

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-512700  
(P2019-512700A)

(43) 公表日 令和1年5月16日(2019.5.16)

(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	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 B	
	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	
	GO 1 N 33/543 5 4 5	
	GO 1 N 33/543 5 7 5	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2018-548776 (P2018-548776)  
 (86) (22) 出願日 平成29年3月16日 (2017. 3. 16)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年9月20日 (2018. 9. 20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2017/002858  
 (87) 国際公開番号 W02017/160104  
 (87) 国際公開日 平成29年9月21日 (2017. 9. 21)  
 (31) 優先権主張番号 10-2016-0031534  
 (32) 優先日 平成28年3月16日 (2016. 3. 16)  
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

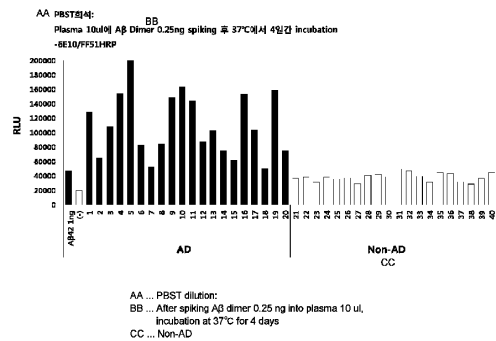
(71) 出願人 517193291  
 ビーブルバイオ, インコーポレーテッド  
 大韓民国 1 3 4 8 7 ソンナムーシ  
 ンダンーグ ビーディーシー Cードン  
 6階 パンギョーロ 2 4 2  
 (74) 代理人 100107515  
 弁理士 廣田 浩一  
 (74) 代理人 100107733  
 弁理士 流 良広  
 (74) 代理人 100115347  
 弁理士 松田 奈緒子  
 (72) 発明者 ビョンソプ・リ  
 大韓民国 1 4 0 2 7 キョンギード ア  
 ニャンーシ マナンーグ サムドクーロ  
 6 3 ボンーギル 3 2 3 0 1 - 5 0 4  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 凝集型-形成ポリペプチドの凝集型を検出する方法

(57) 【要約】

本発明は、( a ) 分析対象の生試料に前記凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型をスパイクング ( s p i k i n g ) するステップ; ( b ) 前記ステップ ( a ) の結果物をインキュベーションさせて前記凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型を追加的に形成させるステップ; ( c ) 前記ステップ ( b ) の結果物に前記凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型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 - 標識を接触させるステップ; 及び ( d ) 前記凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型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ステップを含む生試料 ( b i o s a m p l e ) の凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型を検出する方法に関するものである。

【選択図】 図 2



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

次のステップを含む生試料 ( b i o s a m p l e ) の凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型を検出する方法：

( a ) 分析対象の生試料に前記凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型をスパイクング ( s p i k i n g ) するステップ；

( b ) 前記ステップ ( a ) の結果物をインキュベーションさせて前記凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型を追加的に形成させるステップ；

( c ) 前記ステップ ( b ) の結果物に前記凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型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 - 標識を接触させるステップ；及び

( d ) 前記凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型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ステップ、

ここで、前記ステップ ( b ) のインキュベーションは前記スパイクングした凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型が前記生試料によりマルチマー化できる十分な時間の間実施する。

**【請求項 2】**

前記スパイクングした凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型のマルチマー化をさせる前記生試料は、前記凝集型 - 形成ポリペプチドのマルチマー型が関与している疾患を有するヒト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】**

前記生試料によりマルチマー化できる十分なインキュベーション時間は、凝集型 - 形成ポリペプチドのマルチマー型が関与している疾患を有するヒトの生試料を用いて発生したシグナルが正常のヒトの生試料を用いて発生したシグナルより 1 . 3 ~ 2 0 倍大きくすること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 ( b i o s a m p l e ) 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 ( p l a s m a ) 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】**

前記凝集型 - 形成ポリペプチドは、A ペプチド、タウ ( t a u ) タンパク質、プリオン、 $\beta$ -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、 $\alpha$ 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、及びアミリンから構成された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】**

前記凝集型 - 形成ポリペプチドは、A ペプチド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】**

前記凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型は、配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列からなる A ペプチドの 2 6 番 C y s 残基によりジスルフィド結合されてなるダイマー型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】**

前記ステップ ( a ) の結果物に緩衝液を追加的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 1 0】**

前記緩衝液は生試料に対して 3 ~ 1 5 倍 ( v / v ) で添加されることを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

**【請求項 1 1】**

前記緩衝液は非イオン性界面活性剤 - 含有燐酸塩緩衝液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】

前記ステップ (b) の凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型の追加的な形成は、前記ステップ (a) の結果物を温度 1 ~ 50 でインキュベーション (incubation) させて実施することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記ステップ (b) の凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型の追加的な形成は、前記ステップ (a) の結果物を 1 日乃至 12 日の間インキュベーション (incubation) させて実施することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 14】

前記ステップ (c) 及び (d) は、次のステップを含む方法により実施されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法：

(c - 1) 前記凝集型を捕獲 (capturing) する前記凝集型 - 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ステップ (b) の結果物を接触させるステップ；

(c - 2) 前記凝集型 - 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型を接触させるステップ；及び

(c - 3) 凝集型 - 検出抗体複合体を検出するステップ。

【請求項 15】

前記検出抗体は、前記ステップ (c - 1) のエピトープと同一なまたはオーバーラップする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 14 に記載の方法。

20

【請求項 16】

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 14 に記載の方法。

【請求項 17】

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 14 に記載の方法。

【請求項 18】

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 17 に記載の方法。

30

【請求項 19】

凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型を含む生試料 (bio sample) の凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型を検出するためのキット。

【請求項 20】

前記生試料 (bio sample) は血液であることを特徴とする、請求項 19 に記載のキット。

【請求項 21】

前記血液試料は血漿 (plasma) であることを特徴とする、請求項 20 に記載のキット。

40

【請求項 22】

前記凝集型 - 形成ポリペプチドは、A ペプチド、タウ (tau) タンパク質、プリオン、 $\beta$ -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、 $\alpha$ 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、及びアミリンから構成された群から選択されたことを特徴とする、請求項 19 に記載のキット。

【請求項 23】

前記凝集型 - 形成ポリペプチドは、A 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 24】

50

前記凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型は配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列からなる A ペプチドの 26 番 C y s 残基によりジスルフィド結合されてなるダイマー型であることを特徴とする、請求項 19 に記載のキット。

【請求項 25】

前記キットは緩衝液を追加的に含むことを特徴とする、請求項 19 に記載のキット。

【請求項 26】

前記緩衝液は非イオン性界面活性剤 - 含有燐酸塩緩衝液であることを特徴とする、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 27】

前記キットは凝集型 - 形成ポリペプチド上のエピトープを認識する捕獲抗体；及び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を追加的に含むことを特徴とする、請求項 19 に記載のキット。

10

【請求項 28】

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する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 27 に記載のキット。

【請求項 29】

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 27 に記載のキット。

【請求項 30】

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 27 に記載のキット。

20

【請求項 31】

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 30 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本特許出願は 2016 年 3 月 16 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 - 2016 - 0031534 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挿入される。

30

【0002】

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

【背景技術】

【0003】

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から、正常でない状態 (例えば、ミスフォールディング型に転換) になればマルチマーを形成して凝集されて疾病を誘発する場合が多い (非特許文献 1 ~ 2)。

40

【0004】

例えば、タンパク質の正常でない凝集、またはミスフォールディングと関連した疾患または疾病はアルツハイマー疾患、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 )、パーキンソン疾患、ハンチントン疾患、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 )、硬変症 ( 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症、二次全身性アミロイド症、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 )、老人全身性アミロイド症、家族性アミロイド多発神経病 ( 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

