

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-513927

(P2009-513927A)

(43) 公表日 平成21年4月2日(2009.4.2)

(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 B O 6 3
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 D	
GO 1 N 33/561 (2006.01)	GO 1 N 33/561	
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2006-516051 (P2006-516051)	(71) 出願人	591003013 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(86) (22) 出願日	平成16年6月24日 (2004. 6. 24)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(85) 翻訳文提出日	平成18年2月17日 (2006. 2. 17)		E AKTIENGESELLSCHAFT
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/006860		T
(87) 国際公開番号	W02004/113925		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(87) 国際公開日	平成16年12月29日 (2004.12.29)		グレンツァーヘルストラッセ124
(31) 優先権主張番号	10328830.9	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(32) 優先日	平成15年6月26日 (2003. 6. 26)	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非対称的な自発的相互作用によるプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質の検出

(57) 【要約】

【課題】本発明は、感度が改善された、感染性プリオンタンパク質の検出方法に関する。

【解決手段】この目的のために、異種の非病原性プロテアーゼ感受性プリオンタンパク質 PrP^cを調査する予定のサンプルに添加し、サンプル中に感染性プリオンタンパク質 PrP^{Sc}が存在する場合に、非対称的な自発的相互作用によってプロテアーゼ耐性プリオン凝集体へ変換させる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 調査されるべきサンプルを準備するステップ、
(b) 異種の正常なプロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrPcを添加するステップ、
(c) プリオンタンパク質PrPScがサンプル中に存在する場合に、添加した異種の正常なプロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrPcをプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質の凝集体に変換するステップ、
(d) プロテアーゼと共にインキュベートするステップ、および
(e) サンプル中のプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質の凝集体を測定するステップを含む、サンプル中のプリオンタンパク質PrPScの検出方法。

10

【請求項2】

ウシ、マウス、ハムスター、ヒツジ、ヤギまたはヒト由来のプリオンタンパク質を検出するための、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

サンプルが脳、神経組織またはリンパ細網系などの組織あるいは体液に由来することを特徴とする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

界面活性剤含有サンプルを調査することを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項5】

サンプルをホモジネート、特に無細胞ホモジネートとして準備することを特徴とする、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

新鮮なホモジネートを用いることを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

ステップ(b)で添加される異種のプリオンタンパク質が、サンプルの由来する種と異なる種に由来することを特徴とする、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

ステップ(b)で添加される異種のプリオンタンパク質が、サンプルの由来する属と異なる属に由来することを特徴とする、請求項7に記載の方法。

30

【請求項9】

(i) ステップ(b)で添加される異種のプリオンタンパク質が齧歯動物種に由来し、かつサンプルがウシ、ヒツジまたはヒトに由来すること、(ii) ステップ(b)で添加される異種のプリオンタンパク質がヒトに由来し、かつサンプルがウシまたはヒツジに由来すること、あるいは(iii) ステップ(b)で添加される異種のプリオンタンパク質がウシまたはヒツジに由来し、かつサンプルがヒトに由来することを特徴とする、請求項7または8に記載の方法。

【請求項10】

異種のプリオンタンパク質がホモジネート、特に無細胞ホモジネートとして添加されることを特徴とする、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項11】

新鮮なホモジネートを用いることを特徴とする、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

ステップ(c)が、異種のプロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrPcとサンプル中に存在する感染性プリオンタンパク質PrPScとが非対称的な自発的相互作用を起こし、プロテアーゼ耐性プリオンタンパク質の凝集体を形成する条件下での、サンプルのインキュベーションを含むことを特徴とする、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

インキュベーションを20～55℃、特に35～50℃の温度で実施することを特徴とする、請求項12に記載の方法。

50

- 【請求項 14】
インキュベーションを少なくとも10分、特に10～240分の時間実施することを特徴とする、請求項12または13に記載の方法。
- 【請求項 15】
ステップ(c)が実質的な生理条件下でのインキュベーションを含むことを特徴とする、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。
- 【請求項 16】
ステップ(c)の前に超音波処理を実施することを特徴とする、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。
- 【請求項 17】 10
1以上の増幅/インキュベーションサイクルを実施することを特徴とする、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。
- 【請求項 18】
プロテイナーゼKをステップ(d)で用いることを特徴とする、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。
- 【請求項 19】
プロテイナーゼKを50～100 μg/mlの濃度で用いることを特徴とする、請求項18に記載の方法。
- 【請求項 20】 20
ステップ(e)で定量的測定を実施することを特徴とする、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。
- 【請求項 21】
ステップ(e)で免疫学的方法によって測定を実施することを特徴とする、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。
- 【請求項 22】
測定をウェスタンブロット法によって実施することを特徴とする、請求項21に記載の方法。
- 【請求項 23】
測定をイムノアッセイによって実施することを特徴とする、請求項21に記載の方法。
- 【請求項 24】 30
測定をサンドイッチアッセイ、特にサンドイッチELISAによって実施することを特徴とする、請求項23に記載の方法。
- 【請求項 25】
TSE疾患を診断するための、請求項1～24のいずれか1項に記載の方法。
- 【請求項 26】
ヒトにおけるTSE疾患を検出するための、請求項25に記載の方法。
- 【請求項 27】
家畜、農場動物および野生動物におけるTSE疾患を検出するための、請求項25に記載の方法。
- 【発明の詳細な説明】 40
- 【技術分野】
- 【0001】
本発明は、改善された感度で、感染性プリオンタンパク質を検出する方法に関する。この目的のために、異種の非病原性プロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrPcを調査されるべきサンプルに添加し、感染性プリオンタンパク質PrPScがサンプル中に存在する場合に該PrPcが非対称的な自発的相互作用によってプロテアーゼ耐性プリオン凝集体に変換される。
- 【背景技術】
- 【0002】 50
プリオンはクールー、変異型クロイツフェルト ヤコブ病(vCJD)、ウシ海綿状脳症(

BSE)、慢性消耗病(CWD)およびスクレピーなどの伝達性海綿状脳症(TSE)を引き起こす感染性粒子である。プリオンの主な成分は糖タンパク質PrP^{Sc}であり、これは正常な細胞表面タンパク質PrP^Cの高次構造が変化したアイソフォームである(Prusiner, PNAS USA 95, 1363-1383, 1998)。疾患に関連するプリオン分子であるPrP^{Sc}は正常なPrP^Cプリオン分子を変換することにより複製することができる。

