プラズモン共鳴が、第1の認識分子の標的の直径とほぼ等しい減衰長さを有するように配置される。

【0027】

一態様では、導電層および膜支持層が基板に配置され、該基板は、複数のアパーチャーに隣接する領域に作られた空隙を該基板に有して、導電層および／または膜支持層の両方向の照射を可能にし、それによって表面プラズモン共鳴を生じさせる。

【0028】

一態様では、センサーチップは、導電層の表面に固定化された第1の認識分子を含む。第1の認識分子は、当技術分野では周知の技法を用いて表面に固定化され得る。たとえば、第1の認識分子は、表面に吸着され得る。あるいは、表面は、第1の認識分子の固定化の前に、ストレプトアビジンまたはアビジンの層で被覆され得る。第1の認識分子は、ビオチン化され、ストレプトアビジン-ビオチン結合によって表面に固定化される場合がある。一態様では、表面はポリエチレングリコール（PEG）分子と一しょにインキュベートされ得る。表面は、活性（カルボキシル化）チオール-PEGと一しょにインキュベートされ得る。次いで表面は、過剰NHS/EDCが溶解したMESバッファー混合物中、カルボジイミド架橋により活性化され得、第1の認識分子と結合し得る。代替態様では、表面は、長活性（カルボキシル化）チオール-PEGおよび短不活性メチル化チオール-PEGを含有するポリエチレングリコール（PEG）混合物と一しょにインキュベートされ得る。長活性（カルボキシル化）チオール-PEG対短不活性メチル化チオール-PEGの比は、最大の機能的結合が得られるように最適化され得る。次いで表面は、過剰NHS/EDCが溶解したMESバッファー混合物中、カルボジイミド架橋により活性化され得、第1の認識分子と結合し得る。

【0029】

「認識分子」という用語は、ある検体に特異的に結合することができる分子を指し得る。「認識分子」は、抗体、核酸、ペプチド、アプタマー、小分子、または他の合成作用物質であり得る。

【0030】

「検体」という用語は、試料中に存在する、センサーチップ上で検出または測定される物

10

20

30

40

50

質を指す。「検体」としては、細胞、ウイルス、核酸、脂質、タンパク質、ペプチド、糖ペプチド、ナノ小胞、マイクロ小胞、エクソソーム、細胞外小胞、糖、代謝産物、またはそれらの組み合わせ、もしくは組織状態が挙げられ得る。「検体」は、たとえば、エクソソームに結合した (bound)、または結合した (associated) ペプチドまたは (miRNAなどの) 核酸バイオマーカーであり得る。「検体」はまた、たとえば、細胞とタンパク質との、またはタンパク質と核酸との複合体であり得る。

【0031】

一態様では、第1の認識分子は、抗体またはその断片である。抗体は、たとえば、汎エクソソームマーカー、またはエクソソームと結合した (associated)、もしくは結合した (bound) マーカーを認識する抗体であり得る。たとえば、抗体は、エクソソームに豊富かつ特徴的なCD63、CD9、またはCD81に特異的な抗体であり得る。抗体はまた、CHL1、L1CAM、またはNCAMなどの細胞起源特異性マーカーに特異的であり得る。抗体はまた、エクソソームに結合した (associated)、または結合した (bound) バイオマーカーを認識し得る。たとえば、抗体は、A β を認識する抗A β 抗体、またはエクソソームに結合した (bound)、もしくは結合した (associated) APP、 α -syn、もしくはタウを認識する抗体であり得る。

10

【0032】

本明細書で用いる場合、「抗体」という用語は、限定ではないが、合成抗体、モノクローナル抗体、組換え生産抗体、多特異性抗体 (二特異性抗体を含む)、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、一本鎖Fv (scFv)、Fab断片、F(ab')断片、ジスルフィド連結Fv (sdFv) (二特異性sdFvを含む)、および抗イディオタイプ (抗Id) 抗体、ならびにこれらのいずれかのエピトープ結合断片を含む。本明細書で提供される抗体は、一特異的、二特異的、三特異的、またはさらに多特異的であり得る。多特異性抗体は、1つのポリペプチドの種々のエピトープに特異的であってもよいし、1つのポリペプチドおよび1つの異種エピトープたとえば異種ポリペプチドまたは固体支持材の両方に特異的であってもよい。

20

【0033】

「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、交換可能に用いられ、ペプチド結合または修飾ペプチド結合により連結されたアミノ酸の (ジペプチド以上の) 任意のポリマーを指す。約10~20未満のアミノ酸残基のポリペプチドが、一般に「ペプチド」と呼ばれる。本発明のポリペプチドは、炭水化物基などの非ペプチド成分を含み得る。ポリペプチドを生産する細胞によって、炭水化物およびその他の非ペプチド置換基がポリペプチドに付加され得、それは細胞種によって異なる。本明細書ではポリペプチドはそれらのアミノ酸主鎖構造の点から定義され、炭水化物基などの置換基は特に明記されないが、それでも存在はし得る。

30

【0034】

本明細書に記載される場合、「核酸」はRNAまたはDNAであり得、一本鎖でも二本鎖でもよく、また、たとえば関心対象のタンパク質をコードする核酸、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸アナログ、たとえばペプチド-核酸 (PNA)、シュード相補的PNA (pc-PNA)、ロックド核酸 (LNA)、その他であってもよい。そのような核酸配列としては、たとえば、限定ではないが、たとえば転写抑制因子として作用するタンパク質、アンチセンス分子、リボソームをコードする核酸配列、小さい阻害性核酸配列、たとえば、限定ではないが、RNAi、shRNAi、siRNA、マイクロRNAi (miRNAi)、アンチセンスオリゴヌクレオチド、その他が挙げられる。

40

【0035】

本明細書で用いる場合、「ナノ小胞」は、自然発生する、または合成された、内側に腔を含む小胞を指し得る。ナノ小胞は、内腔の成分を囲む脂質二層膜を含み得る。ナノ小胞としては、リボソーム、エクソソーム、細胞外小胞、マイクロ小胞、アポトーシス性小胞 (またはアポトーシス体)、空胞、リソソーム、輸送小胞、分泌小胞、気体小胞、マトリックス小胞、または多胞体を挙げることができる。ナノ小胞は、約1000 nm未満、約900

50

nm未満、約800 nm未満、約700 nm未満、約600 nm未満、約500 nm未満、約450 nm未満、約400 nm未満、約350 nm未満、約300 nm未満、約250 nm未満、約240 nm未満、約230 nm未満、約220 nm未満、約210 nm未満、約200 nm未満、約190 nm未満、約180 nm未満、約170 nm未満、約160 nm未満、約150 nm未満、約140 nm未満、約130 nm未満、約120 nm未満、約110 nm未満、約100 nm未満、約90 nm未満、約80 nm未満、約70 nm未満、約60 nm未満、約50 nm未満、約40 nm未満、約30 nm未満、約20 nm未満、または約10 nm未満の寸法を有し得る。

【0036】

エクソソームは、ナノ小胞の一種であり、当技術分野では細胞外小胞、マイクロ小胞、またはマイクロ粒子とも呼ばれる。これらの小胞は、真核細胞から細胞外部へ放たれ、または細胞膜から細胞外部へ分離する。これらの膜小胞のサイズは不均一であり、直径は約10 nm～約5000 nmの範囲である。細胞内多胞体の開口放出により放出されるこの小さな小胞（直径およそ10～1000 nm、好ましくは30～100 nm）は、当技術分野で「エクソソーム」と呼ばれている。本明細書に記載される方法および組成物は、あらゆるサイズのその他の小胞にも等しく適用できる。

【0037】

「試料」という用語は、検体を含む、または検体の存在について検査される、任意の試料を指す。そのような試料としては、細胞、生物（細菌、ウイルス）、溶解細胞または生物、細胞抽出物、核抽出物、細胞または生物の成分、細胞外液、細胞または生物のインビトロ培養培地、血液、血漿、血清、胃腸分泌物、尿、腹水、組織または腫瘍のホモジネート、滑液、便、唾液、痰、囊胞液、羊水、脳脊髄液、腹水、肺胞洗浄液、精液、リンパ液、涙、胸水、乳頭吸引液、母乳、皮膚や気道、腸管、および泌尿生殖器の外切片、ならびに前立腺液に由来する、またはそれらを含む試料が挙げられる。試料は、ウイルス性もしくは細菌性試料、汚染水域などの環境源から採取した試料、空気試料、または土壌試料、ならびに食品業界の試料であり得る。試料は生物学的試料の場合もあり、それは、試料が生体に由来する、または生体から採取されたことを指す。生物は、インビボ（たとえば全生物）でもインビトロ（たとえば培養成長させた細胞または器官）でもよい。「生物学的試料」は、対象由来の細胞もしくは細胞集団、またはある量の組織もしくは液も指す。試料は対象から取り出されている場合が多いが、「生物学的試料」という用語は、インビボで、すなわち対象から取り出されことなく分析される細胞または組織も指し得る。「生物学的試料」は対象由来の細胞を含む場合が多いが、この用語は、非細胞生物学的物質、たとえば血液、唾液、または尿の、非細胞部分も指し得る。生物学的試料は、初代、二次、もしくは転移性腫瘍の切除、気管支鏡生検、もしくはコア針生検、または胸水由来の細胞体に由来し得る。加えて、細針吸引生物学的試料も有用である。一態様では、生物学的試料は、初代腹水細胞である。生物学的試料としては、患者組織に由来する外植片ならびに初代および／または形質転換細胞培養物も挙げられる。生物学的試料は、対象から細胞試料を取り出すことによって準備することができるが、以前に単離された（たとえば別の人によって、別のときに、および／または別の目的で単離された）細胞または細胞抽出物を用いて行うこともできる。治療歴または予後歴のあるような保管組織も使用することができる。生物学的試料としては、限定ではないが、組織生検、搔把物（たとえば口腔内の搔把物）、全血、血漿、血清、尿、唾液、細胞培養物、または脳脊髄液が挙げられる。本明細書に記載される組成物および方法により分析される試料は、含有されるエクソソームの精製または濃縮の処理がされている場合がある。一態様では、試料は血液である。

【0038】

一局面では、光源、検出器、および本明細書で定義されるセンサーチップを含む撮像システムが提供され、検出器は、光源で生じ、センサーチップを透過した光を検出するように位置決めされている。

【0039】

一局面では、本明細書で定義されるセンサーチップを含むキットも提供される。

【0040】

該キットは、センサーチップの表面に捕捉された検体、または該捕捉された検体と結合した検体に特異的な、第2の認識分子をさらに含み得る。キットは、1つまたは複数の検体が検出できるように、1つまたは複数の検体にそれぞれ特異的な1つまたは複数の第2の認識分子を含み得る。

【0041】

第2の認識分子は、(1)シグナル増幅、(2)共局在分析（たとえば、同じ小胞に同時に存在する異なる標的を検出）、ならびに(3)分子のおよび組織的な差異に基づく検体亜集団の区別を可能にし得る。

【0042】

第2の認識分子をシグナル増幅部分に結合させてもよく、シグナル増幅部分には、捕捉された検体と比べて光学密度が増加した不溶性凝集体の形成を誘導する能力と、測定される表面プラズモン共鳴シグナルを増加させる能力がある。たとえば、キットは、(A β 42に特異的な抗体などの)抗体である第2の認識分子を含み得る。第2の認識分子を西洋わさびペルオキシダーゼ酵素に結合させてもよい。キットは、酵素基質をさらに含み得る。西洋わさびペルオキシダーゼ酵素はしたがって、センサーチップの表面に捕捉された検体と比べて光学密度が増加した不溶性凝集体の形成を誘導することができる。

【0043】

「シグナル増幅分子」という用語は、センサーチップの表面で不溶性凝集体の形成を誘導することができ、それによって、捕捉された検体と比べて光学密度が増加している分子を指す場合がある。これは、第2の認識分子がセンサーチップの表面の検体に結合すると、透過波長のより大きい変化（スペクトルシフト）、または透過強度の変化をもたらすことで、センサーチップの感度を増加させることに役立つ。「シグナル増幅分子」は、たとえば、西洋わさびペルオキシダーゼなどの酵素であり得、これが酵素基質と反応して、センサーチップの表面に不溶性凝集体を形成させる。「シグナル増幅分子」は、センサーチップの表面で第2の認識分子に結合し凝集体を形成させる二次抗体であってもよい。二次抗体を、より大きい凝集体の形成に役立つ酵素、金粒子、または大分子にさらに結合させて、光学密度を増加させてもよい。

【0044】

一態様では、本発明は、アルツハイマー病（AD）患者の血液試料から直接エクソソーム結合アミロイド β （A β ）を検出する高感度の分析プラットフォーム、いわゆる増幅プラズモンエクソソーム（APEX）に関する。この分析方法は、透過型表面プラズモン共鳴（SPR）およびインサイチューの光産物の酵素的変換を利用して、複合的集団分析を可能にし得る。APEX技術は、エクソソーム成分（たとえばタンパク質およびmiRNA）のマルチパラメトリックなインサイチューのプロファイリングを可能にし得る。APEXプラットフォームは、異なる循環A β 集団（エクソソーム結合、非結合、および全体）のみならず異なる循環A β 組織状態を測定するのに用いられ、これらの血液測定値と脳アミロイドプラーク負荷のPET撮像との相関をとる。

【0045】

一局面では、センサーチップを製造する方法が提供され、該方法は、

(a)上部膜支持層を設ける工程；

(b)該上部膜支持層に導電層を堆積させる工程；

(c)該膜支持層を貫通する複数のアパーチャーを形成する工程

を含み、該複数のアパーチャーは、該導電層も貫通しており、該導電層および／または該上部膜支持層の照射により表面プラズモン共鳴が生じるように配置されている。

【0046】

いくつかの態様では、方法は、

シリコン基板の上面に上部膜支持層を、および下面に下部膜支持層を、被覆する工程；

該上部膜支持層にフォトレジストの層を設ける工程；ならびに

深紫外線リソグラフィー（DUV）により該フォトレジストに複数のアパーチャーを画定

10

20

30

40

50

する工程、および反応イオンエッチング（RIE）により該複数のアパーチャーのパターンを該上部膜支持層に転写する工程をさらに含む。

【0047】

いくつかの態様では、方法は、

該上部膜支持層の該フォトレジストを除去する工程、そして該上部膜支持層の表面に二酸化ケイ素保護層を被覆する工程；

該下部膜支持層にフォトレジストの層を被覆する工程；

フォトリソグラフィにより該フォトレジストに検知エリアを画定する工程；

反応イオンエッチング（RIE）により該検知エリアのパターンを該下部膜支持層に転写する工程；

該検知エリアのパターンを該シリコン基板に転写する工程；

該上部膜支持層の表面の該保護層を希釈フッ化水素により除去する工程；および

該上部膜支持層に該導電層を堆積させる工程

をさらに含む。

【0048】

「検知エリア」という用語は、本明細書で用いる場合、プラズモン層および／または膜支持層の照射により表面プラズモン共鳴が生じるように配置されている複数の穴を含む、センサーチップのエリアを指す。

【0049】

本明細書で用いる場合、「レジスト」という用語は、それを積層させる基板に画像またはパターンを転写するのに使われる薄層を指す。レジストは、リソグラフィにより、後続の処理工程、典型的にはエッチングの間、下にある基板の選択エリアを保護する（サブ）マイクロメートルスケールの一時的なマスクを形成するようパターン形成され得る。この薄層を作製するのに用いられる材料（典型的には粘性溶液）も、レジストという用語に含まれる。レジストは一般に、所与のリソグラフィ技術用に特別配合されたポリマーまたはその前駆物質と他の小分子（たとえば光酸発生剤）との混合物である。フォトリソグラフィの際に用いられるレジストは、たとえば「フォトレジスト」と呼ばれる。電子ビームリソグラフィの際に用いられるレジストは、「eビームレジスト」と呼ばれる。

【0050】

一局面では、試料中の検体を検出する方法が提供され、該方法は、

(a) 本明細書で定義されるセンサーチップの表面に検体を捕捉する工程；および

(b) 第2の認識分子と該センサーチップの表面に捕捉された該検体との結合を検出する工程を含み、該第2の認識分子は該検体に特異的であり、対照試料と比較して増加した該第2の認識分子の結合は、試料中に該検体が存在することを示す。

【0051】

方法は、1つまたは複数の検体に特異的な1つまたは複数の第2の認識分子の結合の（順次または同時の）検出を含み得る。これによって、試料中の複数の検体またはバイオマーカーの組織状態（たとえば共局在）の検出、定量化、および分析が可能になる。各検体は、異なるセットの第1および第2の認識分子により認識され得る。第1および第2の認識分子はそれぞれ、同じ検体または異なる検体を認識し得る。第1および第2の認識分子の種々の組み合わせにより、検体の共局在の検出が可能になり得る。このことは、複数の検体の同時検出を可能にし得、またこれらの分子の共局在の検出を可能にし得る。

