

(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2006-510914

(P2006-510914A)

(43) 公表日 平成18年3月30日(2006.3.30)

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

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2004-563299 (P2004-563299)	(71) 出願人	505226644
(86) (22) 出願日	平成15年12月19日 (2003.12.19)		アジェンス フランセーズ ドゥ セキュ
(85) 翻訳文提出日	平成17年8月10日 (2005.8.10)		リテ サニタイル デ アリメント-アフ
(86) 国際出願番号	PCT/FR2003/003857		ザー
(87) 国際公開番号	W02004/059322		AGENCE FRANCAISE DE
(87) 国際公開日	平成16年7月15日 (2004.7.15)		SECURITE SANITAIRE
(31) 優先権主張番号	02/16383		DES ALIMENTS-AFSSA
(32) 優先日	平成14年12月20日 (2002.12.20)		-
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		フランス、メゾン-アルフォルト エフ-
			94701、アベニュー ドュ ジェネラル
			ルクラレク 27-31
			27-31, avenue du Gen
			eral Leclerc, f-9470
			1 Maisons-Alfort Fr
			ance
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 補助的大環状配位子を使用する P r P 検出方法

(57) 【要約】

本発明は、伝染性亜急性海綿状脳症の原因となるプリオンの病原性形状の検出方法であって、P r P^{s c} を含み得る生体試料中に、遊離又は担体に結合した補助的大環状配位子 (A M L) を添加し、次に結果として生じた懸濁液を抗 P r P^{s c} 抗体と反応させ、かつ P r P の存在を検出することを特徴とする方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

PrP^{Sc} を含み得る生体試料中に、遊離又は担体に結合した補助的大環状配位子 (AML) を添加し、次に結果として生じた懸濁液を抗 PrP^{Sc} 抗体と反応させ、かつ PrP の存在を検出することを特徴とする PrP 、及び特には PrP^{Sc} の検出方法。

【請求項 2】

AML との接触前又は接触後に、プロテイナーゼ K により試料を処理する補足ステップを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の PrP 、及び特には PrP^{Sc} の検出方法。

【請求項 3】

前記生体試料は、ヒトを含む動物に由来することを特徴とする請求項 1 又は 2 のいずれかに記載の PrP 、及び特には PrP^{Sc} の検出方法。 10

【請求項 4】

前記試料は、組織又は生物学的流体、特に頭脊柱液又は血清であることを特徴とする請求項 3 に記載の PrP 、及び特には PrP^{Sc} の検出方法。

【請求項 5】

前記固体担体は、好ましくは NHS 基又は NH_2 基によって官能化され、かつ好ましくは磁気ボール又はマイクロプレートであることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の PrP 、及び特には PrP^{Sc} の検出方法。

【請求項 6】

前記補助的大環状配位子は、 PrP^{Sc} の抗体との結合部位の空間内の近い又は隣接する部位で結合されることを特徴とする請求項 1 から 5 のいずれかに記載の PrP 、及び特には PrP^{Sc} の検出方法。 20

【請求項 7】

補助的大環状配位子は、メタシクロファン系、及び特にはカリックス - アレンから選択されることを特徴とする請求項 1 から 6 のいずれかに記載の PrP 、及び特には PrP^{Sc} の検出方法。

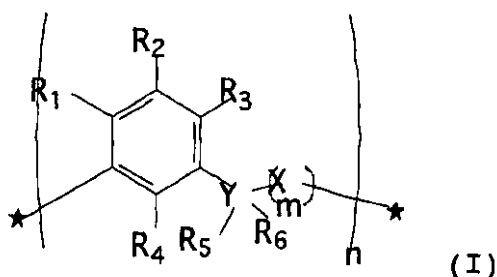
【請求項 8】

好ましいカリックス - アレンは、フェノール面上で官能化されたパラ - スルホナト - カリックス - アレン、好ましくは p - スルホナト - カリックス - [4] - アレン、p - スルホナト - カリックス - [6] - アレン、p - スルホナト - カリックス - [8] - アレン、又はそれらの誘導体の 1 種であることを特徴とする請求項 7 に記載の PrP 、及び特には PrP^{Sc} の検出方法。 30

【請求項 9】

補助的大環状配位子は、下記一般式 (I)

【化 1】



40

[式中、

R_1 は、水素原子、水酸基、 OR 基又は $OCOR$ 基を表し、 R は、以下に定義する通りであり、

R_2 は、水素原子、 R 、 COR 、 Pol 、 CH_2Pol 基 (式中、 Pol は、リン酸、硫酸、アミン、アンモニウム、カルボン酸基を表し、かつ R は、以下に定義する通りであ 50

る)を表し、

R_3 は、水素原子、水酸基、OR基又はOCOR基(式中、Rは、以下に定義する通りである)を表し、

R_4 は、水素原子、水酸基、OR基、 OCH_2R 基又はOCOR基(式中、Rは、以下に定義する通りである)を表し、

Yは、炭素、窒素原子又は硫黄原子であり、

R_5 及び R_6 は、各々別個に、不在であるか、又は水素原子、 CH_2 基又は以下に定義するようなRを表すか、又は

R_5 及び R_6 は、共に酸素又は硫黄原子を表し、

Xは、 CH_2 基、又は酸素若しくは硫黄原子を表し、

mは、0又は1に等しい整数を表し、

Rは、水素原子、又は飽和若しくは非飽和、分岐若しくは非分岐、環状若しくは非環状、ハロゲン基によって置換される又は置換されない、かつ極性又は非極性基を有する炭化水素鎖を表し、

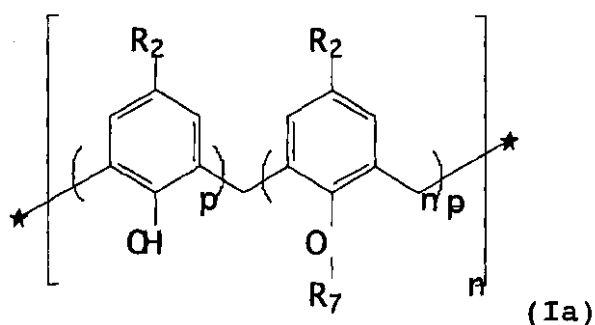
nは、3~15の整数であり、

置換基 R_1 から R_5 、R、X、Y及び整数mは、モチーフに応じて異なる性質であり得る]に対応することを特徴とする請求項7又は8のいずれかに記載のPrP、及び特にはPrP^{s.c}の検出方法。

【請求項10】

前記補助的大環状配位子は、下記一般式(Ia)

【化2】



[式中、

別個に解釈される各 R_2 基は、硫酸基又はリン酸基であり、

R_7 は、 $(CH_2)_r-Z$ 基(式中、Zは、COOEt、COOH、CN又は NH_2 基である)であり、

rは、1~20の整数であり、

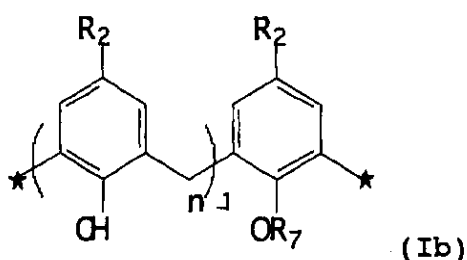
pは、1~10の整数であり、

nは、2~10の整数である]に対応することを特徴とする請求項9に記載のPrP、及び特にはPrP^{s.c}の検出方法。

【請求項11】

前記配位子は、下記一般式(Ib)

【化3】



10

20

30

40

50

[式中、

n は、4 ~ 8 の整数であり、

別個に解釈される各 R_2 基は、硫酸基又はリン酸基であり、

R_8 は、 $(CH_2)_t - (CO)_s - (NH_2)$ 基又は $(CH_2)_t - COOH$ 基 (式中、 t は、0 ~ 6 の整数であり、かつ s は、0 ~ 6 の整数である) を表す] に対応することを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記配位子は、式 (Ib) (式中、2 個の R_2 基は、各々硫酸基であり、 n は、4、6 又は 8 であり、かつ R_8 は、水素原子、 CH_2COOH 基、 CH_2CONH_2 基又は $CH_2CH_2NH_2$ 基である) カリックス-アレンであることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。 10

【請求項 13】

前記配位子は、2 個の R_2 基が、各々硫酸基であり、 n が、6 に等しい整数であり、かつ R_8 が、 $(CH_2)_2 - NH_2$ 基であるようになっていたことを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

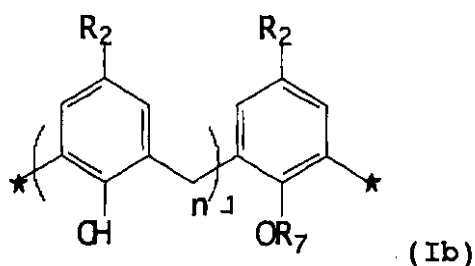
【請求項 14】

前記カリックスアレンが、特に NHS 又は NH_2 基によって官能化される担体に結合されることを特徴とする請求項 7 から 12 のいずれかに記載の PrP^{Sc} の検出方法。

【請求項 15】

配位子は、式 (Ib)

【化 4】



30

[式中、 n は、4 ~ 8 の整数であり、

別個に解釈される各 R_2 基は、硫酸基又はリン酸基であり、

R_8 は、 $(CH_2)_t - (CO)_s - (NH_2)$ 基又は $(CH_2)_t - COOH$ 基 (式中、 t は、0 ~ 6 の整数であり、かつ s は、0 ~ 6 の整数である) を表し、

かつ担体は、好ましくは NHS 基又は NH_2 基によって官能化される固体担体タイプであり、かつ好ましくは磁気ポール又はマイクロプレートである] に対応する、官能化した担体上にグラフトされる補助的大環状配位子。

【請求項 16】

生理的又は病原性、ウシ又はヒト又はその他の種の PrP^{Sc} 、組換え PrP^{Sc} 、 PrP^{Sc} を生体試料、特に生物学的流体中で検出するための組成物を製造するための補助的大環状配位子、及び特には遊離又は担体に結合した、請求項 9、10 及び 15 に定義するような、式 (I)、(Ia) 又は (Ib) の配位子の使用。 40

【請求項 17】

BSE、小型反芻動物の振戦病、クロイツフェルト・ヤコブタイプの、 PrP^{Sc} が原因となる疾患の診断キットであって、補助的大環状配位子、及び特には遊離又は担体に結合した、請求項 9、10 及び 15 に定義するような、式 (I)、(Ia) 又は (Ib) の配位子を含むことを特徴とするキット。

【請求項 18】

PrP^{Sc} の免疫学的定量キットであって、補助的大環状配位子、及び特には遊離又は 50

担体に結合した、請求項 9、10 及び 15 に定義するような、式 (I)、(Ia) 又は (Ib) の配位子を含むことを特徴とするキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、伝染性垂急性海綿状脳症の原因となるプリオンの病原性形状の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

PrP 又は細胞プリオン蛋白に関して PrP^C と示される天然又は正常プリオン蛋白は、哺乳動物のリンパ系及びニューロン細胞中で広く発現する糖タンパクである。 10

【0003】

PrP^C の構造変化は、プロテイナーゼ K に耐性を有する病原性 PrP^S 蛋白の出現及び増殖に至らせる。この病原性蛋白は、PrP^S 又は PrP^{Res} と区別なく呼ぶことができる。動物器官中に PrP^S が蓄積することは、多数の疾病、特に小型反芻動物の振戦病、大鹿及び羚羊の慢性消耗病 (又は chronic wasting disease 「CWD」)、ウシ海綿状脳症 (BSE) 及びヒトにおけるクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) の原因である。