50

イド脈管病 (hereditary cerebral amyloid angiopathy)、及び血透析 - 関連アミロイド症を含む。

【0005】

このような疾患または疾病の有無または進行程度を測定するに当たって、抗原の量が試料の中に非常に少ないか、または抗原の大きさが非常に小さくて測定が困難であるか、または体の中の抗原の量と試料の中の抗原の量が比例しない場合に、例えば、アルツハイマー疾患に關与する A $\beta$  (アミロイド - ベータ) も正常人に比べて非正常人で A $\beta$  オリゴマーレベルが高いと知られているが、血液試料内 A $\beta$  オリゴマー量の検出が難しいか、または血液試料内に非定型的に A $\beta$  オリゴマーが存在するとき、診断が難しいことがある。

【0006】

また、測定しようとする抗原があまり小さいか、または量が少なくてサンドイッチ ELISA を通じての疾患の診断が容易ではない場合がある。

【0007】

ここに、本発明者らは患者と正常人との間の診断シグナルの差 (differentiation) を極大化した凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型検出方法の開発必要性を認識した。

【0008】

本明細書の全体に亘っ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として本明細書に参照に挿入されて、本発明が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】

【0009】

【非特許文献 1】 Massimo Stefani, et al., J. Mol. Med. 81: 678 - 699 (2003)

【非特許文献 2】 Radford SE, et al., Cell. 97: 291 - 298 (1999)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

前記の背景下で、本発明者らは凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型を検出する新規方法を開発するために幅広い研究をしてきたものであり、その結果、ポリペプチドの凝集型形成を抑制する防御システム (clearing system) の差を用いて患者と正常人との間の診断シグナルの差 (differentiation) を極大化した凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型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) の凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型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) の凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型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、以下の発明の詳細な説明、請求範囲、及び図面により、一層明確になる。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明の一態様によれば、本発明は次のステップを含む生試料 (biosample) の凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型を検出する方法を提供する： (a) 分析対象の生試料に前記凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型をスパイク (spiking) するステップ； (b) 前記ステップ (a) の結果物をインキュベーションさせて前記凝集型 -

10

20

30

40

50

形成ポリペプチドの凝集型を追加的に形成させるステップ；(c)前記ステップ(b)の結果物に前記凝集型-形成ポリペプチドの凝集型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-標識を接触させるステップ；及び(d)前記凝集型-形成ポリペプチドの凝集型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ステップ、ここで、前記ステップ(b)のインキュベーションは前記スパイクした凝集型-形成ポリペプチドのダイマー型が前記生試料によりマルチマー化できる十分な時間の間実施する。

【0015】

本発明は、ポリペプチドの凝集型形成を抑制する防御システム(clearing system)の差を用いて患者と正常人との間の診断シグナルの差(differentiation)を極大化した凝集型-形成ポリペプチドの凝集型検出方法に関するものである。

10

【0016】

本明細書で、用語“凝集型-形成ポリペプチド”は、マルチマー型(オリゴマー型)が形成できるか、またはモノマーとの疎水性相互作用による凝集型が形成できるポリペプチドを意味する。特に、下記の構造的変化は多様な疾患を誘発する。例えば、アルツハイマー疾患、クロイツフェルト-ヤコブ病、スポンジフォーム脳疾患(Spongiform encephalopathies)、パーキンソン疾患、ハンチントン疾患、筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis)、セルピン欠乏症(Serpin deficiency)、肺気腫(emphysema)、硬変症(cirrhosis)、第II型糖尿病、一次全身性アミロイド症、二次全身性アミロイド症、前頭側頭葉性痴呆(Fronto-temporal dementia)、老人全身性アミロイド症、家族性アミロイド多発神経病(familial amyloid polyneuropathy)、遺伝性大脳アミロイド脈管病(hereditary cerebral amyloid angiopathy)、及び血透析-関連アミロイド症を含む。

20

【0017】

一般に、前記凝集型-形成ポリペプチドの非-凝集型は正常であり、凝集型は疾患、特にアルツハイマー疾患、クロイツフェルト-ヤコブ病、またはパーキンソン疾患のような神経退行性疾患を誘発する。

【0018】

本発明の一具現例によれば、前記スパイクした凝集型-形成ポリペプチドのダイマー型のマルチマー化をさせる前記生試料は、前記凝集型-形成ポリペプチドのマルチマー型が関与している疾患を有するヒトの生試料であり、より好ましくは前記生試料によりマルチマー化できる十分なインキュベーション時間は、凝集型-形成ポリペプチドのマルチマー型が関与している疾患を有するヒトの生試料を用いて発生したシグナルが正常のヒトの生試料を用いて発生したシグナルより1.3~20倍大きくすることに十分な時間である。

30

【発明の効果】

【0019】

本発明の特徴及び利点を要約すると、次の通りである：

40

(a)本発明は生試料(biosample)の凝集型-形成ポリペプチドの凝集型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の中に測定しようとする凝集型-形成ポリペプチドの凝集型(抗原)の量が非常に少ないか、または凝集型-形成ポリペプチドの凝集型(抗原)の大きさが非常に小さくて測定し難いか、または人体内凝集型-形成ポリペプチドの凝集型(抗原)の量と生試料の中の凝集型-形成ポリペプチドの凝集型(抗原)の量が比例しない場合に、ポリペプチドの凝集型形成を抑制する防御システム(clearing system)の差を用いて患者と正常人との間の診断シグナルの差(differentiation)を極大化した。

(c)本発明は、便利で、迅速な方式により実施することができ、これは生試料(bi

50

o s a m p l e ) の凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型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】

【0020】

【図1】本発明の実施例に従って、s26C - Beta - アミロイド (Amyloid) (1 - 40) ダイマー (Dimer) を処理した後、3日と4日の間インキュベーションされたサンプルでMDS (multimer detection system) (6E10 / FF51HRP set) を用いたA オリゴマー (oligomer) 検出結果を示す。

10

【図2】本発明の実施例に従って、s26C - Beta - アミロイド (Amyloid) (1 - 40) ダイマー (Dimer) を処理した後、3日と4日の間インキュベーションされたサンプルでMDS (multimer detection system) (6E10 / FF51HRP set) を用いたA オリゴマー (oligomer) 検出結果を示す。

【図3】本発明の実施例に従って、S26C - Beta - アミロイド (1 - 40) ダイマーを処理した後、0日、1日、2日、3日、4日、5日の間インキュベーションされたサンプルでMDS (multimer detection system) (6E10 / FF51HRP set) を用いたA オリゴマー (oligomer) 検出結果を示す。

【図4】本発明の実施例に従って、S26C - Beta - アミロイド (1 - 40) ダイマー 0.25 ng を処理後、0日、5日インキュベーションしたサンプルと無処理した後、0日、5日の間インキュベーションされたサンプルでMDS (multimer detection system) (6E10 / FF51HRP set) を用いたA オリゴマー (oligomer) 検出結果を示す。

20

【図5】本発明の実施例に従って、S26C - Beta - アミロイド (1 - 40) ダイマーを処理した後、1日と2日の間インキュベーションされたサンプルでMDS (multimer detection system) (6E10 / WO2HRP set) を用いたA オリゴマー (oligomer) 検出結果を示す。

【図6】本発明の実施例に従って、S26C - Beta - アミロイド (1 - 40) ダイマーを処理した後、1日と2日の間インキュベーションされたサンプルでMDS (multimer detection system) (6E10 / WO2HRP set) を用いたA オリゴマー (oligomer) 検出結果を示す。

30

【図7】本発明の実施例に従って、S26C - Beta - アミロイド (1 - 40) ダイマーを処理後、1日、2日、3日、4日の間インキュベーションされたサンプルでMDS (multimer detection system) (6E10 / WO2HRP set) を用いたA オリゴマー (oligomer) 検出結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

