

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7498663号
(P7498663)

(45)発行日 令和6年6月12日(2024.6.12)

(24)登録日 令和6年6月4日(2024.6.4)

(51)国際特許分類		F I	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53
G 0 1 N	33/542(2006.01)	G 0 1 N	33/542
A 6 1 P	39/02 (2006.01)	A 6 1 P	39/02
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395
		D Z N A	
		A	
		D	
請求項の数 6 (全11頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号 特願2020-533605(P2020-533605)		(73)特許権者	591143065
(86)(22)出願日 平成30年12月19日(2018.12.19)			ハー・ルンドベック・アクチエゼルスカ
(65)公表番号 特表2021-508044(P2021-508044			ベツト
A)			デンマーク国, 2 5 0 0 バルビー, オ
(43)公表日 令和3年2月25日(2021.2.25)			ッテイリアベエイ, 9
(86)国際出願番号 PCT/EP2018/085898		(74)代理人	100092783
(87)国際公開番号 WO2019/121952			弁理士 小林 浩
(87)国際公開日 令和1年6月27日(2019.6.27)		(74)代理人	100120134
審査請求日 令和3年12月8日(2021.12.8)			弁理士 大森 規雄
(31)優先権主張番号 PA201700738		(74)代理人	100141195
(32)優先日 平成29年12月21日(2017.12.21)			弁理士 西澤 恵美子
(33)優先権主張国・地域又は機関		(72)発明者	マリク, イブラヒム, ジョン
デンマーク(DK)			デンマーク国, 2 5 0 0 バルビー, オ
前置審査			ッテイリアベエイ 9, ハー・ルンドベ
			ック・アクチエゼルスカベツト内
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アルファーシヌクレイン病のアッセイ、方法、及び治療

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象のサンプル中の凝集アルファーシヌクレインを検出するための方法であって、以下のステップ：

- a) 対象から得たサンプルを用意するステップ、及び
b) 前記サンプルを発光アッセイにかけるステップ、
を含み、

前記サンプルは、血液サンプル、血漿サンプル、又は血清サンプルであり、前記発光アッセイは、時間分解蛍光共鳴エネルギー移動（T R - F R E T）を使用し、ここで、2つの異なるフルオロフォアは、アルファーシヌクレインに結合する2つの抗体に連結されており、使用される一方のフルオロフォアであるドナーは、使用される他方のフルオロフォアであるアクセプターよりも長い蛍光時間を有し、

前記方法の結果は、アルファーシヌクレイン病を診断するため又はアルファーシヌクレイン病を治療するために使用される医薬の治療応答をモニターするために提供される、方法。

【請求項2】

- c) 結果を対照と比較するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記発光アッセイは、アルファーシヌクレインに結合する2つの同一のアルファーシヌクレイン抗体を使用している、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

前記ドナーのフルオロフォアは、L u m i 4 - T b (T b 2 + クリプテート) 又はユウロピウムクリプテート (E u 3 + クリプテート) から選択される、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記アクセプターのフルオロフォアは、d 2、X L 6 6 5、又はフルオレセインから選択される、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記対象は、ヒトである、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、患者におけるアルファシヌクレインレベルを判断し、モニターすることによって、パーキンソン病患者などのようなアルファシヌクレイン病の診断及び効率的な治療を可能にするアッセイに関する。

【背景技術】

【0002】

パーキンソン病 (P D)、認知症を伴うパーキンソン病 (P D D)、レビー小体型認知症 (D L B)、及び多系統萎縮症 (M S A) は、 α -シヌクレイン脳病変を伴う神経変性障害の例である。P D は、最も多く見られる運動障害であり、振戦、運動緩徐又は運動を始めるのが困難、硬直、及び姿勢反射障害とも呼ばれるバランスの欠陥によって特徴づけられる。P D は、世界全体でおよそ 4 ～ 6 0 0 万人がかかっていると考えられる。P D 患者の約 8 0 % は、P D D に至る認知症を発症する。典型的に、認知症は、パーキンソン病の経過の後期に生じる。D L B では、認知症は、最初の症状であるが、運動症状は、最初の 1 年の間に現われる場合があり、これによってこれらの障害を臨床的に区別している。D L B は、すべての認知症のうちの 1 5 ～ 2 0 % 以下に相当し得る。

