

(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2016-514842

(P2016-514842A)

(43) 公表日 平成28年5月23日(2016.5.23)

(51) Int.Cl.

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

F I

G O 1 N 33/53

N

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2016-505803 (P2016-505803)	(71) 出願人	506083604 アフィリス・アクチェンゲゼルシャフト
(86) (22) 出願日	平成26年4月2日 (2014.4.2)		A F F I R I S A G
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月26日 (2015.11.26)		オーストリア、アー―１０３０ヴィエナ、
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/056588		カールーファルカス―ガッセ２２番
(87) 国際公開番号	W02014/161879	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成26年10月9日 (2014.10.9)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	13162107.0	(74) 代理人	100084146
(32) 優先日	平成25年4月3日 (2013.4.3)		弁理士 山崎 宏
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		(72) 発明者	ギュンター・シュタッフラー
			オーストリア、アー―１０３０ヴィエナ、
			カールーファルカス―ガッセ２２番、アフ
			ィリス・アクチェンゲゼルシャフト内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体サンプル中の a S y n 特異的抗体を検出する方法

(57) 【要約】

以下のステップ：

サンプルをaSyn含有凝集体と接触させて、aSyn特異的抗体をaSyn含有凝集体に結合させ、次いで、

単一粒子検出技術、好ましくは蛍光活性化細胞分類(FACS)によって、aSyn含有凝集体に結合したaSyn特異的抗体を検出すること、

を含む、生体サンプル中のaSyn特異的抗体を検出する方法を開示する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

生体サンプル中のアルファシヌクレイン (aSyn) 特異的抗体を検出する方法であって、以下のステップ：

サンプルをaSyn含有凝集体、特に、aSynからなる凝集体と接触させて、aSyn特異的抗体をaSyn含有凝集体に結合させ、次いで、

単一粒子検出技術、好ましくは蛍光活性化細胞分類 (FACS) によって、aSyn含有凝集体に結合したaSyn特異的抗体を検出すること、を含む、方法。

【請求項 2】

aSyn特異的抗体が、ヒト抗体、好ましくはヒトIgGまたはIgM抗体、特にヒトIgG抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

aSyn特異的抗体が、自己抗体である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

aSyn含有凝集体が、50 nm ~ 15 μ m、好ましくは100 nm ~ 10 μ m、特に200 nm ~ 5 μ mのサイズを有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 5】

aSyn含有凝集体が、pH2 ~ 9にて、少なくとも20分、好ましくは少なくとも1時間、特に少なくとも4時間、aSynをインキュベートすることによって調製される、請求項 1 ~ 4 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 6】

aSyn含有凝集体が、サンプルをaSyn含有凝集体と接触させるために、0.01 ~ 10 μ M、好ましくは0.1 ~ 1 μ Mの量で存在する、請求項 1 ~ 5 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 7】

生体サンプルが、ヒト血液であるか、またはヒト血液由来のサンプル、好ましくはヒト血清もしくはヒト血漿；ヒト脳脊髄液もしくはヒトリンパ液である、請求項 1 ~ 6 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 8】

aSyn含有凝集体を、少なくとも10分、好ましくは10分 ~ 24時間、特に20分 ~ 2時間サンプルと接触させる、請求項 1 ~ 7 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 9】

デマスキングステップが、特に、IgM抗体が検出されるならば、サンプルをaSyn含有凝集体と接触させる前にサンプル中のaSyn特異的抗体上で行われる、請求項 1 ~ 8 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 10】

生体サンプルが、aSyn免疫療法を受けるか、または受けることが想定される患者のサンプルであり、aSyn特異的抗体の検出量が、患者からサンプルを採取した時点と同時点における同じ患者のプロテイノパチー関連、特にシヌクレイノパチー関連診断結果と関連する、請求項 1 ~ 9 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 11】

方法が、異なる時点で採取された同じ患者のサンプルで少なくとも2回行われ、および、好ましくは、aSyn特異的抗体の検出量が、患者からサンプルを採取した時点と同時点における同じ患者のプロテイノパチー関連、特にシヌクレイノパチー関連診断結果と関連する請求項 1 ~ 10 のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 12】

方法が、6ヶ月毎に少なくとも1回、好ましくは、3ヶ月毎に少なくとも1回、特に、毎月少なくとも1回行われる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

プロテイノパチー、特にシヌクレイノパチーの診断のための、特にプロテイノパチーの

10

20

30

40

50

早期追跡のため、およびプロテインパチーの治療用薬物のための臨床試験の進行の観察のための、請求項1～12のいずれか1つに記載の方法の使用であって、プロテインパチーが、好ましくは、パーキンソン病(PD)、レビー小体病(LBD)、レビー小体型認知症(DLB)、パーキンソン病認知症(PDD)、多系統萎縮症(MSA)、純粋自律神経失調症(PAF)、レム睡眠行動障害(RBD)、脳内鉄蓄積I型神経変性(1型NBIA)、封入体筋炎(IBM)、大脳皮質基底核変性症(CBD)、進行性核上性麻痺(PSP)、ピック病(PiD)、ボクサー認知症(慢性外傷性脳症、DP)、前頭側頭型認知症(FTD)、リティコ・ボディグ(Lytico-Bodig)疾患(LD)、ハンチントン病(HD)および脊髄小脳変性症(1,2,3および7型)および筋萎縮性側索硬化症(ALS)、プリオノシス(prionosis)およびII型糖尿病；およびアルファシヌクレイン蓄積および/または凝集による疾患、特にアルツハイマー病(AD)、ダウン症候群(DS)、進行性核上性麻痺(PSP)、大脳皮質基底核変性症(CBD)、前頭側頭型認知症/ピック病(FTD/PiD)から選ばれる使用。

10

【請求項14】

aSyn含有凝集体；およびサンプル容器；を含む、請求項1～12のいずれか1つに記載の方法を行うためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特に、パーキンソン病(PD)、レビー小体病(LBD)、レビー小体型認知症(DLB)、パーキンソン病認知症(PDD)、多系統萎縮症(MSA)、純粋自律神経失調症(PAF)、レム睡眠行動障害(RBD)、脳内鉄蓄積I型神経変性(1型NBIA)および封入体筋炎(IBM)などのシヌクレイノパチーに関連し、それらを診断するための、生体サンプル中のアルファシヌクレイン(aSyn)特異的抗体を検出する方法に関する。本発明はまた、アルツハイマー病(AD)、ダウン症候群(DS)、進行性核上性麻痺(PSP)、大脳皮質基底核変性症(CBD)、前頭側頭型認知症/ピック病(FTD/PiD)などのアルファシヌクレイン沈着および/または凝集を伴う疾患に関連し、それらを診断するための、生体サンプル中のアルファシヌクレイン(aSyn)特異的抗体を検出する方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

シヌクレイノパチーは、共通の病理学的特徴を共有する神経変性障害の多様なグループの1つである：神経病理学的検査において、ニューロンおよびグリア細胞の選択された集団におけるaシヌクレイン(aSyn)タンパク質の異常な凝集を含む、特徴的な病変を検出することができる。

30

【0003】

aSyn(最初はPARK1およびPARK4として同定された)は、新皮質、海馬、歯状回、嗅球、線条体、視床および小脳、ならびに、たとえば、結腸または筋肉組織中、末梢ニューロンおよび神経節において広範に発現される140個のアミノ酸からなるタンパク質である。該タンパク質の主な形態は、全140アミノ酸長の転写物である。他のアイソフォームは、エクソン3および5が欠損しているアルファ-シヌクレイン-98、エクソン3が喪失され、残基41-54を欠損しているアルファ-シヌクレイン-126、4；およびエクソン5の喪失により残基103-130を欠損しているアルファ-シヌクレイン-112である。aSynは、B-、T-およびNK細胞ならびに単球および血小板などの造血細胞においても高度に発現される。これらの細胞における正確な役割は分かっていないが、それは巨核球(血小板前駆体)の分化に参与している。

40

【0004】

最も一般的なシヌクレイノパチーとして、パーキンソン病(PD)、レビー小体病(LBD)、レビー小体型認知症(DLB)、パーキンソン病認知症(PDD)、多系統萎縮症(MSA)、純粋自律神経失調症(PAF)、レム睡眠行動障害(RBD)、脳内鉄蓄積I型神経変性(1型NBIA)および封入体筋炎(IBM)が挙げられる。

【0005】

50

これらの疾患に対する現在の治療選択肢として、L-ドーパ、ドーパミン作動薬、抗コリン薬ならびにモノアミン酸化酵素阻害薬などの症候性薬物療法が挙げられる。しかしながら、現在、存在するすべての治療の機会は、症候性緩和をもたらすのみであり、患者に長期的な疾患修飾効果を誘発しない。

【 0 0 0 6 】

レビー小体病(LBD)は、振せん、硬直、動作緩慢、および脳におけるドーパミン作動性ニューロンの喪失を特徴とする進行性の神経変性障害である。DLBおよびPDDの場合、兆候は、認知障害も含む。西欧の国々において年齢が60歳異常の集団の2%までが、PD/LBDの典型的兆候を発症する。現在、症候性治療のみが利用可能である。残念ながら、これらの療法は、初期症状からの一時的な緩和を提供するにすぎず、疾患の進行を止めることはない。PD/LBDの病因は、まだ完全に理解されていないが、遺伝的感受性と環境因子が、この疾患の発症に関与している。すべての遺伝的進歩にもかかわらず、PD/LBDは、主に原因不明で散発性の障害である(突発性PD/LBDとも呼ばれる)。

10

【 0 0 0 7 】

この疾患に罹患している患者は、脳の皮質領域および皮質下領域、ならびに結腸神経節などの末梢ニューロンまたは神経節において、レビー小体(LB)と呼ばれる特徴的なユビキチン化細胞内封入体を発現させる。特に、ドーパミン作動性ニューロンまたはニューロン投射が高含量である領域は、この典型的な病理学的特徴を示す。近年、いくつかの研究が、シナプスタンパク質aSynが、LBD病因において中心的役割を演じることを明らかにすることができた。LBDにおいて、aSynは、罹患した大脳領域または末梢ニューロンおよび神経節のいたるところでLBに蓄積する。さらに、aSynの単一点突然変異ならびに遺伝子量の変化(たとえば、aSyn遺伝子の複製または増殖)は、まれな家族性パーキンソニズムを伴うことを実証することができた。重要なことは、トランスジェニック(tg)マウスならびにキイロショウジョウバエは、PD/LBD/DLBのいくつかの特徴を模倣するので、これらの動物モデルにおける過剰発現研究からの結果に基づいて、PD/LBDの病因におけるその重要な役割が強調される。

20

【 0 0 0 8 】

もう1つの非常に重要なシヌクレイノパチーは、多系統萎縮症(MSA)である。MSAは、L-DOPA抵抗性パーキンソニズム、小脳性運動失調および自律神経障害を特徴とする散発性の神経変性障害である。患者は、線条体、黒質、小脳、橋、ならびに下オリーブおよび脊髄などのさまざまな脳領域に影響を及ぼす多系統ニューロン喪失に苦しむ。MSAは、中枢神経系全体にわたるaSyn-陽性グリア細胞質(GCI)およびニューロン封入体を特徴とする。これらの封入体は、線条体黒質変性症、オリーブ-橋-小脳萎縮症、ならびに髄質および脊髄における自律神経核の関与を伴う。MSAの病因に対するGCIの重要性は、一般的に認められ、乏突起膠細胞におけるaSyn過剰発現の効果を分析する近年のトランスジェニックマウスモデルの分析によって強調される。ヒトaSynを過剰発現しているtgマウスにおいて、GCI-様凝集体およびMSAの生化学的マーカーの両方が観察された。

30

【 0 0 0 9 】

aSynの蓄積がシヌクレイノパチーにおける神経変性の典型的な特徴をもたらす正確なメカニズムは、完全には理解されていないが、近年の研究は、aSynの異常な形成および蓄積が、シヌクレイノパチーの根底にある変性過程に関与することをほのめかす。近年、aSynのさまざまな形態が、LBにおいて同定されている。タンパク質の全長型の他に、リン酸化、ニトロシル化/ニトロ化、アセチル化、およびモノ-、ジ-、またはトリ-ユビキチン化aSynなどの修飾されたaSynのさまざまな形態が同定されている。さらに、aSyn 1-119、aSyn 1-122およびaSyn 1-123などのC末端切断型タンパク質が、トランスジェニックマウスおよびPD/MSA症例の両方に由来する脳組織において検出されている。

