

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-531775

(P2005-531775A)

(43) 公表日 平成17年10月20日(2005.10.20)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/37	C 1 2 Q 1/37 Z N A	4 H O 4 5
GO 1 N 33/531	GO 1 N 33/531 B	
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543 5 4 5 D	
GO 1 N 33/545	GO 1 N 33/545 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-518441 (P2004-518441)
 (86) (22) 出願日 平成15年7月4日 (2003. 7. 4)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年2月28日 (2005. 2. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/DE2003/002249
 (87) 国際公開番号 W02004/005920
 (87) 国際公開日 平成16年1月15日 (2004. 1. 15)
 (31) 優先権主張番号 10230141. 7
 (32) 優先日 平成14年7月4日 (2002. 7. 4)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

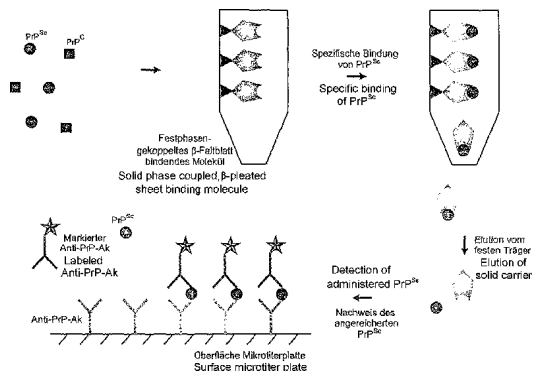
(71) 出願人 505003388
 プリオンタイプ・ゲゼルシャフト・ミット
 ・ベシュレンクテル・ハフツング・ウント
 ・コンパニー・コマンドイトゲゼルシャフ
 ト
 ドイツ連邦共和国, 04 1 0 3 ライプツ
 イヒ, ドイチャー・プラッツ 5ペー
 (71) 出願人 505003399
 シュロイスナー, カトリン
 ドイツ連邦共和国, 6 3 2 6 3 ノイ-イ
 ーゼンブルク, シュトルツェシュトラーセ
 7 8
 (74) 代理人 100099623
 弁理士 奥山 尚一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 病理学的に変化したプリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の濃縮方法および検出方法

(57) 【要約】

本発明は、生きている生物の病理学的変性プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を濃縮および追跡する方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

病理学的に変化したプリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を検出する方法であって、

- a) 固体担体と一緒に標本をインキュベートするステップであって、前記固体担体が - プリーツシート結合性分子と結合されるステップと、
 - b) 前記 - プリーツシート結合性分子に結合されていない、前記標本の成分を除去するステップと
 - c) - プリーツシート結合性分子に結合された、前記標本の成分を検出するステップと、
- を含む、方法。

10

【請求項 2】

ステップ a) の前に、前記標本がプロテイナーゼ処理に付される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記固体担体が、球形ポリマー、プラスチック表面、シリカゲル被覆スライドガラス、毛細管または膜である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 - プリーツシート結合性分子が、3 ~ 30 アミノ酸残基の長さを有するオリゴペプチドか、または置換された複素環式芳香族である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記オリゴペプチドが、配列番号 1 ~ 10 に記載のアミノ酸配列を提供する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記検出が、免疫学的検出方法を用いて実施される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

病理学的に変化したプリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を検出するためのキットであって、
- プリーツシート結合性分子と結合した少なくとも一の固体担体、洗浄液、溶離液および検出システムを含む、キット。

30

【請求項 8】

前記検出システムが、免疫学的検出システムであって、抗 PrP 抗体で被覆された第 2 の固体担体と、酵素でマークした二次抗体と、基質溶液と、停止溶液とを含む、請求項 7 に記載のキット。

【請求項 9】

前記一の固体担体が、使い捨てカラムに詰められており、前記第 2 の固体担体がマイクロタイタープレートである、請求項 7 または 8 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生きている生物の病理学的に変化したプリオンタンパク質を検出する方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

伝達性海綿状脳症 (TSE) は、感染性の、常に致命的な、中枢神経系の変性疾患である。これらの疾患で生じる脳の組織病理学的変化は、天然の細胞プリオンタンパク質 (PrP^C) の配座異性体である、病理学的に変化したプリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) の蓄積と関連付けられている。疾患の経過中に生じるプリオン複製は、 PrP^{Sc} と PrP^C との間の直接相互作用の結果として起こり、正常な PrP^C に、病的な PrP^{Sc} の立体配座を強制する。 PrP^C と比較すると、 PrP^{Sc} は、 - プリーツシート構造の含有量増加

50

およびプロテアーゼ（たとえばプロテイナーゼ K）に対する高い抵抗性を特徴とする。

【0003】

この PrP^{Sc} の抵抗性が、牛海綿状脳症（BSE）を検出するための *in vitro* 診断で、現在使用されている。現行のテストシステムの原理は、脳幹（門部）由来の組織部分をホモジナイズし、それらをプロテイナーゼ K で処理することにある。プロテアーゼ処理は、正常な PrP^C を完全に分解するが、BSE 感染動物由来の PrP^{Sc} は、アミノ酸数個分だけ短縮されるに過ぎず、その結果、相対分子量が、33 ~ 35 kDa から 27 ~ 30 kDa に減少する。この後、ウエスタンブロットまたは ELISA 技術を使用し、モノクローナル抗体を用いて、残存する PrP を可視化する。

【0004】

このテストシステムの重大な不都合は、その感度が低いことである。BSE 感染牛における PrP^{Sc} 濃度は、中枢神経系（CNS）における既存のテストシステムに十分な高く、したがって、診断は、これまでは、死後テストに限定され、また少なくとも 18 ヶ月から数年という感染生物の潜伏期を頼りにする。

【0005】

上述の PrP^{Sc} の検出に加えて、TSE を診断するための 2 つの他の方法：CNS における典型的な海綿状変化を検出するための組織病理学的方法、およびマウスモデルで標本の感染性を実証するバイオアッセイがある。これらの方法は両者とも、重大な不都合を有する。脳の構造変化は、臨床期直前の、潜伏後期のみを生じるため、該組織病理学的方法は、発症前診断に適さない。さらに、必要な脳成分を生きている生物から得ることはできないため、この方法を用いた場合は、死後に診断が行われる。理論上は、バイオアッセイは、1 つの感染単位を検出することができるが、この方法は、少なくとも数ヶ月を要し、数年を必要とすることさえある。

【0006】

潜在的感染後できる限り速く、かつ/または未だ生きている生物で、診断を実施するためには、以前の検出方法の感度を実質的に上昇させなければならず、また CNS 以外の組織/体液での検出を可能にしなければならない。

【0007】

病的な PrP^{Sc} の、ヒト血清タンパク質、たとえばプラスミノゲンへの結合は、フィッシャー（Fischer）らによって記載されている [Fischer, MB; Roelcke, C; Parizek, P; Schwarz, HP; Aguzzi, A (2000) ; 「Binding of disease-associated prion proteins to plasminogen」. Nature, 408: 479 - 483]。PrP^C を結合させることはできないため、プリオンタンパク質のプラスミノゲンへの結合は、該タンパク質の立体配座によって左右される。フィブリノゲンも PrP^{Sc} を結合することができるが、Ca²⁺ イオンがない場合は、結合することができない。

