

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-501132

(P2020-501132A)

(43) 公表日 令和2年1月16日 (2020.1.16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 5	2 G O 5 9
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 H O 4 5
GO 1 N 21/3577 (2014.01)	GO 1 N 21/3577	
CO 7 K 17/00 (2006.01)	CO 7 K 17/00 Z N A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-527788 (P2019-527788)	(71) 出願人	513250798
(86) (22) 出願日	平成29年12月1日 (2017.12.1)		プロセナ バイオサイエンシーズ リミテッド
(85) 翻訳文提出日	令和1年7月22日 (2019.7.22)		アイルランド国, エー96 ティー927
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/064332		, ダブリン州, ダン レアリー, アッパー
(87) 国際公開番号	W02018/102763		ジョージズ ストリート, アデルフィ
(87) 国際公開日	平成30年6月7日 (2018.6.7)		プラザ
(31) 優先権主張番号	62/429,604	(74) 代理人	110001139
(32) 優先日	平成28年12月2日 (2016.12.2)		S K 特許業務法人
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100130328
			弁理士 奥野 彰彦
		(74) 代理人	100130672
			弁理士 伊藤 寛之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 α -シヌクレインの二次構造プロファイルを検出する赤外線アッセイ

(57) 【要約】

本発明は、事前の単離、濃縮又は前処理なしに、血清、血漿又は脳脊髄液等の複雑な液体からの α -シヌクレインの二次構造分析を可能にする赤外線アッセイを提供する。二次構造プロファイルは、凝集形態の α -シヌクレインの割合及び/又は凝集形態の α -シヌクレインの凝集の程度の指標を提供する。

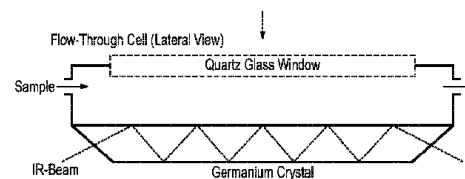


FIG. 1C

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

サンプル中の α -シヌクレインの二次構造のプロファイルの測定方法であって、

(a)前記サンプルを、赤外線源、 α -シヌクレインの残基40~55、91~97、又は118~123内のエピトープに対する抗体に連結された赤外線センサーエレメント、及び赤外線ディテクター、を含むセルに導入する工程（これにより、前記サンプル中の α -シヌクレインは、赤外線センサーエレメントの表面上の抗体に結合する）、

(b)前記サンプルの α -シヌクレインを特徴付ける赤外線スペクトルを得るために、赤外線ビームを赤外線源から赤外線センサーを経由して赤外線ディテクターに照射する工程、

(c)前記サンプル中の α -シヌクレインの二次構造プロファイルを測定するために、得られた赤外線スペクトルを分析する工程、
を含む、方法。

【請求項 2】

前記二次構造プロファイルは、凝集形態の α -シヌクレインの割合及び / 又は凝集形態の α -シヌクレインの凝集の程度の指標を提供する、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記工程(c)は、 α -シヌクレインの二次構造を測定するための α -シヌクレインのアミドIバンド最大値、単量体 α -シヌクレインを示す 1646cm^{-1} のアミドIバンド最大周波数、及び凝集した α -シヌクレインを示すより低いアミドIバンド最大周波数、のシフトを分析する工程、を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記工程(c)は、得られた赤外線スペクトルを、既知の二次構造及び / 又は既知の濃度を有する α -シヌクレインのスペクトルと比較することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記赤外線センサーエレメントは、アミドIバンドを検出するのに十分なシグナル対ノイズ比を有する、赤外線を透過する台形又は平行四辺形のゲルマニウム内部反射エレメントを含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗体は、シラン又はチオールリンカーによって前記赤外線センサーに連結されている、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

(i)異なる波長でのUV/Vis蛍光を含む別の光学的方法によって、赤外線分析と並行してシグナルを検出する工程、及び / 又は

(ii)免疫ATR-IR振動分光法と並行蛍光分光法とを組み合わせる工程、
をさらに含む、前記いずれかの請求項に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗体は23E8、又は23E8のCDRsを有する抗体である、請求項1~7いずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

前記抗体は1H7、又は1H7のCDRsを有する抗体である、請求項1~7いずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

前記抗体はMJFR1、又はMJFR1のCDRsを有する抗体である、請求項1~7いずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

前記サンプルは対象由来である、前記いずれかの請求項に記載の方法。

【請求項 12】

前記サンプルはヒト由来である、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

前記サンプルは、ヒト α -シヌクレインを発現する導入遺伝子を有するトランスジェニ

10

20

30

40

50

ックマウス由来である、前記いずれかの請求項に記載の方法。

【請求項 14】

前記サンプルは体液である、前記いずれかの請求項に記載の方法。

【請求項 15】

前記サンプルはヒトの脳脊髄液 (CSF) 又は血液である、請求項11に記載の方法。

【請求項 16】

前記ヒトはレビー小体病を有する、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

前記ヒトはパーキンソン病を有する、請求項15に記載の方法。

【請求項 18】

前記ヒトは前記疾患に対する免疫療法を受けている、請求項16又は17に記載の方法。

【請求項 19】

前記サンプルはヒト又はトランスジェニック動物の脳ホモジネートである、前記いずれかの請求項に記載の方法。

【請求項 20】

前記サンプルは細胞培養に使用される培地である、前記いずれかの請求項に記載の方法。

【請求項 21】

前記細胞は組換えヒト α -シヌクレインを発現する、請求項20に記載の方法。

【請求項 22】

経時的なプロファイルの変化を検出するために、同じ対象からのサンプルに対して複数回実施された、前記いずれかの請求項に記載の方法。

【請求項 23】

前記ヒトは免疫療法のレジメを受けており、前記レジメは経時的な前記プロファイルの変化に対応して変化する、請求項18に記載の方法。

【請求項 24】

前記サンプルはパーキンソン病を有する患者由来であり、前記サンプルのアミドIバンドの最大周波数が凝集した α -シヌクレインを示す 1646cm^{-1} 未満で生じる、請求項2に記載の方法。

【請求項 25】

前記患者は前駆期パーキンソン病を有する、請求項24に記載の方法。

【請求項 26】

前記患者は軽度のパーキンソン病を有する、請求項24に記載の方法。

【請求項 27】

前記患者は中等度のパーキンソン病を有する、請求項24に記載の方法。

【請求項 28】

前記患者は進行期パーキンソン病を有する、請求項24に記載の方法。

【請求項 29】

前記いずれかの請求項に記載の方法であって、対象の集団に対して実施され、
 α -シヌクレインのアミドIバンド最大周波数のレベルが閾値を超えている対象よりも、
 α -シヌクレインのアミドIバンドの最大周波数レベルが閾値を下回る対象の割合多くが、
パーキンソン病の治療を受けている、方法。

【請求項 30】

前記アミドIバンド最大周波数の閾値は 1643cm^{-1} である、請求項29に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2016年12月2日に出願された米国仮特許出願第62/429,604号の利益を主張し、全ての目的のためにその全体が参考として組み込まれる。

【配列表の参照】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

この出願は、2017年12月1日に作成され、7.8キロバイトを含む506047SEQLIST.TXTという名前のファイル内の電子配列表を含み、参照により本明細書に組み込まれる。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

α -シヌクレイン脳病変は、シヌクレイノパチーと呼ばれるいくつかの神経変性疾患に見られる特徴である。 α -シヌクレインは、ニューロン内封入体であるレビー小体 (LB) 及びレビー神経突起の主な成分である。

【 0 0 0 4 】

シヌクレイノパチーは、パーキンソン病 (PD)、レビー小体型認知症 (DLB)、アルツハイマー病のレビー小体亜型 (LBVAD)、多発性レビー小体病 (DLBD)、多系統萎縮症 (MSA) 及び脳内鉄蓄積を伴う神経変性1型 (NBIA-1) を含む。 10

【 0 0 0 5 】

シヌクレイノパチーは、高齢化集団における運動障害及び認知機能低下の一般的な原因である (Galasko et al., Arch. Neurol. (1994) 51:888-95)。今日まで、これらの障害は治療可能でも予防可能でもなく、PDの原因及び病因を理解することは新しい治療法を開発するのに重要である (Tanner et al., Curr. Opin. Neurol. (2000) 13:427-30)。PDの原因は議論を引き起こしており、様々な神経毒及び遺伝的感受性因子を含む複数の因子が役割を果たすことが提唱されている。

【 0 0 0 6 】

以下のいくつかの研究は、 α -シヌクレインがPDの病因において中心的な役割を果たすことを示した。(1) このタンパク質はLBに蓄積する (Spillantini et al., Nature (1997) 388:839-40; Takeda et al., J. Pathol. (1998) 152:367-72; Wakabayashi et al., Neurosci. Lett. (1997) 239:45-8)。(2) α -シヌクレイン遺伝子における変異は、希少家族型パーキンソン症ととも分離される (Kruger et al., Nature Gen. (1998) 18:106-8; Polymeropoulos et al., Science (1997) 276:2045-7)。(3) トランスジェニックマウス (Masliah et al., Science (2000) 287:1265-9) 及びショウジョウバエ (Feany et al., Nature (2000) 404:394-8) における過剰発現は、PDのいくつかの病理学的側面を模倣する。従って、脳内の α -シヌクレインの蓄積が、ヒト、マウス、及びハエのように多様な種における類似の形態学的及び神経学的変化と関連しているという事実は、この分子がPDの発症に寄与することを示唆する。 30