【0003】

アルファシヌクレインは、主にシナプス前部に位置する小さな 1 4 0 アミノ酸の神経細胞内タンパク質である。 α -シヌクレインの神経細胞内蓄積は、大きな円形の細胞質内封入体であるレビー小体及びペール小体 (p a l e b o d y)、軸索における糸状の封入体であるレビー神経突起、並びに小シナプス封入体 (s m a l l s y n a p t i c i n c l u s i o n) などのような凝集体形成を神経細胞の内部にもたらす。

【0004】

α -シヌクレインの凝集及び毒性に至るプロセスは、十分に理解されていない。 α -シヌクレイン遺伝子の突然変異又は重複は、P D 及び D L B のまれな原因となる。病因性突然変異 A 3 0 P、A 5 3 T、E 4 6 K (K r u g e r e t a l . , 1 9 9 8) (P o l y m e r o p o u l o s e t a l . , 1 9 9 8) (Z a r r a n z e t a l . , 2 0 0 4) 並びに α -シヌクレインの重複及び三重化 (C h a r t i e r - H a r l i n e t a l . 2 0 0 4) (S i n g l e t o n e t a l . , 2 0 0 3) は、P D 又は D L B のいずれかを引き起こすことが報告された。これらの突然変異のほとんどは、始原原線維 (p r o t o f i b r i l l a r) の割合の増加に関係し、最終的に、原線維化学種 (f i b r i l l a r s p e c i e s) が形成され、これらは、様々な有毒性を有する可能性がある。凝集は、セリン 1 2 9 でのアルファシヌクレインのリン酸化に関連する。通常のアルファシヌクレインは、わずか (4 %) しかリン酸化されていないが、原線維性のアルファシヌクレインは、8 0 % リン酸化されていることが推定され、p S 1 2 9 アルファシヌクレインに対する抗体は、最小の凝集体を検出する。

【0005】

少量のアルファシヌクレインは、脳の間質液中、脳脊髄液 (C S F) 及び血液中、細胞外で見つけられる。このアルファシヌクレインの発生源は、明らかではないが、アルファシヌクレインは、おそらく、細胞から、細胞体及びシナプスの両方から、たとえば

10

20

30

40

50

、神経細胞が活性化される時のシナプス放出の間に放出されるであろう。アルファーシヌクレインの中には、おそらく、病気の細胞及び死細胞から生じるものもあるであろう。アルファーシヌクレインはまた、多くの血球及び血小板においても見つけられており、これらは、血液中のアルファーシヌクレインの発生源である可能性が高い。エキソソーム中に分泌されるアルファーシヌクレインの割合は低く、細胞外液中のアルファーシヌクレインの大部分は、エキソソームに関連しない遊離タンパク質として見つけられる。

【0006】

α -シヌクレイン病変を伴う神経変性疾患の初期に患者を同定するための改善された診断ツールが必要とされる。神経変性プロセスは、臨床診断の数年前、おそらく10～20年前にスタートするという証拠がある。REM睡眠行動障害(RBD)は、 α -シヌクレイン病の前駆期として現在認識されている。RBDを有するほとんどの人は、RBDの診断から20年以内にPD又はDLBに転換するであろう。アルファーシヌクレイン病の前駆期の他の徴候は、嗅覚消失を含む。

【0007】

現在、運動症状がはっきり表われる前に臨床医の診断を支援する生化学的方法はない。その時点で、脳への実質的な損傷が、おそらく既に生じている。正確な診断アッセイの重要性は、うまくいけば疾患の進行を停止させる又は遅らせるであろう新たな疾患修飾療法が出現するとともに、さらに大きくなるであろう。

【0008】

総アルファーシヌクレインを測定する数種のアッセイが、利用可能であり、それらのうちのいくつかは、検証済みである又は大規模な臨床研究において検証されているところである(Goldman et al., 2017)。これらの研究は、CSFにおける総アルファーシヌクレインのわずかな減少がパーキンソン病に関連することを示した。アルファーシヌクレインのいくつかの種類のオリゴマー形態及びセリン-129のリン酸化形態を測定するための数種の探索的アッセイもまた、存在し(Majbour et al., 2016a)、予備的なデータは、これらの化学種がPD CSFにおいて増加しているかもしれないことを示唆する。しかしながら、やはり、患者レベルと対照レベルとの間の差はわずかで、個人間に大きなばらつきがある。現在のアッセイはすべて、わずかな差及び個人間の大きなばらつきを欠点として持ち、これらのアッセイを、アルファーシヌクレイン凝集を伴う疾患の診断の支援において有用でないものになっている。全体的に見て、現在の証拠は、総CSF α -シヌクレインがPDにおいて低下しており、 α -シヌクレインオリゴマー又はリン酸化アルファーシヌクレインといった亜種が、PDと対照を区別するかもしれないことを示唆する。

