

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 513294

(P2003 - 513294A)

(43)公表日 平成15年4月8日(2003.4.8)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-コード* (参考)
G 0 1 N 33/58		G 0 1 N 33/58	Z 2 G 0 4 5
C 0 7 K 1/14	ZNA	C 0 7 K 1/14	ZNA 2 G 0 5 4
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 21/78	C 4 H 0 4 5
33/68		33/68	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 54数)

(21)出願番号 特願2001 - 535393(P2001 - 535393)

(86)(22)出願日 平成12年11月3日(2000.11.3)

(85)翻訳文提出日 平成14年5月7日(2002.5.7)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/10877

(87)国際公開番号 W001/032694

(87)国際公開日 平成13年5月10日(2001.5.10)

(31)優先権主張番号 199 52 955.8

(32)優先日 平成11年11月3日(1999.11.3)

(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(71)出願人 ア-ツェ-ゲ-テ-ー プロゲノミクス ア
クチェンゲゼルシャフト

ACGT PROGENOMICS A
G

ドイツ連邦共和国 06120 ハレ(ザ-レ)
ワインベルクヴェーク 22

(72)発明者 ベ-ム、ゲラルト

ドイツ連邦共和国 06114 ハレ(ザ-レ)
ヴィントホルストシュトラ-セ 6

(72)発明者 シュミット、ウルリッヒ

ドイツ連邦共和国 06108 ハレ(ザ-レ)
シャルロッテンシュトラ-セ 3

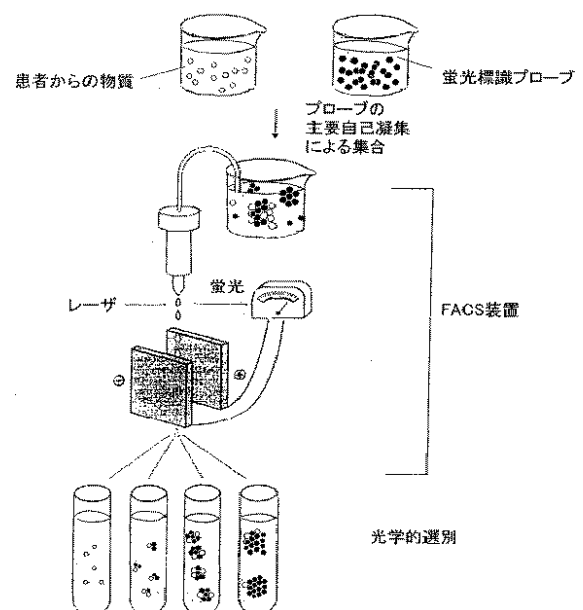
(74)代理人 弁理士 恩田 博宣 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 分子会合体の特徴付けおよび分離方法

(57)【要約】

本発明は分子会合体、特に300nm 未満のサイズの粒子の特徴付けと、任意選択としてそれらの分離するための方法に関し、そのような分子会合体の蛍光染料によってマークされた部分ユニットがマ-カ-として用いられ、マークされた会合体および凝集体がFACS(蛍光活性化細胞選別装置) によって特徴付けが行われる方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 サブユニットから構成される分子会合体の特徴付けを行う方法であって、

- 非会合サブユニットを少なくとも1つの蛍光染料で標識し、
 - 標識サブユニットを相互に、または非標識サブユニットと、もしくはサブユニットから構成された分子会合体と接触させて、沈着させるか、および/または前記標識サブユニットを相互に、または非標識サブユニットと、もしくはサブユニットから構成された分子会合体と結合させ、標識分子会合体を形成し、
 - 前記標識分子会合体をFACS(蛍光活性化細胞選別装置) を通じて特徴付けを行ない、
 - 前記分子会合体は任意選択で公知の方法で単離される
- ことを特徴とする方法。

【請求項2】 前記サブユニットがモノマー、ダイマーおよび/ またはオリゴマーであることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記分子会合体のサブユニットが互いに同じであるか異なっていることを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 少なくとも前記分子会合体の一部が空間的および/ または化学当量論的に明確に定義された構造を有していることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項5】 空間的および/ または化学当量論的に明確に定義された構造を有する前記分子会合体が、ウィルスカプシドあるいはファージカプシドなどの天然蛋白質コートから、あるいはプロテオソーム、シャペロン複合体またはリボゾームなどの巨大分子会合体から誘導されるサブユニット、またはそれらの修飾サブユニットによって構成されることを特徴とする請求項4記載の方法。

【請求項6】 前記分子会合体がアデノビリダエ、アレナビリダエ、アルテリウィルス、アストロビリダエ、バシロビリダエ、バキュロビリダエ、バトナウィルス、バリナビリダエ、ビルナビリダエ、プロモビリダエ、ブンヤビリダエ、カリシビリダエ、カプリビリダエ、カルラウィルス、カウリモウィルス、シルコビリダエ、クロステロウィルス、コモビリダエ、コロナビリダエ、コルチコビリ

ダエ、シストビリダエ、ディアントウィルス、エマノウィルス、フィロビリダエ、フラビビリダエ、フロウィルス、フセロビリダエ、ゲニミビリダエ、グッタビリダエ、ヘパドナビリダエ、ヘルペスビリダエ、ホルデイウィルス、ヒピビリダエ、イダエノウィルス、イノビリダエ、イリドビリダエ、レビビリダエ、リボスリックスビリダエ、ルテオウィルス、マクロモウィルス、マラフィウィルス、ミクロビリダエ、ミオビリダエ、ネクロウィルス、ノダビリダエ、オルトミクソビリダエ、パポバビリダエ、パラミクソビリダエ、パルティティビリダエ、パルコビリダエ、フィコドナビリダエ、ピコルナビリダエ、プラスマビリダエ、ポドビリダエ、ポリドナビリダエ、ポテックスウィルス、ポティビリダエ、ポックスビリダエ、レオビリダエ、レトロビリダエ、ラウドビリダエ、リジディオウィルス、セキビリダエ、シホビリダエ、ソベモウィルス、テクチビリダエ、テヌイウィルス、テトラビリダエ、トバモウィルス、トブラウィルス、トガビリダエ、トムブスビリダエ、トチビリダエ、トリコウィルス、ティモウィルス、ウンブラウィルスから構成される群のウィルスカプシドあるいはファージカプシドであるか、あるいはそれらのカプシドから誘導されるか、もしくは上に述べたウィルスまたはファージの1または複数の修飾サブユニットから誘導されることを特徴とする請求項4または5記載の方法。

【請求項7】 前記分子会合体の少なくとも一部がその構造および/または会合に関して不規則であることを特徴とする請求項1または2記載の方法。

【請求項8】 前記分子会合体が同じかまたは異なるサブユニットで構成されたペプチド会合体または蛋白質会合体であるか、一本鎖または二本鎖DNAであるか、一本鎖または二本鎖RNAであるか、糖蛋白質会合体、脂質会合体、リン脂質会合体、炭水化物会合体、多糖類会合体、親水性または疎水性の炭水化物化合物を含む会合体、イソプレノイド系化合物の会合体、もしくはそれらの混合物であることを特徴とする請求項7記載の方法。

【請求項9】 前記分子会合体のサブユニットが、アルツハイマー ペプチド、タウ蛋白質、プリオン蛋白質、ハンチンティン、シヌクレイン、SCA1/ アタキシシン、シスタチンC、免疫グロブリン、リポ蛋白質、トランススレチン、アポリポ蛋白質A1、血清アミロイドA、島細胞アミロイドポリペプチド、インシュリ

ン、カルシトニン、 - 2 - ミクログロブリン、リソザイム、フィブリノーゲン、ゲルソリン、心房ナトリウム排泄因子、ホックスD13 の遺伝子産物、転写因子 CBFA1 、ポリ(A) - 結合蛋白質II、またはそれらの誘導体、もしくはそれらの修飾型またはそのフラグメントであることを特徴とする請求項7または8記載の方法。

【請求項10】 分子会合体が、アルツハイマー病、遺伝性海綿状脳障害、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、脊髄小脳失調I型、および遺伝性脳アミロイド血管障害中、あるいは一次または反応性非全身性アミロイド症、二次全身性アミロイド症、家族性アミロイド多発性神経障害IおよびIII、糖尿病II型、注射局所化および透析関連アミロイド症、甲状腺脳癌、 - 2 - ミクログロブリンアミロイド症、非神経障害性アミロイド症、遺伝性腎臓アミロイド症、フィンランド遺伝性系統性アミロイド症、心房性アミロイド症、合指症II型、マシャド - ヨセフ病、鎖骨頭蓋骨形成不全症、および眼球咽頭筋ジストロフィ中に発現することを特徴とする請求項7～9のいずれか1項または複数項記載の方法。

【請求項11】 前記会合体が1 - 1000nm、好ましくは10 - 300nm、好ましくは10 - 100nm、そしてさらに好ましくは1-100nmのサイズ範囲であることを特徴とする請求項の1～10のいずれか1項または複数項記載の方法。

【請求項12】 サイズおよび組成に関してサブユニットから構成される分子会合体の特徴付けにFACS法を適用する方法であって、該会合体の少なくとも1つのサブユニットを少なくとも1つの蛍光染料で標識する適用方法。

【請求項13】 サブユニットから構成される分子会合体の特徴付けを行う方法であって、前記分子会合体が、アルツハイマー病、遺伝性海綿状脳障害、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、脊髄小脳失調I型、および遺伝性脳アミロイド血管障害中などの神経変性疾患と共に、あるいは一次または反応性非全身性アミロイド症、二次全身性アミロイド症、家族性アミロイド多発性神経障害IおよびIII、糖尿病II型、注射局所化および透析関連アミロイド症、甲状腺脳癌、 - 2 - ミクログロブリンアミロイド症、非神経障害性アミロイド症、遺伝性腎臓アミロイド症、フィンランド遺伝性系統性アミロイド症、心房性アミロイド症、合指症II型、マシャド - ヨセフ病、鎖骨頭蓋骨形成不全症、および眼球咽頭

筋ジストロフィ中に、発現することを特徴とする請求項11記載の適用方法。

【請求項14】 前記蛍光染料が前記分子会合体またはそのサブユニットと相互作用する分子性物質に結合され、その蛍光標識分子物質が特に抗体、特異的リガンド、補因子、基質または基質類似物、あるいはその誘導物質であることを特徴とする請求項11または12記載の適用方法。

【請求項15】 特徴付けされるべき会合体のサイズが1 - 1000nm、好ましくは10 - 300nm、好ましくは10 - 100nm、より好ましくは1 - 100nmであることを特徴とする請求項12記載の適用方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は分子会合体、特に300nm未満のサイズの粒子の分子会合体の特徴付けおよび分離方法に関するものであり、蛍光染料で標識されたそのような分子会合体のサブユニットがマーカーとして用いられ、標識会合体または凝集体の特徴付けがFACS(蛍光活性化細胞選別装置)装置によって行われることを特徴とする方法に関するものである。

【0002】

(発明の分野および技術の状況)

ある一連の疾病では、形態的に「不規則な会合体」、いわゆる凝集体が形成される。そうした病的沈着物は蛋白質、蛋白質フラグメント、あるいはペプチドで構成されていることが多く、これらは身体全体に(全身に)分散されたり、膵臓や中枢神経システムなどの特定の器官に集中した形で見出される。アルツハイマー病において、ペプチド(アルツハイマーペプチド、より大きな前駆体蛋白質のフラグメントとして長さはほとんどの場合42アミノ酸)が脳における特徴的な沈着物として見出されており、いわゆるアミロイド発生凝集体(「老人斑」)を形成する。アルツハイマー病の第2の特徴として、タウ蛋白質によって形成される神経細線維構造の形成(「もつれ」あるいは「対形成らせんフィラメント」)が発生する。現在までのところ、どのようにこれらの蛋白質沈着物が病気の経路を変更するのか、あるいはこれらの沈着物がその疾病に対して病原として関与しているのかあるいは単なる副作用にすぎないのかについては、多くのアミロイド発生病で決定的に明らかにはされていない。

【0003】

プリオン蛋白質によって起こされる遺伝性海綿状脳障害についても同様の事態が示されている。この病気のヒトにおける形態はクロイツフェルトヤコブ病であり、動物においては狂牛病(BSE)および羊(スクレイピー)病が特によく知られている。牛におけるBSEの発病と新しい形態のクロイツフェルトヤコブ病(vCJD)との間の関係は現段階ではまだ完全に排除されていない(M.E. et al., Transmission to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE

agent, Nature 389, S. 498-501, 1997)。羊における同様の疾病（スクレイピー）の場合、疾病に関係する蛋白質の濃度と感染性との間に関係が認められている。以下の表はKelly, J. W., Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior, Curr, Opin. Struct. Biol. 6, S. 11-17, 1996からの引用に多少の変更、追加を加えたものである。

【0004】

【表1】

優勢神経劣化性アミロイド発生性疾病

疾病	関与蛋白質
アルツハイマー病	β 蛋白質/アルツハイマー β ペプチド
遺伝性海綿状脳障害 (CJD, クールー、BSE、スクレイピー)	(1-40, 1-42, 1-43); タウ蛋白質 プリオン蛋白質
ハンチントン舞踏病	ハンチンティン
パーキンソン病	シヌクレイン
遺伝性脳アミロイド血管障害	シスタチンC

