

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-158247

(P2010-158247A)

(43) 公開日 平成22年7月22日(2010.7.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	4 B O 4 2
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
C O 7 K 17/00 (2006.01)	C O 7 K 17/00	4 C O 8 4

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 75 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-34088 (P2010-34088)	(71) 出願人	591076811 ノバルティス バクシンズ アンド ダイ アグノスティックス、インコーポレーテッ ド アメリカ合衆国、カリフォルニア 946 08, エミリービル, ホートン ストリー ト 4560
(22) 出願日	平成22年2月18日 (2010.2.18)		
(62) 分割の表示	特願2006-523408 (P2006-523408) の分割	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
原出願日	平成16年8月13日 (2004.8.13)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	60/494, 962	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成15年8月13日 (2003.8.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/570, 368		
(32) 優先日	平成16年5月12日 (2004.5.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/586, 509		
(32) 優先日	平成16年7月9日 (2004.7.9)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プリオン特異的ペプチド試薬

(57) 【要約】

【課題】種々の試料、例えば生体被験体から得られた試料、血液製品、牧場動物および他のヒトおよび動物の食料中の病原性プリオン蛋白の存在を検出するための組成物および方法を提供すること。

【解決手段】プリオン蛋白の Pr P^SC 型と優先的に相互作用するペプチド試薬を記載する。プリオンおよびプリオン関連疾患の検出、診断、精製、治療および予防のための試薬または試薬に対する抗体を使用する方法も記載する。これらのペプチド試薬は広範な用途において、例えば病原性プリオンを単離するため、または、試料中の病原性プリオンの存在を検出するための道具として、治療用または予防用の組成物の成分として、および/または、プリオン特異的抗体の作成のために使用できる。例えば、Pr P^Cと比較して Pr P^SC と優先的に相互作用するペプチド試薬は例えば疾患の診断のためなどに有用である。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

本明細書中に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明はプリオン蛋白と相互作用するペプチド試薬、このようなペプチド試薬をコードするポリヌクレオチド、このようなペプチド試薬およびポリヌクレオチドを使用して抗体を作成する方法、および、このような方法で作成した抗体に関する。本発明は更に、試料中の病原性プリオンの存在を検出するためにこれらのペプチド試薬を使用する方法、および、治療用または予防用の組成物中の成分としてこれらのペプチド試薬を使用する方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

(背景)

蛋白コンホメーション疾患には、後に異常蛋白形態の自己会合をもたらし、結果的に組織の沈着および損傷をもたらすような、蛋白の異常なコンホメーション遷移から生じる伝染性海綿状脳障害を包含する種々の未関連の疾患を包含する。これらの疾患はまた臨床状態における顕著な同様性、典型的には種々の長さのインキュベーションの後に死に至る診断後の急速な進行を共有している。

20

【0003】

コンホメーション疾患の1つのグループは「プリオン疾患」または「伝染性海綿状脳障害(TSE)と称される。ヒトにおいては、これらの疾患はクロイツフェルト-ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン-シュトロイスラー-シェンカー症候群(GSS)、胎児家族性不眠症およびクールーを包含する(例えば、非特許文献1;非特許文献2参照)。動物において、TSEはヒツジスクラピー、ウシ海綿状脳障害(BSE)、伝染性ミンク脳障害、および、係留ラバ、シカおよびヘラジカの慢性消耗病を包含する(非特許文献3)。伝染性海綿状脳障害は同様の特質、即ち霊長類、げっ歯類およびトランスジェニックマウスを含む実験動物に実験的に接種した場合に疾患を伝染するプリオン蛋白の異常(ベータリッチ、プロテイナーゼK耐性)なコンホメーションの存在を特徴とする。

30

【0004】

近年、ウシ海綿状脳障害の急速な蔓延およびそのヒト海綿状脳障害発生率上昇との相関が非ヒト動物における伝染性海綿状脳障害の検出への関心を顕著に高めている。これらの疾患の偶発的伝染の悲劇的結末(例えば、非特許文献4;非特許文献5)、脱汚染の困難さ(非特許文献6)および最近のウシ海綿状脳障害への関心(非特許文献7)は、伝染性海綿状脳障害を有するヒトおよび動物を発見する診断法、および、感染被験体のための治療法の両方を保有する緊急性の根拠となっている。

【0005】

プリオンは海綿状脳障害(プリオン疾患)を誘発する感染性の病原体である。プリオンは細菌、ウイルスおよびウイロイドとは大きく異なる。優勢な仮説は、全ての他の感染性病原体とは異なり、鋳型として機能し、正常なプリオンのコンホメーションを異常なコンホメーションに変換するプリオン蛋白の異常なコンホメーションにより感染が誘発されるとしている。プリオン蛋白は1980年代初頭に最初に特性化された。(例えば、非特許文献8;非特許文献9;非特許文献10参照)。完全なプリオン蛋白コード遺伝子その後クローニングされ、配列決定され、そしてトランスジェニック動物において発現されている。例えば、非特許文献11参照。

40

【0006】

プリオン疾患の重要な特徴はプリオン蛋白の正常(細胞性または非病原性)の形態(PrP^C)からの異常な形状の蛋白(PrP^{Sc})、別称スクラピー蛋白の形成である。例

50

例えば、非特許文献12；非特許文献13；非特許文献14；非特許文献15を参照のこと。光学顕微鏡および結晶学的な研究によれば、プリオンの疾患関連の形態は優勢にはアルファヘリックスの折りたたみ非疾患形態と比較してベータシート構造が実質的にリッチ化されていることがわかった。例えば、非特許文献16；非特許文献17；非特許文献18を参照のこと。構造上の変化には生化学的特性の改変が後続すると考えられ：PrP^Cは非変性界面活性剤中で可溶であり、PrP^{S^C}は不溶であり；PrP^Cはプロテアーゼにより容易に消化されるが、PrP^{S^C}は部分的に耐性であり、「PrPres」（非特許文献19）、「PrP27-30」（27-30kDa）または「PK-耐性」（プロテイナーゼK耐性）の形態として知られるN末端トランケーションされたフラグメントの形成をもたらす。更にまた、PrP^{S^C}はPrP^Cを病原性のコンホーメーションに変換することができる。例えば、非特許文献20；非特許文献21を参照のこと。

10

【0007】

生体被験体および生体被験体から得た試料におけるコンホーメーション疾患蛋白の病原性アイソフォームの検出は困難であることがわかっている。即ち、被験体の死亡の前のこれらの伝染性およびアミロイド含有条件の決定的な診断および緩和治療は未だなお大きな問題となっている。脳の生検の組織病理学的検査は被験体にとって危険を伴い、患部およびアミロイドの沈着は生検試料が採取された部位によっては見逃される場合がある。しかしながら生検に関わる危険はなお動物、患者および医療担当者に対して存続している。更にまた、動物に対する脳の検査で得られる結果は動物が食料に供されるまで通常は得ることができない。更にまた、プリオンペプチドに対して作成された抗体は変性したPrP^{S^C}およびPrP^Cの両方を認識するが、感染性（未変性）PrP^{S^C}を選択的に認識することは不可能である。（例えば非特許文献22参照）。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Harrison's Principles of Internal Medicine, Isselbacherら（編）McGraw-Hill, Inc. New York, (1994)

【非特許文献2】Medoriら（1992）N. Engl. J. Med. 326: 444-9

30

【非特許文献3】Gajdusek (1990) Subacute Spongiform Encephalopathies: Transmissible Cerebral Amyloidoses Caused by Unconventional Viruses, Pp. 2289-2324, Virology, Fields (編) New York: Raven Press, Ltd.

【非特許文献4】Gajdusek, Infectious Amyloids, and Prusiner Prions In Fields Virology, Fieldsら（編）Lippincott-Ravin, Pub. Philadelphia (1996)

40

【非特許文献5】Brownら（1992）Lancet, 340: 24-27

【非特許文献6】Asherら（1986）59-71頁, In: Laboratory Safety: Principles and Practices, Miller (編) Am. Soc. Microb.

【非特許文献7】British Med. J. (1995) 311: 1415-1421

【非特許文献8】Bolton, McKinleyら（1982）Science 218: 1309-1311

【非特許文献9】Prusiner, Boltonら（1982）Biochemistry 21: 6942-6950

【非特許文献10】McKinley, Boltonら（1983）Cell 35: 5

50

7 - 6 2

【非特許文献11】Basler, OeschB (1986) Cell 46:417 - 428

【非特許文献12】ZhangB (1997) Biochem. 36(12):3543 - 3553

【非特許文献13】CohenおよびPrusiner (1998) Ann Rev. Biochem. 67:793 - 819

【非特許文献14】PanB (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:10962 - 10966

【非特許文献15】SafarB (1993) J Biol Chem 268:20276 - 20284 10

【非特許文献16】WilleB (2001) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 99:3563 - 3568

【非特許文献17】PeretzB (1997) J. Mol. Biol. 273:614 - 622

【非特許文献18】CohenおよびPrusiner, Chapter 5: Structural Studies of Prion Proteins in PRION BIOLOGY AND DISEASES (編) S. Prusiner, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999, pp: 191 - 228 20

【非特許文献19】BaldwinB (1995); CohenおよびPrusiner (1995)

【非特許文献20】KanekoB (1995) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 92:11160 - 11164

【非特許文献21】Caughey (2003) Br Med Bull. 66:109 - 20

【非特許文献22】MatsunagaB (2001) PROTEINS: Structure, Function and Genetics 44:110 - 118

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】 30

【0009】

即ち、種々の試料、例えば生体被験体から得られた試料、血液製品、牧場動物および他のヒトおよび動物の食料中の病原性プリオン蛋白の存在を検出するための組成物および方法がなお必要とされている。更にまた、プリオン関連疾患の診断および治療のための方法および組成物がなお必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0010】

(発明の要旨)

本発明は部分的には、プリオン蛋白と相互作用するペプチド試薬に関する。より詳しくは、本明細書に記載するペプチド試薬はプリオン蛋白の病原性アイソフォームと優先的に相互作用する。これらのペプチド試薬は広範な用途において、例えば病原性プリオンを単離するため、または、試料中の病原性プリオンの存在を検出するための道具として、治療用または予防用の組成物の成分として、および/または、プリオン特異的抗体の作成のために使用できる。例えば、PrP^Cと比較してPrP^{S^C}と優先的に相互作用するペプチド試薬は例えば疾患の診断のため、または、献血試料のスクリーニングまたは器官提供に関する器官のスクリーニングのために生体被験体から得た試料中の病原性形態の直接の検出のために有用である。 40

より広範な態様において、本発明はコンホーメーション疾患蛋白の病原性形態と優先的に相互作用するペプチド試薬を包含する。特定の実施形態においては、本明細書に記載したペプチド試薬はプリオン蛋白の非病原性形態と比較してプリオン蛋白の病原性形態と優 50

先に相互作用する。本明細書に記載したペプチド試薬は部分的または完全に合成であつてよく、例えば以下の部分、即ち、環化された残基またはペプチド、ペプチドの多量体、標識、および/または、他の化学部分の1つ以上を含んでよい。適当なペプチド試薬の例は、配列番号12~132のペプチド、例えば、配列番号66、67、68、72、81、96、97、98、107、108、119、120、121、122、123、124、125、126、127、14、35、36、37、40、50、51、77、89、100、101、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、128、129、130、131、132、56、57、65、82および84に示したもののようなペプチド、およびその類縁体および誘導体から誘導されたものを包含する。本明細書に記載したペプチド試薬は何れかのコンホーメーション疾患蛋白質、例えばプリオン蛋白質(例えば病原性蛋白質PrP^S^Cおよび非病原性形態のPrP^C)と相互作用してよい。特定の実施形態においては、ペプチド試薬はPrP^Cと比較してPrP^S^Cと優先的に相互作用する。ペプチド試薬は一般的に1つ以上の種に由来するPrP^S^Cに特異的であるが、単一の種に由来するPrP^S^Cに特異的であってもよい。

10

【0011】

別の実施形態においては、本明細書に記載した配列の何れかで示すペプチドから誘導したペプチド試薬が提供される。特定の実施形態においては、ペプチド試薬はプリオン蛋白質の領域から誘導され、例えば、残基23~43または85~156(例えば配列番号2に示すマウスプリオン配列に相当する番号付けで23~30、86~111、89~112、97~107、113~135および136~156)に相当する領域を使用する。簡便のために、上記したアミノ酸残基番号は配列番号2のマウスプリオン蛋白質配列に相当するものであり;当業者は当該分野で知られた配列および本明細書の記載に基づく他の種のプリオン蛋白質における相当領域を容易に見出せる。例示されるペプチド試薬は配列番号66、67、68、72、81、96、97、98、107、108、119、120、121、122、123、124、125、126、127を有するペプチドから;または配列番号14、35、36、37、40、50、51、77、89、100、101、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、129、130、131、132または128を有するペプチドから;または配列番号56、57、65、82および84を有するペプチドから誘導したものを包含する。

20

【0012】

別の態様において、本発明は本明細書に記載したペプチド試薬1つ以上およびプリオン蛋白質を含む複合体を包含する。

30

【0013】

別の態様において、プリオン蛋白質を認識する抗体を作成する方法が提供され、該方法は本明細書に記載したペプチド試薬の何れか(またはペプチド試薬をコードするポリヌクレオチド)を被験体(例えば動物)に投与する工程を含む。特定の実施形態においては、該方法は更に動物に由来する抗体を単離する工程を含む。本発明の関連する態様は該方法により作成される抗体を包含する。好ましい抗体は病原性の形態に特異的である。

【0014】

更に別の態様において、本発明は本明細書に記載した抗体の何れかおよびプリオン蛋白質を含む複合体を包含する。特定の実施形態において、プリオン蛋白質は非病原性の形態であり、他の実施形態において、それは病原性のアイソフォームである。

40

【0015】

本明細書に記載したペプチド試薬および/または抗体の何れかは例えば全体または部分的にポリヌクレオチド1つ以上によりコードされてよく、これもまた本発明の部分を構成する。

【0016】

更に別の態様において、プリオン蛋白質の存在を検出するための方法が提供される。検出方法は、特に、プリオン関連疾患を診断(例えばヒト被験体または非ヒト動物被験体において)するため、実質的にPrP^S^Cを伴わない血液製品、血液製剤または食料を確保す

50

るため、移植のための器官および組織の試料を分析するため、手術器具および装置の脱汚染をモニタリングするため、並びに、病原性プリオンの存在または非存在を知ることが重要である他の状況における方法と組み合わせよう。

【0017】

検出方法は病原性プリオンアイソフォームとの本発明のペプチド試薬の優先的相互作用に依存している。特定の実施形態においては、生物学的試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法が提供される。

【0018】

1つの実施形態においては、方法は病原性プリオン蛋白が存在する場合にそれと本明細書に記載したペプチド試薬の相互作用を可能にする条件下にペプチド試薬1つ以上に病原性プリオンを含有することが疑われる試料を接触させること；および試料中の病原性プリオンの存在、または非存在をそのペプチド試薬への結合により検出することを包含する。ペプチド試薬および病原性プリオンの相互作用は溶液中で実施することができ、或いは、反応体1つ以上を固相中または固相上に提供することができる。本発明のペプチド試薬がキャプチャー試薬、検出試薬または両方として使用できるサンドイッチ型の試験を実施することができる。他のプリオン結合試薬（例えば抗体または変性されたプリオン蛋白に結合する他の結合分子）を本発明のペプチド試薬と組み合わせ本態様において使用してよい。

10

【0019】

本実施形態の1つの態様において、本発明のペプチド試薬1つ以上を固体支持体上に提供し、病原性プリオンが存在する場合にそのペプチド試薬への結合を可能にする条件下に病原性プリオンを含有することが疑われる試料に接触させる。未結合の試料物質、例えば何れか非病原性プリオンは除去でき、そして病原性プリオンはペプチド試薬に結合したまま残存する間、または、ペプチド試薬から解離した後に、検出することができる。病原性プリオンは検出可能に標識されたペプチド試薬（病原性プリオンを「キャプチャー」するために使用するものと同じペプチド試薬か、または、本発明の第2のペプチド試薬）または検出可能に標識された抗プリオン抗体または他のプリオン結合試薬を用いて検出することができる。本抗体またはプリオン結合試薬はプリオンの病原性形態に対して特異的である必要はない。

20

【0020】

本実施形態の別の態様において、プリオン結合試薬は固体支持体上に提供され、そして病原性プリオンが存在する場合にはそのプリオン結合試薬との結合を可能にする条件下に病原性プリオンを含有することが疑われる試料に接触させる。未結合の試料物質は除去でき、そして病原性プリオンは、ペプチド試薬に結合したまま残存する間、または、ペプチド試薬から解離した後に、検出することができる。病原性プリオンは本発明の検出可能に標識されたペプチド試薬1つ以上を用いて検出できる。

30

【0021】

本実施形態の別の態様において、試料中の病原性プリオンは固体支持体（例えばELISAプレート）に非特異的に結合させることができ、そして、病原性プリオンアイソフォームに優先的に相互作用する本発明の検出可能に標識されたペプチド試薬1つ以上の結合により検出される。

40

【0022】

別の実施形態において、方法は、病原性プリオンが存在する場合はそれへの配列番号12～132の配列を有するペプチドおよびその類縁体および誘導体からなる群より選択されるペプチド試薬の結合を可能にする条件下、そのようなペプチド試薬1つ以上に病原性プリオンを含有することが疑われる試料を接触させること；および、試料中の病原性プリオンの存在または非存在をペプチド試薬へのその結合により検出することを包含する。好ましい実施形態においては、試料は配列番号66、67、68、72、81、96、97、98、107、108、119、120、121、122、123、124、125、126、127、14、35、36、37、40、50、51、77、89、100、1

50

01、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、128、129、130、131、132、56、57、65、82および84の配列を有するペプチド、ならびにその類縁体および誘導体からなる群より選択されるペプチド試薬1つ以上に接触させる。

【0023】

更に別の実施形態においては、試料中の病原性プリオンを検出するための方法が提供され、方法は、第1のペプチドを含む固体支持体を提供すること、ここで第1のペプチドはPrP^{Sc}と優先的に相互作用する本明細書に記載したペプチド試薬1つ以上を含むこと；試料中に病原性プリオンが存在する場合に第1のペプチドへの結合を可能にする条件下で試料に固体支持体を接触させること；第1のペプチドにより結合された病原性プリオンに検出可能に標識された第2のペプチドが結合できるような条件下で、第2のペプチドに固体支持体を接触させること、ここで第2のペプチドはPrP^{Sc}と優先的に相互作用する本明細書に記載したペプチド試薬1つ以上を含むこと；および、第1のペプチド、試料由来の病原性プリオンおよび第2のペプチドの間に形成された複合体を検出することにより、試料中の病原性プリオンの存在を検出すること、を含む。

10

【0024】

更に別の実施形態においては、プリオン結合試薬を含む固体支持体を準備すること、ここでプリオン結合試薬はプリオン蛋白に結合すること；プリオン蛋白が試料中に存在する場合にそれがプリオン結合試薬に結合できるような条件下に試料に固体支持体を接触させること；本発明の検出可能に標識されたペプチド試薬に固体支持体を接触させること、ここでペプチド試薬は病原性プリオン蛋白と優先的に相互作用すること；および、プリオン結合試薬、試料由来の病原性プリオンおよびペプチド試薬の間に形成された複合体を検出すること、を含む、試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法が提供される。

20

【0025】

別の実施形態においては、試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法が提供され、方法は、本明細書に記載した第1のペプチド試薬を含む固体支持体を準備し、ここで第1のペプチド試薬は病原性プリオンに優先的に相互作用し；検出可能に標識されたペプチド試薬リガンド複合体の形成を可能にする条件下で検出可能に標識された第1のリガンド（例えばプラスミノゲン、ラミニン受容体およびヘパンスルフェート）に固体支持体を接触させ、ここで第1のペプチド試薬の検出可能に標識された第1のリガンドに対する結合親和性が第1のペプチド試薬の病原性プリオンに対する結合親和性よりも弱く；病原性プリオンが試料中に存在する場合に第1のペプチド試薬に結合して第1のリガンドを置き換えることができるような条件下に固体支持体に病原性プリオンを含有することが疑われる試料を接触させる；そして、固体支持体上の検出可能に標識されたりガンドの減少により試料中の病原性プリオンの存在を検出するという工程を含む。

30

【0026】

病原性プリオンを検出する上記した方法の何れもプリオン関連疾患を診断する方法において使用できる。

【0027】

本発明はまた、本発明のペプチド試薬1つ以上を含む固体支持体を準備すること、病原性プリオンが存在する場合にそのペプチド試薬への結合を可能にする条件下、病原性プリオンを含有することがわかっている、またはその疑いのある試料に固体支持体を接触させること；および未結合の試料物質がある場合はそれを除去することを含む病原性プリオンを単離するための方法を提供する。別の実施形態は更に、ペプチド試薬から結合病原性プリオンを解離させ、そして場合により解離した病原性プリオンを回収する工程を含む。

40

【0028】

本発明はまた本発明のペプチド試薬1つ以上を含む固体支持体を準備すること、病原性プリオンが存在する場合にそのペプチド試薬への結合を可能にする条件下、病原性プリオンを含有することがわかっている、またはその疑いのある試料に固体支持体を接触させること；および未結合の試料物質を回収することを含む試料から病原性プリオンを除去する

50

ための方法を提供する。

【0029】

本発明のペプチド試薬1つ以上を含む固体支持体を準備する上記した実施形態のすべてにおいて、代替の実施形態が意図され、それにおいては、ペプチド試薬はペプチド試薬を固体支持体に結合させるよりも前に試料にペプチド試薬を接触させる。これらの実施形態においては、ペプチド試薬は結合対の一方のメンバーを含み、そして、固体支持体は結合対の第2のメンバーを含む。例えば、本発明のペプチド試薬はビオチン含有するか、または含有するように修飾してよい。ビオチニル化ペプチド試薬はペプチド試薬の病原性プリオンへの結合を可能にする条件下、病原性プリオン含有することが疑われる試料と接触させる。次にアビジンまたはストレプトアビジンを含む固体支持体をビオチニル化ペプチド試薬に接触させる。他の適当な結合対は本明細書に記載するとおりである。

10

【0030】

本明細書に記載した固体支持体を用いる方法のいずれにおいても、固体支持体は例えばニトロセルロース、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス、ポリビニルフロリド、ジアゾ化紙、ナイロン膜、活性化ビーズおよび/または磁気応答性ビーズ、ポリ塩化ビニル；ポリプロピレン、ポリスチレンラテックス、ポリカーボネート、ナイロン、デキストラン、キチン、砂、シリカ、軽石、アガロース、セルロース、ガラス、金属、ポリアクリルアミド、シリコン、ゴム、多糖類；ジアゾ化紙；活性化ビーズ、磁気応答性ビーズ、および、固相合成、アフィニティー分離、精製、ハイブリダイゼーション反応、イムノアッセイおよび他のこのような用途のために一般的に使用される何れかの物質であることができる。支持体は、粒子状であることができ、または、連続表面の形態であることもでき、そして、メンブレン、メッシュ、プレート、ペレット、スライド、ディスク、キャピラリー、中空系、針状物、ピン、チップ、固体繊維、ゲル（例えばシリカゲル）およびビーズ、（例えば多孔性ガラスビーズ、シリカゲル、場合によりジビニルベンゼンと交差結合したポリスチレンビーズ、グラフト化共重合ビーズ、ポリアクリルアミドビーズ、ラテックスビーズ、場合によりN, N' -ビス - アクリロイルエチレンジアミンと交差結合したジメチルアクリルアミドビーズ、酸化鉄磁気ビーズおよび疎水性重合体でコーティングしたガラス粒子を包含する。

20

【0031】

更にまた、本明細書に記載した方法のいずれにおいても、試料は生物学的試料であることができ、即ち、生存中、またはかつて生存していた生物から得た、または誘導した試料、例えば、器官、全血、血液画分、血液成分、血漿、血小板、血清、脳脊髄液(CSF)、脳組織、神経系組織、筋肉組織、骨髄、尿、涙液、非神経系組織、器官および/または生検または剖検試料である。好ましい実施形態において、生物学的試料は血液、血液画分、または血液成分を含む。試料は非生物学的試料であってもよい。

30

【0032】

別の態様において、本発明は本明細書に記載した検出方法の何れかにより被験体由来の生物学的試料中の病原性プリオンの存在を検出することにより被験体におけるプリオン関連疾患を診断する方法を提供する。

【0033】

別の態様において、本発明は病原性プリオンを実質的に伴わない血液製品の調製する方法を包含し、方法は、本明細書に記載した方法のいずれかにより収集血液試料由来の血液（例えば全血、血漿、血小板または血清）のアリコートを手洗いし、病原性プリオンが検出された試料は何れも排除し、そして、病原性プリオンが検出されなかった試料を合わせて病原性プリオンを実質的に伴わない血液製品を提供するという工程を含む。

40

【0034】

更に別の態様において、本発明は病原性プリオンを実質的に伴わない食糧、特に畜肉補給物（例えばヒトおよび動物の消費に供される牛肉、ラム、マトンまたは豚肉）を調製する方法を包含し、方法は、食糧に投入されることになる生存または死滅した生物から採取した試料または食糧に進入させることを意図する食品から採取した試料を、本明細書に記

50

載した方法の何れかを用いてスクリーニングし、病原性プリオンが検出された試料を識別し、そして病原性プリオンが検出された試料中の食糧に投入されることが意図される生存または死滅の生物または食品を食糧から除去し、これにより病原性プリオンを実質的に伴わない食糧を提供するという工程を含む。

【0035】

別の態様において、本発明は本明細書に記載したペプチド試薬1つ以上を含む固体支持体を包含する。固体支持体は特に、試料中の病原性プリオン蛋白を検出するため、試料からプリオン蛋白を単離するため、および試料から病原性プリオン蛋白を排除するための本発明の方法において使用できる。固体支持体は上記した通りである。

【0036】

別の態様においては、本発明は試料中の病原性プリオンの存在を検出するため、試料から病原性プリオンを単離するため、試料から病原性プリオンを排除するための種々のキットを包含し、キットは本明細書に記載したペプチド試薬1つ以上および/または本明細書に記載したペプチド試薬1つ以上を含む固体支持体および他の必要な試薬および場合により陽性および陰性の対照の何れかを含む。ペプチド試薬は検出可能に標識されていてよい。

【0037】

別の態様において、本明細書に記載したペプチド試薬、ポリヌクレオチドおよび/または抗体の1つ以上を含む組成物が提供される。

【0038】

更に別の態様において、プリオン疾患を治療または防止する方法が提供され、例えば、方法は、本明細書に記載した組成物1つ以上を動物（例えば非ヒトまたはヒト動物）に投与することを含む。別の実施形態においては、方法はプライミング工程において本明細書に記載した組成物のいずれかを含む第1の組成物を投与すること、および、例えば被験体において免疫応答を誘導するのに十分な量のブースターとしての本明細書に記載した組成物のいずれかを含む第2の組成物を投与することを含む。組成物は筋肉内、粘膜内、鼻内、皮下、皮内、経皮、腔内、直腸内、経口および/または静脈内に投与してよい。

本発明は例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

単離されたペプチド試薬であって、該ペプチド試薬は、コンホーメーション疾患蛋白の非病原性形態と比較した場合、該コンホーメーション疾患蛋白の病原性形態と優先的に相互作用する、ペプチド試薬。

(項目2)

前記コンホーメーション疾患がプリオン関連疾患であり、病原性蛋白がPrP^SCであり、そして前記非病原性形態がPrP^Cである、項目1に記載のペプチド試薬。

(項目3)

前記ペプチド試薬が、プリオン蛋白のフラグメントに由来する、項目2に記載のペプチド試薬。

(項目4)

前記ペプチド試薬が、ポリプロリンII型ヘリックスモチーフを含む、項目3に記載のペプチド試薬。

(項目5)

前記ペプチド試薬が、配列モチーフPXXPを含み、ここでPは、プロリンまたはN置換グリシンであり、そして、Xは任意のアミノ酸である、項目1に記載のペプチド試薬。

(項目6)

前記ペプチド試薬が、配列モチーフPXXPを含み、ここでPは、プロリンまたはN置換グリシンであり、そして、Xは任意のアミノ酸である、項目2に記載のペプチド試薬。

(項目7)

前記ペプチド試薬が、遺伝子的にコードされている、項目1に記載のペプチド試薬。

(項目8)

10

20

30

40

50

前記ペプチド試薬が、配列番号 12 ~ 132 を有するペプチドからなる群より選択されるペプチドに由来する、項目 2 に記載のペプチド試薬。

(項目 9)

前記ペプチド試薬が、配列番号 66、67、68、72、81、96、97、98、107、108、119、120、121、122、123、124、125、126、127、14、35、36、37、40、50、51、77、89、100、101、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、128、129、130、131、132、56、57、65、82 および 84 を有するペプチドからなる群より選択されるペプチドに由来する、項目 8 に記載のペプチド試薬。

