

(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2005-528588

(P2005-528588A)

(43) 公表日 平成17年9月22日(2005.9.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/15	GO 1 N 33/15	Z
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543	5 4 1 A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2003-568402 (P2003-568402)	(71) 出願人	504308604 ランカスター大学 The University of L ancaster イギリス国、ランカスター・エル・エー・ 1・4・ワイ・ダブリュウ (番地なし)
(86) (22) 出願日	平成15年2月14日 (2003. 2. 14)	(74) 代理人	100086324 弁理士 小野 信夫
(85) 翻訳文提出日	平成16年9月17日 (2004. 9. 17)	(74) 代理人	100125748 弁理士 高橋 徳明
(86) 国際出願番号	PCT/GB2003/000677	(72) 発明者	オールソップ デビット イギリス国、ランカシャー・エル・エー・ 6・1・エヌ・エフ、カーンフォース、バ ートン・イン・ケンダル、モウブレイ・ド ライブ・1
(87) 国際公開番号	W02003/069332		
(87) 国際公開日	平成15年8月21日 (2003. 8. 21)		
(31) 優先権主張番号	0203446.0		
(32) 優先日	平成14年2月14日 (2002. 2. 14)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シヌクレイン関連疾患の検出および／またはモニタリング

(57) 【要約】

本発明は患者においてシヌクレイン症を診断する方法、また、シヌクレイン症を治療する目的で患者に投与した治療薬の有効性をモニタリングする方法を提供する。本方法は患者から採取した非脳体液サンプルをそのサンプル中のシヌクレインの存在および／または量について解析することを含んでなる。シヌクレインは凝集シヌクレインであってもよい。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者においてシヌクレイン症を診断する方法であって、患者由来の非脳体液サンプルを、そのサンプル中のシヌクレインの存在および/または量について解析することを含んでなる方法。

【請求項 2】

シヌクレイン症を治療する目的で投与した治療薬の有効性をモニタリングする方法であって、動物から採取した非脳体液サンプルをシヌクレインの存在および/または量について解析することを含んでなる方法。

【請求項 3】

非脳体液サンプルが全血、血清、血漿、尿、リンパ液または唾液を含んでなる群から選択される非脳体液である、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

解析されるシヌクレインが可溶型（天然型）もしくは凝集型のシヌクレイン、変異型、硝化型、リン酸化型もしくはグリコシル化型のシヌクレイン、シヌクレイン断片、その他の改変された誘導体、または他の分子との複合体の一部として見出されるシヌクレインを含んでなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

シヌクレイン症がパーキンソン病、レビー小体を伴う痴呆、アルツハイマー病、多系統萎縮症および癌を含んでなる群から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

シヌクレインの解析が、 - シヌクレイン、 - シヌクレインまたは - シヌクレインの解析である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

シヌクレインの解析が、 - シヌクレインの解析である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

シヌクレインの存在の解析が、ラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、サンドイッチイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、沈降反応、ゲル免疫拡散法、凝集法、プロテイン A イムノアッセイ、免疫電気泳動法、電気泳動およびウエスタンブロット法、または試験されるサンプル中のシヌクレインタンパク質および/またはそれらの関連誘導体の量を測定することができるその他の技術を含んでなる群から選択される方法によって行われる、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

i) 前濃縮ステップを実施するための、シヌクレインと結合可能な、またはシヌクレインとの複合体の一部である分子と結合可能な、固相と結合しているシヌクレイン結合種を用いたサンプルの処理；

ii) サンプルからの固相の除去；および所望により

iii) 解析に向けてシヌクレインを比較的少量の液体に放出させるための固相の処理をさらに含んでなる、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記種が結合されている固相が、磁性ビーズまたはその他の適したマトリックスである、請求項 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は「シヌクレイン（synucleins）」と呼ばれるタンパク質の異常（例えば、発現されるタンパク質のレベルおよび/または性質における異常）に関連した疾病

10

20

30

40

50

の検出および/またはモニタリングに関する。

【背景技術】

【0002】

シヌクレインは神経組織で高レベルで発現される小さなタンパク質（約14 kDa）のファミリーである。このファミリーに属する3種類のシヌクレイン（ α -、 β -、および γ -シヌクレイン）は、異なる染色体に存在する3つの遺伝子の産物である（1）。1種類以上のシヌクレインの異常に関連した疾患を本明細書において「シヌクレイン症（synucleinopathies）」と呼ぶ。

【0003】

シヌクレイン症としては、いくつかの重大な神経変性状態、例えば、パーキンソン病（PD）、レビー小体を伴う痴呆（DLB）、アルツハイマー病（AD）および多系統萎縮症（MSA）が挙げられる。シヌクレインはまた、ヒト癌における種々の腫瘍（例えば、乳房、卵巣）においても異常に高いレベルで発現される（2）。 10

【0004】

このファミリーの β -シヌクレインメンバーの、神経変性疾患の病気の発生における関与を最初に示したのは、アルツハイマー病（AD）に罹患した脳の精製アミロイドのタンパク質分解断片の1つの単離に基づいてであった（3）。この β -シヌクレイン断片は、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）不溶性物質の約10%に相当し、ADアミロイドの非A β -成分（NAC）と名づけられた。アミノ酸配列決定では、配列決定に使用した酵素の特異性のために、N末端残基を確実に指定できなかったが、NACが少なくとも35アミノ酸を含んでなることが示された。これらの35アミノ酸は後に、140アミノ酸前駆体（NACP）の残基61~95に相当することが分かった。NACPは β -シヌクレインと呼ばれるタンパク質と同一であることが判明した。PDとの明らかな関連は、この疾患の稀な遺伝性のものにおいて β -シヌクレイン遺伝子中に2つの異なる突然変異が見られると分かったことで確立された。1つの突然変異、 β -シヌクレイン（A53T）は、あるイタリア人およびギリシャ人家系で見出され、Ala⁵³のThrへの置換を引き起こしている（4）。もう1つの突然変異、 β -シヌクレイン（A30P）は、ドイツ系家系で見出され、Ala³⁰のProへの変化を引き起こしている（5）。 20

【0005】

「レビー小体（Lewy bodies）」および「レビー神経突起（Lewy neurites）」として知られている脳の病変が、PDおよびDLB患者の脳における主要な病理学的特徴を成している。これらのレビー小体およびレビー神経突起は、異常な微小繊維形態の α -シヌクレインを含有している（6）。さらなる免疫組織化学的および免疫電子顕微鏡検査によって、 α -シヌクレインがその他の神経変性疾患における病理学的病変とも関連しており、MSAにおいて見出されるグリア細胞質内封入体などの非神経細胞に関係していることもあることが分かった（7）。 α -シヌクレインが関係するこれらおよびその他の神経変性疾患はまとめて「シヌクレイン症」として知られている。PDおよびDLBでは、 α -および β -シヌクレインはシナプス前軸索末端で検出されており、 β -シヌクレインは異常な軸索球状物様病変で検出されている（7）。 30

【0006】

シヌクレイン症の基礎的な疾病メカニズムの理解が達成されるという進歩があるにもかかわらず、これらの疾病の診断に有用な方法を早急に開発しなければならない必要性は依然残されている。このような診断方法の必要性は、生存中におけるPDの正確な診断が驚くほど難しく、約75%の割合でしか正確な判断を下していないことを示す研究によって十分証明されている（8、9）。このことは臨床的観点からだけでなく、これが臨床試験と疫学的研究との整合性に影響を及ぼすことから深刻な問題である。 40

【0007】

上記の証拠に基づき、シヌクレインの検出は、これらの状態を診断するための優れたマーカーであるといえる。神経変性を患う患者では、シヌクレインタンパク質が脳内に維持されていると考えられている。結果として、神経変性障害の診断を行うために、シヌクレ 50

インの存在あるいは不在について脳脊髄液（ＣＳＦ）を解析する技術が提案されている。

【０００８】

このように、例えば、WO-A-00/02053（Innogenetics N.V.）では、特に、神経変性状態の鑑別診断を目的としたＣＳＦ中の - シヌクレインの検出を開示している。より一般的なレベルでは、WO-A-00/02053に、血液、リンパ液、尿およびＣＳＦなどの体液中の神経変性の広範な選択マーカー（単に - シヌクレインだけでない）の検出が開示されている。WO-A-00/02053には、ＣＳＦ以外のいずれかでの - シヌクレイン、またはさらに言えば、その他のシヌクレインの検出について特に開示しておらず、参照した最近の思想を支持している。

【０００９】

しかしながら、神経変性状態を検出することを目的としたシヌクレインの存在についてのＣＳＦの解析はいくつかの不都合な点を伴う。具体的には、ＣＳＦを収集する技術は、サンプルを採取するものにとっては技術的に難しいものであり、また、多くの場合、サンプルを提供するものに対して不快感を与える。

【００１０】

同様の不都合はまた、投与した薬剤の有効性をモニタリングすることが望まれる場合にも存在する。このようなモニタリングは、例えば、特定患者の治療、あるいはシヌクレイン症の治療用薬剤の適合性を評価するための試験モデルにおいて薬剤の有効性を評価するために行われ得る。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１１】

