

(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2016-511254

(P2016-511254A)

(43) 公表日 平成28年4月14日(2016.4.14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18 ZNA	4B024
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4C085
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4H045
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 D	
A61P 25/28 (2006.01)	A61K 39/395 N	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-559593 (P2015-559593)
 (86) (22) 出願日 平成26年2月27日 (2014. 2. 27)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年8月28日 (2015. 8. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2014/059287
 (87) 国際公開番号 W02014/132210
 (87) 国際公開日 平成26年9月4日 (2014. 9. 4)
 (31) 優先権主張番号 13/781, 158
 (32) 優先日 平成25年2月28日 (2013. 2. 28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 14/138, 347
 (32) 優先日 平成25年12月23日 (2013. 12. 23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513208009
 ユナイテッド アラブ エミレーツ ユニ
 バーシティ
 UNITED ARAB EMIRATE
 S UNIVERSITY
 アラブ首長国連邦 アル アイン ピーオ
 ー ボックス 15551
 (74) 代理人 110000800
 特許業務法人創成国際特許事務所
 (72) 発明者 エルーアグナフ, オマル
 アラブ首長国連邦 アル アイン ピーオ
 ー ボックス 15551 ユナイテッド
 アラブ エミレーツ ユニバーシティ
 Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA04 CA07
 DA02 FA02 GA11 HA03 HA15
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルファーシヌクレイン抗体及びその使用

(57) 【要約】

【解決手段】本発明は、 α -シヌクレインの凝集形態に対する高親和性と α -シヌクレインのモノマー形態に対する低親和性とを有する抗体を述べる。該抗体は神経変性の病気の診断に有益である。

【選択図】 図2

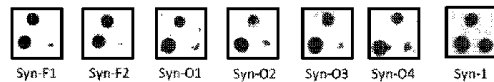


Figure 2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- シヌクレイン凝集物に対する高結合親和性とシヌクレインモノマーに対する低結合親和性とを有する抗体又はそのフラグメント。

【請求項 2】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントにおいて、

VH鎖を備え、

該 VH鎖において、CDR1領域が、配列番号 16, 28 又は 40 のアミノ酸配列を有し、

該 VH鎖において、CDR2領域が、配列番号 17, 29 又は 41 のアミノ酸配列を有し、

該 VH鎖において、CDR3領域が、配列番号 18, 30 又は 42 のアミノ酸配列を有する抗体又はそのフラグメント。

10

【請求項 3】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントにおいて、

VL鎖を備え、

該 VL鎖において、CDR1領域が、配列番号 22, 34 又は 46 のアミノ酸配列を有し、

該 VL鎖において、CDR2領域が、配列番号 23, 35 又は 47 のアミノ酸配列を有し、

該 VL鎖において、CDR3領域が、配列番号 24, 36 又は 48 のアミノ酸配列を有する抗体又はそのフラグメント。

20

【請求項 4】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントにおいて、

免疫グロビン重鎖の可変領域 (VH) を備え、

該 VHが、配列番号 2, 6 又は 10 に示されるアミノ酸配列を備える抗体又はそのフラグメント。

【請求項 5】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントにおいて、

免疫グロビン軽鎖の可変領域 (VL) を備え、

該 VLが、配列番号 4, 8 又は 12 に示されるアミノ酸配列を備える抗体又はそのフラグメント。

30

【請求項 6】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントにおいて、

免疫グロビン重鎖の可変領域 (VH) と免疫グロビン軽鎖の可変領域 (VL) とを備え、

VHとVLとが、それぞれ、配列番号 2 と 4 か、配列番号 6 と 8 か、又は配列番号 10 と 12 かに示されるアミノ酸配列を備える抗体又はそのフラグメント。

【請求項 7】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントにおいて、

VH鎖とVL鎖とを備え、

該 VH鎖において、CDR1領域が配列番号 16, 28 又は 40 のアミノ酸配列を有し、CDR2領域が配列番号 17, 29 又は 41 のアミノ酸配列を有し、CDR3領域が配列番号 18, 30 又は 42 のアミノ酸配列を有し、

該 VL鎖において、CDR1領域が配列番号 22, 34 又は 46 のアミノ酸配列を有し、CDR2領域が配列番号 23, 35 又は 47 のアミノ酸配列を有し、CDR3領域が配列番号 24, 36 又は 48 のアミノ酸配列を有する抗体又はそのフラグメント。

40

【請求項 8】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントにおいて、

- シヌクレイン凝集物が、 - シヌクレインのプロトフィブリル及び/又は可溶性オ

50

リゴマーを備える抗体又はそのフラグメント。

【請求項 9】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントにおいて、

- シヌクレイン凝集物が - シヌクレインのフィブリルである抗体又はそのフラグメント。

【請求項 10】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントが、ヒトの - シヌクレイン凝集物に対して 10^{-7} M より小さい解離定数 K_d を有する抗体又はそのフラグメント。

【請求項 11】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントが、モノマーの - シヌクレインに対して 10^{-5} M より大きい解離定数 K_d を有する抗体又はそのフラグメント。

10

【請求項 12】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントにおいて、

抗体が、 - シヌクレインのオリゴマー形態に対してよりも - シヌクレインのフィブリルに対して高い親和性を有する抗体又はそのフラグメント。

【請求項 13】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントが、 - シヌクレインの C 末端領域を備えるエピトープに結合している抗体又はそのフラグメント。

【請求項 14】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントが、確認抗体である抗体又はそのフラグメント。

20

【請求項 15】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントが、 - シヌクレインの線形エピトープを認識しない抗体又はそのフラグメント。

【請求項 16】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントにおいて、

抗体が、単クローン抗体である抗体又はそのフラグメント。

【請求項 17】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントと、医薬的に容認可能な希釈剤又はキャリアとを備える医薬組成物。

30

【請求項 18】

薬物として使用する請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメント。

【請求項 19】

配列番号 1, 3, 5, 7, 9 又は 11 に示される核酸配列を備えるポリヌクレオチド。

【請求項 20】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントを個体に投与することを備える、個体において - シヌクレインの病理学で神経変性疾患を防止又は治療する方法。

【請求項 21】

請求項 20 記載の方法において、

神経変性疾患が、パーキンソン病、レビー小体型認知症、アルツハイマー病、多系統萎縮症、精神病、統合失調症又はクロイツフェルト・ヤコブ病である方法。

40

【請求項 22】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントを備える神経変性疾患を個体が有するか否かの決定方法に使用するテストキット。

【請求項 23】

- シヌクレインのフィブリル及び凝集物を検出する方法であって、

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントを生物学試料に加えるステップと、

- シヌクレインのフィブリル及び / 又は凝集物と、抗体又はそのフラグメントとの間に形成される複合体の存在を検出するステップとを備える方法。

【請求項 24】

50

- シヌクレインに関係する神経変性疾患を診断する方法であって、
請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントを被験者からの生物学試料に加えることと、
- シヌクレインの凝集物と、抗体又はそのフラグメントとの間に形成される複合体の
存在又は非存在を検出することとを備える方法。

【請求項 25】

請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントをイメージング剤として使用する抗体又はそのフラグメント。

【請求項 26】

- シヌクレイン凝集物をイメージングする方法であって、
請求項 1 記載の抗体又はそのフラグメントを個体に投与することと、
抗体を検出することとを備える方法。

10

【請求項 27】

請求項 26 記載の方法において、
抗体は検出可能なレベルを備える方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、 - シヌクレイン凝集物（例：アミロイドのフィブリル（fibril）、プロト
フィブリル（protofibril）及びオリゴマー）に対する高親和性と - シヌクレインモノ
マーに対する低親和性とを有する抗体又はそのフラグメントに関する。本発明は、また、
- シヌクレインに関係する神経病理学の診断、治療及び予防におけるこれらの抗体及び
フラグメントの使用に関する。

20

【背景技術】

【0002】

シヌクレインは、神経組織において高レベルで表現される 14 k D a の小タンパク質の
ファミリーである。ファミリーのうちの 3 つのメンバーは、 - , - , 及び - のシヌ
クレインである。

【0003】

- シヌクレインは、主に脳組織に発現し、主に神経のシナプス前終末に位置する。
- シヌクレインのヒト形態の主要構造は、140 アミノ酸ポリペプチドから成る。ヒトの
- シヌクレインの野生型の配列は図 20（配列番号：49）に見出すことができる。
- シヌクレインは、通常、可溶性モノマータンパク質として存在するが、その環境に関係
して幾つかの折り重なった確認（confirmations）を採ることができる。モノマーの -
シヌクレインは、また、凝集して、オリゴマー及び高分子量不溶性フィブリルになること
ができる。

30

【0004】

シヌクレインの異常性に関係する病気は、しばしばシヌクレイン病（synucleinopathie
s）として参照付けられる。シヌクレイン病は、神経変性疾患の病態、パーキンソン病（
P D）、レビー小体型認知症（D L B）及び多系統萎縮症（M S A）を含む。シヌクレイ
ン病では、P D 及び D L B の脳ホモジネートの可溶性 - シヌクレインオリゴマーが正常
の脳に比して上昇することが示されている。さらに、しばしば P D 及び D L B の最終段階
を特徴付ける腫瘍性病変（neuropathologic lesions）（レビー小体）は、フィブリルの
- シヌクレインの沈着物からなることが広く判明している。

40

【0005】

商業的に使用されている - シヌクレイン抗体が、知られており、脳の P D 病理を特徴
付けることに広く使用されている。しかし、そのような抗体は、非特異性であり（non-sp
ecific）、 - シヌクレインのモノマー形態及び凝集形態を共に認識しない。そして、
- シヌクレインのすべての凝集形態を認識しないかもしれない。

【0006】

S y n - 1（B D バイサイエンス（BD Biosciences）社製）及び m A b 2 1 1（サン

50

タ クルツ バイオテクノロジー (Santa Cruz Biotechnology) 社製) を含んでいる。知られている α -シヌクレイン抗体は、 α -シヌクレインのモノマー及び凝集形態に等しく結合することが知られている。

【0007】

国際公開WO2011/104696号公報は、 α -シヌクレインのプロトフィブリル形態を特異的に認識する抗体を開示する。これらの抗体は、 α -シヌクレインのフィブリルとモノマーとに低結合親和性 (low binding affinity) を示す。

【発明の概要】

【0008】

本発明は、 α -シヌクレイン凝集物に対する高結合親和性と α -シヌクレインのモノマー形態に対する低結合親和性を有する抗体及びフラグメントを目指している。

10

【0009】

本発明は、また、そのような抗体又はそのフラグメントを備える組成と、該抗体又はフラグメントを使って、 α -シヌクレインの凝集物の存在を検出する方法、及び α -シヌクレインに関係する病気の診断でのそれらの使用とを目指している。

【0010】

さらなる実施形態では、本発明は、そのような抗体又はそのフラグメントを備える組成と、該抗体又はフラグメントを使って、 α -シヌクレインの病理学に関係する病気を治療又は診断する方法とを目指している。

【0011】

α -シヌクレイン凝集物に対する特異性のある抗体を用いることは、PD及び他のシヌクレイン病の新規な病理学を現出させる助けとすることができる。

20

【0012】

α -シヌクレインの凝集物に特異性がありかつ α -シヌクレインのモノマーに対して低結合親和性を有する抗体を生産することによって、本発明は、 α -シヌクレインに関係する神経変性疾患の進行を追尾する新規のツールを提供する。本発明の抗体は、また、 α -シヌクレインに関係する病気の治療に使用することができる抗体を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】 α -シヌクレインのフィブリルに免疫のある宿主 (宿主19, 22及び23) 及び α -シヌクレインのオリゴマーに免疫のある宿主 (宿主210, 211及び212) とに対する力価検査の結果を示し、例1で説明される図。力価検査の結果を示し、例1で説明される図。

30

【図2】 α -シヌクレイン凝集物 (フィブリル (F)、オリゴマー (O) 及びモノマー (M)) に対する雑種細胞の特異性をスクリーニングしたドットプロットの結果を示し、例2で説明される図。

【図3】 抗体 Syn-F1, Syn-F2, Syn-O1, Syn-O2, Syn-O3 及び Syn-O4、並びに Syn-1 (BD Bioscience) の抗体をコントロールとして用いて抑制 ELISA の結果を示し、例4で説明される図。

【図4】 異なるタンパク質で形成されたアミロイドフィブリルに対する抗体 Syn-F1, Syn-F2, Syn-O1, Syn-O2, Syn-O3, 及び Syn-O4、並びに抗体 Syn-1 の交差反応性を示し、例5 (A) で説明される図。

40

【図5】 α -シヌクレイン及び β -シヌクレインによって形成されたアミロイドフィブリルに対する抗体 Syn-F1, Syn-F2, Syn-O1, Syn-O2, Syn-O3, 及び Syn-O4 の抗体、並びに Syn-1 の抗体の交差反応性を示し、例5 (B) で説明される図。

【図6】 α -シヌクレインのペプチド NAC (61-98), NAC (61-75), 及び切断された α -シヌクレイン (1-122) に対する抗体 Syn-F1, Syn-F2, Syn-O1, Syn-O2, Syn-O3, 及び Syn-O4 の抗体、並びに抗体 Syn-1 の交差反応性を示し、例5 (C) で説明される図。

50

【図7】Biacore(商標)を使つてのmAbのSyn-F1, Syn-F2, Syn-01, Syn-02, Syn-03, Syn-04, Syn-03, Syn-04及びmAb 211(Santa Cruz Biotechnology社製)についてのセンサーグラムの結果を示し、例6で説明される図。についてのセンサーグラムの結果を示し、例6で説明される図。

【図8】mAbのSyn-F1, Syn-F2, Syn-01, Syn-02, Syn-03, 及びSyn-04、並びにSyn-1の抗体(コントロールとしての抗体)についてのペプスカン(社名Pepscan)結果を、エピトープ決定のドットプロットにより示し、例7で説明される図。

【図9】ELISAによるペプスカン結果を示し、例7で説明され、プレートが本発明A) Syn-F1, B) Syn-F2, C) Syn-01, D) Syn-02, E) Syn-03及びF) Syn-04、並びにプレートがコントロール抗体G), Syn 211, H) N-19, I) FL-1, J) Syn-1, 抗体K) 3B6及びL) 5C2により調べられている図。

【図10】ペプスカンELISAのプレート上に置かれたのX線フィルムのプロットを示し、例7で説明され、コントロール抗体N-19, FL-140, 5C2, Syn-1, Syn-211, 3B6のプロットは図10のAに示され、本発明の抗体Syn-F1, Syn-F2, Syn-01, Syn-02, Syn-03, 及びSyn-04は、図10のBに示されている図。

【図11】 α -シヌクレイン凝集物の検出についてのサンドイッチ法のELISAの結果を示し、例8で説明され、抗体Syn-F1, Syn-F2, Syn-01, Syn-02, Syn-03, 及びSyn-04、並びにSyn-1の抗体が捕獲抗体として使用され、FL-140が検出抗体として使用された図。

【図12】リン酸化したSer129- α -シヌクレイン凝集物の検出についてのサンドイッチ法のELISAの結果を示し、例9として説明され、抗体Syn-02及びSyn-F2, 並びにSyn-1が捕獲抗体として使用され、ウサギの抗p-S129- α -シヌクレインが検出抗体として使用された図。

【図13】パーキンソン病無しの被験者のコントロール症例からの組織の免疫組織化学分析を示し、例10で説明される図。

【図14】パーキンソン病の症例からの組織の免疫組織化学分析を示し、例10で説明される図。

【図15】多系統萎縮症の症例からの組織の免疫組織化学分析を示し、例10で説明される図。

【図16】パーキンソン病保持PD患者(A)、進行性DLB患者(B)及び古典的なPD患者からの組織試料におけるSyn-02の染色の結果を示し、例11で説明される図。

【図17】海馬のCA2領域の脳セクション(A)と嗅内皮質に脳セクション(B)との治療のSyn-F2抗体の染色結果を示し、例12で説明され、各セクションは次の治療: 1) 前処理無しか、2) クエン酸緩衝における10分、120分のオートクレーブか、3) 15分間のギ酸におけるオートクレーブか、又は4) 20 μ g/mlのプロテアーゼKを受け、5) Syn-1抗体をもつコントロールがギ酸により15分、処置された組織試料上で実施された図。

【図18】BiFC蛍光分析による穿刺(矢頭)の形成を示す入手写真を示し、例14で説明される図。

【図19】各試験の抗体の斑点陽性細胞の%を示し、例14で説明される図。

【図20】ヒト α -シヌクレインの野生型配列を示す図。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は、 α -シヌクレイン凝集物に対する高い結合親和性と α -シヌクレインモノマーに対する低い結合親和性を有する抗体に関する。抗体は、モノマーの α -シヌクレイン形態に比して α -シヌクレイン凝集物に結合する親和性を増大されている。

【0015】

10

20

30

40

50

1つの実施形態では、本発明は、
 - シヌクレイン凝集物に対する高い結合親和性と、
 - シヌクレインモノマーに対する低い結合親和性とを有する抗体又はそのフラグメントに関する。

【0016】

別記しない限り、術語の - シヌクレイン凝集物は、 - シヌクレインの早期可溶性の凝集物形態（例えば、プロトフィブリルを含む低分子量及び高分子量の可溶性オリゴマー）、及び - シヌクレインの成熟した不溶性の凝集物形態（例えば成熟したフィブリル）をカバーすると、意図される。特に、抗体及びそのフラグメントは、 - シヌクレインのフィブリルに対する高結合親和性と - シヌクレインのオリゴマーに対する高結合親和性とを有する。

10

【0017】

- シヌクレイン凝集物に対する高親和性を有することは、抗体又はフラグメントが、
 - シヌクレイン凝集物に対して 10^{-7} Mより小さい解離定数 K_d を有することを意味する。好ましくは、抗体は、 10^{-8} Mより小さいか若しくは 10^{-9} Mより小さい K_d を有し、又はさらに好ましくは、 10^{-10} Mより小さいか又は 10^{-11} Mより小さい K_d を有する。好ましくは、 - シヌクレインは、ヒトの - シヌクレインである。

