

(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2008-532475

(P2008-532475A)

(43) 公表日 平成20年8月21日(2008.8.21)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/37	(2006.01)	C 1 2 Q 1/37		4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2006-516030 (P2006-516030)	(71) 出願人	591003013
(86) (22) 出願日	平成16年6月22日 (2004.6.22)		エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成18年2月7日 (2006.2.7)		F. HOFFMANN-LA ROCH
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/006750		E AKTIENGESELLSCHAFT
(87) 国際公開番号	W02005/001481		T
(87) 国際公開日	平成17年1月6日 (2005.1.6)		スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
(31) 優先権主張番号	10328125.8		グレンツァーヘルストラツセ124
(32) 優先日	平成15年6月23日 (2003.6.23)	(74) 代理人	100091096
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		弁理士 平木 祐輔
		(74) 代理人	100096183
			弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(74) 代理人	100122389
			弁理士 新井 栄一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自発的な変換反応後のプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質の検出

(57) 【要約】

本発明は、改善された感度で、感染性または病原性プリオンタンパク質を検出する方法に関する。本発明によれば、サンプル中の非病原性プリオンタンパク質PrPcと低分子のプロテアーゼ感受性PrPSc凝集体とを相互作用させて高分子のプロテアーゼ耐性PrPSc凝集体を形成させることによる、自発的な変換反応によってプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrPScが新たに形成される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 調査するサンプルを準備するステップ、

(b) サンプル中に内因的に存在するプロテアーゼ感受性の病原性プリオンタンパク質PrP^{Sc}を、これと非病原性プリオンタンパク質PrP^Cと相互作用させてプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrP^{Sc}を生じさせることにより、形成されているPrP^{Sc}凝集体を少しも分解させることなく変換するステップ、

(c) プロテアーゼと共にインキュベートするステップ、および

(d) サンプル中のプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrP^{Sc}を測定するステップを含む、サンプル中のプリオンタンパク質PrP^{Sc}を検出する方法。

10

【請求項 2】

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

【請求項 3】

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

【請求項 4】

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

【請求項 5】

ステップ(b)が、プロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrP^{Sc}が自発的にプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrP^{Sc}に変換する条件下でのサンプルのインキュベーションを含むことを特徴とする、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 6】

インキュベーションを20～55℃、特に40～50℃の温度で実施することを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】

インキュベーションを少なくとも10分間、特に10～120分間継続することを特徴とする、請求項5または6に記載の方法。

【請求項 8】

ステップ(b)の前に超音波処理を実施することを特徴とする、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 9】

外来の非病原性プリオンタンパク質PrP^Cをサンプルに添加することを特徴とする、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

同種の非病原性プリオンタンパク質PrP^Cを添加することを特徴とする、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ(c)でプロテイナーゼKを用いることを特徴とする、請求項10に記載の方法。

40

【請求項 12】

プロテイナーゼKを50～100 µg/mlの濃度で用いることを特徴とする、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

ステップ(d)で定量的測定を行うことを特徴とする、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 14】

ステップ(d)における測定を、免疫学的方法を用いて行うことを特徴とする、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 15】

50

測定をウエスタンブロットを用いて行うことを特徴とする、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

測定をイムノアッセイを用いて行うことを特徴とする、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

測定をサンドイッチアッセイ、特にサンドイッチELISAを用いて行うことを特徴とする、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

TSE疾患を診断するための、請求項1～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

ヒトにおけるTSE疾患を検出するための、請求項18に記載の方法。

10

【請求項20】

家畜、生産動物および野生動物におけるTSE疾患を検出するための、請求項18に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、改善された感度で、感染性または病原性プリオンタンパク質を検出する方法に関する。このために、サンプル中の非病原性プリオンタンパク質PrPcとプロテアーゼ感受性の低分子量のPrPSc凝集体とが相互作用して高分子量のプロテアーゼ耐性PrPSc凝集体を形成する自発的な変換反応によって、プロテアーゼ耐性プリオンタンパク質がデノボ形成される。

20

【背景技術】

【0002】

プリオンはクールー、変異型クロイツフェルト ヤコブ病 (vCJD)、ウシにおける海綿状脳症 (BSE)、慢性消耗病 (CWD) およびスクレイピーなどの伝達性海綿状脳症 (TSE) の原因となる感染性粒子である。プリオンの主な構成成分は糖タンパク質PrPScであり、これは正常な細胞表面タンパク質PrPcの高次構造が変化したアイソフォームである (Prusiner, PNAS USA 95, 1363-1383, 1998)。疾患に関連するプリオン分子PrPScは正常なPrPcプリオン分子の変換により複製することができる。

【0003】

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

30

【0004】

このモデルは、感染性の粒子はPrPScの多量体の高次凝集体を構成するが、単量体PrPSc分子は不安定であり他のPrPSc分子との凝集によってのみ安定化されるという原理に基づくものである。したがって、複製の律速段階は核の形成であり、この核がその後作用してPrPSc凝集体をさらに安定化させる。

【0005】

PrPScオリゴマーは、凝集体の末端に新しいPrPc分子が付加され、変換されかつ組み込まれるにつれて伸長する。従って、そのような「核生成プリオン複製」の動力学は、サンプル中に存在するPrPSc核の数、およびPrPcとPrPScが互いに相互作用する可能性によって制限される。