【0008】

WO 02/00713 号によれば、CNS 物質から PrP^{Sc} を単離するためには、PrP^{Sc} の、ヒトプラスミノゲンへの特異的結合が使用される。この目的のために、ヒトプラスミノゲンを磁気粒子上に固定する。しかし、この方法は、プラスミノゲンを含有しない、体液中および組織中の PrP^{Sc} の検出に適するにすぎず、たとえば、血清中の PrP^{Sc} の検出には適さない。この方法の他の不都合は、高価なことおよびプラスミノゲンを担持した磁気粒子のタンパク質結合能力が限られていることである。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、本発明は、高い感度を達成し、また生きている生物での TSE の診断を可能にする方法を提供するという目的に基づく。

【課題を解決するための手段】

【0010】

10

20

30

40

50

この目的は、特許請求の範囲に明確に規定される主題事項によって達成される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本発明を、添付の図面を参照しながら説明する。

【0012】

本明細書で使用されるとき、用語「 β -プリーツシート結合性分子」は、その三次元構造および/またはその物理的性質のために、タンパク質、たとえば病理学的に変化したモノマー/オリゴマーのプリオンタンパク質における β -プリーツシート構造と相互に作用できる、また、この相互作用に基づいてそれらを結合することができる、有機分子を表す。代表的な β -プリーツシート結合性分子を、配列番号1~10に記載する。

10

【0013】

本明細書で使用されるとき、用語「 β -シートブレーカー(BSB)」は、 β -アミロイドの β -プリーツシート構造(アルツハイマー病ではタンパク質が凝集する)およびアミロイド様構造に結合するのみならず、それらの異常な折り畳みを阻止したり逆戻りさせたりすることもできる、短いペプチドを表す。

【0014】

本明細書で使用されるとき、用語「病理学的に変化したプリオンタンパク質」は、PrP^{Sc}を指す。PrP^{Sc}は、モノマー形および/またはオリゴマー形、および繊維状の形、アミロイド凝集体でも存在することができる。

【0015】

本明細書では、死後に、脳幹組織でプロテイナーゼK耐性PrP^{Sc}が検出されるウシを、「BSE陽性牛」と定義する。

20

【0016】

本発明は、

- a) 固体担体と一緒に標本をインキュベートするステップであって、該固体担体を β -プリーツシート結合性分子に結合させるステップと、
 - b) β -プリーツシート結合性分子に結合されていない、該標本の成分を除去するステップと、
 - c) β -プリーツシート結合性分子に結合された、病理学的に変化したプリオンタンパク質(PrP^{Sc})を検出するステップと
- を含む、病理学的に変化したプリオンタンパク質(PrP^{Sc})を検出する方法に関する。

30

【0017】

本発明による方法を用いると、体液、細胞溶解物または体組織の中に含まれるモノマーおよび/またはオリゴマー形の、病理学的に変化したプリオンタンパク質は、最小の、これまでは検出不可能であった濃度のPrP^{Sc}を実証できるような方法で濃縮される。結果として、TSE誘発性プリオンによる感染直後でさえも、生きている動物またはヒトを、感染していると分類することができる。以前は、この種の高感度テストを使用することができず、その上、検出は、死後に、PrP^{Sc}濃度が十分に高い脳組織を用いて実施することしかできなかつたため、これが不可能であった。さらに、該方法は、感度が高いため、体組織で、たとえば、既存の検出方法を用いた場合には、感染がかなりの程度まで既に進行したときに限って結果を示す脳ホモジネートで、感染後、かなり早期に、結果を提供する。

40

【0018】

調査すべき標本は、体液、たとえば血液、血清、血漿、脳脊髄液、水性体液、涙液、尿、唾液、リンパ液、乳汁、あるいは、たとえば白血球またはリンパ系組織由来の細胞の細胞溶解物、あるいは、たとえば中枢神経系由来の組織、リンパ組織(たとえば脾臓、扁桃、リンパ節)または他の器官の組織ホモジネートであってもよい。

【0019】

インキュベーション前に、標本を、場合により、標本調製段階に付してもよい。これは、特に、組織標本の場合に必要なかもしれない。組織標本は、適切な緩衝液、たとえば50

50

mMリン酸緩衝液、pH 7.5を加えた後、たとえば、超音波処理またはリボライザー (ribolyser) 処理を使用して機械的に粉碎し、次いで、それらの成分を、溶液または懸濁液に変えるためにホモジナイズする。機械的処理により得られた組織懸濁液または細胞懸濁液中の固体成分、または体液中に存在する固体成分を分離するために、標本を、遠心分離段階および/または濾過段階にも付してもよい。

【0020】

上述の標本調製の有無にかかわらず、標本を、任意選択的に、付加的にまたは排他的に、プロテイナーゼ処理に付して、インキュベーション前に、PrP^Cのタンパク質分解的分解を達成することができる。これは、検出されるPrP^{Sc}、たとえばPrP^{Sc}のモノマーおよび/またはオリゴマー形が、プロテイナーゼ処理後に限ってPrP^{Sc}とPrP^Cとを区別することができる抗体を使用して検出される場合に、主として指示される。この目的のために、該標本材料を、プロテアーゼ、たとえばプロテイナーゼKで処理する。プロテアーゼ消化は、それぞれのプロテアーゼの標準条件で実施してもよく、製造業者の説明書に従って実施してもよく、好ましくは、37で1時間で実施される。使用される酵素濃度は、標本材料によって、およそ10 μg/ml ~ およそ1 mg/mlの範囲内であってもよく、好ましくは、およそ50 μg/mlの酵素で、標本材料のタンパク質含有量はおよそ0.5 ~ およそ10 mg/mlである。

10

【0021】

該固体担体は、球形ポリマー (たとえばセファロース、アガロースまたはラテックス)、プラスチック表面 (たとえばマイクロタイタープレート)、シリカゲル被覆ガラスプレート (たとえば薄層クロマトグラフィ用)、毛細管または膜であってもよい。球形ポリマーは、カラムクロマトグラフィまたはバッチ操作 (たとえば磁気ビーズ) における担体として使用することができる。該ポリマーを、カラムクロマトグラフィに使用する場合、ポリマーは、予め充填された、使い捨てカラムで使用することが好ましい。本明細書に列挙した固体担体とともに、- プリーツシート結合性分子のカップリングに使用することができる、任意の固体担体が適する。

20

【0022】

標本は、閉鎖した容器内で、固体担体、たとえばガラスプレート、マイクロタイタープレートと一緒に、約4 ~ 約50の範囲内の温度で、約5分 ~ 約120分間、インキュベートしてもよい。インキュベーションは、好ましくは、低回転数 (たとえば80 rpm) のインキュベーターシェーカーで、37で1時間、実行される。標本を固体担体と一緒にインキュベートすることにより、標本中に含まれるPrP^{Sc}は、固体担体上に固定された- プリーツシート結合性分子に結合される。固体担体、たとえば、球形ポリマーをポリマークロマトグラフィに使用する場合、インキュベーションは、カラムで実施される。カラムの装置への連結および標本の流通速度に基づいて、カラムに応じてインキュベーション期間を変えることができる。

