

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-96855

(P2015-96855A)

(43) 公開日 平成27年5月21日(2015.5.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 1 A	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A D	
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 33/547 (2006.01)	GO 1 N 33/553	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	GO 1 N 33/547	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 84 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-240068 (P2014-240068)
 (22) 出願日 平成26年11月27日 (2014.11.27)
 (62) 分割の表示 特願2013-160587 (P2013-160587) の分割
 原出願日 平成25年8月1日 (2013.8.1)
 (31) 優先権主張番号 09/602, 689
 (32) 優先日 平成12年6月23日 (2000.6.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 09/631, 818
 (32) 優先日 平成12年8月3日 (2000.8.3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501291558
 ミナーヴァ・バイオテクノロジーズ・コーポレーション
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02451, ウォルトハム, ベアー・ヒル・ロード 40
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100101373
 弁理士 竹内 茂雄
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修

最終頁に続く

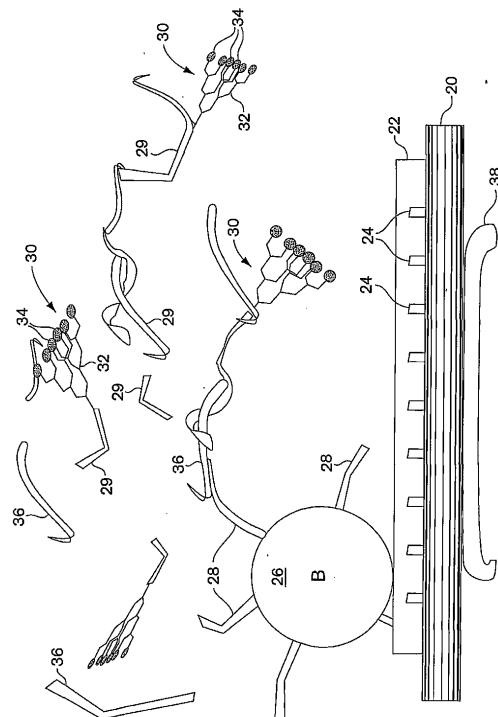
(54) 【発明の名称】 タンパク質凝集の迅速且つ高感度の検出

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 神経変性疾患に関与する種の存在について生物学的試料を迅速且つ高感度に分析できるキットを提供する。

【解決手段】 表面を有する第一のアーティクル20と、表面を有する第二のアーティクルと、そして凝集体形成種を結合できる複数の結合種28を含むキットであって、前記結合種の少なくとも一部は、前記第一のアーティクルの表面に固定されるか又は固定されるように適応され、前記結合種の少なくとも一部は、前記第二のアーティクルの表面に固定されるか又は固定されるように適応されているキット。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

表面を有する第一のアーティクルと；

表面を有する第二のアーティクルと；そして

凝集体形成種を結合できる複数の結合種とを含むキットであって、前記結合種の少なくとも一部は、前記第一のアーティクルの表面に固定されるか又は固定されるように適応され、前記結合種の少なくとも一部は、前記第二のアーティクルの表面に固定されるか又は固定されるように適応されているキット。

【請求項 2】

結合種が神経変性疾患の凝集体形成種を結合できる、請求項 1 に記載のキット。

10

【請求項 3】

凝集に影響を及ぼす候補薬をさらに含む、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 4】

神経変性疾患を抑制する候補薬をさらに含む、請求項 2 に記載のキット。

【請求項 5】

結合種がペプチドである、請求項 1 又は 2 に記載のキット。

【請求項 6】

結合種がタンパク質である、請求項 1 又は 2 に記載のキット。

20

【請求項 7】

結合種がタンパク質由来の配列である、請求項 1 又は 2 に記載のキット。

【請求項 8】

結合種が小分子である、請求項 1 又は 2 に記載のキット。

【請求項 9】

小分子が、コンゴレッド又はチオフラビン T である、請求項 8 に記載のキット。

30

【請求項 10】

結合種が、凝集体形成種又は原線維形成種に対する抗体である、請求項 1 又は 2 に記載のキット。

【請求項 11】

結合種が、神経変性疾患に関係する原線維又は凝集体を結合できる、請求項 2 に記載のキット。

【請求項 12】

結合種が、神経変性疾患に関係する原線維又は凝集体に組み込まれることが可能な、請求項 2 に記載のキット。

【請求項 13】

結合種が、複数の凝集体に結合した複数のアーティクルを包含するマクロ構造を形成できる、請求項 11 に記載のキット。

40

【請求項 14】

結合種が、神経変性疾患に関係する複数の凝集体に結合した複数のアーティクルを包含するマクロ構造を形成できる、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 15】

結合種が、生体分子の異常凝集が関与する疾患に特徴的な凝集が可能なタンパク質である、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 16】

50

結合種が、免疫グロブリン、ヘモグロビン、p53、フィブリン、インテグリン、クリオグロブリン、ヒトのランゲルハンス島アミロイドポリペプチド(hIAPP)、及び他のアミロイドタンパク質から選ばれる、請求項1に記載のキット。

【請求項17】

結合種が、 - アミロイドタンパク質、アミロイドタンパク質、アミロイド前駆体タンパク質(APP)、タウ、シヌクレイン、PrP^{CJD}、PrP^{BSE}、PrP^{scrapie}、ハンチンチン、並びにそれらのフラグメント及び融合物から選ばれる、請求項2に記載のキット。

【請求項18】

種が、 - アミロイドペプチドのアミノ酸1~40、又は1~42を包含する、請求項2に記載のキット。

【請求項19】

タンパク質、フラグメント又は融合物が、凝集体結合、凝集体形成耐性である、請求項17に記載のキット。

【請求項20】

アートの少なくとも一つが金であるか又は金被覆されている、請求項1、2、3又は4に記載のキット。

【請求項21】

自己集合単層が金表面上に形成されている、請求項20に記載のキット。

【請求項22】

自己集合単層が合成分子からなる、請求項20に記載のキット。

【請求項23】

自己集合単層が、チオール及びジチオールだけで構成され、タンパク質の単層への直接組込みを含まない、請求項22に記載のキット。

【請求項24】

チオール、ジチオール及びシステイン又は硫黄末端ペプチドが、自己集合単層に組み込まれている、請求項22に記載のキット。

【請求項25】

自己集合単層が親和性リガンドの結合パートナーを提示する、請求項22に記載のキット。

【請求項26】

表面が金属を配位できる部分を提示する、請求項24に記載のキット。

【請求項27】

表面が、表面に対して固定化された金属を配位しているキレートを保持し、結合種がポリアミノ酸標識で誘導体化されている、請求項24に記載のキット。

【請求項28】

自己集合単層が、非修飾生体分子への化学結合を容易にするためにカルボキシ末端ヘッド基を提示する、請求項22に記載のキット。

【請求項29】

生体分子上の第一級アミンが、EDC/NHSカップリング化学によってカルボキシル化表面に結合している、請求項28に記載のキット。

【請求項30】

自己集合単層が、ニトリロ三酢酸、2,2'-ビス(サリチリデンアミノ)-6,6'-デメチルジフェニル、又は1,8-ビス(a-ピ

10

20

30

40

50

リジル) - 3, 6 - ジチアオクタンを含む、請求項 22 に記載のキット。

【請求項 31】

自己集合単層が、自己集合単層形成種を含む混合自己集合単層であり、前記自己集合単層形成種のすべてではないが一部が金属を配位できる部分を含む、請求項 22 に記載のキット。

【請求項 32】

第一のアーティクルが、液に懸濁可能な、単離可能な粒子である、請求項 1、2、又は 20 ~ 30 に記載のキット。

【請求項 33】

粒子が単離可能な粒子である、請求項 32 に記載のキット

10

【請求項 34】

第一のアーティクルがコロイド粒子である、請求項 32 に記載のキット。

【請求項 35】

第一のアーティクルが金コロイド粒子である、請求項 34 に記載のキット。

【請求項 36】

第一のアーティクルが SPR チップである、請求項 1 又は 20 に記載のキット。

20

【請求項 37】

第一のアーティクルが粒子であり、キットが、結合種の少なくとも一部に固定された又は固定されるように適応された追加の粒子をさらに含む、請求項 1、2、32、又は 35 に記載のキット。

【請求項 38】

凝集に影響を及ぼす候補薬をさらに含む、請求項 37 に記載のキット。

【請求項 39】

第一のアーティクル表面に固定された又は固定されるように適応された結合種が表面に固定可能であり、固定が第一のアーティクル上のそのパートナーに結合する親和性標識によって容易になる、請求項 37 に記載のキット。

30

【請求項 40】

第一のアーティクル表面に固定された又は固定されるように適応された結合種が、金属結合標識 / 金属 / キレート連結によって表面に固定可能である、請求項 39 に記載のキット。

【請求項 41】

表面が、表面に対して固定化された金属を配位しているキレートを保持し、結合種がポリアミノ酸標識で誘導体化されている、請求項 40 に記載のキット。

40

【請求項 42】

ポリアミノ酸標識がヒスチジン標識である、請求項 41 に記載のキット。

【請求項 43】

結合種が、第一のアーティクルの表面に化学カップリング反応を通して固定されている、請求項 37 に記載のキット。

【請求項 44】

EDC 及び NHS が、結合種上の第一級アミンを第一のアーティクル表面上のカルボキシレートに連結するのに使用される、請求項 43 に記載のキット。

50

【請求項 4 5】

第一のアーティクル表面に固定された又は固定されるように適応された結合種が、相補的核酸配列対を介して表面に固定可能である、請求項 1、2、21 ~ 23 に記載のキット。

【請求項 4 6】

結合種が末端システインを持ち、それによって第一のアーティクル表面に固定されている、請求項 1、又は 2 に記載のキット。

【請求項 4 7】

結合種の少なくとも一部に固定された複数の粒子を含み、前記結合種が、表面に固定されていない補助的な凝集体形成種又は原線維形成種の不在下で、粒子/粒子曝露時の粒子凝集をある時間枠内遅らせるほど低い表面濃度で前記粒子表面に対して固定されている結果、補助的な凝集体又は原線維形成種の不在下での凝集を、補助的な凝集体又は原線維形成種の存在下での凝集と比較できる、請求項 37 に記載のキット。

10

【請求項 4 8】

比較が視覚的に測定される、請求項 47 に記載のキット。

【請求項 4 9】

比較パラメータが溶液の色の目に見える変化である、請求項 48 に記載のキット。

【請求項 50】

結合種が、神経変性疾患の凝集体形成種又は原線維形成種でない、請求項 2 に記載のキット。

20

【請求項 5 1】

結合種が、神経変性疾患の凝集体形成種又は原線維形成種であるが、他の結合種を神経変性疾患の凝集体形成種又は原線維形成種に変換できない、請求項 2 に記載のキット。

【請求項 5 2】

結合種が、神経変性疾患の凝集体形成種又は原線維形成種によって凝集体形成種又は原線維形成種に変換される、請求項 2 に記載のキット。

30

【請求項 5 3】

凝集体形成種に変換された結合種が、他の結合種を凝集体形成種又は原線維形成種に変換できる、請求項 52 に記載のキット。

【請求項 5 4】

凝集反応を増幅するために、追加として、神経変性疾患の凝集体形成種又は原線維形成種によって凝集体形成種に変換されることが可能な種をさらに含む、請求項 2 に記載のキット。

【請求項 5 5】

結合種が、金属を配位できる部分にその N - 末端で固定されているペプチドである、請求項 11 又は 12 に記載の組成物。

40

【請求項 5 6】

結合種が、EDC / NHS 化学、核酸配列、又は親和性標識相互作用により、少なくとも 1 個のカルボキシレート基を介して第一のアーティクル表面に固定されている又は固定されるように適応されている、請求項 1、2、3、4、及び 37 に記載のキット。

【請求項 5 7】

液に懸濁可能な、単離可能な粒子が、どの次元の断面も 500 nm を超えない、請求項 32 に記載のアーティクル。

【請求項 5 8】

液に懸濁可能な、単離可能な粒子が、どの次元の断面も 1

50

00 nmを超えない、請求項32に記載のキット。

【請求項59】

自己集合単層が、結合種の固定を容易にする部分を提示する混合単層であり、シグナリング実体をさらに含む、請求項35に記載のアーティクル。

【請求項60】

コロイド自体がシグナリング実体である、請求項59に記載のアーティクル。

【請求項61】

複数の補助的シグナリング実体を含む、請求項59に記載のアーティクル。

10

【請求項62】

コロイド粒子に共有結合的に固定された複数の補助的シグナリング実体を含む、請求項59に記載のアーティクル。

【請求項63】

シグナリング実体が、チオールに共有結合的に付着し、自己集合単層に組み込まれている、請求項59に記載のアーティクル。

【請求項64】

シグナリング実体が電気活性種である、請求項63に記載のアーティクル。

20

【請求項65】

シグナリング実体がメタロセンである、請求項64に記載のアーティクル。

【請求項66】

シグナリング実体がフェロセン又はフェロセン誘導体である、請求項65に記載のアーティクル。

【請求項67】

粒子が複数の固定電気活性種を保持している、請求項32に記載のアーティクル。

【請求項68】

補助的シグナリング実体が、染料、顔料、電気活性分子、蛍光部分、アップレギュレーティングリン光体、又は西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼを含む酵素固定シグナリング部分を含む、請求項59に記載のアーティクル。

30

【請求項69】

第一のアーティクルが磁氣的に懸濁可能な粒子である、請求項1に記載のキット。

【請求項70】

粒子が金被覆磁気粒子である、請求項33に記載のキット。

40

【請求項71】

結合種が、第一のアーティクル表面に特異的に固定されている又は特異的に固定されるように適応されている、請求項1に記載のキット。

【請求項72】

凝集体形成種を結合でき、親和性標識に固定されている結合種を含む組成物。

【請求項73】

結合種が、疾患に関係する凝集体形成種を結合できる、請求項72に記載の組成物。

【請求項74】

50

結合種が、神経変性疾患に関係する凝集体形成種を結合できる、請求項 7 2 に記載の組成物。

【請求項 7 5】

結合種がペプチドである、請求項 7 2 に記載の組成物。

【請求項 7 6】

結合種がタンパク質である、請求項 7 2 に記載の組成物。

【請求項 7 7】

結合種がタンパク質由来の配列である、請求項 7 2 に記載の組成物。

【請求項 7 8】

結合種が小分子である、請求項 7 2 に記載の組成物。

【請求項 7 9】

結合種が凝集体形成種又は原線維形成種に対する抗体である、請求項 7 2 に記載の組成物。

【請求項 8 0】

結合種が凝集体を結合できる、請求項 7 2 に記載のキット。

【請求項 8 1】

結合種が、疾患に関係する凝集体を結合できる、請求項 7 2 に記載のキット。

【請求項 8 2】

結合種が、神経変性疾患に関係する凝集体を結合できる、請求項 7 2 に記載のキット。

【請求項 8 3】

結合種が、複数の凝集体に結合した複数のアーティクルを包含するマクロ構造を形成できる、請求項 8 0 に記載のキット。

【請求項 8 4】

結合種が、疾患に関係する複数の凝集体に結合した複数のアーティクルを包含するマクロ構造を形成できる、請求項 8 0 に記載のキット。

【請求項 8 5】

結合種が、神経変性凝集関連疾患に特徴的な凝集が可能なタンパク質である、請求項 7 2 に記載のキット。

【請求項 8 6】

結合種が、凝集関連疾患に特徴的な凝集が可能なタンパク質である、請求項 7 2 に記載のキット。

【請求項 8 7】

結合種が、神経変性疾患に特徴的な凝集が可能なタンパク質である、請求項 7 2 に記載のキット。

【請求項 8 8】

結合種が、A P P、 α -アミロイドタンパク質、アミロイドタンパク質、タウ、シヌクレイン、Pr P^{CJD}、Pr P^{BSE}、Pr P^{scrapie}、ハンチンチン、並びにそれらのフラグメント及び融合物から選ばれる、請求項 7 2 に記載のキット。

【請求項 8 9】

タンパク質、フラグメント又は融合物が、凝集体結合性、凝集体形成耐性である、請求項 8 8 に記載のキット。

【請求項 9 0】

結合種の少なくとも一部に固定された又は固定されるように適応された粒子をさらに含む、請求項 7 2 に記載の組成物。

【請求項 9 1】

10

20

30

40

50

親和性標識が金属結合標識である、請求項 7 2 に記載の組成物。

【請求項 9 2】

前記部分がポリアミノ酸標識である、請求項 7 2 に記載の組成物。

【請求項 9 3】

ポリアミノ酸標識がヒスチジン標識である、請求項 7 2 に記載の組成物。

【請求項 9 4】

凝集体形成種を含有する試料中で凝集体を形成させ；そして、

表面と、凝集体又は凝集体形成種を結合できる複数の結合種とを有するアーティクルに前記凝集体を曝露することを含む方法であって、前記結合種は前記アーティクル表面に対して固定されている又は固定されるように適応されている方法。

【請求項 9 5】

凝集体を、凝集に影響を及ぼす候補薬の存在下で、アーティクルに曝露することをさらに含む、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

方法が液媒体中で実施される、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 7】

溶液が洗浄剤又は界面活性剤を含有しない、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

結合種、アーティクル、又は凝集体形成種と一緒に結合するのに毛細管流動力を必要としない、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 9】

表面が液媒体を吸収しない、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

結合種がペプチドである、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

結合種がタンパク質である、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

結合種がタンパク質由来の配列である、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

結合種が小分子である、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

アーティクルが、液に懸濁可能な、単離可能な粒子である、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

アーティクルがコロイド粒子である、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

アーティクルが金コロイド粒子であり、その表面が結合種が固定されている SAM である、請求項 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

アーティクルが粒子であり、方法が、凝集体を、結合種の少なくとも一部に対して固定された又は固定されるように適応された追加の粒子に曝露することを含む、請求項 9 4 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 108】

結合種が、金属結合標識 / 金属 / キレート連結を介して
 アーティクル表面に固定されている又は固定されるように適応されている、請求
 項 94 に記載の方法。

【請求項 109】

アッセイが、複数の個々に空間的にアドレス可能な領域
 で実施される、請求項 94 に記載の方法。

【請求項 110】

個々に空間的にアドレス可能な領域が多穴滴板の異なる
 ウェルを含む、請求項 94 に記載の方法。

10

【請求項 111】

表面を有するアーティクルと；そして
 凝集体形成種を結合できる複数の結合種とを含むキットであって、
 前記結合種の少なくとも一部は、前記表面に対して固定されている又は固定さ
 れるように適応されており、前記表面は、凝集体形成種の特異的結合を実質的
 に阻害する化学官能性を有しているキット。

【請求項 112】

化学官能性がトリエチレングリコール末端チオールであ
 る、請求項 111 に記載のキット。

【請求項 113】

表面が、タンパク質遮断ステップの不在下で、非特異的
 結合を実質的に阻害する化学官能性を有する、請求項 111 に記載のキット。

20

【請求項 114】

凝集体形成種が神経変性疾患に伴う、請求項 111 に記
 載のキット。

【請求項 115】

アーティクルが、液に懸濁可能な、単離可能な粒子であ
 る、請求項 111 に記載のキット。

【請求項 116】

アーティクルがコロイド粒子である、請求項 111 に記
 載のキット。

30

【請求項 117】

アーティクルが粒子であり、結合種の少なくとも一部に
 対して固定された又は固定されるように適応された追加の粒子をさらに含む、請
 求項 111 に記載のキット。

【請求項 118】

結合種が、金属結合標識 / 金属 / キレート連結を介して
 表面に固定されている又は固定されるように適応されている、請求項 115 に記
 載のキット。

【請求項 119】

表面が自己集合単層を保持している、請求項 111 に記
 載のキット。

40

【請求項 120】

自己集合単層が、コロイド / コロイド自己凝集を阻害す
 る種を含む、請求項 119 に記載のキット。

【請求項 121】

自己集合単層が荷電部分を含有する、請求項 120 に記
 載のキット。

【請求項 122】

自己集合単層がカルボキシ末端種を含有する、請求項 1

50

20に記載のキット。

【請求項123】

自己集合単層がポリエチレングリコールチオールを含有する、請求項120に記載のキット。

【請求項124】

荷電部分が、ニトリロ三酢酸、2,2'-ビス(サリチリデンアミノ)-6,6'-デメチルジフェニル、又は1,8-ビス(a-ピリジル)-3,6-ジチアオクタンを含む、請求項121に記載のキット。

【請求項125】

荷電部分がニトリロ三酢酸を含む、請求項124に記載のキット。

10

【請求項126】

自己集合単層がオリゴヌクレオチドを含む、請求項119に記載のキット。

【請求項127】

自己集合単層がDNA部分を含む、請求項119に記載のキット。

【請求項128】

自己集合単層が荷電ペプチドを含む、請求項119に記載のキット。

20

【請求項129】

自己集合単層が合成分子からなる、請求項119に記載のキット。

【請求項130】

自己集合単層が、カルボキシ末端チオールを含む溶液から表面上に付着された、請求項119に記載のキット。

【請求項131】

溶液が界面活性剤を含有する、請求項130に記載のキット。

【請求項132】

溶液が、カルボキシレート、カルボン酸塩、又はクエン酸ナトリウムを含有する、請求項130に記載のキット。

30

【請求項133】

自己集合単層が、コロイド粒子自体の形成中でないときに表面上に付着した、請求項130に記載のキット。

【請求項134】

自己集合単層が、粒子が液-液界面に存在しない液中で懸濁状態にある表面上に付着している、請求項130に記載のキット。

【請求項135】

自己集合単層が、結合種又は結合種の結合パートナーの固定を容易にする部分を末端に持つチオールをさらに含む混合自己集合単層である、請求項119に記載のキット。

40

【請求項136】

凝集体又は原線維を、結合種に固定可能な複数のコロイドに曝露することによって前記コロイドを前記原線維又は凝集体に連結させることを含む、請求項94に記載の方法。

【請求項137】

曝露ステップが洗浄剤を含まない溶液中で行われる、請求項136に記載の方法。

【請求項138】

50

曝露ステップが吸収性表面の不在下で行われる、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

コロイドの添加によって原線維又は凝集体を目視的に検出可能にすることを含む、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 0】

目視的に検出可能なパラメータが溶液の色変化である、請求項 1 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

目視的に検出可能なパラメータが、目に見えるコロイド - ペプチド細網の形成である、請求項 1 3 9 に記載の方法。

10

【請求項 1 4 2】

コロイド - ペプチド凝集体が光散乱によって検出される、請求項 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

自己集合単層形成分子種及び界面活性剤を含有する媒体に表面を曝露することによって、自己集合単層を表面に形成することを含む方法。

【請求項 1 4 4】

自己集合単層形成分子種及びカルボキシレートを含有する媒体に表面を曝露することによって、自己集合単層を表面に形成することを含む方法。

20

【請求項 1 4 5】

コロイド粒子自体の形成中でないときに自己集合単層をコロイド粒子表面に形成することを含む方法。

【請求項 1 4 6】

粒子が液 - 液界面に存在しない液中で懸濁状態にあるコロイド粒子表面上に自己集合単層を形成することを含む方法。

【請求項 1 4 7】

媒体が、自己集合単層形成分子種及び界面活性剤を含有する溶液又は懸濁液である、請求項 1 4 3 に記載の方法。

30

【請求項 1 4 8】

表面に自己集合単層を形成後、自己集合単層から残存する界面活性剤をすべて除去することをさらに含む、請求項 1 4 3 に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

コロイド粒子を熱サイクルすることをさらに含む、請求項 1 4 3 に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

少なくとも 2 個の結合種を提供し、各々は凝集体形成種を結合でき、相互に固定されている又は相互に固定されるように適応されていることによって凝集体リンカーを規定し；そして、

40

前記リンカーを、凝集体形成種を含有すると考えられる試料、又は凝集に影響を及ぼす候補薬を含有する溶液に曝露することを含む方法。

【請求項 1 5 1】

結合種が、疾患に関係する凝集体形成種を結合できる、請求項 1 5 0 に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

結合種が、神経変性疾患の凝集体形成種を結合できる、請求項 1 5 0 に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

50

結合種が、非神経変性疾患の凝集体形成種を結合できる、請求項 150 に記載の方法。

【請求項 154】

凝集体形成種を産生できる生細胞を、凝集に影響を及ぼす候補薬に曝露し；そして

前記細胞によって産生された物質の凝集体形成のポテンシャルをモニタすることを含む方法。

【請求項 155】

細胞が産生した物質の凝集ポテンシャルを、凝集体を、表面と、凝集体又は凝集体形成種を結合できる複数の結合種とを有するアーティクルに曝露することによってモニタすることを含み、前記結合種は、前記アーティクル表面に対して固定されている又は固定されるように適応されている、請求項 154 に記載の方法。

10

【請求項 156】

凝集ポテンシャルのモニタリングが、溶液の色変化をモニタすることによって達成される、請求項 155 に記載の方法。

【請求項 157】

凝集ポテンシャルのモニタリングが、コロイド - ペプチド細網の形成程度をモニタすることによって達成される、請求項 155 に記載の方法。

20

【請求項 158】

細胞が候補薬に曝露されない、請求項 154 に記載の方法。

【請求項 159】

モニタリングステップが、細胞試料又は細胞周囲の液を除去することを含まない、請求項 154 に記載の方法。

【請求項 160】

モニタリングステップが細胞の存在下で行われる、請求項 154 に記載の方法。

【請求項 161】

モニタリングステップの前に細胞が溶解される、請求項 154 に記載の方法。

30

【請求項 162】

細胞が疾患に関係する凝集体形成種を産生でき、前記細胞によって産生された物質の、疾患に特徴的な凝集体形成のポテンシャルをモニタすることを含む、請求項 154 に記載の方法。

【請求項 163】

疾患が神経変性疾患である、請求項 155 に記載の方法。

【請求項 164】

疾患が非神経変性疾患である、請求項 155 に記載の方法。

40

【請求項 165】

凝集体形成種を結合できる種と、凝集体形成種を含有すると考えられる試料又は凝集に影響を及ぼす候補薬のうちの一つを含有する溶液を作成し；そして

いかなる成分も前記溶液に移したり、容器から前記溶液を除去したりすることなく、前記溶液中の凝集を検出することを含む方法。

【請求項 166】

種が疾患に関係する凝集体形成種を結合でき、方法が疾

50

患に特徴的な凝集を検出することを含む、請求項 1 6 5 に記載の方法。

【請求項 1 6 7】

疾患が神経変性疾患である、請求項 1 6 6 に記載の方法。

【請求項 1 6 8】

疾患が非神経変性疾患である、請求項 1 6 6 に記載の方法。

【請求項 1 6 9】

液にエネルギーを導入することをさらに含む、請求項 1 6 5 に記載の方法。

10

【請求項 1 7 0】

少なくとも 2 個の粒子を含み、各々が凝集体形成種に対して固定されている系。

【請求項 1 7 1】

少なくとも 2 個の粒子の各々が、凝集体形成種を結合している結合種に固定されている、請求項 1 7 0 に記載の系。

【請求項 1 7 2】

少なくとも 2 個の粒子を含み、各々が疾患に関係する凝集体形成種に対して固定されている、請求項 1 7 0 に記載の系。

20

【請求項 1 7 3】

凝集体を含み、少なくとも 2 個の粒子が前記凝集体に対して固定されている系。

【請求項 1 7 4】

凝集体が疾患に関係する凝集体である、請求項 1 7 3 に記載の系。

【請求項 1 7 5】

第一の表面と、前記表面に対して固定された又は固定されるように適応された、凝集体形成種を結合できる複数の結合種とを有するアーティクルを用意し；そして

前記第一の表面を、凝集体形成種を含有している又は含有すると考えられる試料に曝露することを含む方法。

30

【請求項 1 7 6】

結合種が疾患に関係する凝集体形成種を結合できる、請求項 1 7 5 に記載の方法。

【請求項 1 7 7】

疾患が神経変性疾患である、請求項 1 7 6 に記載の方法。

【請求項 1 7 8】

疾患が非神経変性疾患である、請求項 1 7 6 に記載の方法。

40

【請求項 1 7 9】

表面が粒子の表面であり、方法が、

粒子に対して固定された結合種を保持している複数の粒子を用意し；そして前記粒子を試料に曝露することを含む、請求項 1 7 5 に記載の方法。

【請求項 1 8 0】

試料中に存在する凝集体形成種を示す、粒子の凝集程度を測定することをさらに含む、請求項 1 7 9 に記載の方法。

【請求項 1 8 1】

表面が粒子の表面であり、方法が、

複数の粒子と、前記粒子の表面に固定された又は固定されるように適応された

50

結合種とを用意し；そして

前記粒子及び結合種を試料に曝露することを含む、請求項 1 7 5 に記載の方法。

【請求項 1 8 2】

結合種及び試料が、異なる生物学的種から得られる、請求項 1 7 9 に記載の方法。

【請求項 1 8 3】

結合種及び試料が、異なる生物学的種に由来する同じタンパク質又はタンパク質フラグメントである、請求項 1 8 1 に記載の方法。

【請求項 1 8 4】

粒子の凝集程度を測定することをさらに含む、請求項 1 7 9 に記載の方法。

【請求項 1 8 5】

試料が凝集体形成種を含有し、曝露ステップが、凝集体形成に影響を及ぼすと考えられる候補薬の存在下で、粒子と結合種を試料に曝露することを含む、請求項 1 8 4 に記載の方法。

【請求項 1 8 6】

試料が細胞によって産生される、請求項 1 8 5 に記載の方法。

【請求項 1 8 7】

粒子の凝集程度を測定することをさらに含む、請求項 1 8 6 に記載の方法。

【請求項 1 8 8】

まず、試料を産生する細胞を、凝集体形成に影響を及ぼすと考えられる候補薬に曝露し、次に、粒子及び結合種を試料に曝露することを含む、請求項 1 8 7 に記載の方法。

【請求項 1 8 9】

細胞を溶解して試料を製造することをさらに含む、請求項 1 8 8 に記載の方法。

【請求項 1 9 0】

候補薬が、疾患を阻害すると考えられる、請求項 1 8 8 に記載の方法。

【請求項 1 9 1】

候補薬が、神経変性疾患を阻害すると考えられる、請求項 1 9 0 に記載の方法。

【請求項 1 9 2】

薬物が、神経変性疾患につながる活性を備えた酵素を阻害すると考えられる、請求項 1 8 8 に記載の方法。

【請求項 1 9 3】

薬物が、神経変性疾患につながる細胞プロセスを阻害すると考えられる、請求項 1 8 8 に記載の方法。

【請求項 1 9 4】

候補薬が - セクレターゼを阻害すると考えられる、請求項 1 9 2 に記載の方法。

【請求項 1 9 5】

候補薬が - セクレターゼを阻害すると考えられる、請求項 1 9 2 に記載の方法。

【請求項 1 9 6】

曝露ステップが、1 ~ 3 8 ないし 1 ~ 4 4 のアミノ酸配列を含む - アミロイドの存在下で、粒子を試料に曝露することを含む、請求項

10

20

30

40

50

185に記載の方法。

【請求項197】

- アミロイドペプチドが1~40のアミノ酸配列を含む、請求項196に記載の方法。

【請求項198】

曝露ステップが、粒子を、神経変性疾患に関係していると考えられる試料から得られた生物学的検体に曝露することを含む、請求項180に記載の方法。

【請求項199】

検体を粒子及び結合種に曝露することを含む、請求項198に記載の方法。

10

【請求項200】

試料が血液試料を含む、請求項198に記載の方法。

【請求項201】

試料がヒト患者から得られる、請求項198に記載の方法。

【請求項202】

試料が動物から得られる、請求項198に記載の方法。

【請求項203】

試料が家畜から得られる、請求項198に記載の方法。

20

【請求項204】

試料が家畜飼料から得られる、請求項198に記載の方法。

【請求項205】

試料が臓器供与試料である、請求項198に記載の方法。

【請求項206】

試料がヒトの消費に適した食物である、請求項198に記載の方法。

【請求項207】

試料がヒト又は動物の消費に適した液である、請求項198に記載の方法。

30

【請求項208】

試料が乳である、請求項198に記載の方法。

【請求項209】

試料が水である、請求項198に記載の方法。

【請求項210】

粒子を試料に曝露したときに試料の目に見える変化を観察することをさらに含む、請求項180に記載の方法。

【請求項211】

目に見える変化が粒子の凝集を含む、請求項210に記載の方法。

40

【請求項212】

目に見える変化が金コロイド粒子の凝集を含む、請求項211に記載の方法。

【請求項213】

目に見える変化が色の変化を含む、請求項210に記載の方法。

【請求項214】

粒子を試料に曝露したときに、粒子/集塊物の有効寸法

50

の変化を光散乱装置を用いて測定することをさらに含む、請求項 180 に記載の方法。

【請求項 215】

試料の画像をデジタル化し、次いでパターン認識を用いて前記試料が凝集体を含有するかどうかを判定することを含む、請求項 180 に記載の方法。

【請求項 216】

結合種が、表面に固定されていない補助的な凝集体形成種又は原線維形成種の不在下で、粒子/粒子曝露時の粒子凝集をある時間枠内遅らせるほど低い表面濃度で前記粒子表面に対して固定されている結果、補助的な凝集体形成種又は原線維形成種の不在下での凝集を、補助的な凝集体形成種又は原線維形成種の存在下での凝集と比較できる、請求項 198 に記載の方法。