【0004】

BSE に感染した家畜において、2～6 年の潜伏期後に遅発出現すること、及び症状発展が遅いことにより、疫学的モデルの発展は、著しく遅れた。BSE は、摂取によってヒトに伝染可能であり、かつクロイツフェルト・ヤコブ病の新規な形状 (vCJD) の出現に至らせた。 20

【0005】

病原性 PrP^S 蛋白の検出は、感染した健康な動物において、疾病の発展前には困難であり、かつ特に病気の動物において血液及び尿中では困難である。現在のところ、ヒトの食料用の動物において存在する PrP^S は、感染した組織の摂取時にヒトに伝染することが明らかである。従って公衆衛生の主要な目標は、

- ヒトの消費用の動物を食物連鎖から取り出すために、ヒトの消費用の動物において、
- ヒトにおける輸血用の献血及び血液製剤で。実際、脳発作の遙か以前の、かつそれ故に臨床的に宣言されるプリオンの疾患を想起させる神経徴候が現れる可能性の遙か以前の、血液及びリンパ液中の病原性 PrP^S 蛋白の存在が示すように、ヒトにおける生理病理学は、知られておらず、かつヒツジのように実験感染ができないので、血液及びその他の生物学的流体中の検出テストが無いことのため、それを研究すること、及びそれ故に献血によるヒト間伝染を予防すること、又は脳損傷が始まる前に感染者を治療することが可能にならない；かつ
- 屠殺場に到着する前に、感染した動物を早期に除去することを可能にする、神経段階以前に動物の群において PrP^S の存在を検出して、この伝染を回避することである。 30

【0006】

従って、生体試料又は動物における PrP^S の存在検出は、極めて重要になっており、幾つもの研究者チームが、免疫学的検出方法を発展させている (国際公開第 02/086511 号パンフレット)。その上、vCJD 治療のためにペプチド、小分子又は阻害物質の PrP^S での複合体生成方法が、活発な研究の対象となっている。しかしながら、先行技術の方法は、PrP^S が、生体試料中で、かつ特に生物学的流体中で少量である時、PrP^S を信頼に値するように同定するという困難な問題に絶えず遭う。 40

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

従って、本発明は、PrP 及び特に PrP^S 蛋白を、現在使用される方法を以っては検出可能でない希釈物で検出することを可能にする方法を対象とし、この検出は、発明者 50

がテストした 119 件の試料に対して 100% の信頼性である。好適には、本発明による方法は、PrP^sc 検出を因子 4 (facteur 4) だけ増幅することを可能にする。

【0008】

より正確には、本発明は、PrP を含み得る生体試料中に、遊離又は担体に結合した補助的大環状配位子 (AML) を添加し、次に結果として生じた懸濁液を抗 PrP 抗体と反応させ、次に PrP の存在を同定することを特徴とする PrP 及び特に PrP^sc の検出方法を対象とする。

【0009】

担体への大環状配位子の結合は、吸着又は共有結合によるような、当業者に公知であるように行われ得るが、別名グラフトと呼ばれる共有結合が好まれる。

【0010】

PrP^sc を検出することを試みる際に、本発明は、AML との接触前又は接触後に、プロテイナーゼ K により試料を処理する補足ステップを同様に含み得る。

【0011】

PrP の存在は、当業者に公知であるあらゆる方法、かつ特にサンドイッチ法、例えば ELISA、免疫プロット、免疫マイクロカンチレバー (immuno micro-cantilever) 検出、質量分析法又は光学及び分光分析によって、抗 PrP / PrP 抗体反応の検出により利用され得る。AML - PrP 複合体の同定は、走査型反射顕微鏡、近視野走査型顕微鏡、又は共焦点走査型顕微鏡のようなプロフィロメトリ走査技術 (techniques de balayage profilométrique) によって行われる。

【0012】

本発明の好ましい実施態様によれば、生体試料は、ヒトを含む動物に由来する。好ましくは、この試料は、脳、中枢神経系組織、又は器官及び特に脾臓又は腸に由来する。本発明の好ましい実施態様によれば、この試料は、生物学的流体、特に頭脊柱液又は血清である。

【0013】

大環状配位子とは、PrP、及び特に PrP^sc に結合されることが可能であり、かつマクロサイクルを形成する一連のサイクルからなる化合物を意味する。大環状配位子は、当業者に公知である。非限定的な例として、シクロファン、メタシクロファン、シクロデキストリン、シクロ (テトラ - クロモトローブ酸)、スフェランド及びシクロ [n] ベラトリレンを挙げることができる。

【0014】

好適には、補助的大環状配位子は、抗体との結合部位の空間内の近い又は隣接する部位で結合されることが可能であり、かつ PrP^sc 抗体結合を増加させることを作用とする。

【0015】

好適には、補助的大環状配位子は、メタシクロファン系から選択される。メタシクロファンの中では、フェノール面上で官能化されたパラ - スルホナト - カリックス - アレンが特に好適である。これらの化合物は、Da Silva et al., J. Supramol. Chem. 1, (2001)、135 - 138 に記載された方法論に従って得ることができる。

【0016】

好適には、補助的大環状配位子は、下記一般式 (I)

【0017】

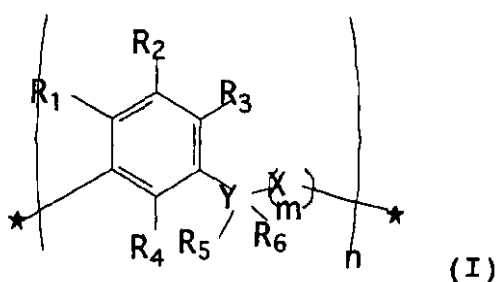
10

20

30

40

【化5】



10

【0018】

[式中、

R_1 は、水素原子、水酸基、OR基又はOCOR基を表し、Rは、以下に定義する通りであり、

R_2 は、水素原子、R、COR、Pol、 CH_2 Pol基(式中、Polは、リン酸、硫酸、アミン、アンモニウム、カルボン酸基を表し、かつRは、以下に定義する通りである)を表し、

R_3 は、水素原子、水酸基、OR基又はOCOR基(式中、Rは、以下に定義する通りである)を表し、

20

R_4 は、水素原子、水酸基、OR基、 OCH_2R 基又はOCOR基(式中、Rは、以下に定義する通りである)を表し、

Yは、炭素、窒素原子又は硫黄原子であり、

R_5 及び R_6 は、各々別個に、不在であるか、又は水素原子、 CH_2 基又は以下に定義する通りのRを表すか、又は

R_5 及び R_6 は、共に酸素又は硫黄原子を表し、

Xは、 CH_2 基、又は酸素若しくは硫黄原子を表し、

mは、0又は1に等しい整数を表し、

Rは、水素原子、又は飽和若しくは非飽和、分岐若しくは非分岐、環状若しくは非環状、ハロゲン基によって置換される又は置換されない、かつ極性又は非極性基を有する炭化水素鎖を表し、

30

nは、3~15の整数であり、

置換基 R_1 から R_5 、R、X、Y及び整数mは、モチーフに応じて異なる性質であり得る]に対応する。

【0019】

このように、式(I)の化合物は、1個のベンゼン環の存在を特徴とする一連のnのモチーフの形状を呈し、かつこの環の置換基は、上記定義の限度内で、モチーフによって可変であり得る。

【0020】

大環状配位子は、当業者に公知の、例えばComprehensive Supramolecular Chemistry、Pergamon、Oxford、1996に記載された技術により調製され得る。

40

【0021】

飽和若しくは非飽和、分岐若しくは非分岐、環状若しくは非環状、ハロゲン基によって置換される又は置換されない、かつ極性又は非極性基を有する炭化水素鎖は、当業者に広く知られている。例として、アルキル、アルケン、アリール、及びシクロヘキサンのような飽和環を挙げることができる。非極性基の一例は、 CF_3 であり、極性基の例は、上記に定義したような置換基Polである。

【0022】

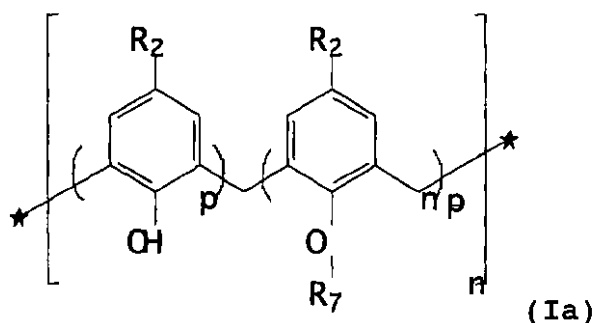
本発明の特殊な実施態様によれば、補助的大環状配位子は、上記一般式(I)に、かつ

50

更に正確には下記一般式 (I a)

【 0 0 2 3 】

【 化 6 】



10

【 0 0 2 4 】

[式中、

別個に解釈される各 R_2 基は、硫酸基又はリン酸基であり、

R_7 は、 $(CH_2)_r - Z$ 基 (式中、 Z は、 $COOEt$ 、 $COOH$ 、 CN 又は NH_2 基である) であり、

r は、1 ~ 20 の整数であり、

p は、1 ~ 10 の整数であり、

n は、2 ~ 10 の整数である] に対応する。

20

【 0 0 2 5 】

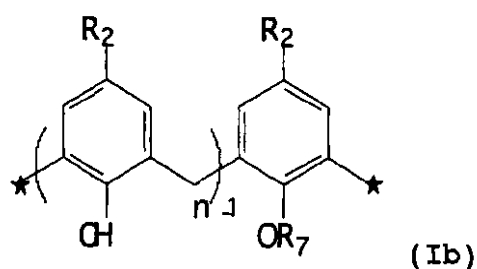
本発明の好ましい実施態様によれば、補助的大環状配位子は、 p -スルホナト-カリックス-[4]-アレン、 p -スルホナト-カリックス-[6]-アレン、 p -スルホナト-カリックス-[8]-アレン、又はそれらの誘導体の1種である。

【 0 0 2 6 】

本発明の第2の実施態様によれば、補助的大環状配位子は、上記一般式 (I) に、かつ更に正確には下記一般式 (I b)

【 0 0 2 7 】

【 化 7 】



30

【 0 0 2 8 】

[式中、 n は、4 ~ 8 の整数であり、

別個に解釈される各 R_2 基は、硫酸基又はリン酸基であり、

R_8 は、 $(CH_2)_t - (CO)_s - (NH_2)$ 基又は $(CH_2)_t - COOH$ 基 (式中、 t は、0 ~ 6 の整数であり、かつ s は、0 ~ 6 の整数である) を表す] に対応する。

【 0 0 2 9 】

好適には、式 (I b) のカリックス-アレンは、2個の R_2 基が、各々硫酸基であり、 n が、4、6 又は 8 であり、かつ R_8 が、水素原子、 CH_2COOH 基、 CH_2CONH_2 基又は $CH_2CH_2NH_2$ 基であるようになっている。

【 0 0 3 0 】

好ましくは、式 (I b) のカリックス-アレンは、2個の R_2 基が、各々硫酸基であり

50

、 n が、6に等しい整数であり、かつ R_7 が、 $(CH_2)_2-NH_2$ 基であるようになっている。

【0031】

本発明の特殊な実施態様によれば、本発明の配位子は、固体担体上にグラフトされる。この担体は、配位子によって担持される官能基との結合を形成する可能性がある官能基によって官能化される。好ましい実施態様によれば、固体担体は、 NHS (N -ヒドロキシスクシンイミド)結合又は NH_2 基によって官能化される。この官能基は、配位子上に担持される官能基と反応し得る。この実施態様において、固体担体の官能基結合との結合を形成するために反応する可能性がある官能基を担持するカリックス-アレン、特に NH_2 又は $COOH$ 結合を担持するカリックス-アレンが、特に好ましい。

