

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 531356

(P2003 - 531356A)

(43)公表日 平成15年10月21日(2003.10.21)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 19/02	4 B 0 2 4
A 6 1 P 19/02		21/04	4 B 0 6 3
21/04		25/28	4 C 0 8 4
25/28		29/00 101	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 73数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 505942(P2001 - 505942)

(86) (22)出願日 平成12年6月29日(2000.6.29)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月28日(2001.12.28)

(86)国際出願番号 PCT/US00/17927

(87)国際公開番号 W001/000235

(87)国際公開日 平成13年1月4日(2001.1.4)

(31)優先権主張番号 09/342,426

(32)優先日 平成11年6月29日(1999.6.29)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 マクギル ユニバーシティー
カナダ国 エイチ3エー 2エー7、ケベック
州、モントリオール、ユニバーシティー
トリート 3550

(71)出願人 キャプリアン ファーマシューティカルズ
インコーポレイテッド
カナダ国 ケベック州 モントリオール
ベア ストリート 5375 スート 201

(72)発明者 キャッシュマン ネイル アール .
カナダ国 オンタリオ州 トロント ディ
ーンウッド サークル 1

(74)代理人 弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 プリオンタンパク質結合タンパク質及びそれらの使用

(57)【要約】

一般に、本発明は、プリオンタンパク質結合タンパク質 (PrPBP)と、それらの診断用途、治療用途および除染用途とに関する。本発明はまた、PrPBP単離のための融合タンパク質試薬を特徴とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の段階を含む、プリオンタンパク質結合タンパク質 (PrBP) を同定する方法：

a) 細胞または生物試料と検出可能なプリオンタンパク質 (PrP) 融合タンパク質とを、該融合タンパク質とPrBPとの複合体形成を可能とする条件下で接触させる段階；及び

b) 該複合体を検出し、それにより該PrBPを同定する段階。

【請求項2】 検出可能なPrP融合タンパク質が高親和性でPrBPと結合する、請求項1記載の方法。

【請求項3】 検出可能なPrP融合タンパク質がコンフォメーション依存的にPrBPとの結合を示す、請求項1記載の方法。

【請求項4】 検出可能なPrP融合タンパク質がアルカリホスファターゼと融合したプリオンタンパク質を含む、請求項1記載の方法。

【請求項5】 PrBPが、ヒト、家畜、またはペットの種に由来する、請求項1記載の方法。

【請求項6】 PrBPが哺乳動物に由来する、請求項1記載の方法。

【請求項7】 哺乳動物が、ウシ、ヒツジ、マウス、またはヤギである、請求項6記載の方法。

【請求項8】 PrBPが競合的にPrPまたはPrP融合タンパク質と結合するか否かを決定する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項9】 PrBPがPrPまたはPrP融合タンパク質と結合する親和性を決定する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項10】 PrPまたはPrP融合タンパク質とPrBPとの結合が、細胞増殖を阻害するか、または細胞死を促進するか否かを決定する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項11】 以下の段階を含む、PrBPをコードする核酸分子を同定する方法：

a) 核酸分子のプールを発現し、通常は細胞表面にPrPを発現していない細胞集団を提供する段階；

b) 該細胞集団を検出可能に標識されたPrPに曝す段階；及び

c) 検出可能に標識されたPrPと結合する細胞を同定し、それによりPrBPをコードする核酸分子を含む細胞を同定する段階。

【請求項12】 核酸分子がcDNAである請求項11記載の方法。

【請求項13】 核酸分子が哺乳動物核酸分子である、請求項11記載の方法

。

【請求項14】 細胞がカエル卵母細胞である、請求項11記載の方法。

【請求項15】 検出可能なタンパク質と共有結合したPrPを含むプリオンタンパク質融合タンパク質。

【請求項16】 高親和性でPrBPとの結合を示す、請求項15記載の融合タンパク質。

【請求項17】 コンフォメーション依存的にPrBPとの結合を示す、請求項15記載の融合タンパク質。

【請求項18】 検出可能なタンパク質がアルカリホスファターゼである、請求項15記載の融合タンパク質。

【請求項19】 プリオンタンパク質が、ヒト、家畜、またはペットの種に由来する、請求項15記載の融合タンパク質。

【請求項20】 プリオンタンパク質が哺乳動物に由来する、請求項15記載の融合タンパク質。

【請求項21】 哺乳動物が、ウシ、ヒツジ、マウス、またはヤギである、請求項20記載の融合タンパク質。

【請求項22】 可溶性である、請求項15記載の融合タンパク質。

【請求項23】 分泌型タンパク質である、請求項15記載の融合タンパク質

。

【請求項24】 以下の段階を含む、生物試料中のPrP^Sを検出する方法：

a) 生物試料とPrBPまたはそのPrP結合断片もしくは類似体とを接触させる段階；及び

b) 該PrBPと該生物試料中のPrP^Sとの複合体形成を検出し、該複合体形成を該生物試料中のPrP^Sの存在の指標とする段階。

【請求項25】 検出段階が、標識PrP特異的抗体を使用して実施され、PrP^Sを欠く対照試料によって生成したシグナルよりも大きいシグナルを、該生物試料中のPrP^Sの存在の指標とする、請求項24記載の方法。

【請求項26】 検出段階が、標識PrPBPを使用して実施され、PrP^Sを欠く対照試料によって生成したシグナルよりも大きいシグナルを、該生物試料中のPrP^Sの存在の指標とする、請求項24記載の方法。

【請求項27】 検出段階が、標識PrP^S特異的抗体を使用して実施される、請求項24記載の方法。

【請求項28】 接触段階の後であり、且つ検出段階の前に、生物試料中のPrP^Cを破壊する段階をさらに含む、請求項24記載の方法。

【請求項29】 PrP^Cがタンパク質分解により破壊される、請求項28記載の方法。

【請求項30】 PrPBPが検出可能である、請求項24記載の方法。

【請求項31】 PrPBPが検出可能な融合タンパク質である、請求項30記載の方法。

【請求項32】 PrPBP融合タンパク質がPrPBP-アルカリホスファターゼ融合タンパク質である、請求項31記載の方法。

【請求項33】 PrPBPが、放射性、蛍光性、発色性、もしくは化学発光性の標識、またはハプテンで標識されている、請求項30記載の方法。

【請求項34】 複合体形成が標識PrPBP特異的抗体を使用して検出される、請求項24記載の方法。

【請求項35】 複合体形成が、フィルター結合、免疫沈降、ゲル電気泳動分離、遠心沈降、または濾過により検出される、請求項24記載の方法。

【請求項36】 PrP^Sが固相支持体上に固定化されている、請求項24記載の方法。

【請求項37】 PrPBPまたはそのPrP結合断片もしくは類似体が固相支持体上に固定化されている、請求項24記載の方法。

【請求項38】 複合体形成がPrP特異的抗体を使用して検出される、請求項37記載の方法。

【請求項39】 以下の段階を含む、生物試料中のPrP^{Sc}を検出する方法：

- a) 生物試料とPrPBP：標識PrP複合体とを接触させる段階、
- b) 生物試料中のPrP^Cを破壊する段階；及び
- c) 生物試料中に存在する非標識PrP^{Sc}によって該PrPBP：PrP複合体内の標識PrPの置換を検出し、該置換を該生物試料中のPrP^{Sc}の存在の指標とする段階。

【請求項40】 標識PrPが標識PrP^{Sc}である、請求項39記載の方法。

【請求項41】 標識PrPがPrP融合タンパク質である、請求項39記載の方法

。

【請求項42】 PrP融合タンパク質が、PrP-アルカリホスファターゼ融合タンパク質である、請求項41記載の方法。

【請求項43】 PrP^Cがタンパク質分解により破壊される、請求項39記載の方法。

【請求項44】 複合体またはPrP^{Sc}が固相支持体上に固定化されている、請求項39記載の方法。

【請求項45】 PrPが、放射性、蛍光性、発色性、もしくは化学発光性の標識、またはハプテンで標識されている、請求項39記載の方法。

【請求項46】 複合体が、フィルター結合、免疫沈降、ゲル電気泳動分離、遠心沈降、または濾過により検出される、請求項39記載の方法。

【請求項47】 以下の段階を含む、生物試料中のPrP^{Sc}を検出する方法：

- a) 生物試料とPrPBP：標識PrP複合体とを接触させる段階；及び
- b) 生物試料中に存在する非標識PrP^{Sc}によって該PrPBP：PrP複合体内の標識PrPの置換を検出し、PrP^{Sc}を欠く対照試料と比した複合体会合標識の減少を、該生物試料中のPrP^{Sc}の存在の指標とする段階。

【請求項48】 PrPBPが、ヒト、家畜、またはペットの種に由来する、請求項24または39記載の方法。

【請求項49】 PrPBPが哺乳動物PrPBPである、請求項24または39記載の方法。

【請求項50】 哺乳動物が、ウシ、ヒツジ、マウス、またはヤギである、請求項49記載の方法。

【請求項51】 生物試料が、ヒト、家畜、またはペットの種に由来する、請求項24または39記載の方法。

【請求項52】 PrPBPが可溶性である、請求項24または39記載の方法。

【請求項53】 PrPBPがカドヘリンである、請求項24または39記載の方法

。

【請求項54】 カドヘリンがプロトカドヘリン-43である、請求項53記載の方法。

【請求項55】 カドヘリンがOB-カドヘリン-1である、請求項53記載の方法。

【請求項56】 カドヘリンが配列番号：2記載の配列を有する、請求項54記載の方法。

【請求項57】 カドヘリンが配列番号：8または9記載の配列を有する、請求項55記載の方法。

【請求項58】 PrPBPまたはそのPrP結合断片もしくは類似体を含む、生物試料中のPrP^Sを検出するキット。

【請求項59】 PrP特異的抗体をさらに含む、請求項58記載のキット。

【請求項60】 PrP特異的抗体がPrP^S特異的抗体である、請求項59記載のキット。

【請求項61】 PrPBPが検出可能である、請求項58記載のキット。

【請求項62】 PrPBPが検出可能な融合タンパク質である、請求項61記載のキット。

【請求項63】 PrPBPがPrPBP-アルカリホスファターゼ融合タンパク質である、請求項62記載のキット。

【請求項64】 PrPBPが、放射性、蛍光性、発色性、もしくは化学発光性の標識、またはハプテンで標識されている、請求項61記載のキット。

【請求項65】 PrPBPが固相支持体上に固定化されている、請求項58記載のキット。

【請求項66】 標識PrPをさらに含む、請求項58記載のキット。

【請求項67】 PrPBPが、ヒト、家畜、またはペットの種に由来する、請

求項58記載のキット。

【請求項68】 PrPBPが哺乳動物PrPBPである、請求項58記載のキット。

【請求項69】 哺乳動物が、ウシ、ヒツジ、マウス、またはヤギである、請求項68記載のキット。

【請求項70】 PrPBPがカドヘリンである、請求項58記載のキット。

【請求項71】 カドヘリンがプロトカドヘリン-43である、請求項70記載のキット。

【請求項72】 カドヘリンがOB-カドヘリン-1である、請求項70記載のキット。

【請求項73】 カドヘリンが配列番号：2記載の配列を有する、請求項71記載のキット。

【請求項74】 カドヘリンが配列番号：8または9記載の配列を有する、請求項72記載のキット。

【請求項75】 プリオン疾患の治療のための可能性のある治療用化合物を同定する方法であって、

a) 試験化合物の存在下で選択されたPrPBPとPrP^S°またはPrP^Cとの結合を測定する段階；及び

b) 試験化合物の非存在下で選択されたPrPBPとPrP^S°またはPrP^Cとの結合を測定する段階を含み、

試験化合物の非存在下で選択されたPrPBPとPrP^S°またはPrP^Cとの結合のレベルよりも低い、試験化合物の存在下での選択されたPrPBPとPrP^S°またはPrP^Cとの結合のレベルを、試験化合物がプリオン疾患の治療のための可能性のある治療用化合物であることの指標とする方法。

【請求項76】 選択されたPrPBPがカドヘリンである、請求項75記載の方法。

【請求項77】 カドヘリンがプロトカドヘリン-43である、請求項76記載の方法。

【請求項78】 カドヘリンがOB-カドヘリン-1である、請求項76記載の方法。

【請求項79】 選択されたPrPBPが配列番号：2記載の配列を有する、請求項77記載の方法。

【請求項80】 選択されたPrPBPが配列番号：8または9記載の配列を有する、請求項78記載の方法。

【請求項81】 プリオン疾患が、ヒト、家畜、またはペットの種に影響を与えるものである、請求項75記載の方法。

【請求項82】 プリオン疾患が、ヒト、ウシ、ヒツジ、またはヤギに影響を与えるものである、請求項75記載の方法。

【請求項83】 生物試料中のPrP^{S^c}を阻害する方法であって、生物試料とPrPBPとを、PrP^{S^c}と該PrPBPとの複合体形成を可能にする条件下で接触させる段階を含む方法。

【請求項84】 生物試料からPrP^{S^c}：PrPBP複合体を回収する段階をさらに含む、請求項83記載の方法。

【請求項85】 哺乳動物におけるプリオン疾患を治療する方法であって、治療的に有効量のPrPBPの全部またはPrP結合部分を、該哺乳動物に投与する段階を含む方法。

【請求項86】 PrPBPがカドヘリンである、請求項85記載の方法。

【請求項87】 カドヘリンがプロトカドヘリン-43である、請求項86記載の方法。

【請求項88】 カドヘリンが0B-カドヘリン-1である、請求項86記載の方法。

【請求項89】 PrPBPが配列番号：2記載の配列を有する、請求項87記載の方法。

【請求項90】 PrPBPが配列番号：8または9記載の配列を有する、請求項88記載の方法。

【請求項91】 哺乳動物における望ましくないPrP^CとPrPBPとの相互作用レベルと関連した障害を治療する方法であって、治療的に有効量のPrPBPの全部またはPrP結合部分を、該哺乳動物に投与する段階を含む方法。

【請求項92】 PrPBPがカドヘリンである、請求項91記載の方法。

【請求項93】 障害が癌である、請求項91記載の方法。

【請求項94】 障害が神経変性疾患である、請求項91記載の方法。

【請求項95】 障害が免疫学的障害である、請求項91記載の方法。

【請求項96】 障害が免疫グロブリンの異常な増殖または分泌を含む、請求項91記載の方法。

【請求項97】 障害がリンパ腫、多発性骨髄腫、単クローン性高ガンマグロブリン血症、B細胞関連自己免疫疾患、重症筋無力症、または慢性関節リウマチである、請求項91記載の方法。

【請求項98】 カドヘリンがプロトカドヘリン-43である、請求項92記載の方法。

【請求項99】 カドヘリンがOB-カドヘリン-1である、請求項92記載の方法。

【請求項100】 PrPBPが配列番号：2記載の配列を有する、請求項98記載の方法。

【請求項101】 PrPBPが配列番号：8または9記載の配列を有する、請求項99記載の方法。

【請求項102】 哺乳動物が、ヒト、家畜、またはペットの種である、請求項91記載の方法。

【請求項103】 哺乳動物が、ヒト、ウシ、ヒツジ、またはヤギである、請求項91記載の方法。

【請求項104】 以下の段階を含む、生物試料中のBリンパ球を検出する方法：

a) 生物試料とPrPBPまたはそのPrP結合断片もしくは類似体とを接触させる段階；及び

b) 該PrPBPと該生物試料との複合体形成を検出し、該複合体形成を該生物試料中のBリンパ球の存在の指標とする段階。

【請求項105】 生物試料が血液試料である、請求項104記載の方法。

【請求項106】 PrPBPがカドヘリンである、請求項104記載の方法。

【請求項107】 カドヘリンがプロトカドヘリン-43である、請求項104記

載の方法。

【請求項108】 PrPBPが配列番号：2記載の配列を有する、請求項107記

載の方法。

【請求項109】 PrPBPを含む、Bリンパ球を検出するキット。

【請求項110】 PrPBPがカドヘリンである、請求項109記載のキット。

【請求項111】 カドヘリンがプロトカドヘリン-43である、請求項110記載のキット。

【請求項112】 PrPBPが配列番号：2記載の配列を有する、請求項111記載のキット。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の背景**

本発明は、プリオンタンパク質結合タンパク質、核酸、及びそれらの使用に関する。

【0002】

プリオン疾患とは、急速に進行する致命的な治療不可能な神経変性症候群の群である。ヒトプリオン障害には、非経口治療剤（例えば、屍体から抽出された下垂体ホルモン）及び移植組織（例えば、角膜及び硬膜の移植体）の不慮の汚染により伝播するクロイツフェルト-ヤコブ（Creutzfeldt-Jakob）病（CJD）が含まれる。後にCJDを発症したドナーまたは家族が疾患を有していたドナーからの汚染の可能性のため、カナダ赤十字（Canadian Red Cross）は、現在までに、1200万ドルを越える血液製剤をカナダ市場から回収した。さらに、ヒツジ及びヤギのスクレイピーは、イギリスにおけるウシ海綿状脳症と同様に、北米における一般的な経済的に重要なプリオン関連疾患である。ウシ海綿状脳症は、人間による牛肉摂取、及びこの種由来の生物学的製品の調製とも、健康的及び経済的に大きく関係している。

【0003】

プリオン疾患は、病理学的には、スポンジ状変化（即ち、脳の微小空洞形成、通常灰白質に多い）、ニューロン細胞の損失、ニューロン損失と釣り合わない星状膠細胞の増殖、及び異常なアミロイド形成タンパク質の蓄積により特徴付けられ、これらは脳内の別々の斑において起こることもある。プリオン疾患における神経変性は、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、及びパーキンソン病のような、他のより一般的な神経変性症候群と共通の基本メカニズムを有している可能性がある。

【0004】

これらの疾患を伝播させる病原体は、感染性材料中に、核酸成分の化学的または物理的な証拠が再現可能に検出されないという点で、ウイルス及びウイロイドとは著しく異なる（Prusiner、Science 216:136~144、1982）。プロテイナーゼ

K消化を利用したスクレイピー病原体の精製法により、スクレイピー罹患ハムスターの脳において27～30kDのプロテアーゼ抵抗性タンパク質が発見され、それはPrP²⁷⁻³⁰と名付けられた (Boltonら、Science 218:1309～1311、1982)。スクレイピー病原体活性と共に精製されたPrP²⁷⁻³⁰は、後に、伝播性病原体の主要な(または唯一の)高分子であることが示された (McKinleyら、Cell 35:57～62、1983)。PrP²⁷⁻³⁰は、後に、やはり疾患を伝播させることができる、33～37kDの完全型のスクレイピー病原体タンパク質 (PrP^{S^c}と名付けられた) のタンパク質分解による消化産物であることが決定された。

