

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-539959

(P2009-539959A)

(43) 公表日 平成21年11月19日(2009.11.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/18 (2006.01)</b>	C07K 16/18	4B024
<b>C12N 15/02 (2006.01)</b>	C12N 15/00	C 4B064
<b>C12N 5/10 (2006.01)</b>	C12N 5/00	B 4B065
<b>G01N 33/53 (2006.01)</b>	G01N 33/53	D 4C085
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A61K 39/395	D 4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-514897 (P2009-514897)  
 (86) (22) 出願日 平成19年6月13日 (2007.6.13)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年2月5日 (2009.2.5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2007/002205  
 (87) 国際公開番号 W02007/144619  
 (87) 国際公開日 平成19年12月21日 (2007.12.21)  
 (31) 優先権主張番号 0611708.9  
 (32) 優先日 平成18年6月14日 (2006.6.14)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 504373299  
 ザ ユニヴァーシティ コート オブ ザ  
 ユニヴァーシティ オブ エディンバラ  
 イギリス エディンバラ イーエイチ8  
 9ワイエル サウス ブリッジ オールド  
 カレッジ  
 (71) 出願人 500480746  
 ユニヴァーシティー オヴ ストラスクラ  
 イド  
 イギリス グラスゴー ジー1 1エック  
 スキュー リッチモンド ストリート 1  
 6 マッキャンシー ビルディング

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プリオンタンパク質に対する新規抗体及びその使用

## (57) 【要約】

本発明は、未変性条件下でプリオンタンパク質の疾患関連型(PrP<sup>Sc</sup>)に選択的に結合する新規抗体、ならびにプリオン病の検出、治療および研究の方法における前記抗体の普遍的な使用に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒトPrPの106～126残基間に見出される保存アミノ酸配列もしくは他の種由来の対応アミノ酸配列を含むまたはそれらのアミノ酸配列からなる凝集ペプチドに特異的な抗体、特にPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>に結合しPrP<sup>C</sup>に結合しない能力を持つ抗体を産生するための、前記凝集ペプチドの使用。

## 【請求項 2】

凝集PrP106～126および異常な疾患関連PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>に選択的に結合するが単量体PrP106～126および正常な宿主PrP<sup>C</sup>に結合しない能力を持つ抗体。

## 【請求項 3】

抗体がポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、またはモノクローナルのIgG、IgM、IgD、IgEもしくはIgAアイソタイプ、またはそれらのフラグメントである、請求項 1 および 2 記載の抗体。

## 【請求項 4】

抗体が 1 型PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>および 2 型PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>に選択的に結合する能力を持つ、請求項 1 または 2 のいずれか 1 項記載の抗体。

## 【請求項 5】

請求項 2～4 のいずれか 1 項記載のモノクローナル抗体を生産する能力を持つ、ハイブリドーマ細胞株。

## 【請求項 6】

以下の工程を含む、請求項 5 記載のハイブリドーマ細胞株を作製する方法：  
 (a) ヒトPrPの106～126アミノ酸配列 (PrP106-126) に対応する合成ペプチドを提供し、前記ペプチドを凝集させる工程；  
 (b) 前記凝集ペプチドでマウスを免疫する工程；  
 (c) 前記免疫されたマウス由来の脾細胞を適切なマウスミエローマパートナーと融合させる工程；および  
 (d) 凝集PrP106-126に結合するが単量体PrP106-126には結合しない分泌抗体に基づいて、適切なハイブリドーマ細胞株を選択する工程。

## 【請求項 7】

工程 (d) のハイブリドーマ細胞株から得られた抗体をヒト化する工程をさらに含む、請求項 6 記載の方法。

## 【請求項 8】

ブダベスト条約に従って2006年7月6日にECACCに寄託された、受託番号06060601に基づいて入手可能なハイブリドーマ細胞株P1：1。

## 【請求項 9】

請求項 8 記載のハイブリドーマ細胞株から得られる抗体。

## 【請求項 10】

事前にプロテイナーゼK消化をする必要なく、PrP<sup>C</sup>の存在下で、組織（例えば、脳、扁桃腺または脾臓の組織生検抽出物）中および体液（例えば、血液、CSF）中の疾患関連PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>の存在を検出する方法における、請求項 2～5 および 9 のいずれか 1 項記載の抗体の使用。

## 【請求項 11】

以下の工程を含む、サンプル中のPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>を検出する方法：

(a) 組織抽出物または体液のサンプルを提供する工程；  
 (b) 請求項 2～5 および 9 のいずれか 1 項記載の抗体が前記サンプル中に存在するPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>と結合できるように、前記サンプルを請求項 2～5 および 9 のいずれか 1 項記載の抗体と接触させる工程；ならびに  
 (c) 抗体-PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>免疫複合体を検出することによって、前記サンプル中にPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>が存在するかどうかを検出する工程。

## 【請求項 12】

10

20

30

40

50

抗体が直接的に標識されている、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 3】

抗体が、適切な標識化抗マウス免疫グロブリンまたは適切な標識化抗PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>抗体のいずれかを用いて間接的に検出される、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 4】

少なくとも一部分において請求項 2 ~ 5 および 9 のいずれか 1 項記載の抗体を含む、動物、特にヒトの組織および体液における疾患関連PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>の検出のための方法またはキット。

【請求項 1 5】

請求項 2 ~ 5 および 9 のいずれか 1 項記載の抗体を用いて他の種由来のPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>を検出する方法。

10

【請求項 1 6】

プリオン病の推定治療薬の有効性を検出するための、請求項 2 ~ 5 および 9 のいずれか 1 項記載の抗体の使用。

【請求項 1 7】

ヒトおよび/または他の種におけるプリオン病の治療用又は予防用の薬物を製造するための、請求項 2 ~ 5 および 9 のいずれか 1 項記載の抗体の使用。

【請求項 1 8】

ヒトおよび/または他の種におけるプリオン病の治療または予防に用いるための、請求項 2 ~ 5 および 9 のいずれか 1 項記載の抗体。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、未変性条件下でプリオンタンパク質の疾患関連形態(PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>)に選択的に結合する新規抗体、ならびにプリオン病の検出、治療および疾患研究の方法における前記抗体の普遍的な(in general)使用に関する。

【背景技術】

【0002】

プリオン病すなわち伝染性海綿状脳症(TSE)は、神経細胞の損失、海綿状変性、グリオシスおよび異常タンパク質凝集体の沈着によって特徴付けられる、進行が急速な致死的神経変性障害のグループである。動物プリオン病としては、ヒツジのスクレイピー、ウシおよび外来有蹄動物の牛海綿状脳症(BSE)、シカおよびエルクの慢性消耗病、伝染性ミンク脳症ならびに飼い猫および外来猫の猫海綿状脳症が挙げられる(Prusiner S. B. et al (1998) Cell 93 : 337-348)。ヒトでは、認知されているプリオン病としては、クールー、孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病(sCJD)、家族性クロイツフェルト・ヤコブ病(fCJD)、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群(GSS)、致死性家族性不眠症および変異型CJD(vCJD)が挙げられる(Prusiner S. B. et al (1998) Cell 93 : 337-348)。CJDは、汚染された死体の下垂体ホルモン、硬膜移植、脳神経外科器具および角膜移植によってヒトの間に伝染してきた(Brown P. et al (2000) Neurology 55 : 1075-1081)。より最近では、輸血によるvCJD伝染の証拠が報告されており(Llewelyn C.A. et al (2004) Lancet 363 : 417-421 ; Peden A. H. et al (2004) Lancet 364 : 527-529 ; Health Protection Agency (2006) CDR weekly 16 (6))、移植および輸血の両サービスへの懸念が生じている。組織および血液のvCJD伝染性を検出することができる感度および特異性の高いアッセイを開発する必要性がかつてないほど重要となっている。そのようなアッセイは、感染宿主において細胞および組織の損傷に先立つ早期の治療的介入を可能にする疾患診断のために価値があり得るだけでなく、輸血、血液製剤、手術、歯科医術、および組織/細胞の移植片/移植による疾患伝染の危険性の減少/除去においても価値があり得る。

30

40

【0003】

プリオン病は、大部分の組織で見られる正常な細胞内プリオンタンパク質(PrP<sup>C</sup>)の - ヘルリックスに富む正常構造から - シートに富む異常構造(PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>)への構造転位によって特

