

(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2018-503807

(P2018-503807A)

(43) 公表日 平成30年2月8日(2018.2.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A D	4 H O 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 B	
CO 7 K 14/47 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5	
	GO 1 N 33/543 5 7 5	
	CO 7 K 14/47	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)		

(21) 出願番号 特願2017-530194 (P2017-530194)
 (86) (22) 出願日 平成27年10月6日 (2015.10.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年6月16日 (2017.6.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2015/010558
 (87) 国際公開番号 WO2016/088999
 (87) 国際公開日 平成28年6月9日 (2016.6.9)
 (31) 優先権主張番号 10-2014-0170608
 (32) 優先日 平成26年12月2日 (2014.12.2)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(71) 出願人 517193291
 ビーブルバイオ, インコーポレーテッド
 大韓民国 1 3 4 8 7 ソンナムーシ
 ンダンーグ ビーディーシー Cードン
 6階 パンギョーロ 2 4 2
 (74) 代理人 100107515
 弁理士 廣田 浩一
 (74) 代理人 100107733
 弁理士 流 良広
 (74) 代理人 100115347
 弁理士 松田 奈緒子
 (74) 代理人 100163038
 弁理士 山下 武志

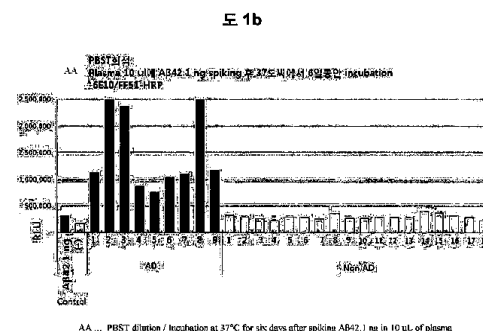
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 凝集形-形成ポリペプチドの凝集形を検出する方法

(57) 【要約】

本発明は、(a) 分析対象の生試料に(i) 凝集形-形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型、(ii) 前記凝集形-形成ポリペプチドの疎水性欠失体(hydrophobic deleted derivative of aggregate-forming polypeptide)、または(iii) 前記凝集形-形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型と前記凝集形-形成ポリペプチドの疎水性欠失体とをスパイク(spiking)する段階と、(b) 前記段階(a)の結果物をインキュベーションして前記凝集形-形成ポリペプチドの凝集形を追加的に形成する段階と、(c) 前記段階(b)の結果物に、前記凝集形-形成ポリペプチドの凝集形に結合する結合剤にシグナル発生標識が結合された結合剤-標識を接触させる段階と、(d) 前記凝集形-形成ポリペプチドの凝集形に結合された結合剤-標識から発生するシグナルを検出する段階と、を含む、生試料の凝集形-形成ポリペプチドの凝集形を検出する方法に関する。

【選択図】 図 1 b



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 分析対象の生試料に (i) 凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型、(ii) 前記凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体 (hydrophobic deleted derivative of aggregate-forming polypeptide)、または (iii) 前記凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型と前記凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体とをスパイク (spiking) する段階と、

(b) 前記段階 (a) の結果物をインキュベーションして前記凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形を追加的に形成する段階 (ここで、前記インキュベーションは、前記スパイクした (i)、(ii) または (iii) が前記生試料によってマルチマー化できるほど十分な時間行う) と、

(c) 前記段階 (b) の結果物に、前記凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形に結合する結合剤にシグナル発生標識が結合された結合剤 - 標識を接触させる段階と、

(d) 前記凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形に結合された結合剤 - 標識から発生するシグナルを検出する段階と、

を含む、生試料の凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形を検出する方法。

【請求項 2】

前記スパイクした (i)、(ii) または (iii) をマルチマー化させる前記生試料は、前記凝集形 - 形成ポリペプチドのマルチマー型の係わった疾患を有する人間の生試料であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記生試料によってマルチマー化できるほど十分なインキュベーション時間は、凝集形 - 形成ポリペプチドのマルチマー型の係わった疾患を有する人間の生試料を利用して発生したシグナルを、正常の人間の生試料を利用して発生したシグナルより 1.5 ~ 20 倍大きくするに十分な時間であることを特徴とする、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記生試料は、血液であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記血液試料は、血漿であることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記凝集形 - 形成ポリペプチドは、A β ペプチド、tau タンパク質、プリオン、 α -シヌクレイン、Ig 軽鎖、血清アミロイド A、トランスサイレチン、シスタチン C、 β 2-ミクログロブリン、ハンチンチン、スーパーオキシドディスムターゼ、セルピン及びアミリンからなる群から選択されたことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記凝集形 - 形成ポリペプチドは、A β ペプチド、tau タンパク質または α -シヌクレインであることを特徴とする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型は、配列番号 1 のアミノ酸配列からなる A β ペプチドまたは配列番号 2 のアミノ酸配列からなる α -シヌクレインであることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体は、配列番号 1 のアミノ酸配列の 37 番目アミノ酸残基乃至 42 番目アミノ酸残基を含む A $\beta_{deleted}$ ペプチドであることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 A $\beta_{deleted}$ ペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列の 29 番目アミノ酸残基乃至 42 番目アミノ酸残基を含むペプチドであることを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 11】

前記 A β d e l e t e ペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列の 9 番目アミノ酸残基乃至 42 番目アミノ酸残基を含むペプチドであることを特徴とする、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記段階 (a) の結果物に緩衝液をさらに添加することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記緩衝液は、生試料に対して 3 ~ 15 倍 (v/v) に添加されることを特徴とする、請求項 12 に記載の方法。

10

【請求項 14】

前記緩衝液は、非イオン性界面活性剤含有リン酸塩緩衝液であることを特徴とする、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

前記段階 (b) の凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形の追加的な形成は、前記段階 (a) の結果物を温度 1 ~ 50 でインキュベーションして行うことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記段階 (b) の凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形の追加的な形成は、前記段階 (a) の結果物を 1 日 ~ 12 日間インキュベーションして行うことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 17】

前記段階 (c) 及び (d) は、

(c-1) 前記凝集形を捕獲 (capturing) する前記凝集形 - 形成ポリペプチド上のエピトープを認識する捕獲抗体に、前記段階 (b) の結果物を接触させる段階と、

(c-2) 前記凝集形 - 形成ポリペプチド上のエピトープを認識する検出抗体に、前記捕獲された凝集形を接触させる段階と、

(c-3) 凝集形 - 検出抗体複合体を検出する段階と、

を含む方法を行うことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記検出抗体は、前記段階 (c-1) のエピトープと同一なまたはオーバーラップされたエピトープを認識する検出抗体であることを特徴とする、請求項 17 に記載の方法。

30

【請求項 19】

前記捕獲抗体は、固体基質に結合されたことを特徴とする、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 20】

前記検出抗体は、検出可能な信号を生成させる標識を有することを特徴とする、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

前記検出抗体に結合された標識は、化合物標識、酵素標識、放射能標識、蛍光標識、発光標識、化学発光標識及び FRET 標識であることを特徴とする、請求項 20 に記載の方法。

40

【請求項 22】

(i) 凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型、(ii) 前記凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体 (hydrophobic deleted derivative of aggregate-forming polypeptide)、または (iii) 前記凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型と前記凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体と、を含む、生試料の凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形を検出するためのキット。

【請求項 23】

前記生試料は、血液であることを特徴とする、請求項 22 に記載のキット。

50

【請求項 24】

前記血液試料は、血漿であることを特徴とする、請求項 23 に記載のキット。

【請求項 25】

前記凝集形 - 形成ポリペプチドは、A β ペプチド、t a u タンパク質、プリオン、 α - シヌクレイン、I g 軽鎖、血清アミロイド A、トランスサイレチン、シスタチン C、 β 2 - ミクログロブリン、ハンチンチン、スーパーオキシドディスムターゼ、セルピン及びアミリンからなる群から選択されたことを特徴とする、請求項 22 に記載のキット。

【請求項 26】

前記凝集形 - 形成ポリペプチドは、A β ペプチド、t a u タンパク質または α - シヌクレインであることを特徴とする、請求項 25 に記載のキット。

10

【請求項 27】

前記凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型は、配列番号 1 のアミノ酸配列からなる A β ペプチドであることを特徴とする、請求項 22 に記載のキット。

【請求項 28】

前記凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体は、配列番号 1 のアミノ酸配列の 37 番目アミノ酸残基乃至 42 番目アミノ酸残基を含む A β d e l e t e ペプチドであることを特徴とする、請求項 22 に記載のキット。

【請求項 29】

前記 A β d e l e t e ペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列の 29 番目アミノ酸残基乃至 42 番目アミノ酸残基を含むペプチドであることを特徴とする、請求項 28 に記載のキット。

20

【請求項 30】

前記 A β d e l e t e ペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列の 9 番目アミノ酸残基乃至 42 番目アミノ酸残基を含むペプチドであることを特徴とする、請求項 29 に記載のキット。

【請求項 31】

前記キットは、緩衝液をさらに含むことを特徴とする、請求項 22 に記載のキット。

【請求項 32】

前記緩衝液は、非イオン性界面活性剤含有リン酸塩緩衝液であることを特徴とする、請求項 31 に記載のキット。

30

【請求項 33】

前記キットは、凝集形 - 形成ポリペプチド上のエピトープを認識する捕獲抗体と、前記捕獲抗体が認識する前記エピトープを認識する検出抗体とをさらに含むことを特徴とする、請求項 22 に記載のキット。