30

【0023】

固体担体に結合した- プリーツシート結合性分子は、PrP^Cよりかなり大きい親和力でPrP^{Sc}を結合し、また、本発明によれば、体液中に存在する可溶性ならびにモノマーおよび/またはオリゴマー形のPrP^{Sc}を捕獲することができる。本発明によれば、該- プリーツシート結合性分子は、3 ~ 約30アミノ酸、好ましくは、4、5または6アミノからなるオリゴペプチド酸である。これらのペプチドは、たとえば、溶解性を良くするために、C末端および/またはN末端修飾することができる。PrP^{Sc}を結合する特性に加えて、- プリーツシート結合性分子は、- シートブレーカー [BSB] の特性も提供することができる。しかし、BSB特性のほかに、本発明による- プリーツシート結合性分子は、PrP^{Sc}への結合特性 (親和性、結合の可逆性) を提供し、その結果、溶液からのPrP^{Sc}の捕獲および濃縮を可能にする。- プリーツシート構造を非常にしっかりと、すなわち不可逆的な様式で結合し、その結果、溶離を防止する、BSBペプチドは、- プリーツシート結合性分子として不適当である。PrP^{Sc}を余りにも低い親和力で、すなわち非永久的様式で結合する (たとえば、- プリーツシート構造の破壊後、

40

50

B S B から P r P^{Sc}を放出する) B S B も、やはり不適當である。特に好ましい - プリーツシート結合性分子を表 1 に示し、配列番号 1 ~ 10 に列挙する。 - プリーツシート結合性分子は、置換された複素環式芳香族であってもよく、フラボノイド、たとえば、チオフラビン T、バイカリンまたはクエルシトリンが有利である。

【0024】

- プリーツシート結合性分子は、好ましくは、共有結合によって、固体担体状に固定されている。 - プリーツシート結合性分子上のアミノ基、カルボキシル基またはヒドロキシル基等の官能基を使用して、担体とのカップリングが達成される。 - プリーツシート結合性分子がペプチドであれば、カップリングは、N 末端のアミノ基または C 末端のカルボキシル基により好ましく達成される。オリゴペプチドが配列 K L V F F (配列番号 2) を有するペントペプチドである場合、アミノ基によるカップリングを用いると、該ペプチドはリシン残基の側鎖にも固定され、これが P r P^{Sc}結合の立体障害を招く可能性があるため、カップリングは、C 末端のカルボキシルにより形成されることが好ましい。

10

【0025】

固体担体と一緒に標本をインキュベートした後、 - プリーツシート結合性分子に結合されていない、該標本の成分を、好ましくは洗浄段階で除去する。適切なストリンジェンシー上昇添加物を含む緩衝化溶液を洗浄液として使用する。該洗浄液の pH 値は、中性の範囲内、好ましくはおよそ pH 7.5 である。できれば、該溶液を緩衝化するために、50 mM リン酸緩衝液を使用する。さもなければ、中性の範囲で pH 値を調節することができる緩衝液が適當である。ストリンジェンシーを高める添加物は、無機塩類、たとえば N a C l であってもよく、S D S、T r i t o n X 100 または T w e e n 20 等の界面活性剤、あるいは、カオトロピック試薬、たとえば尿素、塩酸グアニジンまたはグアニジンイソチオシアナートであってもよい。1 ~ 4 M の N a C l を含む緩衝液が洗浄液として有利に使用される。

20

【0026】

担体材料の表面特性によって、 - プリーツシート結合性分子に結合した P r P^{Sc}は、場合により固体担体から溶離される(たとえば、球形ポリマーをカラムクロマトグラフィで使用する時)。他の担体、たとえば膜またはプラスチック表面を使用する場合、該 P r P^{Sc}は、固体担体で直接検出することができる。しかし、この場合、必要に応じて、溶離も可能である。

30

【0027】

- プリーツシート結合性分子から、したがって固体担体から、該 P r P^{Sc}を溶離するために、該担体を極めて少量の溶離液ですすぐ。使用する検出システムの感度に十分な濃度を達成するためには、溶離体積は、標本の体積よりかなり少なくなければならない。

【0028】

P r P^{Sc}とキャッチャー分子との間の結合を解く添加物を含有する緩衝化溶液を、溶離液として使用する。該溶離液の pH 値は、約 pH 6 ~ 約 pH 8.5 の範囲内、好ましくはおよそ pH 7.5 である。できれば、該溶液を緩衝化するために、50 mM リン酸緩衝液を使用する。さもなければ、上述の範囲で、好ましくは中性の範囲で、pH 値を調節することができる緩衝液が適當である。該添加物は、たとえば、界面活性剤、たとえば S D S、T r i t o n X 100 または T w e e n 20、カオトロピック試薬、たとえば尿素、塩酸グアニジンまたはグアニジンイソチオシアナート、無機塩類、たとえば N a C l であってもよい。該溶離液は、好ましくはデタージェント、たとえば、5% S D S を含有する。

40

【0029】

この後、前段階で濃縮された P r P^{Sc}を検出することができる。この目的のために、免疫化学的検出方法(たとえば E L I S A、ウエスタンブロット、免疫沈殿);生物物理学的検出方法(たとえば質量分析法、蛍光相関分光法);生化学的検出方法(たとえば生化学的パラメーター、相対モル質量、N 末端または C 末端アミノ酸配列、結合パートナーの会合定数および解離定数の測定);または生物学的検出方法(たとえば細胞毒性アッセイ

50

)を使用することができる。

【0030】

できれば、該検出は、PrP^{Sc}の速やかな検出を可能にする方法で実行する。これは、たとえば、免疫学的検出方法、好ましくはサンドイッチELISAであってもよい。サンドイッチELISAは、既知の方法を使用して実施される。この状況で、検出抗体たとえば酵素(たとえばセイヨウワサビペルオキシダーゼ)を、着色した化合物、蛍光染色(たとえばフルオレセイン)、金粒子または核酸(たとえばDNAまたはRNAオリゴヌクレオチド)で、マークすることができる。

【0031】

酵素マーキングの場合、染色の強度を、基質の変換後に測光法的に記録し、また標本中に含まれるPrP^{Sc}の量に比例する。該抗体マーキングが、着色された化合物または蛍光染色であれば、染色またはそれぞれの蛍光の強度が直接測定される。該抗体マーキングが核酸である場合、結合した抗体の量は、PCR(たとえばリアルタイムPCR)を使用してシグナルが増幅されることを特徴とする、DNA標識またはRNA標識の吸収によって測定される。

10

【0032】

本発明はまた、体液、細胞溶解物、組織ホモジネートまたは他の流体中のPrP^{Sc}を検出するためのキットにも関する。本発明によれば、該テストキットは、PrP^{Sc}濃縮用固体担体、免疫学的検出システム、可溶化、洗浄および溶離緩衝液濃縮物、様々なコントロール、酵素マーク抗PrP抗体および対応する基質、ならびに停止液を含有する。