50

徴付けられる。PrP<sup>C</sup>とは違って、PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>は凝集し易く、非イオン性界面活性剤に不溶であり、制限プロテイナーゼK消化に部分的な耐性を示してプロテイナーゼK耐性コア(PrP<sup>r<sup>es</sup></sup>)を形成する(Prusiner S. B et al (1998) Cell 93 : 337-348)。PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>の存在は、プリオン病の顕著な特徴と考えられており、伝染性と密接に関連しており、今日までに知られている唯一の直接的かつ明白な疾患関連マーカーである(Morel N. et al (2004) J. Biol. Chem. 279 : 30413-30419)。従って、PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>の検出は、ヒトおよび動物に用いるために現在開発されている大部分の診断テストおよびスクリーニングアッセイの基盤である。被検サンプルがPrP<sup>C</sup>およびPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>の両方を含有するであろうことを考慮すれば、未変性条件下でそれら2つの形態を区別できる試薬はアッセイ法の開発において有益な手段であろう。そのような試薬の幾つかは文献に記載されており、前記試薬としてはプラスミノゲン(Fischer M. et al (2000) Nature 408 : 479-483)、RNAアプタマー(Rhie A. et al (2003) J. Biol. Chem. 278 : 39697-39705 ; Sayer N.M. et al (2004) J. Biol. Chem. 278 : 13102-13109)、抗DNA抗体およびDNA結合タンパク質(Zou W. Q. et al (2004) PNAS 101 : 1380-1385)ならびにPrP<sup>C</sup>の複製的接合部分を含有するモチーフグラフト抗体(Moroncini G. et al (2004) PNAS 101 : 10404-10409)が挙げられる。しかしながら、アッセイ開発において最も有用な試薬は、PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>へ特異的に結合する抗体であろう。

10

#### 【0004】

現在入手可能な抗PrP抗体の多くは、例えばmAb 6H4(Korth C. et al (1997) Nature 390 : 74-77)のように未変性条件下でPrP<sup>C</sup>とPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>の両方と交差反応するか、あるいは、例えばmAb 3F4(Kascsak R. J. et al (1987) J. Virol 61 : 3688-3693)のように未変性条件下ではPrP<sup>C</sup>とのみ結合するが強い界面活性剤中もしくはカオトロピック試薬中でまたは加熱することにより変性した後ではPrP<sup>C</sup>とPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>の両方と結合する。実際、これらの抗体結合特性は、いわゆるコンホメーション依存性イムノアッセイ(CDI)(Safar J. et al (1998) Nat. Med. 4 : 1157-1165)の開発に利用されている。しかしながら、PrP<sup>C</sup>とPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>とを明確に区別するためには、プロテイナーゼKで被検サンプルを前処理してPrP<sup>C</sup>を完全に分解しそのサンプル中に存在するPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>の検出を可能にすることが必要である。現在、PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>にはプロテイナーゼK感受性形態も存在すること(Safar J. et al (2005) PNAS 102 : 3501-3506)や、それらの形態が疾患伝染に関与していること(Yakovleva O. et al (2004) Transfusion 44 : 1700-1705)について、証拠が山のように存在している。従って、プロテイナーゼK消化の必要性なしにPrP<sup>C</sup>と全ての形態のPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>とを区別することができる抗体が必要とされる。

20

30

#### 【0005】

抗体は、ユニークなアミノ酸決定基すなわちエピトープを介してタンパク質を特異的に認識する。これらエピトープは、直線状アミノ酸配列または三次元空間でアミノ酸により形成される独特なコンホメーションであり得る。PrP<sup>C</sup>のPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>への変換がタンパク質コンホメーションにおける大きな変化を伴うことを考慮すると、変換に際して固有のエピトープが形成されるまたは現れる可能性がある。精製したPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>を用いる免疫によって未変性PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>に特異的な抗体を産生する試みは、例えば3F4(Kascsak R. J. et al (1987) J. Virol 61 : 3688-3693)のように、それら抗体が未変性条件下ではPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>に対して僅かに親和性を有するかまたは全く親和性を有さないことを特徴とするため、一般的には成功していなかった。しかしながら、幾つかの報告によるとPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>特異的な抗体、例えば全長組み換えウシPrPに対して産生されたmAb 15B3(Korth C. et al (1997) Nature 390 : 74-77)、ヒトPrPのアミノ酸残基214~226に対応する合成ペプチドに対して産生されたmAb V5B2(Serbec V. C. et al (2004) J. Biol. Chem. 279 : 3694-3698)、PrPに見出されるチロシン-チロシン-アルギニンモチーフで構成される合成ペプチドに対して産生された抗体(Paramithiotis E. et al (2003) Nat. Med. 9 : 893-899)について近年記載されている。しかしながら、それらの抗体の使用はそれらの抗体が作製された研究所外では制限されており、更なるPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>特異的な抗体の作製には利益がある。

40

#### 【0006】

アミノ酸残基106~126(Swiss-Protプライマリアクセション番号P04156のヒトPrP配列

50

に従って番号付け)にわたる領域がPrP<sup>C</sup>とPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>との間のコンホメーション変化を惹起する重要な領域のひとつであり得ることについて、証拠が山のように存在する。未変性PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>被覆マイクロビーズで免疫したマウスはPrPアミノ酸残基101~120の間の領域を標的として主にIgM免疫応答を開始することが分かっており、その領域が未変性PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>の主要免疫原性領域に相当することが示唆されている(ayebi M. et al (2004) Mol. Med. 10 : 104-111)。さらに、アミノ酸残基109~112の間に位置するエピトープに結合する抗体3F4(Kascsak R. J. et al (1987) J. Virol 61 : 3688-3693)は、未変性PrP<sup>C</sup>に結合できるが未変性PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>には結合できず、このことは、変換に際し前記領域における大きなコンホメーション変化を示唆している。アミノ酸残基106~126(PrP106-126)を含む合成ペプチドはPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>に関連するいくつかの特性を示すことが研究によって示されている。例えば、PrP106-126はpH依存性ランダムコイルを経て $\beta$ -シート変換し凝集して、プロテイナーゼKでの消化に部分的な耐性があるアミロイド線維を形成し(Selvaggini F. et al (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 194 : 1380-1386, DeGioia L. et al (1994) J. Biol. Chem. 269 : 7859-7862)、PrP106-126微小凝集体へのヒト神経細胞株の露出は内在性PrP<sup>C</sup>が幾つかの特性をPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>と共有するアミロイド形成的形態への凝集を触媒し(Singh N. et al (2002) Front. Biosci. 7 : 60-71; Gu. Y. et al (2002) J. Biol. Chem. 277 : 2275-2286)、プリオン毒性と似た特長を有する細胞毒性をもたらす。理論により束縛されることを望まないが、本発明者らは、凝集したPrP106-126で動物を免疫した後に産生される特定の抗体が凝集に際して形成されるユニークなコンホメーションエピトープと特異的に結合することができ、そのエピトープがPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>にも存在するであろうと仮定した。この理論は、一つには、アミロイド線維状態のアルツハイマー病ペプチドA (1-40)に結合するが可溶性単量体ペプチドには結合しないコンホメーション特異的モノクローナル抗体(mAb)の作製を記述している論文の発表により支持されている(O'Nuallin B. et al (2002) PNAS 99 : 1485-1490)。

#### 【発明の概要】

##### 【0007】

本発明は、一つには、ヒトプリオンタンパク質のアミノ酸残基106~126由来のアミノ酸配列に対応する合成ペプチド配列から構成される凝集体を使用して動物を免疫し、事前にサンプルをプロテイナーゼK処理する必要なく未変性条件下でPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>を特異的に検出できるがPrP<sup>C</sup>を検出しない特定の抗体を作製することに基づく。

そこで、第一の態様は、ヒトPrPに特異的な抗体、特にPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>に結合できるがPrP<sup>C</sup>に結合しない抗体を産生させるための、ヒトPrPの残基106~126に見出される保存アミノ酸配列または他の種由来の対応アミノ酸配列を含むまたはそれらからなる凝集ペプチドの使用を提供することである。さらなる態様では、本発明は、凝集PrP106-126および異常な疾患関連PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>と特異的に結合できるが単量体PrP106-126および正常な宿主PrP<sup>C</sup>とは結合しない抗体を提供する。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、IgG、IgM、IgD、IgEもしくはIgAアイソタイプでもよく、またはそれらのフラグメントでもあり得る。

