

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6590837号
(P6590837)

(45) 発行日 令和1年10月16日(2019.10.16)

(24) 登録日 令和1年9月27日(2019.9.27)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 E
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/553
GO 1 N 21/35 (2014.01)	GO 1 N 21/35
GO 1 N 21/552 (2014.01)	GO 1 N 21/552

請求項の数 22 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-569009 (P2016-569009)	(73) 特許権者	516243652
(86) (22) 出願日	平成27年2月12日(2015.2.12)		ルールーユニベルシタット ポーフム
(65) 公表番号	特表2017-509900 (P2017-509900A)		ドイツ連邦共和国 ポーフム 4 4 8 0 1
(43) 公表日	平成29年4月6日(2017.4.6)		, ユニベルシタットシュトラーセ 1 5 0
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/052945	(73) 特許権者	516243663
(87) 国際公開番号	W02015/121339		ユニベルシタット デュースブルグーエッ
(87) 国際公開日	平成27年8月20日(2015.8.20)		セン
審査請求日	平成29年12月21日(2017.12.21)		ドイツ連邦共和国 4 5 1 4 1 エッセン
(31) 優先権主張番号	14155138.2		, ユニベルシタットシュトラーセ 2
(32) 優先日	平成26年2月14日(2014.2.14)	(74) 代理人	100092783
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小林 浩
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100187964
			弁理士 新井 剛

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 立体構造および二次構造解析のためのバイオセンサー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

疾患の進行に関連する立体構造の変換を経ている候補バイオマーカータンパク質の量および二次構造の直接解析のための赤外線センサー素子であって、

台形または平行四辺形の形状であり、赤外線内で透明であり、アミド I バンドを検出するのに十分なシグナル対ノイズ比を有するゲルマニウム内反射体と、

前記バイオマーカータンパク質に対応する少なくとも 1 つの受容体であって、前記候補バイオマーカータンパク質への特異的且つ立体構造的に独立した結合が可能な抗体であり、並びに、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、及び前記短いシラン/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でブロックする、短いシランリンカーを用いたシラン化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、前記ゲルマニウム内反射体の少なくとも 1 つの表面と直接グラフト結合する前記受容体とを含む前記赤外線センサー素子。

【請求項 2】

異なる波長での蛍光の検出を含む別の光学的方法による並行解析にさらに適する、請求項 1 に記載の赤外線センサー素子。

【請求項 3】

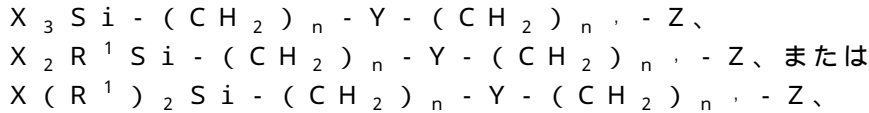
前記内反射体が、

(i) ゲルマニウム単結晶であり、および/または
 (i i) 前記内反射体を通じて、2つ以上の赤外光の通過を可能にする、請求項1または2に記載の赤外線センサー素子。

【請求項4】

前記シランリンカーおよびチオールリンカーが、均質なシランおよびチオールリンカー、シランリンカーの混合物、ならびにチオールリンカーの混合物を含み、かつ、原子20個以下または原子15個以下の鎖長を有し、

前記シランリンカーが、以下の式：



のうちの1つを有し、

前記チオールリンカーが、以下の式：



を有し、

式中、出現毎にXは、ハロゲンおよびC₁₋₆アルコキシより独立して選択され、nは1~10の整数であり、n'は1~5の整数であり；出現毎にR¹は、C₁₋₆アルキルより独立して選択され、Yは、化学結合、-O-、-CO-、-SO₂-、-NR²-、-S-、-SS-、-NR²CO-、-CONR²-、-NR²SO₂-、および-SO₂NR²-より選択され（R²はHまたはC₁₋₆アルキル）、Zは、-CO₂H、-SO₃H、およびそのエステル誘導体を含むアミン反応基である、請求項1~3のいずれか一項に記載の赤外線センサー素子。

【請求項5】

請求項4に記載の赤外線センサー素子が、

(i) シラン化により取得可能である、ここで、前記リンカー中、XはC₁₋₆アルコキシ基より独立して選択され、Yは-NHCO-であり、Zは-CO₂Hまたはそのエステル誘導体であり、nは1~5の整数であり、n'は1~3の整数であり、または

(i i) チオール化により取得可能である、ここで、前記リンカー中、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、nは1~8の整数であり、n'は1~5の整数である、前記赤外線センサー素子。

【請求項6】

(i) 疾患の進行に関連する立体構造の変換を経ている前記候補バイオマーカータンパク質が、アミロイド - ペプチド (アルツハイマー病と関連)、 - シヌクレイン (パーキンソン病と関連) を含む、アミロイド形成ペプチドまたは健康状態依存性の、特徴的な二次構造組成を有する (ポリ) ペプチドであり、および/または

(i i) 前記候補バイオマーカータンパク質と交差反応しない前記ブロッキング物質が、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より選択される、請求項1~5のいずれか一項に記載の赤外線センサー素子。

【請求項7】

(i) 前記候補バイオマーカータンパク質が、アミロイド - ペプチドであり、前記抗体が、抗体A8978を含む、前記アミロイド - ペプチドのセントラルエピトープと特異的に結合する抗体であり、または

(i i) 前記候補バイオマーカータンパク質が、 - シヌクレインであり、前記抗体が、抗体4B12またはS5566を含む、立体構造的な特異性を有さない、 - シヌクレインペプチドと特異的に結合する抗体である、請求項1~5のいずれか一項に記載の赤外線センサー素子。

【請求項8】

請求項1~7に記載の前記赤外線センサーを含む、疾患の進行に関連する立体構造の変換を経ている候補バイオマーカータンパク質の量および二次構造を直接解析するためのデ

10

20

30

40

50

バイス。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の短いシランリンカーを用いた赤外線センサー素子の調製方法であって、

- (a) 酸化により、内反射体の少なくとも 1 つの表面を表面活性化するステップと、
 - (b) 短いシランリンカーを、ステップ (a) で得られた活性化表面にグラフト結合させるステップと、
 - (c) 前記短いシランリンカーのアミン反応基を介して、前記受容体を前記内反射体に共有結合によりカップリングさせるステップと、
 - (d) 前記短いシランリンカー上の残留するアミン反応基を、前記候補バイオマーカートンパク質と交差反応しない前記ブロッキング物質でブロックするステップと
- を含む、方法。

10

【請求項 10】

- (i) 前記酸化が、 H_2O_2 / シュウ酸により実施され、および / または
- (i i) 前記シランリンカーが、請求項 4 または 5 で定義される通りであり、そのアミン反応基にエステル誘導体を有し、および / または
- (i i i) 前記ブロッキング物質が、カゼインである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の短いチオールリンカーを用いて前記赤外線センサー素子を調製する方法であって、

- (a) HF との反応により、前記ゲルマニウム内反射体の少なくとも 1 つの表面を表面活性化するステップと、
 - (b) 短いチオールリンカーを、ステップ (a) で得られた活性化表面にグラフト結合させるステップと、
 - (c) 前記短いチオールリンカーのアミン反応基を介して、前記受容体を前記内反射体に共有結合によりカップリングさせるステップと、
 - (d) 前記短いチオールリンカー上の残留するアミン反応基を、前記ブロッキング物質でブロックするステップと
- を含む、方法。

20

【請求項 12】

- (i) 前記表面活性化が、HF (49%) により実施され、および / または
- (i i) 前記チオールリンカーが、請求項 4 または 5 で定義される通りであり、そのアミン反応基にエステル誘導体を有し、および / または
- (i i i) 前記ブロッキング物質が、カゼインである、請求項 11 に記載の方法。

30

【請求項 13】

体液を含む複合的な液体中の、疾患の進行に関連する立体構造の変換を経ている候補バイオマーカートンパク質の二次構造を測定するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の赤外線センサー素子、または請求項 8 に記載のデバイスの使用。

【請求項 14】

- (a) 請求項 1 ~ 7 に記載の前記赤外線センサー素子を含む IR セル中に、前記赤外線センサーの表面上の前記受容体に対応する潜在的な候補バイオマーカートンパク質を流動させるステップと、
 - (b) 前記セルを通じて IR ビームを照射し、そこから赤外スペクトルを取得するステップと、
 - (c) 得られた赤外スペクトルを解析して、前記候補バイオマーカートンパク質の二次構造を測定するステップと
- を含む、複合的な液体中の、疾患の進行に関連する立体構造の変換を経ている候補バイオマーカートンパク質の二次構造を測定する方法。

40

【請求項 15】

- (i) 前記方法が、ステップ (a) の前に、請求項 1 ~ 7 に記載の赤外線センサー素子

50

を、IRセル内に据付けるステップをさらに含み、および/または

(ii)前記方法が、得られた赤外スペクトルを解析して、前記候補バイオマーカータンパク質の二次構造組成に基づき、統計的手法を用いてサンプルを分類するステップ(d)をさらに含み、および/または

(iii)前記方法が、前記受容体に対応する遊離リガンドの溶液を適用することにより、赤外線素子の表面を再生するステップ(e)をさらに含み、および/または

(iv)ステップ(b)で得られた前記スペクトルが、アミドIバンドを解像するのに十分なシグナル対ノイズ比を有し、および/または

(v)ステップ(c)が、前記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を解析して、前記候補バイオマーカータンパク質の二次構造を測定するステップを含み、および/または

(vi)ステップ(c)が、前記得られた赤外スペクトルを、二次構造が公知および/もしくは濃度が公知の候補バイオマーカータンパク質のスペクトルと比較するステップを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

(i)赤外線解析と並行して、異なる波長での、UV/Vis-蛍光を含む別の光学的方法による検出をさらに含み、および/または

(ii)免疫-ATR-IR振動分光法を、並行してなされる蛍光分光法と組み合わせ、および/または

(iii)前処理せずに、脳脊髄液、血液、もしくは血清を含む体液中の候補バイオマーカータンパク質を直接測定するのに適し、および/または

(iv)前記候補バイオマーカータンパク質の別個の(in-vitroの)、またはオンラインの測定に適する、請求項14または15に記載の方法。

【請求項17】

疾患の進行を判定する方法であって、

候補バイオマーカータンパク質の立体構造の変換が疾患の進行と関連しており、前記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が、前記疾患の進行を示唆する分類指標であり、

前記進行の判定が、請求項14~16のいずれか一項に記載の方法により実施され、および/または1638~1648cm⁻¹の値を有する分類指標閾値が、前記疾患の進行を示唆する分類指標である、前記方法。

【請求項18】

候補バイオマーカータンパク質としてアミロイド-βを用いて、アルツハイマー病の進行を判定する場合、アミロイド-βペプチドのアミドIバンド最大値の下方シフトが、1638~1648cm⁻¹の閾値を有する場合、アルツハイマー病の進行を示唆する、請求項14~17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

候補バイオマーカータンパク質としてα-シヌクレインを用いて、パーキンソン病の進行を判定する場合、α-シヌクレインペプチドのアミドIバンド最大値の下方シフトが、1638~1648cm⁻¹の閾値を有する場合、パーキンソン病の進行を示唆する、請求項14~17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項20】

前記ゲルマニウム単結晶が、台形に切断されたゲルマニウム単結晶である、請求項3に記載の赤外線センサー素子。

【請求項21】

前記(i)の場合、Xはメトキシ基およびエトキシ基より独立して選択され、nは3、n'は2であり、

前記(ii)の場合、nは8であり、n'は4である、請求項5に記載の赤外線センサー素子。

【請求項22】

10

20

30

40

50

前記エステル誘導体が、N - ヒドロキシ - スクシンイミジルエステルの活性なエステルである、請求項 10 または 12 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、立体構造 (conformation) および二次構造解析 (secondary structure analysis) のための、特に振動分光法により、例えば体液のような複合的な混合物内の単一の選択されたタンパク質について直接的で非侵襲的な二次構造定性解析を行うためのバイオセンサーを提供する。解析する場合、選択された物質を単離、濃縮する必要、または特別な調製手順により前処理する必要がない。