【0018】

フィブリルは、 - シヌクレインの不溶性の高分子量の凝集物形態である。

【0019】

- シヌクレインの可溶性のオリゴマー形態は、種々のサイズでかつ形態で現れ、二量体、三量体、四量体及び多量体を含む。プロトフィブリルは、モノマー形態から - シヌクレインフィブリルの形成途中の中間段階である。術語としての - シヌクレインのオリゴマー形態は、プロトフィブリルを含むことを意図される。

20

【0020】

抗体に対するそのフラグメントとは、その活性フラグメント、すなわち、本発明による抗体の定義に使用される特徴と同一特徴を有するフラグメントを意味する。すなわち、
 - シヌクレイン凝集物に対する高結合親和性と、
 - シヌクレインモノマーに対する低結合親和性とを有するという特徴である。便宜上、術語としての抗体を使用するときは、該同一特徴を示すそのフラグメントも、考慮される。

【0021】

- シヌクレインモノマーに対する低結合親和性を有することは、 - シヌクレインモノマーに対する抗体又はフラグメントの結合度が、 - シヌクレイン凝集物に対する結合度より少なくとも 100 倍小さく、好ましくは、 - シヌクレイン凝集物に比較して - シヌクレインモノマーに対して約 500 倍又は約 1000 倍、低い結合親和性であることを意味する。1つの実施形態では、抗体又はそのフラグメントはモノマーの - シヌクレインに対して 10^{-5} Mより大きい解離定数 K_d を有する。

30

【0022】

1つの実施形態では、抗体は、 - シヌクレインのオリゴマー形態に対してよりも - シヌクレインのフィブリルに対して高い親和性を有してもよい。

【0023】

抗体の結合親和性は、当該技術で認識されている種々の方法を使って決めることができる。該方法は、等温熱量及び表面プラズモン共鳴法を基本とするアプローチを含み、例えば、図6で説明する。結合 (binding) は、例えば E L I S A や R I A s のような免疫測定法 (immunoassays: イノムアッセイ) を用いて評価することもできる。好ましくは、結合親和性は、B I A C o r e ^{T M} X - 100を用いた表面プラズモン共鳴法のアッセイを用いて決められる。

40

【0024】

1つの実施形態では、抗体は、立体構造の抗体である。抗体は、立体構造のエピトープを認識する。すなわち、抗体が認識する該エピトープは、 - シヌクレインの凝集物の三次構造を含む。1つの実施形態では、抗体は、表5に記載されているように、直鎖ペプチ

50

ドエピトープのどれよりも - シヌクレインフィブリルに強く結合する。特に、抗体の結合度は、表 5 に記載されているように、直鎖ペプチドエピトープに対してよりも - シヌクレインフィブリルに対しての方が少なくとも 10 倍高く、好ましくは 500 倍より高いか、又は好ましくは 1000 倍より高い。

【0025】

本発明の抗体は、 - シヌクレインのアミノ酸領域の 127 - 140 の範囲内の直鎖エピトープに弱く結合してもよい。弱く結合することによってとは、本発明の抗体の結合親和性が、 - シヌクレインのアミノ酸領域の 127 - 140 の範囲内の直鎖エピトープに対して、 - シヌクレイン凝集物に対する抗体の結合親和性よりも、少なくとも 100 倍小さいこと、特に、 - シヌクレインフィブリルよりも少なくとも 100 倍小さいことを意味する。好ましくは、 - シヌクレインのアミノ酸領域 127 - 140 の範囲の直鎖エピトープに対する結合親和性は、 - シヌクレイン凝集物に対する抗体の結合親和性にして、 - シヌクレイン凝集物に対する抗体の結合親和性より 1000 倍小さい。1つの実施形態では、抗体は、 - シヌクレインの直鎖エピトープを認識しないか、結合しない。

10

【0026】

1つの実施形態では、抗体によって認識されるエピトープは、 - シヌクレインの C 末端領域を備える。 - シヌクレインの C 末端領域を備えるエピトープを認識することによってとは、抗体がその能力で結合するエピトープの少なくとも一部が - シヌクレインの C 末端領域の少なくとも一部を含むことを意味する。

20

【0027】

1つの実施形態では、本発明の抗体は、リン酸化した - シヌクレインの凝集した形態にも結合できる。該抗体は、リン酸化された - シヌクレインの凝集形態に比較して、リン酸化された - シヌクレインのモノマー形態に対して低結合親和性を示す。例えば、該抗体の結合親和性は、凝集されてリン酸化された - シヌクレインに比較して、モノマーのリン酸化された - シヌクレイン形態に対して少なくとも 100 倍小さく、好ましくは 500 倍小さく、もっと好ましくは 1000 倍小さい。 - シヌクレインのリン酸化は、Ser 129 に起こすことができる。

【0028】

本発明の抗体は、また、他のアミロイドのタンパク質に対して低結合親和性を示す。該他のアミロイドのタンパク質には、 - シヌクレイン、 - シヌクレインのモノマー、IAPP (islet amyloid polypeptide: 膵島アミロイドポリペプチド)、 - アミロイドモノマー、Tau 及び Aβ が含まれる。例えば、該抗体の結合親和性は、 - シヌクレイン凝集物に対してよりも、これらのペプチド/タンパク質の 1つ又はそれより多くに対しての方が少なくとも 100 倍小さい。

30

【0029】

1つの実施形態では、本発明の - シヌクレイン凝集物の抗体の結合親和性は、 - シヌクレイン凝集物に対してよりも - シヌクレインに対して少なくとも 100 倍小さく、好ましくは 1000 倍小さい。特に、該抗体の結合親和性は、 - シヌクレインのフィブリルに対する結合親和性よりも、 - シヌクレインに対して、少なくとも 100 倍、好ましくは 1000 倍小さい。

40

【0030】

1つの実施形態では、本発明の - シヌクレイン凝集物の抗体の結合親和性は、 - シヌクレイン凝集物に対してよりも - シヌクレインに対して少なくとも 100 倍小さく、好ましくは 1000 倍小さい。特に、該抗体の結合親和性は、 - シヌクレインフィブリルに対する結合親和性よりも、 - シヌクレインに対して、少なくとも 100 倍、好ましくは 1000 倍小さい。

【0031】

本発明のさらなる実施形態は、可変重 (VH) 鎖及び可変軽 (VL) 鎖上の CDR I - 3 領域の定義されたアミノ酸配列を備える。

50

【 0 0 3 2 】

本発明の1つの実施形態では、抗体は、可変重鎖（VH）を備え、該VHは、配列番号（SEQ ID NO）2，6又は10において示されるアミノ酸配列を備える。

【 0 0 3 3 】

抗体又はフラグメントは、免疫グロビンの軽鎖の可変領域（VL）を備えることができる。該VLは、配列番号4，8，又は12において示されるアミノ酸配列を備える。

【 0 0 3 4 】

特に、抗体又はフラグメントは、免疫グロビンの重鎖の可変領域（VH）と免疫グロビンの軽鎖の可変領域（VL）とを備え、：

該VHが配列番号2において示されるアミノ酸配列を備え、該VLが配列番号4において示されるアミノ酸配列を備えるか；

該VHが配列番号6において示されるアミノ酸配列を備え、該VLが配列番号8において示されるアミノ酸配列を備えるか；又は

該VHが配列番号10において示されるアミノ酸配列を備え、該VLが配列番号12において示されるアミノ酸配列を備える。

10

【 0 0 3 5 】

1つの実施形態では、抗体又はそのフラグメントは、VH鎖を備えることができ、該VH鎖において：

CDR1領域は、配列番号16，28，又は40のアミノ酸配列を有し、；

CDR2領域は、配列番号17，29，又は41のアミノ酸配列を有し、；かつ、

CDR3領域は、配列番号18，30，又は42のアミノ酸配列を有する。

20

【 0 0 3 6 】

特に、抗体又はその結合フラグメントは、VH鎖を備え、該VH鎖において、CDR1領域は配列番号16のアミノ酸配列を有し、CDR2領域は配列番号17のアミノ酸配列を有し、CDR3領域は配列番号18のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 3 7 】

特に、抗体又はその結合フラグメントは、VH鎖を備え、該VH鎖において、CDR1領域は配列番号28のアミノ酸配列を有し、CDR2領域は配列番号29のアミノ酸配列を有し、CDR3領域は配列番号30のアミノ酸配列を有する。

30

【 0 0 3 8 】

特に、抗体又はその結合フラグメントは、VH鎖を備え、該VH鎖において、CDR1領域は配列番号40のアミノ酸配列を有し、CDR2領域は配列番号41のアミノ酸配列を有し、CDR3領域は配列番号42のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 3 9 】

さらなる実施形態では、抗体又はそのフラグメントは、VL鎖を備え、該VL鎖において：

CDR1領域は、配列番号22，34，又は46のアミノ酸配列を有し、；

CDR2領域は、配列番号23，35，又は47のアミノ酸配列を有し、；かつ

CDR3領域は、配列番号24，36，又は48のアミノ酸配列を有している。

40

【 0 0 4 0 】

特に、抗体又はそのフラグメントは、VL鎖を備え、該VL鎖において、CDR1領域は配列番号22のアミノ酸配列を有し、CDR2領域は配列番号23のアミノ酸配列を有し、CDR3領域は配列番号24のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 4 1 】

特に、抗体又はそのフラグメントは、VL鎖を備え、該VL鎖において、CDR1領域は配列番号34のアミノ酸配列を有し、CDR2領域は配列番号35のアミノ酸配列を有し、CDR3領域は配列番号36のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 4 2 】

特に、抗体又はそのフラグメントは、VL鎖を備え、該VL鎖において、CDR1領域は配列番号46のアミノ酸配列を有し、CDR2領域は配列番号47のアミノ酸配列を

50

有し、CDR3領域は配列番号48のアミノ酸配列を有する。

【0043】

1つの実施形態では、抗体又はそのフラグメントはVH鎖とVL鎖とを備え、：

該VH鎖において、CDR1領域は配列番号16のアミノ酸配列を有し、CDR2領域は配列番号17のアミノ酸配列を有し、CDR3領域は配列番号18のアミノ酸配列を有し、；かつ

該VL鎖において、CDR1領域は配列番号22のアミノ酸配列を有し、CDR2領域は配列番号23のアミノ酸配列を有し、CDR3領域は配列番号24のアミノ酸配列を有する。

【0044】

特に、抗体又はその結合フラグメントはVH鎖とVL鎖とを備え、：

該VH鎖において、CDR1領域は配列番号28のアミノ酸配列を有し、CDR2領域は配列番号29のアミノ酸配列を有し、CDR3領域は配列番号30のアミノ酸配列を有し、；かつ

該VL鎖において、CDR1領域は配列番号34のアミノ酸配列を有し、CDR2領域は配列番号35のアミノ酸配列を有し、CDR3領域は配列番号36のアミノ酸配列を有する。

【0045】

特に、抗体又はその結合フラグメントはVH鎖とVL鎖とを備え、：

該VH鎖において、CDR1領域は配列番号40のアミノ酸配列を有し、CDR2領域は配列番号41のアミノ酸配列を有し、CDR3領域は配列番号42のアミノ酸配列を有し、；かつ

該VL鎖において、CDR1領域は配列番号46のアミノ酸配列を有し、CDR2領域は配列番号47のアミノ酸配列を有し、CDR3領域は配列番号48のアミノ酸配列を有する。

【0046】

したがって、1つの実施形態では、本発明による抗体又は結合フラグメントは、6つのCDR配列(VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2及びVL-CDR3)によって特徴付けられる。該6つのCDR配列は、表Aにおける次のそれぞれの複数群のうちの各群から任意の組合せで独立に選択される。

【0047】

【表1】

表A (Table A)

VH-CDR1 SEQ ID NOs	VH-CDR2 SEQ ID NOs	VH-CDR3 SEQ ID NOs	VL-CDR1 SEQ ID NOs	VL-CDR2 SEQ ID NOs	VL-CDR3 SEQ ID NOs
16	17	18	22	23	24
28	29	30	34	35	36
40	41	42	46	47	48

【0048】

さらに、単離された抗体、又はその抗原結合フラグメントであって、ヒトの -シヌクレインに特異的に結合するフラグメントが提供される。該抗体又は該フラグメントはVHとVLとを備え、該VLは、配列番号2又は6又は10に少なくとも90%、95%又は100%、同一であるポリペプチド配列を備える。さらに、単離された抗体、又はその抗原結合フラグメントであって、ヒトの -シヌクレインに特異的に結合するフラグメントが提供される。該抗体又は該そのフラグメントはVHとVLとを備え、該VLは、配列番

10

20

30

40

50

号4又は8又は12に少なくとも90%、95%又は100%、同一であるポリペプチド配列を備える。

【0049】

任意の特定のポリペプチドが、他のポリペプチドと少なくとも90%又は95%同一であるかは、当該技術において知られているコンピュータプログラム/ソフトウェアを用いて決めることができる。これらの変異ポリペプチドは、対応する親配列を有するポリペプチドと同一の性質を本質的に保持する。そのような変異体は、基準化合物に対して保存的な置換、例えば広義で同一の分子性質のアミノ酸間の変更を有する。例えば、“非本質的な”アミノ酸において保存置換又は変更につながるアミノ酸置換が行われてもよい。アミノ酸置換は、天然起源又は非天然のアミノ酸に1つ又はそれより多くのアミノ酸の置換を含むことができる。保存的な置換は、典型的には次の群のうちの置換：グリシン及びアラニン；バリン、イソロイシン及びロイシン；アスパラギン酸及びグルタミン酸；アスパラギン及びグルタミン；セリン及びスレオニン；リジン及びアルギニン；並びにフェニルアラニン及びチロシンを含む。

10

【0050】

ポリペプチドは、融合してインフレームになるか、又はリンカー若しくは他の配列に包含されるかしてもよい。ポリペプチドは、例えば - シヌクレイン抗体又はそのフラグメントをコード化した部分と、少なくとも1つの異種性の部分とを備える融合部分を備えてもよい。

【0051】

抗体、又はその抗原結合フラグメントをコード化している単離されたポリヌクレオチドが提供される。該ポリヌクレオチドは、例えば、1つ若しくはそれより多くのCDR、又はここで説明する - シヌクレイン抗体可変重鎖領域若しくは可変軽鎖領域をコード化している核酸である。核酸はDNA及びRNAを含む。

20

【0052】

本発明の1つの観点は、ここで説明する - シヌクレイン抗体のVH鎖をコード化しているポリヌクレオチドを提供する。特に、本発明の1つの実施態様は、単離されたポリヌクレオチドを提供する。該ポリヌクレオチドは、配列番号2, 6又は10のアミノ酸をコード化している核酸を備える。さらなる実施態様は、配列番号1, 5, 又は9の核酸配列を備えるポリヌクレオチドを提供する。

30

【0053】

本発明の別の観点は、 - シヌクレイン抗体のVL鎖をコード化しているポリヌクレオチドを提供する。1つの実施態様では、該ポリヌクレオチドは、配列番号4, 8又は12のアミノ酸配列をコード化している核酸を備える。さらなる実施態様は、配列番号3, 7, 又は11の核酸配列を備えるポリヌクレオチドを提供する。

【0054】

1つの実施態様では、ポリヌクレオチドは、 - シヌクレイン抗体の重鎖のCDR1, CDR2及び/又はCDR3の領域をコード化している。該ポリヌクレオチドは、配列番号13, 14, 15, 25, 26, 27, 37, 38, 及び/又は39の核酸配列を備えることができる。

40

【0055】

さらに、 - シヌクレイン抗体の軽鎖のCDR1, CDR2, 及び/又はCDR3領域をコード化しているポリヌクレオチドが提供される。該ポリヌクレオチドは、配列番号19, 20, 21, 31, 32, 33, 43, 44, 及び/又は45の核酸配列を備えることができる。

【0056】

1つの実施態様では、本発明による抗体又はその結合フラグメントは、6つのCDR配列(VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2及びVL-CDR3)によって特徴付けられる。各領域は、表Bからの、CDR配列の次のそれぞれの複数群のうちの各群から任意の組合せで独立に選択した配列を有するポリ

50

ヌクレオチドによってコード化されている。

【0057】

【表2】

表B (Table B)

VH-CDR1 SEQ ID NOs	VH-CDR2 SEQ ID NOs	VH-CDR3 SEQ ID NOs	VL-CDR1 SEQ ID NOs	VL-CDR2 SEQ ID NOs	VL-CDR3 SEQ ID NOs
13	14	15	19	20	21
25	26	27	31	32	33
37	38	39	43	44	45

10

【0058】

さらに、VH-CDR1、VH-CDR2及びVH-CDR3の領域についての核酸配列を備えるポリヌクレオチドが提供される。各領域は、表Bから任意の組合せで、VH-CDRの配列のそれぞれの複数群のうちの各群から独立に選択される。

【0059】

さらに、VL-CDR1、VL-CDR2及びVL-CDR3の領域についての核酸配列を備えるポリヌクレオチドが提供される。各領域は、表Bから任意の組合せで、VL-CDRの配列のそれぞれの複数群の各群から独立に選択される。

20

【0060】

さらに、ここで定義されるポリヌクレオチド配列のポリヌクレオチド変異体が提供される。ポリヌクレオチド変異体は、ここで定義される - シヌクレイン抗体又はフラグメントをコード化しているポリヌクレオチド配列に実質的な同一性(identity)を有していてもよい。典型的には、ポリヌクレオチド変異体は、1つ又はそれより多くの置換、付加、削除及び/又は挿入を含むだろう。これらの置換等は、好ましくは、変異体のポリヌクレオチドによってコード化された抗体の結合親和性が実質的にここで明細に説明されるポリヌクレオチド配列によってコード化されている抗体に対して実質的に減らないように、される。例えば、コード化されたポリペプチドにおける非本質的なアミノ酸の残基において保存的な置換又は変更につながるヌクレオチド置換がなされてもよい。任意の特別のポリヌクレオチドが他のものに実質的に同一であるかは、当該技術において知られている方法、コンピュータのプログラム/ソフトウェアを用いて決めることができる。

30

【0061】

軽鎖及び/又は重鎖の少なくとも可変ドメインをコード化しているポリヌクレオチドは、2つ又は唯一の免疫グロビン鎖の可変ドメインをコード化することができる。1つの実施態様は、ポリヌクレオチドを備える発現ベクターを提供する。

