

(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2019-537727
(P2019-537727A)

(43) 公表日 令和1年12月26日(2019.12.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 6 5 E	2 G O 5 9
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 2 9
GO 1 N 21/3577 (2014.01)	GO 1 N 21/3577	4 H O 4 5
GO 1 N 21/552 (2014.01)	GO 1 N 21/552	
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-527201 (P2019-527201)
 (86) (22) 出願日 平成29年11月21日 (2017.11.21)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年6月27日 (2019.6.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/079949
 (87) 国際公開番号 W02018/091743
 (87) 国際公開日 平成30年5月24日 (2018.5.24)
 (31) 優先権主張番号 16199805.9
 (32) 優先日 平成28年11月21日 (2016.11.21)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 516243652
 ルーラー-ユニベルシタット ボーフム
 ドイツ連邦共和国 ボーフム 44801
 , ユニベルシタットシュトラッセ 150
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74) 代理人 100110663
 弁理士 杉山 共永
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁
 (72) 発明者 ゲルワート, クラウス
 ドイツ連邦共和国 ミュンスター 491
 49, グリムシュトラッセ 5
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー病の鑑別診断のための複合アッセイ

(57) 【要約】

本発明は、アルツハイマー病の鑑別診断および異なる病期への亜分類のための複合免疫赤外線アッセイを提供する。本方法は、確実な疾患診断および患者の層別化用に適用することができる。本アッセイでは、体液中のアミロイド-ベータペプチドおよびタウタンパク質の二次構造分布内の変化について無標識の検出を考慮している。未変性からシート濃縮アイソフォームへのこの二次構造の変化は、臨床疾患発現の何年も前に現れる。ここで、本複合方法では、液体生検をベースとする診断のためにこのシフトを利用している。

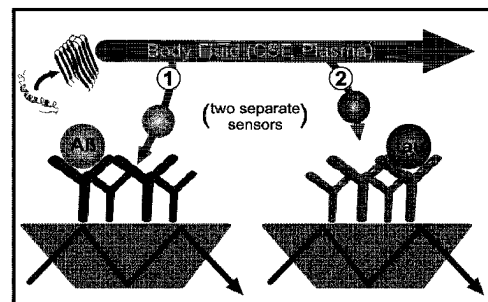


Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

体液中の可溶性のアミロイド - ベータ (A) ペプチド画分および可溶性のタウタンパク質画分の二次構造分布の直接解析による、アルツハイマー病の鑑別診断および異なる病期への亜分類のための方法であって、

(a) 赤外線透過材料のコアを備える内部反射素子と、

前記コアの少なくとも 1 つの表面に直接グラフトされている、前記 A ペプチド用の少なくとも 1 つの受容体であって、

前記 A ペプチドへの特異的かつ立体配座的に独立した結合が可能な抗体であり、ならびに

前記少なくとも 1 つの受容体の自由にアクセス可能なアミン基を短いシラン / チオールリンカー上のアミン反応基と反応させ、かつ前記短いシラン / チオールリンカー上の残留するアミン反応基を前記 A ペプチドと交差反応しないブロッキング物質でブロッキングする、前記短いシランリンカーを用いたシラン化によってまたは前記短いチオールリンカーを用いたチオール化によって、前記内部反射素子の少なくとも 1 つの表面に直接グラフトされている、

前記 A ペプチド用の前記少なくとも 1 つの受容体と

を有する第 1 の赤外線センサー素子を含む第 1 の IR セル内で、可溶性の A ペプチドを有する体液の少なくとも 1 回のフラックスを行って、前記第 1 の IR セルを通して IR ビームを送って、ならびにそれから赤外線スペクトルを得る、ステップと；

(b) 赤外線透過材料のコアを備える内部反射素子と、

前記コアの少なくとも 1 つの表面に直接グラフトされている、前記タウタンパク質用の少なくとも 1 つの受容体であって、

前記タウタンパク質への、それぞれ、特異的かつ立体配座的に独立した結合が可能な抗体であり、ならびに

前記少なくとも 1 つの受容体の自由にアクセス可能なアミン基を短いシラン / チオールリンカー上のアミン反応基と反応させ、かつ前記短いシラン / チオールリンカー上の残留するアミン反応基を前記タウタンパク質と交差反応しないブロッキング物質でブロッキングする、前記短いシランリンカーを用いたシラン化によってまたは前記短いチオールリンカーを用いたチオール化によって、前記内部反射素子の少なくとも 1 つの表面に直接グラフトされている、

前記タウタンパク質用の前記少なくとも 1 つの受容体と

を有する第 2 の赤外線センサー素子を含む第 2 の IR セル内で、可溶性のタウタンパク質を有する体液の少なくとも 1 回のフラックスを行って、前記第 2 の IR セルを通して IR ビームを送って、ならびにそれから赤外線スペクトルを得る、ステップと；

(c) 得られた前記赤外線スペクトルを解析して、前記鑑別診断のために前記体液中の前記可溶性の A ペプチドのおよび前記可溶性のタウタンパク質の二次構造分布を決定するステップであって、前記 A ペプチドのおよび / または前記タウタンパク質のアミド I バンドのダウンシフトによって前記病期が示される、ステップと

を含む、方法。

【請求項 2】

前記第 1 のおよび第 2 の IR セルの前記赤外線透過材料は、シリコン、ゲルマニウム、セレン化亜鉛、セレン化ガリウムおよびダイヤモンドから独立して選択され、好ましくはゲルマニウムである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 1 のおよび第 2 の赤外線センサー素子は、

台形または平行四辺形の形状であり、前記アミド I バンドを検出するのに十分な信号対雑音比を持って赤外線透過であるゲルマニウム内部反射素子と、

前記 A ペプチド用または前記タウタンパク質用の少なくとも 1 つの受容体であって、

前記 A ペプチドへのまたは前記タウタンパク質への、それぞれ、特異的かつ立体配

10

20

30

40

50

座的に独立した結合が可能な抗体であり、ならびに

前記少なくとも1つの受容体の自由にアクセス可能なアミン基を短いシラン/チオールリンカー上のアミン反応基と反応させ、かつ前記短いシラン/チオールリンカー上の残留するアミン反応基を前記Aペプチドまたは前記タウタンパク質と、それぞれ、交差反応しないブロッキング物質でブロッキングする、前記短いシランリンカーを用いたシラン化によってまたは前記短いチオールリンカーを用いたチオール化によって、前記内部ゲルマニウム反射素子の少なくとも1つの表面に直接グラフトされている、

前記Aペプチド用または前記タウタンパク質用の前記少なくとも1つの受容体とを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記内部反射素子は、

(i) ゲルマニウム単結晶、好ましくは台形に切断されたゲルマニウム単結晶であり；および/もしくは

(ii) 前記反射素子を通して、赤外光の1回を超える通過を可能としたりは提供し；および/もしくは

(iii) 異なる波長での蛍光の検出を含めて別の光学的方法による代替または並行の解析にさらに適しており；ならびに/または

(iv) 前記Aペプチドまたはタウタンパク質と交差反応しない前記ブロッキング物質は、カゼイン、エタノールアミン、L-リジン、ポリエチレングリコール、アルブミン、およびそれらの誘導体から選択される、請求項1または3に記載の方法。

【請求項5】

前記シランリンカーおよびチオールリンカーは、均一なシランリンカーおよびチオールリンカー、シランリンカーの混合物およびチオールリンカーの混合物を含み、原子が20個以下または原子が15個以下の有効リンカー鎖長を有し、好ましくは、前記シランリンカーは、以下の式のうちの1つを有する：

(i) $X_3Si-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_{n'}-Z$ 、

(ii) $X_2R^1Si-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_{n'}-Z$ または

(iii) $X(R^1)_2Si-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_{n'}-Z$ 、

および前記チオールリンカーは以下の式を有する：

(iv) $WS-(CH_2)_n-Y-(CH_2)_{n'}-Z$ 、

[式中、Wは、 R^1S -またはHであり、Xは、出現する毎にハロゲンおよび C_{1-6} アルコキシから独立して選択され、nは、1~10の整数であり、n'は、1~5の整数である； R^1 は、出現する毎に C_{1-6} アルキルから独立して選択され、Yは、化学結合、 $-O-$ 、 $-CO-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-NR^2-$ 、 $-S-$ 、 $-SS-$ 、 $-NR^2CO-$ 、 $-CONR^2-$ 、 $-NR^2SO_2-$ および $-SO_2NR^2-$ (式中、 R^2 はHまたは C_{1-6} アルキルである)から選択され、およびZは、 $-CO_2H$ 、 $-SO_3H$ およびそれらのエステル誘導体を含めてアミン反応基である]、

