

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-530107

(P2004-530107A)

(43) 公表日 平成16年9月30日(2004.9.30)

(51) Int. Cl.⁷

G 0 1 N 33/53

C 1 2 Q 1/02

F I

G O 1 N 33/53

C 1 2 Q 1/02

D

テーマコード (参考)

4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 164 頁)

(21) 出願番号 特願2002-559681 (P2002-559681)
 (86) (22) 出願日 平成14年1月22日 (2002.1.22)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年7月23日 (2003.7.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2002/000257
 (87) 国際公開番号 W02002/059615
 (87) 国際公開日 平成14年8月1日 (2002.8.1)
 (31) 優先権主張番号 0101762.3
 (32) 優先日 平成13年1月23日 (2001.1.23)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 597166578
 メディカル リサーチ カウンシル
 イギリス国 ダブリュ1エヌ 4エイエル
 ロンドン, パーク クレセント 20
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (72) 発明者 江成 政人
 東京都中央区築地 5-1-1 国立がん
 センター研究所 放射線研究部

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 方法

(57) 【要約】

本発明は、プリオンとの結合能を有する1若しくは2以上のデバイスに組織/臓器を接触させ、かかる組織/臓器との接触から上記デバイスを抜き出し、プリオンがデバイスに結合しているかどうかを測定することからなり、デバイスを組織/臓器と120分間接触させることを特徴とする組織/臓器若しくはそれらの液におけるプリオンの存在を測定する方法に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

組織 / 臓器におけるプリオンの存在を検出する方法において、

- (a) 組織 / 臓器を、プリオンとの結合能を有するデバイスと接触させ、
- (b) 上記組織 / 臓器との接触から上記デバイスを抜き出し、及び
- (c) プリオンが上記デバイスに結合しているかどうかを測定する

工程からなる方法。

【請求項 2】

組織 / 臓器におけるプリオンの存在を検出する非侵襲的方法において

- (a) 組織 / 臓器を、プリオンとの結合能を有するデバイスと接触させ、
- (b) 上記組織 / 臓器との接触から上記デバイスを抜き出し、及び
- (c) プリオンが上記デバイスに結合しているかどうかを測定する

工程からなる方法。

【請求項 3】

デバイスが、プリオンを分解から保護する能力を有することを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

組織 / 臓器が、哺乳動物の組織 / 臓器であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 いずれかに記載の方法。

【請求項 5】

組織 / 臓器が、家畜又はヒトの組織 / 臓器であることを特徴とする請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

組織 / 臓器が、プリオンが蓄積する組織 / 臓器であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 いずれかに記載の方法。

【請求項 7】

組織 / 臓器が、脳、脾臓、リンパ節、又は扁桃腺から選択されることを特徴とする請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

デバイスが金属を含むことを特徴とする先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

金属が、スチール、ステンレススチール、銀、金、又はそれらの組み合わせからなるグループから選択される 1 若しくは 2 以上の金属を含むことを特徴とする請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

デバイスが、1 若しくは 2 以上のワイヤーを含むことを特徴とする請求項 8 又は 9 記載の方法。

【請求項 11】

1 若しくは 2 以上の実験動物をデバイスと接触させ；

上記実験動物のインキュベーションを行い；

上記実験動物における悪影響や死亡例を観察し；また任意に

プリオンを証明するため、悪影響又は死亡が認められる実験動物の生検を実施する

工程からなるデバイスにプリオンが結合しているかどうかを測定する方法。

【請求項 12】

デバイスを 1 若しくは 2 以上の実験動物と、1 実験動物あたり 1 時間以上接触させることを特徴とする請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

デバイスを 1 若しくは 2 以上の実験動物と、1 実験動物あたり 5 時間以上接触させることを特徴とする請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

デバイスを 1 若しくは 2 以上の実験動物と、1 実験動物あたり 5 時間を超えて接触させる

10

20

30

40

50

ことを特徴とする請求項 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

実験動物が哺乳動物であることを特徴とする請求項 1 1 ~ 1 4 いずれかに記載の方法。

【請求項 1 6】

実験動物がマウスであることを特徴とする請求項 1 5 記載の方法。

【請求項 1 7】

実験動物がトランスジェニックマウスであることを特徴とする請求項 1 6 記載の方法。

【請求項 1 8】

トランスジェニックマウスが、1 若しくは 2 以上の P r P トランスジーンを有することを特徴とする請求項 1 7 記載の方法。

10

【請求項 1 9】

P r P トランスジーンが、哺乳動物における P r P をコードすることを特徴とする請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 0】

P r P トランスジーンが、家畜又はヒトの P r P をコードすることを特徴とする請求項 1 9 記載の方法。

【請求項 2 1】

(a) 細胞株をデバイスと接触させ；

(b) 上記細胞株のインキュベーションを行い；及び

(c) 上記細胞株がプリオンを含んでいるかどうかを測定する

20

工程からなり、デバイスにプリオンが結合しているかどうかを測定する方法。

【請求項 2 2】

蛋白質測定法、免疫測定法、ウエスタンブロット法、又はセルブロット法を用いて、細胞株がプリオンを含んでいるかどうかを測定することを特徴とする請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

デバイスの表面で直接プリオンを検出することにより、該デバイスにプリオンが結合しているかどうかを測定する方法。

【請求項 2 4】

蛋白質測定法、免疫測定法、又はウエスタンブロット法を用いて、デバイスの表面にプリオンが結合しているかどうかを測定することを特徴とする請求項 2 3 記載の方法。

30

【請求項 2 5】

デバイスと組織 / 臓器との接触時間が 1 2 0 分以下であることを特徴とする請求項 1 ~ 2 4 いずれかに記載の方法。

【請求項 2 6】

デバイスと組織 / 臓器との接触時間が 3 0 分以下であることを特徴とする請求項 1 ~ 2 4 いずれかに記載の方法。

【請求項 2 7】

デバイスと組織 / 臓器との接触時間が 5 分以下であることを特徴とする請求項 1 ~ 2 4 いずれかに記載の方法。

【請求項 2 8】

40

金属を含むことを特徴とするプリオンとの結合能を有するデバイス。

【請求項 2 9】

スチール、ステンレススチール、銀、金、又はそれらの組み合わせからなるグループから選択される 1 若しくは 2 以上の金属を含むことを特徴とする請求項 2 8 記載のデバイス。

【請求項 3 0】

1 若しくは 2 以上のワイヤーからなることを特徴とする請求項 2 8 又は 2 9 に記載のデバイス。

【請求項 3 1】

デバイスに結合したプリオンが保護されることを特徴とする請求項 2 8 ~ 3 0 いずれかに定義されるデバイス。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は方法に関する。具体的に本発明はプリオンタンパク質の存在を検出するアッセイ法に関する。

【背景技術】

【0002】

背景知識として、プリオンとは核酸をもたない伝達性（伝播性）粒子である。プリオンタンパク質（PrP）遺伝子はプリオンタンパク質をコードする。PrPの正常型はPrP^cと呼ばれるのに対し、異常構造をとる異性体はPrP^{Sc}と呼ばれており、プリオンの主要な又は唯一の成分であると信じられている。プリオン病の中で最も注目されているのは牛海綿状脳症（BSE；Bovine Spongiform Encephalopathy）、羊スクレイピー、及びヒトにおけるクロイツフェルト・ヤコブ病（CJD；Creutzfeldt-Jacob Disease）である。CJDの最も一般的な症状は、個体に特発性に現れる孤発性（散発性）CJD（sCJD）である。医原性CJD（iCJD）は事故感染による疾病である。家族性CJD（fCJD）は、ヒトPrP遺伝子の変異を原因として稀に家族内で発生する形態のCJDである。ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病（GSS；Gerstmann-Strassler-Scheinker Disease）もまた稀な遺伝性のヒト・プリオン病である。いずれの家族性疾患も常染色体優性疾患である。ヒトにおける「新変異型」CJD（vCJD）は、他のCJD型におけるものとは異なるPrP糖化パターンを伴う別種のCJD株型である。畜牛からBSEが伝播してヒトvCJDが発生した可能性が示唆されている。

10

20

【0003】

プリオンは、物理的及び化学的不活化に対し極めて耐性であり、そのことが、プリオンを含む材料を、熱滅菌やホルムアルデヒド等の従来法により滅菌する場合の問題となっている（Taylor et al. (1994), Arch. Virol. 139, 313-326; Brown et al. (1982), N. Engl. J. Med. 306, 1279-1282; Ernst & Race (1993), J. Virol. Methods 41, 193-201; Taylor (1993), Br. Med. Bull. 49, 810-821)。医原性であると証明された、若しくは医原性であることが疑われる100を超えるヒトへの伝播例が既に報告されている。Zobele et al. (1999) Mol. Med. 5, 240-243 では、スクレイピープリオンに感染したステンレススチール器具を滅菌するモデルシステムが提供されている。ワイヤーを10%ホルムアルデヒドで1時間処理した後もなお、該ワイヤーを指標マウスの脳内に移植した結果、感染が引き起こされたとの知見に証明されるように、マウス馴化スクレイピープリオンがステンレススチールワイヤーに強固に結合し得ることが報告されている。

30

【0004】

ヒトに対する診断は通常、組織病理学的及び免疫組織化学的測定法に依拠している。さらに進んだプリオン感染診断法には、脳又は扁桃腺の生検などの侵襲的手法が必要となる。これら生検のホモジェネートをマウス等の実験動物の脳に注入する。実験動物がプリオン感染の臨床症状を発症した場合は、その実験動物の脳をさらに調べてプリオンの存在を確認する。この方法が抱える問題は、生検に含まれるプリオンが分解されてしまう点にある。結果的に、感染性は通常24時間以内に消失する。

40

【0005】

本発明は、先行技術が抱える問題を克服しようとするものである。

【発明の開示】

【0006】

本発明は、組織／臓器又はそれらの液におけるプリオンを検出する方法を提供する。本方法では、組織／臓器と接触させる金属ワイヤー等のデバイスを使用する。驚くべきことに、本デバイスは5分以内にプリオンと結合する能力を有する。その後、本デバイスを組織／臓器との接触から拔出する。本デバイスでは、プリオンが3日以上も分解されずに保存されるが、これは驚きに値する。先行技術の方法では、プリオンは早くも24時間後には分解してしまう。デバイスにプリオンが結合しているかどうかを確認するため、以下に記

50

載するように数多くの異なる方法を用いることができる。従来知られていたより遥かに短時間でプリオンが本デバイスに結合するので、プリオン感染の診断も、先行技術の方法に比べると著しく速やかにすることができる。

【0007】

第一の特徴として本発明は、組織/臓器におけるプリオンの存在を検出する方法を提供する。この方法は、プリオンとの結合能を有するデバイスに組織/臓器を接触させ、該組織/臓器との接触から該デバイスを抜き出し、該デバイスにプリオンが結合しているかどうかを測定する工程からなる。

【0008】

第二の特徴として本発明は、組織/臓器におけるプリオンの存在を測定する非侵襲的方法を提供する。この方法は、プリオンとの結合能を有するデバイスに組織/臓器を接触させ、該組織/臓器との接触から該デバイスを抜き出し、該デバイスにプリオンが結合しているかどうかを測定する工程からなる。上記非侵襲的方法により、上記無損傷の組織/臓器が少なくとも実質的に無損傷のままであることが好ましい。

【0009】

本発明の方法で用いるデバイスでは、プリオンが分解されずに保存される点で有利である。

【0010】

組織/臓器は哺乳動物のものであることが好ましい。組織/臓器が、家畜又はヒトの組織/臓器であることがより好ましい。

【0011】

本発明の方法は、プリオンが蓄積する組織/臓器におけるプリオンを検出する点で有利である。組織/臓器は、脳、脾臓、リンパ節、又は扁桃腺から選択されることが好ましい。

【0012】

本発明のデバイスは、1若しくは2以上の金属を含み、又はポリスチレン等のプラスチック、若しくは硝子を含むものでもよい。本発明では、これらの材料にプリオンタンパク質が結合することを開示しているが、これは驚くべきことである。本発明のデバイスは、1若しくは2以上の金属を含むことが好ましい。金属が、スチール、ステンレススチール、銀、金、若しくはそれらの組合せからなるグループから選択される1若しくは2以上の金属を含むことが好ましい。より好ましいのは、金属がステンレススチールであることである。

【0013】

本発明のデバイスは、直径が5mm未満、好ましくは1mm未満、好ましくは実施例に記載した大きさをもつ1若しくは2以上のワイヤー又は球(sphere)を含むことが好都合である。デバイスが、1若しくは2以上の金属ワイヤーを含むことが好ましい。

【0014】

本発明の第三の特徴として、1若しくは2以上の実験動物をデバイスに接触させ、該実験動物のインキュベーションを行い、該実験動物における悪影響や死亡例を観察し、またプリオンを証明するため、悪影響又は死亡が認められる実験動物の生検を任意に実施する工程からなる、デバイスにプリオンが結合しているかどうかを測定する方法を提供する。

【0015】

1若しくは2以上のデバイスを、1時間以上実験動物と接触させることが好ましい。1若しくは2以上のデバイスを、5時間以上実験動物と接触させることがより好ましい。1若しくは2以上のデバイスを、5時間を超えて実験動物と接触させることがより好ましい。最も好ましいのは、1若しくは2以上のデバイスを実験動物と永久に接触させておくことである。デバイスそのものに起因する悪影響は、これまで認められていない。

【0016】

本発明に有用な実験動物(1若しくは2以上)は、哺乳動物であることが好ましい。実験動物がマウスであることが好ましい。実験動物には、トランスジェニックマウスも含まれる。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

かかるトランスジェニックマウスが、1若しくは2以上のPrPトランスジーンを有することが好ましい。

【 0 0 1 8 】

第四の特徴として本発明は、1若しくは2以上の細胞株をデバイスと接触させ、該細胞株のインキュベーションを行い、プリオン/プリオンタンパク質の存在を調べるために上記細胞株のアッセイを行う工程からなる、プリオンがデバイスに結合しているかどうかを測定する方法を提供する。

【 0 0 1 9 】

プリオン/プリオンタンパク質の存在は、蛋白質測定法(プロテインアッセイ)、免疫測定法(イムノアッセイ)、ウエスタンブロット法、又はセルブロット法等、当技術分野で公知の好適方法のいずれによってもアッセイが可能である。プロテイナーゼKによる処理後にPrP^{Sc}の存在を検出することが好ましい。

10

【 0 0 2 0 】

第五の特徴として本発明は、デバイスにプリオンが結合しているかどうかを、該プリオン/プリオンタンパク質を該デバイス表面上で直接検出することにより測定する方法を提供する。上記方法によりプリオン/プリオンタンパク質を検出するにあたり、蛋白質測定法、免疫測定法、又はウエスタンブロット法、好ましくは免疫測定法を用いることが好ましい。

【 0 0 2 1 】

本発明に用いるデバイスは、組織/臓器との接触時間が120分以下であることが好ましい。デバイスと組織/臓器との接触時間が30分以下であることが、より好ましい。最も好ましいのは、デバイスと組織/臓器との接触時間が5分以下であることである。

20

【 0 0 2 2 】

利点

本発明には数多くの利点がある。それらの利点を以下に明らかにする。

【 0 0 2 3 】

例えば本発明は、商業的に有用な方法を提供する点で有利である。

【 0 0 2 4 】

さらに例をあげると本発明は、組織/臓器におけるプリオンの存在を検出する方法を提供する点で有利である。

30

【 0 0 2 5 】

さらに例をあげると本発明は、プリオンを分解から保護する点で有利である。

【 0 0 2 6 】

さらに例をあげると本発明は、プリオン感染を治療する薬剤の調製に用いられる1若しくは2以上の作用因子(agent)の同定法を提供する点で有利である。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 2 7 】

プリオン、PrP^c及びPrP^{Sc}

ここに言及される「プリオン」なる用語は、核酸をもたないタンパク性感染性粒子のこと

40

【 0 0 2 8 】

PrP^{Sc}は、PrP^c(プリオンタンパク質の正常型)の構造的異性体であり、プリオンの主要な又は唯一の成分であると確信されている。

【 0 0 2 9 】

本発明の好ましい実施形態においては、プリオンを含有している可能性のある組織/臓器を試験する。

【 0 0 3 0 】

Victor A. McKusick et alが HYPERLINK "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/0mim>" においてプリオンの背景を教示している。以下に記載するプリオンに関する情報は、そこからの抜

50

粹である。

【0031】

プリオンタンパク質遺伝子の変異は、ゲルストマン・ストロイスラー病 (GSD; Gerstmann-Straussler disease)、クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD; Creutzfeldt-Jakob disease)、及び家族性致死性不眠症と関係があり、プリオンタンパク質の異常アイソフォームは、上記疾病、並びにクールー病及び羊スクレイピーにおける感染性作用因子として作用し得る。

【0032】

Prusiner (1982、1987) は、プリオンが核酸をもたない新しい分類の感染性作用因子を代表していることを示唆した (プリオンという用語は Prusiner (1982) によって提唱されたもので、「タンパク質感染性作用因子 (protein infectious agent)」を表している)。プリオン病は接種により伝達し、或いは常染色体優性疾患として遺伝する神経変性症状である。Prusiner (1994) は、伝達性海綿状脳症の病因を再検討し、プリオンタンパク質のプロテアーゼ耐性アイソフォームがかかる疾患の病因として重要であることを記している。Mestel (1996) は、感染性タンパク質の存在についての肯定的及び否定的証拠 (並びに肯定的又は否定的見解) を再検討している。

10

【0033】

Tagliavini et al. (1991) は、インディアナ州の家族 (Indiana kindred) 内患者 2 名から単離したアミロイド・ブランクコアから抽出したタンパク質を精製して特徴づけを行った。上記著者らは、GSD アミロイドの主要成分は 11 kD の PrP 分解産物であり、その N 末端がヒト PrP c DNA から推定されるアミノ酸配列の 58 番目に位置するグリシン残基に相当していることを見出した。またアミロイド断片は、さらに大きな PrP 断片を含み、外見上無処理の N 末端及びアミロイド P 成分を有していた。Tagliavini et al. (1991) はこれらの知見を、疾患プロセスに伴いタンパク質分解による PrP の開裂が生じ、不溶性フィブリルへとポリマー化するアミロイド生成ペプチドが生成されることを示唆するものであると解釈した。上記家族には、構造遺伝子の変異が認められなかったので、PrP の一次構造以外の要因が、アミロイド形成過程において重要な役割を担っている可能性がある。

20

【0034】

プリオンが、上記疾患の主要原因たる感染性作用因子によって合成が刺激されるシアロ糖タンパク質であるというのが、一つの解釈となっており、Manuelidis et al. (1987) は、PrP ペプチドが CJD における感染性作用因子ではないことを示唆する証拠を提示した。Pablos-Mendez et al. (1993) は、「プリオン病のねじれた歴史」を再検討し、プリオンが感染性であるという見解にとって代わる見解、すなわちプリオンは細胞毒性代謝産物であるとの見解を示唆した。本著者らは、代謝産物 PrP のプロセシングの研究、及びこのタンパク質の出現を増強する作用因子の試験を行うことが、自分達の仮説を立証する上で有用であると示唆した。上記著者らのモデルからは、PrP の異化を阻害し得る物質により PrP が蓄積されることが予想された。トランスジェニックマウスにおいて PrP 合成量が増加すると、実験用スクレイピーの潜伏期間が短縮される。Pablos-Mendez et al. (1993) の仮説は、PrP の合成経路よりむしろ分解経路が細胞内で脱線することを示唆した。

30

40

【0035】

Forloni et al. (1993) は、PrP の 106 ~ 126 ペプチドには、インビトロにおいてアミロイド様フィブリルへとポリマー化する高い固有の能力がみられることを見出した。上記著者らはまた、初期ラット海馬培養物を、上記ペプチドに相当するペプチドにマイクロモル濃度下で慢性的に曝すことにより、神経死が生じることを示した。このようなペプチドの細胞毒効果にはアポトーシス機構が関与していることを Forloni et al. は示唆した。

【0036】

伝達性海綿状脳症の感染性、病原性作用因子は、PrP タンパク質のプロテアーゼ耐性が

50

つ不溶性の形態であり、正常型プロテアーゼ感受性PrPタンパク質から翻訳後に派生することが示唆されている (Beyreuther and Masters, 1994)。Kocisko et al. (1994) は、精製成分からなる無細胞系において、正常型PrPタンパク質がプロテアーゼ耐性PrPタンパク質へと転化することについて報告している。このようにPrPが正常型から病原性へと選択的に転化するには、既存の病原性PrPが存在していることが必要とされる。上記著者らは、新たなPrPタンパク質の生合成、アミノ基に結合することによるPrPタンパク質のグリコシル化、又はPrPタンパク質における正常型グリコシルホスファチジルイノシトール・アンカーの存在は、上述の転化には不要であることを示した。これは、病原性PrPタンパク質が、それ自身と正常型PrPタンパク質との間の特異的タンパク質-タンパク質相互作用の結果、形成され得ることを示す直接的な証拠である。

10

【0037】

Rivera et al. (1989) は、13歳の重症進行性神経疾患男性患者について記載している。その患者の核型は、15p; 20pのテロメア融合に起因する偽中心重複性染色体を示していた。リンパ球においては、異常染色体のセントロメア収縮は常に20番染色体で起きるのに対し、線維芽細胞においては上記両染色体のセントロメアが交互に収縮していた。上記著者らは、機能性DNA配列の構造が修飾される結果、セントロメア特異的タンパク質への正常な結合が妨げられ、セントロメアが不活化することを示唆した。上記著者らはまた、クロイツフェルト・ヤコブ病で認められる海綿状グリオニューロナル (glioneuronal) ジストロフィーを想起させる上記患者の疾患は、プリオンタンパク質の変異が生じた後に発生すると主張した。

20

【0038】

Collinge et al. (1990) は、家族性であれ孤発性であれ、「プリオン病」という用語が診断用語として、より適切であると示唆した。GSD病に罹患したインディアナ州の家族 (Indiana kindred) の症例が、Farlow et al. (1989) 及び Ghetti et al. (1989) によって報告された。遺伝子予測にPrP遺伝子分析を採用することには、遺伝性の遅発性神経変性疾患の発症前検査の浸透度や合併症が不確実であるがゆえに生じる潜在的な問題がある。しかしCollinge et al. (1991) は、遺伝性プリオン病を抱える家族にとって、リスク保持者の発症前診断並びにCJD又はGSDの排斥を可能にし、遺伝カウンセリングの質を向上させる機能が上記分析にはあると結論付けた。

【0039】

Gajdusek (1991) は、現在までに判明しているPRNP変異をチャート図にまとめた。すなわち単一アミノ酸の変化を起こす5種類の変異と、オクタペプチド反復がそれぞれ5、6、7、8又は9回行われる5ヶ所における挿入である。上記著者はまた、トランスサイレチン遺伝子 (TTR; 176300) において同定されたアミロイドーシスを惹起する18種類のアミノ酸置換をまとめた表も発表し、上述した2分類の疾患における挙動を比較した。

30

【0040】

Schellonberg et al. (1991) は、PRNP挿入変異と共に、CJD及びGSSDと関連するPRNP遺伝子の102、117及び200番目のコドンにおけるミスセンス変異を、アルツハイマー病の76家族、孤発性アルツハイマー病と推測される127症例、ダウン症候群の16症例、及び256正常対照例で調べたが、いずれの症例も上記のどの変異に対しても、ポジティブではなかった。Jendroska et al. (1994) は、特発性パーキンソン病 (PD; 168600)、多系統萎縮症、びまん性レビー小体病 (127750)、スチール-リチャードソン-オルゼウスキー (Steele-Richardson-Olszewski) 症候群 (260540) 大脳皮質基底核変性症、及びピック病 (172700) を含む種々の運動障害を呈する90症例において、組織プロット免疫染色法により病原性プリオンタンパク質の検出を試みた。これらの脳標本のいずれからも病原性プリオンタンパク質は同定されなかったが、クロイツフェルト・ヤコブ病に罹患している4対照例からは容易に検出された。Perry et al. (1995) は、54家族からのアルツハイマー病患者82名 (家族内症例を30件含む) と、これら患者とそれぞれ同年齢の対照群39名のプリオン遺伝子座におけ

40

50

る変異をSSCPによりスクリーニングした。その結果、第68コドン近傍に24bpの欠失が認められたが、それは遅発性アルツハイマー病家族の成員中、罹患した兄弟姉妹2名と子供1名においてgly-proに富む5個のオクタペプチド反復のうちの1個が消失したものだ。しかし、同じ家系で罹患した他の家族成員には、このような欠失が認められなかった。ただし遅発性アルツハイマー病家族の非罹患成員6名のうち年齢が一致する対照3名においても上記の欠失が認められた。これとは別のオクタペプチド反復の欠失が同じアルツハイマー病家族のさらに別の成員3名において観察されたが、その3名のうち2名は罹患していた。これら以外に変異は認められなかった。Perry et al. (1995) は、プリオンタンパク質の変異とアルツハイマー病との間に関係があるとの証拠はないと結論した。

10

【0041】

Hsiao et al. (1990) は、分析対象家族のうち3名のPrP遺伝子のオープンリーディングフレームに変異は認められなかったが、その後Hsiao et al. (1992) は、phe198-to-ser変異を明らかにした。176640.0011を参照のこと。

【0042】

Palmer and Collinge (1993) は、プリオンタンパク質遺伝子における変異及び多型性について再検討を行った。

【0043】

Chapman et al. (1996) は、プリオンタンパク質遺伝子の第200コドンにおける病原性リシン変異(176640.0006)に対してヘテロ接合性で、第129コドンでのメチオニンに対してホモ接合性である患者の致死性不眠症及び重症視床病理について報告した。上記著者らは、この表現型と、第178コドンでの変異(176640.0010)に関する表現型との類似性を強調した。

20

【0044】

Collinge et al. (1996) は、ヒト・プリオン病を広範な症例から調べ、種々の天然型プリオン株型を示す可能性があるプロテアーゼ耐性PrPのパターンを同定した。上記著者らは「新変異型」CJDのプロテアーゼ耐性PrPを研究して、かかるPrPが、他の形態のCJDから分子基準によって区別され得る別種の株型であるか否かを判定した。Collinge et al. (1996) は、ウエスタンブロット法を行った結果、孤発性CJD及び医原性CJD(死体の脳から得た成長ホルモンの投与に通常起因する)が、異なる3種類のプロテアーゼ耐性PrPパターンを伴うことを明らかにした。1型及び2型は、孤発性CJDと一部の医原性CJDにおいて認められる。3番目の型は、抹消経路からプリオンに暴露されることによる後天性プリオン病で認められる。Collinge et al. (1996) は、「新変異型」CJDが、PrPグリコシル化の特徴的なパターンを含むウエスタンブロット上でみられるプロテアーゼ耐性PrPの独特で高度に一貫した出現と会合していることを明らかにした。近交系マウスにCJDを伝達すると、接種したCJDに特有のPrPパターンを示した。牛海綿状脳症(BSE)プリオンを伝達すると「新変異型」CJDのグリコフォーム率と極めて近いグリコフォーム率パターンが生じた。上記著者らは、サルにおける実験的BSEと、家猫における天然型BSEのPrPが、実験的マウスBSE及び「新変異型」CJDのものと区別できないグリコシル化パターンを示すことを見出した。Collinge et al. (1996) の報告に対し、Aguzzi and Weissmann (1996) による再検討が行われたが、その再検討においてCollinge et al. (1996) はBSEと関連性のある「新変異型」CJDの神経病理性及び臨床上の性質の再検討を行ったのであると結論された。

30

40

【0045】

Prusiner (1996) は、プリオン病に関する分子生物学及び遺伝子学に包括的な再検討を加えた。Collinge (1997) も同様に、この観点から再検討した。Collingeは、ヒト・プリオン病の3種類のカテゴリー、すなわち(1)クールー及び医原性CJDを含む後天性、(2)定型及び非定型CJDを含む孤発性、(3)家族性CJD、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、致死性家族性不眠症、及び種々の非定型痴呆を含む遺伝性、を認識した。Collinge (1997) は、当時までに報告されていた12種の病理性変異を表に示

50

した。疾患表現型をコードするタンパク質の能力は、生物学に重要なメンデルの法則に依拠しない伝達性を表していることを記した上でCollinge (1997) は、進化の過程で、多様な種において他のタンパク質にかかる方法が用いられてこなかったとすれば驚きであると述べている。同著者はまた、酵母にみられるプリオン様機構の同定についても言及した (Wickner, 1994; Ter Avanesyan et al., 1994)。

【0046】

Horwich and Weissman (1997) は、関連性のある伝達性神経変性疾患群におけるプリオンタンパク質の中心的役割について再検討した。そのデータからはプリオンタンパク質が疾患プロセスに必要であることが示され、プリオンタンパク質が、その正常な可溶性ヘリックス構造から不溶性シート構造へと構造転化することが疾患及び感染の発生と密接に関連していることが示された。上記著者らは、かかる転化プロセスの多くは未だ解明されていないと記している。

10

【0047】

Mallucci et al. (1999) は、常染色体優性分裂により、初老期痴呆、運動失調及び他の神経精神症状がみられる英国の大家族について報告した。特定の個人について種々の時期に、脱髄疾患、アルツハイマー病、クロイツフェルト・ヤコブ病、及びゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群の診断を行った。Mallucci et al. (1999) はまた、上記家族と血縁関係にあると思われるアイルランドの家族についても記載しており、その記載においては罹患した個人に対し、多発性硬化症、痴呆、大脳皮質基底核変性症、及び「新変異型」CJDの診断が考慮された。分子研究を行った結果、PRNP遺伝子の $\alpha 117 - \text{to} - \text{val}$ に変異が認められたことから、上記罹患者の疾患がプリオン病であると同定した。上記著者らは、上述の血縁関係にある両家族にみられる表現型の発現に多様性があることを強調し、「新変異型」CJDが疑われる症例を含め、非定型初老期痴呆又は神経精神特性や運動失調を呈する個人に関しては、PRNP分析により遺伝性プリオン病を除外すべきであると提唱した。Hegde et al. 1999は、伝達性プリオン病と遺伝性プリオン病には神経変性に至る共通の経路があることを明らかにした。Hegde et al. 1999は、異常な折りたたみを有するアイソフォームである蓄積したPrP^{Sc}がもつ神経変性疾患を引き起こす際の有効性は、宿主がコードするPrPがCtmPrPと呼ばれる膜透過体となって偏在することに依存していることを観察した。さらに、伝達性プリオン病におけるPrP^{Sc}蓄積の時間経過に密接に引き続いてCtmPrP生成量が増加する。従って、PrP^{Sc}が蓄積することにより、CtmPrPの発生又は代謝に関与する現象がイントランスで調節されていることが明らかである。以上のデータからHegde et al. 1999は、CtmPrPに介される神経変性現象が、遺伝性プリオン病と感染性プリオン病の病原における共通のステップであるかもしれないと結論した。

20

30

【0048】

PrPの非病原性細胞アイソフォームであるPrP^Cは、神経細胞に強く発現される遍在型(ユビキタスな)糖タンパク質である。Mouillet-Richard et al. (2000) は、抗体仲介架橋を介したPrP^C依存性シグナルトランスダクションを調べるためにマウス1C11神経細胞分化モデルを用いた。この1C11クローンは、上皮形態を有し、神経細胞会合機能をもたない委任神経外胚葉幹細胞である。1C11細胞は誘導を受けて神経細胞様形態を発達させ、セロトニン作動性細胞又はノルアドレナリン作動性細胞のいずれかへと分化する。これら2つの分化経路のどちらを選択するかは、どのような誘導体が用いられたかに依存する。PrP^Cが特異的抗体と結合することにより、セロトニン作動性細胞又はノルアドレナリン作動性細胞の双方においてチロシンキナーゼFYN (137025) のリン酸化レベルが著減した。PrP^CのFYNへの結合は、カベオリン-1 (601047) 依存性だった。Mouillet-Richard et al. (2000) は、クラトウリン (clathourin) (118960を参照のこと) もまた、この結合に関与している可能性のあることを示唆した。PrP^C依存性のFYN活性化を誘導する1C11細胞株の能力は、完全に分化したそのセロトニン作動性又はノルアドレナリン作動性幹細胞に限定されていた。さらに、PrP^Cのシグナリング活性は主として神経突起で生じた。Mouillet-Richard et al. (