【0062】

さらなる実施態様は、発現ベクターを備える宿主細胞に関する。好ましくは、宿主細胞は単離されている。1つの実施態様では、宿主細胞は、非ヒトの細胞である。発現ベクターは、挿入されたポリヌクレオチドを指示(direct)及び/又はコントロールする核酸配列を備えることができる。そのような核酸配列は制御配列(regulatory sequence)を含むことができる。該制御配列は、プロモーター配列、ターミネーター配列、ポリアデニル化、配列、及びエンハンサー配列を含む。種々の細胞におけるポリペプチドのクローニング及び発現は知られている。

40

【0063】

本発明による抗体の例は、伝統的な雑種細胞技術によって開発されている。抗体は、多クローンであるか、又は単クローンである。明細な実施形態では、抗体は単クローンである。

50

【0064】

典型的には、抗体は、哺乳類の抗体、例えば霊長目の動物、ヒト、齧歯動物、ウサギ、ヒツジ、ブタ、又はウマの抗体である。抗体は、任意のクラス又はアイソタイプ、例えば I g M 又は I g G であり得る。好ましくは、抗体は I g G である。

【0065】

本発明の別の観点では、抗体は試料において - シヌクレイン凝集物の存在を検出する診断ツールとして用いることができる。抗体は、個体 (individual) における - シヌクレインに関係する神経変性疾患を監視及び / 又は診断するのに用いられてもよい。

【0066】

これらの抗体は、 - シヌクレインに関係する神経変性疾患の診断ツールとして適切であってもよい。該神経変性疾患には、限定しないが、パーキンソン病、レビー小体型認知症及びその他の - シヌクレイン関係の神経変性疾患を含む。

10

【0067】

1つの実施態様では、本発明は、 - シヌクレイン凝集物を検出する方法に関し、該方法は、：

抗体又はそのフラグメントを生物学試料に付加するステップ、；及び

- シヌクレイン凝集物と抗体又はフラグメントとの間で形成される複合体の存在を検出するステップを備える。

【0068】

複合体の検出は、該試料における - シヌクレイン凝集物の存在を指し示す。

20

【0069】

該方法は、さらに、形成された複合体のレベルを測定して、該レベルを基準レベルと比較するステップを備えることができる。該基準レベルは、典型的には、 - シヌクレイン症状を有しないと知られている個体 (“ 正常な個体 ”) からの試料、又は試験される固体と同一の個体から早い段階の試験で得られた試料から計算される。

【0070】

該方法は、 - シヌクレインのフィブリル及びオリゴマーを検出することができる。

【0071】

該方法は、試験管内で組織の又は生物学流体の試料上で実施されることができる。個体から得られて試験される試料は、例えば脳脊髄液 (C S F)、血液、尿、唾液、又は脳、腸、大腸、皮膚若しくは唾液腺の組織であってもよい。特に好ましい方法では、試料は C S F 試料である。別の好ましい方法では、該試料は、脳組織の試料である。

30

【0072】

試料は、所定時間でかつ所定条件下で抗体と結合され、有効に試料内での - シヌクレイン凝集物に対する結合性を許容される。

【0073】

試料は、測定される前に標準の方法を用いて処理されてもよい。1つの実施形態では、組織の試料は、抗体で試験する前に、前処理無しとされる。前処理とは、得られる組織が例えばオートクレーブ (高圧蒸気殺菌)、ギ酸及び / 又はプロテイナーゼ K 処理のような任意の処理を受けないことを意味する。

40

【0074】

当該技術において知られている標準の方法は、試料において抗体と - シヌクレイン凝集物との間に形成された複合体のレベルを検出及び / 又は測定することに用いられてもよい。

【0075】

- シヌクレインの存在の分析は、例えば次の方法で実施することができる。放射免疫測定法、酵素に関係する免疫測定 (ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)、サンドイッチ免疫測定法 (sandwich immunoassay)、蛍光免疫法、沈降反応、ゲル免疫アッセイ、凝集アッセイ、プロテイン A アッセイ、免疫電気泳動法 (immunoelectrophoresis)、電気泳動法 (electrophoresis)、ウエスタンブロット法である。試験する試料にお

50

ける - シヌクレインの存在を測定及び / 又は検出することができる他の適切な技術を用いることができる。

【0076】

1つの実施形態では、抗体は、表面上、例えばマイクロウェルプレート又は診断試験ストリップを被覆されてもよく、試料は、抗体に付加され、結合を許容するのに有効な状況下に結合される。その次に、複合体の存在が検出できる。

【0077】

好ましい方法では、ELISAアッセイ(測定)は、- シヌクレイン凝集物の量を検出及び / 又は定量化する。1つの実施形態では、本発明は、サンドイッチELISAに目指される。該サンドイッチELISAは、マイクロプレートの表面が本発明による抗体により被覆された該マイクロプレートに、試験される試料を付加し、; 該抗体に結合する試料における任意の - シヌクレイン凝集物試料の存在を許容し、; かつ任意の抗体 / - シヌクレインの凝集物複合体の存在を検出することを備える。検出は、- シヌクレインに結合する標識抗体を用いて実施することができる。

10

【0078】

該方法は、神経変性疾患の診断及び / 又は神経変性疾患の進行の監視に用いることができる。- シヌクレイン凝集物の量及び / 又はサイズが検出できる。

【0079】

該神経変性疾患は、限定されないが、パーキンソン病、認知症(dementia)、アルツハイマー病、ダウン症候群、多系統萎縮症、精神病(psychosis)、統合失調症(schizophrenia)又はクロイツフェルト・ヤコブ病(Creutzfeldt-Jakob disease)を含む。認知症は、レビー小体型認知症であってもよい。

20

【0080】

本発明は、- シヌクレインに関係する神経変性疾患を診断する方法に関する。該方法は、本発明の抗体を個体に投与すること、及び - シヌクレイン凝集物の存在又は非存在を検出することを備える。- シヌクレイン凝集物と抗体との間に形成された複合体の存在又は非存在が検出できる。

【0081】

- シヌクレイン凝集物の存在は、個体が神経変性疾患を有すること指し示し、- シヌクレイン凝集物の非存在は、該被験者(個体)が神経変性疾患を有しないこと指し示す。

30

【0082】

1つの実施形態では、- シヌクレインに関係する神経変性疾患を診断する方法は、: 本発明の抗体を個体からの試料に付加すること、; - シヌクレイン凝集物と抗体との間に形成された複合体の存在を検出すること、; 及び個体が - シヌクレインに関係する神経変性疾患を有するか否かを決定することを備える。

【0083】

個体が - シヌクレインに関係する神経変性疾患を有するか否かを決定することは、試料に形成された複合体のレベルを基準レベルと比較すること、及び該試料に形成された複合体のレベルが基準レベルに対して減少しているかを決定することを含む。

40

【0084】

該方法は、さらに、神経変性疾患を治療するのに治療法上有効な量の薬を個体に投与することを備える。

【0085】

さらなる実施形態では、- シヌクレインに関係する神経変性疾患の進行を監視する方法は、: 本発明の抗体を個体からの試料に付加すること、: - シヌクレイン凝集物と抗体との間に形成された複合体の存在を検出すること、; 及び試料に形成された複合体のレベルを基準レベルと比較することを備える。

【0086】

該方法は、さらに、基準レベルに対する複合体の検出レベルの比較に基づいて個体の治

50

療管理体制 (treatment regime) を変更することを備える。該治療管理体制は、該病気の進行に關係して、該病気を治療するのに投与された薬を変更することによって、及び/又は薬の投与の頻度及び/又は量を変更することによって、変更することができる。ベースラインのレベルに比較される複合体の増大レベルは、個体が - シヌクレイン症状を進める (develop) 過程を有するか又は過程にあるかを典型的には指し示す。ベースラインレベルは、 - シヌクレイン症状を有しないことが知られている個体 (“正常な個体”) からの試料からか又は試験される固体と同一の個体から早い段階の試験で得られた試料から典型的には計算される。

【0087】

相關が、CSFの - シヌクレインオリゴマーレベルと疾患重症度との間に存在することが示されている。試料のオリゴマー又はフィブリルの存在及び/又は量を検出することは、特に、パーキンソン病及びその他の - シヌクレイン症状に關係する病気のバイオマーカーとして抗体を用いることにより、神経変性疾患の進行及び/又は重症度を追尾することに使用できる。

10

【0088】

本発明の1つの実施形態では、抗体は、個体がパーキンソン病を有するかを診断することに用いられる。CSF試料は、患者から採取される。抗体は、複合体が抗体と試料に存在する凝集された - シヌクレインとの間に形成されることを許容するのに有効な条件で試料と接触する。次に、抗体複合体の存在が検出できる。形成される複合体の量が、測定されて、基準レベルと比較される。

20

【0089】

本発明の1つの実施形態では、抗体は、ELISAに用いられて、CSFにおける凝集された - シヌクレインを測定することができる。抗体は、試料内の凝集された - シヌクレインを他の抗体を使うELISAと比較して高い感度と特異性で測定することができる。特に、本発明の抗体を使用するELISAは、mAb211を捕獲抗体としてかつピオチン化211を検出抗体として使用するELISAと比較して、 - シヌクレインのオリゴマー及びプロトフィブリルを検出する感度及び特異性を高める。

【0090】

該方法は、分析の結果を用いることにより治療薬の有効性を監視することに用いることができる。有効な治療薬は、基準値に比較して、採取された試料に存在する - シヌクレイン凝集物の減少を引き起こす薬として決めることができる。該基準値は、治療前に患者の - シヌクレインの量を反映するか、未治療の患者に見い出された - シヌクレインの典型量を表すかもしれない。

30

【0091】

抗体は、検出可能な標識 (label) によって標識化されてもよい。標識は、抗体が - シヌクレイン凝集物に結合されたときに抗体の検出を許容する標識となる。検出可能な標識は、限定しないが、蛍光標識、放射性標識及び造影剤を含む。

【0092】

適切な放射標識は、例えばF18, 1123, In111, 1131, C14, H3, Tc99m, P32, 1125及びガリウム68のようなものを含む。適切な蛍光標識は、蛍光及びローダミンを含むことができる。適切な造影剤は、例えばガドリニウム (GD)、ジスプロシウム及び鉄のようなレアアース、並びに磁性剤を含む。他の標識は、核磁気共鳴活性標識、PETスキャナにより検出可能なポジトロン放出アイソトープ、化学発光の及び酵素のマーカーを含む。

40

【0093】

抗体は、標準技術により標識化することができる。

【0094】

本発明の別の観点において、抗体は、イメージング剤として用いることができる。特に、抗体は、ヒト及び動物の組織における - シヌクレイン凝集物の検出と局在性及び/又は定量化とに使用することができる。

50

【0095】

本発明は、 α -シヌクレイン凝集物をイメージングする方法を提供する。該方法は、抗体への α -シヌクレイン凝集物の結合を検出することを備える。

【0096】

1つの実施形態では、本発明の抗体は、試料に接触でき、次に、 α -シヌクレイン凝集物に結合する試料における抗体が検出され得る。抗体は、好ましくは、標識化された抗体である。 α -シヌクレイン凝集物の存在又は非存在は、適切なイメージング技術を用いて体内の脳で検出されてもよい。そのような体内方法において、該方法は、さらに、抗体を個体に投与すること、および抗体を検出することを備える。

【0097】

適切なイメージング技術は、ポジトロン放出技術（PET）、ガンマシンチグラフィ、磁気共鳴画像法（MRI）、機能的磁気共鳴画像法（fMRI）、脳磁気図検査（MEG）及び単一光子放射型コンピュータ断層撮影法（SPECT）を含む。

【0098】

α -シヌクレイン凝集物の存在又は非存在は、また、試験管内、例えば脳セクションのような組織試料において検出することができる。そのような実施形態では、適切なイメージング技術は、また、電子顕微鏡、共焦点顕微鏡又は光学顕微鏡を含んでもよい。

【0099】

個体の脳に存在する α -シヌクレイン凝集物の個数及び/又はサイズは、病気に関係する α -シヌクレインの進行と相関関係がある。 α -シヌクレイン凝集物の数及び/又はサイズの増大は、病気の進行を指し示し、 α -シヌクレイン凝集物のサイズ又は個数の減少は、病気の退縮を指し示す。

【0100】

該診断方法は、獣医学の使用も可能である。

【0101】

本発明はキットにも関係する。該キットは、本発明による抗体を診断方法の実施用に備える。抗体は、インタクト（intact）の免疫グロビン又はそのフラグメント、例えばFab, F(ab)₂又はFvフラグメントのようなフラグメントであってもよい。抗体は、上述したように標識化されてもよい。該キットは、個体が神経変性疾患を有するかを決定する方法の使用用であり得る。

【0102】

該キットは、該方法のどれもが実施できる1つ又はそれより多くの他の試薬又は器具を付加的に備えてもよい。そのような試薬又は器具は、限定はしないが、次の1つ又はそれより多くを含む。適切な緩衝液、個体から試料を得る手段、定量的反応がなされ得るウェルを備える支持体である。該キットは、上記の方法を実施する器具をオプションで備えてもよい。

【0103】

本発明の1つの実施形態では、抗体及びそのフラグメントは、薬物として使用することができる。

【0104】

本発明は、個体の α -シヌクレインに関係する神経変性疾患の治療に使用するための抗体又はそのフラグメントに関する。

【0105】

本発明は、個体の α -シヌクレイン症状をもつ神経変性疾患を治療する方法に関する。該方法は、抗体又はそのフラグメントの治療上の有効量を個体に投与することを備える。

【0106】

該神経変性疾患は、限定はしないが、パーキンソン病、認知症、アルツハイマー病、ダウン症候群、多系統萎縮症、精神病、統合失調症又はクロイツフェルト・ヤコブ病である。認知症は、レビー小体型認知症であってもよい。

【0107】

10

20

30

40

50

- シヌクレイン凝集物は、抗体又はそのフラグメントの投与によって減少又は抑制され得る。抗体は、溶解可能なシヌクレインの種 (species) を備える試料に投与されるか、又は個体に直接投与されてもよい。

【0108】

抗体は、- シヌクレイン凝集物の沈着物の部位に、例えばレビー小体に投与されてよく、投与は、典型的には脳に血を供給する血管に又は脳それ自体に注入することによって行われる。

【0109】

個体は、ヒト又はヒトではない動物であってもよい。ここで述べる組成及び方法は、また、獣医学の実用に使用することができる。

【0110】

用語の“治療 (treatment)”及び“処置する (treating)”等は、状況 (condition) の治療 (curing)、解放 (relieving)、逆転 (reversing)、軽減 (alleviating)、管理 (managing) 又は発症 (onset) の遅延 (delaying the onset) を含むこと、又は状況の発症 (developing) 若しくは悪化 (worsening) のリスクを減少させることを意図されている。該用語は、また、状況の対症 (palliative)、予防 (prophylactic) 及び防止 (preventative) の治療を含めることを意図されている。

【0111】

本発明の1つの実施態様では、医薬組成物は、抗体又はそのフラグメント、及び医薬的に容認される希釈剤 (diluent) 又はキャリア (carrier) を備える。

【0112】

一般的には、該キャリアの性質は、採用される投与の特定のモードに関係するだろう。医薬形態は、固体、溶液及び懸濁液を含む。適切な医薬キャリアは、不活性の希釈剤又は賦形剤 (filler)、水、及び種々の有機溶剤を含む。組成物は、また、香料、結合剤 & 賦形剤 (excipients) のような付加的な成分を含む。

【0113】

経口投与に適切な形態は、錠剤 (tablet)、カプセル (capsule)、ピル (pill)、粉 (powder)、徐放製剤 (sustained release formulation)、溶液 (solution) 及び懸濁液 (suspension) を含む。ペアレンタルインジェクション (parental injection) の適切な形態は、無菌の溶液、懸濁液又は乳濁液を含む。

【0114】

例示的なペアレンタル投与の形態は、無菌水溶液の状態、例えばプロピレン水溶液又はブドウ糖溶液のような無菌水溶液状態での懸濁液又は溶液を含む。

【0115】

例えば錠剤の例示的な経口形態は、：例えば澱粉、アルギン酸崩壊剤及び複雑珪酸塩のような崩壊剤 (disintegrant)、；例えばショ糖、ゲラチン、アカシアのような結合剤、；並びに例えばステアリン酸マグネシウム、硫酸ラウリルナトリウム及び滑石のような潤滑剤を含む。固体組成は、また、固体又は固いゲラチンカプセルを含んでもよい。好ましい材料は、ラクトース、乳糖及び高分子量のポリエチレングリコールを含む。

【0116】

種々の医薬組成物の調製方法が当該技術において周知である。“レミントンの薬品科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)”が参照される。

【0117】

本発明は、また、1つ又はそれより多くの治療薬と組み合わせられる抗体及びフラグメントに関する。

【実施例】

【0118】

次の実施例は、説明上、提供され、本発明をこれらの明細な実施例に限定することは意図されない。

【0119】

10

20

30

40

50

例 1

- シヌクレイン凝集物抗体の調製
- シヌクレインフィブリルの調製

【0120】

精製された組換え型の α -シヌクレインが用いられる。新しく調製された α -シヌクレイン (50 μ M) の溶液が、凝集のためサーモミキサー (800 rpm) 内で37℃、7日間インキュベートされた。 α -シヌクレインの凝集過程は、チオフラビン-S (Th-S) の結合アッセイにより監視される。凝集物が完成すると、フィブリルは、一定分量化されて、小さな試料とされ、使用までは -80℃ で貯蔵された。

【0121】

- シヌクレインオリゴマーの調製

新しく調製された α -シヌクレイン溶液は、ドーパミンと分子量比 1 : 7 (α -シヌクレイン : ドーパミン) で混合され、サーモミキサー (800 rpm) 内で37℃、夜通しで混合された。翌日、オリゴマーを含む水溶液が、一定分量化されて、小さな試料とされ、使用までは -80℃ で貯蔵された。

