

(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2017-530373

(P2017-530373A)

(43) 公表日 平成29年10月12日(2017. 10. 12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68	2 G O 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D 4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H O 4 5
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-533721 (P2017-533721)	(71) 出願人	517087336
(86) (22) 出願日	平成27年9月11日 (2015. 9. 11)		ボード オブ リージェンツ オブ ザ
(85) 翻訳文提出日	平成29年4月11日 (2017. 4. 11)		ユニバーシティー オブ テキサス シス
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/049844		テム
(87) 国際公開番号	W02016/040907		アメリカ合衆国, テキサス州 7 8 7 0 1
(87) 国際公開日	平成28年3月17日 (2016. 3. 17)		, オースティン, 2 0 1 ウェスト セブ
(31) 優先権主張番号	62/049, 306		ンス アベニュー
(32) 優先日	平成26年9月11日 (2014. 9. 11)	(71) 出願人	517085310
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アムプリオン, インコーポレイテッド
			アメリカ合衆国, テキサス州 7 7 0 1 9
			, ヒューストン, スイート 8 4 2, 1 3
			0 2 ワッフ ドライブ
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ミスフォールディングタンパク質の検出

(57) 【要約】

例えばアルツハイマー病、パーキンソン病などを有する患者の、試料に由来するミスフォールディングタンパク質を増幅および検出するための方法およびキットが提供される。例えば、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定する方法は、該試料をモノマーフォールディングタンパク質と接触させて、インキュベーション混合物を形成させること；ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させるのに効果的になるように2回以上のインキュベーションサイクルを実施すること；モノマーフォールディングタンパク質の少なくとも一部のミスフォールディングおよび/または凝集を誘発するのに効果的になるように該インキュベーション混合物をインキュベートすること；存在する任意のタンパク質凝集物の少なくとも一部を分解するのに効果的になるように該インキュベーション混合物を物理的に破壊すること；ならびに該可溶性ミスフォールディングタンパク質の少なくとも一部を検出することによって、該試料中の該可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定すること、を含み得る。該モノマーフォールディングタンパク質および該可溶性ミスフォールディングタンパク質には、プリオンタンパク質 (PrP) およびそのアイソフォームが除外され得る。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定する方法であって、

前記試料を、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質に対応するモノマーフォールディングタンパク質と接触させて、インキュベーション混合物を形成させること；

ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させるのに効果的になるように 2 回以上のインキュベーションサイクルを実施することであって、各インキュベーションサイクルが、

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在下で、前記モノマーフォールディングタンパク質の少なくとも一部のミスフォールディングおよび/または凝集を誘発するのに効果的になるように前記インキュベーション混合物をインキュベートすること；

存在する任意のタンパク質凝集物の少なくとも一部を分解するのに効果的になるように前記インキュベーション混合物を物理的に破壊すること、を含むこと；ならびに

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の少なくとも一部を検出することによって、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定すること、を含み、

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質が、可溶性ミスフォールディングモノマーおよび可溶性ミスフォールディング凝集物のうちの 1 つまたは複数を含み；

前記ミスフォールディングタンパク質の増幅部分が、前記可溶性ミスフォールディングモノマーの増幅部分、前記可溶性ミスフォールディング凝集物の増幅部分、および不溶性ミスフォールディング凝集物のうちの 1 つまたは複数を含むが、

ただし、前記モノマーフォールディングタンパク質および前記可溶性ミスフォールディングタンパク質には、プリオンタンパク質 (PrP) およびそのアイソフォームが除外されていることを前提とする、方法。

【請求項 2】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の指示薬を前記インキュベーション混合物に接触させることをさらに含み、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の前記指示薬が、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在下での指示状態、および前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の非存在下での非指示状態を特徴とし；

前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を前記判定することが、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の前記指示薬の前記指示状態を検出することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記指示薬の前記指示状態および前記指示薬の前記非指示状態が、蛍光の差を特徴とし、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を前記判定することが、蛍光の差を検出することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

モル過剰の、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質指示薬を、前記インキュベーション混合物に接触させることを含み、前記モル過剰が、前記インキュベーション混合物中の前記モノマーフォールディングタンパク質および前記可溶性ミスフォールディングタンパク質に含まれるタンパク質モノマーの総モル量よりも大きい、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の前記指示薬が、チオフラビン T、コンゴレーレッド、m-I-スチルベン、クリサミン G、PIB、BF-227、X-34、TZDM、FDDNP、MeO-X-04、IMPY、NIAD-4、発光コンジュゲートポリチオフェン、蛍光タンパク質、およびそれらの誘導体のうちの 1 種または複数を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を前記判定することが、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を測定することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、および100%のうちの少なくとも約1つまたは複数の感度で、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を検出することを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

100 nmol、10 nmol、1 nmol、100 pmol、10 pmol、1 pmol、100 fmol、10 fmol、3 fmol、1 fmol、100 attomol、10 attomol、および1 attomolのうちの約1つまたは複数より少ない、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を検出することを含む、請求項 6 に記載の方法。

10

【請求項 9】

前記試料によって含まれるモノマーフォールディングタンパク質に対するモル比で、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を検出することを含み、前記モル比が、1:100、1:10、000、1:100、000および1:1、000、000の約1つまたは複数より小さい、請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 10】

80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、および100%のうちの少なくとも約1つまたは複数の特異度で、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を検出することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

約1 nM～約2 mM；約10 nM～約200 μM；約100 nM～約20 μM；約1 μM～約10 μM；約7 μM；および約2 μMのうちの1つまたは複数の濃度の前記モノマーフォールディングタンパク質を含む前記インキュベーション混合物を調製することを含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 12】

Tris-HCl、PBS、MES、PIPES、MOPS、BES、TES、およびHEPESのうちの1つまたは複数を含む緩衝組成物を含む前記インキュベーション混合物を調製することを含み、前記インキュベーション混合物が、約1 μM～約1 Mの総濃度の前記緩衝組成物を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

約1 μM～約500 mMの総濃度の塩組成物を含む前記インキュベーション混合物を調製することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記塩組成物が、NaClおよびKClのうちの1つまたは複数を含む、請求項 13 に記載の方法。

40

【請求項 15】

前記インキュベーション混合物を、約5～約9、約6～約8.5、約7～約8、および約7.4のうちの1つまたは複数のpHで調製または維持することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記インキュベートすることが、前記インキュベーション混合物を、約4～約60、約4～約35、約8～約50、約12～約40、約18～約30、約18～約26；および約22のうちの1つでインキュベートすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

50

前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を前記判定することが、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を、対照試料に比較して判定することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を前記検出することが、ウェスタンブロットアッセイ、ドットブロットアッセイ、酵素免疫測定法 (E L I S A)、チオフラビン T 結合アッセイ、コンゴレッド結合アッセイ、沈降アッセイ、電子顕微鏡測定、原子間力顕微鏡測定、表面プラズモン共鳴、および分光法のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 E L I S A が、両側サンドウィッチ E L I S A (t w o - s i d e d s a n d w i c h E L I S A) を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記分光法が、準光散乱分光法、マルチスペクトル紫外分光法、共焦点二色蛍光相関分光法、フーリエ変換赤外分光法、分光法検出によるキャピラリー電気泳動法、電子スピン共鳴分光法、核磁気共鳴分光法、および蛍光共鳴エネルギー移動 (F R E T) 分光法のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を前記検出することが、
前記インキュベーション混合物をプロテアーゼと接触させること；ならびに
ウェスタンブロットアッセイ、ドットブロットアッセイ、および E L I S A のうちの 1 つまたは複数において、抗ミスフォールディングタンパク質抗体を利用して前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を検出すること、
を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

標識された形態の前記モノマーフォールディングタンパク質を提供することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

標識された形態の前記モノマーフォールディングタンパク質が、共有結合により取り込まれた放射性アミノ酸、共有結合により取り込まれた同位体標識アミノ酸、および共有結合により取り込まれたフルオロフォアのうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を前記検出することが、ミスフォールディングタンパク質の前記増幅部分に取り込まれた、標識された形態の前記モノマーフォールディングタンパク質を検出することを含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記試料が対象から採取され、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って前記対象のタンパク質ミスフォールディング病 (P M D) の存在を判定または診断することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

前記 P M D が、アミロイドーシス；シヌクレイン病；トリプレットリピート病；および筋萎縮性側索硬化症のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記 P M D が、アルツハイマー病および全身性アミロイドーシスのうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 P M D が、パーキンソン病、レビー小体型認知症；多系統萎縮症；およびシヌクレイン関連神経軸索ジストロフィーのうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 25 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

前記 P M D が、ハンチントン病を含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 30】

前記試料が対象から採取され、対照群の対象から採取された対照試料と比較して、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って前記対象の P M D の存在を判定または診断することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 31】

前記検出することが、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を検出することを含み、前記試料が対象から採取され、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を所定の閾値量に比較することによって、前記対象の P M D の存在を判定または診断することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 32】

前記試料が、認知テストに従って認知症の臨床徴候を示さなかった対象から採取され、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って前記対象の P M D の存在を判定または診断することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 33】

前記試料が、アミロイドベータのコントラスト画像に従って皮質斑またはタングルを示さなかった対象から採取され、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って前記対象の P M D の存在を判定または診断することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 34】

前記試料が、認知症テストに従って認知症の臨床徴候を示した対象から採取され、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って前記対象の認知症の臨床徴候への寄与因子として、P M D の存在を判定または診断することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 35】

前記試料が、認知テストに従って認知症の臨床徴候を示さなかった対象から採取され、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って前記対象の P M D の存在を判定または診断することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 36】

前記試料が、羊水；胆汁；血液；脳脊髄液；耳垢；皮膚；滲出液；糞便；胃液；リンパ；乳；粘液；粘膜；腹水；血漿；胸水；膿；唾液；皮脂；精液；汗；滑液；涙液；および尿のうちの 1 種または複数を含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 37】

対象から前記試料を得ることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 38】

前記対象が、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、シカ、ヘラジカ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、および非ヒト霊長類のうちの 1 つである、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記対象が、P M D のリスクがある、P M D を有する、および P M D の処置を受けている、のうちの 1 つまたは複数である、請求項 37 に記載の方法。

40

【請求項 40】

前記試料が対象から採取され、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を、前記試料と異なる時間に前記対象から採取された比較試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量に比較することによって、前記対象の P M D の進行または恒常性を測定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 41】

前記対象が P M D 調整療法で処置され、

前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を、比較試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量に比較することであって、前記試料および比較

50

試料が、前記 P M D 調整療法を受けている期間の異なる時点で前記対象から採取されること；ならびに

前記対象が前記期間の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の変化に従って前記 P M D 調整療法に応答する、または前記期間の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の恒常性に従って前記 P M D 調整療法に応答しない、の一方であることを判定すること、をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記 P M D 調整療法で、前記 P M D 調整療法に応答すると判定された前記対象を処置することをさらに含む、請求項 4 1 に記載の方法。

10

【請求項 4 3】

前記試料が対象から採取され、前記対象が P M D 調整療法で処置されて、前記モノマーフォールディングタンパク質の生成を阻害する、または前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の凝集を阻害する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記試料および前記インキュベーション混合物の 1 つまたは複数の中で前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を選択的に濃縮することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を前記選択的に濃縮することが、前記インキュベーション混合物を形成させる前に前記試料を前処置することを含む、請求項 4 4 に記載の方法。

20

【請求項 4 6】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を前記選択的に濃縮することが、前記インキュベーション混合物をインキュベートする前に前記インキュベーション混合物を前処置することを含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を前記選択的に濃縮することが、1 種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質の特異的抗体を前記可溶性ミスフォールディングタンパク質に接触させて、捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質を形成させることを含む、請求項 4 4 に記載の方法。

30

【請求項 4 8】

前記 1 種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質の特異的抗体が、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質のアミノ酸配列に特異的な抗体、および前記可溶性ミスフォールディングタンパク質のコンフォメーションに特異的な抗体のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記 1 種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質の特異的抗体が、固相に連結されている、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記固相が、磁気ビーズおよびマルチウェルプレートのうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 4 9 に記載の方法。

40

【請求項 5 1】

前記試料を前記モノマーフォールディングタンパク質と接触させて、前記インキュベーション混合物を形成させることが、モル過剰の前記モノマーフォールディングタンパク質を、前記捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質を含む前記試料に接触させることを含み、前記モノマーフォールディングタンパク質の前記モル過剰が、前記捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質に含まれるタンパク質モノマーの総モル量よりも大きい、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 2】

50

前記インキュベーション混合物を前記インキュベートすることが、前記捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在下で、前記モノマーフォールディングタンパク質の少なくとも一部のミスフォールディングおよび/または凝集を誘発して、ミスフォールディングタンパク質の前記増幅部分を形成させるのに効果的である、請求項49に記載の方法。

【請求項53】

前記タンパク質凝集物が、前記モノマータンパク質、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質、および前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の捕捉形態のうちの1つまたは複数を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項54】

前記インキュベーション混合物を前記物理的に破壊することが、音波処理、攪拌、振とう、凍結/解凍、レーザ照射、オートクレーブインキュベーション、高圧、およびホモジネーションのうちの1つまたは複数を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項55】

前記インキュベーション混合物を前記物理的に破壊することが、周期的攪拌を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項56】

前記周期的攪拌が、約50回転/分(RPM)~10,000RPM、約200RPM~2000RPM、および約500RPMのうちの1つまたは複数の間、実施される、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

前記インキュベーション混合物を前記物理的に破壊することが、約5秒~約10分、約30秒~約1分、約45秒~約1分、および約1分間のうちの1つまたは複数の間、各インキュベーションサイクルで実施される、請求項1に記載の方法。

【請求項58】

前記インキュベーション混合物を前記インキュベートすることが、独立して、約5分~約5時間、約10分~約2時間、約15分~約1時間、および約25分~約45分のうちの1つまたは複数の間、各インキュベーションサイクルで実施される、請求項1に記載の方法。

【請求項59】

各インキュベーションサイクルが、独立して、約5分~約5時間インキュベートすることおよび約5秒~約10分間物理的に破壊すること；約10分~約2時間インキュベートすることおよび約30秒~約1分間物理的に破壊すること；約15分~約1時間インキュベートすることおよび約45秒~約1分間物理的に破壊すること；約25分~約45分インキュベートすることおよび約45秒~約1分間物理的に破壊すること；ならびに約1分間インキュベートすることおよび約1分間物理的に破壊すること、のうちの1つまたは複数の間、前記インキュベーション混合物をインキュベートすることおよび物理的に破壊することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項60】

前記インキュベーションサイクルを前記実施することが、約2回~約1000回、約5回~約500回、約50回~約500回、および約150回~約250回のうちの1つまたは複数の間、反復される、請求項1に記載の方法。

【請求項61】

前記インキュベーション混合物を前記インキュベートすることが、独立して、各インキュベーションサイクルで約15~約50の温度で実施される、請求項1に記載の方法。

【請求項62】

前記試料を前記モノマーフォールディングタンパク質と接触させて、前記インキュベーション混合物を形成させることが、生理的条件下で実施される、請求項1に記載の方法。

【請求項63】

10

20

30

40

50

前記試料をモル過剰の前記モノマーフォールディングタンパク質と接触させて、前記インキュベーション混合物を形成させることを含み、前記モル過剰が、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質に含まれるタンパク質モノマー総モル量よりも大きい、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記試料をチオフラビン T およびモル過剰の前記モノマーフォールディングタンパク質と接触させて、前記インキュベーション混合物を形成させることであって、前記モル過剰が、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質に含まれるタンパク質モノマーの量よりも大きいこと；

ミスフォールディングタンパク質の前記増幅部分を形成させるのに効果的になるように 2 回以上の前記インキュベーションサイクルを実施することであって、各インキュベーションサイクルが、

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在下で、前記モノマーフォールディングタンパク質の少なくとも一部のミスフォールディングおよび/または凝集を誘発するのに効果的になるように前記インキュベーション混合物をインキュベートすること；

存在する任意のタンパク質凝集物の少なくとも一部を分解するのに効果的になるように前記インキュベーション混合物を振とうすること、を含むこと；

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質に対応する前記チオフラビン T の蛍光を検出することによって、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定すること、

を含み、

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質が、可溶性ミスフォールディングモノマーおよび可溶性ミスフォールディング凝集物のうちの 1 つまたは複数を含み；

ミスフォールディングタンパク質の前記増幅部分が、前記可溶性ミスフォールディングモノマーの増幅部分、前記可溶性ミスフォールディング凝集物の増幅部分、および不溶性ミスフォールディング凝集物のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記モノマーフォールディングタンパク質が、化学合成、組換え生成、および非組換え生体試料からの抽出のうちの 1 つによって生成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質が、実質的に可溶性ミスフォールディング凝集物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6 7】

ミスフォールディングタンパク質の前記増幅部分が、実質的に前記可溶性ミスフォールディング凝集物の増幅部分、および前記不溶性ミスフォールディング凝集物のうちの 1 つまたは複数である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記試料に α S フィブリルおよびタウフィブリルが除外されていることを前提とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6 9】

試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定する方法であって、

前記試料から可溶性ミスフォールディングタンパク質を捕捉して、捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質を形成させること；

前記捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質を、モル過剰の、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質に対応する前記モノマーフォールディングタンパク質と接触させて、インキュベーション混合物を形成させることであって、前記モル過剰が、前記捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質に含まれるタンパク質モノマーの量よりも大きいこと；

ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させるのに効果的になるように 2 回以上のインキュベーションサイクルを実施することであって、各インキュベーションサイ

10

20

30

40

50

クルが、

前記捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在下で、前記モノマーフォールディングタンパク質の少なくとも一部のミスフォールディングおよび/または凝集を誘発するのに効果的になるように前記インキュベーション混合物をインキュベートすること；

存在する任意のタンパク質凝集物の少なくとも一部を分解するのに効果的になるように前記インキュベーション混合物を物理的に破壊すること、を含むこと；ならびに

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の少なくとも一部を検出することによって、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定すること、を含む、

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質が、可溶性ミスフォールディングモノマーおよび可溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含む；

前記捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質が、捕捉された可溶性ミスフォールディングモノマーおよび捕捉された可溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含む、

前記ミスフォールディングタンパク質の増幅部分が、前記可溶性ミスフォールディングモノマーの増幅部分、前記可溶性ミスフォールディング凝集物の増幅部分、および不溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含むが、

ただし、前記モノマーフォールディングタンパク質および前記可溶性ミスフォールディングタンパク質には、プリオンタンパク質（PrP）およびそのアイソフォームが除外されていることを前提とする、方法。

【請求項70】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の指示薬を前記インキュベーション混合物に接触させることをさらに含み、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の前記指示薬が、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在下での指示状態、および前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の非存在下での非指示状態を特徴とし；

前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を前記判定することが、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の前記指示薬の前記指示状態を検出することを含む、請求項69に記載の方法。

【請求項71】

前記指示薬の前記指示状態および前記指示薬の前記非指示状態が、蛍光の差を特徴とし、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在の前記判定が、蛍光の差を検出することを含む、請求項69に記載の方法。

【請求項72】

モル過剰の、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質指示薬を、前記インキュベーション混合物に接触させることを含み、前記モル過剰が、前記インキュベーション混合物中の前記モノマーフォールディングタンパク質および前記可溶性ミスフォールディングタンパク質に含まれるタンパク質モノマーの総モル量よりも大きい、請求項69に記載の方法。

【請求項73】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の前記指示薬が、チオフラビンT、コンゴアレッド、m-I-スチルベン、クリサミンG、PIB、BF-227、X-34、TZDM、FDDNP、MeO-X-04、IMPY、NIAD-4、発光コンジュゲートポリチオフェン、蛍光タンパク質、およびそれらの誘導体のうちの1種または複数を含む、請求項69に記載の方法。

【請求項74】

前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を前記判定することが、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を測定することを含む、請求項69に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 75】

80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、および100%のうちの少なくとも約1つまたは複数の感度で、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を検出することを含む、請求項73に記載の方法。

【請求項 76】

100nmol、10nmol、1nmol、100pmol、10pmol、1pmol、100fmol、10fmol、3fmol、1fmol、100attomol、10attomol、および1attomolのうちの約1つまたは複数より少ない、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を検出することを含む、請求項73に記載の方法。

10

【請求項 77】

前記試料によって含まれるモノマーフォールディングタンパク質に対するモル比で、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を検出することを含み、前記モル比が、1:100、1:10,000、1:100,000および1:1,000,000の約1つまたは複数より小さい、請求項73に記載の方法。

【請求項 78】

80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、および100%のうちの少なくとも約1つまたは複数の特異度で、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を検出することを含む、請求項69に記載の方法。

20

【請求項 79】

約1nM～約2mM；約10nM～約200μM；約100nM～約20μM；約1μM～約10μM；約7μM；および約2μMのうちの1つまたは複数の濃度の前記モノマーフォールディングタンパク質を含む前記インキュベーション混合物を調製することを含む、請求項69に記載の方法。

【請求項 80】

Tris-HCL、PBS、MES、PIPES、MOPS、BES、TES、およびHEPESのうちの1つまたは複数を含む緩衝組成物を含む前記インキュベーション混合物を調製することを含み、前記インキュベーション混合物が、約1μm～約1Mの総濃度の前記緩衝組成物を含む、請求項69に記載の方法。

30

【請求項 81】

約1μm～約500mMの総濃度の塩組成物を含む前記インキュベーション混合物を調製することを含む、請求項79に記載の方法。

【請求項 82】

前記塩組成物が、NaClおよびKClのうちの1つまたは複数を含む、請求項80に記載の方法。

【請求項 83】

前記インキュベーション混合物を、約5～約9、約6～約8.5、約7～約8、および約7.4のうちの1つまたは複数のpH値で調製または維持することを含む、請求項69に記載の方法。

