

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-526124

(P2004-526124A)

(43) 公表日 平成16年8月26日(2004.8.26)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 33/543

C 1 2 Q 1/37

GO 1 N 21/27

GO 1 N 21/78

GO 1 N 27/416

F I

GO 1 N 33/543 5 8 1 A

GO 1 N 33/543 5 9 5

C 1 2 Q 1/37

GO 1 N 21/27 C

GO 1 N 21/78 C

テーマコード (参考)

2 GO 4 5

2 GO 5 4

2 GO 5 9

4 BO 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 219 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-506112(P2002-506112)

(86) (22) 出願日 平成13年6月25日(2001.6.25)

(85) 翻訳文提出日 平成14年12月24日(2002.12.24)

(86) 国際出願番号 PCT/US2001/020232

(87) 国際公開番号 W02002/001230

(87) 国際公開日 平成14年1月3日(2002.1.3)

(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024
58, ニュートン, チャーチ・ストリート
142

(74) 代理人 100089705

弁理士 社本 一夫

(74) 代理人 100076691

弁理士 増井 忠式

(74) 代理人 100075270

弁理士 小林 泰

(74) 代理人 100080137

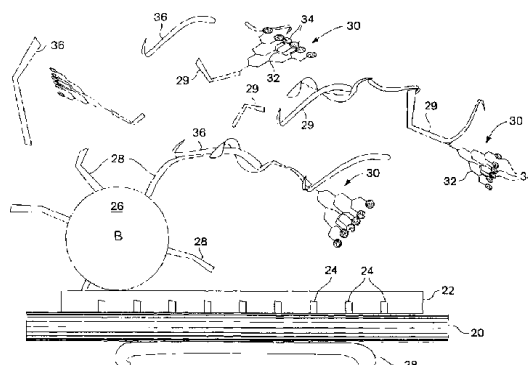
弁理士 千葉 昭男

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】

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方法、アッセイ、及び成分を記載する。技術及び成分は疾患の診断並びに神経変性疾患の治療用候補薬のスクリーニングのために提供される。当該技術は、簡便且つ極めて高感度であり、容易に入手可能な成分を利用している。神経変性疾患の凝集体形成又は凝集体形成種を結合できる結合種を、電極の表面及び粒子の表面に固定、又は溶液中に遊離の状態を提供し、凝集体形成種を結合させる及び／又は凝集に関与させる。



【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。

【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。

20

【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、コンゴー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。

【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。

30

【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。

【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。

40

【請求項 16】

結合種が、免疫グロブリン、ヘモグロビン、p 53、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 (h I A P P)、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、 β -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 (A P P)、タウ、シヌクレイン、P r P^{C J D}、P r P^{B S E}、P r P^{s c r a p i e}、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

50

記載のキット。

【請求項 18】

種が、 β -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】

アーティクル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。

10

【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み込みを含まない、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。

20

【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。

30

【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(α -ピリジル)-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 に記載のアーティクル。

40

【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。

【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】

50

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。

【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。

【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。

【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。

【請求項 45】

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 46】

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 47】

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。

【請求項 48】

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 49】

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。

【請求項 51】

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。

10

20

30

40

50

【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。

【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 5 2 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。

10

【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 1 1 又は 1 2 に記載の組成物。

【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 3 7 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 3 2 に記載のアーティクル。

20

【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 100 nm を超えない、請求項 3 2 に記載のキット。

【請求項 5 9】

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 3 5 に記載のアーティクル。

【請求項 6 0】

コロイド自体がシグナリング実体である、請求項 5 9 に記載のアーティクル。

【請求項 6 1】

複数の補助的シグナリング実体を含む、請求項 5 9 に記載のアーティクル。

30

【請求項 6 2】

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 5 9 に記載のアーティクル。

【請求項 6 3】

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 5 9 に記載のアーティクル。

【請求項 6 4】

シグナリング実体が電気活性種である、請求項 6 3 に記載のアーティクル。

【請求項 6 5】

シグナリング実体がメタロセンである、請求項 6 4 に記載のアーティクル。

40

【請求項 6 6】

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 6 5 に記載のアーティクル。

【請求項 6 7】

粒子が複数の固定電気活性種を保持している、請求項 3 2 に記載のアーティクル。

【請求項 6 8】

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 5 9 に記載のアーティクル。

【請求項 6 9】

50

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 7 0】

粒子が金被覆磁気粒子である、請求項 3 3 に記載のキット。

【請求項 7 1】

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 7 2】

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 7 3】

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 7 2 に記載の組成物。

10

【請求項 7 4】

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。

20

【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。

30

【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。

40

【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、 β -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、P r P^{C J D}、P r P^{B S E}、P r P s c r a p i e、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】

50

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 88 に記載のキット。

【請求項 90】

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 72 に記載の組成物。

【請求項 91】

親和性標識が金属結合標識である、請求項 72 に記載の組成物。

【請求項 92】

前記部分がポリアミノ酸標識である、請求項 72 に記載の組成物。

【請求項 93】

ポリアミノ酸標識がヒスチジン標識である、請求項 72 に記載の組成物。

【請求項 94】

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 95】

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 94 に記載の方法。

【請求項 96】

方法が液媒体中で実施される、請求項 93 に記載の方法。

【請求項 97】

溶液が洗浄剤又は界面活性剤を含有しない、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 98】

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 96 に記載の方法。

【請求項 99】

表面が液媒体を吸収しない、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 100】

結合種がペプチドである、請求項 94 に記載の方法。

【請求項 101】

結合種がタンパク質である、請求項 94 に記載の方法。

【請求項 102】

結合種がタンパク質由来の配列である、請求項 94 に記載の方法。

【請求項 103】

結合種が小分子である、請求項 94 に記載の方法。

【請求項 104】

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 94 に記載の方法。

【請求項 105】

アーティクルがコロイド粒子である、請求項 94 に記載の方法。

【請求項 106】

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 94 に記載の方法。

【請求項 107】

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 94 に記載の方法。

【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。

10

20

30

40

50

【請求項 1 0 9】

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 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 1 0】

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 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

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、凝集体形成種の非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。 10

【請求項 1 1 2】

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 1 1 1 に記載のキット。

【請求項 1 1 3】

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 1 1 1 に記載のキット。

【請求項 1 1 4】

凝集体形成種が神経変性疾患に伴う、請求項 1 1 1 に記載のキット。 20

【請求項 1 1 5】

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 1 1 に記載のキット。

【請求項 1 1 6】

アーティクルがコロイド粒子である、請求項 1 1 1 に記載のキット。

【請求項 1 1 7】

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 1 1 1 に記載のキット。

【請求項 1 1 8】

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 1 1 5 に記載のキット。 30

【請求項 1 1 9】

表面が自己集合単層を保持している、請求項 1 1 1 に記載のキット。

【請求項 1 2 0】

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 1 1 9 に記載のキット。

【請求項 1 2 1】

自己集合単層が荷電部分を含有する、請求項 1 2 0 に記載のキット。

【請求項 1 2 2】

自己集合単層がカルボキシ末端種を含有する、請求項 1 2 0 に記載のキット。 40

【請求項 1 2 3】

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 1 2 0 に記載のキット。

【請求項 1 2 4】

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 1 2 1 に記載のキット。

【請求項 1 2 5】

荷電部分がニトリロ三酢酸を含む、請求項 1 2 4 に記載のキット。

【請求項 1 2 6】

自己集合単層がオリゴヌクレオチドを含む、請求項 1 1 9 に記載のキット。

【請求項 1 2 7】

自己集合単層が DNA 部分を含む、請求項 1 1 9 に記載のキット。

【請求項 1 2 8】

自己集合単層が荷電ペプチドを含む、請求項 1 1 9 に記載のキット。

【請求項 1 2 9】

自己集合単層が合成分子からなる、請求項 1 1 9 に記載のキット。

【請求項 1 3 0】

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 1 1 9 に記載のキット。

10

【請求項 1 3 1】

溶液が界面活性剤を含有する、請求項 1 3 0 に記載のキット。

【請求項 1 3 2】

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 1 3 0 に記載のキット。

【請求項 1 3 3】

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 1 3 0 に記載のキット。

【請求項 1 3 4】

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 1 3 0 に記載のキット。

20

【請求項 1 3 5】

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 1 1 9 に記載のキット。

【請求項 1 3 6】

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 9 4 に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

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 1 3 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

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。

30

【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。

【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。

40

【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。

【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。

50

【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。

【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、

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】

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 1 5 0 に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

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 1 5 5】

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 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 5 6】

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 1 5 5 に記載の方法。

【請求項 1 5 7】

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 1 5 5 に記載の方法。

【請求項 1 5 8】

細胞が候補薬に曝露されない、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 5 9】

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 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 6 0】

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 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 6 1】

モニタリングステップの前に細胞が溶解される、請求項 1 5 4 に記載の方法。

【請求項 1 6 2】

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 1 5 4 に記載の

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 1 6 3】

疾患が神経変性疾患である、請求項 1 5 5 に記載の方法。

【請求項 1 6 4】

疾患が非神経変性疾患である、請求項 1 5 5 に記載の方法。

【請求項 1 6 5】

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。

10

【請求項 1 6 6】

種が疾患に関係する凝集体形成種を結合でき、方法が疾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。

【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。

20

【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。

【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。

30

【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。

【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。

40

【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。

【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】

50

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 β -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 γ -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、1～38ないし1～44のアミノ酸配列を含む β -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 1 8 5 に記載の方法。

【請求項 1 9 7】

β -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 1 9 6 に記載の方法。

【請求項 1 9 8】

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 1 8 0 に記載の方法。

【請求項 1 9 9】

検体を粒子及び結合種に曝露することを含む、請求項 1 9 8 に記載の方法。

【請求項 2 0 0】

試料が血液試料を含む、請求項 1 9 8 に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 2 0 1】
試料がヒト患者から得られる、請求項 1 9 8 に記載の方法。
- 【請求項 2 0 2】
試料が動物から得られる、請求項 1 9 8 に記載の方法。
- 【請求項 2 0 3】
試料が家畜から得られる、請求項 1 9 8 に記載の方法。
- 【請求項 2 0 4】
試料が家畜飼料から得られる、請求項 1 9 8 に記載の方法。
- 【請求項 2 0 5】
試料が臓器供与試料である、請求項 1 9 8 に記載の方法。 10
- 【請求項 2 0 6】
試料がヒトの消費に適した食物である、請求項 1 9 8 に記載の方法。
- 【請求項 2 0 7】
試料がヒト又は動物の消費に適した液である、請求項 1 9 8 に記載の方法。
- 【請求項 2 0 8】
試料が乳である、請求項 1 9 8 に記載の方法。
- 【請求項 2 0 9】
試料が水である、請求項 1 9 8 に記載の方法。
- 【請求項 2 1 0】
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 20
1 8 0 に記載の方法。
- 【請求項 2 1 1】
目に見える変化が粒子の凝集を含む、請求項 2 1 0 に記載の方法。
- 【請求項 2 1 2】
目に見える変化が金コロイド粒子の凝集を含む、請求項 2 1 1 に記載の方法。
- 【請求項 2 1 3】
目に見える変化が色の変化を含む、請求項 2 1 0 に記載の方法。
- 【請求項 2 1 4】
粒子を試料に曝露したときに、粒子／集塊物の有効寸法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 1 8 0 に記載の方法。 30
- 【請求項 2 1 5】
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 1 8 0 に記載の方法。
- 【請求項 2 1 6】
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 1 9 8
に記載の方法。
- 【請求項 2 1 7】 40
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 1 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 2 1 8】
結合種及び試料が異なる生物学的種である、請求項 1 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 2 1 9】
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 1 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 2 2 0】
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 2 1 9 に記載の方法。
- 【請求項 2 2 1】 50

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 2 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2 2】

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 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 3】

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 2 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 2 4】

複数の電気活性種がメタロセンを含む、請求項 2 2 3 に記載の方法。

10

【請求項 2 2 5】

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 2 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 2 6】

アーティクルが磁気ビーズである、請求項 1 7 5 に記載の方法。

【請求項 2 2 7】

アーティクルが S P R チップである、請求項 1 7 5 に記載の方法。

【請求項 2 2 8】

アーティクルが電極である、請求項 1 7 5 に記載の方法。

【請求項 2 2 9】

20

アーティクルが E L I S A プレートである、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。

【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】

30

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。

【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。

40

【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。

【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。

50

【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。

【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、コロイドー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。

10

【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ー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。

20

【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。

30

【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。

【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。

40

【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

50

1 に記載の方法。

【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；

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 2 5 8】

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 2 5 7 に記載の方法。

【請求項 2 5 9】

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 2 6 0】

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 2 6 1】

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 6 0 に記載アーティクル。

【請求項 2 6 2】

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 2 6 3】

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 1 7 3 に記載の系。

【請求項 2 6 4】

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 2 6 3 に記載の系。

【請求項 2 6 5】

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 2 6 4 に記載の系。

【請求項 2 6 6】

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 2 6 0 に記載のアーティクル。

【請求項 2 6 7】

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。

10

20

30

40

50

【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】

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。

10

【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。

【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 β -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

30

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 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

40

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 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ように適応された第二の化学又は生物学的種との間

50

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 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。

【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。

10

20

30

40

50

【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。

【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。

10

【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】

酵素がカルパインである、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。

20

【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

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。

30

【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変化を測定することを含む、請求項 276 又は 279 に記載の方法。

40

【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】

被検体を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

50

を測定する
ことを含む方法。

【請求項 3 1 1】

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 3 1 2】

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 3 1 1 に記載の方法。

【請求項 3 1 3】

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 3 1 1 に記載の方法。

【請求項 3 1 4】

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 3 1 1 に記載の方法。

【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含む、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ビ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ビ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、候補薬がビトロネクチン／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

10

20

30

40

50

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、曝露することを含む、請求項 3 2 0 に記載の方法。

10

【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含む、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】

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。

20

【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。

【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ョンを含む、請求項 3 2 7 に記載の方法。

30

【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。

【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。

40

【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。

【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

50

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。

【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】

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。 10

【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。

【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。 20

【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。

【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。 30

【請求項 3 4 5】

第一及び第二の時点の差が 20 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 10 分を超えない、請求項 3 3 5 に記載の方法。

【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 30 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子に曝露し、前記第一組の条件下で凝集体形成に影 50

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。

【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。 30

【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。

【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。 40

【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】

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 3 6 6】

疾患が神経変性疾患である、請求項 3 6 5 に記載の方法。

【請求項 3 6 7】

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。

10

【請求項 3 6 8】

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 3 6 7 に記載の方法。

【請求項 3 6 9】

凝集程度を、曝露ステップ後 1 0 時間してから測定することを含む、請求項 3 6 7 に記載の方法。

20

【請求項 3 7 0】

凝集程度を、曝露ステップ後 1 5 時間してから測定することを含む、請求項 3 6 7 に記載の方法。

【請求項 3 7 1】

凝集程度、曝露ステップ後 2 0 時間してから測定することを含む、請求項 3 6 7 に記載の方法。

【請求項 3 7 2】

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；

30

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 3 7 3】

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；

40

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

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】

50

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 377】

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 376 に記載の方法。

【請求項 378】

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 376 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

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。

【0002】

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。

【0003】

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）、A D、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（T T R）、及び伝達性海綿状脳症（P r P）などであるが、これらに限定されない（括弧内は凝集に関与する関係タンパク質）。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関係及び／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（B S E、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質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、L a n s b u r y の P r o c . N a t L . A c a d . S c i . U S A , 9 6 : 3 3 4 2 (1 9 9 9) 参照。これら

10

20

30

40

50

の疾患では、病原状態に関係するペプチドが、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会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。

【0004】

例えば、アルツハイマー病（AD）では、これらの凝集体は β -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。 β -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 J ら、“ β -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病序との関係（The carboxy terminus of the β -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。

【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観察（Observation of metastable A β 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ろう。有毒中間体であるプロトフィブリルの存在は、A β 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 μ M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。

【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

10

20

30

40

50

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。

10

【0008】

コンゴー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、コンゴー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。

20

【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必要がある。

30

【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。گرانツマン血小板無力症は出血障害で、インテグリン α IIb β 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糸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。

40

【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関係ない。これを説明するために

50

、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 h I A P P 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。

【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。

10

【0014】

例えば、腫瘍抑制タンパク質 p 5 3 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。p 5 3 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 p 5 3 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。p 5 3 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 (N E S) も含まれている⁸。p 5 3 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 N E S が露出する。増殖抑制因子である c - A b l は、p 5 3 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。p 5 3 の 4 量体化を刺激する、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。

20

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、アールティクル、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 1～200 nm 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。

30

【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、アールティクル、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。

40

【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。

【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関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

50

に記載のような粒子の関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。

【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ティクルと、表面を有する第二のアーティクルと、複数の結合種とを含み、前記結合種の少なくとも一部は、前記第一のアーティク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、前記第二のアーティク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ティクルを使用することができる。各アーティクルは、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、表面プラスモン共鳴（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）を組み合わせることもできる。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非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。

【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。

【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。

【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。

【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。

【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。

【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。

【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

エ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（A P P）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、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。

10

【0031】

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）、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 β -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

20

30

【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。

40

【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有する媒体に曝露する。

50

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。

【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。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。

10

【0035】

本発明の各種態様のさらに具体的な例において、凝集体（プラー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。

20

【0036】

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

30

【0037】

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。

40

【0038】

50

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β-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。

【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、凝集プロセスに関与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質、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。

20

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】

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

50

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られ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】

[発明の詳細な説明]

国際特許出願番号PCT/US00/01997、出願日2000年1月25日、発明者Bamdad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WO00/43791、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Bamdad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WO00/34783、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09/602,778号、出願日2000年6月23日、発明者Bamdad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09/631,818号、出願日2000年8月3日、発明者Bamdad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IgG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

40

50

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。

【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。

【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。

【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、コンゴーレッド、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β-シート/β-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。

【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】

10

20

30

40

50

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

【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。

20

【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、電気的、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、その定義内に含める。

30

40

【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

50

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

【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／NH₂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。

20

【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。

【0060】

30

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ていることになる。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。

40

【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で、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、配列相同の健常な対応物に比べて分子の立体配座におけ

50

る変化を特徴とするので、類似分子にいつそう結合しやすくなる。神経変性疾患、I I 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。 10

“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、 30
眼液、唾液、脳脊髄液、又は扁桃、リンパ節、穿刺生検などから得られた液又は他の試料などである。

【0065】

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“H I S－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、6～1 40
0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、H I S－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。

【0066】

“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、第一及び第二の種類の連結を定義する。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 50

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。

【0067】

“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

10

【0068】

“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。

【0069】

“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。

20

【0070】

“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 S c i e n c e 245, 845 (1989), B a i n, C. ; E v a l l, J. ; W h i t e s i d e s, G. M. による J. A m. C h e m. S o c. 111, 7155-7164 (1989), B a i n, C. ; W h i t e s i d e s, G. M. による J. A m. C h e m. S o c. 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（S A M）、及びS A Mで被覆した表面を有するコロイド粒子のようなアーティクルを利用している。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S A M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、S A M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S A Mを含む。S A Mは、表面に密集したS A Mを形成するS A M形成種から、又はこれらの種に組み合わせた、S A M全体の電子伝達を促進できる分子ワイヤ又は他の種（S A Mに参加可能な欠陥促進種を含む）、あるいはS A M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、S A M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

30

40

50

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。

【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パ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ーティクル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性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、デンドリマー32を含み、各デンド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。

10

【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（α-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。

20

30

【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、コンゴー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。

40

【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

50

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。

【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。

【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、特定の候補葉が、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。

【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／又は候補葉の濃度との関連で、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。

10

【0086】

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ビーズ、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。

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。

30

【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ビ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。

40

50

【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、ビーズ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。

【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うるのは、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。

【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。

【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、原線維又はプラー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プラー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、多穴滴板の個々のウェルなどに配置できる。

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応できる。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。ペプチドのプラーク、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、原線維又はプラー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。原線維又はプラー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、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

50

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。

【0099】

複合体は、交流ボルタンメトリー（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。

【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、通常の形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。

【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-チオールを直接付着によって、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ろう。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プラークに組み込み、それらを懸濁状態に維持する場合に顕著な利点がある。

【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。

【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。

10

【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。

20

30

【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応できる。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、すなわち治療上有効な効果を示しうる。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、候補薬をマイクロアレイに加え、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。

40

【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

50

。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。

【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、感知電極に磁氣的に引き寄せられるので電子分析を行う。

【0110】

溶液を電磁場又は機械的攪拌で脈動させると組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。

【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（10 mMのリン酸塩、pH 7.4、100 mM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標識を持つ58.2 μ M又は14 μ Mのいずれかの濃度の合成A β （1-40）ペプチド、NTA/Ni⁺⁺を提示する金コロイド30 μ L（製法は以下に記載）；及び0.6 μ MのA β -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 μ Mの（His）₆-A β 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 β ペプチド及びA β 原線維“シード”を含有するすべてのウェルに明らかにすることができる。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）を含有する溶液中にも形成できる。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 β 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 β 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 β 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 β ペプチドは含有していたがシードとなる原線維は

10

20

30

40

50

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、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。

10

【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。

20

【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。

30

【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、疾患のような生理学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。

40

【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】

50

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。

10

【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みうる。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。

20

【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体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応答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応答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。

30

40

【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、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

50

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。

【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るなくてもよい。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、及び分泌を含むうる。

10

【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、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。

20

【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。

30

【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、コロイドー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。

40

【0128】

本発明の本態様の一つの利点は、色の変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

50

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変化を示す、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、コロイドーコロイド凝集は、結合相互作用又はその妨害を示し、自動化できる。 10

【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。リガンドー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。 20

【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 30

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、被検体がいなければ消光は回避される。 40 50

【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。

10

【0133】

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－RGD－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－ATP－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TNF－470－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TNF－470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。RGD／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18に記載する。

20

30

【0134】

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

40

50

用する他の薬物を確認することができる。

【0135】

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。

10

【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。

【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関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）のプロセッシングである。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 β -及び γ -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

50

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/cdk512 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、 β -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、 β -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】

50

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、ビ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。カルパインは、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 β -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。

【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関与する膜タンパク質の切断に関わっている。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）。

【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。

【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関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 N T A / N i (I I) 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 G S T 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。

10

20

30

40

50

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変化する。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。

10

【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レートを持つコロイドに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。

20

【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変化の減退、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。

30

【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ものではない。

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。

40

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 （ミクロン）；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）； $^{\circ}$ C（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

50

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。

【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、 $14\text{ }\mu\text{M}$ のHis-A β (1~40) ペプチド及び $30\text{ }\mu\text{L}$ のNTA-チオールコロイドを含有する $100\text{ }\mu\text{L}$ の分液を、 $1\text{ }\mu\text{M}$ のA β 原線維シード(種)、 50 pM のA β 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 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 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 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) $1\text{ }\mu\text{M}$ のA β 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 pM のA β 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。

10

【0157】

実施例2：コロイドの製造

本実施例では、 1.5 mL の市販の金コロイド(Amersham製Auro Dye)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 $100\text{ }\mu\text{L}$ の貯蔵緩衝液(クエン酸ナトリウム及びトウイーン-20)に再懸濁させた。 $40\text{ }\mu\text{M}$ のニトリロ三酢酸(NTA)チオール、 $100\text{ }\mu\text{M}$ のフェロセンチオール、及び $500\text{ }\mu\text{M}$ のカルボキシ末端チオールを含有する $100\text{ }\mu\text{L}$ 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、 $400\text{ }\mu\text{M}$ のDMF中トリエチレングリコール末端チオール $100\text{ }\mu\text{L}$ 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、 $100\text{ }\mu\text{L}$ の 100 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 $180\text{ }\mu\text{M}$ のNiSO₄で1:1に希釈した。

20

30

【0158】

実施例3：SAM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、SAM形成、カラーゲン被覆、細胞成長、コロイド形成、及び交流ボルタンメトリー(ACV)に関する。SAM形成に関しては、ガラス製の顕微鏡スライドをTiの層、次にAu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(HS-(CH₂)₁₅CH₃)、40%のトリエチレングリコール末端チオール、HS(CH₂)₁₁(CH₂CH₂)₃OH、(式)及び50%のポリ(エチニルフェニル)チオール(C₁₆H₁₀S)を含有するDMF溶液 $300\text{ }\mu\text{L}$ を用い、室温で0.5時間インキュベートした。次に、 2 mL の $400\text{ }\mu\text{M}$ 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°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分間の熱サイクルである。次に電極をEtOHに浸漬し、次いで無菌PBSで濯いだ。

40

【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

50

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（NTA-Ni-SAM）で誘導体化した。コロイドは低密度のNTA-Ni（総チオール濃度1000：M中40 μ MのNTA）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 β -アミロイドペプチド（アミノ酸1～40）をpH7.4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 $^{\circ}$ C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Nikonカメラ（ASA800フィルム）で写真に撮って記録した。

【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NTA-Ni SAM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 β -アミロイドペプチド（1～40）を、最終体積100 μ L中の最終濃度20 μ Mを達成するように加えた。ヒスチジン標識 β -アミロイドペプチドは、最終体積100 μ L中の最終濃度が20 μ Mになるように加えた。予め形成した β -アミロイド原線維を最終濃度が1 μ Mになるように加えた。試料を37 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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7A）。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7Bに示す。

【0163】

実施例6：薬物スクリーニング

ヒスチジン標識 β -アミロイド（1～40）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。

【0164】

96穴滴板の各ウェルに、30 μ LのNTA-SAM保持コロイド、10.7 μ Mのヒスチジン標識 β -アミロイド（1～40）ペプチド65 μ L（最終濃度6.6 μ M）、5 μ Lの候補薬（各薬物の最終濃度が100～200 μ 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。

【0165】

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β-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。

【0166】

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。

【0167】

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の写真の写重複写である。プレート一番右側のウェル（カラム12）は、β-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β-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。

【0168】

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1000μM中40μMのNTA-チオールを使用した。ヒスチジン標識β-アミロイド（1～40）ペプチドを、最終体積100μL中の最終濃度が58.2μM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β-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β-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。β-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β-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：電子の検出

β-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β-アミロイドペプチド（1～40）を、β-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β-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100μMのオクタメチルフェロセン-チオールを使用した）。30μL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

10

20

30

40

50

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asketに混合した。ヒスチジン標識 β -アミロイドペプチド（アミノ酸 1~40）を、100 μ L 体積中の最終濃度 14 μ M になるように加えた。 β -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 μ 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 β -アミロイドペプチド（1~40）なし；（2）コロイド、His 標識 β -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 Lab 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 β -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 μ 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 β -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 μ 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 μ A のわずかなピークを生じた。図 9 のトレース 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 μ 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 β -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 β -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 β -アミロイドは、最終体積 100 μ L 中の最終濃度が 10.2 μ M になるように加えた。予備形成凝集体は、最終濃度が 2 μ 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、 β -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。

【0175】

ベースラインの測定：

1. 40 μ 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 β 1~40 ペプチド提示コロイド；直径 = 14.96 nm
3. 1 μ M の β -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 β 1~40 を固定していない）；直径 = 15.93 nm；t = 0

実験：

1. 1 μ M の β -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 β 1~40 ペプチド提示コロイド、t = 0 での測定で 15.5 nm。
2. 1 μ M の β -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 β 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 nm 超、図 10 参照。

【0176】

陰性対照：

3. ヒスチジン標識 A β 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 β 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 β -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（ β -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。

10

【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 β -アミロイドペプチドが、正常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 μ M の A β 1~42 原線維を、様々な FBS 濃度の溶液中、ヒスチジン標識 A β 1~40 を提示した 40 μ M の NTA-SAM コロイド 30 μ 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 β 1~40 を含有するが予備形成 A β 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。

20

【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

30

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 μ M の NTA-SAM 保持コロイドの分液 30 μ L を 96 穴滴板のウェルに加えた。His 標識 A β (1~40) ペプチドを最終濃度 3.75 μ 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 β 原線維（1 μ M；1~42）を添加又は“播種”した；（2）溶液に予備形成 A β 原線維（0.1 μ M；1~42）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 β をコロイドに固定しなかった。37℃で3時間後、His 標識 A β 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 β 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

40

50

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8mg/ml、#109は4.6mg/mlと測定された。

【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。 10

【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。 20

【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。 30

【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。 40

【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。 50

【0186】

【化1】

106-128 (KTNMKH MAGAAAAGAVVGGLGGY)

109-141 (MKH MAGAAAAGAVVGGLGGY MLGSAMSRPMMHF)

113-141 (AGAAAAGAVVGGLGGY MLGSAMSRPMMHF)

119-141 (GAVVGGLGGY MLGSAMSRPMMHF)

117-141 (AAGAVVGGLGGY MLGSAMSRPMMHF)

115-141 (AAAAGAVVGGLGGY MLGSAMSRPMMHF)

113-141 (AGAAAAGAVVGGLGGY MLGSAMSRPMMHF)

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：電子の検出

この仮説的実施例では、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ようになるので、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

この予言的実施例では、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（HRPO）、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、単純ヘルペスウィ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（Localization of a passively transferred human recombinant monoclonal antibody to herpes simplex virus glyco

40

50

protein 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（HRPO）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り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（Akerstom, 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技術でこれを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Aβ1~42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

10

20

30

40

50

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関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。 β -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)。

【0192】

アミロイド前駆体タンパク質 (APP: β -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 β -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- β 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 ATPases)”, Journal of Biological Chemistry, 270:6, 2419-2422, 1995年2月10日)。細胞 (体積100 μ l、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°C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 (30 μ l) をヒスチジン標識 β -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 β -アミロイドの最終濃度は17 μ Mであった。対照ウェルは、1) β -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。

【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 β -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。

【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 β -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 (β -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。 β -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、 β -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。

【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 (p 53)

この仮説的实施例では、p 53 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。p 53 (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

【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。

20

【0198】

がんで発生する p 53 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-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 p 53 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。p 53 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

【0199】

あるいは、DNA 結合に影響を及ぼす突然変異を有する p 53 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】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

40

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。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

50

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 ペプチドのようなビ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色変化が見られた。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、赤から青への色の変化が起きる。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離し、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、赤から青への色の変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、55 μ L のリン酸塩緩衝液 (pH 7.4)、30 μ L の NTA-SAM 誘導体化コロイド、10 μ L の 50 μ M His-AB、及び 5 μ L 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 10 μ L の 50 μ M 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。530 nm 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。

【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。

10

【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。

20

【0208】

実施例20：色の変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。

【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 β 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 β 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2.5 μ M、5 μ M、10、20、及び50 μ MのA β ペプチド又はランダムペプチドを含有していた。A β 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提供している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。

30

【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 β 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 β 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変化、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。

40

【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

50

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。

【図面の簡単な説明】

【図 1】デンドリマー又はポリマー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、神経変性疾患に関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。

10

【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。

【図 6】50 ピコモルの A β 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)。

20

【図 7 A】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 7 B】図 7 A 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。

【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。

30

【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相関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 β 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変化を示す (コロイド凝集を示す) 図である。