【0122】

免疫化

BALB/c系マウスが皮下免疫用に α -シヌクレインにより用いられた。各マウスは、フロイント完全アジュバントと (1 : 1 v/v) 混合された50 μ gの α -シヌクレイン溶液の初期免疫を受けた。初期免疫に後続して追加免疫は、3週間間隔で、フロイント不完全アジュバント (1 : 1 v/v) と混合された α -シヌクレインの25 μ gにより行われた。各追加免疫の10日目に、血が尻尾の静脈から収集され、血清が分離された。ELISAが実施されて、 α -シヌクレインに対する宿主の免疫応答のチェックが実施された。

【0123】

宿主の免疫応答性をチェックするELISA

96のウェルのクリアのマキシソーププレート (96 well clear maxisorp plate (NUNC)) が、PBS内の夜通しのインキュベーションで1ウェルにつき100 μ l (70 ng/ウェル) 被覆された。プレートは、次に、PBST (0.05%のTween-20を含むPBS) で3回、洗浄し、次に、室温で1h (hは時間)、ブロッキングバッファ (2.25%のゲラチンを含むPBST) でインキュベートした。該プレートは、PBSで3回洗浄され、マウスからの連続して希釈された抗血清の100 μ l (1/100が10倍の希釈により後続される) が複製でウェル (複数) に付加され、該プレートは室温で1h、インキュベートされた。プレートがPBSTで洗浄された後、1 : 20000に希釈したヤギの抗マウスIgG-HRP (ウェルにつき100 μ l、Jackson Immunoresearch (ジャクソン免疫研究社)) が各ウェルに付加され、室温で1h、インキュベートされた。プレートは、次に、PBSTで3回洗浄され、TMBの基質 (KPL, Gaithersburg, USA (KPLガイサブルグUSA社)) の100 μ lで色が着くまでインキュベートした。反応は、H₂SO₄ (0.6N, 1ウェルにつき100 μ l) を付加して停止させ、450 nmの吸光度がVictor (ビクター社) のX3マイクロタイタープレート読取器を使って測定された。良好な免疫反応を示す宿主が、次に、融合のため採取された。

【0124】

α -シヌクレインフィブリル (宿主19, 22及び23) と α -シヌクレインオリゴマー (宿主210, 211及び212) とにより免疫されている宿主の力価 (titer) が採取され、結果が図1及び表1に示されている。宿主は、力価が前回の反応の半分に下がったときに融合のために採取された。

【0125】

10

20

30

40

【表 3】

表 1 (Table 1)

Immunogen	Host ID	1 st Booster titer	1 st Pre-fusion titer	2 nd Pre-fusion titer	3 rd Pre-fusion titer
α-synuclein fibrils	19	8871	13461	6061	1923
	22	4924	8543	1939	475
	23	10514	11402	7905	1595
α-synuclein oligomers	210	430	2138	1059	614
	211	578	1608	1205	604
	212	155	1522	891	339

10

【0126】

- シヌクレインフィブリルにより免疫されたマウスは、第1回の追加免疫直後、非常に高い力価を示した。したがって、これらのマウスにはそれ以上の追加免疫は与えなかった。 - シヌクレインオリゴマーにより免疫されたマウスは、第2回の追加免疫後、満足できる応答を示した。融合用のマウスを採取する前、融合前の力価（1月休養後）が実施された。幾つかの宿主は、 - シヌクレイン凝集物の高い抗原性のために、2月休養後でさえ高い力価を示した。

20

【0127】

S p 2 / 0 の骨髄しゅ細胞による脾細胞の融合

前回の実験のマウスは、最後の腹腔内免疫に、初期の投与量の3倍、PBSで与えられた。3日後、マウスは犠牲になった。脾臓が無菌的に単離され、IMDM (Gibco (ギブコ社)) で洗浄された。脾細胞が抽出され、計測され、50%のPEG 4000 (Merck (マーク社)) を用いてS P 2 / 0 の骨髄しゅ細胞と融合された。融合された細胞は、IMDMの成長培地（2 mMのグルタマクス (GlutaMAX^{T M} Gibco社の登録商標) において再懸濁された。成長培地は、IX Pen strep (100 U / mlのペニシリンと100 μg / mlのストレプトマイシン; Sigma (シグマ社))、50 μg / mlのゲンタマイシン (Sigma)、50 μM 2 -メルカプトエタノール (Sigma) で、HAT (IX, Sigma) とマクロファジとが追加された20%胎児ウシの血清 (Hyclone (ハイクロネ社))、 6×10^5 細胞 / プレート (5 - 6週間の古いBALB / c系マウスからの新しく単離された細胞) であった。該細胞は、(200 μl / ウェル) 蒔かれ、96 - ウェルの組織培養皿 (Nunc (ナック社)) とされ、37 °Cの5% CO₂ で成長された。1週間のインキュベーションの後、プレートからの培地が、新しく調製されてHT (IX, Sigma) が追加されたIMDA成長培地に変化した。雑種細胞が、培地色が黄色に変化するまで成長を許容された。培養表面は、陽性クローンのスクリーニングに用いられた。

30

40

【0128】

陽性クローンのスクリーニング

96のウェルのクリアのマキシソーププレート (96 well clear maxisorp plate (NUNC)) が、PBS内の - シヌクレインのフィブリル又はオリゴマーのウェル当たり100 μl (70 ng / ウェル) で夜通しのインキュベーションにより被覆された。プレートは、PBST (0.05%のTween - 20を含むPBS) で3回洗浄され、ブロッキングバッファ (0.05%のTween - 20を含むPBST) で室温で1 h、インキュベートされた。その後、プレートは、融合プレートからの培養表面の100 μl / ウェル

50

を付加された。プレートは、室温で1 h、インキュベートされた。プレートがP B S T (3 X) で洗浄された後、1 : 2 0 0 0 0 に希釈したヤギの抗マウスのI g G - H R P (ウェル当たり1 0 0 μ l , Jackson Immunoresearch) が各ウェルに付加されて、室温で1 h、インキュベートされた。プレートはそれからP B S T で洗浄され、T M B の基質 (K P L , Gaitherburg, USA) で、色が着くまでインキュベートされた。反応は、1 0 μ l のH₂S O₄ (0 . 6) を付加することによって停止させ、4 5 0 n m の吸光度がV i c t o r³ の1 4 2 0 マルチ標識マイクロタイタープレート読取器を使って測定された。陽性クローンは、2 4 ウェルのプレートに移され、再びスクリーンされて、安定的なクローンを識別した (identify) 。

【 0 1 2 9 】

合計が1 1 0 0 の陽性クローンが初期のスクリーニングで得られ、(- シヌクレインフィブリルで免疫されたマウスからの) 5 7 個の陽性クローンと、(- シヌクレインオリゴマーで免疫されたマウスからの) 4 3 個のクローンとがさらなる特徴のために選択された。陽性クローンのアイソタイプが、アイソタイプピングのキット (Sigma) を用いて識別された。I g G クローンが、多数回継代されて、安定なクローンを識別し、単一の細胞クローニングのために採取された。

【 0 1 3 0 】

アイソタイプ

9 6 のウェルのクリアのマキシソーププレート (NUNC) が、P B S のp H 7 . 4 において1 / 1 0 0 0 に希釈の抗マウスの重鎖の抗体 (Sigma , アイソタイプキット) の1 0 0 μ l / ウェルで4 での夜通しのインキュベーションにより被覆された。プレートは、P B S T (0 . 0 5 % のT w e e 2 0 を含むP B S) で3 回洗浄され、ブロッキングバッファ (2 . 5 % のゲラチンと0 . 0 5 % のT w e e n 2 0 とを含むP B S ; ウェル当たり4 0 0 μ l) で室温、1 h でインキュベートされた。プレートは、次に、P B S T で3 回洗浄され、各クローンから培養表面の1 0 0 μ l がウェルに付加された。プレートは、室温で1 h、インキュベートされ、プレートがP B S T で洗浄された後、1 : 2 0 0 0 0 に希釈したヤギの抗マウスのI g G - H R P (1 0 0 μ l / ウェル) が各ウェルに付加され、1 h、室温でインキュベートされた。プレートは、それから、P B S T で洗浄され、色が着くまで、1 0 0 μ l / ウェルのT M B 基質 (K P L , Gaitherburg, USA) でインキュベートされた。反応は、1 0 0 μ l / ウェルのH₂S O₄ (0 . 6 N ,) を付加することによって停止され、4 5 0 n m の吸光度がV i c t o r³ 1 4 2 0 マルチ標識マイクロタイタープレート読取器を使って測定された。I g G の陽性クローンがT - 2 5 フラスコに移され、単一細胞クローニングのために採取された。

【 0 1 3 1 】

- シヌクレインのフィブリル又はオリゴマーで免疫されたマウスから得られたアイソタイプのクローンが表 2 で示される。

【 0 1 3 2 】

10

20

30

【表 4】

表 2 (Table 2)

Clones obtained from mice immunized with α -synuclein fibrils		Clones obtained from mice immunized with -synuclein oligomers	
Clone Name	Isotype	Clone Name	Isotype
Syn-F1	IgG1	Syn-O1	IgG2b
Syn-F2	IgG2a	Syn-O2	IgG1
Syn-F3	IgG2a	Syn-O3	IgG1
Syn-F4	IgG1	Syn-O4	IgG1
Syn-F5	IgG1	Syn-O5	IgG1
Syn-F6	IgG2b	Syn-O6	IgG1
		Syn-O7	IgG1
		Syn-O8	IgG1

10

20

【 0 1 3 3 】

識別されかつ選択された 100 個のクローンから 33 個の親クローンが、IgG アイソタイプであることが判明した。残りのクローンは、IgM であるか又は IgG と IgM アイソタイプの混合であった。該 IgM 又は該混合されたアイソタイプのクローンは、冷凍され、さらなる特徴づけのために採取はしなかった。IgG クローンは、少なくとも 3 回継代され、14 個の安定したクローンが選択された。10 個のクローンは IgG I であると判明し、2 個のクローンは IgG 2 a であると判明し、2 個のクローンは IgG 2 b のアイソタイプであると判明した。

30

【 0 1 3 4 】

単一細胞のクローニング

細胞は、陽性の雑種細胞クローンの T - 25 フラスコから収集された。該細胞は、計数され、IMDM 内で希釈化され、~ 100 個の細胞が採取され、20 ml の成長培地に付加された。成長培地は、グルタマクス（登録商標）（2 mM, Gibco）と、ペンストレブ（Penstrep Sigma）と、50 μ g/ml のゲンタミシン（Gentamycin Sigma）と、50 μ M のベタ - ME（Sigma）と、20% の胎児ウシの血清（Hyclone）と、若い BALB/c から新たに単離されたマクロファジ（6000 個の細胞 / ウェル）とが追加された IMDM であった。該細胞は、混合され、蒔かれた（200 μ l / ウェル）。該プレートは、37、5% の CO₂ でインキュベートされた。雑種細胞は、成長を許容された、それら細胞が集密的（confluent）になるまで、単一細胞を含むウェルがマークされた。単一コロニーを示すウェルからの培養表面が、ELISA によるスクリーニングのために採取され、陽性のウェルからの細胞が 24 ウェルのプレートに移され、T - 25 フラスコへの移し前に再度スクリーンされた。T - 25 フラスコからの培養表面が少なくとも 3 回スクリーンされて、安定したクローンを選択した。

40

【 0 1 3 5 】

各クローンから得られた単一細胞のクローンは 24 ウェルのプレートに移され、さらに

50

、安定のためにチェックされた。各親クローンからの少なくとも2つの単一細胞のクローンがさらなる特徴づけのためにT-25フラスコに移された。

【0136】

例2

ドットプロットによる - シヌクレイン凝集物に対する雑種細胞の特異性のスクリーニング

【0137】

フィブリル(F)、オリゴマー(O)又はモノマー(M)における - シヌクレインの50ng(PBS内の5 μ l)が、ニトロセルロース膜上にスポットされ、室温で30分間乾燥させた。該膜は、室温で1h、PBST(0.05%のTween20を含むPBS)において5%の脱脂粉乳がブロックされる。1:1で希釈された培養表面により探索する前に、PBSTで3回洗浄され、室温で2h、インキュベートされた。Syn-1抗体は、コントロールとして用いられた。膜がPBSTで洗浄された後、1:20000の希釈されたヤギの抗体IgG-HRPが付加され、室温で1h、インキュベートされた。膜は、PBSTで洗浄され、その後、PBSで2回続けた。膜は、Super signal West pico Chemiluminescent(スーパーシグナル ウェスト ピコ ケミルミネセンス社)の基質(Pierce)により開発された。

10

【0138】

ドットプロットの残りが、図2に示される。ドットプロットにより試験された278個のクローンのうち、45個のクローンが安定であることが判明し、そのうちの14個が - シヌクレイン凝集物に特異性があった。

20

【0139】

例3

単クローン抗体の大量の培養及び精製

【0140】

- シヌクレイン凝集物に対して特異性であると識別された6個のクローンが大量培養のために採取された。これらのクローンは、Syn-F1, Syn-F2, Syn-01, Syn-02, Syn-03及びSyn-04である。成長培地は、2mMグルタマクス(登録商標(Gibco))と、ペnstレブ(Penstrep Sigma)と、50 μ h/mlのゲンタミシン(Gentamycin(Sigma))と、50 μ Mのベタ-ミー(beta-ME Sigma)とが追加されたCDM4mAb(ハイクローン社(Hyclone))であった。ひとたび細胞が集密でかつ培地色が黄色に変化すると、培養表面が集められ、-20 $^{\circ}$ Cで使用まで貯蔵される。単クローンの抗体は、Protein G-Agarose(プロタインG-アガロス社)のコラム(column)が用意され、20mMリン酸塩バッファのpH7.2の20ベッドボリューム(volume)と平衡とされる。培養表面(200ml)は、410分間、1500rpmでは遠心分離される。該表面は、収集され、~1ml/分の流速を維持しつつ、コラムを還流する。該コラムは、20mMのリン酸塩バッファのpH7.2の15ベッドボリュームにより洗浄されて、タンパク質を除去される。結合抗体が、溶出バッファ(50mMグリシンのpH2.5)を用いて溶出される。500 μ lの部分として溶出された。精製された抗体は、最終的にPBSに対して透析された。別のバッチから精製された単クローンの抗体は、集められ、濃度がBCAアッセイにより決定された。これらの単クローンの抗体は、凍結乾燥され、100 μ gの一定分量として-20 $^{\circ}$ Cで使用まで貯蔵される。

30

40

【0141】

例4

精製された抗体の特徴づけ

抑制ELISA

【0142】

384個のウェルの黒のマキシソープ処理(NUNC)は、PBSのpH7.4において4の夜通しのインキュベーションにより - シヌクレインフィブリルの1つのウェルにつき50 μ l(1.4 μ g/ml)で被覆される。プレートは、PBST(0.05%

50

TweenをもつPBS)をもつ4回、洗浄され、ブロッキングバッファ(0.05% TweenをもつPBSにおける2.25%ゲラチン)により1h、室温でブロックされる。0.6mlのケイ素管における α -シヌクレインのフィブリル、オリゴマー又はモノマーの連続2回の希釈が、ブロッキングバッファにおいて行われた(18回の連続的な2倍希釈により後続される80 μ Mからの出発)。各管に、等量20ng/mlの精製された単クローンの抗体(Syn-F1, Syn-F2, Syn-O1, Syn-O2, Syn-O3, Syn-O4)又はSyn-1(BD Bioscience)が、コントロールとして付加され、最終的に10ng/mlの濃度を付与し、室温で2.5h、混合によって管をインキュベートした。プレインキュベートされた溶液は、それから、ELISAのプレートに付加され、室温で10分間インキュベートされた。該プレートをPBSTで(4回)洗浄した後、1/15000に希釈したヤギの抗マウスのIgG-URPの抱合体(Dako(ダコ社))が付加され、該プレートは、室温で1h、インキュベートされた。該プレートは、PBSTで洗浄され、50 μ lの基質(SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific)が付加され、直ちに、VictorのX3マイクロタイタープレート読取器を用いて読み取られた。x軸上の α -シヌクレイン濃度とy軸上のCPS値とのログ希釈(log dilution)を採取して、グラフがプロットされた。

10

【0143】

抑制ELISAによるmAbの結合親和性の対比結果が図3及び表3に見出すことができる。

20

【0144】

【表5】

表3 (Table 3)

mAbs	IC 50 (μ M) Fibrils	IC 50 (μ M) Monomers	Fold Affinity to Fibrils
Syn-F1	0.00012	2.083	16558
Syn-F2	0.00118	3.707	3141
Syn-O1	0.00037	4.793	12737
Syn-O2	0.00012	3.283	27312
Syn-O3	0.00047	5.329	11129
Syn-O4	0.00052	3.605	6932
Syn-1	0.00210	0.001	0.476

30

All the monoclonal antibodies, Syn-F1, Syn-F2, Syn-O1, Syn-O2, Syn-O3 and Syn-O4, were found to be specific for α -synuclein fibrils.