【0003】

プリオンの複製は、溶液中でのPrP^CとPrP^{Sc}の熱力学的平衡に基づく「核生成/重合(nucleation/polymerization)」モデルに従って生じると考えられている(JarrettおよびLandsbury, Cell, Vol 73, 1055-1058, 1993; Masel, JansenおよびNowak, Biophys. Chem. 77, 139-152, 1999)。

10

【0004】

このモデルの基礎は、感染性粒子はPrP^{Sc}の多量体の高度に秩序化された(highly ordered)凝集体であるが、単量体PrP^{Sc}分子は不安定であり、他のPrP^{Sc}分子との凝集によってのみ安定化されるということである。したがって、複製における律速段階はPrP^{Sc}凝集体をさらに安定化するように作用する核の形成である。

【0005】

PrP^{Sc}オリゴマーは、新しいPrP^C分子が結合し、変換されかつ組み込まれる限り凝集体の末端で自身を伸長する。したがって、そのような「核生成プリオン複製(nucleated prion replication)」は、サンプル中に存在するPrP^{Sc}核の数、およびPrP^CとPrP^{Sc}の互いに相互作用する能力によって制限される。

20

【0006】

今まで、プリオンタンパク質PrP^{Sc}はTSE型の疾患を診断するのに利用可能な唯一のマーカーであった。しかし、PrP^{Sc}の濃度は脳内でさえ非常に低いものであるため、かなり末期段階のTSE疾患でのみ診断上検出することができる。このように、TSE疾患を検出するための診断方法は非常に限られたものでしかない。

【0007】

したがって、PrP^{Sc}検出の感度を増加させる試みがなされている。近年、サンプル中のPrP^{Sc}の検出の感度を増加させる方法が、プリオン複製における上記モデルに基づいて開発されている(SaborioらNature 411, 810-813; 2001およびSoto, Biochem. Soc. Trans. 30, 569-574, 2002, WO 02/04954)。PMCA(protein misfolding cyclic amplification)と称するこの方法は、調査する予定のサンプルを非病原性PrP^Cに接触させることにより、サンプル中に存在する少量のPrP^{Sc}と添加したPrP^Cとを相互作用させて凝集体を形成させること、形成された凝集体を脱凝集すること、およびサンプル中の病原性PrP^{Sc}を測定することを含む。サンプルに添加される非病原性PrP^Cは、調査する予定のサンプルと同一の種由来する同種のPrP^Cである。通常この方法は実験的に加速された数サイクルのプリオン複製からなる。各サイクルは2段階からなる。第1段階では、非常に少量のPrP^{Sc}がいくらかのPrP^C分子と相互作用し、PrP^Cを変換し、これによりPrP^{Sc}ポリマーの成長を誘導する。

30

【0008】

第2段階では、これらのポリマーを超音波を用いて小さな断片に分解し、各サイクルにおいて潜在的な核の数を指数関数的に増大させる。この方法のサイクル性により、少なくとも理論的には、PrP^{Sc}の検出のために望ましい増幅状態に達するまで必要なだけの数のサイクルが可能である。

40

【0009】

最終的にこの方法の目的は、凝集体の成長段階および鋳型ユニットの増幅段階からなるサイクル反応を用いてPrP^C基質を消費しながら鋳型ユニットの数を指数関数的に増大することである。

【0010】

ハムスターモデルに用いられたPMCA法が最近マウス、ヒツジ、ヤギ、ウシおよびヒトなどの別の種について記載されており、どの種を用いるかによって、増幅のために使用する必要がある超音波処理の強さはそれぞれのPrP^{Sc}ポリマーの凝集状態に応じて明確に変更

50

すべきとの注釈がなされている (Anderesら, Poster presentation, Transmissible Spongiform Encephalopathies. New perspectives for prion therapeutics, International Conference, December 1.-3., 2002, Paris, France)。

【 0 0 1 1 】

しかし、プリオン増幅のためのサイクル法は技術的に影響され易い傾向があり、記載されているように長いインキュベーション - 超音波処理サイクルが必要である。

【 0 0 1 2 】

Wen-QuanおよびCashman (J. Biochem. Chem. 277, 43942-43947, 2002) は、脳ホモジネートを酸/塩酸グアニジニウムで処理することにより、非病原性PrPcからPrPSc様アイソフォームを形成することができることを記載している。これらのアイソフォームの形成は、クロイツフェルト - ヤコブ病患者の脳由来の少量の感染性プリオンタンパク質PrPScを添加することによって増加することができる。

10

【 0 0 1 3 】

Lucassenら (Biochem. 42, 4127-4135, 2003) は、ハムスターまたはマウス由来のスクレピーに感染した脳ホモジネートを同種の正常な脳ホモジネートと混合することによる、プロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrPScのin vitro増幅を記載している。

【 0 0 1 4 】

Horiuchiら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000), 5836-5841) は、異種形態のプリオンタンパク質間の相互作用を記載している。異種プロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrPcはプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrPScに結合することができるが、非常にわずかな程度でのみプロテアーゼ耐性状態へ変換されることが見出された。さらに、異種プロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrPcの存在により、同種のプロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrPcのプロテアーゼ耐性PrPScへの変換が妨げられる可能性がある。これらの知見に基づけば、プロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrPScと異種プロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrPcから形成されるプリオンタンパク質凝集体が、診断用検出方法に適切なプロテアーゼ耐性を有するであろうことは予想されるべきものではなかった。

20

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 5 】

本発明の基礎となった目的は、サンプル中の疾患に關与するおよび/または感染性のプリオンタンパク質PrPScを検出するための、簡単、迅速かつ感度の高い方法を提供することであった。

30

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 6 】

本発明によるこの目的の解決策には、

- (a) 調査されるべきサンプルを準備するステップ、
 - (b) 異種の、非病原性プロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrPcを添加するステップ、
 - (c) PrPScがサンプル中に存在する場合に、添加した異種の正常なプロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrPcをプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質の凝集体に変換するステップ
- 、
- (d) プロテアーゼと共にインキュベートするステップ、および
 - (e) サンプル中のプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質の凝集体を測定するステップ
- が含まれる。

