

(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2010-504502

(P2010-504502A)

(43) 公表日 平成22年2月12日(2010.2.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 H O 4 5
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18 Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2008-531777 (P2008-531777)	(71) 出願人	508085545 レベレーションバイオ・リミテッド イギリス国ドーセット ビーエイチ8 9 エイエイ, ボーンマス, ホールデンハース ト・ロード 4 2 6 - 4 2 8
(86) (22) 出願日	平成18年9月20日 (2006. 9. 20)	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(85) 翻訳文提出日	平成20年4月24日 (2008. 4. 24)	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(86) 国際出願番号	PCT/GB2006/003494	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(87) 国際公開番号	W02007/034177	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(87) 国際公開日	平成19年3月29日 (2007. 3. 29)	(74) 代理人	100096013 弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 感染性海綿状脳症の検出のための試薬および方法

(57) 【要約】

本発明は、成熟全長 P r P のごく N 末端にある領域に結合する、抗体などの剤を用いた、試料中の感染性海綿状脳症 (T S E) の検出に関する。これらは、タンパク質分解の必要を伴わずに、 T S E の検出において使用するための P r P ^d に関する高感度イムノアッセイの発展を可能にする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

MANLGCWMLVLFVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSR (配列番号 1)、
 MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGWNTGGSR (配列番号 2) および
 MANLGYWLLALFVTMTDVG LCKKRPKPGGWNTGGSR (配列番号 3)

からなる群より選択されるアミノ酸配列に特異的に結合する、特異的結合メンバー。

【請求項 2】

KKRPKPGGWNT および KKRPKPGGWNT からなる群より選択されるアミノ酸配列に特異的に結合する、請求項 1 記載の特異的結合メンバー。

【請求項 3】

アミノ酸配列 KKRPKPG に特異的に結合する、請求項 2 記載の特異的結合メンバー。

【請求項 4】

アミノ酸配列 PGGGWNT に特異的に結合する、請求項 2 記載の特異的結合メンバー。

【請求項 5】

細胞性プリオンタンパク質 (PrP^c) に比較して、疾患型プリオンタンパク質 (PrP^d) に優先的に結合する、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の特異的結合メンバー。

【請求項 6】

PrP^d に結合し、そして PrP^c に対して実質的に結合を示さない、請求項 5 記載の特異的結合メンバー。

【請求項 7】

抗体分子である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の特異的結合メンバー。

【請求項 8】

抗体分子が、YWH1、YWH2 および YWH3 からなる群より選択される抗体である、請求項 7 記載の特異的結合メンバー。

【請求項 9】

抗体が ECCAC 寄託番号 05091301 を持つハイブリドーマによって産生される、請求項 8 記載の特異的結合メンバー。

【請求項 10】

抗体が、ECCAC 寄託番号 05091301 を持つハイブリドーマによって産生される抗体と、PrP^d に対する結合に関して競合する、請求項 8 記載の特異的結合メンバー。

【請求項 11】

ECCAC 寄託番号 05091301 を持つハイブリドーマによって産生される抗体の V_HCDR1、V_HCDR2 および V_HCDR3 配列、ならびに V_LCDR1、V_LCDR2 および V_LCDR3 配列を含む、請求項 8 記載の特異的結合メンバー。

【請求項 12】

試料中の疾患型プリオンタンパク質 (PrP^d) の存在を検出する方法であって
 請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項記載の第一の特異的結合メンバーと試料を接触させ、そして

前記試料に対する前記の第一の特異的結合メンバーの結合を決定する、

ここで、前記試料に対する前記の第一の特異的結合メンバーの結合が、試料が疾患型プリオンタンパク質を含有することの指標となる

ことを含む、前記方法。

【請求項 13】

第一の特異的結合メンバーが検出可能標識を含む、請求項 12 記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

第一の特異的結合メンバーの結合が、第二の特異的結合メンバーを用いて決定される、請求項 12 または請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

前記の第二の特異的結合メンバーが、前記の第一の特異的結合メンバーに結合する、請求項 13 記載の方法。

【請求項 16】

前記の第二の特異的結合メンバーが検出可能標識を含む、請求項 14 または請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

検出可能標識がランタニド元素である、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

検出可能標識がコロイド金である、請求項 16 記載の方法。

【請求項 19】

第一の特異的結合メンバーが固定されている、請求項 12 ~ 18 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 20】

第一の特異的結合メンバーが側方流動デバイス上に固定されている、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

試料中の疾患型プリオンタンパク質を検出する方法であって；

第一の特異的結合メンバーと試料を接触させ；そして

第二の特異的結合メンバーを用いて、前記試料中の分子に対する前記の第一の特異的結合メンバーの結合を決定する

前記結合の存在は、疾患型プリオンタンパク質の存在の指標となる、

ここで、前記の第一または第二の特異的結合メンバーの一方は、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項記載の特異的結合メンバーであり、そして前記の第一または第二の特異的結合メンバーのもう一方は、PrP^C および PrP^D の両方に結合することを含む、前記方法。

【請求項 22】

前記の第一または前記の第二の特異的結合メンバーが固定されている、請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

前記の第一および第二の特異的結合メンバーの非固定化特異的結合メンバーが、検出可能標識を含む、請求項 21 または請求項 22 記載の方法。

【請求項 24】

前記試料中の分子に対する前記の第一の特異的結合メンバーの結合が、検出可能標識の存在を検出することによって決定される、請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

第一または第二の特異的結合メンバーが、側方流動デバイス上で固定されている、請求項 22 ~ 24 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 26】

検出可能標識が蛍光標識である、請求項 23 または請求項 24 記載の方法。

【請求項 27】

蛍光標識がランタニド元素である、請求項 26 記載の方法。

【請求項 28】

ランタニド元素がユーロピウムである、請求項 27 記載の方法。

【請求項 29】

前記標識の蛍光が増進剤または誘導剤で増進される、請求項 26 ~ 28 のいずれか 1 項記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 30】

結合が、蛍光光度計を用いて蛍光を検出することによって決定される、請求項 26 ~ 29 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 31】

蛍光光度計が時間分解蛍光光度計である、請求項 30 記載の方法。

【請求項 32】

前記試料中の PrP の濃度が前記蛍光から決定される、請求項 30 または請求項 31 記載の方法。

【請求項 33】

前記試料中のタンパク質を可溶化することを含む、請求項 12 ~ 32 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 34】

タンパク質が、可溶化剤で試料を処理することによって可溶化される、請求項 33 記載の方法。

【請求項 35】

可溶化剤がカオトロピック剤である、請求項 34 記載の方法。

【請求項 36】

カオトロピック剤がグアニジン (Gd) 塩である、請求項 35 記載の方法。

【請求項 37】

カオトロピック剤が GdHCl である、請求項 36 記載の方法。

【請求項 38】

界面活性剤の存在下、カオトロピック剤で試料を処理する、請求項 35 ~ 37 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 39】

界面活性剤の非存在下、カオトロピック剤で試料を処理する、請求項 35 ~ 37 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 40】

試料が非生物学的表面から得られる、請求項 12 ~ 39 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 41】

試料が個体から得られる、請求項 12 ~ 39 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 42】

疾患型プリオンタンパク質の存在が、個体が感染性海綿状脳症 (TSE) を有する指標となる、請求項 41 記載の方法。

【請求項 43】

試料が前記個体の組織試料または生物学的液体である、請求項 41 または請求項 42 記載の方法。

【請求項 44】

生物学的液体が血液である、請求項 43 記載の方法。

【請求項 45】

組織試料が、脳、血液、扁桃腺、リンパまたは皮膚組織由来である、請求項 44 記載の方法。

【請求項 46】

組織試料の破壊によって試料を調製する、請求項 45 記載の方法。

【請求項 47】

可溶化剤の存在下で組織試料を破壊する、請求項 46 記載の方法。

【請求項 48】

試料をプロテアーゼ処理しない、請求項 12 ~ 47 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 49】

前記試料をプロテイナーゼ K 処理しない、請求項 48 記載の方法。

【請求項 50】

10

20

30

40

50

抗体を産生する方法であって：

配列番号 1 ～ 3 およびその断片からなる群より選択されるペプチド配列を含む免疫原を動物に投与し；そして

前記動物から、前記ペプチド配列に結合する抗体を単離することを含む、前記方法。

【請求項 5 1】

ペプチド配列が：K K R P K P G G W N T および K K R P K P G G W N T からなる群より選択される、請求項 5 0 記載の方法。

【請求項 5 2】

キメラペプチドがタンパク質キャリアーに連結されている、請求項 5 0 または請求項 5 1 記載の方法。

【請求項 5 3】

抗体を産生する方法であって：

配列番号 1 ～ 3 およびその断片からなる群より選択される配列を含むペプチドと、抗体の抗原結合ドメインの多様な集団を接触させ；そして

前記配列に対する前記集団のメンバーの結合を決定することを含む、前記方法。

【請求項 5 4】

ペプチドが：K K R P K P G G W N T および K K R P K P G G W N T からなる群より選択される配列を含む、請求項 5 3 記載の方法。

【請求項 5 5】

抗体の抗原結合ドメインが、ウイルス粒子表面上にディスプレイされる、請求項 5 3 または請求項 5 4 記載の方法。

【請求項 5 6】

抗体の抗原結合ドメインが、抗体、あるいは s c F v、F a b、F v、d A b、F d またはディアボディ分子に含まれる、請求項 5 3 ～ 5 5 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5 7】

ペプチドに結合する前記集団中の抗体の抗原結合ドメインを同定することを含む、請求項 5 3 ～ 5 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 5 8】

抗体の抗原結合ドメインをディスプレイするウイルス粒子を単離し、そして / または精製することを含む、請求項 5 7 記載の方法。

【請求項 5 9】

抗体の抗原結合ドメインをコードする核酸が前記粒子から得られる、請求項 5 8 記載の方法。

【請求項 6 0】

前記粒子から、特異的結合メンバーをコードする核酸を配列決定することを含む、請求項 5 9 記載の方法。

【請求項 6 1】

前記粒子から得た前記核酸の配列を持つ核酸を発現させて、コードされる抗体の抗原結合ドメインを産生することを含む、請求項 5 9 または請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 6 2】

試料中の P r P^d の存在を検出するためのキットであって：

請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項記載の 1 以上の抗体；および

試料に対する前記抗体の結合を決定するための検出試薬を含む、前記キット。

【請求項 6 3】

個体から得た組織を取り扱い、そして / または保管するための装置を含む、請求項 6 2 記載のキット。

【請求項 6 4】

10

20

30

40

50

前記組織由来の前記試料をホモジナイズし、そして／または抽出するための試薬を含む、請求項 6 2 または請求項 6 3 記載のキット。

【請求項 6 5】

可溶化剤を含む、請求項 6 2 ～ 6 4 のいずれか 1 項記載のキット。

【請求項 6 6】

検出試薬が、P r P^c および P r P^d の両方に結合する第二の抗体を含む、請求項 6 2 ～ 6 5 のいずれか 1 項記載のキット。

【請求項 6 7】

1 以上の抗体または第二の抗体が固定されている、請求項 6 6 記載のキット。

【請求項 6 8】

側方流動デバイス中に、1 以上の抗体または第二の抗体が固定されている、請求項 6 7 記載のキット。

【請求項 6 9】

1 以上の抗体または第二の抗体が検出可能標識で標識されている、請求項 6 6 ～ 6 8 のいずれか 1 項記載のキット。

【請求項 7 0】

請求項 1 ～ 1 1 のいずれか 1 項記載の抗体を産生する、ハイブリドーマ細胞。

【請求項 7 1】

抗体を産生する方法であって；

培地中で請求項 7 0 記載のハイブリドーマ細胞を培養し；そして

前記培地から前記抗体を単離する

ことを含む、前記方法。

【請求項 7 2】

請求項 7 0 記載のハイブリドーマを産生する方法であって；

配列番号 1 ～ 3 およびその断片からなる群より選択される配列からなるペプチドで、非ヒト哺乳動物を免疫し

前記哺乳動物由来の抗体産生細胞および不死化細胞の 1 以上の融合体を産生して、ハイブリドーマ細胞集団を提供し；そして

前記集団をスクリーニングして、前記ペプチドに特異的に結合する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定する

ことを含む、前記方法。

【請求項 7 3】

前記集団から前記ハイブリドーマを単離し、そして／または精製することを含む、請求項 7 2 記載の方法。

【請求項 7 4】

培地中で前記ハイブリドーマを維持し、そして／または培養することを含む、請求項 7 3 記載の方法。

【請求項 7 5】

前記培地から、前記ペプチドに結合する抗体を単離することを含む、請求項 7 4 記載の方法。

【請求項 7 6】

感染性プリオンタンパク質の検出に有用な化合物に関してスクリーニングする方法であって、

配列番号 1 ～ 3 およびその断片からなる群より選択される配列からなるペプチドと、試験化合物を接触させ；そして

ペプチドに対する化合物の結合を決定する

ことを含む、前記方法。

【請求項 7 7】

ペプチドに対する前記化合物の結合が、該化合物が感染性プリオンタンパク質の検出に有用であることの指標となる、請求項 7 6 記載の方法。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、感染性海綿状脳症（TSE）の検出のための方法および材料に関する。