40

50

2000) は、P r P^C がシグナルトランスダクションタンパク質である可能性を示唆した。

【0049】

マッピング

体細胞ハイブリダイゼーション及びインサイチュ-ハイブリダイゼーションを組み合わせることにより (Sparkes et al., 1986)、或いは染色体をソーティングして得た DNA をスポットプロットングすることにより (Liao et al., 1986)、プリオン関連タンパク質のヒト遺伝子を 20 p 12 - p t e r にマッピングした。Robakis et al. (1986) もまたインサイチュ-ハイブリダイゼーションにより P R N P 遺伝子座を 20 p に定めた。

【0050】

20 p の中間部欠失を分析した結果から Schnittger et al. (1992) は、p t e r - - P R N P - - S C G 1 (1 1 8 9 2 0) - - B M P 2 A (1 1 2 2 6 - - P A X 1 (1 6 7 4 1 1) - - c e n の順番の遺伝子座を明らかにした。Puckett et al. (1991) は、P R N P 遺伝子の 5 - prime であり、高いヘテロ接合性を有する R F L P を同定した。この R F L P は、20 番染色体の p t e r - p 1 2 領域における有用なマーカーとして使える可能性がある。

10

【0051】

Riek et al. (1998) は、マウス・プリオンタンパク質の精製 N M R 構造を用いて、遺伝性のヒト伝達性海綿状脳症の構造基礎を解明した。マウス・プリオンタンパク質細胞型においては、疾病特異的サブドメインの存在を示唆する変異部位の空間クラスターは観察されなかった。ヒト P R N P 第 1 2 9 位置における多型性が、a s p 1 7 8 - t o - a s n (D 1 7 8 N ; 1 7 6 6 4 0 . 0 0 0 7) 変異から遮断されている疾患表現型に対して高度に特異的な影響を及ぼすことが観察されたが、第 1 2 8 残基と第 1 7 8 残基との水素結合がかかる影響の構造的基礎となっている。全般的にみて、一部の疾患関連アミノ酸の置換が発生するだけで、P R N P 細胞型の安定性が減じられることを N M R 構造は示しており、変異タンパク質にみられる僅かな構造上の差異が、種々多様な方法により分子間のシグナリングに影響することが示唆される。

20

【0052】

Windl et al. (1999) は、ドイツ・クロイツフェルト・ヤコブ病サーベイランスユニットと呼ばれる、プリオン病が疑われる患者 5 7 8 名の P R N P 遺伝子のコーディング領域における変異及び多型性の調査を 4 年半にわたり実施した。上記著者らは、病原性であることが既に報告されていたミスセンス変異が認められた 4 0 症例を見出した。その中では D 1 7 8 N 変異が一番多かった。それらの症例全てにおいて D 1 7 8 N は第 1 2 9 コドンのメチオニンと結びついており、それにより定型致死性家族性不眠症遺伝子型がもたらされていた。新規なミスセンス変異が 2 例と、サイレントな多型性が数例認められた。Windl et al. (1999) は、文献記載中の図 1 に P R N P のコーディング領域における既知の病原性変異を図式化した。

30

【0053】

歴史

Aguzzi and Brandner (1999) は、「プリオン遺伝子学 (the genetics of prions) 」を再検討したが、本著者らが伝達性海綿状脳症を引き起こす不可解な作用因子と定義したプリオンは、非遺伝性病原のパラダイムに含まれることから、「プリオン遺伝子学」というのは言葉の矛盾ではないかとの疑問を呈した。Griffith (1967) が初めて提唱したタンパク質オンリー (protein-only) 仮説によれば、プリオン感染性は、現在では P R N P と呼ばれる細胞タンパク質の異常型であるスクレイピータンパク質と同一である。スクレイピープリオンが細胞プリオンを集めて、それらをさらにスクレイピープリオンに転化させることにより複製が行われる。新たに形成されたスクレイピープリオンが転化サイクルに参加して連鎖反応が生じ、スクレイピープリオンがこれまでにない速さで蓄積されることになる。Prusiner (1982) が病原性タンパク質を精製し、Weissmannら (Oesch et al., 1985; Basler et al., 1986) が、その正常細胞型タンパク質である P R N P と同様にスクレイピータンパク質もコードする遺伝子をクローニングしてからは、上記の仮説は広く認め

40

50

られ、受け入れられるようになった。タンパク質オンリー仮説から予測されたように、Prnp遺伝子を除去することにより、プリオンに暴露させたマウスが実験的スクレイピーに罹患することが阻止されたことを、Weissmannのグループ (Bueler et al., 1993) が報告したことから、上記の説にさらに弾みがついた。Aguzzi and Brandner (1999) は、プリオン病の家族性形状とプリオン遺伝子の変異との関連性に関する発見は、非常に画期的なものであると考えた。

【0054】

動物モデル

プリオンの構造遺伝子 (Prn-p) をマウス2番染色体にマッピングした。マウスの第2遺伝子座であり、Prn-pと密接な関連性があるPrn-iは、マウスにおけるスクレイピーの潜伏期間の長さを決定する (Carlson et al., 1986)。スクレイピーの潜伏期間を制御する別の遺伝子であるシンボル化した (symbolized) Pid-1はマウス17番染色体に位置している。プリオン潜伏期間に影響を及ぼす量的形質遺伝子座 (QTL) についても第9、11章 (Stephenson et al 2000)、第2、11、12章 (Lloyd et al 2001)、及び第2、8、4、15章 (Manolatron et al 2001) に記載がある。Scott et al. (1989) は、シリアンハムスターから得たプリオンタンパク質遺伝子をハーバリングするトランスジェニックマウスに、ハムスター・スクレイピープリオンを接種すると、ハムスターに特有のスクレイピー感染力、潜伏期間、及びプリオンタンパク質アミロイドプラークを示すことを報告した。Hsiao et al. (1994) は、高レベルの変異型P101Lプリオンタンパク質を発現する2系統のトランスジェニックマウスは、実験的マウス・スクレイピーと識別できない神経疾患及び中枢神経系病理を発生した。ヒト・プリオンタンパク質の第102アミノ酸は、マウス・プリオンタンパク質の第101アミノ酸に対応しているので、P101Lマウス変異は、ゲルストマン・ストロイスラー病をヒトに発生させるpro102-to-leu変異 (176640.0002) に相当する。Hsiao et al. (1994) は、P101Lトランスジーンを低レベルに発現するマウスと、変異型P101Lプリオンタンパク質を高レベルに発現するトランスジェニックマウスの脳抽出物を注入したシリアンハムスターとに、神経変性が連続して伝達されたことを報告した。上記高発現トランスジェニックマウスの脳には低レベルの感染性プリオンしか蓄積しなかったにもかかわらず、接種を受けた動物に連続して疾患が伝達されたことは、これら未接種動物の脳においてもプリオンのデノボ形成が生じたことを示唆しており、プリオンに外来核酸がないことのさらなる証拠となった。

【0055】

Bueler et al. (1994)、Manson et al. (1994)、及びSakaguchi et al. (1996) は、PrPノックアウトマウスに関する研究を報告した。Sakaguchi et al. (1996) は、自分たちが作製したPrPノックアウトマウスは、70週齢までは一見正常だが、その時点から一様に小脳性失調症の兆候を呈し始めたことを報告した。組織学的研究により、小脳回の大部分においてプルキニエ細胞 (Purkinje cells) が顕著に消失していることが判明した。小脳萎縮及び第四脳室拡張についての記載がある。同様の病理学的変化は、Bueler et al. (1994) 及びManson et al. (1994) が作製したPrPノックアウトマウスでは観察されなかった。Sakaguchi et al. (1996) は、この結果の違いは、マウス系統の違い、或いはPrP遺伝子内におけるノックアウトの程度の違いに起因する可能性があるとして述べた。特筆すべきは、記載されている3系統全てのノックアウトマウスにおいてプリオン感染感受性が消失していたことである。

【0056】

Collinge et al. (1994) は、PrPヌルマウスに関する自らの研究に基づき、正常なシナプス機能にとってプリオンタンパク質が必要であると結論付けた。上記著者らは、細胞性PrPが翻訳後に修飾された形態であるPrP^{Sc}の生成に伴うドミナントネガティブ効果により、遺伝性プリオン病が引き起こされ、究極的には機能性PrP (PrP^C) が漸進的に消失すると主張した。Tobler et al. (1996) は、PrPヌルマウスにおいてサーカディアンリズムや睡眠の変化がみられることを報告し、かかる変化が致死性家族性不眠

10

20

30

40

50

症における睡眠変化との興味深い類似性を示すものであると強調した。

【0057】

PrPを欠損するマウスは正常に発達するが、スクレイピー耐性であり、PrPトランスジェーンを導入することにより、スクレイピー病に対する感受性が回復する。かかる活性に必要なPrP内の領域を同定するため、Shmerling et al. (1998)は、アミノ近位(amin o-proximal)に欠失をもつPrPを発現するPrPノックアウトマウスを調製した。驚くべきことに、第32~121残基又は第32~134残基は欠失しているが、それより短い欠失のないPrPは、生後1~3ヶ月という早い段階で重篤な運動失調、及び小脳の顆粒層に限定される神経細胞死を惹起した。この欠陥は、野生型PrP遺伝子の複製を1つ導入することにより完全に防ぐことができた。Shmerling et al. (1998)は、上述の切断PrPが非機能的であり、PrP様機能を有する別の分子と、共通リガンドを目指して競合するのではと推測した。

10

【0058】

Telling et al. (1996)は、プリオン病における基本的現象は、細胞性プリオンタンパク質が病原性アイソフォームPrP^{Sc}へと転化する該タンパク質における構造変化であるとする見解を支持する観察結果を報告した。上記著者らは、致死性家族性不眠症(FFI)においては、脱グリコシル後のPrP^{Sc}のプロテアーゼ耐性断片の大きさは19kDであるのに対し、他の遺伝性及び孤発性プリオン病におけるそれは21kDだったことを見出した。FFI患者の脳から得た抽出物は、ヒト-マウスキメラPrP遺伝子を発現するトランスジェニックマウスへの接種約200日後に疾患を伝達し、19-kDのPrP^{Sc}断片の形成を誘導したが、他方、家族性及び孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病患者の脳から得た抽出物を接種した場合は、上述のマウスに21-kDのPrP^{Sc}断片が産生された。Telling et al. (1996)の結果は、PrP^{Sc}の構造が初期PrP^{Sc}形成を指示する鋳型として機能することを示しており、PrP^{Sc}構造内において多様性が暗号化されている各種プリオン株を説明する機構が示唆された。

20

【0059】

Lindquist (1997)は、「一見無関係の現象が予期せぬ衝突をすることにより生まれた最もエキサイティングな科学の概念のひとつ」を指摘した。上記著者が論じているのは、酵母遺伝学における2つの不可解な問題は、プリオン仮説と同様の仮説により説明できるかもしれないとするWickner (1994)による示唆についてである。Two-yeast変異から、表現型の遺伝はときとして異なる核酸が遺伝するというより、むしろ異なるタンパク質構造が遺伝することに基づいている可能性があることを確信させる例が得られた。従って、酵母はプリオン様プロセスを研究する上で新しい重要なツールとなる可能性がある。さらに上記著者は、プリオンが病原性である必要はないと示唆した。実際、同著者は高分子の自発的構造変化は、クロマチン構造の変化に関連する現象等の後成現象だけでなく、発達途上で調節される一部の正常な現象をも含めた多様で正常な生物学的プロセスの中心に位置していることを示唆した。

30

【0060】

Hegde et al. (1998)は、位相体の相対比率を変化させるPrP変異を発現するトランスジェニックマウスを用いて種々のPrP位相体の形態を研究した。ある位相体は完全に小胞体腔へと転位し、PrP-Secと命名された。他の2つの位相体は、カルボキシル末端側から体腔側(PrP-Ctm)へ、又はアミノ末端側から体腔側(PrP-Ntm)へのいずれかの方向性により小胞体膜全体に及んでいる。高レベルのPrP-Ctmをもたらす変異をハーピングするF2産生マウスは、58±11日に神経変性を発生した。PrPの過剰発現がその原因ではなかった。神経病理はスクレイピーのものと類似の変化を示したが、PrP^{Sc}は存在しなかった。PrP-Ctmの発現レベルは疾患の程度と関連していた。

40

【0061】

Supattapone et al. (1999)は、野生型PrPを欠損する(Prnp-/-)トランスジェニック(Tg)マウスにおいて、大きな欠失を2つ有する106アミノ酸の編集後Pr

50

Pが発現することから、プリオンの伝播が支持されると報告した。完全長PrP^{Sc}を含むRocky Mountain laboratory (RML) プリオンは、約300日後にTg (PrP106) Prnp - / - マウスに疾患を発生させたが、他方、PrP^{Sc106}を含むRML106プリオンを伝達した場合、反復継代により約66日後にTg (PrP106) Prnp - / - マウスに疾患を発生させた。約165日以内にスクレイピーを発病したTg (PrP106) Prnp + / - マウスに野生型のマウスPrP^Cを共発現させることにより、RMLプリオンの継代に対する人工的伝達障壁が消失し、野生型のマウスPrPが、RML106プリオンの複製をイントランスで加速する作用を有していることが示唆された。精製PrP^{Sc106}は、プロテアーゼ耐性であり、糸状体を形成し、非変性洗浄剤に不溶だった。

10

【0062】

Kuwahara et al. (1999)は、Prnp - / - 及びPrnp + / + マウスから海馬細胞株を樹立した。14日齢マウス胚から、かかる培養物を樹立した。研究対象とした6細胞株は、その発達段階は異なるものの、全て神経前駆細胞系統に属していた。Kuwahara et al. (1999)は、細胞培養物から血清を除去するとPrnp - / - 細胞ではアポトーシスが生じたが、Prnp + / + 細胞では生じなかったことを見出した。プリオンタンパク質又はBCL2遺伝子に形質導入を行うことにより、無血清条件下におけるPrnp - / - 細胞のアポトーシスが抑制された。Prnp - / - 細胞はPrnp + / + 細胞のものより短い神経突起を伸張していたが、PrPを発現させることにより、Prnp - / - 細胞の神経突起の長さが伸びた。Kuwahara et al. (1999)は、かかる知見から、野生型プリオンタンパク質の機能消失がプリオン病の病理の一部要因になり得ると結論した。Yeast-2-ハイブリッドシステムにおいてBCL2遺伝子がプリオンタンパク質と相互作用することが既に報告されていたことから、上記著者らはBCL2遺伝子に形質導入を試みた。その結果は、哺乳動物細胞においてもBCL2とPrPとの間に何らかの相互作用があることを示唆するものだった。

20

【0063】

スクレイピー感染マウスにおいてプリオンは、循環B及びTリンパ球でなく、脾臓B及びTリンパ球と会合することが見出され、また濾胞樹状細胞を含む間質において見出される。成熟濾胞樹状細胞の形成及び維持には、膜結合型リンフォトキシン - / を発現させるB細胞の存在が必要とされる。可溶性リンフォトキシン - 受容体でマウスを処理すると、脾臓から成熟濾胞樹状細胞が消失する。Montrasio et al. (2000)は、上記処理により脾臓でのプリオン蓄積が消失し、またスクレイピーを腹腔内接種した後に神経侵入が遅延したことを明らかにした。Montrasio et al. (2000)は、脾臓におけるプリオン複製にとって濾胞性樹状細胞が主要な部位であることが、自分たちの研究結果により証明されたと結論した。

30

【0064】

Chiesa et al. (1998)は、14回のオクタペプチド反復を含む変異プリオンタンパク質を発現するトランスジェニックマウス系統を作製した。この変異プリオンタンパク質のヒトホモログは、遺伝性プリオン痴呆と会合する。この挿入部はPRNP遺伝子において同定されたものとしては当時最大のものであり、進行性痴呆及び運動失調によって、また小脳及び基底核におけるPrP含有アミロイドプラークの存在によって特徴付けられるプリオン病と会合していた (Owen et al., 1992; Duchen et al., 1993; Krasemann et al., 1995)。上記の変異タンパク質を発現するマウスは、トランスジェンアレイがそれぞれホモ接合性かヘミ接合性であるかにより、65日齢又は240日齢で顕著な運動失調を伴う神経系の疾患を発症した。変異PrPは誕生直後からプロテアーゼに耐性及び洗浄剤に不溶な形態に転化した。その形態はPrPのスクレイピーアイソフォームに似たものだった。かかる形態は、マウスの生涯にわたり脳の多くの領域で劇的に蓄積した。PrPが蓄積するに連れ、小脳では顆粒細胞の大規模なアポトーシスが生じた。

40

【0065】

非侵襲的

50

ここに用いる「非侵襲的」なる用語は、本発明の方法により被験者の表面が、損傷、穿孔、又は切断されないことが好ましいことを意味する。ここにおいて「表面」なる用語は、皮膚（内部、外部いずれも）を指し、また粘膜、呼吸器表面等の表面、或いは消化管、三半規管、口腔、咽喉等の解剖学的表面の壁部や、被験者におけるその他全ての表面を指す。

【0066】

本発明の方法は、非侵襲的であることが好ましい。

【0067】

組織 / 臓器

ここに用いられる「組織 / 臓器」なる用語は、本発明の方法により、プリオンの存在を試験する対象としての全ての組織 / 臓器を指す。

10

【0068】

組織 / 臓器は、プリオンが蓄積する組織 / 臓器のいずれでもよく、又はそれら組織 / 臓器に由来するものでもよい。

【0069】

組織 / 臓器が、脳、脾臓、リンパ節、又は扁桃腺であることが好ましい。組織 / 臓器が脳若しくは扁桃腺であることが、より好ましい。

【0070】

組織 / 臓器は、生検若しくはホモジェネートの形状のものでもよい。

【0071】

組織 / 臓器、生検、若しくはホモジェネートには、かかる組織 / 臓器における液、例えば喀痰、粘液又はそれ以外の液も含まれる。

20

【0072】

ここに用いる「無損傷」なる用語は、最低限の場合を除いて、組織又は生検が、本発明のデバイス又は方法によって被験者から取り去られないことを意味する。

【0073】

プリオンを結合する

ここに用いる「プリオンを結合する」なる用語は、接着、会合、結合、粘着、又はこれら以外のプリオンと金属表面との相互作用を意味する。

【0074】

金属とプリオンは、共有結合、イオン結合、Van Der Waals結合、一時的又は可逆的会合、或いはこれら以外の形態での結合相互作用等、金属とタンパク質との間に生じることが可能な結合形態のいずれによっても結合する。

30

【0075】

プリオンを保存する

ここに用いる「プリオンを保存する」なる用語は、金属表面に結合したプリオンが保存されるという本発明に開示した驚くべき知見に言及するものである。ここにおいて「保存する」なる用語は、金属表面に結合したプリオンが分解から保護され、その感染性が通常予想されるより長期に維持されることを意味する。例えば、先行技術を用いる場合、脳に注入したプリオンの感染性は約24時間しか保たれない。本発明の方法によれば、金属表面に結合したプリオンは、少なくとも3日間は脳内に保存されるので有利である。

40

【0076】

さらにプリオンを保存するため、約 - 20 でデバイスをインキュベーションすることが有利である。プリオンとプロテアーゼとの接触を阻害したり、プリオンと食細胞との接触を阻害したりするなどのプリオンを分解から保護する作用により、上記保存性は一層強化される。

【0077】

デバイス

ここに用いる「デバイス」なる用語は、本発明の方法に有用なデバイスであれば、いずれのデバイスにも言及するものである。

50

【0078】

デバイスは、プリオンとの結合能を有するものであればどのようなデバイスでもよい。

【0079】

デバイスが、ポリスチレン等のプラスチック、硝子、又は金属を含むことが好ましい。デバイスが金属を含むことが好ましい。金属が、スチール、ステンレススチール、銀、金、又はそれらの組合せからなるグループから選択される1若しくは2以上の金属を含むことが、より好ましい。最も好ましいのは、ワイヤーがステンレススチールを含むことである。ここにいう「それらの組合せ」なる用語は、合金中の少なくとも1種が、スチール、ステンレススチール、銀、又は金からなるグループから選択される2若しくは3以上の金属合金に言及するものである。

10

【0080】

デバイスは、2若しくは3以上の種類の異なる金属、又は2若しくは3以上の種類の異なる金属合金を含むものでよい。

【0081】

デバイスが、1若しくは2以上の針、スパーテル、ピン、ワイヤー又は球を含むことが好ましい。デバイスが、1若しくは2以上のワイヤーを含むことがより好ましい。Braun Melunger AG社(ドイツ)が市販しているステンレススチール製モノフィラメント縫合ワイヤーなどのように、それぞれ直径が約0.15mm、長さが約5mmである1若しくは2以上のワイヤーを含むデバイスが最も好ましい。

【0082】

本発明の方法により組織/臓器をデバイスに接触させる。

20

【0083】

デバイスを組織/臓器と接触させる前に滅菌することが好ましい。デバイスをパー11(約121)で30分間滅菌することがより好ましい。デバイスを、1MのNaOHにパー11(約121)で1時間30分間浸漬するか、4Mのチオシアン酸グアニジウムに16時間浸漬するかにより、滅菌することが最も好ましい。

【0084】

デバイスに接触させる

被験者を覆っている皮膚表面を損傷、穿孔若しくは切断して、デバイスを組織/臓器と接触させる。組織/臓器が、脳、脾臓、扁桃腺、又はリンパ節であることが好ましい。

30

【0085】

生存被験者には、デバイスとの接触前に全身若しくは局所麻酔を施す。その代わりとして、又はそれに加えて、被験者の意識を一部若しくは完全に消失せしめるように、鎮静剤を投与してもよい。

【0086】

本発明の方法は、組織/臓器を貫通若しくは突刺して、デバイスを組織/臓器に挿入し、組織/臓器の表面にデバイスを接触させ、組織/臓器に付随する粘液等の液にデバイスを接触させ、又は他の何らかの方法でデバイスを組織/臓器に接触させることからなる。

【0087】

非侵襲的方法

本発明の方法は、非侵襲的であることが好ましい。組織/臓器が無損傷で残ることが、より好ましい。

40

【0088】

かかる非侵襲的方法により試験する組織/臓器は、プリオンが蓄積していればいかなる組織/臓器、生検、ホモジェネートであってもよい。

【0089】

生存被験者に試験を行う場合の組織/臓器には、扁桃腺を用いる。扁桃腺へは経口で到達できるので、被験者の外側を覆う皮膚表面を損傷、穿孔若しくは切断することがない。

【0090】

生存被験者を試験する場合は、デバイスとの接触前に、被験者が意識消失しない程度に軽

50

鎮静剤を投与してもよい。その代わりとして、又はそれに加えて、被験者に局所麻酔を施してもよい。かかる麻酔は、1若しくは2以上の扁桃腺周辺部位に局所的に処すことが好ましい。

【0091】

本発明の方法は、デバイスを組織/臓器に挿入し、組織/臓器の表面にデバイスを接触させ、喀痰、粘液等の液、又は組織/臓器に付随する他の液にデバイスを接触させることからなる。

【0092】

デバイスと組織/臓器との接触時間は120分以下であることが好ましい。デバイスと組織/臓器との接触時間は30分以下であることがより好ましい。デバイスと組織/臓器との接触時間は5分以下であることが最も好ましい。これらの時間は、本発明の侵襲的及び非侵襲的いずれの方法にも適用される。

10

【0093】

デバイスを組織/臓器に接触させる所要時間が短いことは、本発明の利点である。その結果、他の先行技術の方法に比し、より速やかに、より経済的に結果を得ることが可能になる。またこれにより、生存被験者の場合における被験者の不快感や苦痛を軽減することができる。

【0094】

デバイスの拔出 (removing)

接触後、組織/臓器若しくはそれらの液からデバイスを拔出する。プリオンがデバイスに結合しているかどうかを直ちに試験してもよい。本発明では、プリオンがデバイスに結合すると保存される点が有利である。従って、試験するまでデバイスを貯蔵しておいてもよい。

20

【0095】

デバイスは、約 - 20 以下で貯蔵することが好ましい。

【0096】

デバイスの試験

本発明においては、プリオンがデバイス表面に結合しているかどうかを測定するためにデバイスの試験を行う。

【0097】

本発明の実施態様の1つとして、1若しくは2以上のプリオン感染感受性実験動物との接触を含む方法により、デバイスを試験する。

30

【0098】

本発明の別の実施態様においては、1若しくは2以上のプリオン感染感受性細胞株との接触を含む方法により、デバイスを試験する。

【0099】

別の実施態様においては、プリオン/プリオンタンパク質をデバイス表面で直接検出する。かかる検出は、蛋白質測定法、免疫測定法、又はウエスタンブロット法等の方法を用いることにより可能である。

【0100】

実験動物

ここに用いる「実験動物 (test animal)」なる用語は、デバイスと接触させ、その組織/臓器にプリオンが含まれているかどうかを測定される動物全てを指す。実験動物は、プリオン感染に感受性を示す動物ならいずれの動物でもよい。

40

【0101】

好ましい実験動物は哺乳動物である。実験動物が成熟哺乳動物であることがより好ましい。さらに好ましくは、実験動物がラット、ハムスター、ウサギ、モルモット、又はマウスであることである。最も好ましい実験動物はマウスである。

【0102】

実験動物は、Tga20マウスなどのようにトランスジェニックマウスでもよい。

50

【0103】

トランスジェニックマウスは、例えば好適宿主にBSEを引き起こすプリオン株のように、特定のプリオン株がもたらすプリオン感染に感受性を示すものでもよい。

【0104】

デバイスを実験動物に接触させる

本発明においては、組織/臓器と接触させたデバイスを1若しくは2以上の実験動物と接触させる前に洗浄する。1回の洗浄に緩衝液50mlを用い、10分間5回洗浄工程を繰り返すことが好ましい。リン酸緩衝生理食塩水等の緩衝液を用いることが好ましい。

【0105】

洗浄したデバイスを次に、ハロタン/O₂等の麻酔剤により麻酔した実験動物と接触させる。 10

【0106】

脳への直接挿入などにより、デバイスの少なくとも一部を実験動物の脳内へ導入して接触させる方法が好ましい。実験動物の脳右頭頂葉にデバイスを直接挿入することが、より好ましい。

【0107】

デバイスは1若しくは2以上の実験動物の脳と接触させる。デバイスと1若しくは2以上の実験動物の脳との接触時間が、1実験動物につき1時間以下であることが好ましい。デバイスと1若しくは2以上の実験動物の脳との接触時間が、1実験動物につき5時間であることがより好ましい。デバイスと1若しくは2以上の実験動物の脳との接触時間が、1実験動物につき5時間以上であることがより好ましい。最も好ましいのは、デバイスと1若しくは2以上の実験動物の脳を永久に接触させることである。 20

【0108】

デバイスとの接触後、実験動物のインキュベーションを行う。ここにおいて、「インキュベーションを行う」なる用語は、当技術分野で十分公知の封じ込め施設等の好適条件下で実験動物を維持することを意味する。

【0109】

実験動物の観察

プリオン感染症状の発生を調べることにより、実験動物におけるプリオン感染の症状を観察する。症状を発症した実験動物の検査を定期的に行い、苦痛の兆候が現れたら殺処分してもよい。マウスにおけるプリオン感染の臨床症状の基準は、Carlson et al. (1986), Cell, 46, 503-511に記載されており、全身振戦、運動失調、尾部硬直、又は頭部の上下運動の兆候のうち少なくとも2つが含まれる。実験動物の生検を任意に行ってもよい。生検は、プリオンが蓄積している臓器や組織など、適切なものであればいずれの臓器や組織に対してでも行うことができる。脳生検を実施することが好ましい。 30

【0110】

プリオンタンパク質の検出には、ウエスタンブロット法(Collinge et al. 1996, Nature 383, 685-690)、免疫測定法(WO9837210号に記載)、及び電気特性のプローピング(WO9831839号に記載)等、当技術分野においてよく知られている種々の方法が採用できる。 40

【0111】

悪影響

ここに用いる「悪影響」なる用語は、プリオン感染によって生じる神経機能障害の臨床兆候のことである。プリオン感染の臨床兆候は当技術分野では十分公知である。臨床兆候が認められた場合、実験動物の検査を毎日実施する。1若しくは2以上の実験動物の死期が確実に近い場合、かかる実験動物は殺処分とし、組織病理学的研究及びプリオン感染確認のために脳を摘出する。

【0112】

トランスジェニック動物

ここに用いる「トランスジェニック動物」なる用語は、組換えDNA技術により導入され 50

た1若しくは2以上の遺伝子をそのゲノムに有する動物を指す。組換えDNA技術は当技術分野の専門家には公知である。トランスジェニック動物においては、「遺伝子」なる用語は「トランスジーン」という用語と同義である。

【0113】

本発明の実験動物はトランスジェニック実験動物であってよい。かかる実験動物が、トランスジェニックラット、トランスジェニックハムスター、トランスジェニックラビット、トランスジェニックモルモット又はトランスジェニックマウスであることが好ましい。より好ましいのは、実験動物がトランスジェニックマウスであることである。

【0114】

外因性PrP遺伝子

ここに用いる「外因性PrP遺伝子」なる用語は一般的に、いずれかの形態のPrPアミノ酸配列又はタンパク質をコードする、いずれかの種のPrP遺伝子を指す。Gabriel et al. (1992), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9097-9101 に、一般に知られているいくつかのPrP配列が記載されている。従って、「外因性PrP遺伝子」なる用語は、「人工PrP遺伝子」及び「キメラPrP遺伝子」をも包含するものである。ここにおいて「人工PrP遺伝子」及び「キメラPrP遺伝子」とは、組換えDNA技術を用い、当技術の専門家には公知の方法により構築された遺伝子のことである。ある動物のゲノムに外因性PrP遺伝子が含まれると、その動物に、本来その動物とは遺伝的に異なる種にしか感染しないプリオンによる感染に対して感受性が生じることになる。米国特許第5792901号、同5908969号、同6008435号及びWO9704814号に、人工PrP遺伝子を有するトランスジェニック動物に関する記載がある。

【0115】

実験動物が、1若しくは2以上の外因性PrP遺伝子を導入されたマウスであることが好適である。外因性PrP遺伝子が哺乳動物のPrPをコードすることが好ましい。外因性PrP遺伝子が家畜若しくはヒトのPrP遺伝子をコードすることが最も好ましい。

【0116】

蛋白質測定法

本発明では、蛋白質測定法により1若しくは2以上のデバイスにおけるプリオンタンパク質の存在を試験する。組織/臓器と接触させたデバイスを緩衝液で洗浄する。この緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水であることが好ましい。次に上記デバイスをプロテイナーゼK又はアルカリ共存下にて20で1時間インキュベーションする。このときのアルカリは2MのNaOHであることが好ましい。BSA希釈液を標準とするMicro BCA Protein assay (Pierce社製、Rockford, IL, USA)等の蛋白質測定法により、溶出液中のタンパク質を定量する。

【0117】

免疫測定法

本発明では、免疫測定法によりデバイスにおけるプリオンの存在を試験する。簡潔に述べると、組織/臓器と接触させた1若しくは2以上のデバイスを緩衝液で洗浄する。この緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水であることが好ましい。検出されるプリオンタンパク質に特異的なモノクローナル抗体の共存下において、デバイスをインキュベーションする。5%BSAを用いてブロックする。その後、ウエスタンブロット法、酵素免疫濾過測定法、及び酵素免疫吸着測定法等により、結合抗体を検出する。これらの方法は、WO98/37210号に詳細に記載されている。

【0118】

細胞株

ここに用いる「細胞株」なる用語は、プリオンに対して感受性を示す1若しくは2以上の細胞型に言及するものである。かかる細胞株としては、ヒツジやマウスにスクレイピーを引き起こすプリオンなど、哺乳動物から単離したプリオンに対して感受性を示すものが好ましい。より好ましいのは細胞株が、BSE、CJD若しくはvCJDを引き起こすプリオンなど、家畜やヒトから単離したプリオンに対する感受性を有することである。

