

(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2011-520108

(P2011-520108A)

(43) 公表日 平成23年7月14日(2011.7.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/566 (2006.01)	GO 1 N 33/566	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
	GO 1 N 33/543 5 1 1 N	
	GO 1 N 33/543 5 0 1 N	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 136 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-507627 (P2011-507627)
 (86) (22) 出願日 平成21年4月29日 (2009. 4. 29)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年12月17日 (2010. 12. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/042185
 (87) 国際公開番号 W02009/134942
 (87) 国際公開日 平成21年11月5日 (2009. 11. 5)
 (31) 優先権主張番号 61/049, 396
 (32) 優先日 平成20年4月30日 (2008. 4. 30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
 35
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 ペレッツ, デイビッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
 62-8097, エミリービル, ピー
 . オー. ボックス 8097

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 病原性配座異性体についてのアクセイ

(57) 【要約】

本発明は、非プリオン病原性配座異性体を含有することが疑われる試料に病原性配座異性体特異的結合試薬を、存在するならば病原性配座異性体に試薬を結合させる条件下で接触させるステップと；試料中に病原性配座異性体がある場合、試薬へのその結合によって病原性配座異性体の存在を検出するステップと；によって、試料中の非プリオン病原性配座異性体の存在を検出する方法を提供し、病原性配座異性体特異的結合試薬は通例プリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する。コンフォメーション病を診断する方法も提供される。

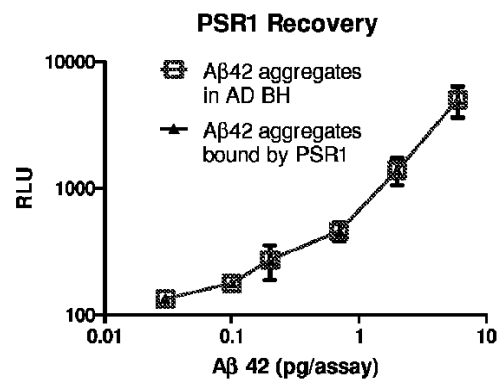


FIGURE 16

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非プリオン病原性配座異性体の存在を検出する方法であって、

前記非プリオン病原性配座異性体を含有することが疑われる試料に病原性配座異性体特異的結合試薬を、存在するならば前記非プリオン病原性配座異性体への前記試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；

前記試料中に前記非プリオン病原性配座異性体がある場合、前記病原性配座異性体特異的結合試薬へのその結合によって前記非プリオン病原性配座異性体を検出するステップと；

を含み、前記病原性配座異性体特異的結合試薬がプリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する、方法。

10

【請求項 2】

前記非プリオン病原性配座異性体がアミロイド疾患に関連する配座異性体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記アミロイド疾患が全身性アミロイドーシス、タウオパチー、およびシヌクレイノパチーから成る群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記非プリオン病原性配座異性体が、アルツハイマー病、ALS、免疫グロブリン関連疾患、血清アミロイド A 関連疾患、および I I 型糖尿病から成る群より選択される疾患に関連する配座異性体である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記非プリオン病原性配座異性体がアルツハイマー病配座異性体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記アルツハイマー病配座異性体がアミロイドベータ (A) タンパク質である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

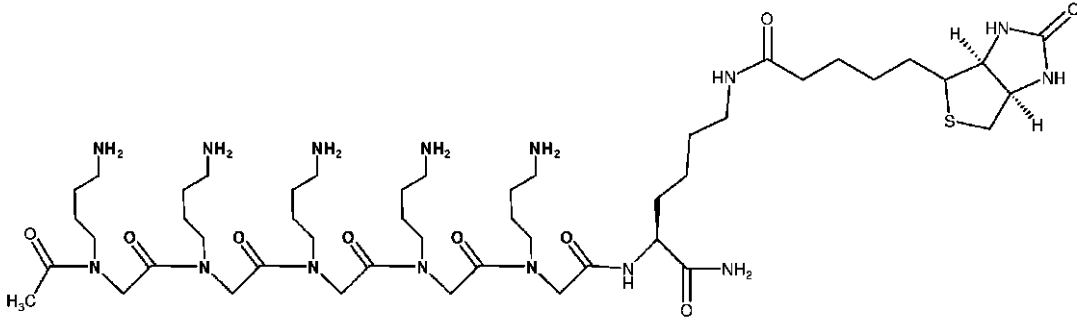
前記アルツハイマー病配座異性体がタウタンパク質である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記病原性配座異性体特異的結合試薬が、PrP₁₉₋₃₀ (配列番号 242)、PrP₂₃₋₃₀ (配列番号 243)、PrP₁₀₀₋₁₁₁ (配列番号 244)、PrP₁₀₁₋₁₁₀ (配列番号 245)、PrP₁₅₄₋₁₆₅ (配列番号 246)、PrP₂₂₆₋₂₃₇ (配列番号 247)、配列番号 14、配列番号 50、配列番号 68、

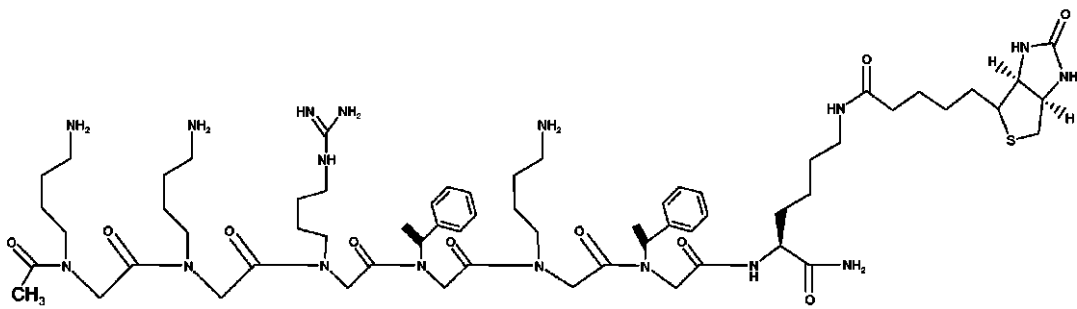
30

【化 3 5】



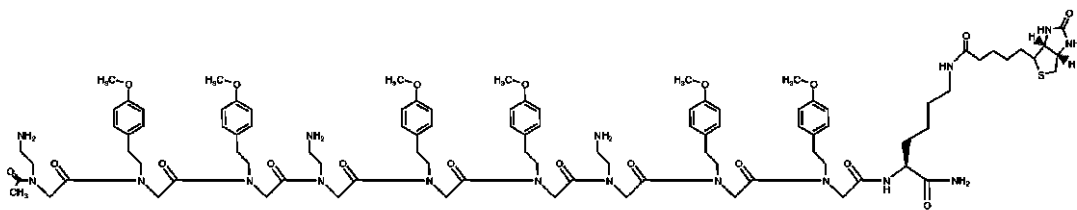
10

I



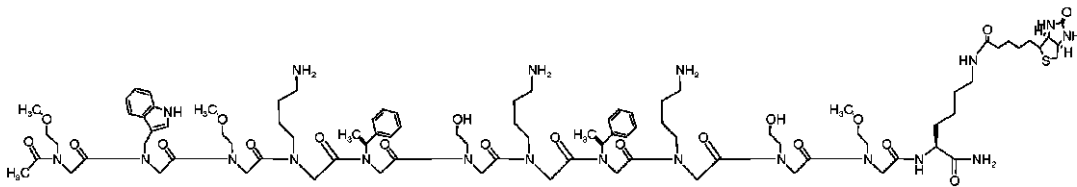
20

II



30

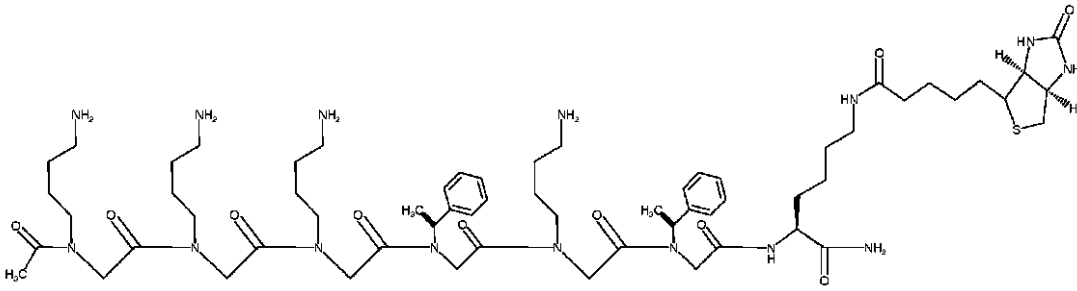
III



40

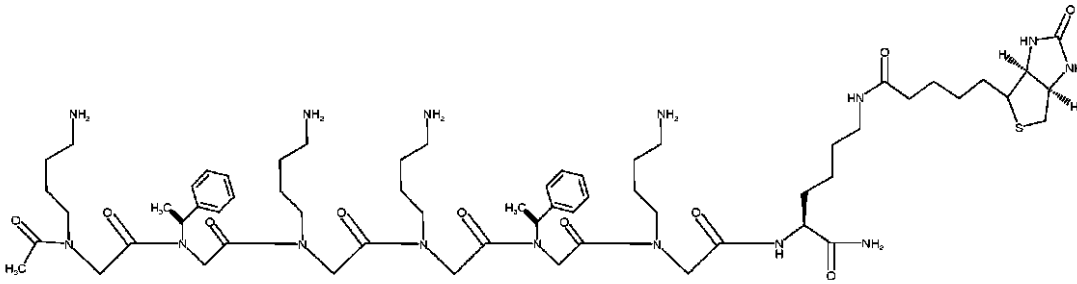
IV

【化 3 7】



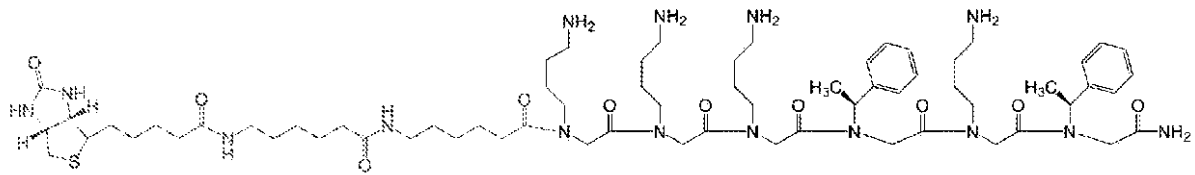
IX

10



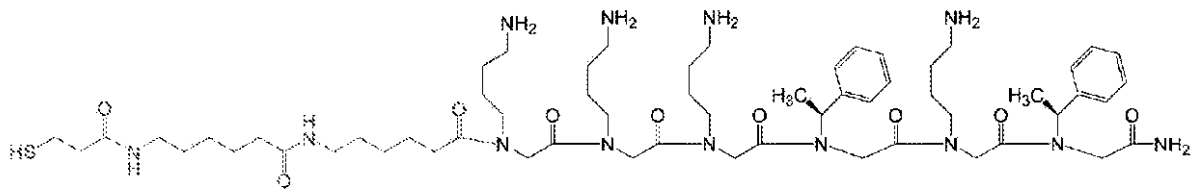
X

20



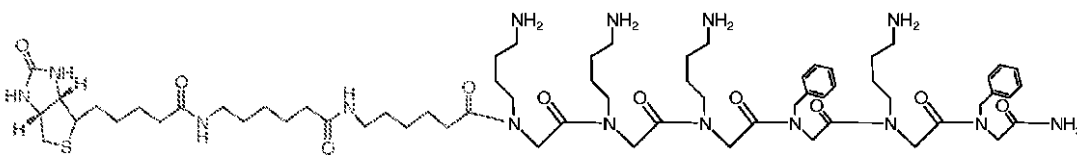
XI A

30



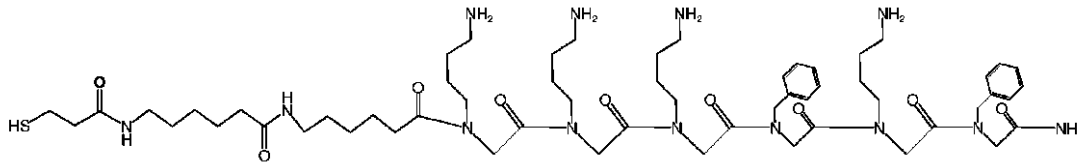
XI B

40



XIII A

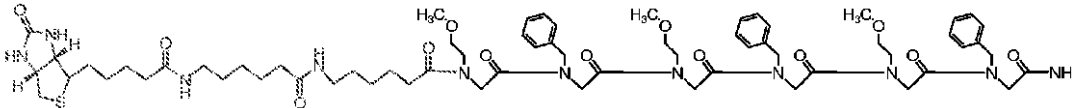
【化 3 8】



XII B

および

10



XIII

から成る群より選択される化合物に由来する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

20

前記試料が、器官、全血、血液画分、血液成分、血漿、血小板、血清、脳脊髄液 (CSF)、脳組織、神経系組織、筋肉組織、骨髓、尿、涙、非神経系組織、生検または剖検から成る群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記試料が血漿または脳脊髄液を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記プリオンタンパク質断片が PrP₁₉₋₃₀ (配列番号 242)、PrP₂₃₋₃₀ (配列番号 243)、PrP₁₀₀₋₁₁₁ (配列番号 244)、PrP₁₀₁₋₁₁₀ (配列番号 245)、PrP₁₅₄₋₁₆₅ (配列番号 246)、PrP₂₂₆₋₂₃₇ (配列番号 247)、配列番号 14、配列番号 50 および配列番号 68 から成るペプチド

30

の群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記プリオンタンパク質断片が、PrP₁₉₋₃₀ (配列番号 242)、PrP₂₃₋₃₀ (配列番号 243)、PrP₁₀₀₋₁₁₁ (配列番号 244)、PrP₁₀₁₋₁₁₀ (配列番号 245)、配列番号 14、配列番号 50 および配列番号 68 から成る群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記病原性配座異性体特異的結合試薬が、配列番号 242、配列番号 243、配列番号 244、配列番号 245、配列番号 246、配列番号 247、配列番号 14、配列番号 50 および配列番号 68 から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記病原性配座異性体特異的結合試薬が、配列番号 242、配列番号 243、配列番号 244、配列番号 245、配列番号 14、配列番号 50 および配列番号 68 から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記病原性配座異性体特異的結合試薬が、

(a) 配列番号 229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、または 241；

(b) 配列番号 229、230、232、233、237、238、239、または 2

50

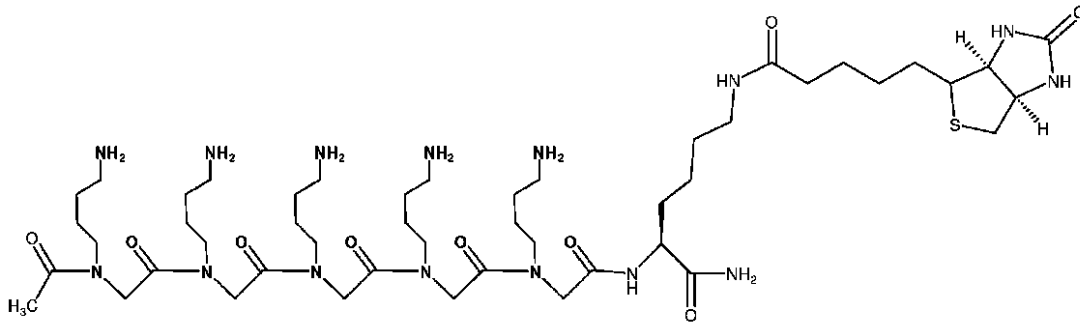
40 ;

(c) 配列番号 230、237、238、239、または 240 ;

(d) 配列番号 240 ;

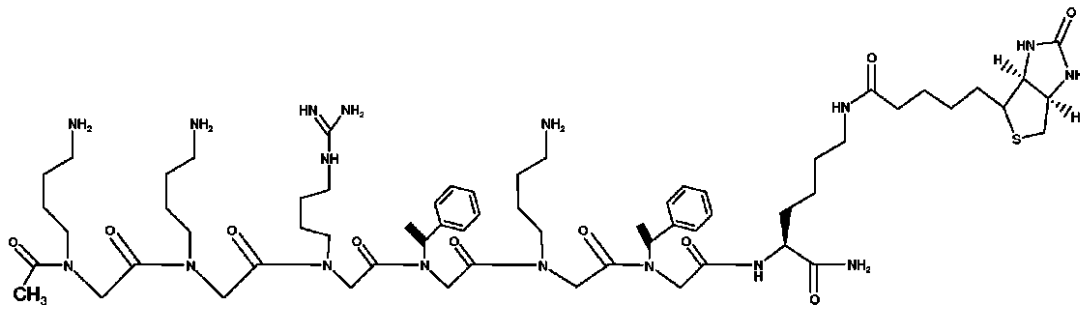
(e)

【化 39】



10

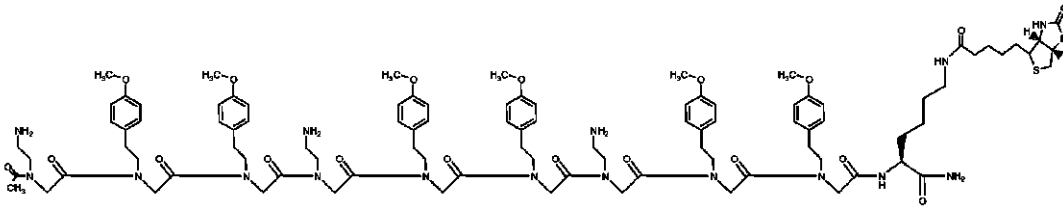
I



20

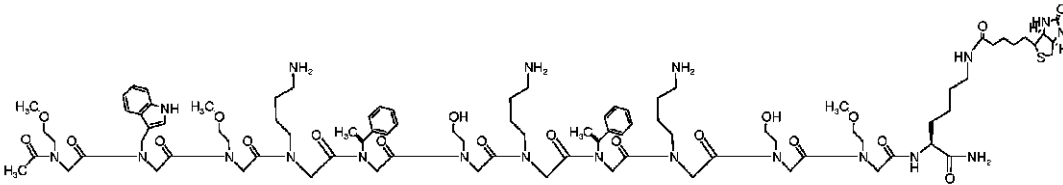
II

【化 4 0】



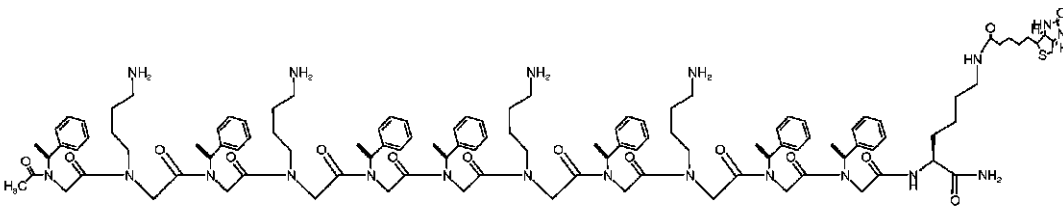
III

10



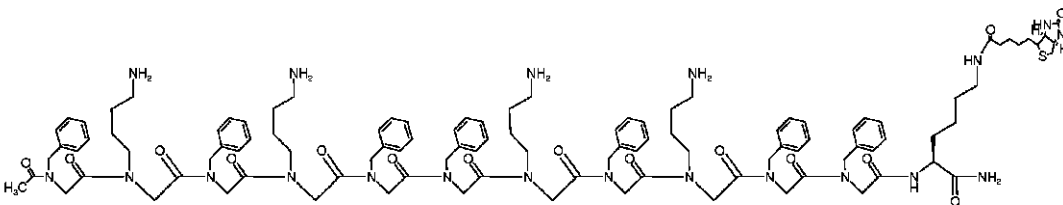
IV

20



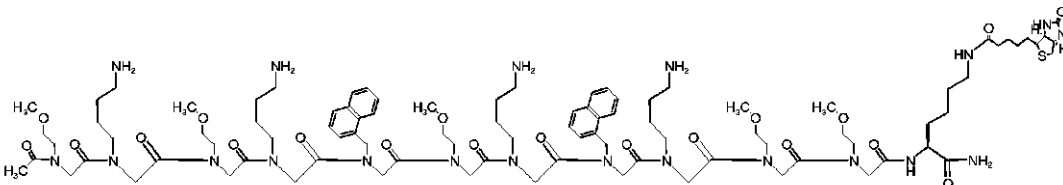
V

30



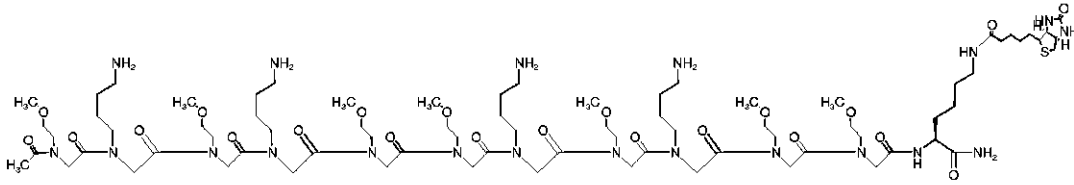
VI

40



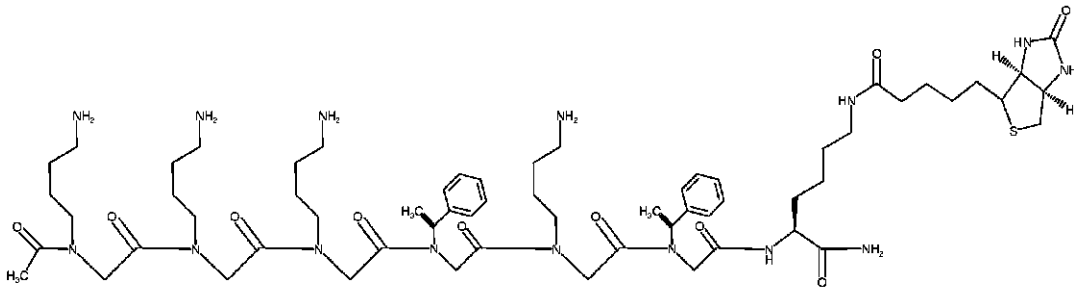
VII

【化 4 1】



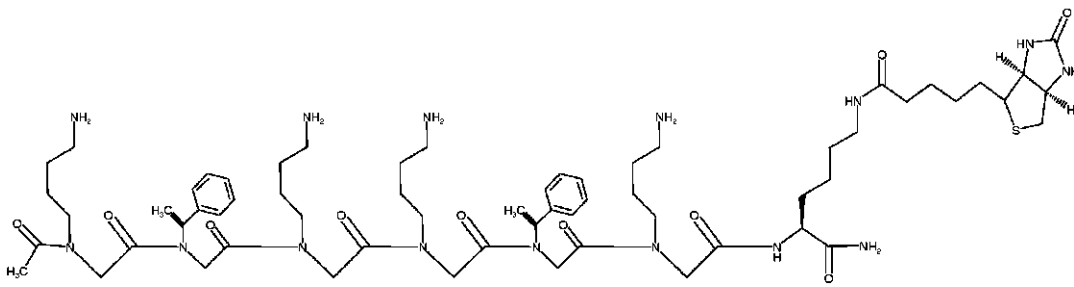
VIII

10



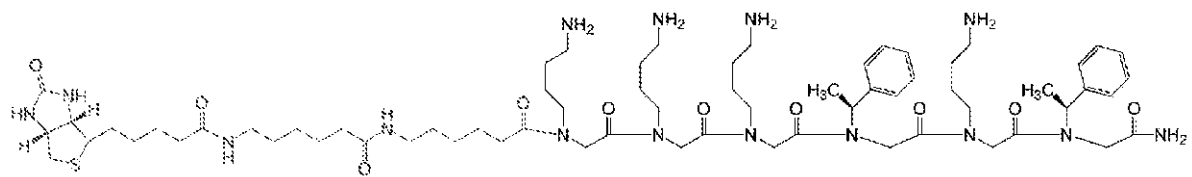
IX

20



X

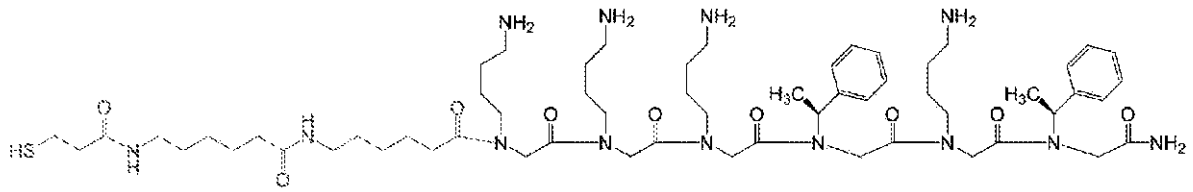
30



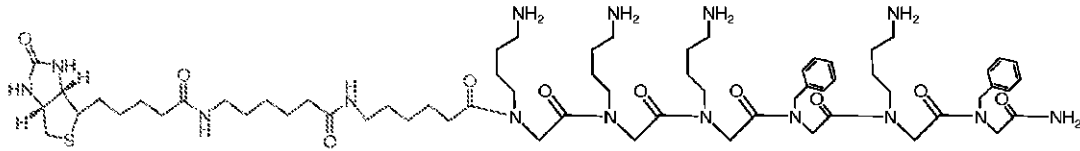
XI A

40

【化 4 2】

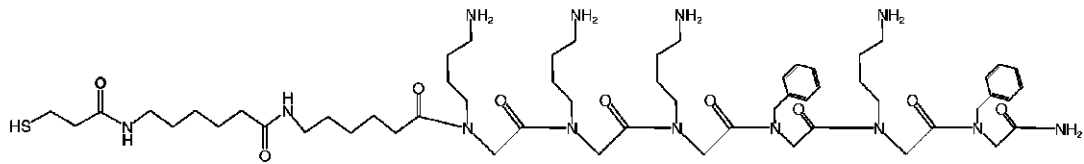


XI B



XIII A

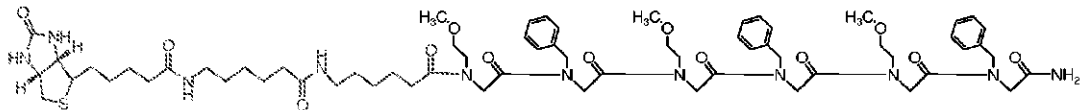
10



XI B

20

または

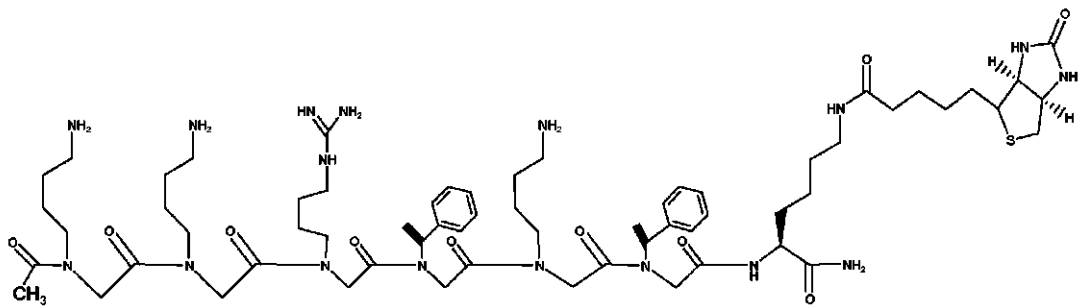


XIII

30

および

(f)

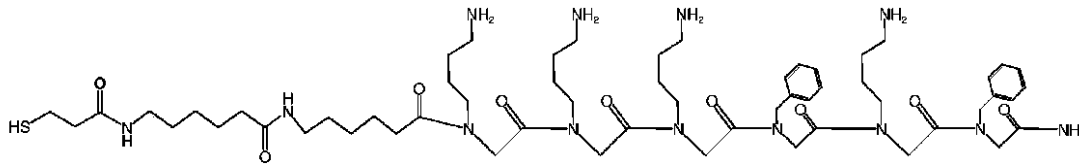


II

40

【化 4 4】

または



XIIB

10

から成る群より選択されるペプチド試薬を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記病原性配座異性体特異的結合試薬が生理学的 pH において少なくとも 3 の正味の正電荷を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記試薬が生理学的 pH において少なくとも 4 の正味の正電荷を有する、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記病原性配座異性体特異的結合試薬が検出可能に標識される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 19】

前記試薬がビオチンによって検出可能に標識される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記試薬が固体担体に結合される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 21】

前記固体担体が、ニトロセルロース、ポリスチレンラテックス、ポリフッ化ビニル、ジアゾ化紙、ナイロン膜、活性化ビーズ、および磁気応答性ビーズから成る群より選択される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

非プリオン病原性配座異性体の存在を検出する方法であって、

30

前記非プリオン病原性配座異性体を含むことが疑われる試料に病原性配座異性体特異的結合試薬を、存在するならば前記非プリオン病原性配座異性体への前記試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；

前記複合体にコンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬を、結合を可能にする条件下で接触させるステップと；

前記試料中に前記非プリオン病原性配座異性体がある場合、前記コンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬へのその結合によって、前記非プリオン病原性配座異性体の存在を検出するステップと；

を含み、前記病原性配座異性体特異的結合試薬がプリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する、方法。

40

【請求項 23】

前記方法が、前記複合体の形成後に非結合試料物質を除去するステップをさらに含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記コンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬が標識抗体である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

前記非プリオン病原性配座異性体が A タンパク質であり、前記コンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬が抗 A 抗体である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 26】

50

非プリオン病原性配座異性体の存在を検出する方法であって、

前記非プリオン病原性配座異性体を含有することが疑われる試料に病原性配座異性体特異的結合試薬を、存在するならば前記非プリオン病原性配座異性体への前記試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、第1の複合体を形成するステップと；

非結合試料物質を除去するステップと；

前記非プリオン病原性配座異性体を前記第1の複合体から解離させて、それにより解離された非プリオン病原性配座異性体を提供するステップと；

前記解離された非プリオン病原性配座異性体に第1のコンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬を、結合を可能にする条件下で接触させて、第2の複合体を形成するステップと；

前記試料中に前記非プリオン病原性配座異性体がある場合、前記第2の複合体の形成を検出することによって、前記非プリオン病原性配座異性体の存在を検出するステップと；
を含み、前記病原性配座異性体特異的結合試薬がプリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する、方法。

【請求項27】

前記第2の複合体の形成が、検出可能に標識された第2のコンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬を使用することによって検出される、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記病原性配座異性体特異的試薬が固体担体にカップリングされる、請求項26に記載の方法。

【請求項29】

前記第1のコンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬が固体担体にカップリングされる、請求項26に記載の方法。

【請求項30】

前記非プリオン病原性配座異性体が、前記第1の複合体をチオシアン酸グアニジンに曝露することによって、前記第1の複合体から解離される、請求項26に記載の方法。

【請求項31】

前記非プリオン病原性配座異性体が、前記複合体を高pHまたは低pHに曝露することによって、前記第1の複合体から解離される、請求項26に記載の方法。

【請求項32】

前記解離後に高pHまたは低pHを中和するステップをさらに含む、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

前記非プリオン病原性配座異性体がAタンパク質であり、前記コンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬が抗A抗体である、請求項26に記載の方法。

【請求項34】

前記Aタンパク質が、前記複合体を高pH条件に曝露することによって、前記第1の複合体から解離される、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

前記高pH条件が約80にて約0.1N NaOHである、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

非プリオン病原性配座異性体の存在を検出する方法であって、

前記非プリオン病原性配座異性体を含有することが疑われる試料に第1の病原性配座異性体特異的結合試薬を、存在するならば前記非プリオン病原性配座異性体への前記第1の試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、第1の複合体を形成するステップと；

前記非プリオン病原性配座異性体を含有することが疑われる前記試料に、検出可能な標識を含む第2の病原性配座異性体特異的結合試薬を、前記第1の複合体中の前記非プリオン病原性配座異性体への前記第2の試薬の結合を可能にする条件下で接触させるステップと；

試料中に前記非プリオン病原性配座異性体がある場合、前記第2の試薬へのその結合に

10

20

30

40

50

よって、前記非プリオン病原性配座異性体を検出するステップと；
 を含み、前記第1および第2の病原性配座異性体特異的結合試薬がプリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する、方法。

【請求項37】

非プリオン病原性配座異性体の存在を検出する方法であって、

(a) 前記非プリオン病原性配座異性体を含有することが疑われる試料にコンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬を、存在するならば前記非プリオン病原性配座異性体への前記試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；

(b) 非結合試料物質を除去するステップと；

(c) 前記複合体に、検出可能な標識を含む病原性配座異性体特異的結合試薬を、前記非プリオン病原性配座異性体への前記病原性配座異性体特異的結合試薬の結合を可能にする条件下で接触させるステップと；

前記試料中に前記非プリオン病原性配座異性体がある場合、前記病原性配座異性体特異的結合試薬へのその結合によって、前記非プリオン病原性配座異性体を検出するステップと；

を含み、前記病原性配座異性体特異的結合試薬がプリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する、方法。

【請求項38】

非プリオン病原性配座異性体の存在を検出する方法であって、

病原性配座異性体特異的結合試薬を含む固体担体を提供するステップと；

前記固体担体に検出可能に標識されたりガンドを結合させるステップであって、前記病原性配座異性体特異的結合試薬の前記検出可能に標識されたりガンドに対する結合親和性は、前記試薬の前記非プリオン病原性配座異性体に対する結合親和性よりも弱い、ステップと；

試料に前記固体担体を、前記試料中に存在するときに前記非プリオン病原性配座異性体が前記試薬に結合して前記リガンドを置換するのを可能にする条件下で、結合させるステップと；

前記試薬と前記試料からの前記非プリオン病原性配座異性体との間に形成された複合体を検出するステップと；

を含み、前記病原性配座異性体特異的結合試薬がプリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する、方法。

【請求項39】

非プリオン病原性配座異性体と非プリオン非病原性配座異性体とを区別する方法であって、

前記非プリオン病原性配座異性体を含有することが疑われる試料に病原性配座異性体特異的結合試薬を、存在するならば前記非プリオン病原性配座異性体への前記試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；

前記病原性配座異性体の前記試薬への結合によって、前記非プリオン病原性配座異性体と前記非プリオン非病原性配座異性体とを区別するステップと；

を含み、前記病原性配座異性体特異的結合試薬がプリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する、方法。

【請求項40】

非プリオンコンフォメーション病を診断する方法であって、

非プリオン病原性配座異性体を含有することが疑われる試料に病原性配座異性体特異的結合試薬を、存在するならば前記非プリオン病原性配座異性体への前記試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；

前記試料中に前記非プリオン病原性配座異性体がある場合、前記試薬へのその結合によって、前記非プリオン病原性配座異性体を検出するステップと；

前記非プリオン病原性配座異性体が検出された場合にコンフォメーション病を診断するステップと；

10

20

30

40

50

を含み、前記病原性配座異性体特異的結合試薬がプリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する、方法。

【請求項 4 1】

非プリオン病原性配座異性体の存在を検出する方法であって、

前記非プリオン病原性配座異性体を含有することが疑われる試料に病原性配座異性体特異的結合試薬を、存在するならば前記非プリオン病原性配座異性体への前記試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；

前記試料中に前記非プリオン病原性配座異性体がある場合、前記病原性配座異性体特異的結合試薬へのその結合によって前記非プリオン病原性配座異性体を検出するステップと；

を含み、前記病原性配座異性体特異的結合試薬が配列番号 2 2 9、2 3 0、2 3 1、2 3 2、2 3 3、2 3 4、2 3 5、2 3 6、2 3 7、2 3 8、2 3 9、2 4 0、または 2 4 1 を含むペプチド領域を含む、方法。

【請求項 4 2】

非プリオン病原性配座異性体の存在を検出する方法であって、

前記非プリオン病原性配座異性体を含有することが疑われる試料に病原性配座異性体特異的結合試薬を、存在するならば前記非プリオン病原性配座異性体への前記試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；

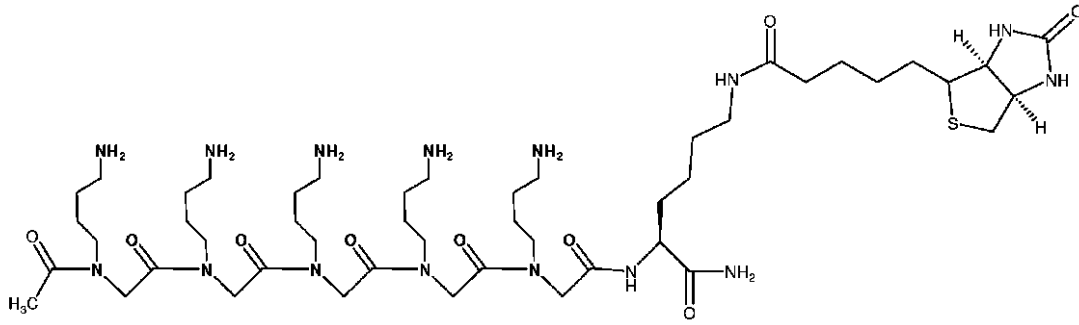
前記試料中に前記非プリオン病原性配座異性体がある場合、前記病原性配座異性体特異的結合試薬へのその結合によって前記非プリオン病原性配座異性体を検出するステップと；

を含み、前記病原性配座異性体特異的結合試薬が、

10

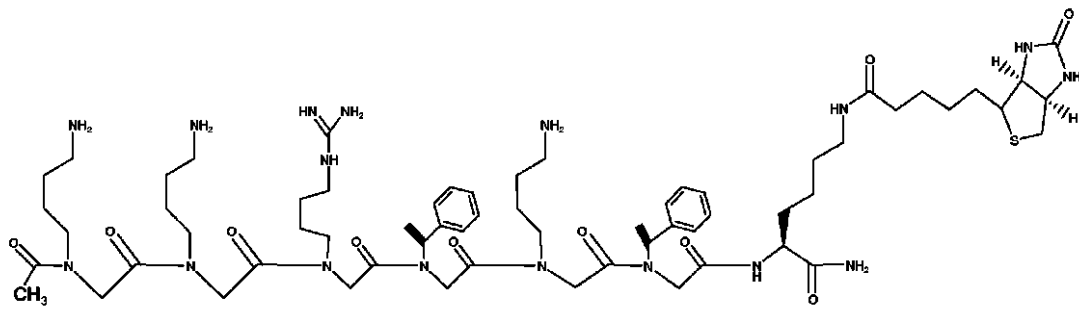
20

【化 4 5】



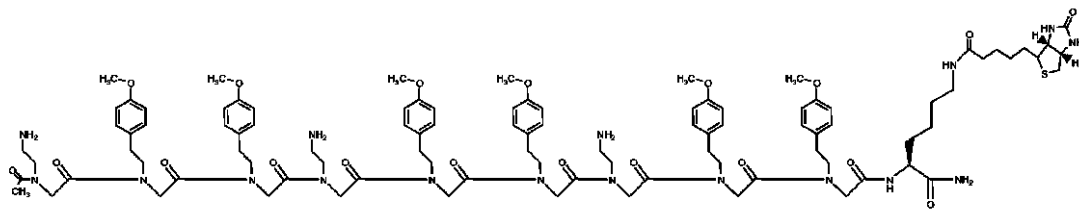
10

I



20

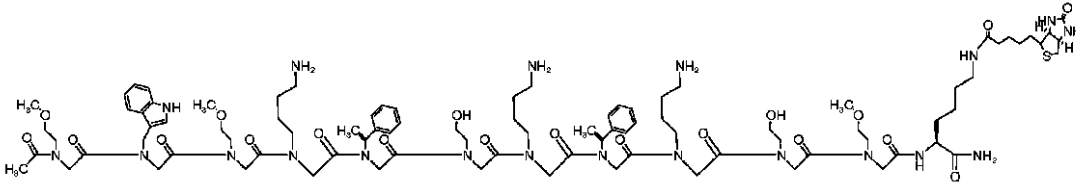
II



30

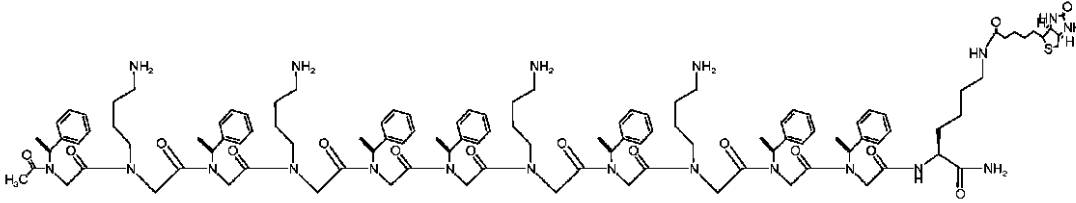
III

【化 4 6】



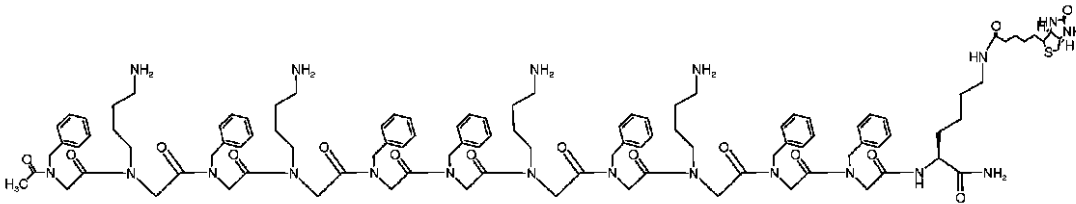
IV

10



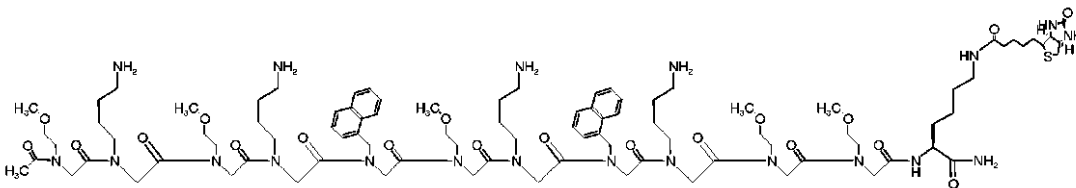
V

20



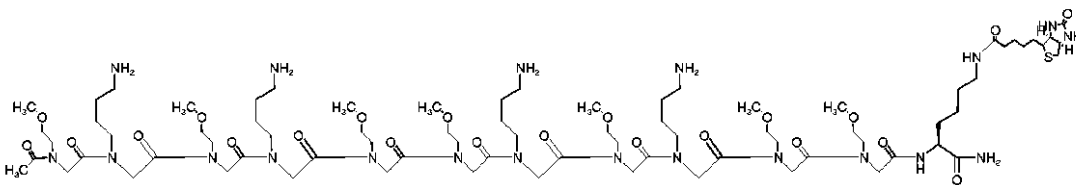
VI

30



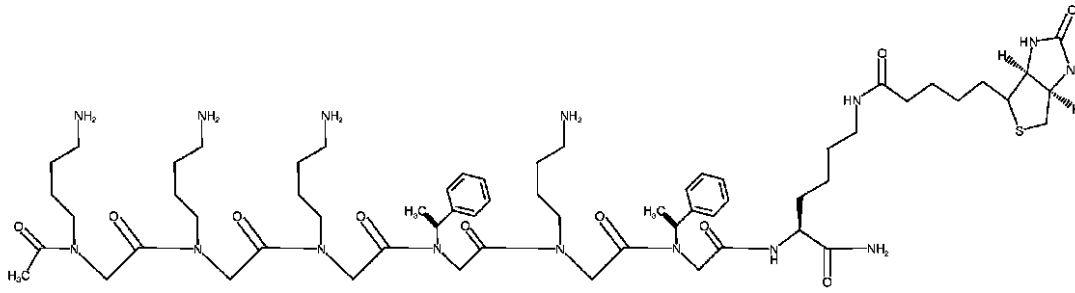
VII

40



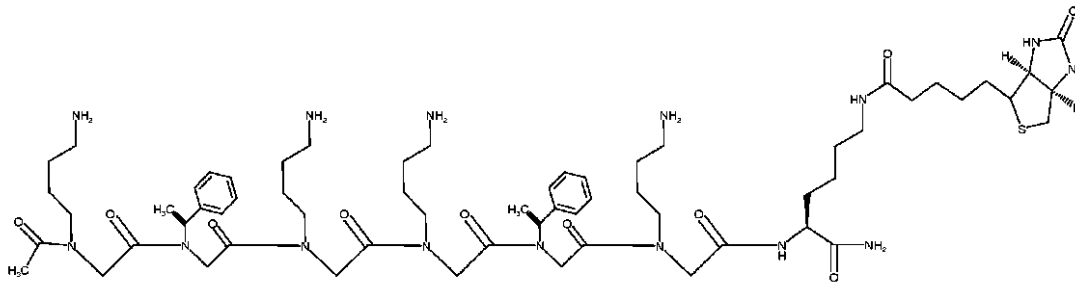
VIII

【化 4 7】



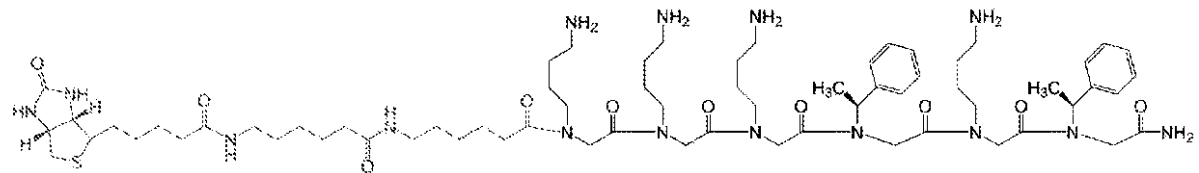
10

IX



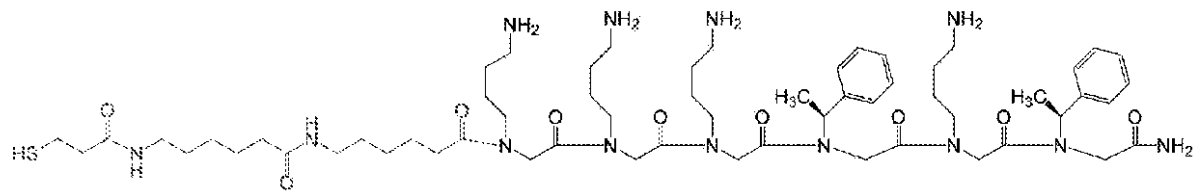
20

X



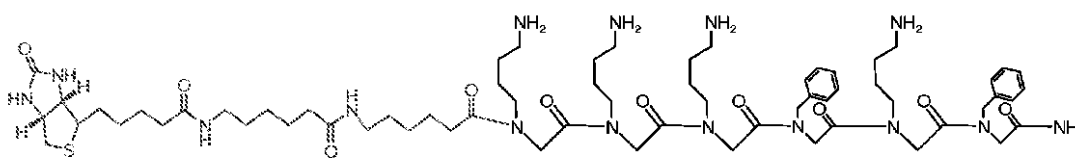
30

XI A



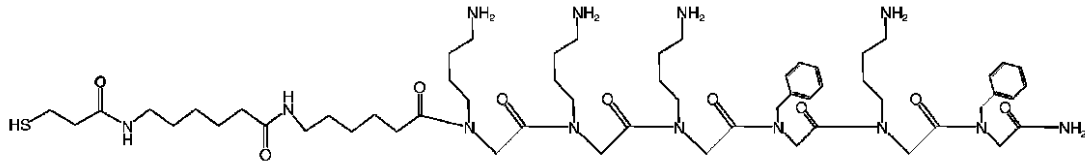
40

XI B



XIII A

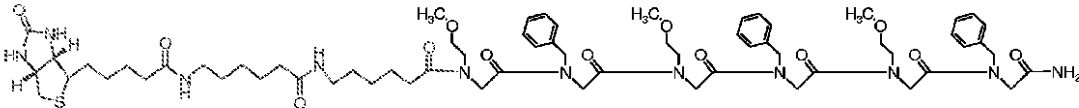
【化 4 8】



XIIB

および

10



XIII

から選択される、方法。

【請求項 4 3】

病原性アルツハイマー病配座異性体の存在を検出する方法であって、

20

前記病原性アルツハイマー病配座異性体を含有することが疑われる試料に病原性配座異性体特異的結合試薬を、存在するならば前記病原性アルツハイマー病配座異性体への前記試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；

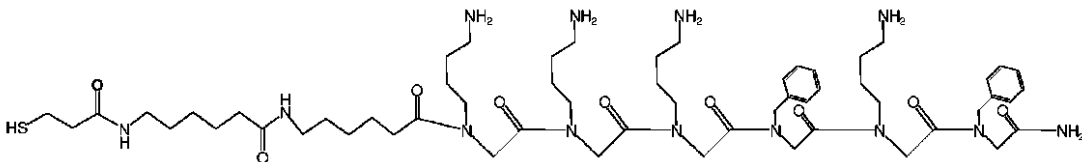
前記複合体にコンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬を、結合を可能にする条件下で接触させるステップと；

前記試料中に前記病原性アルツハイマー病配座異性体がある場合、前記コンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬へのその結合によって、前記病原性アルツハイマー病配座異性体の存在を検出するステップと；

を含み、前記病原性配座異性体特異的結合試薬が

【化 4 9】

30



である、方法。

【請求項 4 4】

前記病原性アルツハイマー病配座異性体が A タンパク質であり、前記コンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬が抗 A 抗体である、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

40

前記病原性アルツハイマー病配座異性体がタウタンパク質であり、前記コンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬が抗タウ抗体である、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記病原性配座異性体特異的結合試薬が磁気ビーズにカップリングされる、請求項 4 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願への相互参照)

この出願は、2008年4月30日に提出された米国仮出願番号第61/049,399

50

6号の利益を主張し、上記仮出願の内容は、その全容が参照によって本明細書に援用される。

【背景技術】

【0002】

(背景)

タンパク質コンフォメーション病は、正常タンパク質の病原性配座異性体への異常なコンフォメーション変化から生じる多種多様の臨床的に関連のない疾患、たとえば伝染性海綿状脳症、アルツハイマー病、ALS、および糖尿病を含む。この変化は次に、病原性配座異性体の自己会合とその結果として起こる組織沈着を生じる可能性があり、周囲組織の損傷を生じることが仮定されている。これらの疾患は、臨床症状の類似点、通例は、様々な長さの潜伏期の後の診断から死亡までの急速な進行を共有する。

10

【0003】

生存している被験体中および生存している被験体から採取した試料中のコンフォメーション病タンパク質の病原性配座異性体の検出は、困難であることが判明している。生存している患者の病原性配座異性体の存在を確認する現在の技法は、未完成で侵襲的である。たとえば組織病理学的検査には、被験体にとって危険な生検が必要である。組織病理学は本質的に病変としてサンプリング誤差を受けやすく、アミロイド沈着は、生検が採取された範囲に応じて消失する可能性がある。それゆえ、被験体の死亡前のこれらの状態についての確定診断および対症処置は、実質的に対処されていない課題のままである。

【0004】

アミロイドベータタンパク質(A_β)凝集体、主にA_β1-40(A_β40)および1-42(A_β42)の沈着は、アルツハイマー病(AD)に完全に関連しており、疾患に対して判断基準となるマーカーと見なされる。しかし、ADの唯一の決定的な試験は、死後脳試料からのA_βプラークの免疫組織化学染色である。現在、ADのFDA承認死前診断試験はない。血漿またはCSF試料は、死前試験に使用することができる。いくつかの死前AD試験は、脳脊髄液(CSF)に焦点を合わせており、溶解性A_β42の定量を試みている。しかし、このバイオマーカーは、ADの間接測定としてのみ役立つ。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