【 0 0 0 7 】

LBは、大量の蓄積された α -シヌクレインを含むことが一貫して見出された (Spillantini et al. National Acad Sciences 95: 6469-6473 (1998))。患者からの異常に処理され凝集した α -シヌクレインの分析は、タンパク質のリン酸化、ニトロ化、ユビキチン化及びC末端切断を含む、異なる翻訳後修飾を明らかにした (Giasson et al. Science 290: 985-989 (2000); Baba et al. Am J Pathol. 152: 879-884 (1998); Fujiwara et al. Nat Cell Biol. 4: 160-164 (2002))。

【 0 0 0 8 】

α -シヌクレイン及び他のバイオマーカーは、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、表面プラズモン共鳴分光法 (SPR)、表面蛍光強度分布分析 (sFIDA) 又は質量分析法等の技術によって体液中で検出することができる。これらの技術は通常、分析物の二次構造についての直接的な情報を提供しない。ELISA又はSPRのような抗体に基づく方法が立体構造感受性抗体を用いて行われたとしても、それらはただ1つの立体構造についての情報を提供する (I. Morgado et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 109(31): 12503-12508 (2012); Venkataramani et al., JAD 29(2):361-371 (2012))。 40

【 0 0 0 9 】

精製蛋白質は、フーリエ変換赤外 (FTIR) 分光法又は減衰全反射 (ATR) センサー表面によって分析されている (J. Ollesch et al., Appl. Spectrosc., 61(10):1025-1031 (2007); K. Elfrink, J. Ollesch et al., Proc Natl Acad Sci, 105(31):10815-10819 (20 50

08)、Frost et al., J. Biol. Chem., 284(6):3546-3551 (2009)、S. Funke et al., J. Biol. Chem., 280(10):8912-7 (2005))。最近、赤外減衰全反射分光法が、体液中のアミロイドベータ及び関連蛋白質の分析のために報告されている (WO 2015/121339; Nabers et al., Analytical Chemistry, 88: 2755-2762 (2016))。しかしながら、潜在的にいくつかの立体構造状態の間で遷移するペプチドの二次構造を分析することにおけるこの技術の精度は、その結合性がペプチドの立体構造状態から少なくとも大部分独立している捕捉抗体の提供に依存する。

【発明の概要】

【0010】

本発明は、サンプル中の α -シヌクレインの二次構造のプロファイルの測定方法であって、(a) 前記サンプルを、赤外線源、 α -シヌクレインの残基40~55、又は91~97内に対する抗体に連結された赤外線センサーエレメント、及び赤外線ディテクターを含むセルに導入する工程 (これにより、前記サンプル中の α -シヌクレインは、赤外線センサーエレメントの表面上の抗体に結合する)、(b) 前記サンプルの α -シヌクレインを特徴付ける赤外線スペクトルを得るために、赤外線ビームを赤外線源から赤外線センサーを経由して赤外線ディテクターに照射する工程、(c) 前記サンプル中の α -シヌクレインの二次構造プロファイルを測定するために、得られた赤外スペクトルを分析する工程、を含む、方法を提供する。任意に、前記二次構造プロファイルは、凝集形態の α -シヌクレインの割合の指標及び/又は凝集形態の α -シヌクレインの凝集の程度を提供する。

【0011】

任意に、 α -シヌクレインの二次構造のプロファイルの上記測定方法の工程(c)は、 α -シヌクレインの二次構造を測定するための α -シヌクレインのアミドIバンド最大値、単量体 α -シヌクレインを示す 1646cm^{-1} のアミドIバンド最大周波数、及び凝集した α -シヌクレインを示すより低いアミドIバンド最大周波数、のシフトを分析する工程、を含む。任意に、工程(c)は、得られた赤外線スペクトルを、既知の二次構造及び/又は既知の濃度を有する α -シヌクレインのスペクトルと比較することを含む。

任意に、前記赤外線センサーエレメントは、アミドIバンドを検出するのに十分なシグナル対ノイズ比を有する、赤外線を透過する台形又は平行四辺形のゲルマニウム内部反射エレメントを含む。任意に、前記抗体は、シラン又はチオールリンカーによって前記赤外線センサーに連結されている。任意に、前記抗体は23E8 (ATCC受託番号PTA-122711)、又は23E8のCDRsを有する抗体である。任意に、前記抗体は1H7 (ATCC受託番号PTA-8220)、又は1H7のCDRsを有する抗体である。任意に、前記抗体はMJFR1 (ABCAM (登録商標) で市販されている α -シヌクレインに対するウサギモノクローナル抗体)、又はMJFR1のCDRsを有する抗体である。

【0012】

任意に、サンプル中の α -シヌクレインの二次構造のプロファイルの上記測定方法は、(i) 異なる波長でのUV/Vis蛍光を含む別の光学的方法によって、赤外線分析と並行してシグナルを検出する工程、及び/又は(ii) 免疫ATR-IR振動分光法と並行蛍光分光法とを組み合わせる工程、をさらに含む。

【0013】

任意に、前記サンプルは対象由来である。任意に、前記サンプルはヒト由来である。任意に、前記サンプルは、ヒト α -シヌクレインを発現する導入遺伝子を有するトランスジェニックマウス由来である。任意に、前記サンプルは体液である。任意に、前記サンプルはヒトの脳脊髄液 (CSF) 又は血液である。任意に、前記ヒトはレビー小体病を有する。任意に、前記ヒトはパーキンソン病を有する。任意に、前記ヒトは前記疾患に対する免疫療法を受けている。任意に、前記サンプルはヒト又はトランスジェニック動物の脳ホモジネートである。任意に、前記サンプルは細胞培養に使用される培地である。任意に、前記細胞は組換えヒト α -シヌクレインを発現する。任意に、本発明の方法は、経時的なプロファイルの変化を検出するために、同じ対象からのサンプルに対して複数回実施される。任意に、前記ヒトは免疫療法のレジメを受けており、前記レジメは経時的な前記プロファ

イルの変化に対応して変化する。

【0014】

任意に、前記サンプルがパーキンソン病を有する患者由来であり、前記サンプルのアミドIバンドの最大周波数が凝集した α -シヌクレインを示す 1646cm^{-1} 未満で生じる。任意に、前記患者は前駆期パーキンソン病を有する。任意に、前記患者は軽度のパーキンソン病を有する。任意に、前記患者は中等度のパーキンソン病を有する。任意に、前記患者は進行期パーキンソン病を有する。

【0015】

任意に、本発明の方法は、対象の集団に対して実施され、 α -シヌクレインのアミドIバンド最大周波数のレベルが閾値を超えている対象よりも、 α -シヌクレインのアミドIバンドの最大周波数レベルが閾値を下回る対象の割合多くが、パーキンソン病の治療を受けている。任意に、前記アミドIバンド最大周波数の閾値は 1643cm^{-1} である。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1A-C】図1A-Cは、IRスペクトロメーター(A)のサンプルチャンバー内のセンサー装置の概略図、サンプルチャンバー(B)の詳細図、及びフロースルーキュベット(C)の概略図を示す。

【0017】

【図2】図2は、最適化したフロースルーキュベットの詳細を示す。装置はカバー内のクォーツウィンドウを経由する代替的光学技法と共に、並行解析用として調製される。ガスケットエレメント、入口、及び出口を、安定性及び流動性に関して最適化した。

【0018】

【図3】図3(A)は、ゲルマニウムと共有結合させた、短鎖トリエトキシシラン(N-(4,4,4-トリエトキシシランブチル)スクシンアミド酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イル-エステル)を示す。スクシンイミジルエステルは、(例えば、蛋白質を構成するリシンの)フリーアミンと反応して、所望の蛋白質(例えば、抗体)の安定的結合をもたらすが、その結合したリジン側鎖を示す(B)。代替的リンカーとして、12-メルカプトドデカン酸NHSエステルはゲルマニウムに共有結合した(C)。NHSエステルは、(例えば、蛋白質形成性リシンの)フリーアミンと反応し、これも共有結合を形成する(D)。

【0019】

定義

抗体が標的に「特異的に結合する」という用語は、他の生物製剤の不均一集団の存在下での抗体の存在を決定する結合反応を指す。従って、指定されたイムノアッセイ条件下で、特定の分子は特定の標的に選択的に結合し、そしてサンプル中に存在する他の生物製剤に有意な量で結合しない。そのような条件下での抗体の標的への特異的結合は、抗体が標的に対する特異性のために選択されることを必要とする。2つの実体間の特異的結合は、少なくとも 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 又は 10^{10}M^{-1} の親和性を意味する。 10^8M^{-1} を超える親和性が好ましい。特異的結合の欠如は、無関係の対照抗体と区別がつかない標的への結合及び/又は 10^6M^{-1} 未満の親和性を意味する。

