

(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2003 - 534000

(P2003 - 534000A)

(43)公表日 平成15年11月18日(2003.11.18)

| (51) Int. Cl. <sup>7</sup>       | 識別記号 | F I            | テ-マコード* ( 参考 ) |
|----------------------------------|------|----------------|----------------|
| C 1 2 N 15/02                    | ZNA  | A 6 1 K 39/395 | D 4 B 0 2 4    |
| A 6 1 K 39/395                   |      |                | N 4 B 0 6 4    |
|                                  |      | A 6 1 P 25/28  | 4 B 0 6 5      |
| A 6 1 P 25/28                    |      | C 0 7 K 7/08   | 4 C 0 8 5      |
| C 0 7 K 7/08                     |      | 14/47          | 4 H 0 4 5      |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 33数 ) 最終頁に続く |      |                |                |

|             |                                 |         |                                                                                                                                       |
|-------------|---------------------------------|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21)出願番号    | 特願2001 - 587002(P2001 - 587002) | (71)出願人 | ブラッド・トランスフュージョン・センター・オブ・スロベニア<br>B L O O D T R A N S F U S I O N<br>C E N T R E O F S L O V E N I A<br>スロベニア国、1000 リュブリャナ、スライメリェーヴァ 6 |
| (86)(22)出願日 | 平成13年5月15日(2001.5.15)           | (72)発明者 | クリン・セルベック, ウラードカ<br>スロベニア国、1000 リュブリャナ、ポランスコヴァ 44                                                                                     |
| (85)翻訳文提出日  | 平成14年11月21日(2002.11.21)         | (74)代理人 | 弁理士 津国 肇 ( 外 1 名 )                                                                                                                    |
| (86)国際出願番号  | PCT/IB01/01666                  |         |                                                                                                                                       |
| (87)国際公開番号  | W001/090191                     |         |                                                                                                                                       |
| (87)国際公開日   | 平成13年11月29日(2001.11.29)         |         |                                                                                                                                       |
| (31)優先権主張番号 | 00111108.7                      |         |                                                                                                                                       |
| (32)優先日     | 平成12年5月23日(2000.5.23)           |         |                                                                                                                                       |
| (33)優先権主張国  | 欧州特許庁 (EP)                      |         |                                                                                                                                       |
|             |                                 | 最終頁に続く  |                                                                                                                                       |

(54)【発明の名称】 プリオン P r P S c イソ型を選択的に検出し得る抗体

(57)【要約】

本発明は、プリオンの P r P <sup>S c</sup> イソ型の C 末端部分に対する新規な抗体に関する。詳細には、本発明は、ウシ海綿状脳症 ( B S E )、クロイツフェルト・ヤコブ病の新しい異型形態 ( v C J D ) の診断におけるそのような抗体の使用に関する。加えて、本発明は、該抗体によって認識されるペプチド並びに、B S E、C J D、v C J D 及びその他の T S E 関連疾患の免疫付け及び / 又は処置におけるその使用に関する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 プリオンタンパク質のPrP<sup>Sc</sup>イソ型のC末端部分またはその一部によってもたらされる三次元立体配座に対して選択的に結合し得るが、PrP<sup>C</sup>形態には結合しない抗体。

【請求項2】 C末端部分が、およそアミノ酸番号190～アミノ酸番号214の範囲にあるプリオンポリペプチドの領域、好ましくはプリオンポリペプチドの番号202～214の範囲にあるプリオンポリペプチドの領域、またはその三次元立体配座を変化させることなく1つ以上のアミノ酸を置換もしくは除去もしくは付加することによって得られるその変化体を含む、請求項1記載の抗体。

【請求項3】 抗体により認識されるタンパク質配列が

**【表1】**

**-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-**

またはその一部である、請求項1または請求項2記載の抗体。

【請求項4】 ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体またはそれらのフラグメントである、前記請求項のいずれか一項記載の抗体。

【請求項5】 マーカーに連結されている、前記請求項のいずれか一項記載の抗体。

【請求項6】 ハイブリドーマ細胞株CNCMI-2476に由来する、請求項1または請求項2のいずれか一項記載の抗体。

【請求項7】 ウシ海綿状脳症またはクロイツフェルト・ヤコブ病またはクロイツフェルト・ヤコブ病の変異型形態またはTSE関連疾患を診断および/または処置するための、請求項1～6のいずれか一項記載の抗体またはその機能的部分の使用。

【請求項8】 BSEおよび/またはCJDおよび/またはvCJDまたはTSE関連疾患に対する薬物を製造するための、請求項1～6のいずれか一項記載の抗体の使用。

【請求項9】 BSE、CJD、vCJDまたはTSE関連疾患に対する能動的ワクチンおよび/または受動的ワクチンを製造するための、請求項1～6の

いずれか一項記載の抗体の使用。

【請求項10】 請求項1～6のいずれか一項記載の抗体を製造する方法であって、下記のアミノ酸配列：

【表2】

**-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-**

又は

**-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-**

を有するペプチド、または三次元立体配座が実質的に保持されるという条件のもとで1つ以上のアミノ酸を置換もしくは欠失もしくは付加することによって得られるその変異体の、免疫応答を誘発するために十分な量で動物を免疫化する工程を含む方法。

【請求項11】 請求項1～6のいずれか一項記載の抗体を含有する、BSEおよび/またはCJDおよび/またはvCJDまたはTSE関連疾患を診断し、かつ/または処置するためのキット。

【請求項12】 請求項1～6のいずれか一項記載の抗体を含む、医薬組成物。

【請求項13】 請求項1～6のいずれか一項記載の抗体を生産し得る、ハイブリドーマ細胞株。

【請求項14】 CNCMI-2476である、請求項13記載のハイブリドーマ細胞株。

【請求項15】 請求項1～6のいずれか一項記載の抗体のイディオタイプに対する抗体。

【請求項16】 薬物またはワクチンを製造するための、請求項15記載の抗体の使用。

【請求項17】 下記のアミノ酸配列

【表3】

**Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr**

を有するか、または該ペプチドの三次元立体配座特徴が実質的に維持されるという条件のもとで1つ以上のアミノ酸を置換することによって該ペプチドに由来する配列を有するペプチド。

【請求項18】 ペプチドが

【表4】

**Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr**

である、請求項17記載のペプチド。

【請求項19】 BSE、CJD、vCJDまたはTSE関連疾患に対する薬物またはワクチンを調製するための、請求項17または請求項18記載のアミノ酸配列の使用。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本発明は、プリオンのPrP<sup>Sc</sup>イソ型のC末端部分に対する新規な抗体に関する。詳細には、本発明は、ウシ海綿状脳症(BSE)、クロイツフェルト・ヤコブ病の新しい異型形態(vCJD)、散発性CJDおよびスクレイピーの診断におけるそのような抗体の使用に関する。

**【0002】**

1986年以降、慢性の変性疾患が英国で診断されている。この疾患に罹患した家畜は神経系の進行性の変性を受け、神経質または攻撃性、異常な姿勢、立ち上がりの協調不能および困難、低下した乳汁産生、または継続した食欲にもかかわらず体重の低下などの性質の変化を示している。

**【0003】**

この疾患はウシ海綿状脳症(BSE)と名付けられたが、今では「狂牛病」と広く呼ばれている。その後の10年間に、約160000例のこの新しく認識された家畜疾患が英国で確認されている、同時に、欧州諸国においても、そして海外(例えば、カナダ、フォークランド諸島およびオマーン王国)においてさえも、この疾患に罹っている動物が報告されている。

**【0004】**

BSEは伝染性の病原体を伴っているが、その性質はまだ完全には理解されていない。この病原体は家畜の脳および脊髄を冒し、病巣は、顕微鏡によって視認され得るスポンジ様の変化を特徴としている。この病原体は非常に安定であり、凍結および乾燥に対してだけでなく、通常の調理温度への加熱に対して、そして低温殺菌、通常的な温度および時間での殺菌のために使用される温度などのさらにより高い温度への加熱に対して耐える。

**【0005】**

BSEに自然感染した家畜において、BSE病原体は、脳組織、脊髄および網膜にのみ見出されている。さらなる研究により、BSE感染動物に由来する脳材料が与えられていた子ウシの遠位回腸、骨髄、後根神経節および三叉神経節におけるBSE感染性が確認されている。