40

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 1 7 】

この発明による方法は、疾患に特異的なPrPSc凝集体の存在下で、外的に添加された異種の非病原性プロテアーゼ感受性プリオンタンパク質が、適切な条件下で非対称的な自発的相互作用 (asymmetric spontaneous interaction) と称するPrPScとPrPc間の自己誘導結合反応によってPrPSc凝集体と結合し、かつ驚くべきことに結合相互作用によって診断

50

上検出可能なプロテアーゼ耐性の状態に達するという事実に基づく。この方法により、改善された感度での感染性プリオンタンパク質PrPScの検出、および種特異的なプリオン抗体を用いた異種のプリオンタンパク質のアイソフォームの検出が可能である。

【0018】

これに関連して、PrPSc陽性サンプル中には、高分子量のプロテアーゼ耐性PrPSc凝集体に加えて、プロテアーゼ感受性の低凝集PrPScが、不均一なポリマーサイズの様々な凝集状態で存在することが想定される (Tzabanら, Biochemistry 41, 12868-12875, 2002)。この低凝集のPrPScは、プロテアーゼ耐性プリオンタンパク質の凝集体の形成を可能にする非対称的な自発的相互作用の鑄型として、サンプルに添加された異種PrPcによって利用され得る。

10

【0019】

適切な条件下で、異種PrPc基質の混合と、様々な凝集状態のPrPSc凝集体に対するその接着/結合とにより、基質に対する保護性の結合事象が起こり得、その結果、異種PrPcのPrPScとの結合相互作用によってプロテアーゼ消化に対する異種PrPcの耐性の増加をもたらされる。また、異種PrPcの結合に起因する凝集状態の増加は、明らかに、凝集体のプロテアーゼ耐性を増加することができ、したがってそれらの成分のプロテアーゼ耐性を増加することができる。

【0020】

サンプル中にPrPScが存在する場合にのみ、PrPSc/PrPc混合凝集体の形成が生じ、この凝集体はプロテアーゼ耐性となった異種PrPcを含有しており、プリオンタンパク質に対する適切な種特異的/交差反応性検出抗体の選別に依存して検出することができる。検出は (PrPScが存在するかしないかに加えて、使用されるプリオン検出抗体の選択された特異性に依存して) 疾患特異的なPrPScの直接的または間接的な検出のためのウエスタンブロット、ELISAなどの既知の方法を用いることによって実施することができる。

20

【0021】

この方法は、特に同種および特に異種の両方のプロテアーゼ感受性プリオンタンパク質の、プロテアーゼ耐性プリオンタンパク質により誘導される共重合 (すなわち結合) が、混合系において累進的に生ずる場合に、疾患特異的なPrPScの検出の感度の大幅な増加をもたらす (異種PrPcの累進的な結合事象は、おそらく高次構造が変化したPrPcの結合に起因してPrPScに変換され得ない凝集体中で結合しているPrPcに起因する)。

30

【0022】

第1の実施形態で、この方法は、異種PrPc基質 (例えば、正常なハムスターの脳ホモジネート) と潜在的にPrPSc陽性またはPrPSc陰性の鑄型 (例えばBSE陽性またはBSE陰性のウシホモジネート) とを適切な条件下で混合すること、次いで、PrPSc鑄型凝集体上での2つの異種プロテアーゼ感受性プリオンタンパク質のPrPc形態の自発的結合相互作用のためのインキュベーションステップ、およびそれに続くプロテアーゼ消化を含む。

【0023】

異種 (および同種) PrPcの結合相互作用はPrPSc鑄型の存在下でのみ生じるのに対して、異種PrPcは内因的な同種のPrPcとともにPrPSc鑄型の不在下でプロテアーゼによって完全に消化される。

40

【0024】

凝集体におけるPrPSc鑄型への結合に起因してプロテアーゼ消化に対して耐性である異種PrPcはその後、適切に選択された検出システムによって診断的に検出ことができ、最初から存在している疾患特異的なプリオンタンパク質PrPScに対する感度の高い指標として用いることができる。

【0025】

異種プロテアーゼ感受性PrPcを添加した後サンプルを、好ましくはスフィンゴミエリン/コレステロールに富む界面活性剤耐性膜 (DRM)、いわゆる脂質ラフトまたはカベオラ様ドメイン (CLD) (Veyら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 93, 14945-14949, 1996; Baronら, EMBO J., 21, 1031-1040, 2002) (これらはPrPScへのPrPcの結合に必要であ

50

り、これによりPrPcとPrPScはグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカーを介して明確に結合される）の存在下、膜可溶化条件下でインキュベートする。

【0026】

適切な条件下で、脂質ラフト中に位置する異種プリオンタンパク質形態のPrPc/PrPSc脂質ラフト - 膜相互作用に起因して、無細胞結合/変換系でPrPcのPrPSc鑄型への非対称的な自発的結合反応が生じ、その結果、PrPSc凝集体との結合事象によって異種PrPcの相対的なプロテアーゼ耐性が生じ、PrPScを診断的に検出するのに使用することができる。

【0027】

非対称的な自発的結合反応（ASI）の診断上の利点は下記のように記載することができる：

- この方法は、ほぼ生理条件下で、例えば脳ホモジネートまたは他の無細胞系で簡単に実施することができる；
- PrPSc検出の感度は、PrPScへの結合後の異種PrPcのプロテアーゼ耐性の増大によって上昇させることができる；
- 異種PrPc基質を介してPrPScを間接的に検出する可能性；
- 検出抗体の選択に応じて、PrPSc/異種PrPcの加法的検出または異種PrPcのみの検出が可能であり、その結果、組織および例えばパフィーコート等の細胞血成分、またはPrPSc鑄型の濃度が非常に低い他の体液中のPrPScを検出する際に、感度を上昇させる；
- 同種のPrPSc/PrPc結合反応（自発的変換反応、STR）と比較して、種特異性（宿主/接種PrP分子のアミノ酸配列における分子レベルでの差異）に応じて、同種の、すなわち変換可能なPrPcとは対照的に、変換不可能なまたは部分的にのみ変換可能なPrPcをプロテアーゼ耐性凝集体中で検出することができるという更なる利点がある。最初に抗体エピトープをPrPSc凝集体に接近可能とするのに必要なそれぞれの変性条件に応じて、接着した非変換の異種PrPcをより簡単にモノマーとして分離することができ、かつプロテアーゼ消化後に最初に存在していたPrPScの感度の高い検出の一助となることができる。

