

(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2005-512601

(P2005-512601A)

(43) 公表日 平成17年5月12日(2005.5.12)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/44	C 1 2 Q 1/44	2 G O 5 4
C 1 2 Q 1/26	C 1 2 Q 1/26	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/28	C 1 2 Q 1/28	
C 1 2 Q 1/42	C 1 2 Q 1/42	
G O 1 N 21/78	G O 1 N 21/78	C
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 13 頁)		

(21) 出願番号	特願2003-556548 (P2003-556548)	(71) 出願人	503220679
(86) (22) 出願日	平成14年12月19日 (2002.12.19)		アクティアル・ファルマセウティカ・ソシ
(85) 翻訳文提出日	平成16年7月1日 (2004.7.1)		エダデ・ポル・クオタス・デ・レスポンサ
(86) 国際出願番号	PCT/IT2002/000811		ビリダデ・リミターダ
(87) 国際公開番号	W02003/056031		ポルトガル9000-082フンシャル (
(87) 国際公開日	平成15年7月10日 (2003.7.10)		マデイラ)、ファ・ドス・フェーヘイロス
(31) 優先権主張番号	011100		260番
(32) 優先日	平成13年12月21日 (2001.12.21)	(74) 代理人	100081422
(33) 優先権主張国	アイルランド (IE)		弁理士 田中 光雄
		(74) 代理人	100106518
			弁理士 松谷 道子
		(74) 代理人	100116311
			弁理士 元山 忠行
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 アルカリ性スフィンゴミエリナーゼを検出するための分析方法およびかかる方法に使用するキット

(57) 【要約】

アルカリ性スフィンゴミエリナーゼの存在についての診断を必要とする患者の便におけるアルカリ性スフィンゴミエリナーゼ (S M a s e) の存在を評価するための蛍光定量的分析方法およびかかる方法に使用されるキットが開示される。アルカリ性 S M a s e は大腸癌などの重篤な病状のマーカーであるためである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む患者の便におけるアルカリ性スフィンゴミエリナーゼの検出方法：

- 1) 患者の便の試料を収集し、それを乾燥する工程；
- 2) 乾燥させた試料から約 3 - 4 グラムを計量し、それを 20 ml のホモゲニゼーション・バッファー (0.25 M スクロース、0.15 M KCl、50 mM KH_2PO_4 含有、pH 7.4) に懸濁する工程；
- 3) 試料を 4000 rpm、+4 で 60 分間遠心分離する工程；
- 4) 上清を回収し、4000 rpm、+4 で 15 分間再び遠心分離する工程；
- 5) 標準としてウシ血清アルブミンを用いてピアス・プロテイン・アッセイにより上清中のタンパク質含量を測定し、各試料についてタンパク質濃度範囲 32 mg/ml から 40 mg/ml を用い、そしてピペットにより 25 μl の各試料をウェルに移す工程；
- 6) 25 μl の各試料に、65 μl のアッセイ・バッファー (50 mM Tris/HCl、2 mM EDTA、0.15 M NaCl 含有、pH 9.0) および 10 μl の 29 μM スフィンゴミエリンを添加し、そしてアッセイ・バッファーに 3 mM の濃度で胆汁酸塩 (TC、TDC、GC、GCD C) を添加する工程；
- 7) 37 で 1 時間インキュベートする工程；
- 8) ピペットにより 100 μl の各標準凍結乾燥細菌スフィンゴミエリナーゼおよび 10 μl のスフィンゴミエリン (29 μM) を取り、試料と同様に 37 で 1 時間インキュベートする工程；
- 9) 1 時間後、100 μl の反応バッファー (50 mM Tris/HCl、pH 7.4、10 mM - グリセロリン酸、750 μM ATP、5 mM EDTA、5 mM EGTA、100 μM アンプレックスレッド、8 U/ml アルカリホスファターゼ、0.2 U/ml コリンオキシダーゼ、2 U/ml 西洋わさびペルオキシダーゼ含有) を添加する工程；
- 10) 反応物を 1 時間以上、37 で光から保護してインキュベートする工程；
- 11) 蛍光マイクロプレート・リーダーにおいて励起範囲 530 - 560 nm および発光検出 590 nm にて蛍光を測定する工程；
- 12) 各点について、バックグラウンドの蛍光をスフィンゴミエリナーゼ非含有コントロールからの値を差し引くことにより補正する工程。