10

20

30

40

50

【0119】

Bosque and Prusiner (2000), J. Virol. 74, 4377-4386は、マウスにスクレイパーを引き起こすRMLプリオンに対し感受性を示すN2aという細胞株に関する記載である。RMLプリオンに感染したマウスの脳ホモジェネートを、N2a細胞株に接種すると、15日後にセルプロット法によりプリオンタンパク質が検出された。20日後にネガティブだった培養物は、その後もネガティブを保っていたので、接種後20日目以降にアッセイに供した。

【0120】

本発明では、1若しくは2以上の細胞株を用いて、1若しくは2以上のデバイスにおけるプリオンタンパク質の存在を試験する。簡潔に述べると、組織/臓器と接触させた1若しくは2以上のデバイスを緩衝液で洗浄する。この緩衝液は、リン酸緩衝生理食塩水であることが好ましい。当技術分野で公知の方法により、上記細胞株を増殖させる。デバイスと細胞株の接触時間が1時間以上であることが好ましい。デバイスと細胞株の接触時間が5時間以上であることが、より好ましい。デバイスと細胞株の接触時間が5時間を超えることが、より好ましい。デバイスと細胞株の接触時間が1日以上であることが、より好ましい。デバイスと細胞株の接触時間が3日以上であることが、より好ましい。デバイスと細胞株の接触時間が3日を超えることが、より好ましい。これらの細胞を培養し、4日後に、1:10の割合で新鮮培地に播く。細胞株におけるプリオンタンパク質の存在は、当技術分野で公知の種々の方法により検出される。用いる方法としては、蛋白質測定法、免疫測定法、ウエスタンブロット法、又はセルプロット法が好ましい。より好ましい方法は、セルプロット法である。

【0121】

セルプロット法

本発明では、1若しくは2以上のデバイスに接触させた1若しくは2以上の細胞株におけるプリオンタンパク質の存在を、Bosque and Prusiner (2000), J. Virol. 74, 4377-4386の方法に従ったセルプロット法により検出する。簡潔に述べると、24 - ウエルプレートの各ウエルにプラスチックカバースリップを置き、それらのウエルに細胞を載せる。4日後に培地を取り除き、PBS等の緩衝液でウエルを洗浄する。ニトロセルロース膜を溶解緩衝液に浸漬し、細胞がニトロセルロース膜と接触するようにカバースリップに該膜を強く押し付ける。この膜をプロテイナーゼK共存下でインキュベーションし、蒸留水で洗浄する。次に、上記プロットを変性緩衝液で洗浄し、ブロックした(5%無脂肪粉ミルク及び0.1%Tween-20)。次にこのプロットを、検出されるPrP^{Sc}型に特異的な抗体の共存下においてインキュベーションし、ウエスタンブロット法におけると同様の手順に従った。Bosque and Prusiner (2000), J. Virol. 74, 4377-4386は、セルプロット法は、ウエスタンブロット法に比べ、約150倍の感度を有すると報告した。

【0122】

作用因子の同定

別の特徴として本発明は、1若しくは2以上の作用因子の同定法を提供するものである。少なくとも2つのデバイスを同じ組織/臓器と接触させる。次にこれらのデバイスを組織/臓器から抜出する。少なくとも1つのデバイスに結合したプリオンの量を推定する。少なくとも1つのデバイスを作用因子(1若しくは2以上)共存下でインキュベーションする。作用因子とのインキュベーション後、デバイスに結合したプリオンの量を推定する。作用因子とのインキュベーションの前後にデバイスに結合したプリオンの量を測定する。作用因子により、デバイスに結合するプリオンの量が減少することが好ましい。作用因子がプリオン感染性を調節することが、より好ましい。

【0123】

プリオンレベルの推定

デバイスに結合したプリオンの量を、蛋白質測定法、免疫測定法、ウエスタンブロット法等の方法により、或いは細胞株を用いたセルプロット法により推定する。

【0124】

作用因子

ここに用いる「作用因子」なる用語は、単一の実存物質 (entity) 又は実存物質の組合せである。

【0125】

作用因子は、有機化合物又は他の化学物質である。作用因子は、入手可能な形態の化合物、又は天然、人工を問わず適当な材料から産生される化合物である。作用因子は、アミノ酸分子、ポリペプチド、又はそれらの化学誘導体、又はそれらの組合せである。作用因子は、センス分子又はアンチセンス分子を問わずポリヌクレオチド分子であってもよい。作用因子は抗体でもよい。

【0126】

作用因子は、設計してもよく、ペプチド若しくは有機小分子等の他の化合物を含む化合物のライブラリーから入手可能なものであってもよい。

【0127】

作用因子としては、天然物質、生物高分子、細菌若しくは真菌若しくは動物 (特に哺乳動物) 細胞・組織等の生物材料から生成された抽出物、有機若しくは無機分子、合成作用因子、半合成作用因子、構造的若しくは機能的模倣体、ペプチド、模倣ペプチド、誘導化作用因子、全タンパク質から分裂したペプチド、又は合成的に合成されたペプチド (例えばペプチド合成装置を用いて、又は組換え技術、又はそれらを組み合わせ)、組換え作用因子、抗体、天然若しくは人工作用因子、融合タンパク質若しくはその均等物及び変異体、それらの誘導体又は組合せ、が列挙される。

【0128】

作用因子は通常、有機化合物である。有機化合物は通常、2若しくは3以上のヒドロカルビル基を有する。ここにおいて「ヒドロカルビル基」とは、少なくともC及びHを含む基のことであり、任意に1若しくは2以上の他の適当な置換基を有していてもよい。置換基の例としては、ハロ -、アルコキシ -、ニトロ -、アルキル基、環式基などがある。置換基が環式基である可能性に加えて、置換基を組み合わせたものも環式基を構成する。ヒドロカルビル基が2個以上のCを有する場合、それらの炭素は必ずしも互いに結合していてもよい。例えば炭素のうち少なくとも2個の炭素が適当な元素又は基を介して結合していてもよい。従って、ヒドロカルビル基にはヘテロ原子が含まれていてもよい。当技術分野の専門家には適当なヘテロ原子は明らかであるが、例えば硫黄、窒素、酸素などがある。一部の適用例においては作用因子が少なくとも1個の環式基を有することが好ましい。環式基は、非融合多環式基等の多環式基でもよい。一部の適用例においては、上記環式基が別のヒドロカルビル基に結合したものが少なくとも1つ作用因子に含まれている。

【0129】

作用因子にはハロ基が含まれていてもよい。ここにおいて「ハロ」は、フルオロ、クロロ、プロモ、又はヨードのことである。

【0130】

作用因子には1個若しくは2個以上の非分枝鎖状若しくは分枝鎖状のアルキル、アルコキシ、アルケニル、アルキレン及びアルケニレンの各基が含まれていてもよい。

【0131】

作用因子の形状は、酸付加塩又は塩基性塩等の薬理学的に許容される塩、或いは水和物を含むその溶媒和物であってもよい。適当な塩に関してはBerge et al, J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19を参照のこと。

【0132】

本発明の作用因子は、他の治療上の特性を示すことが可能である。

【0133】

作用因子は、1若しくは2以上の他の薬理学的に活性な作用因子と併用してもよい。

【0134】

複数の活性作用因子を併用して投与する場合は、同時に、個別に、又は連続して投与してもよい。

10

20

30

40

50

【0135】

さらなる特徴として本発明は、1若しくは2以上の作用因子の同定法を提供する。かかる方法は、プリオン結合能を有するデバイスを組織/臓器に接触させ、該組織/臓器との接触から該デバイスを抜き出し、該デバイスに結合したプリオンの量を推定し、作用因子を該デバイスとインキュベーションし、該作用因子により該デバイスに結合するプリオンの量が減少したかどうかを測定する工程からなるものである。

【0136】

従って別の特徴として本発明は、プリオン感染を調節し得る1若しくは2以上の作用因子に関する。かかる作用因子は、薬剤調製に有利に用いられる。従って本発明の別の特徴は、被験者に治療有効量の上記作用因子を投与し、該被験者におけるプリオン感染性を調節することに關する。

10

【0137】

アミノ酸配列

アミノ酸配列には本発明の作用因子が含まれていてもよい。

【0138】

ここにおいて、「アミノ酸配列」なる用語は、「ポリペプチド」及び/又は「タンパク質」という用語と同義である。場合によっては、「アミノ酸配列」なる用語が「ペプチド」なる用語と同じ意味である。場合によっては、「アミノ酸配列」なる用語が「タンパク質」なる用語と同じ意味である。

【0139】

アミノ酸配列は、適当な材料から単離するか、合成して作製するか、組換えDNA技術により調製するかのいずれでもよい。

20

【0140】

ヌクレオチド配列

ヌクレオチド配列は、本発明の組成物の成分として使用されるアミノ酸配列を発現させるために用いられる。

【0141】

ここにおいて、「ヌクレオチド配列」なる用語は、「ポリヌクレオチド」なる用語と同義である。

【0142】

ヌクレオチド配列は、ゲノム又は合成又は組換えに端を発するDNA若しくはRNAである。ヌクレオチド配列は、センス鎖若しくはアンチセンス鎖のいずれかの二本鎖若しくは一本鎖、又はそれらの組合せのいずれでもよい。

30

【0143】

ヌクレオチド配列はDNAであってもよい。

【0144】

ヌクレオチド配列は、組換えDNA技術(例えば組換えDNA)を用いて調製できる。

【0145】

ヌクレオチド配列は、cDNAであってもよい。

【0146】

ヌクレオチド配列は、自然に発生する配列と同じでもよく、それに由来するものでもよい。

40

【0147】

変異体/ホモログ/誘導体

本発明はまた、変異体、ホモログ及びそれらの誘導体の使用も包含するものである。ここにおいて、「ホモログ」なる用語は、対象とするアミノ酸配列及び対象とするヌクレオチド配列とある程度の相同性を有する実存物質を意味する。ここにおいて、「相同性(homology)」なる用語は、「同一性(identity)」と言い換えることもできる。

【0148】

本発明の文脈において相同配列には、対象とする配列と、少なくとも75、85若しくは

50

90%の同一性を示し、好ましくは少なくとも95若しくは98%の同一性を示すアミノ酸配列が含まれると解される。通常相同配列は、対象とするアミノ酸配列と同じ活性部位等を有する。相同性は類似性として捉えることもできるが(すなわち、アミノ酸残基が類似の化学特性・機能を有する)、本発明の文脈においては相同性が配列の同一性を表すことが好ましい。

【0149】

本発明の文脈において相同配列には、対象とする配列と、少なくとも75、85若しくは90%の同一性を示し、好ましくは少なくとも95若しくは98%の同一性を示すヌクレオチド配列が含まれると解される。通常相同体は、活性部位等をコードする配列として、対象とする配列と同じ配列を有している。相同性は類似性として捉えることもできるが(すなわち、アミノ酸残基が類似の化学特質・機能を有する)、本発明の文脈においては相同性が配列の同一性を表すことが好ましい。

10

【0150】

相同性の比較は肉眼により、さらに一般的には、容易に入手可能な配列比較プログラムの助けを借りて行うことができる。これら市販コンピュータプログラムにより、2若しくは3以上の配列間における相同性の割合(%)が計算できる。

【0151】

相同性の割合は、隣接する配列を基に計算される。すなわち、一方の配列を他方の配列と並べ、一方の配列中の各アミノ酸を、他方の配列中の対応するアミノ酸と直接、一残基毎に比較するのである。これは、「ギャップなし」アラインメントと呼ばれる。通常、このようなギャップなしアラインメントは、比較的残基数の少ない場合に行われる。

20

【0152】

上記の方法は、非常に簡便かつ堅実な方法であるが、1つの挿入部又は欠失部以外は同一な2つの配列において、かかる挿入部又は欠失部以降のアミノ酸残基がアラインメントから外れてしまう結果になるということが考慮されず、その結果、全体のアラインメントが終了したときの相同性の割合が大きく低下してしまう可能性がある。結果的に殆どの配列比較法は、全体としての相同性スコアに不当にペナルティを課すことなく、可能性のある挿入部又は欠失部を考慮に入れた最適化アラインメントを作出するように設計されている。これは、局所相同性を最大化することを意図して、配列アラインメントに「ギャップ」を挿入することにより実現される。

30

【0153】

しかしながら、より複雑なこれらの方法は、アラインメントで生じるそれぞれのギャップに「ギャップペナルティ」を課すことになり、同数の同一アミノ酸に対し、配列アラインメント内のギャップ数が少なければ少ないほど(比較する2つの配列間における高い関連性を反映して)、ギャップ数の多い場合より高いスコアが得られる。ギャップの存在に対し相対的に高いコストを課し、ギャップ内に続く残基の各々に、より少ないペナルティを課す「アフィンギャップコスト」が通常使用される。これは最も一般的に使用されるギャップスコアリングシステムである。当然のことながら高いギャップペナルティは、より少ないギャップで最適化アラインメントをもたらす。殆どのアラインメントプログラムは、ギャッププログラムに修正を加えることを認めている。しかし、そのようなソフトウェアを配列比較に用いる際には、初期値を使用することが好ましい。例えば、GCG Wisconsin Bestfit packageを使う場合のアミノ酸配列に対する初期ギャップペナルティは、ギャップ1個につき - 12で、各ギャップ延長につき - 4である。

40

【0154】

従って相同性の最大割合(%)を計算するには、まず、ギャップペナルティを考慮した上で最適化アラインメントを作製する必要がある。かかるアラインメントを実現するのに適したコンピュータプログラムは、GCG Wisconsin Bestfit package (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12: 387) である。配列比較を行えるソフトウェアの例としては他にも、BLAST package (Ausubel et al., 1999 ibid-Chapter 18を参照)、FASTA (Atschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410

50

)、及びGENEWORKSの比較ツールセットがあるが、これらに限定されない。BLAST及びFAST Aはいずれもオフライン及びオンラインでのサーチに利用できる (Ausubel et al., 1999 ibid、7-58~7-60頁を参照)。しかし適用例の中には、GCG Bestfitプログラムを使用することが好ましい場合もある。BLAST 2 Sequencesという新しいツールもタンパク質とヌクレオチド配列との比較を行うために利用できる (FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8を参照)。

【0155】

最終的な相同性割合は同一性に換算して求められものの、通常アラインメントプロセス自体は、オールオアナッシング (all-or-nothing) という考えに依拠して2つの配列を比較するものではない。その代わりに、化学的類似性又は進化論的距離に基づき、2つ1組の比較にスコアを与える類似性スコア拡大縮小マトリックス (scaled similarity score matrix) が一般的に使用される。そのようなマトリックスの中でよく用いられるものとして、BLASTプログラムセットの初期マトリックスであるBLOSUM62 matrixが例示される。GCG Wiconsinプログラムには一般的に公開初期値を、カスタムシンボル比較表 (custom symbol comparison table) (詳細はユーザーマニュアルを参照) がある場合は、それらのいずれかを使用する。適用例の中には、GCG packageには公開初期値を、また他のソフトウェアには、BLOSUM62などの初期マトリックスを用いることが好ましい場合がある。

10

【0156】

ソフトウェアが一旦最適化アラインメントを作製すると、相同性割合、好ましくは配列同一性割合を計算することが可能になる。通常ソフトウェアは配列比較の一部として上記計算を行い、数字で結果を出す。

20

【0157】

配列にはまた、アミノ酸残基の欠失、挿入、又は置換があり、沈黙の変化をもたらし、機能的同等物を産生する。残基の極性、電荷、可溶性、疎水性、親水性、及び/又は両親媒性に基づき、物質の二次結合活性が保持される限りにおいて意図的にアミノ酸の置換を行ってもよい。例えば、負電荷アミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれ、正電荷アミノ酸にはリシン及びアルギニンが含まれ、同じような親水性値を有する無電荷極性頭部基をもつアミノ酸にはロイシン、イソロイシン、バリン、グリシン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、フェニルアラニン、及びチロシンが含まれる。

30

【0158】

例えば下記の表に基づき、保存的置換を行うことができる。2段目の同じブロック内のアミノ酸同士、及び好ましくは3段目の同じ行にあるアミノ酸同士は、互いに置換させてもよい。

【0159】

【表A】

脂肪族	無極性	GAP
		ILV
	極性無電荷	CSTM
		NQ
	極性電荷	DE
KR		
芳香族		HFVY

10

表A

本発明はまた、相同的置換（ここでは、置換（substitution）及び交換（replacement）はいずれも、既存のアミノ酸残基を他の残基と入れ替えることを意味する）の発生、すなわち、塩基性と塩基性、酸性と酸性、極性と極性など、既存物ベース（like-for-like）の置換が生じることその範囲に含むものである。非相同的置換、すなわち、ある分類の残基から別の分類の残基への置換、或いは、オルニチン（以下Zと記す）、ジアミノ酪酸

20

【0160】

及び二基置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸^{*}、乳酸^{*}、天然型アミノ酸のハロゲン化誘導体（トリフルオロチロシン^{*}、p-Cl-フェニルアラニン^{*}、p-Br-フェニルアラニン^{*}、p-I-フェニルアラニン^{*}、L-アリル-グリシン^{*}、^{*}-アラニン^{*}、L-^{*}-アミノ酪酸^{*}、L-^{*}-アミノ酪酸^{*}、L-^{*}-アミノイソ酪酸^{*}、L-^{*}-アミノカプロン酸[#]、7-ヘプタン酸^{*}、L-メチオニンスルホン[#]、L-ノルロイシン^{*}、L-ノルバリン^{*}、p-ニトロ-L-フェニルアラニン^{*}、L-ヒドロキシプロリン[#]、L-チオプロリン^{*}など）、フェニルアラニン（Phe）のメチル誘導体[4-メチル-Phe^{*}、ペンタメチル-Phe^{*}、L-Phe（4-アミノ）[#]、L-Tyr（メチル）^{*}、L-Phe（4-イソプロピル）^{*}、L-Tic（1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキシル酸）^{*}、L-ジアミノプロピオン酸[#]及びL-Phe（4-ベンジル）^{*}など]を含む非天然型アミノ酸によって交換を行ってもよい。記号^{*}は、上記の説明に照らして（相同的又は非相同的置換に関連して）つけたものであって誘導体が疎水性であることを示し、記号[#]は、誘導体が親水性であることを示し、また記号^{*}は、誘導体が両親媒性であることを示している。

30

【0161】

変異型アミノ酸配列には、配列中の2個のアミノ酸の間ならどこにでも挿入できる適当なスペーサー基を含んでいてもよく、かかるスペーサー基には、グリシン又は^{*}-アラニン残基等のアミノ酸スペーサーの他にメチル、エチル又はプロピル基等のアルキル基が含まれる。さらなる変異型には1個若しくは2個以上のアミノ酸残基がペプチド型で存在することが含まれ、当技術分野の専門家には十分理解されるものである。誤解を招かないように、ここにおいて、「ペプチド型」とは、^{*}-炭素置換基が、残基内において^{*}-炭素上よりむしろ窒素原子上に存在している変異型アミノ酸残基のことである。ペプチド型ペプチドの調製法については、例えば、Simon RJ et al., PNAS (1992)89(20), 9367-9371 and Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995)13(4), 132-134等の文献に見出せる。

40

【0162】

本発明に用いるヌクレオチド配列は、その中に合成若しくは修飾ヌクレオチドが含まれて

50

いてもよい。オリゴヌクレオチドに施す種々多様の修飾の形は当技術分野では公知である。かかる修飾には、メチルホスホン酸バックボーン及びホスホロチオ酸バックボーン、及び/又は、分子の3'及び/又は5'末端へのアクリジン鎖又はポリリシン鎖の付加が含まれる。本発明の目的を達成するために、ここに説明するヌクレオチド配列は、当技術で利用されるいずれの方法によって修飾されても構わない。そのような修飾は、本発明において有用なヌクレオチド配列のインピボでの活性増強や寿命延長を図るために行われる。

【0163】

本発明はさらに、ここに開示された方法により同定された配列との相補ヌクレオチド配列若しくはそれらの誘導體、断片若しくはその誘導體の使用にも関する。配列がその断片と相補的であれば、その配列は別の生物等における類似のコード配列を同定するためのプロンプとして用いることができる。

10

【0164】

ハイブリダイゼーション

本発明にはまた、ヌクレオチド配列、又は誘導體、断片若しくはその誘導體とのハイブリダイズ能を有するヌクレオチド配列の使用も含まれる（作用因子がアンチセンス配列の場合など）。

【0165】

ここにおいて、「ハイブリダイゼーション」とは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術による増幅方法と同様に、「塩基ペアリングによって核酸鎖を相補鎖に結びつける方法」をも含むものである。

20

【0166】

「変異型」なる用語には、他のヌクレオチド配列とのハイブリダイズ能を有する配列と相補的な配列も含まれる。

【0167】

「変異型」なる用語が、ストリンジェントな条件下（例えば、50、0.2×SSC[1×SSC=0.15M NaCl, 0.015M Na₃クエン酸 pH7.0]）でヌクレオチド配列とのハイブリダイズ能を有する配列と相補的な配列を包含することが好ましい。

【0168】

より好ましいのは、「変異型」なる用語が、高度にストリンジェントな条件下（例えば、65、0.1×SSC[1×SSC=0.15M NaCl, 0.015M Na₃クエン酸 pH7.0]）でヌクレオチド配列とのハイブリダイズ能を有する配列と相補的な配列を包含することである。

30

【0169】

分泌

ポリペプチドは、発現宿主から、より簡便にポリペプチドを回収できる培養培地へと分泌される。

【0170】

構築物

「共役体」、「カセット」、及び「ハイブリッド」等の用語と同じ意味を有する「構築物」なる用語には、直接的又は間接的にプロモーターに結合する本発明に有用なヌクレオチド配列が含まれる。「融合」なる用語には、直接的又は間接的な結合が含まれる。通常は野生型遺伝子プロモーターと会合するタンパク質をコードするヌクレオチド配列が自然に結びつくとき、また両方の配列が自然環境下にあるときは、これらの用語に含まれない場合もある。

40

【0171】

構築物が導入された例えば細菌、好ましくは*Bacillus subtilis*等の*Bacillus*属の細菌又は植物において遺伝的構築物の選択を可能にするために、構築物にさらにマーカーを含有させるか発現させることもできる。使用できるマーカーは数多く存在し、マンノース-6-リン酸イソメラーゼをコードするマーカー（特に植物に対して）、或いはG418耐性

50

、ヒグロマイシン耐性、ブレオマイシン耐性、カナマイシン耐性及びゲンタマイシン耐性等の抗生物質耐性をもたらすマーカ等が例示される。

【0172】

ベクター

「ベクター」なる用語には、発現ベクター、形質転換ベクター、及びシャトルベクターが含まれる。

【0173】

「発現ベクター」なる用語は、インピボ又はインピトロでの発現が可能な構築物を意味する。

【0174】

「形質転換ベクター」なる用語は、ある実存物質から別の実存物質へと伝達させることが可能な構築物を意味し、これら実存物質は同じ種でも異なる種でもよい。構築物がある種から別の種へと伝達され得るとき、例えば*E. coli*プラスミドから*Bacillus*属等の細菌へ伝達され得るとき、かかる形質転換ベクターは「シャトルベクター」と呼ばれることがある。シャトルベクターは、*E. coli*プラスミドからアグロバクテリア菌へと導入され、それがさらに植物に導入されることさえ可能な構築物である。

【0175】

ベクターを、下記に説明するように適切な宿主細胞に導入し、本発明の範疇にあるポリペプチドを発現させる。従って本発明はさらなる特徴として、本発明に用いるポリペプチドの調製法を提供するものであり、かかる調製法は、上述したように発現ベクターを導入又はトランスフェクトした宿主細胞を、ポリペプチドをコードするコード配列のベクターによる発現が可能な条件下において培養し、発現したポリペプチドを回収することからなる方法である。

【0176】

ベクターとしては、複製起点を有するプラスミド、ウイルス、又はファージベクター、任意に上記ポリヌクレオチドの発現プロモーター及び任意にかかるプロモーターの調節因子が例示される。

【0177】

ベクターには、1若しくは2以上の選択マーカ遺伝子が含まれていてもよい。産業用微生物に対する最適な選択系は、宿主生物内において変異を必要としない選択マーカ集団によって形成されるものである。真菌選択マーカとしては、アセタミダーゼ (*amdS*)、ATP合成酵素、サブユニット9 (*oliC*)、オロチジン-5'-リン酸-脱炭酸酵素 (*pvrA*)、フレオマイシン耐性及びベノミル耐性 (*benA*) の各遺伝子が例示される。非真菌選択マーカとしては、細菌性G418耐性遺伝子 (これは酵母にも使用できるが、糸状菌には使えない)、アンピシリン耐性遺伝子 (*E. coli*)、ネオマイシン耐性遺伝子 (*Bacillus*)、及び - グルクロニダーゼ (*GUS*) をコードする *E. coli uidA* 遺伝子が例示される。

【0178】

ベクターは、例えばRNA産生のため、若しくは宿主細胞のトランスフェクション及び形質転換に用いるため、インピトロで用いることができる。

【0179】

従って本発明に用いるポリヌクレオチドは、例えばクローニングベクター又は発現ベクター等の組換えベクター (特に複製ベクター) に取り込むことができる。かかるベクターは適合宿主細胞において核酸を複製するのに用いられる。従って、ポリヌクレオチドを複製ベクターに導入し、該ベクターを適合宿主細胞に導入し、また該宿主細胞を、ベクター複製を生じさせる条件下で増殖させることにより、多量のポリヌクレオチドが作出される。ベクターは宿主細胞から回収する。好適な宿主細胞については発現ベクターとの関連で下記に説明する。

【0180】

遺伝子工学的に作出された宿主細胞は、作用因子及び拮抗因子を同定するスクリーニング

10

20

30

40

50

法において、アミノ酸配列（又はその変異体、ホモログ、断片又はその誘導体）を発現させることに用いられる。このような遺伝子工学的に作出された宿主細胞をペプチドライブラリー又は有機分子のスクリーニングに用いることができる。拮抗因子、及び抗体、ペプチド、又は有機小分子等の作用因子は、薬理組成物の基礎となる。プリオン感染治療における治療薬として、かかる作用因子又は拮抗因子は、単独又は他の治療薬との併用のいずれで投与してもよい。

【0181】

発現ベクター

ヌクレオチド配列は組換え複製ベクターに取り込むことができる。かかるベクターは、ヌクレオチド配列の複製・発現に用いられる。発現は、プロモーター/エンハンサー及び他の発現調節シグナルを含む制御配列を使用することによって制御できる。原核プロモーター、及び真核細胞において機能を有するプロモーターが使用される。組織特異的又は刺激特異的プロモーターが用いられる。上記2若しくは3以上の異なるプロモーターの配列エレメントを有するキメラプロモーターもまた用いられる。

10

【0182】

ヌクレオチド配列を発現させることにより、宿主組換え細胞によって産生されるタンパク質は、その配列及び/又は使用するベクターによって、分泌されるか或いは細胞内で保持されるが決まる。特定の原核又は真核細胞膜を介して配列をコードする物質の分泌を指示するシグナル配列を、コード配列を用いて設計することができる。

【0183】

融合タンパク質

本発明に用いられるアミノ酸配列を、例えば、抽出及び精製の補助とするための融合タンパク質として作出してもよい。融合タンパク質とするためのパートナーとしては、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、6xHis、GAL4(DNA結合及び/又は転写活性化ドメイン)及び λ -ガラクトシダーゼなどが挙げられる。融合タンパク質パートナーとタンパク質配列との間に、融合タンパク質配列を除去させるためのタンパク質分解開裂部位を含めても都合よい。融合タンパク質がタンパク質配列の活性を阻害しないことが好ましい。

20

【0184】

融合タンパク質には、目的物質に融合させた抗原又は抗原決定基が含まれていてもよい。融合タンパク質は、免疫系の全身性刺激をもたらすという意味においてアジュバントとして作用する物質を有する非天然に生成された融合タンパク質であってもよい。抗原又は抗原決定基は、かかる物質のアミノ末端又はカルボキシ末端いずれに結合させてもよい。

30

【0185】

融合タンパク質をコードするためにアミノ酸配列を異種配列と結合させてもよい。例えば、上記物質の活性に影響し得る作用因子のペプチドライブラリーをスクリーニングする際に、市販抗体によって認識される異種エピトープを発現させるキメラ物質をコードすることが有用であるとも考えられる。

【0186】

立体異性体及び幾何異性体

作用因子は、立体異性体及び/又は幾何異性体として存在することができる。例えば、作用因子は1若しくは2以上の不斉中心及び/又は幾何中心を有し、2若しくは3以上の立体異性体及び/又は幾何異性体として存在し得る。本発明は、かかる作用因子の立体異性体及び幾何異性体の全体を個別に、又はそれらを混合して使用することを意図する。これらの形態が適切な機能的活性をもち続ける限りにおいて(必ずしも同程度の活性を維持しなくてもよいが)、請求項に用いる用語はこれらの形態を包含するものである。

40

【0187】

薬理学的塩

作用因子は薬理学的に許容される塩としての剤型で投与される。

【0188】

50

薬理的に許容される塩は、当技術分野の専門家には公知であり、例えば、Berge et al, in J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977) に記載されている塩が該当する。好適な酸付加塩は、非毒性塩を形成する酸から形成することができ、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸、硫酸、重硫酸、リン酸、リン酸水素、酢酸、トリフルオロ酢酸、グルコン酸、乳酸、サリチル酸、クエン酸、タトル酸、アスコルビン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、ギ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸及び p - トルエンスルホン酸が含まれる。

【0189】

1 若しくは 2 以上の酸性成分が存在するとき、薬理的に許容される適切な塩基が付加された塩は、非毒性塩を形成する塩基から形成することができ、アルミニウム塩、カルシウム塩、リチウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、亜鉛塩、及びジエタノールアミン塩等の薬理的に活性なアミン類が含まれる。

【0190】

作用因子における薬理的に許容される塩は、作用因子の溶液と必要な酸又は塩基を適宜混合することにより、容易に調製できる。かかる塩を溶液中で沈殿させ、濾過により回収するか、又は溶媒を留去させることにより回収する。

【0191】

作用因子は、多型性として存在することができる。

【0192】

作用因子には、1 若しくは 2 以上の不斉炭素原子が含まれていてもよく、従って作用因子は 2 若しくは 3 以上の立体異性型として存在する。作用因子がアルケニル又はアルケニレン基を有するとき、シス (E) 及びトランス (Z) 異性もまた生じる。本発明は、作用因子の個々の立体異性体、適宜にその個々の互変異性型、またその混合物を含むものである。

【0193】

ジアステレオ異性体又はシス - 及びトランス - 異性体は、例えば作用因子又はその適切な塩若しくは誘導体の立体異性体混合物に、画分の結晶化、クロマトグラフィー又は HPLC といった従来法を施すことにより分離できる。作用因子の個別の鏡像異性体もまた、対応する光学的に純粋な中間体から調製されるか、或いは、適切な対掌性支持体を用いて、HPLC 等により対応ラセミ体を分解することにより調整されるか、或いは、対応ラセミ体を、適当な光学活性を有する酸又は塩基と適宜に反応させて形成されたジアステレオ異性塩の画分を結晶化することにより調製される。

【0194】

また本発明は、作用因子又はその薬理的に許容される塩の適切な同位体バリエーション (isotopic variations) を全て含む。作用因子又はその薬理的に許容される塩の同位体バリエーションとは、少なくとも 1 個の原子が、原子番号は同じだが自然界で通常見出されるものとは原子量が異なる原子に置換されているものと定義される。作用因子又はその薬理的に許容される塩に取り込まれてもよい同位体には、例えば、それぞれ水素、炭素、窒素、酸素、リン、硫黄、フッ素及び塩素の同位体である ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、 ^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F 及び ^{36}Cl 等が含まれる。作用因子又はその薬理的に許容される塩の同位体バリエーションの中には、例えば ^3H や、 ^{14}C などの放射性同位体を取り込まれたもののように、薬剤及び/又は基質の組織分布の研究用として有用なものがある。トリチウム化した同位体 (^3H)、及び炭素 14 同位体 (^{14}C) は、その調製及び検出が簡便な点で特に好ましい。さらに重水素 (^2H) 等の同位体で置換すると代謝安定性が向上し、例えばインピボでの半減期の延長又は必要投与量の低減化などの一定の治療上の利点を得られるので、好ましい場合がある。本発明の作用因子又は本発明におけるその薬理的に許容される塩の同位体バリエーションは一般的に、適切な試薬の好適な同位体バリエーションを用いて従来どおりの手順により調製される。