40

全ての単クローン抗体Syn-F1, Syn-F2, Syn-O1, Syn-O2, Syn-O3及びSyn-O4は α -シヌクレインのシヌクレインに特異性があることが見出された。

【0145】

例5

抗体 - ドットプロットの交差反応性の試験

【0146】

A) 種々のアミロイドのフィブリルとペプチドの異なるタンパク質50ng(5 μ lのP

50

B S , p H 7 . 4 に存在する) によって形成されたアミロイドのフィブリルとの交差反応性を試験するために、 β -シヌクレインからのフィブリル (F) とモノマー (M) 、 T a u , A - b e t a , I A P P 及び A B r i がニトロセルロースの膜上にスポットされ、室温で 30 分、乾燥させた。該膜は P B S T (0 . 0 5 % の T e e n を含む P B S) 内の 5 % の脱脂粉乳でブロックされて、室温で 1 h 、インキュベートされた。P B S T で 3 回洗浄後、該膜は、(P B S T 内の 5 0 n g / m l) 、室温で 2 h 、次のものでインキュベートされた。単クローンの抗体、S y n - F 1 , S y n - F 2 , S y n - 0 1 , S y n - 0 2 , S y n - 0 3 , S y n - 0 4 、又はコントロール抗体、 β -シヌクレイン用の S y n - 1 (B D B i o s c i e n c e) 、 T a u 用の 5 E 2 (G i f t f r o m D r . D . W a l s h , H a r v a r d M e d i c a l S c h o o l (ハーバード大医学部の D . W a l s h 博士からの贈り物)) 、 A - b e t a 用の 8 2 E I (I B L) 、 I A P P 用の R I O / 9 9 (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y (サンタクルツ バイオテクノロジー社)) 、及び A b r i 用のウサギの抗 A B r i 血清。該膜は、洗浄され、1 / 2 0 0 0 0 に希釈したヤギの抗マウスの I g G - H R P の抱合体 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h (ジャクソン イミュンリサーチ社)) か又は 1 / 1 0 0 0 0 に希釈したヤギの抗ウサギの I g G - E f R P の抱合体 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h) かで室温で 1 h 、インキュベートされた。プロットが、それから、Super signal West Pico (スーパー シグナル ウェスト ピコ社) の化学発光基質で現像された。

10

【 0 1 4 7 】

種々のタンパク質によって形成されたアミロイドフィブリルとの交差反応性の結果が図 4 に見られる。本発明による単クローンの抗体は、 β -シヌクレインのアミロイドフィブリルに対して特異性があることが見出され、他のアミロイドフィブリル又はモノマーとは交差反応しない。

20

【 0 1 4 8 】

B) β -シヌクレイン及び α -シヌクレインによって形成されたアミロイドフィブリルに対する本発明の、立体構造の単クローン抗体の交差反応性を試験するために、 β -シヌクレイン及び α -シヌクレインからのフィブリル (F) 及びモノマー (M) の 5 0 n g が、ニトロセルロースの膜上にスポットされた。該膜は、P B S T における 5 % の脱脂粉乳により 1 h 、ブロックされ、それから、我々の単クローン抗体 (S y n - F 1 , S y n - F 2 , S y n - 0 1 , S y n - 0 2 , S y n - 0 3 , S y n - 0 4) 又はコントロール抗体、 β -シヌクレイン用の S y n - 1 (B D B i o s c i e n c e) 、 α -シヌクレイン用の A n t i - B e t a - s y n u c l e i n (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y) 、及び α -シヌクレイン用の C - 2 0 (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y) で、2 h 、室温で探索した。膜は、洗浄され、1 / 2 0 0 0 0 に希釈したヤギの抗マウスの I g G - H R P の抱合体 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h) か又は 1 / 3 0 0 0 0 0 に希釈したチキンの抗ヤギの I g G - H R P の抱合体 (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y) かで室温で 1 h 、インキュベートされた。プロットが、それから、スーパー シグナル ウェスト ピスコ社 (S u p e r s i g n a l W e s t P i c o) の化学発光基質で現像された。

30

【 0 1 4 9 】

β -シヌクレイン又は α -シヌクレインによって形成されたアミロイドフィブリルとの交差反応性の結果が図 5 に見られる。本発明による単クローン抗体は β -シヌクレインフィブリルに対して特異性があることが見出され、フィブリル又はモノマーの形態において β -シヌクレイン及び α -シヌクレインのいずれにも反応しない。

40

【 0 1 5 0 】

C) β -シヌクレインの異なるフラグメントに対する我々の立体構造の単クローン抗体の交差反応性を試験するために、全長の β -シヌクレイン (1 - 1 4 0) 及びペプチドフラグメントからのフィブリル (F) 及びモノマー (M) 、 α -シヌクレイン (1 - 1 2 2) 、 N A C (6 1 - 9 5) 並びに N A C (6 1 - 7 8) がニトロセルロースの膜上にスポットされた。膜は、P B S T 内の 5 % の脱脂粉乳により 1 h 、ブロックされ、それから、我々の単クローン抗体 (S y n - F 1 , S y n - F 2 , S y n - 0 1 , S y n - 0 2 , S y n - 0 3 , S y n - 0 4) 及びコントロール抗体、 β -シヌクレイン用の S y n - 1 (B D

50

Bioscience)、並びに5 C 2 (Santa Cruz Biotechnology)で2 h、室温で探索した。膜は、1 / 2 0 0 0 0に希釈したヤギの抗マウスのI g G - H R Pの抱合体 (Jackson ImmunoResearch)か又は1 / 3 0 0 0 0 0に希釈したチキンの抗ヤギのI g G - H R Pの抱合体 (Santa Cruz Biotechnology)かで室温で1 h、インキュベートする前に、洗浄された。プロットが、それから、Super signal West Picoの化学発光基質で現像された。

【 0 1 5 1 】

異なる - シヌクレインフラグメントによって形成されたフィブリルとの交差反応性は図6に見ることができる。本発明による単クローン抗体は、切断 (truncated) - シヌクレイン、N A C領域 (6 1 - 9 5)又はN A C領域 (6 1 - 7 8)のいずれかによって形成されたアミロイドフィブリルとは反応しなかったが、エピトープの部分が - シヌクレインのC末端領域にあると暗示させる全長の - シヌクレイン (1 - 1 4 0)によって形成されるフィブリルにのみ反応した。 - シヌクレインモノマーに対する我々のm A bの無反応性は、また、我々のm A bによって認識されるエピトープが立体構造特異性であるかもしれないことを暗示する。

10

【 0 1 5 2 】

例 6

運動定数の決定

ピアコア (Biacore : 商標) 分析

【 0 1 5 3 】

我々のm A bと - シヌクレインフィブリルとの間の間の運動定数は、ピアコア X 1 0 0 (BIAcore X 100)器を用いて表面プラズモン共鳴測定器により決定された。 - シヌクレインフィブリルは、C M 5 センサーチップに固定された。該チップは、1 0 m Mの酢酸ナトリウムのバッファのp H 4 . 5に1 2 0 μ g / m lの - シヌクレインフィブリルの3 5 μ lを注入することによって、 - N (ヒドロキシコハク酸イミド)スクシンイミド (N H S)と、Nエチル - N (ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (carbof iimide) (E D C)とに作動する。会合速度定数は、8つの異なる濃度のm A bをH B Sの作動バッファに1 0 μ l / 分の低速で注入することによって得られる。なお、該m A bは、S y n - F 1, S y n - F 2, S y n - 0 1, S y n - 0 2, S y n - 0 3, S y n - 0 4、及びm A b 2 1 1 (Santa Cruz Biotechnology)であり、該バッファは、1 0 m Mのヘペス、0 . 1 5 m MのN a C l、3 . 4 m MのE D T A、及び0 . 0 0 5 %の界面活性物質P 2 0のp H 7 . 4である。解離速度は、4 0 μ l / 分で測定された。センサーチップは、1 0 0 m MのN a H C O 3のp H 9 . 6を用いて再生された。センサーグラム (Sensograms)は、B O A 査定ソフトウェアを用いて分析された。

20

30

【 0 1 5 4 】

ピアコア社 (Biacore)によるm A bの比較を示す結果が図7及び表4に見ることができる。単クローン抗体は、1 0 - 8より小さいK dを有することが見出された。m A bのS y n - 0 1は、K D 1 5 . 9 p Mの最高の親和性を有していることが見出された。6つのm A bの中で最低の親和性は、2 . 6 m MのS y n - F 2であることが見出された。

【 0 1 5 5 】

【表 6】

表 4 (Table 4)

mAb	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Syn-F1	1.230E+7	0.001564	1.272E-10
Syn-F2	1.256E+6	0.003377	2.688E-9
Syn-O1	5.857E+6	9.360E-5	1.598E-11
Syn-O2	1.314E+7	0.001274	9.694E-11
Syn-O3	2.217E+6	3.789E-4	1.709E-10
Syn-O4	7.236E+6	9.964E-4	1.377E-10
mAb 211	1.648E+5	4.220E-4	2.560E-9

10

【0156】

例 7

mAb に対するエピトープのマッピング

【0157】

本発明の mAb が線形又は立体構造のエピトープを発見するかを見出すために、抗体の親和性が β -シヌクレイン配列をカバーするペプチドに対して試験された。ペプチドは、14 個分のアミノ酸長さであり、7つのアミノ酸が重複し、ヒトの β -シヌクレイン配列（表 5 参照）をカバーするものであり、このペプチドが合成された（Shanghai Hanhong Chemical Co., China（シャンハイ ハンホン ケミカル社 中国））。ペプチドは、高圧滅菌された水又は DMSO に溶解し、最終的に 1 mg/ml の濃度になる。

【0158】

20

【表 7】

表 5 (Table 5)

Peptide No.	Sequence no.	Peptide Sequence
1	1-14	H-MDVFMKGLSKAKEG-OH
2	8-21	H-LSKAKEGVVAAAEEK-OH
3	15-28	H-VVAAAEEKTKQGVAE-OH
4	22-35	H-TKEQGVAAEAGKTKE-OH
5	29-42	H-AAGKTKEGVLYVGS-OH
6	36-49	H-GVLYVGSKTKEGVV-OH
7	43-56	H-KTKEGVVHGVATVA-OH
8	50-63	H-HGVATVAEKTKEQV-OH
9	57-70	H-EKTKEQVTNVGGAV-OH
10	64-77	H-TNVGGAVVTGVTAV-OH
11	71-84	H-VTGVTAVAQKTVEG-OH
12	78-91	H-AQKTVEGAGSIAAA-OH
13	85-98	H-AGSIAAATGFVKKD-OH
14	92-105	H-TGFVKKDQLGKNEE-OH
15	99-112	H-QLGKNEEGAPQEGI-OH
16	106-119	H-GAPQEGILEDMPVD-OH
17	113-126	H-LEDMPVDPDNEAYE-OH
18	120-133	H-PDNEAYEMPSEEGY-OH
19	127-140	H-MPSEEGYQDYEPEA-OH

10

20

【0159】

ドットプロットによるペプスカン (Pepscan)

ニトロセルロースの膜は、0.1%のEDC(1-Etyl-3-[3-ジメチルアミノプロピル])のカルボジイミドと、PBS内で10分、室温で前処理され、空気乾燥される。200ng(5μlのPBSでpH7.4において)のペプチド1-19(-シヌクレインのペプチドライブラリ、表5)と、50ngの-シヌクレインフィブリル(スポット20)が膜上にスポットされた。-空気乾燥後、膜は、PBST内の5%の脱脂粉乳をブロックし、1h、室温でインキュベートした。膜は、Syn-F1, Syn-F2, Syn-01, Syn-02, Syn-03, Syn-04、又はSyn-1の単クローンの抗体(PBST内の50n/ml)と共にインキュベートされる前に、3回、洗浄され、2h、室温でインキュベートされた。膜は、PBSTで洗浄され、(PBSTにおいて)1:20000で希釈したヤギ抗マウスIgG-HRP(ジャクソン免疫研究社(Jackson ImmunoResearch)でインキュベートされた。ペプスカンの結果は図8において

30

40

【0160】

ドットプロットを用いたペプスカンの結果は、mAb、Syn-01, Syn-02, Syn-03, Syn-04, Syn-F1, Syn-F2は、線形のエピトープを認識しないことを暗示する。

【0161】

ELISAによるペプスカン

ドットプロットを用いたペプスカンの結果を確認するために、mAbは、また、ELISAを用いたペプスカンにより試験された。384のウェルの黒のマキシソーププレート(NUNC)は、完全な可能を可能にする37の夜通しのインキュベーションによって

50

、0.2 MのNaHCO₃のpH9.6、内の50 μl (500 ng / ウェル) のペプチド (表5に詳説されている - シヌクレインペプチド1-19) と、PBSのpH7.4内の50 μl (100 ng / ウェル) の - シヌクレインフィブリルとで被覆された。プレートは、PBSTで3回洗浄され、100 μlのブロッキングバッファ (PBST内の2.25%ゲラチン) と共に1h、室温でブロックした。該プレートをPBSTで3回の洗浄後、次のmAbの50 μl (100 ng / ml) と次のコントロール抗体とが付加されて、1h、室温でインキュベートされた。該次のmAbとは、Syn-F1, Syn-F2, Syn-01, Syn-02, Syn-03及びSyn-04である。該次のコントロール抗体とは、Syn-1 (マウスの抗 - シヌクレイン; BD Bioscience) の50 μl (100 ng / ml)、N-19 (ヤギの抗 - シヌクレイン; サンタクルツバイオテクノロジー社 (Santa Cruz Biotechnology)) の50 μl (100 ng / ml)、211 (マウスの抗 - シヌクレイン; Santa Cruz Biotechnology) の50 μl (100 ng / ml)、FL-140 (ウサギの抗 - シヌクレイン; Santa Cruz Biotechnology) の50 μl (200 ng / ml)、5C2 (マウスの抗 - シヌクレイン; Santa Cruz Biotechnology) の50 μl (1 μg / ml)、及び3B6 (マウスの抗 - シヌクレイン; Santa Cruz Biotechnology) の50 μl (1 μg / ml) である。プレートはPBSTで洗浄され、次の付加物が付加され、1h、室温でインキュベートされる。該付加物とは、ヤギの抗マウスIgG-HRP抱合体 (1/20000; ジャクソン免疫研究社 (Jackson ImmunoResearch)) 又はヤギの抗ウサギのIgG-HRP抱合体 (1/5000; Jackson ImmunoResearch) 又は希釈されたチキンの抗ヤギのIgG-HRP抱合体 (1/20000) である。該プレートは、PBSTで洗浄され、基質 (SuperSignal ELISA FEMTO Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific) の50 μl が付加され、直ちに、ピクチャーX3のマイクロタイタープレート読取器により読み取った。ELISAの信号が測定された後、該プレートは、X線フィルムに感光され、スポットが現像された。

【0162】

ELISAによるペプスカンのスクリーニング結果は、図9及び図10 (コントロール抗体、A、本発明の抗体、B) に見ることができる。ELISAによるペプスカン方法は、また、抗体がいずれのペプチドにも反応しないが、C末端のペプチド (127-140) にはわずかに反応したことを示していた。このことは、立体構造のエピトープを形成することに参与していることを暗示する。

【0163】

例8

- シヌクレイン凝集物を検出するサンドイッチELISA

384ウェルELISAの黒のマイクロプレート (Nunc Maxisorb, NUNC, Denmark) は、200 mMのNaHCO₃において4thでの夜通しのインキュベーションにより我々の立体構造の単クローン抗体 (Syn-F1, Syn-F2, Syn-01, Syn-02, Syn-03又はSyn-04) (50 μm / ウェル) の1つの抗体の0.1 μg / mlで被覆された。

【0164】

該プレートは、0.05%のTween-20 (PBST) を含むPBSにより4回洗浄され、2h、37thでブロッキングバッファ (2.5%のゲラチンと1%のBSAを含むPBST) の100 μl / ウェルでインキュベートされた。

【0165】

該プレートは、PBSTで4回洗浄され、モノマー、オリゴ糖又は凝集物の - シヌクレインの種々の濃度 (PBS内で10, 5, 1, 0.5, 0.1, 及び0.05 nM) の50 μl が付加された。該プレートは、それから、37thで2.5h、インキュベートされた。

【0166】

PBSTでの4回の洗浄後、ブロッキングバッファ内で1:1000に希釈されたFL-140 (ウサギの多クローン抗体, Santa Cruz Biotechnology) の50 μl が、付加さ

れ、37 で2 h、インキュベートされた。

【0167】

ウェルがPBSTで4回洗浄され、ブロッキングバッファにおいて1:10,000に希釈されたヤギの抗ウサギのIgG HRP (Jackson ImmunoResearch)の50 µl / ウェルが付加され、1.5 h、37 でインキュベートされた。

【0168】

該プレートは、PBSTで4回洗浄され、結合したHRPの活動度が、増強された化学発光基質 (SuperSignal ELISA Femto, Pierce Biotechnology) を用いて化学発光によって、効力を検定され、その後、相対光単位で化学発光度がパーキンエルマー社 (PerkinElmer) のマイクロプレート読取器により直ちに測定された。

10

【0169】

立体構造のmAbが α -シヌクレインの凝集物形態のみ検出し、 α -シヌクレインのモノマー形態を検出しないことを確認するために、上述のELISAアッセイが、Syn-1を捕獲抗体として用いて、コントロールとして実施された。

【0170】

結果が図11に示されている。該結果は、立体構造のmAbがSyn-F1, Syn-F2, Syn-01, Syn-02, Syn-03, 及びSyn-04が、 α -シヌクレインのオリゴマー形態及び凝集形態の方法に反応していることを示している。Syn-1は、 α -シヌクレインのモノマー形態及び凝集形態の方法に反応していることを示している。

20

【0171】

ELISAは、 α -シヌクレインのモノマー形態を検出せず、 α -シヌクレインのオリゴマー形態及びフィブリル形態の両方を全mAb、検出することを示している。これに対し、ELISAの結果は、Syn-F1及びSyn-F2に対して α -シヌクレインのオリゴマー形態の α -シヌクレインフィブリルの α -シヌクレインフィブリルの方に幾分の特異性があることを示した。

【0172】

例9

凝集されリン酸化したSer129- α -シヌクレイン (p-S129- α -syn)

【0173】

384ウェルELISA黒マイクロプレート (Nunc Maxisorb, NUNC, Denmark) は、200 mMのNaHCO₃において4での夜通しのインキュベーションにより我々の立体構造の単クローン抗体 (Syn-F2, Syn-02) (50 µl / ウェル) のうちの1つの0.1 µg / mlにより被覆された。

30

【0174】

該プレートは、0.05%のTween-20 (PBST) を含むPBSにより4回洗浄され、ブロッキングバッファ (2.5%のゲラチンと1%のBSAを含むPBST) の100 µl / ウェルにより2 h、37 でインキュベートされた。

【0175】

該プレートは、PBSTで4回洗浄され、モノマーのp-S129- α -シヌクレイン又は凝集物のp-S129- α -シヌクレインの種々の濃度 (PBSにおいて1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 nM) の50 µlが付加された。該プレートは、37 で2.5 h、インキュベートされた。

40

【0176】

PBSTで4回洗浄後、ブロッキングバッファにおいて1/1000に希釈されたウサギの抗p-S129- α -シヌクレイン (Epitomics (エピトミクス社)) の50 µlが付加され、37 で2 h、インキュベートされた。

【0177】

ウェルがPBSTで4回洗浄された後、ブロッキングバッファにおいて1:10,000希釈されたヤギの抗ウサギのIgG HRPの (Jackson ImmunoResearch) の50 µl