40

【0006】

これまでプリオンタンパク質PrPScはTSE型の疾患を診断するために利用可能な唯一のマーカーであった。しかし、PrPScの濃度は脳内でさえ非常に低いものであるため、TSE疾患の比較的遅い段階でのみ診断上検出することが可能である。その結果、TSE疾患を検出するために存在する診断方法は非常に制限されている。

【0007】

50

したがって、PrPScの検出の感度を増大させる努力がなされている。近年、プリオン複製における上述のモデルに基づき、サンプル中のPrPSc検出の感度を増大させる方法が開発された (Saborioら, Nature 411, 810-813; 2001およびSoto, Biochem. Soc. Trans. 30, 569-574, 2002, WO 02/04954)。PMCA (protein misfolding cyclic amplification) と称するこの方法は、調査するサンプルを非病原性PrPcと接触させ、サンプル中に存在する少量のPrPScと添加したPrPcとを相互作用させて凝集体を形成させ、形成した凝集体を分解し、病原性PrPScをサンプル中で測定することを含む。この方法は、通常、実験的に促進された数サイクルのプリオン複製からなる。各サイクルは2つの段階からなる。第1段階では、非常に少量のPrPScが二、三のPrPc分子と相互作用してPrPcを変化させ、それによってPrPSc凝集体の成長を誘導する。

10

【0008】

第2段階では、超音波処理を用いてこれらの凝集体を小部分に分割し、その結果、各サイクルにおいて可能な核数が指数関数的に増大する。この方法のサイクル性により、少なくとも理論上は、PrPScを検出するために望まれる増幅状態を得るのに必要なだけ多くの数のサイクルが可能になる。

【0009】

最終的にこの方法は、凝集体の成長段階および鋳型ユニットの増殖段階からなるサイクル反応を用いて、PrPc基質を利用することによる鋳型ユニット数の指数関数増殖を達成することを目的とする。

【0010】

ハムスターモデルに応用されたPMCA法は、最近、マウス、ヒツジ、ヤギ、ウシおよびヒトなどの別の種についても記載され、用いられる種によって付されるべき増幅に必要な超音波処理の強さは、明らかに、特に関連のPrPSc重合体の凝集状態に基づいて変更する必要があるという注釈がされている (Anderesら, Poster presentation, Transmissible Spongiform Encephalopathies. New perspectives for prion therapeutics, International Conference, December 1.-3., 2002, Paris, France)。

20

【0011】

しかし、プリオンを増幅するためのサイクル法は技術的問題を生ずる傾向があるようであり、また、記載されているように長いインキュベーション/音波処理サイクルが必要である。

30

【0012】

Tzabanら (Biochemistry 41, 12868-12875, 2002) は、以前知られていなかったプロテアーゼ感受性PrPSc種が、プリオンに感染したハムスターの脳内に低分子量の凝集体の形態で存在することを報告している。凝集体のプロテアーゼ耐性は、凝集体のサイズが増加するにつれて増加する。しかし、この所見が診断と関連し得るという具体的な示唆はない。

【0013】

Lucassenら (Biochem. 42 (2003), 4127-4135) は、プロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrPScが、スクレイピーに感染したハムスターまたはマウスの脳ホモジネートと同種の正常な脳ホモジネートとを混合することによって、in vitroで増幅されることを報告している。

40

【0014】

Horiuchiら (PNAS USA, 97 (2000), 5836-5841) は、異種および同種間でマウスとハムスターのPrPアイソフォームの結合相互作用を研究している。これらの結果によれば、同種のPrP-感受性とPrP-耐性との結合は、異種PrP-感受性の結合と比較して好ましいものではない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明の根本にある目的は、サンプル中の病原性プリオンタンパク質PrPScを検出する

50

ための、簡単、迅速かつ敏感な方法を提供することであった。

【課題を解決するための手段】

【0016】

この目的は、

(a) 調査するサンプルを準備するステップ、

(b) サンプル中に内因的に存在するプロテアーゼ感受性の病原性プリオンタンパク質PrP^{Sc}を、これと非病原性プリオンタンパク質PrP^Cとを相互作用させてプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrP^{Sc}を生じさせることにより、形成されているPrP^{Sc}凝集体を少しも分解させることなく変換するステップ、

(c) プロテアーゼと共にインキュベーションするステップ、および

(d) サンプル中のプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrP^{Sc}を測定するステップを含む本発明に従って達成される。

10

【0017】

この発明による方法は、プロテアーゼ感受性PrP^{Sc}凝集体の存在 (Tzabanら、上記参照のこと) およびプロテアーゼ耐性PrP^{Sc}凝集体を生じる自発的変換反応に関するこれらの驚くべき能力を基礎とする。

【0018】

この発明は、改善された程度の感度で、感染性プリオンタンパク質を検出する方法に関する。サンプル中の内因性の天然PrP^Cとプロテアーゼ感受性の低分子量のPrP^{Sc}凝集体とが相互作用して、高分子量のプロテアーゼ耐性PrP^{Sc}凝集体を形成する自発的な変換反応によって、プロテアーゼ耐性PrP^{Sc}がデノボ形成される。

20

【0019】

これに関連して、PrP^{Sc}陽性サンプル中には、高分子量のプロテアーゼ耐性PrP^{Sc}凝集体に加えて、プロテアーゼ感受性の低凝集PrP^{Sc}も、いろいろな凝集状態の不均質な重合体サイズで存在すると考えられる。この低凝集のPrP^{Sc}は、サンプル中に内因的に存在するPrP^Cによって、増幅サイクルを取り入れることなくプロテアーゼ耐性PrP^{Sc}凝集体の形成を可能にする自発的変換反応の鋳型として用いられ得る。