(項目 10)

前記ペプチド試薬が、配列番号 66、67、68、72、81、96、97、98、107、108、119、120、121、122、123、124、125、126 および 127 を有するペプチドからなる群より選択されるペプチドに由来する、項目 8 に記載のペプチド試薬。

(項目 11)

前記ペプチド試薬が、N 末端および / または C 末端においてアミノ酸配列 (G) n を含み、ここで n は、1、2、3 または 4 である、項目 8 に記載のペプチド試薬。

(項目 12)

前記ペプチド試薬が、ピオチニル化されている、項目 9 または 10 に記載のペプチド試薬。

(項目 13)

前記ペプチド試薬が、配列番号 14、35、36、37、40、50、51、77、89、100、101、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、128、129、130、131 および 132 を有するペプチドからなる群より選択されるペプチドに由来する、項目 8 に記載のペプチド試薬。

(項目 14)

前記ペプチド試薬が、N 末端および / または C 末端においてアミノ酸配列 (G) n を含み、ここで n は、1、2、3 または 4 である、項目 13 に記載のペプチド試薬。

(項目 15)

前記ペプチド試薬が、ピオチニル化されている、項目 13 または 14 に記載のペプチド試薬。

(項目 16)

前記ペプチド試薬が、配列番号 109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、129、130、131 および 132 を有するペプチドからなる群より選択されるペプチドに由来する、項目 8 に記載のペプチド試薬。

(項目 17)

前記ペプチド試薬が、ピオチニル化されている、項目 16 に記載のペプチド試薬。

(項目 18)

前記ペプチド試薬が、配列番号 56、57、65、82 および 84 を有するペプチドからなる群より選択されるペプチドに由来する、項目 8 に記載のペプチド試薬。

(項目 19)

前記ペプチド試薬が、ピオチニル化されている、項目 18 に記載のペプチド試薬。

(項目 20)

項目 7 に記載のペプチド試薬をコードするポリヌクレオチド。

(項目 21)

項目 2 ~ 19 の何れかに記載のペプチド試薬および病原性プリオン蛋白を含む複合体。

(項目 22)

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 病原性プリオン蛋白が存在する場合に、項目 2、8、9、10、13 または 16 の

10

20

30

40

50

何れかに記載の第 1 のペプチド試薬が、該病原性プリオン蛋白に結合し得る条件下において、病原性プリオンを含有することが疑われる試料に該第 1 のペプチド試薬を接触させて、第 1 の複合体を形成する工程；および

(b) 該病原性プリオンが存在する場合に、該第 1 のペプチド試薬への結合によって、該試料中の該病原性プリオンの存在を検出する工程、
を包含する、方法。

(項目 2 3)

前記第 1 のペプチド試薬が、検出可能に標識されている、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記第 1 のペプチド試薬が、ビオチニル化されている、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 5)

前記第 1 のペプチド試薬が、固体支持体に結合している、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 6)

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 病原性プリオンが存在する場合に、項目 2、8、9、10、13 または 16 の何れかに記載の第 1 のペプチド試薬が、該病原性プリオンに結合し得る条件下において、該病原性プリオンを含有することが疑われる試料を該第 1 のペプチド試薬に接触させて、第 1 の複合体を形成する工程；

(b) 項目 2、8、9、10、13 または 16 の何れかに記載の第 2 のペプチド試薬が、該第 1 の複合体中の病原性プリオンに結合し得る条件下において、該第 1 の複合体を該第 2 のペプチド試薬に接触させる工程であって、ここで該第 2 のペプチド試薬は、検出可能な標識を含む、工程；および

(c) 該病原性プリオンが存在する場合に、該第 2 のペプチド試薬への結合によって、該試料中の該病原性プリオンの存在を検出する工程、
を包含する、方法。

(項目 2 7)

前記第 1 のペプチド試薬および前記第 2 のペプチド試薬が異なる、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記第 1 のペプチド試薬および前記第 2 のペプチド試薬が同じである、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記第 1 のペプチド試薬が、固体支持体に結合している、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 3 0)

前記第 1 のペプチド試薬が、ビオチニル化されている、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 3 1)

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 病原性プリオンが存在する場合に、項目 2、8、9、10、13 または 16 の何れかに記載の第 1 のペプチド試薬が、該病原性プリオンに結合し得る条件下において、該病原性プリオンを含有することが疑われる試料を該第 1 のペプチド試薬に接触させて、第 1 の複合体を形成する工程；

(b) 未結合の試料物質を除去する工程；

(c) 該第 1 の複合体から該病原性プリオンを解離させる工程；

(d) 項目 2、8、9、10、13 または 16 の何れかに記載の第 2 のペプチド試薬が、該病原性プリオンに結合し得る条件下において、該解離された病原性プリオンを該第 2 のペプチド試薬に接触させる工程であって、ここで該第 2 のペプチド試薬は、検出可能な標識を含む、工程；および

(e) 該病原性プリオンが存在する場合に、該第 2 のペプチド試薬への結合によって、該試料中の該病原性プリオンの存在を検出する工程、
を包含する、方法。

10

20

30

40

50

(項目32)

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 病原性プリオン蛋白が存在する場合に、項目2、8、9、10、13または16の何れかに記載の第1のペプチド試薬が、該病原性プリオンに結合し得る条件下において、該病原性プリオンを含有することが疑われる試料を該第1のペプチド試薬に接触させて、第1の複合体を形成する工程；

(b) 未結合の試料物質を除去する工程；

(c) 該第1の複合体から該病原性プリオンを解離させる工程；

(d) プリオン結合試薬が、該病原性プリオンに結合し得る条件下において、該解離された病原性プリオンを該プリオン結合試薬に接触させる工程であって、ここで該プリオン結合試薬は、検出可能な標識を含む、工程；および

(e) 該病原性プリオンが存在する場合に、該プリオン結合試薬への結合によって、該試料中の該病原性プリオンの存在を検出する工程、
を包含する、方法。

(項目33)

前記プリオン結合試薬が、抗プリオン抗体、モチーフグラフト化ハイブリッドポリペプチド、カチオン系またはアニオン系の重合体、増殖触媒およびプラスミノゲンからなる群より選択される、項目32に記載の方法。

(項目34)

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 病原性プリオンが存在する場合に、プリオン結合試薬が、該病原性プリオンに結合し得る条件下において、該病原性プリオンを含有することが疑われる試料を該プリオン結合試薬に接触させて、第1の複合体を形成する工程；

(b) 未結合の試料物質を除去する工程；

(c) 項目2、8、9、10、13または16の何れかに記載のペプチド試薬が、該病原性プリオンに結合し得る条件下において、該第1の複合体を該ペプチド試薬に接触させる工程であって、ここで該ペプチド試薬は、検出可能な標識を含む、工程；および

(d) 該病原性プリオンが存在する場合に、該ペプチド試薬への結合によって、該試料中の該病原性プリオンの存在を検出する工程、
を包含する、方法。

(項目35)

試料中の病原性プリオンを検出するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 固体支持体を提供する工程であって、該固体支持体は、項目2、8、9、10、13または16の何れかに記載の第1のペプチド試薬を含む、工程；

(b) 試料中に存在する場合に、病原性プリオンが該第1のペプチド試薬に結合し得る条件下において、該固体支持体を該試料に接触させる工程；

項目2、8、9、10、13または16の何れかに記載の第2のペプチド試薬が、該第1のペプチド試薬により結合された病原性プリオンに結合し得る条件下において、該固体支持体を検出可能に標識された第2のペプチド試薬に接触させる工程；ならびに

(c) 該第1のペプチド試薬、該試料由来の病原性プリオンおよび該第2のペプチド試薬の間に形成された複合体を検出することにより、該試料中の病原性プリオンの存在を検出する工程、

を包含する、方法。

(項目36)

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) プリオン結合試薬を含む固体支持体を提供する工程；

(b) 試料中に存在する場合に、プリオン蛋白が該プリオン結合試薬に結合し得る条件下において、該固体支持体試料を該試料に接触させる工程；

(c) 該固体支持体を、項目2、8、9、10、13または16の何れかに記載の検出可能に標識された第2のペプチド試薬に接触させる工程；ならびに

10

20

30

40

50

(d) 該プリオン結合試薬、該生物学的試料由来の病原性プリオンおよび該第2のペプチド試薬の間に形成された複合体を検出する工程、
を包含する、方法。

(項目37)

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 項目2、8、9、10、13または16の何れかに記載の第1のペプチド試薬を含む固体支持体を提供する工程；

(b) 該固体支持体を検出可能に標識された第1のリガンドと組み合わせる工程であって、ここで該検出可能に標識された第1のリガンドに対する該第1のペプチド試薬の結合親和性は、病原性プリオンに対する該第1のペプチド試薬の結合親和性より弱い、工程；

(c) 試料中に存在する場合に、病原性プリオンが該第1のペプチド試薬に結合し、該第1のリガンドを置き換え得る条件下において、該試料を該固体支持体と組み合わせる工程；

(d) 該第1のペプチド試薬および該試料由来の病原性プリオンの間に形成された複合体を検出する工程、
を包含する、方法。

(項目38)

前記固体支持体が、ニトロセルロース、ポリスチレンラテックス、ポリビニルフロリド、ジアゾ化紙、ナイロンメンブレン、活性化ビーズおよび磁気応答性ビーズからなる群より選択される、項目25に記載の方法。

(項目39)

前記試料が、生物学的試料である、項目22に記載の方法。

(項目40)

前記生物学的試料が、器官、全血、血液画分、血液成分、血漿、血小板、血清、脳脊髄液(CSF)、脳組織、神経系組織、筋肉組織、骨髄、尿、涙液、非神経系の組織、器官および/または生検試料もしくは剖検試料からなる群より選択される、項目39に記載の方法。

(項目41)

前記生物学的試料が、全血、血漿、血小板、血液画分または血清である、項目40に記載の方法。

(項目42)

項目2、8、9、10、13または16の何れかに記載のペプチド試薬のうち少なくとも1つを含む、固体支持体。

(項目43)

試料中の病原性プリオンの存在を検出するためのキットであって、該キットは、以下：

(a) 項目42に記載の固体支持体；ならびに
他の必要な試薬、および必要に応じて、陽性対照および陰性対照、
を備える、キット。

(項目44)

項目2、8、9、10、13または16の何れかに記載のペプチド試薬を含む、組成物。

(項目45)

項目20に記載のポリヌクレオチドを含む、組成物。

(項目46)

プリオン疾患を治療または防止する方法であって、該方法は、項目44に記載の組成物の1つ以上を動物に投与する工程を包含する、方法。

(項目47)

被験体が、哺乳動物である、項目46に記載の方法。

(項目48)

前記哺乳動物が、ヒトである、項目47に記載の方法。

(項目49)

10

20

30

40

50

前記組成物が、筋肉内、粘膜内、鼻内、皮下、皮内、経皮、腔内、直腸内、経口または静脈内に投与される、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 5 0)

プリオン疾患を治療または防止する方法であって、該方法は、以下：

(a) プライミング工程において、項目 4 4 の何れかに記載の組成物を含む第 1 の組成物を投与する工程、および

(b) 被験体において免疫応答を誘導するのに十分な量のブースターとして、項目 4 4 の何れかに記載の組成物を含む第 2 の組成物を投与する工程、を包含する、方法。

(項目 5 1)

試料由来の病原性プリオン蛋白を単離するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 項目 2、8、9、10、13 または 16 の何れか 1 項に記載のペプチド試薬を含む固体支持体を提供する工程；

(b) 該試料中に存在する場合に、病原性プリオン蛋白が第 1 のペプチド試薬へ結合し得る条件下において、該試料を該固体支持体に接触させて、第 1 の複合体を形成する工程；および

(c) 未結合の試料物質を除去する工程、を包含する、方法。

(項目 5 2)

前記第 1 の複合体から前記病原性プリオン蛋白を解離させる工程をさらに包含する、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 3)

試料由来の病原性プリオン蛋白を排除するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 項目 2、8、9、10、13 または 16 の何れか 1 項に記載のペプチド試薬を含む固体支持体を提供する工程；

(b) 病原性プリオン蛋白が存在する場合に、該病原性プリオン蛋白が該ペプチド試薬に結合し得る条件下において、該固体支持体を該病原性プリオン蛋白を含むことが疑われる試料に接触させる工程；および

(c) 未結合の試料物質を除去する工程、を包含する、方法。

(項目 5 4)

病原性プリオンを実質的に伴わない血液製品を調製する方法であって、該血液製品は、全血、血漿、血小板または血清を含み、該方法は、以下：

(a) 項目 2 2 に記載の方法により、収集された血液試料から全血、血漿、血小板または血清のアリコートスクリーニングする工程；

(b) 病原性プリオンが検出された試料を排除する工程；および

(c) 病原性プリオンが検出されない試料を合わせて、病原性プリオンを実質的に伴わない血液製品を提供する工程、を包含する、方法。

(項目 5 5)

病原性プリオンを実質的に伴わない食糧の調製する方法であって、該方法は、以下：

(a) 項目 2 2 に記載の方法により、該食糧に投入される生物から収集した試料、または該食糧に投入されることが意図される食品から収集した試料をスクリーニングする工程；

(b) 病原性プリオンが検出された試料を排除する工程；および

(c) 病原性プリオンが検出されない試料を合わせて、病原性プリオンを実質的に伴わない食糧を提供する工程、を包含する、方法。

上記およびその他の要件発明の実施形態は本明細書の開示を参考にすれば当業者が容易に知りえるものである。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【 0 0 3 9 】

【図 1】図 1 はヒト（配列番号 1）およびマウス（配列番号 2）のプリオン蛋白のアミノ酸配列を示す。

【図 2】図 2 はヒト（配列番号 3）、シリアンハムスター（ハムスター）（配列番号 4）、ウシ（配列番号 5）、ヒツジ（配列番号 6）、マウス（配列番号 7）、ヘラジカ（配列番号 8）、ファロージカ（ファロー）（配列番号 9）、ミュールジカ（ミュール）（配列番号 10）およびホワイトテイルジカ（ホワイト）（配列番号 11）に由来するプリオン蛋白のアライメントを示す。ヘラジカ、ファロージカ、ミュールジカおよびホワイトテイルジカは 2 残基、S / N 1 2 8 および Q / E 2 2 6（太字で示す）において相互に相違するのみである。

【図 3】図 3 は、パネル A - F は本明細書に記載したペプチド試薬の何れかを調製するために行ってよい例示されるペプチド置換を示す。ペプチドは各パネルにおいて丸印で囲んであり、そして本明細書に記載した例示されるペプチド試薬内に示されており（配列番号 14、Q W N K P S K P K T N G）、ここではプロリン残基（配列番号 14 の残基 8）が N 置換グリシン（ペプチド）残基と置き換えられている。パネル A はプロリン残基がペプチド残基：N - (S) - (1 - フェニルエチル) グリシンで置換されたペプチド試薬を示し、パネル B はプロリン残基がペプチド残基：N - (4 - ヒドロキシフェニル) グリシンで置換されているペプチド試薬を示し、パネル C はプロリン残基がペプチド残基：N - (シクロプロピルメチル) グリシンで置換されているペプチド試薬を示し、パネル D はプロリン残基がペプチド残基：N - (イソプロピル) グリシンで置換されているペプチド試薬を示し、パネル E はプロリン残基がペプチド残基：N - (3 , 5 - ジメトキシベンジル) グリシンで置換されているペプチド試薬を示し、そしてパネル F はプロリン残基がペプチド残基：N - ブチルグリシンで置換されているペプチド試薬を示す。

【図 4】図 4 は実施例 2 に記載したウエスタンブロット実験の結果を示す。レーン 1 および 2 は正常マウス脳ホモジネート（レーン 1、「C」標示）および変性感染マウス脳ホモジネート（レーン 2、「Sc」標示）におけるプリオン蛋白の存在を示す。レーン 3、4 および 5 はヒト血漿の存在下病原性プリオン形態への本明細書に記載したペプチド試薬（配列番号 68）の特異的結合を示す。特にレーン 3 はヒト血漿対照であり、レーン 4 は正常マウス脳ホモジネート試料である。レーン 5 は感染マウス脳ホモジネート試料における Pr P S c へのペプチド試薬による強力な結合を示している。

【図 5】図 5 は本明細書に記載した例示される P E G 連結ペプチド試薬の構造を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 0 】

（詳細な説明）

本発明は比較的小型のペプチド（50～100アミノ酸長未満、好ましくは50アミノ酸長未満、およびより好ましくは約30アミノ酸長未満）が非病原性および病原性プリオン蛋白の間の識別のために使用できるという意外であり、そして、予期せぬ発見に関する。即ち、本発明はこれらのペプチドおよびその誘導体（総称して「ペプチド試薬」と称する）が異なる特異性および/または親和性で病原性および非病原性の蛋白型に結合し、従って、診断/検出用試薬または治療用組成物において、またはそれ自体として、使用できるという意外な発見に関する。本発明の開示に先立ち、大型の分子（例えば抗体、Pr P^C、型 r Pr P およびプラスミノゲン）のみが病原性および非病原性の形態を差別化するために使用できると考えられていた。そのため、以前に記載されている抗原ペプチドを用いて抗体を作成し、それが病原性および非病原性の形態の間を識別する能力を評価した。しかしながら、プリオン蛋白の比較的非免疫原性の性質のため、病原性形態に特異的な抗体を作成することが困難であることが判明した。例えば R . A . W i l l i a m s o n e t a l . 「 A n t i b o d i e s a s T o o l s t o P r o b e P r i o n P r o t e i n B i o l o g y 」 , i n P R I O N B I O L O G Y A N D D I S E A S E S , e d . S . P r u s i n e r , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , 1 9 9 9 , p p : 7 1 7 - 7 4

10

20

30

40

50

1を参照のこと。

【0041】

本明細書に記載した特定のペプチドが病原性 (PrP^{Sc}) プリオン蛋白と優先的に相互作用するということの発見は特に診断、検出試験および治療のための新規な試薬の開発を可能にする。即ち、本発明はペプチド試薬に関し、更には、これらのペプチド試薬を利用した検出試験および診断試験、これらのペプチド試薬を利用した精製または単離方法、および、これらのペプチド試薬を含む治療用組成物に関する。同様に、これらのペプチド試薬をコードするポリヌクレオチドおよびこれらのペプチド試薬を使用して作成された抗体も提供される。本明細書に記載したペプチド試薬、ポリヌクレオチドおよび/または抗体は例えば生物学的試料中の病原性プリオンの存在を検出するための組成物および方法において有用である。そのうえ、本発明は更に治療または予防用の組成物中の成分としてこのようなペプチド試薬、抗体および/またはポリヌクレオチドを使用する方法に関する。

10

【0042】

本発明において使用するペプチド試薬 (およびこれらのペプチド試薬をコードするポリヌクレオチド) は非病原性アイソフォームと比較して病原性アイソフォームと優先的に相互作用するペプチドを含む。例えば、特定の実施形態においては、本明細書に記載したペプチド試薬は病原性コンホーメーション疾患蛋白形態に特異的に結合し、そして、非病原性形態には結合しない (またはより低い程度で結合する)。本明細書に記載したペプチド試薬 (およびそれをコードするポリヌクレオチド) は例えば抗体を作成するために使用してよい。これらの抗体は病原性形態、非病原性形態または両方を認識してよい。これらの分子は診断試験および/または予防用または治療用の組成物において、単独または種々の組み合わせで有用である。

20

【0043】

本発明の実施は、特段の記載が無い限り、当業者の知る化学、生化学、分子生物学、免疫学および薬理学の従来の方法を使用する。このような手法は文献において十分説明されている。例えば Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990; Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); および Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K. S. ed., CRC Press, 1997); Short Protocols in Molecular Biology, 4th ed. (Ausubel et al. eds., 1999, John Wiley & Sons); Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechnology Series), 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag); Peters and Dalrymple, Fields Virology (2d ed), Fields et al. (eds.), B. N. Raven Press, New York, NYを参照のこと。

30

40

【0044】

本発明のペプチド試薬、抗体および方法は特定の製剤または工程のパラメーターに限定されず、それ自体当然ながら変動してよい。本明細書において使用する用語は本発明の特

50

定の実施形態の説明を目的としているのみであり、限定を意図していない。

【0045】

本明細書において引用した全ての出版物、特許および特許出願は参照により全体が本明細書に組み込まれる。

【0046】

(I. 定義)

本発明の理解を容易にするために、本出願において使用する選択された用語を以下に説明する。

【0047】

「プリオン」、「プリオン蛋白」、「PrP蛋白」および「PrP」という用語は、本明細書においては、互換的に使用し、病原性の蛋白形態（多様な呼称、即ちスクラピー蛋白、病原性蛋白形態、病原性アイソフォーム、病原性プリオンおよびPrP^{S^c}と称される）および非病原性形態（多様な呼称、即ち細胞性蛋白形態、細胞性アイソフォーム、非病原性アイソフォーム、非病原性プリオン蛋白およびPrP^C）の両方、並びに病原性コンホーメーションおよび正常な細胞コンホーメーションの何れも有さないプリオン蛋白の変性形態および種々の組み換え形態を指すものとする。病原性蛋白形態はヒトおよび動物における疾患状態（海綿状脳障害）に関連し、非病原性形態は通常は動物の細胞中に存在し、そして、適切な条件下で病原性PrP^{S^c}コンホーメーションに変換される。プリオンは天然にはヒト、ヒツジ、ウシおよびマウスを含む広範な種類の哺乳動物種において生産される。ヒトプリオン蛋白の代表的なアミノ酸配列を配列番号1に示す。マウスプリオン蛋白の代表的アミノ酸配列を配列番号2に示す。他の代表的配列番号は図2に示すとおりである。

10

20

【0048】

本明細書においては、「病原性」という用語は、蛋白が疾患を実際に誘発することを指すか、または、単に蛋白が疾患に関連しており、従って疾患が存在する場合に存在することも意味する。即ち、本開示に関連して使用する場合に病原性蛋白は必ずしも疾患の特定の起因物質である蛋白である必要はない。病原性形態は感染性であっても無くてもよい。「病原性プリオン形態」という用語は、哺乳動物、トリまたは組み換えのプリオン蛋白のコンホーメーションおよび/またはベータシートリッチのコンホーメーションをより特定して指すものとする。一般的に、ベータシートリッチコンホーメーションはプロテイナーゼK耐性である。「非病原性」および「細胞性」という用語は、コンホーメーション疾患蛋白形態に関して使用する場合は、その存在が病気と関連しない蛋白の正常なアイソフォームも互換的に指すために使用する。

30

【0049】

更にまた「プリオン蛋白」または「コンホーメーション疾患蛋白」とは本明細書においては本明細書に記載した配列と厳密に同一のものを有するポリペプチドに限定されない。用語は発見または未発見の種または疾患（例えばアルツハイマー、パーキンソン等）の何れかのコンホーメーション疾患蛋白形態を包含することは自明である。当業者は本発明の開示および当該技術を鑑み、例えば配列比較プログラム（例えばBLASTおよび本明細書に記載した他のもの）または構造的特徴またはモチーフの同定およびアライメントを用いて、何れかの他のプリオン蛋白における図に示す配列に相当する領域を決定することができる。

40

【0050】

「PrP遺伝子」という用語は本明細書においては既知の多形および病原性突然変異を含むプリオン蛋白を発現する何れかの遺伝的物質を指すものとする。「PrP遺伝子」という用語は一般的にはPrP蛋白の何れかの形態をコードする何れかの種の何れかの遺伝子を指す。いくつかの共通して知られているPrP配列は、このような配列を開示して説明するものとして参照により本明細書に組み込まれるGabriel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9097-9101 (1992) および米国特許第5,565,186号、同第5,763,740号、同第5,792,9

50

01号および国際公開WO97/04814号に記載されている。PrP遺伝子は本明細書に記載した「宿主」および「被験」動物を含む何れかの動物から得ることができ、そして全てのその多形および突然変異であることができ、未だ発見されていない他のこのようなPrP遺伝子も用語は含むものとして認識される。このような遺伝子により発現される蛋白はPrP^C（非疾患）またはPrP^{S^C}（疾患）形態のいずれかであると推測できる。

【0051】

「プリオン関連疾患」とは本明細書においては、病原性プリオン蛋白（PrP^{S^C}）により完全または部分的に誘発される疾患を指す。プリオン関連疾患は例えばスクラピー、ウシ海綿状脳障害（BSE）、狂牛病、ネコ海綿状脳障害、クールー、クロイツフェルトヤコブ病（CJD）、新変異体クロイツフェルトヤコブ病（nvCJD）、慢性疲労疾患（CWD）、ゲルストマン シュトロイスラー症候群（GSS）および胎児家族性不眠症（FFI）を包含するがこれらに限定されない。

10

【0052】

「ペプチド試薬」という用語は本明細書においては、例えば唯一のアミノおよび/またはイミノ分子を含むがそれだけに限定されない化合物を包含するアミノ酸またはアミノ酸様分子の天然または合成の重合体を含む何れかの化合物を一般的に指すものとする。本発明のペプチド試薬は病原性プリオン蛋白と優先的に相互作用し、そして典型的にはプリオン蛋白のフラグメントから誘導される。「ペプチド」は「オリゴペプチド」または「ポリペプチド」と互換的に使用するものとし、これらの用語の使用により如何なる特定の大きさも意図しないものとする。定義に包含されるものは例えばアミノ酸の類縁体（例えば非天然アミノ酸、ペプチド等）1つ以上を含有するペプチド、置換された連結部または天然または非天然（例えば合成）の当該分野で知られた他の修飾を有するペプチドである。即ち合成のペプチド、2量体、多量体（例えば直列リピート、多重抗原性ペプチド（MAP）形態、直線状連結ペプチド）、環化、分枝鎖分子等が定義に包含される。用語はまたN置換グリシン残基（「ペプチド」）および他の合成アミノ酸またはペプチド1つ以上を含む分子も包含する。（ペプチドの説明に関しては例えば米国特許第5,831,005号；同第5,877,278号；および同第5,977,301号；Nguyen et al. (2000) Chem Biol. 7(7): 463-473；およびSimon et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(20): 9367-9371参照）。本発明において使用するのに適するペプチドの非限定的な長さは3~5残基長、6~10残基長（またはその間の何れかの整数）、11~20残基長（またはその間の何れかの整数）、21~75残基長（またはその間の何れかの整数）、75~100残基長（またはその間の何れかの整数）、または100残基長より大きいポリペプチドを包含する。典型的には本発明において有用なペプチドは意図する用途に適する最大長を有することができる。好ましくは、ペプチドは約3~100残基長である。一般的に、当業者は本明細書の記載に鑑みて最大長を容易に選択できる。更にまた、本明細書に記載したペプチド、例えば合成ペプチドは別の分子、例えば標識、リンカー、または別の化学部分（例えばビオチン、アミロイド特異的染料、例えばコントロールレッドまたはチオフラビン）を含んでもよい。このような部分は更にプリオン蛋白とのペプチドの相互作用を增強し、および/または、プリオン蛋白を更に検出可能とする場合がある。

20

30

40

【0053】

ペプチド試薬はまた、非天然のアミノ酸1つ以上を含む、置換、付加および/または欠失1つ以上を有する本発明のアミノ酸配列の誘導体を包含する。好ましくは、誘導体は何れかの野生型または比較対照用の配列と少なくとも約50%の同一性、本明細書に記載した何れかの野生型または比較対照用の配列と好ましくは少なくとも約70%の同一性、より好ましくは少なくとも約75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を示す。配列（またはパーセント）同一性は後述する通り測定できる。このような誘導体はポリペ

50

プチドの発現後修飾、例えばグリコシル化、アセチル化、ホスホリル化等を包含することができる。

【0054】

ペプチド誘導体はまた、ポリペプチドが所望の活性を維持する限り、欠失、付加および置換（一般的には保存的な性質）を含むネイティブの配列への修飾を包含する。これらの修飾は部位指向性突然変異を介するなど意図的であってよく、或いは、蛋白を生産する宿主の突然変異またはPCR増幅によるエラーを介するなど偶発的であってよい。更に、以下の作用、即ち、毒性の低下；プリオン蛋白に対する親和性および/または特異性の増大；細胞プロセッシングの促進（例えば分泌、抗原提示等）；およびB細胞および/またはT細胞への提示の促進の1つ以上を有するような修飾を行ってもよい。本明細書に記載したポリペプチドは組み換え、合成、天然原料からの精製、または組織培養において作製できる。

10

【0055】

「フラグメント」とは、本明細書においては、天然に存在する未損傷の完全長の蛋白および構造の一部のみよりなるペプチドを指す。例えばフラグメントは蛋白のC末端の欠失および/またはN末端の欠失を包含することができる。典型的には、フラグメントはその誘導元である完全長ポリペプチド配列の機能の1種、数種または全てを保有している。典型的には、フラグメントはネイティブの蛋白の少なくとも5連続アミノ酸残基、好ましくは少なくとも8連続アミノ酸残基、より好ましくはネイティブの蛋白の少なくとも約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30連続アミノ酸残基を含む。