【0052】

一態様では、第1の認識分子はAβ42を認識する抗体であり、第2の認識分子はAβ42を認識する別の抗体である。

【0053】

一態様では、第1の認識分子はAβ42を認識する抗体であり、第2の認識分子はCD63を認識する抗体であり、Aβ42とCD63との共局在が検出される。

【0054】

10

20

30

40

50

第2の認識分子とセンサーチップの表面に捕捉された検体との「結合」の検出は、スペクトル項シフト（透過波長の変化）、または固定波長での透過強度の変化により得る。たとえば、センサーチップの表面に捕捉された検体は、当初の基準波長を有している。第2の認識分子の結合後、透過波長は、より長い波長にシフトし得る。

【0055】

試料の透過共鳴波長の変化（またはスペクトル項シフト（ $\Delta\lambda$ ））または固定波長での透過強度の変化を、対照試料で観測される変化と比較することができる。それによって、たとえば、第2の認識分子と捕捉された検体との増加した結合があるかどうかを決定することができる。

【0056】

試料中の、対照試料と比較して「増加した第2の認識分子の結合」は、第2の認識分子の結合後のスペクトルシフトの変化、または固定波長での透過強度の変化を、試料と対照試料とで比較することによって決定することができる。増加したスペクトルシフトの変化または透過強度の変化は、第2の認識分子と検体との増加した結合があることを示し得る。

【0057】

一態様では、スペクトルシフトまたは透過強度の増加した変化とは、対象と対照対象との間の1.2倍以上の増加を指し得る。この用語は、1.1倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、21倍、22倍、23倍、24倍、25倍、26倍、27倍、28倍、29倍、30倍、31倍、32倍、33倍、34倍、35倍、36倍、37倍、38倍、39倍、40倍、41倍、42倍、43倍、44倍、45倍、46倍、47倍、48倍、49倍、50倍、51倍、52倍、53倍、54倍、55倍、56倍、57倍、58倍、59倍、60倍、61倍、62倍、63倍、64倍、65倍、66倍、67倍、68倍、69倍、70倍、71倍、72倍、73倍、74倍、75倍、76倍、77倍、78倍、79倍、80倍、81倍、82倍、83倍、84倍、85倍、86倍、87倍、88倍、89倍、90倍、91倍、92倍、93倍、94倍、95倍、96倍、97倍、98倍、99倍、および100倍からなる群より選択される増加も指し得る。

【0058】

第2の認識分子は、検体に特異的な認識分子であり得る。第2の認識分子をシグナル増幅部分に結合させ（coupled）てもよく、シグナル増幅部分は、捕捉された検体と比べて光学密度が増加した不溶性凝集体の形成を誘導する能力がある。たとえば、センサーチップの表面に捕捉された検体は、当初の基準波長を有している。第2の認識分子の結合後、透過波長はより長い波長にシフトし得る。第2の認識分子がシグナル増幅部分に結合すると、光学密度の増加によって、透過波長は、より長い波長にもシフトし得る。

【0059】

第2の認識分子をシグナル増幅部分と融合させてもよい。あるいは第2の認識分子をシグナル増幅部分に結合させ（conjugated）てもよい。

【0060】

シグナル増幅部分は酵素であり得る。一態様では、シグナル増幅部分は酵素である。酵素は、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ラクタマーゼ、もしくは β -ガラクトオキシダーゼ、またはそれらの酵素的断片であり得る。一態様では、酵素は西洋わさびペルオキシダーゼである。一態様では、第1のバイオ認識分子がシグナル増幅部分と融合されている。たとえば、第1のバイオ認識分子は、共有結合により西洋わさびペルオキシダーゼ酵素と融合させた抗体であり得、該酵素は、当技術分野で周知の技法により、共有結合により該抗体と連結している。

【0061】

方法は、酵素を酵素基質に接触させる工程をさらに含み得る。酵素基質は、酵素の存在下で、または酵素の作用により、不溶性産物を形成できるものであり得る。西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）には、3-アミノ-9-エチルカルバゾール、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、またはクロロナフトール、4-クロロ-1-ナフトールなどの調合物が使用さ

10

20

30

40

50

れ得る。これらの基質はHRPの酵素反応後に不溶性産物になることができる。

【0062】

一態様では、酵素基質は3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリドである。

【0063】

代替態様では、シグナル増幅部分は、第2の認識分子に結合する能力がある二次抗体であり得る。二次抗体が第2の認識分子に結合すると、不溶性凝集体の形成が誘導され得る。

【0064】

一態様では、第1の認識分子が、表面プラズモン共鳴センサーチップの表面に固定化されており、該第1の認識分子は、検体を該センサーチップの表面に捕捉する能力がある。検体は、エクソソーム結合 (bound) またはエクソソーム結合 (associated) バイオマーカーであり得る。検体は、エクソソーム結合 (bound) 凝集バイオマーカーであり得る。第1の認識分子は検体に特異的であり得る。

【0065】

一態様では、第1の認識分子は抗体である。抗体は、たとえば、汎エクソソームマーカー、またはエクソソームに結合した (associated)、もしくは結合した (bound) マーカーを認識する抗体であり得る。たとえば、抗体は、エクソソームに豊富かつ特徴的なCD63、CD9、またはCD81に特異的な抗体であり得る。抗体はまた、CHL1、L1CAM、またはNCAMなどの細胞起源特異性マーカーに特異的であり得る。抗体はまた、エクソソームに結合した (associated)、または結合した (bound) バイオマーカーを認識し得る。たとえば、抗体は、A β を認識する抗A β 抗体、またはエクソソームに結合した (bound)、もしくは結合した (associated) APP、 α -syn、もしくはタウを認識する抗体であり得る。

【0066】

「対照試料」という用語は、検体を含有していない試料を指す。「対照試料」は、試料との比較として、試料が関心対象の検体を含有しているかどうかを決定するのに用いられ得る。

【0067】

「バイオマーカー」という用語は、本明細書で用いる場合、その存在またはレベルが関心対象の事象と相関している作用物質または要素であると理解される。バイオマーカーは、細胞、タンパク質、核酸、ペプチド、糖ペプチド、エクソソーム、またはそれらの組み合わせであり得る。たとえばバイオマーカーは、その存在またはレベルが、対象が神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患している、またはそれを発症するリスクがあることを示す、A β 42またはタウペプチドである。別の例では、バイオマーカーは、その存在またはレベルが、対象が神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患している、またはそれを発症するリスクがあることを示す、エクソソーム結合 (bound) A β 42またはタウペプチドである。いくつかの態様では、バイオマーカーは、エクソソーム結合 (associated) バイオマーカーである。

【0068】

一態様では、検体を検出するための本明細書で定義されるセンサーチップの使用が提供される。

【0069】

一局面では、対象の神経変性疾患またはアミロイドーシスを検出する方法が提供され、該方法は、

(a) 試料を、本明細書で定義されるセンサーチップの表面に接触させる工程;および

(b) 第2の認識分子と該センサーチップの表面に捕捉された検体との結合を検出する工程を含み、該第2の認識分子は該検体に特異的であり、対照対象と比較して増加した該第2の認識分子の結合は、対象が神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患していることを示す。

【0070】

「対象」という用語は、任意の脊椎動物または哺乳類などの任意の動物、特にヒトを意味

10

20

30

40

50

し、また、たとえば個人または患者と呼ばれる場合もある。

【0071】

「対照対象」という用語は、神経変性疾患もしくはアミロイドーシスに罹患していないことがわかっている対象、または神経変性疾患もしくはアミロイドーシスに罹患するリスクがない対象を指す。「対照対象」は、健常対象の場合もある。「対照対象」は、認知障害ではない（NCI）人であり得る。この用語には、対照対象から採取された試料が含まれる。

【0072】

一態様では、バイオマーカーは、エクソソーム結合（bound）またはエクソソーム結合（associated）バイオマーカーである。一態様では、バイオマーカーは、エクソソーム結合凝集バイオマーカーである。バイオマーカーは、限定ではないが、 $A\beta$ 、APP、 α -Syn、タウ、APOE、SOD1、TDP-43、バスン、およびフィブロンネクチンからなる群より選択され得る。一態様では、 $A\beta$ は $A\beta$ 42である。別の態様では、 $A\beta$ は $A\beta$ 40である。いくつかの態様では、 $A\beta$ の分子サブタイプは、 $A\beta$ 42、 $A\beta$ 40、 $A\beta$ 39、または $A\beta$ 38である。一態様では、バイオマーカーはタウである。いくつかの態様では、バイオマーカーは、CD63、CD9、CD81、ALIX、TSG101、フロチリン-1、フロチリン-2、LAMP-1、HSP70、HSP90、RNA、およびDNAからなる群より選択される、エクソソームバイオマーカーである。

10

【0073】

神経変性疾患は、アルツハイマー病、軽度認知障害、血管性認知症、血管性軽度認知障害、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、進行性核上性麻痺、および／またはタウオパシーからなる群より選択され得る。

20

【0074】

方法は、神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患していることが判明した対象を治療する工程をさらに含み得る。

【0075】

「治療する」という用語は、本明細書で用いる場合、（1）疾患の1つまたは複数の症状の出現を予防する、または遅延させること、（2）疾患または疾患の1つもしくは複数の症状の発生を阻害すること、（3）疾患を軽減すること、すなわち疾患または疾患の少なくとも1つ以上の症状の退縮をもたらすこと、ならびに／あるいは（4）疾患の1つまたは複数の症状の重症度の低下をもたらすことを指し得る。

30

【0076】

一態様では、「治療する」という用語は、薬物を投与して、神経変性疾患またはアミロイドーシスの進行を緩慢にすることを指す。

【0077】

本明細書では、対象の神経変性疾患またはアミロイドーシスを検出する方法が提供され、該方法は、対象から採取した試料中のエクソソーム結合バイオマーカーのレベルを検出する工程を含み、基準と比較して増加したエクソソーム結合バイオマーカーのレベルは、対象が神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患していることを示す。

【0078】

一局面では、対象の神経変性疾患またはアミロイドーシスを検出する方法が提供され、該方法は、対象から採取した試料中のエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルを検出する工程を含み、基準と比較して増加したエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルは、対象が神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患していることを示す。

40

【0079】

方法は、試料中の1つまたは複数のエクソソーム結合バイオマーカーの検出を含み得る。これによって、同じエクソソーム上に存在する複数のバイオマーカーの共局在または存在の検出が可能になる。

【0080】

バイオマーカーは、限定ではないが、 $A\beta$ 、APP、 α -Syn、タウ、APOE、SOD1、TDP

50

-43、バスーン、および/またはフィブロンクチンからなる群より選択され得る。

【0081】

方法は、エクソソーム結合バイオマーカーの分子サブタイプのレベルを検出する工程を含み得る。

【0082】

一態様では、 $A\beta$ は $A\beta 42$ または $A\beta 40$ である。いくつかの態様では、 $A\beta$ は、 $A\beta 42$ 、 $A\beta 40$ 、 $A\beta 39$ 、または $A\beta 38$ である。

【0083】

一態様では、 $A\beta$ は前原線維凝集体である。前原線維 $A\beta$ 凝集体は、優先的にエクソソームと結合することが見出された。一態様では、本明細書で定義される方法は、前原線維 $A\beta$ 凝集体に結合したエクソソームの検出を含む。

【0084】

一態様では、凝集バイオマーカーは前原線維凝集体である。凝集バイオマーカーは、 $A\beta$ の前原線維凝集体であり得る。あるいは、凝集バイオマーカーは、APP、 α -Syn、またはタウの前原線維凝集体であり得る。

【0085】

一態様では、基準は対照対象である。

【0086】

一態様では、タンパク質凝集体の前原線維組織状態を決定するために、エクソソーム結合を代用として測定する方法が提供され、前原線維組織状態において対照と比較して増加したタンパク質凝集体のレベルは、対象が神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患していることを示す。

【0087】

一態様では、方法は、CD63、CD9、CD81、ALIX、TSG101、フロチリン-1、フロチリン-2、LAMP-1、HSP70、HSP90、DNA、およびRNAからなる群より選択されるエクソソームバイオマーカーを検出する工程をさらに含み、エクソソームバイオマーカーは、エクソソーム結合バイオマーカーと共局在している。

【0088】

一態様では、方法は、NCAM、L1CAM、CHL-1、およびIRS-1からなる群より選択される神経細胞バイオマーカーを検出する工程をさらに含み、神経細胞バイオマーカーは、エクソソーム結合バイオマーカーと共局在している。

【0089】

一態様では、異なるバイオマーカーの組織的および分子的亜集団を測定する方法が提供される。たとえば、方法は、エクソソーム結合バイオマーカー、遊離（非結合）バイオマーカー、および全（エクソソーム結合および非結合）バイオマーカーの測定を含み得る。方法は、疾患をより良く予測するために、異なるバイオマーカーの相対濃度を測定する工程も含み得る。

【0090】

一態様では、神経変性疾患は、アルツハイマー病、軽度認知障害、血管性認知症、血管性軽度認知障害、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、進行性核上性麻痺、および/またはタウオパシーからなる群より選択される。

【0091】

一態様では、神経変性疾患は、アルツハイマー病および軽度認知障害からなる群より選択される。

【0092】

方法は、神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患している対象を治療する工程をさらに含み得る。

【0093】

方法は、さらに、PET撮像などの脳撮像研究との相関をとる場合がある。これには、特定脳領域の撮像との相関が含まれる。一態様では、脳撮像（PET）と相関のある循環バ

10

20

30

40

50

イオマーカーを特定し、かつ測定する方法が提供される。一態様では、特定脳領域の撮像（PET）と相関のある循環バイオマーカーを特定し、かつ測定する方法が提供される。

【0094】

本発明は、(1) 循環A β の、異なる分子的、生物物理学的、および組織的亜集団の測定および特徴決定に、バイオマーカー（共局在する個々のマーカーを含む）を用いることができる、(2) 血液中の循環エクソソーム結合A β は、異なる患者集団にわたりA β 沈着のPET撮像（大域平均）と強い相関があり得る、(3) 血液中の循環エクソソーム結合A β は、異なる患者集団にわたりA β のPET撮像（初期AD領域、帯状領域）と強い相関があり得る、ならびに(4) 循環エクソソーム結合A β により（アルツハイマー病、軽度認知障害、認知障害なし、血管性認知症、血管性軽度認知障害、および急性脳卒中などの）臨床小群を区別できる、という知見に基づく。

10

【0095】

方法は、治療を必要とする対象に治療有効量の薬物を投与する工程を含み得る。薬物は、たとえばドネペジル、リバスチグマート（Rivastigmate）、またはガラントミンなどのコリンエステラーゼ阻害剤であり得る。薬物はまた、メマンチンなどのNMDA受容体アンタゴニストであり得る。薬物は、ドネペジルとメマンチンとの組み合わせなどの、コリンエステラーゼ阻害剤とNMDA受容体アンタゴニストとの組み合わせであり得る。薬物は、AZD3293などのBACE1阻害剤、または抗体、たとえばアデュカヌマブなどの抗アミロイド抗体であり得る。薬物はまた、TRx0237（LMTX）などの抗タウ薬物であり得る。いくつかの態様では、本明細書に記載される治療有効量の薬物の1つもしくは複数、または2つ以上の組み合わせを、治療を必要とする対象に投与する場合がある。

20

【0096】

いくつかの態様では、デンプン形成タンパク質凝集体の量を減じるのに有効な分子が、治療薬の潜在的な候補になり得る。したがって、いくつかの態様では、方法は、治療を必要とする対象に、次の分子（薬物）：メチルチオニウム塩化物、ロイコ-メチルチオニウムビス（ヒドロメタンスルホナート）、クルクミン、酸フクシン、没食子酸エピガロカテキン、サフラナル、コンゴレッド、アピゲニン、アズールC、ベーシックブルー41、（トランス,トランス）-1-ブromo-2,5-ビス-(3-ヒドロキシカルボニル-4-ヒドロキシ)スチリルベンゼン（BSB）、シカゴスカイブルー6B、-シクロデキストリン、ダウノマイシンヒドロクロリド、ジメチルイエロー、ディレクトレッド80、2,2-ジヒドロキシベンゾフェノン、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド（C16）、ヘミンクロリド、ヘマチン、インドメタシン、ジュグロン、ラクモイド、メクロサイクリンスルホサリチラート、メラトニン、ミリセチン、1,2-ナフトキノン、ノルジヒドログアヤレチン酸、R()-ノルアポモルフィンヒドロブロミド、オレンジG、o-バニリン（2-ヒドロキシ-3-メトキシベンズアルデヒド）、フェルフェナジン、フタロシアニン、リファマイシンSV、フェノールレッド、ロリテトラサイクリン、キナクリンマスタードジヒドロクロリド、チオフラビンS、ThT、およびトリメチル(テトラデシル)アンモニウムブロミド（C17）、ジアリルタルタル、エオシンY、フェノフィブラート、ネオクプロイン、ナイスタリン（nystalin）、オクタデシルスルファート、およびローダミンBの1つもしくは複数、または2つ以上の組み合わせを投与する工程を含み得る。