【表2】

他のアミロイド発生性疾病

疾病	関与蛋白質
注入性局所化アミロイド症	インシュリン
β -2ミクログロブリンアミロイド症	β -2ミクログロブリン
一次非全身性アミロイド症	免疫グロブリン
フィンランド遺伝性全身性アミロイド症	ゲルソリン
心房性アミロイド症	心房ナトリウム排泄因子
家族性アミロイド多発性神経障害	トランスシレチン
甲状腺の髄様癌	カルシトニン
遺伝性非神経障害	リソザイム
糖尿病 II 型	島細胞アミロイドポリペプチド
反応性非全身性アミロイド症	リポ蛋白質
鎖骨頭蓋ディスプラシイ	転写因子 CBFA1
遺伝性腎臓アミロイド症	フィブリノーゲン
眼球咽頭筋ジストロフィ	ポリ (A) 結合蛋白質 II

【0005】

これらの疾病で観察される凝集体は主に上に述べた蛋白質とその蛋白質のフラグメントから形成され、そしてそれぞれこれらの疾病の発病に極めて特徴的である。従ってこれらの疾病に対する可能な診断方法は、蛋白質、あるいはその分子会合体の蛋白質フラグメントが適切な条件下で *in vitro* でそれぞれの会合体を選択的に凝集させる傾向を有しているという事実に基づいて行われることになる。こうした疾病のほとんどの事例で、これまでは診断的アッセイ、あるいはそのための技術的解決方法を見つけることは困難であった。これまでのところ、アルツハイマー病の診断のための既知のテスト方法は関与している蛋白質およびペプチドに対する免疫学的検出に基づいており、従って、凝集した沈着物やそれらのサブユニット各々の会合体の直接的検出に基づいてはいなかった。脳脊髄液 (CSF 液) はこの目的のために無痛腰椎穿刺によって患者から採取される。アルツハイマー病に関して検出されるべき物質がこのCSF に含まれている。正確な検出は、2つの可溶性アルツハイマー固有物質である、タウ蛋白質とアミロイド ペプチドを同時測定することによって実現される (M. Shoji et al., Combination assay of CSF tau A₁₋₄₀ and A₁₋₄₀₍₄₃₎ as a biochemical marker of Alzheimer's disease, *J. Neurol. Sci.* 158, S. 134-140, 1998; F. Hulstaert, K. Blennow, A. Inaniciu, H. C. Schoonderwaldt, M. Reimenschneider, P. P. De Dcyn, C. Bancher, P. Cras, J. Wiltfang, P. D. Mehta, K. Ilbal, H. Pottel, E. Vanmenchelen, and H. Vanderstichele; Improved discrimination of AD patients using beta-amyloid (1-42) and tau levels in CSF, *Neurology* 52, S. 1555-1562, 1999)。

【0006】

米国特許第5,593,846号では、可溶性アミロイド ペプチド濃度の測定方法について述べられているが、この方法では病理性成分 (沈着物) は検出されない。

米国特許第5,434,050号では、アルツハイマー病の診断法が述べられており、ここではペプチドが固体構造 (例えば、脳バイオプシーからの物質) の固定される。こうした方法は重大な医学的介入を伴わずに実行することは不可能であり、現段階では用いられていない。

【0007】

国際特許出願W099/15903号では、病理性沈着物をFCS法（蛍光相関分光分析）を用いて検出することができる方法について記述している。しかしながら、FCS法は分散制御されるため高い処理量には不適切であり、少量 - 最大で異なったサイズの2 ~ 3種類の分子 - が区別されるだけで、それぞれの分子種は少なくとも質量が10倍は違っていなければならない、サイズ分布を評価することができるだけであり、方法の各ステップ中に、わずかに数種類（通常1種類）の蛍光染料を使用することができるだけである。この方法では、プローブの自己凝集が重要な問題である。従って、この方法は広い範囲で病理性が疑われる信号や特徴を早期に把握するのには適しておらず、ペプチドとタウ蛋白質を同時に検出することは不可能である。さらに、各測定には相当量の時間が必要である。本発明で開発された方法では、異種会合体の光分散の性質とおよび蛍光強度に基づいてこうした自己凝集物を区別することができるので、プローブの自己凝集が測定結果に影響を及ぼすことはない。上に述べた例で排除された、プローブの自己凝集の可能性は、最適の感度が達成されるので本発明の方法にとっては有益である。国際特許出願W099/15903号には適切なプローブとの凝集体の形成に基づいて、病理性蛋白質沈着物を判定するための診断方法も述べられており、国際特許出願W099/15903号に述べられている方法と同様、サンプル - プローブ会合体の一般的測定に関する権利の主張がなされており、ここで述べられている発明はこの技術分野での現状と比べての利点としてフローサイトメトリーによる蛋白質凝集体の測定を用いている。しかしながら、本発明においては、国際特許出願W099/15903号の場合と同様、分子会合体の特徴付けがなされており、その記述によるとこれらが病理性の沈着物であることが明らかにされている。さらに、国際特許出願W099/15903号では、1つの会合体の測定は標的に向かうプローブを決定することで行われており、プローブと標的は同じ化合物/構造と定義されている。この場合、請求項1から、プローブが標識されるかどうかは明確に決められてはいない。ここで述べられている発明においては、会合体のサブユニット/部分構造は他のサブユニットとも結合するが、ただそのプローブは蛍光染料で標識されねばならない点が違っている。こうした特徴は国際特許出願W099/15903号においても示されており、従ってこれはこの技術分野の現状を示すものである。国際特許出願W099/15903号の

請求項1で、さらに別の基本的な特徴として、プローブの自己凝集が優勢になる前にプローブの標的との結合が測定される時間的限定が示唆されている。この時間的限定は本発明では生じず、そのため、本発明は国際特許出願W099/15903号に述べられている方法とはかなり違っている。さらに、会合体の検出と特徴付けはプローブの自己凝集が開始された時点で、そしてその状態下で好適に行われる。しかしながら、この基本的な特徴は国際特許出願W099/15903号では達成されていない。FACSを用いた測定に関連して、本明細書に述べられている方法は新しく、さらに、プローブの自己凝集とは関係なく高い診断的信頼性を約束するものであり、特許法の観点に従ってみて、進歩性のあるものである。国際特許出願W099/15903号の発明者らが自己凝縮が優勢になる前に測定を行わねばならないという欠陥に気づいていたことは明らかである。

【0008】

米国特許第5,486,460号はアルツハイマー診断法について述べており、この方法においては、より高い濃度の脳脊髄液が乾燥され、その後、チオフラビンSで標識される。しかしながら、この方法は実際には極めて魅力の低いものであり、臨床診断のためには不十分であり、無視されている。

【0009】

国際特許出願W097/04311 A2は、その表面上のレセプタの存在および分布が違っている種々の生きた細胞の混合物から生きた細胞を分離するためのFACSに基づく方法について権利を請求している。この技術の現状に照らすと、細胞の浸透性化（従ってそれらの細胞の致死）を必要とする蛍光標識抗体は用いられないが、細胞表面に存在するレセプタの天然リガンドから導かれる蛍光標識ペプチドが使用される。そうしたペプチドとそれらの細胞を共にインキュベートすることによって、ペプチドはそれぞれのレセプタに固定し、FACS装置を用いて分離することができる特定の細胞集団を形成する。この方法は、ここに述べられている診断方法が細胞集団に対してではなく蛋白質凝集体に対しての特徴付けのためだけに蛍光標識ペプチドが使用される点で、本発明とはかなり違っている。分析のプロセスと意図がまったく違っている。本願においては、FACSによる蛋白質凝集体の単離をオプションとして実行することができる。しかしながら、本明細書に述べら

れている蛋白質凝集体のような小さな粒子の選別は、国際特許出願第W097/04311 A2号には述べられていない。国際特許出願第W097/04311 A2号の請求項6はとりわけ蛍光標識アミロイド ペプチドを含んでいるが、細胞の培養や、蛍光標識ペプチドと細胞レセプタの相互作用はいずれの時点でも行われないので、本願で述べられている発明とは無関係である。加えて、本発明におけるFACS技術は主に蛋白質凝集体の分析のために用いられ、一方、国際特許出願第W097/04311 A2号は生きた細胞の分離方法について述べているのである。

【0010】

米国特許第PS 5540494号において、従来のフローサイトメトリーで測定したデータを用いて分析される粒子の絶対半径および絶対表面の計算を可能にする方法が述べられている。しかしながら、本発明によれば、データの解釈、つまり蛋白質凝集体の特徴に関するFACSに基づく測定はその特定の特許内で権利請求されている方法を用いずに行われる。フローサイトメトリーは測定が行われる前に適切な標準で較正され、すべてのデータ測定はその標準を基準としているので、蛋白質凝集体の全体的な寸法を判定する必要はない。

【0011】

いずれの場合も、上に述べた疾病に関連したペプチド（蛋白質フラグメント）を可溶性形態、あるいは結晶化のための沈着物形成シードの形態で検出されるようにする、高度に個別的で鋭敏な方法を開発し、それぞれの疾病のための鮮明で感度の高い診断アッセイを有することは非常に望ましいことであろう。さらに、疾病に関する正しい（生化学的、血清学的）診断をできるだけ早く入手して、その疾病を発症する前に最初の治療的ステップを取ることができるようにすることは巨大な利点であろう。早期診断とその後の治療をうまく結合することは、従って、健康サービスにおける巨大な節約につながるであろう。さらに、こうした診断アッセイは予防措置としての健康的には問題がないとされる高齢者の診断チェックとして、定期的に用いることも可能であろう。

【0012】

従って、本明細書に述べられている本発明の目的は、現状の技術の上に述べたような欠陥を伴わない、分子会合体を特徴付けするための方法を提供することで

ある。

【0013】

本発明によれば上記目的は、サブユニットから構成される分子会合体の特徴付けに関して請求項1 に述べた方法によって達成され、この方法によれば、

- 非会合サブユニットを少なくとも1つの蛍光染料で標識し、
- 標識サブユニットを相互に、または非標識サブユニットと、もしくはサブユニットから構成された分子会合体と接触させて、沈着させるか、および/ または前記標識サブユニットを相互に、または非標識サブユニットと、もしくはサブユニットから構成された分子会合体と結合させ、標識分子会合体を形成し、
- 該標識分子会合体をFACS(蛍光活性化細胞選別装置) を通じて特徴付けを行ない、
- 該分子会合体は任意選択で公知の方法で単離される。

【0014】

本願を好適な適用例は、従属請求項および以下の説明に説明されている通りである。

(説明)

生化学的アッセイ、バイオテクノロジー的アッセイ、および医学的診断アッセイでは、通常、分子構造の会合体の特徴付けという問題がある。これらの会合体のサブユニットは各蛋白質のペプチド、糖蛋白質、核酸、脂質およびリン脂質、炭水化物および多糖類、およびそれらから誘導される物質などの種々の化学的分類に属するか、会合体は異なるクラスに由来するサブユニットを含んでいる場合もある。これらの特徴付けは医学的診断あるいは治療目的の使用には適している。また、生物科学および生化学分野の基礎研究の分野および応用研究の分野においては、こうした特徴付けは必要であろう。

【0015】

ここで述べられている発明においては、そうした分子会合体の測定および特徴付けを行うため、そしてサイズや組成などの選ばれた性質に関してそうした会合体の集まりを分離するために、予想しなかった実験結果を用いている。

【0016】

驚くべきことに、分子会合体の特徴付けはまず最初に細胞の特徴付けおよび選別のために開発された方法によって解決される。これに関連して用いられる装置はFACS装置（蛍光活性化細胞選別装置）と呼ばれる。FACS装置（細胞選別装置、より簡単にはフローサイトメトリー）は液体ストリームに焦点を合わせた1つの液滴内の個々の粒子の分散光信号および蛍光信号を分析する光学的測定装置である。静止蛍光メータとは対照的に、その結果は流体ストリーム内で検出システムを通過している各粒子の複数の物理的パラメータの同時的測定に基づいている。光励起はレーザーによって行われる。評価は液体ストリーム中で、統計的に十分な量のシングルイベント（粒子）をカウントした後に行われる。細胞選別装置（FACS装置）はフローサイトメトリーと比較して、蛍光強度や散乱光（粒子のサイズおよび形状、粒度）などの測定された性質に従って電荷を有する粒子を含んだ液体ストリームの液滴を提供する上でさらに幅広い選択の余地を提供し、これらのデータは粒子を異なった容器に選別するために用いることができる。粒子を含んだ荷電液滴は電場により導かれ、その電荷に従って分離される。

【0017】

FACS装置は個々の粒子の定量的測定を高い精度で可能にし、特に非常に短い時間内で大量の粒子を分析することができるようにする。さらなる利点は、所定の性質（例えばサイズや蛍光強度）に関してそれらの粒子を選別する可能性の故に、粒子を予備的なスケールで特徴付けできる点である。FACS装置では、液体ストリーム内の1つの粒子の分析が、主としてその光散乱および蛍光信号に関して行われる。

【0018】

現在までのこの技術分野の現状では、FACSで測定可能なのは細胞あるいは細胞小器官を有する系だけである。驚くべきことに、FACS装置、好ましくは最新の世代のFACS装置を用いることによって、分子会合体および凝集体の特徴付けを行うことができることが分かった。本発明によれば、これらの会合体はそうした装置の解像度限界（約300nm）よりずっと小さくても測定が可能である。適切な蛍光染料を用いることによって、分子レベル物質のサイズと構造の特徴付けを高い解像度で行うことができる。分子会合体形成後にその会合体の検出のために十分に

強い蛍光信号を放出するいずれの蛍光染料でもこの目的のために用いることができる。その方法の感度が高くない時は、高い量子効果を有する染料が好ましい。同時に、レーザに基づく方法では、横方向の散乱に基づいて形状と粒度に関する情報と、前方散乱に基づいて分子会合体あるいは凝集体のサイズに関する情報とを得ることができる。