【0195】

作用因子がプロドラッグに由来してもよいことは当技術の専門家には理解されるところで

ある。プロドラッグとしては、保護基（1又は複数）を有し、そのままでは薬物学的活性はもたないが、状況次第で投与に供してもよく（経口又は非経口で）、投与されると体内で代謝されて薬物学的に活性な本発明作用因子を形成する実存物質が例として挙げられる。

【0196】

例えばH. Bundgaard, Elsevier, 1985「プロドラッグの設計 (Design of Prodrugs)」(その開示を参考のため本明細書に添付する)に記載があるように、「プロ成分」として知られるある種の成分を、作用因子の適切な機能上に配置してもよい。このようなプロドラッグも本発明の範疇に含まれる。

【0197】

本発明はまた、本発明作用因子の両性イオン型の使用も含む。請求項で用いられる用語は、かかる型を1若しくは2以上包含している。

【0198】

溶媒和物

本発明には、本発明作用因子を溶媒和物として使用することも含まれる。

【0199】

プロドラッグ

上に示したとおり本発明はまた、作用因子のプロドラッグとしての使用も含むものである。

【0200】

薬理学的に許容される塩

作用因子は、薬理学的に許容される塩として投与される。通常薬理学的に許容される塩は、所望の酸又は塩基を適宜に用いて容易に調製できる。塩は溶液中で沈殿させ、濾過により回収し、又は溶媒を留去させて回収する。

【0201】

化学合成法

作用因子は化学合成技術により調製できる。

【0202】

本発明化合物の合成過程において、感作性官能基の保護、脱保護を行わなければならないことは、当技術の専門家には明白である。従来法によってもこれは可能であり、そのような方法としては例えば、「有機合成における保護基 (Protective Groups in Organic Synthesis)」T W Greene and P G M Wuts, John Wiley and Sons Inc. (1991)、及び「保護基 (Protective Groups)」P.J. Kocienski, Georg Thieme Verlag (1994)に記載の方法が挙げられる。

【0203】

反応過程において、特定条件下、例えば塩基感作性基を含む光学中心を有する基質と共に塩基を反応に用いる場合、存在する立体中心のラセミ化が起こり得る場合がある。これは例えばグアニル酸化の過程で起こり得る。当技術分野で公知のように、反応に用いる配列、条件、試薬、保護/脱保護方法等を選択することにより、このような潜在的な問題を回避することが可能となる。

【0204】

本発明の化合物及び塩は、従来法により分離・精製される。

【0205】

ジアステレオ異性体は従来法により分離され、かかる従来法としては、式[1]に示される化合物又はその適当な塩若しくは誘導体と立体異性体との混合物の画分結晶化、クロマトグラフィー又はHPLCがある。式[1]に示される化合物の個別の鏡像異性体もまた、対応する光学的に純粋な中間体から調製されるか、或いは、適当な対掌性支持体を用いて、HPLC等により対応ラセミ体を分解することにより調整されるか、或いは、対応ラセミ体を、適切な光学活性を有する酸又は塩基と反応させて形成されたジアステレオ異性塩の画分結晶化とにより調製される。

10

20

30

40

50

【0206】

作用因子、又はその変異体、ホモログ、誘導体、断片若しくは模倣体は、作用物質の全体若しくは一部を合成する化学的手法により生成される。例えば、ペプチドの場合は、固相法によりペプチドを合成し、樹脂から剥がし、分取高速液体クロマトグラフィー（例：Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY）により精製する。合成ペプチドの組成物はアミノ酸分析又は配列決定（例：the Edman degradation procedure; Creighton, supra）を行うことにより確認できる。

【0207】

ペプチド作用因子は、種々の固相法（Roberge JY et al (1995) Science 269: 202-204）により合成され、また例えば、ABI 431 A Peptide Synthesizer（Perkin Elmer社製）を製造者マニュアルに準拠して用いることにより、自動的な合成も可能である。従って、作用因子若しくはその一部を有するアミノ酸配列を、直接合成を行う間に改変させ、及び/又は他のサブユニット若しくはその一部から得た配列と化学的手法により結合させて、変異型作用因子を生成することもできる。

【0208】

本発明の別の実施態様においては、ペプチド作用因子（又はその変異体、ホモログ、誘導体、断片若しくは模倣体）のコード配列は、全体的若しくは部分的に、当技術分野で公知の化学的手法により合成される（Caruthers MH et al (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 2 15-23, Horn T et al (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232を参照）。

【0209】

模倣体

ここにおいて、「模倣体（mimetic）」なる用語は、基準（reference）作用因子と同質の活性若しくは効果を有するペプチド、ポリペプチド、抗体、又は他の有機化学物質などを含む全ての化学物質に関するが、それらに限定されない。

【0210】

化学誘導体

ここに用いられる「誘導体」又は「誘導された」なる用語には、作用因子の化学修飾が含まれる。かかる化学修飾は、水素を、ハロ基、アルキル基、アシル基、又はアミノ基と置換することであると説明される。

【0211】

化学修飾

作用因子の化学修飾により、作用因子と標的との間の水素結合相互作用、電荷相互作用、疎水相互作用、Van Der Waals相互作用、又は双極相互作用が、増強又は減弱される。

【0212】

1つの特徴として、同定された作用因子は他の化合物の発生モデル（例えば、鋳型として）となり得る。

【0213】

組換え法

作用因子又は標的は、組換えDNA法により調製できる。

【0214】

他の活性成分

組成物には作用因子以外にも治療に用いられる別の物質が含まれていてもよい。

【0215】

抗体

組成物に使用する作用因子には1若しくは2以上の抗体が含まれていてもよい。

【0216】

ここにおいて、「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、Fab断片、及びFab発現ライブラリーから作出された断片が含まれるが、それらに限定されない。かかる断片には、標的物質に対する結合活性を保持している全

抗体の断片、Fv、F(ab')及びF(ab')₂の各断片、一本鎖抗体(scFv)、抗体の抗原結合部位を有する融合タンパク質や他の合成タンパク質が含まれる。さらに抗体又はその断片は、例えば米国特許A-239400号に記載のあるヒト化抗体であってもよい。中和抗体、すなわち対象ポリペプチドの生物活性を阻害する抗体は、特に診断及び治療において好ましい。

【0217】

抗体は、本発明物質で免疫したり、ファージディスプレイライブラリーを用いたりするなどの標準的な方法で作製される。

【0218】

ポリクローナル抗体が望まれる場合、本発明において同定された作用因子及び/又は物質から得られるエピトープ(1又は複数)を有する免疫原性ポリペプチドを用い、選択した哺乳動物(例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマなど)を免疫する。宿主の種に応じて、種々のアジュバントを使用して免疫応答を高めてもよい。かかるアジュバントには、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウム等のミネラルゲル、並びにリソレシチン、ブルロン酸ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、スカシ貝ヘモシアニン及びジニトロフェノール等の界面活性物質が含まれるが、これらに限定されない。BCG(Bacilli Calmette-Guerin)及びCorynebacterium parvumは、ヒト・アジュバントとして潜在的有用性を持ち、精製した上で採用され、全身性防御を刺激することを目的として対象ポリペプチドを免疫反応不全の個体に投与する。

10

【0219】

免疫した動物の血清を回収し、公知の手法に従って処理する。本発明において同定された作用因子及び/又は物質から得られるエピトープに対するポリクローナル抗体を含有する血清に、他の抗原に対する抗体が含まれている場合、かかるポリクローナル抗体を免疫親和性クロマトグラフィーにかけて精製する。ポリクローナル抗血清の作製及び処理方法は、当技術分野で公知である。このようなポリクローナル抗体を作製するために、本発明はさらに、動物やヒトにおける免疫原として用いるために、本発明のポリペプチド又はその断片を別のポリペプチドにハプテン結合させることも含む。

20

【0220】

特定のエピトープに対することを意図したモノクローナル抗体の作出も、当技術分野の専門家には容易なことである。ハイブリドーマを用いてモノクローナル抗体を作製する一般的な方法がよく知られている。細胞を融合させることにより、また、腫瘍形成DNAでBリンパ球の形質転換を直接行うことや、Epstein-Barrウイルスによるトランスフェクションによっても、抗体産生不死化細胞株を作出することができる。軌道エピトープに対して産生されたモノクローナル抗体のパネルをスクリーニングして、アイソタイプ又はエピトープ親和性といった種々の特性を調べる。

30

【0221】

培養中の連続細胞株を用いた抗体分子の産生方法であればいずれの方法によってモノクローナル抗体を調製してもよい。これらの方法には、Koehler and Milstein (1975 Nature 256: 495-497)によって初めて報告されたハイブリドーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kosbor et al (1983) Immunol Today 4: 72; Cote et al (1983) Proc Natl Acad Sci 80: 2026-2030)、及びEBV-ハイブリドーマ法(Cole et al (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss Inc, pp 77-96)が含まれるが、これらに限定されない。さらに、好適な抗原特異性及び生物活性を有する分子を得るために、マウス抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子に挿入するという、「キメラ抗体」を産生するために開発された方法も用いられる(Morrison et al (1984) Proc Natl Acad Sci 81: 6851-6855; Neuberger et al (1984) Nature 312: 604-608; Takeda et al (1985) Nature 314: 452-454)。或いは、一本鎖抗体の作製に関する記載に基づく方法(米国特許第4946779号)を、ある物質に特異的な一本鎖抗体の産生に採用してもよい。

40

【0222】

Orlandi et al (1989, Proc Natl Acad Sci 86: 3833-3837)及びWinter G and Milstein

50

C (1991; Nature 349: 293-299) に記載されているように、リンパ球集団においてインビボでの産生を誘導することによっても抗体は産生され、また、組換え免疫グロブリンライブラリー又は高度に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによっても産生される。

【0223】

物質に対する特異的結合部位を有する抗体断片も作製することができる。かかる断片には例えば、抗体分子のペプシンを消化させることにより作出される F (a b ´) 2 断片、及び F (a b ´) 2 断片のジスルフィド架橋を還元することにより作出される F a b 断片が含まれるが、これらに限定されない。或いは、所望の特異性を有するモノクローナル F a b 断片の迅速かつ簡便な同定を可能にするため、F a b 発現ライブラリーを構築してもよい (Huse WD et al (1989) Science 256: 1275-1281)。

10

【0224】

一般的なアッセイ方法

1 若しくは 2 以上の好適標的 (プリオン感受性タンパク質又は遺伝子のアミノ酸配列及び / 又はヌクレオチド配列など) を用いて、本発明の作用因子を同定する。

【0225】

そのような試験において使用される標的は、溶液中で遊離の状態、固体支持体に固着させた状態、細胞表面に担持されている状態、又は細胞内に局在する状態のいずれであってもよい。標的活性の消失、又は標的と試験に供する作用因子との間の結合複合体の形成を測定する。

20

【0226】

本発明の方法としてはスクリーニングがあり、それにより数多くの作用因子におけるプリオン感染調節性を試験する。

【0227】

薬剤スクリーニングの方法は、1984年9月13日に公開された欧州特許出願84/03564号に記載の方法に基づいて行う。概略を述べると、種々の小ペプチド試験化合物を、プラスチックピン又は他の物の表面などの固体基質上で多数合成する。これらのペプチド試験化合物を適当な標的又はその断片と反応させ、洗浄する。その後、当技術分野で公知の方法を適切に実施するなどして、結合した実存物質を検出する。精製した標的もまた、プレートに直接コーティングして薬剤スクリーニング法に用いることができる。或いは、非中和抗体を使用し、ペプチドを捕捉して固体支持体上で不死化させることができる。

30

【0228】

本発明による方法は、定量アッセイにだけでなく、試験化合物の小規模及び大規模いずれのスクリーニングにも適していると期待される。

【0229】

好ましい特徴の1つとして本発明は、プリオン感染に対する調節能を有する作用因子の同定法に関する。

【0230】

レポーター

本発明の方法により同定された作用因子のスクリーニングには種々多様なレポーターを用いることができ、好都合に検出され得る (例えば分光法により) シグナルを有するレポーターが好適である。例を挙げると、Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ)、Promega (Madison, WI) 及び US Biochemical Corp (Cleveland, OH) 等の数多くの企業が、アッセイ手法に用いる市販キットやプロトコルを供給している。適切なレポーター分子若しくは標識物には、基質、補因子、阻害剤、磁気粒子などと同様、放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、又はクロモジェニック (発色性) 材料が含まれる。かかる標識物の使用について教示している特許には、米国特許 A - 3817837号、同 A - 3850752号、同 A - 3939350号、同 A - 3996345号、同 A - 4277437号、同 A - 4275149号、及び同 A - 4366241号がある。

40

50

【0231】

宿主細胞

「宿主細胞」なる用語には、本発明の作用因子に対する標的を有することができる全ての細胞が含まれる。

【0232】

従って、本発明のさらなる実施態様では、本発明の標的である、若しくは本発明の標的を発現させるポリヌクレオチドにより形質転換若しくはトランスフェクトさせた宿主細胞を提供する。かかるポリヌクレオチドが、標的となるポリヌクレオチド若しくは標的を発現させるポリヌクレオチドの複製及び発現に用いるベクターに担持されていることが好ましい。細胞は、このようなベクターと適合するものを選択するが、原核細胞（例えば細菌）
10、真菌細胞、酵母細胞、又は植物細胞が例挙される。

【0233】

グラム陰性細菌である*E. coli*は、異種遺伝子発現のための宿主として広く使用されている。しかし、*E. coli*細胞内には大量の異種タンパク質が蓄積する傾向がみられる。しかる後に*E. coli*細胞内の大量のタンパク質から所望のタンパク質を精製することは時として困難である。

【0234】

*E. coli*とは対照的に、*Bacillus*属の細菌は培養培地へのタンパク質分泌能を有している点で異種宿主として非常に好適である。他にも宿主として適している細菌としては、*Streptomyces*属や*Pseudomonas*属のものがある。
20

【0235】

本発明に有用なポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの特質及び/又は発現されたタンパク質をさらにプロセッシングする必要度によっては、酵母や他の真菌等の真核宿主が好ましい。一般的に、真菌細胞より酵母細胞の方が、操作が容易な点で好ましい。しかしタンパク質の中には、酵母細胞からの分泌が乏しいものや、時には正しくプロセッシングされない（例えば、酵母における過グリコシル化）ものがある。そういった場合には、別の真菌宿主生物を選択しなければならない。

【0236】

本発明の範囲における発現宿主としての好適例には、*Aspergillus*種（欧州特許出願公開第0184438号及び同0284603号に記載あるもの）及び*Trichoderma*種等の真菌
30；*Bacillus*種（欧州特許出願公開第0134048号及び同0253455号に記載あるもの）、*Streptomyces*種及び*Pseudomonas*種等の細菌；並びに*Kluyveromyces*種（欧州特許出願公開第0096430号、同0301670号に記載あるもの）及び*Saccharomyces*種等の酵母がある。例を挙げると一般的な発現宿主は、*Aspergillus niger*、*Aspergillus niger* var. *tubigenis*、*Aspergillus niger* var. *awamori*、*Aspergillus aculeatis*、*Aspergillus nidulans*、*Aspergillus oryzae*、*Trichoderma reesei*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Kluyveromyces lactis*及び*Saccharomyces cerevisiae*から選択される。

【0237】

酵母、真菌、及び植物宿主細胞等の適当な宿主細胞を使用することにより、本発明の組換え発現産物に最適化生物活性を発生させるために必要な翻訳後修飾（例：ミリスチル化、グリコシル化、切断化（truncation）、ラピデーション（投石；lapidation）及びチロシン、セリン又はトレオニンのリン酸化）をもたらすことができる。
40

【0238】

生物

「生物」なる用語には、本発明による標的及び/又は該標的から得られる産物を有することができる生物であればいかなる生物も含まれる。生物の例には、真菌、酵母又は植物が含まれる。

【0239】

本発明に関し、「トランスジェニック生物」なる用語には、本発明による標的及び/又は
50

得られた産物を有する生物であればいかなる生物も含まれる。

【0240】

治療

本発明の方法により同定される作用因子は、治療用の作用因子として用いられる。つまり治療に利用される。

【0241】

「治療 (therapy)」なる用語は、「治療 (treatment)」なる用語同様、治療効果、軽減効果、及び予防効果を含意するものである。

【0242】

治療は、ヒト及び家畜等の哺乳動物を対象とする。

10

【0243】

治療は、プリオン感染に伴う症状を治療するためのものである。

【0244】

薬理組成物

本発明に有用な薬理組成物には、治療有効量の作用因子 (1若しくは2以上) 及び薬理的に許容される担体、希釈剤若しくは賦形剤が含まれる (それらを併用することも含めて)。

【0245】

薬理組成物は、ヒト医学及び獣医学におけるヒト及び動物への使用に供され、通常1若しくは2以上の薬理的に許容される希釈剤、担体若しくは賦形剤を含んでいる。治療に使用する上で許容される担体又は希釈剤は薬理学分野では十分公知であり、例えば Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro edit. 1985) に、それらに関する記載がみられる。薬理的担体、賦形剤若しくは希釈剤は、意図する投与経路及び標準的な薬理的運用例に基づいて選択される。薬理組成物には、担体、賦形剤若しくは希釈剤として (或いはそれらに加えて)、(1若しくは2以上の) 適切な結合剤、潤滑剤、懸濁化剤、コーティング剤又は可溶化剤が含まれていてもよい。

20

【0246】

保存料、安定剤、染料、さらには香料が薬理組成物に含まれていてもよい。保存料としては、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、p-ヒドロキシ安息香酸のエステルが例示される。酸化防止剤及び懸濁化剤も用いられる。

30

【0247】

送達系が異なると、異なる組成物/処方要件が必要とされる場合もある。例を挙げると本発明に有用な薬理組成物を、吸入用若しくは摂取可能溶液用の鼻腔スプレー若しくはエアゾールとして、ミニポンプを用いて投与又は粘膜経路から投与すべく処方し、或いは、非経口経路により投与するために、例えば静脈内、筋肉内若しくは皮下経路により送達するために組成物を注入可能な剤型に処方する。その他、数多くの経路から投与するような処方を計画することもできる。

【0248】

作用因子はシクロデキストリンと併用することもできる。シクロデキストリンは、薬剤分子と包接及び非包接複合体を形成することが知られている。薬剤-シクロデキストリン複合体が形成されると、薬剤分子における可溶性、溶解速度、生体利用率及び/又は安定性が変化する。一般的に薬剤-シクロデキストリン複合体は、殆どの投与形態及び投与経路において有用である。シクロデキストリンは、薬剤との複合体化を指示する代わりに、例えば担体、希釈剤若しくは可溶化剤などの補助添加剤として用いることもできる。 -、 -、及び - シクロデキストリンが最も一般的に用いられ、好適例については、WO-A-91/11172号、同A-94/02518号、及び同A-98/55148号に記載がある。

40

【0249】

作用因子がタンパク質の場合、該タンパク質は、治療中の被験者においてインサイチューで調製される。これに関し、上記タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、上記タン

50

パク質が上記ヌクレオチド配列により発現されるように、非ウイルス方法（例えばリポソームを用いて）及び/又はウイルス方法（例えばレトロウイルスベクターを用いて）により送達される。

【0250】

投与

「投与する」なる用語には、ウイルス又は非ウイルス方法による送達が含まれる。ウイルス送達機構には、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、及びバキュロウイルスベクターが含まれるが、これらに限定されない。非ウイルス送達機構には、脂質仲介トランスフェクション、リポソーム、免疫リポソーム、リポフェクチン、陽イオン性界面両親媒性物質（CFA）、及びそれらを組み合わせたものが含まれる。

10

【0251】

本発明に有用な成分は単独でも投与できるが、例えば成分が、意図する投与経路や標準的な薬理的な運用例に基づいて選択された好適な薬理賦形剤、希釈剤又は担体と混合される場合のように、一般的には薬理組成物として投与される。

【0252】

例えばかかる成分は、香料又は色素を含有していてもよい錠剤、カプセル剤、胚珠（ovule）剤、エリキシル剤、液剤、又は懸濁剤の各剤型において、即効性、遅延性、非定型性、徐放性、間欠性、又は放出制御性の各処方にて投与される。

【0253】

薬剤が錠剤の場合、かかる錠剤は、ミクロクリスタリンセルロース、ラクトース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、二塩基酸カルシウムホスフェート及びグリシン等の賦形剤、澱粉（トウモロコシ、ジャガイモ、タピオカの澱粉が好ましい）、ナトリウムデンプングリコラート、クロスカルメロースナトリウム及びある種の錯体珪酸塩等の崩壊剤、並びにポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、ヒドロキシプロピルセルロース（HPC）、スクロース、ゼラチン及びアカシア等の粒状化バインダーを含有していてもよい。さらに、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、ベヘン酸グリセリル、及びタルク等の潤滑剤を含有していてもよい。

20

【0254】

同じような形状をした各種固形組成物もゼラチンカプセルへの充填物として採用される。この場合の好適な賦形剤には、ラクトース、澱粉、セルロース、乳糖、又は高分子ポリエチレングリコールが含まれる。水性懸濁剤及び/又はエリキシル剤とする場合は、種々の甘味料、香味料、色素若しくは染料を、乳化剤及び/又は懸濁剤を、水、エタノール、プロピレングリコール及びグリセリン等の希釈剤を、或いはこれらの組合せを、作用因子と混合させることができる。

30

【0255】

投与（送達）経路には、経口（例えば錠剤、カプセル剤として、又は摂取可能溶液として）、局所、粘膜（例えば吸入用鼻腔スプレー若しくはエアゾールとして）、鼻腔内、非経口（例えば注入により）、胃腸内、脊髄内、腹腔内、筋肉内、静脈内、子宮内、眼窩内、皮内、頭蓋内、気管内、腔内、大脳室内、脳内、皮下、眼内（硝子体内若しくは前房内を含む）、経皮、経直腸、口腔内、経膈、硬膜外、舌下からの1若しくは2以上が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0256】

薬理成分の全てが同じ経路から投与されなければならない訳ではない。同様に、組成物が2以上の活性成分を有しているとき、これらの成分は異なる経路から投与されることもある。

【0257】

非経口投与される場合の成分の投与例には、静脈内投与、動脈内投与、くも膜下投与、脳室内投与、尿道内投与、胸骨内投与、頭蓋内投与、筋肉内投与、又は皮下投与からの1若しくは2以上が含まれ、及び/又は点滴法により投与される。

50

【0258】

非経口投与の場合、成分は無菌水溶液として用いることが最適であり、かかる無菌水溶液には、該溶液を血液と等張にするために十分量の例えば塩分又はグルコース等の物質が別に含まれていてもよい。水溶液は、必要に応じて適宜に緩衝化しなければならない（pH 3～9が好ましい）。無菌条件下での好適な非経口製剤の調製は、当該技術の専門家には公知の標準的な薬理技術に基づいて容易に実施される。

【0259】

上述したように本発明における有用成分（1若しくは2以上）は、鼻腔内投与又は吸入により投与され、乾燥パウダー吸入器により、或いは加圧容器、ポンプ、スプレー若しくはネブライザーを用いたエアゾールスプレー方式により好都合に伝達される。その際、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン（HFA 134ATM）若しくは1, 1, 1, 2, 3, 3-ヘptaフルオロプロパン（HFA 227E ATM）等のヒドロフルオロアルカン、二酸化炭素、又は他の好適ガス等の噴射剤が用いられる。加圧式エアゾールの場合には、一定量を送達するためのバルブ弁を設けることにより、投与単位を決定できる。例えば溶媒としてエタノールと噴射剤との混合物を使用して、活性化合物の溶液若しくは懸濁液を、加圧容器、ポンプ、スプレー、又はネブライザーに収容させることができ、さらには、ソルビタントリオレートなどの潤滑剤を収容することもできる。吸入器又は散布器に用いるカプセル及びカートリッジ（例えばゼラチンから作られる）は、作用因子とラクトースや澱粉等の適当なパウダーベースとの混合パウダーを収容するような製法とする。

【0260】

或いは、成分（1若しくは2以上）を座剤、腔座薬の剤型で投与するか、ゲル、ヒドロゲル、ローション、液剤、クリーム、軟膏、又は粉パウダーの剤型として局所に塗布することもできる。成分（1若しくは2以上）は、例えば皮膚パッチを用いて皮膚に、つまり経皮的に投与することもできる。上記成分はまた、肺若しくは直腸を経路として投与することもできる。また、眼を経路として投与することもできる。眼に使用するときには、pHを調整した等張の無菌生理食塩水を用いた微粉状懸濁剤として、又は好ましくはpHを調整した等張の無菌生理食塩水を用いた溶液として、任意に塩化ベンジルアルコニウム等の保存料を添加し、化合物を処方する。或いはまたペトロラツム等の軟膏として処方することもできる。

【0261】

皮膚に局所塗布する場合、成分（1若しくは2以上）は、例えば鉱物油、液状ペトロラツム、白色ペトロラツム、プロピレングリコール、ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレン化合物、乳化ワックス及び水の1若しくは2以上を混合したものに懸濁若しくは溶解させた活性化合物を含有する好適な軟膏として処方される。

【0262】

或いは、成分（1若しくは2以上）は、例えば鉱物油、モノステアリン酸ソルビタン、ポリエチレングリコール、液状パラフィン、ポリソルビン酸60、セチルエステルワックス、セテアリアルアルコール、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコール及び水の1若しくは2以上を混合したものに懸濁若しくは溶解させた適切なローション又はクリームとして処方される。

【0263】

投与量

通常医師は、実際に個々の対象者にとって最適な投与量を決定する。特定患者に対する投与量及び投与回数は多様であり、用いる特定化合物の活性、該化合物の代謝安定性及び作用持続時間、年齢、体重、健康状態、食生活、投与形態及び投与時期、排出速度、薬剤の併用状況、特定症状の程度、個々人が受ける治療などの種々の要因に左右される。

【0264】

処方

成分（1若しくは2以上）は、当技術分野で公知の手法を用いて、1若しくは2以上の適

10

20

30

40

50

切な担体、希釈剤又は賦形剤と混合することにより、薬理組成物に処方される。

【0265】

動物実験モデル

プリオン感染を調節する療法又は治療的作用因子を探索及び/又は設計する際に、インビボモデルを使用する。かかるモデルは、プリオン感染の発生又は治療に關与する多様なパラメーターに対する種々のツール/リード化合物の効果を調べるために用いられる。これらの動物実験モデルは、本発明の方法として、又は本発明の方法において使用される。動物実験モデルは、非ヒト動物実験モデルである。

【0266】

一般的な組換えDNA方法技術

ここに述べる方法は、当技術分野において一般的によく知られているが、特に、Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989)、及びAusubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc.を参照している。PCRについては、米国特許A - 4683195号、同A - 4800195号、同A - 4965188号に記載されている。

【0267】

本発明の別の特徴として、デバイスを実験動物に接触させて組織/臓器内のプリオンの量を測定することが挙げられる。かかる測定は、デバイスに接触させた実験動物が臨床症状を呈するまでに要した時間、及びその実験動物が死亡するまでに要した時間を調べることにより実現する。簡潔に説明すると、実験動物をデバイスと接触させた時間を記録する。次に実験動物を観察して臨床症状の発生を調べる。マウスにおけるプリオン感染の臨床診断の基準に関しては、Carlson et al. (1986), *Cell*, 46, 503-511に記載がある。臨床症状を発症した時間を記録する。再び実験動物を観察するが、その際、最初は1日1回で、死期が近づくにつれ観察回数を増やす。マウスが死亡すると、その時間を再度記録する。臨床症状の発症と死亡までの間隔を計算する。この時間間隔は、試料中のプリオン量と反比例関係にある。この時間間隔から時間係数を引いたものの対数は、試料中のプリオンの数の対数の一次関数として表される。時間係数は、Pruisner et al. (1982), *Annals. of Neurology* 11 353-358)に従い、時間間隔と投与量との線形関係を最大化することにより決定される。

【0268】

以下の実施例を参照しながら本発明を説明する。

【実施例1】

【0269】

試料中のプリオンの検出

組織/臓器は、プリオンの有無を試験する生存ヒト脳である。真直ぐなスチールワイヤーを従来どおりに無菌する。定位固定フレームを被験者の頭部に固定し、軽鎮静剤を投与する。頭蓋に脳が露出しないように5mmの開口部をドリルで開ける。開口部の向き合う両端部位から、2本の真直ぐなステンレススチールワイヤー切片をそれぞれ進入させ、脳内に挿入することにより脳と接触させる。5分後にワイヤーを抜去し、事前滅菌済密封管内において-20℃下で一晩保存する。

【0270】

上記金属ワイヤーにプリオンが結合しているかどうかを測定するため、ヒトにCJDを引き起こすプリオンによる感染に対して感受性を示すマウスを使用する。

【0271】

試験対象試料と接触させるマウスはレベル1の動物微生物用封じ込め施設で飼育し、耳穿孔により識別する。試料との接触前に、これらマウスをハロタン/ O₂で麻酔する。ワイヤーを室温解凍し、永久挿入を行うことによりマウス5匹の脳右頭頂葉と接触させる。その後かかるマウスをレベル1の動物微生物用封じ込め施設で維持する。

【0272】

上記マウスにおける悪影響を3日毎に観察した。プリオン感染の臨床兆候が認められたマ

10

20

30

40

50

ウスは毎日調べ、苦痛の兆候がみられたら死亡させる。マウスにおけるスクレイピーの臨床診断基準は、Carlson et al. (1986), Cell 46, 503-511に記載されている。

【0273】

死亡したマウスの脳を、プリオン感染の確認作業を行うまで - 80 で保存する。

【0274】

死亡した実験マウスにおけるプリオン感染を、ウエスタンブロット分析により確認した。10% (w/v) 脳ホモジェネートを冷温の溶解緩衝液 (PBS中に10mMのTris-HCl及び10mMのEDTA (pH 7.4)、100mMのNaCl、0.5% NP-40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム) において調製する。3000rpmで5分間遠心分離を行って不溶物を除去する。プロテイナーゼK (50mg/ml) により、37で1時間消化させる。Pefabloc (Boehringer社製) を最終濃度が2mMとなるように添加して反応を終了させる。同量のローディングバッファー (125mMのTris-HCl (pH 6.8)、20%グリセロール、4% SDS、0.02%プロモフェノールブルー) 中で試料を5分間沸騰させてから、16%トリス-グリシンゲル上で電気泳動を行う。ゲルをImmobilon-P膜上にブロットし、5% Blotto (0.05% Tween-20を含むPBS中に5%無脂肪粉ミルクと) に固定した後、CJDプリオンを特異的に検出する抗体の共存下で一晩インキュベーションする。0.05% Tween-20を含むPBSでブロットを洗浄し、アルカリホスファターゼ共役抗マウス抗体共存下にて室温で1時間インキュベーションする。ブロットを再度洗浄し、化学発光基質 (Amersham社製) を用いて現像し、Storm 840 phosphoimager (Molecular Dynamics社製) 上で視覚化する。

10

20

【0275】

以上より、本発明の方法を用いてプリオンが試料から検出されることが示される。

【実施例2】

【0276】

試料中のプリオンの検出

組織/臓器は、プリオンの存在を試験する死亡ウシの冷凍脳生検である。レベル3の微生物用封じ込め施設内で上記組織を解凍する。各々の直径が0.15mmで長さが5mmのステンレスワイヤー5本を、1MのNaOHにパー11で1時間30分浸漬させて滅菌する。ワイヤーが冷却したら組織/臓器にそれぞれ挿入する。

【0277】

5分後、各ワイヤーを扁桃腺組織から抜き出し、ワイヤー間で生じる交叉汚染を回避するために別々の事前滅菌済密封管において - 20 下で一晩保存する。

30

【0278】

実施例1と同様に、実験マウスを用い上記各ワイヤーのプリオン感染性に関するアッセイを行う。

【0279】

プリオン感染の確認作業を行うまで、死亡マウスの脳を - 80 で保存する。

【0280】

好適宿主にBSEを引き起こすプリオンに対して特異的なモノクローナル抗体を使用する以外は、実施例1と同様にしてウエスタンブロット法を実施する。

40

【0281】

これにより、本発明の方法により試料中のプリオンが検出されることが示される。

【実施例3】

【0282】

スチール表面に結合するプリオンによるスクレイピーの伝播

イントロダクション：プリオンは、従来の滅菌消毒法に対して顕著に耐性である。滅菌消毒を実施したにも関わらず、クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者の脳内で使用された電極から続けて2名の患者に疾病が伝播し、最終的にはチンパンジーにも伝播した。脳以外の種々の組織で、感染性の代用マーカーであるPrP^{Sc}が認められたことにより、手術用器具を介して変異型CJDが伝播する可能性が懸念されてきている。