【請求項 34】

前記検出抗体は、前記捕獲抗体が認識する前記エピトープと同一なまたはオーバーラップされたエピトープを認識する検出抗体であることを特徴とする、請求項 33 に記載のキット。

【請求項 35】

前記捕獲抗体は、固体基質に結合されたことを特徴とする、請求項 33 に記載のキット。

40

【請求項 36】

前記検出抗体は、検出可能な信号を生成させる標識を有することを特徴とする、請求項 33 に記載のキット。

【請求項 37】

前記検出抗体に結合された標識は、化合物標識、酵素標識、放射能標識、蛍光標識、発光標識、化学発光標識及び F R E T 標識であることを特徴とする、請求項 36 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

本特許出願は、2014年12月02日に大韓民国特許庁に提出された大韓民国特許出願第10-2014-0170608号に対して優先権を主張し、前記特許出願の開示事項は、本明細書に参照として取り込まれる。

【 0 0 0 2 】

本発明は、生試料 (b i o s a m p l e) の凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形を検出する方法またはキットに関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

まず、タンパク質を構成するポリペプチドは、マルチマーを形成して、機能的なタンパク質をなす場合もあるが、正常な状態では、モノマーとして存在していて、非正常な状態 (例えば、ミスフォールディングに転換) になると、マルチマーを形成して凝集し、疾病を誘発する場合が多い (非特許文献1~2)。

【 0 0 0 4 】

例えば、タンパク質の非正常な凝集またはミスフォールディングに係わる疾患または病気は、アルツハイマー病、クロイツフェルト - ヤコブ病、スポンジフォーム脳疾患 (S p o n g i f o r m e n c e p h a l o p a t h i e s)、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症 (A m y o t r o p h i c l a t e r a l s c l e r o s i s)、セルピン欠乏症 (S e r p i n d e f i c i e n c y)、肺気腫 (e m p h y s e m a)、肝硬変 (c i r r h o s i s)、第II型糖尿病、一次全身性アミロイドーシス、二次全身性アミロイドーシス、前頭側頭葉性痴呆 (F r o n t o - t e m p o r a l d e m e n t i a s)、老人性全身性アミロイドーシス、家族性アミロイドポリニューロパチー (f a m i l i a l a m y l o i d p o l y n e u r o p a t h y)、遺伝性大脳アミロイド血管症 (h e r e d i t a r y c e r e b r a l a m y l o i d a n g i o p a t h y) 及び血透析関連アミロイドーシスを含む。

【 0 0 0 5 】

これらの疾患または疾病の有無や進行程度を測定するにあたって、抗原の量が試料中に非常に少ないか、あるいは抗原の大きさが非常に小さくて、測定し難いか、あるいは体中の抗原の量と試料中の抗原の量が比例していない場合に、例えば、アルツハイマー病に与するA β (アミロイド - ベータ) も、正常人に比べ、非正常人はA β オリゴマーのレベルが高いと知られているが、血液試料内のA β オリゴマー量の検出が難しいか、血液試料内に非定型的にA β オリゴマーが存在する場合、診断が困難な場合がある。

【 0 0 0 6 】

また、測定しようとする抗原が小さすぎるか、量が少なく、sandwich ELISAを介しての疾患の診断が容易でない場合がある。

【 0 0 0 7 】

そこで、本発明者らは、患者と正常人間の診断シグナルの違い (d i f f e r e n t i a t i o n) を極大化した凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形検出方法の開発の必要性を認識した。

【 0 0 0 8 】

本明細書全体にかけて多数の論文及び特許文献が参照され、その引用が表示されている。引用された論文及び特許文献の開示内容は、その全体が本明細書に参照として取り込まれ、本発明の属する技術分野の水準及び本発明の内容がより明確に説明される。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 0 9 】

【 非特許文献1 】 M a s s i m o S t e f a n i , e t a l . , J . M o l . M e d . 81 : 678 - 699 (2003)

【 非特許文献2 】 R a d f o r d S E , e t a l . , C e l l . 97 : 291 - 298 (1999)

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明者らは、凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形を検出する新規な方法を開発するために鋭意研究し、その結果、ポリペプチドの凝集形の形成を抑制する防御システム (clearing system) または疎水性相互作用 (hydrophobic interaction) の違いを利用して、患者と正常人間の診断シグナルの違い (differentiation) を極大化した凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形検出方法を開発した。

【0011】

したがって、本発明の目的は、生試料 (biosample) の凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形を検出する方法を提供することにある。

【0012】

本発明の他の目的は、生試料 (biosample) の凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形を検出するためのキットを提供することにある。

【0013】

本発明の他の目的及び利点は、発明の詳細な説明、請求の範囲及び図面により、さらに明確にされる。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明の一様態によると、本発明は、以下の段階を含む、生試料の凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形を検出する方法を提供する：(a) 分析対象の生試料に (i) 凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型、(ii) 前記凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体 (hydrophobic deleted derivative of aggregate-forming polypeptide)、または (iii) 前記凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型と前記凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体とをスパイク (spiking) する段階と、(b) 前記段階 (a) の結果物をインキュベーションして前記凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形を追加的に形成する段階 (ここで、前記インキュベーションは、前記スパイクした (i)、(ii) または (iii) が前記生試料によってマルチマー化できるほど十分な時間行う) と、(c) 前記段階 (b) の結果物に、前記凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形に結合する結合剤にシグナル発生標識が結合された結合剤 - 標識を接触させる段階と、(d) 前記凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形に結合された結合剤 - 標識から発生するシグナルを検出する段階。

【0015】

本発明は、ポリペプチドの凝集形の形成を抑制する防御システム (clearing system) または疎水性相互作用 (hydrophobic interaction) の違いを利用して、患者と正常人間の診断シグナルの違い (differentiation) を極大化した凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形検出方法に関する。

【発明の効果】

【0016】

本発明の特徴と利点を要約すると以下のものである：

(a) 本発明は、生試料 (biosample) の凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形を検出する方法、またはキットを提供する。

(b) 本発明の方法は、生試料中の測定しようとする凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形 (抗原) の量が非常に少ないか、その大きさが非常に小さくて、測定することが難しいか、あるいは人体内凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形 (抗原) の量と生試料中の凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形 (抗原) の量が比例していない場合に、ポリペプチドの凝集形形成を抑制する防御システム (clearing system)、および / または疎水性相互作用 (hydrophobic interaction) の違いを利用して、

10

20

30

40

50

患者と正常人間の診断シグナルの違い (d i f f e r e n t i a t i o n) を極大化した。

(c) 本発明は、便利で迅速な方式で実施することができて、これは、生試料 (b i o s a m p l e) の凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形を検出する方法の自動化を可能にする。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 7 】

【図 1 a】図 1 a は、r e c . A β 1 - 4 2 スパイクした後、4 日間インキュベーション時間による A β オリゴマーの変化を示す。

【図 1 b】図 1 b は、r e c . A β 1 - 4 2 スパイクした後、6 日間インキュベーション時間による A β オリゴマーの変化を示す。

【図 1 c】図 1 c は、r e c . A β 1 - 4 2 スパイクした後、2 日、3 日、4 日、5 日間インキュベーション時間による A β オリゴマーの変化を示す。

【図 1 d】図 1 d は、r e c . A β 1 - 4 2 スパイクした後、5 日間インキュベーション、r e c . A β 1 - 4 2 を添加せずに 0 日、5 日間インキュベーション後、A β オリゴマーの変化を示す。

【図 2 a】図 2 a は、r e c . A β 9 - 4 2 ビオチンをスパイクした後、6 日間インキュベーション後、A β オリゴマーの変化を示す。

【図 2 b】図 2 b は、A β とバインディングする r e c . A β 9 - 4 2 をスパイクした後、2 日、3 日、4 日間インキュベーション後、A β オリゴマーの変化を示す。

【図 3】図 3 は、組換え α - シヌクレインをスパイクした後、インキュベーション 0 日、2 日、4 日、6 日間、経時による α - シヌクレインオリゴマーの変化を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 8 】

本明細書において、用語「凝集形 - 形成ポリペプチド」は、マルチマー型 (オリゴマー型) を形成することができるか、モノマーとの疎水性相互作用による凝集形を形成することができるポリペプチドを意味する。特に、下記構造的変化は、様々な疾患を誘発する。例えば、アルツハイマー病、クロイツフェルト - ヤコブ病、スポンジフォーム脳疾患 (S p o n g i f o r m e n c e p h a l o p a t h i e s) 、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症 (A m y o t r o p h i c l a t e r a l s c l e r o s i s) 、セルピン欠乏症 (S e r p i n d e f i c i e n c y) 、肺気腫 (e m p h y s e m a) 、肝硬変 (c i r r h o s i s) 、第 I I 型糖尿病、一次全身性アミロイドーシス、二次全身性アミロイドーシス、前頭側頭葉性痴呆 (F r o n t o - t e m p o r a l d e m e n t i a s) 、老人性全身性アミロイドーシス、家族性アミロイドポリニューロパチー (f a m i l i a l a m y l o i d p o l y n e u r o p a t h y) 、遺伝性大脳アミロイド血管症 (h e r e d i t a r y c e r e b r a l a m y l o i d a n g i o p a t h y) 及び血透析関連アミロイドーシスを含む。