40

【 0 0 1 0 】

LBおよびレビー神経突起またはGCIにおいて検出される15%以下のaSynが、先端切断されていると現在考えられている。先端切断型aSynを用いる、以前のインビトロ研究は、C末端の20-30個のアミノ酸を欠損しているaSynが、凝集し、レビー神経突起およびLBに見い

50

出されるフィラメントを形成する傾向の増大を示していることを実証することができた。さらに、LBに沈着したaSynの約90%が、セリン129(Ser129)においてリン酸化されている。対照的に、正常な脳では、総aSynのわずか4%しか、リン酸化されておらず、このことは、Ser129-リン酸化aSynの蓄積が、PDの病因において重要である可能性があることを示唆している。したがって、これらの先端切断型および/または修飾型のaSynは、aSynオリゴマー/小線維の形成のためのシード分子として働くと考えられる。したがって、全長aSynならびに先端切断型および/または修飾型のaSynは、結果として、蓄積して凝集体形成を導くと考えられる。近年の研究に基づいて、このような凝集体形成(すなわち、オリゴマーおよび小線維)は、たとえば、シナプス末端および軸索において、PD/LBD/シヌクレイノパチー発症のための重要な役割を演じると考えられ、先端切断型/修飾型のaSynの存在によって増強されることが可能であったと考えられる。

10

【0011】

シヌクレイノパチー、特にLBD/PDおよびMSAの診断は、段階的な動作緩慢の発生と次の異常：一次視覚、前庭、小脳や固有感覚機能障害によって引き起こされるものではない筋硬直、4-6 Hzの安静時振戦および/または姿勢の不安定の少なくとも1つに基づいて、純粋に臨床に行われる(Jankovic J.ら, J, Neurol, Neurosurg, Psychiatr, (2008)79(4): 368-76, criteria: United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank Diagnostic Criteria for Parkinson's Disease and Criteria of diagnosis of Parkinson disease(Gelbら, 1999)、Advisory Council of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke、US National Institutes of Healthによって委託および援助された)。さらに、PD/LBの診断は、追加の支持的臨床徴候の実現やアルツハイマー病、多発性脳梗塞および薬物誘発性パーキンソニズムなどのパーキンソン症候群を二次的に生み出しうる他の原因の除外に決定的に依存する。可能性の高いPD/LBD診断を確立するために、進行性核上性麻痺および多系統萎縮症などのパーキンソンプラス症候群も同様に除外されなければならない。

20

【0012】

MSAに対して、可能性の高いMSAの診断は、散発性で、厳密に定義された自律神経障害およびレボドパに対する応答性が乏しいパーキンソニズムまたは小脳性運動失調症などの進行性の成人発症障害を必要とする(Gilmanら Neurology. (2008)Aug 26;71(9):670-6. Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy.)。

30

【0013】

PD/LBD/MSAの臨床的診断の限界は、誤診率が高いこと(最高率を有する神経科医などの専門家による剖検で評価された診断特異性は、75-90%である; Jankovic J J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. (2008)79(4): 368-76.)、ならびに疾患が、機能障害をもたらす実質的なニューロン喪失を引き起こした遅い時点での診断のみが、可能であったという事実である。

【0014】

臨床診断に加えて、最先端の画像化技術が、現在、シヌクレイノパチーの診断を具体化するために用いられる。コンピューター断層撮影法および磁気共鳴画像法(MRI)による患者の脳の走査が通常用いられるが、大脳基底核の腫瘍、血管病変および水頭症などのパーキンソニズムの他の二次的原因を排除するために、分析が用いられる(Brooks DJら, J. Nucl. Med. (2010)51(4): 596-609)。しかしながら、特殊化したMRI技術(たとえば、拡散テンソル画像法(DTI))は、大脳基底核および中脳の構造の変更を探索することにより、より一貫性のある有望な結果を実証している。さらに、ドーパミン作動系に影響を及ぼさない他の疾患からドーパミン作動性神経変性(たとえば、PD/LBD)の形態を区別するために、ドーパミン作動性画像化が利用される。この画像化を、単光子放出コンピューター断層撮影(SPECT)またはPETを用いて行うことができる。たとえば、退行性パーキンソニズムと非退行性振戦疾患の間で診断的不確実性をもつ患者において、ドーパミン輸送体リガンド[¹²³I]イオフルパン(DaTscan(商標))によるベースライン画像化は、3年間の臨床診断に関して78%の感度および97%の特異度を示し、ベースライン臨床診断についてはそれぞれ93%およ

40

50

び46%を示した(Cummings JLら、Brain.(2011);134(11):3146-3166.)。

【0015】

シヌクレイノパチーを診断するための現在のアルゴリズムは、疾患の早期における確実な診断のための感度および特異度の欠如に悩まされている。診断能力を増強するために、臨床ならびに画像化データを、疾患特異的バイオマーカーにおける病態生理学的に意味のある変化と組合わせて使用しなければならない。構造的MRI；ADに典型的な脳脊髄液の特徴(低いA β 42、高い総タウ、高いホスホ-タウ)；正のアミロイド画像化；定義された遺伝的リスク；によって評価される海馬萎縮を有するアルツハイマー病に例示されるこのような変化は、国際的加齢研究所(NIA、NIH、USA)、NIH NINCDS作業部会、およびアルツハイマー病協会などの国際的規制期間および利益団体によって助言される、ADについての診断手順における根本的变化のための基本である(Duboisら、Lancet Neurol.9(2010): 1118-1127)。

10

【0016】

残念ながら、PD/LBD/MSAについて、現在までに、利用可能な検証されたそのようなバイオマーカーデータはない。しかしながら、パーキンソン病のためのマイケル・ジェイ・フォックス財団の指導下で臨床および生医学研究者の国際的な共同体が、近年、パーキンソン病進行のバイオマーカーを識別するための高度な画像処理、生物学的サンプリングならびに臨床的および行動的評価を用いる、最近診断されたPD患者と健常者のコホートを総合的に評価する重大な臨床試験である、パーキンソン病進行マーカーの新たな取り組み(PPMI)を開始している。主な目的の1つは、シヌクレイノパチーにおける疾患進行についての可能性のあるバイオマーカーとしてさまざまな体液中のaSynレベルの変化を評価することである。この目的は、疾患進行について、ならびに、さまざまな生体組織および体液中のaSynの同定における、aSynの可能性のある中心的役割に基づいている。LebouvierらおよびShannonらによる研究は、PD患者の末梢組織におけるaSyn病理を実証した(Lebouvierら、PLoS ONE(2010)5(9): e12728；Shannonら、Mov. Disord. (2012)27: 709-715)。aSynもまた、シヌクレイノパチー患者および健康なコントロールのCSFおよび血漿中で同定されている(Borghiaら Neuroscience Letters、(2000)287: 1、pp65-67；Journal of Neural Transmission(2006)、113、10、pp 1435-1439；Leeら、Experimental Neurology、(2007)204: 2、pp583-588)。興味深いことには、Qiao-Xin Liら(Experimental Neurology、(2007)204: 2、pp 583-588)による近年の研究は、PD被験者からの血漿中のaSynレベルが、年齢を適合させたコントロールよりも有意に低く(p=0.001)、早期発症型PD患者のaSynレベルは、遅発性PD被験者およびコントロールの両方のレベルよりも低いことを示したが、Leeらは、血漿aSynレベルが、PDおよびMSA患者において、コントロールと比較して、実際に増加されることを示したので、健康な被験者および疾患の被験者のaSynのレベルにおいて矛盾する証拠がある。El-Agnafらは、ヒト血漿中の凝集した(オリゴマー化した)aSynの存在を実証し、27人のコントロールと比較して、34人のPD患者から得られた血漿サンプル中の有意に上昇した(P=0.002)レベルのaSynのオリゴマー体の存在を報告することができた；(El-Agnafら、FASEB J.(2006)20、419-425)。Smithら(PLoS ONE(2012)7(12): e52285およびその参考文献)は、PDおよび非PD患者において有意な差異を検出できなかったことを明らかにした。これらの不一致は、新たなバイオマーカーの検証において生じる問題を実証し、早期診断のための新たな検証されたバイオマーカーを同定する必要性に根拠を与える。さらに、Wangらもまた、翻訳後修飾されたaSyn(pS129)のCFSレベルが、PD疾患の重篤度と弱い相関関係があり、総aSyn濃度と組合わせる場合、第二の顕著なシヌクレイノパチーであるMSA、および特にシヌクレインを含む原発性の病変を有する第三の神経変性疾患である進行性核上まひ(PSP)からPDを区別することに寄与することを実証した(Wangら、Sci Transl Med.(2012)Feb 15;4(121))。

20

30

40

【0017】

異なる組織におけるaSynのさまざまな形態(すなわち、全長、先端切断型、リン酸化(主としてS129にて)、ニトロシル化およびユビキチン化aSyn；およびこれらの形態のオリゴマーおよび凝集体)の単なる検出に加えて、いくつかの研究グループが、健康者および突

50

発性または遺伝性シヌクレイノパチーに罹患している疾患患者からの血清/血漿または血漿生成物(たとえば: IVIG)に対する自己抗体を同定することができた。Woulfeらは、PD患者において、2002年においてすでに、抗aSyn Abを検出することができた(Neurology 58:(2002)1435-1436)。Papachroniらは、ウエスタンブロット分析によって、PD患者およびコントロール個人の末梢血清中のシヌクレインファミリーのメンバーに対するAbの存在を調べた。モノマー β -または γ -シヌクレインに対するAbの存在は、PDの関連性を示さなかった。しかしながら、モノマーaSynに対するマルチエピトープのAbは、すべての患者の65%において検出することができ、疾患の遺伝性モードと強い相関関係を示した。突発性形態のPDを有する患者におけるAb存在の頻度は、コントロールグループにおける頻度と有意に相違しなかったが、家族性形態のPDを有する患者の非常に高い割合(90%)が、aSynに対するAbに対して陽性であった(Papachroniら、Journal of Neurochemistry、(2007)101: 749-756)。したがって、Patriasらは、健康なコントロールから得られた3つの静脈内免疫グロブリン(IVIG)製剤、ガムネックス(Talecris Biotherapeutics)、ガンマガード(Baxter Healthcare)およびフレボガンマ(Grifols Biologicals)において、aSynモノマーおよび可溶性オリゴマー(aSynのモノマーならびに未確定の凝集体を含む)に特異的なAbを同定することができた。天然のIVIG製剤において抗体を測定し、抗体-抗原複合体解離後、ELISAおよびウエスタンブロットによって反応性を評価した。

10

【0018】

さらに、主として従来のELISAおよび免疫ブロット技術による分析に基づく健康なコントロールおよび疾患患者における抗aSyn Abのレベルに関するさまざまな報告が発表されている。2002年に、Woulfeらは、ELISAによってPDおよびコントロールの間の変化を検出することはできなかった。対照的に、Grudenら(2011、2012)および Yanamandraら(2011)は、抗aSyn Abが、コントロールと比較して、PD患者において増加すること、特に疾患の早期(早期PD(ホーエンアンドヤールステージ1-2)における最高の増加)およびコントロールと比較して後期PD(ホーエンアンドヤールステージ2.5-4)における増加を実証した。後期においては、コントロールと比較して、PD患者においてより少ない増加が検出可能であった。Yamandraらは、抗モノマーaSynの反応性のELISAおよび免疫ブロット分析によって、早期PD患者のグループでは、個人の63%が、高い反応性を示すことを実証することができた(コントロールと比較して、平均で5倍、メジアンレベルで10倍)。後期PDグループにおいて、免疫反応は低下し、コントロールと比較して、それぞれ平均およびメジアンにおいて約4および6倍の増加を示し(P,0.007)、患者の約58%が、高レベルの抗体を示す。この報告において、ELISAおよびウエスタンブロット分析の診断能力もまた統計的に評価された(受信者動作特性(ROC)分析)。早期および後期PD患者においてELISAによって決定された自己免疫反応性についてのROC曲線下面積(AUC)は、コントロールと比較して、それぞれ0.884(95% 信頼区間0.79~0.97)および0.779(0.6~0.95)であった。ウエスタンブロットデータについての対応するROC曲線から計算されたAUC値は、それぞれ、早期PD対コントロールについて0.85(0.74-0.95)であり、後期PD対コントロールについて0.817(0.67-0.95)であった。これは、モノマーaSynに対する自己免疫反応が、早期および後期PD患者において診断的価値を有することを指示するが、最適設定における患者の同定率は約60%にすぎない。オリゴマー体のaSynへの有意な結合を検出することはできず、線維状aSynに対する反応性の分析もまた、早期PD、後期PDまたはコントロールにおいて有意な差異が観察されないことを示した。早期/後期PD患者対コントロールにおける線維に対する免疫反応のROC分析は、0.5より大きくないAUC値および対角線に近いROC曲線を与え、このことは、診断的価値が無い、またはほとんど無いことを示す。年齢または性別とともに、PD患者およびコントロールにおけるaSyn線維に対する免疫反応の間には、有意な相関関係は無かった(Grudenら、J Neuroimmunol 233(2011): 221-227.; Yanamandraら、PLoS One 6(2011): e18513.; Grudenら、Neuroimmunomodulation 19(2012):334-342)。