40

【請求項 84】

前記インキュベートすることが、前記インキュベーション混合物を、約4～約60、約4～約35、約8～約50、約12～約40、約18～約30、約18～約26；および約22のうちの1つでインキュベートすることを含む、請求項69に記載の方法。

【請求項 85】

前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を前記判定することが、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を、対照試料に比較して

50

判定することを含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 86】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を前記検出することが、ウェスタンブロットアッセイ、ドットブロットアッセイ、酵素免疫測定法 (ELISA)、チオフラビン T 結合アッセイ、コンゴーレッド結合アッセイ、沈降アッセイ、電子顕微鏡測定、原子間力顕微鏡測定、表面プラズモン共鳴、および分光法のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 87】

前記 ELISA が、両側サンドウィッチ ELISA を含む、請求項 85 に記載の方法。

【請求項 88】

前記分光法が、準光散乱分光法、マルチスペクトル紫外分光法、共焦点二色蛍光相関分光法、フーリエ変換赤外分光法、分光法検出によるキャピラリー電気泳動法、電子スピン共鳴分光法、核磁気共鳴分光法、および蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 分光法のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 85 に記載の方法。

【請求項 89】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を前記検出することが、
前記インキュベーション混合物をプロテアーゼと接触させること；ならびに
ウェスタンブロットアッセイ、ドットブロットアッセイ、および ELISA のうちの 1 つまたは複数において、抗ミスフォールディングタンパク質抗体を利用して前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を検出すること、
を含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 90】

標識された形態の前記モノマーフォールディングタンパク質を提供することをさらに含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 91】

標識された形態の前記モノマーフォールディングタンパク質が、共有結合により取り込まれた放射性アミノ酸、共有結合により取り込まれた同位体標識アミノ酸、および共有結合により取り込まれたフルオロフォアのうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 92】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を前記検出することが、ミスフォールディングタンパク質の前記増幅部分に取り込まれた、標識された形態の前記モノマーフォールディングタンパク質を検出することを含む、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 93】

前記試料が対象から採取され、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って前記対象の PMD の存在を判定または診断することをさらに含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 94】

前記 PMD が、アミロイドーシス；シヌクレイン病；トリプレットリピート病；および筋萎縮性側索硬化症のうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 95】

前記 PMD が、アルツハイマー病および全身性アミロイドーシスのうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 96】

前記 PMD が、パーキンソン病、レビー小体型認知症；多系統萎縮症；およびシヌクレイン関連神経軸索ジストロフィーのうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 97】

前記 PMD が、ハンチントン病を含む、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 98】

前記試料が対象から採取され、対照群の対象から採取された対照試料に比較して、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って前記対象のPMDの存在を判定または診断することをさらに含む、請求項69に記載の方法。

【請求項99】

前記検出することが、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を検出することを含み、前記試料が対象から採取され、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を所定の閾値量に比較することによって、前記対象のPMDの存在を判定または診断することをさらに含む、請求項69に記載の方法。

【請求項100】

前記試料が、認知テストに従って認知症の臨床徴候を示さなかった対象から採取され、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って前記対象のPMDの存在を判定または診断することをさらに含む、請求項69に記載の方法。

10

【請求項101】

前記試料が、アミロイドベータのコントラスト画像に従って皮質斑またはタングルを示さなかった対象から採取され、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って前記対象のPMDの存在を判定または診断することをさらに含む、請求項69に記載の方法。

【請求項102】

前記試料が、認知症テストに従って認知症の臨床徴候を示した対象から採取され、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って前記対象の認知症の臨床徴候への寄与因子として、PMDの存在を判定または診断することをさらに含む、請求項69に記載の方法。

20

【請求項103】

前記試料が、羊水；胆汁；血液；脳脊髄液；耳垢；皮膚；滲出液；糞便；胃液；リンパ；乳；粘液；粘膜；腹水；血漿；胸水；膿；唾液；皮脂；精液；汗；滑液；涙液；および尿のうちの1種または複数を含む、請求項69に記載の方法。

【請求項104】

対象から前記試料を得ることをさらに含む、請求項69に記載の方法。

【請求項105】

前記対象が、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、シカ、ヘラジカ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、および非ヒト霊長類のうちの1つである、請求項103に記載の方法。

30

【請求項106】

前記対象が、PMDのリスクがある、PMDを有する、およびPMDの処置を受けている、のうちの1つまたは複数である、請求項103に記載の方法。

【請求項107】

前記試料が対象から採取され、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を、前記試料と異なる時間に前記対象から採取された比較試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量に比較することによって、前記対象のPMDの進行または恒常性を測定することをさらに含む、請求項69に記載の方法。

【請求項108】

40

前記対象が調整療法で処置され、

前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を、比較試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量に比較することであって、前記試料および前記比較試料が、前記PMD調整療法を受けている期間の異なる時点で前記対象から採取されること；ならびに

前記対象が前記期間の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の変化に従って前記PMD調整療法に応答する、または前記期間の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の恒常性に従って前記PMD調整療法に応答しない、の一方であることを判定すること、をさらに含む、請求項69に記載の方法。

50

【請求項 109】

前記 P M D 調整療法で、前記 P M D 調整療法に応答すると判定された前記対象を処置することをさらに含む、請求項 107 に記載の方法。

【請求項 110】

前記試料から可溶性ミスフォールディングタンパク質を捕捉して、捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質を形成させることが、1 種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質特異的抗体を用いて実施され、前記 1 種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質特異的抗体が、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質のアミノ酸配列に特異的な抗体、および前記可溶性ミスフォールディングタンパク質のコンフォメーションに特異的な抗体のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 69 に記載の方法。

10

【請求項 111】

前記試料から可溶性ミスフォールディングタンパク質を捕捉して、捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質を形成させることが、1 種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質特異的抗体を用いて実施され、前記 1 種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質特異的抗体が、固相に連結されている、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 112】

前記固相が、磁気ビーズおよびマルチウェルプレートのうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 110 に記載の方法。

20

【請求項 113】

前記タンパク質凝集物が、前記モノマータンパク質、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質、および前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の捕捉形態のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 114】

前記インキュベーション混合物を前記物理的に破壊することが、音波処理、攪拌、振とう、凍結/解凍、レーザ照射、オートクレーブインキュベーション、高圧、およびホモジネーションのうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 115】

前記インキュベーション混合物を前記物理的に破壊することが、周期的攪拌を含む、請求項 69 に記載の方法。

30

【請求項 116】

前記周期的攪拌が、約 50 回転/分 (RPM) ~ 10,000 RPM、約 200 RPM ~ 2000 RPM、および約 500 RPM のうちの 1 つまたは複数の間、実施される、請求項 114 に記載の方法。

【請求項 117】

前記インキュベーション混合物を前記物理的に破壊することが、約 5 秒 ~ 約 10 分、約 30 秒 ~ 約 1 分、約 45 秒 ~ 約 1 分、および約 1 分間のうちの 1 つまたは複数の間、各インキュベーションサイクルで実施される、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 118】

前記インキュベーション混合物を前記インキュベートすることが、独立して、約 5 分 ~ 約 5 時間、約 10 分 ~ 約 2 時間、約 15 分 ~ 約 1 時間、および約 25 分 ~ 約 45 分のうちの 1 つまたは複数の間、各インキュベーションサイクルで実施される、請求項 69 に記載の方法。

40

【請求項 119】

各インキュベーションサイクルが、独立して、約 5 分 ~ 約 5 時間インキュベートすることおよび約 5 秒 ~ 約 10 分間物理的に破壊すること；約 10 分 ~ 約 2 時間インキュベートすることおよび約 30 秒 ~ 約 1 分間物理的に破壊すること；約 15 分 ~ 約 1 時間インキュベートすることおよび約 45 秒 ~ 約 1 分間物理的に破壊すること；約 25 分 ~ 約 45 分インキュベートすることおよび約 45 秒 ~ 約 1 分間物理的に破壊すること；ならびに約 1 分

50

間インキュベートすることおよび約 1 分間物理的に破壊すること、のうちの 1 つまたは複数の間、前記インキュベーション混合物をインキュベートすることおよび物理的に破壊することを含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 120】

前記インキュベーションサイクルを前記実施することが、約 2 回～約 1000 回、約 5 回～約 500 回、約 50 回～約 500 回、および約 150 回～約 250 回のうちの 1 つまたは複数の間、反復される、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 121】

前記インキュベーション混合物を前記インキュベートすることが、独立して、各インキュベーションサイクルで約 15 ～約 50 の温度で実施される、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 122】
前記試料を前記モノマーフォールディングタンパク質と接触させて、前記インキュベーション混合物を形成させることが、生理的条件下で実施される、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 123】

前記試料をモル過剰の前記モノマーフォールディングタンパク質と接触させて、前記インキュベーション混合物を形成させることを含み、前記モル過剰が、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質に含まれるタンパク質モノマー総モル量よりも大きい、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 124】

前記モノマーフォールディングタンパク質が、化学合成、組換え生成、および非組換え生体試料からの抽出のうちの 1 つによって生成される、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 125】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質が、実質的に可溶性ミスフォールディング凝集物である、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 126】

ミスフォールディングタンパク質の前記増幅部分が、実質的に前記可溶性ミスフォールディング凝集物の増幅部分、および前記不溶性ミスフォールディング凝集物のうちの 1 つまたは複数である、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 127】

前記試料に α S フィブリルおよびタウフィブリルが除外されていることを前提とする、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 128】

試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定するキットであって、既知量の、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質に対応するモノマーフォールディングタンパク質、および既知量の、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の指示薬のうちの 1 つまたは複数と；

取扱説明書と、

を含み、前記取扱説明書で、

前記試料を、前記既知量のモノマーフォールディングタンパク質および前記既知量の、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の指示薬のうちの 1 つまたは複数と接触させて、インキュベーション混合物を形成させること；

ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させるのに効果的になるように 2 回以上のインキュベーションサイクルを実施することであって、各インキュベーションサイクルが、

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在下で、前記モノマーフォールディングタンパク質の少なくとも一部のミスフォールディングおよび/または凝集を誘発するのに効果的になるように前記インキュベーション混合物をインキュベートして、ミスフォールディングタンパク質の前記増幅部分を形成させること；

10

20

30

40

50

存在する任意のタンパク質凝集物の少なくとも一部を分解するのに効果的になるように前記インキュベーション混合物を物理的に破壊すること、を含むこと；ならびに

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を検出することによって、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定すること、がユーザに指導され、

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質が、可溶性ミスフォールディングモノマーおよび可溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含み；

前記ミスフォールディングタンパク質の増幅部分が、前記可溶性ミスフォールディングモノマーの増幅部分、前記可溶性ミスフォールディング凝集物の増幅部分、および不溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含むが、

ただし、前記モノマーフォールディングタンパク質および前記可溶性ミスフォールディングタンパク質には、プリオンタンパク質（PrP）およびそのアイソフォームが除外されていることを前提とする、キット。

【請求項129】

前記既知量の前記モノマーフォールディングタンパク質、および前記既知量の、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の指示薬を含む、請求項128に記載のキット。

【請求項130】

マルチウェルマイクロタイタープレート（multiwell microtitre plate）；マイクロ流体プレート；振とう装置；およびインキュベーション装置のうちの1つまたは複数を含む、請求項128に記載のキット。

【請求項131】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の指示薬の指示状態および非指示状態が、蛍光の差を特徴とし、前記取扱説明書で、前記試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を蛍光分光法によって判定することが前記ユーザに指導される、請求項128に記載のキット。

【請求項132】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の前記指示薬が、チオフラビンT、コンゴアレッド、m-I-スチルベン、クリサミンG、PIB、BF-227、X-34、TZDM、FDDNP、MeO-X-04、IMPY、NIAD-4、発光コンジュゲートポリチオフェン、蛍光タンパク質、およびそれらの誘導体のうちの1種または複数を含む、請求項128に記載のキット。

【請求項133】

前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定することを前記ユーザへ指導する前記取扱説明書が、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を測定することの指導を含む、請求項128に記載のキット。

【請求項134】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を検出することを前記ユーザに指導する取扱説明書が、ウェスタンブロットアッセイ、ドットブロットアッセイ、酵素免疫測定法（ELISA）、チオフラビンT結合アッセイ、コンゴアレッド結合アッセイ、沈降アッセイ、電子顕微鏡測定、原子間力顕微鏡測定、表面プラズモン共鳴、および分光法のうちの1つまたは複数を実施することの指導を含む、請求項128に記載のキット。

【請求項135】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を検出するように前記ユーザに指導する取扱説明書が、

前記インキュベーション混合物をプロテアーゼと接触させること；ならびに

ウェスタンブロットアッセイ、ドットブロットアッセイ、およびELISAのうちの1つまたは複数において、抗ミスフォールディングタンパク質抗体を利用して前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を検出すること、の指導を含む、請求項128に記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 1 3 6】

前記モノマーフォールディングタンパク質が、共有結合により取り込まれた放射性アミノ酸、共有結合により取り込まれた同位体標識アミノ酸、および共有結合により取り込まれたフルオロフォアのうちの1つまたは複数を含む、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【請求項 1 3 7】

前記取扱説明書が、対象から前記試料を採取することを前記ユーザに指導することをさらに含む、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【請求項 1 3 8】

前記取扱説明書が、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って前記対象の P M D の存在を判定することを前記ユーザに指導することをさらに含む、請求項 1 3 7 に記載のキット。

10

【請求項 1 3 9】

前記 P M D が、アミロイドーシス；シヌクレイン病；トリプレットリピート病；および筋萎縮性側索硬化症のうちの少なくとも1つを含む、請求項 1 3 8 に記載のキット。

【請求項 1 4 0】

前記 P M D が、アルツハイマー病および全身性アミロイドーシスのうちの少なくとも1つを含む、請求項 1 3 8 に記載のキット。

【請求項 1 4 1】

前記 P M D が、パーキンソン病、レビー小体型認知症；多系統萎縮症；およびシヌクレイン関連神経軸索ジストロフィーのうちの少なくとも1つを含む、請求項 1 3 8 に記載のキット。

20

【請求項 1 4 2】

前記 P M D が、ハンチントン病を含む、請求項 1 3 8 に記載のキット。

【請求項 1 4 3】

8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、および 1 0 0 % のうちの少なくとも約 1 つまたは複数の感度で、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を検出することを提供する、請求項 1 3 8 に記載のキット。

【請求項 1 4 4】

1 0 0 n m o l、1 0 n m o l、1 n m o l、1 0 0 p m o l、1 0 p m o l、1 p m o l、1 0 0 f m o l、1 0 f m o l、3 f m o l、1 f m o l、1 0 0 a t t o m o l、1 0 a t t o m o l、および 1 a t t o m o l のうちの約 1 つまたは複数より少ない、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を検出することを提供する、請求項 1 3 8 に記載のキット。

30

【請求項 1 4 5】

前記試料によって含まれるモノマーフォールディングタンパク質に対するモル比で、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を検出することを提供し、前記モル比が、1：1 0 0、1：1 0、0 0 0、1：1 0 0、0 0 0 および 1：1、0 0 0、0 0 0 の約 1 つまたは複数より小さい、請求項 1 3 8 に記載のキット。

40

【請求項 1 4 6】

8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、および 1 0 0 % のうちの少なくとも約 1 つまたは複数の特異度で、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を検出することを提供する、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【請求項 1 4 7】

前記取扱説明書が、約 1 n M ~ 約 2 m M；約 1 0 n M ~ 約 2 0 0 μ M；約 1 0 0 n M ~ 約 2 0 μ M；および約 1 μ M ~ 約 1 0 μ M のうちの1つまたは複数の濃度範囲の前記モノマーフォールディングタンパク質を含む前記インキュベーション混合物を調製することを

50

前記ユーザに指導することをさらに含む、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【請求項 1 4 8】

Tris-HCL、PBS、MES、PIPES、MOPS、BES、TES、および HEPES のうちの 1 つまたは複数を含む緩衝組成物をさらに含み、前記取扱説明書が、約 1 μ m ~ 約 1 M の総濃度の前記緩衝組成物を含む前記インキュベーション混合物を調製することの前記ユーザへの指導をさらに含む、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【請求項 1 4 9】

塩組成物をさらに含み、前記取扱説明書が、約 1 μ m ~ 約 5 0 0 mM の総濃度の塩組成物を含む前記インキュベーション混合物を調製することの前記ユーザへの指導をさらに含む、請求項 1 4 8 に記載のキット。

10

【請求項 1 5 0】

前記塩組成物が、NaCl および KCl のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 1 4 9 に記載のキット。

【請求項 1 5 1】

前記取扱説明書が、前記インキュベーション混合物を、約 5 ~ 約 9、約 6 ~ 約 8 . 5、約 7 ~ 約 8、および約 7 . 4 のうちの 1 つまたは複数の pH 範囲で調製または維持することの前記ユーザへの指導をさらに含む、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【請求項 1 5 2】

前記取扱説明書が、前記インキュベーション混合物を、約 4 ~ 約 6 0、約 4 ~ 約 3 5、約 8 ~ 約 5 0、約 1 2 ~ 約 4 0、約 1 8 ~ 約 3 0、約 1 8 ~ 約 2 6；および約 2 2 のうちの 1 つでインキュベートすることの前記ユーザへの指導をさらに含む、請求項 1 2 8 に記載のキット。

20

【請求項 1 5 3】

前記取扱説明書が、対照群の対象から採取された対照試料に比較して、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って前記対象の PMD の存在を判定することを前記ユーザに指導することをさらに含む、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【請求項 1 5 4】

前記取扱説明書が、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を所定の閾値量に比較することによって、前記対象の PMD の存在を判定することを前記ユーザに指導することをさらに含む、請求項 1 2 8 に記載のキット。

30

【請求項 1 5 5】

前記取扱説明書が、羊水；胆汁；血液；脳脊髄液；耳垢；皮膚；滲出液；糞便；胃液；リンパ；乳；粘液；粘膜；腹水；血漿；胸水；膿；唾液；皮脂；精液；汗；滑液；涙液；および尿のうちの 1 種または複数を含む前記試料を得ることを前記ユーザに指導することを含む、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【請求項 1 5 6】

前記取扱説明書が、前記試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を、前記試料と異なる時間に前記対象から採取された比較試料中の前記可溶性ミスフォールディングタンパク質の量に比較することによって、前記対象の PMD の進行または恒常性を測定することを前記ユーザに指導することをさらに含む、請求項 1 2 8 に記載のキット。

40

【請求項 1 5 7】

前記取扱説明書が、前記試料および前記インキュベーション混合物の 1 つまたは複数の中で前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を選択的に濃縮することを前記ユーザに指導することをさらに含む、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【請求項 1 5 8】

1 種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質の特異的抗体を含む、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【請求項 1 5 9】

前記 1 種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質の特異的抗体が、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質のアミノ酸配列に特異的な抗体、および前記可溶性

50

ミスフォールディングタンパク質のコンフォメーションに特異的な抗体のうちの１つまたは複数を含む、請求項１５８に記載のキット。

【請求項１６０】

前記取扱説明書が、前記１種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質の特異的な抗体を前記可溶性ミスフォールディングタンパク質に接触させて、捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質を形成させることによって、前記可溶性ミスフォールディングタンパク質を選択的に濃縮することを前記ユーザに指導することをさらに含む、請求項１５９に記載のキット。

【請求項１６１】

前記１種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質の特異的な抗体が、固相に連結されて提供される、請求項１５９に記載のキット。

【請求項１６２】

前記固相が、磁気ビーズおよびマルチウェルプレートのうちの１つまたは複数を含む、請求項１５９に記載のキット。

【請求項１６３】

前記インキュベーション混合物を物理的に破壊するための前記取扱説明書が、音波処理、攪拌、振とう、凍結／解凍、レーザー照射、オートクレーブインキュベーション、高圧、およびホモジネーションのうちの１つまたは複数を利用することのユーザへの指導を含む、請求項１２８に記載のキット。

【請求項１６４】

前記インキュベーション混合物を物理的に破壊するための前記取扱説明書が、約５０回転／分（RPM）～１０，０００RPM、約２００RPM～２０００RPM、および約５００RPMのうちの１つまたは複数の間、周期的攪拌を実施することのユーザへの指導を含む、請求項１２８に記載の方法。

【請求項１６５】

前記インキュベーション混合物を物理的に破壊するための前記取扱説明書が、約５秒～約１０分、約３０秒～約１分、約４５秒～約１分、および約１分間のうちの１つまたは複数の間、各インキュベーションサイクルで前記物理的破壊を実施することのユーザへの指導を含む、請求項１２８に記載のキット。

【請求項１６６】

前記インキュベーション混合物をインキュベートするための前記取扱説明書が、約５分～約５時間、約１０分～約２時間、約１５分～約１時間、および約２５分～約４５分のうちの１つまたは複数の間、各インキュベーションサイクルで前記インキュベーション混合物をインキュベートすることのユーザへの指導を含む、請求項１２８に記載のキット。

【請求項１６７】

各インキュベーションサイクルのための前記取扱説明書が、約５分～約５時間インキュベートして約５秒～約１０分間物理的に破壊するため；約１０分～約２時間インキュベートして約３０秒～約１分間物理的に破壊するため；約１５分～約１時間インキュベートして約４５秒～約１分間物理的に破壊するため；約２５分～約４５分インキュベートして約４５秒～約１分間物理的に破壊するため；ならびに約１分間インキュベートして約１分間物理的に破壊するため、のうちの１つまたは複数のために、前記インキュベーション混合物をインキュベートして物理的に破壊するためのユーザへの指導を含む、請求項１２８に記載のキット。

【請求項１６８】

前記インキュベーションサイクルを実施するための前記取扱説明書が、約２回～約１０００回、約５回～約５００回、約５０回～約５００回、および約１５０回～約２５０回、のうちの１つまたは複数で前記インキュベーションサイクルを実施することのユーザへの指導を含む、請求項１２８に記載のキット。