【請求項 2】

体液に対して行う、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

以下の試薬の試料を別々に含有する試験管を含む、患者の便または体液におけるアルカリ性スフィンゴミエリナーゼを検出するためのキット：

- a) 便または体液中の、アルカリ性スフィンゴミエリナーゼによってコリンリン酸へと加水分解されるべきスフィンゴミエリン；
- b) コリンリン酸からコリンへの加水分解を触媒するアルカリホスファターゼ；
- c) コリンを過酸化水素へと酸化するコリンオキシダーゼ；
- d) 過酸化水素と e) との反応を補助するための西洋わさびペルオキシダーゼ
- e) その蛍光が便または体液に存在するアルカリ性 S M a s e のマーカーとなる蛍光化合物レゾルフィンをもたらす、アンブラー・レッド試薬 ((10 - アセチル - 3,7 - ジヒドロキシフェノキサジン))；および、
- f) 濃度標準として用いる凍結乾燥した細菌スフィンゴミエリナーゼ。

【請求項 4】

以下の工程を含む患者からの生物学的材料におけるアルカリ性スフィンゴミエリナーゼの検出方法：

- 1) 生物学的材料の試料を収集する工程；
- 2) 試料をホモゲニゼーション・バッファー (0.24 - 0.26 M スクロース、0.14 - 0.16 M KCl、45 - 55 mM KH_2PO_4 含有、約 pH 7.4 に調整)

に懸濁する工程；

3) 試料を少なくとも1回遠心分離して上清を回収する工程；

4) 上清中のタンパク質含量を測定する工程；

5) 上清の試料に、アッセイ・バッファー(44 - 55 mM Tris / HCl、1.9 - 2.2 mM EDTA、0.14 - 0.16 M NaCl含有、pH 8.9 - 9.1)および28 - 30 μMスフィンゴミエリンおよびアッセイ・バッファー(2.9 - 3.1 mMの濃度の胆汁酸塩(TC、TDC、GC、GCDC)含有)を添加する工程；

6) アッセイ混合物を約37℃で約1時間インキュベートする工程；

7) 工程6)からの試料と、28 - 31 μMのスフィンゴミエリンを混合し、約37℃で約1時間インキュベートする工程；

8) 反応バッファー(45 - 55 mM Tris / HCl、pH 7.3 - 7.5、9 - 11 mM - グリセロリン酸、745 - 755 μM ATP、4 - 6 mM EDTA、4 - 6 mM EGTA、95 - 105 μMアンブレックスレッド試薬、7 - 9 U/mlアルカリホスファターゼ、0.1 - 0.3 U/mlコリンオキシダーゼおよび1.5 - 2.5 U/ml西洋わさびペルオキシダーゼ含有)を添加する工程；

9) 反応混合物を少なくとも1時間、約37℃で光から保護してインキュベートする工程；

10) 励起範囲530 - 560 nmおよび発光検出約590 nmにて蛍光を測定する工程。

【請求項5】

各試料について、蛍光の読みをスフィンゴミエリナーゼ非含有コントロールからの値を差し引くことによりバックグラウンドの蛍光について補正する、請求項4の方法。

【請求項6】

ピラス・プロテイン・アッセイによりタンパク質含量を測定する請求項4または5の方法。

【請求項7】

以下を含む患者から得た生物学的試料におけるアルカリ性スフィンゴミエリナーゼを検出するためのキット：

a) スフィンゴミエリン

b) アルカリホスファターゼ，

c) コリンオキシダーゼ，

d) 西洋わさびペルオキシダーゼ，

e) アンブラー・レッド試薬

f) 凍結乾燥した細菌スフィンゴミエリナーゼ。

【請求項8】

図面を参照して実質的に明細書に記載されたアルカリ性スフィンゴミエリナーゼの検出方法。

【請求項9】

図面を参照して実質的に明細書に記載されたアルカリ性スフィンゴミエリナーゼの検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルカリ性スフィンゴミエリナーゼの存在の評価を必要とする患者の便または体液におけるアルカリ性スフィンゴミエリナーゼの存在を評価するための分析方法に関する。本発明はまた、かかる分析方法を実施するためのキットにも関する。

