



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3482210 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
G01N 33/68 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2021.09.27
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2021.06.23
(86)	European Application Nr.	17755235.3
(86)	European Filing Date	2017.07.06
(87)	The European Application's Publication Date	2019.05.15
(30)	Priority	2016.07.06, US, 201662359139 P
(84)	Designated Contracting States:	AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
	Designated Extension States:	BA ; ME
(73)	Proprietor	Prothena Biosciences Limited, 77 Sir John Rogerson's Quay, Block C Grand Canal Docklands, Dublin 2, D02 VK60, Irland
(72)	Inventor	BARBOUR, Robin, 250 Normandy Lane, Walnut Creek, California 94598, USA KIRIK, Deniz, Vipemollevagen 103, 224 66 Lund, Sverige LANDECK, Natalie Regina, Eichfeld 6, 69427 Madau, Tyskland
(74)	Agent or Attorney	CURO AS, Vestre Rosten 81, 7075 TILLER, Norge

(54)	Title	ASSAY FOR DETECTING TOTAL AND S129 PHOSPHORYLATED ALPHA-SYNUCLEIN
------	-------	--

(56)	References Cited:	WO-A2-2005/047860 MARGOT FOURNIER ET AL: "Parkin depletion delays motor decline dose-dependently without overtly affecting neuropathology in [alpha]-synuclein transgenic", BMC NEUROSCIENCE, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 14, no. 1, 5 November 2013 (2013-11-05), page 135, XP021165883, ISSN: 1471-2202, DOI: 10.1186/1471-2202-14-135 NOUR K. MAJBOUR ET AL: "Oligomeric and phosphorylated alpha-synuclein as potential CSF biomarkers for Parkinson's disease", MOLECULAR NEURODEGENERATION, vol. 11, no. 1, 19 January 2016 (2016-01-19), XP055407319, DOI: 10.1186/s13024-016-0072-9 JINXIA ZHOU ET AL: "Changes in the solubility and phosphorylation of [alpha]-synuclein over the course of Parkinson's disease", ACTA NEUROPATHOLOGICA, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 121, no. 6, 13 March 2011 (2011-03-13), pages 695-704, XP019906863, ISSN: 1432-0533, DOI: 10.1007/S00401-011-0815-1 ANDERSON JOHN P ET AL: "Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease", JOURNAL OF
------	-------------------	--

BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US, vol. 281, no. 40, 6 October 2006 (2006-10-06), pages 29739-29752, XP002500217, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M600933200 [retrieved on 2006-07-17]
NATALIE LANDECK ET AL: "A novel multiplex assay for simultaneous quantification of total and S129 phosphorylated human alpha-synuclein", MOLECULAR NEURODEGENERATION, vol. 11, no. 1, 22 August 2016 (2016-08-22), XP055407399, DOI: 10.1186/s13024-016-0125-0

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. *In vitro* framgangsmåte for samtidig detektering av total alfa-synuclein og S129-fosforylert (pS129) alfa-synuclein, hvilken framgangsmåte omfatter å:

a) kontakte en prøve med:

5 (i) et donorkompleks som omfatter et antistoff som spesifikt binder til alfa-synuclein bundet til en bærer og en donormarkør, som lett eksiteres til å aktivere oksygen for å produsere separat oksygen;

10 (ii) et første akseptorkompleks for å detektere pS129-alfa-synuclein som omfatter et antistoff som binder til pS129-alfa-synuclein, hvori antistoffet har en assosiasjonskonstant som er minst fem ganger større for pS129-alfa-synuclein enn ikke-fosforylert alfa-synuclein, bundet til en bærer og en første akseptormarkering; hvori dersom pS129-alfa-synuclein er til stede i prøven, antistoffer av donorkomplekset og første akseptorkomplekset binder til pS129-alfa-synucleidet som danner en første lagdeling, hvori donormarkøren er lett eksiterbar for å
15 produsere separat oksygen for å aktivere den første akseptormarkeringen for å produsere et første signal;

