

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2002 - 538468

(P2002 - 538468A)

(43)公表日 平成14年11月12日(2002.11.12)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ド [*] (参考)
G 0 1 N 33/48 33/53		G 0 1 N 33/48 33/53	B D

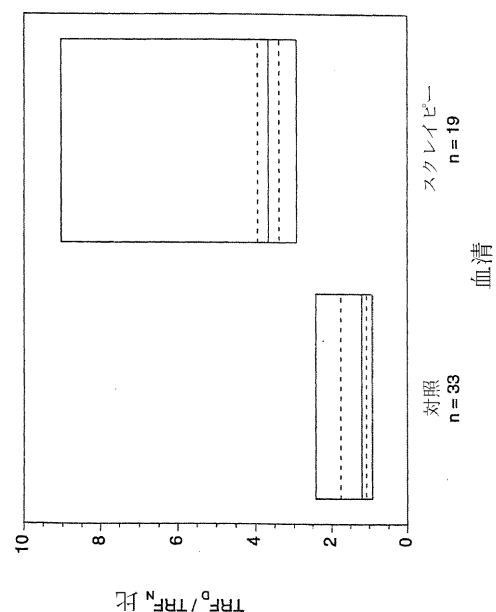
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 46数)

(21)出願番号	特願2000 - 602807(P2000 - 602807)	(71)出願人	ザ・レジェンツ・オブ・ザ・ユニバーシテ ィー・オブ・カリフォルニア アメリカ合衆国 カリフォルニア州 オー クランド フランクリン ストリート 12 ス フロア 1111
(86)(22)出願日	平成12年2月28日(2000.2.28)	(72)発明者	プルシナー スタンレイ ビー . アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン フランシスコ パチェコ ストリート 400
(85)翻訳文提出日	平成13年9月3日(2001.9.3)	(72)発明者	サファー ジリ ジー . アメリカ合衆国 カリフォルニア州 コン コード スティメル ドライブ 1003
(86)国際出願番号	PCT/US00/05259	(74)代理人	弁理士 清水 初志 (外1名) 最終頁に続く
(87)国際公開番号	W000/52197		
(87)国際公開日	平成12年9月8日(2000.9.8)		
(31)優先権主張番号	09/264,148		
(32)優先日	平成11年3月5日(1999.3.5)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

(54)【発明の名称】 プリオンおよびPrPScの単離のために調製された血液血清試料

(57)【要約】

試料は、例えば試料中のプリオンを検出するなどの試料中のタンパク質をさらに分析することが可能な方法で血液から調製される。血液は採血され、凝血させられ、血清を得るために分離過程(例えば遠心分離)にかけられる。血清は、試料中でプリオンと結合して薬剤/タンパク質複合体を形成する錯化剤で処理され、それは、複合体の濃縮を可能にする。複合体の濃縮の結果、例えば、プリオンを検出するための分析方法において異なるタイプの範囲を示して分析されるなどの良好な結果で解析される試料となる



【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の段階を含む、試料を調製する方法：

血液の量を得る段階；

血液を凝血させる段階；

該凝血した血液から血清を分離する段階；

該血清と、タンパク質の病原性コンフォメーションを有するタンパク質/薬剤複合体を形成する錯化剤とを接触させる段階；

試料中で該複合体を濃縮させる段階。

【請求項2】 タンパク質の病原性の形態が、A4タンパク質、PrPタンパク質、およびトランスシレチンからなる群より選択されるタンパク質であって、血清が遠心分離を使用して分離され、および錯化剤がヘテロポリ酸またはその塩である、請求項1記載の方法。

【請求項3】 血液が、病気の症状を示していないヒト、ウシ、またはヒツジからなる群より選択される哺乳動物から得られ、且つ錯化剤がホスホタングステン酸の塩である、請求項2記載の方法。

【請求項4】 血液がヒトであり、タンパク質の病原性型がPrP^{Sc}であり、かつ錯化剤がホスホタングステン酸ナトリウムである、請求項3記載の方法。

【請求項5】 以下の段階をさらに含む、請求項1記載の方法：

可溶性、3次元構造、および感染性からなる群より選択される特徴を決定するために複合体のタンパク質を分析する段階。

【請求項6】 以下の段階をさらに含む、請求項5記載の方法：

タンパク質の特徴を、血液が抽出された動物と同じ動物の脳組織から抽出されたタンパク質の病的形態の同じ特徴と比較する段階。

【請求項7】 以下の段階をさらに含む、請求項1記載の方法：

第2の病原性コンフォメーションよりも第1のコンフォメーションに対して高い親和性を有する結合パートナーと、試料の第1の部分とを接触させる段階、および第1の部分における第1の結合パートナー/タンパク質複合体の第1の濃度を決定する段階；

結合パートナーに対する第2のコンフォメーションの結合親和性を増加させる

ために、試料の第2の部分进行处理する段階；

第2の処理された部分における結合パートナー/タンパク質複合体の第2の濃度を決定するために、試料の第2の部分と結合パートナーとを接触させる段階；

該処理の結果生じた第1のコンフォメーションにあるタンパク質の、結合パートナーに対する親和性の増加を補償する、調整された濃度を提供するために第2の濃度を調整する段階；

第2の病原性コンフォメーションにあるタンパク質の存在を決定するために、第1の濃度を調整された濃度と比較する段階。

【請求項8】 第1の濃度と第2の濃度が時間分解解離増強蛍光を使用して決定され、

タンパク質の第2の病原性コンフォメーションが、試料中に 1×10^3 粒子/ml またはそれ以下の濃度で存在し、

該タンパク質が A4タンパク質、PrP^{Sc}タンパク質、またはトランスシレチンからなる群より選択され、ならびに、

試料の第2の部分が、第2の病原性コンフォメーションにある少なくとも2%の任意のタンパク質を、結合パートナーに対して増大した結合親和性をもつコンフォメーションに変換するために十分な、熱、圧力、または化学変性からなる群より選択される処置を使用して処理される、

請求項7記載の方法。

【請求項9】 結合パートナーが、タンパク質の第2の病原性コンフォメーションよりもタンパク質の第1のコンフォメーションに対して少なくとも10倍高い親和性を有するラベル化された抗体を含み、

血液がヒト、ウシ、ヒツジ、およびブタからなる群より選択される哺乳動物から抽出される、

請求項7記載の方法。

【請求項10】 以下の段階をさらに含む、請求項1記載の方法：

タンパク質の第2のコンフォメーションを、結合パートナーに対して該第2のコンフォメーションよりも高い親和性を有する結合コンフォメーションに変換するために試料进行处理する段階；

試料中の結合パートナー/タンパク質複合体の濃度を決定するために、処理された試料と結合パートナーとを接触させる段階；

該処理の結果生じた第1のコンフォメーションにあるタンパク質の、結合パートナーに対する親和性の増加を補償する、調整された濃度を提供するために濃度を調整する段階；

該調整された濃度を、試料中の第2のコンフォメーションにあるタンパク質の存在を決定するために、対照濃度と予め決定された標準濃度からなる群より選択される既知の濃度と比較する段階。

【請求項11】 結合パートナーが標識化抗体を含み、錯化剤がホスホタングステン酸の金属塩を含み、且つ濃度がフローサイトメトリーを使って決定される、請求項10記載の方法。

【請求項12】 タンパク質がPrPタンパク質であって、調整された濃度が処理された非感染性対照試料から決定された既知の濃度と比較される、請求項10記載の方法。

【請求項13】 調整された濃度が、ヒト、ウシ、ヒツジからなる群より選択される哺乳動物の非感染の個体群に由来する処理された試料から予め決定された既知濃度と比較される、請求項10記載の方法。

【請求項14】 抗体が3F4であって、錯化剤がホスホタングステン酸ナトリウムである、請求項11記載の方法。

【請求項15】 第2のコンフォメーションにあるタンパク質が1ml当たり 1×10^3 タンパク質分子またはそれ以下の濃度で試料中に存在し、第1のコンフォメーションが1ml当たり 1×10^6 タンパク質分子またはそれ以上の濃度で試料中に存在する、請求項10記載の方法。

【請求項16】 以下の段階を含む、血液中のPrP^{Sc}の存在を決定するための方法：

ヒト、ウシ、ヒツジからなる群より選択される哺乳動物から抽出された血液から得られた血清と、血液中のPrP^{Sc}と結合し、PrP^{Sc}の比重と比較してより大きい比重を有する複合体を形成する錯化剤とを接触させる段階；

濃縮された試料中で、複合体を濃縮するために重力を使用する段階；

該濃縮された試料のPrP^{Sc}を分析する段階。

【請求項17】 錯化剤がヘテロポリ酸またはその塩であって、複合体を濃縮するために重力を使用することが遠心分離により増強される、請求項16記載の方法。

【請求項18】 以下の段階を含む、試料を調製する方法：

血液の量を得る段階；

血液を凝血させる段階；

凝血した血液から血清を分離する段階；

該血清と、PrP^{Sc}タンパク質により複合体を形成するホスホタンゲステン酸およびその塩からなる群より選択される錯化剤とを接触させる段階；ならびに、

PrP^{Sc}タンパク質により形成された複合体を濃縮する段階。

【請求項19】 血清とホスホタンゲステン酸ナトリウムとを接触させる方法であって、

血液がヒト、ウシ、およびヒツジからなる群より選択される哺乳動物から得られる、請求項18記載の方法。

【請求項20】 以下の段階をさらに含む、請求項18記載の方法：

溶解度、三次元構造、および感染性からなる群より選択される特徴を決定するために複合体のPrP^{Sc}タンパク質を解析する段階；

PrP^{Sc}タンパク質の特徴を、血液が得られた動物と同じタイプの動物の脳組織由来のタンパク質の疾病コンフォメーションの同じ特徴と比較する段階。

【請求項21】 血清を錯化剤と接触させた後、濃縮が遠心分離を使用して実施される、請求項18記載の方法。

【請求項22】 血清を錯化剤と接触させた後、濃縮がろ過を使用して実施される、請求項18記載の方法。

【請求項23】 抗凝固剤の非存在下において、滅菌された容器中で室温にて放置させること以外の手順を使用することなしに、血液を凝血させる、請求項18記載の方法。

【請求項24】 錯化剤を30 から45 の範囲において、1～16時間の範囲で血清と接触させる、請求項18記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****政府の権利**

アメリカ合衆国政府は米国国立保健研究所によって授与された助成金番号AG02132に準じて本出願において一定の権利を有する。

【0002】**発明の分野**

本発明は一般に、血液中のプリオンを検出する方法に関する。

【0003】**発明の背景**

プリオンは、ヒト及び動物において中枢神経系の海綿状脳症を引き起こす感染性病原体である。プリオンは、細菌、ウイルスおよびウイロイドとは異なる。現在の有力な仮説は、プリオンタンパク質の感染性には核酸成分は必要でないというものである。さらに、1つの種の動物（例えばヒト）に感染するプリオンは、別の種（例えばマウス）に容易に感染しないと考えられる。

【0004】

プリオンおよびこれによって引き起こされる疾患の研究における重要な段階は、プリオンタンパク質（「PrP」）と命名されたタンパク質の発見および精製であった [Boltonら、Science 218:1309~11 (1982) ; Prusinerら、Biochemistry 21:6942~50 (1982) ; McKinleyら、Cell 35:57~62 (1983)]。その後、プリオンタンパク質をコードする完全な遺伝子のクローニング、塩基配列決定、およびトランスジェニック動物における発現がなされた。PrP^cは単一コピーの宿主遺伝子によってコードされ [Baslerら、Cell 46:417~28 (1986)]、通常は神経細胞の外表面に認められる。プリオン病は、PrP^cがPrP^{Sc}と呼ばれる変異型に変換されることによって起こるといふ仮説が有力である。

【0005】

動物およびヒトの感染性神経変性疾患の感染および発病にはいずれもプリオンタンパク質（PrP^{Sc}）のスクレイピー型アイソフォームが必要であることが示された。これについては、プルシナー（Prusiner, S.B.）、「プリオン病の分子生