【請求項１６９】

前記インキュベーションサイクルを実施するための前記取扱説明書が、約１５ ～ 約 ５

10

20

30

40

50

0 の温度でインキュベートすることのユーザへの指導を含む、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【請求項 1 7 0】

前記モノマーフォールディングタンパク質が、化学合成、組換え生成、および非組換え生体試料からの抽出のうちの 1 つによって生成される、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【請求項 1 7 1】

前記可溶性ミスフォールディングタンパク質が、実質的に可溶性ミスフォールディング凝集物である、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【請求項 1 7 2】

ミスフォールディングタンパク質の前記増幅部分が、実質的に前記可溶性ミスフォールディング凝集物の増幅部分、および前記不溶性ミスフォールディング凝集物のうちの 1 つまたは複数である、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【請求項 1 7 3】

前記取扱説明書で、 α S フィブリルおよびタウフィブリルを除外した前記試料を提供することが前記ユーザに指導される、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2014 年 9 月 11 日出願の米国特許仮出願第 62 / 049,306 号の優先権を主張するものであり、その出願の内容全体は、参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

【0 0 0 2】

背景

タンパク質ミスフォールディング病 (PMD) としては、アルツハイマー病、パーキンソン病、2 型糖尿病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、全身性アミロイドーシス、プリオン病などが挙げられる。異なるタンパク質のミスフォールディング凝集物が、形成および蓄積される場合がある。ミスフォールディング凝集物は、数ある影響の中で、細胞機能不全および組織損傷を誘発し得る。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 3】

例えばアルツハイマー病 (AD) およびパーキンソン病 (PD) は、脳変性疾患であり、効果的処置または正確な前臨床診断を有さない。これまでに得られた証拠によって、AD において、例えばアミロイドベータタンパク質 ($A\beta$) のミスフォールディング、凝集、および脳内沈着は、AD の病態を惹起する因子であり得ることが示唆されている。 $A\beta$ 斑は元々、該疾患の特徴であると思われてきたが、現在の研究では、可溶性 $A\beta$ オリゴマーが AD の神経変性を誘発する重大なシナプス毒性種である可能性が示唆されている。脳は再生能力が低いため、PMD の初期診断が、不可逆的神経病理的变化を起こす前の介入を可能にするのに不可欠である。ミスフォールディングおよびオリゴマー化のプロセスが、臨床症状および実質的脳損傷の発生の数年または数十年前に開始し得ることが、複数のエビデンスで示されている。広く許容され、早期で感受性のある客観的検査室診断の欠如が、依然として、PMD に罹患する患者のケアに関する主要な問題である。

【0 0 0 4】

本出願は、例えば関連疾患の診断のための、タンパク質ミスフォールディングの検出が、難解であるが興味をそそる試みになり得ることを認識している。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 5】

概要

一実施形態において、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定する方法が、提供される。該方法は、試料をモノマーフォールディングタンパク質と接触させて、インキュベーション混合物を形成させることを含み得る。該方法は、ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させるのに効果的になるように2回以上のインキュベーションサイクルを実施することを含み得る。各インキュベーションサイクルは、可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在下で、モノマーフォールディングタンパク質の少なくとも一部のミスフォールディングおよび/または凝集を誘発するのに効果的になるようにインキュベーション混合物をインキュベートすることを含み得る。各インキュベーションサイクルは、例えば可溶性ミスフォールディングタンパク質を放出するために、存在する任意のタンパク質凝集物の少なくとも一部を分解するのに効果的になるようにインキュベーション混合物を物理的に破壊することを含み得る。該方法は、可溶性ミスフォールディングタンパク質の少なくとも一部を検出することによって、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定することを含み得る。可溶性ミスフォールディングタンパク質は、可溶性ミスフォールディングモノマーおよび可溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含み得る。ミスフォールディングタンパク質の増幅部分は、可溶性ミスフォールディングモノマーの増幅部分、可溶性ミスフォールディング凝集物の増幅部分、および不溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含み得る。モノマーフォールディングタンパク質および可溶性ミスフォールディングタンパク質には、プリオンタンパク質 (PrP) およびそのアイソフォームが除外され得る。

10

20

30

40

50

【0006】

別の実施形態において、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定する方法が、提供される。該方法は、試料をチオフラビンTおよびモル過剰のモノマーフォールディングタンパク質と接触させて、インキュベーション混合物を形成させることを含み得る。該モル過剰は、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質に含まれるタンパク質モノマーの量よりも大きくなり得る。該方法は、ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させるのに効果的になるように2回以上のインキュベーションサイクルを実施することを含み得る。各インキュベーションサイクルは、可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在下で、モノマーフォールディングタンパク質の少なくとも一部のミスフォールディングおよび/または凝集を誘発するのに効果的になるようにインキュベーション混合物をインキュベートして、ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させることを含み得る。各インキュベーションサイクルは、例えば可溶性ミスフォールディングタンパク質を放出するために、存在する任意のタンパク質凝集物の少なくとも一部を分解するのに効果的になるようにインキュベーション混合物を振とうすることを含み得る。該方法はまた、可溶性ミスフォールディングタンパク質に対応するチオフラビンTの蛍光を検出することによって、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定することを含み得る。可溶性ミスフォールディングタンパク質は、可溶性ミスフォールディングモノマーおよび可溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含み得る。ミスフォールディングタンパク質の増幅部分は、可溶性ミスフォールディングモノマーの増幅部分、可溶性ミスフォールディング凝集物の増幅部分、および不溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含み得る。モノマーフォールディングタンパク質および可溶性ミスフォールディングタンパク質には、プリオンタンパク質 (PrP) およびそのアイソフォームが除外されている。

【0007】

一実施形態において、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定する方法が、提供される。該方法は、試料から可溶性ミスフォールディングタンパク質を捕捉することを含み得る。該方法は、捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質をモル過剰のモノマーフォールディングタンパク質と接触させて、インキュベーション混合物を形成させることを含み得る。該モル過剰は、捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質に含まれるタンパク質モノマーの量よりも大きくなり得る。該方法は、ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させるのに効果的になるように2回以上のイ

ンキュベーションサイクルを実施することを含み得る。各インキュベーションサイクルは、捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在下で、モノマーフォールディングタンパク質の少なくとも一部のミスフォールディングおよび/または凝集を誘発するのに効果的になるようにインキュベーション混合物をインキュベートして、ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させることを含み得る。各インキュベーションサイクルは、例えば可溶性ミスフォールディングタンパク質を放出するために、存在する任意のタンパク質凝集物の少なくとも一部を分解するのに効果的になるようにインキュベーション混合物を物理的に破壊することを含み得る。該方法はまた、可溶性ミスフォールディングタンパク質の少なくとも一部を検出することによって、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定することを含み得る。可溶性ミスフォールディングタンパク質は、可溶性ミスフォールディングモノマーおよび可溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含み得る。捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質は、捕捉された可溶性ミスフォールディングモノマーおよび捕捉された可溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含み得る。ミスフォールディングタンパク質の増幅部分は、可溶性ミスフォールディングモノマーの増幅部分、可溶性ミスフォールディング凝集物の増幅部分、および不溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含み得る。モノマーフォールディングタンパク質および可溶性ミスフォールディングタンパク質には、プリオンタンパク質 (PrP) およびそのアイソフォームが除外されている。

10

20

30

40

50

【0008】

別の実施形態において、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定するキットが、提供される。該キットは、既知量のモノマーフォールディングタンパク質と、既知量の可溶性ミスフォールディングタンパク質指示薬と、を含み得る。該キットは、取扱説明書を含み得る。該取扱説明書で、試料を、既知量のモノマーフォールディングタンパク質および既知量の可溶性ミスフォールディングタンパク質指示薬のうちの1つまたは複数と接触させて、インキュベーション混合物を形成させることがユーザに指導され得る。該取扱説明書で、ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させるのに効果的になるように2回以上のインキュベーションサイクルを実施することがユーザに指導され得る。各インキュベーションサイクルは、可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在下で、モノマーフォールディングタンパク質の少なくとも一部のミスフォールディングおよび/または凝集を誘発するのに効果的になるようにインキュベーション混合物をインキュベートして、ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させることを含み得る。各インキュベーションサイクルは、例えば可溶性ミスフォールディングタンパク質を放出するために、存在する任意のタンパク質凝集物の少なくとも一部を分解するのに効果的になるようにインキュベーション混合物を物理的に破壊することを含み得る。該取扱説明書で、可溶性ミスフォールディングタンパク質を検出することによって、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定することがユーザに指導され得る。可溶性ミスフォールディングタンパク質は、可溶性ミスフォールディングモノマーおよび可溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含み得る。ミスフォールディングタンパク質の増幅部分は、可溶性ミスフォールディングモノマーの増幅部分、可溶性ミスフォールディング凝集物の増幅部分、および不溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含み得る。モノマーフォールディングタンパク質および可溶性ミスフォールディングタンパク質には、プリオンタンパク質 (PrP) およびそのアイソフォームが除外され得る。

【0009】

試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定するために本明細書に開示された方法およびキットは、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の非存在を判定するのに効果的になり得る。

【0010】

本明細書の一部に取り込まれ、それを構成する添付の図面は、例示的方法および結果を

示しており、例示的实施形態を示すために用いられているに過ぎない。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1A】インキュベーションの0時間、5時間、10時間、および24時間目に撮影された電子顕微鏡写真を示す。

【図1B】可溶性オリゴマーA β タンパク質凝集物のウェスタンブロットである。

【図2A】実施例1の様々な濃度の合成可溶性オリゴマーA β タンパク質がシードとなった、時間の関数としてThT蛍光によって測定された非増幅アミロイド形成を示すグラフである。

【図2B】実施例1の様々な濃度の合成可溶性オリゴマーA β タンパク質がシードとなった、時間の関数としてThT蛍光によって測定された増幅サイクル促進アミロイド形成を示すグラフである。

10

【図3A】AD、NND、およびNAND群から得られた代表的試料5つのCSFがシードとなったA β 凝集の平均反応速度を示す、ThT蛍光標識の関数として測定されたアミロイド形成対時間のグラフである。

【図3B】AD、NND、およびNAND群から得られた試料の存在下でのA β 凝集のための時間単位での誘導期時間のグラフである。

【図3C】AD、NND、およびNAND患者から得られたCSF試料の存在下での180A β -PMCAサイクル、即ち90時間のインキュベーション(P90)の後に得られたアミロイド形成の度合いを示すグラフである。

20

【図4A】AD対NANDに関する、図3Bに示された誘導期の値を利用した、異なるカットオフポイントでの偽陽性率(特異度)の関数としての真陽性率(感度)のプロットである。

【図4B】AD対NNDに関する、図3Bに示された誘導期の値を利用した、異なるカットオフポイントでの偽陽性率(特異度)の関数としての真陽性率(感度)のプロットである。

【図4C】AD対全ての対照試料に関する、図3Bに示された誘導期の値を利用した、異なるカットオフポイントでの偽陽性率(特異度)の関数としての真陽性率(感度)のプロットである。

【図4D】図3Bに示された誘導期の値を利用した、異なるカットオフポイントでの偽陽性率(特異度)の関数としての真陽性率(感度)のプロットであり、図4A~4Cの群比較の異なる組み合わせについての最も信頼できるカットオフポイントを推定している。

30

【図5】表1は、誘導期数を利用して計算されたA β -PMCAテストの感度、特異度および予測値の推定を示す。

【図6】ADおよび対照患者から得られたCSF試料の存在下での300A β -PMCAサイクル、即ち150時間のインキュベーション(P90)の後に得られた試料の時間単位での誘導期時間のグラフである。

【図7A】ヒトCSFに添加された合成によって調製したA β オリゴマーを用いた免疫枯渇の結果を示すウェスタンブロットである。

【図7B】対照および免疫枯渇CSF試料がシードとなったA β 凝集の反応速度を示すグラフである。

40

【図7C】A11コンフォメーション抗体のみで枯渇された、対照および免疫枯渇CSF試料がシードとなったA β 凝集の反応速度を示すグラフである。

【図8A】複合的生体試料に由来するA β オリゴマーを捕捉するために用いられるELISA固相法の略図である。

【図8B】複合的生体試料に由来するA β オリゴマーを捕捉するために用いられる磁気ビーズ固相法の略図である。

【図9】表2は、A β オリゴマーを捕捉する特異的抗体の能力を示す。

【図10】ヒト血漿に添加された異なる量の合成オリゴマーの存在によるA β 凝集の促進を示すアミロイド形成対時間のグラフである。

50

【図 1 1】A D 患者および対照から得られた血漿試料の存在下での A β - P M C A アッセイにおいて 5 0 % 凝集に達するまでの時間を示すグラフである。

【図 1 2】プロテアーゼ消化後のウェスタンブロットによってモニタリングされた異なる量の合成 A β オリゴマーの存在下でのインキュベーション / 超音波処理サイクルによる A β 凝集の増幅結果を示すウェスタンブロットである。

【図 1 3 A】P D - P M C A による α S シードの検出を示すチオフラビン T 蛍光対時間のグラフである。

【図 1 3 B】示された量の α S シードの関数としてプロットされた 5 0 % 凝集に達するまでの時間のグラフである。

【図 1 4】アルツハイマー病 (A D) または非神経変性疾患 (N N D) を有する対照に対する、P D - P M C A によるヒト P D 患者から得られた C S F 試料中の α S シードの検出を示す。

【図 1 5】表 3 は、 α S オリゴマーを捕捉する異なる配列またはコンフォメーション抗体の能力を実証する。

【図 1 6 A】 α S オリゴマーを捕捉するために用いられる E L I S A 固相法の略図である。

【図 1 6 B】 α S オリゴマーを捕捉するために用いられる磁気ビーズ固相法の略図である。

【図 1 7 A】N - 1 9 α S 抗体を用いたヒト血漿に由来する α S オリゴマーの免疫沈降 / 凝集の結果を示すグラフである。

【図 1 7 B】2 1 1 α S 抗体を用いたヒト血漿に由来する α S オリゴマーの免疫沈降 / 凝集の結果を示すグラフである。

【図 1 7 C】C - 2 0 α S 抗体を用いたヒト血漿に由来する α S オリゴマーの免疫沈降 / 凝集の結果を示すグラフである。

【図 1 8 A】C S F 試料中の α S シードの検出のための対照試料における結果を示すグラフである。

【図 1 8 B】C S F 試料中の α S シードの検出のための P D 患者における結果を示すグラフである。

【図 1 8 C】C S F 試料中の α S シードの検出のための多系統萎縮症 (M S A) 患者における結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 2 】

詳細な記載

タンパク質ミスフォールディング病 (P M D) の診断のためなど、試料中のミスフォールディングタンパク質の検出のための方法およびキットが提供される。異なるタンパク質のミスフォールディング凝集物が、形成および蓄積される場合がある。ミスフォールディング凝集物は、数ある影響の中で、細胞機能不全および組織損傷を誘発し得る。例えば P M D としては、アルツハイマー病 (A D) または全身性アミロイドーシスなどのアミロイドーシス；パーキンソン病 (P D)、レビー小体型認知症などのシヌクレイン病；多系統萎縮症；シヌクレイン関連神経軸索ジストロフィー；2 型糖尿病；ハンチントン病 (H D) などのトリプレットリピート病；筋萎縮性側索硬化症 (A L S) などを挙げることができる。異なるタンパク質のミスフォールディング凝集物が、形成および蓄積される場合がある。ミスフォールディング凝集物は、数ある影響の中で、細胞機能不全および組織損傷を誘発し得る。

【 0 0 1 3 】

幾つかの実施形態において、P M D には、感染性プリオン病、例えば伝達性海綿状脳症 (T S E) が除外され得る。そのような伝達性海綿状脳症 (T S E) は、ヒトおよび動物が罹患する感染性神経変性疾患の一群である。例えばヒト T S E 病としては、クロイツフェルト・ヤコブ病およびその亜種 (C J D、 v C J D)、クールー病、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病 (G S S)、ならびに致死性家族性不眠症 (F F I) を挙

10

20

30

40

50

げることができる。動物の T S E 病としては、ヒツジおよびヤギ（スクレーピー）；ウシ（牛海綿状脳症、B S E）；ヘラジカ、オジロジカ、ミュールジカおよびアカシカ（慢性ウェイスティング病、C W D）；ミンク（伝達性ミンク脳症、T M E）；ネコ（ネコ海綿状脳症、F S E）；ニアラおよびより大きなクーズー（外来性有蹄類脳症、E U E）などを挙げることができる。

【 0 0 1 4 】

本明細書で用いられる「モノマータンパク質」および「可溶性ミスフォールディングタンパク質」は、プリオンタンパク質（P r P）およびそのアイソフォームが除外されている。本明細書で用いられる「プリオン」は、T S E を誘発することが知られるミスフォールディングタンパク質である。プリオンタンパク質（P r P）は、複数のアイソフォーム：正常型、一般的、または細胞性アイソフォーム（P r P^C）；プロテアーゼ耐性アイソフォーム（P r P^{res}）；感染性または「スクレーピー」アイソフォーム（P r P^{Sc}）などに関連づけることができる。

10

【 0 0 1 5 】

タンパク質ミスフォールディング循環増幅（P M C A）という方法は、インビトロでのミスフォールディングおよび凝集プロセスの人工的促進および増幅を通してミスフォールディング凝集物の超高感度な検出を提供し得る。P M C A の基本的概念が、過去に開示された（それぞれ全体として参照により本明細書に組み入れられる、S o t o e t a l , W O 2 0 0 2 / 0 4 9 5 4 号；E s t r a d a , e t a l . 米国特許出願公開第 2 0 0 8 0 1 1 8 9 3 8 号）。しかし本明細書の出願日より前に、P M D の診断のためなど、試料中のプリオン以外の可溶性ミスフォールディングタンパク質の増幅および検出のための P C M A を可能にした特許出願はない。本明細書では、P M D 患者に見出され得る通り、可溶性ミスフォールディングタンパク質の検出のための P M C A 技術を可能にする特定の実施例および詳細を開示する。

20

【 0 0 1 6 】

様々な実施形態において、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定する方法が、提供される。本明細書に記載された通り、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定する方法およびキットは、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の非存在を判定するのに効果的になり得る。本明細書に記載された可溶性ミスフォールディングタンパク質は、例えば P M D に関連する様々な神経病変を誘発または誘導する、病原性タンパク質であり得る。該方法は、試料をモノマーフォールディングタンパク質と接触させて、インキュベーション混合物を形成させることを含み得る。該方法は、ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させるのに効果的になるように 2 回以上のインキュベーションサイクルを実施することを含み得る。各インキュベーションサイクルは、可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在下で、モノマーフォールディングタンパク質の少なくとも一部のミスフォールディングおよび/または凝集を誘発するのに効果的になるようにインキュベーション混合物をインキュベートして、例えばミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させること、を含み得る。各インキュベーションサイクルは、例えば可溶性ミスフォールディングタンパク質を放出するために、存在する任意のタンパク質凝集物の少なくとも一部を分解するのに効果的になるようにインキュベーション混合物を物理的に破壊することを含み得る。該方法は、可溶性ミスフォールディングタンパク質の少なくとも一部を検出することによって、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定することを含み得る。可溶性ミスフォールディングタンパク質は、可溶性ミスフォールディングモノマーおよび可溶性ミスフォールディング凝集物のうちの 1 つまたは複数を含み得る。ミスフォールディングタンパク質の増幅部分は、可溶性ミスフォールディングモノマーの増幅部分、可溶性ミスフォールディング凝集物の増幅部分、および不溶性ミスフォールディング凝集物のうちの 1 つまたは複数を含み得る。モノマーフォールディングタンパク質および可溶性ミスフォールディングタンパク質には、プリオンタンパク質（P r P）およびそのアイソフォームが除外され得る。

30

40

【 0 0 1 7 】

50

本明細書で用いられる「A β 」または「ベータアミロイド」は、アミロイド前駆体タンパク質（APP）の連続切断によって形成されたペプチドを指す。様々なA β アイソフォームは、38～43アミノ酸残基を含み得る。A β タンパク質は、APPが任意の組み合わせで β -および/または γ -セクレターゼによって処理されると、形成され得る。A β は、ADに罹患した個体またはADを有する疑いがある個体の脳におけるアミロイド斑の構成要素であり得る。様々なA β アイソフォームが、包含され得、Aベータ40およびAベータ42に限定されない。様々なA β ペプチドが、AD関連の神経損傷に関連し得る。

【0018】

本明細書で用いられる「 α S」または「アルファ・シヌクレイン」は、全長140アミノ酸の α -シヌクレインタンパク質、例えば「 α S-140」を指す。他のアイソフォームまたは断片としては、「 α S-126」、つまり例えばエクソン3の欠損により、残基41～54が欠如したアルファ・シヌクレイン-126；および「 α S-112」、つまり例えばエクソン5の欠損により、残基103～130が欠如したアルファ・シヌクレイン-112を挙げることができる。 α Sは、PDに罹患した個体またはPDを有する疑いがある個体の脳内に存在し得る。様々な α Sアイソフォームが、包含され得、 α S-140、 α S-126、および α S-112に限定されない。様々な α Sペプチドが、PD関連の神経損傷に関連し得る。

【0019】

本明細書で用いられる「タウ」は、単一遺伝子からの選択的スプライシングの産物、例えばヒトにおけるMAPT（微小管関連タンパク質タウ）であるタンパク質を指す。タウタンパク質は、タウのアイソフォームのいずれかの全長またはトランケート形態を包含する。様々なアイソフォームとしては、タウ遺伝子のエクソン2、3、および10における選択的スライシングに対応するヒト脳組織内に存在することが知られる6つのタウアイソフォームが挙げられるが、これらに限定されない。3種のアイソフォームは、3つの結合ドメインを有し、他の3種は、4つの結合ドメインを有する。ミスフォールディングタウは、ADに罹患した個体、またはADもしくは他のタウパチーを有する疑いがある個体の脳内に存在し得る。