凝集A_βをCSFまたは血漿などの他の体液から直接特異的に検出できる試験は、大きな利点を有する。凝集A_βの早期検出によって、アルツハイマー病のより迅速でより効率的な診断および潜在的療法の評価が可能となる。

30

【0006】

他のコンフォメーション病タンパク質の病原性配座異性体を検出できる試験も、それによってこれらのコンフォメーション病のより迅速でより効率的な診断および潜在的療法の評価も可能となるため、望ましい。

【課題を解決するための手段】

【0007】

(好ましい実施形態の簡潔な概要)

本発明は、一部は、病原性プリオンタンパク質および他の非プリオン病原性配座異性体の両方と優先的に相互作用する病原性配座異性体特異的結合試薬に関する。いくつかの実施形態において、PCSB試薬はPrP19-30(配列番号242)、PrP23-30(配列番号243)、PrP100-111(配列番号244)、PrP101-110(配列番号245)、PrP154-165(配列番号246)およびPrP226-237(配列番号247)などのプリオンタンパク質断片に由来する。他の実施形態において、病原性配座異性体特異的結合試薬は：配列番号242、配列番号243、配列番号244、配列番号245、配列番号246および配列番号247のアミノ酸配列を有する。

40

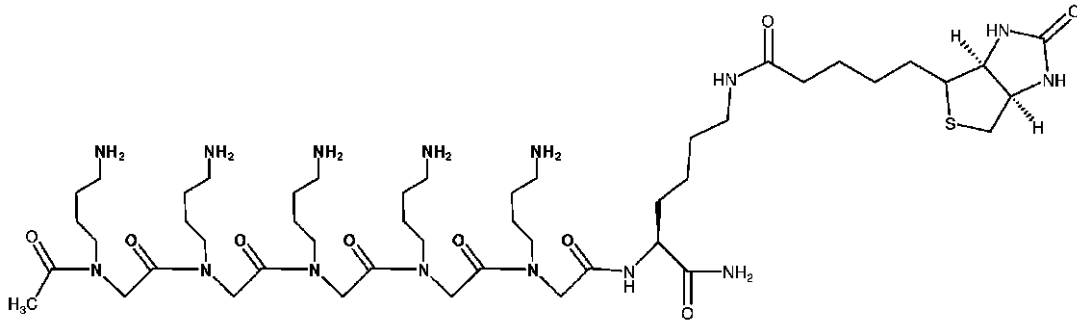
【0008】

50

他の実施形態において、PCSB試薬は、プリオンタンパク質断片のペプチド類似体である。いくつかの実施形態において、ペプチド類似体は、以下の構造：

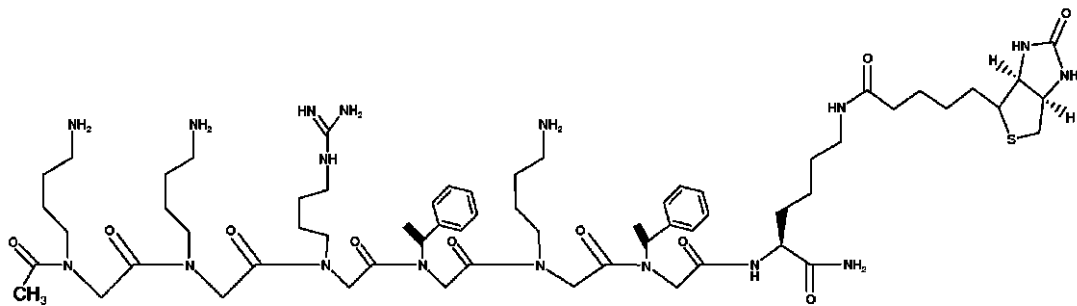
【0009】

【化1】



10

I

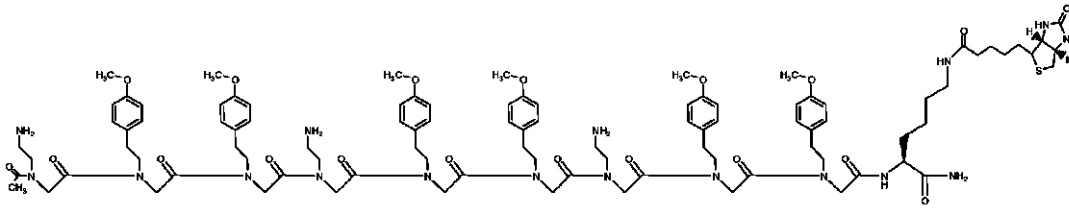


20

II

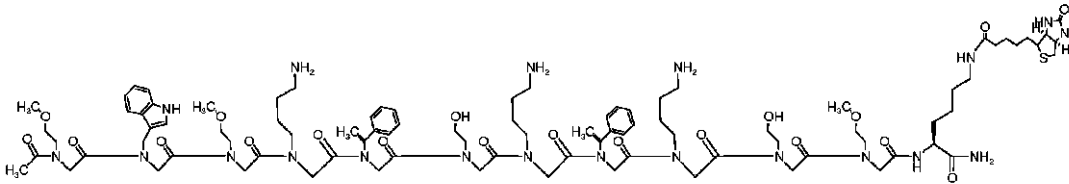
【0010】

【化 2】



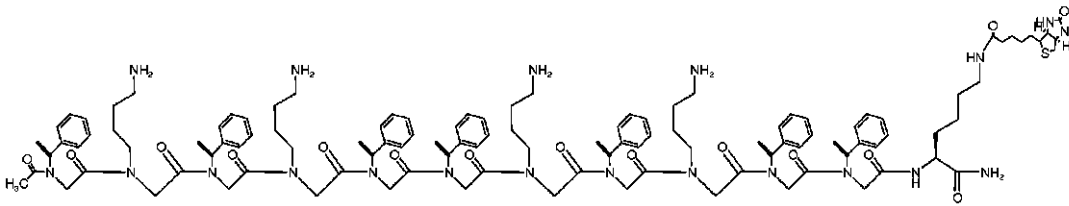
III

10



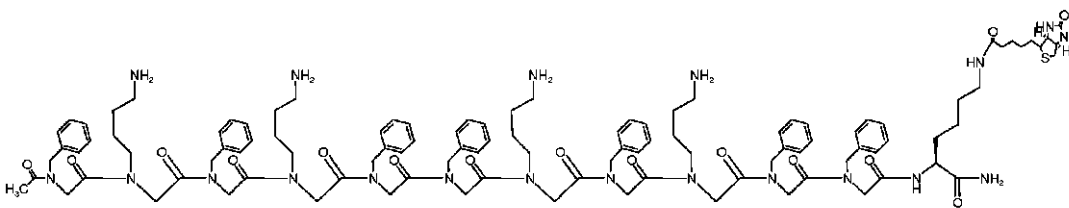
IV

20



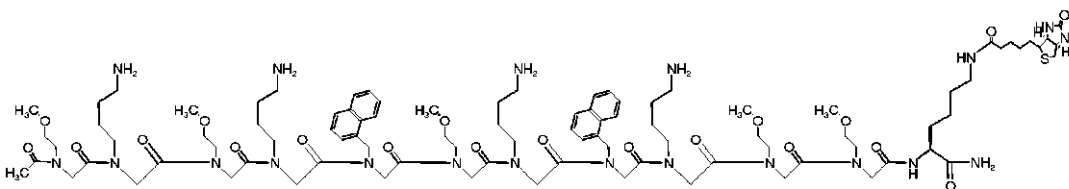
V

30



VI

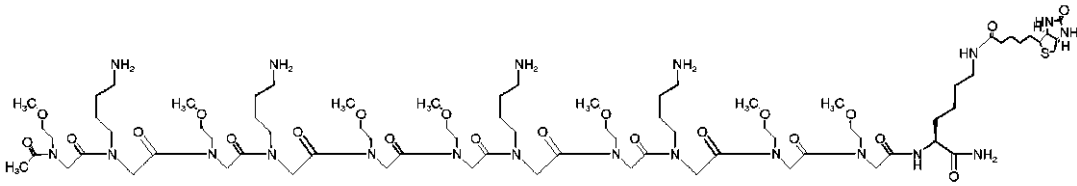
40



VII

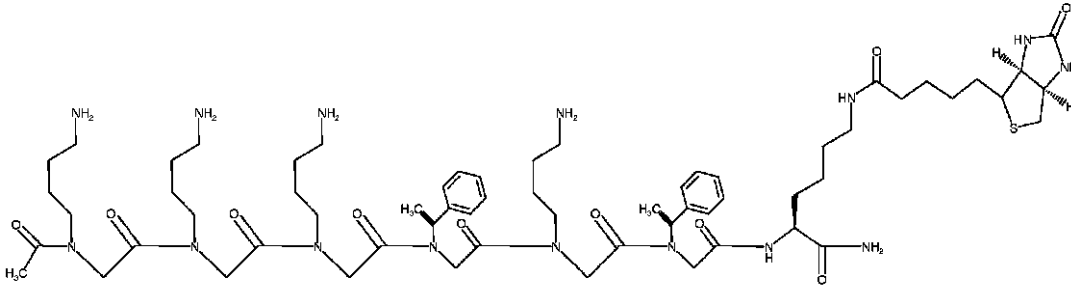
【 0 0 1 1 】

【化3】



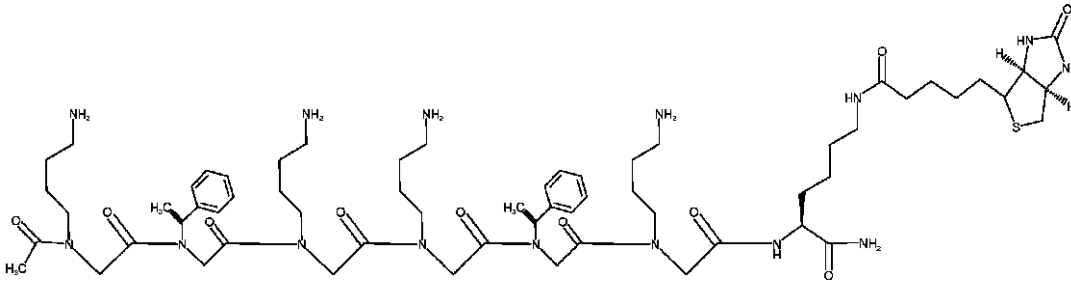
VIII

10



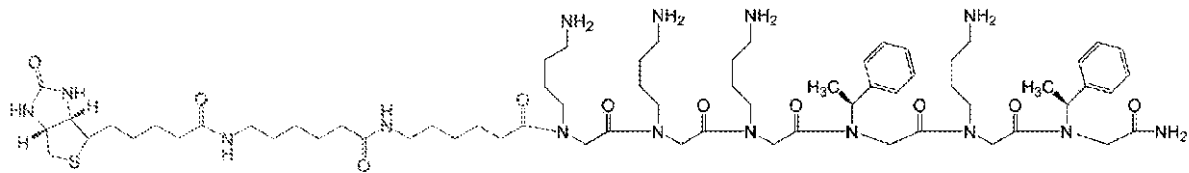
IX

20



X

30

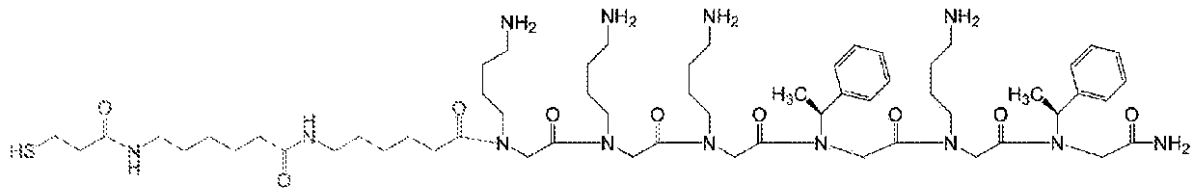


XI

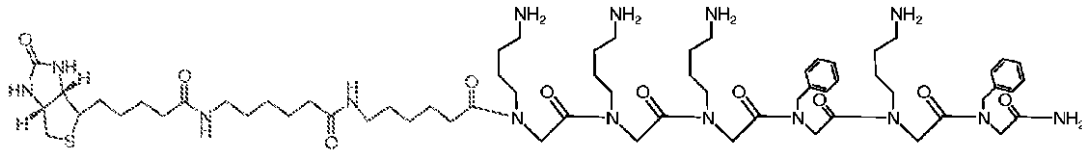
40

【0012】

【化4】

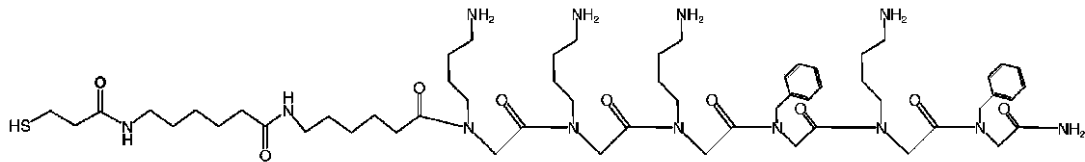


XI B



XI A

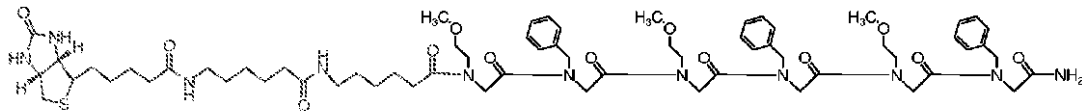
10



XI B

20

または



XIII

30

の1つを有する。

【0013】

好ましい実施形態において、病原性配座異性体特異的結合試薬は、生理学的 pH において少なくとも3の、または生理学的 pH において少なくとも4の正味の正電荷を有する。

【0014】

一態様において、非プリオン病原性配座異性体の存在を検出する方法が提供される。検出方法は、非プリオン病原性配座異性体を含むことが疑われる試料に病原性配座異性体特異的結合試薬を、存在するならば非プリオン病原性配座異性体への試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；試料中に非プリオン病原性配座異性体がある場合、病原性配座異性体特異的結合試薬へのその結合によって、非プリオン病原性配座異性体を検出するステップと；を含み、病原性配座異性体特異的結合試薬は、プリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する。

40

【0015】

試薬によって検出される非プリオン病原性配座異性体は、アミロイド疾患、たとえば全身性アミロイドーシス、タウオパチー (tauopathy)、またはシヌクレイノパチーに関連する配座異性体であり得る。たとえば、非プリオン病原性配座異性体は、アルツハイマー病、ALS、免疫グロブリン関連疾患、血清アミロイドA関連疾患、またはII

50

型糖尿病に関連し得る。

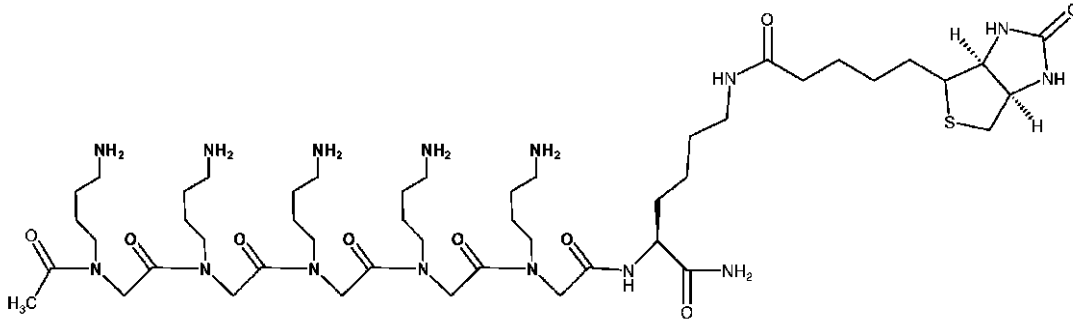
【0016】

好ましい実施形態において、PCSB試薬で検出される非プリオン病原性配座異性体は、アルツハイマー病配座異性体、たとえばアミロイド - またはタウタンパク質である。このような場合、好ましい病原性配座異性体特異的結合試薬は、プリオン断片PrP19-30(配列番号242)、PrP23-30(配列番号243)、PrP100-111(配列番号244)、PrP101-110(配列番号245)、PrP154-165(配列番号246)、PrP226-237(配列番号247)、配列番号14、配列番号50、または配列番号68に由来して、

【0017】

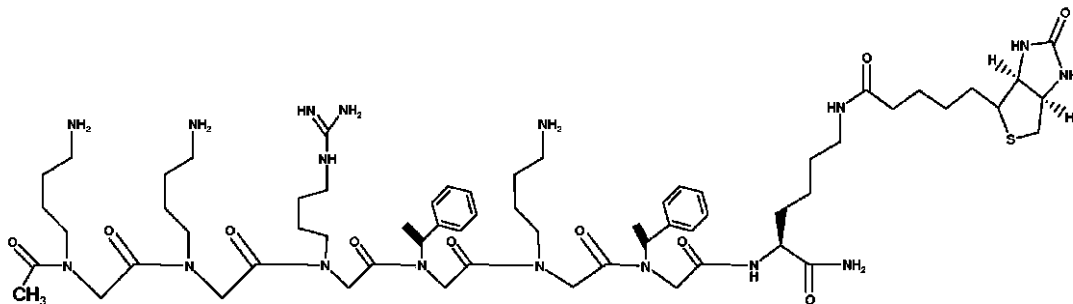
【化5】

10



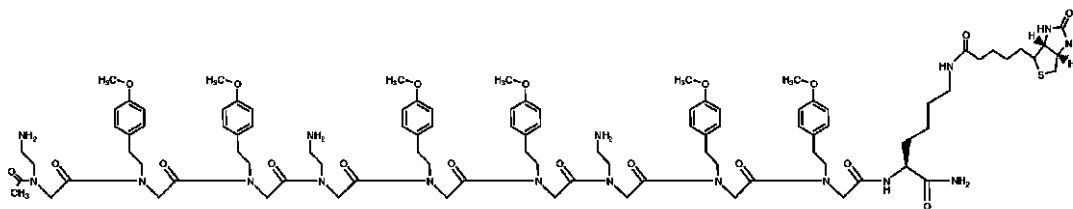
20

I



30

II

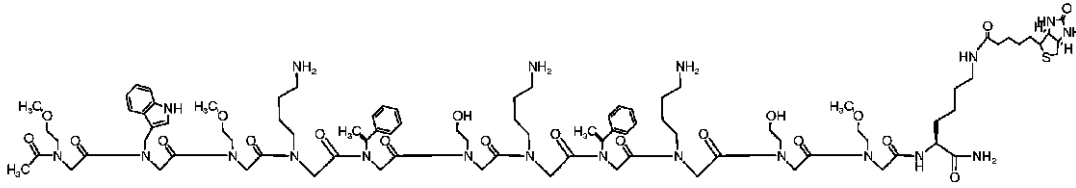


40

III

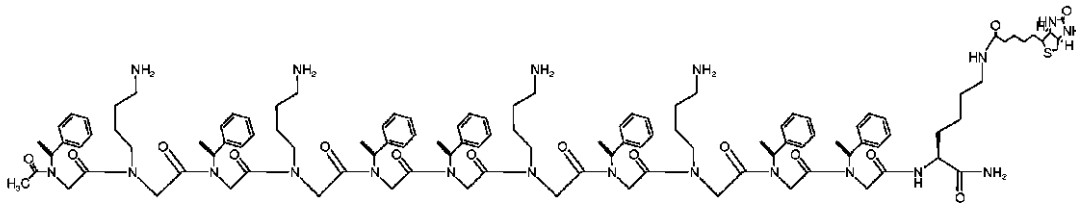
【0018】

【化 6】



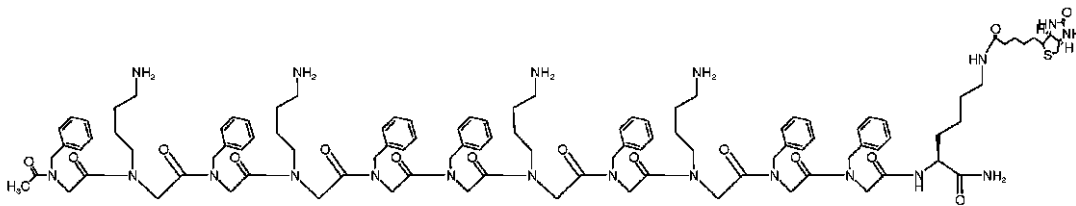
IV

10



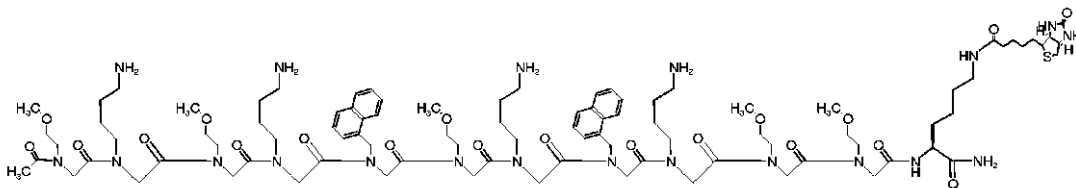
V

20



VI

30

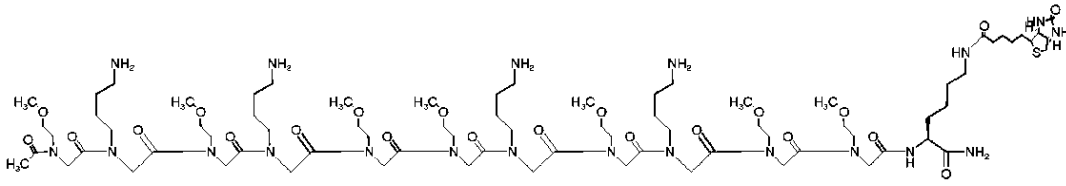


VII

【 0 0 1 9 】

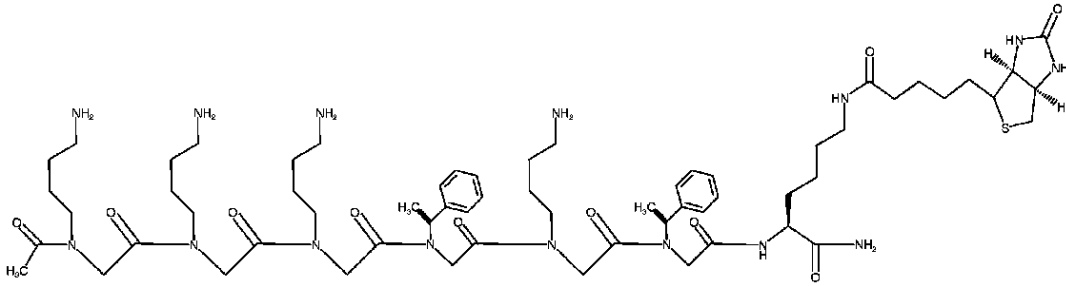
40

【化 7】



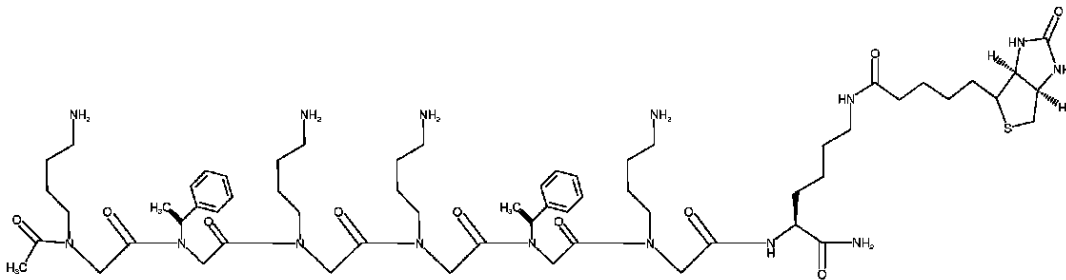
VIII

10



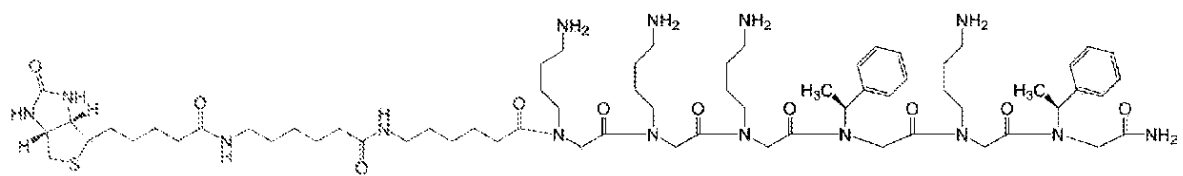
IX

20



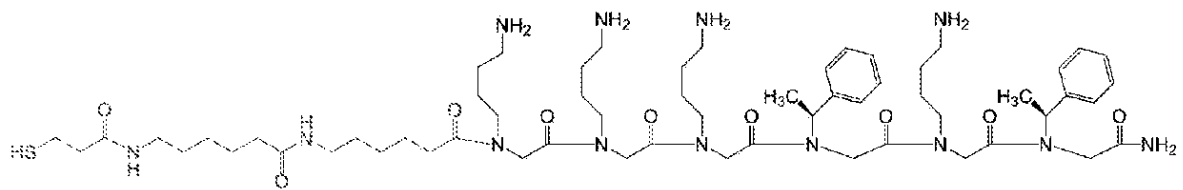
X

30



XI A

40

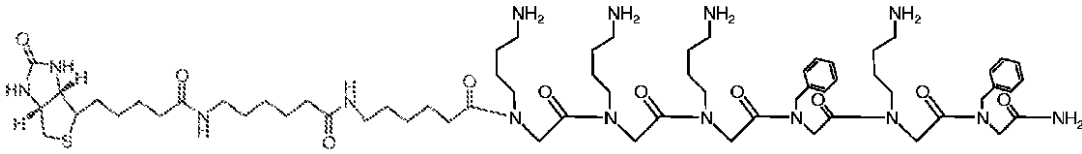


XI B

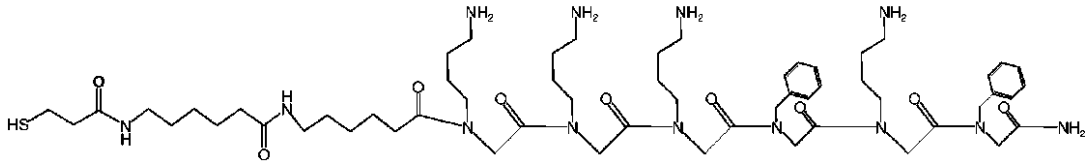
50

【 0 0 2 0 】

【化 8】



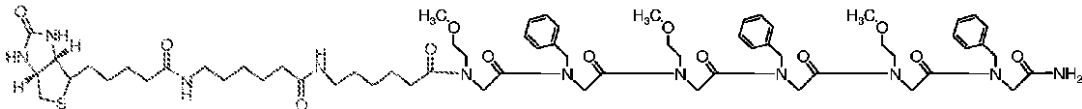
XIII A



XIII B

10

および



XIII

20

を含む。

【0021】

試験される試料は、器官、全血、血液画分、血液成分、血漿、血小板、血清、脳脊髄液 (CSF)、脳組織、神経系組織、筋肉組織、骨髄、尿、涙、非神経系組織、生検または剖検であり得る。好ましい実施形態において、試料は血漿または脳脊髄液である。

30

【0022】

本発明の方法では、病原性配座異性体特異的結合試薬は通例、たとえばビオチンによって検出可能に標識される。試薬は通例、固体担体、たとえばニトロセルロース、ポリスチレンラテックス、ポリフッ化ビニル、ジアゾ化紙 (diazotized paper)、ナイロン膜、活性化ビーズ、および磁気応答性ビーズに結合される。

【0023】

別の態様において、非プリオン病原性配座異性体の存在を検出する他の方法も提供される。本方法は、非プリオン病原性配座異性体含有することが疑われる試料を病原性配座異性体特異的結合試薬と、存在するならば非プリオン病原性配座異性体への試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；複合体をコンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬と、結合を可能にする条件下で接触させるステップと；試料中に非プリオン病原性配座異性体がある場合、コンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬へのその結合によって、非プリオン病原性配座異性体の存在を検出するステップと；を含むことがあり、病原性配座異性体特異的結合試薬はプリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する。コンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬は、標識抗体であることが可能である。非プリオン病原性配座異性体が A タンパク質であるとき、コンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬は抗 A 抗体である。

40

【0024】

一実施形態において、本方法は、複合体形成後に、非結合試料物質を除去するステップ

50

をさらに含む。

【 0 0 2 5 】

非プリオン病原性配座異性体の存在を検出する他の方法は、非プリオン病原性配座異性体を含むことが疑われる試料を病原性配座異性体特異的結合試薬と、存在するならば非プリオン病原性配座異性体への試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、第1の複合体を形成するステップと；非結合試料物質を除去するステップと；非プリオン病原性配座異性体を第1の複合体から解離させて、それにより解離された非プリオン病原性配座異性体を提供するステップと；解離された非プリオン病原性配座異性体をコンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬と、結合を可能にする条件下で接触させて、第2の複合体を形成するステップと；試料中に非プリオン病原性配座異性体がある場合、第2の複合体の形成を検出することによって、非プリオン病原性配座異性体の存在を検出するステップと；を少なくとも含み、病原性配座異性体特異的結合試薬は、プリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する。

10

【 0 0 2 6 】

第2の複合体の形成は、検出可能に標識された第2のコンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬を使用して検出することができる。

【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態において、病原性配座異性体特異的結合試薬および/またはコンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬は固体担体にカップリングされる。

【 0 0 2 8 】

非プリオン病原性配座異性体は、(P C S B 試薬との) 第1の複合体から、複合体をチオシアン酸グアニジンに曝露すること、複合体を水酸化ナトリウムに曝露すること、または複合体を高pHもしくは低pHに曝露して、いくつかの場合では、解離後に高pHまたは低pHを中和することによって解離させることができる。

20

【 0 0 2 9 】

非プリオン病原性配座異性体がAである実施形態において、タンパク質は好ましくは、水酸化ナトリウムなどの高pH条件への曝露によって、好ましくは約80の約0.1N NaOHにて、複合体から解離される。

【 0 0 3 0 】

非プリオン病原性配座異性体の存在を検出するための別の方法は、非プリオン病原性配座異性体を含むことが疑われる試料を第1の病原性配座異性体特異的結合試薬と、存在するならば非プリオン病原性配座異性体への第1の試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、第1の複合体を形成するステップと；非プリオン病原性配座異性体を含むことが疑われる試料を、検出可能な標識を含む第2の病原性配座異性体特異的結合試薬と、第1の複合体中の非プリオン病原性配座異性体への第2の試薬の結合を可能にする条件下で接触させるステップと；試料中に非プリオン病原性配座異性体がある場合、第2の試薬へのその結合によって、非プリオン病原性配座異性体を検出するステップと；を少なくとも含み、第1および第2の病原性配座異性体特異的結合試薬は、プリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する。

30

【 0 0 3 1 】

非プリオン病原性配座異性体の存在を検出するためのまた別の方法は、(a) 非プリオン病原性配座異性体を含むことが疑われる試料をコンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬と、存在するならば非プリオン病原性配座異性体へのC D P S B 試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；(b) 非結合試料物質を除去するステップと；(c) 複合体を、検出可能な標識を含む病原性配座異性体特異的結合試薬と、非プリオン病原性配座異性体への病原性配座異性体特異的結合試薬の結合を可能にする条件下で接触させるステップと；試料中に非プリオン病原性配座異性体がある場合、病原性配座異性体特異的結合試薬へのその結合によって、非プリオン病原性配座異性体を検出するステップと；を少なくとも含み、病原性配座異性体特異的結合試薬は、プリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する。

40

50

【0032】

非プリオン病原性配座異性体の存在を検出するためのなおまた別の方法は、病原性配座異性体特異的結合試薬を含む固体担体を提供するステップと；固体担体を検出可能に標識されたりリガンドと結合させるステップであって、病原性配座異性体特異的結合試薬の検出可能に標識されたりリガンドに対する結合親和性は、非プリオン病原性配座異性体に対する結合親和性よりも弱い、ステップと；非プリオン病原性配座異性体が試料中に存在するときに、試薬に結合させて、リガンドを置換させる条件下で、試料を固体担体に結合させるステップと；試薬と試料からの非プリオン病原性配座異性体との間に形成された複合体を検出するステップと；を少なくとも有し、病原性配座異性体特異的結合試薬は、プリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する。

10

【0033】

非プリオン病原性配座異性体と非プリオン非病原性配座異性体とを区別する方法も提供される。方法は、非プリオン病原性配座異性体を含むことが疑われる試料に病原性配座異性体特異的結合試薬を、存在するならば非プリオン病原性配座異性体への試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；試薬に対する病原性配座異性体への結合によって、非プリオン病原性配座異性体と非プリオン非病原性配座異性体とを区別するステップ；を少なくとも有し、病原性配座異性体特異的結合試薬は、プリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する。

【0034】

非プリオンコンフォメーション病を診断する方法も提供される。方法は、非プリオン病原性配座異性体を含むことが疑われる試料に病原性配座異性体特異的結合試薬を、存在するならば非プリオン病原性配座異性体への試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；試料中に非プリオン病原性配座異性体がある場合、試薬へのその結合によって、非プリオン病原性配座異性体を検出するステップと；非プリオン病原性配座異性体を検出された場合に、コンフォメーション病を診断するステップと；を少なくとも有し、病原性配座異性体特異的結合試薬がプリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する。

20

【0035】

別の態様において、本発明は、非プリオン病原性配座異性体を含むことが疑われる試料に病原性配座異性体特異的結合試薬を、存在するならば非プリオン病原性配座異性体への試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；試料中に非プリオン病原性配座異性体がある場合、病原性配座異性体特異的結合試薬へのその結合によって、非プリオン病原性配座異性体を検出するステップとを少なくとも有し；病原性配座異性体特異的結合試薬が配列番号229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、または241を含むペプチド領域を含む、非プリオン病原性配座異性体の存在を検出する方法を提供する。

30

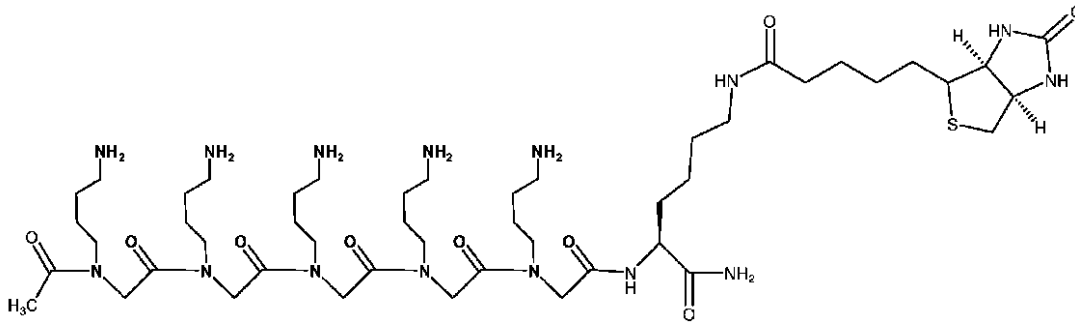
【0036】

なおまた別の態様において、本発明は、非プリオン病原性配座異性体を含むことが疑われる試料に病原性配座異性体特異的結合試薬を、存在するならば非プリオン病原性配座異性体への試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；試料中に非プリオン病原性配座異性体がある場合、病原性配座異性体特異的結合試薬へのその結合によって、非プリオン病原性配座異性体を検出するステップとを少なくとも有し；病原性配座異性体特異的結合試薬が：

40

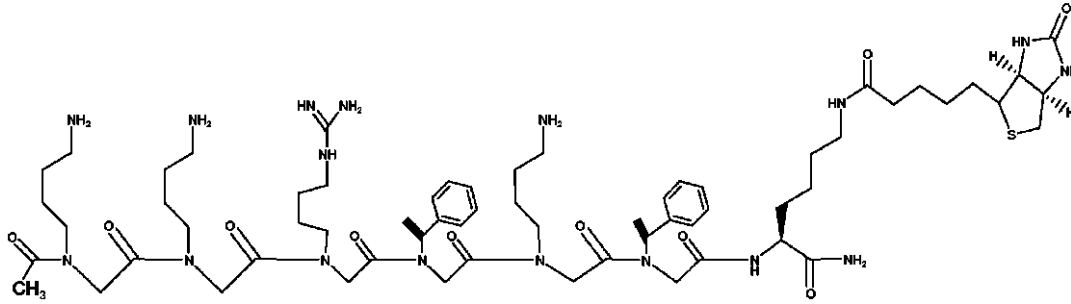
【0037】

【化 9】

**I**

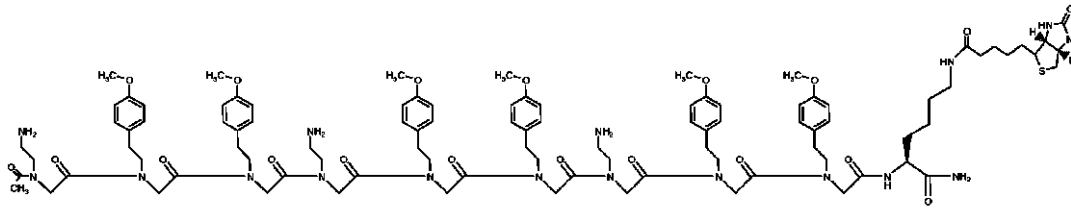
【 0 0 3 8 】

【化 1 0】



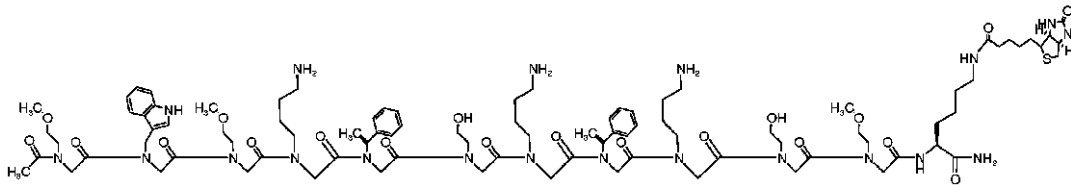
10

II



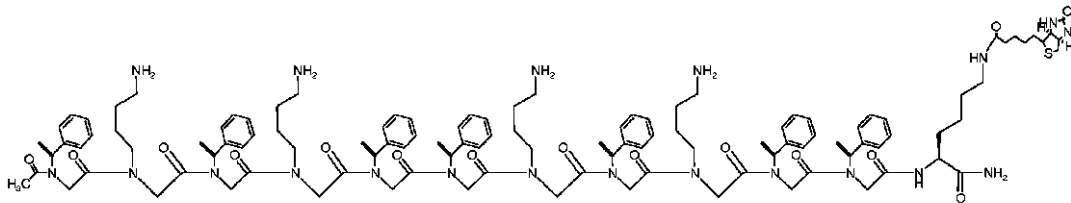
20

III



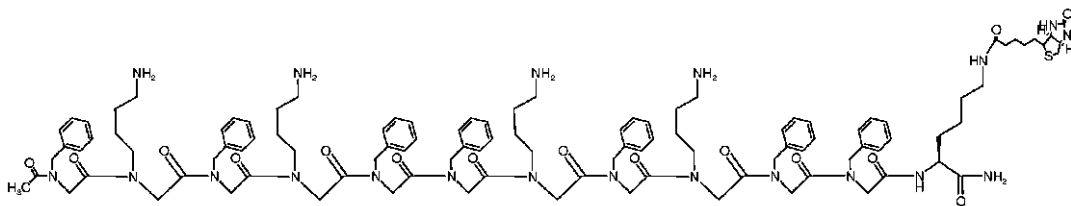
30

IV



40

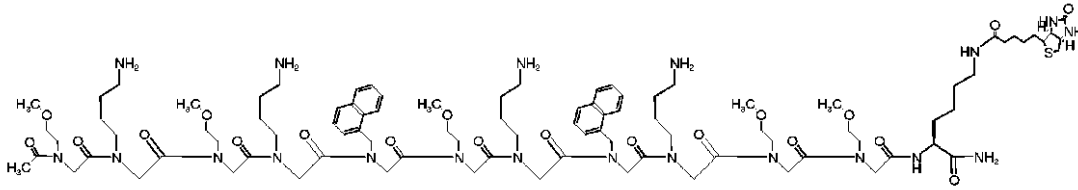
V



VI

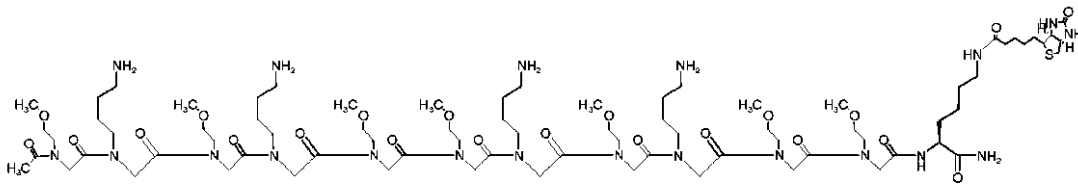
【 0 0 3 9】

【化 1 1】



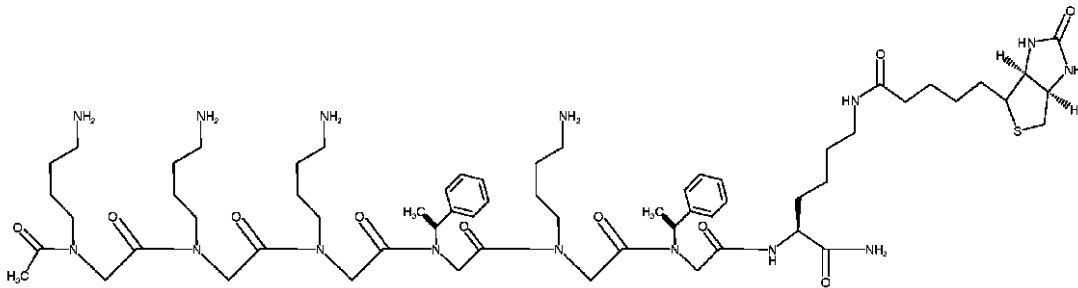
VII

10



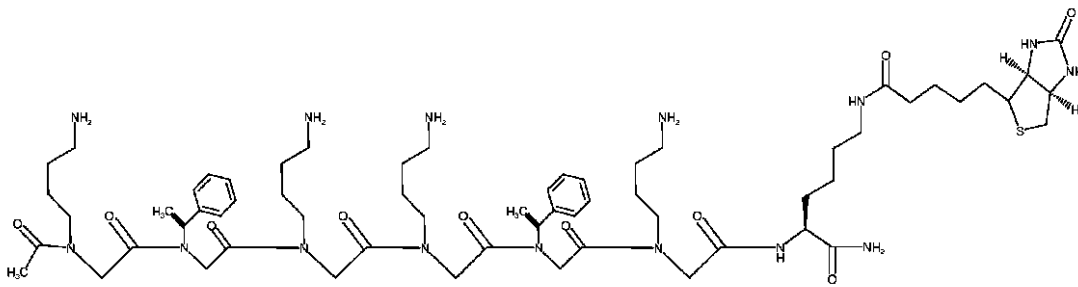
VIII

20



IX

30

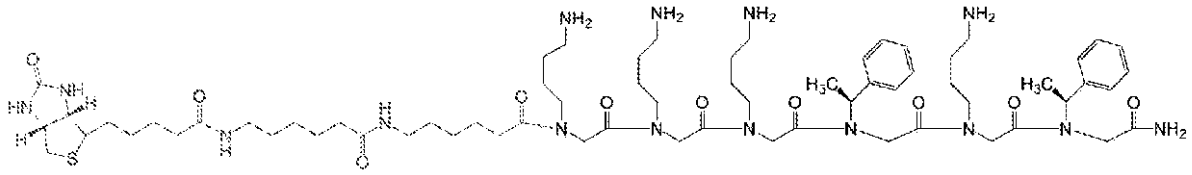


X

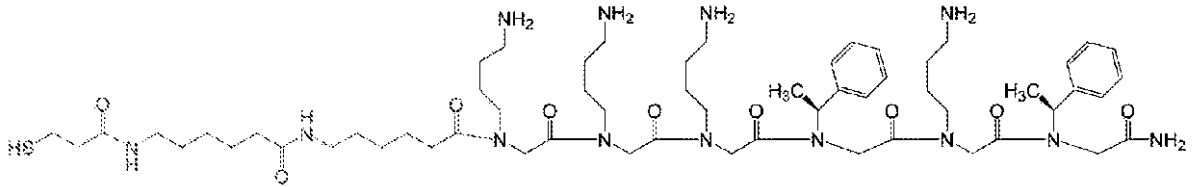
40

【 0 0 4 0 】

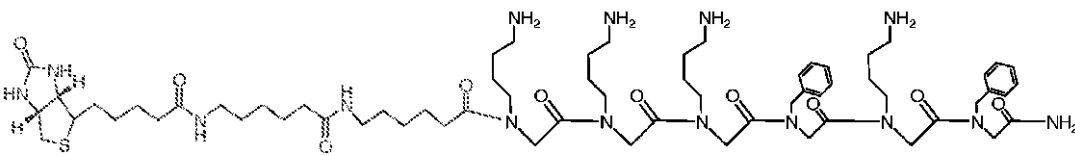
【化 1 2】



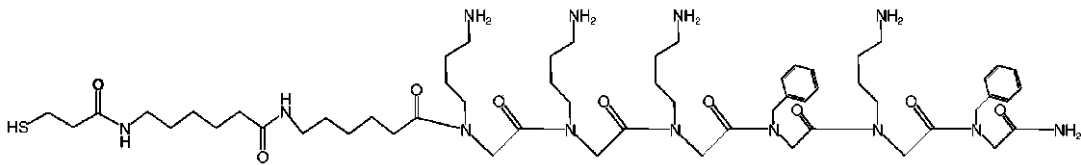
XI A



XI B

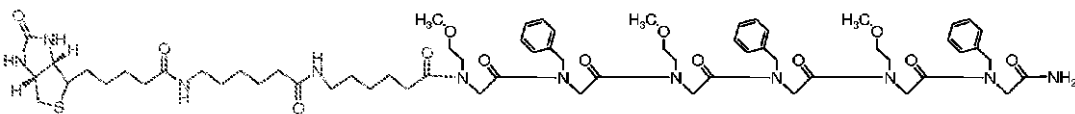


XII A



XII B

および



XIII

10

20

30

40

から選択される、非プリオン病原性配座異性体の存在を検出する方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図 1】図 1 A および図 1 B は、正常試料ではなくアルツハイマー試料のパネルでのミスフォールド A₄₀ および A₄₂ の蓄積と、A₄₀ E L I S A によってこれらのミスフォールド A₄₀ ペプチドが変性後のみに認識されることを示す。正常またはアルツハイマー病個人からの 10% (w/v) 脳ホモジネート (BH) を、水 (天然、白色棒) または 5.4 M G d n S C N (変性、黒色棒) のどちらかによって室温にて 30 分間処理してから、T B S T (50 mM T r i s、p H 7.5; 150 mM N a C l; 0.05% T w e e n - 20) で希釈して、試料 100 μ L 当り 10% B H 100 n L を各 E L I S

50

A ウェルに加えるようにした。E L I S A 捕捉プレートは (1 A) 1 1 A 5 0 - B 1 0 抗体 (A 4 0 の C 末端に特異的) または (1 B) 1 2 F 4 抗体 (A 4 2 の C 末端に特異的) によって、各ウェルを 2 . 5 μ g / m L でコーティングした。3 7 °C で 1 時間インキュベートした後、プレートを T B S T で 4 回洗浄して、結合した A 4 2 ペプチドを、T B S T + 0 . 1 % ウシ血清アルブミンで希釈したアルカリホスファターゼ (A P) 結合体化 4 G 8 検出抗体 (A 4 2 の残基 1 7 - 2 4 を認識する) 0 . 2 μ g / m L で検出した。3 7 °C にて 1 時間後、プレートを再度、T B S T で 4 回洗浄した。L u m i p h o s P l u s は、化学発光基質であった。正常者 (3 2 0 、 3 2 6 、 3 2 7 、 3 2 8) およびアルツハイマー患者 (残りの番号が付けられた試料) の患者識別番号は示された通りである。緩衝液対照 (b k g d) を使用して、E L I S A のバックグラウンドシグナルを決定した。

【図 2】図 2 は、ミスフォールド A 4 2 が遠心分離によってペレット化することができる不溶性凝集形態であることと、凝集体の変性によって溶解性が生じ、説明した E L I S A による検出が行われることを示す。1 0 % B H 1 0 0 n L を、T B S T 1 0 0 μ L で希釈する前に、水 (天然、白色棒) または 5 . 4 M G d n S C N (変性、黒色棒) のどちらかによって室温にて 3 0 分間処理した。1 セットの試料をサンドイッチ E L I S A (全試料) に直接利用した。別のセットは 1 3 5 , 5 2 0 g で 1 . 5 時間、4 °C にて遠心分離した。ペレット画分を 6 M G d n S C N 中で 3 0 分間、室温にて変性させて、1 0 0 μ L T B S T で希釈した。次に上清およびペレット画分の両方を E L I S A に利用した。A 4 2 ペプチドは上述のように、1 2 F 4 抗体で捕捉して、4 G 8 - A P 検出抗体によって検出した。

【図 3】図 3 は、血漿中の A 4 2 凝集体の P S R 1 結合 (すなわちブルダウン) がピーズではなくペプチド X I I b に起因し得ることを示す。正常者またはアルツハイマー病患者からの 1 0 % B H 7 5 n L を T B S T T (5 0 m M T r i s , p H 7 . 5 ; 1 5 0 m M N a C l ; 1 % T w e e n - 2 0 ; 1 % T r i t o n - X 1 0 0) 中の 8 0 % 血漿 1 0 0 μ L にスパイクした。B H スパイク溶液を P S R 1 または陰性ピーズ (G L U T) のどちらかと 1 時間、3 7 °C にてインキュベートして、次に T B S T で 5 回洗浄した。捕捉物質を 6 M G d n S C N によって 3 0 分間、室温にて変性させて、T B S T で希釈してから、1 2 F 4 (A 4 2 の C 末端を認識) 捕捉プレートに適用した。捕捉物質は、先に記載したように、4 G 8 - A P によって検出した。正常者 (3 2 0 、 3 2 6 、 3 2 7 、 3 2 8) およびアルツハイマー患者 (残りの番号が付けられた試料) の患者識別番号は示された通りである。緩衝液対照 (b k g d) を使用して、E L I S A のバックグラウンドシグナルを決定した。

【図 4】図 4 A および 4 B は、E L I S A によって検出された正常ヒト血漿中の内因性可溶性 A 4 0 および A 4 2 レベルを示す。濃度漸増プールヒト血漿を T B S T 緩衝液で希釈し、1 1 A 5 0 - B 1 0 (4 A) または 1 2 F 4 (4 B) プレートに適用して A 4 0 および A 4 2 をそれぞれ捕捉した。捕捉されたペプチドは上述のように、4 G 8 - A P 検出抗体によって検出した。

【図 5 - 1】図 5 (A ~ F) は、P S R 1 が A 4 0 および A 4 2 凝集体を結合するが、変性剤によって可溶化されている A 4 2 凝集体は認識しないことを示す。図 5 A は、変性された合成 A 4 2 を 1 2 F 4 コート E L I S A プレートに適用することによって作成した A 4 2 の標準曲線である。図 5 B は、量漸増天然または変性アルツハイマー 1 0 % B H (患者番号 2 9 1) からの A 4 2 の検出である。B H は、水 (天然、白色三角形) または 5 . 4 M G d n S C N (変性、灰色丸) によって 3 0 分間室温にて処理してから T B S T 1 0 0 μ L で希釈し、1 2 F 4 (A 4 2 の C 末端に特異的) 捕捉プレートに適用して B H 中の A 4 2 のレベルを査定した。図 5 C は、水 (天然、白色丸および三角形) または 5 . 4 M G d n S C N (変性、灰色丸および三角形) のどちらかによって 3 0 分間、室温にて処理してから、T B S T T 緩衝液中の 8 0 % ヒト血漿 1 0 0 μ L で希釈して、P S R 1 (三角形) または陰性 (G L U T 、 丸) ピーズのどちらかと 1 時間、3 7 °C にてインキュベートされた、アルツハイマー 1 0 % B H (患者番号 2 9 1) から捕捉された A 4 2 の量を示す。ブルダウンの後、ピーズを T B S T で 5 回洗浄して、結合物質を 6 M