【0020】

したがって、適切な条件下で、高凝集かつプロテアーゼ耐性であるPrP^{Sc}重合体の濃度の増加がサンプル中に存在する非病原性PrP^Cによって引き起こされる。すなわち、サンプル中に内因的に存在するPrP^Cと添加された外来PrP^Cが、適切な場合に、低凝集で成長可能なPrP^{Sc}結晶核に結合されることになる。次に、これはプロテアーゼ耐性PrP^{Sc}凝集体数の増加、およびいろいろな検出法によるPrP^{Sc}検出感度のはっきりと認識可能な増加をもたらす。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

この発明による方法は、ウシ、マウス、ハムスター、ヒツジ、ヤギまたはヒトなど、種々の生物由来のプリオンタンパク質を検出するのに適切である。これは、例えばヒトにおいて、あるいは家畜、生産動物および野生動物においても同様に、TSE疾患を診断することに用いることができる。

40

【0022】

その最も単純な実施形態では、この方法は、スフィンゴミエリン/コレステロールに富む界面活性剤耐性膜 (DRM)、すなわち脂質膜 (lipid raft) と称するもの (BaronおよびCaughey, Journal Biological Chemistry 2003, Geb 19, 出版前にインターネットで公開) またはカベオラ様ドメイン (CLD) (Veyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, 14945-14949, 1996) が存在し、PrP^CとPrP^{Sc}とがグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカーによって確実に結合され、PrP^CからPrP^{Sc}への変換が促進される膜可溶性条件下でサンプルをインキュベートするステップからなる。

【0023】

そして適切な条件下で、いわゆる自発的変換反応がPrP^C/PrP^{Sc}-脂質膜相互作用によっ

50

て生じ、低凝集のプロテアーゼ感受性PrPSc (sPrPSc) から高分子量のプロテアーゼ耐性PrPSc超凝集体 (superaggregate) (rPrPSc) への変換を生じさせる。

【0024】

この方法の利点は自明である：

- 実施が単純、
- 内因性PrPc基質の利用、
- 内因的に存在し、かつ従来はプロテアーゼ消化によって失われていた低凝集のsPrPScを利用すること、および従来は検出方法の感度を増加させるために、このsPrPScを高凝集のrPrPScへ変換すること、
- ほんのわずかな濃度のPrPSc鑄型 (プロテアーゼ感受性 (すなわちsPrPSc) 状態) が潜在的に高含量のPrPcと共に存在する組織および、例えば軟膜等の細胞血構成成分におけるPrPScの検出に関する感度の増加。

10

【0025】

この方法のステップ(a)は調査するサンプルを準備することからなる。サンプルはプリオンタンパク質を含み得る組織または体液、例えば脳、神経組織またはリンパ細網系 (例えば血液または血液構成成分) に由来し得る。サンプルは通常、脂質膜保存性界面活性剤、例えばTriton X100などの非イオン性界面活性剤を含むホモジネートの形態で調製される。特に、ウシおよびヒト由来のサンプルの場合は、SDSなどのイオン性界面活性剤を添加しないことが好ましい。血液、細胞血構成成分、軟膜等の体液からなるサンプルは、プリオンタンパク質含有細胞を濃縮することによって (例えば抗血液凝固剤添加全血由来のリンパ球その他の単核細胞 (例えばAccuspin System Histopaque 1077, Sigma Diagnostics) を単離することによって) 調製することができる。サンプルは実質的な生理的条件下、例えばpH 6~8および50~500mmolのNaCl/lに対応する塩濃度で調製されることが好ましい。プロテアーゼ阻害剤、またはプロテアーゼ阻害剤の組合せ (例えばprotease inhibitor cocktail complete, Roche Diagnostics) をサンプルに添加して、サンプル中に存在する内因性プロテアーゼを不活化するのが好都合である。ホモゲナイズ後に直接サンプルを用いるか、または新鮮な (すなわち前凍結していない) サンプルを用いることが好ましい。

20

【0026】

この発明の方法のステップ(b)は、プロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrPScが自発的にプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrPScへ変換する条件下でサンプルをインキュベートすることからなるのが好ましい。この自発的変換では、非病原性プリオンタンパク質PrPcがサンプル中に存在するプロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrPScに結合されることになる。

30

【0027】

適切な場合には、それ自体がサンプル中に存在する低分子量のPrPSc凝集体と結合することができる外来の非病原性プリオンタンパク質PrPc、例えばPrPcホモジネートを、感度をさらに増大する目的でサンプルに添加することができる。サンプルに添加される物質は、ホモゲナイズ後に凍結されていない新鮮なホモジネートであることが好ましい。

40

【0028】

サンプルは20~55℃、特に35~50℃の温度でインキュベートされるのが好ましい。インキュベーションは感度の効果的な増加を達成するのに十分な時間で行われる。インキュベーションは少なくとも10分間、例えば10~240分、そして特に好ましくは15~120分続けることが好ましい。適切な場合には、サンプル中に初めから存在する高分子量のPrPSc凝集体が低分子量の凝集体に分解される分解ステップをステップ(b)の前に実施することができる。例えば、そのようなステップは単一の超音波処理を含むことができる。しかし、この発明による方法がステップ(b)で形成される凝集体を分解することなく、特にあらゆる増幅サイクルなしに (すなわち、特に数回の連続的な超音波処理/インキュベーションサイクルなしに) 実施されることは明確にされるものとする。