20

30

40

【0019】

対照的に、Besong-Agboらは、PD患者のAbレベルが、健康なコントロールおよびアルツハイマー病に罹患している患者と比較して低いことを示したのに対して、Smithらは、シ

50

ヌクレイノパチー患者および健康なコントロールと比較して有意な変化がないことを示した(Neurology. 2013 Jan 8;80(2):169-75)。天然の α -シヌクレイン自己抗体レベルは、パーキンソン病患者において、より低い(Besong-Agboら、PLoS ONE 7(12)(2012): e52285 およびその参考文献)。

【 0 0 2 0 】

WO 2010/069603 A1およびEP 2 366 714 A1は、aSynでコーティングされた粒子で抗体を検出することを含む、PD患者の血清または血漿中のaSyn特異的抗体を検出する方法を開示する。Papachroniら(J. Neurochem. 101(2007): 749-756)は、遺伝性PDにおけるaSynに対する自己抗体について報告する。Apetriら(J. Mol. Biol. 255(2006): 63-71)は、ラマン顕微鏡法および原子間力顕微鏡法によって、aSynオリゴマーの二次構造を分析する。血液中の抗aSyn抗体の捕捉に用いられるaSyn凝集体の検出の開示はない。

10

【 0 0 2 1 】

WO 97/14028 A2は、特異的マーカーで標識された「ビーズセット」を用い、FACSを用いる多重分析システムを開示する。Spellsら(Abstract of the 29th annual meeting of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics: S113)は、HLA抗原でコーティングされたポリスチレンビーズで検出されたHLA抗体の特異性を報告する。Liら(BMC Neuroscience 8(2007): 22)は、循環する抗A β 抗体のELISA測定のための低pH抗原-抗体解離手順の改良を示す。

【 0 0 2 2 】

要約すると、今までのところ、これらの方法(全長、先端切断型または修飾型ならびに凝集体などのaSynの検出、あるいはBiacore、ELISAもしくはウエスタンブロットによってそれらを特異的に検出する抗体の検出)はいずれも、PD/LBD/MSAまたはいずれかの他のシヌクレイノパチーのための予測バイオマーカーとしてそれらを適格(>80%の特異性)とする基準を満たしていない。

20

【 0 0 2 3 】

上述したように、低リスクかつ低コストで、繰り返し適用することができる信頼できるバイオマーカーが依然として欠乏している。このことは、これまでに行われた血液ベースのAD、PDおよびMSAバイオマーカーを開発するためのすべての努力が失敗したために特に当てはまる(Hampelら、Nat. Rev. Drug Discov. 9(2010): 560-574)。このようなバイオマーカーのアベイラビリティは、疾患修飾療法の開発のために、最も重要である。このよう

30

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 2 4 】

PD/LBD、DLB、PDD、PAF、RBD、MSA、1型NBIAなどのシヌクレイノパチーの診断を改良するための方法、特に、疾患の早期を追跡するための方法、およびシヌクレイノパチーの治療用薬物のための臨床試験の進行を観察するための方法を提供することが本発明の目的である。本発明のさらなる目的は、生体サンプル中、特に、ヒトシヌクレイノパチー患者、あるいはPD/LBD、DLB、PDD、PAF、RBD、MSA、1型NBIA、IBMなどのシヌクレイノパチーを有することが疑われるか、または発症のリスクがあるヒト個人のサンプル中の抗aSyn抗体を検出するための信頼できるツールを提供することである。

40

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 2 5 】

したがって、本発明は、以下のステップ：

サンプルをaSyn含有凝集体、特に、aSynからなる凝集体と接触させて、aSyn特異的抗体をaSyn含有凝集体に結合させ、次いで、

単一粒子検出技術、好ましくは蛍光活性化細胞分類(FACS)によって、aSyn含有凝集体に結合したaSyn特異的抗体を検出すること、

50

を含む、生体サンプル中のaSyn特異的抗体を検出する方法を提供する。

【0026】

本発明では、PD/LBD、DLB、PDD、PAF、RBD、MSA、1型NBIAなどのシヌクレイノパチーの診断、およびこれらの疾患ならびにアルツハイマー病(AD)、ダウン症候群(DS)、PSP、CBD、FTD/PiDの発症のモニタリングにおいて非常に有用な診断ツールとして用いることができる、aSyn特異的抗体、特に、aSyn特異的自己抗体の新規な検出方法が開示される。本発明方法は、aSyn特異的抗体の捕捉ツールとして単一のペプチドが用いられるのみならず、代わって、aSynからなる凝集体(「aSynからなる凝集体(aSyn-consisting-aggregates)」)または特に、aSynを含む凝集体(「aSyn含有凝集体(aSyn-comprising-aggregates)」)も用いられる発明に基づき、そして、それによって生成された抗体-aSyn-凝集複合体が、単一粒子検出技術を用いて検出される発明に基づく。もし、aSyn含有凝集体とaSynからなる凝集体の両方が本明細書において用いられる場合、aSynからなる凝集体が本発明のaSyn凝集体の好ましい実施態様であるので、用語「aSyn凝集体」は、「aSyn含有凝集体」、特に「aSynからなる凝集体」を意味する。

10

【0027】

要約すると、aSynからなる凝集体は、全長aSynタンパク質(上記で開示したように、140aa長のタンパク質)からなる凝集体である。aSyn含有凝集体は、他の成分、A β 1-42、A β p(E)3-42(または他のA β の形態)、腓島アミロイドポリペプチド、タウタンパク質(リン酸化タウなど)、TAR-DNA結合タンパク質43(TDP43)などの特に他のアミロイド原性ポリペプチドに加えて、aSynタンパク質を含有する。本発明のために、用語「aSyn含有凝集体」は、aSyn(全長aSyn140aaタンパク質)の代わりに、またはaSyn(全長aSyn140aaタンパク質)以外に、先端切断型または修飾型aSynポリペプチド、特に、aSyn-98(エクソン3および5を欠損)、aSyn-126(aa41-54を欠損；エクソン4の喪失)およびaSyn-112(aa103-130を欠損；エクソン5の喪失)、リン酸化(特にセリン129-セリン129)、ニトロシル化/ニトロ化、アセチル化およびモノ-、ジ-またはトリ-ユビキチン化aSyn、またはC末端20アミノ酸欠損、好ましくはC末端25アミノ酸欠損、特にC末端30アミノ酸欠損などのaSynのC-末端先端切断型などのaSynの天然の形態であるaSynポリペプチドを含有する凝集体も包含する。このような凝集体成分、特に上述したaSyn変異体のための前提条件は、これらの成分が、凝集体を形成する能力がある(すなわち、本発明、特に実施例セクションの開示にしたがって適用された条件下で凝集体を形成する能力がある)ことである。

20

30

【0028】

本発明のaSyn凝集体は、たとえば、aSynまたはaSyn、およびA β ポリペプチド(特にA β 1-42、A β p(E)3-42(または他のA β の形態))、腓島アミロイドポリペプチド、タウタンパク質、TDP43；および/または先端切断型または修飾型aSynポリペプチドなどの他の凝集体タンパク質/ポリペプチドなどの凝集体形成タンパク質の一夜のインキュベーションによって生成される。続いて、aSyn-(含有またはからなる)凝集体を、健康なドナー(HD)、あるいは患者、特にPDおよびMSA患者もしくはPDおよびMSAを有する疑いがある患者のいずれかに由来する血清サンプルとともにインキュベートして、患者抗体(IgGおよびIgMの両方)を結合させる。aSyn含有凝集体、特に、aSynからなる凝集体に結合した抗体を、当業者に利用可能な任意の適当な方法、たとえば、aSyn凝集体に結合したaSyn特異的抗体を認識する標識二次抗体を用いることによって検出することができる。たとえば、フィコエリスリン(PE)標識二次抗体を用いることができる。その後、aSyn凝集体(および任意に1つ以上の二次抗体などの検出剤)に結合したaSyn特異的抗体を含む免疫複合体を、フローサイトメトリーとしても知られるFACS(蛍光活性化細胞分類)分析などの単一粒子検出技術を用いて測定する。次いで、特定のサンプルについて得られたaSyn特異的抗体のレベルを、健康サンプルのレベルまたは既知の疾患状態にある患者のサンプルのレベル、たとえば、PDおよびMSA患者のサンプルのレベルと比較することができる。本発明方法を用いて、PDおよびMSA患者が、健康な被験者と比較して、本発明にしたがって提供されたaSyn凝集体(遊離aSyn特異的免疫グロブリン)に対して反応性であるaSyn特異的免疫グロブリンをさまざまなレベルで有することを明らかにすることができた。さらに、本発明方法を用いて、PDおよび

40

50

MSA患者由来のaSyn特異的免疫グロブリンの反応性(本発明にしたがって提供されるaSyn凝集体に対する)が、デマスキング(潜在的に結合したaSyn抗原を自己抗体から除去すること)として知られる手順によって増加されうること明らかにすることができた。このことは、これらの血清を特別な方法で処理した後にaSyn凝集体に対する反応性の増加を検出することができない健康な被験者からのaSyn特異的免疫グロブリンの反応性とは対照的である。一方、デマスキング(すなわち、血清中で既に結合したaSynの解離)後のIgM抗体の反応性は、PDおよびMSA患者において、IgMのレベルの増加を示した。さらに、デマスキング有りおよび無しのIgGレベルの間の差異を決定した(デルタ(Δ)値)。このパラメーターも、健康なコントロールと比較して、PDおよびMSA患者において上昇し、疾患の病理状態におけるaSynによる抗体の、より高い抗体占有を明らかにした。さらに、本発明によって提供されるデータは、本発明方法が、非常に高いaSyn特異的抗体を検出する能力を有し、したがって、これまでに公表された方法と比較して、PDおよびMSAなどの非常に高い診断力を有することを明らかにする。これらの事実を考慮すると、本発明方法は、シヌクレイノパチー、特にPDおよびMSAを同定し、特定の患者の治療に対する臨床的応答を追跡するための予測診断ツールの理論的な前提条件を満たす。

10

20

30

40

50

【0029】

本発明は、ヒトサンプル中のaSyn特異的抗体の分析のために開発された。したがって、本発明は、ヒトaSyn特異的抗体、好ましくはヒトIgGまたはIgM抗体、特にヒトIgG抗体を検出する好ましい実施態様である。すでに言及したように、ヒトにおけるaSyn特異的抗体の検出は、当技術分野において原理上は知られている；しかしながら、可能なバイオマーカーとしての役割を実証することができなかった。本発明から明らかのように、このことは、当技術分野で利用可能な検出方法の分析的不十分性によるものでもあった。本発明方法が優れていることにより、ヒトサンプルにおけるバイオマーカーとしてのこれらの抗体の利用可能性が、有効になる。したがって、本発明方法は、生物サンプル中の自己抗体を検出するのに特に適している。したがって、本発明の好ましい実施態様において、検出および定量されるべきaSyn特異的抗体は、自己抗体である。

【0030】

従来技術の方法とは対照的に、本発明方法は、サンプルからaSyn特異的抗体を結合するためのプローブとしてaSyn凝集体を用いる。このような凝集体は、当技術分野において原理上は知られているが、特にヒトサンプル中のaSyn特異的抗体の分析において、このような凝集体の使用が、FACSなどの単一粒子検出技術との組合せにおいても、このような方法を著しく改良することができるということは、実現されなかった。このような凝集体の使用により、単一粒子検出技術(さまざまな異なる分野および異なる問題において確立された技術である)による検出は、通常、非常に複雑であり取り扱いが難しいヒトサンプル(血液など)中のaSyn特異的抗体を分析することが可能になる。