10

20

30

40

50

G d n S C Nによって30分間、室温にて溶離させた。試料をT B S Tで希釈して、12 F 4 捕捉プレートに適用した。捕捉物質は、先に記載したように、4 G 8 - A Pによって検出した。図5 Dは、各種濃度の合成A 40を変性させて、11 A 50 - B 10 コート(A 40のC末端に特異的) E L I S A 捕捉プレートに適用することによって作成したA 40の標準曲線である。図5 Eは、水(天然、白色三角形)または5.4 M G d n S C N(変性、灰色丸)によって30分間室温にて処理してから、T B S T 100 μ lで希釈した、アルツハイマー10% B H(患者番号291)中で検出されたA 40の量を示す。試料を11 A 50 - B 10 捕捉プレートに直接適用して、B H中のA 42のレベルを査定した。図5 Fは、水(天然、白色丸および三角形)または5.4 M G d n S C N(変性、灰色丸および三角形)のどちらかによって30分間、室温にて処理してから、T B S T T 緩衝液中の80%ヒト血漿100 μ lで希釈し、P S R 1または陰性(G L U T)ビーズのどちらかと1時間、37 にてインキュベートした、アルツハイマー10% B H(患者番号291)から捕捉されたA 40の量を示す。プルダウンの後、ビーズをT B S Tで5回洗浄して、結合物質を6 M G d n S C Nによって30分間、室温にて溶離させた。試料をT B S Tに希釈して、11 A 50 - B 10 捕捉プレートに適用した。捕捉物質は、先に記載したように、4 G 8 - A Pによって検出した。

【図5 - 2】図5(A ~ F)は、P S R 1がA 40およびA 42凝集体を結合するが、変性剤によって可溶化されているA 凝集体は認識しないことを示す。図5 Aは、変性された合成A 42を12 F 4コートE L I S Aプレートに適用することによって作成したA 42の標準曲線である。図5 Bは、量漸増天然または変性アルツハイマー10% B H(患者番号291)からのA 42の検出である。B Hは、水(天然、白色三角形)または5.4 M G d n S C N(変性、灰色丸)によって30分間室温にて処理してからT B S T 100 μ lで希釈し、12 F 4(A 42のC末端に特異的)捕捉プレートに適用してB H中のA のレベルを査定した。図5 Cは、水(天然、白色丸および三角形)または5.4 M G d n S C N(変性、灰色丸および三角形)のどちらかによって30分間、室温にて処理してから、T B S T T 緩衝液中の80%ヒト血漿100 μ lで希釈して、P S R 1(三角形)または陰性(G L U T、丸)ビーズのどちらかと1時間、37 にてインキュベートされた、アルツハイマー10% B H(患者番号291)から捕捉されたA 42の量を示す。プルダウンの後、ビーズをT B S Tで5回洗浄して、結合物質を6 M G d n S C Nによって30分間、室温にて溶離させた。試料をT B S Tで希釈して、12 F 4 捕捉プレートに適用した。捕捉物質は、先に記載したように、4 G 8 - A Pによって検出した。図5 Dは、各種濃度の合成A 40を変性させて、11 A 50 - B 10 コート(A 40のC末端に特異的) E L I S A 捕捉プレートに適用することによって作成したA 40の標準曲線である。図5 Eは、水(天然、白色三角形)または5.4 M G d n S C N(変性、灰色丸)によって30分間室温にて処理してから、T B S T 100 μ lで希釈した、アルツハイマー10% B H(患者番号291)中で検出されたA 40の量を示す。試料を11 A 50 - B 10 捕捉プレートに直接適用して、B H中のA 42のレベルを査定した。図5 Fは、水(天然、白色丸および三角形)または5.4 M G d n S C N(変性、灰色丸および三角形)のどちらかによって30分間、室温にて処理してから、T B S T T 緩衝液中の80%ヒト血漿100 μ lで希釈し、P S R 1または陰性(G L U T)ビーズのどちらかと1時間、37 にてインキュベートした、アルツハイマー10% B H(患者番号291)から捕捉されたA 40の量を示す。プルダウンの後、ビーズをT B S Tで5回洗浄して、結合物質を6 M G d n S C Nによって30分間、室温にて溶離させた。試料をT B S Tに希釈して、11 A 50 - B 10 捕捉プレートに適用した。捕捉物質は、先に記載したように、4 G 8 - A Pによって検出した。

【図5 - 3】図5(A ~ F)は、P S R 1がA 40およびA 42凝集体を結合するが、変性剤によって可溶化されているA 凝集体は認識しないことを示す。図5 Aは、変性された合成A 42を12 F 4コートE L I S Aプレートに適用することによって作成したA 42の標準曲線である。図5 Bは、量漸増天然または変性アルツハイマー10% B H(患者番号291)からのA 42の検出である。B Hは、水(天然、白色三角形)ま

10

20

30

40

50

たは 5.4 M GdnSCN (変性、灰色丸) によって 30 分間室温にて処理してから TBS-T 100 μ l で希釈し、12F4 (A 42 の C 末端に特異的) 捕捉プレートに適用して BH 中の A 42 のレベルを査定した。図 5 C は、水 (天然、白色丸および三角形) または 5.4 M GdnSCN (変性、灰色丸および三角形) のどちらかによって 30 分間、室温にて処理してから、TBS-T 緩衝液中の 80% ヒト血漿 100 μ l で希釈して、PSR1 (三角形) または陰性 (GLUT、丸) ビーズのどちらかと 1 時間、37 $^{\circ}$ C にてインキュベートされた、アルツハイマー 10% BH (患者番号 291) から捕捉された A 42 の量を示す。プルダウンの後、ビーズを TBS-T で 5 回洗浄して、結合物質を 6 M GdnSCN によって 30 分間、室温にて溶離させた。試料を TBS-T で希釈して、12F4 捕捉プレートに適用した。捕捉物質は、先に記載したように、4G8-AP によって検出した。図 5 D は、各種濃度の合成 A 40 を変性させて、11A50-B10 コート (A 40 の C 末端に特異的) ELISA 捕捉プレートに適用することによって作成した A 40 の標準曲線である。図 5 E は、水 (天然、白色三角形) または 5.4 M GdnSCN (変性、灰色丸) によって 30 分間室温にて処理してから、TBS-T 100 μ l で希釈した、アルツハイマー 10% BH (患者番号 291) 中で検出された A 40 の量を示す。試料を 11A50-B10 捕捉プレートに直接適用して、BH 中の A 42 のレベルを査定した。図 5 F は、水 (天然、白色丸および三角形) または 5.4 M GdnSCN (変性、灰色丸および三角形) のどちらかによって 30 分間、室温にて処理してから、TBS-T 緩衝液中の 80% ヒト血漿 100 μ l で希釈し、PSR1 または陰性 (GLUT) ビーズのどちらかと 1 時間、37 $^{\circ}$ C にてインキュベートした、アルツハイマー 10% BH (患者番号 291) から捕捉された A 40 の量を示す。プルダウンの後、ビーズを TBS-T で 5 回洗浄して、結合物質を 6 M GdnSCN によって 30 分間、室温にて溶離させた。試料を TBS-T に希釈して、11A50-B10 捕捉プレートに適用した。捕捉物質は、先に記載したように、4G8-AP によって検出した。

【図 6】図 6 A および 6 B は、vCJD 試料中の PrP^{Sc} についての各種の病原性配座異性体特異的結合試薬 (6 つの異なるペプチドおよび PSR1) の捕捉プロフィールを、緩衝液または 50% 血漿を含有する AD 試料中の A 凝集体の捕捉プロフィールと比較して、それにより PSR1 およびプリオン由来ペプチドが緩衝液および血漿中の PrP^{Sc} および A 凝集体を結合することを示す。ビオチン化ペプチドを M280-ストربتリアビジンビーズにコートしてから、試料とインキュベートした。PSR1 ペプチドを Dynal M270-カルボン酸ビーズに結合させた。vCJD 実験では、10% vCJD BH 100 nL を TBS-T (8A、上パネル) または TBS-T 中 50% 血漿 (8B、上パネル) 100 μ l で希釈して、表示した病原性配座異性体特異的結合試薬と 1 時間、37 $^{\circ}$ C にてインキュベートした。ビーズを TBS-T で 6 回洗浄して、0.1 M NaOH によって 10 分間、室温にて溶離させた。溶離液を 0.3 M NaH₂PO₄ で 5 分間、室温にて中和させてから、3F4 コート捕捉プレート (2.5 μ g/mL 3F4 抗体、ヒト PrP 配列の残基 109-112 を認識) に適用した。物質を 1 時間、37 $^{\circ}$ C にて捕捉して、TBS-T で 6 回洗浄し、TBS-T 中の 0.01 \times カゼインブロッカー中の AP 結合体化 POM2 抗体 (プリオンオクタリピート配列を認識) によって検出した。37 $^{\circ}$ C での 1 時間のインキュベーションの後、プレートを再度洗浄して、Lumiphos Plus 基質で検出した。AD 実験では、10% AD BH 50 nL を TBS-T (8A、下パネル) または TBS-T 中 50% 血漿 (8B、下パネル) に同様にスパイクした。試料を配座異性体特異的結合試薬によって同様にプルダウンさせて、6 M GdnSCN で 30 分間、室温にて溶離し、TBS-T で希釈した。溶離液を 12F4 捕捉プレートに適用して、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 結合体化 4G8 によって検出した。vCJD のデータは、Lau, A. L., ら、Proc Natl Acad Sci USA. 104 (28): 11551-11556 (2007) のように、先に公開されている。

【図 7】図 7 は、TBS-T 中の 50% CSF にスパイクした AD BH からの凝集 A 42 に対する、同じパネルのプリオン由来ペプチドおよび PSR1 の捕捉プロフィールを

示す。プルダウンおよび A 42 特異的サンドイッチ E L I S A 検出を上述のように実施した。

【図 8】図 8 は、A D 脳ホモジネート対正常脳ホモジネート (N B H) 中の A 42 の変性の最適化のための、NaOH 濃度用量設定 (t i t r a t i o n) および温度スクリーニングを示す。

【図 9】図 9、パネル A ~ F は、本明細書に記載する P C S B の試薬のいずれかを調製するために行うことができる例示的なペプチド置換を示す。ペプチドは、各パネルで丸が付けられており、プロリン残基 (残基 8) が N 置換グリシン (ペプチド) 残基によって置換された、本明細書に記載される例示的な試薬 (Q W N K P S K P K T N G、配列番号 2 5 0) に示されている。パネル A は、プロリン残基がペプチド残基によって置換されたペプチド試薬を示す：N - (S) - (1 - フェニルエチル) グリシン；パネル B は、プロリン残基がペプチド残基によって置換されたペプチド試薬を示す：N - (4 - ヒドロキシフェニル) グリシン；パネル C は、プロリン残基がペプチド残基によって置換されたペプチド試薬を示す：N - (シクロプロピルメチル) グリシン；パネル D は、プロリン残基がペプチド残基によって置換されたペプチド試薬を示す：N - (イソプロピル) グリシン；パネル E は、プロリン残基がペプチド残基によって置換されたペプチド試薬を示す：N - (3 , 5 - ジメトキシベンジル) グリシン；およびパネル F は、プロリン残基がペプチド残基によって置換されたペプチド試薬を示す：N - ブチルグリシン。

【図 10】図 10 は、本明細書に記載する例示的な P E G 結合病原性配座異性体特異的結合試薬の構造を示す。

【図 11】図 11 は、P S R 1 および P r P 2 3 - 3 0 による A の捕捉が、シートプロッカーによる捕捉よりも優れていることを示す。A L 3 0 は、A 2 0 - 1 6 逆配列 (L - アミノ酸の代わりに D - アミノ酸を使用する) であり、以下の構造：ピオチン - A H X - D (F F V L K) - C O N H 2 (配列番号 2 5 2) を有する。A L 3 2 は A 2 0 - 1 6 であり、以下の構造：ピオチン - A H X - F F V L K - C O N H 2 (配列番号 2 5 3) を有する。A L 3 3 は A 1 6 - 2 0 - N m e L であり、以下の構造：ピオチン - A H X - K L V F F - N m e L - C O N H 2 (配列番号 2 5 4) を有する。N m e L は、大半のペプチドカスタム合成会社から入手できる「標準」アミノ酸修飾の N - メチル化リジンである。A L 3 4 は、A (1 6 - 2 0 - N m e L) ₂ であり、以下の構造：ピオチン - A H X - K L V F F - N m e L - A H X - K L V F F - N m e L - C O N H 2 (配列番号 2 5 5) を有する。

【図 12】図 12 は、有意なレベルの全タウが正常脳およびアルツハイマー病脳の両方で検出されることを示す。正常脳 (患者 I D 番号 3 2 0、3 2 6、3 2 7、3 2 8) または A D 脳 (患者 I D 番号 3 2 5、3 3 4、3 2 5、2 6 4 - 1、2 3 0 - 1、2 1 8 - 2、2 2 1 - 1、2 0 1 - 2、1 8 4 - 1、1 7 7 - 1、および 2 9 1) ホモジネートは、処置無し (天然、白色棒) であるか、または 3 M G n S C N (黒色棒) で処置するかのどちらかであった。全タウは、B i o S o u r c e タウイムノアッセイキットを使用して定量した。

【図 13】図 13 は、対照グルタチオンビーズとは対照的に、P S R 1 ビーズに特異的に結合するタウの量を示す。正常脳 (患者 I D 番号 3 2 0、3 2 6、3 2 7、3 2 8) または A D 脳 (患者 I D 番号 3 2 5、3 3 4、3 2 5、2 6 4 - 1、2 3 0 - 1、2 1 8 - 2、2 2 1 - 1、2 0 1 - 2、1 8 4 - 1、1 7 7 - 1、および 2 9 1) ホモジネートは、緩衝液で希釈して、M 2 7 0 - グルタチオン (白色棒) または P S R 1 (黒色棒) のどちらかとインキュベートした。

【図 14】図 14 は、P S R 1 がタウ凝集体を結合するが、変性剤によって可溶化されているタウ凝集体は認識しないことを示す。正常脳 (患者 I D 番号 3 2 0、3 2 6) または A D 脳 (患者 I D 番号 3 3 4、2 3 0) は、水 (N) または 5 M G d n S C N (D) のどちらかで処置して、T B S T T 中 2 5 % 血漿で希釈し、次に M 2 7 0 グルタチオン対照ビーズ (白色棒) または P S R 1 (黒色棒) のどちらかとインキュベートした。プルダウン後、ビーズを T B S T T で洗浄して、G d n S C N とインキュベートした。捕捉したタ

10

20

30

40

50

ウは、BioSource タウイムノアッセイキットを使用して定量した。

【図15A】図15AおよびBは、モノマー性可溶性A のサンドイッチELISAおよび凝集A のPSR1プルダウンについて、LODを計算するために使用したデータを示す。図15Aでは、様々な量の合成可溶性A (pg/mL)は、サンドイッチELISAによって検出される。図15Bでは、プール正常ヒトCSF 200uLにスパイクされた様々な量の10%AD脳ホモジネートがPSR1プルダウンに供され、サンドイッチELISAによって検出される。黒丸は、A 40を表す。白丸は、A 42を表す。

【図15B】図15AおよびBは、モノマー性可溶性A のサンドイッチELISAおよび凝集A のPSR1プルダウンについて、LODを計算するために使用したデータを示す。図15Aでは、様々な量の合成可溶性A (pg/mL)は、サンドイッチELISAによって検出される。図15Bでは、プール正常ヒトCSF 200uLにスパイクされた様々な量の10%AD脳ホモジネートがPSR1プルダウンに供され、サンドイッチELISAによって検出される。黒丸は、A 40を表す。白丸は、A 42を表す。

【図16】図16は、AD BH中のA 42凝集体の全量(正方形)を、PSR1に結合されたA 42凝集体(三角形)と比較する。

【図17】図17は、モノマー性A 42(三角形)および凝集A 42(丸)の結合に対する血漿の濃度上昇の効果を示す。

【図18】図18は、各種解離条件でのNBH(正常脳ホモジネート、白色棒)およびAD(アルツハイマー病患者からの脳ホモジネート、黒色棒)のシグナルを比較する。

【図19】図19は、全タウ(A&B)、P-タウ231(C&D)およびP-タウ181(E&F)のELISAおよびPSR1ビーズプルダウンのLODを計算するために使用したデータを示す。図19Aは、タウELISA標準曲線を示す。図19Bは、AD BHスパイクCSF(200uLアッセイ)でのタウプルダウンを示す。図19Cは、P-タウ231 ELISA標準曲線を示す。図19Dは、AD BHスパイクCSF(70uL CSF)でのP-タウ231プルダウンを示す。図19Eは、P-タウ181 ELISA標準曲線を示す。図19Fは、AD BHスパイクCSF(70uL CSF)でのP-タウ181プルダウンを示す。

【発明を実施するための形態】

【0042】

(表の簡単な説明)

表1は、例示的なコンフォメーション病および関連するコンフォメーション病タンパク質を示す。

【0043】

表2は、さらなるコンフォメーション病タンパク質および関連するコンフォメーション病を示す。

【0044】

表3は、PCSB試薬を生成するのに使用される例示的なペプチド配列を示す。

【0045】

表4は、PCSB試薬を生成するのに好適な、例示的なペプトイド領域を示す。

【0046】

表5は、表4で使用した省略形のキーを示す。

【0047】

表6は、表4に示した各配列の関連構造を与える。

【0048】

表7は、PSR1のプルダウン効率を定量する。

【0049】

表8は、実施例10で測定したタウレベルを定量化する。

【0050】

表9は、実施例11で測定したタウレベルを定量化する。

【0051】

10

20

30

40

50

表 10 は、アルツハイマー病でない個人の CSF からの A_β 40 および 42 の PSR1 ピーズへの結合を定量化する。

【0052】

表 11 は、濃度漸増血漿の存在下での PSR1 のモノマー性および凝集 A_β への結合を定量化する。

【0053】

(配列リストの簡単な説明)

配列番号 1 ~ 11 は、異なる種からのプリオンタンパク質のアミノ酸配列を提供する：ヒト (配列番号 1)、マウス (配列番号 2)、ヒト (配列番号 3)、シリアンハムスター (ハムスター) (配列番号 4)、ウシ (配列番号 5)、ヒツジ (配列番号 6)、マウス (配列番号 7)、ヘラジカ (配列番号 8)、ダマジカ (ファロウ (fallow)) (配列番号 9)、ミュールジカ (ラバ) (配列番号 10)、およびオジロジカ (ホワイト (white)) (配列番号 11)。

10

【0054】

配列番号 12 ~ 228 は、PCSB 試薬を生成するのに使用される例示的なペプチド配列のアミノ酸配列を提供する。

【0055】

配列番号 229 ~ 241 は、PCSB 試薬を生成するのに使用される例示的なペプチド領域の修飾アミノ酸配列を提供する。

【0056】

配列番号 242 ~ 249 は、PCSB 試薬を生成するのに使用される例示的なプリオンタンパク質断片のアミノ酸配列を提供する。

20

【0057】

配列番号 250 は、PCSB 試薬を生成するのに使用される例示的なペプチド配列のアミノ酸配列を提供する。

【0058】

配列番号 251 は、配列番号 1 で示されるようなヒトプリオンタンパク質のアミノ酸配列残基 19 ~ 30 を提供する。

【0059】

配列番号 252 ~ 255 は、シートブレイカー AL30、AL32、AL33、および AL34 のアミノ酸配列を提供する。

30

【0060】

配列番号 256 ~ 261 は、実施例 3 で試験を行った修飾プリオンタンパク質断片のアミノ酸配列を提供する。

【0061】

(発明の詳細な説明)

本発明は、プリオンタンパク質の病原性配座異性体と優先的に相互作用する PCSB 試薬が、アルツハイマー病、糖尿病、全身性アミロイドーシスなどの他のコンフォメーション病の病原性配座異性体とも優先的に相互作用するという、驚くべきかつ予想外の発見に関するものである。これらの PCSB 試薬は通例、プリオンタンパク質断片に由来する。

40

【0062】

これらの PCSB 試薬が非プリオン病原性配座異性体とも優先的に相互作用するという発見によって、プリオン以外のコンフォメーション病およびコンフォメーション病タンパク質ならびにプリオン関連疾患に対してこれらの PCSB 試薬を利用する検出アッセイ、診断アッセイ、および精製または単離方法の開発が可能となる。

【0063】

いずれの理論にも束縛されたくはないが、これらの PCSB 試薬が非プリオン病原性配座異性体を優先的に結合して、それらを検出する能力は、ある病原性配座異性体に共通の構造モチーフの存在によることが考えられる。本明細書に含まれているかのように参照により本明細書に援用される、Lau, A. L.ら、Proc Natl Acad Sci

50

USA. 104(28): 11551-11556(2007)は、プリオンタンパク質断片に由来するPCSB試薬とPrP^{Sc}との間の相互作用が正電荷に大きく依存することを示唆している。相互作用は、配列をスクランブルすることによって影響されないように思われるが、正電荷以外の個々のアミノ酸の特性も相互作用に何らかの役割を果たしているように思われる。これらの研究は、これらPCSB試薬が疾患に関連するPrP^{Sc}の直鎖状配列ドメインよりも、構造モチーフを結合すること示唆している。

【0064】

アミロイドを形成する多くの病原性配座異性体が、同様の物理的特性を共有している。たとえばプリオンタンパク質の病原性配座異性体であるPrP^{Sc}は、以下の特徴：シート含有率の増加(PrP^Cでの約3%からPrP^{Sc}での>40%)を示し、PrP^{Sc}線維は、線維軸に沿って垂直に配向されたシートで構成されている。出願人は、すべてのアミロイド形成タンパク質に共通の構造モチーフの1つへの結合は、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する試薬が非プリオンタンパク質の病原性配座異性体とも優先的に相互作用する機構であると考えている。

10

【0065】

これらのPCSB試薬は、病原性配座異性体とのこのような優先的な相互作用を示すために、より大型の構造または他の種類の骨格分子の一部である必要はない。いずれの特定の理論にも束縛されたくはないが、これらのPCSB試薬は、病原性配座異性体への結合は許容するが、非病原性配座異性体への結合は許容しないコンフォメーションを自発的に取るように思われる。例示されたPCSB試薬によって本発明の方法で有用なPCSB試薬にとっての出発点(たとえばサイズまたは配列特徴に関して)が与えられるが、より所望の属性(たとえばより高い親和性、より高い安定性、より高い溶解度、より低いプロテアーゼ感受性、より高い特異性、合成がより容易であることなど)を備えたPCSB試薬を生産するために多くの修飾が行えることが、当業者に明らかになる。

20

【0066】

一般に、本明細書に記載するPCSB試薬は、病原性配座異性体に優先的に相互作用することができる。それゆえこれらの試薬によって、たとえば、疾患形成タンパク質を整理、凝集またはそうでなければ次に検出可能である状態まで誘導することによる、病原性配座異性体の存在の即時の検出、したがって生存しているかまたは死亡した脳、脊髄、脳脊髄液または他の神経組織系はもちろんのこと、血液および脾臓も含む、本質的にいずれの生物または非生物試料中の病原性配座異性体の診断も可能となる。PCSB試薬は、広範囲の単離、精製、検出、診断および治療用途に有用である。

30

【0067】

本発明の方法で使用するPCSB試薬は、参照により本明細書に援用されるWO05/016137およびWO07/030804でさらに詳細に説明されている。

【0068】

本発明の実施には、別途指摘しない限り、当該分野の範囲内で化学、生化学、分子生物学、免疫学および薬理学の従来の方法が使用される。このような技法は、文献で十分に説明されている。たとえばRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods in Enzymology (S. ColowickおよびN. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); および Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. WeirおよびC. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K. S. ed., CRC Press, 1997); Short Protocols in Molecular Biology, 4th

40

50

ed. (Ausubel & eds., 1999, John Wiley & Sons); Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream & eds., 1998, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechnology Series), 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag); Peters and Dalrymple, Fields Virology (2d ed), Fields & (eds.), B.N. Raven Press, New York, NYを参照。

【0069】

本発明の試薬および方法は、特定の処方またはプロセスパラメーターに限定されず、したがってもちろん変化し得ることが理解されるべきである。本明細書で使用する用語が本発明の特定の実施形態を説明する目的のみのためであり、制限するものではないことも理解されるべきである。

10

【0070】

本明細書で引用したすべての刊行物、特許および特許出願は、参照によりその全体が本明細書に援用される。

【0071】

(I. 定義)

本発明の理解を容易にするために、この出願で使用する選択された用語を下で議論する。

20

【0072】

本明細書で使用するように、「病原性」という用語は、タンパク質もしくは配座異性体が疾患を実際に引き起こすことを意味し得るか、または「病原性」という用語は、タンパク質もしくは配座異性体が疾患と関連しており、したがって疾患が存在するときに存在することを単に意味し得る。それゆえ、本開示と関連して使用されるような病原性タンパク質または配座異性体は、必ずしも疾患の特異的原因因子であるタンパク質ではなく、したがって感染性であってもなくてもよい。「病原性配座異性体」という用語は、より具体的には、疾患に関連するタンパク質のコンフォメーションおよび/またはシートに富むコンフォメーションを指すために使用される。「病原性配座異性体」は、そのコンフォメーションがミスフォールド配座異性体、凝集形のミスフォールド配座異性体、または2つの混合物であるか否かにかかわらず、疾患に関連するタンパク質の任意のコンフォメーションである。「非病原性」および「細胞の」という用語は、コンフォメーション病タンパク質または配座異性体に関して使用されるときに、その存在が疾病と関連していないタンパク質の正常な配座異性体を指すために互換的に使用される。特定の疾患、たとえばアルツハイマー病に関連する病原性配座異性体は、「病原性アルツハイマー病配座異性体」と呼ばれることがある。

30

【0073】

「病原性配座異性体特異的結合試薬」または「PCSB試薬」という用語は、これに限定されるわけではないが、親和性または特異性の上昇により、非病原性配座異性体とは対照的に病原性配座異性体と優先的に相互作用する、ペプチドおよびペプトイドを含む任意の種類試薬を指す。優先的相互作用は、各ペプチドの特異的アミノ酸残基および/またはモチーフの間の相互作用を必ずしも必要としない。たとえば、ある実施形態において、本明細書に記載する病原性配座異性体特異的結合試薬は、病原性配座異性体と優先的に相互作用するが、それにもかかわらず、非病原性配座異性体を弱い、検出可能なレベル(たとえば興味のあるポリペプチドで示される結合の10%以下)で結合することも可能であり得る。通例、弱い結合、すなわちバックグラウンド結合は、たとえば適切な対照の使用によって、興味のある病原性配座異性体との優先的相互作用から容易に識別できる。一般に、本発明の方法で使用する病原性配座異性体特異的結合試薬は、過剰な非病原性形態の存在下で病原性配座異性体を結合する。

40

【0074】

50

病原性配座異性体特異的結合試薬は、別のペプチドまたはタンパク質と、特異的に、非特異的に、または特異的および非特異的結合のある組合せで結合する場合に、「相互作用する」といわれる。試薬は、病原性配座異性体と、病原性配座異性体に対して非病原性配座異性体に対してよりも高い親和性および/または高い特異性で結合する場合に、「優先的に相互作用する」といわれる。「優先的に相互作用する (interact preferentially)」、「優先的に相互作用する (preferentially interact)」、「選択的に結合する (bind selectively)」、「選択的に結合する (selectively bind)」、および「選択的に捕捉する」という用語は、本明細書で互換的に使用される。優先的相互作用は、各ペプチドの特異的アミノ酸残基および/またはモチーフの間の相互作用を必ずしも必要としないことが理解されるべきである。たとえば、ある実施形態において、本明細書に記載するPCSB試薬は、病原性配座異性体と優先的に相互作用するが、それにもかかわらず、非病原性配座異性体を弱いが、検出可能なレベル(たとえば興味のあるポリペプチドで示される結合の10%以下)で結合することが可能であり得る。通例、弱い結合、すなわちバックグラウンド結合は、たとえば適切な対照の使用によって、興味のある化合物またはポリペプチドとの優先的相互作用から容易に識別できる。一般に、本明細書に記載する試薬は、100倍過剰を超える非病原性配座異性体の存在下で、病原性配座異性体を結合する。

10

【0075】

本明細書に記載する方法で利用されるPCSB試薬は、プリオンタンパク質断片に由来して、プリオンタンパク質の病原性形態と優先的に相互作用する。「プリオンタンパク質断片に由来する」用語は、本明細書で使用するように、プリオンタンパク質断片の化学構造に基づく化学構造を有する試薬を指す。このような試薬は、天然プリオンタンパク質配列を有するペプチド断片、保存的アミノ酸置換を持つ天然プリオンタンパク質配列を有するペプチド断片、またはプリオンタンパク質のペプチド断片のペプトイド類似体であり得る。

20

【0076】

「プリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する」という用語は、本明細書で使用するように、先に定義した特性を組合せて有する試薬を指す。一例として、このような試薬は、上で定義したようなプリオンタンパク質断片の化学構造に基づく化学構造を有し、また病原性プリオンタンパク質に対して非病原性プリオンタンパク質に対してよりも高い親和性および/または高い特異性で結合する。

30

【0077】

「非プリオン病原性配座異性体」という用語は本明細書で使用するように、本明細書で定義するようなプリオン疾患に関連するものではなく、コンフォメーション病タンパク質の病原性配座異性体を指す。

【0078】

「コンフォメーション病タンパク質」は、 β -ブリーツシートとの関連で望ましくない原線維またはアミロイド重合などの異常なコンフォメーションを生じるように、タンパク質の構造が変化(たとえばミスフォールド)した、コンフォメーション病に関連するタンパク質の病原性および非病原性配座異性体を指す。コンフォメーション病タンパク質の例は、制限なく、アルツハイマー病タンパク質、たとえばA β およびタウ;プリオンタンパク質、たとえばPrP^{Sc} およびPrP^C、ならびに糖尿病タンパク質アミリンを含む。2つ以上の異なるコンフォメーションが想定されるタンパク質に関連する、疾患の非制限的なリストを下、

40

【0079】

【表 1】

表 1

疾患	コンフォメーション病タンパク質
プリオン疾患 (たとえばクロイツフェルト-ヤコブ病、スクラピー、ウシ海綿状脳症)	PrP ^{Sc}
アルツハイマー病	A β ペプチド 非A β 成分
ALS	SOD1,タウ
ピック病	ピック小体 (タウ)
パーキンソン病	レヴィー小体 (タウ、アルファ-シヌクレイン)
I I型糖尿病	アミリン
多発性骨髄腫-形質細胞異形成	I g G軽鎖 I g G重鎖
家族性アミロイドポリニューロパシー	トランスサイレチン
甲状腺髄様癌	プロカルシトニン
慢性腎不全	ベータ2-ミクログロブリン
うっ血性心不全	心房性ナトリウム利尿因子
老人性心および全身性アミロイドーシス	トランスサイレチン
慢性炎症	血清アミロイドA
アテローム性動脈硬化	ApoA1
家族性アミロイドーシス	ゲルソリン
嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、ボクサー認知症、ハレルフォルデンスパッツ病、筋緊張性ジストロフィーなどを含む、すべてのタウオパチー	タウ
ゴーシェ病、多系統萎縮症、レヴィー小体認知症などを含む、シヌクレイノパチー	アルファ-シヌクレイン
膠様滴状角膜ジストロフィー	おそらくラクトフェリン
高齢者の大動脈アミロイドーシス	メジン
皮膚アミロイドーシス	ケラチン
遺伝性脳出血 (アイスランドタイプ)	シスタチンC

に示す。

「コンフォメーション病タンパク質」は本明細書で使用するように、本明細書に記載する配列と同じ配列を有するポリペプチドに限定されない。この用語が、同定済みのまたは未

10

20

30

40

50

同定の種または疾患（たとえばアルツハイマー病、パーキンソン病など）のいずれによるコンフォメーション病タンパク質も含むことは、容易に明らかとなる。当業者は、本開示および当該分野の教示を考慮して、たとえば配列比較プログラム（たとえばBLASTおよび本明細書に記載する他のもの）または構造特性もしくはモチーフの同定およびアライメントを使用して、任意の他のプリオンタンパク質の図に示した配列に対応する領域を決定することができる。

【0080】

「コンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬」または「CDPSB試薬」は、他のコンフォメーション病タンパク質および他の種類のタンパク質とは対照的に、特定のコンフォメーション病タンパク質と優先的に相互作用する任意の種類の試薬を指す。好ましくは、コンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬は、コンフォメーション病タンパク質の病原性および非病原性配座異性体の両方に結合する。しかし多くの例で、コンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬は、コンフォメーション病タンパク質の可溶性形態のみに結合でき、したがって凝集体/ミスフォールド病原性配座異性体を結合できない。この場合、不溶性病原性配座異性体を検出されるように変性させることが必要であり得る。通例、このような試薬はモノクローナルまたはポリクローナル抗体である。

10

【0081】

「プリオン」、「プリオンタンパク質」、「PrPタンパク質」および「PrP」という用語は、病原性配座異性体（スクラピータンパク質、病原性タンパク質形態、病原性アイソフォーム、病原性プリオンおよびPrP^{S^c}と様々に呼ばれる）および非病原性配座異性体（細胞タンパク質形態、細胞アイソフォーム、非病原性アイソフォーム、非病原性プリオンタンパク質、およびPrP^Cと様々に呼ばれる）の両方はもちろんのこと、病原性コンフォメーションまたは正常細胞コンフォメーションのどちらも有し得ないプリオンタンパク質の変性形態および各種の組み換え形態も指すために、本明細書で互換的に使用される。病原性配座異性体は、ヒトおよび動物の疾患状態（海綿状脳症）に関連している。非病原性配座異性体は通常、動物細胞に存在して、適切な条件下で病原性PrP^{S^c}コンフォメーションに変換され得る。プリオンは、ヒト、ヒツジ、ウシおよびマウスを含む多種多様の哺乳動物種で自然に産生される。ヒトプリオンタンパク質の代表的なアミノ酸配列は、配列番号1として示される。マウスプリオンタンパク質の代表的なアミノ酸配列は、配列番号2として示される。他の代表的な配列は、配列番号3～11として提供される。プリオンタンパク質の断片は、実際の配列に対応する配列番号によって、または断片の最初および最後のアミノ酸のアミノ酸位置を示すことによって指定される。別途指摘しない限り、断片の最初および最後のアミノ酸を示すことによって呼ばれる断片は、配列番号1によって示されるようなヒトプリオンタンパク質の配列に基づく。たとえば「PrP₁₉₋₃₀」という用語は、LGLCKKRPKPGGの配列（配列番号251）を有するペプチドを指す。

20

30

【0082】

「アルツハイマー病（AD）タンパク質」または「ADタンパク質」という用語は、病原性配座異性体（病原性タンパク質形態、病原性アイソフォーム、病原性アルツハイマー病タンパク質、およびアルツハイマー病配座異性体と様々に呼ばれる）および非病原性配座異性体（正常細胞形態、非病原性アイソフォーム、非病原性アルツハイマー病タンパク質と様々に呼ばれる）の両方はもちろんのこと、病原性コンフォメーションまたは正常細胞コンフォメーションのどちらも有し得ないアルツハイマー病タンパク質の変性形態および各種の組み換え形態も指すために、本明細書で互換的に使用される。例示的なアルツハイマー病タンパク質は、A およびタウタンパク質を含む。

40

【0083】

「アミロイドベータ」、「アミロイド - 」、「Aベータ」、「A₄₂」、「A₄₀」、および「A_{40/42}」という用語はすべて、本明細書で使用するように、アミロイド前駆体タンパク質（APP）の切断によって形成された39～43アミノ酸長の断片である、アミロイド - ペプチドを指す。A という用語は、任意の形態の

50

アミロイド - ペプチドを一般に指すために使用される。「A 42」という用語は、APPのアミノ酸1~42に対応する断片を指す。「A 40」という用語は、APPのアミノ酸1~40に対応する断片を指す。A 40/42という用語は、A 40およびA 42アイソフォームの両方を指すために使用される。

【0084】

「糖尿病タンパク質」という用語は、病原性配座異性体（病原性タンパク質形態、病原性アイソフォーム、病原性糖尿病タンパク質と様々に呼ばれる）および非病原性配座異性体（正常細胞形態、非病原性アイソフォーム、非病原性糖尿病タンパク質と様々に呼ばれる）の両方はもちろんのこと、病原性コンフォメーションまたは正常細胞コンフォメーションのどちらも有し得ない糖尿病タンパク質の変性形態および各種の組み換え形態も指すために、本明細書で使用される。例示的なII型糖尿病タンパク質はアミリンであり、膵島アミロイドポリペプチド（IAPP）としても公知である。

10

【0085】

「断片」は本明細書で使用するよう、自然界で見出されるような無傷の全長タンパク質および構造の一部のみから成るペプチドを指す。たとえば断片は、タンパク質のC末端欠失および/またはN末端欠失を含むことができる。通例、断片は、それが由来する全長ポリペプチド配列の機能の1つ、いくつかまたはすべてを保持する。通例、断片は、天然タンパク質の少なくとも5の連続アミノ酸残基を；好ましくは少なくとも約8の連続アミノ酸残基を；さらに好ましくは、天然タンパク質の少なくとも約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30の連続アミノ酸残基を含む。

20

【0086】

「単離された」とは、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指すときに、示された分子が、その分子が自然界で見出され、生物全体から分離され別個であること、またはポリヌクレオチドもしくはポリペプチドが自然界に見出されないときには、そのポリヌクレオチドもしくはポリペプチドがその所期の目的に使用できるのに足るほど、他の生物学的高分子を含んでいないことを意味する。

【0087】

「ペプトイド」は、少なくとも1つの、好ましくは2つ以上のアミノ酸置換、好ましくはN置換グリシンを含有するペプチド模倣体を指すために一般に使用される。ペプトイドは特に、米国特許第5,811,387号に記載されている。本明細書で使用するよう、**「ペプトイド試薬」**は、アミノ末端領域と、カルボキシ末端領域と、アミノ末端領域とカルボキシ末端領域との間の少なくとも1つの**「ペプトイド領域」**とを有する分子である。アミノ末端領域は、通例いずれのN置換グリシンも含有しない、試薬のアミノ末端側の領域を指す。アミノ末端領域は、H、アルキル、置換アルキル、アシル、アミノ保護基、アミノ酸、ペプチドなどであることが可能である。カルボキシ末端領域は、いずれのN置換グリシンも含有しない、ペプトイドのカルボキシ末端の領域を指す。カルボキシ末端領域は、H、アルキル、アルコキシ、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、カルボキシ保護基、アミノ酸、ペプチドなどを含むことができる。

30

【0088】

「ペプトイド領域」は、アミノ末端に最も近いN置換グリシンから開始してそのN置換グリシンを含み、カルボキシ末端に最も近いN置換グリシンで終了してそのN置換グリシンを含む領域である。ペプトイド領域は、その中のアミノ酸の少なくとも3つがN置換グリシンによって置換された試薬の部分を一般に指す。

40

【0089】

「生理学的に関連するpH」は、約5.5~約8.5；または約6.0~約8.0；または通常は約6.5~約7.5のpHを指す。

【0090】

「脂肪族」は、直鎖または分枝炭化水素部分を指す。脂肪族基は、ヘテロ原子およびカルボニル部分を含むことができる。

50

【0091】

「アルキル」は、単独で使用されても、または別の基の一部として使用されても、脂肪族炭化水素鎖を指し、これに限定されるわけではないが、別途明示的に規定しない限り、1～6個の、1～5個の、1～4個の、または1～3個の炭素原子を含有する直鎖および分枝鎖を含む。たとえばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、tert-ブチルなどは、「アルキル」という用語に含まれる。

【0092】

「アルケニル」は、たとえばこれに限定されるわけではないが、ビニル、アリル、2-メチル-アリル、4-but-3-enyl、4-hex-5-enyl、3-メチル-but-2-enylなどを含む、少なくとも1個の2重結合、たとえば2～7個の、2～6個の、2～5個の、または2～4個の炭素原子を含有するアルキル基を示すことを意図する。

10

【0093】

「アルキニル」は、少なくとも1個の3重炭素間結合、たとえば2～7個の、2～6個の、2～5個の、または2～4個の炭素原子を有するアルキル基を示すことを意図する。例示的なアルキニル基は、エチニル、プロピニルなどを含む。

【0094】

「アルコキシ」は、単独で使用されても、または別の基の一部として使用されても、式-O-アルキル、たとえばメトキシの基の通常の意味を有し、ここでアルキルは本明細書で定義する通りである。

20

【0095】

「ハロ」または「ハロゲン」は、単独でまたは別の基の一部として使用されるとき、第VII族元素、たとえばF、Cl、BrおよびIの通常の意味を有する。

【0096】

「アリール」は、単独でまたは別の基の一部として使用されるとき、たとえば1、2または3環の、たとえば6～20個の、6～14個の、または6～10個の環炭素原子の芳香族炭化水素系たとえばフェニル、ベンジル、ナフチル、ナフタレン、アントラセン、フェナントレニル、アントラセニル、ピレニルなどを意味する。アリールの定義には、1個以上の縮合非芳香族カルボシクリルまたはヘテロシクリル環を含有する芳香族系、たとえば1,2,3,4-テトラヒドロナフタレンおよびインダンも含まれる。縮合非芳香環を含有するアリール基は、芳香族部分または非芳香族部分を介して結合できる。

30

【0097】

「アリール-アルキル」または「アラルキル」は、式-アルキル-アリールの基を意味し、ここでアリールおよびアルキルは本明細書における定義を有する。

【0098】

「アリーロキシ」は、式-O-アリールの基、たとえばヒドロキシフェニルのその通常の意味を有し、ここでアリールは、本明細書で定義する通りである。

【0099】

「アラルコキシ」は、式-O-アルキル-アリールの基、たとえばメトキシフェニルのその通常の意味を有し、ここでアルコキシおよびアリールは本明細書で定義する通りである。

40

【0100】

「シクロアルキル」は単独で使用されてもまたは別の基の一部として使用されても、環式アルキル、アルケニル、またはアルキニル基、たとえば3～10個の炭素原子の単環、2環式、3環式、縮合、架橋またはスピロ飽和炭化水素部分、たとえばシクロプロピルのその通常の意味を有する。「シクロアルキル-アリール」という用語は、式-アリール-シクロアルキルの基を示すことを意図し、ここでアリールおよびシクロアルキルは、本明細書で定義する通りである。「シクロアルキアルキル(cycloalkylalkyl)」は、式-アルキル-シクロアルキルの基、たとえばシクロプロピルメチルまたはシクロヘキシルメチル基を示すことを意図し、ここでアルキルおよびシクロアルキルは、本明細

50

書で定義する通りである。

【0101】

本明細書で使用するように、「ヘテロアリアル」基は、硫黄、酸素、または窒素などの少なくとも1個のヘテロ原子環員を有する芳香族複素環を指す。ヘテロアリアル基は、単環式および多環式（たとえば2、3または4個の縮合環を有する）系を含む。ヘテロアリアル基の例は、制限なく、ピリジル、ピリミジニル、ピラジニル、ピリダジニル、トリアジニル、フリル（フラニル）、キノリル、イソキノリル、チエニル、イミダゾリル、チアゾリル、インドリル、ピリル、オキサゾリル、ベンゾフリル、ベンゾチエニル、ベンズチアゾリル、イソキサゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、インダゾリル、1,2,4-チアジアゾリル、イソチアゾリル、ベンゾチエニル、プリニル、カルバゾリル、ベンズイミダゾリル、インドリニルなどを含む。いくつかの実施形態において、ヘテロアリアル基は1~約20個の炭素原子を、さらなる実施形態において、約3~約20個の炭素原子を有する。いくつかの実施形態において、ヘテロアリアル基は、3~約14個の、3~約7個の、または5~6個の環形成原子を含有する。いくつかの実施形態において、ヘテロアリアル基は、1~約4個の、1~約3個の、または1~2個のヘテロ原子を有する。

10

【0102】

本明細書で使用するように、「ヘテロシクロアルキル」は、環形成炭素原子の1個以上がO、N、またはS原子などのヘテロ原子によって置換された環化アルキル、アルケニル、アルキニル基を含む、非芳香族複素環を指す。例示的な「ヘテロシクロアルキル」基は、モルホリノ、チオモルホリノ、ピペラジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、2,3-ジヒドロベンゾフリル、1,3-ベンゾジオキソール、ベンゾ-1,4-ジオキサン、ペペリジニル、ピロリジニル、イソキサゾリジニル、イソチアゾリジニル、ピラゾリジニル、オキサゾリジニル、チアゾリジニル、イミダゾリジニルなどを含む。ヘテロシクロアルキルの定義には、非芳香族複素環式環に縮合された（すなわち共通の結合を有する）1個以上の芳香環を有する部分、たとえばフタルイミジル、ナフタルイミジル、ならびにインドレンおよびイソインドレン基などの複素環のベンゾ誘導体も含まれる。いくつかの実施形態において、ヘテロシクロアルキル基は、1~約20個の炭素原子を、さらなる実施形態において、約3~約20個の炭素原子を有する。いくつかの実施形態において、ヘテロシクロアルキル基は、3~約14、3~約7、または5~6個の環形成原子を含有する。いくつかの実施形態において、ヘテロシクロアルキル基は、1~約4個の、1~約3個の、または1~2個のヘテロ原子を有する。いくつかの実施形態において、ヘテロシクロアルキル基は0~3個の2重結合を含有する。いくつかの実施形態において、ヘテロシクロアルキル基は、0~2個の2重または3重結合を含有する。

20

30

【0103】

「ヘテロアリアルアルキル」は、式-アルキル-ヘテロアリアル基を指し、ここでアルキルおよびヘテロアリアルは、本明細書で定義する通りである。

【0104】

「アシル」は、式-C(O)-アルキルの基を指す。いくつかの実施形態において、アシル基は、1~10個、1~8個、1~6個、または1~4個の炭素原子を有する。

40

【0105】

「アミノアシル」は、式-C(O)-アルキル-アミノの基を指し、ここでアルキルは本明細書で定義する通りである。

【0106】

「アルキルアミノ」は、式-NH-アルキルの基を指し、ここでアルキルは本明細書で定義する通りである。

【0107】

「ジアルキルアミノ」は、式-N(アルキル)₂の基を指し、ここでアルキルは本明細書で定義する通りである。

【0108】

50

「ハロアルキル」は、1個以上のハロゲンによって置換されたアルキル基を指し、ここでアルキルおよびハロゲンは本明細書で定義する通りである。

【0109】

「アルコシアルキル」は、式 - アルキル - アルコシの基を指し、ここでアルキルおよびアルコシは本明細書で定義する通りである。

【0110】

「カルボシアルキル」は、式 - アルキル - COOHの基を指し、ここでアルキルは本明細書で定義する通りである。

【0111】

「カルバミル」は、式 - C(O)NH₂の基を指す。

10

【0112】

「カルバミルアルキル」は、式 - アルキル - C(O)NH₂の基を指し、ここでアルキルは本明細書で定義する通りである。

【0113】

「グアニジノアルキル」は、式 - アルキル - NHC(=NH)NH₂の基を指し、ここでアルキルは本明細書で定義する通りである。

【0114】

「チオール」は、式 - SHの基を指す。

【0115】

「アルキルチオール」は、式 - S - アルキルの基を指し、ここでアルキルは本明細書で定義する通りである。

20

【0116】

「アルキルチオアルキル」は、式 - アルキル(alkyl) - S - アルキルの基を指し、ここでアルキルは本明細書で定義する通りである。

【0117】

「イミダゾリルアルキル」は、式 - アルキル - イミダゾリルの基を指し、ここでアルキルは本明細書で定義する通りである。

【0118】

「ペリジルアルキル」は、式 - アルキル - ペリジニルの基を指し、ここでアルキルは本明細書で定義する通りである。

30

【0119】

「ナフチルアルキル」は、式 - アルキル - ナフチルの基、たとえば(8'-ナフチル)メチルを意味し、ここでナフチルはその通常の意味を有し、アルキルは本明細書で定義する通りである。

【0120】

「インドリルアルキル」は、式 - アルキル - インドールの基、たとえば3'-インドリルエチル、および3'-インドリルメチルを意味し、ここでインドールはその通常の意味を有し、アルキルは本明細書で定義する通りである。

【0121】

「N含有ヘテロシクリル」は、少なくとも1個の環形成N原子を含有する任意のヘテロアリアルまたはヘテロシクロアルキル基を指すことを意図する。例示的なN含有ヘテロシクリル基は、ピリジニル、イミダゾリル、ペリジニル、ペラジニル、ピロリル、インドリル、などを含む。

40

【0122】

「N含有ヘテロシクリルアルキル」は、N含有ヘテロシクリルアルキルによって置換されたアルキルを指すことを意図する。

【0123】

「アミノ」および「1級アミノ」は、NH₂を指す。「2級アミノ」はNHRを指し、「3級アミノ」はNR₂を指し、ここでRは任意の好適な置換基である。

【0124】

50

「アンモニウム」は基 - N (R) ³⁺ を指すことを意図し、ここでRはアルキル、シクロアルキル、アリール、シクロアルキルアルキル、アリールアルキルなどの任意の適切な部分であり得る。