10

【請求項 217】

結合種と、試料中に存在する任意の凝集体形成種又は原線維形成種との相互作用を測定することをさらに含む、請求項 175 に記載の方法。

【請求項 218】

結合種及び試料が異なる生物学的種である、請求項 175 に記載の方法。

【請求項 219】

粒子に対して固定され、凝集体形成種に結合する結合種の存在下で、表面を試料に曝露することを含む、請求項 175 に記載の方法。

20

【請求項 220】

前記粒子が、補助的なシグナリング実体を保持している、請求項 219 に記載の方法。

【請求項 221】

補助的シグナリング実体が、染料、顔料、電気活性分子、蛍光部分、アップレギュレーティングリン光体、又は西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼを含む酵素固定シグナリング部分を含む、請求項 220 に記載の方法。

30

【請求項 222】

表面が電極の表面であり、粒子が前記表面に対して固定された電気活性種を保持している、請求項 219 に記載の方法。

【請求項 223】

粒子が、複数の固定された電気活性種を保持している、請求項 222 に記載の方法。

【請求項 224】

複数の電気活性種がメタロセンを含む、請求項 223 に記載の方法。

【請求項 225】

複数の電気活性種がフェロセン又はフェロセン誘導体を含む、請求項 223 に記載の方法。

40

【請求項 226】

アーティクルが磁気ビーズである、請求項 175 に記載の方法。

【請求項 227】

アーティクルが SPR チップである、請求項 175 に記載の方法。

【請求項 228】

アーティクルが電極である、請求項 175 に記載の方法

50

。

【請求項 2 2 9】

ア－ティクルが E L I S A プレ－トである、請求項 1 7 5 に記載の方法。

【請求項 2 3 0】

表面が、複数の個々に空間的にアドレス可能な領域を含む、請求項 1 7 5 に記載の方法。

【請求項 2 3 1】

個々に空間的にアドレス可能な領域が多穴滴板の異なるウェルを含む、請求項 2 1 0 に記載の方法。

10

【請求項 2 3 2】

試料を、凝集体形成に影響を及ぼす候補薬の存在下で、表面に曝露することを含む、請求項 2 3 1 に記載の方法。

【請求項 2 3 3】

候補薬の存在に起因する、凝集体形成種と表面に固定された結合種との相互作用の低下を観察することをさらに含む、請求項 2 3 2 に記載の方法。

【請求項 2 3 4】

試料が、凝集体形成種を含有する薬物スクリーニング製剤である、請求項 1 7 5 に記載の方法。

20

【請求項 2 3 5】

表面が粒子の表面であり、方法が、

結合種と、前記結合種に固定可能な粒子と、前記結合種に固定可能な磁気ビーズとを液媒体中に懸濁された状態で含む組成物を形成し；そして

前記組成物を試料に曝露することを含む、請求項 1 7 5 に記載の方法。

【請求項 2 3 6】

粒子及び／又は磁気ビーズが固定されたキレートを保持し、結合種の少なくとも一部が、キレートに配位されている金属に固定可能な金属結合標識を保持している、請求項 2 3 5 に記載の方法。

30

【請求項 2 3 7】

粒子及びビーズの少なくとも一部が結合種に固定されている、請求項 2 3 5 に記載の方法。

【請求項 2 3 8】

組成物がさらに、粒子に固定された又は固定可能なレドックス活性種を含む、請求項 2 3 5 に記載の方法。

【請求項 2 3 9】

組成物を、凝集体形成種及び凝集体の形成に影響を及ぼす候補薬を含有する試料に曝露することをさらに含む、請求項 2 3 5 に記載の方法。

40

【請求項 2 4 0】

レドックス活性剤を保持している粒子に固定された凝集体形成種又は原線維形成種に固定されている磁気ビーズの少なくとも一部を電極に引き寄せ、電極に近接するレドックス活性剤の存在を測定することをさらに含む、請求項 2 3 8 に記載の方法。

【請求項 2 4 1】

方法を磁気ビーズの不在下で実施し、コロイド－ペプチド細網を電極上に沈殿させることを含む、請求項 2 4 0 に記載の方法。

【請求項 2 4 2】

方法を磁気ビーズの不在下で実施し、電極が、信号を出すコロイド－ペプチド細網を電極に誘引するために、凝集体形成種を結合できる

50

結合種を提示することを含む、請求項 2 4 0 に記載の方法。

【請求項 2 4 3】

電極が非特異的結合阻害物質で被覆されている、請求項 2 4 0 に記載の方法。

【請求項 2 4 4】

非特異的結合阻害物質が自己集合単層を含む、請求項 2 4 3 に記載の方法。

【請求項 2 4 5】

自己集合単層が、ポリエチレングリコール末端自己集合単層形成種を含む、請求項 2 4 4 に記載の方法。

10

【請求項 2 4 6】

自己集合単層が、電子に対する自己集合単層の透過性を向上させる種をさらに含む、請求項 2 4 4 に記載の方法。

【請求項 2 4 7】

電子に対する透過性を向上させる種が、導電性の自己集合単層形成種を含む、請求項 2 4 6 に記載の方法。

【請求項 2 4 8】

電子に対する透過性を向上させる種が、自己集合単層中に欠陥部位を生じさせる種を含む、請求項 2 4 6 に記載の方法。

【請求項 2 4 9】

凝集体形成種を結合できる結合種と；

前記結合種に対して固定された電子シグナリング実体とを含む組成物。

20

【請求項 2 5 0】

結合種が、神経変性疾患の凝集体形成種を結合できる、請求項 2 4 9 に記載の組成物。

【請求項 2 5 1】

第一の表面に対して固定された又は固定されるように適応された結合種を用意し、前記結合種は神経変性疾患の凝集体形成種ではないが、神経変性疾患の凝集体形成種を結合でき；そして

前記結合種を神経変性疾患の凝集体形成種に変換することを含む方法。

30

【請求項 2 5 2】

結合種に、他の結合種を神経変性疾患の凝集体形成種に変換させることをさらに含む、請求項 2 5 1 に記載の方法。

【請求項 2 5 3】

結合種を、神経変性疾患の凝集体形成種と相互作用させ、それによって構造的に神経変性疾患の凝集体形成種に変換し、次いでその種に他の結合種を変換させることを含む、請求項 2 5 2 に記載の方法。

【請求項 2 5 4】

系を、神経変性疾患の凝集体形成種でない、表面に結合していない補助的結合種に曝露し、前記補助的結合種を神経変性疾患の凝集体形成種に変換させることを含む、請求項 2 5 1 に記載の方法。

40

【請求項 2 5 5】

結合種が当初アーティクル表面に固定されている、請求項 2 5 1 に記載の方法。

【請求項 2 5 6】

結合種が当初アーティクル表面に固定されていない、請求項 2 5 1 に記載の方法。

【請求項 2 5 7】

神経変性疾患の凝集体形成種を結合でき、アーティクル表面に固定された又は固定されるように適応された結合種を用意し；

50

場合により前記結合種を前記アーティクル表面に固定させ；
 前記結合種を凝集体形成種に変換せずに、前記結合種に神経変性疾患の凝集体形成種を結合させ；そして
 第二のアーティクル表面に固定された又は固定されるように適応された第二の結合種に凝集体形成種を結合させる
 ことを含む方法。

【請求項 258】

結合種及び神経変性疾患の凝集体形成種が、生物学的分類上異なる種に由来する、請求項 257 に記載の方法。

【請求項 259】

神経変性疾患の凝集体形成種ではないが、神経変性疾患の凝集体形成種を結合できる結合種を用意し；

前記結合種を神経変性疾患の凝集体形成種と相互作用させることによって神経変性疾患の凝集体形成種に変換し、神経変性疾患の凝集体形成種の存在に特徴的な凝集に参加させ；そして

神経変性疾患の凝集体形成種の存在に特徴的な凝集を検出することを含む方法。

【請求項 260】

アーティクルの表面と；

表面に固定された、凝集体形成種を結合できる結合種と；

表面に固定されたシグナリング実体と
 を含むアーティクル。

【請求項 261】

結合種が神経変性疾患の凝集体形成種を結合できる、請求項 260 に記載アーティクル。

【請求項 262】

表面を有するアーティクルと；

自己集合単層を介して表面に固定された又は固定されるように適応された、凝集体形成種を結合できる複数の結合種と
 を含むキット。

【請求項 263】

少なくとも 2 個の粒子の各々が、粒子に固定され且つ凝集体を結合している結合種を介して、凝集体に対して固定されている、請求項 173 に記載の系。

【請求項 264】

少なくとも 2 個の粒子に対して固定された凝集体を含み、前記粒子の少なくとも 1 個が第二の凝集体に対して固定されている、請求項 263 に記載の系。

【請求項 265】

粒子と凝集体がヒトの肉眼に見える構造を形成する、請求項 264 に記載の系。

【請求項 266】

シグナリング実体が多数のシグナリング実体である、請求項 260 に記載のアーティクル。

【請求項 267】

原線維又は凝集体を目に見えるようにする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 268】

試料が天然試料である、請求項 175 に記載の方法。

【請求項 269】

10

20

30

40

50

試料が、構造が予め決められた試料である、請求項 175 に記載の方法。

【請求項 270】

凝集体関連の状態の危険性がある又はその治療が適応されるヒト又は動物患者に、前記状態を治療するための候補薬を投与し；そして前記患者から採取した試料を、状態の治療における候補薬の有効性を示すアッセイに曝露することを含む方法。

【請求項 271】

ヒト又は動物が、凝集体関連疾患の危険性がある又はその治療が適応され、方法が、試料を、凝集の阻害における候補薬の有効性を示すアッセイに曝露することを含む、請求項 270 に記載の方法。

10

【請求項 272】

ヒト又は動物が、凝集体関連疾患の危険性がある又はその治療が適応され、方法が、試料を、凝集の増強における候補薬の有効性を示すアッセイに曝露することを含む、請求項 270 に記載の方法。

【請求項 273】

ヒト又は動物患者が、神経変性疾患の危険性がある又はその治療が適応され、方法が、試料を、神経変性疾患の抑制又は治療における候補薬の有効性を示すアッセイに曝露することを含む、請求項 270 に記載の方法。

20

【請求項 274】

試料を、試料の凝集ポテンシャルを示すアッセイに曝露することを含む、請求項 270 に記載の方法。

【請求項 275】

ポリアミノ酸標識を含む、1～38ないし1～42の-アミロイドペプチドを含む組成物。

【請求項 276】

第一のコロイド粒子を、第二のコロイド粒子に対して、第一のコロイド粒子に固定された又は固定されるように適応された第一の化学又は生物学的種と、第二のコロイド粒子に固定された又は固定されるように適応された第二の化学又は生物学的種との間の結合相互作用によって固定させ；そして第一のコロイド粒子の第二のコロイド粒子に対する固定化を測定することを含む方法。

30

【請求項 277】

方法を、結合相互作用に影響を及ぼす候補薬の存在下で実施することを含む、請求項 126 に記載の方法。

【請求項 278】

第一のコロイド粒子を、第二のコロイド粒子に対して、第一のコロイド粒子に対して固定された又は固定されるように適応された第一の化学又は生物学的種と、第二のコロイド粒子に対して固定された又は固定されるように適応された第二の化学又は生物学的種との間の結合相互作用によって固定させ、ただし前記結合相互作用は、第一の核酸配列の相補核酸配列への結合は関与していない；そして第一のコロイド粒子の第二のコロイド粒子に対する固定化を測定することを含む方法。

40

【請求項 279】

第一のコロイド粒子を、第二のコロイド粒子に対して、第一のコロイド粒子に対して固定された又は固定されるように適応された第一の化学又は生物学的種と、第二のコロイド粒子に対して固定された又は固定される

50

ように適応された第二の化学又は生物学的種との間の結合相互作用によって固定させ、前記第一のコロイド粒子は第二に、粒子を介して、少なくとも一つの自己集合単層を介して連結し；そして

第一のコロイド粒子の第二のコロイド粒子に対する固定化を測定することを含む方法。

【請求項 280】

第一及び第二の化学又は生物学的種は、それぞれ第一及び第二のコロイド粒子に対して自己集合単層を介して固定されている、請求項 279 に記載の方法。

【請求項 281】

測定ステップが、溶液の色の変化をモニタすることを含む、請求項 280 に記載の方法。

【請求項 282】

方法を、結合相互作用に影響を及ぼす薬物候補の存在下で実施することを含む、請求項 279 に記載の方法。

【請求項 283】

固定された発光種又は吸光種を保持している第一のコロイド粒子を用意し；

固定された発光種又は吸光種の発光又は吸光に影響を及ぼす能力を有する第二の種を保持している第二のコロイド粒子を、第一のコロイド粒子に接近させ、前記第二の種に、固定された発光種又は吸光種の発光又は吸光に影響を及ぼさせ、少なくとも 1 個のコロイドは自己集合単層で誘導体化されていることを含む方法。

【請求項 284】

前記発光種が蛍光種であり、方法が、第二の種に、固定された種の蛍光に影響を及ぼさせることを含む、請求項 283 に記載の方法。

【請求項 285】

第一のコロイド粒子に対して固定された種と、第二のコロイド粒子に対して固定された種との間に結合事象を発生させることによって、第二のコロイド粒子を第一のコロイド粒子に接近させることを含む、請求項 283 に記載の方法。

【請求項 286】

第一のコロイド粒子に固定された第一の種を、第二のコロイド粒子に対して固定された第二の種に対して固定させることによって、第二のコロイド粒子を第一のコロイド粒子に接近させることを含む、請求項 283 に記載の方法。

【請求項 287】

第一及び第二の種を相互に結合させる、請求項 286 に記載の方法。

【請求項 288】

第一及び第二の種を相互に特異的に結合させる、請求項 287 に記載の方法。

【請求項 289】

第一及び第二の種を共通の物質に結合させることを含む、請求項 287 に記載の方法。

【請求項 290】

共通の物質が共通のコロイド粒子である、請求項 289 に記載の方法。

【請求項 291】

共通の物質が生物学的材料の表面である、請求項 289

10

20

30

40

50

に記載の方法。

【請求項 292】

生物学的材料が腫瘍である、請求項 291 に記載の方法。

【請求項 293】

生物学的材料が細胞である、請求項 291 に記載の方法。

【請求項 294】

生物学的材料がタンパク質複合体である、請求項 291 に記載の方法。

10

【請求項 295】

第一のコロイド粒子に固定された第一の種と、第二のコロイド粒子に固定された第二の種を、それぞれ共通の生物学的標的に特異的に結合させることによって、第二のコロイド粒子を第一のコロイド粒子に接近させることを含む、請求項 283 に記載の方法。

【請求項 296】

第二の種に、第一の種の発光を消光させることを含む、請求項 283 に記載の方法。

【請求項 297】

第二の種に、第一の種の発光を増強させることを含む、請求項 283 に記載の方法。

20

【請求項 298】

第二の種に、発光種の発光又は吸光の波長をシフトさせることを含む、請求項 283 に記載の方法。

【請求項 299】

結合相互作用が酵素によって影響される、請求項 276 又は 279 に記載の方法。

【請求項 300】

前記酵素がカスパーゼである、請求項 299 に記載の方法。

30

【請求項 301】

酵素活性に影響を及ぼす薬物候補の存在下で方法を実施することを含む、請求項 300 に記載の方法。

【請求項 302】

酵素がカルpain である、請求項 299 に記載の方法。

【請求項 303】

酵素活性に影響を及ぼす薬物候補の存在下で方法を実施することを含む、請求項 302 に記載の方法。

【請求項 304】

酵素に第一及び第二種間の結合相互作用を促進させ、次いで少なくとも 1 個のコロイド粒子を、少なくとも 1 個の第一又は第二の種に固定させることを含む、請求項 299 に記載の方法。

40

【請求項 305】

第一のコロイド粒子と、第二のコロイド粒子と、前記第一のコロイド粒子に対して固定された又は固定されるように適応された第一の化学又は生物学的種と、前記第二のコロイド粒子に対して固定された又は固定されるように適応された第二の化学又は生物学的種とを用意し；

前記第一及び第二の化学又は生物学的種を、第一の化学又は生物学的種と第二の化学又は生物学的種との連結を促進する能力を有する、又はその能力を有すると考えられる酵素に曝露し；そして

50

第一の化学又は生物学的種と第二の化学又は生物学的種との連結における酵素活性を示す、第一のコロイド粒子の第二のコロイド粒子に対する固定化又は非固定化を測定することを含む方法。

【請求項 306】

酵素がカスパーゼである、請求項 304 に記載の方法。

【請求項 307】

酵素がカルパインである、請求項 304 に記載の方法。

【請求項 308】

測定ステップが、第一のコロイド粒子の第二のコロイド粒子に対する固定化を示す色の变化を測定することを含む、請求項 276 又は 279 に記載の方法。

10

【請求項 309】

第一のコロイド粒子の第二のコロイド粒子に対する固定化を、目に見える細網の測定によって測定することを含む、請求項 276 又は 279 に記載の方法。

【請求項 310】

被検体含有すると考えられる試料を、第一の化学又は生物学的種に対して固定された又は固定されるように適応された第一のコロイド粒子及び第二の化学又は生物学的種に対して固定された又は固定されるように適応された第二のコロイド粒子に曝露し、前記第一及び第二の化学又は生物学的種はそれぞれ被検体に固定する能力を有しており；そして

20

試料中に被検体の存在を示す、第一のコロイド粒子の第二のコロイド粒子に対する固定化を測定することを含む方法。

【請求項 311】

第一及び第二のコロイド粒子を、前記コロイド粒子を相互に固定する能力を有する複数の化学又は生物学的種と、少なくとも一つの結合相互作用を分断することによって第一及び第二のコロイド粒子の相互の固定を阻止する候補薬とに曝露し；そして

30

候補薬の結合相互作用の分断における有効性を示す、第一及び第二のコロイド粒子の相互の固定化を測定することを含む方法。

【請求項 312】

化学又は生物学的種が、少なくとも一つの自己集合単層を介してコロイド粒子を相互に固定する能力を有する、請求項 311 に記載の方法。

【請求項 313】

第一及び第二のコロイド粒子を、それぞれ第一及び第二のコロイド粒子に固定された又は固定されるように適応された第一及び第二の種に曝露することを含み、前記第一及び第二の化学又は生物学的種が、相互に特異的に結合する能力を有し、候補薬が前記第一及び第二の化学又は生物学的種間の特異的結合の分断の候補である、請求項 311 に記載の方法。

40

【請求項 314】

第一及び第二のコロイド粒子を、それぞれ第一及び第二のコロイド粒子に対して固定された又は固定されるように適応された第一及び第二の化学又は生物学的種、及び前記第一及び第二の化学又は生物学的種に結合する能力を有する第三の種に曝露することを含み、候補薬が前記第一及び第二の化学又は生物学的種のうちのひとつと前記第三の種との間の結合を分断するためのものである、請求項 311 に記載の方法。

50

【請求項 3 1 5】

第一及び第二の化学又は生物学的種が R G D - 含有モチーフを含み、第三の種がエンドスタチンを含む、請求項 3 1 4 に記載の方法。

【請求項 3 1 6】

第一のコロイド粒子と、前記第一のコロイド粒子に対して固定された又は固定されるように適応された第一の化学又は生物学的種と、第二のコロイド粒子と、前記第二のコロイド粒子に対して固定された又は固定されるように適応された第二の化学又は生物学的種と、第三の粒子と、前記第三のコロイド粒子に対して固定された又は固定されるように適応された第三の化学又は生物学的種とを用意し、前記第一及び第二の化学又は生物学的種はそれぞれ前記第三の化学又は生物学的種に連結する能力を有しており；そして

第一及び第二の化学又は生物学的種の各々と第三の化学又は生物学的種との間の結合を介して、第一のコロイド粒子の第二のコロイド粒子に対する固定化を測定する

ことを含む方法。

【請求項 3 1 7】

第一、第二、及び第三のコロイド粒子を、第一又は第二の化学又は生物学的種と第三の化学又は生物学的種との間の結合相互作用を分断する候補薬の存在下で、互いに曝露することを、請求項 3 1 4 又は 3 1 6 に記載の方法。

【請求項 3 1 8】

第一及び第二の化学又は生物学的種の各々がピトロネクチンから誘導され、第三の化学又は生物学的種がアンギオスタチンである、請求項 3 1 6 に記載の方法。

【請求項 3 1 9】

第一及び第二の化学又は生物学的種の各々がピトロネクチンであり、第三の化学又は生物学的種がアンギオスタチンであり、候補薬がピトロネクチン/アンギオスタチン結合を分断するための候補である、請求項 3 1 7 に記載の方法。

【請求項 3 2 0】

凝集体形成種を含有している又は含有していると考えられる；又は凝集体形成種の前駆体を含有している又は含有していると考えられる；又は凝集体形成種を産生できる又は産生できると考えられる；又は凝集体形成種の前駆体を産生できる又は産生できると考えられる第一の試料を、第一の試料の凝集プロセスへの関与傾向に影響を及ぼす能力を有していると考えられる第二の試料に曝露し；そして

第二の試料の、第一の試料の凝集プロセスへの関与傾向に影響を及ぼす能力を測定する

ことを含む方法。

【請求項 3 2 1】

第一の試料を、第二の試料に、第一の試料の凝集プロセスへの関与傾向に影響を及ぼす第二の試料の能力を緩和する候補薬の存在下で、曝露することを、請求項 3 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 2 2】

測定ステップが、第一の試料の凝集ポテンシャルを測定することを、請求項 3 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 2 3】

第一の試料が、疾患に関係する凝集体形成種を含有している又は含有していると考えられる、請求項 3 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 2 4】

10

20

30

40

50

疾患が神経変性疾患である、請求項 3 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 2 5】

第一の試料が、凝集体形成種であるタンパク質又はペプチドを含む、請求項 3 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 2 6】

第一の試料が、凝集体形成種であるタンパク質又はペプチドの前駆体を含む、請求項 3 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 2 7】

第一の試料が、凝集体形成種であるタンパク質又はペプチドを産生する細胞から誘導された種を含む、請求項 3 2 0 に記載の方法。

10

【請求項 3 2 8】

第一の試料が、細胞から分泌された物質を含む、請求項 3 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 2 9】

第一の試料が、細胞の溶解産物又はそのフラクシオンを含む、請求項 3 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 3 0】

第二の試料が、凝集体形成種でなく、凝集体形成種の前駆体でもない、請求項 3 2 0 に記載の方法。

20

【請求項 3 3 1】

第二の試料が、天然、合成、又はクローン化されたタンパク質、ペプチド、核酸、又は酵素である、請求項 3 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 3 2】

第二の試料が細胞から誘導されている、請求項 3 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3 3】

第二の試料が、細胞から誘導された物質を含む、請求項 3 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3 4】

測定ステップが、コロイド粒子に対して固定された結合種の、凝集体又は凝集体形成種への結合によるコロイド粒子の凝集を測定することを含む、請求項 3 2 0 に記載の方法。

30

【請求項 3 3 5】

それぞれが表面と、前記表面に対して固定された又は固定されるように適応された、凝集体形成種を結合できる複数の結合種とを有する複数の粒子を用意し；

前記粒子と前記結合種を、凝集体形成に影響を及ぼすと考えられる候補薬に曝露し；

凝集体形成に影響を及ぼす候補薬の第一の時点における有効性を示す、前記粒子の第一の観察可能な特徴を測定し；そして

凝集体形成に影響を及ぼす候補薬の第二の時点における有効性を示す、前記粒子の第二の観察可能な特徴を測定する

ことを含む方法。

40

【請求項 3 3 6】

候補薬が凝集体形成を阻害すると考えられ、測定ステップが、凝集体形成を阻害する候補薬の第一及び第二の時点における有効性を示す、粒子の第一及び第二の観察可能な特徴を測定することを含む、請求項 3 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 3 7】

50

結合種が神経変性疾患の凝集体形成種を結合でき、候補薬が神経変性疾患の凝集体形成を阻害すると考えられ、測定ステップが、神経変性疾患の凝集体形成を阻害する候補薬の第一及び第二の時点における有効性を示す、粒子の第一及び第二の観察可能な特徴を測定することを含む、請求項 3 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 3 8】

粒子、結合種、及び候補薬を補助的な凝集体形成種に曝露することをさらに含む、請求項 3 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 3 9】

第一及び第二の観察可能な特徴の少なくとも一つが、直接目で確認可能な変化である、請求項 3 3 5 に記載の方法。

10

【請求項 3 4 0】

第一及び第二の観察可能な特徴の少なくとも一つが、色の変化である、請求項 3 3 9 に記載の方法。

【請求項 3 4 1】

第一及び第二の観察可能な特徴の少なくとも一つが、肉眼で確認可能である、請求項 3 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 4 2】

第一及び第二の時点の差が少なくとも 1 日である、請求項 3 3 5 に記載の方法。

20

【請求項 3 4 3】

第一及び第二の時点の差が少なくとも 1 . 5 日である、請求項 3 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 4 4】

第一及び第二の時点の差が少なくとも 2 日である、請求項 3 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 4 5】

第一及び第二の時点の差が 2 0 分を超えない、請求項 3 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 4 6】

第一及び第二の時点の差が 1 0 分を超えない、請求項 3 3 5 に記載の方法。

30

【請求項 3 4 7】

第一及び第二の時点の差が 5 分を超えない、請求項 3 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 4 8】

第一及び第二の時点の差が 1 分を超えない、請求項 3 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 4 9】

第一及び第二の時点の差が 3 0 秒を超えない、請求項 3 3 5 に記載の方法。

40

【請求項 3 5 0】

第一及び第二の測定ステップ中及び第一及び第二の測定ステップ間に、アッセイを分断 / 攪乱することなく、また外部エネルギーをアッセイに曝露することなく、第一の観察可能な特徴を測定し、第二の観察可能な特徴を測定することを含む、請求項 3 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 5 1】

凝集体形成に影響を及ぼすと考えられる候補薬を、第一組の条件下で、それぞれが表面と、前記表面に対して固定された又は固定されるように適応された、凝集体形成種を結合できる複数の結合種とを有する複数の粒

50

子に曝露し、前記第一組の条件下で凝集体形成に影響を及ぼす候補薬の有効性を示す、前記粒子の観察可能な特徴を測定し；

前記候補薬を、第二組の条件下で、それぞれが表面と、前記表面に対して固定された又は固定されるように適応された、凝集体形成種を結合できる複数の結合種とを有する複数の粒子に曝露し；そして

前記第二組の条件下で凝集体形成に影響を及ぼす候補薬の有効性を示す、前記粒子の観察可能な特徴を測定する

ことを含む方法。

【請求項 3 5 2】

候補薬が凝集体形成を阻害すると考えられ、測定ステップが、凝集体形成を阻害する候補薬の有効性を示す、粒子の観察可能な特徴を測定することを含む、請求項 3 5 1 に記載の方法。

10

【請求項 3 5 3】

候補薬が神経変性疾患の凝集体形成を阻害すると考えられ、測定ステップが、神経変性疾患の凝集体形成を阻害する候補薬の有効性を示す、粒子の観察可能な特徴を測定することを含む、請求項 3 5 1 に記載の方法。

【請求項 3 5 4】

第一組の条件が第一の時点であり、第二組の条件が第二の時点である、請求項 3 5 1 に記載の方法。

【請求項 3 5 5】

第一組の条件が凝集の第一段階であり、第二組の条件が凝集の第二段階である、請求項 3 5 1 に記載の方法。

20

【請求項 3 5 6】

複数の粒子及び結合種が溶液中にある、請求項 3 5 1 に記載の方法。

【請求項 3 5 7】

凝集の第一及び第二段階の観察可能な特徴の測定ステップが、溶液の色を測定することを含む、請求項 3 5 6 に記載の方法。

【請求項 3 5 8】

凝集の第一及び第二段階の観察可能な特徴の測定ステップが、機器を通して色変化を観察することを含む、請求項 3 5 7 に記載の方法。

30

【請求項 3 5 9】

凝集の第一及び第二段階の観察可能な特徴の測定ステップが、凝集体の相対的寸法を測定することを含む、請求項 3 5 3 に記載の方法。

【請求項 3 6 0】

凝集体の相対的寸法が顕微鏡検査によって測定される、請求項 3 5 9 に記載の方法。

【請求項 3 6 1】

凝集の第一及び第二段階の観察可能な特徴の測定ステップが、凝集体の分子量を測定することを含む、請求項 3 5 3 に記載の方法。

40

【請求項 3 6 2】

第一組の条件が第一のペプチド濃度を含み、第二組の条件が第二のペプチド濃度を含む、請求項 3 5 1 に記載の方法。

【請求項 3 6 3】

第一及び第二組の条件のいずれかが、低濃度又は高濃度のペプチドを含む、請求項 3 6 2 に記載の方法。

【請求項 3 6 4】

第一組の条件が第一の種類の結合種を含み、第二組の条件が第二の種類の結合種を含む、請求項 3 5 1 に記載の方法。

【請求項 3 6 5】

50

凝集体の形成段階を測定し；そして

凝集体又は凝集体形成の段階を疾患の段階と相関させることを含む方法。

【請求項 366】

疾患が神経変性疾患である、請求項 365 に記載の方法

。 【請求項 367】

それぞれが表面と、前記表面に対して固定された又は固定されるように適応された、凝集体形成種を結合できる複数の結合種とを有する複数の粒子を用意し；

前記粒子を、凝集体形成に影響を及ぼすと考えられる候補薬の存在下で、凝集体形成種を含有する試料に曝露し；そして

曝露ステップの少なくとも 5 時間後に、凝集体形成に影響を及ぼす候補薬の有効性を示す、前記粒子の凝集程度を測定することを含む方法。

【請求項 368】

それぞれが表面と、前記表面に固定された又は固定されるように適応された、神経変性疾患の凝集体形成種を結合できる複数の結合種とを有する複数の粒子を用意し；

前記粒子を、神経変性疾患の凝集体形成を阻害すると考えられる候補薬の存在下で、神経変性疾患の凝集体形成種を含有する試料に曝露し；そして

曝露ステップの少なくとも 5 時間後に、凝集体形成を阻害する候補薬の有効性を示す、前記粒子の凝集程度を測定することを含む、請求項 367 に記載の方法。

【請求項 369】

凝集程度を、曝露ステップ後 10 時間してから測定することを含む、請求項 367 に記載の方法。

【請求項 370】

凝集程度を、曝露ステップ後 15 時間してから測定することを含む、請求項 367 に記載の方法。

【請求項 371】

凝集程度、曝露ステップ後 20 時間してから測定することを含む、請求項 367 に記載の方法。

【請求項 372】

それぞれが表面と、前記表面に固定された又は固定されるように適応された、凝集体形成種を結合できる複数の結合種とを有する複数の粒子を用意し；

前記粒子を、神経変性疾患の凝集体形成に影響を及ぼすと考えられる候補薬の存在下で、凝集体形成種を含有する試料に曝露し；そして

曝露ステップ後 1 分以内に、凝集体形成に影響を及ぼす候補薬の有効性を示す、前記粒子の凝集程度を測定することを含む方法。

【請求項 373】

それぞれが表面と、前記表面に固定された又は固定されるように適応された、神経変性疾患の凝集体形成種を結合できる複数の結合種とを有する複数の粒子を用意し；

前記粒子を、神経変性疾患の凝集体形成を阻害すると考えられる候補薬の存在下で、神経変性疾患の凝集体形成種を含有する試料に曝露し；

曝露ステップ後 1 分以内に、凝集体形成を阻害する候補薬の有効性を示す、前記粒子の凝集程度を測定する

10

20

30

40

50

ことを含む、請求項 3 7 2 に記載の方法。

【請求項 3 7 4】

凝集程度を、曝露ステップ後 3 0 秒以内に測定することを含む、請求項 3 7 2 に記載の方法。

【請求項 3 7 5】

凝集程度を、曝露ステップ後 1 0 秒以内に測定することを含む、請求項 3 7 2 に記載の方法。

【請求項 3 7 6】

疾患過程の第一段階を示す症状を呈する第一の患者に、疾患治療のために第一の薬物を投与し（前記第一の薬物は、凝集体形成に影響を及ぼすポテンシャルを示すアッセイに曝露すると、凝集体形成への影響に関して第一の特徴を示す）；そして

疾患過程の第二段階を示す症状を呈する第二の患者に、疾患治療のために第二の薬物を投与する（前記第二の薬物は、前記アッセイに曝露すると、凝集体形成への影響に関して第二の特徴を示す）

ことを含む方法。

【請求項 3 7 7】

神経変性疾患過程の第一段階を示す症状を呈する第一の患者に、疾患治療のために第一の薬物を投与し（前記第一の薬物は、凝集体形成の阻害を示すアッセイに曝露すると、凝集体形成の阻害に関して第一の特徴を示す）；そして