## 【0006】

ヒトでは、クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）と名付けられている類似した変性症候群が知られている。CJDは、明かな機能不全、進行性痴呆および脳の空胞変性を伴う中枢神経系の遅い変性性のヒト疾患である。CJDは、1年に百万人あたり1人の割合で世界中で散発的に発生している。よりまれには、ゲルスマン - ストロイスラー症候群、クールー病および致死性家族性不眠症の関連するTSE（伝染性海綿様脳症）状態がある。

## 【0007】

1996年に、英国海綿様脳症諮問委員会（SEAC）は、CJDの新しい異型形態（vCJD）が10例確認されたと発表している。すべての患者は1994年または1995年に発症している。しかし、報告された10例は、CJDの散発型形態とは非常に異なっている。罹患者は、従来のCJD患者よりもはるかに若い。典型的には、CJD患者は63歳を越えている。これに対して、異型CJDの発症に対する平均患者年齢は約28歳である。vCJDにおける疾患の経過は平均して13ヶ月であるが、これは、平均して6ヶ月の継続期間である従来のCJD症例と異なる。異型症例では、脳における脳波計（EEG）電気活性は散発性CJDの特徴を示していない。脳の病理学はCJDとして識別可能である、そのパターンは散発性CJDとは異なり、プリオンタンパク質斑の大きい集塊を有している。

## 【0008】

SEACによれば、すべての犠牲者は過去10年に牛肉または牛肉製品を食べていたことが報告されている。このことは、vCJDとBSEとの因果関係を示している。1997年に発表された2つの論文は、BSE病原体がvCJDの原因である可能性が非常に高いことを確認している。この目的のために、1つの研究者グループは3群の同系交配マウスおよび1群の交雑マウスにBSE、vCJDおよび散発性CJDをそれぞれ感染させた。中間結果は、BSE接種マウスが、vCJD患者に由来する組織が接種されたマウスと同じパターンの潜在時間、臨床的徴候および脳病巣を示したことを示している。このことから、BSEおよびvCJDは同じ特性を有するか、または同じ「株」であると結論される。さら

に、散発性CJDおよび知られているスクレイピー株はvCJDまたはBSEと類似していない。これらの結果が他の研究者によって確認されたので、現在では、BSEはヒトに伝染して、vCJDの発症をもたらし得ると考えられている。

#### 【0009】

感染した家畜に由来する製品を消費した結果、BSEがヒト集団に伝染し得る可能性に関する社会的および科学的な関心が増大しているために、BSEに罹っている家畜は畜殺すべきであり、そしてその畜殺体をヒトの食物連鎖の中に入れるべきではないと提案されている。しかし、BSEが、感染動物の行動の結果として発現するには典型的には5年以上要することを考えれば、そして畜殺した動物の脳を調べることに以外に、特定のウシがBSEに罹っているか否かの可能性を評価する迅速な方法がないため、採用すべき唯一の安全な方法で、そのうえ、牛肉製品を食べることの安全性に関する社会的な恐怖を静める方法は、畜殺を広げることであると提案されている。そのような処置は、BSEに感染していない何千頭もの家畜を畜殺することになることがほぼ避けられない。したがって、BSEの迅速な確認方法がこの分野では求められている。

#### 【0010】

組織中のBSE病原体の存在を確認する現在利用可能な1つの方法は、BSEに感染していると考えられる材料を動物（通常的にはマウス）に接種することである。しかし、マウス接種研究は700日までの長い時間を要し、そして、組織中のBSEを同定できないことは、病原体が本当に存在していないこと、またはこの方法の感度が単に限られていることのいずれかを示している。

#### 【0011】

BSEおよび他のTSE（vCJDなど）の発症に関与する病原体は、知られている最小のウイルスよりも小さく、まだ完全に特徴付けられていない。病原体の正体については主に3つの説がある：（1）病原体は、異常な特徴を持ったウイルスである；（2）病原体は、感染後に部分的にプロテアーゼ耐性の形態に変化する、もっぱら宿主にコードされたタンパク質（「プリオン」）である；そして（3）病原体は、宿主由来の保護的なタンパク質と一緒にコートされている小さい非コードの調節性核酸である。BSE病原体は、熱および通常の滅菌処理に

対して極めて抵抗性である。BSE病原体はまた、宿主動物において何らかの検出可能な免疫応答または炎症反応を誘起しない。

#### 【0012】

近年、この疾患に関与する病原体はウイルスと異なることが今も見出されている。この病原体は複数の分子形態で存在し得るが、ウイルスは、明確な超微細構造の形態を有する単一形態で存在する。さらに、これらの病原体は、何らかの免疫応答をほぼ常に引き起こすウイルスとは対照的に、非免疫原性である。さらに、感染性粒子内の必須核酸に対する証拠がない。これに対して、ウイルスは、子孫ウイルスを合成するためのテンプレートとして使用される核酸ゲノムを有している。したがって、最終的には、プリオンがこの変性疾患の原因であると結論されていた。その唯一知られている成分はプリオンであり、これは個体自身の染色体遺伝子によってコードされている。

#### 【0013】

感染性プリオンは本質的には、 $PrP^{Sc}$ と略記される、プリオンタンパク質の「スクレーピーイソ型」と呼ばれるタンパク質からなる。翻訳後修飾はまだ明らかにされていないが、これにより、 $PrP^{Sc}$ が、明らかに、遍在する細胞プリオンタンパク質 $PrP^C$ から生じている。両者( $PrP^{Sc}$ および $PrP^C$ )は1コピーの染色体遺伝子によってコードされており、そして接種されたプリオンが正常な宿主 $PrP^C$ ポリペプチドからの $PrP^{Sc}$ の産生を開始させることが示されている。細胞表面に主に見出される正常な形態とは対照的に、このイソ型は細胞内の小胞に蓄積する。イソ型はまた、正常な形態の $PrP^C$ に対して、 $PrP^{Sc}$ イソ型の増大したプロテアーゼ耐性の原因であり得る増大した $\beta$ シート含有量によって示されるその立体配座構造が異なっている。

#### 【0014】

現在、この疾患を防止するために使用できる処置またはワクチンは何もない。これは、主に、 $PrP^{Sc}$ イソ型の免疫原性が明らかに低く、このために、「正常」なイソ型の $PrP^C$ との交差反応性を同時に避けながら、 $PrP^{Sc}$ イソ型を特異的に認識する抗体を製造することが妨げられているためであり得る。

#### 【0015】

さらに、生きている動物においてこの疾患を検出するための適切な試験もない。動物病理学者は、脳組織の死後顕微鏡検査によってBSEを確認することができる。しかし、組織中のBSE病原体の存在を検出するときには、BSE病原体の存在は、BSEに感染していると考えられる材料を動物（通常的にはマウス）に接種することによって明らかにされる。したがって、スクレイピーなどのようなBSE、CJD、vCJDまたはTSE関連疾患などの神経系の変性疾患の発症に關与する病原体を検出する手段を提供することがこの分野では求められている。

#### 【0016】

したがって、本発明の課題は、BSE、CJD、vCJDおよび/またはTSE関連疾患を生じさせる病原体の存在を特異的に検出することを獣医師および/または医師ができるようにする手段を提供することにある。

#### 【0017】

本発明に至った広範な研究の過程で、本発明者らは、PrP<sup>C</sup>がPrP<sup>Sc</sup>へのその変換の際に受ける立体配座変化の1つがPrP<sup>C</sup>のC末端部分の三次構造の変化に存在することを見出している。

#### 【0018】

したがって、1つの態様により、本発明は、PrP<sup>Sc</sup>イソ型のC末端部分またはその一部に対する抗体、すなわち、「ミスフォールド」形態で示されるプリオンポリペプチドの該部分の三次元立体配座に対する抗体を提供する。PrP<sup>C</sup>形態は、PrP<sup>Sc</sup>とは明らかに異なる、プリオンポリペプチドのこの部分における三次元立体配座を示すので、本発明の抗体はPrP<sup>Sc</sup>イソ型に対して選択的に結合することができるが、PrP<sup>C</sup>形態には結合しない。したがって、本発明の抗体はそのようなイソ型を区別することができる。本発明の抗体は、好ましくは、PrP<sup>Sc</sup>のアミノ酸番号190～214によって含まれる領域もしくはその一部に対して、より好ましくはPrP<sup>Sc</sup>のおよそ202位～およそ214位の配列もしくはその一部に対して、またはPrP<sup>Sc</sup>イソ型によって示されるような該領域の立体配座特徴が本質的に保持される条件のもとで1つ以上のアミノ酸を置換もしくは除去することによって得られる変化体に対するものである。好ましい態様