物学 (Molecular biology of Prion Disease)」、Science、252:1515~1522 (1991) を参照されたい。動物で最も頻度の高いプリオン病は、ヒツジおよびヤギのスクレイピー、ならびにウシの牛海綿状脳症 (BSE) である [Wilesmith, J および Wells, Microbiol. Immunol. 172:21~38 (1991)]。ヒトでは以下の4種類のプリオン病が確認されている：(1)クールー、(2)クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)、(3)ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病 (GSS)、および(4)致死性家族性不眠症 (FFI) [Gajdusek, D.C., Science 197:943~960 (1977) ; Medoriら、N. Eng. J. Med. 326:444~449 (1992)]。ヒトのプリオン病が散発性、遺伝性および感染性の疾患として出現する理由は、当初は謎であったが、現在ではPrPの細胞遺伝学的な由来によって説明されている。

【0006】

CJD症例のほとんどは散発的であるが、約10%~15%はヒトPrP遺伝子の変異によって生じる常染色体優性遺伝疾患として遺伝する (Hsiaoら、Neurology 40:1820~1827 (1990) ; Goldfarbら、Science 258:806~808 (1992) ; Kitamotoら、Proc. R. Soc. Lond. 343:391~398 (1994))。医原性CJDは、死体脳下垂体由来のヒト成長ホルモン、さらには硬膜移植片により引き起こされる (Brownら、Lancet 340:24~27)。CJDと、スクレイピーに感染したヒツジ肉の摂取などの感染原因とを関連づけるための多くの試みにもかかわらず、医原的に誘発された疾患の場合を除いて、現在まで同定されたものはない (Harries-Jonesら、J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 51:1113~1119 (1988))。一方、ニューギニア高地のフォレ (Fore) 族および近隣種族を数十年にわたって打ちのめしてきたクールーは、儀式として行われる食人風習に伴う感染によって蔓延したと考えられている (Alpers, M. P., 「神経系の遅発性伝染病 (Slow Transmissible Diseases of the Nervous System)」、第1巻、S.B. PrusinerおよびW.J. Hadlow編 (New York ; Academic Press)、pp. 66~90 (1979))。

【0007】

実験用霊長類へのCJDの初期の伝染には、ウィリアムハドロー (William Hadlow) によるクールーとスクレイピーとの間の類似性の認識に始まる多くの歴史がある。1959年に、ハドロー (Hadlow) は、クールーで死亡した患者由来の抽出物

を非ヒトの霊長類へ接種し、長い潜伏期間の後に、該動物に予想された疾患が観察されることを示した (Hadlow.W.J. (1959) Lancet 2:289~290) 7年後、ガイドユセック (Gajdusek)、ギブス (Gibbs) およびアルパース (Alpers) は、18ヶ月~21ヶ月にわたる潜伏期間の後の、チンパンジーへのクールの伝染性を示した (Gajdusekら (1966) Nature 209:794~796)。クールの神経病理学とCJDの神経病理学との類似性 (Klatzoら (1959) Lab Invest. 8:799~847) により、チンパンジーにおける同様の実験が促され、疾患の伝染性が1968年に報告された (Gibbs.Jr.ら (1968) Science 161:388~389)。その後25年間の間、CJD、クール、およびGSSの約300の症例が、様々な類人猿およびサルに伝染された。

【0008】

このような実験の犠牲、不足、及びしばしば認められる残忍さは、この研究を制限し、従って知識の蓄積を制限した。信頼のおける伝染データのほとんどが非ヒト霊長類を用いた研究に派生すると言われる一方で、明らかにより不規則ではあるが、ヒトプリオン病の症例のいくつかは齧歯類にも伝染する (Gibbs, Jr.ら、「神経系の遅発性伝染性疾患 (Slow Transmissible Diseases of the Nervous System)」、第2巻、S.B. PrusinerおよびW.J. Hadlow編 (New York; Academic Press)、pp. 87~110 (1979); Takeishiら、「ヒトおよび動物のプリオン病 (Prion Diseases of Humans and Animals)」、Prusinerら編 (London: Ellis Horwood)、pp. 129~134 (1992))。

【0009】

パッチソン (Pattison) は、ヒツジと齧歯類との間のスクレイピー病原体の移行に関する研究の中で、ヒトプリオン病の齧歯類への伝染が稀であることを「種間障壁」の例として挙げている [Pattison, I.H., NINDB Monograph 2, D.C. Gajdusek, C.J., Gibbs, Jr.およびM.P. Alpers編 (Washington, D.C.: U.S. Government Printing)、pp. 249~257 (1965)]。以上の調査では、プリオンの1つの種から他の種への一次的移行には長期の潜伏期が必要であり、また発症に至る動物は稀であった。一方、同一種における二次的移行は、すべての動物が発症し、潜伏期間も著しく短いことが特徴である。

【0010】

シリアンハムスター (SHa) とマウスとの間にみられる種間障壁の分子的基盤はPrP遺伝子の配列にあることが、トランスジェニック (Tg) マウスを用いて示されている [Scottら、Cell 59:847~857 (1989)]。SHaPrPとMoPrPとは、254アミノ酸残基のうち16カ所が異なる [Baslerら、Cell 46:417~428 (1986) ; Lochtら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6372~6376 (1986)]。SHaPrPを発現しているTg (SHaPrP) マウスでは、SHaプリオンを接種した際の潜伏期に短縮が認められる。ヒトまたはヒツジPrPの導入遺伝子を発現したマウスで同じような試験を行った場合には種間障壁は解消されず、感染した動物の比率は極めて低く、潜伏期も極めて長い。したがって、例えばヒトプリオンの場合には、何らかの試料がプリオンに感染しているか否かを判定するために試料を確実に試験することを目的として、トランスジェニック動物 (別の種のPrP遺伝子を含むマウスなど) を用いることはできない。このような試験の欠如に起因する、健康への危険を以下に例示する。

【0011】

ヒト脳下垂体由来のHGHを投与された後にCJDを発症した若年成人は45人を上回る (Kochら、N.Eng.J.Med. 313:731~733 (1985) ; Brownら、Lancet 340:24~27 (1992) ; Fradkinら、JAMA 265:880~884 (1991) ; Buchananら、Br.Med.J. 302:824~828 (1991))。幸いなことに今日では組換えHGHが用いられているが、高HGHによって促進された野生型PrP^{sc}の発現の増大がプリオン病の発病を引き起こす可能性がわずかながらあることも指摘されている (Lasmezasら、Biochem.Biophys.Res.Commun. 196:1163~1169 (1993))。脳下垂体から調製されたHGHがプリオンにより汚染されたことは、サルに疑わしいロットのHGHを接種してから66カ月後にプリオン病が伝染したことから裏づけられる (Gibbs, Jr.ら、N.Eng.J.Med. 328:358~359 (1993))。プリオン病の潜伏期が長いいため、HGHを投与された世界中の数千人の人々における医原性CJDの実態は何十年もの間判明しないと考えられる。医原性CJDはまた、汚染されたヒト脳下垂体由来の性腺刺激ホルモンを投与された不妊症の4人の女性において (Healyら、Br.J.Med. 307:517~518 (1993) ; Cochiusら、Aust.N.Z.J.Med. 20:592~593 (1990) ; Cochiusら、J.Neurosurg.Psychiatry 55:1094~1095 (1992))、および、硬膜移

植を受けた少なくとも11人の患者において発症したと考えられる (Nisbetら、J. Am. Med. Assoc. 261 : 1118 (1989) ; Thadaniら、J. Neurosurg. 69 : 766 ~ 769 (1988) ; Willsonら、J. Neurosurg. Psychiatric 54 : 940 (1991) ; Brownら、Lancet 340 : 24 ~ 27 (1992))。これら医原性CJDの症例は、プリオンによって汚染された可能性のある医薬品のスクリーニングの必要性を強調する。

【0012】

近年、フランスの2人の医師が、死体から抽出した成長ホルモンを投与された小児に対する過失致死で告訴された。この小児はクロイツフェルト・ヤコブ病を発症した (New Scientist, July 31, 1993, 4ページを参照のこと)。パスツール研究所 (Pasteur Institute) によると、1983年から1985年中期の間にヒト成長ホルモンを投与された若年者において、1989年以来、24のCJDの発症例が報告されている。これらの小児のうち15人は死亡した。しかし現在においても、死体から抽出された成長ホルモンを投与されたフランスの小児数百人がCJD発病の危険にさらされていると考えられる (New Scientist, November 20, 1993, 10ページ参照)。さらに多くの人々がプリオンの存在について一度も試験されていない血液を与えられている。このような観点から、CJDを引き起こすプリオンを血液及び血液製剤から除去するための簡便で経済的な方法に対する需要は明らかに存在する。本発明はそのような方法を提供する。

【0013】

発明の概要

この発明の核心は試料に存在するタンパク質 (例えばPrP^{Sc}) の疾病コンフォメーションを単離し、特徴づけ、または望ましくは単に検出することを可能にする様式における (血液から得られた) 試料の調製である。全血は患者から採取される。血液は室温で凝血し、その後、血清を分離するため遠心分離にかけられる。分離された血清は、血清中でPrP^{Sc}と結合するホスホタングステン酸ナトリウム (PTA) のような錯化剤と接触させることによって、存在する任意のPrP^{Sc}濃縮を可能にする。PrP^{Sc}を含んでいると推定される濃縮された画分はさらに濃縮され、PrP^{Sc}は特徴づけられ、または望ましくはPrP^{Sc}が存在するかどうか決定するために単に分析される。PrP^{Sc}の検出はPrP^{Sc}で汚染された血液の使用を避けるこ

とを可能にする。驚いたことに、試料が血漿、血小板、または白血球から調製されて、プリオンの存在を試験する場合には陰性の結果が得られても、現在の発明に従って同じ血液から試験試料が調製された場合には、陽性の結果さえも得られる。このように、本明細書に開示される方法は、血液中に存在するプリオン、または別のタンパク質の病原性コンフォメーションを単離し、特徴づけ、望ましくは一つまたはそれ以上の異なった分析手段を使用して、それらを検出することを可能にする発明の前処理の方法である。

【0014】

本発明は、血液の量を得る段階、血液の量を凝血させる段階、凝血した血液から血清を分離する段階、血清を錯化剤と接触させてタンパク質の病原性コンフォメーションを有するタンパク質/薬剤の複合体を形成する段階、試料中に複合体を濃縮する段階を含む、試料の調製方法を含む。その濃縮された複合体は本発明で調製された試料である。この方法で試料を調製することによって、他の方法では決定され得ない血液の特徴を決定することが可能になり、調製された試料の分析を実施することができる。例えば、他の方法ではプリオンが検出され得ない調製された試料においても、プリオンタンパク質のような病原性形態のタンパク質の存在を決定することが可能である。その血液はいかなる哺乳動物からでも得ることが可能で、好ましくはタンパク質のコンフォメーションな変化に関する疾病をもつと推測される哺乳動物から得られる。例えば、その血液は、まだ疾病の症状がでていないが、コンフォメーションが変換したタンパク質の存在に関連した疾病、例えばPrPタンパク質のコンフォメーションが変化した形態、すなわち、プリオンに関連したプリオン関連疾病を有していると疑われている、ヒト、ウシ、またはヒツジから得られる可能性がある。

【0015】

試料を濃縮するための多くの異なった錯化剤や方法を使用することができるが、最も好ましくは、本発明は、ヒトまたは農場の動物に由来する血液のような血液中のプリオンの存在を決定するために実施される。本発明を実施し、試料を正しく調製するために、プリオンの存在を決定する場合には、その錯化剤は好ましくはホスホタンゲステン酸の塩、または最も好ましくはホスホタンゲステン酸ナ

トリウムである。さらに、試料の複合体の濃縮は多くの異なった方法で実施されるかもしれないが、好ましくは遠心分離を使用して実施される。発明の重要な局面は凝血を防ぐための抗凝固剤を使用するいかなる手順も使用せずに、血液を凝血させることである。血液を抗凝固剤の非存在下で滅菌された容器に室温で放置するような直接的な簡単な方法で、血液は凝血させることができる。その血液が凝血した後、好ましくは血清は遠心分離のような手順を用いて分離され、その後、血清はタンパク質の病原性コンフォメーションを有するタンパク質/薬剤の複合体を形成する錯化剤との接触に至る。このタンパク質/薬剤の複合体が形成された後、次にコンフォメーション的に変化したタンパク質の存在を分析されるような本発明における試料を得るために、複合体は遠心分離のような既知の手順によって濃縮される。