30

40

【0097】

エクソソーム結合バイオマーカーの増加したレベルは、対象と対照対象との間の1.2倍以上の増加を指し得る。「増加したレベル」という用語は、1.1倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、21倍、22倍、23倍、24倍、25倍、26倍、27倍、28倍、29倍、30倍、31倍、32倍、33倍、34倍、35倍、36倍、37倍、38倍、39倍、40倍、41倍、42倍、43倍、44倍、45倍、46倍、47倍、48倍、49倍、50倍、51倍、52倍、53倍、54倍、55倍、56倍、57倍、58倍、59倍、60倍、61倍、62倍、63倍、64倍、65倍、66倍、67倍、68倍、69倍、70倍、71倍、72倍、73倍、74倍、75倍、76倍、77倍、78倍、79倍、80倍

50

、81倍、82倍、83倍、84倍、85倍、86倍、87倍、88倍、89倍、90倍、91倍、92倍、93倍、94倍、95倍、96倍、97倍、98倍、99倍、および100倍からなる群より選択される増加も指し得る。

【0098】

一局面では、神経変性疾患を発症するリスクのある対象を検出する方法が提供され、該方法は、対象から採取した試料中のエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルを検出する工程を含み、基準と比較して増加したエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルは、対象が神経変性疾患に罹患していることを示す。

【0099】

一局面では、対象の神経変性疾患またはアミロイドーシスを検出し、かつ治療する方法が提供され、該方法は、

10

(a) 対象から採取した試料中のエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルを検出する工程であって、基準と比較して増加したエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルは、対象が神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患していることを示す、工程、および

(b) 神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患している対象を治療する工程を含む。

【0100】

一局面では、対象の神経変性疾患またはアミロイドーシスを治療する方法が提供され、該方法は、

20

(a) 対象から採取した試料中のエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルを検出する工程であって、基準と比較して増加したエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルは、対象が神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患していることを示す、工程、および

(b) 神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患している対象を治療する工程を含む。

【0101】

一態様では、対象の神経変性疾患またはアミロイドーシスを検出し、かつその進行を緩慢にする方法が提供され、該方法は、

30

(a) 対象から採取した試料中のエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルを検出する工程であって、基準と比較して増加したエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルは、対象が神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患していることを示す、工程、および

(b) 神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患している対象を治療する工程を含む。

【0102】

一局面では、試料中のバイオマーカーの凝集状態を決定する方法が提供され、該方法は、試料中のエクソソーム結合バイオマーカーのレベルを検出する工程を含み、基準と比較して増加したエクソソーム結合バイオマーカーのレベルは、バイオマーカーの凝集度の指標となる。

40

【0103】

方法は、エクソソーム結合バイオマーカーのレベルを検出する工程の前に、試料をエクソソーム集団に接触させる工程を含み得る。

【0104】

一態様では、試料中の凝集バイオマーカーは、非凝集バイオマーカーと比較して、エクソソームに優先的に結合する。

【0105】

試料は、対象から採取され得る。

【0106】

一態様では、基準と比較して増加したバイオマーカーの凝集度は、対象の神経変性疾患ま

50

たはアミロイドーシスの指標となる。

【0107】

方法は、神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患している対象を治療する工程を、さらに含み得る。

【0108】

一態様では、試料中のバイオマーカーの凝集状態を決定する方法が提供され、該方法は、試料をエクソソーム集団に接触させる工程、および試料中のエクソソーム結合バイオマーカーのレベルを検出する工程を含み、基準と比較して増加したエクソソーム結合バイオマーカーのレベルは、バイオマーカーの凝集度の指標となる。

【0109】

当業者であれば、本明細書に記載される本発明が、具体的に記載した以外の変形形態および変更形態が可能であることを理解するであろう。本発明はその趣旨および範囲に含まれるそうした変形形態および変更形態をすべて含むものと理解されたい。本発明はまた、本明細書で言及するまたは示す、すべての工程、特徴、組成物、および化合物を個別にまたはまとめて、ならびにそうした工程または特徴の任意の2つ以上のあらゆるすべての組み合わせを含む。

【0110】

本明細書および以下の特許請求の範囲を通じて、文脈に特に定めのないかぎり、「含む (comprise)」という単語ならびに「comprises」および「comprising」などのその変化形は、記載の整数もしくは工程、または整数もしくは工程の群の包含を意味するが、任意の他の整数もしくは工程、または整数もしくは工程の群の排除を意味するものではないことを理解されたい。

【0111】

本明細書では、あらゆる従来刊行物（またはそれから得られる情報）またはあらゆる既知の事項の参照は、そのような従来刊行物（またはそれから得られる情報）または既知の事項が、本明細書が関する試みの範囲（the field of endeavor）の一般知識の一部をなすと了承する、または認める、またはなんら示唆するものではないし、そのように解釈すべきでもない。

【0112】

次に、以下の実施例を参照しながら本発明の特定の態様を記載していくが、そうした実施例は説明のみを目的とし、前記した一般性の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【0113】

本明細書では、あらゆる従来刊行物（またはそれから得られる情報）またはあらゆる既知の事項の参照は、そのような従来刊行物（またはそれから得られる情報）または既知の事項が、本明細書が関する試みの範囲の一般知識の一部をなすと了承する、または認める、またはなんら示唆するものではないし、そのように解釈すべきでもない。

【0114】

材料および方法

細胞培養物。ヒト細胞株SH-SY5Y（神経細胞）、HUVEC（臍帯静脈内皮）、THP-1（単球）、PC-3（前立腺上皮）、およびSK-OV-3（卵巣上皮）をAmerican Type Culture Collectionから入手した。GLI36（グリア）およびSK-OV-3をダルベッコ改変必須培地（DMEM、Gibco）で増殖させた。SH-SY5Yをダルベッコ改変イーグル培地：Nutrient Mixture F-12 Medium（DMEM/F12 Gibco）で培養した。PC-3、THP-1、およびHUVECは、それぞれF-12K、RPMI-1640、およびEGM-2培地で増殖させた。5%ウシ胎仔血清（FBS）を足したEGM-2を除いて、その他のすべての培地に10% FBSおよびペニシリン-ストレプトマイシンを足した。

【0115】

エクソソームの単離および定量化。1～15継代の細胞を、小胞を除いた培地（5%除去FBS）で48時間培養してから、小胞を採集した。エクソソームを含有するすべての培地を0

10

20

30

40

50

.2 μm 膜フィルター (Millipore) で濾過し、分画遠心法 (最初は1万g、次いで10万g) により単離し、APEXプラットフォームを用いたエクソソーム分析に使用した。血液細胞および血小板からエクソソームを単離するために、血液分画から血液細胞を、血小板を豊富に含む血漿から血小板を得た。これらの成分をHEPES緩衝食塩水で洗い、2 mM 塩化カルシウムおよび2 μM カルシウムイオノフォア (A23187) といっしょに37°Cでインキュベートして、エクソソーム産生を刺激した。次いで、前述のようにして、すべての小胞を採集した。エクソソーム濃度の独立した定量化には、ナノ粒子トラッキング分析 (NTA) システム (NS300、Nanosight) を用いた。最適な計測を実現するために、およそ50個の小胞が視野に入るようにエクソソーム濃度を調節した。一貫性を保つために、すべてのNTA測定を同一のシステム設定で行った。

10

【0116】

APEXセンサーの製造。8インチのシリコン (Si) ウエハ上にAPEXセンサーを製造した。簡単に説明すると、熱酸化により10 nmの二酸化ケイ素 (SiO_2) 層を作製し、低圧化学的気相成長 (LPCVD) により145 nmの窒化ケイ素 (Si_3N_4) をウエハに堆積させた。フォトレジストで被覆した後、深紫外線 (DUV) リソグラフィーを実施して、レジストにナノホールアレイパターンを画定した。このパターンを、反応性イオンエッチング (RIE) により、 Si_3N_4 膜に転写した。フォトレジストを除去した後、プラズマ援用化学的気相成長 (PECVD) により SiO_2 の薄い保護層 (100 nm) をウエハの表側に堆積させた。光透過を可能にするために、ウエハの裏側にフォトレジストをスピンコートした; 検知エリアの画定にはリソグラフィー法を用いた。RIEにより Si_3N_4 および SiO_2 をエッチングし、次いで水酸化カリウム (KOH) および水酸化テトラメチルアンモニウム (TM AH) でSiのエッチングを行った。エッチング後、希釈フッ化水素 (DHF) (1:100) を用いて保護 SiO_2 層を除去した。最後に、Ti/Au (10 nm/100 nm) を Si_3N_4 膜に堆積させた。すべてのナノホール寸法およびセンサーの均一性を、走査型電子顕微鏡法 (JEOL 6701) により特徴決定した。

20

【0117】

チャンネルの組み付け。標準的なソフトリソグラフィーにより、マルチチャンネルフローセルを製造した。SU-8ネガ型レジスト (SU8-2025、Microchem) を用いてモールドを作製した。Siウエハにフォトレジストを30秒間、2000 rpmでスピンコートし、65°Cおよび95°Cで、それぞれ2分間および5分間バイクした。UV光に曝露した後、レジストを再びバイクしてから、攪拌下で現像した。現像したモールドをデシケーター内で15分間、トリクロロシランのペーパーで化学処理してから、引き続き使用した。ポリジメチルシロキサンポリマー (PDMS) と架橋剤とを10:1の比率で混合し、それをSU-8モールドに流し込んだ。65°Cで4時間かけて硬化させた後、PDMS層をモールドから切り出し、APEXセンサーに組み付けた。試料の処理用に、1.1 mm生検パンチですべての入口および出口を作製した。

30

【0118】

光学セットアップおよびスペクトル分析。タングステンハロゲンランプ (Stocker Yale Inc.) で、10X顕微鏡対物レンズ越しにAPEXセンサーを照射した。光ファイバーで透過光を集め、分光計 (Ocean Optics) に送った。すべての測定は、室温で、周囲光の干渉を排除するため閉じた箱内で実施した。透過光の強度を、波長 (330 nm~1600 nm) に対するカウントとしてデジタル記録した。スペクトル分析のために、特別注文のRプログラムを用いた局所回帰法による透過ピークの当てはめによって、スペクトルピークを決定した。すべての当てはめを局所的に行った。つまり、ポイントxの当てはめの場合、xからの距離により重みづけしたx付近のポイントを用いて当てはめを行った。マルチオーダー・ポリノミナル曲線による当てはめと比較して、この方法は、分析されるデータポイント数およびデータ範囲がもたらす結果のばらつきを排除することができた。センサーの最適な幾何学的形状の決定 (図10) には、ピーク透過強度を定量化するスペクトル変化、ピーク形状 (半値全幅、FWHM)、および屈折率の変化に応答する検出感度をそれぞれ用いた。測定した透過スペクトルによって、異なるセンサーにわたり均一性が実証

40

50

され、ベースラインのスペクトルピーク位置の標準偏差は0.03 nmであった。すべてのスペクトルシフト ($\Delta\lambda$) を、透過スペクトルピークの変化として決定し、適切な対照実験（詳細は以下を参照のこと）に対し相対的に計算した。

【0119】

センサー表面の機能化。APEXセンサーに分子特異性を付与するために、まず、製造したAu表面を、長活性（カルボキシル化）チオール-PEGおよび短不活性メチル化チオール-PEG（Thermo Scientific）（活性:不活性は1:3、PBS中10 mM）を含有するポリエチレングリコール（PEG）混合物といっしょに室温で2時間インキュベートした。洗浄後、表面を、過剰NHS/EDCが溶解したMESバッファー混合物中、カルボジイミド架橋により活性化させ、特異的プローブおよびリガンド（たとえば、抗体およびA β 42凝集体）と結合させた。すべてのプローブ情報は、表1に記載されている。余剰の非結合プローブをPBS洗浄により除去した。結合させたセンサーは、後で使用するために、PBS中4℃で保管した。すべてのセンサー表面修飾をスペクトル的に観察して、均一に機能化されていることを確認した。

【0120】

（表1）プロファイリングに用いたマーカーおよびそれらのプローブのリスト

10

20

30

40

50

タンパク質 の名称	説明	抗体、 カタログ番号
Aβ42	アミロイド-ベータ42。β-およびγ-セクレターゼによるアミロイド前駆タンパク質の逐次切断による疎水性42ペプチド断片。	Invitrogen, 374200; Abcam, ab34376
APP	アミロイド前駆タンパク質。神経成長および修復に不可欠な役割を果たす大きな膜タンパク質。神経細胞のシナプスで濃縮される。	Fitzgerald, 10R-1097; Biolegend 806001
α-syn	アルファ-シヌクレインタンパク質。脳に豊富であり、シナプス前神経終末に局在する。	Invitrogen, 32-8100; R&D Systems, AF1338
CD9	エクソソームに豊富かつ特徴的なテトラスパニン足場糖タンパク質。	BD Biosciences, 555370
CD63	III型リソソーム膜タンパク質。テトラスパニンファミリーのメンバーであり、エクソソームに豊富かつ特徴的である。	BD Biosciences, 556019
CD81	TAPA-1としても知られる。インテグリンと結合することが知られているテトラスパニンファミリーの広く発現するタンパク質であり、エクソソームに特徴的である。	BD Biosciences, 555675
CHL1	神経細胞接着分子L1様としても知られる、L1の近縁ホモログ。神経細胞外マトリックスおよび細胞接着タンパク質であり、神経系発生およびシナプス可塑性において役割を果たし、シグナル伝達経路に関与し得る。	R&D Systems, MAB2126, AF2126
IRS-1	インスリン受容体基質1。インスリンによるさまざまな細胞プロセスの制御を仲介できるシグナリングアダプタータンパク質。	R&D Systems, MAB39781; Fitzgerald, 70R-35306

10

20

30

40

50

L1CAM	神経細胞接着分子L1。神経細胞遊走、軸索伸長、シナプス形成、ミエリン形成、および神経細胞分化などのプロセスに 関与している膜貫通タンパク質。	Invitrogen, 13- 1719-82
NCAM	神経細胞接着分子。同種親和性結合する糖タンパク質であって、 神経細胞同士の接着、神経突起束状化、および 神経突起の伸長に関与する細胞接着分子である。 シナプスの可塑性ならびに学習および記憶において 役割を果たす。	BD Biosciences, 559049; R&D Systems, AF2408
Tau	タウ。微小管を安定させる、微小管関連タンパク質。 中枢神経系の神経細胞に豊富である。	Research Instruments, MN1000; R&D Systems, AF3494

10

標的miRNA プローブ配列	標的miRNAプローブ配列
miR 9	5 - UUUCGGUUAUCUAGCUUUAUUU-3 -ビオチン
miR 15b	5 - UAAACCAUGAUGUGCUGCUAUU-3 -ビオチン
miR 29b	5 - CACUGAUUUCAAAUGGUGCUAUU-3 -ビオチン
miR 29c	5 - ACACCAGGAGAAAUCGGUCAUU-3 -ビオチン
miR 107	5 - AUAGCCCUGUACAAUGCUGCUUU-3 -ビオチン
miR 146a	5 - CCCAUGGAAUUCAGUUCUCAUU-3 -ビオチン
miR 181c	5 - UCACCGACAGGUUGAAUGUUUU-3 -ビオチン

20

30

【0121】

APEXシグナル増幅。APEX増幅を確立するために、シグナル増強のための不溶性光産物の酵素的成長を組み入れ、プラットフォームを構築するための光基質濃度および反応持続時間を最適化した。簡単に説明すると、エクソソームを、CD63機能化APEXセンサー（BD Biosciences）といっしょに10分間インキュベートした。次いで、結合した小胞をビオチン化抗CD63抗体で標識した（Ancell、10分間）。対照実験として、結合した小胞に対し、同量のビオチン化IgGアイソトープ対照抗体（Biolegend）を用いて、増幅効率を決定した。非結合抗体を洗浄した後、ニュートラアビジン（Thermo Scientific）と結合させた高感度西洋わさびペルオキシダーゼを、結合した小胞と反応させ、それから光基質として濃度の異なる3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド（Life Technologies）を投入した。リアルタイムのスペクトル変化を観察して、最適な基質濃度および反応持続時間を決定した。最適化条件は、1 mg/mLで3分間と決定された。インキュベーションおよび洗浄の流量はすべて、それぞれ3 μ l/分および10 μ l/分に維持した。不溶性光産物の局在付着を走査型電子顕微鏡法により確認した。この最適化ワークフローを図11aに示す。

40

【0122】

この条件セットを用いて、既知量のエクソソームをさらに滴定し、それらの関連のAPEXシグナルを測定した。検出シグナルを生成できる最低標的濃度としてのAPEX検出限界 =