【0125】

「アミノ酸」は、20個の天然に存在しかつ遺伝的にコードされた - アミノ酸またはその保護誘導体のいずれも指す。アミノ酸の保護誘導体は、アミノ部分、カルボキシ部分、または側鎖部分に1個以上の保護基を含有することができる。アミノ保護基の例は、ホルミル、トリチル、フタルイミド、トリクロロアセチル、クロロアセチル、プロモアセチル、ヨードアセチル、およびウレタン型ブロック基、たとえばベンジルオキシカルボニル、4 - フェニルベンジルオキシカルボニル、2 - メチルベンジルオキシカルボニル、4 - 10
メトキシベンジルオキシカルボニル、4 - フルオロベンジルオキシカルボニル、4 - クロロベンジルオキシカルボニル、3 - クロロベンジルオキシカルボニル、2 - クロロベンジルオキシカルボニル、2, 4 - ジクロロベンジルオキシカルボニル、4 - プロモベンジルオキシカルボニル、3 - プロモベンジルオキシカルボニル、4 - ニトロベンジルオキシカルボニル、4 - シアノベンジルオキシカルボニル、t - ブトキシカルボニル、2 - (4 -
キセニル) - イソプロポキシカルボニル、1, 1 - ジフェニルエチ - 1 - イルオキシカルボニル、1, 1 - ジフェニルプロパ - 1 - イルオキシカルボニル、2 - フェニルプロパ - 20
2 - イルオキシカルボニル、2 - (p - トルイル) - プロパ - 2 - イルオキシカルボニル、シクロペンタニルオキシ - カルボニル、1 - メチルシクロペンタニルオキシカルボニル、シクロヘキサニルオキシカルボニル、1 - メチルシクロヘキサニルオキシカルボニル、20
2 - メチルシクロヘキサニルオキシカルボニル、2 - (4 - トルイルスルホニル) - エトキシカルボニル、2 - (メチルスルホニル) エトキシカルボニル、2 - (トリフェニルホスフィノ) - エトキシカルボニル、フルオレニルメトキシカルボニル(「FMOC」)、2 - (トリメチルシリル) エトキシカルボニル、アリルオキシカルボニル、1 - (トリメチルシリルメチル) プロパ - 1 - エニルオキシカルボニル、5 - ベンズイソキサリルメトキシカルボニル、4 - アセトキシベンジルオキシカルボニル、2, 2, 2 - トリクロロエトキシカルボニル、2 - エチニル - 2 - プロポキシカルボニル、シクロプロピルメトキシカルボニル、4 - (デシクロキシ) ベンジルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、1 - ピペリジルオキシカルボニルなど；ベンゾイルメチルスルホニル基、2 - ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィンオキシドおよび同様のアミノ保護基を 30
含む。カルボキシ保護基の例は、メチル、p - ニトロベンジル、p - メチルベンジル、p - メトキシベンジル、3, 4 - ジメトキシベンジル、2, 4 - ジメトキシベンジル、2, 4, 6 - トリメトキシベンジル、2, 4, 6 - トリメチルベンジル、ペンタメチルベンジル、3, 4 - メチレンジオキシベンジル、ベンズヒドリル、4, 4' - ジメトキシベンズヒドリル、2, 2', 4, 4' - テトラメトキシベンズヒドリル、t - ブチル、t - アミル、トリチル、4 - メトキシトリチル、4, 4' - ジメトキシトリチル、4, 4', 4'' - トリメトキシトリチル、2 - フェニルプロパ - 2 - イル、トリメチルシリル、t - ブチルジメチルシリル、フェナシル、2, 2, 2 - トリクロロエチル、ベータ - (ジ(n - ブチル)メチルシリル) エチル、p - トルエンスルホニルエチル、4 - ニトロベンジルスルホニルエチル、アリル、シンナミル、1 - (トリメチルシリルメチル) プロパ - 1 - エン 40
- 3 - イルおよび同様の部分を含む。使用される保護基の種は、分子の残りを破壊することなく、誘導体化保護基を適切な箇所を選択的に除去できる限り、重要ではない。保護基のさらなる例は、E. Haslam, Protecting Groups in Organic Chemistry, (J. G. W. McOmie, ed., 1973), at Chapter 2; ならびにT. W. GreeneおよびP. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, (1991), at Chapter 7に見出され、そのそれぞれの開示はその全体が参照により本明細書に援用される。

【0126】

「N置換グリシン」は、式 - (NR - CH₂ - CO) - の残基を指し、ここで各Rは、

10

20

30

40

50

(C₂ - C₆)アルキル、ハロ(C₁ - C₆)アルキル、(C₂ - C₆)アルケニル、(C₂ - C₆)アルキニル、(C₆ - C₁₀)シクロアルキル-アリール、アミノ(C₁ - C₆)アルキル、アンモニウム(C₁ - C₆)アルキル、ヒドロキシ(C₁ - C₆)アルキル、(C₁ - C₆)アルコキシ(C₁ - C₆)アルキル、カルボキシ、カルボキシ(C₂ - C₆)アルキル、カルバミル、カルバミル(C₂ - C₆)アルキル、グアニジノ、グアニジノ(C₁ - C₆)アルキル、アミジノ、アミジノ(C₁ - C₆)アルキル、チオール、(C₁ - C₆)アルキルチオール、炭素原子2 ~ 10個のアルキルチオアルキル、N含有ヘテロシクリル、N含有ヘテロシクリル(C₁ - C₆)アルキル、イミダゾリル、炭素原子4 ~ 10個のイミダゾリルアルキル、ペペリジル、炭素原子5 ~ 10個のペペリジルアルキル、インドリル、炭素原子9 ~ 15のインドリルアルキル、ナフチル、炭素原子11 ~ 16個のナフチルアルキル、およびアリール(C₁ - C₆)アルキルから独立して選択されるものなどの非水素部分であり；ここで各R部分は、ハロゲン、ヒドロキシおよび(C₁ - C₆)アルコキシから独立して選択される1 ~ 3個の置換基によって場合により置換される。

【0127】

(NR - CH₂ - CO) - のいくつかの実施形態において、Rは、(C₂ - C₆)アルキル、ハロ(C₁ - C₆)アルキル、(C₂ - C₆)アルケニル、(C₂ - C₆)アルキニル、(C₆ - C₁₀)シクロアルキル-アリール、アミノ(C₁ - C₆)アルキル、ヒドロキシ(C₁ - C₆)アルキル、(C₁ - C₆)アルコキシ(C₁ - C₆)アルキル、カルボキシ、カルボキシ(C₂ - C₆)アルキル、カルバミル、カルバミル(C₂ - C₆)アルキル、グアニジノ、グアニジノ(C₁ - C₆)アルキル、チオール、(C₁ - C₆)アルキルチオール、炭素原子2 ~ 10個のアルキルチオアルキル、イミダゾリル、炭素原子4 ~ 10個のイミダゾリルアルキル、ペペリジル、炭素原子5 ~ 10個のペペリジルアルキル、インドリル、炭素原子9 ~ 15個のインドリルアルキル、ナフチル、炭素原子11 ~ 16個のナフチルアルキル、ジフェニル(C₁ - C₆)アルキルまたはアリール(C₁ - C₆)アルキルであり；ここで各R部分は、ハロゲン、ヒドロキシ、および(C₁ - C₆)アルコキシから独立して選択される1 ~ 3個の置換基によって場合により置換される。

【0128】

(NR - CH₂ - CO) - のいくつかの実施形態において、Rは、ハロゲン、ヒドロキシまたは(C₁ - C₆)アルコキシから独立して選択される1 ~ 3個の置換基によって置換される、(C₂ - C₆)アルキル、アミノ(C₁ - C₆)アルキル、ヒドロキシ(C₁ - C₆)アルキル、(C₁ - C₆)アルコキシ(C₁ - C₆)アルキル、グアニジノ(C₁ - C₆)アルキル、炭素原子9 ~ 15個のインドリルアルキル、炭素原子11 ~ 16個のナフチルアルキル、ジフェニル(C₁ - C₆)アルキルまたはアリール(C₁ - C₆)アルキルである。

【0129】

(NR - CH₂ - CO) - のいくつかの実施形態において、Rは、生理学的に関連するpHにて荷電した部分である。生理学的に関連するpHにて正に荷電したRの例はたとえば、アミノ(C₁ - C₆)アルキル、アンモニウム(C₁ - C₆)アルキル、グアニジノ、グアニジノ(C₁ - C₆)アルキル、アミジノ、アミジノ(C₁ - C₆)アルキル、N含有ヘテロシクリル、およびN含有ヘテロシクリル(C₁ - C₆)アルキルを含み、ここで各R部分は、ハロゲン、C₁ - C₃メトキシ、およびC₁ - C₃アルキルから独立して選択される1 ~ 3個の置換基によって場合により置換される。

【0130】

(NR - CH₂ - CO) - のいくつかの実施形態において、Rは生理学的に関連するpHにおいて中性の部分である。生理学的に関連するpHにて中性のRの例はたとえば、(C₂ - C₆)アルキル、ハロ(C₁ - C₆)アルキル、(C₂ - C₆)アルケニル、(C₂ - C₆)アルキニル、(C₆ - C₁₀)シクロアルキル-アリール、(C₁ - C₆)アルコキシ(C₁ - C₆)アルキル、炭素原子2 ~ 10個のアルキルチオアルキル、ジフ

10

20

30

40

50

エニル (C₁ - C₆) アルキル、およびアリール (C₁ - C₆) アルキルを含む。さらなる例は、エチル、プロパ - 1 - イル、プロパ - 2 - イル、1 - メチルプロパ - 1 - イル、2 - メチルプロパ - 1 - イル、3 - フェニルプロピ - 1 - イル、3 - メチルブチル、ベンジル、4 - クロロ - ベンジル、4 - メトキシ - ベンジル、4 - メチル - ベンジル、2 - メチルチオエチ - 1 - イル、および 2, 2 - ジフェニルエチルを含む。

【0131】

- (NR - CH₂ - CO) - のいくつかの実施形態において、R はアミノ (C₁ - C₆) アルキル (たとえばアミノブチル) である。

【0132】

さらなる例示的な N 置換グリシンは、R がエチル、プロパ - 1 - イル、プロパ - 2 - イル、1 - メチルプロパ - 1 - イル、2 - メチルプロパ - 1 - イル、3 - フェニルプロピ - 1 - イル、3 - メチルブチル、ベンジル、4 - ヒドロキシベンジル、4 - クロロ - ベンジル、4 - メトキシ - ベンジル、4 - メチル - ベンジル、2 - ヒドロキシエチル、メルカプトエチル、2 - アミノエチル、3 - プロピオン酸、3 - アミノプロピル、4 - アミノブチル、2 - メチルチオエチ - 1 - イル、カルボキシメチル、2 - カルボキシエチル、カルバミルメチル、2 - カルバミルエチル、3 - グアニジノプロパ - 1 - イル、イミダゾリルメチル、2, 2 - ジフェニルエチルまたはインドール - 3 - イル - エチルであるものを含む。

10

【0133】

N 置換グリシンの塩、エステル、および保護形態 (たとえば Fmoc または Boc などにより N 保護されたもの) も含まれる。

20

【0134】

N 置換グリシンを含むアミノ酸置換基を生成する方法は、特に、その全体が参照により本明細書に援用される、米国特許第 5, 811, 387 号に開示されている。

【0135】

「モノマー」または「サブユニット」は、鎖を形成するために他のモノマーに結合できる分子、たとえばペプチドを指す。アミノ酸および N 置換グリシンは例示的なモノマーである。他のモノマーと結合したとき、モノマーは「残基」と呼ばれ得る。

【0136】

(II. コンフォメーション病)

30

本発明は、非プリオンコンフォメーション病タンパク質の病原性配座異性体を検出する方法およびこのようなタンパク質に関連する疾患を診断する方法に関する。コンフォメーション病タンパク質およびその対応する疾患は、下の表

【0137】

【表 2】

表 2

コンフォメーション病タンパク質	疾患／症状／原因	
炎症／免疫 免疫グロブリン軽鎖 免疫グロブリン重鎖 血清アミロイドA シスタチンC リゾチーム フィブリノゲン	全身性アミロイドーシスー骨髄腫関連 全身性アミロイドーシスー骨髄腫関連 全身性アミロイドーシス、関節リウマチ、慢性炎症 全身性アミロイドーシスー家族性 全身性アミロイドーシスー家族性 全身性アミロイドーシスー家族性	10
神経系 アミロイドβ プリオンタンパク質	アルツハイマー病 伝染性海綿状脳症	20
内分泌性ホルモン プロラクチン 膵島アミロイドポリペプチド 心房性ナトリウム利尿因子	下垂体ー加齢性 局所性アミロイドーシスー2型糖尿病関連 局所心房性アミロイドーシス	
輸送タンパク質 トランスサイレチン β2-マイクログロブリン アポリポタンパク質A I	全身性アミロイドーシスー家族性、老人性 全身性アミロイドーシス 慢性血液透析 全身性アミロイドーシスー家族性	30
眼タンパク質 ゲルソリン ラクトフェリン ケラトエピセリン	全身性アミロイドーシスー家族性 家族性角膜アミロイドーシス 家族性角膜ジストロフィー	40

に示す疾患を含む。

【0138】

本発明のコンフォメーション病は、プリオンに関連する疾患以外の、2つ以上の異なるコンフォメーションを形成するタンパク質に関連する任意の疾患を含む。本明細書で特に興味のある疾患は、アルツハイマー病、全身性アミロイドーシス、タウオパチー、およびシヌクレイノパチーなどの、すべてクロスベータシート特徴を呈するアミロイド疾患を含む。興味のある他の疾患は、糖尿病およびポリグルタミン病である。

【0139】

本発明の方法のある実施形態において、コンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬（「CDPSB試薬」）は、非病原性および病原性配座異性体の両方の捕捉または検出のどちらかを行うために使用される。使用される特定のCDPSB試薬は、検出される病原性配座異性体に依存する。たとえば診断されるコンフォメーション病がアルツハイマー病である場合、ここでCDPSB試薬は、アルツハイマー病タンパク質Aの非病原性および病原性配座異性体の両方を認識する抗体であり得る。

【0140】

（III．本発明の方法で使用される試薬）

本発明で使用される病原性配座異性体特異的結合試薬（「PCSB試薬」）は、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する試薬である。

【0141】

通例、PCSB試薬は、プリオンタンパク質断片に由来する。好ましくは、このようなPCSB試薬は、ペプチドまたはペプチドとして一般に公知であるものを含む修飾ペプチドのどちらかである。

【0142】

ある実施形態において、このようなPCSB試薬はポリカチオン性である。最も好ましくは、PCSB試薬は、生理学的pHにおいて少なくとも3または4の正味の正電荷を有する。理論に束縛されたくはないが、出願人は、プリオンタンパク質断片に由来するPCSB試薬がPrP^{Sc}に結合する機構に類似した機構によって、本明細書に記載するPCSB試薬が非プリオン病原性配座異性体に結合して、したがって同様の結合特性を示すと考えている。Lauroは（本明細書の上で引用した）、血漿および緩衝液の両方においてPrP^{Sc}への結合に必要なコアペプチド配列が4個の正に荷電したアミノ酸を有することを示している。正に荷電したアミノ酸残基を3個しか含有しないペプチドは、緩衝液中のみでPrP^{Sc}を結合できる。さらに、血漿および緩衝液の両方においてPrP^{Sc}を結合するペプチドのアラニンスキャニング（scanning）は、正に荷電したアミノ酸のいずれか1個を除去することによって、バックグラウンドレベルに低下する。

【0143】

（A．好ましいプリオンタンパク質断片）

PCSB試薬は好ましくは、あるプリオンタンパク質断片のアミノ酸配列に由来する。これらの好ましい領域は、マウスプリオン配列（配列番号2）およびヒトプリオン配列（配列番号1）の両方に関して例示される。本発明の方法で使用されるPCSB試薬は好ましくは、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用することが公知の他のPCSB試薬の基礎として作用するプリオンタンパク質断片に由来するが、生じるPCSB試薬が病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用できる限り、いずれのプリオンタンパク質断片から由来していてもよい。特に好ましい配列を下に記載する。

【0144】

本発明で使用されるPCSB試薬は、いずれの種または改変体のアミノ酸配列の断片からも由来し得る。ヒト、マウス、ヒツジおよびウシを含む多くの異なる種によって産生されたプリオンタンパク質のポリヌクレオチドおよびアミノ酸配列が公知である。これらの配列の改変体もそれぞれの種に存在する。たとえばある実施形態において、本明細書に記載するペプチドPCSB試薬は、配列番号1-11で示される配列のいずれかに由来する。本明細書で具体的に開示されるPCSB試薬の配列は、マウスまたはヒトプリオン配列のどちらかに基づくが、当業者は、適切な場合には、他の種による対応する配列を容易に代用することができる。

【0145】

PCSB試薬が由来可能であるプリオンタンパク質断片の好ましい長さは、長さが3～5の残基、長さが6～10（またはその間の任意の整数）の残基、長さが11～20（またはその間の任意の整数）の残基、長さが21～75（またはその間の任意の整数）の残基、長さが75～100（またはその間の任意の整数）の残基、または長さが100の残基を超えるポリペプチドを含む。好ましくは、ペプチドは長さが約3～100の残基であ

10

20

30

40

50

る。一般に当業者は、本明細書の教示を考慮して、最大長を容易に選択することができる。さらに、本明細書に記載するような試薬、たとえば合成ペプチドは、標識、リンカー、または他の化学的部分（たとえばビオチン、コントロールレッドまたはチオフラビンなどのアミロイド特異性色素）などのさらなる分子を含み得る。このような部分は、PCSB試薬と病原性配座異性体との相互作用および/または病原性配座異性体のさらなる検出をさらに向上させ得る。

【0146】

好ましい実施形態において、PCSB試薬は、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用することが公知のプリオンタンパク質断片、たとえば以下のヒトプリオンタンパク質断片：PrP₁₉₋₃₀（配列番号242）、PrP₂₃₋₃₀（配列番号243）、PrP₁₀₀₋₁₁₁（配列番号244）、PrP₁₀₁₋₁₁₀（配列番号245）、PrP₁₅₄₋₁₆₅（配列番号246）、PrP₂₂₆₋₂₃₇（配列番号247）、配列番号14、配列番号50および配列番号68に対応する配列を有する断片に由来する。

10

【0147】

（B・PCSBペプチド試薬）

プリオンタンパク質断片に由来するPCSB試薬は、プリオンタンパク質断片の正確なアミノ酸配列を有し得るか、またはプリオンタンパク質断片の変形または修飾形態であり得る。本発明の方法で使用されるPCSB試薬は好ましくは、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用することが公知の他のPCSB試薬の基礎として作用するプリオンタンパク質断片に由来するが、生じる試薬が病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用できる限り、いずれのプリオンタンパク質断片から由来していてもよい。

20

【0148】

PCSB試薬は、1つ以上の非天然型アミノ酸を含む、1つ以上の置換、付加および/または欠失を有する、プリオンタンパク質断片のアミノ酸配列の誘導体を含む。好ましくは、誘導体は、任意の野生型または参照配列に対して少なくとも約50%の同一性を、好ましくは少なくとも約70%の同一性を、さらに好ましくは、本明細書に記載する任意の野生型または参照配列に対して少なくとも約75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を示す。配列（またはパーセント）同一性は、後述する方法などの、当業者に公知の任意の方法を使用して決定できる。このような誘導体は、ポリペプチドの発現後修飾、たとえばグリコシル化、アセチル化、リン酸化などを含むことができる。

30

【0149】

アミノ酸配列の類似性またはパーセント同一性を決定する技法は、当該分野で周知である。一般に「類似性」とは、適切な場所における2つ以上のポリペプチドのアミノ酸対アミノ酸の比較で、アミノ酸が同一であるか、または電荷もしくは疎水性などの同様の化学的および/もしくは物理的特性を有することを意味する。そしていわゆる「パーセント同一性」と呼ばれるもの（*score*）は、比較されたポリペプチド配列の間で決定できる。核酸およびアミノ酸配列同一性を決定する技法も、当該分野で周知であり、遺伝子のmRNAのヌクレオチド配列を（通常、cDNA中間体を介して）決定することと、それによりコードされたアミノ酸配列を決定することと、これを第2のアミノ酸配列と比較することとを含む。一般に「同一性」は、2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列それぞれの、正確なヌクレオチド対ヌクレオチドまたはアミノ酸対アミノ酸の対応を指す。

40

【0150】

2つ以上のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列は、その「パーセント同一性」を決定することによって比較できる。「パーセント同一性」は、配列を整列させて、2つの整列した配列間の正確な一致数をカウントし、参照配列の長さで割り、結果に100を掛けることにより、2つの分子間の配列情報の直接比較（参照配列および参照配列に対する%同一性が不明の配列）によって決定することができる。ペプチド分析のためにAdvanced

50

es in Appl. Math. 2: 482 - 489, 1981のSmith and Watermanの局所相同性アルゴリズムを適合させた、ALIGN, Dayhoff, M.O. in Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff ed., 5 Suppl. 3: 353 - 358, National biomedical Research Foundation, Washington, DCなどの容易に入手可能なコンピュータプログラムを使用して分析に役立てることができる。ヌクレオチド配列同一性を決定するプログラム、たとえばまたSmith and Watermanアルゴリズムに依存した、BESTFIT、FASTAおよびGAPプログラムは、Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 (Genetics Computer Group, Madison, WIから入手できる)で入手できる。これらのプログラムは、製作者によって推奨され、上で触れたWisconsin Sequence Analysis Packageに記載されているデフォルトパラメーターによって容易に利用される。たとえば、特定のヌクレオチド配列の参照配列に対するパーセント同一性は、Smith and Watermanの相同性アルゴリズムを、デフォルトのスコアリング表および6ヌクレオチド部位のギャップペナルティと共に使用して決定することができる。

【0151】

本発明の状況においてパーセント同一性を確立する別の方法は、University of Edinburghが著作権を所有し、John F. CollinsおよびShane S. Sturrokによって開発され、多くの供給源、たとえばインターネットから入手可能である、MPSRCHTMパッケージプログラムを使用することである。この1組のパッケージから、デフォルトパラメーターがスコアリング表に使用されている(たとえばギャップオープンペナルティ12、ギャップ延長ペナルティ1、およびギャップ6)、Smith-Watermanアルゴリズムを使用することができる。生成されたデータから、「Match」値は「配列同一性」を反映する。配列間のパーセント同一性または類似性を計算するための他の好適なプログラムは、一般に当該分野で公知であり、たとえば、別のアラインメントプログラムは、デフォルトパラメーターと共に使用されるBLASTである。たとえば、BLASTNおよびBLASTPは、以下のデフォルトパラメーターを使用して使用できる: 遺伝コード = 標準; フィルタ = なし; スtrand = 両方; カットオフ = 60; 期待値 = 10; マトリクス = BLOSUM62; ディスクリプション = 50配列; ソート = HIGH SCORE; データベース = 非重複、GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translation + Swiss protein + Spupdate + PIR。これらのプログラムの詳細は容易に入手できる。

【0152】

PCSB試薬は、ポリペプチドが所望の活性を保持する限り、天然プリオンタンパク質配列に対する修飾、たとえば欠失、付加および置換(一般に自然界では保存的)を備えたPCSB試薬も含むことができる。ある実施形態において、保存的アミノ酸置換が好ましい。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸のファミリー内で起きるその側鎖に関連する置換である。遺伝的にコードされたアミノ酸は、一般に4つのファミリーに分類される: (1) 酸性 = アスパラギン酸、グルタミン酸; (2) 塩基性 = リジン、アルギニン、ヒスチジン; (3) 非極性 = アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン; および(4) 非荷電極性 = グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは場合により、芳香族アミノ酸として一緒に分類される。たとえばロイシンとイソロイシンもしくはバリンとの、アスパラギン酸のグルタミン塩との、トレオニンとセリンとの孤立置換(isolated replacement)、またはアミノ酸と構造的に関連するアミノ酸との同様の保存的置換は、生物活性に対して大きな効果を有しないと合理的に予測可能である。このような修飾は、部位特異的変異誘発に

よるなど計画的であり得るか、またはタンパク質を産生する宿主の変異もしくはPCR増幅によるエラーによるなど偶発的であり得る。さらに、以下の効果：毒性の低下；病原性配座異性体に対する親和性および/または特異性の向上；細胞プロセッシングの促進（たとえば分泌、抗原提示など）；ならびにB細胞および/またはT細胞への提示の促進の1つ以上を有する修飾が行われ得る。

【0153】

PCSB試薬は、アミノ酸の1つ以上の類似体（たとえば非天然アミノ酸などを含む）、置換された結合を有するペプチドはもちろんのこと、天然型および非天然型（たとえば合成）の両方の、当該分野で公知の他の修飾も含有し得る。それゆえ合成ペプチド、ダイマー、マルチマー（たとえばタンデムリピート、多抗原性ペプチド(MAP)形態、直鎖状結合ペプチド）、環化、分枝分子などは、ペプチドと見なされる。これは、1個以上のN置換グリシン残基（「ペプチド」）および他の合成アミノ酸またはペプチドを含む分子も含む。（ペプチドの説明については、たとえば米国特許第5,831,005号；同第5,877,278号；および同第5,977,301号；Nguyenら(2000) *Chem Biol*. 7(7): 463-473；ならびにSimonら(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(20): 9367-9371を参照）。

10

【0154】

これらおよび他のアミノ酸類似体ならびにペプチドミメティックの一般的な総説については、Nguyenら(2000) *Chem Biol*. 7(7): 463-473；Spatola, A.F., in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983)を参照。Spatola, A.F., *Peptide Backbone Modifications* (総説), Vega Data, Vol. 1, Issue 3, (3月、1983)；Morley, *Trends Pharm Sci* (総説), pp. 463-468 (1980)；Hudson, D.ら, *Int J Pept Prot Res*, 14: 177-185 (1979) (- - CH₂NH - -, CH₂CH₂ - -)；Spatolaら, *Life Sci*, 38: 1243-1249 (1986) (- - CH₂ - - S)；Hann J. *Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 307-314 (1982) (- - CH - CH - -, シスおよびトランス)；Almqvistら, *J Med Chem*, 23: 1392-1398 (1980) (- - COCH₂ - -)；Jennings-Whiteら, *Tetrahedron Lett*, 23: 2533 (1982) (- - COCH₂ - -)；Szelkeら, *European Appln. EP45665CA*: 97: 39405 (1982) (- - CH(OH)CH₂ - -)；Holladayら, *Tetrahedron Lett*, 24: 4401-4404 (1983) (- - C(OH)CH₂ - -)；およびHruby, *Life Sci*, 31: 189-199 (1982) (- - CH₂ - - S - -)も参照；そのそれぞれは参照により本明細書に援用される。

20

30

【0155】

天然アミノ酸および非天然アミノ酸類似体の任意の組合せが本明細書に記載するPCSB試薬を生成するために使用できることも明らかになる。遺伝子コードされていない一般に見られるアミノ酸類似体は、これに限定されるわけではないが、オルニチン(Orn)；アミノイソ酪酸(Aib)；ベンゾチオフェニルアラニン(BtPhe)；アルピジン(Abz)；t-ブチルグリシン(Tle)；フェニルグリシン(PhG)；シクロヘキシルアラニン(Cha)；ノルロイシン(Nle)；2-ナフチルアラニン(2-Nal)；1-ナフチルアラニン(1-Nal)；2-チエニルアラニン(2-Thi)；1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸(Tic)；N-メチルイソロイシン(N-MeIle)；ホモアルギニン(Har)；N-メチルアルギニン(N-MeArg)；ホスホチロシン(pTyrまたはpY)；ピペコリン酸(Pip)；

40

50

4 - クロロフェニルアラニン (4 - C l P h e) ; 4 - フルオロフェニルアラニン (4 - F P h e) ; 1 - アミノシクロプロパンカルボン酸 (1 - N C P C) ; およびサルコシン (S a r) を含む。P C S B 試薬で使用されるアミノ酸のいずれも D - または、より通例には L - 異性体のどちらかであり得る。

【 0 1 5 6 】

本明細書に記載する P C S B 試薬を形成するために使用され得るアミノ酸の他の非天然型類似体は、生物機能的同等物であり、本発明の化合物においても有用であり、同配体によって場合により置換された 1 個以上のアミド結合を有する化合物を含む、アミノ酸のスルホン酸アナログおよびボロン酸アナログなどのペプチドおよび / またはペプチドミメティック化合物を含む。本発明の状況において、たとえば - - C O N H - - は、同配体によって結合されたラジカルが - - C O N H - - によって結合されたラジカルと同様の配向で保持されるように、- - C H ₂ N H - - 、 - - N H C O - - 、 - - S O ₂ N H - - 、 - - C H ₂ O - - 、 - - C H ₂ C H ₂ - - 、 - - C H ₂ S - - 、 - - C H ₂ S O - - 、 - - C H - - C H - - (シスまたはトランス) 、 - - C O C H ₂ - - 、 - - C H (O H) C H ₂ - - および 1 , 5 - 2 置換 (d i s u b s t i t u t e d) テトラゾールによって置換され得る。本明細書に記載する P C S B 試薬の 1 個以上の残基はペプチドを含み得る。

10

【 0 1 5 7 】

それゆえ試薬は、1 個以上の N 置換グリシン残基も含み得る (1 個以上の N 置換グリシン残基を有するペプチドは、「ペプチド」と呼ばれ得る) 。たとえばある実施形態において、本明細書に記載する P C S B 試薬のいずれの 1 個以上のプロリン残基も N 置換グリシン残基によって置換される。この点で好適である特定の N 置換グリシンは、これに限定されるわけではないが、N - (S) - (1 - フェニルエチル) グリシン ; N - (4 - ヒドロキシフェニル) グリシン ; N - (シクロプロピルメチル) グリシン ; N - (イソプロピル) グリシン ; N - (3 , 5 - ジメトキシベンジル) グリシン ; および N - ブチルグリシンを含む。他の N 置換グリシンも、本明細書に記載する P C S B 試薬配列内の 1 個以上のアミノ酸残基を置換するのに好適であり得る。

20

【 0 1 5 8 】

本明細書に記載する P C S B 試薬は、モノマー、マルチマー、環化分子、分枝分子、リンカーなどであり得る。本明細書に記載する配列のいずれのマルチマー (すなわちダイマー、トリマーなど) またはその生物機能性同等物も予期される。マルチマーは、ホモマルチマーであること、すなわち同一のモノマーで構成されることが可能であり、たとえば各モノマーは同じペプチド配列である。代わりに、マルチマーはヘテロマルチマーであることが可能であり、ヘテロマルチマーとは、マルチマーを構成するすべてのモノマーが同一とは限らないことを意味する。

30

【 0 1 5 9 】

マルチマーは、モノマーの相互への、または、たとえば多抗原性ペプチド (M A P S) (たとえば対称的 M A P S) 、ポリマー骨格、たとえば P E G 骨格に結合されたペプチドおよび / またはスパーサー単位を用いてもしくは用いずに直列に結合されたペプチドを含む基質への、直接結合によって形成することができる。

【 0 1 6 0 】

代わりに、結合基をモノマー性配列に付加して、モノマーを共に結合させて、マルチマーを形成することができる。結合基を使用するマルチマーの非制限的な例は、グリシンリンカーを使用するタンデムリピート ; リンカーを介して基質に結合された M A P S および / またはリンカーを介して骨格に結合された直鎖状結合ペプチドを含む。結合基は、当業者に公知であるような 2 官能性スパーサー単位 (ホモ 2 官能性またはヘテロ 2 官能性) の使用を含み得る。一例としてであり、制限するものではないが、スクシンイミジル - 4 - (p - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (S M C C) 、スクシンイミジル - 4 - (p - マレイミドフェニル) ブチレートなどの試薬を使用して共に結合するペプチドに、このようなスパーサー単位を含める多くの方法は、P i e r c e I m m u n o t e c h n o l o g y H a n d b o o k (P i e r c e C h e m i c a l

40

50

Co., Rockville, Ill.)に記載されており、Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.)およびAldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wis.)からも入手可能であり、“Comprehensive Organic Transformations”, VCK-Verlagsgesellschaft, Weinheim/Germany (1989)に記載されている。モノマー性配列を共に結合するために使用され得る結合基の一例は、 $-Y_1$
 $-F-$ $-Y_2$ であり、ここで Y_1 および Y_2 は、同じまたは異なり、炭素原子0~20
 個の、好ましくは0~8個の、さらに好ましくは0~3個のアルキレン基であり、Fは、
 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-S-S-$ 、 $-C(O)-O-$ 、 $-NR-$ 、
 $-C(O)-NR-$ 、 $-NR-C(O)-O-$ 、 $-NR-C(O)-$
 $-NR-$ 、 $-NR-C(S)-NR-$ 、 $-NR-C(S)-O-$ など
 の1個以上の官能基である。 Y_1 および Y_2 は、ヒドロキシ、アルコキシ、ヒドロキシアル
 キル、アルコキシアルキル、アミノ、カルボキシル、カルボキシアルキルなどによって
 場合により置換され得る。モノマーの任意の適切な原子が結合基に結合可能であることは
 理解されるべきである。

10

【0161】

さらに、本明細書に記載するPCSB試薬は直鎖状、分枝状または環化状であり得る。
 モノマー単位は、環化され得るか、または共に結合され得て、マルチマーを直鎖または分
 枝方式で、環の形で(たとえば大員環)、星の形で(デンドリマー)またはボールの形で
 (たとえばフラレン)で与える。当業者は、本明細書に開示したモノマー性配列から形
 成することができる多数のポリマーを容易に認識する。ある実施形態において、マルチマ
 ーは環式ダイマーである。上と同じ用語を使用すると、ダイマーはホモダイマーまたはヘ
 テロダイマーであることが可能である。

20

【0162】

環式形態は、モノマーまたはマルチマーにかかわらず、これに限定されるわけではない
 が、たとえば:(1)窒素とC末端カルボニルとの間の直接アミド結合形成、またはたと
 えばイプシロン-アミノカルボン酸との縮合などによるスペーサー基の仲介のどちらかに
 よる、N末端アミンとC末端カルボン酸による環化;(2)たとえばアスパラギン酸もし
 くはグルタミン酸側鎖とリジン側鎖との間にアミド結合を形成することによる、または2
 個のシステイン側鎖間もしくはペニシラミン側鎖とシステイン側鎖との間もしくは2個の
 ペニシラミン側鎖間でのジスルフィド結合形成による、2個の残基の側鎖間の結合の形成
 による環化;(3)側鎖(たとえばアスパラギン酸またはリジン)とN末端アミンまたは
 C末端カルボキシルのどちらかそれぞれとの間のアミド結合の形成による環化;および/
 または(4)短い炭素スペーサー基の仲介による2個の側鎖の結合;などの上に記載した
 結合のいずれかによって生成できる。

30

【0163】

さらに、本明細書に記載するPCSB試薬は、さらなるペプチド成分または非ペプチド
 成分も含み得る。さらなるペプチド成分の非制限的な例は、スペーサー残基、たとえば2
 個以上のグリシン(天然または誘導体化)残基または一端もしくは両端上のアミノヘキサ
 ン酸リンカーまたはペプチド試薬の可溶化を補助し得る残基、たとえばアスパラギン酸な
 どの酸性残基(AspまたはD)を含む。ある実施形態において、たとえばペプチド試薬
 は、多抗原性ペプチド(MAP)として合成される。通例、ペプチド試薬の複数のコピー
 (たとえば2~10コピー)は、分枝リジンなどのMAP担体または他のMAP担体コア
 に直接合成される。たとえばWuら、2001 123(28):6778-84;Sp
 etzlerら(1995)Int J Pept Protein Res. 45(1
):78-85を参照。

40

【0164】

本明細書に記載するPCSB試薬に含まれ得る非ペプチド成分(たとえば化学部分)の
 非制限的な例は、1つ以上の検出可能な標識、タグ(たとえばビオチン、His-Tag
 、オリゴヌクレオチド)、色素、結合対のメンバーなどをペプチド試薬の末端または内部

50

のどちらかに含む。非ペプチド成分も、定量的構造活性データおよび/または分子モデリングによって非干渉性であることが予測される化合物上の位置に、直接またはスパーサー（たとえばアミド基）を介して（たとえば1つ以上の標識の共有結合を介して）結合され得る。本明細書に記載するPCSB試薬は、アミロイド特異的色素（たとえばコンゴレッド、チオフラビンなど）などのプリオン特異的の化学部分も含み得る。化合物の誘導体化（たとえば標識化、環化、化学部分の結合など）は、試薬の結合特性、生物機能および/または薬理学的活性を実質的に干渉（および向上させることさえ）すべきでない。

【0165】

上述のペプチドは、これに限定されるわけではないが、組換え構築物からの発現およびペプチド合成を含む、当業者に公知の標準方法を使用して調製できる。

【0166】

（C、PCSB試薬の基礎として使用される好ましいペプチドの例）

本発明の病原性配座異性体特異的結合試薬を生成するのに有用なペプチドの非制限的な例は、好ましくは、表3に示す配列に由来する。表のペプチドは、慣習的な1文字のアミノ酸コードによって表され、左側のそのアミノ末端および右側のカルボキシ末端と共に示される。Xは、任意のアミノ酸をその位置に配置できることを示す。

【0167】

表の配列

【0168】

【表3 - 1】

表3:PCSB試薬を生成するためのペプチド配列

ペプチド配列	配列番号
KKRPK	12
MANLGCWMLVLFVATWSDLGLC	13
(GGG)QWNKPSKPKTN	14
QWNKPSKPKTNMKHV	15
NQNN[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTKGEN	16
TTKGENFTETD	17
GENFTETD	18
GENFTETD[V/I]K[M/I]MERVVEQMC[I/V]TQY[E/Q]ESQAYY[Q/D] (G)(R)R[G/S][S/A]S	19

【0169】

10

20

30

【表 3 - 2】

ペプチド配列	配列番号
NQNN[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTKGENFTETD[V/I] K[M/I]MERVVEQMC[I/V]TQY[E/Q]ESQAYY[Q/D](G)(R)R[G/S][S/A]S	20
[A/V/T/M][V/I]LFSSPPVILLISFLIFL[I/M]VG	21
G[N/S]D[W/Y]EDRYYRENM[H/Y]RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R] Y[S/N]NQN[N/T] FVH	22
N[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTK	23
VYYR	24
RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R]	25
KKRPKPGG(G)WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG	26
WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG(G)	27
WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG(G)[G/T]WGQPHGG	28
GGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTN	29
GGTHSQWNKPSKPKTN	30
WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG(G)[G/T]WGQPHGGGGWGQ PHGGGGWGQPHGG	31
GQPHGGGW	32
RPIIHFGSDYEDRYYRENMHR	33
RPMIHFGNDWEDRYYRENMYR	34
(GGGG)C(GG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV(GGGG) C	35
(GGGG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV	36
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV(GGGG)	37
[M/L]KH[M/V]	38
KPKTN[M/L]KH[M/V]	39
C(GG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV(GGGG)C	40
SRPIIHFGSDYEDRYYRENMHRYPN	41
PMIHFGNDWEDRYYRENMYRPVD	42
AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	43
RPMIHFGNDWEDRYYRENMYR(GGG)	44
GGGRPMIHFGNDWEDRYYRENMYRGG	45
(GG)C(GGG)RPMIHFGNDWEDRYYRENMYR(GGG)C	46

【表 3 - 3】

ペプチド配列	配列番号
AGAAAAGAVVGGLGG	47
GGLGG	48
LGS	49
QWNKPSKPKTN(GGG)	50
QWNKPSKPKTN(GGG)QWNKPSKPKTN	51
QWNKPSKPKTNLKHV(GGG)	52
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTN	53
GGTHNQWNKPSKPKTN	54
(GGG)AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	55
(GGG)AGAAAAGAVVGGLGG	56
(KKK)AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	57
YMLGSAM[S/N]R	58
[S/N]RP[M/I/L][I/L]H	59
YMLGSAM[S/N]RP[M/I/L][I/L]H	60
YMLGSAM[S/N]RP[M/I/L][I/L]HFG[N/S]D	61
[W/Y]EDRYRENM[H/Y]RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R]Y	62
[W/Y]EDRYRENM[H/Y]RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R]Y[S/N]NQN[N/T]	63
D[Q/E/R]Y[S/N]NQN[N/T]	64
(KKK)AGAAAAGAVVGGLGG	65
(GGG)KKRPKPGGWNTGGSRYPGQGS	66
(GGG)KKRPKPGGWNTGG	67
(GGG)KKRPKPGG	68
PHGGGWGQHGGSWGQPHGGSWGQ	69
PHGGGWGQPHGGSWGQ	70
PHGGGWGQ	71
(GGG)KKRPKPGGGKKRPKPGG	72
(GGG)GPKRKGPK	73
(GGG)WNTGGSRYPGQGS	74
(GGG)WNKPSKPKT	75
(GGG)RPMIHFGNDWEDRYRENMYR(GG)C	76

10

20

30

40

【 0 1 7 1 】

【表 3 - 4】

ペプチド配列	配列番号
QWNKPSKPKTNLKHV(GGG)	77
(GGG)AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	78
(GGG)NKPSKPK	79
(GGG)KPSKPK	80
(GGG)KKRPKPGGGQWNKPSKPKTN	81
KKKAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMDDD	82
DDDAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	83
KKKAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMKKK	84
(GGG)KKKKKKKK	85
DDDAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMDDD	86
(GGG)NNKQSPWPTKK	87
DKDKGGV GALAGAAVAAGGDKDK	88
(GGG)QANKPSKPKTN	89
(GGG)QWNKASKPKTN	90
(GGG)QWNKPSKAKTN	91
(GGG)QWNAPSKPKTN	92
(GGG)QWNKPSAPKTN	93
(GGG)QWNKPSKPATN	94
(GGG)QWNKASKAKTN	95
(GGG)KKRAKPGG	96
(GGG)KKRPKAGG	97
(GGG)KKRAKAGG	98
(GGG)QWNKASKPKTN	99
(GGG)QWAKPSKPKTN	100
(GGG)QWNKPAKPKTN	101
(GGG)QWNKPSKPKAN	102
(GGG)QWNKPSKPKTA	103
(GGG)AKRPKPGG	104
(GGG)KARPKPGG	105
(GGG)KKAPKPGG	106
(GGG)KKRPAPGG	107

10

20

30

40

【 0 1 7 2 】

【表 3 - 5】

ペプチド配列	配列番号
(GGG)KKAPKAGG	108
(GGG)KKRPKPGGWNTGG	109
QWNKPSKPKTNGGGQWNKPSKPKTNGGGQWNKPSKPKTN	110
((QWNKPSKPKTN))2K	111
4-分枝MAPS-GGGKKRPKPGGWNTGGG	112
8-分枝MAPS-GGGKKRPKPGGWNTGGG	113
KKKAGAAAAGAVVGGLGG-CONH2	114
DLGLCKKRPKPGGXWNTGG	115
DLGLCKKRPKPGGXWNTG	116
DLGLCKKRPKPGGXWNT	117
DLGLCKKRPKPGGXWN	118
DLGLCKKRPKPGGXW	119
DLGLCKKRPKPGGX	120
LGLCKKRPKPGGXWNTG	121
LGLCKKRPKPGGXWNT	122
LGLCKKRPKPGGXWN	123
LGLCKKRPKPGGXW	124
LGLCKKRPKPGGX	125
GLCKKRPKPGGXWNTGG	126
GLCKKRPKPGGXWNTG	127
GLCKKRPKPGGXWNT	128
GLCKKRPKPGGXWN	129
GLCKKRPKPGGXW	130
GLCKKRPKPGGX	131
LCKKRPKPGGXWNTGG	132
LCKKRPKPGGXWNTG	133
LCKKRPKPGGXWNT	134
LCKKRPKPGGXWN	135
LCKKRPKPGGXW	136
LCKKRPKPGGX	137
CKKRPKPGGXWNTGG	138

10

20

30

40

【 0 1 7 3 】

【表 3 - 6】

ペプチド配列	配列番号
CKKRPKPGGXWNTG	139
CKKRPKPGGXWNT	140
CKKRPKPGGXWN	141
CKKRPKPGGXW	142
CKKRPKPGGX	143
KKRPKPGGXWNTGG	144
KKRPKPGGXWNTG	145
KKRPKPGGXWNT	146
KKRPKPGGXWN	147
KKRPKPGGXW	148
KKRPKPGGX	149
DVGLCKKRPKPGGXWNTGG	150
DVGLCKKRPKPGGXWNTG	151
DVGLCKKRPKPGGXWNT	152
DVGLCKKRPKPGGXWN	153
DVGLCKKRPKPGGXW	154
DVGLCKKRPKPGGX	155
VGLCKKRPKPGGXWNTG	156
VGLCKKRPKPGGXWNT	157
VGLCKKRPKPGGXWN	158
VGLCKKRPKPGGXW	159
VGLCKKRPKPGGX	160
THSQWNKPSKPKTNMKHM	161
THSQWNKPSKPKTNMKH	162
THSQWNKPSKPKTNMK	163
THSQWNKPSKPKTNM	164
THSQWNKPSKPKTN	165
HSQWNKPSKPKTNMKHM	166
HSQWNKPSKPKTNMKH	167
HSQWNKPSKPKTNMK	168
HSQWNKPSKPKTNM	169

10

20

30

40

【表 3 - 7】

ペプチド配列	配列番号
HSQWNKPSKPKTN	170
SQWNKPSKPKTNMKHM	171
SQWNKPSKPKTNMKH	172
SQWNKPSKPKTNMK	173
SQWNKPSKPKTNM	174
SQWNKPSKPKTN	175
QWNKPSKPKTNMKHM	176
QWNKPSKPKTNMKH	177
QWNKPSKPKTNMK	178
QWNKPSKPKTNM	179
THSQWNKPSKPKTNMKHV	180
HSQWNKPSKPKTNMKHV	181
SQWNKPSKPKTNMKHV	182
QWNKPSKPKTNMKHV	183
THGQWNKPSKPKTNMKHM	184
THGQWNKPSKPKTNMKH	185
THGQWNKPSKPKTNMK	186
THGQWNKPSKPKTNM	187
THGQWNKPSKPKTN	188
HGQWNKPSKPKTNMKHM	189
HGQWNKPSKPKTNMKH	190
HGQWNKPSKPKTNMK	191
HGQWNKPSKPKTNM	192
HGQWNKPSKPKTN	193
GQWNKPSKPKTNMKHM	194
GQWNKPSKPKTNMKH	195
GQWNKPSKPKTNMK	196
GQWNKPSKPKTNM	197
GQWNKPSKPKTN	198
THGQWNKPSKPKTNMKHV	199
HGQWNKPSKPKTNMKHV	200

10

20

30

40

【 0 1 7 5 】

【表 3 - 8】

ペプチド配列	配列番号
GQWNKPSKPKTNMKHV	201
THNQWNKPSKPKTNMKHM	202
THNQWNKPSKPKTNMKH	203
THNQWNKPSKPKTNMK	204
THNQWNKPSKPKTNM	205
THNQWNKPSKPKTN	206
HNQWNKPSKPKTNMKHM	207
HNQWNKPSKPKTNMKH	208
HNQWNKPSKPKTNMK	209
HNQWNKPSKPKTNM	210
HNQWNKPSKPKTN	211
NQWNKPSKPKTNMKHM	212
NQWNKPSKPKTNMKH	213
NQWNKPSKPKTNMK	214
NQWNKPSKPKTNM	215
NQWNKPSKPKTN	216
THNQWNKPSKPKTNMKHV	217
HNQWNKPSKPKTNMKHV	218
NQWNKPSKPKTNMKHV	219
PHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQ	220
GGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHM	221
QWNKPSKPKTNMKHMGGGQWNKPSKPKTNMKHM	222
GGWGQGGGTH[N/S]QWNKPSKPKTN[L/M]KH[V/M](GGGG)	223
PHGGGWGQH[G/S]SWGQPHGG[G/S]WGQ	224
QWNKPSKPKTN[L/M]KH[V/M](GGG)	225
GGGAWNKPSKPKTN	226
4-分枝MAPS-(GGG)QWNKPSKPKTN(GGG)	227
8-分枝MAPS-(GGG)KKRPKPGGWNT(GGG)	228

のいずれも、アミノおよび/またはカルボキシ末端にGlyリンカー（G_n、ここでn = 1、2、3、または4）を場合により含み得る。角カッコ内のアミノ酸は、別のペプチドにおいてその位置で使用できる代替の残基を示す。丸カッコは残基がペプチド試薬に存在してもよく、または存在しなくてもよいことを示す。「2」が続く二重丸カッコ（たとえば配列番号111）は、配列が二重カッコの間のペプチドのコピーを2個含むことを示す。コピー回数の表示に続く残基（たとえば配列番号111では「K」）は、二重カッコ間のペプチドの各コピーが伸長する残基を示す。それゆえ配列番号111は、そのカルボ

10

20

30

40

50

キシ末端がリジンの a - および e - アミノ官能基を介してリジン (K) 残基にそれぞれ結合された、QWNKPSKPKTNペプチド配列 (すなわち配列番号 1 4) のダイマーである。「MAPS」を含む配列は、多抗原性部位を備えたペプチドを示す。「分枝」という用語に先行する数字は、コピー数を示す。それゆえ配列番号 1 1 2 は、各末端に Gly リンカーを備えた配列番号 6 7 である、GGGKKRPPGGWNTGGGを 4 コピー含有するが、配列番号 1 1 3 は、また各末端に Gly リンカーを備えた配列番号 6 7 である、GGGKKRPPGGWNTGGGを 8 コピー含有する。

【 0 1 7 6 】

ある実施形態において、ペプチド断片は、それぞれが本明細書にその全体が援用される、すべて“ Prion - Specific Peptide Reagents ”という名称で、2004年8月13日に出願された共有に係る特許出願の米国特許出願番号第 1 0 / 9 1 7 , 6 4 6 号、2005年2月11日に提出された米国特許出願番号第 1 1 / 0 5 6 , 9 5 0 号、および2004年8月13日に提出された国際出願 PCT / US 2 0 0 4 / 0 2 6 3 6 3 の、配列番号 2 に示すマウスプリオン配列に従って番号付けした、残基 2 3 - 4 3 または 8 5 - 1 5 6 に対応する領域のいずれからも由来することができる (たとえば 2 3 - 3 0、8 6 - 1 1 1、8 9 - 1 1 2、9 7 - 1 0 7、1 1 3 - 1 3 5、および 1 3 6 - 1 5 6)。

10

【 0 1 7 7 】

いくつかの実施形態において、ペプチド断片は、配列番号 1 4、5 0、5 1、5 2、1 2、7 2、6 8 または 1 1 5 から 2 1 9 までのいずれか 1 つから選択される。いくつかの実施形態において、ペプチド断片は、配列番号 1 4、5 0、5 1、5 2、または 1 6 1 から 2 1 9 までのいずれか 1 つから選択される。いくつかの実施形態において、ペプチド断片は、配列番号 1 2、7 2、6 8 または 1 1 5 から 1 6 0 までのいずれか 1 つから選択される。いくつかの実施形態において、ペプチド断片は、配列番号 1 4、5 0、または 6 8 のいずれか 1 つから選択される。

20

【 0 1 7 8 】

(D . ペプトイド PCSB 試薬)

特に好ましい実施形態において、PCSB 試薬はペプトイドである。通例、PCSB 試薬は、プリオンタンパク質断片に由来する。好ましいペプトイドを下に記載する。

【 0 1 7 9 】

(ペプトイドの設計)

開始点として、ペプトイド PCSB 試薬は、ペプチド断片の配列内のアミノ酸残基の N 置換グリシンによる置換の実施、米国特許第 5 , 8 1 1 , 3 8 7 号 ; 同第 5 , 8 3 1 , 0 0 5 号 ; 同第 5 , 8 7 7 , 2 7 8 号 ; 同第 5 , 9 7 7 , 3 0 1 号 ; 同第 6 , 0 7 5 , 1 2 1 号 ; 同第 6 . 2 5 1 , 4 3 3 号 ; および同第 6 , 0 3 3 , 6 3 1 号はもちろんのこと、Simonら (1 9 9 2) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 8 9 : 9 3 6 7 に記載された方法を使用する修飾ペプチドの合成 (これらの刊行物はその全体が参照により本明細書に援用される)、および本明細書に記載する方法による病原性配座異性体への結合についての修飾ペプチドの試験によって、上述のプリオンタンパク質断片の配列またはそのような断片の改変体のいずれかに基づいて設計することができる。さらなる置換は、好適な試薬が実現されるまで、下の置換スキームに従って行うことができる。

30

40

【 0 1 8 0 】

いくつかの実施形態において、PCSB 試薬は、

a) プリオンタンパク質のペプチド断片を提供して、ペプチド断片の第 1 のアミノ酸を N 置換グリシンによって、以下の :

i) Ala、Gly、Ile、Leu、Pro、および Val は、N - (アルキル) グリシン、N - (アラルキル) グリシン、または N - (ヘテロアリーラルキル) グリシンによって置換され ;

ii) Asp、Asn、Cys、Gln、Glu、Met、Ser および Thr は、N - (ヒドロキアルキル) グリシン、N - (アルコキシ) グリシン、N - (アミノアル