【0005】

PrP²⁷⁻³⁰の部分アミノ酸配列が決定され、cDNAがクローニングされた際、このタンパク質をコードする遺伝子が宿主由来であることが見いだされた (Oeschら、Cell 40:735～746、1985)。この細胞性タンパク質は、正常な脳から単離されており、それは、PrP^{S^c}とは異なり、プロテアーゼ感受性であり、かつスクレイピー疾患発症活性とは関連していない (Bendheimら、Ciba Found.Symp.164～177、1988)。感染性粒子関連PrP^{S^c}は、正常細胞性前駆体PrP^Cに由来するという仮説が立てられた (Prusiner、Science 252:1515～1522、1991)。最近、細胞の非存在下でPrP^{S^c}によりPrP^CからPrP^{S^c}への変換が触媒されることが報告された (Kociskoら、Nature 370:471～473、1994)。プロテアーゼ感受性の正常細胞性アイソフォームPrP^Cは、進化上保存された膜タンパク質であるが、その機能は不明である。最近、グリコシル-ホスファチジルイノシトール (GPI) 関連タンパク質であるPrP^Cが、コンカナバリンA刺激により誘導されるT細胞活性化を修飾することが示され (Cashmanら、Cell 61:185～182、1990)、このタンパク質が重要な機能的役割を有することが示唆された。

【0006】

種間のプリオン疾患の伝播は、PrPアミノ酸配列により主に決定される「種の障壁」により制限されている。さらに、最近のトランスジェニック実験により、やはりプリオン病原体形成に関与するPrPとは別の種特異的高分子の役割も示唆されている。プリオン疾患を有するヒトからの脳抽出物を接種された、ヒトPrP^Cを高レベルに発現するトランスジェニックマウスは、ヒトプリオンに対して耐性

であった。ヒトプリオンに対する感受性は、マウスPrP遺伝子を切除するか、またはヒト-マウスキメラプリオン遺伝子を発現させた場合にのみ起こった。これらの知見からは、ヒトプリオンタンパク質に対する親和性よりもマウスプリオンタンパク質に対する親和性の方が高い種特異的結合タンパク質が存在する可能性が示唆される (Tellingら、Cell 83:79~90、1995)。現在、ヒトプリオン疾患の高感度の診断のための検査法は市場に出ておらず、治療のための治療法は存在しない。

【0007】

発明の概要

一般に、本発明は、実質的に純粋なプリオンタンパク質結合タンパク質 (PrBP) を特徴とする。これらのタンパク質は、飽和可能かつ置換可能な様式でプリオンタンパク質 (PrP) と結合することを特徴とする。好ましくは、結合は高親和性でもあり、適当な機能的シグナル (例えば、細胞増殖の阻害、または細胞死レベルの増強) の生成をもたらす。2つのPrBPが以下に示され、マウス細胞から単離されるこれらのタンパク質は、細胞表面タンパク質である。これらのPrBPをコードする遺伝子のクローニング及び特徴決定が、本明細書に記載される。他の好ましいPrBPは、任意の生物に由来する細胞試料または組織試料から単離されうるが、哺乳動物、特にヒト及び任意の家畜またはペットの種が好ましい起源である。

【0008】

PrBPをコードする精製された核酸；それらの核酸を含有するベクター及び細胞；PrBPと特異的に結合する抗体；並びに細胞における発現のため位置するPrBPをコードするDNAで形質転換された細胞を提供する段階と、DNAを発現させるための条件下で形質転換細胞を培養する段階と、組換えPrBPを回収する段階とを含む組換えPrBPを作製する方法もまた、本発明に含まれる。

【0009】

そのようなPrBPは、プリオン関連疾患及び非プリオン関連疾患、例えば筋ジストロフィーのような変性症候群、及び異常な細胞増殖または異常な細胞死を含む障害の検出及び治療のため有用である。これらのPrBPは、プリオンタンパク

質を含有することが既知であるか、またはそのように推測される試料の除染のためにも有用である。

【0010】

もう一つの局面において、本発明は、PrP部分とアルカリホスファターゼ部分とを有する融合タンパク質も含む。好ましくは、このタンパク質には、PrPドメインの結合的及び機能的な能力が完全に維持されている。そのようなPrP-AP融合タンパク質は、細胞、組織、体液、またはその他の生物試料中のPrPBPまたはPrP^{S^c}の標識、検出、または同定のための有用なアフィニティ試薬を提供する。

【0011】

さらに、PrP-AP融合タンパク質は、細胞試料中のPrPBPタンパク質の同定及びアフィニティ精製を容易にし、PrPBPコード配列のクローニングも容易にする。本発明に係る一つの特定の方法においては、最小限のバックグラウンド表面PrPBPを発現するカエル卵母細胞に、cDNAのライブラリープールまたはクローンからインビトロ転写されたmRNAを注入し、PrP-AP融合タンパク質と接触させ、PrP-APが結合するタンパク質を発現する細胞を同定し、それにより、PrPBPをコードするcDNAクローンを明確に同定することができる。それらの細胞からcDNAを精製することにより、PrPBPコード配列が容易に回収されうる。

【0012】

関連した局面において、本発明は、生物試料中のPrP^{S^c}を検出するための方法及びキットを特徴とする。好ましい態様において、本方法には、(a)生物試料とPrPBPまたはその断片もしくは類似体とを接触させる段階；及び(b)PrP特異的(即ち、PrP^CまたはPrP^{S^c}のいずれかと特異的に結合する抗体)またはPrP^{S^c}特異的のいずれかでありうる二次PrP抗体を使用して、PrPBPと該生物試料中のPrP^{S^c}との複合体形成を検出する段階が含まれる。PrP特異的抗体を使用する場合には、PrP^C対照からの閾値シグナルを確立し、この閾値を越えるシグナルを、PrP^{S^c}陽性試料の指標とする。PrP^{S^c}特異的抗体を使用する場合には、PrP^{S^c}陽性試料は陽性シグナルを生じるが、正常対照はバックグラウンドシグナルしか示さないため、この対照段階は不要である。

【0013】

生物試料中のPrP^S°を検出するためのもう一つの好ましい態様においては、(a) 生物試料とPrBPとを接触させる段階；(b) (例えば、タンパク質分解により) 生物試料中のPrP^Cを破壊する段階；及び(c) PrBPと生物試料中のPrP^S°との複合体形成を検出する段階が含まれる。そのような複合体形成の検出は、生物試料中のPrP^S°の存在の指標として扱われる。検出アッセイ法において使用されるPrBPは、融合タンパク質(例えば、PrBP-AP)、またはPrP^S°と結合するPrBPの断片もしくは類似体でありうる。好ましい態様において、複合体形成は、直接標識されたPrBP(または、その断片もしくは類似体)を使用して検出される。もう一つの好ましい態様において、複合体形成は、例えばPrBP(または、その断片もしくは類似体)に対する抗体を使用することにより、間接的に検出される。さらにもう一つの態様において、PrP^S°の検出は、生物試料中に存在する非標識PrP^S°によるPrBP: PrP^S°複合体内の標識PrP^S°の置換を測定することにより決定される。または、生物試料中のPrP^S°は、(a) 限定された量の標識PrP(例えば、PrP-AP、コンフォメーション依存的PrP-アルカリホスファターゼ融合タンパク質)の存在下で生物試料とPrBPとを接触させる段階；(b) (例えば、タンパク質分解により) 生物試料中のPrP^Cを破壊する段階；及び(c) 生物試料中の非標識PrP^S°によるPrBP複合体からの標識PrPの置換を検出する段階により検出されうる。そのような置換の検出(即ち、PrP^S°-PrBP複合体形成の検出)は、生物試料中のPrP^S°の存在の指標として扱われる。

【0014】

もう一つの関連する局面において、本発明は、生物試料からPrP^S°を除染するための方法及びキットを特徴とする。好ましい態様において、本方法は、(a) PrBP: PrP^S°複合体形成の形成が許容されるよう、十分な時間、PrBP(または、その断片もしくは類似体)またはPrBP融合タンパク質により生物試料を処理する段階；及び(b) 生物試料からPrBP: PrP^S°複合体を回収する段階を含む。そのような除染法は、PrP^S°の除去または不活化のための、PrBP(または、その断片もしくは類似体)による生物試料(例えば、移植用に調製された細胞または臓器)の灌流の使用も含む。

【0015】

もう一つの態様において、PrBPB（または、その断片）と結合したPrP^{S[°]}は、抗PrP抗体により検出されうる。

【0016】

PrP^{S[°]}と結合するPrBPBは、診断またはその他のアッセイ法においてPrP^{S[°]}を定量するために使用されうる。

【0017】

あるPrBPBがPrP^{S[°]}と結合せず、代わりにPrP^Cとのみ結合する場合、そのPrBPBは、PrP^{S[°]}及びPrP^Cの両方を含有する試料からPrP^Cを除去するために使用されうる。次いで、PrP^{S[°]}及びPrP^Cの両方と結合する抗体が、試料中に残存しているPrP^{S[°]}を検出するために使用されうる。

【0018】

さらにもう一つの関連する局面において、本発明は、動物（例えば、ヒト）におけるプリオン疾患を治療または予防する方法を特徴とする。好ましい態様において、本方法は、PrBPB: PrP^{S[°]}複合体形成と拮抗するか、PrP^CからPrP^{S[°]}への変換を遮断するか、またはPrBPB: PrP^{S[°]}複合体により媒介される生物学的活性を阻害する、治療的に有効量の化合物を動物へ投与することを含む。さらにもう一つの好ましい態様において、本方法は、PrP^CからPrP^{S[°]}への変換に拮抗する治療的に有効量の化合物を動物へ投与することを含む。

【0019】

もう一つの治療法において、本発明は、動物におけるPrBPB: PrP^{S[°]}複合体により媒介される生物学的活性を抑制する方法を特徴とする。好ましい態様において、本方法は、PrBPB: PrP^{S[°]}複合体相互作用を阻害する化合物（例えば、PrBPBに対する抗体、PrBPB、またはその断片もしくは類似体）を、動物へ投与することを含む。さらに、PrBPBによる処理は、PrP^CとPrP^{S[°]}との相互作用を予防することにより、体内の細胞毒性シグナルの生成を遮断しうる。

【0020】

もう一つの局面において、本発明は、PrBPB（または、その断片もしくは類似体）とPrPとの結合相互作用を減少させる能力について化合物を同定する方法を特徴とする。好ましい態様において、本方法は、(a)化合物とPrBPB及びPrPと

を混合する段階；(b)化合物の存在下でPrBPとPrPとの結合を測定する段階；並びに(c)化合物が、対照試料と比して、PrBPとPrPとの結合を減少させるか否かを同定する段階を含む。

【0021】

もう一つの治療法において、本発明は、PrBPの機能的活性化を抑制することにより、神経変性症候群を治療する方法を特徴とする。好ましい態様において、本方法は、PrBPからの細胞内シグナルの生成を遮断または増強する化合物、例えば低分子のアンタゴニストもしくはアゴニスト、ペプチド、またはペプチド模倣体(peptidomimetic)を動物へ投与することを含む。

【0022】

ある種の疾患、例えば、神経変性疾患、癌、及び免疫学的障害は、PrBPであるカドヘリンとPrP^cとの相互作用を増加または減少させる分子を投与することにより治療されうる。例えば、カドヘリンの全部またはPrP結合部分が、内因性カドヘリンとPrP^cとの相互作用を妨害するために使用されうる。さらに、神経変性疾患、癌、及び免疫学的障害の治療にとって有用な化合物は、選択された試験化合物が、カドヘリンとPrP^cとの結合を増加または減少させるか否かを決定することにより同定されうる。

【0023】

「プリオン結合タンパク質」または「PrBP」とは、飽和可能かつ置換可能な様式で「プリオンタンパク質」または「PrP」と結合する任意のタンパク質を意味する。好ましくは、この結合はまた、通常の生理学的条件下で「高親和性」であり、かつコンフォメーション依存的である。本発明に係るPrBPは、好ましくは、それらの通常の細胞内存在時間の少なくとも一部にわたり、細胞表面に存在するが、その時間の全部または一部にわたり、宿主細胞の細胞質、細胞質小器官、または核に天然に存在してもよい(または存在するよう操作されていてもよい)。PrBPは、特定の細胞、組織、または臓器に、タンパク質ファミリーとして存在してもよく、任意の生物(特に、ヒト、または家畜、例えばヒツジ、ウシ、ネコ、及びヤギのような哺乳動物)に由来するPrBPが、本発明に含まれる。

【0024】

「高親和性」とは、100 μ M未満、10 μ M未満、1 μ M未満、100nM未満、好ましくは10nM未満、より好ましくは2nMまたはさらには1nM未満の（プリオンタンパク質とPrPBPとの）親和性定数を意味する。

【0025】

「飽和可能な」結合とは、ある一定の最大レベルに達した後、増加が停止する（プリオンタンパク質とPrPBPとの）結合を意味する。それは、タンパク質のうちの1つの結合部位の数に限界があること、及びこれらの結合部位が特異的であることを示している。これは、非特異的に細胞表面と接着するタンパク質に特徴的な、非特異的な、継続的に増加する結合とは対照的である。

【0026】

「コンフォメーション依存的な結合」とは、正常な生理学的結合特徴が完全に維持されるよう、適切に翻訳後修飾され、折り畳まれ、輸送された非変性タンパク質において起こる結合を意味する。

【0027】

「競合的」結合とは、非標識型のタンパク質のうちの1つ（例えば、PrP）の濃度を増加させることにより漸進的に阻害される（プリオンタンパク質とPrPBPとの）結合を意味する。

【0028】

「プリオン疾患」とは、急速に進行する致命的な治療不可能な脳変性障害の群であり、ヒトのクロイツフェルト-ヤコブ病（CJD）、クールー、ゲルストマン-シュトロイスラー（Gerstmann-Straussler）症候群、及び致命的家族性不眠症（Prusiner、Science 252:1515～1522、1991）、ヒツジ及びヤギのスクレイピー、並びにウシ海綿状脳症を含み、最近記載されたその他の反芻動物及びネコのプリオン疾患も含むが、これらに限定されることはない。

【0029】

「プリオン疾患の治療」とは、プリオン疾患と関連した任意の症状、特に海綿状変化、ニューロン細胞損失、星状膠細胞増殖、PrP^{Sc}タンパク質の蓄積、痴呆、及び死亡を引き起こすものを減少させるか、予防するか、またはそれらの開始を遅延させる能力を意味する。

【0030】

「実質的に純粋な」とは、少なくとも60重量（乾燥重量）%が対象となる化合物である調製物を意味する。好ましくは、調製物は、少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも90重量%、最も好ましくは99重量%が対象となる化合物である。純度は、任意の適切な方法、例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動またはHPLC分析により測定されうる。

【0031】

「精製されたDNA」とは、それが由来する生物の天然に存在するゲノムにおいて直接連続しているコード配列（5'末端上に1個及び3'末端上に1個）の両方と直接連続していないDNAを意味する。従って、その用語は、例えば、ベクター；自律複製性のプラスミドもしくはウイルス；または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAへ組み込まれている組換えDNA、または他の配列と無関係な別個の分子（例えば、PCRもしくは制限エンドヌクレアーゼ処理により作製されたcDNAもしくはゲノムDNA断片）として存在する組換えDNAを含む。それは、付加的なポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAも含む。「形質転換された細胞」とは、組換えDNA技術により、（本明細書において使用されるように）PrPBPをコードするDNA分子が導入されている細胞（またはそのような細胞の子孫）を意味する。

【0032】

「発現のため位置している」とは、DNA分子が、配列の転写及び翻訳を指図する（即ち、例えばPrPBPの産生を容易にする）DNA配列と近接して位置していることを意味する。

【0033】

「精製された抗体」とは、それが天然に会合しているタンパク質及び天然に存在する有機分子が排除されている、少なくとも60重量%の抗体を意味する。好ましくは、調製物は、少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも90重量%、最も好ましくは少なくとも99重量%が抗体、例えばPrPBP特異的抗体である。精製されたPrPBP抗体は、例えば、組換え作製されたPrPBPを使用したアフィニティークロマトグラフィ及び標準的な技術により入手されうる。

【0034】

「特異的に結合する」とは、PrPBPを認識し、それと結合するが、天然にPrPBPを含んでいる試料、例えば生物試料中の他の分子を認識し、それと結合することは実質的にない抗体を意味する。

【0035】

「アルカリホスファターゼ」とは、検出可能なシグナルを生成させることができるアルカリホスファターゼタンパク質の任意の部分の意味する。

【0036】

前述のように、本発明は、プリオン疾患の診断及び治療のための2つの極めて重要な進歩を提供する。第一に、本発明は、PrPBPを同定し単離するため、そしてこれらのPrPBPをコードする遺伝子またはcDNAをクローニングするために使用されうるPrP融合タンパク質を提供する。特に、一つの好ましいPrP融合タンパク質は、アルカリホスファターゼ融合を使用する。このPrP-APタンパク質は、多数の利点を有する。例えば、PrP-APタンパク質は、PrPBPとの結合（特に、高親和性の結合）にとって必要でありうるPrPの正常な構造への影響を最小限にするという利点を有する。また、PrP-AP融合体は、従来のPrP発現構築物よりも優れた利点である、正常な細胞性PrP機能を誘発する能力を保持している。おそらく最も重要なこととして、本発明のPrP-AP融合タンパク質は、PrPBPと特異的に、かつ高親和性で結合することができる。従って、この融合タンパク質は、組織起源からPrPBPを分離または単離するための有用なアフィニティ試薬を提供する。これは、新規なPrPBPを同定するための手段を提供し、且つタンパク質微量配列決定のため、及びcDNA配列またはゲノム配列のクローニングのための（例えば、ゲル上の新規タンパク質バンドとして）これらのタンパク質の迅速な精製を許容するため、有利である。一つの特定の技術において、PrP-AP融合タンパク質は、cDNAライブラリーからインビトロ転写されたmRNAを微量注入したカエル卵母細胞をスクリーニングし、融合タンパク質との特異的結合を示すクローンを選択することによる、新規PrPBPの同定及びクローニングのため使用されうる。このPrPBPスクリーニングの方法は、通常は細胞において極めて低いレベルで発現しているPrPBP、または通常はPrP-AP結合に接近不可能であるかもしれないPrPBPの同定を許

容するため、有利である。さらに、PrP-AP融合タンパク質は、容易に測定可能な酵素であるアルカリホスファターゼを含むため、この融合タンパク質は、実験的または診断的な条件下でのPrPBPの定量及び可視化のための有用なツールを提供する。

【0037】

もう一つの重要な局面において、本発明は、初めて、飽和可能かつ置換可能な様式でプリオンタンパク質と結合するプリオンタンパク質結合タンパク質を提供する。そのようなPrPBPは、多数の利点を有する。第一に、これらのタンパク質はPrPと特異的に結合するため、検出可能マーカーで標識され、細胞、組織、または生物学的体液の中のPrP^{S^c}の存在についてアッセイするための容易な手段を提供しうる。また、これらのタンパク質は、標識された場合、PrPと結合する他の薬剤の同定のための薬物スクリーニングプロトコール（例えば、競合的結合アッセイ法）において使用されうる。また、PrP^{S^c}との特異的かつ飽和可能な結合親和性のため、PrPBPは、二次的な分離技術によりPrP^{S^c}を除去することによる、または体内のPrP^{S^c}の動員活性を中和することによる、感染した細胞、組織、または生物学的体液の治療のための優れた候補を提供する。PrPBPは、また、プリオン疾患に罹患した患者を治療するために使用され得るという点でも有利である。例えば、PrPBP、それらのペプチド断片、または類似体は、体内へ注入された場合、いずれかのプリオンタンパク質と結合することにより、PrP^CからPrP^{S^c}への変換を予防するために使用されうる。