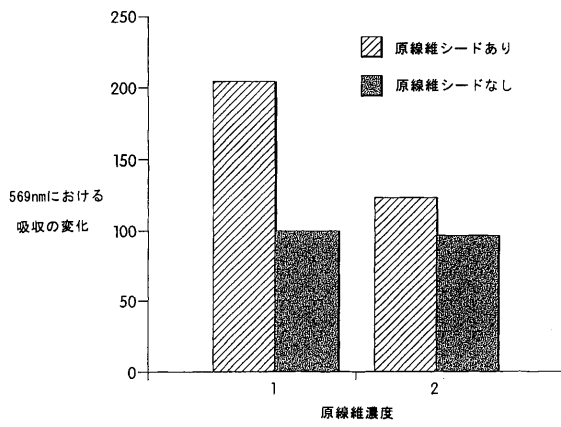
【符号の説明】

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。

40

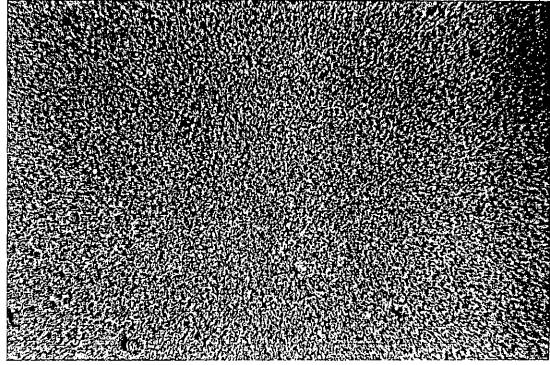
【図 3】

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ーベチド溶液の吸光度



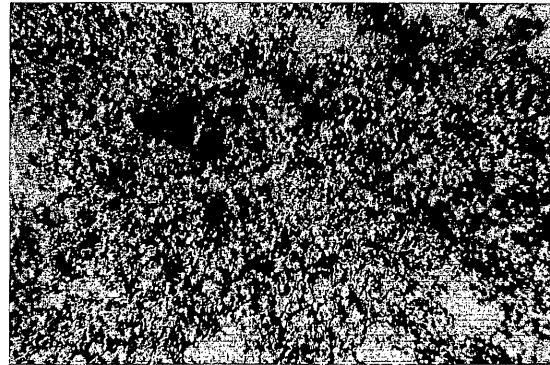
【図 4】

陰性対照、 β -アミロイド原線維なし



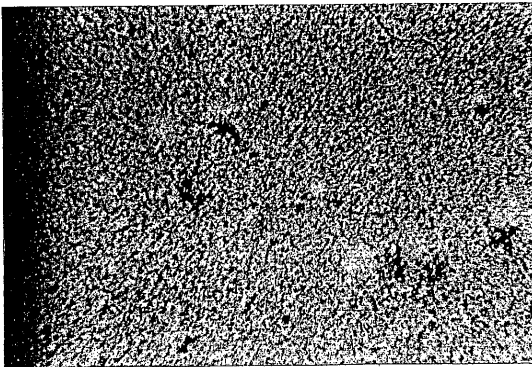
【図 5】

300nMの β -アミロイド原線維

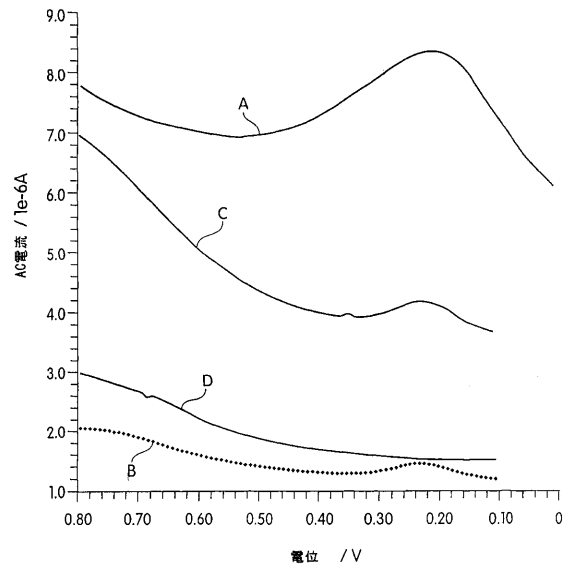


【図 6】

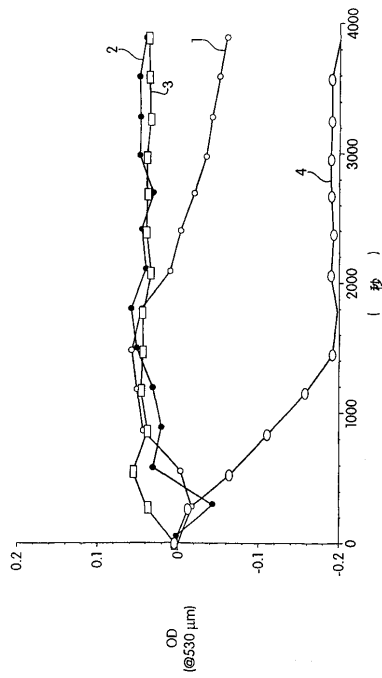
50pMの β -アミロイド原線維



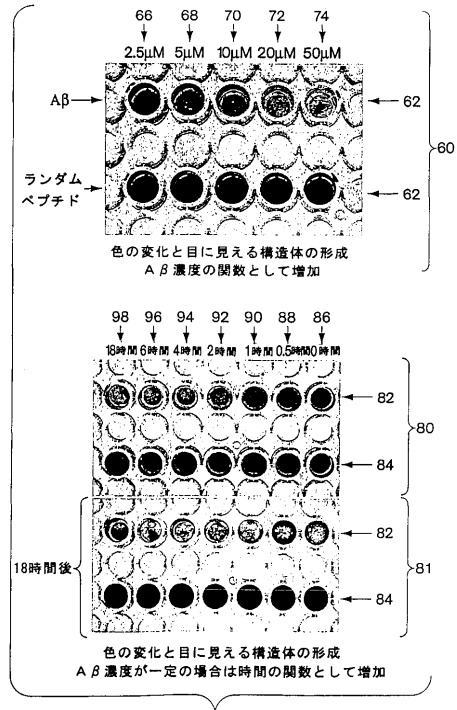
【図 9】



【図 1 2】



【図 1 4】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/01230 A2

(51) International Patent Classification: G01N 33/68

(21) International Application Number: PCT/US01/20232

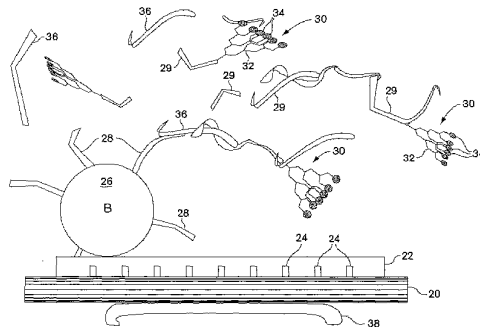
(22) International Filing Date: 25 June 2001 (25.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 23 June 2000 (23.06.2000) US
09/602,689
09/631,818 3 August 2000 (03.08.2000) US(71) Applicant: MINERVA BIOTECHNOLOGIES COR-
PORATION [US/US]; 142 Church Street, Newton, MA
02458 (US).(72) Inventors: BAMDAD, Cynthia, C.; 142 Church Street,
Newton, MA 02458 (US). BAMDAD, R., Shoshana; 142
Church Street, Newton, MA 02458 (US).(74) Agent: OYER, Timothy, J.; Wolf, Greenfield & Sacks,
P.C., 600 Atlantic Avenue, Boston, MA 02210 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: RAPID AND SENSITIVE DETECTION OF PROTEIN AGGREGATION



(57) Abstract: Methods, assays, and components are described in which biological samples can be rapidly and sensitively analyzed for the presence of species associated with neurodegenerative disease. Techniques and components are provided for diagnosis of disease, as well as for screening of candidate drugs for treatment of neurodegenerative disease. The techniques are simple, extremely sensitive, and utilize readily-available components. Binding species, capable of binding a neurodegenerative disease aggregate-forming or aggregate-forming species, are fastened to surfaces of electrodes and surfaces of particles, or provided free in solution, to bind aggregate-forming species and/or be involved in aggregation.

WO 02/01230 A2

WO 02/01230

PCT/US01/20232

RAPID AND SENSITIVE DETECTION OF PROTEIN AGGREGATIONField of the Invention

This invention relates to methods, assays, and components for the rapid and
5 sensitive detection and analysis of biomolecular interactions with particular applications
to peptide aggregation associated with disease states such as neurodegenerative disease,
and non-disease aggregation. Such methods and assays can be employed for clinical
testing as well as to facilitate drug discovery by high-throughput drug screening.

Background of the Invention

10 A variety of diseases are characterized by abnormal and toxic aggregation of
biological molecules such as proteins and peptides, sometimes called protein
condensation, tangle formation, fibril formation, plaque formation, etc. It would
therefore be advantageous to identify inhibitors of these abnormal aggregation events.
However, there are some diseases in which toxicity stems from the inhibition of a
15 naturally occurring aggregation process. In these cases, it would be advantageous to
identify molecules that restore the normal aggregation function.

An important class of disease associated with abnormal protein aggregation, and a
major focus of the present invention, is neurodegenerative disease. Neurodegenerative
diseases to which the invention is related include, without limitation (with their
20 associated proteins involved in aggregation), Familial British Dementia (ABRI),
Parkinson's Disease (α -synuclein), Alzheimer's Disease ($A\beta$ peptide), Finnish-type
Familial Amyloidosis (Gelsolin), Huntington's Disease (Huntingtin), AD, Frontotemporal
Dementia (Tau), Senile Systemic Amyloidosis (Transthyretin), Familial Amyloid
Polyneuropathy (TTR), and Transmissible Spongiform Encephalopathy (PrP). Many
25 neurodegenerative diseases have now been shown to be linked to and/or caused by
plaque associated with aggregate formation in the brain that occurs as a result of aberrant
aggregation of neuro peptides. Neurodegenerative diseases including Alzheimer's,
Parkinson's, Gertsmann-Straussler-Scheinker Syndrome, Fatal Familial Insomnia,
Huntington's Chorea, Kuru, and Familial amyloid polyneuropathy and transmissible
30 spongiform encephalopathies such as Creutzfeldt Jakob, Scrapie, and Bovine Spongiform
Encephalopathy (BSE, Mad Cow), are characterized by ordered protein aggregates that
form in the brain. Although the proteins that make up these aggregates share no

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-2-

sequence homology, or even conserved motif, the aggregates themselves share certain morphological features. See Lansbury, *Proc. NatL Acad. Sci. USA*, 96:3342 (1999). In these diseases, peptides related to the pathogenic state, which are normally soluble, undergo a conversion of their 3-dimensional structure via a mutation of the native peptide or a physical association with altered peptides, to an insoluble, ordered polymerized state that is characteristic of the abnormal protein deposits that are found in the brain in neurodegenerative diseases. This ordered polymerizing or aggregation may result from seeding with indigenous or exogenous agents or peptides.

For example, in Alzheimer's disease (AD), these aggregates are made up of β -amyloid protein that has undergone a conformational change, from soluble monomers, to insoluble, β -sheet oligomers. The concentration of these fibrils in the brain has been correlated to the progression of clinical disease. The growth profile of the characteristic fibrils is extremely non-linear, which could explain why its victims can appear asymptomatic for years, then suddenly undergo a rapid degeneration into dementia. Fibril formation *in vitro* is peptide concentration dependent. Short synthetic peptides, derived from the β -amyloid ($A\beta$) protein, can be made to form fibrils *in vitro* to mimic fibril formation that is characteristic of Alzheimer's disease. $A\beta$ 1-42 (with an extended hydrophobic C-terminus) has been shown to form fibrils at a faster rate than $A\beta$ 1-40. See J. Jarrett *et al.*, "The carboxy terminus of the β -amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease," *Biochemistry* 32: 4693-4697 (1993). While $A\beta$ 1-40 can form fibrils or aggregates on its own, solutions containing $A\beta$ 1-40 undergo accelerated fibril formation if they are "mixed" with the less soluble 1-42 peptide or are "seeded" with pre-formed peptide fibrils. Although $A\beta$ 1-40 is the predominant protein in neuritic plaque, these studies indicate that the rate of fibril formation may depend on the ratio of the concentration of 1-42 to 1-40. Consistent with these findings, all forms of early onset AD involve higher expression levels of the 1-42 peptide.

Atomic force microscopy (AFM) studies of *in vitro* fibril formation using the two most prevalent variants of $A\beta$, 1-42 and 1-40, have identified a metastable intermediate, termed the protofibril that occurs before fibril formation. See J. Harper *et al.*, "Observation of metastable $A\beta$ protofibrils by atomic force microscopy," *Chem. and Biol*

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-3-

4: 119-125 (1997). The existence of these precursors to fibrils may explain the diffuse amyloid deposition observed in the brains of people pre-disposed to AD. The existence of a protofibril that is a toxic intermediate would explain several observed inconsistencies in vitro and in vivo that argued both for and against the A β fibril being the pathogenic agent of AD. Existing assays to test for neurodegenerative disease fibrils or fibril-forming species, or to screen for drugs suitable for treatment of neurodegenerative disease are Congo red and Thioflavin-T assays (Methods in Enzymology, Academic Press, 1999, Vol. 309, pgs. 274-287; 304-305) which typically cannot detect small aggregates or protofibrils. Specifically, they cannot detect aggregate or fibril-forming species at a concentration below about 100 μ M. This is inadequate for detecting early stage disease, and for screening drugs suitable for use at early stage disease.

Drug candidates that act at a pre-symptomatic stage of the disease (when only small fibrils or aggregates are present) would have a greater efficiency in inhibiting plaque/fibril formation and preventing symptomatic disease. In order to do this, small fibril aggregates need to be efficiently detected. However, these aggregates are too small to be detected by nearly every detection method. Although they can be detected by AFM, this technique does not lend itself to clinical diagnostics or drug screening protocols. Therefore, at present, it has not been possible to screen for drugs that would act on the smaller fibrillar species. Additionally, screening for drugs to inhibit fibril formation at any stage has been severely limited.

The rate of aggregate and fibril formation is an extremely non-linear function of the concentration of converted or misfolded peptide, such as mutant neuro peptide or converted prion peptides, which are aggregate-forming or fibril-forming species. Once the concentration of the aberrant species reaches a critical concentration, the reaction rate proceeds too quickly to be affected by drug treatment. Therefore, for a drug to be effective at inhibiting plaque formation, thus making it a preventative therapeutic rather than a palliative one, it would necessarily have to act at an early stage. Current state of the art technology is not capable of detecting small aggregates or fibrils in a manner that is compatible with parallel drug screening methods or non-invasive diagnosis. This means that: 1) drugs to treat the early disease state cannot be readily identified; 2) pre-

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-4-

symptomatic patients cannot be identified; and 3) the effectiveness of potential drug candidates that exist, or will be identified in the future, cannot be accurately assessed.

Another drawback of existing technologies, for example, Congo Red and Thioflavin-T is that they require mechanical intervention during the process. That is, the process requires transfer of fluid from one container to another, and the like which disturbs the assay in a non-reproducible way accelerating fibril formation. Additionally, addition of the Congo Red and Thioflavin components quenches the reaction and stops the aggregation process, thus several time points cannot be taken of a single assay in solution.

One complication with the diagnosis of neurodegenerative disease is the fact that species capable of forming aggregates or fibrils characteristic of the disease may be present in extremely low concentration, yet at a concentration which, if detectable, could signify onset of the disease.

While information exists as to the process of neurodegenerative disease, a need exists for specific techniques for diagnosis and drug screening including simple, inexpensive, and reliable assays for detection of neurodegenerative disease, techniques for screening candidate drugs for treatment of neurodegenerative disease, and related components.

There are also many non-neurodegenerative diseases that involve aberrant protein aggregation. These diseases include but are not limited to the following: In multiple myeloma, antibody light chain aggregates to cause toxic effects. Waldenstrom's Macroglobulinemia is a disease characterized by antibody heavy chain aggregation. A class of proteins, called cryoglobulins, precipitates at low temperatures, causing blockage of affected blood vessels. Disseminated intravascular coagulation (DIC) is a major cause of morbidity and mortality in people with severe systemic infections or autoimmune diseases, presumably because it depletes fibrin, resulting in an inhibition of blood clotting. Glanzmann's thrombasthenia is a bleeding disorder, characterized by abnormal platelet aggregation due to a defect in the integrin, α IIb β 3¹. Abnormal fibronectin aggregation is characteristic of genetic human fibronectin-deposit glomerular disease². Sickle cell anemia is caused by mutant hemoglobin that aggregates rather than

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-5-

forming tetramers³. Abnormal protein aggregation has also been implicated as a toxic factor in stroke.

Of particular importance is abnormal protein aggregation involved in Type II Diabetes. Human islet amyloid polypeptide (hIAPP) is the major component of plaques found in the pancreatic islets of Langerhans in people who have type II diabetes mellitus⁴. Amino acids 20-29 have been shown to be responsible for this aggregation. The aggregation of hIAPP proceeds non-linearly as a function of time and can be accelerated by "seeding" the reaction with pre-formed aggregates, analogous to the case of beta-amyloid aggregation characteristic of Alzheimer's disease. However, unlike Alzheimer's disease, aggregation of hIAPP is independent of peptide concentration. An off-aggregation peptide micelle model has been suggested to explain this. Methods of the invention can be used to screen for drugs that inhibit this aggregation. For example, the hIAPP fragment that contains amino acids 20-29 are attached to colloids and added to solutions containing drug candidates. Solutions that contained drugs that inhibited aggregation remain pink while aggregation are characterized by a color change.

On the other hand, many disease states are characterized by a loss of a normal aggregation or multimerization process. A method to screen for therapeutics to restore this activity would also be useful. Blood clotting is accomplished by aggregation of the protein fibrin, which is a product of the precursor protein fibrinogen. Additionally, there are proteins that are not functional as monomers but must exist as dimers or tetramers in order to function. For many proteins, their biological function critically depends on their multimerization state. The aggregation assays described herein can readily be adapted to screen for molecules that either disrupt or enhance multimerization (a type of aggregation).

For example, the tumor suppressor protein p53, which is mutated in about 50% of all human cancers⁵, inhibits cell growth through activation of cell cycle arrest and apoptosis. Many aspects of p53's complicated function hinge on its multimerization state. Some research indicates that to be oncogenic, p53 needs to form tetramers⁶. Tetramerization is required for its DNA-binding⁷ and transcription activity. The tetramerization domain of p53 also contains a nuclear export signal (NES)⁸. It is believed that attenuation of p53 requires its export from the nucleus. Conversion of the

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-6-

tetramer to dimers and monomers exposes the NES. c-Abl, which is a growth suppressor binds to the C-terminus of p53 only if it is a tetramer and this stimulates DNA binding⁹. There may be therapeutic value in identifying molecules that stimulate p53 tetramerization as well as those that disrupt it.

5 Summary Of The Invention

The present invention provides a series of compositions, articles, kits, and methods associated with neurodegenerative disease, other diseases characterized by aberrant aggregation, non-disease processes characterized by aggregation, as well as general methods for the detection of biomolecular interactions. Techniques and
10 components are provided for diagnosis of disease, as well as for screening of candidate drugs for treatment of neurodegenerative and non-neurodegenerative diseases, characterized by aberrant protein aggregation. Also provided are techniques and components for screening of candidate compositions for enhancing aggregation, where aggregation is desired. The techniques are simple, extremely sensitive, and utilize
15 readily-available components. The techniques and components of the invention are able to very sensitively detect aggregate-forming or fibril-forming species, which typically are very small, e.g., between 1 and 200nm in length and have heretofore been difficult or impossible to detect with existing technology and in screening for drugs to treat neurodegenerative and other diseases.

20 One important aspect of the invention involves compositions, articles, kits, and methods associated with diseases other than neurodegenerative diseases, and non-disease processes, and it is to be understood that one important aspect of the invention involves all of the disclosure herein as it applies to non-neurodegenerative disease and non-disease processes.

25 The present invention therefore contemplates the ability to detect and monitor aggregates or proto-fibrils that are characteristic of early stages of these diseases. The present invention also contemplates the ability to study the rate of aggregate formation in response to treatment with putative drug candidates.

30 The present invention provides methods for the detection of aggregates and fibrils which can be used to screen for peptide sequences that are involved in the phenotype of neurodegenerative and other protein aggregation diseases and non-disease processes. In

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-7-

one technique, selected peptide sequences are synthesized and are fastened to or adapted to be fastened to particles and subjected to assays of the invention. These assays can determine whether particle aggregation occurs or other binding involving particles as described herein, indicative of the peptide sequence's potential for participating in aggregation processes. In another technique, random peptide sequences are genetically engineered into a phage, which can be bound to a particle and participate in an assay of the invention. The methods of the present invention provide for detection of fibrils and peptide aggregates and can be used for the diagnosis of these diseases, since it has been shown that aggregates circulate in the cerebro spinal fluid (CSF) and, it is believed, in other bodily fluids that can be readily sampled.

In one embodiment, the present invention contemplates a detection system in which biological samples can be rapidly and sensitively analyzed for the presence of aggregates, fibrils, and proto-fibrils (or aggregate-forming species) that are characteristic of aggregate processes such as neurodegenerative diseases, including transmissible spongiform encephalopathies. In one aspect, the invention provides a series of kits that can be used for detection of disease or non-disease aggregate processes or drug screening. In one embodiment, a kit includes a first article having a surface, a second article having a surface, and a plurality of binding species, at least some of which are immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to the surface of the first article, and at least some of which are immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to the surface of the second article. The binding species are capable of binding aggregate-forming species. As will become apparent from the detailed description below, a variety of combinations of articles can be used in this embodiment. Each article can be a fluid-suspendable, isolatable article, each being a colloid particle or one being a colloid particle and the other being a magnetic bead or the like, or one article can be a surface of a larger article such as an electrode, a surface plasmon resonance (SPR) chip, or other macroscopic article, and the other article can be a fluid-suspendable particle as described above.

Another kit of the invention includes an article having a surface (a variety of articles are contemplated), and a plurality of binding species at least some of which are immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to the surface. The

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-8-

surface can be any surface as described herein and can include, in combination, a signaling entity that can indicate binding of aggregate forming species or fibrils or aggregates to the surface. In one embodiment, the surface has a chemical functionality that substantially inhibits non-specific binding of binding species that are not

5 immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to the surface, or aggregate-forming or fibril-forming species. This embodiment allows for particularly sensitive detection techniques.

In the description of many kits, assays, etc. of the invention, many species are described that can be immobilized relative to another species or component. It is to be

10 understood that in each case where one species or component can be immobilized relative to another species or component, in other embodiments these species or components can be fastened to each other.

Another kit of the invention includes an article having a surface and a plurality of binding species immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to the

15 surface, and in this embodiment, the article is specifically not an SPR component. This embodiment allows for very sensitive, non-SPR analyses such as electronic analyses of diseased samples or drug activity.

In another aspect, the invention provides a series of components, systems, and articles that can be used in conjunction with various kits and methods of the invention.

20 One article of the invention includes a surface at which a binding species is fastened. A signaling element also is fastened to the surface of this article. A composition of the invention includes a binding species, and a signaling entity immobilized with respect to the binding species. Another composition of the invention includes a binding species fastened to a moiety that can coordinate a metal.

One system of the invention comprises at least two particles immobilized

25 relative to a neurodegenerative disease fibril or aggregate. Another system of the invention comprises at least two particles immobilized relative to a fibril or aggregate of any source. Another system of the invention includes at least two particles immobilized relative to an aggregate-forming species. These systems typically are the result of assays

30 designed to detect diseased or pre-diseased states, or candidate drug screening mixtures.

In another aspect, the invention provides a series of methods. One method

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-9-

involves providing an article having a surface and a plurality of binding species capable of binding a aggregate-forming species immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to the surface. The surface is exposed to a sample containing or suspected of containing aggregate-forming species. Optionally, the surface also is
5 exposed to a signaling entity constructed and arranged to be able to signal binding of disease aggregate-forming species present in the sample to the binding species immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to the surface.

Another method involves providing a binding species, immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to a surface of an article, and converting the binding
10 species from a state in which it is not a neurodegenerative disease aggregate-forming species to one that is an aggregate-forming species. This method finds significant use in highly sensitive assays, as will be apparent from the detailed description below.

In another embodiment, a method of the invention involves allowing a binding species to interact with a neurodegenerative disease aggregate-forming species and
15 thereby to be converted to a neurodegenerative disease aggregate-forming species. The converted species thereafter participates in aggregation characteristic of the presence of neurodegenerative disease aggregate forming or fibril-forming species. This aggregation then is detected. This method also represents a significant advance in sensitivity of disease state or pre-disease state screening.

In another embodiment, a method of the invention is provided which, while not intended to be limited to this purpose, can find use in drug screening and represents a significant advance in that arena. The method involves providing a binding species
20 immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to a surface of an article, optionally allowing the binding species to become immobilized relative to the surface (if unfastened initially), and allowing the binding species to bind an aggregate-forming species. The binding can occur before or after fastening of the binding species to the surface, and the binding species may or may not be converted to an aggregate-forming species during binding. A second binding species, immobilized relative to or adapted to
25 be immobilized relative to a surface of a second article, is allowed to bind the aggregate-forming species. The binding of the second binding species to the aggregate-forming species can occur at any point in time relevant to other steps according to this method.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-10-

Another method of the invention involves an article having a surface and a plurality of binding species immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to the surface. The surface of the article is exposed to a sample suspected of containing neurodegenerative disease aggregate-forming or a fibril-forming species from another source. A variety of individual techniques can accompany this method, for example, for detection of disease state in a sample, as will be apparent.

Another method of the invention involves first forming aggregates in a sample that contains aggregate-forming species. The aggregates are exposed to an article including a plurality of binding species immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to the surface of the article. The binding species are capable of binding the aggregates, or aggregate-forming species.

In another aspect, the invention provides a technique for determining effectiveness of candidate drugs for inhibition of disease. The technique involves exposing a cell that can produce disease aggregate-forming species to a candidate drug and determining the aggregation potential of material produced by, e.g. secreted from the cell. The cell can be one that naturally produces the species or one that has been transfected to produce the species, or is inducible to produce the species via known techniques. The cell can be adapted to produce aggregate-forming species by transfecting the cells with a plasmid of, for example, the $A\beta$ fibril-forming species, derived from amyloid precursor protein (APP). The potential of the material produced by the cell for aggregation characteristic of disease can be monitored by exposing the cell environment, after exposing the cell to the candidate drug, to any assays of the invention, for example, assays designed to exhibit colloid aggregation indicative of the presence of aggregate-forming species. Cells that produce or have the capability of producing aggregate-forming species need not have the capability to secrete aggregate-forming species. Alternatively, cells that produce or retain aggregate-forming species intracellularly, can be lysed prior to colloid addition. This aspect of the invention is applicable for any disease process involving aggregation, including neurodegenerative disease.

Another aspect of the invention is a series of methods for forming self-assembled monolayers on surfaces, and articles having surfaces coated with SAMs. In one set of

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-11-

preferred embodiments, SAMs formed completely of synthetic molecules completely cover a surface or a region of a surface, e.g. completely cover the surface of a colloid particle. "Completely cover" in this context, means that there is no portion of the surface or region that directly contacts a protein, antibody, or other species that prevents

5 complete, direct coverage with the SAM. I.e. the surface or region includes, across its entirety, a SAM consisting completely of non-naturally-occurring molecules (i.e. synthetic molecules). The SAM can be made up completely of SAM-forming species that form close-packed SAMs at surfaces, these species in combination with molecular wires or other species able to promote electronic communication through the SAM

10 (including defect-promoting species able to participate in a SAM), other species able to participate in a SAM, and any combination of these. Preferably, all of the species that participate in the SAM include a functionality that binds, optionally covalently, to the surface. In a preferred embodiment a self-assembled monolayer is formed on a gold colloid. A self-assembled monolayer, whether formed on a colloid or on another surface,

15 can be comprised of a mixture of thiol species (when gold is the surface) that include triethylene glycol-terminated thiols to resist non-specific adsorption and thiols terminating in a binding partner of an affinity tag, e.g. terminating in a chelate that can coordinate a metal such as nitrilo tri-acetic acid which, when in complex with nickel atoms, capture histidine-tagged binding species. In a preferred embodiment the binding species is a

20 beta-amyloid peptide which can readily self-aggregate. The present invention provides a method for rigorously controlling the concentration of the histidine-tagged peptides presented on the colloid surface. Without this rigorous control over peptide density on each colloid particle, co-immobilized peptides would readily aggregate with each other to form micro-hydrophobic-domains that would catalyze colloid-colloid aggregation in the

25 absence of aggregate-forming species present in a sample. This is an advantage of the present invention, over existing colloid agglutination assays.

The methods described in the present invention produce self-assembled monolayers on colloids that resist non-specific adsorption without protein blocking steps, such as blocking with BSA. The methods described herein also produce derivatized

30 colloids that are stable in biologically relevant fluids and do not require detergents (for stability; maintaining colloids in suspension), which interfere with binding reactions.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-12-

This allows sensitive binding assays to be performed in solution. This abrogates the need for having binding partners adhered to adsorbent surfaces, as is common for existing colloid agglutination assays. As is discussed below, detergent can advantageously be used for SAM formation on colloids. In this case, detergent can be and preferably is removed after SAM formation and is no longer present on the colloid, in the SAM, or elsewhere during binding interactions or other use of the colloids.

These methods can be used to form monolayer-coated articles that can be used in conjunction with other aspects of the invention. One method involves forming a self-assembled monolayer on a surface by exposing the surface to a medium containing self-assembled monolayer-forming molecular species and a surfactant. In another method, a surface is exposed to a medium containing self-assembled monolayer-forming molecular species and a carboxylate. In yet another method, surfactant and carboxylate can be included together in the medium. Surfactants that can be used in accordance with this aspect of the invention to deposit a self-assembled monolayer onto a species include essentially any of a wide variety of surfactants. Carboxylates used to assist in self-assembled monolayer formation include preferably salts of carboxylic acids, including sodium citrate.

Another method for self-assembled monolayer formation involves forming a self-assembled monolayer on a surface of a colloid particle. The formation does not occur during formation of the colloid particle itself. For example, the monolayer can be formed on a fully pre-formed colloid particle. In another method, a self-assembled monolayer is formed on a surface of a colloid particle in suspension in a fluid, where the particle is not present at any fluid-fluid interface.

In more specific examples of various aspects of the invention, peptides or other binding species capable of incorporating into, or binding, aggregates (including plaques and fibrils) are modified with signaling moieties and then mixed with a biological sample that may contain disease-associated peptide or protein aggregates/fibrils or agents capable of inducing aggregate formation. "Binding", in this context, can involve any hydrophobic, non-specific, or specific (e.g. in the case of an antibody) interaction. "Incorporating into" means becoming a part of an aggregate or fibril, preferably without disturbing or distorting the naturally-occurring process of aggregate or fibril formation.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-13-

Other species, capable of incorporating into aggregates, modified with recruitment moieties (e.g., magnetic bead or magnetic or electromagnetic particles such as dendrimers) that can be differentially attracted to a sensing surface, are also mixed into the same sample. After a suitable incubation period, the sample solution is subjected to conditions that differentially attract the recruitable peptides to a detection apparatus. The incorporation of signaling and recruitable moieties into pre-existing aggregates provides a sensitive and efficient method for labeling the aggregates and then concentrating them into a detection area.

The sequences of the binding species attached to signaling and recruitment species can be chosen such that they can readily incorporate into an existing aggregate, but in the absence of a pre-existing aggregate, would not readily aggregate. Peptides can be linked to signaling moieties by direct chemical bond attachment to labeled dendrimers or polymers. Alternatively, peptides can be linked to signaling moieties through association with a particle-like material, including colloids, that simultaneously present both binding species and signaling group. In addition, versions of species that can participate in aggregate formation can be added, free in solution (labeled or unlabeled), to accelerate the aggregation process and thus act as amplifiers.

Binding species can be linked to recruitment moieties by direct chemical attachment, such as attaching peptides to magnetic polymers that can be recruited to a detection area by an electromagnetic field or stationary magnet. Additionally, binding species can be linked indirectly to recruitment moieties for example by association with protein A-coated magnetic beads, (which present a surface functionality including a portion of protein A that will bind antibodies), or charged particles, that can then be differentially attracted to a sensing area or surface. Binding species can also be linked by direct chemical bond or by association with particle-like materials to recruitment moieties that are recruitable by virtue of a biological recognition unit, such as a peptide linked to an affinity tag (such as a histidine tag) which then binds to a metal coordinated by a surface-bound chelate, such as nitrilotriacetic acid (NTA) which can be immobilized at a surface as part of a self-assembled monolayer (SAM) at a surface. Binding species or any other species can also be linked to a surface with use of a Strept tag, commercially available from Biometra, attached to self-assembled monolayer-forming species such as a

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-14-

thiol. Streptavidin tag forming part of a self-assembled monolayer will readily fasten biotin-modified moieties such as biotin-modified binding species. Binding species can be linked to surfaces in other ways, as described more fully below.

Another aspect of the invention involves determining the effectiveness of a candidate drug for treatment of a condition involving aggregation, such as neurodegenerative disease or other protein aggregation disease in a human or animal subject, or a condition in which it is desirable to enhance aggregation. One method involves administering, to a human or animal subject at risk for aggregation-associated disease, or indicated for treatment for disease (e.g., showing symptoms of disease or exhibiting a positive test for a physiological characteristic indicative of disease) a candidate drug for treatment of the disease. A sample then is drawn from the subject and is exposed to an assay indicative of the effectiveness of the candidate drug in inhibiting or treating neurodegenerative disease or other aggregation condition. Specifically, the sample can be exposed to an assay indicative of aggregation potential of the sample. Preferred assays indicative of aggregation potential of the sample include assays described in this summary and the detailed description below. For example, the sample drawn from the subject can be exposed to an arrangement including an article having a first surface and a plurality of binding species, capable of binding an aggregate-forming species fastened to or adapted to be fastened to the surface. Interaction of the binding species with aggregate-forming species, or fibrils or aggregates, present in the sample drawn from the subject is determined. Alternatively, a human or animal can be administered a candidate drug and a sample drawn from the subject and exposed to an assay indicative to the effectiveness of the candidate drug in enhancing aggregation where desired.

Another aspect of the invention involves novel polyamino acid-tagged, e.g. histidine-tagged species associated with neurodegenerative disease or other protein aggregation disease. In one embodiment, the invention provides polyamino acid-tag β -amyloid peptides of 1-38, 1-39, 1-40, 1-41, or 1-42, with peptides 1-40 and 1-24 being preferred.

Another aspect of the invention involves a method in which a first sample is exposed to a second sample, and the second sample's ability to affect the first sample's

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-15-

propensity for involvement in an aggregation process is determined. The first sample contains or is suspected of containing an aggregate forming species, or a precursor of an aggregate forming species, or is able to produce or is suspected of being able to produce an aggregate-forming species. Or, the first sample is able to produce or is suspected of being able to produce a precursor of an aggregate-forming species. The second sample is suspected of having the ability to affect the first sample's propensity for involvement in an aggregation process. A precursor of an aggregate-forming species can be a parent protein that is cleaved or post-translationally modified to form an aggregate-forming species, or is a nucleic acid that codes for an aggregate-forming species, or the parent protein. The aggregate-forming species or its precursor can come from a cell (such as material secreted from a cell, a cell lysate, or a fraction thereof). The second sample is not an aggregate-forming species, and is not a precursor of an aggregate-forming species. The second sample is any protein, peptide, nucleic acid, enzyme, where any of these are naturally-occurring or synthetic or cloned, optionally derived from a cell. The second sample also can be any other material derived from a cell. The second sample also can be a small molecule, which optionally is derived from a cell.