【0020】

本明細書で用いられる「ミスフォールディングタンパク質」は、生体系の典型的な非病的正常機能に関与する場合に存在するため、タンパク質の構造的コンフォメーションの全てまたは一部をもはや含まないタンパク質である。ミスフォールディングタンパク質は、凝集し得る。ミスフォールディングタンパク質は、タンパク質凝集物内に局在し得る。ミスフォールディングタンパク質は、非機能性タンパク質であり得る。ミスフォールディングタンパク質は、タンパク質の病原性配座異性体であり得る。モノマーフォールディングタンパク質組成物が、シードに関連するミスフォールディング、オリゴマー化、および凝集のための触媒活性を有さないネイティブの非病原的確認で提供され得る。モノマーフォールディングタンパク質組成物は、シード不含形態で提供され得る。

【0021】

本明細書で用いられる「モノマーフォールディングタンパク質」は、単一タンパク質分子を指す。「可溶性凝集ミスフォールディングタンパク質」は、溶液中に残存するモノマーミスフォールディングタンパク質の凝集を指す。可溶性ミスフォールディングタンパク質の例は、ミスフォールディングタンパク質が可溶性である限り、任意の数のタンパク質モノマーを含み得る。例えば可溶性ミスフォールディングタンパク質は、モノマー、またはモノマータンパク質の2～約50単位の凝集物を含み得る。

【0022】

モノマーおよび/または可溶性ミスフォールディングタンパク質は、凝集して、不溶性凝集物および/またはより高級オリゴマーを形成し得る。例えばA β タンパク質の凝集は、プロトフィブリル、フィブリルを、そして最終的にはAD対象において観察され得るアミロイド斑をもたらし得る。「シード」または「核」は、可溶性ミスフォールディングタンパク質または短い断片化フィブリル、特にさらなるミスフォールディング、オリゴマー

10

20

30

40

50

化、および凝集のための触媒活性を有する可溶性ミスフォールディングタンパク質を指す。そのような核形成依存性凝集は、緩徐な誘導期を特徴とし得、その時期に凝集物が形成され得、その後さらなる凝集物およびより大きなポリマーの急速な形成を触媒し得る。誘導期は、あらかじめ形成された核またはシードの添加によって最小化または排除され得る。シードに関連するミスフォールディングおよび凝集の触媒活性を有さないモノマータンパク質組成物が、提供され得る。モノマータンパク質組成物は、シード不含形態で提供され得る。

【0023】

本明細書で用いられる「可溶性」種は、生理学的条件下の生体液中の溶液を形成し得るが、「不溶性」種は、生理学的条件下のそのような生体液中の沈殿物、フィブリル、沈着物、タングル、または他の非溶解形態として存在し得る。そのような生体液としては、例えば羊水；胆汁；血液；脳脊髄液；耳垢；皮膚；滲出液；糞便；胃液；リンパ；乳；粘液、例えば鼻分泌物；粘膜、例えば鼻粘膜；腹水；血漿；胸水；膿；唾液；皮脂；精液；汗；滑液；涙液；尿などのうちの1種または複数の流体、またはそれから搾出された流体を挙げることができる。不溶性種としては、例えばA β 、 α S、タウなどのフィブリルを挙げることができる。非生体液に溶解するが生理学的条件下での前述の生体液の1種には溶解しない種は、不溶性と見なされ得る。例えばA β 、 α S、タウなどのフィブリルは、例えばドデシル硫酸ナトリウム(SDS)水溶液などの界面活性剤の溶液に溶解され得るが、それでも生理学的条件下の上述の生体液の1種または複数には不溶性であり得る。

【0024】

幾つかの実施形態において、該試料には、A β 、 α S、またはタウなどのミスフォールディングタンパク質の不溶性種が、生理学的条件下の上記生体液の1種または複数に不溶性になり得る沈殿物、フィブリル、沈着物、タングル、ブランクまたは他の形態として除外され得る。

【0025】

例えば該試料には、フィブリル形態の α Sおよびタウが除外され得る。該試料には、不溶性形態のミスフォールディングA β 、 α Sおよび/またはタウタンパク質が除外され得、例えば該試料には、ミスフォールディングA β 、 α Sおよび/またはタウタンパク質が、沈殿物、フィブリル、沈着物、タングル、ブランクまたは他の非溶解形態、例えばフィブリル形態として除外され得る。本明細書に記載された方法は、不溶性形態のミスフォールディングA β およびタウタンパク質を除外することによって、例えばミスフォールディングA β およびタウタンパク質を沈殿物、フィブリル、沈着物、タングル、ブランクまたは他の非溶解形態、例えばフィブリル形態として除外することによって、試料を調製することを含み得る。本明細書に記載されたキットは、ミスフォールディングA β 、 α Sおよび/またはタウタンパク質を、沈殿物、フィブリル、沈着物、タングル、ブランクまたは他の非溶解形態、例えばフィブリル形態として除外することによって試料を調製することがユーザに指導される取扱説明書を含み得る。試料からの、そのような不溶性形態の上記のミスフォールディングタンパク質の除外は、実質的または完全であり得る。

【0026】

本明細書で用いられる可溶性ミスフォールディングタンパク質の凝集物は、可溶性ミスフォールディングタンパク質をはじめとする非共有結合のタンパク質集合体を指す。可溶性ミスフォールディングタンパク質の凝集物は、「脱凝集」または破壊されて、可溶性ミスフォールディングタンパク質を分解または放出し得る。可溶性ミスフォールディングタンパク質シードのコレクションの触媒活性は、少なくとも一部が混合物中のシード数に応じて規模を増減し得る。したがって、混合物中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の凝集物を破壊して可溶性ミスフォールディングタンパク質シードを放出することが、モノマータンパク質のオリゴマー化のための触媒活性を上昇させることになり得る。

【0027】

本明細書で用いられる「ミスフォールディングタンパク質」は、生体系の典型的な非病的正常機能に関与する場合に存在するため、タンパク質の構造的コンフォメーションの全

10

20

30

40

50

てまたは一部をもはや含まないタンパク質である。ミスフォールディングタンパク質は、凝集し得る。ミスフォールディングタンパク質は、タンパク質凝集物内に局在し得る。ミスフォールディングタンパク質は、非機能性タンパク質であり得る。ミスフォールディングタンパク質は、病的アイソフォームであり得る。

【0028】

様々な実施形態において、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定する方法が、提供される。該方法は、試料をチオフラビンTおよびモル過剰のモノマーフォールディングタンパク質と接触させて、インキュベーション混合物を形成させることを含み得る。該モル過剰は、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質に含まれるタンパク質モノマーの量よりも大きくなり得る。該方法は、ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させるのに効果的になるように2回以上のインキュベーションサイクルを実施することを含み得る。各インキュベーションサイクルは、可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在下で、モノマーフォールディングタンパク質の少なくとも一部のミスフォールディングおよび/または凝集を誘発するのに効果的になるようにインキュベーション混合物をインキュベートして、ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させることを含み得る。各インキュベーションサイクルは、例えば可溶性ミスフォールディングタンパク質を放出するために、存在する任意のタンパク質凝集物の少なくとも一部を分解するのに効果的になるようにインキュベーション混合物を振とうすることを含み得る。該方法はまた、可溶性ミスフォールディングタンパク質に対応するチオフラビンTの蛍光を検出することによって、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定することを含み得る。可溶性ミスフォールディングタンパク質は、可溶性ミスフォールディングモノマーおよび可溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含み得る。捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質は、捕捉された可溶性ミスフォールディングモノマーおよび捕捉された可溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含み得る。ミスフォールディングタンパク質の増幅部分は、可溶性ミスフォールディングモノマーの増幅部分、可溶性ミスフォールディング凝集物の増幅部分、および不溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含み得る。幾つかの実施形態において、モノマーフォールディングタンパク質および可溶性ミスフォールディングタンパク質には、プリオンタンパク質(P_{PrP})およびそのアイソフォームが除外され得る。

【0029】

様々な実施形態において、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定する方法が、提供される。該方法は、試料から可溶性ミスフォールディングタンパク質を捕捉することを含み得る。該方法は、捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質をモル過剰のモノマーフォールディングタンパク質と接触させて、インキュベーション混合物を形成させることを含み得る。該モル過剰は、捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質に含まれるタンパク質モノマーの量よりも大きくなり得る。該方法は、ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させるのに効果的になるように2回以上のインキュベーションサイクルを実施することを含み得る。各インキュベーションサイクルは、捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在下で、モノマーフォールディングタンパク質の少なくとも一部のミスフォールディングおよび/または凝集を誘発するのに効果的になるようにインキュベーション混合物をインキュベートして、ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させることを含み得る。各インキュベーションサイクルは、例えば可溶性ミスフォールディングタンパク質を放出するために、存在する任意のタンパク質凝集物の少なくとも一部を分解するのに効果的になるようにインキュベーション混合物を物理的に破壊することを含み得る。該方法はまた、可溶性ミスフォールディングタンパク質の少なくとも一部を検出することによって、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定することを含み得る。可溶性ミスフォールディングタンパク質は、可溶性ミスフォールディングモノマーおよび可溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含み得る。捕捉された可溶性ミスフォールディングタン

10

20

30

40

50

パク質は、捕捉された可溶性ミスフォールディングモノマーおよび捕捉された可溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含み得る。ミスフォールディングタンパク質の増幅部分は、可溶性ミスフォールディングモノマーの増幅部分、可溶性ミスフォールディング凝集物の増幅部分、および不溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数を含み得る。幾つかの実施形態において、モノマーフォールディングタンパク質および可溶性ミスフォールディングタンパク質には、プリオンタンパク質（PrP）およびそのアイソフォームが除外され得る。

【0030】

本明細書で用いられる可溶性ミスフォールディングタンパク質の言及は、試料、インキュベーション混合物などの中に分散された可溶性ミスフォールディングタンパク質の任意の形態を包含し得る。例えば可溶性ミスフォールディングタンパク質の言及は、可溶性ミスフォールディングタンパク質、例えばPMDに罹患した対象から得られた試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質を包含し得る。可溶性ミスフォールディングタンパク質の言及は、例えば（例えばインキュベーション混合物中の）ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を包含し得る。可溶性ミスフォールディングタンパク質の言及は、捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質、例えば可溶性ミスフォールディングタンパク質に特異的な抗体を用いて試料から捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質を包含し得る。

10

【0031】

幾つかの実施形態において、該方法は、可溶性ミスフォールディングタンパク質の指示薬をインキュベーション混合物に接触させることを含み得る。該可溶性ミスフォールディングタンパク質の指示薬は、可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在下での指示状態、および可溶性ミスフォールディングタンパク質の非存在下での非指示状態を特徴とし得る。試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定することは、可溶性ミスフォールディングタンパク質の指示薬の指示状態を検出することを包含し得る。指示薬の指示状態および指示薬の非指示状態は、蛍光の差を特徴とし得る。試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在の判定は、蛍光の差を検出することを含み得る。

20

【0032】

複数の実施形態において、該方法は、モル過剰の、可溶性ミスフォールディングタンパク質指示薬を、インキュベーション混合物に接触させることを含み得る。該モル過剰は、インキュベーション混合物中のモノマーフォールディングタンパク質および可溶性ミスフォールディングタンパク質に含まれるタンパク質モノマーの総モル量よりも大きくなり得る。

30

【0033】

様々な実施形態において、可溶性ミスフォールディングタンパク質の指示薬としては、チオフラビンT、コンゴレッド、m-I-スチルベン、クリサミンG、PIB、BF-227、X-34、TZDM、FDDNP、MeO-X-04、IMPY、NIAD-4、発光コンジュゲートポリチオフエン、緑色蛍光タンパク質および黄色蛍光タンパク質などの蛍光タンパク質との融合物、それらの誘導体などのうちの1種または複数を経ることができ。

40

【0034】

幾つかの実施形態において、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定することは、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を測定することを含み得る。試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の量は、対照試料と比較して測定され得る。試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の量は、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、および100%のうちの少なくとも約1つまたは複数の感度で検出され得る。検出された試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の量は、100nmol、10nmol、1nmol、100pmol、10pmol、1pmol、100fmol、10fmol、3fmol

50

1、1 fmol、100 attomol、10 attomol、および1 attomolのうちの約1つまたは複数より少なくなり得る。試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の量は、試料によって含まれるモノマーフォールディングタンパク質に対するモル比で検出され得る。該モル比は、1：100、1：10、000、1：100、000および1：1、000、000の約1つまたは複数より小さくなり得る。

【0035】

様々な実施形態において、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質は、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、および100%のうちの少なくとも約1つまたは複数の特異度で検出され得る。

10

【0036】

幾つかの実施形態において、該インキュベーション混合物は、約1 nM～約2 mM；約10 nM～約200 μM；約100 nM～約20 μM；または約1 μM～約10 μM；および約2 μMのうちの1つまたは複数の濃度、または濃度範囲のモノマーフォールディングタンパク質を含み得る。

【0037】

幾つかの実施形態において、該インキュベーション混合物は、緩衝組成物を含み得る。該緩衝組成物は、本明細書に記載されたインキュベーション混合物のpH、例えばpH5～pH9を調製または保持するのに効果的になり得る。該緩衝組成物は、Tris-HCl、PBS、MES、PIPES、MOPS、BES、TES、およびHEPESなどのうちの1つまたは複数を含み得る。該緩衝剤の濃度は、約1 μM～約1 Mの総濃度であり得る。例えば該緩衝剤は、0.1 M濃度のTris-HClであり得る。

20

【0038】

様々な実施形態において、該インキュベーション混合物は、塩組成物を含み得る。該塩組成物は、インキュベーション混合物のイオン強度を上昇させるのに効果的になり得る。該塩組成物は、NaCl、KClなどのうちの1つまたは複数を含み得る。該インキュベーション混合物は、約1 μM～約500 mMの総濃度の塩組成物を含み得る。

【0039】

幾つかの実施形態において、該インキュベーション混合物は、約5～約9、約6～約8.5、約7～約8、および約7.4のうちの1つまたは複数のpH値もしくはpH範囲を特徴とし得る、そのpH値もしくはpH範囲で調整され得る、またはそのpH値もしくはpH範囲を保持され得る。

30

【0040】

幾つかの実施形態において、該インキュベーション混合物は、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、35、36、37、40、45、50、55、および60のうちの約1つもしくは複数の温度、例えば約22、または前記値の任意の2つの間の温度範囲、例えば約4～約60、約4～約35、約8～約50、約12～約40、約18～約30、約18～約26などのうちの1つまたは複数の温度範囲でインキュベートされ得る。

【0041】

複数の実施形態において、可溶性ミスフォールディングタンパク質を検出することは、ウェスタンブロットアッセイ、ドットブロットアッセイ、酵素免疫測定法(ELISA)、チオフラビンT結合アッセイ、コンゴレッド結合アッセイ、沈降アッセイ、電子顕微鏡測定、原子間力顕微鏡測定、表面プラズモン共鳴、および分光法のうちの1つまたは複数を含み得る。ELISAは、両側サンドウィッチELISA(two-sided sandwich ELISA)を包含し得る。分光法は、準光散乱分光法、マルチスペクトル紫外分光法、共焦点二色蛍光相関分光法、フーリエ変換赤外分光法、分光法検出によるキャピラリー電気泳動法、電子スピン共鳴分光法、核磁気共鳴分光法、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)分光法のうちの1つまたは複数を含み得る。

40

【0042】

50

様々な実施形態において、可溶性ミスフォールディングタンパク質を検出することは、インキュベーション混合物をプロテアーゼと接触させることを含み得る。可溶性ミスフォールディングタンパク質は、ウェスタンブロットアッセイ、ドットブロットアッセイ、およびELISAのうちの1つまたは複数において、抗ミスフォールディングタンパク質抗体を利用して検出され得る。

【0043】

幾つかの実施形態において、該方法は、標識された形態のモノマーフォールディングタンパク質を提供することを含み得る。標識された形態の該モノマーフォールディングタンパク質は、共有結合により取り込まれた放射性アミノ酸、共有結合により取り込まれた同位体標識アミノ酸、および共有結合により取り込まれたフルオロフォアのうちの1つまたは複数を含み得る。可溶性ミスフォールディングタンパク質を検出することは、ミスフォールディングタンパク質の増幅部分に取り込まれた、標識された形態のモノマーフォールディングタンパク質を検出することを含む。

10

【0044】

複数の実施形態において、該試料は、対象から採取され得る。該方法は、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って対象のPMDの存在を判定または診断することを含み得る。試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在は、対照群の対象から採取された対照試料に比較して判定され得る。

【0045】

幾つかの実施形態において、PMDは、アミロイドーシス；シヌクレイン病；トリプレットリピート病；または筋萎縮性側索硬化症のうちの少なくとも1つを包含し得る。PMDとしては、アミロイドーシス、例えばアルツハイマー病または全身性アミロイドーシスのうちの少なくとも1つを挙げることができる。PMDとしては、シヌクレイン病、例えばパーキンソン病、レビー小体型認知症；多系統萎縮症；またはシヌクレイン関連神経軸索ジストロフィーのうちの少なくとも1つを挙げることができる。PMDとしては、ハンチントン病を挙げることができる。

20

【0046】

様々な実施形態において、該検出することは、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を検出することを含み得る。該方法は、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を、所定の閾値量に比較することによって、対象のPMDの存在を判定または診断することを含み得る。

30

【0047】

複数の実施形態において、該試料は、認知テストに従って認知症の臨床徴候を示さなかった対象から採取され得る。該方法は、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って対象のPMDの存在を判定または診断することを含み得る。

【0048】

幾つかの実施形態において、該試料は、アミロイドベータのコントラスト画像に従って皮質斑またはタングルを示さなかった対象から採取され得る。該方法は、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って対象のPMDの存在を判定または診断することをさらに含み得る。

40

【0049】

様々な実施形態において、該試料は、認知症テストに従って認知症の臨床徴候を示した対象から採取され得る。該方法は、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って対象の認知症の臨床徴候への寄与因子として、PMDの存在を判定または診断することをさらに含み得る。

【0050】

幾つかの実施形態において、該試料は、羊水；胆汁；血液；脳脊髄液；耳垢；皮膚；滲出液；糞便；胃液；リンパ；乳；粘液、例えば鼻分泌物；粘膜、例えば鼻粘膜；腹水；血漿；胸水；膿；唾液；皮脂；精液；汗；滑液；涙液；尿などのうちの1種または複数を挙げることができる。

50

【0051】

複数の実施形態において、該方法は、対象から試料を得ることを含み得る。該対象は、ヒト、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、シカ、ヘラジカ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、または非ヒト霊長類のうちの1つであり得る。非ヒト動物は、野生または家畜であり得る。該対象は、PMDのリスクがある、PMDを有する、PMDの処置を受けている、ミスフォールディングタンパク質の調節不能、ミスフォールディング、凝集または素因に関連する疾患を有するリスクがある、ミスフォールディングタンパク質の調節不能、ミスフォールディング、凝集または素因に関連する疾患を有する、ミスフォールディングタンパク質の調節不能、ミスフォールディング、凝集または素因に関連する疾患のための処置を受けている、のうちの1つまたは複数であり得る。

10

【0052】

様々な実施形態において、該方法は、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を、試料と異なる時間に対象から採取された比較試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の量に比較することによって、対象のPMDの進行または恒常性を測定または診断することを含み得る。様々な実施形態において、該試料は、PMDのための治療を受けている患者から採取され得る。PMCAアッセイを利用して、どの患者が治療によって処置され得るかを決定することができる。

【0053】

例えば、様々なメカニズムを通してA β 恒常性をターゲットとする複数の新規治療薬が、現在、開発途中である。A β オリゴマーのためのPMCAアッセイを利用して、どの患者がPMD疾患改善療法で処置され得るかを決定することができる。PMCA法による検出で、A β オリゴマーのレベルの変化、例えば低下または上昇を示す患者を、A β 調整療法への「応答者」として分類することができ、A β オリゴマーのレベルを低下する治療薬で処置することができる。異常なA β 恒常性を欠く患者を、「非応答者」として分類することができ、処置しなくてもよい。こうして、A β 恒常性の調整を目的とした治療により利益を享受し得る患者が、同定され得る。

20

【0054】

同じく、例えば様々なメカニズムを通して α S恒常性を標的とする複数の新規治療薬が、現在、開発途中である。 α S恒常性を標的とする治療的アプローチは、PD01A+もしくはPD03A+などの能動免疫化、またはPRX002などの受動免疫化を含み得る。 α SオリゴマーのためのPMCAアッセイを用いて、どの患者が α S調整療法で処置され得るかを決定することができる。PMCA法による検出で、 α Sオリゴマーのレベルの変化、例えば低下または上昇を示す患者を、 α S調整療法への「応答者」として分類することができ、 α Sオリゴマーのレベルを低下する治療薬で処置することができる。異常な α S恒常性を欠く患者を、「非応答者」として分類することができ、処置しなくてもよい。こうして、 α S恒常性の調整を目的とした治療により利益を享受し得る患者が、同定され得る。

30

【0055】

さらに、例えば可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を、PMCAを用いて患者から得られた試料で測定することができる。可溶性ミスフォールディングタンパク質の測定値が高い患者は、可溶性ミスフォールディングタンパク質恒常性を調整する治療薬で処置することができる。可溶性ミスフォールディングタンパク質の測定値が正常な患者は、処置しなくてもよい。可溶性ミスフォールディングタンパク質の恒常性の調整を目的とした治療薬への患者の応答を、追跡することができる。例えば可溶性ミスフォールディングタンパク質レベルを、治療的介入の開始時の患者試料で測定することができる。臨床上有意義な期間の患者の治療に続いて、追加の患者試料を得ることができ、可溶性ミスフォールディングタンパク質レベルを測定することができる。治療的介入の後、可溶性ミスフォールディングタンパク質レベルの変化を示した患者は、処置に応答すると見なされ得る。不変の可溶性ミスフォールディングタンパク質レベルを示した患者は、非応答と見なされ得る。該方法は、PMCA反応と干渉し得る成分を含有する患者試料中の可溶性ミスフォ