本発明の目的は、先行技術に関連した不都合な点を克服することである。

【課題を解決するための手段】

【００１２】

本発明の第１の態様によれば、患者由来の非脳体液サンプルを、そのサンプル中のシヌクレイン（またはその改変型の１種）の存在および／または量について解析することを含んでなる、患者においてシヌクレイン症を診断する方法が提供される。患者はヒトまたは非ヒト（例えば、非ヒト哺乳類）であり得る。

【００１３】

シヌクレイン症の診断は、解析の結果に基づいて実施できる。

【００１４】

本発明の第２の態様によれば、動物から採取した非脳体液サンプルをシヌクレイン（またはその改変型の１種）の存在および／または量について解析することを含んでなる、シヌクレイン症を治療する目的で投与した治療薬の有効性をモニタリングする方法が提供される。動物はヒトまたはその他の動物（例えば、非ヒト哺乳類）であり得る。

【００１５】

治療薬の有効性は、実施した解析の結果を用いてモニタリングできる。有効な治療薬は、採取したサンプル中に存在するシヌクレイン量を参照値と比べて減少させるものであり得る。参照値は、治療薬の投与前に同じ患者から採取したサンプル中のシヌクレイン量を表してもよいし、または処置を施していない患者由来のサンプル中に見出されるシヌクレインの標準的な量を代表するものであってもよく、または効果のない薬剤を投与された動物モデルから採取したサンプル中に見出されるシヌクレイン量を表してもよい。見出されるシヌクレインの「標準的な」量は、適した対照群から採取したサンプルの解析によって決定することができる。

【００１６】

本発明は最近の思想に反して、シヌクレインがシヌクレイン症患者由来の非脳体液サンプル（例えば、血液、血清、血漿、尿、リンパ液および唾液）に存在しているという驚くべき発見に基づいている。当然のことながら、本発明にしたがって解析を行うために非脳体液サンプルを収集することは、先行技術で提案されたようにＣＳＦサンプルの解析を必

10

20

30

40

50

要とする方法よりもかなり好都合である。

【0017】

最も好ましくは、サンプルは、非脳体液、例えば、全血、血清、血漿、尿、リンパ液または唾液である。

【0018】

解析されるシヌクレインは、可溶型（天然型）もしくは凝集型のシヌクレインであってもよいし、または変異型、硝化型、リン酸化型もしくはグリコシル化型、あるいはその他の改変型であってもよい。シヌクレインは、シヌクレイン断片であってもよいし、または他の分子との複合体の一部として見出されるものであってもよい。

【0019】

サンプル中の凝集シヌクレインの存在または量について解析することが特に好ましい。例えば、凝集シヌクレインの存在、または全ての患者に見られる「バックグラウンド」レベル（“background level”）よりも高いレベルの凝集シヌクレインの存在を、シヌクレイン症を患う患者由来のサンプルと、そうではない健康な患者由来のサンプルとを見分けるために使用できる。当然のことながら、診断またはモニタリングは、サンプル中のシヌクレインの凝集度の増加、および/またはサンプル中の凝集したシヌクレインの比率の増加に基づいて行うこともできる。

【0020】

本発明は可溶型または前段で記載したその他の型いずれかの、 - 、 - または - シヌクレインの検出に適用できる。

【0021】

本発明は特に、可溶型または前記のその他の型いずれかの、 - シヌクレインの検出に適用できる。

【0022】

診断および/またはモニタリングされるシヌクレイン症は、例えば、PD、DLB、MSA、ADまたは癌であり得る。

【0023】

本発明の方法は、アッセイの対象であるサンプル中のシヌクレインの量を決定すること、およびその量を、健全な（すなわち、シヌクレイン症ではない）個体から採取したサンプルおよび既知の病期のシヌクレイン症罹患個体から採取したサンプルから予め決定しておいた参照値と比較することによって行うことができる。シヌクレイン症患者由来の非脳体液の硝化型、リン酸化型または凝集型のシヌクレインのレベルは、健全な個体由来の体液と比べて上昇すると推測できる。

【0024】

本発明の第1の態様の方法は、いくつかの異なる目的で診断を行うために使用できる。例えば、本方法を、患者がシヌクレイン症に罹患しているか否かを判定するための患者の診断に適用することができる。あるいは、この方法を、シヌクレイン症の進行または程度を判定するための患者の診断に適用することができる。

【0025】

同様に、本発明の第2の態様の方法もまた、いくつかの異なる目的で、例えば、シヌクレイン症に罹患している患者（ヒトまたは非ヒト）の治療のために投与される薬剤の有効性のモニタリングのために使用できる。本発明の第2の態様の方法の別の用途は、試験モデルまたはスクリーニング、例えば、試験動物モデルまたはヒト臨床試験においてシヌクレイン症の可能性ある治療法として投与される薬剤の有効性をモニタリングすることにある。

【0026】

本発明の方法は、いくつかの検出方法のうちいずれか1つによって達成できる。検出方法は、例えば、ラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、サンドイッチイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、沈降反応、ゲル免疫拡散法、凝集法、プロテインAイムノアッセイ、免疫電気泳動法、電気泳動およびウエスタンブロット法、ま

10

20

30

40

50

たは試験されるサンプル中のシヌクレインタンパク質および/またはそれらの関連誘導体の量を測定することができるその他の技術であり得る。

【0027】

本方法は、例えば、シヌクレインと結合可能な固相と結合しているシヌクレイン結合種を用いたサンプルの処理を含み得る。このような固相に結合されている種を用いて、比較的多量の原サンプルに存在するシヌクレインがその種と結合され得る前濃縮ステップを実施できる。次いで、固相をサンプルと分け、解析に向けてシヌクレインを比較的少量の液体に放出させるように処理することができる。

【0028】

抗体が結合している固相は、例えば、磁性ビーズであり得る。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0029】

本発明の好ましい実施形態では、シヌクレイン結合種は、シヌクレインと特異的に結合可能な抗体であり得る。本発明による使用に適した抗体の例としては、以下の抗体が挙げられる：

抗体 211： - シヌクレインのアミノ酸残基 121 ~ 125 を認識するもの；

抗体 N-19： - シヌクレインの N 末端領域を認識するもの；

抗体 FL-140：全長 - シヌクレインに対して作製されたもの；

抗体 C20：、 および - シヌクレインの C 末端領域を認識する入手可能な型；

(全て Santa Cruz Biotechnology 社製)

20

および

抗体 LB509： - シヌクレインのアミノ酸残基 115 ~ 122 を認識するもの

(Zymed Laboratories から入手可能)。

【0030】

あるいは、シヌクレイン結合種は、例えば、シヌクレインと特異的に結合可能なタンパク質断片、またはシヌクレインとの複合体の一部である別の分子に対する抗体であってもよい。

【0031】

(例えば、前濃縮ステップにおける生成物中の)シヌクレインの存在は、シヌクレインに対して反応性のある抗体を用いた免疫プロット法を実施することにより検出できる。

30

【0032】

本発明の別の実施形態では、原サンプル中または前濃縮ステップにおける生成物中いずれかのシヌクレインの存在を、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) を実施することにより検出できる。可溶性シヌクレインの存在の検出に適したこの ELISA 実施形態の例では、一次 (捕捉) 抗体および二次 (検出) 抗体は、シヌクレイン内の異なるエピトープを認識する抗体であり得る。あるいは、凝集型のシヌクレインを検出する場合には、シヌクレイン内に 1 つだけ存在するエピトープを認識する単一抗体を、捕捉抗体および検出抗体の双方として使用できる。リン酸化型の可溶性シヌクレインの存在を検出するには、捕捉抗体はシヌクレインに対して反応性を有する抗体であり得、検出抗体はリン酸化されたアミノ酸を認識するものであり得る。当然のことながら、捕捉抗体および検出抗体の特異性は逆であってもよく、そのような場合でもアッセイの有効性は維持される。硝化型の可溶性シヌクレインの存在を検出するには、捕捉抗体はシヌクレインに対して反応性を有する抗体であり得、検出抗体は硝化されたアミノ酸を認識する抗体であり得る。当然のことながら、捕捉抗体および検出抗体の特異性は逆であってもよく、そのような場合でもアッセイの有効性は維持される。

40

【0033】

グリコシル化種のシヌクレインの存在は、適した脱グリコシル化酵素の使用によって、または化学的な脱グリコシル化方法によって調べることができる。例えば、サンプルの SDS PAGE によって得られたバンドの相対重量を、シアリダーゼおよびエンド-O-グリコシダーゼとともにインキュベート (incubate) した同じ材料のサンプルの

50

SDS PAGEによって得られたバンドの重量と比較することができる。バンドの分子量の変化によって、グリコシル化型の存在が示される。ヒト脳がシムラ (Shimura) らによって確認された - シヌクレインの 22 kDa 0- 結合型グリコシル化イソ型 (Sp 22) を含んでいることは知られている (10)。

【 0034 】

シヌクレインアッセイによって検出された物質は、例えば、ゲルまたはプロットから溶出したタンパク質のタンデム質量分析によって、あるいはN末端アミノ酸配列データの解析によってさらに調べることができる。