【0031】

本発明に使用されるべき凝集体のサイズが、分析用途のために規格化されるのが好ましい。これは、凝集体の生成中に特定のパラメーターを既定することによってなしうる。凝集体の生成中に適用される条件に応じて、凝集体のサイズを調整することができる。本発明のaSyn凝集体の好ましいサイズは、50 nm~15 μ m、好ましくは100 nm~10 μ m、特に500 nm~5 μ mである(凝集体の長さ、すなわち、最長の長さによって決定される)。

【0032】

本発明に適した凝集体を提供するための好ましい方法は、全長aSyn(1-140)、aSyn-98、aSyn-112およびaSyn-126またはリン酸化(特にセリン129-セリン129)、ニトロシル化/ニトロ化、アセチル化およびモノ-、ジ-またはトリ-ユビキチン化aSyn、またはC末端20-30アミノ酸欠損もしくは凝集体を形成する能力があるより短いaSynタンパク質などのaSynのC末端切断型などの修飾された全長aSynなどの天然スプライス変異体を、pH2~9にて、少なくとも20分、好ましくは少なくとも1時間、特に少なくとも4時間インキュベートするステップを含む。インキュベーションの期間は、凝集体のサイズを調整するパラメーターの1つである：インキュベーションを長く行くと、凝集体は、より大きくなる。典型的なイン

キュベーション時間は、10分～24時間である。インキュベーション時間が短い場合、通常、凝集体のサイズは非常に小さく、その数も少ない：48時間よりも非常に長いインキュベーション時間をかけて生成された凝集体は、通常、本発明方法には好ましくない。もちろん、所望のサイズを達成するために、たとえば、分画遠心分離および類似の技術によって、凝集体が必要に応じて、仕分けされ、「篩い分け」されてもよい。

【0033】

本発明のaSyn含有凝集体の好ましい実施態様は、aSynまたはaSynポリペプチドに加えて、A β またはその変異体を含む凝集体に関する。aSynに関しては、凝集体形成が可能である変異体のみが使用される。したがって、以下のグループのA β 変異体が、aSyn含有凝集体において特に好ましい(最も好ましいグループ4、次いで、グループ3、次いで、グループ2およびグループ1)。

10

【0034】

グループ1のA β 変異体：コア配列A β 16-20または第二コア配列A β 25-35を含むペプチド。これらのペプチドは、それら自体によって、アミロイド線維を形成することが明らかにされている。これらのコア配列から出発して、ペプチドは、A β ペプチドに存在するアミノ酸によって、または先端切断型天然A β ペプチドもしくは先端切断型修飾A β ペプチドのいずれかを形成する別のアミノ酸によって、伸長されうる。

【0035】

グループ2のA β 変異体：配列A β 16-20-X₂₁₋₂₃-24-28-X₂₉₋₃₀-31-36(aa 16～20、24～28および31～36が、存在し、3および2 aaのリンカー(任意の一次配列)によって結合されることを意味する)を含むペプチド。この配列から出発して、ペプチドは、A β ペプチドに存在するアミノ酸によって、または先端切断型天然A β ペプチドもしくは先端切断型修飾A β ペプチドのいずれかを形成する別のアミノ酸によって、伸長されうる。

20

【0036】

グループ3のA β 変異体：配列A β 16-36を含むペプチド。この配列から出発して、ペプチドは、A β ペプチドに存在するアミノ酸によって、または先端切断型天然A β ペプチドもしくは先端切断型修飾A β ペプチドのいずれかを形成する別のアミノ酸によって、伸長されうる。

【0037】

グループ4のA β 変異体：配列11-36またはA β p(E)11-36を含むペプチド。この配列から出発して、ペプチドは、A β ペプチドに存在するアミノ酸によって、または先端切断型天然A β ペプチドもしくは先端切断型修飾A β ペプチドのいずれかを形成する別のアミノ酸によって、伸長されうる。

30

【0038】

本発明のaSyn含有凝集体のもう1つの好ましい実施態様は、aSynまたはaSynポリペプチドに加えて、タウタンパク質またはその変異体を含む凝集体に関する。aSyn(およびA β)に関しては、凝集体形成が可能である変異体のみが使用される。しかしながら、最も好ましいのは、タウの凝集体であり、他のaSyn含有凝集体は、修飾型または先端切断型のタウ(たとえば、タウ441+過リン酸化タウ441および/またはタウのより短いバージョン(たとえば、タウ412、410、383、381、352)、特に健康者において天然に生じるものまたは、特に、疾患に対するマーカー機能を有するタウタンパク質変異体(全6種の天然のアイソフォームまたはその突然変異体(たとえば、P301L、P301S、V337Mなど)のいずれか、たとえば、好ましくはアミノ酸181、202、205、212、214、231、396および任意に18、153、175、199、235、262、394、404および422などのタウに存在するさらなる残基において同時にリン酸化されたものを含む)。

40

【0039】

本発明のaSyn含有凝集体のもう1つの好ましい実施態様は、aSynまたはaSynポリペプチドに加えて、膵島アミロイドポリペプチド(IAPP)またはその変異体を含む凝集体に関する。IAPPは、89アミノ酸残基のプレプロホルモンとして合成される。シグナル配列の切断は、67アミノ酸を含むプロIAPPをもたらす。後者は、さらに処理された、37残基の

50

成熟 IAPP になる。プロ IAPP の正常なプロセッシングは、その COOH 末端における切断(おそらくトランスゴルジネットワーク内のプロホルモンコンバーターゼ 1/3 による)、次いで、その NH₂ 末端(プロホルモンコンバーターゼ 2 による)における切断によって開始され、成熟型の IAPP を形成する二段階プロセスであることが明らかにされている。IAPP は、哺乳動物種間で、よく保存されているが、アミノ酸 20 と 29 の間に注目すべき変動がある。この領域間の差異は、IAPP の凝集し、アミロイドを形成する能力を決定する。実際に、この領域に 1 つ以上のプロリン残基を有する種(ネコ以外)は、膵島アミロイドを形成しない。IAPP は、凝集して、2 型糖尿病(T2D)患者およびサルおよびネコなどの他の哺乳動物種における β 機能障害および死亡に関連している膵島アミロイド沈着を形成するその能力を通して発見された。アミロイドは、 β プリーツシート構造をもつ不溶性、線維性のタンパク質凝集体である。アミロイドは、コンゴレッドまたはチオフラビン S による染色後、特徴的な光学特性をもち、光学顕微鏡検査によって分析されうる。しかしながら、アミロイドの発達は、光学顕微鏡検査によってアミロイドの形跡が観察される前に電子顕微鏡検査によって検出されうる線維または凝集体(直径 7-10 nm および長さ数百 nm)の形成から始まる。T2D 患者において、膵臓組織の組織学的分析は、IAPP 凝集体の蓄積が、 β 細胞量の交換を導き、進行性の β 機能障害および高血糖をもたらすことを示す。その他に、IAPP 線維は、膵臓において直接損傷効果を有するようにみえる。膵臓アミロイド沈着物は、II 型糖尿病患者の 95% 以上において見い出され、それらの形成は、疾患の進行に非常に関連している。一般に、アミロイドは、タンパク質から形成され、それらの非凝集状態においてコンパクトな三次構造へ折り畳まれうるか、または可溶性の天然の状態においてコンパクトな三次構造を採用することができない本質的に無秩序なポリペプチドから生じうる。IAPP は、インビボでアミロイドを形成する本質的に無秩序なポリペプチドの重要な例である。IAPP は、T2D 患者の膵臓における膵島アミロイドの主な成分であるが、少なくとも 2 つのさらなる成分が、これらの沈着物において同定されている：アポ E およびヘパラン硫酸プロテオグリカンバールカン(HSPG)。アミロイド形成の動力学は複雑であり、可溶性ペプチドがアミロイド線維と平衡状態にある最終的定常状態を特徴とする S 字状のプロフィールを示す。アミロイド形成は、「シーディング」と呼ばれる、少量の予め形成された線維の添加によって促進されうる。T2D において分泌される IAPP の画分は、不完全に処理される。プロ IAPP の低下した NH₂ 末端処理は、アミロイド形成および β 細胞死をもたらす。NH₂ 末端で伸長されたヒトプロ IAPP 中間体(IAPP-Npro)の蓄積は、アミロイド形成における決定的な開始ステップである。実際に、IAPP-Npro は、溶液中で、成熟 IAPP よりもアミロイド原性が低いことが見い出されたが、HSPG の成分であるグリコサミノグリカン(GAG)と、より効果的に相互作用する。したがって、IAPP は、損なわれた NH₂ 末端プロセッシングを形成し、特に、IAPP-Npro は、本発明の aSyn 含有凝集体において好ましい形態である。

10

20

30

【0040】

本発明の aSyn 含有凝集体のもう 1 つの好ましい実施態様は、aSyn または aSyn ポリペプチドに加えて、少なくとも 2 つのさらなる凝集体成分、特に、1 つ以上の A β またはその変異体および / または 1 つ以上のタウタンパク質またはその変異体および / または 1 つ以上の IAPP またはその変異体を含有する凝集体に関する。

【0041】

本発明の aSyn 含有凝集体のもう 1 つの好ましい実施態様は、本明細書に開示される aSyn または aSyn 変異体に加えて、異なる凝集体形成ポリペプチド種の凝集体成分を含む凝集体に関する(本明細書で用いる用語「ポリペプチド」は、用語「タンパク質」をカバーしており、通常、これらの 2 つの用語は、同義的に用いられる；したがって、用語「タンパク質」は、本明細書において、100 未満または 50 未満のアミノ酸残基をもつポリペプチドにも適用される)。このさらなる凝集体形成ポリペプチド種が、タウタンパク質またはその凝集体形成変異体、A β 1-42 ペプチドまたはその凝集体形成変異体；IAPP およびその凝集体形成変異体、特に IAPP-Npro、TAR-DNA 結合タンパク質 43(TDP43) またはその凝集体形成変異体；およびスーパーオキシド・ジスムターゼ 1(SOD1) またはその凝集体形成変異体から選ばれるのが好ましい。

40

50

【0042】

すでに述べたように、好ましいタウ(タウ変異体)の凝集体形成変異体は、過リン酸化タウ、異常リン酸化タウ(Shahaniら、J. Neurosci. 26(2006)、6103-6114においてそのように称され、定義されている)、疾患に対するマーカー機能を有するタウタンパク質変異体(全6種の天然のアイソフォーム(タウ441、タウ412、タウ410、タウ383、タウ381、タウ352)またはその突然変異体(たとえば、P301L、P301S、V337Mなど)のいずれか、たとえば、タウ441、タウ412、タウ410、タウ383、タウ381、タウ352の好ましくはアミノ酸181、202、205、212、214、231、396および任意に18、153、175、189、235、262、394、404および422などのタウに存在するさらなる残基において同時にリン酸化された形態(タウリン酸化のより詳細な分析は、Hangerら、Trends in Mol. Med. 15(2009)、112-119などに開示されている。)である。

10

【0043】

本発明方法にしたがって、aSyn特異的抗体が検出されるべきサンプルを、aSyn凝集体と接触させて、サンプル中に存在する(およびaSyn凝集体に対して反応性である)可能性のあるaSyn特異的抗体の結合を達成する。したがって、aSyn凝集体の濃度は、抗体のための十分な結合位置を提供するように調節されている。したがって、サンプル中の抗体を結合するためのaSyn凝集体の濃度は、好ましくは0.01~10 μ M、好ましくは0.1~1 μ Mである。最適濃度は、結合されるべき抗体の性、サンプルの性質、計画された接触時間および凝集体のサイズにも従属する。

【0044】

20

本発明方法は、主として、ヒトサンプルにおける適用を目的とする。したがって、生体サンプルが、ヒト血液またはヒト血液由来のサンプルであるのが好ましく、ヒト血清またはヒト血漿；ヒト脳脊髄液またはヒトリンパ液であるのが好ましい。サンプル源に関して、一連の定期的試験を確立してもよい(特に、サンプルが血液由来である場合)。

【0045】

サンプル中の抗体の、凝集体への適当な結合を可能にする好ましい接触時間は、少なくとも10分(たとえば、10分~48時間)、好ましくは15分~24時間、特に30分~2時間である。