10

【背景技術】

【0002】

体液中のバイオマーカー候補を検出するための定量的な方法は、酵素結合免疫吸着測定法 (Enzyme-Linked Immune-Sorbent Assays: ELISA)、表面プラズモン共鳴分光法 (Surface Plasmon Resonance spectroscopy: SPR)、表面蛍光強度分布解析法 (surface Fluorescence Intensity Distribution Analysis: sFIDA)、または質量分析技法 (mass spectroscopy techniques) である。これらの技法は、分析物の二次構造について直接的な情報を提供しない。ELISA または SPR のような抗体に基づく方法は、特定の 1 つの立体構造の構造情報が間接的に導かれるように、立体構造感受性抗体で補完され得る (I. Morgado et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 109(31): 12503-12508 (2012); Venkataramani et al., JAD 29(2): 361-371 (2012))。このような立体構造感受性抗体を用いた場合、特定の二次構造のみが検出されることが、本発明者らの試験で実証された。したがって、分析対象化合物の特定の構造的組成に基づき、サンプルを識別するのは不可能である。検出可能な立体構造は、いずれも天然のサンプル中に存在するが、例えば疾患において、組成は変化する。以下に記載する識別では、記録されるシグナルは、認められた構造の濃度差を反映しなければならないので、構造独立型抗体を必要とする。sFIDA は、同様の固定化および検出抗体を用いることにより、候補バイオマーカーのダイマーまたはオリゴマーを検出する。しかし、sFIDA は、構造情報を検出しない (S. Funke et al., Rejuvenation Res., 13(2-3): 206-209 (2010))。フーリエ変換赤外 (FTIR) 分光法によるタンパク質の二次構造解析、および特別な減衰全反射 (ATR) センサー表面上に固定化後の組換えタンパク質または精製タンパク質の解析について頻繁に記載されている (J. Ollesch et al., Appl. Spectrosc, 61(10): 1025-1031 (2007); K. Elfrink, J. Ollesch et al., Proc Natl Acad Sci, 105(31): 10815-10819 (2008); Frost et al., J. Biol. Chem., 284(6): 3546-3551 (2009); S. Funke et al., J. Biol. Chem., 280(10): 8912-7 (2005))。RNA のような核酸の FTIR - 分光学的二次構造解析はすでに公表されている (E. Brauns and R. B. Dyer, Biophys. J., 89(5): 3523-3530 (2005))。科学および技術的知識の現状では、事前に単離しないで行われる、血清、血漿、または脳脊髄液のような複合的な液体に由来する成分の二次構造解析は、今日までに報告されていない。ATR フローセンサーを適用することにより、複合的な体液から特定の成分を選択的に検出することは、革新的な新規開発に当たる。これまで、このような技法は、単離後のタンパク質にのみ適用された。ATR センサーの内反射体 (IRE) は、屈折率が高い赤外線透過物質から一般的に構成される。このような物質として、ダイヤモンド、ゲルマニウム、シリコン、またはセレン化亜鉛が挙げられる。タンパク質は、繫留型脂質 (K. Elfrink, L. Nagel-Steger and D. Riesner, Biol. Chem., 388(1): 79-89 (2007); K. Elfrink, J. Ollesch et al., PNAS 2008; J. Guldenhaupt et al., The FEBS Journal, 275(23): 5910-5918 (2008); C. Kotting et al., Chemical Physics, 396: 72-83 (2012); P. Pinkerneil et al., Chemphyschem, 13(11): 2649-2653 (2012))、蒸着型または化学的隔離型金表面上のチオールケミストリー (Ataka et al., J. Am. Chem. Soci., 126(49): 16199-16206 (2004); A. Badura et al., Photochem. and Photobiol., 82(5): 1385-1390 (2006))、またはシラン (B. M. Smith et al.

20

30

40

50

, Langmuir, 20(4): 1184-1188 (2004); S. Devouge et al., Bioorg. & Med. Chem. Lett., 15(13): 13252-13256 (2005); P. W. Loscutoff and S. F. Bent, Ann. Rev. Physical Chemistry, 57(1):467-495 (2006); J. Matijasevic et al., Langmuir, 24(6): 2588-2596 (2008); S. Devouge et al., Journal of Colloid and Interface Science, 332(2):408-415 (2009); J. Schartner et al., J. Am. Chem. Soc., 135(10):4079-4087 (2013)) を介して、これらの表面上に固定化される。このプロセスでは、ゲルマニウム以外のその他の半導体上への抗体またはその他のタンパク質の固定化について記載されている (P. Hofer and Fringeli, Biophysics of Structure and Mechanism, 6(1): 67-80 (1979); S. Lofas and B. Johnsson, J. Chem. Soc, Chem. Comm. (21): 1526 (1990); B. Byrne et al., Sensors (Basel, Switzerland), 9(6):4407-4445 (2009); M. Punzet et al., Nanoscale, 4(7): 2431 (2012))。本発明に関連する試薬は、本発明者らにより合成された。塩基性シランが公表された (J. Schartner et al., J. Am. Chem. Soc., 135 (10) :4079-4087 (2013)) が、主要な用途、すなわち遊離リジン残基および短鎖トリエトキシシランを介した抗体の固定化について、これまで記載されていない。タンパク質を構成するリジンを介した、その他のスクシンイミジルエステル上への抗体の固定化が報告されている (Lofas and B. Johnsson, J. Chem. Soc., Chem. Comm. (21): 1526 (1990)、欧州特許第 1 2 1 4 5 9 4 号明細書、および国際公開第 2 0 0 0 0 7 0 3 4 5 号パンフレット)。しかし、解析は、I R 分光法では実施されず、したがってタンパク質の二次構造解析は実施されなかった。共有結合によるタンパク質の固定化を目的とする機能化された短鎖トリアルコキシシラン (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 (dioxopyrrolidine) - 1 - イルエステル等) の使用が報告されている。

【 0 0 0 3 】

さらなるアプローチでは、A T R - I R E はシラン化され、ビオチンとカップリングされ、その結果、二次構造解析を一切行わないアビジン/ストレプトアビジンセンサーを実現した (M. Voue et al., Langmuir, 23(2):949-955 (2007))。ここでは、センサー表面は、より複雑なワークフローにおいて、腐食性の化学薬品を通じて修飾されたが、この場合分析物の二次構造に影響を及ぼし、変化させる可能性がある。提示された調製法は、生理学的条件下で、複合的な体液中の選択されたタンパク質について解析するための提案されたセンサーを生み出すのに適さないことが判明した (Kleiren et al., Spectroscopy-An International Journal, 24 (1-2, SI): 61-66. (2010))。Voue (M. Voue et al., Langmuir, 23(2):949-955 (2007); S. Devouge et al., Journal of Colloid and Interface Science, 332(2):408-415 (2009)) とは別に、国際公開第 0 2 / 0 5 6 0 1 8 号パンフレットおよび欧州特許第 A - 1 8 0 6 5 7 4 号明細書は、リガンド - 受容体相互作用の解析に適する光学素子について開示する。

【 0 0 0 4 】

国際公開第 0 2 / 0 5 6 0 1 8 号パンフレットは、受容体とのリガンド相互作用を研究するためのデバイスについて明示的に言及しているが、同デバイスは、赤外線内で透明な減衰型内部全反射体からなり、その少なくとも 1 つの表面が、酸化、ヒドロキシル化、または還元により化学的に活性化され、受容体を固定化する能力を有する長鎖シラン誘導体と共有結合によりグラフト結合している。減衰型内部全反射要素は、ゲルマニウム、シリコン、Z n S e、Z n S、および A M - T I R より選択される物質から作製される。デバイスは、リガンド - 受容体相互作用を試験するのに適する。さらに、国際公開第 0 2 / 0 0 1 2 0 2 号パンフレットは、A T R - I R - 分光法と偏光照射法および屈折率測定法との併用について記載する。

【 0 0 0 5 】

欧州特許第 A - 1 8 0 6 5 7 4 号明細書は、リガンド - 受容体相互作用の研究、特に分析物 - 標的物相互作用の研究、例えば生体分子および化学的分子および有機成分と表面とのそれらの相互作用等の研究に適するデバイスについて開示するが、同デバイスは、赤外線内で透明な減衰型内部全反射要素からなり、その少なくとも 1 つの表面が還元され、受

10

20

30

40

50

容体を固定することができるアルケンと共有結合によりグラフト結合しており、この場合、前記アルケンは、アルキル、ハロアルキル、ハロ、アルケニル、シアノ、エポキシ、チオ、アミノ、ヒドロキシル、イソシアノ、イソチオシアノ、カルボキシ、ポリアルコキシ、アルキルアリールスルホキシ - ポリアルコキシ、またはヘテロアリーロキシ - カルボニルアルキル (carbonylalkyl) - ポリアルコキシより選択される、1つまたは複数の置換基により任意選択で置換される。減衰型内部全反射要素は、ゲルマニウム、特に台形、半円筒形、ファイバー状、またはロッド状の幾何学的形状、または多面体の形状を有する結晶から作製される。デバイスは、リガンド - 受容体相互作用、特に生体分子または有機成分、あるいはグラフト結合した有機分子における、または同分子内における、生体分子または有機成分または水溶性分子とのそれらの相互作用または錯体形成または反応を試験するのに適する。

10

【0006】

国際公開第02/001202号パンフレットおよび米国特許出願公開第2012/0309943号明細書は、例えばシランによる抗体 - サポートの主要生成法について開示する。

【0007】

国際公開第07/131997号パンフレットは、ATR - IR - 測定装置について言及しており、この場合、サンプルは、ATR表面に対して所定の距離で、直接接触することなく保持される。分光学的に不活性な媒体がスペーサーとして意図される。

【0008】

従来型の分光法は、単一の分析物を解析用に高濃度で単離するために、複合的なサンプルの多段階調製を必要とする。二次構造は、調製期間中に変化する可能性がある。

20

【0009】

SPRおよびELISA法は、複合的な媒体に含まれる特定の成分を高感度で定量化するが、二次構造情報を集めることはできない。これらの方法は高感度であるが、純粋に定量的な方法である。立体構造感受性 (立体構造特異性を意味する) 抗体は、分析物の構造の遷移状態について感度は一般的に劣るが (S. A. Funke, International Journal of Alzheimer's Disease, 2011: 1-8 (2011); K. A. Bruggink et al., Analytical Biochemistry, 433(2): 112-120 (2013))、それにもかかわらず疾患と関連性を有する (I. Benilova et al., Nature Neuroscience, 15(3): 349-357 (2012))。

30

【0010】

抗体結合について報告されたIR適合物質は、シリコン、ダイヤモンド、およびゲルマニウムを含む。シリコンは、分析対象となるスペクトルのフィンガープリント範囲内でIR照射を吸収する。ダイヤモンドは高価な物質であり、感度向上のためにより大きな検出器領域を確保したくても、その実現を妨げる。シリコンおよびダイヤモンドの屈折率は、ゲルマニウムの屈折率よりも低い、これは後者と比較してシグナル/ノイズ比の低下を反映する。

【0011】

捕捉および検出用に、同一の抗体を選択することにより、sFIDAはダイマーまたはオリゴマー凝集物に対して高感度となる (L. Wang-Dietrich et al., JAD, 34(4):985-994 (2013))。二次構造は直接解析されない。

40

【0012】

タンパク質の二次構造解析は、一連の技法 (UV/VIS円偏光二色性分光法、IR分光法、NMR分光法) の標準的な応用である。いずれも、高純度の濃縮したタンパク質を解析に必要とする。

【0013】

シランによるタンパク質の固定化は、もっぱら受容体 - リガンド相互作用の解析について、欧州特許第A - 1806574号明細書および国際公開第02/056018号パンフレットに開示されている。したがって、繫留型タンパク質の反応およびこれとの反応が検討された。繫留型タンパク質のさらなるリガンドの二次構造解析については検討されな

50

かった。

【0014】

最も重要な公知のタンパク質ミスフォールディング疾患であるアルツハイマー病の信頼性のある診断は、現在のところ、疾患が進行した状態を前提とする。現在のバイオマーカー解析法は、定量的ELISAに基づく。例えば、疾患進行期間中に生じるアミロイド(A)ペプチドの構造変換は、患者に臨床症状が現れるはるか前に開始すると考えられる。このような検討から、バイオマーカー候補について構造解析を行えば、確立した診断を補完する可能性を提供するだけでなく、これよりも重要でさえあるが、診断時期をより早めることを可能にし得る。したがって、治療をより早期に開始することができ、より長期にわたり生活の質を確保できる。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明の簡単な説明