【0019】

ここに述べられている発明は分子会合体の特徴付けのための情報を提供するものである。分子会合体は、特異的あるいは非特異的に結合した、化学的に異なるかあるいは同様のサブユニットから構成される。本発明によれば、該分子会合体の非会合サブユニットに対して、この方法では少なくとも1つの光マーカー、特に少なくとも1つの蛍光分子を提供することができる。標識サブユニットと、非標識サブユニットと、あるいはサブユニットで構成された分子会合体と、標識サブユニットを会合および/または結合させるために、標識サブユニットを「マーカー」として、標識サブユニットと、または非標識サブユニットと、あるいはサブユニットで構成された分子会合体と接触させることができる。この方法で、標識分子会合体が形成され、それらの分子会合体をFACS（蛍光活性化細胞選別装置）を用いてサイズ、形状および組成に関して特徴付けることができる。その後、例えば、サイズあるいは蛍光強度による分子会合体の分離など、周知の方法で調べられた会合体の分離を行うことができる。一定の予め選択した性質（サイズ、信号強度）を有する会合体をFACSによって荷電させる。この会合体の電荷を用いて、分離（選別）を行うことができる。当業者には他の分離方法も知られており、分子会合体の化学的および物理的構造に基づいて、そのような他の分離方法を用いることができる。分離後、例えば蛍光強度、蛍光分光分析、光散乱、吸収分光分析、および/または分子会合体の環状2色あるいは直線2色性あるいは散乱光分布などの光学的方法によって選別された会合体のさらなる特徴付けを行うこともできる。FACSによる特徴付けはフローシステムで実行されるので、分子会合体の分離はFACSによる特徴付けの直後に行うことができる。

【0020】

FACSによる特徴付けの間に、複数の染料を同時に用いることができる。従って

、分子会合体の異なったサブユニットの標識に異なった蛍光染料を用いることにより、1つの分子会合体のいくつかの異なったサブユニット間の区別を行うことができる。

【0021】

本発明による特徴付けを行うことによって、一方では（例えば、1つの分子会合体または凝集体の異なるサブユニットを異なる蛍光染料で標識することによって）会合体および凝集体の構造に関する判断を行うことができる。異なるサブユニットに対して異なる蛍光染料を用いることで、分子会合体のいくつかの異なったサブユニットを本発明によって区別することができる。この装置の現状の技術は分子会合体の最大で4つまでの異なったサブユニットの区別が可能である。他方で、懸濁液あるいは溶液内の個々の凝集体および会合体のサイズと形状の分布分析を行うなど、会合体または凝集体の集団分布を分析することも可能である。

【0022】

望ましくはテスト溶液の非標識物質がその会合体に含まれている場合から、テスト溶液に含まれている非標識物質を含まない蛍光標識物質の自己凝集を、上に述べた方法で区別することができる。このことは（FACS信号の散乱光部分を用いて）凝集体の分子量および形状の比較分析と、それらに関連した凝集体の蛍光強度の測定によって達成することができる。複数パラメータデータ測定結果を適切に選択された基準と比較することで、蛍光標識プローブの自己凝集を判別すること、つまり、測定された凝集体内の非蛍光標識物質の割合を分析することで一定の測定結果から人為的な測定結果を区別することが可能になる。

【0023】

本発明によれば、分子会合体の2つの形状を区別することができる。一方では、会合体を分析して、主に均一な集団を有する規則的な幾何学構造を得る。こうした会合体を本発明では三次元あるいは化学量論的構造を有する分子会合体として「規則的」分子会合体として定義され、それらは固有の集合プロセスによって構成される。こうした分子会合体の例は、たった1つのタイプのサブユニットから形成されしばしば20面体構造を有するウィルスやファージ被覆（次のセクション参照）、あるいはリボソーム、シャペロン、あるいはプロテアソームなどの不

均一なサブユニットから構成される巨大分子会合体である。他方、そして本発明によれば、サイズおよび構造において統計的な分布を有している分子会合体および規則的な会合体をまったく、あるいはほとんど含んでいない分子会合体も含まれる。これらの分子会合体は本発明によれば凝集体と呼ばれ、その構造および/または組成物が不規則な分子会合体である。こうした凝集体は、例えば、遺伝子組み換えによる蛋白質生成中に封入小体として出現し、あるいはアミロイド発生班、封入小体、あるいはその他の形態生理学的構造の形態の疾病の病的特性である。

【0024】

それらは通常、サイズと構造が多様である。この発明においては、その規則性に関しては拘束されず、その会合体の両方の形態に対する一般的特徴付け用語として「分子会合体」という簡略化された用語を用いる。

【0025】

この説明で用いられている方法は、規則的な分子会合体の特徴付けを可能にする。こうした会合体は例えば多くの場合20面体構造で形成されるウィルス性被膜構造内で見出すことができる。他のウィルスまたはファージは非20面体対称構造であり、それらは、例えばフィラメント状、らせん状であり、あるいは形態生理学的形状の構造を有している。ウィルスおよびファージの被覆は通常明確な構造を有しており、そのサブユニットはお互いに向き合っており、従って、それらは規則的な組成および/または構造を有する巨大分子会合体のための優れたモデルシステムである。各単一のウィルス被膜のサイズおよび分子組成の特徴付けはこれらのウィルスシェルおよびその他の分子会合体（細胞性プロテアソーム、シャペロン複合体、あるいはリボソームなど）の特徴付けのための重要な分析的援助となり得る。こうしたウィルスおよびファージの例を、それらの一次的形態で以下に示す。

【0026】

【表3】

形態	代表例 (ウィルス、ファージ)
アモルファス	ウンブラウィルス、テヌイウィルス
未知	
棒状	バキュロビリダエ、バドナウィルス、バルナビリダエ、フィリビリダエ、ラブドビリダエ、
フィラメント状	カピロウィルス、カルラウィルス、クロステロウィルス、イノビリダエ、リポスリックスビリダエ、ポテックスウィルス、ポティビリダエ、トバモウィルス、トブラウィルス、ポリドナビリダエ、
らせん状	ホルデイウィルス、パラミクソビリダエ、トリコウィルス
20 面体	アデノビリダエ、アストロビリダエ、ビルナビリダエ、プロモビリダエ、カリシビリダエ、カウリモウィルス、シルコビリダエ、コモビリダエ、コルチコビリダエ、ディアントウィルス、エマノウィルス、ヘパドナウィルス、ヘルペスビリダエ、イダエオウィルス、イリドビリダエ、ルピビリダエ、ルテノウィルス、マクロモウィルス、マラフィウィルス、マクロビリダエ、ネクロウィルス、ノバビリダエ、パポバビリダエ、パルティティビリダエ、パルボビリダエ、フィコドナビリダエ、ピコルナビリダエ、レオビリダエ、リジディオウィルス、セキビリダエ、ソベノウィルス、テクティビリダエ、テトラビリダエ、トンブスビリダエ、トチビリダエ、チモウィルス
等方性	シストビリダエ、ゲミニビリダエ
卵形	ボックスビリダエ
多形	コロナビリダエ、ヒポビリダエ、プラスマビリダエ
球形	アレナビリダエ、アリテリウィルス、ブンヤビリダエ、フラビビリダエ、オルトミクソビリダエ、レトロビリダエ、トガビリダエ
レモン形	フセロビリダエ
有尾ファージ	ミオビリダエ、ポドビリダエ、シホビリダエ

こうしたウィルス性シェル構造の1例を、(ポリオーマ蛋白質エンベロープのVPI サブユニットからの)ポリオーマウィルスシュードキャプシドを用いて以下に説明する。上に示した表で、古細菌スルホルブルシバタエに感染するSSVI - 粒子(フセロビリダエ)について強調しておかねばならない。この代表的なファージはその宿主特異性により非常に好熱性であり、従って、高温で安定しており、バイオテクノロジーと医学の分野の多くの適用例で有益である。非常に安定した蛋白質シェルを形成することも可能である。リポスリックスビリダエからも同様の代表例を見つけることができる。(ファージ蛋白質から形成される)蛋白質シェルが関連するプロセスで使うことが可能なバシロビリダエとグッタビリダエの好熱性および超好熱性の代表的事例についてはそれほど分類が行われていない。

【0027】

蛍光標識は蛋白質(システイン)内のチオール基およびその他の分子性物質への染料の特異的な共有結合によって行われることが多い。従って、しばしば蛍光染料のマレイミド誘導体またはヨードアセチミド誘導体を用いられる。アミノ基への結合の場合、スクシンイミジルエステル、スルホニルハライド、イソチオシアネート、そしてアルデヒドが蛍光マーカー誘導体として用いられることが多い。(蛋白質およびペプチド内の例えばセリン、トレオニン、およびチロシンなどでの)OH基、(例えば多糖類を標識するための)アルデヒドやケトン、および活性カルボニル基への特異的な結合のための多くの試薬がある。特殊な適用例としては、エフェクタ分子の蛍光標識ビオチンとの結合(ビオチン化)であろう。

【0028】

分子性物質の特異的蛍光標識は非共有結合によっても行われる。この場合、その抗原に特異的に結合するという結合性の故に、特に、蛍光標識抗体が使われる。特に、蛍光標識されたりガンドはレセプタおよび酵素、補因子、基質、あるいは基質類似物に対して適している。別の適用可能性はフェナンスリダイン(臭化エチジウム)、あるいはアクリダイン及シアニンなどの挿入物質の使用である。アミロイド発生物質の形成は染料コンゴレッドを用い、次に蛍光測定を行うことで検出することができる。

【0029】

上に述べた発明の1つの重要な適用例はアミロイド発症の診断である。患者の、例えば、ホモジナイズ組織、液体、血液、尿、およびその他の体液からの生物学的物質を、1または複数の異なった蛍光標識された蛋白質あるいはペプチド(マーカー)と混合し、一定時間インキュベートする。その患者の物質内に可溶性単量体ペプチドまたは蛋白質形態、あるいは結合プロセスのための結晶化のためのシード(一次会合体)、この時期の用いられたマーカーを有する凝集体あるいは会合体の形態として含まれている可能性がある。温度、培養期間、溶液添加、pH値などのプロセス変数を適切に選択することによって、さらに、当業者が周知の最適化および選択を行った後に、単量体形態あるいはすでに形成された会合体、あるいは会合体形成のための結晶化のシードの識別を行うことができる。患

者のテスト溶液内にやはり存在している細胞因子あるいは触媒は、確認の正確さを妨げることなしに会合体形成に寄与することができる。

【0030】

この方法は1つの操作サイクルで種々の分子物質を提供的に分類することを可能にし、FACS装置内での会合体(タイプの違いはここでは異なった蛍光標識によって区別することができる)発現の相対的頻度はテスト溶液(例えば患者の液体)内に存在しているサブユニットの量に比例している。異なったマーカーのために異なった蛍光染料を用いることによって、例えば、タウ蛋白質、アルツハイマーペプチド(1-42)、アルツハイマーペプチド(1-40)を同時並行的に検出することができる。同時に、コンゴレッドの使用によって、形成された凝集体のアミロイド発生性特性について調べることもできる。最新のFACS装置は4つの蛍光を同時に検出することを可能にしており、従って、高度に正確な診断を行うことができる。非常に感度の高い単一粒子測定が行われるので、このテストに必要なテスト物質は非常に少なく、これは患者にとっては好適である。上に述べたような測定変数は非常に幅広い範囲で設定できるので、患者テストの特性を非常に正確に分類することができ、これによって、適切な標準化あるいはその疾病の経過および進行の判定後に優れた定量的判定を行うことができる。

【0031】

アミロイド発生症の分野での診断的使用とは別に、上に述べた方法で治療用物質のスクリーニングを行うことも可能である。この場合、アミロイド発生性凝集体は治療用物質が存在している状況で、測定変数として役立ち、アミロイド発生性凝集体の形成を阻止する物質が治療的にも有効であると期待できる。上に述べたアミロイド発生性凝集体を溶解できる物質も治療的に有効である可能性がある。

【0032】

検出しようとしている物質と同じマーカーの使用(蛍光標識は例外として)の他に、検出されるべき物質と部分的にだけ同じマーカーの使用も有用である場合がある。この場合、特定の蛋白質において、標的物質とほとんど同じであるがそのアミノ酸配列の1つまたは複数の箇所に置換基を有している蛋白質フラグメン

トあるいはペプチドを用いることができる。そうした相同性配列もそれらが天然の配列と比較して他の、そして多くの場合集合あるいは結合にとってより好ましい性質を持っている可能性をもっている限り、役に立つ可能性がある。こうした均一な配列の明確化は本明細書に述べられている発明を用いて行うことができる。さらに、この方法を用いれば、凝集体および会合体形成の動力学的確認やここに述べられている方法の診断的、分析的記述をさらに拡張することも容易に行うことができる。特に、アミロイド発生性疾患の診断において、異なった動力学的相間の区別を行うことも可能である。追加分子がより大きな凝集体あるいは会合体に急速に結集している現象は、結晶化のためのシードの最初の（そしてよりゆっくりした）形成後だけに起きることが多い。従って人為的な凝集体化シードを添加すれば凝集体化あるいは集合化のプロセスをスピードアップすることも可能である。

【0033】

FACS装置の標準化された光学的および分光分析的範囲の他に、その装置を多少技術的に修正した後、周知の分離プロセスを用いてさらに特性毎に分子会合体を分離することができ、その場合分離された分子会合体はその光学的性質によって、あるいは吸収、環状あるいは直線状2色分光性、量子効果、励起凝集体化の寿命、エネルギー転移、強度差、あるいは放射活性など他の性質によって、特徴付けが行われる。