【0046】

もし生体サンプルが特別に前処理されないならば、aSyn凝集体への結合能力をもつaSyn特異的抗体は、aSyn凝集体との接触中に結合される。サンプル中でマスクされるaSyn特異的抗体(すなわち、既に結合パートナー(たとえば、aSyn含有構造、または内因性aSynペプチド)に結合している抗体)は、本発明方法(そのような特別なサンプル前処理が不在)によって検出されない。反応性抗体のみの同定および定量が、多くの場合、それで十分であって、望ましいものであるが、サンプル中のaSyn特異的抗体の総量(反応性および非反応性)、あるいは反応性aSyn特異的抗体の数、非反応性(マスクされた)aSyn特異的抗体の数およびaSyn特異的抗体の総数のすべてが、検出されるべきである状況または診断的課題がありうる。

30

【0047】

したがって、本発明のもう1つの好ましい実施態様では、サンプルは、デマスクされる、すなわち、aSyn特異的抗体が、本発明のaSyn凝集体との接触前にサンプル中に存在する結合パートナーへの結合から「遊離」される。このことは、サンプル中の結合パートナーに結合されない抗体(「遊離」または「反応性」抗体)の検出のみならず、サンプル中のすべてのaSyn特異的抗体の検出を可能にする。本発明の過程では、反応性aSyn特異的抗体、特に反応性aSyn特異的IgGの量が、PDおよびMSAの診断および進行の重要なマーカーであることが決定された。上述のとおり、本発明方法は、サンプル中のaSyn特異的抗体の総量、すなわち、サンプル中の遊離(または反応性)抗体ならびにすでに結合した抗体(たとえば、aSyn構造)の決定にも適している。これは、PDおよびMSA診断のためにも非常に重要なパラメーターである、サンプル中の「反応性」対「非反応性」抗体の差分(Δ)を確立するのに役立つ。このような差分は、PDおよびMSAに関して、「健康状態」のヒトにおいて

40

50

存在しない(または低い)であるのに対して、この差分は、aSyn特異的IgGおよびaSyn特異的IgMの両方に関して、PDおよびMSAにおけるマーカー機能にとって不可欠である。

【0048】

本発明方法は、単一粒子検出技術を応用する。このような技術は、aSyn凝集体へのaSyn特異的抗体の「陽性」結合結果の数および量の同定および定量(カウント)を可能にする。この技術の好ましい具体例は、当技術分野において確立された技術であるFACSである。aSyn凝集体に結合した抗体を検出するために用いられるべき他の検出方法は、たとえば、ルミネックスまたはマスサイトメトリーである。

【0049】

ルミネックス技術によれば、サンプル調製は、「材料および方法」で記載したように行うことができる。サンプル調製の後、たとえば、ルミネックス・リーダーなどの多重検出システムにおいて検出されうる蛍光染色されたマイクロスフェアにカップリングした二次抗体によって、特定のaSyn特異的抗体によって認識されるaSyn凝集体を検出することができる(Binderら、Lupus15(2005):412-421)。

10

【0050】

マスサイトメトリーを単一粒子検出技術として用いるならば、サンプル調製を、後記実施例セクションの「材料および方法」に記載したように行ってもよい。サンプル調製の後、原子質量分析によって検出されうる遷移元素の安定同位体にカップリングした二次抗体によって、特異的抗体によって認識されるaSyn凝集体を検出することができる。次いで、>5,500 Kに加熱したアルゴンプラズマ充填誘導コイルを通して、サンプルを噴霧すること
20
ことができる。サンプルを気化し、イオン化して、原子的構成要素にし、飛行時間型質量分析によって、同位体タグ付けされた抗体の数を定量する(Janesら、Nat. Biotechnol. 29 (2011):602-604)。

20

【0051】

別法として、1つの結合パートナー(aSyn凝集体または抗体/血清)が固定されているが、結合は流動条件下で測定される単粒子検出技術を用いることも可能である。Hybcell技術および表面プラズモン共鳴技術が例示される。本発明においてHybcell技術をもちいて、血清サンプルをHybcellの表面にスポットティングすることができ(回転シリンダー)、直接
30
蛍光標識され、プレインキュベートされたaSyn凝集体を用いて、あるいは蛍光標識されたモノクローナルaSyn特異的二次抗体を用いて、インキュベーションを行なうことができる。aSyn凝集体に結合した抗体は、レーザーにより検出される(Ronacher、Anagnostics Technical Note ANA-TN-005 (2010))。本発明方法において表面プラズモン共鳴を用いるならば、逆のセットアップを適用することができる：プレインキュベートされたaSyn凝集体をチップ表面に固定化することができる。血清からチップ上のaSyn凝集体へのaSyn特異的抗体の結合は、チップ表面の質量の増加によって検出することができ、したがって、結合パートナーの標識は必要ない。感度を高めるか、またはIgGサブタイプを決定するために、抗IgG-ABの連続注入が可能である(Cannonら、Anal. Biochem. 328 (2004):67-75)。チップ表面にaSyn凝集体を直接固定化する代わりに、捕捉抗体を用いることができる。このセットアップのために、aSyn特異的抗体をチップ表面に固定化し、プレインキュベートされたaSyn凝集体を注入する。凝集体を捕捉した後、血清を注入し、質量の増加により、反応
40
性を測定する。

30

40

【0052】

本発明によるaSyn凝集体へのaSyn特異的抗体の結合の検出は、二次抗体(たとえば、二次標識抗IgGまたは抗IgM抗体)によるaSyn凝集体へのaSyn特異的抗体の結合を検出するための、たとえば、蛍光分光法(Missailidisら、Methods in Molecular Biology 248 (2003):431-441)などのいずれかの適当な方法によって行なうことができる。

【0053】

凝集体に結合した自己抗体の検出は、プロテインAまたはプロテインGなどの、抗体を特異的に結合する基質を用いて行なうことができる。もう一つの可能性は、aSyn凝集体を用いて、aSyn凝集体特異的自己抗体を沈降させ、複合体を洗浄し、抗体をビオチン化するこ
50

50

とである。次いで、ストレプトアビジンを第二段階の試薬として用いることができる。

【0054】

aSyn、タウ、A β またはその変異体などのタンパク質が、粒子(ナノ粒子、ナノまたはマイクロビーズ)上に固定される、従来技術(たとえば、WO 2010/099199 A1、WO 2010/069603 A1、およびEP 2 366 714 A1)の開示とは対照的に、本発明の凝集体は、このような表面なしで提供され、任意の足場または表面補助なしの凝集体それ自体からなる。これは、マイクロまたはナノビーズの使用と比べて、天然の状況、特にヒト血液に、より類似する。

【0055】

本発明の使用の好ましい分野は、パーキンソン病(PD)、レビー小体病(LBD)、レビー小体型認知症(DLB)、パーキンソン病認知症(PDD)、多系統萎縮症(MSA)、純粋自律神経失調症(PAF)、レム睡眠行動障害(RBD)、脳内鉄蓄積I型神経変性(1型NBIA)および封入体筋炎(IBM)などのシヌクレイノパチー；ならびにアルツハイマー病(AD)およびダウン症候群(DS)、進行性核上性麻痺(PSP)、大脳皮質基底核変性症(CBD)、前頭側頭型認知症/ピック病(FTD/PiD)などの他の疾患の診断である。

【0056】

本発明の好ましい実施態様は、本発明によって著しく改良されるプロテイノパチーの診断である。プロテイノパチーは、疾患、特に変質したタンパク質によって引き起こされる神経変性疾患である。特にプロテイノパチーの早期追跡のため、およびプロテイノパチーの治療用薬物のための臨床試験の進行の観察のために、本発明にしたがって診断されるべき好ましいプロテイノパチーは、アルツハイマー病(AD)、ダウン症候群における認知症、パーキンソン病(PD)、レビー小体病(LBD)、レビー小体型認知症(DLB)、パーキンソン病認知症(PDD)、多系統萎縮症(MSA)、純粋自律神経失調症(PAF)、レム睡眠行動障害(RBD)、脳内鉄蓄積I型神経変性(1型NBIA)、封入体筋炎(IBM)、大脳皮質基底核変性症(CBD)、進行性核上性麻痺(PSP)、ピック病(PiD)、ボクサー認知症(慢性外傷性脳症、DP)、前頭側頭型認知症(FTD)、リティコ・ボディグ(Lytico-Bodig)疾患(LD)、ハンチントン病(HD)および脊髄小脳変性症(1,2,3および7型)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、プリオノシス(prionosis)およびII型糖尿病；およびアルファシヌクレイン蓄積および/または凝集による疾患、特にアルツハイマー病(AD)、ダウン症候群(DS)、進行性核上性麻痺(PSP)、大脳皮質基底核変性症(CBD)、前頭側頭型認知症/ピック病(FTD/PiD)である。

【0057】

本発明方法は、PDおよびMSA診断に関連して用いるのに特に適している。本発明にしたがって、PDおよびMSA状態のマーカーとして、ヒト患者中のaSyn特異的自己抗体が提供される。血液中のaSyn特異的抗体が「正常」レベルである人々は、PDおよびMSAに関して「健康」である。もしこのレベルがPDおよびMSAを有する患者またはPDおよびMSAを発症するリスクをもつか、もしくはPDおよびMSAを有することが疑われる被験者において変更されるならば、そのような変更レベルは、PDおよびMSAと相関する。「変更された」レベルは、場合によって、aSyn特異的抗体の絶対数の変更であるか、またはaSyn特異的抗体(たとえば、特定のクラスのaSyn特異的抗体(IgG、IgMなど))全体の反応性の変更である。たとえば、変更された反応性aSyn特異的IgGは、PDおよびMSAと相関し、PDおよびMSAのマーカーである。本発明方法に関し、反応性aSyn特異的IgGの「健康」レベルを100%に設定すると、血液サンプル中の反応性aSyn特異的IgGの有意な変更は、たとえば、70%以下、50%以下および30%以下の減少、または少なくとも30%、たとえば、少なくとも50%もしくは少なくとも100%の増加などである。

【0058】

PDおよびMSAならびにPDおよびMSAの進行に対するマーカーを提供するので、疾患の進行および可能な治療方法の性能、特に治療方法が、aSyn特異的抗体、特にIgGまたはIgMの「健康」または「より健康な」レベルを確立することができるかどうかを観察するための方法に用いることができる。

【0059】

したがって、本発明方法は、PDおよびMSA患者、特にPDおよびMSAを治癒もしくは軽減す

るための医薬で治療されているPDおよびMSA患者の監視のために用いられるのが好ましい。本発明方法を、PDおよびMSAワクチン(たとえば、PD01A、Trial AFF008、NCT 01568099)またはaSyn標的疾患修飾薬に対する臨床試験において患者を観察するのに成功裏に適用することができる。

【0060】

本発明方法または、プロテイノパチー、好ましくはシヌクレイノパチー、特にPDおよびMSA発症のリスクを評価するため、または早期プロテイノパチー、好ましくはシヌクレイノパチー、特にPDおよびMSAを検出するために用いることができる。本発明によれば、認知および/または機能的障害よりも有意に早い時点で、aSyn特異的自己抗体に関する患者の免疫学的設定(immunological set-up)における変化を検出することが原理的に可能となる。これは、ルーチン試験フォーマットにおいて確立されるならば、集団のより大きな部分に関するプロテイノパチー、好ましくはシヌクレイノパチー、特にPDおよびMSAの早期診断の有意な改善を可能にした。これは、患者を、プロテイノパチー、好ましくはシヌクレイノパチー、特にPDおよびMSAに対する早期治療計画および/または予防(もしくは遅延化)方策、特に免疫療法(ワクチン接種など)に対して適格にする。

10

【0061】

別の態様によれば、本発明は、aSyn凝集体;およびサンプル容器、特にヒトサンプル(たとえば、血液、血清、血漿など)のための容器;を含む、本発明方法を行なうキットに関する。

【0062】

20

本発明のキットが、さらに、たとえば抗IgG-または抗IgM-抗体などのaSyn特異的抗体、好ましくは二次抗体、特に標識二次抗体に結合しているaSyn凝集体を検出する手段を含むのが好ましい。さらなる成分は、標準サンプル、正および/または負のコントロール、使用説明書ならびに適当な包装手段(たとえば、安定した箱、着色バイアルなど)でありうる。