本発明は、事前の単離または濃縮を行わない、複合的な体液に由来する選択成分の二次構造直接解析法を提供する。この解析法は、短いシランまたはチオールリンカーを介してセンサー素子上に直接固定化された抗体を有するセンサー素子、特に、固定化されたトリエトキシシランまたはチオールリンカーに、抗体がペプチド結合を介して共有結合したゲルマニウム表面に基づく。免疫学的結合は、ELISA法と同様に、ゲルマニウム表面に高い選択物質特異性を付与する。捕捉された物質は、特定の二次構造について、赤外分光法により解析される。予測可能なミスフォールディングが定量可能である。この方法により、複合的な体液中のバイオマーカー二次構造が、特定可能である。センサー設計は、代替的分光技術、例えば蛍光分光法との並行制御を可能にする。物質に対する免疫学的に確認済みの特異性が高ければ、前処理を行わずに、複合的な液体、例えば脳脊髄液(csf)または血液に由来する選択されたバイオマーカーの二次構造直接解析が可能となる。

20

【0016】

したがって、本発明は、下記事項を提供する：

(1) 高分子化合物の量および二次構造を直接解析するための光学センサー素子であって、前記赤外線センサー素子が、赤外線内で透明なゲルマニウム内反射体と、短いシランリンカーを用いたシラン化、または短いチオールリンカーを用いたチオール化により、および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て、前記内反射体の少なくとも1つの表面と直接グラフト結合した、高分子化合物に対応する少なくとも1つの受容体とを含む光学センサー素子。

30

(1') 疾患の進行に関連する立体構造の変換を経ている候補バイオマーカータンパク質の量および二次構造の直接解析のための赤外線センサー素子であって、前記赤外線センサー素子が、台形または平行四辺形の形状であり、赤外線内で透明なゲルマニウム内反射体と、候補バイオマーカータンパク質への特異的で立体構造的に独立した結合が可能な抗体であり、短いシランリンカーを用いたシラン化または短いチオールリンカーを用いたチオール化、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ること、および短いシラン/チオールリンカー上の残留するアミン反応基を、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でブロックすることにより、前記ゲルマニウム内反射体の少なくとも1つの表面と直接グラフト結合したバイオマーカータンパク質に対応する前記少なくとも1つの受容体とを含む赤外線センサー素子。

40

(2) 上記(1)または(1')の光学センサーを含む、高分子化合物の量および二次構造を直接解析するためのデバイス。

(3) 下記ステップを含む、上記(1)の短いシランリンカーを用いた光学センサー素子の調製法：

(a) 酸化により、ゲルマニウム内反射体の少なくとも1つの表面を表面活性化するステップ、

50

(b) 短いシランリンカーを、ステップ(a)で得られた活性化表面にグラフト結合させるステップ、および

(c) 短いシランリンカーのアミン反応基を介して、受容体を内反射体に共有結合によりカップリングさせるステップ。

(3') 下記のステップを含む、上記(1')のいずれか1つに記載の短いシランリンカーを用いて赤外線センサー素子を調製する方法：

(a) 酸化により、内反射体の少なくとも1つの表面を表面活性化するステップ、

(b) 短いシランリンカーを、ステップ(a)で得られた活性化表面にグラフト結合させるステップ、

(c) 短いシランリンカーのアミン反応基を介して、受容体を内反射体に共有結合によりカップリングさせるステップ、および

(d) 短いシランリンカー上の残留するアミン反応基を、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でブロックするステップ。

(4) 下記ステップを含む、上記(1)の短いチオールリンカーを用いて、光学センサー素子を調製する方法：

(a) HFとの反応により、ゲルマニウム内反射体の少なくとも1つの表面を表面活性化するステップ、

(b) 短いチオールリンカーを、ステップ(a)で得られた活性化表面にグラフト結合させるステップ、および

(c) 短いチオールリンカーのアミン反応基を介して、受容体を内反射体に共有結合によりカップリングさせるステップ。

(4') 下記のステップを含む、請求項1~7のいずれか一項に記載の短いチオールリンカーを用いて赤外線センサー素子を調製する方法：

(a) HFとの反応により、ゲルマニウム内反射体の少なくとも1つの表面を表面活性化するステップ、

(b) 短いチオールリンカーを、ステップ(a)で得られた活性化表面にグラフト結合させるステップ、および

(c) 短いチオールリンカーのアミン反応基を介して、受容体を内反射体に共有結合によりカップリングさせるステップ、および

(d) 短いチオールリンカー上の残留アミン反応基を、ブロッキング物質でブロックするステップ。

(5) 体液を含む複合的な液体中の、高分子化合物の二次構造および任意選択でその量を測定するための、上記(1)の光学センサー素子または上記(2)のデバイスの使用。

(5') 体液を含む複合的な液体中の、疾患の進行に関連する立体構造の変換を経ている候補バイオマーカータンパク質の二次構造および任意選択でその量を測定するための、上記(1')の赤外線センサー素子または上記(2)のデバイスの使用。

(6) 下記のステップを含む、複合的な液体中の高分子化合物の二次構造および任意選択でその量を測定する方法：

(a) 上記(1)の光学センサー素子を含むIRセル中に、前記光学センサーの表面上の受容体に対応する潜在的な高分子リガンドを流動させるステップ；

(b) 前記セルを通じてIRビームを照射し、そこから赤外スペクトルを得るステップ；ならびに

(c) 得られた赤外スペクトルを解析して、高分子化合物の二次構造および任意選択でその量を測定するステップ。

(6') 下記ステップを含む、複合的な液体中に含まれる、疾患の進行に関連する立体構造の変換を経ている候補バイオマーカータンパク質の二次構造および任意選択でその量を測定する方法：

(a) 上記(1')の赤外線センサー素子を含むIRセル中に、前記赤外線センサーの表面上の受容体に対応する潜在的な候補バイオマーカータンパク質を流動させるステップ；

10

20

30

40

50

(b) 前記セルを通じてIRビームを照射し、そこからアミドIバンドを解像するのに十分なシグナル対ノイズ比を有する赤外スペクトルを得るステップ；ならびに

(c) 得られた赤外スペクトルを解析して、候補バイオマーカータンパク質の二次構造および任意選択でその量を測定するステップ。

(7) 疾患の進行を判定する方法であって、候補バイオマーカータンパク質の立体構造の変換が、疾患の進行と関連し、バイオマーカータンパク質のアミドIバンドの最大値がシフトした場合、そのようなシフトが疾患の進行を示唆する分類指標である方法。前記方法(7)では、疾患の進行の判定が、上記(6')の方法により実施され、および/または閾値として $1638 \sim 1648 \text{ cm}^{-1}$ の値を有する分類指標が、疾患の進行を示唆する分類指標であるのが好ましい。

10

【0017】

本発明の光学センサー素子は、少なくとも赤外分光法および任意選択で蛍光分光法による、特定の物質、特にタンパク質の二次構造の直接解析を可能にし、物質/タンパク質を単離または濃縮する必要がない。これは、特に疾患バイオマーカー候補が定量的に解析されるだけでなく、特に二次構造についても解析されることを意味する。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舞蹈病のようなタンパク質ミスフォールディング型疾患を考慮すれば、この情報は、疾患の進行と決定的な関連性を有する。

【0018】

本発明の方法の長所は、無処理の複合的な液体、特に天然の体液に由来するバイオマーカー候補分子の二次構造の直接検出である。検出対象物質の単離および濃縮は不要であり、それはセンサーおよび検出技法の一部である。対照的に、その他の技法で用いられる立体構造感受性抗体は、二次構造組成について定量的に測定することができない。さらに、立体構造感受性抗体は、単一の二次構造要素に対して有する特異性が低い。本発明のセンサー素子は、例えば蛍光技法を用いる並行制御実験に適する。

20

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】IR分光光度計(A)のサンプルチャンバー内にあるセンサーデバイスの概略図、サンプルチャンバー(B)の詳細図、およびフロースルーキューベット(C)の模式図である。

30

【図2】最適化したフロースルーキューベットを詳細に示した図である。デバイスは、カバー内の石英ウィンドウを経由する代替的光学技法と共に、並行解析用として調製される。ガスケット要素、入口、および出口を、安定性および流動性に関して最適化した。

【図3】ゲルマニウムと共有結合させた、短鎖トリエトキシシラン(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)を示す図である(A)。スクシンイミジルエステルは、例えばタンパク質を構成するリジンの遊離アミンと反応して、所望のタンパク質、例えば抗体の安定的結合をもたらすが、その結合したリジン側鎖を示す図である(B)。代替的リンカーとして、やはりゲルマニウムに共有結合した、12-メルカプトドデカン酸NHSエステルを示す図である(C)。NHSエステルは、例えばタンパク質を構成するリジンの遊離アミンと反応して、やはり共有結合を形成する(D)。

40

【図4】蛍光顕微鏡解析実験を示す図である。反応性シラン上(A)では、蛍光は検出されない(B)が、8G7-FITC抗体が結合した(C)。検出抗体1E8が結合しても(D)、蛍光は増加しない(E)。カゼインでブロックした表面(F)は、蛍光を示さない(G)他に、検出抗体8G7-FITCとも結合しない(H)。特異的に固定化されたA-ペプチド(ここでは:A₁₋₄₂、I)のみが、抗体8G7-FITCを捕捉する(J)。

【図5】本発明と共に、非神経変性対照患者をアルツハイマー病患者から識別するのに用いられるA-ペプチドの赤外線吸収のアミドIマーカーバンドを示す図である。「健常」であるモノマー(実線)、「疾患性」オリゴマー(破線)、および「疾患性」線維型(点

50

線)の各立体構造内の単離された合成Aペプチド(A)を抗体1E8により、ATR表面に捕捉した。二次構造の構成は明確に異なる。抗体KW1で捕捉されたヒトcsf由来のオリゴマーA分画のアミドIバンド(B、破線)は、抗体B10で捕捉された天然の線維型分画(C、点線)と異なる。両者は、合成サンプルと比較して天然の立体構造多様性を反映する。立体構造的に独立した抗体A8978で捕捉された、対照患者14例(実線)およびアルツハイマー病患者9例(点線)の未処理csfに由来するA分画(D)は異なるが、定義された立体構造をとる合成ペプチドほどではない。それにもかかわらず、分離は一意的である:すべての対照アミドI最大値は、 1643 cm^{-1} を上回り、すべてのアルツハイマー病患者は下回る(分離線)。より顕著なこととして、クラススペクトルの算術平均は、異なるバンド位置を示す(E)。

10

【図6】アミドIバンド位置は、対照患者をアルツハイマー病患者から一意的に識別することを可能にすることを示す図である(A)。 1647 および 1640 cm^{-1} における吸光係数を用いて計算した二次分離関数によるLDA分類において、これらの知見が確認された(B)。

【図7】対照患者およびアルツハイマー病患者から得られたEDTA安定化血漿のAペプチド分画のアミドIバンド最大値も、csfのAと同様に区別する(図5E)。抗体A8978は、12-メルカプトドデカン酸NHSエステルを介してGe-IREに連結させた。

【図8】合成AペプチドのアミドI(黒色の四角)およびアミドIIバンド(灰色の丸)のシグナル対ノイズ(S/N)比を示す図である。

20

【図9】CSFから検出された、AD患者37例および非神経変性対照患者63例の平均アミドIバンド(A)は、AD患者サンプルにおいて、頻度の明確な下方シフトを示すことを表す図である。判定基準として頻度の閾値を用いた場合、ROC曲線は、AUCとして0.93を示した(B)。

【図10】血漿から検出された、AD患者35例および非神経変性対照患者61例の平均アミドIバンド(A)は、CSFで検出された場合と同様に、AD患者サンプルにおいて頻度の下方シフトを示すことを表した図である。判定基準として頻度の閾値を用いた場合、ROC曲線は、AUCとして0.85を示した(B)。

【図11】CSF(A)および血漿サンプル(B)について記録されたアミドIバンド最大値の位置の分布を示す図である。塗りつぶした菱形は、対照患者サンプル、白抜き菱形はAD症例を表す。ガウシアン正規分布は、表示のヒストグラムデータと十分な近似を示した。25/50/75%分位点を箱ヒゲ図に示す。これらの図は、平均バンド位置(四角)、±標準偏差(SD、ヒゲの部分)、および認められた最低/最大値(x)をさらに示す。破線は、判定閾値の位置 1643 cm^{-1} を示す。

30

【図12】mAB A8978のシランリンカーの代わりにチオールリンカーで調製したセンサーを用いて、患者2例のCSFから検出されたアミドIバンドは、疾患クラス分離(一点鎖線)について同一のバンド特性を示すことを表す図である。

【図13】(A)ブロックされないセンサーは、純粋サンプルに由来する β -シヌクレインまたはアルブミンに容易に結合し(別のセンサー素子)、これらのタンパク質を連続適用した際に、純粋溶液に由来するAペプチドに対して受容的な状態に留まった(点線:アルブミンと β -シヌクレインのシグナルの組み合わせ)。(B)ブロックされたセンサーは、 β -シヌクレインおよびアルブミンについて、検出可能な結合を示さなかった。Aペプチドのみが、連続適用後に検出された。