20

【0033】

使用される固体担体は、好ましくは、アフィニティークロマトグラフ用材料、たとえば使い捨てカラムで、またはプラスチック表面上、たとえばマイクロタイタープレートで、使用される、本発明に従って - プリーツシート結合性分子と結合されているセファローズである。該固体担体が、本発明による結合を有するアフィニティークロマトグラフ用材料である場合、これらは、懸濁液中に含まれてもよく、乾燥形であってもよく、またはテストキット中の使い捨てカラム内に既に詰められていてもよい。

【0034】

該免疫学的検出システムは、好ましくは、第2の固体担体、たとえばマイクロタイタープレートが、PrPに特異的な抗体で、好ましくはモノクローナル抗PrP抗体で、特に、マウス抗PrP抗体で、被覆されている、サンドイッチELISAである。テストキット中の固体担体は、特に、真空包装様式で提供される。

30

【0035】

組換え方法で製造されるPrPおよび/またはPrPペプチドが、コントロールとして使用されることが好ましい。好ましくは、セイヨウワサビペルオキシダーゼが、抗体マーキングとして使用される。

【0036】

本発明による方法およびテストキットは、医学および農学の分野で必要とされる、多数の標本を考慮して、広くデザインされた研究を可能にする。適切に設備が整った研究所では、検出方法の自動化が可能である。前述の全ての方法と比較してみると、本発明による方法は生きている動物およびヒトでのTSE診断にも適する。

40

【0037】

以下の実施例を参考にしながら、本発明をさらに詳細に説明する。

【実施例】

【0038】

実施例1: MTPフォーマットで異なるペプチドを使用した、脳ホモジネートからのPrP^{Sc}の単離。

マイクロタイタープレート(MTP)(ヌンク・イムノ(Nunc-Immuno)(商標)プレート・マキシソープ(Plate Maxisorp)(商標)サーフィス(Surface)F96(デンマークのロスキレにあるヌンク(Nunc, Roskilde

50

de, Denmark))を、表1に記載のペプチドで被覆した(図2参照)。被覆は、穴1個につき100 μ lのペプチド溶液(0.1Mの炭酸緩衝液pH9.6中10 μ g/ml)と、4で16時間インキュベートすることにより実施した。流体を真空除去し、MTPを、穴1個につき300 μ lの洗浄緩衝液(PBS(10mMリン酸緩衝液、0.15MのNaCl、pH7.2);0.05%のTween 20))で3回洗浄した。洗浄用緩衝液中0.5%のカゼインと、室温で1時間インキュベートすることにより、遊離型の結合部位をブロックした。

【0039】

洗浄段階(穴1個当たり300 μ lの洗浄用緩衝液)の後、被覆MTPをホイルで覆い、穴1個当たり100 μ lのPrP^{Sc}含有標本(プラテリア(Platelia)登録商標でOD>4.0の、BSE陽性動物からの脳ホモジネート;陽性所見は、脳組織の免疫組織学的調査で確認した)と、37で1時間インキュベートした。未結合の標本材料を、真空除去し、MTPを、穴1個当たり300 μ lの洗浄用緩衝液で3回洗浄した。検出抗体(プラテリア(Platelia)(登録商標)BSE検出キット、米国ハーキュリーズにあるバイオ・ラド研究所(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)とのインキュベーションを、製造業者の説明書に従って、室温で1時間実施した。洗浄穴1個当たり300 μ lの洗浄用緩衝液で5回洗浄することにより、余分の検出抗体を除去した。基質溶液(テトラメチルベンジジン[TMB]、プラテリア(Platelia)(登録商標)BSE検出キット、米国ハーキュリーズにあるバイオ・ラド研究所(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)を加えた後、1MのH₂SO₄を加えることにより、30分後に染色現像を停止した。450nm(リファレンス620nm)における吸光測定により、染色の強度を記録した。

【0040】

測定された吸光は、該ペプチドに結合したPrP^{Sc}の量に比例し、したがって、キャッチャー分子の効率の尺度を提供する。最高の - プリーツシート結合性分子(ペプチド2)からのシグナルを100%として、被験ペプチドの相対結合効率を表1にまとめる。

【0041】

【表1】

表1: 様々なペプチドのPrP^{Sc}結合効率の比較

番号	配列	効率	
ペプチド1	Arg-Val-Val-Ile-Ala	54.7	配列番号1
ペプチド2	Lys-Leu-Val-Phe-Phe	100.0	配列番号2
ペプチド3	Leu-Pro-Phe-Phe-Asp	46.6	配列番号3
ペプチド4	Propionyl-Ile-Ile-Gly-Leu	55.1	配列番号4
ペプチド5	Propionyl-Arg-Ile-Ile-Gly-Leu	58.1	配列番号5
ペプチド6	Gly-Val-Val-Ile-Ala	64.5	配列番号6
ペプチド7	Propionyl-DArg-DArg-DAla-DPhe-DPhe-DVal-amide	76.5	配列番号7

【0042】

<実施例2: MTPフォーマットでKLVFFに結合したPrP^{Sc}の溶離>

PrP^{Sc}とキャッチャー分子との間の結合は、非常に強く、またPrP^{Sc}を固体担体から溶離するためには、比較的強烈な条件が必要である。溶離条件も、MTPフォーマットを使用してテストした。

【0043】

実施例1の場合と同様に、MTPをペプチド2(KLVFF)で被覆し、PrP^{Sc}を含有する脳ホモジネート(プラテリア(Platelia)(登録商標))で、OD>3.0

を加えた。穴1個につき300 μ lの洗浄用緩衝液(PBS; 0.05%のTween 20)で3回洗浄した後、潜在的緩衝液(表2参照)100 μ lを加え、室温で5分間インキュベートした。この後、流体を除去し、溶離緩衝液中に溶離したPrP^{Sc}量およびMTP上に残っているPrP^{Sc}量を、プラテリア(Platelia)(登録商標)BSE検出キット(米国ハーキュリーズにあるバイオ・ラド研究所(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA))を使用して測定した。界面活性剤含有緩衝液(5%SDSを含む)のみが、キャッチャー分子からPrP^{Sc}を完全に溶離するために適していたことが、溶離効率の比較(表2)から分かる。カオトロピック試薬(たとえば6M尿素)の存在下では、PrP^{Sc}が部分的に溶離しただけであった。pH値が低い(たとえばpH3)、すなわち、それぞれ高いイオン強度(たとえば2MのNaCl)を有する溶離緩衝液中では、PrP^{Sc}は、キャッチャー分子にほぼ完全に結合したままであった。

10

【0044】

【表2】

表2: 様々な溶離条件の比較

	溶離剤	緩衝液組成物	溶離効率
A	2M NaCl	20mMリン酸緩衝液、2M NaCl、pH7.4	+/-
B	pH3	100mMグリシン/HCl緩衝液、pH3.0	+/-
C	6M尿素	20mMリン酸緩衝液、6M尿素、pH7.4	+
D	5%SDS	20mMリン酸緩衝液、5%SDS、pH7.4	+++