20

【0056】

「ポリヌクレオチド」という用語は当該技術分野で知られる通り一般的に核酸分子を指す。「ポリヌクレオチド」は2本鎖および1本鎖の配列の両方を包含し、そして、例えば原核生物の配列、真核生物のmRNA、ウイルス由来のcDNA、原核生物または真核生物のmRNA、ゲノムRNAおよびウイルス由来のDNA配列（例えばRNAおよびDNAウイルスおよびレトロウイルス）、原核生物のDNAまたは真核生物（例えば哺乳動物）のDNA、特に合成のDNA配列を指すがこれらに限定されない。用語は更に、DNAおよびRNAの既知塩基類縁体の何れかを包含する配列も捕獲し、そして、欠失、付加および置換（一般的には保存的な性質）を含むネイティブの配列への修飾を包含する。これらの修飾は部位指向性突然変異を介するなど意図的であってよく、或いは、プリオンコードポリヌクレオチドを含む宿主の突然変異を介するなど偶発的であってよい。ポリヌクレオチドの修飾は例えば宿主細胞内のポリペプチド産物の発現を促進することを含む作用をいくらかでも有してよい。

30

【0057】

ポリヌクレオチドは生物学的に活性な（例えば免疫原性または治療用の）蛋白またはポリペプチドをコードすることができる。ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの性質に応じて、ポリヌクレオチドは例えばポリヌクレオチドが抗原またはエピトープをコードする場合には僅か10ヌクレオチドを含むことができる。典型的には、ポリヌクレオチドは少なくとも18、19、20、21、22、23、24、25、30またはそれ以上のアミノ酸のペプチドをコードする。

40

【0058】

「ポリヌクレオチドコーディング配列」または選択されたポリペプチドを「コードする」配列とは、適切な調節配列（または「制御エレメント」）の制御下におかれた場合にインピボでポリペプチドに転写（DNAの場合）および翻訳（mRNAの場合）される核酸分子である。コーディング配列の境界は5'（アミノ）末端の開始コドンおよび3'（カルボキシ）末端の翻訳終止コドンにより決定される。転写終止配列はコーディング配列に対して3'側に位置してよい。典型的な「制御エレメント」は例えば、転写調節部、例えばプロモーター、転写エンハンサーエレメント、転写終止シグナルおよびポリアデニル化配列；および翻訳調節部、例えば翻訳の開始の最適化のための配列、例えばShine-

50

Dalgar no (リボソーム結合部位)配列、コサック配列(即ち例えばコーディング配列の5'側に位置する翻訳の最適化のための配列)、リーダー配列(異種またはネイティブ)、翻訳開始コドン(例えばATG)および翻訳終止配列を包含するがこれらに限定されない。プロモーターは誘導性プロモーター(プロモーターに作動可能に連結したポリヌクレオチド配列の発現が分析対象、コファクター、調節蛋白等により誘導される場合)、抑制性プロモーター(プロモーターに作動可能に連結したポリヌクレオチド配列の発現が分析対象、コファクター、調節蛋白等により誘導される場合)および構成性プロモーターを包含する。

【0059】

「作動可能に連結した」とは、記載した成分がその通常の機能を行うように配置されているエレメントの配置を指す。即ち、コーディング配列に作動可能に連結したあるプロモーターは、適切な酵素が存在する場合にコーディング配列の発現を起こすことが可能である。プロモーターはそれがコーディング配列の発現を指向するように機能する限りそれと連続している必要はない。即ち、例えば介在する未翻訳であるが転写されている配列はプロモーター配列とコーディング配列の間に存在することができ、そして、コーディング配列およびプロモーター配列はなおコーディング配列に「作動可能に連結している」と考えることができる。

10

【0060】

核酸分子を説明するために本明細書において使用する「組み換え」核酸分子はゲノム、cDNA、半合成または合成起源のポリヌクレオチドを意味し、これらはその起源または操作に基づき、(1)それが天然に会合しているポリヌクレオチドの全体または部分と会合していない;および/または(2)それが天然に連結しているものとは異なるポリヌクレオチドに連結している。蛋白またはポリペプチドに関して使用する場合の「組み換え」という用語は組み換えポリヌクレオチドの発現により生産されるポリペプチドを意味する。「組み換え宿主細胞」、「宿主細胞」、「細胞」、「細胞系統」、「細胞培養」および単細胞の実態として培養される原核生物の微生物または真核生物の細胞系統を指す他のこのような用語は互換的に使用され、そして組み換えベクターまたは他の転移DNAのためのレシピエントとして使用できるか、使用されていた細胞を指し、そしてトランスフェクトされている起源細胞の子孫を包含する。単一の親細胞の子孫は、偶発的または意図的な突然変異があり得るため、必ずしも形態において、または、ゲノムまたは全DNA相補体において、起源親に完全に同一である必要はない。関連の特性、例えば所望のペプチドをコードするヌクレオチド配列の存在により特性化されるほど十分に親と同様である親細胞の子孫はこの定義により意図される子孫に包含され、上記した用語に含まれる。

20

30

【0061】

「単離された」とは、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す場合には、記載した分子が、その分子が天然に共存する全生物体から分離され区別されているか、または、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドが天然に存在しない場合は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドがその意図する用途のために使用できるほど十分に他の生物学的巨大分子を伴っていないことを意味する。

【0062】

当該技術分野で知られる「抗体」は、化学的または物理的手段により目的のポリペプチドのエピトープに結合または会合できる生物学的部分1つ以上を包含する。例えば、本発明の抗体は病原性のプリオンのコンホーメーションと優先的に相互作用(例えば特異的に結合)してよい。「抗体」という用語はポリクローナルおよびモノクローナルの調製物の両方から得られる抗体、並びに、以下のもの、即ちハイブリッド(キメラ)抗体分子(例えばWinter et al. (1991) Nature 349: 293-299; および米国特許第4,816,567号参照); F(ab')₂ およびF(ab)フラグメント; Fv分子(非共有結合ヘテロ2量体、例えばInbar et al. (1972) Proc Natl Acad Sci USA 69: 2659-2662; および Ehrlich et al. (1980) Biochem 19: 4091-4096

40

50

参照) ; 1鎖Fv分子(sFv)(例えばHuston et al.(1988)Proc Natl Acad Sci USA 85:5897-5883参照); 2量体および3量体の抗体フラグメントコンストラクト; ミニボディー(例えばPack et al.(1992)Biochem 31:1579-1584; Cumber et al., (1992)J Immunology 149B:120-126); ヒト化抗体分子(例えばRiechmann et al.(1988)Nature 332:323-327; Verhoeyan et al.(1988)Science 239:1534-1536; および1994年9月21日公開の英国特許公開GB2, 276, 169参照); およびこのような分子から得られる何れかの機能的フラグメント、ただしそのフラグメントは親抗体分子の免疫学的結合特性を保持しているものを包含する。「抗体」という用語は更に非従来工程、例えばファージディスプレイにより得られる抗体も包含する。

【0063】

本明細書においては、「モノクローナル抗体」という用語は均質な抗体集団を有する抗体組成物を指す。用語は抗体の種または原料に関して限定的なものではなく、またそれが作成される方法により限定する意図もない。即ち、用語はネズミハイブリドーマから得られる抗体、並びにネズミではなくヒトハイブリドーマを用いて得られるヒトモノクローナル抗体を包含する。例えばCote et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 1985, p 77を参照のこと。

【0064】

ポリクローナル抗体が望ましい場合は、選択された哺乳動物(例えばマウス、ウサギ、ヤギ、ウマ等)を免疫原性の組成物(例えば本明細書に記載したペプチド試薬)で全身免疫化する。免疫化動物から得た血清を収集し、既知の手法に従って投与する。選択されたペプチド試薬に対するポリクローナル抗体を含有する血清が他の抗原に対する抗体を含有する場合は、ポリクローナル抗体はイムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製できる。ポリクローナル抗血清を作成しプロセッシングするための方法は当該技術分野で知られており、例えばMayer and Walker, eds.(1987)IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY(Academic Press, London)を参照されたい。

【0065】

本明細書に記載したペプチド試薬に対して指向されるモノクローナル抗体は当業者が容易に製造できるものである。ハイブリドーマによりモノクローナル抗体を作成するための一般的な方法は周知である。不朽化抗体生産細胞系統は細胞融合により、または、癌原性DNAによりBリンパ球の直接の形質転換またはエプスタイン-バーウィルスによりトランスフェクションのような他の手法によっても創生できる。例えばM. Schreier et al.(1980)HYBRIDOMA TECHNIQUES; Hammerling et al.(1981), MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS; Kennett et al.(1980) MONOCLONAL ANTIBODIESを参照。更に、米国特許第4, 341, 761号; 同第4, 399, 121号; 同第4, 427, 783号; 同第4, 444, 887号; 同第4, 466, 917号; 同第4, 472, 500号; 同第4, 491, 632号; および同第4, 493, 890号も参照のこと。

【0066】

本明細書においては、「1ドメイン抗体」(dAb)とは指定された抗原に特異的に結合するVHドメインより構成される抗体である。dAbはVLドメインを含有しないが、抗体について存在既知の他の抗原結合ドメイン、例えばカッパおよびラムダドメインを含有してよい。dAbsを調製するための方法は当該技術分野で知られている。例えばWard et al., Nature 341:544(1989)を参照のこと。

【0067】

抗体はVHおよびVLドメイン並びに他の既知の抗原結合ドメインより構成することもできる。これらの型の抗体およびその調製方法の例は当該技術分野で知られている（例えば参照により本明細書に組み込まれる米国特許第4,816,467号を参照）。例えば「脊椎動物抗体」とは、通常は「Y」配置に凝集しており、そして、鎖の間に共有結合を有していても有さなくてもよい、軽鎖および重鎖を含む4量体またはその凝集物である抗体を指す。脊椎動物の抗体においては、鎖のアミノ酸配列は脊椎動物においてインサイチュまたはインビトロ（例えばハイブリドーマ中）で生産される抗体に存在する配列と相同である。脊椎動物の抗体は例えば精製されたポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を包含し、その調製方法は後述する通りである。

10

【0068】

「ハイブリッド抗体」とは、鎖が個別に哺乳動物の抗体鎖に対して相同であり、その新規な組立物を呈し、これにより2つの異なる抗原が4量体または凝集物により沈殿可能となる抗体である。ハイブリッド抗体において、重鎖および軽鎖の1対が第1の抗原に対して作成された抗体中に存在するものと相同であり、鎖の第2の対は第2の抗体に対して作成された抗体中に存在するものに相同である。これにより「2価性」の特性、即ち同時に2抗原に結合する能力が生じる。このようなハイブリッドはまた後述するようなキメラ鎖を用いて形成できる。

【0069】

「キメラ抗体」は重鎖および/または軽鎖が融合蛋白である抗体を指す。典型的には、鎖のアミノ酸配列の1部分が特定の種または特定のクラスから誘導された抗体における相当配列に相同であり、鎖の残余のセグメントは別の種および/またはクラスから誘導した配列に相同である。通常は軽鎖および重鎖の両方の可変領域が脊椎動物の1種から誘導した可変領域または抗体を模倣し、定常部分は脊椎動物の別の種から誘導した抗体における配列に相同である。しかしながら、定義はこの特定の例に限定されない。同様に包含されるものは、重鎖または軽鎖の一方または両方が異なる原料の抗体内の配列を模倣する配列の組み合わせより構成される何れかの抗体であり、その場合のこれらの原料は起源が異なるクラスまたは異なる種に由来するものであってよく、そして融合点は可変/定常の境界にあっても無くてもよい。即ち、定常領域および可変領域の何れも既知の抗体配列を模倣していない抗体を作成することが可能である。次に例えば自身の可変領域が特定の抗原に対してより高い特異的親和性を有するか、または自身の定常領域が増強された補体固定を示すような抗体を構築すること、または、特定の定常領域により保有される特性のその他の改良が可能となる。

20

30

【0070】

別の例は「改変された抗体」であり、これは脊椎動物抗体中の天然に存在するアミノ酸配列が変異している抗体を指す。組み換えDNA手法を利用することにより、所望の特性が得られるように抗体を再設計することができる。可能な変異は多く、そしてアミノ酸1つ以上の変化から領域、例えば定常領域の完全な再設計までに渡る。所望の細胞過程の特徴を得るための一般的には定常領域の変化、例えば補体固定、膜との相互作用および他のエフェクター機能の変化、可変領域の変化は抗原結合特性を改変するために行うことができる。抗体はまた特定の細胞または組織の部位に対する分子または物質の特異的な送達を支援するように操作することもできる。所望の改変は分子生物学における既知の手法、例えば組み換え手法、部位指向性の突然変異誘発等により行うことができる。

40

【0071】

更に別の例は「1価の抗体」であり、これは第2の重鎖のFc（即ち幹）領域に結合した重鎖/軽鎖2量体より構成される凝集物である。この種の抗体は抗原性モジュレーションを回避する。例えばGlennie et al., Nature 295:712 (1982)を参照。抗体の定義内にやはり包含されるものは、「抗体のFabフラグメント」である。「Fab」領域は重鎖および軽鎖の分枝鎖部分を含む配列に概ね等価または類似であり、そして、特定の抗原に対して免疫学的結合を示すことがわかっているがエフ

50

ェクター F c 部分を欠いている重鎖および軽鎖の部分を目指す。「F a b」は 1 重鎖および 1 軽鎖の凝集物（一般的には F a b' として知られている）並びに 2 H および 2 L 鎖（F（a b）² として知られている）を含有する 4 量体を包含し、これらは指定の抗原または抗原ファミリーと選択的に反応することができる。F a b 抗体は上記したものと類似のサブセット、即ち「脊椎動物 F a b」、「ハイブリッド F a b」、「キメラ F a b」および「改変 F a b」に分割できる。抗体の F a b フラグメントを作成する方法は当該技術分野で知られており、例えば蛋白分解および組み換え手法による合成が包含される。

【0072】

「抗原 - 抗体複合体」は抗原上のエピトープに特異的に結合した抗体により形成される複合体を指す。

10

【0073】

ペプチド（またはペプチド試薬）はそれが特異的、非特異的、または、特異的および非特異的な結合の何らかの組み合わせにおいて結合する場合に他のペプチドまたは蛋白と「相互作用する」という。ペプチド（またはペプチド試薬）は非病原性アイソフォームよりも病原性アイソフォームにより大きいアフィニティーおよび/またはより大きい特異性で結合する場合に病原性プリオン蛋白と「優先的に相互作用する」という。病原性プリオン蛋白と優先的に相互作用するペプチド試薬はまた本明細書においては病原性プリオン特異的ペプチド試薬とも称する。優先的相互作用とは各ペプチドの特定のアミノ酸残基および/またはモチーフの間の相互作用を必ずしも要さない。例えば特定の実施形態においては、本明細書に記載したペプチド試薬は病原性アイソフォームと優先的に相互作用するが、

20

【0074】

「親和性」という用語は結合の強度を指し、解離定数（ K_d ）として定量的に表すことができる。好ましくは、病原性アイソフォームと優先的に相互作用するペプチド（またはペプチド試薬）は好ましくは、それが非病原性アイソフォームと相互作用するよりも、少なくとも 2 倍高値の親和性、より好ましくは少なくとも 10 倍高値の親和性、そしてさらに

30

【0075】

アミノ酸配列の「同様性」または「パーセント同一性」を測定するための手法は当該技術分野で周知である。一般的に、「同様性」とは、アミノ酸は電荷または疎水性のような化学的および/または物理的な特性が同一または同様であるような、適切な場所におけるポリペプチド 2 個以上のアミノ酸とアミノ酸の対比を示す。次に所謂「パーセント同一性」は対比されたポリペプチド配列の間で求めることができる。核酸およびアミノ酸配列の同一性を測定するための方法も当該技術分野で周知であり、そしてその遺伝子に対する mRNA のヌクレオチド配列を調べること（通常は cDNA 中間体を介する）およびそれによりコードされたアミノ酸配列を調べること、およびこれを第 2 のアミノ酸配列と比較することを包含する。一般的に、「同一性」は 2 つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列の、それぞれ、厳密なヌクレオチドとヌクレオチド、または、アミノ酸とアミノ酸の対応性を指す。

40

【0076】

2 つ以上のアミノ酸またはポリヌクレオチドの配列はその「パーセント同一性」を測定することにより比較できる。パーセント同一性は 2 分子（比較対照配列および比較対照配列と未知の % 同一性を有する配列）との間の配列情報の直接の比較により、配列をアラインすること、2 つのアラインされた配列の間のマッチの厳密な数を計数すること、比較対照配列の長さで割ること、および結果に 100 をかけることによって、求めることができ

50

る。容易に入手できるコンピュータープログラム、例えばペプチド分析のために Smith and Waterman の Advances in Appl. Math. 2: 482 - 489, 1981 の局所的相同性アルゴリズムを採用した ALIGN, Dayhoff, M.O., Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff ed., 5 Suppl. 3: 353 - 358, National biomedical Research Foundation, Washington DC を用いて分析を支援することができる。ヌクレオチド配列同一性を測定するためのプログラムは Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 (Genetics Computer Group, Madison, WI より入手可能)、例えばやはり Smith and Waterman のアルゴリズムに基づいている BESTFIT、FASTA および GAP プログラムから入手可能である。これらのプログラムは製造元により推奨され上記した Wisconsin Sequence Analysis Package 内に記載されているデフォルトパラメータを用いて容易に利用される。例えば比較対照配列に対する特定のヌクレオチド配列のパーセント同一性はデフォルトスコアリングテーブルおよびギャップペナルティ - 6 ヌクレオチド位置で Smith and Waterman の相同性アルゴリズムを用いて測定することができる。

10

20

30

40

50

【0077】

本発明の範囲内でパーセント同一性を確立する別の方法は John F. Collins and Shane S. Sturrok により開発され多くの情報源、例えばインターネットから入手可能な University of Edinburgh の著作権による MPSRCH (商標) プログラムパッケージを使用することである。この一連のパッケージから、Smith-Waterman アルゴリズムを用い、その際、スコアリングテーブルに対してデフォルトパラメータを使用する (例えばギャップオープンペナルティ - 12、ギャップエクステンションペナルティ - 1 および 1 ギャップ 6)。発生したデータのうち、「Match」の数値が「配列同一性」を反映している。配列間のパーセント同一性または同様性を計算するための他の適当なプログラムは当該技術分野で知られており、例えば別のアライメントプログラムはデフォルトパラメータとともに使用する BLAST である。例えば BLASTN および BLASTP を以下のデフォルトパラメータ、即ち、遺伝子コード = スタンダード; フィルター = なし; 鎖 = 両方; カットオフ = 60; エクスペクト = 10; マトリックス = BLOSUM62; デスクリプション = 50 配列; ソート = HIGH SCORE による; データベース = 非冗長、GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS 翻訳 + Swiss 蛋白 + Spupdate + PIR を用いながら使用することができる。これらのプログラムの詳細は容易に入手できる。

【0078】

「免疫原性組成物」とは本明細書においては被験体への組成物の投与が体液性および/または細胞性の免疫応答の被験体における発生をもたらすような、何れかの組成物 (例えばペプチド、抗体および/またはポリヌクレオチド) を指す。免疫原性組成物は注射、吸入、経口、鼻内または何れかの他の非経腸または粘膜 (例えば直腸内または腔内) の投与経路による等、レシピエント被験体内に直接導入することができる。

【0079】

「エピトープ」とは特定の B 細胞および/または T 細胞が応答して、エピトープのような分子が免疫学的反応を示すことができようにする、または、生物学的試料中に存在する抗体と反応することができるようにする抗原上の部位を意味する。用語はまた「抗原決定基」または「抗原決定部位」と互換的に使用される。エピトープはエピトープに独特の空間的コンホメーションにおける 3 アミノ酸以上を含むことができる。一般的に、エピトープは少なくとも 5 個のこのようなアミノ酸よりなり、より通常では 8 ~ 10 個のこのようなアミノ酸よりなる。アミノ酸の空間的コンホメーションを測定する方法は当該技術分野で知られており、そして例えば X 線結晶分析および 2 次元核磁気共鳴が包含される。

更にまたある蛋白におけるエピトープの識別は、疎水性試験または部位指向性血清学的によるなど、当該技術分野で周知の手法を用いて容易に行える。また Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81:3998-4002 (ある抗原中の免疫原性エピトープの位置を測定するためにペプチドを迅速に合成する一般的な方法); 米国特許第4,708,871号 (抗原のエピトープを発見して化学的に合成するための操作法); および Geysen et al., Molecular Immunology (1986) 23:709-715 (ある抗体に対する高親和性を有するペプチドを識別するための手法) を参照のこと。同じエピトープを認識する抗体は、ある抗体が標的抗原への別の抗体の結合をブロックする能力を示す単純なイムノアッセイにおいて識別することができる。

10

【0080】

「免疫学的応答」または「免疫応答」とは、本明細書においては、ポリペプチドがワクチン組成物中に存在する場合に本明細書に記載したペプチドに対する体液性および/または細胞性の免疫応答の被験体における発生である。これらの抗体はまた、感染性の中和および/または抗体補体性または抗体依存性の細胞毒性の媒介を行うことにより免疫化された宿主に対して保護を与える場合がある。免疫学的反応性は当該技術分野で周知の競合試験のような標準的イムノアッセイにおいて測定してよい。

【0081】

「遺伝子転移」または「遺伝子送達」とは宿主細胞内に目的のDNAを信頼性高く挿入するための方法または系を指す。このような方法は非組み込み転移DNAの一過性の発現、転移レプリコン(例えばエピソーム)の染色体外複製および発現、または、宿主細胞のゲノムDNA内への転移遺伝子物質の組み込みをもたすことができる。遺伝子送達発現ベクターは例えばアルファウイルス、ポックスウイルスおよびワクシニアウイルスを包含するがこれらに限定されない。免疫化のために使用する場合は、このような遺伝子送達発現ベクターはワクチンまたはワクチンベクターと称される場合がある。

20

【0082】

「試料」という用語は生物学的および非生物学的な試料を包含する。生物学的試料は生存中またはかつて生存していた生物から得られた、または誘導されたものである。非生物学的試料は生存中またはかつて生存していた生物から誘導されない。生物学的試料は例えば動物(生存中または死亡)から誘導した試料、例えば器官(例えば脳、肝臓、腎臓等)、全血、血液画分、血漿、脳脊髄液(CSF)、尿、涙液、組織、器官、生検試料を包含するがこれらに限定されない。非生物学的試料の例は医薬品、食品、化粧品等を包含する。

30

【0083】

「標識」および「検出可能な標識」という用語は、検出が可能な分子、例えば放射性同位体、蛍光物質、発光物質、化学発光物質、酵素、酵素基質、酵素コファクター、酵素阻害剤、発色団、染料、金属イオン、金属ゾル、リガンド(例えばビオチンまたはハプテン)等を包含するがこれらに限定されない。「蛍光物質」という用語は検出可能な範囲の蛍光を示すことができる物質またはその部分を指す。本発明と共に使用してよい標識の特定の例は、例えばフルオレセイン、ローダミン、ダンシル、ウンベリフェロン、テキサスレッド、ルミノール、アクラジマムエステル、NADPH、ベータ-ガラクトシダーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびウレアーゼを包含するがこれらに限定されない。標識はまた、エピトープタグ(例えばHis-Hisタグ)、抗体または増幅可能かその他の検出が可能なオリゴヌクレオチドであってもよい。

40

【0084】

(II. 一般的概要)

本明細書に記載するものはペプチド試薬がプリオン蛋白の病原性および非病原性のアイソフォームの間において、例えば一方の形態と優先的に相互作用するがもう一方とはしないことにより、これらの識別が可能であるようなペプチド試薬(および/またはこれらの

50

ペプチド試薬をコードするポリヌクレオチド)を含む組成物である。これらのペプチド試薬を用いて作成された抗体、並びに、これらのペプチド試薬および/または抗体を含む組成物およびその製造および使用方法も提供される(例えば病原性プリオン蛋白の単離および/または検出用)。

【0085】

本発明は部分的にはプリオン蛋白の比較的小型のフラグメントがプリオンの病原性形態と優先的に相互作用できるという本発明者等による発見に立脚している。これらのフラグメントは、病原性プリオンアイソフォームとのこの優先的相互作用を示すためにより大型の構造や他の型のスカホールド分子の部分である必要は無い。特定の理論に拘泥するものではないが、ペプチドフラグメントは、おそらくは非病原性アイソフォームに存在するコンホーメーションを模倣することにより、病原性プリオンアイソフォームへの結合は可能とするが非病原性プリオンアイソフォームへは不可能であるコンホーメーションを自発的にとると考えられる。コンホーメーション疾患蛋白の特定のフラグメントが、ここではプリオンについて示されるそのコンホーメーション疾患蛋白の病原性形態と優先的に相互作用するというこの一般的な原理は、病原性形態と優先的に相互作用するペプチド試薬を製造するため他のコンホーメーション疾患蛋白にも容易に適用できる。当業者に明らかなように、フラグメントは出発点(例えば大きさ、または特性の点において)を与えるが、より望ましい属性(例えばより高いアフィニティー、より高い安定性、より高い溶解度、低いプロテアーゼ感受性、より高い特異性、より容易な合成等)を有するペプチド試薬を製造するために多くの修飾をフラグメントに対して行うことができる。

10

20

【0086】

一般的に本明細書に記載したペプチド試薬はプリオン蛋白の病原性形態と優先的に相互作用することができる。即ち、これらのペプチド試薬は病原性プリオン蛋白の存在の容易な検出を可能とし、従って、生存中または死亡後の脳、脊髄または他の神経系の組織並びに血液を包含する本質的に如何なる生物学的または非生物学的な試料中のプリオン関連疾患の診断も可能とする。

【0087】

更にまた、本明細書に記載したペプチド試薬は診断用または治療用の組成物および方法において使用してよい抗体の作成のために使用できる。特に、ペプチド試薬および/または抗体が病原性蛋白と優先的に相互作用する場合、例えば疾患形態の蛋白を、定序化、凝集、またはその他の方法で誘導して後に検出できるような状態とすることにより、病原性アイソフォームの存在を検出するために使用できる。本明細書に記載したペプチド試薬は血液含有試料中の病原性形態の検出を含む種々の診断試験において有用である。抗体および/またはペプチド試薬(またはその成分の部分の1つ以上)を標識またはマーキングすることにより検出の促進および/またはプリオン蛋白の相互作用の増強を行うことができる。

30

【0088】

更にまた、何れかの適当なシグナル増幅系、例えばシグナル増幅用の分枝鎖DNAの使用(例えば米国特許第5,681,697号;同第5,424,413号;同第5,451,503号;同第5,4547,025号;および同第6,235,483号);標的増幅法の適用、例えばPCR、ローリングサークル増幅、Third Waveのインベーター(Arruda et al. 2002 Expert. Rev. Mol. Diagn. 2: 487;米国特許第6090606号、同第5843669号、同第5985557号、同第6090543号、同第5846717号)、NASBA、TMA等(米国特許第6,511,809号;EP0544212A1);および/またはイムノPCR法(例えば米国特許5,665,539;国際公開WO98/23962号;WO00/75663号;およびWO01/31056号)等を行うことにより更に検出を容易にすることができる。

40

【0089】

更にまた、本明細書に記載したペプチド試薬および抗体は単独または何れかの組み合わせ

50

せにおいて疾患の治療または防止のために使用できる。

【0090】

(I I I . A . ペプチド試薬)

コンホーメーション疾患蛋白の病原性形態と相互作用するペプチド試薬を記載する。コンホーメーション疾患蛋白はここではプリオン蛋白により例示する。

【0091】

以下に示すものは、2種以上の異なるコンホーメーションが推定される関連蛋白を有する疾患の非限定的な一覧である。

【0092】

【化1】

10

疾患	コンホーメーション疾患蛋白
プリオン疾患 (例えばクロイツフェルトヤコブ病、スクラピー、ウシ海綿状脳障害)	PrP ^{Sc}
アルツハイマー病	APP, A* ペプチド * 1-抗キモトリプシン、褐色、非A成分
ALS	SODおよびニューロフィラメント
ピック病	ピック体
パーキンソン病	ローリー体
1型糖尿病	アミリン
多発性骨髄腫-血漿細胞異混和症	IgGL-鎖
家族性アミロイド性多発性神経障害	トランスサイレチン

20

【0093】

【化2】

甲状腺の髄質癌	プロカルシトニン
慢性腎不全	β 2-ミクログロブリン
うっ血性心不全	心房性ナトリウム尿因子
老年性の心臓および全身のアミロイドーシス	トランスサイレチン
慢性炎症	血清アミロイドA
アテローム性動脈硬化症	アポA1
家族性アミロイドーシス	ゲルソリン