【0028】

この方法のステップ(a)は、調査する予定のサンプルの準備からなる。サンプルは、脳、神経組織またはリンパ細網系、例えば血液または血液成分などのプリオンタンパク質を含み得る組織あるいは体液に由来し得る。サンプルは通常、脂質ラフト保存性界面活性剤（例えばTriton X100などの非イオン界面活性剤）を含有するホモジネートの形態で準備される。特に、ウシまたはヒトサンプルはSDSなどのイオン界面活性剤を含まないことが好ましい。血液、細胞血成分、パフィーコート等の体液のサンプルは、プリオンタンパク質を含む細胞を濃縮することによって、例えばリンパ球及び他の単核細胞を血液凝固が阻止された全血から単離することによって調製することができる（例えば、Accuspin system Histopaque 1077, Sigma Diagnostics）。サンプルは、本質的に生理的な条件下（例えばpH6~8、および50~500mmol/l NaClに対応する塩濃度）で準備することが好ましい。プロテアーゼ阻害剤またはプロテアーゼ阻害剤の組合せ（例えば、Protease-Inhibitor Cocktail complete, Roche Diagnostics）をサンプルに添加して、サンプル中に存在する内生的プロテアーゼを活性化するのが有益である。ホモジナイゼーション後に、サンプルを直接または新鮮なまま（すなわち前凍結なしに）使用することが好ましい。

【0029】

本発明による方法のステップ(b)は、異種の非病原性プロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrPcを調査する予定のサンプルに添加することからなる。一般に各場合に本質的に等しい濃度（例えば10%）のホモジネートを用いる場合、添加される異種プリオンタンパク質とサンプル中に存在するプリオンタンパク質との比率は1:99~99:1であり、10:90~90:10が特に好ましい。

【0030】

本発明の意味における「異種」という用語は、異なる種、好ましくは異なる属の正常なプリオンタンパク質PrPcがサンプルに添加されることを意味する。例えば、齧歯動物のPrPc、例えばハムスターのPrPcまたはマウスのPrPcを、ウシサンプル、ヒツジサンプルまた

10

20

30

40

50

はヒトサンプルに添加することが特に好ましい。また、ヒトのPrPcをウシのサンプルに添加すること、またはウシもしくはヒツジのPrPcをヒトのサンプルに添加することも好ましい。サンプルに添加される異種物質、好ましくはPrPcホモジネートが、ホモジナイゼーション後に凍結されていない新鮮なホモジネートであることが特に好ましい。

【0031】

本発明による方法のステップ(c)は、好ましくは、異種プロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrPcと、サンプル中に存在する感染性プリオンタンパク質PrPScとの非対称的な自発的相互作用が起こり、プロテアーゼ耐性プリオンタンパク質凝集体が生じる条件下で、サンプルをインキュベートすることを含む。この非対称的な自発的相互作用は、異種非病原性プリオンタンパク質PrPcと、サンプル中に存在する感染性プリオンタンパク質PrPScとの結合を含む。

10

【0032】

サンプルを20~55℃、特に35~50℃の温度でインキュベートすることが好ましい。インキュベーションは、感度の効果的な増加を達成するのに十分な期間で実施される。インキュベーション期間は、少なくとも10分、例えば10~240分、および特に好ましくは15~120分であることが好ましい。場合により、脱凝集ステップをステップ(c)の前に実施することができ、その際、高分子量のPrPSc凝集体が低分子量の凝集体に脱凝集される。かかるステップは、例えば単一の超音波処理を含むことができる。

【0033】

本発明による方法は、1以上の更なる増幅サイクル、すなわち例えばPMCA法に対応する1以上の連続した超音波/インキュベーションサイクルをさらに含むことができる。

20

【0034】

一方、分析にイムノアッセイを用いた場合、本発明の特定の実施形態において高感度を達成するのに、長いインキュベーション期間または増幅は必要ないことが見出された。

【0035】

本発明による方法のステップ(d)のプロテアーゼは、サンプル中に存在する同種の非病原性プリオンタンパク質PrPcと、添加した異種のプリオンタンパク質PrPcをモノマー形態に切断することができるが、PrPScと凝集体化した形態中に存在する添加した異種PrPcが、切断に対して実質的に耐性であるように選択される。適当なプロテアーゼの一例はプロテイナーゼKである。プロテイナーゼKは50~100 µg/mlの濃度で使用されることが特に好ましい。

30

【0036】

本発明による方法のステップ(e)は、サンプル中のプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrPScの測定を含む。その測定は、当技術分野で既知の全ての方法によって定性的にまたは/および定量的に実施することができる。適当な方法の例は、病原性プリオンタンパク質が特異的抗体との反応によって測定される免疫学的方法である。

【0037】

特に好ましい実施形態では、プリオンタンパク質はウエスタンブロットによって測定される。このためには、サンプルを変性条件下で、例えばSDS-PAGEによって、電気泳動的に分離し、そしてそこに含まれるタンパク質を、適当な膜、例えばニトロセルロースまたはポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜にブロットする。次いで、プリオンタンパク質は、直接的に標識化することができるかもしくは標識化された二次抗体によって検出可能な、ポリクローナルまたはモノクローナル抗プリオン抗体との反応によって、膜上で可視化される。これに関連して、検出可能な基質、例えば化学発光基質を用いる酵素標識が好ましい。市販の抗プリオン抗体は実施例で言及される。

40

【0038】

一方、電気泳動による前分離なく、サンプルを適切な検出試薬と接触させるイムノアッセイにより測定を実施することもできる。イムノアッセイは、プリオンタンパク質に対する固相抗体(例えばピオチニル化抗体)および標識化抗体(例えば酵素標識した抗体)を用いる、サンドイッチアッセイとして実施することが好ましい。1以上の抗プリオン抗体