【0038】

前記利点に加え、本明細書において同定されたPrPBPのうちの少なくとも1個は、種選択的でなく、ヒト、マウス、及びウシを含む多数の異なる種に由来するPrPと結合することが示されている。本明細書に記載されたPrPBPが様々な種に由来するPrPと結合するのは、PrPBPとの結合を担っているPrPエピトープが、高度に保存されていることが示されているアミノ末端配列に由来するという事実による可能性が高い。

【0039】

本発明のその他の特徴及び利点は、記載された説明及び特許請求の範囲より明

らかになると思われる。

【0040】

詳細な説明

PrP-AP融合タンパク質は、PrPBPのマーカールおよび「アフィニティー試薬」として働くように構築した。新規PrPBPは選択したマウス細胞株の表面上で検出した。これらのPrPBPは、PrP-AP融合タンパク質のPrP部分と高親和性で、競合的、飽和的でコンフォメーション依存的に結合した。

【0041】

PrP結合タンパク質検出系の開発

PrPBP検出系を開発するために、プリオンタンパク質およびアルカリホスファターゼ部分を含む可溶性組換え融合タンパク質（PrP-APと命名する）は、選択したヒト胎盤熱安定性APのインフレームでのマウスPrP遺伝子から構築した（図1A）。マウスPrP断片(Lochtら、PNAS 83: 6372~6、1986; GenBankアクセッション番号M13685)はマウス脳cDNAから標準的なPCRによって作製し、開始メチオニン（従ってPrPリーダー配列を含有する）からGPIアンカー結合シグナル配列の開始部のArg²²⁹（従ってGPIアンカーの結合を除去する）までのオープンリーディングフレーム全体を含んだ。この配列を増幅するために使用したPCRプライマーを以下に示す：

5' AGA CAT AAG CTT GCA GCC ATC ATG GCG AAC CTT GGC 3'

（フォワードプライマー）（配列番号：3）；および

5' GAG ATT GGA TCC TCT TCT CCC GTC GTA ATA G 3'

（リバースプライマー）（配列番号：4）

これらのプライマーは、カセット挿入部位の下流にAP遺伝子を含有するAPtag-2発現ベクター(ChengおよびFlanagan、Cell 79: 157~168、1994)のHinfIII-BglII部位へ後にライゲーションするために適当な制限酵素切断部位（フォワード：HindIII、リバース：BamHI）を含有するように設計された。PCR産物がこのベクターにライゲーションされると、BamHI-BglII結合が融合タンパク質のプリオン部分とアルカリホスファターゼ部分の間にGly-Ser-Ser-Glyリンカーを生じる。APtag-2発現ベクターはSV40複製起点およびCMVプロモーターを含有し、COS細胞にお

けるベクター増幅および高レベルの融合タンパク質産生を可能にする。融合タンパク質のAP部分のみへのタンパク質結合の可能性を検出するために、CMVプロモーターおよびSV40起点を含有するpCDNA1ベクター(Invitrogen, San Diego, CA)に由来する、それ自身のリーダー配列を有するAPが発現され、CMV/SEAPと命名された(図1B)。

【0042】

PrP-AP融合タンパク質はPrP^oおよびAPの免疫学的決定基を含有する

COS細胞は、標準的なDEAE-デキストラン技法によってPrP-AP融合タンパク質ベクターまたはCMV/SEAPベクターのいずれかをトランスフェクトされた。予測されるように、³⁵[S]-メチオニンと共にインキュベーションし、標準的な技法により(「抗体実験マニュアル(Antibodies, A Laboratory Manual)」Harlow & Lane、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY、1988)、APモノクローナル抗体(MIA 1801、ヒト胎盤; Medix Biotech, San Carlos, CA; レーン3)で免疫沈降させたPrP-AP-トランスフェクトCOS細胞上清(図2、レーン3および4)はAPの存在およびPrP-APベクターの設計に一致する97 kDの顕著なバンドを示した。同じ上清とPrPウサギポリクローナル抗体(Bendheimら、Nature 310: 418~21、1984; レーン4)との免疫沈降でも、97 kDのバンドを生じ、PrP-AP-トランスフェクトCOS細胞は、APおよびPrP抗体両方に免疫反応性である97 kDタンパク質を分泌したことを示した。予測されるように、³⁵[S]-メチオニンと共にインキュベーションし、上記のように(レーン1)抗AP抗体で免疫沈降させたCMV/SEAP-トランスフェクトCOS細胞上清(図2、レーン1および2)は、APの分子量および免疫反応性に一致する67 kDタンパク質を示した。これらの同じCOS細胞上清を、PrPに対するポリクローナル抗体で免疫沈降すると、67 kDタンパク質は検出されず、CMV/SEAPタンパク質内にプリオン部分が存在しないことが示された。

【0043】

PrP-APおよびAPは、上清1mlあたり約5 μgの濃度でトランスフェクトしたCOS細胞によって発現および分泌され、共に同様の上清AP活性を示した(Chenおよびlanagan、Cell 79: 157~168、994に記載されているように測定した)。トランスフェクトされていないCOS細胞およびmock-トランスフェクトCOS細胞の上清は検

出可能なAP活性または免疫検出可能なPrP^oを含有しなかった。このデータは、PrP-AP結合タンパク質の分布、機能および分子的なアイデンティティーを決定するために使用したPrP-AP「アフィニティー試薬」の構築および発現の成功を実証した。

【0044】

選択した細胞株の表面のPrPBpの検出

PrP-APタンパク質が細胞のPrPBpを検出することができるかどうかを判定するために、マウス、ヒト、霊長類および神経/神経芽細胞腫細胞系から誘導したものを含むいくつかの異なる細胞株を60 mmプレートで集密化するまで(約100,000細胞) DMEM/10%ウシ胎児血清(FCS)と共に培養した。これらの細胞をリン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄し、PrP-AP融合タンパク質もしくはCMV/SEAPタンパク質(すなわち、PrP部分を欠損する)をDMEM/5%FCSに加えたものを含有する3mlのCOS細胞上清またはmock-トランスフェクトCOS細胞の馴化培地(conditioned media)と共に室温において75~90分間インキュベーションした。PrP-AP-トランスフェクト細胞上清は平均500 OD単位/時間のAP活性を発現し(ChengおよびFlanagan(上記))、約5 µg/mlのPrP-AP融合タンパク質の存在を示した。その後、細胞を洗浄し、溶解し、65 °Cにおいて10分間加熱して内因性ホスファターゼを不活性化し、上記のようにPrP-APの熱安定性アルカリホスファターゼ活性を測定した。特に、AP活性は、ELISAリーダー(EAR 400 AT Easy Reader, SLT Instruments, Austria)によって405 nmにおいて測定したとき、p-ニトロフェニルホスフェートの黄色産物への変換によって測定した。

【0045】

3種の異なるマウス細胞株から得られた結果を図3に例示する。NIH 3T3およびL929細胞は胎仔線維芽細胞由来であり、G8細胞は筋芽細胞腫(筋系統)である。

【0046】

ヒト神経芽細胞腫株SK-N-SHおよびSK-N-MC並びに神経膠腫細胞株U87およびU373、ヒト腎内皮(HEK)細胞、霊長類COS細胞、マウスおよびヒト末梢リンパ球、並びにマウスおよびヒト解離性脳細胞も陽性である。PrPBpは実際には偏在的であり、種制限的な結合を示すとは思われない。しかし、それらは末梢赤血球および

アフリカツメガエル卵母細胞から欠損している。

【0047】

PrP-AP-トランスフェクトCOS細胞の上清から誘導したPrP-AP融合タンパク質と共にインキュベーションした場合に、熱処理したG8、NIH 3T3およびL929細胞株において高レベルのAP活性が検出された(図3の「prpap」)。この結果は、PrPB PはG8、NIH 3T3およびL929細胞型の表面に大量に存在して、PrP-AP融合タンパク質由来のPrPと高親和性で結合することができることを示している。これらのマウス細胞株をmock-トランスフェクトCOS細胞上清に由来する馴化培地と共にインキュベーションしたとき、AP活性はほとんどまたは全く検出されなかった(すなわち、PrP-AP融合タンパク質が存在しない場合、図3の「対照」を参照)。また、これらの細胞株をCMV/SEAP-トランスフェクトCOS細胞の上清と共にインキュベーションした場合に、AP活性はほとんどまたは全く検出されなかった。これは、G8、NIH 3T3およびL929細胞株においてAP活性の増加が検出されることは特異的なPrPB Pの検出によるものであり、PrP-AP融合タンパク質のAP部分だけへの他のタンパク質の結合によらないことを示している。これらの実験において、SEAPおよびPrP-AP上清は等しいアルカリホスファターゼ活性(1時間あたり~500 OD単位/時間)を含有した。筋細胞が高レベルのPrPB Pを発現したという事実は、PrP^oを過剰発現するトランスジェニック動物における選択的な脆弱性に一致している(Westawayら、Cell 76: 117~129、1994)。

【0048】

異なる技法を使用してPrPB Pを検出し、それらの細胞内局在化を測定するために、懸濁状態の細胞をPrP-AP融合タンパク質で標識し、間接的免疫蛍光アッセイ法を使用した。プロテアーゼを使用しないで細胞を機械的に分離し、ハンクス液(Hank's Buffered Salt solution: HBSS)中で粉砕し、PrP-APまたはAPタンパク質と共に60分間室温においてインキュベーションし、氷冷HBSSで3回洗浄し、次いで抗APモノクローナル抗体(MIA 1801、ヒト胎盤、Medix Biotech, San Carlos, CA)と共に氷上で30分間インキュベーションした。その後、細胞を4℃において維持し、再度洗浄し、フルオレセインイソチオシアネートに結合したヤギ抗マウスIgG(Jackson Immunoresearch, Philadelphia, PA)と共にインキュベーション

し、洗浄し、蛍光顕微鏡(Orthoplan fluorescence microscope)またはフローサイトメトリー(Facscan; Becton Dickinson, Oakville, Ontario, Canada)によって調査した。

【0049】

G8細胞(マウス筋細胞株)の蛍光顕微鏡の結果を図4に例示する。細胞表面の明らかな標識化がPrP-APタンパク質と共にインキュベーションしたG8細胞において検出されたが(図4、左側のパネル)、APタンパク質単独の場合には検出されなかった(図4、右側のパネル)。これらの結果は、特異的なマウスPrPBPがG8細胞の細胞表面に存在することを示した。COS細胞、NIH 3T3およびL929細胞を含む他の細胞株はG8について記載するものと同様の結果を示した。

【0050】

N末端の10~20アミノ酸を欠損するPrP-AP調製物(偶発性タンパク質分解による)は細胞表面に結合せず、受容体への結合にPrP N末端を必要としている。この所見はペプチド競合実験によって裏付けられた(以下参照)。

【0051】

G8および他の細胞株の表面のPrPBPに結合しているPrP部分を同定するために、上記のものと等価であるが、PrPタンパク質の選択されたドメインに特異的である遮断性ドメイン抗体の存在下において実験を行う。この目的に有用な特定の遮断性ドメイン抗体には、例えば、PrPカルボキシル末端に特異的な抗体(「タンパク質X」によって種特異的な結合を決定すると仮定; Tellingら、Cell 83: 79~80、1995)、中央のコドン領域96~176位に特異的な抗体(PrP^cからPrP^Sへの認識-変換およびPrP^cペプチドのアポトーシス特性に重要であると仮定; Forloniら、Nature 362: 543~546)およびアミノ末端オクタペプチド反復領域(家族性CJDに主に出現する; Prusiner、Ann. Rev. Microbiol. 48: 655~686、1994)の抗体が挙げられる。次いで結合ドメインの構造的な特徴およびアミノ酸配列を利用して、PrPBPに高親和性で結合する他の化合物を開発する。

【0052】

EDTAおよびEGTAに対して透析したPrP-APは細胞表面への結合を示さず、これは1mMの硫酸銅の添加によって回復した。N末端の10~20アミノ酸を欠損するPrP-AP

調製物にCuSO₄を添加しても、銅結合に関与するオクタペプチドドメインが保持されていても細胞表面結合を回復しなかった。これらのデータは、結合反応が銅自体によって媒介されるのではなく、結合を容易にするためのPrPのN末端の銅誘導性のなんらかの構造変化によって媒介されることを示唆した。

【0053】

PrP-APはグリコシル-ホスファチジルイノシトール変異細胞JY5(表面PrP^oを欠損する)に、JY25細胞(細胞細胞表面PrP^oを保有する)に対するのと同様に等しく結合する。従って、PrP^oが同種(自己-自己)結合に関与する場合には、これはPrP-APの細胞表面受容体だけではありえない。

【0054】

PrPBP結合の特徴付け

PrPBPが競合的にPrPに結合するかどうかを判定するために、³⁵[S]-標識PrP-APを、PrP-AP結合活性を以前に示した細胞株で評価した。35 mmの培養皿で集密化するまで増殖した細胞を、以前に記載したように、予め³⁵[S]-メチオニンを代謝的に標識しておいたPrP-AP融合タンパク質をトランスフェクトしたCOS細胞の上清と共にインキュベーションした。その後、細胞を洗浄し、溶解し、 γ -カウント法により結合放射活性を定量した。

【0055】

NIH 3T3細胞の結果を図5に示す。³⁵[S]-標識PrP-APとPrPBPとの結合は、非標識PrP-APの濃度を増加させてインキュベーションすることによって阻害され、非標識PrPによる標識PrPの競合的な置換を実証している。さらに、PrPBPへの結合(³⁵[S]-標識PrP-APによる)はCMV/SEAP融合タンパク質由来のAPの濃度を増加させてインキュベーションしても阻害されず、これは結合が融合タンパク質のPrP部分を介して生じており、AP部分を介していないことを示している。

【0056】

PrPBPとPrPの結合親和性並びに所定の細胞集団に存在する総結合部位数を測定するために、G8細胞を使用してChengおよびFlanagan(Cell 79: 157~168, 1994)の技法の改良法によりScatchard分析を実施した。PrP-APおよびCMV/SEAPをトランスフェクトしたCOS細胞の上清をアミコン限外濾過細胞(Amicon ultrafiltratio

n cell) 中で濃縮し、次にHBHA緩衝液(0.5mg/mlのBSA、0.1% NaN₃、20 mMのHEPES(pH 7.0)を添加したハックス液)で連続希釈を行った。一連のリガンド希釈液と共に平衡インキュベーションした後、細胞をHBHAですみずみまで洗浄し、溶解し、上記のように結合AP活性について熱量的にアッセイした。結合PrP-APおよび総PrP-APをK_dアフィニティー検討のために測定した；B_{max}測定値(細胞あたりの結合部位数)はAPの比活性(1 pmolのPrP-APはアッセイ条件およびインキュベーション期間下において約3 OD単位に相当する)から算出した。コンピュータプログラムLIGANDを使用してScatchardデータをプロットし、解析した。G8細胞は~1 × 10⁵PrP-AP結合部位を有し、解離定数(K_d)は1.48 × 10⁻⁹M ~ 25 × 10⁻⁹Mの範囲であることが見いだされた。この高親和性の結合は特異的な受容体-リガンド相互作用に一致している。

【0057】

PrPのコンフォメーションがPrPBPへの高親和性結合に重要であるかどうかを判定するために、³⁵[S]-標識PrP-APを100 において5分間煮沸して、そのコンフォメーションを破壊した。この処理は完全にNIH 3T3細胞への結合をなくし、PrPタンパク質のコンフォメーションがPrPBPへの高親和性結合にとって重要であることを示した。

【0058】

PrPのPrPBPとの結合は、細胞増殖および生存度に影響を与えるものなどの生理的シグナルを伝達する

PrPBPの生理学的機能を測定するために、PrPBPを有することが既知なG8筋肉細胞株をPrP-APまたはAPタンパク質と共にインキュベーションし、細胞増殖を測定した。24ウェルプレート中の姉妹G8培養物を、25% v/vのPrP-APまたはAPを含有するCOS細胞中で3日間インキュベーションした。2つの発現タンパク質と共に3日間インキュベーションした後、8倍視野で培養ウェル中の細胞を計数した。結果は、G8筋原細胞株の自然増殖は、AP単独(283 ± 24.5細胞；p=0.002、マン・ホイットニーのノンパラメトリック検定法)と比較して、PrP-AP(64 ± 9.8SEM細胞)の存在下では抑制されることを示した。

【0059】

質的には、PrP-APに暴露したG8細胞培養物はAP暴露培養物より小型で相が暗く (phase dark) 非結合の細胞が多いと思われ、増殖の減少は細胞死の増加によることが示唆された (図6)。PrP-APに暴露したG8細胞培養物に観察された細胞数の低下は、PrPBPとPrP-APとの結合が、細胞増殖を阻害するまたは細胞死を促進するシグナルを伝達することを強く示唆している。

【0060】

PrPBPの特徴付け

上記のPrPBPが実際にタンパク質であることを明らかにするために、姉妹NIH 3T3細胞培養物を0.25%トリプシンの存在下または非存在下においてカルシウム不含HBSS中で室温において30分インキュベーションし、その後PrP-APとインキュベーションし、先に記載したように結合AP活性の熱量的評価を実施した。この比較的軽度なタンパク質分解は表面PrP-AP結合をバックグラウンドレベルまで完全に除くのに十分であった(対応のあるt検定により $P < 0.001$)。これらの結果は、PrPBPが実際にタンパク質であるか、または少なくともタンパク質骨格に存在するという知見に一致していた。

【0061】

ライブラリーの作製

2種類のpcDNA3.1プラスミドライブラリーを以下のようにG8細胞から作製した。総RNAはTRIzol (GIBCO BRL)を用いて抽出し、ポリA⁺mRNAはオリゴテックス (Oligotex) dT (Qiagen)を使用して単離した。2本鎖cDNAの合成は、dTまたはランダムヘキサマープライマーを用いたタイムセイバー (Time Saver) cDNAキット (Pharmacia)を使用して実施した。次いで、cDNAをT4 DNAポリメラーゼで平滑末端化し、Bam HIオリゴで調整し、S-500カラム (Pharmacia)でサイズ分画した。次いで、サイズ選択したcDNAをpcDNAaにライゲーションし、このライブラリーを標準的な技法によって高効率コンピテント大腸菌 (E. coli) 細胞 (Invitrogen) にエレクトロポレーションした。

【0062】

プラスミドの作製、インビトロにおける転写およびマイクロインジェクション

両pcDNA3.1プラスミドライブラリーは約 0.5×10^6 の独立クローンを含んだ。Pr

PrリガンドのmRNA量は「中の下」(転写物の0.01%の範囲)であり、適切な配向の全長cDNAが細胞の対応するmRNAの約1/10の頻度でpCDNA3にうまくクローニングされたと仮定して、本発明者らは、1つの陽性クローンを同定するためには $1-5 \times 10^5$ クローンを調査しなければならないだろうと控えめに推定した。ライブラリーを大腸菌(*E. coli*)中で増幅して各々1,500~2,000クローンのプールを得た。個々のプールをレプリカプレートにして、一方のフィルターを増殖させてプラスミドDNAを作製するために使用し、他方を保存した。プールからのプラスミドはプラスミドMIDIキット(Qiagen)を用いて作製し、mRNAをインビトロで転写し、message mMachine(Ambion, Austin TX)を使用してプールから作製した。アフリカツメガエル卵母細胞は先に記載されているように調製し(Seguela P.ら、*J. Neurosci.* 16: 448~455、1996)、ナノリッターインジェクター(World Precision Instruments)を用いて卵母細胞あたり50 nL(75~125 ngのmRNA)をマイクロインジェクションした。