【0063】

本発明を以下の実施例および図面によってさらに説明するが、本発明はそれらに限定されるものではない。

【図面の簡単な説明】

【0064】

30

【図1】FACS分析を用いるaSyn凝集体のサイズ決定を示す。フローサイトメトリーを用いて、aSyn凝集体を検出することができ、ドットプロット(A)で、それらをSSC-A(対数目盛り)-およびFSC-A(対数目盛り)チャンネルにおける均質集団として描く。FSC-A-ヒストグラム(B)に示すように、aSyn凝集体のサイズ分布(FCS-Aシグナルによって決定された)を、市販のサイズ校正ビーズ(1、2、4、6、10および15 μm)を用いて決定した。

【図2】FACSベースアッセイを用いる凝集体s(A、B、C)およびA β 1-42凝集体(D、E、F)に対するモノクローナル抗体反応性の検出を示す。aSyn特異的モノクローナル抗体LB509は、aSyn凝集体に特異的に結合する(A)が、A β 1-42凝集体とは相互作用しない(D)。対照的に、A β 1-42特異的抗体3A5は、A β 1-42(E)に結合するが、aSyn凝集体には結合しない(B)。FL2-PE-チャンネルにおける二次抗免疫グロブリン-PE標識抗体を用いて反応性を決定した。無関係なコントロールモノクローナル抗体D129は、aSyn(C)ともA β 1-42(F)凝集体とも相互作用せず、異なる凝集体は、特異的に反応性モノクローナル抗体に結合するという発見を示す(E)。CおよびFに示す蛍光強度は、PE標識二次抗体のみとともに凝集体をインキュベートする場合に見られるように、バックグラウンド染色を表す。

40

【図3】2つの異なる方法、FACSベース法(A、C)およびELISA(B、D)に対するアッセイ感度(A、B)およびアッセイ直線(C、D)性の比較を示す。(A)連続希釈したモノクローナル抗体LB509とともにaSyn凝集体をインキュベートし、フローサイトメトリーを用い、FL-2チャンネルにて反応性を決定した。(B)aSynでコーティングしたMaxisorp ELISAプレート上のモノクローナル抗体LB509滴定。比較のために、すべての結果を倍バックグラウンド(fold-background)シグナルで示す。下のパネルは、本明細書に記載のFACS凝集アッセイ(C)お

50

よびELISA(D)の直線範囲を示す。80ng/ml ~ 0.128ng/mlの範囲のFACS凝集アッセイ(3対数期にわたる)および15.625ng/ml ~ 0.498ng/mlの範囲のELISA(2対数期にわたる)において、aSyn特異的モノクローナル抗体を用いて直線範囲を決定した。黒線は、示された範囲についてのエクセルで計算した傾向線を表す。ピアソンの決定係数(R2)を両方の滴定について示す。

【図4】aSyn特異的ワクチンで免疫されたマウス個体(A、B、C)由来の血清の異なる希釈を用いるか、または20匹のマウス個体(D)由来のCSFの1:100希釈を用いる、aSyn FACS凝集アッセイ(黒棒)およびaSyn ELISA(灰色棒)由来のシグナルを示す。すべての値を倍バックグラウンド値で示す。図に示すように、FACS凝集アッセイは、ELISAなどの標準的方法よりも30倍まで高い感度でaSyn特異的抗体を検出する。マウス2(B)および3(C)からの血清は、1:125,000希釈でさえも、2x BG(バックグラウンド)以上のMFIシグナルを示し、マウス1(A)からの血清は、1:25,000の希釈にて、> 2x BGのMFIシグナルをもたらししたが、示した希釈によるELISAでは、シグナルを検出することはできなかった。1:500の血清希釈を用いると、MFIシグナルは、バックグラウンドの400倍以上に達したが(C)、ELISAシステムでは、同じ血清希釈は、バックグラウンドのわずか20倍の増加しかもたらさなかった。

CSFサンプルの1:100希釈を用いる2つの方法の比較の結果、ELISAにおける有意なシグナル検出に到達したのは20個のサンプルのうち1つのみであった。FACS凝集アッセイで測定する場合、20個のサンプルのうち17個が、> 2x BGのMFIシグナルを示した。

【図5】健康なドナー由来の血漿から抽出されたIgG画分(IVIG)のヒト製剤中のaSyn特異的IgG自己抗体反応性の決定を示す。IVIGを、記載したFACSアッセイに付した。FL2-PEチャンネルにてAβ凝集体の蛍光強度を評価し、メジアン蛍光強度(MFI)として表した。

【図6】aSynとAβ1-42、aSynとp(E)Aβ3-42またはAβ1-42とp(E)Aβ3-42のいずれかの等モル混合物から生成した凝集体に対するモノクローナル抗体の反応性を示す。Aβ1-42(3A5)、p(E)Aβ3-42(D129)およびaSyn(LB509)のいずれかに特異的なモノクローナル抗体とともに凝集体をインキュベートし、混合凝集体のモノクローナル抗体結合パターンを決定した。FACS PEヒストグラムは、モノクローナル抗体3A5が、Aβ1-42凝集体を含む混合物に排他的に結合する(6A+B)が、p(E)Aβ3-42/aSyn凝集体混合物には反応性がない(6C)ことを示す。抗p(E)Aβ3-42モノクローナル抗体D129は、p(E)Aβ3-42を含む混合物のみに結合し(6E+F)、Aβ1-42/aSynには反応性を示さない(6D)。aSyn特異的モノクローナル抗体LB509は、aSynを含む凝集体混合物のみに反応し(6G+I)、Aβ1-42/p(E)Aβ3-42凝集体混合物とは反応しない(6H)。

【図7】Aβ1-42-HiLyte-555(PE)およびaSyn-HiLyte-488(FITC)の特異的蛍光標識Aβ1-42およびaSynペプチドの等モル混合物で生成した凝集体のFACS分析。得られた0.5-10 μmのサイズ範囲の凝集体をFSC-A/SSC-AのP1でゲートし(A)、PE/FITCドットプロットでP1をさらに評価して、Aβ1-42-HiLyte-555(PE)およびaSyn-HiLyte-488(FITC)の寄与を決定した(C)。非標識混合凝集体をネガティブコントロールとして用いた(B)。

【図8】異なる濃度のaSynおよびAβ1-42から生成した凝集体に対するモノクローナル抗体反応性。表1に示すとおり、Aβ1-42およびaSynペプチドを混合した。

【図9】Aβ1-42(3A5)、Aβp(E)3-42(D129)およびaSyn(LB509)に対して特異的なモノクローナル抗体の、Aβ1-42、Aβp(E)3-42およびaSynペプチドの等モル混合物からなる凝集体に対する反応性を示す。

【図10】PD患者由来のヒト血漿中のIgG(A)およびIgM(B)自己抗体反応性の決定を示す。血漿サンプル(1:300希釈)を、記載したFACSアッセイに付した。FL2-PEにてaSyn凝集体への結合の蛍光強度を評価し、メジアン蛍光強度(MFI)として表した。

【発明を実施するための形態】

【0065】

実施例

材料および方法：

ELISAを用いたaSyn特異的抗体の検出

aSynペプチド(Anaspecから購入)を濃度5 μg/mlの100 mM NaHCO₃(pH 9.2)にて希釈し、M

10

20

30

40

50

axisorp 96ウエルプレート上で一夜コーティングした。非特異的結合を防止するために、1% BSA/PBSを用いて37 °Cにて1時間プレートをブロックした。結合緩衝液(PBS/0.1% BSA/0.1% Tween20)で連続希釈したモノクローナル抗体(示した濃度から開始)を用いて、37 °Cにて1時間ELISAを行なった。PBS/0.1% Tween20での繰り返し洗浄ステップ(3回)を行なった後、二次抗ヒトIgG HRP(0.5 µg/ml)検出抗体を37 °Cにて1時間加えた。サンプルを再び3回洗浄し、アッセイ開始のためにABTS(0.1 Mクエン酸中0.68 mM、pH 4.3)を30分間加えた後、プレートリーダー(Biotek-Gen5 Program)上で波長405 nmにてOD測定を行なった。

【0066】

FACS分析を用いたaSyn特異的抗体の検出

再懸濁させ、溶液が透明になるまで短いボルテックスを行うことにより、500 µgの凍結乾燥aSynを100 µlの滅菌ろ過したMonoQに溶解した。次いで、超音波処理水浴にて、この溶液を30秒間超音波処理し、5 µlのアリコート衝撃凍結することなく-20 °Cにて保管した。凝集体の形成を誘発するために、アリコートを解凍し、エッペンドルフ管中、振とう器(350 rpm)で37 °Cにて一夜、1% NH₄OH(pH 5)中、35 µMの濃度にて、aSyn溶液の全体積をインキュベートした。1つの実験のみのためにaSyn凝集体を用い、残りを捨てた。

さらに、実験ごとのサンプルを調製する前に、同程度のaSyn凝集体密度を確保するために、凝集体の量を決定した。

一夜インキュベーションした後に生成した凝集体の数をFSC/SSCチャンネルにて測定した後、サンプル調製を行い、基質として用いた凝集体の数を正規化した。詳しくは、上述したように、3 µlの一夜生成したaSyn凝集体を、97 µlの0.5% BSA/PBS中で希釈した。FACS Canto IIを用いて、70 µlのこのaSyn希釈物を、高流速(2 µl/秒)で測定して、35秒の捕捉時間を得、凝集体の数を決定した。これらの条件下で捕捉された約10,000個の粒子を標準として定義した。多かれ少なかれ凝集体が検出されたならば、さらなるサンプル調製のための基質として用いるaSyn凝集体溶液の体積を調節して、異なる実験におけるサンプル内で同程度の凝集体密度を確保する。このことは、たとえば、5000イベントのみが捕捉されたならば、サンプル調製のための基質の体積が、ウエル当り6 µlに増加されたことを意味する。上述したように、~10,000個の粒子を、各サンプル調製のための出発物質として用いた。

【0067】

aSyn特異的抗体の検出のために、3 µlのaSyn凝集体懸濁液を、92 µlの0.2 µmろ過0.5% BSA/PBSと混合し、次いで、さらなるサンプル調製のために、96ウエルのV型底プレートのウエルに移した。ブロッキングのために、これらの懸濁液を室温にて60分間インキュベートした。

【0068】

各測定用に、-80 °Cからのマウスまたはヒト血清サンプルのアリコートを新たに解凍し、0.5% BSA/PBSで、マウス血清サンプルの場合1:50に、または人血清サンプルの場合1:5に希釈し、次いで、これらのサンプルを、0.22 µmの96ウエルフィルタープレート遠心分離機を通し、遠心分離(3000 rpmで3分)によって0.2 µmのフィルター処理を行った。0.5% BSA/PBSでCSFサンプルを1:5に予じめ希釈し、滅菌ろ過は行わなかった。5 µlの予め希釈した血清またはCSFサンプルを95 µlのaSyn凝集体懸濁液に加え、最終マウス血清希釈1:1000およびヒト血清またはCSF希釈1:100を得た。振とう器(350 rpm)で、室温にて60分間インキュベートした後、150 µlの0.5% BSA/PBSをすべてのウエルに加えた。プレートを3000 rpmにて5分間遠心分離し(96ウエルプレート-遠心分離機)、シンクに徹底的に注ぐことによって上清(SN)を除去した。その後、200 µlの0.5% BSA/PBSを加え、この洗浄ステップを3回繰り返した。マウス血清およびCSFサンプルを検出するために、4回目の洗浄を行なった後、SNを再び捨て、1:10,000希釈した、PEで標識した抗mIgG(H+L)F(ab')₂フラグメント(Jackson Immuno Research)を含む100 µlの0.5% BSA/PBSに、ペレットを再懸濁させた。IVIGの検出のために、1:1000希釈した、PEで標識した抗hIgG(H+L)F(ab')₂フラグメント(Jackson Immuno Research)を用いた。振とう器(600 rpm)で、室温にて60分間、サンプルをさらにインキュベートした。続いて、さらなる洗浄ステップを行わずに、ハイス

ループットサンプラー (HTS) を備えたFACS Cantoでサンプルを測定した。それらのFSC/SSC特性に基づいて、aSyn凝集体を同定した。凝集体への抗体結合シグナルをFL2-PEチャンネルにおいて評価し、FACS Divaソフトウェアを用いて、メジアン蛍光強度(MFI)に基づいて評価した。