50

3 x (対照からのバックグラウンドシグナルの標準偏差) と決定した。

【0123】

APEXタンパク質検出。すべてのセンサー表面を2% w/vウシ血清アルブミン (BSA) でブロックして、非特異的タンパク質結合を減じた。機能化センサーにエクソソームを投入し、室温で10分間インキュベートしてエクソソームを捕捉させ、PBSで洗って非結合分を除去した。小胞外タンパク質標的の場合、上記のように、APEX増幅のためにエクソソームを検出抗体で直接標識した。小胞内タンパク質標的の場合、エクソソームを追加の固定化および透過処理 (eBioscience) に供してから、検出抗体で標識した。APEX増幅の前および後にスペクトル測定を実施し、特別設計のRプログラムで分析した。

【0124】

APEX miRNA検出。APEXセンサーをp19タンパク質 (New England Biolabs) で、そのキチン結合ドメインにより機能化し、2% w/v BSAでブロックした。miRNA検出のために、エクソソームライセートをビオチン化RNAプローブ (350 nM) といっしょに15分間インキュベートして、標的miRNA鎖とハイブリダイズさせた。この混合物を、結合バッファー (1x p19 Binding Buffer、pH 7.0、40U RNase阻害剤、0.1 mg/mL BSA) 中、機能化センサーに投入して、ハイブリダイズしたmiRNA標的/RNAプローブ二重体のp19捕捉を可能にした。APEX増幅のために、結合したビオチン化二重体に、ニュートラアビジン (Thermo Scientific) と結合させた高感度西洋わさびペルオキシダーゼを投入した。スペクトル測定を実施し、特別設計のRプログラムで分析した。

【0125】

酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)。ELISAプレート (Thermo Scientific) にキャプチャー抗体 (5 µg/ml) を吸着させ、Superblock (Thermo Scientific) でブロックしてから、試料といっしょにインキュベートした。PBST (0.05% Tween 20を含むPBS) で洗浄した後、検出抗体 (2 µg/ml) を添加し、室温で2時間インキュベートした。西洋わさびペルオキシダーゼと結合させた二次抗体 (Thermo Scientific) および化学発光基質 (Thermo Scientific) と一緒にインキュベートした後、化学発光強度を測定してタンパク質を検出した (Tecan)。

【0126】

ウェスタンブロッティング。超遠心分離法により単離したエクソソームを、プロテアーゼ阻害剤 (Thermo Scientific) を含有する放射性免疫沈降アッセイ (RIPA) バッファーに溶解させ、ビスニコニン酸アッセイ (BCAアッセイ、Thermo Scientific) により定量化した。タンパク質ライセートをドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離させ、ポリフッ化ビニリデン膜 (PVDF、Invitrogen) に転写し、タンパク質マーカー：HSP90 (Cell Signaling)、HSP70 (BioLegend)、フロチリン1 (BD Biosciences)、CD63 (Santa Cruz)、ALIX (Cell Signaling)、TSG101 (BD Biosciences)、LAMP-1 (R&D Systems)、および神経細胞マーカーNCAM (R&D Systems) に対する抗体を用いて免疫ブロットした。西洋わさびペルオキシダーゼと結合させた二次抗体 (Cell Signaling) とのインキュベーション後、増強した化学発光により免疫検出した (Thermo Scientific)。

【0127】

タンパク質の凝集。凍結乾燥したNH₄OH処理Aβ42タンパク質 (rPeptide) をNaOH (60 mM、4°C) に再懸濁させ、超音波処理し、PBS34中pHをpH 7.4に調節した。このタンパク質を直ちに0.2 µm膜フィルター (Millipore) で濾過し、その濾液をより小さいAβ42凝集体として用いた。より大きいAβ42凝集体の調製では、タンパク質を上記のように処理し、攪拌しながら1時間インキュベートしてさらなる凝集を誘導し、それから0.2 µm膜フィルター (Millipore) で濾過した。その濾液を大きいAβ凝集体として用いた。同様のサイズのBSA凝集体を対照として調製するために、2% w/v BSAをPBSに溶解させ、80°Cで、1時間および2時間加熱して、それぞれ小さい対照凝集体および大きい対照凝集体のクラスターリングを誘導した。

【0128】

凝集体のサイズ決定。A β 42凝集体およびBSA凝集体の流体力学的直径を動的光散乱分析により決定した（Zetasizer Nano ZSP、Malvern）。4°Cで3 x 14回測定を実施した。Z平均直径および多分散性を分析した。各測定につき自己相関関数および多分散性を観察して、サイズ決定する試料の質を確保した。

【0129】

エクソソーム-A β 結合の特徴決定。調製したタンパク質凝集体（A β 42およびBSA対照）を、前述したようにEDC/NHS結合を介するAPEXセンサーの表面機能化に用いた。非結合タンパク質凝集体をPBSで洗い流した。得られた透過スペクトルシフトから、タンパク質結合体の量を測定した。この情報を、結合親和性を正規化するために、結合したタンパク質凝集体の数、およびそれらのエクソソーム結合用の結合した全タンパク質表面積（詳しい情報は下記を参照）の決定に用いた。タンパク質凝集体での表面機能化に次いで、センサーにエクソソーム（10¹⁰/ml）を投入した。3秒ごとに合計480秒間にわたりスペクトル変化を測定して、リアルタイム動態センサーグラムを構築した。

【0130】

異なるサイズのタンパク質凝集体のエクソソーム結合動態および結合親和性を決定した。タンパク質凝集体サイズの差、ならびに（検知表面からの距離の増加に伴う）SPR関連の感度の指数的減衰を説明するために、次式：

$$S = E \times \int_0^{2r} \pi \left[r^2 - (r-z)^2 \right] \times e^{(-2z/d)} dz$$

を用いて、エクソソームと相互作用する結合凝集体の総表面積を計算した。式中、Sはシグナル、zはセンサー表面からの距離、Eはz = 0のときの電場であり、この場合の定数1/dは減衰長さであって、現センサー設計では200 nmに設定され、また、rは結合したタンパク質凝集体の半径である。

【0131】

すべてのタンパク質凝集体は、透過型電子顕微鏡写真からわかるように球体に近く（図3b、左）、それらのrは動的光散乱分析で決定した。上の式を用いてセンサーに結合したタンパク質凝集体の数、ならびにそれぞれの総表面積を決定し、それによってエクソソームとの相互作用に使用可能な結合部位の数を概算した。すべてのエクソソーム結合データ（ $\Delta\lambda$ ）をそれぞれのタンパク質結合部位に対し正規化した。正規化A β 42結合データを、同様のサイズのBSA対照に対し相対化し、当てはめにより結合親和性定数KDを決定した。

【0132】

走査型電子顕微鏡法。すべての試料を、半分に薄めた（half-strength）Karnovsky固定液で固定し、PBSで2回洗浄した。一連の濃度上昇エタノールで脱水後、試料を移して臨界乾燥（Leica）させ、次いで金（Leica）でスパッタコートし、それから走査型電子顕微鏡（JEOL 6701）で撮像した。

【0133】

透過型電子顕微鏡法。エクソソームを金ナノ粒子（15 nm、Ted Pella）で免疫標識し、2%パラホルムアルデヒドで固定し、銅グリッド（Ted Pella）へ移した。結合した小胞を洗浄し、シュウ酸ウラニルとメチルセルロースとの混合物で対比染色した。乾燥させた試料を透過型電子顕微鏡（JEOL 2200FS）で撮像した。

【0134】

臨床試料の採集。この研究は、NUHおよびNUS治験審査委員会の承認を受けた（2015/00441、2015/00406、および2016/01201）。すべての被験者は、治験審査委員会が承認したプロトコルにしたがいリクルートされ、インフォームド・コンセントがなされた。リクルートされた被験者全員が国立大学病院（NUH、シンガポール）で神経心理学的査定をいくつか受け、それには認知能力を査定するミニメンタルステート検査（MMSE）、Montreal Cognitive Assessment（MoCa）、および血管性認知症バッテリ

ー (VDB) が含まれた。AD、MCI、またはNCIの臨床診断は、神経心理学的査定、ならびに臨床的特徴および血液調査の評価により下された。VaDおよびVMCIの臨床診断は、神経心理学的査定の組み合わせ、脳卒中の臨床歴、および磁気共鳴撮像 (MRI) により観測される脳血管疾患の程度から下された。すべての臨床査定および分類は、公表基準46~48にしたがい、APEX測定とは無関係に実施した。急性脳卒中の血漿試料は、脳卒中和診断された入院24時間以内の患者から採集した。長期的血漿試料は、1年にわたるフォローアップの外来通院時に患者から採集し、PETによる脳撮像はしなかった。血漿の採集では、(該当する場合は) PET放射性トレーサーの注射前に、被験者の静脈血 (5 ml) をEDTAチューブに採血し、直ちに処理した。簡単に説明すると、すべての血液試料を10分間、400 g (4℃) で遠心機にかけた。パフイーコート破壊せずに血漿を移し、10分間、1100 g (4℃) で再び遠心機にかけた。すべての血漿試料を非特定化し、APEXプラットフォームでの測定まで-80℃で保管した。すべてのAPEX測定を、PET撮像結果および臨床診断を盲検化して実施した。

10

【0135】

臨床APEX測定。すべての血漿試料を、補充図15aに略図化したアッセイ構成にしたがい測定した。簡単に説明すると、エクソソーム結合Aβ42集団を測定するために、小胞の精製も単離も必要とせず、Aβ42捕捉およびCD63検出 (Aβ42+ CD63+) により未変性血漿試料を直接用いた。血漿試料中の非結合Aβ42集団の存在を示すために、サイズ排除濾過 (カットオフサイズ = 50 nm、Whatman) により、サイズが大きい濾滓を除去した。これは、Aβ42捕捉およびAβ42検出に基づくこのアッセイ構成では非結合Aβ42と全Aβ42とを区別できなかったため、必要であった。非結合Aβを測定するために、血漿濾液をAβ42捕捉およびAβ42検出 (Aβ42+ Aβ42+) により評価した。なお、この濾過は、非結合Aβ42集団の存在を実証するために実施しただけであって、未変性血漿試料からより反映性の高いエクソソーム結合Aβ42だけを直接測定する臨床のコンテキストでは不要である。全Aβ42を測定するために、未変性血漿試料をAβ42捕捉およびAβ42検出 (Aβ42+ Aβ42+) により直接評価した。すべての測定で、APEXセンサー用ブロック剤として5% BSAを用いた。また、IgGアイソタイプ対照抗体で機能化した対照センサー上で同じ試料をインキュベートした、試料対応陰性対照を含めた。すべての測定をこのIgG対照に対し相対化して、試料対応非特異性結合を明らかにした。

20

【0136】

陽電子放射断層撮影法 (PET) による撮像。採血後、Siemens 3T Biograph mMRシステム (Siemens Healthineers) を用いて被験者を走査し、PET画像およびMR画像を同時に取得した。PETデータは、370 MBqの11C-Pittsburgh Compound B (PiB) を静注した40~70分後に取得された。MRデータは、取得用の12チャンネルのヘッドレシーブコイルを用いて取得され、PET減弱補正用のUltrashort Echo Time (UTE) 画像およびT1強調磁化準備型グラジエントエコー (MPRAGE) 画像 (1 mm 等方性分解能、TI / TE / TR = 900 / 3.05 / 1950 ms) からなった。

30

【0137】

PETデータの分析。Freesurfer (5.3.0) でT1強調MPRAGE画像を処理して、PETデータ分析用に皮質の領域分割を得た。Ordinary Poisson Ordered Subset Expectation Maximization (OP-OSEM) アルゴリズムを用いてPET画像を復元し、4 mmガウスフィルタを用いて滑らかにした。UTEに基づくμ-マップを用いてデータを減弱化した。次に、得られた減弱補正後の標準化取込値 (SUV) 画像をAdvanced Normalization Tools (ANTs) を用いてMPRAGE画像と共位置合わせし、被験者固有のFreesurfer領域分割を用いて平均小脳灰色物質強度に対し相対的に標準化取込値比 (SUVR) を計算した。特定領域の平均SUVRを計算し、全脳領域のSUVRを平均化することにより、各患者の大域平均SUVRを計算した。

40

【0138】

統計学的分析。すべての測定を三つ組で実施し、データを平均±標準偏差で示す。スチューデントの両側t検定により有意度検定を実施した。試料間比較では、複数対の試料をそ

50

れぞれ検定し、得られたP値をボンフェローニ補正によって多重仮説検定用に調節した。調節後P < 0.05を有する値を有意と決定した。対応のある一元配置ANOVA検定によって、分析のおよび生物学的変動係数（すなわち、群内、群間、および全体）を決定した。この臨床研究では、線形回帰といっしょに相関を実施して適合度（R²）を決定した。すべての統計学的分析は、Rパッケージ（R-package）（バージョン3.4.2）およびGraphpad Prism 7を用いて実施した。

【0139】

実施例1

エクソソーム結合Aβの増幅プラズモン分析

ADの最初期の病理特徴のひとつが、脳内のAβ沈着である。これらのプラークは、異常アミロイドタンパク質断片、主として疎水性のスプライスバリエーションAβ42のクラスターリングから形成される。Aβタンパク質は細胞外スペースへと放出され、血流に入って循環し得る。同じく細胞外スペースに見られるエクソソームは、哺乳類細胞から多胞エンドソームと細胞膜との融合により分泌されるナノスケールの膜小胞である。このエクソソーム新生の際、陥入する細胞膜に糖タンパク質および糖脂質が組み入れられ、新生エクソソーム10、11に分かれる。これらの表面マーカーによって、エクソソームは細胞外Aβタンパク質と結合（associate）かつ結合（bind）することができる（図1a）。神経細胞起源（SH-SY5Y細胞）に由来する細胞外小胞の多峰的な特徴決定により、それらのエクソソーム形態、サイズ分布、および分子組成を確認した（図5）。

【0140】

小胞の透過型電子顕微鏡分析から、それらがAβ42タンパク質凝集体と結合する能力がさらに明らかになった（図1bおよび図5）。

【0141】

エクソソーム-Aβ結合を評価するために、エクソソーム分子共局在の増幅マルチパラメトリックプロファイリングのためのAPEXプラットフォームを開発した。このシステムは、二層フォトニック構造としてパターン形成されたプラズモンナノホールの周期的アレイにより透過型SPRを測定し、また、インサイチューの酵素的変換により、結合したエクソソーム上に不溶性光産物を急成長させる（図1c）。（センサー上面で生じる）APEX酵素的付着を補完するために、結合二層フォトニックシステムに同じサイズのプラズモンナノホールをパターン形成し、（酵素活性から離れる）裏側照射（図20）によりSPR測定を強化した。得られた酵素的付着は、透過光スペクトルの赤方偏移（スペクトルシフトΔλ、図1d）で実証されたように、SPRシグナル増幅に関し屈折率を安定的に変化させるのみならず、分子共局在分析に関し空間的に画定される。センサーに結合したエクソソームのAPEX増幅前および後の走査型電子顕微鏡像により、酵素的変換後の光付着物の局在成長を確認した（図6）。

【0142】

こうして、開発したAPEXプラットフォームを用いてAβタンパク質とエクソソームとの結合をAD患者および対照被験者の臨床血液試料から直接測定し、測定値と、大域的および局所性脳プラーク沈着のPET撮像との相関をとった（図1e）。高スループットの複合的臨床分析のために、高度な製造法（すなわち深紫外線リソグラフィー、図7）によって8インチウエハ上にセンサーマイクロアレイを作製し、各ウエハは2000の検知素子を有する40超のマイクロアレイチップを収容できた（図8a）。図1fは、本研究で並行測定に使用した、開発したAPEXマイクロアレイチップの写真を示す。開発したセンサーの走査型電子顕微鏡像から、製造が非常に均一であったことがわかった（図8b）。

【0143】

複合的プロファイリングのための最適化シグナル増幅

最初に酵素的APEX増幅を開発した。一連のセンサー機能化、つまり抗体結合、エクソソーム結合、酵素標識、および光産物増幅を実施し、段階的な全スペクトルシフト（累積Δλ、図2a）を測定した。エクソソームに豊富かつ特徴的なIII型リソソーム膜タンパク質である対CD63抗体でセンサーを機能化して、神経細胞（SHSY5Y）由来の小胞を捕捉し

10

20

30

40

50

た。不溶性光産物の局在付着を促進するために、西洋わさびペルオキシダーゼをカスケード酵素として組み入れ、その可溶性基質（3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド）の変換を触媒させた。センサーに結合した小胞を別の抗CD63抗体で酵素標識した。酵素標識は有意なスペクトル変化をもたらさなかったが、光産物の形成はおよそ400%のシグナル増強をもたらした。それと比較して、IgGアイソトープ対照抗体を用いた対照実験は、微小なバックグラウンド変化を実証した（図9）。重要なことに、このSPRシグナル増幅は、走査型電子顕微鏡法により確認すると、高局在化した光付着物による面積範囲の増加と、高い相関があった（図2b）。