50

が用いられ、かつ酵素 - 抗体コンジュゲートが検出可能な酵素基質と共に標識化された二次抗体として使用される、サンドイッチELISAによって検出を実施することが特に好ましい。

【0039】

感染性PrPScがサンプル中に存在するときに形成されるプロテアーゼ耐性凝集体を検出するために、既に言及したように、種もしくは属特異的なまたは種もしくは属に独立的なプリオンタンパク質を認識する抗体を使用することができる。かかる抗体の2以上の組合せまたは混合物を使用することもできる。

【0040】

齧歯動物、例えばハムスターまたは/およびウシプリオンタンパク質に特異的な抗体、あるいはウシまたは/およびヒトプリオンタンパク質に特異的な抗体を含む、抗体の組合せが、本発明による方法の特に好ましい実施形態において使用される。

10

【実施例】

【0041】

以下の実施例によって、本発明をさらに説明する。

【0042】

実施例1：ウシ/ハムスター系における異種PrP形態間の非対称的な自発的相互作用

この実施例では、異種PrP形態間で非対称的な自発的相互作用が起こり得る（例えばハムスターPrPcがウシPrPSc凝集体と結合することができる）ことが示される。これは、同種PrP形態間の自発的変換反応、例えば無細胞結合/変換系におけるウシPrPcのウシPrPSc凝集体への結合、と比較される。

20

【0043】

1.1 サンプルの調製

延髄門領域（VLA case 99/00946）から得たBSE陽性ウシ脳ホモジネート（10%ショ糖中20%のホモジネート）を氷冷した次の正常脳ホモジネートで100倍に希釈した：

(a)0.5%Triton X100およびprotease inhibitor cocktail complete(Roche Diagnostics)を含むPBSバッファー中の10%ホモジネートとして、健康なウシの延髄門領域から得た正常なウシの脳ホモジネート（同種系）または

(b)0.5%Triton X100およびprotease inhibitor cocktail complete(Roche Diagnostics)を含むPBSバッファー中の10%ホモジネートとして、Syrianハムスターの正常な脳ホモジネート（異種系）。

30

【0044】

ホモジネートは全て、Ribolyser組織ホモジナイザー(Hybaidd, UK)およびHybaidd(UK)のセラミックビーズを含有するグリーンチューブを用いて、調製した。protease inhibitor cocktail completeを含有するPBSバッファー中で正常な脳サンプルをホモジネートした後、Triton X100を添加して0.5%の最終濃度とし、ホモジネートを振とうしながら25 15分間で可溶化した。次いで、正常な脳ホモジネートを氷槽に置き、上述したBSEの脳ホモジネートと混合した。その後、200 μ lのアリコートを下に記載される処理手順に供した。なお、0分のサンプルは氷槽で維持した。

40

【0045】

インキュベーションの直後に、全てのサンプルをプロテイナーゼK（最終濃度100 μ g/ml）により、37 60分間で消化した。PMSFを40mMの最終濃度で添加することによって反応を停止した。次いで、サンプルをアリコートに分け、分析した。

正常ハムスターサンプル（消化対照）：サンプル2；

正常ウシサンプル（消化対照）：サンプル9；

同種系（ウシPrPSc/ウシPrPc）：

500rpmで振とうしながら（エッペンドルフシェーカー）47 50で0/15/30/60分間のインキュベーション；サンプル10~13；

Becher共振器（BR30）とサンプル保持装置（EH3）とを備えたマイクロ超音波処理器（mic rosonicator）（Bandelin Electronik, Sono plus, Berlin）を用いた間接的な超音波処

50

理（15秒の1パルス）に続いて、500rpmで振とうしながら（エッペンドルフシェーカー）、47 で0/15/30/60分間のインキュベーション：サンプル14～17；

異種系（ウシPrPSc/ハムスターPrPc）

500rpmで振とうしながら（エッペンドルフシェーカー）室温で0/60分間のインキュベーション：サンプル3、4；

500rpmで振とうしながら（エッペンドルフシェーカー）47 で0/60分間のインキュベーション：サンプル5、6；

Becher共振器（BR30）とサンプル保持装置（EH3）とを備えたマイクロ超音波処理器（microsonicator）（Bandelin Electronik, Sono plus, Berlin）を用いた間接的な超音波処理（1パルス、15秒）に続いて、500rpmで振とうしながら（エッペンドルフシェーカー）、47 で0/60分間のインキュベーション：サンプル7、8。

一定のインキュベーション期間の後、サンプルを氷槽に戻し、続いてプロテイナーゼKにより並行して消化した。

【0046】

1.2 ウエスタンブロット分析

SDS-PAGEを還元条件（95 で5分）下でサンプルを2xSDSサンプルバッファと混合することによって実施し、続いてPVDF膜上にエレクトロブロットした。膜をDigブロックおよび洗浄バッファキット（Roche Diagnostics）で処理し、そして、一組の様々な種特異的なモノクローナル抗プリオン抗体（以下で述べる）と共に1時間インキュベートし、その後、ヒツジ抗マウスIgG-アルカリホスファターゼコンジュゲート（40mU/ml）Fabフラグメント（Roche Diagnostics）と共に30分間インキュベートした。膜における反応性は、CDP-Star化学発光基質を使用して発色させ、Lumilagerシステム（Roche Diagnostics）で可視化（約10分）した。

【0047】

ウエスタンブロット用のモノクローナル抗体：

抗体L42(R Biopharm, Germany)：250ng/ml；ウエスタンブロットにおいて、L42はヒトおよびウシPrPと反応するが、ハムスターPrPとは弱い交差反応性のみを有する（図6）。

ICSM 18（Imperial College London, UK）：500ng/ml；ICSM 18はハムスター、ヒトおよびウシPrPと反応する（図1）。

ICSM 35（Imperial College London, UK）：500ng/ml；ICSM 35はヒトおよびウシPrPと反応し、かつICSM 18に比べて、ウシPrPよりもハムスターPrPとより強く反応する（図3）。

3F4（Signet, USA）：500ng/ml；ウエスタンブロットにおいて、3F4はハムスターおよびヒトPrPと反応するが、ウシPrPとは反応しない（図4）。