【0009】

末梢体液、血漿及び唾液中のアルファーシヌクレインの測定は、CSFよりもさらに変化しやすい結果をもたらした。最近の大きな研究では、血漿及び唾液の α -シヌクレインレベルは、PDと健康な対照参加者を有意に識別せず、CSF中の α -シヌクレインレベルと末梢体液(血漿及び唾液)中の α -シヌクレインレベルとの有意な相関性はなかった(Goldman et al., 2017)。そのため、現在、CSF α -シヌクレインは、PDにとって、末梢 α -シヌクレインよりも、診断上大いに役に立つ。サンプルを得るためのCSFサンプリングは、侵襲性の手段であり、PDについての血漿バイオマーカーがあることは、このことが可能であれば、有益であろうと思われる。

【発明の概要】

【0010】

アルファーシヌクレイン凝集のモニタリングは、パーキンソン病(PD)、レビー小体型認知症(DLB)、びまん性レビー小体病(DLBD)、及び多系統萎縮(MSA)を含む1つの神経変性疾患群であるシヌクレイン病の病因の研究に非常に重要である。したがって、本発明の方法は、上記に述べられた疾患の疾患進行を診断する又はモニターするために使用することができる。その代わりに、方法は、治療応答をモニターする又は追跡するために及び患者の治療に関する話し合いを行うために使用することができる。この治

10

20

30

40

50

療は、ある実施形態では、抗体治療又はアルファシヌクレインを含むワクチン接種などのような、アルファシヌクレインに対して向けられる能動免疫療法又は受動免疫療法であってもよい。

【0011】

一実施形態では、本発明は、

- a) 患者からサンプルを得るステップ
 - b) サンプルを本発明の発光アッセイにかけるステップ、及び
 - c) 任意選択で、結果を対照と比較するステップ
- を含むインビトロにおける方法である。

【0012】

サンプルは、好ましくは、血液サンプル、血漿サンプル、又は血清サンプルである。

【0013】

使用される抗体は、フルオロフォアに連結されたアルファシヌクレイン抗体である。アルファシヌクレインに対して結合性の2つの抗体に連結されてもよい2つの異なるフルオロフォアが、本発明の方法において使用されてもよい。一方のフルオロフォアは、使用される他方のフルオロフォア（アクセプター）よりも長い蛍光時間を有する（ドナー）。

【0014】

ドナーは、好ましくは、Lumi4-Tb（Tb2+クリプテート）又はユウロピウムクリプテート（Eu3+クリプテート）から選択され、アクセプターは、好ましくは、XL665又はフルオレセイン若しくはd2から選択される。ドナーとアクセプターとの間の近接度は、好ましくは、互換性のある読み取り装置において2つの異なる波長665nm及び620nmなどで、蛍光放射を測定することによってエネルギー移動のレベルを検出することによって判断される。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、620nm（Tb-クリプテートドナー）放射及び665nm（d2-アクセプター）放射の両方の同時測定を可能にするPHERASTAR FSXデバイスを使用して行われる測定を示す図である。665/620*10000の比率を、各ウェルについて計算する。相対的エネルギー移動率、デルタF %は、その比率を使用して計算され、タンパク質に対して補正することができる。棒グラフは、キット#1及びキット#2（凝集アルファシヌクレインを検出する）の両方を使用して測定した血漿サンプル（8倍希釈）のそれぞれについてタンパク質に対して補正されたデルタF %を示す。3人のPD患者と3人の健康対照との間に明らかな差異がある。この図は、PD患者の血漿において有意に高いレベルの凝集アルファシヌクレインがあり、この方法が、血液サンプルに基づき、PD患者において疾患進行を同定し、且つ診断し、且つモニターするために使用することができることを示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