【0144】

（センサー上面で生じる）酵素的増幅を補完するために、APEXセンサーの設計をその分析性能および安定性が向上するよう最適化した。表面照射にのみ対応する既成の金担持ガラスの設計（図20）と比較して、APEXの二層プラズモン構造は、裏面照射によるSPR励起を可能にする（図2c）。この新規な最適化設計は、裏面照射による強力な透過型SPRを示したのみならず（図10a~c）、おそらくは酵素活性に直接入射する照射（すなわち温度変動）の低減により、分析安定性も実証した（図10d）。酵素基質濃度ならびに反応持続時間の最適化によって、APEXアッセイをさらに確立した（図2d）。一定した裏面照射により、異なる基質濃度と関連するリアルタイムのスペクトル変化が観察され、また、10分未満でかなりのシグナル増幅が達成されること、したがって全APEXワークフローを1時間未満で完了できることが見出された。

【0145】

こうした最適化条件をそろえ、次にエクソソームの定量化についてのAPEX検出感度を測定した。神経細胞（SH-SY5Y）由来小胞を標準的なナノ粒子トラッキング分析により定量化した。抗CD63抗体を用いて滴定実験を実施した（図2e）。最適化されたAPEX増幅は、検出感度を10倍向上させて強化できると決定され、およそ200エクソソームの検出限界（LOD）が確立された。この観測された感度は、今のところ報告されているバルクのエクソソーム測定では最高のLODであり、ウェスタンブロットティングおよび化学発光ELISAよりも、それぞれ 10^5 倍および 10^3 倍良好である。

【0146】

マイクロアレイAPEXプラットフォームを用いて、神経変性疾患関連の多様なマーカーをプロファイリングするアッセイをさらに開発した。アミロイド β （A β 42）、アミロイド前駆タンパク質（APP）、アルファ-シヌクレイン（ α -syn）、L1近縁ホモログ（CHL1）、インスリン受容体基質1（IRS-1）、神経細胞接着分子（NCAM）、およびタウタンパク質といったタンパク質マーカー（図2f）の特異的アッセイを確立した。重要なことに、さらなるAPEXアッセイワークフローの開発により（図11a）、このプラットフォームは、小胞外および小胞内タンパク質の両方ならびにエクソソームmiRNAの検出のためのシグナル増幅能を実証した（図11b）。アッセイ開発に用いたすべての検出プロトコルは、表1に記載されている。

【0147】

A β 凝集体とエクソソームとの結合の増大

次に、開発したAPEXプラットフォームを用いて、エクソソームと、異なる構造形態の病的A β タンパク質との結合を評価した。アミロイド播種および線維化のさまざまな段階を模倣するために、アミロイドプラークの主要成分A β 42の異なるサイズの凝集体を調製した。クラスティングの程度を変えて異なるサイズのA β 42凝集体を形成し（図3a、実験の詳細は「方法」を参照されたい）、それらの球状形態および単峰サイズ分布を、それぞれ透過型電子顕微鏡法および動的光散乱分析により確認した（図3b）。より大きいA β 42凝集体が線維構造を形成する強い傾向を実証したことが、さらに注目された（図12）。

【0148】

エクソソーム-A β 結合の動態を決定するために、調製したA β 42凝集体をAPEXプラットフォームに固定化し、センサーを等濃度の神経細胞由来エクソソームといっしょにイン

10

20

30

40

50

キュベートした（図3c）。比較として、対照実験で、同様のサイズのウシ血清アルブミン（BSA）凝集体（図13）を調製し、特徴決定した。リアルタイムのエクソソーム結合を測定することにより、エクソソームは凝集体のサイズにかかわらず、同様のサイズのBSA対照よりも強力にA β 42凝集体と結合できることが実証された（図3d）。より重要なことに、より小さいA β 42凝集体との結合親和性（図3d、左）と比較して、小胞はより大きいA β 42凝集体との有意に高い（5倍よりも高い）親和性を示した（図3d、右）。すべての親和性をA β 42凝集体表面積に対し正規化し、それぞれのBSA対照に対し相対化した（詳細は「方法」を参照されたい）。

【0149】

次に、種々の細胞起源に由来する細胞外小胞を用い、APEXプラットフォームを使って、それぞれの、より大きいA β 42凝集体との結合を測定した（図3e）。ナノ粒子トラッキング分析により決定した、さまざまな細胞起源に由来する等濃度の小胞（図14）を、A β 42機能化センサーといっしょにインキュベートした。試験したすべての細胞起源のうち、神経細胞、赤血球、血小板、および上皮細胞由来の小胞はA β 42凝集体とのより強力な結合を実証したが、グリア細胞および内皮細胞由来の小胞は微々たる結合しか示さなかったことが注目された。次に、これらの各細胞起源に対する一団の特異的マーカー、ならびに汎エクソソームマーカー（すなわちCD63）を、結合した小胞のAPEXシグナル増幅に用いた。CD63は、シグナル増強に関し、試験したすべての小胞にわたり性能が一貫していた。このマーカー特定により、CD63を用いて、エクソソーム結合A β を特定し、かつ測定する（A β 42+CD63+と定義される；図15）APEXアッセイを開発した。

【0150】

血中エクソソーム結合A β から明らかになる脳プラーク負荷

エクソソームと、アミロイドプラークの構成要素である前原線維A β 凝集体との増大した結合に鑑み、エクソソーム結合A β は、脳プラーク負荷をより反映した循環バイオマーカーとなり得る、という仮説を立てた。この仮説を検定するために、さまざまな抗体を用いて異なるAPEXアッセイを開発して、臨床血液試料由来の異なる循環A β 42集団を評価した（図15a）。具体的には、エクソソーム結合A β 42集団を特徴決定するために、APEXアッセイを、未変性血漿からA β 42を直接濃縮し、捕捉されたA β 42と結合したCD63の相対量を測定するよう設計した。このアッセイ構成は、A β 42+CD63+集団の特異的検出を示したのみならず（図15b~c）、機能的適性も反映しており、前原線維A β 凝集体とエクソソームとの増大した結合により、結合CD63シグナルを、全循環A β 42中の前原線維A β 42の相対量を測定する代理指標とみなすことができた。非結合A β 42集団の存在を示すために、サイズ除去濾過によって血漿中のサイズが大きい濾滓（たとえばエクソソーム）を除去してから、血漿濾液中のA β 42を測定した。最後に、全循環A β 42を測定するために、未変性血漿を直接A β 42濃縮およびA β 42検出により評価した。

【0151】

次に、（1）APEXは循環A β 42を血液試料から直接測定できるか、（2）異なる血中A β 42集団は脳プラーク負荷とどれほど相関があるか、（3）特定の循環A β 42集団はさまざまな臨床群を区別可能か、という主要な問題に取り組むことを目的として可能性臨床試験を行った。

【0152】

こうした目標を達成するために、ADと診断済（n = 17）、軽度認知障害と診断済（MCI、n = 18）、認知障害ではない健常対照（NCI、n = 16）、ならびに血管性認知症（VaD、n = 9）および神経血管性不全（すなわち血管性軽度認知障害、VMCI、n = 12；および急性脳卒中、n = 12）の臨床対照の、同年齢の被験者（n = 84）をリクルートした。すべての臨床情報は表2に記載されている。すべての被験者を血液サンプリングおよびAPEX分析にリクルートした。急性脳卒中患者は例外として、すべての被験者が、同時に脳アミロイドプラークのPET撮像を行うことにも同意した。PET撮像用のPittsburgh Compound B（PiB）放射性トレーサーを注射する直前に血漿試料を採集した。撮像した臨床群間および群内で、PET撮像によって幅広い脳プラーク負荷が明らかになり

10

20

30

40

50

(図4a)、脳局所多様性が実証され(表2)、発表済みの他の臨床研究とも一致を見た。
【0153】

(表2) 臨床情報およびPET撮像の標準化取込値比(SUVr)

リクルート時の 診断	被験者数 n=34	女性 (%)	男性 (%)	年齢範囲	年齢 中央値	標準化取込値比(SUVr)				
						左後方帯状	右後方帯状	左後頭	右後頭	大域平均
アルツハイマー 病(AD)	17	14(82%)	3(18%)	57-89	76	1.26-2.58	1.28-2.51	1.17-1.94	1.20-1.97	1.18-2.14
軽度認知障害 (MCI)	18	7(39%)	11(61%)	58-82	75	1.05-2.66	1.11-2.54	1.07-1.84	1.05-2.28	1.06-2.26
認知障害なし (NCI)	16	7(44%)	9(56%)	55-83	75	1.12-1.97	1.02-2.18	1.07-1.48	1.07-1.73	1.08-1.74
血管性認知症 (VaD)	9	5(56%)	4(44%)	59-81	76	0.93-1.41	0.90-1.32	0.92-1.54	0.92-1.52	1.03-1.35
血管性 軽度認知障害 (vMCI)	12	7(58%)	5(42%)	62-81	72	1.04-2.20	1.01-2.14	1.04-1.65	1.05-1.65	1.06-2.02
急性脳卒中	12	匿名かつ非特定化				アミロイドプラークのPET撮像は実施せず				

10

20

AD:アルツハイマー病、MCI:軽度認知障害、NCI:認知障害なし、VaD:血管性認知症、V
MCI:血管性軽度認知障害

【0154】

開発したAPEXアッセイ(図11a)を用いて、これらの臨床血漿試料中の異なる循環Aβ42集団、つまりエクソソーム結合Aβ42、非結合集団、および全循環Aβ42を評価した(図4b)。エクソソーム結合Aβ42集団は、エクソソームマーカー(すなわちCD63、CD9、およびCD81)および神経細胞マーカー(すなわちNCAM、L1CAM、およびCHL-1)による強力な共局在シグナルを示し、この集団において神経細胞エクソソームが大きな割合を占め得ることが示唆された(図16a)。非結合Aβ42の測定は血漿濾液で実施したので、これらの濾液をさらに特徴決定し、それらの微々たる小胞の数、ならびにエクソソームマーカーおよび神経細胞マーカーによるシグナルの微小な共局在を確認した(図16b~c)。大域PETアミロイド撮像との相関をとると、エクソソーム結合Aβ42の測定値は、非結合Aβ42(図4b、中央、 $R^2 = 0.0193$)または全Aβ42(図4b、右、 $R^2 = 0.1471$)と比較して、最高の相関を示した(図4b、左、 $R^2 = 0.9002$)。興味深いことに、全Aβ42の測定値により実証された、低い、かつ負の関連(本研究でも他の発表済みの報告でも示されている)と違って、エクソソーム結合Aβ42集団からの相対的なCD63測定値は、脳アミロイドプラークのPET撮像との高相関かつ正の関連を示した。この知見は、(1)エクソソームは前原線維Aβ42凝集体、特に容易に原線維を形成できるより大きい凝集体との増大した結合を示した(図3d)、(2)PETトレーサーはより大きいアミロイド原線維には大いに結合するが、より小さい凝集体との結合はほぼ見られない、という、類似のエクソソームおよびPETトレーサーのAβ42結合優先性によるものと考えられる。なお、この高い相関は脳領域特異性も実証しており、エクソソーム結合Aβ42の測定値は、後頭領域(AD後期の領域、図17b)よりも帯状領域(AD初期の領域、図17a)の脳プラーク負荷と、より強い相関を示した。

30

40

【0155】

臨床診断の区別については、非結合集団でも全Aβ42集団でもなくエクソソーム結合Aβ42のAPEX分析だけが良好な特異性を実証した(図4d)。具体的には、エクソソーム結合Aβ42の測定値は、AD臨床群同士(すなわちADとMCI、 $P < 0.01$)のみならず、他の健常および臨床対照からも($P < 0.0001$ 、スチューデントのt検定)区別できた。この実証された特異性は、さまざまな臨床群の区別に関し、PET脳アミロイド撮像と同

50

等である（図18）。一方、血漿細胞外小胞のナノ粒子トラッキング分析では、すべての臨床群にわたり小胞のサイズも濃度も有意差がなかった（図19）。

【0156】

実施例2

ADは重度の認知症の最も一般的な形態である。その複雑かつ進行性の神経病理が理由で、疾患改変治療の成功には早期の検出および時宜を得た介入が欠かせない。ADの血清バイオマーカーを見つけることに高い関心が寄せられているものの、その開発はいくつかの難題が理由で混迷している。まず、脳脊髄液中のその等価物と違って、血流中の病理AD分子は、濃度ははるかに低いことが実証されている。血漿中A β レベルは、従来のELISAアッセイの検出限界の下限に近い傾向があり、この制約が、発表された諸報告でいくつかの知見の矛盾をもたらした可能性がある。二つ目は、血漿中A β の分析と、AD最初期の病理特徴である脳プラーク沈着との相関関係がほとんど確立されていないことである。考えられる理由の一つは、異なる測定方法論に起因し得る。脳アミロイド負荷の決定によく使われるPET撮像プローブは、不溶性原線維の付着を優先的に測定するが、従来のELISA測定では、血漿中の可溶性A β を測定する。加えて、血液に基づく測定値と脳病理との潜在的相関が、従前の画一的な血液測定により隠れていたかもしれない。しかし、この差に依拠するのは、より基本的な問題、つまり脳内の原線維の病理をよりよく反映できる循環A β タンパク質の亜集団があるかどうか、ということである。

【0157】

異なる循環A β 集団を区別すべく、血漿から直接エクソソーム結合A β 、非結合A β 、および全A β のマルチパラメトリックな分析を行う専用の分析プラットフォーム（APEX）を開発した。具体的には、センサー設計、デバイス製造、およびアッセイ開発の新しい技術的進歩を使って、光性能および検出能の増大を実現する（図20）。センサーの設計および製造という点では、APEXプラットフォームは、パターン形成された窒化ケイ素膜に載った金ナノホールの周期的アレイを備え、大規模な精密ナノパターン形成の最新製造プロセス、深紫外線リソグラフィーにより製造される。APEX技術はこうした技術的進歩のおかげで、（1）光性能の向上（すなわち、二方向の光照射によりSPR検出を可能にする増大した透過強度）、および（2）信頼性の高い大規模生産を実現する。アッセイ技術という点では、APEXプラットフォームは、速やかなインサイチューの酵素的変換を活用して、高局在の増幅シグナルを実現する。この開発は、多様な標的（たとえば小胞内タンパク質およびRNA標的）の高感度の検出を可能にするだけでなく、複数の標的が同時にエクソソームに存在するときだけ不溶性付着物が局所形成されるので、マルチパラメトリックな集団研究のエクソソーム共局在分析を容易にする。これらの技術的進歩の集大成により、観測されたAPEXの感度は、エクソソームプロファイリングに関し今までに報告されたなかで最高となり、標準的なELISA測定をはるかに凌ぐものである。開発したAPEXプラットフォームを用いて、エクソソームと、原線維アミロイドプラークの主構成要素である、より大きい前原線維A β との結合の増大を実証した。臨床血漿試料中のエクソソーム結合アミロイドの亜集団（CD63+ A β 42+）をさらに特定し、定量化すると、さまざまな臨床集団（すなわち、AD、MCI、認知的に正常な対照、ならびに他の神経変性疾患および神経血管性疾患を有する臨床対照）にわたり、脳アミロイドプラーク負荷との高相関が見出された。

【0158】

異なる循環A β 集団の評価をすることは、AD研究および臨床ケアのパラダイムシフトをもたらし得る。積み重なる証拠が、前原線維A β 凝集体がAD神経変性の有毒なドライバーとして機能し得ることを裏付けている。それらが優先的にエクソソームと結合すること、ならびにヒトアミロイドプラークにおけるエクソソームマーカーの濃縮に関する最近の知見は、存在し得る新しいプラーク播種の機構に光を当てるのみならず、複雑なAD病理をより反映する循環バイオマーカーとしてのエクソソーム結合A β の重要性も示唆している。したがって本研究は、技術開発に関してもバイオマーカーの改良に関しても、他の前臨床および臨床研究を補完できると考えられる。技術開発の点では、たとえば、IP質量

分析は不偏性の分子スクリーニングを可能にし、かつバイオマーカーの発見に、特に異なる分子アイソフォームおよびバリエーション（たとえば（APP）669-711およびA β 1-40）の検出に有益であるが、本APEX技術は、未変性血漿試料からの高速かつ高感度な読み取りを提供し、質量分析測定で典型的に必要な大がかりな試料処理が不要なので、的を絞った臨床測定に適している。バイオマーカーの改良という点では、本研究で実証したように、異なる循環A β 集団の分析は、画一的な血液測定により従前は隠れていた新規な相関を明らかにし得、かつ将来の血液に基づくAD臨床管理を前進させ得る。重要なことに、開発したこの方法論を、現在行われている400以上のADの治験で強化して、患者のための現行の標準治療を再定義することも考えられる。開発したこの技術は、追加の技術的新機軸、たとえばチップ上エクソソーム処理、他のADマーカーとの組合せ分析、なら

10

びに長期的な臨床コホート検証により、治験の異なる相対疾患治療の客観的評価にこそって重要な最小侵襲性の早期の検出、分子層別化、および連続的観察を容易にする総合的な能力を提供することができよう。