により、アミノ酸配列は、

【0019】

【表5】

-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-

又は

-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-

である。

【0020】

配列番号1は、本発明において同定されるようにアミノ酸番号180～219のウシプリオンポリペプチドのアミノ酸配列のC末端領域の一部を示している。

【0021】

【表6】

Thr-Thr-Lys-Gly-Glu-Asn-Phe-Thr-Glu-Thr-Asp-Ile-Lys-Met-Met-Glu-

180                      185                      190                      195

Arg-Val-Val-Glu-Gln-Met-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-

200                      205                      210

Ala-Tyr-Tyr-Gln-Arg-Gly-Ala-Ser

215

【0022】

本発明においてここで規定される抗体は、 $PrP^C$ 形態には存在しない、 $PrP^{Sc}$ イソ型のC末端部分によりもたらされる三次元立体配座に選択的に結合することによって $PrP^{Sc}$ と $PrP^C$ とを区別することができる。

【0023】

抗体はポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得るが、交差反応性のために、モノクローナル抗体が好ましい。さらに、抗体のフラグメントもまた本発明の抗体の意味に含まれ、これには、特に、 $F_{ab}$ 領域またはその一部分などの、標的に結合するそのようなフラグメントが挙げられる。それぞれの必要性に基づいて、当業者は対応するフラグメントを設計することができる。

## 【0024】

抗体という用語は、病原体に対する処置された個体の応答を低下させるように、定常領域がヒト起源に由来し、一方で、可変領域がマウスなどの動物起源に由来するヒト化抗体などのキメラ抗体をも含むことが意図される。二重特異性抗体もまた本発明の範囲内であると見なされる。二重特異性抗体は、2つの $F_{ab}$ フラグメントがそれぞれ異なる標的に指向している免疫グロブリンまたはそのフラグメントである。例えば、1つの $F_{ab}$ フラグメントは $PrP^{Sc}$ のC末端部分に指向するが、もう一方の $F_{ab}$ フラグメントは、アッセイにおいて使用される標的などの任意の標的に指向し得る。

## 【0025】

抗体は、放射能標識、蛍光標識または色素などの、標的の検出において一般に使用されるマーカーに結合することができる。好ましい態様において、抗体は、ブダペスト条約に従ってパスツール研究所（パリ、フランス）に2000年5月10日に寄託されたハイブリドーマ細胞株CNCM I - 2476により産生される抗体である。

## 【0026】

上記の抗体は、抗体が $PrP^{Sc}$ イソ型に選択的に結合するという点で、哺乳動物（例えば、有蹄動物またはヒトなど）におけるウシ海綿様脳症またはクロイツフェルト・ヤコブ病またはその変異型形態またはTSE関連疾患の診断および/または処置のために使用することができる。種々の種（例えば、ヒト、ウシ、ヒツジなど）において本発明の抗体を使用することができるというこの特質は、本発明の抗体の新規かつ興味深い特徴であり、そしてすべてのそれぞれの個体を調べるために1つの抗体のみが必要であるように確認方法を楽にする。

## 【0027】

個体が相当する疾患に罹患しているどうかを確認するために、組織（ホモジネートもしくは切片）または体液（例えば、血液、唾液、尿もしくは脳脊髄液）などの試料が、検査される個体から採取され、そして試料を抗体と適切な条件のもとで接触させることによって $PrP^{Sc}$ イソ型の存在について試験される。

## 【0028】

試料を抗体と接触させる方法は、何らかの特定の限定を受けず、利用可能な手段および試料自体に依存するだけである。したがって、抗体は、例えば、ELISA、ドットプロット、ウエスタンプロット、免疫組織化学法などの方法で使うことができる。これらはすべて当業者が十分に精通している。

【0029】

プリオン関連疾患の存在について個体を迅速に試験することを可能にするために、本発明はまた、本発明による抗体を少なくとも1つ含むキットを提供する。さらに、キットはまた、行われるそれぞれのアッセイに適合した緩衝液、支持体材料およびマーカ剤を含む。

【0030】

さらに、本発明の抗体はまた、効果的な量の本発明の抗体を、選択的に適切な賦形剤およびキャリアとともに罹患した個体に投与することによって、プリオン関連疾患の治療において使用することができる。したがって、本発明はまた、本発明による抗体を少なくとも1つ含有する医薬組成物を含む。

【0031】

さらに、本発明はまた、PrP<sup>Sc</sup>イソ型に対して個体を免疫化する方法を提供する。これに関して、正常な形態(PrP<sup>C</sup>)とは異なることが見出されているC末端部分のペプチドを、個体における免疫応答を誘発させるために使用することができる。そのようなペプチドは、好ましくは、アミノ酸番号190~215のプリオン配列またはその一部に由来し、より好ましくはポリペプチドのおよそ202位~およそ214位の配列またはその一部に由来し、あるいはPrP<sup>Sc</sup>イソ型により示されるような該領域の立体配座的特徴が実質的に保持される条件のもとで1つ以上のアミノ酸を置換もしくは除去することによって得られる変異体に由来する。最も好ましい態様により、アミノ酸配列は、

【0032】

【表7】

**-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-**

又は

**-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-**

である。

**【0033】**

さらに、抗体そのものは、免疫付けのために使用され得る抗イディオタイプ抗体を作製するために使用することができる。免疫付けのために、当業者は、追加抗原投与工程間の適切な期間を選び、そして必要と考えられる場合には適正なアジュバントを選択することが理解される。

**【0034】**

本発明の抗体はまた、抗イディオタイプ抗体（すなわち、本発明の抗体の結合領域に対する抗体）を惹起させるために使用することができる。このような抗イディオタイプ抗体は本発明の抗体の鏡像を表し、上記に述べられた疾患を防止および治療するために使用することができる。したがって、抗イディオタイプ抗体もまた本発明の範囲内であり、当技術分野で十分に知られている方法に従って、すなわち、例えば、本発明の抗体の超可変領域で動物を免疫化し、そしてそれに対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を産生させることによって産生させることができる。次の工程において、得られた抗体は、該抗イディオタイプ抗体に対する本発明の抗体の結合に従って選択される。

**【0035】**

本発明の抗体を得るための方法は、動物（例えば、マウスまたはウサギなど）を、プリオンポリペプチドのC末端部分のアミノ酸を含むペプチドの免疫付け量で、好ましくは、下記の配列を有するペプチドの免疫化量で免疫化する工程を含む：

**【0036】**

**【表8】**

**-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-**

## 【0037】

より好ましくは、免疫化工程のためには、下記のアミノ酸配列を得るために、プリオンポリペプチドの207位のGln残基をGluにより置換することによって上記配列から得られたペプチドが使用される：

## 【0038】

## 【表9】

**-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-**

## 【0039】

この配列は、驚くべくことに、PrP<sup>Sc</sup>に対して特異的に抗体を容易に惹起させることができる十分に強い免疫応答を誘発することが証明されている。何らかの理論にとらわれることなく、このペプチドを用いて得られたこの驚くべき結果は、天然のGln残基は水素結合を形成することができ、その結果、エピトープの一部であるときには所望されないペプチドの不溶性を生じさせ得るということにあると考えられる。一方、ヒトPrPの配列に存在するGluは、これに対してGlnがウシPrPの一次構造における同じ位置に存在しているが、見たところでは、そのような関連を形成していないようである。

## 【0040】

免疫化工程のために上記ペプチドのいずれかを使用することは、完全なプリオンポリペプチドを使用するときなど、ロックアウトマウスを事前に調製する必要がないという利点を有している。免疫化のために、好ましくは、ペプチドがそのN末端を介してキャリアに結合されているペプチドとキャリアとの結合体を使用する。この方法は、ペプチドをC末端を介してキャリアに結合することと比較して、より良好な免疫応答を明らかにもたらすことが示され得る。

## 【0041】

動物を抗原で免疫化した後、脾細胞が単離され、当技術分野で十分に知られている方法および技術に従ってミエローマ細胞と融合させられる。融合した細胞の選択は、非融合細胞の増殖を支持しない適切な培地（HAT培地など）を使用しで行われる。選択培地で増殖する融合したミエローマ細胞は、免疫化工程のため

に使用されたペプチドに結合し得る抗体の産生についてスクリーニングされる。

【0042】

本発明はまた、本発明の抗体を産生することができ、かつ上記の方法に従って得ることができるハイブリドーマ細胞株に関する。得られた細胞株は、約8時間の倍加時間で極めて早く増殖することが見出されている。抗体の分泌もまた、通常のハイブリドーマ抗体分泌と比較して非常に大きいことが見出された。好ましい態様により、ハイブリドーマはCNCMI-2476であり、これは、ブダペスト条約に従ってパスツール研究所（パリ、フランス）に2000年5月10日に寄託されている。