30

更にまた、上記列挙したコンホーメーション疾患蛋白は各々、本発明により全て包含される異なる系統をもたらす多くの変異体、または突然変異体を包含する。マウスプリオン蛋白の種々の領域および配列の機能的分析は後述するとおりである。また例えば Pri o l a (2 0 0 1) A d v . P r o t e i n C h e m . 5 7 : 1 - 2 7 を参照のこと。マウス (M o) 、 ハムスター (H a) 、 ヒト (H u) 、 トリ (A) およびヒツジ (S h) に関して以下に示すものに相当する領域および残基は標準的な操作法および本明細書の記載に従って他種について容易に決定できる。

40

【0094】

【化3】

アミノ酸	機能
Mo1-28	トランスロケーションドメイン (切断)
22	推定切断部位
23-28	欠失によりプリオン蛋白のC末端における蛋白X関連突然変異の作用がなくなるため、蛋白X結合部位と潜在的に相互作用する基本領域
23-88	オクタリピード領域 (1~9挿入または2欠失が疾患を強化) ; 各リピード内ヒスチジンによる銅配位
34-52	ポリプロリンヘリックスの形成およびヒドロキシプロリンの形成のためのオクタリピードの部分
86-91	プロテイナーゼK消化時のPrP ^{Sc} の切断部位
Hu82-146	GSS患者の罹患脳中に存在する7Kdaフラグメント ; この領域に相当する合成ペプチドはイオンチャンネルを形成
HuP102	GSSに関連するP102L突然変異はプリオン蛋白のプロテアーゼ耐性コンホメーションへの自発的変換をもたらさないと考えられる ; プロリンは試験した全種において保存されている
HuP105	GSSに関連するP105L突然変異はプリオン蛋白のプロテアーゼ耐性コンホメーションへの自発的変換をもたらさないと考えられる ; プロリンは試験した全種において保存されている
Hu102-105	PXXPモチーフ ; 可能なポリプロリンII型ヘリックス
Mo_106	疾患の耐性に関連
Hu106-126	イオンチャンネルをモジュレートする銅を形成すること

10

20

【0095】

30

【化4】

	が示唆されている合成ペプチドの突然変異形態、銅モジュレートイオンチャンネル；A型に突然変異した場合にペプチドがよりアミロイド発生性となることから、このペプチドの原線維発生挙動の低下を示すG114およびG119	
Mo_111	疾患耐性に関連	
Sh104-113	D13Fabと共結晶化するペプチド	
Ha109-112	結晶構造中に示されるとおりD13ペプチドにより特異的に認識されるループ（M109およびM112はFab内の結合ポケット内に挿入される）	10
Hu113-120	パンドローム配列；完全保存	
A117V	パンドローム内の病原性突然変異；その領域を含むペプチドのアミロイド発生性を増大	
Ha129-131	PrPCにおけるβシート1	
Hu129/Go132	プリオン疾患への易罹患性／耐性に関連する多形	
Ha136	ヒッジにおけるコーティング小窩に関連するアラニン多形	
Mo138/Go142	プリオン疾患への易罹患性／耐性に関連する多形	
Mo141-176	マウスミニプリオンPrP106中の欠失部分（23～88）は無作用；この領域の非本質的機能を示唆	20
Ha144-154	ヘリックスA	
Ha155	プリオン疾患への易罹患性／耐性に関連する多形	
Ha160-163	シート2	
MoV165	種バリア；ヒトトランスジェニックマウスがこれらの残基をマウス配列に復帰突然変異させた場合により急速なインキュベーション時間が得られる	
MoQ167	種バリア；ヒトトランスジェニックマウスがこれらの残基をマウス配列に復帰突然変異させた場合により急速なインキュベーション時間が得られる	30
MoQ168	推定蛋白X結合部位；突然変異時にはプリオン疾患から保護	
Sh171	プリオン疾患への易罹患性／耐性に関連する多形	
MoQ172	推定蛋白X結合部位；突然変異時にはプリオン疾患から保護	
176	ジスルフィド結合システイン	
Ha173-194	ヘリックスB	
178	疾患関連突然変異	
180	疾患関連突然変異；グリコシル化部位	
196	グリコシル化部位	40
198	疾患関連突然変異	
Hu200-228	ヘリックスC	
HuE200	Lybian JewsKにおける家族性CJDに関連するKへの突然変異	

【化5】

	(組み合わせにおけるM129多形も疾患の機会を増大)
208	疾患関連突然変異
210	疾患関連突然変異
MoT215	推定蛋白X結合部位；突然変異時にはプリオン疾患から保護
217	疾患関連突然変異
MoQ219	推定蛋白X結合部位；突然変異時にはプリオン疾患から保護
232	疾患関連突然変異
232	GPIアンカー
~233	推定GPIアンカー切断部位
233-254	成熟蛋白からは除去される部分

10

プリオン蛋白(および他のコンホーメーション疾患蛋白)は同じアミノ酸配列を有する2つの異なる3次元のコンホーメーションを有している。1つのコンホーメーションは疾患の特性に関連し、一般的に不溶性であるが、他のコンホーメーションは疾患の特性に関連せず、可溶である。例えばWille et al., 「Structural Studies of the Scrapie Prion Protein by Electron Crystallography」, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99(6): 3563-3568 (2002)を参照。プリオン蛋白に関して例示したが、本発明は列挙した疾患、蛋白および系統に限定されない。

20

【0097】

即ち、特定の態様において、本明細書に記載したペプチド試薬は天然の蛋白、例えばコンホーメーション疾患蛋白(例えばプリオン蛋白)またはプリオン蛋白に対する相同性を示すモチーフまたは配列を含有する蛋白から誘導されたアミノ酸配列を含む。特に本発明のペプチド試薬は典型的には天然のプリオン蛋白から誘導される。ペプチド試薬は好ましくはプリオン蛋白の特定の領域に由来するアミノ酸配列から誘導される。これらの好ましい領域はマウスプリオン配列(配列番号2)に関して例示され、アミノ酸残基23~43および85~156の領域およびそのサブ領域にある。本発明はマウス配列から誘導されたペプチド試薬に限定されないが、ヒト、ウシ、ヒツジ、シカ、ヘラジカ、ハムスターを含む何れかの種のプリオン配列から本明細書に記載したものと同様の方法で誘導されるペプチド試薬を包含する。プリオン蛋白から誘導される場合、本明細書に記載したペプチド試薬はポロプロリンII型ヘリックスモチーフを含んでよい。このモチーフは、他の配列、特にアラニンテトラペプチドが同様にポリプロリンII型ヘリックスを形成することが示唆されている(例えばNguyen et al., Chem. Biol. 2000 7: 463; Nguyen et al. Science 1998 282: 2088; Schweitzer-Stenner et al. J. Am. Chem. Soc. 2004 126: 2768参照)が、典型的には一般的配列PxxP(例えば配列番号1の残基102~105)を含有する。PxxP配列において、「x」は何れかのアミノ酸であり、そして「P」が天然の配列内のプロリンであるが本発明のペプチド試薬においてはプロリン代替物で置き換えられていてよい。このようなプロリン代替物は通称ペプトイドのN置換グリシンを包含する。即ち、PxxP配列を基にしたポリプロリンII型ヘリックスを含む本発明のペプチド試薬においては、「P」はプロリンまたはN置換グリシン残基を示し、そして「x」は何れかのアミノ酸またはアミノ酸類縁体を示す。特に好ましいN置換グリシンは本明細書に記載するとおりである。

30

40

【0098】

更にまた、ヒト、マウス、ヒツジおよびウシを含む多くの異なる種により生産されるプ

50

リオン蛋白のポリヌクレオチドおよびアミノ酸配列が知られている。これらの配列の変異体も各種内に存在する。即ち、本発明において使用されるペプチド試薬は何れかの種または変異体のアミノ酸配列のフラグメントまたは誘導体を含むことができる。例えば、特定の実施形態においては、本明細書に記載したペプチド試薬は図2に示す配列（配列番号3～11）の何れかから誘導される。本明細書に特に開示するペプチド試薬の配列は一般的にはマウスのプリオン配列に基づいているが、当業者は適宜、他の種に由来する相当配列で容易に置換することができる。例えばヒトの診断または治療が望まれる場合は、マウスの配列を相当するヒトの配列のものと置き換えることは容易に行える。特定の実施例において、概ね残基85～残基112に由来する領域から誘導したペプチド試薬（配列番号35、36、37、40）において、残基109に相当する位置のロイシンはメチオニンで置き換えてよく、残基112に相当する位置のバリンはメチオニンで置き換えてよく、そして97に相当する位置のアスパラギンはセリンで置き換えてよい。同様に、ウシの診断が望まれる場合は、ウシプリオン配列を反映するように開示したペプチド配列において適切な置換を行ってよい。即ち、概ね残基85～残基112の領域から誘導したペプチド試薬に関する上記例をやはり用いて、残基109に相当する位置のロイシンはメチオニンで置き換えてよく、そして97に相当する位置のアスパラギンはグリシンで置き換えてよい。これらの配列におけるアミノ酸の置き換え、欠失、付加および他の突然変異を含むプリオン蛋白の誘導体もまた使用できる。好ましくは、プリオン蛋白の配列と対比した場合のアミノ酸の置き換え、付加および欠失は病原性形態と相互作用するペプチド試薬の能力に影響しない。

10

20

【0099】

本明細書に記載したペプチド試薬のためにどのような原料を用いるかに関わらず、そのようなペプチド試薬は既知のプリオン蛋白との配列同一性を必ずしも示さない。即ち、本明細書に記載したペプチド試薬は、それらがコンホーメーション疾患蛋白の病原性形態と優先的に相互作用する能力を保持している限り、本明細書に記載した天然のプリオン蛋白または配列と比較して1つ以上のアミノ酸の置き換え、付加および欠失を含むことができる。特定の実施形態においては、保存的なアミノ酸の置き換えが好ましい。保存的なアミノ酸の置き換えは側鎖において関連しており、アミノ酸のファミリー内で起こるものである。遺伝子コードされたアミノ酸は一般的には以下の4ファミリー、即ち（1）酸性＝アルパルテート、グルタメート；（2）塩基性＝リジン、アルギニン、ヒスチジン；（3）非極性＝アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；および（4）未荷電極性＝グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシンに分類される。フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは場合により一括して芳香族アミノ酸に分類される。例えばロイシンをイソロイシンまたはバリンで、アスパルテートをグルタメートで、スレオニンをセリンで個別に置き換えること、または、同様にアミノ酸を構造的に関連するアミノ酸で保存的に置き換えることは、生物学的活性に多大な影響は与えないと推測するのは合理的である。

30

【0100】

また、天然のアミノ酸および非天然のアミノ酸類縁体の何れかの組み合わせを用いて本明細書に記載したペプチド試薬を作成できことも明らかである。遺伝子コードされていない共通して遭遇するアミノ酸の類縁体は、例えばオルニチン（Orn）；アミノイソ酪酸（Aib）；ベンゾチオフェニルアラニン（BtPhe）；アルピジン（Abz）；t-ブチルグリシン（Tle）；フェニルグリシン（PhG）；シクロヘキシルアラニン（Cha）；ノルロイシン（Nle）；2-ナフチルアラニン（2-Nal）；1-ナフチルアラニン（1-Nal）；2-チエニルアラニン（2-Thi）；1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸（Tic）；N-メチルイソロイシン（N-Me Ile）；ホモアルギニン（Har）；N-メチルアルギニン（N-Me Arg）；ホスチロシン（pTy rまたはpY）；ピペコリン酸（Pip）；4-クロロフェニルアラニン（4ClPhe）；4-フルオロフェニルアラニン（4-FPhe）；1-アミノ

40

50

シクロプロパンカルボン酸(1-NCPC);およびサルコシン(Sar)を包含するがこれらに限定されない。本発明のペプチド試薬において使用するアミノ酸の何れもDまたは、より典型的にはL異性体の何れかであってよい。

【0101】

本明細書に記載したペプチド試薬を形成するために使用してよいアミノ酸の他の非天然の類縁体は、生物学的に機能的な等価物であり、本発明の化合物において有用であるアミノ酸のスルホン酸およびボロン酸類縁体のようなペプチドおよび/またはペプチドミメティック化合物を包含し、そして、イソスターにより場合により置き換えられたアミド結合1つ以上を有する化合物を包含する。本発明の範囲内においては、例えば - - CONH - - は - - CH₂NH - -、 - - NHCO - -、 - - SO₂NH - -、 - - CH₂O - -、 - - CH₂CH₂ - -、 - - CH₂S - -、 - - CH₂SO - -、 - - CH - - CH - - (シスまたはトランス)、 - - COCH₂ - -、 - - CH(OH)CH₂ - - および 1, 5 - ジ置換テトラゾールで置き換えてよく、その際にはこれらのイソスターにより連結された基が - - CONH - - により連結された基と同様の方向に保持されるようにする。本明細書に記載したペプチド試薬の残基1つ以上はペプチドを含んでよい。

10

【0102】

即ち、ペプチド試薬はまたN置換グリシン残基1つ以上を含んでよい(N置換グリシン残基1つ以上を有するペプチドは「ペプチド」と称してよい)。例えば特定の実施形態においては、本明細書に記載したペプチド試薬の何れかのプロリン残基1つ以上はN置換グリシン残基で置き換えられる。この点に関して、適当な特定のN置換グリシンは例えば、N - (S) - (1 - フェニルエチル)グリシン; N - (4 - ヒドロキシフェニル)グリシン; N - (シクロプロピルメチル)グリシン; N - (イソプロピル)グリシン; N - (3, 5 - ジメトキシベンジル)グリシン; およびN - ブチルグリシン(例えば図3)を包含するがこれらに限定されない。他のN置換グリシンもまた本明細書に記載したペプチド試薬配列中のアミノ酸残基1つ以上を置き換えるのに適している場合がある。これらおよび他のアミノ酸類縁体およびペプチドミメティックに関する一般的考察はNguyen et al. (2000) Chem Biol. 7 (7): 463 - 473; Spatola, A.F., Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983)を参考のこと。更にまた、Spatola, A.F., Peptide Backbone Modifications (一般的考察), Vega Data, Vol. 1, Issue 3, (1983年3月); Morley, Trends Pharm Sci (一般的考察), pp. 463 - 468 (1980); Hudson, D. et al., Int J Pept Prot Res, 14: 177 - 185 (1979) (- - CH₂NH - -、CH₂CH₂ - -); Spatola et al., Life Sci, 38: 1243 - 1249 (1986) (- - CH₂ - - S); Hann J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 307 - 314 (1982) (- - CH - - CH - -、シスまたはトランス); Almquist et al., J Med Chem, 23: 1392 - 1398 (1980) (- - COCH₂ - -); Jennings - White et al., Tetrahedron Lett, 23: 2533 (1982) (- - COCH₂ - -); Szelke et al., 欧州特許出願EP 45665 CA: 97: 39405 (1982) (- - CH(OH)CH₂ - -); Holladay et al., Tetrahedron Lett, 24: 4401 - 4404 (1983) (- - C(OH)CH₂ - -); およびHruby, Life Sci, 31: 189 - 199 (1982) (- - CH₂ - - S - -)も参考にでき; これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。C末端カルボン酸は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5, 288, 707号に開示されている通り、ボロン酸 - - B(OH)₂またはボロン酸エステル - - B(OR)₂または他のこのようなボロン酸誘導体で置き換えられることができる。

20

30

40

50

【0103】

本明細書に記載したペプチド試薬は単量体、多量体、環化分子、分枝鎖分子、リンカー等を含んでよい。本明細書に記載した配列の何れかまたはその生物学的機能の等価物の多量体（即ち2量体、3量体等）もまた意図される。多量体はホモ多量体、即ち同一の単量体よりなるものであってよく、例えば各単量体は同じペプチド配列である。或いは、多量体はヘテロ多量体であってもよく、これは多量体を構成する単量体全てが同一ではないことを意味する。

【0104】

多量体は単量体の相互の、または支持体への直接の結合により形成でき、例えば多重抗原ペプチド(MAPS)（例えば対称MAPS）、重合体スカホールド、例えばPEGスカホールドに結合したペプチド、および/または、スペーサー単位を伴うか伴うことなく直列に連結したペプチドが包含される。

10

【0105】

或いは、連結基を単量体配列に付加することにより単量体を統合して多量体を形成することができる。連結基を用いた多量体の非限定的な例は、グリシンリンカーを使用した直列リピート；支持体にリンカーを介して結合したMAPSおよび/またはスカホールドにリンカーを介して結合した線状連結ペプチドを包含する。連結基は当業者の知る通り2官能性のスペーサー単位（ホモ2官能性またはヘテロ2官能性の何れか）を用いる場合がある。限定せずに例示すれば、スクシンイミジル-4-(p-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボキシレート(SMCC)、スクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート等のような試薬を用いながらペプチドを連結する場合にこのようなスペーサー単位を組み込むための多くの方法は、Pierce Immunotechnology Handbook (Pierce Chemical Co., Rockville, Ill)に記載されており、そして更に、Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.)およびAldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wis)より入手可能であり、そして、「Comprehensive Organic Transformations」, VCK-Verlagsgesellschaft, Weinheim/Germany (1989)に記載されている。単量体配列を統合して連結するために使用してよい連結基の1例は -Y₁- -F- -Y₂- であり、ここでY₁およびY₂は同じかまたは異なっていて、そして炭素原子0~20個、好ましくは0~8個、より好ましくは0~3個の炭素原子のアルキレン基であり、そしてFは -O-、-S-、-S-S-、-C(O)-O-、-NR-、-C(O)-NR-、-NR-C(O)-O-、-NR-C(O)-NR-、-NR-C(S)-NR-、-NR-C(S)-O- のような官能基1つ以上である。Y₁およびY₂は場合によりヒドロキシ、アルコキシ、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、アミノ、カルボキシル、カルボキシアルキル等で置換されていてよい。単量体のいずれかの適切な原子が連結基に結合することができると考えられる。

20

30

【0106】

更にまた、本発明のペプチド試薬は直鎖、分枝鎖または環化してよい。単量体単位は環化することができるか、または、共に連結して直鎖または分枝鎖の状態、環の形態（例えばマクロ環）、星状の形態（樹状体）または球状形態（例えばフラレン）の多量体を提供してよい。本明細書に記載した単量体配列から形成できる重合体の多重度は当業者の知る通りである。特定の実施形態においては、多量体は環状2量体である。上記した用語定義に従えば、2量体はホモ2量体またはヘテロ2量体であってよい。

40

【0107】

環状の形態は、単量体または多量体に関わらず上記した結合の何れかにより作成でき、その非限定的な例は(1)窒素とC末端カルボニルの間の直接のアミド結合の形成を介して、または、例えばイプシロンアミノカルボン酸との縮合によるなどしてスペーサー基の介在を介して、C末端カルボン酸とともにN末端アミンを環化すること；(2)例えばア

50

スパルテートまたはグルタメート側鎖およびリジン側鎖の間のアミド結合の形成によるか、またはシステイン側鎖 2 個の間、または、ペニシラミンとシステイン側鎖の間、またはペニシラミン側鎖 2 個の間のジスルフィド結合の形成によるかして 2 残基の側鎖の間の結合の形成を介して環化すること；(3) 側鎖（例えばアスパルテートまたはリジン）およびそれぞれ N 末端アミンまたは C 末端カルボキシルの何れかとの間のアミド結合の形成を介して環化すること；および/または(4) 短炭素スパーサー基の介在を介して 2 側鎖を連結すること、である。

【0108】

好ましくは本明細書に記載したペプチド試薬は病原性および/または感染性ではない。

【0109】

本発明のペプチド試薬は 3 ~ 約 100 残基長（またはその間の数値）またはそれより長く、好ましくは約 4 ~ 75 残基（またはその間の数値）、好ましくは約 5 ~ 約 63 残基（またはその間の数値）、更により好ましくは約 8 ~ 約 30 残基（またはその間の数値）の長さであり、そして最も好ましくはペプチド試薬は 10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 または 30 残基である。

【0110】

本明細書に記載した組成物および方法において有用なペプチド試薬の非限定的な例は表 1 および表 4 に示す配列から誘導される。表中のペプチド試薬は従来 of 1 文字アミノ酸コードにより表示し、そしてその N 末端を左側、C 末端を右側に示す。四角括弧内のアミノ酸は異なるペプチド試薬においてその位置で使用できる代替残基を示す。丸括弧は残基がペプチド試薬から存在または非存在であってよいことを示す。何れかのプロリン残基が N 置換グリシン残基で置き換えられてペプトイドを形成してよい。表中の配列の何れも場合により Gly リンカー（G_n、ここで n = 1、2、3 または 4）を N および/または C 末端に含んでよい。

【0111】

【化 6】

表 1

ペプチド配列	配列番号
KKRPK	12
MANLGCWMLVLFVATWSDLGLC	13

【0112】

10

20

30

【化7】

(GGG)QWNKPSKPKTN	14	
QWNKPSKPKTNMKHV	15	
NQNN[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTKGEN	16	
TTKGENFTETD	17	
GENFTETD	18	
GENFTETD[V/I]K[M/I]MERVVEQMC[I/V]TQY[E/Q]ESQ AYY[Q/D](G)(R)R[G/S][S/A]S	19	10
NQNN[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTKGENFTE TD[V/I]K[M/I]MERVVEQMC[I/V]TQY[E/Q]ESQAYY[Q/D]](G)(R)R[G/S][S/A]S	20	
[A/V/T/M][V/I]LFSSPPVILLISFLIFL[I/M]VG	21	
G[N/S]D[W/Y]EDRYYRENM[H/Y]RYPNQVYYRP[M/V]D [Q/E/R]Y[S/N]NQN[N/T]FVH	22	
N[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTK	23	
VYYR	24	
RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R]	25	20
KKRPKPGG(G)WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG	26	
WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG(G)	27	
WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG(G)[G/T]WGQPHGG	28	
GGWGQGGTHSQWNKPSKPKTN	29	
GGTHSQWNKPSKPKTN	30	
WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG(G)[G/T]WGQPHGG GWGQPHGGGWGQPHGG	31	
GQPHGGGW	32	30
RPIHFGSDYEDRYYRENMR	33	
RPMIHFNDWEDRYYRENMYR	34	
(GGGG)C(GG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV(GGGG)C	35	
(GGGG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV	36	
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV(GGGG)	37	
[M/L]KH[M/V]	38	40
KPKTN[M/L]KH[M/V]	39	

【0113】

【化 8】

C(GG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV(GGGG) C	40	
SRPIHFGSDYEDRYRENMHRYPN	41	
PMIHFNDWEDRYRENMYRPVD	42	
AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	43	
RPMIHFNDWEDRYRENMYR(GGG)	44	10
GGGRPMIHFNDWEDRYRENMYRGG	45	
(GG)C(GGG)RPMIHFNDWEDRYRENMYR(GGG)C	46	
AGAAAAGAVVGGLGG	47	
GGLGG	48	
LGS	49	
QWNKPSKPKTN(GGG)	50	
QWNKPSKPKTN(GGG)QWNKPSKPKTN	51	
QWNKPSKPKTNLKHV(GGG)	52	20
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTN	53	
GGTHNQWNKPSKPKTN	54	
(GGG)AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	55	
(GGG)AGAAAAGAVVGGLGG	56	
(KKK)AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	57	
YMLGSAM[S/N]R	58	
[S/N]RP[M/I/L][I/L]H	59	30
YMLGSAM[S/N]RP[M/I/L][I/L]H	60	
YMLGSAM[S/N]RP[M/I/L][I/L]HFG[N/S]D	61	
[W/Y]EDRYRENM[H/Y]RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R]Y	62	
[W/Y]EDRYRENM[H/Y]RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R]Y [S/N]NQN[N/T]	63	
D[Q/E/R]Y[S/N]NQN[N/T]	64	
(KKK)AGAAAAGAVVGGLGG	65	
(GGG)KKRPKPGGWNTGGSRYPGQGS	66	
(GGG)KKRPKPGGWNTGG	67	40
(GGG)KKRPKPGG	68	

【 0 1 1 4 】

【化9】

PHGGGWGQHGGSWGQPHGGSWGQ	69
PHGGGWGQPHGGSWGQ	70
PHGGGWGQ	71
(GGG)KKRPKPGGGKKRPKPGG	72
(GGG)GPKRKGPK	73
(GGG)WNTGGSRYPGQS	74
(GGG)WNKPSKPKT	75
(GGG)RPMIHFNDWEDRYRENMYR(GG)C	76
QWNKPSKPKTNLKHV(GGG)	77
(GGG)AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	78
(GGG)NKPSKPK	79
(GGG)KPSKPK	80
(GGG)KKRPKPGGGQWNKPSKPKTN	81
KKKAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMDDD	82
DDDAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	83
KKKAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMKKK	84
(GGG)KKKKKKKK	85
DDDAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMDDD	86
(GGG)NNKQSPWPTKK	87
DKDKGGVGLAGAAVAAGGDKDK	88
(GGG)QANKPSKPKTN	89
(GGG)QWNKASKPKTN	90
(GGG)QWNKPSKAKTN	91
(GGG)QWNAPSKPKTN	92
(GGG)QWNKPSAPKTN	93
(GGG)QWNKPSKPATN	94
(GGG)QWNKASKAKTN	95
(GGG)KKRAKPGG	96
(GGG)KKRPKAGG	97
(GGG)KKRAKAGG	98
(GGG)QWNKASKPKTN	99

10

20

30

40

【0115】

【化 10】

(GGG)QWAKPSKPKTN	100
(GGG)QWNKPAKPKTN	101
(GGG)QWNKPSKPKAN	102
(GGG)QWNKPSKPKTA	103
(GGG)AKRPKPGG	104
(GGG)KARPKPGG	105
(GGG)KKAPKPGG	106
(GGG)KKRPAPGG	107
(GGG)KKAPKAGG	108
(GGG)KKRPKPGGGWNTGG	127
QWNKPSKPKTNGGGQWNKPSKPKTNGGGQWNKPSKPKTN	128

10

1つの態様において、本発明のペプチド試薬は本明細書に開示したペプチドの各々およびその誘導体（本明細書に記載したもの）を包含する。即ち本発明は配列番号12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131または132のペプチドから誘導されたペプチド試薬を包含する。

20

30

【0116】

本発明は好ましくは配列番号12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、72、74、76、77、78、81、82、84、89、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131または132のペプチドから誘導されたペプチド試薬を包含する。

40

【0117】

特定の好ましい実施形態においては、ペプチド試薬は病原性プリオンに特異的に結合し、例えばペプチド試薬は配列番号66、67、68、72、81、96、97、98、107、108、119、120、121、122、123、124、125、126、127、14、35、36、37、40、50、51、77、89、100、101、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、128、129、130、131、132、56、57、65、82および84のペプチドお

50

よびその類縁体（例えばN置換グリシンによるプロリン1つ以上の置換）および誘導体から誘導する。

【0118】

上記した通り、本明細書に記載したペプチド試薬は置換、付加および/または突然変異1つ以上を含んでよい。例えば残基1つ以上は、ペプチドが形成されるように、ペプチド試薬中において他の残基、例えばアラニン残基で、または、アミノ酸類縁体またはN置換グリシン残基で置き換えられてよい（例えばNguyen et al. (2000) Chem Biol. 7 (7) : 463 - 473 参照）。

【0119】

更にまた、本明細書に記載したペプチド試薬は別のペプチドまたは非ペプチドの成分を含んでよい。別のペプチド成分の非限定的な例は、スペーサー残基、例えば2個以上のグリシン（天然または誘導体）残基または一方または両方の末端上のアミノヘキサン酸リンカー、または、ペプチド試薬の可溶化を支援する残基、例えば酸性の残基、例えば配列番号83および86に示すようなアスパラギン酸（AspまたはD）を包含する。特定の実施形態においては、例えばペプチド試薬は多重抗原性ペプチド（MAP）として合成される。典型的には、ペプチド試薬の複数のコピー（例えば2～10コピー）を分枝鎖リジンのようなMAP担体または他のMAP担体コア上に直接合成する。例えばWu et al. (2001) J Am Chem Soc. 2001 123 (28) : 6778 - 84 ; Spetzler et al. (1995) Int J Pept Protein Res. 45 (1) : 78 - 85 を参照。

10

20

【0120】

本明細書に記載したペプチド試薬内に含んでよい非ペプチド成分（例えば化学部分）の非限定的な例は、ペプチド試薬の何れかの末端または内部にある検出可能な標識、タグ（例えばビオチン、His-Tag、オリゴヌクレオチド）、染料、結合対のメンバー等の1つ以上を包含する。非ペプチドの成分はまた、定量的構造-活性データおよび/または分子モデリングにより非妨害性であると推定される化合物上の位置に、直接またはスペーサー（例えばアミド基）を介して結合（例えば標識1つ以上の共有結合を介して）してよい。本明細書に記載したペプチド試薬はまたアミロイド特異的染料（例えばコンゴレッド、チオフラビン等）のようなプリオン特異的の化学部分を包含してよい。化合物の誘導体化（例えば標識、環化、化学部分の結合等）はペプチド試薬の結合特性、生物学的機能および/または薬理学的活性を実質的に妨害してはならない（そして場合によってはそれら結合特性、生物学的機能および/または薬理学的活性を増強し得る）。