12F10（SP10-B10, France）：500ng/ml；12F10はヒトおよびウシPrPと反応する（図2）。

【0048】

6H4（Prionics, Switzerland）：500mg/ml；6H4はヒトおよびウシPrPと反応し、かつハムスターPrPとはわずかな程度で反応する（図5）。

【0049】

ウエスタンブロットにおけるサンプル2～17の結果は図1～6に示される。30kDより小さなプロテイナーゼK耐性ウシプリオンのバンド（PrPScに典型的なニグリコシル化、一グリコシル化および非グリコシル化バンド）が、使用された抗体（ICSM 18、12F10、6H4およびL42）の特異性に依りて、同種のウシPrPSc/ウシPrPc系（サンプル10～17を参照）で見出された。約35kDaでのバンドパターンは、依然として変換されていない、結合したウシPrPcと解釈される（サンプル10～17を参照）。

【0050】

一方、おそらくハムスターPrPcよりなるプロテイナーゼK耐性ハムスタープリオンのバンド（約35kDa）は、異種のウシPrPSc/ハムスターPrPc系、すなわち異種PrPc結合が生ずる可能性がある系（抗体の反応性パターンICSM 18、35、3F4および6H4、サンプル3～8を参照）で認めることができる。プリオンタンパク質のアミノ酸配列およびプリオンタンバ

10

20

30

40

50

ク質上の抗体エピトープ認識における種差に応じて、異種系で形成されたPrPSc分子のグリコフォーム分布および見掛けの分子量を伴う限定的な変換プロセス（ICSM 18認識パターン、サンプル3～8）を見出すことができ、該PrPSc分子は同種系における新しく変換されたPrPSc分子に対応する（抗体ICSM 18のプリオンタンパク質認識パターンの結果としてのみ可視化される）。正常なハムスター脳/ウシ脳ホモジネート（希釈実験に使用される）は、プロテアーゼ耐性PrPバンドを生じなかった（サンプル2および9）。プロテイナーゼKを用いるウエスタンブロットにおける二次抗体の特定の交差反応性は、約30kDaのバンドの存在によって明らかにされる（サンプル2、9、3～8、10～17）。

【 0 0 5 1 】

120、100、80、60、50、40、30および20kDaのバンドを有する、Magic Mark Western Standard (Invitrogen) を分子量対照として用いた（いずれの場合もサンプル1）。 10

【 0 0 5 2 】

1.3 ELISA分析

サンプルを2x グアニジニウムHCl変性バッファー（7.6MグアニジニウムHCl、最終濃度3.8M グアニジニウムHCl）と室温で15分間、450rpmで振とうしながら混合して、抗体反応性エピトープを曝露した。次いで、40μlのサンプルを、ICSM 35 IgG-ビオチン（1μg/ml）/ICSM 18 Fab'-PODポリコンジュゲート（100 mU/ml）の抗体コンジュゲートミックスを含む、200μlのインキュベーションバッファーに添加し、これをサーモ-BSA-ストレプトアビジンで被覆したマイクロタイタープレート（Biocoat, Germany）中で振とうしながら（400rpm）25℃で2時間インキュベートした。プレートをPBS/0.05% Tween 20で洗浄し、固定された免疫複合体は、TMB基質を用いて（200μl、5分）検出した。酵素反応は50μlの停止液（2M H₂SO₄）を添加することによって停止した。OD値は2波長測光器を用いて、450nmと、690nmの参照波長で測定した（ブランク値 = 0.017）。 20

【 0 0 5 3 】

結果は表1に示される。

【表 1】

サンプル	1	2
2	0.1050	0.0940
3	2.0460	1.9860
4	1.8970	1.9320
5	1.9730	1.9830
6	1.8630	1.9180
7	1.4550	1.4790
8	1.4090	1.4680
9	0.0730	0.0770
10	0.7600	0.8020
11	0.7570	0.7680
12	0.7550	0.8200
13	0.8050	0.8030
14	0.7120	0.7530
15	0.6480	0.7430
16	0.6870	0.7710
17	0.7820	0.7390

10

20

30

40

【 0 0 5 4 】

プロテイナーゼK耐性ウシPrP凝集体は、同種のウシPrPSc/ウシPrPc系において、使用された実験条件下で、インキュベーション時間（0～60分）と無関係に形成される（サンプル10～13および14～17を参照）。

【 0 0 5 5 】

サンプル9は、同種の希釈実験におけるPrPc供給源として用いられた、正常なウシの脳ホモジネート（PrPc消化対照）である。

【 0 0 5 6 】

プロテイナーゼK-耐性凝集体は、異種のウシPrPSc/ハムスターPrPc系において認識でき、使用された実験条件下で、インキュベーション時間/温度とは無関係に形成される（サ

50

ンプル3/4、5/6、7/8参照)。異種のウシPrPSc/ハムスターPrPc系における値は、同種のウシPrPSc/ウシPrPc系における値よりも驚くほど高い。

【0057】

サンプル2は、異種の希釈実験におけるPrPc供給源として使用された。正常なハムスターの脳ホモジネート(PrPc消化対照)である。異種のウシPrPSc/ハムスターPrPc系における超音波処理後には、超音波処理をしていないサンプル(ELISAサンプル5、6)と比べて、ELISA系におけるOD値の減少が生じ得る(ELISAサンプル7、8;約25%の減少)。一方、この減少は同種のウシPrPSc/ウシPrPc系では生じない(ELISAサンプル10~13およびサンプル14~17を参照)。