本発明の抗体は、ヒト化されたもの(Thompson, K.M. et al (1986) Immunology 58, 157-160)であってもおよび/または単一ドメイン抗体形態(Ward, E.S. et al (1989) Nature 341, 544-546)であってもよい。

本発明の抗体は、事前にプロテイナーゼK消化する必要なくPrP<sup>C</sup>の存在下で散発性CJD(sCJD)およびvCJD由来の1型PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>および2型PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>と特異的に結合してPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>とPrP<sup>C</sup>とを区別することができる。PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>のプロテイナーゼK感受性形態の存在と疾患伝染にそれら形態が関与している可能性とを考慮すると、前もってプロテイナーゼK消化する必要なくPrP<sup>S<sup>c</sup></sup>とPrP<sup>C</sup>とを区別することができる試薬は非常に望ましい。

##### 【0008】

本発明の典型的な抗体は、PrPペプチドフラグメントの凝集体で形成され単量体ペプチドには見出されないコンホメーションエピトープに対して産生される。好ましくは、前記ペプチドはヒトPrP(Swiss-Protプライマリアクセション番号P04156)の残基106~126に

見出される保存アミノ酸配列または他の種由来の対応アミノ酸配列を含むまたはそれからなる。例えば、マウスの対応配列はアミノ酸残基105～126(Swiss-Protプライマリアクセション番号P04925)に位置し、ヒツジの対応配列は残基109～129(Swiss-Protプライマリアクセション番号P23907)に位置し、またウシの対応配列は残基117～137(Swiss-Protプライマリアクセション番号P10279)に位置する。当業者であれば、他の種由来の対応配列を容易に同定することができる。本発明のペプチドは、標準的なペプチド合成技術、例えば、標準的な9-フルオレニル-メトキシカルボニル(F-Moc)化学反応、標準的なブチルオキシカーボネート(T-Boc)化学反応またはフルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)/tert-ブチル系(Atherton E. and Sheppard R. C. (1998) Solid Phase Peptide Synthesis : A Practical Approach, Oxford, IRL Press)のいずれかを用いることによって合成され得る。純度は85%を通常上回っているであろうが注意深く確認すべきであり、この目的のために例えば種々のクロマトグラフィー技術(高性能液体クロマトグラフィーが挙げられる)および分光分析(ラマン分光法が挙げられる)を使用することができる。前記ペプチドを、適切な緩衝液、たとえばpH 7.0のPBS中に再懸濁し室温で16時間インキュベーションして、適切な動物の免疫に先立って凝集体を形成させておいてもよい。

10

#### 【0009】

本発明者らは本発明のモノクローナル抗体を産生することができるハイブリドーマ細胞株を作製した。ヒトPrPのアミノ酸残基106～126(PrP106-126)に対応する合成ペプチドを凝集させた。この凝集ペプチドを用いてマウスを免疫した。その免疫したマウス由来の脾細胞を適切なマウスミエロマパートナーと融合させて、周知の技術に従ってハイブリドーマ細胞株を選択した(Hawlow E. and Lane D. (1988) Antibodies : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Lab. Press, Plainview, NY)。これらのハイブリドーマ細胞株由来の上清サンプルを、凝集PrP106-126および単量体PrP106-126との結合についてELISAによりスクリーニングした。次に、凝集PrP106-126と結合するが単量体PrP106-126と結合しない抗体を分泌するハイブリドーマ細胞株を単細胞クローニングして、生み出した細胞株のストックを冷凍した。

20

そこで、本発明の第三の態様では、本発明のモノクローナル抗体(IgMアイソタイプ)を分泌することができるハイブリドーマ細胞株(P1:1)が提供される。このハイブリドーマ細胞株は、ブダペスト条約に従って、2006年6月6日にECACCに寄託されており、受託番号06060601に基づいて入手可能である。

30

#### 【0010】

本発明の抗体は、とりわけ、事前のプロテイナーゼK消化の必要なくPrP<sup>C</sup>の存在下で組織(例えば、脳、扁桃線または脾臓の組織生検抽出物)中および体液(例えば、血液、CSF)中で疾患関連PrP<sup>Sc</sup>の存在を検出する方法において役立つ。従って、以下の工程を含むサンプル中のPrP<sup>Sc</sup>を検出する方法を提供する：

(a)組織または体液のサンプルを提供する工程；

(b)前記サンプルを本発明の抗体と接触させて前記抗体が前記サンプル中に存在するPrP<sup>Sc</sup>と結合できるようにする工程；および

(c)抗体-PrP<sup>Sc</sup>免疫複合体を検出することにより前記サンプル中にPrP<sup>Sc</sup>が存在するか否かを検出する工程。

40

抗体-PrP<sup>Sc</sup>免疫複合体の検出に関して、当業者であれば本技術分野で既知の種々のイムノアッセイ手法、とりわけELISA、DELFI A、RIA、免疫沈降に次ぐウエスタンブロッティング、およびフローサイトメトリーを知っているであろう。これらのイムノアッセイではいずれか適切な標識を用いることができ、そのような標識としては、直接的または間接的に可視化され得る放射性、蛍光、発色性(例えばアルカリリンフォスファターゼもしくはホースラディッシュペルオキシダーゼ)、化学発光またはハプテン(例えばビオチン)が挙げられるがこれらに限られない。本発明の抗体は、イムノアッセイ用に直接的に標識してもよい。あるいは、PrP<sup>Sc</sup>と本発明の抗体とによって形成された複合体を、適切に標識した抗マウス免疫グロブリンまたは適切に標識した抗PrP抗体のどちらかを用いて間接的に検出してもよい。

50

## 【 0 0 1 1 】

そこで、本発明の第四の態様は、動物、特にヒトの組織中および体液中の疾患関連PrP<sup>S</sup>を検出するための方法またはキットであって、本発明の抗体を少なくとも一部に含む前記方法またはキットを提供する。

異なる種におけるペプチド配列が相対的に保存されていることを考慮すると、本発明の抗体は他の種由来のPrP<sup>S</sup>と交差反応するであろうことが予想される。この理論をテストするため、本発明者らは、本発明由来の抗体が凝集した組み換えマウスPrPと特異的に結合できるが単量体組み換えマウスPrPとは結合しないことをイムノプロットティングによって示すことができた。

そこで、本発明の第五の態様は、本発明の抗体を用いて他の種由来のPrP<sup>S</sup>を検出する方法を提供し、且つ少なくとも本発明の抗体を含む方法/キットを包含する。

本発明の第六の態様は、プリオン病の推定治療薬の有効性を決定するための本発明の抗体の使用を包含する。本発明の抗体を、とりわけPrP<sup>S</sup>の検出用アッセイで用いることができ、可能性のある治療薬が細胞培養モデルおよび動物モデルの両方において伝染性を除去できるかまたはPrP<sup>S</sup>の発生を予防できるかを決定することができる。

ある種の抗PrP抗体が*in vivo*(White A. R. et al (2003) Nature 422 : 80-83 ; Sigurdsson E. M. et al (2003) Neuroscience Letters 336 : 185-187)と*in vitro*(Feraudet C. et al (2005) J. Biol. Chem. 280 : 11247-11258)の両方でプリオン複製を阻害できプリオン病の発生を遅らせることができることを、最近いくつかの論文が報告している。そこで、本発明の第七の態様では、ヒトおよび/または他の種におけるプリオン病の治療用または予防用の薬物を製造するためのいずれかの形態の本発明の抗体の使用を提供する。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 1 2 】

【 図 1 a 】 [PrP106-126凝集体の作製]室温にて0時間、1時間または16時間インキュベーションしたサンプルを600 nmでの濁度の上昇によりモニターした、PrP106-126凝集体の形成の経時変化。

【 図 1 b 】 [PrPヌルマウスの免疫]免疫前血清サンプル(白色棒グラフ)と試験採血血清サンプル(灰色棒グラフ)を凝集PrP106-126被覆マイクロウェルに血清抗体を結合させたELISAにより決定した、凝集PrP106-126で免疫した各マウスの免疫応答。試験採血血清サンプルについて得られた吸光度値の上昇は、免疫前血清サンプルの場合と比較して、陽性の免疫応答を示していた。