10

【0032】

本発明は、配位子が、上記に定義したような式(Ib)(式中、 n は、4~8の整数である)に対応し、かつ担体が、好ましくは NHS 基又は NH_2 基によって官能化される固体担体タイプであり、かつ好ましくは磁気ボール又はマイクロプレートである、官能化した担体上にグラフトされる補助的大環状配位子も同様に対象とする。かかるグラフトは、蛋白及び配位子間の後続の相互作用、並びに抗PrP抗体による検出用のエピトープ(epitope)の立体化学的外観を保護し、担体上でグラフトによる標的となる部位は、PrPとの相互作用に役立つ部位と異なる。

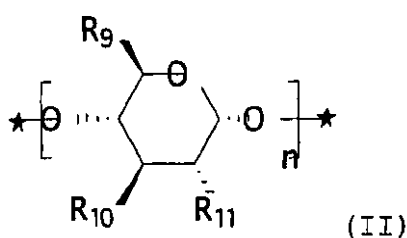
【0033】

本発明のもう一つの実施態様によれば、前記補助的大環状配位子は、シクロデキストリン系、及び特には一般式(II)

20

【0034】

【化8】



30

【0035】

(式中、

R_9 は、水素原子、又は CH_2 、 OH 、 OR 、 $OCOR$ 、 COR 、 CH_2Pol 、 OCH_2R 、 SR 、 NR 基を表し、 Pol 及び R は、以下に定義し、

R_{10} 及び R_{11} は、各々別個に、水素原子、又は CH_2 、 OH 、 OR 、 $OCOR$ 、 COR 、 CH_2Pol 、 OCH_2R 基を表し、 Pol 及び R は、以下に定義し、

Pol は、リン酸、硫酸、アミン、アンモニウム、又はカルボン酸基を表し、

R は、飽和若しくは非飽和、分岐若しくは非分岐、環状若しくは非環状、ハロゲン基によって置換される又は置換されない、かつ極性又は非極性基を有する炭化水素鎖を表し、
 n は、6~8の整数であり、

40

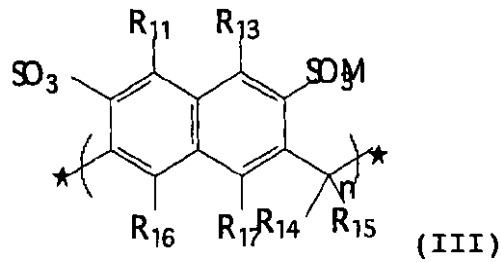
置換基 R_9 から R_{11} は、モチーフに応じて異なる性質であり得る)に対応するシクロデキストリン系から選択される。このように、式(II)の化合物は、1個の環の存在を特徴とする一連の n のモチーフの形状を呈し、かつこの環の置換基は、上記定義の限度内で、モチーフによって可変であり得る。

【0036】

本発明の実施応用例によれば、前記補助的大環状配位子は、シクロ-テトラ-クロモトロープ酸系、及び特には一般式(III)

【0037】

【化9】



10

【0038】

(式中、

R_{12} 及び R_{13} は、各々別個に、水素原子、又は以下に定義するような R 若しくは Pol 基を表し、

R_{14} 及び R_{15} は、各々別個に、水素原子、 CH_2 基、又は以下に定義するような R 基を表すか、又は

R_{14} 及び R_{15} は、共に酸素又は硫黄原子を表し、

R_{16} 及び R_{17} は、各々別個に、水素原子、又は水酸基、又は OR、 OCH_2R 、OCOR、SR、 SCH_2R 、SCOR 基を表し、R は、以下に定義する通りであり、

M は、水素原子、又は Na、K、Li、Cs、Rb、Mg 及び Ca から選択される原子を表し、

20

Pol は、リン酸、硫酸、アミン、アンモニウム、又はカルボン酸基を表し、

R は、飽和若しくは非飽和、分岐若しくは非分岐、環状若しくは非環状、ハロゲン基によって置換される又は置換されない、かつ極性又は非極性基を有する炭化水素鎖を表し、

n は、3 ~ 15 の整数であり、

置換基 R_{12} から R_{17} 、M、Pol、及び R は、モチーフに応じて異なる性質であり得る) に対応するシクロ-テトラ-クロモトローブ酸系から選択される。このように、式 (III) の化合物は、1 個の環の存在を特徴とする一連の n のモチーフの形状を呈し、かつこの環の置換基は、上記定義の限度内で、モチーフによって可変であり得る。

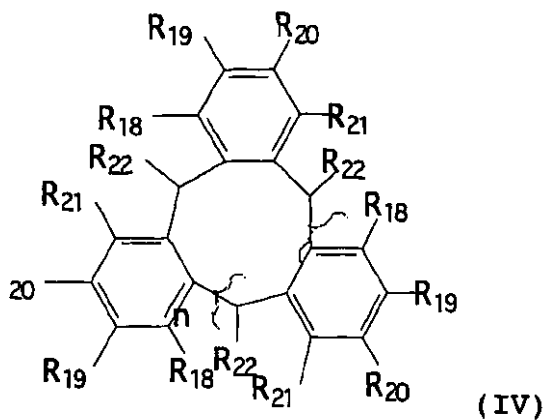
【0039】

30

本発明のもう一つの実施態様によれば、前記補助的大環状配位子は、一般式 (IV)

【0040】

【化10】



40

【0041】

(式中、

R_{18} は、水素原子、又は CH_2 、OH、OR、OCOR、COR、 CH_2Pol 、 OCH_2R 、SR、NR 基を表し、Pol 及び R は、以下に定義し、

50

R_{19} 、 R_{20} 、 R_{21} 及び R_{22} は、各々別個に、水素原子、又は CH_2 、 OH 、 O 、 R 、 $OCOR$ 、 COR 、 CH_2Pol 、 OCH_2R 基を表し、 Pol 及び R は、以下に定義し、

Pol は、リン酸、硫酸、アミン、アンモニウム、又はカルボン酸基を表し、

R は、飽和若しくは非飽和、分岐若しくは非分岐、環状若しくは非環状、ハロゲン基によって置換される又は置換されない、かつ極性又は非極性基を有する炭化水素鎖を表し、

n は、1 ~ 10 の整数であり、

置換基 R_{18} から R_{22} 、 R 、 Pol 、及び R は、モチーフに応じて異なる性質であり得る) に対応するシクロ[n]ペラトリレン系から選択される。このように、式(IV)の化合物は、1個の環の存在を特徴とする一連の n のモチーフの形状を呈し、かつこの環の置換基は、上記定義の限度内で、モチーフによって可変であり得る。

10

【0042】

本発明のもう一つの対象は、生体試料中でプリオン PrP^{Sc} を検出するための補助的大環状配位子 (AML)、及び特には遊離又は担体に結合した上記式(I)、(Ia)又は(Ib)の配位子の使用にある。

【0043】

本発明は、BSE、小型反芻動物の振戦病、クロイツフェルト・ヤコブタイプの、 PrP^{Sc} が原因となる疾患の診断キットであって、補助的大環状配位子、及び特には遊離又は担体に結合した上記式(I)、(Ia)又は(Ib)の配位子の使用を含むことを特徴とするキットも同様に対象とする。

20

【0044】

本発明は、 PrP^{Sc} の免疫学的定量キットであって、補助的大環状配位子、及び特には遊離又は担体に結合した上記式(I)、(Ia)又は(Ib)の配位子の使用を含むことを特徴とするキットも同様に対象とする。

【0045】

本発明のその他の利点及び特性は、生体試料が、遊離又はグラフトした補助的大環状配位子の存在下に置かれる際の、 PrP^{Sc} の検出増幅に関する、以下に続く実施例を読めば、現れるであろう。

【0046】

これらの実施例において、添付図面を参照する。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0047】

実施例1：補助的大環状配位子の調製

【0048】

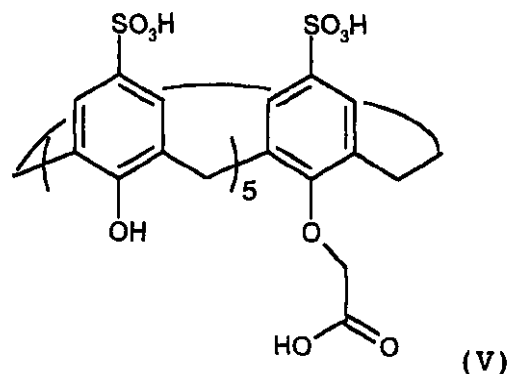
1.1 p-スルホナト-3,7-(2-カルボキシ-メトキシ)-カリックス-[6]-アレン(AML1と名付ける)の調製

【0049】

この補助的大環状配位子AML1は、一般式(V)を有する：

【0050】

【化 1 1】



10

【0051】

この配位子は、次のように合成する：1当量の塩基 (K_2CO_3) の存在下でのアセトニトリル中のカリックス[6]アレンの懸濁液を、還流で攪拌する。30分後、0.5当量のアルキル化剤 (プロモ酢酸エチル) を、還流で、かつ攪拌して24時間維持する反応混合物中に添加する。懸濁液の冷却後、溶剤を減圧下で蒸発させ、かつ結果として生じた固体を、200 mL の CH_2Cl_2 中に溶解し、かつ塩酸溶液 (1 M) により2回、かつ脱塩水により1回洗浄する。硫酸マグネシウム ($MgSO_4$) 上で乾燥させた後、有機溶剤を減圧下で蒸発させ、かつ白色粉末を得ることが可能になる。それを、シリカクロマトグラフカラム上で精製する (溶出剤: CH_2Cl_2 :ヘキサン; 4:1)。精製した生成物を、 1H 、 ^{13}C の NMR 及びエレクトロスプレー質量分析で分析する。カルボン酸エステルの鹸化は、24時間、周囲温度で攪拌して、水:エタノール (30:70) 混合物中で、溶解水酸化カリウムによって行う。形成された沈殿物を濾過し、次に50 mL の塩酸 (1 M) 及び50 mL の水で洗浄し、次にシリカクロマトグラフカラム上で精製し (溶出剤 クロロホルム:メタノール:酢酸; 95:5:0.1%)、かつ溶剤の蒸発後に白色かつ結晶質の固体を得ることが可能になる。この生成物を、 1H 、 ^{13}C の NMR 及びエレクトロスプレー質量分析で分析する。スルホン化は、24時間、50 で硫酸を用いた処理によって行われる。生成物を、エーテルにより沈殿させ、かつ白色の結晶質粉末の形状で AML 1 を得ることが可能になる。

20

30

【0052】

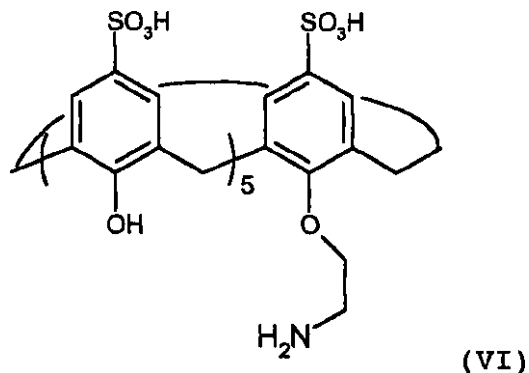
1.2 p-スルホナト-3,7-(2-アミノ-エチルオキシ)-カリックス-[6] - アレン (C6S と名付ける) の調製

【0053】

この補助的大環状配位子 C6S は、一般式 (VI) を有する：

【0054】

【化 1 2】



40

【0055】

この配位子は、Eric Da Silva 及び Anthony W. Coleman

50

、Synthesis and complexation properties towards amino acids of mono-substituted p-sulphonato-calix-[n]-arene、Tetrahedron 59 (2003) 7357-7364に記載された方法により調製される。