【0016】

本発明の第一の目的は、疾病コンフォメーションとして血液中に存在するタンパク質（例えばプリオン）を明らかにする試料調製方法を提供することである。この方法は、どのようにタンパク質が他の器官の中で特徴づけられるかではなく、血液の中に存在するようにこれらのタンパク質を単離し、特徴づけることを可能にする。

【0017】

本発明のもうひとつ別の目的は、プリオン形成を阻害する天然に存在する因子を明らかにするために必要とされる、最初の段階を含む方法を提供することであり、この阻害因子は、あるタンパク質の疾病コンフォメーションに関連する疾病（例えばプリオン病）の処置のための治療として、自然発生的な、または改良された形態で使用されうる。

【0018】

本発明のもう一つの目的は、試料が血液中にあるタンパク質の疾病コンフォメーション（例えばPrP^{Sc}）を検出するために、種々の技術を使って分析されることが可能な（本発明の方法によって生成された）試料を提供することである。

【0019】

本発明の目的は感染性のプリオン（PrP^{Sc}）が血液中に存在するかどうか決定

するための方法を提供することである。

【0020】

もうひとつ別の目的は血液試料を使って、プリオン関連の疾病の診断を確認する方法を提供することである。

【0021】

本発明の利点は、血液中のプリオンの検出のために分析される試験可能な試料を供給することである。

【0022】

本発明の特徴は、血液の血清のみがPrP^{Sc}を検出するための分析を実施するために使用することができることであり、すなわち、血液、血漿、血小板、および白血球を試験することにより偽の陰性の結果が提供される。

【0023】

もう一つの利点は、血液、血液製品、骨髄、および他の器官と組織（例えば、ヒトの移植手術に使用される）が試験可能であって、プリオンが存在しないことが確かめられる。

【0024】

もう一つの本発明の特徴は、試験に先だって本発明で処理された試料を提供するためのさまざまな異なった錯化剤が血清中の任意のPrP^{Sc}を濃縮するために使用されることが可能なことである。

【0025】

もう一つの本発明の特徴は、錯化剤がヘテロポリ酸もしくはその金属塩、またはペプチド、低分子、選択的にPrP^{Sc}を結合する抗体、およびPrP^{Sc}結合抗体のような生物薬剤でありうることである。

【0026】

もう一つ別の特徴は、好ましい錯化剤がホスホタングステン酸の金属塩であって、特に好ましくは、ホスホタングステン酸ナトリウムであることである。

【0027】

本発明のまた別の特徴は、その方法によって血液中のプリオンの存在が明らかにされ、それによって血液ならびに他の器官および/または組織からプリオン感

染性を除去するための精製手順を容易にすることである。

【0028】

本発明の他の目的は、本方法によって調製された試料を使用することによって、その溶解度、三次元構造、および感染性を含むタンパク質の特異的な特徴を決定するために形成された複合体において、その後さらに、タンパク質の存在を分析することである。

【0029】

発明の重要な利点は、タンパク質の病原性コンフォメーションが血液から抽出され、その後、脳組織のような他の組織から抽出された同様のタンパク質と比較することによって分析されることが可能であるということである。

【0030】

本発明の、これらおよびその他の目的、局面、利点、および特徴は、以下により詳しく述べる方法論の詳細を読むことにより、当業者には明らかになると考えられる。

【0031】

好ましい態様の詳細な説明

本試験試料、方法論、および構成要素について開示及び記載する前に、本発明は特定の試料、段階、錯化剤、タンパク質、標識、またはアッセイ法に限定されることなく、同様に、当然ながら変更されることが理解されねばならない。また、本明細書で用いられた専門用語は特定の態様の説明のみを目的としていて、限定することを意図したものではなく、本発明の範囲は添付する特許請求の範囲によってのみ制限されることが理解されねばならない。

【0032】

別に特記しない限り、本明細書で用いる科学技術用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者が一般に理解しているものと同一の意味を有する。本発明の実施または試験においては、本明細書に記載したものと同様または同等の任意の材料および方法を利用することができるが、好ましい方法および材料は以下に記載する。本明細書に記載した刊行物はすべて、その文献に関して引用される方法および/または材料を説明または開示する目的で、参照として本明細書に組み入

れられる。

【0033】

本明細書において考察された刊行物は、本出願の提出日の以前の開示のみのために提供される。本明細書中のいかなる記載も、先行発明の価値により、そのような出願に本発明が先行する権利を持たないことを認めたものと解釈されるべきではない。さらに、実際の出願日が本明細書において提供されたものと異なる場合、提供された出願日が変更されることがある。

【0034】

定義

「血清」という用語は、生体から血液を採血し、その血液をいかなる保存剤も加えずに容器に放置し、血液を凝血させることによって得られる、血液の一部を意味する。血漿は、その後、凝血から分離される血液の液体の部分である。凝血は可溶性タンパク質（フィブリノーゲン）から不溶性タンパク質（フィブリン）への変換によって形成される。フィブリンは固形物の中に血液の微粒子をもった繊維状物質の海綿状ネットワークを形成する。凝血は一般的に室温で10～15分かかかるが、採血された血液の特定のタイプおよびその血液が置かれた容器の形状によりさまざまである。広義の意味で「血清」という用語は、本明細書において凝血形成タンパク質も除去された血液中の非固形物質に関して使用される。血清と血漿の違いは、血清がフィブリンを含む凝血した血液によって形成されるのに対して、血漿はフィブリノーゲンを含み、抗凝固剤のために凝血しない血液から形成される。フィブリノーゲン試験は検体が血清かあるいは血漿かどうかを決定するために使用されうる。血清には、フィブリノーゲンが反応することなしに添加されうる。抗凝固された血漿の検体は、それらの採集後すぐに遠心分離される。抗凝固剤を加えない血液からの血清検体は、一般的に室温で少なくとも30分で凝血するはずである。凝血時間はガラスあるいはシリコン粒子のような物理的要素によって影響され、またトロンビンの添加によって短縮され得る。血漿を得るために、EDTA、クエン酸ナトリウム（緩衝されていても、または緩衝されていなくてもよい）またはヘパリンのような抗凝固剤が加えられる。比較例1～3では、緩衝されたクエン酸ナトリウムが抗凝固剤として使用される。血清を必要とする本発

明の方法では抗凝固剤は使用されない。

【0035】

本明細書中で用いられる「錯化剤」という用語は、収縮型タンパク質の高次構造（例えばPrP^S）および/または、開放型タンパク質の高次構造（例えばPrP^C）と、選択的に結合、または複合する任意の材料を指す。この錯化剤は、ペプチドもしくは抗体、例えばPrP^Sに選択的な抗体などの任意のコンフォメーションを有する（天然型または変性された）生物分子、または例えばリタングステン酸ナトリウムなど塩の形状でありうる、例えばリタングステン酸（PTA）などの化学薬剤であってよい。錯化剤は、単独でも、組み合わせも用いられ得る。例えば、生物学的錯化剤を、ペプチドおよび化学薬剤の使用などの化学的錯化剤と関係して用いてもよい。別の実施例においては、同じ種類の2つの錯化剤、例えばリタングステン酸（およびその塩）の混合体ならびにトリクロロ酢酸などを併せて使用することができる。形成された複合体は、錯化剤を表面に固定化するなど、組成物の残余から該複合体を分離するためのいくつかの手段を提供しなければならない。例えば錯化剤は、タンパク質または薬剤単独よりも高い比重を有する薬剤/タンパク質複合体を形成する所望のタンパク質（PrP^S）と結合する。従って、薬剤/タンパク質複合体を、好ましくは、遠心分離法を使用することによって補足された重力を介して分離することができる。PrP^Cに結合するより容易にPrP^Sに結合する錯化剤が好ましく、特に好ましい薬剤は、高い親和力でPrP^Sと結合し、PrP^Cと有意な濃度では結合しない。客観的には、好ましい結合剤は、PrP^Cに結合する2倍またはそれ以上の結合親和力でPrP^Sに結合し、好ましくは、PrP^Cに結合するより5倍またはそれ以上の結合親和力で結合する。

【0036】

本明細書中で用いる「タンパク質」という用語は、任意のアミノ酸配列を含み、糖タンパク質などの修飾配列を含むことを意図したものである。この用語は、天然に存在するタンパク質およびペプチドに加えて、組換え的又は化学的に合成されたものが含まれる。本発明と関連して用いられる場合、「タンパク質」という用語は、両方のコンフォメーションが同じかまたは実質的に同じアミノ酸配列を有するが、2つ又はそれ以上の異なる三次構造をとるような、少なくとも2種の

異なるコンフォメーションをとりうる天然に存在するタンパク質を特に意図したものである。タンパク質の2つのコンフォメーションは、疾患状態と関連しない少なくとも一つのコンフォメーションと、疾患状態と関連する（病原性の）少なくとも一つのコンフォメーションがある。本開示と関連して用いられるタンパク質の特異的かつ好ましい実施例は、PrP^c型と呼ばれる非疾患型と、PrP^{Sc}型と呼ばれる疾患型を含むPrPタンパク質である。プリオンタンパク質またはPrPタンパク質のPrP^{Sc}型は感染性かつ病原性であるが、他のタンパク質の疾患構造には病原性にもかかわらず感染性でない。本明細書で用いられる病原性という用語は、タンパク質が疾患を実際に引き起こすことを意味しうり、また、タンパク質が疾患と関連しており、従って疾病が存在する場合に存在することを単に意味しうる。したがって、本開示と関連して用いられる病原性タンパク質は、必ずしも疾患の特異的原因薬剤となるタンパク質ではない。

【0037】

「PrPタンパク質」「PrP」などの用語は本明細書内で互換的に用いられ、ヒトおよび動物に疾患（海綿状脳症）を引き起こすことが知られている感染性粒子型PrP^{Sc}、及び適切な条件下で感染性PrP^{Sc}型に変換される非感染型PrP^cの両方を意味するものとする。

【0038】

本明細書内で本発明者らが互換的に用いる「プリオン (prion)」、「プリオンタンパク質」、及び「PrP^{Sc}タンパク質」などという用語は、PrPの感染性PrP^{Sc}型を指し、「タンパク質 (protein)」および「感染 (infection)」の2つの単語をつなげて短縮したものである。そのみではないにしても、粒子の大部分はPrP遺伝子によってコードされるPrP^{Sc}分子からなる。プリオンは一般的にPrP^{Sc}の二量体である。プリオンは、細菌、ウイルスおよびウイロイドとは異なる。既知のプリオンは、動物に感染して、ヒツジおよびヤギの神経系の感染性変性疾患であるプリオン疾患「スクレイピー」のほか、「ウシ海綿状脳症」(BSE)又は「狂牛病」、およびネコの「ネコ海綿状脳症」を引き起こす。ヒトが罹患するプリオン病としては、(1)クールー、(2)クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、(3)ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病(GSS)、および(4)致死性家族

性不眠症 (FFI) の4種類が知られている。本明細書で用いられる「プリオン」とは、以上の疾患のすべてもしくは任意の1つ、または用いられる任意の動物、特にヒトおよび家畜動物における他の疾患を引き起こすすべての型のプリオンを含む。

【0039】

「PrP遺伝子」という用語は、本明細書内で既知の多型性及び病原性変異体を含むPrPタンパク質を発現する遺伝的材料を説明するために用いられる。「PrP遺伝子」という用語は一般に、任意の型のPrPタンパク質をコードする、任意の種における任意の遺伝子を指す。一般的に知られたいくつかのPrP配列は、ガブリエル (Gabriel) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9097~9101 (1992)、及び米国特許第5,565,186号、同第5,763,740号、同第5,762,901号、及び国際公開公報第97/04814号に記載されており、これはこのような配列を開示および説明するために参照として本明細書に組み入れられる。PrP遺伝子は、本明細書中に記載された「宿主」及び「試験」動物を含む任意の動物ならびにその任意の及び全ての多型及び変異体に由来することができ、その用語は未だ発見されていない他のこのようなPrp遺伝子遺伝子を含むと認識される。