【0043】

別の態様により、本発明は、下記のアミノ酸配列によって示されるペプチド配列：

【0044】

【表10】

Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Gln-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr

又は

Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr

【0045】

または三次元立体配座構造が実質的に維持されるという条件のもとで1つ以上のアミノ酸を置換もしくは除去することによってこれらの配列に由来するペプチドに関する。

【0046】

これらのペプチドは、PrP<sup>Sc</sup>イソ型によりもっぱら示されるが、PrP<sup>C</sup>形態には由来しない三次元立体配座を明らかにもたらしめている。したがって、上記に述べているように、このペプチドは、免疫付けされた個体がプリオンポリペプチドの「ミスフォールド型形態」に対する免疫応答を生じさせ得るようにヒトまたは動物を免疫付けするために、そしてそのような免疫応答を天然の方法では身

体からなくすために同様に使用することができる。さらに、該ポリペプチドはまた、上記のプリオン関連疾患に対する薬物を製造するために使用することができる。

#### 【0047】

下記の実施例は本発明を例示しているが、本発明は実施例に限定されない。

#### 【0048】

##### 実施例1

##### 合成ペプチドの調製

免疫付けのために、ヒトPrP（ヒトプリオンタンパク質）の一次構造から、長さが13アミノ酸のペプチドが選ばれた。このペプチドは、アミノ酸202～214のプリオンタンパク質のC末端部分に近いところに位置する。このペプチドは、下記のアミノ酸配列にするために、207位のGln残基をGlu残基により交換することによって改変された：

#### 【0049】

##### 【表11】

**H-Cys-Ile-Thr-Gln-Tyr-Glu-Arg-Glu-Ser-Gln-Ala-Tyr-Tyr-OH**

#### 【0050】

このペプチドは、そのN末端部分を介してキャリアタンパク質のKLH（keyhole limpet homocyanin）に結合され、ペプチドは通常的にはC末端を介してキャリアに連結されるので、これは、潜在的に免疫原性のペプチドをキャリアに連結するという新規な特徴を表している。

#### 【0051】

##### 実施例2

##### 動物の免疫化

BALB/cマウスを、1個体あたり0.2mgのKLH-ペプチド結合体（実施例1に従って調製したもの）を用いてフロイント完全アジュバント（CFA）（200μl/マウス）で皮下に免疫付けした。14日後、マウスを、再び、1個体あたり0.1mgのKLH-ペプチドを用いてフロイント不完全アジュバント

( I F A ) ( 2 0 0  $\mu$ l / マウス ) で腹腔内に免疫付けした。2 週間後、マウスには、1 個体あたり 0 . 2 mg の K L H - ペプチドが、もう一度、フロインド不完全アジュバントで腹腔内に接種された。血液を、最後の接種を行った 1 0 日後に尾から採取して、結合体に対する抗体の存在を間接 E L I S A によって測定した。プレートを K L H、K L H - ペプチドおよび遊離ペプチドでコーティングした。マウス抗体の結合を、H R P と結合させたヤギ抗マウス抗体によって検出した。驚くべきことに、すべてのマウスの免疫応答は非常に高かった。

#### 【 0 0 5 2 】

最終的な追加抗原を生理的食塩水溶液で静脈内注射した ( 0 . 1 mg / マウスを 1 0 0  $\mu$ l )。

#### 【 0 0 5 3 】

### 実施例 3

#### ハイブリドーマの作製

追加抗原注射の 4 日後にマウスを犠牲に付し、その脾臓を取り出した。脾細胞を単離し、そして標準的な技術 ( Liddel, J.E., Cryer, A., A practical guide to monoclonal antibodies, John Wiley & Sons, ニューヨーク, 1991 ) に従って、5 0 % P E G を使用して、3 分間、マウスのミエローマ細胞 N S 1 と ( 1 0 : 4 の比で ) 融合させた。細胞を洗浄し、9 6 ウエルマイクロタイタープレート内に、1 3 % F C S ( HyClone, 米国 ) を補充した D M E M ( これは下記では単に D M E M と呼ばれる ) にマウスの胸腺細胞のフィーダー層とともに再懸濁した。翌日、H A T D M E M をすべてのウエルに加えた。上清を、1 0 日後 ~ 1 4 日後に、間接 E L I S A によって、特異的な抗体の存在について調べた。このために、マイクロタイタープレート ( Nunc, デンマーク ) を、5 0 mM 炭酸塩 / 重炭酸塩緩衝液 ( pH 9 . 6 ) 中、+ 4 で一晩、5  $\mu$ g/ml のペプチドまたは K L H - ペプチド結合体または K L H 単独 ( Bachem, スイス ) でコーティングした。プレートを P B S / Tween 2 0 ( Sigma, 米国 ) で 3 回洗浄して、1 % B S A ( Sigma, 米国 ) で 3 0 分間ブロッキングした。P B S / Tween 2 0 で洗浄した後、上清をウエルに加え、3 7 で 2 時間インキュベーションした。プレートを P B S / Tween 2 0 で 3 回洗浄して、H R P と結合させたヤギ抗マウス免疫グロブリン ( Sigm

a、米国)を、1%BSAで1:5000希釈してウエルに加えた。37℃で2時間インキュベーションした後、プレートをPBS/Tween 20で洗浄して、基質をウエルに加えた(ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;Sigma、米国)。プレートの読み取りを410nmで行った。すべての容量は50μlであった。

#### 【0054】

陽性のウエルに由来するハイブリドーマをHT DMEM培地においてより大きい容量(24ウエルプレート)に移した。特異的な抗体の存在を間接ELISAによって再び測定して、選択された系統をDMEMにおいて組織培養フラスコに移した。最後に、選択されたハイブリドーマを限界希釈法によって2回クローン化して、液体窒素で凍結した。

#### 【0055】

選択された系統は、DMEMにおいて、すなわち、HTを必要とすることなく、約8時間の倍加時間で極めて早く増殖した。また、抗体の分泌が非常に大きいことが見出された。得られたクローンの1つをパスツール研究所に寄託して、寄託番号第CNCMI-2476を受け取った。

#### 【0056】

##### 実施例4

##### 抗体の試験

モノクローナル抗体とPrPとの反応性を、保存されたクローンの上清を使用して調べた。モノクローナル抗体を、CJD患者、vCJD患者に由来する脳組織、ならびにBSE陽性家畜の脳、およびヒツジのスクレイピー感染脳に対する免疫組織化学によって調べた。対照には、正常なヒト、ウシおよびヒツジの脳を使用した。スクリーニングはまたウエスタンブロットおよびドットブロットによっても行われた。

#### 【0057】

##### 組織化学のためのサンプル調製:

種々の源(ヒト、ウシおよびヤギ)に由来する脳組織のパラフィン切片を、標準的な技術を使用して調製した(装置:Ventana)。この場合、厚さが6~8μmの切片が得られた。サンプルをHCOOHで処理し(図1、5、6)、または全

く前処理しなかった(図2~4)。続いて、内因性のペルオキシダーゼを、(Ventana、米国)によって提供されたキットを使用してブロッキングし、そして抗体をDako S-2022 (Dako、米国)で希釈して4 µg/mlの濃度で加え、42で20分間インキュベーションした。

#### 【0058】

続いて、ビオチン化ヤギ抗マウス+ウサギ(Ventana、米国)を加え、42で20分間インキュベーションし、その後、ストレプトアビジンHRP (Ventana)と42で20分間インキュベーションし、DAB(ジアミノベンジジン)をCuとともに4分間インキュベーションした。

#### 【0059】

結果：

免疫組織化学反応のパターンは、mAbのCNCMI-2476が、異なる種(ヒト、ウシ、ヒツジ)に由来するすべての知られているTSE形態と反応し、そして病理学的タンパク質とのみ反応していることを示している。健康な個体およびアルツハイマー病患者の脳組織に対しては反応していない。

#### 【0060】

脳ホモジネートの調製：

脳組織(視床または延髄または脊髄)を、10%スクロース、20mMのHEPES (pH7.5)、2%サルコシルおよび5mMのEDTAにおいて、ホモジナイザー(Potter)でホモジネートした(5回、1mlに0.1g)。ホモジネートを+4および14000rpmで45分間遠心分離した。上清を-20で凍結し、これに対してペレットは1MのNaOHで溶解した。サンプル中のタンパク質濃度を、280および260nmにおける吸光度を測定することによって求めた。