【 0035 】

本発明を以下の実施例、プロトコール、ならびに実施例 1 および 2 の結果を示す添付図面の図 1 ~ 4 を参照してさらに説明する。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

【 実施例 1 】

【 0036 】

免疫沈降、ゲル電気泳動およびウエスタンブロット法によるヒト血漿およびCSF中の - 、 - 、および - シヌクレインタンパク質の検出

a) ダイナビーズ (Dynabeads) :

組換えプロテインA (Dynal Biotech) でコーティングした磁気ポリスチレンビーズを、製造業者の使用説明書に従って、捕捉抗体を用いて誘導体化した。血漿またはCSF由来のシヌクレインの捕捉に用いた抗体は、通常、Santa Cruz Biotechnology社製の / / - シヌクレイン (FL - 140) であったが、 - 、 - 、または - シヌクレインに対するその他の抗体を同目的に使用できる。ビーズを何度も使用する場合には、製造業者の使用説明書に従って、捕捉抗体をダイナビーズと共有結合によって架橋させた。使用前に、ビーズを 1.5 ml プラスチック試験管内で 0.1 M リン酸バッファー (pH 8.1) で十分に洗浄し、洗浄後は、試験管を Dynal 社製の磁気性部分濃縮器 (Magnetic Partial Concentrator) (Dynal MPC) に入れてビーズを試験管壁に集めた。

【 0037 】

b) 免疫沈降 :

- 、 - 、および - シヌクレインタンパク質 (1 ml) を含むCSFまたは血漿サンプルを、抗体コーティングビーズに直接添加し、4 で一晩攪拌した。0.1 M リン酸バッファー (pH 8.1) で十分に洗浄した後、それらを 4 X NUPAGE LDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動サンプルバッファー (Invitrogen) 中で煮沸することによって免疫沈降した物質をビーズから溶出させた。

【 0038 】

c) ゲル電気泳動 :

ビーズからの溶出物を、中性 pH SDS - NUPAGE 4 ~ 12 % ビス - トリスアクリルアミドゲル (Invitrogen 社製) での電気泳動により分画した。既知の分子量のタンパク質マーカーを用いてゲルに目盛りをつけた。

【 0039 】

d) ウエスタンブロット法 :

ゲルを泳動した後、分離したタンパク質を Invitrogen Xセル II ブロットモジュール (Xcell II Blot Module) (200 V、125 mA にて、1時間) を用いてニトロセルロースメンブレンに転写した。転写後、メンブレンを PBS / Tween 20 (PBST) で十分に洗浄し、その後、ブロッキングバッファー (5 % 乾燥粉乳を含む PBS) で室温にて1時間ブロッキングした。種々の異なる抗体を用いて、プロット上の、 - 、 - 、および - シヌクレインタンパク質、またはそれらの改変型 (例えば、硝化型またはリン酸化型) を検出した。適した抗体の例としては、 - シヌクレイン (C - 20)、 - シヌクレイン (C - 20) および - シヌクレイン (C - 20)、 - 、 - および - シヌクレイン (FL - 140

)、全てSanta Cruz Biotechnology社製、またはニトロチロシンまたはホスホセリンに対する抗体(Sigma)が挙げられる。メンブレンを一次抗体とともに4で一晚インキュベートした後、PBS/Tween 20で十分に洗浄し、その後、一次抗体の免疫グロブリン種に向けられた西洋わさびペルオキシダー共役二次抗体(secondary horseradish peroxidase conjugated antibody)とともにインキュベートした(室温にて1時間)。メンブレンをPBSTで十分に洗浄し、ペルオキシダーゼ活性を化学発光法(ECL)によって検出した。

【0040】

e) 結果:

10

図1は、前濃縮を -シヌクレイン(FL140)に対して反応性を有する抗体を用いて実施し、同じ抗体を用いて検出を行った、ヒト血漿サンプルのウエスタンブロット法による解析の結果を示す。レーン1は組換え -シヌクレインタンパク質を含み、レーン2はヒト血漿を含んでいる。

【0041】

図2は、前濃縮を -シヌクレイン(FL140)に対して反応性の抗体を用いて実施し、同じ抗体を用いて検出を行った、ヒト血漿サンプルのウエスタンブロット法による解析の結果を示す。レーン1は組換え -シヌクレインタンパク質を含み、レーン2はヒト血漿を含んでいる。

【0042】

20

図2は、前濃縮を -シヌクレイン(C20)に対して反応性を有する抗体を用いて実施し、同じ抗体を用いて検出を行った、ヒト血漿サンプルのウエスタンブロット法による解析の結果を示す。レーン1は組換え -シヌクレインタンパク質を含み、レーン2は組換え -シヌクレインタンパク質を含み、レーン3は組換え -シヌクレインタンパク質を含み、レーン4はヒト血漿を含んでいる。

【0043】

図3は、前濃縮を -シヌクレイン(C20)に対して反応性を有する抗体を用いて実施し、 -シヌクレインに対する抗体(C20)を用いて検出を行った、ヒト血漿サンプルのウエスタンブロット法による解析の結果を示す。レーン1はヒト血漿を含み、レーン2は組換え -シヌクレインタンパク質を含み、レーン3は組換え -シヌクレインタン

30

【実施例2】

【0044】

シヌクレイン症患者由来の血漿中の -シヌクレインの検出

次の試験により、シヌクレイン症を患うヒト患者の血漿をはじめとする血漿中のシヌクレインを検出する能力を例示し、その結果を図4(パネルA~E)に示す。

【0045】

実施例1に記載の方法に従って、シヌクレイン症(パーキンソン病およびレビー小体を伴う痴呆)を患う患者由来の血漿、および年齢をマッチングさせた対照患者由来の血漿を、前濃縮ステップを達成するため -シヌクレインに対して反応性を有する抗体と架橋している磁性ビーズ(以下で列挙)とともにインキュベートした。

40

【0046】

得られた免疫沈降物をSDS-PAGEにより分画し、(上記の方法に従って)以下で説明する抗体を用いてウエスタンブロット法を実施した。洗浄剤であるSDSは、この方法で調べられるサンプル中に存在する可能性のあるシヌクレイン凝集物を分解するため、以下に示す結果は、試験したサンプル中の凝集シヌクレインの存在または不在に関する情報は提供しないが、記載した方法の、非脳体液サンプル中に存在するシヌクレインを同定する能力を例示するよう働く。

【0047】

ウエスタンブロットを行ったゲルには、外来組換えヒト -シヌクレインおよび/また

50

は正常ヒト脳溶解物（脳組織内では - シヌクレインが高レベルで見出されるため）から選択した - シヌクレイン陽性対照物質を含む少なくとも1つのレーンを含めた。

【0048】

実施例2.1および2.2の場合には、ゲルに外来組換えヒト - シヌクレインおよび - シヌクレインを含むレーンをさらに含めた。これらのレーンのタンパク質に標識がないことから、ウエスタンブロット法に使用した抗体は - シヌクレインと特異的に結合可能なものであって、他のシヌクレインイソ型とは結合しないということが示される。

【0049】

2.1 抗体FL-140を用いた免疫沈降；抗体LB509を用いたウエスタンブロット法

一次抗体FL-140を用いて免疫沈降を行った。抗体LB509を用いてウエスタンブロット法を実施した。この結果を図4Aのウエスタンブロットメンブレンの写真で示す。それについては以下のとおりである：

レーン1： 6 ng 組換えヒト - シヌクレイン
 レーン2： 6 ng 組換えヒト - シヌクレイン
 レーン3： 6 ng 組換えヒト - シヌクレイン
 レーン4： 3 μg 正常ヒト脳溶解物
 レーン5、6、13： パーキンソン病患者由来の血漿
 レーン7、8： DLB患者由来の血漿
 レーン9～12, 14： 年齢をマッチングさせた対照患者由来の血漿

10

20

【0050】

レーン13および14は、組換えヒト - シヌクレイン（1 μg - シヌクレイン / ml 抗体）を用いて予め吸着させておいたLB509を用いて調べられた。これら2つのレーンで結合が認められないことから、LB509抗体の - シヌクレインに対する特異性が示される。

【0051】

これらの結果から、シヌクレイン症患者および対照患者双方の血漿サンプル、ならびに陽性対照（外来 - シヌクレインおよび脳溶解物）中の内生シヌクレインを検出するアッセイの能力が示される。

【0052】

2.2 抗体FL-140を用いた免疫沈降；抗体211を用いたウエスタンブロット法
 一次抗体FL-140を用いて免疫沈降を行い、抗体211を用いてウエスタンブロット法を実施したことを除き、実施例2.1を繰り返した。この結果を図2Bに示す。

30

【0053】

レーン13および14は、組換えヒト - シヌクレイン（1 μg - シヌクレイン / ml 抗体）を用いて予め吸着させておいた抗体211を用いて調べられた。これら2つのレーンで結合が認められないことから、211抗体の - シヌクレインに対する特異性が示される。