40

【図14】確認されたAD患者のCSFと共にインキュベートした後、ブロックされた(破線、灰色)およびブロックされないセンサー素子(実線、黒色)を用いて得られたアミドIおよびIIバンドを示す図である。

【図15】調整後の細胞培養培地を用いてインキュベートし、連続的にすすいだ後の、センサーを用いて得られたアミドIおよびIIバンドを示す図である。カゼインで表面をブロックすると、主にヘリックス型Aペプチド(A)について、期待されたバンドパターンおよび強度が得られた。カゼインの代わりにアルブミンを用いた場合、シグナル強度

50

が高まり、バンドパターンが不規則となるが、それは、望ましくない物質の重複するスペクトルの寄与を示唆する(B)。

【図16】ブロックされたセンサー上で、異なる抗体を用いて得られた、対照患者(実線、黒色)およびAD患者(破線、灰色)のCSFに含まれるA分画に由来するアミドイバンドを示す図である。1E8は、N末端エピトープを認識した(A)。KW1は、オリゴマーAペプチドを捕捉した(B)。B10は線維を選択した(C)。

【図17】抗体4B12を用いて捕捉した血清中シヌクレイン分画は、対照患者(黒色、実線)およびPD患者(灰色、破線)の血液サンプル中において、閾値(一点鎖線)により区別可能な類似した立体構造の変換を示したことを表した図である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明は、最適化され、単純化されたプロトコールを用いて、分析対象となる高分子化合物に対応する受容体、すなわち抗体を、ゲルマニウム表面上に、シランまたはチオールケミストリーを介して、直接、緊密に固定化することに基づく。液体(例えば、血液またはcsf)を解析するために、液体は流通系内のセンサーに供給される。高分子化合物は、機能化されたセンサー表面上の抗体により固定化される。

【0021】

本発明の態様(1)および(1')の光学センサー素子は、特に赤外線解析に適するが、任意選択で、さらに異なる波長での蛍光の検出を含む別の光学的方法による並行解析にも適する。さらに、センサー素子は、ペプチドやタンパク質だけでなく、ヌクレオチド含有ポリマー、例えばDNAおよびRNA等を含む、高分子化合物の光学解析に適する。

【0022】

本発明の光学センサー素子の好ましい実施形態では、内反射体は、台形または平行四辺形の形状、ファイバー状またはロッド状の幾何学的形状を有するゲルマニウム結晶である。ゲルマニウム結晶は、ゲルマニウム単結晶であるのが好ましいが、ただし台形に切断されたゲルマニウム単結晶が特に好ましい。

【0023】

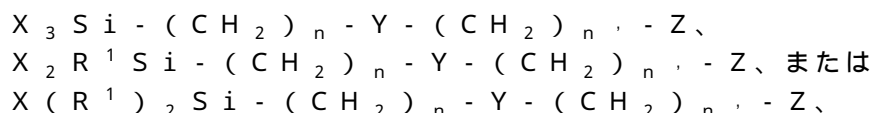
ゲルマニウム結晶は、反射体を通過する1つを超える赤外光の通路を可能にするのがさらに好ましいが、5つを超える通路が特に好ましい。かかる複数の通路内での候補バイオマーカータンパク質との接触を可能にするために、バイオマーカータンパク質に対応する受容体が、適する数の前記ゲルマニウム内反射体の表面にグラフト結合する。

【0024】

受容体、したがって高分子をゲルマニウム内反射体にカップリングするのに利用されるシランおよびチオールリンカーとして、均質なシラン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が挙げられる。受容体/高分子の堅固で緊密な連結を可能にするために、短鎖リンカー、好ましくは原子20個を超えない、または原子15個を超えない鎖長を有するリンカーが利用される。

【0025】

かかる短鎖リンカーとして、下記の式のうちの1つを有するシランリンカーが挙げられ



およびチオールリンカーは下記の式を有し：



式中、出現毎にXは、ハロゲンおよびC₁~₆アルコキシより独立して選択され、nは1~10の整数であり、n'は1~5の整数であり；出現毎にR¹は、C₁~₆アルキルより独立して選択され、Yは、化学結合、-O-、-CO-、-SO₂-、-NR²-、-S-、-SS-、-NR²CO、-CONR²-、-NR²SO₂-、および-SO₂NR²-より選択され(R²は、HまたはC₁~₆アルキル)、およびZは、-CO₂H、

10

20

30

40

50

- SO_3H 、およびそのエステル誘導体を含むアミン反応基である。

【0026】

本発明の範囲内のハロゲンとして、フッ素、塩素、臭素、およびヨウ素原子が挙げられる。 C_{1-6} アルキルおよび C_{1-6} アルコキシとして、飽和または不飽和であり得る1~6個の炭素原子を有する直鎖状、分岐状、または環状のアルキルまたはアルコキシ基が挙げられる。環状のアルキル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基を意味する。適する C_{1-6} アルキルおよび C_{1-6} アルコキシ基として、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として、遊離アミノ基と反応するあらゆる種類の官能基が挙げられる。とりわけ、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、およびそれらのエステル誘導体(活性なエステルを含む)が特に好ましい。

10

【0027】

上記式内の $-(\text{CH}_2)_n-$ および $-(\text{CH}_2)_{n'}$ の構造的要素は、1つまたは複数の二重結合および/または三重結合も含み得るが、1つまたは複数のハロゲン原子、例えばフッ素等で置換され得る。

【0028】

本発明の好ましい実施形態では、光学センサー素子は、シラン化により取得可能であり、リンカー中、Xは C_{1-6} アルコキシ基より、好ましくはメトキシ基およびエトキシ基より独立して選択され、Yは $-\text{NHCO}-$ であり、Zは $-\text{CO}_2\text{H}$ またはそのエステル誘導体であり、 n は1~5の整数であり、 n' は1~3の整数であり、好ましくは、 n は3であり、 n' は2である。

20

【0029】

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、リンカー中、Yは化学結合であり、Zは $-\text{CO}_2\text{H}$ またはそのエステル誘導体であり、 n は1~8の整数であり、 n' は1~5の整数であり、好ましくは、 n は8であり、 n' は4である。12-メルカプトドデカン酸NHSエステルが特に好ましい。

30

【0030】

光学センサー素子の別の好ましい実施形態では、高分子化合物に対応する少なくとも1つの受容体は、特異抗体である。さらに、高分子化合物が、例えばアルツハイマー病(Aペプチドおよびタンパク質)、パーキンソン病((\quad) -シヌクレイン)、クロイツフェルト-ヤコブ病(プリオンタンパク質)、またはハンチントン舞踏病(ハンチンチンタンパク質)等の、ただしこれらに限定されないタンパク質ミスフォールディング型疾患に特徴的なタンパク質であるのが好ましく、高分子化合物が、健康状態依存性の、特徴的な二次構造組成を有するアミロイド形成ペプチドまたは(ポリ)ペプチドであるのが好ましい。

【0031】

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として、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挙げられるが、カゼインが好ましい。

40

【0032】

候補バイオマーカータンパク質がAペプチドであるとき、抗体は、抗体A8978(Sigma Aldrich社)等の、アミロイド-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、候補バイオマーカータンパク質が-シヌクレインであるとき、抗体は、抗体4B12(Covance, BioLegend Inc.社)またはS5566(Sigma Aldrich社)等の、立体構造特異性を有さない、-シヌクレインペプチドに特異的に結合する抗体である。

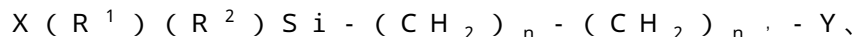
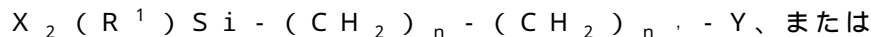
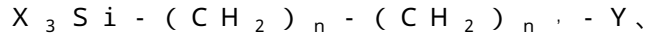
50

【 0 0 3 3 】

本発明の態様(2)のデバイスは、適するIRセル(チャンバー)に組み込まれた、本発明の態様(1)または(1')のセンサー素子を有する。デバイスは、光(IR)放射素子、光(IR)検出素子、およびデータ処理ユニットをさらに備え得る。追加の光学的方法により並行検出する場合、デバイスは、異なる波長の、かかる追加の光学的方法のための光源および検出器要素、例えばUV/Vis-蛍光用の光源および検出器要素等をさらに備え得る。

【 0 0 3 4 】

本発明の態様(3)および(3')の方法では、 H_2O_2 /シュウ酸を用いた処理により、酸化処理が実施される。さらに、本方法では、短いシランリンカーを用いたシラン化が、下記の式を有するシラン誘導体を用いて実施されるのが好ましく、



式中、変数は上記定義の通りである。Yの定義では、 CO_2H または SO_3H 部分のエステル誘導体がいられるのが特に好ましく、これは、単純な C_{1-6} アルキルエステルであり得るが、活性化エステル、例えばN-ヒドロキシスクシンイミドエステルまたは任意のその他の活性化エステル誘導体等であってもよい。また、本方法では、受容体が抗体であるのがやはり好ましい。ブロッキング物質がカゼインであるのがさらに好ましい。

【 0 0 3 5 】

本発明の態様(4)および(4')の方法では、表面の活性化は、HF(49%)を用いた処理により実施される。さらに、本方法では、短いチオールリンカーを用いたチオール化は、下記の式を有するチオールリンカーを用いて実施されるのが好ましく、



式中、変数は上記定義の通りである。Yの定義では、 CO_2H または SO_3H 部分のエステル誘導体がいられるのが特に好ましく、これは、単純な C_{1-6} アルキルエステルであり得るが、活性化エステル、例えばN-ヒドロキシスクシンイミドエステルまたは任意のその他の活性化エステル誘導体等であってもよい。本方法では、受容体が抗体であるのがやはり好ましい。ブロッキング物質は、カゼインであるのがさらに好ましい。

【 0 0 3 6 】

態様(3)/(3')および(4)/(4')のいずれにおいても、光学センサー素子の方法は、腐食性の化学薬品を用いずに、室温下で構築される。単一ステップは、いずれもIR-スペクトルに基づいて評価され得る。このバリデーションステップは、分析物の特異的検出および正確な二次構造の測定にとって必要不可欠である。

【 0 0 3 7 】

本発明の態様(6)および(6')の方法は、

(a) これまでに本明細書で定義したような光学センサー素子を含むIRセル中に、前記光学センサー表面上の受容体に対応する潜在的な高分子リガンドを流動させるステップ

(b) 前記セルを通じてIRビームを照射し、そこから赤外スペクトルを得るステップ ; ならびに

(c) 得られた赤外スペクトルを解析して、高分子化合物の二次構造および任意選択でその量を測定するステップ

を含む。

【 0 0 3 8 】

ステップ(d) : 得られた赤外スペクトルを解析して、高分子化合物の二次構造組成に基づき、統計的手法を用いてサンプルを分類するステップをさらに含む場合もある。

【 0 0 3 9 】

好ましい実施形態では、本方法は、ステップ(a)の前に、前記光学センサー素子を、IRセル内に据付けるステップをさらに含む。さらに/あるいは、本方法は、ステップ(

10

20

30

40

50

e) : 受容体に対応する遊離リガンドの溶液を適用することにより、光学素子の表面を再生するステップをさらに含み得る。

【0040】

さらに好ましい実施形態では、ステップ(b)で得られたスペクトルは、アミドIバンドを解像するのに十分なシグナル対ノイズ比を有する。このシグナル対ノイズ比は、ステップ(c)が、好ましくは、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を解析して、候補バイオマーカータンパク質の二次構造を判定するステップを含むことを可能にする；および/または

【0041】

さらなる実施形態では、本方法のステップ(c)は、得られた赤外スペクトルを、二次構造が公知および/または濃度が公知の高分子リガンドのスペクトルと比較するステップをさらに含む。

10

【0042】

別の実施形態では、本方法は、赤外線解析と並行して、異なる波長での、UV/Vis-蛍光を含む、別の光学的方法により検出するステップをさらに含む。特に、免疫-ATR-IR振動分光法を、並行してなされる蛍光分光法と組み合わせる方法が好ましい。

【0043】

態様(6)、(6')、および(7)の方法は、前処理せずに(すなわち、富化または精製ステップに先行する分離を行わないで)、体液中の高分子を測定する、特に哺乳動物(ヒト、動物)起源の、脳脊髄液、血液、または血清を含む体液中に含まれる候補バイオマーカータンパク質を直接測定するのを可能にする/直接測定するのに適する。本方法は、候補バイオマーカータンパク質の別個の(in-vitroの)、またはオンラインの(患者上での体液の直接測定)測定に適する。いずれの方式でも、本方法は、疾患進行の評価をさらに含み得る。