Another aspect of the invention involves self-assembled monolayers on colloid particles, preferably gold colloid particles, where the self-assembled monolayers include some species that are linked to biotin. Preferably, mixed self-assembled monolayers on gold colloid particles are formed, including long chain alkyl (e.g., C11) thiols including several (e.g., 3) ethylene glycol units at the exposed terminus, the exposed terminus covalently linked to biotin. A mixed self-assembled monolayer can include this species along with an inert or non-specific-binding-inhibiting species, such as a COOH-terminated thiol, a PEG-terminated thiol, or the like. Mixed self-assembled monolayers according to this aspect of the invention may include from about .01 to about 50% biotin, more preferably from about .05 to about 20%, more preferably from about .1 to about 5% biotin-containing SAM-forming species. Colloids carrying such a mixed SAM can be made similarly to SAM-coated colloids described below. SAM-forming species that present biotin can be formed using routine organic synthetic techniques.

In preferred embodiments involving binding interactions, binding is determined, or allowed to occur, involving a species immobilized relative to a surface in a fluid medium

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-16-

(e.g. a particle in suspension), in the absence of capillary fluid action or other fluid/surface attractive interaction that causes fluid to migrate relative to an absorbent surface, such as is common in a variety of known assays involving physiological samples and/or other colloid agglutination assays. That is, preferably binding is allowed to occur, or is determined, in a fluid that is stationary or, if mobile, does move or flow due to surface absorbance.

Other advantages, novel features, and objects of the invention will become apparent from the following detailed description of the invention when considered in conjunction with the accompanying drawings, which are schematic and which are not intended to be drawn to scale. In the figures, each identical or nearly identical component that is illustrated in various figures is represented by a single numeral. For purposes of clarity, not every component is labeled in every figure, nor is every component of each embodiment of the invention shown where illustration is not necessary to allow those of ordinary skill in the art to understand the invention.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 depicts peptides capable of participating in fibril or plaque formation attached to metal-containing compounds, such as ferrocene, via dendrimers or polymers. These derivatized peptides become associated with magnetic particles presenting similar peptides through their simultaneous incorporation into aggregates associated with neurodegenerative disease. After recruitment to a SAM-coated electrode via a magnet, the presence of the aggregates is determined by detecting the presence of incorporated electroactive signaling moieties, like ferrocene, using techniques such as cyclic voltammetry (CV) or alternating current voltammetry (ACV).

Figure 2 depicts peptides capable of participating in aggregate formation and a metal complex, such as a ferrocene derivative, attached to a colloid particle. These peptides become associated with magnetic particles bearing similar peptides when both are incorporated into aggregates of abnormal versions of these prion-type (or fibril forming) peptides in the solution. After recruitment to a SAM-coated electrode via a magnet, the presence of the aggregates is electronically detected.

Figure 3 is a bar graph showing the detection of fibril formation by spectrophotometric means.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-17-

Figure 4 is a photocopy of a photograph of a negative control in one assay of the invention.

Figure 5 is a photocopy of a photograph of a forty-fold magnification of aggregates, easily visibly identifiable to the unaided human eye, formed of an assay of
5 the invention.

Figure 6 is a photocopy of a photograph of small aggregates visible under a microscope, formed in an assay of the invention from 50 picomolar A β fibrils (figs. 4-6 all are magnified 40x).

Figure 7A is a photocopy of a photograph of a 40x magnified large colloid aggregation, readily visibly identifiable to the unaided human eye, formed in accordance
10 with another assay of the invention.

Figure 7B is a photocopy of a photograph of the negative control of the assay of Figure 7A.

Figure 8 is a color copy of a photograph of an ELISA plate showing the results of a drug screening assay of the invention.
15

Figure 9 is an overlay of four ACVs showing electronic detection of a fibril in another assay of the invention.

Figure 10 shows the results of a light-scattering fibril assay of the invention.

Figure 11 is the negative control of the light-scattering experiment of Figure 10.

Figure 12 is a graph showing drug activity as a function of time in a neurodegenerative disease assay, correlating drug activity to aggregate size.
20

Figure 13 shows results, in color, of an assay in which colloids aggregate indicative of a binding interaction, as compared to a control.

Figure 14 shows color change, from pink to blue (indicating colloid aggregation),
25 resulting from increased A β concentration in a neurodegenerative disease assay, or the passage of time in an assay with constant concentration.

Detailed Description of the Invention

International patent application serial number PCT/US00/01997, filed 01/25/00 by Bamdad et al., entitled "Rapid and Sensitive Detection of Aberrant Protein
30 Aggregation in Neurodegenerative Diseases" (published as WO 00/43791 on 07/27/00), International patent application serial number PCT/US00/01504, filed 01/21/00 by

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-18-

Bamdad, et al, entitled "Interaction of Colloid-Immobilized Species with Species on Non-Colloidal Structures" (published as WO 00/34783 on 07/27/00), commonly-owned, copending U.S. patent application serial no. 09/602,778, filed 06/23/00 by Bamdad et al., entitled "Interaction of Colloid-Immobilized Species with Species on Non-Colloidal Structures"; and commonly-owned, copending U.S. patent application serial no. 09/631,818, filed 08/03/00 by Bamdad et al., entitled "Rapid and Sensitive Detection of Protein Aggregation" all are incorporated herein by reference.

Definitions

"Small molecule", as used herein, means a molecule less than 5 kiloDalton, more typically less than 1 kiloDalton. As used herein, "small molecule" excludes proteins.

The term "aggregates" refers to complexes of homologous molecules (e.g. fibrils) as well as mixtures of molecules (e.g. interacting molecules such as binding partners, peptides, proteins, nucleic acids or complexes of these that promote the formation of aggregates, including complexes characterized by specific interactions). "Aggregates" can be associated with disease states such as neurodegenerative disease and other disease, and can be associated with non-disease states. Aggregates associated with neurodegenerative disease typically involve aggregation of proteinaceous molecules such as tangles or plaques characteristic and are associated with, i.e. may cause, neurodegenerative disease. Neurodegenerative disease aggregates typically are complexes of homologous molecules, but may include mixtures. Non-neurodegenerative disease aggregates include those associated with type II diabetes, sickle-cell anemia, which diseases involve aggregates similar to those of neurodegenerative disease, as well as other non-neurodegenerative disease aggregates such as myeloma, which involves light or heavy chain IgG agglomeration. Aggregates that are not associated with disease include those associated with, e.g., blood clotting (fibrinogen, plasminogen aggregates, and related factors), aggregates that act as tumor suppressors such as P53 aggregates, and the like. Those of ordinary skill in the art understand aggregates as they relate to neurodegenerative disease, non-neurodegenerative disease, and non-disease physiological processes. Aggregates associated with each of these processes are distinguishable from each other by those of ordinary skill in the art. "Aggregates", as used herein, encompasses fibrils. All fibrils are aggregates but not all aggregates are fibrils.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-19-

Aggregates of the present invention are typically of such a size (by virtue of the colloid interaction) that they can be visualized by eye, under a microscope, by light scattering, or by color changes.

While "aggregates" is used to refer to collections of molecules or fragments
5 involved with disease and non-disease processes described herein (aggregates is defined below), it is to be understood that fibrils are types of aggregates involved in certain disease processes. Where "fibrils" are described herein, it is to be understood that they are aggregates.

The phrase "render the aggregate visible" refers to techniques whereby a non-
10 visible aggregate is made visible to the eye, visible under a microscope, or visible by absorbance. A variety of approaches are contemplated, including but not limited to attaching or decorating aggregate with particles with specific absorption characteristics, such as gold colloids, particles carrying color-generating entities, etc.

The term "candidate drug" as used herein, refers to any medicinal substance used
15 in humans, animals, or plants. Encompassed within this definition are compound analogs, naturally occurring, synthetic and recombinant pharmaceuticals, hormones, antimicrobials, neurotransmitters, etc. This includes any substance or precursor (whether naturally occurring, synthetic or recombinant) which is to be evaluated for use as a drug for treatment of neurodegenerative disease, or other disease characterized by aberrant
20 aggregation, or prevention thereof. Evaluation typically takes place through activity in an assay, such as the screening assays of the present invention.

A variety of types of particles can be used in the invention. For example, "fluid
suspendable particle" means a particle that can be made to stay in suspension in a fluid in
which it is used for purposes of the invention (typically an aqueous solution) by itself, or
25 can be maintained in solution by application of a magnetic field, an electromagnetic field, agitation such as stirring, shaking, vibrating, sonicating, centrifuging, vortexing, or the like. A "magnetically suspendable" particle is one that can be maintained in suspension in a fluid via application of a magnetic field. An electromagnetically-suspendable
particle is one that can be maintained in suspension in a fluid by application of an
30 electromagnetic field (e.g., a particle carrying a charge, or a particle modified to carry a charge). A "self-suspendable particle" is a particle that is of low enough size and/or

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-20-

mass that it will remain in suspension in a fluid in which it is used (typically an aqueous solution), without assistance of for example a magnetic field, for at least 1 hour. Other self-suspendable particles will remain in suspension, without assistance, for 5 hours, 1 day, 1 week, or even 1 month, in accordance with the invention.

5 As used herein, a "binding species capable of binding an aggregate-forming species" includes any species such as a protein, peptide, sequence of either, antibody, Congo red, Thioflavin-T, or any species capable of the binding so described. In some cases, this binding can be site-specific, such as in the case of antibodies or P53. In other cases it can be non-specific. In the case of proteins or peptides, the binding typically
10 involves non-specific hydrophobic interaction. In the case of neurodegenerative disease, β -sheet/ β -sheet interactions typically are involved. Binding species also can include peptides, fragments, or whole proteins that are homologous to naturally-occurring disease aggregate-forming species.

"Proteins" and "peptides" are well-known terms in the art, and are not precisely
15 defined in the art in terms of the number of amino acids that each includes. As used herein, these terms are given their ordinary meaning in the art. Generally, peptides are amino acid sequences of less than about 100 amino acids in length, but can include sequences of up to 300 amino acids. Proteins generally are considered to be molecules of at least 100 amino acids.

20 As used herein, a "metal binding tag" refers to a group of molecules that can become fastened to a metal that is coordinated by a chelate. Suitable groups of such molecules include amino acid sequences, typically from about 2 to about 10 amino acid residues. These include, but are not limited to, histidines and cysteines ("polyamino acid tags"). Such binding tags, when they include histidine, can be referred to as a "poly-
25 histidine tract" or "histidine tag" or "HIS-tag", and can be present at either the amino- or carboxy-terminus, or at any exposed region, of a peptide or protein or nucleic acid. A poly-histidine tract of six to ten residues is preferred for use in the invention. The poly-histidine tract is also defined functionally as being a number of consecutive histidine residues added to a protein of interest which allows the affinity purification of the
30 resulting protein on a metal chelate column, or the identification of a protein terminus through the interaction with another molecule (e.g. an antibody reactive with the HIS-

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-21-

tag).

"Affinity tag" is given its ordinary meaning in the art. Affinity tags include, for example, metal binding tags, GST (in GST/glutathione binding clip), and streptavidin (in biotin/streptavidin binding). At various locations herein specific affinity tags are

5 described in connection with binding interactions. It is to be understood that the invention involves, in any embodiment employing an affinity tag, a series of individual embodiments each involving selection of any of the affinity tags described herein.

As used herein, "chelate coordinating a metal" or metal coordinated by a chelate, refers to a metal coordinated by a chelating agent that does not fill all available
10 coordination sites on the metal, leaving some coordination sites available for binding via a metal binding tag.

"Signaling entity" means an entity that is capable of indicating its existence in a particular sample or at a particular location. Signaling entities of the invention can be those that are identifiable by the unaided human eye, those that may be invisible in
15 isolation but may be detectable by the unaided human eye if in sufficient quantity (e.g., colloid particles), entities that absorb or emit electromagnetic radiation at a level or within a wavelength range such that they can be readily detected visibly (unaided or with a microscope including an electron microscope or the like), or spectroscopically, entities that can be detected electronically or electrochemically, such as redox-active molecules
20 exhibiting a characteristic oxidation/reduction pattern upon exposure to appropriate activation energy ("electronic signaling entities"), or the like. Examples include dyes, pigments, electroactive molecules such as redox-active molecules, fluorescent moieties (including, by definition herein, phosphorescent moieties), up-regulating phosphors, chemiluminescent entities, electrochemiluminescent entities, or enzyme-linked signaling
25 moieties including horse radish peroxidase and alkaline phosphatase. "Precursors of signaling entities" are entities that by themselves may not have signaling capability but, upon chemical, electrochemical, electrical, magnetic, or physical interaction with another species, become signaling entities. An example includes a chromophore having the ability to emit radiation within a particular, detectable wavelength only upon chemical
30 interaction with another molecule. Precursors of signaling entities are distinguishable from, but are included within the definition of, "signaling entities" as used herein.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-22-

As used herein, "fastened to or adapted to be fastened", in the context of a species relative to another species or to a surface of an article, means that the species is chemically or biochemically linked via covalent attachment, attachment via specific biological binding (e.g., biotin/streptavidin), coordinative bonding such as chelate/metal binding, or the like. For example, "fastened" in this context includes multiple chemical linkages, multiple chemical/biological linkages, etc., including, but not limited to, a binding species such as a peptide synthesized on a polystyrene bead, a binding species specifically biologically coupled to an antibody which is bound to a protein such as protein A, which is covalently attached to a bead, a binding species that forms a part (via genetic engineering) of a molecule such as GST or Phage, which in turn is specifically biologically bound to a binding partner covalently fastened to a surface (e.g., glutathione in the case of GST), etc. As another example, a moiety covalently linked to a thiol is adapted to be fastened to a gold surface since thiols bind gold covalently. Similarly, a species carrying a metal binding tag is adapted to be fastened to a surface that carries a molecule covalently attached to the surface (such as thiol/gold binding) which molecule also presents a chelate coordinating a metal. A species also is adapted to be fastened to a surface if a surface carries a particular nucleotide sequence, and the species includes a complementary nucleotide sequence.

"Covalently fastened" means fastened via nothing other than one or more covalent bonds. E.g. a species that is covalently coupled, via EDC/NHS chemistry, to a carboxylate-presenting alkyl thiol which is in turn fastened to a gold surface, is covalently fastened to that surface.

"Specifically fastened" or "adapted to be specifically fastened" means a species is chemically or biochemically linked to another specimen or to a surface as described above with respect to the definition of "fastened to or adapted to be fastened", but excluding all non-specific binding.

"Non-specific binding", as used herein, is given its ordinary meaning in the field of biochemistry.

"Colloids", as used herein, means nanoparticle, i.e. very small, self-suspendable particles including inorganic, polymeric, and metal particles. Typically, colloid particles are of less than 250 nm cross section in any dimension, more typically less than 100 nm

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-23-

cross section in any dimension, and preferably 10-30nm, and can be metal, non-metal, crystalline or amorphous. As used herein this term includes the definition commonly used in the field of biochemistry, and it typically means gold colloid particles.

A "moiety that can coordinate a metal", as used herein, means any molecule that
5 can occupy at least two coordination sites on a metal atom, such as a metal binding tag or a chelate.

As used herein, a component that is "immobilized relative to" another component either is fastened to the other component or is indirectly fastened to the other component, e.g., by being fastened to a third component to which the other component also is
10 fastened, or otherwise is translationally associated with the other component. For example, a signaling entity is immobilized with respect to a binding species if the signaling entity is fastened to the binding species, is fastened to a colloid particle to which the binding species is fastened, is fastened to a dendrimer or polymer to which the binding species is fastened, etc. A colloid particle is immobilized relative to another
15 colloid particle if a species fastened to the surface of the first colloid particle attaches to an entity, and a species on the surface of the second colloid particle attaches to the same entity, where the entity can be a single entity, a complex entity of multiple species, a cell, another particle, etc.

"Aggregate-forming species", as used herein, means biological species associated
20 with disease or non-disease processes involving aggregates, as defined above, having sufficient binding capacity to bind to other molecules associated with the disease or non-disease process (including like molecules), to form fibrils or aggregates characteristic of the process. In some disease processes such as neurodegenerative disease, such aggregate-forming species typically are characterized by a change in molecule
25 conformation, relative to sequence-homologous, healthy, counterparts, allowing them to bind more readily to like or similar molecules. In some cases, such as in neurodegenerative disease, type-II diabetes, and myeloma, such aggregate-forming species have the capability to convert binding species from non-aggregate-forming conformation into aggregate-forming conformation. Protofibrils formed from
30 neurodegenerative disease aggregate-forming species have been reported to be a precursor of, or an early form of, neurodegenerative disease associated aggregates.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-24-

Protofibrils are included in the definition of aggregate-forming species as used herein. Similar to the term "aggregates", those of ordinary skill in the art understand the meaning of the term "aggregate forming species" as it is applied to neurodegenerative disease aggregate-forming species, non-neurodegenerative disease aggregate-forming species, and non-disease aggregate-forming species.

"Diverse biological species" means different animals, such as mouse and hamster, mouse and goat, etc.

The term "sample" refers to any cell, tissue, or fluid from a biological source (a "biological sample"), or any other medium, biological or non-biological, that can advantageously be evaluated in accordance with the invention including, but not limited to, a biological sample drawn from a human patient, a sample drawn from an animal, a sample drawn from food designed for human consumption, a sample including food designed for animal consumption such as livestock feed, milk, an organ donation sample, a sample of blood destined for a blood supply, a sample from a water supply, or the like. One example of a sample is a sample drawn from a human or animal to whom a candidate drug has been given to determine the efficacy of the drug.

A "sample suspected of containing" a particular component means a sample with respect to which the content of the component is unknown. For example, a fluid sample from a human suspected of having a disease, such as a neurodegenerative disease or a non-neurodegenerative disease, but not known to have the disease, defines a sample suspected of containing neurodegenerative disease aggregate-forming species. "Sample" in this context includes naturally-occurring samples, such as physiological samples from humans or other animals, samples from food, livestock feed, etc., as well as "structurally predetermined samples", which are defined herein to mean samples, the chemical or biological sequence or structure of which is a predetermined structure used in an assay designed to test whether the structure is associated with a particular process such as a neurodegenerative disease. For example, a "structurally predetermined sample" includes a peptide sequence, random peptide sequence in a phage display library, and the like. Typical samples taken from humans or other animals include cells, blood, urine, ocular fluid, saliva, cerebro-spinal fluid, fluid or other samples from tonsils, lymph nodes, needle biopsies, etc.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-25-

As used herein, a "metal binding tag" refers to a group of molecules that can become fastened to a metal that is coordinated by a chelate. Suitable groups of such molecules include amino acid sequences, typically from about 2 to about 10 amino acid residues. These include, but are not limited to, histidines and cysteines ("polyamino acid tags"). Such binding tags, when they include histidine, can be referred to as a "poly-histidine tract" or "histidine tag" or "HIS-tag", and can be present at either the amino- or carboxy-terminus, or at any exposed region, of a peptide or protein or nucleic acid. A poly-histidine tract of six to ten residues is preferred for use in the invention. The poly-histidine tract is also defined functionally as being a number of consecutive histidine residues added to a protein of interest which allows the affinity purification of the resulting protein on a metal chelate column, or the identification of a protein terminus through the interaction with another molecule (e.g. an antibody reactive with the HIS-tag).

"Affinity tag" is given its ordinary meaning in the art. Affinity tags, include, by definition, metal binding tags.

As used herein, "metal binding tag/metal/chelate linkage" defines a linkage between first and second species in which a first species is immobilized relative to a metal binding tag and a second species is immobilized relative to a chelate, where the chelate coordinates a metal to which the metal binding tag is also coordinated. U.S. Patent No. 5,620,850 of Bamdad, et al., incorporated herein by reference, describes exemplary linkages.

The term "biological binding" refers to the interaction between a corresponding pair of molecules that exhibit mutual affinity or binding capacity, typically specific or non-specific binding or interaction, including biochemical, physiological, and/or pharmaceutical interactions. Biological binding defines a type of interaction that occurs between pairs of molecules including proteins, nucleic acids, glycoproteins, carbohydrates, hormones and the like. Specific examples include antibody/antigen, antibody/hapten, enzyme/substrate, enzyme/inhibitor, enzyme/cofactor, binding protein/substrate, carrier protein/substrate, lectin/carbohydrate, receptor/hormone, receptor/effector, complementary strands of nucleic acid, protein/nucleic acid repressor/inducer, ligand/cell surface receptor, virus/ligand, etc.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-26-

The term "binding partner" refers to a molecule that can undergo binding with a particular molecule. Biological binding partners are examples. For example, Protein A is a binding partner of the biological molecule IgG, and vice versa.

The term "determining" refers to quantitative or qualitative analysis of a species
5 via, for example, spectroscopy, ellipsometry, piezoelectric measurement, immunoassay, electrochemical measurement, and the like. "Determining" also means detecting or quantifying interaction between species, e.g. detection of binding between two species.

The term "self-assembled monolayer" (SAM) refers to a relatively ordered assembly of molecules spontaneously chemisorbed on a surface, in which the molecules
10 are oriented approximately parallel to each other and roughly perpendicular to the surface. Each of the molecules includes a functional group that adheres to the surface, and a portion that interacts with neighboring molecules in the monolayer to form the relatively ordered array. See Laibinis, P. E.; Hickman, J.; Wrighton, M. S.; Whitesides, G. M. Science 245, 845 (1989), Bain, C.; Evall, J.; Whitesides, G. M. J. Am. Chem. Soc.
15 111, 7155-7164 (1989), Bain, C.; Whitesides, G. M. J. Am. Chem. Soc. 111, 7164-7175 (1989), U.S. Patent No. 5,620,850, each of which is incorporated herein by reference. Certain embodiments of the invention make use of self-assembled monolayers (SAMs) on surfaces, such as surfaces of colloid particles, and articles such as colloid particles having surfaces coated with SAMs. In one set of preferred embodiments, SAMs formed
20 completely of synthetic molecules completely cover a surface or a region of a surface, e.g. completely cover the surface of a colloid particle. "Synthetic molecule", in this context, means a molecule that is not naturally occurring, rather, one synthesized under the direction of human or human-created or human-directed control. "Completely cover" in this context, means that there is no portion of the surface or region that directly
25 contacts a protein, antibody, or other species that prevents complete, direct coverage with the SAM. I.e. in preferred embodiments the surface or region includes, across its entirety, a SAM consisting completely of non-naturally-occurring molecules (i.e. synthetic molecules). The SAM can be made up completely of SAM-forming species that form close-packed SAMs at surfaces, or these species in combination with molecular
30 wires or other species able to promote electronic communication through the SAM (including defect-promoting species able to participate in a SAM), or other species able

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-27-

to participate in a SAM, and any combination of these. Preferably, all of the species that participate in the SAM include a functionality that binds, optionally covalently, to the surface, such as a thiol which will bind to a gold surface covalently. A self-assembled monolayer on a surface, in accordance with the invention, can be comprised of a mixture

5 of species (e.g. thiol species when gold is the surface) that can present (expose) essentially any chemical or biological functionality. For example, they can include tri-ethylene glycol-terminated species (e.g. tri-ethylene glycol-terminated thiols) to resist non-specific adsorption, and other species (e.g. thiols) terminating in a binding partner of an affinity tag, e.g. terminating in a chelate that can coordinate a metal such as

10 nitrilotriacetic acid which, when in complex with nickel atoms, captures a metal binding tagged-species such as a histidine-tagged binding species. The present invention provides a method for rigorously controlling the concentration of essentially any chemical or biological species presented on a colloid surface or any other surface. In many embodiments of the invention the self-assembled monolayer is formed on gold

15 colloid particles.

The term "self-assembled mixed monolayer" refers to a heterogeneous self-assembled monolayer, that is, one made up of a relatively ordered assembly of at least two different molecules.

"Molecular wires" as used herein, means wires that enhance the ability for a fluid

20 encountering a SAM-coated electrode to communicate electrically with the electrode. This includes conductive molecules or, as mentioned above and exemplified more fully below, molecules that can cause defects in the SAM allowing communication with the electrode. A non-limiting list of additional molecular wires includes 2-mercaptopyridine, 2-mercaptobenzothiazole, dithiothreitol, 1, 2-benzenedithiol, 1, 2-

25 benzenedimethanethiol, benzene-ethanethiol, and 2-mercaptoethylether. Conductivity of a monolayer can also be enhanced by the addition of molecules that promote conductivity in the plane of the electrode. Conducting SAMs can be composed of, but are not limited to: 1) poly (ethynylphenyl) chains terminated with a sulfur; 2) an alkyl thiol terminated with a benzene ring; 3) an alkyl thiol terminated with a DNA base; 4) any sulfur

30 terminated species that packs poorly into a monolayer; 5) all of the above plus or minus alkyl thiol spacer molecules terminated with either ethylene glycol units or methyl groups

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-28-

to inhibit non specific adsorption. Thiols are described because of their affinity for gold in ready formation of a SAM. Other molecules can be substituted for thiols as known in the art from U.S. Patent No. 5,620,820, and other references. Molecular wires typically, because of their bulk or other conformation, creates defects in an otherwise relatively tightly-packed SAM to prevent the SAM from tightly sealing the surface against fluids to which it is exposed. The molecular wire causes disruption of the tightly-packed self-assembled structure, thereby defining defects that allow fluid to which the surface is exposed to communicate electrically with the surface. In this context, the fluid communicates electrically with the surface by contacting the surface or coming in close enough proximity to the surface that electronic communication via tunneling or the like, can occur.

Referring now to Figure 1, one arrangement of the present invention is illustrated schematically. Shown in Figure 1 is an article 20, specifically an electrode including a SAM 22 on a surface thereof. SAM 22 includes "molecular wires" 24, in embodiments where it is desirable that SAM 22 be relatively electrically conductive. Typically, a mixed SAM is formed of a relatively non-conducting species such as an alkyl thiol optionally terminating in a non-specific binding inhibitor such as polyethylene glycol, mixed with molecular wires. The selection of surfaces and functional groups for binding self-assembling monolayer molecules to surfaces is a well-known art. See U.S. Patent Nos. 5,512,131 and 5,620,850, and International Patent Publication no. WO 96/29629, incorporated herein by reference, for this and other teachings.

A particle 26, specifically a magnetic bead, is provided along with a plurality of binding species, capable of binding an aggregate-forming species including that associated with neurodegenerative disease or non-neurodegenerative disease, or other aggregate-forming species, immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to the bead. A plurality of binding species 28 also are provided fastened or fastenable to signaling entities 30 which, in the embodiment illustrated, comprise dendrimers 32, each carrying a plurality of individual signaling entities 34. A plurality of target molecules 36, which are neurodegenerative disease or non-neurodegenerative disease aggregate-forming or other fibril-forming species, are introduced by, for example, being included in a physiological sample suspected of containing the molecules. Binding species 28 bind

-29-

to aggregate-forming or fibril-forming species 36 to define a linkage including bead 26 with attached binding species, signaling entity 30 with attached binding species, and aggregate or fibril-forming species 36 immobilized with respect to each. This arrangement can be drawn to a surface of electrode 20 via a magnet 38 under the
5 electrode and, where signaling entities 34 are electronic or electro-active (redox active) signaling entities, their proximity near electrode 20 can be detected indicating presence of the aggregate or fibril-forming species 36 in the sample.

Specifically, in this embodiment, electronic signaling entity 34 can be a redox-active molecule such as a metallocene, specifically ferrocene (i.e. a ferrocene derivative).
10 Proximity of a ferrocene as signaling entity 34 near electrode 20 can be determined by a cyclic voltammetric technique such as alternating current voltammetry (ACV) or via a device employing charge counting.

Binding species 28 need not be fastened to signaling entity 30 and/or bead 26 initially, but a mixture can be provided including a sample suspected of containing
15 species 36, binding species 28, signaling entity 30, and bead 26, where binding species 28 is adapted to be fastened to signaling entity 30 and/or bead 26 if not already fastened. In this arrangement, species 28 can be adapted to be fastened to signaling entity 30 and/or bead 26 by including a chemical or biological binding partner of a molecule fastened to signaling entity 30 or bead 26. Bead 26, if a polymeric bead, can include a variety of
20 covalently-attached linking molecules. Similarly, entity 30 can be modified in this way. Bead 26 also can be coated with a surface layer of a material that facilitates formation of a SAM thereon, such as gold, and a SAM forming molecule (such as a thiol in the case of the gold surface) carrying a linking molecule can be formed thereon. Linkages between a linking molecule on bead 26 or signaling entity 30 and binding species 28 can include an
25 affinity tag such as metal binding tag/metal/chelate linkages, complementary nucleic acid sequences, biotin/streptavidin, etc. In an arrangement where a metal binding tag/metal/chelate linkage is used, a chelate can form part of a SAM on bead 26, and can be covalently attached to signaling entity 30. The chelate coordinates a metal, but leaves at least two open coordinate sites on the metal. A metal binding tag such as a polyamino
30 acid tag can be incorporated into binding species 36, giving species 36 the ability to fasten to the bead or signaling entity by coordination of the metal binding tag to the

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-30-

metal. Examples of suitable chelates include nitrilotriacetic acid, 2,2'-bis(salicylideneamino)-6,6'-demethyldiphenyl, or 1,8-bis(a-pyridyl)-3,6-dithiaoctane. In an alternate immobilization technique, binding species 36 can carry a terminal cysteine and fasten thereby to a gold surface of bead 26.

5 A variety of binding species 36 can be selected. The binding species can be a peptide, protein, sequence from a protein, small molecule such as Congo red or Thioflavin-T, or sequence homologous to sequence derived from aggregate-forming species, RNA, DNA, nucleoside derivatives, or antibody to the aggregate-forming or fibril-forming species 36.

10 A variety of surfaces can form components of kits or systems or participate in methods of the invention. Surfaces such as surfaces of beads, colloids, electrodes, ELISA plates, other multi-well plates, and the like can be used.

In many techniques of the invention it is desirable to prevent any binding species introduced into an assay from participating in aggregate formation. In such a case, aggregate-binding, but aggregate-formation-resistant binding species can be used. Aggregate-formation-resistant species can easily be selected by those of ordinary skill in the art from among species such as antibodies, fragments of proteins or peptides, etc. that will bind but not form aggregates.

The surface of the article, whether it be an electrode, particle, bead, colloid, or the like, preferably has a chemical functionality that substantially inhibits non-specific binding of aggregate-forming species. This can be accomplished in one embodiment by forming a SAM on the surface for presentation of a desired functionality for the assay, the SAM being a mixed SAM including other non-specific-binding inhibitors. NSB inhibitors include polyethylene glycol-terminated SAM-forming species.

25 Preferably, a SAM coating the colloid inhibits colloid/colloid self-aggregation. This can be accomplished by incorporating a sufficient amount of SAM-forming species that are charged in addition to species that resist NSB. Charged moieties and/or carboxy-terminated species should be present in an amount of about 10 percent or more of the SAM, or preferably at least about 30 percent or at least about 45 percent of the SAM.

30 These species can also be present in higher percentages such as, for example, 60 percent, 80 percent, 90 percent, or even 95 percent.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-31-

Referring now to Figure 2, another arrangement suitable for use as an assay as illustrated in Figure 1 is shown, but with modifications. In the arrangement of Figure 2, rather than a signaling entity 30 fastened to or adapted to be fastened to species 28, species 28 is immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to individual signaling entities 34 by way of each of species 28 and signaling entities 34 being fastened to or adapted to be fastened to a colloid particle 40. Species 28 and signaling entities 34 can be adapted to be fastened to colloid particle 40 by any of a variety of chemical or biological techniques known in the art or described herein. It is particularly convenient, with the use of gold colloid particles 40, to attach signaling entities 34 and binding species 28 to a thiol which will bind to the surface of colloid 40. A SAM can be formed coating a surface of colloid 40 including the signaling entities 34 and binding species 28. In the arrangement of Figure 2, binding of binding species 28, fastened to each of bead 26 and colloid 40, to aggregate or fibril-forming species 36, followed by activation of magnet 38 to draw bead 26 to the proximity of electrode 20, in turn draws signaling entities 34 close to electrode 20 since signaling entities 34 are immobilized relative to bead 26. Electronic or electrochemical detection of signaling entities 34 near electrode 20 is routine using ACV or the like.

The assays illustrated in Figures 1 and 2 can be used for a variety of purposes. When used to determine whether aggregate-forming species 36 is present in a sample, a kit including bead 26, signaling entity 30 (Figure 1) or colloid particle 40 (Figure 2), and binding species 28 fastened to or adapted to be fastened to bead 26, entity 30, or colloid particle 40, is provided and mixed in solution with the sample. If aggregate-forming species 36 is present in the sample, then this is indicated by the proximity of signaling entity 34 near electrode 20 after mixture and activation of magnet 38. If aggregate-forming species 36 is not present, then signaling entity 34 should not be drawn to the electrode upon activation of the magnet.

In another technique, used for drug screening, aggregate-forming species 36 can be provided in known quantity in the sample in addition to a candidate drug for treatment of neurodegenerative disease, non-neurodegenerative disease, or other protein aggregation disease, or for treatment of a condition in which aggregation is desired. In such an arrangement, different candidate drugs will have different effects upon the

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-32-

binding of binding species 28 and in turn to signaling entity 30 or colloid particle 40 to bead 26 via the aggregate-forming species 36. Candidate drugs that inhibit this binding are candidates for treatment of neurodegenerative disease or other protein aggregation disease, or for treatment of a condition in which aggregation is desired. The assay can be

5 established in such a way that a signal (proximity of signaling entity 34 to electrode 20) is proportional or otherwise related not only to the concentration of aggregate-forming species 36 in the sample, but to the degree of aggregation or fibril formation occurring within the sample. In such an arrangement, in a drug screening assay, the signal will be proportional or related to the degree to which a particular drug candidate prevents

10 aggregation characteristic of a particular disease from aggregate or fibril-forming species 36 present in the sample, or the signal will be proportional or related to the degree to which a particular drug candidate enhances aggregation for physiological conditions where enhanced aggregation is desired.