以下、生試料 (bio sample) の凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型を検出するための本発明の方法をステップ別に詳細に説明すると、次の通りである：

40

【0022】

(a) スパイクング (spiking) するステップ

まず、本発明の方法は分析対象の生試料に前記凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型をスパイクング (spiking) するステップを含む。

【0023】

本明細書で、用語 “生試料 (bio sample)” は、分析しようとする有機体 - 由来試料を意味する。前記生試料は、生物原の細胞、組織、または生体液、または本発明に従って分析できる他のメディアム (medium) を意味し、これはヒトから採取した試料、動物から採取した試料、ヒト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、リンパ液、牛乳、小便、大便、涙、唾

50

液、精液、脳抽出物（例えば、脳均質液）、脊髄液（SCF）、虫垂、腓腸、及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。

【0024】

本発明の他の具現例によれば、前記凝集型 - 形成ポリペプチドは、アルツハイマー疾患に關与するA ペプチドとタウ（tau）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、パーキンソン疾患に關与する - シヌクレイン、一次全身性アミロイド症に關与するIg 軽鎖、二次全身性アミロイド症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タウタンパク質、老人全身性アミロイド症に關与するトランスサイレチン、家族性アミロイド多発神経病に關与するトランスサイレチン、遺伝性大脳アミロイド脈管病に關与するシスタチンC、血透析 - 関連アミロイド症に關与する 2 - マイクログロブリン、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、及び硬変症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、前記凝集型 - 形成ポリペプチドはアルツハイマー疾患に關与するA ペプチドまたはタウタンパク質、またはパーキンソン疾患に關与する - シヌクレインであり、最も好ましくはA ペプチドである。

10

【0025】

本明細書で、用語“スパイクング（spiking）”は分析対象の生試料に凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型を添加または添加後に混合する過程を意味する。

20

【0026】

本明細書で、用語“マルチマー”にはオリゴマーも含まれる。

【0027】

本明細書で、用語“ダイマー”は2つのモノマーが結合されて形成されるものである。

【0028】

本発明によれば、分析対象の生試料に前記凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型をスパイクング（spiking）する場合は、凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型形成を抑制させる防御システム（clearing system）の差を用いて患者と正常人との間の診断シグナルの差（differentiation）を極大化するために、即ち患者の生試料は防御システム（clearing system）の程度が低くて凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型形成が促進されることに反して、正常人の生試料では防御システム（clearing system）の程度が高くて凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型形成が減少して診断シグナルの差（differentiation）が極大化される。

30

【0029】

本発明の更に他の具現例によれば、前記凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型は前記凝集型 - 形成ポリペプチドのモノマー型である配列表の配列番号1のアミノ酸配列からなるA ペプチド2つが、前記配列表の配列番号1のアミノ酸配列からなるA ペプチドの26番Cys残基によりジスルフィド結合されてなされる。

【0030】

本発明の他の具現例によれば、前記ステップ（a）の結果物に緩衝液を追加的に添加する。より好ましくは、前記緩衝液は生試料に対して3 ~ 15倍（v/v）で添加され、さらに好ましくは5 ~ 13倍（v/v）で添加され、さらなる好ましくは7 ~ 11倍（v/v）で添加され、さらに好ましくは8 ~ 10倍（v/v）で添加される。

40

【0031】

本発明に用いられる緩衝液は当業界に公知された多様な緩衝液を用いることができるが、好ましくは前記緩衝液は非イオン性界面活性剤 - 含有磷酸塩緩衝液である。

【0032】

本発明に用いられる磷酸塩緩衝液に含まれる非イオン性界面活性剤は当業界に公知された多様な非イオン性界面活性剤を用いることができ、好ましくはアルコキシレイテッドア

50

ルキルエーテル、アルコキシレイテッドアルキルエステル、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が使われて、最も好ましくはTween-20が使われる。

【0033】

(b) 凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型を追加的に形成させるステップ

次に、本発明の方法は、(b)前記ステップ(a)の結果物をインキュベーションさせて前記凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型を追加的に形成させるステップを含む。

【0034】

本発明の最も大きい特徴の1つは、生試料の中に測定しようとする凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型(抗原)の量が非常に少ないか、または凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型(抗原)の大きさが非常に小さくて測定し難いか、または人体内凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型(抗原)の量と生試料の中の凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型(抗原)の量が比例しない場合に、前述した前記凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型を生試料にスパイク(spike)して凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型を追加的に形成させることによって、疾病または疾患の有無または進行程度が測定できるということである。

10

【0035】

本発明の他の具現例によれば、前記ステップ(b)の凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型の追加的な形成は、前記ステップ(a)の結果物を温度1~50でインキュベーション(incubation)させて実施し、より好ましくは温度35~50でインキュベーション(incubation)させて実施し、さらに好ましくは温度35~45で実施し、さらなる好ましくは温度35~40で実施する。

20

【0036】

本発明で、前記ステップ(b)のインキュベーションは前記スパイクした凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型が前記生試料によりマルチマー化できる十分な時間の間実施し、より好ましくは前記生試料によりマルチマー化できる十分なインキュベーション時間は、凝集型 - 形成ポリペプチドのマルチマー型が関与している疾患を有するヒトの生試料を用いて発生したシグナルが正常のヒトの生試料を用いて発生したシグナルより1.3~20倍大きくすることに十分な時間である。

30

【0037】

本発明の更に他の具現例によれば、ヒトの生試料を用いて発生したシグナルが正常のヒトの生試料を用いて発生したシグナルより1.3~20倍大きくすることに十分な時間の間実施するための、前記ステップ(b)の凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型の追加的な形成は、前記ステップ(a)の結果物を1日~12日の間インキュベーション(incubation)させて実施し、より好ましくは1日~10日の間実施し、さらに好ましくは1日~8日の間実施し、さらなる好ましくは1日~6日の間実施し、さらに好ましくは2日~6日の間実施し、最も好ましくは2日~5日の間実施する。

【0038】

本明細書で、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の間スタンディングすること(kept to stand)またはシェーキング(shaking)することを意味し、シェーキングする場合には、好ましくはマイルドシェーキング(mild shaking)することを意味する。

40

【0039】

本発明の最も大きい特徴の他の1つは、生試料を所定の温度で一定期間スタンディング(即ち、インキュベーション)することによって、生試料に存在するスパイクされた凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型と凝集型 - 形成ポリペプチドが互いによく凝集(aggregation)されるようにして患者と正常人との間の診断シグナルの差(differentiation)を極大化したという点である。

【0040】

50

(c) 前記ステップ (b) の結果物に前記凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型に結合する結合剤 - 標識の接触

そして、本発明の方法は (c) 前記ステップ (b) の結果物に前記凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型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 - 標識を接触させるステップを経る。

**【0041】**

本発明で、前記凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型に結合する結合剤は、抗体、ペプチドアダプター、アドネクチン (AdNectin)、アフィボディ (affibody)、米国特許第 5, 831, 012 号)、アビマー (Avimer, Silverman, J. et al, Nature Biotechnology 23(12): 1556 (2005)) またはクニツドメイン (Kunitz domain, Arnoux B et al., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 58 (Pt 7): 12524 (2002))、及び Nixon, AE, Current opinion in drug discovery & development 9(2): 2618 (2006)) である。

10

**【0042】**

本発明で、前記凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型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、フェロキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、及び  $\beta$ -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、及び FRET (蛍光共鳴エネルギー伝達; fluorescence resonance energy transfer) 標識を含むが、これに限定されるものではない。

20

**【0043】**

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

最後に、本発明の方法は、(d) 前記凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型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ステップを含む。

**【0044】**

前記凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型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多様な方法により実施することができ、例えば抗原 - 抗体反応と関連した免疫分析法を用いて実施することができる。