20

【0044】

態様(6)、(6')、および(7)の方法は、アミロイド- β を候補バイオマーカータンパク質として用いてアルツハイマー病の進行を判定するのに特に適するが、この場合、好ましくは閾値を $1643\text{ cm}^{-1} \pm 5\text{ cm}^{-1}$ 、(または $1643\text{ cm}^{-1} \pm 3\text{ cm}^{-1}$ 、または $1643\text{ cm}^{-1} \pm 1\text{ cm}^{-1}$ 、または約 1643 cm^{-1})として、アミロイド- β ペプチドのアミドIバンドの最大値が 1647 cm^{-1} から 1640 cm^{-1} にシフトすれば、それはアルツハイマー病を示唆する。また、このような方法は、 α -シヌクレインを候補バイオマーカータンパク質として用いてパーキンソン病の進行を判定するのも特に適するが、この場合、好ましくは閾値を $1643\text{ cm}^{-1} \pm 5\text{ cm}^{-1}$ (または $1643\text{ cm}^{-1} \pm 3\text{ cm}^{-1}$ 、または $1643\text{ cm}^{-1} \pm 1\text{ cm}^{-1}$ 、または約 1643 cm^{-1})として、 α -シヌクレインペプチドのアミドIバンドの最大値が 1646 cm^{-1} から 1641 cm^{-1} に下方シフトすれば、それはパーキンソン病の進行を示唆する。

30

【0045】

本出願の本発明は、高分子基質に対応する受容体、例えば機能的抗体等の光学素子表面上への直接的で緊密な特異的固定化を実現する。上記国際公開第02/056018号パンフレットおよび欧州特許第A-1806574号明細書は、受容体の固定化または受容体とリガンドとの相互作用を解析するための、長鎖シランおよび炭化水素を用いた光学素子の化学的機能化について開示するが、これらとは対照的に、極めて特異的な抗体等の、高分子に対応する受容体を緊密に固定化すれば、複合的な液体の一成分として、所与の高分子について、その立体構造解析を可能にする。

40

【0046】

本発明のセンサーを用いた場合、アルツハイマー病の主たるバイオマーカー候補であるA β -ペプチドの検出限界は、csf中の通常濃度と比較して、それよりも2桁低く、血液中の通常濃度と比較して、それよりも約1桁低かった。アルツハイマー病の進行過程では、A β -ペプチドの立体構造は変化する。従来型のアッセイ法には、csf中の様々な鎖

50

長を有する A - ペプチドの濃度および比が含まれるに過ぎない。本発明のセンサーを用いた場合、異なる A - 立体構造がリアルタイムで検出可能であり、測定された吸収は、存在する二次構造の平均シグナルを提示する。アルツハイマー患者の場合、対照患者と比較して、立体構造感受性スペクトル領域に生じる有意で特異的な変化が識別可能であった。これにより、本技法の感度および実用性が示された。

【0047】

本発明のセンサー素子に、電磁放射を組み合わせる必要がある。使用可能な波長は、紫外～テラヘルツを含む。プロトタイプ開発の場合、中赤外線 (MIR) 領域が利用された。抗体結合物質は、特定の波長において照射を吸収し、吸収スペクトルを生成する。吸収シグナルの強度は、物質濃度の定量的解釈を可能にする。吸収波長は、タンパク質の場合、例えば二次構造の直接的で定性的な解釈を可能にする。さらに、本発明のセンサー素子は、同時適用される少なくとも2つの異なる分光法、例えば分析物の赤外線吸収測定法および蛍光測定法を用いて、少なくとも2つの波長範囲における並行検出が行えるように設計される。

10

【0048】

全体的なプロセスは、概ね自動化され得る。したがって、本発明のデバイスおよび方法は、科学に関係のない者にとっても操作可能である。診断目的で、本方法を分類統計学と組み合わせることも考えられる。

【0049】

確立されたセンサー技法を用いた場合、所望の物質に対応する抗体が入手可能であれば、定義された物質を、複合的な溶液において、定性的および定量的に直接解析可能である。したがって、未処理体液中のタンパク質の二次構造直接解析が実現可能となる。センサーの特異性は、抗体の特異性に基づく。基礎研究の場合、本発明は、特に低濃度溶液からのタンパク質の構造解析を可能にする。

20

【0050】

バイオインフォマティクスに関する分類指標を適用することにより、結合した物質のいくつかの状態が、自動的に区別可能である。識別の感度および特異性は、ケース毎にバリデーションされなければならない。

【0051】

本センサーは、立体構造的分類を用いて新規バイオマーカーを探索するための新規分野を開拓する。臨床用途で本発明を使用することは、体液が抽出後に直接解析可能であるので特に意義深い。事前に定義された成分のみが検出され、量と共にその構造の両方が、診断情報を得るために解析される。

30

【0052】

具体的な例として、アルツハイマー病等の神経変性疾患が挙げられるが、同疾患は、csfに含まれる、これまでに識別されたバイオマーカー候補分子の A および について、その量および構造の変化を示す。本出願の本発明を用いた場合、両方のパラメーターが同時検出される。

【0053】

本発明は、複合的な液体中の特定のタンパク質について、タンパク質のアミドIバンドの二次構造解析を実現する。二次構造は、疾患状態のバイオマーカーとして用いられる。対応するバイオマーカーの存在下で、アミドIの構造感受性の頻度が、本明細書で定義する閾値未満であれば、それは疾患状態を示唆する。閾値は、A ペプチドにつき図9、10、および11、ならびに - シヌクレインにつき図16に記載されている。下記の詳細な考察は、アルツハイマー病の A ペプチド、およびパーキンソン病の - シヌクレインに重点が置かれている。この閾値は、新たな知見である。閾値を決定するために、体液中に認められるアミドIバンドについて、十分なシグナル対ノイズ比を提供する実験装置を発明した。測定条件に対して非常に敏感であるので、体液中のバイオマーカーの二次構造について測定することが重要である。例えば、A の二次構造は、測定条件に応じてヘリックスとランダムコイルの間で変化する。本出願の例として、A ペプチドが用いられ

40

50

る。分析物の濃度が生理学的濃度未満であっても（図8）、アミドIバンドについて優れたS/Nが得られた。A ペプチドは、ヒト脳脊髄液（CSF）では、約10～15 ng/mlに濃縮される。実証された検出限界は、この数値を少なくとも1桁下回る。

【0054】

A ペプチドの例に示す通り、意図したタンパク質が検出される：定義され、緩衝化された溶液からの、および複合的な調整後の細胞培養培地からの合成A ペプチドの捕捉が、任意選択的な蛍光制御解析により確認された（図11）。

【0055】

実施例2および3の結果に基づき、 $1638 \sim 1648 \text{ cm}^{-1}$ の値の閾値分類指標が、本発明の特徴である。

10

【0056】

本発明の好ましい光学材料はゲルマニウムである。単一の反射配置を唯一備えた、いわゆる「BiATR」装置は、生理学的濃度のA ペプチドの二次構造解析には不十分なシグナル品質を有することが判明した。A ペプチドが、純粋で重水素化された溶液内に5倍を超えて過剰に提供されたとしても、二次構造解析は、実現したS/Nスペクトル低く、実施することはできなかつた[Kleiren et al. Spectroscopy 2010]。したがって、疾患マーカーとしての閾値は、このアプローチにより決定することはできない。本発明の好ましい実施形態は、台形の形状をした多重反射結晶型IREを特徴とする。平行四辺形の形状も密接に関連しており、同様に可能である。閾値を決定するためには、機能化された表面において、少なくとも5つの内反射を利用して、十分なシグナル対ノイズ比を実現

20

【0057】

抗体飽和表面をブロックするステップが、分析物の意図するようなアミドIバンド解析を行うのに重要である。分析物と反応しないが、シランまたはチオールリンカーとは反応する、球形タンパク質からなる界面活性剤を含まない溶液が、センサー素子の非特異的結合部位の化学的クエンチング/ブロッキングに用いられる（実施例5および6を参照）。

【0058】

カゼイン等の非交差反応性のブロッキング物質が、立体構造解析、特にアミドIバンド解析に必要とされるという知見が、本発明にとって重要である。免疫学的ブロッキングの標準的物質であるアルブミンは、A ペプチドの特異的検出には不向きである（実施例7

30

【0059】

免疫学プロトコールでは、多くの場合乾燥ミルク粉末が緩衝化溶液に適用される。緩衝化乾燥ミルク溶液は、アルブミンを含有するのでA 検出には適用できない。界面活性剤は、センサーシステムにとって不要である。すべての実施例は、界面活性剤を含まない溶液を用いて実施された。本発明との複合した問題は、免疫学プロトコールで用いられるような、一般的低濃度の界面活性剤を用いる場合、予想されない。

【0060】

サンプル中のA ペプチドの二次構造を解析する場合、抗体は、セントラルペプチドエピトープに対して感受性（特異性）を有さなければならないが、ペプチドのエピトープ構造に対して感受性を有してはならない（実施例8を参照）。

40

【0061】

本発明の態様（6）および（7）の方法は、タンパク質ミスフォールディング型疾患、またはプロテオパシーとしても知られている様々な立体構造的疾患に適用可能であるが、同疾患は、下記のペプチド/タンパク質のミスフォールディングにより引き起こされる：アミロイド - （A）ペプチドおよび タンパク質（アルツハイマー病（AD））； - シヌクレイン（パーキンソン病（PD））、プリオンタンパク質（クロイツフェルト - ヤコブ病（CJD）、狂牛病として一般的に知られているウシ海綿状脳症（BSE）、ハンチントンタンパク質（ハンチントン舞踏病）。

【0062】

50

A (実施例1~8)およびβ-シヌクレイン(実施例9)の解析を目的とした使用について、特に示す。

【0063】

本発明は、下記の非限定的な実施例でさらに説明される。

【実施例】

【0064】

材料および方法

本発明は、Specac社製(Specac Ltd.社、Slough、英国)の市販サンプルコンパートメント「GS11000-25回反射型入射角可変式ATR」を備えたIR分光光度計を用いて直接利用可能である(図1A、光路は図1B)。光学素子のゲルマニウムATR-結晶(52×20×2mm、Korth Kristalle GmbH社、Altenholz(Kiel)、ドイツ)を、最適化したブラケット内に組み込んだ(図1B、図2)。その後、結晶表面について所定の化学修飾を行い、特異的センサー特性を生み出した(図3)。別途記載しない限り、すべての化学薬品は、Sigma-Aldrich社(Munich、ドイツ)から購入した。バッファーおよび水は、超音波バス内で脱気した。

【0065】

サンプルセット：フィージビリティー試験には、患者23例、すなわちアルツハイマーの可能性が最も高いと確定診断された患者9例、および非神経変性対照患者14例が、最初に含まれた。継続募集を行い、AD患者37例および対照患者63例のcsfサンプル、およびAD患者35例および対照患者61例の血漿サンプルを用いて解析を実施した。患者の診断は、心理学報告書、MRT画像データ、csfおよび血液解析の結果、および計量的心理テスト診断に基づく。入手可能性に応じて、PET(陽電子放出型コンピュータ断層撮影法)、またはSPECT(単光子放射型コンピュータ断層撮影法)所見が検討された。追加報告は、近親者が関わる経過観察に起因する。

【0066】

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℃で搬送および保管した。サンプルは、測定前に前処理せず、37℃で30秒間解凍を行うのみであり、用いられるまで氷上で保持した。

【0067】

リン酸緩衝化生理食塩水(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 の形態の)、pH7.4。

【0068】

反応-リン酸バッファー：50mMの Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 、pH8.0。

【0069】

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

【0070】

シラン化溶液：用いられるシラン(N-(4,4,4-トリエトキシシランブチル)スクシニアミド酸2,5-ジオキソピロリジン-1-イルエステル)を合成し、記載に従い特徴づけした(J. Schartner et al., Journal of the American Chemical Society, 135(10):4079-4087 (2013))。

【0071】

抗体：捕捉分子として2つの抗体、1E8(Nanotools Antikörper technik GmbH社、Teningen、ドイツ)およびA8978(ロット番号：061M4773、Sigma Aldrich社)を用いて本方法を試験した。1E8は、アミロイドβペプチドのN末端アミノ酸1~11に結合し、A8978はアミノ酸13~28に結合する。蛍光検出は、FITC-標識8G7抗体(Nanotool