【図面の簡単な説明】

10

【0058】

【図1】抗体ICSM 18を用いたウエスタンブロット分析の結果を示す。

【図2】抗体12F10を用いたウエスタンブロット分析の結果を示す。

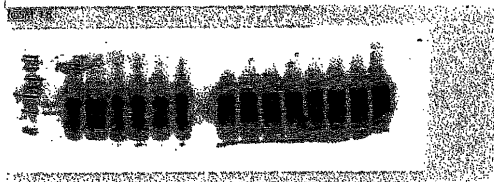
【図3】抗体ICSM 35を用いたウエスタンブロット分析の結果を示す。

【図4】抗体3F4を用いたウエスタンブロット分析の結果を示す。

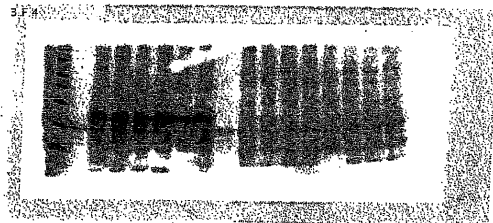
【図5】抗体6H4を用いたウエスタンブロット分析の結果を示す。

【図6】抗体L42を用いたウエスタンブロット分析の結果を示す。

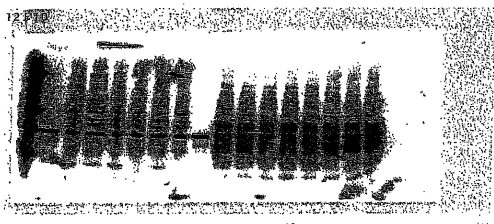
【図1】



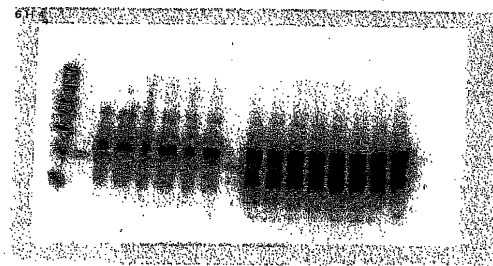
【図4】



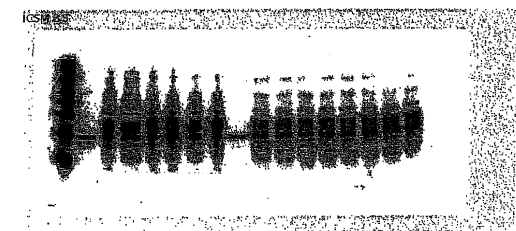
【図2】



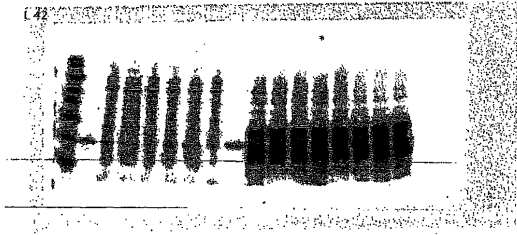
【図5】



【図3】



【図 6】



【手続補正書】

【提出日】平成19年2月21日(2007.2.21)

【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】

(a) 調査されるべきサンプルを準備するステップ、

(b) 異種の正常なプロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrPcを添加するステップ、

(c) PrPScがサンプル中に存在する場合に、添加した異種の正常なプロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrPcをプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質の凝集体に変換するステップ、

(d) プロテアーゼと共にインキュベートするステップ、および

(e) サンプル中のプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質の凝集体を測定するステップを含む、サンプル中のプリオンタンパク質PrPScの検出方法。

【請求項 2】

ウシ、マウス、ハムスター、ヒツジ、ヤギまたはヒト由来のプリオンタンパク質を検出するためのものであり、その際、前記サンプルが脳、神経組織またはリンパ細網系などの組織あるいは体液に由来する、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

界面活性剤含有サンプルを調査することを特徴とする、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

サンプルをホモジネート、特に無細胞ホモジネートとして準備すること、その際、好ま

しくは新鮮なホモジネートを用いることを特徴とする、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

ステップ(b)で添加される異種のプリオンタンパク質が、サンプルの由来する種と異なる種に由来すること、好ましくはサンプルの由来する属と異なる属に由来することを特徴とする、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

(i)ステップ(b)で添加される異種のプリオンタンパク質が齧歯動物種に由来し、かつサンプルがウシ、ヒツジまたはヒトに由来すること、(ii)ステップ(b)で添加される異種のプリオンタンパク質がヒトに由来し、かつサンプルがウシまたはヒツジに由来すること、あるいは(iii)ステップ(b)で添加される異種のプリオンタンパク質がウシまたはヒツジに由来し、かつサンプルがヒトに由来することを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

異種のプリオンタンパク質がホモジネート、特に無細胞ホモジネートとして添加すること、その際、好ましくは新鮮なホモジネートを用いることを特徴とする、請求項1~6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

ステップ(c)が、異種のプロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrPcとサンプル中に存在する感染性プリオンタンパク質PrPScとが非対称的な自発的相互作用を起こし、プロテアーゼ耐性プリオンタンパク質の凝集体を形成する条件下での、サンプルのインキュベーションを含むことを特徴とする、請求項1~7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

インキュベーションを20~55℃、特に35~50℃の温度で実施することを特徴とする、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

インキュベーションを少なくとも10分、特に10~240分の時間実施することを特徴とする、請求項8または9に記載の方法。

【請求項11】

ステップ(c)が実質的な生理条件下でのインキュベーションを含むことを特徴とする、請求項1~10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

ステップ(c)の前に超音波処理を実施することを特徴とする、請求項1~11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

1以上の増幅/インキュベーションサイクルを実施することを特徴とする、請求項1~12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

プロテイナーゼKをステップ(d)で、好ましくは50~100 µg/mlの濃度で用いることを特徴とする、請求項1~13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

ステップ(e)で定量的測定を実施することを特徴とする、請求項1~14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

ステップ(e)で免疫学的方法によって、特にウエスタンブロット法、またはサンドイッチアッセイ、特にサンドイッチELISA等のイムノアッセイによって、測定を実施することを特徴とする、請求項1~15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

特にヒト、家畜、農業動物および/または野生動物における、TSE疾患を診断するための、請求項1~16のいずれか1項に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP2004/006860
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68		
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) EPO-Internal, WPI 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 02/33420 A (GABIZON RUTH ; SHAKED GIDEON M (IL); HADASIT MEDICAL RES SERVICES A (I) 25 April 2002 (2002-04-25)	1-3,7,8, 10-12, 18, 20-23, 25,27
Y	page 16, paragraph 4 - page 17, paragraph 1; example 2	4-6,9, 13-17, 19,24,26
Y	WO 02/04954 A (SOTO CLAUDIO ; SABORIO GABRIELLA (FR); APPLIED RESEARCH SYSTEMS (NL)) 17 January 2002 (2002-01-17) cited in the application the whole document	4-6,9, 13-17, 19,24,26
-/--		
<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) *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 9 September 2004		Date of mailing of the International search report 29/09/2004
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 Diez Schlereth, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006860