請求項1、3または4に記載の方法。

【請求項6】

前記赤外線センサー素子は、

(i) シラン化により取得可能であり、かつ式(i)~(iii)の前記リンカーにおいて、Xは C_{1-6} アルコキシ基から、好ましくはメトキシ基およびエトキシ基から独立して選択され、Yは $-NHCO-$ であり、Zは $-CO_2H$ またはそのエステル誘導体であり、ならびにnは1~5の整数でありおよびn'は1~3の整数であり、好ましくは、nは3でありおよびn'は2であり；または

(ii) チオール化により取得可能であり、かつ式(iv)の前記リンカーにおいて、WはHであり、Yは化学結合であり、Zは $-CO_2H$ またはそのエステル誘導体であり、ならびにnは1~8の整数でありおよびn'は1~5の整数であり、好ましくは、nは8でありおよびn'は4である、

請求項5に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7】

(i) 前記 A ペプチドに結合する前記受容体は抗体であり、好ましくは、抗体 A 8 9 7 8 を含めて、前記 A ペプチドのセントラルエピトープに特異的に結合する抗体であり；
または

(ii) 前記タウタンパク質に結合する前記受容体は抗体であり、好ましくは、抗体タウ - 5 を含めて、タウのミドルエピトープにおよび全てのタウ変異体に存在するエピトープに特異的に結合する抗体である、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記方法は、アルツハイマー病の初期 / 前駆、中度、および重度の病期への鑑別を提供し、かつ

10

(i) 記載のバイオマーカー、CSF 由来の A_β、血漿由来の A_β、および CSF 由来のタウのアミド I の最大値が全て、弁別閾値 ($1643 \text{ cm}^{-1} \pm 5 \text{ cm}^{-1}$) 未満であり、これらによって重度の病期が示され、

(ii) 2つのバイオマーカー、一方はCSFまたは血漿由来の A_β、他方はCSF由来のタウ、のアミド I の最大値が弁別閾値 ($1643 \text{ cm}^{-1} \pm 5 \text{ cm}^{-1}$) 未満であることによって、中度の病期が示され、

(iii) 1つまたは2つのバイオマーカー (CSF および / または血漿由来の A_β) の、しかしCSF由来のタウではないが、アミド I の最大値が弁別閾値 ($1643 \text{ cm}^{-1} \pm 5 \text{ cm}^{-1}$) 未満であることによって、初期の病期が示される、
請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記鑑別診断は、認知症タイプの確実な臨床プロファイルを提供し、好ましくは前記方法は、CSF 由来の A_β (A)、血漿由来の A_β (B)、および CSF 由来のタウ (C) の二次構造分布の検出を含み、最も好ましくは、前記方法は、認知症アルツハイマー型 (DAT) と疾患対照 (Disease Control) との鑑別診断を可能にし、DAT 患者は、初期、中度、および重度の DAT に亜分類され、DC 患者は健康対照、その他の疾患、およびアルツハイマー病とは別の起源に起因する認知症に分けられる、
請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

30

(i) 両方のバイオマーカー、A_β に対しては (A) および (B) ならびにタウに対しては (C)、について弁別閾値 ($1643 \text{ cm}^{-1} \pm 5 \text{ cm}^{-1}$) によってアルツハイマー病と DC 患者とが分けられる；および / または

(ii) (A)、(B)、および (C) の組合せによって、確実な DAT 診断に適用可能なバイオマーカーパネルが提供される、
請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

体液の解析に基づいて患者の病状について情報を提供し、前記バイオマーカータンパク質の前記アミド I バンド最大値のシフトが、前記病の進行を示す分類指標である、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 12】

$1638 \sim 1648 \text{ cm}^{-1}$ の値を有する閾値分類指標が前記病の前記進行を示す分類指標である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の第 1 のおよび第 2 の赤外線センサー素子を含む、アルツハイマー病の鑑別診断および異なる病期への亜分類のためのキット。

【請求項 14】

請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の第 1 のおよび第 2 の赤外線センサー素子を含む、アルツハイマー病の鑑別診断および異なる病期への亜分類のためのデバイス。

【請求項 15】

50

体液中の可溶性のアミロイド - ベータ (A) ペプチド画分および可溶性のタウタンパク質画分の二次構造分布の直接解析のための、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の第 1 のおよび第 2 の赤外線センサー素子、請求項 1 3 に記載のキットまたは請求項 1 4 に記載のデバイスの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、アルツハイマー病の鑑別診断および異なる病期への亜分類のための複合免疫赤外線アッセイを提供する。本方法は、確実な疾患診断および患者の層別化用に適用することができる。本アッセイでは、体液中のアミロイド - ベータペプチドおよびタウタンパク質の二次構造分布内の変化について無標識の検出を考慮している。未変性からシート濃縮アイソフォームへのこういった二次構造の変化は、A およびタウに対して時間遅れで生じるが、臨床疾患発現の何年も前に現れる。ここで、本複合方法では、液体生検をベースとする診断のためにこのシフトを利用している。

10

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

アルツハイマー病 (A D) は、世界中で 3 , 5 0 0 万人を超えて影響を及ぼしている最も頻繁に起こる神経変性疾患のうちの 1 つである (Prince et al., London, UK doi:10.1111/j.0963-7214.2004.00293.x (2015))。A D の鑑別診断および、特に疾患の初期段階または前駆段階への亜分類は、クリニカルルーチンにおいて依然として難しい問題である。A D の初期検出のための信頼性のあるバイオマーカーの必要性が、現在、非常に望まれている。しかし確実でかつ初期の鑑別診断が将来の治療介入にとって基本である (Chiba, Neurodegenerative Diseases, edited by Uday Kishore, 181-225. InTech doi:10.5772/55293 (2013); Thorsett and Latimer, Current Opinion Chem. Biol. 4(4):377-82 (2000))。したがって、科学研究所は、好ましくは液体生検をベースとする単純な診断試験に焦点を合わせている (Doecke, Arch. Biol. 69(10):1318 doi:10.1001/archneurol.2012.1282 (2012); Andreasen et al., J. Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 64(3):298-305 (1998); Fiandaca et al., Frontiers in Neurology 6(Nov):1-13 doi:10.3389/fneur.2015.00237 (2015); Mapstone et al., Nature Medicine 20(4):415-18. doi:10.1038/nm.3466 (2014))。

20

30

【 0 0 0 3 】

アルツハイマー病では、主として内在的な不規則なアミロイド - ベータ (A) ペプチドおよびタウタンパク質のシート濃縮アイソフォームへの二次構造の変化が疾患の進行中の起因事象として考察されている (Sarroukh et al., Cell. Mol. Life Sci. 68(8):1429-38 doi:10.1007/s00018-010-0529-x (2011); Cerf et al., Biochem. J. 421(3):415-23 doi:10.1042/BJ20090379 (2009); Fandrich, et al., Prion 3(2):89-93 (2009); Sachse et al., PNAS 105(21):7462-66 doi:10.1073/pnas.0712290105 (2008); Glabe, J. Biol. Chem. 283(44):29639-43 doi:10.1074/jbc.R800016200 (2008); Cavallucci et al., Mol. Neurobiol. doi:10.1007/s12035-012-8251-3 (2012); Haass and Selkoe, Nature Rev. Mol. Cell Biol. 8(2):101-12 doi:10.1038/nrm2101 (2007); Kolarova et al., Int. J. Alzheimer's Disease doi:10.1155/2012/731526 (2012); Yang et al., Devel. Brain Res. 156(2):127-38 doi:10.1016/j.devbrainres.2005.02.004 (2005))。これによって、タウ凝集および神経原線維変化 (N F T) への沈着が A 凝集を伴うことが示唆されている (Lo et al., Arch. Neurol. 68(10):1257-66 doi:10.1001/archneurol.2011.123 (2011); Bennett et al., Arch. Neurol. 61(3):378-84 doi:10.1001/archneur.61.3.378 (2004); Coomaraswamy et al., PNAS 107(17):7969-74 doi:10.1073/pnas.1001056107 (2010); Braak and Braak, Acta Neuropathologica 82(4):239-59 doi:10.1007/BF00308809 (1991); Thal et al., J. Neuropath. Exp. Neurol. 59(8):733-48. (2000); Thal et al., Science of Aging Knowledge Environment 2006(6):re1 doi:10.1126/sageke.200