【背景技術】

【0002】

細胞性プリオンタンパク質（通常、PrP^cと称される）の疾患関連アイソフォーム（本明細書において、以後、PrP^dと称す）への変換は、TSEの病因形成における重要なプロセスである（Prusiner 1998）。その結果、PrP^dの特異的検出は、ウシにおけるウシ海綿状脳症（BSE）、ヒツジ、ハムスターおよびマウスにおけるスクレイピー、シカおよびエルク（elk）における慢性消耗病、ならびにヒトにおけるクロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）を含む、TSEの生化学的診断の基礎を形作る（Kascsak, Ferskoら 1997; Kubler, Oeschら 2003）。

10

【0003】

PrP^dの特異的検出のための既知の技術は、一般的に、プロテイナーゼK（PK）またはトリプシンなどの酵素を用いた、PrP^cの示差タンパク質分解、その後、ウェスタンブロッティング（Maded, Groschupら 1998; Schaller, Fatzerら 1999; Madec, Belliら 2000; Oesch, Doherrら 2000; Cooley, Clarkら 2001; Stack, Chaplinら 2002）または他の免疫化学的手段（MoynaghおよびSchimmel 1999; Grassi, Comoyら 2001; Biffiger, Zwaldら 2002; Safar, Scottら 2002）による、PrPのプロテアーゼ耐性コア（通常、PrP^{res}と称される）の検出を伴う。

20

【0004】

しかし、PrP^{res}の検出が、疾患関連PrP（すなわちPrP^d）の存在を反映することを確実にするには、タンパク質分解の正確な状態を同定する、注意深い最適化が必要である。さらに、疾患の最終段階における、動物由来の1種類の組織（例えば脳幹）中のPrP^{res}の検出のために最適化されている条件は、前臨床疾患の検出に必要な、一次および二次リンパ組織または他の体液（例えば血液）中のPrP^{res}の検出には不適切である可能性もある。これらの状況において、タンパク質分解に最適な条件は、常に再調整する必要があり、そして管理が困難である可能性もある。タンパク質分解での別の問題は、ハイスループット自動化から生じる制約であり、この場合、タンパク質分解の不適切な管理は、偽陽性および/または偽陰性を生じさせる可能性もある。

30

【0005】

PrP^dに特異的な多様なモノクローナル抗体（Mab）が報告されてきている（Korth, Stierliら 1997; Curin Serbec, Bresjanacら 2003; Paramithiotis, Pinardら 2003）。これらのMabはすべて、比較的親和性が低く、そしてコンホメーション・エピトープを認識する。これは、PrP^dを変性させると、これらの抗体の結合が排除されることを意味する。変性しなければ、PrP^dの大部分は凝集状態で「ロック」される。その結果、これらの抗体の使用はいくぶん限定されており、そして検出感度は非常に減少している可能性もある。

40

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、予期せぬことに、成熟全長PrPのごくN末端にある領域に結合する剤が、PrP^dの検出法において有用であり、使用可能に特異的であることを認識した。これは、タンパク質分解に必要でない、PrP^dに関する高感度イムノアッセイの開発を可

50

能にする。

【0007】

本発明の1つの側面は、配列番号1、配列番号2および配列番号3からなる群より選択されるアミノ酸配列に結合する、特異的結合メンバーを提供する。

配列番号1、配列番号2および配列番号3は、それぞれ、全長ヒト、反芻動物およびネズミPrPのごくN末端に相当する。

【0008】

本明細書に記載するような特異的結合メンバーは、ヒト、反芻動物（ヒツジ、ウシおよびシカを含む）および/またはネズミPrP^dに結合可能である。

配列番号1、配列番号2および配列番号3からなる群より選択されるアミノ酸配列に結合する特異的結合メンバーは、これらのアミノ酸配列の1以上、2以上または3つすべての中の、直鎖エピトープに特異的に結合可能である。例えば、特異的結合メンバーは、配列番号1、配列番号2および/または配列番号3のアミノ酸配列由来の6以上、7以上、8以上、9以上、10以上または11以上の隣接アミノ酸からなるエピトープに結合可能である。

【0009】

いくつかの態様において、特異的結合メンバーは、アミノ酸配列KKRPKPGGWNTまたはKKRPKPGGWNTに結合可能であるか、あるいはアミノ酸配列KKRPKPGGWNTおよび/またはKKRPKPGGWNT内のエピトープに特異的に結合可能である。いくつかの好ましい態様において、特異的結合メンバーは、直鎖エピトープKKRPKPGまたは直鎖エピトープPGGWNTに結合可能である。

【0010】

本明細書に記載するような特異的結合メンバーは、本明細書記載の方法によって、生物学的材料から抽出されるPrP^dに結合可能である。好ましくは、特異的結合メンバーは、PrP^dに特異的に結合する、すなわち抗体はPrP^dに結合するが、同じ供給源由来のPrP^c、例えば本明細書に記載するような生物学的材料から抽出されるPrP^cにはほとんどまたはまったく結合を示さない。

【0011】

好ましくは、特異的結合メンバーは、変性PrP^dおよび未変性PrP^dの両方に結合するが、変性または未変性コンホメーションのいずれかであるPrP^cには、ほとんどまたはまったく結合を示さない。組換えPrPは、PrP^cのN末端を取り除くかまたはマスキュラー、翻訳後プロセスを経ない。したがって、本明細書に記載するような特異的結合メンバーは、また、組換えPrPにも結合可能である。

【0012】

特異的結合メンバーは、PrP配列のごくN末端にある領域、例えばヒト、ウシ、ヒツジまたはネズミPrP配列のごくN末端にある領域に結合可能である。例えば、特異的結合メンバーは、PrP配列のN末端および最初のチロシン残基（例えばヒトPrPのTy₃₈およびウシPrPのTy₄₁）の間の領域、すなわちPrPのN末端38または40アミノ酸からなる領域に結合可能である。

【0013】

シグナルペプチドを含む全長ヒトPrPのごくN末端にある領域である、配列番号1の中の直鎖エピトープに結合する特異的結合メンバー、特にアミノ酸配列KKRPKPGGWNTに結合する特異的結合メンバーは、ヒトPrP^dに対する結合において特に有用でありうる。シグナルペプチドを含む全長ウシPrPのN末端にある、配列番号2の中の直鎖エピトープ、特にアミノ酸配列KKRPKPGGWNTに特異的に結合する特異的結合メンバーは、ウシ、ヒツジまたはシカPrP^dに対する結合において特に有用でありうる。シグナルペプチドを含む全長ネズミPrPのごくN末端にある領域である、配列番号3の中の直鎖エピトープに結合する特異的結合メンバー、特にアミノ酸配列KKRPKPGGWNTに結合する特異的結合メンバーは、ネズミPrP^dに対する結合において特に有用でありうる。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 4 】

本発明記載の抗体には、本明細書記載の Y W H 1、Y W H 2 および Y W H 3 抗体が含まれる。

Y W H 1 は、J o h n C o w a r d によって、仮寄託番号 0 5 0 9 1 3 0 1 で英国ウィルトシャー州ポートンダウンの E C C A C に 2 0 0 5 年 9 月 1 日に寄託された、「Y W H 1」と称されるハイブリドーマによって産生される。本明細書に記載するような Y W H 1 抗体は、寄託されたハイブリドーマによって産生される抗体の $V_H CDR 1$ 、 $V_H CDR 2$ および $V_H CDR 3$ 配列、ならびに $V_L CDR 1$ 、 $V_L CDR 2$ および $V_L CDR 3$ 配列を有することも可能であり、より好ましくは、抗体は、寄託されたハイブリドーマによって産生された抗体の V_L および V_H 領域を有する。いくつかの態様において、Y W H 1 抗体は、寄託されたハイブリドーマによって産生されてもよいし、または寄託されたハイブリドーマによって産生された抗体に同一であってもよい。他の態様において、本明細書に記載するような Y W H 1 抗体は、寄託されたハイブリドーマによって産生された抗体と、 $P r P^d$ に対する結合に関して競合しうる。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 5 】

ターゲットエピトープに特異的に結合する結合メンバー（すなわち特異的結合メンバー）は、ポリペプチド中にエピトープが存在し、そしてアクセス可能である場合（例えば $P r P^d$ ）、ターゲットエピトープ（例えば $P r P$ のごく N 末端にある領域中のターゲット）に有意な結合を示すことも可能であり、そしてターゲットエピトープが存在しないかまたは特異的結合メンバーに対してアクセス不能であるペプチドまたはポリペプチド（例えば $P r P^c$ ）に対してはほとんどまたはまったく結合を示さないことも可能である。特に、特異的結合メンバーは、試料中に存在する他のタンパク質、特に、哺乳動物の脳、皮膚、扁桃腺またはリンパ組織試料、あるいは血液、唾液または尿などの生物学的液体の試料中に存在する他のタンパク質に対する有意な結合をまったく示さないことも可能である。さらに、 $P r P^d$ のごく N 末端にある領域内に特異的に結合する抗体は、この領域外で、 $P r P^d$ に対する有意な結合をまったく示さないことも可能である。

【 0 0 1 6 】

一般的に、ターゲットエピトープに特異的に結合する特異的結合メンバーは、約 10^5 モル/リットルより高い（例えば 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、および 10^{12} 以上のモル/リットルの）結合親和性を有しうる。

【 0 0 1 7 】

特異的結合メンバーは、互いに結合特異性を有する分子対のメンバーである。特異的結合対のメンバーは、天然に由来してもよいし、あるいは完全にまたは部分的に合成的に産生されてもよい。分子対の一方のメンバーは、分子対の他方のメンバーに特異的に結合し、そしてしたがって該メンバーの特定の空間的構成および極性構成に相補的である、表面上領域または空洞を有する。したがって、対のメンバーは、互いに特異的に結合する特性を有する。特異的結合対の種類の例は、抗原 - 抗体、ビオチン - アビジン、ホルモン - ホルモン受容体、受容体 - リガンド、酵素 - 基質である。本明細書に記載するような特異的結合メンバーは、例えばフォールディングされたドメインなどのペプチドまたはポリペプチドを形成するか、あるいは抗原に結合する能力に加えて、別の機能特性を分子に与える、免疫グロブリンまたは他のアミノ酸配列を含んでもよい。

【 0 0 1 8 】

好ましい特異的結合メンバーには、抗体分子が含まれる。抗体分子は、天然であっても、あるいは部分的にまたは完全に合成的に産生されてもよい、免疫グロブリンである。該用語には、抗体および抗体断片を含む、抗体結合ドメインを含む、いかなるポリペプチドまたはタンパク質も含まれる。抗原結合ドメインを含む抗体断片には、F a b、s c F v、F v、d A b、F d、およびディアボディが含まれる。

【 0 0 1 9 】

いくつかの好ましい態様において、本明細書記載の特異的結合メンバーは、モノクローナルまたはポリクローナル抗体であってもよい。

本明細書に記載するような抗体を産生する方法は：

配列番号 1 ~ 3 およびその断片からなる群より選択される配列を含む免疫原を、動物に投与し；そして

前記動物から、前記ペプチド配列に結合する抗体を単離することを含んでもよい。

【0020】

アミノ酸配列の断片は、配列番号 1、配列番号 2 または配列番号 3 のアミノ酸配列由来の 6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、10 以上または 11 以上の隣接アミノ酸を含んでもよい。適切な断片には、KKRPKPGGWNT、KKRPKPGGWNT、KKRPKPG および PGGGWNT が含まれる。

10

【0021】

免疫原は、キーホール・リンペット (Keyhole Limpet) ・ヘモシアニンなどのタンパク質キャリアーを含んでもよい。他の適切なキャリアーは当該技術分野に周知である。

【0022】

いくつかの態様において、免疫原は、ヒツジまたはウシ PrP 配列のアミノ酸 25 ~ 36、および例えばヒツジまたはウシ PrP 配列のアミノ酸 62 ~ 69 からなるキメラペプチド、あるいはヒト PrP 配列のアミノ酸 23 ~ 34、および例えばヒト PrP 配列のアミノ酸 59 ~ 66 からなるキメラペプチドを含んでもよい。

【0023】

当該技術分野に知られる多様な技術のいずれかを用いて、免疫した動物から抗体を得て、そして好ましくは、関心対象の抗原に対する抗体の結合を用いて、スクリーニングしてもよい。例えば、ウェスタンブロッティング技術、イムノアッセイまたは免疫沈降を用いてもよい (Armitage ら (1992) Nature 357 80 - 82)。