20

【0045】

<実施例3: ペプチドKL VFFのEAHセファロースへの共有カップリング>

アミノ基によるカップリングの場合には、ペプチドがN末端および側鎖(Lys)の両方に固定され、これが、三次元構造を妨げる可能性がある。こういう理由で、ペプチドのC末端のカルボキシル基により、- プリーツシート結合性分子KL VFFの該固体担体への特異的結合を達成した。EAH-セファロース4B(スウェーデンのアップサラにあるアマーシャム・ファルマシア・バイオテック(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden))を担体材料として使用した。

30

【0046】

カップリング反応の準備をするために、EAH-セファロースを0.5MのNaClで洗浄し、余分の流体を完全に除去した。リガンド(配列KL VFFを有するペプタペプチド)を、最終濃度である5mg/mlまでH₂Oに溶解し、pHをHClで4.5に調節した。ゲルを、リガンド溶液に再懸濁し(ゲル1部+リガンド溶液2部)、およびEDC(N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カーボジイミド)を、最終濃度0.1Mで加えた。穏やかに回転させながら、室温で24時間にわたって、カップリング反応を実施した。この後、上澄みをゲル沈殿物から完全に除去した。製造業者の薦めに従って、存在するあらゆる遊離形の結合位置を、0.1M EDCの存在下、1M酢酸でブロックした。KL VFFを加えたゲルを、クロマトグラフ用カラム(床体積1ml)に入れ、いずれの場合にも、3 \times 2mlの緩衝液A(0.1Mの酢酸ナトリウム、0.5MのNaCl、pH4)および3 \times 2mlの緩衝液B(0.1Mのトリス/HCl、0.5MのNaCl、pH8)で交互に少なくとも3回、さらに最後に10 \times 2mlのH₂Oで洗浄した。

40

【0047】

<実施例4: KL VFF-セファロースを用いた、脳ホモジネートからのPrP^{Sc}の単離>

TKL VFF-セファロースが、- プリーツシート結合性分子とし適当であることを

50

証明するために、BSE陽性牛の脳ホモジネートからのPrP^{Sc}を、該カラム材料に結合させ、次いで、再度溶離した。BSE精製キット(米国ハーキュリーズにあるバイオ・ラド研究所(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA))を使用し、製造業者の説明書に従って、脳材料を準備した。該標本材料も、製造業者の説明書に従って、標本希釈緩衝液R6(プラテリア(Platelia)(登録商標)BSE検出キット、米国ハーキュリーズにあるバイオ・ラド研究所(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA))に溶解した(プラテリア(Platelia)(登録商標)で、OD 6.0)。

【0048】

実施例3に示した通りに、KLVFF-セファロース1mlを用いてドリップ・カラムを調製し、室温で、PBSを満たし、平衡化した。該標本(250µl)を加えた後、カラムをPBS 2mlで洗浄し、流出液を分画で回収した。次いで、結合しているPrP^{Sc}を、PBS中5%のSDS 1.5mlを用いて、分画で溶離した。プラテリア(Platelia)(登録商標)BSE検出キットを使用して、個々の分画で得られたPrP^{Sc}の量を免疫学的に測定した。 10

【0049】

図3は、この実験の溶離プロフィールを示し、KLVFF-セファロースがPrP^{Sc}を可逆的に結合する能力、したがって、この材料が、大量の標本からPrP^{Sc}を選択的に濃縮するのに適することを記録する。ここで使用される脳標本は、PrP^{Sc}含有量が非常に高い(ODinプラテリア(Platelia)(登録商標)でOD 6.0)ため、この状況で、流出液中に含まれるPrP^{Sc}は、カラム容量の過負荷に起因する。溶離液中に得られるシグナルは、ELISAにおける溶離緩衝液中のSDSの妨害作用によって低減される。 20

【0050】

<実施例5: MTPフォーマットでKLVFFを用いた、体液からのPrP^{Sc}の単離(プリオン型in vivoBSEテスト)>

MTP(ヌンク・イムノ(Nunc-Immuno)(商標)プレート・マキシソープ(Plate Maxisorp)(商標)サーフィス(Surface)、F96(デンマークのロスキレにあるヌンク(Nunc, Roskilde, Denmark))を、ペプチドKLVFF(図2)で被覆した。被覆は、100µlのペプチド溶液(0.1Mの炭酸緩衝液pH9.6中10µg/ml)と、4で16時間インキュベートすることにより行った。この後、流体を真空除去し、穴1個につき300µlの洗浄用緩衝液(PBS; 0.05%のTween 20; pH7.2)で、MTPを3回洗浄した。洗浄用緩衝液中0.5%のカゼインと、室温で1時間インキュベートすることにより、遊離形の結合位置をブロックした。洗浄段階(穴1個につき300µlの洗浄用緩衝液で3回)の後、被覆MTPをホイルで覆い、穴1個につき100µlのPrP^{Sc}含有標本と、室温で1時間インキュベートした。 30

【0051】

この実験では、BSE陽性の牛9頭およびBSE陰性の牛5頭からの水性体液標本ならびにBSE陽性の牛6頭およびBSE陰性の牛13頭からの脳脊髄液標本を調査した。全ての標本は、BSE精製キット(米国ハーキュリーズにあるバイオ・ラド研究所(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA))を用いて、予め準備しておいた。未結合標本材料を真空除去し、穴1個につき300µlの洗浄用緩衝液でMTPを3回洗浄した。検出抗体(洗浄用緩衝液中5µg/mlのV5B2、ダルムシュタットにあるr-バイオファーム(r-Biopharm, Darmstadt))とのインキュベーションを、室温で1時間実施した。この後、再度、プレートを300µlの洗浄用緩衝液で3回洗浄し、ヤギ抗マウスIgGペルオキシダーゼコンジュゲート(洗浄用緩衝液中1:20000、米国ジャクソン(Jackson, USA))と、室温で1時間、インキュベートした。穴1個につき300µlの洗浄用緩衝液で5回洗浄することにより、余分のコンジュゲートを除去した。基質溶液(TMB)を加えた後、1Mの 40 50

H₂SO₄を加えることにより、15分後に染色現像を停止し、450nm（リファレンス620nm）における吸光測定により、染色強度を記録した。測定される吸光は、該ペプチドに結合したPrP^{Sc}量に比例する。図4から分かる通り、BSE陽性動物で得られる値は、BSE陰性動物と比較して、有意に（t-検定法）上昇している。水性体液標本では、陽性標本と陰性標本との間の差は、脳脊髄液の場合より、かなり明白である。これは、対応する体液中に存在するPrP^{Sc}濃度によって説明される。これらの結果を考慮すると、水性体液は、生きている動物の体液で、PrP^{Sc}を検出するための標本材料として、脳脊髄液より好ましい。