50

ノウェルが付加され、1.5 h、37 でインキュベートされた。

【0178】

該プレートは、P B S Tで4回洗浄され、結合H R Pの活性度が、増強された化学発光基質によって (SuperSignal ELISA Femto, Pierce Biotechnology) を用いて化学発光反応によって、効力を検定され、その後、相対光単位で化学発光度がPerkinElmer社のマイクロプレート読取器により直ちに測定された。

【0179】

立体構造のm A bは、 α -シヌクレインの凝集形態のみ検出され、 β -シヌクレインのモノマー形態は検出れないのを確認するために、上述のさらなるE L I S Aの効力検定が、Syn - 1を捕獲抗体として用いて、コントロールとして実施される。

10

【0180】

その結果が図12に見ることができる。該結果は、立体構造のm A bのSyn - F 2及びSyn - 0 2が、凝集されてリン酸化された α -シヌクレイン形態に反応していることを示している。Syn - 1は、類似したものを示したが、両場合共に、リン酸化したS 1 2 9 α -シヌクレインのモノマー形態及び凝集形態に低反応を示した。

【0181】

シヌクレインの凝集化及びリン酸化は、P Dの病変形成において重要な役割を果たしていると考えられる。それ故に、生物学的な流体において α -シヌクレインのリン酸化又は非リン酸化形態の検出は、P Dに対して生物学的にマークする可能性として用いることができる。

20

【0182】

E L I S Aの効力検定は、 α -シヌクレインの凝集形態は明細に検出し、 β -シヌクレインのモノマー形態は検出しないように、開発が進んでいる。効力検定は、捕獲抗体として抗体Syn - F 1, Syn - F 2, Syn - 0 1, Syn - 0 2, Syn - 0 3, 又はSyn - 0 4を用いる開発が進められている。そして、凝集された α -シヌクレイン用のF L - 1 4 0 (全長の α -シヌクレインに対して隆起するウサギの多クローン抗体, Santa Cruz Biotechnology) のような抗体、又はp - S 1 2 9 α -シヌクレイン用にウサギの抗p - S 1 2 9 α -シヌクレインが後続している。

【0183】

例 1 0

免疫組織化学

30

【0184】

m A bは、パーキンソン病の症例からの脳セクションのペルオキシダーゼの免疫組織化学を用いて試験された。Syn - F 1及びSyn - 0 2は、10000分の1 (0.1 μ g / ml) に希釈で用いられ、Syn - F 2, Syn - 0 1, Syn - 0 3及びSyn - 0 4は5000分の1 (0.2 μ g / ml) の希釈で用いられた。マウスの陰性のコントロールスライド (control slide) が同時に処理され、すべての免疫組織化学的なステップが含まれるが、一次抗体は省略される。

【0185】

結果

m A bは、パーキンソン病 (P D) 及び多系統萎縮症 (M S A) の症例においてペルオキシダーゼの免疫組織化学を用いて働きを向上してきた。すべての抗体は、P D脳のレビー小体及びレビー神経炎における強い免疫染色 (図14) 及び多系統萎縮症の白質グリア細胞質内封入体 (図15) を生成した。マウスの陰性のコントロールスライド (control slide) もまた処理されたが、セクションにおいてどんな免疫反応性も生成しなかった。

40

【0186】

コントロール症例において (図13)、画像は、我々のm A bと、商業利用されているマウスの単クローンの抗 α -シヌクレインの抗体 (Syn - 1) 又はマウスの単クローンの抗リン酸化されたS e r 1 2 9の α -シヌクレイン (phospho-syn) とに対する免疫染色されたセクションを示し、コントロール症例からの前帯状皮質におけるものである。マ

50

ウス及びウサギの陰性のコントロールスライドもまた同時に処理された。すべてのセクションが、神経核及び膜を視覚化するために、クレシルバイオレット（青）（Cresyl violet (blue)）で対比染色された。明るさに対して同一の調整がすべての画像に適用された。スケールバーは、20 μm を表している（全パネルに適用）。

【0187】

パーキンソン病の症例において（図14）、画像は、我々のmAbと、商業利用されているマウスの単クローンの抗-シヌクレインの抗体（Syn-1）又はマウスの単クローンの抗リン酸化されたSer129の-シヌクレイン（phospho-syn）とに対するレビー小体の免疫活性を示し、パーキンソン病症例からの前帯状皮質におけるものである。すべてのセクションが、神経核及び膜を視覚化するために、クレシルバイオレット（青）で対比染色された。明るさに対して同一の調整がすべての画像に適用された。スケールバーは、20 μm を表している（全パネルに適用）。

10

【0188】

多系統萎縮症の症例において（図15）、画像は、我々のmAbと、商業利用されているマウスの単クローンの抗-シヌクレインの抗体（Syn-1）又はマウスの単クローンの抗リン酸化されたSer129の-シヌクレイン（phospho-syn）とに対するグリア細胞質内封入体の免疫活性を示し、MSAの症例からの被殻におけるものである。セクションが、神経核及び膜を視覚化するために、クレシルバイオレット（青）で対比染色された。明るさに対して同一の調整がすべての画像に適用された。スケールバーは、20 μm を表している（全パネルに適用）。

20

【0189】

例11

神経変性疾患を有すると知られている患者からの感謝脳組織の試料がSyn-02抗体で試験された。抗体は、5000分の1（0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の希釈で用いられた。抗体は、全ての患者の試料において強い染色を生成した。

【0190】

患者Aは、パーキンソン遺伝子内のヘテロ接合性エクソンの欠失に関係するヘテロ接合性のミスセンス（missense）の変異を有する常染色体性で劣性早発性パーキンソン症候群を有するとして知られていた。図16（A）に示されるように、オリゴマーの-シヌクレインが、シナプスと細胞プロセス（矢頭）において観察された。非常に少数の凝集物が、僅かのニューロメラニン含有ニューロンの細胞質内に見ることができた。

30

【0191】

患者Bは、アプログレッシブ（aprogressive）なDLBのパテント（patent）である。図16（B）に示されるように、オリゴマーの-シヌクレインの免疫活性がシナプス、レビー小体神経突起のような構造及び細胞外凝集物内に観察された。

【0192】

患者Cは、後発性特発性パーキンソンをもつ。図16（C）に示されるように、オリゴマーの-シヌクレインの免疫活性が、レビー小体類似の細胞質内封入体及び神経突起内に観察された。

【0193】

これらの結果は、本発明の抗体が-シヌクレインに関係する神経変性の病気を診断するのに使えることを示している。

40

【0194】

例12

脳組織の試料の異なるセクション（海馬のCA2領域、嗅内皮質表面層1-3、嗅内皮質中性）が、Syn-01, Syn-02, Syn-03, Syn-04, Syn-F1及びSyn-V2抗体によって試験された。該抗体は、5000分の1の希釈で用いられた。脳の試料は、4つの処置、1)前処理無し、2)クエン酸緩衝内での120、10分のオートクレーブ、3)15分のギ酸、4)20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプロテイナーゼK処理の4個のうちの1つで処理される。

50

【0195】

インキュベーションは4で夜通しであった。検出は、色素体としてのロムリン (Romulin) を有するヒストステイン (Histostain) HPキットにより行われた。コントロール抗体 Syn - 1 は、1 : 1000 の希釈で用いられた。コントロール抗体で試験された組織の試料はギ酸で15分前処理された。

【0196】

結果は、抗体が脳組織の前処置無しでさえ働いたことを示した。しかしながら、抗体は前処理により、より良く採取された。タンパク質Kの処理された試料は、より良い結果を示した。プロテイナーゼK処理は、異常なシヌクレイン (すなわち、細胞内凝集物) の免疫性を高め、かつシナプスの染色の拡散を減少させることが知られている。コントロール抗体と、海馬 (A) 及び海馬傍回 (B) のCA2領域における syn - F2抗体との結果が図17に示されている。

10

【0197】

例13

6つの抗体クローン Syn - F1, Syn - F2, Syn - 01, Syn - 02, Syn - 03, 及び Syn - 04 に対する重鎖及び軽鎖の種々の領域のポリヌクレオチド及びアミノ酸の配列が決定された。

【0198】

RNAが、技術マニュアルによる“TRIzol (登録商標) Plus RNA purification System” (Invitrogen) を用いて、雑種細胞のクローン Syn - F1, Syn - F2, Syn - 01, Syn - 02, Syn - 03, 及び Syn - 04 から抽出された。単離された全RNAは、アルゴスのゲルの電気泳動法によって分析された。

20

【0199】

全RNAは、技術マニュアルによる“SuperscriptTM III First-strand synthesis System” を使って、アイソタイプ - 明細 (isotype-specific) のアンチセンスのプライマー又は普遍的なプライマーを用いて、逆転写され、cDNAにされた。VH及びVLの抗体フラグメントは、遺伝子記述のRACEの標準作動手続により増幅された。

【0200】

増幅された抗体フラグメントは、標準分子クローニング技術を用いて標準クローニングベクターにクローンされた。Colony PCRのスクリーニングが、正しいサイズの挿入によりクローンを識別するために実施された。正しいサイズのインサートを有し5より小さくない個数の単一クローンが各抗体フラグメントに配列された。

30

【0201】

DNA配列は、各VH及びVL領域ごとに決定され、対応のアミノ酸配列が決定された。先頭の配列、フレームワーク領域 (FR1, FR2, FR3及びFR4)、及び相補性決定領域 (complementarity determining regions) が、各重鎖及び軽鎖の変化領域ごとに決定された。結果は、表6に示されている。CDR1, CDR2及びCDR3のポリヌクレオチド及びアミノ酸の配列が配列番号13 - 48で示されている。

【0202】

Syn - F1のVH及びVL領域をコードしたDNA配列が配列番号1及び3で提供される。Syn - F1のVH及びVLのアミノ酸配列は、配列番号2及び4で提供される。Syn - F1のVH領域のCDR1, CDR2及びCDR3領域は、配列番号13, 14及び15でそれぞれ提示されている。対応するアミノ酸配列は、配列番号16, 17及び18でそれぞれ提示される。Syn - F1のVL領域のCDR1, CDR2及びCDR3領域は、配列番号13, 14及び15でそれぞれ提示されている。対応するアミノ酸配列は、配列番号22, 23及び24でそれぞれ提示される。

40

【0203】

Syn - F2のVH及びVL領域をコードしたDNA配列が配列番号5及び7で提供される。Syn - F2のVH及びVLのアミノ酸配列は、配列番号6及び8で提供される。Syn - F2のVH領域のCDR1, CDR2及びCDR3領域は、配列番号25, 26

50

及び 27 でそれぞれ提示されている。対応するアミノ酸配列は、配列番号 28 , 29 及び 30 で提示される。Syn - F2 の VL 領域の CDR 1 , CDR 2 及び CDR 3 領域は、配列番号 31 , 32 及び 33 でそれぞれ提示されている。対応するアミノ酸配列は、配列番号 34 , 35 及び 36 で提示される。

【 0204 】

Syn - 01 , Syn - 02 , Syn - 03 及び Syn - 04 の VH 及び VL 領域をコードした DNA 配列が配列番号 9 及び 11 でそれぞれ提供される。Syn - 01 , Syn - 02 , Syn - 03 及び Syn - 04 の VH 及び VL のアミノ酸配列は、配列番号 10 及び 12 で提供される。Syn - 01 , Syn - 02 , Syn - 03 及び Syn - 04 の VH 領域の CDR 1 , CDR 2 及び CDR 3 領域は、配列番号 37 , 38 及び 39 でそれぞれ提示されている。対応するアミノ酸配列は、配列番号 40 , 41 及び 42 で提示される。Syn - 01 , Syn - 02 , Syn - 03 及び Syn - 04 の VL 領域の CDR 1 , CDR 2 及び CDR 3 領域は、配列番号 43 , 44 及び 45 でそれぞれ提示されている。対応するアミノ酸配列は、配列番号 46 , 47 及び 48 で提示される。

10

【 0205 】

Syn - 01 , Syn - 02 , Syn - 03 及び Syn - 04 の VH 及び VL 領域の配列も同じであった。

【 0206 】

【表 8】

表 6 (Table 6) / その 1

ANTIBODY	SEQ ID NO:	SEQUENCE (<i>Leader</i> -FR1- <u>CDR1</u> -FR2- <u>CDR2</u> -FR3- <u>CDR3</u> -FR4)
SYN-F1 (VH)	1	<p><i>ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTTGTCTTA</i> <i>TTTTAAAAGGTGTCCAGTGT GATGTGCAGCTGGTGGA</i> <i>GTCTGGGGGAGACTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCGG</i> <i>AACTCTCCTGTGCAGCCTCT <u>GGATTCACTTTCAGTAG</u></i> <i>CTTTGGAATGCACTGGGTTTCGTCAGGCTCCAGAGAAGG</i> <i>GGCTGGAGTGGGTCGCA <u>TACATTAATAGTGGCAGTAGT</u></i> <i><u>ACCATCTACTATGCAGACACAGTGAAGGGC</u> CGATTCAC</i> <i>CATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACACCCTGTTCTGC</i> <i>AGATGACCAGTCTAAGGTCTGAGGACACGGCCATGTAT</i> <i>TACTGTGCAAGG <u>GGAAATAACCCTGGGACGGGATATTA</u></i> <i><u>CTATTCTATGGACTAC</u> TGGGGTCAGGGAACCTCAGTCA</i> <i>CCGTCTCCTCA</i></p>
SYN-F1 (VH)	2	<p><i>MDSRLNLVFLVLILKGVQC DVQLVESGGDLVQPGSRKLSAAS</i> <i>GFTFSSFGMH WVRQAPEKGLEWVA YINSGSSTIYYADTVKG</i> <i>RFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCAR <u>GNNPGTGYYY</u></i> <i><u>SMDY</u> WGQGTSVTVSS</i></p>
SYN-F1 (VL)	3	<p><i>ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCTGTTTCTGTTAGTGCTCTGGA</i> <i>TTCAGGAAACCAACGGTG ATGTTGTGATGACCCAGACTCCAC</i> <i>TCAC TTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTG</i> <i><u>CAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAAACCTA</u></i> <i><u>TTTGAATTGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGC</u></i> <i>CTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACA</i> <i>GGTTCCTGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTTACTGAAAA</i> <i>TCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTACTGCG</i> <i><u>TGCAAGGTACACATTTTCCCACGTTCCGGAGTGGGGACCAAGC</u></i> <i>TGGAATAAAA</i></p>
SYN-F1 (VL)	4	<p><i>MMSPAQFLFLVLWIQETNG DVVMTQTPLTSLVTIGQPASIS</i> <i><u>KSSQSLLYSNGKTYLNWLLQRPQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRF</u></i> <i>TGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGFHPTFGVGTKLEIK</i></p>
SYN-F2 (VH)	5	<p><i>ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTTGTCTTATTTAAAAGG</i> <i><u>TGTCCAGTGT</u> GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCT</i></p>

10

20

30

40

表 6 (Table 6) / その 2

		<p>TAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCGGAAACTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTCACTTTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTTTCGTCAG GCTCCAGAGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGCATACATTAGTAGT GGCAGTAGTACCATCTACTATGCAGACACAGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACACCCTGTTCTCCTGC AAATGACCAGTCTAAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACT GTGCAAGAGGAAATAACCCTGGGACGGGATATTACTATGCTA TGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA</p>	10
SYN-F2 (VH)	6	<p><i>MDSRLNLVFLVLILKGVQC</i> DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAAS <u>GFTFSSFGMHVWRQAPEKGLEWVAYISSGSSTIYYADTVKGRFTI</u> SRDNPKNLFLQMTSLRSEDAMYYCARGNNPMTGYYYAMDY WGQGTSVTVSS</p>	
SYN-F2 (VL)	7	<p><i>ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCTGTTTCTGTTAGTGCTCTGGATTG</i> <i>AGGAAACCAACGGT</i> GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCA CTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAA <u>GTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAAACCTATTTG</u> <u>AATTGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTA</u> ATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGT TCACTGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTTACTGAAAATCA GCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCGTGC <u>AAGGTACACATTTCCACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGG</u> AAATAAAA</p>	20
SYN-F2 (VL)	8	<p><i>MMSPAQFLFLLVLWIQETNG</i> DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKS <u>SQSLLYSNGKTYLNWLLQRPQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGS</u> GSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGTHTFPTFGGGTKLEIK</p>	30
SYN-O1 (VH)	9	<p><i>ATGGTGTTGGGGCTTAAGTGGGTTTCTTTGTTGTTTTTATCAAGG</i> <i>TGTGCATTGT</i> GAGGTGCAGCTTGTGAGTCTGGTGGAGGATT GGTGCAGCCTAAAGGATCATTGAACTCTCATGTGCCGCTCT GGTTTCACCTTCAATACCTATGCCATGCACTGGGTCGCCAGG CTCCAGGAAAGGGTTTGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTA <u>AAAGTAGTAATTATGCAACATATTATGCCGACTCAGTGAAAG</u> <u>ACAGATTACCATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTA</u> TCTGCAAATGAACAACCTGAAAACCTGAGGACACAGCCATGTA TTACTGTGTGAGACCCTTAAGTGGTACTTCGATGTCTGGGGC</p>	40