【 0 0 6 9 】

混合凝集体の生成および検出

異なるペプチド(たとえば、aSynおよびA β 1-42)が、両方を含む混合凝集体を形成するかどうかを試験するために、ペプチド蛍光N末端標識A β 1-42およびC末端標識aSynペプチドを用いた。AndersonおよびWebb(BMC Biotechnology 2011、11:125)に記載されたように、A β およびaSynペプチドの標識は、アミロイド凝集体形成を妨げない。したがって、A β 1-42-Hilyle-555(PEチャンネルで検出可能)およびaSyn-Hilyle-488(FITCチャンネルで検出可能)を等モル比(20 μ M)にて混合し、1% NH₄OH(pH 4.5)中、振とう器(350 rpm)で、室温にて20時間インキュベートした。インキュベーション後、FACS Canto IIを用いて、これらの凝集体を分析した。捕捉された凝集体をサイズについてFSC-A/SSC-AのP1(~ 0.5 μ m-10 μ m)でゲートし、PE/FITCドットプロットでP1をさらに分析して、A β 1-42-Hilyle-555(PE)およびaSyn-Hilyle-488(FITC)の寄与を決定した。

10

【 0 0 7 0 】

基質としてモノマーaSyn、A β 1-42およびp(E)A β 3-42タンパク質の混合溶液から生成した凝集体を用いる分析による特異的抗体反応性の検出

再懸濁させ、溶液が透明になるまで短いボルテックスを行うことにより、100 μ lの滅菌ろ過MonoQ(aSyn)または100 μ lの滅菌ろ過1%NH₄OH pH11(A β 1-42およびp(E)A β 3-42)に、500 μ gの凍結乾燥したaSynまたは100 μ gのA β 1-42もしくはp(E)A β 3-42のいずれかを溶解した。次いで、超音波処理水浴にて、これらの溶液を30秒間超音波処理し、5 μ lのアリコート衝撃凍結することなく-20 $^{\circ}$ Cにて保管した。凝集体の形成を誘発するために、個々のタンパク質からアリコートを解凍し、3つの個々のタンパク質の全体積を、1% NH₄OH(pH4.5)中で、~ 35 μ Mの等モル濃度に希釈した。これらのタンパク質溶液を以下の3つの可能な組合せすべてで混合した後、エッペンドルフ管中、振とう器(350 rpm)で37 $^{\circ}$ Cにて20時間インキュベートした：A β 1-42とaSyn、A β 1-42とp(E)A β 3-42、およびp(E)A β 3-42とaSyn。さらに、等モル比(= 50:50)のみならず、異なる比の凝集体混合物を試験するための滴定実験も行った。凝集体混合物の比は、実験において指示される(たとえば、1:100 = 1 μ lのaSyn(20 μ M) + 99 μ lのA β 1-42(20 μ M)溶液)。さらなるサンプル調製のための基質として、混合凝集体を用い、上記段落でaSyn凝集体について記載したように処理した。

20

30

【 0 0 7 1 】

デマスキング

患者血清中に存在する可能性があるaSynへのaSyn特異的自己抗体の結合を中断させ、それによって、抗原ベースの方法(ELISAまたはFACSなど)によるこれらのaSyn結合自己抗体の検出を防止するために、1:16.7希釈溶液の10mMのグリシン(pH2.6)で血清を予め5分間希釈した。次いで、5 μ lの酸性化血清を、3 μ lのaSynとともにさらに5分間共インキュベートした。次いで、92 μ lの0.5%BSA/PBSを加えて混合物を中和し、20 ~ 60分間インキュベートした。デマスキングされなかった血清に対して、上述したとおり、洗浄ステップおよび二次抗体とのインキュベーションを行なった。

40

【 0 0 7 2 】

結果

aSyn凝集体：オリゴマー化および線維形成

モノマーaSynからのaSyn凝集体の形成は、近年、複数の条件下で集中的に研究されている。aSynペプチドの凝集が、pH、温度、緩衝液組成およびタンパク質濃度などの様々な条件に大きく依存することが見出されている。凝集は、モノマーからの β ヘアピンの形成から始まり、可溶性オリゴマーに至る。次いで、パラレル β シートへのコンホメーション遷移が、遠心分離によって沈殿しうる線維および線維状凝集体の形成をもたらす。

50

【 0 0 7 3 】

本発明にしたがって、aSyn凝集体s(全長ヒトaSyn 1-140)が生成された。これらのaSyn凝集体は、FACS分析を用いて検出することができる。材料および方法セクションにおいて記載したように、この目的のために、種なし可溶性aSynペプチドを37℃にて20時間、35 μ Mの濃度でインキュベートした。図1A(上パネル)に示されるように、FACS分析によってaSyn凝集体の透明で均質な集団を検出することができた。1~15 μ mの範囲の校正されたサイズのビーズを用いて、aSyn凝集体のサイズ分布(前方散乱FSC-Aによって定義される)を分析した(フローサイトメトリー・サイズ校正キット(カタログ番号F-13838)、モレキュラー・プローブス)(図1、下パネル)。この分析を用いて、aSyn凝集体のサイズが、予想されたように、マイクロメーター以下~10 μ m以下の範囲であることが示され、生成された凝集体の大部分は、500 nm以下~2 μ mであった。

10

【 0 0 7 4 】

モノクローナル抗体とaSyn凝集体の反応性

aSyn凝集体がaSyn特異的抗体の結合を許可するかどうかを決定するため、およびこのような相互作用が本明細書において記載したFACSベースアッセイを用いて監視されうるかどうかを決定するために、もう一つの実験セットを行なった。この目的のために、aSyn凝集体ならびにA β 1-42凝集体を生成し(国際出願PCT/EP2012/068494の開示にしたがって作成)、aSyn(LB509)またはA β 1-42(3A5)に特異的であるモノクローナル抗体とともにインキュベートした。さらに、両方の形態の凝集体を、非特異的コントロールモノクローナル抗体D129とともにインキュベートした。図2のFACSヒストグラムに示すように、モノクローナル抗体LB509は、aSyn凝集体を排他的に結合するが、モノクローナル抗体3A5は、A β 1-42凝集体のみと相互作用する。さらに、アイソタイプコントロールとして用いた無関係のモノクローナル抗体D129は、aSynともA β 凝集体とも反応しない。このことは、記載したFACSベースアッセイが、特異的様式におけるaSyn抗体の検出を可能にすることを明らかにする。

20

【 0 0 7 5 】

FACSアッセイおよびELISAシステムにおけるaSynに対する抗体反応性の直線範囲の決定

直線解析の測定範囲の上限および加減を決定するために、モノクローナル抗体LB509を用いて滴定実験を行った(図3)。

【 0 0 7 6 】

ピアソンの決定係数(R²)を用いるエクセルで直線範囲を評価するための計算は、FACS凝集アッセイにおいて80-0.128ng/mlの範囲で、LB509濃度について>0.9966のR²値をもたらした(よって3対数期にわたる)。ELISAにおける直線性の決定は、15.625 ng/ml~0.489 ng/mlの直線範囲をもたらした(よって2対数期のみにわたる)。R²値が1であることは、100%の直線性を示す。

30

【 0 0 7 7 】

aSyn特異的ワクチンで処置された動物の血清およびCSF中の特異的自己抗体のaSyn結合に対するFACS凝集アッセイおよびELISAの感度

この実験の目的は、aSyn特異的ワクチンで処置された動物の血清およびCSFサンプルのaSyn反応性に対する2つの独立した検出方法(ELISAおよびFACSベースアッセイ)の検出限界を決定し、比較することである。したがって、ELISA測定のために、aSynを、マキシソープ・マイクロタイタープレート上に固定した。あるいは、FACS分析用に、aSyn凝集体を生成した。続いて、個々のシステムに、3つの異なる血清の希釈シリーズまたは20個の異なるマウスCSFサンプルの1:100希釈を適用し、ELISAの場合は405nmにおけるOD値、またはFACSアッセイの場合は蛍光強度(MFI値)を決定した。比較のために、異なる血清-(図4A、B、C)およびCSF-(図4D)測定についてシグナル:ノイズ比を評価し、倍バックグラウンドシグナル(xBG)としてシグナルを表した。

40

【 0 0 7 8 】

免疫されたマウス由来の血清の滴定によって、FACS凝集アッセイの感度が、より高いことを確認した。マウス2(B)および3(C)からの血清は、1:125,000希釈でさえも、2 x BG以

50

上のMFIシグナルを示し、それぞれ、マウス2では2 x BGであり、マウス3では3.11 x BGであったが、この血清希釈を用いるELISAではシグナルを検出することができなかった。マウス1(C)からの血清を用いて測定されたMFIシグナルもまた、1:25,000希釈にて4.45 x BGのMFIをもたらしたが、この希釈を用いるELISAでは、特異的シグナルはなかった。

【0079】

さらに、20匹のマウスからのCSFサンプルも、両方のアッセイで分析した。CSFサンプルを用いる2つの方法の比較において、ELISAでは、有意なシグナル検出に到達したのは20個のサンプルのうち1つのみであった(マウス8の2.02 x BG)が、FACS凝集アッセイによる測定では、20個のサンプルのうち17個が、>2x BGのMFIシグナルを示した。マウス2からのCSFサンプルの分析は、ほぼ30 x BGのMFIシグナルをもたらした。ELISA測定では、同じCSFは、陽性シグナルをもたらさなかった。

10

【0080】

これは、aSyn特異的自己抗体を検出するために新たに開発されたFACSベースアッセイの感度が、ELISAなどの従来のアッセイシステムの30倍にも高くなることを示す。

【0081】

IVIGを用いるヒト自己抗体のaSyn反応性の決定

IVIG(静注用免疫グロブリン)は、市販の血液製剤である。それは、健康なドナー由来の血漿(少なくとも1000人のドナーからのヒト血漿)から抽出されたIgG画分をプールしたものを含む。IVIG製剤が、aSynペプチドに特異的な天然抗体(自己抗体)を含むことが明らかにされている。

20

【0082】

この実験の目的は、本明細書に記載の技術が、効果的な方法で、IVIG(IVIG-Subcuvia、オーストリアのBaxterから入手)中のaSyn特異的自己抗体を検出する可能性を提供するかどうかを決定することであった。

【0083】

この目的のために、FACS分析用aSyn凝集体を作成した。続いて、さまざまなIVIG希釈物(200 µg ~ 64 ng/ml)を凝集体に適用し、蛍光強度MFI値)を決定した。図5に示すように、FACSベースアッセイは、aSyn特異的自己抗体を検出するために新たに開発されたFACSベースアッセイが、aSyn特異的自己抗体に対して高い感度をもつことを示す強い蛍光シグナルを提供した。

30

【0084】

モノクローナル抗体と混合凝集体の反応性

混合凝集体がaSyn、Aβ1-42、およびp(E)Aβ3-42特異的抗体の結合を許可するかどうか、およびどの程度まで許可するかを決定するため、およびこのような相互作用が本明細書において記載したFACSベースアッセイを用いて監視されうるかどうかを決定するために、もう一つの実験セットを行なった。この目的のために、材料および方法セクションに記載したように、純粋なaSyn凝集体、Aβ1-42凝集体およびp(E)Aβ3-42凝集体に加えて、等モル混合物または個々のタンパク質の異なる比率の凝集体混合物を作成した。次いで、これらの凝集体を、aSyn(LB509)またはAβ1-42(3A5)またはp(E)Aβ3-42(D129)のいずれかに特異的なモノクローナル抗体とともにインキュベートし、混合凝集体のモノクローナル抗体-結合パターンを決定した。

40

【0085】

3つの異なる凝集体基質(等モル量の示されたペプチドを混合することによって作成される)に対するこれらのモノクローナル抗体の反応性を図6に示す。FACS PEヒストグラムが示すように、モノクローナル抗体3A5は、Aβ1-42凝集体を含む混合物に排他的に結合する(6A+B)が、p(E)Aβ3-42/aSyn凝集体混合物には反応性を示さない(6C)。抗p(E)Aβ3-42モノクローナル抗体D129は、p(E)Aβ3-42を含む混合物のみに結合し(6E+F)、Aβ1-42/aSynには反応性を示さない(6D)。さらに、aSyn特異的モノクローナル抗体LB509は、aSynを含む凝集体混合物のみに反応し(6G+I)、Aβ1-42/p(E)Aβ3-42凝集体混合物とは反応しない(6H)。このことは、第一に、異なるペプチドを含む混合凝集体が作成されうることを、そして