30

**【0045】**

本発明の更に他の具現例によれば、前記ステップ (c) 及び (d) は次のステップを含む方法により実施される: (c-1) 前記凝集型を捕獲 (capturing) する前記凝集型 - 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ステップ (b) の結果物を接触させるステップ; (c-2) 前記凝集型 - 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型を接触させるステップ; 及び (c-3) 凝集型 - 検出抗体複合体を検出するステップ。

**【0046】**

このような検出方法は 2 つ形態の抗体、即ち捕獲抗体及び検出抗体を用いる。本明細書で、用語、“捕獲抗体” は生試料で検出しようとする凝集型 - 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り捕獲された凝集型 - 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。本明細書に用いら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')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fv) を含む。

40

**【0047】**

前記検出方法は、凝集型 - 形成ポリペプチド上のエピトープを特異的に認識する 1 セットの捕獲抗体及び検出抗体を用いるものであって、前記捕獲抗体及び検出抗体が特異的に

50

認識する前記エピトープは互いに同一またはオーバーラップしている。

【0048】

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われる用語、“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するアミノ酸配列を含むエピトープを包括する。例えば、6E10、FF51、及びWO2抗体に対するエピトープはヒトA ペプチド配列の各々、アミノ酸3-8、1-4、及び4-10からなるアミノ酸配列を有する。このようなエピトープは完全にオーバーラップするエピトープで説明できる。

【0049】

本発明の他の具現例によれば、ヒトA 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3-8、1-4、または4-10からなるアミノ酸配列を有する。

10

【0050】

本発明の更に他の具現例によれば、前記捕獲抗体が認識するエピトープは、前記凝集型-形成ポリペプチドで反復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型-形成ポリペプチドで反復されない配列である。本発明の検出方法によれば、捕獲抗体に結合された凝集型-形成ポリペプチドは、検出抗体とこれ以上結合できず、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ためである。

【0051】

本発明の他の具現例によれば、前記捕獲抗体及び検出抗体は互いに同一である。即ち、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ものが好ましい。

20

【0052】

本発明の更に他の具現例によれば、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、及びジェ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、マイクロタイプレート、粒子(例えば、ビード)、親和性コラム、及びイムノプロットメンブレン(例えば、ポリビニリデンフルオライドメンブレン)形態でありうる(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)。

【0053】

本発明の他の具現例によれば、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、ピオチン)、酵素標識(例えば、アルカリンホスファターゼ、フェロキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、及び $\beta$ -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、化学発光標識及びFRET(蛍光共鳴エネルギー伝達; fluorescence resonance energy transfer)標識を含むが、これに限定されるものではない。抗体を標識するための多様な標識及び方法は、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.)。

30

40

【0054】

本発明で、凝集型-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(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991);及びMarks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))のような従来技術によって免疫原に以前に記載されたエピトープを用いて準備することができる。前記抗体製造のための一般的な方法は、Harlow, E. and Lane, D.

50

, 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。

**【0055】**

単クローン抗体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 (immortal cell line) 及び抗体を生産するリンパ球の融合により実施される。前記単クローン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。多クローン抗体は、前述した抗原に適した動物に注入し、抗体を含む抗血清を収集した後、公知された親和性技術により抗体を分離する方法により製造できる。

10

**【0056】**

凝集型 - 検出抗体複合体の検出は、当業界の公知された多様な方法により実施することができる。凝集型 - 検出抗体複合体の形成は生試料に凝集型の存在を示す。前記ステップは従来の方法に従って、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. に記載されたように、多様な検出することができる標識/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。

20

**【0057】**

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には、プロモクロロインドリルホスフェート (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用いることができる; ホースラディッシュフェロキシダーゼで表示する場合、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ナイトレート)、レゾルフィンベンジルエーテル、ルミノール、アムプレクスレッド試薬 (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'-テトラメチルベンズイジン)、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。

30

**【0058】**

このような方法により凝集型 - 形成ポリペプチドのマルチマー型が関与している疾患を有するヒトの生試料を用いて発生したシグナルが正常のヒトの生試料を用いて発生したシグナルより 1.3 ~ 20 倍大きくすることができ、より好ましくは 1.5 ~ 10 倍、さらに好ましくは 1.6 倍 ~ 10 倍大きくすることができる。

**【0059】**

本発明の他の様態によれば、本発明は凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型を含む生試料 (bio sample) の凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型を検出するためのキットを提供する。

40

**【0060】**

本発明のキットは前述した本発明の生試料 (bio sample) の凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型を検出する方法を用いるものであって、この両者に共通する内容は反復記載に従う明細書の過度な複雑性を避けるために、その記載を省略する。

**【0061】**

本発明の他の具現例によれば、前記キットは凝集型 - 形成ポリペプチド上のエピトープを認識する捕獲抗体; 及び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を

50

追加的に含む。

【実施例】

【0062】

以下、実施例を通じて本発明をより詳細に説明する。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、本発明の要旨に従って本発明の範囲がこれら実施例により制限されないということは当業界で通常の知識を有する者において自明である。

【0063】

実施例

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D.Wに1%のBlock Aceが希釈されるように製造した。HBR1はScantibodies Laboratory社から購入した。6E10抗体はBiolegend社から購入した。WO2-HRP抗体はAbsolute Antibody社から購入した。FF51-HRPは(株)The H Labから購入した。WO2-HRP抗体はAbsolute Antibody社から購入した。組換え (recombinant) A1-42はBiolegend社から購入した。組換えS26C-Beta-アミロイド (Amyloid) (1-40) ダイマー (Dimer) はJPT社から購入した。血漿 (plasma) サンプルは盆唐ソウル大学病院及び中央大学病院から提供を受けた。ECL溶液はRockland社から購入した。プレートはNunc社から購入した。6E10、FF51、及びWO2抗体に対するエピトープはヒトAペプチド配列の各々、アミノ酸3-8、1-4、及び4-10からなるアミノ酸配列を有する。S26C-Beta-アミロイド (1-40) ダイマーのシーケンスはDAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGCNKGAIIGLMVGGVVであり、各単量体の26番システイン残基によってジスルフィド結合したダイマー (Dimer) 形態をなしている。

【0064】

実施例2：6E10プレート製造

6E10抗体 (抗Aタンパク質、Biolegend) 30 µgをコーティングバッファ (sigma) 10 mlに希釈し、プレート (Nunc) に100 µlを各ウェルに分注後、4 冷蔵庫に一日間反応させた。前記プレートをPBSに3回洗浄し、D.Wに1% Block Aceが溶けているブロッキングバッファ240 µlを分注後、室温で2時間反応させた。前記プレートはPBSで3回洗浄し、室温に30分間乾燥させた後、使用した。

【0065】

実施例3：対照群準備

陽性対照群 (positive control) は組換えA1-42 (rec.A) (1 µg/ml) 10 µlにPBST 990 µlを添加して100 µlを使用した。陰性対照群 (negative control) はPBS 100 µlを使用した。

【0066】

実施例4：サンプル準備

サンプルは2サンプルを基準として準備した。凍らせた血漿サンプルを37 ヒートブロック (heat block) に15分間溶かした後、30秒間ボルテックスした (vortexing) 後、使用した。S26C-Beta-アミロイド (1-40) ダイマー 0.25 ngがスパイク (spiking) されたサンプルは、血漿20 µlにHBR1 (0.123 mg/ml) 8.08 µlとPBST 180 µl、S26C-Beta-アミロイド (1-40) ダイマー (0.25 ng/10 µl) 20 µlを混合して全体228.08 µl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いサンプルは、血漿20 µlにHBR1 (0.123 mg/ml) 8.08 µlとPB

10

20

30

40

50

S T 200  $\mu$ l を混合して全体 228.08  $\mu$ l になるように準備した。

【0067】

実施例 5 : インキュベーション ( i n c u b a t i o n )