#### 【0061】

ドットプロット：

10倍希釈した上清およびペレットをサンプルとして使用した。サンプルはそのまま使用したか、またはプロテイナーゼK(10 µg/mlおよび100 µg/ml)で消化して使用した。電気泳動を、25mM Tris、0.32Mグリシン、0.16%SDS(w/v) pH8.3を用いてBioRadセルで行った。転写を、25mM Tri

s、192mMグリシン、20%メタノール(v/v) pH8.3を用いて、0.2mmのPVDFメンブレンに対して行った。転写を100Vで50分間行った。その後、メンブレンを5%ミルクでブロッキングし、そしてモノクローナル抗体(CNCMI-2476の場合には40 µg/ml)を含む1%ミルク中で1~2時間(穏やかに振とうしながら)インキュベーションした。メンブレンを洗浄した後、メンブレンを、1%ミルクで1:5000希釈されたHRP結合二次抗体(ヤギ抗マウス、Sigma、米国)と(1~2時間、穏やかに振とうしながら)インキュベーションした。メンブレンを洗浄して、免疫反応を、化学発光キット(ECTL、Amersham、米国)を使用して検出した。

#### 【0062】

結果：

正常な脳のサンプルと抗体V5B2(CNCMI-2476)との反応は生じなかった。陽性の対照として、KLH-ペプチドを使用した。

#### 【0063】

本発明によって提供されるモノクローナル抗体はPrP<sup>Sc</sup>に対して大きい特異性を示している。認識させるために、PrP<sup>C</sup>のプロテイナーゼK消化をスクリーニング法に先立って使用することは必要ではなかった、正常な脳組織とmAbとの反応は同じ条件のもとでは存在しなかった。このことは、産生された抗体が非常に特異的であり、PrP<sup>Sc</sup>のみを認識していることを示している。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1は、抗体CNCMI-2476で処理された、散発性CJD罹患者に由来するヒト脳組織サンプルの写真(10倍の拡大)を示す。

##### 【図2】

図2は、抗体CNCMI-2476で処理された、散発性CJD罹患者に由来するヒト脳組織サンプルの写真(60倍の拡大)を示す。

##### 【図3】

図3は、抗体CNCMI-2476で処理された、新しい異型CJD罹患者に由来するヒト脳組織サンプルの写真(60倍の拡大)を示す。

**【図4】**

図4は、抗体CNCMI - 2476で処理された、新しい異型CJD罹患者に由来するヒト脳組織サンプルの写真（20倍の拡大）を示す。

**【図5】**

図5は、抗体CNCMI - 2476で処理された、BSEの徴候を示す動物に由来するウシ脳組織サンプルの写真（20倍の拡大）を示す。

**【図6】**

図6は、抗体CNCMI - 2476で処理された、スクレイピー罹患ヤギに由来する脳組織サンプルの写真（10倍の拡大）を示す。

**【図7】**

図7は、正常な脳組織の様々なサンプルが抗体CNCMI - 2476にさらされたドットプロット実験の結果を示す。対照として、配列番号2のペプチドおよび該ペプチドとKLHとの結合体を使用した。

**【配列表】**

## SEQUENCE LISTING

<110> Blood Transfusion Centre of Slovenia

<120> Antibodies capable to selectively detect prion PrPsc isoforms

<130> 80242

<140>

<141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 40

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 1

Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Ile Lys Met Met Glu  
1 5 10 15

Arg Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Gln  
20 25 30

Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly Ala Ser  
35 40

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 2

Cys Ile Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr  
1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 3

Cys Ile Thr Gln Tyr Gln Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr  
1 5 10

【図1】

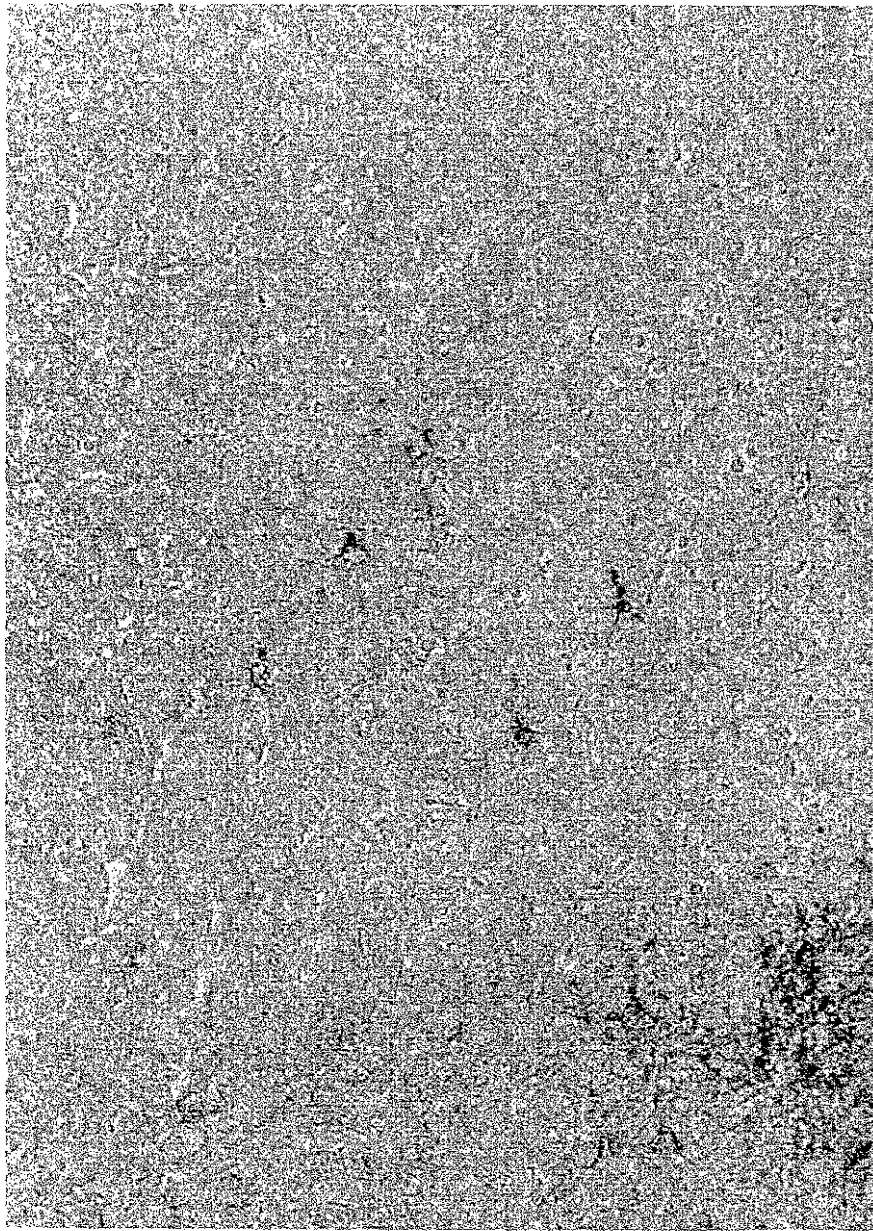
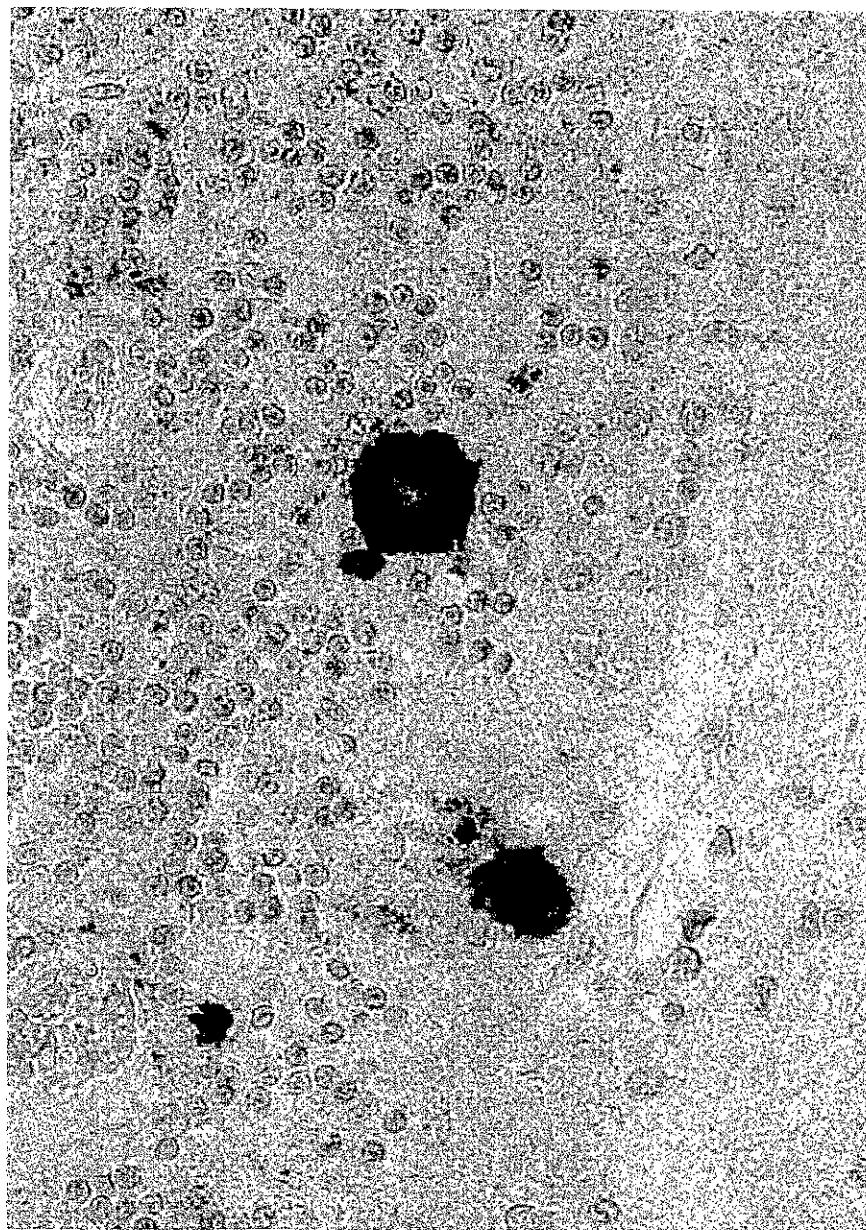