【 0 0 1 9 】

一般に、前記凝集形 - 形成ポリペプチドの非凝集形は、正常であり、凝集形は、疾患、特にアルツハイマー病、クロイツフェルト - ヤコブ病またはパーキンソン病のような退行性神経疾患を誘発する。

【 0 0 2 0 】

本発明の一具現例によると、前記スパイクした (i) 、(i i) または (i i i) をマルチマー化させる前記生試料は、前記凝集形 - 形成ポリペプチドのマルチマー型の係わった疾患を有する人間の生試料であり、より好ましくは、前記生試料によってマルチマー化できるほど十分なインキュベーション時間は、凝集形 - 形成ポリペプチドのマルチマー型の係わった疾患を有する人間の生試料を利用して発生したシグナルを、正常の人間の生試料を利用して発生したシグナルより 1 . 5 ~ 2 0 倍大きくするに十分な時間である。

【 0 0 2 1 】

以下、生試料 (b i o s a m p l e) の凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形を検出する

10

20

30

40

50

ための本発明の方法を段階的に詳細に説明すると、以下のようである。

【0022】

(a) スパイクする段階

まず、本発明の方法は、分析対象の生試料に、(i)前記凝集形-形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型(オリゴマー型)、(ii)前記凝集形-形成ポリペプチドの疎水性欠失体(hydrophobic deleted derivative of aggregate-forming polypeptide)、または(iii)前記凝集形-形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型(オリゴマー型)と前記凝集形-形成ポリペプチドの疎水性欠失体とをスパイク(spiking)する段階を含む。

10

【0023】

本明細書において、用語「生試料(biosample)」は、分析しようとする有機体由来の試料を意味する。前記生試料は、生物源の細胞、組織、または生体液、または本発明によって分析できる他のメディア(medium)を意味し、これは、人間から採取した試料、動物から採取した試料、人間または動物のための食品から採取した試料を含む。好ましくは、分析対象の生試料は、血液、血清、血漿、リンパ、牛乳、尿、便、涙、唾液、精液、脳抽出物(例えば、脳均質液)、脊髄液(SCF)、虫垂、脾臓、および扁桃組織抽出物を含む、体内流体試料である。より好ましくは、前記生試料は、血液であり、最も好ましくは、血漿である。

20

【0024】

本発明の他の具現例によると、前記凝集形-形成ポリペプチドは、アルツハイマー病に關与するA β ペプチドと τ タンパク質、クロイツフェルト-ヤコブ病及びスポンジフォーム脳疾患に關与するプリオン、パーキンソン病に關与する α -シヌクレイン、一次全身性アミロイドーシスに關与するIg軽鎖、二次全身性アミロイドーシスに關与する血清アミロイドA、前頭側頭葉性痴呆に關与する τ タンパク質、老人性全身性アミロイドーシスに關与するトランスサイレチン、家族性アミロイドポリニューロパシーに關与するトランスサイレチン、遺伝性大脳アミロイド血管症に關与するシスタチンC、血透析関連アミロイドーシスに關与する β 2-ミクログロブリン、ハンチントン病に關与するハンチンチン、筋萎縮性側索硬化症に關与するスーパーオキシドディスムターゼ、セルピン欠乏症、肺気腫、および肝硬変に關与するセルピン、及び第II型糖尿病に關与するアミリンを含む。より好ましくは、前記凝集形-形成ポリペプチドは、アルツハイマー病に關与するA β ペプチドまたは τ タンパク質、またはパーキンソン病に關与する α -シヌクレインであり、最も好ましくは、A β ペプチドまたは α -シヌクレインである。

30

【0025】

本明細書において、用語「スパイク(spiking)」は、分析対象の生試料に、凝集形-形成ポリペプチドのモノマー型(またはマルチマー型)および/または凝集形-形成ポリペプチドの疎水性欠失体を添加、または添加後混合する過程を意味する。

【0026】

本明細書において、用語「マルチマー」は、二つ以上のモノマーが結合して形成されるものであって、これはオリゴマーも含む。

40

【0027】

本発明によると、分析対象の生試料に(i)前記凝集形-形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型をスパイクする場合は、凝集形-形成ポリペプチドの凝集形の形成を抑制する防衛システム(clearing system)の違いを利用して、患者と正常人の診断シグナルの違い(differentiation)を極大化する、すなわち患者の生試料は、防衛システム(clearing system)の程度が低く、凝集形-形成ポリペプチドの凝集形形成が促進されるのに対し、正常人の生試料では、防衛システム(clearing system)の程度が高く、凝集形-形成ポリペプチドの凝集形形成が減少され、診断シグナルの違い(differentiation)が極大化される。

50

【0028】

本発明のまた他の具現例によると、前記凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型は、配列番号1のアミノ酸配列からなるAβペプチドまたは配列番号2のアミノ酸配列からなるα - シヌクレインである。

【0029】

本発明によると、分析対象の生試料に(i i)前記凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体(hydrophobic deleted derivative of aggregate-forming polypeptide)をスパイク(spiking)する場合は、疎水性(hydrophobic)を有するアミノ酸残基を含む凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体と生試料に存在する凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型(オリゴマー型)との疎水性相互作用(hydrophobic interaction)の違いを利用して、患者と正常人間の診断シグナルの違い(differentiation)を極大化する、すなわち患者の生試料に存在する凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型(オリゴマー型)と凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体は、疎水性相互作用によって凝集形を多量形成するが、正常人の生試料に存在する凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型と凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体は、疎水性相互作用によって凝集形を形成してはいるが、患者の場合よりは少なく、患者と正常人間の診断シグナルの違い(differentiation)が極大化される。

10

20

【0030】

本明細書において、用語「凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体(hydrophobic deleted derivative of aggregate-forming polypeptide)」は、凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型(オリゴマー型)と疎水性相互作用によって凝集形が形成できるように、凝集形 - 形成ポリペプチドのアミノ酸配列から、疎水性アミノ酸残基を多数含むように、アミノ酸残基を欠失させた誘導体である。

【0031】

凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体は、凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型(オリゴマー型)と疎水性相互作用のために、長さ(分子量)および/または疎水性アミノ酸残基を考慮して選択することができ、好ましくは、前記凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体(hydrophobic deleted derivative of aggregate-forming polypeptide)は、配列番号1のアミノ酸配列の37番目アミノ酸残基乃至42番目アミノ酸残基を含むAβ_{deleted}ペプチドであり、より好ましくは、前記Aβ_{deleted}ペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列の29番目アミノ酸残基乃至42番目アミノ酸残基を含むペプチドであって、さらに好ましくは、前記Aβ_{deleted}ペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列の17番目アミノ酸残基乃至42番目アミノ酸残基を含むペプチドであり、最も好ましくは、前記Aβ_{deleted}ペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列の9番目アミノ酸残基乃至42番目アミノ酸残基を含むペプチドである。

30

40

【0032】

本発明によると、分析対象の生試料に(i i i)前記凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型と前記凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体をスパイク(spiking)する場合は、上述の(i)前記凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型及び(i i)前記凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体をそれぞれスパイクして達成される効果を両方とも利用するために、すなわち、ポリペプチドの凝集形形成を抑制する防御システム(clearing system)及び疎水性相互作用(hydrophobic interaction)の違いを利用して、患者と正常人間の診断シグナルの違い(differentiation)を極大化する。

【0033】

本発明の他の具現例によると、前記段階(a)の結果物に緩衝液をさらに添加する。よ

50

り好ましくは、前記緩衝液は、生試料に対して3～15倍(v/v)に添加され、さらに好ましくは、5～13倍(v/v)に添加されて、よりさらに好ましくは、7～11倍(v/v)、最も好ましくは、8～10倍(v/v)に添加される。

【0034】

本発明に用いられる緩衝液は、当業界に公知された様々な緩衝液を利用することができるが、好ましくは、前記緩衝液は、非イオン性界面活性剤含有リン酸塩緩衝液である。

【0035】

本発明に用いられるリン酸塩緩衝液に含有される非イオン性界面活性剤は、当業界に公知された様々な非イオン性界面活性剤を利用することができて、好ましくは、アルコキシル化アルキルエーテル、アルコキシル化アルキルエステル、アルキルポリグリコシド、ポリグリセリルエステル、ポリソルベート類及びシュガーエステルを含む。より好ましくは、Tween-20またはTriton X-100が使用されて、最も好ましくは、Tween-20が使用される。

10

【0036】

(b)凝集形-形成ポリペプチドの凝集形を追加的に形成させる段階

本発明の方法は、(b)前記段階(a)の結果物をインキュベーションし、前記凝集形-形成ポリペプチドの凝集形を追加的に形成させる段階を含む。

【0037】

本発明の最大の特徴の一つは、生試料中の測定しようとする凝集形-形成ポリペプチドの凝集形(抗原)の量が非常に少ないか、その大きさが非常に小さくて、測定することが難しいか、あるいは人体内凝集形-形成ポリペプチドの凝集形(抗原)の量と生試料中の凝集形-形成ポリペプチドの凝集形(抗原)の量が比例していない場合に、上述の(i)前記凝集形-形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型、(ii)前記凝集形-形成ポリペプチドの疎水性欠失体(hydrophobic deleted derivative of aggregate-forming polypeptide)、または(iii)前記凝集形-形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型と前記凝集形-形成ポリペプチドの疎水性欠失体とを生試料にスパイク(spiking)して、凝集形-形成ポリペプチドの凝集形を追加的に形成させることにより、疾病または疾患の有無や進行程度を測定することができるということである。