【0054】

これらの結果から、対照患者およびシヌクレイン症患者血漿サンプル、ならびに陽性対照中の内生シヌクレインを検出するアッセイの能力が示される。

40

【0055】

2.3 抗体FL-140を用いた免疫沈降；抗体N-19を用いたウエスタンブロット法

一次抗体FL-140を用いて免疫沈降を行った。抗体N-19を用いてウエスタンブロット法を実施した。この結果を図4Cに示し、調べたサンプルを以下に記載する：

レーン1、2、7： パーキンソン病患者由来の血漿
 レーン3、4、8、9： 年齢をマッチングさせた対照患者由来の血漿
 レーン5： 3 μg 正常ヒト脳溶解物
 レーン6、10： 6 ng 組換えヒト - シヌクレイン

50

【0056】

レーン7～10は、組換えヒト α -シヌクレイン(1 μ g α -シヌクレイン/ml抗体)を用いて予め吸着させておいた抗体N-19を用いて調べられた。これら2つのレーンで結合が認められないことから、N-19抗体の α -シヌクレインに対する特異性が示される。

【0057】

これらの結果から、血漿サンプル、ならびに陽性対照中の内生シヌクレインを検出するアッセイの能力が示される。

【0058】

2.4 抗体211を用いた免疫沈降；抗体FL-140を用いたウエスタンブロット法 10
一次抗体FL-140を用いて免疫沈降を行った。抗体211を用いてウエスタンブロット法を実施した。この結果を図4Dに示し、調べたサンプルを以下に記載する：

レーン1、5、6： パーキンソン病患者由来の血漿
レーン2、3、7、8：年齢をマッチングさせた対照患者由来の血漿
レーン4、9： 6ng 組換えヒト α -シヌクレイン
レーン10： 3 μ g 正常ヒト脳溶解物

【0059】

レーン1～4は、組換えヒト α -シヌクレイン(1 μ g α -シヌクレイン/ml抗体)を用いて予め吸着させておいた抗体FL-140を用いて調べられた。これら2つのレーンで結合が認められないことから、FL-140抗体の α -シヌクレインに対する特 20
異性が示される。

【0060】

これらの結果から、患者の血漿サンプル中の内生シヌクレインを検出し、ならびに陽性対照中のシヌクレインを検出するアッセイの能力が示される。

【0061】

2.5 抗体211を用いた免疫沈降；抗体N-19を用いたウエスタンブロット法
一次抗体211を用いて免疫沈降を行った。抗体N-19を用いてウエスタンブロット法を実施した。この結果を図4Eに示し、調べたサンプルを以下に記載する：

レーン1、10： 6ng 組換えヒト α -シヌクレイン
レーン2： 3 μ g 正常ヒト脳溶解物 30
レーン3、4、7： パーキンソン病患者由来の血漿
レーン5、6、8、9：年齢をマッチングさせた対照患者由来の血漿

【0062】

レーン7～10は、組換えヒト α -シヌクレイン(1 μ g α -シヌクレイン/ml抗体)を用いて予め吸着させておいた抗体N-19を用いて調べられた。これら2つのレーンで結合が認められないことから、N-19抗体の α -シヌクレインに対する特異性が示される。

【0063】

これらの結果から、患者の血漿サンプル中の内生シヌクレインを検出し、さらに陽性対照中のシヌクレインを検出するアッセイの能力が示される。 40

【実施例3】

【0064】

E L I S Aによるヒト血漿中の可溶性 α -シヌクレインタンパク質の測定

A. 試薬

1. コーティングバッファー

200mM NaHCO₃ (Sigma) pH 9.6。次いで、この溶液を0.2 μ mフィルター(Aldrich)を通して濾過する。

【0065】

2. ブロッキング溶液

ブロッキング溶液は、2.5%ゼラチン(Sigma)および0.05%Tween 50

20 (Sigma) を含む 100 ml の PBS バッファー (pH 7.4) からなる。この溶液は新しく作製し、その日のうちに使用すべきであるが、濾過する必要はない。

【0066】

3. 抗体のビオチン化

ビオチン製造業者「PIERCE」が推奨するように抗体をビオチン化した。

【0067】

B. 方法

1. プレート (Nunc, maxisorp) を、100 μ l / ウェルの、200 mM NaHCO₃ (pH 9.6) 中、1:1000 (2 μ g / ml) の α -シヌクレイン (C-20) 抗体、 α -シヌクレインの C 末端に対して作製されたアフィニティー精製ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社、カタログ番号 SC-7011) でコーティングする。このプレートを次いで、プレートシーラー (Sigma) および食品包装用フィルムを用いてカバーし、4℃ で一晩保存する。 10

2. 吸い込み口の上に逆さまにすることによって、プレートから N-19 抗体を吸引する。PBS-Tween 20 (0.05%) (PBST) で 4 回洗浄する。

3. 200 μ l / ウェル ブロッキングバッファーを用いてプレートをブロックする。プレートを 37℃ で 1 時間インキュベートする。

4. プレートを PBST (0.05% Tween-20 を含有する PBS バッファー) で 4 回洗浄する。

5. 100 μ l / ウェルの血漿または血清を添加する。プレートをカバーし、37℃ で 2 時間インキュベートする。 20

6. プレートを PBST で 4 回洗浄する。ビオチン化した N-19 抗体、 α -シヌクレインの N 末端に対して作製されたアフィニティー精製ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社、カタログ番号 sc-7012) をブロッキングバッファーで希釈率 1:1000 (0.2 μ g / ml) に希釈し、100 μ l / ウェルを添加する。37℃ で 2 時間インキュベートする。

7. PBST で 4 回洗浄する。

8. 100 μ l / ウェルの、ブロッキングバッファーで 3:5000 希釈したエクストラアビジン-アルカリホスファターゼ (Extra Avidin-Alkaline Phosphatase) (Sigma) を添加し、37℃ で 1 時間インキュベートする。 30

9. プレートを PBST で 4 回洗浄する。100 μ l / ウェルのアルカリホスファターゼイエロー (Alkaline phosphatase Yellow) 「pNPP」を添加し、室温にて 30 分間インキュベートする。405 nm の吸光度値を読み取る。

【0068】

C. 結果

上記の手順を用いて、シヌクレイン症を患っていない健常な個体から採取したヒト血漿に 1 μ M よりも高い濃度で α -シヌクレインが含まれていることが判明した。

【実施例 4】

【0069】

パーキンソン病患者および対照患者の血漿中の凝集シヌクレイン量の測定および比較 40

n = 34 の臨床的に診断されたパーキンソン病患者、および n = 27 の年齢をマッチングさせた対照患者由来の血漿サンプルを、下記、多量体 (凝集) α -シヌクレインの測定のプロトコール 2 で以下に記載したように実施した ELISA により解析した。選択した ELISA プロトコールは、サンドイッチ ELISA であり、凝集 (オリゴマー化) 型のシヌクレインに特異的なものである。

【0070】

405 nm の吸光度の上昇が、試験したサンプル中の凝集シヌクレインの存在の増加を示す。吸光度は光学濃度単位 (OD) で測定した。

【0071】

臨床的に診断されたパーキンソン病患者由来の血漿サンプルの平均吸光度は、1.70 50

D + / - 標準偏差 (SD) 0.7057であった。これに対し、年齢をマッチングさせた対照患者由来の血漿サンプルの平均吸光度は、0.236 OD + / - SD 0.396であった。これらの値は著しく異なり、シヌクレイン症であるパーキンソン病を患う患者群での平均値がかなり高かった。

【0072】

群間の吸光度、ひいては凝集シヌクレインレベルの差は、統計的解析上有意であることがわかった。

【0073】

フィッシャーの正確確率検定を、吸光度値 0.5 OD を「高」レベルのオリゴマー化シヌクレインを表すよう割り当てて実施したところ、パーキンソン病群および対照群で得られた値間で非常に有意な差が示された ($P = 0.002$)。フィッシャーの正確確率検定に、吸光度 0.25 OD というカットオフ値を選択すると、さらに有意な差 ($P = 0.001$) が得られた。よって、上記の、これら 2 つの選択したカットオフ値のいずれかよりも高い吸光度値は、パーキンソン病の存在を十分に示す。

10

【0074】

プロトコール

可溶性 - シヌクレインタンパク質の測定のプロトコール 1

A. 試薬

1. コーティングバッファー

200 mM NaHCO₃ (Sigma) pH 9.6。次いで、この溶液を 0.2 μm フィルター (Aldrich) を通して濾過する。

20

【0075】

2. ブロッキング溶液

ブロッキング溶液は 2.5% ゼラチン (Sigma) および 0.05% Tween 20 (Sigma) を含む 100 ml の PBS バッファー (pH 7.4) からなる。この溶液は新しく作製し、その日のうちに使用すべきであるが、濾過する必要はない。

【0076】

3. 抗体のビオチン化

ビオチン製造業者「PIERCE」が推奨するように抗体をビオチン化した。

【0077】

30

B. 方法

1. プレート (Nunc, maxisorp) を、100 μl / ウェルの、200 mM NaHCO₃ (pH 9.6) 中、希釈率 1:1000 (0.2 μg/ml) の N-19 抗体、- シヌクレインの N 末端に対して作製されたアフィニティー精製ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. カタログ番号 sc-7012) でコーティングする。このプレートを次いで、プレートシーラー (Sigma) および食品包装用フィルムを用いてカバーし、4 で一晩保存する。