In drug screening assays, it is often desirable to quantitatively determine the

15 relationship between immobilization of bead 26 relative to signaling entities 34 in conjunction with concentration of aggregate-forming species 36 and/or concentration of drug candidate in a particular solution. In such an arrangement, it is desirable that binding species 28 bind aggregate-forming species 36 without conversion of binding species 28 to an aggregate-forming species, to maintain a 1:1 correlation between binding

20 events and signal. This can be done by selecting binding species 28 and aggregate-forming species 36 from diverse biological species, e.g. from hamster and mouse, respectively, or a sequence derived from the same species that binds 1:1 with target.

In another arrangement, it is desirable to maximize sensitivity of the assay, rather than maintaining a 1:1 correlation between the binding events and signals or species in

25 solution. In such an arrangement it is desirable to convert binding species 28 from species that simply will bind neurodegenerative aggregate-forming species 36, but are not aggregate-forming species themselves, into aggregate-forming species with the ability to convert other binding species to aggregate or fibril-forming species. In such an arrangement, with references to Figures 1 and 2, if only a very, very small amount of

30 aggregate-forming species 36 is present in a sample (e.g. where as few as 100,000 molecules must be detected because that number of infectious prion molecules is

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-33-

sufficient to cause disease, characteristic of a sample from a patient in a very early stage neurodegenerative disease), "amplifier" species 29 can be provided in solution and mixed with a sample. In such an arrangement, even though a very small amount of aggregate-forming species 36 may be present in a sample, amplifier species 29 can be converted thereby to aggregate or fibril-forming species thereby rendering aggregate or fibril-forming species present in sufficient concentration to be detected using the assay. If no aggregate-forming species 36 is initially present in the sample, then amplifier species 29 will remain unconverted and little or no signal will be detected. Not only can amplifier species 29 amplify the concentration of aggregate-forming species 36 present in a sample to detectable levels, but it can facilitate massive aggregation of species 36 characteristic of neurodegenerative disease which in turn can form macro structures including many hundreds or thousands of beads, colloids, and/or signaling entities bound to many thousands of aggregate-forming species in a single macro structure. These structures can be easily detected electronically or electrochemically, and often visibly.

Amplifier species 29 can be selected among all of the species listed above for binding species 28, but need not be the same as binding species 28 in a particular assay. For example, binding species 28 in a particular assay can be a binding species, but without the ability to be converted to an aggregate-forming species, while amplifier species 29 can be convertible to define an aggregate-forming species. The latter situation (binding species 28 is not convertible but amplifier species 29 is convertible to an aggregate-forming species) it is useful in preventing particle/particle aggregation in the absence of a positive result (in the absence of aggregate-forming species 36 in a sample), but amplification of species 36, when it is provided in a sample, occurs, sensitizing the assay.

In conjunction with the use of amplifier species 29 to cause massive aggregation of a sample that initially includes insufficient aggregate-forming species 36 to cause massive aggregation (yet levels of species 36 desirably detected), electronic signaling entities and magnetic beads as illustrated in Figures 1 and 2 need not necessarily be used. In such an arrangement, a kit can be provided including colloid particles 40, binding species 28 fastened to or adapted to be fastened to colloid particles 40, and amplifier binding species 28. Such a kit can be mixed with a sample suspected of containing, or known to contain

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-34-

(in the case of drug screening), aggregate or fibril-forming species 36. Even at very low levels, species 36 can convert amplifier binding species 29 to aggregate or fibril-forming species, causing massive aggregation and the formation of macro structures easily detectable, for example, visible by the unaided human eye, e.g. color change, or visible
5 under a microscope, detectable via a light scattering, absorbance or the like. In this arrangement, colloid particles 40 need not necessarily carry any auxiliary signaling entities.

In the arrangement described above with reference to Figures 1 and 2, it is desirable that binding species 28 be selected, and provided in concentration on surfaces
10 of beads 26 and colloid particles 40 (where colloid particles are used), such that in the absence of auxiliary, non-surface immobilized aggregate-forming species 36, particle aggregation on particle/particle exposure is hindered within a time frame allowing comparison of (1) aggregation in the absence of auxiliary aggregate-forming species with (2) aggregation in the presence of auxiliary aggregate or fibril-forming species. That is,
15 if no aggregate or fibril-forming species 36 is initially present in a sample, then aggregation of colloid particles may occur, but only slowly or to a limited extent, whereas if species 36 initially is present, then aggregation will occur more rapidly and/or to a much greater extent. In such an assay a control can include no sample, and the rate and/or aggregation level of the sample can be compared to that of the control.

20 It is not intended that the methods and assays of the present invention as described in the immediately preceding paragraphs discussing neurodegenerative disease be limited to only a particular aggregate associated with a particular neurodegenerative disease. Indeed, the present invention contemplates detecting fibrils associated with a host of such diseases (*e.g.* Alzheimer's, Parkinson's, Creutzfeldt Jakob, etc.).

25 The present invention provides a variety of assays and components for assays, for detection of disease or determination of effectiveness of drugs for treatment of such disease. The assays can involve electronic or electrochemical detection of an interaction of a sample or drug screen assay with a sensing electrode, or can involve aggregation, which can be detected by a variety of techniques, including but not limited to visual
30 inspection, density scanning, light transmission, absorbance, color change and/or light scattering. In connection with aggregation, binding species that can bind aggregate-

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-35-

forming species or can incorporate into pre-existing aggregates or fibrils, are attached to colloids (*e.g.* gold colloids) or other particles (*e.g.* fluorescent beads). These particles, optionally along with free binding species (species that are not attached to colloids but are suspended or dissolved in a fluid in which the colloids are suspended) are mixed with solutions that contain aggregates (*e.g.* patient samples). As the particles (*e.g.* colloids) become incorporated into the fibril, they render the fibril optically detectable. To inhibit peptides immobilized on colloids from interacting with each other, repellant groups - such as charged moieties (COOH, DNA, charged peptides) - can be fastened to surfaces of the colloids. This causes the immobilized peptides to interact with the fibril rather than with each other and thus reduces the occurrence of false positives in a diagnostic assay.

Also, flexible groups, such as glycol units can be chemically inserted between the nitrilo tri-acetic (NTA) moiety and the thiol portion. The introduction of more degrees of freedom would slow the rate of interaction by increasing the entropic cost of the reaction.

It is not intended that the present invention be limited by the method of detection. To facilitate detection, the present invention contemplates a variety of techniques. For example, a signaling entity, such as a dye, can be fastened to one end of a peptide capable of incorporating aggregates. As the signal-modified peptides incorporate into the fibril, they render it "visible" by concentrating the dye on its surface. In another embodiment, fluorescent moieties and quenching moieties are attached to the ends of separate peptides. At low concentration in solution, they do not interact frequently with each other; however, when co-localized on a fibril, a quenching reaction takes place, causing a change in the fluorescence of the solution. These changes can be analyzed using standard ELISA plate readers. In yet another embodiment, two compounds are attached to the termini of two separate peptides capable of incorporating into a fibril or plaque. The compounds are designed such that one compound modifies the second to render it active or detectable. The chemical modification is such that without the modification the compound does not fluoresce but after modification it does. Statistically, the reaction will happen orders of magnitude more frequently when the two compounds are co-localized on a fibril or plaque. In another embodiment electronic or electrochemical interaction serves as a detection technique, for example, where the presence of a redox-

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-36-

active molecule near an electrode surface can be detected, indicating binding of a species immobilized relative to the redox-active molecule to a species immobilized relative to the electrode, or relative to a recruitable particle that can be drawn to the electrode, such as a magnetic bead. In another detection technique, an image of a sample can be digitized, then pattern recognition software is used to determine whether the sample contains aggregates. For example, a sample as shown in Figure 8 can be digitized using a CCD camera, and pattern recognition can be used to determine color, aggregate size, aggregate spatial distribution, relative amount of aggregation, etc. This allows automation of both diagnostic screening and drug screening. It is particularly useful, when doing screening of a large number of drugs, to be able to individually spatially address various samples. Techniques of the invention can be carried out using individually spatially-addressable regions, such as different wells of a multi-well plate (see Figure 8) and/or a plurality of electrodes. A plurality of electrodes can be arranged in individual wells of a multi-well plate, or the like.

It is particularly useful, when doing screening of a large number of drugs, to be able to individually spatially address various samples. Techniques of the invention can be carried out using individually spatially-addressable regions, such as different wells of a multi-well plate (see Figure 8) and/or a plurality of electrodes. A plurality of electrodes can be arranged in individual wells of a multi-well plate, or the like.

Regardless of which embodiment is employed, the assays of the present invention can be readily adapted to screen drug libraries for compounds that inhibit aggregate formation. For a drug-screening assay, one can attach binding species to colloids (or other particle) and incubate with solutions containing aggregate-forming or fibril-forming species and a drug candidate. The solutions may or may not be agitated to accelerate the incorporation of peptide into the fibrils. As the binding species are incorporated into the aggregates or fibrils, or aggregate-forming or fibril-forming species that then form aggregates or fibrils, they bring the attached colloids close to each other, which causes the colloid solution to change color (e.g. from a pink suspension to a dark blue precipitate in a clear solution). This transition is clearly visible by eye. By absorption spectrophotometry, the peak at 569 nm degrades as the colloids aggregate.

In one embodiment, the method of the present invention employs peptides (that

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-37-

can form aggregates characteristic of neurodegenerative diseases or other protein aggregation diseases or other non-disease processes) which are modified with signaling and/or recruitment moieties and are incubated with a biologically-derived sample (or an in vitro mimic of such a sample) potentially containing converted or aggregated peptides indicative of the disease state. The existence of peptide plaques, aggregates, or fibrils is detected via the incorporation of the labeled peptides. This assay can be done in a variety of ways, as described below, in a system that allows fast and efficient detection of fibrillar or aggregated species.

For example, one element can be a magnetic particle that bears a peptide that participates in fibril or plaque formation. The second element can be in the form of a colloid derivatized with a heterologous SAM that presents both a peptide that participates in aggregate formation and a redox-active compound, such as a ferrocene derivative, which acts as a signaling moiety. Peptides that participate in fibril or plaque formation can catalyze the misfolding and spontaneous aggregation of other peptides, such as those attached to the beads and colloids. The presence of these fibrillar or converted species of peptide can be detected in a sample by detecting the association of peptides on magnetic beads with peptides on signaling colloids through their simultaneous incorporation into fibrils or aggregates.

Following an incubation period in which this aggregation is allowed to occur, an electromagnetic field can be applied that attracts the complex, which now contains magnetic particles as well as signaling colloids. In this system, magnetic particles provide a method of mixing biological recognition particles through a large sample volume and then rapidly recruiting the labeled targets to an electrode for detection. When an oscillating potential is applied to the electrode, a current peak at the oxidation potential that is characteristic of the redox-active metal indicates the presence of the aggregate at the electrode and, consequently, the presence of the aggregated peptides. In addition, free non-converted peptides can be added into the measurement solution to increase the rate of aggregation and/or the amount of material aggregated, thus acting as aggregation amplifiers. Aggregate formation can also be accelerated by varying the incubation and measurement conditions, including using frequency pulses and changes in temperature and electrical and magnetic fields. The magnetic particles can be drawn to a

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-38-

sensing electrode. Alternatively, in this embodiment and in other embodiments where species are desirably recruited to an electrode or another location, gravity can be used. For example, in assays of the invention components can be used that are not fluid self-suspendable, but will settle by gravity. Or, in other assays, fluid-suspendable
5 components will aggregate to form non fluid-suspendable entities that will settle out of suspension.

The complexes can be detected using a variety of techniques including alternating current voltammetry (ACV). This detection method can be supplemented by the use of additional analysis techniques such as higher order harmonic analysis. These complexes
10 may also be able to be detected by optical means such as surface plasmon resonance (SPR). In using the latter technique, large shifts in optical properties are caused by recruitment of particle/particles complexes to the detecting surface.

The aggregated state of these disease related peptides can also be detected by attaching potentially pathogenic peptides (binding species or aggregate or fibril-forming species) to either end of a linker, such that upon introduction of a polymerization seed or
15 aggregate (aggregate or fibril-forming species optionally able to convert binding species to aggregate or fibril-forming species), the chains would form aggregates whose detectable properties would be altered from the original, non-aggregated state, e.g. by being visibly identifiable, rendered able to scatter light in light-scattering detection,
20 change in viscosity in a flow detection system, electronic detection where an electronic signaling entity is linked to a component that forms part of the aggregate, etc. Alternatively, normal forms of pathogenic peptides can be attached to functionalized hydrogels or to ordered "holes" in gel-like materials. Since the introduction of a seed or protein aggregate would cause the conversion of the presented, soluble peptides into
25 polymers or aggregates, that have altered optical properties, these aggregates could be optically detected.

Alternatively, the magnetic particle can be gold-coated and derivatized with a SAM that presents the desired peptide either by direct attachment of a peptide-thiol, or indirectly such as a DNA-peptide binding to a DNA-thiol incorporated in a SAM, or a
30 histidine-tagged peptide binding to an NTA-thiol incorporated into a SAM. The colloid described herein may be a cluster of metal atoms, the preferred metal being gold.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-39-

Because gold clusters can be made from as few as 20 gold atoms, colloids would be among the smallest possible particles with a diameter of only a few nanometers which could have significant advantages when incorporating these relatively small-sized fibril-forming peptides and metal-containing compounds into fibrils and plaques and
5 maintaining them in suspension.

There can also be a linker inserted between the peptide and the particle or colloid or the recognition group that links the peptide to the particle or colloid so that steric hindrance does not interfere with the interaction between, e.g., a binding species and a fibril or aggregate-forming species. This linker or spacer can be made of a variety of
10 materials, including glycols or amino acids. The length of the spacer can be varied to promote a shift in the oxidation potential of the electroactive signal detection substance by creating an increased hydrophobic environment due to the proximity of the aggregates.

The magnetic particle can also be replaced by a second colloid of larger
15 dimensions and these larger colloids can be electromagnetically attracted to the electrode surface. However, they will only signal if decorated with satellite colloids that present signaling moieties. Alternatively, either colloid can be decorated with charged moieties that alter its mobility when an electromagnetic force is applied. All of the colloids can also be of similar size and an electromagnetic force can then be used to separate
20 aggregated colloids from individual particles. In another variation, the first particle could be a heavier particle or colloid that can be mechanically mixed during incubation and subsequently allowed to accumulate on the electrode surface by sedimentation when measurements are taken.

These techniques can also be employed in a one-particle system. For example,
25 magnetic beads can present pathogenic peptides and a transition metal complex. When pathogenic peptides in solution interact with peptides on beads to form aggregates, the local environment of the transition metal changes such that it will oxidize at a higher potential. The presence of pathogenic aggregates or fibrils are detected as a shift in the oxidation potential of the transition metal or as the appearance of a second oxidation
30 peak at a lower potential, when the system is electrochemically analyzed. An alternative one-particle system includes magnetic particles that display the normal peptide and

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-40-

amplifying peptides in solution that carry transition metal complexes. These transition metals can be linked to dendrimers or polymers, either conducting or non-conducting. As pathogenic peptides in the test sample promote aggregate formation, the metal-containing compounds become intertwined with peptides attached to magnetic particles
5 resulting in an electroactive and magnetic complex that can be recruited and electronically or electrochemically detected.

This assay system can also be constructed without using beads. Peptides with metal-containing compounds or peptide-thiols and transition metal complex thiols can be immobilized on or incorporated into SAMs on electrodes. Amplifying peptides may or
10 may not be added to the measurement solution. If the test sample contains pathogenic or infectious peptides, then they attach to the surface immobilized peptides. This changes the local environment of the metal complexes and thus changes their oxidation potential. Amplifying peptides in the measurement solution may carry metal complexes that may be linked to dendrimers or polymers. If the test sample contains pathogenic peptides, then
15 the aggregated species act to bridge the metalated peptides and the surface immobilized peptides. This interaction places the signaling moiety near the electrode surface and an electronic signal is transmitted to the electrode. Similarly, peptides incorporated into SAMs, formed on electrodes by either direct thiol attachment or by binding a His-tagged peptide to a pre-formed NTA-SAM, can be introduced to a sample solution that contains
20 pathogenic peptides and also colloids that present both peptide and signaling moieties such as ferrocenes. Again, their integration into fibrils/aggregates brings the signaling moiety (in this case a colloid) close to the electrode and a signal is transmitted. Conversely, peptides derivatized with NTA groups can be attached to surfaces via an interaction with a peptide that contains a six histidine stretch. Amplifying peptides may
25 or may not be added to the measurement solution.

These techniques can also be adapted to screening for potential drug candidates to treat these neurodegenerative diseases or other protein aggregation diseases or other non-disease processes. Specifically, in all of the described variations, a drug candidate can be added to the solution and its ability to inhibit, or enhance aggregate formation as a
30 function of time and concentration, which would translate into dosage, measured. Various parameters, such as a loss of signal or a shift in the position of the current peak

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-41-

can be indicative of a positive, and therefore therapeutically useful, effect. In addition, the drug candidates can be attached to beads bearing redox-active, e.g. metal-containing, compounds, which can be colloids coated with SAMs either with or without NTA-thiols, that oxidize at a different potential than those metal-containing compounds attached to the colloids having peptides attached to them. One then looks for the different oxidation peak. The signaling metal-containing compound can also be removed from the colloid that has peptides attached and the single current peak from the drug-containing colloids measured. Also, a multiplexing drug screening device can be designed in which the drug candidates are added to microarrays and the whole array is flipped upside down onto a SAM-modified electrode lid for analysis.

This competitive inhibition assay could also be performed in a system in which the signal detection compound is on a colloid containing drug candidates. In this system, a magnetic bead without metal-containing signal detection compounds carries peptides. Free peptides in solution can interact with the peptides bound to these magnetic beads. Putative drug candidates can be then placed on colloids having metal-containing signal detection compounds. The metal-containing signal detection compounds on the colloids would signal if they interrupted the aggregation process and interacted directly with the peptide on the magnetic beads. One could also obtain a signal if the drug candidates interacted with aggregates. The latter information could be useful, but would likely require a subsequent multi-step assay to determine where the drug was acting.

Drug candidates are added to solutions containing pre-formed fibrils, peptides attached to electronic signaling colloids, and peptides attached to magnetic beads. Following an incubation period, magnetic beads are attracted to a sensing electrode and analyzed by ACV. A loss of signal indicates that the drug candidate has inhibited fibril formation.

The metastable protofibril can be selectively formed and purified to homogeneity by size exclusion chromatography, then used as the target fibril species for drug screening. Similarly, alpha-synuclein, the protein that incorporates into fibrils characteristic of Parkinson's disease, can be His-tagged and attached to electronic signaling colloids and magnetic particles. These particles are incubated with synnuclein fibrils in solution or from a Parkinson's patient sample, then magnetically attracted to a

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-42-

sensing electrode for electronic analysis.

Pulsing the solutions with electromagnetic fields or mechanical agitation is used to accelerate the incorporation process.

As noted previously, it is also not intended that the assays of the present invention be limited to electronic or electrochemical interaction. In a particular embodiment, the method does not employ a sensing surface. Rather, the method involves aggregation, which can be detected by a variety of techniques, including but not limited to visual inspection, density scanning, light transmission, absorbance, color change and/or light scattering. Peptides, which can incorporate into pre-existing fibrils, are attached to colloids (*e.g.* gold colloids) or other particles (*e.g.* fluorescent beads). These peptide-presenting particles, along with free peptides, are mixed with solutions that contained fibrils (*e.g.* patient samples). As the particles (*e.g.* colloids) become incorporated into the fibril, they render the fibril optically detectable.

While it is not intended that the present invention be limited to the particular details of how this embodiment is formatted into an assay, a convenient approach is the 96-well ELISA plate format. For the reaction, the following reagents can be added to the ELISA plate in phosphate buffer (10mM phosphate, pH 7.4, 100 mM NaCl) and the following concentrations can be conveniently used: a synthetic A β (1-40) peptide, with an N-terminal (His)₆ tag, at either 58.2 μ M or 14 μ M, 30 μ L NTA/Ni⁺⁺-presenting gold colloids (preparation described below) and 0.6 μ M of A β -amyloid fibril "seeds". The ELISA plate can then be incubated at 37°C, without agitation, for a desired period (*e.g.* 30 minutes to 2 hour). At 1 hour, large dark red aggregate structures are clearly visible in the wells that contained 58.2 μ M (His)₆-A β peptide. After a desired period (*e.g.* between 1 and 4.5 hours), the plate can be agitated briefly and then visually inspected. The aggregate structures are clearly visible in all wells that contained both (His)₆-A β peptide and A β fibril "seeds". These aggregate, fibrillar-like structures are also able to form in solutions that contained up to 50% fetal bovine serum (FBS), albeit at a slower rate. When the concentration of FBS is serially diluted and incubated with fibril seeds and (His)₆-A β peptide at constant concentration, the rate of visible fibril formation increases with decreasing FBS concentration, which indicates that the assay was specific for A β fibrils and not recognizing fibrillar species present in fetal serum. Wells that contained

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-43-

either fibrils or (His)₆-A β peptide, but not both, do not form visible aggregates. As a negative control, an irrelevant His-tagged peptide can be incubated with the colloids and seed fibrils. Such control solutions will not produce visible, fibrillar aggregates.

Using the above-described method, fibril seed concentrations as low as 10
5 picomolar are visibly distinguishable from solutions that contained colloids and A β peptide, but did not contain seed fibrils.

The colorimetric techniques described herein do not disrupt the assay process. A single fluid mixture is prepared and, without any transfer or other agitation required, the mixture can be observed to determine aggregate formation or lack thereof. Alternatively,
10 a particular assay can be exposed to agitation or other form of energy. For example, it may be desirable in certain instances to determine whether introduction of energy into a particular system affects aggregate formation. Energy can be introduced in the form of agitation such as stirring, shaking, vibrating, sonicating, vortexing, or other mechanical agitation, exposure to electromagnetic radiation such as infrared, ultraviolet, or visible
15 light, exposure to radio frequency energy, microwave radiation, or essentially any electromagnetic radiation at any portion of the spectrum, exposure to heat. In some instances, exposure of a system to energy will affect the rate of aggregation which can be indicative of the potential affect of the energy on neurodegenerative and other aberrant aggregation disease processes.

20 The colorimetric techniques facilitate another aspect of the invention that involves correlating drugs or candidate drugs with activity as a function of time or as a function of aggregate formation in connection with aggregate-forming biological processes. One embodiment of the invention involves providing particles and binding species capable of binding aggregate-forming species fastened to or adapted to be
25 fastened to the surface. The particles and binding species are exposed to a candidate drug suspected of affecting fibril formation. A first observable feature of the particles is determined indicative of effectiveness of a candidate drug in affecting aggregate formation at a first point in time. Then, at a second point in time, a second observable feature of the particles is determined indicative of effectiveness of a candidate drug in
30 effecting aggregate formation. The assay can be constructed so that particles will bind to each other to varying degrees, or will become otherwise immobilized with respect to

each other by being bound to a common surface. The candidate drug may be one that is suspected of inhibiting fibril formation, and the determining steps involve determining first and second observable features of the particles indicative of effectiveness of the candidate drug in inhibiting aggregate formation at the first and second points in time.

5 Alternatively, the drug can be suspected of enhancing aggregate formation and its ability to do so can be determined at first and second points in time. The assay can involve exposure to auxiliary aggregate-forming species.

The observable features include directly visibly-identifiable changes (e.g., color change due to colloid aggregation or other direct visibly identifiable change described
10 herein such as fluorescence quenching, etc.) The technique can be automated as well, involving spectroscopic determination of color change.

The first and second points in time, in one set of embodiments are relatively large. Specifically, they differ in time by at least 1 day or at least 1.5 days, or even at least 2 days. This set of embodiments can be useful in identifying drugs that may be
15 particularly effective at late-stage aggregate associated physiological processes such as disease. In another set of embodiments, the first and second points in time differ by no more than 20 minutes, or less than 10 minutes, or less than 5 minutes or 1 minute, or even less than 30 seconds. This set of embodiments can be used to identify drugs that are particularly effective at very early-stage aggregate processes.

20 One advantage of this technique of the invention is that it can be conducted in a "one pot" assay. That is, the first and second observable features can be determined without disruption or agitation of the assay or exposure of external energy to the assay during and between the first and second determining steps. With this in mind, spectroscopic determination of an observable change preferably is done using visual
25 spectroscopy. This is convenient because the assay looks for a change in the visible range (pink to blue), and visible spectroscopy does not add significant energy to the system. Even as visible spectroscopy is used, it is preferred that short spectra are taken at separate points in time, rather than exposing the assay to spectroscopic energy for long periods of time.

30 The observable features of the particles indicative of their binding status, and thereby the effectiveness of the candidate drug can be determined, if spectroscopically, at

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-45-

least two different wavelengths. For example, blue and pink each can be monitored to monitor a decrease in blue and an increase in pink.

Observable features also can include the formation of reticulum, i.e., visible observation of aggregate formation.

5 In another embodiment, the plurality of particles are exposed to the sample and an extent of aggregation of the particles is determined at least five hours after the exposing step. This can be done, also, at least 10 hours after the exposing step, at least 15 hours, or at least 20 hours after the exposing step. In one step of embodiments no determination of aggregation occurs before these periods of time.

10 In another set of embodiments, the particles are exposed to the sample and aggregation is determined no later than one minute after the exposing step, or no later than 30 seconds, or no later than 10 seconds after the exposing step.

As noted, this aspect of the invention can involve determination of drugs particularly useful for treatment of patients at different disease stages. This leads to one
15 method of the invention involving administering, to a first patient exhibiting symptoms indicative of a first stage of a aggregate-associated process, a first drug for treatment of the process, wherein the first drug, upon exposure to an assay indicative of potential for effecting fibril formation, exhibits a first characteristic of affecting fibril formation. A second patient exhibiting symptoms indicative of a second stage of the process is
20 administered a second drug, wherein the second drug, upon exposure to the assay, exhibits a second characteristic of affecting fibril formation. The aggregate-associated process can involve neurodegenerative disease, non-neurodegenerative disease, or non-disease processes. Additionally, changes in pH, salt and/or buffer concentration, etc. can be used to alter the rate of aggregate formation. This can be useful techniques of the
25 invention, described below, involving correlation of aggregate size or formation progress, to effectiveness of certain drugs.

The invention also involves using a cell that can produce an aggregate-forming species for a variety of purposes. In one technique, the cell can be exposed to a candidate
30 drug for inhibition of aggregation-associated physiological processes such as neurodegenerative disease, and the potential of materials produced by the cell for formation of aggregates characteristic of neurodegenerative disease can be monitored.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-46-

This can be useful for determining the effectiveness of the candidate drug for inhibition of the disease. Other techniques can be carried out as well. Use of a cell itself, rather than simply isolating aggregate-forming species produced by the cell and testing those species, allows one to carry out experiments and monitor drug efficacy in real time. This provides several advantages, including techniques that are simple, inexpensive, and rapid. One technique involves monitoring the production, e.g., secretion, of neurodegenerative disease aggregate or fibril-forming species from the cell as a function of time, for example over periods of time including 5 seconds, 30 seconds, and other small-time intervals including any number of minutes up to 1 day, and over longer periods of time including any number of days up to a week or even longer periods including 2 weeks, 3 weeks, etc. Monitoring production of these species by cells as a function of time allows determination of drug activity profiles as material is continually produced over time, i.e. ability of the drug to continually act in response to newly-produced material. Drug efficacy as a function of time also can be studied. This can allow determination of the effectiveness of the drug in acting in response to different materials produced by the cell at different points in time, for example points in time as described above. Also, stability (thermal) of the drug as a function of time can be determined, as can capacity of the drug to act upon increasing levels of materials secreted by the cell, etc.

Methods of the invention need not be limited to cells that have the capability to secrete aggregate-forming species. Alternatively, cells that produce or retain aggregate-forming species intracellularly, can be lysed prior to colloid addition. Although this aspect of the invention is described for a neurodegenerative disease, it applied to non-neurodegenerative disease, and other non-disease processes; the cell may have the ability to produce or retain any aggregate-forming species or precursor of an aggregate-forming species.

In addition, assays can be constructed in different ways to derive information at different points in time relative to production of material in the cell. For example, a cell can be made to produce aggregate-forming species in the presence of a pre-mixed assay including colloids along with binding species fastened or fastenable to the colloids, or colloids and/or binding species can be added at any point in time in the process.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-47-

The technique also allows for the determination of the effectiveness of a candidate drug in affecting aggregate formation, where a specific mechanism associated with the formation may not be known. A candidate drug may be determined to be effective in affecting aggregate formation by affecting the production of the species by the cell, or affecting aggregate formation after aggregate forming species have been produced, or affecting of any stage of the process. Stages of the process can include transcription, translation, post-translational modification, and secretion.

The technique also allows for the monitoring, e.g. visualization, of the effectiveness of a candidate drug in affecting aggregate formation over time without intervention. In the assay described, no translation of any assay component, such as pipeting, agitation, or transfer of solution, is required. This can more effectively simulate the natural, biological environment, and thereby more effectively identify drugs that are effective in a natural environment. In this aspect of the invention any of the determination/visualization techniques described herein can be used, e.g. visualization with the unaided human eye of colloid/colloid aggregation, spectrophotometry, light-scattering, and other techniques described herein. Preferred techniques are visual inspection of a cell-containing medium to determine whether the medium remains pink in the presence of colloids, indicating no aggregate or fibril formation, or changes to blue, indicating colloid aggregation indicative of the presence of aggregate-forming species, or any color indication on the spectrum between pink and blue indicative of a corresponding intermediate state.

The technique also can involve visual or other detection of localization of aggregate or fibril formation, typically in concentrated areas surrounding cells, where a higher level of aggregate or fibril-forming species typically exists. Localization of aggregate or fibril-forming species can be seen as areas of increased peptide or colloid reticulum or as areas where the solution has cleared adjacent areas of increased peptide/colloid reticulum due to drawing of the aggregate or fibril-forming species into the areas of reticulum. The ability to observe aggregation around individual cells or clusters of cells allows for a more accurate assessment of the efficacy of a particular drug. Specifically, quantification of efficacy can be monitored more readily. For example, an assay can be conducted without knowledge of the number of cells involved,

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-48-

where a pattern of reticulum is easily recognizable and associated with a particular cell.

This technique also allows for determination of the toxicity of a candidate drug with respect to a cell.

The present invention also provides a series of assays and kits involving colloid-
5 colloid interaction. Assays of the invention first and second colloid particles that are
allowed to become immobilized with respect to each other, or are prevented from
becoming immobilized with respect to each other. Assays can indicate binding
interactions, can involve enzymes that facilitate binding interactions, enzymes that
cleave, drugs that inhibit binding interactions, or essentially any other binding
10 interactions, the existence or lack thereof desirably being determined. Although this
aspect of the invention is described with respect to first and second colloid particles
becoming immobilized with respect to each other, generally many colloid particles would
be involved in a particular assay, and observed to determine whether aggregation of the
colloid particles, characteristic of binding between them or binding to a common surface,
15 occurs. Where aggregation does not occur a solution in which colloid particles are
suspended remains pink. Where aggregation does occur, the solution will become blue
or purple, and in many cases a visible reticulum (visible aggregation) will result. The
reticulum can be determined visibly with the human eye, or microscopically.

One advantage of this aspect of the invention is that color change, or lack thereof,
20 can be determined spectroscopically. For example, a particular assay can be established
for the determination of the ability of a candidate drug to inhibit binding between first
and second species. The first and second species can be immobilized relative to (e.g.,
directly fastened to colloid particles), and the particles can be provided in separate
containers (e.g., separate wells of a multi-well plate), and exposed to different candidate
25 drugs. The wells can be measured spectroscopically for a change in absorption at a
particular wavelength indicative of a color change resulting from colloid aggregation.
Thus, one significant aspect of the invention involves automatically, via instrumentation,
determining aggregation of colloid particles indicative of binding interaction or
prevention thereof. In this and other assays of the invention species can first be
30 immobilized relative to (e.g., fastened to) colloid particles and then exposed to a
candidate drug, enzyme, or other species that may inhibit or facilitate binding, followed

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-49-

by exposure to the candidate drug or enzyme. Or first or second chemical or biological species can first be exposed to a candidate drug, enzyme, or the like followed by exposure to colloid particles to which the first and second chemical or biological species have the ability to fasten or become immobilized. Regardless of the order in which steps of assays of the invention are carried out, colloid-colloid aggregation is indicative of binding interactions or prevention thereof, and can be automated.

A variety of signaling entities can be immobilize relative to colloid particles, if desired. Signaling entities presented on colloids can be fluorescent molecules. Fluorescent-conjugated antibodies and other fluorescent fusion proteins, including green fluorescent proteins, are widely used in biomedical research and testing. These fluorescent proteins and molecules can easily be attached to gold colloids that also present putative binding partners either through affinity tags, EDC/NHS chemistry or by binding to a His-tagged protein A or G presented on NTA-SAM-coated colloids according to the invention. Signaling entities such as fluorescent moieties also can be co-immobilized on a colloid via a biotin terminated ligand, or may be fastened via a chelate/metal/metal binding tag linkage. A fluorescent moiety may also be fastened by attaching it to an antibody and using a chelate/metal/metal binding tag with His-protein G to bind the antibody. The moieties can then be directly detected. Alternatively, one set of colloids bearing a first ligand bears a fluorescence moiety while a second set of colloids is derivatized to present a putative binding partner and a quenching moiety. If the ligand-receptor pair interact, then a measurable quenching of the fluorescence signal results. Drug candidates can be tested for their ability to disrupt these interactions.