20

【0038】

本発明の他の具現例によると、前記段階(b)の凝集形-形成ポリペプチドの凝集形の追加的な形成は、前記の段階(a)の結果物を温度1～50℃でインキュベーション(incubation)して行い、より好ましくは、温度25～50℃でインキュベーション(incubation)して行って、さらに好ましくは、温度25～45℃で行い、よりさらに好ましくは、温度25～40℃で行って、最も好ましくは、温度25～38℃で行う。

30

【0039】

本発明において、前記段階(b)のインキュベーションは、前記スパイクした(i)、(ii)または(iii)が前記生試料によってマルチマー化できるほど十分な時間行って、より好ましくは、前記生試料によってマルチマー化できるほど十分なインキュベーション時間は、凝集形-形成ポリペプチドのマルチマー型が関与した疾患を有する人間の生試料を用いて発生した信号を、正常人の生試料を用いて発生したシグナルより1.5～20倍大きくするに十分な時間である。

40

【0040】

本発明のまた他の具現例によると、患者の生試料を用いて発生された信号が正常人の生試料を用いて発生された信号よりも1.5～20倍大きくするに十分な時間実施するための、前記段階(b)の凝集形-形成ポリペプチドの凝集形の追加的な形成は、前記段階(a)の結果物を1日～12日間インキュベーション(incubation)して実施し、好ましくは30時間(hr)～10日間実施して、より好ましくは2日～8日間実施し、さらに好ましくは2日～6日間実施して、よりさらに好ましくは3日～6日間実施し、

50

最も好ましくは4日～6日間実施し、さらに最も好ましくは5日～6日間に実施する。

【0041】

本明細書において、用語‘インキュベーション’は、分析対象の生試料を所定の温度で一定期間スタンディングすること(kept to stand)またはシェイク(shaking)することを意味し、シェイクする場合は、好ましくは、マイルドシェイク(mild shaking)することを意味する。

【0042】

本発明の最大の特徴の他の一つは、生試料を所定の温度で一定期間スタンディング(つまり、インキュベーション)することにより、生試料に存在するスパイクされた凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型(またはマルチマー型)及び/または前記凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体と凝集形 - 形成ポリペプチドとが互いによく凝集(aggregation)されるようにして、患者と正常人間の診断シグナルの違い(differentiation)を極大化したことである。

10

【0043】

(c)前記段階(b)の結果物に前記凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形に結合する結合剤 - 標識の接触

本発明の方法は、(c)前記段階(b)の結果物に、前記凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形に結合する結合剤にシグナル発生標識が結合された結合剤 - 標識を接触させる段階を経る。

20

【0044】

本発明において、前記凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形に結合する結合剤は、抗体、ペプチドアプタマー、アドネクチン(AdNectin)、affibody(米国特許第5,831,012号)、Avimer(Silverman, J. et al, Nature Biotechnology 23(12):1556(2005))、またはKunitz domain(Arnoux B et al., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 58(Pt7):12524(2002))、およびNixon, A E, Current opinion in drug discovery & development 9(2):2618(2006))である。

30

【0045】

本発明において、前記凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形に結合する結合剤に結合されるシグナル発生標識は、化合物標識(例えば、ビオチン)、酵素標識(例えば、アルカリンホスファターゼ、ペロキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ及び β -グルコシダーゼ)、放射能標識(例えば、 I^{125} 、及び C^{14})、蛍光標識(例えば、フルオレセイン)、発光標識、化学発光標識、およびFRET(蛍光共鳴エネルギー移動; fluorescence resonance energy transfer)標識を含むが、これらに限定されるものではない。

【0046】

(d)前記凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形に結合された結合剤 - 標識から発生するシグナルの検出

40

最後に、本発明の方法は、(d)前記凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形に結合された結合剤 - 標識から発生するシグナルを検出する段階を含む。

【0047】

前記凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形に結合された結合剤 - 標識から発生するシグナルの検出は、当業界に公知された様々な方法で実施することができ、例えば、抗原 - 抗体反応に係わる免疫分析法を利用して実施することができる。

【0048】

本発明のまた他の具現例によると、前記段階(c)及び(c)は、以下の段階を含む方法で実施される:(c-1)前記凝集形を捕獲(capturing)する前記凝集形 - 形成ポリペプチド上のエピトープを認識する捕獲抗体に、前記段階(b)の結果物を接触

50

させる段階と、(c-2)前記凝集形-形成ポリペプチド上のエピトープを認識する検出抗体に、前記捕獲された凝集形を接触させる段階と、(c-3)凝集形-検出抗体複合体を検出する段階。

【0049】

このような検出方法は、二つの形態の抗体、すなわち、捕獲抗体及び検出抗体を利用する。本明細書において、用語、‘捕獲抗体’は、生試料から検出しようとする凝集形-形成ポリペプチドに結合できる抗体を意味する。用語、‘検出抗体’は、前記捕獲抗体によって捕獲された凝集形-形成ポリペプチドに結合できる抗体を意味する。‘抗体’は、抗原に結合できる免疫グロブリンタンパク質を意味する。本明細書に利用された抗体は、検出しようとするエピトープ、抗原または抗原断片に結合できる全体抗体だけでなく、抗体断片(例えば、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv)を含む。

10

【0050】

前記検出方法は、凝集形-形成ポリペプチド上のエピトープを特異的に認識する一セットの捕獲抗体と検出抗体を利用するものであって、前記捕獲抗体と検出抗体が特異的に認識する前記エピトープは、互いに同一であるか、オーバーラップされている。

【0051】

捕獲抗体及び検出抗体に対するエピトープを言及しながら使用される用語、‘オーバーラップ(overlapped with)’は、完全にまたは部分的にオーバーラップされたアミノ酸配列を含むエピトープを包括する。たとえば、6E10およびW02抗体に対するエピトープは、ヒトAβペプチド配列のそれぞれ、アミノ酸3-8及び4-10からなるアミノ酸配列を有して、6E10及びFF51抗体に対するエピトープは、ヒトAβペプチド配列のそれぞれ、アミノ酸3-8及び1-4からなるアミノ酸配列を有し、1E11及びW02抗体に対するエピトープは、ヒトAβペプチド配列のそれぞれ、アミノ酸1-8及び4-10からなるアミノ酸配列を有して、1E11及びFF51抗体に対するエピトープは、ヒトAβペプチド配列のそれぞれ、アミノ酸1-8及び1-4からなるアミノ酸配列を有する。これらのエピトープは、完全にオーバーラップされたエピトープと説明することができる。

20

【0052】

また、3B6及び3B6 biotin抗体に対するエピトープは、α-シヌクレインタンパク質配列の119-140からなる配列である。

30

【0053】

本発明の他の具現例によると、ヒトAβペプチド配列を言及しながら表現する場合、前記エピトープは、アミノ酸1-8、3-8、1-4または4-10からなるアミノ酸配列を有して、α-シヌクレインタンパク質配列を言及しながら表現する場合、前記エピトープは、アミノ酸119-140からなるアミノ酸配列を有する。

【0054】

本発明のまた他の具現例によると、前記捕獲抗体が認識するエピトープは、前記凝集形-形成ポリペプチドで繰り返されない配列であり、前記検出抗体が認識するエピトープは、前記凝集形-形成ポリペプチドで繰り返されない配列である。本発明の検出方法によると、捕獲抗体に結合された凝集形-形成ポリペプチドは、検出抗体とそれ以上結合することができず、これは、検出抗体が認識する追加的なエピトープが存在しないからである。

40

【0055】

本発明の他の具現例によると、前記捕獲抗体及び検出抗体は、互いに同一である。すなわち、捕獲抗体及び検出抗体に特異的に結合されるエピトープは、同一であることが好ましい。

【0056】

本発明のまた他の具現例によると、前記捕獲抗体は、固体基質に結合される。このような形態の公知の物質は、ポリスチレン及びポリプロピレン、ガラス、金属、及びゲルのような炭化水素重合体を含む。前記固体基質は、ディップスティック、マイクロタイタープレート、粒子(例えば、ビーズ)、親和性カラム及びイムノプロット膜(例えば、ポリフ

50

ッ化ビニリデン膜)の形態でありえる(参照:米国特許第5,143,825号、第5,374,530号、第4,908,305号及び第5,498,551号)。

【0057】

本発明の他の具現例によると、前記検出抗体は、検出可能な信号を生成させる標識を有する。前記標識は、化合物標識(例えば、ビオチン)、酵素標識(例えば、アルカリンホスファターゼ、ペロキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ及び β -グルコシダーゼ)、放射能標識(例えば、 I^{125} 、及び C^{14})、蛍光標識(例えば、フルオレセイン)、発光標識、化学発光標識、およびFRET(蛍光共鳴エネルギー移動; fluorescence resonance energy transfer)標識を含むが、これらに限定されるものではない。抗体を標識するための様々なカバーおよび方法は、当業界に公知されている(Harlow and Lane, eds. Antibodies: A Laboratory Manual (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)。

10

【0058】

本発明において、凝集形-形成ポリペプチドに結合できる抗体を融合方法(Kohler and Milstein, European Journal of Immunology, 6:511-519 (1976))、組換えDNA方法(米国特許第4,816,56号)またはファージ抗体ライブラリー(Clackson et al, Nature, 352:624-628 (1991); およびMarks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597 (1991))のような従来技術にしたがって、免疫原として従来に記載されエピトープを利用して準備することができる。前記抗体の製造のための一般的な方法は、Harlow, E. and Lane, D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1988; Zola, H., Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 及びColigan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley / Greene, NY, 1991に記載されている。