【0029】

50

この発明の方法の(c)に合致するプロテアーゼは、非病原性プリオンタンパク質PrPcを切断することができるが、少なくとも高分子量の凝集体に由来するPrPScが切断に対して大方の場合耐性であるように選択される。適切なプロテアーゼの一例はプロテイナーゼKである。プロテイナーゼKを50~100 µg/mlの濃度で使用することが特に好ましい。

【0030】

この発明の方法のステップ(d)は、サンプル中のプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrPScを測定することからなる。この測定は従来技術で公知のあらゆる方法を用いて定性的および/または定量的に実施することができる。適切な方法の例は、病原性プリオンタンパク質が特定の抗体との反応によって測定される免疫学的方法である。

【0031】

特に好適な実施形態では、プリオンタンパク質はウエスタンブロット法によって測定される。このためには、サンプルを変性条件下で例えばSDS-PAGEにより電気泳動的に分画し、サンプル中に含まれるタンパク質を、例えばニトロセルロース膜またはポリフッ化ビニリデン(PVDF)膜といった適切な膜にブロットする。その後、膜上のプリオンタンパク質を、直接標識することができるかまたは標識した二次抗体を用いて検出することができるポリクローナルあるいはモノクローナル抗プリオン抗体との反応によって可視化する。これに関連して、酵素的に標識すること、および検出可能な基質、例えば化学発光基質を用いることが好ましい。市販の抗プリオン抗体は実施例に明記される。

【0032】

一方、測定は、あらゆる前電気泳動分画なしに、サンプルを適切な検出試薬と接触させるイムノアッセイによって行うことができる。イムノアッセイをプリオンタンパク質に対する固相抗体(solid phase-side antibody)(例えばビオチニル化抗体)と、プリオンタンパク質に対する標識化(例えば酵素標識化)抗体とを用いたサンドイッチアッセイとして実施するのが好ましい。検出のために、抗プリオン抗体と、標識した二次抗体としての酵素-抗体コンジュゲートとを、検出可能な酵素基質と共に用いるサンドイッチELISAを用いることが特に好ましい。

【実施例】

【0033】

以下の実施例によってさらに本発明を説明する。

【0034】

実施例1：自発的変換反応によるウシPrPScの増幅

延髄の門領域から得た、BSEウシの脳ホモジネート(10%スクロース中20%, Ribolyser)(VLAケース99/00946)を氷で冷やしながらか100倍に希釈した:

(a)延髄の門領域から得た正常なウシの脳ホモジネート(protease inhibitor cocktail complete (Roche Diagnostics)と0.5%のTriton X100を含有するPBSバッファ-中の10%ホモジネート)、または

(b)10%の正常なハムスターの脳ホモジネート(protease inhibitor cocktail complete (Roche Diagnostics)と0.5%のTriton X100を含有するPBSバッファ-中の10%ホモジネート)。

【0035】

ハムスターのホモジネート(ハムスターPrPc)はウシPrPcとの比較のための対照として用いた。

【0036】

ホモジネートはHybaidセラミックビーズを含有するホモジネーション容器中でRibolyser装置を用いて調製した。protease inhibitor cocktail completeを含有するPBSバッファ-中で正常な脳をホモゲナイズした後にTriton-X100を添加し、サンプルをエッペンドルフ遠心分離機中、3000gで3分間遠心分離した。

【0037】

正常な脳由来の上清を氷浴に置き、BSEの脳ホモジネートと混合した。200 µlのアリコート以下を以下の処理手順に供した。0分はサンプルが氷浴で維持されたことを意味する。

10

20

30

40

50

【0038】

以下のサンプルを図1で調査した：

分子量マーカー：図1、レーン2；

正常なウシの脳（消化対照）：図1、レーン3；

正常なハムスターサンプルで希釈したBSEウシの脳：図1、レーン4；

正常なウシサンプルで希釈したBSEウシの脳：

室温（25℃）で0/15/30/60分間、500rpmで振とうしながら（エッペンドルフシェーカー）

インキュベーション：図1、レーン5～8；

47℃で0/15/30/60分間、500rpmで振とうしながら（エッペンドルフシェーカー）インキュ

ベーション：図1、レーン9～12；

ピーカー共振器（BR30）とサンプル保持装置（EH3）とを備えたマイクロ超音波処理器（microsonicator）（Bandelin Electronik, Sono plus, Berlin）を用いた単一の超音波処理

（1パルス15秒、強度50%）後、47℃で0/15/30/60分間、500rpmで振とうしながら（エッペンドルフシェーカー）インキュベーション：図1、レーン13～16。

【0039】

以下のサンプルを図2で調査した：

分子量マーカー：図2、レーン2；

正常なハムスターの脳（消化対照）：図2、レーン2；

正常なハムスターサンプルで希釈したBSEウシの脳：

室温（25℃）で0/60分間、500rpmで振とうしながら（エッペンドルフシェーカー）インキュベーション：図2、レーン3～4；

47℃で0/60分間、500rpmで振とうしながら（エッペンドルフシェーカー）インキュベーション：図2、レーン5～6；

ピーカー共振器（BR30）とサンプル保持装置（EH3）とを備えたマイクロ超音波処理器（Bandelin Electronik, Sono plus, Berlin）を用いた単一の超音波処理（1パルス15秒、強度50%）後、47℃で0/60分間、500rpmで振とうしながら（エッペンドルフシェーカー）イン