【0020】

「抗体」という用語は、インタクトな抗体及びその結合断片を含む。典型的には、断片は、インタクトな抗体と競合し、これは抗原断片への特異的結合に由来し、別々の重鎖、軽鎖、Fab、Fab'F(ab')₂、Fabc、及びFvを含む。断片は、組換えDNA技術によって、又はインタクトな免疫グロブリンの酵素的又は化学的分離によって産生される。「抗体」という用語はまた、他のタンパク質との融合タンパク質に化学的に結合しているか、又は融合タンパク質として発現されている1つ以上の免疫グロブリン鎖を含む。用語「抗体」はまた、二重特異性抗体を含む。二重特異性抗体又は二機能性抗体は、2つの異なる重鎖/軽鎖対及び2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合又はFab'断片の連結を含む様々な方法によって産生することができる。例えば、Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990)、Kos

10

20

30

40

50

telny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992)を参照。

【0021】

本発明の抗体は、典型的には、望ましくないコンタミネーション物質から実質的に純粋である。これは、作用物質が典型的には少なくとも約50%w/w（重量/重量）の純度であり、さらに干渉タンパク質及びコンタミネーション物質を実質的に含まないことを意味する。時々、抗体は少なくとも約80%w/w、そしてより好ましくは少なくとも90又は約95%w/wの純度である。但し、従来のタンパク質精製技術を用いて、少なくとも99%w/wの均一な抗体を得ることができる。

【0022】

「エピトープ」又は「抗原決定基」という用語は、B細胞及び/又はT細胞が応答する抗原上の部位を指す。B細胞エピトープは、タンパク質の三次元フォールディングによって並置された隣接アミノ酸又は非隣接アミノ酸の両方から形成され得る。隣接アミノ酸又は翻訳後修飾アミノ酸から形成されたエピトープは、典型的には変性溶媒への曝露時に保持されるが、三次元フォールディングによって形成されたエピトープは典型的には変性溶媒での処理で失われる。エピトープは、典型的には少なくとも3個、一般的に言えば5~10個のアミノ酸を独特の空間的立体配座で含む。エピトープの空間的立体配座を決定する方法には、例えば、X線結晶解析及び二次元核磁気共鳴が含まれる。例えば、Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)におけるエピトープマッピングプロトコルを参照。同じエピトープを認識する抗体は、ある抗体が別の抗体の標的抗原への結合をブロックする能力を示す単純なイムノアッセイで同定することができる。

【0023】

「体液」という用語は、測定可能な量の α -シヌクレイン又はその断片を含むと疑われる哺乳動物宿主の体液を指す。具体的には、血液、脳脊髄液（CSF）、脳又は他の臓器間質液（ISF）、尿、唾液、房水、及び腹水を含む。「血液」という用語は、全血、並びに血漿及び血清を指す。

【0024】

シヌクレイノパチー性疾患は、レビー小体、レビー神経突起又は他の α -シヌクレイン沈着物を特徴とする疾患を意味する。

【0025】

単量体 α -シヌクレインは、段階的に凝集して最初に可溶性オリゴマーを形成し、次いで不溶性原線維を形成し、それがレビー小体を形成すると考えられている。凝集 α -シヌクレインは、ダイマーを含み、レビー小体等の複雑な三次元構造までのあらゆる程度の凝集状態の α -シヌクレインを指す。繊維状 α -シヌクレインは、オリゴマー α -シヌクレイン中の α ヘリックスと比較して β シートが豊富である。レビー小体を有する対象におけるように、 α -シヌクレインが単量体型から凝集型に移行すると、全体的な二次構造分布は、ランダムな立体構造から α ヘリックスを通して β シートに向かってほとんどはシフトする。 α -シヌクレイン骨格のカルボニル基の振動伸縮から生じるアミドIバンドの最大吸光度値は、 α -シヌクレインの凝集が増加するにつれて、より低い波長にシフトする。

【0026】

定性分析は分析物の有無を検出する。定量的アッセイは、分析物の有無を検出だけでなく、存在する場合には、分析物の絶対量又は相対量を提供する。

【0027】

1つ又は複数の列挙された要素を「含む」組成物又は方法は、具体的に列挙されていない他の要素を含んでいてもよい。例えば、 α -シヌクレインペプチドを含む組成物は、より大きなポリペプチド配列の構成要素として、単離された α -シヌクレインペプチド及び α -シヌクレインペプチドの両方を包含する。

【0028】

サンプルは、凝集形態の α -シヌクレインを含んでいてもよいテストアリコートを指す。そのようなサンプルは、以下でさらに論じるように、他の供給源の中でも、患者、細胞培養物又はトランスジェニック動物から得ることができる。無関係成分の除去、又は溶媒

10

20

30

40

50

、緩衝液などの添加など、分析前にサンプルをさらに処理することができる。

【詳細な説明】

【0029】

本発明は、様々な凝集状態の α -シヌクレインを捕捉することができる α -シヌクレインに対する抗体を用いて α -シヌクレインの立体構造状態を分析するための免疫赤外アッセイを提供する。この抗体は、 α -シヌクレインの残基40～55又は91～97内のエピトープに結合する。そのような抗体は、抗体がセンサーの表面上のサンプルから α -シヌクレインを捕捉できるようにセンサーエレメント上に固定化される。赤外線放射がセンサーエレメントを通過し、出現する放射線が検出される。センサーエレメントから出てくる放射線のスペクトルは、凝集の立体構造状態に依存する。より具体的には、 α -シヌクレイン骨格中のカルボニル基の振動伸縮から生じるアミドIバンドの最大吸光度値は、 α -シヌクレインの凝集が増加するにつれて、より低い波長にシフトする。従って、検出されたスペクトルは、試料中の凝集の程度及び/又は凝集した α -シヌクレインの量の尺度を提供することができる。 α -シヌクレインの程度及び/又は量は、シヌクレイノパチー性疾患又はそれに対する感受性の診断を補助するため、並びにシヌクレイノパチー性疾患を有する対象の状態及びそれらの治療に対する反応を測定するために有用である。

10

【0030】

1) 検出に使用される抗体

本発明は、開示されたアッセイ方法において α -シヌクレインを捕捉するのに使用するための3つのクラスの抗体を提供する。抗体は、単独で、又は互いに組み合わせて、又は他の抗体と組み合わせて使用することができる。一方法では、以下に開示される3つのクラスの抗体のうちの1つが捕捉抗体として単独で使用される。下記の3つのクラスの抗体は、4B12抗体とは異なるエピトープ特異性を有する(WO2015121339で報告された α -シヌクレインの残基103～108)。

20

【0031】

第1のクラスの捕捉抗体は、 α -シヌクレインの残基40～55内のエピトープに特異的に結合する。23E8抗体、又は23E8の可変領域もしくはCDRsを有する抗体(好ましくはKabatによって定義される)は、そのような抗体の例である。23E8抗体を生産するハイブリドーマは、ATCC受託番号PTA-122711として寄託されている。成熟重鎖及び軽鎖可変領域は、配列番号10及び11で示される。KabatによるCDR H1、H2及びH3は配列番号12～14で示され、KabatによるCDR L1、L2及びL3は配列番号15～17で示される。

30

【0032】

第2のクラスの抗体は、 α -シヌクレインの残基91～97内のエピトープに特異的に結合する。1H7抗体、又は1H7の可変領域もしくはCDRsを有する抗体(好ましくはKabatによって定義される)は、赤外線センサーエレメントの表面で使用するためのそのような抗体の例である。1H7抗体を生産するハイブリドーマは、ATCC受託番号PTA-8220として寄託されている。成熟重鎖及び軽鎖可変領域は、US20150024433の配列番号9及び11(本願の配列番号2及び3)で示される。KabatによるCDR H1、H2及びH3は、US20150024433の配列番号12～14(本願の配列番号4～6)で示され、CDR L1、L2及びL3は、配列番号15～17(本願の配列番号7～9)で示される。

40

【0033】

第3のクラスの抗体は、 α -シヌクレインの残基118～123内のエピトープに特異的に結合する。MJFR1抗体(ウサギモノクローナル抗体)又はMJFR1のCDRsを有する抗体(好ましくはKabatによって定義される)は、赤外線センサーエレメントの表面で使用するためのそのような抗体の例である。MJFR1抗体はABCAM(登録商標)から市販されている。

【0034】

例えば、抗体が特定の残基、例えば、 α -シヌクレイン40～55内のエピトープに結合すると言われる場合、それはその抗体が特定の残基からなるポリペプチド(即ちこの例では α -シヌクレイン40～55)に特異的に結合することを意味する。そのような抗体は、 α -シヌクレイン40～55内の全ての残基と必ずしも接触するわけではない。 α -シヌクレイン40

50

～55内の全ての－アミノ酸置換又は欠失が必ずしも結合親和性に有意に影響するわけでもない。抗体のエピトープ特異性は、例えば、 α -シヌクレインの配列にわたり、少数のアミノ酸（例えば、3個のアミノ酸）の増分で異なる約15個のアミノ酸の重複ペプチドの集まりを試験することによって測定することができる。ペプチドをマイクロタイターディッシュのウェル内に固定化する。固定化は、ペプチドの一方の末端をビオチン化することによって達成することができる。任意に、同じペプチドの異なるサンプルをN末端及びC末端でビオチン化し、比較の目的で別々のウェルに固定化することができる。これは末端特異的抗体を同定するのに特に有用である。抗体を様々なペプチドのそれぞれへの特異的結合についてスクリーニングする。エピトープは、抗体が特異的結合を示す全てのペプチドに共通のアミノ酸のセグメント内に存在すると定義される。