【0040】

「抗体」という用語は、抗原と結合する能力を持つ免疫グロブリンタンパク質を意味する。本明細書中で用いられる抗体とは、抗体全体のほかに、関心対象のエピトープ、抗原または抗原性断片と結合しうる任意の抗体断片 (例えば、F(ab)'、Fab、Fv) も含むことを意図している。本発明のアッセイ法のために好ましい抗体は、PrPタンパク質に対する免疫反応性または免疫特異性を有し、したがって、関心対象のタンパク質、例えばPrPタンパク質と特異的および選択的に結合し、PrP^{Sc}タンパク質又はPrP^{Sc}二量体と特異的に結合する。天然非疾患型及び疾患型の両方に対して (例えば天然PrP^Cおよび天然PrP^{Sc}の両方に対して) 免疫反応性または免疫特異性を有する抗体が用いられ得る。PrPに対する抗体は、好ましくは免疫特異的であり、たとえば関連物質と実質的に交差反応的でない。本発明に関連して用いられ得る特異的抗体のいくつかは、公布された国際公開公報第97/10505号において開示され、これは、抗体の開示及び記載のために参照とし

て本明細書に組み入れられている。公布されたこのPCT出願は1998年12月8日に公布された米国特許第5,846,533号と対応し、これも又参照として本明細書に組み入れられる。「抗体」という用語は、すべての種類の抗体、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ファージディスプレイ法によって作製されるものなどを含む。本発明の特に好ましい抗体は、天然PrP^cおよびPrP^{Sc}の両方に対して比較的高度の親和性を有する抗体であり、PrP^{Sc}に対してより高度の親和性を有する抗体が好ましい。本発明の抗体は、本明細書において定義されたような「錯化剤」である。

【0041】

PrP^cに結合する抗体はモノクローナル抗体263K 3F4であり、1986年10月8日にアメリカン・タイプカルチャー・コレクション (American Type Culture Collection)、12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852に寄託され、1989年2月21日に公布された米国特許第4,806,627号で開示及び記載されたハイブリドーマ細胞株ATCC HB9222から作製され、これらは、PrP^cに選択的に結合するがPrP^{Sc}には結合しない抗体を開示するために参照として本明細書に組み入れられる。

【0042】

「精製された抗体」とは、天然の状態では付随しているような、他のタンパク質、炭水化物および脂質を実質的に含まないものを意味する。このような抗体は、PrP^{Sc}タンパク質（またはその抗原性断片）と「優先的に結合」し、他の抗原的に関連のない分子を実質的に認識せず、結合しない。本発明の精製された抗体は、好ましくは特定の種に対して免疫反応性および免疫特異性を、より好ましくは天然PrP^{Sc}に対して免疫特異性を有する。

【0043】

タンパク質（例えば、PrPタンパク質）の「抗原性断片」とは、抗体と結合できるようなタンパク質の部分を意味する。

【0044】

「特異的に結合する」とは、特定のポリペプチド、例えばPrP^{Sc}などのタンパク質のエピトープに対する、抗体の高結合活性および/または高親和性の結合を意味する。この特定のポリペプチド上のエピトープに対する抗体の結合は、好ま

しくは任意のその他のエピトープ、特に関心対象の特定のポリペプチドに付随するか、または同一試料中にある分子中に存在しうるものに対する同じ抗体の結合よりも強く、例えば、PrP^{Sc}などのタンパク質のエピトープ断片に対してより強く結合するため、結合条件を調整することにより、PrP^{Sc}のエピトープ断片など所望のタンパク質のエピトープ部位または断片とほぼ独占的に結合する。

【0045】

「検出可能的に標識された抗体」、「検出可能的に標識された抗PrP」又は「検出可能的に標識された抗PrP断片」とは、検出可能な標識が結合された抗体（または結合特異性を保持する抗体断片）を意味する。検出可能な標識は、通常化学的接合により結合されるが、標識がポリペプチドの場合、代替的に遺伝子工学的技法により結合されてもよい。検出可能的に標識されたタンパク質の製造法は、当技術分野において周知である。検出可能な標識は当技術分野において周知であるが、通常は放射性同位元素、フルオロフォア、常磁性標識、酵素（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ）、または、検出可能なシグナル（例えば放射能、蛍光、色）を放出する、もしくは標識をその基質に曝露した後に検出可能なシグナルを放出するかどちらかの、他の成分もしくは化合物である。多様な検出可能な標識/基質の対（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ/ジアミノベンジジン、アビジン/ストレプトアビジン、ルシフェラーゼ/ルシフェリン）、抗体標識法、標識抗体の使用法が、当技術分野において周知である（例えば、Harlow及びLane編「抗体：実験室マニュアル(Antibodies: A Laboratory Manual)」(1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYを参照のこと）。ユーロピウムは、特に好ましい標識である。

【0046】

本明細書で使用される略語は、以下を含む：

CNSは、中枢神経系を指す；

BSEは、ウシ海綿状脳症を指す；

CJDは、クロイツフェルト ヤコブ病を指す；

FFIは、致死性家族性不眠症を指す；

GdnHClは、グアニジン塩酸塩を指す；

GSSは、ゲルシュトマン-シュトラスラー-シャインカー病を指す；

Huは、ヒトを指す；

HuPrPは、ヒトプリオンタンパク質を指す；

Moは、マウスを指す；

MoPrPは、マウスプリオンタンパク質を指す；

SHaは、シリアンハムスターを指す；

SHaPrPは、シリアンハムスタープリオンタンパク質を指す；

PrP^Sは、プリオンタンパク質のスクレイピーアイソフォームを指す；

PrP^Cは、プリオンタンパク質の細胞に一般的に含まれる正常なアイソフォームを指す；

PrP^{CJD}は、PrPタンパク質のCJDアイソフォームを指す。

FVBは、FVBマウスの卵が比較的大きく外因性DNAの微量注入に比較的許容性があるため、トランスジェニックマウス作製にしばしば用いられる、マウスの標準近交系統を指す；

[PrP]は シート構造におけるプリオンタンパク質の濃度を指す；

[DRC]はタンパク質の、疾患関連性のコンフォメーションの濃度を指す；

PTAはリンタングステン酸を指す；

NaPTAはリンタングステン酸ナトリウムを指す；

TCAはトリクロロ酢酸を指す；

ACはアフィニティークロマトグラフィーを指す。

【0047】

本発明の一般的局面

プリオンを検出するためのアッセイ法は開発中であるが、未だ商品化されていない。また、このようなアッセイ法の費用、利便性または（大規模な）精度は未だ決定されていない。したがって、ヒト血漿などの材料がプリオンを含むと疑われる場合、それは破棄される。英国内においてヒト血漿の供給経路が断たれたことを示す、1998年11月25日付のウォールストリートジャーナル紙（The Wall Street Journal）の第一面の「狂牛病に対する不安により英国では献血血液のすべての部分を破棄した（Mad Cow' Fears Leads U.K. to Destroy Parts of all Don

ated Blood)」と題された記事を参照のこと。このような劇的な措置がとられた理由は、(1)プリオンが、そのヒト血漿内に存在しうること、(2)プリオン病が致死的かつ現時点で治療不可能であること、(3)現時点で、市販のプリオン検査法が存在しないこと、及び(4)現時点で、試料からプリオンを除去する市販の方法が存在しないことである。本発明は、例えばPrP^{Sc}などのタンパク質コンフォメーションに関連する疾患の存在を試験するような、さらなる解析を行うことが可能な様式で、試料を調製するための方法を含む。

【0048】

PrP遺伝子により発現するタンパク質などいくつかのタンパク質は、複数のコンフォメーションをとる。例えばPrPタンパク質は、その細胞型すなわちPrP^C型又はスクレイピー型すなわちPrP^{Sc}型が想定されうる。ある型タンパク質は無害である(例えばPrP^C)が、別の型タンパク質は病原性である(例えばPrP^{Sc})。PrP^{Sc}などの収縮した病原性の型タンパク質が動物内に極めて少量存在する場合、該動物は疾患の症状を示さない(例えば、ヒト、ウシ、ヒツジ、ブタ、またはニワトリ)。しかし該動物は、病原型の該タンパク質に関連した疾患、すなわちプリオン病にかかると考えられる。疾患の感染の恐れを避けるためには、体液中、及び特に被験者に導入されうる体液(例えば血液製剤)中に存在するすべてのPrP^{Sc}を除去することが重要である。本発明は、試料中にタンパク質の病原性コンフォメーションが存在するかどうか決定するための分析ができるように、特定の様式に試料を調製する点において有用である。タンパク質の病原性のコンフォメーションが検出される場合には、その血液の残余は破棄される。タンパク質の病原性コンフォメーションが検出されない場合には、その血液はそのまま使用、貯蔵、またはそれらから誘導される血液産物の生産に使われる。

【0049】

不溶性タンパク質に関する疾病

本明細書に提供された多くの開示や特定の例は、本発明の血液中における特徴づけられていないPrP^{Sc}に対する使用に関連している。しかしながら、先に示したように、本発明は2種類の異なったコンフォメーション形態であって、そのうちの一つは疾病と関連しているようなコンフォメーション形態をとっている、存

在する任意のタンパク質を特徴付けるか、またはそれを決定することに適用される。以下は、2種類またはそれ以上の異なったコンフォメーションをとっている不溶性タンパク質に関する疾病の非制限リストである。

疾患	不溶性タンパク質
アルツハイマー病	APP, Aβ ペプチド、 α -抗キモトリプシン tan , 非-A β 成分
プリオン病、クロイツェフェルド ヤコブ病、スクレイピー およびウシ海綿状脳症	PrP^{Sc}
ALS	SOD および神経線維
ピック病	ピック体
パーキンソン病	レウリー体
I型糖尿病	アミリン
多重性骨髄腫	
血漿細胞障害	IgGL-鎖
家族性アミロイド性	
多発性神経障害	トランスセレチン
甲状腺髄質上皮癌	
	プロカルシトニン
慢性腎不全	β_2-ミクログロブリン
充血性心不全	心房性ナトリウム排泄増加性因子
老人性心臓病および 全身性アミロイド症	トランスセレチン
慢性炎症	血清アミロイドA
アテローム性動脈硬化症	ApoA1
家族性アミロイド症	ゲルソリン

【0050】

上記のリストに記載されている不溶性タンパク質はそれぞれ、多くの変化や変異を含んでおり、それは、現在までの異なる種類が全て網羅されるということに注意すべきである。プリオン病に関連したPrP遺伝子における既知の病原性変異や多形性は以下に与えられており、ヒト、ヒツジ、ならびにウシの配列は1996年10月15日発行の米国特許第5,565,186号に与えられている。

【0051】

【表】 変異表

病原性ヒト変異	ヒト多型性	ヒツジ多型性	ウシ多型性
2 オクタブピート挿入	コドン 129 Met/Val	コドン 171 Arg/Glu	5 又は 6 オクタブピート
4 オクタブピート挿入	コドン 219 Glu/Lys	コドン 136 Ala/Val	
5 オクタブピート挿入			
6 オクタブピート挿入			
7 オクタブピート挿入			
8 オクタブピート挿入			
9 オクタブピート挿入			
	コドン 102 Pro-Leu		
	コドン 105 Pro-Leu		
	コドン 117 Ala-Val		
	コドン 145 Stop		
	コドン 178 Asp-Asn		
	コドン 180 Val-Ile		
	コドン 198 Phe-Ser		
	コドン 200 Glu-Lys		
	コドン 210 Val-Ile		
	コドン 217 Asn-Arg		
	コドン 232 Met-Ala		

【0052】

このようなタンパク質は同じアミノ酸配列で2種類の異なった3次元構造をとっていることにも注意すべきである。一つのコンフォメーションは疾病の特徴と関連し、一般的には不溶性である一方、もう一つのコンフォメーションは疾病の特徴とは関連せず、可溶性である。本発明の方法論はリストにあげられた疾病、タンパク質、および種類に制限されることはない。