50

【0283】

材料と方法：ステンレススチールワイヤーをスクレイピーに感染した脳又は脳ホモジェネートに露出し、徹底的に洗浄し、指標マウスの脳に挿入して感染性を測定した。

【0284】

結果：スクレイピー感染マウス脳と5分間接触させるだけで、スチールワイヤーが高度な感染性を獲得し、指標マウスの脳に感染性ワイヤーを30分間挿入すれば、疾患を誘発するに十分だった。ワイヤーに結合した感染性は、ホモジェネートとして注入する場合より、遥かに長期にわたり脳に滞留し、ワイヤーに介される感染の顕著な有効性が説明される。NaOHを用いた場合、検出可能レベルのPrPは溶出されなかったが、感染性ワイヤー上のPrPの存在はケミルミネセンスによって明らかになった。推奨されるいくつかの殺菌消毒法により、ワイヤーに結合したマウス・プリオンは不活化したが、10%ホルムアルデヒドへの露出では不活化には不十分だった。

10

【0285】

結論：プリオンは、簡便かつ緊密にステンレススチールの表面に結合し、短時間の露出でスクレイピーをレシピエントマウスに伝播できる。このシステムは汚染された手術用器具と類似しているため、滅菌法の評価が可能になる。

【0286】

概要

プリオンは、最も一般的な病原体よりも不活化に対し耐性である (Ernst, D. R. & Race, R. E. (1993) *J. Virol. Methods* 41, 193-201, Taylor, D. M., Fraser, H., McConnell, I., Brown, D. A., Brown, K. L., Lamza, K. A. & Smith, G. R. (1994) *Arch. Virol.* 139, 313-326, Taylor, D. M., (2000) *Vet. J.* 159, 10-17, Brown, P., Gibbs, C. J., Jr., Amyx, H. L., Kingsbury, D. T., Rohwer, R. G., Sulima, M. P. & Gajdusek, D. C. (1982) *N. Engl. J. Med.* 306, 1279-1282)。孤発性CJD (sCJD) 患者の脳内で使用した電極は、毎回の使用後にベンゼン、70%エタノール及びホルムアルデヒドの蒸気にあてたにも関わらず、続けて2名の患者に、最後にはチンパンジーに疾患を伝播した (Bernoulli, C., Siegfried, J., Baumgartner, G., Regli, F., Rabinowicz, T., Gajdusek, D. C. & Gibbs, C. J., Jr. (1977) *Lancet* 1, 478-479, Gibbs, C. J., Jr., Asher, D. M., Kobrine, A., Amyx, H. L., Sulima, M. P. & Gajdusek, D. C. (1994) *J. Neurosurg. Psychiatry* 57, 757-758)。PrP^{Sc}が神経においてだけでなく、リンパ組織でも認められたことにより、手術用器具を介して変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) が伝播する可能性が懸念されてきている (Hill, A. F., Zeidler, M., Ironside, J. & Collinge, J. (1997) *Lancet* 349, 99-100, Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C. L., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J. & Lantos, P. (1997) *Nature* 389, 448-450, Hill, A. F., Butterworth, R. J., Joiner, S., Jackson, G., Rossor, M. N., Thomas, D. J., Frosh, A., Tolley, N., Bell, J. E., Spencer, M., King, A., Al-Sarraj, S., Ironside, J. W., Lantos, P. L. & Collinge, J. (1999) *Lancet* 353, 183-189, Wadsworth, J. D. F., Joiner, S., Hill, A. F., Campbell, T. A., Desbruslais, M. & Collinge, S. (2001) *Lancet*, In press.)。スチールワイヤーをスクレイピー感染脳ホモジェネート共存下で一晩インキュベーションし、これらワイヤーを指標マウス脳内に永久挿入することにより、スチール表面が有するスクレイピープリオンとの結合能を調べた。この方法で疾患が有効に伝播した (Zobeley, E., Flechsig, E., Cozzio, A., Enari, M. & Weissmann, C. (1999) *Mol. Med.* 5, 240-243)。

20

30

40

【0287】

しかしながら、スチールワイヤーの脳ホモジェネートへの長時間露出は、手術による侵襲の過程で得られる条件を反映していない。本発明者らは、無損傷の脳にワイヤーを5分間だけ挿入するのみで、脳ホモジェネートに一晩露出するときより、遥かに高い感染性を獲得することができ、また1%スクレイピー感染脳ホモジェネート0.03mlを脳に直接注入することにより得られるのと同程度の感染性を獲得できることを示している。さらに、感染を引き起こす露出時間は30分で十分だった。本発明の実験により、スチールに結

50

合したプリオンに対する滅菌法の有効性を評価するモデルが提供され、脳及び扁桃腺等の臓器における感染性を評価するための、侵襲を最低限にしたアプローチが示唆される。

【0288】

材料及び方法

感染性ワイヤーの調製

「ステンレススチール製モノフィラメント縫合ワイヤー (Stainless steel suture monofilament wire)」 (Art.Nr. 01614037, USP 4/0, B.Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen, Germany; batch 1/7502 or 1/8452) からステンレススチールワイヤー切片 (直径 0.15 mm; 長さ 5 mm) を切り出した。文献記載 (Williams, R. L. & Williams, D. F., (1988) *Biomaterials* 9, 206-212) のとおり、金ワイヤー切片 (5 × 0.13 mm、Alfa Aesar Johnson Matthey GmbH製、Germany) を 2% Triton X-100 で 15 分間超音波洗浄し、蒸留水で入念にすすぎ洗いし、1 時間 37 °C で乾燥した。1 × ダルベッコリン酸緩衝液 (D-PBS; Gibco BRL社製、Glasgow, UK) 中で脳を 21 ゲージ及び 25 ゲージの針にそれぞれ 8 回通過させてホモジェナイズし、10% (w/v) ホモジェネートを得た。これらのホモジェネートを室温下にて 5 分間、1000 rpm で遠心分離 (Eppendorf centrifuge 5415c, Hamburg, Germany) にかかけ、上清を回収した。かかる遠心分離工程の結果、試料中の PrP^{Sc} のうち 80 ~ 90% が消失することが、本発明者らにより最近判明したことから (P.Kloehn、未発表データ)、この工程は避けることが好ましい。ワイヤーを、遠心分離処理をした 10% 脳ホモジェネートの共存下において PBS 中、室温下で 16 時間インキュベーションし、やはり室温下において 50 ml の PBS で 10 分間 5 回洗浄した。これらのワイヤーを風乾し、室温で 1 日間保存し、25 ゲージの注入針をトロカール (套管針) として用いて、深麻酔下にある指標マウスの脳内に挿入した。

10

20

【0289】

表面に結合した PrP のケミルミネセンス

ステンレスワイヤー切片 (0.15 × 5 mm) 20 本を脳の一方の半球に 5 分間挿入した。もう一方の半球は、上述のとおりホモジェナイズして遠心分離にかけた。20 本のステンレスワイヤー切片を、遠心分離処理をした 10% ホモジェネート 0.5 ml の共存下において室温で 5 分間インキュベーションし、50 ml の D-PBS において 10 分間 5 回洗浄し、24 時間の乾燥後直ちに PrP についてのアッセイを行った。5% 無脂肪粉ミルク (w/v; Marvel, Premier Brands UK Ltd.製、Wirral, Merseyside, U.K.) を含有する D-PBS 0.2 ml の共存下で、攪拌しながら 1 時間ワイヤーのインキュベーションを行った。ブロッキング試薬を除去した後、上記ワイヤーを、1% 無脂肪粉ミルクを含有する D-PBS において 200 ng/ml の抗 PrP 抗体 (6H4; Prionics AG社製、Zurich, Switzerland) 共存下で 1 時間インキュベーションし、0.2 ml の D-PBS において 5 分間 3 回洗浄し、その後ホースラディッシュペルオキシダーゼ共役ウサギ抗マウス IgG1 抗体 (1:5000 希釈物; Zymed社製、South San Francisco, California, USA) 共存下で 1 時間インキュベーションした。D-PBS において 5 分間 5 回洗浄した後、ワイヤーを、製造者のマニュアルに従って SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce社製、Rockford, ILL, USA) 0.2 ml に露出した。ルミノメーター (AutoLumat LB953; EG&G Berthold GmbH製、Bad Wildbad, Germany) を用いてケミルミネセンスを測定した。

30

40

【0290】

結果

ステンレススチールの表面がスクレイピー感染性と結合する能力は、スクレイピー終末期のマウスの 10% w/v 脳ホモジェネート共存下でスチールワイヤー (5 × 0.15 mm) を 16 時間インキュベーションした結果から文献で既に明らかになっており、これを以下に「標準条件」として言及する (Zobeley, E., Flechsig, E., Cozzio, A., Enari, M. & Weissmann, C. (1999) *Mol. Med.* 5, 240-243)。感染組織への手術用器具の露出を、より实际的にモデル化するために、スクレイピーを接種してスクレイピー症状の発症が予想される 2 ヶ月前に殺処分した野生型マウスの脳に、ワイヤー切片を 5、30、又は 12

50

0 分間挿入した。これらの「一時的に挿入した」ワイヤーを洗浄し、乾燥させて、Tga 20 指標マウスの脳内に永久移植してアッセイを行った (Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (1996) EMBO J. 15, 1255-1264)。3 グループの潜伏期間は、 65 ± 4 及び 69 ± 5 日であり (表 1、実験 1)、スクレイピー感染脳への露出が一番短い場合でも、同じ脳ホモジェネートの 1% ホモジェネート 0.03 ml を脳内接種した場合 (潜伏期間は 68 ± 8 日) と同程度の感染性が得られたことが示された。脳ホモジェネートに露出した金ワイヤーを脳内に挿入した場合においても感染性が得られた (表 1、実験 2)。

【0291】

【表 1】

10

表 1. スクレイピー感染マウスの無損傷脳又は脳ホモジェネートへの露出後におけるスチール又は金ワイヤーの感染性

接種	疾患症例数/総数	潜伏期間 \pm s. d. (日数)
<u>実験 1</u>		
ワイヤーの一時的挿入 5 分間	5 / 5	68 ± 2
30 分間	6 / 6	65 ± 4
120 分間	6 / 6	69 ± 5
10% 脳ホモジェネート ⁺ に露出したワイヤー	7 / 7	75 ± 5
脳ホモジェネート ⁺ (1%, 0.03 ml)	4 / 4	68 ± 8
<u>実験 2</u>		
ホモジェネートに露出したワイヤー		
スチールワイヤー (10%, w/v)	4 / 4	85 ± 4
金ワイヤー (10%, w/v)	3 / 3	74 ± 2
スチールワイヤー (1%, w/v)	4 / 4	86 ± 8
金ワイヤー (1%, w/v)	4 / 4	81 ± 6

30

40

実験 1 を行うに際し、RML 大脳内接種の 87 日後、すなわち臨床症状発症の約 2 ヶ月前に C57BL/6 マウス 2 匹を殺処分した。ワイヤーを、脳内に上述の時間挿入し、或いは遠心分離処理した 10% 脳ホモジェネートに 16 時間露出させ、方法の項に記載したとおりの処理を行った。実験 2 では、方法の項に記載したとおりに、RML に感染した終末期 CD1 マウスの遠心分離処理した脳ホモジェネートにワイヤー切片を露出させた。

【0292】

⁺ Tga 20 マウスにおいて終点滴定 (Reed, J. & Muench, H. (1938) Am. J. Hygiene 27, 493-497) によって測定した $6.81 \log LD_{50}$ ユニット/ml の 10% ホモジェネー

50

ト。

【0293】

第二の重要な疑問は、疾患が発生するためには感染性ワイヤーをどの位の時間、脳組織に接触させる必要があるかということに関するものである。感染性ワイヤーは、スクレイピー症状の発症が予想される1ヶ月前に殺処分した感染野生型マウスの脳に5分間挿入して調製した。洗浄後、麻酔下の指標マウスの脳にワイヤーを一時的に挿入した。表2に示したように、30分間又は2時間ワイヤーに接触させたマウスは全て、それぞれ 94 ± 10 及び 100 ± 18 日後に症状を発症した。その後続けて脳組織に露出させた、又は露出させなかった感染性ワイヤーを、最終的に指標マウスを用いて分析したところ、全例において約70日後にスクレイピー病が発症し、脳に露出したことによっても検出可能レベルの感染性が消失しなかったことが示された。

10

【0294】

【表2】

表2：指標マウス脳への感染性ワイヤーの一時的挿入

接種	疾患症例数 ／総数	潜伏期間± (日数)
スクレイピー脳への露出により感染したワイヤー		
(a) 指標マウスへの一時的挿入		
30分間	4 / 4 [§]	94 ± 10
120分間	2 / 2 [#]	100 ± 18 ^{&}
(b) 指標マウスへの永久挿入		
これまで挿入しなかったワイヤー	3 / 3	71 ± 2
一時的に挿入(下記時間)した後のワイヤー		
30分間	4 / 4	71 ± 3
120分間	5 / 5	68 ± 1
(c) 対照群		
脳ホモジェネートに露出したワイヤー	6 / 6	76 ± 3
脳ホモジェネート(1%、0.03ml)	3 / 3	69 ± 3

20

30

感染性ワイヤーは、RML脳内接種121日後に殺処分されたC57B16×129Svマウスの脳内に5分間挿入することにより調製し、PBS50mlで10分間5回洗浄した。深麻酔下にあるTga20指標マウス6匹の脳内に感染性ワイヤーを表2に示した期間挿入した。回収したワイヤーをPBS1mlで洗浄し、Tga20指標マウスに移植した。対照群として、同じ脳から得て遠心分離処理した10%ホモジェネート(6.8logLD₅₀ユニット/ml)の共存下においてインキュベーションしたワイヤーと、ホモジェネート自体を指標マウスに導入した。

40

[§]マウス6匹中2匹は、侵襲当日に死亡した。

[#]マウス6匹中4匹は、侵襲から1日以内に死亡した。

[&]潜伏期間は、87及び113日だった。

【0295】

50

これまでの実験では、10%脳ホモジェネートに露出させたワイヤーから、2MのNaOHを用いて検出可能レベルのタンパク質を溶出させることはできなかった(1ワイヤーあたり50ng未満のタンパク質)(Zobeley, E., Flechsig, E., Cozzio, A., Enari, M. & Weissmann, C. (1999) Mol. Med. 5, 240-243)。脳ホモジェネート又は無損傷の脳に露出させたワイヤーの表面にPrPが結合しているかどうかを測定するため、これらのワイヤーをモノクローナルPrP抗体6H4共存下でインキュベーションし(Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H., Raeber, A., Braun, U., Ehrensperger, F., Hornemann, S., Glockshuber, R., Riek, R., Billeter, M., Wuthrich, K. & Oesch, B. (1997) Nature 390, 74-77)、次にホースラディッシュペルオキシダーゼ共役ウサギ抗マウスIgG1抗体共存下でインキュベーションし、基質存在下でケミルミネセンスを測定することにより、脳又は脳ホモジェネートに露出させたステンレススチールワイヤー表面に結合したPrPのケミルミネセンスを明らかにした。ステンレススチールワイヤー切片を脳内に一時的に挿入(「浸す」)するか、或いは、PrPノックアウトマウス(Prnp^{0/0})、非感染Tga20マウス(Tga20)及びRML感染終末期Tga20マウス(RML-Tga20)からそれぞれ得た10%脳ホモジェネート(ホモジェネート)共存下で上記ワイヤー切片をインキュベーションした。ワイヤーを洗浄し、抗PrP抗体6H4及びホースラディッシュペルオキシダーゼ共役抗マウスIgG1抗体で処理し、ケミルミネセンスを測定した。

10

【0296】

20

終末期にある指標マウスの感染脳に一時的に挿入したワイヤーのケミルミネセンスは、試薬バックグラウンドの約5.5倍に上った。バックグラウンド減算後の値は、感染脳ホモジェネートに露出させたワイヤーの値より約4倍、非感染脳に一時的に挿入したワイヤーの値より約1.8倍高かった。この実験から、PrPがワイヤー表面に結合していることが示された。感染脳から得た試料のケミルミネセンスが高い値を示すのは、PrP^{Sc}が蓄積するために終末期感染マウス脳の総PrP量が、非感染対照群のものより約5倍多いとの知見(Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (1996) EMBO J. 15, 1255-1264, Bueler, H., Raeber, A., Sailer, A., Fischer, M., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (1994) Mol. Med. 1, 19-30)と一致している。プロテイナーゼKによる処理の結果、全例においてイムノフルオレセンスが消失してしまったため、ワイヤー上でPrP^CとPrP^{Sc}を識別することはできなかった。PrPを脱着させるため、スクレイピー感染脳に一時的に挿入したワイヤー切片40本を2MのNaOH0.05mlを用いて1時間抽出し、溶出液をHClで中和し、試料の半分をウエスタンブロット分析に供した。上記同様にNaOHに溶解して中和した精製グリコシル化マウスPrP0.3ngが明瞭に検出された条件下においても、PrP特異的免疫反応は全く検出されなかった。従って、1本のワイヤーが15pg未満のPrP、つまり 3×10^8 分子未満、を放出したことになる。1logLD₅₀ユニットの感染性に 10^5 PrP^{Sc}分子が伴うと仮定した場合(Bolton, D.C., Rudelli, R. D., Currie, J.R. & Bendheim, P. E. (1991) J. Gen. Virol. 72, 2905-2913)、1本のワイヤーの放出量が、3000logLD₅₀ユニット未満であることになる。だが1本のワイヤーがもたらす潜伏期間は、約20000logLD₅₀ユニットに相当する1%脳ホモジェネート0.03mlの注入がもたらす潜伏期間とほぼ同じである。この若干推論的な計算から、ワイヤー表面から放出されたと考えられるPrPレベルが、直ちにワイヤーの感染性の根拠とはならないことが示唆され、感染性は、脱着したプリオンに起因するよりむしろ不可逆的に結合したPrP^{Sc}(又はPrP^{*})(Weissmann, C. (1991) Nature 349, 569-571)に起因しているのではないかという疑問が提起される。

30

40

【0297】

ワイヤーに結合したプリオンが濃縮ホモジェネートと同程度の感染性を示すのはどういう理由からであろうか。脳ホモジェネートを脳内接種すると、マウスの体内全体に急速に感染性が広がり(Millson, G.C., Kimberlin, R.H., Manning, E.J. & Collis, S.C. (1979

50

) Vet. Microbiol. 1979, 89-99)、4日以内にプリオンは脳内で検出されなくなる (Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M. & Weissmann, C. (1993) Cell 73, 1339-1347)。恐らくワイヤーに結合したプリオンは、より安定しているため、より長期にわたり作用し得ると考えられる。本発明者らは、直接、或いは $Prn p^{+/+}$ 又は $Prn p^{0/0}$ マウスの脳内に1日又は5日間放置した後に、感染性ワイヤーのアッセイを行った。表3は、指標マウスにおける潜伏期間が約90日間であることから証明されるように、5日間脳組織に滞留した後も低レベルとはいえワイヤーが感染性を維持していたことを示している。ワイヤーに結合した感染性は、5日以上局所的に高濃度を保っていたことから、ホモジェネートを注入した場合より総露出量が多いとも考えられる。

10

【0298】

【表3】

表3：脳ホモジェネート、PBS、又は非感染マウス脳に露出した後のプリオンコーティング処理済ワイヤーにおける感染性

接種	疾患症例数/総数	潜伏期間 s. d. (日数)
感染性ワイヤー	3 / 4	62 ± 3
実験1：感染性ワイヤーをインビトロで以下と接触		
(a) Prnp ^{0/0} 脳ホモジェネート		
ワイヤー	4 / 4	89 ± 3
ホモジェネート	1 / 4*	108
(b) PBS		
ワイヤー	3 / 3	85 ± 6
PBS	0 / 4	> 260
実験2：感染性ワイヤーをインビボで以下と接触		
(a) Prnp ^{+/+} マウスの脳、1日		
ワイヤー	3 / 3	104 ± 20
周辺組織	0 / 8†	> 260
(b) Prnp ^{+/+} マウスの脳、5日間		
ワイヤー	2 / 3	86 ± 4
周辺組織	0 / 8†	> 260
(c) Prnp ^{0/0} マウスの脳、1日		
ワイヤー	3 / 3	79 ± 4
周辺組織	1 / 8†*	101
(d) Prnp ^{0/0} マウスの脳、5日間		
ワイヤー	3 / 3	91 ± 5
周辺組織	0 / 8†	> 260

10

20

30

40

感染性ワイヤーは、終末期のCD1マウスの遠心分離処理した10%脳ホモジェネートから調製した(Zobeley, E., Flechsig, E., Cozzio, A., Enari, M. & Weissmann, C. (1999) Mol. Med. 5, 240-243)。インビトロアッセイ(実験1)においては、20本のワイヤーを、用時調製した非感染Prnp^{0/0}マウスの脳ホモジェネート(PBS中で10% w/v) 0.2 mlと共に、或いはPBS/0.1%アルブミン0.2 mlと共にEppendorf管に入れて、サーモミキサー(1400 rpm)を用い、37℃で24時間振盪した

50

。cog溶液0.2mlで洗浄した後、ワイヤーの感染性アッセイを行った。各調製物(0.4ml)からの試料30μlの感染性アッセイを、Tag20指標マウスを用いて行った。インビボ実験(実験2)においては、非感染Prnp^{+/+}(C57B16)又はPrnp^{0/0}マウスの脳内に感染性ワイヤーを移植した。1日後及び5日後にそれぞれマウスを殺処分し、ワイヤーに隣接する周辺脳組織を切断し取り出した。ワイヤーはPBS1mlで洗浄し、アッセイにかけた。脳試料(それぞれ約80mg)をPBS中でホモジェナイズして10%ホモジェネートを得、遠心分離処理した試料を指標マウスの各々に大脳内注入した。

【0299】

スクレイピーの診断は組織病理学又はヒストプロット法によって確定した(Flechsigg, E., Shmerling, D., Hegyi, I., Raeber, A.J., Fischer, M., Cozzio, A., von Mering, C., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (2000) Neuron 27, 399-408)。

?マウス9匹中1匹が注入をしている間又は注入後に死亡した。

【0300】

本発明者らによるワイヤーモデルは、推奨された方法(Ernst, D. R. & Race, R.E. (1993) J. Virol. Methods 41, 193-201, Taylor, D. M., (2000) Vet. J. 159, 10-17, Manuelidis, L. (1997) J. Neurovirol. 3, 62-65)又は他の方法により手術用器具を滅菌する際のモデルとなる。さらなる実験において、種々の処理を感染性ワイヤー切片に施してアッセイを行った。水酸化ナトリウム(1M、1時間)又はチオシアン酸グアニジニウム(4M、16時間)によって、ワイヤーはバイオアッセイ能力の限界まで完全に非感染性となったが(表4)、ホルムアルデヒド処理を行い、プリオンコーティングしたワイヤーを挿入された指標マウスは6匹全て92±8日でスクレイピーを発症した。

【0301】

【表4】

表4：種々の処理後に表面に結合したマウス・プリオンの感染性

接種	疾患症例数／ 総数	潜伏期間 s. d. (日数)
1. 非感染ワイヤー		
無処理	0／3	>260
2. 感染性ワイヤー		
無処理	6／6	76±5
水酸化ナトリウム(1M、1時間、25℃)	0／6	>260
ホルムアルデヒド(10%、1時間、25℃)	6／6	92±8
チオシアン酸グアニジニウム(4M、16時間、25℃)	0／6	>260

感染性ワイヤーは、遠心分離処理した脳ホモジェネートから調製し、文献記載のとおりアッセイを行った(Zobeley, E., Flechsigg, E., Cozzio, A., Enari, M. & Weissmann, C. (1999) Mol. Med. 5, 240-243)。ホモジェネートの滴定終点検出法(Reed, J. & Muench, H. (1938) Am. J. Hygiene 27, 493-497)から、6.75logLD₅₀ユニット/mlの10%ホモジェネート力価を得た。NaOH及びホルムアルデヒドの各溶液を使用直前に調製し、4Mのチオシアン酸グアニジニウムをRNA溶解緩衝液とした(#40082, Applied Biosystems社製、Foster City, CA, USA)。ワイヤーを1mlの溶液に露出させ、移植前にPBS1mlで4回洗浄した。

【0302】

上述の汚染除去研究から、手術に用いられる器具の汚染除去研究用モデルが得られる。しかし、RMLマウス・プリオンや、マウスで継代したBSE(301V)より熱安定性に劣るマウス馴化スクレイピー単離物(Chandler, R.L. (1961) Lancet 1, 1378-1379)、又はハムスター263K系統(Taylor, D. M., (2000) Vet. J. 159, 10-17, Taylor, D. M., Fernie, K., McConnell, I. & Steele, P.J. (1998) Vet. Microbiol. 64, 33-38)を本実施例において用いたことは重要な点である。本発明による表面に結合した感染性の滅菌実験は、好適な感受性を示す宿主においてCJD、vCJD、及びBSEプリオンを用いて実施することが当然に望ましい。本実施例では、ワイヤー表面と組織との接触面積は、手術用器具の場合に比し相対的に小さいので、マウスで得られた結果をさらに補強するために小さいスチールピース等によって拡大した表面を使用することが望ましく、かかる拡大表面は、より大型の指標動物に好都合に用いることができる。

10

【0303】

ケミルミネセンスによりPrP^{Sc}の存在を測定するため、或いは好適な指標マウス若しくは培養感受性細胞株を用いて感染性を調べるために、組織生検でなく、脳又は扁桃腺に短時間「浸した」ワイヤーを使用することが有利なことは明らかである。

【実施例4】

【0304】

ワイヤー切片の脳又は脾臓への一時的挿入によるプリオン感染性の生体内アッセイ及び指標マウスを用いた分析

20

スクレイピー感染性と結合するステンレススチールの能力は、終末期のスクレイピー罹患CD1マウスの10%脳ホモジェネート共存下でスチールワイヤーを16時間インキュベーションすることにより既に明らかにされている(Zobeley et al. 1999)。RMLに感染したC57B16マウス(87dpi)の脳内に、スクレイピー症状の予想発症時期の2ヶ月前にステンレススチールワイヤーを一時的に5分間挿入するだけで、ワイヤー表面をプリオン感染性で飽和させるに十分なことを本発明者らはここに示すものである。さらに本発明者らは、ワイヤーを一時的にC57B16マウス脾臓に挿入することによりRMLを大脳内接種した49日後に、該マウス脾臓においてプリオン感染性を認めた(表1)。1匹のマウス(DNA#41682)の脾臓にワイヤーを挿入し、5分及び30分後に抜き出した。「浸した」ワイヤーを、PBSを用いて標準条件下で洗浄し、実施例3に説明したように指標マウスの脳に永久移植することにより、直ちにアッセイを行った。表1に示すように、潜伏期間はそれぞれ79±7及び82±3日だった。また、ワイヤーを上記と同一マウスの全脳に一時的に挿入し、同一条件下で分析した。脳に5分及び30分間露出させたワイヤーは、それぞれ87±5(4/5)及び103±15(3/5)日後に指標マウスに疾患を発症させた。同じ脳の1%ホモジェネートは、85±6(5/5)日以内に全指標マウスに疾患を伝達し(表1)、滴定終点検出法による力価は約4.5logLD₅₀ユニット/mlだった。

30

【0305】

【表5】

表1 RML接種49日後におけるC57B16マウスの無損傷の脳又は脾臓に露出させたステンレススチールワイヤー切片における感染性

接種原	疾患症例数/総数	潜伏期間 s. d. (日数)
5分間脳に露出させたワイヤー	4/5+	87±5
30分間脳に露出させたワイヤー	3/5#	103±15
5分間脾臓に露出させたワイヤー	4/4	79±7
30分間脾臓に露出させたワイヤー	4/5	82±3
脳ホモジェネート(1%)	5/5	85±6
脳ホモジェネート(0.01%)	0/5	>150
脳ホモジェネート(0.001%)	0/5	>150
脳ホモジェネート(0.0001%)	0/5	>150

浸漬実験は実施例3と同様にして実施した。

+5番目のマウスは135日後に行動異常を発症した(DNA#42988)

#4番目のマウスは143日後に行動異常を発症した(DNA#43091)

10

20

References to Example 3

1. Ernst, D. R. & Race, R. E. (1993) *J. Virol. Methods* **41**, 193-201.
2. Taylor, D. M., Fraser, H., McConnell, I., Brown, D. A., Brown, K. L., Lamza, K. A. & Smith, G. R. (1994) *Arch. Virol.* **139**, 313-326.
3. Taylor, D. M. (2000) *Vet. J.* **159**, 10-17.
4. Brown, P., Gibbs, C. J., Jr., Amyx, H. L., Kingsbury, D. T., Rohwer, R. G., Sulima, M. P. & Gajdusek, D. C. (1982) *N. Engl. J. Med.* **306**, 1279-1282.
5. Bernoulli, C., Siegfried, J., Baumgartner, G., Regli, F., Rabinowicz, T., Gajdusek, D. C. & Gibbs, C. J., Jr. (1977) *Lancet* **1**, 478-479. 10
6. Gibbs, C. J., Jr., Asher, D. M., Kobrine, A., Amyx, H. L., Sulima, M. P. & Gajdusek, D. C. (1994) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **57**, 757-758.
7. Hill, A. F., Zeidler, M., Ironside, J. & Collinge, J. (1997) *Lancet* **349**, 99-100.
8. Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C. L., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J. & Lantos, P. (1997) *Nature* **389**, 448-450.
9. Hill, A. F., Butterworth, R. J., Joiner, S., Jackson, G., Rossor, M. N., Thomas, D. J., Frosh, A., Tolley, N., Bell, J. E., Spencer, M., King, A., Al-Sarraj, S., Ironside, J. W., Lantos, P. L. & Collinge, J. (1999) *Lancet* **353**, 183-189. 20
10. Wadsworth, J. D. F., Joiner, S., Hill, A. F., Campbell, T. A., Desbruslais, M. & Collinge, S. (2001) *Lancet* **In press**.
11. Zobeley, E., Flechsig, E., Cozzio, A., Enari, M. & Weissmann, C. (1999) *Mol. Med.* **5**, 240-243.
12. Williams, R. L. & Williams, D. F. (1988) *Biomaterials* **9**, 206-212.
13. Fischer, M., Rüllicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (1996) *EMBO J.* **15**, 1255-1264. 30
14. Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H., Raeber, A., Braun, U., Ehrensperger, F., Hornemann, S., Glockshuber, R., Riek, R., Billeter, M., Wuthrich, K. & Oesch, B. (1997) *Nature* **390**, 74-77.
15. Büeler, H., Raeber, A., Sailer, A., Fischer, M., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (1994) *Mol. Med.* **1**, 19-30. 40
16. Bolton, D. C., Rudelli, R. D., Currie, J. R. & Bendheim, P. E. (1991) *J. Gen. Virol.* **72**, 2905-2913.
17. Weissmann, C. (1991) *Nature* **349**, 569-571.
18. Millson, G. C., Kimberlin, R. H., Manning, E. J. & Collis, S. C. (1979) *Vet. Microbiol.* **1979**, 89-99.

19. Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M. & Weissmann, C. (1993) *Cell* **73**, 1339-1347.
20. Manuelidis, L. (1997) *J. Neurovirol.* **3**, 62-65.
21. Chandler, R. L. (1961) *Lancet* **1**, 1378-1379.
22. Taylor, D. M., Fernie, K., McConnell, I. & Steele, P. J. (1998) *Vet. Microbiol.* **64**, 33-38.
23. Reed, J. & Muench, H. (1938) *Am. J. Hygiene* **27**, 493-497.
24. Flechsig, E., Shmerling, D., Hegyi, I., Raeber, A. J., Fischer, M., Cozzio, A., von Mering, C., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (2000) *Neuron* **27**, 399-408.