10

【0035】

II) 免疫グロブリンの一般的な特徴

基本的な抗体構造単位はサブユニットのテトラマーを含むことが知られている。各テトラマーは、2つの同一のペアのポリペプチド鎖からなり、各ペアは1本の「軽」鎖（約25kDa）及び1本の「重」鎖（約50～70kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、約100～110の可変領域、又は主に抗原認識に関与するより多くのアミノ酸を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能に関与する定常領域を規定する。

【0036】

軽鎖はカッパ又はラムダとして分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、又はイプシロンとして分類され、それぞれ抗体のアイソタイプをIgG、IgM、IgA、IgD及びIgEとして定義する。軽鎖及び重鎖内で、可変領域及び定常領域は、約12以上のアミノ酸の「J」領域によって連結され、重鎖はまた、約10以上のアミノ酸の「D」領域も含む。（一般には、Fundamental Immunology, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7を参照（全ての目的のために全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

20

【0037】

各軽鎖／重鎖ペアの可変領域は抗体結合部位を形成する。従って、インタクトな抗体は2つの結合部位を有する。二機能性又は二重特異性抗体を除いて、2つの結合部位は同じである。鎖はすべて、相補性決定領域又はCDRとも呼ばれる3つの超可変領域によって連結された比較的保存されたフレームワーク領域（FR）の同じ一般構造を示す。各ペアの2本の鎖からのCDRはフレームワーク領域によって整列され、特定のエピトープへの結合を可能にする。N末端からC末端へ、軽鎖及び重鎖の両方がドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4を含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991)、Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)、又はChothia et al., Nature 342:878-883 (1989)の定義に従っている。

30

【0038】

A. 非ヒト抗体の生産

マウス又は他の非ヒト抗体は、従来のハイブリドーマ技術によって生産することができる。所望の結合特異性は、免疫原の選択及び／又はスクリーニングアプローチによって付与され得る。残基40～55のエピトープ特異性を有する抗体を作製するために、これらの残基（即ち、40～55）からなる α -シヌクレインの断片を免疫原、又はこれらの残基を含む α -シヌクレイン全長までのより長い断片を使用することができる。抗体は、上記のようにオーバーラッピングペプチドに結合することによってスクリーニングできる。 α -シヌクレインに選択的に結合する抗体を生産するために、全長 α -シヌクレイン、又はエピトープを構成するのに十分な残基を含むその断片（例えば、残基129を含む3～15の隣接残基）を免疫原として使用することができる。

40

【0039】

キメラ抗体及びヒト化抗体は、キメラ抗体又はヒト化抗体の構築のための出発材料を提供するマウス又は他の非ヒト抗体と同じ又は類似の結合特異性及び親和性を有する。キメラ抗体は、その軽鎖及び重鎖遺伝子が、典型的には遺伝子工学によって、異なる種に属す

50

る免疫グロブリン遺伝子セグメントから構築されている抗体である。例えば、マウス抗体の可変ドメインをコードするDNAを配列決定し、そして可変ドメインをコードするDNAコンストラクトを、IgG1及びIgG4などのヒト定常(C)セグメントに連結させることができる。次に、コンストラクトを発現させて抗体を生産する。ヒトアイソタイプIgG1が好ましい。一方法では、抗体のアイソタイプはヒトIgG1である。IgM抗体も一方法において使用することができる。従って、典型的なキメラ抗体は、マウス抗体由来のVドメイン又は抗原結合ドメインと、ヒト抗体由来のCドメイン又はエフェクタードメインとからなるハイブリッド蛋白質である。

【0040】

ヒト化抗体は、実質的にヒト抗体又はヒト抗体（アクセプター抗体と呼ばれる）のコンセンサスに由来する可変領域フレームワーク残基、及び実質的に又は完全にマウス抗体（ドナー免疫グロブリンと呼ばれる）に由来するいくつかの及び通常は6つ全ての相補性決定領域を有する。Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)、WO 90/07861、U.S. Pat. No. 5,693,762、U.S. Pat. No. 5,693,761、U.S. Pat. No. 5,585,089、U.S. Pat. No. 5,530,101、及びWinter, U.S. Pat. No. 5,225,539を参照（全ての目的のために全体が参照により本明細書に組み込まれる）。存在する場合、定常領域もまた実質的に又は完全にヒト免疫グロブリンに由来する。ヒト可変ドメインは通常、そのフレームワーク配列がCDRが由来するマウス可変領域ドメインと高度の配列同一性を示すヒト抗体から選択される。重鎖及び軽鎖可変領域フレームワーク残基は、同じ又は異なるヒト抗体配列に由来し得る。ヒト抗体配列は、天然に存在するヒト抗体の配列であり得るか、又はいくつかのヒト抗体のコンセンサス配列であり得る。Carter et al., WO 92/22653を参照。ヒト可変領域フレームワーク残基由来の特定のアミノ酸は、CDR立体構造及び/又は抗原への結合に対するそれらの可能な影響に基づいて置換のために選択される。そのような可能性のある影響の調査は、モデリング、特定の位置におけるアミノ酸の特性の検査、又は特定のアミノ酸の置換もしくは突然変異誘発の効果の経験的観察による。

【0041】

例えば、マウス可変領域フレームワーク残基と選択されたヒト可変領域フレームワーク残基との間でアミノ酸が異なる場合、アミノ酸が以下であると合理的に予想されるとき、ヒトフレームワークアミノ酸は通常、マウス抗体由来の同等のフレームワークアミノ酸によって置換されるべきである。（1）抗原を直接非共有結合させる、（2）CDR領域に隣接する、（3）もしくはCDR領域と相互作用する（例えば、CDR領域の約6オングストローム以内にある）、（4）VL-VHインターフェースに参加する。

【0042】

置換のための他の候補は、その位置でヒト免疫グロブリンにとってまれなアクセプターヒトフレームワークアミノ酸である。これらのアミノ酸は、マウスドナー抗体の同等の位置からの、又はより典型的なヒト免疫グロブリンの同等の位置からのアミノ酸で置換することができる。ヒト化免疫グロブリンの可変領域フレームワークは通常、ヒト可変領域フレームワーク配列又はそのような配列のコンセンサスに対して少なくとも85%の配列同一性を示す。

【0043】

B. ヒト抗体

α -シヌクレインに対するヒト抗体は、以下に記載される種々の技術によって提供される。免疫原として α -シヌクレインの断片のみを使用することによって、及び/又は α -シヌクレインの欠失変異体の集合に対して抗体をスクリーニングすることによって、特定のエピトープ特異性を有するヒト抗体をスクリーニングすることもできる。ヒト抗体は、アイソタイプ特異性ヒトIgG1を有することが好ましい。以下を含むいくつかの方法がヒト抗体を生産するために利用可能である。トリオーマ法、Oestberg et al., Hybridoma 2:361-367 (1983)、Oestberg, U.S. Pat. No. 4,634,664、及びEngleman et al., U.S. Pat. No. 4,634,666（全ての目的のために全体が参照により本明細書に組み込まれる）。トランスジェニック非ヒト哺乳動物は、以下に詳述されている。Lonberg et al., WO93/1222、U

.S. Pat. No. 5,877,397, U.S. Pat. No. 5,874,299, U.S. Pat. No. 5,814,318, U.S. Pat. No. 5,789,650, U.S. Pat. No. 5,770,429, U.S. Pat. No. 5,661,016, U.S. Pat. No. 5,633,425, U.S. Pat. No. 5,625,126, U.S. Pat. No. 5,569,825, U.S. Pat. No. 5,545,806, Nature 148, 1547-1553 (1994)、Nature Biotechnology 14, 826 (1996)、Kucherlapati, WO 91/10741 (全ての目的のために全体が参照により本明細書に組み込まれる)。ファージディスプレイ方は以下を参照。Dower et al., WO 91/17271及びMcCafferty et al., WO 92/01047, U.S. Pat. No. 5,877,218, U.S. Pat. No. 5,871,907, U.S. Pat. No. 5,858,657, U.S. Pat. No. 5,837,242, U.S. Pat. No. 5,733,743及びU.S. Pat. No. 5,565,332 (全ての目的のために全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

【0044】

10

C. 定常領域の選択

キメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体の重鎖及び軽鎖可変領域は、ヒト定常領域の少なくとも一部に連結することができる。定常領域の選択は、部分的には、抗体依存性補体及び/又は細胞媒介毒性が望ましいかどうか依存する。重鎖領域は、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4を含んでいてもよい。軽鎖定常領域は、ラムダ又はカッパであり得る。抗体は、2本の軽鎖及び2本の重鎖を含むテトラマーとして、別々の重鎖、軽鎖として、Fab、Fab' F(ab')₂、及びFvとして、又はスペーサーを介して重鎖及び軽鎖可変ドメインが連結されている単鎖抗体として発現され得る。