【 図 2 a 】 [凝集PrP106-126と特異的に結合するmAbの同定]mAb P1 : 1、mAb P1 : 2およびmAb P1 : 3を、PrP106-126ペプチドの非存在下(白色棒グラフ)、単量体PrP106-126-NH<sub>2</sub>の存在下(灰色棒グラフ)、凝集PrP106-126の存在下(黒色棒グラフ)にてブレインキュベーションし、次に凝集PrP106-126被覆マイクロウェルへの抗体結合についてELISAによりスクリーニングした。3つのmAb全てについての結果を正規化するために、得られた結果を最大吸収率(%)として表した。mAb P1 : 2およびmAb P1 : 3の結合は、単量体PrP106-126と凝集PrP106-126双方のブレインキュベーション後に阻害された。一方、mAb P1 : 1の結合は凝集PrP106-126でのブレインキュベーション後にのみ阻害された。

【 図 2 b 】 [凝集PrP106-126と特異的に結合するmAbの同定]凝集PrP106-126との結合に対する精製mAb P1 : 1の特異性を示すELISA。mAb P1 : 1を、PrP106-126ペプチドの非存在下、過剰量の100倍モルの単量体PrP106-126-NH<sub>2</sub>中、過剰量の100倍モルの凝集PrP106-126中でブレインキュベーションし、次に凝集PrP106-126被覆マイクロウェルへの抗体結合についてスクリーニングした。過剰量の100倍モルの凝集PrP106-126とのブレインキュベーション後にのみ、結合の阻害が検出された。

【 図 3 a 】 [ヒト脳ホモジェネート由来のPrP<sup>C</sup>、PrP<sup>S</sup>およびPrP<sup>res</sup>の免疫沈降]アルツハイマー病神経学的対照脳由来の1%脳ホモジェネート(レーン2)ならびにvCJD脳由来の1%脳ホモジェネート(レーン3およびレーン4)を10 μgのmAb P1 : 1で免疫沈降させた。レーン4については、免疫沈降に先立ってvCJD脳ホモジェネートをプロテイナーゼK(PK)で処理した。分子量マーカー(レーン1)と並べてのSDS-PAGEおよびPVDFメンブレン上

10

20

30

40

50

へのエレクトロトランスファーの後で、そのメンブレンをmAb 3F4でプロービングすることによってPrP<sup>C</sup>、PrP<sup>Sc</sup>およびPrP<sup>res</sup>を検出した。

【図3b】[ヒト脳ホモジェネート由来のPrP<sup>C</sup>、PrP<sup>Sc</sup>およびPrP<sup>res</sup>の免疫沈降]レビー小体型認知症脳から調製した1%ホモジェネート(レーン2)、アルツハイマー病脳から調製した1%ホモジェネート(レーン3)、アミロイド血管症脳から調製した1%ホモジェネート(レーン4)、vCJD脳から調製した1%ホモジェネート(レーン5およびレーン6)、sCJD MM1脳から調製した1%ホモジェネート(レーン7およびレーン8)ならびにsCJD VV2A脳から調製した1%ホモジェネート(レーン9およびレーン10)をP1:1 mAbで免疫沈降させた。レーン6、レーン8およびレーン10については、免疫沈降に先立って脳ホモジェネートをPKで消化した。分子量マーカー(レーン1)と並べてのSDS-PAGEおよびPVDFメンブレン上へのエレクトロトランスファーの後で、そのメンブレンをmAb 3F4でプロービングすることによってPrP<sup>C</sup>、PrP<sup>Sc</sup>およびPrP<sup>res</sup>を検出した。

【図4a】[recMoPrP凝集体の作製] -ヘリックスrecMoPrPをPBS(対照)または0.2%SDS添加したPBS(SDS処理)で調製し、これらを室温にて10分間インキュベーションした。次に、両サンプルをPBSで20倍に希釈し、一晚室温にてインキュベーションした。各サンプルのアリコート量を14,000×gで30分間遠心沈殿させ、上清を収集した。遠心分離前の各サンプル中のタンパク質含量(白色棒グラフ)と遠心分離後の各上清中のタンパク質含量(灰色棒グラフ)とをBCAプロテインアッセイで決定し、その結果は得られた570 nmの吸光度の読み値として表した。遠心分離前の570 nmの吸光度の読み値と比べてSDS処理した遠心分離後のサンプルについて得られた570 nmの吸光度の読み値の低下は、不溶性recMoPrP凝集体の形成を示していた。

【図4b】[mAb P1:1の単量体recMoPrPおよび凝集recMoPrPとの結合の比較]上述の凝集組換えマウスPrPのアリコート(スロットA)と単量体組換えマウスPrPのアリコート(スロットB)とをニトロセルロースメンブレン上にスロットプロットし、mAb P1:1(プロット1)または負の対照としての非PrP関連マウスIgM(プロット2)のどちらかでプロービングした。mAb P1:1は凝集recMoPrPと特異的に結合した。

【発明を実施するための形態】

【0013】

(発明の詳細な説明)

ここで、図面を参照しながら実施例によって本発明を詳細に説明する。これら実施例は、本発明の特定の実施態様を例証するのに役立つが、本発明の実施態様を限定するものとみなされない。

【0014】

[実施例1: PrP106-126アミロイド線維の調製]

ヒトPrP106-126(KTNMKHMAGAAAAGAVVGGLG)およびヒトPrP106-126-NH<sub>2</sub>(KTNMKHMAGAAAAGAVVGGLG-NH<sub>2</sub>)に対応する合成ペプチドをシグマジエノシス(Sigma Genosys)から入手した。凝集PrP106-126を作製するため、PrP106-126(2 mg)を1 mLの200 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に加えて、室温で16時間インキュベーションした。凝集体の形成は、0時間後、1時間後および16時間後にアリコート(125 μL)をリン酸緩衝液で最終容積1 mLに希釈して、600 nmでリン酸緩衝液ブランクに対する濁度を測定することによってモニターした。凝集PrP106-126を記載どおりに形成し、600 nmでの濁度の変化を測定することにより凝集体の形成をモニターして(図1a)、PrPヌルマウスの免疫に用いた。

【0015】

[実施例2: マウスの免疫]

3匹のPrPヌル(PrP<sup>0/0</sup>)マウス(Neuropathogenesis Unit, IAH, Edinburghより供給)(Manson J. C. et al (1994) Mol. Neurobiol. 8: 121-127)を50 μgの凝集PrP106-126を含む完全フロイントアジュバントでそれぞれ皮下免疫し、次に28日おきに50 μgの凝集PrP106-126を含む不完全フロイントアジュバントでさらに2回追加皮下免疫をした。最後の免疫から7日後に、試験採血をし、得られた血清サンプルを以下に記述するようにELISAによって凝集PrP106-126被覆マイクロウェルと結合している抗体についてスクリーニングし

た。

96ウェル イムロン4 HXBマイクロタイタープレート(テルモラボシステムズ(Thermo Lab systems))のウェルをPBS(10 mMリン酸、2.7 mM KCl、137 mM NaCl、pH 7.4)中の100 ngの凝集PrP106-126で37 にて一晚被覆した。このウェルをPBST(0.05%(v/v)の Tween 20を含むリン酸緩衝生理食塩水)で3回洗滌し、プロット乾燥させ、5%ウシ胎児血清(FCS)を含むPBST(200 μL/ウェル)で37 にて60分間ブロックした。このウェルをPBSTで2回洗滌し、プロット乾燥させた。免疫した3匹のマウス由来のテスト血清および免疫前血清のアリコート(100 μL/ウェル)を1%FCS添加したPBSTで1/1000希釈し、ウェルに3連で加え、37 にて60分間インキュベーションした。そのウェルをPBSTで4回洗滌し、プロット乾燥させた。ヤギ抗マウス多価Ig-HRPコンジュゲート(シグマ(Sigma))を1%FCS添加したPBSTで1/2000希釈して全てのウェルに加え(100 μL/ウェル)、37 にて60分間インキュベーションした後、ウェルをPBSTで4回洗滌し、プロット乾燥させた。全てのウェルにシユアブルー(SureBlue)TMBマイクロウェルペルオキシダーゼ基質(インサイトバイオテクノロジー社(Insight Biotechnology Ltd))(100 μL/ウェル)を加え、37 にて30分間インキュベーションした時点で0.18 M硫酸停止溶液を加え(100 μL/ウェル)、マイクロプレートリーダー(ダイナックス(Dynex)MRX)で450 nmの吸光度を測定した。結果を、抗マウス多価Ig-HRPのPrP106-126線維被覆ウェルとの非特異的結合の平均吸光度に対して補正した各試験サンプルの450 nm平均吸光度として計算した。