【図面の簡単な説明】

【0052】

10

【図1】固相結合したβ-ブリーツシート結合性分子を使用して、PrP^{Sc}を濃縮および検出するための、本発明による方法の原理を図式的に示す図である。

【図2】マイクロタイタープレート形式（MTP）における、PrP^{Sc}結合アッセイの構造を図式的に示す図である（実施例1）。様々なβ-シートブレカー（BSB）ペプチドを、潜在的β-ブリーツシート-結合分子およびPrP^{Sc}キャッチャーとして、担体上に固定した；標本材料とのインキュベーション後、モノクローナル抗PrP抗体を使用して、結合したPrP^{Sc}を可視化した。

【図3】BSE陽性牛の脳ホモジネートからのPrP^{Sc}をKLVEFF-セファロースに結合後、個々の分画中のPrP^{Sc}含量の溶離プロフィールを示す図である。分画中に含まれるPrP^{Sc}の量は、プラテリア（Platelia）（登録商標）BSE検出キットを使用して、半定量的方式で測定し、光学密度（Optical Density）[OD]値で示す。

20

【図4】牛からの水性体液標本および脳脊髄液標本における、PrP^{Sc}検出の評価を示す図である。この実施例では、ELISA形式で、PrP^{Sc}のキャッチャー分子として、ペプチドKLVEFFを使用した。検出は、PrP^{Sc}に対するモノクローナル抗体V5B2（ダルムシュタットにあるr-バイオファーム（r-Biopharm, Darmstadt））およびポリクローナルペルオキシダーゼがコンジュゲートしたヤギ抗マウスIgG抗体を用いて実施した。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Labor Diagnostik GmbH Leipzig
 Schleussner, Cathrin

<120> Verfahren zur Anreicherung und zum Nachweis von pathologisch
 veränderten Prion-Proteinen (PrPSc)

<130> LAB-001 PCT

<150> 102 30 141.7

<151> 2002-07-04

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> synthetische Sequenz

<400> 1
 Arg Val Val Ile Ala
 1 5

<210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> synthetische Sequenz

<400> 2
 Lys Leu Val Phe Phe
 1 5

10

20

30

40

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> synthetische Sequenz

<400> 3
Leu Pro Phe Phe Asp
1 5

10

<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> synthetische Sequenz

<220>
<221> LIPID
<222> (1)..(1)
<223> propionyl

20

<400> 4
Ile Ile Gly Leu
1

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> synthetische Sequenz

30

<220>
<221> LIPID
<222> (1)..(1)
<223> propionyl

<400> 5
Arg Ile Ile Gly Leu
1 5

40

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> synthetische Sequenz

<400> 6
Gly Val Val Ile Ala
1 5

10

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> synthetische Sequenz

<220>
<221> LIPID
<222> (1)..(1)
<223> propionyl

20

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> AMIDATION

<400> 7
Arg Arg Ala Phe Phe Val
1 5

30

<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> synthetische Sequenz

<400> 8
Ile Ile Gly Leu
1

40

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> synthetische Sequenz

<400> 9

Arg Ile Ile Gly Leu

1 5

10

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> synthetische Sequenz

<400> 10

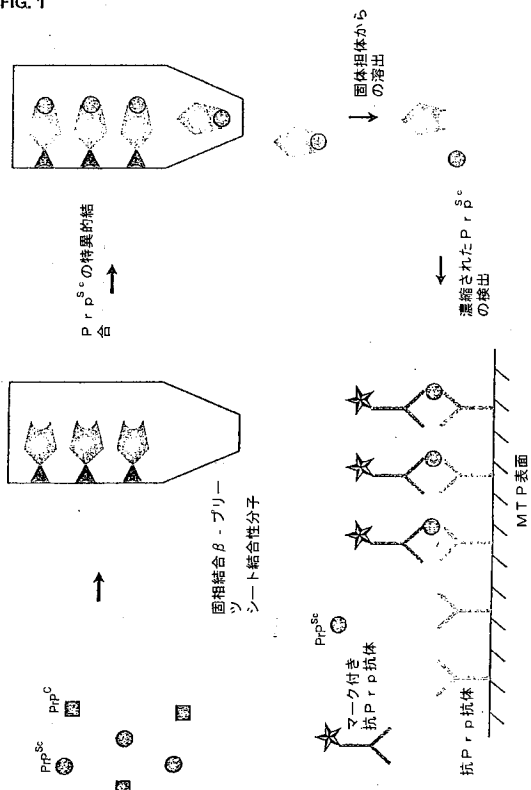
Arg Arg Ala Phe Phe Val

1 5

20

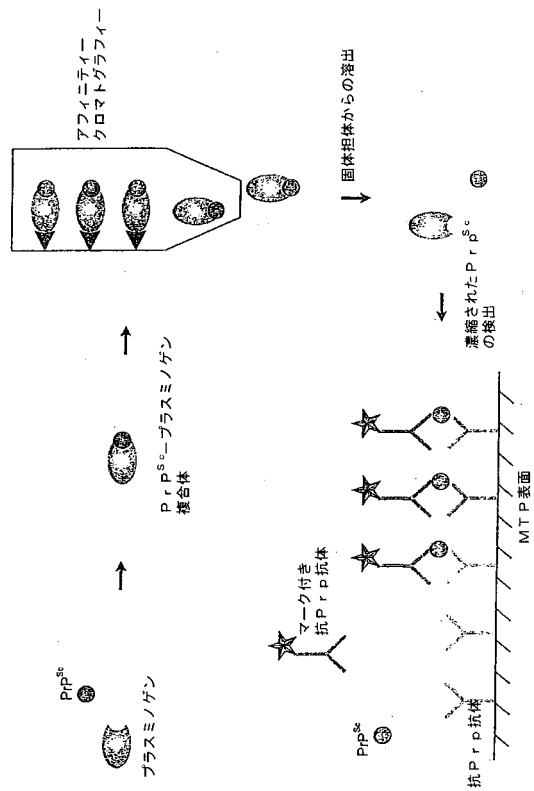
【 図 1 】

FIG. 1



【 図 2 】

FIG. 2



毛細管または膜である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記検出が、免疫学的検出方法を用いて実施される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

病理学的に変化したプリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) を検出するためのキットであって、
- プリーツシート結合性分子と結合した少なくとも一の固体担体と、洗浄液と、溶離液と、検出システムとを含む、キット。

【請求項 6】

前記検出システムが、免疫学的検出システムであり、抗 PrP 抗体で被覆された第 2 の固体担体と、酵素でマークされた二次抗体と、基質溶液と、停止溶液とを含む、請求項 5 に記載のキット。

【請求項 7】

前記 1 種の固体担体を使い捨てカラム内に詰められており、前記第 2 の固体担体がマイクロタイタープレートである、請求項 5 または 6 に記載のキット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/DE 03/02249
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 G01N33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00 29850 A (WALLAC OY ;BIRKETT CHRISTOPHER ROBIN (GB); BBSRC OFFICE (GB); HOPE) 25 May 2000 (2000-05-25) claims 1-9	1-9
Y	WO 01 07473 A (STOTT KELVIN) 1 February 2001 (2001-02-01) page 1, line 11 -page 2, line 7 page 35, line 1 - line 4 page 36, line 27 -page 37, line 11 claims 16,17,23,24	1-9
Y	WO 01 07474 A (STOTT KELVIN) 1 February 2001 (2001-02-01) page 36, line 25 -page 37, line 9 claims 15,16,20,21	1-9
	-/--	
<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 : *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) *C* 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. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 February 2004		Date of mailing of the international search report 11/02/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer van der Kooij, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/DE 03/02249