40

50

ールディングタンパク質凝集物の検出を含み得る。

【0056】

幾つかの実施形態において、該対象は、PMD調整療法で処置され得る。該方法は、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を、比較試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の量に比較することを含み得る。試料および比較試料は、可溶性ミスフォールディングタンパク質の調整療法を受けている期間の異なる時点で対象から採取され得る。該方法は、対象がその期間の可溶性ミスフォールディングタンパク質の変化に従って可溶性ミスフォールディングタンパク質の調整療法に応答する、またはその期間の可溶性ミスフォールディングタンパク質の恒常性に従って可溶性ミスフォールディングタンパク質の調整療法に応答しない、の一方であることを判定または診断することを含み得る。該方法は、可溶性ミスフォールディングタンパク質の調整療法で、可溶性ミスフォールディングタンパク質の調整療法に応答すると判定された対象を処置することを含み得る。例えばADの場合、PMD調整療法は、BACE1（ベータセクレターゼ1）の阻害剤； γ -セクレターゼの阻害剤；およびA β 恒常性の調整剤、例えばA β 恒常性の免疫療法調整剤、のうちの1つまたは複数の投与を含み得る。A β 調整療法は、E2609；MK-8931；LY2886721；AZD3293；セマガセスタット（LY-450139）；アバガセスタット（BMS-708163）；ソラネズマブ；クレネズマブ；バビネオズマブ；BIB037；CAD106；8F5もしくは5598、またはA β グロブリンに対して増加する他の抗体、例えば全体の教示が参照により本明細書に組み入れられるBarghorn et al, “Globular amyloid β -peptide₁₋₄₂ oligomer—a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer’s disease” J. Neurochem., 2005, 95, 834-847に記載されたもの；ACC-001；V950；Affitope AD02などのうちの1つまたは複数の投与を含み得る。

10

20

【0057】

PDの場合、例えばPMD調整療法は、PD01A+もしくはPD03A+などの能動免疫化、PRX002などの受動免疫化などを含み得る。該PMD調整療法はまた、GDNF（グリア細胞株由来神経栄養因子）、イノシン、カルシウムチャネルブロッカー、具体的にはイスラジピンなどのCav1.3チャネルブロッカー、ニコチンおよびニコチン受容体アゴニスト、GM-CSF、グルタチオン、ピオグリタゾンなどのPPARガンマアゴニスト、ならびにD2/D3ドーパミン受容体アゴニストおよびLRRK2（ロイシンリッチリピートキナーゼ2）阻害剤をはじめとするドーパミン受容体アゴニストでの処置を含み得る。

30

【0058】

複数の実施形態において、ミスフォールディングタンパク質の量を、PMCAを利用して患者から得られた試料で測定することができる。ミスフォールディングタンパク質の測定値が増加した患者は、PMDのための疾患修飾療法で処置することができる。ミスフォールディングタンパク質の測定値が正常な患者は、処置されなくてもよい。疾患修飾療法への患者の応答を、追跡することができる。例えばミスフォールディングタンパク質レベルを、治療的介入の開始時の患者試料で測定することができる。臨床上有意義な期間の患者の治療に続いて、追加の患者試料を得ることができ、可溶性ミスフォールディングタンパク質レベルを測定することができる。治療的介入の後、ミスフォールディングタンパク質レベルの変化を示した患者は、処置に応答すると見なされ得る。不変のミスフォールディングタンパク質レベルを示した患者は、非応答と見なされ得る。該方法は、PMCA反応と干渉し得る成分を含有する患者試料中のミスフォールディングタンパク質凝集物の検出を含み得る。

40

【0059】

複数の実施形態において、該方法は、試料およびインキュベーション混合物の1つまたは複数の中で可溶性ミスフォールディングタンパク質を選択的に濃縮することを含み得る

50

。可溶性ミスフォールディングタンパク質を選択的に濃縮することは、インキュベーション混合物を形成させる前に試料を前処置することを含み得る。可溶性ミスフォールディングタンパク質を選択的に濃縮することは、インキュベーション混合物をインキュベートする前にインキュベーション混合物を前処置することを含み得る。可溶性ミスフォールディングタンパク質を選択的に濃縮することは、1種または複数の特異的抗体を可溶性ミスフォールディングタンパク質に接触させて、捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質を形成させることを含み得る。

【0060】

例えばADの場合、1種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質の特異的抗体は、6E10、4G8、82E1、A11、X-40/42、16ADVなどのうちの1つまたは複数を含み得る。そのような抗体は、以下の通り入手することができる：6E10および4G8（Covance、ニュージャージー州プリンストン所在）；82E1（IBL America、ミネソタ州ミネアポリス所在）；A11（Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド所在）；X-40/42（MyBioSource, Inc.、カリフォルニア州サンディエゴ所在）；および16ADV（Accumen Pharmaceuticals、カリフォルニア州リバモア所在）。

10

【0061】

さらにPDの場合、例えば1種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質の特異的抗体は、 α/β -シヌクレインN-19； α -シヌクレインC-20-R； α -シヌクレイン211； α -シヌクレインSyn204； α -シヌクレイン2B2D1； α -シヌクレインLB509； α -シヌクレインSPM451； α -シヌクレイン3G282； α -シヌクレイン3H2897； α/β -シヌクレインSyn202； α/β -シヌクレイン3B6； $\alpha/\beta/\gamma$ -シヌクレインFL-140などのうちの1つまたは複数をはじめとするPD特異的抗体を包含し得る。幾つかの実施形態において、1種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質の特異的抗体は、 α/β -シヌクレインN-19； α -シヌクレインC-20-R； α -シヌクレイン211； α -シヌクレインSyn204などのうちの1つまたは複数を含み得る。そのような抗体は、以下の通り入手される： α/β -シヌクレインN-19（cat. No. SC-7012、Santa Cruz Biotech、テキサス州ダラス所在）； α -シヌクレインC-20-R（SC-7011-R）； α -シヌクレイン211（SC-12767）； α -シヌクレインSyn204（SC-32280）； α -シヌクレイン2B2D1（SC-53955）； α -シヌクレインLB509（SC-58480）； α -シヌクレインSPM451（SC-52979）； α -シヌクレイン3G282（SC-69978）； α -シヌクレイン3H2897（SC-69977）； α/β -シヌクレインSyn202（SC-32281）； α/β -シヌクレイン3B6（SC-69699）；または $\alpha/\beta/\gamma$ -シヌクレインFL-140（SC-10717）。

20

30

【0062】

さらに、該1種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質の特異的抗体は、可溶性ミスフォールディングタンパク質のアミノ酸配列に特異的な抗体、または可溶性ミスフォールディングタンパク質のコンフォメーションに特異的な抗体のうちの1つまたは複数を含み得る。該1種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質の特異的抗体は、固相に連結され得る。該固相は、磁気ビーズおよびマルチウェルプレートのうちの1つまたは複数を含み得る。

40

【0063】

例えばELISAプレートは、患者の試料に由来する可溶性ミスフォールディングタンパク質を捕捉するのに用いられる抗体でコーティングされ得る。抗体コーティングELISAプレートを患者試料と共にインキュベートすることができ、非結合材料を洗い流すことができ、PMCA反応を実施することができる。抗体をビーズに連結させることもできる。ビーズを患者の試料と共にインキュベートし、それを用いて可溶性ミスフォールディングタンパク質-抗体複合体を、患者試料の残りとは分離することができる。

50

【0064】

様々な実施形態において、該試料をモノマーフォールディングタンパク質と接触させて、インキュベーション混合物を形成させることは、モル過剰のモノマーフォールディングタンパク質を、捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質を含む試料に接触させることを含み得る。モノマーフォールディングタンパク質の該モル過剰は、捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質に含まれるタンパク質モノマーの総モル量よりも大きくなり得る。インキュベーション混合物をインキュベートすることは、捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在下で、該モノマーフォールディングタンパク質の少なくとも一部のミスフォールディングおよび/または凝集を誘発して、ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させるのに効果的になり得る。

10

【0065】

幾つかの実施形態において、該タンパク質凝集物は、モノマータンパク質、可溶性ミスフォールディングタンパク質、および可溶性ミスフォールディングタンパク質の捕捉形態のうちの1つまたは複数を含み得る。

【0066】

複数の実施形態において、インキュベーション混合物を物理的に破壊することは、音波処理、撹拌、振とう、凍結/解凍、レーザ照射、オートクレーブインキュベーション、高圧、ホモジネーションなどのうちの1つまたは複数を含み得る。例えば振とうは、周期的撹拌を含み得る。該周期的撹拌は、約50回転/分(RPM)~10,000RPMで実施され得る。該周期的撹拌は、約200RPM~2000RPMで実施され得る。該周期的撹拌は、約500RPMで実施され得る。

20

【0067】

様々な実施形態において、インキュベーション混合物を物理的に破壊することは、約5秒~約10分、約30秒~約1分、約45秒~約1分、約1分間などの各インキュベーションサイクルで実施され得る。例えば、該インキュベーション混合物を物理的に破壊することは、約5秒~約10分、約30秒~約1分、約45秒~約1分、約1分間などのうちの1つまたは複数の間、振とうすることにより各インキュベーションサイクルで実施され得る。インキュベーション混合物をインキュベートすることは、独立して、約5分~約5時間、約10分~約2時間、約15分~約1時間、約25分~約45分などの時間、各インキュベーションサイクルで実施され得る。各インキュベーションサイクルは、独立して、約5分~約5時間インキュベートすることおよび約5秒~約10分間物理的に破壊すること；約10分~約2時間インキュベートすることおよび約30秒~約1分間物理的に破壊すること；約15分~約1時間インキュベートすることおよび約45秒~約1分間物理的に破壊すること；約25分~約45分インキュベートすることおよび約45秒~約1分間物理的に破壊すること；ならびに約1分間インキュベートすることおよび約1分間物理的に破壊すること、のうちの1つまたは複数の間、インキュベーション混合物をインキュベートすることおよび物理的に破壊することを含み得る。

30

【0068】

インキュベーションサイクルを実施することは、約2回~約1000回、約5回~約500回、約50回~約500回、約150回~約250回など、反復され得る。インキュベーション混合物をインキュベートすることは、独立して、各インキュベーションサイクルで、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50の温度、または前記値の任意の2つの間の範囲、例えば約15~約50で実施される。

40

【0069】

複数の実施形態において、試料をモノマーフォールディングタンパク質と接触させて、インキュベーション混合物を形成させることは、生理的条件下で実施され得る。試料をモノマーフォールディングタンパク質と接触させて、インキュベーション混合物を形成させることは、試料をモル過剰のモノマータンパク質と接触させることを含み得る。モル過剰

50

は、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質に含まれるタンパク質モノマーの総モル量よりも大きくなり得る。モノマーフォールディングタンパク質および/または可溶性ミスフォールディングタンパク質は、例えばモノマーフォールディングタンパク質および/または可溶性ミスフォールディングタンパク質のタンパク質分解切断によって形成された、1つまたは複数のペプチドを含み得る。例えばADの場合、モノマーフォールディングタンパク質および/または可溶性ミスフォールディングタンパク質は、アミロイド前駆体タンパク質の β -または γ -セクレターゼ切断を介して形成された1つまたは複数のペプチドを含み得る。例えばADの場合、モノマーフォールディングタンパク質および/または可溶性ミスフォールディングタンパク質は、Aベータ40およびAベータ42のうちの1つまたは複数を含み得る。さらに例えばPDの場合、モノマーフォールディングタンパク質および/または可溶性ミスフォールディングタンパク質は、 α S-140のタンパク質分解切断を介して形成された1つまたは複数のペプチドを含み得る。モノマー α Sタンパク質および/または可溶性オリゴマー α Sタンパク質は、 α S-140、 α S-126、 α S-112などのうちの1つまたは複数を含み得る。本明細書で用いられる「 α S-140」は、全長140アミノ酸 α -シヌクレインタンパク質を指す。他のアイソフォームとしては、「 α S-126」、つまり例えばエクソン3の欠損により、残基41~54が欠如したアルファ-シヌクレイン-126；および「 α S-112」、つまり例えばエクソン5の欠損により、残基103~130が欠如したアルファ-シヌクレイン-112を挙げることができる。

10

20

【0070】

様々な実施形態において、該モノマーフォールディングタンパク質は、化学合成、組換え生成、または非組換え生体試料からの抽出のうちの1つによって生成され得る。可溶性ミスフォールディングタンパク質は、実質的に可溶性ミスフォールディング凝集物であり得る。ミスフォールディングタンパク質の増幅部分は、実質的に可溶性ミスフォールディング凝集物の増幅部分、および不溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数であり得る。

【0071】

様々な実施形態において、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定するキットが、提供される。該キットは、既知量のモノマーフォールディングタンパク質と、既知量の可溶性ミスフォールディングタンパク質指示薬と、を含み得る。該キットは、取扱説明書を含み得る。該取扱説明書で、本明細書に記載された方法のいずれかを実施するようにユーザに指導され得る。例えば該取扱説明書で、試料を、既知量のモノマーフォールディングタンパク質および既知量の可溶性ミスフォールディングタンパク質指示薬のうちの1つまたは複数と接触させて、インキュベーション混合物を形成させることがユーザに指導され得る。該取扱説明書で、ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させるのに効果的になるように2回以上のインキュベーションサイクルを実施することがユーザに指導され得る。各インキュベーションサイクルは、可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在下で、モノマーフォールディングタンパク質の少なくとも一部のミスフォールディングおよび/または凝集を誘発するのに効果的になるようにインキュベーション混合物をインキュベートして、ミスフォールディングタンパク質の増幅部分を形成させることを含み得る。各インキュベーションサイクルは、例えば可溶性ミスフォールディングタンパク質を放出するために、存在する任意のタンパク質凝集物の少なくとも一部を分解するのに効果的になるようにインキュベーション混合物を物理的に破壊することを含み得る。該取扱説明書で、可溶性ミスフォールディングタンパク質を検出することによって、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を判定することがユーザに指導され得る。可溶性ミスフォールディングタンパク質は、可溶性ミスフォールディングタンパク質およびミスフォールディングタンパク質の増幅部分を含み得る。

30

40

【0072】

様々な実施形態において、該キットは、既知量のモノマーフォールディングタンパク質と、既知量の可溶性ミスフォールディングタンパク質指示薬と、を含み得る。該キットは

50

、個々のプレートまたは装置の1つまたは複数として、組み合わせた装置としてなどで含まれる、マルチウェルマイクロタイタープレート (multiwell microtitre plate) ; マイクロ流体プレート ; 振とう装置 ; インキュベーション装置 ; および蛍光測定装置のうちの1つまたは複数を含み得る。例えば振とうマイクロプレートリーダーを用いて、インキュベーションおよび振とうのサイクルを実施して、実験過程のThT蛍光発光を自動測定することができる (例えば、FLUOstar OPTIMA、BMG LABTECH Inc. , ノースカロライナ州カリー所在)。

【0073】

該キットの複数の実施形態において、可溶性ミスフォールディングタンパク質の指示薬の指示状態および非指示状態は、蛍光の差を特徴とし得る。該取扱説明書で、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在を蛍光分光法によって判定することがユーザに指導され得る。

10

【0074】

該キットの幾つかの実施形態において、可溶性ミスフォールディングタンパク質の指示薬としては、チオフラビンT、コンゴアレッド、m-I-スチルベン、クリサミンG、PIB、BF-227、X-34、TZDM、FDDNP、MeO-X-04、IMPY、NIAD-4、発光コンジュゲートポリチオフェン、緑色蛍光タンパク質および黄色蛍光タンパク質などの蛍光タンパク質との融合物、それらの誘導体などのうちの1種または複数を挙げることができる。該モノマーミスフォールディングタンパク質は、共有結合により取り込まれた放射性アミノ酸、共有結合により取り込まれた同位体標識アミノ酸、および共有結合により取り込まれたフルオロフォアのうちの1つまたは複数を含み得る。

20

【0075】

該キットの様々な実施形態において、該取扱説明書で、本明細書に記載された方法のいずれかを実施することがユーザに指導され得る。例えば該取扱説明書は、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を測定するためのユーザへの指導を含み得る。該取扱説明書で、ウェスタンブロットアッセイ、ドットブロットアッセイ、酵素免疫測定法 (ELISA)、チオフラビンT結合アッセイ、コンゴアレッド結合アッセイ、沈降アッセイ、電子顕微鏡測定、原子間力顕微鏡測定、表面プラズモン共鳴、および分光法などのうちの1つまたは複数を実施することによって可溶性ミスフォールディングタンパク質を検出することがユーザに指導され得る。

30

【0076】

該取扱説明書で、インキュベーション混合物をプロテアーゼと接触させること、ならびにウェスタンブロットアッセイ、ドットブロットアッセイ、およびELISAのうちの1つまたは複数において、抗ミスフォールディングタンパク質抗体を利用して可溶性ミスフォールディングタンパク質を検出すること、によって可溶性ミスフォールディングタンパク質を検出することがユーザに指導され得る。

【0077】

該キットの複数の実施形態において、該取扱説明書で、対象から試料を採取することがユーザに指導され得る。該取扱説明書は、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在に従って対象のPMDの存在を判定するためのユーザへの指導を含み得る。試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の存在は、対照群の対象から採取された対照試料と比較して判定され得る。該取扱説明書で、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を、所定の閾値量に比較することによって、対象のPMDの存在を判定することがユーザに指導され得る。該取扱説明書で、羊水 ; 胆汁 ; 血液 ; 脳脊髄液 ; 耳垢 ; 皮膚 ; 滲出液 ; 糞便 ; 胃液 ; リンパ ; 乳 ; 粘液、例えば鼻分泌物 ; 粘膜、例えば鼻粘膜 ; 腹水 ; 血漿 ; 胸水 ; 膿 ; 唾液 ; 皮脂 ; 精液 ; 汗 ; 滑液 ; 涙液 ; 尿などのうちの1種または複数を含む試料を得ることがユーザに指導され得る。該取扱説明書で、試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の量を、試料と異なる時間に対象から採取された比較試料中の可溶性ミスフォールディングタンパク質の量に比較することによって、対象のPMDの進行または恒常性を測定することがユーザに指導され得る。

40

50

【0078】

該取扱説明書で、試料およびインキュベーション混合物の1つまたは複数の中で可溶性ミスフォールディングタンパク質を選択的に濃縮することがユーザに指導され得る。例えば該キットは、可溶性ミスフォールディングタンパク質を選択的に濃縮または捕捉するように構成された1種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質の特異的抗体を含み得る。該1種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質の特異的抗体は、可溶性ミスフォールディングタンパク質のアミノ酸配列に特異的な抗体、および可溶性ミスフォールディングタンパク質のコンフォメーションに特異的な抗体のうちの1つまたは複数を含み得る。該取扱説明書で、該1種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質の特異的抗体を、可溶性ミスフォールディングタンパク質に接触させて、捕捉された可溶性ミスフォールディングタンパク質を形成させることによって、可溶性ミスフォールディングタンパク質を選択的に濃縮することがユーザに指導され得る。該1種または複数の可溶性ミスフォールディングタンパク質の特異的抗体は、提供されて固相に連結され得る。該固相は、磁気ビーズおよびマルチウェルプレートのうちの1つまたは複数を含み得る。

10

【0079】

該キットの様々な実施形態において、インキュベーション混合物を物理的に破壊するための取扱説明書で、音波処理、攪拌、振とう、凍結/解凍、レーザ照射、オートクレーブインキュベーション、高圧、ホモジネーションなどのうちの1つまたは複数を利用することがユーザに指導され得る。該取扱説明書で、本明細書に記載された任意のRPM範囲に従って、例えば約50RPM~10,000RPMで周期的攪拌を実施することがユーザに指導され得る。該取扱説明書で、各インキュベーションサイクルで本明細書に記載された任意の時間範囲に従って、例えば約5秒~10分間、物理的破壊を実施することがユーザに指導され得る。該取扱説明書で、各インキュベーションサイクルで本明細書に記載された任意の時間範囲に従って、例えば約5分~5時間、インキュベーション混合物をインキュベートすることがユーザに指導され得る。該インキュベーションサイクルを実施するための取扱説明書で、本明細書に記載された任意の反復回数、例えば約2回~約1000回、インキュベーションサイクルを実施することがユーザに指導され得る。該インキュベーションサイクルを実施するための取扱説明書は、約15~約50の温度でインキュベートするためのユーザへの指導を含み得る。

20

30

【0080】

該キットの様々な実施形態において、該モノマーフォールディングタンパク質は、化学合成、組換え生成、または非組換え生体試料からの抽出のうちの1つによって生成され得る。可溶性ミスフォールディングタンパク質は、実質的に可溶性ミスフォールディング凝集物であり得る。ミスフォールディングタンパク質の増幅部分は、実質的に可溶性ミスフォールディング凝集物の増幅部分、および不溶性ミスフォールディング凝集物のうちの1つまたは複数であり得る。

【0081】

実施例

実施例1：合成A β オリゴマーの調製

A β 1-42を、Yale大学W. Keck Facilityにて固相N-tert-ブチルオキシカルボニルの化学作用を利用して合成し、逆相HPLCによって精製した。最終生成物を凍結乾燥し、アミノ酸分析および質量分析によって特徴づけた。凝集されたミスフォールディングA β タンパク質を含まない原液を調製するために、凝集物を高pHに溶解し、30kDaカットオフフィルターでろ過して、残留する凝集物を除去した。異なるタイプの凝集物を調製するために、シード不含のA β 1-42の溶液(10 μ M)を、0.1M Tris-HCl(pH7.4)中、25で異なる時間、攪拌しながらインキュベートした。この調製物は、インキュベーション時間に応じて異なる割合で、A β モノマー、そしてフィブリル、プロトフィブリルおよび可溶性ミスフォールディングA β タンパク質の混合物を含有した。凝集の度合いを、ThT蛍光発光、ネガティブ染色後