20

【0024】

より好ましくは、抗体分子はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体を産生する方法は、当該技術分野に周知であり (例えば、Harlow ら Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor, NY, 1988) pp. 353 - 355 を参照されたい)、そして以下により詳細に記載される。例えば、免疫した哺乳動物から、抗体産生細胞を単離して、そして不死化細胞と融合させて、抗体産生ハイブリドーマ細胞集団を産生してもよく、次いでこれをスクリーニングして、最適な結合特性を示す抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定してもよい。

30

【0025】

いくつかの態様において；

配列番号 1 ~ 3 およびその断片からなる群より選択される配列を含む免疫原で、非ヒト哺乳動物を免疫し、

前記哺乳動物由来の抗体産生細胞および不死化細胞の 1 以上の融合体を産生して、ハイブリドーマ細胞集団を提供し；そして

前記集団をスクリーニングして、配列番号 1 ~ 3 およびその断片からなる群より選択される配列に結合する抗体を産生するハイブリドーマ細胞を同定する

40

ことを含む方法によって、ハイブリドーマを産生してもよい。

【0026】

好ましくは、配列番号 1 ~ 3、およびその断片からなる群より選択される 1 以上のペプチド配列、例えば KKRPKPGGWNT または KKRPKPGGWNT、あるいはこれらの配列の 1 つの中のペプチドエピトープに対する、集団の細胞によって産生される抗体の結合を試験することによって、ハイブリドーマ細胞集団をスクリーニングする。例えば、ウェスタンブロッティング技術、イムノアッセイまたは免疫沈降を用いてもよい。

【0027】

PrP のごく N 末端にある配列内のエピトープ (例えばウシ PrP のアミノ酸 1 ~ 40

50

またはヒトPrPのアミノ酸1～38、好ましくはウシPrPのアミノ酸25～36またはヒトPrPのアミノ酸23～34)に結合する抗体を産生すると同定されたハイブリドーマ細胞を集団から単離し、そして/または精製してもよい。

【0028】

単離後、当該技術分野に周知の方法を用いて、培地中でハイブリドーマを拡大し、維持し、そして/または培養してもよい。ハイブリドーマによって産生される抗体を前記培地から単離してもよい。本明細書に記載するように抗体を産生する方法は；
培地中で上述のように産生されたハイブリドーマ細胞を培養し；そして
上述のような抗体、例えば配列番号1～3およびその断片からなる群より選択される1以上の配列、例えばKKRPKPGGWNTまたはKKRPKPGGWNTに結合する抗体を、培地から単離することを含んでもよい。

10

【0029】

あるいは、多くの既知のディスプレイ技術およびコンビナトリアルライブラリーのいずれを用いて特異的結合メンバーを産生してもよい(Rothel et al. *FASEB J.* 2006; 20:1599-610)。初期には、組換え技術を用いて、免疫グロブリンV領域が修飾のための骨格として用いられたが、近年、多くのアプローチが採用されてきている。2つの例には、フィブロネクチンIII型ドメインの関与が含まれる(Koide et al. *Journal of Molecular Biology* 1998; 284:1141-51)。別の例は、ロドサーマス・マリナス(*Rhodothermus marinus*)に見られるキシラナーゼ由来の炭水化物結合モジュールの使用を伴う(Cicortas et al. *Gunnarsson et al. Protein Eng. Des. Sel.* 2004; 17:213-21)。PrPに対する別の結合パートナー(例えば核酸、グリコサミノグリカン等)が、当該技術分野に知られる他の方法によって発見可能である。

20

【0030】

好ましい態様において、例えば、機能的免疫グロブリン結合ドメインを表面上にディスプレイするラムダ・バクテリオファージまたは糸状バクテリオファージを用いて、発現された免疫グロブリン可変ドメイン、または抗体の抗原結合ドメインを含む他の分子の組換え的に産生されたライブラリーから、PrPのN末端配列内のエピトープに特異的なモノクローナル抗体を得てもよい；例えばWO92/01047を参照されたい。ライブラリーは免疫学的に未処置であってもよく、すなわちエピトープを含むペプチドで免疫されていない生物から得た配列から構築するか、または関心対象の抗原に曝露されたことがある生物から得た配列を用いて構築したものであってもよい。本明細書に記載するような抗体を作製する方法は：

30

配列番号1～3およびその断片からなる群より選択されるペプチド配列を含む免疫原と、抗体の抗原結合ドメインの多様な集団を接触させ；そして
前記ペプチドに対する前記集団のメンバーの結合を決定することを含んでもよい。

【0031】

40

いくつかの態様において、免疫原は、ヒツジまたはウシPrP配列のアミノ酸25～36、および例えばヒツジまたはウシPrP配列のアミノ酸62～69からなるキメラペプチド、あるいはヒトPrP配列のアミノ酸23～34、および例えばヒトPrP配列のアミノ酸59～66からなるキメラペプチドを含んでもよい。

【0032】

抗体の抗原結合ドメインは、ウイルス粒子表面上にディスプレイされてもよく、すなわち、多様な集団がファージディスプレイライブラリーであってもよい。

方法は、配列番号1～3およびその断片からなる群より選択されるアミノ酸配列、例えばKKRPKPGGWNTまたはKKRPKPGGWNTに結合する、前記集団内の抗体の抗原結合ドメインを同定することを含んでもよい。

50

【 0 0 3 3 】

抗体の同定された抗原結合ドメインをディスプレイするウイルス粒子を単離し、そして / または精製し、そして抗体の抗原結合ドメインをコードする核酸を前記粒子から得てもよい。

【 0 0 3 4 】

抗体の抗原結合ドメインをコードする核酸を配列決定し、そして / または発現させて、配列番号 1、配列番号 2 および / または配列番号 3 のペプチド配列内のエピトープに結合する、コードされる抗体の抗原結合ドメインを産生してもよい。

【 0 0 3 5 】

ルーチンの方法論を用いて、上述のように産生された抗体の抗原結合ドメインをさらに試験して、その特異性を決定する、すなわちペプチド配列の一方または両方に特異的に結合するかどうかを決定してもよい。

10

【 0 0 3 6 】

いくつかの態様において、例えば鎖シャフリングによるアフィニティー成熟、および部位特異的、ランダムまたはコンビナトリアル突然変異誘発を含む、標準的な抗体操作技術を用いて、抗体の抗原結合ドメインの結合特性をさらに最適化してもよい。

【 0 0 3 7 】

続く使用のため、標準的技術を用いて、抗体または抗体分子に含まれる抗体の抗原結合ドメイン、例えば s c F v、F a b、F v、d A b、F d またはディアボディ分子を、例えば I g G 抗体に、再フォーマットしてもよい。

20

【 0 0 3 8 】

本発明の別の側面は、個体において T S E を検出する方法であって個体から得た試料と、上述のような特異的結合メンバー、例えば配列番号 1 ~ 3 およびその断片からなる群より選択されるアミノ酸配列、例えば K K R P K P G G W N T または K K R P K P G G W N T に特異的に結合する抗体分子を接触させ ; そして前記試料に対する前記抗体の結合を決定することを含む方法を提供する。

【 0 0 3 9 】

試料に対する抗体の結合は、試料中に P r P^d が存在する指標となり、これは個体が T S E を有する指標となる。

30

結合量は、試料中の P r P^d の量の指標となりうる。これは、個体における T S E の度合いまたは進行の指標となりうる。

【 0 0 4 0 】

対照に比較して、抗体の結合を決定してもよい。適切な対照には、健康な個体 (すなわち T S E に罹患していない個体) 由来の組織が含まれうる。

個体から得た神経組織 (例えば脳組織) から、リンパ組織 (例えば一次または二次リンパ組織) から、または細胞 (例えば白血球、線維芽細胞) から、試料を調製してもよい。また、体液 (例えば血液、唾液または尿) から試料を調製してもよい。

【 0 0 4 1 】

いくつかの好ましい態様において、個体由来の一次リンパ組織または二次リンパ組織を用いる。

40

個体から得た組織および液体を処理して、可溶化し、そして不溶性タンパク質凝集体および断片を抽出して、イムノアッセイにおける検出を容易にしてもよい。

【 0 0 4 2 】

適切な処理には、可溶化剤、例えば溶媒またはカオトロピック剤での処理、塩溶液での化学的処理、および超音波処理などの物理的処理が含まれうる。

カオトロピック剤は、タンパク質を変性させ、そして特に、タンパク質凝集体および断片の抽出を容易にしうる試薬である。適切なカオトロピック剤は、当該技術分野に周知であり、そしてこれには、グアニジン塩酸 (G d H C l) および尿素が含まれる。変性効果を生じるいかなる濃度でカオトロピック剤を用いてもよく、例えば 8 M G d H C l を使

50

用してもよい。

【0043】

適切な溶媒もまた当該技術分野に周知であり、そしてこれにはメタノールが含まれる。適切な塩溶液には、飽和硫酸アンモニウムが含まれる。

抗体と接触させる前に、個体から得た組織を破壊し、そして／またはホモジナイズしてもよい。例えば、界面活性剤、例えば Tween - 20TM または Triton X - 100TM の存在下または非存在下、カオトロピック剤の存在下で、組織をホモジナイズしてもよい。

【0044】

好ましくは、組織または抽出物は、前記抗体と接触させる前に、プロテアーゼ処理には供されない（すなわち、組織または抽出物は、プロテアーゼ処理されない）。

いくつかの態様において、個体は非ヒト動物である。本明細書記載の方法を用いて、ヒツジおよびヤギにおけるスクレーピー、ハムスターおよびマウスにおける実験的スクレーピー、エルクおよびシカ（シカ科）における慢性消耗病、ならびに／あるいはウシまたは他の動物における BSE を検出してもよい。

【0045】

他の態様において、個体はヒトであり、そして本明細書記載の方法を用いて、クロイツフェルト - ヤコブ病（CJD）、クールー病、ゲルストマン - ストロイスラー - シヤインカー症候群または家族性致死性不眠症（FFI）を検出してもよい。

【0046】

個体は、TSE に関連する行動上の変化または臨床的症状を示さなくてもよいし、あるいは、個体は、TSE に関連する、1 以上の行動上の変化または臨床的症状を示してもよい。

【0047】

配列番号 1 ~ 3 およびその断片からなる群より選択される配列、例えば KKRPKPGGGWNT または KKRPKPGGGWNT に結合し、そして PrP^d に特異的に結合可能な特異的結合メンバーを上述する。いくつかの態様において、特異的結合メンバーは、検出可能標識、または検出可能標識に結合するタグを含んでもよい。標識の存在を検出することによって、試料に対する特異的結合メンバーの結合を決定してもよい。検出した標識の量から、試料中の PrP^d のレベル、量または濃度を決定してもよい。

【0048】

適切な標識を、以下により詳細に記載する。

他の態様において、第一の特異的結合メンバーに結合し、そして検出可能標識を含む、第二の特異的結合メンバーを用いて、特異的結合メンバーの結合を決定してもよい。

【0049】

好適には、サンドイッチアッセイ形式を使用してもよい。個体において TSE を検出する方法は；

第一の特異的結合メンバーと、前記個体由来の試料を接触させ；そして

第二の特異的結合メンバーを用いて、前記試料において、PrP^d 分子に対する前記の第一の特異的結合メンバーの結合を決定する

ことを含んでもよく、

前記結合の存在は個体における TSE の存在の指標となり、ここで、前記の第一または第二の特異的結合メンバーの一方が、配列番号 1 ~ 3 およびその断片からなる群より選択される配列、例えば KKRPKPGGGWNT または KKRPKPGGGWNT に結合し、そして前記の第一または第二の特異的結合メンバーの他方が、PrP^c および PrP^d の両方に結合する。

【0050】

例えば、第一の特異的結合メンバーが、配列 KKRPKPGGGWNT または KKRPKPGGGWNT に結合可能であり、そして第二の特異的結合メンバーが、PrP^c および PrP^d に結合可能であるか、あるいは第二の特異的結合メンバーが、配列 KKRPKP

10

20

30

40

50

G G G W N T または K K R P K P G G W N T に結合可能であり、そして第一の特異的結合メンバーが、P r P^c および P r P^d に結合可能である。

【0051】

適切な特異的結合メンバーには、炭水化物、グリコサミノグリカン、核酸、ペプチド、および抗体分子を含むタンパク質が含まれてもよい。

P r P^c および P r P^d に結合する、抗体などの特異的結合メンバーは、当該技術分野に周知であり、そして例えば、両方のタンパク質型に共通のエピトープ、例えば P r P 配列の残基 51 ~ 98 に渡る 8 ペプチド反復領域を認識してもよい。

【0052】

前記の第一および第二の特異的結合メンバーの一方が固定され、そして他方の特異的結合メンバーの結合を検出してもよい。好ましくは、第一の特異的結合メンバーが固定化される。特異的結合メンバーは、例えば不溶性支持体に対する付着によって固定化されていてもよい。支持体は、微粒子または固体型であってもよいし、そしてプレート、試験管、ビーズ、ボール、フィルターまたは膜が含まれてもよい。特異的結合メンバーは、例えば、アフィニティークロマトグラフィーで使用するのに適した不溶性支持体に固定されていてもよい。不溶性支持体に特異的結合メンバーを固定するための方法が、当業者に知られる。