神経変性疾患過程の第二段階を示す症状を呈する第二の患者に、疾患治療のために第二の薬物を投与する（前記第二の薬物は、前記アッセイに曝露すると、凝集体形成の阻害に関して第二の特徴を示す）

ことを含む、請求項 3 7 6 に記載の方法。

【請求項 3 7 8】

アッセイが、それぞれ表面と、前記表面に固定された又は固定されるように適応された、神経変性疾患の凝集体形成種を結合できる複数の結合種とを有する複数の粒子、及び神経変性疾患の凝集体形成種を含有する試料を含む、請求項 3 7 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

発明の属する技術分野

本発明は、生体分子の相互作用、特に神経変性疾患などの病的状態に関係するペプチド凝集及び非病的凝集の迅速且つ高感度の検出及び分析のための方法、アッセイ、及び成分に関する。このような方法及びアッセイは、臨床検査に使用できるだけでなく、高処理量の薬物スクリーニングによる薬物の発見も容易にする。

【0 0 0 2】

発明の背景

タンパク質やペプチドなどの生体分子の異常凝集及び有毒凝集を特徴とする様々な疾患があり、時にタンパク質凝縮症、もつれ形成症、原線維形成症、プラーク形成症などと呼ばれている。従って、このような異常凝集事象を阻害する物質が確認できれば有益と思われる。ところが、天然の凝集プロセスの阻害によって生じる毒性が病気を起こすこともある。このような場合は、正常の凝集機能を回復させる分子が識別できれば有益であろう。

【0 0 0 3】

本発明の主眼でもある、タンパク質の異常凝集に伴う重要な疾患は神経変性疾患である。本発明に係る神経変性疾患は、家族性英国型痴呆（A B R I）、パー

10

20

30

40

50

キンソン病（ α -シヌクレイン）、アルツハイマー病（A β ペプチド）、フィンランド型家族性アミロイドーシス（ゲルソイン）、ハンチントン病（ハンチンチン）、AD、前頭側頭性痴呆（タウ）、老人性全身性アミロイドーシス（トランスチレチン）、家族性アミロイドポリニューロパチー（TTR）、及び伝達性海綿状脳症（PrP）などであるが、これらに限定されない（括弧内は凝集に關与する關係タンパク質）。多くの神経変性疾患は、今日では、神経ペプチドの異常凝集の結果、脳内に発生する凝集体形成に伴うプラークが關係及び/又は原因であることが示されている。アルツハイマー病、パーキンソン病、ゲルストマン-シュトラウスラー-シャインカー症候群、致死性家族性不眠症、ハンチントン舞蹈病、クールー病、及び家族性アミロイドポリニューロパチー、並びにクロイツフェルト・ヤコブ病、スクレイピー、及びウシ海綿状脳症（BSE、狂牛病）のような伝達性海綿状脳症などの神経変性疾患は、脳内に形成される規則的に配列されたタンパク凝集体を特徴とする。これらの凝集体を作るタンパク質には配列の相同性も、保存モチーフさえもないが、凝集体自体はある形態学的な特徴を有している。これについては、LansburyのProc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:3342 (1999)参照。これらの疾患では、病原状態に關係するペプチドが、通常は可溶性であるのに、天然ペプチドの突然変異や変性ペプチドとの物理的會合により三次元構造が変化し、規則的に配列された不溶性の重合状態に変換される。これが、神経変性疾患の脳内にみられるタンパク質の異常沈積の特徴である。この、規則的に配列された重合状態又は凝集体は、内因性もしくは外因性の物質又はペプチドの播種によって起こることもある。

10

20

【0004】

例えば、アルツハイマー病（AD）では、これらの凝集体は α -アミロイドタンパク質からできているが、立体配座上の変化を受け、可溶性モノマーから不溶性の β -板状オリゴマーに変換されている。これらの原線維の脳内濃度は疾患の進行と相関している。特徴的原線維の成長のしかたは、極度に非線形であるという特性がある。このことは、患者が数年間は無症状であるように見えた後、突然急激な変性が進んで痴呆状態に陥ることの説明となる。インビトロでの原線維形成はペプチド濃度に依存している。 α -アミロイド（A β ）タンパク質から誘導された短鎖の合成ペプチドから、アルツハイマー病に特徴的な原線維形成を模した原線維をインビトロで形成させることができる。A β 1~42（長い疎水性C-末端を有する）のほうがA β 1~40よりも速い速度で原線維を形成することが示されている。J. Jarrett 以下、" α -アミロイドタンパク質のカルボキシ末端はアミロイド形成の種として重要である：アルツハイマー病の発生機序との關係(The carboxy terminus of the B-amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease)", Biochemistry 32:4693-4697 (1993)参照。A β 1~40もそれ自体で原線維又は凝集体を形成できるが、A β 1~40を含有する溶液は、低溶性の1~42ペプチドと“混合”するか、又は予め形成されたペプチド原線維を“播種”すると、原線維形成が促進される。A β 1~40は神経突起斑の主要タンパク質であるが、これらの研究によれば、原線維形成速度は1~42の1~40に対する比率に依存するようである。早期発症ADのすべての形態で1~42ペプチドの発現レベルが高いことは、これらの所見と一致する。

30

40

【0005】

A β の二大変異体、1~42及び1~40を用いて、インビトロでの原線維形成を原子間力顕微鏡（AFM）で調べると、原線維形成の前に現れる準安定中間体が確認され、プロトフィブリルと名付けられた。J. Harperら、"原子間力顕微鏡検査による準安定A β プロトフィブリルの觀察(Observation of meta

50

stable AB protofibrils by atomic force microscopy) ”, Chem. and Biol. 4: 119 - 125 (1997) 参照。このような原線維前駆体の存在は、ADの素因のあるヒトの脳に観察されるびまん性のアミロイド沈着の説明となる。有毒中間体であるプロトフィブリルの存在は、A 原線維がADの病原物質であることに賛成意見と反対意見の両方が論じられた、インビトロ及びインビボにおけるいくつかの観察された不一致を説明すると思われる。神経変性疾患の原線維又は原線維形成種を検査したり、神経変性疾患の治療に適した薬物のスクリーニングをするための現存のアッセイは、コンゴレッド及びチオフラビンTアッセイであるが (Methods in Enzymology (酵素学における方法), Academic Press, 1999, Vol. 309, 274 - 287 ページ; 304 - 305 ページ)、通常、小凝集体やプロトフィブリルの検出はできない。具体的には、約100 µM未満の濃度の凝集体又は原線維形成種は検出できない。これは、初期の疾患の検出や、初期の疾患に使用するのに適した薬物のスクリーニングには不適切である。

10

20

30

40

50

【0006】

疾患の発症前の段階（小原線維又は小凝集体しか存在しない時期）に作用する候補薬があれば、プラーク/原線維形成の抑制及び有症疾患の予防により有効であろう。これを実現するためには、小さな原線維凝集体を効率よく検出する必要がある。しかしながら、このような凝集体は小さすぎてまずどの検出法でも検出できない。AFMを使えば検出できるが、この技術は臨床診断や薬物スクリーニングのプロトコルに不向きである。従って、現時点では、小さな原線維種に対して作用する薬物をスクリーニングすることはできない。そのうえ、原線維形成を任意の段階で抑制する薬物のスクリーニング法は非常に限られている。

【0007】

凝集体及び原線維形成速度は、神経ペプチド変異体又は転化プリオンペプチドのような変換された又は誤って折り畳まれたペプチド濃度の極度に非線形的な関数である（これらのペプチドは凝集体形成種又は原線維形成種である）。異常種の濃度が臨界濃度に達すると、反応速度が迅速に進行しすぎて薬物療法が及ばなくなる。従って、薬物がプラーク形成の阻害に有効であるためには、対症療法的というより予防療法的なものにして、早期の段階で作用させる必要がある。当該技術の現状は、小さな凝集体又は原線維を、並行薬物スクリーニング法や非侵襲的診断に適合するような様式で検出することはできない。このことは、1) 疾患の初期状態を治療する薬物を容易に確認できない；2) 発症前の患者を識別できない；そして、3) 現存する、又は将来的に確認されることになる潜在的候補薬の有効性を正確に評価できない、ことを意味する。

【0008】

コンゴレッド及びチオフラビンTなどを用いる現行技術の別の欠点は、アッセイの過程で機械的介入を必要とすることである。すなわち、アッセイの過程で液を一つの容器から別の容器に移し替えることなどが必要になるので、原線維形成を促進する非再現的アッセイを妨害する。そのうえ、コンゴレッド及びチオフラビン成分の添加は反応を停止させ、凝集プロセスを停止させてしまうので、溶液中での単一のアッセイで、いくつかの時点を取って観察することができない。

【0009】

神経変性疾患の診断で厄介な問題は、疾患に特徴的な凝集体又は原線維を形成できる種が非常に低濃度で存在することがあり、それでも検出できれば、疾患の発症を意味する濃度で存在しているという事実である。

【0010】

神経変性疾患の進行に関する情報はあがるが、神経変性疾患を検出するための簡便且つ安価で信頼できるアッセイを含む、診断及び薬物スクリーニング用の特異

的技術、神経変性疾患の治療のための候補薬のスクリーニング技術、並びに関連成分に対する需要がある。

【0011】

異常タンパク質凝集が関与する非神経変性疾患も多数ある。これに属する疾患は、記述したものにだけに制限されないが、以下の通りである。多発性骨髄腫では、抗体のL鎖が凝集して毒性を生じる。ワルデンストレームマクログロブリン血症は、抗体のH鎖の凝集を特徴とする疾患である。クリオグロブリンと呼ばれる種類のタンパク質は、低温で沈殿し、患部の血管の遮断を起こす。播種性血管内凝固(DIC)は、重症の全身感染又は自己免疫疾患患者の罹病及び死亡の主たる原因である。これはおそらく、疾患によってフィブリンが枯渇し、血液凝固が阻害されるためであろう。グランツマン血小板無力症は出血障害で、インテグリン IIb/3の欠乏による血小板の凝集異常を特徴とする¹。フィブロネクチンの凝集異常は、ヒトの遺伝性フィブロネクチン沈着系球体疾患の特徴である²。鎌状赤血球貧血は、4量体を形成せずに凝集してしまう変異ヘモグロビンによって発生する³。卒中の有毒因子として異常タンパク質凝集の関与も考えられている。

10

【0012】

特に重要なのは、II型糖尿病に関与する異常タンパク質凝集である。ヒトのランゲルハンス島アミロイドポリペプチド(hIAPP)は、II型真性糖尿病患者の膵臓のランゲルハンス島にみられるプラークの主成分である⁴。アミノ酸20~29がこの凝集の原因であることが示されている。hIAPPの凝集は時間の関数として非線形的に進行し、反応に予め形成された凝集体を“播種”することによって促進されうる。これはアルツハイマー病に特徴的な β -アミロイド凝集の場合と同様である。しかしながら、アルツハイマー病とは違ってhIAPPの凝集はペプチド濃度に無関係である。これを説明するために、凝集していないペプチドミセルモデルが提唱されている。本発明の方法を使用すれば、この凝集を阻害する薬物をスクリーニングすることができる。例えば、アミノ酸20~29を含有するhIAPPフラグメントをコロイドに付着させ、候補薬を含有する溶液に加える。凝集を阻害した薬物を含有した溶液は、凝集が色の変化で特徴づけられている間、ピンク色のままである。

20

30

【0013】

一方で、正常の凝集又は多量体化プロセスの喪失を特徴とする多くの病的状態もある。この活性を回復するための治療薬をスクリーニングする方法も有用であろう。血液凝固は、前駆体タンパク質のフィブリノゲンの産物であるタンパク質のフィブリンの凝集によって達成される。さらに、単量体では機能せず、機能するためには2量体又は4量体として存在しなければならないタンパク質もある。多くのタンパク質では、その生物学的機能は、それらの多量体化状態に決定的に依存している。本明細書中に記載の凝集アッセイは、多量体化(一種の凝集)を分断又は促進するいずれの分子のスクリーニングにも容易に適応できる。

【0014】

例えば、腫瘍抑制タンパク質p53は、細胞周期の停止及びアポトーシスの活性化を通じて細胞増殖を抑制するが、全ヒトがんの約50%で変異を起こしている。p53の複雑な機能の多くの側面は、それがどのような多量体化状態を取っているかで決まる。いくつかの研究から、発がんのためにはp53が4量体を形成する必要があることが分かっている⁶。そのDNA結合⁷及び転写活性に4量体化が必要なのである。p53の4量体化ドメインには核内から核外への輸送シグナル(NES)も含まれている⁸。p53の弱化には、核からのその搬出が必要と考えられている。4量体から2量体及び単量体へ変換されるとNESが露出する。増殖抑制因子であるc-Ab1は、p53が4量体である場合にのみ、そのC-末端に結合し、これがDNA結合を促進する⁹。p53の4量体化を刺激す

40

50

る、並びにそれを分断する分子の確認は治療上の価値があると考えられる。

発明の要旨

本発明は、神経変性疾患、異常凝集を特徴とする他の疾患、凝集を特徴とする非疾患性プロセスに関わる一連の組成物、アール、キット及び方法、並びに生体分子相互作用の一般的検出法を提供する。疾患の診断、並びに異常タンパク質凝集を特徴とする神経変性疾患及び非神経変性疾患の治療のための候補薬のスクリーニングのための技術及び成分を提供する。また、凝集が望ましい場合に凝集を促進するための候補組成物をスクリーニングする技術及び成分も提供する。当該技術は、簡便且つ極めて高感度で、容易に入手できる成分を利用するものである。本発明の技術及び成分は、既存の技術や、神経変性疾患及び他の疾患を治療するための薬物のスクリーニングで、これまで検出が困難又は不可能な、例えば1~200nmの長さの、通常非常に小さい凝集体形成種又は原線維形成種を非常に高感度に検出することができる。

10

【0015】

本発明の重要な一態様は、神経変性疾患以外の疾患及び非疾患性プロセスに関わる組成物、アール、キット及び方法も包含するので、本明細書に記載のすべての開示内容は、非神経変性疾患及び非疾患性プロセスにも適用されると理解されるべきである。

【0016】

そこで、本発明は、これらの疾患の早期に特徴的な凝集体又はプロトフィブリルを検出及びモニタする能力の提供を意図している。本発明は、また、推定候補薬による治療に反応する凝集体形成速度を調べる能力を提供することも意図している。

20

【0017】

本発明は、神経変性疾患及び他のタンパク質凝集疾患並びに非疾患性プロセスの表現型に關与するペプチド配列のスクリーニングに使用できる凝集体及び原線維の検出法を提供する。一技術において、選択したペプチド配列を合成し、粒子に固定するか又は固定されるように適応し、そして本発明のアッセイにかける。これらのアッセイで、ペプチド配列が凝集プロセスに参加している可能性を示す粒子の凝集が起こっているか、又は本明細書中に記載のような粒子の關与する他の結合であるかを調べることができる。別の技術では、ランダムなペプチド配列を遺伝子工学的にファージに組み込み、これを粒子に結合させて、本発明のアッセイに参加させることができる。本発明の方法は、原線維及びペプチド凝集体を検出するためのものである。これらの疾患の診断に使用することができる。なぜならば、これらの凝集体は、脳脊髄液(CSF)中を循環していることが示されており、また容易に試料採取できる他の体液中にも循環していると考えられているからである。

30

【0018】

一実施の形態において、本発明は、伝達性海綿状脳症を含む神経変性疾患のような凝集体プロセスの特徴である凝集体、原線維、及びプロトフィブリル(又は凝集体形成種)の存在について、生物学的試料を迅速且つ高感度に分析できる検出系を意図している。一態様において、本発明は、疾患性もしくは非疾患性の凝集体プロセスの検出又は薬物スクリーニングに使用できる一連のキットを提供する。一実施の形態において、キットは、表面を有する第一のアールと、表面を有する第二のアールと、複数の結合種とを含み、前記結合種の少なくとも一部は、前記第一のアールの表面に対して固定されているか又は固定されるように適応され、前記結合種の少なくとも一部は、前記第二のアールの表面に対して固定されるか又は固定されるように適応されている。結合種は凝集体形成種を結合することができる。以下の詳細な説明で明らかになるように、本実施の形態では様々な組合せのアールを使用することができる。各ア

40

50

ーティクルは、液に懸濁可能な、単離可能なアーティクルでありうるが、それぞれがコロイド粒子であったり、一方がコロイド粒子で、他方が磁気ビーズなどであったり、一方のアーティクルが電極、表面プラズモン共鳴（SPR）チップ、又は他の肉眼で見えるアーティクルなどの大きなアーティクルの表面で、他方のアーティクルが前述のような液に懸濁可能な粒子であったりする。

【0019】

本発明の別のキットは、表面を有するアーティクル（様々なアーティクルを意図している）と、複数の結合種とを含み、前記結合種の少なくとも一部は前記表面に対して固定されているか又は固定されるように適応されている。表面は、本明細書中に記載のような任意の表面であってよく、凝集体形成種又は原線維又は凝集体の表面への結合を示すことができるシグナリング実体(signaling entity)を組み合わせて含むこともできる。一実施の形態において、表面は、表面に対して固定されていない又は固定されるように適応されていない結合種、又は凝集体形成種もしくは原線維形成種の特異的結合を実質的に阻害する化学官能性を有する。本実施の形態は、特に高感度な検出技術を可能にする。

10

【0020】

本発明の多くのキット、アッセイなどの記述中、多くの種が別の種又は成分に対して固定できることが記載されている。一つの種又は成分が他の種又は成分に対して固定できる場合、他の実施の形態においてもこれらの種又は成分は相互に固定できると理解されるべきである。

20

【0021】

本発明の別のキットは、表面を有するアーティクルと、前記表面に対して固定されているか又は固定されるように適応されている複数の結合種を含む。本実施の形態においては、該アーティクルは具体的にはSPR成分ではない。本実施の形態により、非常に高感度の非SPR分析、例えば疾患試料又は薬物活性の電子分析が可能になる。

【0022】

別の態様において、本発明は、本発明の様々なキット及び方法と組み合わせて使用できる一連の成分、系、及びアーティクルを提供する。本発明の一つのアーティクルは、結合種を固定する表面を含む。シグナリングエレメントも該アーティクルの表面に固定される。本発明の組成物は、結合種と、結合種に対して固定されたシグナリング実体とを含む。本発明の別の組成物は、金属に配位できる部分に固定された結合種を含む。

30

【0023】

本発明の一つの系は、神経変性疾患の原線維又は凝集体に対して固定された少なくとも2個の粒子を含む。本発明の別の系は、任意の供給源の原線維又は凝集体に対して固定された少なくとも2個の粒子を含む。本発明の別の系は、凝集体形成種に対して固定された少なくとも2個の粒子を含む。これらの系は、典型的には、疾患状態又は前疾患状態の検出、あるいは候補薬物のスクリーニング混合物のために設計されたアッセイの結果である。

40

【0024】

別の態様において、本発明は一連の方法を提供する。一つの方法は、表面を有するアーティクルと、前記表面に対して固定された又は固定されるように適応された、凝集体形成種を結合できる複数の結合種とを提供することを含む。該表面は、凝集体形成種を含有している、又は含有していると考えられる試料に曝露される。場合により、該表面は、試料中に存在する疾患の凝集体形成種と表面に対して固定された又は固定されるように適応された結合種との結合を信号で知らせるように構築及び配置されたシグナリング実体にも曝露される。

【0025】

別の方法は、アーティクルの表面に対して固定された又は固定されるように適

50

応された結合種を提供すること、そして前記結合種を、神経変性疾患の凝集体形成種でない状態から、凝集体形成種である状態に変換することを含む。当該方法は、以下の詳細な説明で明らかになるように、非常に高感度のアッセイで重要な役割を果たす。

【0026】

別の実施の形態において、本発明の方法は、結合種を神経変性疾患の凝集体形成種と相互作用させることにより、神経変性疾患の凝集体形成種に変換することを含む。変換された種は、以後、神経変性疾患の凝集体形成種又は原線維形成種の存在に特徴的な凝集に参加する。次にこの凝集を検出する。当該方法も、疾患状態又は前疾患状態のスクリーニングの感度を著しく向上させる。

10

【0027】

別の実施の形態において、本発明の提供する方法は、当該目的に限定するつもりはないが、薬物スクリーニングに使用することができ、その分野に顕著な進歩をもたらす。当該方法は、アーティクルの表面に対して固定された又は固定されるように適応された結合種を提供し、場合により（当初固定されていない場合）、結合種を表面に対して固定させ、そして該結合種を凝集体形成種と結合させることを含む。この結合は、結合種を表面に固定させる前後に生じ、結合種は、結合中に凝集体形成種に変換されてもされなくてもよい。第二のアーティクルの表面に対して固定された又は固定されるように適応された第二の結合種を、凝集体形成種に結合させる。第二の結合種の凝集体形成種への結合は、本方法による他のステップとの関係で適切な任意の時点で生じうる。

20

【0028】

本発明の別の方法は、表面を有するアーティクルと、前記表面に対して固定された又は固定されるように適応された複数の結合種とを含む。アーティクルの表面は、神経変性疾患の凝集体形成種又は原線維形成種を含有していると考えられる別の供給源由来の試料に曝露される。本方法は、様々な個々の技術に利用できる。例えば、明らかにされるように、試料中の疾患状態の検出などである。

【0029】

本発明の別の方法は、凝集体形成種を含有する試料中にまず凝集体を形成させることを含む。凝集体は、アーティクルの表面に対して固定された又は固定されるように適応された複数の結合種を含むアーティクルに曝露される。該結合種は、凝集体又は凝集体形成種を結合することができる。

30

【0030】

別の態様において、本発明は、候補薬の、疾患抑制に対する有効性を判定する技術も提供する。該技術は、疾患の凝集体形成種を産生できる細胞を候補薬に曝露し、細胞から産生された物質、例えば細胞から分泌された物質の凝集ポテンシャルを判定することを含む。細胞は、該種を天然に産生できるものであるか、又は該種を産生できるようにトランスフェクトされたものであるか、又は公知技術によって該種を産生できるように誘導可能である。細胞は、例えばアミロイド前駆体タンパク質（APP）由来のA β 原線維形成種のプラスミドを細胞にトランスフェクトすることによって、凝集体形成種を産生するように適応できる。細胞の産生した物質の、疾患に特徴的な凝集に対するポテンシャルは、細胞を候補薬に曝露した後、細胞環境を本発明の任意のアッセイ、例えば凝集体形成種の存在を示すコロイド凝集を呈するように設計されたアッセイに曝露することによってモニタできる。凝集体形成種を産生する、又は産生する能力を有する細胞は、凝集体形成種分泌能を有する必要はない。その代わりに、凝集体形成種を細胞内に産生する又は保持する細胞は、コロイド添加の前に溶解することができる。本発明の本態様は、神経変性疾患を含む凝集の関与する任意の疾患プロセスに適用可能である。

40

【0031】

50

本発明の別の態様は、表面に自己集合単層を形成させる一連の方法、及びSAMで被覆された表面を有するアーティクルである。一組の好適な実施の形態では、完全に合成分子で形成されたSAMが表面又は表面領域を完全に被覆する。例えばコロイド粒子の表面を完全に被覆する。本文脈における“完全に被覆する”とは、SAMによる完全な直接被覆を妨害するタンパク質、抗体、又は他の種に直接接触する表面の部分又は領域がないことを意味する。すなわち、該表面又は領域は、全体的に、完全に非天然分子（すなわち合成分子）からなるSAMを含む。SAMは、表面に密集したSAMを形成するSAM形成種、これらの種と組み合わせ、SAM全体の電子伝達を促進できる分子ワイヤ又は他の種（SAMに参加可能な欠陥促進種を含む）、SAMに参加可能な他の種、及びこれらの任意の組合せから完全に形成できる。好ましくは、SAMに参加するすべての種は、表面に結合する、場合により共有結合する官能性を含む。好適な実施の形態において、自己集合単層は金コロイド上に形成される。自己集合単層は、コロイド上に形成されるにせよ別の表面上に形成されるにせよ、（金が表面の場合）チオール種の混合物で構成できる。前記チオール種は、非特異的吸着に抵抗性のあるトリエチレングリコール末端チオール、及び末端に親和性標識の結合パートナーを持つチオール、例えば末端に金属を配位できるニトリロ三酢酸のようなキレート（これは、ニッケル原子と錯体化するとヒスチジン標識された結合種を捕捉する）を持つチオールを含む。好適な実施の形態において、結合種は、容易に自己凝集できる - アミロイドペプチドである。本発明は、コロイド表面に提示されたヒスチジン標識ペプチドの濃度を厳密に制御する方法を提供する。各コロイド粒子上のペプチド密度に対するこのような厳密な制御がなければ、互いに固定されたペプチドは相互に容易に凝集し、試料中に存在する凝集体形成種がなくても、コロイド - コロイド凝集を触媒する微小 - 疎水性 - ドメインを形成するであろう。これは、既存のコロイド降着アッセイに優る本発明の利点である。

10

20

【0032】

本発明で記述している方法によって、タンパク質遮断ステップがなくても、例えばBSAで遮断しなくても、非特異的吸着に抵抗性のある自己集合単層がコロイド上に製造される。また、本明細書中に記載の方法によって、生物学的関連液中で安定で、結合反応を妨害する洗浄剤（安定性のため；コロイドを懸濁状態に維持する）を必要としない誘導体化コロイドも製造される。これにより、高感度の結合アッセイを溶液中で実施することが可能になる。これにより、既存のコロイド膠着アッセイでよく行われる吸着性表面に結合パートナーを付着させる必要がなくなる。以下に解説の通り、洗浄剤はコロイド上にSAMを形成させるのに都合よく使用できる。この場合、洗浄剤は、SAM形成後に除去できる、及び好ましくは除去され、コロイドの結合相互作用中もしくは他の使用中、コロイド上、SAM中、または何処にももはや存在しない。

30

【0033】

これらの方法は、本発明の他の態様と組み合わせて使用できる単層被覆アーティクルの形成に使用できる。一つの方法は、表面に自己集合単層を形成することを含む。すなわち、該表面を自己集合単層形成分子種及び界面活性剤を含有する媒体に曝露する。別の方法では、表面を、自己集合単層形成分子種及びカルボキシレートを含む媒体に曝露する。さらに別の方法では、界面活性剤とカルボキシレートを媒体中に一緒に含めることもできる。本発明の本態様に従って自己集合単層を種の上に付着させるのに使用できる界面活性剤は、本質的に任意の各種界面活性剤を含む。自己集合単層の形成を補助するのに使用するカルボキシレートは、好ましくはクエン酸ナトリウムを含むカルボン酸塩を含む。

40

【0034】

自己集合単層形成のための別の方法は、コロイド粒子の表面上に自己集合単層を形成することを含む。この形成は、コロイド粒子自体の形成中には発生しない

50

。例えば、単層は、予め完全に形成されたコロイド粒子上に形成できる。別の方法において、自己集合単層は、液に懸濁しているコロイド粒子の表面に形成される。この場合、粒子はいかなる液 - 液界面にも存在しない。

【 0 0 3 5 】

本発明の各種態様のさらに具体的な例において、凝集体（ブランク及び原線維を含む）に組み込み又は結合可能なペプチド又は他の結合種は、シグナリング部分で修飾した後、疾患関連のペプチドもしくはタンパク質凝集体 / 原線維、又は凝集体形成を誘発できる因子を含有する生物学的試料と混合する。本文脈中で“結合する”という場合、任意の疎水性、非特異的、又は特異的（例えば抗体の場合）相互作用を含み得る。“組み込む”とは、好ましくは、天然の凝集体又は原線維形成プロセスを妨げたり、歪めたりすることなく、凝集体又は原線維の一部になることを意味する。凝集体に組み込み可能で、感知表面に差別的に引き寄せられ得る誘引部分（例えば、磁気ビーズ又はデンドリマーのような磁気もしくは電磁気粒子）で修飾された他の種も同じ試料に混合される。適切なインキュベーション期間を経て、試料溶液を、誘引可能なペプチドを検出装置に差別的に引き寄せる条件に曝露する。シグナリング部分及び誘引可能部分を予め存在している凝集体に組み込むことは、高感度且つ効率的な凝集体の標識法を提供する。次いでそれらを検出領域に集中させる。

10

【 0 0 3 6 】

シグナリング種及び誘引種に付着した結合種の配列は、それらが既存の凝集体に容易に組み込まれ得るように、ただし予め存在する凝集体がない場合は容易に凝集しないように選ぶことができる。ペプチドは、標識されたデンドリマー又はポリマーへの直接化学結合による付着によって、シグナリング部分に連結できる。あるいは、ペプチドは、結合種とシグナリング基の両方を同時に提示するコロイドなどの粒子様物質との会合によってシグナリング部分に連結してもよい。さらに、凝集体形成に参加可能なバージョンの種を、溶液中に遊離状態で加え（標識又は非標識）、凝集プロセスを加速させる、従って増幅剤として作用させることもできる。

20

【 0 0 3 7 】

結合種は、例えばペプチドを磁気ポリマーに付着させるような直接的な化学付着によって誘引部分に連結できる。誘引部分は電磁場又は静置磁石によって検出領域に誘引可能である。さらに、結合種は、例えばタンパク質 A - 被覆磁気ビーズ（抗体に結合するタンパク質 A の部分を含む表面官能性を提示する）、又は荷電粒子との会合によって誘引部分に間接的に連結することもできる。誘引部分は感知領域又は表面に差別的に引き寄せ可能である。結合種は、直接的な化学結合又は粒子様物質との会合によっても誘引部分に連結可能である。誘引部分は、親和性標識（例えばヒスチジン標識）に連結されたペプチドのような生物学的認識単位によって誘引可能である。次に、これがニトリロ三酢酸（NTA）のような表面結合キレートによって配位された金属に結合する。キレートは表面の自己集合単層（SAM）の一部として表面に固定できる。結合種又は他の任意の種は、Biometra から市販されているストレプト (Strept) 標識を使用して表面に連結させることもできる。ストレプト標識は、チオールなどの自己集合単層形成種に付着させてある。自己集合単層の一部を形成しているストレプトアビジン (Streptavidin) 標識は、ビオチン修飾結合種のようなビオチン修飾部分に容易に固定される。結合種は、以下でさらに十分に説明するように、他の方法によっても表面に連結できる。

30

40

【 0 0 3 8 】

本発明の別の態様は、ヒト又は動物患者における神経変性疾患又は他のタンパク質凝集疾患などの凝集が関与する状態、又は凝集の増強が望ましい状態の治療のための候補薬の有効性を判定することに関する。一つの方法は、凝集関連疾患

50

の危険性がある、又は疾患の治療が適応される（例えば疾患の症状がある、又は疾患を示す生理学的特徴の検査が陽性である）ヒト又は動物患者に疾患治療のための候補薬を投与することを含む。次に、患者から試料を採取し、神経変性疾患又は他の凝集状態の抑制又は治療における候補薬の有効性を示すアッセイにかけられる。具体的には、該試料を、試料の凝集ポテンシャルを示すアッセイに曝露すればよい。試料の凝集ポテンシャルを示す好適なアッセイは、本要旨中及び以下の詳細な説明中に記載のアッセイを含む。例えば、患者から採取した試料を、第一の表面を有するアーティクルと、表面に固定されるか又は固定されるように適応された、凝集体形成種を結合できる複数の結合種とを含む構成に曝露できる。結合種と、患者から採取した試料中に存在する凝集体形成種、又は原線維もしくは凝集体との相互作用を測定する。あるいは、ヒト又は動物に候補薬を投与し、患者から試料を採取し、凝集の増強が望ましい場合、凝集を増強する候補薬の有効性を示すアッセイに曝露することもできる。

10

【0039】

本発明の別の態様は、神経変性疾患又は他のタンパク質凝集疾患に付随する新規なポリアミノ酸標識種、例えばヒスチジン標識種に関する。一実施の形態において、本発明は、ポリアミノ酸標識 - アミロイドペプチド 1 ~ 38、1 ~ 39、1 ~ 40、1 ~ 41、又は 1 ~ 42 を提供する。このうちペプチド 1 ~ 40 及び 1 ~ 24 が好適である。

20

【0040】

本発明の別の態様は、第一の試料を第二の試料に曝露し、凝集プロセスに関する第一の試料の傾向に影響を及ぼす第二の試料の能力を測定する方法に関する。第一の試料は、凝集体形成種又は凝集体形成種の前駆体を含有しているか含有していると考えられている、又は凝集体形成種を産生できるか産生可能と考えられている。あるいは、第一の試料は、凝集体形成種の前駆体を産生できる又は産生可能と考えられている。第二の試料は、第一の試料の凝集プロセスへの関与傾向に影響を及ぼす能力を有していると考えられている。凝集体形成種の前駆体は、切断されるか翻訳後修飾されて凝集体形成種を形成する親タンパク質であり得るか、又は凝集体形成種もしくは親タンパク質をコードする核酸である。凝集体形成種又はその前駆体は、細胞由来であり得る（例えば細胞からの分泌物、細胞溶解産物、又はそのフラクション）。第二の試料は、凝集体形成種でなく、凝集体形成種の前駆体でもない。第二の試料は、任意のタンパク質、ペプチド、核酸、酵素であり、これらはいずれも、場合により細胞から誘導された、天然又は合成又はクローン化物である。第二の試料は、細胞から誘導された他の任意の物質であってもよい。第二の試料は、場合により細胞から誘導された小分子であってもよい。