発明の詳細な説明

本発明の目的は、レビー小体、レビー神経突起、及び小シナプス封入体の形態をした凝集不溶性アルファシヌクレインの蓄積が脳中に存在するアルファシヌクレイン関連障害、すなわちアルファシヌクレイン病のための診断法において使用するためのアッセイを提供することである。そのような障害は、パーキンソン病（PD）、認知症を伴うパーキンソン病（PDD）、レビー小体型認知症（DLB）、多系統萎縮（MSA）、及びREM睡眠行動異常症（RBD）並びにアルファシヌクレイン病変を伴う他の神経変性障害などのような1つ又はそれ以上の神経変性障害を含むが、これらに限定されない。

【0017】

本発明は、一方は凝集アルファシヌクレインに基づき、一方はリン酸化アルファシヌクレインに基づく2つのアッセイについての新たな使用を提供する。両方のアッセイは、対照の個人由来の血漿と比較して、PD患者由来の血漿において大きな増加を示す（図

10

20

30

40

50

1)。

【0018】

本発明の一態様によれば、本発明は、有効量のアルファシヌクレイン抗体により前記患者を治療することによって、本発明の発光アッセイを使用して、パーキンソン病などのようなアルファシヌクレイン病を有すると診断された患者を治療するための方法に関する。

【0019】

抗体治療の治療効果は、血液、血漿、又は血清中のアルファシヌクレインの患者レベルを測定して評価されてもよい。評価は、抗体治療より前に（たとえば患者を診断する時）又は1、2、3、4回、若しくはそれ以上の治療の後になされてもよい。たとえば、方法はまた、一実施形態によれば、抗体治療の治療効果及び疾患進行をモニターするために使用されてもよい。

【0020】

アッセイは、

a. 適切な結合条件下で患者由来の血液、血漿、又は血清サンプルを発光アッセイにかけるステップ及び

b. 適用可能な場合、パーキンソン病を有していない人由来の対照とデータを比較するステップ又はたとえば、データを、同じ人から異なる（以前の）時点で得られたデータと比較し、それによって、疾患進行をモニターするステップを含んでいてもよい。

【0021】

その結果に基づいて、患者が治療を継続すべきかどうか又はちょうど診断するところであれば、患者が治療を始めるべきかが決定されてもよい。たとえば、アッセイによって得られるデータによって、対照と比較して存在するアルファシヌクレインが多いことが示される場合、治療の継続又は開始が勧められてもよい。

【0022】

対照と患者との間の差は、2倍、3倍、4倍、又はそれ以上であってもよい。図1に示されるように、対照は非常に低く、したがって、陽性の結果は、バックグラウンドを無視することによって判定されてもよい。

【0023】

アッセイは、発光を測定するアッセイであり、HTRF（ホモジニアス時間分解蛍光法）ベースのアッセイであってもよい。この技術は、時間分解測定（TR）と蛍光共鳴エネルギー移動技術（FRET）を組み合わせたものである（Degorce et al, 2009, current Chemical Genomics, 3, 22-32）。TR-FRETアッセイでは、シグナルは、互いに隣接する場合に、ドナーとアクセプター分子（たとえば、抗体にカップルされた）との間の蛍光エネルギー移動を通して起きる。

【0024】

HTRF技術は、抗体などのような生体分子間の反応をモニターするために、蛍光ドナーとしてユウロピウムクリプテートを又はテルビウムクリプテート（Tb）を使用してもよい。例として、ユウロピウムクリプテート（Eu³⁺ + クリプテート）及びLumi4-Tb（Tb³⁺ + クリプテート）を含む。

【0025】

HTRFのために開発されたアクセプターは、紅藻類から精製されるフィコビリタンパク質色素であるXL665であってもよい。XL665は105 kDaの大きなヘテロ六量体の構造体（edifice）であり、HTRFアッセイにおけるその光物理学的特性のよりよい安定性及び保存のために、単離の後に架橋される。XL665の光物理学的特性に非常に類似している一連の光物理学的特性を持つが、XL665の1/100の大きさである有機構造物によって特徴づけられるアクセプターの一種は、たとえば土類キレート又はクリプテートである。より小さな実体を使用することによって、これにより、XL665ベースのTR-FRET系において時に疑われる立体障害の問題が解決される。これらの近赤外アクセプターはまた、典型的な化合物スクリーニングプロセスにおいて