40

50

6.6.re1 (2006))。

【 0 0 0 4 】

クリニカルルーチンでは、神経心理学的試験および脳脊髄液 (C S F) 中の多様なバイオマーカーレベルの神経化学的定量的結果が、従来技術の鑑別診断に使用されている。しかし、A 40、A 42、総タウレベルまたは高リン酸化タウレベルなどのバイオマーカー濃度自体は、A Dの進行と相関しない可能性がある (Wiltfang et al., J Neurochem., 101(4):1053-59 doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04404.x (2007), Gabelle et al., J Alzheimers Dis., 26(3):553-63 doi:10.3233/JAD-2011-110515 (2011), Blennow et al., J Nutr Health Aging, 13(3):205-8 doi:10.1007/s12603-009-0059-0 (2009))。さらに、これらのバイオマーカー定量化に基づくと、鑑別診断は、依然として難しい問題である。しかし、陽電子放出断層撮影法 (P E T) および磁気共鳴断層撮影法 (M R T) によれば、ヒトの脳内の斑などの凝集物 (シート濃縮タンパク質から蓄積された) が検出される。それにもかかわらず、P E T および M R T は非常に高価で時間のかかる技法であり、こういった技法は前駆 A D 段階の検出には適用できず、したがって疾患の中度 / 後期の段階の決定のみを提供する。さらなる欠点は、P E T の場合における造影剤の使用であり、これもまた患者にストレスを与える。既に述べた技法の他に、蛍光に基づく免疫アッセイ、特に酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) および表面蛍光強度分布解析法 (s F I D A) もまた新しい分野である。しかし、これらの技法には、分析対象のバイオマーカーの二次構造に影響を及ぼし得る蛍光標識検出抗体が必要である。さらに、E L I S A および s F I D A は、タンパク質二次構造または二次構造分布に関してなんら直接的な情報を明らかにしなかった。さらに、タウタンパク質の二次構造は、言及の技法では立体配座への感受性が欠けているので、今日まで診断目的または鑑別目的のために決して使用されなかった。

10

20

【 0 0 0 5 】

かかる二次構造の変化を決定するために、フーリエ変換赤外 (F T I R) 差分光法が強力なツールである (Kotting and Gerwert, Chemphyschem 6(5):881-888 doi:10.1002/cphc.200400504 (2005))。ペプチド結合の C = O 振動によって引き起こされるアミド I バンドの周波数によって、タンパク質骨格の二次構造が示される。特に、体液中の シート濃縮バイオマーカーアイソフォームの増加は、表面検査減衰全反射 (A T R) 技法によりモニタリングされる 1630 cm^{-1} への周波数ダウンシフトによって確実に検出される。体液中の特定のタンパク質の二次構造分布を解析するために、対象のタンパク質を表面層内に選択的に結合させる必要があり、これは抗体機能化内部反射素子 (I R E) を用いて達成される (Schartner et al., JACS 135(10):4079-87 doi:10.1021/ja400253p (2013))。本方法は、中度の A D と疾患対照との鑑別用に、C S F および血漿由来の可溶性の A 画分の二次構造分布の抽出および決定に適用された (Nabers et al., J. Biophotonics 9(3):224-34 doi:10.1002/jbio.201400145 (2016); Nabers et al., Anal. Chem. Doi: 10.1021/acs.analchem.5b04286 (2016))。

30

【 0 0 0 6 】

対照的に、表面プラズモン共鳴 (S P R)、表面弾性波または水晶振動子マイクロバランスなどの技法を使用して、タンパク質 - リガンドまたはタンパク質薬物相互作用を解析する。こういった技法は動力学的情報のみを提供するが、スペクトル解像度は提供しないので、タンパク質内の直接的な二次構造変化を明らかにすることができない。表面増強赤外吸収 (S E I R A) 分光法などのさらなる技法は理論的にはスペクトル解像度を提供するであろうが、測定の実現性は、粗い金表面の調製に起因して極めて困難な問題であり、したがってタンパク質二次構造転移解析用のロバストプラットフォームを提供しない。

40

【 0 0 0 7 】

国際公開第 2 0 1 5 / 1 2 1 3 3 9 号パンフレットでは、振動分光法による、立体配座および二次構造解析用の、例えば体液のような、複合的な混合物内の、特に単一の選択されたタンパク質の直接非侵襲的定性の二次構造解析用のバイオセンサーが提供されている。解析のために、選択した物質を単離し、濃縮し、または特別な調製手順によって前処理

50

することを必要としない。バイオセンサーは、候補バイオマーカータンパク質の立体配座転移が疾患の進行に関連している疾患の進行の決定に適しており、バイオマーカータンパク質のアミドIバンド最大値のシフトは、疾患の進行を示す分類指標である。タンパク質ミスフォールディング病を、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、クロイツフェルト-ヤコブ病、またはハンチントン病とすると、こういった情報は、疾患の進行に決定的に関係している。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の簡単な説明

アルツハイマー病 (AD) は、2つの重要なバイオマーカー候補のミスフォールディングを含めて、多因子性プロテオパシーである。アミロイド-ベータペプチド (A β) およびタウタンパク質の両方が、疾患の進行中にシートアイソフォームの増大を示す。以前に、脳脊髄液 (CSF) および血漿中の総A β 画分中のシートA β アイソフォームの含有量の増加を、免疫赤外線センサーによるAD検出に適用することができた。本明細書では、疾患対照 (DC) 患者および認知症アルツハイマー型 (DAT) 患者由来の300試料を、それぞれ可溶性のA β (CSF、血漿) およびタウタンパク質 (CSF) の二次構造分布に関して解析した。タウタンパク質の二次構造分布は、DATに対して特異的ではなく、認知症の一般的なマーカーであることが証明されたが、A β とタウとの複合データ解析により、93%の精度でDC/DAT鑑別のための診断アッセイが得られた。さらに、複合データの評価によってDATの初期段階および後期段階においてDAT患者を細別する可能性が示されたが、この評価はDC対象の鑑別診断を実現する可能性がある。したがって本発明は、

(1) 体液中の可溶性のアミロイド-ベータ (A β) ペプチド画分および可溶性のタウタンパク質画分の二次構造分布の直接解析による、アルツハイマー病の鑑別診断および異なる病期への亜分類のための方法であって、

(a) 赤外線透過材料のコアを備える内部反射素子と、前記コアの少なくとも1つの表面に直接グラフトされている、A β ペプチド用の少なくとも1つの受容体とを有する第1の赤外線センサー素子を含む第1のIRセル内で、可溶性のA β ペプチドを有する体液の少なくとも1回のフラックスを行って、前記第1のIRセルを通してIRビームを送って、ならびにそれから赤外線スペクトルを得る、ステップと；

(b) 赤外線透過材料のコアを備える内部反射素子と、前記コアの少なくとも1つの表面に直接グラフトされている、タウタンパク質用の少なくとも1つの受容体とを有する第2の赤外線センサー素子を含む第2のIRセル内で、可溶性のタウタンパク質を有する体液の少なくとも1回のフラックスを行って、前記第2のIRセルを通してIRビームを送って、ならびにそれから赤外線スペクトルを得る、ステップと；

(c) 得られた赤外線スペクトルを解析して、鑑別診断のために体液中の可溶性のA β ペプチドのおよび可溶性のタウタンパク質の二次構造分布を決定するステップであって、好ましくはA β ペプチドのおよび/またはタウタンパク質のアミドIバンドのダウンシフトによって病期が示される、ステップとを含む、方法、

(2) 上の態様(1)の好ましい一実施形態であって、前記第1のおよび第2の赤外線センサー素子は、台形または平行四辺形の形状であり、アミドIバンドを検出するのに十分な信号対雑音比を持って赤外線透過であるゲルマニウム内部反射素子と、A β ペプチド用またはタウタンパク質用の少なくとも1つの受容体であって、A β ペプチドへのまたはタウタンパク質への、それぞれ、特異的かつ立体配座的に独立した結合が可能な抗体であり、ならびに前記少なくとも1つの受容体の自由にアクセス可能なアミン基を短いシラン/チオールリンカー上のアミン反応基と反応させ、かつ短いシラン/チオールリンカー上の残留するアミン反応基をA β ペプチドまたはタウタンパク質と、それぞれ、交差反応しないブロッキング物質でブロッキングする、短いシランリンカーを用いたシラン化によ

10

20

30

40

50

てまたは短いチオールリンカーを用いたチオール化によって、前記内部ゲルマニウム反射素子の少なくとも1つの表面に直接グラフトされている、A ペプチド用またはタウタンパク質用の少なくとも1つの受容体とを含む、好ましい一実施形態、

(3) 上の(1)または(2)に記載の第1のおよび第2の赤外線センサー素子を含む、アルツハイマー病の鑑別診断および異なる病期への亜分類のためのキット、

(4) 上の(1)または(2)に記載の第1のおよび第2の赤外線センサー素子を含む、アルツハイマー病の鑑別診断および異なる病期への亜分類のためのデバイス、ならびに

(5) 体液中の可溶性のアミロイド-ベータ(A)ペプチド画分および可溶性のタウタンパク質画分の二次構造分布の直接解析のための、上の(1)もしくは(2)に記載の第1のおよび第2の赤外線センサー素子、上の(3)に記載のキットまたは上の(4)に記載のデバイスの使用、