50

キル)グリシン、またはN-(グアニジノアルキル)グリシンによって置換され；

i i i) P h e、T r p、およびT y rは、N-(アラルキル)グリシン、N-(ヘテロアリアルアルキル)グリシン、N-(ヒドロキシアラルキル)グリシン、またはN-(アルコキシアラルキル)グリシンによって置換され；

i v) A r g、H i s、およびL y sは、N-(アミノアルキル)グリシン、またはN-(グアニジノアルキル)グリシンによって置換される、置換スキームにより置換するステップと；

b) ペプチド断片の第2のアミノ酸を、ステップa)によるN置換グリシンによって置換するステップと；

c) ペプチド断片の第3のアミノ酸をステップa)によるN置換グリシンによって置換するステップと；

d) 場合により、ステップc)を1~27回反復して、それにより3~30個のN置換グリシンを含む、設計したペプチドPCSB試薬を提供し；そして設計したペプチドPCSB試薬を合成するステップ

とによって設計される。

【0181】

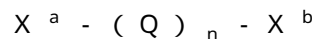
修飾したペプチドは、本明細書に記載する方法に従って、病原性配座異性体への結合について試験することができる。上のスキームによるアミノ酸モノマーのN置換グリシンによるさらなる置換は、好適な結合が得られるまで、実施および再試験することができる(すなわちプリオンの病原性形態と優先的に相互作用するPCSB試薬)。

【0182】

ペプチドを生成する方法は、米国特許第5,811,387号および同第5,831,005号に開示されており、それぞれは、本明細書に開示する方法と同様に、参照によりその全体が本明細書に援用される。

【0183】

本発明の方法で使用される病原性配座異性体特異的結合試薬は、



の式を有し得、式中：

各Qは独立して、アミノ酸またはN置換グリシンであり、 $-(Q)_n-$ はペプチド領域を定義し；

X^a は、H、 $(C_1 - C_6)$ アルキル、シクロアルキル、アリアル、アラルキル、ヘテロアリアル、ヘテロアリアルアルキル、ヘテロシクロアルキル、 $(C_1 - C_6)$ アシル、アミノ $(C_1 - C_6)$ アシル、アミノ酸、アミノ保護基、または2~約100アミノ酸のポリペプチドであり、ここで X^a は、リンカー部分を介して場合により結合される結合体化部分によって場合により置換され；

X^b は、H、 $(C_1 - C_6)$ アルキル、アリアル、アラルキル、ヘテロアリアル、ヘテロアリアルアルキル、ヘテロシクロアルキル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシル、 $(C_1 - C_6)$ アルコキシ、アリアルオキシ、アラルコキシ、カルボキシ保護基、アミノ酸、2~約100アミノ酸のポリペプチドであり、ここで X^b は、リンカー部分を介して場合により結合される結合体化部分によって場合により置換され；

nは、3~約30であり(すなわちnは、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29もしくは30、またはそれ以上である)；

ここでペプチド領域 $-(Q)_n-$ の少なくとも約50%は、これに限定されるわけではないが、N置換グリシンを含む。

【0184】

いくつかの実施形態において、各Qは独立して、N置換グリシンである。

【0185】

いくつかの実施形態において、PCSB試薬は、 $X^a - (Q)_n - X^b$ の式を有し、式中、nは、約4~約30、好ましくは約5~約30であり、ここでペプチド領域 $-(Q)$

10

20

30

40

50

)_n - の少なくとも約 50% は、これに限定されるわけではないが、N 置換グリシンを含み、ただしペプチド領域 - (Q)_n - は、これに限定されるわけではないが：

(a) - A A B A - ;

(b) - A A B A B -

(c) - A B A C C - ;

(d) - A A A A A - ;

(e) - A B C B A - ;

(f) - A A B C A - ; または

(g) - A B A B A - ; から独立して選択される少なくとも 1 つのサブ領域を含むという条件であり、ここで A、B、および C は、それぞれ異なる N 置換グリシンである。

10

【0186】

いくつかの実施形態において、X^a は、それぞれリンカー部分を介して場合により結合される結合体化部分によって場合により置換される、(C₁ - C₆) アシルまたはアミノ (C₁ - C₆) アシルである。

【0187】

いくつかの実施形態において、X^a は、それぞれリンカー部分を介して場合により結合される架橋または結合試薬から選択される結合体化部分によってそれぞれ場合により置換される、(C₁ - C₆) アシルまたはアミノ (C₁ - C₆) アシルである。

【0188】

いくつかの実施形態において、X^a は、リンカー部分を介して場合により結合されるピオチンまたはメルカプトから選択される結合体化部分によってそれぞれ場合により置換される、(C₁ - C₆) アシルまたはアミノ (C₁ - C₆) アシルである。

20

【0189】

いくつかの実施形態において、X^b は、リンカー部分を介して場合により結合される結合体化部分によって場合により置換されるアミノ酸である。

【0190】

いくつかの実施形態において、X^b は、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノである。

【0191】

いくつかの実施形態において、X^b はアミノである。

30

【0192】

いくつかの実施形態において、n は、約 5 ~ 約 15 ; 5 ~ 約 10 ; または 6 である。

【0193】

いくつかの実施形態において、n は、4 ~ 10、4 ~ 8、5 ~ 7 または 6 である。

【0194】

いくつかの実施形態において、X^b は、結合体化部分によって場合により置換されるアミノ酸であり、n は 6 である。

【0195】

いくつかの実施形態において、リンカー部分は、式 - { NH (CH₂)_m C (O) }_p - を有する領域を含有する。

40

【0196】

いくつかの実施形態において、m は 1 ~ 10 である。

【0197】

いくつかの実施形態において、m は 1 ~ 8 である。

【0198】

いくつかの実施形態において、m は 5 である。

【0199】

いくつかの実施形態において、p は 1 ~ 5 である。

【0200】

いくつかの実施形態において、p は 1 ~ 3 である。

50

【0201】

いくつかの実施形態において、pは1または2である。

【0202】

いくつかの実施形態において、X^bは、リンカー部分を介して場合により結合される結合体化部分によって場合により置換されるアミノ酸であり、nは6である。

【0203】

いくつかの実施形態において、X^bは、アミノ、アルキルアミノ、またはジアルキルアミノであり；X^aは、H、(C₁-C₆)アルキル、(C₁-C₆)アシル、アミノ(C₁-C₆)アシル、アミノ酸、またはアミノ保護基であり、ここでX^aは、リンカー部分を介して場合により結合される結合体化部分によって場合により置換され；nは6である。

10

【0204】

いくつかの実施形態において、X^bは、アミノ、アルキルアミノ、またはジアルキルアミノであり；X^aは、H、(C₁-C₆)アルキル、(C₁-C₆)アシル、アミノ(C₁-C₆)アシル、アミノ酸またはアミノ保護基であり、ここでX^aは、リンカー部分を介して場合により結合される、架橋剤または結合剤から選択される結合体化部分によって置換され；nは6である。

【0205】

いくつかの実施形態において、X^bは、アミノ、アルキルアミノ、またはジアルキルアミノであり；X^aは、H、(C₁-C₆)アルキル、(C₁-C₆)アシル、アミノ(C₁-C₆)アシル、アミノ酸またはアミノ保護基であり、ここでX^aは、リンカー部分を介して場合により結合される、ビオチンまたはメルカプトを含む結合体化部分によって置換され、リンカー部分の少なくとも一部は式 - {NH(CH₂)_mC(O)}_p - を有し；nは6であり；mは1~10であり；pは1~5である。

20

【0206】

いくつかの実施形態において、各Qは独立して、アミノ酸または式 - (NR-CH₂-CO) - を有するN置換グリシンであり、式中、各Rは、(C₂-C₆)アルキル、ハロ(C₁-C₆)アルキル、(C₂-C₆)アルケニル、(C₂-C₆)アルキニル、(C₆-C₁₀)シクロアルキル-アリアル、アミノ(C₁-C₆)アルキル、アンモニウム(C₁-C₆)アルキル、ヒドロキシ(C₁-C₆)アルキル、(C₁-C₆)アルコキシ(C₁-C₆)アルキル、カルボキシ、カルボキシ(C₂-C₆)アルキル、カルバミル、カルバミル(C₂-C₆)アルキル、グアニジノ、グアニジノ(C₁-C₆)アルキル、アミジノ、アミジノ(C₁-C₆)アルキル、チオール、(C₁-C₆)アルキルチオール、炭素原子2~10個のアルキルチオアルキル、N含有ヘテロシクリル、N含有ヘテロシクリル(C₁-C₆)アルキル、イミダゾリル、炭素原子4~10個のイミダゾリルアルキル、ピペリジル、炭素原子5~10個のピペリジルアルキル、インドリル、炭素原子9~15個のインドリルアルキル、ナフチル、炭素原子11~16個のナフチルアルキルおよびアリアル(C₁-C₆)アルキルから独立して選択され；ここで各R部分は、ハロゲン、ヒドロキシおよび(C₁-C₆)アルコキシから独立して選択される1~3個の置換基によって場合により置換される。

30

【0207】

いくつかの実施形態において、各Qは独立して、アミノ酸または式 - (NR-CH₂-CO) - を有するN置換グリシンであり、式中、各Rは、(C₂-C₆)アルキル、ハロ(C₁-C₆)アルキル、(C₂-C₆)アルケニル、(C₂-C₆)アルキニル、(C₆-C₁₀)シクロアルキル-アリアル、アミノ(C₁-C₆)アルキル、ヒドロキシ(C₁-C₆)アルキル、(C₁-C₆)アルコキシ(C₁-C₆)アルキル、カルボキシ、カルボキシ(C₂-C₆)アルキル、カルバミル、カルバミル(C₂-C₆)アルキル、グアニジノ、グアニジノ(C₁-C₆)アルキル、チオール、(C₁-C₆)アルキルチオール、炭素原子2~10個のアルキルチオアルキル、イミダゾリル、炭素原子4~10個のイミダゾリルアルキル、ピペリジル、炭素原子5~10個のピペリジルアルキル、インドリル、炭素原子9~15個のインドリルアルキル、ナフチル、炭素原子11~16

40

50

個のナフチルアルキル、ジフェニル ($C_1 - C_6$) アルキルまたはアリール ($C_1 - C_6$) アルキルから独立して選択され;ここで各 R 部分は、ハロゲン、ヒドロキシおよび ($C_1 - C_6$) アルコキシから独立して選択される 1 ~ 3 個の置換基によって場合により置換される。

【0208】

いくつかの実施形態において、各 Q は独立して、アミノ酸または式 - ($NR - CH_2 - CO$) - の N 置換グリシンであり、式中、各 R は、ハロゲン、ヒドロキシおよび ($C_1 - C_6$) アルコキシから独立して選択される 1 ~ 3 個の置換基によって置換される、($C_2 - C_6$) アルキル、アミノ ($C_1 - C_6$) アルキル、ヒドロキシ ($C_1 - C_6$) アルキル、($C_1 - C_6$) アルコキシ ($C_1 - C_6$) アルキル、グアニジノ ($C_1 - C_6$) アルキル、炭素原子 9 ~ 15 個のインドリルアルキル、炭素原子 11 ~ 16 個のナフチルアルキル、ジフェニル ($C_1 - C_6$) アルキルまたはアリール ($C_1 - C_6$) アルキルから独立して選択される。

10

【0209】

いくつかの実施形態において、各 Q は独立して、アミノ酸であるか、または N - (4 - アミノブチル) グリシン、N - (1 - フェニルエチル) グリシン、N - (2 - アミノエチル) グリシン、N - (2 - [4 - メトキシフェニル] エチル) グリシン、N - (2 - メトキシエチル) グリシン、N - (2 - ヒドロキシエチル) グリシン、N - (1H - インドール - 3 - イル) メチル) グリシン、もしくは N - ベンジルグリシンから選択される N 置換グリシンである。

20

【0210】

いくつかの実施形態において、各 Q は独立して、アミノ酸であるか、または N - (4 - アミノブチル) グリシンもしくは N - ベンジルグリシンから選択される N 置換グリシンである。

【0211】

いくつかの実施形態において、各 Q は独立して、N 置換グリシンである。

【0212】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - は、これに限定されるわけではないが、生理学的に関連する pH にて荷電された少なくとも 3 個のまたは少なくとも 4 個の N 置換グリシンを含む。いくつかの実施形態において、電荷は正である。いくつかの実施形態において、ペプチド領域の残りの N 置換グリシンは、生理学的に関連する pH にて中性である。

30

【0213】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - は、これに限定されるわけではないが、生理学的に関連する pH にて荷電された 2 ~ 6 個の、3 ~ 5 個の、または 4 個の N 置換グリシンを含む。いくつかの実施形態において、電荷は正である。いくつかの実施形態において、ペプチド領域の残りの N 置換グリシンは、生理学的に関連する pH にて中性である。

【0214】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - の 2 個の N 置換グリシン残基は、生理学的に関連する pH にて正に荷電され、ペプチド領域の残りの N 置換グリシン残基は、生理学的に関連する pH にて中性である。

40

【0215】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - の 3 個の N 置換グリシン残基は、生理学的に関連する pH にて正に荷電され、ペプチド領域の残りの N 置換グリシン残基は、生理学的に関連する pH にて中性である。

【0216】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - の 4 個の N 置換グリシン残基は、生理学的に関連する pH にて正に荷電され、ペプチド領域の残りの N 置換グリシン残基は、生理学的に関連する pH にて中性である。

50

【0217】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - の5個のN置換グリシン残基は、生理学的に関連するpHにて正に荷電され、ペプチド領域の残りのN置換グリシン残基は、生理学的に関連するpHにて中性である。

【0218】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - は、生理学的に関連するpHにてポリオン性である。

【0219】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - は、生理学的に関連するpHにてポリカチオン性である。

10

【0220】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - は、生理学的に関連するpHにてポリアニオン性である。

【0221】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - は、生理学的に関連するpHにて少なくとも3+の正味電荷を有する。

【0222】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - は、生理学的に関連するpHにて少なくとも4+の正味電荷を有する。

【0223】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - は、生理学的に関連するpHにて2+ ~ 6+の正味電荷を有する。

20

【0224】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - は、生理学的に関連するpHにて3+ ~ 5+の正味電荷を有する。

【0225】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - は、生理学的に関連するpHにて4+の正味電荷を有する。

【0226】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - は、これに限定されるわけではないが、生理学的に関連するpHにて正に荷電された、少なくとも3個のN置換グリシンを含む。

30

【0227】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - は、これに限定されるわけではないが、生理学的に関連するpHにて正に荷電された、少なくとも4個のN置換グリシンを含む。

【0228】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - は、これに限定されるわけではないが、生理学的に関連するpHにて正に荷電された、2 ~ 6個のN置換グリシンを含む。

40

【0229】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - は、これに限定されるわけではないが、生理学的に関連するpHにて正に荷電された、3 ~ 5個のN置換グリシンを含む。

【0230】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - は、これに限定されるわけではないが、生理学的に関連するpHにて正に荷電された、4個のN置換グリシンを含む。

【0231】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域 - (Q)_n - のN置換グリシンは式 - (

50

NR - CH₂ - CO) - を有し、式中、R は、(C₂ - C₆) アルキル、ハロ(C₁ - C₆) アルキル、(C₂ - C₆) アルケニル、(C₂ - C₆) アルキニル、(C₆ - C₁₀) シクロアルキル - アリール、アミノ(C₁ - C₆) アルキル、アンモニウム(C₁ - C₆) アルキル、ヒドロキシ(C₁ - C₆) アルキル、(C₁ - C₆) アルコキシ(C₁ - C₆) アルキル、カルボキシ、カルボキシ(C₂ - C₆) アルキル、カルバミル、カルバミル(C₂ - C₆) アルキル、グアニジノ、グアニジノ(C₁ - C₆) アルキル、アミジノ、アミジノ(C₁ - C₆) アルキル、チオール、(C₁ - C₆) アルキルチオール、炭素原子 2 ~ 10 個のアルキルチオアルキル、N 含有ヘテロシクリル、N 含有ヘテロシクリル(C₁ - C₆) アルキル、イミダゾリル、炭素原子 4 ~ 10 個のイミダゾリルアルキル、ピペリジル、炭素原子 5 ~ 10 個のピペリジルアルキル、インドリル、炭素原子 9 ~ 15 個のインドリルアルキル、ナフチル、炭素原子 11 ~ 16 個のナフチルアルキル、およびアリール(C₁ - C₆) アルキルから独立して選択され；ここで各 R 部分は、ハロゲン、ヒドロキシおよび(C₁ - C₆) アルコキシから独立して選択される 1 ~ 3 個の置換基によって場合により置換され、ペプチド領域 - (Q)_n - は、これに限定されるわけではないが少なくとも 3 個の、少なくとも 4 個の、2 ~ 6 個の、3 ~ 5 個の、または、4 個の N 置換グリシンを含み、ここで R は、生理学的に関連する pH にて荷電される部分である。

【0232】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域のすべての N 置換グリシンは隣接している。

【0233】

いくつかの実施形態において、ペプチド PCSB 試薬は、これに限定されるわけではないが、少なくとも 1 個の結合体化部分を含む。

【0234】

いくつかの実施形態において、ペプチド PCSB 試薬は、これに限定されるわけではないが、リンカー部分を介して結合された少なくとも 1 個の結合体化部分を含む。

【0235】

好ましい実施形態において、ペプチド PCSB 試薬は、これに限定されるわけではないが、アミノ末端領域、カルボキシ末端領域、およびアミノ末端領域とカルボキシ末端領域との間に少なくとも 1 個のペプチド領域を含み、ここでペプチド領域は、これに限定されるわけではないが約 3 ~ 約 30 個の N 置換グリシンおよび場合により 1 個以上のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、これに限定されるわけではないが約 4 ~ 約 30 個の、または約 5 ~ 約 30 個の N 置換グリシンを含む。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、これに限定されるわけではないが約 4 ~ 約 30 個の、または約 5 ~ 約 30 個の N 置換グリシンおよび：

(a) - A A B A - ；

(b) - A A B A B -

(c) - A B A C C - ；

(d) - A A A A A - ；

(e) - A B C B A - ；

(f) - A A B C A - ；または

(g) - A B A B A - から選択されるペプチドサブ領域を含み；

ここで A、B、および C は、それぞれ異なる N 置換グリシンであり、各サブ領域は、アミノ末端からカルボキシ末端方向へ左から右へ読み取られる。

【0236】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、これに限定されるわけではないが約 50 ~ 約 100 % の、約 75 ~ 約 100 % の、または 100 % の N 置換グリシンを含む。

【0237】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、長さが約 5 ~ 約 50 個の、約 5 ~ 約 30 個の、約 5 ~ 約 15 個の、約 5 ~ 約 7 個の、または 6 個のサブユニットである。

10

20

30

40

50

【0238】

いくつかの実施形態において、ペプチド試薬は、サブユニットが約5～約50個の、約5～約30個の、約5～約15個の、または約6～約9個の全長を有する。

【0239】

いくつかの実施形態において、少なくとも1つのペプチド領域は、ペプチド試薬の全長の約50%より大きく、約75%より大きく、または約90%より大きい。

【0240】

いくつかの実施形態において、すべてのN置換グリシンは、ペプチド領域内で隣接している。

【0241】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域のN置換グリシンは、式 - (NR - CH₂ - CO) - を有し、式中、Rは本明細書を通じて定義する通りである。

【0242】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、生理学的に関連するpHにてポリオン性であり、荷電したペプチド領域について本明細書を通じて記載する実施形態のいずれかに従う特徴を有する。

【0243】

他の実施形態において、PCSB試薬は、3～15個の隣接N置換グリシンを有するペプチド領域を含み、ここでペプチド領域は、生理学的に関連するpHにて正味電荷を有する。いくつかの実施形態において、正味電荷は、生理学的に関連するpHにて少なくとも3+または少なくとも4+の正味電荷などの正味正電荷である。いくつかの実施形態において、試薬自体は、生理学的に関連するpHにて、2+～6+、3+～5+、または4+の正味電荷を有する。

【0244】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域の隣接N置換グリシンの少なくとも2個、少なくとも3個、または少なくとも4個は、生理学的に関連するpHにて荷電される。さらなる実施形態において、ペプチド領域の隣接N置換グリシンの少なくとも2個は、1級アミノ、2級アミノ、3級アミノ、アンモニウム(4級アミノ)、グアニジノ、アミジノ、またはN含有ヘテロシクリルから選択される少なくとも1個の部分を含む。

【0245】

またさらなる実施形態において、ペプチド領域の隣接N置換グリシンの少なくとも2個は、これに限定されるわけではないが、1級アミノ、2級アミノ、アンモニウム、グアニジノ、アミジノ、またはN含有ヘテロシクリルから選択される少なくとも1個のN置換基を含む。

【0246】

またさらなる実施形態において、隣接N置換グリシンの少なくとも2個は、本明細書で与えた定義に従うR基であるN置換基を含む。

【0247】

またさらなる実施形態において、ペプチドPCSB試薬は、これに限定されるわけではないが、6個の隣接N置換グリシンのペプチド領域を含み、ペプチドPCSB試薬自体は、生理学的に関連するpHにて3+または4+の正味電荷を有する。

【0248】

「ペプチド試薬」は、アミノ末端領域、カルボキシ末端領域、およびアミノ末端領域とカルボキシ末端領域との間の少なくとも1つの「ペプチド領域」を有する分子である。アミノ末端領域は、通例いずれのN置換グリシンも含有しない、試薬のアミノ末端側の領域を指す。アミノ末端領域は、H、アルキル、置換アルキル、アシル、アミノ保護基、アミノ酸、ペプチドなどであることが可能である。いくつかの実施形態において、アミノ末端領域は、X^aに相当する。カルボキシ末端領域は、いずれのN置換グリシンも含有しない、ペプチドのカルボキシ末端の領域を指す。カルボキシ末端領域は、H、アルキル、アルコキシ、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、カルボキシ保護基、アミノ

10

20

30

40

50

酸、ペプチドなどを含むことができる。いくつかの実施形態において、カルボキシ末端領域は、 X^b に相当する。いくつかの実施形態において、ペプチドPCSB試薬は、約5～約50個のサブユニット；約5～約30個のサブユニット；約5～約15個のサブユニット；または約6～約9個のサブユニットの全長を有する。いくつかの実施形態において、ペプチドはカルボキシ末端アミドである。ペプチド領域は、その中のアミノ酸の少なくとも3つがN置換グリシンによって置換されているPCSB試薬の部分を一般に指す。

【0249】

「ペプチド領域」（本明細書では「 $-(Q)_n-$ 」とも呼ばれる）は、アミノ末端に最も近いN置換グリシンから開始してそのN置換グリシンを含み、カルボキシ末端に最も近いN置換グリシンで終了してそのN置換グリシンを含む領域として同定され得る。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、これに限定されるわけではないが、少なくとも約50%の、少なくとも約60%の、少なくとも約70%の、少なくとも約80%の、少なくとも約90%の、少なくとも約95%の、少なくとも約99%の、または100%のN置換グリシンを含む。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、これに限定されるわけではないが約25～約100%の；約50～約100%の；約75～約100%のN置換グリシンを含む。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、これに限定されるわけではないが、100%のN置換グリシンを含む。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、ペプチドPCSB試薬の全長の約50%より大きい（たとえば約50～100%）。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、ペプチド試薬の全長の約60%を超える（たとえば約60～100%）。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、ペプチド試薬の全長の約75%を超える（たとえば約75～100%）。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、ペプチド試薬の全長の約90%を超える（たとえば約90～100%）。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、試薬の全長の100%である。

【0250】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、少なくとも3個のN置換グリシンを含有する。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、少なくとも4個のN置換グリシンを含有する。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、少なくとも5個のN置換グリシンを含有する。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、少なくとも6個のN置換グリシンを含有する。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、3～約30個の；約5～約30個のN置換グリシン；および場合により1個以上のアミノ酸を含有する。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、サブユニットが約5～約50個の、5～約30個の、5～約15個の、5～約10個の、5～約9個の、5～約8個の、または5～約7個の長さである。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、サブユニットが約3、4、5、6、7、8、9、または10個の長さである。いくつかの実施形態において、ペプチド領域はサブユニットが6個の長さである。いくつかの実施形態において、ペプチド領域内のN置換グリシンのすべてが近接している。いくつかの実施形態において、ペプチド領域のサブユニットのすべてがN置換グリシンである。

【0251】

さらなる実施形態において、PCSB試薬は、これに限定されるわけではないが、4～12個の、4～10個の、4～9個の、4～8個の、5～7個の、または6個の隣接N置換グリシンのペプチド領域を含む。

【0252】

いくつかの実施形態により、ペプチド領域は、生理学的に関連するpHにてポリイオン性であることが可能である。「ポリイオン性」という用語は、ペプチド領域が生理学的に関連するpHにて荷電される2個以上の残基を含有することを意味する。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、生理学的に関連するpHにてポリカチオン性またはポリアニオン性である。さらなる実施形態において、ペプチド領域は、生理学的に關

10

20

30

40

50

連する pH にて少なくとも 3 + または少なくとも 4 + の正味電荷を有する。またさらなる実施形態において、ペプチド領域は、生理学的に関連する pH にて 2 + ~ 6 +、3 + ~ 5 +、または 4 + の正味電荷を有する。

【0253】

荷電される N 置換グリシン残基の非制限的な例は、N - (5 - アミノペンチル)グリシン、N - (4 - アミノブチル)グリシン、N - (3 - アミノプロピル)グリシン、N - (2 - アミノエチル)グリシン、N - (5 - グアニジノペンチル)グリシン、N - (4 - グアニジノブチル)グリシン、N - (3 - グアニジノプロピル)グリシン、および N - (2 - グアニジノエチル)グリシンを含む。

【0254】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、生理学的に関連する pH にて正に荷電される少なくとも 3 個または少なくとも 4 個の N 置換グリシンを含有する。

【0255】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、生理学的に関連する pH にて正に荷電される 2 ~ 6 個の、3 ~ 5 個の、または 4 個のアミノ N - 置換グリシンを含有する。

【0256】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、式 - (NR - CH₂ - CO) - を有する残基を含有し、式中、残基の少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、2 ~ 6 個、3 ~ 5 個、または 4 個が生理学的に関連する pH にて荷電される。

【0257】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域の荷電された残基は、式 - (NR - CH₂ - CO) - を有し、式中、R は、アミノ (C₁ - C₆) アルキル、アンモニウム (C₁ - C₆) アルキル、グアニジノ、グアニジノ (C₁ - C₆) アルキル、アミジノ、アミジノ (C₁ - C₆) アルキル、N 含有ヘテロシクリルおよび N 含有ヘテロシクリル (C₁ - C₆) アルキルから独立して選択され、ここで各 R 部分は、ハロゲン、C₁ - C₃ メトキシ、および C₁ - C₃ アルキルから独立して選択される 1 ~ 3 個の置換基によって場合により置換される。いくつかの実施形態において、R は、アミノブチルなどのアミノ (C₁ - C₆) アルキルである。

【0258】

いくつかの実施形態において、PCSB 試薬は、生理学的に関連する pH にて少なくとも 3 + または少なくとも 4 + の正味電荷を有する。またさらなる実施形態において、試薬は、生理学的に関連する pH にて 2 + ~ 6 +、3 + ~ 5 +、または 4 + の正味電荷を有する。

【0259】

本発明の方法で使用される PCSB 試薬のペプチド領域は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 または 12 個またはそれ以上の残基の連続 N 置換グリシンの配列を指す、少なくとも 1 つのペプチドサブ領域を含有することができる。いくつかの実施形態において、ペプチド領域は：

- (a) - A A B A - ;
- (b) - A A B A B -
- (c) - A B A C C - ;
- (d) - A A A A A - ;
- (e) - A B C B A - ;
- (f) - A A B C A - ; または
- (g) - A B A B A - ;

から独立して選択される少なくとも 1 つのペプチドサブ領域を含有し、

A、B、および C はそれぞれ、異なる N 置換グリシンを表す。たとえばサブ領域で生じる各 A は、特定の N 置換グリシンを指し、サブ領域で発生する各 B は、別の特定の N 置換グリシンを指すが、A および B は互いに異なっている。したがって、C は、A または B のどちらとも異なる N 置換グリシンである。サブ領域配列は、アミノからカルボキシの方向

10

20

30

40

50

に左から右へ読み取られることを意味する。いくつかの実施形態において、Aが疎水性残基のときに、Bは親水性残基であり、逆もまた同じである。いくつかの実施形態において、ペプチドサブ領域は同種であり、すなわち1種類のN置換グリシンのみを含有する。いくつかの実施形態において、Aが脂肪族残基のとき、Bは環式残基である。いくつかの実施形態において、Bが脂肪族残基であるとき、Aは環式残基である。いくつかの実施形態において、AおよびBの両方が脂肪族である。いくつかの実施形態において、AおよびBは脂肪族であり、Cは環式である。いくつかの実施形態において、全てのN置換グリシンは、たとえばサブ領域 - A A B A - では脂肪族である（たとえば - (N - (2 - メトキシエチル)グリシン)₂ - N - (4 - アミノブチル)グリシン - (N - (2 - メトキシエチル)グリシン) - 、ここでAはN - (2 - メトキシエチル)グリシンであり、BはN - (4 - アミノブチル)グリシンである）。

【0260】

いくつかの実施形態において、ペプチド領域は、トリペプチド、すなわち3個の隣接したN置換グリシンを含有する。例示的なトリペプチドペプチドサブ領域は、 - (N - (2 - (4 - ヒドロキシフェニル)エチル)グリシン)₂ - N - (4 - グアニジノブチル)グリシン - 、 - N - (4 - アミノブチル)グリシン - (V)₂ - を含み、ここでVは、N - ベンジルグリシンまたはN - (2 - メトキシエチル)グリシン、 - N - ベンジルグリシン - W - N - ベンジルグリシン - であり、ここでWは、N - (4 - アミノブチル)グリシンまたはN - (2 - メトキシエチル)グリシン、および - N - (4 - アミノエチル)グリシン - (N - (2 - (4 - メトキシフェニル)エチル)グリシン)₂ - である。いくつかの実施形態において、トリペプチドサブ領域は、少なくとも1個の脂肪族残基および少なくとも1個の環式残基を含有する（たとえば(A)₂ - B、B₂ - A、またはB - A - B、ここでAは脂肪族残基であり、Bは環式残基である）。

【0261】

いくつかの実施形態において、ペプチドサブ領域は、N - (4 - アミノブチル)グリシン - (S) - N - (1 - フェニルエチル)グリシンジペプチドなどのジペプチドである。

【0262】

本発明の方法で有用なPCSB試薬は、モノマー、マルチマー、環化分子、分枝分子、リンカーなどを含む。本明細書に記載する配列のいずれのマルチマー（すなわちダイマー、トリマーなど）またはその生物機能性同等物も予期される。マルチマーは、ホモマルチマーであること、すなわち同一のモノマーで構成されることが可能である。代わりに、マルチマーはヘテロマルチマーであることが可能であり、すなわちマルチマーを構成するすべてのモノマーが同一とは限らない。

【0263】

マルチマーは、モノマーの相互への、または、たとえば多抗原性ペプチド(MAPS)（たとえば対称的MAPS）、ポリマー骨格、たとえばPEG骨格に結合されたペプチドおよび/またはスペーサー単位を用いてもしくは用いずに直列に結合されたペプチドを含む基質への、直接結合によって形成することができる。代わりに、リンカーをモノマーに付加して、それらを結合させてマルチマーを形成することができる。リンカーを使用するマルチマーの非制限的な例は、たとえば、グリシンリンカーを使用するタンデムリピート、リンカーを介して基質に結合されたMAPSおよび/またはリンカーを介して骨格に結合された直鎖状結合ペプチドを含む。リンカー部分は、当業者に公知であるような2官能性スペーサー単位（ホモ2官能性またはヘテロ2官能性のいずれか）の使用を含み得る。

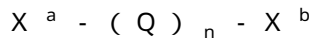
【0264】

いくつかの実施形態において、PCSB試薬は、コンフォメーション病タンパク質の非病原性形態の親和性よりも、少なくとも約2倍；5倍；10倍；20倍；50倍；100倍；200倍；500倍；または1000倍大きい親和性で、病原性配座異性体と相互作用する。いくつかの実施形態において、親和性は、コンフォメーション病タンパク質の非

病原性形態の親和性よりも少なくとも約10倍大きい。いくつかの実施形態において、親和性は少なくとも100倍大きい。

【0265】

本発明の検出方法は、本明細書に記載するPCSB試薬のいずれも利用することができる。いくつかの実施形態において、本発明の検出方法は、



の式を有するPCSB試薬を利用し、式中：

各Qは独立して、アミノ酸またはN置換グリシンであり、 $-(Q)_n-$ はペプチド領域を定義し；

X^a は、H、 $(C_1 - C_6)$ アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、ヘテロシクロアルキル、 $(C_1 - C_6)$ アシル、アミノ $(C_1 - C_6)$ アシル、アミノ酸、アミノ保護基、または2～約100アミノ酸のポリペプチドであり、ここで X^a は、リンカー部分を介して場合により結合される結合体化部分によって場合により置換され；

X^b は、H、 $(C_1 - C_6)$ アルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、ヘテロシクロアルキル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシル、 $(C_1 - C_6)$ アルコキシ、アリールオキシ、アラルコキシ、カルボキシ保護基、アミノ酸、2～約100アミノ酸のポリペプチドであり、ここで X^b は、リンカー部分を介して場合により結合される結合体化部分によって場合により置換され；

nは、3～約30であり；ここでペプチド領域 $-(Q)_n-$ の少なくとも約50%が、これに限定されるわけではないが、N置換グリシンを含む。

【0266】

いくつかのこのような実施形態において、nは、約4～約30、好ましくは約5～約30であり、ペプチド領域 $-(Q)_n-$ は：

(a) - A A B A - ；

(b) - A A B A B -

(c) - A B A C C - ；

(d) - A A A A A - ；

(e) - A B C B A - ；

(f) - A A B C A - ；または

(g) - A B A B A - ；

から独立して選択される少なくとも1つのサブ領域を含み、ここでA、B、およびCは、それぞれ異なるN置換グリシンである。

【0267】

検出方法のいくつかの実施形態において、PCSB試薬は、アミノ末端領域、カルボキシ末端領域、およびアミノ末端領域とカルボキシ末端領域との間に少なくとも1個のペプチド領域を含有し、ここでペプチド領域は、約3～約30個のN置換グリシンおよび場合により1個以上のアミノ酸を含有する。いくつかのこのような実施形態において、ペプチド領域は：

(a) - A A B A - ；

(b) - A A B A B -

(c) - A B A C C - ；

(d) - A A A A A - ；

(e) - A B C B A - ；

(f) - A A B C A - ；および

(g) - A B A B A - ；

から選択されるペプチドサブ領域を有し、ここでA、B、およびCはそれぞれ、異なるN置換グリシンである。

【0268】

本発明の方法のいくつかの実施形態において、PCSB試薬は、これに限定されるわけ

ではないが、プリオンタンパク質の3～30アミノ酸ペプチド断片のペプチド類似体を含み、ペプチド断片は、配列番号12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、135、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、または228であり、ここで：

(a) ペプチド断片の少なくとも1個の非プロリン残基は、N置換グリシンによって置換されて、ペプチド類似体を形成し；または

(b) ペプチド断片の少なくとも5アミノ酸残基は、N置換グリシンによってそれぞれ置換され、ペプチド類似体を形成する。

【0269】

上の方法のいくつかの実施形態において、ペプチド断片の任意の1個以上のアミノ酸残基のN置換グリシンによる置換は、以下の置換スキームに相当する：

i) Ala、Gly、Ile、Leu、Pro、およびValは、N-(アルキル)グリシン、N-(アラキル)グリシン、またはN-(ヘテロアリーラルキル)グリシンによって置換され；

ii) Asp、Asn、Cys、Gln、Glu、Met、Ser、およびThrは、N-(ヒドロキシアルキル)グリシン、N-(アルコキシ)グリシン、N-(アミノアルキル)グリシン、またはN-(グアニジノアルキル)グリシンによって置換され；

iii) Phe、Trp、およびTyrは、N-(アラキル)グリシン、N-(ヘテロアリーラルキル)グリシン、N-(ヒドロキシアラキル)グリシン、またはN-(アルコキシアラキル)グリシンによって置換され；

iv) Arg、His、およびLysは、N-(アミノアルキル)グリシンまたはN-(グアニジノアルキル)グリシンによって置換される。

【0270】

いくつかのこのような実施形態において、PCSB試薬は、上述のプリオンタンパク質の5～30アミノ酸ペプチド断片のペプチド類似体である。

【0271】

(好ましいペプチド領域の配列)

表4は、本発明で使用するPCSB試薬を調製するのに好適な、例示的なペプチド領域(アミノからカルボキシ方向)を示す。表5は、表1で使用した省略形のキーを示す。

表6は、各配列の関連構造を与える。

【0272】

10

20

30

40

【表 4】

表4:PCSB試薬の代表的なペプチド領域

ペプチド領域配列	配列番号
Nab-Nab-Nab-Nab-Nab	229
Nab-Nab-Ngb-Nspe-Nab-Nspe	230
Nae-Nmpe-Nmpe-Nae-Nmpe-Nmpe-Nae-Nmpe-Nmpe	231
Nme-Ntrp-Nme-Nab-Nspe-Nhye-Nab-Nspe-Nhye-Nme	232
Nspe-Nab-Nspe-Nab-Nspe-Nspe-Nab-Nspe-Nab-Nspe-Nspe	233
Nbn-Nab-Nbn-Nab-Nbn-Nbn-Nab-Nbn-Nab-Nbn-Nbn	234
Nme-Nab-Nme-Nab-Nnm-Nme-Nab-Nnm-Nab-Nme-Nme	235
Nme-Nab-Nme-Nab-Nme-Nme-Nab-Nme-Nab-Nme-Nme	236
Nab-Nab-Nab-Nspe-Nab-Nspe	237
Nab-Nspe-Nab-Nab-Nspe-Nab	238
Nab-Nab-Nab-Nspe-Nab-Nspe	239
Nab-Nab-Nab-Nbn-Nab-Nbn	240
Nme-Nbn-Nme-Nbn-Nme-Nbn	241

10

20

【 0 2 7 3 】

【表 5】

表5:表1の省略形のキー

ペプチド残基省略形	アミノ酸置換
Ntyr	N-(2-(4-ヒドロキシフェニル)エチル)グリシン
Nhph	N-(4-ヒドロキシフェニル)グリシン
Nspe	(S)-N-(1-フェニルエチル)グリシン
Nme	N-(2-メチルエチル)グリシン
Ncpm	N-(シクロプロピルメチル)グリシン
Ntrp	N-(2-3'-インドリルエチル)グリシン
Nab	N-(4-アミノブチル)グリシン
Nmpe	N-(2-(4-メチルフェニル)エチル)グリシン
Ndmb	N-(3, 5-ジメチルベンジル)グリシン
Nbn	N-ベンジルグリシン
Nhye	N-(2-ヒドロキシエチル)グリシン
Nip	N-イソプロピルグリシン
Nnm	N-((8' ナフチル)メチル)グリシン
Ngb	N-(4-グアニジノブチル)グリシン
Nae	N-(4-アミノエチル)グリシン

10

20

【 0 2 7 4 】

【表 6 - 1】

表6:表4のペプチド領域の関連構造

配列番号	構造
229	
230	
231	
232	
233	
234	
235	

10

20

30

【 0 2 7 5 】

【表 6 - 2】

配列番号	構造
236	
237	
238	
239	
240	
241	

10

20

30

具体的な P C S B 試薬の調製は以下で説明する。

【 0 2 7 6 】

本発明の方法のいくつかの実施形態において、P C S B 試薬は、これに限定されるわけではないが、本明細書に記載するような配列、たとえば、配列番号 2 2 9、2 3 0、2 3 1、2 3 2、2 3 3、2 3 4、2 3 5、2 3 6、2 3 7、2 3 8、2 3 9、2 4 0、または 2 4 1 の配列を含む。いくつかの実施形態において、P C S B 試薬は、配列番号 2 2 9、2 3 0、2 3 2、2 3 3、2 3 4、2 3 5、2 3 7、2 3 8、2 3 9、または 2 4 0 から選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、P C S B 試薬は、これに限定されるわけではないが、配列番号 2 2 9、2 3 0、2 3 5、2 3 7、2 3 8、2 3 9、または 2 4 0 から選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、P C S B 試薬は、これに限定されるわけではないが、配列番号 2 3 0、2 3 7、2 3 8、2 3 9、または 2 4 0 から選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、本方法で使用する P C S B 試薬は、これに限定されるわけではないが、配列番号 2 2 9、2 3 6、2 3 1、2 3 2、2 3 3、2 3 4 または 2 3 5 から選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、P C S B 試薬は、これに限定されるわけではないが、配列番号 2 3 0、2 3 7、2 3 8、2 3 9、または 2 4 0 から選択される配列を含む。いくつかのこのような実施形態において、P C S B 試薬は、これに限定されるわけではないが、配列番号 2 3 0、2 3 7 または 2 4 0 を含む。いくつかのこのような実施形態において、P C S B 試薬は、これに限定されるわけではないが、配列番号 2 4 0 を含む。

40

【 0 2 7 7 】

50

(E . 好ましいペプチドの例)

好ましい実施形態において、本発明の方法で使用される病原性特異的配座異性体結合試薬は、プリオンタンパク質の病原性配座異性体と優先的に相互作用する試薬、たとえば実施例 4 において記載される I、II、VII、IX、X、XIa、XIb、XIIa、または XIIb で示される試薬の 1 つ以上である。

【 0 2 7 8 】

好ましい実施形態において、PCSB 試薬は、ヒトプリオンタンパク質断片 PrP₁₉₋₃₀ (配列番号 242)、PrP₂₃₋₃₀ (配列番号 243)、PrP₁₀₀₋₁₁₁ (配列番号 244)、PrP₁₀₁₋₁₁₀ (配列番号 245)、PrP₁₅₄₋₁₆₅ (配列番号 246)、PrP₂₂₆₋₂₃₇ (配列番号 247) ペプチド、配列番号 14、配列番号 50、または配列番号 68 に由来するペプチドである。

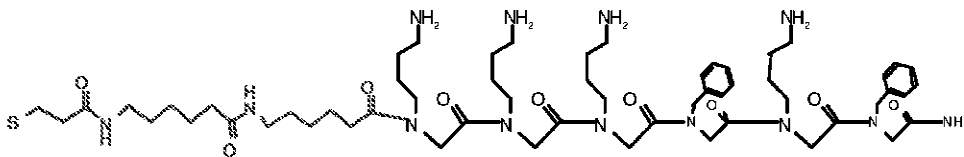
10

【 0 2 7 9 】

特に好ましい実施形態において、PCSB 試薬は、

【 0 2 8 0 】

【 化 1 3 】



20

の構造を含む。

【 0 2 8 1 】

(F . 本発明の方法で使用される PCSB 試薬の同定)

本発明の方法で使用される PCSB 試薬は、プリオンタンパク質の病原性配座異性体と優先的に相互作用する。この特性は、任意の公知の結合アッセイ、たとえば ELISA、ウェスタンブロットなどの標準イムノアッセイ；標識ペプチド；ELISA 様アッセイ；および/または細胞ベースアッセイ、特に「病原性配座異性体の PCSB 試薬への結合による病原性配座異性体の検出」に関して以下の節で説明されているアッセイを使用して試験することができる。

【 0 2 8 2 】

30

本発明の方法で使用される PCSB 試薬の特異性を試験する 1 つの好都合な方法は、病原性および非病原性配座異性体の両方を含有する試料を選択することである。通例、このような試料は、罹患した動物からの組織を含む。病原性形態に特異的に結合することが公知である、本明細書に記載するような PCSB 試薬は、(当該分野で周知であり、以下でさらに説明される方法によって) 固体担体に結合され、他の試料成分から病原性配座異性体を分離 (「プルダウン」) して、固体担体における試薬 - タンパク質結合相互作用の数に直接関連する定量値を得るために使用される。この結果を結合特異性が不明の PCSB 試薬の結果と比較して、このような試薬が病原性配座異性体と優先的に相互できるか否かを判定することができる。

【 0 2 8 3 】

40

これらのアッセイは、病原性配座異性体が一般に、あるプロテアーゼ、たとえばプロテイナーゼ K に対して耐性であるという事実を利用し得る。同じプロテアーゼは、コンフォメーション病タンパク質の非病原性配座異性体を分解することができる。したがってプロテアーゼを使用するとき、試料を 2 つの等量に分け得る。プロテアーゼを第 2 の試料に添加して、同じ試験を実施することができる。第 2 の試料中のプロテアーゼによって任意の非病原性配座異性体が分解されるため、第 2 の試料の任意の試薬 - タンパク質結合相互作用は、病原性配座異性体に起因し得る。

【 0 2 8 4 】

(IV . 病原性配座異性体の PCSB 試薬への結合による病原性配座異性体の検出)

記載した PCSB 試薬は、試料 (たとえば、血液、脳、脊髄、CSF または器官試料な

50

どの生物学的試料)をスクリーニングするために、たとえばこれらの試料でのコンフォメーション病タンパク質の病原性形態の存在または非存在を検出するために、多種多様のアッセイでを使用することができる。多くの現在の診断試薬とは異なり、本明細書に記載するPCSB試薬は、血液試料、血液製剤、CSF、または生検試料を含む、実質的にいずれの種類の生物学的または非生物学的試料での検出も可能である。検出方法はたとえば、立体配座タンパク質疾患を診断する方法においておよび病原性配座異性体の存在または非存在を知ることが重要であるその他の任意の状況において使用することができる。

【0285】

(捕捉試薬または検出試薬のどちらかとしての病原性配座異性体特異的結合試薬の使用)

本発明の方法で使用されるPCSB試薬は通例、プリオンタンパク質断片に由来し、またプリオンタンパク質の病原性配座異性体と優先的に相互作用する。これらのPCSB試薬の少なくともいくつかは、優先的に病原性プリオンおよび他の病原性配座異性体の両方と同程度まで優先的に相互作用することが予想される。1より多くのコンフォメーション病タンパク質の病原性配座異性体を含むことが予想される試料では、または存在する病原性配座異性体の種類を判定することが方法の目的のために重要である場合、病原性配座異性体特異的結合試薬は、異なる種類のコンフォメーション病タンパク質に対して異なる結合特異性および/または親和性を有するCDPSB試薬と組合せて、検出に使用すべきである。たとえば、病原性配座異性体特異的結合試薬が捕捉試薬として使用される場合、コンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬を、検出試薬として使用するべきであり、逆もまた同様である。しかしアッセイされる特定の試料が1種類の病原性配座異性体のみを含むことが予想される場合、または病原性配座異性体が存在することを判定することが方法の目的にとって重要でない場合、ここでPCSB試薬は、捕捉および検出試薬の両方として使用できる。

【0286】

本発明の方法で使用されるいくつかのPCSB試薬は、検出アッセイが非プリオン病原性配座異性体のみを検出を可能にする方式で実施できるように、他の病原性配座異性体と比較して、病原性プリオンと異なる程度で優先的に相互作用する。この場合、PCSB試薬は、捕捉および検出試薬の両方として使用できる。

【0287】

(病原性配座異性体特異的結合試薬を捕捉剤として使用する方法)

好ましい実施形態において、本発明は、非プリオン病原性配座異性体を含むことが疑われる試料に病原性配座異性体特異的結合試薬を、存在するならば病原性配座異性体への試薬の結合を可能にする条件下で接触させるステップと;試料中に病原性配座異性体がある場合、試薬へのその結合によって病原性配座異性体の存在を検出するステップとによって;試料中の非プリオン病原性配座異性体の存在を検出する方法を提供し、ここで病原性配座異性体特異的結合試薬はプリオンタンパク質断片に由来して、プリオンタンパク質の病原性配座異性体と優先的に相互作用する。

【0288】

本発明の方法の使用では、試料は、非プリオン病原性配座異性体を含むことが公知である、または疑われるいずれのものでもよい。試料は、生物学的試料(すなわち生存している生物またはかつて生存していた生物から調製した試料)または非生物学的試料であることが可能である。好適な生物学的試料は、これに限定されるわけではないが器官、全血、血液画分、血液成分、血漿、血小板、血清、脳脊髄液(CSF)、脳組織、神経系組織、筋肉組織、骨髄、尿、涙、非神経系組織、器官、および/または生検もしくは剖検を含む。好ましい生物学的試料は、血漿およびCSFを含む。

【0289】

試料は、PCSB試薬の病原性配座異性体への結合を、試料中に病原性配座異性体が存在する場合に可能にする条件下で、本明細書に記載する1つ以上のPCSB試薬と接触させる。本明細書の開示に基づく特定の条件を判定することは、十分に当業者の能力の範囲

10

20

30

40

50

内である。通例、試料および P C S B 試薬を、ほぼ中性の p H の好適な緩衝液（たとえば p H 7 . 5 の T B S 緩衝液）中で、好適な温度（たとえば約 4 ）にて好適な期間（たとえば約 1 時間 ~ 一晚）にわたって共にインキュベートして、結合を起こさせる。

【 0 2 9 0 】

本方法のこのような実施形態において、病原性配座異性体特異的結合試薬は捕捉試薬であり、試料中の病原性配座異性体の存在は、病原性配座異性体特異的結合試薬へのその結合によって検出される。捕捉後、病原性配座異性体の存在は、捕捉および検出試薬として同時に作用する、まさに同じ病原性配座異性体特異的結合試薬によって検出され得る。代わりに、異なる病原性配座異性体特異的結合試薬、または好ましくは、1 つ以上のコンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬のどちらかであり得る、別個の検出試薬が存在することがある。好ましい実施形態において、捕捉ステップの後に、非結合試料は除去され、病原性配座異性体は、それが捕捉試薬と形成した複合体から解離されて、検出のために変性される。捕捉試薬は、好ましくは固体担体に結合される。

10

【 0 2 9 1 】

（検出試薬として病原性配座異性体特異的結合試薬を使用する方法）

他の実施形態において、本発明は、非プリオン病原性配座異性体を含むことが疑われる試料にコンフォメーション病タンパク質の病原性形態および非病原性形態の両方に結合するコンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬を、存在するならばコンフォメーション病タンパク質への C D P S B 試薬の結合を可能する条件下で接触させて、第 1 の複合体を形成するステップと；第 1 の複合体に P C S B 試薬を、試料中に病原性配座異性体がある場合、結合を可能にする条件下で接触させて、P C S B 試薬へのその結合によって、病原性配座異性体の存在を検出するステップとによって、試料中の非プリオン病原性配座異性体の存在を検出する方法を提供し、ここで P C S B 試薬はプリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する。

20

【 0 2 9 2 】

（ A . 病原性配座異性体を捕捉する試薬 ）

好ましい実施形態において、捕捉試薬は、プリオンタンパク質断片に由来してプリオンタンパク質の病原性配座異性体と優先的に相互作用する、病原性配座異性体特異的結合試薬である。他の実施形態において、捕捉試薬は、コンフォメーション病タンパク質の病原性形態および非病原性形態の両方を結合する、コンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬である。

30

【 0 2 9 3 】

捕捉試薬は、試料中の任意の非プリオン病原性配座異性体を試薬に結合させて、複合体を形成する条件下で試料と接触する。このような結合条件は、当業者によって容易に決定され、本明細書にさらに記載される。通例、方法は、マイクロタイタープレートのウェル内で、または小容量のプラスチック管内で実施されるが、いずれの好都合な容器も好適である。試料は一般に、液体試料または懸濁物であり、捕捉試薬の前または後に反応容器に添加され得る。

【 0 2 9 4 】

捕捉試薬は好ましくは、以下の節でさらに詳細に記載される固体担体に結合される。いくつかの実施形態において、固体担体は試料の適用前に結合される。固体担体（たとえば磁気ビーズ）は最初に、本明細書に記載するような捕捉試薬と、捕捉試薬が担体に十分に固定されるように反応させる。捕捉試薬が結合された固体担体は次に、病原性配座異性体を含むことが疑われる試料と、捕捉試薬の病原性配座異性体への結合を可能にする条件下で接触させる。