【0056】

1.3 プレート及びボール上の配位子C6Sのグラフト

【0057】

この配位子は、活性化表面を担持する固体担体（ボール又はプレート）と結合する。

【0058】

プレート上のグラフト：

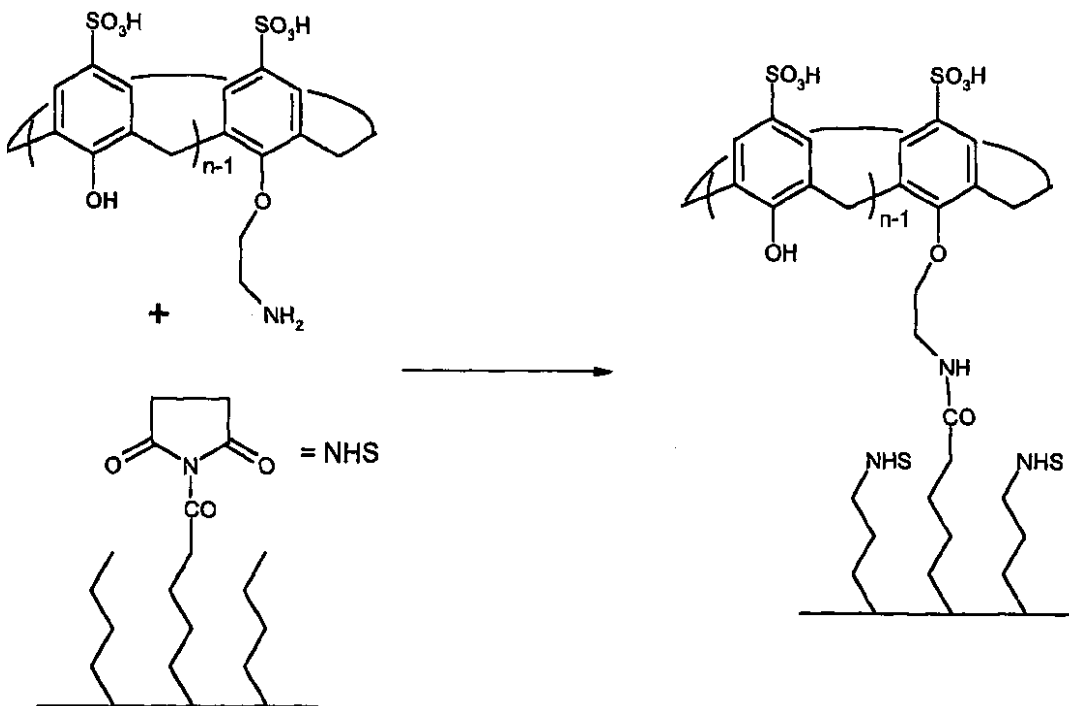
96ウェルのプレート「NHS活性化プレート」は、Covialab社（フランス、リヨン）に由来する。100 μ Lの配位子溶液を、リン酸緩衝液50mM、pH8.2中で様々な濃度で溶解させる。ウェルは、37 $^{\circ}$ Cでの2時間のインキュベーション後、MilliQ水で3回（3 \times 200 μ L）洗浄する。プレートは、その使用前に周囲温度で乾燥させる。

【0059】

グラフトの概要：

【0060】

【化13】



【0061】

幾つかのプレートが様々な配位子C6S濃度で作られた。これらのプレートは、明細書全体で「プレートC6S」と定義する。

【0062】

ボール上のグラフト：

4 mLの活性化NHSボール溶液（2 \times 10⁹ ボール/mL；Dynabeads（登録商標）M270 Amine、DynaLs社、ノルウェー）を、1 mLの管で分取する。ボールを遠心分離し、かつ磁化によって沈殿させる。上清を取り除き、かつボールを1 mLの水で3回洗浄する。ボールの残渣を、リン酸緩衝液50mM、pH8.2中で様々

10

20

30

40

50

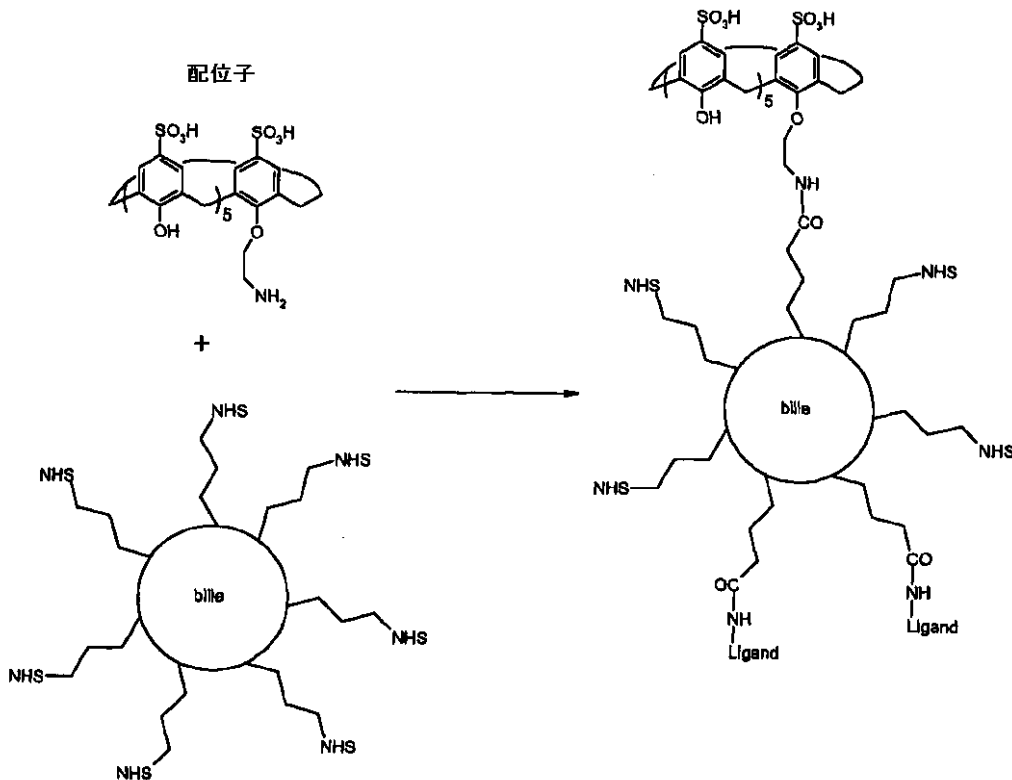
な量のカリックスアレン溶液により取る。50 mg/mL (リン酸緩衝液 50 mM、pH 8.2) での 600 μ L、120 μ L、60 μ L、及び 12 μ L の配位子溶液を添加する。ボールを、周囲温度で 24 時間、攪拌する。反応しなかった配位子を除去するために、ボールを MilliQ 18 水で 3 回洗浄する。2 \times 10⁹ ボール/mL の最初の濃度を復元するために、ボールを、1 mL の水中に保存する。ボールの溶液は、すぐに使用できる。これらのボールは、明細書全体で「ボール C6S」と定義する。

【0063】

ボール上の C6S のグラフトの概略：

【0064】

【化14】



10

20

30

【0065】

1.4 改質鉱物表面上の AML1 のグラフト

【0066】

1 mL の 3 - アミノプロピルトリ - メトキシシラン (ABC R 社) を、5 分間、50 mL の溶液 (95% のエタノール及び 5% の H₂O) 中で溶解させる。シリコンプレートを攪拌して 4 分間、この溶液中に浸す。シリコンプレートをエタノールですすぎ、次にプレートを 15 分間、130 で乾燥させる。結合剤 (DCC/HOBT) を使用して、DMSO 中の 10 μ L の溶解 AML1、0.1 M を、改質シリコンプレート上に結合した。試料は、23 で 12 時間、乾燥させた。

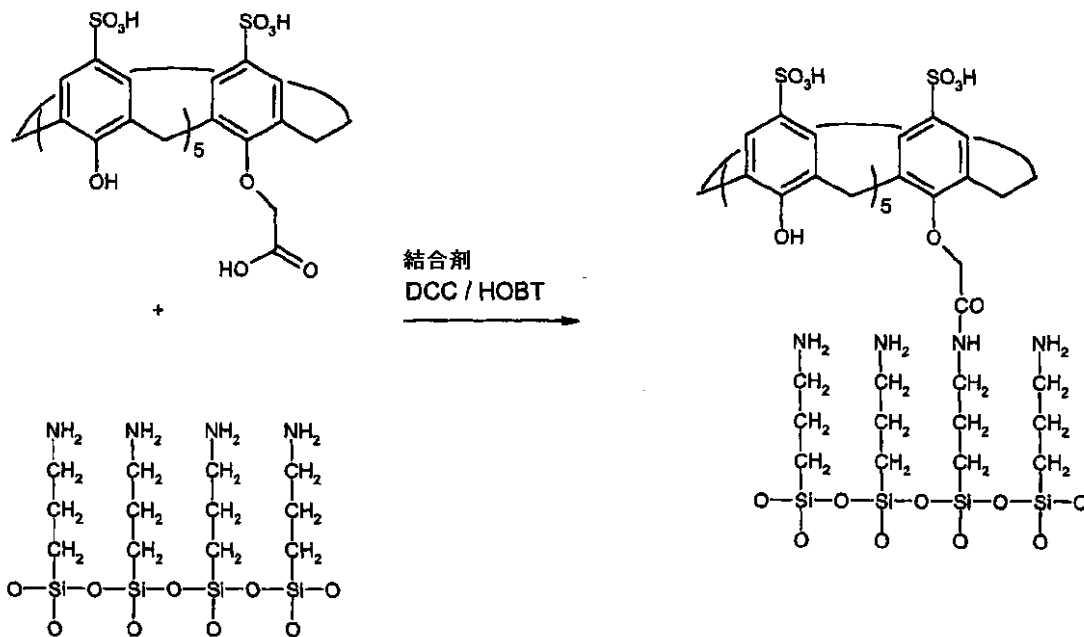
40

【0067】

結合の概要：

【0068】

【化 15】



10

20

【0069】

実施例 2：固体担体に結合されない AML 1 を使用した、P r P の検出

【0070】

2.1 試料の調製

【0071】

図 1 及び 2 の実施例の実施に役立った試料は、次のように調製した：

【0072】

AML 無しの試料：10 重量% / 容量で懸濁液を得るために、0.5 g の脳組織を 4.5 mL のブドウ糖溶液 5% 中で破碎する。(10 mg の脳に等しい) 5% のブドウ糖中の 100 μl の 10% の脳ホモジェネートに関して、10 μl 中の 1 μg のプロテイナーゼ K (Boehringer) を添加する。溶液は、渦巻き状にし、かつもう 1 時間、37 でインキュベートする。100 μl の Laemmli の変性緩衝液を添加した後、100 で 5 分間、加熱し、5 分間 12000 G で遠心分離し、かつ上清を SDS PAGE に対し遊走させるために回収する。

30

【0073】

AML 有りの試料：10 重量% / 容量で懸濁液を得るために、0.5 g の脳組織を 4.5 mL のブドウ糖溶液 5% 中で破碎する。(10 mg の脳に等しい) 5% のブドウ糖中の 100 μl の 10% の脳ホモジェネートに関して、1 μl の AML、0.1 M を添加する。37 で 1 時間後、10 μl 中の 1.5 μg のプロテイナーゼ K (Boehringer) を添加する。溶液は、渦巻き状にし、かつもう 1 時間、37 でインキュベートする。100 μl の Laemmli の変性緩衝液を添加した後、100 で 5 分間、加熱し、5 分間 12000 G で遠心分離し、かつ上清を SDS PAGE に対し遊走させるために回収する。