50

、第二に、これらの凝集体が、各モノクローナル抗体と特異的に反応することを明らかにする。

【0086】

異なる標識ペプチドとの混合凝集体の形成

材料および方法セクションに記載したように、異なって蛍光標識された β 1-42および α -シヌクレインペプチドとの等モル混合凝集体を作成した。したがって、A β 1-42-Hilyte-555(PEチャンネルで検出可能)およびaSyn-Hilyte-488(FITCチャンネルで検出可能)の等モルを混合し、一夜のインキュベーションによって凝集体を作成した。インキュベーション後、FACS Canto IIを用いて混合凝集体を分析した。0.5-10 μ mのサイズ範囲の捕捉された凝集体をFSC-A/SSC-AのP1でゲートし、PE/FITCドットプロットでP1をさらに評価して、A β 1-42-Hilyte-555(PE)およびaSyn-Hilyte-488(FITC)の寄与を決定した。A β 1-42-Hilyte-555およびaSyn-Hilyte-488の共インキュベーションは、~90%二重陽性である混合凝集体をもたらした、このことは、凝集体集団内でのA β 1-42およびaSynの均質な分布を示す。

10

【0087】

さらなる実験において、異なるペプチド構成をもつ混合凝集体に対する特異的 α -A β 1-42-およびaSyn-モノクローナル抗体の反応性を検討し、ネガティブコントロールとして、p(E)A β 3-42特異的抗体を用いた。したがって、サンプル調製前に、A β 1-42およびaSynモノマーを用いる定量的、対称滴定シリーズを用いて、異なる混合凝集体-基質を作成した。詳細には、A β 1-42およびaSynの35 μ Mモノマー溶液を、表1に示す比率で混合し、サンプル調製後にPE-MFIを決定した。

20

【0088】

表1

	%	μ l
基質1: A β 1-42/aSyn	100/0	100/0
基質2: A β 1-42/aSyn	99.9/0.1	99.9/0.1
基質3: A β 1-42/aSyn	99/1	99/1
基質4: A β 1-42/aSyn	90/10	90/10
基質5: A β 1-42/aSyn	50/50	50/50
基質6: A β 1-42/aSyn	10/90	10/90
基質7: A β 1-42/aSyn	1/99	1/99
基質8: A β 1-42/aSyn	0.1/99.9	0.1/99.9
基質9: A β 1-42/aSyn	0/100	0/100

30

【0089】

予測されるように、100% A β 1-42凝集体を基質として用いる場合、非特異的コントロール抗体D129の反応性はなく、aSyn特異的抗体LB509との反応性もなかった。しかし、滴定シリーズは、0.1%/1%のaSynが99.9/99%のA β 1-42と混合されるとすぐに、LB509が、100%aSyn凝集体とインキュベートされた場合に達成されたシグナルよりさらに強いaSyn特異的抗体LB509の強い反応性を誘発するのに充分であることを示した。これに対する可能な理由の1つは、aSynが単独で、立体障害ゆえにモノクローナル抗体がすべての利用可能なエピトープにアクセスするのを阻害する非常に密集したエピトープと凝集体を形成することであった。一方、混合凝集体において、aSynは、すべての利用可能なエピトープがモノクローナル抗体によって、それ自体をブロックすることなく、アクセスされうるように組み込まれ、したがって、PE-MFIシグナルは、100%aSyn凝集体を基質として用いる場合の測定値と比較して、増加される。

40

【0090】

PD患者由来のヒト血液中のaSynアミロイド抗体の決定

a. aSynに対するIgGの反応性

上述のSyn凝集体およびFACS分析を用い、天然のaSyn特異的抗体含量について、PD患者(n=30、~60-80歳)由来の血清サンプルを分析する。試験したすべてのサンプルにおいて、aSyn凝集体に対して特異的な天然抗体が検出される。結果は、試験したすべてのサン

50

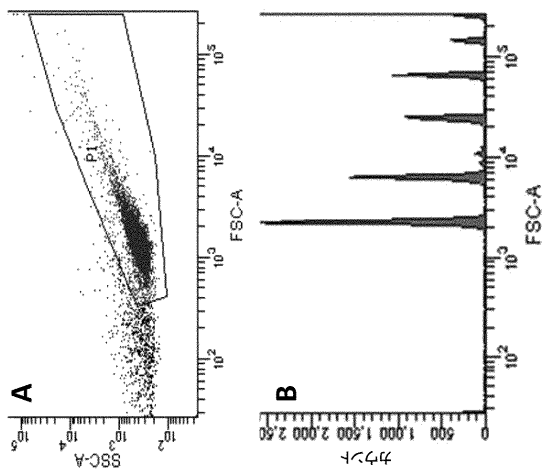
ルにおいて、aSyn凝集体に対して特異的な天然の抗体が検出されるが、自己抗体のレベルは、患者によって明らかに異なることを示す(図10A)。

【0091】

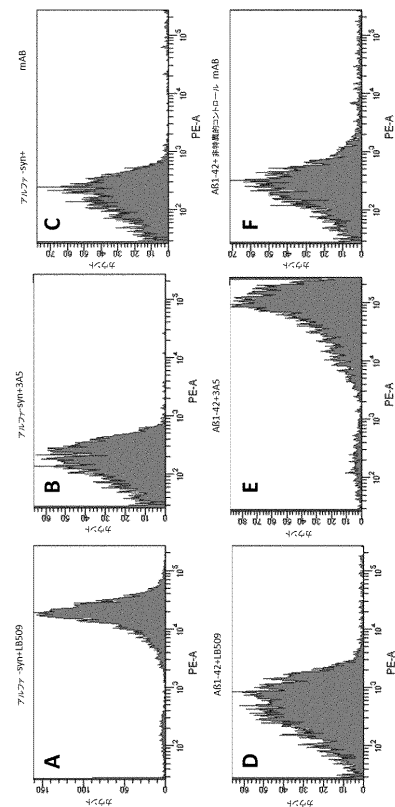
b. 異なるaSynに対するIgMの反応性

実験の次のセットにおいて、上述の血清サンプルと同じセットを用いて、aSyn凝集体特異的IgM反応性を決定する。試験したすべてのサンプルにおいて、aSyn凝集体に対して特異的なIgMアイソタイプの天然抗体が検出される。再度、IgG抗体の反応性に匹敵して、PD患者のコントロールのセット内で、自己抗体の異なるレベルを検出することができた。

【図1】



【図2】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/056588

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/564

ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/069603 A1 (NEURIMMUNE THERAPEUTICS AG [CH]; UNIV ZUERICH [CH]; WEIHOFEN ANDREAS []) 24 June 2010 (2010-06-24)	1-4,7,8,10-14
Y	page 13 - page 14 page 71 - page 76 figure 5	5,6,9
Y	WO 97/14028 A2 (LUMINEX CORP [US]; CHANDLER VAN S [US]; FULTON R JERROLD [US]; CHANDLE) 17 April 1997 (1997-04-17) p17 last par	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 June 2014

Date of mailing of the international search report

24/06/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rosin, Oliver

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/056588

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KIM SPELLS ET AL: "Specificity of HLA antibodies detected with HLA antigen-coated polystyrene beads.", 29TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR HISTOCOMPATIBILITY AND IMMUNOGENETICS; MIAMI BEACH, FL, USA; OCTOBER 28-NOVEMBER 01, 2003, 1 January 2003 (2003-01-01), page S113, XP055070270, abstract -----	1-13
X	EP 2 366 714 A1 (RENTSCHLER HOLDING GMBH & CO KG DR [DE]) 21 September 2011 (2011-09-21) the whole document -----	14
Y	the whole document -----	1-13
X	PAPACHRONI KATERINA K ET AL: "Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease", JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, WILEY INTERSCIENCE, NEW YORK, NY, US, vol. 101, no. 3, 1 May 2007 (2007-05-01), pages 749-756, XP002530228, ISSN: 0022-3042, DOI: 10.1111/J.1471-4159.2006.04365.X abstract -----	14
Y	abstract -----	1-13
Y	APETRI ET AL: "Secondary Structure of alpha-Synuclein Oligomers: Characterization by Raman and Atomic Force Microscopy", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 355, no. 1, 6 January 2006 (2006-01-06), pages 63-71, XP005197985, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2005.10.071 the whole document -----	4,5
Y	LI QINGYOU ET AL: "Improvement of a low pH antigen-antibody dissociation procedure for ELISA measurement of circulating anti-A[beta] antibodies", BMC NEUROSCIENCE, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 8, no. 1, 20 March 2007 (2007-03-20), page 22, XP021022581, ISSN: 1471-2202, DOI: 10.1186/1471-2202-8-22 abstract -----	9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/056588

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010069603 A1	24-06-2010	AU 2009328505 A1	28-07-2011
		CA 2746778 A1	24-06-2010
		CN 102317316 A	11-01-2012
		EA 201190041 A1	28-02-2012
		EP 2370466 A1	05-10-2011
		JP 2012512634 A	07-06-2012
		KR 20110110200 A	06-10-2011
		NZ 593964 A	21-12-2012
		SG 172121 A1	28-07-2011
		US 2011300077 A1	08-12-2011
		WO 2010069603 A1	24-06-2010

WO 9714028 A2	17-04-1997	AT 496288 T	15-02-2011
		AU 7398996 A	30-04-1997
		CA 2227895 A1	17-04-1997
		EP 0852004 A2	08-07-1998
		US 6524793 B1	25-02-2003
		US 2005118574 A1	02-06-2005
		WO 9714028 A2	17-04-1997

EP 2366714 A1	21-09-2011	AU 2011222920 A1	20-09-2012
		CA 2791409 A1	09-09-2011
		EP 2366714 A1	21-09-2011
		EP 2542586 A1	09-01-2013
		US 2013052200 A1	28-02-2013
		WO 2011107544 A1	09-09-2011

フロントページの続き

(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

(72)発明者 マルクス・マントラー

オーストリア、アー - 1 0 3 0 ヴィエナ、カール - ファルカス - ガッセ 2 2 番、アフィリス・アク
チェンゲゼルシャフト内

(72)発明者 アンドレアス・マイアホーファー

オーストリア、アー - 1 0 3 0 ヴィエナ、カール - ファルカス - ガッセ 2 2 番、アフィリス・アク
チェンゲゼルシャフト内

(72)発明者 アルネ・フォン・ボニン

オーストリア、アー - 1 0 3 0 ヴィエナ、カール - ファルカス - ガッセ 2 2 番、アフィリス・アク
チェンゲゼルシャフト内

专利名称(译)	检测生物样品中的Syn特异性抗体的方法		
公开(公告)号	JP2016514842A	公开(公告)日	2016-05-23
申请号	JP2016505803	申请日	2014-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	阿费里斯股份公司		
申请(专利权)人(译)	Afirisu股份公司		
[标]发明人	ギンター・シュタッフラー マルクス・マントラー アンドレアス・マイア・ホーファー アルネ・フォン・ボニン		
发明人	ギンター・シュタッフラー マルクス・マントラー アンドレアス・マイア・ホーファー アルネ・フォン・ボニン		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/564 G01N33/6896 G01N2800/2814		
FI分类号	G01N33/53.N		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	2013162107 2013-04-03 EP		
其他公开文献	JP6416871B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)			
步骤如下：使样品与含aSyn的聚集体接触，以使aSyn特异性抗体与含aSyn的聚集体结合，然后通过单颗粒检测技术，优选荧光激活细胞分选（FACS），检测与含aSyn的聚集体结合的aSyn特异性抗体，公开了一种检测生物样品中aSyn特异性抗体的方法，该方法包括：			
(21) 出願番号	特願2016-505803 (P2016-505803)	(71) 出願人	506083604
(86) (22) 出願日	平成26年4月2日 (2014.4.2)		アフィリス・アクチエンゲゼルシャフト
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月26日 (2015.11.26)		AFFIRIS AG
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/056588		オーストリア、アー-1030ヴィエンナ
(87) 国際公開番号	WO2014/161879		、カール・ファルカス・ガッセ22番
(87) 国際公開日	平成26年10月9日 (2014.10.9)	(74) 代理人	100081422
(31) 優先権主張番号	13162107.0		弁理士 田中 光雄
(32) 優先日	平成25年4月3日 (2013.4.3)	(74) 代理人	100084146
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
		(72) 発明者	ギンター・シュタッフラー
			オーストリア、アー-1030ヴィエンナ、
			カール・ファルカス・ガッセ22番、アフ
			ィリス・アクチエンゲゼルシャフト内
			最終頁に続く