前記実施例 4 で、S 2 6 C - B e t a - アミロイド ( 1 - 4 0 ) ダイマーが処理されて準備されたサンプルは 37 インキュベーターで各 0 日、1 日、2 日、3 日、4 日、5 日の間インキュベーションさせた ( 6 E 1 0 / F F 5 1 H R P s e t ) 。また、前記実施例 4 で S 2 6 C - B e t a - アミロイド ( 1 - 4 0 ) ダイマーが無処理されて準備されたサンプルは、37 インキュベーターで 0 日、5 日の間インキュベーションさせた ( 6 E 1 0 / F F 5 1 H R P s e t ) 。そして、前記実施例 4 で、S 2 6 C - B e t a - アミロイド ( 1 - 4 0 ) ダイマーが処理されて準備されたサンプルは 37 インキュベーターで各 1 日、2 日、3 日、4 日の間インキュベーションさせた ( 6 E 1 0 / W O 2 H R P s e t ) 。

10

【0068】

実施例 6 : 6 E 1 0 / F F 5 1 H R P s e t : S 2 6 C - B e t a - アミロイド ( 1 - 4 0 ) ダイマーを処理した後、3 日と 4 日の間インキュベーションされたサンプルで M D S ( m u l t i m e r d e t e c t i o n s y s t e m ) を用いた A オリゴマー ( o l i g o m e r ) 検出

6 E 1 0 コーティングプレート ( 3  $\mu$ g / m l ) に陽性対照群及び、陰性対照群に S 2 6 C - B e t a - アミロイド ( 1 - 4 0 ) ダイマーが 0 . 2 5 n g 処理されて 3 日と 4 日の間インキュベーションされたサンプルを各々 1 0 0  $\mu$ l ずつ分注した後、室温で 1 時間反応させた。前記プレートを T B S T で 3 回洗浄し、F F 5 1 - H R P 抗体をバッファ A に 0 . 5  $\mu$ g / m l になるように製造後、1 0 0  $\mu$ l ずつ分注した。前記プレートを T B S T で 3 回洗浄後、E C L 溶液を 1 0 0  $\mu$ l 分注した。E C L と反応されたプレートはルミノメーター機器 ( p e r k i n e l m e r ) に挿入し、発光 ( l u m i n e s c e n t ) シグナルを測定した。その結果は、以下の図 1、2 の通りである。

20

【0069】

図 1 及び図 2 は、S 2 6 C - B e t a - アミロイド ( 1 - 4 0 ) ダイマーを添加後、インキュベーション時間に従って A D サンプルと N o n A D サンプルとの間のシグナルの変化を示す。3 日と 4 日インキュベーションされた各条件で A D と N o n A D との間に差を示す。

30

【0070】

図 1 及び図 2 を通じて見ると、N o n A D 患者サンプルと比較時、A D 患者のサンプルでの A オリゴマーのシグナルが高く出るとは、A D 患者サンプルで A オリゴマー形成を抑制させる防御システムが N o n A D 患者でより少なく活性化されると判断される。

【0071】

実施例 7 : 6 E 1 0 / F F 5 1 H R P s e t : S 2 6 C - B e t a - アミロイド ( 1 - 4 0 ) ダイマーを処理した後、0 日、1 日、2 日、3 日、4 日、5 日の間インキュベーションされたサンプルで M D S ( m u l t i m e r d e t e c t i o n s y s t e m ) を用いた A オリゴマー ( o l i g o m e r ) 検出

40

6 E 1 0 コーティングプレート ( 3  $\mu$ g / m l ) に陽性対照群及び、陰性対照群に S 2 6 C - B e t a - アミロイド ( 1 - 4 0 ) ダイマーが 0 . 2 5 n g 処理されて 0 日、1 日、2 日、3 日、4 日、5 日の間インキュベーションされたサンプルを各々 1 0 0  $\mu$ l ずつ分注した後、室温で 1 時間反応させた。前記プレートを T B S T で 3 回洗浄し、F F 5 1 - H R P 抗体をバッファ A に 0 . 5  $\mu$ g / m l になるように製造後、1 0 0  $\mu$ l ずつ分注した。前記プレートを T B S T で 3 回洗浄後、E C L 溶液を 1 0 0  $\mu$ l 分注した。E C L と反応されたプレートはルミノメーター機器 ( p e r k i n e l m e r ) に挿入し、発光 ( l u m i n e s c e n t ) シグナルを測定した。その結果は、以下の図 3 の通りである。

【0072】

50

図3は、S26C-Beta-アミロイド(1-40)ダイマーを添加後、インキュベーション時間に従ってADサンプルとNon ADサンプルとの間のシグナルの変化を確認したグラフであって、インキュベーション時間が増加するにつれて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、1.64倍、2.14倍、3.01倍、3.35倍に増加することを示す。

【0073】

図3を通じて見ると、Non AD患者サンプルと比較時、AD患者のサンプルでのAオリゴマーのシグナルが高く出るとは、AD患者サンプルでAオリゴマー形成を抑制させる防御システムがNon AD患者でより少なく活性化されると判断される。

【0074】

実施例8：6E10/FF51HRP set：S26C-Beta-アミロイド(1-40)ダイマー 0.25ngを処理後、0日、5日インキュベーションしたサンプルと無処理した後、0日、5日の間インキュベーションされたサンプルでMDS(multimer detection system)を用いたAオリゴマー(oligomer)検出

6E10コーティングプレート(3μg/ml)に陽性対照群及び、陰性対照群にS26C-Beta-アミロイド(1-40)ダイマーが0.25ng処理された後、0日、5日処理されない各0日、5日の間インキュベーションされたサンプルを各々100μlずつ分注した後、27インキュベーター(incubator)で静置状態で1時間反応させた。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0.5μg/mlになるように製造後、100μlずつ分注した。前記プレートをTBSTで3回洗浄後、ECL溶液を100μl分注した。ECLと反応され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、以下の図4の通りである。

【0075】

図4は、S26C-Beta-アミロイド(1-40)ダイマーを添加せず、0日と5日、添加した後、0日と5日の間インキュベーションされたサンプルでAオリゴマーを測定したデータであって、S26C-Beta-アミロイド(1-40)ダイマーをスパイクしなかったときとスパイクしたとき、時間に従ってADサンプルのシグナルがNon ADサンプルよりシグナルが増加することを示した。

【0076】

S26C-Beta-アミロイド(1-40)ダイマーをスパイクせず、0日と5日間インキュベーションしたサンプルの場合は、ADのシグナルがNon ADのシグナルより各々1.09倍、1.97倍の差を示しており、0日から5日間Aオリゴマー(oligomer)の変化量は1.8倍増加した。一方、S26C-Beta-アミロイド(1-40)ダイマーを0.25ngスパイクした後、0日と5日間インキュベーションしたサンプルの場合は、ADのシグナルがNon ADのシグナルより各々1.1倍、3.47倍の差を示し、0日から5日間Aオリゴマー(oligomer)の変化量は3.15倍増加することを示す。

【0077】

図4を通じて見ると、Non AD患者サンプルと比較時、AD患者のサンプルでのAオリゴマーのシグナルが高く出るとは、AD患者サンプルでAオリゴマー形成を抑制させる防御システムがNon AD患者でより少なく活性化されると判断される。

【0078】

実施例9：6E10/WO2HRP set：S26C-Beta-アミロイド(1-40)ダイマーを処理した後、1日と2日の間インキュベーションされたサンプルでMDS(multimer detection system)を用いたAオリゴマー(oligomer)検出

6E10コーティングプレート(3μg/ml)に陽性対照群及び、陰性対照群にS26C-Beta-アミロイド(1-40)ダイマーが0.25ng処理されて1日と2日

10

20

30

40

50

の間インキュベーションされたサンプルを各々100 $\mu$ lずつ分注した後、室温で1時間反応させた。前記プレートをTBSで3回洗浄し、WO2-HRP抗体をバッファAに0.25 $\mu$ g/mlになるように製造後、100 $\mu$ lずつ分注した。前記プレートをTBSで3回洗浄後、ECL溶液を100 $\mu$ l分注した。ECLと反応され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、以下の図5、6の通りである。