40

【0074】

2.2 免疫プロットによる検出方法

【0075】

Laemmli、Nature 227 (1970)、680 - 685 で記載されたように、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS PAGE) の存在下で 15% のポリアクリルアミドの一次元電気泳動ゲルに対する遊走後、蛋白は、ニトロセルロース膜上に電気泳動に

50

よって転移し、かつアミノ酸126-160からなる特異エピトープを認識するモノクローナル抗体により、60分間、周囲温度で免疫ブロットされる。二次抗体(1/5000)は、西洋ワサビペルオキシダーゼ(IgG H+L)と結合したマウスの免疫グロブリンの重及び軽鎖に向けられるヤギ抗体である。

【0076】

ブロットは次に洗浄され、かつ信号が、フィルム(Biomex light、Kodak)上にECLキット(Amersham)によるか、super Signal Ultra(Pierce)、及びFluor S.Multimager(BioRad)上の視覚化による化学発光で検出される。

【0077】

図1は、AML1の無い同じ蛋白の検出と比較して、本発明の方法が実施される際にプリオンの検出が少なくとも4倍に増幅されることを示す比較例である。AML1が無い場合、1/8を超える希釈に関していかなるPrP^{Sc}も検出されない。AMLの存在下で、同じ試料中のPrP^{Sc}検出は、1/32の希釈まで可能である。図2の結果は、検出を示す。

【0078】

2.3 顕微鏡検査の結果

【0079】

図3及び4で報告した走査型プローブ顕微鏡での実験に供した試料は、次のように調製した：

【0080】

補助的大環状配位子のみを含む試料：補助的大環状配位子(50mM)を含む試料を、新たに分割した雲母上のそれぞれ10 μ lのAML溶液及び10 μ lの水の沈殿によって調製し、かつ37 $^{\circ}$ Cで24時間の乾燥させる。

【0081】

組換えPrP蛋白(recPrP)のみを含む試料：recPrP(50mM)を含む試料を、新たに切断した雲母上のそれぞれ1/10(v/v)のAML1/recPrP、1/100(v/v)のAML1/recPrP、及び1/1000(v/v)のAML1/recPrPの10 μ lの溶液及び10 μ lの水の沈殿によって調製し、かつ37 $^{\circ}$ Cで24時間の乾燥させる。

【0082】

補助的大環状配位子及びrecPrPを同時に含む試料：1)補助的大環状配位子及びrecPrPを同時に含む試料は、新たに分割した雲母上のそれぞれ1 μ lのAML溶液及び1000 μ lのrecPrPの沈殿によって調製し、かつ37 $^{\circ}$ Cで24時間の乾燥させる；2)補助的大環状配位子(AML1)及びrecPrPを同時に含む試料は、新たに切断した雲母上のそれぞれ1 μ lのAML溶液及び100 μ lのrecPrPの沈殿によって調製し、かつ37 $^{\circ}$ Cで24時間の乾燥させる；3)補助的大環状配位子及びrecPrPを同時に含む試料は、新たに切断した雲母上のそれぞれ1 μ lのAML溶液及び10 μ lのrecPrPの沈殿によって調製し、かつ37 $^{\circ}$ Cで24時間の乾燥させる。

【0083】

非接触モードで、三脚スキャナ100 μ mを備えた、1Hzの走査周波数のシリコンプローブを有する、高い共振周波数($F_0 = 320$ kHz)のピラミッド型カンチレバーを使用するThermomicroscope Explorer AFMを用いた映像技術による分析を行う。映像処理は、ソフトウェアSPMLab 5.1によって行い、かつフィルタをかけずに示す。

【0084】

図3及び4から、recPrPの映像のみが、特徴を示す円形凝集体の構造を示しているということになる。AMLの存在下で、recPrPに関して観察した構造は、順次改質され、AML量の増加関数であり、かつ丸いモチーフ及び場合により直交結晶子を示す。補助的大環状配位子のみ(AML1)の画像は、recPrP-AMLのフィルムのモ

10

20

30

40

50

チーフと似通っているが、より小さい構造を示す。

【 0 0 8 5 】

その他の実験が、原子間力顕微鏡によって行われた。

【 0 0 8 6 】

粗度の表面分析による後続の分析を、表 I に示す。これらの粗度測定の使用は、プロファイロメトリ分析技術に広げられ得る。

【 0 0 8 7 】

【 表 1 】

	AMLのみ	AML/recPrP 1/1000	AML/recPrP 1/100	AML/recPrP 1/10	recPrPのみ
Ra (nm)	48	69.6	123.9	134.4	1.11
RMS (nm)	58.7	82.8	149	163.1	1.95
平均高さ	217.7	233.3	408.7	469.8	5.4
高さ最大値	448.9	484.3	894.66	1056.9	43.17

10

【 0 0 8 8 】

【 数 1 】

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |z_i - \bar{z}|$$

20

【 0 0 8 9 】

【 数 2 】

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (z_i - \bar{z})^2}$$

30

【 0 0 9 0 】

【 数 3 】

$$Avg Height = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z_i$$

【 0 0 9 1 】

計算した粗度値は、Thermomicroscope SPML 5.01のソフトウェアによって得られる。平均粗度 Ra は、高さ偏差の算術平均として定義され(式 A)、粗度二乗平均 (root mean square roughness RMS) は、画像の平均値への点からの距離の二乗の平均値の平方根(式 B)及び試料の平均高さ(式 C)として定義される。

40

【 0 0 9 2 】

実施例 3 : 固体担体にグラフトされた C 6 S を使用した、組換え PrP の検出

【 0 0 9 3 】

3.1 プレート上のウシ組換え PrP の検出

【 0 0 9 4 】

50

a) 手順

この実験で使用する手順は、従来のELISAにおいて行われる手順を真似る。

【0095】

実施例1により、活性化アミンプレート(NHS)のグラフトは、PBS溶液50mM(リン酸緩衝食塩水)中で希釈された、広い段階のスルホン化カリックス-6-アレン(C6S)により6時間、行われる。次にPBST(PBS Tween)溶液(0.05%、乳5%)によって飽和する前に、プレートを周囲温度で1時間蒸留水ですすぐ。すすぎ後、PBST0.05%中で0.25 μ g/mlの濃度で希釈されたウシ組換えプリオン蛋白(PrP)が沈殿する。それを周囲温度で1時間インキュベートする。プレートを、再び3回すすぐ。次にそれをPBST0.05%中で0.5 μ g/mlの濃度で希釈されたペルオキシダーゼでマークされる抗PrP抗体溶液によって周囲温度で1時間インキュベートする。使用する抗体は、ヒトPrPのアミノ酸145-154によって定義される領域、及び動物PrPの相同的領域を認識する(AC23)。最後に、新規なサイクルのすすぎの後、顕色剤(revelateur)、光を避けて周囲温度で10分間インキュベートしたOPD(オルト-フェニレンジアミン)溶液を添加する。反応は、H₂SO₄溶液を用いて停止させる。得られた信号の読み取りは、495nmの分光光度計を用いて行う。

10

【0096】

b) 結果

結果は、縦座標で測定された光学濃度値(DO)が、C6Sによって捕獲され、かつ洗浄後に引っ掛かったままであるPrP量を反映することを示す図5に示す。様々なグラフトに関して得られた信号は、ウシ組換えPrPが、C6Sによって大いに捕獲されることを示す。ウシ組換えPrPは、NHSプレート上にグラフトされたC6Sに固定される。

20

【0097】

3.2 ボール上のヒト組換えPrPの検出

【0098】

a) 実験条件:

実施例1により、NHSボールを、C6Sのボール上へのグラフトのために、蒸留水中で希釈されたC6S溶液と最初に接触させる。この期間後、ボールを蒸留水で、次にPBST0.05%で洗浄する。PBST0.05%中で、0.25 μ g/mlに定量したヒト組換えPrP溶液を、並行して調製する。次に100 μ lのPrP溶液に対して、それぞれ:0;0.1;1;5及び10 μ lのボール溶液の添加によって、広い段階のC6Sボールを製作する。インキュベーションは、37で1時間続き、次にボールを磁化により上清から分離する。ボールに固定されたPrPは、ELISA法に近いサンドイッチ法によりマークされる抗体を用いて直接定量する。

30

【0099】

ペルオキシダーゼでマークされる顕色抗体を、PBST溶液0.05%によるボールの洗浄後、37で1時間インキュベートする。再び洗浄され、次に10分間インキュベートされるOPD溶液によって顕色される前に、ボールを磁化により上清から分離する。反応は、H₂SO₄溶液を用いて停止させる。用いた顕色抗体は、8D11G12(bio Merieux、フランス)である。

40

【0100】

得られた信号の読み取りは、495nmの分光光度計を用いて行う。

【0101】

b) 結果

ボール上の顕色結果は、図6に示し、かつC6Sが、NHS担体上で官能基が損失せず、正確にグラフトされ、様々な種の組換えPrPの捕獲特性をとりわけ保っており、かつこの蛋白の特異抗体によって得られる信号を再現可能に増幅しさえすることを示している。

【0102】

50

実施例 4 : 固体担体にグラフトされる C 6 S を使用した、生理的 P r P の検出

【 0 1 0 3 】

4 . 1 ボール上のヒト血清

【 0 1 0 4 】

a) 手順 :

実施例 1 により、N H S ボールを、グラフトのために、蒸留水中で希釈された C 6 S 溶液と最初に接触させる。この期間後、ボールを蒸留水で、次に P B S T 0 . 0 5 % で洗浄する。

【 0 1 0 5 】

広い段階の血清を、P B S 中の希釈によって調製する。並行して P B S 中の 0 . 2 5 μ g / m l に定量したヒト組換え P r P 溶液を、並びに P B S T 溶液 0 . 0 5 %、乳 5 % を調製し、それらはそれぞれ陽性及び陰性対照の役を果たす。

【 0 1 0 6 】

ボールを、2 5 0 μ l の試料に対して $2 \times 1 0^9$ ボール / m l の 5 μ l の溶液の割合で添加する。インキュベーションは、攪拌して、3 7 $^{\circ}$ C で 1 時間続く。次にボールを磁化により上清から分離する。ボールに固定された P r P は、マークされる抗体を用いて直接定量する。

【 0 1 0 7 】

ボール上の顕色は、E L I S A に近い手順を使用する。ペルオキシダーゼでマークされる顕色抗体を、P B S T 溶液 0 . 0 5 % によるボールのすすぎ後、3 7 $^{\circ}$ C で 1 時間、かつ軽く攪拌してインキュベートする。再び洗浄され、次に 1 0 分間インキュベートされる O P D 溶液によって顕色される前に、ボールを磁化により上清から分離する。反応は、 H_2SO_4 溶液を用いて停止させる。用いた顕色抗体は、8 D 1 1 G 1 2 である。

【 0 1 0 8 】

得られた信号の読み取りは、4 9 5 n m の分光光度計を用いて行う。

【 0 1 0 9 】

b) 結果

結果を図 7 に示すが、図 7 は以下のことを明らかにしている :

- 乳中の陰性対照が、ノイズを算定することを可能にし、他方で P r P 溶液 0 . 2 5 μ g / m l 中の陽性対照が、実験が機能したこと及び解釈可能であることを確認することを可能にしている。

- N H S ボール上にグラフトされる C 6 S は、ヒト血清中に存在する生理的 P r P を捕獲する。更に、血清の希釈が、希釈に関して 1 / 5 及び 1 / 1 0 に達する飽和トレイによって増大する時に、捕獲は、更に良好である。