キュベーション：図2、レーン7～8；

正常なウシの脳（消化対照）：図2、レーン9；

ウシサンプルで希釈したBSEウシの脳：

47℃で0/15/30/60分間振とうしながらインキュベーション：図2、レーン10～13；

単一の超音波処理および47℃で0/15/30/60分間のインキュベーション：図2、レーン14～17。

【0040】

この直後にサンプルをプロテイナーゼK（100 µg/ml）で消化した（37℃で60分間）。反応をプロテアーゼ阻害剤PMSFを終末濃度が40mMになるように添加することによって停止した。サンプルをSDS-PAGEに供した後にPVDF膜上にエレクトロブロットングした。膜をブロッキングし、洗浄し（Dig blocking and washing buffer reagent, Roche Diagnostics）そしてモノクローナル抗プリオン抗体L42（R-Biopharm, Darmstadt, 250 ng/ml）と共にインキュベートした（1時間、室温）。その後、ヒツジ抗マウスIgG-アルカリホスファターゼ（40mU/ml）コンジュゲートFabフラグメント（Roche Diagnostics）と共に30分間インキュベートした。膜上での反応性はCDP-Star化学発光基質の使用（10分）に続くLumi Imagerシステム（Roche Diagnostics）による可視化によって明らかにした。ウエスタン

プロットにおいて、モノクローナル抗プリオン抗体L42はヒト、ウシおよびヒツジのPrPとは反応しているが、ハムスターのPrPとは良い場合でも非常に弱い反応性を示している。

【0041】

図1および2に記載した結果は、感度の著しい改善は47℃でのインキュベーションによって達成されたことを示している。感度の更なる獲得は、インキュベーション前に一度超音波処理する（sonifying）ことによって達成することができた。

【0042】

実施例2：自発的な変換反応によるハムスターPrPScの増幅

スクレイピーハムスターの脳を滅菌した組織粉碎機を用いてハンクス平衡塩類溶液中でホモジナイズして10%のホモジネートを得た。その後ホモジネートを約2000gで15分間遠心分離し、生じた上清を -70 で保存した。

【0043】

正常なハムスターの脳の10%ホモジネートを、protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) を含む氷冷したPBSバッファー中で、Ultraturraxホモジナイザーを用いて調製した。Triton-X100を添加して0.5%の終末濃度とし、サンプルをエッペンドルフ遠心分離機中、3000gで3分間遠心分離した。延髄の問領域に由来するウシの脳の10%ホモジネートを対照として調製した。

【0044】

正常な脳由来の上清をスクレイピーハムスターの脳ホモジネートと混合した(1:160、1:320)。60 μ lのアリコートを下記の処理ステップに供し、図3で調査した：

分子量マーカー：図3、レーン1；

正常なハムスターの脳(消化対照)：図3、レーン2；

希釈したスクレイピーハムスターの脳：

ハムスターPrPScを、対照としてのハムスターPrPcまたはウシPrPcと共に室温(25)で30分間、500rpmで振とうしながら(エッペンドルフシェーカー)インキュベーション：図3、レーン3と4(1:160希釈)ならびにレーン10と11(1:320希釈)；

ピーカー共振器(BR30)とサンプル保持装置(EH3)とを備えたマイクロ超音波処理器(Bandelin Elektronik, Sono plus, Berlin)を用いた単一の超音波処理(各々強度50%で0.9秒の10パルス)後、47 で60分間、500rpmで振とうしながら(エッペンドルフシェーカー)インキュベーション：図3、レーン5(1:160希釈)およびレーン12(1:320希釈)；超音波処理/インキュベーションサイクルを2~5回実施：図3、レーン6~9(1:160希釈)およびレーン13~16(1:320希釈)。

【0045】

この直後にサンプルをプロテイナーゼK(100mg/ml)で消化した(37 で60分間)。反応を、Pefablockを10mMの終末濃度となるまで添加することによって停止した。サンプルをSDS-PAGEに供し、その後PVDF膜上にエレクトロブロッティングした。膜をブロッキング/洗浄し(Dig blocking and washing buffer reagent, Roche Diagnostics)、モノクローナル抗プリオン抗体3F4(Signet Laboratories, USA, 500 ng/ml)と共にインキュベートし(室温で1時間)、その後ヒツジ抗マウスIgG-アルカリホスファターゼ(40mU/ml)コンジュゲートFabフラグメント(Roche Diagnostics)と共に30分間インキュベートした。膜上での反応性は、CDP-Star化学発光基質の使用(15分)に続くLumilimagerシステム(Roche Diagnostics)による可視化によって明らかにした。ウエスタンブロットにおいて、モノクローナル抗体3F4はヒトおよびハムスターのPrPとは反応しているが、ウシPrPは全く認識していない。

【0046】

この実験結果は図3に記載されている。図中に矢印で示すように、ウエスタンブロット後、モノクローナル抗体3F4はハムスターのPrPcがレーン4および11に依然として過剰に存在している事実に起因して、SDSゲルの移動方向前面の免疫反応性ペプチド消化産物と反応している。単一の超音波処理によりPrPcの代わりにPrPScの有意な増加を生じている(レーン5/12；図中の矢印を参照)。レーン6~9および13~16についてはPMCA法(2~5サイクル)を用いた。検出可能なPrPScにおける減少をレーン9と16で認めることができる。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】図1は、実施例1で行った電気泳動の結果を示す図である。