【0002】

より具体的には、本発明の方法は、アルカリ性スフィンゴミエリナーゼの検出のためのインビトロでの蛍光定量的方法であり、アルカリ性スフィンゴミエリナーゼは以下に詳細に記載するように、大腸癌や家族性大腸ポリープ症などの、重篤な病状のマーカーである

10

20

30

40

50

。

【背景技術】

【0003】

酵素、スフィンゴミエリナーゼ（スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ、S M a s e）は、スフィンゴミエリンのセラミドとコリンリン酸塩への加水分解を触媒する。

【0004】

3種類のS M a s e（酸性、中性およびアルカリ性）が今日までに同定されており、これらは以下のようないくつかのアイソフォームとして存在する：

- リソソーム酸性S M a s e（A - S M a s e）；
- 細胞基質Zn²⁺ - 依存性酸性S M a s e；
- 膜中性マグネシウム - 依存性S M a s e（N - S M a s e）；
- 細胞基質マグネシウム - 非依存性N - S M a s e；および、
- アルカリ性S M a s e。

10

【0005】

S M a s eは広範な生理的および病理的プロセスにおいて役割を果たしていることが示されており、これらプロセスには以下が含まれる：エンドサイトーシスされたS Mのリソソームによる加水分解、セラミドにより媒介される細胞のシグナル伝達、アテローム発生、最終分化、細胞周期の停止、アポトーシス、炎症、および真核生物のストレス応答の調節。

【0006】

20

それぞれリソソームおよび膜結合酵素として細胞中に存在する酸性および中性S M a s eとは対照的に、アルカリ性S M a s eは組織差および種差を示す。ヒトにおいては、アルカリ性S M a s eは腸粘膜および胆汁中にみられる。アルカリ性S M a s eは、十二指腸にて出現し、腸内、特に空腸の遠位部分で高レベルに達し、そして結腸および直腸においてはかなりの量が存在する。このS M a s eは至適アルカリ性pH 9.0を示し、Mg²⁺ - 非依存性、胆汁酸塩 - 依存性そしてトリプシン耐性である。

【0007】

アルカリ性S M a s eの病理学的な重要性が最近認識されるようになったため。主に以下の理由による数々の研究が促進された。

【0008】

30

第一に、この酵素は、ミルク、卵、肉および魚にかなりの量存在する食餌性スフィンゴミエリンの加水分解を担っている可能性がある。第二に、この酵素はコレステロールの吸収を調節している可能性がある。第三に、腸管にアルカリ性S M a s eが存在すること、および該酵素の検出量が結腸直腸癌において選択的に減少していることは、この酵素が腸の発癌において役割を果たしていることを示唆する。というのは、生理的条件下では、この酵素はアポトーシスを刺激し、腸粘膜を発癌から保護するからである。

【0009】

以前の研究により、生理的条件下では、アルカリ性S M a s eは胆汁酸塩により、腸粘膜から管腔へと解離するという示された。しかし、胆汁酸塩濃度が異常に高い病理的条件下では、胆汁酸塩によるアルカリ性S M a s eの解離が酵素の生合成より過剰となり、その結果粘膜におけるアルカリ性S M a s e活性が低レベルとなり、大便または体液、即ち胆汁への該酵素の排出が異常に多くなる。その結果、正常の基準値を超える便または体液中へのアルカリ性S M a s eの排出過剰は、結腸直腸癌および家族性大腸ポリープ症についての診断マーカーとして有用であると考えられる。したがって、腸管の上記病状を患っている可能性のある患者の便または体液中のアルカリ性S M a s eを検出するための信頼できるアッセイが必要となる。

40

【0010】

さらに、細菌株（例えば、ストレプトコッカス・ターモフィラス（*Streptococcus thermophilus*）、乳酸桿菌（*Lactobacilli*））のなかには高レベルのS M a s eを含むものがあり、アルカリ性S M a s eの評価により、プロバイオティクスおよび/またはプロバイオテ

50

イクスに基づく産物による処理後の該細菌の数の変化を評価する方法が提供される。

【 0 0 1 1 】

アルカリ性 S M a s e のアッセイ方法は以前から知られている。S M a s e の活性は、インピボで S M の放射性前駆体により細胞を標識し、標識産物のレベルを測定することにより、あるいはインピトロで放射標識された S M または色素生産性の S M のアナログあるいは中性 S M の色素および蛍光誘導体を用いることにより、判定することができる。