【0045】

20

D. 組み換え抗体の発現

キメラ抗体、ヒト化抗体、及びヒト抗体は、典型的には組換え発現によって生産される。組換えポリヌクレオチドコンストラクトは、典型的には、天然に会合した又は異種のプロモーター領域を含む、抗体鎖のコード配列に作動可能に連結された発現制御配列を含む。好ましくは、発現制御配列は真核生物宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトすることができるベクター上の真核生物プロモーター系である。ベクターが適切な宿主に組み込まれると、宿主はヌクレオチド配列の高レベル発現、並びに交差反応性抗体の回収及び精製に適した条件下で維持される。

【0046】

これらの発現ベクターは典型的には、宿主生物においてエピソームとして又は宿主染色体DNAの不可欠な部分として複製可能である。一般に、発現ベクターは、所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能にするために、選択マーカー（例えば、アンピシリン耐性又はハイグロマイシン耐性）を含む。

30

【0047】

大腸菌は、本発明のDNA配列をクローニングするために特に有用な原核生物宿主の1つである。酵母などの微生物も発現に有用である。サッカロミセスは好ましい酵母宿主であり、適切なベクターは所望により発現制御配列、複製起点、終結配列などを有する。典型的なプロモーターには、3-ホスホグリセレートキナーゼ及び他の解糖系酵素が含まれる。誘導性酵母プロモーターには、とりわけ、アルコールデヒドロゲナーゼ、イソシトロムC、並びにマルトース及びガラクトースの利用に関与する酵素からのプロモーターが含まれる。

40

【0048】

哺乳類細胞は、免疫グロブリン又はその断片をコードするヌクレオチドセグメントを発現するための好ましい宿主である。Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987)を参照。インタクトな異種蛋白質を分泌することができる多数の適切な宿主細胞系が当該分野で開発されており、CHO細胞系、種々のCOS細胞系、HeLa細胞、L細胞、ヒト胚腎臓細胞、及びミエローマ細胞系を含む。好ましくは、細胞は非ヒトである。これらの細胞用の発現ベクターは、複製起点、プロモーター、エンハンサー (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)) などの発現制御配列、及びリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写ターミネーター配列などの必要なプロセッシング情報部位を含んでいてもよい。好ましい発現制御配列は、内在性遺伝子、サイトメガロ

50

ウィルス、SV40、アデノウィルス、ウシパピローマウィルスなどに由来するプロモーターである。Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992)を参照。

【0049】

あるいは、トランスジェニック動物のゲノムへの導入及びその後のトランスジェニック動物のミルク中での発現のために、抗体コード配列を導入遺伝子に組み込むことができる（例えば、U.S. Pat. No. 5,741,957、U.S. Pat. No. 5,304,489、U.S. Pat. No. 5,849,992を参照）。適切な導入遺伝子には、カゼイン又はβラクトグロブリンなどの乳腺特異的遺伝子由来のプロモーター及びエンハンサーと作動可能に連結した軽鎖及び/又は重鎖のコード配列が含まれる。

【0050】

目的のDNAセグメントを含むベクターは、細胞宿主の種類に応じて、周知の方法により宿主細胞に導入することができる。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションは原核細胞に一般的に利用され、一方、リン酸カルシウム処理、エレクトロポレーション、リポフェクション、バイオリスティックス又はウィルスベーストランスフェクションは他の細胞宿主に使用することができる。哺乳類細胞を形質転換するために使用される他の方法には、ポリブレン、プロトプラスト融合、リポソーム、エレクトロポレーション、及びマイクロインジェクションの使用が含まれる（一般的にはSambrook et al. 前述を参照）。トランスジェニック動物の作製のために、導入遺伝子を受精卵母細胞に微量注入することができ、又は胚性幹細胞のゲノムに組み込むことができ、そのような細胞の核を除核卵母細胞に移入することができる。

【0051】

一旦発現されると、抗体は、HPLC精製、カラムクロマトグラフィー、及びゲル電気泳動などを含む当該分野の標準的な手順に従って精製され得る（一般的にはScopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)を参照）。

【0052】

II. α-シヌクレイン

α-シヌクレインは、もともとヒト脳において、ADブランク（NAC）の非β-アミロイド成分の前駆蛋白質として同定された。（Ueda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (23):11282-11286 (1993)）α-シヌクレインは、ADアミロイドの非Aβ成分の前駆体（NACP）とも呼ばれ、140アミノ酸のペプチドである。全長α-シヌクレインは以下のアミノ酸配列を有する。

（配列番号1）

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAETKQGVAAEAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVH GVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAV AQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQL GKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA (Ueda et al., I bid.; GenBankアクセッション番号: P37840)

【0053】

特記しない限り、α-シヌクレインへの言及は、分析されている試料中に見出される全長形態及びその断片、並びに翻訳後修飾（例えば、リン酸化）を受けた形態を含む、上記の天然ヒトアミノ酸配列並びにその天然の対立遺伝子及び種変異体を意味する。α-シヌクレインの断片又は変異体は、例示された配列におけるように、整列した残基に同じ番号が割り当てられるように番号が付けられる。

【0054】

III. α-シヌクレインの二次構造プロファイルのアッセイ

A. IRアッセイ

本発明のIRアッセイは、赤外線源、赤外線センサーエレメント、及び赤外線ディテクターを含む装置内で行われる。赤外線センサーエレメントは、サンプルを保持するためにセル内に収容されている。セルは、サンプルを連続的にモニタリングすることを可能にするフロースルーセルであり得る。

【0055】

赤外線源には、加熱ランプ、黒体放射体、ネルンストランプ、IR-LED、及びIRビームを

10

20

30

40

50

生成するIRレーザーが含まれる。

【0056】

赤外線センサーエレメントは、IR放射を透過する内部反射エレメント（IRE）と少なくとも1つのホルダーとを含む。赤外線センサーエレメントのIREは、典型的には、高屈折率を有する1つ以上の赤外線透過材料から形成される。これはダイヤモンド、ゲルマニウム、シリコン又はセレン化亜鉛を含む。例えば、IREはゲルマニウム結晶である。ゲルマニウム結晶はゲルマニウム単結晶であり得る。IREは台形、平行四辺形、繊維状、又は棒状であり得る。例えば、IREは台形又は平行四辺形の形状である。例えば、IREは台形のゲルマニウム結晶である。IREエレメントは、IREを通る赤外線放射の2回以上の通過、例えば、5回の通過を可能にする形状、配向及び寸法によって構成されることが好ましい。ホルダーはIREをセルに固定するためのものである。ホルダーはソリッドで垂直であることが好ましい。また好ましくは4つのホルダーが存在する。4つの垂直でソリッドなホルダーがあることがさらに好ましい。

10

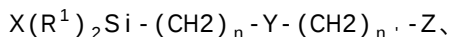
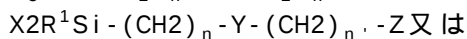
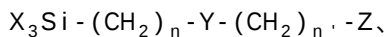
【0057】

赤外線センサーエレメントは、上記の抗体（例えば、23E8、1H7、又はMJFR1）に連結している。抗体は、リンカー、例えば、シラン又はチオールリンカーを介して赤外線センサーエレメントに連結することができる。リンカーには、均一なシラン及びチオールリンカー、シランリンカーの混合物、及びチオールリンカーの混合物が含まれる。例えば、20原子以下又は15原子以下の鎖長を有するリンカーが利用される。

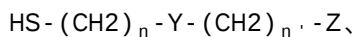
20

【0058】

例示的な短鎖リンカーは、以下の式のうちの1つを有するシランリンカーを含む。



及び上記チオールリンカーは以下の式を有する。



ここで、Xは各々独立してハロゲン及び C_{1-6} アルコキシから選択され、nは1～10の整数であり、n'は1～5の整数であり、R¹は各々独立して C_{1-6} アルキルから選択され、Yは-O-、CO-、-SO₂-、-NR²-、-S-、-SS-、-NR²CO-、-CONR²-、-NR²SO₂-及び-SO₂NR²-（ここでR²はH又は C_{1-6} アルキルである）の化学結合から選択され、Zは-CO₂H、-SO₃H及びそれらのエステル誘導体を含むアミン反応性基である。

30

【0059】

C_{1-6} アルキル及び C_{1-6} アルコキシは、飽和又は不飽和であってもよい、1～6個の炭素原子を有する直鎖、分岐鎖又は環状アルキル又はアルコキシ基を含む。環状アルキル及びアルコキシ基の場合、3～6個の炭素原子を有するものを指す。適切な C_{1-6} アルキル及び C_{1-6} アルコキシ基は、とりわけ、メチル及びメトキシ、エチル及びエトキシ、n-プロピル及びn-プロポキシ、イソプロピル及びイソプロポキシ、シクロプロピル及びシクロプロポキシ、n-ブチル及びn-ブトキシ、tert-ブチル及びtert-ブトキシ、シクロブチル及びシクロブトキシ、n-ペンチル及びn-ペントキシ、シクロペンチル及びシクロペントキシ、n-ヘキシル及びn-ヘキソキシ、シクロヘキシル及びシクロヘキソキシなどを含む。アミン反応性基Zは、フリーアミノ基と反応性であるあらゆる種類の官能基を含む。これらの中でも、-CO₂H、-SO₃H及びそれらのエステル誘導体（活性エステルを含む）が特に好ましい。