【0063】

PrP-BPsのクローニングおよび特徴付け

本発明者らは、10~20卵母細胞は、PrP-AP結合を容易に検出することができる500,000個のG8細胞の膜領域を有すると推定した。卵母細胞は、室温においてPrP-AP上清と共にインキュベーションすることによってインジェクションの48時間後のPrPBP発現についてモニターした。次いで卵をHBHAで6回洗浄した。内因性細胞ホスファターゼを不活性化するための均一な加熱を65 °Cの加熱用ブロック中で実施した。結合AP活性は、0.33mg/ml NBTおよび0.17mg/ml BCIPをAP緩衝液(100 mM Tris-HCl、pH 9.5、100 mM NaCl、5 mM $MgCl_2$)に加えたものと共に0.5~12時間インキュベーションすることによって検出した。

【0064】

インジェクションシリーズの全てにおいて、ベクター(pcDNA3.1、Invitrogen)単独をインジェクションした卵を含む陰性対照およびELF-1プラスミドクローン(Changら、79: 157~168、1994)から調製し、MEK-4-AP融合タンパク質を使用して検出したmRNAをインジェクションした卵を含む陽性対照を含んだ。任意の有意なPrP結合を示さなかった33プール(約660の個別のアフリカツメガエル卵母細胞を

含む)をスクリーニングすることにより、34番目のプールがPrP-AP結合に対して陽性であることが見いだされた。以降のプールはPrP結合も陰性であった。適当なストック細菌培養物の希釈物によって、約200個のcDNAクローンを各々含有する10個のプールにプール34を分画化した。1つの陽性クローンが単離されるまで、これらのうち、最も高レベルのPrP結合を示すプールをさらに分画化するために選択した。結合活性について試験した32の個々のcDNAクローンのうち、クローン6がバックグラウンドと比較して最も高いレベルのPrP-AP結合活性を示した。クローン7は中程度のPrP-AP結合を示した。

【0065】

配列決定

クローン6および7のcDNAインサートを標準的な方法を使用して配列決定した。

【0066】

相同性を検索するために、EMBLおよびGENBANK核酸データベースの最新版をBLASTネットワークサーバー(National Library of Medicine)を使用して検索し、タンパク質データベースをBLASTおよびBLITZネットワークサーバー(Heidelberg)の両方を使用して調査した。

【0067】

クローン6のcDNAインサートはプロトカドヘリン-43の一部(プロトカドヘリン-43のアミノ酸67~252位)をコードした。クローン6のこの部分の核酸および推定アミノ酸配列を図7Aおよび図7Bに示す。プロトカドヘリン-43はSanoら(EMBO J. 12: 2249~2256, 1993)によって記載されている。プロトカドヘリン-43の配列情報は入手可能である: GENBANK L11373(プロトカドヘリン-43)。

【0068】

クローン7のcDNAインサートはOB-カドヘリン-1の一部(アミノ末端カドヘリン反復)をコードした。OB-カドヘリン-1(カドヘリン11としても周知である)はOkazakiら(J. Biol. Chem 269: 12092~12098, 1994)によって記載されている。OB-カドヘリン-1の配列情報は入手可能である: DBJ D21253(マウスOB-カドヘリン)(配列番号: 7および配列番号: 8)およびSwissProt P55287(ヒトOB-カドヘリン)(配列番号: 9)。

【0069】

一次および二次スクリーニング基準を満足するクローンが同定されたら、一連の実験を実施する。例えば、ハイブリダイゼーションするmRNA種のサイズを明らかにし、異なるサイズの多数の関連転写物が存在するかどうかを判定するためにノーザンブロット分析を実施する。異なる細胞、器官、および種のノーザンブロット、並びに異なる発育状態および疾患状態（特にマウススクレイピー）由来の組織を使用するブロットは細胞の特異性およびPrPBPの調節に関する重要な情報を提供する。細胞表面PrP-AP結合とPrPBP発現の矛盾は、PrPBPを可溶性の種として発現する細胞もあることを示唆していると思われる。また、アミノ酸配列を使用して、PrPBPに対する有用な抗体プローブの作製を容易にする免疫原性配列を同定する。生理的に適当なPrPBPの配列を同定することにより、プリオン疾患および他の神経変性疾患の理解をより深め、これらの疾患の治療法として相互作用を遮断するまたはこの伝達分子を不活性化する低分子治療薬の開発を可能にする数多くの検討も可能になる。

【0070】

別法において、PrP-APアフィニティーカラムおよび標準的なカラム精製技法を使用してPrPBPタンパク質を精製することによってPrPBPをクローニングすることができる。有用なPrPBP源には組織、細胞または膜ホモジネートが含まれる。カラム単離後、PrPBPを生化学的に特徴付け、分子量、pKおよびグリコシル化などの特性についての情報を得る。また、タンパク質を微細配列決定し、データベース検索および変性オリゴヌクレオチドを使用するcDNAクローニング並びにハイブリダイゼーションスクリーニングまたはPCR増幅の標準的な技法を容易にする。

【0071】

カドヘリン

カドヘリンは、最初、組織の発生的形成および維持における細胞-細胞認識および接着現象において、他の接着分子ファミリーのメンバー（インテグリン、免疫グロブリンファミリー接着分子、およびセレクトインを含む）と協力する、カルシウム依存的でホモフィリック(homophilic)な細胞-細胞接着分子として認識された。

【0072】

カドヘリンスーパーファミリーは、免疫グロブリン折り畳みのいくつかの三次構造特徴を共有する反復ドメインに折り畳まれる、細胞外「カドヘリンモチーフ」(約110アミノ酸を有する)の所有によって規定される異なる群のタンパク質を含む。一方、カドヘリンの細胞質ドメインは顕著に異なり、一部にはこれらの分子の広範に異なる機能を反映している。配列相同性分析は、カドヘリンスーパーファミリーが少なくとも2つのサブファミリー、典型的なカドヘリンおよびプロトカドヘリンと考えられることを示唆している。カドヘリンを4つの機能的なサブグループ、典型的なカドヘリン、デスモソーム型カドヘリン、プロトカドヘリン、および他のカドヘリン関連タンパク質に分類されると総説している他の研究者もいる(Suzuki, J. Cell. Biochem. 61: 531~542, 1996)。脳特異的なカドヘリンの新たなファミリーが最近同定され、カドヘリン関連神経受容体(CNR)と命名され、非受容体チロシンキナーゼfynを介してシグナル伝達する。

【0073】

最初に認識されたカドヘリンは、初期発生段階において分割球のカルシウム依存的圧密を媒介することが見いだされているE-カドヘリンまたはウボモルリンであった。最初の典型的なカドヘリンは全てホモフィリックな接着分子で、5つの細胞外カドヘリンドメインを有する。このグループ分けにはM-カドヘリン、N-カドヘリン、P-カドヘリン、およびR-カドヘリンが含まれる。さらに最近発見された典型的なカドヘリン(サブファミリーを構成することもある)にはカドヘリン5~13が含まれる。これらの新たな異型の「典型的な」カドヘリンのいくつか(カドヘリン5および8を含む)はL細胞にトランスフェクトされたときにホモフィリックな結合活性を示すとは思われないが、それらは細胞-細胞接触点においてカルシウム依存的な局在化を示し、ヘテロフィリック(heterophilic)なりガンドの存在を示唆している(Suzuki, J. Cell. Biochem. 61: 531~542, 1996)。ホモフィリックな結合を示す典型的なカドヘリンでさえも、E-カドヘリンへのインテグリン E7の結合(Cepek, Nature 372: 190~193, 1994)およびN-カドヘリンへの線維芽細胞増殖因子受容体結合によって示唆されているようにヘテロフィリック(heterophilic)結合リガンドを有する可能性がある。

【0074】

カドヘリンの多数のヘテロフィリック(heterophilic)リガンドも同定しなければならぬと思われる。本発明者らは、検出試薬としてPrP-AP融合タンパク質およびカエル卵母細胞発現系を使用して、プリオンタンパク質がカドヘリンタンパク質の新規リガンドとして作用することを実証した。

【0075】

典型的なカドヘリンの接着性で、特異性決定部位は、ほとんどのカドヘリンN末端ドメイン、EC1に含有されていると言われている(Shapiroら、Nature 374: 327~337、1995)。典型的なカドヘリンのほとんどの細胞質ドメインのC末端部は十分に保存されており、カテニンへのそれらの結合を反映している(Ozawaら、1990, Hiranoら、1992)。この規則の例外はT-カドヘリン(カドヘリン-13)およびカドヘリン-8のスプライシング変異体である。カドヘリン-13は膜貫通ドメインを有さないが、プリオンタンパク質と同様に、グリコシル-ホスファチジルイノシトール末端を介して細胞表面に固定され、カドヘリン8は、任意の種類の膜固定を完全に欠損している可溶性アイソフォームとして細胞より分泌されうる(Suzukiら、1996)。

【0076】

プロトカドヘリンは、細胞外カドヘリンドメインの所有により典型的なカドヘリンとの相同性を有する大型で完全には特徴付けされていない群のタンパク質である。しかし、特徴付けられたプロトカドヘリンは全て、典型的なカドヘリンのEC3およびEC5ドメインと最も顕著な類似性を有する5つより多くのカドヘリンドメインを有すると思われる(Sanoら、EMBO J., 12: 2249~2256、1993)。従って、典型的なカドヘリンのEC1結合モチーフはプロトカドヘリンに共有されない；結果として、プロトカドヘリンのホモフィリックな接着活性はこのファミリーのタンパク質の全ての既知のメンバーに共有されない。

【0077】

プロトカドヘリンはまた、典型的なカドヘリンのものとは異なる細胞質ドメインも有し、互いから、プロトカドヘリンの特殊化された機能的役割を示唆している。従って、プロトカドヘリンは新規であり現在未知のヘテロフィリック(heter

ophilic)な分子に結合することが仮定されている。

【0078】

カドヘリンの機能は現在完全には知られていない。明らかに、いくつかの典型的カドヘリンが発生段階における細胞層分離および形態形成に参与している。N-カドヘリンは軸索伸長に重要な役割を果たしている。カドヘリンはまた成熟組織における細胞-細胞認識の維持に参与しており、転移癌などの認識が欠失している疾患に参与する可能性がある。腫瘍発生における作用は、 β -カテニンのwntプロト-癌遺伝子産物の競合によって示唆されている。天疱瘡は、デスモソーム型カドヘリンの免疫認識によって媒介される自己免疫疾患である。カドヘリンはまた神経変性疾患、筋疾患、および免疫疾患に参与する可能性もある。カドヘリンに結合する際のプリオンタンパク質の関与により、カドヘリン機能に対するプリオンタンパク質の作用またはプリオン機能に対するカドヘリンの作用を妨害または増強する薬剤の開発が可能になる。

【0079】

有用なPrP-結合カドヘリンには、E-カドヘリン(ウボモルリン)、M-カドヘリン、N-カドヘリン、P-カドヘリン、R-カドヘリン、カドヘリン5、カドヘリン6、カドヘリン7、カドヘリン8(溶解型で分泌されうる)、カドヘリン9、カドヘリン10、カドヘリン11(0B-カドヘリン)、カドヘリン12、カドヘリン13(T-カドヘリン、細胞内ドメインを欠損し、GPI-結合している)、PC-1(プロトカドヘリン-42)、PC-2(プロトカドヘリン-43)、プロトカドヘリン3、プロトカドヘリン4(Pcdh3; GenBankアクセッション番号: AF131761およびAAD20038)、プロトカドヘリン5、プロトカドヘリン6、プロトカドヘリン7(BHプロトカドヘリン; GenBankアクセッション番号: AB006755、AB006756、AB006757およびAF04364)、プロトカドヘリン8(GenBankアクセッション番号: AF061573)、プロトカドヘリン9(AA858832)、OL-プロトカドヘリン(マウス; MMU88549)、カドヘリン関連神経受容体、Cnr1(D86919)、Cnr2(D86917)、Cnr3(AB008179)、Cnr4(AB008180)、Cnr5(AB008181)、Cnr6(AB008182)、Cnr7(AB008183)およびCnr8(AB008184)、並びにショウジョウバエ、マウス、およびヒト(X87241)由来のFAT遺伝子が含まれるが、これらに限定されることはない。これらのタンパク質のいくつかは、例えば、Sanoら、EMBO J

., 12: 2249 ~ 2256, 1993)およびSuzuki, J. Cell. Biochem. 61: 531 ~ 542, 1996に記載されている。

【0080】

PrPへのPrPBPの結合はカルシウム依存的である

典型的なカドヘリンは最初に、カルシウム依存的であるホモフィリックな細胞-細胞接着反応への関与に関して認識された。さらに別の研究では、カルシウムが接着相互作用自体には必要とされないが、カドヘリン折り畳みのカルシウム結合部位と反応して、分子を細胞表面でより強固で安定にすることが示された(Shapiroら、Nature 374: 327 ~ 337, 1995)。ホモフィリックな結合相互作用に関与しないカドヘリンファミリーメンバーでさえも、細胞-細胞接触点に局在化されるカルシウムによって誘導されることがある(ヘテロフィリック(heterophilic)なりガンドへの、カルシウム媒介性の結合を示唆している)。

【0081】

G8細胞およびCOS細胞の表面で最初に同定されたPrPBPがカドヘリタンパク質の主要な特徴(即ち、カルシウム依存的な結合)を有するかどうかをさらに検討するために、以下の実験を実施した。PrP-AP上清を2 mMのEDTAと共に室温において2時間インキュベーションして培地中のカルシウムをキレート結合させた。同時に、集密化したCOS細胞およびG8細胞を1 mM EDTAを含有するPBS中で5分間細胞がプレートの底から持ち上がるまでインキュベーションした。次いで、細胞をDMEM 5% FCSで1回洗浄し、対照細胞は1.3 mMのCaCl₂および1 mMのMgCl₂だけを含有するHBHA中でインキュベーションしたが、実験細胞は1 mM EDTAを含有するPBS中で室温において30分間インキュベーションして培地中のカルシウムを除去した。第1の群の陰性対照細胞をペレット化し、DMEM5%(PrP-APを含有しない)で再懸濁した。第2群の陽性対照細胞(培地にカルシウムが存在する)および第3群の実験細胞(EDTAで処理)はEDTA処理したPrP-AP中で室温において1.5時間再懸濁させ、次に冷却したHBHAで3回洗浄した。次いで、以前に記載されているように細胞を溶解し、それらの上清をPrP-AP活性について調査した。

【0082】

COS細胞およびG8細胞とPrP-APとの結合はカルシウムキレート剤EDTAの存在下

では有意に低下し (COS細胞およびG8細胞共に $P < 0.0001$ 、 $N=6$)、最適な結合のためには Ca^{2+} などの2価陽イオンの存在の必要性を示している。

【0083】

PrPへのPrPBPの結合はカルシウム依存的なトリプシン抵抗性を示す

カルシウムの結合は、おそらくプロテアーゼ感受性部位を遮蔽するコンフォメーション変化を誘導することにより、トリプシン消化から一部のカドヘリンを保護する (Takeichi, J. Cell. Biol. 75: 464:474, 1977)。G8細胞およびCOS細胞の表面において最初に同定されたPrPBPがカドヘリタンパク質の主要な特性 (即ち、カルシウムの存在下におけるタンパク質分解) への抵抗性を有するかどうかを判定するために、以下の実験を実施した。集密化したCOS細胞およびG8細胞を0.25%トリプシンおよび10 mM $CaCl_2$ を含有するPBS中で37 °Cにおいて20分間インキュベーションするか、または0.25%トリプシンおよび1 mM EDTAを含有するPBS中でインキュベーションし、次いでDMEM5%FCSで3回洗浄した。エッペンドルフチューブあたり約 1×10^6 細胞を分布させ、これらをHBHA培地で2回洗浄した。次いで、細胞をPrP-AP上清と共に室温において1.5時間インキュベーションし、その後冷却したHBHA中で3回洗浄した。次いで、細胞を50 mM Tris、150 mM NaCl、1% トリトン-X100、0.02% NaN_3 、pH 8.0中で氷上で溶解した。溶解物を微量遠心分離し、上清を加熱用ブロック上で12分間均一に65 °Cまでの温度に加熱して、内因性細胞ホスファターゼを不活性化した。結合AP活性は、NBTおよびBCIPをAP緩衝液 (100 mM Tris-HCl、pH 9.5、10.0 mM NaCl、5 mM $MgCl_2$ 、0.5 ~ 12時間) に加えたものと共にインキュベーションすることによって検出した。

【0084】

Ca^{2+} イオンの存在下では、PrP-APとのインキュベーションの前に細胞をトリプシンで処理したにもかかわらず、COS細胞およびG8細胞へのPrP-AP結合は維持された。 Ca^{2+} が存在しない場合には、トリプシン処理はPrP-AP結合を有意に低下させた (COS細胞は $P < 0.001$ 、G8細胞は $P < 0.05$ 、 $N=4$)。このデータは、カドヘリン分子の既知の特徴である、COS細胞およびG8細胞の表面上のPrPBP種が Ca^{2+} の存在下においてトリプシンのタンパク質分解から保護されることを示している (Takahashiら、Oncogene 8: 2925 ~ 2929, 1993)。従って、このデータは、PrPがカドヘ

リンファミリーメンバーに結合するという知見を裏付ける。

【0085】

ヒトPrBPの単離およびクローニング

ヒトPrBPは、マウス相同物について上記のように単離することができる。特に、組換えヒトPrP-AP融合タンパク質は、マウスPrP遺伝子の代わりにKretzschmarら(DNA 5: 315~324, 1986)によって記載されているヒトPrP cDNAを使用して本質的に上記のように構築される。ヒトPrP断片は、以下のプライマーを使用した標準的なPCR増幅によって作製される：

5' AGA CAT AAG CTT GCA GCC ATC ATG GCG AAC CTT GGC 3'

(フォワードプライマー) (配列番号：5) ; および

5' GAG ATT GGA TCC TCT CTG GTA ATA GGC CTG 3'

(リバースプライマー) (配列番号：6)

次いで、この断片をAPtag-2発現ベクターにインフレームでクローニングする (ChengおよびFlanagan、前記)。このベクターから発現される融合タンパク質産物を使用して、ヒトPrBPを上記のアフィニティー技法のいずれかによって単離する (例えば、ヒトPrBP産生細胞からの沈殿による)。単離されたタンパク質が実際にヒトPrBPであるという証明も上記のように実施することができる。

【0086】

一旦単離されたら、ヒトPrBPタンパク質を微量配列決定することができ、アミノ酸配列をハイブリダイゼーションスクリーニングまたは任意の適当なヒトcDNAまたはゲノムDNAライブラリーからヒトPrBPコード配列を増幅するためのPCRプライマーのためのオリゴヌクレオチドを設計するために使用することができる。