を提供する。

【0009】

本発明は、2つのセンサー素子によるAとタウとの個別の検出に基づいている。これに関連して、解析および亜分類は、体液から個別に抽出されたAおよびタウ両方の二次構造分布の決定に基づいている。今までのところ、CSF中のタウタンパク質の二次構造分布は、診断目的のために考慮されたことがなかった。さらに、アルツハイマー病の検出のためにCSFからタウの二次構造の変化を組み込むことによって、診断精度に対する付加的な効果以上のものが提供される。A(例えばCSFおよび/または血漿中の)およびタウ(例えばCSF中の)の二次構造分布を解析することで、軽度から重度の病期におけるアルツハイマー病の亜分類、およびADとその他の認知症タイプとの鑑別が可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】複合免疫赤外線アッセイのスキームおよび解析の原理を示す図である。(A)CSFおよび/または血漿中に存在するA(1)およびタウ(2)の全画分を、抗体機能化免疫赤外線センサーを使用して個別に抽出した。検出されたAおよびタウの二次構造分布は、赤外線アミドIの最大値の位置によって示される。

【図2】CSFおよび血漿中のA、ならびにCSF中のタウの解析に基づくDCとDATとの弁別用の箱ひげ図に表示されるようにアミドIの最大値の位置の分布を示す図である。両方の診断群は、CSF($p = 2.5 \times 10^{-11}$, Kruskal-Wallis ANOVA、信頼水準 $\alpha = 0.05$)およびEDTA血漿($p = 3.4 \times 10^{-9}$)からのAのアミドIの最大値において高い有意差を、およびCSFからのタウに対して中程度の有意性($p = 1.6 \times 10^{-3}$)を示した。箱ひげ図では、25/50/75%分位点は水平線として、平均バンド位置は正方形として、±標準偏差はひげとして、および観察最小値/最大値はクロスとして表示されている。

【図3】61人のDC(灰色)および39人のDAT(黒色)の試料について、CSF中のタウ、CSF中のAおよびEDTA血漿中のAについて決定されたアミドIの最大値の位置の3D散布図である。透明なブラックボックス内のデータ点は、3つのアッセイ全てにおいてDATとして同定された対象を示す。

【図4】CSF中のA(A)の二次構造分布、EDTA血漿中のA(B)の二次構造分布、およびCSF中のタウタンパク質(C)の二次構造分布の決定に基づくDC($n = 61$)とDAT($n = 39$)との鑑別のためのROC曲線解析の図である。この順序で、0.90、0.85、および0.67のAUCが得られた。したがって、診断精度、92%(A、CSF)、85%(A、血漿)、および68%(タウ、CSF)が算出された(D)。これらのデータに基づくと、タウの二次構造分布単独では、認知症に対して、特定のDAT検出に対するよりも一般的なバイオマーカーであるといっそう思われる。

【図5】複合免疫赤外線アッセイによるDATとその他のタイプの認知症との鑑別診断および病期分類のための手順のダイアグラムである。アッセイは、体液中のAペプチドおよびタウタンパク質の二次構造分布の決定に基づいている。この分布は、抽出されたバイ

10

20

30

40

50

オマーカー画分の赤外線立体配座感受性アミドIバンドの最大値の位置で表されている。
 1643 cm^{-1} の弁別マーカーバンド未満の最大値は病気であると定義される。この手順は、CSFおよび血漿からの抽出A画分およびCSF由来のタウタンパク質画分に適用される。3つのバイオマーカー全ての値が 1643 cm^{-1} 以上である場合、認知症には割り当てられないことになる。対照的に、 1643 cm^{-1} 未満のバイオマーカー値は重度のDATを示す。タウアミドIの最大値のみがマーカーバンド未満である場合、他のタイプの認知症が同定されることになる。

【図6】A (CSF/血漿)およびタウ(CSF)の二次構造分布を表すアミドIの最大値の決定を、61人のDC患者と39人のDAT患者との鑑別のために使用した図である。これによって、多数決(黒色=最大値 $<1643\text{ cm}^{-1}$ および灰色=最大値 1643 cm^{-1})がDCおよびDATを示した。したがって、DC群については3件のみの偽陽性が、DAT群については4件が観察された。これは、ジェロントサイキアトリストおよび神経科医による臨床評価と比較して、複合データ解析については、95%の特異性、90%の感度、したがって全体で93%の診断精度という結果である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

免疫赤外線センサーおよびその製造は、出願人の先の特許出願国際公開第2015/121339号パンフレットに記載されており、これは体液中のAとタウの両方の二次構造分布の検出に現在適用されている。IRセンサーの製造は、最適化され、単純化されたプロトコルを用いたシラン化学またはチオール化学により赤外線透過材料の表面上に、それぞれA用またはタウ用の受容体、すなわち抗体を直接にかつ密接に固定化することを
 含む。液体(例えば血清、血漿またはCSF)を解析するために、これをフローシステム中のセンサーに供給する。高分子物質は、機能化センサーの表面上で抗体によって固定化される。光学センサー素子は、赤外線解析に特に適しており、場合によってはさらに、異なる波長での蛍光の検出を含めて別の光学的方法による並行または代替の解析に適している。

【0012】

本発明によれば、第1のおよび第2のIRセルの赤外線透過材料は、シリコン、ゲルマニウム、セレン化亜鉛、セレン化ガリウム、およびダイヤモンドから独立して選択され、好ましくはゲルマニウムである。

【0013】

本発明の好ましい実施形態では、光学センサー素子は台形または平行四辺形の形状、ファイバーまたは桿状の形状を有するゲルマニウム結晶を含む内部反射素子を有する。ゲルマニウム結晶はゲルマニウム単結晶であることが好ましいが、台形に切断されたゲルマニウム単結晶が特に好ましい。

【0014】

ゲルマニウム結晶は、反射素子を通して赤外光の1回、1回を超える、または3回を超える反射を可能とするまたは提供するのがさらに好ましく、5回を超える反射またはさらに20回を超える反射が特に好ましい(アクティブに検知された13回の反射を伴う25回の反射が好ましい)。かかる多重反射において候補バイオマーカータンパク質との接触を可能にするために、バイオマーカータンパク質用の受容体は、前記内部ゲルマニウム反射素子の適正な数の表面にグラフトされている。

【0015】

受容体をカップリングするのに、したがって、高分子を内部ゲルマニウム反射素子にカップリングするのに利用されるシランリンカーおよびチオールリンカーは、均一なシランリンカーおよびチオールリンカー、シランリンカーの混合物およびチオールリンカーの混合物を含む。受容体/高分子短鎖リンカーの緊密で密接な結合を可能にするために、好ましくは、原子が20個以下または原子が15個以下の有効リンカー鎖長(炭素原子およびヘテロ原子を含めて)を有するリンカーが利用される。

【0016】

10

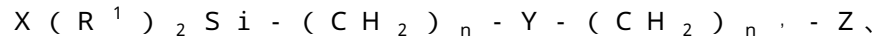
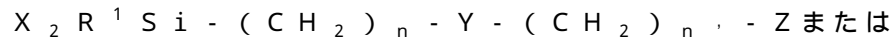
20

30

40

50

シランリンカーを含むかかる短鎖リンカーは、以下の式のうちの1つを有する：



およびチオールリンカーは以下の式を有する：



[式中、Wは、 $R^1 S$ -またはHであり、Xは、出現する毎にハロゲンおよび C_{1-6} アルコキシから独立して選択され、nは、1~10の整数であり、n'は、1~5の整数であり、 R^1 は、出現する毎に C_{1-6} アルキルから独立して選択され、Yは、化学結合、
-O-、-CO-、-SO₂-、-NR²-、-S-、-SS-、-NR²CO-、CO
NR²-、-NR²SO₂-および-SO₂NR²- (式中、R²はHまたは C_{1-6} アルキルである)から選択され、およびZは、-CO₂H、-SO₃Hおよびそれらのエステル誘導体を含めてアミン反応基である]。

10

20

30

40

50

【0017】

本発明内のハロゲンには、フッ素、塩素、臭素、およびヨウ素の原子が含まれる。 C_{1-6} アルキルおよび C_{1-6} アルコキシには、飽和であっても不飽和であってもよい、1~6個の炭素原子を有する直鎖状の、分枝状の、もしくは環状のアルキル基またはアルコキシ基が含まれる。環状のアルキル基およびアルコキシ基の場合、これは3~6個の炭素原子を有するものを指す。適切な C_{1-6} アルキル基および C_{1-6} アルコキシ基としては、とりわけ、メチルおよびメトキシ、エチルおよびエトキシ、n-プロピルおよびn-プロポキシ、イソ-プロピルおよびイソ-プロポキシ、シクロプロピルおよびシクロプロポキシ、n-ブチルおよびn-ブトキシ、tert-ブチルおよびtert-ブトキシ、シクロブチルおよびシクロブトキシ、n-ペンチルおよびn-ペントキシ、シクロペンチルおよびシクロペントキシ、n-ヘキシルおよびn-ヘキソキシ、シクロヘキシルおよびシクロヘキソキシ等が挙げられる。アミン反応基Zには、遊離アミノ基と反応性であるあらゆる種類の官能基が含まれる。これらの中で、-CO₂H、-SO₃H、およびそれらのエステル誘導体(活性なエステルを含めて)が特に好ましい。