免疫したマウスは、各マウス由来の免疫前および最終試験採血の血清サンプルを凝集PrP106-126被覆マイクロウェルと結合する抗体につきELISAスクリーニングによって決定したところ、3匹全てが凝集PrP106-126に対する免疫応答を開始した。

【0016】

[実施例3：モノクローナル抗体の産生]

ハイブリドーマ作製のために選択したマウスに50 μgの凝集PrP106-126を含むPBSで最終静脈内追加免疫を行い、4日後に屠殺した。免疫したマウス由来の脾細胞を一般的なポリエチレングリコール(PEG)1500融合プロトコルを用いてSP2/0-Ag14マウスミエローマ細胞(ECACC番号85072401)と融合させ、得られたハイブリドーマをHAT培地中で選択した(Haw low E. and Lane D. (1988) Antibodies : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Lab. Press, Plainview, NY)。1%FCSを添加したPBSTで上清サンプルを1/2希釈してスクリーニングしたことを除いて、基本的には免疫応答を決定するために記載したように、ハイブリドーマ上清を凝集PrP106-126と結合するmAbの分泌につきELISAによって型通りにスクリーニングした。凝集PrP106-126と結合するmAbを分泌するハイブリドーマを3回単細胞クローニングし、各細胞株の凍結ストックを蓄えた。産生されたmAbのアイソタイプを、アイソトリップ(Isotrip)マウスモノクローナル抗体アイソタイプピングキット(ロシュ・ダイアグノスティック(Roche Diagnostics))を用いてキットと共に供給された説明書に従って決定した。

No.3のマウス由来の脾細胞とSP2/0マウスミエローマ細胞との融合の後、播種した360ウェルの中から、凝集PrP106-126被覆マイクロウェルと結合する抗体を分泌している活発に分裂中のハイブリドーマを含有する4ウェルを同定した(結果は示さず)。これらの4ウェル由来の細胞を単細胞クローニングして、それぞれP1:1、P1:2、P1:3およびP1:4と命名した。クローニングの間、細胞株P1:4は増殖が極端に遅く、ひとたび細胞株の凍結ストックを蓄えるとこの細胞株を用いた更なる作業は実施できなかったことを注記しておく。

ハイブリドーマP1:2およびP1:3は両方ともIgG1 アイソタイプ抗体を分泌することが示された。ハイブリドーマP1:1はIgM アイソタイプ抗体を分泌したが、この細胞株で非常に弱いIgG1シグナルも検出され、更なるラウンドの単細胞クローニングの後でも排除できなかった。これはロシュ社のアイソタイプピングストリップとの非特異的相互作用によって引き起こされたと本発明者らは現在考えている。

【0017】

[実施例4：凝集PrP106-126と特異的に結合するmAbの同定]

10

20

30

40

50

各ハイブリドーマ上清のアリコート(1:1で1%FCS添加PBST、凝集PrP106-126を含む1%FCS添加PBST(最終濃度10 µg/mL)または単量体PrP106-126-NH<sub>2</sub>を含む1%FCS添加PBST(最終濃度10 µg/mL)と混合し、ローラーミキサー上で室温にて60分間インキュベーションし、14,000 × gにて10分間遠心沈降させた。COOH末端アミド化はPrP106-126の凝集体を形成する性向を減少させることが報告されており(Salmona M. et al (1999) Biochem. J. 342:207-214; Bergstrom A.L. et al (2005) J. Biol. Chem. 280:23114-23121)、従ってペプチドPrP106-126-NH<sub>2</sub>を新たに、特に使用する直前に調製すると凝集体を形成しないであろうことが想定された。凝集PrP106-126被覆マイクロタイタープレートの3連ウェルに各上清のアリコート(100 µL)を移し、先に記載したようにELISAを実施した。凝集PrP106-126でのプレインキュベーション後に抗体結合の有意な減少を示し単量体PrP106-126-NH<sub>2</sub>でのプレインキュベーション後には抗体結合の有意な減少を示さないハイブリドーマについて更に分析を進めた。

得られた結果から(図2a)、凝集PrP106-126およびPrP106-126-NH<sub>2</sub>単量体ペプチドとの双方とのプレインキュベーションがmAb P1:2およびmAb P1:3の凝集PrP106-126被覆マイクロウェルとの結合を阻害したことは明らかであった。このことは、mAb P1:2およびmAb P1:3が凝集PrP106-126と単量体PrP106-126の双方に存在するエピトープと結合したことを示唆していた。これら2つのmAbは、以前キーホールリンペットヘモシアニンと結合させたペプチドでマウスを免疫後にPrP106-126に対して産生されたmAbと同様の特性を有すると思われる(Hanan E. et al (2001) Cell Mol. Neurobiol. 21:693-703)。

#### 【0018】

P1:1のmAbの結合は、凝集PrP106-126とのプレインキュベーション後のみ阻害され、単量体ペプチドとのプレインキュベーション後には阻害されなかった(図2a)。従って、mAb P1:1は凝集PrP106-126に特異的なコンホメーションエピトープと結合するようである。mAb P1:1のアイソタイプ(IgM、)が以前にアルツハイマー型ペプチドA (1-40)線維と特異的に結合することが報告された2つのmAb(O'Nuallain B. et al (2002) PNAS 99:1485-1490)と同じであることに気付いたことは興味深い。

これらの結果に基づいて、ハイブリドーマP1:2およびP1:3に関する全ての作業を停止して、一旦各細胞株の凍結ストックを蓄えたままにし、ハイブリドーマP1:1に専念することを決定した。精製mAb P1:1の凝集PrP106-126との特異的結合を1 µg/mLのmAb P1:1濃度でELISAによって確認した(図2b)。懸念されるのは、阻害剤の非存在下で最大吸光度が0.205の読み値といった相対的に低い吸光度値が得られたことであった。これらの低い読み値はmAb P1:1がその標的に対して低い親和性しか有さないという事実が原因の可能性があり、このことはIgMアイソタイプ抗体にとっては珍しくない。しかしながら、特異的エピトープの低親和性の可能性または立体障害の可能性を軽視すべきではなく、更なる調査が必要である。

#### 【0019】

##### [実施例5: IgMアイソタイプモノクローナル抗体の精製]

50%飽和硫酸アンモニウムを用いた沈殿に次ぐスーパーロース(Superose)6カラム(アマシャムバイオサイエンス(Amersham Biosciences))でのサイズ排除クロマトグラフィーによって、使用済み(spent)ハイブリドーマ培養上清(200 mL)からIgMアイソタイプmAbをPBS緩衝液中に精製した。次に、精製したIgMの濃度をELISAによって以下のように決定した。

96ウェルイムノロン(Immulon)4 HXBマイクロタイタープレートのウェルを1ウェルあたり100 ngの抗マウス(µ鎖特異的)IgM(Sigma)を含むpH 9.6の50 mMカーボネート/ピカーボネート被覆緩衝液で一晩4 にて被覆した。このウェルをPBSTで3回洗滌し、プロット乾燥させ、5%FCS添加したPBST(200 µL/ウェル)で37 にて60分間ブロッキングし、PBSTで2回洗滌し、プロット乾燥させた。マウスIgM標準物質(Sigma)の2倍段階希釈を200 ng/mL ~ 1.56 ng/mLの範囲で調製し、試験サンプルの2倍段階希釈を1/1000 ~ 1/16,000希釈で調製した。全ての希釈は1%FCS添加したPBSTで調製した。標準物質および試験サンプルの各アリコート(100 µL)を抗マウスIgM被覆マイクロタイタープレートに3連で移し、37 にて60分間インキュベーションし、ウェルをPBSTで4回洗滌し、プロット乾燥させた。1%F

CS添加したPBSTで1/2000希釈したヤギ抗マウス(μ鎖特異的)IgM-HRPコンジュゲート(100 μL/ウェル)を全てのウェルに加え、37 °Cで30分間インキュベーションし、ウェルをPBSで4回洗滌し、プロット乾燥させた。全てのウェルにTMB基質(100 μL/ウェル)を加え、室温で10分間インキュベーションした時点で酸停止溶液(100 μL/ウェル)を加え、マイクロプレートリーダーを用いて450 nmの吸光度を測定した。標準物質と試験サンプルの各々の平均吸光度を算出し、各標準物質についての平均吸光度を対応するIgM濃度に対してプロットして検量線を作成し、その検量線から試験サンプル中のIgM濃度を決定した。