Fig. 1

【図2】

Color profile: Disabled  
Composite

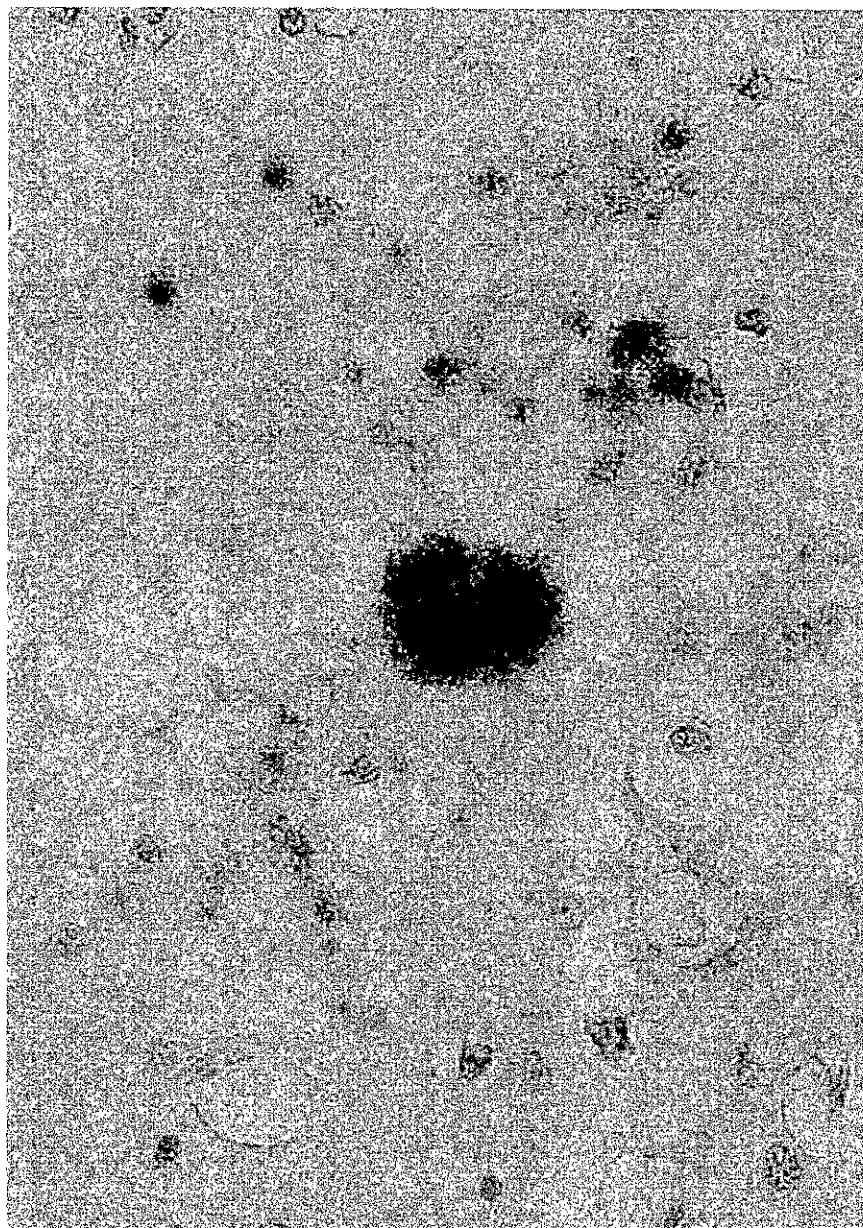


C:\Scan\cal01.tif  
13. mar 2000 0:19:52

Fig. 2

【図3】

Color profile: Disabled  
Composite

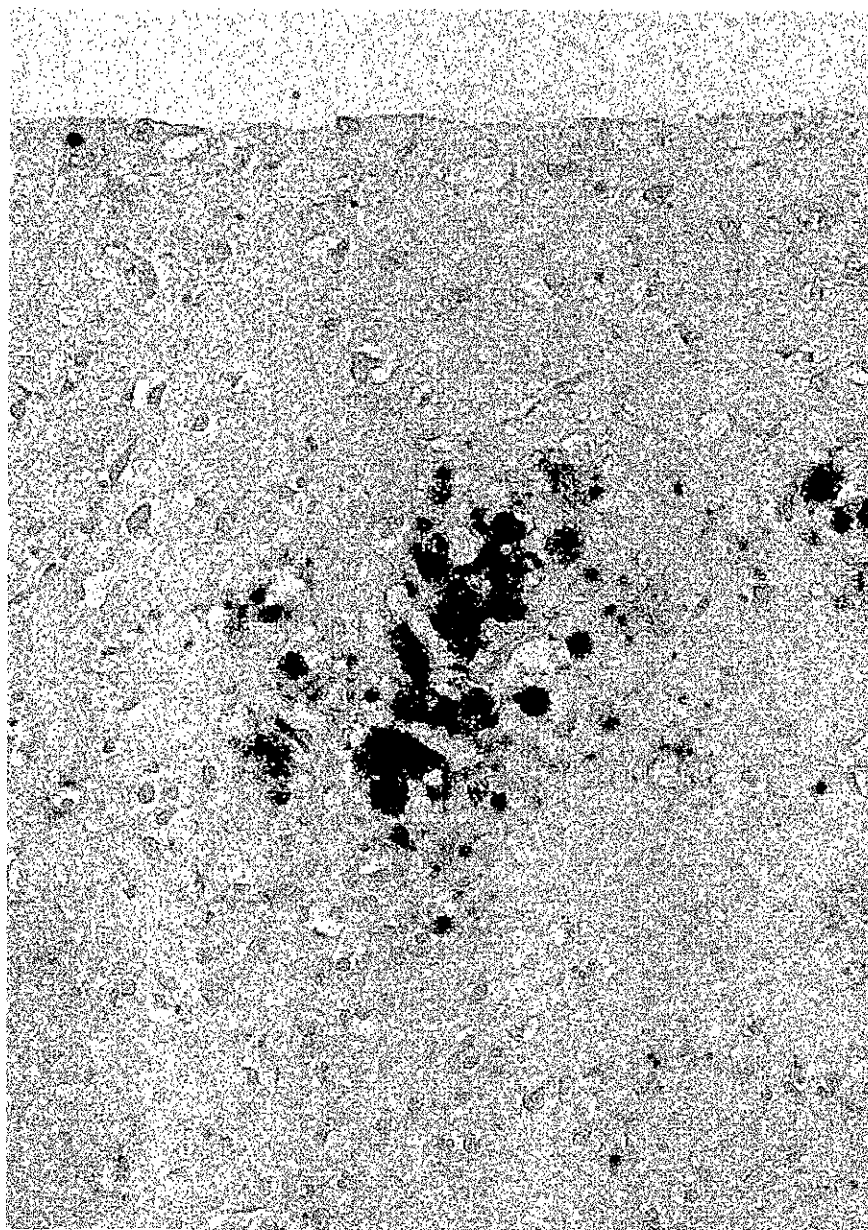


C:\Scan\cel05.tif  
13. mar 2000 01:09

Fig. 3

【図4】

Color profile: Disabled  
Composite

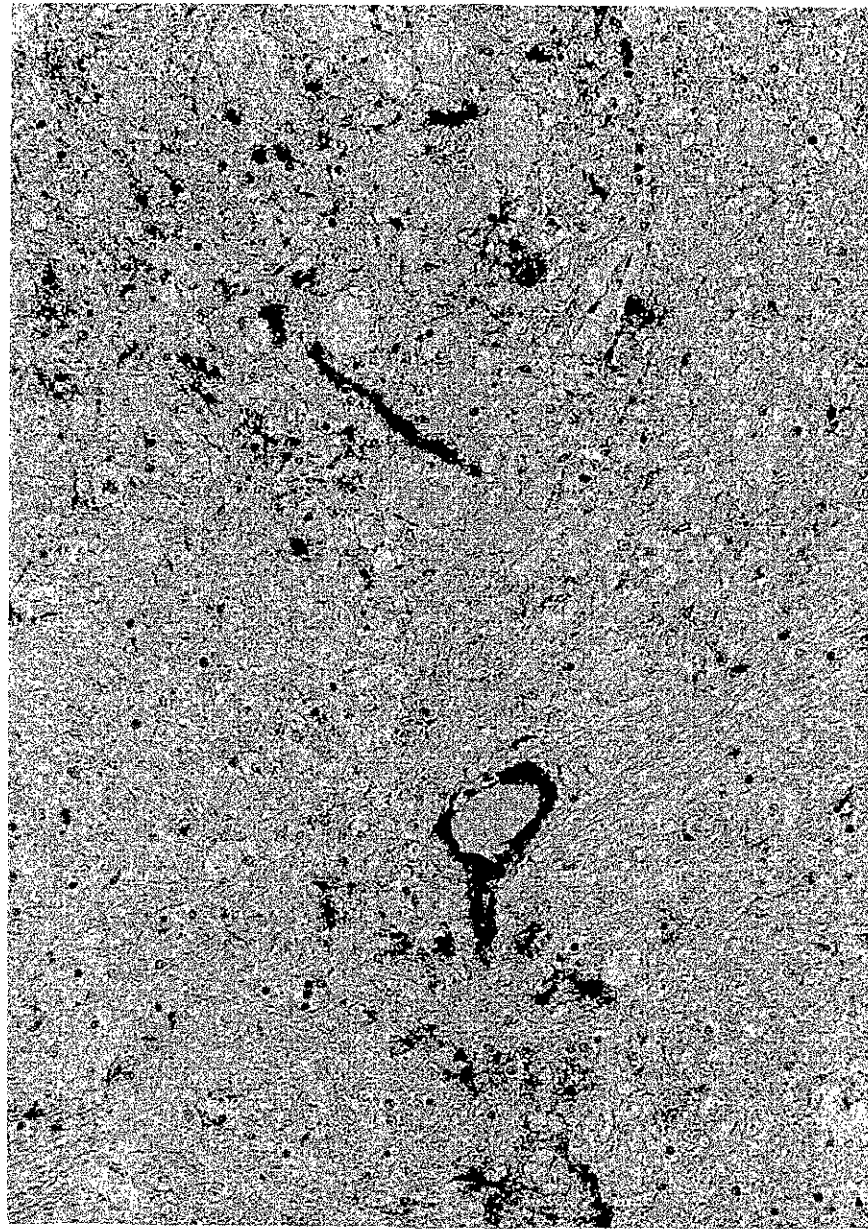


C:\scan\col04.tif  
15. maj 2000 0:18:41

Fig. 4

【図5】

Color profile: Disabled  
Composite



C:\scan\cel06.tif  
15. maj 2000 0:15:19

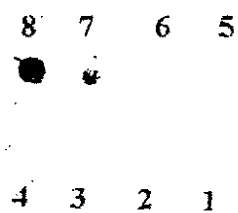
Fig. 5

【図6】



Fig. 6

【図7】



B2

FIG. 7

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| Internat. Application No.<br>PCT/Id 01/01666                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |   |                                                                                                                                                                                                        |                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC 7 C07K16/18 A61K39/395 G01N33/569 C12N5/20 C07K16/42<br>C07K14/47 A61K39/00                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |   |                                                                                                                                                                                                        |                    |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |   |                                                                                                                                                                                                        |                    |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 7 C07K 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)<br>BIOSIS, EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, WPI Data, PAJ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |   |                                                                                                                                                                                                        |                    |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>RUBENSTEIN R ET AL: "Immune surveillance and antigen conformation determines humoral immune response to the prion protein immunogen"<br/>JOURNAL OF NEUROVIROLOGY, GB, BASINGSTOKE, vol. 5, no. 4, August 1999 (1999-08), pages 401-413, XP000905565<br/>ISSN: 1355-0284</td> <td>1,2,4,<br/>7-9,11,<br/>12</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>abstract<br/><br/>page 402, column 2, last paragraph -page 406, column 2, paragraph 1<br/>* page 403, figure 1, amino-acids 218-230 and table 1 at page 404, amino acid sequence of Y224A *<br/>---<br/>-/-</td> <td>3,5,6,<br/>10,13-19</td> </tr> </tbody> </table>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                        | Category *              | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | X | RUBENSTEIN R ET AL: "Immune surveillance and antigen conformation determines humoral immune response to the prion protein immunogen"<br>JOURNAL OF NEUROVIROLOGY, GB, BASINGSTOKE, vol. 5, no. 4, August 1999 (1999-08), pages 401-413, XP000905565<br>ISSN: 1355-0284 | 1,2,4,<br>7-9,11,<br>12 | Y | abstract<br><br>page 402, column 2, last paragraph -page 406, column 2, paragraph 1<br>* page 403, figure 1, amino-acids 218-230 and table 1 at page 404, amino acid sequence of Y224A *<br>---<br>-/- | 3,5,6,<br>10,13-19 |