【0018】

上記式中の $-(CH_2)_n-$ および $-(CH_2)_{n'}-$ の構造的要素は、1つもしくは複数の二重結合および/または三重結合も含有することができ、かつ1つまたは複数のフッ素などのハロゲン原子または重水素で置換されていてもよい。

【0019】

本発明の好ましい一実施形態では、光学センサー素子はシラン化により取得可能であり、式(i)~(iii)のリンカーにおいて、Xは C_{1-6} アルコキシ基から、好ましくはメトキシ基およびエトキシ基から独立して選択され、Yは-NHCO-であり、Zは-CO₂Hまたはそのエステル誘導体であり、ならびにnは1~5の整数でありおよびn'は1~3の整数であり、好ましくは、nは3でありおよびn'は2である。

【0020】

別の実施形態では、光学センサー素子はチオール化により取得可能であり、式(iv)のリンカーにおいて、WはHであり、Yは化学結合であり、Zは-CO₂Hまたはそのエステル誘導体であり、ならびにnは1~8の整数でありおよびn'は1~5の整数であり、好ましくは、nは8でありおよびn'は4である。特に好ましいのは12-メルカプトドデカン酸NHSEステルである。

【0021】

光学センサー素子の別の好ましい実施形態では、A ペプチド用およびタウタンパク質用の受容体は特異的抗体である。A ペプチドの場合、抗体は、抗体A8978 (Sigma Aldrich)などの、A ペプチドのセントラルエピトープに特異的に結合する抗体であり、タウタンパク質の場合、抗体は、抗体タウ-5 (AHB0042, Thermo Fisher Scientific)などの全てのタウ変異体(リン酸化および切断型変異体、3~4反復領域を有する変異体、またはアイソフォームを含めて)に存

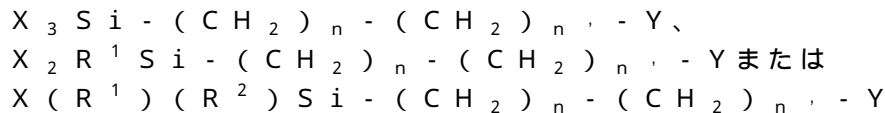
在するエピトープに特異的に結合する抗体である。

【0022】

候補バイオマーカータンパク質と交差反応しないブロッキング物質には、カゼイン、エタノールアミン、L-リジン、ポリエチレングリコール、アルブミン、およびそれらの誘導体が含まれ、好ましくはカゼインである。

【0023】

センサー素子を調製する方法では、酸化を、 H_2O_2 / シュウ酸での処理によって実施する。さらに、方法では、短いシランリンカーを用いたシラン化は、以下の式を有するシラン誘導体を用いて実施するのが好ましい：



[式中、変数は上に記載の通りである]。

Yの記載では CO_2H または SO_3H の部分のエステル誘導体を使用することが特に好ましく、これは単純な $C_1 \sim 6$ アルキルエステルであってもよいが、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルなどの活性化エステル、またはその他の任意の活性化エステル誘導体であってもよい。方法ではまた、受容体は抗体であることが好ましい。ブロッキング物質はカゼインであることがさらに好ましい。

【0024】

センサー素子を調製する方法では、表面活性化を、HF(49%)での処理によって実施する。さらに、方法では、短いチオールリンカーを用いたチオール化は、以下の式を有するチオールリンカーを用いて実施するのが好ましい：



[式中、変数は上に記載の通りである]。

Yの記載では CO_2H または SO_3H の部分のエステル誘導体を使用することが特に好ましく、これは単純な $C_1 \sim 6$ アルキルエステルであってもよいが、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルなどの活性化エステル、またはその他の任意の活性化エステル誘導体であってもよい。方法ではまた、受容体は抗体であることが好ましい。ブロッキング物質はカゼインであることがさらに好ましい。

【0025】

センサー素子を調製する方法では、光学センサー素子は室温中で形成される。IRスペクトルに基づいて、あらゆる単一ステップを評価することができる。このバリデーションステップは、被検化合物の特異的検出および正確な二次構造決定に必須である。

【0026】

本発明の態様(4)のデバイスは、適切なIRセル(チャンバ)内に組み込まれているセンサー素子を有する。これは、光(IR)発光素子、光(IR)検出素子およびデータ処理ユニットをさらに含んでもよい。さらなる光学的方法による並行検出のために、デバイスは、異なる波長で、UV/Vis蛍光用の光源および検出器素子などのかかるさらなる光学的方法のための光源および検出器素子をさらに含んでもよい。

【0027】

本発明の態様(1)の方法は、

(a) 赤外線透過材料のコアを備える内部反射素子と、

前記コアの少なくとも1つの表面に直接グラフトされている、Aペプチド用の少なくとも1つの受容体とを有する第1の赤外線センサー素子を含む第1のIRセル内で、可溶性のAペプチドを有する体液の少なくとも1回のフラックスを行って、前記第1のIRセルを通してIRビームを送って、ならびにそれから赤外線スペクトルを得る、ステップと；

(b) 赤外線透過材料のコアを備える内部反射素子と、

前記コアの少なくとも1つの表面に直接グラフトされている、タウタンパク質用の少なくとも1つの受容体と

10

20

30

40

50

を有する第2の赤外線センサー素子を含む第2のIRセル内で、可溶性のタウタンパク質を有する体液の少なくとも1回のフラックスを行って、前記第2のIRセルを通してIRビームを送って、ならびにそれから赤外線スペクトルを得る、ステップと；

(c) 得られた赤外線スペクトルを解析して、鑑別診断により体液中の可溶性のAβペプチドのおよび可溶性のタウタンパク質の二次構造分布を決定する、ステップとを含む。

【0028】

本発明の方法では、ステップ(a)および(b)において適用する体液は、血清、血漿およびCSFを含めてバイオマーカーを含む任意の複合的な体液であってもよい。さらなる適切な体液は涙液および乳頭吸引液である。

【0029】

好ましい一実施形態では、方法は、ステップ(a)および(b)の前に、IRセル内に前記光学センサー素子を取り付けるステップをさらに含む。追加的に/代替的に、方法は、ステップ(a')および(b')：受容体に対する遊離のリガンド溶液を適用することによって光学素子の表面の再生を行うステップをさらに含んでもよい。

【0030】

ステップ(a)および(b)で得られたスペクトルは、アミドIバンドを識別するのに十分な信号対雑音比を有する。これにより、ステップ(c)におけるバイオマーカータンパク質のアミドIバンド最大値のシフトの解析によって、候補バイオマーカータンパク質の二次構造を決定し、鑑別診断を実施することが可能になる。

【0031】

さらなる一実施形態では、方法のステップ(c)は、得られた赤外線スペクトルを、既知の二次構造および/または既知の濃度を有する可溶性のAβペプチドのおよび/または可溶性のタウのスペクトルと比較するステップをさらに含む。

【0032】

別の実施形態では、方法は、赤外線解析の代わりにまたはそれと並行して、異なる波長で、UV/Vis蛍光含めて、別の光学的方法による検出を含んでもよい。特に、方法は、免疫-ATR-FTIR振動分光法を並行の蛍光分光法と組み合わせるのが好ましい。

【0033】

態様(1)の方法は、前処理なしで(すなわち、個別の先行する濃縮または精製ステップなしで)、体液中の可溶性のAβペプチドおよび可溶性のタウを決定すること、特に、脳脊髄液、血液または血清を含めて、哺乳動物(ヒト、動物)起源の体液中でこれらを直接決定することを可能にし/これらの決定にとって適切である。方法は、個別の(インビトロでの)またはオンラインの(患者で体液を直接決定する)方法での候補バイオマーカータンパク質の決定に適している。両方の場合において、方法は、鑑別診断およびアルツハイマー病の病期の評価をさらに含み得る。