20

【0059】

モノクローナル抗体の製造のためのハイブリドーマ細胞株の準備は、不滅細胞株(imortal cell line)と抗体を生産するリンパ球の融合で行われる。前記モノクローナル抗体の製造は、当業界に公知された技術を用いて実施することができる。ポリクローナル抗体は、上述の抗原を適切な動物に注入し、抗体を含む抗血清を収集し、公知の親和性技術により抗体を分離する方法によって製造することができる。

30

【0060】

凝集形-検出抗体複合体の検出は、当業界に公知の様々な方法で実施することができる。凝集形-検出抗体複合体の形成は、生試料に凝集形の存在を示す。前記段階は、従来の方法にしたがって、例えば、Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980、及びHarlow and Lane, eds. Antibodies: A Laboratory Manual (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.に記載されているように、多様な検出可能な標識/基質対を用いて、定量的にまたは定性的に実施することができる。

40

【0061】

前記検出抗体をアルカリンホスファターゼで標識する場合は、プロモクロロインドイルフォスフェート(BCIP)、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)及びECFを、発色反応のための基質として利用することができる。ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識する場合は、基質として、クロロナフトール、アミノエチルカルバゾール、ジアミ

50

ノベンジジン、D - ルシフェリン、ルシゲニン（ビス - N - メチルアクリジニウム硝酸塩）、レゾルフィンベンジルエーテル、ルミノール、アンプレックスレッド試薬（10 - アセチル - 3, 7 - ジヒドロキシフェノキサジン）、TMB（3, 3, 5, 5 - テトラメチルベンジジン）、ECL（enhanced chemiluminescence）及びABTS（2, 2 - アジン - ジ [3 - エチルベンゾチアゾリンスルホネート] ）などが用いられる。

【0062】

このような方法で、凝集形 - 形成ポリペプチドのマルチマー型が関与した疾患を有する人間の生試料を用いて発生された信号を、正常人の生試料を用いて発生された信号よりも1.5 ~ 20倍大きくすることができ、より好ましくは1.5 ~ 10倍、より好ましくは1.6倍 ~ 10倍大きくすることができる。

10

【0063】

本発明の他の態様によると、本発明は、以下を含む生試料（bio sample）の凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形を検出するためのキットを提供する：（i）前記凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型、（ii）前記凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体（hydrophobic deleted derivative of aggregate-forming polypeptide）、または（iii）前記凝集形 - 形成ポリペプチドのモノマー型またはマルチマー型と前記凝集形 - 形成ポリペプチドの疎水性欠失体。

20

【0064】

本発明のキットは、上述の本発明の生試料（bio sample）の凝集形 - 形成ポリペプチドの凝集形を検出する方法を利用するものであって、その共通する内容は、本明細書の過度なる複雑性を避けるために、その記載を省く。

【0065】

本発明の他の具現例によると、前記キットは、凝集形 - 形成ポリペプチド上のエピトープを認識する捕獲抗体と前記捕獲抗体が認識する前記エピトープを認識する検出抗体とをさらに含む。

【0066】

以下、実施例を通じて本発明をさらに詳細に説明するが、これら実施例は、本発明をより具体的に説明するためのものであって、本発明の範囲がこれら実施例に限定されないことは、本発明の属する技術分野で通常の知識を有する者にとっては自明なことであろう。

30

【実施例】

【0067】

実施例1：実験材料の準備

コーティングバッファ（Carbonate - Bicarbonate Buffer）、PBST、TBST及びPBSは、Sigma社から購入した。Block Aceは、Bio-rad社から購入した。バッファAは、TBSTにBlock Aceを0.4%に希釈して製造した。ブロッキング（blocking）バッファは、DWに1% Block Aceが希釈されるように製造した。6E10抗体は、Biolegend社から購入した。3B6抗体は、Novus Biologicals社から購入した。3B6 - biotin抗体は、Novus Biologicals社から購入した抗体をPeoplife社でビオチン化（biotinylation）した。ストレプトアビジン（streptavidin）- HRPは、Thermo Scientific社から購入した。HBR1は、Scantibodies Laboratory社から購入した。FF51 - HRPは、（株）The H Labから購入した。組換え（recombinant）Aβ1 - 42は、Biolegend社から購入した。組換えAβ9 - 42 biotinは、Anaspec社から購入した。組換えAβ9 - 42は、Anaspec社から購入した。組換えα - シヌクレインは、Milipore社から購入した。血漿（plasma）サンプルは、ブندانソウル大学病院及び中央大学病院から入手した。ECL溶液は、Rockland社から購入した。プレートは、Nun

40

50

c社から購入した。6E10及びFF51抗体に対するエピトープは、ヒトA β ペプチド配列のそれぞれ、アミノ酸3-8と1-4からなるアミノ酸配列を有する。3B6及び3B6 biotin抗体に対するエピトープは、 α -シヌクレインタンパク質配列の119-140からなる配列である。

【0068】

実施例2：6E10プレートの製造

6E10抗体（抗A β タンパク質、Biolegend）30 μ gをコーティングバッファー（sigma）10mlに希釈して、プレート（Nunc）に100 μ lを各ウェルに分注した後、4の冷蔵庫で一日間反応した。前記プレートをPBSで3回洗浄し、D.Wに1%Block Aceが溶いてあるブロッキングバッファー240 μ lを分注した後、室温で2時間反応した。前記プレートは、PBSで3回洗浄し、室温で30分間乾燥した後、使用した。

10

【0069】

実施例3：3B6プレートの製造

3B6抗体（抗 α -シヌクレインタンパク質、Novus Biologicals）20 μ gをコーティングバッファー（sigma）10mlに希釈して、プレート（Nunc）に100 μ lを各ウェルに分注後、4の冷蔵庫で一日間反応した。前記プレートをPBSで3回洗浄し、D.Wに1%Block Aceが溶いてあるブロッキングバッファー240 μ lを分注した後、室温で2時間反応した。前記プレートは、PBSで3回洗浄し、室温で30分間乾燥した後、使用した。

20

【0070】

実施例4：対照群の準備

陽性対照群（positive control）は、組換えA β 1-42（rec. A β ）（1 μ g/ml）10 μ lにPBST990 μ lを添加し、100 μ lを使用した。陽性対照群（positive control）は、組換え α -シヌクレイン（1mg/ml）10 μ lにPBST990 μ lを添加し、100 μ lを使用した。陰性対照群（negative control）は、PBS100 μ lを使用した。

【0071】

実施例5：サンプルの準備

サンプルは、2サンプルを基準にして準備した。凍結された血漿サンプルを、37ヒートブロック（heat block）に15分間解かした後、30秒間ボルテックス（vortexing）後使用した。rec. A β 1-42 1ngがスパイク（spiking）されたサンプルは、血漿20 μ lにHBR1（0.123mg/ml）8.08 μ lとPBST 180 μ l、rec. A β 1-42（1ng/10 μ l）20 μ lを混合して、全体228.08 μ lになるように準備した。rec. A β 9-42 ビオチン 1ngがスパイクされたサンプルは、血漿20 μ lにHBR1（0.123mg/ml）8.08 μ lとPBST 180 μ l、rec. A β 9-42 ビオチン（1ng/10 μ l）20 μ lを混合して、全体228.08 μ lになるように準備した。rec. A β 9-42 1ngがスパイクされたサンプルは、血漿20 μ lにHBR1（0.123mg/ml）8.08 μ lとPBST 180 μ l、rec. A β 9-42（1ng/10 μ l）20 μ lを混合して、全体228.08 μ lになるように準備した。組換え α -シヌクレイン1 μ gがスパイクされたサンプルは、血漿20 μ lにHBR1（0.123mg/ml）8.08 μ lとPBST 180 μ l、組換え α -シヌクレイン（1 μ g/10 μ l）20 μ lを混合して、全体228.08 μ lになるように準備した。また、組換えペプチドをスパイクしなかったサンプルは、血漿20 μ lにHBR1（0.123mg/ml）8.08 μ lとPBST 200 μ lを混合して、全体228.08 μ lになるように準備した。

30

40

【0072】

実施例6：インキュベーション（incubation）

前記実施例5でrec. A β 1-42を処理して用意したサンプルは、37のインキ

50

ュベーターで各4日と6日間インキュベーションした。前記実施例5でrec. Aβ1-42を処理して用意したサンプルは、37 インキュベーターで各2日、3日、4日、5日間インキュベーションした。rec. Aβ1-42を処理しなかったサンプルは、37 インキュベーターで各0日、5日間インキュベーションした。そして、前記実施例5でrec. Aβ9-42ピオチンを処理して用意したサンプルは、6日間インキュベーションした。前記実施例5でrec. Aβ9-42を処理して用意したサンプルは、各2日、3日、4日間インキュベーションした。また、前記実施例5で組換えα-シヌクレインを処理して用意したサンプルは、各0日、2日、4日、6日インキュベーションした。

【0073】

実施例7：rec. Aβ1-42を処理した後、4日と6日間インキュベーションしたサンプルから、MDS (multimer detection system) を用いてのAβオリゴマー (oligomer) の検出