【0034】

本発明に述べられている方法では、蛍光標識の助けを借りて、どんな化学的性質あるいはどんな構造を有している分子会合体でも、あるいはどんな混合比率を有している分子会合体でもその特徴付けを行なえる。この特徴付けは会合体あるいは凝集体などの集合の統計的解釈によって行われ、それによって各単一または複数の凝集体（粒子）の特定の特徴を測定することができる。本発明の別の特徴は、特徴付けと同時並行的に重要な特徴に基づいて分子粒子の選別および計数が可能なことである。従って、電子顕微鏡、蛍光顕微鏡、蛍光相関分光分析などの分析的方法を用いて、FACS分析後に収集された種を調べることができる。

【0035】

特定の性質を示すFACSによって特徴付け、選別が行われた分子会合体を（例えば、細胞培養、動物モデル、あるいは均一で定量的に価値あるソース物質を用いたテストなど）さらなる実験で用いることができる。これによって、望ましい性質に関連して、正確に定義され、特徴付けが行われた均一集団の分子性粒子を用いることが可能になる。多くの場合、これは実験にとって基本的要件である。

【0036】

ここで述べられている方法の1つの重要な利点はFACS法の標準化と広い範囲での普及である。この技術はすべての診断センターで確立されており、それに基づく医学的テスト方法はインフラストラクチャとして重要な利点を有している。FACSは一般的には流動ストリームで行われ、つまり測定されるべきサンプルはその装置を通じて継続的に流れる。こうしたフロースルーシステムはハイスループットスクリーニングのために自動化には特に適している。この装置はサンプルの各サイクル後、迅速かつ自動的にフラッシュすることができ、他の手作業や1方向物質の交換は不必要である。自動サンプリング装置の使用によって、サービス係員に対して過重な負担をかけることなく、ワークステーションで大きなサンプル流量を得ることが可能になる。

【0037】

本発明は異なる構造が異なる蛍光染料で標識されている限り、各粒子の異なる構造の組成の定量的比率を明確にすることができる。従って、非常に正確な定量化を行って、その組成の平均値とは別に、その集団内の組成の統計的分布に関する正確な記述を提供することも可能である。さらに、それら粒子はかならずしも直接的に標識される必要はなく、例えば、定義されるべき準構造に結合する特異的なリガンドが使える場合は、蛍光染料による間接標識を行うこともできる。

【0038】

最後に、例えば、DNA、RNA、ペプチド、あるいは蛋白質などの治療的に有効な物質に対するウィルス様蛋白質シェルのパッケージング効率に関連して粒子の分子構造の分析を行うこともできる。こうした適用例は、例えば、遺伝子治療ベクター系の製造の分野に適している。これによって、そうした系の特徴付けとその後の最適化のための正確な分析用機器が提供される。

【0039】

本発明の実施の形態を以下の例で述べるが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。これらの例とその説明では、図面を参照する。

図1は、FACSによるサンプル特徴付けのための例を図式的に示している。この例で、蛍光標識サブユニットが一定の種の非標識サブユニットおよび/または会合体と合わされて、標識分子会合体を形成する。レーザーで励起した後、サイズおよび蛍光に関する信号が測定され、一定の、所定の分離と（凝集体あるいは会合体のサイズに関しての）FACS装置の動作原理に基づく選別を行うことができる。

【0040】

図2はFACS技術で特徴付けられたウィルス様キャプシドの電子顕微鏡写真およびゲルろ過分析を示している。(A)ポリオーマウィルスから得られた非会合キャプソメア。(B) pH7.2で透析した後のウィルス様ポリオーマウィルスコート45nm粒子。(C) pH8.5での透析後の30nm粒子。(D) ウィルス様ポリオーマウィルスコートのサイズ分布に関するゲルろ過テスト。

【0041】

図3はテキサスレッドで標識したウィルス様ポリオーマウィルス粒子の、図2と同様のFACS分析を示している。A：24個のキャプソメアから構成される粒子の分析、B：72個の五量体から構成されるキャプシドの会合体の分析。C：集合欠損変種PyVP1 - CT63。D：非会合状態でのキャプソメア（ウィルス様ポリオーマウィルスコートなし）。E：非会合状態でのキャプソメアのドットプロット。粒子サイズが極端に小さい（5nm）ことから、前方向光散乱は非常に弱い。F：異なったサイズの遊離五量体の蛍光ウィルス様粒子の図式的ヒストグラム図。

【0042】

図4は凝集体化の種々の条件でのアルツハイマーペプチド（1-42）のFACS分析の結果を示している。A：0.1% SDS含量溶液での蛍光標識凝集体。B：2% SDS含量溶液の場合、凝集体は他の条件が同じでも現れない。C：蛍光標識ペプチドと非蛍光標識ペプチドの混合物はより弱い蛍光を伴う凝集体を形成する。D：同じ条件下で、ペプチドなしで蛍光染料を用いた比較対象実験（ネガティブコントロール）。E：同じ条件下での比較対象実験。この場合は蛍光染料で標識

されていないアルツハイマー ペプチド (1 - 42) を使用 (ネガティブコントロール)。

【0043】

図5は異なるように標識されたPyVP1 変種のFACS分析を示している。フルオレセインとテキサスレッドで標識された種から構成されるPyVP1 - CallisS - T249C が形成される。このキャプシド集団は明確なフルオレセイン蛍光 (A のM1) とテキサスレッド蛍光 (B のM2) を示している。フルオレセイン蛍光 (FL1) をテキサスレッド蛍光と対比してグラフ化すると、両方の染料が1つの粒子上に局在している (C の右上側象限) ことが明らかになる。1つだけの染料を含んでいる粒子は検出されない。

【0044】

(実施例1)

所定サイズの蛍光標識ウィルスコートの製造とFACSによるそのウィルスシェルの特徴付け

この実施例でのウィルスコートは、溶液内で五量体であるポリオーマウィルス VP1 であり、これは現状の技術で *in vitro* で簡単にシェルに結合させることができる。従って、第1段階においては、その配列にシステインを含まないポリオーマウィルスの変種がつくられ、野生型の蛋白質の6つのシステイン (Cys-12、Cys-16、Cys-115、Cys-274、およびCys-283) が現状の技術に基づく方法で突然変異を生成させる方法でセリンと置換される。これは、その溶液の酸化還元状態がその蛋白質の状態にはまったく影響を及ぼさず、従って多くの適用事例で操作がずっと簡単になるという利点を有している。

【0045】

突然変異誘発は業者の仕様書に基づいてQuickChange 法 (Stratagene) によって実行される。突然変異誘発では以下のオリゴヌクレオチドが用いられる。

【0046】

C12S、C16S、C20S : 5' - GTC TCT AAA AGC GAG ACA AAA AGC AAA AGC ACA AAG GCT ACG CCA AGA CCC - 3' および 5' - GGG TCT TGG GCT AGC CTT TGT CTTTGT GCT TTT TGT CTC GCT TTT AGA GAC - 3'、C115S : 5' - GAG GAC CTC ACG TCT GAC AC

C CTA C - 3'および5' - GTA GGG TGT CAG ACG TGA GGT CCT C - 3' ; C274S, C
283S : 5' - GGG CCC TTC AGC AAA GGA GAA GGT CTA TAC CTC TCG TGA GAT ATA AT
G - 3'および5' - CAT TAT ATC TAC GCT CGA GAG GTA TAG ACC TTC TCC TTT GCT
GAG GGG CCC - 3'。

【0047】

さらに、C 末端で63アミノ酸が欠失している別の蛋白質をつくることもできる。
このC - 末端はその集合には不可欠であるため、従って、上に述べたコート蛋
白質の変種は集合性を欠いていない。より短くした変種PyVP1 - CT63の製造は
オリゴヌクレオチド5' - ATT ACC CGG GAT AGG GAT TTT TGA CCC ATA - 3'の助け
を借りて行われる。

【0048】

キャプソメアの特異的標識のために、1つのシステインをその蛋白質の特殊な
領域に導入することができる。これは、例えば、位置249 で、そこでスレオニン
がシステインによって置換される。突然変異誘発は業者の仕様書に基づいてQuic
kChange 法 (Stratagene) によって、オリゴヌクレオチド5' - GGA CGG GTG GGG
TGC ACG GTG CAG TG - 3'および5' - CAC TCG AGG CAC GTG CAA CCC ACC CGT CC -
3'を用いて実行される。

【0049】

標準的な方法によって製造された蛋白質PyVP1-Ca11s-T249C の集合は、先ず、
この技術の現状 (cf. Salunke, Caspar & Carcea, Biophys. J, 56, S.887-900,
1989) に関してすでに述べた条件と同じ条件で行われる。ここでは、2つの会
合体変種を用いる。10mM HEPES、50mM NaCl 、0.5mM NaCl_2 、5 %グリシン、
pH7.2 による蛋白質の透析を室温で72時間行った後、(72 個のキャプソメアで構
成されている) 直径が45nmのウィルス様キャプシドが得られる。他方、10mM HEP
ES、50mM NaCl 、0.5mM NaCl_2 、5 %グリシン、pH8.5 で室温で72時間透析を
行った後では24個のキャプソメアから構成されるずっと小さな粒子 (直径30nm)
が得られる。

【0050】

この実験でのPyVP1-Ca11s-T249C 蛋白質は可溶性五量体として発現され、天然

性のものであり、それが集合能力を有していることを示している。図2に、ゲルろ過実験を示しており、これはPyVP1-Ca11s-T249蛋白質が適切な条件下で異なったサイズのキャプシド状構造に集合できることを示している。図2には電子顕微鏡写真による形成されたキャプシドも示している。

【0051】

染料フルオレセインマレイミドまたはテキサスレッドマレイミド (Molecular Probe) を用いて業者の仕様書に従って、会合前に生成キャプソメアを標識することができる。これによって、1つのシステイン249のサイトでの特異的な結合が行われる。

【0052】

図3は会合粒子のFACS分析の結果を示している。FACS分析においては、それらの粒子は驚くほど良好に検出されており、それらは相互に区別することもでき、各粒子についてサイズおよびその構造分布を調べることができる。

【0053】

(実施例2)

アルツハイマー ペプチドの凝集体化の特徴付け

合成型のアルツハイマー ペプチド(1-42)がSigma社により市販されている。このペプチドを10mM HEPES、50mM NaCl、および2% SDS、pH7.2を含む緩衝液に溶解する。ペプチドはメーカーの仕様書に従って、アミノ基で染料ローダミン-X-スクシンイミジルエステル (Molecular Probe) によってうまく蛍光標識される。過剰な染料のほとんどはその後ゲルろ過カラムによってペプチドから分離される。このようにして標識された(ゲルろ過の画分3からの)ペプチドは3つの同時並行的な実験において用いられる。一方、SDSを含まない緩衝剤によって希釈(1:20)することで凝集体化が誘発される。得られた凝集体はFACS法によって検出することができる(図4A)。比較対象(実験2)で、SDSを含有した緩衝剤(2% SDS、w/v)によって希釈すると、凝集体は形成されず、特異的なFACS信号は起こらない(図4B)。

【0054】

3つめの実験で、SDSを含まないが非標識アルツハイマー ペプチドを含む緩

衝液を付加すると、予想されるように再び凝集体が現れるが、それらは副次的な蛍光信号を発生するだけで、明らかに、標識されていないペプチドが凝集体の形成に参与していることが示された（これは、散乱曲線によれば、同じサイズの分布を示す）（図4C）。

【0055】

比較例として、溶解した蛍光染料（ゲルろ過の画分4）についての測定も行ったが（図4D）、これはアルツハイマーペプチド(1-42)凝集体の代わりに特異的なFACS信号は示さない。比較対象として用いられた標識されていないペプチド（図4E）も特異的なFACS信号を示さない。

【0056】

この実施例は、例えばアルツハイマーペプチドから構成される凝集体のサイズ、タイプおよび組成をFACS技術の助けを借りて個別的に特徴付けできることを示している。同時に、例えば患者の液体からなどの同じ化学的性質を有する非標識ペプチドをアミロイド発生性凝集体に組み込むことができることも示されている。従って、この方法により、高度の感度と特異性で分子会合体および凝集体を特徴付けする可能性が示されており、病理性沈着物の特徴付けを行うことができる。

【0057】

（実施例3）

混合キャプシドの製造と特徴付け

混合蛋白質シェル（キャプシド）、つまり、いくつかの異なる分子性物質からモザイク状に組み込まれた粒子の特徴付けは、本発明による可能性の特に優れた実証である。異なるコート蛋白質からコート蛋白質の変種PyVP1-Ca11s-T249Cの単一システイン249上に集合された混合キャプシドを確認するために、第1の実験で、蛍光染料フルオレインマレイミドを結合して、第2の実験では、テキサスレッドマレイミドを結合させる。この異なるように標識されたキャプソメアを混合して、等モル比率で相互に集合させる。キャプシド形成の分析はFACSによって行われる。これにより1つの粒子内での異なる蛍光物質の検出が可能となる。図5は等モル条件下で集合されたキャプシドの分析を示している。蛍光物質で標

識されたキャプシドの集団および遊離した、非集合キャプソメアの集団が示されている(図5A)。フルオレセイン蛍光対テキサスレッド蛍光を比較するグラフを作成することで、両方の蛍光物質を同時に含む粒子の集団が監視される。しかしながら、1つの染料だけで標識された粒子は存在しない。

【0058】

この実施例は、ここに述べられている方法がモザイク状に集合したポリオーマウィルスVP1 コート蛋白質の特徴付けを可能にすることを示しており、集合中に形成される各単一粒子が両方の異なるように蛍光標識されたキャプソメアタイプを組み込んでいることも実証されている。光ビーム内に存在するすべての蛍光の平均値を測定する他のすべての分光分析的方法とは対照的に、この方法の場合、多数の個別粒子に基づく分子会合体および凝集体の構造の分布の判定を可能にする。これによって、個々の粒子の特徴付けとは別に、各粒子に組み込まれたサブユニットの統計的分布を測定することも、それらが異なった蛍光染料によって標識されている場合には可能になる。