40

50

の電子顕微鏡、A 1 1 コンフォメーション抗体を用いたドットプロット試験および 4 G 8 抗 A β 抗体を用いたゲル電気泳動後のウェスタンブロットによって特徴づけた。

【 0 0 8 2 】

異なるサイズの A β オリゴマーの混合物を、フィブリル形成の過程で作製した。具体的には、可溶性ミスフォールディング A β タンパク質を、モノマー合成 A β 1 - 4 2 (1 0 μ M) を攪拌しながら 2 5 でインキュベートすることによって調製した。5 時間のインキュベーション後に、多量の可溶性ミスフォールディング A β タンパク質の球状の外観が、ネガティブ染色後の電子顕微鏡測定によって観察され、少量のみのプロトフィブリルおよびフィブリルも観察された。1 0 時間目にプロトフィブリルが主に観察され、2 4 時間目に、長いフィブリルが多量に観察された。図 1 A は、インキュベーションの 0 時間目、5 時間目、1 0 時間目、および 2 4 時間目に撮影された電子顕微鏡写真を示している。

10

【 0 0 8 3 】

可溶性ミスフォールディング A β タンパク質凝集物を、Kayed, et al. "Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis," Science 2003, 300, 486 - 489 の方法に従って A 1 1 抗オリゴマー特異的抗体を利用して陽性とテストされた。1 0 時間および 2 4 時間のさらなるインキュベーションの後、プロトフィブリルおよびフィブリル構造を観察した。凝集物のサイズを、定義された孔径のフィルターでのろ過および SDS - PAGE 分離後のウェスタンブロットによって測定した。5 時間のインキュベーションによって形成された可溶性ミスフォールディング A β タンパク質は、3 0 k D a カットオフのフィルター中に保持され、1 0 0 0 k D a カットオフのフィルターを通過した。図 1 B は、可溶性ミスフォールディング A β タンパク質凝集物のウェスタンブロットである。この可溶性ミスフォールディング A β タンパク質の電気泳動分離から、該材料の大部分が約 1 7 0 k D a の SDS 耐性凝集物として移動し、1 7 k D a に小さなバンドを有することが示された。

20

【 0 0 8 4 】

実施例 2 : A β - PMCA は合成 A β オリゴマーを検出する

実施例 2 A . A β 凝集のシーディングを、異なる量の合成可溶性ミスフォールディング A β タンパク質 (対照 (A β オリゴマー不含) ; または合成可溶性ミスフォールディング A β タンパク質 3 , 8 0 , 3 0 0 , および 8 4 0 0 フェムトモル) を含み、または含まずに、チオフラビン T の存在下でシード不含 A β 1 - 4 2 の溶液をインキュベーションすることによって試験した。A β - PMCA の一般的手順 : 0 . 1 M Tris - HCl (pH 7 . 4) 中の 2 μ M 凝集物不含 A β 1 - 4 2 の溶液 (総量 2 0 0 μ L) を、不透明 9 6 ウェルプレートに入れ、単独で、または合成 A β 凝集物 (実施例 1 に記載された通り 5 時間インキュベートすることにより調製) もしくは CSF アリコット 4 0 μ L の存在下でインキュベートした。試料を 5 μ M チオフラビン T (ThT) の存在下でインキュベートし、2 2 の一定温度で Eppendorf サーモミキサーを利用して周期的攪拌に供した (5 0 0 r p m で 1 分間、その後、振とうせずに 2 9 分間) 。様々な時点で、ThT 蛍光をプレート内で、プレート分光蛍光計を用いて 4 3 5 n m で励起した後、4 8 5 n m で測定した。図 2 A は、示されたフェムトモル濃度の合成可溶性ミスフォールディング A β タンパク質シードを用いた、チオフラビン T の蛍光による測定でのアミロイド形成 (循環増幅を含まない) 対時間のグラフである。緩衝液のペプチド濃度、温度および pH をモニタリングして、誘導期の度合いおよび実験間の再現性を制御した。これらの条件下では、自然な A β 凝集物は、実験が実施された時間 (1 2 5 時間) では検出されなかった。モノマー A β 1 - 4 2 タンパク質の凝集が、0 . 3 ~ 8 . 4 f m o l の実施例 1 の合成可溶性ミスフォールディング A β タンパク質の存在下で観察された。

30

40

【 0 0 8 5 】

実施例 2 B : インキュベーションと物理的破壊の組み合わせ期である増幅サイクルを用いた。図 2 A と同じ試料を、周期的攪拌 (5 0 0 r p m で 1 分間攪拌した後、振とうせず

50

に29分間)を行いながらインキュベートした。凝集を、プレート分光蛍光計(励起435; 発光485)を用いて、アミロイドフィブリルへのチオフラビンT(ThT)結合によって経時的に測定した。グラフは、三重測定の平均および標準誤差を示す。A β オリゴマーの濃度は、平均分子量170kDaと仮定して推定した。図2Bは、様々な濃度の実施例1の合成可溶性ミスフォールディングA β タンパク質に関する時間の関数として、ThT蛍光によって測定された増幅周期促進アミロイド形成を示すグラフである。これらの条件下では、8400、300、80および3fmolの合成可溶性ミスフォールディングA β タンパク質によって誘導されたモノマーA β 1-42タンパク質の凝集が、明らかに急速であり、合成可溶性ミスフォールディングA β タンパク質の非存在下で観察されたものより容易に識別された。この結果から、これらの条件下での検出限界が、所与の試料中では3fmol以下の可溶性ミスフォールディングA β タンパク質であることが示される。

10

【0086】

実施例3: A β -PMCAは、AD患者の脳脊髄液中のミスフォールディングA β を検出する

CSFのアリコットを、AD患者50名、非変性神経疾患(NND)に罹患した認知的に正常な個体39名、および他の形態の認知症をはじめとする非AD神経変性疾患(NAND)に罹患した個体37名から得た。テストCSF試料を、DSM-IVおよびNINCDS-ADRA指針(McKhann et al., 1984)による定義と、様々なテスト、例えば日常的医学検査、神経学的評価、神経心理学的評価、磁気共鳴画像、ならびにA β 1-42、総タウおよびホスホタウのCSFレベルの測定などを利用した測定と、によりおそらくADであると診断された患者50名から得た。試料採取時のAD患者の平均年齢は、71.0 $\pm$ 8.1歳(範囲49~84歳)であった。対照CSF試料を、正常圧水頭症の症例12名、末梢神経傷害の患者7名、種々の形態の脳腫瘍の患者7名、ICUS患者2名、重度頭痛の患者1名、脳炎患者3名、高血圧患者1名、および潰瘍診断の6名からなる非変性神経疾患(NND)に罹患した患者39名から得た。CSF試料がこの患者群から採取された時の平均年齢は、64.6 $\pm$ 14.7歳(範囲31~83歳)であった。対照CSF試料はまた、前頭側頭型認知症10名(行動障害型5名および言語障害型5名)、パーキンソン病の患者6名(認知症関連4名および運動ニューロン疾患1名)、進行性核上性麻痺患者6名、脊髄小脳失調6名(認知症関連1名)、筋萎縮性側索硬化症4名、ハンチントン病2名、MELAS1名、レビー小体型認知症1名、および血管型認知症1名からなる非AD神経変性疾患(NAND)に罹患した個体37名から採取した。この群の試料採取時の平均年齢は、63.8 $\pm$ 11.1歳(範囲41~80歳)であった。CSF試料は、一夜絶食後に非外傷性針によるL4/L5間またはL3/L4間の腰部穿刺によってポリプロピレン試験管に採取した。試料を4および3,000gで3分間遠心分離し、分取して、分析まで-80で貯蔵した。CSF細胞カウント、グルコースおよびタンパク質濃度を測定した。アルブミンを、レートネフェロメトリーによって測定した。血液脳関門の統合性および髄腔内IgG産生を評価するために、アルブミン比率(CSFアルブミン/血清アルブミン) $\times 10^3$ およびIgG指数(CSFアルブミン/血清アルブミン)(CSF IgG/血清IgG)を計算した。この試験は、Helsinki Declarationの条項にしたがって実施され、Ethics Committeeにより認可された。

20

30

40

【0087】

実験と分析の開始部分は、盲検で実施した。図3Aは、AD、NND、およびNAND群から得られた代表的試料5つのA β 凝集の平均反応速度を示すThT蛍光標識の関数として測定されたアミロイド形成対時間のグラフである。

【0088】

結果から、AD患者からのCSFが対照CSFに比較してA β 凝集を有意に促進することが示される($P < 0.001$)。ヒトCSF試料の存在下でのA β 凝集反応速度における差の有意性は、一元配置分散分析と、それに続くテューキー多重比較事後検定によって

50

解析した。有意水準は、 $P < 0.05$ に設定した。AD と他の 2 群の試料との差は、 $P < 0.001$ (***) で高い有意性があった。

【0089】

図 3 B は、AD、NND および N AND 群から得られた試料についての時間単位での誘導期時間のグラフである。A β 凝集に及ぼす個々の試料の影響を測定するために、誘導期を推定して、対照緩衝液試料を差し引いた後の 40 任意単位よりも大きな ThT 蛍光までの時間として定義した。この値は、対照緩衝液試料の測定値のおよそ 5 倍に対応することを考慮して選択された。

【0090】

図 3 C は、180 A β - PMCA サイクル、即ち 90 時間インキュベーション (P90) の後に得られたアミロイド形成の度合いを示すグラフである。実験群の間での誘導期および P90 の比較から、AD と、非変性神経疾患または非 AD 神経変性疾患の個体から得られた対照試料との有意差が明らかである。さらに、凝集パラメータと AD 患者の年齢との間に相関が検出されず、マーカのレベルが、患者の年齢ではなく患者の CSF における凝集 A β タンパク質に対応することが示される。

10

【0091】

図 5 の表 1 は、誘導期数を利用して計算された A β - PMCA テストの感度、特異度および予測値の推定を示す。

【0092】

再現性を試験するために、図 3 A ~ C に示されたものと類似の実験を、独立して、異なる試料、試薬、および A β - PMCA の基質としての A β ペプチドの新しいバッチを用いて実施した。300 A β - PMCA サイクル、即ち 150 時間インキュベーション (P150) の後に得られたアミロイド形成の度合いを、各患者で測定した。対照群には、他の神経変性疾患に罹患したヒトおよび非神経病の患者の両者が含まれる。各試料のデータは、二重測定の平均を表す。統計学的差を、スチューデント t 検定により解析した。図 6 は、300 A β - PMCA サイクル、即ち 150 時間インキュベーション (P90) の後に得られた試料の時間単位での誘導期時間のグラフである。

20

【0093】

試験過程で、4 番目の位置に由来する CSF 試料の全組み合わせは、高濃度の合成オリゴマーを添加した後でも全く凝集しなかった。試料採取時の試薬汚染が、アッセイを妨害したと予測される。

30

【0094】

異なる試料間の凝集反応速度の差を、誘導期、A50 および P90 をはじめとする様々な異なる反応速度パラメータの推定によって評価した。誘導期は、緩衝液単独のバックグラウンド値の 5 倍よりも高い ThT 蛍光に達するのに必要となる時間と定義される。A50 は、最大凝集の 50 % に達する時間に対応する。P90 は、90 時間目の凝集 (ThT 蛍光として測定) の度合いに対応する。感度、特異度および予測値は、このデータを用いて測定し、カットオフ閾値は、MedCalc ソフトウェア (MedCalc Software、ベルギーのオステンダ所在) を用いた受信者動作特性 (ROC) 曲線解析によって測定した。

40

【0095】

実施例 4 : CSF 中の AD の A β - PMCA 検出のためのミスフォールディング A β の閾値の測定

図 5、表 1 の裏づけとして、感度、特異度および予測値を、誘導期データを用いて測定し、カットオフ閾値は、MedCalc ソフトウェア (バージョン 12.2.1.0、MedCalc、ベルギー所在) を用いた受信者動作特性 (ROC) 曲線解析によって測定した。図 5、表 1 に示される通り、90.0 % 感度および 84.2 % 特異度が、非変性神経疾患を有する年齢が一致した個体からなる対照群について推定された。反対に、他の形態の認知症をはじめとする他の神経変性疾患からの AD の臨床的により関連した識別では、100 % 感度および 94.6 % 特異度が推定された。AD を他の形態の神経変性疾患と

50

区別するための $A\beta$ - PMCA のこの能力は、臨床的に有意である。全ての対照個体を考慮した全体的感度および特異度は、それぞれ 90 % および 92 % であった。

【0096】

$A\beta$ - PMCA テストの性能を評価して AD 患者を対照と区別するために、真陽性率（感度）を、異なるカットオフポイントの偽陽性率（特異度）の関数としてプロットした。この解析では、AD 対 N AND（図 4 A）、AD 対 N ND（図 4 B）、および AD 対全ての対照試料（図 4 C）の誘導期の値を用いた。曲線下面積で推定されたテストの性能は、AD に対して、N AND、N ND および全ての対照と比較して、それぞれ 0.996 ± 0.0033 、 0.95 ± 0.020 および 0.97 ± 0.011 であった。統計解析を、MedCalc ROC 曲線解析ソフトウェア（バージョン 12.2.1.0）を用いて実施し、結果から、 $P < 0.0001$ で該テストが AD を対照と区別し得ることが示された。異なる組み合わせでの群比較について最も信頼性のあるカットオフポイントを推定するために、感度（青色線）および特異度（赤色線）を、各カットオフ値についてプロットした（図 4 D）。グラフは、AD 対全ての対照試料（N AND および N ND 群を含む）の曲線および 95 % 信頼区間を示す。これらのカットオフ値を用いて、図 5、表 1 の感度、特異度および予測値を推定した。

10

【0097】

実施例 5： $A\beta$ オリゴマー免疫枯渇はヒト脳脊髄液における $A\beta$ シードを除去し、 $A\beta$ - PMCA による AD CSF 中の可溶性ミスフォールディング $A\beta$ タンパク質の検出が確認される

20

免疫枯渇実験を実施して、 $A\beta$ - PMCA が CSF 中に存在する可溶性ミスフォールディング $A\beta$ タンパク質に関連するシーディング活性を検出することを確認した。可溶性ミスフォールディング $A\beta$ タンパク質の効率的免疫枯渇の方法論を最初に、合成的に調製された可溶性ミスフォールディング $A\beta$ タンパク質を用いることによって最適化した。免疫枯渇は、 $A\beta$ の配列を特異的に認識する抗体（4G8）とコンフォメーション抗体（A11）との混合物でコンジュゲートされた Dynabeads と共にインキュベートすることによって実施した。図 7 A は、ヒト CSF に添加された合成的に調製された $A\beta$ オリゴマーを用いた免疫枯渇の結果を示すウェスタンブロットである。可溶性ミスフォールディング $A\beta$ タンパク質は、この免疫枯渇によって効率的に除去された。

30

【0098】

図 7 A および 7 B は、チオフラビン T 蛍光により測定された、アミロイド形成対時間のグラフであり、AD CSF 中のシーディング活性が可溶性ミスフォールディング $A\beta$ タンパク質免疫枯渇によって除去されたことが実証される。4G8 および A11 抗体での免疫枯渇前または後の AD CSF の試料を用いて、 $A\beta$ - PMCA アッセイにおいて $A\beta$ 凝集のシードにした。免疫枯渇を、3つの AD CSF に適用した。図 7 B は、対照および免疫枯渇 CSF 試料の反応速度を示すグラフである。図 7 B は、免疫枯渇 AD CSF の場合に $A\beta$ - PMCA 反応での $A\beta$ 凝集の反応速度が対照 CSF 試料で観察されたものと同等で、両者とも免疫枯渇前の AD CSF で観察された凝集と有意に異なったことを示している。図 7 C は、対照、および $A\beta$ - PMCA アッセイによってモニタリングされた A11 コンフォメーション抗体および凝集のみが枯渇された免疫枯渇 CSF 試料の反応速度を示すグラフである。図 7 C は、ミスフォールディング $A\beta$ を特異的に認識する A11 コンフォメーション抗体を用いて免疫枯渇された AD CSF を用いて得られた類似の結果を示す。これらの結果から、 $A\beta$ - PMCA が AD CSF 中の可溶性ミスフォールディング $A\beta$ タンパク質を検出することが確認される。

40

【0099】

実施例 6：固相免疫捕捉

図 8 A および 8 B は、血漿などの複合試料から可溶性ミスフォールディング $A\beta$ タンパク質を捕捉するために用いられる 2 つの固相法の略図である。方策 1 は、ELISA プレート上の固相に結合された特異的抗体でプレコーティングされた ELISA プレートをを用いた。プレートを洗浄した後、 $A\beta$ - PMCA 反応を、同じプレートで実施した。方策 2

50

は、特異的抗体でコーティングされた固相として磁気ビーズを用いた。このアプローチは、試料の濃度を提供した。

【0100】

実施例7：免疫捕捉の特異度

図9は、A β オリゴマーを捕捉する特異的抗体の能力を実証する表2を示す。上のパネルは、この試験で用いられた種々の配列の抗体のA β タンパク質上のエピトープ認識部位の略図を示す。図9の表2は、A β オリゴマーを捕捉するための異なる配列およびコンフォメーション抗体の効率を実証している。オリゴマーを捕捉する能力を、健常なヒト血漿における合成A β オリゴマーの添加およびA β -PMCAでの検出によって測定した。記号は、異なる抗体を用いた検出限界が<12 fmol (+++); 10~100 fmol (++) ; >1 pmol (+)、および捕捉試薬なし(-)よりも有意に高くない、を示している。

10

【0101】

実施例8：ヒト血漿に添加されたA β オリゴマーの検出

図10は、ヒト血漿に添加された可溶性ミスフォールディングA β タンパク質の検出を示すチオフラビンT蛍光によって測定されたアミロイド形成対時間のグラフである。プロテインGでプレコーティングされたELISAプレートを、抗コンフォメーション抗体(Acumenの16ADV)でコーティングした。それゆえ、プレートを、そのままのヒト血漿(対照)(100 μ l)または異なる濃度の合成可溶性ミスフォールディングA β タンパク質を添加されたヒト血漿(100 μ l)と共にインキュベートした。インキュベーション後に、プレートを、A β 40モノマー(2 μ M)およびThT(5 μ M)の存在下でA β -PMCAに供した(29分間インキュベーションおよび30秒間振とう)。アミロイド形成を、チオフラビンT蛍光によって測定した。図10は、同様に働く3種の異なる抗体で実施された複数の実験の代表例である。

20

【0102】

実施例9：AD患者試料対対照による、それらからの可溶性ミスフォールディングA β の捕捉

図11は、AD患者および対照からの血漿試料中のA β -PMCAアッセイにおいて50%凝集に達するまでの時間を示すグラフである。ADに罹患した患者、非AD神経変性疾患(NAD)に罹患した患者および健常対照の血漿試料を、抗A β 抗体(82E1)コーティングビーズと共にインキュベートした。A β -PMCAを、実施例2に記載された通り実施した。50%凝集に達するのに必要となる時間を、各群の個々の患者で記録した。差は、一元配置分散分析と、それに続くチューキー多重比較事後検定によって解析した。このデータのROC解析は、対照からAD患者を正しく同定することに関して82%の感度および100%の特異度を示した。

30

【0103】

実施例10：音波処理および振とうは様々な検出方法で効果的になる

図12は、凝集を断片化する手段として振とうの代わりに音波処理を利用することによるA β 凝集の増幅の結果を示すウェスタンブロットである。実験は、異なる量の合成A β オリゴマーの存在下で実施した。10 μ g/mlシード不含モノマーA β 1-42の試料を、単独(レーン1)で、または300(レーン2) fmol、30(レーン3) fmol および3(レーン4) fmolのミスフォールディングA β と共にインキュベートした。試料は、増幅せずに凍結するか(非増幅)、または96 PMCAサイクルに供し(増幅)、それぞれには30分間のインキュベーションと、その後の20秒間の音波処理が含まれた。凝集A β を、プロテアーゼK(PK)での試料の処置後の抗A β 抗体を用いたウェスタンブロットによって検出した。本発明者らの実験では、チオフラビンT蛍光を用いた検出が音波処理と適合性がなく、物理的破壊法としての振とうによって非常にうまくいくことが観察された。図12は、A β 凝集物のための異なる検出法、この場合、ウェスタンブロットを用いると、音波処理が振とうと同様にうまく働くことを示している。

40

【0104】

50

実施例 11 : P M C A 基質としてのモノマー A β の生成

シード不含モノマー A β を、サイズ排除クロマトグラフィーによって得た。手短に述べると、ジメチルスルホキシド中で調製された 1 mg / mL ペプチド溶液のアリコットを、pH 7.5 の 10 mM リン酸ナトリウムで 0.5 mL / 分で溶出される Superdex 75 カラムを用いて分画した。ピークは、220 nm の UV 吸収によって検出される。A β のモノマー/ダイマーを含む 4 ~ 10 kDa 分子量に対応するピークを回収して、アミノ酸分析によって濃度を測定した。試料を貯蔵して、-80 で凍結乾燥した。