6E10コーティングプレート (3 μg/ml) に、陽性対照群、陰性対照群及びrec. Aβ1-42を処理して4日と6日間インキュベーションしたサンプルを、それぞれ100 μlずつ分注した後、室温で1時間反応した。前記プレートをTBSTで3回洗浄し、FF51-HRP抗体を、バッファAに1/1000希釈して100 μlずつ分注した後、室温で1時間反応した。前記プレートをTBSTで3回洗浄した後、ECL溶液を100 μl分注した。ECLと反応したプレートは、ルミノメーター機器 (perkin elmer) に挿入し、発光 (luminescent) シグナルを測定した。その結果は、下記図1aのようである。

【0074】

図1a及び1bは、rec. Aβ1-42添加後、インキュベーション時間によって、ADサンプルのシグナルがNon ADサンプルのシグナルに比べて増加していることを示している。4日と6日間インキュベーションされた各条件において、ADとNon AD間の差を示す。

【0075】

図1a及び1bからみて、Non AD患者サンプルと比較時、AD患者のサンプルにおけるAβオリゴマーのシグナルが高く出るのは、AD患者サンプルにおいて、Aβオリゴマーの形成を抑制させる防御システムが、Non AD患者ほど活性化しないからであると判断される。

【0076】

実施例8：rec. Aβ1-42を処理した後、各2日、3日、4日、5日間インキュベーションしたサンプルから、MDS (multimer detection system) を用いてのAβオリゴマー (oligomer) の検出

6E10コーティングプレート (3 μg/ml) に、陽性対照群、陰性対照群及びrec. Aβ1-42を処理して各2日、3日、4日、5日間インキュベーションしたサンプルをそれぞれ100 μlずつ分注した後、27 インキュベーターで静置状態で1時間反応した。前記プレートをTBSTで3回洗浄し、FF51-HRP抗体をバッファAに10 ng/mlになるように製造後、100 μlずつ分注した。前記プレートを27 インキュベーターで静置状態で1時間反応し、TBSTで3回洗浄した後、ECL溶液を100 μl分注した。ECLと反応したプレートは、ルミノメーター機器 (perkin elmer) に挿入し、発光 (luminescent) シグナルを測定した。その結果は、下記図1cのようである。

【0077】

図1cは、rec. Aβ1-42添加後、2日、3日、4日、5日間インキュベーション時間によって、ADサンプルのシグナルがNon ADサンプルのシグナルに比べて1.15倍、1.34倍、1.65倍、1.84倍に増加していることを示している。インキュベーション日数が増えるにつれて、ADとNon AD間に差がますます広がることを示す。

【0078】

図1cからみて、Non AD患者サンプルと比較時、AD患者のサンプルにおけるAβオリゴマーのシグナルが高く出たのは、AD患者サンプルにおいて、Aβオリゴマーの形成を抑制させる防御システムが、Non AD患者ほど活性化しないからであると判断される。

【0079】

実施例9：rec.Aβ1-42を処理して5日間、rec.Aβ1-42を無処理して0日、5日間インキュベーションしたサンプルから、MDS (multimer detection system) を用いてのAβオリゴマー (oligomer) の検出
6E10コーティングプレート (3 μg/ml) に、陽性対照群、陰性対照群及びrec.Aβ1-42を処理して5日間、rec.Aβ1-42を無処理して各0日、5日間
インキュベーションしたサンプルをそれぞれ100 μlずつ分注した後、27 インキュベーターで静置状態で1時間反応した。前記プレートをTBSTで3回洗浄し、FF51-HRP抗体をバッファAに10 ng/mlになるように製造後、100 μlずつ分注した。前記プレートを27 インキュベーターで静置状態で1時間反応し、TBSTで3回洗浄した後、ECL溶液を100 μl分注した。ECLと反応したプレートは、ルミノメーター機器 (perkinelmer) に挿入し、発光 (luminescent) シグナルを測定した。その結果は、下記図1dのようである。

10

【0080】

図1dは、rec.Aβ1-42添加後5日間インキュベーション、rec.Aβ1-42を添加せずに0日、5日間インキュベーションしたサンプルからAβオリゴマーを測定したデータであって、Aβ1-42をスパイク (spiking) した時とスパイクしなかった時、経時によるADサンプルのシグナルとNon ADサンプルのシグナルの増加状態を示したもので、rec.Aβ1-42添加後5日間インキュベーションしたサンプルでのみ、ADとNon AD間に差を示す。

20

【0081】

図1dからみて、AD患者のサンプルからAβオリゴマーのシグナルが高く出るのは、AD患者のサンプルにおいて、Aβオリゴマーの形成を抑制させる防御システムが、Non AD患者ほど活性化しないからであると判断されて、Aβ1-42をスパイクしたとき、Aβオリゴマーの形成を抑制させる防御システムに対する効果を示すと判断される。

30

【0082】

実施例10：rec.Aβ9-42ビオチンを処理した後、6日間インキュベーションしたサンプルから、MDS (multimer detection system) を用いてのAβオリゴマーの検出

6E10コーティングプレート (3 μg/ml) に、陽性対照群、陰性対照群、rec.Aβ9-42ビオチンを処理して6日間インキュベーションしたサンプルをそれぞれ100 μlずつ分注した後、室温で1時間反応した。前記プレートをTBSTで3回洗浄し、FF51-HRP抗体をバッファAに1/1000希釈し、100 μlずつ分注した後、室温で1時間反応した。前記プレートをTBSTで3回洗浄した後、ECL溶液を100 μl分注した。ECLと反応したプレートは、ルミノメーター機器 (perkinelmer) に挿入し、発光シグナルを測定して、その結果は、下記図2aにまとめた。

40

【0083】

図2aは、Aβとバインディングするrec.Aβ9-42ビオチンをスパイクして、6日間インキュベーションしたとき、AD患者群のシグナルが正常群のシグナルより高いことを示す。

【0084】

図2aからみて、rec.Aβ9-42ビオチンがAβにバインディングして凝集 (aggregation) を促進し、抗原の量的な部分と大きさ的な部分の変化によって区分がされると判断された。

【0085】

実施例11：rec.Aβ9-42ビオチンを処理した後、2日、3日、4日間インキ

50

ュベーションしたサンプルから、MDS (multimer detection system) を用いての A β オリゴマーの検出

6E10 コーティングプレート (3 μ g/ml) に、陽性対照群、陰性対照群、rec. A β 9-42 を処理して2日、3日、4日間インキュベーションしたサンプルをそれぞれ100 μ l ずつ分注した後、27 インキュベーターで静置状態で1時間反応した。前記プレートをTBS-Tで3回洗浄し、FF51-HRP 抗体をバッファAに10 ng/ml になるようにように製造後、100 μ l ずつ分注した。前記プレートを27 インキュベーターで静置状態で1時間反応し、TBS-Tで3回洗浄した後、ECL 溶液を100 μ l 分注した。ECL と反応したプレートは、ルミノメーター機器 (perkinelmer) に挿入し、発光シグナルを測定して、その結果は、下記図2bにまとめた。

10

【0086】

図2bは、A β とバインディングする rec. A β 9-42 をスパイクし、2日、3日、4日間インキュベーションしたとき、経時によって、AD 患者群のシグナルが、正常群のシグナルより、1.1倍、1.52倍、1.84倍高まることを示す。

【0087】

図2bからみて、rec. A β 9-42 ビオチンがA β にバインディングして凝集 (aggregation) を促進し、抗原の量的な部分と大きさ的な部分の変化によって、区別がされると判断された。

【0088】

実施例12：組換え α -シヌクレインを処理した後、0日、2日、4日、6日間インキュベーションしたサンプルから、MDS (multimer detection system) を用いての α -シヌクレインオリゴマーの検出

20

3B6 コーティングプレート (2 μ g/ml) に、陽性対照群、陰性対照群、組換え α -シヌクレインを処理して0日、2日、4日、6日間インキュベーションしたサンプルを、それぞれ100 μ l ずつ分注した後、27 インキュベーターで静置状態で1時間反応した。前記プレートをTBS-Tで3回洗浄し、3B6-biotin 抗体をバッファAに2 μ g/ml になるように製造した後、100 μ l ずつ分注した。前記プレートを27 インキュベーターで静置状態で1時間反応し、TBS-Tで3回洗浄した。ストレプトアビジン (streptavidin) - HRP をバッファAに1/5000倍に希釈し、100 μ l ずつ分注した後、前記プレートを27 インキュベーターで静置状態で1時間反応し、TBS-Tで3回洗浄した。ECL 溶液を100 μ l 分注した。ECL と反応したプレートは、ルミノメーター機器 (perkinelmer) に挿入し、発光シグナルを測定して、その結果は、下記図3にまとめた。

30

【0089】

図3は、組換え α -シヌクレインを添加した後、インキュベーション0日、2日、4日、6日間、経時によって、PD サンプルのシグナルと Non PD サンプルのシグナルの変化を示したデータであって、0日のとき、Non PD シグナルに対し、PD サンプルのシグナル ratio が0.92倍を示していたものが、2日、4日、6日間インキュベーション時、1.34倍、1.76倍、1.78倍に増加していることを示した。