| Category *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                     | Relevant to claim No.   |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |   |                                                                                                                                                                                                        |                    |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | RUBENSTEIN R ET AL: "Immune surveillance and antigen conformation determines humoral immune response to the prion protein immunogen"<br>JOURNAL OF NEUROVIROLOGY, GB, BASINGSTOKE, vol. 5, no. 4, August 1999 (1999-08), pages 401-413, XP000905565<br>ISSN: 1355-0284 | 1,2,4,<br>7-9,11,<br>12 |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |   |                                                                                                                                                                                                        |                    |
| Y                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | abstract<br><br>page 402, column 2, last paragraph -page 406, column 2, paragraph 1<br>* page 403, figure 1, amino-acids 218-230 and table 1 at page 404, amino acid sequence of Y224A *<br>---<br>-/-                                                                 | 3,5,6,<br>10,13-19      |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |   |                                                                                                                                                                                                        |                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |   |                                                                                                                                                                                                        |                    |
| * Special categories of cited documents :<br>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>*E* earlier document but published on or after the international filing date<br>*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)<br>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>*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<br>*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<br>*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.<br>*Z* document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |   |                                                                                                                                                                                                        |                    |
| Date of the actual completion of the international search<br><br>18 December 2001                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Date of mailing of the international search report<br><br>28/12/2001                                                                                                                                                                                                   |                         |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |   |                                                                                                                                                                                                        |                    |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.<br>Fax: (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Authorized officer<br><br>Muller-Thomalla, K                                                                                                                                                                                                                           |                         |                                                                                    |                       |   |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                         |   |                                                                                                                                                                                                        |                    |

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|           |                |
|-----------|----------------|
| Internati | Application No |
| PCT/IB    | 01/01666       |