First and second chemical or biological species can be immobilized relative to first and second colloid particles respectively, and other chemical or biological species can be immobilized with respect to other colloid particles in such studies. In some cases the first and second chemical or biological species will be identical, i.e., a plurality of colloid particles will carry the same immobilized entities. In other cases entities will differ. Chemical or biological species can be fastened directly to colloid particles, e.g., by being covalently attached to a SAM-forming species that fastens to the particles, or can be immobilized relative to colloid particles, e.g., by being fastened to a colloid particle, via another colloid particle. For example, a chemical species is immobilized

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-50-

with respect to a colloid particle if it is fastened to another colloid particle that is itself fastened to the colloid particle. In one set of embodiments, colloid aggregation is studied using chemical or biological species that are immobilized, or adapted to be immobilized relative to colloid particles by a binding interaction that does not involve a nucleic acid sequence binding to a complimentary nucleic acid sequence.

A variety of studies involving colloids/colloid aggregation can be carried out in accordance with the invention. One set of assays makes use of the effect of an absorptive or emissive species, immobilized with respect to a colloid particle, by a second species that is immobilized with respect to a second colloid particle, brought into proximity or removed from proximity of the first colloid particle by binding, cleavage, or other interaction desirably studied in accordance with the invention. For example, a fluorescent molecule may be immobilized with respect to a first colloid particle and a chemical species having the ability to quench fluorescence of the fluorescent molecule, i.e., effect emission of the fluorescent molecule, can be provided on a second colloid particle. Then, first and second species immobilized with respect to the first and second colloid particles, if they bind to each other, will bring the first and second colloid particles into proximity with each other, causing quenching of the fluorescent molecule. If the first and second species immobilize with respect to the first and second colloid particle, each can bind to a common analyte, then presence of the analyte will cause quenching of fluorescence, and absence of the analyte will avoid quenching.

A drug candidate may be studied for competition with the analyte for binding of one of the species, or binding with one site on the analyte. In this case, the analyte may be provided as a known species. Presence of the drug candidate will thus inhibit immobilization of the first and second colloid particles relative to each other, thus will inhibit quenching. Alternative embodiments involve enhancing emission or shifting the wavelength of emission or absorption of a first molecule, by a second molecule on a second colloid particle.

This colloid/colloid aggregation technique can be used to identify the binding partners of drugs or proteins of interest. This can be accomplished by attaching the drug or protein to one set of colloids and possible binding partners to other sets of colloids and assaying for a binding interaction between the two sets of colloids. Once a biological

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-51-

target of a drug or protein has been identified, candidate drugs can be added to the assay in the presence of the colloid-attached binding partners to disrupt binding of the drug or protein to the cognate ligand, allowing identification of synthetic mimics of the drug or protein on the first set of colloids. This technique is very useful in identifying the biological target of orphan drugs or uncharacterized proteins for diagnostic or drug-screening purposes. This technique will also allow identification of synthetic replacements or "mimics" of currently used drugs that are expensive or difficult to produce.

In one embodiment, an angiogenesis inhibitor is attached to one set of colloids (via an affinity tag linkage, chemical coupling, or nonspecific adsorption), and its biological target is attached to another set of colloids. For the unique case of an angiogenesis inhibitor that has two or more ligand-binding sites, such as endostatin, the ligand may be attached to one set of colloids and the angiogenesis inhibitor may be added in solution. Drug candidates are added and assayed for their ability to disrupt the binding interaction. Any drug that inhibits the interaction is then attached to a third set of colloids and assayed for binding to the angiogenesis inhibitor and the biological target of the angiogenesis inhibitor. A drug that binds to the biological target of the angiogenesis inhibitor and inhibits binding of the angiogenesis inhibitor to its target can be deemed a "mimic" of the angiogenesis inhibitor, and may be used as a replacement drug. This assay may be used to screen for mimics of virtually any drug. It is of specific interest for drug screening for synthetic replacements of angiogenesis inhibitors, which are both costly and difficult to produce. The assay can be used to identify synthetic replacements for endostatin, through disruption of the endostatin-vitronectin or endostatin-RGD-peptide interactions, angiostatin, through disruption of the angiostatin-ATP-synthase or angiostatin-vitronectin interaction, or TNP-470 through disruption of the TNP-470-methionine-aminopeptidase interaction. As in other colloid/colloid assays, color change, fluorescence quenching, or other emissive molecule enhancement or suppression and the like can be indications of a result. Study of RGD/endostatin interaction is described in example 18 below.

This colloid/colloid aggregation technique also can be used for discovery of angiogenesis inhibitors or ligands involved in angiogenesis pathways. In one assay,

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-52-

suspected angiogenesis inhibitors or proteins involved in can be immobilized relative to (e.g., fastened to) a first colloid particle. Second colloid particles can be immobilized with respect to molecules that have been implicated in angiogenesis and/or metastasis, such as basement membrane proteins, integrins, or adhesion molecules. If a particular angiogenesis inhibitor binds to the basement membrane protein, integrin, or adhesion molecule immobilized on the second set of colloids, then the two sets of colloids will become immobilized with respect to each other and the binding interaction will become detectable by methods of the invention such as color change, precipitation, etc. Once an angiogenesis inhibitor is identified by this method, candidate drugs for disruption of the binding can be screened. If the drugs disrupt interactions, then colloid particles will not immobilize relative to each other or will do so to a lesser degree. This assay can be used with known angiogenesis inhibitors to identify or verify the biological targets of the angiogenesis inhibitors. Drug candidates can then be added to the assay to identify other drugs that act on the same biological target.

Another embodiment in which colloid particles can be immobilized relative to each other in such assays involves colloid each being immobilized with respect to a common surface. The common surface can be a surface of another colloid particle presenting binding partners of species on the first colloid particles. The common surface can also be the surface of an article such as a membrane such as a nitrocellulose membrane, a chip surface, a surface of an article derivatized with an SAM, or the like. In preferred embodiments, the surface to which the colloid particles can bind includes binding sites at a high enough density so that if binding occurs (between species on the common surface and species on the colloid particles), the colloid particles will be brought into close enough proximity that detection (via color change characteristic of aggregation, quenching of fluorescence, or other property described herein) can occur.

In another embodiment antibodies that recognize the HIV-related P24 protein can be fastened to or otherwise immobilized relative to colloid particles and exposed to a sample suspected of containing P24. If P24 is present, colloid particles will be brought into close proximity and detected as described herein. The invention also provides for screening of candidate drugs for disruption of P24/antibody interaction.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-53-

There are many disease states in which a protein must be post-translationally modified by an enzyme before it becomes functional, and the present invention provides techniques and components that can study such processes. Below are examples of enzyme modifications that promote a disease state. In these cases, it would be desirable to inhibit enzyme activity and, in so doing, inhibit the disease. However, there are cases in which one would want to accelerate enzyme activity as a therapeutic. Caspases are enzymes that are involved in promoting apoptosis, which is the term for "programmed cell death". Thus, it is advantageous to identify drugs, or biomolecules, that increase caspase activity and thus programmed cell death. Targeting these therapeutic agents to cancer cells enables the specific destruction of tumor cells.

Enzymes whose activity can be assayed using methods of the invention fall into two general categories: 1) enzymes that cleave a substrate; and 2) enzymes that add a piece onto a substrate.

An example of enzyme activity that falls into the first category, cleavage, is the processing of amyloid pre-cursor protein (APP). Cleavage products of APP form the aggregates and plaques associated Alzheimer's disease, thus enzymes that modify APP, such as presenilin and beta- and gamma-secretase, are important targets of therapeutics. Cleavage generally produces peptides comprised of amino acids 1-40 or 1-42, with the 1-42 peptide being much more prone to aggregation and disease.

In other cases, it is advantageous to enhance enzyme cleavage activity. In such a case it is advantageous to screen for drugs or biomolecules that accelerate, either directly or indirectly, the cleavage of a certain substrate. For example, caspases are proteases that are critical players in the signaling cascade that triggers apoptosis or programmed cell death. Therefore, it is beneficial to identify agents that accelerate or trigger the activity of this class of enzyme. The drugs can then be targeted to tumor cells for their specific destruction with minimal damage to healthy cells.

Caspase 3 cleaves the sequence DXXD/X. It has been shown that caspase 3 cleaves protein kinase C (PKC) between the regulatory domain and the kinase domain. This allows the catalytic domain to function unchecked. This activity triggers apoptosis (programmed cell death). Mutants in the kinase domain of PKC did not trigger this type of (p53-dependent) apoptosis. In one embodiment of the present invention a peptide

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-54-

containing the Caspase 3 cleavage site is fastened to colloid particles. For example, the peptide can be synthesized or expressed with affinity tags at either end of the peptide, with gold colloids derivatized to present binding partners of the affinity tags. To this composition is added the enzyme that cleaves the substrate, either purified or as part of a mixture in the presence or absence of drug candidates, and their effect on cleavage is determined using techniques described herein with respect to colloid/colloid interaction. Drugs that stimulate cleavage, thus stimulate apoptosis, can be screened and identified, also using techniques described herein.

Another example of an enzyme that cleaves a substrate that could trigger apoptosis is now described. A complex comprised of cyclin dependent kinase 5¹⁰ (cdk5) and p35¹¹ are required for certain critical cellular processes in neurons. However, cleavage of p35 to p25 by the enzyme, calpain, creates the new protein complex p25/cdk5¹². This new complex is improperly localized and is constitutively active. The complex hyperphosphorylates tau which disrupts the cytoskeleton and triggers apoptosis in neurons. It has also been implied that cleavage of p35 to p25 can be enhanced by addition of beta-amyloid peptide 1-42.

It is clear that a drug able to inhibit cleavage of p35 would be useful as a therapeutic. For this reason it would be advantageous to identify agents that inhibit cleavage of p35 by calpain or other modifiers. The following is a prophetic example demonstrating how the present invention can be used to facilitate high throughput screening of drugs to inhibit p35 proteolysis.

P35, which is the substrate for the enzyme calpain, is adapted (if necessary) to facilitate fastening, either directly or indirectly, to separate colloids that have also been derivatized to facilitate this fastening. For example, recombinant p35 protein could be expressed with a histidine tag at one terminus for attachment to a first gold colloid bearing NTA-Ni (which binds His-tags) and recombinantly fused to Glutathione-S-transferase (GST) at the other end for attachment to a second colloid bearing Glutathione. Alternatively, p35 could be spontaneously attached to a second colloid that has been derivatized to present an antibody against a portion of p35.

Initially, the modified p35 would not be mixed with the colloids. Rather, aliquots of p35 are separately incubated with calpain and a panel of drug candidates, suspected of

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-55-

having the ability to inhibit p35 cleavage by calpain. Following a suitable incubation period, two populations of gold colloids derivatized to simultaneously bind to two separate sites on the substrate, p35, are added. If when the gold colloids are added to the solutions, they remain the characteristic pink of the colloids free in suspension, then one
5 can conclude that the substrate was cleaved and thus could not act to link two or more colloids into a colloid-peptide reticulum. If however, the solution turns from pink to blue, then one can infer that p35 was not cleaved, simultaneously linked 2 or more colloids together and that the drug candidate effectively inhibited calpain cleavage.

Alternatively, rather than monitor color change, one can observe the assay under a
10 microscope to determine whether or not a peptide colloid reticulum had been formed. A drug that inhibited p35 cleavage would preserve the continuity of the peptide and leave both recognition sites connected to each other and to two separate colloids.

In another aspect of the invention, beta-amyloid peptides (1-40 or 1-42, either soluble or in pre-formed aggregates) are added to the assay, along with the p35 substrate,
15 purified calpain, a lysate containing calpain, or a lysate containing the cleavage activity and drug candidates suspected of inhibiting cleavage.

It is not intended that the invention be limited by a specific enzyme or by using intact p35. Any portion of p35 that contains the cleavage site would be suitable for use as the assay substrate. Further, the substrate can be modified with any functionality that
20 facilitates the simultaneous attachment of the substrate, directly or indirectly, to two colloids. The substrate can be modified with affinity tags, affinity sequences, biotin, and the like. It is preferred, but not required, that the substrate be modified with two different affinity tags to discourage binding of two sites on the peptide to two sites on the *same* colloid. Alternatively, the substrate can be unmodified but attached to two colloids via
25 antibody recognition. Calpain can be added to the assay either in purified form or mixed with other enzymes, as in a cell lysate, and proteins, including beta-amyloid peptides.

The assay can readily be multiplexed by performing in 96-well plate format and/or by analyzing on an automated spectrophotometer.

Another example of an enzyme that can be studied in accordance with techniques
30 of the invention is matrix metallo proteins. Matrix metallo proteins are expressed on the surfaces of cancer cells, and are involved in cleavage of membrane proteins which is

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-56-

implicated in the progression of cancer and metastasis. In one technique of the invention, a substrate that can be cleaved by a matrix metallo protein (such substrates are known in the art) is modified for immobilization relative to two colloid particles. Exposure of this arrangement to the matrix metallo protein, in the presence of a candidate drug for inhibition of cleavage activity of the protein, indicates effectiveness of the candidate drug. Where the candidate drug effectively inhibits matrix metallo protein activity, the arrangement will be blue (aggregated colloids), and where the candidate drug does not effectively inhibit matrix metallo protein activity, the arrangement will be pink (dispersed colloids).

10 An example of enzyme activity that falls into the second category, addition, is the modification of the cancer-associated protein, Ras. Farnesyl protein transferase is an enzyme that adds a lipid-like group to Ras. This modification allows Ras to embed in the membrane and become functional. In this particular case, it becomes oncogenic. the substrate as with FPT, affinity tags or binding agents are added to each separate part of the substrate, such that a substrate bearing two tags will only result from the enzyme performing its function. In the specific case of the protein Ras, it can be recombinantly prepared with an affinity tag such as (His)₆ at the N-terminus to facilitate the later attachment of one colloid to the protein. The lipid-like group that the enzyme adds is a farnesyl pyrophosphate, which is easily synthesized in the lab with an affinity tag like biotin attached distal to the site of attachment to Ras. The affinity tagged Ras and the affinity tagged addition group are mixed with the enzyme and a drug candidate. After allowing suitable time for the reaction to proceed, colloids bearing binding partners for each affinity ligand are added to the test solution. Again an inhibition of the pink to blue color change indicates that the drug candidate inhibited the enzyme activity.

25 One aspect of the invention involves determining colloid/colloid interactions, indicative of binding interactions between species immobilized with respect to colloids. The ability to form SAMs on colloids in accordance with the invention is one technique for linking species to colloids for such studies. Colloids can be linked to species desirably studied for their ability to bind to each other, such as biologically-relevant binding partners such as ligands and receptors, or can carry linked species that may have the ability to bind to a common entity, or which can each link to a species immobilized

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-57-

with respect to another colloid particle. This finds use in drug studies as well. Species for study can be linked to colloids by any technique described herein, e.g. metal binding tag/metal/chelate linkages. For example, metal binding tags such as histidine-tags can be attached to ligands and tagged putative binding partners can be incubated together with

5 NTA/Ni(II) presenting colloids. A visible reticulum (aggregation visible by the human eye, by microscopy, etc.) will result if the two components are binding partners. Alternatively, the putative binding partners can be GST fusion proteins that would bind to glutathione presented on the colloid. Other linkers useful for attaching a binding species or other participant in assays of the invention to a surface include affinity tags.

10 Affinity tags are well-known species used widely in biology, biochemistry, etc.

In one embodiment, compositions and methods can be used to detect target proteins and their interactions with other proteins, nucleic acids and small molecules. It is not meant that the invention be limited to studying interactions that involve proteins. The methods described herein can be applied to the detection of any two species

15 interacting with each other. As described elsewhere in this invention, gold colloids have the intrinsic optical property that they appear pink when dispersed in a homogeneous solution. However, if the colloids are forced into close proximity to each other, then the solution turns toward the blue end of the spectrum. Proteins can be attached to gold colloids by a variety of methods described herein. The assay need not be limited to the

20 detection of direct interactions. Ligands attached to colloids may cause the colloids to be drawn close together when the ligands recognize a common target, which may be a complex of biomolecules rather than a single target molecule.

Protein-colloid reticulums are also clearly visible in solutions that contain ligands and their binding partners, attached to colloids. Proteins or other molecules can be

25 attached to colloids in a variety of ways including but not limited to attaching an affinity tag to the protein or molecule of interest and attaching a binding partner for the affinity tag to the colloid. Peptides terminated in with a sulfur can be directly attached to gold colloids or incorporated into self-assembled monolayers formed on colloids. In a preferred embodiment, colloids are derivatized with self-assembled monolayers (SAMs)

30 that present binding partners for convenient affinity tags that can be genetically fused to recombinant proteins of interest. For example, proteins can be expressed as fusion

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-58-

proteins such that they contain a label such as glutathione-S-transferase (GST).
Glutathione, which is the binding partner of GST can be easily attached to a thiol and
incorporated into a self-assembled monolayer on the surface of a gold colloid.
Alternatively, unmodified proteins can be covalently attached to colloids bearing exposed
5 carboxylates via EDC/NHS coupling chemistry.

The invention also anticipates mixing a drug candidate with colloids presenting
molecules that either directly or indirectly bind to each other and detecting a diminution
of the color change from pink to blue or a reduction in the extent of visible reticulum
formation. Conversely, methods of the invention can be used to identify molecules that
10 facilitate the binding of two molecules to each other, either directly or indirectly.

The function and advantage of these and other embodiments of the present
invention will be more fully understood from the examples below. The following
examples are intended to illustrate the benefits of the present invention, but do not
exemplify the full scope of the invention.

15 Examples

The following examples serve to illustrate certain embodiments of the present
invention and are not to be construed as limiting the scope thereof.

In the experimental disclosure which follows, the following abbreviations apply: eq
(equivalents); μ (micron); M (Molar); μ M (micromolar); mM (millimolar); N (Normal);
20 mol (moles); mmol (millimoles); μ mol (micromoles); nmol (nanomoles); g (grams); mg
(milligrams); μ g (micrograms); ng (nanograms); L (liters); ml (milliliters); μ l
(microliters); cm (centimeters); mm (millimeters); μ m (micrometers); nm (nanometers);
nM (nanomolar); °C (degrees Centigrade); PBS (phosphate buffered saline); U (units);
d (days).

25 These examples describe techniques that are applicable to the investigation of
aggregate formation of any type, whether it relates to neurodegenerative disease, non-
neurodegenerative disease, or non-disease processes involving aggregation. With the
benefit of the description herein, those of ordinary skill in the art can readily alter the
examples below and apply them to any number of neurodegenerative or non-
30 neurodegenerative diseases involving aggregation, and non-disease aggregation
processes.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-59-

Example 1: Spectrophotometric Detection of Fibrils

In this example, 100 μ L aliquots that contained 14 μ M His-A β (1-40) peptides and 30 μ L of NTA-thiol colloids were incubated with either 1 μ M of A β fibril seeds, 50 pM A β , fibril seeds or no fibrils. The mixtures were incubated at 37°C for 0.5 hours then transferred to a cuvette and placed in a Hitachi U-2000 Spectrophotometer. For each aliquot, the absorbance at 569 nm was recorded, then the cuvette was removed, rapped sharply against a hard surface to accelerate peptide incorporation into the fibril, allowed to rest for 10 minutes then re-scanned at 569 nm. A sharp decrease in absorption at 569 (as the fibrils precipitated out of solution) was observed for the solutions that contained fibril seeds, while those that contained only peptide remained stable (Figure 3). The height of the bars in the graph are the ratio of the initial measurement to the second measurement. 1) 1 μ M of A β fibril seeds (striped bar) and no fibrils present (solid bar); and 2) 50pM A β fibril seeds (striped bar) and no fibrils present (solid bar). The analysis process can be automated by using an absorption spectrophotometer that is compatible with a multi-well-plated format.

Example 2: Colloid Preparation

In this example, 1.5 ml of commercially available gold colloid (Auro Dye by Amersham) were pelleted by centrifugation in a microfuge on high for 10 minutes. The pellet was resuspended in 100 μ L of the storage buffer (sodium citrate and tween-20). 100 μ L of a dimethyl formamide (DMF) solution containing 40 μ M nitrilo tri-acetic acid (NTA)-thiol, 100 μ M ferrocene-thiol, and 500 μ M carboxy-terminated thiol was added (the ferrocene signaling entity is optional). Following a 3-hour incubation in the thiol solution, the colloids were pelleted and the supernatant discarded. They were then heat cycled in 100 μ L of 400 μ M tri-ethylene glycol-terminated thiol in DMF for 2 minutes at 55°C, 2 minutes at 37°C, 1 minute at 55°C, 2 minutes at 37°C, then room temperature for 10 minutes. Heat cycling results in the elimination of any species that are not in the lowest energy confirmation, resulting in a stable, close-packed, self-assembled monolayer. Heat cycling can be carried out with any of a wide variety of self-assembled monolayer-forming species. The colloids were then pelleted and 100 μ L 100mM NaCl phosphate buffer were added. The colloids were then diluted 1:1 with 180 μ M NiSO₄ in the colloid storage buffer.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-60-

Example 3: Formation of a SAM-coded Electrode

In some of the embodiments described below, the examples involve SAM formation, collagen coating, cell growth, colloid formation, and Alternating Current Voltammetry (ACV). For SAM formation, glass microscope slides were sputtered with a layer of Ti followed by a layer of Au. Each electrode was incubated at RT for 0.5 hours with 300 μ L of a DMF solution that contained 10% methyl-terminated thiol (HS-(CH₂)₁₅CH₃), 40% tri-ethylene glycol-terminated thiol, HS(CH₂)₁₁(CH₂CH₂)₃OH, (formula) and 50% poly (ethynylphenyl) thiol (C₁₆H₁₀S). 2 ml of 400 μ M tri-ethylene glycol-terminated thiol were then added to a scintillation vial containing the chip and the vial was heat cycled in a water bath as follows: 2 minutes @ 55°C; 2 minutes @ 37°C; 1 minute @ 55°C; 2 minutes @ 37°C then RT for 10 min. Electrodes were then dipped in EtOH, then sterile PBS to rinse.

Example 4: Assay Demonstrating Extremely Sensitive Detection of Aggregates

Pre-formed aggregates, characteristic of neurodegenerative disease and other diseases characterized by aberrant protein aggregation, and other non-disease processes, can be sensitively detected by monitoring color change and visible fibril formation as a function of time.

Gold colloids were derivatized with nitrilo tri-acetic acid/nickel self-assembled monolayers (NTA-Ni-SAMs), for the capture of histidine-tagged proteins, as described in Example 2. Colloids were coated with a low density of NTA-Ni (40 μ M NTA-thiol in a total thiol concentration of 1000:M) to inhibit the aggregation of nearest neighbor peptides, immobilized on a common colloidal particle. 30 μ L aliquots of the derivatized colloids were placed in wells of a 96-well plate. Histidine-tagged β -amyloid peptides (amino acids 1-40) were dissolved in phosphate buffer pH 7.4, then added to the colloid solutions such that the final concentration in a 100 μ L volume was 14 μ M. Pre-formed fibrils, made from synthetic non-histidine-tagged μ -amyloid peptides, were serially diluted and added to the solutions such that the final concentration of fibrils varied from 330 nanomolar to 50 picomolar. For every assay (each well), a negative control assay, in which no fibril was added, was performed (Figure 4). Solutions were incubated at 37° C for 1 hour and care was taken not to agitate the solutions. The color of the solutions that contained fibrils, changed from the characteristic pink color of gold colloids, to a deep purple/gray. Solutions that contained

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-61-

histidine-tagged μ -amyloid (1-40), but no pre-formed fibrils changed to a lighter purple color, and at a slower rate than solutions to which fibrils were added. Dark masses, in the centers of wells that contained pre-formed fibrils, were clearly visible with the unaided eye (Figure 5). Observation using 40-fold magnification with a dissecting microscope revealed large, purple reticulums. These aggregates were clearly suspended in the fluid medium rather than sedimented onto the bottom of the plate. Negative control wells showed a grainy precipitate, but no large aggregates. Visual examination allowed us to discriminate between wells that contained pre-formed fibril and those that did not, down to an added fibril concentration of 50 picomolar (Figure 6). Results were recorded by photographs taken with a Nikon camera (ASA 800 film) attached to an inverted microscope at 40-fold magnification.

Example 5: Visualization Using Colloids

At higher peptide and fibril concentration, large colloid-decorated fibril structures are visible.

Colloids bearing 40 μ M NTA-Ni SAMs were prepared as described in Example 2. 30 μ L aliquots of colloids were added to wells of a 96-well plate. Histidine-tagged β -amyloid peptide (1-40) was added to achieve a final concentration of 20 μ M in a final volume of 100 μ L. Histidine-tagged β -amyloid peptide was added such that the final concentration was 20 μ M in a final volume of 100 μ M. Pre-formed β -amyloid fibrils were added such that the final concentration was 1 μ M. The sample was incubated at 37 degrees C for 20 minutes then rapped sharply three times to accelerate aggregation. After 1 hour continued incubation, at 37 degrees C, large colloid-fibril structures were clearly visible with the naked eye (Figure 7A). As colloids agglomerated onto the fibrillar structure, the surrounding solution cleared (no pink color). As a negative control, instead of a binding species fastened to the colloids, an irrelevant protein was fastened. The results are shown in Figure 7B.

Example 6: Drug Screening

We determined conditions under which histidine-tagged β -amyloid (1-40) peptides would form aggregates. Drug candidates from the Sigma Aldrich RBI drug library were separately added to each assay solution to determine which drug candidates inhibited fibril formation characteristic of Alzheimer's disease. Colloids bearing NTA-Ni-SAMs (previously described) were added as a method to visualize results.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-62-

To each well of a 96-well plate were added: 30 μ L of NTA-SAM bearing colloids, 65 μ L of a 10.7 μ M solution of histidine-tagged β -amyloid (1-40) peptide (6.6 μ M final concentration), plus 5 μ L of a drug candidate such that the final concentration of each drug would be between 100-200 μ M. Plates containing solutions were incubated at 37 degrees C for several hours. During this time, plates were visually examined and photos were taken to record progress periodically.

Results:

Color change (from pink to blue) predicted which drugs inhibited fibril formation. At about 2 hours incubation time, one could clearly see with the unaided eye which wells contained drugs that had inhibited fibril formation by comparing the color of the solution to wells that contained positive control, i.e., no drug added and negative control, drug added but the histidine-tagged peptide was GST, not β -amyloid.

Colloids agglomerated onto fibrils in the wells also enabling the identification of wells that contained drugs that inhibited fibril formation by noting the lack of visible aggregates in the wells. 40-fold magnification enhanced the ability to discriminate between the action of drugs in different wells.

Figure 8 is a photocopy of a photograph of a small molecule library, rack 1 after 72 hours incubating at 37 degrees C. The wells on the right-most side of the plate (column 12) are negative control wells that remained pink, in which His-tagged GST replaced the β -amyloid peptide. The next column to the left, column number 11 was the positive control that contained His-tagged β -amyloid and no drug candidate. Well G9 remained bright pink, indicating that the compound within that well inhibited fibril formation. Note wells A4, B5, C5, D5, F5, F9, G5, and H10 all displaying readily visibly-identifiable aggregate formation.

Monitoring color and or aggregate formation as a function of time under physiologic conditions are indicators of drug efficacy and drug stability.

Example 7: Using peptides free in solution to amplify

Colloids presenting NTA-Ni-SAMs were prepared as described in example 2; 40 μ M NTA-thiol in a total thiol concentration of 1000 μ M was used. Histidine-tagged β -amyloid (1-40) peptides were added to achieve a final concentration of 58.2 μ M in 100 μ L final volume. As a negative control, an irrelevant histidine-tagged peptide, GST, was added to colloid solutions in place of the β -amyloid peptide. Solutions were incubated at 37 degrees

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-63-

C. Within 15 minutes large aggregates were clearly visible in solutions that contained histidine-tagged β -amyloid peptide. No structures were visible in control solutions. Solutions with β -amyloid peptide turned gray/purple while negative control solutions remained pink. These results are consistent with the idea that free β -amyloid peptides in solution became aggregated and acted to amplify or accelerate the aggregation process.

Example 8: Electronic detection

Our strategy to electronically detect β -amyloid fibrils was to first incorporate histidine-tagged β -amyloid peptides (1-40) into pre-formed fibrils made from β -amyloid 1-42 peptides. Colloids bearing NTA and a ferrocene derivative, for electronic signaling, were added so that at least some of the His-tagged β -amyloid peptides were attached to the colloidal particles. Our aim was to then add magnetic beads that bore binding ligands that would bind to the colloid-decorated fibrils and magnetically recruit them to the working electrode.

Colloids bearing NTA-SAMs were prepared as described in Example 2 (with the exception that 100 μ M octamethyl ferrocene-thiol was used in place of a standard ferrocene-thiol). 30 μ L of colloids were added to each assay solution. To facilitate alternating current voltammetry (ACV) analysis, without having to pipet solutions after peptide addition (which would accelerate fibril formation of peptides in the absence of pre-formed fibrils), assay solutions were mixed in a 1ml. capacity silicon gasket clamped over a gold-coated glass slide that had been derivatized with a self-assembled monolayer as described in Example 3, over a stationary magnet. Histidine-tagged β -amyloid peptide (amino acids 1-40) was added to a final concentration of 14 μ M in a 100 μ L volume. Pre-formed fibrils made up of β -amyloid peptide (1-42) were added to achieve a final concentration of 15 μ M. Negative control solutions were: (1) colloids, histidine-tagged GST plus fibrils, but no His-tagged β -amyloid peptide (1-40); (2) colloids, His-tagged β -amyloid peptide (1-40) but no fibrils; and (3) all the components expected to give a positive result, but measured at time zero, before His-tagged peptides could incorporate into the fibril. Solutions were incubated at 37 degrees C for 20 minutes. Commercially available magnetic beads (from Bang Labs and Prozyme) that were derivatized with Protein A (which binds the Fc portion of antibodies) were pre-bound to 1/10 their binding capacity with an antibody (purchased from Biosource Int.) that recognizes β -amyloid peptide 1-42, but not 1-40. 20 μ L of the antibody-presenting magnetic

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-64-

beads were injected into each solution immediately prior to ACV analysis (10 Hz.; 25mVolts overpotential; Ag/AgCl reference electrode with Pt auxiliary; SAM-coated gold chip acted as the working electrode).

RESULTS:

5 The solution that contained histidine-tagged β -amyloid peptides (1-40), colloids bearing NTA-Ni and ferrocene plus pre-formed fibrils, that had been incubated at 37 degrees C for 20 minutes, produced a current peak of 2.0 μ Amps at the characteristic oxidation potential (220 mVolts) of the ferrocene derivative (octamethyl ferrocene) that was attached to the colloidal particle, see Figure 9, trace A.

10 An identical solution that was measured immediately, before histidine-tagged peptides could incorporate into the aggregate, produced an insignificant peak of approximately 0.17 μ Amps at 220 mVolts, Figure 9, trace B.

Another negative control solution that contained all the components, but no pre-formed aggregate generated an insignificant peak of .022 μ Amps (Figure 9, trace C).

15 A third negative control solution that contained pre-formed fibrils but in which histidine-tagged GST protein was attached to the colloids in place of histidine-tagged β -amyloid peptides produced no current peak (Figure 9, trace D).

Example 9: Light Scattering Analysis

A commercially available light scattering device, that quantitates the average diameter of particles in solution, was used to analyze solutions that contained NTA-Ni-SAM coated colloids and histidine-tagged β -amyloid (1-40) peptides in the presence or absence of pre-formed aggregate. Colloids were prepared as described in Example 2, histidine-tagged β -amyloid was added such that the final concentration was 10.2 μ M, in a final volume of 100 μ L. Pre-formed aggregates were added such that the final concentration was 2 μ M.

25 Baseline measurements, of average particle diameter were taken of the reagents alone to ensure that none of the components were aggregating in the absence of β -amyloid fibrils.

Baseline Measurements:

1. 40 μ M NTA-SAM-derivatized colloids alone; diameter = 14.87 nm
2. colloids presenting histidine-tagged A β 1-40 peptides; diameter = 14.96 nm
- 30 3. colloids (without surface-immobilized His-tagged A β 1-40) mixed with 1 μ M β -amyloid peptide (1-42) pre-formed fibrils; diameter = 15.93 nm; t=0

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-65-

Experiment:

1. colloids presenting histidine-tagged A β 1-40 peptides, mixed with 1 μ M β -amyloid peptide (1-42) pre-formed fibrils, measured at t=0 15.5 nm.
2. colloids presenting histidine-tagged A β 1-40 peptides, mixed with 1 μ M β -amyloid peptide (1-42) pre-formed fibrils, measured at t=1.5 hours, under high intensity lamp: diameter = greater than 10,000 nm, see Figure 10.

Negative controls:

3. colloids presenting histidine-tagged A β 1-40 peptides; buffer was added in place of the pre-formed fibrils; measured at t=0; diameter = 14.96 nm.
4. colloids presenting histidine-tagged A β 1-40 peptides; buffer was added in place of the pre-formed fibrils; measured at t=1.5; diameter = 579.7 nm, see Figure 11.

These results show that the amount of aggregate in a specimen can be quantitated, by measuring the diameter of resultant macro-structures. A light scattering device, that simultaneously measures the average particle diameter of solutions in 96-well plate format, is commercially available. Until now, attempts to use light scattering to distinguish between peptide monomers and β -amyloid aggregates have met with limited success because the diameters of both species are very small and at the lower limits of detection (β -amyloid fibrils are on the order of hundreds of nanometers), and the difference between monomers and aggregates is also small. However, the inventor illustrates that ligand-bearing colloids act to link together smaller, hard to detect fibrils, and stitch them into easily detectable macro-structures.