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	C. I. LASMÉZAS ET AL: "Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein" SCIENCE, vol. 275, 1997, pages 402-405, XP002295670 the whole document -----	1-27
A	LUCASSEN R ET AL: "In vitro amplification of protease-resistant prion protein requires free sulfhydryl groups" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, US, vol. 42, no. 14, 15 April 2003 (2003-04-15), pages 4127-4135, XP002262517 ISSN: 0006-2960 the whole document -----	1-27
A	WO 03/001211 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; TATZELT JOERG (DE); HARTL ULRICH (DE); WINKL) 3 January 2003 (2003-01-03) the whole document -----	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/006860

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0233420	A	25-04-2002	AU 1264702 A	29-04-2002
			BR 0115131 A	13-01-2004
			CA 2426126 A1	25-04-2002
			EP 1328813 A2	23-07-2003
			WO 0233420 A2	25-04-2002
			JP 2004511809 T	15-04-2004
WO 0204954	A	17-01-2002	AU 6408901 A	21-01-2002
			BG 107498 A	28-11-2003
			BR 0112262 A	20-05-2003
			CA 2413078 A1	17-01-2002
			CN 1449497 T	15-10-2003
			CZ 20030036 A3	18-06-2003
			EE 200300005 A	16-08-2004
			EP 1299729 A2	09-04-2003
			WO 0204954 A2	17-01-2002
			HR 20030033 A2	29-02-2004
			HU 0301020 A2	28-07-2003
			JP 2004503748 T	05-02-2004
			NO 20030059 A	07-03-2003
			SK 18582002 A3	02-05-2003
ZA 200300878 A	09-02-2004			
WO 03001211	A	03-01-2003	WO 03001211 A1	03-01-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/006860

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RESEARCHIERTE 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) EPO-Internal, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02/33420 A (GABIZON RUTH ; SHAKED GIDEON M (IL); HADASIT MEDICAL RES SERVICES A (I) 25. April 2002 (2002-04-25)	1-3,7,8, 10-12, 18, 20-23, 25,27
Y	Seite 16, Absatz 4 - Seite 17, Absatz 1; Beispiel 2	4-6,9, 13-17, 19,24,26
Y	WO 02/04954 A (SOTO CLAUDIO ; SABORIO GABRIELLA (FR); APPLIED RESEARCH SYSTEMS (NL)) 17. Januar 2002 (2002-01-17) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	4-6,9, 13-17, 19,24,26
----- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/>	Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*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)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*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</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher 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</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche		Abschließdatum des Internationalen Recherchenberichts
9. September 2004		29/09/2004
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		Bevollmächtigter Beauftragter Diez Schlereth, D

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/006860

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	C. I. LASMÉZAS ET AL: "Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein" SCIENCE, Bd. 275, 1997, Seiten 402-405, XP002295670 das ganze Dokument	1-27
A	LUCASSEN R ET AL: "In vitro amplification of protease-resistant prion protein requires free sulfhydryl groups" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, US, Bd. 42, Nr. 14, 15. April 2003 (2003-04-15), Seiten 4127-4135, XP002262517 ISSN: 0006-2960 das ganze Dokument	1-27
A	WO 03/001211 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; TATZELT JOERG (DE); HARTL ULRICH (DE); WINKL) 3. Januar 2003 (2003-01-03) das ganze Dokument	1-27

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/006860

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0233420	A	25-04-2002	AU 1264702 A 29-04-2002
			BR 0115131 A 13-01-2004
			CA 2426126 A1 25-04-2002
			EP 1328813 A2 23-07-2003
			WO 0233420 A2 25-04-2002
			JP 2004511809 T 15-04-2004
WO 0204954	A	17-01-2002	AU 6408901 A 21-01-2002
			BG 107498 A 28-11-2003
			BR 0112262 A 20-05-2003
			CA 2413078 A1 17-01-2002
			CN 1449497 T 15-10-2003
			CZ 20030036 A3 18-06-2003
			EE 200300005 A 16-08-2004
			EP 1299729 A2 09-04-2003
			WO 0204954 A2 17-01-2002
			HR 20030033 A2 29-02-2004
			HU 0301020 A2 28-07-2003
			JP 2004503748 T 05-02-2004
			NO 20030059 A 07-03-2003
			SK 18582002 A3 02-05-2003
			ZA 200300878 A 09-02-2004
WO 03001211	A	03-01-2003	WO 03001211 A1 03-01-2003

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, IT, LU, 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, 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, NA, 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

(72)発明者 ガッスナー, ディーター

ドイツ連邦共和国 8 2 3 8 0 ペイツェンベルク, アム タールフェルト 5

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ03 QQ08 QQ79 QR16 QR48 QR52 QR66 QR77 QS10
QS12 QS16 QS28 QS36 QX02

专利名称(译)	通过不对称自发相互作用检测蛋白酶抗性朊蛋白		
公开(公告)号	JP2009513927A	公开(公告)日	2009-04-02
申请号	JP2006516051	申请日	2004-06-24
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ガッスナー, デイター		
发明人	ガッスナー, デイター		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/561 C12Q1/37 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2800/2828		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.501.D G01N33/561 C12Q1/37		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR16 4B063/QR48 4B063/QR52 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QS10 4B063/QS12 4B063/QS16 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	10328830 2003-06-26 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开的是提高灵敏度，用于检测传染性朊病毒蛋白的方法。对于A为此，当加入到样品计划调查非致病性蛋白酶敏感的朊病毒蛋白朊蛋白异构，感染朊病毒蛋白的PrPSc是存在于样品中，非对称自愿相互由动作以转换为蛋白酶抗性朊病毒聚集体。技术领域

サンプル	1	2
2	0.1050	0.0940
3	2.0460	1.9860
4	1.8970	1.9320
5	1.9730	1.9830
6	1.8630	1.9180
7	1.4550	1.4790
8	1.4090	1.4680
9	0.0730	0.0770
10	0.7600	0.8020
11	0.7570	0.7680
12	0.7550	0.8200
13	0.8050	0.8030
14	0.7120	0.7530
15	0.6480	0.7430
16	0.6870	0.7710
17	0.7820	0.7390