【0105】

実施例 12 : A β の生成および精製

pET28 GroES - Ub - A β 42 プラスミドを含む大腸菌細胞を、37 のリアブロス (LB) 培地で増殖させて、発現を 0.4 mM IPTG で誘導した。4 時間後に、細胞を採取して、溶解緩衝液 (20 mM Tris - Cl (pH 8.0)、10 mM NaCl、0.1 mM PMSF、0.1 mM EDTA および 1 mM β -メルカプトエタノール) に溶解し、18,000 rpm で 30 分間遠心分離した。封入小体を、6 M 尿素を含有する再懸濁緩衝液 (50 mM Tris - Cl (pH 8.0)、150 mM NaCl、および 1 mM DTT) に再懸濁させた。不溶性タンパク質を、18,000 rpm で 30 分間の遠心分離によって除去した。GroES - Ub - A β 42 融合タンパク質を含む上清が回収される。融合タンパク質から A β 42 を切除するために、融合タンパク質を再懸濁緩衝液で 2 倍希釈し、1:100 の酵素対基質モル比の組換え脱ユビキチン化酵素 (Usp2cc) により 37 で 2 時間処理した。その後、試料を C18 カラム (25 mm $\times$ 250 mm、米国の Grace Vydac) にロードした。A β 42 を、溶媒系緩衝液 1 (30 mM 酢酸アンモニウム (pH 10)、2% アセトニトリル) および緩衝液 2 (70% アセトニトリル) で、緩衝液 2 の 20 ~ 40% 直線勾配を利用して、流速 10 mL / 分で 35 分間にわたり精製した。精製された A β 42 を凍結乾燥して、使用まで -80 で貯蔵した。

【0106】

実施例 13 : P D - P M C A による α S シードの検出

実施例 13 A : α S 凝集物のシーディングを、異なる量の合成可溶性オリゴマー α S タンパク質 : 対照 (α S オリゴマー不含) ; または 1 ng / mL、10 ng / mL、100 ng / mL、および 1 μ g / mL 合成可溶性オリゴマー α S タンパク質シードを含み、または含まずに、チオフラビン T の存在下でシード不含 α S の溶液をインキュベーションすることによって試験した。 α S - P M C A の一般的手順 : P B S (pH 7.4) 中の 100 μ g / mL α S シード不含 α S の溶液 (総量 200 μ L) を、不透明 96 ウェルプレートに入れ、単独で、または示された濃度の合成 α S 凝集物もしくは C S F アリコット 40 μ L の存在下でインキュベートした。試料を 5 μ M チオフラビン T (ThT) の存在下でインキュベートし、22 の一定温度で E p p e n d o r f サーモミキサーを利用して周期的攪拌に供した (500 rpm で 1 分間、その後、振とうせずに 29 分間)。様々な時点で、ThT 蛍光をプレート内で、プレート分光蛍光計を用いて 435 nm で励起した後、485 nm で測定した。図 13 A は、示された濃度の合成可溶性オリゴマー α S タンパク質シードを用いた、P D - P M C A による α S シードの検出を示す、時間の関数としてのチオフラビン T 蛍光のグラフである。緩衝液のペプチド濃度、温度および pH をモニタリングして、誘導期の度合いおよび実験間の再現性を制御した。モノマー α S タンパク質の凝集が、1 ng / mL、10 ng / mL、100 ng / mL および 1 μ g / mL 合成可溶性オリゴマー α S タンパク質シードの α S の存在下で観察された。

【0107】

実施例 13 B : 添加された α S シードの量の関数としての 50% 凝集に達するまでの時間を、実施例 1 A の試料を用いて測定した。図 13 B は、添加された α S シードの量の関数としてプロットされた 50% 凝集に達するまでの時間を示すグラフである。

【0108】

実施例 14 : α S - P M C A は P D 患者の脳脊髄液中のオリゴマー α S を検出する

対照およびPD患者から得られたヒトCSF試料中のシーディング活性の検出を、PD - PMCAによって実施した。PBS (pH 7.4) 中の精製されたシード不含アルファ - シヌクレイン (100 μg/mL) を、確認されたPD、ADまたは非神経変性神経病 (NND) を有するヒト患者から得られたCSFの存在下、500 rpmで振とうしながら37℃で凝集させた。凝集の度合いを、プレート分光蛍光計を用いて435 nmで励起した後、485 nmのチオフラビン蛍光によってモニタリングした。

【0109】

CSFのアリコットを、PD患者、非変性神経疾患 (NND) に罹患した認知的に正常な個体、およびアルツハイマー病 (AD) に罹患した患者から得た。テストCSF試料を、DSM - IVによる定義と、様々なテスト、例えば日常的医学検査、神経学的評価、神経心理学的評価、および磁気共鳴画像などを利用した測定と、によりおそらくPDであると診断された患者から得た。CSF試料は、一夜絶食後に非外傷性針によるL4/L5間またはL3/L4間の腰部穿刺によってポリプロピレン試験管に採取した。試料を4および3,000 gで3分間遠心分離し、分取して、分析まで-80℃で貯蔵した。CSF細胞カウント、グルコースおよびタンパク質濃度を測定した。アルブミンを、レートネフエロメトリーによって測定した。血液脳関門の統合性および髄腔内IgG産生を評価するために、アルブミン比率 (CSF アルブミン / 血清アルブミン) × 10³ およびIgG指数 (CSF アルブミン / 血清アルブミン) (CSF IgG / 血清IgG) を計算した。この試験は、Helsinki Declarationの条項にしたがって実施され、Ethics Committeeにより認可された。

10

20

【0110】

実験と分析の開始部分は、盲検で実施した。図14は、PD、ADおよびNND群から得られた代表的試料のαS凝集の平均反応速度を示すThT蛍光標識の関数として測定されたαSオリゴマー化対時間のグラフである。

【0111】

結果から、PD患者からのCSFが対照CSFに比較してαS凝集を有意に促進することが示される (P < 0.001)。ヒトCSF試料の存在下でのαS凝集反応速度における差の有意性は、一元配置分散分析と、それに続くテューキー多重比較事後検定によって解析した。有意水準は、P < 0.05に設定した。PDと他の2群の試料との差は、P < 0.001 (***) で高い有意性があった。

30

【0112】

実施例15：免疫捕捉の特異度

図15は、αSオリゴマーを捕捉する異なる配列またはコンフォメーション抗体の能力を実証する表3を示す。オリゴマーを捕捉する能力は、健常ヒト血漿に合成αSオリゴマーを添加し、αS - PMCAで検出することによって測定される。最初の欄は、テストされた様々な抗体および対応する商業的供給元を示す。二番目の欄は、この試験で用いられた種々の配列の抗体のαSタンパク質上のエピトープ認識部位の列挙である。三番目の欄は、αSオリゴマーを捕捉するための特異的抗体の観察された能力を示す。記号は、異なる抗体を用いた検出限界が < 12 fmol (+ + +) ; 10 ~ 100 fmol (+ +) ; > 1 pmol (+) 、および捕捉試薬なし (-) よりも有意に高くない、を示している。アルファ/ベータ - シヌクレイン抗体N - 19 (N - 末端エピトープ) およびアルファ - シヌクレイン抗体C - 20 - R (C末端エピトープ) は最良の結果を示し、アルファ - シヌクレイン抗体211 (エピトープ：アミノ酸121 ~ 125) は、非常に良好な結果を示し、アルファ - シヌクレイン抗体204 (エピトープ：断片1 ~ 130) は、良好な結果を示し、16ADVマウスIgG1 (コンフォメーションエピトープ) は、結果を示さなかった。

40

【0113】

実施例16：固相免疫捕捉

図16Aおよび16Bは、血漿などの複合試料から可溶性ミスフォールディングαSタンパク質を捕捉するために用いられる2つの固相法の略図である。方策1は、ELISA

50

プレート上の固相に結合された特異的抗体でプレコーティングされたE L I S A プレートを用いた。プレートを洗浄した後、 α S - P M C A 反応を、同じプレートで実施した。方策2は、特異的抗体でコーティングされた固相として磁気ビーズを用いた。このアプローチは、試料の濃度を提供した。

【0114】

実施例17：ヒト血漿に添加された α -シヌクレインオリゴマーの検出のための α S - P M C A

ヒト血漿からの α -シヌクレインオリゴマーの免疫沈降を、抗 α -シヌクレイン抗体でコーティングされたビーズ(Dynabeads)、および検出のためにチオフラビン-Tと共にシーディング基質として α -シヌクレインモノマーを用いるシーディング凝集アッセイによって実施した。抗 α -シヌクレイン抗体でコーティングされたビーズ(1×10^7 個)を、 α -シヌクレインシード(+0.2 μ gシード)を含み、または α -シヌクレインシードを含まずに(-シード)、ヒト血漿(500 μ L)と共にインキュベートした。免疫沈降後に、ビーズを反応緩衝液20 μ Lに再懸濁させて($1 \times$ PBS)、ビーズ10 μ Lを96ウェルプレートの各ウェルに添加した。凝集アッセイを、 α -シヌクレインモノマー(200 μ g/mL)およびチオフラビン-T(5 μ M)を添加することにより実施した。蛍光の増加を、435 nmでの励起および485 nmでの発光を利用した蛍光光度計によってモニタリングした。図17Aは、シードを含む、または含まない、血漿中のN-19抗体による免疫沈降/凝集結果を示す。図17Bは、シードを含む、または含まない、血漿中の211抗体による免疫沈降/凝集結果を示す。図17Cは、シードを含む、または含まない、血漿中のC-20抗体による免疫沈降/凝集結果を示す。

10

20

【0115】

実施例18： α S - P M C A はPDおよび多系統萎縮症に罹患した患者の脳脊髄液中のオリゴマー α Sを高い感度および特異度で検出する

PDおよび関連の α -シヌクレイン病、例えば多系統萎縮症(MSA)の生化学的診断のための α S - P M C Aの効率を試験するために、テストを、これらの疾患に罹患した多くの患者および他の疾患に罹患した対照からのCSFで実施した。図18A、18B、および18Cは、 α S - P M C Aを用いた、それぞれ対照、ならびにPDおよびMSAに罹患した患者のヒトCSF試料中のシーディング活性の検出を示している。緩衝液MES(pH 6.0)中の精製されたシード不含アルファ-シヌクレイン(100 μ g/mL)を、ヒト患者および対照からのCSFの存在下、500 rpmで振とうしながら37 で凝集させた。凝集の度合いを、プレート分光蛍光計を用いて435 nmで励起した後、485 nmのチオフラビン蛍光によってモニタリングした。

30

40

【0116】

テストCSF試料を、DSM-IVによる定義と、様々なテスト、例えば日常的医学検査、神経学的評価、神経心理学的評価、および磁気共鳴画像などを利用した測定と、によりおそらくPDおよびMSAであると診断された患者から得た。CSF試料は、一夜絶食後に非外傷性針によるL4/L5間またはL3/L4間の腰部穿刺によってポリプロピレン試験管に採取した。試料を4 および3,000 gで3分間遠心分離し、分取して、分析まで-80 で貯蔵した。CSF細胞カウント、グルコースおよびタンパク質濃度を測定した。アルブミンを、レートネフェロメトリーによって測定した。この試験は、Helinski Declarationの条項にしたがって実施され、Ethics Committeeにより認可された。

【0117】

実験と分析の開始部分は、盲検で実施した。図18A、18Bおよび18Cは、それぞれ対照と、PDおよびMSA群から得られた2つの代表的試料と、の α S凝集の平均反応速度を示すThT蛍光標識の関数として測定された α S凝集対時間のグラフである。

【0118】

結果から、PD患者からのCSFが対照CSFに比較して α S凝集を有意に促進することが示される($P < 0.001$)。ヒトCSF試料の存在下での α S凝集反応速度におけ

50

る差の有意性は、一元配置分散分析と、それに続くチューキー多重比較事後検定によって解析した。有意水準は、 $P < 0.05$ に設定した。 PD と他の 2 群の試料との差は、 $P < 0.001$ (***) で高い有意性があった。

【0119】

29 の PD または MSA 試料と、41 の対照との全組の結果は、29 の PD または MSA 試料のうち 26 が陽性であったが、41 の対照試料では 3 つが陽性であり、90 % 感度および 93 % 特異度に対応した。

【0120】

用語「包含する」または「包含している」が、本明細書または特許請求の範囲で用いられる限りにおいて、それは、過渡的言語として用いられる場合に解釈される用語「含んでいる」と類似の手法で包括的とする。さらに用語「または」が用いられる限りにおいて（例えば、 A または B ）、それは、「 A もしくは B またはその両方」を意味するものとする。本出願者らが、「 A または B のみであって両方ではないこと」を示す場合、用語「 A または B であり両方でない」が用いられよう。したがって本明細書における用語「または」の使用は、包括的使用であり、排他的使用ではない。Bryan A. Garner, A Dictionary of Modern Legal Usage 624 (2d. Ed. 1995) を参照されたい。同じく、用語「の中の」または「の中へ」が本明細書または特許請求の範囲で用いられる限りにおいて、それは、追加的に「の上で」または「の上へ」を意味する。用語「選択的に」が本明細書または特許請求の範囲で用いられる限りにおいて、それは、装置のユーザが装置使用において必要となるまたは望む構成要素の特色または機能を活性化または脱活性化し得るような構成要素の条件を指す。用語「動作可能に連結された」が本明細書または特許請求の範囲で用いられる限りにおいて、それは、識別された構成要素が指定された機能を実施する方法で連結されていることを意味するものとする。用語「実質的に」が本明細書または特許請求の範囲で用いられる限りにおいて、それは、識別された構成要素が対象となる業界で許容され得る誤差の度合いで示される関係または性能を有することを意味するものとする。

【0121】

本明細書および特許請求の範囲で用いられる単数形「 a 」、「 an 」および「 the 」は、その単数形が明記しない限りは複数を含むものとする。例えば「 a compound (化合物)」は、2 つ以上の化合物の混合物および単一化合物を含み得る。

【0122】

本明細書で数値と共に用いられる用語「約」は、その通史の $\pm 10\%$ を含むものとする。言い換えれば「約 10」は、9 ~ 11 を意味し得る。

【0123】

本明細書で用いられる用語「場合による」および「場合により」は、次に記載される状況が、起こる場合、または起こらない場合があり、そのためその記載は、その状況が起こる例と、起こらない例を含む。

【0124】

加えて、本開示の特色または態様が、マーカッシュ群に関して記載されている場合、本開示がそれによってマーカッシュ群の任意の各構成要素または構成要素の下位群に関して記載されることは、当業者に認識されるであろう。当業者に理解される通り、記載された説明を提供することに関してなど、あらゆる目的で、本明細書に開示された全ての範囲も、あらゆる可能な下位範囲およびその下位範囲の組み合わせを包含する。任意の列挙された範囲は、同じ範囲を十分に記載し、少なくとも均等な半量、三分の一、四分之、五分之に分割することができるものと容易に認識することができる。非限定的例として、本明細書で議論された各範囲は、下部三分の一、中部三分の一および上部三分の一などに即座に分割され得る。同じく当業者に理解される通り、「まで」、「少なくとも」、「を超える」、「未満」などの全ての言語が、列挙された数値を含み、先に議論された通り次に下位範囲に分割され得る範囲を指す。最後に、当業者に理解されるであろうが、範囲は個々の構成要素を含む。例えば 1 ~ 3 個のセルを有する群は、1、2、または 3 個のセル

を有する群を指す。同様に 1 ～ 5 個のセルを有する群は、1、2、3、4、または 5 個のセルを有する群を指す、などとなる。様々な態様および実施形態が、本明細書に開示されたが、他の態様および実施形態が、当業者に自明となろう。

【 0 1 2 5 】

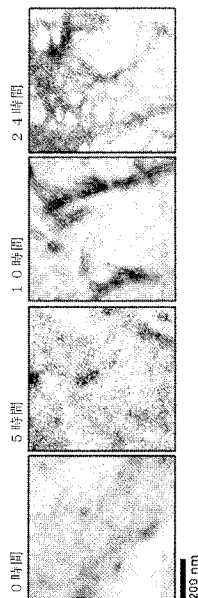
先に述べられた通り、本出願は、その実施形態の記述によって例示されており、その実施形態は、かなり詳細に記載されたが、添付の特許請求の範囲をそのような詳細に制限または限定することが本出願者の意図ではない。本出願の利益を有するさらなる利点および改良が、当業者に即座に明らかとなろう。それゆえ本出願は、より広範囲の態様において、特定の詳細、示された例示的实施例、または参照された任意の装置に限定されない。本発明の一般的概念の主旨および範囲を逸脱することなく、そのような詳細、実施例、および装置から逸脱することができる。

10

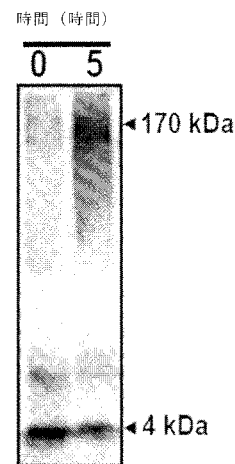
【 0 1 2 6 】

本明細書に開示された様々な態様および実施形態は、例示を目的としており、限定ではなく、真の範囲および主旨は、以下の特許請求の範囲に示されている。

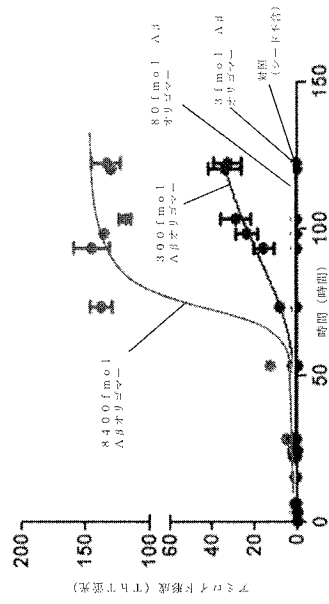
【 図 1 A 】



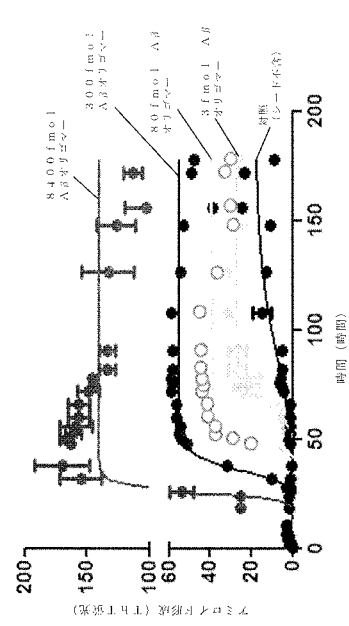
【 図 1 B 】



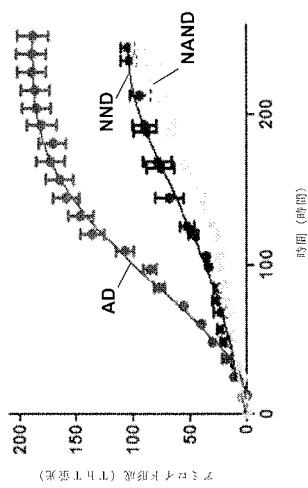
【図 2 A】



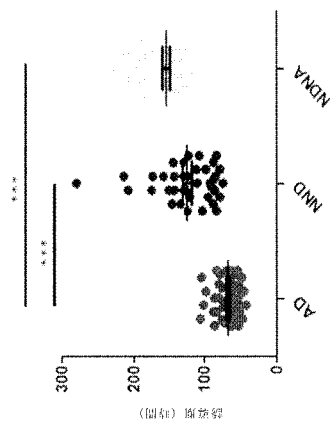
【図 2 B】



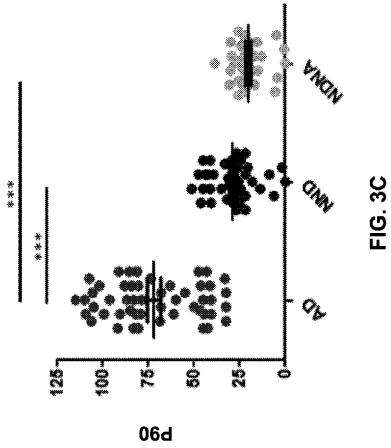
【図 3 A】



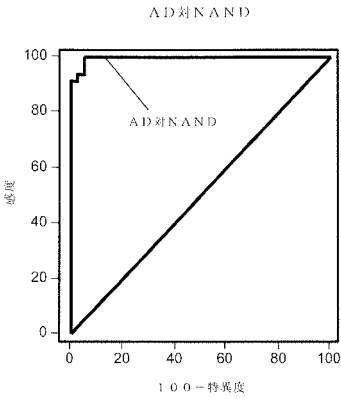
【図 3 B】



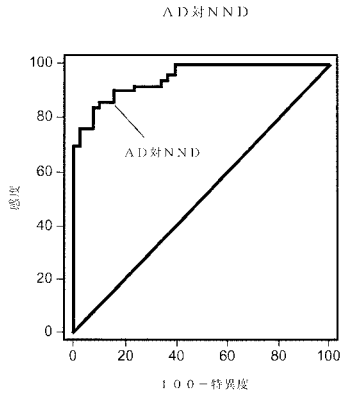
【図3C】



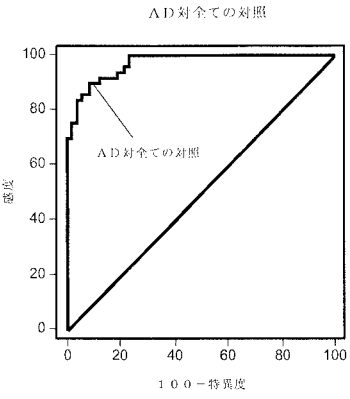
【図4A】



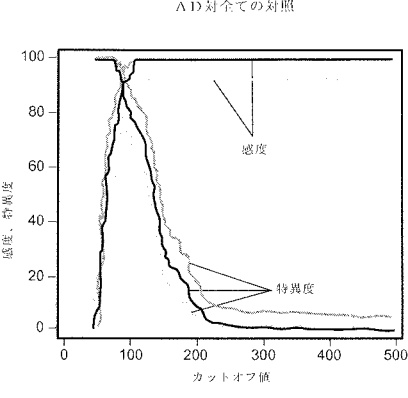
【図4B】



【図4C】



【図4D】

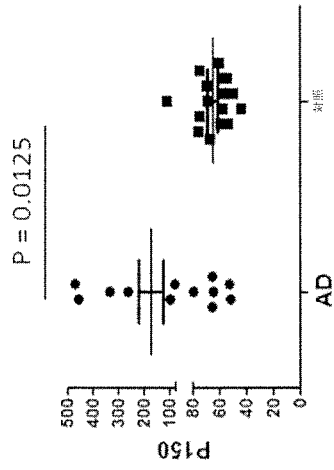


【図5】

群	感度 ²	感度 ³	陽性予測値 ²	陰性予測値 ²
AD対N+ND	100.0%	94.6%	96.2%	100.0%
AD対NND	90.0%	84.2%	88.2%	86.5%
AD対対照 ³	90.0%	92.0%	88.2%	93.2%