【0053】

一般的な手順

本発明の核心は、例えば、タンパク質の疾病コンフォメーションの存在を分析されるか、または例えば、PrP^{Sc}の存在を分析されるような、調製された試料がその後さらに解析されるように試料が調製されることを可能にする処理段階を決定することにある。試料が本発明に基づいて正しく調製されれば、多くの異なった分析方法が興味の対象となっているタンパク質の検出に使用されうる。しかしながら、試料が本発明に基づいて調製されない場合には、既知の分析方法は偽

の陰性の結果を提供すると思われる。

【0054】

簡潔に言えば、本発明ははじめに、血液試料を得る段階と、その血液を凝血させる段階とを含む。血清を分離し、血清を興味の対象となっているタンパク質と薬剤/タンパク質複合体を形成する錯化剤とで処理する。複合体の形成は興味の対象となっているタンパク質の濃縮を、たとえば、その比重を増加させることで容易にさせ、それによって複合体を遠心分離によって分離することで行うことができる。この時点で、試料は適切に調製されており、例えば、興味の対象となっているタンパク質の存在を任意の既知の方法、またはこれから開発される方法によって試験するなどして、さらに解析することができる。

【0055】

本発明の試料を調製するために使用される血液は、いかなる血液であってもよいが、好ましくは、ヒト、または国内の農場での動物、例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、またはニワトリである。血液を凝血させることが重要であるが、凝血を行うにあたり特別な手順は必要としない。血液は単純に室温（好ましくは、滅菌されたガラス製の容器中で）で放置することで凝血が観察される。もちろん、いかなる抗凝固剤、抗凝血薬剤など、または凝血を阻害するであろう他の化合物も添加していないことが重要である。凝血に關与する血液中のタンパク質はそれによって取り除かれ、これらのタンパク質の除去は、その凝血形成タンパク質が興味の対象となっているタンパク質の検出を何かしら阻害するかもしれないという点において、試料調製に対して重要であると思われる。ひとたび凝血が形成されれば、血清は既知の手順、たとえば、血清が凝血から明瞭に分離され、血清が試料の上部から流し出せるまで試料を遠心分離することにより分離される。

【0056】

血清が得られた後、血清は、興味の対象となっているタンパク質が濃縮されるような方法で処理される。これは、好ましくは、錯化剤あるいは興味の対象となるタンパク質のいずれかよりも高い比重を有する薬剤/タンパク質複合体を形成する錯化剤を加えることによって行われる。それ故、その複合体は試料の中で沈降し、その速度は遠心分離により大きく加速される。

【0057】

末端使用 (end use)

試料が、ひとたび本発明に従って調製されると、試料は多くの可能な末端での使用法を有する。例えば、試料は単に、興味の対象となっているタンパク質（たとえばプリオン）を、試料中に存在するかどうかを決定するための、更なる解析を行うためにだけに使用することができる。しかしながら、本発明は、他の可能な末端使用法の範囲を提供している。例えば、試料は、錯化剤と複合体を形成するタンパク質の特異的な特徴付けを行うために使用することができる。タンパク質のキャラクタリゼーションは有用な情報を与える。その特徴はタンパク質の溶解度、3次元構造、および感染性を決定することを含んでいる。これらの特徴は他と同様、そのタンパク質が脳組織から抽出され単離されたときのように、異なった器官あるいは組織から抽出されたタンパク質の同様に決定されたキャラクタリゼーションと比較することができる。

【0058】

ここでは、なぜ本発明が機能するかに関して結論的な断定をすることができない。従って、本発明の範囲は、基礎をなすメカニズムを説明するいかなる特定の理論によっても束縛されることはない。にもかかわらず、凝血形成に含まれるタンパク質は、病原性コンフォメーションの形成に対して阻害的な効果を持つように見える。または、凝血を形成しているタンパク質は何か他の阻害剤、またはタンパク質の病原性形態を形成させる因子を除去する。このような場合を仮定すれば、この阻害剤の単離は、疾病に対して貴重な療法を提供する。阻害剤は、病原性形態のタンパク質に関連した疾病の兆候に初めて気づいた後、ヒトを含むいかなる哺乳動物に対しても投薬されうるであろう。このような阻害剤の投薬は、更なる病原性形態のタンパク質の形成を阻害し、それによって、疾病の進行を停止させることであろう。

【0059】

錯化剤

一つの態様において、ヘテロポリ酸（例えばPTA）などの化学薬剤、又は好ましくはその金属性塩（NaPTA）が錯化剤である。試料中の実質的にすべてのPrP^{Sc}。

がPTAと複合体を形成するのに十分な時間、試料を錯化剤に曝す。例えば試料は、約30 ~ 45 (好ましくは37) で約1時間~16時間インキュベートされうる。錯化剤は、PrP^{Sc}と複合体を形成する。重要なことは、形成された複合体が、例えば、濾過、磁場の利用、沈降などの何らかの方法により試料の残りから分離されうるということである。

【0060】

本発明の方法は、PrP^{Sc}または他の病原性タンパク質が得られた試料中に実質的に濃縮されている生物試料を提供する。

【0061】

本発明における錯化剤として有用な化合物には、抗体、酵素、ペプチド、化学種、結合分子などが含まれる。これらの錯化剤は、血清中のプリオンの結合および濃縮を可能にし、無傷の血清の必須要素を完全に維持するような方法、例えば細胞の形態とタンパク質の完全性を保持するような方法で使用される。

【0062】

化学薬剤

本発明の一つの態様において、生物材料からプリオンを除去するための化合物は、PrP^{Sc}を沈殿させる化学薬剤である。本発明における錯化剤として使用するために好ましい種類の化学薬剤の一つが、ヘテロポリ酸およびその塩である。ヘテロポリ酸は、少なくとも1個の中心成分と少なくとも1個の配位成分をもつオキシアニオン (oxyanion) が、完全にまたは部分的にプロトン化されたものである。ヘテロポリ酸は、ケギン (Keggin) 構造またはドーソン (Dawson) 構造をとってよい。

【0063】

ヘテロポリ酸の特定の種類は、プロトン化された型のヘテロポリモリブデン酸塩である。これらの陰イオンは、1個または複数の中心原子の周囲に2個~18個の六価モリブデン原子を含む。約36個の異なる成分が、これらヘテロポリモリブデン酸塩の中心原子として同定されている。これら陰イオンは、いずれも高度に酸素化されている。ヘテロポリモリブデン酸塩の例には、 $[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]^3$ 、 $[\text{As}^2\text{Mo}_{18}\text{O}_{60}]^3$

$_{62}]^6$ 、 $[\text{TeMo}_6\text{O}_{24}]^6$ があり、中心原子はそれぞれ P^{5+} 、 As^{5+} 、 Te^{6+} である。ヘテロポリモリブデン酸塩に関するより詳細な考察は、「カーク-オズマ化学技術百科事典 (Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology)」、3版 ed., 15, 688 ~ 689 (1981) において提供される。

【0064】

プロトン化された型のヘテロポリモリブデン酸塩に類似した、ヘテロポリ酸の別の種類は、プロトン化型のヘテロポリタングステン酸塩である。ヘテロポリタングステン酸塩では、配位成分がモリブデンではなくタングステンである。その全ての開示が明確に参照として本明細書に組み入れられている、米国特許第4,376,219号では、多様なヘテロポリ酸の調製について検討されている。これらのヘテロポリ酸の中心元素は、P、Si、B、Ge、As、Se、Ti、Zr、Mn、F、V、Ce、及びThからなる群より選択されうる。このようなヘテロポリ酸の配位元素には、Moおよび/またはWが含まれる。最適な配位元素には、V、Mn、Co、Ni、Cu、Zn、及びFeが含まれうる。中心原子数に対する配位元素数の比は2.5 ~ 12であってよく、好ましくは9 ~ 12であってよい。米国特許第4,376,219号に例示されている特定のヘテロポリ酸は、リンタングステン酸、ケイタングステン酸、10-タングスト-2-バナドリン酸、6-タングスト-6-モリブドリン酸、リンモリブデン酸、ケイモリブデン酸、ゲルマノタングステン酸、タングストフッ素酸、18-タングスト-2-リン酸に加えて、例えばNa塩、K塩、Mg塩、Ca塩などの金属塩といったこれらの酸類のすべてまたは一部の塩類を含む。本発明に使用する特定のヘテロポリ酸は、リンタングステン酸すなわち $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ とその金属塩、特にNaとの塩類である。このような錯化剤は PrP^{Sc} に効果的に結合する。

【0065】

これら化学薬剤を、単独でも、組み合わせても、また緩衝液や不活性な結合化学物質などの他の非生理活性化学物質と共に使用してもよい。本発明のヘテロポリ酸（例えばPTA）は、これに限定されるわけではないが、好ましくは金属塩状態で使用される。金属塩には、ナトリウム、カリウム、カルシウムなどが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0066】

血清中に添加されたヘテロポリ酸またはその塩の量は、血清中に存在するPrP^S°を実質的に濃縮するのに十分な量、好ましくは除去されるべき試料の一部において、PrP^S°を検出不可能な程度まで、または少なくとも非感染性の程度まで除去するために十分な量でなければならない。血清に対するヘテロポリ酸の重量比は、例えば約1:20から約1:1までであってよい。ヘテロポリ酸は、ヘテロポリ酸の適切な分散を提供することによって、ヘテロポリ酸の有効表面積を拡大させ、且つ複合体形成を増加させる任意の方法で血清と結合してよい。

【0067】

生物薬剤

別の態様においては、錯化剤は、PrP^S°に選択的に結合するタンパク質、ペプチド、又はその他の生体成分である。

【0068】

一つの態様においては、錯化剤は、プリオンに選択的に結合するように設計されたペプチドまたは他の小分子である。ペプチドや小分子は、PrP^S°に優先的に結合することが好ましい。「優先的に結合する」とは、ペプチドが、生物学的溶液中の他のタンパク質と比べて、少なくとも20倍またはそれ以上、より好ましくは50倍またはそれ以上、より好ましくは100倍またはそれ以上、そしてさらにより好ましくは1000倍またはそれ以上PrP^S°と結合する可能性があるように設計されたことを意味する。体液には一般に天然型のPrP^S°が含まれるため、本発明のペプチドは、好ましくは、変性型PrP^S°と対照的に、天然型PrP^S°に結合するように設計される。当業者により予想されうるように、PrP^S°の領域により結合が生じやすいようなペプチドを設計することで、ペプチドはPrP^S°への結合が最大となるように設計されうる。PrP^S°に結合する有用な抗体は、1998年12月8日に公布された米国特許第5,846,533号に開示および記載されており、これは、抗体と抗体作成法を開示および記載するために、本明細書において参照として組み入れられている。又は、PrP^CまたはPrP^S°及びPrP^Cの両方に選択的に結合するようにペプチドを設計してもよい。

【0069】

本発明の錯化剤はまた、プリオンに選択的な抗体であってもよい。この抗体は

、抗体と対象となるタンパク質とを結合させるような様式で、血清に添加されうる。このような抗体はPrP^{Sc}に結合し、例えば米国特許第5,846,533号に開示されている抗体である。試料中に存在するPrP^Cを除去するためには、PrP^Cに選択的または独占的に結合する抗体を利用しうる。このような抗体は、1986年10月8日に寄託されたATCC HB9222細胞系から作製されたモノクローナル抗体263K 3F4を開示する、1989年2月21日に公布された米国特許第4,806,627号に開示され、これは参照として本明細書内に組み入れられる。抗体を産生する細胞系を、アメリカン・タイプカルチャー・コレクション(12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852)から入手することができる。