【0090】

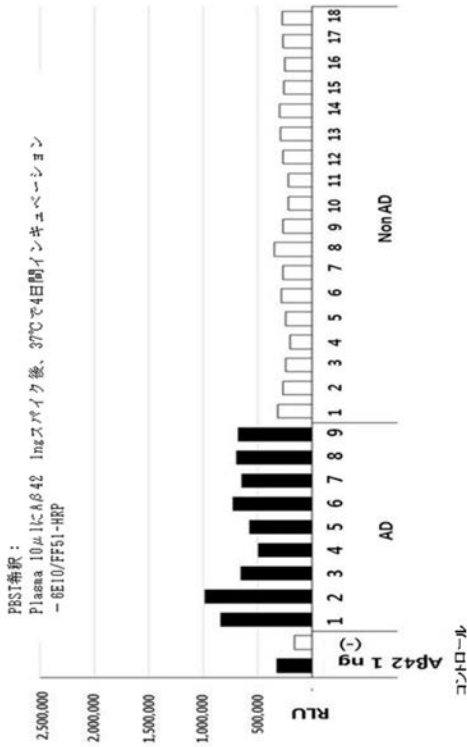
40

図3からみて、Non PD 患者のサンプルと比較時、PD 患者のサンプルから α -シヌクレインのシグナルが高く出たのは、PD 患者サンプルにおいて、 α -シヌクレインオリゴマーの形成を抑制させる防御システムが、Non PD 患者ほど活性化しないからであると判断される。

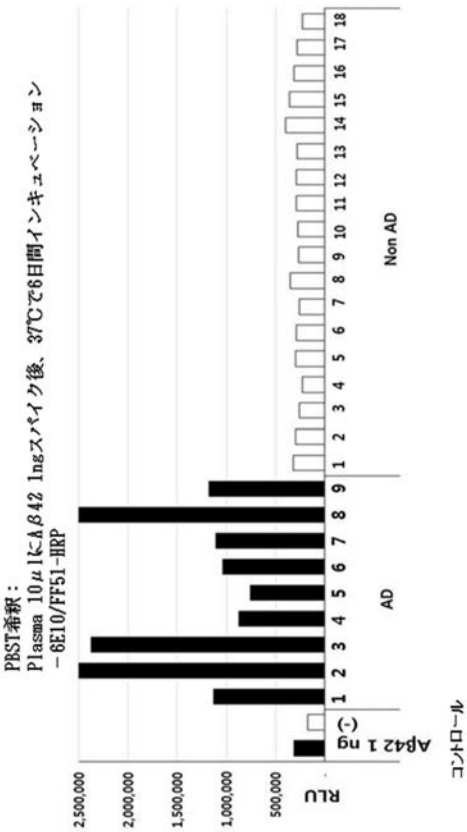
【0091】

以上、本発明の特定な部分を詳細に記述したが、当業界の通常の知識を有する者にとっては、このような具体的な記述はただ望ましい具現例に過ぎなく、これに本発明の範囲が限定されないことは明らかである。従って、本発明の実質的な範囲は、添付の請求項とその等価物により定義されると言える。

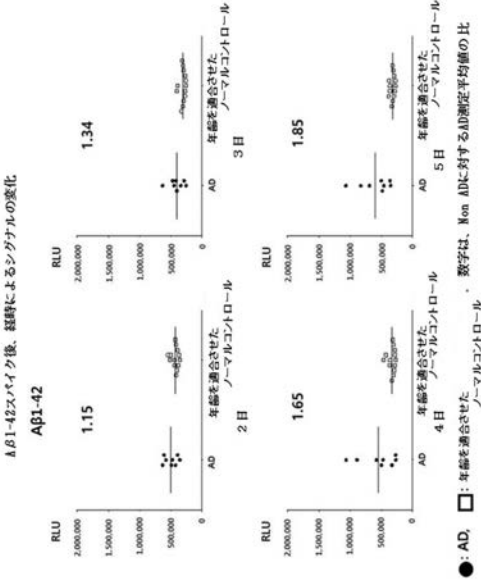
【図 1 a】



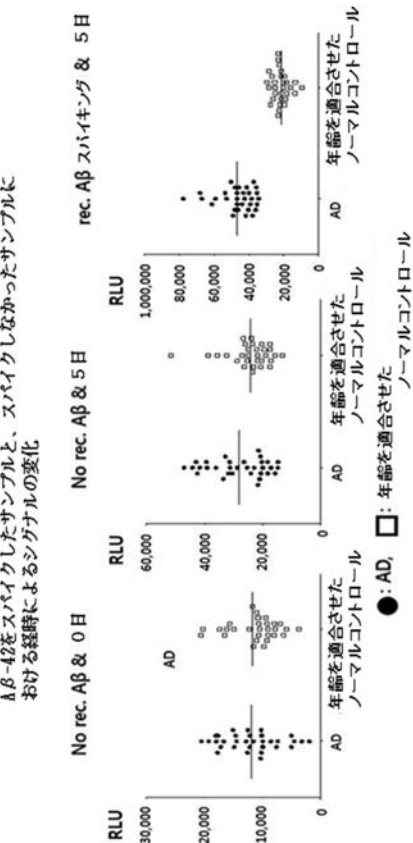
【図 1 b】



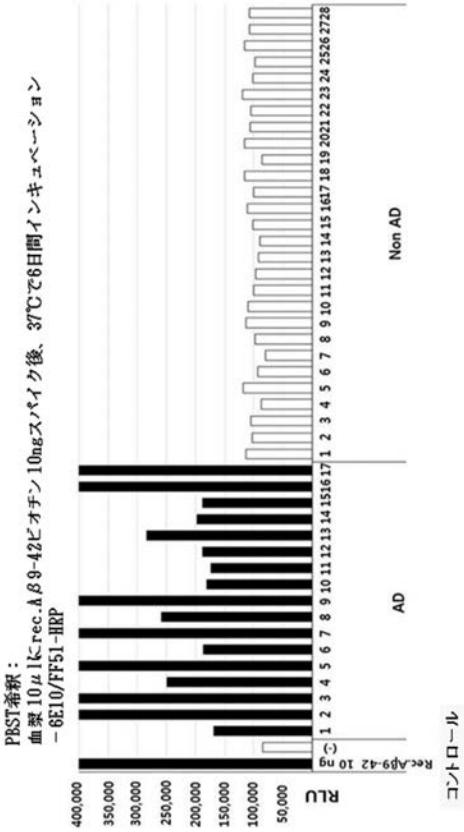
【図 1 c】



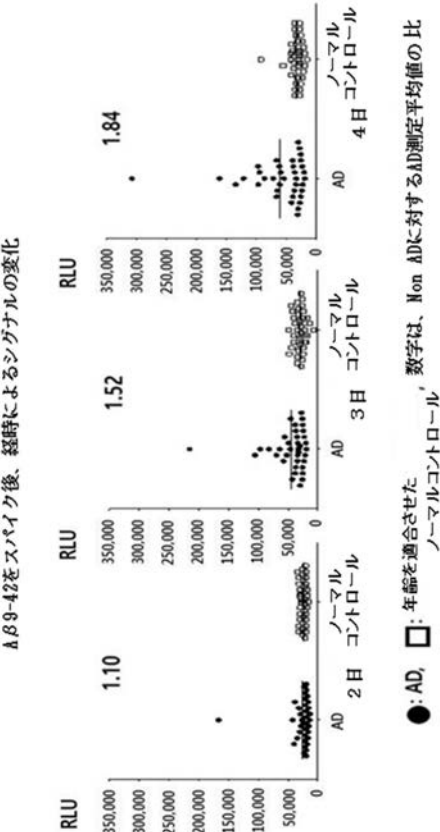
【図 1 d】



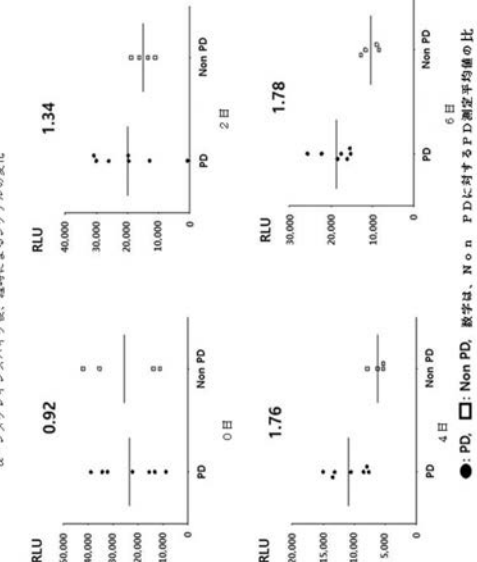
【図 2 a】



【図 2 b】



【図 3】



【手続補正書】

【提出日】平成29年8月2日(2017.8.2)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2018503807000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/010558