30

【0041】

本発明の別の態様は、コロイド粒子、好ましくは金コロイド粒子上の自己集合単層に関する。この場合、該自己集合単層は、ビオチンに連結される何らかの種を含む。好ましくは、曝露される末端にいくつか（例えば3個）のエチレングリコール単位を含む長鎖アルキル（例えばC11）を含む混合自己集合単層を金コロイド粒子上に形成する。この曝露末端がビオチンに共有結合する。混合自己集合単層は、この種と、不活性種又は非特異的結合阻害種、例えばCOOH-末端チオール、PEG-末端チオールなどを含みうる。本発明の本態様による混合自己集合単層は、約0.01~約50%のビオチン、更に好ましくは約0.05~約20%、さらに好ましくは約0.1~約5%のビオチン含有SAM形成種を含みうる。このような混合SAMを持つコロイドは、以下に記載のSAM被覆コロイドと同じように製造できる。ビオチンを提示するSAM形成種は、日常的有機合成技術を用いて形成できる。

40

【0042】

50

結合相互作用が関与する好適な実施の形態では、結合の測定または形成は、液媒体中の表面（例えば懸濁状態の粒子）に対して固定されている種の関与の下、吸収表面に対して液を移動させるような毛管液作用又は他の液/表面誘引相互作用（このような作用は生理的試料を使用する様々な公知アッセイ及び/又は他のコロイド膠着アッセイではよく見かける）のない状態で行われる。すなわち、好ましくは、静止した液中で、又は動いたとしても表面吸収による移動や流れの中で結合を生じさせる、又は結合を測定する。

【0043】

本発明の他の利点、新規特徴、及び目的は、添付の図面と合わせて考慮するとき、以下の本発明の詳細な説明から明らかになるであろう。図面は概略図であり、正確な縮尺率で描かれたものではない。図中、様々な図に示されているそれぞれ同一又はほぼ同一の成分は一つの数字で表してある。平明化のために、すべての図に全成分が標識されているわけでも、本発明を当業者に理解してもらう上で図面が不要な箇所では本発明の各実施の形態の全成分が表示されているわけでもない。

10

【0044】

国際特許出願番号 PCT/US00/01997、出願日2000年1月25日、発明者 B a m d a d ら、発明の名称 “ 神経変性疾患における異常タンパク質凝集の迅速且つ高感度の検出 (Rapid and Sensitive Detection of Aberrant Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases) ” (公開番号及び公開日 W O 0 0 / 4 3 7 9 1、2000年7月27日) ; 国際特許出願番号 PCT/US00/01504、出願日2000年1月21日、発明者 B a m d a d ら、発明の名称 “ コロイド固定種と非コロイド構造上の種との相互作用 (Interaction of Colloid-Immobilized Species with Species on Non-Colloidal Structures) ” (公開番号及び公開日 W O 0 0 / 3 4 7 8 3、2000年7月27日) ; 同一出願人による係属中の米国特許出願第 0 9 / 6 0 2 , 7 7 8 号、出願日2000年6月23日、発明者 B a m d a d ら、発明の名称 “ コロイド固定種と非コロイド構造上の種との相互作用 (Interaction of Colloid-Immobilized Species with Species on Non-Colloidal Structures) ” ; 及び同一出願人による係属中の米国特許出願第 0 9 / 6 3 1 , 8 1 8 号、出願日2000年8月3日、発明者 B a m d a d ら、発明の名称 “ タンパク質凝集の迅速且つ高感度の検出 (Rapid and Sensitive Detection of Protein Aggregation) ” は、いずれも本願に引用して援用する。

20

30

定義

本明細書中で使用している “ 小分子 ” は、5キロドルトン未満、より典型的には1キロドルトン未満の分子を意味する。本明細書中で使用している “ 小分子 ” からタンパク質は除外される。

【0045】

“ 凝集体 ” という用語は、相同分子の複合体（例えば原線維）、並びに分子混合物（例えば、凝集体形成を促進する結合パートナー、ペプチド、タンパク質、核酸又はこれらの複合体などの相互作用分子、特異的相互作用によって特徴づけられる複合体を含む）のことである。“ 凝集体 ” は、神経変性疾患及び他の疾患のような疾患状態、並びに非疾患状態に付随しうる。神経変性疾患に付随する凝集体は、典型的には、神経変性疾患に特徴的な、そして神経変性疾患に付随する、すなわちその原因となるもつれ又はプラークなどのタンパク質分子の凝集を含む。神経変性疾患の凝集体は、典型的には相同分子の複合体であるが、混合物を含むこともある。非神経変性疾患の凝集体は、神経変性疾患の凝集体に類似した凝集体が関与するII型糖尿病、鎌状赤血球貧血に伴う凝集体、並びにL鎖又はH鎖 I g G 凝集が関与する骨髄腫のような他の非神経変性疾患の凝集体を含む。疾患に関係しない凝集体は、例えば血液凝固に伴う凝集体（フィブリノゲン、プラ

40

50

スミノゲン凝集体、及び関連因子)、P53凝集体のような腫瘍抑制物質として作用する凝集体などを含む。当業者であれば、凝集体が、神経変性疾患、非神経変性疾患、及び非疾患性の生理的プロセスに関係することは理解するであろう。これらの各プロセスに関係する凝集体は、当業者には相互に区別可能である。本明細書中で使用している“凝集体”は、原線維を包含する。すべての原線維は凝集体であるが、必ずしもすべての凝集体が原線維というわけではない。本発明の凝集体は、典型的には、(コロイド相互作用のために)眼で、顕微鏡下で、光散乱によって、又は色変化によって視覚化可能である。

【0046】

“凝集体”は、本明細書中に記載の疾患及び非疾患プロセスに関与する分子又はフラグメントの集合のことであるが、原線維は、ある種の疾患プロセスに関与する凝集体の一種であることは理解されるべきである。本明細書中で“原線維”が記述されている場合、それらは凝集体であると理解されるべきである。

10

【0047】

“凝集体を見えるようにする”という句は、見えない凝集体を目に見えるようにする、顕微鏡下で見えるようにする、又は吸光度によって見えるようにする技術のことを言う。特異的な吸収特性を有する金コロイドのような粒子、発色実体を持つ粒子などを凝集体に付着させる又はそのような粒子で凝集体を装飾するなど、さまざまな方法が考えられるが、それらに限定されない。

【0048】

本明細書中で使用している“候補薬”という用語は、ヒト、動物、又は植物に使用される任意の医薬物質のことである。この定義に包含されるのは、化合物類似体、天然、合成及び組換え医薬品、ホルモン、抗菌物質、神経伝達物質などである。これは、神経変性疾患、又は異常凝集を特徴とする他の疾患の治療又はそれらの予防のために、薬物としての使用について評価されることになる任意の物質又は前駆体(天然、合成、又は組換えを問わず)を含む。評価は、典型的には、本発明のスクリーニングアッセイのようなアッセイにおける活性を通して実施される。

20

【0049】

本発明には様々な種類の粒子が使用できる。例えば、“液に懸濁可能な粒子”は、本発明の目的のためにそれが使用される液(典型的には水溶液)中で、自力で懸濁状態を維持できる粒子、又は磁場、電磁場の印加や、攪拌、振盪、振動、音波処理、遠心分離、渦流などのかき混ぜの適用によって溶液中に維持されうる粒子を意味する。“磁氣的に懸濁可能な”粒子は、磁場の印加によって液中で懸濁状態を維持できる粒子である。電磁氣的に懸濁可能な粒子は、電磁場の印加によって液中で懸濁状態を維持できる粒子である(例えば電荷を持つ粒子、又は電荷を持つように修飾される粒子)。“自己懸濁可能な粒子”は、それが使用される液(典型的には水溶液)中で少なくとも1時間、例えば磁場の補助なしに懸濁状態を保てるほど十分に小さいサイズ及び/又は質量の粒子である。その他の自己懸濁可能粒子は、本発明に従って、補助なしで5時間、1日間、1週間、又はさらには1ヶ月間も懸濁状態を保つであろう。

30

40

【0050】

本明細書中で使用している“凝集体形成種を結合できる結合種”は、タンパク質、ペプチド、いずれかの配列、抗体、コンゴレッド、チオフラビン-T、又はすでに述べたような結合が可能な任意の種のような任意の種を含む。ある場合には、この結合は抗体又はP53の場合のように部位特異的なこともある。別の場合には非特異的なこともある。タンパク質又はペプチドの場合、結合は、典型的には非特異的疎水的相互作用を含む。神経変性疾患の場合、典型的にはシートのシート相互作用が関与する。結合種も、天然の疾患凝集体形成種と相同のペプチド、フラグメント、又は全タンパク質を含みうる。

50

【0051】

“タンパク質”及び“ペプチド”は、当該技術分野では周知の用語であるが、各々が含むアミノ酸の数に関して当該技術分野では正確に定義されていない。本明細書中で使用しているこれらの用語には、当該技術分野における通常の意味が付与される。一般的に、ペプチドは長さ約100個未満のアミノ酸配列であるが、300個までの配列を含みうる。タンパク質は、一般的に少なくとも100個のアミノ酸分子とされている。

【0052】

本明細書中で使用している“金属結合標識”は、キレートに配位されている金属に固定されうる分子群のことを言う。適切なそのような分子群は、典型的には約2～約10個のアミノ酸残基を有するアミノ酸配列を含む。これに含まれるのはヒスチジン及びシステインであるが(“ポリアミノ酸標識”)、これらに限定されない。そのような結合標識は、ヒスチジンを含む場合、“ポリヒスチジントラクト(tract)”又は“ヒスチジン標識”又は“HIS-標識”と呼ぶことができ、ペプチド又はタンパク質又は核酸のアミノ末端もしくはカルボキシ末端のいずれか、又は任意の曝露領域に存在しうる。本発明での使用には、6～10個の残基のポリヒスチジントラクトが好適である。ポリヒスチジントラクトは、機能的に、問題のタンパク質に付加されたいくつかの連続したヒスチジン残基という定義もされる。これにより、得られたタンパク質の金属キレートカラムでの親和精製や、別の分子(例えば、HIS-標識に反応する抗体)との相互作用を通じてタンパク質末端の識別が可能になる。

10

20

【0053】

“親和性標識”という用語には、当該技術分野における通常の意味が付与される。親和性標識は、例えば、金属結合標識、GST(GST/グルタチオン結合クリップにおける)、及びストレプトアビジン(ビオチン/ストレプトアビジン結合における)などである。本明細書中の様々な箇所で、特異的な親和性標識が結合相互作用との関係で記述されている。本発明は、親和性標識を使用するすべての実施の形態において、本明細書中に記載のいずれかの親和性標識の選択をそれぞれ必要とする個々の実施の形態の連続を含むことを理解すべきである。

30

【0054】

本明細書中で使用している“金属に配位しているキレート”又はキレートによって配位されている金属とは、キレート剤によって配位された金属のことであるが、キレート剤は金属上のすべての利用可能な配位部位を満たさず、金属結合標識による結合が利用できる配位部位をいくつか残している。

【0055】

“シグナリング実体(signaling entity)”は、特定の試料中で、又は特定の位置でその存在を示すことができる実体のことである。本発明のシグナリング実体は、ヒトの肉眼で識別可能なもの、孤立状態では見えないかもしれないが、十分な量であればヒトの肉眼で検出可能であり得るもの(例えばコロイド粒子)、視覚的(肉眼又は電子顕微鏡などを含む顕微鏡を用いて)又は分光学的に容易に検出できるようなレベル又は波長内で電磁放射線を吸収又は放出するもの、適当な活性エネルギーに曝露されると特徴的な酸化/還元パターンを示すレドックス活性分子のように電子的又は電気化学的に検出できるもの(“電子シグナリング実体”)などであり得る。例えば、染料、顔料、レドックス活性分子のような電気活性分子、蛍光部分(本明細書における定義により、リン光部分も含む)、アップレギュレーティングリン光体、化学発光実体、電気化学発光実体、又は西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼなど酵素に連結したシグナリング実体などである。“シグナリング実体の前駆体”は、それ自体はシグナリング能力を持たないが、別の種との化学的、電気化学的、電氣的、磁氣的、又は物理的相互作用により、シグナリング実体となる実体である。一例として、別の分

40

50

子との化学相互作用があった場合にのみ、特定の検出可能な波長内で放射線を出す能力を有する発色団が挙げられる。シグナリング実体の前駆体は、本明細書中で使用している“シグナリング実体”とは識別可能であるが、その定義内に含まれる。

【0056】

別の種又はアーティクル表面に対する種との関連で本明細書中で使用している“固定されている又は固定されるように適応されている”とは、該種が、共有結合、特定の生物学的結合（例えばビオチン/ストレプトアビジン）、キレート/金属結合のような配位結合、などを介して化学的又は生化学的に連結されていることを意味する。例えば、本文脈で“固定されている”というときには、複数の化学的連結、複数の化学/生物学的連結などが含まれる。例えば、ポリスチレンビーズ上で合成されたペプチドのような結合種、ビーズに共有結合しているタンパク質Aのようなタンパク質に結合している抗体に特異的生物学的に結合している結合種、表面に共有結合的に固定されている結合パートナーに特異的生物学的に結合しているGST又はファージのような分子の一部を形成している（遺伝子工学によって）結合種（例えばGSTの場合のグルタチオン）などであるが、これらに限定されない。別の例として、チオールは金と共有結合するので、チオールに共有結合している部分は、金表面に固定されるように適応されている。同様に、金属結合標識をもつ種も、表面に共有結合した分子（チオール/金結合など）を保持する表面に固定されるように適応されている。この分子は金属に配位しているキレートも表す。また、表面が特定のヌクレオチド配列を有し、種が相補的ヌクレオチド配列を含んでいれば、その種は表面に固定されるように適応されている。

10

20

【0057】

“共有結合的に固定されている”とは、一つ以上の共有結合を介して固定されていることにほかならない。例えば、金表面に固定されているカルボキシレート提示アルキルチオールにEDC/NHS化学を介して共有結合している種は、該表面に共有結合的に固定されている。

【0058】

“特異的に固定されている”又は“特異的に固定されるように適応されている”とは、種が、“固定されている又は固定されるように適応されている”という定義に関して前述したように、別の検体又は表面に化学的又は生化学的に連結されていることを意味するが、すべての非特異的結合は除外される。

30

【0059】

本明細書中で使用している“非特異的結合”は、生化学の分野における通常の意味を与えられる。

本明細書中で使用している“コロイド”は、ナノ粒子、すなわち無機、ポリマー及び金属粒子などの非常に小さい自己懸濁可能な粒子を意味する。典型的には、コロイド粒子は、どの次元の断面も250nm未満、さらに典型的にはどの次元の断面も100nm未満、好ましくは10~30nmで、金属、非金属、結晶質又は非晶質であり得る。本明細書中で使用しているように、この用語は生化学の分野で普通に使用されている定義を含み、典型的には金のコロイド粒子を意味する。

40

【0060】

本明細書中で使用している“金属に配位できる部分”とは、金属原子上の少なくとも二つの配位部位を占めることができる、金属結合標識又はキレートのような任意の分子を意味する。

【0061】

本明細書中で使用している、別の成分“に対して固定された”成分は、例えば、該別の成分も固定されている第三の成分に固定されることによって、又はそう

50

でなければ他の成分と移行的に会合することによって、他の成分に固定されているか、又は他の成分に間接的に固定されている、のいずれかである。例えば、シグナリング実体が、結合種に固定されている、結合種が固定されているコロイド粒子に固定されている、結合種が固定されているデンドリマー又はポリマーに固定されている、などであれば、シグナリング実体は結合種に対して固定されることになる。第一のコロイド粒子表面に固定されている種が実体に付着しており、第二のコロイド粒子表面上の種が同じ物質に付着していれば、コロイド粒子は別のコロイド粒子に対して固定されている。このとき、実体は、単一の実体、複数種の複合実体、細胞、別の粒子などであってよい。

【0062】

本明細書中で使用している“凝集体形成種”は、前述の定義のような凝集体の関与する疾患又は非疾患プロセスに付随する生物学的種のこと、疾患又は非疾患プロセスに付随する他の分子（類似分子を含む）に結合して該プロセスに特徴的な原線維又は凝集体を形成するに足る結合能力を有する。神経変性疾患のような一部の疾患プロセスでは、このような凝集体形成種は、典型的には、配列相同の健全な対応物に比べて分子の立体配座における変化を特徴とするので、類似分子にいっそう結合しやすくなる。神経変性疾患、II型糖尿病、骨髄腫のような場合、このような凝集体形成種は、結合種を、凝集体を形成しない立体配座から凝集体を形成する配座に変換する能力を有する。神経変性疾患の凝集体形成種から形成されたプロトフィブリルは、神経変性疾患に関連する凝集体の前駆体又はその初期形態であると報告されている。プロトフィブリルは、本明細書中で使用している凝集体形成種の定義に含まれる。“凝集体”の用語と同様、当業者であれば、“凝集体形成種”の用語の意味は、神経変性疾患の凝集体形成種、非神経性疾患の凝集体形成種、及び非疾患性の凝集体形成種に適用されることは理解されよう。

【0063】

“異なる生物学的種”とは、マウスとハムスター、マウスとヤギなどのような異なる動物を意味する。

“試料”という用語は、任意の細胞、組織、又は生物源由来の液（“生物学的試料”）、又は本発明に従って有益に評価されうる生物学的又は非生物学的なその他の任意の媒体のことである。例えば、ヒト患者から採取した生物学的試料、動物から採取した試料、ヒトが消費するように設計された食品から採取した試料、家畜飼料などの動物消費用に設計された食品などの試料、乳、臓器提供試料、血液供給用の血液試料、水道から採取した試料などであるが、これらに限定されない。試料の一例は、薬物の効力を測定するために候補薬を投与されたヒト又は動物から採取した試料である。

【0064】

特定の成分を“含有していると考えられる試料”とは、試料に関して成分の内容が未知の試料のことである。例えば、神経変性疾患又は非神経変性疾患のような疾患を有していると考えられるが、その疾患を有していることがわかっていないヒトから採取した液試料は、神経変性疾患の凝集体形成種を含有していると考えられる試料を規定する。この文脈における“試料”は、ヒト又は他の動物から採取した生理的試料のような天然試料、食品、家畜飼料などから採取した試料、並びに“構造を予め決められた試料”を含む。本明細書中では、“構造を予め決められた試料”とは、試料の化学的又は生物学的配列又は構造が予め決められており、その構造が神経変性疾患のような特定のプロセスと関連しているかどうかを試験するために設計されたアッセイに使用される試料を意味する。例えば、“構造を予め決められた試料”は、ペプチド配列、ファージ表示ライブラリーのランダムペプチド配列などである。ヒト又は他の動物から採取した典型的な試料は、細胞、血液、尿、眼液、唾液、脳脊髄液、又は扁桃、リンパ節、穿刺生検など

10

20

30

40

50

から得られた液又は他の試料などである。

【 0 0 6 5 】

本明細書中で使用している“金属結合標識”は、キレートに配位されている金属に固定されうる分子群のことを言う。適切なそのような分子群は、典型的には約2～約10個のアミノ酸残基を有するアミノ酸配列を含む。これに含まれるのはヒスチジン及びシステインであるが(“ポリアミノ酸標識”)、これらに限定されない。そのような結合標識は、ヒスチジンを含む場合、“ポリヒスチジントラクト”又は“ヒスチジン標識”又は“HIS-標識”と呼ぶことができ、ペプチド又はタンパク質又は核酸のアミノ末端もしくはカルボキシ末端のいずれか、又は任意の曝露領域に存在しうる。本発明での使用には、6～10個の残基のポリヒスチジントラクトが好適である。ポリヒスチジントラクトは、機能的には、問題のタンパク質に付加されたいくつかの連続したヒスチジン残基とも定義される。これにより、得られたタンパク質の金属キレートカラムでの親和精製や、別の分子(例えば、HIS-標識に反応する抗体)との相互作用を通じてタンパク質末端の識別が可能になる。

10

【 0 0 6 6 】

“親和性標識”は、当該技術分野における通常の意味を付与される。親和性標識は、定義により金属結合標識を含む。

本明細書中で使用している“金属結合標識/金属/キレート連結”は、第一及び第二の種間の連結を定義する。この場合、第一の種は金属結合標識に対して固定され、第二の種はキレートに対して固定され、キレートは金属に配位し、金属には結合標識も配位している。B a m d a dらの米国特許第5,620,850号(本発明に引用して援用する)に、連結の例が記載されている。

20

【 0 0 6 7 】

“生物学的結合”という用語は、相互親和性又は結合能を示す対応分子対間の相互作用のことである。典型的には特異的又は非特異的な結合又は相互作用であり、生化学的、生理学的、及び/又は薬学的相互作用を含む。生物学的結合は、タンパク質、核酸、糖タンパク質、炭水化物、ホルモンなどを含む分子対間に生じる種類の相互作用を規定する。具体的な例は、抗体/抗原、抗体/ハプテン、酵素/基質、酵素/インヒビター、酵素/補因子、結合タンパク質/基質、担体タンパク質/基質、レクチン/炭水化物、受容体/ホルモン、受容体/エフェクター、核酸の相補鎖、タンパク質/核酸リプレッサー/誘導物質、リガンド/細胞表面受容体、ウィルス/リガンドなどである。

30

【 0 0 6 8 】

“結合パートナー”という用語は、特定の分子と結合することができる分子のことである。生物学的結合パートナーがその例である。例えば、タンパク質Aは生体分子I g Gの結合パートナーである。逆もまた然りである。

【 0 0 6 9 】

“測定する”という用語は、例えば、分光法、楕円偏光法、圧電測定、イムノアッセイ、電気化学測定などによる種の定量又は定性分析のことである。“測定する”とは、種間の相互作用の検出又は定量も意味する。例えば2つの種間の結合の検出である。

40

【 0 0 7 0 】

“自己集合単層”(S A M)という用語は、表面に自然に化学吸着する比較的整列した分子集合のことである。この場合、分子は互いにほぼ平行に、表面に対してはおおよそ垂直に配列している。各分子は、表面に付着する官能基と、単層中で隣接する分子と相互作用する部分とを含み、比較的整列したアレイを形成する。L a i b i n i s , P . E . ; H i c k m a n , J . ; W r i g h t o n , M . S . ; W h i t e s i d e s , G . M . による Science 245, 845 (1989), B a i n , C . ; E v a l l , J . ; W h i t e s i d e s ,

50

G. M. による J. Am. Chem. Soc. 111, 7155 - 7164 (1989), Bain, C.; Whitesides, G. M. による J. Am. Chem. Soc. 111, 7164 - 7175 (1989), 米国特許第 5, 620, 850 号参照。これらの参考文献はいずれも本願に引用して援用する。本発明のある種の実施の形態は、コロイド粒子表面のような表面に形成した自己集合単層 (SAM)、及び SAM で被覆した表面を有するコロイド粒子のようなアートを利用している。一組の好適な実施の形態では、完全に合成分子で形成された SAM が、表面又は表面領域を完全に覆っている。例えば、コロイド粒子表面を完全に覆っている。本文脈における“合成分子”は、天然のものではなく、ヒトの指揮下又はヒトが創作もしくは指揮した制御下で合成されたものを意味する。本文脈における“完全に被覆する”とは、SAM による完全な直接被覆を妨害するタンパク質、抗体、又は他の種に直接接触する表面の部分又は領域がないことを意味する。すなわち、好適な実施の形態において、該表面又は領域は、全体的に、完全に非天然分子 (すなわち合成分子) からなる SAM を含む。SAM は、表面に密集した SAM を形成する SAM 形成種から、又はこれらの種に組み合わせた、SAM 全体の電子伝達を促進できる分子ワイヤ又は他の種 (SAM に参加可能な欠陥促進種を含む)、あるいは SAM に参加可能な他の種、及びこれらの任意の組合せから、完全に形成できる。好ましくは、SAM に参加するすべての種は、表面に結合する (場合により共有結合する) チオールのような官能性を含む。チオールは金表面に共有結合する。本発明による表面の自己集合単層は、本質的に任意の化学又は生物学的官能性を提示 (曝露) できる種の混合物 (例えば、金が表面の場合、チオール種) で構成されることができる。例えば、非特異的吸着に抵抗性のあるトリエチレングリコール末端種 (例えばトリエチレングリコール末端チオール)、及び末端に親和性標識の結合パートナーを持つ他の種 (例えばチオール)、例えば末端に、金属に配位できるニトリロ三酢酸のようなキレート (これは、ニッケル原子と錯体化するとヒスチジン標識結合種のような金属結合標識種を捕捉する) を持つ種を含む。本発明は、コロイド表面又は他の任意の表面に提示される本質的に任意の化学又は生物学的種の濃度を厳密に制御する方法を提供する。多くの実施の形態において、自己集合単層は金コロイド粒子上に形成される。

10

20

30

【0071】

“自己集合混合単層”という用語は、異種の自己集合単層のことを言う。すなわち、少なくとも 2 個の異なる分子の比較的整列された集合から成る自己集合単層のことである。

【0072】

本明細書中で使用している“分子ワイヤ”は、SAM 被覆電極に接触する液の、電極と電氣的に伝達し合う能力を増強するワイヤを意味する。これに含まれるのは、導電性分子、又は SAM に欠陥を生じさせて電極との伝達を可能にする分子 (これについては前述したが、以下で更に詳しく例示する) などである。追加の分子ワイヤの非制限的リストは、2-メルカプトピリジン、2-メルカプトベンゾチアゾール、ジチオトレイトール、1, 2-ベンゼンジチオール、1, 2-ベンゼンジメタンチオール、ベンゼン-エタンチオール、及び 2-メルカプトエチルエーテルなどである。単層の導電性は、電極面の導電性を増大させる分子を加えることによっても向上させられる。導電性 SAM は、1) 硫黄を末端に持つポリ (エチニルフェニル) 鎖; 2) ベンゼン環を末端に持つアルキルチオール; 3) DNA 塩基を末端に持つアルキルチオール; 4) 硫黄を末端に持つ、単層にゆるく詰まる任意の種; 5) 末端にエチレングリコール単位又はメチル基のいずれかを持ち、非特異的吸着を阻害するアルキルチオールスペーサーを前記すべてに加えるか除去したもので構成されうるが、これらに限定されない。チオールを取り上げるのは、金に対する親和性があるため、SAM を容易に形成するから

40

50

である。米国特許第5,620,820号及び他の参考文献から当該技術分野で知られているようにチオールを他の分子で置き換えることもできる。分子ワイヤは、典型的には、そのかさ高さ又は他の立体配座のために、そうでなければ比較的密集したSAMに欠陥を生じさせ、曝露される液に対して、SAMが表面を密封するのを妨げている。分子ワイヤは、密集した自己集合構造の崩壊を招くことによって、表面が曝露される液に、表面との電氣的伝達を可能にする欠陥を規定する。このような状況において、液は、表面と接触するか、又はトンネル現象などによる電子伝達が起こりうるほど十分表面に接近することによって表面と電氣的伝達をする。

【0073】

本発明の一つの構成が概略的に示されている図1を参照する。図1に示されているのはア－ティクル20である。具体的には、その表面にSAM22を含む電極である。SAM22は、SAM22が比較的導電性であることが望ましい実施の形態では、“分子ワイヤ”24を含む。典型的には、混合SAMは、場合によりポリエチレングリコールのような非特異的結合阻害物質を末端に持つアルキルチオールのような比較的導電種を分子ワイヤと混合して形成される。表面及び自己集合単層分子を表面に結合させるための官能基の選択は当該技術分野で周知である。米国特許第5,512,131号及び5,620,850号、並びに国際特許公開番号WO96/29629を参照。前記特許は、上記内容の解説及び他の解説のために本願に引用して援用する。

【0074】

粒子26、具体的には磁気ビーズが、該ビーズに対して固定されている又は固定されるように適応されている複数の結合種とともに提供されている。該結合種は、神経変性疾患又は非神経変性疾患に伴うものを含む凝集体形成種、又は他の凝集体形成種を結合できる。複数の結合種28もシグナリング実体30に固定されて又は固定可能な状態で提供されている。シグナリング実体30は、図示された実施の形態では、 dendリマー32を含み、各 dendリマーは複数の個々のシグナリング実体34を保持している。複数の標的分子36、すなわち神経変性疾患又は非神経変性疾患の凝集体形成種又は他の原線維形成種が、例えば該分子の含有が考えられる生理的試料に含まれて導入される。結合種28が、凝集体形成種又は原線維形成種36に結合すると、結合種の付着したビーズ26、結合種の付着したシグナリング実体30、及びそれぞれに対して固定された凝集体又は原線維形成種36を含む連結が規定される。この構成は、電極20の表面に、電極下の磁石38によって引き寄せることができる。シグナリング実体34が電子又は電気活性(レドックス活性)シグナリング実体の場合、電極20付近への接近は検出でき、試料中に凝集体又は原線維形成種36の存在を示す。

【0075】

具体的には、本実施の形態では、電子シグナリング実体34は、メタロセン、特にフェロセン(すなわちフェロセン誘導体)のようなレドックス活性分子であり得る。シグナリング実体34としてフェロセンの電極20付近への接近は、交流ボルタンメトリー(ACV)のようなサイクリックボルタンメトリー技術によって、又は電荷計数を使用する装置によって測定できる。

【0076】

結合種28は、初めからシグナリング実体30及び/又はビーズ26に固定されている必要はないが、結合種28が、既に固定されていなくても、シグナリング実体30及び/又はビーズ26に固定されるように適応されている場合、種36の含有が考えられる試料、結合種28、シグナリング実体30、及びビーズ26を含む混合物が提供できる。この構成では、種28は、シグナリング実体30又はビーズ26に固定されている分子の化学又は生物学的結合パートナーを含むことによって、シグナリング実体30及び/又はビーズ26に固定されるように

10

20

30

40

50

適応できている。ビーズ26は、ポリマービーズの場合、共有結合的に付着させた様々な連結分子を含むことができる。同様に実体30もこのように修飾できる。ビーズ26も、その上にSAMの形成を容易にする物質の表面層、例えば金で被覆することができ、連結分子を持つSAM形成分子(金表面の場合のチオールのような)をその上に形成できる。ビーズ26上の連結分子又はシグナリング実体30と、結合種28との間の連結は、金属結合標識/金属/キレート連結、相補核酸配列、ビオチン/ストレプトアビジンなどのような親和性標識を含むことができる。金属結合標識/金属/キレート連結を使用する構成の場合、キレートはビーズ26上のSAMの一部を形成でき、シグナリング実体30には共有結合的に付着できる。キレートは金属に配位するが、金属上の利用可能な配位部位を少なくとも二つは残している。結合種36の中にポリアミノ酸標識のような金属結合標識を組み込めるので、種36には、その金属結合標識が金属に配位することによってビーズ又はシグナリング実体に固定される能力が備わる。適切なキレートの例は、ニトリロ三酢酸、2,2'-ビス(サリチリデンアミノ)-6,6'-デメチルジフェニル、または1,8-ビス(a-ピリジル)-3,6-ジチアオクタンなどである。代替の固定化技術では、結合種36が末端にシステインを持つことができ、それによってビーズ26の金表面に固定される。

【0077】

様々な結合種36が選択できる。該結合種は、ペプチド、タンパク質、タンパク質由来の配列、コンゴレッドもしくはチオフラビンTのような小分子、凝集体形成種から誘導された配列と相同の配列、RNA、DNA、ヌクレオシド誘導体、又は凝集体形成種もしくは原線維形成種36の抗体などであり得る。

【0078】

様々な表面が、キットもしくは系の成分を形成し、本発明の方法に参加することができる。ビーズ、コロイド、電極、ELISAプレート、他の多穴滴板などの表面が使用できる。

【0079】

本発明の多くの技術においては、アッセイに導入されたいかなる結合種も凝集体形成に参加させないようにするのが望ましい。そのような場合、凝集体とは結合するが、凝集体形成抵抗性の結合種を使用すればよい。凝集体形成抵抗性の種は、当業者であれば、結合はするが凝集体は形成しない抗体、タンパク質又はペプチドのフラグメントのような種の中から容易に選ぶことができる。

【0080】

アーティクルの表面は、それが電極、粒子、ビーズ、コロイドなど何であれ、凝集体形成種の非特異的結合を実質的に阻害する化学官能性を有するのが好ましい。これは、一実施の形態では、アッセイに望ましい官能性を提示するSAMを表面に形成することによって達成できる。そのSAMは、他の非特異的結合阻害物質を含む混合SAMである。NSB(non-specific-binding)阻害物質は、ポリエチレングリコール末端を持つSAM形成種などである。