1. 感度、特異度は、各群の測定値の範囲内において、図9Bに示された感度曲線を用いた。カットオフは、MedCalcソフトウェアを用いた。
2. 陽性予測値、陰性予測値は、各群の測定値の範囲内において、図9Bに示された感度曲線を用いた。
3. 対照は、NND+N+NDからの説明を指す。

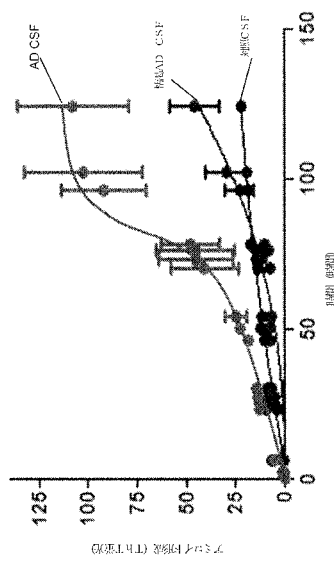
【図 6】



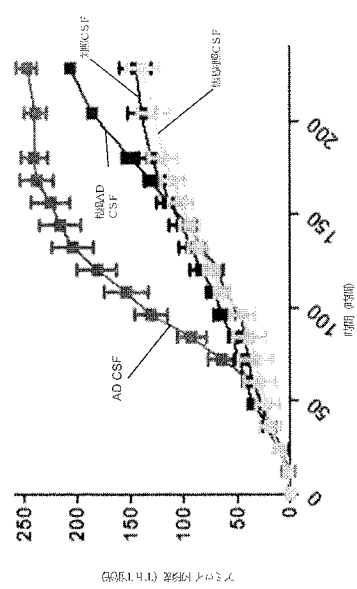
【図 7 A】



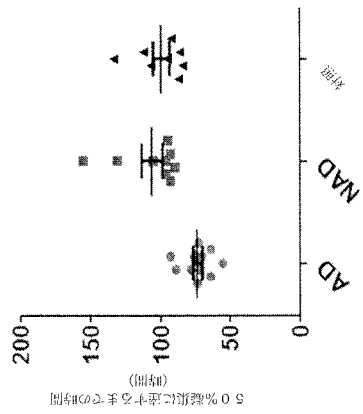
【図 7 B】



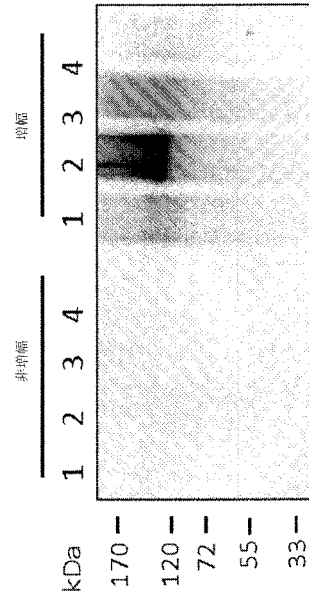
【図 7 C】



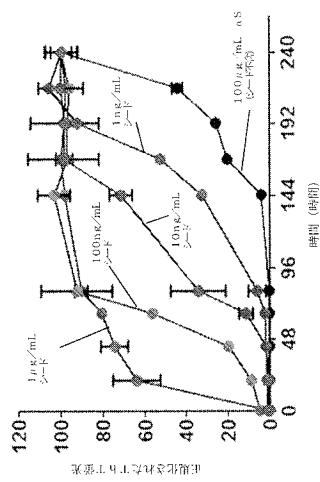
【図 1 1】



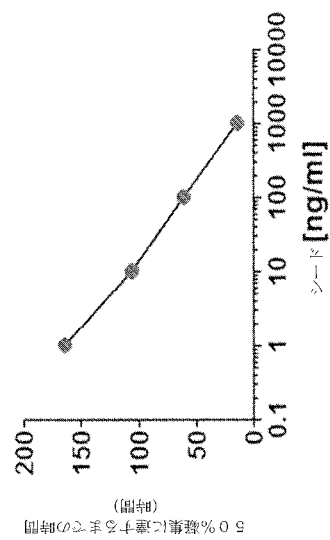
【図 1 2】



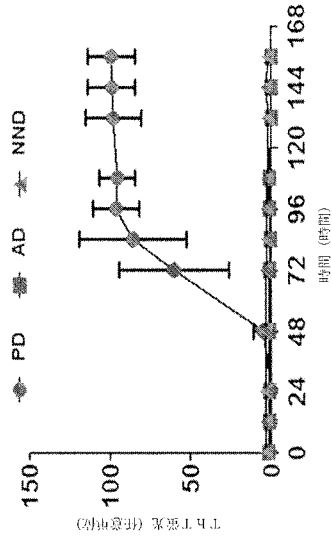
【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



【 図 1 4 】



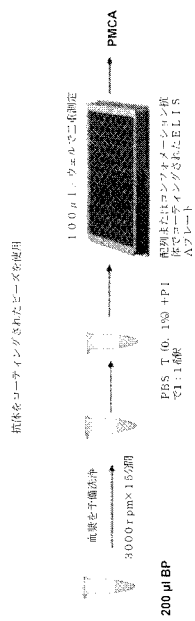
【 図 1 5 】

43

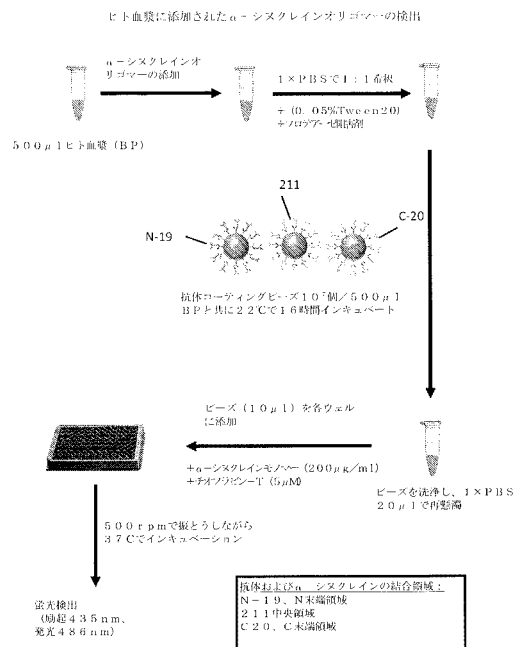
抗体 (会社)	エпитオープ	アルファ-シスグレイン オリゴマー捕捉能力
アルファ/ベータ シスグレイン抗体 N-19 (Santa Cruz Biotechnology)	N 末端	+++
アルファ-シスグレイン抗体 C-20-R (Santa Cruz Biotechnology)	C 末端	+++
アルファ-シスグレイン抗体 211 (Santa Cruz Biotechnology)	アミノ酸 121 ~ 125	++
アルファ-シスグレイン抗体 Syn-204 (Santa Cruz Biotechnology)	断片 1 ~ 130	+
16Aβ マウス IgG1 (Acumen)	コンフォメーション	-

+++	最良
++	非常に良好
+	良好
-	結果なし

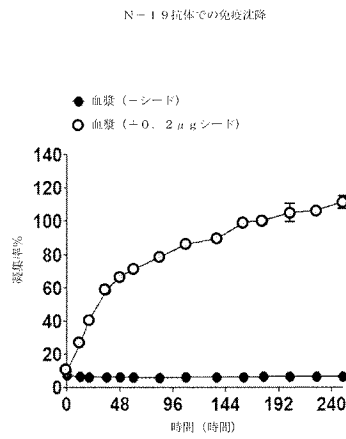
【 図 1 6 A 】



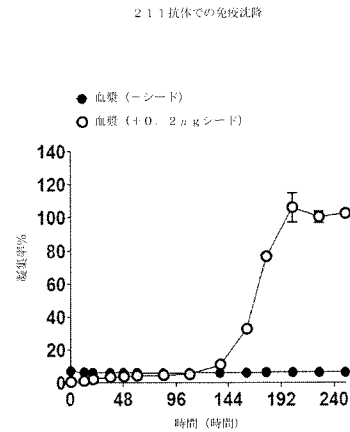
【 図 1 6 B 】



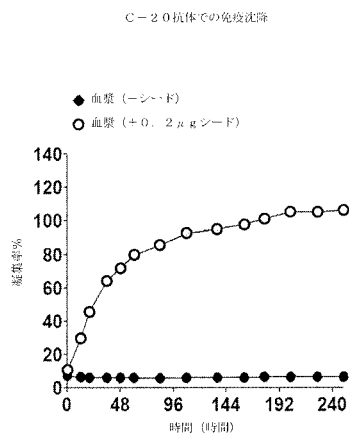
【図 17 A】



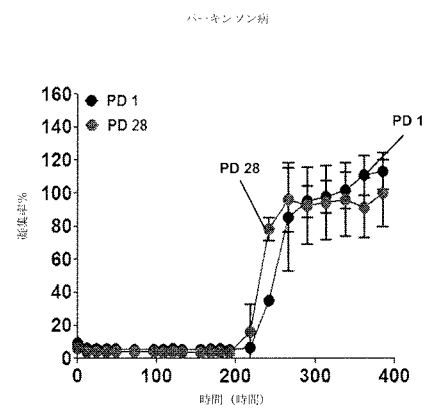
【図 17 B】



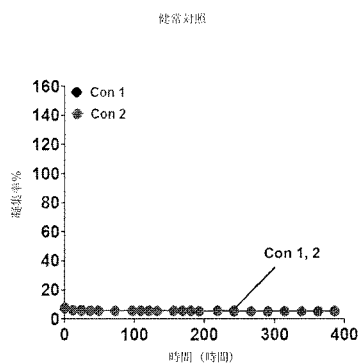
【図 17 C】



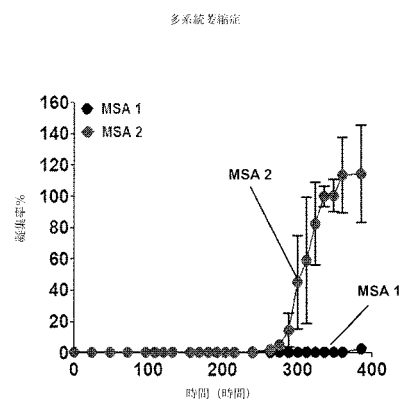
【図 18 B】



【図 18 A】



【図 18 C】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/49844

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12Q 1/00, G01N 33/00, A61K 38/00 (2015.01)

CPC - G01N 33/564, G01N 33/6839, G01N 2800/2828

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)

IPC(8): C12Q 1/00, G01N 33/00, A61K 38/00 (2015.01)

CPC: G01N 33/564, G01N 33/6839, G01N 2800/2828

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 435/4, 435/7.92, 436/86

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatBase, Google Patents, Google Scholar, Google Web, search terms: misfolded protein, soluble misfolded protein, incubation cycle, misfolded aggregate, disrupt, amplify, indicator, detect, fluorescence, Thioflavin T, Congo Red, m-I-Stilbene, sensitivity, molar ratio, temperature, pH, ELISA, sedimentation assay, electron microscopy, atomic force mic

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HERVA et al. 'Anti-amyloid Compounds Inhibit alpha-Synuclein Aggregation Induced by Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA)'. J Biol Chem (25 April 2014) vol 289, no 17, pp 11897-11905, pg 11898, col 1, para 2-4, col 2, para 1, pg 11899, col 2, para 1, pg 11900, col 1, para 1, Figs. 1, 2	1-127
Y	US 2008/0118938 A1 to ESTRADA et al. 22 May 2008 (22.05.2008) para [0007]-[0009], [0026], [0029]-[0031], [0040]-[0042], [0044], [0045], [0058], [0060]-[0062], [0071], [0080], [0141], [0154], [0155]	1-127

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* 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

26 January 2016

Date of mailing of the international search report

05 FEB 2016

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/49844

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

***** See Supplemental Sheet to continue *****

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-127

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/49844

Continuation of Box No. III, Observations where unity of invention is lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-127, directed to a method for determining a presence of a soluble, misfolded protein in a sample.

Group II: Claims 128-173, directed to a kit for determining a presence of a soluble, misfolded protein in a sample.

The inventions listed Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I includes the special technical feature of a method step of contacting the sample with a monomeric, folded protein, not required by Group II.

Group II includes the special technical feature of a kit comprising known amount of a monomeric, folded protein and a known amount of an indicator of misfolded protein, and instructions, not required by Group I.

Common Technical Features

Groups I and II are related to each other as a composition (Group II) and a method of using the composition (Group I) and share the technical feature of determining a presence of a soluble, misfolded protein in a sample. However, this shared technical feature do not represent a contribution over prior art in view of the article entitled "Anti-amyloid Compounds Inhibit alpha-Synuclein Aggregation Induced by Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA)" by HERVA et al. (hereinafter 'Herva') and US 2008/0118938 A1 to ESTRADA et al. (hereinafter 'Estrada').

Herva teaches contacting the sample comprising soluble, misfolded protein [e.g. alpha-synuclein, alphaS] (pg 11898, col 1, para 3, PMCA, Seeded reactions ... were done by diluting 1:100 of 90 uM alpha-synuclein fibrils, previously generated by PMCA, into fresh soluble alpha-synuclein recombinant substrate) with a monomeric, folded protein corresponding to the soluble, misfolded protein to form an incubation mixture (pg 11898, col 1, para 3, PMCA, recombinant wild-type full-length human alpha-synuclein ... was prepared as indicated (13) and diluted to a final 90 uM concentration in conversion buffer); conducting an incubation cycle two or more times effective to form an amplified portion of misfolded protein (fibrils), each incubation cycle comprising incubating the incubation mixture effective to cause misfolding and/or aggregation of at least a portion of the monomeric, folded protein in the presence of the soluble, misfolded protein [and] physically disrupting the incubation mixture effective to break up at least a portion of any protein aggregate present (pg 11898, col 1, para 3, PMCA, samples were subjected to cycles of 20-s sonication and 30-min incubation at 37 degree C; pg 11899, col 1, para 2, The PMCA technique combines cycles of incubation at 37 degree C (to grow fibrils) and sonication (to break fibrils into smaller growing fractions) of samples containing Triton X-100 for solubility, avoiding precipitation of the aggregates.) and determining the presence of the amplified portion of the soluble, misfolded aggregate, and/or insoluble, misfolded aggregate, (pg 11900, col 1, para 1, the kinetics of fibril formation of 30 and 90 uM (Fig. 1, C and D) recombinant alpha-synuclein substrates in the absence or presence of 0.9 uM alpha-synuclein fibrils in a 24-h PMCA or in a regular incubation reaction. When recombinant alpha-synuclein fibrils were added ... PMCA fibrils formed as fast as 2 h, with the maximum level reached between 4 and 8 h (Fig. 1, C and D); pg 11900, col 1, para 2, Circular dichroism (CD) was performed to compare the product of PMCA alpha-synuclein and non-PMCA control samples (Fig. 2A). Comparison of the spectra showed an increase in beta-sheet content in alpha-synuclein PMCA samples compared with the non-PMCA-treated alpha-synuclein that remained mainly unfolded ... Both Coomassie Blue staining and immunoblotting with specific alpha-synuclein antibodies showed that only after PMCA were large aggregates of alpha-synuclein present; provided that the monomeric, folded protein and the soluble, misfolded protein exclude prion protein (PrP) and isoforms thereof (alpha-synuclein is commonly known in the art to be a distinct protein encoded by a gene different than the PrP prion protein).

Herva does not specifically teach determining a presence of a soluble, misfolded protein [e.g. alphaS] in a sample by detecting at least a portion of the soluble, misfolded protein comprising a soluble, misfolded monomer and a soluble, misfolded aggregate, however, Estrada teaches that PMCA technology can be used for diagnosis and/or identification of a misfolded protein in a subject, including alpha-synuclein (para [0009] "methods and compositions for diagnosis and/or identification of a misfolded protein ... PMCA is a cyclical process ... and consists on cycles composed of two phases. During the first phase the sample containing minute amounts of misfolded oligomers and a large excess of soluble monomeric protein are incubated to induce growth or amplification of misfolded proteins", para [0030] "the detected misfolded protein could comprise abnormally folded proteins or protein fragments. For example the misfolded protein may be a wild type, variant, or mutant of ... alpha-synuclein"). Herva further teaches detecting soluble misfolded protein (para [0042] "detection of amplified misfolded protein in a reaction mix or serially amplified reaction mix may be via a variety of methods ... the misfolded protein may be detected by a sedimentation assay, using centrifugation to separate aggregated from soluble protein." Said non-sedimenting soluble misfolded protein would comprise the claimed soluble misfolded monomer and soluble misfolded (small, slowly sedimenting) aggregate.). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art to have applied the PMCA method of alpha-synuclein, as taught by Herva, to determine a presence of a soluble, misfolded alphaS protein in a sample, as taught by Estrada, because Estrada teaches that PMCA method can be used as a sensitive mean for diagnosing disorders with misfolded protein in a subject (para [0009] "the method can be used to diagnose or detect misfolded protein associated with ... diseases associated with protein aggregates or aggregation. ... The methods typically use the functional property of misfolded oligomers to serve as seeds to catalyze the polymerization of monomeric protein (i.e., a substrate protein) as a way to measure their presence in biological fluids").

As said technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
C 0 7 K 14/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/00	
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	
C 0 7 K 17/02 (2006.01)	C 0 7 K 17/02	

(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, KR, 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

- (71) 出願人 517085321
 ジャラ, クラウドディオ ソートー
 アメリカ合衆国, テキサス州 77546, フレンズウッド, 2403 パイン ドライブ
- (71) 出願人 517085332
 シャーナワーズ, モハンマド
 アメリカ合衆国, テキサス州 77054, ヒューストン, アpartment 2165, 8450
 ケンブリッジ ストリート
- (71) 出願人 517085343
 レボピッツ, ラッセル エム.
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94607, オークランド, シャープ1304, 222 ブ
 ロードウェイ
- (71) 出願人 517085354
 ボールラス, ベネディクト ケー.
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92107, サン ディエゴ, 4704 ナイアガラ アベ
 ニュー
- (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一
- (74) 代理人 100121511
 弁理士 小田 直
- (74) 代理人 100202751
 弁理士 岩堀 明代
- (74) 代理人 100191086
 弁理士 高橋 香元
- (72) 発明者 ジャラ, クラウドディオ ソートー
 アメリカ合衆国, テキサス州 77546, フレンズウッド, 2403 パイン ドライブ
- (72) 発明者 シャーナワーズ, モハンマド
 アメリカ合衆国, テキサス州 77054, ヒューストン, アpartment 2165, 8450
 ケンブリッジ ストリート
- (72) 発明者 レボピッツ, ラッセル エム.
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94607, オークランド, シャープ1304, 222 ブ
 ロードウェイ

(72)発明者 ボールラス, ベネディクト ケー.
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92107, サン ディエゴ, 4704 ナイアガラ アベ
ニュー

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA26 DA36 FA14 FA16 FB03
4C084 AA17 NA14 ZA011 ZA151 ZA161 ZA941 ZC351 ZC781
4H045 AA11 AA30 CA40 DA76 EA50

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017530373A5	公开(公告)日	2018-10-25
申请号	JP2017533721	申请日	2015-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	得克萨斯大学系统校董局		
申请(专利权)人(译)	得克萨斯大学系统校董局		
[标]发明人	ジャラクラウドイオソート シャーナワーズモハンマド レボビッツラッセルエム ボールラスベネディクトケー		
发明人	ジャラ,クラウドイオ ソート シャーナワーズ,モハンマド レボビッツ,ラッセル エム. ボールラス,ベネディクト ケー.		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 A61K45/00 A61P25/28 A61P25/16 A61P25/14 A61P3/10 A61P21/02 A61P25/00 C07K14/00 C07K16/00 C07K17/02		
CPC分类号	A61P3/10 A61P21/02 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 G01N33/6896 G01N2800/52 G01N33/582		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D A61K45/00 A61P25/28 A61P25/16 A61P25/14 A61P3/10 A61P21/02 A61P25/00 C07K14/00 C07K16/00 C07K17/02		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/FA14 2G045/FA16 2G045/FB03 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA151 4C084/ZA161 4C084/ZA941 4C084/ZC351 4C084/ZC781 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50		
代理人(译)	Iwahori明代		
优先权	62/049306 2014-09-11 US		
其他公开文献	JP2017530373A		

摘要(译)

提供了用于扩增和检测来自患有阿尔茨海默氏病，帕金森氏病等的患者样品中错误折叠的蛋白质的方法和试剂盒。例如，确定样品中可溶性错误折叠蛋白的存在的方法可有效地使样品与单体折叠蛋白接触以形成孵育混合物；形成错误折叠蛋白的扩增部分。孵育周期超过一个；孵育孵育混合物可有效诱导至少一部分单体折叠蛋白的错误折叠和/或聚集；任何存在 物理破坏孵育混合物以有效破坏至少一部分蛋白质聚集体；并检测至少一部分可溶性错误折叠蛋白质 和通过确定样品中的可溶性错折叠蛋白的存在可以包括。单体折叠蛋白和可溶性错误折叠蛋白可以排除the病毒蛋白 (PrP) 及其同工型。[选择图]无