【配列表】

SEQUENZPROTOKOLL

<110> ACGT ProGenomics AG

<120> Verfahren zur Charakterisierung und zur Auftrennung von molekularen Assoziaten

<130> P12606

<140>

<141>

<150> DE - 199 52 955.8

<151> 1999-11-03

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1152

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Variante von Polyomavirus VP1 mit allen natürlichen Cysteinen ersetzt durch Serin, und Einführen eines neuen Cysteins anstelle von Thr 249 (PyVP1-CallS-T249C)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1152)

<400> 1

atg gcc ccc aaa aga aaa agc ggc gtc tct aaa agc gag aca aaa agc	48
Met Ala Pro Lys Arg Lys Ser Gly Val Ser Lys Ser Glu Thr Lys Ser	
1 5 10 15	
aca aag gct agc cca aga ccc gca ccc gtt ccc aaa ctg ctt att aaa	96
Thr Lys Ala Ser Pro Arg Pro Ala Pro Val Pro Lys Leu Leu Ile Lys	
20 25 30	
ggg ggt atg gag gtg ctg gac ctt gtg aca ggg cca gac agt gtg aca	144
Gly Gly Met Glu Val Leu Asp Leu Val Thr Gly Pro Asp Ser Val Thr	
35 40 45	

gaa ata gaa gct ttt ctg aac ccc aga atg ggg cag cca ccc acc cct	192
Glu Ile Glu Ala Phe Leu Asn Pro Arg Met Gly Gln Pro Pro Thr Pro	
50 55 60	
gaa agc cta aca gag gga ggg caa tac tat ggt tgg agc aga ggg att	240
Glu Ser Leu Thr Glu Gly Gly Gln Tyr Tyr Gly Trp Ser Arg Gly Ile	
65 70 75 80	
aat ttg gct aca tca gat aca gag gat tcc cca gga aat aat aca ctt	288
Asn Leu Ala Thr Ser Asp Thr Glu Asp Ser Pro Gly Asn Asn Thr Leu	
85 90 95	
ccc aca tgg agt atg gca aag ctc cag ctt ccc atg ctc aat gag gac	336
Pro Thr Trp Ser Met Ala Lys Leu Gln Leu Pro Met Leu Asn Glu Asp	
100 105 110	
ctc acg tct gac acc cta caa atg tgg gag gca gtc tca gtg aaa acc	384
Leu Thr Ser Asp Thr Leu Gln Met Trp Glu Ala Val Ser Val Lys Thr	
115 120 125	
gag gtg gtg ggc tct ggc tca ctg tta gat gtg cat ggg ttc aac aaa	432
Glu Val Val Gly Ser Gly Ser Leu Leu Asp Val His Gly Phe Asn Lys	
130 135 140	
ccc aca gat aca gta aac aca aaa gga att tcc act cca gtg gaa ggc	480
Pro Thr Asp Thr Val Asn Thr Lys Gly Ile Ser Thr Pro Val Glu Gly	
145 150 155 160	
agc caa tat cat gtg ttt gct gtg ggc ggg gaa ccg ctt gac ctc cag	528
Ser Gln Tyr His Val Phe Ala Val Gly Gly Glu Pro Leu Asp Leu Gln	
165 170 175	
gga ctt gtg aca gat gcc aga aca aaa tac aag gaa gaa ggg gta gta	576
Gly Leu Val Thr Asp Ala Arg Thr Lys Tyr Lys Glu Glu Gly Val Val	
180 185 190	
aca atc aaa aca atc aca aag aag gac atg gtc aac aaa gac caa gtc	624
Thr Ile Lys Thr Ile Thr Lys Lys Asp Met Val Asn Lys Asp Gln Val	
195 200 205	
ctg aat cca att agc aag gcc aag ctg gat aag gac gga atg tat cca	672
Leu Asn Pro Ile Ser Lys Ala Lys Leu Asp Lys Asp Gly Met Tyr Pro	
210 215 220	
gtc gaa atc tgg cat cca gat cca gca aaa aat gag aac aca agg tac	720
Val Glu Ile Trp His Pro Asp Pro Ala Lys Asn Glu Asn Thr Arg Tyr	
225 230 235 240	

```

ttt ggc aat tac act gga ggc acg tgc acc cca ccc gtc ctg cag ttc 768
Phe Gly Asn Tyr Thr Gly Gly Thr Cys Thr Pro Pro Val Leu Gln Phe
                245                250                255

aca aac acc ctg aca act gtg ctc cta gat gaa aat gga gtt ggg ccc 816
Thr Asn Thr Leu Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu Asn Gly Val Gly Pro
                260                265                270

ctc agc aaa gga gaa ggt cta tac ctc tcg agc gta gat ata atg ggc 864
Leu Ser Lys Gly Glu Gly Leu Tyr Leu Ser Ser Val Asp Ile Met Gly
                275                280                285

tgg aga gtt aca aga aac tat gat gtc cat cac tgg aga ggg ctt ccc 912
Trp Arg Val Thr Arg Asn Tyr Asp Val His His Trp Arg Gly Leu Pro
                290                295                300

aga tat ttc aaa atc acc ctg aga aaa aga tgg gtc aaa aat ccc tat 960
Arg Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Arg Lys Arg Trp Val Lys Asn Pro Tyr
305                310                315                320

ccc atg gcc tcc ctc ata agt tcc ctt ttc aac aac atg ctc ccc caa 1008
Pro Met Ala Ser Leu Ile Ser Ser Leu Phe Asn Asn Met Leu Pro Gln
                325                330                335

gtg cag ggc caa ccc atg gaa ggg gag aac acc cag gta gag gag gtt 1056
Val Gln Gly Gln Pro Met Glu Gly Glu Asn Thr Gln Val Glu Glu Val
                340                345                350

aga gtg tat gat ggg act gaa cct gta ccg ggg gac cct gat atg acg 1104
Arg Val Tyr Asp Gly Thr Glu Pro Val Pro Gly Asp Pro Asp Met Thr
                355                360                365

cgc tat gtt gac cgc ttt gga aaa aca aag act gta ttt cct ccc ggg 1152
Arg Tyr Val Asp Arg Phe Gly Lys Thr Lys Thr Val Phe Pro Pro Gly
                370                375                380

```

<210> 2

<211> 384

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Variante
von Polyomavirus VP1 mit allen natürlichen
Cysteinen ersetzt durch Serin, und Einführen eines
neuen Cysteins anstelle von Thr 249
(PyVP1-Calls-T249C).

<400> 2

Met Ala Pro Lys Arg Lys Ser Gly Val Ser Lys Ser Glu Thr Lys Ser
 1 5 10 15
 Thr Lys Ala Ser Pro Arg Pro Ala Pro Val Pro Lys Leu Leu Ile Lys
 20 25 30
 Gly Gly Met Glu Val Leu Asp Leu Val Thr Gly Pro Asp Ser Val Thr
 35 40 45
 Glu Ile Glu Ala Phe Leu Asn Pro Arg Met Gly Gln Pro Pro Thr Pro
 50 55 60
 Glu Ser Leu Thr Glu Gly Gly Gln Tyr Tyr Gly Trp Ser Arg Gly Ile
 65 70 75 80
 Asn Leu Ala Thr Ser Asp Thr Glu Asp Ser Pro Gly Asn Asn Thr Leu
 85 90 95
 Pro Thr Trp Ser Met Ala Lys Leu Gln Leu Pro Met Leu Asn Glu Asp
 100 105 110
 Leu Thr Ser Asp Thr Leu Gln Met Trp Glu Ala Val Ser Val Lys Thr
 115 120 125
 Glu Val Val Gly Ser Gly Ser Leu Leu Asp Val His Gly Phe Asn Lys
 130 135 140
 Pro Thr Asp Thr Val Asn Thr Lys Gly Ile Ser Thr Pro Val Glu Gly
 145 150 155 160
 Ser Gln Tyr His Val Phe Ala Val Gly Gly Glu Pro Leu Asp Leu Gln
 165 170 175
 Gly Leu Val Thr Asp Ala Arg Thr Lys Tyr Lys Glu Glu Gly Val Val
 180 185 190
 Thr Ile Lys Thr Ile Thr Lys Lys Asp Met Val Asn Lys Asp Gln Val
 195 200 205
 Leu Asn Pro Ile Ser Lys Ala Lys Leu Asp Lys Asp Gly Met Tyr Pro
 210 215 220
 Val Glu Ile Trp His Pro Asp Pro Ala Lys Asn Glu Asn Thr Arg Tyr
 225 230 235 240
 Phe Gly Asn Tyr Thr Gly Gly Thr Cys Thr Pro Pro Val Leu Gln Phe
 245 250 255

Thr Asn Thr Leu Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu Asn Gly Val Gly Pro
 260 265 270
 Leu Ser Lys Gly Glu Gly Leu Tyr Leu Ser Ser Val Asp Ile Met Gly
 275 280 285
 Trp Arg Val Thr Arg Asn Tyr Asp Val His His Trp Arg Gly Leu Pro
 290 295 300
 Arg Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Arg Lys Arg Trp Val Lys Asn Pro Tyr
 305 310 315 320
 Pro Met Ala Ser Leu Ile Ser Ser Leu Phe Asn Asn Met Leu Pro Gln
 325 330 335
 Val Gln Gly Gln Pro Met Glu Gly Glu Asn Thr Gln Val Glu Glu Val
 340 345 350
 Arg Val Tyr Asp Gly Thr Glu Pro Val Pro Gly Asp Pro Asp Met Thr
 355 360 365
 Arg Tyr Val Asp Arg Phe Gly Lys Thr Lys Thr Val Phe Pro Pro Gly
 370 375 380

<210> 3

<211> 963

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VP1-Protein
 von Polyomavirus, verkürzt um 63 Aminosäuren am
 C-Terminus, Ersetzung aller Cysteine durch Serin
 sowie Austausch von Thr 249 gegen Cys
 (PyVP1-DCT63)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(963)

<400> 3

atg gcc ccc aaa aga aaa agc ggc gtc tct aaa agc gag aca aaa agc 48
 Met Ala Pro Lys Arg Lys Ser Gly Val Ser Lys Ser Glu Thr Lys Ser
 1 5 10 15
 aca aag gct agc cca aga ccc gca ccc gtt ccc aaa ctg ctt att aaa 96

Thr	Lys	Ala	Ser	Pro	Arg	Pro	Ala	Pro	Val	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Lys	
			20					25						30		
ggg	ggt	atg	gag	gtg	ctg	gac	ctt	gtg	aca	ggg	cca	gac	agt	gtg	aca	144
Gly	Gly	Met	Glu	Val	Leu	Asp	Leu	Val	Thr	Gly	Pro	Asp	Ser	Val	Thr	
		35					40					45				
gaa	ata	gaa	gct	ttt	ctg	aac	ccc	aga	atg	ggg	cag	cca	ccc	acc	cct	192
Glu	Ile	Glu	Ala	Phe	Leu	Asn	Pro	Arg	Met	Gly	Gln	Pro	Pro	Thr	Pro	
	50					55				60						
gaa	agc	cta	aca	gag	gga	ggg	caa	tac	tat	ggt	tgg	agc	aga	ggg	att	240
Glu	Ser	Leu	Thr	Glu	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Trp	Ser	Arg	Gly	Ile	
	65				70					75					80	
aat	ttg	gct	aca	tca	gat	aca	gag	gat	tcc	cca	gga	aat	aat	aca	ctt	288
Asn	Leu	Ala	Thr	Ser	Asp	Thr	Glu	Asp	Ser	Pro	Gly	Asn	Asn	Thr	Leu	
			85						90					95		
ccc	aca	tgg	agt	atg	gca	aag	ctc	cag	ctt	ccc	atg	ctc	aat	gag	gac	336
Pro	Thr	Trp	Ser	Met	Ala	Lys	Leu	Gln	Leu	Pro	Met	Leu	Asn	Glu	Asp	
			100					105					110			
ctc	acg	tct	gac	acc	cta	caa	atg	tgg	gag	gca	gtc	tca	gtg	aaa	acc	384
Leu	Thr	Ser	Asp	Thr	Leu	Gln	Met	Trp	Glu	Ala	Val	Ser	Val	Lys	Thr	
		115					120					125				
gag	gtg	gtg	ggc	tct	ggc	tca	ctg	tta	gat	gtg	cat	ggg	ttc	aac	aaa	432
Glu	Val	Val	Gly	Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Asp	Val	His	Gly	Phe	Asn	Lys	
	130					135					140					
ccc	aca	gat	aca	gta	aac	aca	aaa	gga	att	tcc	act	cca	gtg	gaa	ggc	480
Pro	Thr	Asp	Thr	Val	Asn	Thr	Lys	Gly	Ile	Ser	Thr	Pro	Val	Glu	Gly	
	145				150					155				160		
agc	caa	tat	cat	gtg	ttt	gct	gtg	ggc	ggg	gaa	ccg	ctt	gac	ctc	cag	528
Ser	Gln	Tyr	His	Val	Phe	Ala	Val	Gly	Gly	Glu	Pro	Leu	Asp	Leu	Gln	
			165					170					175			
gga	ctt	gtg	aca	gat	gcc	aga	aca	aaa	tac	aag	gaa	gaa	ggg	gta	gta	576
Gly	Leu	Val	Thr	Asp	Ala	Arg	Thr	Lys	Tyr	Lys	Glu	Glu	Gly	Val	Val	
		180						185					190			
aca	atc	aaa	aca	atc	aca	aag	aag	gac	atg	gtc	aac	aaa	gac	caa	gtc	624
Thr	Ile	Lys	Thr	Ile	Thr	Lys	Lys	Asp	Met	Val	Asn	Lys	Asp	Gln	Val	
		195						200					205			
ctg	aat	cca	att	agc	aag	gcc	aag	ctg	gat	aag	gac	gga	atg	tat	cca	672

```

Leu Asn Pro Ile Ser Lys Ala Lys Leu Asp Lys Asp Gly Met Tyr Pro
  210                      215                      220

ggt gaa atc tgg cat cca gat cca gca aaa aat gag aac aca agg tac 720
Val Glu Ile Trp His Pro Asp Pro Ala Lys Asn Glu Asn Thr Arg Tyr
225                      230                      235                      240

ttt ggc aat tac act gga ggc acg tgc acc cca ccc gtc ctg cag ttc 768
Phe Gly Asn Tyr Thr Gly Gly Thr Cys Thr Pro Pro Val Leu Gln Phe
                      245                      250                      255

aca aac acc ctg aca act gtg ctc cta gat gaa aat gga gtt ggg ccc 816
Thr Asn Thr Leu Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu Asn Gly Val Gly Pro
                      260                      265                      270

ctc agc aaa gga gaa ggt cta tac ctc tcg agc gta gat ata atg ggc 864
Leu Ser Lys Gly Glu Gly Leu Tyr Leu Ser Ser Val Asp Ile Met Gly
                      275                      280                      285

tgg aga gtt aca aga aac tat gat gtc cat cac tgg aga ggg ctt ccc 912
Trp Arg Val Thr Arg Asn Tyr Asp Val His His Trp Arg Gly Leu Pro
                      290                      295                      300

aga tat ttc aaa atc acc ctg aga aaa aga tgg gtc aaa aat ccc tat 960
Arg Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Arg Lys Arg Trp Val Lys Asn Pro Tyr
305                      310                      315                      320

ccc 963
Pro