【0081】

好ましくは、コロイドを被覆しているSAMは、コロイド/コロイド自己凝集を抑制する。これは、NSBに抵抗する種の他に、荷電された十分な量のSAM形成種を配合することによって達成できる。荷電部分及び/又はカルボキシ末端種は、SAMの約10%以上の量、又は好ましくはSAMの少なくとも約30%もしくは少なくとも約45%の量存在すべきである。これらの種は、例えば60%、80%、90%、又はさらには95%といった高率で存在してもよい。

【0082】

今度は図2を参照する。これは、図1に示したようなアッセイとしての使用に適した別の構成を、変更を加えて示してある。図2に構成においては、シグナリング実体30が種28に固定されるか固定されるように適応されているのではな

10

20

30

40

50

く、種 28 とシグナリング実体 34 のそれぞれをコロイド粒子 40 に固定するか固定されるように適応することによって、種 28 を個々のシグナリング実体 34 に対して固定するか固定されるように適応している。種 28 とシグナリング実体 34 は、当該技術分野で公知の又は本明細書中に記載の様々な任意の化学又は生物学的技術によって、コロイド粒子 40 に固定されるように適応できる。金コロイド粒子 40 を使用する場合、コロイド粒子 40 の表面に結合するチオールにシグナリング実体 34 と結合種 28 を付着させるのが、特に好都合である。SAM は、シグナリング実体 34 及び結合種 28 を含むコロイド 40 の表面を覆うように形成できる。図 2 の構成では、ビーズ 26 及びコロイド 40 のそれぞれに固定されている結合種 28 を凝集体又は原線維形成種 36 に結合させ、次いで磁石 38 を活性化することによってビーズ 26 を電極 20 の近傍に引き寄せさせる。すると、シグナリング実体 34 はビーズ 26 に対して固定されているので、シグナリング実体 34 も電極 20 付近に引き寄せられることになる。電極 20 付近のシグナリング実体 34 の電子的又は電気化学的検出は、ACV などを使用して行う日常的な技術である。

10

【0083】

図 1 及び 2 に示したアッセイは様々な目的に使用できる。凝集体形成種 36 が試料中に存在するかどうかを測定するために使用する場合、ビーズ 26、シグナリング実体 30 (図 1) 又はコロイド粒子 40 (図 2) を含むキットと、ビーズ 26、物質 30、又はコロイド粒子 40 に固定される化又は固定されるように適応されている結合種 28 を用意し、試料と溶液中で混合する。凝集体形成種 36 が試料中に存在すれば、混合及び磁石 38 の活性化後、シグナリング実体 34 が電極 20 付近に接近することによって、それが示される。凝集体形成種 36 が存在しなければ、シグナリング実体 34 は磁石を活性化しても電極に引き寄せられないはずである。

20

【0084】

薬物スクリーニングに使用する別の技術では、凝集体形成種 36 は、神経変性疾患、非神経変性疾患、もしくは他のタンパク質凝集疾患の治療用、又は凝集が望ましい状態の治療用の候補薬に加えて、試料中に既知量が用意される。このような構成では、異なる候補薬は、結合種 28 の結合、ひいては凝集体形成種 36 を介するシグナリング実体 30 又はコロイド粒子 40 とビーズ 26 との結合に異なる影響を及ぼす。この結合を阻害する候補薬は、神経変性疾患もしくは他のタンパク質凝集疾患の治療用、又は凝集が望ましい状態の治療用の候補薬である。アッセイは、信号(シグナリング実体 34 の電極 20 への接近)が、試料中の凝集体形成種 36 の濃度だけでなく、試料中で生じる凝集又は原線維形成の程度にも比例する又はそうでなければ関連する、というようにして確立できる。そのような構成の薬物スクリーニングアッセイでは、信号は、特定の候補薬が、試料中に存在する凝集体又は原線維形成種 36 の特定の疾患に特徴的な凝集を防止する程度に比例する又は関連する、又は信号は、特定の候補薬が、凝集の増強が望ましい生理的状态に対しては凝集を増強する程度に比例する又は関連する。

30

40

【0085】

薬物スクリーニングアッセイでは、特定の溶液中の凝集体形成種 36 の濃度及び / 又は候補薬の濃度との関連で、シグナリング実体 34 に対するビーズ 26 の固定の間の関係を定量的に測定するのが望ましいことが多い。そのような構成では、結合種 28 が、凝集体形成種 36 に、結合種 28 が凝集体形成種に転化することなく結合し、結合事象と信号との間に 1 : 1 の相関関係を維持するのが望ましい。これを達成するには、結合種 28 と凝集体形成種 36 を異なる生物学的種、例えばそれぞれハムスターとマウスから選択する、又は同一種から誘導した、標的と 1 : 1 の結合をする配列から選択すればよい。

【0086】

50

別の構成では、溶液中での結合事象と信号又は種との間の相関を1:1に維持するより、アッセイの感度を最大限にすることのほうが望ましい。そのような構成では、結合種28を、単に神経変性凝集体形成種36を結合するが、それ自体は凝集体形成種でない種から、他の結合種を凝集体又は原線維形成種に変換する能力を有する凝集体形成種に変換することが望ましい。そのような構成では、図1及び2を参照すると、極々少量の凝集体形成種36が試料中に存在しさえすれば(例えば、わずか100,000個の分子でも検出しなければならない。なぜならば感染性プリオン分子は、ごく初期の神経変性疾患患者の試料に特徴的なその程度の数でも疾患を起こすのに十分である)、“増幅”種29を溶液中に提供して、試料と混合できる。このような構成では、たとえごく少量の凝集体形成種36しか試料中に存在し得なくても、増幅種29がそれにより凝集体又は原線維形成種に変換されることによって、凝集体又は原線維形成種がアッセイを用いて検出するに足る濃度で存在できる。凝集体形成種36が初めから試料中に存在しない場合、増幅種29は未変換のままなので、信号は殆どないし全く検出されない。増幅種29は、試料中に存在する凝集体形成種36の濃度を検出可能なレベルにまで増幅できるだけでなく、神経変性疾患に特徴的な種36の塊状凝集を容易にできる。すなわち、単一のマクロ構造の中で数千の凝集体形成種に結合した数百又は数千のピーズ、コロイド、及び/又はシグナリング実体を含むマクロ構造を形成できる。これらの構造は電子的又は電気化学的に容易に検出可能であり、目に見えることも多い。

10

20

【0087】

増幅種29は、結合種28に関して前掲したすべての種の中から選ぶことができるが、特定のアッセイでは必ずしも結合種28と同じでなくてもよい。例えば、特定のアッセイで結合種28は結合種であり得るが、凝集体形成種に変換される能力はない。一方、増幅種29は変換可能で、凝集体形成種を規定できる。後者の状況(結合種28は凝集体形成種に変換できないが、増幅種29は変換可能)は、陽性の結果がない場合(試料中に凝集体形成種36がない場合)は粒子/粒子凝集の防止に有用であるが、種36が試料中に存在する場合はその増幅が生じてアッセイを高感度にする。

【0088】

当初は不十分な凝集体形成種36しか含まない試料の塊状凝集を起こすために、増幅種29を使用して塊状凝集(種36が望ましい状態で検出されるレベルに)を生じさせることに関連して、図1及び2に示したような電子シグナリング実体及び磁気ピーズは必ずしも使用しなくてもよい。このような構成では、コロイド粒子40、コロイド粒子40に固定されている又は固定されるように適応されている結合種28、及び増幅結合種28を含むキットが提供できる。このようなキットは、凝集体又は原線維形成種36の含有が考えられる、又は含有していることが分かっている(薬物スクリーニングの場合)試料と混合できる。たとえごく少量でも、種36は増幅結合種29を凝集体又は原線維形成種に変換できるので、容易に検出可能な塊状凝集及びマクロ構造の形成が起きる。容易に検出可能とは、色の変化などでヒトの肉眼で見える、又は顕微鏡下で見える、光散乱、吸光度などで検出可能ということである。この構成では、コロイド粒子40は、何らかの補助的なシグナリング実体を必ずしも保持する必要はない。

30

40

【0089】

図1及び2を参照しながら前述した構成において、結合種28の選択と、ピーズ26及びコロイド粒子40(コロイド粒子が使用される場合)の表面における濃度は、以下のことを考慮して提供されるのが望ましい。すなわち、補助的な、表面に固定されない凝集体形成種36が存在しない場合は、粒子/粒子曝露時の粒子凝集をある時間枠内遅らせて、(1)補助的凝集体形成種が存在しない場合の凝集と、(2)補助的凝集体又は原線維形成種が存在する場合の凝集を比較で

50

きるようにする。つまり、試料中に当初凝集体又は原線維形成種 36 が存在しなければ、コロイド粒子の凝集は発生してもごく緩慢であるか限られた程度であるが、当初から種 36 が存在すれば、凝集はより迅速に、及び / 又はかなり大きな程度で発生しうる。そのようなアッセイでは、対照は試料を含まないので、試料の速度及び / 又は凝集レベルは対照のそれと比較できる。

【0090】

直前のパラグラフで神経変性疾患を取り上げて記述した本発明の方法及びアッセイを、特定の神経変性疾患に伴う特定の凝集体だけに限定するつもりはない。実際、本発明はそのような疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病など）の宿主に付随する原線維の検出を考えている。

10

【0091】

本発明は、疾患の検出又はそのような疾患を治療する薬物の有効性の測定のための様々なアッセイ及びアッセイのための成分を提供する。これらのアッセイに必要とされるのは、試料又は薬物スクリーニングアッセイと感知電極との相互作用を電子的又は電気化学的に検出すること、又は、これらだけに限定されないが、目視点検、密度スキャンニング、光透過、吸光度、色変化及び / 又は光散乱などの様々な技術によって検出可能な凝集である。凝集に関しては、凝集体形成種を結合できる、又は予め存在する凝集体又は原線維に組み込まれ得る結合種が、コロイド（例えば金コロイド）又は他の粒子（例えば蛍光ビーズ）に付着している。これらの粒子は、場合により遊離の結合種（コロイドに付着していないが、コロイドが懸濁している液中に懸濁している又は溶解している種）とともに、凝集体を含有する溶液（例えば患者試料）と混合される。粒子（例えばコロイド）が原線維に組み込まれると、原線維が光学的に検出可能になる。コロイドに固定されたペプチドが相互に作用し合うのを防止するために、荷電部分のような反発基（COOH、DNA、荷電ペプチド）をコロイド表面に固定することができる。こうすることで固定されたペプチドは互い同士ではなく原線維と相互作用するようになり、診断アッセイにおける偽陽性の発生が削減される。

20

【0092】

グリコール単位のようなフレキシブル基をニトリロ三酢酸（NTA）部分とチオール部分との間に化学的に挿入することもできる。より大きな自由度の導入により、反応のエントロピーコストが増加することによって相互作用速度が低下する。

30

【0093】

本発明を検出法によって制限するつもりはない。検出を容易にするために、本発明は様々な技術を考えている。例えば、染料のようなシグナリング実体は、凝集体を組み込み可能なペプチドの一端に固定できる。信号修飾ペプチドが原線維に組み込まれると、その表面に染料が集中して“目に見える”ようになる。別の実施の形態では、蛍光部分及び消光部分を別のペプチド末端に付着させる。溶液中で濃度が低いときには相互に頻繁に作用し合うことはないが、原線維上に共に集まると、消光反応が起きて、溶液中の蛍光に変化が生じる。こうした変化は、標準の ELISA プレートリーダーを用いて分析できる。さらに別の実施の形態では、原線維又はブランクに組み込み可能な二つの別のペプチドの末端に二つの化合物を付着させる。化合物は、一つの化合物が第二の化合物を修飾してそれを活性化又は検出可能にするように設計される。化学修飾は、修飾しなければ化合物は蛍光発光しないが、修飾後は蛍光を発光するというようにする。統計的には、二つの化合物が原線維又はブランク上に共に集まると、反応は何桁も頻繁に起こるようになる。別の実施の形態では、電子又は電気化学的相互作用が検出技術としての役割を果たす。例えば、電極表面付近にレドックス活性分子の存在が検出できるということは、レドックス活性分子に対して固定された種と、電極に対

40

50

して固定された種、又は電極に引き寄せられる磁気ビーズのような誘引可能な粒子に対して固定された種が結合したことを示す。別の検出技術では、試料の画像をデジタル化し、次いでパターン認識ソフトウェアを用いて試料に凝集体が含まれているか否かを判定する。例えば、図8に示した試料をCCDカメラを用いてデジタル化し、パターン認識を用いて、色、凝集体のサイズ、凝集体の空間分布、凝集の相対量などを測定できる。これにより診断スクリーニング及び薬物スクリーニングの両方の自動化が可能になる。多数の薬物スクリーニングを実施する際、様々な試料に個々に空間的にアドレスをつけられると特に便利である。本発明の技術は、多穴滴板の異なるウェル(図8参照)のような、個々に空間的にアドレス可能な領域、及び/又は複数の電極を用いて実施できる。複数の電極は、

10

【0094】

多数の薬物スクリーニングを実施する際、様々な試料に個々に空間的にアドレスをつけられると特に便利である。本発明の技術は、多穴滴板の異なるウェル(図8参照)のような、個々に空間的にアドレス可能な領域、及び/又は複数の電極を用いて実施できる。複数の電極は、多穴滴板の個々のウェルなどに配置できる。

【0095】

どの実施の形態を使用するかにかかわらず、本発明のアッセイは、凝集体形成を阻害する化合物の薬物ライブラリーのスクリーニングに容易に適應できる。薬物スクリーニングアッセイの場合、結合種をコロイド(又は他の粒子)に付着させ、凝集体形成種又は原線維形成種及び候補薬を含有する溶液とインキュベートする。ペプチドの原線維への組込みを促進するために溶液を攪拌してもしなくてもよい。結合種が、凝集体もしくは原線維、又はその後凝集体もしくは原線維を形成する凝集体形成種もしくは原線維形成種に組み込まれると、付着したコロイドを互いに接近させるので、コロイド溶液の色が変化する(例えばピンク色の懸濁液から透明溶液中に暗青色の沈殿)。この推移ははっきりと目に見える。吸光度分析では、コロイドが凝集すると569nmにあるピークが減衰する。

20

【0096】

一実施の形態において、本発明の方法はペプチド(神経変性疾患又は他のタンパク質凝集疾患又は他の非疾患プロセスに特徴的な凝集体を形成できる)を使用する。このペプチドをシグナリング及び/又は誘引部分で修飾し、疾患状態を示す転化又は凝集ペプチドを含有している可能性のある生物由来試料(又はそのような試料をインビトロで模倣したもの)とインキュベートする。ペプチドのブランク、凝集体、又は原線維の存在は、標識ペプチドの組込みによって検出される。本アッセイは、以下に示すように多様な方法で、原線維種又は凝集種の迅速且つ効率よい検出を可能にする系で実施できる。

30

【0097】

例えば、一つの要素は、原線維又はブランク形成に参加するペプチドを保持する磁気粒子であり得る。第二の要素は、凝集体形成に参加するペプチドと、シグナリング実体として働くフェロセン誘導体のようなレドックス活性化合物の両方を提示する異種SAMで誘導体化されたコロイドの形態であり得る。原線維又はブランク形成に参加するペプチドは、ビーズ及びコロイドに付着したペプチドのような他のペプチドの誤った折り畳み及び自然凝集を触媒できる。これらのペプチドの原線維種又は転化種の存在は、磁気ビーズ上のペプチドとシグナリングコロイド上のペプチドの、それらの原線維又は凝集体への同時組込みによる会合を検出することにより、試料中に検出できる。

40

【0098】

この凝集を生じさせるインキュベーション期間の後、電磁場を印加すると、磁気粒子とシグナリングコロイドを含有している複合体を誘引できる。この系では

50

、磁気粒子が、生物学的認識粒子を多量の試料全体に混合し、次いで検出のために標識された標的を電極に迅速に誘引するという方法を提供する。電極に振動電位を印加すると、レドックス活性金属に特徴的な酸化電位時の電流ピークが、電極における凝集体の存在、つまり凝集ペプチドの存在を示す。さらに、遊離の非転化ペプチドを測定溶液に加えて、凝集速度及び/又は凝集した物質の量を増加させることができる。すなわち凝集増幅物質として機能させる。凝集体形成は、インキュベーション及び測定条件を変化させることによっても促進できる。例えば、周波数パルス、並びに温度及び電場及び磁場の变化などを利用する。磁気粒子は感知電極に引き寄せることができる。あるいは、種が電極又は別の位置に誘引されるのが望まれる本実施の形態及び他の実施の形態では、重力を利用することもできる。例えば、本発明のアッセイでは、液に自己懸濁不能であるが重力によって沈降する成分が使用できる。又は、他のアッセイでは、液に懸濁可能な成分が凝集して液に懸濁不能な物質、すなわち懸濁状態を離れて沈降する物質を形成することになる。

10

【0099】

複合体は、交流ポルタンメトリー（ACV）を含む様々な技術を用いて検出できる。この検出法は、高次調和解析のような追加の分析技術の使用で補足できる。これらの複合体は、表面プラスモン共鳴（SPR）のような光学手段によっても検出可能である。後者の技術を使用すると、粒子/粒子複合体の検出表面への誘引によって光学的性質に大きな移動が生じる。

20

【0100】

これらの疾患関連ペプチドの凝集状態は、可能性ある病原ペプチド（結合種又は凝集体もしくは原線維形成種）を、リンカーのいずれかの末端に付着させて検出することもできる。すなわち、重合シード（種）又は凝集体（凝集体又は原線維形成種は、場合により結合種を凝集体又は原線維形成種に変換できる）を導入すると、鎖が凝集体を形成し、その検出可能な性質は、もとの非凝集状態から変化して、眼で確認可能、光散乱検出で光散乱可能、フロー検出系における粘度の変化、シグナリング実体が凝集体の一部を形成する成分に連結されている場合は電子検出などによる検出が可能となる。あるいは、通常の状態の病原ペプチドを、官能基化ヒドロゲル又はゲル様物質の整列した“正孔”に付着させることもできる。シード（種）又はタンパク質凝集体の導入で、提供された可溶性ペプチドが、変化した光学的性質を持つポリマー又は凝集体に変換されるので、これらの凝集体は光学的に検出できることになる。

30

【0101】

あるいは、磁気粒子を金で被覆し、SAMで誘導体化することもできる。SAMは、ペプチド-チオールに直接付着によって、又はSAMに組み込まれたDNA-チオールへのDNA-ペプチドの結合、もしくはSAMに組み込まれたNTA-チオールへのヒスチジン標識ペプチドの結合のように間接的に、のいずれかで所望のペプチドを提示する。本明細書中に記載のコロイドは金属原子のクラスターであり得、好適な金属は金である。金のクラスターはわずか20個の金原子で製造できるので、コロイドは、直径がわずか数ナノメートルしかない最も小さい粒子の一つとなる。このように小さい粒子は、これらの比較的小さい原線維形成ペプチド及び金属含有化合物を原線維及びブランクに組み込み、それらを懸濁状態に維持する場合に顕著な利点がある。

40

【0102】

ペプチドと、粒子又はコロイド又は該ペプチドを該粒子又はコロイドに連結する認識基との間に挿入されたリンカーがあってもよい。リンカーの存在により、例えば結合種と原線維又は凝集体形成種との間の相互作用が立体障害によって妨害されずにすむ。このリンカー又はスペーサーは、グリコール又はアミノ酸を含む様々な物質から作成できる。スペーサーの長さは、電気活性信号検出物質の酸

50

化電位のシフトを促進するために、凝集体の接近による増大した疎水性環境を作り出すことによって変化させることができる。

【0103】

磁気粒子は、寸法の大きい第二のコロイドで置き換えることも可能である。これらの大きなコロイドは電極表面に電磁氣的に誘引可能である。しかしながら、これらが信号を発するのは、シグナリング部分を提示するサテライトコロイドで装飾された場合だけである。あるいは、いずれかのコロイドを、電磁力が印加された場合にその運動性を変化させる荷電部分で装飾することもできる。すべてのコロイドは同じような大きさであることもでき、その場合は電磁力を使用すれば凝集コロイドを個々の粒子から分離できる。別の変形では、第一の粒子が重い粒子又はコロイドで、インキュベーション時に機械的に混合でき、次いで測定を行う際、沈降によって電極表面に蓄積させることができる。

10

【0104】

これらの技術は一粒子系でも使用できる。例えば、磁気ビーズは病原ペプチドと遷移金属錯体を提示できる。溶液中の病原ペプチドがビーズ上のペプチドと相互作用をして凝集体を形成すると、遷移金属の局所環境が変化して酸化電位が高くなる。病原凝集体又は原線維の存在は、系を電気化学的に分析すると遷移金属の酸化電位のシフトとして、又は低電位に第二の酸化ピークの出現として検出される。代替の一粒子系は、正常ペプチドを呈する磁気粒子と、遷移金属錯体を含む溶液中の増幅ペプチドを含む。これらの遷移金属は、導電性又は非導電性のデンドリマー又はポリマーに連結できる。検査試料中の病原ペプチドが凝集体形成を促進すると、金属含有化合物は磁気ビーズに付着したペプチドと絡み合い、結果として電気活性及び磁気複合体を生じ、これが誘引されて電子的又は電気化学的に検出できる。

20

【0105】

このアッセイ系はビーズを使用しなくても構築できる。金属含有化合物を有するペプチド又はペプチドチオール及び遷移金属錯体チオールを、電極上のSAMに固定又は組み込むことができる。増幅ペプチドは測定溶液に加えても加えなくてもよい。検査試料に病原ペプチド又は感染ペプチドが含まれていると、それらは表面に固定されたペプチドに付着する。すると、これが金属錯体の局所環境を変化させるので、それらの酸化電位も変化する。測定溶液中の増幅ペプチドは、デンドリマー又はポリマーに連結できる金属錯体を保持していてもよい。検査試料中に病原ペプチドが含まれていると、凝集した種が金属化ペプチドと表面に固定されたペプチドとを架橋する作用をする。この相互作用でシグナリング部分が電極表面付近に置かれるので、電子信号が電極に伝達される。同様に、電極上に形成されたSAMに、直接的なチオール付着、又はHis-標識ペプチドを予め形成されたNTA-SAMに結合させる、のいずれかによって組み込まれたペプチドを、病原ペプチドと、ペプチド及びフェロセンのようなシグナリング部分の両方を提示するコロイドも含有する試料溶液に導入できる。ここでも、それらが原線維/凝集体に統合されると、シグナリング部分(この場合コロイド)が電極に接近し、信号が伝達される。逆に、NTA基で誘導体化されたペプチドを、6個のヒスチジンのストレッチを含有するペプチドと相互作用させることによって表面に付着させることもできる。増幅ペプチドは測定溶液に加えても加えなくてもよい。

30

40

【0106】

これらの技術は、このような神経変性疾患又は他のタンパク質凝集疾患又は他の非疾患プロセスを治療するための可能性ある候補薬のスクリーニングにも適用できる。具体的には、前述したすべての変形(の形態)において、候補薬を溶液に加え、凝集体形成を阻害又は増強する候補薬の能力を時間及び濃度の関数として測定する(これは用量に反映されることになる)。信号の喪失又は電流ピーク

50

の位置の移動といった様々なパラメータは陽性の効果、すなわち治療上有用な効果を示しうる。さらに、候補薬を、レドックス活性化化合物、例えば金属含有化合物を保持するビーズに付着させることもできる。これは、NTA-チオールを持つ又は持たないSAMで被覆されたコロイドであり得るが、これはペプチドを付着させたコロイドに付着した金属含有化合物とは異なる電位で酸化される。すると、異なる酸化ピークが予想される。シグナリング金属含有化合物はペプチドが付着したコロイドから除去することもできるので、薬物含有コロイド由来の単一の電流ピークが測定できる。また、候補薬をマクロアレイに加え、アレイ全体を上下にひっくり返して分析のためにSAM修飾電極の蓋に載せる多重薬物スクリーニング装置も設計できる。

10

【0107】

この競合阻害アッセイは、信号検出化合物が候補薬を含有するコロイド上にある系でも実施できる。この系では、金属含有信号検出化合物を持たない磁気ビーズがペプチドを保持している。溶液中の遊離ペプチドがこれらの磁気ビーズに結合したペプチドと相互作用できる。次に、推定上の候補薬を、金属含有信号検出化合物を有するコロイド上に配置する。コロイド上の金属含有信号検出化合物は、凝集プロセスを妨害し、磁気ビーズ上のペプチドと直接相互作用をすれば信号を出す。候補薬が凝集体と相互作用をしても信号を得ることができる。後者の情報は有用であるが、薬物の作用部位を判定するのに、続けてマルチステップアッセイが必要となるようである。

20

【0108】

候補薬は、予め形成された原線維、電子シグナリングコロイドに付着したペプチド、及び磁気ビーズに付着したペプチドを含有する溶液に加える。インキュベーション期間後、磁気ビーズは感知電極に引き寄せられるので、ACVによって分析する。信号の喪失は、候補薬が原線維形成を阻害したことを示す。

【0109】

準安定なプロトフィブリルを選択的に形成し、均一にするためにサイズ排除クロマトグラフィーで精製し、その後薬物スクリーニングの標的原線維として使用することができる。同様に、パーキンソン病に特徴的な原線維に組み込まれるタンパク質の α -シヌクレインをHis標識し、電子シグナリングコロイド及び磁気粒子に付着させることができる。これらの粒子を、溶液中又はパーキンソン病患者の試料由来のシヌクレイン原線維とインキュベートすると、感知電極に磁気的に引き寄せられるので電子分析を行う。

30

【0110】

溶液を電磁場又は機械的攪拌で脈動させると組み込みプロセスが加速される。

先に述べたように、本発明のアッセイを電子的又は電気化学的相互作用に限定するつもりもない。特定の実施の形態において、当該方法は感知表面を使用しない。むしろ、当該方法は凝集を含み、その凝集は、これらだけに限定されないが、目視点検、密度スキャンニング、光透過、吸光度、色変化及び/又は光散乱などの様々な技術によって検出可能である。予め存在している原線維に組み込み可能なペプチドは、コロイド(例えば金コロイド)又は他の粒子(例えば蛍光ビーズ)に付着している。これらのペプチド提示粒子は、遊離ペプチドと共に、原線維(例えば患者試料)を含有する溶液と混合される。粒子(例えばコロイド)が原線維に組み込まれると、原線維は光学的に検出可能になる。

40

【0111】

この実施の形態をアッセイにどうフォーマットするかに関する特定の詳細に本発明を限定するつもりはないが、便宜的な手法は96穴ELISAプレートのフォーマットである。反応に関し、次の試薬をリン酸塩緩衝液(10mMのリン酸塩、pH7.4、100mMのNaCl)中のELISAプレートに加えることができ、以下の濃度が便宜上使用される。すなわち、N-末端に(His)₆標

50

識を持つ $58.2 \mu\text{M}$ 又は $14 \mu\text{M}$ のいずれかの濃度の合成 A (1-40) ペプチド、NTA / Ni⁺⁺ を提示する金コロイド $30 \mu\text{L}$ (製法は以下に記載) ; 及び $0.6 \mu\text{M}$ の A - アミロイド原線維の “シード (種)” である。次に ELISA プレートは、攪拌せずに所望の時間 (例えば 30 分 ~ 2 時間) 37 でインキュベートできる。1 時間の時点で、 $58.2 \mu\text{M}$ の (His)₆ - A ペプチドを含有するウェル中に暗赤色の凝集体構造が明らかに見える。所望の時間 (例えば 1 ~ 4.5 時間) の後、プレートを短く攪拌し、次いで目視点検を行う。凝集体構造は、(His)₆ - A ペプチド及び A 原線維 “シード” を含有するすべてのウェルに明らかに見ることができる。これらの凝集体、原線維様構造は、速度は遅いが、50% までのウシ胎仔血清 (FBS) を含有する溶液にも形成できる。FBS の濃度を倍数希釈し、一定濃度の原線維シード及び (His)₆ - A ペプチドとインキュベートすると、目に見える原線維形成速度は FBS 濃度が減少するにつれて増加する。これは、本アッセイが A 原線維に特異的で、胎仔血清中に存在する原線維種を認識していないことを示す。原線維又は (His)₆ - A ペプチドのどちらか一方だけを含有するウェルは目に見える凝集体を形成しない。陰性対照として、無関係の His 標識ペプチドをコロイド及びシードとなる原線維と共にインキュベートできる。このような対照溶液には目に見える原線維凝集体は形成されない。

【0112】

前述の方法を用いると、コロイドと A ペプチドは含有していたがシードとなる原線維は含有していなかった溶液から、わずか 10 ピコモルという原線維シード濃度を目で識別できる。

【0113】

本明細書中に記載の比色技術はアッセイプロセスを中断しない。単一の液混合物を調製し、いかなる移動も他の攪拌も必要とせずに、該混合物の凝集体形成又は非形成について観察し、判定できる。あるいは、特定のアッセイを攪拌又は他の形態のエネルギーに曝露してもよい。例えば、ある場合には、エネルギーを特定の系に導入することが凝集体形成に影響を及ぼしたかどうかを判定したいこともある。エネルギーは、攪拌、振盪、振動、音波処理、渦流、又は他の機械的攪拌のようなかき混ぜの形態で、赤外線、紫外線、又は可視光線のような電磁放射線への曝露、無線周波エネルギー、マイクロ波放射線、又は任意のスペクトル部分にある本質的に任意の電磁放射線への曝露、熱への曝露によって導入できる。時に、系をエネルギーに曝露することで凝集速度に影響が出るが、これは、エネルギーが神経変性及び他の異常凝集疾患プロセスに影響を及ぼしている可能性を示していると言えよう。

【0114】

比色技術は、凝集体を形成する生物学的プロセスに関して、薬物又は候補薬を時間の関数として又は凝集体形成の関数として活性と相関させるという本発明の別の態様を容易にする。本発明の一実施の形態は、粒子と、表面に固定された又は固定されるように適応された、凝集体形成種を結合できる結合種の提供に関する。粒子と結合種は、原線維形成に影響を持つと考えられる候補薬に曝露される。第一の時点において、凝集体形成に影響を及ぼす候補薬の有効性を示す、粒子の第一の観察可能な特徴を測定する。次に、第二の時点において、凝集体形成に影響を及ぼす候補薬の有効性を示す、粒子の第二の観察可能な特徴を測定する。アッセイは、粒子が相互に異なる程度に結合するように、又はそうでなければ共通の表面に結合することによって互いに関して固定されるように構築できる。候補薬は、原線維形成を阻害すると考えられるものであり、判定ステップは、第一及び第二の時点における、凝集体形成を阻害する候補薬の有効性を示す、粒子の第一及び第二の観察可能な特徴を測定することを含む。あるいは、薬物は凝集体形成を増強するとも考えられるので、その増強能力を第一及び第二の時点で判定

10

20

30

40

50

できる。このアッセイは補助的な凝集体形成種に曝露することも含む。

【0115】

観察可能な特徴とは、直接目で確認可能な変化を含む（例えば、コロイド凝集による色の変化、又は本明細書中に記載の蛍光消光のような他の直接目視確認可能な変化など）。この技術は、色の変化を分光学的に測定するなど、自動化することもできる。

【0116】

一組の実施の形態では、第一及び第二の時点の差が比較的大きい。具体的には、少なくとも1日又は少なくとも1.5日、さらには少なくとも2日異なる。この組の実施の形態は、疾患のような生理的プロセスに付随する後期の凝集体に特に有効な薬物の確認に有用であり得る。別の組の実施の形態では、第一及び第二の時点の時間差が20分を超えない、又は10分未満、又は5分もしくは1分未満、又はさらには30秒未満である。この組の実施の形態は、ごく早期の凝集体プロセスに特に有効な薬物の確認に使用できる。

【0117】

本発明の本技術の一つの利点は、“ワンポット”アッセイで実施できるということである。すなわち、第一及び第二の測定ステップ中及びステップ間に、アッセイを中断したり攪乱することなく、又はアッセイに外部エネルギーを曝露することなく、第一及び第二の観察可能な特徴を測定できるということである。これを心に留めると、観察可能な変化の分光学的測定は、好ましくは視覚分光法を用いて実施される。本アッセイは、目視可能な範囲での変化（ピンクから青）を求めており、また可視分光法は系に大きなエネルギーを加える必要がないため、都合がよい。可視分光法を使う場合でも、アッセイを分光エネルギーに長時間曝すのではなく、異なる時点で短いスペクトルを取るのが好ましい。

【0118】

粒子の結合状態を示す観察可能な粒子の特徴、及びそれによる候補薬の有効性は、分光学的方法であれば、少なくとも二つの波長で測定できる。例えば、青とピンクはそれぞれ青の減少とピンクの増加をモニタすることによってモニタできる。

【0119】

観察可能な特徴には、細網の形成、すなわち目に見える凝集体形成の観察所見も含まれる。

別の実施の形態では、複数の粒子が試料に曝露され、粒子の凝集程度が曝露ステップの少なくとも5時間後に測定される。これは曝露ステップの少なくとも10時間後、少なくとも15時間後、又は少なくとも20時間後に実施することもできる。実施の形態の一ステップでは、これらの時間より前には凝集の測定はなされない。