【0034】

態様(1)の方法は、候補バイオマーカータンパク質としてアミロイド-βおよびタウを有するアルツハイマー病の進行の決定に特に適しており、ここで、 1647 cm^{-1} から 1640 cm^{-1} までのAβペプチドのアミドIバンドの最大値のシフトによって、好ましくは、閾値 $1643\text{ cm}^{-1} + / - 5\text{ cm}^{-1}$ を伴って、(または $1643\text{ cm}^{-1} + / - 3\text{ cm}^{-1}$ 、または $1643\text{ cm}^{-1} + / - 1\text{ cm}^{-1}$ 、または約 1643 cm^{-1})、および 1647 cm^{-1} から 1640 cm^{-1} までのタウタンパク質のアミドIバンドの最大値のシフトによって、好ましくは、閾値 $1643\text{ cm}^{-1} + / - 5\text{ cm}^{-1}$ を伴って、(または $1643\text{ cm}^{-1} + / - 3\text{ cm}^{-1}$ 、または $1643\text{ cm}^{-1} + / - 1\text{ cm}^{-1}$ 、または約 1643 cm^{-1})、アルツハイマー病が示される。方法はまた、候補バイオマーカータンパク質としてアミロイド-βおよびタウを有するアルツハイマー病の進行の決定に特に適している。本明細書では、鑑別診断は、認知症タイプの確実な臨床プロファイルを提供し、好ましくは方法は、CSF由来のAβ(A)、血漿由来のAβ(B)、およびCSF由来のタウ(C)の二次構造分布の検出を含む。具体的には

10

20

30

40

50

、本発明の方法は、認知症アルツハイマー型（DAT）と疾患対照（Disease Control）との鑑別診断を可能にし、DAT患者は、初期、中度、および重度のDATに亜分類され、DC患者は健康対照、その他の疾患、およびアルツハイマー病とは別の起源に起因する認知症に分けられる。特に、両方のバイオマーカー、A_β に対しては（A）/（B）およびタウに対しては（C）について弁別閾値（ $1643 \text{ cm}^{-1} \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ ）によってアルツハイマー病とDC患者とが分けられる；および/または（A）、（B）、および（C）の組合せによって、確実なDAT診断に適用可能なバイオマーカーパネルが提供される。

【0035】

両方のバイオマーカーに対して、Nabers et al., Anal. Chem. Doi: 10.1021/acs.analchem.5b04286 (2016)および国際公開第2015/121339号パンフレットに記載のそれと同様の、単純な閾値分類指標が確立されている。これによって、疾患対照（DC）と認知症アルツハイマー型（DAT）との鑑別のための弁別スペクトルマーカーバンドを使用して、両方の診断群をCSF A_β 解析に基づいて90%の診断精度で分けることができた。血漿A_β 解析単独から観察された予測精度はより低かった（84%）。さらに、タウタンパク質の二次構造分布のみに基づく両方の群の分離は、68%の精度で依然として不十分なままであった。しかし、CSFおよび血漿由来のA_β の決定されたアミドIの周波数をタウのものと同様にマーカーパネルへと組み合わせると、単純多数決分類指標によって有意により高い予測値が実証された。ここで、93%の精度と95%の特異性を達成することができた。偽陽性の診断は関係当事者に深刻な心理的結果を有する可能性があるため、特異性が高いことは、特にADなどの難病にとって極めて重要である。しかし、複合データ解析によって第2の大きな利点を実証された。A_β とタウとのデータを組み合わせることで、病期についてより多くの情報と他のタイプの認知症に対する指標とを提供することができる。鑑別診断の原理は単純である。第1のステップでは、CSF由来のA_β の抽出可溶性の画分のアミドIの最大値を、Nabers et al., in Anal. Chem Doi: 10.1021/acs.analchem.5b04286 (2016)および国際公開第2015/121339号パンフレットに記載の通りに決定した。これによって、 1643 cm^{-1} 以上の最大値によってDCが示され、この周波数未満の最大値によってDATが示された。第2のステップでは、同じ手順を血漿試料に適用した。この場合も、各試料についてA_β のアミドIの最大値を決定した。ここで、両方の値が一貫してマーカーの周波数超または未満であった場合、DCとDATとの間の鑑別は高い精度でなし得た。しかし、首尾一貫しないA_β 結果（CSFおよび血漿）については、タウタンパク質の二次構造分布を決定支援として使用することができた。一方、タウタンパク質の二次構造分布によってまた、DC群とDAT群とをアルツハイマーより別の起源に起因する認知症へと、または疾患の初期、中度もしくは重度の段階へと亜分類する可能性が実証された。それとともに、パーキンソン病患者または血管性認知症患者を、DC群内で同定することができた（A_β CSF 1643 cm^{-1} ; A_β 血漿 1643 cm^{-1} ; タウ CSF $< 1643 \text{ cm}^{-1}$ ）。一方、DAT群を、疾患の、初期（f.e. A_β CSF $< 1643 \text{ cm}^{-1}$; A_β 血漿 $< 1643 \text{ cm}^{-1}$; タウ CSF 1643 cm^{-1} ）、中度（A_β CSF $< 1643 \text{ cm}^{-1}$; A_β 血漿 1643 cm^{-1} ; タウ CSF $< 1643 \text{ cm}^{-1}$ ）または（A_β CSF 1643 cm^{-1} ; A_β 血漿 $< 1643 \text{ cm}^{-1}$; タウ CSF $< 1643 \text{ cm}^{-1}$ ）、および重度（A_β CSF $< 1643 \text{ cm}^{-1}$; A_β 血漿 $< 1643 \text{ cm}^{-1}$; タウ CSF $< 1643 \text{ cm}^{-1}$ ）の段階へと鑑別することができた。

【0036】

本発明を以下の実施例においてさらに説明するが、それらは本発明を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0037】

材料および方法：国際公開第2015/121339号パンフレットと同じ実験設定を使用した。

10

20

30

40

50

【0038】

サンプリングおよび前処理：CSFは腰椎穿刺により取り出し、Essen大学病院で一定量分取し、液体窒素内で急速凍結し、-80で輸送および保管した。試料は、測定前に前処理せず、37で30秒間解凍のみを行い、使用するまで氷上で保持した。

【0039】

患者集団：疾患対照(DC)患者および認知症アルツハイマー型(DAT)患者の試料入手および診断の詳細は先に詳細に記載されている(Nabers et al., Anal. Chem. Doi: 10.1021/acs.analchem.5b04286 (2016))。前の研究では、141人の患者試料を免疫赤外線センサーを使用して解析した。この集団のうち、100人の患者を本研究のために無作為に選択した。CSFおよび血漿から抽出されたAの赤外線アミドIデータは、(Nabers et al., Anal. Chem. Doi: 10.1021/acs.analchem.5b04286 (2016))から採用した。

10

【0040】

溶液および試薬：

リン酸緩衝生理食塩水(PBSバッファー)：137mM塩化ナトリウム(NaCl)、2.7mM塩化カリウム(KCl)、12mM総ホスフェート(Na_2HPO_4 および NaH_2PO_4 の形態で)、pH7.4。

【0041】

カゼインブロッキング溶液：200mM水酸化ナトリウム(NaOH)、牛乳(粉末)由来の1%(w/v)カゼイン、pHを H_3PO_4 で7.4に調整。

20

【0042】

シラン化溶液：使用するNHS-シラン(N-(4,4,4-トリエトキシシランブチル)スクシンアミド酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル)を合成し、記載の通りに確認した(Schartner et al., JACS 135(10):4079-4087 (2013))。

【0043】

抗体：それぞれの体液からAを抽出するために、抗体A8978(ロット番号：061M4773、Sigma Aldrich)を用いた。タウタンパク質検出の場合、抗体タウ-5(AHB0042、Thermo Fisher Scientific)を使用した。

【0044】

測定の実施：一般的な手順は、国際公開第2015/121339号パンフレットに記載のものと同じである。IR測定を、液体窒素で冷却したテルル化カドミウム水銀(MCT)検出器を備えたVertex 70V分光光度計(Bruker Optics GmbH、Ettlingen、ドイツ)で実施した。両面インターフェログラムを、インターフェロメーターの前後方向の動きの中で、データレート80kHzにて、スペクトル解像度 2cm^{-1} 、ブラックマン-ハリス-3項-アポディゼーション、メルツ相補正、および4回ゼロ充填で記録した。参照スペクトルを、1000回のインターフェログラムの平均値として、試料スペクトルを、200回のインターフェログラムの平均値として記録した。ブランクセンサーの参照単一チャンネルスペクトル、2-プロパノールを含むセンサー、シラン化表面、バッファー、平衡状態の抗体コーティング表面またはカゼインコーティング表面を記録することにより、ランベルト-ベールの法則($E = -\log(I/I_0)$)に基づく、高感度差分分光法が可能となった。状態変化の吸光度は、変化前後における強度関係の10を底とする負の対数である。

30

40

【0045】

ワークフロー：CSF中のタウタンパク質のFTIR分光解析のためのセンサー調製の詳細については先に公開した(国際公開第2015/121339号パンフレット; Nabers et al., Anal. Chem. Doi:10.1021/acs.analchem.5b04286 (2016); Nabers et al., Journal of Biophotonics 9(3):224-34 doi:10.1002/jbio.201400145 (2016))。手短に言えば、全てのコネクションチューブを含めてフローセルの総容量は400 μl となった。各解析について、試料あたり1つのセンサー素子をシラン(Schartner et al., JACS 135