30

【0121】

本発明のペプチド試薬は典型的には本明細書に記載するプリオン蛋白フラグメントまたはペプチド配列に対して少なくとも約50%の配列同一性を有する。好ましくは、ペプチド試薬は本明細書に記載するプリオン蛋白フラグメントまたはペプチド配列に対して少なくとも70%の配列同一性：より好ましくは、少なくとも約75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99または100%の配列同一性を有する。

【0122】

本明細書に記載したペプチド試薬は病原性形態と優先的に相互作用し、従って広範な単離、精製、検出、診断および治療用途において有用である。例えばペプチド試薬が病原性形態に優先的に相互作用する実施形態においては、ペプチド試薬自体が血液、神経系組織（脳、脊髄、CSF等）のような試料中または他の組織または器官の試料中の病原性形態を検出するために使用できる。ペプチド試薬はまた病原性形態に関連する疾患の存在を診断するため、病原性形態を単離するため、および、病原性形態を除去することにより試料を脱汚染するためにも有用である。

40

【0123】

プリオン蛋白とのペプチド試薬の相互作用の何れかの知られた結合試験、例えばELISA、ウエスタンブロット等のような標準的なイムノアッセイを用いて試験できる。

50

【 0 1 2 4 】

本発明のペプチド試薬の特異性を試験する1つの好都合な方法は病原性および非病原性のプリオンを含有する試料を選択することである。典型的なこのような試料は罹患動物の脳または脊髄の組織を包含する。病原性形態に特異的に結合する本明細書に記載したペプチド試薬を固体支持体に結合（当該技術分野で周知の、更に後述する方法）し、そして他の試料成分から病原性プリオンを分離（ブルダウン）して固体支持体上のペプチド-プリオン結合の相互作用の数に直接関係する定量的数値を得るために使用する。当該技術分野で知られた変法および他の試験法を用いて本発明のペプチド試薬の特異性を明らかにすることもできる。実施例を参照。

【 0 1 2 5 】

本明細書に記載したペプチド試薬を使用する場合には必要とされないが、これらの試験は病原性コンホーメーションを有するプリオンが一般的にプロテイナーゼKのような特定のプロテアーゼに対して耐性であるという事実を利用する場合がある。同じプロテアーゼは非病原性コンホーメーションのプリオンを分解することも可能である。従って、プロテアーゼを使用する場合は、試料を2等分することができる。プロテアーゼを第2の試料に添加し、同じ試験を実施する。第2の試料中のプロテアーゼは非病原性プリオン全て分解することになるため、第2の試料中の如何なるペプチド-プリオン結合相互作用も病原性プリオンに起因するものとなる。

【 0 1 2 6 】

即ち、本明細書に記載したペプチド試薬の結合の特異性および/または親和性を評価する方法の非限定的な例は標準的なウエスタンおよびファウエスタンプロットの操作法；標識ペプチド；ELISA様試験；および/または細胞系の試験を包含する。ウエスタンプロットは例えば典型的にはニトロセルロースまたはPVDfに電子プロットングされている「ブルダウン」試験（本明細書に記載）から得られた試料上のSDS-PAGEゲルから変性したプリオン蛋白を検出するタグ付けされた一次抗体を使用する。変性したプリオン蛋白を認識する抗体は記載（例えば特に、Peretz et al., 1997 J. Mol. Biol., 273: 614; Peretz et al., 2001 Nature 412: 739; Williamson et al., 1998 J. Virol. 72: 9413; 米国特許第6,765,088号；米国特許第6,537,548号）されており、一部は市販されている。他のプリオン結合分子、例えばモチーフグラフトハイブリッドポリペプチド（WO03/085086参照）、特定のカチオンまたはアニオン系の重合体（WO03/073106参照）、「増殖触媒」である特定のペプチド（WO02/097444参照）およびプラスミノゲンも記載されている。次にこの一次抗体をタグに対するプローブ（例えばストレプトアビジンコンジュゲートアルカリホスファターゼ、セイヨウワサビエルオキシダーゼ、ECL試薬および/または増殖可能なオリゴヌクレオチド）で検出（および/または増幅）する。結合はまた、標識され、そして、アフィニティータグに対するプローブ（例えばストレプトアビジンコンジュゲートアルカリホスファターゼ、セイヨウワサビエルオキシダーゼ、ECL試薬および/または増殖可能なオリゴヌクレオチド）で増幅されるアフィニティータグ（例えばビオチン）を有するペプチドのような検出試薬を用いて評価できる。更にまた、サンドイッチELISAと同様のマイクロプレートの操作法を使用してよく、例えば本明細書に記載したプリオン特異的ペプチド試薬を用いてプリオン蛋白を固体支持体（例えばマイクロプレートのウェル、ビーズ等）に固定し、そしてコンジュゲートアルカリホスファターゼ、セイヨウワサビエルオキシダーゼ、ECL試薬または増幅可能なオリゴヌクレオチドのようなアフィニティータグおよび/または検出ラベルを有する別のプリオン特異的等量的ペプチド試薬を包含するがこれに限定されない別の検出試薬を使用する。細胞系の試験はまた、例えばプリオン蛋白を個々の細胞上で直接検出するようなものも使用できる（例えば蛍光に基づく細胞ソーティング、計数または特異的標識細胞の検出を可能にする蛍光標識プリオン特異的試薬を使用）。

【 0 1 2 7 】

10

20

30

40

50

(I I I . B . ペプチド試薬の作製)

本発明のペプチド試薬は全て当該技術分野で周知の多くの方法で作製できる。

【 0 1 2 8 】

ペプチド試薬が全体または部分的に遺伝子的にコードされたペプチドである1つの実施形態においては、ペプチドは当該技術分野で周知の組み換え手法を用いて作成できる。当業者は、標準的な方法および本明細書の記載を用いて所望のペプチドをコードするヌクレオチド配列を容易に決定できる。単離後、組み換えペプチドは場合により本明細書に記載する通り、そして当該技術分野で周知のように、非遺伝子コード成分（例えば検出可能な標識、結合対メンバー等）を含むように修飾することによりペプチド試薬を作製することができる。

10

【 0 1 2 9 】

オリゴヌクレオチドプローブは既知配列に基づいて設計でき、そして、ゲノムまたはcDNAライブラリをプローブするために使用できる。次に、配列を更に標準的な方法および例えば完全長配列の所望の部分で遺伝子をトランケーションするために用いられる制限酵素を用いて単離することができる。同様に、フェノール抽出のような既知の手法を用いて目的の配列を細胞およびそれを含有する組織から直接単離することができ、そして配列を更に操作することにより所望のトランケーションを行うことができる。DNAを獲得し単離するために使用する手法の説明については前掲の Sambrook et al. を参照のこと。

【 0 1 3 0 】

ペプチドをコードする配列はまた例えば既知配列に基づいて合成により製造できる。ヌクレオチド配列は所望の特定のアミノ酸配列のための適切なコドンを用いて設計できる。完全な配列は一般的に標準的な方法により調製された重複するオリゴヌクレオチドから組立てられ、そして完全なコーディング配列に組立てられる。例えば Edge (1981) Nature 292:756; Nambair et al. (1984) Science 223:1299; Jay et al. (1984) J. Biol. Chem. 259:6311; Stemmer et al. (1995) Gene 164:49-53 を参照。

20

【 0 1 3 1 】

要件のペプチド試薬において有用なポリペプチドをコードする配列をクローニングするために組み換え手法が容易に使用され、これを次に適切な塩基対の置き換えによりインビトロで突然変異誘発させ、これにより所望のアミノ酸に対するコドンを得る。このような変化には1アミノ酸の変化をもたらす僅か1塩基対が包含されるか、または、数個の塩基対の変化が含まれる場合がある。或いは、突然変異はミスマッチの2重鎖の融点より低い温度で親ヌクレオチド配列（一般的にはRNA配列に相当するcDNA）にハイブリダイズするミスマッチプライマーを用いて行うことができる。プライマーは比較的狭い限界内にプライマー長と塩基組成を維持することにより、そして突然変異塩基を中央に保持することにより特異的なものとすることができる。例えば Innis et al. (1990) PCR Applications: Protocols for Functional Genomics; Zoller and Smith, Methods Enzymol. (1983) 100:468 を参考。プライマー伸長はDNAポリメラーゼ、クローニングされた産物および突然変異したDNAを含有するクローンを用いて行い、プライマー伸長鎖の分離により誘導し、選択する。選択はハイブリダイゼーションプローブとして突然変異体のプライマーを用いて行うことができる。手法はまた複数の点突然変異を行うためにも適用される。例えば Dalbie-McFarland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79:6409 を参照。

30

40

【 0 1 3 2 】

コーディング配列を単離および/または合成した後、それらを発現のための何れかの適当なベクターまたはレプリコンにクローニングすることができる（実施例も参照）。本明

50

細書の記載から明らかな通り、欠失または突然変異を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを種々の組み合わせで作動可能に連結する発現コンストラクトを作成することにより、広範な種類の修飾ポリペプチドをコードするベクターが生成できる。

【0133】

多くのクローニングベクターが当業者に知られており、適切なクローニングベクターの選択を所望に応じて行う。クローニングのための組み換えDNAベクターおよびそれらが形質転換することができる宿主細胞の例は、バクテリオファージ (E. coli)、pBR322 (E. coli)、pACYC177 (E. coli)、pKT230 (グラム陰性細菌)、pGV1106 (グラム陰性細菌)、pLAFR1 (グラム陰性細菌)、pME290 (非E. coliグラム陰性細菌)、pHV14 (E. coliおよびバチルス・サブチルス)、pBD9 (バチルス)、pIJ61 (ストレプトマイセス)、pUC6 (ストレプトマイセス)、YIp5 (サッカロマイセス)、Y Cp19 (サッカロマイセス) およびウシ乳頭腫ウイルス (哺乳動物細胞) を包含する。一般的に上掲DNA Cloning: Vols. I & II; 上掲 Sambrook et al., ; 上掲 B. Perbel を参照。

10

【0134】

昆虫細胞発現系、例えばバキュロウイルス系もまた使用でき、そして当業者が知る通りであり、そして例えば Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) に記載されている。バキュロウイルス/昆虫細胞発現系のための材料および方法は特に Invitrogen, San Diego CA からキット形態 (MaxBacキット) で販売されている。

20

【0135】

植物発現系もまた本明細書に記載したペプチド試薬を製造するために使用できる。一般的にこのような系は異種の遺伝子で植物細胞をトランスフェクトするためにウイルス系ベクターを使用する。このような系の説明については、例えば Porta et al., Mol. Biotech. (1996) 5: 209-221; および Hackland et al., Arch. Virol. (1994) 139: 1-22 を参考のこと。

【0136】

Tomei et al., J. Virol. (1993) 67: 4017-4026 および Selby et al., J. Gen. Virol. (1993) 74: 1103-1113 に記載のワクシニアウイルス系感染/トランスフェクション系のようなウイルス系も本発明において使用できる。この系においては、細胞をまずバクテリオファージ T7 RNAポリメラーゼをコードするワクシニアウイルス組み換え体でインビトロでトランスフェクトする。このポリメラーゼはそれが T7 プロモーターを担持した鋳型のみ転写するという点において明らかな特異性を示す。感染の後、T7 プロモーターにより駆動される目的の DNA でトランスフェクトする。ワクシニアウイルス組み換え体に由来する原形質中で発現されるポリメラーゼはトランスフェクトされた DNA を RNA に転写し、次にこれが宿主翻訳機序により蛋白に翻訳される。方法は大量の RNA およびその翻訳産物の高水準の一過性の原形質生産をもたらす。

30

40

【0137】

遺伝子はプロモーター、リボソーム結合部位 (細菌発現の場合) および場合によりオペレーター (本明細書においては総称して「制御」エレメントと称する) の制御下にあることにより、この発現コンストラクトを含有するベクターにより形質転換された宿主細胞内の RNA 内に所望のポリペプチドをコードする DNA 配列を転写できるようなる。コーディング配列はシグナルペプチドまたはリーダー配列を含有してもしなくてもよい。本発明においては、天然のシグナルペプチドまたは非相同の配列の両方を使用できる。リーダー配列は翻訳後プロセッシングにより宿主から除去できる。例えば米国特許第 4, 431, 739 号; 第 4, 425, 437 号; 第 4, 338, 397 号を参照。このような配列は例えば TPA リーダー配列並びにミツバチメリチンシグナル配列を包含するがこれらに限定

50

されない。

【0138】

宿主細胞の生育と対比して蛋白の配列の発現を調節することができる他の調節配列もまた望ましい場合がある。このような調節配列は当業者の知る通りであり、そして、その例には調節化合物の存在を含む化学的または物理的な刺激に応答して遺伝子の発現のスイッチを入り切りするものが包含される。他の型の調節エレメント、例えばエンハンサー配列もベクター内に存在してよい。

【0139】

制御配列および他の調節配列はベクター内への挿入の前にコーディング配列にライゲーションしてよい。或いは、コーディング配列は制御配列および適切な制限部位を既に含んでいる発現ベクター内に直接クローニングすることができる。

10

【0140】

一部の場合において、コーディング配列が適切な方向で制御配列に連結されるように、即ち適切な読み枠を維持するために、これを修飾する必要がある。突然変異体または類縁体は蛋白をコードする配列の部分の欠失により、配列の挿入により、および/または、配列内のヌクレオチド1つ以上の置換により、調製してよい。部位指向性突然変異のようなヌクレオチド配列を修飾するための手法は当該分野で周知である。例えば上掲の Sambrook ; 上掲の DNA Cloning , Vols . I and II ; 上掲の Nucleic Acid Hybridization を参照。

【0141】

次に発現ベクターを用いて適切な宿主細胞を形質転換する。多くの哺乳動物細胞系統が当該技術分野で知られており、American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能な不朽化細胞系統、例えばチャニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎 (BHK) 細胞、サル腎細胞 (COS)、ヒト肝細胞癌細胞 (例えば HepG2)、Ver o293細胞並びにその他のものを包含する。同様に細菌の宿主、例えば E. coli、バチルス・サブチルスおよびストレプトコッカス・エスピーが本発明の発現コンストラクトと共に使用される。本発明において有用なコウボの宿主は特に、サッカロマイセス・セレベシアエ、カンジダ・アルピカンス、カンジダ・マルトーサ、ハンセヌラ・ポリモルファ、クルイペロマイセス・フラジリス、クルイペロマイセス・ラクティス、ピチア・グレリモンジ、ピチア・パストリス、スキゾサッカロマイセス・ボンベおよびヤロウイア・リポリティカを包含する。バキュロウイルス発現ベクターと共に使用するための昆虫細胞は特に Aedes aegypti、Autographa californica、Bombyx mori、Drosophila melanogaster、Spodoptera frugiperda および Trichoplusia ni を包含する。

20

30

【0142】

選択される発現系と宿主に応じて、本発明の蛋白は目的の蛋白が発現される条件下に上記した発現ベクターで形質転換されている生育中の宿主細胞により生産される。適切な生育条件の選択は当業者の知る通りである。

【0143】

1つの実施形態において、形質転換された細胞は周囲の培地中にポリペプチド産物を分泌する。特定の調節配列を例えば、組織プラスミノゲン活性化物質 (TPA) リーダー配列、インターフェロン (または) シグナル配列、または既知分泌蛋白由来の他のシグナルペプチド配列を用いながらベクター内に含めることにより蛋白産物の分泌を増強することができる。次に分泌されたポリペプチド産物を本明細書に記載した種々の手法、例えば標準的な精製手法、例えばヒドロキシアパタイト樹脂、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズエクスクルージョンクロマトグラフィー、電気泳動、HPLC、免疫吸着法、アフィニティークロマトグラフィー、免疫沈降法等で単離することができる。

40

【0144】

50

或いは、形質転換された細胞を、細胞を溶解するが組み換えポリペプチドは実質的に未損傷のまま維持できる化学的、物理的または機械的手段を用いて破壊する。細胞内蛋白質はまた、例えばポリペプチドの連結が起こるような界面活性剤または有機溶媒の使用により、細胞壁または細胞膜から成分を除去することにより得ることができる。このような方法は当業者の知る通りであり、例えば *Protein Purification Applications: A Practical Approach*, (E. L. V. Harris and S. Angal, Eds., 1990) に記載されている。

【0145】

例えば、本発明と共に使用するための細胞を破壊する方法は、音波処理または超音波処理；撈拌；液体または固体押出；熱処理；凍結解凍；乾燥；爆発的脱圧縮；浸透圧ショック；トリプシン、ノイラミニダーゼおよびリゾチームのようなプロテアーゼを含む溶解性酵素による処理；アルカリ処理；および胆汁酸塩、ドデシル硫酸ナトリウム、Triton、NP40およびCHAPSのような界面活性剤および溶媒の使用を包含するがこれらに限定されない。細胞を破壊するために使用する特定の手法は概ね所望により選択され、そしてポリペプチドが発現される細胞の型、培養条件および使用される何れかの前処理に応じて異なる。

10

【0146】

細胞の破壊の後、細胞破砕物を一般的に遠心分離により除去し、そして細胞内生産ポリペプチドを標準的な精製手法、例えばカラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズエクスクルージョンクロマトグラフィー、電気泳動、HPLC、免疫吸着法、アフィニティークロマトグラフィー、免疫沈降法等を用いて更に精製する。

20

【0147】

例えば本発明の細胞内ポリペプチドを得るための1つの方法では、抗体（例えば予め作成されている抗体）を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーによるか、またはレクチンアフィニティークロマトグラフィーにより、アフィニティー精製を行う。特に好ましいレクチン樹脂は、マンノース部分を認識するものであり、例えば *Galanthus nivalis* アグルチニン (GNA)、*Lens culinaris* アグルチニン (LCA または レンチルレクチン)、*Pisum sativum* アグルチニン (PSA または ピーレクチン)、*Narcissus pseudonarcissus* アグルチニン (NPA) および *Allium ursinum* アグルチニン (AUA) に由来する樹脂を包含するがこれらに限定されない。適当なアフィニティー樹脂の選択は当業者の知る通りである。アフィニティー精製の後、上記した手法の何れかのような当該技術分野で周知の従来手法を用いてポリペプチドを更に精製することができる。

30

【0148】

ペプチド試薬は例えばペプチド分野の当業者が知る数種の手法の何れかにより好都合に化学合成できる。一般的に、これらの方法は成長中のペプチド鎖へのアミノ酸1つ以上の逐次的付加を使用する。通常は第1のアミノ酸のアミノまたはカルボキシ基の何れかを適当な保護基で保護する。次に、保護された、または誘導体化されたアミノ酸を不活性の固体支持体に結合するか、または、アミド結合の形成を可能にする条件下適当に保護された相補（アミノまたはカルボキシル）基を有する配列内の次のアミノ酸を添加することにより、溶液中において利用する。次に保護基を新しく付加したアミノ酸残基から除去し、次のアミノ酸（適当に保護されている）の添加等を行う。所望のアミノ酸が適切な配列で連結された後、残存する保護基（および固相合成手法を使用する場合は固体支持体）があればこれを逐次的または同時に除去することにより最終的なポリペプチドとする。一般的な操作法の単純な変法により、例えば、保護されたトリペプチドを適切に保護されたジペプチドにカップリング（キラル中心をラセミ化しない条件下）させ脱保護後にペンタペプチドを得ることにより、成長中の鎖に一度に1個以上のアミノ酸を付加させることもできる。固相ペプチド合成手法については、例えば *J. M. Stewart and J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1984) および

40

50

G. Barany and R. B. Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, editors . E. Gross and J. Meienhofer, Vol. 2 (Academic Press, New York, 1980), pp. 3 - 254; そして伝統的な溶液合成については M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, (Springer-Verlag, Berlin 1984) および E. Gross and J. Meienhofer, Eds., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 1 を参照。これらの方法は典型的には比較的小型のポリペプチド、即ち約 50 ~ 100 アミノ酸長のものを使用するが、より長いポリペプチドにも適用される。

10

【0149】

典型的な保護基は t - ブチルオキシカルボニル (Boc)、9 - フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) ベンジルオキシカルボニル (Cbz); p - トルエンシルホニル (Tx); 2, 4 - ジニトロフェニル; ベンジル (Bzl); ピフェニルイソプロピルオキシカルボキシ - カルボニル、t - アミルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、o - プロモベンジルオキシカルボニル、シクロヘキシル、イソプロピル、アセチル、o - ニトロフェニルシルホニル等を包含する。

【0150】

典型的な固体支持体は交差結合重合体支持体である。これらはジビニルベンゼン交差結合スチレン系重合体、例えばジビニルベンゼン - ヒドロキシメチルスチレン共重合体、ジビニルベンゼン - クロロメチルスチレン共重合体およびジビニルベンゼン - ベンズヒドリルアミノポリスチレン共重合体を包含する。

20

【0151】

重合体を含有するペプチドの合成は例えば米国特許第 5, 877, 278 号; 同第 6, 033, 631 号; Simon et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9367 に従って行うことができる。

【0152】

本発明のペプチド試薬はまた同時多重ペプチド合成の方法によるなど、他の方法によって化学的に調製することもできる。例えば Houghten Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82: 5131 - 5135; 米国特許第 4, 631, 211 号を参照。

30

【0153】

(IV. 抗体)

更に、本発明において使用する本明細書に記載したペプチド試薬は抗体を作成するために使用できる。特定の実施形態においては、これらのペプチド試薬に対して形成した抗体は病原性プリオンに特異的である。別の実施形態においては、抗体は病原性および非病原性の形態の両方に結合する。更に別の実施形態においては、抗体は非病原性のアイソフォームに特異的である。場合により本明細書に記載した抗体は非病原性形態から病原性のコンホーメーションへの変換を抑制する。典型的には本発明の抗体は動物に対し本明細書に記載したペプチド試薬 (またはそのようなペプチド試薬をコードするポリヌクレオチド) を投与することにより作成する。方法はまた動物から抗体を単離することも包含する。

40

【0154】

本発明の抗体はポリクローナルまたはモノクローナル抗体の調製物、単独特異的な抗血清、ヒト抗体であってよく、または、ハイブリッドまたはキメラ抗体、例えばヒト化抗体、改変抗体 (Fab')₂ フラグメント、F(ab) フラグメント、Fv フラグメント、単ドメイン抗体、2 量体その機能的フラグメントであって、または 3 量体の抗体のフラグメントまたはコンストラクト、ミニボディー、または対象となる抗原に結合するこれらの機能的フラグメントであってよい。

【0155】

抗体は当該技術分野で周知の手法を用いて製造でき、例えば米国特許第 4, 001, 3

50

08号；同第4,722,890号；同第4,016,043号；同第3,876,504号；同第3,770,380号および同第4,372,745号に開示されている。例えば、ポリクローナル抗体は一般的に適当な動物、例えばマウス、ラット、ウサギ、ヒツジまたはヤギを目的の抗原（例えば本明細書に記載したペプチド試薬）で免疫化することにより作成する。免疫原性を増大させるために、抗原を免疫化前に担体に連結することができる。このような担体は当業者には周知である。免疫化は一般的に食塩水、好ましくはFreundの完全アジュバントのようなアジュバント中に抗原を混合または乳化し、そして混合物または乳化物を非経腸的（一般的には皮下または筋肉内）に注射することにより行われる。動物は一般的には2～6週間後に食塩水中、好ましくはFreundの不完全アジュバントを用いて抗原を1回以上注射することによりブーストする。抗原はまた当該技術分野で既知の方法を用いたインビトロの免疫化により作成してよい。次にポリクローナル抗血清を免疫化動物から得る。

10

20

30

40

50

【0156】

モノクローナル抗体は一般的にはKohler and Milstein(1975) Nature 256:495-497の方法またはその変法を用いて調製する。典型的には、マウスまたはラットを本明細書に記載するとおり免疫化する。しかしながら、血清を抽出するために動物を出血させるよりはむしろ、脾臓（及び場合により数個のリンパ節）を摘出し、解離させて単細胞化する。所望により、細胞懸濁液を、抗原をコーティングしたプレートまたはウェルに適用することにより、脾細胞をスクリーニング（非特異的付着細胞除去後）してよい。抗原に特異的な膜結合免疫グロブリンを発現するB細胞はプレートに結合し、懸濁液の残余と共に洗い出されることはない。次に得られたB細胞または全解離脾細胞をハイブリドーマ形成の為に骨髓腫細胞に融合するように誘導し、選択培地（例えばヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン培地、「HAT」）中で培養する。得られたハイブリドーマを制限希釈によりプレティングし、免疫化抗原に特異的に結合する（そして未関連の抗原には結合しない）抗体の生産について試験する。次に選択されたモノクローナル抗体分泌ハイブリドーマをインビトロ（例えば組織培養ビンまたは中空系の反応器中）で、またはインビボ（例えばマウス腹水として）で培養する。

【0157】

ヒト化およびキメラ抗体もまた本発明において有用である。ハイブリッド（キメラ）抗体分子は一般的にはWinter et al.(1991) Nature 349:293-299および米国特許第4,816,567号において考察されている。ヒト化抗体分子は一般的にはRiechmann et al.(1988) Nature 332:323-327; Verhoeyan et al.(1988) Science 239:1534-1536; および1994年9月21日公開の英国特許公開GB2,276,169において考察されている。ヒト化抗体を操作する1つの方法では、マウス抗体遺伝子由来のプロモーター、リーダーおよび可変領域配列、および、ヒト抗体由来の定常領域エクソンを含有する組み換えDNAをクローニングすることによりマウス-ヒト抗体、ヒト化抗体を作成する。一般的には、Kuby, Immunology, 3rd Edition, W.H. Freeman and Company, New York(1998), p136を参照。

【0158】

本明細書に記載したペプチド試薬に対して指向されたモノクローナルおよびポリクローナルの両方の抗体は診断および治療用途において得に有用であり、例えば中和するこれらの抗体は受動免疫療法において有用である。モノクローナル抗体は特に抗イディオタイプ抗体を形成するために使用してよい。

【0159】

抗イディオタイプ抗体は、対抗して保護することが望まれる物質の抗原の「内部イメージ」を保有する免疫グロブリンである。抗イディオタイプ抗体を形成するための方法は当該技術分野で知られている。例えばGrzych(1985), Nature 316:74; MacNamara et al.(1984), Science 226:

1325, Uytdehaag et al (1985), J. Immunol. 134:1225を参照。これらの抗イディオタイプ抗体はまたコンホーメーション疾患の治療および/または診断のために有用である。

【0160】

抗体フラグメントもまた本発明の範囲に包含される。未損傷の抗体分子の免疫学的結合特性を示すことができる抗原結合部位を含む多くの抗体フラグメントが当該技術分野で知られている。例えば機能的抗体フラグメントは、例えばペプシンを用いて抗体分子から抗原結合に関与しない定常領域を切断してF(ab')₂フラグメントを形成することにより製造できる。これらのフラグメントは2抗原結合部位を含有するが、重鎖の各々に由来する定常領域の部分は欠いている。同様に、所望により単一の抗原結合部位を含むFabフラグメントを例えばパインでポリクローナルまたはモノクローナル抗体を消化することにより製造できる。重鎖および軽鎖の可変領域のみを含む機能的フラグメントもまた、組み換え体の製造または免疫グロブリン分子の優先的蛋白分解のような標準的な手法を用いて製造できる。これらのフラグメントはまたFvとしても知られている。例えばInbar et al. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69:2659-2662; Hochman et al., (1976) Biochem 15:2706-2710; および Ehrlich et al. (1980) Biochem 19:4091-4096を参照。

10

【0161】

単鎖Fv(「sFvまたはscFv」)ポリペプチドはペプチドコードリンカーにより連結されるV_H-およびV_L-コード遺伝子を含む遺伝子融合物から発現される共有結合V_H-V_Lヘテロ2量体である。Houston et al. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:5879-5883。抗体V領域由来の天然には凝集しているが化学的には分離している軽鎖および重鎖のポリペプチドを、抗原結合部位の構造と実質的に同様である三次元構造に折りたたまれるsFv分子に変換するための化学構造(リンカー)を識別して開発するための多くの方法が報告されている。例えば米国特許第5,091,513号;同第5,132,405号;および同第4,946,778号を参照できる。sFv分子は当該技術分野で知られた方法を用いて製造してよい。例えばHouston et al., (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:5879-5338;米国特許第5,091,513号;同第5,132,405号および同第4,946,778号を参照。配列設計の基準は一方の鎖のC末端と他方のN末端の間の距離に渡る適切な長さを決定することを含み、この場合、リンカーはコイル化または二次構造の形成を行わない小型親水性アミノ酸残基から形成される。このような方法は当該技術分野で報告されている。例えば米国特許第5,091,513号;第5,132,405号および第4,946,778号を参照。適当なリンカーは一般的にグリシンおよびセリン残基の交互のセットのポリペプチド鎖を含み、溶解度を向上させるために挿入されたグルタミン酸およびリジンの残基を含んでよい。