40

【0060】

上記式中の $(CH_2)_n$ 及び $(CH_2)_{n'}$ の構成要素はまた、1つ以上の二重及び/又は三重結合を含んでいてもよく、フッ素などの1つ以上のハロゲン原子で置換されていてもよい。

【0061】

シランリンカーにおいて、Xは独立して C_{1-6} アルコキシ基、好ましくはメトキシ及びエトキシ基から選択される。Yは-NHCO-である。Zは-CO₂H又はそのエステル誘導体であり、nは1～5の整数、n'は1～3の整数、好ましくはnは3、n'は2である。短いシランリンカーを有する赤外線センサーエレメントを調製する方法は、HFとの反応により内部反射エレメン

50

トの少なくとも1つの表面を活性化する工程、活性化表面に短いシランリンカーをグラフトする工程、及び短いシランリンカーのアミン反応性基を介して抗体を内部反射エレメントに共有結合させる工程、及び短いシランリンカー上の残りのアミン反応性基をブロッキング物質でブロッキングする工程を含む。

【0062】

チオールリンカーにおいて、Yは化学結合である。Zは $-CO_2H$ 又はそのエステル誘導体であり、nは1~8の整数、n'は1~5の整数、好ましくはnは8、n'は4である。特に好ましくは12-メルカプトドデカン酸NHSエステルである。短いチオールリンカーを有する赤外線センサーエレメントを調製する方法は、HFとの反応により内部反射エレメントの少なくとも1つの表面を活性化する工程、活性化表面に短いチオールリンカーをグラフト化する工程、及び短いチオールリンカーのアミン反応性基を介して抗体を内部反射エレメントに共有結合させる工程、及び短いチオールリンカー上の残りのアミン反応性基をブロッキング物質でブロッキングする工程を含む。

10

【0063】

抗体を表面に結合させた後、表面への非特異的結合を減らすために表面をブロックすることができる。分析物とは反応しないがシラン又はチオールリンカーとは反応する球状蛋白質の界面活性剤フリー溶液を、センサーエレメントの非特異的結合部位のケミカルクエンチング/ブロッキングに使用する。 α -シヌクレインと交差反応しない適切なブロッキング物質は、カゼイン、エタノールアミン、L-リジン、ポリエチレングリコール、アルブミン、及びそれらの誘導体を含み、そして好ましくはカゼインである。

20

【0064】

赤外線ディテクターは、セル内のサンプルを特徴付けるIR吸光度スペクトルを取得するディテクターとすることができる。ディテクターの2つの主な種類は、熱とフォトリック（フォトリックディテクター）である。赤外線ディテクターは、例えば、テルル化カドミウム水銀（MCT）、アンチモン化インジウム、ヒ化インジウム、又はセレン化鉛であり得る。

【0065】

赤外線源はIRビームを発生させる。赤外線は、 $0.75 \sim 1000 \mu m$ の波長を有する、スペクトルの赤色端の波長よりも長い波長の電磁放射として表される。赤外線は、場合によっては、長波又は遠赤外線（約 $3.0 \sim 1000 \mu m$ ）及び短波又は近赤外（約 $0.75 \sim 3.0 \mu m$ ）に細分される。約 $5.88 \sim 6.25 \mu m$ の波長範囲は、通常 $1600 \sim 1700 cm^{-1}$ のアミドIバンドを含む赤外スペクトルの一部における波数に対応する。波数としても知られる逆センチメートルにおける波長の逆数は、放射の周波数の尺度として使用することができる。

30

【0066】

アッセイにおいて、IRビームは、 α -シヌクレインに結合した抗体に連結したIRセンサーエレメントに送られる。 α -シヌクレインは特定の波長の放射線を吸収し、吸光度スペクトルを生成する。これは赤外線ディテクターによって捕捉される。吸光度スペクトルは、赤外線放射の異なる波長又は周波数での吸光度を示すチャートとして表すことができます。そのような吸光度スペクトルは、 α -シヌクレイン中の異なる結合の振動に対応するいくつかのバンドを含む。アミドI及びアミドIIバンドは蛋白質赤外吸収スペクトルの2つの主要なバンドである。アミドIバンドは本分析にとって特に興味深いものである。アミドIバンドは、蛋白質又はペプチド骨格中の $C=O$ 結合の振動による吸光度を指すための生化学文献における慣習的な用語である。アミドIバンドの正確な周波数又は波長は、蛋白質の種類及びその凝集状態によって異なり、典型的には 1600 から $1700 cm^{-1}$ の間である。アミドIIバンドは、N-H曲げ振動（40~60%）及びC-N伸縮振動（18~40%）から生じる。アミドIIバンドは立体構造感受性がある。

40

【0067】

単量体状態の α -シヌクレインについては、バンドは約 $1646 cm^{-1}$ のピーク周波数を有する。 α -シヌクレインが凝集するにつれて、ピークの周波数は低くシフトする。吸光度シグナルの強度は、物質濃度の定量的又は定性的解釈を可能にする。 α -シヌクレインの二次構造を測定するために α -シヌクレインのアミドIバンド最大周波数のシフトを分析する

50

とき、 1646cm^{-1} のアミドIバンド最大周波数は単量体 α -シヌクレインを示し、それより低い α -シヌクレインのアミドIバンド最大周波数は凝集した α -シヌクレインを示す。

【0068】

測定されたIRスペクトルのアミドIバンドは単一のピークを有していてもよく、その周波数は α -シヌクレインの凝集状態を表す値を提供する。例えば、バンドが 1646cm^{-1} に生じる単一のピークを有する場合、サンプルは実質的に単量体状態の α -シヌクレインを含有する。単一ピークが 1643cm^{-1} 以下にシフトする場合、レビー小体病を有する対象において生じるように実質的な凝集がある。ピークシフトが低いほど、凝集した α -シヌクレインの割合及び/又は程度は大きい。周波数は、例えば、約 1646 から 1636cm^{-1} の範囲であり得るが、しばしば 1646 - 1638 又は 1646 - 1640 又は 1646 - 1641 又は 1646 - 1642 又は 1646 - 1643cm^{-1} の範囲内である。 10

【0069】

アミドIバンドは、追加的又は代替的に、曲線の面積を分析し、曲線の下を二等分するミッドポイント周波数によってバンドを特徴付けることによって分析することができる。バンドの対称性に応じて、このミッドポイント周波数はバンドピークの周波数と同じでも異なってもよい。曲線下面積を二等分するミッドポイント周波数は、単一ピークの周波数と同様に、凝集の量及び程度の尺度として使用することができる。

【0070】

スペクトルによっては、アミドIバンドは、 α -シヌクレインの異なる立体構造状態（例えば、単量体、オリゴマー及び繊維状）に対応する複数のピークを有することができる。そのような場合、異なる形態の割合を測定するために、それぞれのピークの曲線の下の高さ又は面積を比較する、追加の分析を実施することができる。IRセンサーエレメントは、少なくとも2つの異なるが同時に適用される分光法（例えば、分析物の赤外吸光度及び蛍光測定）を用いた少なくとも2つの波長範囲を並行して検出するように設計することができる。追加の光学的方法による並列検出のために、装置は、異なる波長でのUV/Vis蛍光用の光源及びディテクターエレメントなどの、追加の光学的方法のための光源及びディテクターエレメントをさらに含んでもよい。UV/Vis蛍光を検出することによって、 α -シヌクレインがIRセンサーエレメントの表面に連結した捕捉抗体に結合するかどうかを確認するために、 α -シヌクレインに特異的に結合する蛍光標識抗体を使用できる。 20

【0071】

IV. 適用

この方法は、シヌクレイノパチー性疾患を有するか又はその危険性がある被験体、特にヒトを診断、予後予測又はモニターするために使用することができる。シヌクレイノパチー性疾患は、パーキンソン病（PD）、レビー小体型認知症（DLB）、アルツハイマー病のレビー小体亜型（LBVAD）、多系統萎縮症（MSA）、脳内鉄蓄積を伴う神経変性1型（NBIA-1）、多発性レビー小体病（DLBD）、及びPDとアルツハイマー病（AD）の組み合わせを含む。適切な患者サンプルは、血液、CSF、ISF、硝子体液、唾液、尿、及び腹水などの体液を含む。対象の脳からの組織サンプルは、同様の分析にかけることができる。しかしながら、対象の脳からサンプルを得ることは望ましくない侵襲的な処置であるので、そのような分析は通常、死体又は実験動物モデルに限定される。 40