50

(10):4079-87 doi:10.1021/ja400253p (2013)) および抗体で新たに機能化した。解析前に、表面をカゼインブロッキング溶液で飽和させた。CSFおよび血漿中のA β 検出のために、モノクローナル抗体A8978 (Sigma Aldrich, aa13~28) を使用した。タウ捕捉をモノクローナルタウ-5抗体 (Life Technology, aa210~230) によって可能とした。解析のために、CSF 50 μ l または EDTA 血漿 150 μ l をそれぞれ 1 ml / 分の流速で循環バッファーに添加した。

【0046】

スペクトルの前処理：水蒸気を、参照スペクトルのスケールドサブトラクションにより除去した。スペクトルをベースライン補正した。

【0047】

[実施例1]：正確なDCとDATとの鑑別のためのA β およびタウタンパク質の二次構造分布。

実施した研究には、61人のDC患者および39人のDAT患者由来の300試料が含まれた。患者の鑑別診断についての詳細は先に記載した (Nabers et al., Anal. Chem. Doi: 10.1021/acs.analchem.5b04286 (2016))。全体として、患者集団をDC対象とDAT対象とに分けた。DAT群をアルツハイマー病の初期、中度および重度の状態へとさらに亜分類した。少数のDC患者については、パーキンソン病または血管性認知症などのアルツハイマー病起源に起因しない認知症に罹患している患者を含めて、完全な鑑別診断が可能であった。CSFおよび/または血漿中のA β およびタウの二次構造分布の分析のために、両方のバイオマーカーを、Nabersら (Nabers et al., Anal. Chem. Doi: 10.1021/acs.analchem.5b04286 (2016)) によって記載の免疫赤外線センサーによってそれぞれの体液から抽出した。したがって、A β およびタウを、それぞれ、表面固定化モノクローナル抗体A8978 (A β のaa13~28) およびタウ-5 (aa210~230) によって、CSFまたは血漿から個別に捕捉した。A β およびタウの記録されたアミドIの最大値の周波数によって二次構造分布が示された。先の研究では、DCとDATとの鑑別用に1643 cm^{-1} の弁別マーカーの周波数を使用して、単純な閾値分類指標を確立した。同じマーカーバンドを今回の研究内で使用した。第1に、CSF由来のA β のアミドIの最大値を各患者の試料に対して決定した。これによって、1643 cm^{-1} 未満の最大値の位置によってDATが示された。次に、血中EDTA血漿由来のA β のアミドIの最大値を同定した。最終的に、本発明者らはCSF中の抽出タウタンパク質画分の最大値を検出した。弁別マーカーバンドを、両方のバイオマーカーおよび両方の体液に対して、DATを示す<1643 cm^{-1} で同じように定義した。DC群およびDAT群のアミドIの最大値分布は、CSF (Kruskal-Wallis ANOVA; $p = 2.5 \times 10^{-11}$; 信頼水準 = 0.05) および血漿 ($p = 3.4 \times 10^{-9}$) 由来のA β については高度に有意な差を示し、そしてCSF由来のタウ ($p = 1.6 \times 10^{-3}$) については有意に異なった (図2)。したがって、A β と比較して、タウアミドIの最大値のより小さなシフトが、DAT対象に対して観察された。タウの平均アミドIの最大値は、DCに対して1645 cm^{-1} そしてDAT対象に対して1641 cm^{-1} であるCSF由来のA β と比較して、DCに対して1644 cm^{-1} そしてDAT群に対して1642 cm^{-1} 、であった。血漿由来のA β は、DCに対して1648 cm^{-1} そしてDAT群に対して1641 cm^{-1} の平均最大値を明らかにした。これらの分布に基づき、また透明なブラックボックスがDATを示している、図3の3D散布図にも示されているが、それ自体で各バイオマーカーの診断性能を、精度、感度、および特異性を与えることによって計算した。加えて、受信者動作特性 (ROC) 曲線解析を、1630.5 cm^{-1} ~ 1660.5 cm^{-1} の間の閾値を走査しかつ各波数での感度および特異性を決定することによって実施した。Nabersらの結果と同様に、A β に基づく解析の診断精度は、85%である血漿中のA β 二次構造分布の解析と比較して (図4B、D; 特異性90%、感度77%、0.85)、CSFに対して90%で最高であった (図4A、D; 特異性89%、感度92%、AUC = 0.90)。対照的に、CSFにおけるタウタンパク質の二次構造分布に基づくDCとDATとの鑑別は68%の診断精度を明らかにしたにすぎな

10

20

30

40

50

く(図4C、D; 特異性67%、感度69%、AUC 0.67)、これはタウ単独ではDAT検出のための適切なバイオマーカーではないことを示している。しかし、3つのバイオマーカー値全てを多数決分類指標に加えることによって、したがって提示されたバイオマーカーパネルベースの診断決定をなすことによって(閾値未満の2つの最大値=病気である、閾値超の2つの最大値=非DAT)、診断性能を、臨床診断と比較して、95%の特異性、90%の感度へと、したがって全体で93%の精度へと高めることが可能であった。それとともに、61件のDCのうち3件のみの偽陽性および31件のDATのうち4件の偽陰性が同定された。

【0048】

[実施例2]: DCとDATとの鑑別診断のための複合アッセイ。

10

複合データ解析によってまた、両方の診断群を亜分類する可能性も提供された。これを図5に概略的に示す。例えば、CSFおよび血漿由来のA β は、 1643 cm^{-1} 以上のアミドIの最大値を実証するが、タウアミドIの最大値は 1643 cm^{-1} 未満であり、この場合、別のタイプの認知症が複合免疫赤外線アッセイによって潜在的に示されている可能性がある(図5)。対照的に、CSFおよび血漿由来のA β のアミドIの最大値がマーカーバンド未満であるがタウ最大値が超である場合、DATの初期状態が表示されるであろう。本発明者らの研究内で、両方の診断群にこの手順を適用した。CSF由来のA β のアミドIの最大値は、全DC症例の69%において、CSF由来のタウよりも高い最大値を実証した。この効果は、A β と比較してタウタンパク質のより高い不規則な特性によって説明することが可能である。一方、全DC症例の25%において、A β に対して最大値がより低く、全症例の6%のみにおいて最大値が同じであった。この関係はDAT群では完全に変わった。そこでは、全てのDAT患者のうち31%のみが、A β に対して、タウに対するよりも大きいアミドIの最大値をもたらし、62%がより低いA β 最大値を示した(図6)。これが支持するところは、A β 蓄積がアルツハイマー病の進行における初期および起因事象であり、かつこれはタウタンパク質凝集を伴うという仮説である。