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 39834 A (UNIV NEW YORK) 19 December 1996 (1996-12-19) figure 9 ---	1-9
A	WO 01 34631 A (AXONYX INC) 17 May 2001 (2001-05-17) the whole document ---	1-9
A	HETENYI C ET AL: "Pentapeptide amides interfere with the aggregation of b-amyloid peptide of alzheimer's disease" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 292, no. 4, 12 April 2002 (2002-04-12), pages 931-936, XP002965576 ISSN: 0006-291X figure 3 page 935, column 1, paragraph 1 ---	1-9
A	SOTO C ET AL: "INHIBITION OF ALZHEIMER'S AMYLOIDOSIS BY PEPTIDES THAT PREVENT BETA-SHEET CONFORMATION" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 226, no. 3, 24 September 1996 (1996-09-24), pages 672-680, XP002050229 ISSN: 0006-291X figure 1 table 1 page 676, paragraph 3 -page 677, paragraph 1 page 678, paragraph 4 ---	1-9
A	TJERNBERG L O ET AL: "CONTROLLING AMYLOID BETA-PEPTIDE FIBRIL FORMATION WITH PROTEASE-STABLE LIGANDS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 272, no. 19, 9 May 1997 (1997-05-09), pages 12601-12605, XP002050230 ISSN: 0021-9258 abstract --- -/--	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 03/02249

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SIGURDSSON E M ET AL: "IN VIVO REVERSAL OF AMYLOID-BETA LESIONS IN RAT BRAIN" JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 59, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 11-17, XP008012465 ISSN: 0022-3069 abstract page 16, column 2, paragraph 3 -----	1-9
P,X	WO 02 088748 A (MESSER HORST ;SEILER JUERGEN (DE)) 7 November 2002 (2002-11-07) page 1, paragraphs 1,4 page 4, paragraph 6 -page 5, paragraph 3 claims 1-3,8-11 -----	1-3,6-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 03/02249

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

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

2. Claims Nos.:
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

See supplemental sheet Further Information PCT/ISA/210

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 03/02249

Further Information

PCT/ISA/210

Continuation of Box I, 2

The current claims 1-3 and 6-9 concern a molecule characterised by a desirable characteristic or property, namely that it has a beta-pleated sheet-binding property. Therefore the claims encompass all molecules that have this characteristic or property, but the application provides support by the description (PCT Article 5) for only a limited number of such molecules. In the present case, the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought.

Moreover, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the molecule by the desired result. This lack of clarity is also such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought.

The current claim 4 concerns a disproportionately large number of possible compounds, as concerns the definition "substituted heterocyclic aromatic compounds". In fact, it encompasses so many possible alternatives that it appears so unclear (PCT Article 6) and so broad that a meaningful search is impossible.

Moreover, the current claim 4 concerns a disproportionately large number of possible oligopeptides 3 to 30 amino acid groups in length, of which only a small portion are supported by the description (PCT Article 6) and can be considered disclosed in the application (PCT Article 5). In the present case, the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought.

Therefore the search was directed to the parts of the claims which can be considered clear and concise, namely to the oligopeptides having an amino acid sequence according to SEQ ID Nos 1 to 10 and the compounds thioflavin T, baicalin and quercitrin (page 6, lines 29-31).

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally need not be the subject of an international preliminary examination

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE 03/02249

Further Information	PCT/ISA/210
<p>Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/DE 03/02249

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0029850	A	25-05-2000	EP 1131635 A1	12-09-2001
			WO 0029850 A1	25-05-2000
			JP 2002530650 T	17-09-2002
WO 0107473	A	01-02-2001	AU 766992 B2	30-10-2003
			AU 6173700 A	13-02-2001
			CA 2378779 A1	01-02-2001
			EP 1203019 A1	08-05-2002
			WO 0107473 A1	01-02-2001
			JP 2003505469 T	12-02-2003
			NZ 516441 A	28-11-2003
WO 0107474	A	01-02-2001	AU 767396 B2	06-11-2003
			AU 6300400 A	13-02-2001
			CA 2379241 A1	01-02-2001
			EP 1204679 A1	15-05-2002
			WO 0107474 A1	01-02-2001
			JP 2003505470 T	12-02-2003
			NZ 516442 A	31-10-2003
WO 9639834	A	19-12-1996	US 5948763 A	07-09-1999
			AU 715662 B2	10-02-2000
			AU 6112996 A	30-12-1996
			CA 2222690 A1	19-12-1996
			EP 0843516 A1	27-05-1998
			JP 2001519753 T	23-10-2001
			WO 9639834 A1	19-12-1996
			US 2003087407 A1	08-05-2003
			US 6462171 B1	08-10-2002
WO 0134631	A	17-05-2001	AU 1463501 A	06-06-2001
			CA 2389041 A1	17-05-2001
			CN 1437442 T	20-08-2003
			EP 1286590 A2	05-03-2003
			WO 0134631 A2	17-05-2001
WO 02088748	A	07-11-2002	DE 10120562 A1	31-10-2002
			WO 02088748 A1	07-11-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/DE 03/02249
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/68 G01N33/543		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 00 29850 A (WALLAC OY ;BIRKETT CHRISTOPHER ROBIN (GB); BBSRC OFFICE (GB); HOPE) 25. Mai 2000 (2000-05-25) Ansprüche 1-9	1-9
Y	WO 01 07473 A (STOTT KELVIN) 1. Februar 2001 (2001-02-01) Seite 1, Zeile 11 -Seite 2, Zeile 7 Seite 35, Zeile 1 - Zeile 4 Seite 36, Zeile 27 -Seite 37, Zeile 11 Ansprüche 16,17,23,24	1-9
Y	WO 01 07474 A (STOTT KELVIN) 1. Februar 2001 (2001-02-01) Seite 36, Zeile 25 -Seite 37, Zeile 9 Ansprüche 15,16,20,21	1-9
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindersicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindersicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
2. Februar 2004		11/02/2004
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Befugmächtiger Bediensteter van der Kooij, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

International	Aktenzeichen
PCT/DE	03/02249

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 96 39834 A (UNIV NEW YORK) 19. Dezember 1996 (1996-12-19) Abbildung 9 ---	1-9
A	WO 01 34631 A (AXONYX INC) 17. Mai 2001 (2001-05-17) das ganze Dokument ---	1-9
A	HETENYI C ET AL: "Pentapeptide amides interfere with the aggregation of b-amyloid peptide of alzheimer's disease" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, Bd. 292, Nr. 4, 12. April 2002 (2002-04-12), Seiten 931-936, XP002965576 ISSN: 0006-291X Abbildung 3 Seite 935, Spalte 1, Absatz 1 ---	1-9
A	SOTO C ET AL: "INHIBITION OF ALZHEIMER'S AMYLOIDOSIS BY PEPTIDES THAT PREVENT BETA-SHEET CONFORMATION" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, Bd. 226, Nr. 3, 24. September 1996 (1996-09-24), Seiten 672-680, XP002050229 ISSN: 0006-291X Abbildung 1 Tabelle 1 Seite 676, Absatz 3 -Seite 677, Absatz 1 Seite 678, Absatz 4 ---	1-9
A	TJERNBERG L O ET AL: "CONTROLLING AMYLOID BETA-PEPTIDE FIBRIL FORMATION WITH PROTEASE-STABLE LIGANDS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 272, Nr. 19, 9. Mai 1997 (1997-05-09), Seiten 12601-12605, XP002050230 ISSN: 0021-9258 Zusammenfassung ---	1-9