【0072】

現在無症候である対象において、体液中において増加した量の凝集した α -シヌクレインが存在することは、シヌクレイノパチー性疾患の発症のリスクが増加していることの指標を提供する（例えば、アミドIピークのシフトは 1646cm^{-1} 未満）。シヌクレイノパチー性疾患のいくつかの症状を示すが、この疾患と診断されていない対象において、体液中の増加した量の凝集した α -シヌクレインの存在は、対象がその疾患を有するか又は発症するリスクが高いという指標を提供する（例えば、 1643cm^{-1} のような閾値以下のアミドIピークのシフト）。シヌクレイノパチー性疾患と診断された対象において、体液中の凝集した α -シヌクレインのレベルは、患者の状態の指標としてモニターすることができ、凝集した α -シヌクレインの経時的な増加は状態の悪化を示す（例えば、アミドIピークは、16 50

43cm⁻¹のような閾値をさらに下回る)。シヌクレイノパチー性疾患と診断され、そしてそれに対する治療を受けている対象において、体液中の凝集 α -シヌクレインのレベルは、治療に対する反応の指標を提供することができ、凝集 α -シヌクレインのレベルの減少は、患者の状態が改善していることを示す(例えば、アミドIピークは、1643cm⁻¹のような閾値を超えて増加する)。この方法は、例えば、 α -シヌクレインに対する免疫療法(例えば、PRX-002等の α -シヌクレインに対する抗体、又は α -シヌクレインに対する抗体を誘導することができる α -シヌクレイン断片)又はシヌクレイノパチー性疾患の他の治療を受けている患者に使用することができる。

【0073】

これらの方法のいずれにおいても、対象から測定されたIRスペクトルは、既知の疾患又は治療状態(例えば、シヌクレイノパチー性疾患と診断され、 α -シヌクレイノパチー性疾患に対する治療に対してポジティブな応答をしている)のコントロール対象からのIRスペクトルと比較することができる。

【0074】

この方法はまた、適切な細胞培養物由来の馴化培地中の α -シヌクレインのインビトロモニタリングに使用でき、 α -シヌクレインの二次構造を分析するために使用できる。細胞培養におけるIRアッセイの適用は、体液サンプルにおいて記載したものと類似している。

【0075】

適切な細胞は、 α -シヌクレイン、好ましくはヒト α -シヌクレインをコードする核酸でトランスフェクトされた細胞、及び α -シヌクレイン、好ましくはヒト α -シヌクレインを天然に発現する細胞を含む。トランスフェクトされた細胞中の α -シヌクレインは、S129A、S129D、A53T及びA20P等の突然変異を有し得る。細胞は、PeakS細胞、SY5Y細胞、ヒト皮質細胞、ヒト神経膠腫細胞株、神経芽腫細胞株、ヒトHeLa細胞、初代ヒト内皮細胞(例えば、HUVEC細胞)、初代ヒト線維芽細胞又はリンパ芽球、初代ヒト混合脳細胞(ニューロン、星状細胞、及び神経膠細胞を含む)、チャイニーズハムスター卵巢(CHO)細胞等を含む。SY5Y細胞は、レチノイン酸/BDNF(脳由来神経栄養因子)での処理によって分化するように誘導され得る神経細胞である。正常ヒト細胞よりも高レベルでpS129 α -シヌクレインを発現するトランスフェクト細胞が好ましい。

【0076】

細胞培養培地をモニターすることは、シヌクレイノパチー性疾患を治療するのに有用な活性について化合物をスクリーニングするのに有用である。ペプチド又は他の化合物のランダムライブラリーもまた適性についてスクリーニングすることができる。段階的様式で合成可能な多くの種類の化合物についてコンビナトリアルライブラリーを作製することができる。そのような化合物は、ポリペプチド、 β ターンミミック、多糖類、リン脂質、ホルモン、プロスタグランジン、ステロイド、芳香族化合物、複素環式化合物、ベンゾジアゼピン、オリゴマー-N-置換グリシン及びオリゴカルバメートを含む。化合物の大規模コンビナトリアルライブラリーは、Affymax, WO 95/12608、Affymax, WO 93/06121、Columbia University, WO 94/08051、Pharmacopeia, WO 95/35503及びScripps, WO 95/30642に記載されたコード化合成ライブラリー(ESL)法によって構築することができる(これらそれぞれは、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる)。ペプチドライブラリーはファージディスプレイ法によっても生成することができる。例えば、Devlin, WO 91/18980を参照。試験化合物は、典型的には約1nMから1mM、通常約10 μ Mから1mMの範囲の濃度で培地に投与される。 α -シヌクレインの形成、プロセッシング又は分泌を阻害することができる試験化合物は、トランスジェニック動物及び最終的なヒト臨床試験におけるさらなる測定のための候補である。

【0077】

本発明の方法はまた、シヌクレイノパチー性疾患の動物モデルにおいて α -シヌクレイン凝集形態をモニターするためにも使用できる。レビー小体病のトランスジェニック動物モデルは、Masliah, et al. Science 287:1265-1269 (2000)、Masliah et al., PNAS USA

10

20

30

40

50

98:12245-12250 (2001)に記載されている。 α -シヌクレインは、ヒトサンプルに関して上述したように体液において、又は動物から直接採取した組織サンプルにおいて分析することができる(参照により組み込まれるWO 2004/041067を参照)。組織サンプルは、レビ-小体、粒子画分及び可溶性画分に分類することができる。

【0078】

理解を明確にする目的で本発明を詳細に説明してきたが、添付の特許請求の範囲内で特定の修正を実施できることは明らかである。本出願において引用された全ての刊行物及び特許文献は、あたかもそれぞれがそのように個々に示されているのと同程度に、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。文脈から他に明らかでない限り、任意の実施形態、態様、特徴又は工程は任意の他のものと組み合わせて使用することができる。引用番号又はアクセッション番号などに関連する内容が時間とともに変化する場合、本出願の有効出願日に存在するバージョンを意図しており、有効出願日は、引用番号又はアクセッション番号を開示している優先出願の実際の出願日又はそれ以前の出願日である。

【実施例】

【0079】

市販のサンプルコンパートメントであるSpecac (Specac Ltd., Slough, 英国) の「GS1 1000-25回反射型入射角可変式ATR」を備えるIR-スペクトロメーター(図1A、光路図1B)。光学エレメント、ゲルマニウムATR結晶(52x20x2mm、Korth Kristalle GmbH, Altenholz (Kiel)、ドイツ)を、最適化されたブラケット内に組み込む(図1C、図2)。続いて、結晶表面の所定の化学修飾により、特異的センサー特性を生成する(図3)。超音波槽で緩衝液と水を脱気する。

【0080】

サンプリングと前処理：

CSFを腰椎穿刺により吸引し、分取し、液体窒素内で凍結し、-80 で搬送及び保存する。サンプルは測定前に別の方法で前処理せず、37 30秒間で解凍し、使用されるまで氷上に保存する。

【0081】

カゼインブロッキング溶液：

200mM水酸化ナトリウム(NaOH)、ウシミルク由来の1%(w/v)カゼイン(粉末)、pHはH₃PO₄で7.4に調製。

【0082】

シラン化溶液：

(N-(4,4,4-トリエトキシシランブチル)スクシンアミド酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イル-エステル)をJ. Schartner et al., Journal of the American Chemical Society, 135(10):4079-4087 (2013)に記載されているように合成し特徴付ける。

【0083】

シランを用いたセンサー表面の調製：

Ge-IREを0.1 μ m粒ダイヤモンド研磨懸濁液で5分間両側研磨する(Struers A/S, Ballerup、デンマーク)。結晶を過酸化水素/シュウ酸混合物(9:1)中で5分間3回インキュベートし、各インキュベーション工程の間に水ですすぎそして窒素ガスで乾燥する。さらに、結晶をフロースルーセル内の最適化されたシリコンウエハに直に取り付ける。ペリスタポンプ(IDEX Health & Science GmbH、ヴェルトハイム、ドイツ)によって流速を1ml/分に調節する。システムの総容積は650 μ lに達した。

【0084】

センサー表面を2-プロパノール中の300 μ Mシラン溶液と共に60分間インキュベートし(図3)、非特異的に連結したシランを2-プロパノールで30分間すすいだ。培地を反応緩衝液に交換した後、抗体のアミドIIバンドの固定化動力学によりモニターして、25 μ g/mlの抗体溶液(1H7、23E8、又はMJFR1)を飽和するまで活性化シラン表面上にフラッシュする。アミドII吸光が平衡に達するまで、非特異的に結合した抗体をPBS緩衝液ですすぐ。セ

ンサー表面のフリー反応部位をカゼインブロッキング溶液で飽和させた後、PBS緩衝液ですすぐ。

【0085】

チオールを用いたセンサー表面の調製：

Ge-IREをシラン化に関する記載（S.M.Han et al., JACS, 123(10):2422-2425 (2001)）と同様にして調製する。HF処理後、結晶を1mMの12-メルカプトドデカン酸NHSエステルを含有するイソプロパノール溶液に直ちに浸漬する。24時間後に単層が形成され、結晶をN₂ガスで乾燥させ、直ちにATRセットアップに設置した。未結合のチオールをイソプロパノールで30分間洗浄することにより除去する。さらなる調製はシラン化プロトコルと同じである。