表 6 (Table 6) / その 3

		ACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA	
SYN-O1 (VH)	10	<u>MVLGLKWWFFVVFYQGVHC</u> EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAAS <u>GFTFNTYAMHWVRQAPGKGLEWVARIRSKSSNYATYYADSVK</u> <u>DRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRPLKWFYFDVW</u> GTGTTVTVSS	
SYN-O1 (VL)	11	<u>ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCT</u> <u>CAGTATCCAGAGGA</u> CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAAT CTTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGT <u>GCCAGCTCAACTGTTAATTACATGCACTGGTACCAGCAGAAG</u> <u>TCAGGCACCTCCCCAAAATATGGATTTATGACACATCCAAAC</u> <u>TGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTTG</u> <u>GACCTTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGAT</u> <u>GCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGGAATAGTAACCCACCCA</u> <u>CGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA</u>	10
SYN-O1 (VL)	12	<u>MDFQVQIFSLLISASVSRG</u> QIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCSAS <u>STVNYMHWYQQKSGTSPKIWIYDTSKLAGV</u> PARFSGSGSWTSY SLTISSMEAEDAATYYCQWNSNPPTFGAGTKLELK	20
SYN-O2 (VH)	9	<u>ATGGTGTGGGGCTTAAGTGGGTTTTCTTTGTTGTTTTTATCAAGG</u> <u>TGTGCATTGT</u> GAGGTGCAGCTTGTTGAGTCTGGTGGAGGATT GGTGCAGCCTAAAGGATCATTGAACTCTCATGTGCCGCCTCT <u>GGTTTCACCTTCAATACCTATGCCATGCACTGGGTCCGCCAGG</u> <u>CTCCAGGAAAGGGTTTGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTA</u> <u>AAAGTAGTAATTATGCAACATATTATGCCGACTCAGTGAAAG</u> <u>ACAGATTCACCATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTA</u> <u>TCTGCAAATGAACAACCTGAAAACCTGAGGACACAGCCATGTA</u> <u>TTACTGTGTGAGACCCCTTAAGTGGTACTTCGATGTCTGGGGC</u> ACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA	30
SYN-O2 (VH)	10	<u>MVLGLKWWFFVVFYQGVHC</u> EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAAS <u>GFTFNTYAMHWVRQAPGKGLEWVARIRSKSSNYATYYADSVK</u> <u>DRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRPLKWFYFDVW</u> GTGTTVTVSS	
SYN-O2 (VL)	11	<u>ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCT</u> <u>CAGTATCCAGAGGACAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAA</u>	40

表 6 (Table 6) / その 4

		<u>TCTTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAG</u> <u>TGCCAGCTCAACTGTTAATTACATGCACTGGTACCAGCAGAA</u> <u>GTCAGGCACCTCCCCAAAATATGGATTTATGACACATCCAA</u> <u>ACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCT</u> <u>TGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAG</u> <u>ATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAAATAGTAACCCACC</u> <u>CACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA</u>	10
SYN-O2 (VL)	12	<u>MDFQVQIFSLLISASVSRGQIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCSASST</u> <u>VNYMHWYQKSGTSPKIWIYDTSKLAGVPARFSGSGSWTSYSL</u> <u>TISSMEAEDAATYYCQQWNSNPPTFGAGTKLELK</u>	
Syn-O3 (VH)	9	<u>ATGGTGTGGGGCTTAAGTGGGTTTTCTTTGTTGTTTTTATCAAGG</u> <u>TGTGCATTGT GAGGTGCAGCTTGTTGAGTCTGGTGGAGGATT</u> <u>GGTGCAGCCTAAAGGATCATTGAAACTCTCATGTGCCGCCTCT</u> <u>GGTTTCACCTCAATAACCTATGCCATGCACTGGGTCCGCCAGG</u> <u>CTCCAGGAAAGGGTTTGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTA</u> <u>AAAGTAGTAATTATGCAACATATTATGCCGACTCAGTGAAAG</u> <u>ACAGATTCACCATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTA</u> <u>TCTGCAAATGAACAACCTGAAAAGTGGAGACACAGCCATGTA</u> <u>TTACTGTGTGAGACCCCTTAAGTGGTACTTCGATGICTGGGGC</u> <u>ACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA</u>	20
SYN-O3 (VH)	10	<u>MVLGLKWVFFVVFYQGVHC</u> EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAAS <u>GFTFNTYAMHWVRQAPGKLEWVARIRSKSSNYATYYADSVK</u> <u>DRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRPLKWFYFDVW</u> <u>GTGTTVTVSS</u>	30
SYN-O3 (VL)	11	<u>ATGGATTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCTGCTAATCAGTGCCT</u> <u>CAGTATCCAGAGGA CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAAT</u> <u>CTTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGT</u> <u>GCCAGCTCAACTGTTAATTACATGCACTGGTACCAGCAGAAG</u> <u>TCAGGCACCTCCCCAAAATATGGATTTATGACACATCCAAAC</u> <u>TGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTTG</u> <u>GACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGAT</u> <u>GCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAAATAGTAACCCACCCA</u> <u>CGTTCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA</u>	40
SYN-O3	12	<u>MDFQVQIFSLLISASVSRG</u> QIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCSASS	

表 6 (Table 6) / その 5

(VL)		<u>TVNYMHWYQQKSGTSPKIWIYDTSKLASGVPARFSGSGSWTSYS</u> <u>LTSSMEAEDAATYYCQQWNSNPPTFGAGTKLELK</u>
Syn-O4 (VH)	9	<i>ATGGTGTGGGGCTTAAGTGGGTTTTCTTTGTTGTTTTTATCAAGG</i> <i>TGTGCATTGT GAGGTGCAGCTTGTTGAGTCTGGTGGAGGATT</i> <i>GGTGCAGCCTAAAGGATCATTGAAACTCTCATGTGCCGCCTCT</i> <u>GGTTTCACCTTCAATACCTATGCCATGCACTGGGTCCGCCAGG</u> <u>CTCCAGGAAAGGGTTTGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTA</u> <u>AAAGTAGTAATTATGCAACATATTATGCCGACTCAGTGAAAG</u> <u>ACAGATTCACCATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTA</u> <i>TCTGCAAATGAACAACCTGAAAAGTGGAGACACAGCCATGTA</i> <i>TTACTGTGTGAGACCCCTTAAGTGGTACTTCGATGTCTGGGGC</i> <i>ACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA</i>
SYN-O4 (VH)	10	<i>MVLGLKWVFFVVFYQGVHC</i> <u>EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAAS</u> <u>GFTFNTYAMHWVRQAPGKLEWVARIRSKSSNYATYYADSVK</u> <u>DRFTISRDDSQSMYLYQMNNLKTEDTAMYYCVRPLKWFYFDVW</u> <i>GTGTTVTVSS</i>
SYN-O4 (VL)	11	<i>ATGGATTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCT</i> <i>CAGTATCCAGAGGA CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAAT</i> <i>CTTGCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGT</i> <u>GCCAGCTCAACTGTTAATTACATGCACTGGTACCAGCAGAAG</u> <u>TCAGGCACCTCCCCAAAATATGGATTTATGACACATCCAAAC</u> <u>TGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTTG</u> <i>GACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGAT</i> <i>GCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGGAATAGTAACCCACCCA</i> <u>CGTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA</u>
SYN-O4 (VL)	12	<i>MDFQVQIFSLLISASVSRG</i> <u>QIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCSASS</u> <u>TVNYMHWYQQKSGTSPKIWIYDTSKLASGVPARFSGSGSWTSYS</u> <u>LTSSMEAEDAATYYCQQWNSNPPTFGAGTKLELK</u>

The leader sequences are italicised and the CRD regions are underlined.

【 0 2 0 7 】

先頭配列はイタリック体とされ、CRD領域は下線付きとなっている。

【 0 2 0 8 】

例 1 4

B i F C 培養システムにおける q - シヌクレインの共凝集

【 0 2 0 9 】

B i F C (bimolecular fluorescence complementation: 二分子蛍光相補性) を確立するために、培養システム, S H - S Y 5 Y 細胞が、G N - l i n k - S y n (V 1 S) 又は S y n G C (S V 2) (Massachusetts General Hospital, Charlestown, MA (マサチューセッツ ゼネラル ホスピタル, チャールストン, MA)) のパメラ マクリーン博士 (Dr. Pamela McLean) から親切なギフト) による電気穿孔を用いて遺伝子導入された。遺伝子導入された細胞は、コロニーが現出するまでの 2 - 3 週間、6 0 0 μ g / m l G 4 1 8 (Invitrogen, Carlsbad, CA (インビトロゲン カールスバッド カリフォ

10

20

30

40

50

ルニア))により選択された。この安定的な株化細胞は、200 μg/mlのG418で保守された。

【0210】

SV2細胞は、ビーナス蛍光タンパク質のC末端のシヌクレインと融合する人の -シヌクレインを安定的に過剰発現し、 μg/mlの正常マウスのIgG又は -シヌクレイン抗体(274, Syn-01, Syn-02, Syn-F1, Syn-F2, BI 1D12, F7A11)の存在において -シヌクレインをタグしたN末端のビーナスフラグメントを過剰表現するV1Sの安定した株化細胞と共培養された。

【0211】

インキュベーションの3日後、BiFC蛍光は、Olympus(Tokyo, Japan)(オリンパス社(東京,日本))のFV1000の共焦点レーザー顕微鏡により分析された。

【0212】

斑点(puncta)形成がセル内に観察された(矢頭)。斑点形成を含む細胞の個数が計数され、斑点陽性細胞の比が計算された。結果は、図18及び図19に示される。グラフは、 -シヌクレイン凝集物を含む細胞のパーセンテージを指示している。ここで説明された特定の例及び実施形態は、性質の例示したものであり、本発明を限定することを意図しない。さらなる実施形態及びその例は、本明細書を考慮して、当業者に明らかであり、本発明の特許請求の範囲に含まれる。

10

20

【図1-1】

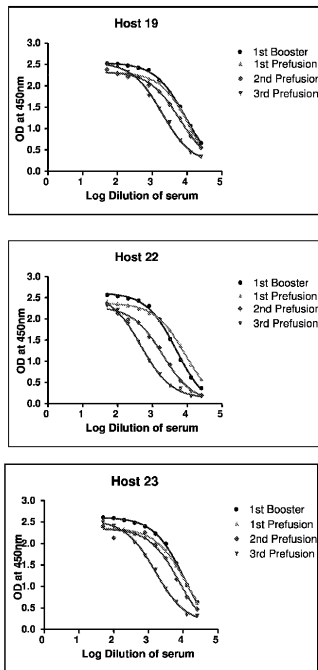


Figure 1

【図1-2】

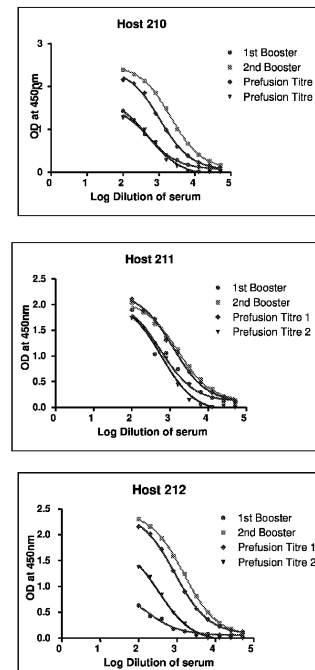


Figure 1cont.

【 2 】

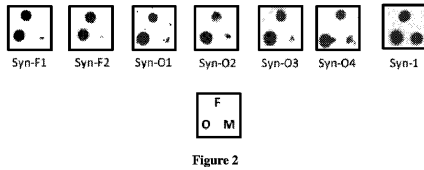


Figure 2

【 3 - 1 】

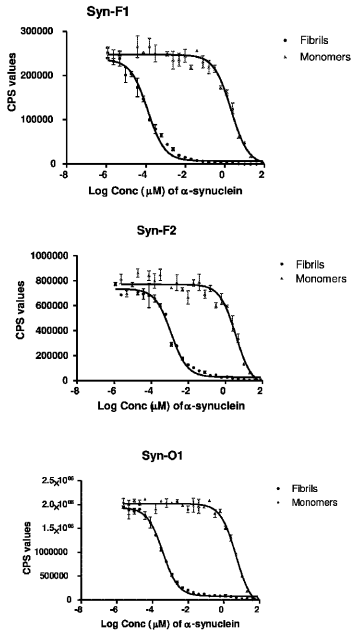


Figure 3

【 3 - 3 】

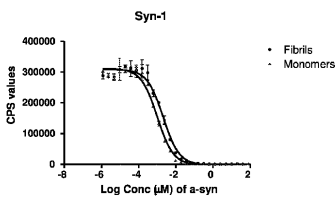


Figure 3

【 4 】

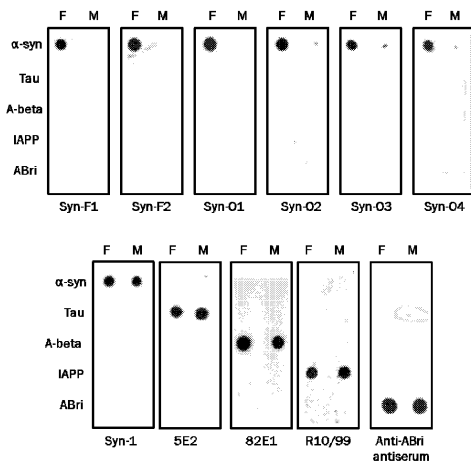


Figure 4

【 3 - 2 】

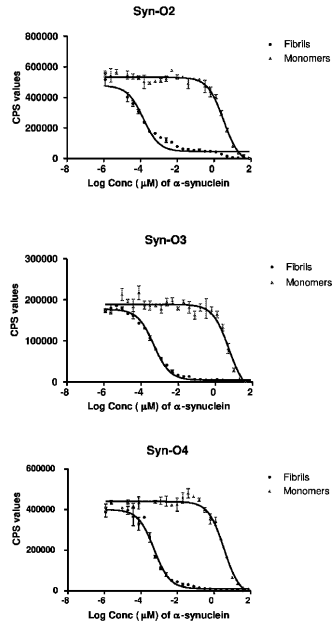


Figure 3 cont

【 5 】

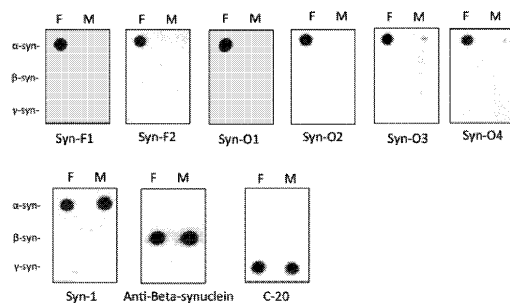


Figure 5

【 6 】

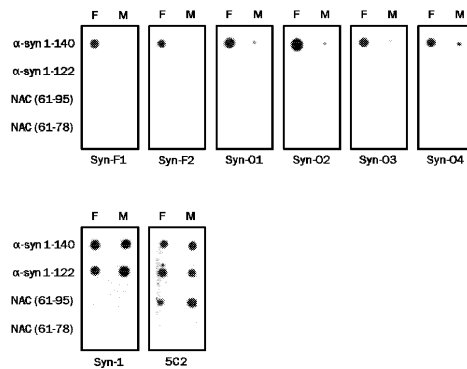
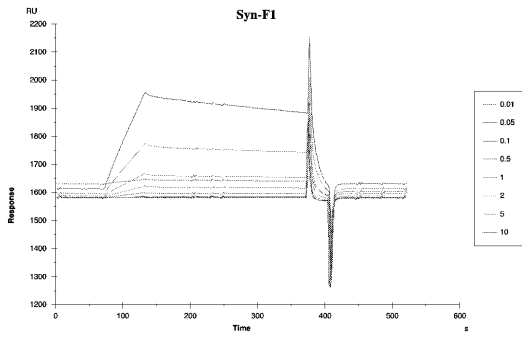


Figure 6

【 図 7 - 1 】



【 図 7 - 2 】

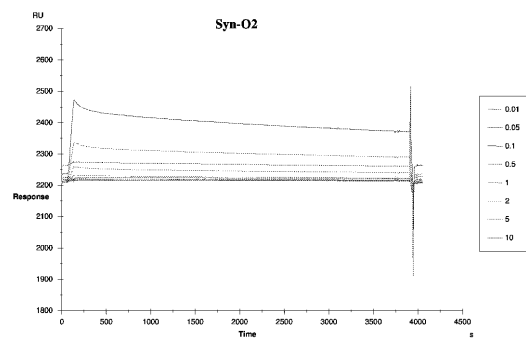
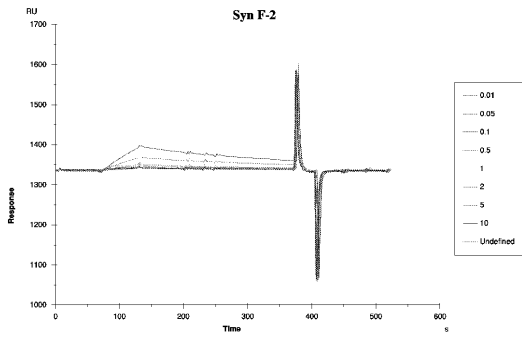
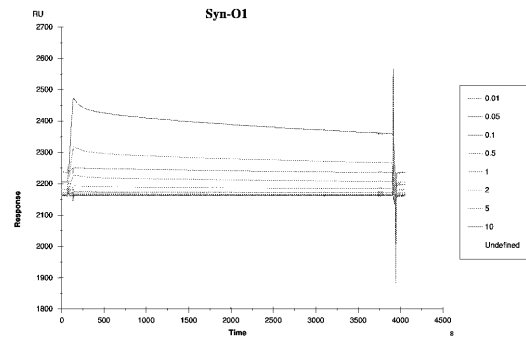
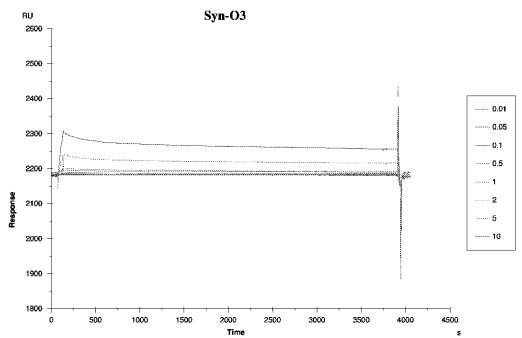


Figure 7

Figure 7 cont.

【 図 7 - 3 】



【 図 7 - 4 】

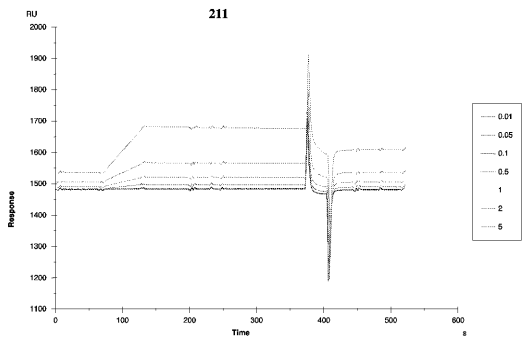


Figure 7 cont.