【0070】

一般的に、スクレイピー感染により、同種由来のPrP^{Sc}に耐性のある宿主生物に対する免疫応答が起こらない。PrP^CまたはPrP^{Sc}のどちらかに結合する抗体は、米国特許第5,846,533号に開示されている。PrP^Cに結合するがPrP^{Sc}に結合しない任意の抗体を使用することができ、例えば米国特許第5,223,409号におけるファージディスプレイ抗体ライブラリの作製法などの周知の方法を用いて、当業者は該抗体を作製することができる。しかし、抗PrPポリクローナル抗体は、大量のギ酸またはSDSで変性したSHaPrP 27-30 (Bendheim、Barryら(1984) Nature 310:418~421; Bode、Pocchiariら(1985) J Gen Virol 66:2471~2478; Safar、Ceroniら(1990) Neurology 40:513~517)により免疫化し、ウサギにおいて作製される。同様に、PrP27~30に対する少量の抗PrPモノクローナル抗体が、マウス内で作製される (Barry、Prusinerら(1986) J Infect Dis 154:518~521; Kasc sak、Rubensteinら(1987) J Virol 61:3688~3693)。これらの抗体は、ギ酸またはSDSで変性したPrP27-30に対して作製され、SHaおよびヒトの双方に由来する天然PrP^C及び処理されたPrP^{Sc}または変性されたPrP^{Sc}を同等に認識できるが、MoPrPには結合しない。予想通り、これらの抗体のエピトープは、SHaとMoPrPのアミノ酸の差を含む配列の領域にマッピングされる (Rogers、Yehielyら(1993) Proc Nati Acad Sci USA 90:3182~3186)。

【0071】

本発明の目的のために、結合が起こらないということは、平衡定数又はアフィ

ニティ定数 K_a が、 10^6 l/molまたはそれ以下であることを意味する。更に、 K_a が 10^7 l/molまたはそれ以上、好ましくは 10^8 l/molまたはそれ以上のときは結合が存在すると認識される。 10^7 l/molまたはそれ以上の結合親和性は、(1)単独のモノクローナル抗体（すなわち多数の1種類の抗体）、又は(2)複数の異なるモノクローナル抗体（例えば多数の5種の異なる各モノクローナル抗体）、又は(3)多数のポリクローナル抗体に起因しうる。また(1)から(3)の組み合わせもまた可能である。選択された好ましい抗体であれば、天然型のPrP^{Sc}に対する結合と比べると、処理または変性されたPrP^{Sc}型タンパク質に対して、少なくとも4倍強く結合すると考えられる。結合親和性の4倍の差は、上記(1)~(3)の通り、複数の異なる種類の抗体の使用によりおこる可能性があり、このために、混合物中の抗体のいくつかにおいては、差は4倍に満たない。

【0072】

タンパク質の検出方法

試料が本発明に従って調製されると、試料を種々の既知の技術によって分析することができる。本明細書に提出された実施例と比較例は、1998年2月20日に出版された国際公開公報第98/37411号で開示され、記載されているタイプのコンフォメーション依存免疫分析(CDI)が使用されている。しかしながら、他のタイプのタンパク質検出方法も使用することもできると思われる。例えば、バイオアッセイ法またはプリオンの検出のために操作された特異的なトランスジェニックマウスを使うことも可能であろう。このようなマウスは、1996年10月15日発行の米国特許第5,565,186号、1998年6月9日発行の米国特許第5,763,740号、1998年8月11日発行の米国特許第5,792,901号で開示されている。または、調製された試料は、1998年12月8日発行の米国特許第5,846,533号で開示され、記載されているタイプの抗体を用いて分析することも可能である。これらの出版物は、本発明に従って調製された試料に使用されうる特定の分析タイプを開示し、記載するために、完全に参照として本明細書に組み入れられる。しかしながら、本発明はこのようなタンパク質分析方法論の使用に限定されないことを指摘する。他の分析方法も使用することができ、正確な結果を得るために本発明に従って調製した試料を使用することができる他の分析方法が、疑いなく開発されるであろう。

【0073】

コンフォメーション依存性免疫分析が高感度であるため、本明細書に記載された実施例は、この分析法を使用し、且つ結果が比較できるように、それによって試験されたそれぞれの実施例と同様な方法で使用する。その分析法の詳細は出版された国際公開公報第98/37411号で述べられてはいるが、その基本となる方法論はいま本明細書に示されている。

【0074】

その方法は、はじめに試料を2つの部分に分ける必要がある。試料の第1の部分は結合パートナーと接触させる。結合パートナーは、タンパク質の第2の病原性コンフォメーションよりもタンパク質の第1のコンフォメーションに対してより高い親和性を持っている。結合パートナーは典型的には、標識化された3F4のような抗体である。結合パートナーを第1のコンフォメーションにあるタンパク質と結合させた後、形成された結合パートナー/タンパク質複合体の濃度が決定される。

【0075】

試料のもう一つの部分は、その後、第2のコンフォメーションにあるタンパク質の結合親和性をその結合パートナーに関して増強するような方法で、処理される。この処理は、種々の異なった方法論を含んでいることがあり、しばしば、その試料を、十分な条件で十分な時間、タンパク質分解酵素にさらして、第2の病原性コンフォメーションにあるタンパク質をより弛緩させ、それによって結合パートナーに結合しやすくさせることが含まれる。

【0076】

処理された第2の部分はその後、結合パートナーとの接触に至る。タンパク質と結合パートナーとの結合を行わせた後、この第2の処理された部分において形成された結合パートナー/タンパク質複合体の濃度が決定される。

【0077】

試料が、タンパク質の第2の病原性コンフォメーションにあるタンパク質を含んでいないのであれば、その処理はほとんど効果を示さないであろう。しかしながら、その処理がタンパク質の第1のコンフォメーションにいくらかの効果があ

り、その結合パートナーに対する結合親和性をわずかに増加させる可能性がある。従って、調整された濃度を提供するために、調整は第2の濃度においてなされなければならない。この調整は、その処理の結果生じる第1のコンフォメーションのタンパク質の、結合パートナーに対する増加した親和性を補償するものである。

【0078】

第1の濃度と調整された濃度を得た後に、その2つの濃度は互いに比較される。調整後の濃度が第1の濃度よりも大きければ、これはもともとの試料において、第2の病原性コンフォメーションにあるタンパク質の存在の徴候を示す。

【0079】

コンフォメーション依存性免疫分析法における種々の別法も行うことができる。出版された国際公開公報第98/37411号に詳細に述べられている一つの別法は、もともとの試料を第1と第2の部分に分解することを必要としていない。処理過程は一つの試料で行われ、その濃度が決定される。その濃度は、試験されている試料がプリオンを含むかどうか決定するために、既知の標準（あらかじめ統計的に有意な集団の試料で得られた値）と比較される。

【0080】

実施例

以下の実施例は、当業者に対して、本発明の作製法および使用法の完全な開示および記述のために示したものであり、発明者らが、その発明と見なす範囲を限定することを意図したのではなく、以下の実験が、実施されたすべてのまたは唯一の実験であることを示すことを意図したものでもない。使用された数値（例えば、量、温度など）に関しては正確を期すよう努力したが、ある程度の実験誤差および偏差は考慮されねばならない。特に示された部分を除き、割合（part）は重量の割合、分子量は重量平均分子量、温度は摂氏、圧力はほぼ大気圧である。

【0081】

比較例1、2および3はプリオンを含む試料がそれぞれ、（1）白血球、（2）血小板、（3）血漿から調製されたとき、それぞれが偽の陰性の結果を示すこ

とを示している。しかしながら、試料が、本発明に従って、血清から調製されたとき（実施例4）には、真の陽性の結果が得られる。比較例1、2、3および実施例4のそれぞれでは、使用された錯化剤はホスホタングステン酸ナトリウムであった。さらに、調製されたそれぞれの試料は、コンフォメーション依存免疫分析（CDI）を用いて試験された。

【0082】

比較例

クエン酸ナトリウムで処理されたシリアハムスター血液の画分におけるPrP^{Sc}のためのコンフォメーション依存免疫分析（CDI）

凝固を阻害するために、シリアハムスターの全血は3.8% (w/v)の緩衝化されたクエン酸ナトリウムpH7.2と1：9で混合し、血漿を得るために、1100rpmで回転させて遠心分離し、Percoll勾配（Pharmacia）によって異なる画分に分離した。正常（対照）ならびにスクレイピー感染（スクレイピー）のシリアハムスター血液から得られた、白血球（WBC）、血小板、血漿は、次に、タンパク質分解酵素阻害剤の存在下で、PTAで沈殿させた。ペレットは、プリオンタンパク質（PrP^{Sc}）の感染性アイソフォームの存在をCDIによって試験された。クエン酸ナトリウムは凝血を阻害するために添加され、比較例を提供する。

【0083】

比較例1

白血球

PrP^{Sc}はスクレイピー感染シリアハムスターの白血球（WBC）中では検出できない。クエン酸化血液から得られたWBCは2% Sarcosylで透析され、ホスホタングステン酸ナトリウムで沈殿させた。それぞれの試料からの天然状態でのアリコート、および変性させたアリコートは、グルタルアルデヒド-活性化ELISAプレートにクロスリンクさせ、両者ともユーロピウムで標識化された3F4モノクローナル抗体とインキュベートさせた。7回の洗浄操作の後、シグナルはDiscovery（Packard Inc.）時間分解蛍光分光光度計で評価された。その結果は、それぞれの試料の変性状態のアリコートのシグナル（TRF_D）と天然状態のアリコートのシグナル（TRF_N）の比で表現される。

【0084】

比較例2

血小板

PrP^S°はスクレイピー感染シリアハムスターの血小板中では検出できない。クエン酸化血液から得られた血小板は2% Sarkosylで透析され、ホスホタングステン酸ナトリウムで沈殿された。それぞれの試料からの天然状態でのアリコート、および変性させたアリコートは、グルタルアルデヒド-活性化ELISAプレートにクロスリンクさせ、両者ともユーロピウムで標識化された3F4モノクローナル抗体とインキュベートさせた。7回の洗浄操作の後、シグナルはDiscovery (Packard Inc.) 時間分解蛍光分光光度計で評価された。その結果は、それぞれの試料の変性状態のアリコートのシグナル (TRF_D) と天然状態のアリコートのシグナル (TRF_N) の比で表現される。

【0085】

比較例3

血漿

PrP^S°はスクレイピー感染シリアハムスターの血漿中では検出できない。クエン酸化血液から得られた血漿は2% Sarkosylと混合され、ホスホタングステン酸ナトリウムで沈殿された。それぞれの試料からの天然状態でのアリコート、および変性させたアリコートは、グルタルアルデヒド-活性化ELISAプレートにクロスリンクさせ、両者ともユーロピウムで標識化された3F4モノクローナル抗体とインキュベートさせた。7回の洗浄操作の後、シグナルはDiscovery (Packard Inc.) 時間分解蛍光分光光度計で評価された。その結果は、それぞれの試料の変性状態のアリコートのシグナル (TRF_D) と天然状態のアリコートのシグナル (TRF_N) の比で表現される。

【0086】

実施例4

凝血した全血からの血清中におけるPrP^S°のためのコンフォメーション依存免疫分析 (CDI)

スクレイピー感染シリアハムスターの血清中におけるPrP^S°の明確な検出。 -2.