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                         |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| Category *                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Relevant to claim No.   |
| X                                                    | WO 93 11155 A (PROTEUS MOLECULAR DESIGN)<br>10 June 1993 (1993-06-10)                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 1,2,4,<br>7-9,11,<br>12 |
| Y                                                    | * page 19, Seq. I.D. No: 48 *<br><br>page 26, line 10 -page 30, line 5<br>example 3<br>---                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 3,5,6,<br>10,13-19      |
| X                                                    | WO 97 10505 A (UNIV CALIFORNIA)<br>20 March 1997 (1997-03-20)                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 1,2,4,<br>7-9,11,<br>12 |
| Y                                                    | page 6, line 23 -page 9, line 12<br>---                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 3,5,6,<br>10,13-19      |
| X                                                    | DE 197 41 607 A (PRIONICS AG)<br>25 March 1999 (1999-03-25)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 1,2,4,<br>7-9,11,<br>12 |
| Y                                                    | page 2, line 1-36,40<br><br>claims 1-18<br>---                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 3,5,6,<br>10,13-19      |
| Y                                                    | KOCISKO DAVID A ET AL: "Partial unfolding<br>and refolding of scrapie-associated prion<br>protein: Evidence for a critical 16-kDa<br>C-terminal domain."<br>BIOCHEMISTRY,<br>vol. 35, no. 41, 1996, pages 13434-13442,<br>XP002150538<br>ISSN: 0006-2960<br>abstract<br>page 13439, column 2, last paragraph -page<br>13441, column 2, paragraph 2<br>---                   | 3,5,6,<br>10,13-19      |
| A                                                    | MURAMOTO T ET AL: "Recombinant<br>scrapie-like prion protein of 106 amino<br>acids is soluble"<br>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF<br>SCIENCES OF USA,US,NATIONAL ACADEMY OF<br>SCIENCE. WASHINGTON,<br>vol. 93, 1 December 1996 (1996-12-01),<br>pages 15457-15462, XP002074795<br>ISSN: 0027-8424<br>abstract<br>page 15461, column 1, last paragraph<br>---<br>-/- | 1-19                    |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.  
PCT/IB 01/01666

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                       |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category *                                           | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                        | Relevant to claim No. |
| T                                                    | <p>CURIN SERBEC V ET AL: "Site-directed monoclonal antibody specifically recognizes PrPSc."<br/>VOX SANGUINIS,<br/>vol. 78, no. Suppl. 1,<br/>July 2000 (2000-07), page 0057 XP000952742<br/>26th Congress of the International Society<br/>of Blood Transfusion; Vienna, Austria; July<br/>09-14, 2000<br/>ISSN: 0042-9007<br/>abstract</p> <p>-----</p> | I-19                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/1B 01/01666

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date        |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| WO 9311155                                | A                   | 10-06-1993                 | AT 177754 T 15-04-1999     |
|                                           |                     |                            | AU 675053 B2 23-01-1997    |
|                                           |                     |                            | AU 3089292 A 28-06-1993    |
|                                           |                     |                            | CA 2124953 A1 10-06-1993   |
|                                           |                     |                            | DE 69228701 D1 22-04-1999  |
|                                           |                     |                            | DE 69228701 T2 29-07-1999  |
|                                           |                     |                            | DK 616613 T3 27-09-1999    |
|                                           |                     |                            | EP 0616613 A1 28-09-1994   |
|                                           |                     |                            | ES 2128362 T3 16-05-1999   |
|                                           |                     |                            | WO 9311155 A1 10-06-1993   |
|                                           |                     |                            | GR 3029740 T3 30-06-1999   |
|                                           |                     |                            | JP 7501798 T 23-02-1995    |
|                                           |                     |                            | NZ 246059 A 28-08-1995     |
|                                           |                     |                            | US 5773572 A 30-06-1998    |
|                                           |                     |                            | ZA 9209392 A 27-07-1993    |
| WO 9710505                                | A                   | 20-03-1997                 | AU 707484 B2 08-07-1999    |
|                                           |                     |                            | AU 7073596 A 01-04-1997    |
|                                           |                     |                            | BR 9610580 A 24-10-2000    |
|                                           |                     |                            | CA 2231409 A1 20-03-1997   |
|                                           |                     |                            | DE 852011 T1 11-10-2001    |
|                                           |                     |                            | EP 0852011 A1 08-07-1998   |
|                                           |                     |                            | JP 2000500005 T 11-01-2000 |
|                                           |                     |                            | NZ 318689 A 25-02-1999     |
|                                           |                     |                            | US 6290954 B1 18-09-2001   |
|                                           |                     |                            | WO 9710505 A1 20-03-1997   |
|                                           |                     |                            | US 5846533 A 08-12-1998    |
| DE 19741607                               | A                   | 25-03-1999                 | DE 19741607 A1 25-03-1999  |
|                                           |                     |                            | AU 9744898 A 12-04-1999    |
|                                           |                     |                            | WO 9915651 A1 01-04-1999   |
|                                           |                     |                            | EP 1012287 A1 28-06-2000   |

-----  
フロントページの続き

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | F I     | テ-マ-コ-ト' (参考) |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------------|
| C 0 7 K                  | 14/47                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | C 0 7 K | 16/18         |
|                          | 16/18                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         | 16/42         |
|                          | 16/42                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | C 1 2 P | 21/08         |
| C 1 2 N                  | 5/10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | G 0 1 N | 33/53         |
| C 1 2 P                  | 21/08                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         | 33/577        |
| G 0 1 N                  | 33/53                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | C 1 2 N | 15/00         |
|                          | 33/577                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |         | 5/00          |
| (81)指定国                  | E P ( A T , B E , C H , C Y ,<br>D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I<br>T , L U , M C , N L , P T , S E , T R ) , O A ( B F<br>, B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W ,<br>M L , M R , N E , S N , T D , T G ) , A P ( G H , G<br>M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z<br>, U G , Z W ) , E A ( A M , A Z , B Y , K G , K Z ,<br>M D , R U , T J , T M ) , A E , A G , A L , A M ,<br>A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B<br>Z , C A , C H , C N , C O , C R , C U , C Z , D E<br>, D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D ,<br>G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I<br>S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K<br>, L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G ,<br>M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P<br>T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L<br>, T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U Z ,<br>V N , Y U , Z A , Z W |         |               |
| Fターム(参考)                 | 4B024 AA01 AA11 BA53 GA03 GA09<br>GA18 GA27 HA15<br>4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24<br>CD30 DA01 DA13 DA15<br>4B065 AA91X AA93Y AB05 AC14<br>BA08 BA24 BB01 BC01 CA25<br>CA43 CA44 CA45 CA46<br>4C085 AA13 AA14 AA15 BB41 CC02<br>CC23 CC40 DD63<br>4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10<br>BA16 BA42 CA40 DA75 DA76<br>DA86 EA05 EA20 EA50 EA52<br>FA20 FA71 FA72 FA81                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |               |

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |         |            |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | <无法获取翻译>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2003534000A5</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 公开(公告)日 | 2008-06-26 |
| 申请号            | JP2001587002                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 申请日     | 2001-05-15 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 斯洛文尼亚输血CENT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 布拉德变压器斯洛文尼亚聚变中心                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 布拉德变压器斯洛文尼亚聚变中心                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |         |            |
| [标]发明人         | クリンセルベックウラードカ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
| 发明人            | クリン-セルベック,ウラードカ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/02 A61K39/395 A61P25/28 C07K7/08 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/42 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/577 C12N5/10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |            |
| CPC分类号         | A61K2039/505 A61K39/00 C07K16/18 A61P25/28                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |         |            |
| FI分类号          | C12N15/00.ZNA.C A61K39/395.D A61K39/395.N A61P25/28 C07K7/08 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/42 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/577.B C12N5/00.B                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/GA03 4B024/GA09 4B024/GA18 4B024/GA27 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/CD30 4B064/DA01 4B064/DA13 4B064/DA15 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/BA24 4B065/BB01 4B065/BC01 4B065/CA25 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/BB41 4C085/CC02 4C085/CC23 4C085/CC40 4C085/DD63 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA16 4H045/BA42 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA05 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/EA52 4H045/FA20 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA81 |         |            |
| 优先权            | 2000111108 2000-05-23 EP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |         |            |
| 其他公开文献         | JP2003534000A<br>JP5042430B2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及针对against病毒的PrPSC 同工型的C-末端部分的新型抗体。特别地，本发明涉及这种抗体在牛海绵状脑病 ( BSE ) 的诊断中的用途，牛海绵状脑病是克雅氏病 ( vCJD ) 的新变体。另外，本发明涉及由所述抗体识别的肽及其在免疫和/或治疗BSE，CJD，vCJD和其他TSE相关疾病中的用途。