40

【 0 2 9 5 】

代わりに捕捉試薬を、固体担体へ結合させる前に、非プリオン病原性配座異性体を含むことが疑われる試料と最初に接触させて、次に固体担体への捕捉試薬の結合を続けてもよい（たとえば、試薬をピオチン化して、固体担体はアビジンまたはストレプトアビジンを含むことが可能である）。

50

【0296】

ある実施形態において、捕捉試薬と病原性配座異性体との間に複合体が作られた後に、非結合試料物質（すなわち、任意の非結合病原性配座異性体を含む、捕捉試薬に結合されていない試料の任意の成分）を除去することができる。たとえば捕捉試薬が固体担体に結合されている場合、非結合物質は固体担体を（非結合試料物質を含有する）反応溶液からたとえば遠心分離、沈殿、濾過、磁力などで分離することによって減少させることができる。方法の次のステップを実施する前に、複合体を有する固体担体を1回以上の洗浄ステップに場合により供し、任意の残留試料物質を除去してもよい。

【0297】

いくつかの実施形態において、非結合試料物質の除去および任意の洗浄の後に、結合した病原性配座異性体を複合体から解離させて、任意の公知の検出方法を使用して検出する。代わりに、複合体中の結合した病原性配座異性体は、捕捉試薬から解離させずに検出される。

10

【0298】

（B．病原性配座異性体の解離および変性）

捕捉試薬に結合して複合体を形成した後、病原性配座異性体は、病原性配座異性体の検出を容易にするために処理され得る。

【0299】

いくつかの実施形態において、非結合物質は除去され、次に病原性配座異性体が複合体から解離される。「解離」は、病原性配座異性体を捕捉試薬とは別に検出できるようにする、病原性配座異性体の捕捉試薬からの物理的分離を指す。病原性配座異性体の複合体からの解離は、たとえば低濃度（たとえば0.4～1.0M）のグアニジニウムヒドロクロライドまたはグアニジニウムイソチオシアネートを使用して実現できる。

20

【0300】

本方法で使用されるCDPSB試薬が変性タンパク質のみを検出できる場合、解離した病原性配座異性体も変性されている。「変性」とは、ポリペプチドの天然コンフォメーションを破壊することを指す。たとえば、試薬が、試薬と病原性配座異性体とを共有結合する活性化可能反応基（たとえば光反応基）を含有する場合、試薬から解離することなく変性を達成することができる。

【0301】

好ましい実施形態において、病原性配座異性体は同時に解離および変性される。

30

【0302】

病原性配座異性体は、高濃度の塩またはカオトロピック剤、たとえば約3M～約6Mのグアニジニウムチオシアネート（GdnSCN）、またはグアニジニウムHCl（GdnHCl）などのグアニジニウム塩を使用して、同時に解離および変性され得る。カオトロピック剤は検出試薬の結合に干渉し得るため、カオトロピック剤は好ましくは、検出が実施される前に除去または希釈される。

【0303】

他の実施形態において、pHを変化させることによって、たとえばpHを12もしくはそれより上に上昇させる（「高pH」）かまたはpHを2もしくはそれより下に低下させる（「低pH」）ことによって、病原性配座異性体は、同時に、捕捉試薬との複合体から解離および変性される。複合体の高いpHへの曝露が好ましい。一般に、12.0～13.0のpHが十分である；好ましくは、12.5～13.0のpHが；さらに好ましくは、12.7～12.9のpHが；最も好ましくは12.9のpHが使用される。代わりに、複合体の低pHへの曝露を使用して、病原性プリオンタンパク質を試薬から解離および変性させることができる。この代案には、1.0～2.0のpHが十分である。いくつかの実施形態において、病原性配座異性体は、pH12.5～13.2で、好適な時間にならって、たとえば90（C）で10分間処理される。

40

【0304】

第1の複合体の高pHまたは低pHどちらかへの曝露は一般に、ごく短時間、たとえば

50

60分間にわたって、好ましくは15分間以下で、さらに好ましくは10分間以下で実施される。いくつかの実施形態において、曝露は室温より上で、たとえば約60、70、80、または90にて実施される。病原性配座異性体を解離させるのに十分な時間の曝露後、酸性試薬（高pH解離条件が使用される場合）または塩基性試薬（低pH解離条件が使用される場合）のどちらかの添加によって、pHを容易に中性（すなわち約7.0～7.5のpH）に再調整することができる。当業者は適切なプロトコルを容易に決定することが可能であり、例が本明細書に記載されている。

【0305】

一般に高pH解離条件を生じさせるためには、約0.05N～約0.2Nの濃度までのNaOHの添加で十分である。好ましくは、NaOHを約0.05N～約0.15Nの濃度で添加する；さらに好ましくは、約0.1N NaOHが使用される。解離が完了すると、pHは、好適な量の酸性溶液、たとえばリン酸、リン酸一ナトリウムの添加によって、中性（すなわち約7.0～7.5）に再調整できる。

10

【0306】

一般に低pH解離条件を生じさせるためには、約0.2M～約0.7Mの濃度までのH₃PO₄の添加で十分である。好ましくは、H₃PO₄を0.3M～0.6Mの濃度で添加する；さらに好ましくは、0.5M H₃PO₄が使用される。解離が完了すると、pHは、好適な量の塩基性溶液、たとえばNaOHまたはKOHの添加によって、中性（すなわち約7.0～7.5）に再調整できる。

【0307】

所望ならば、病原性配座異性体の複合体からの解離は、タンパク質を変性させることなく、たとえば低濃度（たとえば0.4～1.0M）のグアニジニウムヒドロクロライドまたはグアニジニウムイソチオシアネートを使用して実施することもできる。タンパク質を変性させることなく、病原性配座異性体を複合体から解離させるためのさらなる条件については、WO2006076497（国際出願PCT/US2006/001090）を参照。代わりに、たとえば試薬が試薬と病原性配座異性体とを共有結合するために使用できる活性化可能反応基（たとえば光反応基）を含有するように修飾される場合、捕捉された病原性配座異性体はまた、試薬からの解離無しに変性させられ得る。

20

【0308】

解離の後、病原性配座異性体は次に捕捉試薬から分離される。この分離は、非結合物質を含有する部分（現在は解離された病原性配座異性体）が保持され、捕捉試薬を含有する部分が廃棄されることを除いて、上述の非結合試料物質の除去と同様の方式で実施することができる。

30

【0309】

（C. 捕捉された病原性配座異性体の検出）

病原性配座異性体の検出は、コンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬を使用して実施され得る。好ましい実施形態において、CDPSB試薬は、コンフォメーション病タンパク質上のエピトープを認識する抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）である。

【0310】

試料中の捕捉された病原性配座異性体の検出も、PCSB試薬を使用することによって実施され得る。このような試薬は、捕捉試薬が同じかもしくは異なる病原性配座異性体特異的結合試薬またはコンフォメーション病タンパク質特異的結合剤のどちらかである実施形態で使用され得る。

40

【0311】

方法が第1の病原性配座異性体特異的結合試薬および第2の病原性配座異性体特異的結合試薬を利用するとき、第1および第2の試薬は同じでも異なってもよい。「同じ」とは、第1および第2の試薬が第2の試薬中の検出可能な標識の包含のみで異なることを意味する。第1および第2の試薬は、たとえばそれらが異なる構造を有するか、またはプリオンタンパク質の異なる領域からの断片に由来する場合に、「異なる」。

50

【0312】

(一般的な検出方法)

次に任意の好適な検出手段を使用して、捕捉試薬と病原性配座異性体との間の結合を同定することができる。

【0313】

結合の検出に使用するのに好適な分析方法は、UV/可視分光法、FTIR、核磁気共鳴分光法、ラマン分光法、質量分析法、HPLC、キャピラリー電気泳動法、表面プラズモン共鳴分光法、微小電気機械システム(MEMS)などの方法、または当該分野で公知の他の任意の方法を含む。

【0314】

結合は、しばしばELISAの形態で、標識試薬または抗体の使用によっても検出され得る。本発明の使用に好適な検出可能な標識は、これに限定されるわけではないが、放射性同位体、蛍光剤、化学発光剤、発色団、蛍光半導体ナノ結晶、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素インヒビター、発色団、色素、金属イオン、金属ゾル、リガンド(たとえばビオチン、ストレプトアビジン(streptavidin)またはハプテン)などを含む、検出可能な任意の分子を含む。さらなる標識は、これに限定されるわけではないが、検出可能な範囲で蛍光を呈することができる物質またはその部分を含む、蛍光を使用する標識を含む。本発明で使用され得る標識の詳細な例は、これに限定されるわけではないが、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、フルオレセイン、FITC、ローダミン、ダンシル、ウンベリフェロン、ジメチルアクリジニウムエステル(DMAE)、テキサスレッド、ルミノール、NADPHおよび β -ガラクトシダーゼを含む。さらに検出可能な標識は、たとえばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、転写媒介増幅(TMA)、分枝DNA(b-DNA)、核酸配列ベース増幅(NASBA)などを含む核酸検出方法によって検出することができる、オリゴヌクレオチドタグを含み得る。好ましい検出可能な標識は、酵素、特にアルカリホスファターゼ(AP)、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、および蛍光化合物を含む。当該分野で周知であるように、酵素は、検出可能な基質、たとえば、発色基質または蛍光発生基質と組合せて利用され、検出可能なシグナルを生成する。

【0315】

標識された検出試薬の使用(上述)に加えて、病原性配座異性体に結合された試薬を分離させるために免疫沈降が使用され得る。好ましくは、免疫沈降は、沈降促進剤の添加によって促進される。沈降促進剤は、タンパク質に結合されている試薬の沈降を促進または増加することができる部分を含む。このような沈降促進剤は、ポリエチレングリコール(PEG)、タンパク質G、タンパク質Aなどを含む。タンパク質Gまたはタンパク質Aが沈降促進剤として使用される場合、タンパク質は場合によりビーズ、好ましくは磁気ビーズに結合され得る。沈降は、遠心分離の使用または磁力の使用によってさらに促進することができる。このような沈降促進剤の使用は、当該分野で公知である。

【0316】

たとえばウェスタンブロットは、通例、ニトロセルロースまたはPVDFに電氣的にブロットされた、「ブルダウン」アッセイ(本明細書に記載するような)から得た試料において、SDS-PAGEゲルから変性タンパク質を検出するタグ化1次抗体を利用する。次に1次抗体は、タグに対するプローブ(たとえばストレプトアビジン結合体化アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ECL試薬、および/または増幅可能なオリゴヌクレオチド)によって検出(および/または増幅)される。結合は、親和性タグに対するプローブ(たとえばストレプトアビジン結合体化アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ECL試薬、または増幅可能なオリゴヌクレオチド)によって標識および増幅される親和性タグ(たとえばビオチン)を有するペプチドなどの検出試薬を使用しても評価することができる。

【0317】

たとえば病原性配座異性体が個々の細胞で直接検出される場合(たとえば特異的に標識

10

20

30

40

50

された細胞の蛍光ベースの細胞選別、カウント、または検出を可能にする蛍光標識試薬を使用して)、細胞ベースアッセイも使用することができる。

【0318】

検出試薬からのシグナルを増幅するアッセイも公知である。その例は、ビオチンおよびアビジンを利用するアッセイ、ならびに酵素標識および媒介イムノアッセイ、たとえばELISAアッセイである。さらなる例は、シグナル増幅のための分枝DNAの使用(たとえば米国特許第5,681,697号;同第5,424,413号;同第5,451,503号;同第5,4547,025号;および同第6,235,483号を参照);PCR、ローリングサークル増幅、Third Waveのインベダーなどの標的増幅技法の利用(Arrudaら、2002 Expert. Rev. Mol. Diagn. 2: 487;米国特許第6090606号,同第5843669号,同第5985557号,同第6090543号,同第5846717号)、NASBA、TMAなど(米国特許第6,511,809号;EP 0544212A1);および/または免疫-PCR技法(たとえば米国特許第5,665,539号;国際公開WO98/23962;WO00/75663;およびWO01/31056を参照)を含む。

10

【0319】

さらに、サンドイッチELISAに類似したマイクロタイタープレート手順が使用され得、たとえば本明細書に記載するような病原性配座異性体特異的結合試薬またはコンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬は、タンパク質を固体担体(たとえばマイクロタイタープレートのウェル、ビーズなど)に固定化するのに使用され、さらなる検出試薬(これに限定されるわけではないが、別の病原性配座異性体特異的結合試薬またはコンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬(結合体化アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ECL試薬、または増幅可能なオリゴヌクレオチドなどの親和性および/または検出標識を有する)を含み得る)は、病原性配座異性体を検出するために使用される。

20

【0320】

(解離した捕捉病原性配座異性体を検出するための好ましい方法)

捕捉試薬と結合された病原性配座異性体とが検出前に解離された場合、解離された病原性配座異性体は、下でさらに十分に説明する、直接ELISAまたは抗体サンドイッチELISA型アッセイのどちらかとしての、ELISA型アッセイで検出することができる。「ELISA」という用語は、抗体による検出を説明するために使用されるが、アッセイは抗体が「酵素結合」されているアッセイに限定されない。検出抗体は、本明細書に記載され、イムノアッセイの分野で周知である検出可能な標識のいずれによっても標識できる。Laurら、PNAS USA 104(28):11551-11556(2007)に記載されているようなELISAは、捕捉試薬から解離した病原性配座異性体の量を定量するために実施できる。

30

【0321】

解離した病原性配座異性体は、固体担体表面にそれを受動的コーティングすることによって、標準ELISA用に調製することができる。このような受動的コーティングの方法は周知であり、通例、pH8の100mM NaHCO₃中で、約37にて数時間、または4にて一晩実施される。他のコーティング緩衝液(たとえば50mMカーボネートpH9.6、10mM Tris pH8、または10mM PBS pH7.2)が周知である。固体担体は、本明細書に記載されているか、または当該分野で周知である固体担体のいずれでもよいが、好ましい固体担体はマイクロタイタープレート、たとえば96ウェルポリスチレンプレートである。高濃度のカオトロピック剤を使用して解離が実施された場合、カオトロピック剤の濃度は、固体担体へのコーティングの前に、少なくとも約2倍に希釈することによって低下される。高または低pHを使用して解離が実施されその後中和された場合、解離された病原性配座異性体は、さらなる希釈を一切行わずにコーティングに使用できる。プレート(単数または複数)を洗浄して、非結合物質を除去できる。

40

50

【0322】

標準 E L I S A が実施される場合、次に検出可能に標識された結合分子、たとえばコンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬または病原性配座異性体特異的結合試薬（捕捉に使用したのと同じ試薬または異なる試薬のどちらか）が添加される。この検出可能に標識された結合分子を任意の捕捉された病原性配座異性体と反応させて、当該分野で周知の方法を使用して、プレートを洗浄し、標識分子の存在を検出する。捕捉試薬が病原性形態に対して特異的である限り、検出分子は、病原性形態に対して特異的である必要はないが、両方の形態に結合してよい。好ましい実施形態において、検出可能に標識された結合分子は抗体である。このような抗体は、周知である抗体はもちろんのこと、病原性配座異性体またはコンフォメーション病タンパク質の病原性形態および非病原性形態の両方に対して特異的である周知の方法によって産生される抗体も含む。

10

【0323】

代わりの実施形態において、解離した病原性配座異性体は、抗体サンドイッチ型 E L I S A を使用して検出される。この実施形態において、解離した病原性配座異性体は、病原性配座異性体またはコンフォメーション病タンパク質に特異的な第 1 の抗体を有する固体担体に「再捕捉」される。病原性配座異性体が再捕捉された固体担体は、場合により洗浄して任意の非結合物質を除去し、次にコンフォメーション病タンパク質または病原性配座異性体に特異的な第 2 の抗体と、第 2 の抗体を再捕捉された病原性配座異性体への結合を可能にする条件下で接触させる。

20

【0324】

第 1 および第 2 の抗体は通例、異なる抗体であり、好ましくはコンフォメーション病タンパク質の異なるエピトープを認識する。たとえば第 1 の抗体は、コンフォメーション病タンパク質の N 末端のエピトープを認識し、第 2 の抗体は N 末端以外のエピトープを認識し、または逆も同様である。第 1 および第 2 の抗体の他の組合せは容易に選択できる。本実施形態において、第 1 の抗体ではなく、第 2 の抗体が検出可能に標識される。

【0325】

試薬からの病原性配座異性体の解離がカオトロピック剤を使用して実施されるとき、検出アッセイを実施する前にカオトロピック剤を除去するか、または少なくとも 15 倍に希釈すべきである。高または低 pH および中和を使用して解離を生じさせるとき、解離された病原性配座異性体は、さらなる希釈を行わずに使用できる。検出を実施する前に解離した病原性配座異性体に変性されているとき、第 1 および第 2 の抗体はどちらも変性配座異性体に結合する。

30

【0326】

（非解離の捕捉された病原性配座異性体を検出する好ましい方法）

他の例示的なアッセイにおいて、捕捉試薬と結合された病原性配座異性体とは検出前に解離していない。たとえば固体担体（たとえばマイクロタイタープレートのウェル）は、病原性配座異性体特異的結合試薬に結合される。次に非プリオン病原性配座異性体を含む、またその含有が疑われる試料を固体担体に添加する。任意の病原性配座異性体が試薬に結合するのに十分なインキュベーション期間の後、固体担体を洗浄して非結合部分を除去することが可能であり、検出可能に標識された、上述のような第 2 の結合分子、たとえばコンフォメーション病タンパク質特異的結合試薬または第 2 の同じかもしくは異なる病原性配座異性体特異的結合試薬が添加される。代わりに、コンフォメーション病タンパク質特異的結合を固体担体に結合させて（たとえばマイクロタイタープレートのウェルをコーティング）、病原性配座異性体特異的検出試薬を使用して検出を実施することができる。

40

【0327】

（病原性アルツハイマー病配座異性体の好ましい検出方法）

本発明の方法の好ましい実施形態において、病原性アルツハイマー病配座異性体が検出されるとき、サンドイッチ E L I S A が使用される。P C S B 試薬を使用した試料からの病原性アルツハイマー病配座異性体の捕捉および非結合試料の除去の後、捕捉された病原

50

性アルツハイマー病配座異性体は通例、たとえばチオシアン酸グアニジンによるインキュベーションまたは高pH解離条件によって、解離および変性される。好ましい実施形態において、病原性アルツハイマー病配座異性体がAである場合、Aは、約0.05N NaOHまたは約0.1N NaOHによって、約90または約80にて、PCSB試薬との複合体から解離し変性される。特に好ましい実施形態において、Aは、約0.1N NaOHで約80にて約30分間で解離および変性される。

【0328】

病原性アルツハイマー病配座異性体を再捕捉するために、アルツハイマー病タンパク質に特異的な抗体によって、固体担体をコーティングすることができる。この捕捉された病原性アルツハイマー病配座異性体は次に、検出可能に標識されているアルツハイマー病タンパク質に特異的な別の抗体を使用して検出することができる。特に好ましい抗体は、A40のC末端に特異的な抗体である11A50-B10(Covance); A42のC末端に特異的な抗体である12F4(Covance); Aアミノ酸17~24に特異的な4G8; Aアミノ酸1~10に特異的な20.1; およびAアミノ酸3~8に特異的な6E10を含む。好ましい実施形態において、20.1は捕捉抗体であり、12F4または11A50-B10は検出抗体として使用される。

10

【0329】

(D.アッセイで使用される固体担体)

ある実施形態において、PCSB試薬またはCDPSB試薬は、固体担体上で提供される。PCSB試薬またはCDPSB試薬は、試料との接触前に固体担体上に提供することができるか、または試薬は、試料との接触およびその中の任意の病原性配座異性体への結合の後に、固体担体への結合に適応させることができる(たとえばビオチン化試薬およびアビジンまたはストレプトアビジンを含む固体担体を使用することによる)。

20

【0330】

本発明の目的では、固体担体は、不溶性マトリクスである任意の物質であり得、興味のある分子(たとえば本発明の試薬、コンフォメーション病タンパク質、抗体など)を連結または結合させることができる剛性または半剛性表面を有することができる。例示的な固体担体は、これに限定されるわけではないが、基質、たとえばニトロセルロース、ポリ塩化ビニル; ポリプロピレン、ポリスチレン、ラテックス、ポリカーボネート、ナイロン、デキストラン、キチン、砂、シリカ、軽石、アガロース、セルロース、ガラス、金属、ポリアクリルアミド、ケイ素、ゴム、ポリサッカライド、ポリフッ化ビニル、ジアゾ化紙、活性化ビーズ、磁気応答性ビーズ、ならびに固相合成、親和性分離、精製、ハイブリダイゼーション反応、イムノアッセイおよび他のこのような用途に一般に使用される任意の材料を含む。担体は、微粒子であり得、または連続表面の形態にあり得、膜、メッシュ、プレート、ペレット、スライド、ディスク、キャピラリー、中空繊維、針、ピン、チップ、中空ではない繊維、ゲル(たとえばシリカゲル)およびビーズ(たとえばポアガラスビーズ、シリカゲル、ジビニルベンゼンによって場合により架橋されたポリスチレンビーズ、グラフト化コポリビーズ、ポリアクリルアミドビーズ、ラテックスビーズ、N-N'-ビス-アクリロイルエチレンジアミンによって場合により架橋されたジメチルアクリルアミドビーズ、酸化鉄磁気ビーズ、および疎水性ポリマーでコーティングされたガラス粒子)を含む。

30

40

【0331】

本明細書に記載するようなPCSB試薬またはCDPSB試薬は、吸着(absorption)、カップリングにより、または結合対の使用によって、たとえば共有的に、PCSB試薬またはCDPSB試薬を結合する標準技法を使用して、固体担体に容易に結合することができる。

【0332】

担体への固定化は、(たとえばタンパク質がより良好な固相結合特性を有するとき)PCSB試薬またはCDPSB試薬をタンパク質へ最初にカップリングすることによって強化され得る。好適なカップリングタンパク質は、これに限定されるわけではないが、ウシ

50

血清アルブミン (B S A) を含む血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、免疫グロブリン分子、チログロブリン、オボアルブミン、および当業者に周知の他のタンパク質などの高分子を含む。分子を担体に結合するために使用できる他の試薬は、ポリサッカライド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸コポリマーなどを含む。このような分子およびこれらの分子をタンパク質にカップリングする方法は、当業者に周知である。たとえば Brinkley, M. A., (1992) Bioconjugate Chem., 3: 2-13; Hashida (1984) J. Appl. Biochem., 6: 56-63; ならびに Anjaneyulu および Staros (1987) International J. of Peptide and Protein Res. 30: 117-124 を参照。

10

【0333】

所望ならば、固体担体に添加される P C S B 試薬または C D P S B 試薬は、容易に官能化されてスチレンまたはアクリレート部分を生成することが可能であり、それゆえポリスチレン、ポリアクリレートまたは他のポリマー、たとえばポリイミド、ポリアクリルアミド、ポリエチレン、ポリビニル、ポリジアセチレン、ポリフェニレン-ビニレン、ポリペプチド、ポリサッカライド、ポリスルホン、ポリピロール、ポリイミダゾール、ポリチオフェン、ポリエーテル、エポキシ、シリカガラス、シリカゲル、シロキサン、ポリホスフェート、ヒドロゲル、アガロース、セルロースなどへの分子の包含を可能とする。好ましい実施形態において、固体担体は、磁気ビーズ、さらに好ましくはポリスチレン/酸化鉄ビーズである。

20

【0334】

P C S B 試薬または C D P S B 試薬は、分子の結合対の相互作用によって固体担体に結合させることができる。このような結合対は周知であり、本明細書の別の箇所では例が記載されている。結合対の一方のメンバーは、上述の技法によって固体担体にカップリングされ、結合対の他方のメンバーは試薬に（合成の前、間、または後に）結合される。このように修飾された P C S B 試薬または C D P S B 試薬は、試料と接触させることが可能であり、病原性配座異性体との相互作用は、存在する場合、溶液中で発生することが可能であり、その後、固体担体を試薬（または試薬-タンパク質複合体）と接触させることができる。本実施形態の好ましい結合対は、ビオチンおよびアビジン、ならびにビオチンおよびストレプトアビジンを含む。ビオチン-アビジンおよびビオチン-ストレプトアビジンに加えて、本実施形態の他の好適な結合対は、たとえば抗原-抗体、ハプテン-抗体、ミメトープ-抗体、受容体-ホルモン、受容体-リガンド、アゴニスト-アンタゴニスト、レクチン-炭水化物、タンパク質 A - 抗体 F c を含む。このような結合対は、周知であり（たとえば米国特許第 6, 551, 843 号および同第 6, 586, 193 号を参照）、当業者は、好適な結合対を選択して、それらを本発明での使用のために適応させる能力を有する。捕捉試薬が上述のような担体への結合に適しているとき、捕捉試薬が担体に結合される前かまたはされた後に、試料を捕捉試薬に接触させることができる。

30

【0335】

代わりに、P C S B 試薬または C D P S B 試薬を、当該分野で周知の結合化学を使用して、固体担体に共有結合させることができる。たとえば P C S B または C D P S B 試薬を含有するチオールを、当該分野で公知の標準方法を使用して、固体担体、たとえばカルボキシル化磁気ビーズに直接結合させることができる（たとえば Chrisey, L. A., Lee, G. U. および O'Ferrall, C. E. (1996). Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films. Nucleic Acids Research 24(15), 3031-3039; Kitagawa, T., Shimozono, T., Aikawa, T., Yoshida, T. および Nishimura, H. (1980). Preparation and characterization of hetero-bifunctional cross-linking reagents for protein modifications. Chem

40

50

. Pharm. Bull. 29 (4), 1130 - 1135 を参照)。カルボキシル化磁気ビーズは、カルボジイミド化学を使用して、マレイミド官能基を含有するヘテロ2官能性架橋剤 (Pierce Biotechnology Inc. による BMPH) に、最初にカップリングされる。チオール化 PCSB または CDPSB 試薬は次に、BMPH コートビーズのマレイミド官能基に共有的にカップリングされる。本発明の検出方法の実施形態で使用されるときに、固体担体は、非結合試料からの試薬および病原性配座異性体を含む複合体の分離を補助する。チオールカップリングに特に好都合な磁気ビーズは、Dynal による DynabeadsTM M-270 カルボン酸である。PCSB または CDPSB 試薬は、リンカー、たとえば1つ以上のアミノヘキサン酸部分も含み得る。

【0336】

(E. 好ましい検出方法)

好ましい実施形態を下に記載する。

【0337】

好ましい実施形態において、本発明の方法は、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する、本明細書に記載するようなペプチド試薬を含む、プリオンタンパク質断片に由来する PCSB 試薬を使用して非プリオン病原性配座異性体を捕捉および検出し、前記方法は、非プリオン病原性配座異性体を含有することが疑われる試料に PCSB 試薬を、非プリオン病原性配座異性体が存在するならば非プリオン病原性配座異性体への PCSB 試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；試料中に非プリオン病原性配座異性体がある場合、PCSB 試薬へのその結合によって、非プリオン病原性配座異性体を検出するステップと；を含む。非プリオン病原性配座異性体の結合は、たとえば複合体を解離させて、非プリオン病原性配座異性体を CDPSB 試薬によって検出することにより検出できる。

【0338】

一実施形態において、捕捉される非プリオン病原性配座異性体は、アルツハイマー病に関連する病原性配座異性体、たとえば A₄₀、A₄₂、またはタウである。このような場合、試料は好ましくは、血漿または脳脊髄液である。PCSB 試薬は、好ましくは PrP₁₉₋₃₀ (配列番号 242)、PrP₂₃₋₃₀ (配列番号 243)、PrP₁₀₀₋₁₁₁ (配列番号 244)、PrP₁₀₁₋₁₁₀ (配列番号 245)、PrP₁₅₄₋₁₆₅ (配列番号 246)、PrP₂₂₆₋₂₃₇ (配列番号 247)、配列番号 14、配列番号 50、配列番号 68 に由来して、

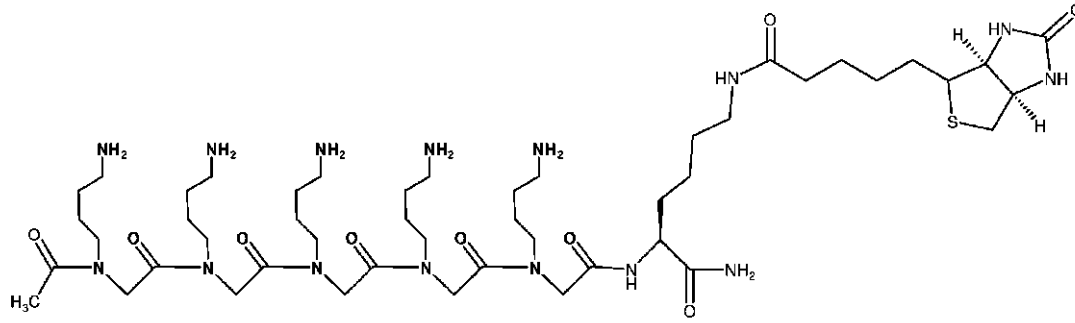
【0339】

10

20

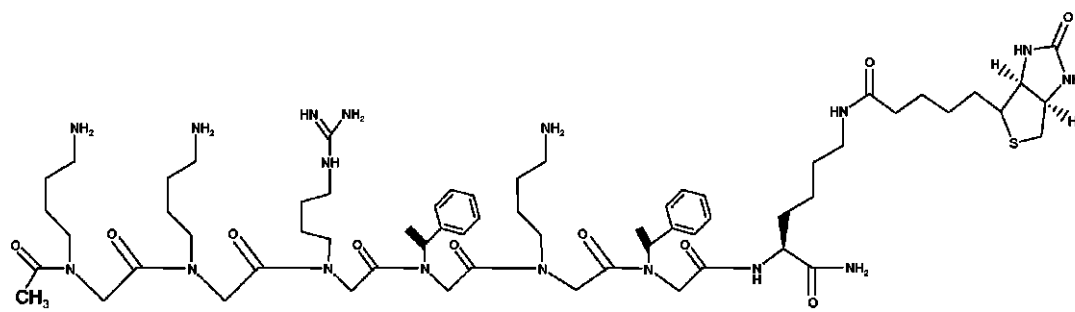
30

【化 1 4】



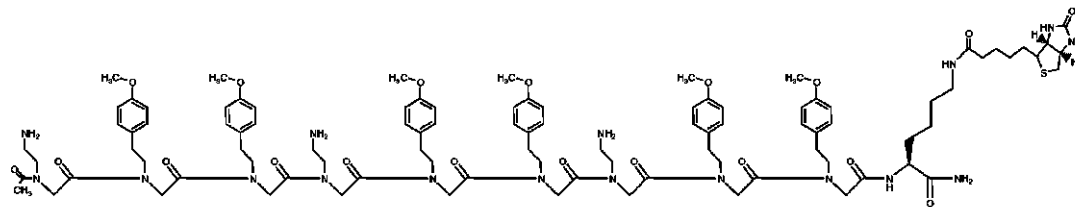
10

I



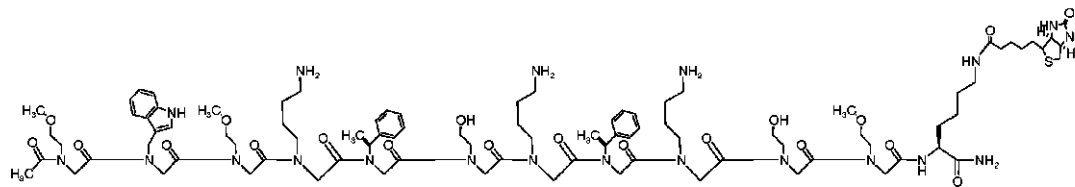
20

II



30

III

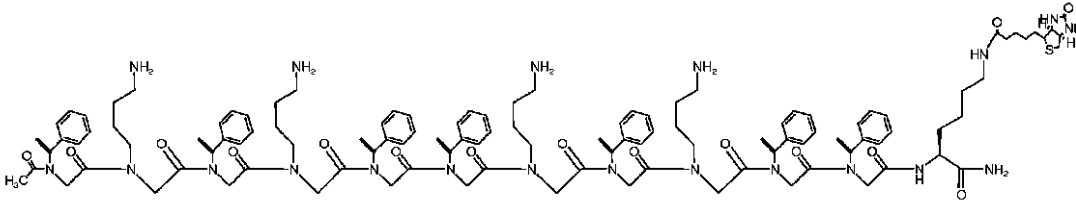


40

IV

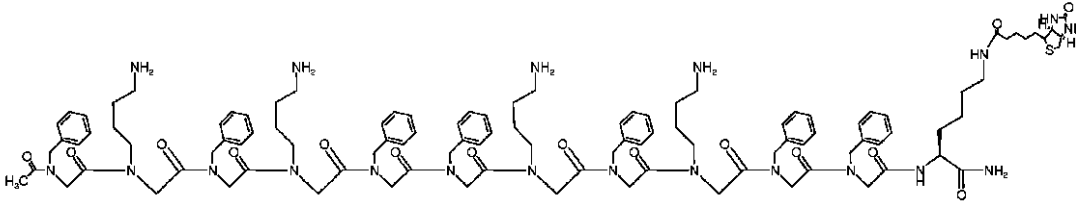
【 0 3 4 0 】

【化 1 5】



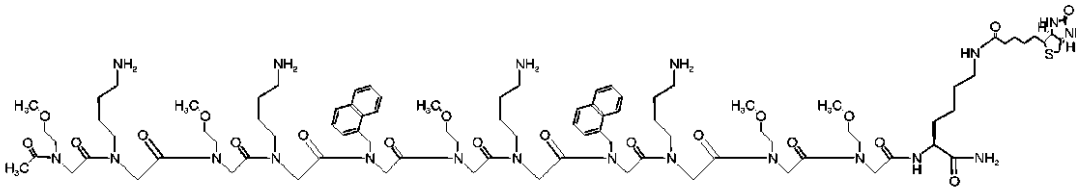
V

10



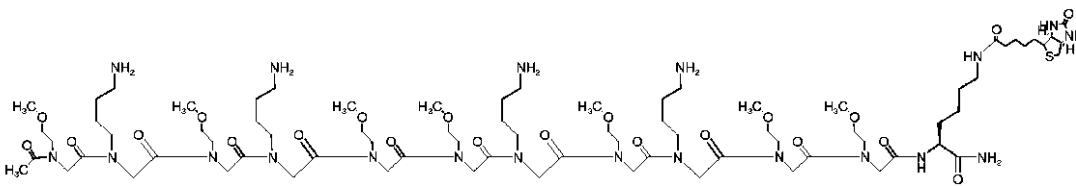
VI

20



VII

30

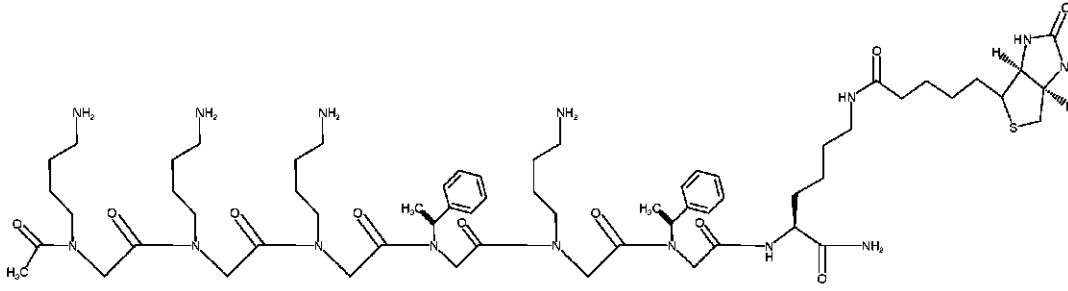


VIII

40

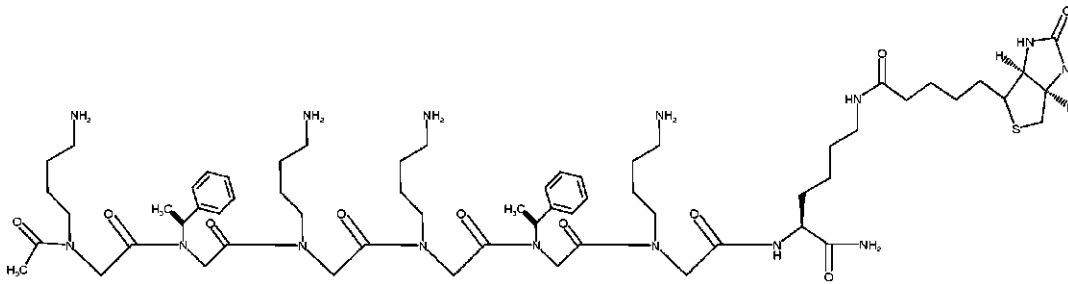
【 0 3 4 1 】

【化 1 6】



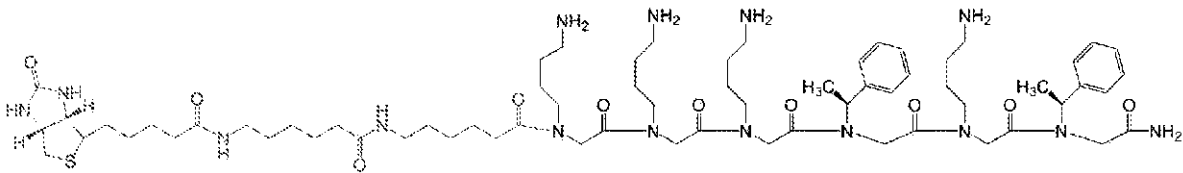
10

IX



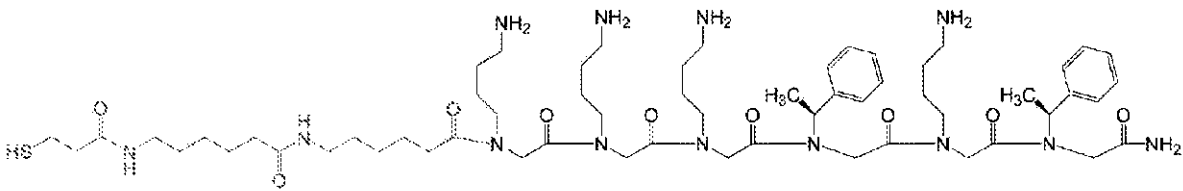
20

X



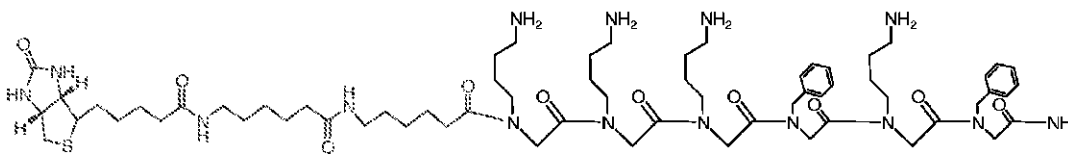
30

XI A



XI B

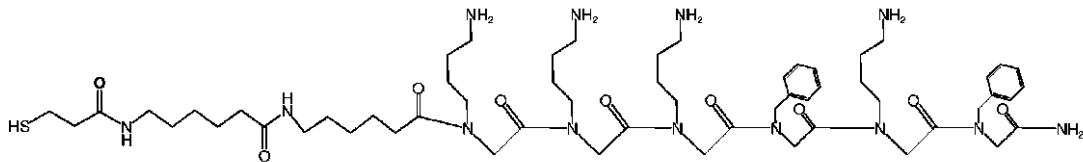
40



XI A

【 0 3 4 2】

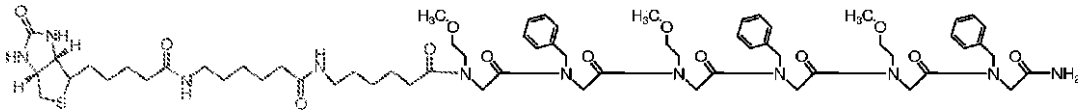
【化 17】



XIII B

および

10



XIII

などのペプチド試薬を含む。

【0343】

他の好ましい実施形態において、本発明の方法は、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する、本明細書に記載するようなペプチド試薬を含む、プリオンタンパク質断片に由来するPCSB試薬を使用して非プリオン配座異性体を捕捉して、CDPSB試薬を使用して非プリオン配座異性体を検出する。方法は、非プリオン病原性配座異性体含有することが疑われる試料にPCSB試薬を、存在するならば非プリオン病原性配座異性体への試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、第1の複合体を形成するステップと；第1の複合体をCDPSB試薬と、結合を可能にする条件下で接触させるステップと；試料中に非プリオン病原性配座異性体がある場合、CDPSB結合試薬へのその結合によって、非プリオン病原性配座異性体の存在を検出するステップとを含む。通例、非結合試料は、第1の複合体を形成した後、第1の複合体をCDPSB試薬と接触させる前に除去される。CDPSB結合試薬は、標識化抗コンフォメーション病タンパク質抗体である

30

【0344】

他のなおまた別の好ましい実施形態において、本発明の方法は、病原性プリオンタンパク質およびCDPSB試薬と優先的に相互作用する、本明細書に記載するようなペプチドを含む、プリオンタンパク質断片に由来するPCSB試薬を使用して、非プリオン病原性配座異性体を捕捉して、その存在を検出する。方法は、非プリオン病原性配座異性体含有することが疑われる試料をPCSB試薬と、存在するならば非プリオン病原性配座異性体へのPCSB試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、第1の複合体を形成するステップと；非結合試料物質を除去するステップと；非プリオン病原性配座異性体を第1の複合体から解離させて、これにより解離された非プリオン病原性配座異性体を提供するステップと；解離された非プリオン病原性配座異性体をCDPSB試薬と、結合を可能にする条件下で接触させて、第2の複合体を形成するステップと；試料中に非プリオン病原性配座異性体がある場合、第2の複合体の形成を検出することによって、非プリオン病原性配座異性体の存在を検出するステップとを含む。第2の複合体の形成は、検出可能に標識された第2のCDPSB試薬を使用して好ましくは検出され、PCSB試薬は、磁気ビーズに好ましくはカップリングされる。

40

【0345】

代案において、本発明は、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する、本明細書に記載するペプチド試薬を含む、プリオンタンパク質断片に由来する第1のPCSB試薬を使用して非プリオン病原性配座異性体を捕捉して、本明細書に記載するような第2

50

の P C S B 試薬を使用して非プリオン病原性配座異性体を検出する方法を提供する。方法は、非プリオン病原性配座異性体を含有することが疑われる試料を第 1 の P C S B 試薬と、存在するならば非プリオン病原性配座異性体への第 1 の試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、第 1 の複合体を形成するステップと；非プリオン病原性配座異性体を含有することが疑われる試料を、検出可能な標識を有する第 2 の P C S B 試薬と、第 1 の複合体中の非プリオン病原性配座異性体への第 2 の試薬の結合を可能にする条件下で接触させるステップと；試料中に非プリオン病原性配座異性体がある場合、第 2 の試薬へのその結合によって、非プリオン病原性配座異性体を検出するステップと；を含む。

【 0 3 4 6 】

また別の代案において、本発明は、C D P S B 試薬を使用して非プリオン病原性配座異性体を捕捉して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する、本明細書に記載するようなペプチド試薬を含む、プリオンタンパク質断片に由来する P C S B 試薬を使用して非プリオン病原性配座異性体を検出する方法を提供する。方法は、(a) 非プリオン病原性配座異性体を含有することが疑われる試料を C D P S B 試薬と、存在するならば非プリオン病原性配座異性体への試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；(b) 非結合試料物質を除去するステップと；(c) 複合体を検出可能な標識を含む P C S B 試薬と、非プリオン病原性配座異性体への P C S B 試薬の結合を可能にする条件下で接触させるステップと；試料中に非プリオン病原性配座異性体がある場合、P C S B 試薬へのその結合によって、非プリオン病原性配座異性体を検出するステップと；を含み、P C S B 試薬は、プリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する。

10

20

【 0 3 4 7 】

上の方法すべてにおいて、「非結合試料」は、接触ステップで捕捉されていない試料中の成分を指す。非結合試料は、当該分野で周知の方法によって、たとえば洗浄、遠心分離、濾過、磁気分離およびこれらの技法の組合せによって除去され得る。好ましくは、本発明の方法において、非結合試料は、複合体の緩衝液による洗浄および/または磁気分離によって除去される。

【 0 3 4 8 】

好ましい実施形態において、本発明の方法は、全身性アミロイドーシス、タウオパチー、およびシヌクレイノパチーを含む、アミロイド疾患の検出に使用される。

30

【 0 3 4 9 】

(F . アルツハイマー病の検出方法)

A 40、A 42、またはタウなどの病原性アルツハイマー病配座異性体の検出方法が提供される。

【 0 3 5 0 】

特に好ましい実施形態において、これらの方法は、病原性アルツハイマー病配座異性体を、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する、本明細書に記載するペプチド試薬を含む、プリオンタンパク質断片に由来する P C S B 試薬によって捕捉し、捕捉された配座異性体を C D P S B 試薬によって検出する。

【 0 3 5 1 】

特に、方法は、病原性アルツハイマー病配座異性体を含有することが疑われる試料を P C S B 試薬と、存在するならば病原性アルツハイマー病配座異性体への P C S B 試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、第 1 の複合体を形成するステップと；非結合試料物質を除去するステップと；病原性アルツハイマー病配座異性体を第 1 の複合体から解離させて、それにより解離された病原性アルツハイマー病配座異性体を提供するステップと；解離された病原性アルツハイマー病配座異性体を C D P S B 試薬と、結合を可能にする条件下で接触させて、第 2 の複合体を形成するステップと；試料中に病原性アルツハイマー病配座異性体がある場合、第 2 の複合体の形成を検出することによって、病原性アルツハイマー病配座異性体の存在を検出するステップと；を含む。第 1 の複合体中の病原性アルツハイマー病配座異性体は好ましくは、約 0 . 0 5 N NaOH または約 0 . 1 N Na

40

50

OHによって約90 または約80 にて、CDPSB試薬に接触する前に解離および変性される。病原性アルツハイマー病配座異性体がA₄₀またはA₄₂であるとき、病原性アルツハイマー病配座異性体は好ましくは、約0.1N NaOHで約80 にて約30分間にわたって解離および変性される。

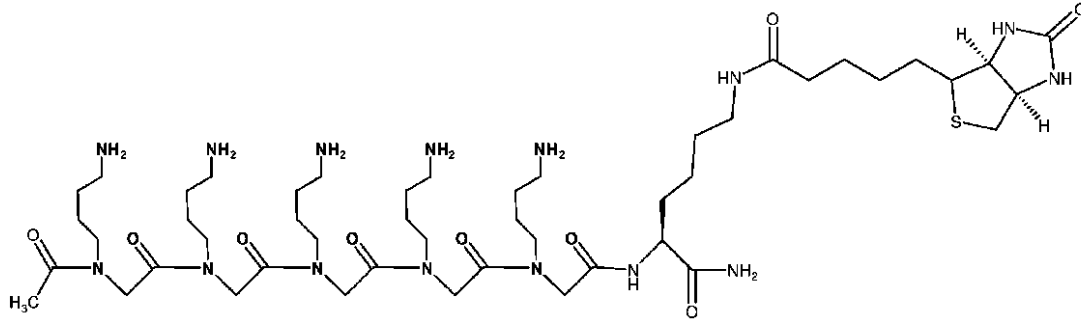
解離および/または変性は、IV(B)節に記載した方法を使用して実施することができる。通例、病原性アルツハイマー病配座異性体は、pHを低いpHから高いpHへ、または高いpHから低いpHへ変化させることによって、同時に解離および変性される。

【0352】

好ましい実施形態において、PCSB試薬は、磁気ビーズなどの固体担体にカップリングされた、PrP¹⁹⁻³⁰ (配列番号242)、PrP²³⁻³⁰ (配列番号243)、PrP¹⁰⁰⁻¹¹¹ (配列番号244)、PrP¹⁰¹⁻¹¹⁰ (配列番号245)、PrP¹⁵⁴⁻¹⁶⁵ (配列番号246)、PrP²²⁶⁻²³⁷ (配列番号247)、配列番号14、配列番号50、配列番号68、または