Example 10: Specificity

To determine whether the β -amyloid peptides presented by the derivatized colloids would incorporate non-specifically into fibrillar species that would be present in a normal diagnostic sample, we performed the visual assay in fetal bovine serum (FBS). (FBS contains 100-fold more irrelevant protein than CSF, including other fibrillar species.) 1 μ M A β 1-42 fibrils were added to 30 μ L of 40 μ M NTA-SAM colloids that presented histidine-tagged A β 1-40 in solutions of varying FBS concentration. The aggregation of derivatized colloids onto fibrils did not increase with increasing FBS concentration, indicating that the assay was not prone to artifacts caused by other proteins or fibrillar species. Negative control solutions, which contained His-tagged A β 1-40 immobilized on colloids but did not

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-66-

contain pre-formed A β fibrils, remained pink; no structures were observed under 40- or 100-fold magnification.

Example 11: Using the Extent of Visible Fibrillar Structure to Diagnose Alzheimer's Disease in CSF Samples

5 In a blinded study using CSF samples (unknown to the operator if one, both or neither came from AD patients), 30 μ M aliquots of colloids bearing 40 μ M NTA-SAMs, prepared as described in example 2, were added to wells of a 96-well plate. His-tagged A β (1-40) peptides were added to achieve a final concentration of 3.75 μ M. Aliquots of CSF from two Alzheimer's disease patients were added to the colloid/peptide solutions. The amount of CSF added was varied to give final CSF concentrations of either 12.5% or 25%.
10 For each CSF sample tested, conditions were varied as follows: (1) sample solutions were doped or "seeded" with pre-formed A β fibrils (1 μ M; 1-42); (2) solutions were seeded with pre-formed A β fibrils (0.1 μ M; 1-42); (3) solutions were not seeded with anything; and (4) as a negative control no probe His-A β was immobilized on the colloids. After 3 hours at
15 37°C, fibrillar macro-structures were visible in all of the test solutions, except for negative controls, which do not include His-tagged A β and one sample from a patient (# 101) that did not contain any pre-formed fibrils. The extent of the fibrillar structures increased with increasing CSF concentration. Similarly, structure formation also increased with increasing seed concentration. The other CSF-containing solutions had turned from pink to purple but
20 did not show any fibril aggregate formation under 40-fold magnification. Control solutions (no immobilized His-A β on colloids) remained pink and did not show any signs of structure formation. After overnight incubation (10 hours total), fibrils were also clearly visible in solutions that contained CSF from patient #109, although they were still much less extensive than those from the first patient. Like patient one, the extent of structure formation
25 increased with increasing CSF concentration and with increasing β -amyloid seed concentration. Examination of sample records confirmed the CSF samples were both from Alzheimer's patients and that disease progression in the first patient (101), based on time since diagnosis and the Blessed Dementia Scale score, was about twice that of the second patient. The Blessed dementia scale score for patient 101 was 21 while the score for patient
30 109 was 12. β -amyloid concentration in patient 101 had been measured at 8 mgs/ml while # 109 was 4.6 mgs/ml.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-67-

Example 12: Detection and Diagnosing of CJD

In this hypothetical example, colloids presenting NTA-Ni are added to a solution containing a His-tagged PrP protein in its soluble (unconverted form) such that at least some of the His-tagged peptides are attached to the colloids.

- 5 Diagnostic: Color Change: Normal Prion Protein (PrP), or a fragment such as amino acids 109-141 or 113-141, is derivitized to facilitate binding to SAM-coated colloids. For example, normal syrian hamster PrP is expressed with an affinity tag such as a 6-histidine tag. Histidine-tagged PrP is attached to NTA-SAM-derivitized colloids via NTA-Ni binding. A sample containing infectious PrP is added. Samples are
- 10 incubated at 37°C to facilitate conversion of normal PrP to the protease-resistant form. Conversion of normal PrP to resistant form causes protein aggregation, and the colloids are forced close together causing a color change from pink to blue. Samples may be doped with normal unbound PrP proteins, or fragments thereof, to amplify the aggregation process, which is accelerated by protein concentration. Samples may also be
- 15 subjected to mechanical agitation, light or sound energy to accelerate the aggregation process.

- Drug Screen: Drug candidates are added to the PrP-bound colloids and infectious PrP sample and are allowed to bind. Samples are then incubated at 37°C to facilitate PrP conversion and aggregation. Samples containing drugs that inhibit binding of the peptide
- 20 to the PrP or conversion of PrP to resistant form remain red, while samples containing drugs that are ineffective change color from red to blue.

- Alternatively the drug candidate, PrP-bound colloid and infectious sample compositions are electronically or electrochemically analyzed after incubation. Samples containing drugs that inhibit binding of the peptide to the PrP or conversion of PrP to
- 25 resistant form will not give an electronic signal or will produce an attenuated signal, while samples containing drugs that are ineffective will give an electronic signal due to precipitation of colloid aggregates onto the electrode.

- A drug screening assay can also be devised that does not contain infectious material. A peptide consisting of amino acids 90-145 of the syrian hamster PrP
- 30 sequence, previously shown to accelerate conversion of normal PrP to protease-resistant form, is added to the PrP-bound colloids. Samples are incubated at 37°C to facilitate

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-68-

conversion of normal PrP to resistant form. Conversion of normal PrP to resistant form causes protein aggregation, and the colloids are forced close together causing a color change from pink to blue. Alternatively the compositions can be electronically or electrochemically analyzed.

5 The invention itself can also be used to determine which PrP sequences are best for use as probe molecules attached to colloids and which sequences function as aggregation accelerators. Candidate *probe* sequence peptides are attached to colloids and tested alone to determine their intrinsic aggregation potential, which should be low (no color change) and then with infectious or converted PrP to assess their ability to bind the converted form of PrP (has color change). Peptide sequences that are candidates for aggregation accelerators are separately attached to colloids and tested alone and with converted PrP for their ability to aggregate and cause solution color change.

106-128 (KTNMKHMAGAAAAGAVVGGLGGY)

109-141 (MKHMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPMMHF)

15 113-141 (AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPMMHF)

119-141 (GAVVGGLGGYMLGSAMSRPMMHF)

117-141 (AAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPMMHF)

115-141 (AAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPMMHF)

113-141 (AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRPMMHF)

20 Chabry J, Caughey B, Chesebro B, J Biol Chem 1998 May 22; 273(21):

13203-7; Residues 90-145 of Syrian hamster PrP, J. Mol. Biol. (1997) 270, 574-586.

Example 13: Electronic Detection

In this hypothetical example, the presence of prion disease in a sample can also be electronically detected. Colloids presenting NTA-Ni and octamethyl ferrocene are added to a solution containing a His-tagged PrP protein in its soluble (unconverted form) such that at least some of the His-tagged peptides are attached to the colloids. Magnetic particles are also added to the assay that either present PrP or an antibody against it. A sample suspected of containing infectious PrP, is added. The infectious PrP will convert the normal PrP both on the colloid and free in solution, causing them to also participate in converting other proteins which results in massive aggregation. Massive aggregation results which incorporates both magnetic particles and colloidal particles into the same

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-69-

aggregates, which are then magnetically drawn to an electrode that can be SAM-coated and analyzed by ACV.

Diagnostic: Electronic. Infectious material can also be electronically detected.

Normal PrP is bound to SAM-coated colloids as described previously that also bear a
 5 signaling moiety, such as a redox-active metal like ferrocene. Samples are then incubated at 37°C to facilitate PrP conversion and aggregation. Conversion of PrP to resistant form causes formation of insoluble aggregates, which precipitate onto the surface of an electrode, and deliver an electronic signal. Electrodes are analyzed using standard electrochemical analyzers and techniques such as alternating current
 10 voltammetry (ACV).

Example 14: ELISA

In this prophetic example, a technique familiar to those skilled in molecular or cellular biology is used. Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) (*Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, Immunology 11.2*, 1996, copyright from John
 15 Wiley and Sons Inc. 1994-1998). Normally when one performs an ELISA, a first species is directly or indirectly attached to a plastic substrate. A second species is added, the plate is washed and the presence of the second species is detected by binding to it a "secondary" antibody that also has a signaling capability; the secondary antibody is usually conjugated to an enzyme, typically horseradish peroxidase (HRPO), alkaline
 20 phosphatase (AP), or a fluorescent tag which is capable of performing a reaction on an added substrate that results in a color change (detected by a spectrophotometer), or a fluorescence labeling tag that can be detected by a fluorimeter (see, for e.g., "Localization 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,
 25 Deerinck TJ, and Ellisman MH, 1999, Journal of Virology Oct. Vol 73 (10 8817-23)). Most often, for convenience, so that every antibody does not need to be conjugated to an enzyme, a mouse antibody is used as the specific recognition antibody, then an enzyme-conjugated rabbit-anti-mouse antibody is added.

Using the technology described herein, one can greatly increase the sensitivity of
 30 ELISAs and detect the presence of the immobilized target species using a natural ligand (protein or peptide) or a drug candidate as the probe molecule. The presence of the

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-70-

immobilized species is detected by binding to it a *ligand* attached to a colloid that also presents a plurality of horseradish peroxidase (HRPO) or alkaline phosphatase (AP). The enzyme can be conveniently linked to the colloid by a variety of means, including a histidine-tag attached directly to the enzyme, or by binding a mouse-anti-goat enzyme-
5 conjugated antibody to a goat antibody that is attached to the colloid via a histidine-tagged protein G (Akerstrom, B., Nielson, E., Bjorck, L. Journal of Biological Chemistry, 1987 Oct. 5 Vol. 262 (28); pgs. 13388-91 and Fahnestock, S.R., Alexander, P., Nagle, J. and Filpula, D. (1986) Journal of Bacteriology Vol. 167, 870-880). By binding a ligand co-immobilized on a colloid with a plurality of enzymes, to the target species *in place of*
10 a secondary antibody, the ratio of signaling molecules to binding events is increased by orders of magnitude. The binding of one antibody or ligand on the colloid to a presented antigen on an ELISA plate indirectly results in the binding of thousands or millions of enzymes. Alternatively, a known species can purposely be attached to wells of a 96-well plate so that one can probe with colloids that each present a separate drug candidate
15 along with the signaling enzymes. Currently, it is not possible to do this with existing ELISA technology each drug candidate can not be conjugated to an enzyme. Alternatively, the natural ligand for the immobilized target can be presented on the colloid along with the signaling enzymes and drug candidates added to each well of the plate to disrupt the interaction. Unbound colloids and thus their signal are lost in a wash
20 step. The target for the antibody- or ligand-presenting colloids can be a cell or a protein bound directly or indirectly (via another antibody or ligand) to an ELISA plate. The advantage to this modification of an ELISA is not only sensitivity, but also efficiency. Because several hundred signaling enzymes remain bound via the colloids to one antigen, substrate hydrolysis will occur more quickly, and less time will be needed for an
25 adequate reading.

In this example, it is described how one would detect the presence of aggregate-forming or fibril-forming, protofibril, or aggregate species in a sample, or screening for drugs that would inhibit disease associated with aberrant protein aggregation, on an ELISA plate. A binding species that binds an aggregate or fibril-forming species, or an
30 antibody to a fibril or aggregate-forming species, proto fibril or aggregate (specifically, an antibody to A β 1-42) is immobilized in a well of an ELISA plate. In a diagnostic

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-71-

assay, the antibody then is exposed to a sample suspected of containing an aggregate-forming or fibril-forming species, and mixed with the sample is a binding species carrying a metal-binding tag (histidine-tag) optionally amplifier species, as described above, and colloid particles with a chelate coordinating a metal (NTA) and a non-electronic signaling entity each fastened to the particle. The non-electronic signaling entity could be a fluorescent tag, horse radish peroxidase, alkaline phosphatase, or the like.

Where one wants to screen for drugs using this assay, the same procedure is carried out but in the presence of a candidate drug for inhibiting aggregation processes.

Example 15: Cell-Based Screening Assay for Candidate Drugs for Affecting Aggregate Formation at a Variety of Stages of Biochemical Progression

In this example, it is described how one tests a candidate drug for activity in affecting cellular processes involved in aggregation-associated disease including neurodegenerative disease and non- neurodegenerative disease, and non-disease processes. A whole cell assay was designed to enable the screening of drugs for their ability to affect, directly or indirectly, beta-amyloid production, processing including cleavage, and secretion (Wolfe, et al., *Nature*, 1999 April 8; 398 (6727):513-7; Haass, *Nat. Med.* December, 1999; 1 (12):1291-6; LaBlanc, et al., *J Neurosci Res.*, April, 1992, 31(4):635-45).

Amyloid precursor protein (APP: the protein precursor of beta-amyloid) was stably transfected into human embryonic kidney cells. Selkoe, "The Cell Biology of Beta-Amyloid Precursor Protein and Presenilin in Alzheimer's Disease.", *Trends in Cell Biology*, 8:11, 447-453, November, 1998; Knops, et al. "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, February 10, 1995). Cells (100 ul vol at 40% confluency) were dispensed into a 96-well plate and grown in DMEM (Dulbecco modified eagle medium) in a CO₂ incubator at 37 degrees C for 24 hrs. Colloids (30 ul) derivatized with NTA-SAMs (4% NTA in the thiol solution) were mixed with histidine-tagged beta-amyloid peptide (1-40) then added to each well of the micro titer plate. The final beta-amyloid concentration in each well was 17 uM. Control wells contained either: 1) histidine-tagged GST instead of beta-amyloid peptide; or 2)

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-72-

everything as above except no cells were present in the growth media; or 3) cells that were not transfected with APP.

When colloids and peptides were added at 21 hrs., only solutions containing cells expressing the APP plasmid, colloids and His-tagged beta-amyloid turned from the
5 characteristic pink to purple. Solutions in the control wells remained pink.

Another batch of cells treated as described above, were allowed to grow for an additional 18 hrs. after colloids and beta-amyloid were added. These cells continued to extrude APP products (beta-amyloid 1-40 and 1-42). When observed under 40-fold magnification, a halo of accumulated colloid-peptide aggregates could be seen around
10 each cell. Cells incubated with colloids and control his-tagged peptides showed no regional accumulation of colloids. Control cells (no APP transfection) incubated with beta-amyloid and colloids also showed no signs of colloid aggregation. Control solutions containing colloids, beta-amyloid and cell growth medium also did not show signs of colloid aggregation.

This example represents yet another aspect of the invention involving exposing a candidate drug for inhibition of neurodegenerative disease to a cell adapted to secrete neurodegenerative disease fibril- or aggregate-forming species, and determining the effect of the candidate drug on the aggregation potential of material secreted from the cell. This example also presents a technique for determining drug toxicity by
20 determining the effect of the candidate drug on a cell.

Example 16: Determination of Aggregation Characteristic of Tumor Suppression (p53)

In this hypothetical example, a strategy is described to screen for molecules that disrupt or enhance multimerization of p53. In some cases, the wild type protein is the target of the screen, while in other cases specific mutants will be targeted such that wild
25 type function can be rescued. The multimerization domain of p53 (wild type or mutant) is expressed such that it is modified with a flexible linker that bears an affinity ligand to facilitate attachment to a gold colloid. In some cases, the tetramerization domain can be expressed without the nuclear export signal. The linker modification can be attached to either the N-terminus of the protein fragment (away from the multimerization domain) or
30 at the C-terminus. Some compositions may contain a heterogeneous population such that the presence of the colloid will not sterically hinder multimerization. Also, unattached

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-73-

proteins may be added to the composition to avoid steric hindrance by the attached colloids.

The protein fragments are added to solutions containing gold colloids that have been modified to facilitate attachment of at least some of the proteins. If the protein fragments multimerize, then the solution will turn from its inherent pink color to a purple/blue. Drug candidates or biomolecules are added to some of the solutions. Again, a color change from pink to blue indicates multimerization. One can monitor a series of color changes. For example, protein fragments are added to the solution, multimerization occurs and the solution turns from pink to blue. Drug candidates or biomolecules are then added and a change from blue back to pink is detected which would indicate that a candidate molecule had disrupted multimerization.

Many of the mutations in p53 that occur in cancers involve the DNA binding domain of the protein. This invention can also be used to screen DNA sequences for their ability to bind to the mutants and also to identify molecules that restore binding to its native cognate DNA sequence. In this scheme, DNA (preferably ds but can also be single stranded) is attached to the colloids (via biotin-SA-SAMs or to commercially available streptavidin-coated colloids). p53 proteins or fragments thereof, that contain both the DNA binding domain and the tetramerization domain, (wt, muts, or both) are added to the solutions. Multimers of p53 that also bind to the colloid-immobilized DNA strands will induce condensation of the colloids and result in a color change from pink to blue. Drug candidates as well as biomolecules can be added to the compositions to test for their ability to promote DNA binding. In another embodiment, the proteins are added to separate batches of colloids that each bear a different DNA sequence. Since the proteins multimerize, a color change in the solution from pink to blue indicates that the protein complex bound to the DNA sequence presented on that particular batch of colloids.

Alternatively, multimers of p53 that have mutations that affect DNA binding can be added along with drug candidates to solutions containing colloids presenting a DNA sequence (preferably the cognate sequence). This screen identifies molecules that alter DNA binding specificity.

Example 17: Determination of Colloid/Colloid Linkage via Biotin/Streptavidin

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-74-

A set of gold colloids was derivatized with self-assembled monolayers that incorporated biotin-thiols (SAM forming species included C11, 3 ethylene glycol units, then biotin) along with C16 carboxy-terminated thiols (a mixed SAM). Streptavidin, which has four binding sites for biotin, or a random protein (GST) was added to the
 5 colloid solutions. Solutions that contained streptavidin and its binding partner biotin, immediately turned blue while the control solutions did not.

Example 18: Determination of Colloid/Colloid Linkage via Protein/Protein Recognition on NTA-presenting Colloids

600 microliters colloids, derivatized with a self-assembled monolayer that
 10 presents nitrilo tri-acetic acid, NTA (for the capture of histidine-tagged proteins), was mixed with 60 microliters of 500 micromolar histidine-tagged RGD-motif-containing peptide. 600 microliters of a second set of NTA-Ni presenting colloids was mixed with 60ul of a 500uM solution of GST, an irrelevant protein, as a negative control. Colloids were spun down and resuspended in phosphate buffer to remove residual unbound
 15 protein or peptide. Endostatin and Angiostatin, two proteins implicated in angiogenesis and suspected of binding to regions of vitronectin, such as the RGD peptide, were prepared by dialysis into phosphate-buffered saline solution and then 1:10 dilution into PBS from a stock concentration of 1mg/mL.

400 ul phosphate buffer (pH 7.4), 200ul either RGD-bound colloids or GST-
 20 bound colloids, and either 100ul endostatin or angiostatin, 50ul endostatin or angiostatin/ 50ul phosphate buffer, or 100ul phosphate buffer (as a negative control) were added to each well of a crystallization dish. Color change was monitored over time at room temperature. After approximately 15 minutes, a color change from red to blue was visible in wells that contained RGD- peptide-bound colloids and endostatin. The color
 25 change was more pronounced in the well that contained 100ul endostatin than in the well that contained 50ul endostatin/50ul phosphate buffer. No color change occurred in the wells containing endostatin and GST-bound colloids or angiostatin and RGD- or GST-bound colloids. Figure 13 shows the result. Row A included colloids and angiostatin. Row B included colloids with endostatin. (Rows C and D are empty wells). Columns 1-
 30 3 have RGD peptide immobilized on the colloids. Rows 4-6 have an irrelevant protein, GST, immobilized on the colloid. Columns 1 and 4 contain 100 ml of the relevant drug

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-75-

(endostatin or angiostatin). The results show that endostatin binds to RGD-motif-containing peptides, and that endostatin is able to bind to two or more RGD-peptides, thus linking the colloids, and causing a color change from red to blue. The results were verified by gel electrophoresis. The RGD peptide and histidine-tagged GST were bound to a small amount of NTA-Ni agarose resin at saturating concentration. Endostatin was incubated with the resin and allowed to bind to the protein on the resin. The histidine-tagged proteins were then eluted using imidazole, and the samples were analyzed by SDS-PAGE. The results clearly showed that endostatin bound to the resin-immobilized RGD peptide and eluted with the protein off of the resin, while it did not bind to the resin-immobilized GST.

This assay could be easily adapted for screening of drug candidates that either mimic the RGD-binding characteristic of endostatin or bind to the RGD-binding domains on endostatin. Drug candidates could be added to the RGD-colloids in the presence of endostatin to look for drugs that inhibit the color change from red to blue.

Example 19: Monitoring Drug Activity as a Function of Time for Drug Profiling

To determine at what stage of aggregate formation a particular drug is effective, for how long the drug is effective, and whether the drug is able to reverse aggregate formation, a drug profiling experiment was run in which many points were taken over time using a 96-well plate spectrophotometer.

To each well of a 96-well plate, 55 μ l phosphate buffer (pH 7.4), 30 μ l NTA-SAM derivitized colloids, 10 μ l, 50 μ M His-AB, and 5 μ l drug candidate or DMSO (for control wells) were added. Negative control wells contained 10 μ l, 50 μ M irrelevant Histidine-tagged peptide in place of His-AB, and DMSO in place of a drug candidate. Positive control wells did contain His-AB, but contained DMSO in place of a drug candidate. Absorbance at 530 nm was read every 5 minutes for 2 hours in a soft-max Pro 96-well spectrophotometer (molecular devices), while an identical 96-well plate was observed and photographed on the benchtop.

Negative control wells remained red, and positive control wells turned blue within 1 hour. Wells containing drug candidates varied in color over time depending on the effectiveness of the drug candidate. Absorbance at 530 nm was plotted against time for each well. Wells that turned blue, indicating no drug or no drug activity, showed a

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-76-

significant drop in absorption at 530 over time. Wells that contained drugs which inhibited aggregation showed a constant absorbance at 530 nm over the range of aggregate size on which the drug was effective, the drug was effective. In this manner, drug efficiency was determined. Figure 12 shows the drug profiles of two drugs that inhibited aggregation (1 and 2) plotted with a positive control (3) and a negative control (4). It can be seen that the two drugs work on different size aggregates for different periods of time.

The results of this experiment demonstrate the strength of another aspect of the invention, which involves determining an appropriate drug for treatment of a physiological process involving aggregation at a particular stage of the process or under conditions of particular aggregate size, or both. Referring to Figure 12, it can be seen that the drug represented by curve 1 shows greater effectiveness at an earlier stage of aggregate formation and/or with respect to smaller aggregates, and the drug represented by curve two shows greater effectiveness at a later stage of aggregate formation and/or with respect to larger aggregates. Conducting experiments such as this with a variety of candidate drugs can provide information for a treatment protocol based upon the stage of a physiological process and/or aggregate size in a patient.

Example 20: Correlation of Color Change to the Extent of Aggregate Formation

This example demonstrates that colloid/colloid aggregation assays of the invention can be used to determine aggregate formation colorimetrically and via formation of visible reticulum.

Mixtures were formed of wells of multi-well plates including colloid particles, binding species capable of binding neurodegenerative aggregate-forming species adapted to be fastened to the colloid particles, and A β peptide. A control included a random peptide. Referring to Fig. 14, a first plate 60 includes rows 62 and 64 containing A β peptide and a random peptide respectively. Columns 66-74 contained 2.5 micromolar, 5 micromolar, 10, 20, and 50 micromolar A β peptide or random peptide, respectively. A β peptide was histidine-tagged, and colloids carried SAMs presenting chelate coordinating nickel. Row 64 contained an irrelevant histidine-tagged peptide. Each well contained one micromolar pre-formed aggregate.

As can be seen, row 62 containing binding species, colloid particles, and pre-

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-77-

formed aggregates turned from pink to blue, and especially at higher concentration, reticulum formation is clearly visible. A significant correlation between A β concentration and reticulum formation is observed.

Referring to plate 80, wells in row 82 contain 10 micromolar A β peptide
5 (histidine-tagged), and NTA thiol-containing SAMs on colloids. Row 84 contained an irrelevant peptide at the same concentration, also histidine-tagged. All wells also contained one micromolar pre-formed aggregate. Components were introduced into the wells of the various rows 86-98 at different times, so that a single observation of the plate showed aggregate formation as a function of time. Row 86 was freshly prepared, row 88
10 had been prepared 0.5 hours prior to observation, and rows 90-98 had been prepared at 1, 2, 4, 6, and 18 hours prior to observation. Plate 81 is an observation of the identical plate as plate 80, after 18 hours. As can be seen, color change from pink to blue, and the formation of readily-visible reticulum, occurs as a function of time.

Those skilled in the art would readily appreciate that all parameters listed herein
15 are meant to be exemplary and that actual parameters will depend upon the specific application for which the methods and apparatus of the present invention are used. It is, therefore, to be understood that the foregoing embodiments are presented by way of example only and that, within the scope of the appended claims and equivalents thereto, the invention may be practiced otherwise than as specifically described.

20

WO 02/01230

PCT/US01/20232

What is claimed is: -78-

1. A kit comprising:
a first article having a surface;
a second article having a surface; and
a plurality of binding species capable of binding a aggregate-forming species, at
5 least some of which binding species are fastened to or adapted to be fastened to the
surface of the first article and at least some of which binding species are fastened to or
adapted to be fastened to the surface of the second article.
2. A kit as in claim 1, wherein the binding species are capable of binding a
10 neurodegenerative disease aggregate-forming species.
3. A kit as in claim 1, further comprising a candidate drug for affecting the
aggregation.
- 15 4. A kit as in claim 2, further comprising a candidate drug for inhibiting the
neurodegenerative disease.
5. A kit as in claim 1 or 2, wherein the binding species is a peptide.
- 20 6. A kit as in claim 1 or 2, wherein the binding species is a protein.
7. A kit as in claim 1 or 2, wherein the binding species is a sequence from a
protein.
- 25 8. A kit as in claim 1 or 2, wherein the binding species is a small molecule.
9. A kit as in claim 8, wherein the small molecule is Congo red or
Thioflavin-T.
- 30 10. A kit as in claim 1 or 2, wherein the binding species is an antibody to the
aggregate-forming or fibril-forming species.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-79-

11. A kit as in claim 2, wherein the binding species is capable of binding neurodegenerative disease-associated fibrils or aggregates.
- 5 12. A kit as in claim 2, wherein the binding species is capable of incorporating into neurodegenerative disease-associated fibrils or aggregates.
13. A kit as in claim 11, wherein the binding species is capable of forming a macrostructure including a plurality of articles bound to a plurality of aggregates.
- 10 14. A kit as in claim 11, wherein the binding species is capable of forming a macrostructure including a plurality of articles bound to a plurality of neurodegenerative disease-associated aggregates.
- 15 15. A kit as in claim 1, wherein the binding species is a protein capable of aggregation characteristic of disease *that involves aberrant biomolecular aggregation*.
16. A kit as in claim 1, wherein the binding species is selected from among immunoglobulins, hemoglobins, p53, fibrin, integrins, cryoglobulins, human islet
- 20 amyloid polypeptide (hIAPP), and other amyloid proteins.
17. A kit as in claim 2, wherein the binding species is selected from among beta-amyloid proteins, amyloid proteins, Amyloid Precursor protein (APP) Tau, synuclein, PrP^{C^D}, PrP^{BSE}, PrP^{Scrapie}, Huntingtin, and fragments and fusions thereof.
- 25 18. A kit as in claim 2, wherein the species includes amino acids 1-40 or 1-42 of the beta-amyloid peptide.
19. A kit as in claim 17, wherein the protein, fragment or fusion is aggregate-
- 30 binding, aggregate-formation-resistant.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-80-

20. A kit as in claim 1, 2, 3 or 4, wherein at least one of the articles is gold or gold-coated.
21. A kit as in claim 20, wherein a self-assembled monolayer is formed on the
5 gold surface.
22. A kit as in claim 20, wherein the self-assembled monolayer consists of synthetic molecules.
- 10 23. A kit as in claim 22, wherein the self-assembled monolayer is composed solely of thiols and di-thiols and does not include direct incorporation of proteins into the monolayer.
24. A kit as in claim 22, wherein thiols, di-thiols and Cysteine or sulfur-
15 terminated peptides are incorporated into the self-assembled monolayer.
25. A kit as in claim 22, where in the self-assembled monolayer presents a binding partner for an affinity ligand.
- 20 26. A kit as in claim 24, wherein the surface presents a moiety that can coordinate a metal.
27. A kit as in claim 24, wherein the surface carries a chelate coordinating a metal immobilized relative to the surface, and the binding species is derivatized with a
25 polyamino acid tag.
28. A kit as in claim 22, wherein the self-assembled monolayer presents carboxy-terminated headgroups to facilitate chemical coupling to unmodified biomolecules.
30
29. A kit as in 28, wherein a primary amine on the biomolecule is coupled to

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-81-

the carboxylated surface via EDC/NHS coupling chemistry.

30. A kit as in claim 22, wherein the self-assembled monolayer includes
nitrilotriacetic acid, 2,2'-bis(salicylideneamino)-6,6'-demethyldiphenyl, or 1,8-bis(a-
5 pyridyl)-3,6-dithiaoctane.
31. An article as in claim 22, wherein the self-assembled monolayer is a
mixed self-assembled monolayer including self-assembled monolayer-forming species,
some but not all of the self-assembled monolayer-forming species include the moiety that
10 can coordinate a metal
32. A kit as in claim 1, 2, or 20 – 30, wherein the first article is a fluid-
suspendible, isolatable particle.
- 15 33. A kit as in claim 32, wherein the particle is an isolatable particle.
34. A kit as in claim 32, wherein the first article is a colloid particle.
35. A kit as in claim 34, wherein the first article is a gold colloid particle.
- 20 36. A kit as in claim 1 or 20, wherein the first article is an SPR chip.
37. A kit as in claim 1, 2, 32, or 35, wherein the first article is a particle, the
kit further comprising additional particles fastened to or adapted to be fastened to at least
25 some of the binding species.
38. A kit as in claim 37, further comprising a candidate drug for affecting the
aggregation.
- 30 39. A kit as in claim 37, wherein the binding species fastened to or adapted to
be fastened to the surface of the first article are fastenable to the surface, wherein

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-82-

fastening is facilitated by an affinity tag binding to its partner on the first article.

40. A kit as in claim 39, wherein the binding species fastened to or adapted to be fastened to the surface of the first article are fastenable to the surface via a metal
5 binding tag/metal/chelate linkage.

41. A kit as in claim 40, wherein the surface carries a chelate coordinating a metal immobilized relative to the surface, and the binding species is derivatized with a polyamino acid tag.
10

42. A kit as in claim 41, wherein the polyamino acid tag is a histidine tag.

43. A kit as in claim 37, wherein the binding species are fastened to the surface of the first article through a chemical coupling reaction.
15

44. A kit as in claim 43 in which EDC and NHS are used to link primary amines on the binding species to carboxylates on the surface of the first article.

45. A kit as in claim 1, 2, 21-23, wherein the binding species fastened to or adapted to be fastened to the surface of the first article are fastenable to the surface via
20 complementary nucleic acid sequence pairs.

46. A kit as in claim 1, or 2, wherein the binding species carry a terminal cysteine and are fastened to the surface of the first article thereby.
25

47. A kit as in claim 37, comprising a plurality of particles fastened to at least some of the binding species, wherein the binding species are immobilized relative to the surface of the particles at a surface concentration small enough that, in the absence of auxiliary, non-surface immobilized aggregate-forming or fibril-forming species, particle
30 aggregation upon particle/particle exposure is hindered within a time frame allowing comparison of aggregation in the absence of auxiliary aggregate or fibril-forming species

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-83-

with aggregation in the presence of auxiliary aggregate or fibril-forming species.

48. A kit as in claim 47, wherein comparison is visually determined.

5 49. A kit as in claim 48 wherein the comparative parameter is a visible change in the color of the solution.

50. A kit as in claim 2, wherein the binding species is not a neurodegenerative disease aggregate-forming or fibril-forming species.

10 51. A kit as in claim 2, wherein the binding species is a neurodegenerative disease aggregate-forming or fibril-forming species but is not capable of converting other binding species to neurodegenerative disease aggregate-forming or fibril-forming species.

15 52. A kit as in claim 2, wherein the binding species is converted by a neurodegenerative disease aggregate-forming or fibril-forming species to an aggregate-forming or fibril-forming species.

20 53. A kit as in claim 52, wherein the binding species converted to an aggregate-forming species is able to convert other binding species to aggregate-forming or fibril-forming species.

25 54. A kit as in claim 2 further comprising species capable of being converted by a neurodegenerative disease aggregate-forming or fibril forming species to aggregate-forming species for addition to amplify the aggregation reaction.

55. A composition as in claim 11 or 12, wherein the binding species is a peptide fastened at its N-terminus to the moiety that can coordinate a metal.

30 56. A kit as in claim 1, 2, 3, 4, and 37, wherein the binding species is fastened to or adapted to be fastened to the surface of the first article via at least one of a

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-84-

carboxylate group via EDC/NHS chemistry, a nucleic acid sequence, or affinity tag interaction.