2. 吸い込み口の上に逆さまにすることによって、プレートから N-19 抗体を吸引する。PBS-Tween 20 (0.05%) (PBST) で 4 回洗浄する。

3. 200 μl / ウェル ブロッキングバッファーを用いてプレートをブロッキングする。プレートを 37 で 1 時間インキュベートする。

40

4. プレートを PBST (0.05% Tween-20 を含有する PBS バッファー) で 4 回洗浄する。

5. 100 μl / ウェルの血漿または血清を添加する。プレートをカバーし、37 で 2 時間インキュベートする。

6. プレートを PBST で 4 回洗浄する。ビオチン化した - シヌクレイン (C-20) 抗体、- シヌクレインの C 末端に対して作製されたアフィニティー精製ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. カタログ番号 SC-7011) をブロッキングバッファーで 1:1000 (2 μg/ml) に希釈し、100 μl / ウェルを添加する。37 で 2 時間インキュベートする。

50

7. PBSTで4回洗浄する。

8. 100 μ l / ウェルの、ブロッキングバッファーで3 : 5000希釈したエクストラアビジン - アルカリホスファターゼ (Sigma) を添加し、37 で1時間インキュベートする。

9. プレートをPBSTで4回洗浄する。100 μ l / ウェルのアルカリホスファターゼイエロー「pNPP」を添加し、室温にて30分間インキュベートする。405 nmの吸光度値を読み取る。

【0078】

可溶性 - シヌクレインタンパク質の測定のプロトコール2

A. 試薬

10

1. コーティングバッファー

200 mM NaHCO₃ (Sigma) pH 9.6。次いで、この溶液を0.2 μ mフィルター (Aldrich) を通して濾過する。

【0079】

2. ブロッキング溶液

ブロッキング溶液は2.5%ゼラチン (Sigma) および0.05% Tween 20 (Sigma) を含む100 mlのPBSバッファー (pH 7.4) からなる。この溶液は新しく作製し、その日のうちに使用すべきであるが、濾過する必要はない。

【0080】

3. 抗体のビオチン化

20

ビオチン製造業者「PIERCE」が推奨するように抗体をビオチン化した。

【0081】

B. 方法

1. プレート (Nunc, maxisorp) を100 μ l / ウェルの、200 mM NaHCO₃ (pH 9.6) 中、希釈率1 : 1000 (0.2 μ g / ml) のFL-140抗体、組換え全長ヒト - シヌクレインタンパク質に対して作製されたアフィニティー精製ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. カタログ番号SC-10717) でコーティングする。このプレートを次いで、プレートシーラー (Sigma) および食品包装用フィルムを用いてカバーし、4で一晩保存する。

30

2. 吸い込み口の上に逆さまにすることによって、プレートからN-19抗体を吸引する。PBS-Tween 20 (0.05%) (PBST) で4回洗浄する。

3. 200 μ l / ウェル ブロッキングバッファーを用いてプレートをブロッキングする。プレートを37 で1時間インキュベートする。

4. プレートをPBST (0.05% Tween-20を含有するPBSバッファー) で4回洗浄する。

5. 100 μ l / ウェルの血漿または血清を添加する。プレートをカバーし、37 で2時間インキュベートする。

6. プレートをPBSTで4回洗浄する。ビオチン化した - シヌクレイン (C-20) 抗体、 - シヌクレインのC末端に対して作製されたアフィニティー精製ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. カタログ番号SC-7011) をブロッキングバッファーで1 : 1000 (2 μ g / ml) に、またはビオチン化したN-19抗体、 - シヌクレインのN末端に対して作製されたアフィニティー精製ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. カタログ番号SC-7012) を希釈率1 : 1000 (0.2 μ g / ml) に希釈し、100 μ l / ウェルを添加する。37 で2時間インキュベートする。

40

7. PBSTで4回洗浄する。

8. 100 μ l / ウェルの、ブロッキングバッファーで3 : 5000希釈したエクストラアビジン - アルカリホスファターゼ (Sigma) を添加し、37 で1時間インキュベートする。

50

9. プレートをPBSTで4回洗浄する。100 μ l/ウェルのアルカリホスファターゼイエロー「pNPP」を添加し、室温にて30分間インキュベートする。405nmの吸光度値を読み取る。

【0082】

可溶性硝化 - シヌクレインタンパク質の測定についてのプロトコール1

A. 試薬

1. コーティングバッファー

200mM NaHCO₃ (Sigma) pH 9.6。この溶液を0.2 μ mフィルター (Aldrich) を通して濾過する。

【0083】

2. ブロッキング溶液

ブロッキング溶液は2.5%ゼラチン (Sigma) および0.05% Tween 20 (Sigma) を含む100mlのPBSバッファー (pH 7.4) からなる。この溶液は新しく作製し、その日のうちに使用すべきであるが、濾過する必要はない。

【0084】

3. 抗体のビオチン化

ビオチン製造業者「PIERCE」が推奨するように抗体をビオチン化した。

【0085】

B. 方法

1. プレート (Nunc, maxisorp) を100 μ l/ウェルの、200mM NaHCO₃ (pH 9.6) 中、希釈率1:1000 (0.2 μ g/ml) のN-19抗体、シヌクレインのN末端に対して作製されたアフィニティー精製ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. カタログ番号 sc-7012) でコーティングする。このプレートを次いで、プレートシーラー (Sigma) および食品包装用フィルムを用いてカバーし、4 $^{\circ}$ Cで一晩保存する。 20

2. 吸い込み口の上に逆さまにすることによって、プレートからN-19抗体を吸引する。PBS-Tween 20 (0.05%) (PBST) で4回洗浄する。

3. 200 μ l/ウェル ブロッキングバッファーを用いてプレートをブロッキングする。プレートを37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートする。

4. プレートをPBST (0.05% Tween-20を含有するPBSバッファー) で4回洗浄する。 30

5. 100 μ l/ウェルの血漿または血清を添加する。プレートをカバーし、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートする。

6. プレートをPBSTで4回洗浄する。ビオチン化したニトロチロシン抗体 (ニトロチロシンを認識するポリクローナルまたはモノクローナルIgG抗体) をブロッキングバッファーで、モノクローナル抗体の場合1:200またはポリクローナル抗体の場合1:1000に希釈し、100 μ l/ウェルを添加する。37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートする。

7. PBSTで4回洗浄する。

8. 100 μ l/ウェルの、ブロッキングバッファーで3:5000希釈したエクストラアビジン-アルカリホスファターゼ (Sigma) を添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートする。 40

9. プレートをPBSTで4回洗浄する。100 μ l/ウェルのアルカリホスファターゼイエロー「pNPP」を添加し、室温にて30分間インキュベートする。405nmの吸光度値を読み取る。

【0086】

可溶性硝化 - シヌクレインタンパク質の測定についてのプロトコール2

B. 試薬

1. コーティングバッファー

200mM NaHCO₃ (Sigma) pH 9.6。次いで、この溶液を0.2 μ 50

mフィルター (Aldrich) を通して濾過する。

【0087】

2. ブロッキング溶液

ブロッキング溶液は2.5%ゼラチン (Sigma) および0.05% Tween 20 (Sigma) を含む100mlのPBSバッファー (pH 7.4) からなる。この溶液は新しく作製し、その日のうちに使用すべきであるが、濾過する必要はない。

【0088】

3. 抗体のビオチン化

ビオチン製造業者「PIERCE」が推奨するように抗体をビオチン化した。

【0089】

B. 方法

1. プレート (Nunc, maxisorp) を100 μ l/ウェルの、200mM NaHCO₃ (pH 9.6) 中、希釈率1:1000 (0.2 μ g/ml) のFL-140抗体、組換え全長ヒト - シヌクレインタンパク質に対して作製されたアフィニティ精製ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. カタログ番号SC-10717) でコーティングする。このプレートを次いで、プレートシーラー (Sigma) および食品包装用フィルムを用いてカバーし、4で一晩保存する。

2. 吸い込み口の上に逆さまにすることによってプレートからN-19抗体を吸引する。PBS-Tween 20 (0.05%) (PBST) で4回洗浄する。

3. 200 μ l/ウェル ブロッキングバッファーを用いてプレートをブロッキングする。プレートを37で1時間インキュベートする。

4. プレートをPBST (0.05% Tween-20を含有するPBSバッファー) で4回洗浄する。

5. 100 μ l/ウェルの血漿または血清を添加する。プレートをカバーし、37で2時間インキュベートする。

6. プレートをPBSTで4回洗浄する。ビオチン化したニトロチロシン抗体 (硝化チロシンを認識するポリクローナルまたはモノクローナルIgG抗体) をブロッキングバッファーで、モノクローナル抗体の場合1:200またはポリクローナル抗体の場合1-1000に希釈し、100 μ l/ウェルを添加する。37で2時間インキュベートする。