【0079】

図5及び図6は、S26C-Beta-アミロイド(1-40)ダイマーを添加後、インキュベーション時間に従ってADサンプルとNon ADサンプルとの間のシグナルの変化を示す。1日と2日インキュベーションされた各条件でADとNon ADとの間に差を示す。

10

【0080】

図5及び6を通じて見ると、Non AD患者サンプルと比較時、AD患者のサンプルでのAオリゴマーのシグナルが高く出るとは、AD患者サンプルでAオリゴマー形成を抑制させる防御システムがNon AD患者でより少なく活性化されると判断される。

【0081】

実施例10: 6E10/WO2HRP set: S26C-Beta-アミロイド(1-40)ダイマーを処理後、1日、2日、3日、4日の間インキュベーションされたサンプルでMDS(multimer detection system)を用いたAオリゴマー(oligomer)検出

20

6E10コーティングプレート(3 $\mu$ g/ml)に陽性対照群及び、陰性対照群にS26C-Beta-アミロイド(1-40)ダイマーが0.25ng処理されて1日、2日、3日、4日の間インキュベーションされたサンプルを各々100 $\mu$ lずつ分注した後、室温で1時間反応させた。前記プレートをTBSで3回洗浄し、WO2-HRP抗体をバッファAに0.25 $\mu$ g/mlになるように製造後、100 $\mu$ lずつ分注した。前記プレートをTBSで3回洗浄後、ECL溶液を100 $\mu$ l分注した。ECLと反応され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、以下の図7の通りである。

【0082】

30

図7は、S26C-Beta-アミロイド(1-40)ダイマーを添加後、インキュベーション時間に従ってADサンプルとNon ADサンプルとの間のシグナルの変化を確認したグラフである。その結果として、インキュベーション1日目ではADサンプルの平均シグナルがNon ADの平均シグナルより1.19倍高いし、全体的にサンプルシグナルが上昇した。一方、2日目、3日目、4日目では、全体的に高まったサンプルのシグナル値が落ちるにつれてADサンプルがNon ADサンプルより1.69倍、1.50倍、1.41倍の差を示すことを確認した。

【0083】

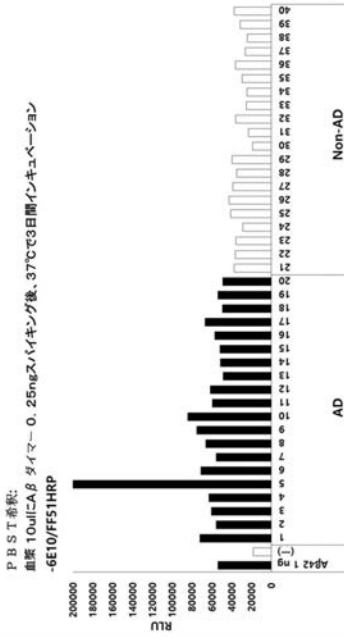
図7を通じて見ると、Non AD患者サンプルと比較時、AD患者のサンプルでのAオリゴマーのシグナルが高く出るとは、AD患者サンプルでAオリゴマー形成を抑制させる防御システムがNon AD患者でより少なく活性化されると判断される。

40

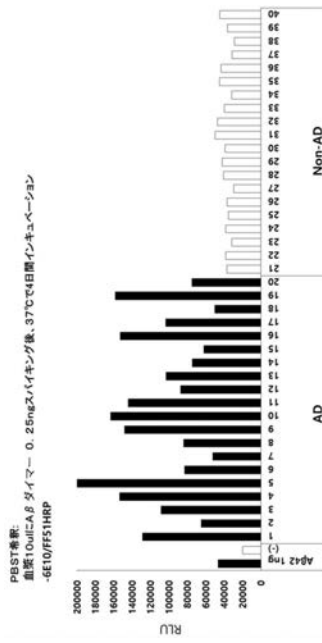
【0084】

以上、本発明の特定の部分を詳細に記述したところ、当業界の通常の知識を有する者に当たって、このような具体的な技術は単に好ましい具現例であり、これに本発明の範囲が制限されるものでない点は明白である。したがって、本発明の実質的な範囲は添付した請求項とその等価物により定義されるということが出来る。

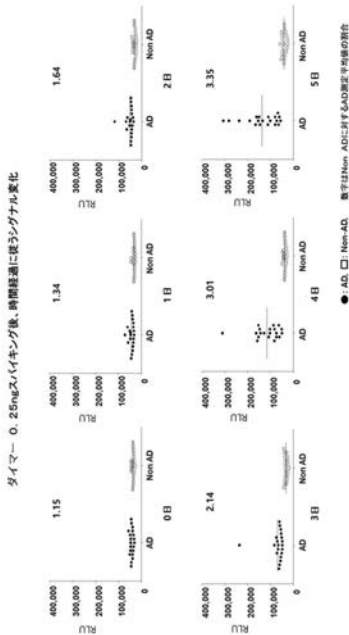
【 図 1 】



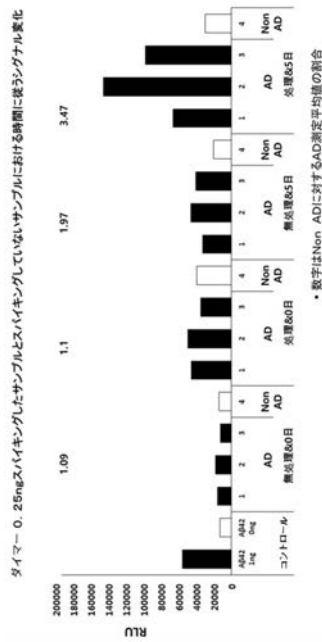
【 図 2 】



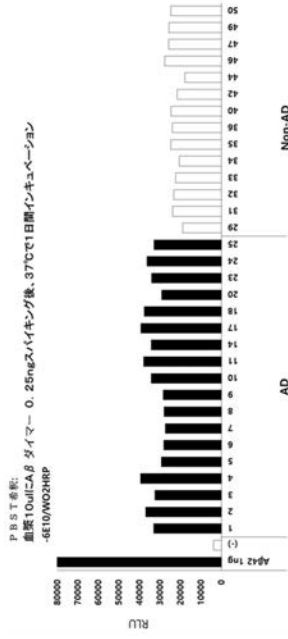
【 図 3 】



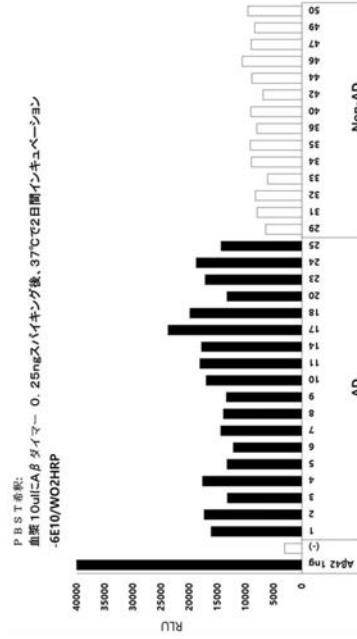
【 図 4 】



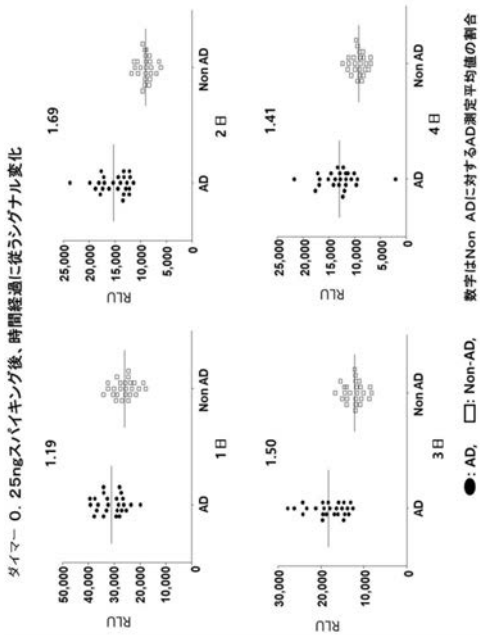
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