【0053】

固定されていない特異的結合メンバーは、検出可能標識を含んでもよい。例えば、抗体は、蛍光体、好ましくはユーロピウムなどのランタニド、放射性同位体、酵素または粒子、あるいは非同位体標識試薬、例えばビオチンまたはジゴキシゲニン、あるいは例えば特有の小分子、ペプチドまたは核酸であってもよい、他の任意の検出可能な「タグ」または標識で標識されていてもよい。

【0054】

いくつかの態様において、固定されていない特異的結合メンバーに結合する第三の特異的結合メンバーを用いて、固定されていない特異的結合メンバーを検出してもよい。第三の抗体は、検出可能標識を含んでもよい。

【0055】

特異的結合メンバーに対する検出可能標識の連結は、直接であっても、または間接的であっても、例えばペプチド結合を介して共有性であっても、または非共有性であってもよい。ペプチド結合を介した連結は、特異的結合メンバー（例えば抗体）および標識分子をコードする遺伝子融合体の組換え発現の結果であってもよい。非共有結合を介した連結は、ビオチン化抗体およびストレプトアビジン/アビジン連結標識分子の間の結合の結果であってもよい。

【0056】

標識には、例えば、免疫クロマトグラフィー・ストリップなどの側方流動アッセイ、フロースルーアッセイ、凝集アッセイ、あるいはディップスティックまたはディップスティック櫛アッセイなどの固相アッセイを含む、F A C S、E L I S A、ウェスタンブロット、T R F I A、免疫組織化学、またはイムノアッセイによって、直接または間接的に、検出可能シグナルが、視覚的に観察されるか、電氣的に検出されるかまたは別の方式で記録されることを可能にする、フルオレセイン、ローダミン、フィコエリトリン、ユーロピウムおよびテキサスレッドなどの蛍光体、発色原色素、例えばジアミノベンジジン、巨大分子コロイド性粒子または微粒子物質、例えば着色されるか、磁性であるかまたは常磁性であるラテックスビーズ、金属ゾル（例えば金ゾル）、色素ゾル、および生物学的または化学的活性剤が含まれる。適切に標識した分子の調製および使用は、当業者に周知である（例えば E P 0 2 9 1 1 9 4 B 1）。

【0057】

生物学的または化学的に活性である剤には、例えば、発色させるかまたは変色させるか、あるいは電氣的特性の変化を引き起こす反応を触媒する、酵素が含まれる。これらは、エネルギー状態間の電子遷移が特徴的なスペクトル吸収または放出を生じるように、分子

10

20

30

40

50

的に励起可能でありうる。これらには、バイオセンサーと組み合わせて用いる、化学的実体が含まれてもよい。ピオチン/アビジンまたはピオチン/ストレプトアビジンおよびアルカリホスファターゼ検出系を使用してもよい。さらなる例には、西洋ワサビ(horseradish)ペルオキシダーゼおよび化学発光が含まれる。

【0058】

いくつかの好ましい態様において、検出可能標識は、ユーロピウム(Eu)、サマリウム(Sm)、テルビウム(Tb)またはジスプロシウム(Dy)などのランタニド元素である。ユーロピウムなどのランタニドの蛍光は、天然蛍光よりもはるかにより長い期間に渡って崩壊するため、これらの標識を時間分解蛍光測定イムノアッセイ(TRFIA)において用いて、バックグラウンドを減少させ、そして感度を上昇させてもよい。

10

【0059】

他の好ましい態様において、ディップスティック、フロースルーデバイスまたは側方流動デバイスなどの固相デバイスを含む、イムノアッセイデバイス中に抗体を配置してもよい。適切なデバイスは当該技術分野に周知である(例えばGB 1589234、EP 0225054、EP 0183442、EP 0291194およびEP 0186799)。

【0060】

本発明の方法は、FACS、ELISA、ウェスタンブロット、TRFIA、免疫組織化学、またはイムノアッセイ、例えば側方流動、フロースルー、凝集または固相アッセイなどの、いかなる好適なアッセイ形式で行ってもよいが、いくつかの特に好ましい態様において、本明細書記載の方法を、DELFIATM(解離増進ランタニド蛍光イムノアッセイ)などのTRFIA形式で行う。

20

【0061】

DELFIATMは、増進溶液と組み合わせてランタニド標識を使用して、時間分解蛍光光度計上で測定される蛍光シグナルを生じる。DELFIATMアッセイは、当該技術分野に周知である(例えばAllcottら J Immunol 158: 345-58; Butcherら J Immunol Methods, 2003 Jan 15; 272(1-2): 247-56を参照されたい)。

【0062】

方法は、検出可能標識と蛍光増進剤を接触させて、そして前記標識から蛍光を検出することを含んでもよい。

30

結合を決定する様式は、本発明の特徴ではなく、そして当業者は、優先性および一般的な知識にしたがって、適切な様式を選択することが可能である。

【0063】

本発明の他の側面は、TSEを検出する際に使用するための抗体分子などの特異的結合メンバーの産生における、配列番号1~3およびその断片、あるいはヒツジまたはウシPrP配列のアミノ酸25~36、および例えばヒツジまたはウシPrP配列のアミノ酸62~69からなるキメラペプチド、あるいはヒトPrP配列のアミノ酸23~34、および例えばヒトPrP配列のアミノ酸59~66からなるキメラペプチド、からなる群より選択される配列からなるペプチドの使用、ならびにTSEの検出における、配列番号1~3およびその断片、例えばKKRPKPGGWNTまたはKKRPKPGGWNT、からなる群より選択されるアミノ酸配列に特異的に結合する抗体分子などの特異的結合メンバーの使用を提供する。

40

【0064】

本明細書に記載するような抗体分子などの特異的結合メンバーは、例えば、内容物が外部環境から保護されているバイアルなどの適切な容器中で、TSEを検出するかまたは診断するためのキットの一部を形成してもよい。

【0065】

個体において、TSEを検出するかまたはTSEの進行を評価するためのキットは：

50

上述のように、配列番号 1 ~ 3 およびその断片、例えば K K R P K P G G W N T または K K R P K P G G W N T、からなる群より選択されるアミノ酸配列に特異的に結合する、抗体分子などの 1 以上の特異的結合メンバー；ならびに
個体から得た試料に対する、前記の 1 以上の特異的結合メンバーの結合を決定するための
検出試薬
を含んでもよい。

【0066】

1 以上の特異的結合メンバーは、溶液中に遊離していてもよいし、または磁気ビーズ、試験管、膜またはマイクロプレートウェルなどの固体支持体上に固定されていてもよい。

検出試薬は、PrP^c および PrP^d 両方に結合する第二の特異的結合メンバーを含んでもよい。PrP^d に特異的な特異的結合メンバーまたは第二の特異的結合メンバーは、検出可能標識、例えばユーロピウムなどのランタニド、金または他のゾル粒子、着色ビーズ、あるいは検出可能標識に結合するタグで標識されていてもよい。適切なタグにはビオチンが含まれる。特異的結合メンバーがタグで標識されている場合、検出試薬はさらに、タグに結合する検出可能標識を含んでもよい。

【0067】

検出試薬は、標識と反応してシグナルを生じる基質、例えば発色原、蛍光または化学発光基質をさらに含んでもよい。基質には、本明細書に記載するような、DEL F I A（登録商標）増進剤および洗浄溶液を含む、DEL F I A（登録商標）などの T R F I A アッセイで使用するのための、増進剤溶液および誘導剤が含まれてもよい。検出試薬は、緩衝溶液、洗浄溶液等をさらに含んでもよい。

【0068】

キットはまた：個体から得た組織を取り扱い、そして / または保管するための装置；および前記組織由来の前記試料をホモジナイズし、そして / または抽出するための試薬、例えば界面活性剤を含むまたは含まない G d H C l などのカオトロピック剤の 1 つまたは両方も含んでもよい。

【0069】

キットにはまた、本明細書に記載するような、例えば、試験試料中の T S E 障害を検出する方法における、抗体分子または他の特異的結合メンバーの使用のための使用説明書も含まれてもよい。

【0070】

本発明の多様なさらなる側面および態様は、本開示を考慮すると、当業者には明らかであろう。本明細書に言及するすべての文書は、その全体が本明細書に援用される。

本発明は、上述の特徴のあらゆる組み合わせおよびサブコンビネーションを含む。

【0071】

本発明の特定の側面および態様が、ここに、例として、そして上述の図および以下に記載する表に関連して例示される。

表 1 は、組織学的に確認された B S E 陽性および陰性ウシ尾側髄質における、疾患関連 PrP の測定を示す。

【実施例】

【0072】

材料

組織

V e t e r i n a r y L a b o r a t o r i e s A g e n c y (V L A) , N e w H a w , A d d l e s t o n e , S u r r e y K T 1 5 3 N B , U K から、ヒツジ吻側髄質および口蓋扁桃の試料を得た。これらには、組織学的に確認されたスクレーピー陽性材料および該疾患に曝露されたことがまったくないヒツジの群れ由来のニュージーランド (N Z) 陰性組織が含まれた。

【0073】

さらに、組織学的に確認された B S E 陽性および陰性のウシ尾側髄質の試料が、V L A

10

20

30

40

50

, Whitley Road, Longbenton, Newcastle upon Tyne NE12 9SE, UKによって入手可能となった。限られた数のヒト脳ホモジネートが、NIBSC CJD Resource Centre, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar EN6 3QG, UK (Minor, Newhamら 2004) から入手可能である。

【0074】

試薬

すべての緩衝液の基本的な構成要素およびGdHCl (8M; カタログ番号G-9284) を、Sigma-Aldrich Co Ltd., Fancy Road, Poole, Dorset UKから得た。2リットルのMilliQ水中に、14.9 g Trizma (登録商標) プリセット結晶 (pH 7.7; カタログ番号T8068)、18 g 塩化ナトリウム (Sigma Ultra; カタログ番号S7653); 1 g アジ化ナトリウム (Sigma Ultra; S8032); 16 mg ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA; カタログ番号D6518); 40 mg アマランス (カタログ番号A1016); 0.2 mL Tween 20 (カタログ番号P7949) および10 g ウシ血清アルブミン (BSA; カタログ番号A3059) を溶解することによって、アッセイ緩衝液を調製した。2リットルのMilliQ水中に、PBS粉末 (pH 7.4; P5368) の小袋2つおよび1 g アジ化ナトリウム (Sigma Ultra; S8032) を溶解することによって、Mabコーティング緩衝液を調製した。2リットルのMilliQ水中に、PBS粉末 (pH 7.4; P5368) の小袋2つ、1 g アジ化ナトリウム (Sigma Ultra; S8032) および40 g ウシ血清アルブミン (BSA; カタログ番号A3059) を溶解することによって、Mabブロッキング緩衝液を調製した。すべての緩衝液を、必要になるまで4 で保管した。

【0075】

1リットルのMilliQ水中に、72.9 g Trizma (登録商標) プリセット結晶 (pH 7.7; カタログ番号T8068)、9 g 塩化ナトリウム (Sigma Ultra; カタログ番号S7653); 1 g アジ化ナトリウム (Sigma Ultra; S8032) および5 mL Tween 20 (カタログ番号P7949) を溶解することによって、DELFLIA (登録商標) 洗浄濃縮物を調製した。この溶液を室温で保管した。脱イオン水中で、濃縮物を25倍に希釈することによって、洗浄溶液を調製した。

【0076】

DELFLIA (登録商標) 増進溶液 (カタログ番号1244-105) および標識試薬 (カタログ番号1244-302) を、PerkinElmer UK Ltd, Chalfont Road, Seer Green, Beaconsfield, Buckinghamshire HP9 2FX, UKから得た。

【0077】

DELFLIA (登録商標) 装置

DELFLIA (登録商標) を実行するには、PerkinElmerから得られうる以下の装置が必要である: (i) プリンターおよびコンピュータを加えた時間分解蛍光光度計、例えばVictor II (カタログ番号1420-012または1420-016); (ii) 自動化洗浄装置、例えばPlatewash (カタログ番号1296-026/R); (iii) 自動化振盪装置、例えばPlateshake (カタログ番号1296-003/R); および(iv) 増進溶液のための場合による分配装置 (Plate Dispense; カタログ番号1296-041/R)。

【0078】

NUNC Maxisorp (登録商標) マイクロタイタープレート (カタログ番号DIS-971-070U) およびプレート封印装置 (カタログ番号DIS-984-505J) を、Fisher Scientific UK Ltd., Bishop Meadow Road, Loughborough, Leicestershire LE11 5RG, UKから得た。