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internation	Kennzeichen
PCT/DE	03/02249

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bez. Anspruch Nr.
A	SIGURDSSON E M ET AL: "IN VIVO REVERSAL OF AMYLOID-BETA LESIONS IN RAT BRAIN" JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY, NEW YORK, NY, US, Bd. 59, Nr. 1, Januar 2000 (2000-01), Seiten 11-17, XP008012465 ISSN: 0022-3069 Zusammenfassung Seite 16, Spalte 2, Absatz 3 -----	1-9
P,X	WO 02 088748 A (MESSER HORST ;SEILER JUERGEN (DE)) 7. November 2002 (2002-11-07) Seite 1, Absätze 1,4 Seite 4, Absatz 6 -Seite 5, Absatz 3 Ansprüche 1-3,8-11 -----	1-3,6-9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 03/02249

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: _____

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Internationales Aktenzeichen PCT/DE 03 02249

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 1-3 und 6-9 beziehen sich auf ein Molekül, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich mit einem beta-Faltblatt-bindende Eigenschaft. Die Patentansprüche umfassen daher alle Moleküle, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Moleküle liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Molekül über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht.

Der geltender Patentanspruch 4 bezieht sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Verbindungen, bezüglich die Definition "substituierte heterocyclische Aromaten". In der Tat umfassen sie so viele Wahlmöglichkeiten daß sie im Sinne von Art. 6 PCT in einem solchen Maße unklar und zu weitläufig gefasst erscheinen, als daß sie eine sinnvolle Recherche ermöglichen.

Weiterhin bezieht sich der geltender Patentanspruch 4 auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Oligopeptide mit einer Länge von drei bis 30 Aminosäureresten", von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und als im Sinne von Art. 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt der Patentanspruch die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint.

Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, die als klar und knapp gefaßt gelten können, nämlich auf die Oligopeptide mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No.1 bis 10 und die Verbindungen Thioflavin T, Baicalin und Quercitrin (Seite 6, Zeile 29-31).

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Kennzeichen
PCT/DE 03/02249

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0029850 A	25-05-2000	EP 1131635 A1	12-09-2001
		WO 0029850 A1	25-05-2000
		JP 2002530650 T	17-09-2002
WO 0107473 A	01-02-2001	AU 766992 B2	30-10-2003
		AU 6173700 A	13-02-2001
		CA 2378779 A1	01-02-2001
		EP 1203019 A1	08-05-2002
		WO 0107473 A1	01-02-2001
		JP 2003505469 T	12-02-2003
		NZ 516441 A	28-11-2003
WO 0107474 A	01-02-2001	AU 767396 B2	06-11-2003
		AU 6300400 A	13-02-2001
		CA 2379241 A1	01-02-2001
		EP 1204679 A1	15-05-2002
		WO 0107474 A1	01-02-2001
		JP 2003505470 T	12-02-2003
		NZ 516442 A	31-10-2003
WO 9639834 A	19-12-1996	US 5948763 A	07-09-1999
		AU 715662 B2	10-02-2000
		AU 6112996 A	30-12-1996
		CA 2222690 A1	19-12-1996
		EP 0843516 A1	27-05-1998
		JP 2001519753 T	23-10-2001
		WO 9639834 A1	19-12-1996
		US 2003087407 A1	08-05-2003
		US 6462171 B1	08-10-2002
WO 0134631 A	17-05-2001	AU 1463501 A	06-06-2001
		CA 2389041 A1	17-05-2001
		CN 1437442 T	20-08-2003
		EP 1286590 A2	05-03-2003
		WO 0134631 A2	17-05-2001
WO 02088748 A	07-11-2002	DE 10120562 A1	31-10-2002
		WO 02088748 A1	07-11-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
// C 0 7 K 7/02	C 0 7 K 7/02	
C 0 7 K 7/06	C 0 7 K 7/06	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, 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, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100096769

弁理士 有原 幸一

(74) 代理人 100107319

弁理士 松島 鉄男

(72) 発明者 エンゲマン, クラウディア

ドイツ連邦共和国, 0 4 1 5 7 ライプツィヒ, シュタウフェンベルクシュトラッセ 1 8

(72) 発明者 ヘシュラー, カーチャ

ドイツ連邦共和国, 0 4 1 0 5 ライプツィヒ, フォイエルバッハシュトラッセ 1 9

(72) 発明者 レーマン, イェルク

ドイツ連邦共和国, 0 4 3 1 6 ライプツィヒ, シュルシュトラッセ 2 6

(72) 発明者 ガーベルト, イェルク

ドイツ連邦共和国, 0 4 1 0 9 ライプツィヒ, ペリッツシュトラッセ 2 3

(72) 発明者 クルムライ, ウルリケ

ドイツ連邦共和国, 0 4 1 0 7 ライプツィヒ, シェイクスピアシュトラッセ 5

F ターム(参考) 4B063 QA01 QQ02 QQ03 QQ79 QR16 QR82 QS33

4H045 AA30 BA13 EA50

专利名称(译)	病理改变的朊病毒蛋白 (PrP ^{Sc}) 的浓缩方法和检测方法		
公开(公告)号	JP2005531775A	公开(公告)日	2005-10-20
申请号	JP2004518441	申请日	2003-07-04
[标]申请(专利权)人(译)	朊病毒型GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tsongu UND比较尼科曼迪为了GESELLSCHAFT格哈德·罗伊斯捐助卡特琳		
申请(专利权)人(译)	朊病毒型GESELLSCHAFT米特Beshurenkuteru-GMBH UND COMPAGNIE命令DITO GESELLSCHAFT Shuroisuna , 卡特林		
[标]发明人	エンゲマンクラウディア ヘシュラーカーチャ レーマンイエルク ガーベルトイエルク クムライウルリケ		
发明人	エンゲマン,クラウディア ヘシュラー,カーチャ レーマン,イエルク ガーベルト,イエルク クムライ,ウルリケ		
IPC分类号	G01N33/53 C07K7/02 C07K7/06 C12Q1/37 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N33/6896 G01N2333/968 G01N2800/2828		
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/37.ZNA G01N33/531.B G01N33/543.545.D G01N33/545.Z C07K7/02 C07K7/06		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR16 4B063/QR82 4B063/QS33 4H045/AA30 4H045/BA13 4H045/EA50		
优先权	10230141 2002-07-04 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及活病理变性朊病毒蛋白生物的方法 (朊病毒钷) 浓缩和跟踪。