【 0 0 1 2 】

これらの既知の一般に用いられているアッセイは完全には満足のいくものではなかった。というのは、これらアッセイは放射性アッセイであるため非常に危険である可能性があり、蛍光定量的アッセイよりも感度が低いためである。

10

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 3 】

本発明の目的は、既知の方法の欠点を克服する、結腸直腸癌や家族性大腸ポリープ症、または胆嚢または肝疾患を患っている可能性のある患者の便または体液中のアルカリ性 S M a s e の信頼できる安価なアッセイを提供することである。

【 0 0 1 4 】

本発明のさらなる目的は、上記アッセイに使用するための分析用キットを提供することである。

【 0 0 1 5 】

本発明の別の目的は、様々な健康状態における、あるいは疾患または薬剤あるいはプロバイオティクスまたは食物サプリメントによる処置後の、細菌コロニー形成を評価することである。

20

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 6 】

本発明の蛍光定量的、間接的アッセイ方法は、以下の反応の連続に基づく。

【 0 0 1 7 】

大便またはその他の体液中に存在するアルカリ性 S M a s e の作用により、スフィンゴミエリンが加水分解されてセラミドとコリンリン酸になり、コリンリン酸はアルカリホスファターゼの作用により加水分解されてコリンが生じる。コリンオキシダーゼの存在下で、コリンから過酸化水素 (H_2O_2) が生じる。

30

【 0 0 1 8 】

後者の化合物を、西洋わさびペルオキシダーゼの存在下で、 H_2O_2 に対する高感度の蛍光発生プローブである 10 - アセチル - 3 , 7 - ジヒドロキシフェノキサジン (以下、アンプレックス・レッド・試薬 (Amplex Red Reagent) と称する) と反応させると、強い蛍光性の化合物であるレゾルフィン (resorufin) が生じる。蛍光は、蛍光測定 (fluorocount) マイクロプレート蛍光光度計により、530 - 560 nm の励起、590 nm の蛍光検出にて測定される。

【 0 0 1 9 】

上記の連続する反応および蛍光検出手段に基づき、本発明のアルカリ性 S M a s e をアッセイする方法は、便について記載する以下の工程を含む。しかし、当業者にとって該方法を適宜常套の改変により胆汁などの体液に適用することが容易であることは明白である。

40

1) 患者の便の試料を収集し、それを乾燥する工程 ;

2) 乾燥させた試料から約 3 - 4 グラムを計量し、それを 20 ml のホモゲニゼーション・バッファー (0 . 25 M スクロース、0 . 15 M KCl、50 mM KH_2PO_4 含有、pH 7 . 4) に懸濁する工程 ;

3) 試料を 4000 rpm、+ 4 で 60 分間遠心分離する工程 ;

4) 上清を回収し、4000 rpm、+ 4 で 15 分間再び遠心分離する工程 ;

5) 標準としてウシ血清アルブミンを用いてピアス・プロテイン・アッセイ (Pierce Pro 50

tein Assay) により上清中のタンパク質含量を測定し、各試料についてタンパク質濃度範囲 32 mg/ml から 40 mg/ml を用い、そしてピペットにより 25 μ l の各試料をウェルに移す工程；

6) 25 μ l の各試料に、65 μ l のアッセイ・バッファー (50 mM Tris / HCl、2 mM EDTA、0.15 M NaCl 含有、pH 9.0) および 10 μ l の 29 μ M スフィンゴミエリンを添加し、そしてアッセイ・バッファーに 3 mM の濃度で胆汁酸塩 (TC、TDC、GC、GCDC) を添加する工程；

7) 37 で 1 時間インキュベートする工程；

8) ピペットにより 100 μ l の各標準 (以下を参照) および 10 μ l のスフィンゴミエリン (29 μ M) を取り、試料と同様に 37 で 1 時間インキュベートする工程；

9) 1 時間後、100 μ l の反応バッファー (50 mM Tris / HCl、pH 7.4、10 mM - グリセロリン酸、750 μ M ATP、5 mM EDTA、5 mM EGTA、100 μ M アンブレックスレッド、8 U/ml アルカリホスファターゼ、0.2 U/ml コリンオキシダーゼ、2 U/ml 西洋わさびペルオキシダーゼ含有) を添加する工程；