【図2】図2は、実施例1で行った電気泳動の結果を示す図である。

【図3】図3は、実施例2で行った電気泳動の結果を示す図である。

10

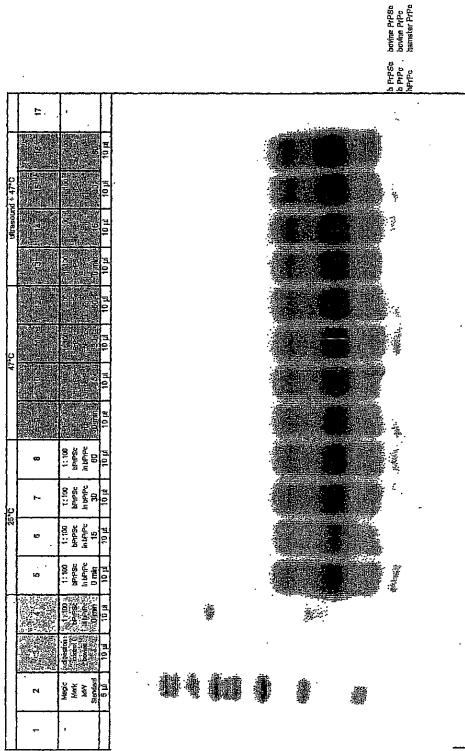
20

30

40

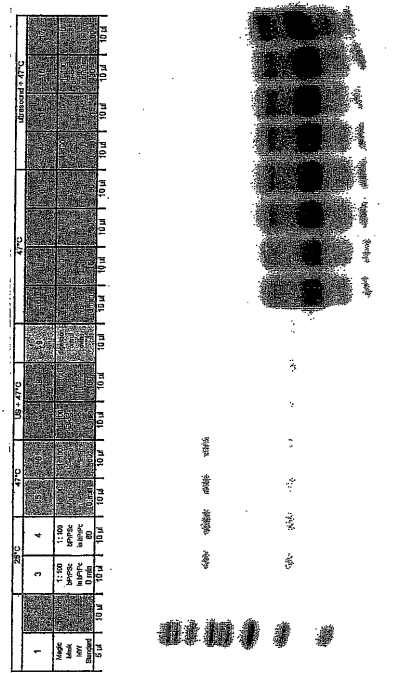
【 図 1 】

Figur 1



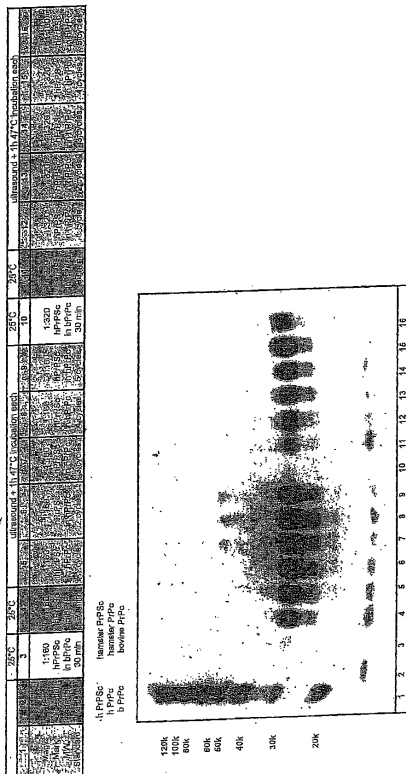
【 図 2 】

Figur 2



【 図 3 】

Figur 3



【手続補正書】

【提出日】平成17年4月18日(2005.4.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 調査するサンプルを準備するステップ、

(b) サンプル中に内因的に存在するプロテアーゼ感受性の病原性プリオンタンパク質PrP^{Sc}を、これと非病原性プリオンタンパク質PrP^Cとを相互作用させて、形成されているPrP^{Sc}凝集体を分解させることなくプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrP^{Sc}を生じさせることにより変換するステップであって、プロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrP^{Sc}が自発的にプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrP^{Sc}に変換する条件下で、20～55、特に40～50の温度でサンプルをインキュベーションすることを含むステップ、

(c) プロテアーゼと共にインキュベートするステップ、および

(d) サンプル中のプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrP^{Sc}を測定するステップを含む、サンプル中のプリオンタンパク質PrP^{Sc}を検出する方法。

【請求項2】

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

【請求項3】

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

【請求項4】

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

【請求項5】

インキュベーションを少なくとも10分間、特に10～120分間継続することを特徴とする、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

ステップ(b)の前に超音波処理を実施することを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

外来の非病原性プリオンタンパク質PrP^Cをサンプルに添加することを特徴とする、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

同種の非病原性プリオンタンパク質PrP^Cを添加することを特徴とする、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

ステップ(c)でプロテイナーゼKを用いることを特徴とする、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

プロテイナーゼKを50～100 μg/mlの濃度で用いることを特徴とする、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

ステップ(d)で定量的測定を行うことを特徴とする、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

ステップ(d)における測定を、免疫学的方法を用いて行うことを特徴とする、請求項1～

11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

測定をウエスタンブロットを用いて行うことを特徴とする、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

測定をイムノアッセイを用いて行うことを特徴とする、請求項12に記載の方法。

【請求項15】

測定をサンドイッチアッセイ、特にサンドイッチELISAを用いて行うことを特徴とする、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

TSE疾患を診断するための、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

ヒトにおけるTSE疾患を検出するための、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

家畜、生産動物および野生動物におけるTSE疾患を検出するための、請求項16に記載の方法。

【手続補正書】

【提出日】平成19年1月30日(2007.1.30)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a)調査するサンプルを準備するステップ、