10

20

30

40

50

発生する内因的な媒体又は化合物の自己蛍光によってそれらの放射が妨害されることが少ないので、特にホモジニアスアッセイに適している。これらの赤色アクセプターの特性はまた、赤色アクセプターを、テルビウムクリプテートとのカップリングに適したものにする。そのうえ、その放射スペクトルにおけるさらなるピークにより、テルビウムクリプテートは、たとえば2つの読み出し装置を用いる多重アッセイの設計を可能にしてもよい520 nmの範囲で放射するフルオレセインなどのような緑色アクセプターとカップルすることができる。特に、希土類キレート又はクリプテートなどのような蛍光化合物、とりわけテルビウム、ユウロピウム、ジスプロシウム、サマリウム、又はネオジムキレート又はクリプテートは、好都合に使用されるであろう。テルビウム又はユウロピウムクリプテートは、好ましくは使用されるであろう。

10

【0026】

本発明の測定の方法を使用する検出及び／又は決定の蛍光分析法において、欧州特許出願第180 492号明細書及び第321 353号明細書において記載される希土類クリプテートは、好都合に選ばれるであろう。

【0027】

欧州特許出願第180 492号明細書において記載されるテルビウムクリプテートTbトリスビピリジン若しくはユウロピウムクリプテートEuトリスビピリジン又は欧州特許出願第321 353号明細書において記載されるクリプテートEuトリスビピリジンジアミン及びTbトリスビピリジンジアミンは、好ましくは使用されるであろう。

【0028】

好都合な特徴によれば、蛍光ドナー化合物は、ユウロピウムクリプテートであり、蛍光アクセプター化合物は、d2、アロフィコシアニン、アロフィコシアニンB、フィコシアニンC、又はフィコシアニンRから選択される。

20

【0029】

発光ドナーとして、エオシン又はエリトロシンなどのようなリン光化合物を使用することもまた可能である。この場合、欧州特許出願第71 991号明細書及び第314 406号明細書において述べられるものなどのようなクロロフィリス(chlorophyllis)又は欧州特許出願第71 991号明細書において述べられるものなどのようなボルフィリン又は国際公開第88 04777号パンフレットのものなどのような他のフタロシアニンから選択される蛍光アクセプター化合物を使用することが好都合であろう。

30

【0030】

本発明の別の特徴によれば、媒体(たとえば血液、血漿、又は血清)中のアルファシヌクレインを検出する及び／又は決定するための発光法は、

- 1) 患者又は対象由来のアルファシヌクレインを含有する前記媒体に、発光ドナーとカップルされたアルファシヌクレインに対する第1の抗体を追加するステップ、
- 2) 発光アクセプターとカップルされた第2のアルファシヌクレイン抗体を追加するステップ、
- 3) 試薬の追加の後に前記媒体をインキュベートするステップ、
- 4) 結果として生じる媒体を蛍光ドナーの励起波長で励起するステップ、並びに
- 5) ある波長での蛍光ドナーのシグナル(この測定値は基準として果たす)及び異なる波長でのエネルギー移動に起因するシグナルを測定するステップを含む。

40

【0031】

一実施形態によれば、アッセイは、HTRF技術を使用してアルファシヌクレイン凝集を検出することを目的とする。凝集アルファシヌクレインは、Tb-クリプテートなどのようなドナー又はアクセプターにより標識された特異的アルファシヌクレインモノクローナル抗体を使用して検出される。色素が隣接している場合、光源(レーザー又はフラッシュランプ)によるドナーの励起は、アクセプターへの蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を引き起こし、これは次に特定の波長(665 nm)で蛍光を発する。アクセプター又はTbにより標識された抗体は、アルファシヌクレインに結合する。アルファシヌクレインが凝集すると、アクセプター又はTbにより標識された抗体は、次いで隣接

50

状態になり、FRETを起こす。シグナル強度は、形成された凝集体の数に比例する。

【0032】

アルファシヌクレイン凝集のモニタリングは、パーキンソン病（PD）、レビー小体型認知症（DLB）、びまん性レビー小体病（DLBD）、及び多系統萎縮（MSA）を含む1つの神経変性疾患群であるシヌクレイン病の病因の研究にとって非常に興味深い。したがって、本発明の方法は、上記に述べられた疾患を診断する又はモニターするために使用することができる。その代わりに、方法は、治療応答をモニターする又は追跡するために及び患者の治療に関する決定を行うために使用することができる。一実施形態では、この治療は、アルファシヌクレイン抗体治療である。