【0159】

実施例3

この実施例は、デンプン形成タンパク質凝集体を阻害剤といっしょにインキュベートすると、自発的タンパク質凝集が低減したことを示す。

【0160】

方法

凝集体のサイズ決定。デンプン形成タンパク質凝集体およびBSA凝集体の流体力学的直径を動的光散乱分析により決定した（Zetasizer Nano ZSP、Malvern）。4℃で3 x 14回測定を実施した。Z平均直径および多分散性を分析した。各測定につき自己相関関数および多分散性を観察して、サイズ決定する試料の質を確保した。

20

【0161】

タンパク質凝集。凍結乾燥したデンプン形成タンパク質をNaOH（60 mM、4℃）に再懸濁させ、超音波処理し、pHをPBS中pH 7.4に調節した。このタンパク質を直ちに0.2 μ m膜フィルター（Millipore）で濾過し、その濾液を小さい初期凝集体として用いた。より大きい凝集体の調製では、タンパク質を上記のように処理し、攪拌しながら1時間インキュベートしてさらなる凝集を誘導した。阻害剤での処理では、10 μ Mの阻害剤（たとえばメチレンブルー）をタンパク質に添加してからインキュベートした。インキュベーションが終了すると、凝集体のサイズ決定を実施した。

30

【0162】

光学分析。実験的分析のために、タングステンハロゲンランプ（Stocker Yale Inc.）で、10X顕微鏡対物レンズ越しにAPEXセンサーを裏面照射した。光ファイバーで透過光を集め、分光計（Ocean Optics）に送った。すべての測定は、室温で、周囲光の干渉を排除するため閉じた箱内で実施した。透過光の強度を、波長に対するカウントとしてデジタル記録した。スペクトル分析のために、特別注文のRプログラムを用いた局所回帰法による透過ピークの当てはめによって、スペクトルピークを決定した。すべての当てはめを局所的に行った。つまり、ポイントxの当てはめの場合、xからの距離により重みづけしたx付近のポイントを用いて、当てはめを行った。マルチオーダー・ポリノミナル曲線による当てはめと比較して、この方法は、分析されるデータポイント数およびデータ範囲がもたらす結果のばらつきを排除することができた。すべてのスペクトルシフト（ $\Delta\lambda$ ）を、透過スペクトルピークの変化として決定し、適切な対照実験に対し相対的に計算した。

40

【0163】

エクソソーム-タンパク質結合の特徴決定。調製したタンパク質凝集体（A β 42およびBSA対照）を、前述したようにEDC/NHS結合を介するAPEXセンサーの表面機能化に用いた。非結合タンパク質凝集体をPBSで洗い流した。得られた透過スペクトルシフトから、結合したタンパク質の量を測定した。この情報を、結合親和性を正規化するために、結合したタンパク質凝集体の数、およびそれらのエクソソーム結合用の結合した全タンパク質

50

表面積（詳しい情報は下記を参照）の決定に用いた。タンパク質凝集体での表面機能化に次いで、センサーにエクソソームを投入した。3秒ごとに合計480秒間にわたりスペクトル変化を測定して、リアルタイム動態センサーグラムを構築した。異なるサイズのタンパク質凝集体のエクソソーム結合動態および結合親和性を決定した。

【0164】

タンパク質凝集体サイズの差、ならびに（センサー表面からの距離の増加に伴う）SPR関連の感度の指数的減衰を説明するために、次式：

$$S = E \times \int_0^{2r} \pi \left[r^2 - (r - z)^2 \right] \times e^{(-2z/l_d)} dz$$

10

を用いて、エクソソームと相互作用する結合凝集体の総表面積を計算した。式中、Sはシグナル、zはセンサー表面からの距離、Eは $z = 0$ のときの電場であり、この場合の定数 l_d は減衰長さであって、現センサー設計では200 nmに設定され、また、rは結合したタンパク質凝集体の半径である。

【0165】

すべてのタンパク質凝集体は球体に近く、それらのrは動的光散乱分析で決定した。上の式を用いてセンサーに結合したタンパク質凝集体の数、ならびにそれぞれの総表面積を決定し、それによってエクソソームとの相互作用に使用可能な結合部位の数を概算した。すべてのエクソソーム結合データ（ $\Delta\lambda$ ）をそれぞれのタンパク質結合部位に対し正規化した。正規化A β 42結合データを、同様のサイズのBSA対照に対し相対化し、当てはめにより結合親和性定数 K_D を決定した。

20

【0166】

miRNA分析。エクソソームライセートをビオチン化RNAプローブといっしょにインキュベートしてから、p19機能化APEXセンサー上のRNA二重体捕捉およびAPEXシグナル増幅が行われた。

【0167】

結果

アルツハイマー病、パーキンソン病、および筋萎縮性側索硬化症といったいくつかの神経変性疾患の病理には、ミスフォールドしたデンブ形成タンパク質の凝集が関与している。タンパク質凝集を標的とする治療には、デンブ形成タンパク質凝集体をばらばらにする、またはデンブ形成タンパク質の凝集を阻害する、などの凝集デンブ形成タンパク質を一掃するさまざまなストラテジーが含まれる。デンブ形成タンパク質凝集体の量を減じるのに有効であることが示されており、したがって疾患改変治療薬の潜在候補である分子としては、メチルチオニウム塩化物、ロイコ-メチルチオニウムビス（ヒドロメタンスルホナート）、クルクミン、酸フクシン、没食子酸エピガロカテキン、サフラナル、コンゴレッド、アピゲニン、アズールC、ベーシックブルー41、(トランス,トランス)-1-プロモ-2,5-ビス-(3-ヒドロキシカルボニル-4-ヒドロキシ)スチリルベンゼン（BSB）、シカゴスカイブルー6B、-シクロデキストリン、ダウノマイシンヒドロクロリド、ジメチルイエロー、ディレクトレッド80、2,2-ジヒドロキシベンゾフェノン、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド（C16）、ヘミンクロリド、ヘマチン、インドメタシン、ジュグロン、ラクモイド、メクロサイクリンスルホサリチラート、メラトニン、ミリセチン、1,2-ナフトキノン、ノルジヒドログアヤレチン酸、R()-ノルアポモルフィンヒドロブロミド、オレンジG、o-バニリン（2-ヒドロキシ-3-メトキシベンズアルデヒド）、フェルフェナジン、フタロシアニン、リファマイシンSV、フェノールレッド、ロリテトラサイクリン、キナクリンマスタードジヒドロクロリド、チオフラビンS、ThT、およびトリメチル(テトラデシル)アンモニウムブロミド（C17）、ジアリルタルタル、エオシンY、フェノフィブラート、ネオクプロイン、ナイスタリン、オクタデシルスルファート、およびローダミンBが挙げられる。

30

40

【0168】

50

ヒトの脳のAD病理を反映した正確な病理を示す動物モデルは実証されていないので、インビトロの実験を使って、疾患改変治療がデンプン形成タンパク質の凝集を阻害する効果をモデリングした。デンプン形成タンパク質の初期のサイズを動的光散乱分析により確認してから、タンパク質のアリコート阻害剤といっしょに、または阻害剤なしでインキュベートした。阻害剤の非存在下では、デンプン形成タンパク質の自発的凝集の結果として、インキュベーション持続時間の増加に伴いタンパク質凝集体のサイズが大きくなった。しかし阻害剤の存在下では、タンパク質の自発的凝集の結果としてのサイズの増加は微小であり、より小さいタンパク質凝集体が形成する結果となった。

【0169】

インキュベーション後、デンプン形成タンパク質をセンサーチップ表面で機能化させてから、神経細胞エクソソームといっしょにインキュベートした。結合親和性の違いからわかるように、神経細胞エクソソームは、より大きいタンパク質凝集体と優先的に結合することが観測され、阻害剤処理したより小さいタンパク質凝集体との結合は少ないことが実証された。エクソソームとタンパク質との結合は、疾患改変治療薬の影響を受けるタンパク質の生物物理学的および／または生化学的な特性の代理指標となり得るので、APEXプラットフォームは、疾患改変治療薬の有効な査定を可能にする。

10

【0170】

いくつかの例の構成を記載してきたが、さまざまな変更形態、代替構成、および均等物を、本開示の趣旨から逸脱することなく使用することができる。たとえば、上述の諸要素は、より大きいシステムの構成成分であり得る。また、上述の諸要素が検討される前、途中、または後にいくつかの工程を行ってもよい。

20

【0171】

本明細書で引用するすべての刊行物、配列アクセッション番号、特許、および特許出願は、あらゆる目的でその全体が参照により組み入れられる。

【0172】

本開示の例示的な態様

いくつかの局面および態様において、本明細書では以下が記載される。

【0173】

対象の神経変性疾患またはアミロイドーシスを検出する方法であって、対象から採取された試料中のエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルを検出する工程を含み、基準と比較して増加したエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルが、対象が神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患していることを示す、方法。

30

【0174】

いくつかの態様では、バイオマーカーは、 $A\beta$ 、APP、 α -Syn、タウ、APOE、SOD1、TDP-43、バスーン、および／またはフィブロンネクチンからなる群より選択される。

【0175】

いくつかの態様では、方法は、エクソソーム結合バイオマーカーの分子サブタイプのレベルを検出する工程を含む。

【0176】

いくつかの態様では、 $A\beta$ の分子サブタイプは、 $A\beta$ 42、 $A\beta$ 40、 $A\beta$ 39、または $A\beta$ 38である。

40

【0177】

いくつかの態様では、バイオマーカーは前原線維凝集体である。

【0178】

いくつかの態様では、方法は、CD63、CD9、CD81、ALIX、TSG101、フロチリン-1、フロチリン-2、LAMP-1、HSP70、HSP90、RNA、およびDNAからなる群より選択されるエクソソームバイオマーカーを検出することをさらに含み、エクソソームバイオマーカーはエクソソーム結合バイオマーカーと共局在している。

【0179】

50

いくつかの態様では、方法は、NCAM、L1CAM、CHL-1、およびIRS-1からなる群より選択される神経細胞バイオマーカーを検出することをさらに含み、神経細胞バイオマーカーはエクソソーム結合バイオマーカーと共局在している。

【0180】

いくつかの態様では、神経変性疾患は、アルツハイマー病、軽度認知障害、認知症、血管性認知症、血管性軽度認知障害、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、進行性核上性麻痺、および／またはタウオパシーからなる群より選択される。

【0181】

いくつかの態様では、神経変性疾患は、アルツハイマー病および軽度認知障害からなる群より選択される。

【0182】

いくつかの態様では、方法は、神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患している対象を治療する工程を含む。

【0183】

いくつかの態様では、試料は、組織生検、血液、血漿、血清、または脳脊髄液である。

【0184】

いくつかの態様では、方法を、脳撮像研究とさらに相互に関連づける。

【0185】

別の局面では、本明細書では、神経変性疾患またはアミロイドーシスを発症するリスクのある対象を検出する方法が記載され、該方法は、対象から採取された試料中のエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルを検出する工程

を含み、基準と比較して増加したエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルは、対象が神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患していることを示す。

【0186】

別の局面では、本明細書では、対象の神経変性疾患またはアミロイドーシスを検出し、かつ治療する方法が記載され、該方法は、以下の工程：

(a) 対象から採取された試料中のエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルを検出する工程であって、基準と比較して増加したエクソソーム結合凝集バイオマーカーのレベルが、対象が神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患していることを示す、工程；および

(b) 神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患している対象を治療する工程、を含む。

【0187】

別の局面では、本明細書では、試料中のバイオマーカーの凝集状態を決定する方法が記載され、該方法は、

試料中のエクソソーム結合バイオマーカーのレベルを検出する工程

を含み、基準と比較して増加したエクソソーム結合バイオマーカーのレベルは、バイオマーカーの凝集度の指標となる。

【0188】

いくつかの態様では、方法は、エクソソーム結合バイオマーカーのレベルを検出する工程の前に、試料をエクソソーム集団に接触させる工程を含む。

【0189】

いくつかの態様では、試料中の凝集バイオマーカーは、非凝集バイオマーカーに比べ、エクソソームに優先的に結合する。

【0190】

いくつかの態様では、試料は、対象から採取される。

【0191】

いくつかの態様では、基準と比較して増加したバイオマーカーの凝集度は、対象の神経変性疾患またはアミロイドーシスの指標となる。

【0192】

10

20

30

40

50

いくつかの態様では、方法は、神経変性疾患またはアミロイドーシスに罹患している対象を治療する工程を含む。

【0193】

いくつかの態様では、治療することは、治療有効量の1つもしくは複数の薬物、またはそれらの組み合わせを対象に投与する工程を含む。

【0194】

いくつかの態様では、薬物は、コリンエステラーゼ阻害剤、NMDA受容体アンタゴニスト、コリンエステラーゼ阻害剤とNMDA受容体アンタゴニストとの組み合わせ、BACE1阻害剤、抗体、タンパク質凝集阻害剤、プロテアソーム阻害剤、小分子、遺伝子治療、抗タウ薬、またはそれらの組み合わせから選択される。

【0195】

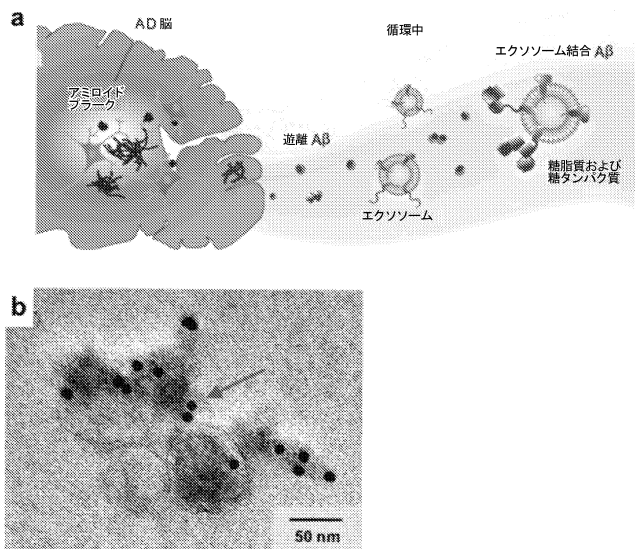
いくつかの態様では、コリンエステラーゼ阻害剤はドネペジル、リバスチグマート (Rivastigmate)、もしくはガランタミンであり;NMDA受容体アンタゴニストはメマンチンであり;BACE1阻害剤はAZD3293であり;抗体はアデュカヌマブであり;かつ／または抗タウ薬はTRx0237(LMTX)である。

【0196】

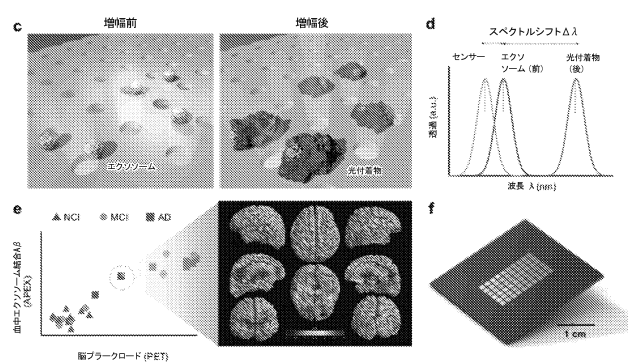
いくつかの態様では、薬物は、メチルチオニウム塩化物、ロイコ-メチルチオニウムビス(ヒドロメタンスルホナート)、クルクミン、酸フクシン、没食子酸エピガロカテキン、サフラナル、コンゴレッド、アピゲニン、アズールC、ベーシックブルー41、(トランス,トランス)-1-ブromo-2,5-ビス-(3-ヒドロキシカルボニル-4-ヒドロキシ)スチリルベンゼン(BSB)、シカゴスカイブルー6B、-シクロデキストリン、ダウノマイシンヒドロクロリド、ジメチルイエロー、ディレクトレッド80、2,2-ジヒドロキシベンゾフェノン、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド(C16)、ヘミンクロリド、ヘマチン、インドメタシン、ジグロン、ラクモイド、メクロサイクリンスルホサリチラート、メラトニン、ミリセチン、1,2-ナフトキノン、ノルジヒドログアヤレチン酸、R()-ノルアポモルフィンヒドロブロミド、オレンジG、o-バニリン(2-ヒドロキシ-3-メトキシベンズアルデヒド)、フェルフェナジン、フタロシアニン、リファマイシンSV、フェノールレッド、ロリテトラサイクリン、キナクリンマスタードジヒドロクロリド、チオフラビンS、ThT、およびトリメチル(テトラデシル)アンモニウムブロミド(C17)、ジアリルタルタル、エオシンY、フェノフィブラート、ネオクプロイン、ナイスタリン(nystalin)、オクタデシルスルファート、および／またはローダミンBから選択される。