【0079】

組織調製装置

Fast Prep (登録商標) 組織破壊装置、スクロース緩衝液およびさらなるポリプロピレンビーズを含有する粉碎試験管を、Bio-Rad Laboratories Ltd., Bio-Rad House, Maylands Avenue, Hemel Hempstead, Hertfordshire HP2 7TD, UK から得た。0.2 mm セラミックビーズを含有する衝撃抵抗性 2 mL スクリューキャップ 粉碎試験管 (QBI O gene Lysing Matrix D; カタログ番号 MBR-247-110Y)、2 mL Safe-Lock (登録商標) エッペンドルフ試験管 (カタログ番号 TUL-150-290U) および試料 24 個分のローターを備えた He 10
raeus Biofuge (登録商標) Pico 微量遠心分離装置 (カタログ番号 CFH-230-010H) を Fisher Scientific UK Ltd から得た。

【0080】

あるいは、界面活性剤を含むおよび含まない GdHCl 中でホモジネートを調製するため、ETDS VII I (The Design Village, Lowlands Estate, Braye Road, Vale, Guernsey GY3 5XH, Channel Islands) を用いた。

【0081】

イムノアッセイ標準

組換えヒツジ ARR および VRQ PrP を、TSE Resource Centre, Institute for Animal Health, Compton, Newbury, Berkshire RG20 7NN, UK から得た。ウシおよびネズミ PrP を、Biogenesis, Technology Road, Poole, Dorset BH17 7DA, UK から得た。20 µg/mL の濃度のストック溶液を、8 M GdHCl 中で調製し、そして 4 で保管した。アッセイ直前に、0.4 M GdHCl を含有するアッセイ緩衝液中でストック溶液を希釈して、6 つ 20
の作業標準、すなわち、0、0.32、1.6、8、40 および 200 ng/mL の組換えヒツジ PrP を得た。

【0082】

抗体の検出

残基 51 ~ 98 に渡る PrP^C の全 8 ペプチド反復領域を認識する精製 BSA 不含 Ma b SAF32 (Monnet, Marthiens ら 2003) を、IDS Ltd, Boldon Business Park, Boldon, Tyne & Wear NE35 9PD, UK から得た。先に記載される方法 (Barnard および Sy 30
2003) にしたがって、ユーロビウムで抗体を標識した。

【0083】

方法

Ma b YWH1 の産生

ウシ PrP 由来のアミノ酸配列に基づいて、一連のキメラペプチドを合成した。これらの 1 つは、成熟タンパク質のごく N 末端 (アミノ酸 25 ~ 36) を、1 つの 8 ペプチド反 40
復 (アミノ酸 62 ~ 69) と一緒に含んだ。ウシ PrP の N 末端配列を図 1 に例示する。キメラペプチド免疫原の構造を図 2 に示す。先に記載される方法 (Price, Cut hbertson ら 1990) にしたがって、BALB/c マウスにおいて、ハイブリドーマを調製した。

【0084】

ファージディスプレイ技術を用いた YWH2 および YWH3 抗体の産生

自社所有 (proprietary) HuCAL (登録商標) ファージディスプレイ技術を用いて、YWH2 および YWH3 を同定した。簡潔には、384 ウェル・マイクロプ 50
レート中に固定した後、HuCAL (登録商標) ライブラリーに対して、ヒト N 末端キメ

ラペプチド抗原（図3）をスクリーニングした。HuCAL（登録商標）ライブラリーにおいて、ヒト抗体レパートリーの構造的多様性は、7つの重鎖および7つの軽鎖可変領域遺伝子によって示され、マスターライブラリーにおいて、49のフレームワークを生じさせる。次いで、非常に変化する遺伝子カセットをこれらのフレームワーク上に重ね合わせて、全ヒト抗体レパートリーを模倣する。Fab形式で、100億を超える機能的ヒト抗体特異性があらかじめ組み立てられ、そしてファージライブラリー中で利用可能である。

【0085】

自社所有技術（Cys DisplayTM）は、高親和性結合剤の簡単な溶出を提供し、そして堅固な384ウェルELISAにおいて、候補をスクリーニングした。2つの陽性クローン（YWH2およびYWH3）を細菌中で発現させ、そしてアフィニティー精製した。基本的な抗体形式は、一価Fab断片であるが、YWH2およびYWH3の場合、これらは、C末端Mycタグ（EQKLISEEDL）を持つ二価ミニ抗体に変換された。

10

【0086】

YWHコーティングプレートの調製

PBSコーティング緩衝液中、精製YWH抗体（1、2および3型）を希釈して、5 μg/mLの濃度にした。12チャンネルのデジタルピペットを用いて、200 μLのコーティング溶液（ウェルあたり1 μg IgG）を、NUNC MaxiSorp（登録商標）マイクロタイタープレートの各ウェルに添加した。プレートを封印して、そして4で一晩保管した。続いて、プレートを洗浄溶液で1回洗浄し、そして吸収紙上で、軽く叩いて乾燥させた。200 μLのブロッキング緩衝液を各ウェルに添加し、プレートを再封印して、そして使用するまで4で保管した。

20

【0087】

ホモジナイズおよび組織の抽出

およそ300 mgの脳またはリンパ組織を注意深く切り出し、重量測定し、そしてスクロース緩衝液、0.2 mmセラミックビーズおよび1つのより大きいポリプロピレンビーズを含有するBio-Rad粉砕試験管に移した。さらに、およそ250 mgの脳またはリンパ組織を注意深く切り出し、重量測定し、そして0.2 mmセラミックビーズおよび1つのより大きいポリプロピレンビーズを含有するQBIgene粉砕試験管（すなわち緩衝液を含まない）に移した。続いて、800 μLの8 M GdHClをQBIgene粉砕試験管に添加した。すべての粉砕試験管に栓をして、氷上で冷却し、FastPrep（登録商標）組織破壊装置に移し、そして製造者の使用説明書にしたがって、最大速度で45秒間、2回プロセッシングした。

30

【0088】

50 μLのスクロース・ホモジネートを、2 mLエッペンドルフSafe-Lock（登録商標）試験管内に注意深くピペッティングし、そして50 μLの8 M GdHClを添加した。試験管に栓をし、そしてボルテックスした。続いて、900 μLのアッセイ緩衝液を添加し、試験管に栓をし、ボルテックスし、そして次いで、13,000 rpmで5分間、微量遠心分離装置中で回転させた。

【0089】

あるいは、組織を切り出し、正確に重量測定し、そしてETDS VIIIホモジナイザー試験管に移した。等体積の8 M GdHCl（界面活性剤を含むまたは含まない）を添加した。試験管を集め、そしてETDS VIIIホモジナイザーを用いて、組織を20秒間（脳）または40秒間（リンパ組織）ホモジナイズした。続いて、アッセイ緩衝液を（使い捨てデバイスの中央試験管を通じて）添加することによって、ホモジネートを希釈した。ETDS VIIIホモジナイザーを用いて、希釈したホモジネートをさらに10秒間混合し、そしてさらなる処理なしに用いた。

40

【0090】

イムノアッセイ

YWHコーティングしたマイクロタイタープレートを、洗浄溶液で2回洗浄し、そして

50

吸収紙上で、軽く叩いて乾燥させた。200 μ L の各標準または試料を、コーティングしたプレートの適切なウェルに2つ組で添加した。プレートを封印し、そして振盪装置上で、18 で2時間インキュベーションした。続いて、プレートを洗浄溶液で3回洗浄し、吸収紙上で軽く叩いて乾燥させ、そして200 μ L のユーロピウム標識抗PrP検出抗体（典型的にはSAF32；アッセイ緩衝液中、1：2000 v/vで希釈）を各ウェルに添加した。振盪装置上で、プレートを18 でさらに60分間インキュベーションした。次いで、プレートを6回洗浄し、軽く叩いて乾燥させ、180°回転させ、そしてさらに6回、再洗浄した。再び、プレートを吸収紙上で軽く叩いて乾燥させた。

【0091】

200 μ L の増進溶液を添加し、プレートを18 で5分間振盪させ、そして時間分解蛍光光度計で蛍光を測定した。自社所有PerkinElmerデータ換算パッケージMulticalc（登録商標）を用いて、PrP濃度を決定した。

【0092】

結果

YWH1、YWH2およびYWH3の校正曲線

3つのYWH抗体に対する組換えヒツジおよびヒトPrPの校正曲線を図4（線形Y軸）および図5（対数Y軸）に示す。Multicalc（登録商標）によって計算した際の、PrPの最少検出可能濃度は、典型的には20 pg/mL未満であった（ウェルあたり4 pg PrPと同等）。図4は、3つの抗体がわずかに異なる特異性を有することを示す。YWH1は、ヒツジおよびウシにより特異的であるが、ヒトPrPとは限定された交差反応性しか持たない。一方、YWH2は、ヒツジおよびヒトPrPを等しく認識する。YWH3は、ヒトとわずかにより高い交差反応性を有するが、組換えタンパク質を用いると高いバックグラウンドを与えるという事実によって、いくぶん難がある。

【0093】

YWH1、YWH2およびYWH3の交差反応

一連の重複ペプチドを調製して、抗体のYWHシリーズのエピトープをマッピングした。競合的遮断アッセイを確立するため、これらのペプチド各々を、2 ng/mL組換えヒツジPrPを含有するアッセイ緩衝液中で希釈して、ある範囲のペプチド濃度（すなわち、0、100、1000および10,000 ng/mL）を得た。200 μ L の各希釈を、コーティングしたプレートの適切なウェルに2つ組で添加した。プレートを振盪装置上で、18 で2時間インキュベーションした。続いて、プレートを洗浄溶液で3回洗浄し、吸収紙上で軽く叩いて乾燥させ、そして200 μ L のユーロピウム標識抗PrP検出抗体（典型的にはSAF32；アッセイ緩衝液中、1：1000 v/vで希釈）を各ウェルに添加した。振盪装置上で、プレートを18 でさらに60分間インキュベーションした。次いで、プレートを6回洗浄し、軽く叩いて乾燥させ、180°回転させ、そしてさらに6回、再洗浄した。再び、プレートを吸収紙上で軽く叩いて乾燥させた。200 μ L の増進溶液を添加し、プレートを18 で5分間振盪させ、そして時間分解蛍光光度計で蛍光を測定した。結果を図6に示す。

【0094】

これらの結果は、YWH1がN末端ペプチドのC末端のエピトープ（すなわちPGGGWNT）を判別することを示す。特に、強い相互作用には三重グリシンモチーフが必要であり、そしてこれは、この試薬がヒツジ/ウシ特異的であり、そしてN末端に二重グリシンモチーフしか持たないヒトPrPには、いくぶん限定された交差反応を持つことを説明する。YWH2のエピトープは、ごくN末端の塩基性領域中にある（すなわちKKRPKPG）。このエピトープが種間で保存されているため、これは、この試薬が、ヒツジならびにヒトPrPを認識する理由を説明する。YWH3との交差反応は、より複雑であり、そしてこれは、この試薬を用いて得られる高いバックグラウンドを説明する。

【0095】

組織学的に確認されたBSE陽性および陰性ウシ脳組織における、疾患関連PrPの測定

M a b Y W H 1 を用いて、尾側から門まで採取した 4 0 0 のウシ脳組織試料 (2 0 0 の組織学的に確認された陽性および 2 0 0 の組織学的に確認された陰性) において、疾患関連 P r P の濃度を決定した、そして表 1 に結果を示す。これらの結果は、Y W H 1 が、B S E 陽性および陰性の間を明らかに区別可能であることを示す ($p < 0.001$)。しかし、陽性試料においては、広い標準偏差があり、そしてこれは、これらの組織において、P r P^d のレベルが異なることを反映する。

【 0 0 9 6 】

スクロースまたは G d H C l 中のホモジナイズ後、スクレーピー陽性および陰性組織における、Y W H シリーズの抗体を用いた、疾患関連 P r P の測定

Y W H 1、Y W H 2 および Y W H 3 を用いて、スクロースまたは G d H C l いずれかににおけるホモジナイズ後、ヒツジ組織試料中の疾患関連 P r P の濃度を決定した。図 7 に示す結果は、Y W H 3 が、組織由来 P r P を認識する際に、比較的劣っていることを示す。これは、非特異的結合の問題のためでありうる。一方、Y W H 1 および Y W H 2 は、スクロース緩衝液または 8 M G d H C l のいずれかでのホモジナイズ後、スクレーピー陽性動物から採取した組織を明らかに同定可能である。したがって、続く実験すべてにおいて、Y W H 1 および Y W H 2 のみを用いた。

【 0 0 9 7 】

組織学的に確認されたスクレーピー陽性および陰性ヒツジ口蓋扁桃における、疾患関連 P r P の測定

Y W H 1 および Y W H 2 を用いて、ヒツジ口蓋扁桃組織の試料において、疾患関連 P r P の濃度を決定した、そして結果を図 8 に示す。門脳組織に対して、V L A によってスクレーピー診断を組織学的に確認する前に、これらのアッセイを盲検で行った。リンパ組織アッセイは、1 0 0 % の一致で、スクレーピー陽性を検出可能であった。