1 s 社)を通じて行い、同抗体は A₁₋₄₂ ペプチドの C 末端を認識する。さらに、A₁₋₄₂ ペプチドのオリゴマー状態に対する立体構造感受性抗体 (KW1) (Morgado et al., PNAS, 109(31): 12503-12508 (2012)) および線維状態に対する立体構造感受性抗体 (B10) を利用した (G. Habicht et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104(49): 19232-19237 (2007))。

【0072】

シランによるセンサー表面の調製: Ge-IRE を、0.1 μm の粒子化ダイヤモンドの研磨用懸濁液を用いて、5 分間、両側研磨した (Struers A/S 社、Ballerup、デンマーク)。結晶を、過酸化水素/シュウ酸混合物 (9:1) 中で 5 分間、3 回インキュベートし、各インキュベーションステップ間において水洗し、窒素ガスを用いて乾燥した。さらに、結晶を、フロースルーセル内の最適化されたシリコンウエハを用いて、速やかに据付けた。ペリスタポンプ (IDEX Health & Science GmbH 社、Wertheim、ドイツ) により、流速を 1 ml / 分に制御した。システムの総容積を 650 μl とした。

10

【0073】

センサー表面を、2-プロパノール中 300 μm のシラン溶液と共に 60 分間インキュベートし (図 3)、非特異的に連結されたシランを 2-プロパノールで 30 分間すすいだ。反応バッファーに培地変更後、抗体のアミド II バンドの固定化動力学によりモニタリングして、25 μg/ml の抗体溶液を、活性化シラン表面上に、飽和するまでフラッシュした。アミド II 吸収が平衡に達するまで、非特異的に結合した抗体を、PBS バッファーですすいだ。センサー表面の自由反応部位を、カゼインブロッキング溶液で飽和させ、その後 PBS バッファーですすいだ。

20

【0074】

チオールによるセンサー表面の調製: Ge-IRE を、シラン化に関する記載と同様に調製した。結晶を記載に従い調製した (S.M. Han et al., JACS, 123(10): 2422-2425 (2001))。HF 処理後、結晶を、1 mM の 1,2-メルカプトドデカン酸 NHS エステルを含有するイソプロパノール溶液中に速やかに浸漬した。24 時間後に単層が形成され、結晶を、N₂ ガスで乾燥させ、速やかに ATR 装置に据付けた。未結合のチオールを、イソプロパノールで 30 分間洗浄して除去した。さらなる調製は、シラン化プロトコールと同一であった。

30

【0075】

測定の実施: 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 70 V 分光光度計 (Bruker Optics GmbH 社、Ettlingen、ドイツ) 上で実施した。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 60 kHz にて、スペクトル解像度 2 cm⁻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、サンプルスペクトルを、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、高感度差スペクトロスコピーが可能となった。状態変化の吸収は、変化前後における強度の比率の 10 を底とする対数をマイナス 1 倍したものである。50 μl の c s f を、A₁₋₄₂ ペプチド分画の二次構造解析用として、循環フロー内の PBS 緩衝系に添加した。結合平衡に達した後、スペクトル変化が認められなくなるまで、PBS バッファーで、未結合の物質を系からすすぎ落とした。したがって、A₁₋₄₂ 吸収スペクトルは、この状態と、カゼインでブロックし、PBS ですすいだセンサー表面との間の差異から計算した。

40

【0076】

スペクトルの前処理: 大気中の水蒸気のスペクトル痕跡を、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。半値幅 (FWHM) が 4 波数未満である高周波ノイ

50

ズを、フーリエローパスフィルターを介して除去した。記載に従い、スペクトルをベースライン補正し(J. Ollesch et al., *The Analyst*, 138(14):4092 (2013))、分類前に、 $1730 \sim 1620 \text{ cm}^{-1}$ の間で、同一のアミドIシグナル強度に標準化した。

【0077】

分類：スペクトルデータの次元数を減らすために、両患者群の平均スペクトルについて、そのアミドI最大値の位置を、分類関連データポイントとして選択した。データの分類は、matlabのプログラミング環境、バージョン2012aによる、線形判別分析法(LDA)に起因した。プログラムインターン機能(「分類する」)を用いた。すべての計算は、Intel Core2 Quad CPU Q9650@3.0GHz、8GB RAMを備えたオフィスPC(Dell Optiplex 780)上で行った。

10

【実施例1】

【0078】

シランがカップリングされたリンカーを用いたA₁₋₄₂内アミドIバンドの解析

確立したセンサー装置の特異性感度(図1、2)は、抗体により定義される。蛍光顕微鏡検査法を用いることにより、FITCがカップリングされた抗体8G7が表面上に結合したときに限り、蛍光を測定することができた。対照は、蛍光を一切発しなかった(図4)。抗体8G7-FITCは、表面上のアミン反応性シランに共有結合しており(図3A、B)、バッファーによる洗浄では除去することはできなかった(図4C)。別の試験抗体1E8は、蛍光を一切示さなかった(図4E)。露出した、カゼインとの非特異的結合部位をブロックした後は、8G7のさらなる結合は認められず、これは、8G7は、カゼインの他、1E8とも結合しないことを示している。8G7-FITCをタンパク質として一般的に見るならば、シラン表面は、サンプル中の含有タンパク質との非特異的相互作用から保護されていることを、この実験は示している。

20

【0079】

A₁₋₄₂ペプチドと共にインキュベートした後に限り、蛍光シグナルが、後続する8G7-FITC標識表面から検出されたが(図4J)、これは、A₁₋₄₂の固定化に成功したことの証しである。さらに、設計されたセンサーは、異なる光学的技法を用いて並行実験を可能にすることが判明した。

【0080】

解析したアミドIバンドの立体構造感受性は、モノマー、オリゴマー、および線維型のA₁₋₄₂ペプチドを用いて証明された(図5A)。線維型およびオリゴマーの状態は、非凝集状態のペプチドとはかなり異なり、それはシートの量がより多いことにより判別可能である。これは、アミド-I-最大値が 1624 cm^{-1} および 1630 cm^{-1} に向かってシフトすることにより明白となり得る。 1665 cm^{-1} の高頻度成分は、線維型の特徴である。オリゴマー化したA₁₋₄₂ペプチドは、アルツハイマー患者では、アミロイドプラークの形成における毒性中間体として議論されている(I. Benilova et al., *Nature Neuroscience*, 15(3):349-357 (2012))。オリゴマーは、モノマーおよび線維型と比較して異なるシート構造を有する。考え得る説明として、逆平行シートの量がより多いことが挙げられる(Cerf et al., *The Biochemical Journal*, 421(3):415-423 (2009); Yu et al., *Biochemistry*, 48(9):1870-1877 (2009); Laganowsky et al., *Science*, 335(6073):1228-1231 (2012))(図5A、約 1682 cm^{-1} における緑色のバンド内のショルダー部)。これは、モノマーおよび線維型においてアミドIバンドが異なることを示唆する。

30

40

【0081】

立体構造感受性抗体B10(線維型)およびKW1(オリゴマー)を用いて、本発明者らは、対照患者の同一の通常ヒトcsf内において、両方の対応するA₁₋₄₂ペプチド分画を検出することができた(図5B、C)。単離されたA₁₋₄₂ペプチドの合成溶液では、定義された立体構造をとる、単離されたペプチドの二次構造のみが明らかにされているが、これと比較して、図5BおよびCのデータは、通常 of 体液中に認められる、期待される二次構造組成を示す。

50

【0082】

したがって、立体構造感受性抗体は、疾患関連の構造的変化の検出に適さない。これらの抗体は、所望の立体構造のみを特異的に検出するが、重要な特性は、モノマー、オリゴマー、およびアミロイド線維の比例的組成である。立体構造独立抗体 A 8 9 7 8 を用いた場合、検出されたアミド I バンドは、A - ペプチド分画の構造的組成と定量的に類似した。これは、患者を区別するための本発明者らのセンサー技法に高い特異性をもたらす可能性がある（図 5 D、E）。

【0083】

対照患者とアルツハイマー患者とは、アミド I 最大値の位置に基づき、100%の正確度で識別可能である（図 6 A）。

10

【0084】

代替的分類指標である、1647および1640 cm^{-1} におけるアミド I 強度に基づく LDA は、モンテカルロ交差検証を1000回反復して、データの3分の1を分類指標のパリテーションから除外する方法に基づき、 $94 \pm 11\%$ の感度、および $100 \pm 0\%$ の特異性で、 $97 \pm 6\%$ の平均正確度を実現する（図 6 B）。

【0085】

チオールリンカーとして12-メルカプトドデカン酸 NHS エステルを介してゲルマニウム IRE 上に共有結合により連結された抗体を用いた場合（図 3 C、D）、EDTA 安定化血漿中 A - ペプチド分画の二次構造に基づき、対照患者から AD 患者の同様の識別を実現した（図 7）。

20

【実施例 2】

【0086】

AD 37 例および対照 63 例からなる拡張データセットにおける、アルツハイマー病（AD）患者および対照群の CSF 内 A - ペプチド構造解析

サンプル 20 例の当初の代表的な解析を、患者 100 例まで拡張した。CSF 中に存在する A - ペプチドの平均的な立体構造は、対照群の方が AD 群よりも高いアミド I バンドの頻度を示した（図 9 A）。これは、対照群では β -ヘリックス型フォールドが支配的であるのに対し、AD 群はすでに β -シート成分の富化を示していることを示唆した。指標としてアミド I バンドの頻度を用いる場合、1643 cm^{-1} は、これまで 92%の正確度、95%の感度、および90%の特異性でクラスを識別するための最適な閾値に該当する。対応する受信者操作特性（Receiver Operating Characteristics：ROC）曲線は、曲線下面積（AUC）として0.93を示す（図 9 B）。

30

【実施例 3】

【0087】

AD 患者 35 例および対照患者 61 例における、EDTA 安定化血漿中 A - ペプチド構造解析の応用

CSF と同様に、血漿中で検出される A - ペプチドの平均的な立体構造は、対照群の方が AD 群よりも高いアミド I バンドの頻度を示した（図 10 A）。これは、血中 A - ペプチド分画に対する同様の疾患の影響を示唆した。やはり、1643 cm^{-1} は、89%の正確度、80%の感度、および93%の特異性でクラスを識別するための最適な頻度の閾値に該当する。対応する ROC 曲線は、AUC として0.85を示す（図 10 B）。

40

【0088】

実施例 2 および 3 では、AD 患者 37 例および対照患者 63 例からなる CSF サンプル、および AD 患者 35 例および対照患者 61 例からなる血漿サンプルについて解析した。

【0089】

対応するヒストグラムおよび箱ヒゲ図により、分布の最大値が十分に区別されるという知見が確認された（図 11）。すべてのクラスは、ガウシアン正規分布に十分に近似された。CSF 対照クラスおよび AD クラスの平均バンド位置は、 ± 1 標準偏差の場合重複しなかった。両側 t 検定により、両サンプル群、CSF および血漿について、 $p < 0.001$ の有意なクラス差が示された。

50

【0090】

A ペプチド分画の最大アミドIバンドの位置は、単純な分類閾値により十分に分離可能であった： 1643 cm^{-1} 未満のバンド最大値は、ADクラスに該当し、 1643 cm^{-1} 以上は、対照患者に該当する。この閾値は、CSFについて92%、および血漿サンプルについて89%の最適正確度を有する分類指標を代表する。

【0091】

99.9%信頼水準におけるt検定統計学に基づけば、一般化分類閾値は、 $1638\sim 1648\text{ cm}^{-1}$ の範囲内にあると予測可能である。

【実施例4】

【0092】

AD患者および対照患者のCSFからチオールリンカーを介して捕捉されたA ペプチド装置のゲルマニウムIREを、研磨、アセトン洗浄し、HF中でインキュベーションを行い(40%、室温で10分間)、蒸留水で洗浄し、 N_2 中で風乾し、チオールリンカー(12-メルカプト-ウンデカン酸-NHS-エステル、図3C、3D)によりオーバーナイトで修飾し、バッファーですすいだ後、抗体A8978で機能化し、カゼインで脱感作した。AD患者1例および対照患者1例のCSFサンプルのA 分画は、シランリンカーで検出された場合と同様の識別特性を示し、 1643 cm^{-1} の分類閾値の有効性が証明された(図12)。

