



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3191599 B1

NORWAY

(19) NO

(51) Int Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2023.10.30
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2023.08.02
(86)	European Application Nr.	15839278.7
(86)	European Filing Date	2015.09.11
(87)	The European Application's Publication Date	2017.07.19
(30)	Priority	2014.09.11, US, 201462049306 P
(84)	Designated Contracting States:	AL; AT; BE; BG; CH; CY; CZ; DE; DK; EE; ES; FI; FR; GB; GR; HR; HU; IE; IS; IT; LI; LT; LU; LV; MC; MK; MT; NL; NO; PL; PT; RO; RS; SE; SI; SK; SM; TR
(73)	Proprietor	Board of Regents of the University of Texas System, 201 West 7th Street, Austin, TX 78701, USA Amprion, Inc., 149 New Montgomery St., Floor 4, San Francisco, California 94105, USA Jara, Claudio Soto, 2902 Conway Street, Houston, Texas 77025, USA Shahnawaz, Mohammad, 5151 Edloe Street Apartment 11407, Houston, Texas 77005, USA Lebovitz, Russell M., 222 Broadway 1304, Oakland, California 94607, USA Vollrath, Benedikt K., 4704 Niagara Avenue, San Diego, California 92107, USA
(72)	Inventor	JARA, Claudio Soto, Houston, Texas 77025, USA SHAHNAWAZ, Mohammad, Houston, Texas 77005, USA LEBOVITZ, Russell M., 222 Broadway 1304, Oakland, California 94607, USA VOLLRATH, Benedikt K., 4704 Niagara Avenue, San Diego, California 92107, USA
(74)	Agent or Attorney	Cosmovici Intellectual Property, Rue du Commerce 4, 1204 GENÈVE, Sveits

(54) Title DETECTION OF MISFOLDED PROTEINS

(56) References

Cited:

US-A1- 2008 118 938, WO-A1-2016/040903, WO-A1-2012/099884,
JORDI PUJOLS ET AL: "High-Throughput Screening Methodology to Identify Alpha-Synuclein Aggregation Inhibitors", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES, vol. 18, no. 3, 2 March 2017 (2017-03-02), page 478, XP055658905, DOI: 10.3390/ijms18030478
HERVA ET AL.: 'Anti-amyloid Compounds Inhibit alpha-Synuclein Aggregation Induced by Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA)'. J BIOL CHEM vol. 289, no. 17, 25 April 2014, pages 11897 - 11905 , PG 11898, XP055318025
MOLLENHAUER B ET AL: "Direct quantification of CSF @a-synuclein by ELISA and first cross-sectional study in patients with neurodegeneration", EXPERIMENTAL NEUROLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 213, no. 2, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 315-325, XP025426427, ISSN: 0014-4886, DOI: 10.1016/J.EXPNEUROL.2008.06.004 [retrieved on 2008-06-14]
NATALIA SALVADORES ET AL: "Detection of Misfolded A[beta] Oligomers for Sensitive Biochemical Diagnosis of Alzheimer's Disease", CELL REPORTS, vol. 7, no. 1, 1 April 2014 (2014-04-01), pages 261-268, XP055164338, ISSN: 2211-1247, DOI: 10.1016/j.celrep.2014.02.031

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Fordringer

1. En in vitro-metode for å detektere tilstedeværelsen av løselig, aggregert feilfoldet protein som omfatter alfa-synukleinaggregater i en prøve som omfatter en biologisk væske, hvor metoden omfatter:

(A) tilveiebringe en inkubasjonsblanding, hvor inkubasjonsblandingen omfatter:

(1) et monomert, foldet protein som omfatter alfa-synuklein som ikke er assosiert med alfa-synukleinfra, i et konsentrasjonsområde på ca. 10 nM til ca. 200 mM;

(2) en buffer med en pH mellom 6 og 7,4;

(3) en saltblanding som omfatter én eller flere av NaCl eller KCl, hvor nevnte saltblanding har en total konsentrasjon på 500 mM $\pm$ 10 %;

(4) tioflavin T (ThT); og

(5) prøven;

der nevnte monomere, foldede protein som omfatter alfa-synuklein er i molart overskudd til tioflavin;

(B) som gjennomfører en inkubasjonssyklus to eller flere ganger som er effektiv for å danne en amplifisert del av feilfoldet protein, som omfatter: inkubering av inkubasjonsblandingen ved en temperatur mellom 15 °C og 50 °C for å forårsake aggregering av minst en del av det monomere, foldede proteinet i nærvær av det løselige, aggregerte feilfoldede proteinet og risting av inkubasjonsblandingen som er effektiv for å bryte opp minst den delen av et hvilket som helst proteinaggregat som er tilstede, og

(C) bestemmer tilstedeværelsen av det løselige, aggregerte feilfoldede proteinet i prøven ved å detektere fluorescens av ThT.

2. Metoden i fordring 1, der det monomere, foldede proteinet som omfatter alfa-synukleinprotein produseres av en av: kjemisk syntese, rekombinant produksjon eller ekstraksjon fra ikke-rekombinante biologiske væsker.

3. Metoden i fordring 1, der trinnet med å inkubere inkubasjonsblandingen omfatter å utsette inkubasjonsblandingen for syklisk omrøring.

4. Metoden i fordring 1, der trinnet med å belyse den inkuberte blandingen med en bølgelengde av lys som eksiterer ThT, omfatter belysning ved ca. 435 nm og overvåking av ThT-fluorescens ved ca. 485 nm.

5. Metoden i fordring 1, der minst ett av trinnene med inkubering av inkubasjonsblandingen med omrøringssykluser, trinnet med bestemmelse utføres ved hjelp av en mikroplateleser.

6. Metoden i fordring 1, der den biologiske væsken omfatter én eller flere av:

fostervann, galle, blod, cerebrospinalvæske, cerumen, hud, eksudat, avføring, magevæske, lymfe, melk, slim, slimhinner, peritonealvæske, blodplasma, pleuravæske, puss, spytt, talg, sæd, svette, synovialvæske, tårer og urin.

7. Metoden i fordring 1, der tilstedeværelsen av det løselige, aggregerte feilfoldede proteinet som omfatter alfa-synuklein, er en indikasjon på en feilfoldingsforstyrrelse (PMD).