【図面】

【図1-1】



【図1-2】



10

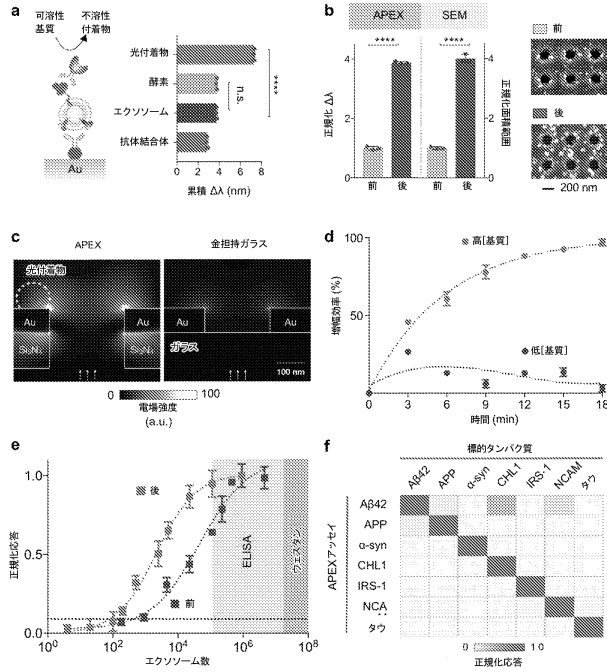
20

30

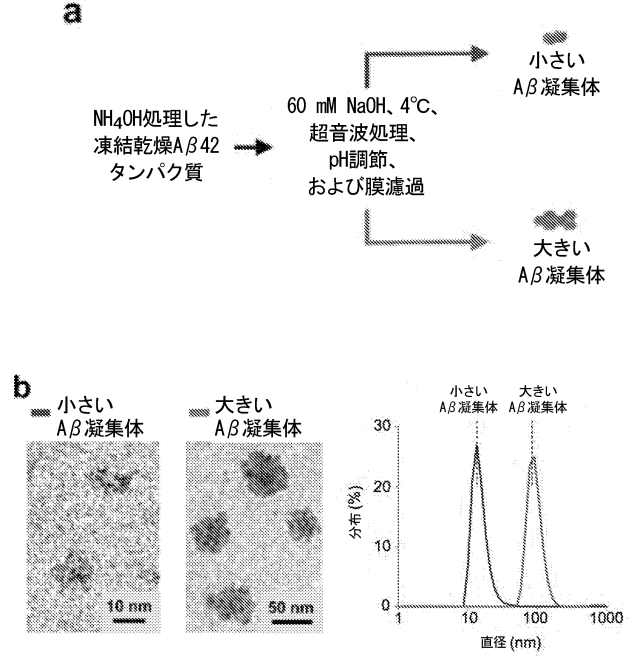
40

50

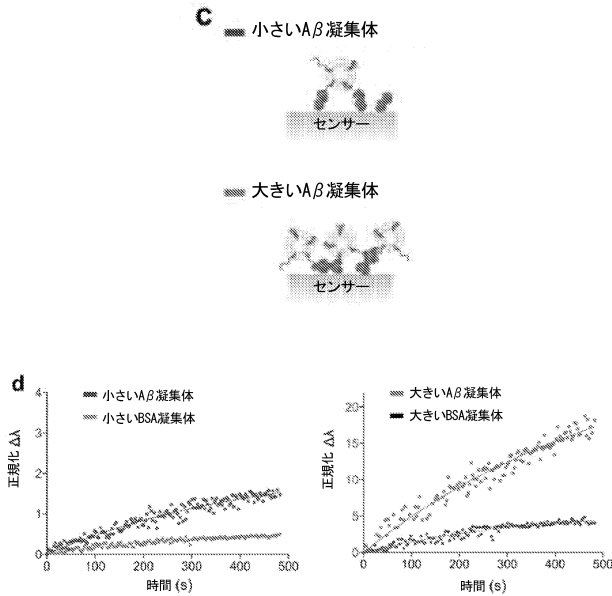
【図 2】



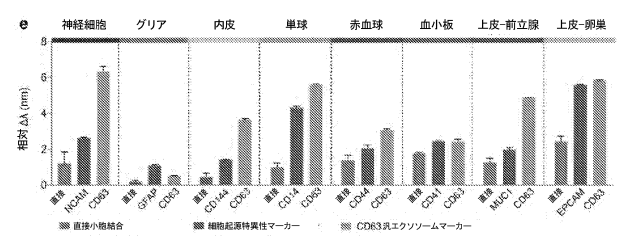
【図 3 - 1】



【図 3 - 2】



【図 3 - 3】



10

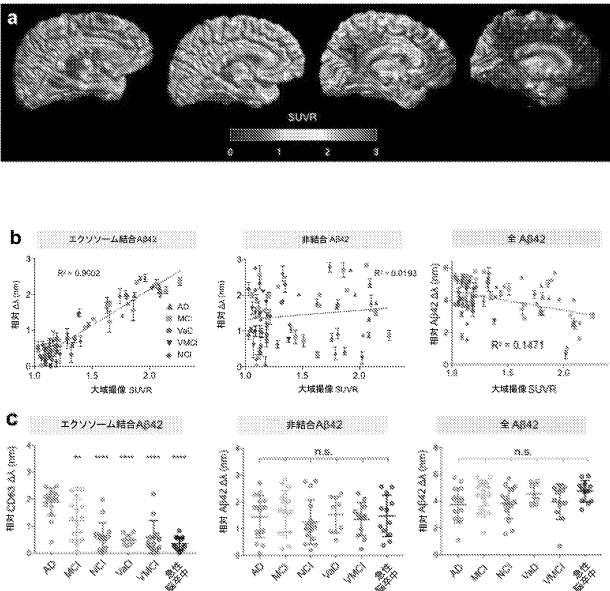
20

30

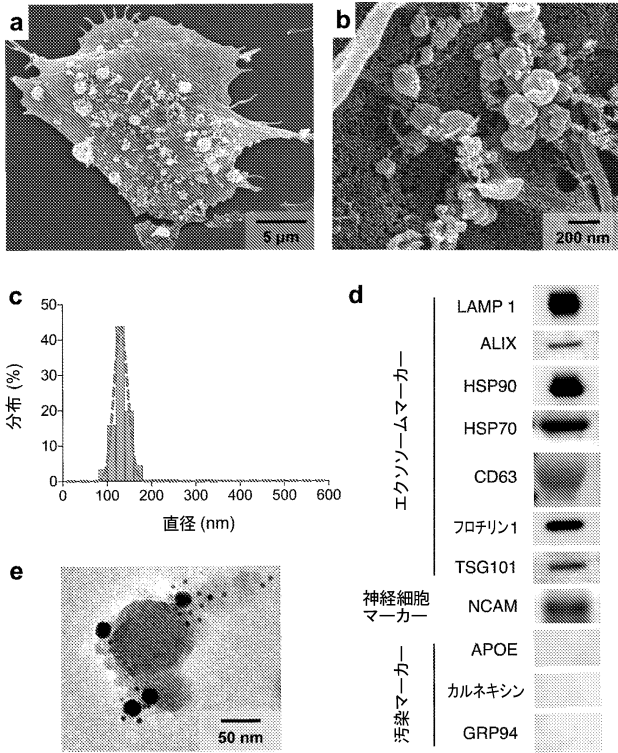
40

50

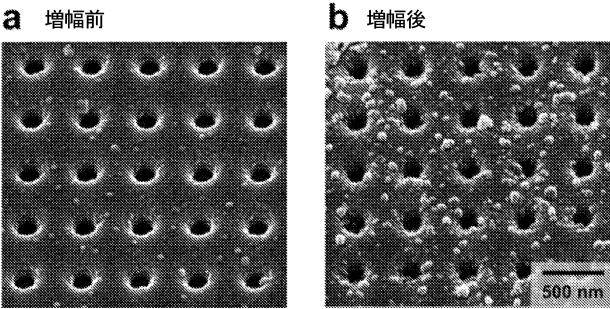
【図 4】



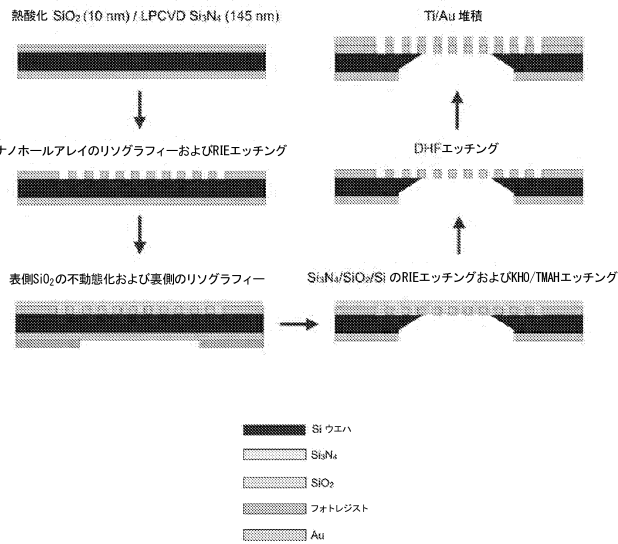
【図 5】



【図 6】



【図 7】



10

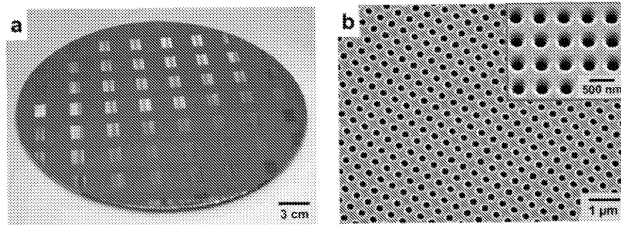
20

30

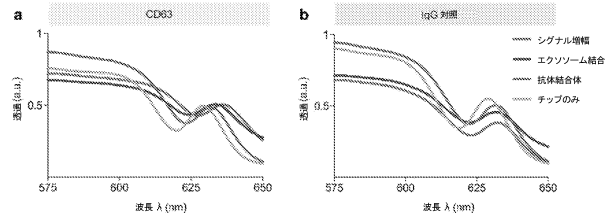
40

50

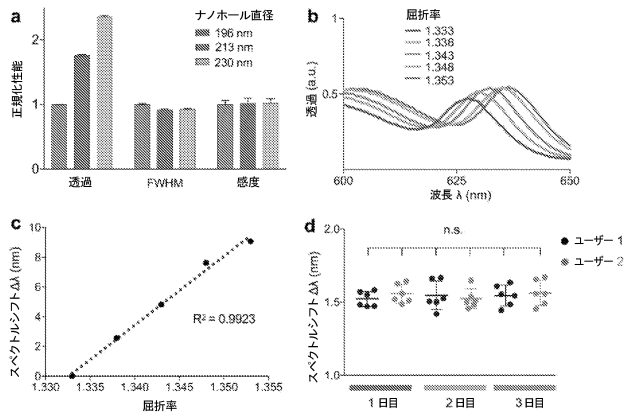
【図 8】



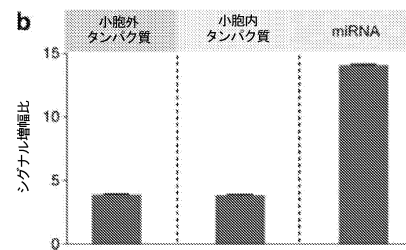
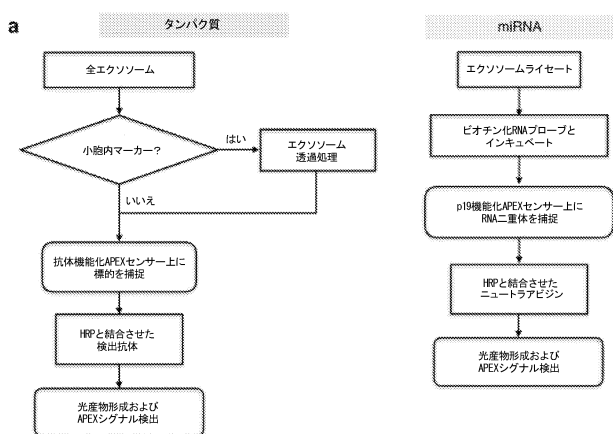
【図 9】