【0033】

したがって、本発明は、患者においてパーキンソン病などのようなシヌクレイン病を診断する又は追跡するための方法であって、

- a) 患者からサンプルを得るステップ
- b) 上記に記載されるように、発光アッセイにサンプルをかけるステップ、及び
- c) 任意選択で、結果を対照と比較するステップ

を含む方法に関する。

【0034】

サンプルは、好ましくは、血液サンプル、血清サンプル、又は血漿サンプルである。

【0035】

使用される抗体は、フルオロフォアに連結されたアルファシヌクレイン抗体であってもよい。使用されるフルオロフォアは、使用される他方のフルオロフォア（アクセプター）よりも長い蛍光時間を有する（ドナー）。ドナーは、好ましくは、Lumi4-Tb（Tb2+クリプテート）又はユウロピウムクリプテート（Eu3+クリプテート）から選択され、アクセプターは、好ましくは、d2、XL665、又はフルオレセインから選択される。

【0036】

ドナーとアクセプターとの間の近接度は、好ましくは、互換性のある読み取り装置において2つの異なる波長（665 nm及び620 nmなど）で、蛍光放射を測定することによってエネルギー移動のレベルを検出することによって判断される。

【0037】

本明細書において使用されるように、用語「アルファシヌクレイン」は、「アルファシヌクレインタンパク質」と同義であり、アルファシヌクレインタンパク質アイソフォームのいずれかを指す（たとえばUniProtでP37840、1〜3として同定される）。アルファシヌクレインのアミノ酸のナンバリングは、下記に示されるような配列を基準にして定められており、メチオニン（M）は、アミノ酸残基1である（配列番号1）。

【化1】

MDVFMKGLSK AKEGVVAAAE KTKQGVAAEA GKTKEGVLYV
GSKTKEGVVH GVATVAEKTQ EQVTNVGGAV VTGVTAVAQK
TVEGAGSIAA ATGFVKKDQL GKNEEGAPQE GILEDMPVDP
DNEAYEMPSE EGYQDYEPEA

【0038】

アルファシヌクレイン抗体は、いくつかの実施形態において、pS129アルファシヌクレイン又はアルファシヌクレインの120〜140の間のC末端残基に結合していてもよい。

【0039】

本発明はまた、アルファシヌクレイン上のエピトープに結合する有効量の抗体を投与

10

20

30

40

50

することによって、パーキンソン病患者を治療するための方法であって、患者は、本発明のアッセイによって診断されたことがある又はモニターされる方法にも関する。

【実施例】

【0040】

このアッセイは、血液サンプルを使用して、アルファシヌクレイン病、たとえばパーキンソン病に罹患している患者を同定し、診断し、且つモニターするために使用することができる。

【0041】

アッセイの原理：

このアッセイは、時間分解蛍光共鳴エネルギー移動（T R - F R E T）技術の使用に基づく。

【0042】

F R E Tは、2つの色素、ドナーとアクセプターとの間のエネルギーの移動に基づく。ドナーが励起されると、ドナーはアクセプターにエネルギーを移動させ、次にアクセプターが蛍光を放射し、その蛍光を測定する。これは、色素が互いに非常に接近している場合のみ起こり得る。きわめて瞬間的なものである通常のF R E T試験は、バックグラウンドの蛍光による限界がある。これは、F R E Tと時間分解測定を組み合わせ、バックグラウンドの蛍光及び非特異的な蛍光を回避することによって克服することができる。さらに、T R - F R E Tにおけるアクセプターは、アクセプターがF R E Tに関与した場合に、長寿命の蛍光を放射するように設計されている。

【0043】

アルファシヌクレイン凝集キットでは、特異的なモノクローナル抗体は、ドナー分子又はアクセプター分子のいずれかにより標識される。ホスホシヌクレインキット（S 1 2 9 P）では、2つの抗体が使用され、一方はアルファシヌクレイン抗体であり、他方はホスホシヌクレイン特異的抗体（S 1 2 9 P）であり、一方の抗体はドナーにより標識され、他方はアクセプター色素により標識される。抗体（ドナー色素及びアクセプター色素により標識された）がヒトアルファシヌクレイン凝集体に結合すると、それらは互いに非常に接近し合うようになり、励起と同時にF R E Tを起こす。