【 0 1 1 0 】

c) 結論

驚くべきことに、N H S ボール上にグラフトされる C 6 S は、ヒト血清中に存在する生理的 P r P を捕獲する。血清の希釈は、ボール上で得られる信号を増大させることを可能にする。

【 0 1 1 1 】

4 . 2 プレート上のヒト頭脊柱液 (L C R)

【 0 1 1 2 】

a) 実験条件 :

L C R 試料を、最初に等しい容量の管に配分する。2 つの希釈点 : 純粋及び 2 / 1 が、各試料に関して作られる。次にそれらに、3 つのタイプの熱処理を受けさせる : 5 6 $^{\circ}$ C で 3 0 分間、7 5 $^{\circ}$ C で 1 5 分間又は 9 5 $^{\circ}$ C で 5 分間である。加熱をしない対照が、純粋な試料に関して並行して作られた。

【 0 1 1 3 】

実施例 1 により、並行して N H S プレートに、グラフトのために、P B S 溶液 5 0 m M 中で希釈された C 6 S 溶液と 6 時間、接触させる。

10

20

30

40

50

【0114】

次に、プレートを蒸留水で、次にP B S T 0 . 0 5 %ですすぐ。

【0115】

試料を、次に沈殿させ、かつ2 ~ 8 で一晩インキュベートする。次にプレートを6回すすぐ。次にそれを、周囲温度で1時間、P B S T 0 . 0 5 %中で、0 . 5 μ g / mlに希釈されるビオチンでマークされる抗P r P抗体溶液によりインキュベートする。使用する抗体は、A C 2 3である。

【0116】

新規なサイクルのすすぎの後、周囲温度で20分間インキュベートしたストレプトタビジン - P A L (アルカリホスファターゼ) 溶液を添加する。プレートを最後にすすぎ、かつP N P P 顕色溶液を、沈殿させ、かつ37 で30分間インキュベートする。反応は、N a O H 溶液0 . 4 Nを用いて停止させる。

10

【0117】

得られた信号の読み取りは、490 nmでのフィルタに対して405 nmで分光光度計を用いて行う。

【0118】

b) 結果:

結果を図8に示すが、図8は、生理的P r Pが、L C R中で定量され得ることを明らかにしている。

【0119】

実施例5：固体担体にグラフトされるC 6 Sを使用した、脳中のP r P^{s c}の検出

20

【0120】

5 . 1 プレート上の検出

【0121】

a) 実験条件:

第1ステップは、クロイツフェルト・ヤコブ病(C J D)に罹患した又は罹患しない患者の脳から抽出によって精製するP r P^{s c}を得ることからなる。各脳の260 mgの試料を採取し、次にブドウ糖溶液5%のホモジェネート10%を得るために破碎される。破碎生成物は、次に針を用いて濾過される。次にプロテイナーゼKによる消化ステップが来る。それを、1時間37 で100 mgの組織に対して20 μ gの濃度で使用する。次に、650 μ lのサルコシル溶液30%を添加する。並行して、400 μ lのショ糖のクッション(c o u s s i n)を、超遠心分離のために管底部に沈殿させる。試料を、次にこのクッション上に沈殿させる。管は、溶接され、次に10000 rpm、20 で2時間、超遠心分離される前に仕上げられる。上清を除去し、かつ管の仕切り壁を吸い取り紙によって大雑把に乾燥させる。次に残渣をトリス - マレエート中に戻す。試料を、95 で5分間加熱し、次に20 、12000 rpmで15分間、遠心分離する。試料を次に使用するまで - 80 で保存する。この第1ステップの成功は、ウェスタンブロットによって確認された。

30

【0122】

b) カリックス - 6 - スルホネートプレートに対するテスト

40

実施例1により、N H Sプレートのグラフトを、P B S 溶液50 mM中で希釈される広い段階のC 6 Sにより6時間、行う。プレートを最初に、周囲温度で6時間、P B S T 溶液0 . 0 5 %、乳5%によって飽和させる。次にそれらをP B S T 溶液0 . 0 5 %によって3回洗浄する。トリスマレエートで予め希釈した試料を、プレート上に沈殿させ、かつ2 ~ 8 で一晩インキュベートする。次にプレートをP B S T 0 . 0 5 %で6回すすぐ。顕色抗体溶液を、周囲温度で1時間インキュベートする。新規な一連の洗浄後、ストレプトタビジン - P A L を20分間インキュベートする。37 で30分間インキュベートされるP N P P (パラ - ニトロフェニルリン酸) 沈殿前に、プレートを最後に洗浄する。次に顕色反応は、硫黄を添加して停止させる。

【0123】

50

DOの読み取りは、490nmでのフィルタに対して405nmで分光光度計を用いて行う。

【0124】

c) 結果

結果を図9に示すが、図9は、驚くべきことに、クロイツフェルト・ヤコブ病に罹患した患者に由来する試料のPrP^{Sc}が、NHSプレート上にグラフトされるC6Sによる捕獲及びPrPタンパク質に特異的に向けられる抗体による検出を使用して、本発明の方法によって検出可能であることを示しており、このことは、陽性対照、ヒト組換えPrP及び陰性対照、PBST0.05%によって立証される。

【0125】

実施例6：固体担体にグラフトされるC6Sを使用した、LCR中のPrP^{Sc}の検出

【0126】

6.1 試料の調整

【0127】

試料は、好ましくは非溶血、かつ細胞片の無い頭脊柱液(LCR)の採取見本からなる。これらの採取見本は、匿名であり、かつ蛋白に対して僅かに吸着性である仕切り壁を有する管中で(-80)で冷凍して保存する(「予潤滑マイクロ遠心管、1.7mL」、Marsh Biomedical Products、ref.T6050G)。

【0128】

採取見本は、2つのカテゴリーに分類される：

【0129】

一方で、CJDに対して陽性の試料。

【0130】

これらは、脳槽中の穿刺による死体解剖の際に回収され、かつウェスタンブロットによる脳組織中のPrP^{Sc}の研究が、(ある種の場合)CJDの診断を確認することを可能にした、死後LCRである。死体解剖の際、採取したLCRを、(細胞片を多量に有する試料を除き)予め遠心分離せずに前述の管中に直ちに配分し、かつアリコートをし、-80で冷凍する。

【0131】

他方で、CJDに対して陰性の試料。それらは、2タイプである：

【0132】

死体解剖の際に回収され、かつウェスタンブロットによる脳組織中のPrP^{Sc}の研究が、CJDの診断を除去することを可能にした、死後LCR(CJDに関する陰性対照)。

【0133】

CJDに罹患していない患者の、かつ外部脳室誘導(DVE)に由来するLCR。これらの採取見本の保存条件は、前記のそれと同一である。

【0134】

6.2 ELISAのアプローチ

【0135】

a) 分析原則

試料を、一定時間、高温で単にインキュベートし、次に冷却後、免疫量分析(ELISA)と適合できる緩衝液中で1/2又は1/5に希釈する(トリス-マレーン緩衝液、pH8)。プロテイナーゼKによる消化が、プレートC6S上の沈殿前に起きる時、試料は、15分間、プロテイナーゼKによって消化され、次に予めの阻害無しに、プレートC6S上にこのように沈殿する。

【0136】

捕獲は免疫学的ではないが、免疫学的顕色による、配位子/アフィニタタイプタイプの反応が問題であるので、用語ELISAを使用する。

【0137】

10

20

30

40

50

E L I S A 技術は、測定可能な、かつ試料中に存在する抗原の量と比例した可溶性生成物に基質を変えることにより、探求する抗原を定量することを可能にする、量的免疫酵素的技術である。ここで使用する技術は、杯状部分 (c u p u l a) の感作を除き、従来の競争力の無いサンドイッチ E L I S A と同じステップを含む。実際、捕獲の抗プリオン抗体は、そのアミン基によってマイクロプレートの N H S 基上にグラフトされる、スルホン化カリックス - 6 - アレンによって代えられる。

【 0 1 3 8 】

マイクロプレートの杯状部分底部での C 6 S の固定化、及び抗原固定の非特異部位の飽和後に、試料を沈殿させ、かつ C 6 S との抗原の結合を可能にするために、プレートをインキュベートする。次に、何回かの洗浄後に、プリオン抗体に特異で、かつマークされる抗体を、添加する。形成された複合体は、吸光度が、マイクロプレート読取装置 (自動化分光光度計) を用いて決定される、着色生成物に変わる酵素基質の添加後に、比色法によって視覚化される。

10

【 0 1 3 9 】

b) 作業方法

大量の L C R を、 1 5 分間 7 5 ° で乾燥湯浴 (b a i n - m a r i e s e c) で、インキュベートする。冷却後、試料をトリス - マレエート緩衝液 0 . 2 M 、 p H 8 中で 5 倍に希釈し (4 倍の量の緩衝液添加) 、かつ C 6 S によって予め感作したマイクロプレート上に直接沈殿させるか、 3 7 ° で 1 5 分間プロテイナーゼ K によって消化し、次にマイクロプレート上に沈殿させる。

20

【 0 1 4 0 】

免疫量分析の連続的ステップを、以下に、時系列順で列挙する：

1 - 活性化アミンプレート (N H S) 上のスルホン化カリックス - 6 - アレン C 6 S のグラフトは、 P B S 溶液 5 0 m M 中で希釈される、広い濃度段階、又は固定濃度に応じて、周囲温度で 6 時間、以上に言及した方法により行う。

2 - 次にプレートを P B S T 0 . 0 5 % で 3 回洗浄し、次に 3 7 ° で 1 時間、 P B S T 0 . 0 5 % - 乳 5 % で飽和させる。

3 - 洗浄後、上記の分析原則により調製した 1 0 0 μ L の L C R を、ウェル毎に沈殿させる；プレートを、 3 7 ° で 1 時間 3 0 分インキュベートする。

4 - 洗浄後、 1 0 0 μ L の顕色抗体を、ウェル毎に沈殿させる (0 . 5 μ g / m L で A C 2 3 - H R P 、 H R P は西洋ワサビペルオキシダーゼ、又は 0 . 5 μ g / m L で A C 2 3 - ビオチン) 。プレートを周囲温度で 1 時間インキュベートする。

30

5 - 洗浄後、形成した複合体は、顕色される：

5 . 1 - 顕色抗体が、ビオチンに結合されるならば、 P B S T 緩衝液 0 . 0 5 % で 1 / 2 0 0 0 0 に希釈される 1 0 0 μ L の S A - P A L 溶液を、ウェル毎に沈殿させる。プレートを、周囲温度で 2 0 分間インキュベートする。洗浄後、 1 0 0 μ L の P N P P を、ウェル毎に沈殿させる。プレートを、 3 7 ° で 1 0 ~ 3 0 分間インキュベートする。インキュベーション後、比色反応を、 0 . 4 N で 5 0 μ L の N a O H を各ウェル中に添加することによって停止させる。次に光学濃度を、 4 5 0 n m でのフィルタに対して 4 0 5 n m で分光光度計で測定する。

40

5 . 2 - 顕色抗体が、ペルオキシダーゼに結合されるならば、 1 0 0 μ L の O P D を、ウェル毎に沈殿させる。プレートを、暗所かつ周囲温度で 1 0 分間インキュベートする。

【 0 1 4 1 】

インキュベーション後、比色反応を、 1 . 8 N で 5 0 μ L の H ₂ S O ₄ を各ウェル中に添加することによって停止させる。次に光学濃度を、 4 9 5 n m で分光光度計で測定する。

【 0 1 4 2 】

b) 結果

1 - 頭脊柱液 (L C R) のプリオン蛋白とのマイクロプレート上にグラフトされる

50

スルホン化カリックス - 6 - アレンモノアミン (C 6 S) の結合の確認 :