記載のようにmAb P1 : 1を精製し、結果として200 mLの使用済みハイブリドーマ培地から1.36 mgのIgMを回収した。精製IgMの最終濃度をPBSで1 mg/mLに調整し、10% (w/v) マルトースおよび0.001% (w/v) アジ化ナトリウムを加えて、精製IgMを100 μLアリコートで -40 °Cにて保存した。

10

#### 【0020】

[実施例6 : ヒト脳ホモジェネート由来のPrP<sup>C</sup>、PrP<sup>Sc</sup>およびPrP<sup>Res</sup>の免疫沈降]

アルツハイマー病神経学的対照脳およびvCJDから、pH 7.4のTBS(0.5% NP-50、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、トリス緩衝食塩水)で脳ホモジェネート(10%)を調製した。このホモジェネートを200 rpmで5分間遠心分離し、上清を集めた。プロテイナーゼK(PK)消化のため、清澄化したホモジェネートにPKを50 μg/mLの最終濃度で加え、37 °Cで60分間インキュベーションし、ペファブロック(Pefabloc、最終濃度1 mM)の添加によって消化を停止させた。アルツハイマー病神経学的脳ホモジェネート(PK未処理)およびvCJD脳ホモジェネート(PK未処理のものとはPK処理したものの両方)由来の10%脳ホモジェネートのアリコート(10 μL)を、10 μgのmAb P1 : 1と混合してPBS(10 mMリン酸、2.7 mM KCl、137 mM NaCl、pH 7.4)で最終容積100 μLとし、ロータリーミキサー上で一晩4 °Cにてインキュベーションした。各サンプルにラット抗IgM結合ダイナビーズ(Dynabead : ダイナル(Dynal)社)(10 μL)を加えて混合し、ロータリーミキサー上で60分間室温にて混合した。次に、そのビーズをPBSで3回洗滌し、25 μLの1×ニューページ(NuPAGE)LDSサンプル緩衝液(インビトロジェン(Invitrogen))中に再懸濁させ、10分間煮沸した。

20

#### 【0021】

免疫沈降物をニューページ・ノベックス(NuPAGE Novex)10%ビス-トリスゲル(Invitrogen)にロードし、200 Vの定電圧で45分間電気泳動させて、30 Vの定電圧で60分間PVDFメンブレン上にエレクトロトランスファーさせた。5%乾燥粉ミルクを含むTBST(10 mM トリス-HCl、150 mM NaCl、0.05% (v/v) ツイーン20、pH 7.5)中で前記メンブレンを一晩4 °Cにてブロッキングした。そのメンブレンを、TBST中で2回洗滌(洗滌1回につき3分)した後、TBSTで1/1000希釈したmAb 3F4(ダコ(Dako))中で60分間室温にてインキュベートしてから、TBST中で3回洗滌した(洗滌1回につき3分)。そのメンブレンを、次に、TBSTで1/40,000希釈したヤギ抗マウスIgG(Fab特異的)ペルオキシダーゼコンジュゲート(Sigma)中で60分間室温にてインキュベートした。そのメンブレンを、TBST中で3回洗滌(洗滌1回につき3分)した後、ECLプラス試薬(Amersham Biosciences)中で5分間室温にてインキュベートし、水気を切って、2枚の透明フィルムの間に置き、ハイパーフィルム(Hyperfilm)ECL(アマシャムバイオサイエンス)に露出させて30秒、3分および10分露光を行った。次に、ハイパープロセッサ(Hyperprocessor)を用いて前記ハイパーフィルムを現像した。その他PK未処理の神経学的対照(アミロイド血管症およびレビー小体型認知症)脳ホモジェネート、sCJD MM1(PK未処理のものとはPK処理したものの両方)脳ホモジェネートおよびsCJD VV2(PK未処理のものとはPK処理したものの両方)脳ホモジェネートを用いた後述の免疫沈降実験全てを上述のように実施した。

30

40

#### 【0022】

最初の実験(図3a)は、mAb P1 : 1が、PK未処理vCJD脳ホモジェネート由来のPrP<sup>Sc</sup>(図3a、レーン3)と、PK処理したvCJDホモジェネート由来のPrP<sup>Res</sup>の微量(図3a、レーン4)とを免疫沈降させたことを示した。アルツハイマー病の脳ホモジェネートからPrP<sup>C</sup>は免疫沈降しなかった(図3a、レーン2)。このデータに基づくと、mAb P1 : 1はvCJD脳由来の全長PrP<sup>Sc</sup>を選択的に免疫沈澱させるがPK消化後のPrP<sup>Res</sup>を選択的に免疫沈澱させ

50

ないと思われる。この所見は、全長組み換えウシPrPに対して産生されたmAbでありPrP<sup>Sc</sup>に特異的に結合することが報告されているmAb 15B3(Korth C. et al (1997) Nature 390 : 74-77)についてなされた所見と類似していた。mAb 15B3はPK消化されたPrP<sup>res</sup>と比べ無処置のPrP<sup>Sc</sup>をより効果的に免疫沈降させると思われ、それはPK消化が結果的に15B3エピトープを遮蔽するかもしれない大きな凝集体(スクレイビー関連線維)を形成するという事実によるものであることが示唆されていた。一方、この説明はmAb P1 : 1についても真実であるかもしれない、その他可能な説明を考える必要があった。一つの可能性は、免疫沈降に先立つPK消化がPrP<sup>Sc</sup>と比べPrP<sup>res</sup>のコンホメーションを変化させて、mAb P1 : 1により認識されるコンホメーションエピトープを破壊することであった。もうひとつのより興味深い可能性は、mAb P1 : 1がvCJD脳ホモジェネート中に存在するPK感受性型のPrP<sup>Sc</sup>を特異的に免疫沈降させるかもしれないということであった。

10

#### 【0023】

これらの可能性について更に調査するため、vCJD脳ホモジェネート由来のPrP<sup>Sc</sup>およびPrP<sup>res</sup>だけでなくsCJD MM1脳ホモジェネート由来のPrP<sup>Sc</sup>およびPrP<sup>res</sup>とsCJD VV2脳ホモジェネート由来のPrP<sup>Sc</sup>およびPrP<sup>res</sup>をも免疫沈降させることを試みた。加えて、mAb P1 : 1のPrP<sup>Sc</sup>に対する特異性を確かめる目的で、アルツハイマー病脳ホモジェネートと平行して更に2つの神経学的対照脳ホモジェネート(アミロイド血管症およびレビー小体型認知症)を含めた。得られた結果(図3b)から、mAb P1 : 1がどの神経学的対照脳ホモジェネート由来のPrP<sup>C</sup>も免疫沈降させられなかったことは明らかであった(図3b、レーン2、レーン3およびレーン4)。mAb P1 : 1は、PK消化なしで、vCJD脳ホモジェネート由来(図3b、レーン5)、sCJD MM1脳ホモジェネート由来(図3b、レーン7)およびsCJD VV2脳ホモジェネート由来(図3b、レーン9)の全長PrP<sup>Sc</sup>を免疫沈降させた。PK消化後、mAb P1 : 1は、vCJD脳ホモジェネート由来(図3b、レーン6)およびsCJD VV2脳ホモジェネート由来(図3b、レーン10)のPrP<sup>res</sup>を微量のみ免疫沈降させたが、sCJD MM1脳ホモジェネート由来のPrP<sup>res</sup>をより著しく免疫沈降させた(図3b、レーン8)。このように、mAb P1 : 1は1型全長PrP<sup>Sc</sup>および2型全長PrP<sup>Sc</sup>ならびに1型PrP<sup>res</sup>と優先的に結合するが2型PrP<sup>res</sup>とは非常に弱く結合するようであった。これらの所見は、mAb P1 : 1のPrP<sup>Sc</sup>およびPrP<sup>res</sup>との結合がPrPのNH<sub>2</sub>末端領域(アミノ酸23-97)によって影響されたことを示唆しているようであった。1型PrP<sup>Sc</sup>と2型PrP<sup>Sc</sup>との主な相違のひとつは主要なPK切断部位の位置であり、1型PrP<sup>Sc</sup>では残基82に位置し、2型PrP<sup>Sc</sup>では残基97に位置する(Parchi P. et al (2000) PNAS 97 : 10168-10172)。従って、PK消化後、1型PrP<sup>res</sup>は2型PrP<sup>res</sup>よりわずかに長いNH<sub>2</sub>末端を有するであろう。mAb P1 : 1を用いて得られた結果に基づくと、PK消化は全長PrP<sup>Sc</sup>と比べて消化の結果得られたPrP<sup>res</sup>のコンホメーションに変化をもたらすようであり、残りのタンパク質構造の明らかな改造(reshuffling)のため実際にそのようなコンホメーションにおける変化が以前に報告されており(Safar J. et al (1993) J. Biol. Chem. 268 : 20276-20284)、また、コンホメーションにおけるその変化はPK切断の主要部位によって影響されると思われる。