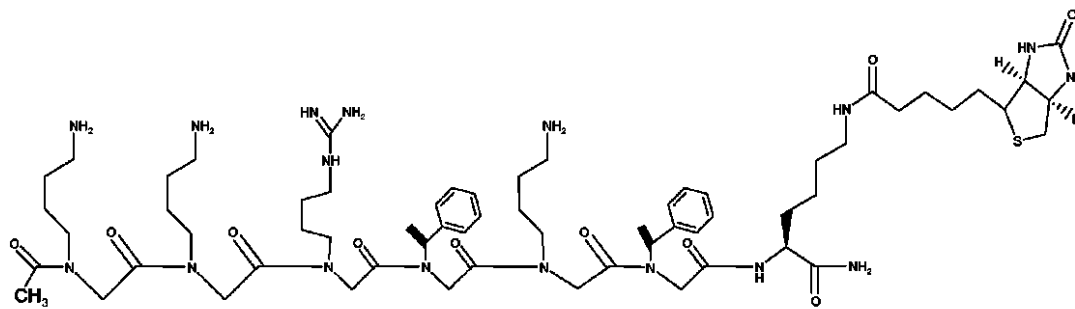
【0353】

【化 1 8】



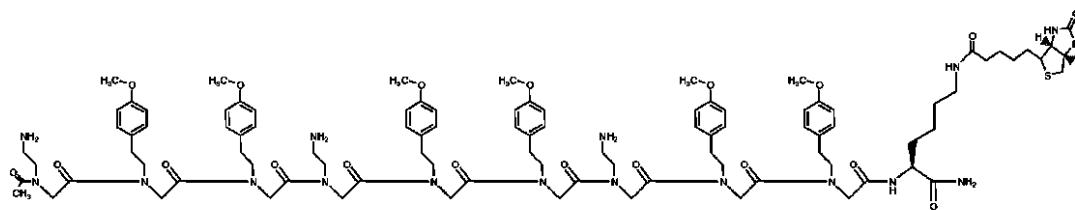
10

I



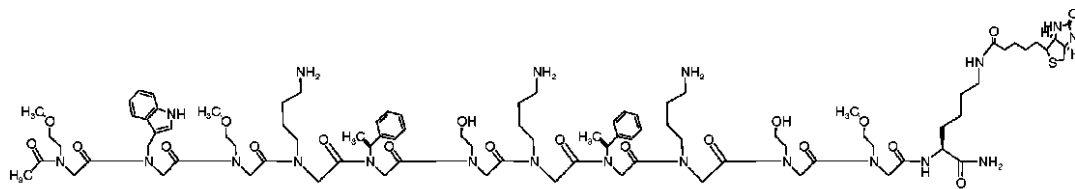
20

II



30

III

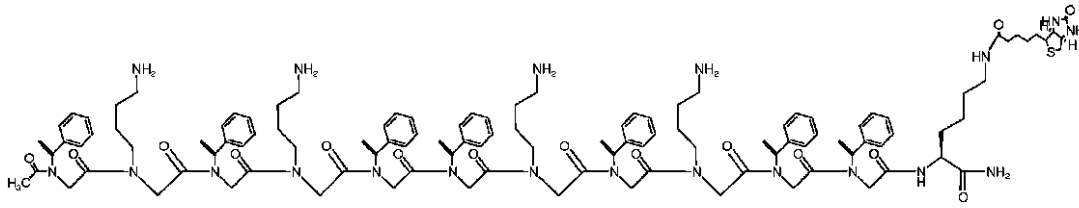


40

IV

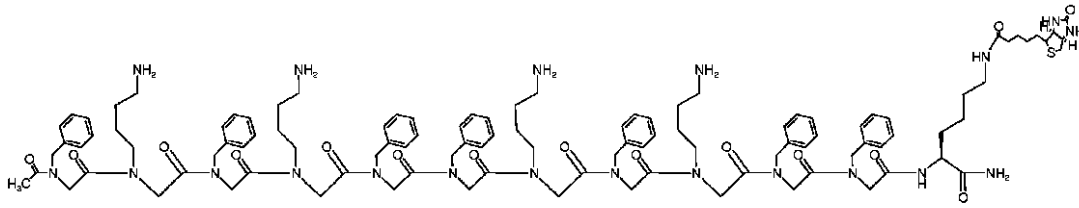
【 0 3 5 4】

【化 1 9】



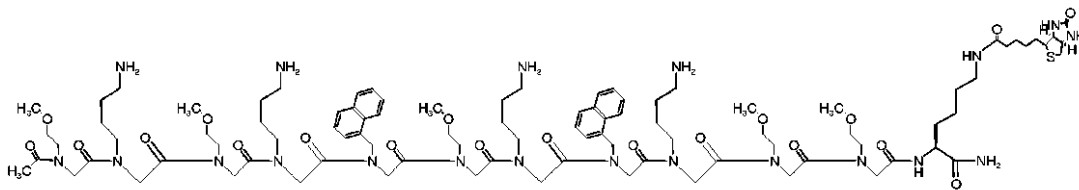
V

10



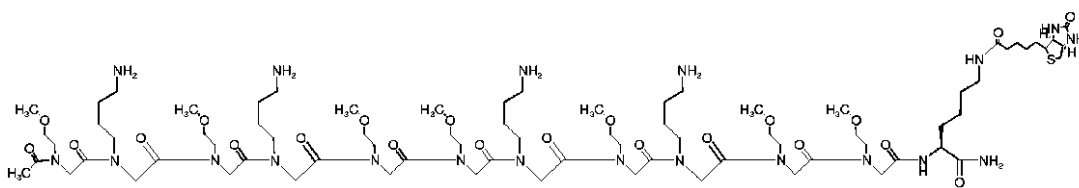
VI

20



VII

30

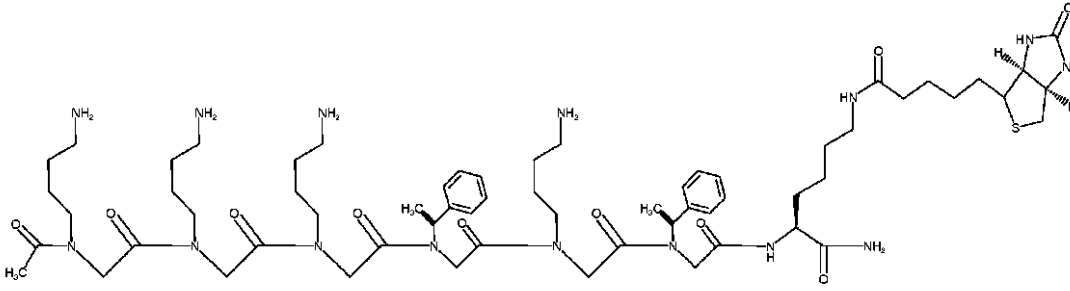


VIII

40

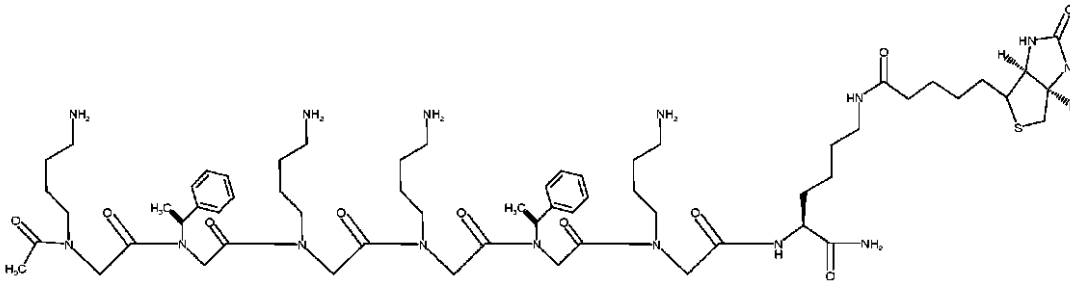
【 0 3 5 5 】

【化 2 0】



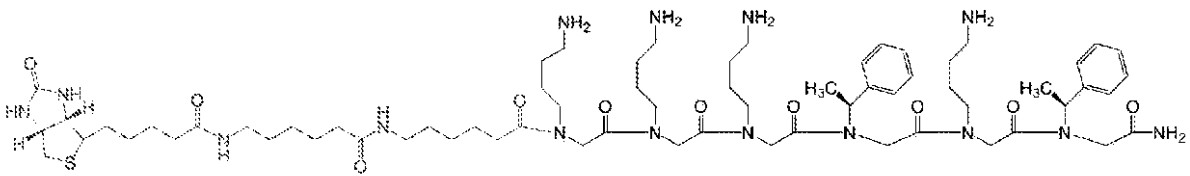
10

IX



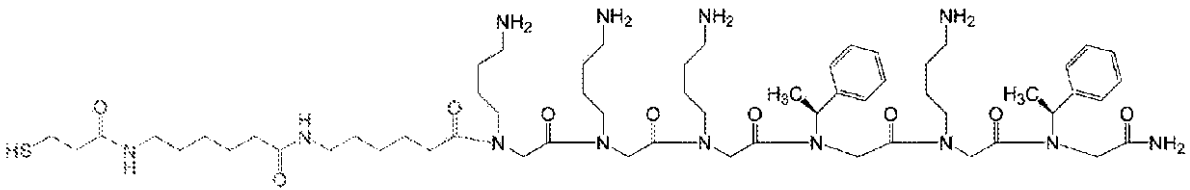
20

X



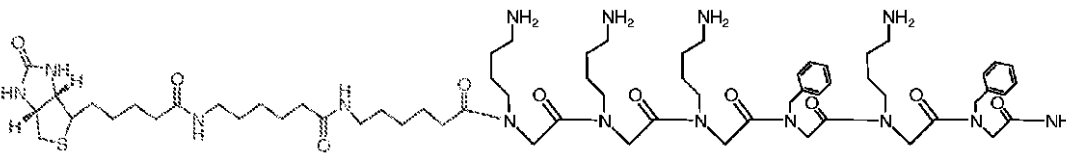
30

XI A



40

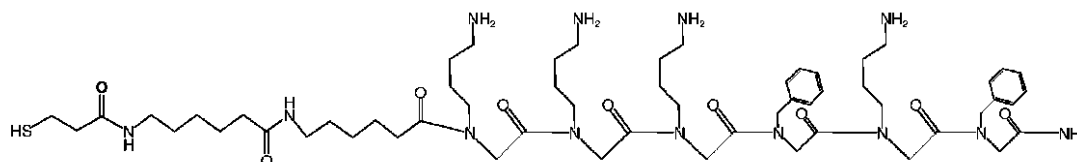
XI B



XII A

【 0 3 5 6 】

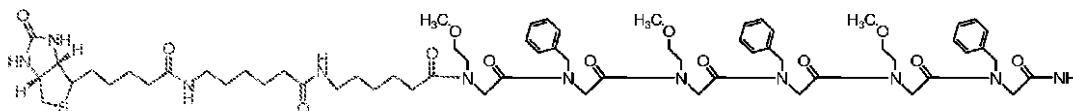
【化 2 1】



XIII B

もしくは

10



XIII

に由来する。

【 0 3 5 7 】

C D P S B 試薬は好ましくは、マイクロタイタープレートなどの固体担体にカップリングされた抗アルツハイマー病タンパク質抗体であり、第2の複合体の形成は好ましくは、第2の検出可能に標識されたC D P S B 試薬を使用して検出される。病原性アルツハイマー病配座異性体が A 40 または A 42 であるとき、好ましい抗アルツハイマー病タンパク質抗体は、A 40 のC末端に特異的な抗体である 1 1 A 5 0 - B 1 0 (C o v a n c e) ; A 42 のC末端に特異的な抗体である 1 2 F 4 (C o v a n c e) ; A アミノ酸 1 8 ~ 2 2 に特異的な 4 G 8 ; A アミノ酸 1 ~ 1 0 に特異的な 2 0 . 1 ; および A アミノ酸 3 ~ 8 に特異的な 6 E 1 0 を含む。特に好ましい実施形態において、2 0 . 1 が E L I S A プレート上の捕捉抗体であり、1 2 F 4 または 1 1 A 5 0 - B 1 0 は、第2の検出可能に標識されたC D P S B 試薬として使用される。試料は好ましくは、血漿または脳脊髄液 (C S F) である。

20

【 0 3 5 8 】

それゆえ、特に好ましい実施形態において、病原性アルツハイマー病配座異性体の存在を検出する方法は、これに限定されるわけではないが：病原性アルツハイマー病配座異性体を含むことが疑われる血漿またはC S F の試料を、磁気ビーズにカップリングされたペプチド X I I b と、存在するならば病原性アルツハイマー病配座異性体へのペプチド X I I b の結合を可能にする条件下で接触させて、第1の複合体を形成するステップと；非結合試料物質を除去するステップと；p H を変化させることによって病原性アルツハイマー病配座異性体を第1の複合体から解離させて、解離した病原性アルツハイマー病配座異性体を提供するステップと；解離した病原性アルツハイマー病配座異性体を固体担体に結合した抗アルツハイマー病タンパク質抗体と、結合を可能にする条件下で接触させて、第2の複合体を形成するステップと；第2の標識された抗アルツハイマー病タンパク質抗体とインキュベートすることによって、第2の複合体の形成を検出するステップと；を含む。

30

40

【 0 3 5 9 】

(G . 競合アッセイ)

いくつかの態様において、本発明の方法は、競合的結合によって病原性配座異性体を検出する。検出手段は、P C S B 結合試薬に弱く結合するリガンドが病原性配座異性体によって置換されるときを判定するために使用され得る。たとえば P C S B 試薬は、固体担体に吸着され得る。続いて、固体担体を、病原性配座異性体が P C S B 試薬に結合するよりも弱い結合親和性で P C S B 試薬に結合する、検出可能に標識されたりリガンドに結合させる。リガンド - P C S B 試薬複合体が検出される。次に試料を添加する。検出可能に標識

50

されたりガンドの結合親和性は、P C S B 試薬に対する病原性配座異性体の結合親和性よりも弱いため、病原性配座異性体は標識リガンドを置換し、P C S B 試薬に結合した標識リガンドの検出量の減少によって、P C S B 試薬と試料中の病原性配座異性体との間に複合体が形成したことが示される。

【0360】

それゆえ、ある実施形態において、非プリオン病原性配座異性体の存在は、P C S B 試薬を含む固体担体を提供するステップと；固体担体を検出可能に標識されたりガンドと結合させるステップであって、P C S B 試薬の検出可能に標識されたりガンドに対する結合親和性が、P C S B 試薬の非プリオン病原性配座異性体に対する結合親和性よりも低い、ステップと；非プリオン病原性配座異性体を含むことが疑われる試料を固体担体に、試料中に非プリオン病原性配座異性体が存在するときに非プリオン病原性配座異性体を P C S B 試薬に結合させてリガンドを置換させる条件下で、結合させるステップと；P C S B 試薬と試料からの非プリオン病原性配座異性体との間に形成された複合体を検出するステップと；によって検出し、P C S B 試薬はプリオンタンパク質断片から由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する。

10

【0361】

(V. 他の方法)

一般に、本明細書に記載する P C S B 試薬は、コンフォメーション病タンパク質の病原性配座異性体と優先的に相互作用することが可能である。それゆえ、これらの試薬によって、生存している脳または死亡脳、脊髄、および他の神経系組織はもちろんのこと、血液も含む、実質的に任意の生物学的または非生物学的試料における病原性配座異性体の存在の即時の検出が可能となる。試薬は、それゆえ広範囲の単離、精製、検出、診断および治療用途に有用である。

20

【0362】

たとえば、本明細書に記載する試薬は、親和性担体を使用して病原性配座異性体を単離するために使用され得る。試薬がその病原性配座異性体選択的結合活性を保持するように、試薬はたとえば吸着、共有結合などによって固体担体に結合させることができる。たとえば試薬の結合部位が引き続きアクセス可能であるように、場合によりスパー基が含まれることがある。固定化された分子は次に、生物学的試料、たとえば血液、血漿、脳、脊髄、および他の組織からの病原性配座異性体を結合するために使用することができる。結合された試薬または複合体は、たとえば pH の変化によって担体から回収され、すなわち病原性配座異性体は複合体から解離され得る。

30

【0363】

それゆえ、ある実施形態において、本発明は、非プリオン病原性配座異性体を含むことが疑われる試料を P C S B 試薬と、存在するならば非プリオン病原性配座異性体への試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；病原性配座異性体の試薬への結合によって、非プリオン病原性配座異性体と非プリオン非病原性配座異性体とを区別するステップと；によって、非プリオン病原性配座異性体と非プリオン非病原性配座異性体とを区別する方法を提供し；P C S B 試薬は、プリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する。

40

【0364】

他の実施形態において、本発明は、非プリオン病原性配座異性体を含むことが疑われる試料を P C S B 試薬と、存在するならば非プリオン病原性配座異性体への試薬の結合を可能にする条件下で接触させて、複合体を形成するステップと；試料中に非プリオン病原性配座異性体がある場合、試薬へのその結合によって非プリオン病原性配座異性体を検出するステップと；非プリオン病原性配座異性体を検出された場合に、コンフォメーション病を診断するステップと；によって、非プリオンコンフォメーション病を診断する方法を提供し、P C S B 試薬はプリオンタンパク質断片に由来して、病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用する。

【0365】

50

本明細書に記載する試薬を使用する複数の変形および組合せが、本発明の方法で利用され得る。以下の非制限的な実施例は、例証のために記載されている。

【実施例】

【0366】

(実施例)

(実施例1: PSR1はPrP^{Sc}に優先的に結合する)

本実施例は、PSR1(磁気ビーズ(ストレプトアビジンM-280 Dynabeads))に結合されたペプチド試薬XIIb)が、PrP^{Sc}を選択的にプルダウンすることを示す。

【0367】

vCJDまたは正常脳ホモジネート(BH)を、1% Tween 20および1% Triton-X 100を含むTBS(Tris緩衝生理食塩水)中の50%ブール正常ヒト血漿中にスパイクした。対照試料にはBHを添加しなかった。各試料100 μ L(10% BH 10nLを含有または含有しない)をXIIbビーズ3 μ L(30mg/mL)と混合して、得られた混合物を750rpmにて常時振とうしながら、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。非結合試料物質は、0.05% Tween 20を含有するTBSTでビーズを4回洗浄することによって除去した。各洗浄ごとに、TBSTを添加して、磁力を使用してビーズを収集し、洗浄緩衝液を除去した。ビーズに結合したPrP^{Sc}を、0.1N NaOHの添加によって解離した。変性したプリオンタンパク質をその後0.3M NaH₂PO₄によって中和し、ELISAプレートに移した。

10

20

【0368】

プルダウン効率は、プルダウン試料からのシグナルを、プルダウンを一切伴わずにグアニジニウムチオシアネート(GdnSCN)によって変性させた同じ試料からのシグナルと比較することによって計算した。vCJDまたは正常脳からのプリオンタンパク質は、同量の5% BHおよび6M GdnSCNと混合することによって変性させて、室温にて10分間インキュベートした。次に試料をTBSTによってプルダウン試料と同じ濃度まで希釈し、TBSTのみを対照とした。各直接変性試料100 μ Lをその後プルダウン試料と同じELISAプレートに移した。

【0369】

ELISAプレートは、0.1M NaHCO₃中2.5 μ g/mLの抗プリオン抗体3F4によってコーティングした。コーティング手順は4 $^{\circ}$ Cにて一晩実施し、次にTBSTで3回洗浄した。プレートを次に、TBS中の1%カゼインで37 $^{\circ}$ Cにて1時間ブロックした。プルダウン試料および直接変性試料の両方からのプリオンタンパク質を、3F4を含むELISAプレート内で300rpmで常時振とうしながら37 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベートして、プレートをTBSTで6回洗浄した。アルカリホスファターゼ(AP)結合体化検出抗体をTBST中0.1%のカゼインで0.1 μ g/mLまで希釈して、次にELISAプレートに添加した。プレートをその後37 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベートして、TBSTで6回洗浄した。強化Lumi-Phos Plus化学発光基質を使用してシグナルを発生させて、ルミノメーターで相対光単位(RLU)として読み取った。

30

【0370】

結果を下に示す。

40

【0371】

【表 7】

表7

	vCJD BH (RLU)			正常BH (RLU)			BHなし (RLU)		
	平均	標準 偏差	%変動係数	平均	標準 偏差	%変動係数	平均	標準 偏差	%変動係数
プルダウン	53.0	6.5	12.3	9.9	0.8	8.0	9.0	1.1	12.3
プルダウンなし	56.3	2.6	4.6	14.6	0.7	4.5	7.7	2.3	29.4

脳組織からのプリオンタンパク質は、3 M GdnSCNによって完全に変性され得、抗プリオン抗体によって検出することができる。この実験では、発明者らは、XIIbビーズを使用したプリオンタンパク質プルダウンによって生成されたシグナルをGdnSCNによる直接変性タンパク質から得たシグナルと比較した。データは、プルダウン試料および直接変性試料のバックグラウンド（BHなし）はそれぞれ9.0および7.7 RLUであることを示した。10%正常BHの直接変性10 nLは、14.6 RLUのシグナルを有し、これは、正常脳でのPrP^Cレベルを反映していた。一方で、プルダウン法によって検出された10%正常BHの10 nLは、9.9 RLUの読取値を示し、これはそのバックグラウンドと同様であった。このことは、ペプチドXIIbの特異性を示した。10 nLの10% vCJD試料をプルダウン法および直接変性法によって試験したときに、データは53.0および56.3 RLUを示し、このことはXIIbビーズのプルダウン効率がほぼ100%に達したことを意味する。

10

20

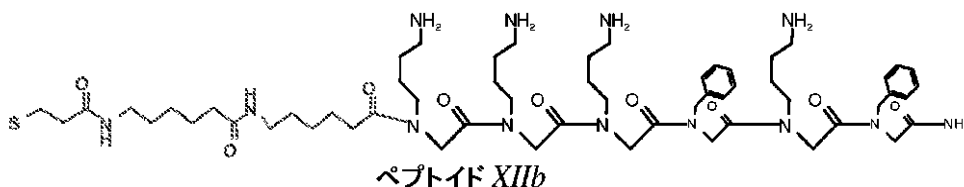
【0372】

（実施例2 PSR1はまた、凝集アミロイドベータタンパク質（A_{40/42}）と優先的に相互作用する）

本実施例は、

【0373】

【化22-1】



30

PSR1はまた、凝集A_{40/42}と優先的に相互作用することを示す。

【0374】

本実施例は、複数のアルツハイマー病脳での不溶性凝集A_{40/42}の存在と、これらの凝集体の検出が、凝集体中でマスクされていた抗体エピトープが変性により露出した後でのみ達成できることを示す。これらの脳からの凝集A_{40/42}のPSR1捕捉は特異的であり、プルダウンビーズではなく、ペプチドXIIbが媒介する。本実施例によって、PSR1は、PSR1によって認識されない可溶性A_{40/42}を含有する試料マトリクスである、血漿中にスパイクされた凝集A_{40/42}を選択的に捕捉することを示す。最終的に、本実施例は、プルダウン前の化学変性剤による試料の変性によって捕捉が妨害されたことを示すことによって、PSR1が凝集A_{40/42}を捕捉することを示している。

40

【0375】

（アルツハイマー病脳および正常脳における全A_{40/42}の定量）

脳中の全A_{40/42}は、Covanceから市販されている抗体を用いたサンドイッチELISAを使用して定量した。96ウェル捕捉プレートの個々のウェルをmAb 11A50-B10（可溶性A₄₀のみを検出）またはmAb 12F4（可溶性A₄₂のみを検出）のどちらかの抗体でコーティングした。ELISAプレートに捕捉され

50

た A 40 または A 42 を、アルカリホスファターゼ (AP) に結合体化された mAb 4G8 (配列 VFFAE を含有する A のすべての形態を認識する) によって検出した。Lumiphos Plus (Lumigen) を化学発光基質として使用した。化学発光は、Luminoskan ルミノメーター (Thermo) で読み取った。

【0376】

AD (患者識別番号 325-1、334、325、264、230、218、221、201、184、177、291) および対照 (患者 320、326、327、328) 脳ホモジネートの A 40 および A 42 レベルは、このサンドイッチ ELISA 検出系を使用して決定した。脳ホモジネートの 5.4 M GdnSCN による変性は、A ペプチドの大半を検出するために必要であった (図 1、5B、および 5E)。抗体が凝集物質中でコンフォメーション的に改変またはマスキングされているエピトープに結合しないであろうことは、十分に認められている。この特性は、プリオンおよび他のアミロイドタンパク質を認識するいくつかの抗体で以前に観察されている。ELISA データは、AD 脳において病原性凝集 A が蓄積しているが、年齢適合非 AD 対照脳においては蓄積していないことを示す。対照脳は、いずれの A 形態 (可溶性または凝集) もそれほど高レベルで含有していなかったが、A 40 および A 42 のいずれもを AD 患者試料から容易に検出した (図 1)。

10

【0377】

標準曲線 (変性合成 A ペプチド) と並行した、ELISA によって検出された 1 つの AD 脳ホモジネート (患者番号 291) の用量設定によって、この脳ホモジネート中の A 40 および A 42 の濃度の決定が可能となり (図 5A、B および 5D、E)、それぞれ 10 および 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と計算した。

20

【0378】

(AD 脳中の A 40 / 42 が凝集される)

ELISA 前の変性剤による処理によってサンドイッチ ELISA による検出が向上したために、AD BH からの A が凝集されていると見なした (図 1)。この A が不溶性 (凝集体の別の特徴) を示すか否かを試験するために、AD BH を遠心分離にかけ、上清およびペレット画分を ELISA に利用した (図 2)。未変性 AD BH では、A シグナルの大半がペレット画分中にあった。しかし、BH の GdnSCN による前処理によって、A シグナルは上清画分に移動した。この実験によって、AD BH で見出される A 凝集体が発明者らの遠心分離条件では不溶性であることと、化学変性剤による前処理によって A が可溶性になることを示す。したがって、AD BH 中の A の物理的特性を直接調べることによって、発明者らは AD BH からの A ペプチドの大半が凝集されていることを確認している。このことは、アミロイド疾患として説明される、あるクラスの疾病で観察されている周知の現象である。2、3 例を挙げるとすれば、プリオン病 (たとえば CJD)、AD、パーキンソン病、II 型糖尿病、および全身性アミロイドーシスが挙げられるこれらの疾患は、規則的凝集タンパク質の存在およびいくつかのタンパク質の正常なコンフォメーションから シートコンフォメーションへの変換に関連している。

30

【0379】

(A への PSR1 結合は、ペプチド試薬 XIIb が媒介する)

PSR1 は、TBST 緩衝液中の 80% 血漿にスパイクした AD 脳ホモジネートから A を捕捉した (図 3)。AD 脳および対照脳からの脳ホモジネートを PSR1 ビーズまたは対照グルタチオンビーズ (ペプチド XIIb なし) と共にインキュベートした。ビーズを洗浄して、捕捉物質を 6 M GdnSCN でビーズから解離および変性させた。磁石を使用してビーズを除去して、変性試料を希釈し、抗 A 42 抗体 12F4 によって事前にコーティングした ELISA プレートに加えた。検出は、AP 標識 4G8 抗体を用いて実施した。PSR1 は AD 試料から A を捕捉したが、対照ビーズ (マレイミドおよびグルタチオンと反応した M270-カルボン酸ビーズ (所内で産生した M270-グルタチオン)) は、いずれの脳試料からも検出可能な量の A を捕捉することができなかった

40

50

。本実験により、A を捕捉する能力はビーズ自体によるのではなく、ビーズに共有結合したペプチドX I I bによることを確認する。

【0380】

(P S R 1 は、可溶性 A の存在下で凝集 A に選択的に結合する)

血漿は、著しいレベルの可溶性 A 40 および A 42 を含有している。したがって、P S R 1 が、可溶性 A の存在下で凝集 A に選択的に結合できるか否かを査定するために、A D 患者番号 291 からの脳ホモジネートを血漿中にスパイクして、P S R 1 プルダウンに供した。

【0381】

図 4 A および 4 B は、T B S T で希釈した濃度漸増血漿 (市販の供給源による正常ヒト血漿) における、発明者らのサンドイッチ E L I S A を使用した、内因性 A レベルの定量を示す。可溶性 A 40 および A 42 レベルは、10 ~ 100 ng / ml の範囲にあることを見出した。

10

【0382】

最初に、E L I S A を天然および変性 A D B H 患者番号 291 試料に実施して、試料中に存在する凝集 A 40 / 42 の量を査定した (図 5 B - A 42 ; 図 5 D - A 40) 。

【0383】

次に、血漿 (T B S T T 緩衝液中 80 % 血漿) 中にスパイクされた量漸増 A D 脳ホモジネートを有する試料を、P S R 1 プルダウンに供した。P S R 1 は、スパイクされた A D 脳ホモジネート (10、20、50 nL スパイク) から A 42 および A 40 を選択的に捕捉することができたが、血漿単独 (0 nL スパイク) からはいずれの可溶性 A 42 も A 40 も捕捉しなかった (図 5 C および F、白三角形 : P S R 1 - 天然 A を参照) 。このことは、P S R 1 がアルツハイマー病脳に見出される凝集 A ペプチドのみを捕捉し、血漿に見出される可溶性 A は捕捉しないことを示唆している。この結果はまた、血漿成分 (これは、高濃度の各種のタンパク質、脂質、およびイオンを含む) は、P S R 1 結合に干渉しないことも示している。

20

【0384】

(P S R 1 捕捉は、プルダウン前の試料の可溶化によって妨害される)

同じ A D 脳ホモジネートを、血漿および P S R 1 とのインキュベーション前に、凝集体を可溶化するために 5 . 4 G d n S C N によって変性したとき、A を検出しなかった。(図 5 C および F - 灰色三角形 : P S R 1 - 変性 A を参照) 。このことは、P S R 1 が、変性によって可溶化することができる、A D 試料で見出された A のミスフォールド凝集特性を認識するが、A D 由来 A ペプチドに特異的な別の決定因子を認識しないという考えを支持する。

30

【0385】

(実施例 3 プリオンタンパク質断片に由来するペプチドが、緩衝液または血漿中にスパイクされた罹患脳ホモジネートからの病原性プリオンタンパク質および凝集 A について同様の捕捉プロフィールを有する)

W O 0 5 / 0 1 6 1 3 7、W O 0 7 / 0 3 0 8 0 4 は、プリオンタンパク質の病原性配座異性体と優先的に相互作用するプリオンタンパク質断片に由来する各種のペプチドおよびペプチドについて記載している。本実験は、これらの試薬が病原性プリオンを捕捉するのと同様の機構によって、これらの試薬が A を捕捉することを示唆している。

40

【0386】

3 つの異なる捕捉プロフィールを有するプリオン断片に由来する、6 つの異なるペプチドを試験した。各ペプチドのアミノ酸配列は、ヒトプリオンタンパク質配列の断片に相当し、以下に記載する。下付文字は、断片の最初および最後のアミノ酸のアミノ酸位置を示す。

【0387】

【数 1】

断片名	配列
修飾 PrP19-30	ビオチン-Ahx-LGLCKKRPKPGG-CONH2 (配列番号 256) (Ahx = アミノヘキサン酸)
修飾 PrP37-48	ビオチン-Ahx-RYPGQGSPGGNR-CONH2 (配列番号 257)
修飾 PrP100-111	ビオチン-Ahx-NKPSKPKTNMKH-CONH2 (配列番号 258)
修飾 PrP154-165	ビオチン-Ahx-MHRYPNQVYYRP-CONH2 (配列番号 259)
修飾 PrP181-192	ビオチン-Ahx-NITIKQHTVTTT-CONH2 (配列番号 260)
修飾 PrP226-237	ビオチン-Ahx-YQRGSSMVLFS-CONH2 (配列番号 261)

10

20

30

40

50

1) グループ 1: PrP₁₉₋₃₀ および PrP₁₀₀₋₁₁₁、これらは、血漿中および緩衝液中の両方で PrP^{S^c} を捕捉する。

2) グループ 2: PrP₁₅₄₋₁₆₅ および PrP₂₂₆₋₂₃₇、これらは、緩衝液中でのみ PrP^{S^c} を捕捉できる。

3) グループ 3: PrP₃₇₋₄₈ および PrP₁₈₁₋₁₉₂、これらは、PrP^{S^c} を捕捉できないペプチドである。PrP₃₇₋₄₈ および PrP₁₈₁₋₁₉₂ は PrP₁₅₄₋₁₆₅ および PrP₂₂₆₋₂₃₇ と同様の物理化学特性を有するが、異なるアミノ酸配列を有するペプチドであるため、これらを負の対照として選択した。

【0388】

結果は非常に驚くべきものであった。ペプチドによって捕捉された凝集 A₄₂ の活性プロフィールは、プリオンベース疾患であるクロイツフェルト ヤーコブ病に罹患した患者からの捕捉 PrP^{S^c} のプロフィールとほぼ同じであった (図 6): グループ 1 のペプチドは、血漿または緩衝液のどちらにスパイクした凝集 A₄₂ も捕捉した; グループ 2 のペプチドは、緩衝液にスパイクした凝集 A₄₂ は捕捉したが、血漿中にスパイクした凝集 A₄₂ は捕捉しなかった; グループ 3 のペプチドは、どちらの A₄₂ も捕捉しなかった。この結果は、試験を行った PCSB 試薬および PrP^{S^c} の結合と、PCSB 試薬および A₄₂ 凝集体の結合との間の結合機構が同様であるということの非常に強力な証拠である。最も有望な相互作用ドメインは、タンパク質アミノ酸配列にかかわらず、共通であり、一般的アミロイド構造の一部であるモチーフである。

【0389】

(概要)

本実施例および実施例 2 は共に、病原性プリオンと優先的に相互作用することができる試薬は、凝集 A₄₂ とも優先的に相互作用できることを示している。これらの試薬が病原性プリオンおよび凝集 A₄₂ の両方にこのような同様の結合特徴で結合する能力は、全く予想されていなかった。

【0390】

これらの試薬の凝集タンパク質を捕捉する能力によって、アルツハイマー病関連 A₄₂ タンパク質凝集体の直接検出が可能となる。このことは、AD 疾患のより間接的なマーカー

の試験と比較して好都合である。このことはまた、非凝集 A に特異的に結合する抗 A 抗体などの試薬と比較しても好都合である。このような抗体は、正常者および AD 患者に存在し、ある生物学的流体中でのその濃度が AD 疾患の唯一の間接的マーカーである、可溶性 A とのみ会合することができる。凝集 A を検出するためにこのような試薬を使用するには、天然試料を、凝集体を可溶化するために処理された試料と比較することが必要である。都合の悪いことに、この分析は、ごく低レベルの凝集体を含有する試料では役に立たず、A レベルを検出可能な限界を超えて希釈しがちである試料操作を必要とする。

【0391】

(実施例 4 凝集 A 42 のプルダウンに対する試料マトリクスの効果)

凝集 A 42 のプルダウンに対する試料マトリクスの効果は、PSR1 および上述のペプチドを、3つの異なるアルツハイマー病脳試料：1) 緩衝液中にスパイクした脳ホモジネート；2) 血漿中にスパイクした脳ホモジネート；および3) CSF 中にスパイクした脳ホモジネートを用いて試験することによって評価した(図7を参照)。

10

【0392】

試料を調製して、図6に記載するように処理した。CSF 中にスパイクした脳ホモジネートは、BH 50 nL を TBS/T 緩衝液中 50% 血漿 100 マイクロリットル中にスパイクすることによって調製した。

【0393】

本実験は、PSR1 が血漿の存在下で凝集 A 42 と優先的に相互作用することを示す他の研究を確認し、PSR1 はまた CSF の存在下でも凝集 A 42 と優先的に相互作用することを示している。

20

【0394】

試験を行ったペプチドは、種々の捕捉プロフィールを示した。緩衝液、血漿、および CSF 中での捕捉挙動の相違は、結合機構を妨害する干渉成分が血漿および CSF 中にあることを示唆する。より広範囲の試薬が、血漿中と比較して、CSF 中で凝集 A 42 を捕捉することができる。血漿の存在下で A 42 を捕捉することができる PrP₁₉₋₃₀ および PrP₁₀₀₋₁₁₁ は、CSF の存在下でも A 42 を捕捉することができる。しかし、血漿の存在下で A を捕捉できない PrP₁₅₄₋₁₆₅ および PrP₂₂₆₋₂₃₇ は CSF の存在下では A を捕捉できる。この知見は、CSF が血漿よりも低いタンパク質濃度を有し、より複雑でない試料マトリクスであるという事実と一致する。したがって、試薬と凝集 A との間の相互作用に干渉し得る成分をあまり含有しそうにない。

30

【0395】

要約すると、これらの実験は、正に荷電した試薬 PSR1、PrP₁₉₋₃₀、および PrP₁₀₀₋₁₁₁ は、単純緩衝液(TBS/T)はもちろんのこと、アルツハイマー病の死前診断により適用可能な体液、たとえば CSF および血漿においても、凝集 A と相互作用可能であったことを示す。

【0396】

(実施例 5 ELISA のための A の解離および変性 - NaOH 濃度およびインキュベーション温度の最適化)

正常者またはアルツハイマー病(AD)患者からの脳ホモジネート(BH)を正常ヒト血漿(NHP)中にスパイクして、PSR1 ビーズによって捕捉した。洗浄後、ビーズを PCR 薄壁管にて NaOH (0.01 N - 0.3 N) によって再懸濁して、Perkin Elmer Master Cycler で 60、70、80、または 90 にて 10 分間インキュベートした。変性した A 試料を約 pH 7.5 まで中和して、次にサンドイッチ ELISA 検出に進んだ。

40

【0397】

結果は、A を 0.05 N NaOH で 90 にて変性させたときに最大のシグナルを示したが、ダイナミックレンジは小さかった(図8を参照)。80 にて変性させたときに、A シグナルは NaOH の 0.05 N から 0.15 N まででプラトーに達し、0.1 N NaOH は 2 番目に大きいシグナルを示した。したがって、さらなる試験は、80

50

にて0.1N NaOHによってAを変性させることに集中した。

【0398】

Aは、プリオンタンパク質よりも高温、長期間インキュベーションでのNaOH変性が必要である。Aには80での30分間の0.1N NaOHによるAの変性が良好に機能するのに対して、プリオンには室温での10分間の0.1N NaOHが良好に機能する。

【0399】

(実施例6 アミロイドベータ検出のためのPSR1捕捉/サンドイッチELISA)
本実施例は、PSR1を病原性配座異性体特異的結合(PCSB)試薬として使用するAの検出プロトコルについて説明する。アッセイは、3つの基本ステップ：1)PCSB試薬を使用する、試料からのA凝集体の捕捉、2)カオトロピック剤を使用する、PCSB試薬からの結合物質の変性および解離、ならびに3)市販の抗体を使用するサンドイッチELISAを有する。ELISAで検出試薬として4G8-APを使用すると、4G8-HRPより優れた線形応答が得られる。

10

【0400】

(試料の調製)

10%脳ホモジネート(BH)100nLを以下の100μL/アッセイ中にスパイクする：a)50%正常ヒト血漿(NHP)および1×TBSTT(50mM Tris、pH7.5;150mM NaCl;1%Tween-20;1%Triton X-100);b)50%正常ヒト脳脊髄液(CSF)および1×TBSTT;またはc)0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)および1×TBSTT。

20

【0401】

(ビーズ捕捉)

これらの試料を、30mg/mLで、Dyna1 M270-カルボン酸ビーズに共有カップリングされたPSR1ペプチド3μL/アッセイに添加して、振とうしながら37にて1時間インキュベートする。代わりに、試料をビオチン化PSR1ペプチドでコーティングされたM280-ストレプトアビジンビーズ(10mg/mL)10μL/アッセイに添加する。

【0402】

ビーズをTBST(50mM Tris、pH7.5、150mM NaCl、0.05%Tween-20)275μLで4回洗浄する。各洗浄ごとに、洗浄したビーズを磁石で収集して、洗浄緩衝液を除去する。

30

【0403】

次に2μL/アッセイの6Mチオシアン酸グアニジンを追加し、試料を室温にて30分間インキュベートして、捕捉した物質を溶離および変性させる。次にTBST 98μL/アッセイを追加してチオシアン酸グアニジンを希釈する。

【0404】

正確な量の6Mチオシアン酸グアニジンを添加するために、試料調製およびビーズ捕捉はバルクで行う(1個のチューブまたはウェルでの複数反応(multiple reaction))。GdnSCNを希釈した後に、プロトコルの残りのために試料を96ウェルマイクロタイタープレートに移す。

40

【0405】

ビーズを磁気分離によって除去して、上清を捕捉プレートに移す。

【0406】

(検出)

捕捉プレート(Thermo ScientificによるMicrolite 2+)を、マウスモノクローナル抗体(mAb)11A50-B10(C末端抗体;A1-40を特異的に結合)またはmAb 12F4(C末端抗体;A1-42を特異的に結合)のどちらか2.5μg/mLでコーティングする。どちらの抗体もCovanceより市販されている。

50

【0407】

上清を捕捉プレート上で37℃にて1時間インキュベートする。捕捉プレートをTBST 275μL/ウェルで4回洗浄する。

【0408】

0.1% BSAおよびTBST中でアルカリホスファターゼに結合体化した0.2μg/mL mAb4G8を検出のために捕捉プレートに添加する。精製抗体はCovanceより入手できる。AP結合体は、Covanceによる開始物質(抗体)を使用して所内で作製する。

【0409】

次に捕捉プレートを検出抗体と共に37℃にて1時間インキュベートして、TBST 275μL/ウェルで4回洗浄する。

10

【0410】

強化Lumiphos Plus(検出のための化学発光基質Lumiphos Plus 1mL当り91μLの比で0.55% SDSを添加)100μLを捕捉プレートに添加する。次に、捕捉プレートを37℃にて30分間インキュベートし、プレートをLuminoskanで読み取る。

【0411】

(実施例7 本発明の方法で使用されるPCSB試薬の合成)

プリオンタンパク質のペプチド断片は、本質的にMerrifield(1969) *Adv. Enzymol.* 32:221ならびにHolmおよびMedal(1989) *Multiple column peptide synthesis*, p.208E, BayerおよびG. Jung(ed.), *Peptides* 1988, Walter de Gruyter & Co. Berlin-N.Y.に記載されているような標準ペプチド合成技法を使用して化学合成した。ペプチドをHPLCで精製して、配列を質量分析法によって検証した。

20

【0412】

ある場合では、合成したペプチドは、NまたはC末端にさらなる残基、たとえばGGG残基を含んでいたか、および/または野生型配列と比較して1個以上のアミノ酸置換を含んでいた。

【0413】

(A. ペプトイド置換)

ペプトイド置換を、配列番号14(QWNKPSKPKTN、配列番号2の残基97~107に相当)、配列番号67(KKRPKPGGWNTGG、配列番号2の残基23~36に相当)および配列番号68(KKRPKPGG、配列番号2の残基23~30に相当)で表されるペプチド内でも行った。特に、これらのペプチドの1個以上のプロリン残基を、各種のN置換ペプトイドによって置換した。図9または任意のプロリンを置換できるペプトイドを参照。ペプトイドは、どちらも参照によりその全体が本明細書に援用される、米国特許第5,877,278号および同第6,033,631号; Simonら(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9367に記載されているように調製および合成した。

30

40

【0414】

(B. マルチマー化)

あるペプチド試薬は、たとえばタンデムリピート(GGGなどのリンカーによるペプチドの複数のコピーの結合)、多抗原性ペプチド(MAPS)および/または直鎖状結合ペプチドを調製することによって、マルチマーとしても調製した。

【0415】

特に、MAPSは、本質的にWuら(2001) *J. Am. Chem. Soc.* 2001 123(28):6778-84; Spetzlerら(1995) *Int. J. Pept. Protein Res.* 45(1):78-85に記載されているような標準技法を使用して調製した。

50

【0416】

直鎖および分枝ペプチド（たとえばPEGリンカーマルチマー化）もポリエチレングリコール（PEG）リンカーを使用して、標準技法を使用して調製した。特に、分枝マルチペプチドPEG骨格は、以下の構造を用いて生成した：ビオチン-PEG-Lys-PEG-Lys-PEG-Lys-PEG-Lys-PEG-Lys（ペプチド対照なし）およびビオチン-PEG-Lys（ペプチド）-PEG-Lys（ペプチド）-PEG-Lys（ペプチド）-PEG-Lys（ペプチド）。さらに、ペプチドからLysへの結合を調製した：Lys-イプシロン-NH-CO-(CH₂)³-Mal-S-Cys-ペプチド。図10Cを参照。

【0417】

（C・ビオチン化）

ペプチドを、合成および精製後に、標準技法を使用してビオチン化した。ビオチンをペプチドのNまたはC末端に添加した。

【0418】

（実施例8 PCSBペプチド試薬）

以下のPCSBペプチド試薬を、N置換グリシン残基を含有するペプチド分子の調製のための合成方法、たとえば、それぞれが参照によりその全体が本明細書に援用される、米国特許第5,811,387号；同第5,831,005号；同第5,877,278号；同第5,977,301号；同第6,075,121号；同第6,251,433号；および同第6,033,631号はもちろんのこと、Simonら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367にも開示されている手順などを使用して調製した。

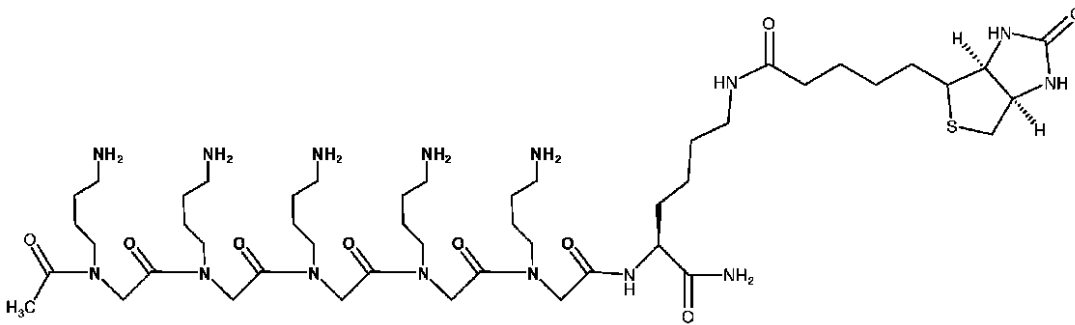
【0419】

（ペプチド試薬I）

下のペプチド試薬は、これに限定されるわけではないが配列番号229を含む。

【0420】

【化22-2】



計算質量：1054.42；実測質量（Observed Mass）：1054.2。
実測質量の測定は全て、Waters（Milford, MA）Micromass ZQ LC/MSシステムで測定した。

【0421】

（ペプチド試薬II）

下のペプチド試薬は、これに限定されるわけではないが配列番号230を含む。

【0422】

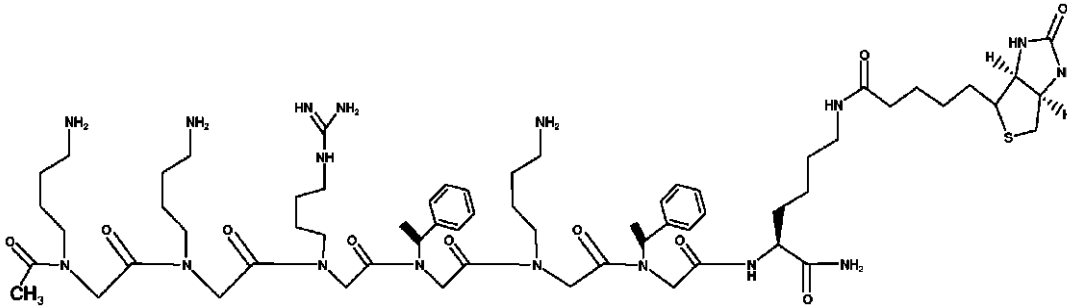
10

20

30

40

【化 2 3】



10

計算質量：1290.70；実測質量：1290.8。

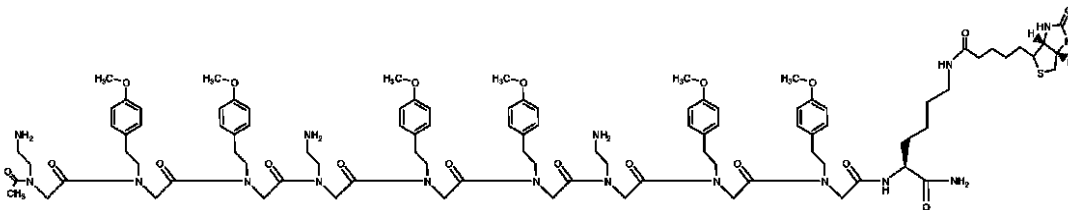
【0423】

(ペプチド試薬 III)

下のペプチド試薬は、これに限定されるわけではないが配列番号 231 を含む。

【0424】

【化 2 4】



20

計算質量：1861.30；実測質量：1861.6。

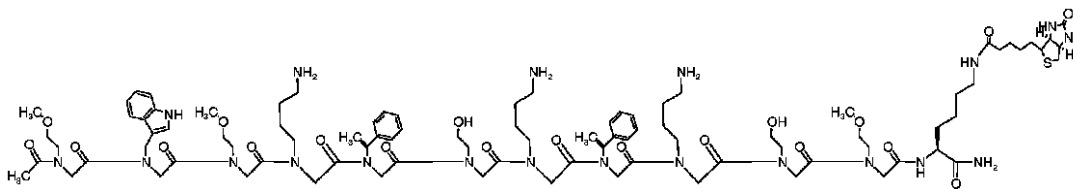
【0425】

(ペプチド試薬 IV)

下のペプチド試薬

【0426】

【化 2 5】



30

は、これに限定されるわけではないが配列番号 232 を含む。

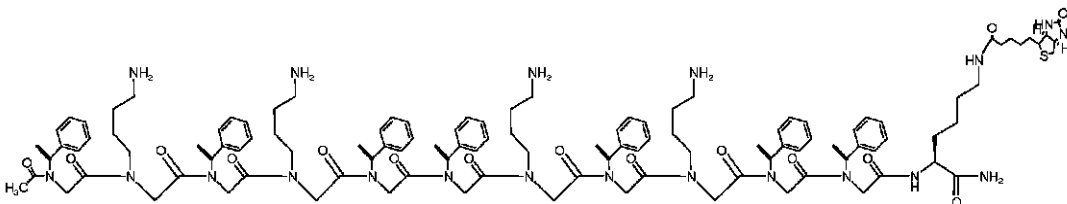
【0427】

(ペプチド試薬 V)

下のペプチド試薬

【0428】

【化 2 6】



40

は、これに限定されるわけではないが配列番号 233 を含む。

【0429】

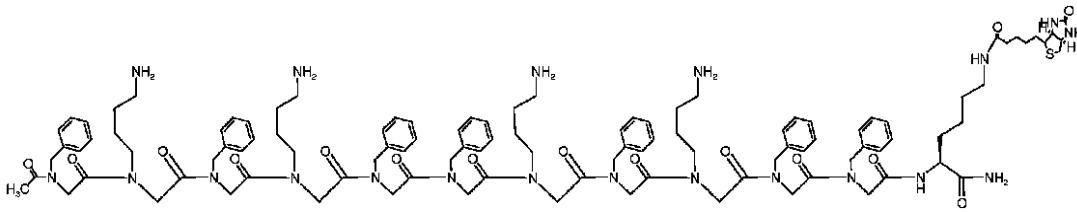
(ペプチド試薬 VI)

下のペプチド試薬は、これに限定されるわけではないが配列番号 234 を含む。

【0430】

50

【化27】



計算質量：1956.49；実測質量：1956.2。

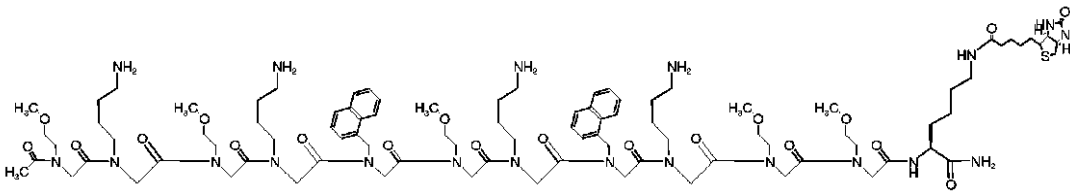
【0431】

(ペプチド試薬VII)

下のペプチド試薬は、これに限定されるわけではないが、配列番号235を含む。

【0432】

【化28】



計算質量：1896.39；実測質量：1896.4。

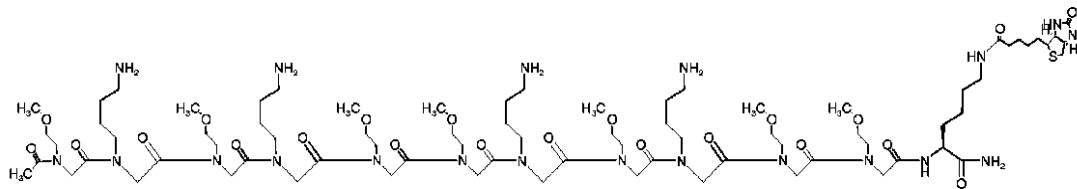
【0433】

(ペプチド試薬VIIII)

下のペプチド試薬は、これに限定されるわけではないが配列番号236を含む。

【0434】

【化29】



計算質量：1732.18；実測質量：1732.4。

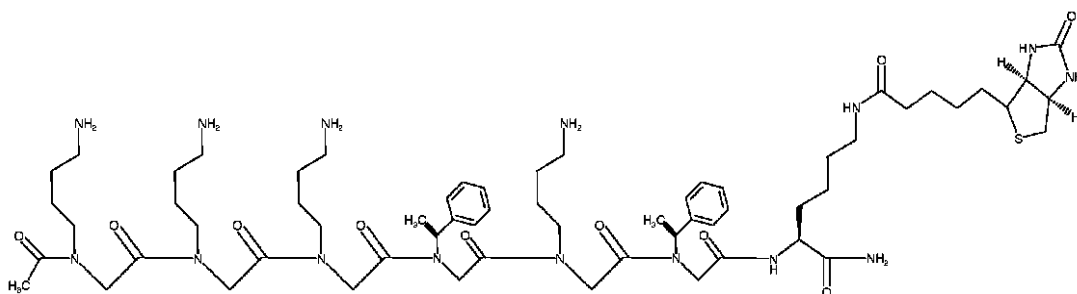
【0435】

(ペプチド試薬IX)

下のペプチド試薬は、これに限定されるわけではないが配列番号237を含む。

【0436】

【化30】



計算質量：1248.65；実測質量：1248.4。

【0437】

(ペプチド試薬X)