20 (iii) et andre akseptorkompleks for å detektere total alfa-synuclein som omfatter et antistoff som binder til alfa-synuclein uavhengig av S129-fosforylering, hvori antistoffet er bundet til en bærer og en andre akseptormarkering; hvori dersom total alfa-synuclein er til stede i prøven, antistoffet er donorkomplekset og det andre akseptorkomplekset binder til total alfa-synuclein som danner en andre lagdeling hvori donormarkøren er lett eksiterbar for å produsere separat oksygen for å aktivere den andre akseptormarkeringen for å produsere et andre signal;

25 (b) eksitere donormarkøren med et lys for å aktivere oksygen for å produsere separat oksygen, for derved å produsere det første signalet dersom pS129-alfa-synuclein er til stede og det andre signalet dersom total alfa-synuclein er til stede; og

(c) detektere det første og andre signalet, dersom til stede, for å indikere nærvær av henholdsvis pS129-alfa-synuclein og total alfa synuclein.

2. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvori det andre signalet detekteres før det første signalet.

30 3. Framgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, hvori kontakten mellom prøven med donorkomplekset omfatter kontakt av prøven med bæreren bundet til donormarkøren for donorkomplekset, hvori bæreren i tillegg er bundet til streptavidin og antistoffet for donorkomplekset, hvori antistoffet er

bundet til biotin, hvori streptavidinet binder til biotinet som danner donorkomplekset i prøven til for derved å kontakte prøven.

4. Framgangsmåte ifølge ett av kravene foran, hvori prøven kontaktes med det første og andre akseptorkomplekset og antistoffet for donorkomplekset bundet til biotin, inkubering av prøven, og
5 deretter kontakt av prøven med bæreren som i tillegg er bundet til streptavidin, hvori streptavidinet binder til biotinet som danner donorkomplekset i prøven for derved å kontakte prøven.

5. Framgangsmåte ifølge ett av kravene foran, utført kvantitativt; eller utført kvantitativt, hvori det første signalet indikerer en mengde av pS129-alfa-synuclein og det andre signalet indikerer en mengde av totalt alfa-synuclein.

10 6. Framgangsmåte ifølge ett av kravene foran, hvori donorkomplekset, det første akseptorkomplekset og det andre akseptorkomplekset kontaktes med prøven samtidig; eller hvori det første og andre akseptorkomplekset kontaktes med prøven før donorkomplekset.

7. Framgangsmåte ifølge ett av kravene foran, hvori antistoffet for det første akseptorkomplekset spesifikt binder til en epitop av fosforylert synuclein i restene 123-134, valgfritt hvori antistoffet for
15 det første akseptorkomplekset er 11A5 (ATCC Tilgangsnummer PTA-8222).

8. Framgangsmåte ifølge ett av kravene foran, hvori:

antistoffet av donorkomplekset spesifikt binder til en epitop i rester 103-108 av alfa-synuclein, valgfritt hvori antistoffet ved donorkomplekset er 4B12; eller

20 hvori antistoffet av donorkomplekset spesifikt binder til en epitop i rester 40-55 av alfa-synuclein, valgfritt hvori antistoffet av donorkomplekset er 23E8 (ATCC Tilgangsnummer PTA-122711); eller

hvori antistoffet ved donorkomplekset spesifikt binder til en epitop i rester 91-97 av alfa-synuclein, valgfritt hvori antistoffet er 1H7 (ATCC Tilgangsnummer PTA-8220); eller

25 hvori antistoffet for donorkomplekset spesifikt binder til en epitop i rester 109-120 av alfa-synuclein, valgfritt hvori antistoffet er 5C12 (ATCC Tilgangsnummer PTA-9197); eller

hvori antistoffet for donorkomplekset spesifikt binder til en epitop i rester 115-122 av alfa-synuclein, valgfritt hvori antistoffet er LB509; eller

30 hvori antistoffet for donorkomplekset er 4B12, LB509, 1H7 (ATCC Tilgangsnummer PTA-8220), 5C12 (ATCC Tilgangsnummer PTA-9197) eller 23E8 (ATCC Tilgangsnummer PTA-122711).