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i 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 33/53; G01N 33/68; C08F 20/36 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: multimer, amyloid-beta, antibody, coherence, signal, detection, deletion																																
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>KR 10-2011-0081330 A (PEOPLEBIO, INC.) 13 July 2011 See abstract; claim 1; paragraphs [0015], [0019], [0021], [0026], [0035]-[0036], [0043], [0046], [0056], [0066]-[0068].</td> <td>22-27,31-37</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-8,12-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td></td> <td>9-11,28-30</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>KR 10-2014-0069346 A (AFFIRIS AG.) 09 June 2014 See abstract; claims 1, 5, 7, 20; paragraphs [0040], [0053]-[0056].</td> <td>1-8,12-21</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>KR 10-2010-0036324 A (PEOPLEBIO, INC.) 07 April 2010 See abstract; claims 1-9.</td> <td>22-27,31-37</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-8,12-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>NCBI, GenBank accession no. AAB26264.2 (14 July 2000) See the entire document.</td> <td>1-37</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>NCBI, NCBI Reference Sequence: NP_000336.1 (11 May 2014) See the entire document.</td> <td>1-37</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2014-0043371 A (WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES LTD.) 09 April 2014 See abstract; claims 1-11.</td> <td>1-37</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	KR 10-2011-0081330 A (PEOPLEBIO, INC.) 13 July 2011 See abstract; claim 1; paragraphs [0015], [0019], [0021], [0026], [0035]-[0036], [0043], [0046], [0056], [0066]-[0068].	22-27,31-37	Y		1-8,12-21	A		9-11,28-30	Y	KR 10-2014-0069346 A (AFFIRIS AG.) 09 June 2014 See abstract; claims 1, 5, 7, 20; paragraphs [0040], [0053]-[0056].	1-8,12-21	X	KR 10-2010-0036324 A (PEOPLEBIO, INC.) 07 April 2010 See abstract; claims 1-9.	22-27,31-37	Y		1-8,12-21	A	NCBI, GenBank accession no. AAB26264.2 (14 July 2000) See the entire document.	1-37	A	NCBI, NCBI Reference Sequence: NP_000336.1 (11 May 2014) See the entire document.	1-37	A	KR 10-2014-0043371 A (WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES LTD.) 09 April 2014 See abstract; claims 1-11.	1-37
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																														
X	KR 10-2011-0081330 A (PEOPLEBIO, INC.) 13 July 2011 See abstract; claim 1; paragraphs [0015], [0019], [0021], [0026], [0035]-[0036], [0043], [0046], [0056], [0066]-[0068].	22-27,31-37																														
Y		1-8,12-21																														
A		9-11,28-30																														
Y	KR 10-2014-0069346 A (AFFIRIS AG.) 09 June 2014 See abstract; claims 1, 5, 7, 20; paragraphs [0040], [0053]-[0056].	1-8,12-21																														
X	KR 10-2010-0036324 A (PEOPLEBIO, INC.) 07 April 2010 See abstract; claims 1-9.	22-27,31-37																														
Y		1-8,12-21																														
A	NCBI, GenBank accession no. AAB26264.2 (14 July 2000) See the entire document.	1-37																														
A	NCBI, NCBI Reference Sequence: NP_000336.1 (11 May 2014) See the entire document.	1-37																														
A	KR 10-2014-0043371 A (WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES LTD.) 09 April 2014 See abstract; claims 1-11.	1-37																														
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.																																
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																																
Date of the actual completion of the international search 17 FEBRUARY 2016 (17.02.2016)		Date of mailing of the international search report 17 FEBRUARY 2016 (17.02.2016)																														
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Telephone No.																														

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/010558

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0081330 A	13/07/2011	AU 2007-241729 A1	01/11/2007
		CA 2649359 A1	01/11/2007
		CN 101427132 A	06/05/2009
		EP 2010904 A1	07/01/2009
		JP 2009-534648 A	24/09/2009
		JP 5164971 B2	21/03/2013
		KR 10-1132293 B1	05/04/2012
		US 2010-0021943 A1	28/01/2010
		US 8008026 B2	30/08/2011
		WO 2007-123345 A1	01/11/2007
KR 10-2014-0069346 A	09/06/2014	CA 2850840 A1	11/04/2013
		CA 2850843 A1	11/04/2013
		CN 103842824 A	04/06/2014
		CN 103842825 A	04/06/2014
		EP 2579042 A1	10/04/2013
		EP 2579042 B1	09/07/2014
		EP 2764367 A1	13/08/2014
		EP 2764368 A1	13/08/2014
		JP 2014-529087 A	30/10/2014
		JP 2014-529088 A	30/10/2014
		KR 10-2014-0073568 A	16/06/2014
		TW 201316000 A	16/04/2013
		US 2014-0234877 A1	21/08/2014
		US 2014-0242727 A1	28/08/2014
		WO 2013-050248 A1	11/04/2013
		WO 2013-050249 A1	11/04/2013
KR 10-2010-0036324 A	07/04/2010	AU 2005-327652 A1	24/08/2006
		CA 2598321 A1	24/08/2006
		CN 101124342 A	13/02/2008
		EP 1848817 A1	31/10/2007
		EP 1848817 B1	24/04/2013
		JP 04772065 B2	14/09/2011
		JP 2008-530578 A	07/08/2008
		KR 10-0987639 B1	13/10/2010
		KR 10-2010-0087403 A	04/08/2010
		US 2010-0009388 A1	14/01/2010
		US 8026070 B2	27/09/2011
		WO 2006-088281 A1	24/08/2006
KR 10-2014-0043371 A	09/04/2014	CN 103597352 A	19/02/2014
		CN 103597352 B	21/10/2015
		EP 2720041 A1	16/04/2014
		US 2014-0113311 A1	24/04/2014
		WO 2012-169453 A1	13/12/2012

국제조사보고서		국제출원번호 PCT/KR2015/010558
A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류들 기재) G01N 33/53; G01N 33/68; C08F 20/36 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 멀티머, 아밀로이드-베타, 항체, 응집, 시그널, 검출, 결실		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2011-0081330 A (주식회사 피플바이오) 2011.07.13. 요약; 청구항 제1항; 단락 [0015], [0019], [0021], [0026], [0035]-[0036], [0043], [0046], [0056], [0066]-[0068] 참조.	22-27,31-37
Y		1-8,12-21
A		9-11,28-30
Y	KR 10-2014-0069346 A (아피리스 아게) 2014.06.09. 요약; 청구항 제1, 5, 7, 20항; 단락 [0040], [0053]-[0056] 참조.	1-8,12-21
X	KR 10-2010-0036324 A (주식회사 피플바이오) 2010.04.07. 요약; 청구항 제1-9항 참조.	22-27,31-37
Y		1-8,12-21
A	NCBI, GenBank accession no. AAB26264.2 (2000.07.14.) 전체 문헌 참조.	1-37
A	NCBI, NCBI Reference Sequence: NP_000336.1 (2014.05.11.) 전체 문헌 참조.	1-37
A	KR 10-2014-0043371 A (와코 준야꾸 고교 가부시카이가이샤) 2014.04.09. 요약; 청구항 제1-11항 참조.	1-37
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2016년 02월 17일 (17.02.2016)		국제조사보고서 발송일 2016년 02월 17일 (17.02.2016)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2015/010558

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0081330 A	2011/07/13	AU 2007-241729 A1 CA 2649359 A1 CN 101427132 A EP 2010904 A1 JP 2009-534648 A JP 5164971 B2 KR 10-1132293 B1 US 2010-0021943 A1 US 8008026 B2 WO 2007-123345 A1	2007/11/01 2007/11/01 2009/05/06 2009/01/07 2009/09/24 2013/03/21 2012/04/05 2010/01/28 2011/08/30 2007/11/01
KR 10-2014-0069346 A	2014/06/09	CA 2850840 A1 CA 2850843 A1 CN 103842824 A CN 103842825 A EP 2579042 A1 EP 2579042 B1 EP 2764367 A1 EP 2764368 A1 JP 2014-529087 A JP 2014-529088 A KR 10-2014-0073568 A TW 201316000 A US 2014-0234877 A1 US 2014-0242727 A1 WO 2013-050248 A1 WO 2013-050249 A1	2013/04/11 2013/04/11 2014/06/04 2014/06/04 2013/04/10 2014/07/09 2014/08/13 2014/08/13 2014/10/30 2014/10/30 2014/06/16 2013/04/16 2014/08/21 2014/08/28 2013/04/11 2013/04/11
KR 10-2010-0036324 A	2010/04/07	AU 2005-327652 A1 CA 2598321 A1 CN 101124342 A EP 1848817 A1 EP 1848817 B1 JP 04772065 B2 JP 2008-530578 A KR 10-0987639 B1 KR 10-2010-0087403 A US 2010-0009388 A1 US 8026070 B2 WO 2006-088281 A1	2006/08/24 2006/08/24 2008/02/13 2007/10/31 2013/04/24 2011/09/14 2008/08/07 2010/10/13 2010/08/04 2010/01/14 2011/09/27 2006/08/24
KR 10-2014-0043371 A	2014/04/09	CN 103597352 A CN 103597352 B EP 2720041 A1 US 2014-0113311 A1 WO 2012-169453 A1	2014/02/19 2015/10/21 2014/04/16 2014/04/24 2012/12/13

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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, TZ, UA, UG, US, UZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. Tween

2. Triton

(72)発明者 ビョンソブ・リ

大韓民国 14027 キョンギ - ド アニョン - シ マナン - グ チャンネ - ロ 76 301 - 406

(72)発明者 クァンス・リ

大韓民国 06566 ソウル ソチョ - グ トンジャク - デロ 150

(72)発明者 シンウォン・キム

大韓民国 05318 ソウル カンドン - グ サンアム - ロ 12 - ギル 24 101 - 710

(72)発明者 クンテク・イム

大韓民国 10872 キョンギ - ド パジュ - シ キョハ - ロ 70

(72)発明者 グァンジェ・キム

大韓民国 22704 インチョン ソ - グ キョンソ - ロ 31ボン - ギル 47 202 - 1304

(72)発明者 ジスン・ヨ

大韓民国 06057 ソウル カンナム - グ オンジュ - ロ 146 - ギル 18 6 - 1007

Fターム(参考) 4H045 BA10 CA40 DA86 EA50