## 【配列表】

2019512700000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成30年9月20日(2018.9.20)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

次のステップを含む生試料(biosample)の凝集型-形成ポリペプチドの凝集型を検出する方法:

(a)分析対象の生試料に前記凝集型-形成ポリペプチドのダイマー型をスパイク(spike)するステップ;

(b)前記ステップ(a)の結果物をインキュベーションさせて前記凝集型-形成ポリペプチドの凝集型を追加的に形成させるステップ;

(c)前記ステップ(b)の結果物に前記凝集型-形成ポリペプチドの凝集型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-標識を接触させるステップ;及び

(d)前記凝集型-形成ポリペプチドの凝集型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ステップ、

ここで、前記ステップ(b)のインキュベーションは前記スパイクした凝集型-形成ポリペプチドのダイマー型が前記生試料によりマルチマー化できる十分な時間の間実施する。

【請求項2】

前記スパイクした凝集型-形成ポリペプチドのダイマー型のマルチマー化をさせる前記生試料は、前記凝集型-形成ポリペプチドのマルチマー型が関与している疾患を有するヒト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】

前記生試料によりマルチマー化できる十分なインキュベーション時間は、凝集型-形成ポリペプチドのマルチマー型が関与している疾患を有するヒトの生試料を用いて発生したシグナルが正常のヒトの生試料を用いて発生したシグナルより1.3~20倍大きくすること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(biosample)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(plasma)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】

前記凝集型-形成ポリペプチドは、Aペプチド、タウ(tau)タンパク質、プリオン、 $\beta$ -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、 $\alpha$ 2-マイクログロブリン、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、及びアミリンから構成された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】

前記凝集型-形成ポリペプチドは、Aペプチド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】

前記凝集型-形成ポリペプチドのダイマー型は、配列表の配列番号1のアミノ酸配列が

らなる A ペプチドの 26 番 C y s 残基によりジスルフィド結合されてなるダイマー型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】

前記ステップ ( a ) の結果物に緩衝液を追加的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 10】

前記緩衝液は生試料に対して 3 ~ 15 倍 ( v / v ) で添加されることを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記緩衝液は非イオン性界面活性剤 - 含有燐酸塩緩衝液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】

前記ステップ ( b ) の凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型の追加的な形成は、前記ステップ ( a ) の結果物を温度 1 ~ 50 でインキュベーション ( i n c u b a t i o n ) させて実施することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記ステップ ( c ) 及び ( d ) は、次のステップを含む方法により実施されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法：

( c - 1 ) 前記凝集型を捕獲 ( c a p t u r i n g ) する前記凝集型 - 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ステップ ( b ) の結果物を接触させるステップ；

( c - 2 ) 前記凝集型 - 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型を接触させるステップ；及び

( c - 3 ) 凝集型 - 検出抗体複合体を検出するステップ。

【請求項 14】

前記検出抗体は、前記ステップ ( c - 1 ) のエピトープと同一なまたはオーバーラップする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 13 に記載の方法。

【請求項 15】

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 13 に記載の方法。

【請求項 16】

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 13 に記載の方法。

【請求項 17】

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 16 に記載の方法。

【請求項 18】

凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型を含む生試料 ( b i o s a m p l e ) の凝集型 - 形成ポリペプチドの凝集型を検出するためのキット。

【請求項 19】

前記生試料 ( b i o s a m p l e ) は血液であることを特徴とする、請求項 18 に記載のキット。

【請求項 20】

前記血液試料は血漿 ( p l a s m a ) であることを特徴とする、請求項 19 に記載のキット。

【請求項 21】

前記凝集型 - 形成ポリペプチドは、A ペプチド、タウ ( t a u ) タンパク質、プリオン、 $\beta$ -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、 $\alpha$ 2 - マイクログロブリン、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、及びアミリンから構成された群から選択されたことを特徴とする、請求項 18 に記

載のキット。

【請求項 2 2】

前記凝集型 - 形成ポリペプチドは、A ペプチドであることを特徴とする、請求項 2 1 に記載のキット。

【請求項 2 3】

前記凝集型 - 形成ポリペプチドのダイマー型は配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列からなる A ペプチドの 2 6 番 C y s 残基によりジスルフィド結合されてなるダイマー型であることを特徴とする、請求項 1 8 に記載のキット。

【請求項 2 4】

前記キットは緩衝液を追加的に含むことを特徴とする、請求項 1 8 に記載のキット。

【請求項 2 5】

前記緩衝液は非イオン性界面活性剤 - 含有燐酸塩緩衝液であることを特徴とする、請求項 2 4 に記載のキット。

【請求項 2 6】

前記キットは凝集型 - 形成ポリペプチド上のエピトープを認識する捕獲抗体；及び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を追加的に含むことを特徴とする、請求項 1 8 に記載のキット。

【請求項 2 7】

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する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 2 6 に記載のキット。

【請求項 2 8】

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 2 6 に記載のキット。

【請求項 2 9】

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 2 6 に記載のキット。

【請求項 3 0】

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 2 9 に記載のキット。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 8

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 3

【補正方法】削除

【補正の内容】

【手続補正 4】


【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 8 4

【補正方法】削除

【補正の内容】

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/KR2017/002858</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <i>G01N 33/58(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/58; G01N 33/53; G01N 33/68; G01N 33/532; G01N 33/50  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: aggregate-forming polypeptide, aggregation, dimer, incubation		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2011-0081330 A (PEOPLEBIO, INC.) 13 July 2011 See paragraphs [0019], [0026], [0043] and [0066]-[0068].	1-31
A	KR 10-2014-0069346 A (AFFIRIS AG.) 09 June 2014 See claims 1 and 5; paragraphs [0053]-[0056].	1-31
A	US 8026070 B2 (AN, S. S. A. et al.) 27 September 2011 See the entire document.	1-31
A	KR 10-1352849 B1 (NANOENITEK, INC.) 21 January 2014 See the entire document.	1-31
PA	KR 10-2016-0067026 A (PEOPLEBIO, INC.) 13 June 2016 See the entire document.	1-31
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <p style="text-align: center;"><b>17 JULY 2017 (17.07.2017)</b></p>		Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center;"><b>17 JULY 2017 (17.07.2017)</b></p>
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. +82-42-481-8578		Authorized officer   Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2017/002858**