【実施例5】

【0093】

ブロックされないセンサー素子は、A ペプチドおよび2つの選択された血液/CSF成分について受容性である。

3つのセンサー素子を、研磨、シラン化し、A ペプチドに対する $1\text{ E }8$ 抗体で飽和させた。2つは、非特異的結合抗体分子をすすぎ落としした後に用い、1つは、カゼイン溶液でブロック後、すすいだ。1つのブロックされないセンサー上において、 γ -シヌクレインを 20 ng/ml の濃度でインキュベートした後、すすぎ、 A_{1-40} ペプチドを 15 ng/ml の濃度でインキュベートした後、すすいだ。他方のブロックされないセンサーを、 $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度のアルブミンと共にインキュベートした後、すすぎ、 A_{1-40} ペプチドを 15 ng/ml の濃度でインキュベートした後、すすいだ。センサー素子は、体液中で予想されるような濃度において、 γ -シヌクレインおよびアルブミンに対して受容性であった(図13A)。A ペプチドに対する結合部位は、いずれのケースにおいてもフリーであったので、結合は非特異的であり、規定のA ペプチドシグナルが記録された。

【0094】

ブロックされたセンサーを 20 ng/ml の γ -シヌクレイン溶液と共にインキュベートした後、すすいだ。センサー表面への結合は観測されなかった(図13B)。連続して、センサーを $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ のアルブミンと共にインキュベートした後、すすいだ。やはりアルブミンシグナルは観測されなかった。 15 ng/ml の A_{1-40} ペプチド溶液と共にインキュベートしたときに限り、すすぎ後に規定のシグナルが得られた(図13B)。

【実施例6】

【0095】

ブロックステップを経ないセンサーは診断に適用できない。

2つのセンサー素子を調製した：カゼインブロックステップを経たセンサーと経ないセンサー。AD患者のCSFの一定分量を、A アミドIバンド解析を目的として、センサー上でインキュベートした。ブロックされない表面で記録されたアミドIバンド強度は、はるかに高い、したがってより非特異性の結合を示した(図14)。ブロックされない場合、バンド位置は、もはや疾患状態と相関関係を有さない：ブロックされないセンサーの読み取り値は、 1649 cm^{-1} における β -ヘリックス型の立体構造が支配的であることを示した一方、ブロックされたセンサーの読み取り値は、 β -シートの富化を示し、

10

20

30

40

50

A の最大アミドIの頻度は、 1639 cm^{-1} であった。したがって、より高い最大頻度は、CSF内のヘリックス型タンパク質の支配的なバックグラウンドが、非特異的に検出されたことに起因する。

【実施例7】

【0096】

シラン化、抗体の機能化、カゼインを用いたブロック、調整後の細胞培養培地を用いたインキュベーション、および非特異的結合タンパク質のすすぎ落としにより調製されたセンサー素子を用いた場合、規定のアミドバンドパターンが認められた：アミドIIバンドの方が、アミドIバンドよりも、その強度は弱かった（図15A）。蛍光制御解析により、Aペプチド結合が確認された（図4）。

10

【0097】

対照的に、ブロッキング用としてカゼインの代わりにアルブミンを用いたとき、同一サンプルの別の一定分量を用いて記録されたアミドバンドパターンは、より高いアミドII強度を示した。全体的なアミドI強度は、約100%まで高まった。したがって、アルブミンが、さらに定義することのできないタンパク質、および $1600\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ の間の吸収により特徴づけられるその他の物質に対する追加の非特異的結合部位をもたらしたことは明白である（図15B）。

【実施例8】

【0098】

1E8ならびにオリゴマーおよび線維型に対して特異的な抗体のCSF解析への適用

20

例示的に示された抗体1E8およびA8978は、モノマー型および線維型のAペプチドの両方を感知する（図6A）。診断を目的とした場合、複合的な体液を分析したとき、セントラルAエピトープを感知するA8978抗体の特異性を強化すれば、1E8抗体よりも有利であることが証明された。1E8は、sAPP α （ β -セクレターゼによるプロセッシング後の、アミロイド前駆体タンパク質のN末端フラグメント（APP））と、そのN末端Aエピトープに起因して交差反応することが公知である。APP α の疾患関連の立体構造はまだ報告されておらず、シグナルの重複が、明確なセンサー読み取りを妨げている（図16A）。ADを対照のAペプチド立体構造から厳密に分離するには、A8978のように、セントラルエピトープ抗体の特異性強化を必要とする（図9、10、および11）。

30

【0099】

オリゴマー（図16B）または線維型（図16C）に対する立体構造特異的抗体を用いても、疾患特異的サンプル特性を示さなかった。両立体構造は、AD患者および対照患者のCSFサンプル中に存在した。したがって、意図するような診断システムは、エピトープの立体構造に対して非特異的な抗体を用いて調製されなければならない。

【実施例9】

【0100】

血清内に存在する α -シヌクレイン解析用センサーのパーキンソン病（PD）への適用

センサー素子を、一般的に調製、研磨、およびシラン化した。 α -シヌクレイン特異的機能化の場合、4B12モノクローナル抗体（Covance、BioLegend Inc.社）をセンサー上に固定化し、その後カゼインでブロックした。血清中に存在する α -シヌクレインについて記録されたスペクトルでは、PDサンプルのアミドIバンド最大値頻度は 1641 cm^{-1} であり、対照患者サンプルについて記録された 1646 cm^{-1} と比較して、明らかな下方シフトを示した。これにより、血液サンプルを対象とする、ラベルフリーのPD診断用のセンサーの適用可能性が示される（図17）。