20

30

#### 【0024】

[実施例7 : 組換えマウスPrP線維と結合する抗体]

0.2% SDS中で可溶化された組換えPrPについて、その組換えPrPは、SDS含有量の0.01%未満への減少および室温での長期的なインキュベーションの際に、コンホメーション変化を起こしてプロテイナーゼK耐性を示す大きな多量体を形成することが報告されていた(Post K. et al (1998) Biol. Chem. 379 : 1307-1317)。従って、以前に記載された方法(Trieschmann L. et al (2005) BMC Biotechnol. 5 : 26-30)を適合させて、単量体 -ヘリックスrecMoPrPから組換えマウスPrP(recMoPrP)凝集体を作製した。100 μg/mLの最終recMoPrP濃度が得られるように、 -ヘリックス組換えマウスPrP(Andy Gill博士(IAH, Compton)による提供)をそれぞれPBSと0.2% (w/v) SDS添加したPBSとで調製し、これらを室温にて10分間インキュベーションした。両サンプル、すなわちSDS共存物とSDS非共存物とをPBSで20倍に希釈し、一晚室温にてインキュベーションした。recMoPrP凝集体の形成は、次のように決定した。各サンプルのアリコート(1 mL)を14,000 × gで30分間遠心沈殿させ、得ら

40

50

れた上清を収集した。次に、ピアス(Pierce)BCAプロテインアッセイキットで供給される試薬を用いて、遠心分離前のサンプル中のタンパク質分配と遠心分離後の上清中のタンパク質分配とを決定した。簡単にいうと、遠心分離前のサンプル25  $\mu$ Lと遠心分離後の上清サンプル25  $\mu$ Lの各々を200  $\mu$ LのBCA試薬に加え、37  $^{\circ}$ Cで30分間インキュベーションし、570 nmの吸光度を測定した。recMoPrPがSDS処理後の溶液からは遠心沈殿したがPBS単独でのインキュベーション後の溶液からは遠心沈殿しなかったという事実(図4 a)により、SDS処理後に不溶性recMoPrP凝集体が形成されたことが確認された。

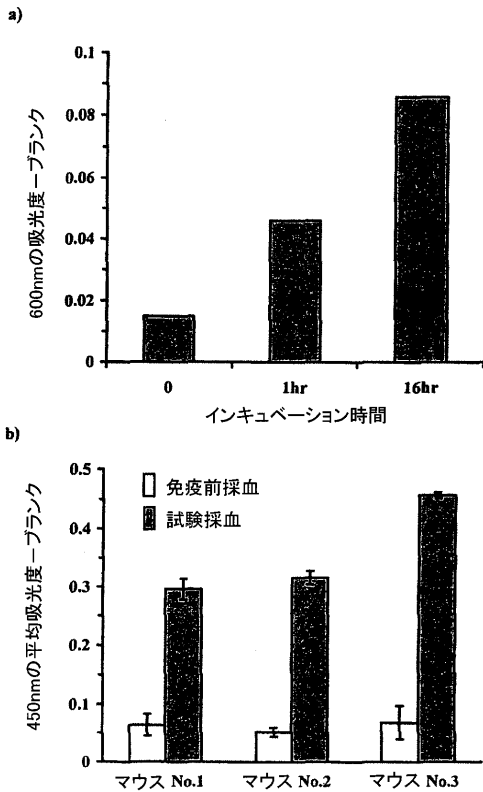
【 0 0 2 5 】

マニホールド真空ろ過ユニットを用いて、単量体  $\alpha$ -ヘリックスrecMoPrPまたはrecMoPrP凝集体のアリコート(500 ng)をハイボンド(Hybond)ECLニトロセルロースメンブレン(アマシャムバイオサイエンス)上にスロットプロットさせた。そのメンブレンをTBST(10 mM トリス-HCl、150 mM NaCl、0.05% (v/v) ツイーン20)で2回洗滌し、5% (w/v) 無脂肪乾燥粉ミルクを含むTBST中で60分間室温にてブロッキングした。次にそのメンブレンをTBST中5  $\mu$ g/mLの濃度の一次抗体、すなわちmAb P1:1中または非PrP関連マウスIgM(Sigma)中のいずれかで60分間室温にてインキュベートしてから、TBST中で3回洗滌した(洗滌1回につき5分)。TBSTで1/1000希釈したウサギ抗マウスIg-HRPコンジュゲート(DAKO)を前記メンブレンに加え、そのメンブレンを室温にて60分間インキュベートし、TBSTで3回洗滌し(洗滌1回につき5分)、1ステップTMBプロットング基質(Pierce)中で最終的に現像して室温にて30分間インキュベーションした。得られた結果(図4 b)から、mAb P1:1は、単量体recMoPrPとの結合は僅かのみまたは全く検出されなかったが凝集recMoPrPとは特異的に結合することが明らかとなった。非PrP関連IgMは、凝集recMoPrPにも単量体recMoPrPにも結合しなかった。これらの所見はmAb P1:1が他の種由来のPrP<sup>Sc</sup>とも特異的に結合し得ることを意味し、従ってmAb P1:1の潜在有用性をTSE診断およびTSE研究の両方において普遍的に拡張できることを意味する。

10  
20

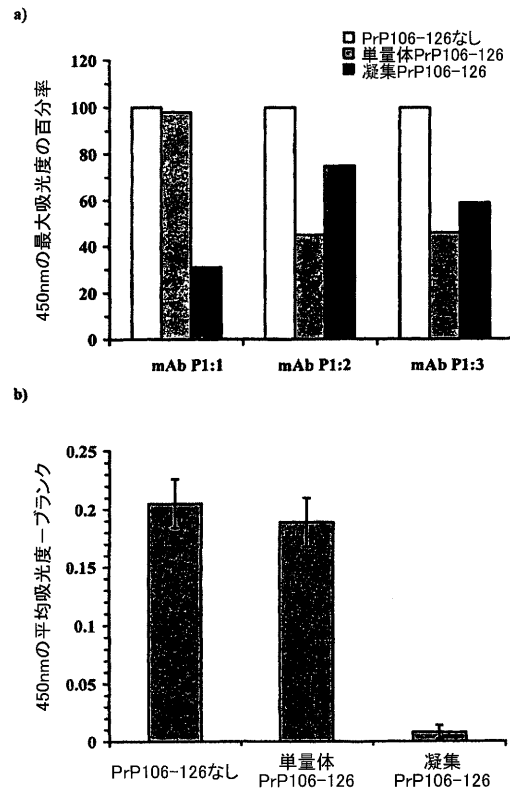
【 図 1 】

Figure 1



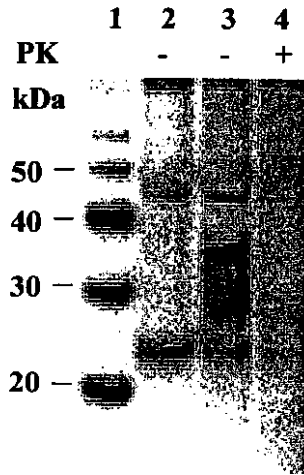
【 図 2 】

Figure 2



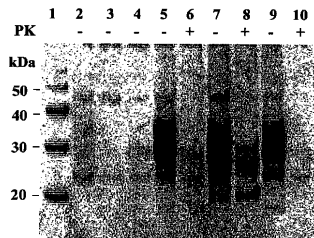
【 図 3 a ) 】

a)



【 図 3 b ) 】

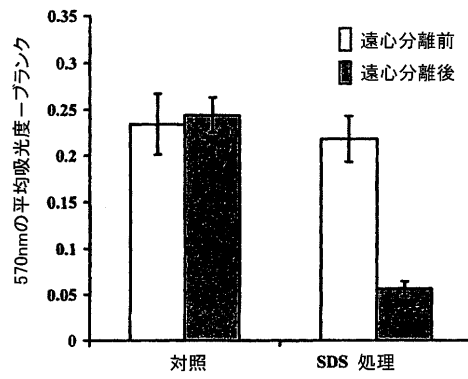
b)