【0120】

別の組の実施の形態では、粒子が試料に曝露され、凝集の測定は曝露ステップの1分以内、又は30秒以内、又は10秒以内に行われる。

前述のように、本発明の本態様は、異なる病期にある患者の治療に特に有用な薬物の判定を含むことができる。これに派生して、本発明の一つの方法は、凝集体関連プロセスの第一期を示す症状を呈する第一の患者に該プロセス治療のための第一の薬物を投与することを含み、前記第一の薬物は、原線維形成に影響を及ぼす可能性を示すアッセイに曝露すると、原線維形成に影響を及ぼす第一の特徴を示す。プロセスの第二期を示す症状を呈する第二の患者には第二の薬物を投与し、前記第二の薬物は、アッセイに曝露すると、原線維形成に影響を及ぼす第二の特徴を示す。凝集体関連プロセスは、神経変性疾患、非神経変性疾患、又は非疾患プロセスを含む。さらに、pH、塩及び/又は緩衝液濃度などの変化を利用して凝集体形成速度を変えることもできる。これは、以下に記載するが、凝

10

20

30

40

50

集体の大きさ又は形成の進行とある種の薬物の有効性との相関に関する本発明の有用な技術になりうる。

【0121】

本発明は、様々な目的のために、凝集体形成種を産生できる細胞の使用にも関する。一つの技術では、細胞を、神経変性疾患のような凝集関連の生理的プロセスを阻害する候補薬に曝露し、細胞が産生した物質の、神経変性疾患に特徴的な凝集体の形成に対する可能性をモニタできる。これは、該疾患を阻害する候補薬の有効性の判定に有用であり得る。他の技術も実施できる。細胞が産生した凝集体形成種を単に単離し、それらの種を試験するのではなく、細胞自体を使用することで、リアルタイムでの実験の実施及び薬効のモニタが可能となる。この方法は、技術が簡便、安価、及び迅速であることを含め、いくつかの利点がある。一つの技術は、細胞からの神経変性疾患の凝集体又は原線維形成種の産生、例えば分泌を、時間の関数としてモニタすることを含む。時間は、例えば、5秒、30秒、及び1日までの任意の分数を含む短い時間間隔、並びに1週間までの任意の日数を含む長い期間、さらに2週間、3週間などといった長期間である。細胞によるこれらの種の産生を時間の関数としてモニタすることは、物質は時間をかけて絶えず産生されるので、薬物活性の特徴、すなわち新しく産生された物質に反応して絶えず作用する薬物の能力の測定が可能となる。時間の関数としての薬効も調査できる。これは、異なる時点、例えば前述の時点で細胞が産生する異なる物質に反応して作用する薬物の有効性の測定を可能にする。また、時間の関数としての薬物の（熱的）安定性、並びに、細胞が分泌した物質の濃度の上昇に対して作用する薬物の能力なども測定できる。

10

20

【0122】

本発明の方法は、凝集体形成種の分泌能力のある細胞だけに限定する必要はない。その代わりに、凝集体形成種を細胞内に産生又は保持する細胞は、溶解してからコロイドを添加すればよい。本発明の本態様は、神経変性疾患について記載されているが、非神経変性疾患及び他の非疾患性プロセスにも適用される。細胞は、何らかの凝集体形成種又は凝集体形成種の前駆体を産生又は保持する能力を有することもある。

【0123】

さらに、アッセイは、細胞の物質産生に関して異なる時点における情報を取り出すために異なる方法で構築することもできる。例えば、コロイドとコロイドに固定された又は固定可能な結合種を含む予め混合されたアッセイの存在下で、細胞に凝集体形成種を産生させることもできるし、コロイド及び/又は結合種をプロセスの任意の時点で添加することもできる。

30

【0124】

当該技術は、凝集体形成に影響を及ぼす候補薬の有効性の測定も可能にする。この場合、形成に関する特異的機序は分かっていなくてもよい。候補薬は、細胞による種の産生に影響を与える、又は凝集体形成種が産生された後の凝集体形成に影響を与える、又はプロセスの任意の段階に影響を与えることによって、凝集体形成に及ぼす影響が有効と判定できる。プロセスの段階とは、転写、翻訳、翻訳後修飾、及び分泌を含みうる。

40

【0125】

当該技術は、凝集体形成に長時間にわたる影響を及ぼす候補薬の有効性を、介入することなくモニタ、例えば視覚化することも可能にする。記載したアッセイでは、ピペットによる分注、攪拌、又は溶液の移動など、いかなるアッセイ成分の移動も必要ない。これにより、自然の生物学的環境をより有効にシミュレートすることが可能になるので、自然環境で有効な薬物を一層効果的に確認することができる。本発明の本態様において、本明細書中に記載のすべての測定/視覚化技術が使用できる。例えば、コロイド/コロイド凝集を肉眼で見る、分光測光、

50

光散乱、及び本明細書中に記載の他の技術などである。好適な技術は、細胞含有媒体を目視点検して、コロイドの存在下で媒体が凝集体又は原線維形成がないことを示すピンク色のままであるか、凝集体形成種の存在を示すコロイド凝集を示す青色に変化するか、又は対応する中間的状态を示すピンクと青の間のスペクトル上の任意の色を示すか、を測定する。

【0126】

当該技術は、凝集体又は原線維形成の局在化を視覚検出又は他の検出法で検出することも含む。典型的には、高濃度の凝集体又は原線維形成種が存在する細胞周囲の濃縮領域における検出である。凝集体又は原線維形成種の局在化は、ペプチド又はコロイド細網の増加領域として、又は凝集体又は原線維形成種が細網領域に引き寄せられるためにペプチド/コロイド細網の増加領域に隣接して溶液が透明になる領域として視認することができる。個々の細胞又は細胞クラスターの周囲の凝集を観察する能力は、特定の薬物の有効性をより正確に評価することを可能にする。具体的には、有効性の定量化がより簡単にモニタできる。例えば、細網のパターンが簡単に認識でき、特定の細胞と関連している場合には、関与する細胞数を知らなくてもアッセイを実施することができる。

10

【0127】

当該技術は、細胞に対する候補薬の毒性の測定も可能にする。

本発明はまた、コロイド-コロイド相互作用が関与する一連のアッセイ及びキットも提供する。本発明のアッセイでは、第一及び第二のコロイド粒子は、互いに対して固定されるか、又は互いに対して固定されないようにしてある。アッセイは、結合相互作用を示すことができ、また、結合相互作用を容易にする酵素、切断する酵素、結合相互作用を阻害する薬物、又は望ましくはその有無が測定される本質的に任意の他の結合相互作用を含むことができる。本発明の本態様は、互いに対して固定される第一及び第二のコロイド粒子に関して記載しているが、一般的には多くのコロイド粒子が特定のアッセイに関与し、粒子間の結合又は共通表面への結合を特徴とするコロイド粒子の凝集が生じているかどうかを測定するために観察される。凝集が発生しない場合、コロイド粒子が懸濁している溶液はピンク色のままである。凝集が発生すると、溶液は青又は紫色になり、多くの場合目に見える細網（目に見える凝集）が生じる。細網はヒトの眼又は顕微鏡を使って目視的に測定できる。

20

30

【0128】

本発明の本態様の一つの利点は、色の变化又は未変化を分光学的に測定できることである。例えば、第一及び第二の種間の結合を阻害する候補薬の能力を測定するための特別なアッセイを構築できる。第一及び第二の種を相対的に固定する（例えばコロイド粒子への直接固定）、粒子を別の容器に提供する（例えば多穴滴板の別のウェル）、そして異なる候補薬に曝露する。ウェルは、コロイド凝集による色の变化を示す、特定の波長における吸収の変化を分光学的に測定できる。従って、本発明の一つの重要な態様は、結合相互作用の有無を示すコロイド粒子の凝集を計器を使って自動的に測定することを含む。本発明の本アッセイ及び他のアッセイでは、初めに種をコロイド粒子に対して不動化（例えば固定）し、次いで結合を阻害又は促進しうる候補薬、酵素、又は他の種に曝露し、それから候補薬又は酵素に曝露する。あるいは、第一又は第二の化学もしくは生物学的種を最初に候補薬、酵素などに曝露し、それから第一及び第二の化学もしくは生物学的種が固定又は不動化される能力を有するコロイド粒子に曝露してもよい。本発明のアッセイの実施ステップ順にかかわらず、コロイド-コロイド凝集は、結合相互作用又はその妨害を示し、自動化できる。

40

【0129】

所望であれば、様々なシグナリング実体をコロイド粒子に対して固定できる。コロイド上に提示されるシグナリング実体は蛍光分子であり得る。グリーン蛍光

50

タンパク質を含む、蛍光複合抗体及び他の蛍光融合タンパク質は、生物医学的研究及び検査に広く使用されている。これらの蛍光タンパク質及び分子は、金コロイドに容易に付着できる。この金コロイドは、親和性標識、EDC/NHS化学、又は本発明によってNTA-SAM被覆コロイド上に提示されるHis標識タンパク質A又はGへの結合、のいずれかにより推定上の結合パートナーも提供している。蛍光部分のようなシグナリング実体は、ビオチン末端リガンドを介してコロイド上に共に固定できる。又はキレート/金属/金属結合標識による連結を介して固定することもできる。蛍光部分は、それを抗体に付着させ、抗体と結合するHis-タンパク質Gとのキレート/金属/金属結合標識を用いて固定させることもできる。次に、該部分は直接検出できる。あるいは、第一のリガンドを持つ一組のコロイドが蛍光部分を持ち、第二の組のコロイドが推定上の結合パートナーと消光部分を提供するように誘導体化される。リガンド-受容体対が相互作用すると、蛍光信号に測定可能な消光が生じる。候補薬は、この相互作用を分断するその能力について試験できる。

10

【0130】

そのような研究では、第一及び第二の化学又は生物学的種は、それぞれ第一及び第二のコロイド粒子に対して固定でき、他の化学又は生物学的種は他のコロイド粒子に対して固定できる。ある場合は、第一及び第二の化学又は生物学的種は同一である。すなわち、複数のコロイド粒子が同じ固定された実体を持つことになる。別の場合は実体は異なる。化学又は生物学的種は、例えば粒子に固定されているSAM形成種に共有結合的に付着することによってコロイド粒子に直接固定できる。又は、例えば別のコロイド粒子を介してコロイド粒子に固定されることによってコロイド粒子に対して固定できる。例えば、化学種が別のコロイド粒子に固定され、その(別の)コロイド粒子がコロイド粒子に固定されていれば、化学種はコロイド粒子に固定されている。一組の実施の形態において、コロイド凝集は、結合相互作用によってコロイド粒子に対して固定されている又は固定されるように適応されている化学又は生物学的種を用いて研究される。このときの結合相互作用は、核酸配列の相補核酸配列に対する結合は含まれない

20

コロイド/コロイド凝集を含む様々な研究が本発明に従って実施できる。一組のアッセイは、コロイド粒子に対して固定された吸光又は発光種の第二の種による影響を利用している。すなわち、第二のコロイド粒子に対して固定された第二の種を、結合、切断、又は本発明に従って研究されるのが望ましい他の相互作用によって、第一のコロイド粒子に接近させたり遠ざけたりすることによる影響である。例えば、蛍光分子を第一のコロイド粒子に対して固定し、該蛍光分子の蛍光を消光する、すなわち蛍光分子の発光を実行する能力を有する化学種を第二のコロイド粒子上に提供できる。次に、第一及び第二のコロイド粒子に対して固定されている第一及び第二の種が互いに結合すると、第一及び第二のコロイド粒子を相互に接近させるので、蛍光分子の消光が起こる。第一及び第二の種が第一及び第二のコロイド粒子に対して固定され、それぞれが共通の被検体に結合できると、被検体の存在が蛍光の消光を起こし、被検体があれば消光は回避される。

30

40

【0131】

候補薬は、一つの種との結合をめぐる被検体との競合について、又は被検体上の一つの部位との結合について試験される。この場合、被検体は既知種として提供される。候補薬の存在が第一及び第二のコロイド粒子の相互間の固定を阻害すると、消光が阻害される。代替の実施の形態は、第二のコロイド粒子上の第二の分子による、第一の分子の発光の増強又は発光もしくは吸光波長の移動を含む。

【0132】

このコロイド/コロイド凝集技術は、薬物又は問題とするタンパク質の結合パートナーを確認するのに使用できる。これは、薬物又はタンパク質を一組のコロイドに、そして可能性ある結合パートナーを他の組のコロイドに付着させ、二組

50

のコロイド間の結合相互作用をアッセイで検定することによって達成できる。薬物又はタンパク質の生物学的標的が一旦確認されたなら、コロイドに付着させた結合パートナーの存在下で候補薬をアッセイに加えて同族リガンドに対する薬物又はタンパク質の結合を分断することにより、第一組のコロイド上の薬物又はタンパク質の合成模倣品を確認することができる。この技術は、診断又は薬物スクリーニングの目的で、希少疾患用薬や特徴付けされていないタンパク質の生物学的標的を確認するのに非常に有用である。この技術を利用すれば、現在使用されている高価な又は製造が困難な薬物の合成代替品又は“模倣品”の確認が可能である。

【 0 1 3 3 】

一実施の形態において、脈管形成阻害薬を一組のコロイドに付着させ（親和性標識連結、化学カップリング、又は非特異的吸着を介して）、その生物学的標的を別の組のコロイドに付着させる。エンドスタチンのような、二つ以上のリガンド結合部位を有する脈管形成阻害薬の特異的ケースの場合、リガンドを一組のコロイドに付着させ、脈管形成阻害薬は溶液に添加するのがよい。候補薬を加え、結合相互作用を分断するその能力についてアッセイで検定する。次に、相互作用を阻害するいずれかの薬物を第三組のコロイドに付着させ、脈管形成阻害薬及び脈管形成阻害薬の生物学的標的に対する結合についてアッセイで検定する。脈管形成阻害薬の生物学的標的に結合し、脈管形成阻害薬がその標的に結合するのを阻害する薬物は、脈管形成阻害薬の“模倣品”とみなすことができ、代替薬として使用できる。このアッセイは、実質的にすべての薬物の模倣品のスクリーニングに使用できる。脈管形成阻害薬は高価で製造も困難であるので、その合成代替品の薬物スクリーニングは特に興味深い。当該アッセイは、エンドスタチン - ビトロネクチン又はエンドスタチン - R G D - ペプチド相互作用の分断を通じてエンドスタチンの、アンギオスタチン - A T P - シンターゼ又はアンギオスタチン - ビトロネクチン相互作用の分断を通じてアンギオスタチンの、又は T N P - 4 7 0 - メチオニン - アミノペプチダーゼ相互作用の分断を通じて T N P - 4 7 0 の合成代替品を確認するのに使用できる。他のコロイド / コロイドアッセイの場合と同様、色の変化、蛍光の消光、又は他の発光分子の増強又は抑制などが結果の指標となりうる。R G D / エンドスタチンの相互作用に関する試験は以下の実施例 1 8 に記載する。

【 0 1 3 4 】

このコロイド / コロイド凝集技術は、脈管形成阻害薬又は脈管形成経路に関与するリガンドの発見にも使用できる。一つのアッセイにおいて、推定脈管形成阻害薬又は関与するタンパク質を第一のコロイド粒子に対して不動化（例えば固定）することができる。第二のコロイド粒子は、脈管形成及び / 又は転移に関与する分子、例えば基底膜タンパク質、インテグリン、又は接着分子に対して固定化することができる。もし、特定の脈管形成阻害薬が、第二組のコロイドに固定されている基底膜タンパク質、インテグリン、又は接着分子に結合すると、二組のコロイドは互いに対して固定され、その結合相互作用が本発明の方法、例えば色の変化、沈殿などによって検出可能になる。本方法で脈管形成阻害薬が確認されると、結合を分断する候補薬がスクリーニングできる。該薬物が相互作用を分断すると、コロイド粒子は互いに対して固定されなくなるか又は固定の程度が低くなる。本アッセイは、既知の脈管形成阻害薬と共に使用して、脈管形成阻害薬の生物学的標的を確認又は立証することもできる。次に、候補薬をアッセイに添加して、同じ生物学的標的に作用する他の薬物を確認することができる。

【 0 1 3 5 】

そのようなアッセイで、コロイド粒子を互いに対して固定できる別の実施の形態は、コロイドをそれぞれ共通表面に対して固定することを含む。共通表面は、第一のコロイド粒子上の種の結合パートナーを提示する別のコロイド粒子の表面

10

20

30

40

50

であってよい。共通表面は、ニトロセルロース膜のような膜などのアーティクルの表面、チップ表面、SAMで誘導体化されたアーティクルの表面などであってもよい。好適な実施の形態では、コロイド粒子が結合できる表面は、結合が起こった場合に（共通表面上の種とコロイド粒子上の種との間で）、コロイド粒子が、検出（凝集に特徴的な色の変化、蛍光の消光、又は本明細書中に記載の他の性質によって）ができるほど十分近くに接近するように、十分高密度の結合部位を含む。

【0136】

別の実施の形態では、HIV関連P24タンパク質を認識する抗体をコロイド粒子に対して固定又はさもなければ不動化し、P24の含有が考えられる試料に曝露する。P24が存在すれば、コロイド粒子は接近し、本明細書中に記載のように検出される。本発明は、P24/抗体の相互作用を分断する候補薬のスクリーニングも提供する。

10

【0137】

タンパク質が機能するには酵素によって翻訳後修飾されなければならない多くの疾患状態があり、本発明はそのようなプロセスを研究できる技術及び成分を提供する。以下に、疾患状態を促進する酵素修飾の例を挙げる。このような例では、酵素活性を阻害することが望ましく、そうすることによって疾患が抑制される。しかしながら、治療上酵素活性を促進したい場合もある。カスパーゼは、“プログラムされた細胞死”という意味の用語であるアポトーシスの促進に参与している酵素である。従って、カスパーゼ活性、ひいてはプログラムされた細胞死を増大する薬物又は生体分子を確認するのは有益なことである。これらの治療薬剤をがん細胞に当てると、腫瘍細胞の特異的破壊が可能になる。

20

【0138】

本発明の方法を用いて活性を検定できる酵素は、1)基質を切断する酵素；及び2)基質に断片を付加する酵素の二つに大まかに分類される。

第一の分類に入る酵素活性、すなわち切断の例は、アミロイド前駆体タンパク質（APP）のプロセシングである。APPの分解産物は、アルツハイマー病に伴う凝集体及びプラークを形成するので、プレシネリン並びに - 及び - セクレターゼのようなAPPを修飾する酵素は、治療の重要な標的である。切断により、一般的に1~40又は1~42のアミノ酸からなるペプチドが生成するが、1~42ペプチドのほうはずっと凝集及び疾患を起こしやすい。

30

【0139】

他の場合には、酵素の切断活性を増大させるのが有益である。そのような例では、ある基質の切断を直接的又は間接的に促進する薬物又は生体分子をスクリーニングするのが有益である。例えば、カスパーゼは、アポトーシスすなわちプログラム細胞死の引き金を引くシグナリングカスケードに重要な役割を果たすタンパク分解酵素である。従って、このクラスの酵素の活性を促進又は始動させる因子（薬剤）を確認するのは有益である。次に薬物を腫瘍細胞に当てると、健常細胞には最小限の損傷しか与えずに腫瘍細胞を特異的に破壊する。

40

【0140】

カスパーゼ3は、配列DXXD/Xを切断する。カスパーゼ3は、プロテインキナーゼC（PKC）を、転写制御ドメインとキナーゼドメインの間で切断することが示されている。このことは、触媒ドメインがチェックされずに機能するのを可能にしてしまう。この活性がアポトーシス（プログラム細胞死）の引き金を引く。PKCのキナーゼドメインの突然変異体は、このタイプの（p53依存性）アポトーシスを誘発しなかった。本発明の一実施の形態で、カスパーゼ3の切断部位を含有するペプチドをコロイド粒子に固定する。例えば、ペプチドは、ペプチドのいずれかの末端に親和性標識を有するように合成または発現できる。金コロイドは、該親和性標識の結合パートナーを提供するように誘導体化する。こ

50

の組成物に、基質を切断する酵素を純粋な状態又は混合物の一部として、候補薬の存在下又は不在下で加える。そして、切断に及ぼす候補薬の影響を、コロイド/コロイド相互作用に関して本明細書中に記載した技術を用いて測定する。切断をシミュレートする、すなわちアポトーシスをシミュレートする薬物は、同じく本明細書中に記載の技術を用いてスクリーニングし確認できる。

【0141】

基質を切断し、アポトーシスを誘発しうる酵素の別の例を記述する。サイクリン依存性キナーゼ510 (cdk5) と p3511 からなる複合体は、ニューロンのある重要な細胞プロセスに必要とされている。しかしながら、酵素カルパインによる p35 の p25 への切断は、新しいタンパク質複合体 p25 / cdk5 12 を作り出す。この新規の複合体は不適切に局在化し、構成的に活性である。この複合体はタウを過剰リン酸化し、これが細胞骨格を分断しニューロンのアポトーシスを誘発する。p35 の p25 への切断は、 γ -アミロイドペプチド1~42 の添加によって増強できることも示唆されている。

10

【0142】

p35 の切断を阻害できる薬物は治療薬として有用であろうことは明らかである。この理由から、カルパイン又は他の修飾因子による p35 の切断を阻害する因子(薬剤)を確認するのは有益であろう。以下は、p35 のタンパク質分解を阻害する薬物の高処理量のスクリーニングを容易にするために本発明をどのように利用できるかを示す予言的な例である。

20

【0143】

酵素カルパインの基質である p35 を、別のコロイドへの直接又は間接的な固定が促進されるように適応する(必要であれば)。コロイドもこの固定を促進するように誘導体化されている。例えば、組換え p35 タンパク質を、NTA-Ni (His 標識を結合する) を持つ第一の金コロイドに付着させるために、一方の末端にヒスチジン標識を持つように発現させる。そして、グルタチオンを持つ第二のコロイドに付着させるために、他方の末端はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST) に組換え的に融合させる。あるいは、p35 は、p35 の部分に対する抗体を提供するように誘導体化されている第二のコロイドに自然に付着させるようにもできる。

30

【0144】

当初、修飾 p35 はコロイドと混合させない。むしろ、p35 の一部を別々に、カルパインとカルパインによる p35 の切断を阻害する能力を有すると考えられる候補薬のパネルとインキュベートする。適切なインキュベーション時間の後、基質 p35 の二つの別の部位に同時に結合するように誘導体化された二つの金コロイド集団を加える。金コロイドを溶液に加えたときに、懸濁液中に遊離したコロイドの特徴的なピンク色のままであれば、基質が切断されて、2個以上のコロイドを連結してコロイド-ペプチド細網にするように作用できなかったと結論づけることができる。しかしながら、溶液がピンク色から青色に変化した場合、p35 は切断されず、2個以上のコロイドが同時に連結した、すなわち候補薬が効果的にカルパイン切断を阻害したと推測できる。

40

【0145】

あるいは、色の変化をモニターするのではなく、顕微鏡下でこのアッセイを観察し、ペプチドコロイド細網が形成されているかどうかを判断してもよい。p35 の切断を阻害した薬物は、ペプチドの連続性を維持し、二つの認識部位を相互に、そして2個の別のコロイドに接続させたままにしておくようである。

【0146】

本発明の別の態様では、 γ -アミロイドペプチド(1~40又は1~42、可溶性又は予め形成された凝集体の状態のいずれか)を、p35 基質、純カルパイン、カルパインを含有する溶解産物、又は切断活性を含有する溶解産物、及び切

50

断を阻害すると考えられる候補薬と共にアッセイに加える。

【0147】

本発明を特定の酵素又は完全な p 3 5 の使用に制限するつもりはない。切断部位を含有する p 3 5 の任意の部分も、アッセイの基質としての使用に適切であろう。さらに、基質の 2 個のコロイドへの直接的又は間接的同時付着を促進する任意の官能性で基質を修飾してもよい。基質は、親和性標識、親和性配列、ピオチンなどで修飾できる。必ずしも必要というわけではないが、基質は、ペプチド上の二つの部位が同じコロイド上の二つの部位に結合するのを防止するために、二つの異なる親和性標識で修飾するのが好ましい。あるいは、基質を修飾せずに、抗体認識を介して 2 個のコロイドに付着させることもできる。カルバインは、純粋な形態、又は細胞溶解産物中にあるような他の酵素及び - アミロイドペプチドを含むタンパク質と混合した形態のいずれかで、アッセイに添加できる。

10

【0148】

当該アッセイは、96穴滴板フォーマットで実施し及び/又は自動分光光度計で分析することにより容易に多重化できる。

本発明の技術に従って研究できる酵素の別の例はマトリックスメタロプロテインである。マトリックスメタロプロテインは、がん細胞表面に発現され、がんの進行及び転移に關与する膜タンパク質の切断に關わっている。本発明の一つの技術で、マトリックスメタロプロテインによって切断できる基質(そのような基質は当該技術分野で公知である)を修飾し、2個のコロイド粒子に対して固定化する。この構成を、タンパク質の切断活性を阻害する候補薬の存在下で、マトリックスメタロプロテインに曝露すると、候補薬の有効性が分かる。候補薬が効果的にマトリックスメタロプロテインの活性を阻害すると、構成は青色になり(凝集コロイド)、候補薬がマトリックスメタロプロテイン活性を効果的に阻害しなければ、構成はピンク色になる(分散コロイド)。

20

【0149】

第二の分類に入る酵素活性、すなわち付加の例は、がん関連タンパク質 R a s の修飾である。ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼは、R a s に脂質様基を加える酵素である。この修飾により、R a s は膜に埋め込まれ、機能を発揮するようになる。この特定の場合には R a s は腫瘍原性を持つ。F P T と同様に基質は、親和性標識又は結合因子を基質の別の部分にそれぞれ付加し、二つの標識を持つ基質は、酵素がその機能を発揮した場合にのみ生じるようにする。タンパク質 R a s の特別な場合では、(H i s)₆ のような親和性標識を N - 末端に組換え的に用意して、一つのコロイドが後にタンパク質に付着するのを容易にできる。酵素が付加する脂質様基はファルネシルピロリン酸で、これは、オチンのような親和性標識を R a s への付着部位からは離れた部位に付着させて、実験室で容易に合成される。親和性標識された R a s と親和性標識された付加基を酵素及び候補薬と混合する。反応が進行するための適切な時間をおいた後、各親和性リガンドに対する結合パートナーを持つコロイドを試験溶液に加える。ここでも、ピンク色から青色への変化の阻害は、候補薬が酵素活性を阻害したことを示す。

30

40

【0150】

本発明の一態様は、コロイドに対して固定された種間の結合相互作用を示す、コロイド/コロイド相互作用の測定を含む。本発明に従って、コロイド上に S A M を形成する能力は、そうした研究のためにコロイドに種を連結させる一つの技術である。コロイドは、相互に結合する能力についての研究が望まれている種、例えばリガンドと受容体のような生物学的に關係のある結合パートナーに連結できる。又は、共通の実体に結合する能力を有しうる、あるいは別のコロイド粒子に対して固定された種にそれぞれ連結できる連結種を持つことができる。これは薬物の研究にも利用できる。研究用の種を、本明細書中に記載の任意の技術、例

50

例えば金属結合標識/金属/キレート連結によってコロイドに連結できる。例えば、ヒスチジン標識のような金属結合標識をリガンドに付着させ、標識された推定上の結合パートナーをNTA/Ni(II)提示コロイドと共にインキュベートできる。二つの成分が結合パートナーであれば、目に見える細網(ヒトの眼、顕微鏡などで見える凝集)が生じる。あるいは、推定上の結合パートナーが、コロイド上に提示されたグルタチオンに結合するGST融合タンパク質であってもよい。結合種又は本発明のアッセイに参加している他の種を表面に付着させるのに有用な他のリンカーは親和性標識などである。親和性標識は、生物学、生化学などで広く使用されている周知種である。

【0151】

一実施の形態で、組成物及び方法を利用して、標的タンパク質、並びにそれと他のタンパク質、核酸及び小分子との相互作用を検出することができる。本発明をタンパク質が関与する相互作用の研究だけに限定するという意味ではない。本明細書中に記載の方法は、互いに作用し合う任意の二つの種の検出にも適用できる。本発明の別の箇所に記載したように、金コロイド粒子は、均一溶液中に分散している場合はピンク色に見えるという固有の光学的性質を有している。しかしながら、コロイドが互いに接近するのを余儀なくされると、溶液はスペクトルの青色の端の方に变化する。タンパク質は、本明細書中に記載の様々な方法で金コロイドに付着させることができる。アッセイは直接的な相互作用の検出に限定する必要はない。コロイドに付着したリガンドは、そのリガンドが共通の標的(これは単一の標的分子であるというよりは生体分子の複合体であろう)を認識すると、コロイドを互いに近くに引き寄せることができる。

【0152】

タンパク質-コロイド細網は、コロイドに付着したリガンド及びそれらの結合パートナーを含有する溶液中ではっきりと目に見える。タンパク質又は他の分子は、コロイドに様々な方法で付着できる。例えば、親和性標識を問題のタンパク質又は分子に付着させ、親和性標識の結合パートナーをコロイドに付着させるなどであるが、これに限定されない。末端に硫黄を持つペプチドは金コロイドに直接付着させることができる、又はコロイド上に形成された自己集合単層に組み込むことができる。好適な実施の形態において、コロイドは、自己集合単層(SAM)で誘導体化され、該SAMは、問題とする組換えタンパク質に遺伝子的に融合できる便利な親和性標識の結合パートナーを提供している。例えば、タンパク質は、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)のような標識を含有する融合タンパク質として発現させることができる。GSTの結合パートナーであるグルタチオンは、容易にチオールに付着させることができ、また金コロイド表面上の自己集合単層に組み込むことができる。あるいは、非修飾タンパク質を、露出したカルボキシル基を持つコロイドにEDC/NHSカップリング化学により、共有結合的に付着させてもよい。

【0153】

本発明は、候補薬を、相互に直接的又は間接的に結合している分子を提示するコロイドと混合し、ピンクから青への色の变化の減退、又は目に見える細網形成の程度の減少を検出することも予期している。逆に、本発明の方法は、2個の分子の相互結合を直接又は間接的に容易にする分子を確認するのにも使用できる。

【0154】

本発明のこれら及び他の実施の形態の機能並びに利点は、以下の実施例でさらに十分に理解されよう。以下の実施例は、本発明の利益を示すのを目的としたものであり、本発明の全範囲を例示したのではない。

実施例

以下の実施例は、本発明のある実施の形態を説明するためのものであって、本発明の範囲を制限すると解釈されるものではない。

10

20

30

40

50

以下の実験内容の開示の中で、次の略語が適用される。eq (当量) ; μ (マイクロン) ; M (モル) ; μ M (マイクロモル) ; mM (ミリモル) ; N (規定) ; mol (モル) ; mmol (ミリモル) ; μ mol (マイクロモル) ; nmol (ナノモル) ; mg (ミリグラム) ; μ g (マイクログラム) ; ng (ナノグラム) ; L (リットル) ; mL (ミリリットル) ; μ L (マイクロリットル) ; cm (センチメートル) ; mm (ミリメートル) ; μ m (マイクロメートル) ; nm (ナノメートル) ; nM (ナノモル) ; (摂氏温度) ; PBS (リン酸緩衝化生理食塩水) ; U (単位) ; d (日)。

【0155】

これらの実施例は、あらゆる種類の凝集体形成について、それが神経変性疾患、非神経変性疾患、又は凝集が関与する非疾患性プロセスに関するかどうかを調べるのに適用可能な技術について記述する。当業者は、本明細書中に記載の利益を用いて、以下の実施例を容易に変更することが可能で、それらを凝集が関与する任意の数の神経変性疾患又は非神経変性疾患、及び非疾患性の凝集プロセスに適用することができる。

10

【0156】

実施例1：原線維の分光光度測定による検出

本実施例では、 $14\ \mu$ MのHis-A (1~40)ペプチド及び $30\ \mu$ LのNTA-チオールコロイドを含有する $100\ \mu$ Lの分液を、 $1\ \mu$ MのA原線維シード(種)、 $50\ \mu$ MのA原線維シード又は原線維なしのいずれかとインキュベートした。混合物を 37°C で0.5時間インキュベートし、次いでキュベットに移し、Hitachi U-2000分光光度計に入れた。各分液につき、 $569\ \text{nm}$ での吸光度を記録し、次いでキュベットを取り出し、硬表面に対して鋭く叩きつけて、ペプチドが原線維に組み込まれるのを促し、10分間放置してから $569\ \text{nm}$ で再度スキャンした。原線維シードを含有していた溶液では $569\ \text{nm}$ の吸収に鋭い低下(原線維が溶液から析出したため)が観察されたが、ペプチドしか含有しなかった溶液は安定を保っていた(図3)。グラフのバーの高さは、2回目の測定に対する1回目の測定の比率である。1) $1\ \mu$ MのA原線維シード(斜線のバー)及び原線維なし(塗りつぶしたバー) ; 2) $50\ \mu$ MのA原線維シード(斜線のバー)及び原線維なし(塗りつぶしたバー)。分析プロセスは、多穴滴板フォーマットとも適合する吸光光度計を用いて自動化できる。