```

<210> 4

<211> 321

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: VP1-Protein
von Polyomavirus, verkürzt um 63 Aminosäuren am
C-Terminus, Ersetzung aller Cysteine durch Serin
sowie Austausch von Thr 249 gegen Cys
(PyVP1-DCT63)

<400> 4

```

Met Ala Pro Lys Arg Lys Ser Gly Val Ser Lys Ser Glu Thr Lys Ser
  1                      5                      10                      15

Thr Lys Ala Ser Pro Arg Pro Ala Pro Val Pro Lys Leu Leu Ile Lys
                      20                      25                      30

```

Gly Gly Met Glu Val Leu Asp Leu Val Thr Gly Pro Asp Ser Val Thr
 35 40 45

Glu Ile Glu Ala Phe Leu Asn Pro Arg Met Gly Gln Pro Pro Thr Pro
 50 55 60

Glu Ser Leu Thr Glu Gly Gly Gln Tyr Tyr Gly Trp Ser Arg Gly Ile
 65 70 75 80

Asn Leu Ala Thr Ser Asp Thr Glu Asp Ser Pro Gly Asn Asn Thr Leu
 85 90 95

Pro Thr Trp Ser Met Ala Lys Leu Gln Leu Pro Met Leu Asn Glu Asp
 100 105 110

Leu Thr Ser Asp Thr Leu Gln Met Trp Glu Ala Val Ser Val Lys Thr
 115 120 125

Glu Val Val Gly Ser Gly Ser Leu Leu Asp Val His Gly Phe Asn Lys
 130 135 140

Pro Thr Asp Thr Val Asn Thr Lys Gly Ile Ser Thr Pro Val Glu Gly
 145 150 155 160

Ser Gln Tyr His Val Phe Ala Val Gly Gly Glu Pro Leu Asp Leu Gln
 165 170 175

Gly Leu Val Thr Asp Ala Arg Thr Lys Tyr Lys Glu Glu Gly Val Val
 180 185 190

Thr Ile Lys Thr Ile Thr Lys Lys Asp Met Val Asn Lys Asp Gln Val
 195 200 205

Leu Asn Pro Ile Ser Lys Ala Lys Leu Asp Lys Asp Gly Met Tyr Pro
 210 215 220

Val Glu Ile Trp His Pro Asp Pro Ala Lys Asn Glu Asn Thr Arg Tyr
 225 230 235 240

Phe Gly Asn Tyr Thr Gly Gly Thr Cys Thr Pro Pro Val Leu Gln Phe
 245 250 255

Thr Asn Thr Leu Thr Thr Val Leu Leu Asp Glu Asn Gly Val Gly Pro
 260 265 270

Leu Ser Lys Gly Glu Gly Leu Tyr Leu Ser Ser Val Asp Ile Met Gly
 275 280 285

Trp Arg Val Thr Arg Asn Tyr Asp Val His His Trp Arg Gly Leu Pro
 290 295 300

Arg Tyr Phe Lys Ile Thr Leu Arg Lys Arg Trp Val Lys Asn Pro Tyr
 305 310 315 320

Pro

<210> 5

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(42)

<223> Beschreibung: Alzheimer-Beta-Peptid (1-42)

<400> 5

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
 35 40

【図面の簡単な説明】

【図1】FACSによるサンプル特徴付けのための例の模式図。

【図2】FACS技術で特徴付けられたウィルス様キャプシドの電子顕微鏡写真およびゲルろ過分析。

【図3】テキサスレッドで標識したウィルス様ポリオーマウィルス粒子の、図2と同様のFACS分析。

【図4A】凝集体化の種々の条件でのアルツハイマー ペプチド(1-42)のFACS分析の結果。0.1% SDS 含量溶液での蛍光標識凝集体。

【図4B】凝集体化の種々の条件でのアルツハイマー ペプチド(1-42)のFACS分析の結果。2% SDS 含量溶液の場合、凝集体は他の条件が同じでも現れない。

【図4C】凝集体化の種々の条件でのアルツハイマー ペプチド(1-42)

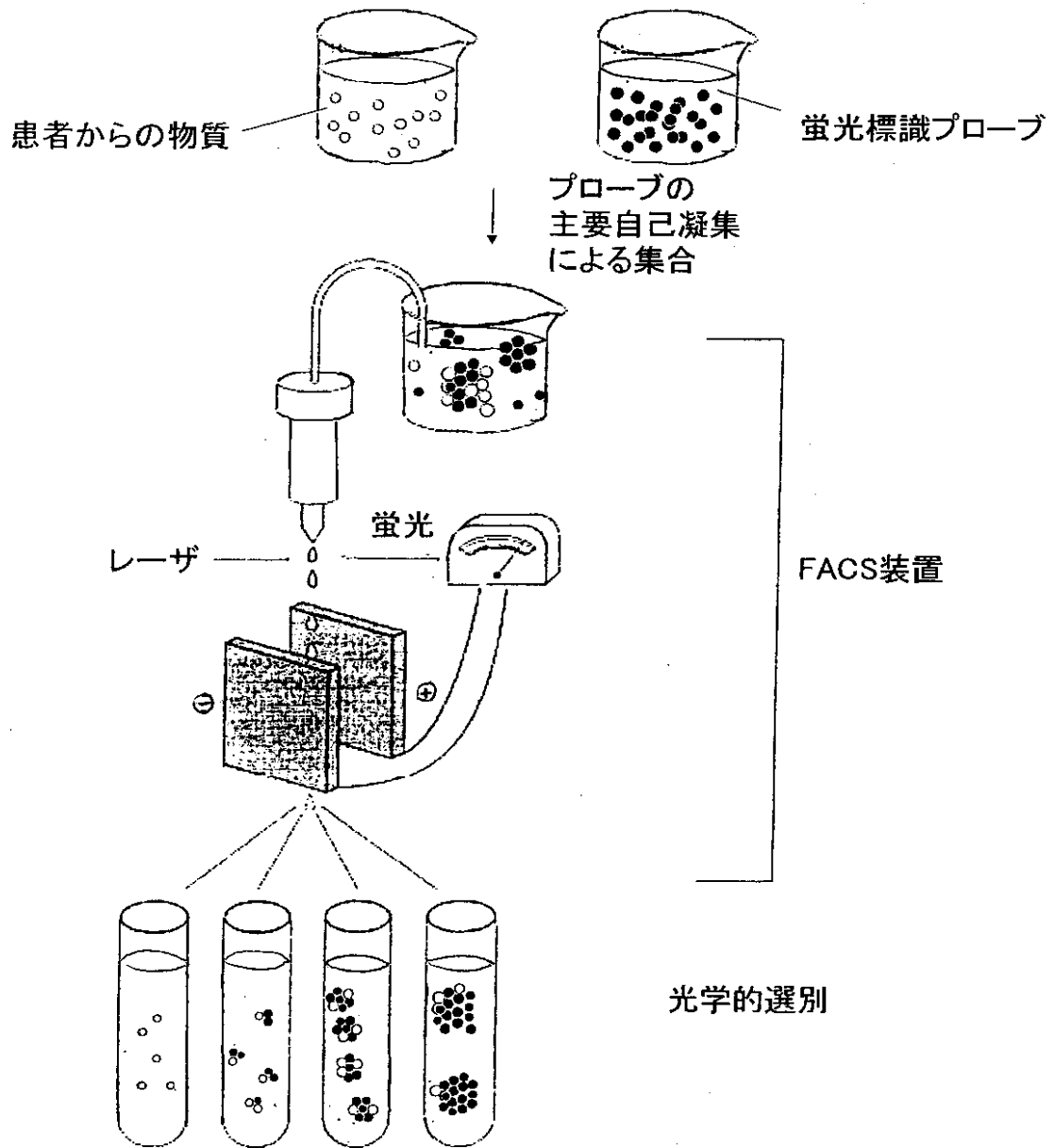
のFACS分析の結果。蛍光標識ペプチドと非蛍光標識ペプチドの混合物はより弱い蛍光を伴う凝集体を形成する。

【図4D】凝集体化の種々の条件でのアルツハイマー ペプチド(1-42)のFACS分析の結果。同じ条件下で、ペプチドなしで蛍光染料を用いた比較対象実験(ネガティブコントロール)。

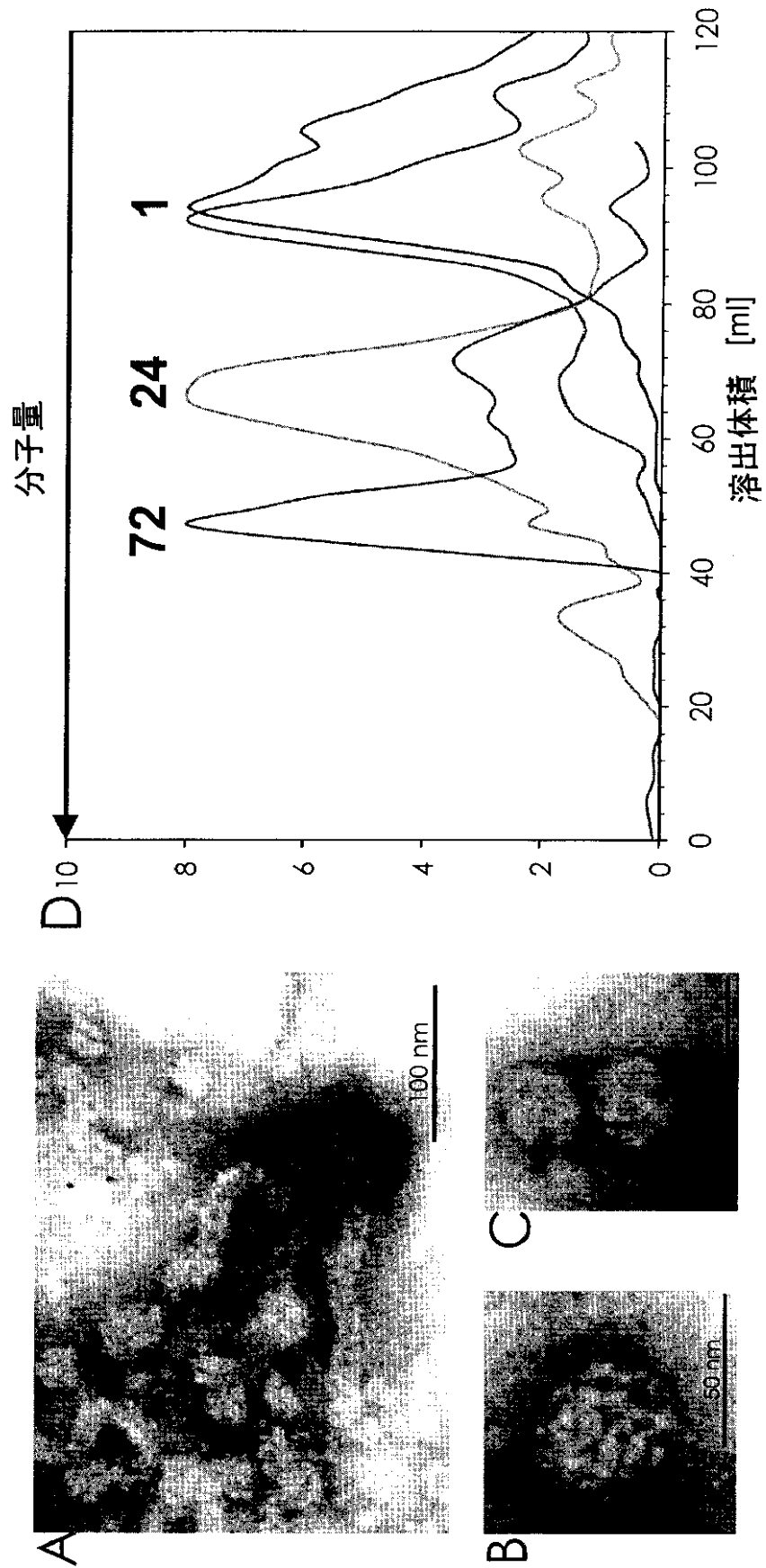
【図4E】凝集体化の種々の条件でのアルツハイマー ペプチド(1-42)のFACS分析の結果。同じ条件下での比較対象実験。この場合は蛍光染料で標識されていないアルツハイマー ペプチド(1-42)を使用(ネガティブコントロール)。