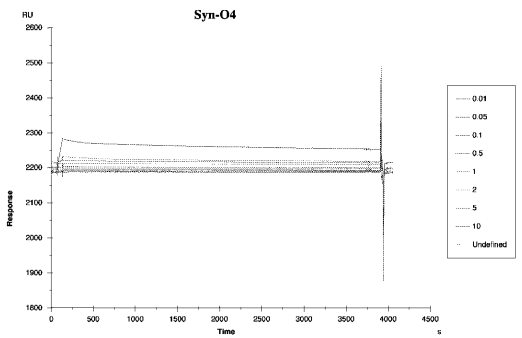


Figure 7 cont.

【 図 8 】

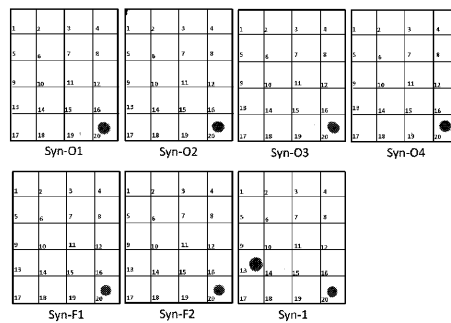
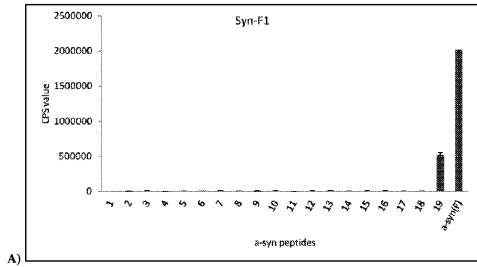
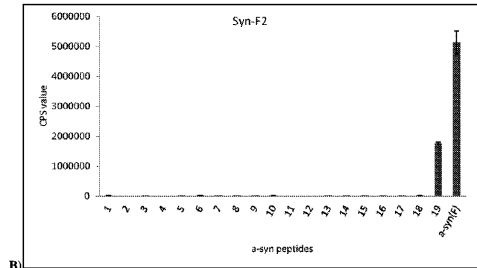


Figure 8

【 図 9 - 1 】



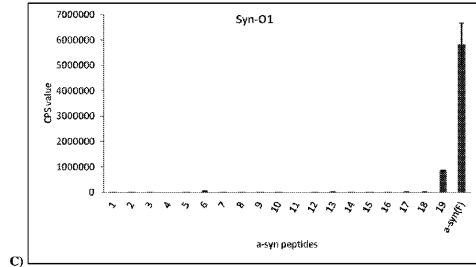
A)



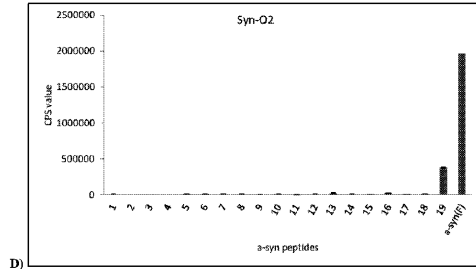
B)

Figure 9

【 図 9 - 2 】



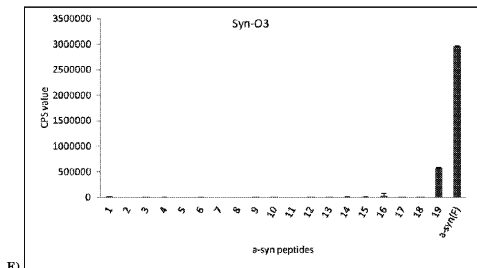
C)



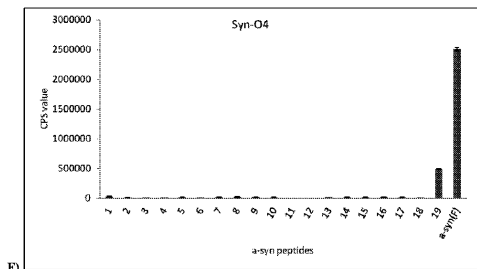
D)

Figure 9 cont.

【 図 9 - 3 】



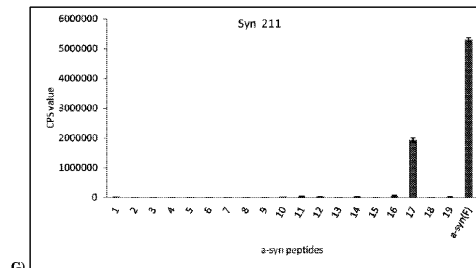
E)



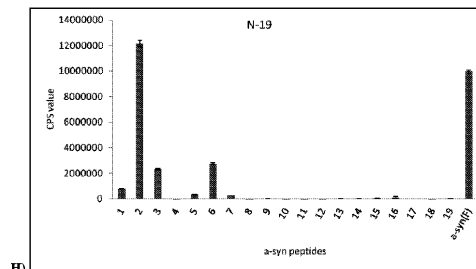
F)

Figure 9 cont.

【 図 9 - 4 】



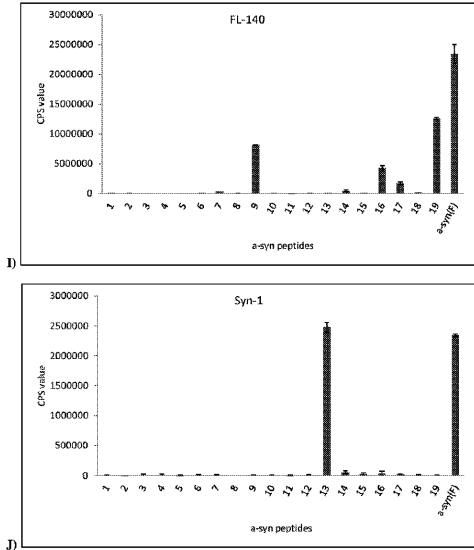
G)



H)

Figure 9 cont.

【 図 9 - 5 】



【 図 1 2 】

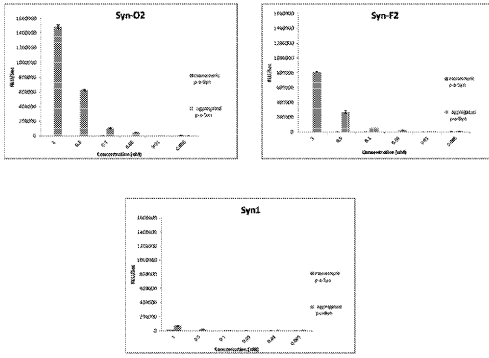


Figure 12

【 図 1 3 】

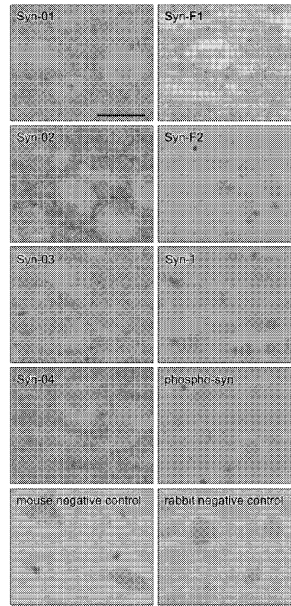


Figure 13

【 図 1 4 】

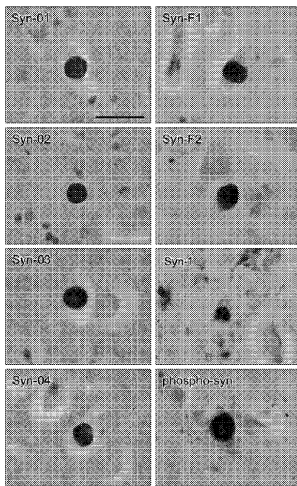


Figure 14

【 図 1 5 】

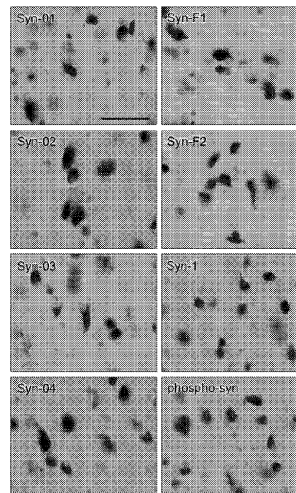
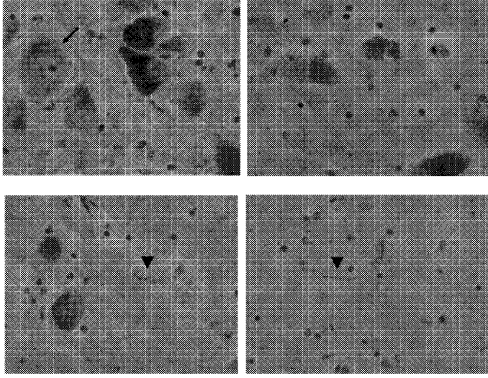


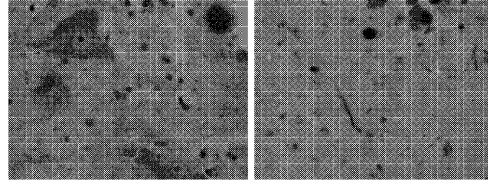
Figure 15

【 図 16 - 1 】

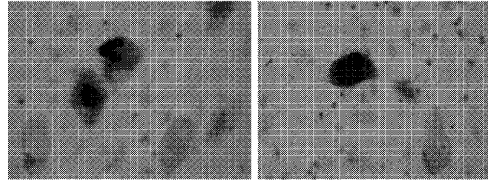


(A)
Figure 16

【 図 16 - 2 】



(B)



(C)

Figure 16 cont.

【 図 17 】

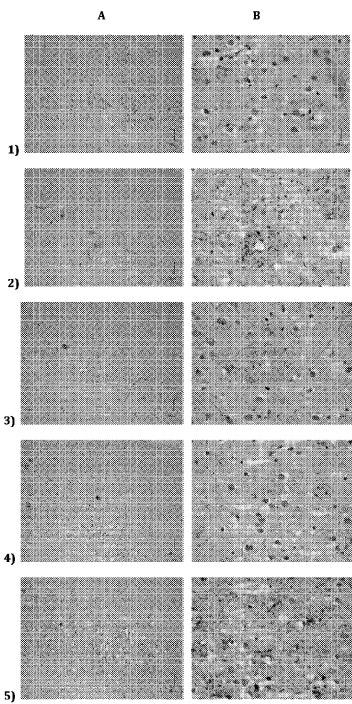


Figure 17

【 図 18 - 1 】

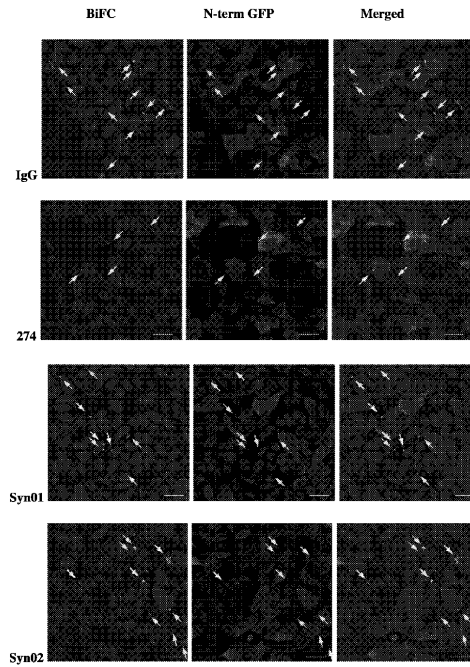


Figure 18

【 図 18 - 2 】

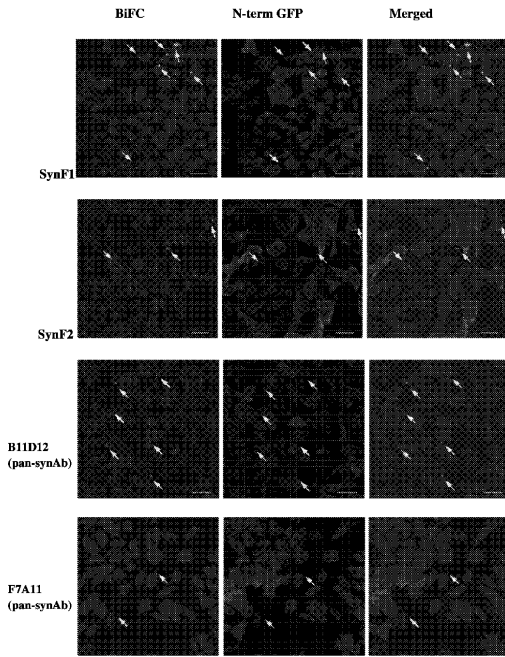


Figure 18 cont.

【 図 19 】

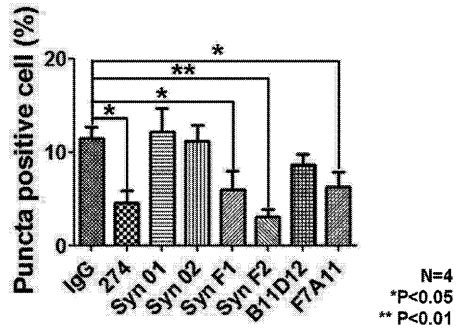


Figure 19

【 図 20 】

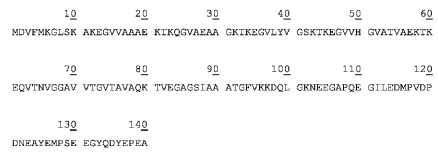


Figure 20

【 配列表 】

201651125400001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2014/059287
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C07K 16/44 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)</i>		
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)		
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) Databases: WPI, EPODOC, GenomeQuest, Patentscope, PubMed. Keywords: alpha-synuclein, antibody, aggregate, dimer, oligomer, trimer, multimer, tetramer, protofibril, fibril, monomer, c-terminal, and similar terms		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
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		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 4 June 2014	Date of mailing of the international search report 04 June 2014	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustrialia.gov.au	Authorised officer Christina van Broekhoven AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. 0262833196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. PCT/IB2014/059287
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/177972 A1 (BIOGEN IDEC INTERNAT NEUROSCIENCE GMBH et al.) 27 December 2012 see [0031-0032], [0094-0096], Examples 2-4 and Claims	1, 8-18, 20-27
X	WO 2010/069603 A1 (NEURIMMUNE THERAPEUTICS AG et al.) 24 June 2010 see Examples 1 and 3, Fig. 5 and Claims	1, 8-12, 14-18, 20-27
X	WO 2011/104696 A1 (BIOARCTIC NEUROSCIENCE AB) 01 September 2011 see Abstract, Examples and Claims	1, 8-13, 16-18, 20-27
X	WO 2009/027690 A1 (UNITED ARAB EMIRATES UNIVERSITY) 05 March 2009 see Example 8	1, 8-12, 17-18, 22-23, 25-26
X	Paleologou, K.E. et al. "Detection of elevated levels of soluble alpha-synuclein oligomers in post-mortem brain extracts from patients with dementia with Lewy bodies", Brain. 2009, vol. 132, no. 4, pp. 1093-1101 see Abstract and pp. 1097	1, 8-11, 17-18, 22-23, 25-26
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2009)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/IB2014/059287			
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 2012/177972 A1	27 December 2012	AU 2012272790 A1	09 May 2013		
		CA 2839563 A1	27 Dec 2012		
		CN 103796679 A	14 May 2014		
		EP 2723379 A1	30 Apr 2014		
WO 2010/069603 A1	24 June 2010	AU 2009328505 A1	28 Jul 2011		
		AU 2009328505 A2	11 Aug 2011		
		CA 2746778 A1	24 Jun 2010		
		CN 102317316 A	11 Jan 2012		
		EA 201190041 A1	28 Feb 2012		
		EP 2370466 A1	05 Oct 2011		
		JP 2012512634 A	07 Jun 2012		
		KR 20110110200 A	06 Oct 2011		
		MX 2011006422 A	15 Sep 2011		
		NZ 593964 A	21 Dec 2012		
		US 2011300077 A1	08 Dec 2011		
WO 2011/104696 A1	01 September 2011	AU 2011219414 A1	06 Sep 2012		
		CA 2789963 A1	01 Sep 2011		
		CN 102869680 A	09 Jan 2013		
		EP 2539366 A1	02 Jan 2013		
		JP 2013525266 A	20 Jun 2013		
		RU 2012140954 A	10 Apr 2014		
		US 2012308572 A1	06 Dec 2012		
		US 8632776 B2	21 Jan 2014		
WO 2009/027690 A1	05 March 2009	US 2013309251 A1	21 Nov 2013		
		CA 2697361 A1	05 Mar 2009		
		EP 2195335 A1	16 Jun 2010		
		EP 2195335 B1	21 Aug 2013		
		HK 1145087 A1	29 Nov 2013		
		JP 2010537962 A	09 Dec 2010		
		US 2010284934 A1	11 Nov 2010		
		US 8613905 B2	24 Dec 2013		
		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 2009)			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members		International application No. PCT/IB2014/059287	
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
<small>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 2009)</small>			

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P 25/18	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 P	25/18	
G 0 1 N 33/531	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
		G 0 1 N	33/531	A

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

Fターム(参考) 4C085 AA13 AA14 BB11 CC28 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA45 DA76 EA21 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2016511254A5	公开(公告)日	2017-03-30
申请号	JP2015559593	申请日	2014-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	阿联酋大学		
申请(专利权)人(译)	阿拉伯联合酋长国ニバー花旗		
[标]发明人	エルアグナフオマル		
发明人	エル-アグナフ,オマル		
IPC分类号	C07K16/18 C07K16/46 C12N15/09 A61K39/395 A61P25/28 A61P25/16 A61P25/00 A61P25/18 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	A61P25/00 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/28 C07K16/18 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/92 G01N33/6896 C07K2317/565		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C07K16/46 C12N15/00.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61P25/28 A61P25/16 A61P25/00 A61P25/18 G01N33/53.D G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA15 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC28 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA45 4H045/DA76 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	13/781158 2013-02-28 US 14/138347 2013-12-23 US		
其他公开文献	JP2016511254A JP6261621B2		

摘要(译)

本发明描述了具有用于 α -突触核蛋白的聚集形式的高亲和力和 α -突触核蛋白的单体形式具有低亲和力的抗体。该抗体可用于诊断神经退行性疾病。 .The