20

30

【0157】

実施例2：コロイドの製造

本実施例では、 $1.5\ \text{mL}$ の市販の金コロイド(Amersham製AuroDye)をマイクロフュージに入れ、高の状態で10分間遠心分離してペレット化した。このペレットを $100\ \mu$ Lの貯蔵緩衝液(クエン酸ナトリウム及びトウイン-20)に再懸濁させた。 $40\ \mu$ Mのニトリロ三酢酸(NTA)-チオール、 $100\ \mu$ Mのフェロセン-チオール、及び $500\ \mu$ Mのカルボキシ末端チオールを含有する $100\ \mu$ Lのジメチルホルムアミド(DMF)溶液を加えた(フェロセンのシグナリング実体は任意)。チオール溶液中での3時間のインキュベーション後、コロイドをペレット化し上清は廃棄した。次に、 $400\ \mu$ MのDMF中トリエチレングリコール末端チオール $100\ \mu$ Lの中で、 55°C で2分間、 37°C で2分間、 55°C で1分間、 37°C で2分間、次いで室温で10分間熱サイクルした。熱サイクルの結果、最低エネルギー配座にないすべての種は除去されるので、安定な、密集した自己集合単層が得られる。熱サイクルは、広範な自己集合単層形成種のいずれについても実施できる。次に、コロイドをペレット化し、 $100\ \mu$ Lの $100\ \text{mM}$ NaClリン酸塩緩衝液を加えた。次に、コロイドを、コロイド貯蔵緩衝液中 $180\ \mu$ Mの NiSO_4 で1:1に希釈した。

40

【0158】

50

実施例 3 : S A Mコード化電極の形成

以下に記載のいくつかの実施の形態において、実施例は、S A M形成、コーゲン被覆、細胞成長、コロイド形成、及び交流ボルタンメトリー (A C V) に関する。S A M形成に関しては、ガラス製の顕微鏡スライドをT i の層、次にA u の層でスパッタリングした。各電極は、10%のメチル末端チオール (H S - (C H ₂) ₁₅ C H ₃)、40%のトリエチレングリコール末端チオール、H S (C H ₂) ₁₁ (C H ₂ C H ₂) ₃ O H、(式)及び50%のポリ(エチニルフェニル)チオール (C ₁₆ H ₁₀ S) を含有するD M F 溶液300 μ Lを用い、室温で0.5時間インキュベートした。次に、2 m l の400 μ Mのトリエチレングリコール末端チオールをチップを含有しているシンチレーションバイアルに入れ、バイアルを水浴中で以下のように熱サイクルした。すなわち、55 で2分間；37 で2分間；55 で1分間；37 で2分間；次いで室温で10分間の熱サイクルである。次に電極をE t O Hに浸漬し、次いで無菌P B Sで濯いだ。

10

【0159】

実施例 4 : 凝集体の極めて高感度の検出を示すアッセイ

神経変性疾患及び異常タンパク質凝集を特徴とする他の疾患、並びに他の非疾患性プロセスに特徴的な予め形成された凝集体を、時間の関数として色の変化及び目に見える原線維形成をモニタすることによって高感度に検出できる。

【0160】

金コロイドを、ヒスチジン標識タンパク質捕捉のため、実施例2に記載のように、ニトリロ三酢酸/ニッケル自己集合単層 (N T A - N i - S A M) で誘導体化した。コロイドは低密度のN T A - N i (総チオール濃度1000 : M 中40 μ M のN T A) で被覆し、共通のコロイド粒子に固定化された最隣接ペプチドの凝集を防止した。30 μ L の誘導体化コロイド分液を96穴滴板のウェルに入れた。ヒスチジン標識 - アミロイドペプチド (アミノ酸1 ~ 40) をp H 7 . 4 のリン酸塩緩衝液中に溶解し、それをコロイド溶液に、100 μ L 中の最終濃度が14 μ M になるように加えた。合成非ヒスチジン標識μ - アミロイドペプチドから製造した予備形成原線維を倍数希釈し、原線維の最終濃度が330ナノモル ~ 50ピコモルの範囲で変化するように溶液に加えた。各アッセイ (各ウェル) に対して、原線維を添加しない陰性対照アッセイを実施した (図4) 。溶液を37 で1時間インキュベートし、溶液を攪拌しないように気をつけた。原線維を含有している溶液の色は、金コロイドの特徴的なピンク色から濃い紫 / 灰色に変化した。ヒスチジン標識μ - アミロイド (1 ~ 40) は含有しているが予備形成原線維を含有していない溶液は、原線維を添加した溶液よりも遅い速度で、薄い紫色に変化した。予備形成原線維を含有しているウェルの中心部には暗色の塊が肉眼で明らかに見えた (図5) 。解剖顕微鏡で40倍の倍率を用いて観察したところ、大きな紫色の細網が見えた。これらの凝集体はプレートの底に沈降しているのではなく、液媒体中に明らかに懸濁していた。陰性対照のウェルには、粒状の沈殿物が見られたが、大きな凝集体はなかった。目視検査で、予備形成原線維を含有しているウェルとそうでないウェルの区別が、添加原線維濃度50ピコモルまで可能であった (図6) 。結果は、40倍の倒立顕微鏡に取り付けたN i k o n カメラ (A S A 800フィルム) で写真に撮って記録した。

20

30

40

【0161】

実施例 5 : コロイドを用いた視覚化

ペプチド及び原線維濃度が高くなると、コロイドで装飾された大きな原線維構造が目に見える。

【0162】

40 μ M のN T A - N i S A M を持つコロイドを実施例2に記載のようにして製造した。30 μ L のコロイド分液を96穴滴板のウェルに加えた。ヒスチジン標識 - アミロイドペプチド (1 ~ 40) を、最終体積100 μ L 中の最終濃

50

度 $20 \mu\text{M}$ を達成するように加えた。ヒスチジン標識 - アミロイドペプチドは、最終体積 $100 \mu\text{L}$ 中の最終濃度が $20 \mu\text{M}$ になるように加えた。予め形成した - アミロイド原線維を最終濃度が $1 \mu\text{M}$ になるように加えた。試料を 37 で 20 分間インキュベートし、凝集を促進するために鋭く 3 回叩いた。 37 で 1 時間のインキュベーションを続けた後、大きなコロイド - 原線維構造が肉眼ではっきりと見えた (図 7 A)。コロイドが原線維構造上に凝集すると、周囲の溶液は透明になった (ピンク色なし)。陰性対照として、コロイドに固定した結合種の代わりに無関係のタンパク質を固定した。結果を図 7 B に示す。

【 0 1 6 3 】

実施例 6 : 薬物スクリーニング

ヒスチジン標識 - アミロイド ($1 \sim 40$) ペプチドが凝集体を形成する条件を決定した。Sigma Aldrich R B I 薬物ライブラリーから選んだ候補薬を各アッセイ溶液に別々に加え、どの候補薬がアルツハイマー病に特徴的な原線維形成を阻害するかを判定した。結果を視覚化するための方法として、NTA - Ni - SAM を持つコロイド (前述) を加えた。

【 0 1 6 4 】

96 穴滴板の各ウェルに、 $30 \mu\text{L}$ の NTA - SAM 保持コロイド、 $10.7 \mu\text{M}$ のヒスチジン標識 - アミロイド ($1 \sim 40$) ペプチド $65 \mu\text{L}$ (最終濃度 $6.6 \mu\text{M}$)、 $5 \mu\text{L}$ の候補薬 (各薬物の最終濃度が $100 \sim 200 \mu\text{M}$ になるように) を加えた。溶液を入れたプレートを 37 で数時間インキュベートした。この間、プレートを視覚検査し、写真を撮って進行を定期的に記録した。

【 0 1 6 5 】

結果 :

色の変化 (ピンクから青) で、どの薬物が原線維形成を阻害したか予測された。約 2 時間のインキュベーション時点で、溶液の色を、薬物を加えていない陽性対照、及び薬物は加えたがヒスチジン標識ペプチドが - アミロイドではなく GST の陰性対照を含有するウェルと比較することにより、どのウェルが原線維形成を阻害した薬物を含有していたか肉眼ではっきり見てとれた。

【 0 1 6 6 】

ウェル中の原線維上に凝集したコロイドからも、原線維形成を阻害した薬物を含有するウェルの識別が可能である。目に見える凝集体がウェル中にないのが分かるからである。 40 倍に拡大すると、異なるウェル中の薬物の作用を区別する能力が向上した。

【 0 1 6 7 】

図 8 は、 37 で 72 時間インキュベーションした後の小分子ライブラリー、ラック 1 の写真の写真複写である。プレートが一番右側のウェル (カラム 12) は、 - アミロイドペプチドの代わりに His 標識 GST を入れた陰性対照のウェルで、ピンク色のままであった。その左隣のカラム、カラム番号 11 は、His 標識 - アミロイドは含有するが候補薬は含有しない陽性対照であった。ウェル G9 は明るいピンク色のままで、そのウェル内の化合物が原線維形成を阻害したことを示していた。A4、B5、C5、D5、F5、F9、G5、及び H10 のウェルはいずれも容易に目視確認できる凝集体形成を示していることに注意する。

【 0 1 6 8 】

生理的条件下で時間の関数として色及び凝集体形成をモニタするのは、薬効及び薬物安定性の指標となる。

実施例 7 : 増幅のため溶液中に遊離したペプチドの使用

NTA - Ni - SAM 提示コロイドを実施例 2 に記載のようにして製造した。総チオール濃度 $1000 \mu\text{M}$ 中 $40 \mu\text{M}$ の NTA - チオールを使用した。ヒスチジン標識 - アミロイド ($1 \sim 40$) ペプチドを、最終体積 $100 \mu\text{L}$ 中の最終

10

20

30

40

50

濃度が $58.2 \mu\text{M}$ を達成するように加えた。陰性対照として、無関係のヒスチジン標識ペプチド GST を γ -アミロイドペプチドの代わりにコロイド溶液に加えた。溶液を 37 でインキュベートした。ヒスチジン標識 γ -アミロイドペプチドを含有する溶液には 15 分以内に大きな凝集体がはっきりと見られた。対照溶液には何の構造物も見られなかった。 γ -アミロイドペプチドを含有する溶液は灰色 / 紫色に変化した。陰性対照溶液はピンク色のままであった。この結果は、溶液中に遊離している γ -アミロイドペプチドは凝集し、凝集プロセスを増幅又は促進するように作用したという考えと一致する。

【0169】

実施例 8 : 電子的検出

γ -アミロイド原線維を電子的に検出する我々の方策は、まず、ヒスチジン標識 γ -アミロイドペプチド (1 ~ 40) を、 γ -アミロイド 1 ~ 42 ペプチドから製造した予備形成原線維に組み込むことであった。NTA と電子シグナリングのためのフェロセン誘導体を持つコロイドを加え、少なくとも一部の His 標識 γ -アミロイドペプチドがコロイド粒子に付着するようにした。我々の目的は、次にコロイド装飾原線維に結合する結合リガンドを持つ磁気ビーズを加え、それらを磁氣的に動作電極に誘引することであった。

【0170】

NTA-SAM 保持コロイドを実施例 2 に記載のようにして製造した (ただし、標準のフェロセン-チオールの代わりに $100 \mu\text{M}$ のオクタメチルフェロセン-チオールを使用した)。 $30 \mu\text{L}$ のコロイドを各アッセイ溶液に加えた。ペプチド添加 (これは予備形成原線維がない場合にペプチドの原線維形成を促進する) 後に溶液をピペットで取る必要をなくして交流ボルタンメトリー (ACV) 分析を容易にするために、アッセイ溶液を、静置磁石上にある実施例 3 に記載のように自己集合単層で誘導体化された金被覆ガラススライド上に固定した 1 mL 容量のシリコンガセットに混合した。ヒスチジン標識 γ -アミロイドペプチド (アミノ酸 1 ~ 40) を、 $100 \mu\text{L}$ 体積中の最終濃度 $14 \mu\text{M}$ になるように加えた。 γ -アミロイドペプチド (1 ~ 42) から製造した予備形成原線維を、最終濃度 $15 \mu\text{M}$ を達成するように加えた。陰性対照溶液は、(1) コロイド、ヒスチジン標識 GST + 原線維、ただし His 標識 γ -アミロイドペプチド (1 ~ 40) なし; (2) コロイド、His 標識 γ -アミロイドペプチド (1 ~ 40)、ただし原線維なし; (3) 陽性の結果をもたらすと思われる全成分、ただし His 標識ペプチドが原線維に組み込まれる前の時点 0 で測定、であった。溶液を 37 で 20 分間インキュベートした。タンパク質 A (抗体の Fc 部分を結合する) で誘導体化された市販の磁気ビーズ (Bang Labs and Prozyme 製) を、結合能の $1/10$ のまで抗体 (BioSource Int. より購入) と予め結合させた。この抗体は γ -アミロイドペプチド 1 ~ 42 は認識するが 1 ~ 40 は認識しない。抗体提示磁気ビーズ $20 \mu\text{L}$ を ACV 分析 (10 Hz ; 25 mV の過電位; Ag/AgCl 参照電極、Pt 補助電極つき; 動作電極として作用する SAM 被覆金チップ) の直前に各溶液に注入した。

【0171】

結果:

ヒスチジン標識 γ -アミロイドペプチド (1 ~ 40)、NTA-Ni 及びフェロセン保持コロイド、並びに予備形成原線維を含有し、37 で 20 分間インキュベートした溶液は、コロイド粒子に付着させたフェロセン誘導体 (オクタメチルフェロセン) の特徴的な酸化電位 (220 mV) で $2.0 \mu\text{A}$ の電流ピークを生じた。図 9 のトレース A 参照。

【0172】

ヒスチジン標識ペプチドが凝集体に組み込まれる前、直ちに測定した同一の溶液は、 220 mV で約 $0.17 \mu\text{A}$ のわずかなピークを生じた。図 9 のトレース

10

20

30

40

50

B 参照。

【0173】

全成分を含有するが予備形成凝集体を含まない別の陰性対照溶液は、 $0.022 \mu\text{A}$ のわずかなピークを生じた(図9、トレースC)。

予備形成原線維は含有するがヒスチジン標識 - アミロイドペプチドの代わりにヒスチジン標識 GSTタンパク質をコロイドに付着させた第三の陰性対照溶液は電流ピークを生じなかった(図9、トレースD)。

【0174】

実施例9：光散乱分析

溶液中の粒子の平均粒径を測定する市販の光散乱装置を用いて、NTA - Ni - SAM被覆コロイドとヒスチジン標識 - アミロイド(1~40)ペプチドを含有する溶液を、予備形成凝集体の存在下又は不在下で分析した。コロイドは実施例2に記載のように製造し、ヒスチジン標識 - アミロイドは、最終体積 $100 \mu\text{L}$ 中の最終濃度が $10.2 \mu\text{M}$ になるように加えた。予備形成凝集体は、最終濃度が $2 \mu\text{M}$ になるように加えた。平均粒径のベースラインの測定は試薬だけで行い、 - アミロイド原線維がなければどの成分も凝集しないことを確認した。

10

【0175】

ベースラインの測定：

1. $40 \mu\text{M}$ のNTA - SAM誘導体化コロイドのみ；直径 = 14.87 nm
2. ヒスチジン標識 A 1~40ペプチド提示コロイド；直径 = 14.96 nm
3. $1 \mu\text{M}$ の - アミロイドペプチド(1~42)予備形成原線維と混合したコロイド(表面にHis標識 A 1~40を固定していない)；直径 = 15.93 nm ； $t = 0$

20

実験：

1. $1 \mu\text{M}$ の - アミロイドペプチド(1~42)予備形成原線維と混合した、ヒスチジン標識 A 1~40ペプチド提示コロイド、 $t = 0$ での測定で 15.5 nm 。
2. $1 \mu\text{M}$ の - アミロイドペプチド(1~42)予備形成原線維と混合した、ヒスチジン標識 A 1~40ペプチド提示コロイド、高輝度ランプ下、 $t = 1.5$ 時間での測定：直径 = $10,000 \text{ nm}$ 超、図10参照。

30

【0176】

陰性対照：

3. ヒスチジン標識 A 1~40ペプチド提示コロイド；予備形成原線維の代わりに緩衝液を添加； $t = 0$ で測定；直径 = 14.96 nm 。
4. ヒスチジン標識 A 1~40ペプチド提示コロイド；予備形成原線維の代わりに緩衝液を添加； $t = 1.5$ で測定；直径 = 579.7 nm 、図11参照。

【0177】

これらの結果から、得られたマクロ構造の直径を測定することによって検体中の凝集体の量が定量できることが分かる。96穴滴板フォーマット中の溶液の平均粒径を同時に測定する光散乱装置が市販されている。これまで、ペプチドモノマーと - アミロイド凝集体との区別に光散乱を使用する試みは、両方の種の直径が非常に小さく検出下限にあること(- アミロイド原線維はおよそ数百nm)、及びモノマーと凝集体の差も小さいことから、限られた成功しか収めていなかった。しかしながら、本発明者らは、リガンド保持コロイドが、小さくて検出の困難な原線維と一緒に連結し、まとめ合わせて容易に検出可能なマクロ構造にする作用を行うことを示した。

40

【0178】

実施例10：特異性

誘導体化されたコロイドによって提示される - アミロイドペプチドが、正常

50

の診断試料中に存在すると思われる原線維種に非特異的に組み込まれるかどうかを見るために、ウシ胎仔血清 (FBS) で視覚的アッセイを実施した。(FBS は、他の原線維種を含め、無関係なタンパク質をCSFより100倍多く含有する。) $1 \mu\text{M}$ のA_{1~42}原線維を、様々なFBS濃度の溶液中、ヒスチジン標識A_{1~40}を提示した $40 \mu\text{M}$ のNTA-SAMコロイド $30 \mu\text{L}$ に加えた。誘導体化コロイドの原線維上への凝集はFBS濃度が高くなっても増加せず、本アッセイは他のタンパク質又は原線維種による誤った人為的結果に傾かないことが分かった。コロイド上に固定化されたHis標識A_{1~40}を含有するが予備形成A_{1~42}原線維を含有しない陰性対照溶液はピンク色のままで、40倍又は100倍に拡大しても構造体は観察されなかった。

10

【0179】

実施例11：目に見える原線維構造の程度を使用してCSF試料中のアルツハイマー病を診断する

CSF試料を用いた盲検試験で(実験者には一つがAD患者の試料であるのか、両方ともそうなのか、両方ともそうでないのか知らされていない)、実施例2に記載のように製造した $40 \mu\text{M}$ のNTA-SAM保持コロイドの分液 $30 \mu\text{L}$ を96穴滴板のウェルに加えた。His標識A_(1~40)ペプチドを最終濃度 $3.75 \mu\text{M}$ を達成するように加えた。2人のアルツハイマー病患者から採取したCSF分液をコロイド/ペプチド溶液に加えた。加えたCSFの量は、最終のCSF濃度が12.5%又は25%のいずれかになるように変えた。試験した各CSF試料について、条件を以下のように変化させた。すなわち、(1)試料溶液に予備形成A_{1~42}原線維($1 \mu\text{M}$; $1 \sim 42$)を添加又は“播種”した;(2)溶液に予備形成A_{1~42}原線維($0.1 \mu\text{M}$; $1 \sim 42$)を播種した;(3)溶液に何も播種しなかった;そして(4)陰性対照として、プローブのHis標識A_{1~40}をコロイドに固定しなかった。37°Cで3時間後、His標識A_{1~40}を含まない陰性対照と予備形成原線維を全く含まない一患者からの一試料(#101)以外のすべての試験溶液に原線維のマクロ構造が見えた。原線維構造の程度はCSF濃度の上昇につれて増大した。同様に、構造形成もシード(種)の濃度が増加すると増大した。他のCSF含有溶液はピンク色から紫色に変わったが、40倍に拡大しても原線維凝集体の形成は見られなかった。対照溶液(コロイド上にHis-A_{1~40}の固定なし)はピンク色のままで、構造形成の何らの徴候も見られなかった。一晚のインキュベーション(合計10時間)後、原線維は、患者#109のCSFを含有する溶液にもはっきりと認められたが、その広がり第一の患者のものよりもかなり小さかった。患者1と同様、構造形成の程度は、CSF濃度の上昇及び β -アミロイドのシード濃度の上昇と共に増大した。試料の検査記録から、CSF試料は両方ともアルツハイマー患者からのもので、第一の患者(101)の疾患の進行は、診断後の経過時間及び痴呆診査の検査法であるBlessed Dementia Scaleスコアに基づき、第二の患者のおよそ2倍であることが確認された。患者101のBlessed Dementia Scaleスコアは21で、患者109のスコアは12であった。患者101の β -アミロイド濃度は 8 mg/ml 、#109は 4.6 mg/ml と測定された。

20

30

40

【0180】

実施例12：CJDの検出と診断

この仮説実施例で、NTA-Ni提示コロイドを、His標識PrPタンパク質を可溶性の状態(非変換形)で含有する溶液に、少なくとも一部のHis標識ペプチドがコロイドに付着するように加える。

【0181】

診断：色の変化：正常プリオンタンパク質(PrP)、又はアミノ酸109~141もしくは113~141のようなフラグメントを、SAM被覆コロイドへ

50

の結合が容易になるように誘導体化する。例えば、正常のシリアンハムスター PrP を、6 - ヒスチジン標識のような親和性標識を持つように発現させる。ヒスチジン標識 PrP は NTA - SAM 誘導体化コロイドに NTA - Ni 結合を介して付着する。伝染性 PrP を含有する試料を加える。試料を 37 でインキュベートして正常 PrP のプロテアーゼ耐性形への変換を促進する。正常 PrP の耐性形への変換はタンパク質凝集を起こすので、コロイドは接近を余儀なくされて、色がピンクから青に変化する。試料には正常の非結合 PrP、又はそのフラグメントを添加して、タンパク質濃度で促進される凝集プロセスを増幅することもできる。試料はまた、凝集プロセスを促進するために機械的攪拌、光又は音のエネルギーに曝露してもよい。

10

【0182】

薬物スクリーニング：候補薬を、PrP 結合コロイド及び伝染性 PrP 試料に加え、結合させる。次に試料を 37 でインキュベートして PrP の変換と凝集を促進する。ペプチドの PrP への結合又は PrP の耐性形への変換を阻害する薬物を含有する試料は赤いままであるが、無効薬物を含有する試料は色が赤から青へ変化する。

【0183】

あるいは、候補薬、PrP 結合コロイド、及び伝染性の試料組成物を、インキュベーション後電子的又は電気化学的に分析する。ペプチドの PrP への結合又は PrP の耐性形への変換を阻害する薬物を含有する試料は電子信号を発しない又は弱い信号を発するが、無効薬物を含有する試料は、電極上にコロイド凝集体が沈殿するために電子信号を発する。

20

【0184】

伝染性物質を含有していない薬物スクリーニングアッセイも考案できる。シリアンハムスターの PrP 配列のアミノ酸 90 ~ 145 からなるペプチドは、正常 PrP のプロテアーゼ耐性形への変換を促進することが従来示されているが、それを PrP 結合コロイドに加える。試料を 37 でインキュベートし、正常 PrP の耐性形への変換を促進する。正常 PrP の耐性形への変換はタンパク質凝集を起こすので、コロイドは接近を余儀なくされて、色がピンクから青に変化する。あるいは、組成物を電子的又は電気化学的に分析することもできる。

30

【0185】

本発明自体は、どの PrP 配列がコロイドに付着したプローブ分子としての使用に最適であるか、またどの配列が凝集促進剤として機能するかを判定するのにも使用できる。候補プローブ配列ペプチドをコロイドに付着させ、単独で試験してそれらの固有の凝集ポテンシャルを測定する。これは低いはずである（色変化なし）。次に伝染性又は変換 PrP と共に試験して、PrP の変換形に結合する候補プローブ配列ペプチドの能力を査定する（色変化あり）。凝集促進剤の候補のペプチド配列をコロイドに別に付着させ、それらの凝集能及び溶液の色変化を起こす能力について、単独で及び変換 PrP と共に試験する。

【0186】

40

【化 1】

106-128 (KTNMKHMAGAAAAGAVVGGLGGY)

109-141 (MKHMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPMMHF)

113-141 (AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPMMHF)

119-141 (GAVVGGLGGYMLGSAMSRPMMHF)

117-141 (AAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPMMHF)

115-141 (AAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPMMHF)

113-141 (AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPMMHF)

10

Chabry J, Caughey B, Chesebro B, J Biol Chem 1998年5月22日; 273(21): 13203-7; シリアンハムスターのPrPの残基90~145 (Residues 90-145 of Syrian Hamster PrP), J. Mol. Biol. (1997) 270, 574-586.

実施例 13 : 電子的検出

この仮説の実施例では、試料中のプリオン疾患の存在も電子的に検出できる。NTA-Ni及びオクタメチルフェロセン提示コロイドを、His標識PrPタンパク質を可溶性の状態(非変換形)で含有する溶液に、少なくとも一部のHis標識ペプチドがコロイドに付着するように加える。PrP又はそれに対する抗体のいずれかを提示する磁気粒子もアッセイに加える。伝染性PrPを含有すると考えられる試料を加える。伝染性PrPは、コロイド上及び溶液中に遊離している正常PrPの両方ともを変換し、それらも他のタンパク質の変換に携わることになるので、塊状凝集が起こる。磁気粒子及びコロイド粒子の両方を同じ凝集体に組み込む塊状凝集が起こる。次に、この凝集体は、SAM被覆される電極に磁氣的に引き寄せられるので、ACVで分析する。

20

【0187】

診断: 電子的: 伝染性物質も電子的に検出できる。正常PrPは、前述のようにSAM被覆コロイドに結合されている。前記コロイドは、フェロセンのようなレドックス活性金属などのシグナリング部分も保持している。次に、試料を37でインキュベートしてPrPの変換と凝集を促進させる。PrPの耐性形への変換は不溶性凝集体の形成を起こすので、これが電極表面上に沈殿して電子信号を出す。電極は、標準の電気化学分析装置及び交流ボルタンメトリー(ACV)のような技術を用いて分析する。

30

【0188】

実施例 14 : ELISA

この予言の実施例では、分子又は細胞生物学の専門家に馴染み深い技術を使用する。エンザイムイムノアッセイ(ELISA)である(Current Protocols in Molecular Biology(分子生物学における現在のプロトコル), Volume 2, Immunology 11.2, 1996, 著作権John Wiley and Sons Inc. 1994-1998)。通常、ELISAを実施する場合、第一の種をプラスチック基板に直接又は間接的に付着させる。第二の種を加え、プレートを洗浄する。第二の種の存在を、シグナリング能力も有する“二次”抗体をそれに結合させることによって検出する。二次抗体は、通常、典型的には西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アルカリホスファターゼ(AP)のような酵素、又は加えられた基質上で反応を実施でき、色の変化を生じる(分光光度計で検出)蛍光タグ、又は蛍光光度計で検出できる蛍光標識タグに結合されている(例えば、“インビボ”における、感染神経線維及び感覚ニューロンに受動移入された、単純ヘルペスウイルスの糖タンパク質Dに対するヒト組換えモノクローナル抗体の局在(Localiz

40

50

ation of a passively transferred human recombinant monoclonal antibody to herpes simplex virus glycoprotein D to infected nerve fibers and sensory neurons in vivo)”, Sanna PP, Deerinck TJ, 及び Ellisman MH, 1999, Journal of Virology 10月 Vol 73 (10 8817 - 23) 参照)。多くの場合、便宜上、すべての抗体を酵素に結合する必要はないので、特異認識抗体としてマウス抗体を使用し、次いで酵素の結合させたウサギ抗マウス抗体を加える。

【0189】

本明細書中に記載の技術を用いてELISAの感度を大幅に上げることができるので、天然リガンド(タンパク質又はペプチド)又は候補薬をプローブ分子として使用し、固定された標的種の存在を検出できる。固定された種の存在は、複数の西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)又はアルカリホスファターゼ(AP)も提示するコロイドに付着させたリガンドをそれに結合させることによって検出される。酵素は、様々な手段によってコロイドに都合よく連結できる。例えば、酵素に直接付着させたヒスチジン標識、又はコロイドに付着させたヤギ抗体にマウス抗ヤギ酵素結合抗体をヒスチジン標識タンパク質Gを介して結合させるなどの手段である(Akerstrom, B., Nielson, E., Bjorck, L. Journal of Biological Chemistry, 1987年10月5日 Vol. 262 (28) 13388 - 91ページ、及び Fahnestock, S.R., Alexander, P., Nagle, J., Filpula, D. (1986) Journal of Bacteriology Vol. 167, 870 - 880)。コロイド上で複数の酵素と共に固定されているリガンドを二次抗体の代わりに標的種に結合させることにより、結合事象に対するシグナリング分子の割合は甚だしく増加する。コロイド上の1個の抗体又はリガンドがELISAプレート上に提示された抗原に結合することは、間接的に数千又は数百万の酵素の結合をもたらす。あるいは、既知種を意図的に96穴滴板に結合させてもよい。そうすると、それぞれ別の候補薬をシグナリング酵素と共に提示しているコロイドを使って精査することができる。現在のところ、各候補薬を酵素に結合させられない既存のELISA技術で行うのは不可能である。あるいは、固定された標的に対する天然リガンドを、シグナリング酵素と共にコロイド上に提示し、プレートの各ウェルに候補薬を加えて、相互作用を分断することもできる。未結合コロイド、従ってそれらの信号は洗浄工程で喪失する。抗体又はリガンド提示コロイドの標的は、ELISAプレートに直接又は間接的に(別の抗体又はリガンドを介して)結合した細胞又はタンパク質であり得る。この変形ELISA法の利点は、感度だけでなく効率でもある。数百のシグナリング酵素がコロイドを介して1個の抗原に結合したままであるので、基質の加水分解がより迅速に起こり、適切な読みに必要な時間も少なくてすむ。

【0190】

本実施例では、ELISAプレート上で、試料中の凝集体形成又は原線維形成種、プロトフィブリル種、又は凝集体種の存在をいかにして検出するか、又は異常タンパク質凝集に伴う疾患を阻害する薬物のスクリーニングをいかにして行うかについて述べる。凝集体又は原線維形成種を結合する結合種、あるいは原線維もしくは凝集体形成種、プロトフィブリル又は凝集体に対する抗体(具体的にはA 1~42に対する抗体)をELISAプレートのウェルに固定する。診断アッセイでは、次に該抗体を、凝集体形成又は原線維形成種を含有していると考えられる試料に曝露し、そして該試料と共に、金属結合標識(ヒスチジン標識)を持つ結合種、場合により前述した増幅種、及び金属に配位したキレート(NTA)を持つコロイド粒子、並びに粒子にそれぞれ固定された非電子シグナリング実体も混合する。非電子シグナリング実体は、蛍光標識、西洋ワサビペルオキシダ

10

20

30

40

50

ーゼ、アルカリホスファターゼなどであろう。

【0191】

本アッセイを用いて薬物をスクリーニングしたい場合、凝集プロセスを阻害する候補薬の存在下で同一の手順を実施する。

実施例15：生化学的進行の各期で凝集体形成に影響を及ぼす候補薬の細胞ベースのスクリーニングアッセイ

本実施例では、神経変性疾患及び非神経変性疾患を含む凝集関連疾患に關与する細胞プロセス、及び非疾患プロセスに影響を及ぼす候補薬の活性をいかにして試験するかについて述べる。 - アミロイドの産生、切断を含むプロセッシング、及び分泌に直接的又は間接的に影響を及ぼす薬物の活性についてそのスクリーニングを可能にする全細胞アッセイが設計されている (Wolfe, ら、Nature, 1999年4月8日; 398(6727): 513-7; Haass, Nat. Med. 1999年12月; 1(12): 1291-6; LaBlanc, ら、J Neurosci Res., 1992年4月, 31(4): 635-45)。

10

【0192】

アミロイド前駆体タンパク質 (APP: - アミロイドのタンパク質前駆体) はヒト胚性腎細胞に安定的にトランスフェクトされた (Selkoe, "アルツハイマー病における - アミロイド前駆体タンパク質及びプレセニリンの細胞生物学 (The Cell Biology of Beta-Amyloid Precursor Protein and Presenilin in Alzheimer's Disease.)", Trends in Cell Biology, 8: 11, 447-453, 1998年11月; Knops, ら, "液胞型ATPアーゼの選択的阻害剤であるバフィロマイシンA1によるA-放出のタンパク質型特異的阻害 (Protein-type Specific-Inhibition of A-Beta Release By Bafilomycin A1, A Selective Inhibitor of Vacuolar ATP ases)", Journal of Biological Chemistry, 270: 6, 2419-2422, 1995年2月10日)。細胞 (体積100ul、集密度40%) を96穴滴板に分配し、DMEM (ダルベッコ変性イーグル培地) 中で37で21時間、CO₂インキュベータ内で成長させた。NTA-SAM (チオール溶液中4% NTA) で誘導体化されたコロイド (30ul) をヒスチジン標識 - アミロイドペプチド (1~40) と混合し、次いで微量定量プレートの各ウェルに加えた。各ウェルの - アミロイドの最終濃度は17uMであった。対照ウェルは、1) - アミロイドペプチドの代わりにヒスチジン標識GST; 又は2) 成長培地中に細胞が存在しない以外は上記すべて; 又は3) APPがトランスフェクトされていない細胞のいずれかを含有していた。