【0087】

または、ヒトPrP-AP融合タンパク質を使用して、pcDNA3.1クローニング系および上記の技法を使用してヒトPrBP発現cDNAクローンを単離する。または、好ましくは、さらに別の技法では、プローブとしてマウスPrBPコード配列 (上記) を使用してヒト脳cDNAライブラリーにおいて低ストリンジェンシーのスクリーニングを実施する。また、マウスPrBP配列をハイブリダイゼーションプローブと

して使用しても、または異なる種間で保存されている可能性のあるマウスPrBPB配列の領域に基づいてPCRプライマーをしてもよく、ヒト配列の増幅に使用してもよい。最後に、望ましい場合には、上記のように、マウスPrBPBの相同物をPrP-APアッセイ法において活性を試験することができる。

【0088】

PrBPBタンパク質発現

一般的に、本発明のPrBPBは、適した発現媒体におけるPrBPBコードcDNA断片の全てまたは一部による適当な宿主細胞の形質転換によって産生してもよい。

【0089】

分子生物学の分野の当業者は、組換えタンパク質を提供するために多様な異なる発現系を用いてもよいことを理解すると思われる。用いられる正確な宿主細胞は本発明にとって重要ではない。PrBPBは、原核細胞宿主（例えば、大腸菌）または真核細胞宿主（例えば、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、昆虫細胞、例えばSf21細胞、または哺乳動物細胞、例えばNIH 3T3、HeLa、もしくは好ましくはCOS細胞）において産生してもよい。そのような細胞は、広範な供給源から入手可能である（例えば、アメリカンタイプカルチャーコレクション（American Type Culture Collection）、ロックランド、メリーランド州；同様に、例えばアウスユベール（Ausubel）ら、「分子生物学の現行プロトコール（Current Protocols in Molecular Biology）」、ジョン・ウィリー＆サンズ、ニューヨーク、1994も参照のこと）。形質転換またはトランスフェクション法、および発現媒体の選択は、選択した宿主系に依存すると考えられる。形質転換およびトランスフェクション法は、例えば、アウスユベール（Ausubel）ら（上記）に記載されており；発現媒体は、例えば、「ベクターのクローニング：実験マニュアル（Cloning Vectors: A Laboratory Manual）」（P.H. Pouwelsら、1985、補則1987）に提供される媒体から選択してもよい。または、PrBPBは、安定的にトランスフェクトした哺乳動物細胞株によって産生してもよい。哺乳動物細胞の安定的なトランスフェクションに適した多くのベクターが公的に利用でき、例えばパウエルズ（Pouwels）ら（上記）を参照のこと。そのような細胞株を構築する方法も、例えば、アウスユベール（Ausubel）ら（上記）に記載の

ように公的に利用できる。一つの例において、PrPBPをコードするcDNAを、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子を含む発現ベクターにクローニングする。プラスミドの組み込み、したがって、宿主細胞染色体へのPrPBPコード遺伝子の組み込みは、細胞培養培地に0.01~300 μ Mメソトレキセートを含めることによって選択される (Ausubelら (上記))。この優性選択は、ほとんどの細胞タイプにおいて行うことができる。組換えタンパク質発現は、トランスフェクトした遺伝子のDHFRを介した増幅によって増加させることができる。遺伝子増幅を有する細胞株を選択する方法は、アウスユベール (Ausubel) ら (上記) に記載されている ; そのような方法は一般的に、メソトレキセートの漸増レベルを含む培地において長期間培養することを含む。この目的のために一般的に用いられるDHFR含有発現ベクターには、pCVSEII-DHFRおよびpAdD26SV(A)が含まれる (Ausubelら (上記))。上記の宿主細胞のいずれか、または好ましくはDHFR欠損CHO細胞株 (例えば、CHO DHFR細胞、ATCCアクセッション番号CRL 9096) は、安定的にトランスフェクトした細胞株のDHFR選択またはDHFRを介した遺伝子増幅にとって好ましい宿主細胞株である。

【0090】

組換えPrPBPが発現されると、それを例えば、アフィニティークロマトグラフィーまたはイオン交換クロマトグラフィーを用いて単離する。一つの例において、抗PrPBP抗体 (例えば、本明細書において産生される) をカラムに結合させて、これを用いてPrPBPを単離してもよい。アフィニティークロマトグラフィーを行う前に、標準的な方法によってPrPBP含有細胞の溶解および分画を行ってもよい (例えば、アウスユベール (Ausubel) ら (上記) を参照のこと)。

【0091】

単離されれば、組換えタンパク質は、望ましければ、例えば、高速液体クロマトグラフィーによってさらに精製することができる (例えば、Fisher、「生化学と分子生物学の実験技術 (Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology)」、ワーク&バードン (Work & Burdon) 編、エルゼビア、1980を参照のこと)。

【0092】

本発明のポリペプチド、特に短いPrPBP断片はまた、化学合成（例えば、「固相ペプチド合成（Solid Phase Peptide Synthesis）」第二版、1984年ピアスケミカル社、ロックフォード、イリノイ州に記載された方法）によって産生することができる。

【0093】

ポリペプチド発現および精製に関するこれらの一般的な技法はまた、有用なPrPBP断片または類似体（本明細書に記載）を産生および単離するために用いることができる。

【0094】

本発明の特に有用な断片には、細胞外PrPBPドメイン、例えば、プロトカドヘリン-43（PC2）アミノ酸29～244位と共に、より小さい断片EC1（アミノ酸29～135位）およびEC2（アミノ酸136～244位）が含まれる。

【0095】

抗PrPBP抗体

PrPBP特異的抗体を産生するために、PrPBPコード配列をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）とのC末端融合体として発現させてもよい（Smithら、Gene 67:31～40、1988）。融合タンパク質は、グルタチオン-S-セファロースビーズ上で精製して、グルタチオンによって溶出し、トロンビンによって切断して（操作された切断部位で）、ウサギの免疫にとって必要な程度に精製する。一次免疫は、フロイントの完全アジュバントを用いて行い、その後、フロイントの不完全アジュバントを用いて免疫する。抗体の力価は、GST-PrPBP融合タンパク質のトロンビン切断PrPBPタンパク質断片を用いて、ウェスタンブロットおよび免疫沈降によってモニターする。免疫血清をCNBr-セファロースカップリングしたPrPBPタンパク質を用いてアフィニティ精製する。抗血清の特異性は、無関係なGSTタンパク質のパネルを用いて決定する。

【0096】

GST融合タンパク質の代わりとして、または補助免疫原として、PrPBPの比較的独自の免疫原性領域に対応するペプチドを作製して、導入されたC末端リジンによってキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）にカップリングしてもよい。

これらのペプチドのそれぞれに対する抗血清は、BSAに結合したペプチド上で同様にアフィニティ精製し、ペプチド結合体を用いるELISAとウェスタンブロット、ならびにGST融合タンパク質として発現されるPrPBPを用いるウェスタンブロットおよび免疫沈降によって特異性を調べる。

【0097】

または、上記のPrPBPおよび標準的なハイブリドーマ技術を用いてモノクローナル抗体を調製してもよい(例えば、Kohlerら、Nature 256:495、1975; Kohlerら、Eur. J. Immunol 6:511、1976; Kohlerら、Eur. J. Immunol. 6:292、1976; Hammerlingら、「モノクローナル抗体とT細胞ハイブリドーマ(Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas)」、エルセビア、ニューヨーク州、1981; Ausubelら、上記を参照のこと)。産生した後、モノクローナル抗体はまた、ウェスタンブロットまたは免疫沈降分析によって特異的PrPBP認識に関して調べる(Ausubelら、上記の方法によって)。PrPBPを特異的に認識する抗体は、本発明において有用であると見なされる; そのような抗体は、例えばイムノアッセイ法において用いて、哺乳動物によって産生されたPrPBPレベルをモニターしてもよい(例えば、PrPBPの量または細胞内位置を決定する)。または、モノクローナル抗体は、上記のPrPBPおよびファージディスプレイライブラリーを用いて調製してもよい(Vaughanら、Nature Biotech. 14:309~314、1996)。

【0098】

好ましくは、本発明の抗体は、一般的に保存された領域外に存在し、荷電残基が高頻度で存在するというような基準によって抗原性である可能性があるように思われるPrPBPの断片を用いて産生する。一つの特定の例において、そのような断片は、PCRの標準的な技術によって産生され、pGEX発現ベクターにクローニングされる(Ausubelら、上記)。融合タンパク質を大腸菌において発現させ、アウスユベール(Ausubel)ら(上記)が記述したようにグルタチオンアガロースアフィニティマトリクスを用いて精製する。抗血清の低親和性または特異性に関して起こりうる問題を最小限にするために、各タンパク質についてそのような融合物質を2個または3個作製し、各融合体を少なくとも2羽のウサギに注入する。抗血清は、好ましくは少なくとも3回の追加免疫注射を含む、一連の注射によ

って作製する。

【0099】

交叉種PrPBP結合

上記のように、本明細書において同定された例としてのPrPBPの少なくとも一つ、すなわちPC2（プロトカドヘリン-43とも呼ぶ）は、種選択的ではなく、ヒト、マウスおよびウシを含む多くの動物からのPrPに結合する。同様に、下記のように、このことは、このPrPBPが非常に保存されたアミノ末端PrPペプチドに結合するという事実によって起こる可能性がある。

【0100】

本発明者らの実験において、ペプチド競合試験から、プリオンタンパク質の遠位アミノ酸末端に由来するこの非常に保存された11個のアミノ酸のペプチドが、PrPBPに富むことが示されているCOS細胞およびG8細胞表面に対するPrP-AP結合を有意に阻害できることが示された。これらの試験において、G8細胞を約100,000個/ウェルの割合で6ウェルプレートに播種した。10 mg/mlの保存溶液から、PrPの11量体ペプチド（KKRPKPGGWNT）または対照シュメルリンクペプチド（PrPアミノ酸100～130位）いずれか200 µlを、グレース培地で10倍希釈したPrP-AP 1.9 mlに加えた。10倍希釈マウスPrP-APの最終容量2 ml中に1 mg/mlペプチドを含むこの混合物をG8細胞含有ウェルに加え、室温で90分インキュベートした。次に、細胞をHBHA 2 mlによって6回洗浄し、溶解緩衝液（100 mM NaCl、10 mM EDTA、0.5% ノニデットP-40、0.5% デオキシコール酸ナトリウムのトリス塩酸溶液、pH 7.4）400 ml中で室温にて15分溶解した。次に、混合物を氷中で15分インキュベートした後、遠心して細胞破片を除去した。上清を新しい試験管に移して、65度で12分間インキュベートして、内因性AP活性を不活化した。PrP-APを、BCPIP基質（カークガード）と共にインキュベートすることによって可視化し、これによって着色反応産物が生成され、これを620 nmで定量する。COS細胞に対するPrP-APの競合的結合は、以下の例外を除いて、同様の方法で実施した：96ウェルプレート中の1ウェルあたり5000個の細胞を播種し、PrP 11量体ペプチドの滴定は、1 mg/mlから始めて連続3倍希釈で減少させる濃度を用いて行った。

【0101】

PrPの11量体は、G8細胞に対してPrP-AP結合の90%と競合したのに対し、対照シュメルリンクペプチドはいかなる作用も示さなかった(図8A)。さらに、PrP 11量体によるPrP-AP結合の競合は用量依存的であり、用いたPrPペプチドの量を漸減させると、競合は次第に減少した(図8B)。これらの結果は、PrPのこの11個のアミノ酸鎖が、その細胞表面受容体へのPrPの結合に関係していることを示した。

【0102】

ウシPrPに対するヒトPrPBP、PC2の結合

全ての実験において用いられる可溶性のヒトPrPBP、可溶性PC2は、その膜貫通ドメインを欠損するPC2遺伝子を含むプラスミドをCOS細胞に一過的にトランスフェクトさせることによって作製した。このプラスミドは、Hu-PC43 3' trunc/PC-1 neoと呼ばれた。これは、PC2の細胞外ドメイン6個全てと、選択マーカーとしてネオマイシン抵抗性遺伝子を含む。培養上清を培養5日後に回収して、ELISAによってPC2の有無を調べた。次に、陽性上清を少量採取して、-80℃で凍結した。マウスPrP-APは、SF9細胞のバキュロウイルス感染後に産生され、これを上清として用いた。

【0103】

飽和結合曲線を作製するために、1 mM Ca^{2+} および1 mM Mg^{2+} を含むダルベッコPBSで1/3に希釈したPC2上清50 μl を、96ウェルイムノロン1Bプレート(ダイネックス社)に加えて4℃で一晩インキュベートした。対照として、無関係なタンパク質(mek4-AP)を含むCOS上清の1/3希釈液も同様に加えた。一晩インキュベートした後、非特異的結合部位を、1ウェル当たり5%粉乳を含むトリス緩衝液(50 mM トリス塩酸、pH 8.0、150 mM NaCl、1 mM Ca^{2+}) 100 μl によって室温で2時間ブロッキングした。次に、ウェルを1ウェル当たり0.05%ツイーンを含むトリス緩衝液200 μl によって5回洗浄し、1ウェル当たり、プロテアーゼ阻害剤(シグマ社、P8340)を含むトリス緩衝液に溶解した組換えウシPrP(rbPrP、プリオニクス社) 50 μl を加えた。用いたrbPrPの濃度は2000 ng/mlから始めて、1500 ng/ml、そして2倍希釈で1.6 ng/mlに達するまで行った。最後のウェルにはrbPrPを加えなかった。各濃度は、1試料あたり3本ずつ実施し、インキュベーション

は、室温で2時間実施した。次に、ウェルを1ウェル当たり0.05%ツイーンを含むトリス緩衝液200 μ lによって10回洗浄し、プロテアーゼ阻害剤を含むトリス緩衝液で5000倍希釈した6H4抗PrPモノクローナル抗体(プリオニクス社)50 μ lと共に室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、ウェルを1ウェル当たり0.05%ツイーンを含むトリス緩衝液200 μ l/ウェルによって10回洗浄して、ヤギ抗マウスIg-HRP結合体(ジャクソン社、10,000倍希釈)のプロテアーゼ阻害剤を含むトリス緩衝液溶液と共に室温で40分インキュベートした。1ウェル当たり0.05%ツイーンを含むトリス緩衝液200 μ lによってさらに10回洗浄した後、ウェルにABTS酵素基質(ベーリンガー社)100 μ lを30~60分、室温にて加え、溶液の吸光度を405 nmで測定した。特異的結合はPC-2含有ウェルからの結果をmek4-AP(無関係タンパク質)ウェルからの結果と比較することによって決定した。実験あたり1試料3個ずつ行った他の対照は、プロテアーゼ阻害剤を含むトリス緩衝液で10,000倍希釈した抗PC2モノクローナル抗体を用いてウェルあたり捕獲したPC2を、室温で1時間、直接測定する段階、その後、洗浄する段階、および上記のようにヤギ抗マウスIg-HRP結合体と共にインキュベートする段階を含んだ。

【0104】

図9は、可溶性ヒトPC2に対するrbPrPの結合が飽和可能であったことを示している。飽和可能な結合は、特異的リガンド受容体相互作用の特徴の一つである。飽和結合曲線を4回繰り返した。データから、ヒト可溶性PC2が、ウシ組換えPrPに統計学的に有意かつ飽和可能に結合することが示された。さらに、rbPrPの飽和結合が約200 ng/mlに達した場合の、可溶性ヒトPC2とrbPrPとの親和性は、このデータから約4 nMであると推定されうる。代表的な飽和結合曲線を図9に示す。

【0105】

アフリカツメガエル卵母細胞におけるヒトPrPBp、PC2の発現およびマウスPrP-AP融合タンパク質による検出

全長ヒトPC2を含むプラスミドを制限酵素消化によって直鎖状にして、PC2 RNAをアンピオンメッセージマシーンキットを用いてインビトロで転写した。PC2 RN

A 15 ngを新しく調製したアフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションした。各卵20個のプール8個にPC2 RNAを注入して、卵20個のプール2個に同様に調製した陽性対照、e1f RNAを注入し、および卵20個のプール2個に陰性対照として緩衝液のみを注入した。卵を18 でバース培地で5日間インキュベートして、タンパク質を発現させた。この期間の後、卵のプールを回収して、24ウェルプレートに播種して、グレース培地で10倍希釈したマウスPrP-AP融合タンパク質と共に室温で4時間、穏やかに振盪しながらインキュベートした。陽性対照は希釈していないmek4-AP上清と共にインキュベートし、偽注射対照はPrP-APと共にインキュベートした。次に、卵母細胞を全て1.5 ml試験管に移して、冷HBHA緩衝液で6回洗浄し、50 mMトリス、pH 8.0、150 mM NaCl、0.02%アジド、1%トリトンX-100によって氷中で15分溶解して、上清を遠心によって回収した。次に、上清をアルカリホスファターゼ基質、発色産物を生成するBCPIP（カークガード）、または蛍光産物を生じるフルオレセインニリン酸（F-dP、モレキュラープロブス社）と共にインキュベートした。各試料の吸光度は、620 nmで測定するか、または各試料の蛍光を535 nmで測定した。

【0106】

マウスPrP-AP融合タンパク質は、アフリカツメガエル卵母細胞に導入されたヒトPC2に結合して、その細胞表面で発現されることが判明した。既知のリガンド受容体分子対を用いる制御された系において、e1f RNAをマイクロインジェクションした卵母細胞は、緩衝液のみを注入した卵母細胞と比較してmek4-AP融合タンパク質に対して統計学的に有意な結合を示した（ p 値 = 0.026、図10）。同様に、PC2 RNAをマイクロインジェクションした卵母細胞に対するマウスPrP-APの統計学的に有意な結合が認められた（ p 値0.001、図10）。

【0107】

マウスPrPに対するヒトPrPBP、PC2の結合

これらの実験を実施するために、マウスPrP-AP融合タンパク質および可溶性ヒトPC2を上記のようにそれぞれ、バキュロウイルス発現系および一過性のCOS細胞感染から産生した。飽和結合曲線実験は、brPrPを未希釈および最終希釈300倍で終了する連続3倍希釈を用いるマウスPrP-AP上清に置換したことを除き、ウシPr

Pについて記述したように実施した。

【0108】

マウスPrP-APは、アフリカツメガエル卵母細胞の細胞表面に発現される全長ヒトPC2に結合することが知られていた。この実験は、マウスPrP-APが、膜貫通ドメインを欠損するヒトPC2の遺伝子操作された可溶性型に結合できることを証明した。実際に、マウスPrP-APは、可溶性ヒトPC2に対する飽和結合を示し、これはBSA対照より優れており、統計学的に有意であった（全てのデータポイントに関して p 値 <0.001 、図11）。飽和結合はマウスPrP-AP上清の3倍希釈液で達し、その希釈液はマウスPrP-AP約3 $\mu\text{g/ml}$ を含むと推定された。最大結合の半分は、上清の10倍希釈液で得られ、これによってPC2に関するPrP-APの推定親和性は低いナノモル範囲であった。双方の結合パートナーが、上清型で用いられること、その正確な各濃度が不明であり、したがって一つまたは他の成分が限られた量存在する可能性があることに注目すること。