7. PBSTで4回洗浄する。

8. 100 μ l/ウェルの、ブロッキングバッファーで3:5000希釈したエクストラアビジン-アルカリホスファターゼ (Sigma) を添加し、37で1時間インキュベートする。

9. プレートをPBSTで4回洗浄する。100 μ l/ウェルのアルカリホスファターゼイエロー「pNPP」を添加し、室温にて30分間インキュベートする。405nmの吸光度値を読み取る。

【0090】

可溶性リン酸化 - シヌクレインタンパク質の測定のプロトコール 1

A. 試薬

1. コーティングバッファー

200mM NaHCO₃ (Sigma) pH 9.6。次いで、この溶液を0.2 μ mフィルター (Aldrich) を通して濾過する。

【0091】

2. ブロッキング溶液

ブロッキング溶液は2.5%ゼラチン (Sigma) および0.05% Tween 20 (Sigma) を含む100mlのPBSバッファー (pH 7.4) からなる。この溶液は新しく作製し、その日のうちに使用すべきであるが、濾過する必要はない。

【0092】

3. 抗体のビオチン化

10

20

30

40

50

ビオチン製造業者「PIERCE」が推奨するように抗体をビオチン化した。

【0093】

B. 方法

1. プレート (Nunc, maxisorp) を $100 \mu\text{l}$ / ウェルの、 200mM NaHCO_3 (pH 9.6) 中、希釈率 $1:1000$ ($0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$) の N-19 抗体、 β -シヌクレインの N 末端に対して作製されたアフィニティー精製ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. カタログ番号 sc-7012) でコーティングする。このプレートを次いで、プレートシーラー (Sigma) および食品包装用フィルムを用いてカバーし、 4°C で一晩保存する。

2. 吸い込み口の上に逆さまにすることによって、プレートから N-19 抗体を吸引する。PBS-Tween 20 (0.05%) (PBST) で 4 回洗浄する。 10

3. $200 \mu\text{l}$ / ウェル ブロッキングバッファーを用いてプレートをブロッキングする。プレートを 37°C で 1 時間インキュベートする。

4. プレートを PBST (0.05% Tween-20 を含有する PBS バッファー) で 4 回洗浄する。

5. $100 \mu\text{l}$ / ウェルの血漿または血清を添加する。プレートをカバーし、 37°C で 2 時間インキュベートする。

6. プレートを PBST で 4 回洗浄する。ビオチン化したホスホセリン抗体 (ホスホセリンを認識するポリクローナルまたはモノクローナル IgG 抗体) をブロッキングバッファーで、モノクローナル抗体の場合 $1:200$ またはポリクローナル抗体の場合 $1:10000$ に希釈し、 $100 \mu\text{l}$ / ウェルを添加する。 37°C で 2 時間インキュベートする。 20

7. PBST で 4 回洗浄する。

8. $100 \mu\text{l}$ / ウェルの、ブロッキングバッファーで $3:5000$ 希釈したエクストラアビジン-アルカリホスファターゼ (Sigma) を添加し、 37°C で 1 時間インキュベートする。

9. プレートを PBST で 4 回洗浄する。 $100 \mu\text{l}$ / ウェルのアルカリホスファターゼイエロー「pNPP」を添加し、室温にて 30 分間インキュベートする。 405nm の吸光度の値を読み取る。

【0094】

可溶性硝化- β -シヌクレインタンパク質の測定についてのプロトコール 2

30

A. 試薬

1. コーティングバッファー

200mM NaHCO_3 (Sigma) pH 9.6。この溶液を $0.2 \mu\text{m}$ フィルター (Aldrich) を通して濾過する。

【0095】

2. ブロッキング溶液

ブロッキング溶液は 2.5% ゼラチン (Sigma) および 0.05% Tween 20 (Sigma) を含む 100ml の PBS バッファー (pH 7.4) からなる。この溶液は新しく作製し、その日のうちに使用すべきであるが、濾過する必要はない。

【0096】

3. 抗体のビオチン化

ビオチン製造業者「PIERCE」が推奨するように抗体をビオチン化した。

40

【0097】

B. 方法

1. プレート (Nunc, maxisorp) を $100 \mu\text{l}$ / ウェルの、 200mM NaHCO_3 (pH 9.6) 中、希釈率 $1:1000$ ($0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$) の FL-140 抗体、組換え全長ヒト β -シヌクレインタンパク質に対して作製されたアフィニティー精製ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. カタログ番号 SC-10717) でコーティングする。このプレートを次いで、プレートシーラー (Sigma) および食品包装用フィルムを用いてカバーし、 4°C で 50

一晚保存する。

2. 吸い込み口の上に逆さまにすることによって、プレートからN-19抗体を吸引する。PBS-Tween 20 (0.05%) (PBST)で4回洗浄する。

3. 200 μ l / ウェル ブロッキングバッファーを用いてプレートをブロッキングする。プレートを37 で1時間インキュベートする。

4. プレートをPBST (0.05% Tween-20を含有するPBSバッファー)で4回洗浄する。

5. 100 μ l / ウェルの血漿または血清を添加する。プレートをカバーし、37 で2時間インキュベートする。

6. プレートをPBSTで4回洗浄する。ビオチン化したホスホセリン抗体 (ホスホセリンを認識するポリクローナルまたはモノクローナルIgG抗体) をブロッキングバッファーで、モノクローナル抗体の場合1:200またはポリクローナル抗体の場合1-1000に希釈し、100 μ l / ウェルを添加する。37 で2時間インキュベートする。 10

7. PBSTで4回洗浄する。

8. 100 μ l / ウェルの、ブロッキングバッファーで3:5000希釈したエクストラアビジン-アルカリホスファターゼ (Sigma) を添加し、37 で1時間インキュベートする。

9. プレートをPBSTで4回洗浄する。100 μ l / ウェルのアルカリホスファターゼイエロー「pNPP」を添加し、室温にて30分間インキュベートする。405nmの吸光度の値を読み取る。 20

【0098】

多量体 (凝集) - シヌクレインタンパク質の測定についてのプロトコール 1

A. 試薬

1. コーティングバッファー

200mM NaHCO₃ (Sigma) pH 9.6。次いで、この溶液を0.2 μ mフィルター (Aldrich)を通して濾過する。

【0099】

2. ブロッキング溶液

ブロッキング溶液は2.5%ゼラチン (Sigma) および0.05% Tween 20 (Sigma) を含む100mlのPBSバッファー (pH 7.4) からなる。この溶液は新しく作製し、その日のうちに使用すべきであるが、濾過する必要はない。 30

【0100】

3. 抗体のビオチン化

ビオチン製造業者「PIERCE」が推奨するように抗体をビオチン化した。

【0101】

B. 方法

1. プレート (Nunc, maxisorp) を100 μ l / ウェルの、200mM NaHCO₃ (pH 9.6) 中、希釈率1:1000 (0.2 μ g/ml) のN-19抗体、シヌクレインのN末端に対して作製されたアフィニティー精製ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. カタログ番号 sc-7012) でコーティングする。このプレートを次いで、プレートシーラー (Sigma) および食品包装用フィルムを用いてカバーし、4 で一晚保存する。 40

2. 吸い込み口の上に逆さまにすることによってプレートからN-19抗体を吸引する。PBS-Tween 20 (0.05%) (PBST)で4回洗浄する。

3. 200 μ l / ウェル ブロッキングバッファーを用いてプレートをブロッキングする。プレートを37 で1時間インキュベートする。

4. プレートをPBSTで4回洗浄する。

5. 100 μ l / ウェルの血漿または血清を添加する。プレートをカバーし、37 で2時間インキュベートする。

6. プレートをPBSTで4回洗浄する。ビオチン化したN-19抗体をブロッキング 50

バッファーで1:2000 (1 µg/ml) に希釈し、100 µl / ウェルを添加する。
37 で2時間インキュベートする。

7. PBSTで4回洗浄する。

8. 100 µl / ウェルの、ブロッキングバッファーで3:5000希釈したエクストラアビジン-アルカリホスファターゼ (Sigma) を添加し、37 で1時間インキュベートする。

9. プレートをPBSTで4回洗浄する。100 µl / ウェルのアルカリホスファターゼイエロー「pNPP」を添加し、室温にて30分間インキュベートする。405 nmの吸光度の値を読み取る。

【0102】

多量体 (凝集) - シヌクレインタンパク質の測定についてのプロトコール 2

A. 試薬

1. コーティングバッファー

200 mM NaHCO₃ (Sigma) pH 9.6。次いで、この溶液を0.2 µmフィルター (Aldrich) を通して濾過する。

【0103】

2. ブロッキング溶液

ブロッキング溶液は2.5%ゼラチン (Sigma) および0.05% Tween 20 (Sigma) を含む100 mlのPBSバッファー (pH 7.4) からなる。この溶液は新しく作製し、その日のうちに使用すべきであるが、濾過する必要はない。