【 0 0 9 8 】

組織学的に確認されたスクレーピー陽性および陰性ヒツジ脳組織における、疾患関連 P r P の測定

同様に、Y W H 1 および Y W H 2 を用いて、吻側から門まで採取したヒツジ脳組織の同等の試料において、疾患関連 P r P の濃度を測定した、そして結果を図 9 に示す。

【 0 0 9 9 】

正常および v C J D ヒト組織における、疾患関連 P r P の測定

v C J D、特発性 C J D、正常脳および正常扁桃腺組織から調製した 2 つ組ホモジネート試料において、Y W H 1 および Y W H 2 を用いて、疾患関連 P r P の濃度を決定した。結果を図 1 0 に示す。本発明者らは、v C J D 扁桃腺組織を試験することが不可能であったが、P r P^d が扁桃腺基質中で検出可能であることを立証するため、3 つのヒト扁桃腺ホモジネートを v C J D 脳ホモジネートでスパイク処理して、1 0 0 %、3 7 . 5 %、1 2 . 5 %、2 . 8 %、1 . 4 %、0 . 0 7 % および 0 % の v C J D 脳組織を含有する混合物を産生した。Y W H 2 を用いて疾患関連 P r P の濃度を決定し、そして結果を図 1 1 に示す。

【 0 1 0 0 】

界面活性剤の存在下および非存在下の、G d H C l による正常およびスクレーピー陽性ヒツジ脳組織における、疾患関連 P r P の測定

多様な量の界面活性剤 (T w e e n 2 0 または T r i t o n X - 1 0 0) を含有する G d H C l 中で調製したホモジネート (2 つの陰性) の 2 つ組試料において、Y W H 1 および Y W H 2 で、疾患関連 P r P の濃度を決定した。結果を図 1 2 に示す。結果は、界面活性剤の存在が、P r P^c および P r P^d 抽出両方の有効性を増加させうることを示す。

【 0 1 0 1 】

代替抗体を用いた、G d H C l による正常およびスクレーピー陽性ヒツジ脳組織における、疾患関連 P r P の測定

8 M G d H C l または 5 % T r i t o n X - 1 0 0 を含有する 8 M G d H C l

10

20

30

40

50

中で調製したホモジネートの2つ組試料(5つの陰性および1つの陽性)を用いて、(i) YWH1、YWH2およびSAF32；(ii) 11G5(エピトープ特異性115~130)、8B4(エピトープ特異性35~45)、4H2(エピトープ特異性145~155)；(iii) R-Biopharm Rhone Ltd., Scotland Science Park, Kelvin Campus, Glasgow G20 OSPから得たP4(エピトープ特異性89~105)；および(iv) TSE Resource Centre, Institute for Animal Health, Compton, Berkshire, UKから得たFH11(エピトープ特異性63~95)を含むMabの別の組み合わせで、疾患関連PrPの濃度を決定した。結果を図13A(界面活性剤なし)および図13B(界面活性剤あり)に示す。結果は、非YWH抗体(N末端およびC末端)で、使用可能な特異性を達成可能であるが、正常および疾患を区別する能力は有意に減少することを示す。

10

【0102】

側方流動デバイスに対するホモジネートの効果

記載するように、8M GdHCl中で陰性ヒツジ脳ホモジネートを調製し、そして希釈した。ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)を、この希釈したホモジネートのアリコット中にスパイク処理して、100mIU/mLの濃度にした。スパイクしたホモジネートおよびスパイクしないホモジネートを2つの異なる種類の妊娠試験(Abbott LaboratoriesおよびBoots自社ブランド)に適用した。結果を図14に示す。結果は、希釈したホモジネートがディップスティックの流動を損なわないことを示す。

20

【0103】

側方流動検出を用いた組換えPrPの測定

PrP特異的ディップスティック・デバイスを産生した。2つの配置を発展させた。第一の配置において、先に記載されるように(Martin JMら J Immunology 1990 11: 31-47)、YWH1を金ゾル粒子にコンジュゲート化し、そしてSAF Mabを、既知の方法(例えば米国特許5712172)に記載されるように、ニトロセルロース・ストリップ上に固定した。第二の配置において、金ゾル粒子にSAF Mabをコンジュゲート化し(上述のとおり)、そしてYWH1をニトロセルロース・ストリップ上に固定した(上述のとおり)。適切なブランクと合わせた、3つの希釈(200ng/mL、40ng/mLおよび8ng/mL)の組換えPrPでの2つの配置の結果を図15に示す。配置1がより高感度であることが示され、そしてこの形式を用いた完全校正曲線を図16に示す。

30

【0104】

側方流動検出を用いたGdHClによる、正常およびスクレーピー陽性ヒツジ脳組織における、疾患関連PrPの測定

ディップスティック検出デバイスを用いて、希釈したホモジネート中の疾患関連PrPの存在をYWH1で検出した(配置1)。2つの陽性と確認されたスクレーピーおよび陰性と確認されたスクレーピーの結果を図17に示す。

【0105】

ユニークな抗PrP^d抗体の産生および使用を本明細書に記載する。これらの抗体には、慣用的なMab産生技術によって産生された試薬(YWH1)およびファージディスプレイ技術を用いて同定された2つの試薬(YWH2およびYWH3)が含まれる。3つの抗体はすべて、PrPのごくN末端のエピトープを認識する。抗体の重要な特性の1つは、線形エピトープに対して比較的高い親和性を持つことである。このエピトープは、組換えPrPに存在し、そして特異性および感度は、図4(線形Y軸)および図5(対数Y軸)に示す、ヒツジおよびヒトPrPに関する校正曲線によって例示される。

40

【0106】

3つの抗体は、わずかに異なる特異性を有する。YWH1は、ヒツジおよびウシにより特異的であるが、ヒトPrPとは限定された交差反応性しか持たない。一方、YWH2は、ヒツジおよびヒトPrPを等しく認識する。YWH3は、ヒトとわずかにより高い交差

50

反応性を有するが、組換えタンパク質を用いると高いバックグラウンドを与えるという事実によって、いくぶん難がある。これらの知見はすべて、図 6 に示す交差反応性データによって支持される。これらの研究から、YWH 1 が N 末端ペプチドの C 末端のエピトープ（すなわち P G G G W N T）を判別することが証明可能であった。一方、YWH 2 のエピトープは、ごく N 末端の塩基性領域中にある（すなわち K K R P K P G）。このエピトープが種間で保存されているため、これは、この試薬が、ヒツジならびにヒト P r P を認識する理由を説明する。

【 0 1 0 7 】

本明細書に記載する堅固な検出法は、きわめて高感度であり、そして検出限界は、ルーチンに、ウェルあたり 5 p g P r P 未満である。これは、扁桃腺および他のリンパ組織において、凝集 P r P を検出するのに十分に高感度である（図 8、10 および 11 を参照されたい）。したがって、方法は、血液または一次リンパ組織における初期段階から、凝集タンパク質が比較的高レベルで C N S に存在する疾患の末期段階まで、疾患の発展を追跡するのに有用でありうる（図 9 および表 1 を参照されたい）。

【 0 1 0 8 】

さらに、M a b の特異性は、P r P^c および P r P^d を区別する示差タンパク質分解に関する必要性を取り除く。したがって、単純な該一工程抽出法は完全自動化に適しており、これは大規模試験が必要な場合に重要である。特に、本発明者らは、このアプローチが特異的でそして迅速な側方流動検出の発展に適していることを立証した。

参考文献

【 0 1 0 9 】

10

20

【化 1 - 1】

- Atarashi, R. et al. (2003). J Biol Chem 278(31): 28944-9.
- Barnard, G. et al. (2000). Luminescence 15(6): 357-62.
- Barnard, G. and M-S. Sy (2003). Prions and Mad Cow Disease. I. Krull. New York, Marcel Dekker: 277-315.
- Biffiger, K. (2002) J Virol Methods 101(1-2): 79-84.
- Buschmann A. et al. (2004) J Virol Methods 117(1): 27-36.
- Caughey, B. et al. (1999) Methods Enzymol 309: 122-33. 10
- Ciechanover, A. and P. Brundin (2003) Neuron 40(2): 427-46.
- Cooley, W. A. et al. (2001). J Comp Pathol 125(1): 64-70.
- Cicortas Gunnarsson L. et al. (2004) Protein Eng Des Sel 17:213-21
- Curin Serbec, V. et al. (2003) J Biol Chem.
- Eaglestone S. et al (2000) Proc Nat Acad Sci USA 97(1): 240-4.
- Epple, G. et al. (2004) Thromb Haemost 91(3): 465-72.
- Gorochoy, G. and J. P. Deslys (2004) Nat Med 10(1): 11; author reply 11-2. 20
- Grassi, J. et al. (2001). Vet Rec 149(19): 577-82.
- Hamir, A. N. et al. (2001). J Vet Diagn Invest 13(2): 152-4.
- Heggebo, R. et al. (2003). J Comp Pathol 128(2-3): 172-81.
- Hooper, N. M. (2003) Trends Biotechnol 21(4): 144-5.
- Kang, S. C. et al. (2004) J Pathol 203(1): 603-8.
- Kang, S. C. et al. (2003) J Pathol 199(4): 534-41. 30
- Kascsak, R. et al. (1997) Immunol Invest 26(1-2): 259-68.
- Kocisko, D. A. et al. (1996) Biochemistry 35(41): 13434-42.
- Koide A, Bailey CW, Huang X, Koide S. (1998) J Mol Biol 11:1141-51.
- Korth, C. et al. (1997) Nature 390(6655): 74-7.
- Kubler, E. et al. (2003). Br Med Bull 66: 267-79.
- Lawson, V. A. et al. (2004) J Biol Chem 279(14): 13689-95.
- Lee, K. S. et al. (2001) J Neurochem 79(1): 79-87. 40
- Lucero, H. A. and P. W. Robbins (2004) Arch Biochem Biophys 426(2): 208-24.
- Lundberg, P. et al.(2002) Bioch Biophys Res Comm 299(1):85-90.
- Ma, J. and S. Lindquist (2002) Science 298(5599): 1785-8.
- Ma, J., R. Wollmann, et al. (2002). Science 298(5599): 1781-5.

【 0 1 1 0 】

【化 1 - 2】

- Madec, J. Y. et al. (2000) Vet Rec 146(3): 74-6.
- Madec, J. Y. et al. (1998) J Virol Methods 75(2): 169-77.
- Martin J.M. et al. (1990) J Immunoassay 11: 31-47
- Minor, P. et al. (2004) J Gen Virol 85(Pt 6): 1777-84.
- Mishra, R. S. et al. (2003). J Alzheimers Dis 5(1): 15-23.
- Moffett, S. et al. (2000) J Biol Chem 275(3): 2191-8.
- Monnet, C. et al. (2003) European J Neuroscience 18(3): 542-9. 10
- Moynagh, J. and H. Schimmel (1999) Nature 400(6740): 105.
- Oesch, B. et al. (2000) Arch Virol Suppl(16): 189-95.
- Paramithiotis, E. et al. (2003) Nat Med 9(7): 893-9.
- Price, K. M. et al. (1990) Dev Biol Stand 71: 23-31.
- Prusiner, S. B. (1998). Brain Pathol 8(3): 499-513.
- Rothe, A. et al. (2006) FASEB J 20:1599-610.
- Safar, J. et al. (1993). J Biol Chem 268(27): 20276-84.
- Safar, J. et al. (1998). Nat Med 4(10): 1157-65. 20
- Safar, J. G. et al. (2002) Nat Biotechnol 20(11): 1147-50.
- Sakudo, A. et al. (2005) Bioch Biophys Res Comm 326(3):600-606.
- Sarnataro, D. et al. (2004) Mol Biol Cell 15(9): 4031-42.
- Schaller, O. et al. (1999). Acta Neuropathol(Berl)98(5):437-43.
- Stack, M. J. et al. (2002 Acta Neuropathol(Berl)104(3):279-86.
- Tenzer, S. et al. (2004). J Immunol 172(2): 1083-91.
- van Keulen, L. J. et al. (2002 Apmis 110(1): 23-32. 30
- van't Hof, W. and M. D. Resh (2000) Meth Enzymol 327: 317-30.
- Walmsley, A. R. et al. (2003) J Biol Chem 278(39): 37241-8.
- Wang, X., F. Wang, et al. (2005). J Biol Chem 280(1): 317-25.
- Wong, E. et al. (2004) Biochem J 380(Pt 1): 273-82.
- Yedidia, Y. et al. (2001) Embo J 20(19): 5383-91.
- Zahn, R. (2003) J Mol Biol 334(3): 477-88.
- Zanusso, G. et al. (1999) J Biol Chem 274(33): 23396-404.
- Zeng, F. et al. (2003) J Neurochem 84(3): 480-90. 40

【 0 1 1 1】

【表 1】

陰性		陽性	
平均	0.046 ng/mL	平均	14.22 ng/mL
標準偏差	0.075 ng/mL	標準偏差	18.07 ng/mL
範囲	0.01~0.253 ng/mL	範囲	0.928~80.25 ng/mL
N	200	N	200