【0044】

患者

患者は、B i s p e b j e r g - F r e d e r i k s b e r g H o s p i t a lの神経内科の外来診療所から募集した。P Dについての臨床診断は、U K P a r k i n s o n ' s D i s e a s e S o c i e t y B r a i n B a n k臨床診断基準に従って確定した。患者は継続的に組み入れ、臨床追跡調査をすべての患者について実行した。追跡調査時に、確実なP D診断についての診断基準を満たす患者のみを試験に受け入れた。対照群の対象は、中枢神経系を冒している可能性のある疾患はなかった。

【0045】

血漿サンプル

静脈血をそれぞれの診療所で採取し、同じ日にB i s p e b j e r g M o v e m e n t D i s o r d e r s B i o b a n k、C o p e n h a g e n、D Kで処理した。血漿サンプルはすべて、組み入れ時に収集した。サンプルは、E D T Aコーティングポリプロピレンチューブ中に収集し、4℃で10分間2000 x gで回転させ、次いで血漿上清を分取し、分析の日まで-80℃で400 µ Lポリプロピレン（P P）チューブ中で保管し、分析の日に30分間氷上で解凍した。

【0046】

実施例1

患者由来のサンプル（3×対照及び3×P D患者）を分析した。サンプルを比較するために、C i s b i oの2種類の市販のキット、アルファシヌクレイン凝集キット（キット# 1）及びホスホシヌクレインキット（キット# 2）を使用した。それぞれのサンプルは、3つの異なる希釈液においてテストした。サンプルは、キットに備えられたバッファー

中で希釈し、386ウェルプレートの中に二通りピペッティングした。抗体混合物をウェルに追加し、RTでインキュベートする。陽性対照及び陰性対照をプレートに含める。

【0047】

測定は、620nm (Tb-クリプテートドナー) 放射及び665nm (d2-アクセプター) 放射の両方の同時測定を可能にするPHERASTAR FSXデバイスを使用して行った。665/620*10000の比率を、各ウェルについて計算する。相対的エネルギー移動率、デルタF %は、その比率を使用して計算し、タンパクに対して補正することができる。棒グラフは、キット#1及びキット#2の両方を使用して測定したサンプル(8倍希釈)のそれぞれについてタンパク質に対して補正されたデルタF %を示す。3人のPD患者と3人の健康対照との間に明らかな差異がある。本実施例は、PD患者の血漿において有意に高いレベルの凝集アルファシヌクレイン及びホスホシヌクレインがあり、この方法が、血液サンプルに基づき、PDの症例を同定し、且つ診断するために使用することができることを示す。

本発明は以下の態様を含み得る。

【1】

対象のサンプル中のアルファシヌクレインを検出するための方法であって、

- a) 対象からサンプルを得るステップ、
 - b) 前記サンプルを発光アッセイにかけるステップ、及び
 - c) 任意選択で、結果を対照と比較するステップ
- を含む方法。

【2】

前記サンプルには、血液サンプル、血漿サンプル、又は血清サンプルがある、請求項1に記載の方法。

【3】

前記発光アッセイは、pS129アルファシヌクレイン又はアルファシヌクレインの120~140残基内に結合するアルファシヌクレイン抗体を使用している、請求項1に記載の方法。

【4】

前記発光アッセイは、pS129アルファシヌクレイン又はアルファシヌクレインの120~140残基内の異なるエピトープに結合する2つの異なるアルファシヌクレイン抗体を使用している、請求項1に記載の方法。

【5】

使用される一方のフルオロフォアは、使用される他方のフルオロフォア(アクセプター)よりも長い蛍光時間を有する(ドナー)、請求項3又は4に記載の方法。

【6】

前記ドナーのフルオロフォアは、Lumi4-Tb(Tb2+クリプテート)、ユウロピウムクリプテート(Eu3+クリプテート)から選択される、請求項5に記載の方法。

【7】

前記アクセプターのフルオロフォアは、d2、XL665、又はフルオレセインから選択される、請求項5に記載の方法。

【8】

前記ドナーと前記アクセプターとの間の近接度は、蛍光を測定することによってエネルギー移動のレベルを検出することによって判断される、請求項1に記載の方法。

【9】

前記方法により、前記サンプル中のアルファシヌクレインレベルが、健康な対象由来の対照サンプルよりも高いことが示される場合、前記対象は、アルファシヌクレインに対する有効量の抗体で治療される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