【図5】異なるように標識されたPyVPI 変種のFACS分析。

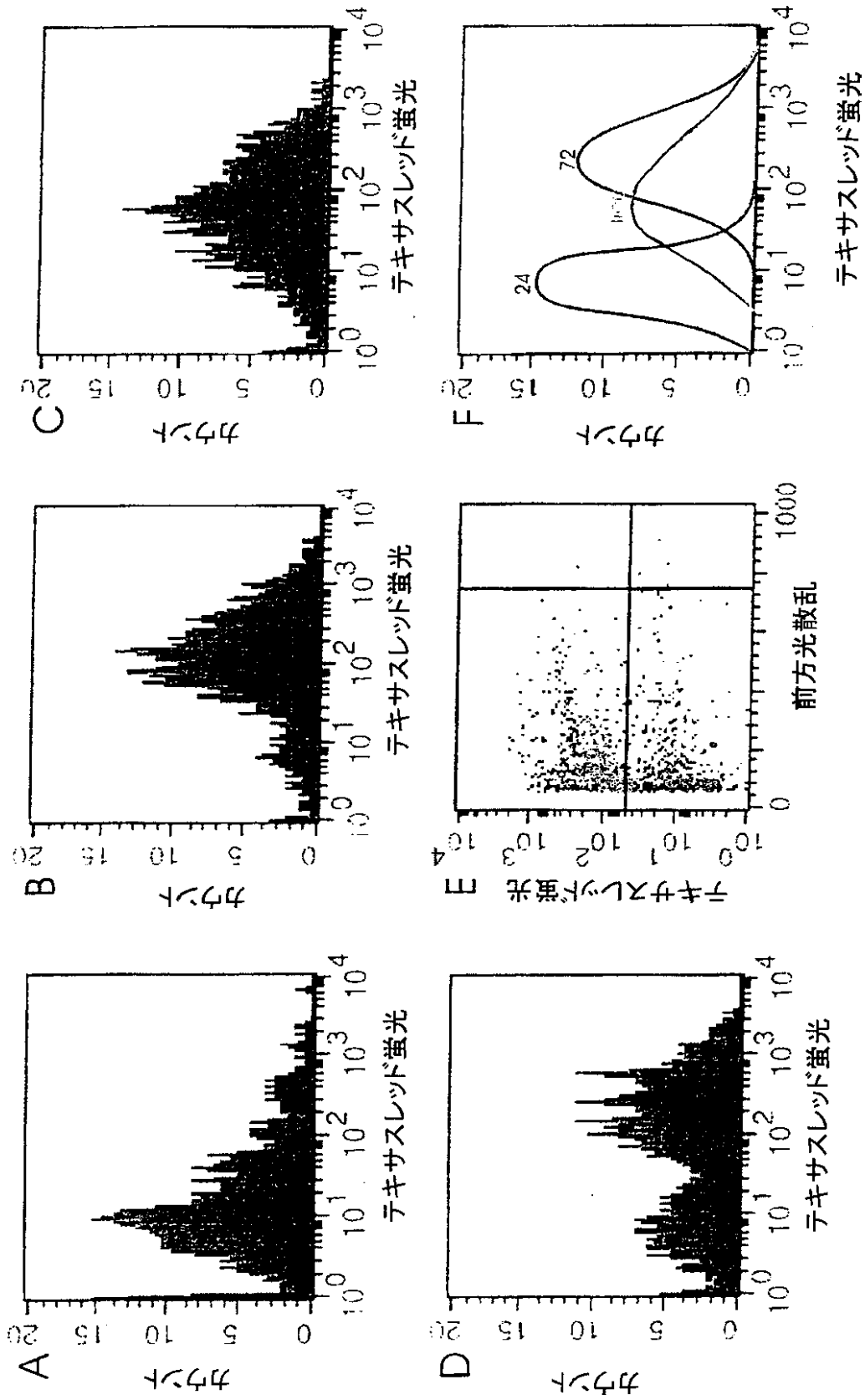
【図1】



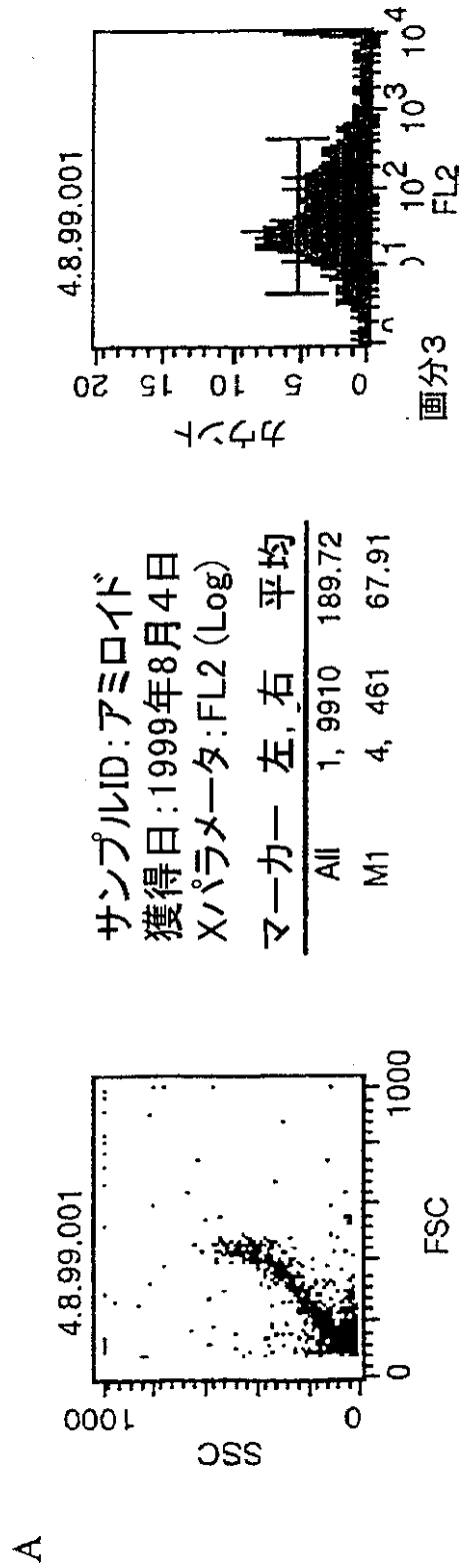
【图2】



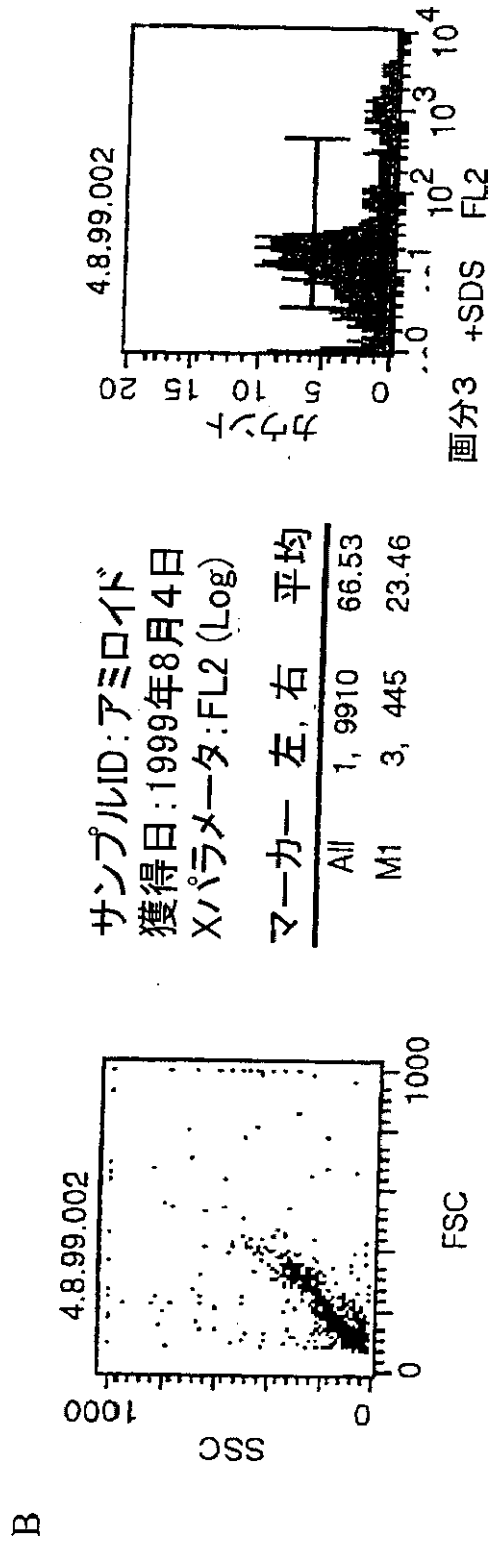
【図3】



【図4A】

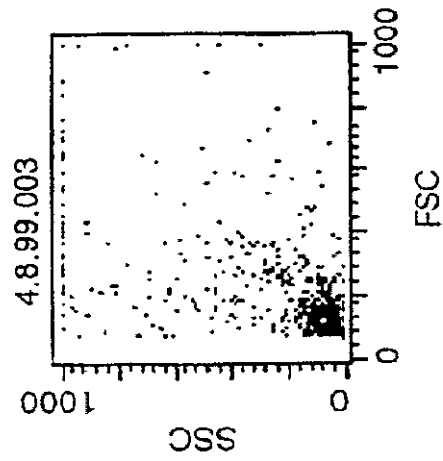


【図4B】



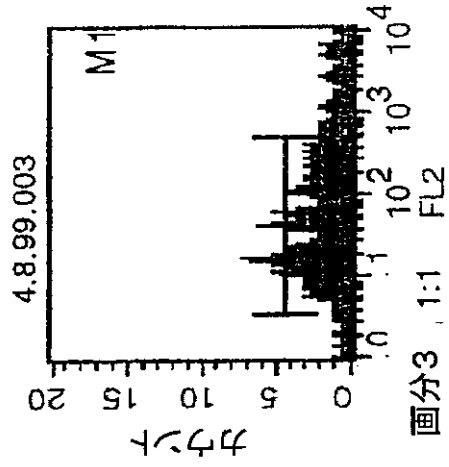
【図4C】

C

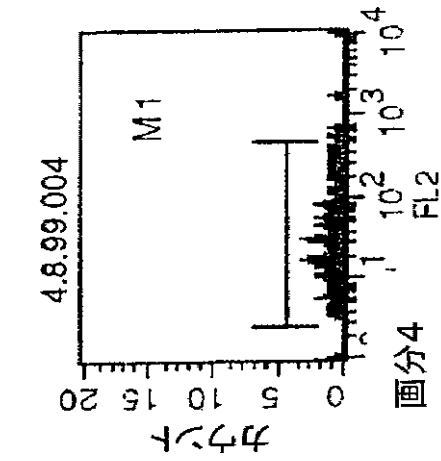


サンプルID:アミロイド
 獲得日:1999年8月4日
 Xパラメータ:FL2 (Log)

マーカー	左	右	平均
All	1,9910	279.18	
M1	3,478	76.53	

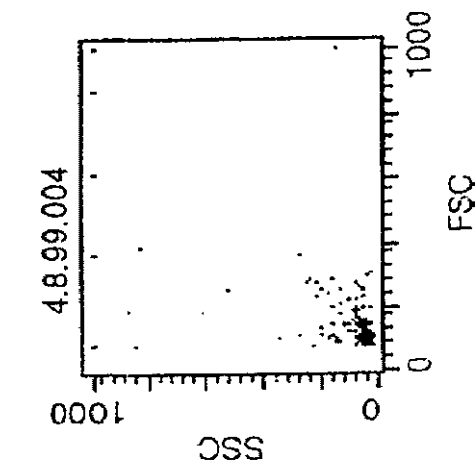


【図4D】



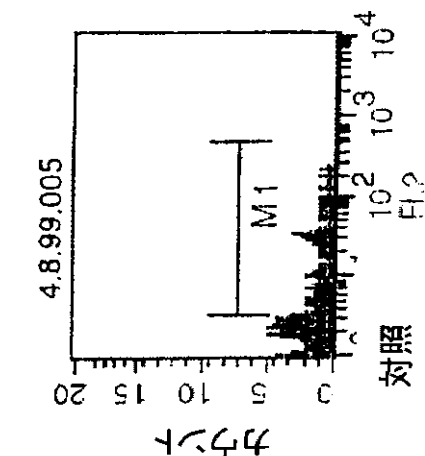
サンプルID:アミロイド
 獲得日:1999年8月4日
 Xパラメータ:FL2 (Log)

マーカー	左	右	平均
All	1,9910	135.82	
M1	2,461	71.04	



D

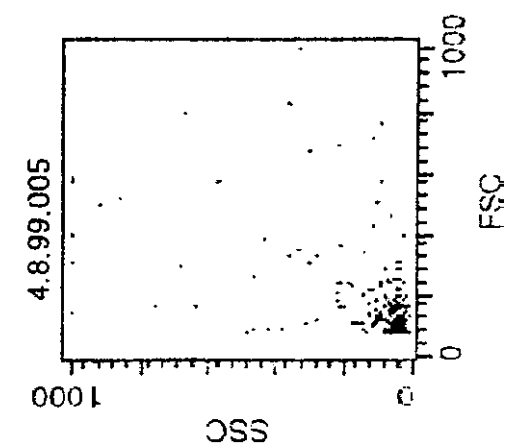
【図4E】



サンプルID: アミロイド
 獲得日: 1999年8月4日
 Xパラメータ: FL2 (Log)