20

30

【0162】

「ミニ抗体」または「ミニボディー」も本発明で使用される。ミニボディーはヒンジ領域によりsFvから分離された自身のC末端におけるオリゴマー化ドメインを含むsFvポリペプチド鎖である。Pack et al., (1992) Biochem 31:1579-1584。オリゴマー化ドメインは別のジスルフィド結合により更に安定化できる自己会合ヘリックス、例えばロイシンジッパーを含む。オリゴマー化ドメインは機能的結合蛋白へのポリペプチドのインピボの折り込みを促進すると考えられている過程である膜を経由するベクター性の折り込みと適合するように設計される。一般的に、ミニボディーは当該技術分野で周知の組み換え法を用いて製造される。例えばPack et al., (1992) Biochem 31:1579-1584; Cumber et al. (1992) J. Immunology 149B:120-126を参照。

40

【0163】

非従来の手段もまた抗体の作成と発見のために使用できる。例えば、ファージディスプレイ

50

レイブラリをスクリーニングして非病原性形態よりも病原性形態により高度に結合する、或いはその逆の抗体を探ることができる。一般的に Siegel, 「Recombinant Monoclonal Antibody Technology」, Transfus, Clin. Biol. (2002) 9(1): 15-22; Sidhu, 「Phage Display in Pharmaceutical Biotechnology」, Curr. Opin. Biotechnol. (2000) 11(6): 610-616; Sharon, et al., 「Recombinant Polyclonal Antibody Libraries」, Comb. Chem. High Throughput Screen (2000) 3(3): 185-196; および Schmitz et al., 「Phage Display: A Molecular Tool for the Generation of Antibodies - Review」, Placenta, (2000) 21 Suppl A: S106-12 を参照。

10

【0164】

上記した通り、抗体はまた、動物に本明細書に記載したペプチド試薬をコードするポリヌクレオチド配列を投与することにより作成してよい。ペプチドをインビボで発現する場合は、抗体はインビボで形成される。ポリヌクレオチドの送達のための方法は後述する通りである。

【0165】

本発明の抗体の特異性はペプチド試薬に関して上記した通り試験できる。上記の通り、病原性コンホーメーションを有するプリオンは一般的にプロテアーゼKのような特定のプロテアーゼに対して耐性である。同様のプロテアーゼは非病原性コンホーメーションにあるプリオンも分解することができる。本発明の抗体の特異性を試験する1つの方法は病原性および非病原性のプリオンの両方を含有する生物学的試料を選択することである。試料は2等分の容量に分割できる。本発明の抗体を固体支持体(後述)上に添加吸着させ、そして、固体支持体上の抗体-プリオン結合相互作用の数に直接関連する定量的数値を得るために使用できる。プロテアーゼを第2の試料に添加し、同じ試験を実施する。第2の試料中のプロテアーゼは如何なる非病原性プリオンも分解するため、第2の試料中の如何なる抗体-プリオン結合相互作用も病原性プリオンに帰属させることができる。変法および当該技術分野で知られる他の試験も本発明の抗体の特異性を明らかにするために使用できる。

20

30

【0166】**(V. 試験)**

本発明のペプチド試薬は、試料(例えば生物学的試料、例えば血液、脳、脊髄、CSFまたは器官の試料)をスクリーニングするための種々の試験において、例えばこれらの試料中のコンホーメーション疾患蛋白の病原性形態の有無を検出するために使用できる。多くの現在のプリオン診断試薬とは異なり、本明細書に記載したペプチド試薬は、実質的に何れの型の生物学的または非生物学的な試料、例えば血液試料、血液製剤または生検試料における検出も可能とする。

【0167】

即ち本発明は、病原性プリオン蛋白が存在する場合にそれへの本発明のペプチド試薬の結合を可能にする条件下にペプチド試薬に病原性プリオンを含有することが疑われる試料を接触させること; および、病原性プリオン蛋白が存在する場合にペプチド試薬へのその結合によりその存在を検出すること、を含む、試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法を提供する。

40

【0168】

本発明の方法において使用するために試料は、病原性プリオン蛋白を含有することがわかっている、または、その疑いがある何れかのものであることができる。試料は生物学的試料(即ち生存中、またはかつて生存していた生物から調製した試料)または非生物学的試料であることができる。適当な生物学的試料は器官、全血、血液画分、血液成分、血漿

50

、血小板、血清、脳脊髄液（CSF）、脳組織、神経系組織、筋肉組織、骨髄、尿、涙液、非神経系の組織、器官および/または生検試料もしくは剖検試料を包含するがこれらに限定されない。好ましい生物学的試料は全血、血液画分、血液成分、血漿、血小板および血清を包含する。

【0169】

試料は試料中に病原性プリオン蛋白が存在する場合にそれへの本発明のペプチド試薬の結合を可能にする条件下、ペプチド試薬1つ以上と接触させる。本発明の開示に基づいて特定の条件を決定することは当業者の能力の範囲内である。典型的には、試料およびペプチド試薬を共に適当な概ね中性のpHの緩衝液中（例えばpH7.5のTBS緩衝液中）、適当な温度（例えば約4℃）において、適当な時間（例えば約1時間～一夜）インキュベートすることにより結合を起こさせる。

10

【0170】

試料中の病原性プリオン蛋白の存在はペプチド試薬へのその結合により検出する。本発明のペプチド試薬へのその結合による病原性プリオン蛋白の存在の検出は多くの方法で達成できる。例えば本発明のペプチド試薬は、ペプチド試薬と病原性プリオン蛋白の間の第1の複合体の形成により病原性プリオン蛋白を特異的に「キャプチャー」するために使用でき、この場合の第1の複合体は試料中に存在する病原性プリオン蛋白を含む未結合の試料物質から分離できる。次に本発明のペプチド試薬1つ以上の添加および結合により病原性プリオン蛋白を検出でき、ここでペプチド試薬は予め検出可能に標識されている（即ち標識ペプチド試薬）。病原性プリオン蛋白は、第1の複体内において検出され、或いは、病原性プリオン蛋白は第1の複合体から解離し、その後本発明の標識ペプチド試薬の添加および結合を行うこともできる。

20

【0171】

或いは、本発明のペプチド試薬を用いて上記した病原性プリオン蛋白をキャプチャーし、そして第1の複合体を未結合の試料物質から分離する場合は、検出可能に標識されたプリオン結合試薬を用いて、病原性プリオン蛋白が第1の複体内にある間、または、第1の複合体から病原性プリオン蛋白を解離させた後に、病原性プリオン蛋白を検出することができる。「プリオン結合試薬」とは、何れかのコンホーメーションのプリオン蛋白に結合する試薬であり、典型的には、プリオン結合試薬はプリオン蛋白の変性型に結合する。このような試薬は報告されており、そして例えば抗プリオン抗体（特にPeretz et al. 1997 J. Mol. Biol. 273: 614; Peretz et al. 2001 Nature 412: 739; Williamson et al. 1998 J. Virol. 72: 9413; 米国特許第6,765,088号; 米国特許第6,537,548号に記載）、モチーフグラフト化ハイブリッドポリペプチド（WO03/085086参照）、特定のカチオンまたはアニオン性の重合体（WO03/073106参照）、「増殖触媒」である特定のペプチド（WO02/097444参照）およびプラスミノゲンを包含する。当然ながら、使用される特定のプリオン結合試薬がプリオンの変性形態に結合する場合は、「キャプチャーされた」病原性プリオン蛋白はプリオン結合試薬を用いた検出の前に変性されなければならない。

30

【0172】

別の代替例においては、プリオン結合試薬を用いて試料中に存在する何れかのプリオン（病原性または非病原性）をキャプチャーすることにより第1の複合体を形成し、そして本発明の検出可能に標識されたペプチド試薬1つ以上を用いて第1の複合体中または第1の複合体から解離後の病原性プリオンを検出する。

40

【0173】

更に別の代替においては、試料は固体支持体上に直接（即ちプリオン結合試薬を使用しない）キャプチャーすることができ、そして、病原性プリオン蛋白が存在する場合は、これは本発明の検出可能に標識されたペプチド試薬1つ以上を用いて検出できる。

【0174】

上記したキャプチャーおよび検出の工程は溶液中で実施でき、または、固体支持体の中

50

または上において、または溶液と固相の何れかの組み合わせにおいて実施できる。一部の適当な溶液相のフォーマットは例えば蛍光相関スペクトル分析 (Giese et al. Arch. Virol. Suppl. 2000 16:161; Bieschke et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000 97:5546 8 参照) および蛍光共鳴エネルギー転移を包含する。典型的には、本発明のペプチド試薬はこれらの溶液相のフォーマットにおいて検出可能に標識される。好ましくは、ペプチド試薬は2種以上の識別可能な検出可能標識で標識される。病原性プリオン蛋白の存在は第1の複合体内の検出可能な標識2つ以上が一致することにより検出できる。適当な固相試験フォーマットは本明細書に記載する通りである。一般的に、固相フォーマットについては、キャプチャー試薬 (本発明のペプチド試薬1つ以上またはプリオン結合試薬1つ以上であることができる) を固体支持体に結合させるか、結合に適合させる。キャプチャー試薬は当該技術分野で既知の何れかの手段により固体支持体への結合に適合させることができ、例えば、キャプチャー試薬および固体支持体は各々1数量の結合対を含み、これによりキャプチャー試薬が固体支持体と接触した場合に、キャプチャー試薬は結合対のメンバーの結合を介して固体支持体に結合する。例えばキャプチャー試薬はビオチンを含むことができ、そして、支持体はアビジンまたはストレプトアビジンを含むことができる。ビオチン-アビジンおよびビオチン-ストレプトアビジンのほかに、本実施形態のための他の適当な結合対は例えば抗原-抗体、ハプテン-抗体、ミメトープ-抗体、受容体-ホルモン、受容体-リガンド、アゴニスト-拮抗剤、レクチン-炭水化物、プロテインA-抗体Fcを包含する。このような結合対は周知であり (例えば米国特許第6,551,843号および第6,586,193号参照)、そして適当な結合対を選択してそれらを本発明の使用に適合させることは当業者の能力の範囲内である。キャプチャー試薬を上記した支持体への結合に適合させる場合は、キャプチャー試薬を支持体に結合する前または後に、試料をキャプチャー試薬に接触させることができる。

10

20

30

40

【0175】

即ち本発明は、下記工程：

- (a) 病原性プリオン蛋白が存在する場合にそれへの第1のペプチド試薬の結合を可能にする条件下に第1のペプチド試薬に病原性プリオンを含有することが疑われる試料を接触させて第1の複合体を形成すること；および、
 - (b) 病原性プリオン蛋白が存在する場合に第1のペプチド試薬へのその結合によりその存在を検出すること、
- を含む、試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法を提供する。

ペプチド試薬は本明細書に記載する通りであり、好ましくは、ペプチド試薬は配列番号12~132を有するペプチドから、より好ましくは、配列番号66、67、68、72、81、96、97、98、107、108、119、120、121、122、123、124、125、126、127、129、130、131、132の1つの配列を有するペプチドから；または、配列番号14、35、36、37、40、50、51、77、89、100、101、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118または128を有するペプチドから；または、配列番号56、57、65、82および84を有するペプチドから誘導される。ペプチド試薬はビオチニル化

【0176】

本発明はまた下記工程：

- (a) 病原性プリオンが存在する場合にそれへの第1のペプチド試薬の結合を可能にする条件下に第1のペプチド試薬に病原性プリオンを含有することが疑われる試料を接触させて第1の複合体を形成すること；
- (b) 該第1の複合体中の病原性プリオンへの第2のペプチド試薬の結合を可能にする条件下に第2のペプチド試薬に該第1の複合体を接触させること、ここで該第2のペプチド試薬は検出可能な標識を含むこと；および、

50

(c) 病原性プリオン蛋白が存在する場合に第2のペプチド試薬へのその結合により試料中のその存在を検出すること、
を含む、試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法を提供する。

【0177】

第1のペプチド試薬および第2のペプチド試薬を利用する方法の場合、第1および第2のペプチド試薬は同じかまたは異なっていることができる。「同じ」とは、第1および第2のペプチド試薬が、第2のペプチド試薬に検出可能な標識が含まれている点においてのみ異なることを意味する。

【0178】

第1のペプチド試薬および第2のペプチド試薬はプリオン蛋白の同じ領域に由来するペプチドフラグメントから、または、プリオン蛋白の異なる領域に由来するペプチドフラグメントから誘導することができる。第1のペプチド試薬および第2のペプチド試薬は各々独立して、配列番号12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131または132を有するペプチドから誘導されたペプチド試薬から選択できる。

10

20

【0179】

第1のペプチド試薬および第2のペプチド試薬は各々独立して、配列番号66、67、68、72、81、96、97、98、107、108、119、120、121、122、123、124、125、126、127、14、35、36、37、40、50、51、77、89、100、101、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、128、129、130、131、132、56、57、65、82および84を有するペプチドから誘導されたペプチド試薬から選択できる。

30

【0180】

第1のペプチド試薬は配列番号66、67、68、72、81、96、97、98、107、108、119、120、121、122、123、124、125、126および127を有するペプチドから誘導されるペプチド試薬から選択でき、そして第2のペプチド試薬は、配列番号14、35、36、37、40、50、51、77、89、100、101、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、128、129、130、131および132を有するペプチドから誘導されたペプチド試薬から選択でき、その逆も可である。第1のペプチド試薬は配列番号66、67、68、72、81、96、97、98、107、108、119、120、121、122、123、124、125、126および127を有するペプチドから誘導されるペプチド試薬から選択でき、そして第2のペプチド試薬は、配列番号56、57、65、82および84を有するペプチドから誘導されたペプチド試薬から選択でき、その逆も可である。第1のペプチド試薬は配列番号14、35、36、37、40、50、51、77、89、100、101、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、128、129、130、131および132を有するペプチドから誘導されるペプチド試薬から選択でき、そして第2のペプチド試薬は、配列番号56、57、65、82および84を有するペプチドから誘導されたペプチド試薬から選択でき、その逆も可である。

40

【0181】

50

第 1 のペプチド試薬はビオチニル化でき、そして固体支持体に結合してよい。

【 0 1 8 2 】

本発明はまた、下記工程：

(a) 病原性プリオンが存在する場合にそれへの第 1 のペプチド試薬の結合を可能にする条件下に第 1 のペプチド試薬に病原性プリオンを含有することが疑われる試料を接触させて第 1 の複合体を形成すること；

(b) 未結合の試料物質を除去すること；

(c) 該第 1 の複合体から該病原性プリオンを解離させること；

(d) 病原性プリオンへの第 2 のペプチド試薬の結合を可能にする条件下に第 2 のペプチド試薬に該解離した病原性プリオンを接触させること、ここで該第 2 のペプチド試薬は検出可能な標識を含むこと；および、

(e) 病原性プリオン蛋白が存在する場合に第 2 のペプチド試薬へのその結合により試料中のその存在を検出すること、

を含む、試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法を提供する。第 1 および第 2 のペプチド試薬は同じかまたは異なっていることができる。

10

【 0 1 8 3 】

本発明はまた、下記工程：

(a) 病原性プリオンが存在する場合にそれへの第 1 のペプチド試薬の結合を可能にする条件下に第 1 のペプチド試薬に病原性プリオンを含有することが疑われる試料を接触させて第 1 の複合体を形成すること；

(b) 未結合の試料物質を除去すること；

(c) 該第 1 の複合体から該病原性プリオンを解離させること；

(d) 病原性プリオンへのプリオン結合試薬の結合を可能にする条件下にプリオン結合試薬に該解離した病原性プリオンを接触させること、ここで該プリオン結合試薬は検出可能な標識を含むこと；および、

(e) 病原性プリオン蛋白が存在する場合にプリオン結合試薬へのその結合により試料中のその存在を検出すること、

を含む、試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法を提供する。プリオン結合試薬は抗プリオン抗体、モチーフグラフト化ハイブリッドポリペプチド、カチオン系またはアニオン系の重合体、増殖触媒およびプラスミノゲン、またはプリオン蛋白に結合することがわかっている何れかの他の部分であることができる。

20

30

【 0 1 8 4 】

本発明はまた、下記工程：

(a) 病原性プリオンが存在する場合にそれへのプリオン結合試薬の結合を可能にする条件下にプリオン結合試薬に病原性プリオンを含有することが疑われる試料を接触させて第 1 の複合体を形成すること；

(b) 未結合の試料物質を除去すること；

(c) 病原性プリオンへのペプチド試薬の結合を可能にする条件下にペプチド試薬に該第 1 の複合体を接触させること、ここで該ペプチド試薬は検出可能な標識を含むこと；および、

(d) 病原性プリオン蛋白が存在する場合にペプチド試薬へのその結合により試料中のその存在を検出すること、

を含む、試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法を提供する。

40

【 0 1 8 5 】

本発明はまた、下記工程：

(a) 第 1 のペプチド試薬を含む固体支持体を準備すること；

(b) 病原性プリオンが試料中に存在する場合にそれが第 1 のペプチド試薬に結合できるような条件下に試料に固体支持体を接触させること；

(c) 検出可能に標識された第 2 のペプチド試薬が第 1 のペプチド試薬により結合された病原性プリオンに結合できるようにする条件下に第 2 のペプチド試薬に固体支持体を接触

50

させること；および、

(d) 第1のペプチド試薬、試料由来の病原性プリオンおよび第2のペプチド試薬の間に形成された複合体を検出することにより試料中の病原性プリオンの存在を検出すること、を含む、試料中の病原性プリオンを検出するための方法を提供する。

【0186】

或いは、プリオン結合試薬は固体支持体上で提供できる。即ち本発明は、下記工程：

(a) プリオン結合試薬を含む固体支持体を準備すること；

(b) プリオン蛋白が試料中に存在する場合にそれがプリオン結合試薬に結合できるような条件下に試料に固体支持体を接触させること；

(c) 検出可能に標識された第2のペプチド試薬に固体支持体を接触させること；および

(d) プリオン結合試薬、生物学的試料由来の病原性プリオンおよび第2のペプチド試薬の間に形成された複合体を検出すること、

を含む、試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法を提供する。

【0187】

試験は競合的フォーマットにおいて提供でき；即ち本発明は、下記工程：

(a) 第1のペプチド試薬を含む固体支持体を準備すること；

(b) 検出可能に標識された第1のリガンドに固体支持体を組み合わせること、ここで検出可能に標識された第1のリガンドへの第1のペプチド試薬の結合親和性は病原性プリオンへの第1のペプチド試薬の結合親和性より弱いこと；

(c) 病原性プリオンが試料中に存在する場合にこれを第1のペプチド試薬に結合させて第1のリガンドを置き換えることができるような条件下に固体支持体に試料を組み合わせること；

(d) 第1のペプチド試薬および試料由来の病原性プリオンの間に形成された複合体を検出すること、

を含む、試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法を提供する。

【0188】

一般的に、本明細書に記載したペプチド試薬は試料中のプリオン蛋白に結合するため（例えばキャプチャー試薬として）、および/またはプリオン蛋白の存在を検出するため（検出試薬として）使用される。キャプチャー試薬および検出試薬は個別の分子であってよく、または、一方の分子がキャプチャーおよび検出機能の両方の作用を有してよい。特定の実施形態においてはキャプチャーおよび/または検出試薬は病原性プリオンと優先的に相互作用する（即ち病原性プリオン蛋白特異的である）本明細書に記載したペプチド試薬である。別の実施形態においては、キャプチャー試薬は病原性プリオンに特異的であり、そして検出試薬は病原性および非病原性の形態の両方に結合し、例えばプリオン蛋白に結合する抗体である。このようなプリオン結合試薬は上記したものである。或いは、別の実施形態においては、キャプチャー試薬は病原性プリオンに特異的でなく、そして検出試薬は病原性プリオンに特異的である。

【0189】

次に検出のための何れかの適当な手段を用いて本明細書に記載したペプチド試薬とプリオン蛋白の間の結合を識別する。例えば本明細書に記載した試験では、標識されたペプチド試薬または抗体を使用する。本発明において使用するのに適する検出可能な標識は、検出が可能な何れかの分子、例えば放射性同位体、蛍光物質、化学発光物質、発色団、蛍光半導体ナノ結晶、酵素、酵素基質、酵素コファクター、酵素阻害剤、発色団、染料、金属イオン、金属ゾル、リガンド（例えばビオチン、ストレプトアビジンまたはハプテン）等を包含するがこれらに限定されない。別の標識は、例えば検出可能な範囲の蛍光を示すことができる物質またはその部分を包含する、蛍光を使用するものであるがこれらに限定されない。本発明で使用してよい標識の特定の例は、セイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）、フルオレセイン、FITC、ローダミン、ダンシル、ウンベリフェロン、ジメチルアクリジニウムエステル（DMAE）、テキサスレッド、ルミノール、NADPHおよ

10

20

30

40

50

び - ガラクトシダーゼを包含するがこれらに限定されない。更に、検出可能な標識はオリゴヌクレオチドタグを包含してよく、そのタグはPCR、TMA、b-DNA、NASBA等を含む核酸検出のための何れかの知られた方法により検出できるものである。

【0190】

標識された試薬（上記）の使用のほかに、免疫沈降を用いてプリオン蛋白（例えば病原性プリオン）に結合したペプチド試薬を分離してよい。好ましくは、免疫沈降は沈降増強剤の添加により促進される。沈降増強剤は、病原性プリオンに結合しているペプチド試薬の沈降を増強または増大させることができる部分を含む。このような沈降増強剤はポリエチレングリコール（PEG）、プロテインG、プロテインA等を包含する。沈降増強剤としてプロテインGまたはプロテインAを使用する場合は、蛋白は場合によりビーズ、好ましくは磁気ビーズに結合することができる。沈降は遠心分離の使用によるか、または磁力の使用により更に増強できる。そのような沈降増強剤の使用は当業者の知る通りである。

10

【0191】

検出試薬からのシグナルを増幅させる試験も知られている。その例はビオチンおよびアビジンを利用する試験、および酵素標識および媒介のイムノアッセイ、例えばELISAである。

【0192】

本明細書に記載した試験の工程の1つ以上は溶液中（例えば液体媒体）または固体支持体上で実施してよい。固体支持体は、本発明の目的のためには不溶性のマトリックスであり、合成または半合成の表面を有し、その上に目的の分子（例えば本発明のペプチド試薬、プリオン蛋白、抗体等）を連結または結合できるような何れかの物質である。例示される固体支持体は、基板、例えばニトロセルロース、ポリ塩化ビニル；ポリプロピレン、ポリスチレン、ラテックス、ポリカーボネート、ナイロン、デキストラン、キチン、砂、シリカ、軽石、アガロース、セルロース、ガラス、金属、ポリアクリルアミド、シリコン、ゴム、多糖類、ポリフッ化ビニル；ジアゾ化紙；活性化ビーズ、磁気応答性ビーズ、および、固相合成、アフィニティー分離、精製、ハイブリダイゼーション反応、イムノアッセイおよび他のこのような用途のために一般的に使用される何れかの物質であることができる。支持体は、粒子状であることができ、または、連続表面の形態であることもでき、そして、メンブレン、メッシュ、プレート、ペレット、スライド、ディスク、キャピラリー、中空糸、針状物、ピン、チップ、固体繊維、ゲル（例えばシリカゲル）およびビーズ、（例えば多孔性ガラスビーズ、シリカゲル、場合によりジビニルベンゼンと交差結合したポリスチレンビーズ、グラフト化共重合ビーズ、ポリアクリルアミドビーズ、ラテックスビーズ、場合によりN, N'-ビス-アクリロイルエチレンジアミンと交差結合したジメチルアクリルアミドビーズ、酸化鉄磁気ビーズおよび疎水性重合体でコーティングしたガラス粒子を包含する。

20

30

【0193】

本明細書に記載したペプチド試薬は標準的方法を用いて固体支持体に容易にカップリングできる。支持体への固定化は蛋白へのペプチド試薬の第1のカップリングにより増強してよい（例えば蛋白がより良好な固体支持体結合特性を有する場合）。適当なカップリング蛋白は、例えば巨大分子、例えばアルブミン、例えばウシ血清アルブミン（BSA）、キーホールリンペットヘモシアニン、免疫グロブリン分子、タイログロブリン、オプアルブミンおよび当業者に周知の他の蛋白を包含するがこれらに限定されない。支持体への分子の結合のために使用できる他の試薬は多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合体アミノ酸、アミノ酸共重合体等を包含する。このような分子およびこのような分子を蛋白にカップリングする方法は当業者に周知である。例えばBrinkley, M. A., (1992) Bioconjugate Chem. 3: 2-13; Hashida et al., (1984) J. Appl. Biochem., 6: 56-63; およびAnjaneyulu and Staros (1987) International J. of Peptide and Protein Res. 30: 117-124を参照。

40

50

【0194】

所望により、固体支持体に付加すべき分子を容易に官能性付与してスチレンまたはアクリレートの部分を形成することができ、これにより分子のポリスチレン、ポリアクリレートまたは他の重合体、例えばポリイミド、ポリアクリルアミド、ポリエチレン、ポリビニル、ポリジアセチレン、ポリフェニレン-ビニレン、ポリペプチド、多糖類、ポリスルホン、ポリピロール、ポリイミダゾール、ポリチオフエン、ポリエーテル、エポキシ、シリカガラス、シリカゲル、シロキサン、ポリホスフェート、ヒドロゲル、アガロース、セルロース等への取り込みが可能となる。

【0195】

ペプチド試薬は分子の結合対の相互作用を介して固体支持体に結合できる。このような結合対はよく知られており、その例は明細書に記載する通りである。結合対の一方のメンバーを上記した手法により固体支持体にカップリングさせ、そして結合対の他方のメンバーをペプチド試薬に結合する（合成前、合成中、合成後）。このようにして修飾されたペプチド試薬は試料に接触でき、そして病原性プリオンが存在すればそれとの相互作用が溶液中で起こり、その後、固体支持体をペプチド試薬（またはペプチド-プリオン複合体）に接触させる。この実施形態のための好ましい結合対はビオチンとアビジン、およびビオチンとストレプトアビジンを包含する。

10

【0196】

適当な対照もまた本発明の試験において使用できる。例えばPrP^Cの陰性対照を試験に使用できる。PrP^{S^C}（またはPrPres）の陽性対照もまた試験で使用できる。このような対照は場合により検出可能に標識できる。

20

【0197】

本発明のペプチド試薬を使用したいいくつかの変法および組み合わせを本発明の試験に適用してよい。以下の非限定的な例を説明のために示す。

【0198】

特定の実施形態においては、試験は生物学的試料中の病原性プリオンの検出に関して説明される。このような方法において、本発明のペプチド試薬は生物学的または非生物学的な試料中の病原性プリオンに対するキャプチャー試薬として使用できる。このような実施形態において、固体支持体（例えば磁気ビーズ）はまず、病原性プリオンと優先的に相互作用する本明細書に記載したペプチド試薬が支持体に十分固定化されるように、ペプチド試薬と反応させる。次に固体支持体をペプチド試薬が病原性プリオンに結合できるような条件下、病原性プリオンを含有することが疑われる試料と接触させる。未結合の試料物質を除去した後、結合した病原性プリオンをペプチド試薬から解離させ、そして、例えば実施例およびその引用文献に記載する通り、ウエスタンブロットやELISAを含む何れかの知られた検出機序を用いて検出する。或いは、結合した病原性プリオンはペプチド試薬から解離することなく検出できる。

30

【0199】

或いは、本発明のペプチド試薬は固体支持体への結合よりも前に病原性プリオンを含有することが疑われる試料と接触させてよく、その後、固体支持体へのペプチド試薬の結合を行う（例えばペプチド試薬をビオチニル化し、そして固体支持体がアビジンまたはストレプトアビジンを含む）。未結合の試料物質を除去した後、病原性プリオンをペプチド試薬から解離させ、そして、例えば実施例およびその引用文献に記載する通り、ウエスタンブロットやELISAを含むがこれらに限定されない何れかの知られた検出機序を用いて検出する。或いは、結合した病原性プリオンはペプチド試薬から解離することなく検出できる。或いは病原性プリオンは検出前にペプチド試薬から解離させる必要はない。

40

【0200】

試料中の病原性プリオンの検出は病原性形態と優先的に相互作用する本明細書に記載したペプチド試薬を用いて行ってよい。或いは、病原性プリオンは非特異的検出試薬（例えば一般的にPrPに結合するペプチドまたは抗体）により検出してよい。特定の実施形態においては、固体支持体からの解離の後、キャプチャーされた病原性プリオンを変性した