表 1

10

【 0 1 1 2 】

配列

【 0 1 1 3 】

【 化 2 】

配列番号 1 MANLGCWMLVLFVATWSDLGLC-KKRPKPGGWNTGGSR配列番号 2 MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLC-KKRPKPGGGWNTGGSR配列番号 3 MANLGYWLLALFVTMTDVGLC-KKRPKPGGWNTGGSR

20

シグナルペプチドを下線で示す

【図面の簡単な説明】

【 0 1 1 4 】

【図 1】図 1 は、免疫原の構築用に選択したウシ P r P 同定ペプチドの N 末端配列を示す。

【図 2】図 2 は、Y W H 1 の産生のための免疫原として用いた、N 末端ウシ・キメラペプチドを示す。

【図 3】図 3 は、Y W H 2 および Y W H 3 のパニングにおける抗原として用いた、N 末端ヒト・キメラペプチドを示す。

【図 4】図 4 は、Y W H 1、Y W H 2 および Y W H 3 に対する、ヒツジおよびヒト組換え P r P の校正曲線を示す（線形 Y 軸）。

【図 5】図 5 は、Y W H 1、Y W H 2 および Y W H 3 に対する、ヒツジおよびヒト組換え P r P の校正曲線を示す（対数 Y 軸）。

【図 6】図 6 は、Y W H 1、Y W H 2 および Y W H 3 の交差反応を示す。

【図 7】図 7 は、スクロースまたは G d H C l 中のホモジナイズ後、スクレーピー陽性および陰性組織における、Y W H シリーズの抗体を用いた疾患関連 P r P の測定を示す。

【図 8】図 8 は、組織学的に確認されたスクレーピー陽性および陰性ヒツジ口蓋扁桃における疾患関連 P r P の測定を示す。P G 1 2 0 1 / 0 4、P G 1 2 0 2 / 0 4 および P G 1 2 0 3 / 0 4 は、組織学的に確認されたスクレーピー陰性組織である。

【図 9】図 9 は、組織学的に確認されたスクレーピー陽性および陰性吻側髄質における疾患関連 P r P の測定を示す。

【図 10】図 10 は、ヒト脳および扁桃腺ホモジネートにおける疾患関連 P r P の測定を示す。

【図 11】図 11 は、v C J D でスパイク処理したヒト扁桃腺ホモジネートにおける疾患関連 P r P の測定を示す。

【図 12】図 12 は、8 M G d H C l を用いた陰性脳組織のホモジナイズにおいて、界

30

40

50

面活性剤を含む影響を示す。

【図 1 3】図 1 3 は、界面活性剤を含む（図 1 3 B）および含まない（図 1 3 A）、脳組織ホモジネート中の疾患関連 P r P の決定における、別の抗体の組み合わせを含む影響を示す。

【図 1 4】図 1 4 は、記載するように調製し、そしてヒト絨毛性ゴナドトロピンでスパイク処理したホモジネートが、ディップスティック妊娠試験の側方流動には干渉しないことを立証する。

【図 1 5】図 1 5 は、2 つの異なる配置の P r P 特異的ディップスティックの有用性を立証する。

【図 1 6】図 1 6 は、P r P 特異的ディップスティック検出を用いた組換え体 P r P の校正曲線を示す。

【図 1 7】図 1 7 は、P r P 特異的ディップスティック検出を用いた、2 つのスクレーパー陽性およびスクレーパー陰性ホモジネートにおける、P r P の測定を示す。

10

【図 1】

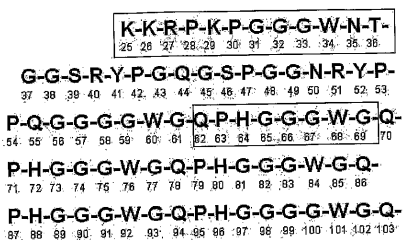
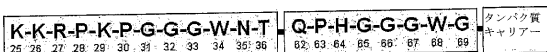
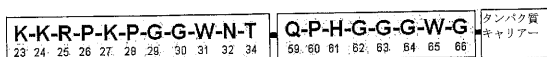


Figure 1

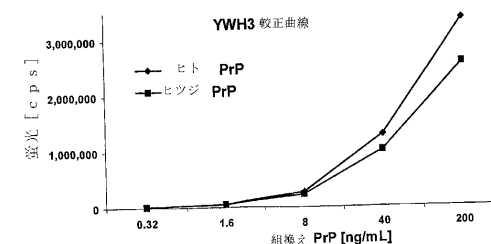
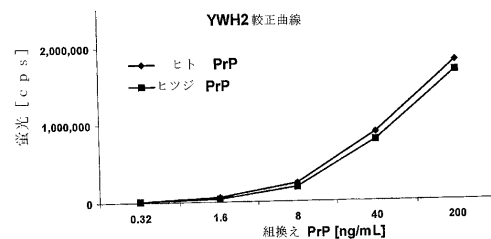
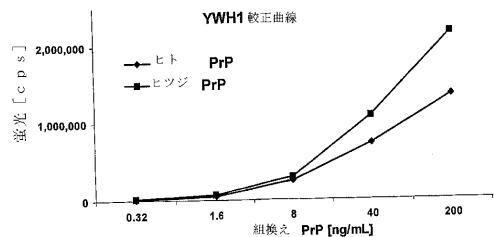
【図 2】



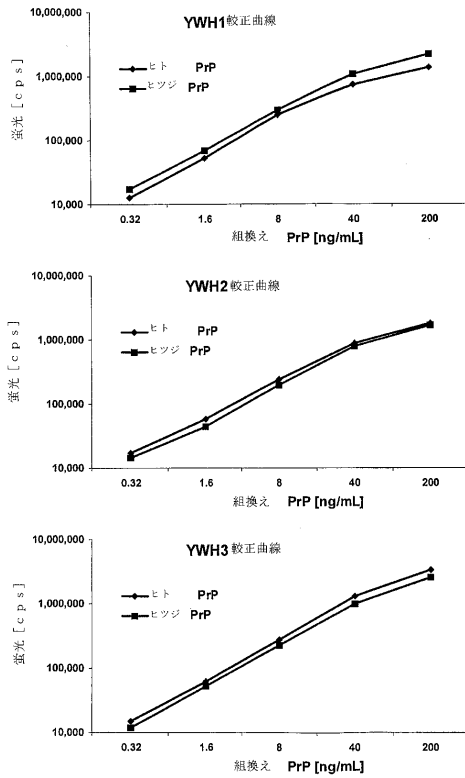
【図 3】



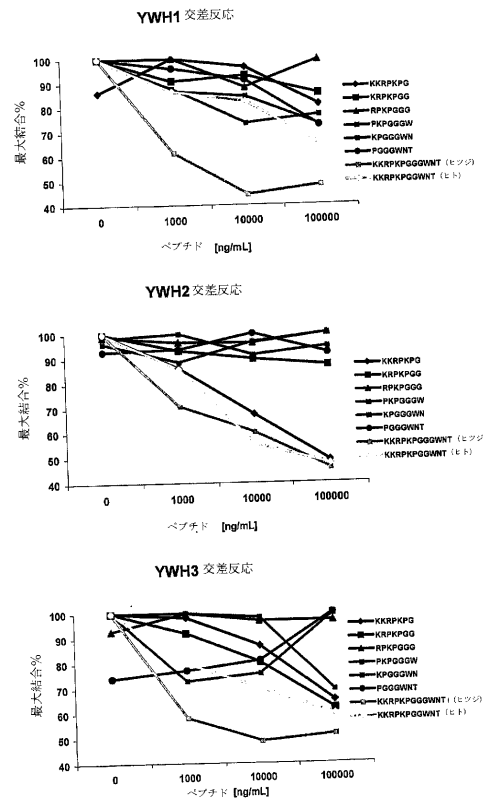
【図 4】



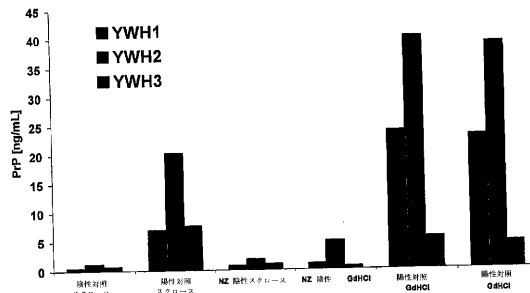
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【図 9】

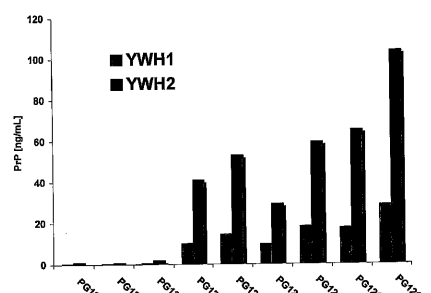


Figure 9

【図 8】

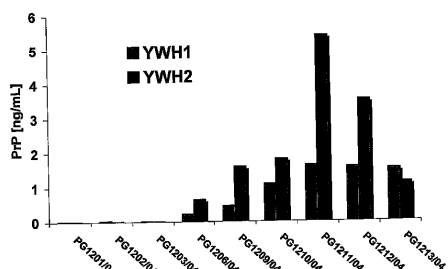
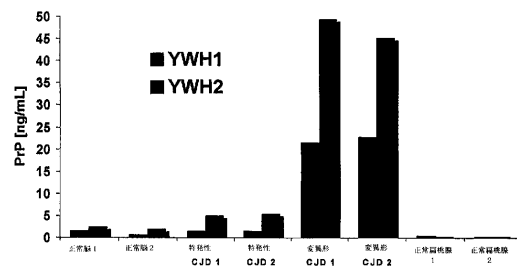
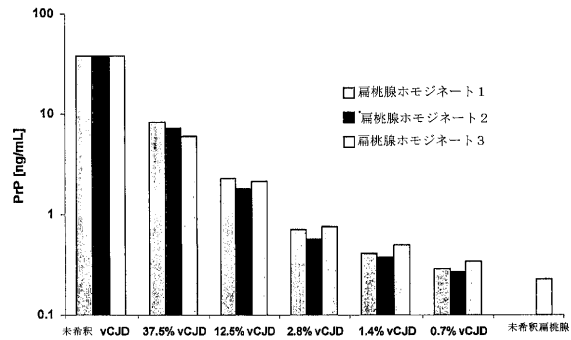


Figure 8

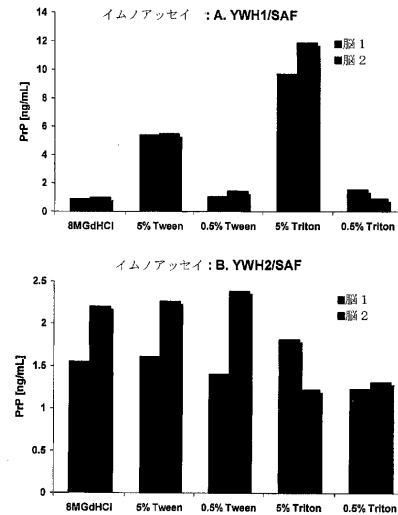
【図 10】



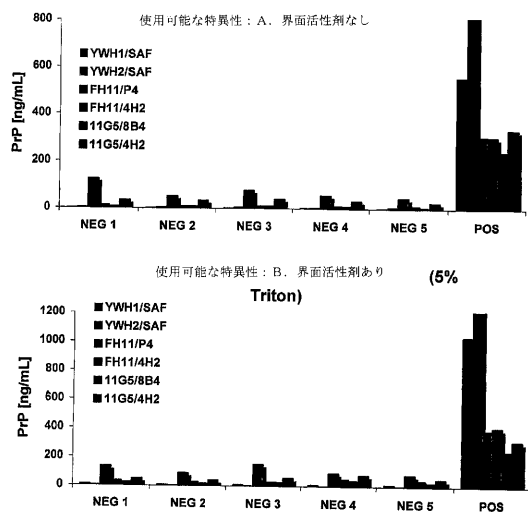
【図 1 1】



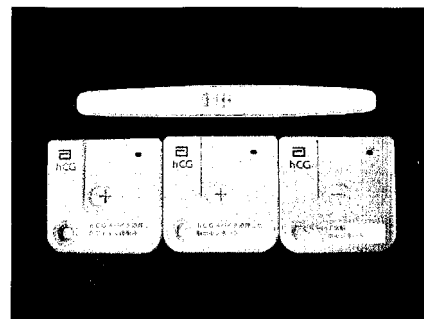
【図 1 2】



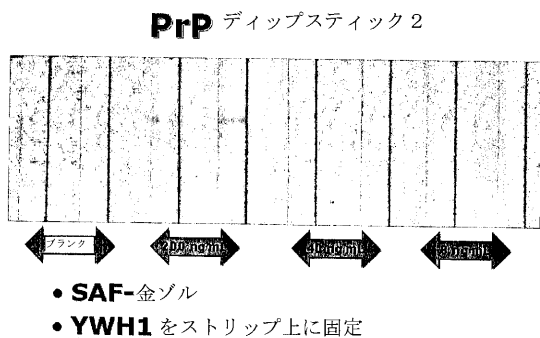
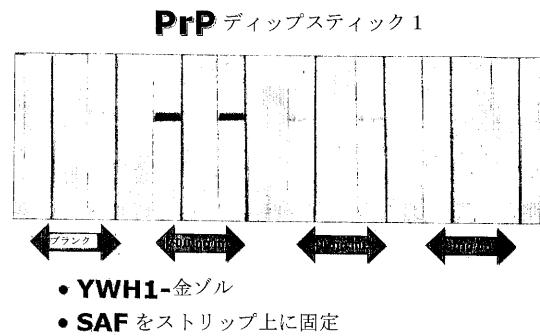
【図 1 3】