57. An article as in claim 32, wherein the fluid-suspendable, isolatable
5 particle is of no more than 500 nm cross section in any dimension.
58. A kit as in claim 32, wherein the fluid-suspendable, isolatable particle is
of no more than 100 nm cross section in any dimension.
- 10 59. An article as in claim 35, wherein the self-assembled monolayer is a
mixed monolayer presenting a moiety to facilitate the fastening of a binding species and
further comprises a signaling entity.
60. An article as in claim 59, wherein the colloid itself is the signaling entity.
15
61. An article as in claim 59, comprising a plurality of auxiliary signaling
entities.
62. An article as in claim 59, comprising a plurality of auxiliary signaling
20 entities covalently fastened to the colloid particle.
63. An article as in claim 59, wherein the signaling entity is covalently
attached to a thiol and incorporated into the self-assembled monolayer.
- 25 64. An article as in claim 63, wherein the signaling entity is an electroactive
species.
65. An article as in claim 64, wherein the signaling entity is a metallocene.
- 30 66. An article as in claim 65, wherein the signaling entity is a ferrocene or a
ferrocene derivative.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-85-

67. An article as in claim 32, wherein the particle carries a plurality of immobilized electroactive species.

5 68. An article as in claim 59, wherein the auxiliary signaling entity comprises a dye, pigment, electroactive molecule, fluorescent moiety, up-regulating phosphor, or enzyme-fastened signaling moiety including horse radish peroxidase and alkaline phosphatase.

10 69. A kit as in claim 1, wherein the first article is a magnetically suspendable particle.

70. A kit as in claim 33, wherein the article is a gold-coated magnetic particle.

15 71. A kit as in claim 1, wherein the binding species is specifically fastened or adapted to be specifically fastened to the surface of the first article.

72. A composition comprising:
a binding species capable of binding an aggregate-forming species, fastened to an affinity
20 tag.

73. A composition as in claim 72, wherein the binding species is capable of binding a disease-associated aggregate-forming species.

25 74. A composition as in claim 72, wherein the binding species is capable of binding a neurodegenerative disease-associated aggregate-forming species.

75. A composition as in claim 72, wherein the binding species is a peptide.

30 76. A composition as in claim 72, wherein the binding species is a protein.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-86-

77. A composition as in claim 72, wherein the binding species is a sequence from a protein.

78. A composition as in claim 72, wherein the binding species is a small
5 molecule.

79. A composition as in claim 72, wherein the binding species is an antibody to the aggregate-forming or fibril-forming species.

10 80. A kit as in claim 72, wherein the binding species is capable of binding aggregates.

81. A kit as in claim 72, wherein the binding species is capable of binding disease-associated aggregates.

15 82. A kit as in claim 72, wherein the binding species is capable of binding neurodegenerative disease-associated aggregates.

20 83. A kit as in claim 80, wherein the binding species is capable of forming a macrostructure including a plurality of articles bound to a plurality of aggregates.

84. A kit as in claim 80, wherein the binding species is capable of forming a macrostructure including a plurality of articles bound to a plurality of disease-associated aggregates.

25 85. A kit as in claim 72, wherein the binding species is a protein capable of aggregation characteristic of neurodegenerative aggregation associated disease.

30 86. A kit as in claim 72, wherein the binding species is a protein capable of aggregation characteristic of aggregation-associated disease.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-87-

87. A kit as in claim 72, wherein the binding species is a protein capable of aggregation characteristic of neurodegenerative disease.

88. A kit as in claim 72, wherein the binding species is selected from among APP, beta-amyloid proteins, amyloid proteins, Tau, synuclein, PrP^{CJD}, PrP^{BSE}, PrP^{Scrapie}, Huntingtin, and fragments and fusions thereof.

89. A kit as in claim 88, wherein the protein, fragment or fusion is aggregate-binding, aggregate-formation-resistant.

90. A composition as in claim 72, further comprising particles fastened to or adapted to be fastened to at least some of the binding species.

91. A composition as in claim 72, wherein the affinity tag is a metal binding tag.

92. A composition as in claim 72, wherein the moiety is a polyamino acid tag.

93. A composition as in claim 72, wherein the polyamino acid tag is a histidine tag.

94. A method comprising:
forming aggregates in a sample containing aggregate-forming species; and
exposing the aggregates to an article having a surface and a plurality of binding species capable of binding the aggregates or aggregate-forming species, the binding species immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to a surface of the article.

95. A method as in claim 94, further comprising exposing the aggregates to the article in the presence of a candidate drug for affecting aggregation.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-88-

96. A method as in claim 93, wherein the method is performed in a fluid medium.
97. A method as in claim 96, wherein the solution does not contain detergents
5 or surfactants.
98. A method as in claim 96, wherein capillary flow force is not required to bring binding species, articles, or aggregate forming species together.
- 10 99. A method as in claim 96, wherein the surface is not absorptive of the fluid medium.
100. A method as in claim 94, wherein the binding species is a peptide.
- 15 101. A method as in claim 94, wherein the binding species is a protein.
102. A method as in claim 94, wherein the binding species is a sequence from a protein.
- 20 103. A method as in claim 94, wherein the binding species is a small molecule.
104. A method as in claim 94, wherein the article is a fluid-suspendible, isolatable particle.
- 25 105. A method as in claim 94, wherein the article is a colloid particle.
106. A method as in claim 94, wherein the article is a gold colloid particle upon a surface of which is a SAM to which the binding species is immobilized.
- 30 107. A method as in claim 94, wherein the article is a particle, the method comprising exposing the aggregate to additional particles immobilized relative to or

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-89-

adapted to be immobilized relative to at least some of the binding species.

108. A method as in claim 94, wherein the binding species are fastened to or adapted to be fastened to the surface of the article via a metal binding tag/metal/chelate linkage.

109. A method as in claim 94, wherein the assay is performed in a plurality of individually spatially-addressable regions.

110. A method as in claim 94, wherein the individually spatially-addressable regions comprise different wells of a multi-well plate.

111. A kit comprising:
an article having a surface; and
a plurality of binding species capable of binding an aggregate-forming species, at least some of which binding species are immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to the surface, wherein the surface has a chemical functionality substantially inhibiting non-specific binding of aggregate-forming species.

112. A kit as in claim 111, wherein the chemical functionality is a tri-ethylene glycol-terminated thiol.

113. A kit as in claim 111, wherein the surface has a chemical functionality substantially inhibiting non-specific binding in the absence of a protein blocking step.

114. A kit as in claim 111, wherein the aggregate-forming species is associated with neurodegenerative disease.

115. A kit as in claim 111, wherein the article is a fluid-suspendible, isolatable particle.

116. A kit as in claim 111, wherein the article is a colloid particle.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-90-

117. A kit as in claim 111, wherein the article is a particle, further comprising additional particles immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to at least some of the binding species.

5

118. A kit as in claim 115, wherein the binding species are fastened to or adapted to be fastened to the surface via a metal binding tag/metal/chelate linkage.

119. A kit as in claim 111, wherein the surface carries a self-assembled monolayer.

10

120. A kit as in claim 119, wherein the self-assembled monolayer comprises a species that inhibits colloid/colloid self aggregation.

121. A kit as in claim 120, wherein the self-assembled monolayer contains charged moieties.

15

122. A kit as in claim 120, wherein the self-assembled monolayer contains carboxy-terminated species.

20

123. A kit as in claim 120, wherein the self-assembled monolayer contains polyethylene glycol thiols.

124. A kit as in claim 121, wherein the charged moieties include nitrilotriacetic acid, 2,2'-bis(salicylideneamino)-6,6'-dimethyldiphenyl, or 1,8-bis(a-pyridyl)-3,6-dithiaoctane.

25

125. A kit as in claim 124, wherein the charged moieties comprise nitrilotriacetic acid.

126. A kit as in claim 119, wherein the self-assembled monolayer comprises oligonucleotides.

30

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-91-

127. A kit as in claim 119, wherein the self-assembled monolayer comprises DNA moieties.

5 128. A kit as in claim 119, wherein the self-assembled monolayer includes charged peptides.

129. A kit as in claim 119, wherein the self-assembled monolayer consists of synthetic molecules.

10 130. A kit as in claim 119, the self-assembled monolayer deposited onto the surface from a solution including a carboxy-terminated thiol.

131. A kit as in claim 130, wherein the solution contains a surfactant.

15 132. A kit as in claim 130, wherein the solution contains carboxolates, salts of carboxylic acids, or sodium citrate

133. A kit as in claim 130, the self-assembled monolayer deposited onto the surface not during formation of the colloid particle itself.

134. A kit as in claim 130, the self-assembled monolayer deposited onto the surface in suspension in a fluid, the particle not present at a fluid-fluid interface.

25 135. A kit as in claim 119, wherein the self-assembled monolayer is a mixed self-assembled monolayer further comprising a thiol terminated with a moiety to facilitate the fastening of the binding species or a binding partner of the binding species.

30 136. A method as in claim 94, comprising exposing the aggregates or fibrils to a plurality of colloids fastenable to the binding species, thereby linking the colloids to the fibrils or aggregates.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-92-

137. A method as in claim 136, wherein the exposing step takes place in a detergent free solution.

5 138. A method as in claim 136, wherein the exposing step takes place in the absence of an absorptive surface.

139. A method as in claim 136, comprising rendering the fibrils or aggregates visibly detectable via addition of the colloids.

10

140. A method as in claim 139, wherein the visibly detectable parameter is a change in the color of the solution.

141. A method as in claim 139, wherein the visibly detectable parameter is the formation of a visible colloid-peptide reticulum.

15

142. A method as in claim 136, wherein the colloid-peptide aggregates are detected by light scattering.

20

143. A method comprising:
forming a self-assembled monolayer on a surface by exposing the surface to a medium containing self-assembled monolayer-forming molecular species and surfactant.

25

144. A method comprising:
forming a self-assembled monolayer on a surface by exposing the surface to a medium containing self-assembled monolayer-forming molecular species and a carboxylate.

30

145. A method comprising:
forming a self-assembled monolayer on a surface of a colloid particle not during formation of the colloid particle itself.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-93-

146. A method comprising:
forming a self-assembled monolayer on a surface of a colloid particle in suspension in a fluid, the particle not present at a fluid-fluid interface.
- 5 147. A method as in claims 143, wherein the medium is a solution or suspension containing the self-assembled monolayer-forming molecular species and the surfactant.
- 10 148. A method as in claim 143 further comprising, after forming the self-assembled monolayer on the surface, removing any residual surfactant from the self-assembled monolayer.
149. A method as in claim 143, further comprising heat-cycling the colloid particle.
- 15 150. A method comprising:
providing at least two binding species, each capable of binding an aggregate-forming species, immobilized relative to each other or adapted to be immobilized relative to each other, thereby defining an aggregate linker; and
20 exposing the linker to a sample suspected of containing aggregate-forming species or a solution containing a candidate drug for affecting aggregation.
151. A method as in claim 150, wherein the binding species are capable of binding a disease associated aggregate-forming species.
- 25 152. A method as in claim 150, wherein the binding species are capable of binding a neurodegenerative disease aggregate-forming species.
153. A method as in claim 150, wherein the binding species are capable of
30 binding a non-neurodegenerative disease aggregate-forming species.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-94-

154. A method comprising:
exposing a live cell that can produce an aggregate-forming species to a candidate
drug for affecting aggregation; and
monitoring the potential of material produced by the cell for formation of
5 aggregates.
155. A method as in claim 154, comprising monitoring the aggregation
potential of the material produced by the cell by exposing the aggregates to an article
having a surface and a plurality of binding species capable of binding the aggregates or
10 aggregate-forming species, the binding species immobilized relative to or adapted to be
immobilized relative to a surface of the article.
156. A method as in claim 155, wherein monitoring the aggregation potential is
achieved by monitoring a change in the solution color.
15
157. A method as in claim 155, wherein monitoring the aggregation potential is
achieved by monitoring the extent of formation of the colloid-peptide reticulum.
158. A method as in claim 154, wherein the cell is not exposed to a candidate
20 drug.
159. A method as in claim 154, wherein the monitoring step does not involve
removing a sample of the cell or fluid surrounding the cell.
- 25 160. A method as in claim 154, wherein the monitoring step takes place in the
presence of the cell.
161. A method as in claim 154, wherein prior to the monitoring step the cell is
lysed.
30
162. A method as in claim 154, wherein the cell can produce disease-associated

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-95-

aggregate-forming species, further comprising monitoring the potential of material produced by the cell for formation of aggregates characteristic of the disease.

163. A method as in claim 155, wherein the disease is neurodegenerative
5 disease.

164. A method as in claim 155, wherein the disease is non-neurodegenerative
disease.

10 165. A method comprising:
forming a solution containing a species capable of binding aggregate-
forming species and one of a sample suspected of containing aggregate-forming species
or a candidate drug for affecting aggregation; and
without transferring any components into the solution or removing the solution
15 from its container, detecting aggregation in the solution.

166. A method as in claim 165, wherein the species is capable of binding a
disease-associated aggregate-forming species, the method comprising detecting
aggregation characteristic of the disease.

20 167. A method as in claim 166, wherein the disease is neurodegenerative
disease.

168. A method as in claim 166, wherein the disease is non-neurodegenerative
25 disease.

169. A method as in claim 165, further comprising introducing energy into the
fluid.

30 170. A system comprising at least two particles each immobilized relative to an
aggregate-forming species.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-96-

171. A system as in claim 170, each of the at least two particles fastened to a binding species binding the aggregate-forming species.

5 172. A system as in claim 170, comprising at least two particles each immobilized relative to a disease-associated aggregate-forming species.

173. A system comprising an aggregate, and at least two particles immobilized relative to the aggregate.

10

174. A system as in claim 173, wherein the aggregate is a disease-associated aggregate.

175. A method comprising:
15 providing an article having a first surface and a plurality of binding species capable of binding an aggregate-forming species immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to the surface; and
exposing the first surface to a sample containing or suspected of containing aggregate-forming species.

20

176. A method as in claim 175, wherein the binding species is capable of binding a disease-associated aggregate-forming species.

177. A method as in claim 176, wherein the disease is neurodegenerative disease.

25

178. A method as in claim 176, wherein the disease is non-neurodegenerative disease.

30 179. A method as in claim 175, wherein the surface is a surface of a particle, the method comprising:

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-97-

providing a plurality of particles carrying the binding species immobilized relative thereto; and
exposing the particles to the sample.

5 180. A method as in claim 179, further comprising determining the extent of aggregation of the particles indicative of aggregate-forming species present in the sample.

10 181. A method as in claim 175, wherein the surface is a surface of a particle, the method comprising:
providing a plurality of particles and binding species fastened to or adapted to be fastened to surfaces of the particles; and
exposing the particles and binding species to the sample.

15 182. A method as in claim 179, wherein the binding species and the sample are derived from diverse biological species.

183. A method as in claim 181, wherein the binding species and sample are the same protein or protein fragments from diverse biological species.

20 184. A method as in claim 179, further comprising determining the extent of aggregation of the particles.

25 185. A method as in claim 184, wherein the sample contains aggregate-forming or species, the exposing step involving exposing the particles and binding species to the sample in the presence of a candidate drug suspected of affecting aggregate formation.

186. A method as in claim 185, wherein the sample is produced by a cell.

30 187. A method as in claim 186, further comprising determining the extent of aggregation of the particles.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-98-

188. A method as in claim 187, comprising first exposing the cell that produces the sample to a candidate drug suspected of affecting aggregate formation, then exposing the particles and binding species to the sample.

5

189. A method as in claim 188, further comprising lysing the cell to produce the sample.

190. A method as in claim 188, wherein the candidate drug is suspected of inhibiting disease.

10

191. A method as in claim 190, wherein the candidate drug is suspected of inhibiting neurodegenerative disease.

192. A method as in claim 188, wherein the drug is suspected of inhibiting an enzyme whose activity has been linked to neurodegenerative disease.

15

193. A method as in claim 188, wherein the drug is suspected of inhibiting a cellular process that is linked to neurodegenerative disease.

20

194. A method as in claim 192, wherein the candidate drug is suspected of inhibiting β -secretase.

195. A method as in claim 192, wherein the candidate drug is suspected of inhibiting γ -secretase.

25

196. A method as in claim 185, the exposing step involving exposing the particles to the sample in the presence of beta-amyloid including amino acid sequences of from 1-38 to 1-44.

30

197. A method as in claim 196, wherein the beta-amyloid peptide includes an

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-99-

amino acid sequence of 1-40.

198. A method as in claim 180, the exposing step comprising exposing the particles to a biological specimen drawn from a sample suspected of being associated
5 with neurodegenerative disease.

199. A method as in claim 198, comprising:
exposing the specimen to the particles and the binding species.

10 200. A method as in claim 198, wherein the sample comprises a blood sample.

201. A method as in claim 198, wherein the sample is drawn from a human patient.

15 202. A method as in claim 198, wherein the sample is drawn from an animal.

203. A method as in claim 198, wherein the sample is drawn from livestock.

204. A method as in claim 198, wherein the sample is drawn from livestock
20 feed.

205. A method as in claim 198, wherein the sample is an organ donation sample.

25 206. A method as in claim 198, wherein the sample is food suitable for human consumption.

207. A method as in claim 198, wherein the sample is a fluid suitable for human or animal consumption.

30 208. A method as in claim 198, wherein the sample is milk.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-100-

209. A method as in claim 198, wherein the sample is water.

210. A method as in claim 180, further comprising observing a change in the
5 sample visible to the eye upon exposure of the particles to the sample.

211. A method as in claim 210, wherein the visible change comprises the
aggregation of particles.

10 212. A method as in claim 211, wherein the visible change comprises the
aggregation of gold colloid particles.

213. A method as in claim 210, wherein the visible change comprises a color
change.

15 214. A method as in claim 180, further comprising measuring a change in
effective particle/agglomerate size upon exposure of the particles to the sample using a
light-scattering device.

20 215. A method as in claim 180, comprising digitizing an image of the sample,
then using pattern recognition to determine whether the sample contains aggregates.

216. A method as in claim 198, the binding species immobilized relative to the
surface of the particles at a surface concentration small enough that, in the absence of
25 auxiliary, non-surface immobilized aggregate-forming or fibril-forming species, particle
aggregation upon particle/particle exposure is hindered within a time frame allowing
comparison of aggregation in the absence of auxiliary aggregate-forming or fibril-
forming species with aggregation in the presence of auxiliary aggregate-forming or fibril-
forming species.

30 217. A method as in claim 175, further comprising determining interaction of

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-101-

the binding species with any aggregate-forming or fibril-forming species present in the sample.

218. A method as in claim 175, wherein the binding species and the sample are
5 diverse biological species.

219. A method as in claim 175, comprising exposing the surface to the sample
in the presence of a binding species immobilized relative to a particle that binds to the
aggregate-forming species.

10

220. A method as in claim 219, wherein the particle carries an auxiliary
signaling entity.

221. A method as in claim 220, wherein the auxiliary signaling entity
15 comprises a dye, pigment, electroactive molecule, fluorescent moiety, up-regulating
phosphor, or enzyme-fastened signaling moiety including horse radish peroxidase and
alkaline phosphatase.

222. A method as in claim 219, wherein the surface is a surface of an electrode,
20 and the particle carries an electroactive species immobilized relative to the surface.

223. A method as in claim 222, wherein the particle carries a plurality of
immobilized electroactive species.

224. A method as in claim 223, wherein the plurality of electroactive species
25 comprise metallocenes.

225. A method as in claim 223, wherein the plurality of electroactive species
comprise ferrocenes or ferrocene derivatives.

30

226. A method as in claim 175, wherein the article is a magnetic bead.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-102-

227. A method as in claim 175, wherein the article is an SPR chip.

228. A method as in claim 175, wherein the article is an electrode.

5

229. A method as in claim 175, wherein the article is an ELISA plate.

230. A method as in claim 175, wherein the surface comprises a plurality of individually spatially-addressable regions.

10

231. A method as in claim 210, wherein the individually spatially-addressable regions comprise different wells of a multi-well plate.

232. A method as in claim 231, comprising exposing the sample to the surface in the presence of a candidate drug for affecting aggregate formation.

15

233. A method as in claim 232, further comprising observing a reduction in interaction of the aggregate-forming species with the surface-immobilized binding species due to presence of the candidate drug.

20

234. A method as in claim 175, wherein the sample is a drug-screening preparation that contains an aggregate-forming species.

235. A method as in claim 175, wherein the surface is a surface of a particle, the method comprising:

25

forming a composition comprising, suspended in a fluid medium, the binding species, particles fastenable to the binding species, and magnetic beads fastenable to the binding species; and

exposing the composition to the sample.

30

236. A method as in claim 235, wherein the particles and/or the magnetic beads

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-103-

carry immobilized chelates, and at least some of the binding species carry a metal binding tag fastenable to a metal coordinated by the chelate.

237. A method as in claim 235, wherein at least some of the particles and beads are fastened to binding species.

5

238. A method as in claim 235, the composition further comprising a redox-active species fastened to or fastenable to the particles.

239. A method as in claim 235, further comprising exposing the composition to a sample containing an aggregate-forming species and a candidate drug for affecting aggregate formation.

240. A method as in claim 238, further comprising drawing at least some of the magnetic beads, fastened to aggregate-forming or fibril-forming species which are fastened to particles carrying redox-active agents, to an electrode and determining the presence of the redox-active agents proximate the electrodes.

241. A method as in claim 240, comprising carrying out the method in the absence of a magnetic bead, and allowing colloid-peptide reticulum to sediment onto the electrode.

242. A method as in claim 240, comprising carrying out the method in the absence of a magnetic bead, and the electrode displays a binding species capable of binding the aggregate-forming species to recruit the signaling colloid-peptide reticulum to the electrode.

243. A method as in claim 240, wherein the electrode is coated with an inhibitor of non-specific binding.

244. A method as in claim 243, wherein the inhibitor of non-specific binding comprises a self-assembled monolayer.

30

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-104-

245. A method as in claim 244, wherein the self-assembled monolayer comprises a polyethylene glycol-terminated self-assembled monolayer-forming species.

5 246. A method as in claim 244, wherein the self-assembled monolayer further comprises a species that enhances permeability of the self-assembled monolayer to electrons.

247. A method as in claim 246, wherein the species enhancing permeability to
10 electrons comprises a conductive self-assembled monolayer-forming species.

248. A method as in claim 246, wherein the species that enhances permeability to electrons comprises a species that causes defect sites in the self-assembled monolayer.

15 249. A composition comprising:
a binding species capable of binding an aggregate-forming species; and
an electronic signaling entity immobilized relative to the binding species.

250. A composition as in claim 249, wherein the binding species is capable of
20 binding a neurodegenerative disease aggregate-forming species.

251. A method comprising:
providing a binding species immobilized relative to or adapted to be immobilized
relative to a surface of a first article, which binding species is not a neurodegenerative
25 disease aggregate-forming species, but is capable of binding a neurodegenerative disease
aggregate-forming species; and
converting the binding species into a neurodegenerative disease aggregate-
forming species.

30 252. A method as in claim 251, further comprising allowing the binding
species to convert other binding species into neurodegenerative disease aggregate-

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-105-

forming species.

253. A method as in claim 252, comprising allowing the binding species to interact with a neurodegenerative disease aggregate-forming species thereby being
5 converted in structure to a neurodegenerative disease aggregate-forming species, then allowing the species to convert the other binding species.

254. A method as in claim 251, comprising exposing the system to non-surface bound auxiliary binding species that are not neurodegenerative disease aggregate-forming
10 species, and allowing the auxiliary binding species to be converted to neurodegenerative disease aggregate-forming species.

255. A method as in claim 251, wherein the binding species initially is fastened to the surface of the article.

15

256. A method as in claim 251, wherein the binding species initially is not fastened to the surface of an article.

257. A method comprising:
20 providing a binding species, capable of binding a neurodegenerative disease aggregate-forming species, fastened to or adapted to be fastened to a surface of an article;
optionally allowing the binding species to fasten to the surface of the article;
allowing the binding species to bind a neurodegenerative disease aggregate-forming species without conversion of the binding species to an aggregate-forming
25 species; and
allowing a second binding species, fastened to or adapted to be fastened to a surface of a second article, to bind the aggregate-forming species.

258. A method as in claim 257, wherein the binding species and the
30 neurodegenerative disease aggregate-forming species are from different species of biological classification.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-106-

259. A method comprising:

providing a binding species that is not a neurodegenerative disease aggregate-forming species but is capable of binding a neurodegenerative disease aggregate-forming species;
5 species;

allowing the binding species to interact with a neurodegenerative disease aggregate-forming species thereby being converted to a neurodegenerative disease aggregate-forming species, and to participate in aggregation characteristic of the presence of neurodegenerative disease aggregate-forming species; and

10 detecting the aggregation characteristic of the presence of the neurodegenerative disease aggregate-forming species.

260. An article comprising:

a surface of the article;

15 a binding species capable of binding an aggregate-forming species fastened to the surface; and

a signaling entity fastened to the surface.

261. An article as in claim 260, wherein the binding species is capable of

20 binding a neurodegenerative disease aggregate-forming species.

262. A kit comprising:

an article having a surface; and

25 a plurality of binding species capable of binding an aggregate-forming species, fastened to or adapted to be fastened to the surface via a self-assembled monolayer.

263. A system as in claim 173, wherein each of the at least two particles is immobilized relative to the aggregate via a binding species fastened to the particle and binding the aggregate.

30

264. A system as in claim 263, comprising an aggregate immobilized relative

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-107-

to at least two particles, at least one of the particles immobilized relative to a second aggregate.

265. A system as in claim 264, wherein the particles and aggregates form a
5 structure visible to the unaided human eye.

266. An article as in claim 260, wherein the signaling entity is a multiple signaling entity.

10 267. A method as in claim 1, comprising rendering a fibril or aggregate visible.

268. A method as in claim 175, wherein the sample is a naturally-occurring sample.

15 269. A method as in claim 175, wherein the sample is a structurally predetermined sample.

270. A method comprising:
administering, to a human or animal subject at risk for or indicated for treatment
20 for an aggregate-associated condition, a candidate drug for treatment of the condition;
and
exposing a sample drawn from the subject to an assay indicative of effectiveness
of the candidate drug in treating the condition.

25 271. A method as in claim 270, wherein the human or animal is at risk for or indicated for treatment for an aggregate-associated disease, the method involving exposing the sample to an assay indicative of effectiveness of the candidate drug in inhibiting aggregation.

30 272. A method as in claim 270, wherein the human or animal is at risk for or indicated for treatment for an aggregate-associated disease, the method involving

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-108-

exposing the sample to an assay indicative of effectiveness of the candidate drug in enhancing aggregation.

273. A method as in claim 270, wherein the human or animal subject is at risk
5 for or indicated for treatment for neurodegenerative disease, the method involving exposing the sample to an assay indicative of effectiveness of the candidate drug in inhibiting or treating neurodegenerative disease.

274. A method as in claim 270, comprising the sample to an assay indicative of
10 aggregation potential of the sample.

275. A composition comprising:
 β -amyloid peptide of from 1-38 to 1-42 comprising a polyamino acid tag.

276. A method comprising:
15 allowing a first colloid particle to become immobilized with respect to a second colloid particle by binding interaction between a first chemical or biological species fastened or adapted to be fastened to the first colloid particle and a second chemical or biological species fastened to or adapted to be fastened to the second colloid particle; and
20 determining the immobilization of the first colloid particle with respect to the second colloid particle.

277. A method as in claim 126, comprising carrying out the method in the
presence of a candidate drug for affecting the binding interaction.

25

278. A method comprising:
allowing a first colloid particle to become immobilized with respect to a second
colloid particle by binding interaction, which binding interaction does not involve a first
nucleic acid sequence binding to a complementary nucleic acid sequence, between a first
30 chemical or biological species immobilized or adapted to be immobilized relative to the first colloid particle and a second chemical or biological species immobilized or adapted

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-109-

to be immobilized relative to the second colloid particle; and
determining the immobilization of the first colloid particle with respect to the second colloid particle.

5 279. A method comprising:
allowing a first colloid particle to become immobilized with respect to a second colloid particle by binding interaction, between a first chemical or biological species immobilized with respect to the first colloid particle and a second chemical or biological species immobilized with respect to the second colloid particle, the first colloid particle
10 linked to the second via particle via at least one self-assembled monolayer; and
determining the immobilization of the first colloid particle with respect to the second colloid particle.

280. A method as in claim 279, wherein the first and second chemical or
15 biological species are immobilized with respect to the first and second colloid particles, respectively, via self-assembled monolayers.

281. A method as in claim 280, wherein the determining step comprises
monitoring a change in the solution color.

20

282. A method as in claim 279, comprising carrying out the method in the presence of a drug candidate for affecting the binding interaction.

283. A method comprising:
25 providing a first colloid particle carrying an immobilized emissive or absorptive species;
bringing a second colloid particle carrying a second species having the ability to affect emission or absorption of the immobilized emissive or absorptive species into proximity of the first colloid particle and allowing the second species to affect the
30 emission or absorption of the immobilized emissive or absorptive species, wherein at least one colloid is derivatized with a self-assembled monolayer.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-110-

284. A method as in claim 283, wherein the emissive species is a fluorescent species, the method involving allowing the second species to effect the fluorescence of the immobilized species.

5

285. A method as in claim 283, comprising bringing the second colloid particle into proximity of the first colloid particle by allowing a binding event to occur between a species immobilized with respect to the first colloid particle and a species immobilized with respect to the second colloid particle.

10

286. A method as in claim 283, comprising bringing the second colloid particle into proximity of the first colloid particle by allowing a first species, fastened to the first colloid particle, to become immobilized with respect to a second species, immobilized with respect to the second colloid particle.

15

287. A method as in claim 286, wherein the first and second species are allowed to bind to each other.

288. A method as in claim 287, wherein the first and second species are
20 allowed to specifically bind to each other.

289. A method as in claim 287, comprising allowing the first and second species to bind to a common entity.

290. A method as in claim 289, wherein the common entity is a common
25 colloid particle.

291. A method as in claim 289, wherein the common entity is a surface of a
biological material.

30

292. A method as in claim 291, wherein the biological material is a tumor.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-111-

293. A method as in claim 291, wherein the biological material is a cell.

294. A method as in claim 291, wherein the biological material is a protein
5 complex.

295. A method as in claim 283, comprising bringing the second colloid particle
into proximity of the first colloid particle by allowing a first species, fastened to the first
colloid particle, and a second species, fastened to a second colloid particle, each to
10 specifically bind to a common biological target.

296. A method as in claim 283, comprising allowing the second species to
quench emission of the first species.

15 297. A method as in claim 283, comprising allowing the second species to
enhance emission of the first species.

298. A method as in claim 283, comprising allowing the second species to shift
the wavelength of emission or absorption of the emissive species.

20 299. A method as in claim 276 or 279, wherein the binding interaction is
affected by an enzyme.

300. A method as in claim 299, wherein the enzyme is caspase.

25 301. A method as in claim 300, comprising carrying out the method in the
presence of a drug candidate for affecting enzyme activity.

302. A method as in claim 299, wherein the enzyme is calpain.

30 303. A method as in claim 302, comprising carrying out the method in the

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-112-

presence of a drug candidate for affecting enzyme activity.

304. A method as in claim 299, comprising allowing an enzyme to facilitate the binding interaction between the first and second species, then allowing at least one of the
5 colloid particles to become fastened to at least one of the first or second species.

305. A method comprising:
providing a first colloid particle, a second colloid particle, a first chemical or biological species immobilized relative to or adapted to immobilized relative to the first
10 colloid particle, and a second chemical or biological species immobilized relative to adapted to immobilized relative to the second colloid particle;
exposing the first and second chemical or biological species to an enzyme having the ability to or suspected of having the ability to facilitate linkage of the first chemical or biological species to the second chemical or biological species; and
15 determining immobilization or lack of immobilization of the first colloid particle with respect to the second colloid particle, indicative of activity of the enzyme in linkage of the first chemical or biological species to the second chemical or biological species.

306. A method as in claim 304, wherein the enzyme is caspase.
20

307. A method as in claim 304, wherein the enzyme is calpain.

308. A method as in claim 276 or 279, the determining step involving determining a color change indicative of immobilization of the first colloid particle
25 relative to the second colloid particle.

309. A method as in claim 276 or 279, comprising determining immobilization of the first colloid particle with respect to the second colloid particle by determination of a visible reticulum.
30

310. A method comprising:

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-113-

exposing a sample suspected of containing an analyte to a first colloid particle immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to a first chemical or biological species and a second colloid particle immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to a second chemical or biological species, the first and second
5 chemical or biological species each having the ability to fasten to the analyte; and
determining immobilization of the first colloid particle with respect to the second colloid particle indicative of the presence of the analyte in the sample.

311. A method comprising:
10 exposing first and second colloid particles to a plurality of chemical or biological species having the ability to immobilize the colloid particles with respect to each other, and to a candidate drug for disruption of at least one binding interaction thereby preventing immobilization of the first and second colloid particles with respect to each other; and
15 determining immobilization of the first and second colloid particles relative to each other indicative of effectiveness of the candidate drug in disrupting binding interaction.

312. A method as in claim 311, wherein the chemical or biological species
20 have the ability to immobilize the colloid particles with respect to each other via at least one self-assembled monolayer.

313. A method as in claim 311, comprising exposing the first and second colloid particles to first and second species fastened to or adapted to be fastened to the
25 first and second colloid particles, respectively, the first and chemical or biological species having the ability to specifically bind to each other, wherein the candidate drug is a candidate for disruption of specific binding between the first and second chemical or biological species.

30 314. A method as in claim 311, comprising exposing the first and second colloid particles to first and second chemical or biological species immobilized relative

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-114-

to or adapted to be immobilized relative to the first and second colloid particles, respectively, and a third species having the ability to bind to the first and second chemical or biological species, and the candidate drug is for disruption of binding between one of the first and second chemical or biological species and the third species.

5

315. A method as in claim 314, wherein the first and second chemical or biological species comprise RGD-containing motifs, and the third species comprises endostatin.