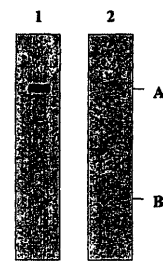
【 図 4 】

Figure 4

a)



b)



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GB2007/002205
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/28 A61K39/395 C12N5/20 G01N33/577		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
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) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 2006/088281 A (PEOPLEBIO INC [KR]; AN SEONG SOO ALEXANDER [US]; LIM KUN TAEK [KR]; OH) 24 August 2006 (2006-08-24) claims 1-45	1-18
A	WO 2006/033974 A (UNIV CASE WESTERN RESERVE [US]; SY MAN-SUN [US]; PAN TAO [US]; LI RULI) 30 March 2006 (2006-03-30) figure 1; example 1	1-18
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *G* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 February 2008		Date of mailing of the international search report 03/03/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bernhardt, Wiebke

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2007/002205

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PAN TAO ET AL: "An aggregation-specific enzyme-linked immunosorbent assay: Detection of conformational differences between recombinant PrP protein dimers and PrP <sup>Sc</sup> aggregates" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 79, no. 19, October 2005 (2005-10), pages 12355-12364, XP009096193 ISSN: 0022-538X abstract; figure 5 page 12362, left-hand column	1-18
A	GU YAPING ET AL: "Prion peptide 106-126 modulates the aggregation of cellular prion protein and induces the synthesis of potentially neurotoxic transmembrane PrP" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 277, no. 3, 2002, pages 2275-2286, XP009096116 ISSN: 0021-9258 abstract	1-18
A	SINGH NEENA ET AL: "Prion peptide 106-126 as a model for prion replication and neurotoxicity" FRONTIERS IN BIOSCIENCE, vol. 7, no. Cited May 17, 2002, 1 April 2002 (2002-04-01), pages a60-71 URL, XP009096117 ISSN: 1093-4715 cited in the application abstract page 63, right-hand column	1-18
A	HANAN E ET AL: "ANTIAGGREGATING ANTIBODY RAISED AGAINST HUMAN PRP 106-126 RECOGNIZES PATHOLOGICAL AND NORMAL ISOFORMS OF THE WHOLE PRION PROTEIN" CELLULAR AND MOLECULAR NEUROBIOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 21, no. 6, December 2001 (2001-12), pages 693-703, XP009017127 abstract	1-18

-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2007/002205

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SERBEC VLADKA CURIN ET AL: "Monoclonal antibody against a peptide of human prion protein discriminates between Creutzfeldt-Jacob's disease-affected and normal brain tissue." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 279, no. 5, 30 January 2004 (2004-01-30), pages 3694-3698, XP009096131 ISSN: 0021-9258 cited in the application abstract	1-18
A	KORTH C ET AL: "PRION (PRPSC)-SPECIFIC EPI TOPE DEFINED BY A MONOCLONAL ANTIBODY" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 390, no. 6655, 6 November 1997 (1997-11-06), pages 74-77, XP002069611 ISSN: 0028-0836 cited in the application abstract	1-18
A	BIESCHKE J ET AL: "ULTRASENSITIVE DETECTION OF PATHOLOGICAL PRION PROTEIN AGGREGATES BY DUAL-COLOR SCANNING FOR INTENSELY FLUORESCENT TARGETS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 97, no. 10, 9 May 2000 (2000-05-09), pages 5468-5473, XP000999285 ISSN: 0027-8424 abstract	1-18
A	KASCSAK R J ET AL: "MOUSE POLYCLONAL AND MONOCLONAL ANTIBODY TO SCRAPIE-ASSOCIATED FIBRIL PROTEINS" JOURNAL OF VIROLOGY, NEW YORK, US, US, vol. 61, no. 12, December 1987 (1987-12), pages 3688-3693, XP002924865 ISSN: 0022-538X cited in the application abstract	1-18
A	PARAMITHIOTIS E ET AL: "A PRION PROTEIN EPI TOPE SELECTIVE FOR THE PATHOLOGICALLY MISFOLDED CONFORMATION" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 9, no. 7, July 2003 (2003-07), pages 893-899, XP001180826 ISSN: 1078-8956 figure 1c	1-18

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2007/002205

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAFAR JIRI G ET AL: "Diagnosis of human prion disease" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 102, no. 9, 1 March 2005 (2005-03-01), pages 3501-3506, XP002432630 ISSN: 0027-8424 page 3501, left-hand column	1-18
A	PARCHI P ET AL: "MOLECULAR BASIS OF PHENOTYPIC VARIABILITY IN SPORADIC CREUTZFELDT-JAKOB DISEASE" ANNALS OF NEUROLOGY, BOSTON, US, vol. 39, no. 6, 1996, pages 767-778, XP009006817 ISSN: 0364-5134 abstract; table 1	4

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No. PCT/GB2007/002205

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

Continuation of Box II.1

Although claims 1, 6, 7 and 10-16 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

-----  
Continuation of Box II.1

Claims Nos.: -

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/GB2007/002205**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: \_\_\_\_\_  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2.  Claims Nos.: \_\_\_\_\_  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: \_\_\_\_\_  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/GB2007/002205

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006088281 A	24-08-2006	AU 2005327652 A1 CA 2598321 A1 EP 1848817 A1	24-08-2006 24-08-2006 31-10-2007
WO 2006033974 A	30-03-2006	EP 1800125 A2	27-06-2007

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 31/00</b>	<b>(2006.01)</b>		A 6 1 K	39/395		N
C 0 7 K 14/47	(2006.01)		A 6 1 P	31/00		
C 1 2 P 21/08	(2006.01)		C 0 7 K	14/47	Z N A	
			C 1 2 P	21/08		

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

(71)出願人 501287779  
 コモン サーヴィシス エージェンシー  
 イギリス エディンバラ イーエイチ5 3エスイー サウス トリニティー ロード (番地なし) トリニティー パーク ハウス

(71)出願人 508368301  
 インスティテュート フォア アニマル ヘルス  
 イギリス アールジー20 7エヌエヌ パークシャー ニューベリー コンプトン

(74)代理人 100082005  
 弁理士 熊倉 禎男

(74)代理人 100084009  
 弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100084663  
 弁理士 箱田 篤

(74)代理人 100093300  
 弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100114007  
 弁理士 平山 孝二

(74)代理人 100111501  
 弁理士 滝澤 敏雄

(72)発明者 ヘッド マーク ウィリアム  
 イギリス イーエイチ4 2エックスユー エディンバラ ウェスターン ジェネラル ホスピタル  
 ブライアン マシューズ ビルディング ナショナル シーージェイディー サーヴェイランス  
 ユニット ユニヴァーシティ オブ エディンバラ

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 BA61 GA03 HA15  
 4B064 AG26 AG27 BJ12 CA10 CA20 CA50 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AA92X AB05 BA08 CA25 CA44 CA46  
 4C085 AA13 AA14 BB11 BB31 BB33 BB34 BB36 BB37 CC22 CC23  
 EE01  
 4H045 AA11 AA20 AA30 CA45 DA75 DA76 DA86 EA20 EA50 FA72

专利名称(译)	抗朊病毒蛋白的新型抗体及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009539959A</a>	公开(公告)日	2009-11-19
申请号	JP2009514897	申请日	2007-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	爱丁堡大学 斯特拉斯克莱德大学 常见的Vie爵士顺机构 富勒研究所动物健康		
申请(专利权)人(译)	盐湖城爱丁堡的盐湖城法院 盐湖城大学斯特拉斯克莱德OVU 常见Savishisu局 富勒研究所动物健康		
[标]发明人	ヘッドマークウィリアム		
发明人	ヘッド マーク ウィリアム		
IPC分类号	C07K16/18 C12N15/02 C12N5/10 G01N33/53 A61K39/395 A61P31/00 C07K14/47 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/2872 A61K2039/505 C07K14/005 C07K2317/34 C12N2790/10022 G01N2800/2828		
FI分类号	C07K16/18 C12N15/00.C C12N5/00.B G01N33/53.D A61K39/395.D A61K39/395.N A61P31/00 C07K14/47.ZNA C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA61 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CA50 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/BB31 4C085/BB33 4C085/BB34 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA45 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	2006011708 2006-06-14 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及在天然条件下选择性结合疾病相关形式的朊病毒蛋白 ( PrP Sc ) 的新型抗体，以及涉及朊病毒疾病的检测，治疗和研究方法中的所述抗体。为了普遍使用。

Figure 2