【図 1 4】

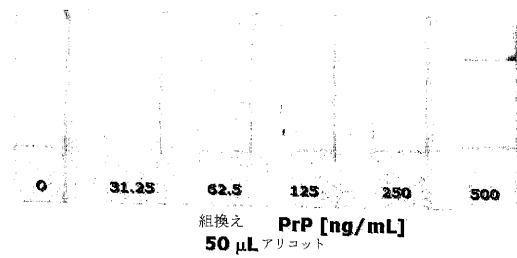


【図 15】



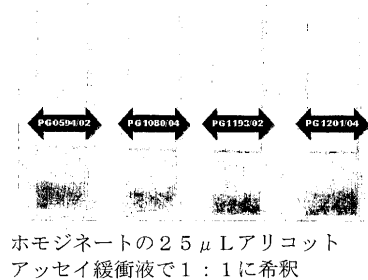
【図 16】

ディップスティック校正



【図 17】

2つの陽性および2つの陰性



【配列表】

2010504502000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成20年5月20日(2008.5.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の疾患型プリオンタンパク質 (PrP^d) の存在を検出する方法であって
 MANLG CWMLVLFVATWSDLG LCKKRPKPGGWNTGGSR (配
 列番号1)、
 MVKSHIGSWILVLFVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSR
 (配列番号2) および
 MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKPGGWNTGGSR (配
 列番号3)

からなる群より選択されるアミノ酸配列に特異的に結合する、第一の特異的結合メンバー
 と試料を接触させ;そして

前記試料に対する前記の第一の特異的結合メンバーの結合を決定する、

ここで、前記試料に対する前記の第一の特異的結合メンバーの結合が、試料が疾患型プ
 リオンタンパク質を含有することの指標となる

ことを含む、前記方法。

【請求項2】

第一の特異的結合メンバーが、以下：K K R P K P G G W N TおよびK K R P K P G G W N T、からなる群より選択されるアミノ酸配列に特異的に結合する、請求項1記載の方法。

【請求項3】

第一の特異的結合メンバーが、アミノ酸配列K K R P K P Gに特異的に結合する、請求項2記載の方法。

【請求項4】

第一の特異的結合メンバーが、アミノ酸配列P G G G W N Tに特異的に結合する、請求項2記載の方法。

【請求項5】

第一の特異的結合メンバーが、細胞性プリオンタンパク質(P r P^c)に比較して、疾患型プリオンタンパク質(P r P^d)に優先的に結合する、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

【請求項6】

第一の特異的結合メンバーが、P r P^dに結合し、そしてP r P^cに対して実質的に結合を示さない、請求項5記載の方法。

【請求項7】

第一の特異的結合メンバーが抗体分子である、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

【請求項8】

第一の特異的結合メンバーが、E C C A C 寄託番号05091301を持つハイブリドーマによって産生される、請求項7記載の方法。

【請求項9】

第一の特異的結合メンバーが、E C C A C 寄託番号05091301を持つハイブリドーマによって産生される抗体と、P r P^dに対する結合に関して競合する、請求項7記載の方法。

【請求項10】

第一の特異的結合メンバーが、E C C A C 寄託番号05091301を持つハイブリドーマによって産生される抗体のV_H C D R 1、V_H C D R 2およびV_H C D R 3配列、ならびにV_L C D R 1、V_L C D R 2およびV_L C D R 3配列を含む、請求項7記載の方法。

【請求項11】

第一の特異的結合メンバーが検出可能標識を含む、請求項1～10のいずれか1項記載の方法。

【請求項12】

第一の特異的結合メンバーの結合が、第二の特異的結合メンバーを用いて決定される、請求項1～11のいずれか1項記載の方法。

【請求項13】

前記の第二の特異的結合メンバーが、前記の第一の特異的結合メンバーに結合する、請求項12記載の方法。

【請求項14】

前記の第二の特異的結合メンバーが検出可能標識を含む、請求項12または請求項13記載の方法。

【請求項15】

試料中の疾患型プリオンタンパク質を検出する方法であって；
第一の特異的結合メンバーと試料を接触させ；そして
第二の特異的結合メンバーを用いて、前記試料中の分子に対する前記の第一の特異的結合メンバーの結合を決定する、
前記結合の存在は、疾患型プリオンタンパク質の存在の指標となる、
ここで、前記の第一または第二の特異的結合メンバーの一方は、以下：

MANLG CWMLVL FVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSR (配列番号 1)、

MVKSHIGSWILVL FVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSR (配列番号 2) および

MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKPGGWNTGGSR (配列番号 3)

からなる群より選択されるアミノ酸配列に特異的に結合する、特異的結合メンバーであり、そして；

前記の第一または第二の特異的結合メンバーのもう一方は、PrP^c および PrP^d の両方に結合する

ことを含む、前記方法。

【請求項 16】

前記の第一および前記の第二の特異的結合メンバーの一方が固定されている、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

前記の第一および第二の特異的結合メンバーの非固定化特異的結合メンバーが、検出可能標識を含む、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

前記試料中の分子に対する前記の第一の特異的結合メンバーの結合が、検出可能標識の存在を検出することによって決定される、請求項 17 記載の方法。

【請求項 19】

前記試料中のタンパク質を可溶化することを含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 20】

タンパク質が、可溶化剤で試料を処理することによって可溶化される、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

可溶化剤がカオトロピック剤である、請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】

試料が非生物学的表面から得られる、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 23】

試料が個体から得られる、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 24】

疾患型プリオンタンパク質の存在が、個体が感染性海綿状脳症 (TSE) を有する指標となる、請求項 23 記載の方法。

【請求項 25】

試料が前記個体の組織試料または生物学的液体である、請求項 23 または請求項 24 記載の方法。

【請求項 26】

可溶化剤の存在下で組織試料を破壊する、請求項 25 記載の方法。

【請求項 27】

試料をプロテアーゼ処理しない、請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 28】

試料中の PrP^d の存在を検出するためのキットであって；

以下；

MANLG CWMLVL FVATWSDLGLCKKRPKPGGWNTGGSR (配列番号 1)、

MVKSHIGSWILVL FVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSR (配列番号 2) および

MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKPGGWNTGGSR (配列

番号 3)

からなる群より選択されるアミノ酸配列に特異的に結合する、1 以上の第一の特異的結合メンバー；および

試料に対する前記結合メンバーの結合を決定するための検出試薬を含む、前記キット。

【請求項 29】

個体から得た組織を取り扱い、そして / または保管するための装置を含む、請求項 28 記載のキット。

【請求項 30】

前記組織由来の前記試料をホモジナイズし、そして / または抽出するための試薬を含む、請求項 28 または請求項 29 記載のキット。

【請求項 31】

可溶化剤を含む、請求項 28 ~ 30 のいずれか 1 項記載のキット。

【請求項 32】

検出試薬が、PrP^c および PrP^d の両方に結合する第二の特異的結合メンバーを含む、請求項 28 ~ 31 のいずれか 1 項記載のキット。

【請求項 33】

1 以上の第一の特異的結合メンバーまたは第二の特異的結合メンバーが固定されている、請求項 32 記載のキット。

【請求項 34】

側方流動デバイス中に、1 以上の特異的結合メンバーまたは第二の特異的結合メンバーが固定されている、請求項 33 記載のキット。

【請求項 35】

1 以上の特異的結合メンバーまたは第二の特異的結合メンバーが検出可能標識で標識されている、請求項 32 ~ 34 のいずれか 1 項記載のキット。

【請求項 36】

感染性プリオンタンパク質の検出に有用な化合物に関してスクリーニングする方法であって、配列番号 1 ~ 3 およびその断片からなる群より選択される配列からなるペプチドと、試験化合物を接触させ、そして；ペプチドに対する化合物の結合を決定する、ことを含み、

ここで該ペプチドに対する該化合物の結合が、該化合物が感染性プリオンタンパク質の検出に有用であることの指標となる、前記方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2006/003494

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/18 C07K16/46 G01N33/50

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)

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)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/028510 A2 (KISELEV VSEVOLOD IVANOVICH [RU]; SVESHNIKOV PETR GEORGIYEVICH [RU]) 31 March 2005 (2005-03-31) page 1, line 31-page 2; page 4, line 30-page 5, line 6; page 26, line 15-page 27, line 6; example 8; claims 75-82	1-77
X	WO 2005/016127 A2 (CHIRON CORP [US]; MICHELITSCH MELISSA D [US]; HU CELINE [US] CHIRON CO) 24 February 2005 (2005-02-24) 0009-0010; page 96, Table 3; 0013; 0151-0163; 0016-0020; 0023-0025; 0124; 0047, 0067-0076; 0238; 0031, 0120	1-77
X	WO 01/00235 A (UNIV MCGILL [CA]; CAPRION PHARMACEUTICALS INC [CA]; CASHMAN NEIL R [CA]) 4 January 2001 (2001-01-04) the whole document	1-77



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 February 2007

Date of mailing of the international search report

21/02/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rengg11, John

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2006/003494**Box 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:
Although claims 12-49 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 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 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

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2006/003494

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005028510 A2	31-03-2005	AU 2004274368 A1	31-03-2005
		CA 2539562 A1	31-03-2005
		CN 1886425 A	27-12-2006
		EP 1673393 A2	28-06-2006
		KR 20060079239 A	05-07-2006
		RU 2251699 C1	10-05-2005
WO 2005016127 A2	24-02-2005	AU 2004264953 A1	24-02-2005
		BR PI0413495 A	17-10-2006
		CA 2535261 A1	24-02-2005
		EP 1653844 A2	10-05-2006
		KR 20060066088 A	15-06-2006
		MX PA06001588 A	25-08-2006
WO 0100235 A	04-01-2001	AU 5778400 A	31-01-2001
		CA 2376914 A1	04-01-2001
		EP 1210110 A1	05-06-2002
		JP 2003531356 T	21-10-2003

フロントページの続き

(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, 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, 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

(74)代理人 100128750

弁理士 福所 しのぶ

(72)発明者 マコーネル, イーアン

イギリス国ケンブリッジシャー シービー3 0イーエス, ケンブリッジ, マディングリー・ロード, ユニバーシティー・オブ・ケンブリッジ, デパートメント・オブ・ベテリナリー・メディシン

(72)発明者 バーナード, ジェフリー・ジョン・ラッセル

イギリス国ケンブリッジシャー シービー3 0イーエス, ケンブリッジ, マディングリー・ロード, ユニバーシティー・オブ・ケンブリッジ, デパートメント・オブ・ベテリナリー・メディシン

(72)発明者 カワード, ジョン

イギリス国ケンブリッジシャー シービー3 0イーエス, ケンブリッジ, マディングリー・ロード, ユニバーシティー・オブ・ケンブリッジ, デパートメント・オブ・ベテリナリー・メディシン

Fターム(参考) 4H045 DA76 EA50

专利名称(译)	检测传染性海绵状脑病的试剂和方法		
公开(公告)号	JP2010504502A	公开(公告)日	2010-02-12
申请号	JP2008531777	申请日	2006-09-20
[标]申请(专利权)人(译)	启示生物有限公司		
申请(专利权)人(译)	启示生物有限公司		
[标]发明人	マコーネルイーアン バーナードジェフリージョンラッセル カワードジョン		
发明人	マコーネル,イーアン バーナード,ジェフリー・ジョン・ラッセル カワード,ジョン		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/18 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 C07K16/18 C07K2317/21 C07K2317/55 C07K2317/626 G01N2800/2828		
FI分类号	G01N33/53.D C07K16/18.ZNA		
F-TERM分类号	4H045/DA76 4H045/EA50		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及使用诸如抗体的试剂检测样品中的感染性海绵状脑病 (TSE) , 其结合成熟全长PrP d 的非常N末端的区域。这些允许开发用于检测TSE而不需要蛋白水解的PrP d 的敏感免疫测定。

陰性		陽性	
平均	0.046 ng/mL	平均	14.22 ng/mL
標準偏差	0.075 ng/mL	標準偏差	18.07 ng/mL
範圍	0.01~0.253 ng/mL	範圍	0.928~80.25 ng/mL
N	200	N	200