5を超える値が血清中でのPrP^{Sc}の存在を示している。正常（対照）またはスクレイピー感染（スクレイピー）のシリアハムスター血液は、ガラス管（Becton-Dickinson Inc.）で凝血させた。血清は凝血から3,000rpmの遠心分離で分離し、タンパク質分解酵素阻害剤で保護された。2 % Sarkosyl、0.8 ~ 1.2% (w/v) のホスホタングステン酸ナトリウム、および35 ~ 50 mMのMgCl₂を加えた後、試料は37度で一夜インキュベートし、14,000gで回転させて遠心分離した。得られたペレットは、再び懸濁され、天然状態と変性状態のアリコートに分けられた。それぞれのアリコートは、グルタルアルデヒド-活性化ELISAプレートにクロスリンクさせ、ユーロピウムで標識化された3F4モノクローナル抗体とインキュベートさせた。7回の洗浄操作の後、シグナルはDiscovery (Packard Inc.) 時間分解蛍光分光光度計で評価された。その結果は、それぞれの試料の変性状態のアリコートのシグナル (TRF_D) と天然状態のアリコートのシグナル (TRF_N) の比で表現される。それぞれのデータポイントは1回の実験を表している。

【0087】

実施例5

血清PrP^{Sc}試験の高い診断上の感度と特異性は、対照とスクレイピー感染シリアハムスターからのデータが全くオーバーラップしていないことから示される。プロット4からのデータは中央値（中央線）、50%（点線）、95%（外側の箱の線）で表してある。

【0088】

本発明は、本明細書において何がもっとも実用的であり、好ましい様態であるかを示し、記載している。しかしながら、そこから本発明の範囲内である新規の出発物が作製され、明らかな改良は、この明細書を読むことにより当業者によって考案されることが認識される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 プリオンを含んでいない対照からの白血球と、「スクレイピー」とラベルされたプリオンに感染した動物から採取された白血球についてのコンフォメーション依存性免疫分析法を行った結果を示したグラフである。手順と結果は比較例1に記述してある。

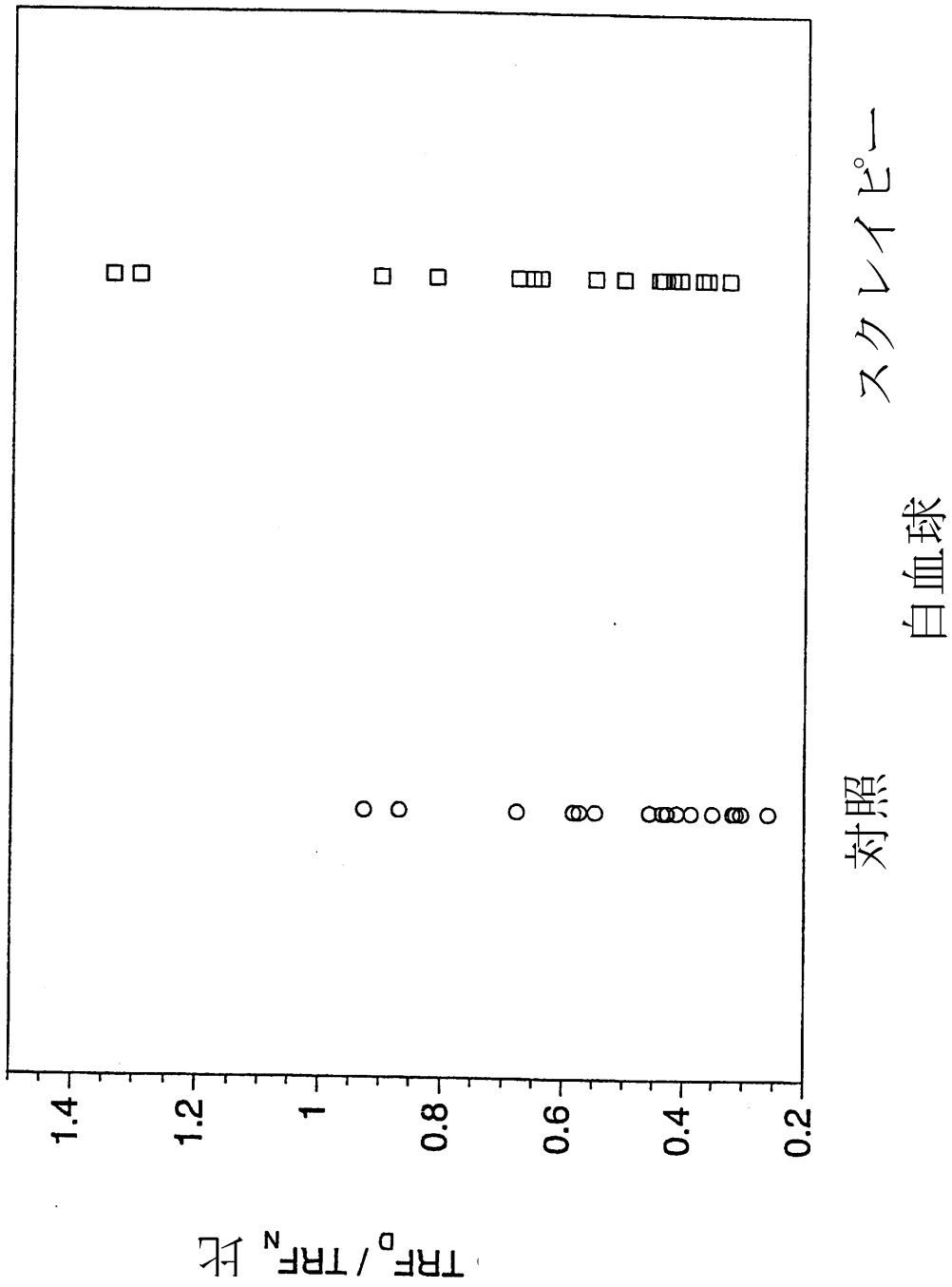
【図2】 プリオンを含んでいない対照からの血小板と、「スクレイピー」とラベルされたプリオンに感染した動物から採取された血小板について行われたコンフォメーション依存性免疫分析法の結果を示したグラフである。手順と結果は比較例2に記述してある。

【図3】 プリオンを含んでいない対照からの血漿と、「スクレイピー」とラベルされたプリオンに感染した動物から採取された血漿について行われたコンフォメーション依存性免疫分析法の結果を示したグラフである。手順と結果は比較例3にさらに記述してある。

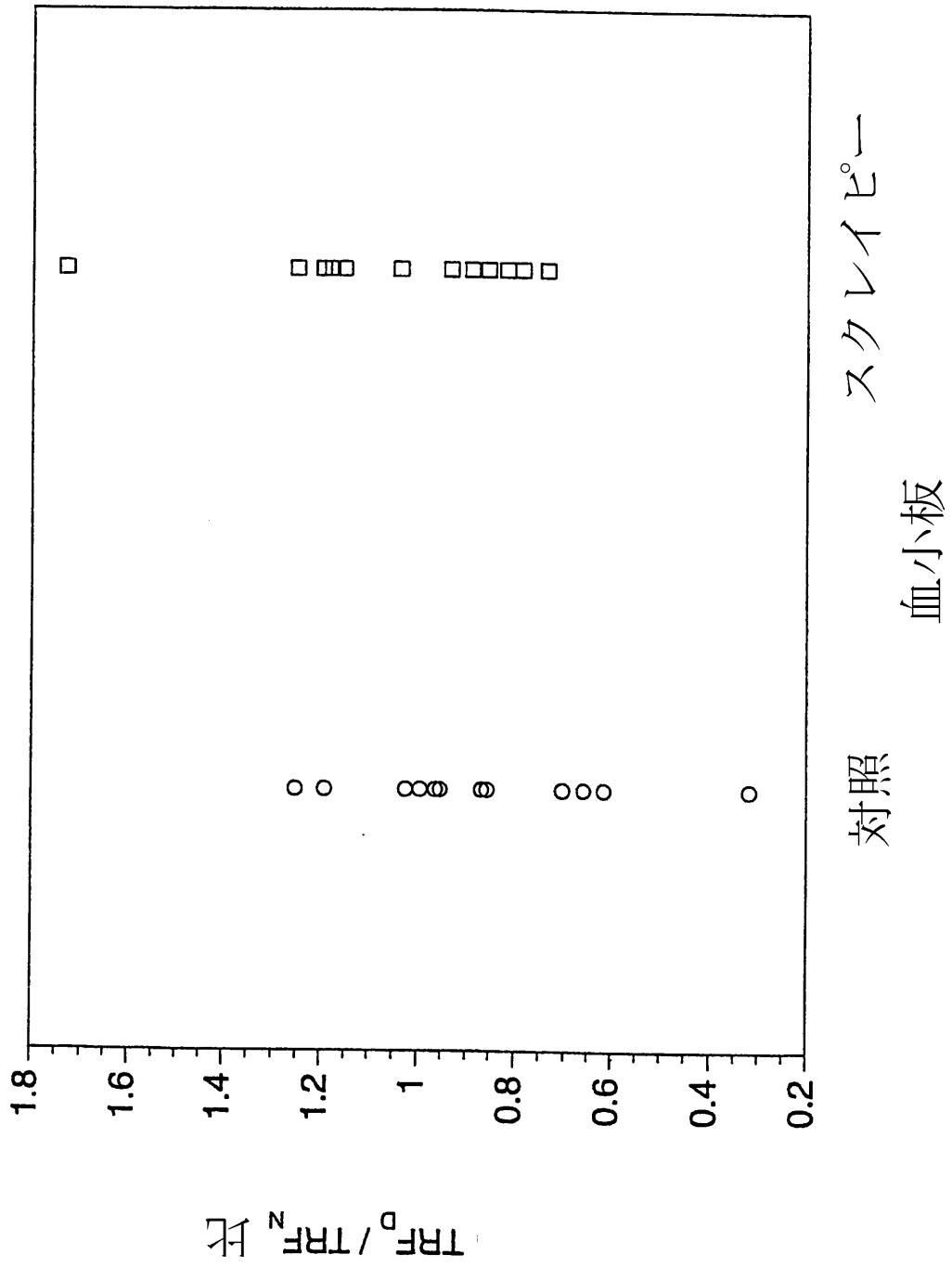
【図4】 本発明に従って調製された血清の試料について行われたコンフォメーション依存性免疫分析法の結果を示したグラフである。分析はプリオンを含んでいない対照について行われた。同様な分析が、プリオンに感染した動物から集められた血清について行われ、それは図4の中で「スクレイピー」とラベルされている。手順と結果は、実施例4にさらに記載されている。

【図5】 実施例4で得られ、図4で示されているデータを組み込んだグラフである。このグラフでは、中央値（中央線）、50%（点線）、および95%（外側の箱の線）が示されている。データは試験された対照血清と試験されたプリオン感染試料にオーバーラップがないことを明瞭に示している。