【0109】

ウシ海綿状脳症感染ウシ抽出物におけるPrPの検出

ウシ海綿状脳症（BSE）と診断されたウシおよびニュージーランド（すなわち、ウシ海綿状脳症が発生していない）由来の対照ウシからの脳ホモジネートを10%（w/v）溶液として調製した。ウシ脳をダウンスホモジナイザー（テフロン乳棒を有する）において冷溶解緩衝液（100 mM NaCl、10 mM EDTA、0.5%ノニデットP-40、0.5%デオキシコール酸ナトリウムのトリス緩衝液溶液、pH 7.4）2容量中で破碎した。試料を氷中で20分インキュベートしてから、ホモジナイザーでさらに15回粉碎した。可溶性の破片を4、3000 rpmで15分間の遠心によって除去した。上清を少量に分けて、 -70°C で保存した。上清のタンパク質含有量を定量したが、この技法は濃度 ~ 10 mg/mlのホモジネートを一貫して生成した。

【0110】

結合をアッセイするため、ポリソルブELISAプレート（ヌンク社）のウェルを、上記のように調製したPC2-含有細胞上清（0.1 M重炭酸緩衝液、pH 9.6）によって4で一晩コーティングした。ウェルを、0.05%ツイーン20を含むPBSで4回洗浄して、ウェルに5%脱脂乳のPBS溶液を満たし、プレートを室温で2時間

インキュベートすることによってブロッキングした。プレートを洗浄して、脳ホモジネート（PBSで希釈）を指定されたウェルに加えて、室温で1.5時間インキュベートした。ウェルをPBSTで4回洗浄した。6H4（70 ng）を適当なウェルに加えて、室温で1時間でインキュベートした後、抗ウサギIgG/西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体を5000倍希釈で含む、1%脱脂乳含有PBST溶液100 μ lと共にさらに0.5時間インキュベートした。ウェルをPBSTによって4回洗浄した。ABTS（ペーリンガー・マンハイム社）をウェルに加えた後、シグナルを405 nmでモニターした。

【0111】

このアッセイ法から、脳抽出物における成分とポリソルブELISAプレート上にコーティングされたsPC2含有上清とが相互作用することが示された（図12）。用量反応作用は、sPC2上清と脳ホモジネートの双方について認められた。さらに、結合レベルの増加は、正常（NZ）脳からの抽出物と比較してBSE脳からの抽出物について認められ、PC2がPrP^{Sc}に対してより強く結合する可能性があることを示唆している。これらの実験において、予めブロッキングしたウェルに結合した脳ホモジネート上のシグナルは、バックグラウンドを越えず、このことは、非特異的タンパク質・タンパク質相互作用が最小であることを示唆している。

【0112】

PC2リンパ球分布

PC2の役割をよりよく理解するために、リンパ系におけるその分布を調べた。末梢血白血球（PBL）をフィコール遠心によって全血から単離した。PBLを、2.5%FBSを添加したダルベッコPBSによって2回洗浄した。ウェル当たり約 1×10^6 個の細胞を丸底96ウェルプレートに播種して、遠心によって沈降させた。細胞を、10 μ g/mlの抗体を2.5%FBSを含むダルベッコPBSに含む抗PC2モノクローナル抗体溶液に再懸濁させた。陰性対照集団をアイソタイプマッチ無関係抗体と共にインキュベートした。細胞を、氷中で抗体と共に15分インキュベートして、ダルベッコPBS、2.5%FBS 200 μ lによって2回洗浄した。次に、細胞を二次抗体、抗ヤギマウスIg FITC結合体（ジャクソン社）と共に氷中で15分間インキュベートして、先の記述と同様に洗浄した後、FITC結合二次抗体上での遊離の抗体結合

部位をブロッキングするために、20倍希釈した正常マウス血清（シグマ社）と共にインキュベートした。次に、B細胞に対して対比染色したウェルをPE結合抗ヒトCD19（ベクトンディッキンソン社）と共にインキュベートして、T細胞に関して対比染色したウェルをPE結合抗ヒトCD3（ベクトンディッキンソン社）と共にインキュベートした。細胞をベクトン・ディッキンソンFACスキャンによって分析した。10,000個の肝細胞からの蛍光放出を回収した。

【0113】

図13Aおよび図13Bに示したデータは、PC2が専らCD19⁺細胞（B細胞）と共に発現されるが、細胞表面CD3を有する細胞（T細胞）には発現されていないことを明確に示した。この知見は、末梢での接種後にPrP^{S^c}が脳へ移動することにB細胞が関係していることを示す最近の結果を考慮すれば有意である（Kleinら、Nature 390：687、1997）。プリオン感染症の初期段階においてこれらの細胞にPC2とPrP^{S^c}の両者が存在することは、PC2が高親和性でPrP^{S^c}に結合し、正常細胞のPrP^CからPrP^{S^c}への変換、および末梢のリンパ様組織から脳への移動に関係する可能性があるという考え方の信頼性を増加させるものである。

【0114】

プリオン疾患検出アッセイ法

PrPBPは、プリオン疾患または病態の検出またはモニタリングにおいて一般的に診断的に用いられる。例えば、PrPBPは、標準的な検出アッセイ法を用いて生物試料において（例えば、組織生検または体液）PrP^{S^c}の有無をモニターするために用いてもよい。そのような検出アッセイ法には、検出可能に標識された成分、例えば、標識PrPBP、標識PrPBP融合タンパク質、標識PrP^C、または標識PrP^{S^c}によるアッセイ法が含まれるがこれらに限定されることはない。本発明のアッセイ法は、PrP^{S^c}の直接検出を含んでもよく、または間接的検出（例えば、PrPBPとPrPとの結合、およびPrPBP、PrP、またはPrP^{S^c}に対して作製された標識二次抗体を用いる複合体の検出による）を含んでもよい。これらの検出アッセイ法において用いられるPrPBP（例えば、マウスまたはヒトPrPBP）は、いかなる細胞において組換え的に産生してもよいが、COS細胞が好ましい宿主細胞である（例えば、Cullen、Meth. Enzymol. 152：684～704、1988）。または、PrPBPは、PrP-APタン

パク質および標準的な技術を用いてアフィニティ精製によって単離してもよい。一つの特定の好ましい態様において、可溶性PrPBP結合ドメインを発現させて、本発明の検出方法において用いる。もう一つの好ましい態様において、PrPBP結合ドメインを、マウスおよびヒトPrPBPコード配列の双方を含む融合タンパク質として発現させる。この場合も、これらの融合タンパク質を本明細書に記載の検出方法において用いる。

【0115】

一つの作業例として、プリオン物質を含むことが既知である、または疑われる生物試料を以下のように試験する。試料を、既知濃度で存在する、検出可能に標識したPrPBP（またはその断片もしくは類似体）またはPrPBP融合タンパク質のいずれかと共にインキュベートする。PrPBPとのインキュベーション後、生物試料を標準的な技法に従ってプロテアーゼによって処理し（例えば、Prusinerら、*Science* 216:136~144、1982）、得られた複合体を、例えば、フィルター結合、免疫沈降、ゲル電気泳動分離、沈降、または濾過によって単離または同定する。次に、単離された複合体を標準的な方法に従って分析および測定する。放射性、蛍光性、発色性（例えば、アルカリホスファターゼもしくは西洋ワサビペルオキシダーゼ）もしくは化学発光性の標識、または標識されたハプテン特異的抗体もしくは他の結合パートナー（例えば、アビジン）を用いて可視化されるハプテン（例えば、ジゴキシゲニンもしくはビオチン）を含むがこれらに限定されることはない、直接的または間接的に可視化される任意の適当な標識をこれらの検出アッセイ法において用いてもよい。免疫学に基づいてアッセイする場合、複合体形成を測定するために、PrPBP（上記のように）またはPrP（Bendheimら、*Nature* 310:418~21、1984）に対して作製したポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を、いかなる標準的なイムノアッセイフォーマット（例えば、ELISA、ウェスタンブロット、またはRIAアッセイ法）において用いてもよい。そのようなイムノアッセイ法の例は、例えば、アウスユベール（Ausubel）ら（上記）に記載されている。適当な対照試料と比較して標識化合物の増加レベルを含むことが判明した試料は、プリオンタンパク質の存在を示すものとして見なし、このように、プリオン関連疾患の指標となる。その上、正常レベルのPrP^cを含む細胞を対

照として用いてもよい。PrP^Cに対して作製された標識二次抗体も同様に、プロテアーゼ処理を行わずに用いてもよく、PrP^C閾値を超えるシグナルは、生物試料中にPrP^{Sc}が測定されたこととして検出された。プロテアーゼ処理を必要としないさらにもう一つの方法において、PrPBPを、生物試料中でプリオンタンパク質と複合体を形成させ、PrP^{Sc}複合体を標識二次PrP^{Sc}特異的抗体試薬を用いて特異的に検出してもよい。

【0116】

もう一つの検出アッセイ法において、生物試料中のPrP^{Sc}を、固相支持体（例えば、ニトロセルロース、イムノビロン、アガロースビーズ、シアン活性化アガロース、または組織培養ウェル）に捕獲して、PrPBPによる結合（または断片もしくはその類似体）またはPrPBP融合タンパク質を検出する。もう一つの方法として、PrPBPまたはPrPBP融合タンパク質を固相支持体に結合させて、PrP^{Sc}の結合を検出する。これらのアッセイフォーマットにおいて、検出は、上記のような標準的な方法によって行い、例えば固相支持体に会合したPrP^{Sc}の検出は、上記のようにPrPBPを用いて直接的または間接的に行う。または、捕獲されたPrP^{Sc} : PrPBP複合体中のPrP^{Sc}を、PrP^{Sc}に対して作製された抗体を用いて検出してもよい（Bendheimら、Nature 310 : 418~21、1984）。この場合も、適当な標識を利用してもよく、例えばいかなる放射性マーカ－もしくは蛍光性マーカ－も用いてもよく、またはアルカリホスファターゼもしくは西洋ワサビペルオキシダーゼを含むがこれらに限定しないいかなる酵素マーカ－を利用してもよく、検出は、発色または蛍光原基質を加えることによって行ってもよい。

【0117】

上記のように、PrP^Cに結合するがPrP^{Sc}には結合しないPrPBPを用いて、生物試料からPrP^Cを除去することができる。試料中に残っているPrP^{Sc}は、例えば、PrP^{Sc}とPrP^Cの双方に結合する抗体などの試薬に結合させることによって定量することができる。このように、PrP^Cに結合するがPrP^{Sc}に結合しないPrPBPであってもPrP^{Sc}に関するアッセイ法に用いることができる。

【0118】

もう一つの検出アッセイ法において、検出可能に標識したPrP^{Sc}をPrPBPと共に

インキュベートした後、PrP^{Sc}を含むことが疑われる生物試料と共にインキュベートする。次に、得られた複合体を上記のような従来の方法に従って測定および定量する。このアッセイフォーマットにおいて、試料中に存在する非標識PrP^{Sc}は複合体に存在する標識PrP^{Sc}と競合的に置換されるために、PrPBP : PrP^{Sc}複合体に存在する標識PrP^{Sc}の量が対照試料と比較して減少していれば、PrP^{Sc}が生物試料中に存在することの指標として見なされる。PrPBP-PrP複合体形成後にプロテアーゼ処理段階と組み合わせた同様のアプローチを用いてもよい。この場合、標識PrPのいかなる形を利用してもよく、この場合も標識化合物のレベルが減少（試料の非存在下での対照と比較して）していれば、アッセイすべき生物試料中にPrP^{Sc}が存在することの指標として見なされる。

【0119】

プリオンの除染

本明細書に記載の方法および組成物は、プリオンタンパク質に汚染されていることが既知である、または疑われる生物試料の除染のために有用である。特に、PrPBPは、PrP^{Sc}に対して結合することができるため、生物試料をPrPBPと共にインキュベートしてもよく、PrPBP複合体を標準的な方法、例えば、二次分離、または分離方法を用いて除去してもよい。または、PrPBPは、PrPと複合体を形成させ、それによってPrPの作用を阻害するために、生物試料と共に単にインキュベートしてもよい。

【0120】

プリオン関連疾患と他の神経変性疾患の治療

本発明の方法および組成物はまた、ヒトを含む哺乳動物においてプリオン疾患を治療または予防する手段を提供する。この治療は、PrPBP : PrP^{Sc}複合体形成に関連した生物学的事象を破壊、抑制、減弱、または中和する化合物（例えば、アンタゴニストまたはアゴニスト）を、直接的に、例えば動物に処理することによって行ってもよい。そのようなアンタゴニストは、本発明の分子および上記の機能的アッセイ法を用いて単離してもよい。例えば、本発明は、PrPBP : PrP^{Sc}複合体相互作用に拮抗することができる化合物（例えば、ペプチド、低分子阻害剤、または模倣剤）を同定する手段を提供する。そのようなアンタゴニストには、Pr

PBPと相互作用して、PrBP : PrP複合体形成を阻害し、そのような複合体形成に起因する関連する生物活性を破壊するPrP^{Sc}、抗PrBP抗体、またはPrP、PrP^{Sc}もしくはPrP^Cの断片もしくは類似体に結合してその生物活性を不活化するPrBP、PrBP断片または類似体；またはPrP^{Sc}、PrBP、もしくはPrBP : PrP^{Sc}複合体形成に関連した生物活性を妨害および阻害する薬剤、ならびに例えば細胞抽出物、哺乳動物血清、もしくは哺乳動物細胞を培養した増殖培地に認められる薬剤を含むペプチドもしくは非ペプチド分子が含まれるがこれらに限定されることはない。

【0121】

本発明において有用なアンタゴニスト分子には、PrP^{Sc}に対して高親和性で結合し、PrP^Cから自身のより多くコピーを動員することができないようにするか否かに関して選択した分子；PrP^Cに対して高親和性で結合して、PrP^{Sc}への変換を遮断することができる分子；PrP^CとPrP^{Sc}またはその複合体との相互作用を防止することによって細胞障害性シグナルの産生を阻害することができる分子；PrP^Cを発現する隣接細胞によって可溶性の毒性メディエータ（例えば、反応性酸素種、および腫瘍壊死因子の発現）の産生を阻害することができる分子；またはこれらの上記のメカニズムの組み合わせ、が含まれる。

【0122】

例えばPrBPなどの候補アンタゴニストの有効性は、プリオンタンパク質とのその相互作用能に依存する。そのような相互作用は、任意の数の標準的な結合技術およびその他の機能的アッセイ法（例えば、本明細書に記載のアッセイ法）を用いて容易にアッセイすることができる。一つの特定の例において、候補アンタゴニストを、PrP^{Sc}との相互作用に関してインビトロで試験してもよく、それらのPrP^{Sc}を介した生物活性の調節能を、本明細書に記載のいかなる機能的試験によってアッセイしてもよい。

【0123】

PrBP : PrP^{Sc}複合体形成の減少、またはインビトロでのPrBP : PrP^{Sc}を介した生物活性の減少を促進する分子は、本発明において有用であると見なされ、そのような分子は、例えば、プリオン疾患を治療または発病を予防する治療薬として用いることができる。

【0124】

試験アンタゴニストが、プリオン疾患の発症に対して保護を付与するか否かの評価は、一般的に、そのような疾患を発症することが知られている動物を用いることを含む（例えば、Chandler、Lancet 6：1378～1379、1961；Eklundら、J. Infectious Disease 117：15～22、1967；Field、Brit. J. Exp. Path. 8：129～239、1969）。適当な動物（例えば、マウスまたはハムスター）を標準的な方法に従って試験化合物によって処置し、無処置対照動物と比較したプリオン関連疾患の発生率の減少または発症の遅延を保護の指標として検出する。試験化合物は、プリオン物質を予め注射した動物に投与してもよく、またはプリオンと化合物とを予めインキュベートして、試験動物にプリオン/化合物混合物を注射することによって、試験化合物のプリオン物質中和能を試験してもよい。プリオン疾患を治療または予防するために用いられる分子（例えば、上記のようなアンタゴニスト）は、「抗プリオン治療物質」と呼ばれる。

【0125】

本発明に係る抗プリオン治療物質は、薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤と共に単位投与財形で投与してもよい。例えば、従来の薬学の実践を用いて、そのような抗プリオン治療物質を、プリオン疾患を有する、もしくは前症候を有する、またはプリオン疾患を発症するリスクを有する動物に投与するために適した製剤または組成物を提供してもよい。いかなる適当な投与経路、例えば、非経口、静脈内、皮下、筋肉内、頭蓋内、眼窩内、眼内、脳室内、嚢内、脊髄内、槽内、腹腔内、鼻腔内、エアロゾル、または経口投与を用いてもよい。

【0126】

製剤を作製するために当技術分野で周知の方法は、例えば、「レミントンの製薬科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）」に認められる。非経口投与のための製剤は例えば、賦形剤、滅菌水または生理食塩液、ポリエチレングリコールのようなポリアルキレングリコール、植物性油、硬化ナフタレンを含みうる。生体適合性の、生分解性ラクチドポリマー、ラクチド/グリコリドコポリマー、またはポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレンコポリマーを用いて、化合物の放出を制御することができる。抗プリオン治療化合物にとってその他のおそ

らく有用な非経口送達系には、エチレン・酢酸ビニルコポリマー粒子、浸透圧ポンプ、埋め込み型注入系、およびリポソームが含まれる。吸入用製剤は、賦形剤、例えば、乳糖を含みうる、または例えばポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、グリココール酸塩、またはデオキシコール酸塩を含む水溶液となりうる、または点鼻液、またはゲルの剤形で投与するための油性溶液となりうる。

【0127】

本発明の方法は、任意の動物、例えば、ヒト、家畜用ペット、または家畜において本明細書に記載の疾患を減少または予防するために用いてもよい。ヒト以外の動物を治療する場合、用いられる抗プリオン治療物質は、好ましくはその種に対して特異的である。

【0128】

その他の態様

一般的に、本発明には、PrP-AP融合タンパク質を用いて本明細書に記載のように単離される可能性があるPrPBP、または上記のマウスPrPBPを用いて相同性スクリーニングもしくはPCR増幅によって容易に単離されるPrPBPも含まれる。同様に、その結合活性を完全に破壊しないように改変された（例えば、本明細書に記載したようにアッセイする）PrP-AP融合タンパク質およびPrPBPも本発明に含まれる。そのような変化は、特定の変異、欠失、挿入、または翻訳後修飾を含んでもよく、またはより大きい融合タンパク質の一つの成分としてタンパク質（例えば、PrPBP）を含めることを含んでもよい。

【0129】

このように、他の態様において、本発明には、PrPBPポリペプチドと実質的に同一であり、適当なPrPに結合する（例えば、明細書に記載のようにアッセイする）いかなるタンパク質も含まれる。そのような相同体には、他の実質的に純粋な天然に存在する哺乳動物PrPBPと共に、対立遺伝子変種；天然変種；誘導変種；高ストリンジェンシー条件またはあまり好ましくはないが低ストリンジェンシー条件で（例えば、少なくとも40ヌクレオチドのプロープ長で40 で2 × SSCによって洗浄）マウスPrPBP DNA配列とハイブリダイズするDNAによってコードされるタンパク質；およびPrPBPに対する抗血清によって特異的に結合するタンパク