下のペプチド試薬は、これに限定されるわけではないが配列番号238を含む。

【0438】

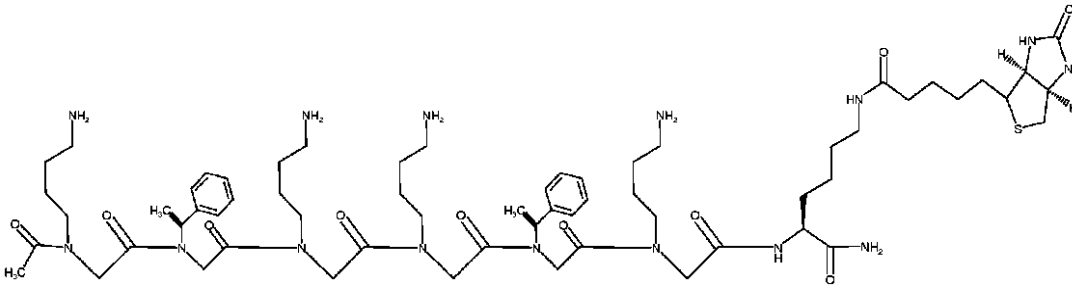
10

20

30

40

【化 3 1】



計算質量：1248.65；実測質量：1248.4。

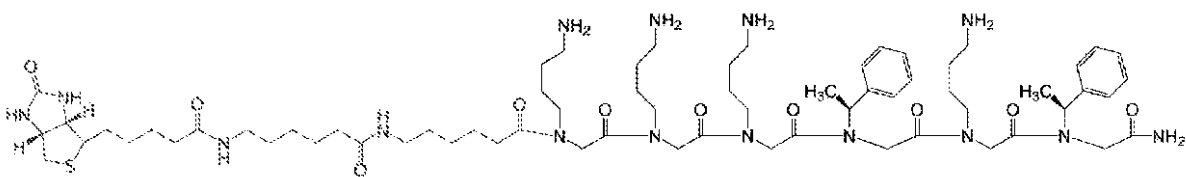
【0439】

(ペプチド試薬 X I a および X I b)

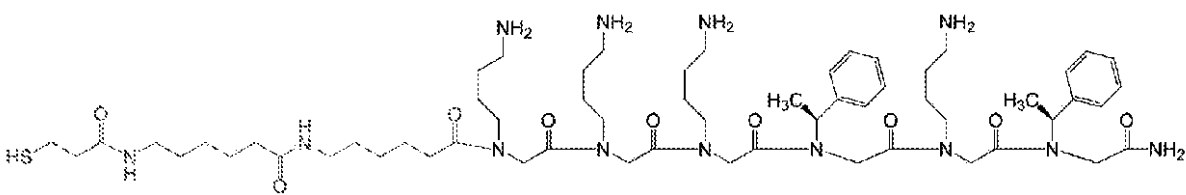
下のペプチド試薬 X I a および X I b は、配列番号 239 を含む。

【0440】

【化 3 2】



X I a



X I b

X I a：計算質量：1304.76；実測質量：1304.6。

X I b：計算質量：1166.59；実測質量：1166.2。

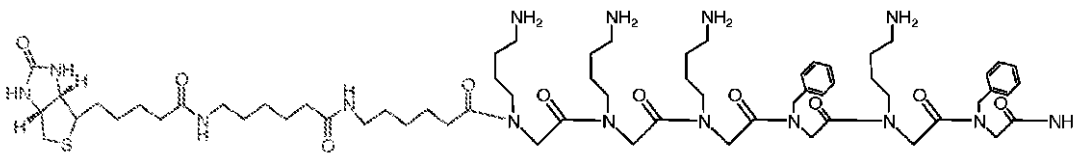
【0441】

(ペプチド試薬 X I I a および X I I b)

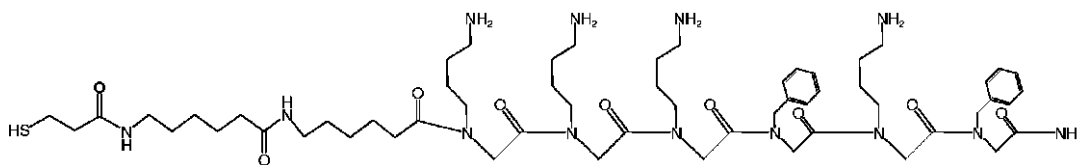
下のペプチド試薬の式 X I I a および X I I b は、配列番号 240 を含む。

【0442】

【化 3 3】



X I I a



X I I b

X I I a：計算質量：1276.71；実測質量：1276.6。

【0443】

(ペプチド試薬 X I I I)

10

20

30

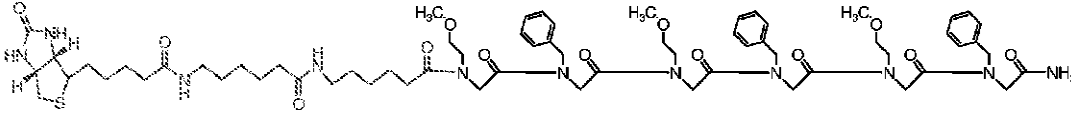
40

50

下のペプチド試薬は、これに限定されるわけではないが、配列番号 241 を含む。

【0444】

【化34】



計算質量：1256.58；実測質量：1256.6。

【0445】

(実施例9 PSR1およびPrP23-30は、シートブロッカーより優れたAの捕捉を示す)

シートブレイカーは、凝集を媒介するAの領域に結合することによってA線維化プロセスを妨害すると考えられている小型分子である。本実施例は、AのPSR1捕捉がシートブレイカーによる捕捉よりも優れていることを示す(図11を参照)。

【0446】

PSR1、PrP23-30、M280SAビーズのみ、ならびにシートブレイカーAL30、AL32、AL33、およびAL34(その構造は下の表で詳説されている)

【0447】

【数2】

AL30 (Aβ20-16 逆配列)	ビオチン-AHX-D(FFVLK)-CONH2 (配列番号 252) [L-アミノ酸の代わりにD-アミノ酸を使用]
AL32 (Aβ20-16)	ビオチン-AHX-FFVLK-CONH2 (配列番号 253) [通常のL-アミノ酸を使用]
AL33 (Aβ16-20- NmeL)	ビオチン-AHX-KLVFF-NmeL-CONH2 (配列番号 254) [NmeLは、大半のカスタムペプチド合成会社から入手できる「標準」アミノ酸修飾物である、N-メチル化リジンである]
AL34 (Aβ(16-20- NmeL) ₂)	ビオチン-AHX-KLVFF-NmeL-AHX- KLVFF-NmeL-CONH2 (配列番号 255) [上のダイマー]

を使用するAの捕捉、および、4G8-HRP試薬を用いたELISAによる検出は、実施例2に記載した方法を使用して実施した。

【0448】

(実施例10 PSR1は凝集全タウを捕捉する)

凝集全タウの全レベル(リン酸化、非リン酸化、または過剰リン酸化)は、アルツハイマー病と関連している。過剰リン酸化凝集全タウは、アルツハイマー病に特に強い関連があるようだ。

【0449】

10

20

30

40

50

A 凝集および酸化ストレスによって引き起こされるタウ過剰リン酸化は、AD発症に關与すると考えられている (Formicchi, P.ら、J. of Cellular Physiology. 208-1:39-46, 2006)。過剰リン酸化タウタンパク質は、高い自己凝集活性を有し、神経変性疾患の脳で見出される対らせん状細線維および神経細線維もつれを形成する (Goedert, M.ら、Trends Neurosci 16:460-465, 1993; Iqbalら、J Neural Transm 53:169-180, 1998)。Thr181および231におけるタウのリン酸化は、CSF中のADバイオマーカーとして試験されている。A₄₂に対するp-タウの比は、ADを有する患者を健常な対照および他の認知症と区別するため、高い診断上の価値を有する (Buergerら、Arch Neurol 59:1267-1272, 2002; Maddalenaら、Arch Neurol 60:1202-1206, 2003)。

10

【0450】

本実施例は、PSR1がAD関連凝集タウを捕捉することを示す。

【0451】

(正常脳およびアルツハイマー病脳の全タウレベルの測定)

正常ヒトおよびアルツハイマー病脳ホモジネートを、室温にて1時間、3M GnSCNで処置した(変性)かまたは処置しなかった(天然)。10%脳ホモジネート100nLを各ELISAウェルに分注した(BioSource TauイムノアッセイキットKHB0042/KHB0041)。全タウ標準物を、0.006M GnSCNを含む希釈溶液によって希釈した。

20

【0452】

各ELISAプレートを被覆して、室温にて一晚インキュベートした。2日目に、ELISAプレートをウェル当り400uLの希釈洗浄緩衝液で4回洗浄し、ウサギ抗タウ抗体100uLを各ウェルに添加した。プレートを室温にて1時間インキュベートして、ウェル当り400uLの希釈洗浄緩衝液で4回洗浄した。機能する抗ウサギHRP 100uLを各ウェルに添加した。次にプレートを室温にて30分間インキュベートして、ウェル当り400uLの希釈洗浄緩衝液で4回洗浄した。次に、100uLのStabilized Chromagenを添加した。次にプレートを暗所で室温にて30分間インキュベートした。反応を、停止液100uLをすべてのウェルに添加して停止させて、450nmで読み取った。

30

【0453】

有意なレベルのタウを正常およびアルツハイマー病脳の両方で検出した(図12)。プリオンおよびA凝集体とは異なり、タウの変性は、検出可能なタウレベルに対して有意な効果を有さず、このことは、タウ抗体結合エピトープはタウの病原性アイソフォームにおいてコンフォメーション的に変更されていないことを示唆した。

【0454】

(PSR1によるブルダウン)

10%正常またはアルツハイマー病脳ホモジネート400nLを各ブルダウン反応のためにTBSTT 100uLで希釈した。反応当り3uLのM270-グルタチオンまたはPSR1ビーズを500uL丸底コーニングプレートに入れた(plate)。反応物を750rpmで振とうしながら、37にて1時間インキュベートした。次にビーズをBioTek BLx405においてTBSTによって洗浄した。残留溶液を除去した後、6M GnSCN 5uLを添加して、ビーズと共に750rpmで振とうしながら室温にて1時間インキュベートして、タンパク質を解離させた。H₂O 120uLを各ウェルに添加した。

40

【0455】

次に、各ブルダウン試薬によって捕捉されたタウの量を定量した。ウェル当り50uLの標準希釈緩衝液をタウELISAプレートに添加した。ブルダウンプレートを磁気スタンドに2分間置き、溶液50uL/ウェルをタウELISAプレートに移した(160n

50

L 10% B H / ウェルに相当)。タウ標準物を 0.12 M G n S C N を含む希釈溶液によって希釈した。E L I S A プレートに被覆して、室温で一晩インキュベートした。2 日目に、E L I S A プレートをウェル当り 400 u L の希釈洗浄緩衝液で 4 回洗浄した。ウサギ抗タウ抗体 100 u L を各ウェルに添加した。プレートを室温にて 1 時間インキュベートして、ウェル当り 400 u L の希釈洗浄緩衝液で 4 回洗浄した。機能する抗ウサギ H R P 100 u L を各ウェルに添加した。プレートを室温にて 30 分間インキュベートして、ウェル当り 400 u L の希釈洗浄緩衝液で 4 回洗浄した。100 u L の S t a b i l i z e d C h r o m a g e n を添加した。プレートを暗所で室温にて 30 分間インキュベートした。反応を、停止液 100 u L をすべてのウェルに添加して停止させて、450 n m で読み取った。

10

【0456】

大半のアルツハイマー病脳試料において、P S R 1 は、正常脳試料においてよりも有意に多いタウを結合し、このことは、P S R 1 が凝集タウに選択的に結合することを示唆した(図13)。対照グルタチオンビーズのプルダウン試料においては、ごくわずかのタウしか検出しなかった。

【0457】

検出されたタウレベルを下の表8、

【0458】

【表8】

ug/mL	ELISA		プルダウン		%結合
	天然	3M GnSCN	M270-グルタチオン	PSR1	
正常 320	1.398	1.389	-0.001	0.080	5.739
正常 326	1.409	1.512	-0.003	0.041	2.733
正常 327	1.515	1.534	-0.002	0.048	3.121
正常 328	1.487	1.519	-0.002	0.045	2.959
AD 325	1.216	1.251	-0.003	0.058	4.608
AD 334	1.190	1.300	-0.002	0.476	36.620
AD 325	1.535	1.612	0.027	0.469	29.074
AD 264-1	1.498	1.477	-0.002	0.066	4.442
AD 230-1	1.559	1.556	0.000	0.454	29.152
AD 218-2	1.387	1.358	-0.003	0.132	9.717
AD 221-1	1.399	1.371	-0.002	0.067	4.871
AD 201-2	1.556	1.535	-0.003	0.459	29.928
AD 184-1	1.185	1.344	-0.003	0.056	4.166
AD 177-1	1.295	1.004	-0.001	0.295	29.370
AD 291	1.201	1.446	-0.003	0.302	20.911

20

30

で定量する。

【0459】

(実施例11 解離した凝集タウは、P S R 1 ビーズによって、もはやプルダウンされない(図14))

正常またはアルツハイマー脳ホモジネートを、5 M G n S C N を用いて、または用いずに室温にて 1 時間インキュベートした。10% 正常またはアルツハイマー病脳ホモジネート 400 n L を各プルダウン反応のために 25% ヒト血漿 - T B S T T 200 u L で希釈した。

40

【0460】

反応当り M 2 7 0 - グルタチオンまたは P S R 1 ビーズ 3 u L を 500 u L 丸底コーニングプレートに入れた。反応物は 750 r p m で振とうしながら、37 °C にて 1 時間インキュベートした。次にビーズを B i o T e k B L x 405 において T B S T T によって洗浄した。残留溶液を除去した後、6 M G n S C N 10 u L を添加して、ビーズと共に 750 r p m で振とうしながら室温にて 1 時間インキュベートして、タンパク質を解離させた。H₂O 120 u L を各ウェルに添加した。

50

【0461】

ブルダウンプレートに磁気スタンドに2分間置き、溶液50 μ L/ウェルをタウELISAプレートに移した(160nL 10% BH/ウェルに相当)。ELISAプレートを被覆して、室温で一晩インキュベートした。2日目に、ELISAプレートをウェル当り400 μ Lの希釈洗浄緩衝液で4回洗浄した。ウサギ抗タウ抗体100 μ Lを各ウェルに添加した。プレートを室温にて1時間インキュベートして、ウェル当り400 μ Lの希釈洗浄緩衝液で4回洗浄した。機能する抗ウサギHRP 100 μ Lを各ウェルに添加した。プレートを室温にて30分間インキュベートして、ウェル当り400 μ Lの希釈洗浄緩衝液で4回洗浄した。100 μ LのStabilized Chromagenを添加した。プレートを暗所で室温にて30分間インキュベートした。反応を、停止液100 μ Lをすべてのウェルに添加して停止させて、450nmで読み取った。

10

【0462】

解離した凝集タウを、PSR1はもはや結合しなかった(図14を参照)。

【0463】

【表9】

表9

				グルタチオン						PSR1					
							M270- グルタチオン	標準 偏差	%変動 係数				PSR1	標準 偏差	%変動 係数
NBH	320	天然	320-N	0.12	0.12	0.12	0.12	0.00	1.44	0.12	0.12	0.13	0.12	0.00	3.62
		変性	320-D	0.11	0.11	0.11	0.11	0.00	2.35	0.11	0.11	0.11	0.11	0.00	1.36
	326	天然	326-N	0.12	0.12	0.12	0.12	0.00	1.49	0.11	0.11	0.11	0.11	0.00	3.22
		変性	326-D	0.11	0.10	0.10	0.10	0.01	5.49	0.10	0.10	0.10	0.10	0.00	2.54
ADBH	334	天然	334-N	0.48	0.48	0.48	0.48	0.00	0.74	1.88	2.74	2.15	2.26	0.44	19.39
		変性	334-D	0.12	0.11	0.11	0.11	0.01	8.91	0.20	0.20	0.21	0.20	0.01	2.49
	230-1	天然	230-N	0.18	0.17	0.20	0.18	0.02	9.13	0.65	0.87	0.54	0.69	0.17	24.09
		変性	230-D	0.12	0.11	0.11	0.12	0.01	4.59	0.12	0.16	0.13	0.13	0.02	14.65

20

現在までに発明者らは、3種類の異なるタンパク質；プリオン、A、およびタウの不溶性規則的タンパク質凝集体がPSR1および他のPCSB試薬を結合することを示している。これらの凝集体の変性によって、溶解性が生じ、PSR1および他のPCSB試薬へのその結合を除去する。この観察結果は、タンパク質アミノ酸配列とは無関係の規則的アミロイド構造を特徴とする相互作用ドメインの存在をさらに支持する。

30

【0464】

(実施例12 ヒトCSF中のAD A凝集体に対するPSR1ビーズブルダウンアッセイの検出限界(LOD)(図15))

PSR1ビーズブルダウンアッセイの検出限界(LOD)を、バックグラウンドを超えて検出可能な凝集Aの最小量を決定することにより評価した。

【0465】

モノマー可溶性Aを検出するためのサンドイッチELISAの感度を、メソスケールディスクバリー(MesoScale Discovery(MSD))技術を使用して評価した(図15A)。標準合成A40または42は、AのC末端に特異的なmAbによって捕捉して、mAb4G8によって検出した。シグナル/雑音比が2の検出限界(LOD)は、A40では1.6 μ g/mLであり、A42では12 μ g/mLであった。

40

【0466】

アルツハイマー病(AD)脳ホモジネート(BH)中でA40および42凝集体を検出するPSR1感度を測定した(図15B)。10%AD BHをプール正常ヒトCSF200 μ L中にスパイクして、PSR1ビーズ3 μ Lによって捕捉した。捕捉されたAを80にて0.1N NaOHによってモノマーAに解離して、上述のようなサンドイッチMSDELISAによって検出した。シグナル/雑音比が2の検出限界(L

50

OD) は、A₄₀では1 pg/mLであり(10% AD BH 11.4 nLをCSF 1 mL中にスパイク)、A₄₂では1 pg/mLであった(10% AD BH 0.3 nLをCSF 1 mL中にスパイク)。

【0467】

(実施例13 ヒト血清中にスパイクされたA₄₂凝集体のPSR1回収(結合効率)(図16))

PSR1によるA₄₂凝集体の回収効率を、AD BH中の全凝集A₄₂の量をPSR1プルダウンによって捕捉された量と比較することによって評価した。

【0468】

10% AD BHを希釈正常ヒト血清(TBSで200倍希釈)200 uL中にスパイクして、PSR1ビーズ3 uLによって捕捉した(図16、四角形)。捕捉されたA₄₂凝集体を80℃にて0.1N NaOHによって解離して、実施例12に記載したようなサンドイッチMSD ELISAによって検出した。

【0469】

PSR1捕捉に供されなかった同量のAD BHを80℃にて0.1NaOHによって変性させて、実施例12に記載したように全A₄₂をサンドイッチELISAによって測定した(図16、三角形)。

【0470】

A₄₂の濃度は、実施例12に記載するように合成A₄₂を使用して標準曲線から計算した。

【0471】

PSR1によって捕捉されたA₄₂凝集体の量は、AD BH中の全A₄₂凝集体と等しく、このことは、PSR1回収が約100%であり、PSR1が非常に効率的な捕捉試薬であることを示した。

【0472】

(実施例14 PSR1ビーズプルダウンアッセイによる正常CSFからのA₄₀およびA₄₂の検出)

アルツハイマー病に罹っていない個人からのCSF中のA₄₀モノマーを結合するPSR1の能力をモニターするために、濃度漸増PSR1(30 mg/mLストックからの3、9、15 uL)を2×TBSTT(1% Tween 20および1% Triton-X 100を含有するTris緩衝生理食塩水)50 uLと混合した、CSFロット410またはロット411 50 uLに添加した。得られた混合物を600 rpmにて常時振とうしながら、37℃で1時間インキュベートした。非結合試料は、TBST(0.05% Tween 20を含有するTris緩衝生理食塩水)でビーズを6回洗浄することによって除去した。各洗浄ごとに、TBSTの添加後に、磁力を使用してビーズを収集し、TBSTを除去した。ビーズ結合タンパク質は、750 rpmにて常時振とうしながら、80℃にて0.1N NaOHによって30分間にわたって解離させた。0.12M NaH₂PO₄/0.4% Tween 20を使用して溶液を中和した。上清をELISAプレートに移して、A₄₀およびA₄₂を測定した。読取値をA₄₀およびA₄₂標準曲線のELISAと比較して定量した。ELISAは、MSD 96ウェルMULTI__SPOT ヒト/げっ歯類4G8 A Triplex Ultra-Sensitiveアッセイ(Meso Scale Discovery)に従って実施した。表10の結果は、漸増ビーズ量と共に、A₄₀およびA₄₂のPSR1ビーズへの結合をpg/mLおよび全体のパーセントで示す。すべてのビーズ濃度でA₄₀のごくわずかな結合が明らかである。検出された量は、正常CSFに存在する全A₄₀の1%未満に相当する。A₄₂の結合は明らかであり、正常CSF中に存在する全てのA₄₂の1~5%に相当する。

【0473】

観察された結合は、正常CSF中でのオリゴマー性A₄₀の存在を示し得る。

【0474】

10

20

30

40

50

【表 10】

表10

ヒトCSFロット410				
Aβ 40 2020pg/ml		Aβ 42 212.6pg/ml		
PSR1への結合				
	Aβ 40		Aβ 42	
PSR1	pg/ml	全体の%	pg/ml	全体の%
3uL	10.28	0.51	3.28	1.54
9uL	15.4	0.76	7.1	3.34
15uL	17.3	0.86	11.8	5.55

10

ヒトCSFロット411				
Aβ 40 1950 pg/ml		Aβ 42 195 pg/ml		
PSR1への結合				
	Aβ 40		Aβ 42	
PSR1	pg/ml	全体の%	pg/ml	全体の%
3uL	5.25	0.27	-	-
9uL	13.57	0.70	4.9	2.52
15uL	15.3	0.78	7.5	3.86

20

30

または、これらの知見は、PSR1がモノマー性A β を低い親和性で結合できることを示唆し得る。

【0475】

(実施例15 A β 42モノマーのPSR1への結合は、低濃度の血漿によってブロックすることができる(図17))

モノマー性A β および凝集A β に対するPSR1結合の親和性を、血漿の濃度漸増の効果を調べることによって評価した。

【0476】

PSR1に対するモノマー性A β 結合のブロックを試験するために、ビーズを濃度漸増血漿の存在下で、大過剰のモノマー性A β 42(25ng/ml)と共にインキュベートした(図17、三角形)。血漿濃度の上昇につれて、モノマー結合の量が減少した。20パーセントの血漿は、モノマーに対するPSR1結合の90%超を阻害した。

40

【0477】

PSR1に対する凝集A β 結合のブロックを試験するために、ビーズを濃度漸増血漿の存在下で、200mL/mL 5%AD脳ホモジネートと共にインキュベートした(図17、丸)。モノマー性A β とは対照的に、凝集A β の結合に、最大85%の血漿は影響しなかった。

【0478】

これらの知見

【0479】

50

【表 1 1】

表11

%	200nL/mL 5% ADBH		25ng/mL Aベータモノマー 1-42	
	平均	標準 偏差	平均	標準 偏差
0.5	349.2	48.3	1202.3	63.6
5	369.7	23.5	423.7	13.9
10	334.6	27.9	145.3	14.9
20	190.2	21.8	95.5	8.7
50	321.4	35.4	50.9	3.8
70	323.3	13.9	36.8	5.6
87.5	241.1	21.4	24.6	1.9

10

は、モノマー性 A は、低い親和性で P S R 1 を結合するが（これは、他のタンパク質によってブロックされる可能性がある）、凝集 A は P S R 1 をより高い親和性で結合することを示唆している。

20

【 0 4 8 0 】

（実施例 1 6 H C l は凝集タウタンパク質と P S R 1 - ビーズとの結合を解離させる（図 1 8 ））

P S R 1 結合凝集体の効率的な免疫検出を実施するためには、凝集体を溶離させて、E L I S A に適合するタンパク質モノマーに解離すべきである。解離のカオトロピック強度は、凝集体の物理化学特性に依存する。凝集タウの P S R 1 からの解離を最適化するために、以下の酸性条件

【 0 4 8 1 】

【 数 3 】

30

#	解離条件
1	6M GdnSCN / 室温 / 30分間
2	pH2.3の、150mM NaClを含む0.1N HCl / グリシン / 室温 / 30分間
3	0.25N HCl / 室温 / 30分間
4	pH2.3の、150mM NaClを含む0.1N HCl / グリシン / 50°C / 30分間
5	0.25N HCl / 50°C / 30分間
6	pH2.3の、150mM NaClを含む0.1N HCl / グリシン / 80°C / 30分間
7	0.25N HCl / 80°C / 30分間

を試験した。

40

【 0 4 8 2 】

正常またはアルツハイマー病（A D）からの脳ホモジネート（B H）を T B S T T（1 % T w e e n 2 0 および 1 % T r i t o n - X 1 0 0 を含有する T r i s 緩衝生理食塩水）中にスパイクした。各試料 1 0 0 u L を P S R 1 - ビーズ（3 0 m g / m L）3 u L と混合した。得られた混合物を 7 5 0 r p m にて常時振とうしながら、3 7 ° C で 1 時間インキュベートした。非結合試料物質は、T B S T（0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含有する T r i s 緩衝生理食塩水）でビーズを 6 回洗浄することによって除去した。各洗浄ごとに、T B S T の添加後に、磁力を使用してビーズを収集し、T B S T を除去した。凝集タウとビーズとの結合は、7 5 0 r p m にて常時振とうしながら、種々の条件（表に表示）で解離させた。解離反応物は 3 つの異なる温度の、3 つの別個のプレートに置いた。6

50

M G d n S C NをH₂Oで希釈し、HClはNaOHによってpH7.5まで中和した。上清を磁力上の同じELISAプレートに移した。タウはヒトタウ(全)ELISA(Biosource)によって定量した。

【0483】

結果を図18に示す。結果は、室温(RT)および50の0.25N HClによってAD BHからの凝集タウとPSR1-ビーズとの結合が解離されることを示す。これらの解離条件は、RTでの6M GdnSCNと同じ効率を有する(RTでの6M GdnSCNは、タンパク質への損傷を伴わずに凝集タンパク質を解離させるため、標準である)。80の0.25N HClによる解離によって、ELISAのタウシグナルが除去され、この除去はおそらくタウタンパク質の損傷によるものである。pH2.3における150mM NaClを含む0.1N HCl-グリシンでは、6M GdnSCNと同じ解離効率を達成できなかった。正常BHでは、シグナルはすべての解離条件で同じレベルであった。条件3(750rpmで振とうしながら室温にて0.25N HClで30分間)は、PSR1ビーズからの凝集タウの好ましい解離条件である。

10

【0484】

(実施例17 AD BHによってスパイクした正常ヒトCSF中の全タウ、P-タウ231、およびP-タウ181に対するPSR1ビーズプルダウンアッセイの検出限界(図19A~F))

(全タウの検出限界)

アルツハイマー病脳ホモジネート(AD BH)を正常ヒトCSF中にスパイクした。各試料200uLを5xTBSTT(1%Tween 20および1%Triton-X 100を含有するTris緩衝生理食塩水)50uLおよびPSR1-ビーズ(30mg/mL)12uLと混合した。得られた混合物を550rpmにて常時振とうしながら、37で1時間インキュベートした。非結合試料物質は、TBST(0.05%Tween 20を含有するTris緩衝生理食塩水)でビーズを6回洗浄することによって除去した。各洗浄ごとに、TBSTの添加後に、磁力を使用してビーズを収集し、TBSTを除去した。ビーズ結合凝集タウは、750rpmにて常時振とうしながら、室温にて0.25N HClによって30分間にわたって解離させた。0.25N NaOHを使用して溶液を中和した。上清を磁力上のINNOTEST hTAU Ag ELISAプレートに移した。INNOTEST hTAU Ag ELISAを、PSR1-ビーズプルダウンアッセイから最終試料量を合成するために、反応当り175uLに変更した。

20

30

【0485】

アッセイ検出限界は、2以上のS/N(シグナル対アッセイバックグラウンド)比を使用して決定した。ELISAアッセイバックグラウンドを、緩衝液のみでのシグナルと見なした。プルダウンアッセイのバックグラウンドを、AD BHをスパイクしなかったCSFのシグナルと見なした。175uL INNOTEST hTAU Ag ELISAの検出限界は、アッセイ当り0.032fmol、すなわち0.32pMであった。タウPSR1ビーズプルダウンアッセイの検出限界は、アッセイ当り0.038fmol、すなわち0.19pMであった。

【0486】

40

(P-タウ231の検出限界)

アルツハイマー病脳ホモジネート(AD BH)を正常ヒトCSF中にスパイクした。70uLの各試料を3.3xTBSTT(1%Tween 20および1%Triton-X 100を含有するTris緩衝生理食塩水)30uLおよびPSR1-ビーズ(30mg/mL)3uLと混合した。得られた混合物を750rpmにて常時振とうしながら、37で1時間インキュベートした。非結合試料物質は、TBST(0.05%Tween 20を含有するTris緩衝生理食塩水)でビーズを6回洗浄することによって除去した。各洗浄ごとに、TBSTの添加後に、磁力を使用してビーズを収集し、TBSTを除去した。ビーズ結合凝集タウは、750rpmにて常時振とうしながら、室温にて0.25N HClによって30分間にわたって解離させた。0.25N NaOHを使

50

用して溶液を中和した。上清を磁力上のヒトタウ [p T 2 3 1] E L I S A プレート (B i o s o u r c e) に移した。

【 0 4 8 7 】

アッセイ検出限界は、2以上のS/N(シグナル対アッセイバックグラウンド)比を使用して決定した。E L I S A アッセイバックグラウンドを、緩衝液のみでのシグナルと見なした。プルダウンアッセイのバックグラウンドを、A D B H をスパイクしなかった C S F のシグナルと見なした。ヒトタウ [p T 2 3 1] E L I S A の検出限界は、アッセイ当り 0 . 0 9 f m o l 、すなわち 1 . 7 2 p M であった。タウ [p T 2 3 1] プルダウンアッセイの検出限界は、アッセイ当り 0 . 2 0 f m o l 、すなわち 2 . 7 1 p M であった。

10

【 0 4 8 8 】

(P - タウ 1 8 1 の検出限界)

アルツハイマー病脳ホモジネート (A D B H) を正常ヒト C S F 中にスパイクした。7 0 u L の各試料を 3 . 3 x T B S T T (1 % T w e e n 2 0 および 1 % T r i t o n - X 1 0 0 を含有する T r i s 緩衝生理食塩水) 3 0 u L および P S R 1 - ビーズ (3 0 m g / m L) 3 u L と混合した。得られた混合物を 7 5 0 r p m にて常時振とうしながら、3 7 で 1 時間インキュベートした。非結合試料物質は、T B S T (0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含有する T r i s 緩衝生理食塩水) でビーズを 6 回洗浄することによって除去した。各洗浄ごとに、T B S T の添加後に、磁力を使用してビーズを収集し、T B S T を除去した。ビーズ結合凝集タウは、7 5 0 r p m にて常時振とうしながら、室温にて 0 . 2 5 N H C l によって 3 0 分間にわたって解離させた。0 . 2 5 N N a O H を使用して溶液を中和した。上清を磁力上の I N N O T E S T P H O S P H O - T A U (1 8 1 P) E L I S A プレートに移した。

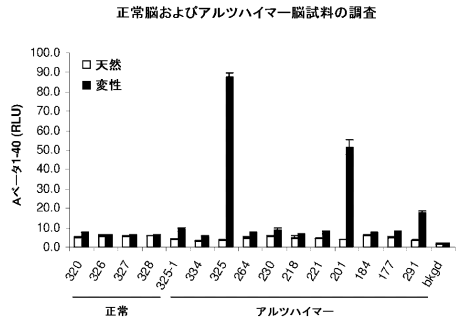
20

【 0 4 8 9 】

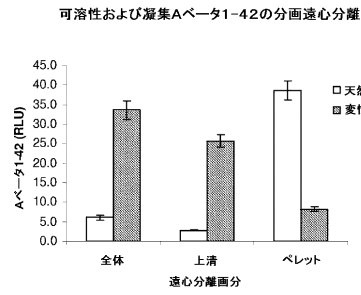
アッセイ検出限界は、2以上のS/N(シグナル対アッセイバックグラウンド)比を使用して決定した。E L I S A アッセイバックグラウンドを、緩衝液のみでのシグナルと見なした。プルダウンアッセイのバックグラウンドを、A D B H をスパイクしなかった C S F のシグナルと見なした。I N N O T E S T P H O S P H O - T A U (1 8 1 P) E L I S A の検出限界は、アッセイ当り 0 . 0 4 f m o l 、すなわち 0 . 5 4 p M であった。タウ [p T 2 3 1] プルダウンアッセイの検出限界は、アッセイ当り 0 . 0 3 f m o l 、すなわち 0 . 4 4 p M であった。

30

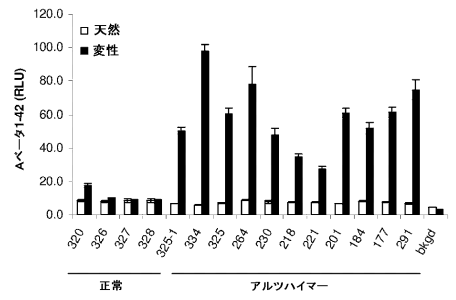
【 図 1 】



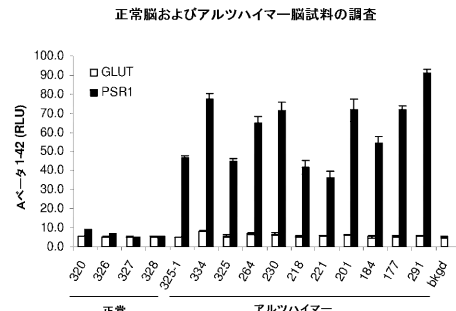
【 図 2 】



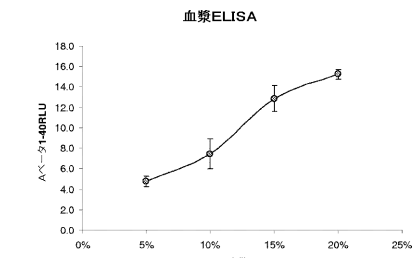
正常脳およびアルツハイマー脳試料の調査



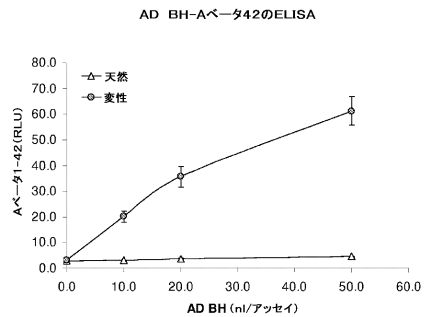
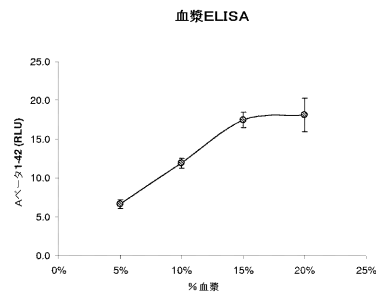
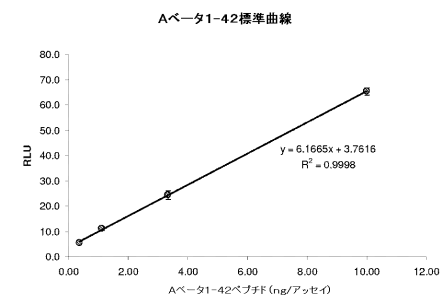
【 図 3 】



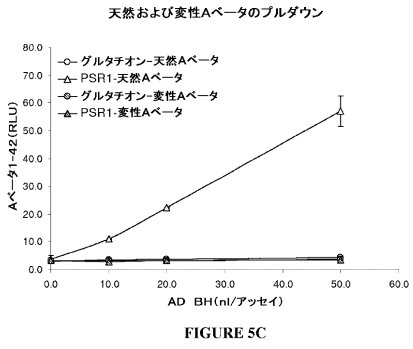
【 図 4 】



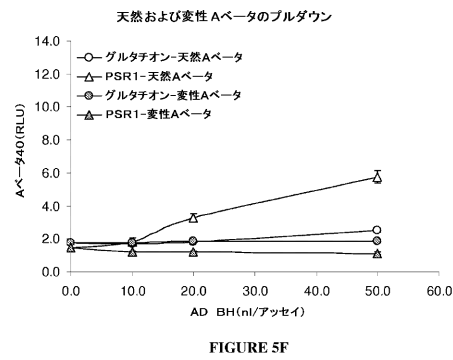
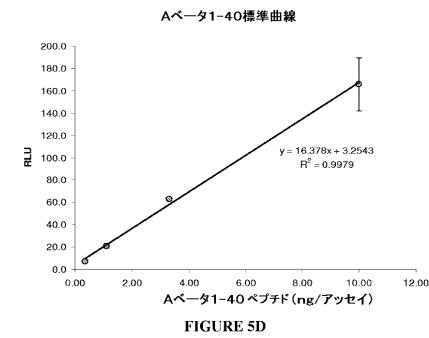
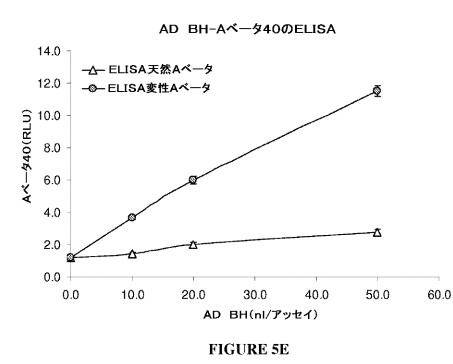
【 図 5 - 1 】



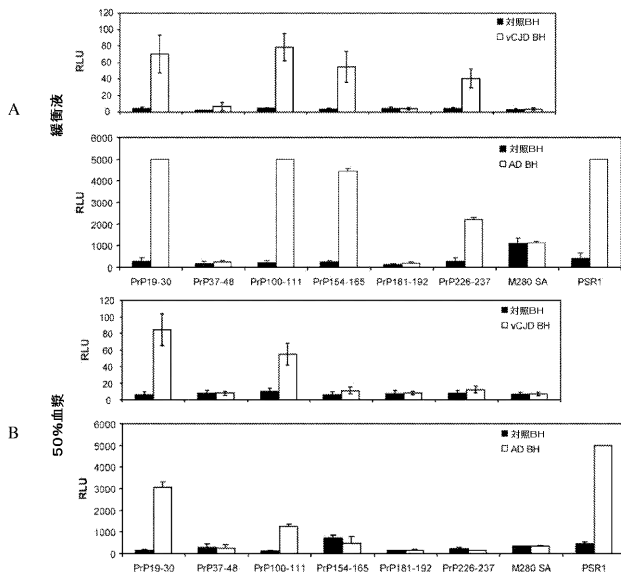
【 図 5 - 2 】



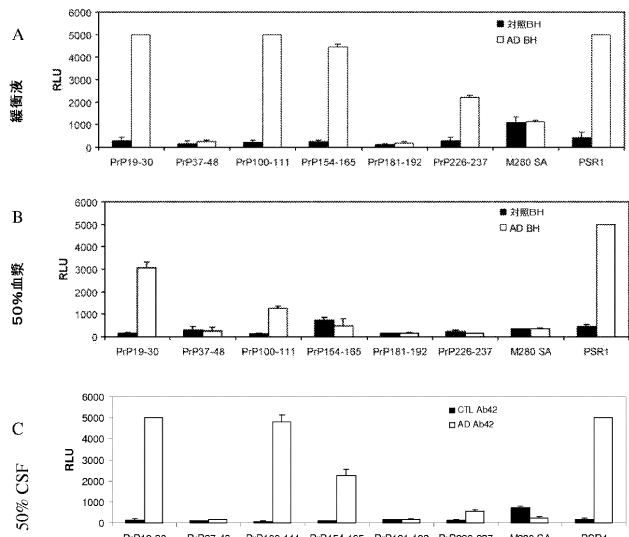
【 図 5 - 3 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】

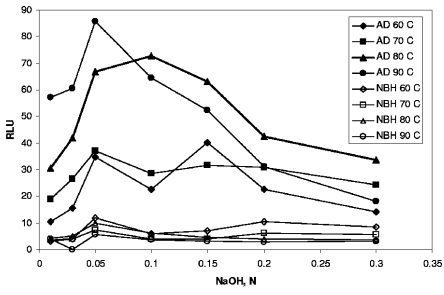
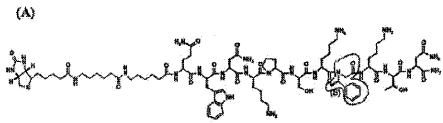
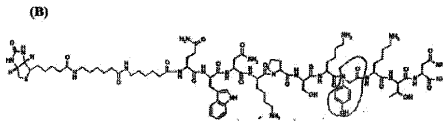


FIGURE 8

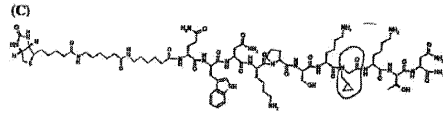
【 図 9 (A) 】



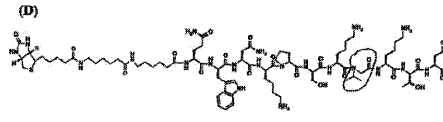
【 図 9 (B) 】



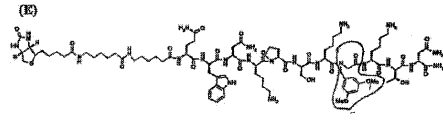
【 図 9 (C) 】



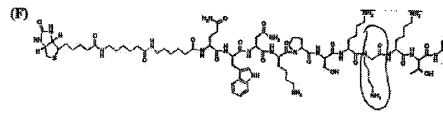
【 図 9 (D) 】



【 図 9 (E) 】



【 図 9 (F) 】



【 図 10 】

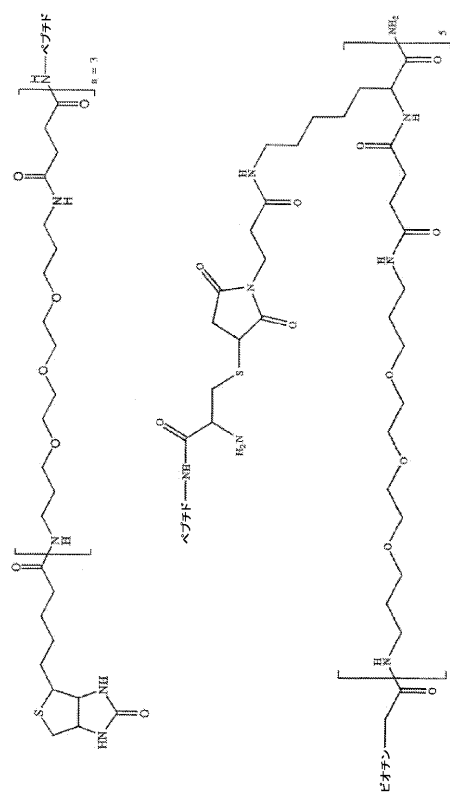


FIGURE 10

【 図 11 】

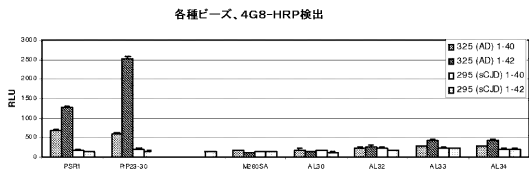


FIGURE 11

【 図 12 】

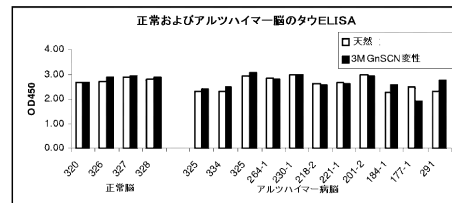


FIGURE 12

【 図 13 】

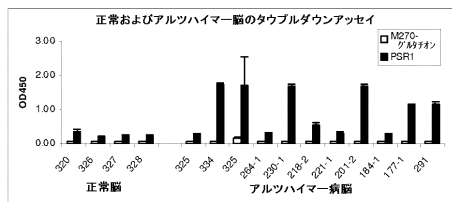


FIGURE 13

【 図 1 4 】

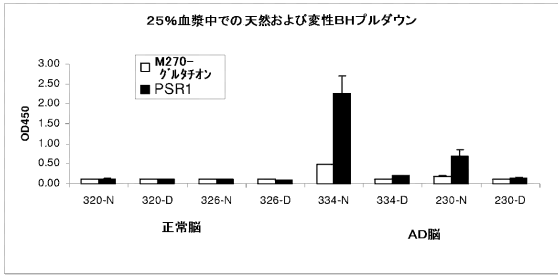


FIGURE 14

【 図 1 5 B 】

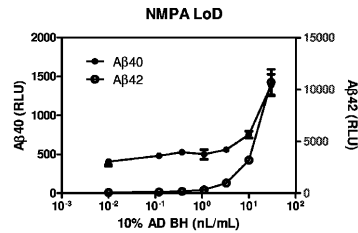


FIGURE 15B

【 図 1 5 A 】

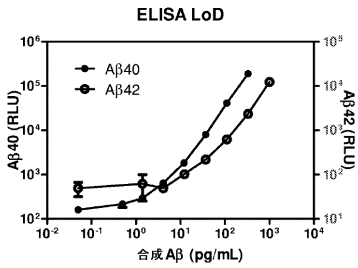


FIGURE 15A

【 図 1 6 】

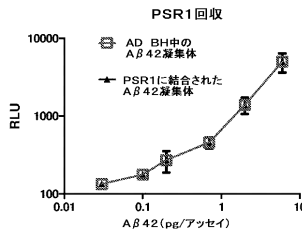


FIGURE 16

【 図 1 7 】

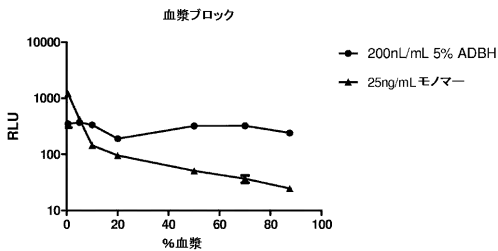


FIGURE 17

【 図 1 9 】

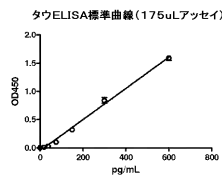


FIGURE 19A

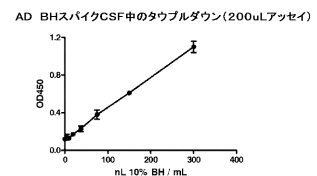


FIGURE 19B

【 図 1 8 】

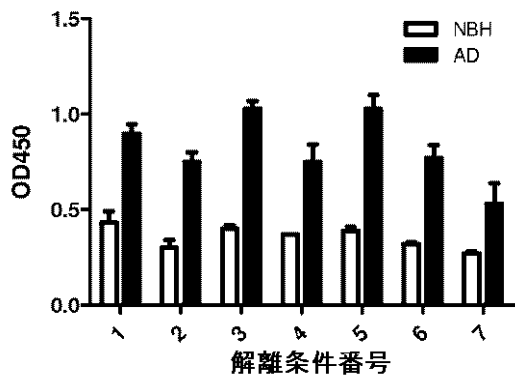


FIGURE 18

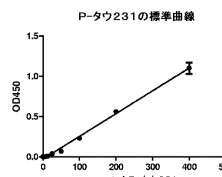


FIGURE 19C

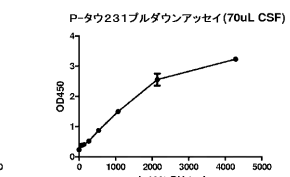


FIGURE 19D

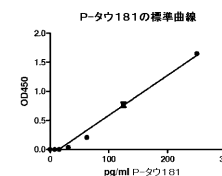


FIGURE 19E

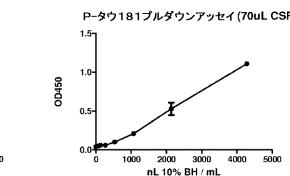


FIGURE 19F

【配列表】

2011520108000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/042185

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K38/00 G01N33/53		
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) A61K 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, BEILSTEIN Data.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YEHIELY F ET AL: "IDENTIFICATION OF CANDIDATE PROTEINS BINDING TO PRION PROTEIN" NEUROBIOLOGY OF DISEASE, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD, GB, vol. 3, no. 4, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 339-355, XP002041124 ISSN: 0969-9961 Materials & Methods.; page 352 - page 353	1-2, 4-5, 8-14, 18, 39
A	WO 2005/057166 A2 (ARETE ASSOCIATES [US]; ORSER CINDY [US]; GROSSET ANNE [US]; DAVIDSON E) 23 June 2005 (2005-06-23) claims ----- -/--	1-46
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 30 July 2009		Date of mailing of the international search report 05/08/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlean 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vogt, Titus

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/042185

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 2007/030804 A1 (NOVARTIS AG [CH]; PERETZ DAVID [US]; CONNOLLY MICHAEL D [US]; ZUCKERMA) 15 March 2007 (2007-03-15) claims -----	1-16
X,P	WO 2008/134034 A1 (UNIV YALE [US]; STRITTMATTER STEPHEN M [US]; LAUREN JUHA [US]; GIMBEL) 6 November 2008 (2008-11-06) claims -----	1-46
A	GAUCZYNSKI S ET AL: "Interaction of prion proteins with cell surface receptors, molecular chaperones, and other molecules." ADVANCES IN PROTEIN CHEMISTRY 2001, vol. 57, 2001, pages 229-272, XP009120551 ISSN: 0065-3233 V. Other PrP interacting molecules; page 251 - page 261 -----	1-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/042185

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005057166 A2	23-06-2005	AU 2004297579 A1	23-06-2005
		CA 2548812 A1	23-06-2005
		EP 1700096 A2	13-09-2006
		JP 2007536502 T	13-12-2007
		US 2005026165 A1	03-02-2005
		US 2008171341 A1	17-07-2008
WO 2007030804 A1	15-03-2007	AU 2006287299 A1	15-03-2007
		CA 2621767 A1	15-03-2007
		EP 1931695 A1	18-06-2008
		JP 2009507833 T	26-02-2009
		KR 20080048527 A	02-06-2008
WO 2008134034 A1	06-11-2008	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 G 0 1 N 33/543 5 0 1 H
 G 0 1 N 33/543 5 0 1 D

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, 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, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ワン, シューメイ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7

(72)発明者 ガオ, マン(キャロル)
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7

(72)発明者 ヤム, アリス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7

(72)発明者 ラウ, アンソニー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7

(72)発明者 ウー, ピン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2011520108A5	公开(公告)日	2013-04-25
申请号	JP2011507627	申请日	2009-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华公司		
[标]发明人	ペレッツデイビッド ワンシューメイ ガオマンキャロル ヤムアリス ラウアンソニー ウーピン		
发明人	ペレッツ, デイビッド ワン, シューメイ ガオ, マン(キャロル) ヤム, アリス ラウ, アンソニー ウー, ピン		
IPC分类号	G01N33/566 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2333/4709 G01N2800/2821		
FI分类号	G01N33/566 G01N33/53.U G01N33/53.D G01N33/543.511.N G01N33/543.501.N G01N33/543.501.H G01N33/543.501.D		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/049396 2008-04-30 US		
其他公开文献	JP2011520108A		

摘要(译)

条件本发明中，致病性构象特异性结合试剂于怀疑含有所述非朊病毒致病性构象的样品，以结合试剂如果存在于致病性构象在接触的步骤；如果样品中存在致病性构象异构体，则通过其与试剂的结合来检测致病性构象异构体的存在；，提供检测样品中非朊病毒致病性构象异构体存在的方法，其中致病性构象异构体特异性结合试剂通常来自朊病毒蛋白片段并与致病性朊病毒蛋白分离并优先互动。还提供了一种诊断构象疾病的方法。