(b)サンプル中に内因的に存在するプロテアーゼ感受性の病原性プリオンタンパク質PrP^{Sc}を、これと非病原性プリオンタンパク質PrP^cとを相互作用させて、形成されているPrP^{Sc}凝集体を分解させることなくプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrP^{Sc}を生じさせることにより変換するステップであって、プロテアーゼ感受性プリオンタンパク質PrP^{Sc}が自発的にプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrP^{Sc}に変換する条件下で、20～55℃、特に40～50℃の温度でサンプルをインキュベーションすることを含むステップ、

(c)プロテアーゼと共にインキュベートするステップ、および

(d)サンプル中のプロテアーゼ耐性プリオンタンパク質PrP^{Sc}を測定するステップを含む、サンプル中のプリオンタンパク質PrP^{Sc}を検出する方法。

【請求項2】

サンプルが脳、神経組織またはリンパ細網系などの組織あるいは体液に由来することを特徴とする、ウシ、マウス、ハムスター、ヒツジ、ヤギまたはヒト由来のプリオンタンパク質を検出する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

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

【請求項4】

インキュベーションを少なくとも10分間、特に10～120分間継続することを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

ステップ(b)の前に超音波処理を実施することを特徴とする、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

外来の非病原性プリオンタンパク質PrP^cをサンプルに添加することを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

同種の非病原性プリオンタンパク質PrPcを添加することを特徴とする、請求項1~6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

ステップ(c)でプロテイナーゼKを用い、好ましくは50~100 µg/mlの濃度で用いることを特徴とする、請求項1~7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

ステップ(d)で定量的測定を行うことを特徴とする、請求項1~8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

ステップ(d)における測定を、免疫学的方法を用いて、特にウエスタンブロット、又はサンドイッチアッセイ、特にサンドイッチELISAなどのイムノアッセイを用いて行うことを特徴とする、請求項1~9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

TSE疾患、特にヒト、家畜、生産動物及び/又は野生動物におけるTSE疾患を診断するための、請求項1~10のいずれか1項に記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006750

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/33420 A (GABIZON RUTH ; SHAKED GIDEON M (IL); HADASIT MEDICAL RES SERVICES A (I) 25 April 2002 (2002-04-25)	1-3,5,9, 11, 13-16, 18-20
Y	page 16, paragraph 4 - page 17, paragraph 1; examples 1,2 ----- -/--	4,6-8, 10,12,17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 September 2004		Date of mailing of the international search report 01/10/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Diez Schlereth, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP2004/006750

G-(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HORIUCHI MOTOHIRO ET AL: "Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 18, no. 12, 15 June 1999 (1999-06-15), pages 3193-3203, XP002176230 ISSN: 0261-4189 cited in the application page 3194</p>	1-20
Y	<p>WO 02/04954 A (SOTO CLAUDIO ; SABORIO GABRIELLA (FR); APPLIED RESEARCH SYSTEMS (NL)) 17 January 2002 (2002-01-17) cited in the application the whole document</p>	4,6-8, 10,12,17
A	<p>LUCASSEN R ET AL: "In vitro amplification of protease-resistant prion protein requires free sulfhydryl groups" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON, PA, US, vol. 42, no. 14, 15 April 2003 (2003-04-15), pages 4127-4135, XP002262517 ISSN: 0006-2960 cited in the application the whole document</p>	1-20
A	<p>CAUGHEY B ET AL: "AGGREGATES OF SCRAPIE-ASSOCIATED PRION PROTEIN INDUCE THE CELL-FREE CONVERSION OF PROTEASE-SENSITIVE PRION PROTEIN TO THE PROTEASE-RESISTANT STATE" CHEMISTRY AND BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 2, no. 12, December 1995 (1995-12), pages 807-817, XP008004297 ISSN: 1074-5521 the whole document</p>	1-20
A	<p>S. TZABAN ET AL: "Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of homogeneous sizes" BIOCHEMISTRY, vol. 41, 2002, pages 12868-12875, XP002296720 cited in the application the whole document</p>	1-20

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006750

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 03/081249 A (FLECHSIG ECKHARD ; MEDICAL RES COUNCIL (GB); WEISSMANN CHARLES (GB); K) 2 October 2003 (2003-10-02) the whole document -----	1-3, 5, 9-11, 13, 14, 16-20
E	WO 2004/059322 A (COLEMAN ANTHONY WILLIAM ; SHAHGALDIAN PATRICK (FR); BIOMERIEUX SA (FR)) 15 July 2004 (2004-07-15) the whole document -----	1-3, 5-7, 13-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP2004/006750

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0233420	A	25-04-2002	AU 1264702	29-04-2002	
			BR 0115131	13-01-2004	
			CA 2426126	25-04-2002	
			EP 1328813	23-07-2003	
			WO 0233420	25-04-2002	
			JP 2004511809	15-04-2004	
WO 0204954	A	17-01-2002	AU 6408901	21-01-2002	
			BG 107498	28-11-2003	
			BR 0112262	20-05-2003	
			CA 2413078	17-01-2002	
			CN 1449497	15-10-2003	
			CZ 20030036	18-06-2003	
			EE 200300005	16-08-2004	
			EP 1299729	09-04-2003	
			WO 0204954	17-01-2002	
			HR 20030033	29-02-2004	
			HU 0301020	28-07-2003	
			JP 2004503748	05-02-2004	
			NO 20030059	07-03-2003	
			SK 18582002	02-05-2003	
			ZA 200300878	09-02-2004	
WO 03081249	A	02-10-2003	WO 03081249	A2	02-10-2003
WO 2004059322	A	15-07-2004	FR 2849205	A1	25-06-2004
			WO 2004059322	A1	15-07-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internationales Aktenzeichen
 PCT/EP2004/006750