【10】

前記方法は、アルファシヌクレイン病を診断する又はモニターするために使用される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

[1 1]

前記方法は、アルファーシヌクレイン病を治療するために使用される医薬の治療応答をモニターするために使用される、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

[1 2]

前記対象は、ヒトである、先行請求項のいずれか一項に記載の方法。

[1 3]

アルファーシヌクレイン上のエピトープに結合する有効量の抗体を投与することによって、パーキンソン病患者を治療する方法であって、前記患者は、請求項 1 ～ 9 に記載のアッセイによって診断されたことがある又はモニターされる方法。

【図面】

【図 1】

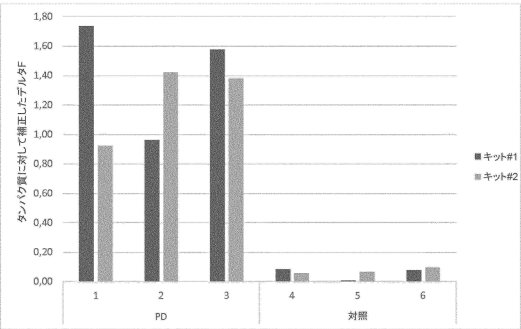


図 1

【配列表】

0007498663000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

F I

A 6 1 K 39/395
C 1 2 N 15/12

N

(72)発明者 カルンキ, ペッカ

デンマーク国, 2 5 0 0 バルビー, オッテイリアベエイ 9, ハー・ルンドベック・アクチエゼルス
スカベット内

(72)発明者 フォグ, カリナ

デンマーク国, 2 5 0 0 バルビー, オッテイリアベエイ 9, ハー・ルンドベック・アクチエゼルス
スカベット内

審査官 小澤 理

(56)参考文献

特表 2 0 1 1 - 5 3 0 0 7 4 (J P, A)

特表 2 0 1 7 - 5 0 7 3 1 7 (J P, A)

米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 1 9 2 0 1 7 (U S, A 1)

特表 2 0 1 4 - 5 0 2 3 5 6 (J P, A)

国際公開第 2 0 1 6 / 0 4 0 9 0 7 (W O, A 1)

BIDINOSTI, M. et al., Novel One-Step Immunoassays to Quantify α -Synuclein, Journal of
Biological Chemistry, 2012年, Vol.287, No.40, p.33691-33705BHUCKORY, S. et al., Evaluating Quantum Dot Performance in Homogeneous FRET Immun
oassays for Prostate Specific Antigen, Sensors, 2016年, Vol.16, No.197, p.1-11, doi:1
0.3390/s16020197MATA, I. F. et al., SNCA Variant Associated with Parkinson Disease and Plasma α -Synuclei
n Level, Archives of Neurology, 2010年, Vol.67, No.11, p.1350-1356FOULDS, P.G. et al., Phosphorylated α -synuclein can be detected in blood plasma and is p
otentially a useful biomarker for Parkinson's disease, The FASEB Journal, 2011年, Vol.2
5, No.12, p.4127-4137, doi.org/10.1096/fj.10-179192PARK, M.J. et al., Elevated Levels of α -Synuclein Oligomer in the Cerebrospinal Fluid of Dr
ug-Native Patients with Parkinson's Disease, J Clin Neurol, 2011年, Vol.7, p.215-222,
http://dx.doi.org/10.3988/jcn.2011.7.4.215YANAMANDRA, K. et al., α -Synuclein Reactive Antibodies as Diagnostic Biomarkers in Blo
od Sera of Parkinson's Disease Patients, PLoS ONE, 2011年, Vol.6, No.4, e18513, p.1-1
3, doi:10.1371/journal.pone.0018513

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

G 0 1 N 3 3 / 5 3

G 0 1 N 3 3 / 6 8

A 6 1 P 3 9 / 0 2

A 6 1 P 2 5 / 1 6

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

C 1 2 N 1 5 / 1 2