10

PRION REFERENCES

Aguzzi, A. : Personal Communication. Zurich, Switzerland, 3/20/1997.

Aguzzi, A.; Brandner, S. The genetics of prions--a contradiction in terms? *Lancet* **354**: 22-25, 1999.

20

Aguzzi, A.; Weissmann, C. A suspicious signature. *Nature* **383**: 666-667, 1996.

Basler, K.; Oesch, B.; Scott, M.; Westaway, D.; Walchli, M.; Groth, D. F.; McKinley, M. P.; Prusiner, S. B.; Weissmann, C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**: 417-428, 1986.

30

Bertoni, J. M.; Brown, P.; Goldfarb, L. G.; Rubenstein, R.; Gajdusek, D. C. Familial Creutzfeldt-Jakob disease (codon 200 mutation) with supranuclear palsy. *J.A.M.A.* **268**: 2413-2415, 1992.

Beyreuther, K.; Masters, C. L.. Catching the culprit prion. *Nature* **370**: 419-420, 1994.

Bosque, P. J.; Vnencak-Jones, C. L.; Johnson, M. D.; Whitlock, J. A.; McLean, M. J.. A PrP gene codon 178 base substitution and a 24-bp interstitial deletion in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* **42**: 1864-1870, 1992.

40

Brown, P.; Galvez, S.; Goldfarb, L. G.; Nieto, A.; Cartier, L.; Gibbs, C. J., Jr.; Gajdusek, D. C. Familial Creutzfeldt-Jakob disease in Chile is associated with the codon 200 mutation of the PRNP amyloid precursor gene on chromosome 20. *J. Neurol. Sci.* **112**: 65-67, 1992.

Brown, P.; Goldfarb, L. G.; Gajdusek, D. C. The new biology of spongiform encephalopathy: infectious amyloidoses with a genetic twist. *Lancet* 337: 1019-1022, 1991.

Brown, P.; Goldfarb, L. G.; Kovanen, J.; Haltia, M.; Cathala, F.; Sulima, M.; Gibbs, C. J., Jr.; Gajdusek, D. C. Phenotypic characteristics of familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with the codon 178-asn PRNP mutation. *Ann. Neurol.* 31: 282-285, 1992.

Brown, P.; Goldfarb, L. G.; McCombie, W. R.; Nieto, A.; Squillacote, D.; Sheremata, W.; Little, B. W.; Godec, M. S.; Gibbs, C. J., Jr.; Gajdusek, D. C. : Atypical Creutzfeldt-Jakob disease in an American family with an insert mutation in the PRNP amyloid precursor gene. *Neurology* 42: 422-427, 1992.

Bueler, H.; Aguzzi, A.; Sailer, A.; Greiner, R.-A.; Autenried, P.; Aguet, M.; Weissman, C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73: 1339-1347, 1993.

Bueler, H.; Raeber, A.; Sailer, A.; Fischer, M.; Aguzzi, A.; Weissmann, C. : High prion and PrP(Sc) levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Molec. Med.* 1: 19-30, 1994.

Campbell, T. A.; Palmer, M. S.; Will, R. G.; Gibb, W. R. G.; Luthert, P. J.; Collinge, J. A prion disease with a novel 96-base pair insertional mutation in the prion protein gene. *Neurology* 46: 761-766, 1996.

Carlson, G. A.; Kingsbury, D. T.; Goodman, P. A.; Coleman, S.; Marshall, S. T.; DeArmond, S.; Westaway, D.; Prusiner, S. B. Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell* 46: 503-511, 1986.

Chapman, J.; Arlazoroff, A.; Goldfarb, L. G.; Cervenakova, L.; Neufeld, M. Y.; Werber, E.; Herbert, M.; Brown, P.; Gajdusek, D. C.; Korczyn, A. D. Fatal insomnia in a case of familial Creutzfeldt-Jakob disease with the codon 200(lys) mutation. *Neurology* 46: 758-761, 1996.

Chapman, J.; Ben-Israel, J.; Goldhammer, Y.; Korczyn, A. D.. The risk of developing Creutzfeldt-Jakob disease in subjects with the PRNP gene codon 200 point mutation. *Neurology* 44: 1683-1686, 1994.

10

20

30

40

- Chapman, J.; Brown, P.; Rabey, J. M.; Goldfarb, L. G.; Inzelberg, R.; Gibbs, C. J., Jr.; Gajdusek, D. C.; Korczyn, A. D. Transmission of spongiform encephalopathy from a familial Creutzfeldt-Jakob disease patient of Jewish Libyan origin carrying the PRNP codon 200 mutation. *Neurology* 42: 1249-1250, 1992.
- Chapman, J.; Korczyn, A. D. Genetic and environmental factors determining the development of Creutzfeldt-Jakob disease in Libyan Jews. *Neuroepidemiology* 10: 228-231, 1991. 10
- Chiesa, R.; Drisaldi, B.; Quaglio, E.; Migheli, A.; Piccardo, P.; Ghetti, B.; Harris, D. A. Accumulation of protease-resistant prion protein (PrP) and apoptosis of cerebellar granule cells in transgenic mice expressing a PrP insertional mutation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97: 5574-5579, 2000.
- Chiesa, R.; Piccardo, P.; Ghetti, B.; Harris, D. : *Neuron* 21: 1339-1351, 1998. 20
- Collinge, J. : Human prion diseases and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Hum. Mol. Genet.* 6: 1699-1705, 1997.
- Collinge, J.; Brown, J.; Hardy, J.; Mullan, M.; Rossor, M. N.; Baker, H.; Crow, T. J.; Lofthouse, R.; Poulter, M.; Ridley, R.; Owen, F.; Bennett, C.; Dunn, G.; Harding, A. E.; Quinn, N.; Doshi, B.; Roberts, G. W.; Honavar, M.; Janota, I.; Lantos, P. L. : Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion. 2. Clinical and pathological features. *Brain* 115: 687-710, 1992. 30
- Collinge, J.; Harding, A. E.; Owen, F.; Poulter, M.; Lofthouse, R.; Boughey, A. M.; Shah, T.; Crow, T. J.: Diagnosis of Gerstmann-Straussler syndrome in familial dementia with prion protein gene analysis. *Lancet* II: 15-17, 1989.
- Collinge, J.; Owen, F.; Poulter, M.; Leach, M.; Crow, T. J.; Rossor, M. N.; Hardy, J.; Mullan, M. J.; Janota, I.; Lantos, P. L. : Prion dementia without characteristic pathology. *Lancet* 336: 7-9, 1990. 40
- Collinge, J.; Palmer, M. S.; Dryden, A. J.: Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 337: 1441-1442, 1991.

Collinge, J.; Poulter, M.; Davis, M. B.; Baraitser, M.; Owen, F.; Crow, T. J.; Harding, A. E.: Presymptomatic detection or exclusion of prion protein gene defects in families with inherited prion diseases. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 1351-1354, 1991.

Collinge, J.; Sidle, K. C. L.; Heads, J.; Ironside, J.; Hill, A. F. : Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383: 685-690, 1996.

Collinge, J.; Whittington, M.; Sidle, K. C. L.; Smith, C. J.; Palmer, M.; Clarke, A. R.; Jefferys, J. G. R. : Prion protein is necessary for normal synaptic function. (Letter) *Nature* 370: 295-297, 1994.

10

Colombo, R. : Age and origin of the PRNP E200K mutation causing familial Creutzfeldt-Jacob disease in Libyan Jews. (Letter) *Am. J. Hum. Genet.* 67: 528-531, 2000.

de Silva, R.; Ironside, J. W.; McCardle, L.; Esmonde, T.; Bell, J.; Will, R.; Windl, O.; Dempster, M.; Estibeiro, P.; Lathe, R. : Neuropathological phenotype and 'prion protein' genotype correlation in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci. Lett.* 179: 50-52, 1994.

20

Deslys, J.-P.; Jaegly, A.; d'Aignaux, J. H.; Mouthon, F.; de Villemeur, T. B.; Dormont, D. : Genotype at codon 129 and susceptibility to Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 351: 1251 only, 1998.

Dlouhy, S. R.; Hsiao, K.; Farlow, M. F.; Foroud, T.; Conneally, P. M.; Johnson, P.; Prusiner, S. B.; Hodes, M. E.; Ghetti, B. : Linkage of the Indiana kindred of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease to the prion protein gene. *Nature Genet.* 1: 64-67, 1992.

30

Doh-ura, K.; Kitamoto, T.; Sakaki, Y.; Tateishi, J. : CJD discrepancy. (Letter) *Nature* 353: 801-802, 1991.

Doh-ura, K.; Tateishi, J.; Sasaki, H.; Kitamoto, T.; Sakaki, Y. : Pro-to-leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Straussler syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 974-979, 1989.

40

Duchen, L. W.; Poulter, M.; Harding, A. E. : *Brain* 116: 555-567, 1993.

Farlow, M. R.; Yee, R. D.; Dlouhy, S. R.; Conneally, P. M.; Azzarelli, B.; Ghetti, B. : Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. I. Extending the clinical spectrum. *Neurology* 39: 1446-1452, 1989.

Forloni, G.; Angeretti, N.; Chiesa, R.; Monzani, E.; Salmona, M.; Bugiani, O. : Neurotoxicity of a prion protein fragment. (Letter) *Nature* 362: 543-546, 1993.

10

Gabizon, R.; Rosenmann, H.; Meiner, Z.; Kahana, I.; Kahana, E.; Shugart, Y.; Ott, J.; Prusiner, S. B. : Mutation and polymorphism of the prion protein gene in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). *Am. J. Hum. Genet.* 53: 828-835, 1993.

Gajdusek, D. C. : The transmissible amyloidoses: genetical control of spontaneous generation of infectious amyloid proteins by nucleation of configurational change in host precursors: kuru-CJD-GSS-scrapie-BSE. *Europ. J. Epidemiol.* 7: 567-577, 1991.

20

Gambetti, P.; Petersen, R.; Monari, L.; Tabaton, M.; Autilio-Gambetti, L. : Fatal familial insomnia and the widening spectrum of prion diseases. *Brit. Med. Bull.* 49: 980-994, 1993.

Ghetti, B.; Tagliavini, F.; Masters, C. L.; Beyreuther, K.; Giaccone, G.; Verga, L.; Farlow, M. R.; Conneally, P. M.; Dlouhy, S. R.; Azzarelli, B.; Bugiani, O. : Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. II. Neurofibrillary tangles and plaques with PrP-amyloid coexist in an affected family. *Neurology* 39: 1453-1461, 1989.

30

Giaccone, G.; Verga, L.; Bugiani, O.; Frangione, B.; Serban, D.; Prusiner, S. B.; Farlow, M. R.; Ghetti, B.; Tagliavini, F. : Prion protein preamyloid and amyloid deposits in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease, Indiana kindred. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 9349-9353, 1992.

Goldfarb, L. G.; Brown, P.; Cervenakova, L.; Gajdusek, D. C. : Molecular genetic studies of Creutzfeldt-Jakob disease. *Molec. Neurobiol.* 8: 89-97, 1994.

40

Goldfarb, L. G.; Brown, P.; Goldgaber, D.; Asher, D. M.; Rubenstein, R.; Brown, W. T.; Piccardo, P.; Kascsak, R. J.; Boellaard, J. W.; Gajdusek, D. C. : Creutzfeldt-Jakob disease and kuru patients lack a mutation consistently found in the Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome. *Exp. Neurol.* 108: 247-250, 1990.

Goldfarb, L. G.; Brown, P.; Haltia, M.; Cathala, F.; McCombie, W. R.; Kovanen, J.; Cervenakova, L.; Goldin, L.; Nieto, A.; Godec, M. S.; Asher, D. M.; Gajdusek, D. C. : Creutzfeldt-Jakob disease cosegregates with the codon 178-asn PRNP mutation in families of European origin. *Ann. Neurol.* 31: 274-281, 1992.

Goldfarb, L. G.; Brown, P.; McCombie, W. R.; Goldgaber, D.; Swergold, G. D.; Wills, P. R.; Cervenakova, L.; Baron, H.; Gibbs, C. J., Jr.; Gajdusek, D. C. : Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88: 10926-10930, 1991.

10

Goldfarb, L. G.; Brown, P.; Mitrova, E.; Cervenakova, L.; Goldin, L.; Korczyn, A. D.; Chapman, J.; Galvez, S.; Cartier, L.; Rubenstein, R.; Gajdusek, D. C. : Creutzfeldt-Jacob disease associated with the PRNP codon 200-lys mutation: an analysis of 45 families. *Europ. J. Epidemiol.* 7: 477-486, 1991.

20

Goldfarb, L. G.; Haltia, M.; Brown, P.; Nieto, A.; Kovanen, J.; McCombie, W. R.; Trapp, S.; Gajdusek, D. C. : New mutation in scrapie amyloid precursor gene (at codon 178) in Finnish Creutzfeldt-Jakob kindred. (Letter) *Lancet* 337: 425, 1991.

Goldfarb, L. G.; Mitrova, E.; Brown, P.; Toh, B. H.; Gajdusek, D. C. : Mutation in codon 200 of scrapie amyloid protein gene in two clusters of Creutzfeldt-Jakob disease in Slovakia. (Letter) *Lancet* 336: 514-515, 1990.

30

Goldfarb, L. G.; Petersen, R. B.; Tabaton, M.; Brown, P.; LeBlanc, A. C.; Montagna, P.; Cortelli, P.; Julien, J.; Vital, C.; Pendelbury, W. W.; Haltia, M.; Wills, P. R.; Hauw, J. J.; McKeever, P. E.; Monari, L.; Schoursank, B.; Swergold, G. D.; Autilio-Gambetti, L.; Gajdusek, D. C.; Lugaresi, E.; Gambetti, P. : Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 258: 806-808, 1992.

40

Goldgaber, D.; Goldfarb, L. G.; Brown, P.; Asher, D. M.; Brown, W. T.; Lin, S.; Teener, J. W.; Feinstone, S. M.; Rubenstein, R.; Kasczak, R. J.; Boellaard, J. W.; Gajdusek, D. C. : Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler-Scheinker's syndrome. *Exp. Neurol.* 106: 204-206, 1989.

- Goldhammer, Y.; Gabizon, R.; Meiner, Z.; Sadeh, M. : An Israeli family with Gerstmann-Straussler-Scheinker disease manifesting the codon 102 mutation in the prion protein gene. *Neurology* 43: 2718-2719, 1993.
- Griffith, J. S. : Self-replication and scrapie. *Nature* 215: 1043-1044, 1967.
- Haltia, M.; Kovanen, J.; Goldfarb, L. G.; Brown, P.; Gajdusek, D. C. : Familial Creutzfeldt-Jakob disease in Finland: epidemiological, clinical, pathological and molecular genetic studies. *Europ. J. Epidemiol.* 7: 494-500, 1991. 10
- Hegde, R. S.; Mastrianni, J. A.; Scott, M. R.; DeFea, K. A.; Tremblay, P.; Torchia, M.; DeArmond, S. J.; Prusiner, S. B.; Lingappa, V. R. : A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* 279:827-834, 1998.
- Hegde, R. S.; Tremblay, P.; Groth, D.; DeArmond, S. J.; Prusiner, S. B.; Lingappa, V. R. : Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature* 402: 732-736, 1999. 20
- Horwich, A. L.; Weissman, J. S. : Deadly conformations--protein misfolding in prion disease. *Cell* 89: 499-510, 1997.
- Hsiao, K.; Baker, H. F.; Crow, T. J.; Poulter, M.; Owen, F.; Terwilliger, J. D.; Westaway, D.; Ott, J.; Prusiner, S. B. : Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* 338: 342-345, 1989. 30
- Hsiao, K.; Cass, C.; Conneally, P. M.; Dlouhy, S. R.; Hodes, M. E.; Farlow, M. R.; Ghetti, B.; Prusiner, S. B. : Atypical Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome with neurofibrillary tangles: no mutation in the prion protein open-reading-frame in a patient of the Indiana kindred. (Abstract) *Neurobiol. Aging* 11: 302, 1990.
- Hsiao, K.; Dlouhy, S. R.; Farlow, M. R.; Cass, C.; Da Costa, M.; Conneally, P. M.; Hodes, M. E.; Ghetti, B.; Prusiner, S. B. : Mutant prion proteins in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Nature Genet.* 1: 68-71, 1992. 40
- Hsiao, K.; Meiner, Z.; Kahana, E.; Cass, C.; Kahana, I.; Avrahami, D.; Scarlato, G.;

Abramsky, O.; Prusiner, S. B.; Gabizon, R. : Mutation of the prion protein in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease. *New Eng. J. Med.* 324: 1091-1097, 1991.

Hsiao, K. K.; Groth, D.; Scott, M.; Yang, S.-L.; Serban, H.; Rapp, D.; Foster, D.; Torchia, M.; DeArmond, S. J.; Prusiner, S. B. : Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 9126-9130, 1994.

Ironside, J. W.; Sutherland, K.; Bell, J. E.; McCardle, L.; Barrie, C.; Estebeiro, K.; Zeidler, M.; Will, R. G. : A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease: neuropathological and clinical features. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 61: 523-530, 1996.

Jendroska, K.; Hoffmann, O.; Schelosky, L.; Lees, A. J.; Poewe, W.; Daniel, S. E. : Absence of disease related prion protein in neurodegenerative disorders presenting with Parkinson's syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 57: 1249-1251, 1994.

Kitamoto, T.; Ohta, M.; Doh-ura, K.; Hitoshi, S.; Terao, Y.; Tateishi, J. : Novel missense variants of prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease or Gerstmann-Straussler syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191: 709-714, 1993.

Kocisko, D. A.; Come, J. H.; Priola, S. A.; Chesebro, B.; Raymond, G. J.; Lansbury, P. T.; Caughey, B. : Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370: 471-474, 1994.

Krasemann, S.; Zerr, I.; Weber, T.; Poser, S.; Kretzschmar, H.; Hunsmann, G.; Bodemer, W. : Prion disease associated with a novel nine octapeptide repeat insertion in the PRNP gene. *Molec. Brain Res.* 34: 173-176, 1995.

Kretzschmar, H. A.; Neumann, M.; Stavrou, D. : Codon 178 mutation of the human prion protein gene in a German family (Backer family): sequencing data from 72-year-old celloidin-embedded brain tissue. *Acta Neuropath.* 89: 96-98, 1995.

Kretzschmar, H. A.; Stowring, L. E.; Westaway, D.; Stubblebine, W. H.; Prusiner, S. B.; DeArmond, S. J. : Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* 5: 315-324, 1986.

10

20

30

40

Kuwahara, C.; Takeuchi, A. M.; Nishimura, T.; Haraguchi, K.; Kubosaki, A.; Matsumoto, Y.; Saeki, K.; Matsumoto, Y.; Yokoyama, T.; Itohara, S.; Onodera, T. : Prions prevent neuronal cell-line death. (Letter) *Nature* 400: 225-226, 1999.

Laplanche, J.-L.; El Hachimi, K. H.; Durieux, I.; Thuillet, P.; Defebvre, L.; Delasnerie-Laupretre, N.; Peoc'h, K.; Foncin, J.-F.; Destee, A. : Prominent psychiatric features and early onset in an inherited prion disease with a new insertional mutation in the prion protein gene. *Brain* 122: 2375-2386, 1999. 10

Laplanche, J. L.; Chatelain, J.; Thomas, S.; Launay, J. M.; Gaultier, C.; Derouesne, C. : Uncommon phenotype for a codon 178 mutation of the human PrP gene. (Letter) *Ann. Neurol.* 31: 345, 1992.

Lee, H. S.; Sambuughin, N.; Cervenakova, L.; Chapman, J.; Pocchiari, M.; Litvak, S.; Qi, H. Y.; Budka, H.; del Ser, T.; Furukawa, H.; Brown, P.; Gajdusek, D. C.; Long, J. C.; Korczyn, A. D.; Goldfarb, L. G. : Ancestral origins and worldwide distribution of the PRNP 200K mutation causing familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 1063-1070, 1999. 20

Liao, Y.-C. J.; Lebo, J.; Lebo, R. V.; Clawson, G. A.; Smuckler, E. A. : Human prion protein cDNA: molecular cloning, chromosomal mapping, and biological implications. *Science* 233: 364-367, 1986. 30

Lindquist, S. : Mad cows meet Psi-chotic yeast: the expansion of the prion hypothesis. *Cell* 89: 495-498, 1997.

Little, B. W.; Brown, B. W.; Rodgers-Johnson, P.; Perl, D. P.; Gajdusek, D. C. : Familial myoclonic dementia masquerading as Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 20: 231-239, 1986. 40

Lugaresi, E.; Medori, R.; Montagna, P.; Baruzzi, A.; Cortelli, P.; Lugaresi, A.; Tinuper, P. Zucconi, M.; Gambetti, P. : Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *New Eng. J. Med.* 315: 997-1003, 1986.

Lugaresi, E.; Montagna, P.; Baruzzi, A.; Cortelli, P.; Tinuper, P.; Zucconi, M.; Gambetti, P. L.; Medori, R. : *Insomnie familiale a evolution maligne: une nouvelle maladie thalamique. Rev. Neurol.* 142: 791-792, 1986.

Mallucci, G. R.; Campbell, T. A.; Dickinson, A.; Beck, J.; Holt, M.; Plant, G.; de Pauw, K. W.; Hakin, R. N.; Clarke, C. E.; Howell, S.; Davies-Jones, G. A. B.; Lawden, M.; Smith, C. M. L.; Ince, P.; Ironside, J. W.; Bridges, L. R.; Dean, A.; Weeks, I.; Collinge, J. : *Inherited prion disease with an alanine to valine mutation at codon 117 in the prion protein gene. Brain* 122: 1823-1837, 1999. 10

Manetto, V.; Medori, R.; Cortelli, P.; Montagna, P.; Tinuper, P.; Baruzzi, A.; Rancurel, G.; Hauw, J.-J.; Vanderhaeghen, J.-J.; Mailloux, P.; Bugiani, O.; Tagliavini, F.; Bouras, C.; Rizzuto, N.; Lugaresi, E.; Gambetti, P. : *Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of 5 new cases. Neurology* 42: 312-319, 1992. 20

Manson, J. C.; Clarke, A. R.; McBride, P. A.; McConnell, I.; Hope, J. : *PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology. Neurodegeneration* 3: 331-340, 1994.

Manuelidis, L.; Sklaviadis, T.; Manuelidis, E. E. : *Evidence suggesting that PrP is not the infectious agent in Creutzfeldt-Jakob disease. EMBO J.* 6: 341-347, 1987.

Mastrianni, J. A.; Curtis, M. T.; Oberholtzer, J. C.; Da Costa, M. M.; DeArmond, S.; Prusiner, S. B.; Garbern, J. Y. : *Prion disease (PrP-A117V) presenting with ataxia instead of dementia. Neurology* 45: 2042-2050, 1995. 30

Medori, R. : *Personal Communication. New York, N. Y., 5/17/1990.*

Medori, R.; Montagna, P.; Tritschler, H. J.; LeBlanc, A.; Cortelli, P.; Tinuper, P.; Lugaresi, E.; Gambetti, P. : *Fatal familial insomnia: a second kindred with mutation of prion protein gene at codon 178. Neurology* 42: 669-670, 1992. 40

Medori, R.; Tritschler, H.-J. : *Prion protein gene analysis in thoursee kindreds with fatal familial insomnia (FFI): codon 178 mutation and codon 129 polymorphism. Am. J. Hum. Genet.* 53: 822-827, 1993.

- Medori, R.; Tritschler, H.-J.; LeBlanc, A.; Villare, F.; Manetto, V.; Chen, H. Y.; Xue, R.; Leal, S.; Montagna, P.; Cortelli, P.; Tinuper, P.; Avoni, P.; Mochi, M.; Baruzzi, A.; Hauw, J. J.; Ott, J.; Lugaresi, E.; Autilio-Gambetti, L.; Gambetti, P. : Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *New Eng. J. Med.* 326: 444-449, 1992.
- Meggendorfer, F. : Klinische und genealogische Beobachtungen bei einem Fall von spastischer Pseudosklerose Jakobs. *Z. Ges. Neurol. Psychiat.* 128: 337-341, 1930. 10
- Meiner, Z.; Gabizon, R.; Prusiner, S. B. : Familial Creutzfeldt-Jakob disease: codon 200 prion disease in Libyan Jews. *Medicine* 76: 227-237, 1997.
- Mestel, R. : Putting prions to the test. *Science* 273: 184-189, 1996.
- Mitrova, E.; Lowenthal, A.; Appeal, B. : Familial Creutzfeldt-Jakob disease with temporal and spatial separation of affected members. *Europ. J. Epidemiol.* 6: 233-238, 1990. 20
- Monari, L.; Chen, S. G.; Brown, P.; Parchi, P.; Petersen, R. B.; Mikol, J.; Gray, F.; Cortelli, P.; Montagna, P.; Ghetti, B.; Goldfarb, L. G.; Gajdusek, D. C.; Lugaresi, E.; Gambetti, P.; Autilio-Gambetti, L. : Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: different prion proteins determined by a DNA polymorphism. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 2839-2842, 1994.
- Montrasio, F.; Frigg, R.; Glatzel, M.; Klein, M. A.; Mackay, F.; Aguzzi, A.; Weissmann, C. : Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* 288: 1257-1259, 2000. 30
- Mouillet-Richard, S.; Ermonval, M.; Chebassier, C.; Laplanche, J. L.; Lehmann, S.; Launay, J. M.; Kellermann, O. : Signal transduction through prion protein. *Science* 289: 1925-1928, 2000.
- Mouillet-Richard, S.; Teil, C.; Lenne, M.; Hugon, S.; Taleb, O.; Laplanche, J.-L. : Mutation at codon 210 (V210I) of the prion protein gene in a North African patient with Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol. Sci.* 168: 141-144, 1999. 40

Nieto, A.; Goldfarb, L. G.; Brown, P.; McCombie, W. R.; Trapp, S.; Asher, D. M.; Gajdusek, D. C. : Codon 178 mutation in ethnically diverse Creutzfeldt-Jakob disease families. (Letter) *Lancet* 337: 622-623, 1991.

Oesch, B.; Westaway, D.; Walchli, M.; McKinley, M. P.; Kent, S. B. H.; Aebersold, R.; Barry, R. A.; Tempst, P.; Teplow, D. B.; Hood, L. E.; Prusiner, S. B.; Weissmann, C. : A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40: 735-746, 1985. 10

Owen, F.; Poulter, M.; Collinge, J.; Crow, T. J. : A codon 129 polymorphism in the PRIP gene. *Nucleic Acids Res.* 18: 3103, 1990.

Owen, F.; Poulter, M.; Collinge, J.; Crow, T. J. : Codon 129 changes in the prion protein gene in Caucasians. (Letter) *Am. J. Hum. Genet.* 46: 1215-1216, 1990.

Owen, F.; Poulter, M.; Collinge, J.; Leach, M.; Lofthouse, R.; Crow, T. J.; Harding, A. E. : *Molec. Brain Res.* 13: 155-157, 1992. 20

Owen, F.; Poulter, M.; Lofthouse, R.; Collinge, J.; Crow, T. J.; Risby, D.; Baker, H. F.; Ridley, R. M.; Hsiao, K.; Prusiner, S. B. : Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. (Letter) *Lancet* I: 51-52, 1989.

Owen, F.; Poulter, M.; Shah, T.; Collinge, J.; Lofthouse, R.; Baker, H.; Ridley, R.; McVey, J.; Crow, T. J. : An in-frame insertion in the prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Molec. Brain Res.* 7: 273-276, 1990. 30

Pablos-Mendez, A.; Netto, E. M.; Defendini, R. : Infectious prions or cytotoxic metabolites? *Lancet* 341: 159-161, 1993.

Palmer, M. S.; Collinge, J. : Mutations and polymorphisms in the prion protein gene. *Hum. Mutat.* 2: 168-173, 1993. 40

Palmer, M. S.; Dryden, A. J.; Hughes, J. T.; Collinge, J. : Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 352: 340-342, 1991. Note: Erratum: *Nature* 352: 547 only, 1991.

- Perry, R. T.; Go, R. C. P.; Harrell, L. E.; Acton, R. T. : SSCP analysis and sequencing of the human prion protein gene (PRNP) detects two different 24 bp deletions in an atypical Alzheimer's disease family. *Am. J. Med. Genet.* 60: 12-18, 1995.
- Pocchiari, M.; Salvatore, M.; Cutruzzola, F.; Genuardi, M.; Allcatelli, C. T.; Masullo, C.; Macchi, G.; Alema, G.; Galgani, S.; Xi, Y. G.; Petraroli, R.; Silvestrini, M. C.; Brunori, M. : A new point mutation of the prion protein gene in Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 34: 802-807, 1993. 10
- Poulter, M.; Baker, H. F.; Frith, C. D.; Leach, M.; Lofthouse, R.; Ridley, R. M.; Shah, T.; Owen, F.; Collinge, J.; Brown, J.; Hardy, J.; Mullan, M. J.; Harding, A. E.; Bennett, C.; Doshi, R.; Crow, T. J. : Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion. 1. Genealogical and molecular studies. *Brain* 115: 675-685, 1992.
- Prusiner, S. B. : Prions causing degenerative neurological diseases. *Annu. Rev. Med.* 38: 381-398, 1987. 20
- Prusiner, S. B. : Molecular biology of prion diseases. *Science* 252: 1515-1522, 1991.
- Prusiner, S. B. : Biology and genetics of prion diseases. *Ann. Rev. Microbiol.* 48: 655-686, 1994.
- Prusiner, S. B. : Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136-144, 1982. 30
- Prusiner, S. B. : Molecular biology and genetics of prion diseases. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 61: 473-493, 1996.
- Puckett, C.; Concannon, P.; Casey, C.; Hood, L. : Genomic structure of the human prion protein gene. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 320-329, 1991. 40
- Reder, A. T.; Mednick, A. S.; Brown, P.; Spire, J. P.; Cauter, V.; Wollmann, R. L.; Cervenakova, L.; Goldfarb, L. G.; Garay, A.; Ovsiew, F.; Gajdusek, D. C.; Roos, R. P. : Clinical and genetic studies of fatal familial insomnia. *Neurology* 45: 1068-1075, 1995.

Riek, R.; Wider, G.; Billeter, M.; Hornemann, S.; Glockshuber, R.; Wuthrich, K. : Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc.Nat. Acad. Sci.* 95: 11667-11672, 1998.

Rivera, H.; Zuffardi, O.; Maraschio, P.; Caiulo, A.; Anichini, C.; Scarinci, R.; Vivarelli, R.: Alternate centromere inactivation in a pseudodicentric (15;20)(pter;pter) associated with a progressive neurological disorder. *J. Med. Genet.* 26: 626-630, 1989. 10

Robakis, N. K.; Devine-Gage, E. A.; Jenkins, E. C.; Kascsak, R. J.; Brown, W. T.; Krawczun, M. S.; Silverman, W. P. : Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the p arm of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140: 758-765, 1986.

Sailer, A.; Bueler, H.; Fischer, M.; Aguzzi, A.; Weissmann, C. : No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* 77: 967-968, 1994. 20

Sakaguchi, S.; Katamine, S.; Nishida, N.; Moriuchi, R.; Shigamatsu, K.; Sugimoto, T.; Nakatani, A.; Kataoka, Y.; Houtani, T.; Shirabe, S.; Okada, H.; Hasegawa, S.; Miyamoto, T.; Noda, T. : Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380: 528-531, 1996.

Samaia, H. B.; Mari, J. J.; Vallada, H. P.; Moura, R. P.; Simpson, A. J. G.; Brentani, R. R. : A prion-linked psychiatric disorder. *Nature* 390: 241 only, 1997. 30

Schellenberg, G. D.; Anderson, L.; O'dahl, S.; Wisjman, E. M.; Sadovnick, A. D.; Ball, M. J.; Larson, E. B.; Kukull, W. A.; Martin, G. M.; Roses, A. D.; Bird, T. D. : APP-717, APP-693, and PRIP gene mutations are rare in Alzheimer disease. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 511-517, 1991.