クロイツフェルト・ヤコブ病に罹患しない患者の脳頭脊柱液を、75 で15分間加熱し、かつ次にELISA免疫学的顕色に適合する緩衝液中で1/2又は1/6に希釈する。試料は、プロテイナーゼKによって消化されず、かつこのようにして1.8~18 µg/mLの広い濃度範囲に応じてC6Sによってグラフトされるプレート上に沈殿する。インキュベーション後、C6S上に捕獲される抗原の免疫学的顕色は、0.5 µg/mLで使用されるペルオキシダーゼに結合される抗体AC23によって確実に行われる。結果を、図10に示す。

【0143】

信号が、杯状部分底部で固定化されるC6Sの第1の濃度から観察されるので、これらの結果は、C6Sが、LCR中でプリオン蛋白の形状と、大いに結合することを示す。

10

【0144】

2 - プロテイナーゼKを使用しない異種段階の病原性プリオン蛋白とのC6Sの結合の確認 :

非希釈又は1/2に希釈したCJD (MJJ) に罹患しない患者のLCR (LCR-) 及びCJDで死亡した患者のLCR (MJC+) に、様々なタイプの熱処理を受けさせる。次にそれらを、7.2 µg/mLでC6Sによりグラフトしたプレート上に沈殿させる。洗浄後、免疫学的顕色が、ビオチンに結合される抗プリオン抗体AC23によって確実に行われる。

【0145】

結果をグラフによって図11に表す。

20

【0146】

これらの結果は、陰性試料よりも陽性試料に有効であるプロテイナーゼKによる処理無しで、プレート上にグラフトされるC6S上のプリオン蛋白の吸着を示している。様々な熱処理は、希釈の無いC6S上のプリオン蛋白の吸着効率に僅かな影響を、かつ試料を希釈した時に一層の影響を及ぼす。このように、異種段階でのC6S MN上のプリオン蛋白の吸着を促進する実験条件は、試料の希釈及び95 で5分間の処理であるように見える。

【0147】

3 - プロテイナーゼKを使用する異種段階の病原性プリオン蛋白とのC6Sの結合の確認 :

30

37 で1時間、消化混合物のプレートC6S上の捕獲前に、事前分析処理で、37 で15分間、プロテイナーゼKによる消化ステップを使用した。残留プロテイナーゼKの除去を、PBS - Tween緩衝液0.05%での連続洗浄によって確実に行う。

【0148】

結果を図12に示す。

【0149】

これらの結果は、プロテイナーゼKによる消化後に、CJD陽性試料に有利になるような光学濃度の差を示す。この差異は、テストされるプロテアーゼK (0.5 µg/mL) の第1の濃度から見る事ができる。

40

【0150】

d) 結論

LCR中のプリオン蛋白の検出は、本発明の方法により可能になる。実際、プロテイナーゼKによる消化が無ければ、(細胞及び病原性の) PrP全体の検出は、スルホン化カリックス - 6 - アレンの存在下で増幅され、かつ予期せぬことに、PrP^{Sc}は、優先的に検出される。プロテイナーゼKによる試料の消化後に捕獲状態のこれらのC6Sを使用することは、CJDに罹患しない患者に由来するLCR及びCJDに罹患した患者に由来するLCRの間で著しく異なる信号を供給しながら、LCRのPrP^{Sc}を検出することを可能にする。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 1 5 1 】

【図 1】一方が調製法を別途記載する特異補助的大環状配位子 (A M L 1) の存在下に置いた試料中の、かつ他方が A M L 1 の存在下に置かれない試料中の P r P^{s c} の免疫プロットによる検出の比較例である。

【図 2】一方が A M L 1 の存在下に置かれた試料中の、かつ他方が A M L 1 の存在下に置かれない試料中の P r P^{s c} 検出の光学濃度のグラフを表す。

【図 3】組換えプリオン蛋白 (r e c P r P) のみ (A)、A M L 1 の存在下に置かれる r e c P r P (B) 及び A M L 1 のみ (C) の乾燥フィルムに関する非接触モードでの走査型プローブ顕微鏡 (S P M) 画像を示す。

【図 4】様々な比率: 1 / 1 0 0 0 A M L 1 / r e c P r P、1 / 1 0 0 A M L 1 / r e c P r P、1 / 1 0 A M L 1 / r e c P r P での、A M L の存在下に置かれた r e c P r P の乾燥フィルムに関する非接触モードでの走査型プローブ顕微鏡 (S P M) 画像を示す。

10

【図 5】ウシ組換え P r P 溶液のインキュベーション、及びペルオキシダーゼでマークされる抗 P r P 抗体 A C 2 3 による顕色後、活性化アミンプレート (N H S) 上にグラフトされるカリックス - アレン C 6 S の濃度に応じて得られる光学濃度値 (D O) を示すグラフ表示である。

【図 6】ペルオキシダーゼでマークされる抗 P r P 抗体 8 D 1 1 G 1 2 を用いた直接顕色による、0 . 2 5 μ g / m l で定量されるヒト組換え P r P 溶液のインキュベーション後、活性化アミンボール (N H S) 上にグラフトされるカリックス - アレン C 6 S の濃度に応じて得られる光学濃度値 (D O) を示すグラフ表示である。

20

【図 7】ペルオキシダーゼでマークされる抗 P r P 抗体 8 D 1 1 G 1 2 を用いた直接顕色による、活性化アミンボール (N H S) 上にグラフトされるカリックス - アレン C 6 S と接触させる P B S T 0 . 0 5 % 中のヒト血清の広い希釈段階によるインキュベーション後に得られる光学濃度値 (D O) を示すグラフ表示である。

【図 8】アルカリホスファターゼでマークされる抗 P r P 抗体 A C 2 3 を用いた顕色による、加熱に応じた C J D に関する陽性 (L C R +) 及び陰性 (L C R -) のヒト頭脊柱液の試料と、活性化アミンプレート (N H S) 上にグラフトされるカリックス - アレン C 6 S を接触させた後に得られる光学濃度値 (D O) を示すグラフ表示である。

【図 9】アルカリホスファターゼでマークされる抗 P r P 抗体 A C 2 3 を用いた顕色による、クロイツフェルト・ヤコブ病に罹患した又は罹患しない患者の脳 (C J D + / C J D -) から抽出した P r P^{s c} と、活性化アミンプレート (N H S) 上にグラフトされるカリックス - アレン C 6 S を接触させた後に得られる光学濃度値 (D O) を示すグラフ表示である。

30

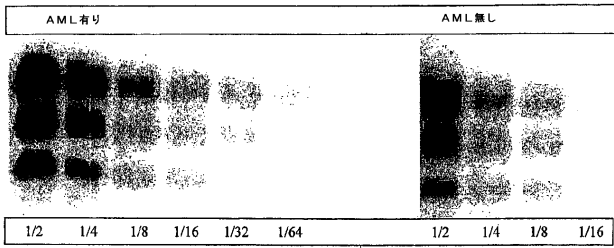
【図 1 0】1 / 2 又は 1 / 6 に希釈し、かつプロテイナーゼ K による消化の無い、C J D に罹患していない患者の L C R の試料と接触させた後に、活性化アミンプレート (N H S) 上にグラフトされるカリックス - アレン C 6 S の濃度に応じて得られる光学濃度値 (D O) を示すグラフ表示である。

【図 1 1】場合により 1 / 2 に希釈し (L C R + 1 / 2 又は L C R - 1 / 2)、プロテイナーゼ K による消化の無い、C J D に罹患していない (L C R -) 又はこの疾患に罹患した (L C R +) 患者の L C R の試料と接触させた後に、活性化アミンプレート (N H S) 上にグラフトされるカリックス - アレン C 6 S の濃度に応じて得られる光学濃度値 (D O) を示すグラフ表示である。

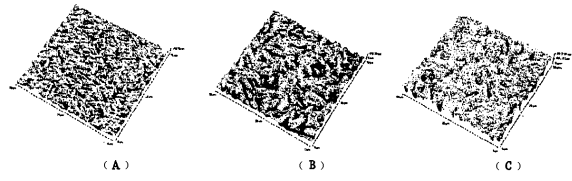
40

【図 1 2】C J D に罹患していない (L C R -) 又はこの疾患に罹患した (L C R +) 患者の L C R の試料と、活性化アミンプレート (N H S) 上にグラフトされるカリックス - アレン C 6 S を接触させた後に、プロテイナーゼ K の濃度に応じて得られる光学濃度値 (D O) を示すグラフ表示である。

【 図 1 】



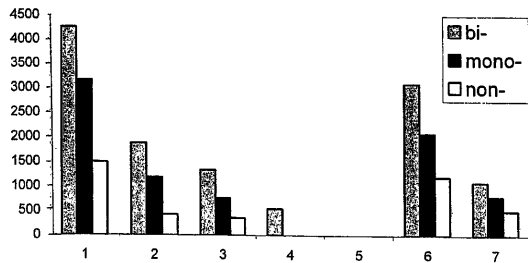
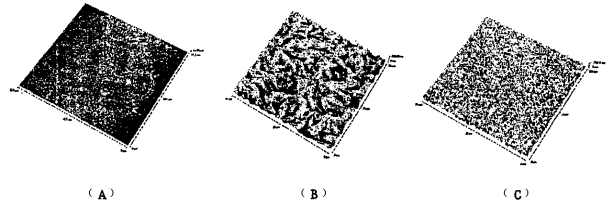
【 図 3 】



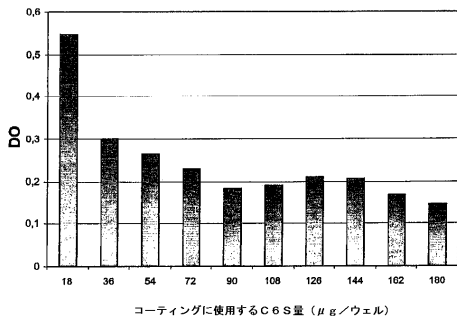
【 図 2 】

希釈 列	AML有り				AML無し	
	1/8	1/16	1/32	1/64	1/4	1/8
1	4257	1883	1331	538	3074	1081
2	3162	1190	761		2067	787
3	1503	426	355		1184	501