10

【0086】

測定の実施：

50 μ lのcsfを循環フロー内のPBS緩衝系に添加する。結合平衡に達した後、スペクトル変化が観察されなくなるまで、未結合の物質をPBS緩衝液で系からすすぎ落とす。従って、吸光度スペクトルは、この状態と、カゼインブロックしPBSですすいだセンサー表面との間の差異から計算される。IR測定は、液体窒素で冷却したテルル化カドミウム水銀（MCT）ディテクター及び縦型角度可変式ATRセットアップ（Specac、英国オルピントン）を備えたVertex 70Vスペクトロメーター（Bruker Optics GmbH、Ettlingen、ドイツ）で実施する。

20

【0087】

上記又は下記に引用される全ての特許出願、ウェブサイト、他の出版物、アクセッション番号等は、あたかも個々の項目が具体的かつ個別に参照により組み込まれるように示されるのと同じ程度にあらゆる目的でその全体が参照により組み込まれる。異なるバージョンの配列が異なる時点でアクセッション番号に関連付けられている場合、本出願の有効出願日におけるアクセッション番号に関連付けられているバージョンが意味される。有効な出願日とは、実際の出願日又は該当する場合にはアクセッション番号を参照する優先権出願の出願日の早い日を意味する。同様に、異なるバージョンの出版物、ウェブサイト等が異なる時間に出版されている場合も、別段の指定がない限り、出願の有効出願日に最後に出版されたバージョンを意味する。特に明記しない限り、本発明の任意の特徴、工程、要素、実施形態、又は態様は、任意の他のものと組み合わせて使用することができる。明確さ及び理解のために本発明を説明及び実施例によってある程度詳細に説明してきたが、添付の特許請求の範囲内で特定の変更及び修正を実施できることは明らかであろう。

30

【図 1 A - C】

図1A

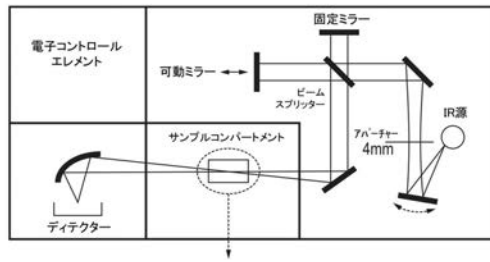


図1B

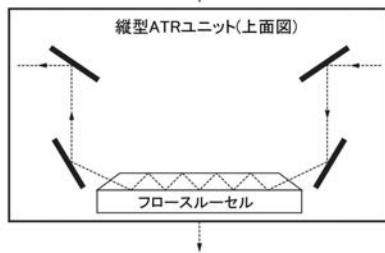
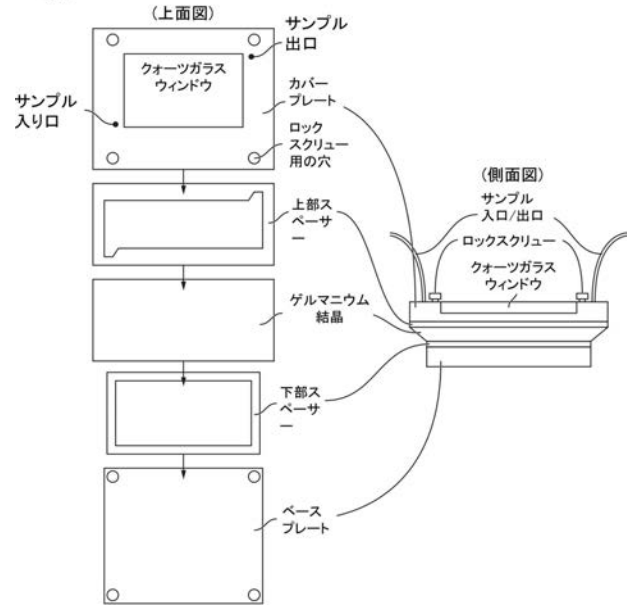


図1C



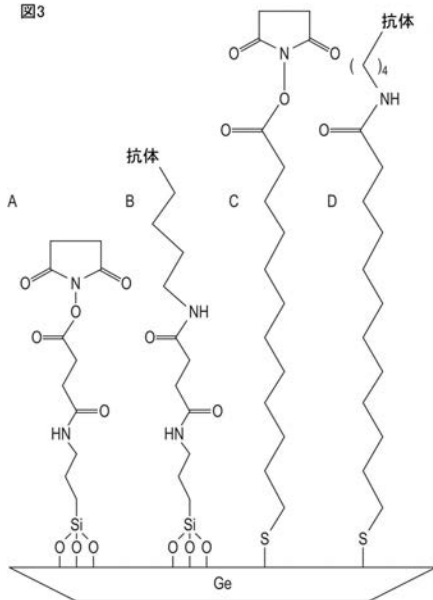
【図 2】

図2



【図 3】

図3



【配列表】

2020501132000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/064332

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/00; A61K 39/395; A61K 49/00; A61P 25/16; C07K 16/18; G01N 21/35 (2018.01) CPC - A61K 39/395; A61K 49/0004; A61K 2039/505; A61K 2039/6056; C07K 16/18; C07K 16/2872; G01N 21/05; G01N 21/3577; G01N 21/552; G01N 21/6428; G01N 21/6458; G01N 2021/6421; G01N 2800/2821; G01N 2800/2835; G01N-033/68/96 (2018.01)		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/121339 A1 (RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM et al) 20 August 2015 (20.08.2015) entire document	1-6, 24
Y		25-28
Y	US 2016/0231335 A1 (ROWAN UNIVERSITY) 11 August 2016 (11.08.2016) entire document	25-28
A	ELFRINK et al. "Structural Changes of Membrane-Anchored Native PrPC," Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 05 August 2008 (05.08.2008), Vol. 105, Pgs. 10815-10819. entire document	1-6, 24-28
A	NABERS et al. "Amyloid-β-Secondary Structure Distribution in Cerebrospinal Fluid and Blood Measured by an Immuno-Infrared-Sensor: A Biomarker Candidate for Alzheimer's Disease," Analytical Chemistry, 16 February 2016 (16.02.2016), Vol. 88, Pgs. 2755-2762. entire document	1-6, 24-28
A	US 2015/0259404 A1 (PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED) 17 September 2015 (17.09.2015) entire document	1-6, 24-28
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 January 2018		Date of mailing of the international search report 23 FEB 2018
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/064332

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 7-23, 29, 30
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
 C 0 7 K 16/18 (2006.01) C 0 7 K 16/18

(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, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, 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, KG, 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, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72) 発明者 バーバー , ロビン
 アメリカ合衆国 9 4 5 9 8 カリフォルニア ウォールナット クリーク ノルマンディー レ
 ーン 2 5 0

F ターム(参考) 2G059 AA01 BB04 BB13 CC16 EE01 EE02 EE12 HH01 JJ12 KK01
 4B063 QA05 QA11 QA19 QQ03 QQ08 QQ13 QQ79 QR48 QR72 QR77
 QR80 QR82 QS33 QS38 QS39 QX01
 4H045 AA11 AA30 AA40 BA60 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74 FA81

专利名称(译)	红外检测法检测 α -突触核蛋白的二级结构		
公开(公告)号	JP2020501132A	公开(公告)日	2020-01-16
申请号	JP2019527788	申请日	2017-12-01
[标]申请(专利权)人(译)	普罗典娜生物科学有限公司		
申请(专利权)人(译)	Purosenabio科学有限公司		
[标]发明人	バーバーロビン		
发明人	バーバー, ロビン		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 C12Q1/02 G01N21/3577 C07K17/00 C07K16/18		
CPC分类号	A61P25/16 C07K16/18 C07K2317/34 G01N21/552 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2835 G01N21/3577 G01N2333/46		
FI分类号	G01N33/543.595 G01N33/53.D C12Q1/02 G01N21/3577 C07K17/00.ZNA C07K16/18		
F-TERM分类号	2G059/AA01 2G059/BB04 2G059/BB13 2G059/CC16 2G059/EE01 2G059/EE02 2G059/EE12 2G059/HH01 2G059/JJ12 2G059/KK01 4B063/QA05 4B063/QA11 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS33 4B063/QS38 4B063/QS39 4B063/QX01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/AA40 4H045/BA60 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/FA81		
代理人(译)	伊藤裕之		
优先权	62/429604 2016-12-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种红外测定法，其无需复杂的分离，浓缩或预处理就可以对来自诸如血清，血浆或脑脊髓液之类的复杂流体的 α -突触核蛋白进行二级结构分析。二级结构概况指示聚集形式的 α -突触核蛋白的百分比和/或聚集形式的 α -突触核蛋白的聚集程度。

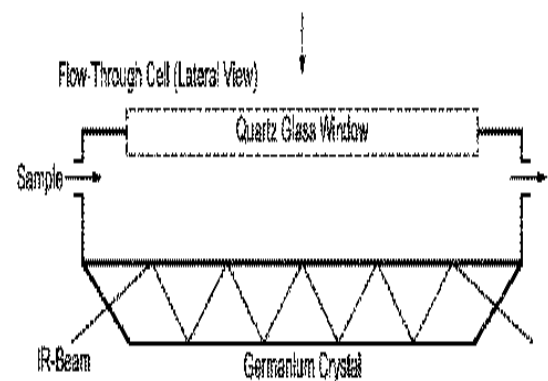


FIG. 1C