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		
		EP 2010904 A4	21/10/2009		
		EP 2010904 B1	08/06/2016		
		JP 2009-534648 A	24/09/2009		
		JP 5164971 B2	21/03/2013		
		KR 10-1132293 B1	05/04/2012		
		KR 10-1188861 B1	08/10/2012		
		KR 10-2009-0013186 A	04/02/2009		
		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	AR 088108 A1	07/05/2014
				AU 2012-320766 A1	13/03/2014
AU 2012-320767 A1	13/03/2014				
CA 2850840 A1	11/04/2013				
CA 2850843 A1	11/04/2013				
CN 103842824 A	04/06/2014				
CN 103842825 A	04/06/2014				
CN 103842825 B	20/04/2016				
EP 2579042 A1	10/04/2013				
EP 2579042 B1	09/07/2014				
EP 2764367 A1	13/08/2014				
EP 2764368 A1	13/08/2014				
HK 1178601 A1	28/11/2014				
JP 2014-529087 A	30/10/2014				
JP 2014-529088 A	30/10/2014				
KR 10-2014-0073568 A	16/06/2014				
MX 2014003983 A	07/05/2014				
MX 2014003984 A	07/05/2014				
RU 2014-117671 A	10/11/2015				
RU 2014-117677 A	10/11/2015				
US 2014-0234877 A1	21/08/2014				
US 2014-0242727 A1	28/08/2014				
US 9625459 B2	18/04/2017				
WO 2013-050248 A1	11/04/2013				
WO 2013-050249 A1	11/04/2013				
US 8026070 B2	27/09/2011	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 A4	10/09/2008		
		EP 1848817 B1	24/04/2013		
		JP 2008-530578 A	07/08/2008		
		JP 4772065 B2	14/09/2011		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2017/002858**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		KR 10-0987639 B1	13/10/2010
		KR 10-2008-0000566 A	02/01/2008
		KR 10-2010-0036324 A	07/04/2010
		KR 10-2010-0087403 A	04/08/2010
		US 2010-0009388 A1	14/01/2010
		WO 2006-088281 A1	24/08/2006
KR 10-1352849 B1	21/01/2014	KR 10-20130079789 A	11/07/2013
		US 2014-0370620 A1	18/12/2014
		WO 2013-103245 A1	11/07/2013
KR 10-2016-0067026 A	13/06/2016	KR 10-1658620 B1	23/09/2016
		KR 10-2016-0067065 A	13/06/2016
		WO 2016-088999 A1	09/06/2016

국제조사보고서

국제출원번호  
PCT/KR2017/002858

<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> G01N 33/58(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/58; G01N 33/53; G01N 33/68; G01N 33/532; G01N 33/50		
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: 용집형-형성 폴리펩타이드, 용집, 다이버, 인큐베이션		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2011-0081330 A (주식회사 피플바이오) 2011.07.13 단락 [0019], [0026], [0043] 및 [0066]-[0068] 참조.	1-31
A	KR 10-2014-0069346 A (아피리스 아게) 2014.06.09 청구항 1 및 5; 단락 [0053]-[0056] 참조.	1-31
A	US 8026070 B2 (AN, S. S. A. 등) 2011.09.27 전체 문헌 참조.	1-31
A	KR 10-1352849 B1 (주식회사 나노엔텍) 2014.01.21 전체 문헌 참조.	1-31
PA	KR 10-2016-0067026 A (주식회사 피플바이오) 2016.06.13 전체 문헌 참조.	1-31
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 " & " 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2017년 07월 17일 (17.07.2017)	국제조사보고서 발송일 2017년 07월 17일 (17.07.2017)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 박정민 전화번호 +82-42-481-3516	

국제조사보고서 대응특허에 관한 정보		국제출원번호 <b>PCT/KR2017/002858</b>			
국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일		
KR 10-2011-0081330 A	2011/07/13	AU 2007-241729 A1	2007/11/01		
		CA 2649359 A1	2007/11/01		
		CN 101427132 A	2009/05/06		
		EP 2010904 A1	2009/01/07		
		EP 2010904 A4	2009/10/21		
		EP 2010904 B1	2016/06/08		
		JP 2009-534648 A	2009/09/24		
		JP 5164971 B2	2013/03/21		
		KR 10-1132293 B1	2012/04/05		
		KR 10-1188861 B1	2012/10/08		
		KR 10-2009-0013186 A	2009/02/04		
		US 2010-0021943 A1	2010/01/28		
		US 8008026 B2	2011/08/30		
		WO 2007-123345 A1	2007/11/01		
		KR 10-2014-0069346 A	2014/06/09	AR 088108 A1	2014/05/07
				AU 2012-320766 A1	2014/03/13
				AU 2012-320767 A1	2014/03/13
CA 2850840 A1	2013/04/11				
CA 2850843 A1	2013/04/11				
CN 103842824 A	2014/06/04				
CN 103842825 A	2014/06/04				
CN 103842825 B	2016/04/20				
EP 2579042 A1	2013/04/10				
EP 2579042 B1	2014/07/09				
EP 2764367 A1	2014/08/13				
EP 2764368 A1	2014/08/13				
HK 1178601 A1	2014/11/28				
JP 2014-529087 A	2014/10/30				
JP 2014-529088 A	2014/10/30				
KR 10-2014-0073568 A	2014/06/16				
MX 2014003983 A	2014/05/07				
MX 2014003984 A	2014/05/07				
RU 2014-117671 A	2015/11/10				
RU 2014-117677 A	2015/11/10				
US 2014-0234877 A1	2014/08/21				
US 2014-0242727 A1	2014/08/28				
US 9625459 B2	2017/04/18				
WO 2013-050248 A1	2013/04/11				
WO 2013-050249 A1	2013/04/11				
US 8026070 B2	2011/09/27	AU 2005-327652 A1	2006/08/24		
		CA 2598321 A1	2006/08/24		
		CN 101124342 A	2008/02/13		
		EP 1848817 A1	2007/10/31		
		EP 1848817 A4	2008/09/10		
		EP 1848817 B1	2013/04/24		
		JP 2008-530578 A	2008/08/07		
		JP 4772065 B2	2011/09/14		

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

국제조사보고서  
대응특허에 관한 정보

국제출원번호  
**PCT/KR2017/002858**

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		KR 10-0987639 B1	2010/10/13
		KR 10-2008-0000566 A	2008/01/02
		KR 10-2010-0036324 A	2010/04/07
		KR 10-2010-0087403 A	2010/08/04
		US 2010-0009388 A1	2010/01/14
		WO 2006-088281 A1	2006/08/24
KR 10-1352849 B1	2014/01/21	KR 10-20130079789 A	2013/07/11
		US 2014-0370620 A1	2014/12/18
		WO 2013-103245 A1	2013/07/11
KR 10-2016-0067026 A	2016/06/13	KR 10-1658620 B1	2016/09/23
		KR 10-2016-0067065 A	2016/06/13
		WO 2016-088999 A1	2016/06/09

## 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, DJ, 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, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. Triton

2. TWEEN

(72)発明者 クァンス・リ

大韓民国 07027 ソウル トンジャク - グ サダン - 口 18 - 1

(72)発明者 シンウォン・キム

大韓民国 07704 ソウル カンソ - グ カンソ - 口 45ダ - ギル 30 - 27 103 - 505

(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 - 口 70 303 - 1002

(72)発明者 グァンジェ・キム

大韓民国 22704 インチョン ソ - グ コマ - 口 36 302

(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 - 口 146 - ギル 18 6 - 1007

专利名称(译)	检测聚集形式形成多肽的聚集形式的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019512700A</a>	公开(公告)日	2019-05-16
申请号	JP2018548776	申请日	2017-03-16
[标]发明人	ビョンソプリ クانسリ シンウォンキム クンテクイム グァンジェキム ジスンヨ		
发明人	ビョンソプリ クانسリ シンウォンキム クンテクイム グァンジェキム ジスンヨ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/54306 G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2821		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/543.541.B G01N33/543.541.Z G01N33/543.545 G01N33/543.575		
代理人(译)	广田幸一		
优先权	1020160031534 2016-03-16 KR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明包括：(a) 在待分析的原始样品中标记形成聚集体的多肽的二聚体形式的步骤；(b) 孵育步骤(a)的所得产物以形成聚集形式。-另外形成形成多肽的聚集形式的步骤；(c) 由步骤(b)得到的聚集物-将信号产生标记结合到结合剂上，该结合剂与形成多肽的聚集形式结合 粘合剂-与标记物接触的步骤；和(d) 与所述聚集物形成多肽的聚集物形式结合的所述粘合剂-生物样品的聚集物形式，包括检测由标记物产生的信号的步骤- 本发明涉及一种检测形成的多肽的聚集形式的方法。[选择图]图2