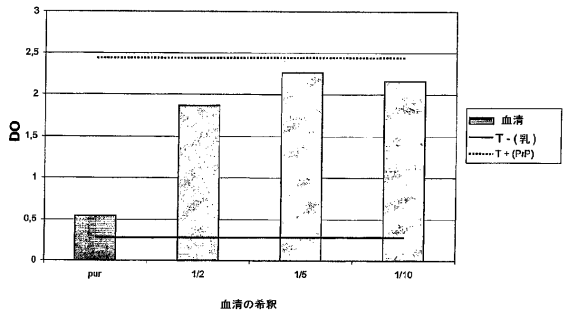
【 図 4 】



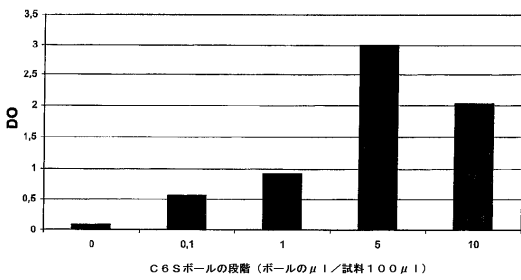
【 図 5 】



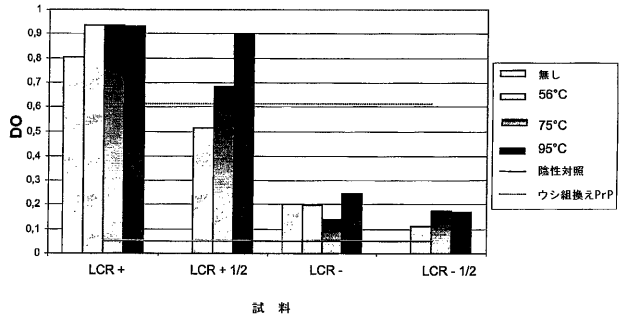
【 図 7 】



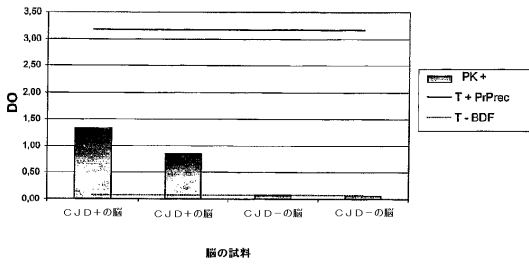
【 図 6 】



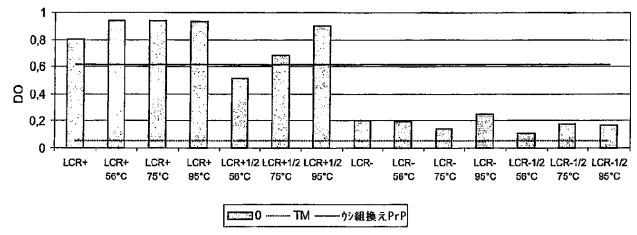
【 図 8 】



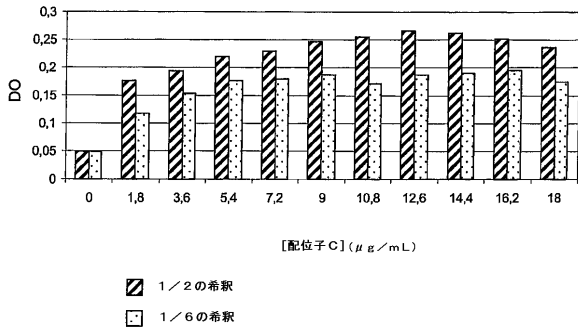
【 図 9 】



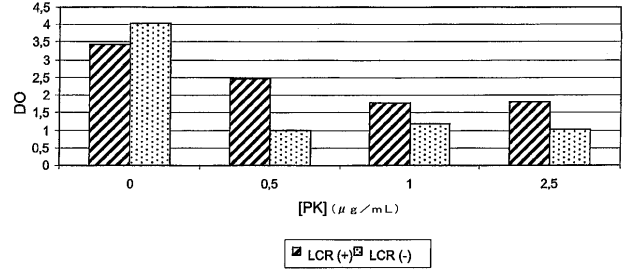
【 図 11 】



【 図 10 】



【 図 12 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 03/03857

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7. G01N33/68 C12Q1/37		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/086511 A (OESCH BRUNO ;PRIONICS AG (CH); BIFFIGER KARIN (CH); MOSER MARKUS () 31 October 2002 (2002-10-31) cited in the application the whole document	1
A	WO 01/23425 A (FISCHER MICHAEL BORIS ;AGUZZI ADRIANO (CH); UNIV ZUERICH (CH)) 5 April 2001 (2001-04-05) abstract	1
A	WO 01/77687 A (WILTSHIRE VITE ROSE ;CARBONELL RUBEN (US); HAMMOND DAVID J (US); S) 18 October 2001 (2001-10-18) abstract	1
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 May 2004		Date of mailing of the international search report 25/05/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreno, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 03/03857

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 571 911 A (STILL W CLARK ET AL) 5 November 1996 (1996-11-05)	1
X	abstract	15
A	WO 97/37995 A (UNIV TEXAS) 16 October 1997 (1997-10-16)	1,15
	abstract; examples	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/FR 03/03857

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02086511	A	31-10-2002	DE 10119713 A1	24-10-2002
			CA 2437880 A1	31-10-2002
			WO 02086511 A2	31-10-2002
			EP 1381868 A2	21-01-2004
WO 0123425	A	05-04-2001	AU 5241100 A	30-04-2001
			CA 2385743 A1	05-04-2001
			EP 1216258 A1	26-06-2002
			WO 0123425 A1	05-04-2001
			JP 2003514773 T	22-04-2003
			US 2002004586 A1	10-01-2002
			US 2001053533 A1	20-12-2001
WO 0177687	A	18-10-2001	AU 5135801 A	23-10-2001
			CA 2405568 A1	18-10-2001
			EP 1272509 A2	08-01-2003
			JP 2003530554 T	14-10-2003
			WO 0177687 A2	18-10-2001
US 5571911	A	05-11-1996	US 5342934 A	30-08-1994
			WO 9400455 A1	06-01-1994
			US 5599926 A	04-02-1997
WO 9737995	A	16-10-1997	AU 2440997 A	29-10-1997
			CA 2251072 A1	16-10-1997
			CA 2391030 A1	16-10-1997
			EP 0891364 A1	20-01-1999
			JP 2000511880 T	12-09-2000
			WO 9737995 A1	16-10-1997
			US 6262257 B1	17-07-2001
			US 2002026047 A1	28-02-2002
			US 2002115566 A1	22-08-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		De la demande internationale No PCT/FR 03/03857
A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 G01N33/68 C12Q1/37		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 02/086511 A (OESCH BRUNO ;PRIONICS AG (CH); BIFFIGER KARIN (CH); MOSER MARKUS () 31 octobre 2002 (2002-10-31) cité dans la demande le document en entier ---	1
A	WO 01/23425 A (FISCHER MICHAEL BORIS ;AGUZZI ADRIANO (CH); UNIV ZUERICH (CH)) 5 avril 2001 (2001-04-05) abrégé ---	1
A	WO 01/77687 A (WILTSHIRE VITE ROSE ;CARBONELL RUBEN (US); HAMMOND DAVID J (US); S) 18 octobre 2001 (2001-10-18) abrégé --- -/-	1
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent		*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date		*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)		*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens		*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
12 mai 2004	25/05/2004	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Moreno, C	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Dem. de Internationale No
 PCT/FR 03/03857

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 5 571 911 A (STILL W CLARK ET AL) 5 novembre 1996 (1996-11-05)	1
X	abrégé ---	15
A	WO 97/37995 A (UNIV TEXAS) 16 octobre 1997 (1997-10-16) abrégé; exemples -----	1, 15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demande internationale No
 PCT/FR 03/03857

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 02086511	A	31-10-2002	DE	10119713 A1	24-10-2002
			CA	2437880 A1	31-10-2002
			WO	02086511 A2	31-10-2002
			EP	1381868 A2	21-01-2004
WO 0123425	A	05-04-2001	AU	5241100 A	30-04-2001
			CA	2385743 A1	05-04-2001
			EP	1216258 A1	26-06-2002
			WO	0123425 A1	05-04-2001
			JP	2003514773 T	22-04-2003
			US	2002004586 A1	10-01-2002
			US	2001053533 A1	20-12-2001
WO 0177687	A	18-10-2001	AU	5135801 A	23-10-2001
			CA	2405568 A1	18-10-2001
			EP	1272509 A2	08-01-2003
			JP	2003530554 T	14-10-2003
			WO	0177687 A2	18-10-2001
US 5571911	A	05-11-1996	US	5342934 A	30-08-1994
			WO	9400455 A1	06-01-1994
			US	5599926 A	04-02-1997
WO 9737995	A	16-10-1997	AU	2440997 A	29-10-1997
			CA	2251072 A1	16-10-1997
			CA	2391030 A1	16-10-1997
			EP	0891364 A1	20-01-1999
			JP	2000511880 T	12-09-2000
			WO	9737995 A1	16-10-1997
			US	6262257 B1	17-07-2001
			US	2002026047 A1	28-02-2002
			US	2002115566 A1	22-08-2002

フロントページの続き

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

(71) 出願人 500525531

センター ナショナル デ ラ レシェルルシェ サイエントフィック - シーエヌアールエス
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
- CNRS

フランス国、パリ セダー 16 エフ - 75794、ルー ミッシェル アンジュ 3
3, rue Michel Ange F - 75794 Paris Cedex 16 France

(71) 出願人 505226655

ユニベルシテ クロウドゥ ベルナルド リヨン
UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON

フランス、セダー ヴィルボン エフ - 69622、ブールバード ドゥ 11 ノーヴェンブル
1918、43
43, boulevard du 11 Novembre 1918, F - 69622 Villeurbanne Cedex France

(71) 出願人 505226666

バイオメリユウ
BIOMERIEUX

フランス、マルシィ - レトワール エフ - 69280、シェマン ドゥ ローム
Chemin de l'Orme, F - 69280 Marcy-l'Etoile France

(74) 代理人 100092897

弁理士 大西 正悟

(74) 代理人 100115200

弁理士 山口 修之

(72) 発明者 ムーザ アリイ

フランス、ウーリン エフ - 69600、シェミン ドゥ グラン ルボイユ、52

(72) 発明者 コルマン アンソニィ ウィリアム

フランス、カリユイル - エ - キュイル エフ - 69300、リュ ドゥ マルニョル、55

(72) 発明者 シャガールディオン パトリック

フランス、リヨン エフ - 69003、リュ アンドレ フィリップ、223

(72) 発明者 ダ シルバ エリック

フランス、リヨン エフ - 69007、リュ カミール ロイ、20

(72) 発明者 マーティン アンブロワズ

フランス、チャーリー エフ - 69390、ルート ドゥ バ プリバ、605シー

(72) 発明者 ラザル アディナ ニコルタ

フランス、リヨン エフ - 69007、アベニュー ジーン ジョルズ、145、レジデンス ベン
ジャミン デルサルト、シャンプル 312

(72) 発明者 ルクレル エドウィッジ

フランス、リヨン エフ - 69001、リュ デ ピエール プランテ、12

(72) 発明者 デュパン マリリン

フランス、ボニユレイ エフ - 69670、シャタネイ

(72)発明者 ペロン エルベ
フランス、セント - ジェニイ - レ - オリール エフ - 6 9 2 9 0、アレ ドゥ ラ ギゴニール、
4

专利名称(译)	使用辅助大环配体的PRP检测方法		
公开(公告)号	JP2006510914A	公开(公告)日	2006-03-30
申请号	JP2004563299	申请日	2003-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家科学研究中心 生物Meryuu 生物梅里埃公司		
申请(专利权)人(译)	Ajensu法国文化安全Sanitairu去Arimento - Afuza - 中心国家德拉Resherurushe科学 - CNR居 Yuniberushite Kuroudu贝尔纳里昂 生物Meryuu		
[标]发明人	ムーザアライ コルマンアンソニウイリアム シャガールディオンパトリック ダシルバエリック マーティンアンブロワズ ラザルアディナニコルタ ルクレルエドウィッジ デュパンマリリン ペロンエルベ		
发明人	ムーザアライ コルマンアンソニウイリアム シャガールディオンパトリック ダシルバエリック マーティンアンブロワズ ラザルアディナニコルタ ルクレルエドウィッジ デュパンマリリン ペロンエルベ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2800/2828 Y10S435/961 Y10S436/823 Y10S530/807		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.501.D G01N33/566		
代理人(译)	大西省吾 山口修之		
优先权	2002016383 2002-12-20 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及检测负责感染性亚急性海绵状脑病的朊病毒的致病形状的方法，该方法包括向有此需要的受试者施用在生物样品中游离或与载体结合的化合物，该化合物可含有PrP^{sc}通过添加辅助大环配体（AML），然后使所得悬浮液与抗PrP^{sc}抗体反应并检测PrP的存在来表征如何在。