10) 反応物を 1 時間以上、37 で光から保護してインキュベートする工程；

11) 蛍光マイクロプレート・リーダーにおいて励起範囲 530 - 560 nm および発光検出 590 nm にて蛍光を測定する工程；

12) 各点について、バックグラウンドの蛍光をスフィンゴミエリナーゼ非含有コントロールからの値を差し引くことにより補正する工程。

【0020】

本発明はまた、上記の方法にしたがって患者の便または体液中のアルカリ性スフィンゴミエリナーゼを検出するためのキットにも関し、該キットは別々に以下の試薬の試料を含有する試験管を含む；

a) 便または体液中のアルカリ性スフィンゴミエリナーゼによって、コリンリン酸へと加水分解されるべきスフィンゴミエリン；

b) コリンリン酸からコリンへの加水分解を触媒するアルカリホスファターゼ；

c) コリンを過酸化水素へと酸化するコリンオキシダーゼ；

d) 過酸化水素と e) との反応を補助するための西洋わさびペルオキシダーゼ

e) その蛍光が便または体液に存在するアルカリ性 S M a s e のマーカーとなる蛍光化合物レゾルフィンをもたらす、アンブラー・レッド試薬 (Amplifier Red Reagent (10 - アセチル - 3,7 - ジヒドロキシフェノキサジン))；および、

f) 濃度標準として用いる凍結乾燥した細菌スフィンゴミエリナーゼ。

【0021】

本発明の分析方法を好適に実施するためには、上記キットの要素に加えて、以下のさらなる材料および装置が必要である；

スクロース；

塩化カリウム (KCl)；

一塩基性リン酸カリウム (KH_2PO_4)；

Trizma 塩基；

EDTA；

塩化ナトリウム；

タウロコール酸 (TC)；

タウロデオキシコール酸 (TDC)；

グリココール酸 (GC)；

グリコケノ (Glycocheno) デオキシコール酸 (GCDC)；

- グリセロリン酸；

ATP ニナトリウム塩；

EGTA；

B C A タンパク質アッセイ試薬；

10

20

30

40

50

ウシ血清アルブミン；

冷却遠心機；

550 - 562 nmにて測定可能なマイクロプレート・リーダー、および、
蛍光測定マイクロプレート蛍光光度計。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

S M a s e 活性の定量を行うには、以下の手段をとるべきである。

【0023】

検量線作成

キットに S M a s e の標準調製物を与える。これは、p H 9 で作用するタイプの S M a s e を含有する細菌抽出物からなる。以下の操作を行う。

S M a s e 検量線の作成：濃度標準を希釈して段階希釈を作成する。

S M a s e 標準を 1 m l のアッセイ・バッファー (p H 9 . 0) により再構成する；この再構成により 96 m U / m l のストック溶液を作成する。

0 . 500 m l のアッセイ・バッファーをピペットにより各試験管に移す。ストック溶液を用いて限界希釈を作成する。各試験管を次の工程へ移す前によく混合する。未希釈の標準を高濃度標準 (96 m U / m l) とし、検量線は以下の濃度の点を含むようにする (m U / m l) : 96 - 48 - 24 - 12 - 6 - 3。バッファーはゼロ標準とする (0 m U / m l) 。

【0024】

典型的検量線

図 1 に単に一例としての検量線を示す。検量線はアッセイする試料の各セットについて作成すべきである。

【0025】

結果の計算

各標準と試料についての二連の読みを平均し、平均ゼロ標準蛍光を差し引く。

標準活性 (m U / m l) に対して標準蛍光をプロットして最適曲線を引く。各試料の S M a s e 活性を決定するために、まず y - 軸上の蛍光値をみつけ、検量線まで水平線を引く。交差点において、x - 軸まで垂直線を引き、対応する S M a s e 活性を読み取る。

【0026】

記載した方法によりインビトロでの S M a s e 活性のアッセイが可能となる；これは、有機試料におけるアルカリ性 S M a s e を検出する目的で開発された。