Schnittger, S.; Gopal Rao, V. V. N.; Deutsch, U.; Gruss, P.; Balling, R.; Hansmann, I. : PAX1, a member of the paired box-containing class of developmental control genes, is mapped to human chromosome 20p11.2 by in situ hybridization (ISH and FISH). *Genomics* 14: 740-744, 1992. 40

Scott, M.; Foster, D.; Miranda, C.; Serban, D.; Coufal, F.; Walchli, M.; Torchia, M.; Groth, D.; Carlson, G.; DeArmond, S. J.; Westaway, D.; Prusiner, S. B. : Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59: 847-857, 1989.

Shibuya, S.; Higuchi, J.; Shin, R.-W.; Tateishi, J.; Kitamoto, T. : Protective prion protein polymorphisms against sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. (Letter) *Lancet* 351: 419 only, 1998. 10

Shmerling, D.; Hegyi, I.; Fischer, M.; Blattler, T.; Brandner, S.; Gotz, J.; Rulicke, T.; Flechsig, E.; Cozzio, A.; von Mering, C.; Hangartner, C.; Aguzzi, A.; Weissmann, C. : Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* 93: 203-214, 1998.

Simon, E. S.; Kahana, E.; Chapman, J.; Treves, T. A.; Gabizon, R.; Rosenmann, H.; Zilber, N.; Korczyn, A. D. : Creutzfeldt-Jakob disease profile in patients homozygous for the PRNP E200K mutation. *Ann. Neurol.* 47: 257-260, 2000. 20

Sparkes, R. S.; Simon, M.; Cohn, V. H.; Fournier, R. E. K.; Lem, J.; Klisak, I.; Heinzmann, C.; Blatt, C.; Lucero, M.; Mohandas, T.; DeArmond, S. J.; Westaway, D.; Prusiner, S. B.; Weiner, L. P. : Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83: 7358-7362, 1986. 30

Speer, M. C.; Goldgaber, D.; Goldfarb, L. G.; Roses, A. D.; Pericak-Vance, M. A. : Support of linkage of Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome to the prion protein gene on chromosome 20p12-pter. *Genomics* 9: 366-368, 1991.

Supattapone, S.; Bosque, P.; Muramoto, T.; Wille, H.; Aagaard, C.; Peretz, D.; Nguyen, H.-O. B.; Heinrich, C.; Torchia, M.; Safar, J.; Cohen, F. E.; DeArmond, S. J.; Prusiner, S. B.; Scott, M. : Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell* 96: 869-878, 1999. 40

Tagliavini, F.; Prelli, F.; Ghiso, J.; Bugiani, O.; Serban, D.; Prusiner, S. B.; Farlow, M. R.; Ghetti, B.; Frangione, B. : Amyloid protein of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease

(Indiana kindred) is an 11 kd fragment of prion protein with an N-terminal glycine at codon 58. *EMBO J.* 10: 513-519, 1991.

Tagliavini, F.; Prelli, F.; Porro, M.; Rossi, G.; Giaccone, G.; Farlow, M. R.; Dlouhy, S. R.; Ghetti, B.; Bugiani, O.; Frangione, B. : Amyloid fibrils in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease (Indiana and Swedish kindreds) express only PrP peptides encoded by the mutant allele. *Cell* 79: 695-703, 1994. 10

Tateishi, J.; Brown, P.; Kitamoto, T.; Hoque, Z. M.; Roos, R.; Wollman, R.; Cervenakova, L.; Gajdusek, D. C. : First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature* 376: 434-435, 1995.

Telling, G. C.; Parchi, P.; DeArmond, S. J.; Cortelli, P.; Montagna, P.; Gabizon, R.; Mastrianni, J.; Lugaresi, E.; Gambetti, P.; Prusiner, S. B. : Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274: 2079-2082, 1996. 20

Telling, G. C.; Scott, M.; Mastrianni, J.; Gabizon, R.; Torchia, M.; Cohen, F. E.; DeArmond, S. J.; Prusiner, S. B. : Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83: 79-90, 1995.

Ter-Avanesyan, M. D.; Dagkesamanskaya, A. R.; Kushnirov, V. V.; Smirnov, V. N. : The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-mendelian determinant [ψ^+] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137: 671-676, 1994. 30

Tobler, I.; Gaus, S. E.; Deboer, T.; Ackermann, P.; Fischer, M.; Rulicke, T.; Moser, M.; Oesch, B.; McBride, P. A.; Manson, J. C. : Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380: 639-642, 1996.

Westaway, D.; DeArmond, S. J.; Cayetano-Canlas, J.; Groth, D.; Foster, D.; Yang, S.-L.; Torchia, M.; Carlson, G. A.; Prusiner, S. B. : Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell* 76: 117-129, 1994. 40

Whittington, M. A.; Sidle, K. C. L.; Gowland, I.; Meads, J.; Hill, A. F.; Palmer, M. S; Jefferys, J. G. R.; Collinge, J. : Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein. *Nature Genet.* 9: 197-201, 1995.

Wickner, R. B. : [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prior analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 264: 566-569, 1994.

Windl, O.; Giese, A.; Schulz-Schaeffer, W.; Zerr, I.; Skworc, K.; Arendt, S.; Oberdieck, C.; Bodemer, M.; Poser, S.; Kretzschmar, H. A. : Molecular genetics of human prion diseases in Germany. *Hum. Genet.* 105: 244-252, 1999.

10

Yamada, M.; Itoh, Y.; Fujigasaki, H.; Naruse, S.; Kaneko, K.; Kitamoto, T.; Tateishi, J.; Otomo, E.; Hayakawa, M.; Tanaka, J.; Matsushita, M.; Miyatake, T. : A missense mutation at codon 105 with codon 129 polymorphism of the prion protein gene in a new variant of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Neurology* 43: 2723-2724, 1993.

20

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059615 A2

- (51) International Patent Classification: **G01N 33/68** Institute of Neurology, Queen Square, London WC1N 3BG (GB).
- (21) International Application Number: PCT/GB02/00257
- (22) International Filing Date: 22 January 2002 (22.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0101762.3 23 January 2001 (23.01.2001) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): **MEDICAL RESEARCH COUNCIL** [GB/GB]; 20 Park Crescent, London W1N 4AL (GB).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **ENARI, Masato** [JP/JP]; National Cancer Center Research Institute, Radiobiology Division, Tsukiji 5-1-1, Chuo-ku, Tokyo 104-0045 (JP); **FLECHSIG, Eckhard** [DE/GB]; MRC Prion Unit/Department of Neurodegenerative Diseases, Institute of Neurology, University of London, Queen Square House, Queen Square, London WC1N 3BG (GB); **WEISSMANN, Charles** [CH/GB]; MRC Prion Unit, Institute of Neurology, Queen Square, London WC1N 3BG (GB); **COLLINGE, John** [GB/GB]; MRC Prion Unit,
- (74) Agents: **HARDING, Charles, Thomas** et al.; D Young & Co, 21 New Peter Lane, London EC4A 1DA (GB).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/059615 A2

(54) Title: METHOD

(57) Abstract: The invention relates to methods for determining the presence of prions in a tissue/organ or fluid therefrom; said method comprising the steps of: contacting the tissue/organ with one or more devices, wherein said devices are capable of binding prions; removing said devices from contact with said tissue/organ; determining if said devices are binding prions wherein the device is contacted with the tissue/organ for 120 minutes.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

METHOD

FIELD OF INVENTION

- 5 The present invention relates to a method. In particular, the present invention relates to an assay method for detecting the presence of prion protein.

BACKGROUND ART

- 10 By way of background information, a prion is a transmissible particle devoid of nucleic acid. The prion protein (PrP) gene encodes prion proteins. The normal form of PrP is called PrP^C; the abnormal conformational isomer is called PrP^{Sc} and is believed to be the main or only component of the prion. The most notable prion diseases are Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), Scrapie of Sheep and Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) of humans.
- 15 The most common manifestation of CJD is sporadic CJD (sCJD), which occurs spontaneously in individuals. Iatrogenic CJD (iCJD) is a disease that results from accidental infection. Familial CJD (fCJD) is a form of CJD that occurs in rare families and is caused by mutations of the human PrP gene. Gerstmann-Strassler-Scheinker Disease (GSS) is also a rare inherited form of human prion disease. Both familial diseases are autosomal dominant disorders. 'New variant' CJD (vCJD) of humans is a distinct strain type of CJD that is associated with a pattern
- 20 of PrP glycoforms that are different from those found for other types of CJD. It has been suggested that BSE may have passed from cattle resulting in vCJD in humans.

- Prions are unusually resistant to physical and chemical inactivation, which causes problems
- 25 when sterilising prion-containing material by conventional methods such as heat sterilisation and formaldehyde (Taylor *et al.* (1994), *Arch. Virol.* 139, 313-326; Brown *et al.* (1982), *N. Engl. J. Med.* 306, 1279-1282; Ernst & Race (1993), *J. Virol. Methods* 41, 193-201; Taylor (1993), *Br. Med. Bull.* 49, 810-821). Over 100 cases of proven or suspected iatrogenic transmissions to humans have now been reported. Zobeley *et al.* (1999) *Mol. Med.* 5, 240-243
- 30 provided a model system for the sterilisation of stainless steel instruments infected with scrapie prions. It was shown that mouse-adapted scrapie prions could firmly bind to stainless steel wire, as evidenced by the finding that the wire gave rise to infection when implanted into the brain of indicator mice, even after treatment with 10 % formaldehyde for 1 hour.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

2

Usually, diagnosis in humans relies on histopathology and immunohistochemical determination. Further methods for the diagnosis of prion infection require invasive procedures such as brain or tonsil biopsies. Homogenates of these biopsies are injected into the brains of test animals such as mice. If the test animals develop clinical symptoms of prion infection then the brain of the test animal is further examined to confirm that prions are present. Problems associated with this method are that prions contained within the biopsies are subject to degradation. Consequently, infectivity is usually lost within 24 hours.

10 The present invention seeks to overcome the problems associated with the prior art.

SUMMARY OF THE INVENTION

15 The present invention provides methods for the detection of prions in a tissue/organ or fluid therefrom. The methods use a device such as a metal wire that is contacted with the tissue/organ. Surprisingly, the device is capable of binding prions within 5 minutes. The device is then removed from contact with the tissue/organ. Surprisingly, the device is able to preserve prions against degradation for greater than 3 days. Using prior art methods, prions degrade after only 24 hours. To determine if the device is binding prions, a number of different methods can be used as discussed below. Since prions bind to the device much faster than previously known, diagnosis of prion infection is significantly quicker than prior art methods.

25 According to the first aspect of the present invention, there is provided a method for detecting the presence of prions in a tissue/organ; said method comprising the steps of: contacting the tissue/organ with a device, wherein said device is capable of binding prions; removing said device from contact with said tissue/organ; and determining if said device is binding prions.

30 According to a second aspect of the present invention, there is provided a non-invasive method for determining the presence of prions in a tissue/organ; said method comprising the steps of: contacting the tissue/organ with a device, wherein said device is capable of binding prions; removing said device from contact with said tissue/organ; and determining if said device is binding prions. Preferably, said intact tissue/organ is left at least substantially intact by said non-invasive method.

35

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

3

The device used in the methods of the present invention advantageously preserves prions against degradation.

5 Preferably, the tissue/organ is mammalian. More preferably, the tissue/organ is a livestock or a human tissue/organ.

The methods of the present invention advantageously detect prions in a tissue/organ in which prions accumulate. Preferably, the tissue/organ is selected from brain, spleen, lymph node or tonsil.

10

The device of the present invention may comprise one or more metals or may comprise plastic such as polystyrene, or glass. It is surprisingly disclosed herein that these materials bind prion protein. Preferably, the device of the present invention may comprise one or more metals. Preferably, the metal is any one or more of the metals selected from the group consisting of

15

steel, stainless steel, silver, gold or combinations thereof. More preferably, the metal is stainless steel.

Advantageously, the device of the present invention may comprise one or more wires or spheres of diameter less than 5mm, preferably less than 1mm, preferably having dimensions as

20

mentioned in the Examples section. Preferably, the device comprises one or more metal wires.

According to a third aspect of the present invention, we provide a method for determining if a device is binding prions comprising the steps of: contacting one or more test animals with the device; incubating the test animal(s); monitoring the test animal(s) for adverse effects or death;

25

and optionally performing a biopsy on the test animal(s) that display adverse effects or death for evidence of prions.

Preferably, one or more devices are contacted with the test animals for 1 hour or more. More preferably, one or more devices are contacted with the test animals for 5 hours or more. More preferably, one or more devices are contacted with the test animals for more than 5 hours. Most preferably, one or more devices are contacted with the test animals permanently. No ill effects due to the device itself have been observed.

30

The test animal(s), which may be useful in the present invention, are preferably mammals.

35

Preferably, the test animal(s) are mice. The test animal(s) may also include transgenic mice.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

4

Preferably, said transgenic mice comprise one or more PrP transgene(s). More preferably, the PrP transgene(s) encode a mammalian PrP. Most preferably, the PrP transgene(s) encode a livestock or a human PrP.

5 According to a fourth aspect of the present invention, we provide a method for determining if a device is binding prions comprising the steps of: contacting one or more cell lines with the device; incubating the cell line(s); and assaying cell line for the presence of prions/prion protein.

10 The presence of prions/prion protein may be assayed by any suitable method known in the art such as by protein assay, immunoassay, Western blotting or cell blotting. Preferably, the presence of PrPSc may be detected following treatment with Proteinase K.

According to a fifth aspect, the present invention provides a method for determining if a device is binding prions by detecting said prions/prion protein directly on the surface of said device. Preferably, prions/prion protein are detected in said method using a protein assay, immunoassay or Western blotting, preferably an immunoassay.

15 The device used in the present invention is preferably contacted with the tissue/organ for 120 minutes or less. More preferably, the device is contacted with the tissue/organ for 30 minutes or less. Most preferably, the device is contacted with the tissue/organ for 5 minutes or less.

ADVANTAGES

25 The present invention has a number of advantages. These advantages will be apparent in the following description.

By way of example, the present invention is advantageous since it provides a commercially useful method.

30

By way of further example, the present invention is advantageous since it provides a method for detecting the presence of prions in tissue/organ.

35 By way of further example, the present invention is advantageous since it provides a method of preserving prions against degradation.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

5

By way of further example, the present invention advantageously provides for the identification of one or more agents for use in the preparation of a medicament for the treatment of prion infection.

5

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

PRION, PrPc and PrPSc

10 As used herein the term "prion" refers to a proteinaceous infectious particle that lacks nucleic acid.

PrPSc is a conformational isoform of PrPc (the normal form of prion protein) and is believed to be the main or only component of the prion.

15

In a preferred embodiment of the present invention, a tissue/organ is tested that may contain prions.

20 Background teachings on prions have been presented by Victor A. McKusick *et al* on <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>. The following information concerning prions has been extracted mainly from that source.

25 Mutations in the prion protein gene are associated with Gerstmann-Straussler disease (GSD), Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), and familial fatal insomnia, and aberrant isoforms of the prion protein can act as an infectious agent in these disorders as well as in kuru and in scrapie in sheep.

30 Prusiner (1982, 1987) suggested that prions represent a new class of infectious agent that lacks nucleic acid. (The term prion, which was devised by Prusiner (1982), comes from 'protein infectious agent.')

The prion diseases are neurodegenerative conditions transmissible by inoculation or inherited as autosomal dominant disorders. Prusiner (1994) reviewed the pathogenesis of transmissible spongiform encephalopathies and noted that a protease-resistant

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

6

isoform of the prion protein was important in the pathogenesis of these diseases. Mestel (1996) reviewed the evidence for and against--and the opinions for and against--the existence of infectious proteins.

5 Tagliavini et al. (1991) purified and characterized proteins extracted from amyloid plaque cores isolated from 2 patients of the Indiana kindred. They found that the major component of GSD amyloid was an 11-kD degradation product of PrP, whose N-terminus corresponded to the glycine residue at position 58 of the amino acid sequence deduced from the human PrP cDNA. In
10 addition, amyloid fractions contained larger PrP fragments with apparently N termini and amyloid P components. Tagliavini et al. (1991) interpreted these findings as indicating that the disease process leads to proteolytic cleavage of PrP, generating an amyloidogenic peptide that polymerizes into insoluble fibrils. Since no mutations of the structural gene were found in the family,
15 factors other than the primary structure of PrP may play a crucial role in the process of amyloid formation.

One interpretation has been that the prion is a sialoglycoprotein whose synthesis is stimulated by the infectious agent that is the primary cause of this disorder and Manuelidis et al. (1987) presented evidence suggesting that the PrP peptide is not the infectious agent in CJD. Pablos-Mendez et al. (1993)
20 reviewed the 'tortuous history of prion diseases' and suggested an alternative to the idea that prions are infectious, namely, that they are cytotoxic metabolites. The authors suggested that studies of the processing of the metabolite PrP and trials of agents that enhance the appearance of this protein would be useful
25 ways to test their hypothesis. Their model predicted that substances capable of blocking the catabolism of PrP would lead to its accumulation. Increasing PrP synthesis in transgenic mice shortens the latency in experimental scrapie. The hypothesis of Pablos-Mendez et al. (1993) suggested an intracellular
30 derailment of the degradative rather than the synthetic pathway of PrP.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

7

Forloni et al. (1993) found that the PrP peptide 106-126 has a high intrinsic ability to polymerize into amyloid-like fibrils in vitro. They also showed that neuronal death results from chronic exposure of primary rat hippocampal cultures to micromolar concentrations of a peptide corresponding to this peptide. They suggested that the neurotoxic effect of the peptide involves an apoptotic mechanism.

It has been suggested that the infectious, pathogenic agent of the transmissible spongiform encephalopathies is a protease-resistant, insoluble form of the PrP protein that is derived posttranslationally from the normal, protease-sensitive PrP protein (Prusiner, Beyreuther and Masters, 1994). Kocisko et al. (1994) reported the conversion of normal PrP protein to the protease-resistant PrP protein in a cell-free system composed of purified constituents. This selective conversion from the normal to the pathogenic form of PrP required the presence of preexisting pathogenic PrP. The authors showed that the conversion did not require biosynthesis of new PrP protein, its amino-linked glycosylation, or the presence of its normal glycosylphosphatidylinositol anchor. This provided direct evidence that the pathogenic PrP protein can be formed from specific protein-protein interactions between it and the normal PrP protein.

Rivera et al. (1989) described a 13-year-old male with a severe progressive neurologic disorder whose karyotype showed a pseudodicentric chromosome resulting from a telomeric fusion 15p;20p. In lymphocytes the centromeric constriction of the abnormal chromosome was always that of chromosome 20, whereas in fibroblasts both centromeres were alternately constricted. The authors suggested that centromere inactivation results from a modified conformation of the functional DNA sequences preventing normal binding to centromere-specific proteins. They also postulated that the patient's disorder, reminiscent of a spongy glioneuronal dystrophy as seen in Creutzfeldt-Jakob disease, may be secondary to the presence of a mutation in the prion protein.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

8

Collinge et al. (1990) suggested that 'prion disease', whether familial or sporadic, may prove to be a more appropriate diagnostic term. An Indiana kindred with GSD disease was reported by Farlow et al. (1989) and Ghetti et al. (1989). Using PrP gene analysis in genetic prediction carries potential problems arising out of uncertainty about penetrance and the complications of presymptomatic testing in any inherited late-onset neurodegenerative disorder. Collinge et al. (1991) concluded, however, that it had a role to play in improving genetic counseling for families with inherited prion diseases, allowing presymptomatic diagnosis or exclusion of CJD or GSD in persons at risk.

Gajdusek (1991) provided a chart of the PRNP mutations found to date: 5 different mutations causing single amino acid changes and 5 insertions of 5, 6, 7, 8, or 9 octapeptide repeats. He also provided a table of 18 different amino acid substitutions that have been identified in the transthyretin gene (TTR; 176300) resulting in amyloidosis and drew a parallel between the behavior of the 2 classes of disorders.

Schellenberg et al. (1991) sought the missense mutations at codons 102, 117, and 200 of the PRNP gene, as well as the PRNP insertion mutations, which are associated with CJD and GSSD, in 76 families with Alzheimer disease, 127 presumably sporadic cases of Alzheimer disease, 16 cases of Down syndrome, and 256 normal controls; none was positive for any of these mutations. Jendroska et al. (1994) used histoblot immunostaining in an attempt to detect pathologic prion protein in 90 cases of various movement disorders including idiopathic Parkinson disease (PD; 168600), multiple system atrophy, diffuse Lewy body disease (127750), Steele-Richardson-Olszewski syndrome (260540), corticobasal degeneration, and Pick disease (172700). No pathologic prion protein was identified in any of these brain specimens, although it was readily detected in 4 controls with Creutzfeldt-Jakob disease. Perry et al. (1995) used SSCP to screen for mutations at the prion locus in 82 Alzheimer disease patients from 54 families (including 30 familial cases), as well as in 39

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

9

age-matched controls. They found a 24-bp deletion around codon 68 which removed 1 of the 5 gly-pro rich octarepeats in 2 affected sibs and 1 offspring in a late-onset Alzheimer disease family. However, the other affected individuals within the same pedigree did not share this deletion, which was also detected in 3 age-matched controls in 6 unaffected members from a late-onset Alzheimer disease family. Another octarepeat deletion was detected in 3 other individuals from the same Alzheimer disease family, of whom 2 were affected. No other mutations were found. Perry et al. (1995) concluded that there was no evidence for association between prion protein mutations and Alzheimer disease in their survey.

Hsiao et al. (1990) found no mutation in the open reading frame of the PrP gene in 3 members of the family analyzed, but Hsiao et al. (1992) later demonstrated a phe198-to-ser mutation; see 176640.0011.

Palmer and Collinge (1993) reviewed mutations and polymorphisms in the prion protein gene.

Chapman et al. (1996) demonstrated fatal insomnia and significant thalamic pathology in a patient heterozygous for the pathogenic lysine mutation at codon 200 (176640.0006) and homozygous for methionine at codon 129 of the prion protein gene. They stressed the similarity of this phenotype to that associated with mutations in codon 178 (176640.0010).

Collinge et al. (1996) investigated a wide range of cases of human prion disease to identify patterns of protease-resistant PrP that might indicate different naturally occurring prion strain types. They studied protease resistant PrP from 'new variant' CJD to determine whether it represents a distinct strain type that can be differentiated by molecular criteria from other forms of CJD. Collinge et al. (1996) demonstrated that sporadic CJD and iatrogenic CJD (usually due to administration of growth hormone from cadaver brain) is associated with 3 distinct patterns of protease-resistant PrP on Western blots.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

10

Types 1 and 2 are seen in sporadic CJD and in some cases of iatrogenic CJD. A third type is seen in acquired prion diseases with a peripheral route of exposure to prions. Collinge et al.(1996) reported that 'new variant' CJD is associated with a unique and highly consistent appearance of protease-resistant PrP on Western blots involving a characteristic pattern of glycosylation of the PrP. Transmission of CJD to inbred mice produced a PrP pattern characteristic of the inoculated CJD. Transmission of bovine spongiform encephalopathy (BSE) prion produced a glycoform ratio pattern of PrP closely similar to that of 'new variant' CJD. They found that the PrP from experimental BSE in macaques and naturally acquired BSE in domestic cats showed a glycoform pattern indistinguishable from that of experimental murine BSE and 'new variant' CJD. The report of Collinge et al. (1996) was reviewed by Aguzzi and Weissmann (1996), who concluded that Collinge et al. (1996) had reviewed the neuropathologic and clinical features of the 'new variant' of CJD that was related to BSE.

Prusiner (1996) provided a comprehensive review of the molecular biology and genetics of prion diseases. Collinge (1997) likewise reviewed this topic. He recognized 3 categories of human prion diseases: (1) the acquired forms include kuru and iatrogenic CJD; (2) sporadic forms include CJD in typical and atypical forms; (3) inherited forms include familial CJD, Gerstmann-Straussler-Scheinker disease, fatal familial insomnia, and the various atypical dementias. Collinge (1997) tabulated 12 pathogenetic mutations that had been reported to that time. Noting that the ability of a protein to encode a disease phenotype represents a nonmendelian form of transmission important in biology, Collinge (1997) commented that it would be surprising if evolution had not used this method for other proteins in a range of species. He referred to the identification of prion-like mechanisms in yeast (Wickner, 1994; Ter Avanesyan et al., 1994).

Horwich and Weissman (1997) reviewed the central role of prion protein in the group of related transmissible neurodegenerative diseases. The data

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

11

5 demonstrated that prion protein is required for the disease process, and that the conformational conversion of the prion protein from its normal soluble alpha-helical conformation to an insoluble beta-sheet state is intimately tied to the generation of disease and infectivity. They noted that much about the conversion process remains unclear.

10 Mallucci et al. (1999) described a large English family with autosomal dominant segregation of presenile dementia, ataxia, and other neuropsychiatric features. Diagnoses of demyelinating disease, Alzheimer disease, Creutzfeldt-Jakob disease, and Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome had been made in particular individuals at different times. Mallucci et al. (1999) also described an Irish family, likely to be part of the same kindred, in which diagnoses of multiple sclerosis, dementia, corticobasal degeneration, and 'new variant' CJD had been considered in affected individuals. Molecular studies identified the disorder as prion disease due to an ala117-to-val mutation in the PRNP gene. They emphasized the diversity of phenotypic expression seen in these kindreds and proposed that inherited prion disease should be excluded by PRNP analysis in any individual presenting with atypical presenile dementia or neuropsychiatric features and ataxia, including suspected cases of 'new variant' CJD. Hegde et al. (1999) demonstrated that transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. Hegde et al. (1999) observed that the effectiveness of accumulated PrP^{Sc}, an abnormally folded isoform, in causing neurodegenerative disease depends upon the predilection of host-encoded PrP to be made in a transmembrane form, termed CtmPrP. Furthermore, the time course of PrP^{Sc} accumulation in transmissible prion disease is followed closely by increased generation of CtmPrP. Thus, the accumulation of PrP^{Sc} appears to modulate in trans the events involved in generating or metabolizing CtmPrP. Hegde et al. (1999) concluded that together these data suggested that the events of CtmPrP-mediated neurodegeneration may represent a common step in the pathogenesis of genetic and infectious prion diseases.

15
20
25
30

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

12

PrP^c, the cellular, nonpathogenic isoform of PrP, is a ubiquitous glycoprotein expressed strongly in neurons. Mouillet-Richard et al. (2000) used the murine 1C11 neuronal differentiation model to search for PrP^c-dependent signal transduction thorough antibody-mediated crosslinking. The 1C11 clone is a committed neuroectodermal progenitor with an epithelial morphology that lacks neuron-associated functions. Upon induction, 1C11 cells develop a neural-like morphology, and may differentiate either into serotonergic or noradrenergic cells. The choice between the 2 differentiation pathways depends on the set of inducers used. Ligation of PrP^c with specific antibodies induced a marked decrease in the phosphorylation level of the tyrosine kinase FYN (137025) in both serotonergic and noradrenergic cells. The coupling of PrP^c to FYN was dependent upon caveolin-1 (601047). Mouillet-Richard et al. (2000) suggested that clathrin (see 118960) might also contribute to this coupling. The ability of the 1C11 cell line to trigger PrP^c-dependent FYN activation was restricted to its fully differentiated serotonergic or noradrenergic progenies. Moreover, the signaling activity of PrP^c occurred mainly at neurites. Mouillet-Richard et al. (2000) suggested that PrP^c may be a signal transduction protein.

MAPPING

The human gene for prion-related protein has been mapped to 20p12-pter by a combination of somatic cell hybridization and in situ hybridization (Sparkes et al., 1986) and by spot blotting of DNA from sorted chromosomes (Liao et al., 1986). Robakis et al. (1986) also assigned the PRNP locus to 20p by in situ hybridization.

By analysis of interstitial 20p deletions, Schnittger et al. (1992) demonstrated the following order of loci: pter--PRNP--SCG1 (118920)--BMP2A (112261)--PAX1 (167411)--cen. Puckett et al. (1991) identified 5-prime of the PRNP gene a RFLP that has a high degree of heterozygosity, which might serve as a useful marker for the pter-p12 region of chromosome 20.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

13

Riek et al. (1998) used the refined NMR structure of the mouse prion protein to investigate the structural basis of inherited human transmissible spongiform encephalopathies. In the cellular form of mouse prion protein, no spatial clustering of mutation sites was observed that would indicate the existence of disease-specific subdomains. A hydrogen bond between residues 128 and 178 provided a structural basis for the observed highly specific influence of a polymorphism at position 129 in human PRNP on the disease phenotype that segregates with the asp178-to-asn (D178N; 176640.0007) mutation. Overall, the NMR structure implied that only some of the disease-related amino acid replacements lead to reduced stability of the cellular form of PRNP, indicating that subtle structural differences in the mutant proteins may affect intermolecular signaling in a variety of different ways.

Windl et al. (1999) searched for mutations and polymorphisms in the coding region of the PRNP gene in 578 patients with suspect prion diseases referred to the German Creutzfeldt-Jakob disease surveillance unit over a period of 4.5 years. They found 40 cases with a missense mutation previously reported as pathogenic. Among these, the D178N mutation was the most common. In all of these cases, D178N was coupled with methionine at codon 129, resulting in the typical fatal familial insomnia genotype. Two novel missense mutations and several silent polymorphisms were found. In their Figure 1, Windl et al. (1999) diagrammed the known pathogenic mutations in the coding region of PRNP.

HISTORY

Aguzzi and Brandner (1999) reviewed 'the genetics of prions' but raised the question of whether this is a contradiction in terms since the prion, which they defined as an enigmatic agent that causes transmissible spongiform encephalopathies, is a paradigm of nongenetic pathology. The protein-only hypothesis, originally put forward by Griffith (1967), says that prion infectivity is identical to scrapie protein (PrP^{Sc}), an abnormal form of the cellular protein, now referred to as PrP^C. Replication occurs by the scrapie prion recruiting

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

14

cellular prion and converting it into further scrapie prion. The newly formed scrapie prion will join the conversion cycle and lead to a chain reaction of events that results in an ever-faster accumulation of scrapie prion. This hypothesis gained widespread recognition and acceptance after Prusiner (1982) purified the pathologic protein and Weissmann and his colleagues (Oesch et al., 1985; Basler et al., 1986) cloned the gene that encodes the scrapie protein as well as its normal cellular counterpart PRNP. Even more momentum was achieved when Weissmann's group (Bueller et al., 1993) showed that genetic ablation of Pmp protects mice from experimental scrapie on exposure to prions, as predicted by the protein-only hypothesis. Aguzzi and Brandner (1999) considered the finding of linkage between familial forms of prion diseases and mutations in the prion gene to be an important landmark (Hsiao et al., 1989).

ANIMAL MODEL

The structural gene for prion (Prn-p) has been mapped to mouse chromosome 2. A second murine locus, Prn-i, which is closely linked to Prn-p, determines the length of the incubation period for scrapie in mice (Carlson et al., 1986). Yet another gene controlling scrapie incubation times, symbolized Pid-1, is located on mouse chromosome 17. Scott et al. (1989) demonstrated that transgenic mice harboring the prion protein gene from the Syrian hamster, when inoculated with hamster scrapie prions, exhibited scrapie infectivity, incubation times, and prion protein amyloid plaques characteristic of the hamster. Hsiao et al. (1994) found that 2 lines of transgenic mice expressing high levels of the mutant P101L prion protein developed a neurologic illness and central nervous system pathology indistinguishable from experimental murine scrapie. Amino acid 102 in human prion protein corresponds to amino acid 101 in mouse prion protein; hence, the P101L murine mutation was the equivalent of the pro102-to-leu mutation (176640.0002) which causes Gerstmann-Straussler disease in the human. Hsiao et al. (1994) reported serial transmission of neurodegeneration to mice who expressed the P101L transgene

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

15

at low levels and Syrian hamsters injected with brain extracts from the transgenic mice expressing high levels of mutant P101L prion protein. Although the high-expressing transgenic mice accumulated only low levels of infectious prions in their brains, the serial transmission of disease to inoculated recipients argued that prion formation occurred de novo in the brains of these uninoculated animals and provided additional evidence that prions lack a foreign nucleic acid.