【0104】

3. 抗体のビオチン化

ビオチン製造業者「PIERCE」が推奨するように抗体をビオチン化した。

【0105】

B. 方法

1. プレート (Nunc, maxisorp) を100 µl / ウェルの、200 mM NaHCO₃ (pH 9.6) 中、1:100 (2 µg/ml) の - シヌクレイン (211) (- シヌクレインのアミノ酸121~125を認識するマウスモノクローナルIgG抗体) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. カタログ番号SC-12767) でコーティングする。このプレートを次いで、プレートシーラー (Sigma) および食品包装用フィルムを用いてカバーし、4 で一晩保存する。

2. 吸い込み口の上に逆さまにすることによって、プレートから211抗体を吸引する。PBS-Tween 20 (0.05%) (PBST) で4回洗浄する。

3. 200 µl / ウェル ブロッキングバッファーを用いてプレートをブロッキングする。プレートを37 で1時間インキュベートする。

4. プレートをPBSTで4回洗浄する。

5. 100 µl / ウェルの血漿または血清を添加する。プレートをカバーし、37 で2時間インキュベートする。

6. プレートをPBSTで4回洗浄する。ビオチン化した - シヌクレイン (211) をブロッキングバッファーで1:200 (1 µg/ml) に希釈し、100 µl / ウェルを添加する。37 で2時間インキュベートする。

7. PBSTで4回洗浄する。

8. 100 µl / ウェルの、ブロッキングバッファーで3:5000希釈したエクストラアビジン-アルカリホスファターゼ (Sigma) を添加し、37 で1時間インキュベートする。

9. プレートをPBSTで4回洗浄する。100 µl / ウェルのアルカリホスファターゼイエロー「pNPP」を添加し、室温にて30分間インキュベートする。405 nmの吸光度の値を読み取る。

【0106】

(参照文献)

10

20

30

40

50

1. クレイトン・ディー・エフ (Clayton, D. F.) および ジョージ・ジェイ・エム (George, J. M.) (1999) シヌクレインズ・イン・シナプティック・プラスティシティー・アンド・ニューロデジェネレイティブ・ディスオーダーズ (Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders) ジャーナル・オブ・ニューロサイエンス・リサーチ (Journal of Neurosciences Research) 58、120~129頁。

2. ブリュニング・ダブリュー (Bruening, W.)、ギアソン・ビー・アイ (Giasson, B. I.)、クレイン・スザント・エイ・ジェイ (Klein-Szanto, A. J.)、リー・ブイ・エム (Lee, V. M.)、トロジャノウスキ・ジェイ・キュー (Trojanowski, J. Q.) および ゴッドウィン・エイ・ケイ (Godwin, A. K.) (2000) シヌクレインズ・アー・エクスプレスド・イン・ザ・マジョリティー・オブ・プレスト・アンド・オバリアン・カルシノーマズ・アンド・イン・プレネオプラスティック・リーション・オフ・ジ・オバリー (Synucleins are expressed in the majority of breast and ovarian carcinomas and in preneoplastic lesions of the ovary) キャンサー (Cancer) 88、2154~2163頁。

3. ウエダ・ケイ (Ueda, K.)、フクシマ・エイチ (Fukushima, H.)、マスリア・イー (Masliyah, E.)、シア・ワイ (Xia, Y.)、イワイ・エー (Iwai, A.)、オテロ・ディー (Otero, D.)、コンドウ・ジェイ (Kondo, J.)、イハラ・ワイ (Ihara, Y.) および サイトウ・ティー (Saitoh, T.) (1993) モレキュラー・クローニング・オフ・シーディーエヌエー・エンコーディング・アン・アンレコグナイズド・コンポーネント・オブ・アミロイド・イン・アルツハイマー・ディジーズ (Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognised component of amyloid in Alzheimer disease) プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンスズ・オブ・ユーエスエー (Proceedings of the National Academy of Sciences of USA) 90、11282~11286頁。

4. ポリメロポウロス・エム・エイチ (Polymeropoulos, M. H.)、ラベダン・シー (Lavedan, C.)、レロイ・イー (Leroy, E.)、イデ・エス・イー (Ide, S. E.)、デヘジア・エー (Dehejia, A.)、デュトラ・エー (Dutra, A.)、パイク・ビー (Pike, B.)、ルート・エイチ (Root, H.)、ルベンSTEIN・ジェイ (Rubenstein, J.)、ボイヤー・アール (Boyer, R.)、ステンロス・イー・エス (Stenroos, E. S.)、チャンドラセクハラッパ・エス (Chandrasekharappa, S.)、アサンアッシアドウ・エー (Athanasiasiadou, A.)、パパペトロポウロス・ティー (Papapetropoulos, T.)、ジョンソン・ダブリュー・ジー (Johnson, W. G.)、ラザリニ・イー・エム (Lazzarini, A. M.)、デュボイシン・アール・シー (Duvoisin, R. C.)、ジイオリオ・ジー (Di Iorio, G.)、ゴルベ・エル・アイ (Golbe, L. I.) および ヌスバウム・アール・エル (Nussbaum, R. L.) (1997) ミューテーション・イン・ジ・アルファ・シヌクレイン・ジーン・アイデンティファイド・イン・ファミリーズ・ウィズ・パーキンソンズ・ディジーズ (Mutation in the -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease) サイエンス (Science) 276、2045~2047頁。

5. クルガー・アール (Kruger, R.)、クーン・ダブリュー (Kuhn, W.)、ミュラー・ティー (Muller, T.)、ウオイタラ・ディー (Woitala

10

20

30

40

50

, D.), グラエバー・エム (Graeber, M.), コセル・エス (Kosel, S.), リュンテック・エイチ (Przuntek, H.), エップレン・ジェイ・ティー (Eppelen, J. T.), スコールズ・エル (Schols, L.) およびリース・オー (Riess, O.) (1998) Ala3プロミューテーション・イン・ザ・ジーン・エンコーディング・アルファ・シヌクレイン・イン・パーキンソンズ・ディジーズ (Ala30Pro mutation in the gene encoding -synuclein in Parkinson's disease.) ネイチャー・ジェネティクス (Nature Genetics) 18、106~108頁。

6. スピランチニ・エム・ジー (Spillantini, M. G.), クロウザー・アール・エー (Crowther, R. A.), ジェイクス・アール (Jakes, R.), カイアンズ・エヌ・ジェイ (Cairns, N. J.), ラントス・ピー・エル (Lantos, P. L.) およびゴードート・エム (Goedert, M.) (1998) フィラメントウス・アルファ・シヌクレイン・インクルージョンズ・リンク・マルチプル・システム・アτροφイー・ウィズ・パーキンソンズ・ディジーズ・アンド・ディメンチア・ウィズ・レビー・ボディー (Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies) ニューロサイエンス・レターズ (Neuroscience Letters) 251、205~208頁。

7. ガルビン・ジェイ・イー (Galvin, J. E.), ウリユー・ケイ (Uryu, K.), リー・ブイ・エム (Lee, V. M.) およびトロジャノウスキ・ジェイ・キュー (Trojanowski, J. Q.) (1999) アキソン・パソロジー・イン・パーキンソンズ・ディジーズ・アンド・レビー・ボディー・ディメンチア・ヒポカンプス・コンテインズ・アルファ・、ベータ・、アンド・ガンマ・シヌクレイン (Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains alpha-, beta-, and gamma-synuclein) プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンスズ・オブ・ユーエスエー (Proceedings of the National Academy of Sciences of USA) 96、13450~13455頁。

8. ヒューズ・エー・ジェイ (Hughes, A. J.), ベン・シュロモ・ワイ (Ben-Shlomo, Y.), ダニエル・エス・イー (Daniel, S. E.) およびリーズ・エー・ジェイ (Lees, A. J.) (1992) ホワット・フィーチャーズ・インブルー・ジ・アキュラシー・オブ・クリニカル・ダイアグノシス・イン・パーキンソンズ・ディジーズ (What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease) ニューロロジ (Neurology) 42、1142~1146頁。

9. ラジュプット・エー・エイチ (Rajput, A. H.), ロズジルスキー・ビー (Rozdilsky, B.) およびラジュプット・エー (Rajput, A.) (1991) アキュラシー・オブ・クリニカル・ダイアグノシス・イン・パーキンソンズ・ディジーズ・ア・プロスペクティブ・スタディー (Accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease - a prospective study) カナディアン・ジャーナル・オブ・ザ・ニューロロジカル・サイエンスズ (Canadian Journal of the Neurological Sciences) 18、275~278頁。

10. シムラ・エイチ (Shimura, H.), ショルスマッチャー・エム・ジー (Schlossmacher, M. G.), ハットリ・エヌ (Hattori, N.), フロスク・エム・ピー (Frosch, M. P.), トロケンバッカー・エー (Trockenbacher, A.), シュナイダー・アール (Schneider, R.), ミ

ズノ・ワイ (Mizuno, Y.)、コシック・ケイ・エス (Kosik, K. S.)、セルコエ・ディー・ジェイ (Selkoe, D. J.) (2001) ユビキチネーション・オブ・ア・ニュー・フォーム・オブ・アルファ・シヌクレイン・バイ・パーキン・フロム・ヒューマン・ブレイン：インプリケーションズ・フォー・パーキンソンズ・ディジーズ (Ubiquitination of a new form of -synuclein by Parkin from human brain: Implications for Parkinson's disease) サイエンス (Science)、293、263～269頁。