20

30

【0193】

21時間の時点でコロイド及びペプチドを加えたところ、APPプラスミドを発現している細胞、コロイド及びHis標識 - アミロイドを含有している溶液だけが特徴的なピンク色から紫色に変わった。対照ウェル中の溶液はピンク色のままであった。

40

【0194】

前述のように処理された細胞の別のバッチを、コロイド及び - アミロイドの添加後さらに18時間成長させた。これらの細胞はAPP産物 (- アミロイド1~40及び1~42) を出し続けていた。40倍に拡大して観察すると、蓄積したコロイド-ペプチド凝集体の光輪が各細胞の周囲に見えた。コロイド及びHis標識ペプチドとインキュベートした細胞は、コロイドの局部的蓄積は見られなかった。 - アミロイド及びコロイドとインキュベートした対照細胞 (APPのトランスフェクションなし) も、コロイド凝集の徴候は見られなかった。コロイド、 - アミロイド及び細胞成長培地を含有する対照溶液にも、コロイド凝集の徴候は見られなかった。

50

【0195】

本実施例は、神経変性疾患を抑制するための候補薬を、神経変性疾患の原線維又は凝集体形成種を分泌するように適応された細胞に曝露し、そして候補薬が細胞から分泌される物質の凝集ポテンシャルに及ぼす影響を測定することを含む、本発明の別の態様も提供している。本実施例は、候補薬が細胞に及ぼす影響を測定することによって、薬物の毒性を測定する技術も提供している。

【0196】

実施例16：腫瘍抑制に特徴的な凝集の測定 (p53)

この仮説的実施例では、p53の多量体化を分断又は増強する分子のスクリーニング法を記載する。ある場合には野生型のタンパク質がスクリーニングの標的になり、別の場合には特定の突然変異体を標的にすることで、野生型の機能を救うことができる。p53(野生型又は突然変異体)の多量体化ドメインが、金コロイドへの付着を容易にする親和性リガンドを持つフレキシブルなリンカーで修飾されるように発現させる。ある場合には、4量体化ドメインを核外への輸送シグナルなしに発現させることができる。リンカーの修飾は、タンパク質フラグメントのN-末端(多量体化ドメインからは離れている)か、又はC-末端のいずれかに付着させることができる。一部の組成物は、コロイドの存在が多量体化を立体的に妨害しないように、異種の集団を含有できる。また、非結合タンパク質を組成物に加えて、付着コロイドによる立体障害を回避することもできる。

10

20

【0197】

タンパク質フラグメントを金コロイドを含有する溶液に加える。金コロイドは、少なくとも一部のタンパク質の付着を容易にするために改変されている。タンパク質フラグメントが多量体化すると、溶液はその固有のピンク色から紫/青色に変わる。候補薬又は生体分子を一部の溶液に加える。ここでも、ピンクから青への色変化は多量体化を示す。色の変化は連続的にモニタできる。例えば、タンパク質フラグメントを溶液に加え、多量体化が起こり、溶液がピンク色から青色に変わる。次に候補薬又は生体分子を加え、青色がピンク色に戻る変化が検出されたら、候補分子が多量体化を分断したことを示すことになる。

【0198】

がんで発生するp53の突然変異の多くは、タンパク質のDNA結合ドメインが関与している。本発明は、突然変異体に結合する能力についてDNA配列をスクリーニングしたり、また、その天然のコグネイトDNA配列への結合を回復させる分子を確認するのに使用できる。この計画では、DNA(好ましくはdsであるが一本鎖であってもよい)をコロイドに付着させる(ビオチン-SA-SAMを介して、又は市販のストレプトアビジン被覆コロイドに)。DNA結合ドメイン及び4量体化ドメインの両方を含有するp53タンパク質又はそのフラグメント(野生型、突然変異体、又は両方)を溶液に加える。p53の多量体は、コロイドに固定されたDNA鎖にも結合するが、コロイドの凝集を誘発し、色をピンクから青へと変化させる。候補薬並びに生体分子も、DNA結合を促進するそれらの能力を試験するために組成物に加えることができる。別の実施の形態では、タンパク質を、それぞれ異なるDNA配列を保持しているコロイドの別のバッチに加える。タンパク質は多量体化するので、ピンクから青への溶液の色変化は、特定のバッチのコロイドに提示されたDNA配列に結合したタンパク質複合体を示す。

30

40

【0199】

あるいは、DNA結合に影響を及ぼす突然変異を有するp53の多量体を、候補薬と共に、DNA配列(好ましくはコグネイト配列)提示コロイドを含有する溶液に加えてもよい。このスクリーニングで、DNA結合特異性を変える分子が確認される。

【0200】

50

実施例 17 : ビオチン / ストレプトアビジンを介するコロイド / コロイド連結の測定

一組の金コロイドを、ビオチン - チオール (SAM 形成種は C11、3 エチレングリコール単位、それにビオチンを含む) 並びに C16 カルボキシ末端チオール (混合 SAM) を組み込んだ自己集合単層で誘導体化した。ビオチンに対して 4 個の結合部位を持つストレプトアビジン、又はランダムタンパク質 (GST) をコロイド溶液に加えた。ストレプトアビジンとその結合パートナーのビオチンを含有する溶液は直ちに青色に変化したが、対照溶液は変化しなかった。

【0201】

実施例 18 : NTA 提示コロイド上のタンパク質 / タンパク質認識を介するコロイド / コロイド連結の測定

ニトリロ三酢酸、NTA (ヒスチジン標識タンパク質捕捉のため) を提示している自己集合単層で誘導体化されたコロイド 600 μ L を、500 μ M のヒスチジン標識 RGD モチーフ含有ペプチド 60 μ L と混合した。第二組の NTA - Ni 提示コロイド 600 μ L を、陰性対照として無関係なタンパク質 GST の 500 μ M 溶液 60 μ L と混合した。コロイドを遠心沈殿させてリン酸塩緩衝液に再懸濁させ、残った非結合タンパク質又はペプチドを除去した。脈管形成に関与し、RGD ペプチドのようなピトロネクチンの領域に結合すると考えられる二つのタンパク質、エンドスタチン及びアンギオスタチンを、透析によってリン酸塩緩衝生理食塩水中に用意し、次に PBS で 1 mg / mL の貯蔵濃度を 1 : 10 に希釈した。

【0202】

400 μ L のリン酸塩緩衝液 (pH 7.4)、200 μ L の RGD 結合コロイド又は GST 結合コロイドのいずれか、及び 100 μ L のエンドスタチン又はアンギオスタチンのいずれか、50 μ L のエンドスタチン又はアンギオスタチン / 50 μ L のリン酸塩緩衝液、又は 100 μ L のリン酸塩緩衝液 (陰性対照として) を結晶化皿の各ウェルに加えた。色の変化を室温で時間をかけてモニタした。約 15 分後、RGD ペプチド結合コロイド及びエンドスタチンを含有するウェルで赤から青への変化が見られた。色の変化は、50 μ L エンドスタチン / 50 μ L リン酸塩緩衝液を含有するウェルより、100 μ L のエンドスタチンを含有するウェルで顕著であった。エンドスタチンと GST 結合コロイド、又はアンギオスタチンと RGD 又は GST 結合コロイドを含有するウェルでは色の変化は起こらなかった。図 13 に結果を示す。A 列はコロイドとアンギオスタチンを含んでいた。B 列はコロイドとエンドスタチンを含んでいた。(C 列と D 列は空)。縦の列 1 ~ 3 は、コロイドに固定された RGD ペプチドを有する。4 ~ 6 列は、コロイドに固定された無関係のタンパク質 GST を有する。縦の 1 列と 4 列は 100 μ L の関係薬 (エンドスタチン又はアンギオスタチン) を含有する。結果は、エンドスタチンが RGD モチーフ含有ペプチドに結合し、またエンドスタチンは 2 個以上の RGD ペプチドに結合できることを示す。従ってコロイドを連結するので、赤から青への変化が起きる。結果はゲル電気泳動でも立証された。RGD ペプチド及びヒスチジン標識 GST は、飽和濃度で少量の NTA - Ni アガロース樹脂に結合した。エンドスタチンを樹脂とインキュベートし、樹脂上のタンパク質に結合させた。次にヒスチジン標識タンパク質をイミダゾールで溶解し、試料を SDS - PAGE で分析した。結果は、エンドスタチンは樹脂に固定された RGD ペプチドに結合し、タンパク質と共に樹脂から溶出していたが、樹脂に固定された GST には結合していなかったことを明らかに示していた。

【0203】

本アッセイは、エンドスタチンに特徴的な RGD 結合を模倣する、又はエンドスタチン上の RGD 結合ドメインに結合する候補薬のスクリーニングにも容易に適応できるであろう。候補薬をエンドスタチンの存在下で RGD コロイドに加え

10

20

30

40

50

、赤から青への色の变化を阻害する薬物を探せばよい。

【0204】

実施例19：薬物特性分析のため時間の関数としての薬物活性のモニタリング

凝集体形成のどの段階で特定の薬物が有効であるか、どのくらいの長さ薬物が有効であるか、そして薬物が凝集体形成を保存できるかどうかを調べるために、薬物の特性分析実験を実施し、96穴滴板分光光度計を用い、長時間にわたり多くの時点を取って調べた。

【0205】

96穴滴板の各ウェルに、55ulのリン酸塩緩衝液(pH7.4)、30ulのNTA-SAM誘導体化コロイド、10ulの50um His-AB、及び5ulの候補薬又はDMSO(対照ウェル用)を加えた。陰性対照ウェルは、His-ABの代わりに10ulの50um 無関係ヒスチジン標識ペプチド、及び候補薬の代わりにDMSOを含有していた。陽性対照ウェルは、His-ABは含有していたが、候補薬の代わりにDMSOを含有していた。530nmにおける吸光度を5分おきに2時間、soft-max Pro 96穴分光光度計(分子装置)で読み、同一の96穴滴板は作業台で観察し、写真撮影した。

10

【0206】

陰性対照ウェルは赤いままで、陽性対照ウェルは1時間以内に青に変わった。候補薬を含有しているウェルは、候補薬の有効性に依りて色が長時間にわたり様々に変化した。530nmにおける吸光度を、各ウェルについて時間に対してプロットした。青変したウェルは、薬物が入っていないか薬物活性がないことを示すが、530nmにおける吸光度が長時間にわたり著しい低下を見せた。凝集を阻害した薬物を含有するウェルは、薬物が有効な凝集体サイズの範囲では530nmで一定の吸光度を示し、薬物が有効であることを示した。このようにして薬物の有効性を測定した。図12に、凝集を阻害した二つの薬物(1及び2)の薬物特性を、陽性対照(3)及び陰性対照(4)と共にプロットして示す。この二つの薬物は、異なる大きさの凝集体に異なる時間作用することが分かる。

20

【0207】

本実験の結果は、本発明の別の態様の効力も示している。すなわち、凝集が関与する生理的プロセスを、該プロセスの特定の段階で、又は特定の凝集体サイズの条件下で、又はその両方で治療するのに適切な薬物を決定することを含む。図12を参照すると、曲線1で示される薬物は、凝集体形成の早期の段階で、及び/又は小さい凝集体に関してより有効であり、曲線2で示される薬物は、凝集体形成の後期の段階で、及び/又は大きい凝集体に関してより有効であることが分かる。様々な候補薬に対してこのような実験を実施すると、患者の生理的プロセスの段階及び/又は凝集体サイズに基づく治療のプロトコルに関する情報を得ることができる。

30

【0208】

実施例20：色の变化と凝集体形成の程度との相関

本実施例は、本発明のコロイド/コロイド凝集アッセイが、凝集体形成を比色的に、そして目に見える細網の形成を通じて測定するのに使用できることを示す。

40

【0209】

コロイド粒子、コロイド粒子に固定されるように適応された、神経変性凝集体形成種を結合できる結合種、及びA ペプチドを含む混合物を多穴滴板のウェルに形成した。対照はランダムペプチドを含んでいた。図14を参照すると、第一のプレート60は、それぞれA ペプチドとランダムペプチドを含有する列62と64を含む。縦の列66~74は、それぞれ2.5µM、5µM、10、20、及び50µMのA ペプチド又はランダムペプチドを含有していた。A ペプチドはヒスチジン標識され、コロイドはニッケルに配位したキレートを示して

50

いるSAMを持っていた。列64は、無関係のヒスチジン標識ペプチドを含有していた。各ウェルは1 μ Mの予備形成凝集体を含んでいた。

【0210】

見て分かるように、結合種、コロイド粒子、及び予備形成凝集体を含有する列62は、ピンク色から青色に変わり、特に高濃度で細網の形成がはっきりと見える。Aの濃度と細網形成との間に著明な相関関係が観察される。

【0211】

プレート80を参照する。列82のウェルは、10 μ MのAペプチド(ヒスチジン標識)、及びコロイド上NTAチオール含有SAMを含む。列84は、同じ濃度の、ヒスチジン標識をした無関係のペプチドを含んでいた。この場合も、すべてのウェルは1 μ Mの予備形成凝集体を含んでいた。列86~98のウェルに成分を異なる時間に導入し、プレートを1回観察するだけで凝集体形成が時間の関数として示されるようにした。列86は調製したて、列88は観察の0.5時間前に調製、列90~98は、観察の1、2、4、6、及び18時間前に調製した。プレート81は、プレート80と同一のプレートの18時間後の観察である。見て分かるように、ピンクから青への色の变化、及び容易に目に見える細網の形成が時間の関数として起こっている。

10

【0212】

当業者であれば、本明細書中に掲載したすべてのパラメータは例示的な意味合いのもので、実際のパラメータは、本発明の方法及び装置が使用される特定の用途によって異なることは理解されよう。従って、前述の実施の形態は例のために提供したものであり、添付のクレーム及びそれと等価の範囲内で、本発明は具体的に記載した以外の方法でも実施できることは理解されるべきである。

20

【図面の簡単な説明】

【0213】

【図1】 dendrimer又はpolymerを介してフェロセンのような金属含有化合物に付着した、原線維又はプラーク形成に参加できるペプチドを示す。これらの誘導体化されたペプチドは、類似のペプチドを提示する磁気粒子と、神経変性疾患に關与する凝集体への同時組込みを通じて会合する。磁石を介してSAM被覆電極に誘引後、凝集体の存在を、組み込まれたフェロセンのような電気活性シグナリング部分の存在をサイクリックボルタンメトリー(CV)又は交流ボルタンメトリー(ACV)のような技術を用いて検出することによって測定する。

30

【図2】コロイド粒子に付着した、凝集体形成に参加できるペプチド及びフェロセン誘導体のような金属複合体を示す。これらのペプチドは、類似のペプチドを持つ磁気粒子と、溶液中のこれらのプリオン型(又は原線維形成)ペプチドの異常型の凝集体に両方が組み込まれると会合する。磁石を介してSAM被覆電極に誘引後、凝集体の存在を電子的に検出する。

【図3】分光光度法による原線維形成の検出を示す棒グラフである。

【図4】本発明のアッセイにおける陰性対照の写真の写真複写である。

【図5】本発明のアッセイで形成された、肉眼にも容易に識別可能な凝集体の40倍に拡大した写真の写真複写である。

40

【図6】50ピコモルのA原線維から本発明のアッセイで形成された、顕微鏡下で見える小凝集体の写真の写真複写である(図4~6は、いずれも倍率40倍)。

【図7】図7Aは本発明の別のアッセイに従って形成された、肉眼にも容易に識別可能な大コロイド凝集の40倍に拡大した写真の写真複写である。図7Bは図7Aのアッセイの陰性対照の写真の写真複写である。

【図8】本発明の薬物スクリーニングアッセイの結果を示すELISAプレートの写真のカラーコピーである。

【図9】本発明の別のアッセイにおける原線維の電子的検出を示す四つのACVのオーバーレイである。

50

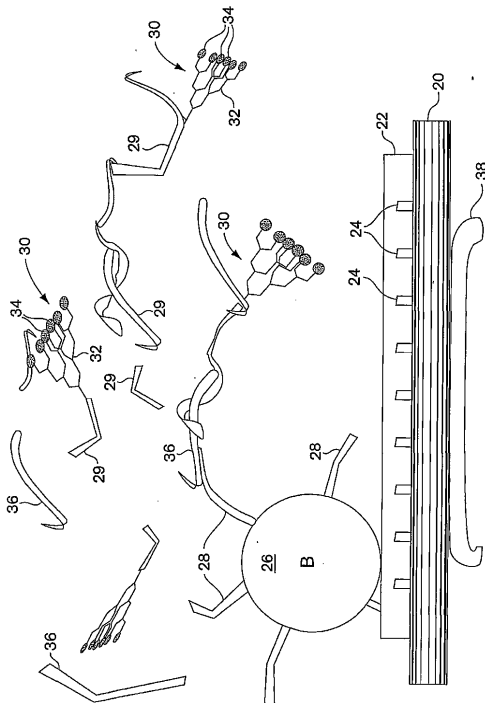
- 【図10】本発明の光散乱原線維アッセイの結果を示す図である。
- 【図11】図10の光散乱実験の陰性対照を示す図である。
- 【図12】神経変性疾患アッセイにおける時間の関数としての薬物活性を、薬物活性を凝集体サイズと関連させて示したグラフである。
- 【図13】結合相互作用を示すコロイド凝集アッセイを、色で対照と比較した結果を示す図である。
- 【図14】神経変性疾患アッセイにおけるA 濃度の増加、又は一定濃度のアッセイにおける時間経過によって生じるピンクから青への色の变化を示す（コロイド凝集を示す）図である。

【符号の説明】

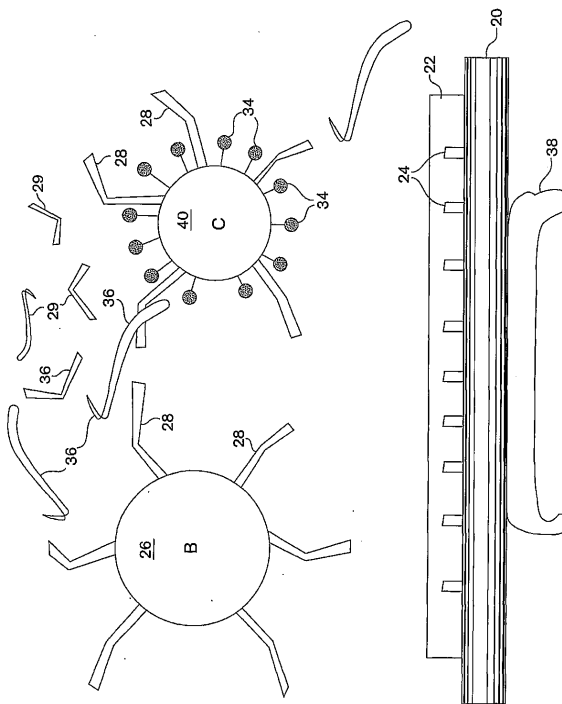
【0214】

20 アーティクル、22 SAM、24 分子ワイヤ、26 粒子（ビーズ）、28 結合種、30 シグナリング実体、32 デンドリマー、34 シグナリング実体、36 標的分子（凝集体又は原線維形成種）、38 磁石、40 コロイド粒子。

【図1】

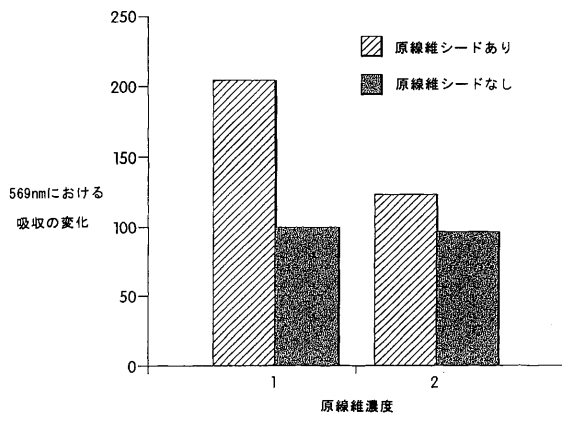


【図2】



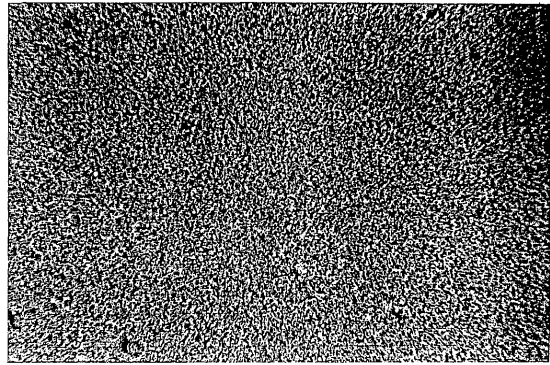
【 図 3 】

β -アミロイド原線維の存在下又は不在下におけるコロイドペプチド溶液の吸光度



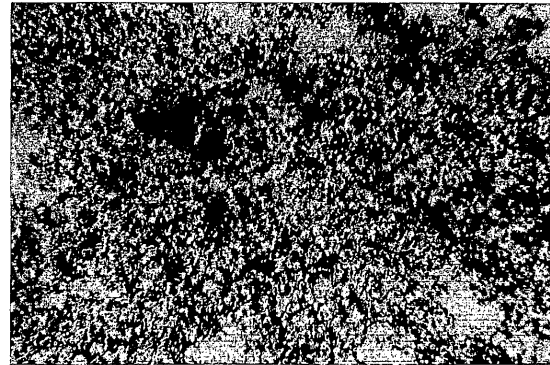
【 図 4 】

陰性対照、 β -アミロイド原線維なし



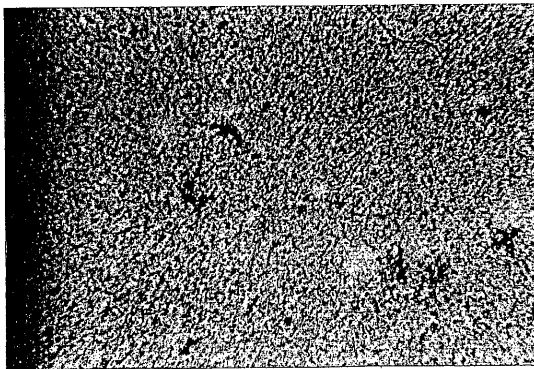
【 図 5 】

300nMの β -アミロイド原線維



【 図 6 】

50pMの β -アミロイド原線維



【 図 7 】

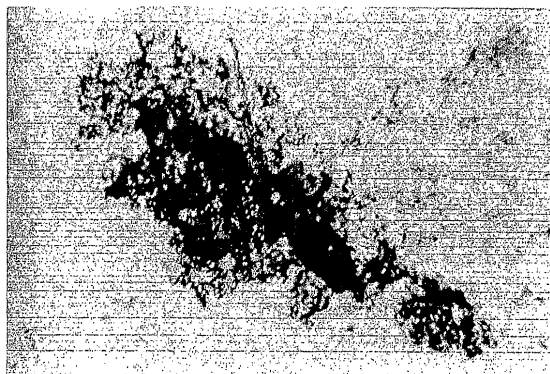


Fig. 7A

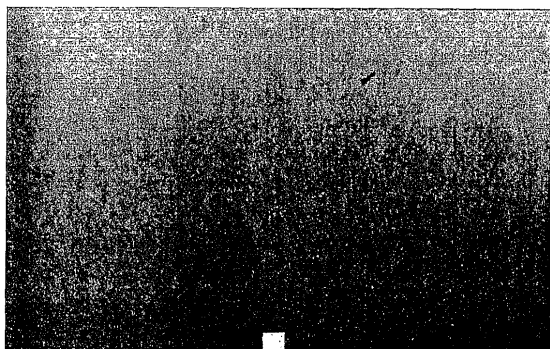
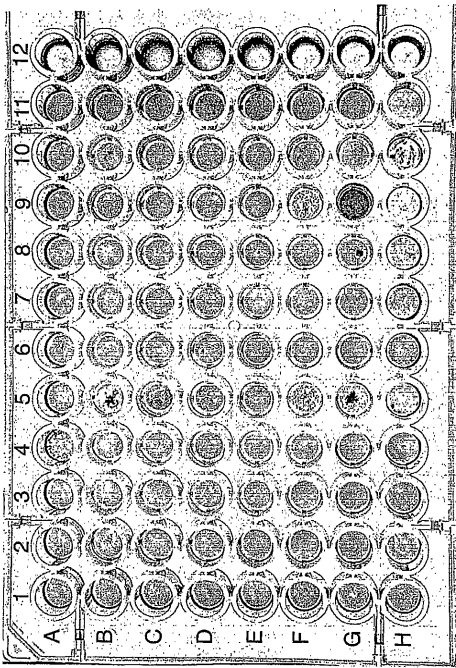
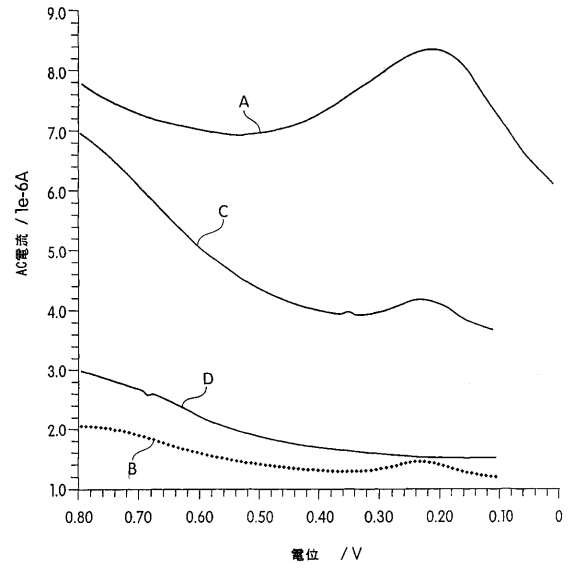


Fig. 7B

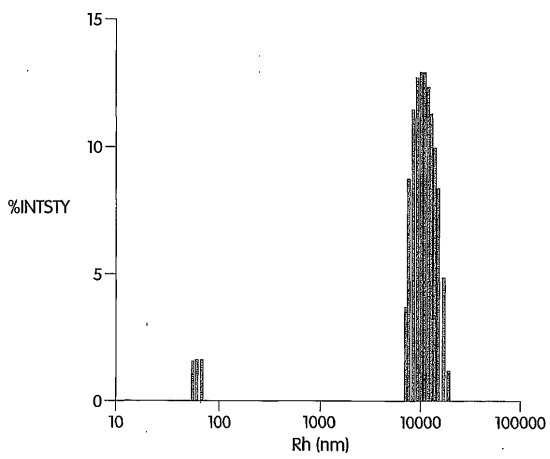
【 図 8 】



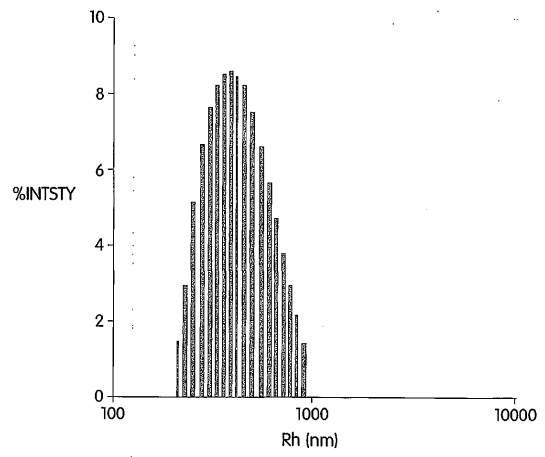
【 図 9 】



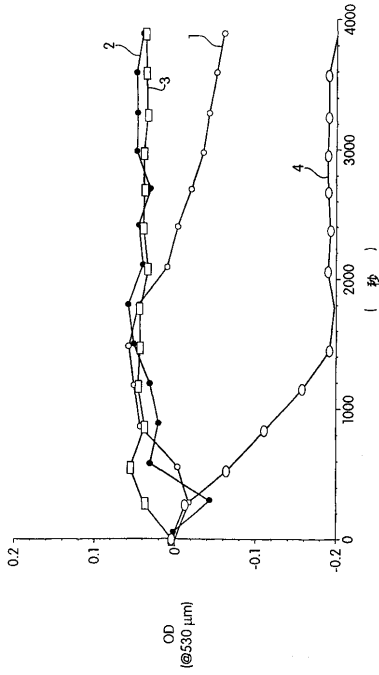
【 図 10 】



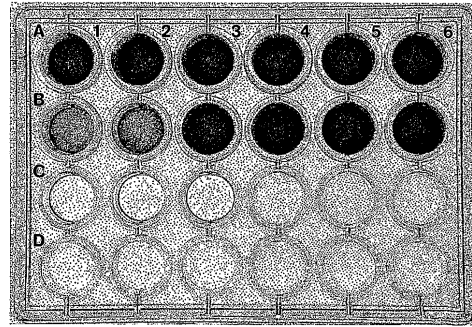
【 図 11 】



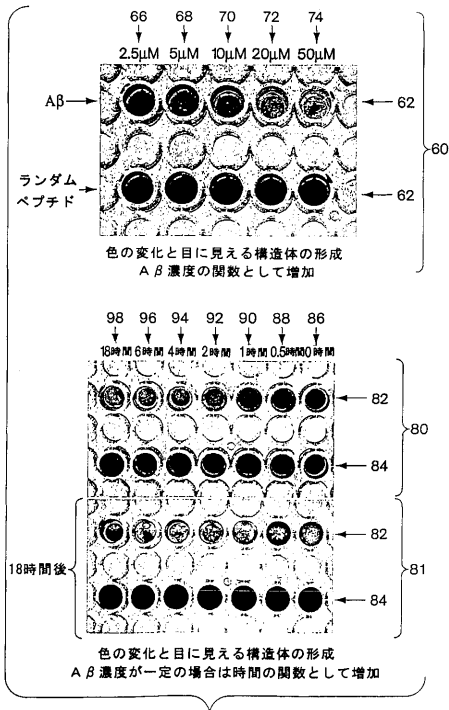
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【配列表】

2015096855000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年1月5日(2015.1.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

表面を有する第一のアーティクルと；

表面を有する第二のアーティクルと；そして

凝集体形成種を結合できる複数の結合種とを含むキットであって、前記結合種の少なくとも一部は、前記第一のアーティクルの表面に固定されるか又は固定されるように適応され、前記結合種の少なくとも一部は、前記第二のアーティクルの表面に固定されるか又は固定されるように適応されているキット。

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)	G 0 1 N	33/543	5 9 5	
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 4 1 A	
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 4 5 A	
C 0 7 K 17/02	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
		A 6 1 P	25/14		
		A 6 1 P	25/16		
		A 6 1 P	25/28		
		C 0 7 K	17/02		

- (72)発明者 バムダッド, シンシア・シー
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02458, ニュートン, チャーチ・ストリート 142
- (72)発明者 バムダッド, アール・ショシャナ
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02458, ニュートン, チャーチ・ストリート 142

专利名称(译)	蛋白质聚集的快速和敏感检测		
公开(公告)号	JP2015096855A	公开(公告)日	2015-05-21
申请号	JP2014240068	申请日	2014-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	格雷格·科尔多瓦生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Minava生物技术公司		
[标]发明人	バムダッドシンシアシー バムダッドアールシヨシヤナ		
发明人	バムダッド,シンシア・シー バムダッド,アール・シヨシヤナ		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/553 G01N33/547 A61K45/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 C07K17/02 C12Q1/37 G01N21/27 G01N21/78 G01N27/416 G01N27/48 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 B82Y30/00 G01N33/54393 G01N33/6896 G01N2500/00		
FI分类号	G01N33/543.581.A G01N33/53.ZNA.D G01N33/53.N G01N33/553 G01N33/547 G01N33/543.595 G01N33/543.541.A G01N33/543.545.A A61K45/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 C07K17/02 A61K50/00.100 G01N33/53.DZN.A		
F-TERM分类号	4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA152 4C084/ZA162 4C084/ZA222 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA60 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA80		
代理人(译)	小林 泰 竹内茂雄 山本修		
优先权	09/602689 2000-06-23 US 09/631818 2000-08-03 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了方法，测定和组分，其中可以快速且灵敏地分析生物样品中与神经变性疾病相关的物种的存在。提供技术和组件用于疾病的诊断，以及用于筛选用于治疗神经变性疾病的候选药物。这些技术简单，极其灵敏，并且使用易于获得的组件。能够结合神经变性疾病聚集体形成或聚集体形成物质的结合物质固定在电极表面和颗粒表面上，或者在溶液中游离，以结合聚集体形成物质和/或参与聚集。