10

316. A method comprising:

providing a first colloid particle, a first chemical or biological species immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to the first colloid particle, a second colloid particle, a second chemical or biological species immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to the second colloid particle, a third particle, a third chemical or biological species immobilized relative to or adapted to be immobilized relative to the third colloid particle, wherein the first and second chemical or biological species each have the ability for linkage to the third chemical or biological species; and determining immobilization of the first colloid particle with respect to the second colloid particle via binding between each of the first and second chemical or biological species and the third chemical or biological species.

20

317. A method as in claim 314 or 316, comprising exposing the first, second, and third colloid particles to each other in the presence of a candidate drug for disruption of binding interaction between the first or second chemical or biological species and the third chemical or biological species.

25

318. A method as in claim 316, wherein each of the first and second chemical or biological species is derived from vitronectin, and the third chemical or biological species is angiostatin.

30

319. A method as in claim 317, wherein each of the first and second chemical

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-115-

or biological species is vitronectin, the third chemical or biological species is angiotatin, and the candidate drug is a candidate for disruption of vitronectin/angiotatin binding.

320. A method comprising:

- 5 exposing a first sample containing or suspected of containing an aggregate-forming species; or containing or suspected of containing a precursor of an aggregate-forming species; or able to produce or is suspected of being able to produce aggregate-forming species; or is able to produce or suspected of being able to produced a precursor of an aggregate-forming species, to a second sample suspected of having the ability to
10 affect the first sample's propensity for involvement in an aggregation process; and
determining the second sample's ability to affect the first sample's propensity for involvement in the aggregation process.

321. A method as in claim 320, comprising exposing the first sample to the
15 second sample in the presence of a candidate drug for moderation of the ability of the second sample to affect the first sample's propensity for involvement in the aggregation process.

322. A method as in claim 320, the determining step involving determining the
20 potential of the first sample for aggregation.

323. A method as in claim 320, wherein the first sample contains or is suspected of containing a disease associated aggregate-forming species.

- 25 324. A method as in claim 323, wherein the disease is neurodegenerative disease.

325. A method as in claim 320, wherein the first sample comprises a protein or peptide that is an aggregate-forming species.
30

326. A method as in claim 320, wherein the first sample comprises a precursor

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-116-

of a protein or peptide that is an aggregate-forming species.

327. A method as in claim 320, wherein the first sample comprises a species
derived from a cell that produces a protein or peptide that is an aggregate-forming
5 species.

328. A method as in claim 327, wherein the first sample comprises material
secreted from the cell.

10 329. A method as in claim 327, wherein the first sample comprises a lysate of
the cell or a fraction thereof.

330. A method as in claim 320, wherein the second sample is not an aggregate-
forming species, and is not a precursor of an aggregate forming species.

15 331. A method as in claim 320, wherein the second sample is a protein,
peptide, nucleic acid, or enzyme, and is naturally-occurring, synthetic, or cloned.

20 332. A method as in claim 331, wherein the second sample is derived from a
cell.

333. A method as in claim 320, wherein the second sample comprises material
derived from a cell.

25 334. A method as in claim 320, the determining step comprising determining
aggregation of colloid particles via binding of binding species, immobilized relative to
the colloid particles, to aggregates or aggregate-forming species.

30 335. A method comprising:
providing a plurality of particles each having a surface and a plurality of binding
species capable of binding a aggregate-forming species immobilized to or adapted to be

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-117-

immobilized to the surface;

exposing the particles and the binding species to a candidate drug suspected of affecting aggregate formation;

5 determining a first observable feature of the particles indicative of effectiveness of the candidate drug in affecting aggregate formation at a first point in time; and
determining a second observable feature of the particles indicative of effectiveness of the candidate drug in affecting aggregate formation at a second point in time.

10 336. A method as in claim 335, wherein the candidate drug is suspected of inhibiting aggregate formation, and the determining steps comprise determining first and second observable features of the particles indicative of effectiveness of the candidate drug in inhibiting aggregate formation at the first and second points in time.

15 337. A method as in claim 335, wherein the binding species are capable of binding a neurodegenerative disease aggregate-forming species and the candidate drug is suspected of inhibiting neurodegenerative disease aggregate formation, and the determining steps comprise determining first and second observable features of the particles indicative of effectiveness of the candidate drug in inhibiting neurodegenerative
20 disease aggregate formation at the first and second points in time.

338. A method as in claim 335, further comprising exposing the particles, the binding species, and the candidate drug to auxiliary aggregate-forming species.

25 339. A method as in claim 335, wherein at least one of the first and second observable features includes directly visually-identifiable change.

340. A method as in claim 339, wherein at least one of the first and second observable features is a color change.

30 341. A method as in claim 335, wherein at least one of the first and second

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-118-

observable features is identifiable by the unaided human eye.

342. A method as in claim 335, wherein the first and second points in time differ by at least one day.

5

343. A method as in claim 335, wherein the first and second points in time differ by at least 1.5 days.

344. A method as in claim 335, wherein the first and second points in time differ by at least two days.

10

345. A method as in claim 335, wherein the first and second points in time differ by no more than 20 minutes.

346. A method as in claim 335, wherein the first and second points in time differ by no more than 10 minutes.

15

347. A method as in claim 335, wherein the first and second points in time differ by no more than 5 minutes.

20

348. A method as in claim 335, wherein the first and second points in time differ by no more than one minute.

349. A method as in claim 335, wherein the first and second points in time differ by no more than 30 seconds.

25

350. A method as in claim 335, comprising:
determining the first observable feature and determining the second observable feature without disruption/agitation of the assay or exposure of external energy to the assay during and between the first and second determining steps.

30

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-119-

351. A method comprising:

exposing a candidate drug, suspected of affecting aggregate formation, to a plurality of particles each having a surface and a plurality of binding species capable of binding aggregate-forming species immobilized to or adapted to be immobilized to the surface, under a first set of conditions and determining an observable feature of the particles indicative of effectiveness of the candidate drug in affecting aggregate formation under the first set of conditions;

exposing the candidate drug to a plurality of particles each having a surface and a plurality of binding species capable of binding a aggregate-forming species immobilized to or adapted to be immobilized to the surface under a second set of conditions; and determining an observable feature of the particles indicative of effectiveness of the candidate drug in affecting aggregate formation under the second set of conditions.

352. A method as in claim 351, wherein the candidate drug is suspected of inhibiting aggregate formation, and the determining step comprises determining an observable feature of the particles indicative of effectiveness of the candidate drug in inhibiting aggregate formation.

353. A method as in claim 351, wherein the candidate drug is suspected of inhibiting neurodegenerative disease aggregate formation, and the determining step comprises determining an observable feature of the particles indicative of effectiveness of the candidate drug in inhibiting neurodegenerative disease aggregate formation.

354. The method of claim 351, wherein the first set of conditions is a first point in time and the second set of conditions is a second point in time.

355. The method of claim 351, wherein the first set of conditions is a first stage of aggregation and the second set of conditions is a second stage of aggregation.

356. The method of claim 351, wherein the plurality of particles and binding species are in a solution.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-120-

357. The method of claim 356, wherein the step of determining the observable feature of the first and second stages of aggregation comprises determining a color of the solution.

5

358. The method of claim 357, wherein the step of determining the observable feature of the first and second stages of aggregation comprises observing a color change via an instrument.

10

359. The method of claim 353, wherein the step of determining the observable feature of the first and second stages of aggregation comprises determining relative dimensions of the aggregates.

15

360. The method of claim 359, wherein relative dimensions of the aggregates are determined by microscopy.

20

361. The method of claim 353, wherein the step of determining the observable feature of the first and second stages of aggregation comprises determining a molecular weight of the aggregates.

362. The method of claim 351, wherein the first set of conditions comprises a first concentration of peptides and the second set of conditions comprises a second concentration of peptides.

25

363. The method of claim 362, wherein any of the first and second set of conditions comprises a low or high concentration of peptides.

30

364. The method of claim 351, wherein the first set of conditions comprises a first type of binding species and the second set of conditions comprises a second type of binding species.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-121-

365. A method comprising:
determining a stage of aggregate formation; and
correlating the stage of aggregate or aggregate formation with a disease stage.

5 366. A method as in claim 365, wherein the disease is neurodegenerative disease.

367. A method comprising:
providing a plurality of particles each having a surface and a plurality of binding
10 species capable of binding a aggregate-forming species immobilized to or adapted to be
immobilized to the surface;
exposing the particles to a sample containing aggregate-forming species in the
presence of a candidate drug suspected of affecting aggregate formation; and
determining an extent of aggregation of the particles indicative of effectiveness of
15 the candidate drug in affecting aggregate formation at least 5 hours after the exposing
step.

368. A method as in claim 367, comprising:
providing a plurality of particles each having a surface and a plurality of binding
20 species capable of binding a neurodegenerative disease aggregate-forming species
immobilized to or adapted to be immobilized to the surface;
exposing the particles to a sample containing neurodegenerative disease
aggregate-forming species in the presence of a candidate drug suspected of inhibiting
neurodegenerative disease aggregate formation; and
25 determining an extent of aggregation of the particles indicative of effectiveness of
the candidate drug in inhibiting aggregate formation at least 5 hours after the exposing
step.

369. A method as in claim 367, comprising:
30 determining the extent of aggregation no sooner than 10 hours after the exposing
step.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-122-

370. A method as in claim 367, comprising:
determining the extent of aggregation no sooner than 15 hours after the exposing
step.
- 5 371. A method as in claim 367, comprising:
determining the extent of aggregation no sooner than 20 hours after the exposing
step.
- 10 372. A method comprising:
providing a plurality of particles each having a surface and a plurality of binding
species capable of binding a aggregate-forming species immobilized to or adapted to be
immobilized to the surface;
exposing the particles to a sample containing aggregate-forming species in the
15 presence of a candidate drug suspected of affecting neurodegenerative disease aggregate
formation; and
determining an extent of aggregation of the particles indicative of effectiveness of
the candidate drug in affecting aggregate formation no later than 1 minute after the
exposing step.
- 20 373. A method as in claim 372, comprising:
providing a plurality of particles each having a surface and a plurality of binding
species capable of binding a neurodegenerative disease aggregate-forming species
immobilized to or adapted to be immobilized to the surface;
25 exposing the particles to a sample containing neurodegenerative disease
aggregate-forming species in the presence of a candidate drug suspected of inhibiting
neurodegenerative disease aggregate formation;
determining an extent of aggregation of the particles indicative of effectiveness of
the candidate drug in inhibiting aggregate formation no later than 1 minute after the
30 exposing step.

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-123-

374. A method as in claim 372, comprising:
determining the extent of aggregation no later than 30 second after the exposing
step.

5 375. A method as in claim 372, comprising:
determining the extent of aggregation no later than 10 second after the exposing
step.

376. A method comprising:
10 administering to a first patient exhibiting symptoms indicative of a first stage of a
disease process a first drug for treatment of the disease, wherein the first drug, upon
exposure to an assay indicative of potential for affecting aggregate formation, exhibits a
first characteristic of affecting aggregate formation; and
administering to a second patient exhibiting symptoms indicative of a second
15 stage of the disease process a second drug for treatment of the disease, wherein the
second drug, upon exposure to the assay, exhibits a second characteristic of affecting
aggregate formation.

377. A method as in claim 376, comprising:
20 administering to a first patient exhibiting symptoms indicative of a first stage of a
neurodegenerative disease process a first drug for treatment of the disease, wherein the
first drug, upon exposure to an assay indicative of inhibition of aggregate formation,
exhibits a first characteristic of inhibition of aggregate formation; and
administering to a second patient exhibiting symptoms indicative of a second
25 stage of a neurodegenerative disease process a second drug for treatment of the disease,
wherein the second drug, upon exposure to the assay, exhibits a second characteristic of
inhibition of aggregate formation.

378. A method as in claim 376, wherein the assay contains a plurality of
30 particles each having a surface, a plurality of binding species capable of binding a
neurodegenerative disease aggregate-forming species immobilized to or adapted to be

WO 02/01230

PCT/US01/20232

-124-

immobilized to the surface, and a sample containing neurodegenerative disease
aggregate-forming species.

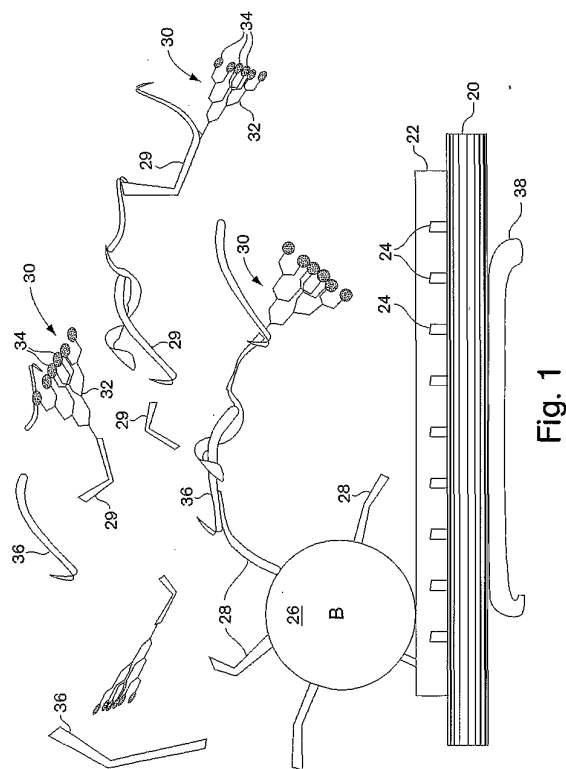


Fig. 1

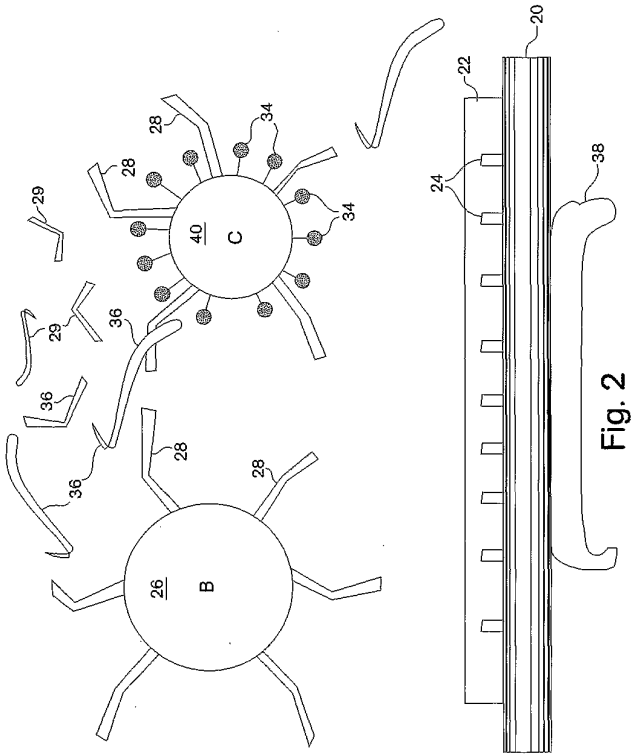


Fig. 2

ABSORBANCE OF COLLOID-PEPTIDE SOLUTION IN THE PRESENCE OR ABSENCE OF
B-AMYLOID FIBRILS

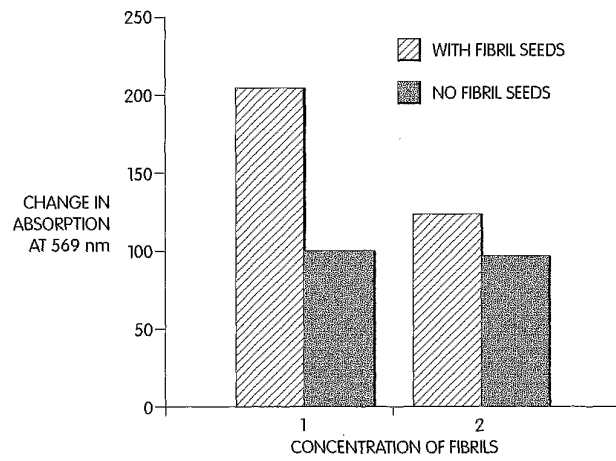


Fig. 3

WO 02/01230

PCT/US01/20232

4/14

Negative control, no β -Amyloid fibril

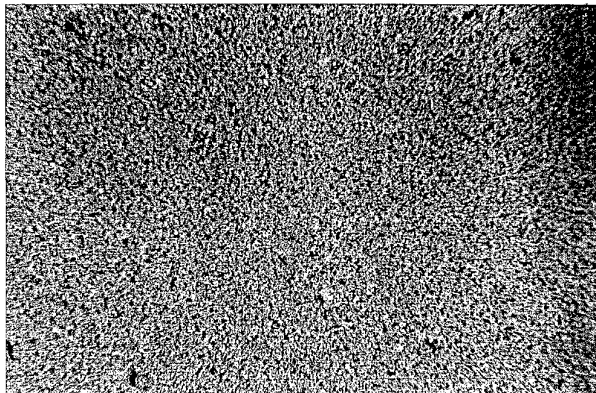


Fig. 4

300nM β -Amyloid fibril



Fig. 5

WO 02/01230

PCT/US01/20232

6/14

50pM β -Amyloid fibril

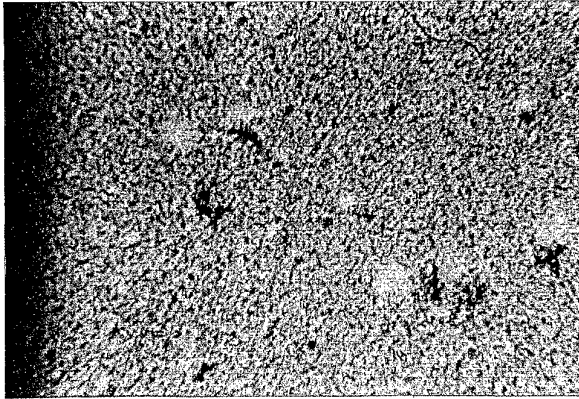


Fig. 6

WO 02/01230

PCT/US01/20232

7/14

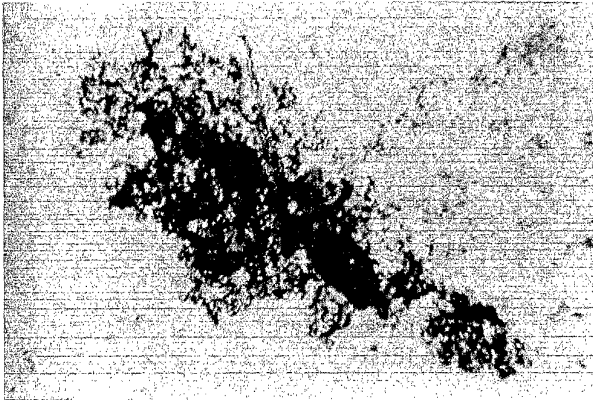


Fig. 7A

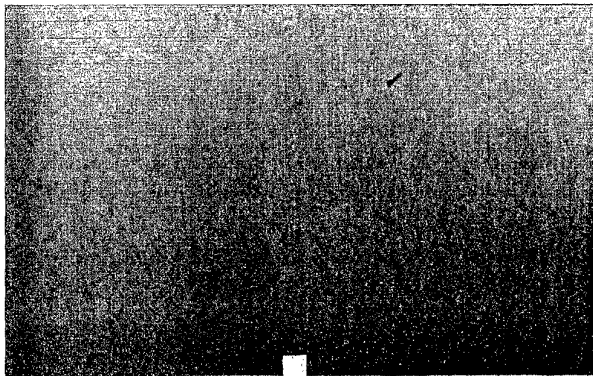


Fig. 7B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

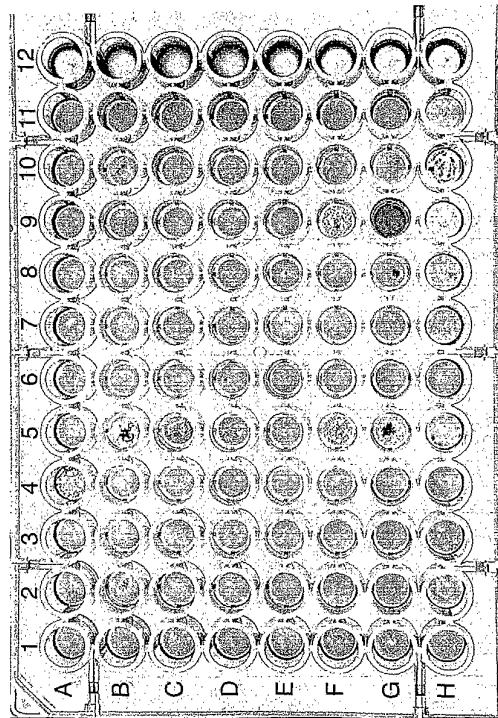


Fig. 8

WO 02/01230

PCT/US01/20232

9/14

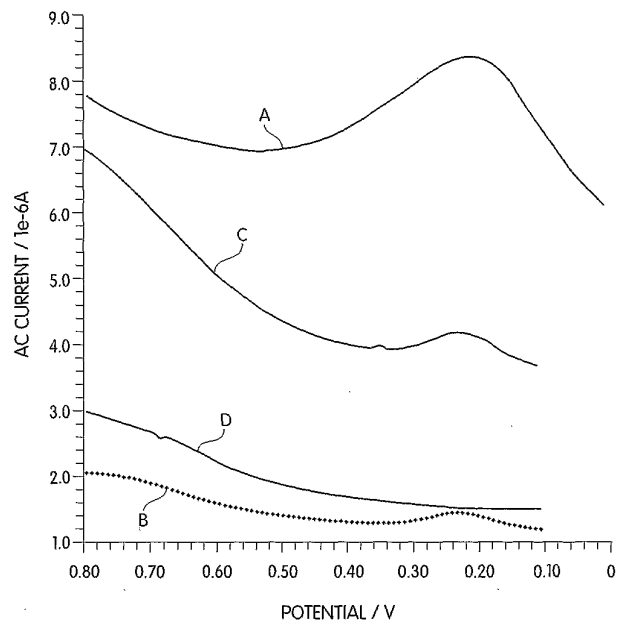


Fig. 9

WO 02/01230

PCT/US01/20232

10/14

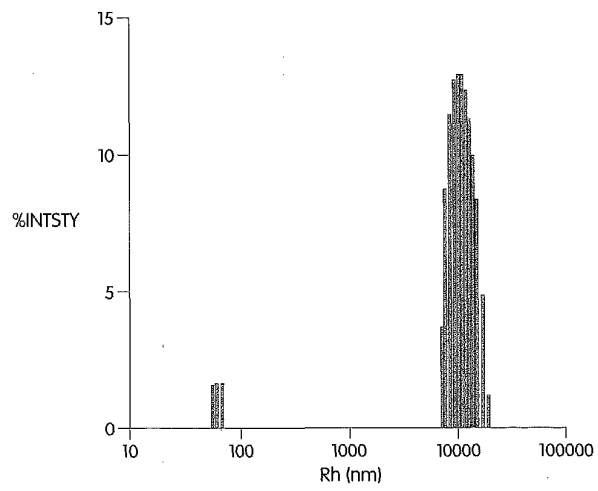


Fig. 10

WO 02/01230

PCT/US01/20232

11/14

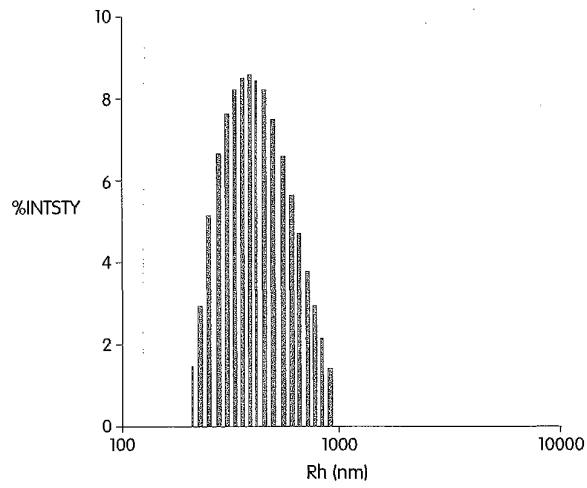


Fig. 11

WO 02/01230

PCT/US01/20232

12/14

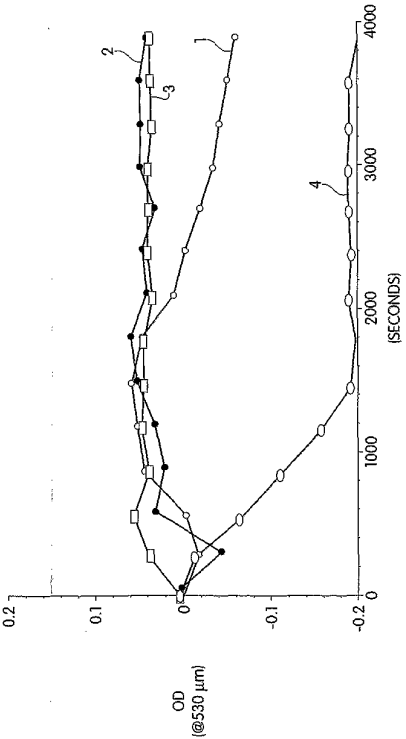


Fig. 12

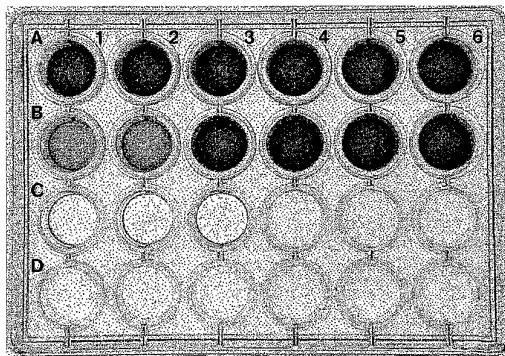


Fig. 13

14/14

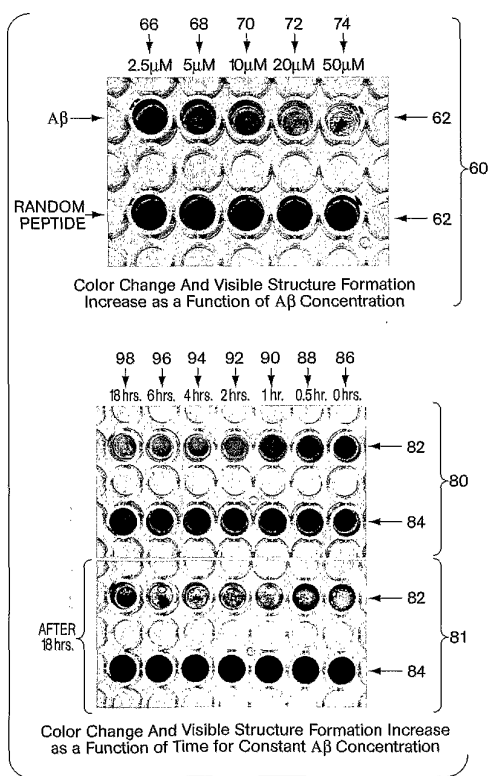


Fig. 14

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

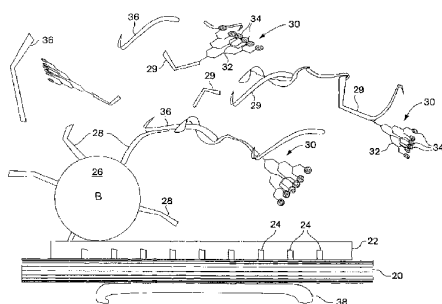
(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/001230 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/543, 33/68, 33/553, 33/58, C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/US01/20232
- (22) International Filing Date: 25 June 2001 (25.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09/602,689 23 June 2000 (23.06.2000) US
09/631,818 3 August 2000 (03.08.2000) US
- (71) Applicant: MINERVA BIOTECHNOLOGIES CORPORATION [US/US]; 142 Church Street, Newton, MA 02458 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EL, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KP, KR, KZ, LC, LI, LU, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (72) Inventors: BAMDAD, Cynthia, C.; 142 Church Street, Newton, MA 02458 (US); BAMDAD, R., Shoshana; 142 Church Street, Newton, MA 02458 (US).
- (88) Date of publication of the international search report: 14 August 2003
- (74) Agent: OYER, Timothy, J.; Wolf, Greenfield & Sacks, P.C.; 600 Atlantic Avenue, Boston, MA 02210 (US).
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: RAPID AND SENSITIVE DETECTION OF PROTEIN AGGREGATION



(57) Abstract: Methods, assays, and components are described in which biological samples can be rapidly and sensitively analyzed for the presence of species associated with neurodegenerative disease. Techniques and components are provided for diagnosis of disease, as well as for screening of candidate drugs for treatment of neurodegenerative disease. The techniques are simple, extremely sensitive, and utilize readily-available components. Binding species, capable of binding a neurodegenerative disease aggregate-forming or aggregate-forming species, are fastened to surfaces of electrodes and surfaces of particles, or provided free in solution, to bind aggregate-forming species and/or be involved in aggregation.

WO 02/001230 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/20232
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/543 G01N33/68 G01N33/553 G01N33/58 C12Q1/68		
According to international Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 31839 A (HARVARD COLLEGE) 23 July 1998 (1998-07-23) claims 27-51 page 11, line 24 - line 32 example 17 --- -/--	1-54, 56-71, 94-142, 175-248, 251-258, 262-269
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 November 2002		Date of mailing of the international search report 05.05.03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Cuendet, P

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/20232
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SIGAL G B ET AL: "SELF-ASSEMBLED MONOLAYER FOR THE BINDING AND STUDY OF HISTIDINE-TAGGED PROTEINS BY SURFACE PLASMON RESONANCE" ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, US, vol. 68, no. 3, 1996, pages 490-497, XP000916112 ISSN: 0003-2700 page 495 page 497 ----	1,21,25, 26,31, 50,59, 94,106, 111,119, 175,251, 262
X	WO 98 37421 A (MAGGIO JOHN E ;ESLER WILLIAM P (US); HARVARD COLLEGE (US); UNIV MI) 27 August 1998 (1998-08-27) claims 26,30 -----	94,111, 175-177
X	WO 99 08695 A (UNIV CALIFORNIA) 25 February 1999 (1999-02-25) claims 27-51 claim 31 -----	94,111, 175-177
A	TERZI E ET AL: "Interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide(1-40) with lipid membranes." BIOCHEMISTRY, UNITED STATES 2 DEC 1997, vol. 36, no. 48, 2 December 1997 (1997-12-02), pages 14845-14852, XP002221485 ISSN: 0006-2960 the whole document -----	1-54, 56-71, 94-142, 175-248, 251-258, 262-269
P,X	WO 00 43791 A (BAMDAD R SHOSHANA ;BAMDAD CYNTHIA CAROL (US); MINERVA BIOTECHNOLOG) 27 July 2000 (2000-07-27) the whole document -----	1-54, 56-71, 94-142, 175-248, 251-258, 262-269

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 01/20232
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☒	Claims Nos.: 270-274, 376-378 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy
2.	☐	Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.	☐	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(e).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
1.	☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	☒	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-54, 56-71, 94-142, 175-248, 251-258, 262-269
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

International Application No. PCT/US 01 20232

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

1. Claims: 1-54,56-71,94-142,175-248,251-258,262-269
method for binding aggregates or aggregating species, the binding being relative to a surface of an article and kit comprising an article/two articles having a surface.
2. Claims: 55,72-93,249-259
compositon comprising a binding species
3. Claims: 143-149
forming a self-assembled monolayer.
4. Claims: 150-164
method comprising the providing at least two binding species and a linker to be exposed.
5. Claims: 165-169
forming a solution containing a species to detect aggregation in solution.
6. Claims: 170-174
system comprising at least two particles.
7. Claims: 260-261
article comprising the surface of the article.
8. Claims: 260-261
composition comprising beta-amyloid peptide.
9. Claims: 276-319
method for allowing a first colloid particle to be immobilised respective to a second colloid particle.
10. Claims: 320-335
method for determining a second sample's ability to affect the first sample's propensity for involvement in aggregation.

International Application No. PCT/US 01/20232

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

11. Claims: 335-375

exposing a plurality of particles to a candidate drug.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational Application No.
PCT/US 01/20232

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9831839 A	23-07-1998	US 6306584 B AU 5926598 A EP 0981643 A	23-10-2001 07-08-1998 01-03-2000
WO 9837421 A	27-08-1998	AU 6174098 A	09-09-1998
WO 9908695 A	25-02-1999	AU 743905 B AU 9197498 A CA 2301142 A EP 1003539 A JP 2001515044 T	07-02-2002 08-03-1999 25-02-1999 31-05-2000 18-09-2001
WO 0043791 A	27-07-2000	AU 3474100 A CA 2361013 A EP 1169646 A JP 2002540383 T	07-08-2000 27-07-2000 09-01-2002 26-11-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 27/48	G O 1 N 21/78	Z
G O 1 N 33/15	G O 1 N 27/48	3 1 1
G O 1 N 33/50	G O 1 N 33/15	Z
G O 1 N 33/566	G O 1 N 33/50	Z N A Z
	G O 1 N 33/566	
	G O 1 N 27/46	3 0 1 G

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行

(74)代理人 100092886
弁理士 村上 清

(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

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 CA30 CB17 CB30 DA36 FA11 FA34 FB11
JA01
2G054 AA06 AA07 AA08 AA10 AB02 AB05 CA21 CA22 CA23 EA03
EA06 FB01 GA03 GA04 GE01
2G059 AA01 BB12 BB14 DD03 DD13 EE01 EE02 EE07 EE12 EE13
FF03 HH02 KK04 KK06 KK07
4B063 QA05 QA20 QQ79 QQ91 QR16 QR55 QR58 QR82 QS12 QS22
QS32 QX01