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RESEARCHIERTE GEBIETE Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02/33420 A (GABIZON RUTH ; SHAKED GIDEON M (IL); HADASIT MEDICAL RES SERVICES A (I) 25. April 2002 (2002-04-25)	1-3,5,9, 11, 13-16, 18-20
Y	Seite 16, Absatz 4 - Seite 17, Absatz 1; Beispiele 1,2 ----- -/--	4,6-8, 10,12,17
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *C* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benützung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 16. September 2004		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 01/10/2004
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Diez Schlereth, D

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/006750

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	HORIUCHI MOTOHIRO ET AL: "Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 18, Nr. 12, 15. Juni 1999 (1999-06-15), Seiten 3193-3203, XP002176230 ISSN: 0261-4189 in der Anmeldung erwähnt Seite 3194	1-20
Y	WO 02/04954 A (SOTO CLAUDIO ; SABORIO GABRIELLA (FR); APPLIED RESEARCH SYSTEMS (NL)) 17. Januar 2002 (2002-01-17) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	4,6-8, 10,12,17
A	LUCASSEN R ET AL: "In vitro amplification of protease-resistant prion protein requires free sulphhydryl groups" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON, PA, US, Bd. 42, Nr. 14, 15. April 2003 (2003-04-15), Seiten 4127-4135, XP002262517 ISSN: 0006-2960 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-20
A	CAUGHEY B ET AL: "AGGREGATES OF SCRAPIE-ASSOCIATED PRION PROTEIN INDUCE THE CELL-FREE CONVERSION OF PROTEASE-SENSITIVE PRION PROTEIN TO THE PROTEASE-RESISTANT STATE" CHEMISTRY AND BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY, LONDON, GB, Bd. 2, Nr. 12, Dezember 1995 (1995-12), Seiten 807-817, XP008004297 ISSN: 1074-5521 das ganze Dokument	1-20
A	S. TZABAN ET AL: "Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of homogeneous sizes" BIOCHEMISTRY, Bd. 41, 2002, Seiten 12868-12875, XP002296720 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-20

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/006750

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	WO 03/081249 A (FLECHSIG ECKHARD ; MEDICAL RES COUNCIL (GB); WEISSMANN CHARLES (GB); K) 2. Oktober 2003 (2003-10-02) das ganze Dokument	1-3,5, 9-11,13, 14,16-20
E	WO 2004/059322 A (COLEMAN ANTHONY WILLIAM ; SHAHGALDIAN PATRICK (FR); BIOMERIEUX SA (FR)) 15. Juli 2004 (2004-07-15) das ganze Dokument	1-3,5-7, 13-20

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/006750

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0233420	A	25-04-2002	AU 1264702	A 29-04-2002
			BR 0115131	A 13-01-2004
			CA 2426126	A1 25-04-2002
			EP 1328813	A2 23-07-2003
			WO 0233420	A2 25-04-2002
			JP 2004511809	T 15-04-2004
WO 0204954	A	17-01-2002	AU 6408901	A 21-01-2002
			BG 107498	A 28-11-2003
			BR 0112262	A 20-05-2003
			CA 2413078	A1 17-01-2002
			CN 1449497	T 15-10-2003
			CZ 20030036	A3 18-06-2003
			EE 200300005	A 16-08-2004
			EP 1299729	A2 09-04-2003
			WO 0204954	A2 17-01-2002
			HR 20030033	A2 29-02-2004
			HU 0301020	A2 28-07-2003
			JP 2004503748	T 05-02-2004
			NO 20030059	A 07-03-2003
			SK 18582002	A3 02-05-2003
			ZA 200300878	A 09-02-2004
WO 03081249	A	02-10-2003	WO 03081249	A2 02-10-2003
WO 2004059322	A	15-07-2004	FR 2849205	A1 25-06-2004
			WO 2004059322	A1 15-07-2004

フロントページの続き

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

(72)発明者 ガッスナー, ディーター

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

(72)発明者 ゴラ, ルース

ドイツ連邦共和国 8 2 4 4 7 シュパッツェンハウゼン, ホフハイマーシュトラッセ 1 8

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ20 QR16 QR48 QR54 QS24

专利名称(译)	自发转化反应后检测蛋白酶抗性朊蛋白		
公开(公告)号	JP2008532475A	公开(公告)日	2008-08-21
申请号	JP2006516030	申请日	2004-06-22
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ガッスナー、ディーター ゴラ、ルース		
发明人	ガッスナー、ディーター ゴラ、ルース		
IPC分类号	C12Q1/37 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 C12Q1/37 G01N2800/2828		
FI分类号	C12Q1/37 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ20 4B063/QR16 4B063/QR48 4B063/QR54 4B063/QS24		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	10328125 2003-06-23 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测具有改善的灵敏度的感染性或致病性朊病毒蛋白的方法。根据本发明，通过使样品中的非致病性朊病毒蛋白PrPc与小蛋白酶敏感性PrPSc聚集体相互作用以形成聚合蛋白酶抗性PrPSc聚集体，蛋白酶的自发转化反应。新形成抗性朊病毒蛋白PrPSc。

Figure 3