質が含まれる。用語にはまた、PrPBP部分を含むキメラポリペプチドが含まれる。

【0130】

本発明はさらに、天然に存在するPrPBPポリペプチドの類似体を含む。類似体は、天然に存在するPrPBPタンパク質とは、アミノ酸配列の差によって、翻訳後修飾によって、またはその双方によって異なってもよい。この場合も、本発明に係るPrPBP類似体は、PrPとの結合能を保持していなければならない。本発明の類似体は、一般的に天然に存在するPrPBPアミノ酸配列の全てまたは一部と少なくとも85%、より好ましくは90%、最も好ましくは95%、またはさらに99%同一性を示すと思われる。配列比較の長さは、少なくとも15個のアミノ酸残基、好ましくは少なくとも25個のアミノ酸残基、およびより好ましくは35個のアミノ酸残基である。改変には、インビボおよびインビトロ化学誘導、例えばアセチル化、カルボキシル化、リン酸化またはグリコシル化が含まれる；そのような改変は、ポリペプチド合成、プロセッシングまたは単離された改変酵素によるその後の処理の際に起こってもよい。類似体はまた、一次配列の変化によって天然に存在するPrPBPとは異なりうる。これらには、天然および誘導型の遺伝子変種が含まれる（例えば、Sambrook、FritschおよびManiatis、「分子のクローニング：実験マニュアル（Molecular Cloning：A Laboratory Manual）」、第二版、CSH出版、1989年、またはAusubelら、（上記）のような、放射線照射もしくはエタンメチルスルフェートに対する暴露によるランダム変異誘発、または部位特異的変異誘発の結果として）。同様に、例えば もしくは アミノ酸のような、例えばD-アミノ酸または天然に存在しないアミノ酸または合成アミノ酸を含む、環状ペプチド、分子、および類似体も含まれる。

【0131】

全長のポリペプチドの他に、本発明はまた、PrPBP断片を含む。本明細書において用いられるように、「断片」という用語は、少なくとも3個の連続するアミノ酸、好ましくは少なくとも5個の連続するアミノ酸、より好ましくは少なくとも20個の連続するアミノ酸、さらにより好ましくは少なくとも30個の連続するアミノ酸、さらにより好ましくは少なくとも50個の連続するアミノ酸、および最も

好ましくは少なくとも60もしくは80またはそれ以上の連続するアミノ酸を意味する。PrPBP断片は、当業者に既知の方法によって作成することができ、または正常なタンパク質プロセシングの結果であってもよい(例えば、生物活性にとって必要でない未完成ポリペプチドからのアミノ酸の除去、またはオルタナティブmRNAスプライシングもしくはオルタナティブタンパク質プロセシング事象によるアミノ酸の除去)。

【0132】

本明細書において言及した全ての出版物および特許出願は、それぞれの独立した出版物または特許出願が特におよび個々に参照として本明細書に組み入れられることを示されるのと同程度に参照として本明細書に組み入れられる。

【0133】

その他の態様は特許請求の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【図1A】 マウスPrP-AP融合タンパク質発現ベクターの略図である。

【図1B】 分泌型アルカリホスファターゼを発現する対照プラスミドの略図である。

【図2】 PrP-AP融合タンパク質がPrP^oおよびAP両方の免疫学的決定基を含有することを例示するオートラジオグラフの写真を示す。APを発現するCMV/SEAPベクター(レーン1およびレーン2)またはPrP-APを発現するAPtagベクター(レーン3および4)をトランスフェクトした³⁵[S]-メチオニン標識COS細胞上清を、成熟タンパク質のN末端の17アミノ酸に対する抗APモノクローナル抗体(レーン1およびレーン3)またはPrPウサギポリクローナル抗体で免疫沈降した。等価な活性のAPを各免疫沈降反応物に添加した。

【図3】 PrP-APがPrP^oドメインを介して選択された細胞株に特異的に付着することを例示する棒グラフである。3種の異なるマウス細胞株を60 mmプレートで集密化するまで培養し(約100,000細胞)、室温において90分、3mlのCOS細胞試験上清と共にインキュベーションし、洗浄し、溶解し、以下に記載するようにアルカリホスファターゼ活性を測定した。対照: 検出可能なアルカリホスファターゼ活性を含有しないmock-トランスフェクトCOS細胞に由来する馴化培地(condi

tioned media)。SEAP : CMV/SEAP構築物をトランスフェクトしたCOS細胞の上清、であり、対照と比較して表面結合を示さない。PrP-AP : PrP-AP構築物をトランスフェクトしたCOS細胞の上清、であり、表面結合を示す。SEAPおよびPrP-AP上清は等しいアルカリホスファターゼ活性を含有した(約500 OD単位/時間)。

【図4】 PrP-APが細胞表面分子を認識するが、APIは認識しないことを「間接的免疫蛍光」プロトコールによってを示す2種類の写真パネルシリーズである。G8細胞(マウス筋肉細胞株)はプロテアーゼを使用しないで、機械的に分離し、PrP-APタンパク質またはAPタンパク質と共にインキュベーションし、洗浄し、抗APモノクローナル抗体と共にインキュベーションし、洗浄し、フルオレセインイソチオシアネートで標識したヤギ抗マウス免疫グロブリンと共にインキュベーションし、洗浄し、蛍光顕微鏡で調査した。AP-インキュベーション細胞(右のパネル)と比較したPrP-AP-インキュベーション細胞(左パネル)の蛍光シグナルは、PrP-AP融合タンパク質のPrPドメインを介する特異的細胞表面結合を示す。

【図5】 PrP-AP結合は競合的で、そのPrP^cドメインを介して移動可能であることを例示するグラフである。35 mmのプレートのNIH 3T3細胞は、上記のように、予め³⁵[S]-メチオニンを代謝的に標識しておいたPrP-AP構築物をトランスフェクトしたCOS細胞由来の上清と共にインキュベーションした。その後、細胞を洗浄し、溶解し、結合放射能を β -カウント法で測定した。結合³⁵[S]-PrP-APは、「コールド」非標識PrP-APの濃度増加に伴って漸次競合されたが、CMV/SEAP-トランスフェクト細胞COS細胞の同様の濃度のAPでは競合されなかった。

【図6】 PrP-APに暴露したG8筋細胞株培養物の細胞数の減少を例示する2種類の写真パネルシリーズである。24ウェルプレートの姉妹G8培養物を、25% v/vのAPを含有するCOS細胞上清、または25% v/vのPrP-APを含有するCOS細胞上清中で3日間インキュベーションした。PrP-APに暴露した細胞培養物はAP暴露培養物より常に密度が低く、PrPB結合が細胞増殖および/または生存度に影響を与えることを示唆している。

【図7 Aおよび7 B】 クローン6のPrPBの核酸配列(配列番号:1)および推定アミノ酸配列(配列番号:2)である。

【図8 Aおよび8 B】 PrPのN末端領域の11量体ペプチドが細胞表面のPrP-

APの結合と競合しうることを例示するグラフである。図8Aは、1mg/mlのPrPの11量体ペプチドがPrP-AP結合の90%を妨害するのに十分であることを示す。一方、ほぼ同じ量の別のPrPペプチド(Schmerlingペプチド、PrPのアミノ酸100~130位)はPrP-AP結合に影響を与えなかった。図8Bは、PrP-AP結合活性を、競合に使用するPrPの11量体ペプチドの濃度の関数として示す。

【図9】 可溶性ヒトプロトカドヘリン-43(PC2)に対する組換えウシPrPの飽和結合曲線を示すグラフである。

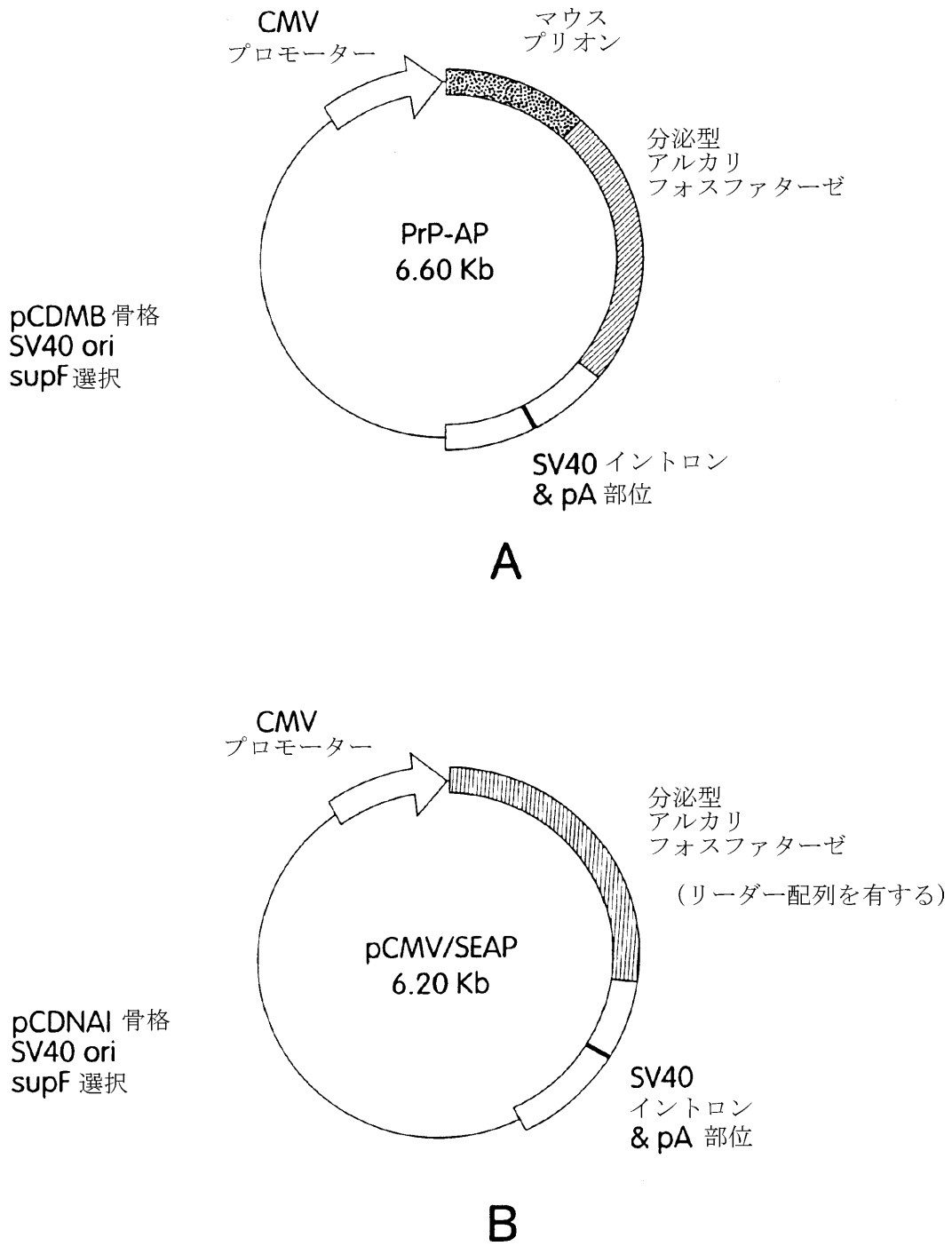
【図10】 アフリカツメガエル卵母細胞における全長ヒトPC2の発現およびマウスPrP-AP融合タンパク質による検出を示すグラフである。水(陰性対照)および全長PC2 RNA(PC2)を注射した卵母細胞をPrP-APでプロービングし、蛍光性アルカリホスファターゼ(AP)基質で可視化した。陽性対照として、elf RNA(elf)を注射し、そのリガンドmek-4-APでプロービングし、同様の方法で可視化した。

【図11】 可溶性ヒトPC2に対するマウスPrP-AP融合タンパク質の飽和結合曲線を示すグラフである。

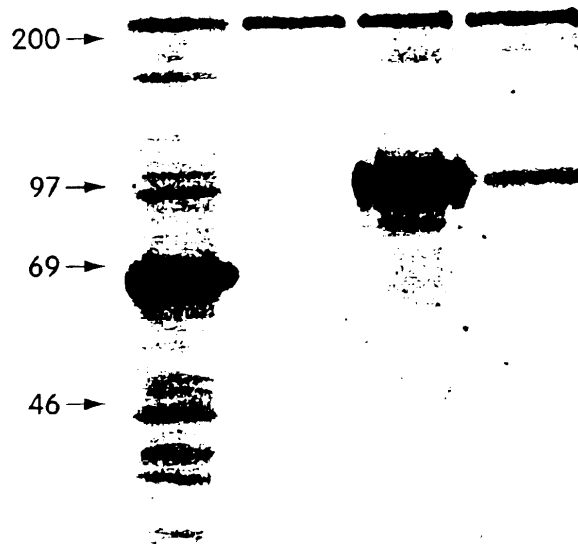
【図12】 PC2アッセイ結果を示すグラフである。2種類のPC2上清希釈液を使用して、BSE脳および正常(NZ)脳の抽出物をアッセイした。405 nmでとった吸光度値をバックグラウンドに対して標準化し(PC2-ve)、平均+/-SD、n=5として表した。

【図13Aおよび13B】 リンパ球上のPC2分布を示すグラフである。図13Aは、図13Bの末梢血T細胞(CD3陽性)とは異なり、末梢血B細胞(CD19陽性)はPC2を同時発現することを示す。

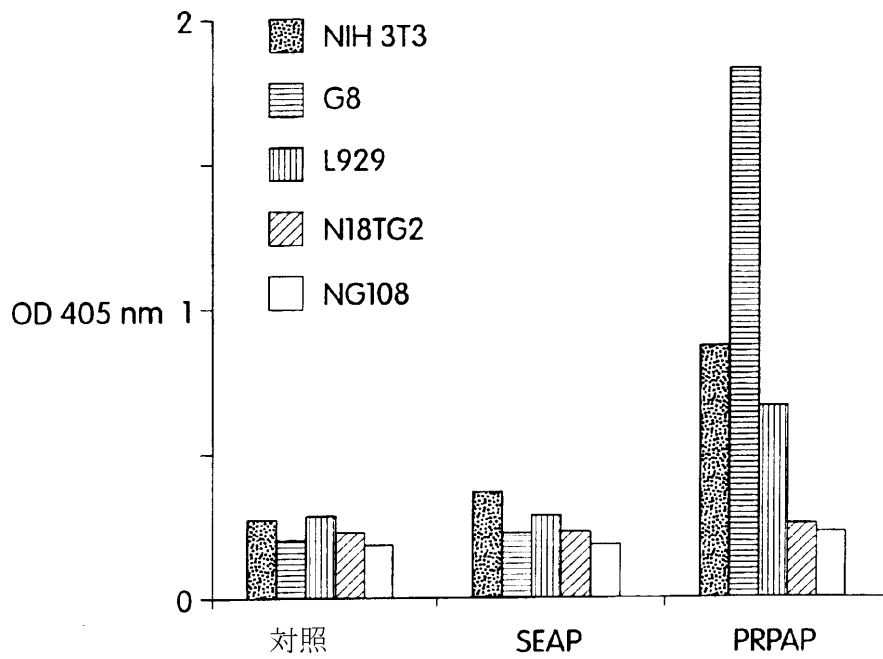
【図1】



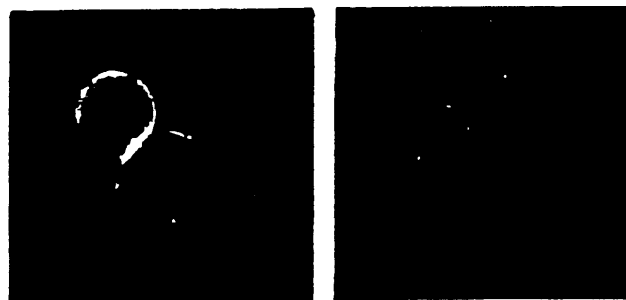
【图2】



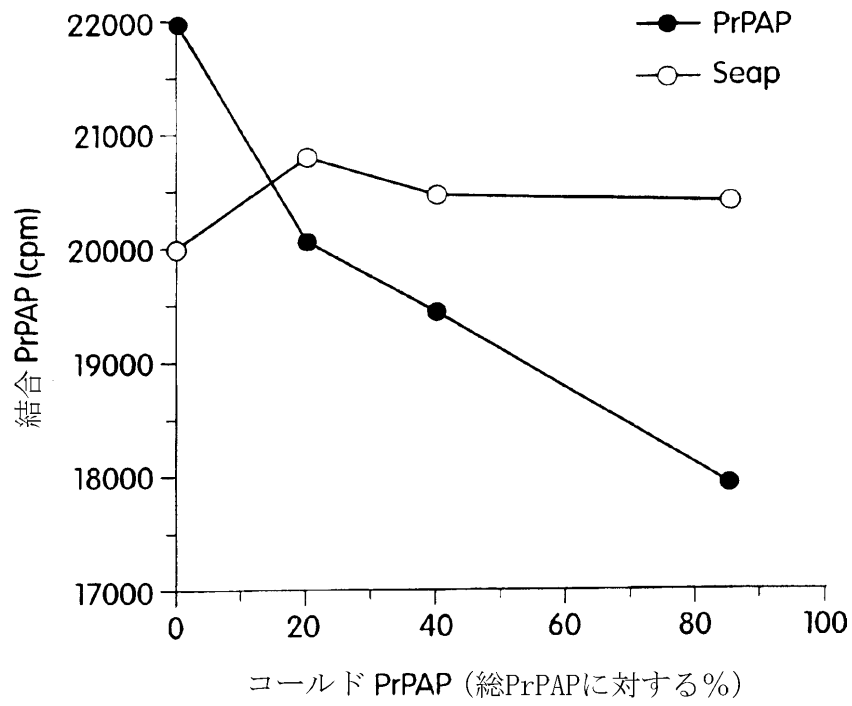
【图3】



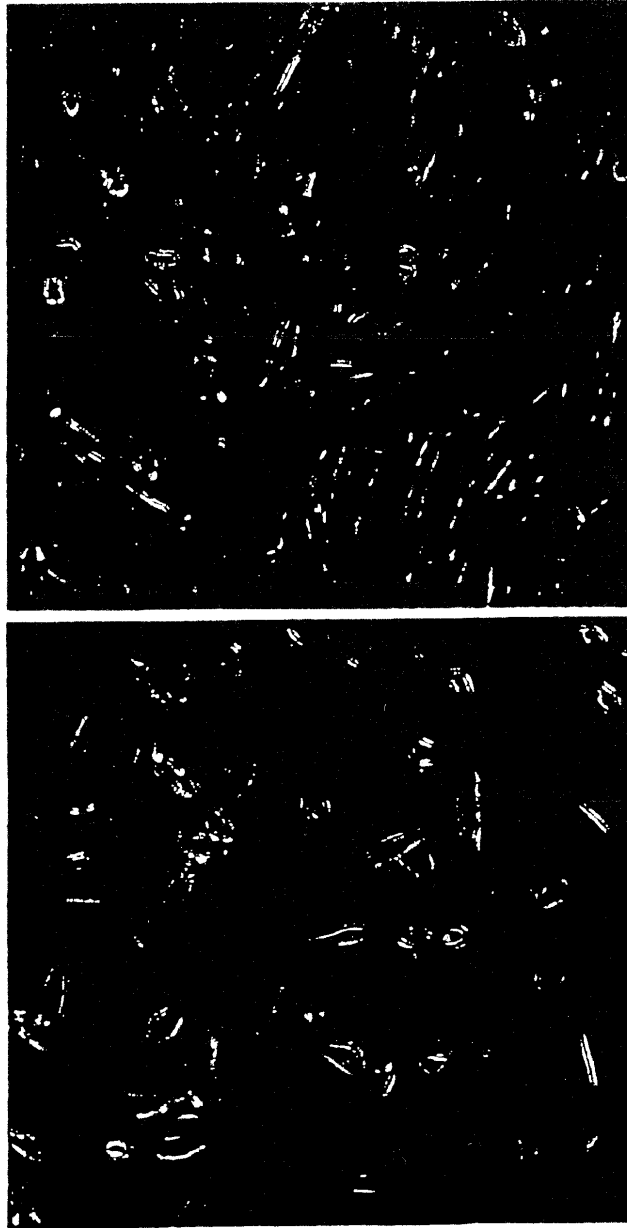
【图4】



【図5】



【図6】



【図7A】

1 gcttcaccatcattcactatgagatcctggaggagagagagggggttccccgtg
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 cgaagggtgtagtaactgatactctaggacctctctctctctccccaaggggcac
 V P K A
 (A) S T I I H Y E I L E E R E R G F P V -