【図 10】



【図 11】



10

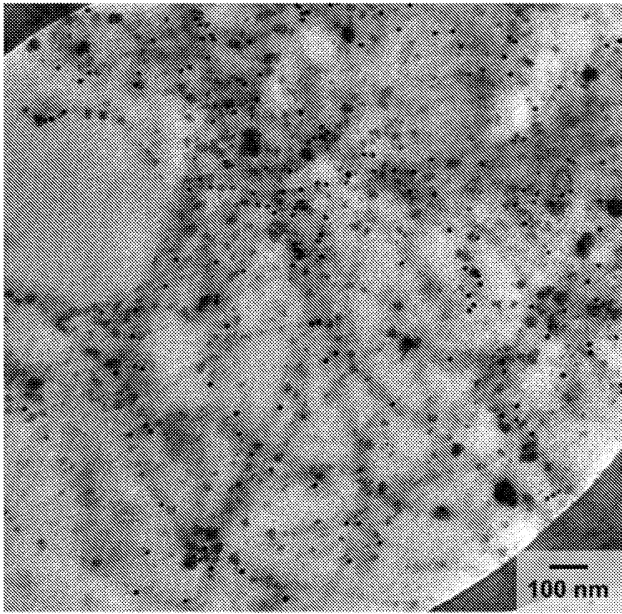
20

30

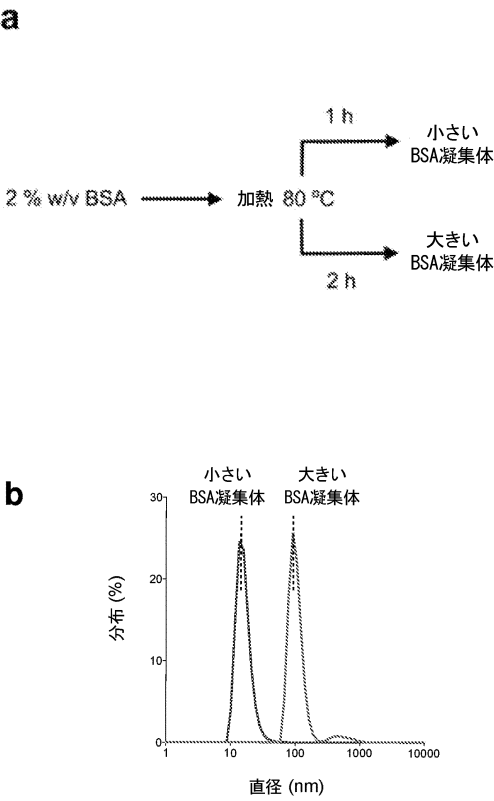
40

50

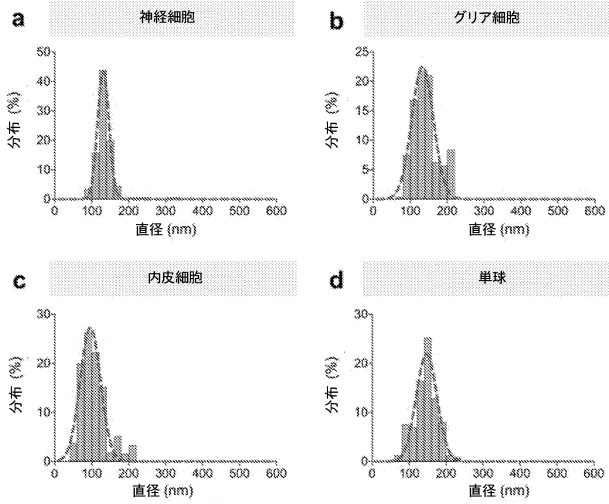
【図 1 2】



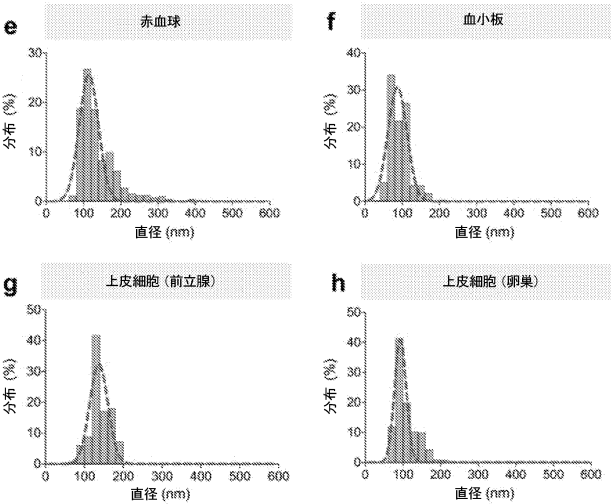
【図 1 3】



【図 1 4 - 1】



【図 1 4 - 2】



10

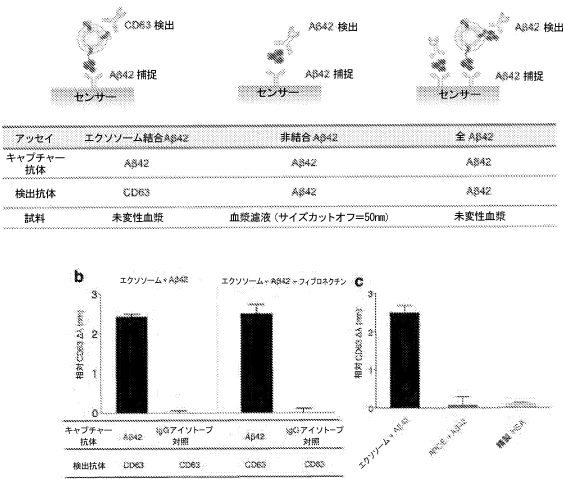
20

30

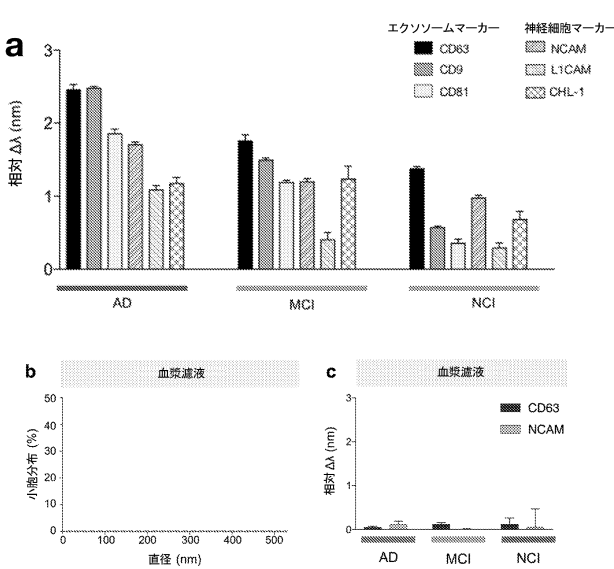
40

50

【図 15】

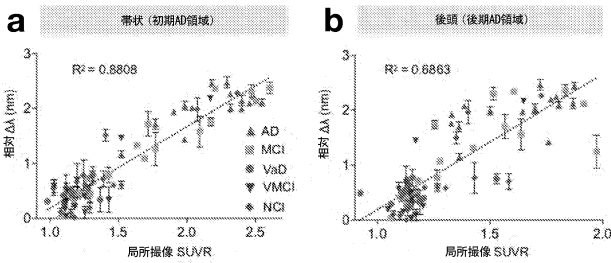


【図 16】

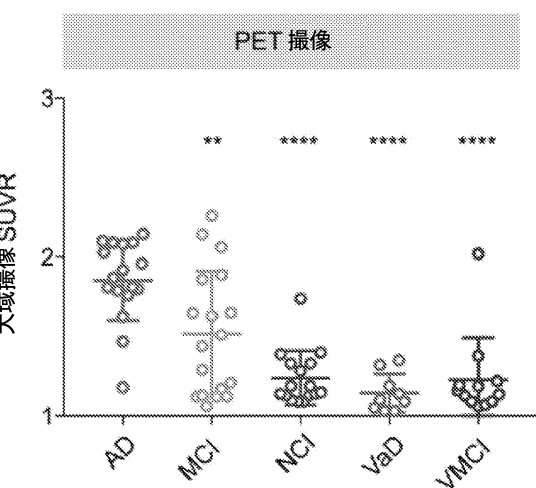


10

【図 17】



【図 18】



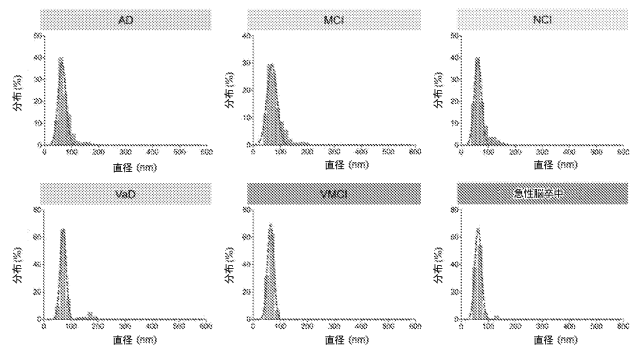
20

30

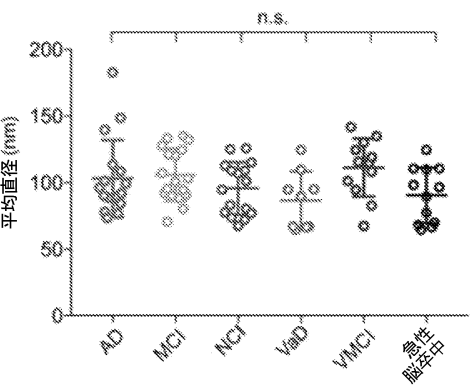
40

50

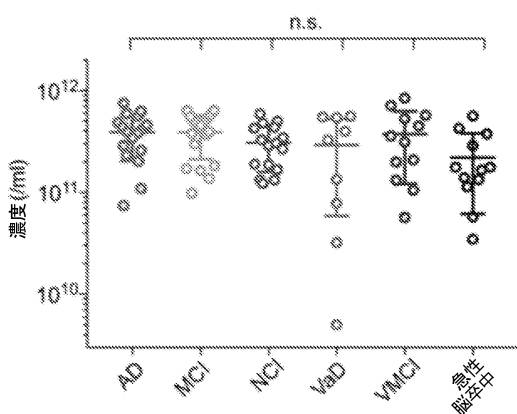
【図 19 A】



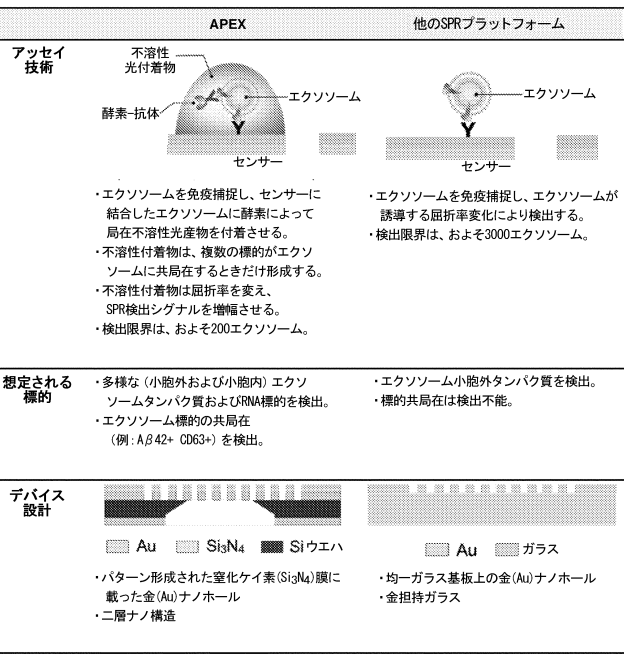
【図 19 B】



【図 19 C】



【図 20 - 1】



10

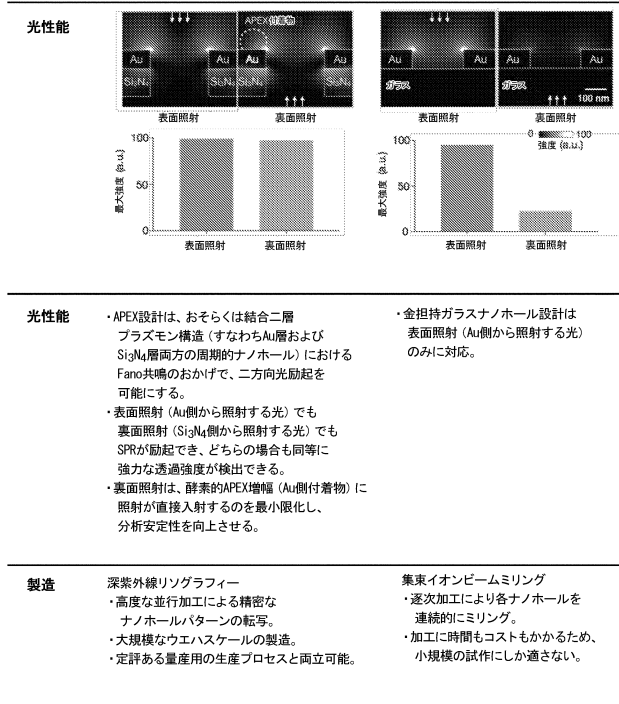
20

30

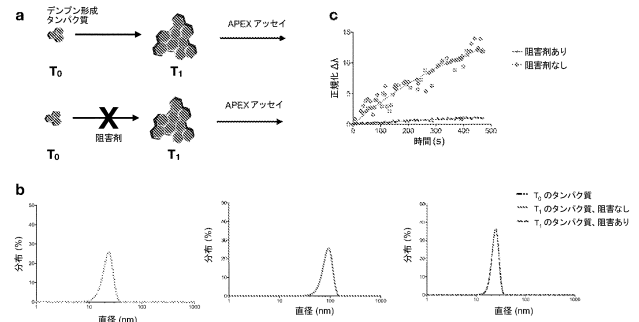
40

50

【図 20-2】



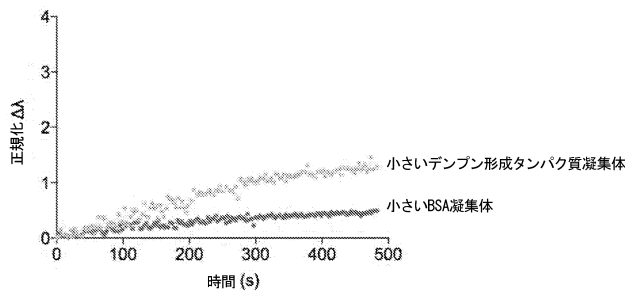
【図 21】



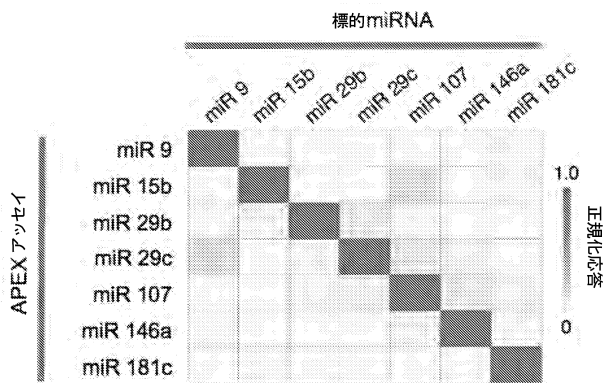
10

20

【図 22】



【図 23】



30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和3年10月26日(2021.10.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2022519583000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2020/050764						
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/532 (2006.01) G01N 33/553 (2006.01) G01N 21/55 (2014.01) A61P 25/28 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)								
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) CPC: G01N33/6896, G01N21/554 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) PATENW (based on EPODOC, WPIAP and the English full-text databases), MEDLINE, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE: G01N33/6896, G01N21/554, APEX, exosome, vesicle, aggregated biomarker, CD63, CD9, CD81, ALIX, TSG101, Flotilin, LAMP-1, HSP70, HSP90, RNA, DNA, Aβ, APP, α-Syn, Tau, APOE, SOD1, TDP-43, bassoon, fibronectin, NCAM, L1CAM, CHL-1, IRS-1, neurodegenerative, Amyloidosis, Alzheimer's, Mild cognitive impairment, Dementia, Parkinson's, Amyotrophic lateral sclerosis, Multiple sclerosis, Progressive supranuclear palsy, Tauopathy, detect, diagnose and similar terms. Internal databases provided by IP Australia, PubMed, Espacenet: Applicant/Inventor and keywords search.								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="3">Documents are listed in the continuation of Box C</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Documents are listed in the continuation of Box C		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
Documents are listed in the continuation of Box C								
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex								
<table border="0"> <tr> <td> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application earlier application or patent but published on or after the international filing date "E" 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 </td> <td> "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 </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application earlier application or patent but published on or after the international filing date "E" 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				
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application earlier application or patent but published on or after the international filing date "E" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family							
Date of the actual completion of the international search 2 April 2020		Date of mailing of the international search report 02 April 2020						
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au		Authorised officer Lauren Howitt AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61262256130						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/IB2020/050764
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/124000 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 20 July 2017 See Abstract, [0222], [0347], Examples 1-2, Figure 3	1-22
X	WO 2015/061634 A2 (NANOSOMIX, INC.) 30 April 2015 See Abstract, [0057], Examples 1-9 and 11-12	1-22
X	WO 2018/218090 A1 (NANOSOMIX, INC.) 29 November 2018 See Abstract, [0003], [0037], [0097], [00131], [00141], Examples 5-6 and 13-15, Figure 1B	1-11, 13-15 and 17-22
X	WO 2015/200851 A1 (INARIAN NEURODIAGNOSTICS, LLC) 30 December 2015 See Abstract, page 5, lines 23-24, page 7, lines 13-25, Examples 1-6	1-2, 5-11, 13-15 and 17-21
X	WO 2017/087467 A1 (EXOSOME SCIENCES, INC.) 26 May 2017 See Abstract, [0007], [0009]-[0010], [0024], [0032], [0035], [0433]-[0434], Examples 6-7 and 12	1-3, 5, 8-11, 13-15 and 17-20
A	WO 2017/193115 A1 (NANOSOMIX, INC.) 09 November 2017 See Abstract, Examples 1-2	1-22
A	IM, H. et al., 'Nano-plasmonic exosome diagnostics', Expert Review of Molecular Diagnostics. 2015, Vol. 15, No. 6, pages 725-733 See Abstract, "nPLEX Technology"	1-22
A	BAO, W. et al., 'PET Imaging for Early Detection of Alzheimer's Disease: From Pathologic to Physiologic Biomarkers', PET Clinics. 2017, Vol. 12, No. 3, pages 329-350 See Abstract, "Radiotracers for Imaging of Synaptic Density in Alzheimer's Disease", Figure 7	1-22

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/IB2020/050764	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2017/124000 A1	20 July 2017	WO 2017124000 A1	20 Jul 2017
		US 2019025330 A1	24 Jan 2019
WO 2015/061634 A2	30 April 2015	WO 2015061634 A2	30 Apr 2015
		CA 2926092 A1	30 Apr 2015
		EP 3060913 A2	31 Aug 2016
		IL 245176 A	31 Jul 2019
		JP 2016535283 A	10 Nov 2016
		KR 20160068964 A	15 Jun 2016
		TW 201606307 A	16 Feb 2016
		US 2015119278 A1	30 Apr 2015
		US 9958460 B2	01 May 2018
		US 2018217165 A1	02 Aug 2018
		WO 2018/218090 A1	29 November 2018
CA 3065999 A1	29 Nov 2018		
US 2018340945 A1	29 Nov 2018		
WO 2015/200851 A1	30 December 2015	WO 2015200851 A1	30 Dec 2015
		CN 106062559 A	26 Oct 2016
		CN 106062559 B	14 Dec 2018
		EP 3161482 A1	03 May 2017
		JP 2017525976 A	07 Sep 2017
		JP 6531171 B2	12 Jun 2019
		US 2017102397 A1	13 Apr 2017
WO 2017/087467 A1	26 May 2017	WO 2017087467 A1	26 May 2017
		EP 3377895 A1	26 Sep 2018
		US 2019049467 A1	14 Feb 2019
WO 2017/193115 A1	09 November 2017	WO 2017193115 A1	09 Nov 2017
		EP 3452828 A1	13 Mar 2019
		JP 2019516106 A	13 Jun 2019
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)			

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,
TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

リッジ ロード

1 E Kent Ridge Road, #13-00, Singapore 119228, Si
ngapore

- (74)代理人 100102978
弁理士 清水 初志
- (74)代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫
- (74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
- (74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 シャオ ホエリン
シンガポール共和国 119077 シンガポール ローワー ケント リッジ ロード 21
- (72)発明者 リム ツー ジュン カリーヌ
シンガポール共和国 119077 シンガポール ローワー ケント リッジ ロード 21
- (72)発明者 チャン ヤン
シンガポール共和国 119077 シンガポール ローワー ケント リッジ ロード 21
- (72)発明者 チェン リーシアン クリストファー
シンガポール共和国 119077 シンガポール ローワー ケント リッジ ロード 21
- (72)発明者 ロー ジー ピン
シンガポール共和国 119228 シンガポール ケント リッジ ロード 1イー #13-00

F ターム (参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 CB01 DA36 FB03 FB07

F ターム (参考)

63

QA19 QQ02 QQ08 QQ79 QR72 QR77 QX02 4C084

AA17 AA20 MA02 NA05 ZA011ZA021 ZA151 ZA161 ZC202 ZC412 ZC422

【要約の続き】

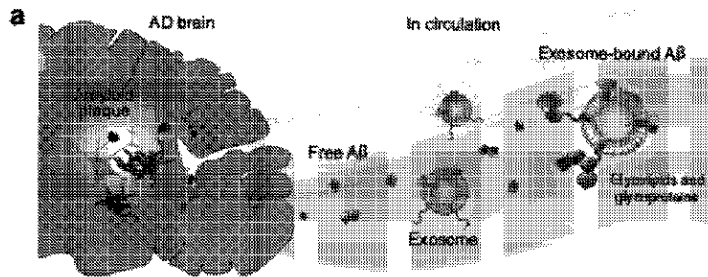


FIGURE 1(a)