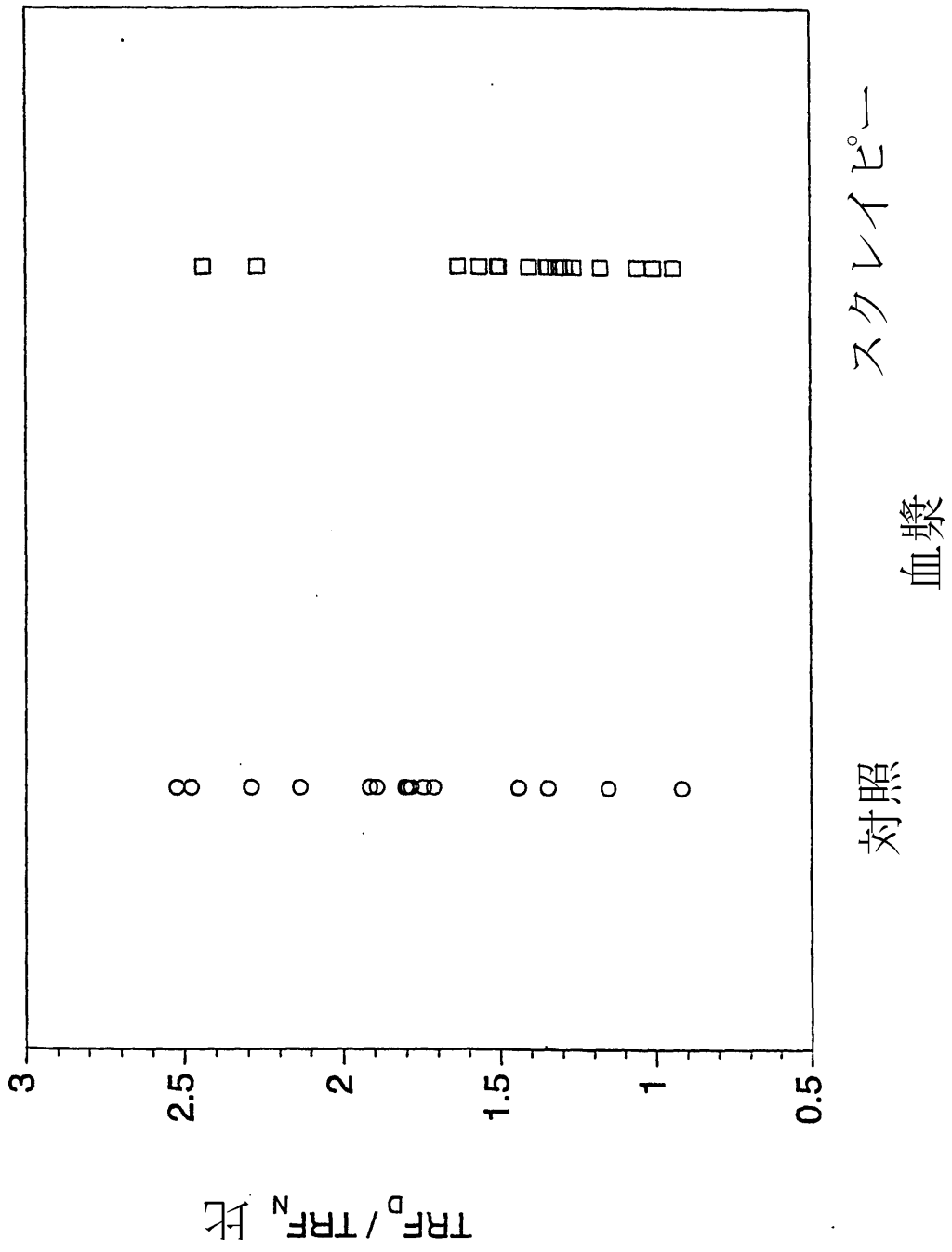
【図1】



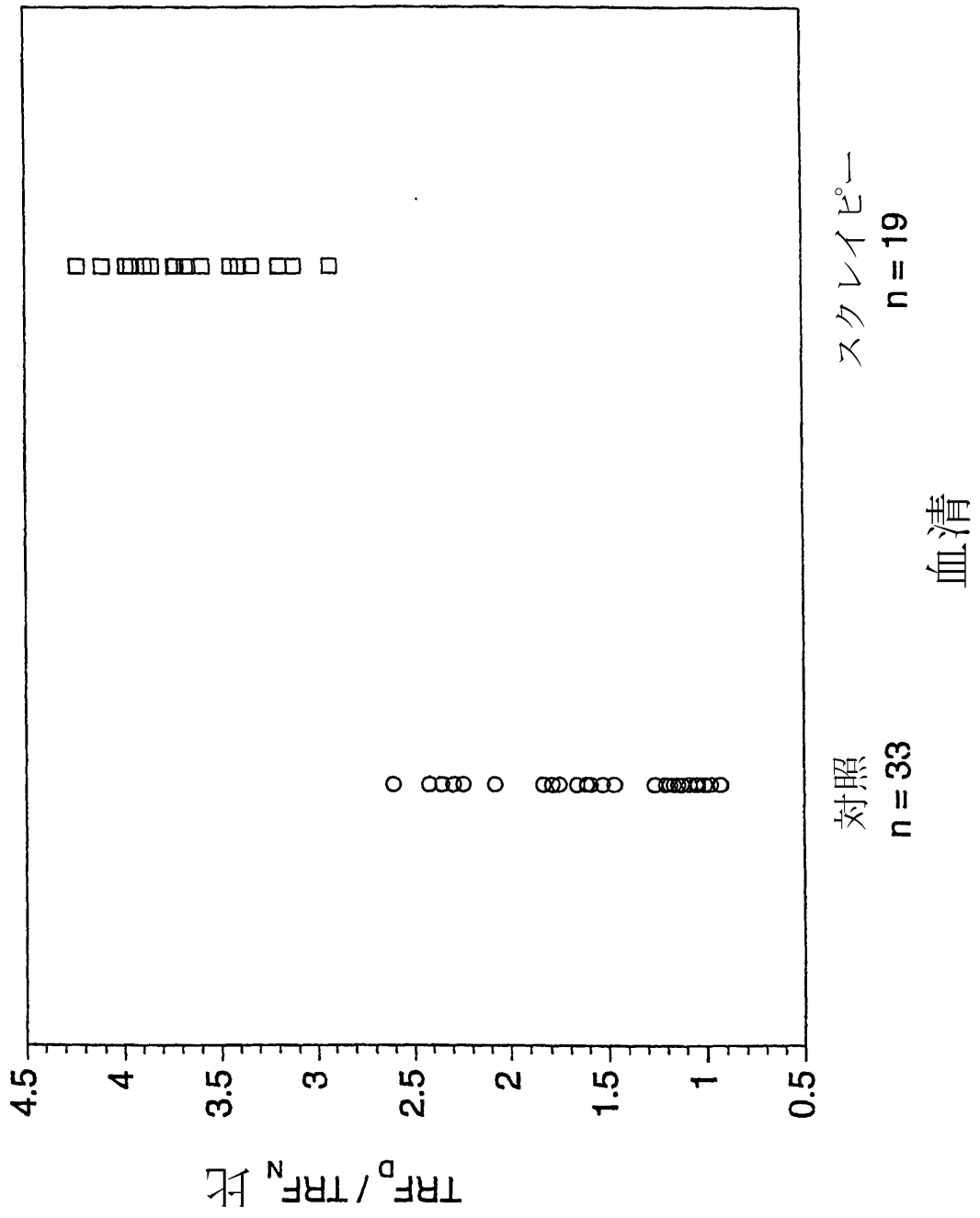
【図2】



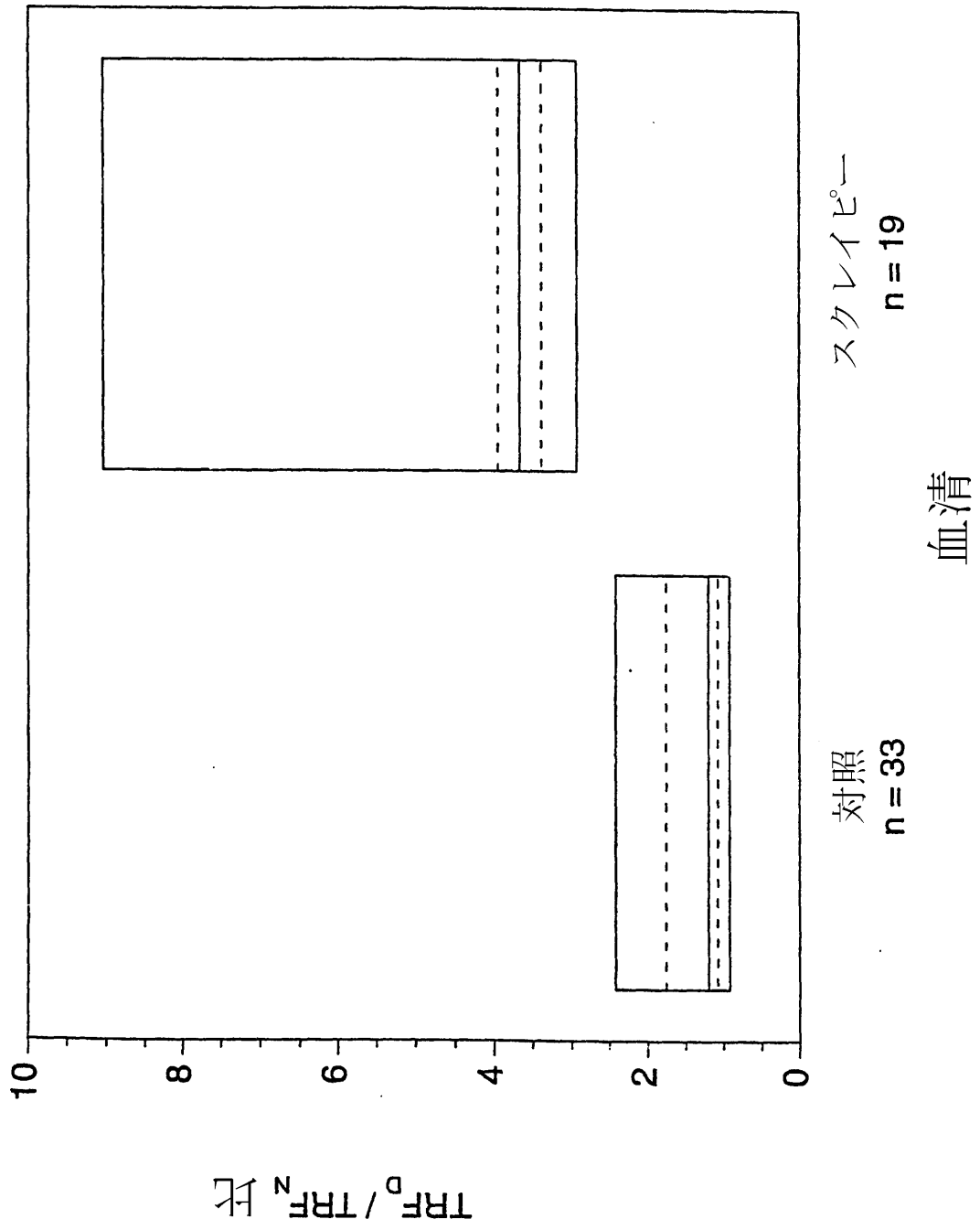
【図3】



【図4】



【図5】



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/US00/05259

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : Please See Extra Sheet. US CL : Please See Extra Sheet. 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) U.S. : 435/6, 23, 24, 188, 325; 436/2, 164, 181, 524, 526, 528, 531, 536, 538, 539, 541; 530/350, 413, 418; 536/23.1; 210/656, 661 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 practicable, search terms used) MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,236,604 A (FIEHLER) 17 August 1993 (17.08.93), columns 3 and 4.	1, 3, 18- 19, 21-22
Y	US 5,422,284 A (LAU) 06 June 1995 (06.06.95) columns 3 and 6.	1, 3, 18-19, 21-22
A,P	US 5,908,969 A (PRUSINER et al.) 01 June 1999 (01.06.99), see entire document.	1-24
Y,P	US 5,846,533 A (PRUSINER et al.) 08 December 1998 (08.12.98), columns 11-21.	5-13, 15, 20
Y	US 5,419,872 A (MONTGOMERY et al.) 30 May 1995 (30.05.95), see entire document.	1, 3, 18-19, 21-24
Y	US 5,750,361 A (PRUSINER et al.) 12 May 1998 (12.05.98), see entire document.	1-6, 10-14, 16-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"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
"B" earlier document published on or after the international filing date		"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
"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"A" document member of the same patent family
"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		
Date of the actual completion of the international search 21 APRIL 2000		Date of mailing of the international search report 29 JUN 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer GAILENE R. GABEL Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. lional application No. PCT/US00/05259
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,750,361 A (PRUSINER et al.) 12 May 1998, see entire document.	1-6, 10-14, 16-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/05259

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7):

C12Q 1/37; G01N 21/00, 31/00, 1/22, 33/544, 33/546, 33/551, 33/553

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

435/6, 23, 24, 188, 325; 436/2, 164, 181, 524, 526, 528, 531, 536, 538, 539, 541; 530/350, 413, 418; 536/23.1;
210/656, 661

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

专利名称(译)	制备用于分离朊病毒和PrPSc的血清样品		
公开(公告)号	JP2002538468A	公开(公告)日	2002-11-12
申请号	JP2000602807	申请日	2000-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
[标]发明人	プルシナースタンレイビー サファージリジー		
发明人	プルシナー スタンレイ ビー. サファー ジリ ジー.		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2800/2828 Y10S435/962 Y10S436/825 Y10T436/106664 Y10T436/107497 Y10T436/25 Y10T436/25125 Y10T436/2525 Y10T436/25375		
FI分类号	G01N33/48.B G01N33/53.D		
优先权	09/264148 1999-03-05 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

从血液中制备样品，其方式允许进一步分析样品中的蛋白质，例如检测样品中的病毒。收集血液，使其凝结，然后进行分离过程（例如离心）以获得血清。用络合剂处理血清，络合剂结合样品中的病毒，形成药物/蛋白质复合物，从而可以浓缩复合物。样品中复合物的浓度得到良好的分析结果，例如通过检测detecting病毒的分析方法显示不同类型的范围。