50

後に検出することにより、非特異的検出試薬の使用が可能となることにより検出が容易になる場合がある。或いは、キャプチャーされた病原性プリオンは、例えば、ペプチド試薬と病原性プリオンを共有結合させるために使用できる活性化可能な反応性の基（例えば光反応性の基）を含有するようにペプチド試薬を修飾する場合は、ペプチド試薬から解離させることなく変性できる。

【0201】

Ryou et al. (2003) Lab Invest. 83(6): 837-43に記載のELISAのようなプロトコルを実施することにより固体支持体から溶離した病原性プリオンの量を定量することができる（実施例参照）。概すれば、マイクロプレートのウェルを固体支持体から解離（溶出）されているキャプチャーされた病原性プリオンでコーティングする。プレートを洗浄して未結合の物質を除去し、抗プリオン抗体または本発明のペプチド（キャプチャー用と同様か異なるもの）のような検出可能に標識された結合分子を添加する。この結合分子はキャプチャーされた試料プリオンと反応することができ、プレートを洗浄し、標識された抗体および/または標識されたペプチド試薬の存在を当該技術分野で周知の方法を用いて検出する。結合分子は病原性プリオン形態に特異的である必要はないが、キャプチャー試薬が病原性プリオン形態に特異的である限り両方のアイソフォームまたは変性されたPrPに結合できる。

10

【0202】

別の例示される試験においては、キャプチャー試薬およびプリオンは検出前に解離させない。例えば固体支持体（例えばマイクロプレートのウェル）をまず病原性プリオン特異的分子（ペプチド試薬）に連結する。次に病原性プリオンを含有するか、含有することが疑われる生物学的試料を固体支持体に添加する。第1の分子に全ての病原性プリオンが結合するのに十分なインキュベーション時間の後、固体支持体を洗浄して未結合の分子を除去し、そして第2の抗PrP抗体またはプリオン特異的ペプチド試薬のような上記した検出可能に標識された二次結合分子を添加する。或いは、病原性および非病原性形態に結合する分子（例えば非特異的キャプチャー試薬）を固体支持体にカップリング（例えばマイクロプレートのウェル上にコーティング）し、病原性プリオン特異的検出試薬（例えば本明細書に記載したペプチド試薬）を用いて検出を行うことができる。

20

【0203】

別の例示される試験は「2ペプチドサンドイッチ」試験であり、プリオン（例えば病原性プリオン）を検出するために使用できる。この手法においては、固体支持体を本明細書に記載した本発明の第1のペプチド試薬1つ以上に反応させ、洗浄して未反応の第1のペプチド試薬を除去し、次に第1のペプチド試薬と試料中に存在する何れかの病原性プリオン蛋白との間の相互作用を可能にする条件下に病原性プリオン蛋白を含有することが疑われる被験試料（例えば生物学的試料）に曝露する。未反応の試料成分を除去し、本発明の第2のペプチド試薬の相互作用を可能にする条件下に第2のペプチド試薬1つ以上を添加することにより存在する何れかの病原性プリオン蛋白と相互作用させる。第1のペプチドプリオン蛋白 - 第2のペプチドの間の相互作用は当該技術分野で知られた何れかの手段で検出できる。典型的には第2のペプチド試薬は検出可能な標識を含む。この試験のためには、第1のペプチド試薬および/または第2のペプチド試薬は病原性プリオン蛋白と優先的に相互作用する。

30

40

【0204】

特定の実施形態においては、抗PrP抗体を用いてプリオン蛋白を検出する。プリオン蛋白、特にPrP^C、または他の変性PrPに結合する抗体、修飾抗体および他の試薬は文献に記載されており、その一部は市販されている（例えばPeretz et al., 1997 J. Mol. Biol. 273: 614; Peretz et al., 2001 Nature 412: 739; Williamson et al., 1998 J. Virol. 72: 9413; 米国特許第6,765,088号に記載されている抗プリオン抗体を参照されたい。これらの一部または他のものは特にInPro Biot echnology, South San Francisco, CA, Caym

50

an Chemicals, Ann Arbor MI; Prionics AG, Zurichより購入でき; また修飾抗体の説明についてはWO 03/085086を参照のこと)。

【0205】

本発明のペプチド試薬はまた競合試験において使用してよい。PrP^{Sc}に弱く結合するリガンドがPrP^{Sc}に特異的な本明細書に記載したペプチド試薬により置き換えられる場合の検出手段を使用して識別できる。例えば、PrP^{Sc}を含有することが疑われる試料を固体支持体上に吸着させる。その後、固体支持体を検出可能に標識されたりリガンド(例えばプラスミノゲン、ラミニン受容体およびヘパンスルフェート)がPrP^{Sc}に結合するような条件下、PrP^{Sc}に結合する検出可能に標識されたりリガンドと組み合わせる。リガンド-PrP^{Sc}複合体を検出する。次に本明細書に記載したPrP^{Sc}結合ペプチド試薬を添加する。検出可能に標識されたりリガンドの結合親和性は病原性プリオンに対するペプチド試薬の結合親和性より弱い。従って、PrP^{Sc}結合ペプチド試薬は標識されたりリガンドを置き換え、そして標識されたりリガンドの検出量の減少はペプチド試薬と生物学的試料に由来する病原性プリオンの間に複合体が形成されたことを示し、検出できる。

10

【0206】

上記した試験の試薬、例えば本明細書に記載したペプチド試薬は上記した検出試験を実施するための適当な説明書および他の必要な試薬とともにキットとして提供できる。ペプチド試薬を固体支持体上に吸着させる場合、キットは更に、または代替として、固体支持体1つ以上の上に吸着されたペプチド試薬を含む。キットは更に、上記した通り適当な陽性および陰性の対照を含んでよい。キットはまた使用する特定の検出試験に応じて、適当な標識および他のパッケージされた試薬および材料(即ち洗浄緩衝液等)を含有できる。

20

【0207】

更に別の実施形態において、本発明は病原性プリオン特異的ペプチド試薬を含む固体支持体に関する。例えば(a)固体支持体を準備すること; および(b)それに病原性プリオン特異的ペプチド試薬1つ以上を結合させることにより、これらの固体支持体を製造する方法も提供される。

【0208】

プリオン特異的ペプチド試薬は更にアフィニティー支持体を用いて病原性プリオン蛋白を単離するために使用してよい。ペプチド試薬は、ペプチド試薬がプリオン選択的結合活性を保持できるように、例えば吸着、共有結合等により固体支持体に固定することができる。場合により、例えばペプチド試薬の結合部位が使用可能なまま維持されるようにスペーサー基を含めてもよい。次に固定化された分子を用いて血液、血漿、脳、脊髄、他の組織のような生物学的試料に由来する病原性プリオン蛋白を結合する。結合したペプチド試薬または複合体は、例えばpHの変化により支持体から回収されるか、または、病原性プリオンは複合体から解離させてよい。

30

【0209】

本発明に従って試験できる試料は、抗体試験に適合した何れかの試料、例えば生存中または死亡した対照に由来する神経系組織(例えば脳、脊髄、CSF等)、血液および/または他の組織に由来する試料を包含する。上記した通り、好ましい実施形態においては、試料は生存中の被験体より得た血液、血液製剤または組織試料である。

40

【0210】

(VI. 別の用途)

(A. 検出)

上記した通り、本明細書に記載したペプチド試薬は被験体中のプリオン疾患を診断するために使用できる。更に、上記したペプチド試薬を用いて血液および/または食料補給物中の病原性プリオン汚染を検出できる。即ち、本明細書に記載した検出試験のいずれかを用いながら個体の採取試料由来の少量、またはプールされた試料をスクリーニングすることにより病原性プリオンを実質的に伴わない血液製品を調製できる。病原性プリオンで汚

50

染された試料またはプールされた試料はそれらを添加する前に排除できる。このようにして病原性プリオン汚染を実質的に伴わない血液製品を提供できる。「病原性プリオンを実質的に伴わない」とは、病原性プリオンの存在が本明細書に記載した試験の何れを用いても検出されないことを意味する。重要な点は、正常組織によって 10^6 倍希釈されている脳組織における病原性蛋白形態を検出することが既にわかっている本明細書に記載したペプチド試薬は、血液中の病原性プリオンを検出できると考えられる唯一の明確化されている試薬である点である。

【0211】

即ち本発明は、病原性プリオンを実質的に伴わない血液製品を調製するための方法であって、該血液製品は全血、赤血球、血清、血小板または血清を含み、該方法は下記工程：
(a) 病原性プリオンを検出するための本明細書において提供された検出方法の何れかにより、収集された血液試料から全血、赤血球、血漿、血小板または血清のアリコートをしクリーニングすること；
(b) 病原性プリオン蛋白が検出された試料を排除すること；および、
(c) 病原性プリオンが検出されない試料を合わせることにより病原性プリオンを実質的に伴わない血液製品を提供すること、
を含む上記方法を提供する。

10

【0212】

同様に食糧は病原性プリオンを実質的に伴わない食糧を提供するために病原性プリオンの存在についてクリーニングすることができる。即ち本明細書に記載した方法の何れかを用いて、ヒトまたは動物の消費のための食品を意図した生物由来の試料に病原性プリオンが存在しないかどうかクリーニングすることができる。食糧内への進入を意図する食料品から得た試料もクリーニングできる。病原性プリオンが検出された試料を発見し、そして病原性プリオンが検出された試料の由来元である食糧に投入されることを意図する生物または食品を食糧から排除する。このようにして、病原性プリオンを実質的に伴わない食糧が提供される。

20

【0213】

即ち本発明は、病原性プリオンを実質的に伴わない食糧の調製方法であって、該方法が下記工程：
(a) 病原性プリオンを検出するための本明細書において提供された検出方法のいずれかにより食糧に投入されることになる生物から収集した試料、または、食糧に投入されることを意図する食品から収集した試料をクリーニングすること；
(b) 病原性プリオンが検出された試料を排除すること；および、
(c) 病原性プリオンが検出されない試料を合わせることにより病原性プリオンを実質的に伴わない食糧を提供すること、
を含む上記方法を提供する。

30

【0214】

(B. 精製)

本発明のペプチドはまた病原性プリオンを単離する目的で（例えば検出の前にプリオン蛋白を濃縮するため）、および、試料から病原性プリオンを排除する目的（例えば病原性プリオンを実質的に伴わない試料を提供する手段として）の両方のために、試料から病原性プリオンを除去するために使用できる。これらの方法において、ペプチド試薬は典型的には固体支持体上に提供される。ペプチド試薬を含む固体支持体を、病原性プリオンを含有する試料に、ペプチド試薬にプリオンが結合する条件下に接触させる。目的が病原性プリオンを単離することである場合は、未結合の試料を除去し、プリオンを含有する固体支持体を収集し、目的が試料からプリオンを排除することであれば、未結合の試料を収集する。

40

【0215】

即ち本発明は、下記工程：

50

- (a) 本発明によるペプチド試薬を含む固体支持体を準備すること；
 - (b) 病原性プリオン蛋白が試料中に存在する場合に、その第 1 のペプチド試薬への結合を可能にする条件下に該固体支持体に該試料を接触させることにより、第 1 の複合体を形成すること；および、
 - (c) 未結合の試料物質を除去すること、
- を含む試料から病原性プリオン蛋白を単離するための方法を提供する。

【 0 2 1 6 】

更に別の実施形態においては、該病原性プリオン蛋白は該第 1 の複合体から解離させてよい。この解離は蛋白精製分野で周知の手法により行うことができる。

【 0 2 1 7 】

本発明は、下記工程：

- (a) 本発明のペプチド試薬を含む固体支持体を準備すること；
 - (b) 病原性プリオン蛋白が存在する場合に、そのペプチド試薬への結合を可能にする条件下に病原性プリオン蛋白を含有することが疑われる試料に固体支持体を接触させること；および、
 - (c) 未結合の試料物質を除去すること、
- を含む試料から病原性プリオン蛋白を排除するための方法を提供する。

【 0 2 1 8 】

(C . 組成物)

本発明は更に本明細書に記載したペプチド試薬および / または抗体 (およびこれらのペプチド試薬および / または抗体をコードするポリヌクレオチド) を含む組成物、および、プリオン関連疾患の治療または防止のための治療用および予防用の組成物におけるこれらの組成物の使用方法に関する。更にまた、抗体、ペプチド試薬 (およびこれらの抗体および / またはペプチド試薬をコードするポリヌクレオチド) はまた予防的 (即ち発症防止) または治療的 (感染後の疾患の治療) な目的のために、単独または組み合わせにおいて、組成物中で使用できる。

【 0 2 1 9 】

本明細書に記載した組成物が疾患を治療または防止するために機能する厳密な機序は重要ではない。ある理論に拘泥するものではないが、本明細書に記載した組成物は以下の機序、即ち、被験体における免疫応答の誘導とそれによるその後の疾患状態の治療または防止；非病原性形態への変換を防止する非病原性形態との相互作用 (例えば結合) ；病原性帰結を防止する病原性形態への結合；および / または病原性形態が別の非病原性形態を疾患形態へ変換しないようにする病原性形態への結合、の 1 つ以上によりコンホーメーション疾患を治療または防止する作用を有すると考えられる。(例えばプリオンの増殖を特定の F a b が抑制する能力を試験した P e r e t z e t a l . (2 0 0 1) N a t u r e 4 1 2 : 7 3 9 - 7 4 3 を参照) 。

【 0 2 2 0 】

組成物はペプチド試薬、抗体および / またはポリヌクレオチドの 1 つ以上の混合物を含むことができる。これらの分子は種々の原料、例えば組み換えにより生産された蛋白、合成により生産された蛋白から得てよい。組成物はまた他の分子、例えば抗原および免疫調節剤、例えば免疫グロブリン、サイトカイン、リンホカインおよびケモカイン、例えば I L - 2、修飾 I L - 2 (c y s 1 2 5 - s e r 1 2 5)、G M - C S F、I L - 1 2、アルファまたはガンマイインターフェロン、I P - 1 0、M I P 1 および R A N T E S と組み合わせて投与してよい。組成物はポリペプチドとして投与するか、または、裸の核酸 (例えば D N A) としてウィルスベクター (例えばレトロウィルスベクター、アデノウィルスベクター、アデン関連ウィルスベクター、アルファウィルスベクター) または非ウィルスベクター (例えばリポソーム、核酸または蛋白をコーティングした粒子) を用いて投与してよい。

【 0 2 2 1 】

組成物はまた、ペプチド試薬と核酸の混合物を含んでよく、これを同じかまたは異なっ

10

20

30

40

50

た用法および/またはベヒクルを用いて送達してよい。同じかまたは異なる組成物は所望の作用を達成するために1回より多く投与(例えば「プライミング」投与後に1回以上の「ブースト」投与を行う)してよい。同じ組成物をプライミングおよび1回以上のブーストとして投与できる。或いは、異なる組成物を用いてプライミングとブーストを行うことができる。

【0222】

本発明の組成物は好ましくは製薬上許容しうる、そして、薬理的に許容しうるものである。特に、組成物は、好ましくは生物学的またはその他の面において望ましくないものであってはならず、即ち、材料は、何れかの望ましくない生物学的作用を起こすか、または、成分が含まれる組成物の何れかの成分と有害な様式において相互作用を起こすことなく、製剤または組成物中において個体に投与される。

10

【0223】

本明細書に記載した組成物は典型的には分子(ペプチド試薬)またはこれをコードするヌクレオチド配列、これらの分子を指向した抗体、および必要に応じて上記した成分の何れか他のものの治療有効量を含む。「治療有効量」とは、投与被験体となる未感染、感染または非曝露の被験体において保護的および/または治療的な応答を誘導する量を意味する。「治療有効量」は日常的治験を介して決定できる比較的広範囲に属する。必要な厳密な量は治療被験体;治療すべき個体の年齢および全身状態;抗体を合成する個体の免疫系の能力;所望の保護の程度;治療すべき状態の重症度;選択される特定の組成物およびその投与様式等の要因に応じて変動する。

20

【0224】

特定の実施形態において、ペプチド試薬は免疫原性であり、本発明の方法は動物に本明細書に記載したペプチド試薬、病原性プリオンに特異的な抗体、および/または、これらのペプチド試薬または抗体をコードするポリヌクレオチドを含む免疫原性の組成物を投与することを含む。本発明において使用される免疫原性の組成物は好ましくはこれらの成分の免疫学的有効量を含む。「免疫学的有効量」とは、プリオン蛋白、好ましくは病原性プリオンへの免疫応答を哺乳動物が起こすことができるようになるのに十分な量である。免疫応答は一般的に被験体において、分泌、細胞および/または抗体媒介性の免疫応答を発生させる。通常はこのような応答は、例えば以下の作用、即ち、免疫学的クラスの内いずれかの抗体、例えば免疫グロブリンA、D、E、GまたはMの生産;BおよびTリンパ球の増殖;免疫学的細胞に対し活性化、生育および分化のシグナルを与えること;ヘルパーT細胞、サプレッサーT細胞および/または細胞毒性T細胞の発現、の1つ以上を包含するがこれらに限定されない。生産された抗体の量は使用する動物、アジュバントの存在等を含む数種の因子により異なる。

30

【0225】

本発明の組成物は更にアジュバント1つ以上を含んでよい。本発明において使用するのに適するアジュバントは以下に列挙するものの1つ以上を包含する。

- E . c o l i 熱不安定性テントロトキシン(LT)またはその脱毒性突然変異体、例えばK63またはR72突然変異体;
- コレラ毒素(CT)またはその脱毒性突然変異対;
- 生体分解性および非毒性の物質(例えばポリ(- ヒドロキシ酸)、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリ無水物、ポリカプロラクトン等)から形成された微粒子(即ち直径約100nmから約150μm、より好ましくは直径約200nmから約30μm、最も好ましくは直径約500nmから約10μm);
- ポリオキシエチレンエーテルまたはポリオキシエチレンエステル(国際特許出願WO99/52549号参照);
- ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤とオクトキシノールの組み合わせ(国際特許出願WO01/21207号参照)またはポリオキシエチレンアルキルのエーテルまたはエステルの界面活性剤と少なくとも1つの別の非イオン系界面活性剤、例えばオクトキシノールの組み合わせ(国際特許出願WO01/21152号参照);

40

50

- キトサン（例えば国際特許出願WO99/27960号参照）；
- 免疫刺激性オリゴヌクレオチド（例えばCpGオリゴヌクレオチド）およびサポニン（国際特許出願WO00/62800号参照）；
- 免疫刺激性2本鎖RNA；
- アルミニウム化合物（例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、ヒドロキシリン酸アルミニウム、オキシ水酸化物、オルトリン酸塩、硫酸塩等（例えばVaccine design: the subunit and adjuvant approach, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X参照)（以降Vaccine design）または種々のアルミニウム化合物と何れかの適当な形態（例えばゲル、結晶性、不定形等）の化合物との混合物、吸着が好ましいもの；
- MF59（5%スクアレン、0.5%Tween 80および0.5%Span 85、マイクロ流動装置を用いてサブミクロン粒子に製剤）（Vaccine designのChapter 10参照；また国際特許出願WO90/14837号参照）；
- リポソーム（Vaccine designのChapter 13および14参照）；
- ISCOM（Vaccine designのChapter 23参照）；
- SAF、10%スクアレン、0.4%Tween 80、5%ブルロニックブロック重合体L121およびthr-MDPを含有、マイクロ流動装置を用いてサブミクロン乳液とするか、回転混合して大粒径の乳液としたもの（Vaccine designのChapter 12参照）；
- Ribivax（商標）アジュバント系（RAS）、（Ribivax Immunochem）、2%スクアレン、0.2%Tween 80およびモノホスホリル脂質A（MPL）、トレハロースジミコレート（TDM）および細胞壁骨格（CWS）からなる群より選択される細菌細胞壁成分1つ以上、好ましくはMPL+CWSを含有（Detox（商標））；
- サポニンアジュバント、例えばQuilAまたはQS21（Vaccine designのChapter 22参照）、別称Stimulon（商標）；
- ISCOM、別の界面活性剤を含まないもの（国際特許出願WO00/07621号）；
- 完全フロイントアジュバント（CFA）および不完全フロイントアジュバント（IFA）；
- サイトカイン、例えばインターロイキン（例えばIL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12等）、インターフェロン（例えばインターフェロン- γ ）、マクロファージコロニー刺激因子、腫瘍壊死因子等（Vaccine designのChapter 27&28参照）；
- モノホスホリル脂質A（MPL）または3-O-脱アセチル化MPL（3dMPL）（例えばVaccine designのChapter 21参照）；
- 3dMPLと、例えばQS21および/または水中油エマルジョンの組み合わせ（欧州特許出願0835318、0735898および0761231）；
- CpGモチーフを含むオリゴヌクレオチド（Krieg（2000）Vaccine, 19: 618-622；Krieg（2001）Curr. Opin. Mol. Ther., 2001, 3: 15-24；WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919およびWO98/52581等参照）即ち少なくとも1つのCGジヌクレオチドを含有；
- ポリオキシエチレンエーテルまたはポリオキシエチレンエステル（国際特許出願第WO99/52549号）；
- ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤とオクトキシノールの組み合わせ（国際特許出願WO01/21207）またはポリオキシエチレンアルキルのエーテルまたはエステルの界面活性剤と少なくとも1つの別の非イオン系界面活性剤、例えばオクトキシノールの組み合わせ（国際特許出願第WO01/21152号）；
- 免疫刺激性オリゴヌクレオチド（例えばCpGオリゴヌクレオチド）およびサポニン（

10

20

30

40

50

国際特許出願第WO00/62800号) ;

- 免疫刺激剤および金属塩粒子 (国際特許出願第WO00/23105号) ;
- サポニンおよび水中油エマルジョン (国際特許出願第WO99/11241号) ; および、
- サポニン (例えばQS21) + 3dMPL + IL-12 (場合により + ステロール) (国際特許出願第WO98/57659号)。

【0226】

ムラミルペプチドは例えばN-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン(thr-MDP)、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(nor-MDP)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)エチルアミン(MTP-PE)等を包含するがこれらに限定されない。

10

【0227】

粘膜または非経腸投与に適する別のアジュバントもまた入手できる (例えばVaccine design: the subunit and adjuvant approach, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995 (ISBN0-306-44867-X)のChapter7参照)。

【0228】

LTの突然変異体、特に「K63」および「R72」突然変異体が、増強された免疫応答をもたらすことから好ましいアジュバント (例えば粘膜アジュバント) である (例えば国際特許出願第WO98/18928号参照)。

20

【0229】

微粒子もまた有用であり、そして好ましくはポリ(-ヒドロキシ酸)から、特にポリ(ラクチド)(PLA)、D,L-ラクチドおよびグリコリドまたはグリコール酸の共重合体、例えばポリ(D,L-ラクチド-コ-グリコリド)(PLGまたはPLGA)またはD,L-ラクチドおよびカプロラク톤の共重合体から誘導される。微粒子は種々の分子量、そしてPLGのような共重合体の場合は種々のラクチド:グリコリド比を有する種々の重合体原料の何れかから誘導してよく、その選択は所望に応じて行う。本発明のプリオン、抗体および/またはポリヌクレオチドは微粒子内部に捕獲するか、それに吸着させてよい。PLG微粒子内の捕獲が好ましい。PLG微粒子はMorris et al., (1994), Vaccine, 12:5-11, Mucosal Vaccine, eds. Kiyono et al., Academic Press 1996 (ISBN012410587)のChapter 13)およびVaccine design: the subunit and adjuvant approach, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995 (ISBN0-306-44867-X)のChapter 16 & 18に更に詳述されている。

30

【0230】

LT突然変異体は微粒子捕獲抗原と組み合わせて好都合に使用してよく、これにより顕著に増強された免疫応答が得られる。

40

【0231】

アルミニウム化合物およびMF59は非経腸用の好ましいアジュバントである。

【0232】

典型的には、組成物は液体の溶液または懸濁液の何れかの注射用製剤として調製され、注射前に液体ベヒクル中の溶液または懸濁液とするのに適する固体形態も調製してよい。調整物は上記した通り増強されたアジュバント作用のためにリボソーム内に乳化またはカプセル化してもよい。

【0233】

製薬上許容しうる塩、例えば無機塩、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩または硫酸塩、並びに有機酸の塩、例えば酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩または安息香酸塩

50

もまた本発明の組成物中に使用できる。特に有用な蛋白基剤は血清アルブミン、キーホルリンペットヘモシアニン、免疫グロブリン分子、タイログロブリン、オプアルブミン、破傷風トキソイドおよび当業者に周知の他の蛋白である。

【0234】

本発明の組成物はまた液体または賦形剤、例えば水、食塩水、グリセロール、デキストロース、エタノール等を、単独または組み合わせにおいて、並びに水和剤、乳化剤またはpH緩衝剤のような物質も含有できる。組成物を投与される個体に対して有害な抗体の生産を自身は誘導しない分子である担体も場合により存在する。適当な担体は典型的には大型の緩徐に代謝される巨大分子、例えば蛋白、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合体アミノ酸、アミノ酸共重合体、脂質凝集物（例えば油滴またはリポソーム）および不活性のウィルス粒子である。このような担体は当該技術分野で周知である。更にまた組成物中のポリペプチド1つ以上は細菌トキソイド、例えばジフテリア、破傷風、コレラ等に由来するトキソイドとコンジュゲートしてよい。

10

【0235】

(D. 送達)

本発明の組成物は単回用量または投与用法の一部として投与してよい。核酸および/またはペプチドは何れかの適当な用法、例えば筋肉内、粘膜内、皮下、皮内、経皮、腔内、直腸内、経口および/または静脈内等を含むがこれらに限定されない用法により投与してよい。用量用法はプライミングおよびブーストの用量を包含してよく、これは粘膜、非経腸またはこれらの種々の組み合わせにより投与してよい。

20

【0236】

特定の実施形態においては、組成物の成分1つ以上を非経腸または粘膜投与する。非経腸投与の適当な経路は、筋肉内(IM)、皮下、静脈内、腹腔内、皮内、経皮および経皮投与（例えば国際特許出願第WO98/20734号参照）経路、並びに組織の間質内への送達を包含する。粘膜投与の適当な経路は経口、鼻内、胃内、肺内、腸内、直腸内、眼内および腔内投与を包含する。組成物は粘膜投与に適合させてよい。例えば組成物を経口投与する場合は、これは場合により腸溶性コーティングされた錠剤またはカプセル、液体、トランスジェニック植物の形態であってよい。組成物を鼻内投与する場合は、それは鼻用スプレー、点鼻液、ゲルまたは粉末の形態であってよい。投薬は単回投与日程または多数回投与日程としてよい。

30

【0237】

組成物（またはその成分）はまた、粒状の担体を用いてカプセル化、吸着または会合させてよい。このような担体は免疫系に対して選択された抗原の複数のコピーを提示し、そして局所リンパ節における抗原の捕獲と貯留を促進する。粒子はマクロファージにより貪食されることができ、そしてサイトカインの放出を介して抗原の提示を増強する。粒状担体の例は、ポリメチルメタクリレート重合体より誘導されたもの、並びにPLGと称されるポリ(ラクチド)およびポリ(ラクチドコグリコリド)より誘導された微粒子を包含する。例えばJeffery et al., Pharm. Res. (1993) 10: 362-368; McGee JP, et al., J. Microencapsul. 14(2): 197-210, 1997; O'Hagan DT, et al., Vaccine 11(2): 149-54, 1993を参照。適当な微粒子はまた、荷電した界面活性剤、例えばアニオン系またはカチオン系の界面活性剤の存在下で製造することにより実質負電荷または実質正電荷を有する表面を有する微粒子を得てよい。例えば、アニオン系界面活性剤、例えば臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(CTAB)を用いて製造した微粒子、即ちCTAB-PLG微粒子は負荷電の高分子、例えばDNAを吸着する（例えば国際特許出願番号PCT/US99/17308参照）。

40

【0238】

更にまた他の粒子系および重合体もインビボまたはエクスピボの送達のために使用できる。例えばポリリジン、ポリアルギニン、ポリオルニチン、スペルミン、スペルミジンのような重合体、並びにこれ等の分子のコンジュゲートも目的の核酸の転移のために有用で

50

ある。同様に、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈降または他の不溶性無機塩、例えばリン酸ストロンチウム、ケイ酸アルミニウム、例えばベントナイトおよびカオリン、酸化クロム、ケイ酸マグネシウム、タルク等を使用した沈降も本発明の方法で使用される。遺伝子転移のために有用な送達系の考察については例えば Felgner, P. L., *Advanced Drug Delivery Reviews* (1990) 5: 163 - 187 を参照のこと。ペプチド（参照により本明細書に組み込まれる 1998 年 11 月 3 日発行の Zuckerman, R. N. et al., 米国特許第 5, 831, 005 号）もまた本発明のコンストラクトの送達のために有用である。