9. Framgangsmåte ifølge ett av kravene foran, hvori:

antistoffet ved det andre akseptorkomplekset spesifikt binder til en epitop i rester 115-122 av alfa-synuclein, valgfritt hvori antistoffet ved det andre akseptorkomplekset er LB509; eller

5 hvori antistoffet ved det andre akseptorkomplekset spesifikt binder til en epitop i rester 91-97 av alfa-synuclein, valgfritt hvori antistoffet ved det andre akseptorkomplekset er 1H7 (ATCC Tilgangsnummer PTA-8220); eller

hvori antistoffet ved det andre akseptorkomplekset spesifikt binder til en epitop i rester 109-122 av alfa-synuclein, valgfritt hvori antistoffet av det andre akseptorkomplekset er 5C12 (ATCC Tilgangsnummer PTA-9197); eller

10 hvori antistoffet ved det andre akseptorkomplekset spesifikt binder til en epitop i rester 40-55 av alfa-synuclein, valgfritt hvori antistoffet er 23E8 (ATCC Tilgangsnummer PTA-122711); eller

15 hvori antistoffet ved det andre akseptorkomplekset er 4B12, LB509, 1H7 (ATCC Tilgangsnummer PTA-8220), 5C12 (ATCC Tilgangsnummer PTA-9197) eller 23E8 (ATCC Tilgangsnummer PTA-122711).

10. Framgangsmåte ifølge krav 9, hvori antistoffet for donorkomplekset er 4B12 og antistoffet for det andre akseptorkomplekset er LB509, 1H7 (ATCC Tilgangsnummer PTA-8220), 5C12 (ATCC Tilgangsnummer PTA-9197), eller 23E8 (ATCC Tilgangsnummer PTA-122711); eller hvori antistoffet for donorkomplekset er 23E8 (ATCC Tilgangsnummer PTA-122711) og antistoffet for det andre akseptorkomplekset er LB509, 1H7 (ATCC Tilgangsnummer PTA-8220), 5C12 (ATCC Tilgangsnummer PTA-9197), eller 4B12; eller hvori antistoffet for donorkomplekset er 5C12 (ATCC Tilgangsnummer PTA-9197) og antistoffet for det andre akseptorkomplekset er 23E8 (ATCC Tilgangsnummer PTA-122711) eller 1H7 (ATCC Tilgangsnummer PTA-8220).

11. Framgangsmåte ifølge ett av kravene foran, hvori antistoffet ved donorkomplekset er 4B12, 25 antistoffet ved det første akseptorkomplekset er 11A5 (ATCC Tilgangsnummer PTA-8222), og antistoffet ved det andre akseptorkomplekset er LB509.

12. Framgangsmåte ifølge ett av kravene foran, hvori bærerene for donorkomplekset, det første akseptorkomplekset, og det andre akseptorkomplekset er kuler.

13. Framgangsmåte ifølge ett av kravene foran, hvori den første akseptormarkeringen omfatter 30 Europium, Terbium, Samarium, eller Gadolinium; og/eller hvori den andre akseptormarkeringen omfatter Europium, Terbium, Samarium, eller Gadolinium;

valgfritt hvori den første akseptormarkeringen omfatter Europium og den andre akseptormarkeringen omfatter Terbium.

14. Framgangsmåte ifølge ett av kravene foran, hvori

(i) prøven er et vev fra et menneske; eller

5 (ii) prøven er fra en transgen mus med et transgent uttrykkende humant alfa-synuclein.

15. Framgangsmåte ifølge ett av kravene foran, hvori prøven er en kroppsvæske, valgfritt cerebrospinalt fluid (CSF) fra et menneske.

16. Framgangsmåte ifølge ett av kravene foran, hvori prøven er en hjerne, hud, eller annet organ-homogenisat fra et menneske, en vill-type eller et transgent dyr; eller

10 hvori prøven er et medium som anvendes til å kultivere celler, valgfritt hvori cellene uttrykker rekombinant humant alfa-synuclein.