【0027】

アルカリ性 S M a s e を特異的にアッセイするためであるが、該方法は酸性および中性 S M a s e 活性を検出する条件を用いる。具体的には：

- ホモゲニゼーション・バッファーは中性の p H であるが、中性 S M a s e を排除するためにプロテアーゼおよびホスファターゼ・インヒビターを含まない。というのは中性 S M a s e はプロテアーゼおよびホスファターゼの活性に対して高感度であり、そのためこれらの酵素により阻害されるからである；

- ホモゲニゼーション・バッファーは、M g 依存性中性 S M a s e 活性を阻害するために M g C l ₂ を含まない；

- 反応バッファーは - グリセロリン酸および A T P を含むため、中性 p H でなお活性である酸性 S M a s e を妨げるために、この反応バッファーにおいて中性 S M a s e を阻害するための高濃度の E D T A と E G T A が存在する。

【図面の簡単な説明】

【0028】

(原文に記載無し)

【図 1】

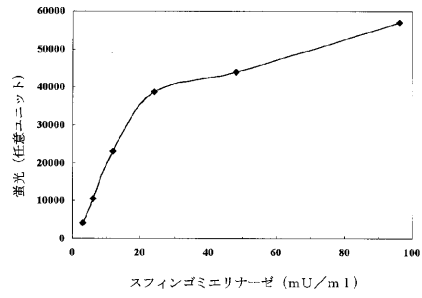


図 1：蛍光アッセイを用いたスフィンゴミエリナーゼの検出

各反応物は特定のアッセイバッファー中の示された量の細菌スフィンゴミエリナーゼを含有していた。

反応物は 37℃で 1 時間インキュベートした。

蛍光は励起 530 nm、蛍光検出 590 nm にて蛍光マイクロプレートリーダーにより測定した。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/IT 02/00811

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/44 G01N33/574		
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) BIOSIS, EP0-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DENISOVA NATALIA A ET AL: "Role of membrane lipids in regulation of vulnerability to oxidative stress in PC12 cells: Implication for aging." FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE, vol. 30, no. 6, 15 March 2001 (2001-03-15), pages 671-678, XP002255204 ISSN: 0891-5849 page 673	1,2,4-6
X	--- -/--	3,7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> 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. *G* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 September 2003		Date of mailing of the international search report 14/10/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer GONCALVES M L F C

PCT/IT 02/00811

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SOFIC E ET AL: "Antioxidant and pro-oxidant capacity of catecholamines and related compounds. Effects of hydrogen peroxide on glutathione and sphingomyelinase activity in pheochromocytoma PC12 cells: Potential relevance to age-related diseases." JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION, vol. 108, no. 5, 2001, pages 541-557, XP002255205 ISSN: 0300-9564	3,7
Y	page 544 -page 545 ---	1,2,4-6
P,Y	GONI F M ET AL: "Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 531, no. 1, 30 October 2002 (2002-10-30), pages 38-46, XP004389130 ISSN: 0014-5793	1,2,4,6
P,X	page 42 ---	3,7
P,X	HE XINGXUAN ET AL: "A fluorescence-based, high-throughput sphingomyelin assay for the analysis of Niemann-Pick disease and other disorders of sphingomyelin metabolism." ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 306, no. 1, 1 July 2002 (2002-07-01), pages 115-123, XP002255206 July 1, 2002 ISSN: 0003-2697	3,7
P,Y	abstract -----	1,2,4,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/IT 02/00811

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

2. ☒ Claims Nos.: 8,9
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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

Box 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.:

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/IT 02 00811

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 8,9

In view of the wording of the claims 8 and 9 presently on file, which render it difficult, if not impossible, to determine the matter for which protection is sought, the present application fails to comply with the clarity requirements of Article 6 PCT (see also Rule 6.1(a) PCT) to such an extent that a meaningful search is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear, namely the methods and kits of claims 1 to 7

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ, 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,M Z,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(72)発明者 クラウディオ・デ・シモーネ

イタリア、イ - 0 0 0 4 0 アルデア、ヴィア・ヌオロ 1 0 番

Fターム(参考) 2G054 AA06 AB03 BB02 BB10 BB13 CA28 CB02 CB03 CE01 EA03

GA04 GB02

4B063 QA01 QQ03 QQ32 QR02 QR03 QR12 QR45 QX02