【0239】

上記した通り、ペプチド（または抗体）はこれ等の分子をコードする核酸として送達できる。所望の配列を選択された制御エレメント（例えばプロモーター、エンハンサー等）を含有する単シストロンまたは多シストロンのベクターに挿入する。終了後、コンストラクトは標準的な遺伝子送達プロトコル、例えば従来シリンジ（米国特許第 5, 399, 346 号、5, 580, 859 号、5, 589, 466 号）または遺伝子銃、例えば *Accelerell*（登録商標）遺伝子送達系（Powderject Technologies, Inc., Oxford, England）の何れかをもちいた注射；米国特許第 5, 219, 740 号に記載のレトロウイルス系、アデノウイルス系（Barr et al., *Gene Therapy* (1994) 1: 51 - 58; Berkner, K. L. *BioTechniques* (1988) 6: 616 - 629; および Rich et al., *Human Gene Therapy* (1993) 4: 461 - 476)、アデノ関連ウイルス（AAV）系（米国特許第 5, 173, 414 号および第 5, 139, 941 号）、ポックスウイルス、ワクシニアウイルス送達系（例えば国際特許出願 WO 94/26911 号参照）、アビポックスウイルス系、例えば鶏痘およびカナリア痘ウイルス、アルファウイルス送達系（米国特許第 5, 843, 723 号；第 5, 789, 245 号；第 6, 342, 372 号；第 6, 329, 201 号）並びに他のウイルス系のようなウイルスによる系；非ウイルス系、例えば荷電または未荷電のリポソーム（例えば Hug and Sleight, *Biochim. Biophys. Acta.* (1991) 1097: 1 - 17; Straubinger et al., *Methods of Enzymology* (1983), Vol. 101, pp. 512 - 527; Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) 84: 7413 - 7416); および/または Papahadjopoulos et al., *Biochem. Biophys. Acta.* (1975) 394: 483 - 491 に記載のものと同様のコキレート脂質組成物を用いながら送達できる。また米国特許第 4, 663, 161 号および第 4, 871, 488 号も参照。ポリヌクレオチドは脊椎動物の被験体に直接送達するか、または、被験体から誘導した細胞にエクスピボで送達し、細胞を被験体に再移植することができる。

【0240】

本発明の方法は更に本発明の抗体有効量を含む組成物を動物に投与することによるプリオン関連疾患の治療または防止を包含する。

【0241】

治療方法は本明細書に記載した組成物の何れか、例えばペプチド含有組成物および/または抗体組成物を組み込むものである。種々の成分は共に、または個別に投与してよい。

【0242】

本発明の方法において使用するのに適する動物はヒトおよび他の霊長類、例えば非ヒト霊長類、例えばチンパンジーおよび他の類人猿またはサル類；牧場動物、例えばウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギおよびウマ、家畜動物、例えばイヌおよびネコ；実験動物、例えばげっ歯類、例えばマウス、ラット、ハムスターおよびモルモット；鳥類、例えば家畜、野生または競技用の鳥類、例えばニワトリ、シチメンチョウおよび他のキジ科のトリ、アヒル、ガチョウ等を包含する。本発明で使用するのに適する動物は成熟および新生仔の両方を含

10

20

30

40

50

む何れかの齢であることができる。トランスジェニック動物もまた本発明において使用できる。プリオン蛋白関連疾患の研究のために現在使用されているトランスジェニック動物の考察については、一般的には Prusiner 「Prions」 Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95: 13363 - 13383 を参照のこと。

【0243】

本発明の組成物はプリオン関連疾患の治療または防止のために使用できる。このようなプリオン関連疾患は病原性プリオン蛋白 (PrP^{Sc}) により全体または部分的に誘発される疾患を包含する。プリオン関連疾患は、スクラピー、ウシ海綿状脳障害 (BSE)、狂牛病、ネコ海綿状脳障害、クールー、クロイツフェルトヤコブ病 (CJD)、ゲルストマン-シュトロイスラー-シェンカー症候群 (GSS) および胎児家族性不眠症 (FFI) を包含する。

【実施例】

【0244】

以下に本発明を実施するための特定の実施形態の実施例を示す。実施例は説明目的のみに示したものであり、如何なる点においても本発明の範囲を限定する意図はない。

【0245】

使用した数値 (例えば量、温度等) に関しては正確さを確保すべく努力したが、一部の実験誤差および偏移は当然ながら許容されなければならない。

【0246】

(実施例1: ペプチド試薬の製造)

プリオン蛋白のペプチドフラグメントは本質的には Merrifield (1969) Advan. Enzymol: 32: 221 および Holm and Medal (1989), Multiple column peptide synthesis, p. 208E, Bayer and G. Jung (ed.), Peptides 1988, Walter de Gruyter & Co. Berlin - N. Y. に記載の通り、標準的ペプチド合成手法を用いて化学合成した。ペプチドは HPLC により精製し、配列は質量スペクトルで確認した。

【0247】

一部の例においては合成したペプチドは、N または C 末端に付加的な残基、例えば GG 残基を含み、また、野生型配列と比較してアミノ酸置換1つ以上を含んでいた。

【0248】

(A. ペプトイド置換)

ペプトイド置換は配列番号14 (QWNKPSKPKTN、配列番号2の残基97~107に相当)、配列番号67 (KKRPKPGGWNTGG、配列番号2の残基23~36に相当) および配列番号68 (KKRPKPGG配列番号2の残基23~30に相当) に示すペプチドにおいて行った。特にこれ等のペプチドのプロリン残基1つ以上を種々のN置換ペプトイドで置換した。何れかのプロリンに対して置換することができるペプトイドについては図3を参照できる。ペプトイドは共に参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第5,877,278号および第6,033,631号; Simon et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9367 に記載の通り調製した。

【0249】

(B. 多量体化)

特定のペプチド試薬はまた多量体として調製し、例えば直列リピート (GGGのようなリンカーを介したペプチドの複数コピーの連結)、多重抗原性ペプチド (MAPS) および/または線状連結ペプチドを調製することにより行った。

【0250】

特にMAPSは本質的には Wu et al. (2001) J Am Chem Soc. 2001 123 (28): 6778 - 84; Spetzler et al. (1995) Int J Pept Protein Res. 45 (1): 78 - 85 に

10

20

30

40

50

記載の通り標準的手法を用いて調製した。

【0251】

直鎖または分枝鎖のペプチド（例えばPEGリンカー-多量体化）もまた標準的手法を用いてポリエチレングリコール（PEG）リンカーを用いて調製した。特に分枝鎖多重ペプチドPEGスカホールドは、以下の構造、即ち、ビオチン-PEG-Lys-PEG-Lys-PEG-Lys-PEG-Lys-PEG-Lys（無ペプチド対照）およびビオチン-PEG-Lys（ペプチド）-PEG-Lys（ペプチド）-PEG-Lys（ペプチド）として作成した。更にペプチドからLysへの連結を、Lys-イプシロン-NH-CO-(CH₂)₃-Mal-S-Cys-ペプチドとして調製した。（図5参照）。

10

【0252】

（C．ビオチニル化）

ペプチドは合成および精製の後に標準的手法を用いてビオチニル化した。ビオチンはペプチドのNまたはC末端に付加した。

【0253】

（実施例2：結合試験）

（A．ブルダウン）

本明細書に記載したペプチド試薬のプリオン蛋白に特異的に結合する能力を磁気ビーズブルダウン試験を用いて調べた。この試験のために、ペプチド試薬をビオチンで標識することによりストレプトアビジンコーティング磁気ビーズへの結合が行えるようにした。

20

【0254】

脳ホモジネートはRMLPrP^SC⁺およびPrP^C+Balb-cマウスから調製する。概すればTBS緩衝液（50mMトリスHCl pH7.5および37.5mMNaCl）5mlに1%TW20および1%トリトン100を添加したものを約0.5gの重量の脳に添加し、10%ホモジネートとした。脳スラリーを大型粒子が消失するまで処理した。200μlのアリコート緩衝液中1:1希釈し、予備冷却したエッペンドルフ試験管に添加し、試料を各々数秒数回反復して音波処理した。試料を500xで10~15分間遠心分離し、上澄みを除去した。

【0255】

プロテイナーゼK消化の作用を試験するために、特定の上澄みを2試料に分割し、プロテイナーゼK4μlを一方の試料に添加し、1時間37℃で回転させた。PMSF8μlをプロテイナーゼKの試験管に添加して消化を停止し、試験管を4℃で最低1時間インキュベートした。

30

【0256】

ホモジネートはその後の使用時まで4℃で保存し、必要に応じて上記した通り再度超音波処理した。脳ホモジネートの10%w/vのPrP^CおよびPrP^SC⁺調製物を以下の通りビオチン標識ペプチド試薬と共に4℃で一夜インキュベートした。緩衝液400μl、抽出物50μlおよびビオチン標識ペプチド試薬（10mM保存溶液）5μlを含有する試験管を作成した。試験管は室温で最低2時間、または、4℃で一夜、プラットホームロッカー上でインキュベートした。

40

【0257】

インキュベーションの後、SA-ビーズ（Dyna1 M280ストレプトアビジン112.06）50μlを添加し、試験管を回転混合した。試験管を揺動（VWR、Rockingプラットホーム、100型）を用いて室温で1時間、または、4℃で一夜、インキュベートした。

【0258】

試料を振とう装置から取り外し、磁場内に置き、結合したペプチド試薬およびプリオンと共に磁気ビーズを回収し、そして試験緩衝液1mlを用いて5~6回洗浄した。試料は即座に使用するか、または後述するウエスタンブロットまたはELISAに供するまで-20℃で保存した。

50

【0259】

(B. ウェスタンブロット)

ウェスタンブロット分析は以下の通り実施した。上記した通り沈降させたビーズ-ペプチド-プリオン複合体を、各試験管に添加したSDS緩衝液(Novex、トリス-グリシンSDS-試料緩衝液2X)25~30 μ lを添加することにより最終洗浄の後に変性した。全ビーズが懸濁するまで試験管を回転混合した。上面が開放し始めるまで試験管を煮沸し、標準的SDS-PAGEゲル上で泳動し、WB分析用の固体メンブレンに移行させた。

【0260】

メンブレンを5%乳/TBS-T[50ml1M Tris pH7.5;37.5ml 4MNaCl、1~10mLツイーン、乳で容量を1Lとする]中室温で30分間ブロッキングした。「Prion Chimeras and Uses Thereof」と題された2003年9月30日出願の国際特許出願PCT/US03/31057に記載の通り抗プリオンポリクローナル抗体10~15mlを1:50倍希釈でメンブレンに添加し、室温で1時間インキュベートした。メンブレンをTBS-Tで数回洗浄した。洗浄後、アルカリホスファターゼ(AP)コンジュゲート二次抗体(ヤギ抗ウサギIgG(H+L)抗体(Pierce))を1:1000希釈(TBS-T中)で添加し、室温で20分間インキュベートした。メンブレンをTBS-Tで数回洗浄した。アルカリホスファターゼ沈降試薬(1工程NBT/BCIP(Pierce))を添加し、バックグラウンドが生じるかシグナルが明確化するまで発色させた。

10

20

【0261】

(C. ELISA)

最終洗浄の後、上記したビーズ-ペプチド複合体をグアニジンチオシアネートで変性させ、Ryou et al.(2003)Lab Invest.83(6):837-43に記載の通り変性蛋白に対してELISAを実施した。ブランク対照より高値のOD値(.172~.259の範囲)を陽性とみなした。

【0262】

(D. 結果)

ウェスタンブロットおよびELISA結合試験の結果を表2にまとめる。概すれば、脳ホモジネートのプロテイナーゼK消化は本明細書に記載したペプチド試薬がPrP^{Sc}に結合する特異的結合の検出のためには必要ではなかった。図4に示すとおり、何れの場合も野生型の脳ホモジネートについては、結合は観察されず、ペプチド試薬がPrP^{Sc}に特異的に結合していたことを示していた。更にまた、上記したウェスタンブロット分析では4対数希釈を超えてPrP^{Sc}が検出され、一方ELISAはウェスタンブロットより少なくとも10Xを超えて高感度であった。

30

【0263】

【化 1 1】

表 2

ペプチド試薬 (NまたはC末端ピオチン標識)	配列番号	ウエスタンブロット ¹	ELISA A _{405nm}
³ CGG ⁵ WGQGGGTHNQWNKPSKPKT NLKHV ³ C	35	+	0.687
³ GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLK V	36	+	ND
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNL KHV ³	37	+	ND
³ CGG ⁵ WGQGGGTHNQWNKPSKPKTN LKHV ³ C	40	+	ND
RPMIHFGNDWEDRYRENMYR ⁴	44	-	ND
⁴ RPMIHFGNDWEDRYRENMYR ⁵ C	76	-	ND
⁵ C ⁴ RPMIHFGNDWEDRYRENMYR ⁴ C ²	46	+	ND
QWNKPSKPKTN ⁴	50	+	0.932
QWNKPSKPKTN	14	+++	0.775
QWNKPSKPKTN ⁴ QWNKPSKPKTN	51	+++	.923
QWNKPSKPKTNLKHV ⁴	77	++	0.839
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTN	53	+	0.254
GGTHNQWNKPSKPKTN	54	+	0.253
⁴ AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	78	不溶	0.259
⁴ AGAAAAGAVVGGLGG	56	不溶	0.313
⁶ AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	57	+	0.901
⁶ AGAAAAGAVVGGLGG	65	++	0.635
⁴ KKRPKPGGWNTGGSRYPGQS	66	+	0.533
⁴ KKRPKPGGWNTGG	67	++	0.451

10

20

30

40

【 0 2 6 4】

【化 1 2】

⁴ KKRPKPGG	68	+++	0.765
PHGGGWGQPHGGSWGQPHGGSWG Q	69	-	0.282
PHGGGWGQPHGGSWGQ	70	-	0.241
PHGGGWGQ	71	-	0.263
⁴ GPKRKGPK	73	+	1.0621
⁴ WNKPSKPKT	75	-	0.247
⁴ NKPSKPK	79	-	0.24
⁴ KPSKPK	80	-	0.225
⁴ KKRPKPGGGKKRPKPGG	72	+	0.522
⁴ KKRPKPGGGQWNKPSKPKTN	81	+	1.247
KKKAGAAAAGAVVGGLGGYMLGS AMDDD	82	-	0.340
DDDAGAAAAGAVVGGLGGYMLGS AM	83	-	0.237
KKKAGAAAAGAVVGGLGGYMLGS AMKKK	84	+	0.268
⁴ KKKKKKKK	85	+ ³	0.530
DDDAGAAAAGAVVGGLGGYMLGS AMDDD	86	-	0.227
⁴ NNKQSPWPTKK	87	-	0.277
DKDKGGV GALAGAAVAAGGDKDK	88	-	0.282
⁴ QANKPSKPKTN	89	+	0.245
⁴ QWNKASKPKTN	90	-	0.283
⁴ QWNKPSKAKTN	91	-	0.256
⁴ QWNAPSKPKTN	92	-	0.230
⁴ QWNKPSAPKTN	93	-	0.250
⁴ QWNKPSKPATN	94	-	0.260
⁴ QWNKASKAKTN	95	-	0.241
⁴ KKRAKPGG	96	+	2.19
⁴ KKRPKAGG	97	+	1.24
⁴ KKRAKAGG	98	+	1.46

10

20

30

40

1 : 目視評価の相対シグナル強度

2 : 環化

50

- 3 : 指定位置で G G G G 残基付加 / 挿入
 4 : 指定位置で G G G 残基付加 / 挿入
 5 : 指定位置で G G 残基付加 / 挿入
 6 : 指定位置で K K K 残基付加 / 挿入
 N D = 測定せず。

【 0 2 6 5 】

アラニンスキャンニングもまた実施することにより結合に関与する残基を発見した。

【 0 2 6 6 】

結果を表 3 に示す。

【 0 2 6 7 】

【 化 1 3 】

10

表 3

ペプチド試薬 (NまたはC末端ビオチン標識)	配列番号	ウエスタンブロット	ELISA A _{405nm}
QWNKPSKPKTN	14	+++	0.775
QANKPSKPKTN	89	+++	0.245
QWNAPSKPKTN	92	+	0.283
QWNKPSAPKTN	93	+	0.256
QWNKPSKPKATN	94	+	0.230
QWNKASKPKTN	99	+/-	0.250
QWNKPSKAKTN	91	+	0.260
QWNKASKAKTN	95	-	0.241
QWAKPSKPKTN	100	ND	0.376
QWNKPAKPKTN	101	ND	0.356
QWNKPSKPKAN	102	ND	0.234
QWNKPSKPKTA	103	ND	0.262
KKRPKPGG	68	+++	0.765
AKRPKPGG	104	+	0.273
KARPKPGG	105	+	0.256
KKAPKPGG	106	+	0.268
KKRPAPGG	107	+	0.578
KKRAKPGG	96	++	2.19
KKRPKAGG	97	++	1.24
KKAPKAGG	108	+	1.46

20

30

40

更にまた、表 4 に示すとおり、配列番号 1 4、配列番号 6 7 および配列番号 6 8 を有するペプチド試薬による PrP^{Sc} への結合は多くの N 置換グリシン (ペプトイド) によるプロリン残基の置換により更に増強された。

50

【 0 2 6 8 】

【 化 1 4 】

表 4

	ウエスタ ンプロッ ト	ELISA A_{405nm}
*(GGG) ¹ QWNKPSK*KTN (配列番号 14)		
プロリン	+++	0.775
5 : N - (S) - (1-フェニルエチル) グリシン (図 3 A において丸で囲んだペプチド) (配列番号 109)	++	0.865
N - (4-ヒドロキシフェニル) グリシン (図 3 B において丸で囲んだペプチド) (配列番号 110)	-	0.934
N - (シクロプロピルメチル) グリシン (図 3 C に おいて丸で囲んだペプチド) (配列番号 111)	+++++	1.141
N - (イソプロピル) グリシン (図 3 D において 丸で囲んだペプチド) (配列番号 112)	ND	0.974
N - (3, 5-ジメトキシベンジル) グリシン (図 3 E において丸で囲んだペプチド) (配列番号 113)	+++	2.045
N-ブチルグリシン (図 3 F において丸で囲んだペ プチド) (配列番号 114)	++++	0.776
* (GGG) ¹ QWNK*SKPKTN (配列番号 14)		
N - (シクロプロピルメチル) グリシン (配列番号 115)	ND	0.498
N - (イソプロピル) グリシン (配列番号 116)	ND	1.57
N - (3, 5-ジメトキシベンジル) グリシン (配列番号 117)	ND	0.823
N-ブチルグリシン (配列番号 118)	ND	0.619
* (GGG) ¹ KKRPK*GG (配列番号 68)		
プロリン	ND	0.765

10

20

30

40

【 0 2 6 9 】

【化 1 5】

N-ブチルグリシン (配列番号119)	ND	0.61
N-3, 5-ジメトキシベンジル) グリシン (配列番号 120)	ND	0.631
N- (イソプロピル) グリシン (配列番号121)	ND	0.509
N- (シクロプロピルメチル) グリシン (配列番号122)	ND	0.503
* (GGG) ¹ KKRPK*GGWNTGG (配列番号 67)		
プロリン	ND	0.451
N-ブチルグリシン (配列番号123)	ND	0.503
N-3, 5-ジメトキシベンジル) グリシン (配列番号124)	ND	0.464
N- (イソプロピル) グリシン (配列番号125)	ND	0.555
N- (シクロプロピルメチル) グリシン (配列番号126)	ND	0.344
(GGG) ¹ QWNKX1SKX2KTN		
X 1においてN- (シクロプロピルメチル) グリシン、X 2においてN- (シクロプロピルメチル) グリシン (配列番号129)	ND	ND
X 1においてN- (シクロプロピルメチル) グリシン、X 2においてN- (3, 5-ジメトキシベンジル) グリシン (配列番号130)	ND	ND
X 1においてN- (シクロプロピルメチル) グリシン、X 2においてN-ブチルグリシン (配列番号131)	ND	ND
X 1において (イソプロピル) グリシン、X 2において (シクロプロピルメチル) グリシン (配列番号132)	ND	ND

10

20

30

¹ 任意の G G G リンカーはこの表の実験のペプチド試薬には存在していなかった。

【0270】

更にまた P r P ^S c 結合ペプチド試薬の多量体化も P r P ^S c に対する親和性を向上させた。特に、直列リピートは1コピーよりも強力なシグナル(ウエスタンブロット測定)をもたらした。ピース上の予備誘導体化 M A P 形態は特定の例においては2倍まで結合を増大させた。しかしながら、M A P 形態は溶液中のペプチドの沈降をもたらした。線状連結ペプチドもまた結合を増強する能力について調べたが、沈降は起こらなかった。

40

【0271】

(実施例3:抗体作製)

以下に本発明のペプチド試薬に対する抗体を作成するために使用できるプロトコルの例を示す。

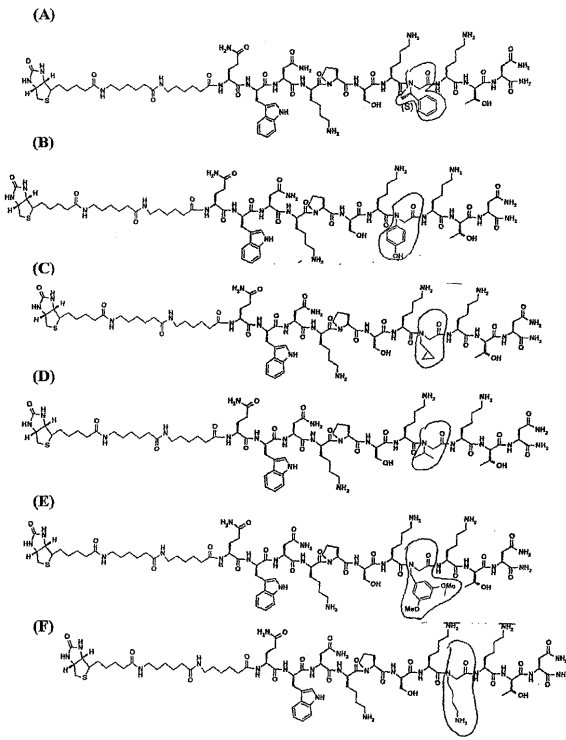
【0272】

マウスを第0日において I M (筋肉内) または I P (腹腔内) のいずれかで本明細書に

50

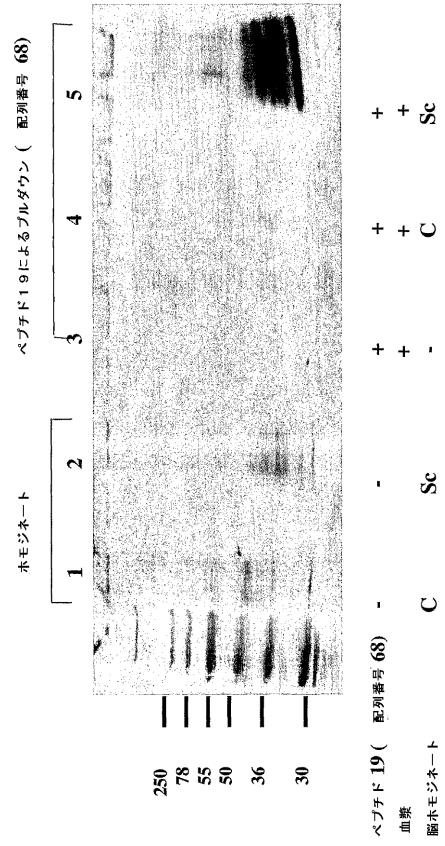
【 図 3 】

FIGURE 3



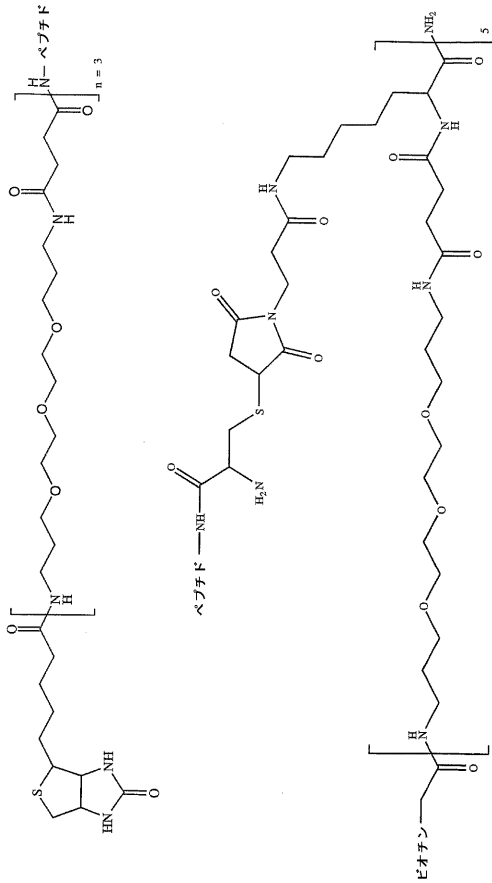
【 図 4 】

FIGURE 4: ヒト血漿およびマウス脳における P r P S c のペプチド特異性



【 図 5 】

FIGURE 5



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 0 7 K	1/14 (2006.01)	C 0 7 K	1/14	4 H 0 4 5
A 2 3 L	1/31 (2006.01)	A 2 3 L	1/31	A
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/566 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	U
G 0 1 N	33/543 (2006.01)	G 0 1 N	33/566	
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 4 1 Z
		G 0 1 N	33/50	Z

- (72)発明者 メリッサ ディー． マイケルイッチ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7 , エミリービル, ピー．オー． ボックス 8 0 9 7 , カイロン コーポレーション 気付
- (72)発明者 セリーヌ フー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7 , エミリービル, ピー．オー． ボックス 8 0 9 7 , カイロン コーポレーション 気付
- (72)発明者 ロナルド ザッカーマン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7 , エミリービル, ピー．オー． ボックス 8 0 9 7 , カイロン コーポレーション 気付
- (72)発明者 マイケル ディー． コナリー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7 , エミリービル, ピー．オー． ボックス 8 0 9 7 , カイロン コーポレーション 気付

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 CB01 DA36 FB03 FB07
 4B024 AA01 AA13 BA80 CA05 HA01
 4B042 AC04 AC08 AG02 AG03 AG04 AH01 AP30
 4B063 QA01 QQ02 QQ36 QQ79 QR16 QR48 QR66 QR72 QS02 QX01
 4C084 AA01 AA02 AA13 CA53 MA52 MA55 MA56 MA59 MA60 MA63
 MA66 NA14 ZA02 ZA15
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 EA21 EA50 FA34 GA21

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2010158247A5	公开(公告)日	2011-02-03
申请号	JP2010034088	申请日	2010-02-18
[标]申请(专利权)人(译)	诺华巴库小腿和诊断公司		
申请(专利权)人(译)	诺华Bakushinzu和诊断公司		
[标]发明人	メリッサディーマイケルイッチ セリーヌフー ロナルドザッカーマン マイケルディーコナリー		
发明人	メリッサ ディー. マイケルイッチ セリーヌ フー ロナルド ザッカーマン マイケル ディー. コナリー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C12Q1/37 C12Q1/02 C07K17/00 C07K1/14 A23L1/31 A61K38/00 A61P25/28 A61K48/00 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/543 G01N33/50		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/00 A61P25/28 C07K14/47 G01N33/6896 G01N2800/2828		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C12Q1/37 C12Q1/02 C07K17/00 C07K1/14 A23L1/31.A A61K37/02 A61P25/28 A61K48/00 G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/53.U G01N33/566 G01N33/543.541.Z G01N33/50.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024 /AA01 4B024/AA13 4B024/BA80 4B024/CA05 4B024/HA01 4B042/AC04 4B042/AC08 4B042/AG02 4B042/AG03 4B042/AG04 4B042/AH01 4B042/AP30 4B063/QA01 4B063/QQ02 4B063/QQ36 4B063 /QQ79 4B063/QR16 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QR72 4B063/QS02 4B063/QX01 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/CA53 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA59 4C084 /MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA02 4C084/ZA15 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/EA21 4H045/EA50 4H045/FA34 4H045 /GA21		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/494962 2003-08-13 US 60/570368 2004-05-12 US 60/586509 2004-07-09 US		
其他公开文献	JP2010158247A		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于检测各种样品中致病性朊病毒的存在组合物和方法，例如，从活体，血液制品和农场动物以及其他人和动物的饲料获得的样品。ŽSOLUTION：描述了这种肽试剂优先与PrP蛋白的PrP Sc型相互作用。还描述了使用该试剂检测，诊断，纯化，治疗和预防朊病毒以及与朊病毒相关的疾病或试剂抗体的方法。这些肽试剂可广泛用于诸如用于分离致病性朊病毒的工具或用于检测样品中致病性朊病毒的存在工具，作为用于治疗或预防和/或制备的组合物的组分。朊病毒特异性抗体。例如，与PrP C相比，优先与PrP SP Sc / SP相互作用的肽试剂可用于疾病的诊断。Ž