【図面の簡単な説明】

【0107】

10

【図1】前濃縮を -シヌクレイン (FL140) に対して反応性を有する抗体を用いて実施し、同じ抗体を用いて検出を行った、ヒト血漿サンプルのウエスタンブロット法による解析の結果を示す (レーン1：組換え シヌクレインタンパク質、レーン2：ヒト血漿)。

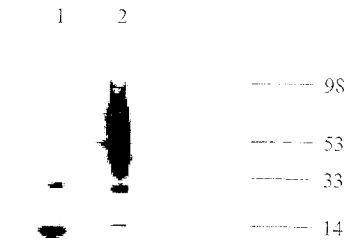
【図2】図2は、前濃縮を -シヌクレイン (C20) に対して反応性の抗体を用いて実施し、同じ抗体を用いて検出を行った、ヒト血漿サンプルのウエスタンブロット法による解析の結果を示す (レーン1：組換え シヌクレインタンパク質、レーン2：組換え シヌクレインタンパク質、レーン3：組換え シヌクレインタンパク質、レーン4：ヒト血漿)。

【図3】図3は、前濃縮を -シヌクレイン (C20) に対して反応性を有する抗体を用いて実施し、 -シヌクレインに対する抗体 (C20) を用いて検出を行った、ヒト血漿サンプルのウエスタンブロット法による解析の結果を示す (レーン1：ヒト血漿、レーン2：組換え シヌクレインタンパク質、レーン2：組換え シヌクレインタンパク質、レーン3：組換え シヌクレインタンパク質)。

20

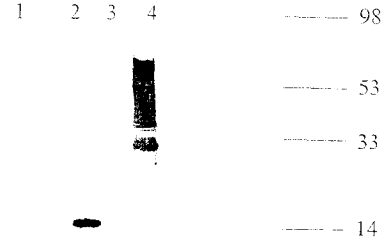
【図4】図4は、シヌクレイン症を患うヒト患者の血漿をはじめとする血漿中のシヌクレインを検出する能力を例示した試験の結果を示す。

【 図 1 】



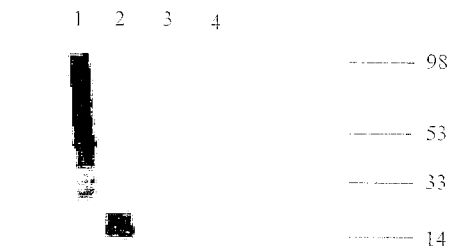
α-シヌクレイン (FL140) を用いて捕獲され、
同一抗体を用いて検出されたヒト血漿
レーン1: 組換えα-シヌクレインタンパク質
レーン2: ヒト血漿

【 図 2 】



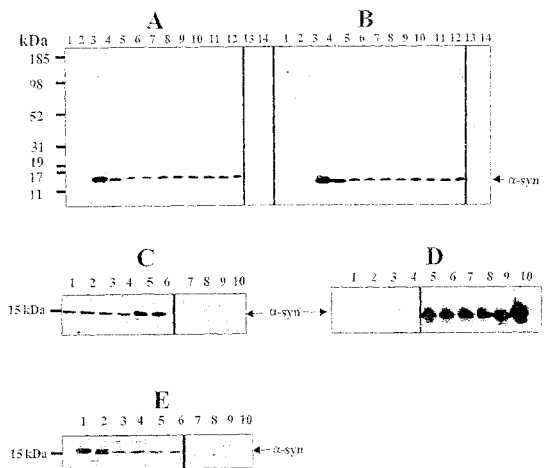
β-シヌクレイン (C-20) を用いて捕獲され、
同一抗体を用いて検出されたヒト血漿
レーン1: 組換えα-シヌクレインタンパク質
レーン2: 組換えβ-シヌクレインタンパク質
レーン3: 組換えγ-シヌクレインタンパク質
レーン4: ヒト血漿

【 図 3 】



β-シヌクレイン (C-20) 抗体を用いて捕獲され、
γ-シヌクレイン (C-20) 抗体を用いて検出されたヒト血漿
レーン1: ヒト血漿
レーン2: 組換えγ-シヌクレインタンパク質
レーン3: 組換えβ-シヌクレインタンパク質
レーン4: 組換えα-シヌクレインタンパク質

【 図 4 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internationa application No PCT/GB 03/00677
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 G01N33/574		
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) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 50300 A (IWATSUBO TAKESHI ;UNIV PENNSYLVANIA (US); LEE VIRGINIA M Y (US); T) 7 October 1999 (1999-10-07) the whole document	1-10
A	WO 00 02053 A (VANDERSTICHELE HUGO ;VOORDE ANDRE VAN DE (BE); INNOGENETICS NV (BE) 13 January 2000 (2000-01-13) cited in the application the whole document	1-10
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 16 October 2003		Date of mailing of the international search report 05/11/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Thumb, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat	pplication No
PCT/GB	03/00677

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>KIM S H ET AL: "Characterization of alpha-synuclein in human lymphocytes" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, vol. 27, no. 1, 2001, page 862 XP001155386 31st Annual Meeting of the Society for Neuroscience; San Diego, California, USA; November 10-15, 2001 ISSN: 0190-5295 the whole document</p> <p>---</p>	1-10
A	<p>JIA TONGLI ET AL: "Stimulation of breast cancer invasion and metastasis by synuclein gamma" CANCER RESEARCH, vol. 59, no. 3, 1 February 1999 (1999-02-01), pages 742-747, XP002258023 ISSN: 0008-5472 the whole document</p> <p>---</p>	1-10
T	<p>EL-AGNAF OMAR M A ET AL: "Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma." THE FASEB JOURNAL: OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY. UNITED STATES OCT 2003, vol. 17, no. 13, October 2003 (2003-10), pages 1945-1947, XP002258024 ISSN: 1530-6860 the whole document</p> <p>-----</p>	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB 03/00677

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9950300	A	07-10-1999	AU 3117799 A WO 9950300 A1	18-10-1999 07-10-1999
WO 0002053	A	13-01-2000	AU 754062 B2 AU 5029099 A BR 9911291 A CA 2329523 A1 CN 1316055 T WO 0002053 A2 EP 1095278 A2 JP 2002519702 T	31-10-2002 24-01-2000 04-12-2001 13-01-2000 03-10-2001 13-01-2000 02-05-2001 02-07-2002

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN, GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC, EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,M X,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 エル アーナフ オマール エム エー
イギリス国、ランカシャー・エル・エー・3・3・エス・イー、モアキャンプ、グロスバノア・パ
ーク、ホダー・アベニュー・3

(72)発明者 セーラム スルタン エー
イギリス国、ランカシャー・エル・エー・1・1・エス・ワイ、ランカスター、ポートランド・ス
トリート・40

专利名称(译)	检测和/或监测突触核蛋白相关疾病		
公开(公告)号	JP2005528588A	公开(公告)日	2005-09-22
申请号	JP2003568402	申请日	2003-02-14
申请(专利权)人(译)	兰开斯特大学		
[标]发明人	オールソップデビット エルアーナフオマルエムエー セーラムスルタンエー		
发明人	オールソップ デビット エル-アーナフ オマル エム エー セーラム スルタン エー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/15 G01N33/543 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/57484 G01N33/6896 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/15.Z G01N33/543.541.A		
代理人(译)	大野信夫 高桥 徳明		
优先权	2002003446 2002-02-14 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供诊断患者的突触核蛋白病的方法和监测给予患者治疗突触核蛋白病的治疗剂的有效性的方法。该方法包括分析取自患者的非脑液样品中样品中突触核蛋白的存在和/或量。突触核蛋白可以是聚集的突触核蛋白。

		特許2005-528588A (P2005-528588A) (43) 公表日 平成17年9月22日(2005.9.22)
(5) Int. Cl. ⁷	FI	テーマコード (参考)
G01N 33/53	GOIN 33/53	D
G01N 33/15	GOIN 33/15	Z
G01N 33/543	GOIN 33/543	541A
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)		
(21) 出願番号	特願2003-568402 (P2003-568402)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成15年2月14日 (2003.2.14)	ランカスター大学
(85) 翻訳文提出日	平成16年9月17日 (2004.9.17)	The University of Lancaster
(86) 国際出願番号	PCT/GB2003/00677	イギリス国、ランカスター・エル・エー・1・4・ワイ・ダブリュ (番地なし)
(87) 国際公開番号	W02003/069332	(74) 代理人
(87) 国際公開日	平成15年8月21日 (2003.8.21)	弁理士 小野 信夫
(31) 優先権主張番号	0203446.0	100086324
(32) 優先日	平成14年2月14日 (2002.2.14)	(74) 代理人
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	弁理士 高橋 徳明
		(72) 発明者
		オールソップ デビット
		イギリス国、ランカシャー・エル・エー・6・1・エヌ・エフ、カーンフォース、ハートン・イン・ケンダル、モウブレイ・ドライブ・1
		最終頁に続く