20

【 図 1 】

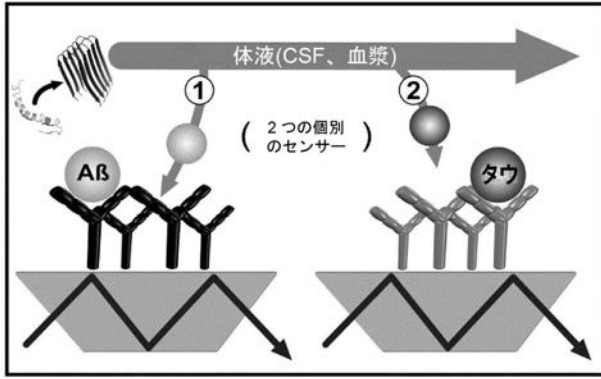


図 1

【 図 2 】

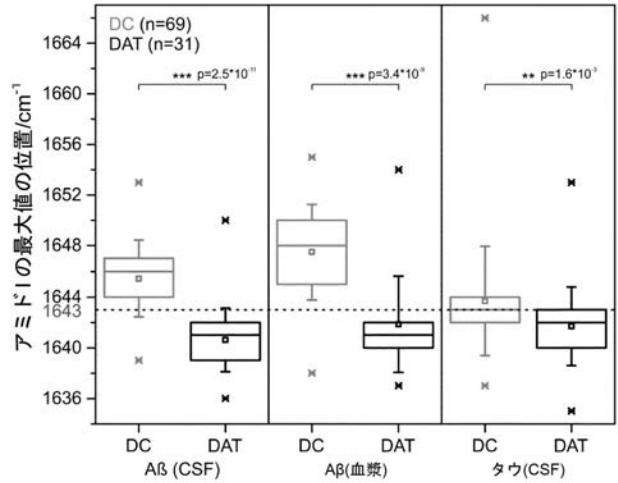


図 2

【 図 3 】

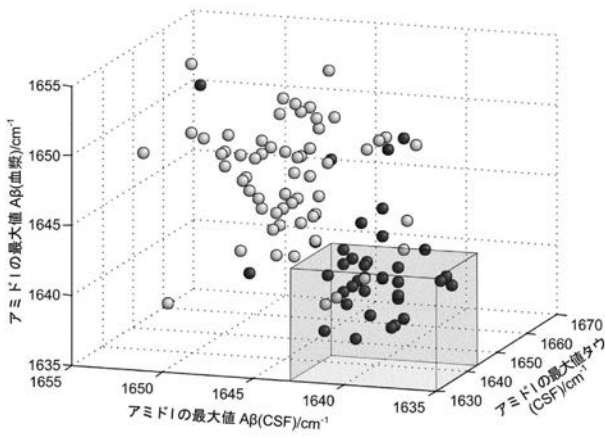


図 3

【 図 4 】

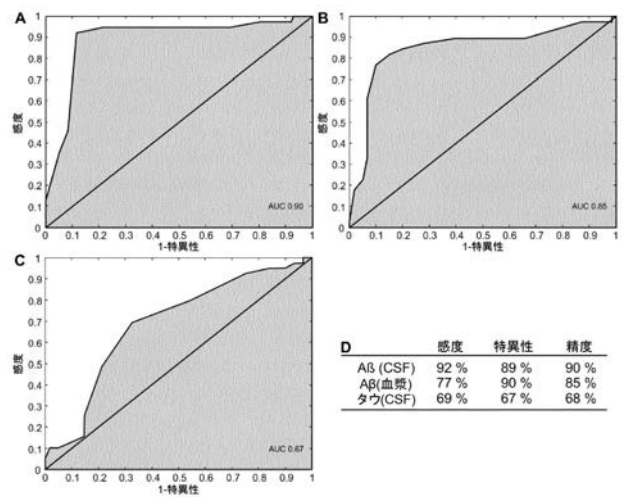


図 4

【 図 5 】

鑑別診断

Aβ (CSF)	Aβ (血漿)	タウ (CSF)	
			非認知症
			他の認知症
			潜在性 DAT
			潜在性 DAT
			初期の DAT
			初期/中度の DAT
			中度の DAT
			重度の DAT

$\geq 1643 \text{ cm}^{-1}$
$< 1643 \text{ cm}^{-1}$

図 5

【 図 6 】

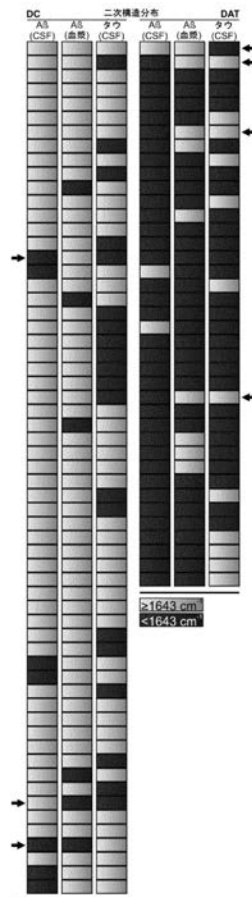


図 6

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/079949

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/121339 A1 (RUHR UNIVERSITÄT BOCHUM [DE]; UNIVERSITÄT DUISBURG ESSEN [DE]) 20 August 2015 (2015-08-20) cited in the application the whole document, in particular page 17, lines 6-9; page 18, lines 10-18; claims 1-7, 14-19; figures 5-7,9,10-12; examples 1-4, 8 ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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		Date of mailing of the international search report
15 January 2018		24/01/2018
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 Weber, Peter

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/079949

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ANDREAS NABERS ET AL: "Amyloid-[beta]-Secondary Structure Distribution in Cerebrospinal Fluid and Blood Measured by an Immuno-Infrared-Sensor: A Biomarker Candidate for Alzheimer's Disease", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 88, no. 5, 1 March 2016 (2016-03-01), pages 2755-2762, XP055352690, US ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04286 cited in the application the whole document, in particular abstract; page 2757, paragraph "Workflow"; page 2758, first paragraph to page 2760, first paragraph; figures 1-3 -& Andreas Nabers ET AL: "Amyloid-beta-Secondary Structure Distribution in Cerebrospinal Fluid and Blood Measured by an Immuno-IR-Sensor: A Biomarker Candidate for Alzheimer's Disease - SUPPLEMENT", Analytical Chemistry, 1 March 2016 (2016-03-01), pages S-1, XP055352696, Retrieved from the Internet: URL:http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/ acs.analchem.5b04286/suppl_file/ac5b04286_ si_001.pdf [retrieved on 2017-03-08] the whole document</p>	1-15
A	<p>ANDREAS NABERS ET AL: "An infrared sensor analysing label-free the secondary structure of the Abeta peptide in presence of complex fluids", JOURNAL OF BIOPHOTONICS, vol. 9, no. 3, 24 March 2015 (2015-03-24), pages 224-234, XP055352691, DE ISSN: 1864-063X, DOI: 10.1002/jbio.201400145 the whole document</p>	1-15
A	<p>EP 2 700 933 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION [ES]; FUNDACION INVESTIGACION BIOMEDICA) 26 February 2014 (2014-02-26) the whole document</p>	1-15

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/079949

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015121339 A1	20-08-2015	CA 2973508 A1	20-08-2015
		EP 3105589 A1	21-12-2016
		JP 2017509900 A	06-04-2017
		US 2017010212 A1	12-01-2017
		WO 2015121339 A1	20-08-2015

EP 2700933 A1	26-02-2014	AU 2013305058 A1	09-04-2015
		CA 2882673 A1	27-02-2014
		CN 104813159 A	29-07-2015
		EP 2700933 A1	26-02-2014
		EP 2885625 A1	24-06-2015
		HK 1212433 A1	10-06-2016
		JP 2015531069 A	29-10-2015
		RU 2015109714 A	10-10-2016
		US 2015211988 A1	30-07-2015
		WO 2014029767 A1	27-02-2014

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M	1/34	F
			C 1 2 M	1/34	B

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

(72) 発明者 ナバース, アンドレアス
 ドイツ連邦共和国 ボーフム 4 4 8 0 5, ベルゲネール シュトラッセ 2 4 3

(72) 発明者 シャルトナー, ジョナス
 ドイツ連邦共和国 ヘルネ 4 4 6 2 7, ランドウエルウェグ 4 4
 Fターム(参考) 2G059 AA06 BB13 CC16 DD03 EE02 EE07 EE12 HH01 HH06 JJ12
 KK01
 4B029 AA07 AA27 BB15 BB17 CC02 FA12
 4H045 AA11 AA30 AA40 CA40 DA50 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	组合测定法可用于阿尔茨海默氏病的鉴别诊断		
公开(公告)号	JP2019537727A	公开(公告)日	2019-12-26
申请号	JP2019527201	申请日	2017-11-21
[标]发明人	ゲルワートクラウド ナバースアンドレアス シャルトナー・ジヨナス		
发明人	ゲルワート,クラウド ナバース,アンドレアス シャルトナー,ジヨナス		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N21/3577 G01N21/552 C07K16/18 C12M1/34		
CPC分类号	G01N21/552 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2821 G01N2800/56		
FI分类号	G01N33/543.565E G01N33/53.D G01N21/3577 G01N21/552 C07K16/18 C12M1/34.F C12M1/34.B		
F-TERM分类号	2G059/AA06 2G059/BB13 2G059/CC16 2G059/DD03 2G059/EE02 2G059/EE07 2G059/EE12 2G059/HH01 2G059/HH06 2G059/JJ12 2G059/KK01 4B029/AA07 4B029/AA27 4B029/BB15 4B029/BB17 4B029/CC02 4B029/FA12 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/AA40 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 浩 鈴木康仁		
优先权	2016199805 2016-11-21 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了组合的免疫红外测定法，用于将阿尔茨海默氏病鉴别诊断和亚分类为不同的疾病阶段。该方法可用于确定的疾病诊断和患者分层。该测定法考虑了体液中淀粉样蛋白-β肽内变化和Tau蛋白二级结构分布的无标记检测。这种从天然富集到β-片富集的亚型的二级结构变化出现在临床疾病表现出现之前的几年。现在，结合的方法利用这种转变进行基于液体活检的诊断。

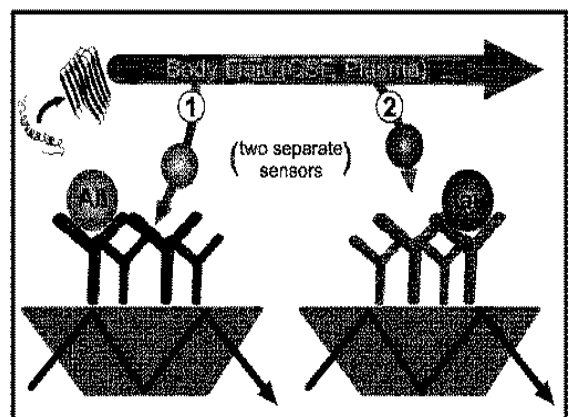


Fig. 1