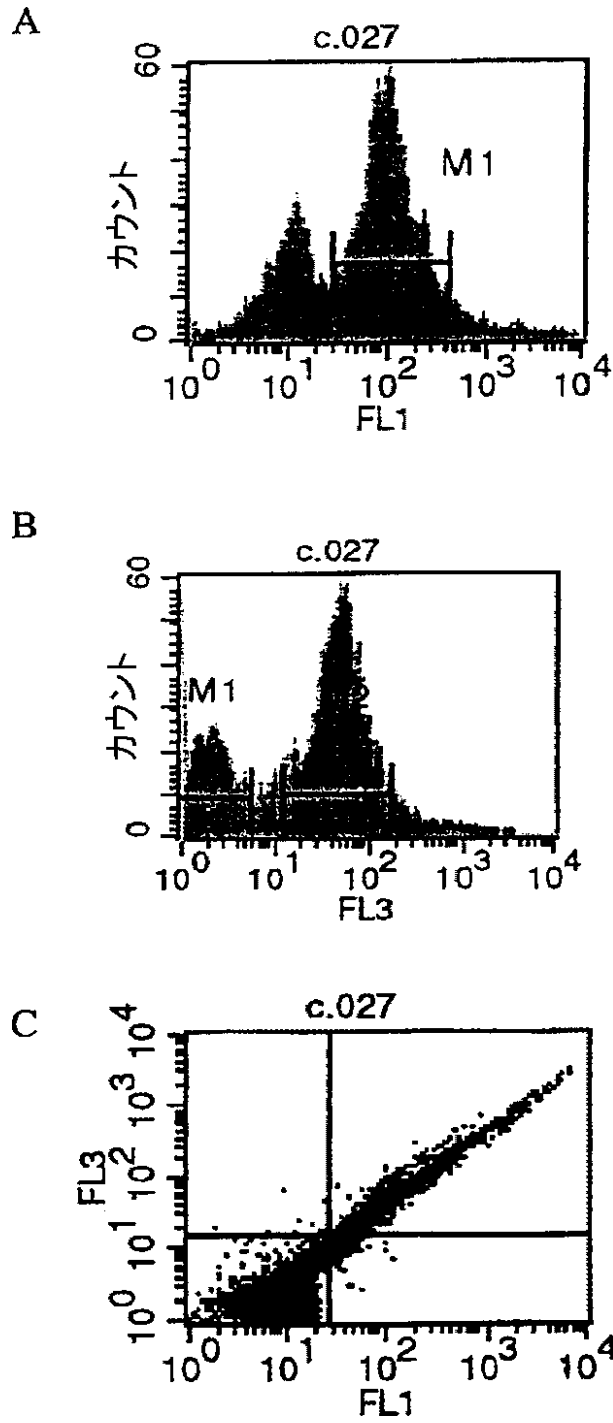
マーカー 左, 右 平均

All	1,9910	10.08
M1	3,478	24.94



E

【図5】



【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成14年1月30日(2002.1.30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 サブユニットから構成される分子会合体の特徴付けを行う方法であって、

- 非会合サブユニットを少なくとも1つの蛍光染料で直接標識し、
- 標識サブユニットを相互に、または非標識サブユニットと、もしくはサブユニットから構成された分子会合体と接触させて、沈着させるか、および/または前記標識サブユニットを相互に、または非標識サブユニットと、もしくはサブユニットから構成された分子会合体と結合させ、標識分子会合体を形成し、
- 前記標識分子会合体をFACS(蛍光活性化細胞選別装置)を通じて特徴付けを行ない、
- 特徴付けされるべき会合体のサイズが1 - 1000nmであり、
- 前記分子会合体が、ウィルスカプシドあるいはファージカプシド、プロテオソーム、シャペロン複合体またはリボゾームであるか；それらの修飾サブユニットによって構成されるか；同じまたは異なるサブユニットで構成されたペプチド会合体又は蛋白質会合体であるか；一本鎖または二本鎖DNAであるか；一本鎖または二本鎖RNAであるか；糖蛋白質会合体；脂質会合体；リン脂質会合体；炭水化物会合体；多糖類会合体；親水性または疎水性の炭水化物化合物を含む会合体；イソプレノイド系化合物の会合体；もしくはそれらの混合物であることを特徴とする方法。

【請求項2】 前記サブユニットがモノマー、ダイマーおよび/またはオリゴマーであることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記分子会合体のサブユニットが互いに同じであるか異なっ

ていることを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 前記分子会合体は任意選択で公知の方法で単離されることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項5】 前記分子会合体がアデノビリダエ、アレナビリダエ、アルテリウィルス、アストロビリダエ、バシロビリダエ、バキュロビリダエ、バトナウィルス、バリナビリダエ、ビルナビリダエ、プロモビリダエ、ブンヤビリダエ、カリシビリダエ、カプリビリダエ、カルラウィルス、カウリモウィルス、シルコビリダエ、クロステロウィルス、コモビリダエ、コロナビリダエ、コルチコビリダエ、シストビリダエ、ディアントウィルス、エマノウィルス、フィロビリダエ、フラビビリダエ、フロウィルス、フセロビリダエ、ゲニミビリダエ、グッタビリダエ、ヘパドナビリダエ、ヘルペスビリダエ、ホルデイウィルス、ヒピビリダエ、イダエノウィルス、イノビリダエ、イリドビリダエ、レビビリダエ、リボスリックスビリダエ、ルテオウィルス、マクロモウィルス、マラフィウィルス、ミクロビリダエ、ミオビリダエ、ネクロウィルス、ノダビリダエ、オルトミクソビリダエ、パポバビリダエ、パラミクソビリダエ、パルティティビリダエ、パルコビリダエ、フィコドナビリダエ、ピコルナビリダエ、プラスマビリダエ、ポドビリダエ、ポリドナビリダエ、ポテックスウィルス、ポティビリダエ、ポックスビリダエ、レオビリダエ、レトロビリダエ、ラブドビリダエ、リジディオウィルス、セキビリダエ、シホビリダエ、ソベモウィルス、テクチビリダエ、テヌイウィルス、テトラビリダエ、トバモウィルス、トブラウィルス、トガビリダエ、トムブスビリダエ、トチビリダエ、トリコウィルス、ティモウィルス、ウンブラウィルスから構成される群のウィルスキャプシドあるいはファージキャプシドであるか、あるいはそれらのキャプシドから誘導されるか、もしくは上に述べたウィルスまたはファージの1または複数の修飾サブユニットから誘導されることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項または複数項記載の方法。

【請求項6】 前記分子会合体のサブユニットが、アルツハイマー ペプチド、タウ蛋白質、プリオン蛋白質、ハンチンティン、シヌクレイン、SCA1/ アタキシン、シスタチンC、免疫グロブリン、リポ蛋白質、トランススレチン、アポリポ蛋白質A1、血清アミロイドA、島細胞アミロイドポリペプチド、インシュリ

ン、カルシトニン、 - 2 - ミクログロブリン、リソザイム、フィブリノーゲン
、ゲルソリン、心房ナトリウム排泄因子、ホックスD13 の遺伝子産物、転写因子
CBFA1 、ポリ(A) - 結合蛋白質II、またはそれらの誘導体、もしくはそれらの修
飾型またはそのフラグメントであることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1
項記載の方法。

【請求項 7】 分子会合体が、アルツハイマー病、遺伝性海綿状脳障害、ハ
ンチントン舞踏病、パーキンソン病、脊髄小脳失調I 型、および遺伝性脳アミロ
イド血管障害中、あるいは一次または反応性非全身性アミロイド症、二次全身性
アミロイド症、家族性アミロイド多発性神経障害I およびIII 、糖尿病II型、注
射局所化および透析関連アミロイド症、甲状腺脳癌、 - 2 - ミクログロブリン
アミロイド症、非神経障害性アミロイド症、遺伝性腎臓アミロイド症、フィンラ
ンド遺伝性系統性アミロイド症、心房性アミロイド症、合指症II型、マシャド -
ヨセフ病、鎖骨頭蓋骨形成不全症、および眼球咽頭筋ジストロフィ中に発現する
ことを特徴とする請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】 前記会合体が10 - 300nm 、好ましくは10 - 100nm 、そしてさ
らに好ましくは1-100nm のサイズ範囲であることを特徴とする請求項の 1 ~ 7 の
いずれか 1 項または複数項記載の方法。

【請求項 9】 サイズおよび組成に関してサブユニットから構成される分子
会合体の特徴付けにFACS法を適用する方法であって、該会合体の少なくとも 1 つ
のサブユニットを少なくとも 1 つの蛍光染料で直接標識することで分子会合体が
請求項 1 に基づいて定義されることを特徴とする適用方法。

【請求項 10】 サブユニットから構成される分子会合体の特徴付けを行う
方法であって、前記分子会合体が、アルツハイマー病、遺伝性海綿状脳障害、ハ
ンチントン舞踏病、パーキンソン病、脊髄小脳失調I 型、および遺伝性脳アミロ
イド血管障害中などの神経変性疾患と共に、あるいは一次または反応性非全身性
アミロイド症、二次全身性アミロイド症、家族性アミロイド多発性神経障害I お
よびIII 、糖尿病II型、注射局所化および透析関連アミロイド症、甲状腺脳癌、
 - 2 - ミクログロブリンアミロイド症、非神経障害性アミロイド症、遺伝性腎
臓アミロイド症、フィンランド遺伝性系統性アミロイド症、心房性アミロイド症

、合指症II型、マシャド - ヨセフ病、鎖骨頭蓋骨形成不全症、および眼球咽頭筋ジストロフィ中に、発現することを特徴とする請求項9記載の適用方法。

【請求項11】 特徴付けされるべき会合体のサイズが10 - 300nm、好ましくは10 - 100nm、より好ましくは1 - 100nmであることを特徴とする請求項9記載の適用方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		national Application No PCT/EP 00/10877
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/537 G01N33/68 G01N33/569		
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, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 627 626 A (BURKHARDT BERND DR MED) 7 December 1994 (1994-12-07) claims 1-3	1-4, 11, 12, 14, 15
A	PALUTKE M ET AL: "FLOW CYTOMETRIC PURIFICATION OF ALZHEIMER'S DISEASE AMYLOID PLAQUE CORE USING THIOFLAVIN T" CYTOMETRY, vol. 8, no. 5, 1987, pages 494-499, XP000872269 ISSN: 0196-4763 abstract	1-4, 7-15
P, A	WO 99 57566 A (UNIV TENNESSEE RES CORP) 11 November 1999 (1999-11-11) the whole document	1-4, 7-15
-/-		
<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		*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
E earlier document but published on or after the international filing date		*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
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)		*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.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*&* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 14 June 2001		Date of mailing of the international search report 26/06/2001
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 Hart-Davis, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/10877

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	<p>WALL JONATHAN ET AL: "Flow cytometric characterization of amyloid fibrils." METHODS IN ENZYMOLOGY, vol. 309, 1999, pages 460-466, XP001006253 1999 Academic Press Inc.; Academic Press Ltd. 525 B Street, Suite 1900, San Diego, CA, 92101-4495, USA; 24-28 Oval Road, London, NW1 7DX, UK ISBN: 0-12-182210-9 the whole document ---</p>	1-4,7-15
P,A	<p>GOLDMANN CLAUDIA ET AL: "Packaging of small molecules into VP1-virus-like particles of the human polyomavirus JC virus." JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 90, no. 1, October 2000 (2000-10), pages 85-90, XP001006271 ISSN: 0166-0934 the whole document -----</p>	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/10877

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0627626 A	07-12-1994	AT 133266 T DE 59301478 D ES 2089638 T	15-02-1996 29-02-1996 01-10-1996
WO 9957566 A	11-11-1999	AU 3772199 A	23-11-1999

フロントページの続き

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

Fターム(参考) 2G045 BB29 BB51 DA36 FA12 FA16

FB06 FB07 FB12 GC15

2G054 AA06 BA10 BB04 BB20 CA23

CE02 EA03 GA04 GA05

4H045 AA20 BA70 CA01 CA45 EA65

专利名称(译)	分子聚集体的表征和分离方法		
公开(公告)号	JP2003513294A	公开(公告)日	2003-04-08
申请号	JP2001535393	申请日	2000-11-03
申请(专利权)人(译)	阿谢歌德在基因组学的专业股份公司		
[标]发明人	ベームゲラルト シュミットウルリッヒ		
发明人	ベーム、ゲラルト シュミット、ウルリッヒ		
IPC分类号	G01N33/58 C07K1/14 G01N21/78 G01N33/537 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/537 G01N33/56983 G01N33/6803 G01N33/6896 G01N2333/4709		
FI分类号	G01N33/58.Z C07K1/14.ZNA G01N21/78.C G01N33/68		
F-TERM分类号	2G045/BB29 2G045/BB51 2G045/DA36 2G045/FA12 2G045/FA16 2G045/FB06 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AA06 2G054/BA10 2G054/BB04 2G054/BB20 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054/GA05 4H045/AA20 4H045/BA70 4H045/CA01 4H045/CA45 4H045/EA65		
优先权	19952955 1999-11-03 DE		
其他公开文献	JP2003513294A5 JP3774664B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种表征分子缔合的方法，特别是尺寸小于300nm的颗粒，以及任选地分离它们的方法，其中以这种分子缔合的荧光染料标记的亚基被用作标记。并且标记的聚集体和聚集体的特征在于FACS（荧光激活细胞分选仪）。