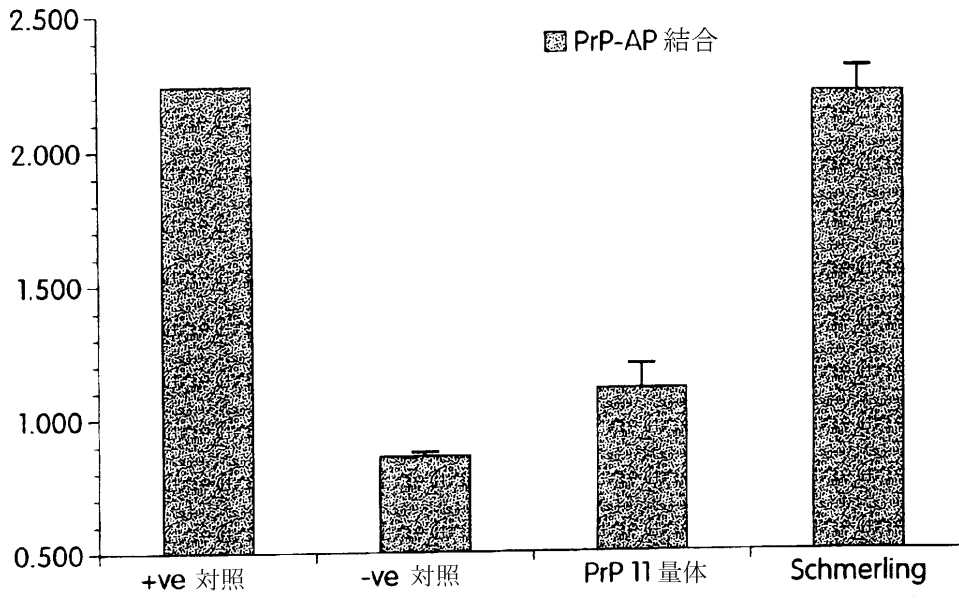
61 ggtaacgtggtcacggatcttggtttggatctcggcagctctgtcggccccgggctccgg
 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
 ccattgcaccagtgcctagaaccaaacctagagccgtcagacagccgggcgccgaggcc
 A N F P
 G N V V T D L G L D L G S L S A R R L R -

121 gtgggtgccggagctagccgtaggttctttgaggtgaactgggagactggagagatgttc
 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
 caccacaggcctcgatcggcatccaagaaactccacttgaccctctgacctctctacaag
 R
 V V S G A S R R F F E V N W E T G E (M) F -

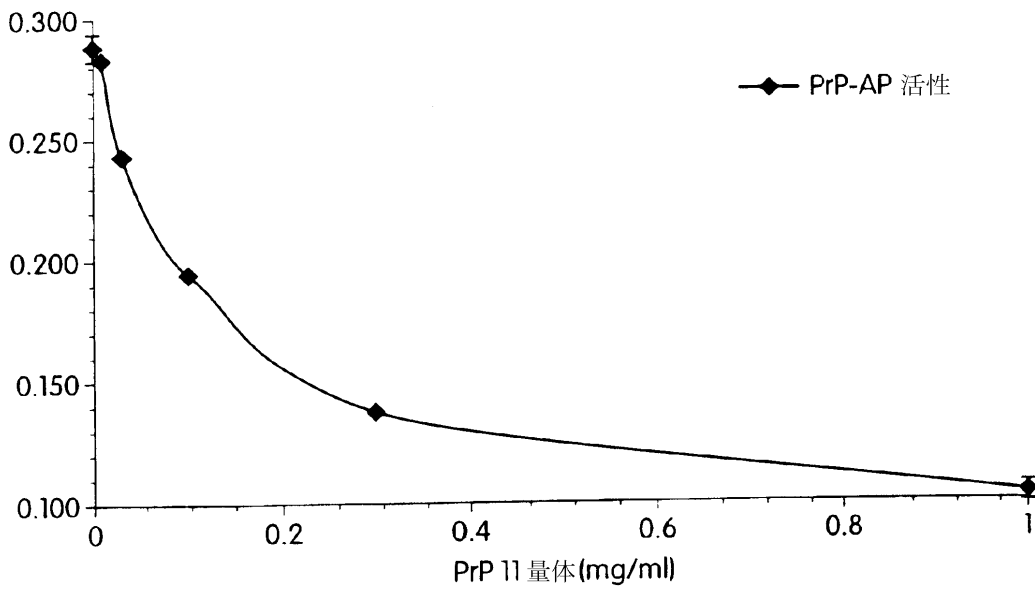
181 gtcaacgatcgactggaccgagaggagctgtgcgggacgctgccctcctgactgtaact
 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
 cagttgctagctgacctggctctcctcgacacgccctgacgacgggaggacgtgacattga
 V N D R L D R E E L C G T L P S C T V T -

241 ctggagttggtggtagagaacccgctggagctgttcagcgcggaagtggtggtccaggac
 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
 gacctcaaccaccatctcttggggcagacctcgacaagtcgcgacctcaccaccaggtcctg
 V I
 L E L V V E N P L E L F S A E V V V Q D -

【图8】

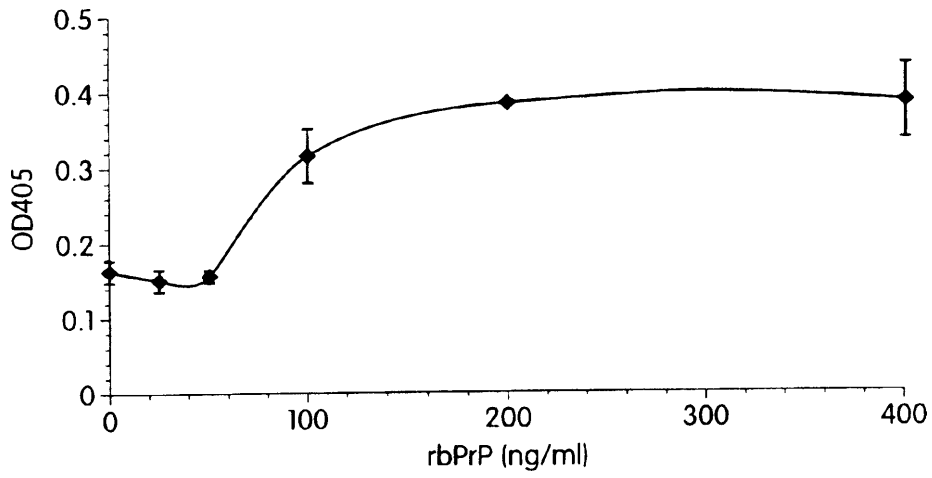


A

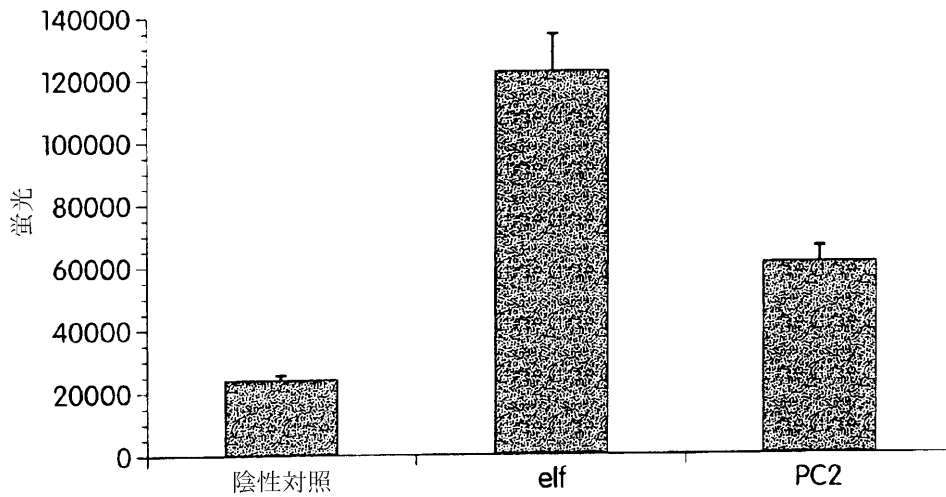


B

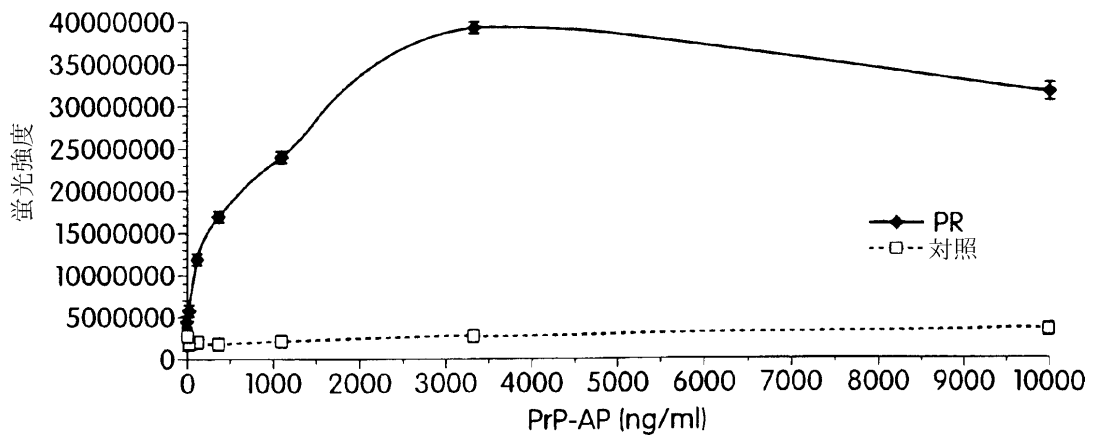
【图9】



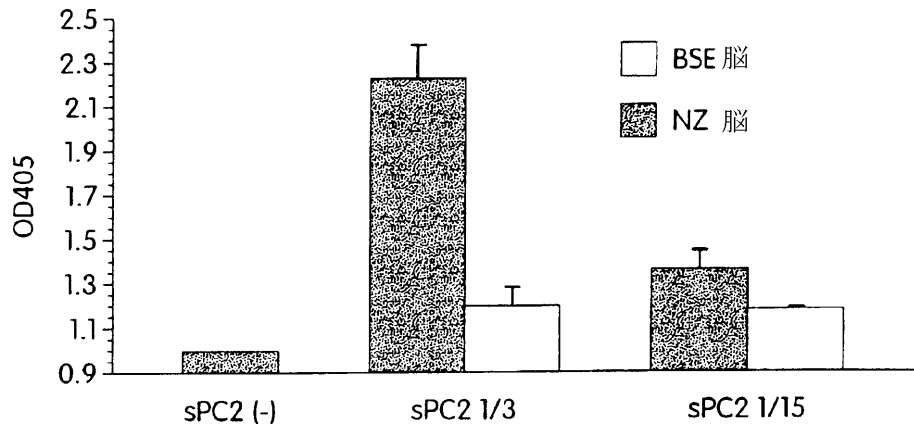
【图10】



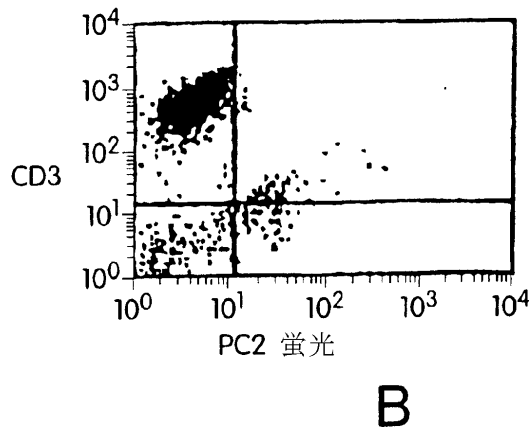
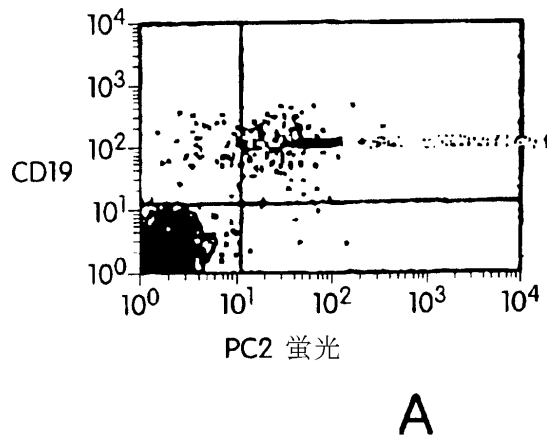
【图11】



【图12】



【图13】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/17927																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) :Please See Extra Sheet US CL :Please See Extra Sheet According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/134.1, 135.1, 192.1; 436/501, 513, 518; 530/387.1, 389.1; 536/23.4 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS, CABA, CAPLUS, EMBASE, LIFESCI, MEDLINE, SCISEARCH, USPATFULL, JAPIO																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
Y	US 5,679,530 A (BRENTANI et al.) 21 October 1997, see entire reference.	1-10, 15-74																		
Y	US 5,750,361 A (PRUSINER et al.) 12 May 1998, see entire reference.	1-10, 15-74																		
Y	US 4,806,627 A (WISNIEWSKI et al.) 21 February 1989, see entire reference.	1-10, 15-74																		
X	WO 97/45746 A2 (MCGILL UNIVERSITY) 04 December 1997, see entire reference.	1-10, 15-74																		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																				
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>*T*</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*X*</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>*B* earlier document published on or after the international filing date</td> <td>*Y*</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>*G*</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	*T*	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	*B* earlier document published on or after the international filing date	*Y*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*G*	document member of the same patent family	*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
* Special categories of cited documents:	*T*	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																		
B earlier document published on or after the international filing date	*Y*	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																		
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*G*	document member of the same patent family																		
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means																				
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																				
Date of the actual completion of the international search 27 SEPTEMBER 2000		Date of mailing of the international search report 26 OCT 2000																		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Rodney P. Swartz</i> RODNEY P. SWARTZ, PH.D. Telephone No. (703) 308-0196																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US00/17927

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Please See Extra Sheet.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-10, 15-74

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/17927A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7):

A61K 39/00, 39/40, 39/395; G01N 33/543, 33/563, 33/566; C07K 16/00; C07H 21/04

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

424/134.1, 185.1, 192.1; 436/501, 513, 518; 530/387.1, 389.1; 536/23.4

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-10, 15-74, drawn to prion protein binding protein, method of identifying, and first method of use.

Group II, claims 11-14, drawn to method of identifying a nucleic acid molecule.

Group III, claims 75-82, drawn to method of identifying inhibitors.

Group IV, claims 83-103, drawn to method of treating mammals.

Group V, claims 104-112, drawn to method of detecting B-lymphocytes.

The inventions listed as Groups I-V do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The prion protein binding protein (PPBP) is a single inventive concept, and as such, a method of making and a first method of use are included in the first invention. Group II is drawn to a structurally and functionally distinct molecule, DNA. Group III is claiming a second method of use. Group IV is claiming a third method of use. Group V is claiming a fourth method of use.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 P 29/00	1 0 1	A 6 1 P 35/00	
35/00		37/00	
37/00		C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47		19/00	
19/00		C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 N 15/09		1/68	Z N A A
C 1 2 Q 1/02		G 0 1 N 33/15	Z
1/68	Z N A	33/50	Z
G 0 1 N 27/447		33/566	
33/15		33/68	
33/50		A 6 1 K 37/02	
33/566		C 1 2 N 15/00	A
33/68		G 0 1 N 27/26	3 1 5 K
			3 2 5 A
			3 2 5 C

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

(72)発明者 ドデュレット ビンセント
カナダ国 ケベック州 モントリオール
クラーク ストリート 4826

(72)発明者 パラミティオティ ユスタツシェ
カナダ国 ケベック州 プシエルビル アルフレッド ラリベルト 208

Fターム(参考) 2G045 AA13 BA11 CA26 CB01 DA36
FB03 FB12 GC15
4B024 AA01 BA31 CA04 DA02 DA12
EA04 GA11 HA01
4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ43 QQ79
QR32 QR55 QS32 QS33
4C084 AA02 AA06 AA07 ZA01 ZA16
ZA18 ZA94 ZA96 ZB07 ZB15
ZB26 ZC54
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA40
DA86 EA50 FA74

专利名称(译)	朊蛋白结合蛋白及其用途		
公开(公告)号	JP2003531356A	公开(公告)日	2003-10-21
申请号	JP2001505942	申请日	2000-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	麦吉尔大学		
申请(专利权)人(译)	麦吉尔大学 校准朊制药公司		
[标]发明人	キャシュマンネイルアール ドデュレットビンセント パラミティオティユスタツシェ		
发明人	キャシュマン ネイル アール. ドデュレット ビンセント パラミティオティ ユスタツシェ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N27/447 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/566 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/00 C07K16/18 G01N33/56972 G01N33/6896 G01N2500/20 G01N2800/2828		
FI分类号	G01N33/53.D A61P19/02 A61P21/04 A61P25/28 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P37/00 C07K14/47 C07K19/00 C12Q1/02 C12Q1/68.ZNA.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/566 G01N33/68 A61K37/02 C12N15/00.A G01N27/26.315.K G01N27/26.325.A G01N27/26.325.C		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/BA11 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS32 4B063/QS33 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/ZA01 4C084/ZA16 4C084/ZA18 4C084/ZA94 4C084/ZA96 4C084/ZB07 4C084/ZB15 4C084/ZB26 4C084/ZC54 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	09/342426 1999-06-29 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

通常，本发明涉及病毒蛋白结合蛋白 (PrPBP) 及其诊断，治疗和去污应用。 本发明的特征还在于用于PrPBP分离的融合蛋白试剂。