40

【 図 1 】

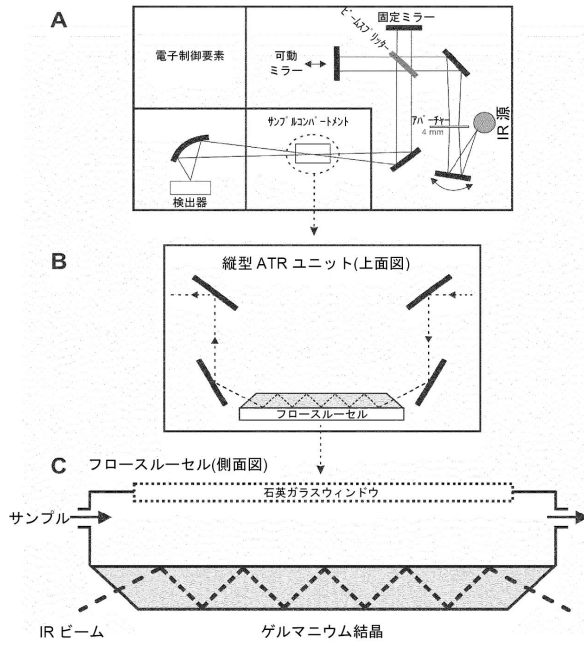


図 1

【 図 2 】

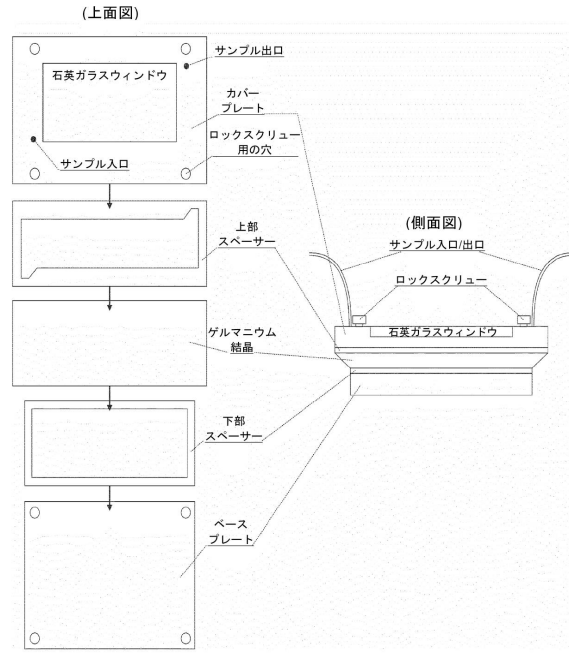


図 2

【 図 3 】

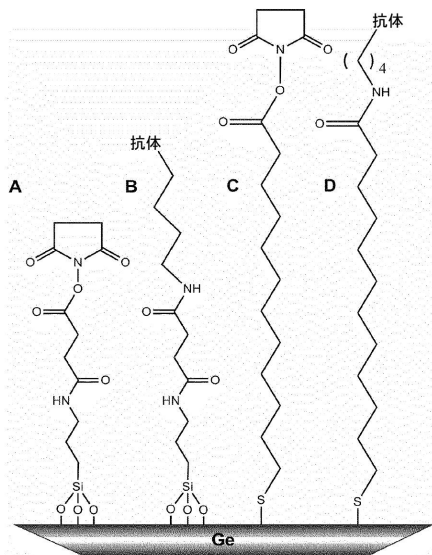


図 3

【 図 4 】

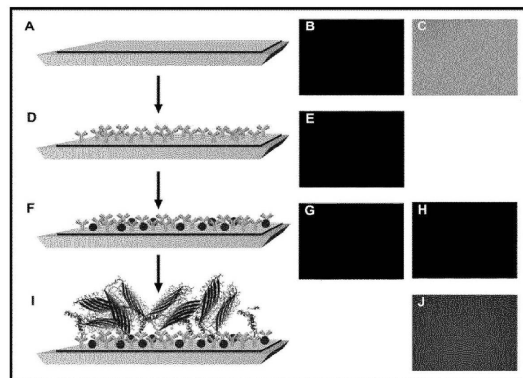


図 4

【 図 5 】

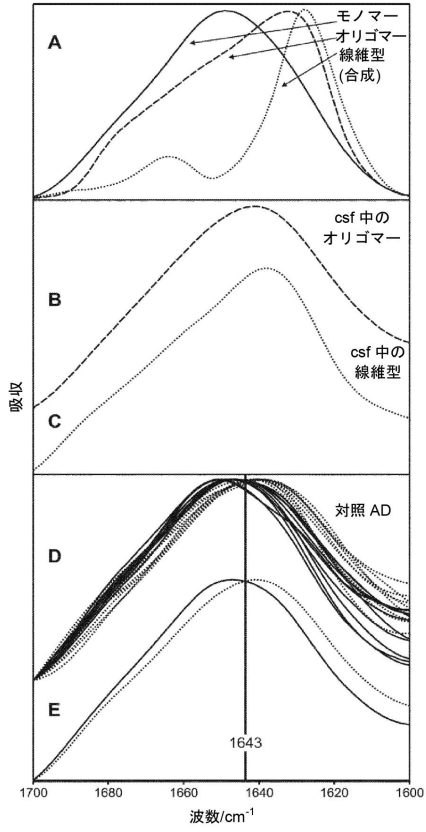


図 5

【 図 7 】

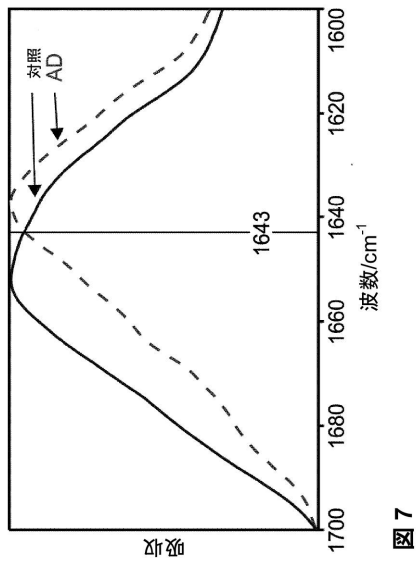


図 7

【 図 6 】

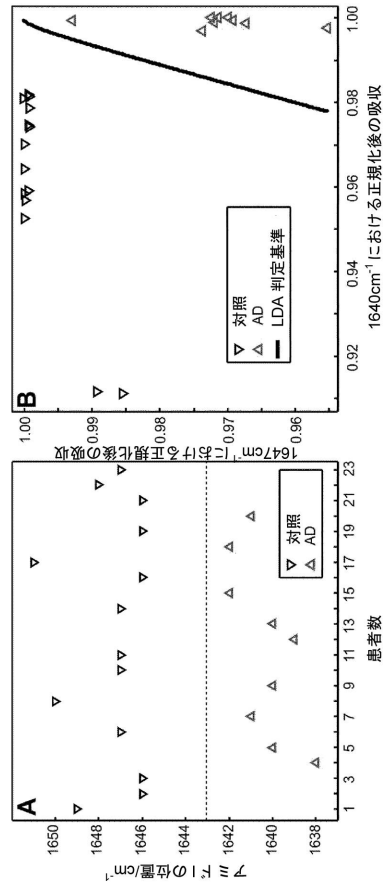


図 6

【 図 8 】

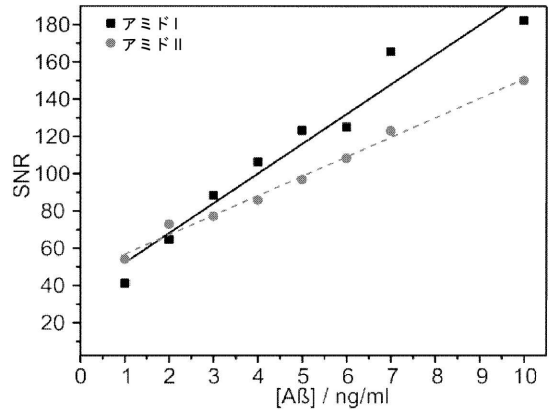


図 8

【 図 9 】

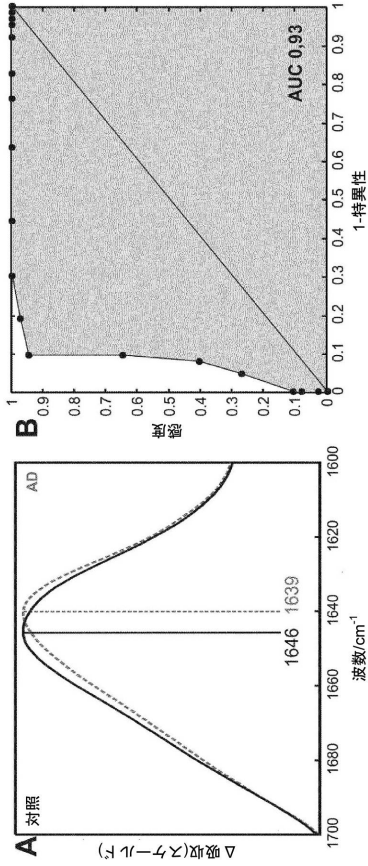


図 9

【 図 10 】

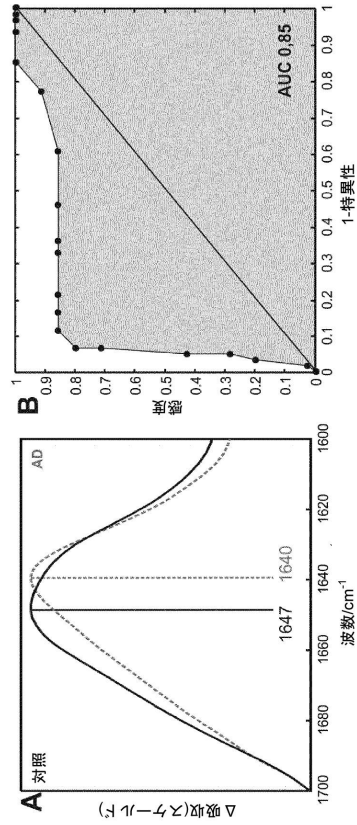


図 10

【 図 11 】

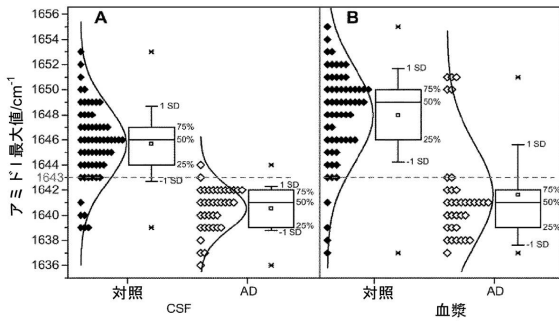


図 11

【 図 12 】

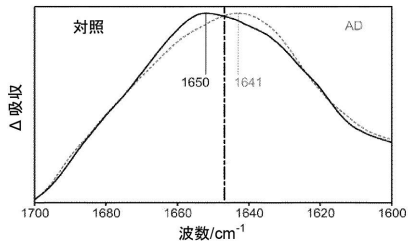


図 12

【 図 13 】

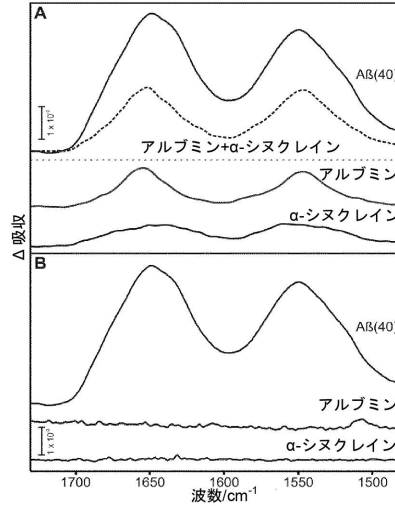


図 13

【 図 14 】

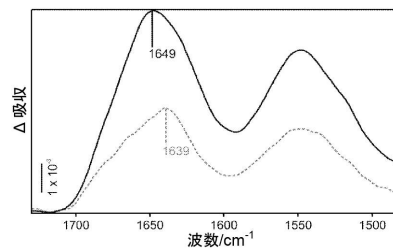
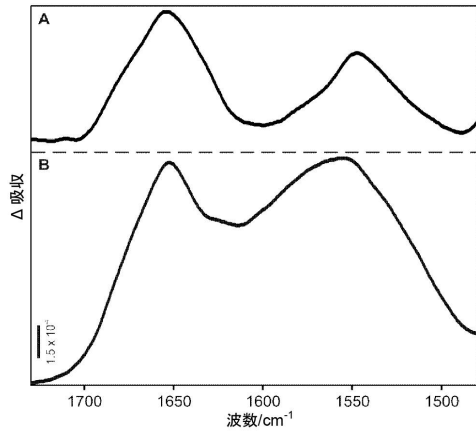


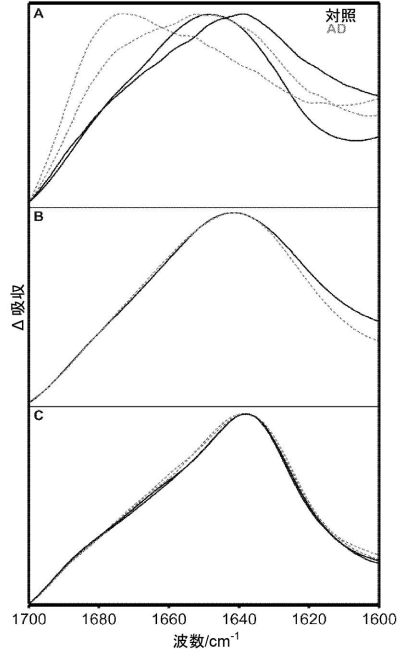
図 14

【 15 】



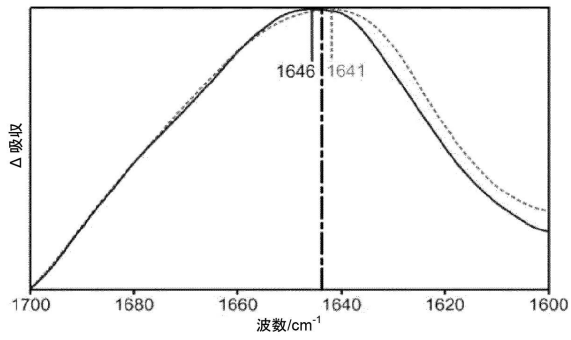
15

【 16 】



16

【 17 】



17

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 21/64 (2006.01) G 0 1 N 21/64 F
G 0 1 N 21/78 (2006.01) G 0 1 N 21/78 C
- (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 4 8 1 4 9 , グリムシュトラッセ 5
- (72)発明者 ウィルトファン, ジェンス
 ドイツ連邦共和国 エッセン 4 5 1 4 3 , エジンハルドルヘ 2 0
- (72)発明者 オレッシュ, ジュリアン
 ドイツ連邦共和国 ウィッテン 5 8 4 5 2 , レッシングシュトラッセ 6
- (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 , ランドウエルウエグ 4 4
- (72)発明者 コットリング, カーステン
 ドイツ連邦共和国 ボーフム 4 4 8 9 2 , イゲルシュトラッセ 1 1

審査官 磯田 真美

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2004/0121491 (US, A1)
 欧州特許出願公開第02490029 (EP, A1)
 KLEIREN, E. et al., Development of a quantitative and conformation-sensitive ATR-FTIR biosensor for Alzheimer's disease: The effect of deuteration on the detection of the A peptide, Spectroscopy, 2010年, Vol. 24, pp. 61-66
 VOUE, M. et al., Biochemical Interaction Analysis on ATR Devices: A Wet Chemistry Approach for Surface Functionalization, Langmuir, 2007年, Vol. 23, pp. 949-955
 DEVOUGE, S. et al., Surface functionalization of germanium ATR devices for use in FTIR-biosensors, Journal of Colloid and Interface Science, 2009年, Vol. 332, pp. 408-415
 SCHATNER, J. et al., Universal Method for Protein Immobilization on Chemically Functionalized Germanium Investigated by ATR-FTIR Difference Spectroscopy, Journal of the American Society, 2013年 2月, Vol. 135, pp. 4079-4087
 MORGADO, I. et al., Molecular basis of α -amyloid oligomer recognition with a conformational antibody fragment, PNAS, 2012年 7月31日, Vol. 109, No. 31, pp. 12503-12508
 OLSZTYNSKA-JANUS, S. et al., Spectroscopic techniques in the study of human tissues and their components. Part I: IR spectroscopy, Acta of Bioengineering and Biomechanics, 2012年, Vol. 14, No. 3, pp. 101-115
 ELFRINK, K. et al., Structural changes of membrane-anchored native PrPC, PNAS, 2008年 8月 5日, Vol. 105, No. 31, pp. 10815-10819

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
 C A p l u s (S T N)

专利名称(译)	用于3D结构和二级结构分析的生物传感器		
公开(公告)号	JP6590837B2	公开(公告)日	2019-10-16
申请号	JP2016569009	申请日	2015-02-12
[标]发明人	ゲルワートクラウド ウィルトファンジェンス オレッシュジュリアン ナバースアンドレアス シャルトナージョナス コットリングカーステン		
发明人	ゲルワート,クラウド ウィルトファン,ジェンス オレッシュ,ジュリアン ナバース,アンドレアス シャルトナー,ジョナス コットリング,カーステン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/553 G01N21/35 G01N21/552 G01N21/64 G01N21/78		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.525.E G01N33/553 G01N21/35 G01N21/552 G01N21/64.F G01N21/78.C		
代理人(译)	小林 浩 荒井刚 鈴木康仁		
優先権	2014155138 2014-02-14 EP		
其他公开文献	JP2017509900A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本文提供了一种用于构象和二级结构分析的生物传感器，特别是用于复杂混合物中单个选择的蛋白质的直接非侵入性定性二级结构分析的生物传感器，例如。体液，通过振动光谱法。为了进行分析，不需要通过特殊的制备程序分离，浓缩或预处理选定的物质。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6590837号 (P6590837)
(45) 発行日 令和1年10月16日(2019.10.16)	(24) 登録日 令和1年9月27日(2019.9.27)	
(51) Int. Cl.	F I	
G O I N 33/53 (2006.01)	G O I N 33/53 D	
G O I N 33/543 (2006.01)	G O I N 33/543 5 2 5 E	
G O I N 33/553 (2006.01)	G O I N 33/553	
G O I N 21/35 (2014.01)	G O I N 21/35	
G O I N 21/552 (2014.01)	G O I N 21/552	
請求項の数 22 (全 28 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2016-569009(P2016-569009)	(73) 特許権者 516243652	
(86) (22) 出願日 平成27年2月12日(2015.2.12)	ルーラー-ウニベルシタット ホーフム	
(65) 公表番号 特表2017-509800(P2017-509800A)	ドイツ連邦共和国 ホーフム 4 4 8 0 1	
(43) 公表日 平成29年4月6日(2017.4.6)	, ウニベルシタットシュトラッセ 1 5 0	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2015/052945	(73) 特許権者 516243663	
(87) 国際公開番号 W02015/121339	ウニベルシタット デュースブルグ-エッ	
(87) 国際公開日 平成27年8月20日(2015.8.20)	セン	
審査請求日 平成29年12月21日(2017.12.21)	ドイツ連邦共和国 4 5 1 4 1 エッセン	
(31) 優先権主張番号 14155138.2	, ウニベルシタットシュトラッセ 2	
(32) 優先日 平成26年2月14日(2014.2.14)	(74) 代理人 100092783	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁(EP)	弁理士 小林 浩	
	(74) 代理人 100120134	
	弁理士 大森 規雄	
	(74) 代理人 100187964	
	弁理士 新井 剛	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 立体構造および二次構造解析のためのバイオセンサー		