Studies on PrP knockout mice have been reported by Bueler et al. (1994), Manson et al. (1994), and Sakaguchi et al. (1996). Sakaguchi et al. (1996) reported that the PrP knockout mice produced by them were apparently normal until the age of 70 weeks, at which point they consistently began to show signs of cerebellar ataxia. Histologic studies revealed extensive loss of Purkinje cells in the majority of cerebellar folia. Atrophy of the cerebellum and dilatation of the fourth ventricle were noted. Similar pathologic changes were not noted in the PrP knockout mice produced by Bueler et al. (1994) and by Manson et al. (1994). Sakaguchi et al. (1996) noted that the difference in outcome may be due to strain differences or to differences in the extent of the knockout within the PrP gene. Notably, in all 3 lines of PrP knockout mice described, susceptibility to prion infection was lost.

Based on their studies in PrP null mice, Collinge et al. (1994) concluded that prion protein is necessary for normal synaptic function. They postulated that inherited prion disease may result from a dominant negative effect with generation of PrP^{Sc}, the posttranslationally modified form of cellular PrP, ultimately leading to progressive loss of functional PrP (PrP^C). Tobler et al. (1996) reported changes in circadian rhythm and sleep in PrP null mice and stressed that these alterations show intriguing similarities with the sleep alterations in fatal familial insomnia.

Mice devoid of PrP develop normally but are resistant to scrapie; introduction of a PrP transgene restores susceptibility to the disease. To identify the regions

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

16

of PrP necessary for this activity, Shmerling et al. (1998) prepared PrP knockout mice expressing PrPs with amino-proximal deletions. Surprisingly, PrP with deletion of residues 32-121 or 32-134, but not with shorter deletions, caused severe ataxia and neuronal death limited to the granular layer of the cerebellum as early as 1 to 3 months after birth. The defect was completely abolished by introducing 1 copy of a wildtype PrP gene. Shmerling et al. (1998) speculated that these truncated PrPs may be nonfunctional and compete with some other molecule with a PrP-like function for a common ligand.

5

10 Telling et al. (1996) reported observations that supported the view that the fundamental event in prion diseases is a conformational change in cellular prion protein whereby it is converted into the pathologic isoform PrP^{Sc}. They found that in fatal familial insomnia (FFI), the protease-resistant fragment of PrP^{Sc} after deglycosylation has a size of 19 kD, whereas that from other inherited and sporadic prion diseases is 21 kD. Extracts from the brains of FFI patients transmitted disease to transgenic mice expressing a chimeric human-mouse PrP gene about 200 days after inoculation and induced formation of the 19-kD PrP^{Sc} fragment, whereas extracts from the brains of familial and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease patients produced the 21-kD PrP^{Sc} fragment in these mice. The results of Telling et al. (1996) indicated that the conformation of PrP^{Sc} functions as a template in directing the formation of nascent PrP^{Sc} and suggested a mechanism to explain strains of prions where diversity is encrypted in the conformation of PrP^{Sc}.

15

20

25 Lindquist (1997) pointed out that 'some of the most exciting concepts in science issue from the unexpected collision of seemingly unrelated phenomena.' The case in point she discussed was the suggestion by Wickner (1994) that 2 baffling problems in yeast genetics could be explained by an hypothesis similar to the prion hypothesis. Two yeast mutations provided a convincing case that the inheritance of phenotype can sometimes be based upon the inheritance of different protein conformations rather than upon the inheritance of different nucleic acids. Thus, yeast may provide important new

30

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

17

tools for the study of prion-like processes. Furthermore, she suggested that prions need not be pathogenic. Indeed, she suggested that self-promoted structural changes in macromolecules lie at the heart of a wide variety of normal biologic processes, not only epigenetic phenomena, such as those associated with altered chromatin structures, but also some normal, developmentally regulated events.

Hegde et al. (1998) studied the role of different topologic forms of PrP in transgenic mice expressing PrP mutations that alter the relative ratios of the topologic forms. One form is fully translocated into the ER lumen and is termed PrP-Sec. Two other forms span the ER membrane with orientation of either the carboxy-terminal to the lumen (PrP-Ctm) or the amino-terminal to the lumen (PrP-Ntm). F2-generation mice harboring mutations that resulted in high levels of PrP-Ctm showed onset of neurodegeneration at 58 +/- 11 days. Overexpression of PrP was not the cause. Neuropathology showed changes similar to those found in scrapie, but without the presence of PrP^{Sc}. The level of expression of PrP-Ctm correlated with severity of disease.

Supattapone et al. (1999) reported that expression of a redacted PrP of 106 amino acids with 2 large deletions in transgenic (Tg) mice deficient for wildtype PrP (Prnp -/-) supported prion propagation. Rocky Mountain laboratory (RML) prions containing full-length PrP^{Sc} produced disease in Tg(PrP106)Prnp -/- mice after approximately 300 days, while transmission of RML106 prions containing PrP^{Sc106} created disease in Tg(PrP106)Prnp -/- mice after approximately 66 days on repeated passage. This artificial transmission barrier for the passage of RML prions was diminished by the coexpression of wildtype mouse PrP^C in Tg(PrP106)Prnp +/- mice that developed scrapie in approximately 165 days, suggesting that wildtype mouse PrP acts in trans to accelerate replication of RML106 prions. Purified PrP^{Sc106} was protease resistant, formed filaments, and was insoluble in nondenaturing detergents.

Kuwahara et al. (1999) established hippocampal cell lines from *Prnp*^{-/-} and *Prnp*^{+/+} mice. The cultures were established from 14-day-old mouse embryos. All 6 cell lines studied belonged to the neuronal precursor cell lineage, although they varied in their developmental stages. Kuwahara et al. (1999) found that serum removal from the cell culture caused apoptosis in the *Prnp*^{-/-} cells but not in *Prnp*^{+/+} cells. Transduction of the prion protein or the BCL2 gene suppressed apoptosis in *Prnp*^{-/-} cells under serum-free conditions. *Prnp*^{-/-} cells extended shorter neurites than *Prnp*^{+/+} cells, but expression of PrP increased their length. Kuwahara et al. (1999) concluded that these findings supported the idea that the loss of function of wildtype prion protein may partly underlie the pathogenesis of prion diseases. The authors were prompted to try transduction of the BCL2 gene because BCL2 had previously been shown to interact with prion protein in a yeast 2-hybrid system. Their results suggested some interaction between BCL2 and PrP in mammalian cells as well.

In scrapie-infected mice, prions are found associated with splenic but not circulating B and T lymphocytes and in the stroma, which contains follicular dendritic cells. Formation and maintenance of mature follicular dendritic cells require the presence of B cells expressing membrane-bound lymphotoxin-alpha/beta. Treatment of mice with soluble lymphotoxin-beta receptor results in the disappearance of mature follicular dendritic cells from the spleen. Montrasio et al. (2000) demonstrated that this treatment abolished splenic prion accumulation and retards neuroinvasion after intraperitoneal scrapie inoculation. Montrasio et al. (2000) concluded that their data provided evidence that follicular dendritic cells are the principal sites for prion replication in the spleen.

Chiesa et al. (1998) generated lines of transgenic mice that expressed a mutant prion protein containing 14 octapeptide repeats, the human homolog of which is associated with an inherited prion dementia. This insertion was the largest identified to that time in the PRNP gene and was associated with a prion disease characterized by progressive dementia and ataxia, and by the presence

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

19

of PrP-containing amyloid plaques in the cerebellum and basal ganglia (Owen et al., 1992; Duchen et al., 1993; Krasemann et al., 1995). Mice expressing the mutant protein developed a neurologic illness with prominent ataxia at 65 or 240 days of age, depending on whether the transgene array was, respectively, homozygous or hemizygous. Starting from birth, mutant PrP was converted into a protease-resistant and detergent-insoluble form that resembled the scrapie isoform of PrP, and this form accumulated dramatically in many brain regions throughout the lifetime of the mice. As PrP accumulated, there was massive apoptosis of granule cells in the cerebellum.

10 NON-INVASIVE

As used herein, the term "non-invasive" means that the surface of a subject to be tested using the methods of the present invention is preferably not broken, punctured or cut. The term "surface" as used herein may refer to skin, whether internal or external, or may refer to surfaces such as mucosal membranes, respiratory surfaces, or the walls of anatomical surfaces such as the alimentary canal, ear canal, buccal cavity, throat or any other surface of a subject.

Preferably, the methods of the present invention are non-invasive.

20 TISSUE/ORGAN

As used herein, the term "tissue/organ" refers to any tissue/organ that is to be tested for the presence of prions according to the methods of the present invention.

25 The tissue/organ may be or may be derived from any tissue/organ in which prions accumulate.

Preferably, the tissue/organ is a brain, spleen, lymph node or tonsil. More preferably, the tissue/organ is a brain or tonsil.

30 The tissue/organ may also be in the form of a biopsy or homogenate.

The tissue/organ, biopsy or homogenate may also include the fluid from said tissue/organ, which may comprise sputum, mucus or other such fluids.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

20

As used herein, the term "intact" means that tissue or a biopsy is not removed from a subject using the devices or methods of the present invention, except possibly at de minimis levels.

BINDING PRIONS

5

As used herein, the term "binding prions" refers to the adherence, association, binding, sticking, or other such interaction of prions with metal surfaces.

10 The binding between metals and prions may occur by any form of binding capable of occurring between metals and proteins such as covalent, ionic, Van Der Waals, transient or reversible association, or any other forms of binding interaction.

PRESERVING PRIONS

15 As used herein, the term "preserving prions" refers to the surprising finding disclosed in the present invention that when prions bind to metal surfaces they are preserved. As used herein, the term "preserved" means that the prions bound to the metal surface are protected against degradation and thus remain infective for a period of time that is longer than would normally be expected. For example, using prior art methods, prions injected into brain remain infective
20 for about 24 hours only. Using the methods of the present invention, prions bound to a metal surface are advantageously preserved in brain for at least 3 days.

Advantageously, the device may be incubated at a temperature of about -20 °C to further preserve the prions. The preservation may be further enhanced by any action which helps
25 protect prions against degradation such as preventing prions from contacting proteases or preventing prions from contacting phagocytic cells.

DEVICE

30 The term "device" as used herein, refers to any device that is useful in the methods of the present invention.

The device may be any device that is capable of binding prions.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

21

5 Preferably, the device comprises plastic such as polystyrene, glass or metal. Preferably, the device comprises metal. More preferably, the metal comprises one or more metals selected from the group consisting of steel, stainless steel, silver, gold or combinations thereof. Most preferably, the wire comprises stainless steel. As used herein, the term "combinations thereof" refers to alloys of two or more metals wherein at least one of the metals is selected from the group consisting of steel, stainless steel, silver or gold.

The device may also comprise two or more different metals or two or more different metal alloys.

10 Preferably, the device comprises one or more needles, spatula, pins, wires or spheres. More preferably, the device comprises one or more wires. Most preferably, the device comprises one or wires each measuring about 0.15 mm in diameter and 5 mm in length, such as stainless steel suture monofilament wire available from Braun MelsungerAG, Germany.

15 According to the methods of the present invention, the tissue/organ is contacted with the device.

20 Preferably, the device is sterilised before contacting the tissue/organ with the device. More preferably, the device is sterilised for 30 minutes at 11 bar (about 121 °C). Most preferably, the device is sterilised by immersing the device in 1 M NaOH for 1 hour 30 minutes at 11 bar (about 121 °C) or 4 M guanidium thiocyanate for 16 hours.

CONTACTING THE DEVICE

25 The device may be contacted with the tissue/organ such that the skin surface covering the subject is broken, punctured or cut to access said tissue/organ. Preferably, the tissue/organ is a brain, spleen, tonsil or lymph node.

30 Prior to contact with the device an anaesthetic such as general or a local anaesthetic may be administered to the subject if said subject is living. Alternatively, or in addition to, sedation may be administered such that the subject loses partial or total consciousness.

35 The methods of the present invention may comprise inserting the device into the tissue/organ such that the tissue/organ is penetrated or pierced by said device; contacting the surface of the

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

22

tissue/organ with the device; contacting the device with fluid such as mucus that is associated with the tissue/organ, or any other method of contacting the tissue/organ with the device.

NON INVASIVE METHODS

5

Preferably, the methods of the present invention are non-invasive. More preferably, the tissue/organ remains intact.

10 The tissue/organ tested using the non-invasive methods may be any tissue/organ, biopsy or homogenate in which prions accumulate.

Preferably, if a living subject is to be tested then the tissue/organ is a tonsil. This tissue/organ can be accessed via the mouth and so the skin surface covering the outside of a subject to be tested is not broken, punctured or cut.

15

If a living subject is to be tested, then prior to contact with the device, light sedation may be administered such that the subject does not lose consciousness. Alternatively, or in addition to, a local anaesthetic may be administered to the subject. Preferably, the anaesthetic is a local anaesthetic administered around the site of one or more tonsils.

20

The methods of the present invention may comprise inserting the device into the tissue/organ; contacting the surface of the tissue/organ with the device; contacting the device with fluid such as sputum or mucus or any other fluid that is associated with the tissue/organ.

25 Preferably, the device is contacted with the tissue/organ for 120 minutes or less. More preferably, the device is contacted with the tissue/organ for 30 minutes or less. Most preferably, the device is contacted with the tissue/organ for 5 minutes or less. These times apply to both invasive and non-invasive methods of the invention.

30 It is an advantage of the present invention that the amount of time taken to contact the device with the tissue/organ is short. This allows results to be obtained more rapidly and more economically than other prior art methods. This also results in less discomfort or distress to the subject being tested, if said subject is living.

35 REMOVING THE DEVICE

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

23

Following contact, the device is removed from the tissue/organ or fluid therefrom. The device may be tested immediately to determine if prions are bound to it. It is an advantage of the present invention that prions are preserved when they are bound to the device. Thus, the device may be stored until it is to be tested.

Preferably, the device is stored at a temperature of about -20°C or lower.

TESTING THE DEVICE

In accordance with the present invention, the device is tested to determine if prions are bound to the surface of said device.

In one embodiment of the present invention, the device is tested by a method comprising contact with one or more test animals that are susceptible to prion infection.

In another embodiment of the present invention, the device is tested by a method comprising contact with one or more cell lines that are susceptible to prion infection.

In another embodiment, prions/prion protein are detected directly on the surface of the device. This can be done using methods such as protein assay, immunoassay or Western blotting.

TEST ANIMAL

As used herein, the term "test animal" refers to any animal that is contacted with a device to determine if the tissue/organ contains prions. The test animal can be any animal that is susceptible to infection by prions.

Preferably, the test animal is a mammal. More preferably, the test animal is an adult mammal.

More preferably, the test animal is a rat, hamster, rabbit, guinea pig or mouse. Most preferably, the test animal is a mouse.

The test animal may also be a transgenic mouse such as a *Tga20* mouse.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

24

The transgenic mouse may be susceptible to prion infection by a particular strain of prion eg. a strain of prion that causes BSE in the appropriate host.

CONTACTING DEVICE WITH TEST ANIMAL

5

According to the present invention, the device that has been contacted with the tissue/organ is washed prior to contact with one or more test animals. Preferably, the washing step is repeated five times for 10 minutes using 50 ml of buffer per wash. Preferably, a buffer such as phosphate buffered saline is used.

10

The washed device is then contacted with the test animals that have been anaesthetised using an anaesthetic such as halothane/O₂.

Preferably, the method of contact is via introduction of at least part of the device into the brain of the test animals, such as by inserting it directly in to the brain. More preferably, the device is inserted directly into the right parietal lobe of the brain of the test animals.

The device is contacted with the brain of one or more test animals. Preferably, the device is contacted with the brain of one or more test animals for 1 hour or less per test animal. More preferably, the device is contacted with the brain of one or more test animals for 5 hours per test animal. More preferably, the device is contacted with the brain of one or more test animals for more than 5 hours per test animal. Most preferably, the device is contacted with the brain of one or more test animals permanently.

25 The test animal is incubated following contact with the device. As used herein, the term "incubated" means the maintenance of the test animal in appropriate conditions, such as a containment facility as is well known in the art.

MONITORING OF TEST ANIMAL

30

Test animals may be monitored for symptoms of prion infection by examination for the development of symptoms of prion infection. At the onset of symptoms, the test animals are examined regularly and may be culled if showing signs of distress. Criteria for clinical diagnosis of prion infection in mice are described by Carlson *et al.* (1986), *Cell* 46, 503-511 and include at least two of the following signs: generalised tremor, ataxia, rigidity of the tail,

35

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

25

or head bobbing. Optionally, biopsies of the test animals may be performed. The biopsy may be performed on any suitable organ or tissue such as one in which prions accumulate. Preferably, a brain biopsy is performed.

- 5 Various methods well known in the art may be used for the detection of prion proteins such as Western blotting (Collinge *et al.* 1996, *Nature* 383, 685-690), immunoassay (described in WO 9837210) and electronic-property probing (described in WO 9831839).

ADVERSE EFFECTS

- 10 As used herein, the term "adverse effects" refers to the clinical signs of neurological dysfunction caused by prion infection. The clinical signs of prion infection are well known in the art. When clinical signs appear, the test animals are examined daily. If the death of one or more test animals is obviously imminent, they are culled and their brains are removed for
15 histopathologic studies and confirmation of prion infection.

TRANSGENIC ANIMALS

- 20 As used herein, the term "transgenic animals" refers to those animals that have one or more gene(s) in their genome that has been introduced using recombinant DNA technology. Recombinant DNA technology is well known to a person skilled in the art. In transgenic animals, the term "gene" is synonymous with the term "transgene".

- The test animals of the present invention may be transgenic test animals. Preferably, said test
25 animals may be transgenic rats, hamsters, rabbits, guinea pigs or mice. More preferably the test animals may be transgenic mice.

EXOGENOUS PrP GENES

- 30 As used herein, the term "exogenous PrP genes" refers generally to PrP genes from any species, which encode any form of PrP amino acid sequence or protein. Some commonly known PrP sequences have been described by Gabriel *et al.* (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9097-9101. Accordingly, the term "exogenous PrP gene" is also used to encompass the terms "artificial PrP gene" and "chimeric PrP gene". As used herein, the term's "artificial PrP
35 gene" and "chimeric PrP gene" refer to genes constructed by recombinant DNA technology,

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

26

using methods well known to a person skilled in the art. When exogenous PrP genes are included in the genome of an animal then it will render that animal susceptible to infection from prions that would naturally only infect a genetically distinct species. Transgenic animals containing artificial PrP genes are described in US 5792901, US 5908969, US 6008435 and
5 WO 9704814.

In a preferred aspect, the test animals may be mice that are transgenic for one or more exogenous PrP genes. Preferably, the exogenous PrP genes encode a mammalian PrP. Most preferably, the exogenous PrP gene(s) encode a livestock or a human PrP.

10

PROTEIN ASSAY

According to the present invention, one or more devices may be tested for the presence of prion proteins using a protein assay. The device(s) that have been contacted with the
15 tissue/organ are washed with a buffer. Preferably, said buffer is phosphate buffered saline. The device(s) are then incubated with proteinase K or an alkali for 1 hour at 20 °C. Preferably, the alkali is 2 M NaOH. The amount of protein in the eluate is determined using a protein assay such as the Micro BCA Protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA) using BSA dilutions as standards.

20

IMMUNOASSAY

According to the present invention, the device may be tested for the presence of prions using an immunoassay. Briefly, one or more devices that have been contacted with the tissue/organ
25 are washed with a buffer. Preferably, said buffer is phosphate buffered saline. A monoclonal antibody that is specific to the prion protein being detected is then incubated with the device. Blocking may be achieved using 5 % BSA. The bound antibody can then be detected using methods such as Western blotting, Enzyme Linked Immunofiltration Assay and Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay. Such methods are described in detail in WO 98/37210.

30

CELL LINE

As used herein, the term "cell line" refers one or more types of cell that may be susceptible to prions. Preferably the cell line is susceptible to prions isolated from a mammal such as those

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

27

prions that cause scrapie in sheep and mice. More preferably the cell line is susceptible to prions isolated from livestock or a human such as those prions that cause BSE, CJD or vCJD.

5 Bosque and Prusiner (2000), *J. Virol.* 74, 4377-4386 described a cell line called N2a that is susceptible to RML prions that cause scrapie in mice. When the N2a cell line was inoculated with RML-prion infected mouse brain homogenates, prion protein was detected using a cell blotting method after 15 days. Cultures that were negative at 20 days remained negative and so cultures were assayed 20 or more days after inoculation.

10 According to the present invention, one or more devices may be tested for the presence of prion proteins using one or more cell lines. Briefly, one or more devices that have been contacted with the tissue/organ are washed with a buffer. Preferably, said buffer is phosphate buffered saline. The cell line(s) are grown using methods well known in the art. Preferably, the device(s) are contacted with the cell line(s) for 1 hour or more. More preferably, the
15 device(s) are contacted with the cell line(s) for 5 hours or more. More preferably, the device(s) are contacted with the cell line(s) for more than 5 hours. More preferably, the device(s) are contacted with the cell line(s) for 1 day or more. More preferably, the device(s) are contacted with the cell line(s) for 3 days or more. Most preferably, the device(s) are contacted with the cell line(s) for more than 3 days. The cells are cultured and after 4 days the
20 cells are split at a 1:10 ratio in fresh medium. The presence of prion protein in the cell line is detected using various methods known in the art. Preferably, the methods used are protein assay, immunoassay, Western blotting or cell blotting. More preferably, the method used is cell blotting.

25 CELL BLOTTING

According to the present invention, the presence of prion protein in one or more cell lines that have been contacted with one or more devices may be detected by cell blotting according to
30 Bosque and Prusiner (2000), *J. Virol.* 74, 4377-4386. Briefly, plastic coverslips are placed in the wells of a 24-well plate and cells are plated into the wells. After 4 days, the medium is removed and the wells are washed with a buffer such as PBS. A nitrocellulose membrane is soaked in lysis buffer and pressed firmly on to the coverslips such that the cells come into contact with the nitrocellulose membrane. The membrane is incubated with proteinase K and washed in distilled water. Next the blot is washed with denaturing buffer and blocked 5 %
35 non-fat milk and 0.1 % Tween-20). The blot was then incubated with an antibody specific to

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

28

the type of PrP^{Sc} being detected and the procedure performed as for Western blotting. Bosque and Prusiner (2000), *J. Virol.* 74, 4377-4386 reported that cell blotting is about 150-fold more sensitive than Western blotting.

5 IDENTIFYING AN AGENT

In another aspect of the present invention, a method is provided for the identification of one or more agents. At least two devices are contacted with the same tissue/organ. The devices are then removed from the tissue/organ. The amount of prions that are bound to at least one of the devices is estimated. At least one of the devices is incubated with the agent(s). Following incubation with the agent(s), the amount of prions bound to the device is estimated. The amount of prions bound to the device before and after incubation with the agent(s) is determined. Preferably, the agent(s) decrease the amount of prions bound to the device. More preferably, the agent(s) modulate prion infection.

15

ESTIMATING PRION LEVELS

20 The amount of prions bound to a device may be estimated by a method such as protein assay, immunoassay, Western blotting or using cell lines and cell blotting.

AGENT

25 As used herein, the term "agent" may be a single entity or it may be a combination of entities.

The agent may be an organic compound or other chemical. The agent may be a compound, which is obtainable from or produced by any suitable source, whether natural or artificial. The agent may be an amino acid molecule, a polypeptide, or a chemical derivative thereof, or a combination thereof. The agent may even be a polynucleotide molecule - which may be a sense or an anti-sense molecule. The agent may even be an antibody.

30

The agent may be designed or obtained from a library of compounds, which may comprise peptides, as well as other compounds, such as small organic molecules.

35

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

29

By way of example, the agent may be a natural substance, a biological macromolecule, or an extract made from biological materials such as bacteria, fungi, or animal (particularly mammalian) cells or tissues, an organic or an inorganic molecule, a synthetic agent, a semi-synthetic agent, a structural or functional mimetic, a peptide, a peptidomimetics, a derivatised agent, a peptide cleaved from a whole protein, or a peptides synthesised synthetically (such as, 5 by way of example, either using a peptide synthesizer or by recombinant techniques or combinations thereof, a recombinant agent, an antibody, a natural or a non-natural agent, a fusion protein or equivalent thereof and mutants, derivatives or combinations thereof.

10 Typically, the agent will be an organic compound. Typically the organic compounds will comprise two or more hydrocarbyl groups. Here, the term "hydrocarbyl group" means a group comprising at least C and H and may optionally comprise one or more other suitable substituents. Examples of such substituents may include halo-, alkoxy-, nitro-, an alkyl group, 15 a cyclic group etc. In addition to the possibility of the substituents being a cyclic group, a combination of substituents may form a cyclic group. If the hydrocarbyl group comprises more than one C then those carbons need not necessarily be linked to each other. For example, at least two of the carbons may be linked *via* a suitable element or group. Thus, the hydrocarbyl group may contain hetero atoms. Suitable hetero atoms will be apparent to those skilled in the art and include, for instance, sulphur, nitrogen and oxygen. For some 20 applications, preferably the agent comprises at least one cyclic group. The cyclic group may be a polycyclic group, such as a non-fused polycyclic group. For some applications, the agent comprises at least the one of said cyclic groups linked to another hydrocarbyl group.

The agent may contain halo groups. Here, "halo" means fluoro, chloro, bromo or iodo.

25

The agent may contain one or more of alkyl, alkoxy, alkenyl, alkylene and alkenylene groups – which may be unbranched- or branched-chain.

The agent may be in the form of a pharmaceutically acceptable salt – such as an acid addition salt or a base salt – or a solvate thereof, including a hydrate thereof. For a review on suitable salts see Berge *et al*, J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19.

30

The agent of the present invention may be capable of displaying other therapeutic properties.

35 The agent may be used in combination with one or more other pharmaceutically active agents.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

30

If combinations of active agents are administered, then they may be administered simultaneously, separately or sequentially.

5 In a further aspect, the present invention also provides a method for identifying one or more agents comprising the steps of: contacting the tissue/organ with a device, wherein said device is capable of binding prions; removing said device from contact with said tissue/organ; estimating the amount of prions bound to said device; incubating agents with said device; determining if said agents decrease the amount of prions bound to the device.

10

Thus, in another aspect, the present invention relates to one or more agents capable of modulating prion infection. Said agent(s) may be advantageously used in the preparation of a medicament. Thus, in another aspect, the invention relates to modulation of prion infection in a subject by administering to said subject a therapeutically effective amount of said agent(s).

15

AMINO ACID SEQUENCE

Amino acid sequences may comprise the agent of the present invention.

20 As used herein, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "polypeptide" and/or the term "protein". In some instances, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "peptide". In some instances, the term "amino acid sequence" is synonymous with the term "protein".

25 The amino acid sequence may be isolated from a suitable source, or it may be made synthetically or it may be prepared by use of recombinant DNA techniques.

NUCLEOTIDE SEQUENCE

30 Nucleotide sequences may be used to express amino acid sequences that may be used as a component of the composition of the present invention.

As used herein, the term "nucleotide sequence" is synonymous with the term "polynucleotide".

35

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

31

The nucleotide sequence may be DNA or RNA of genomic or synthetic or recombinant origin. The nucleotide sequence may be double-stranded or single-stranded whether representing the sense or antisense strand or combinations thereof.

5 The nucleotide sequence may be DNA.

The nucleotide sequence may be prepared by use of recombinant DNA techniques (e.g. recombinant DNA).

10 The nucleotide sequence may be cDNA.

The nucleotide sequence may be the same as the naturally occurring form, or may be derived therefrom.

15 VARIANTS/HOMOLOGUES/DERIVATIVES

The present invention also encompasses the use of variants, homologues and derivatives of any thereof. Here, the term "homologue" means an entity having a certain homology with the subject amino acid sequences and the subject nucleotide sequences. Here, the term
20 "homology" can be equated with "identity".

In the present context, an homologous sequence is taken to include an amino acid sequence which may be at least 75, 85 or 90% identical, preferably at least 95 or 98% identical to the subject sequence. Typically, the homologues will comprise the same active sites etc. as the
25 subject amino acid sequence. Although homology can also be considered in terms of similarity (i.e. amino acid residues having similar chemical properties/functions), in the context of the present invention it is preferred to express homology in terms of sequence identity.

In the present context, an homologous sequence is taken to include a nucleotide sequence
30 which may be at least 75, 85 or 90% identical, preferably at least 95 or 98% identical to the subject sequence. Typically, the homologues will comprise the same sequences that code for the active sites etc. as the subject sequence. Although homology can also be considered in terms of similarity (i.e. amino acid residues having similar chemical properties/functions), in the context of the present invention it is preferred to express homology in terms of sequence
35 identity.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

32

Homology comparisons may be conducted by eye, or more usually, with the aid of readily available sequence comparison programs. These commercially available computer programs can calculate % homology between two or more sequences.

5

% homology may be calculated over contiguous sequences, i.e. one sequence is aligned with the other sequence and each amino acid in one sequence is directly compared with the corresponding amino acid in the other sequence, one residue at a time. This is called an "ungapped" alignment. Typically, such ungapped alignments are performed only over a relatively short number of residues.

10

Although this is a very simple and consistent method, it fails to take into consideration that, for example, in an otherwise identical pair of sequences, one insertion or deletion will cause the following amino acid residues to be put out of alignment, thus potentially resulting in a large reduction in % homology when a global alignment is performed. Consequently, most sequence comparison methods are designed to produce optimal alignments that take into consideration possible insertions and deletions without penalising unduly the overall homology score. This is achieved by inserting "gaps" in the sequence alignment to try to maximise local homology.

15

However, these more complex methods assign "gap penalties" to each gap that occurs in the alignment so that, for the same number of identical amino acids, a sequence alignment with as few gaps as possible - reflecting higher relatedness between the two compared sequences - will achieve a higher score than one with many gaps. "Affine gap costs" are typically used that charge a relatively high cost for the existence of a gap and a smaller penalty for each subsequent residue in the gap. This is the most commonly used gap scoring system. High gap penalties will of course produce optimised alignments with fewer gaps. Most alignment programs allow the gap penalties to be modified. However, it is preferred to use the default values when using such software for sequence comparisons. For example when using the GCG Wisconsin Bestfit package the default gap penalty for amino acid sequences is -12 for a gap and -4 for each extension.

20

Calculation of maximum % homology therefore firstly requires the production of an optimal alignment, taking into consideration gap penalties. A suitable computer program for carrying out such an alignment is the GCG Wisconsin Bestfit package (University of Wisconsin,

25

30

35

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

33

- U.S.A.; Devereux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Research* 12:387). Examples of other software than can perform sequence comparisons include, but are not limited to, the BLAST package (see Ausubel *et al.*, 1999 *ibid* – Chapter 18), FASTA (Atschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.*, 403-410) and the GENEWORKS suite of comparison tools. Both BLAST and FASTA are available for offline and online searching (see Ausubel *et al.*, 1999 *ibid*, pages 7-58 to 7-60). However, for some applications, it is preferred to use the GCG Bestfit program. A new tool, called BLAST 2 Sequences is also available for comparing protein and nucleotide sequence (see *FEMS Microbiol Lett* 1999 174(2): 247-50; *FEMS Microbiol Lett* 1999 177(1): 187-8).
- 10 Although the final % homology can be measured in terms of identity, the alignment process itself is typically not based on an all-or-nothing pair comparison. Instead, a scaled similarity score matrix is generally used that assigns scores to each pairwise comparison based on chemical similarity or evolutionary distance. An example of such a matrix commonly used is the BLOSUM62 matrix - the default matrix for the BLAST suite of programs. GCG Wisconsin programs generally use either the public default values or a custom symbol comparison table if
- 15 supplied (see user manual for further details). For some applications, it is preferred to use the public default values for the GCG package, or in the case of other software, the default matrix, such as BLOSUM62.
- 20 Once the software has produced an optimal alignment, it is possible to calculate % homology, preferably % sequence identity. The software typically does this as part of the sequence comparison and generates a numerical result.
- The sequences may also have deletions, insertions or substitutions of amino acid residues which produce a silent change and result in a functionally equivalent substance. Deliberate amino acid substitutions may be made on the basis of similarity in polarity, charge, solubility, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or the amphipathic nature of the residues as long as the secondary binding activity of the substance is retained. For example, negatively charged amino acids include aspartic acid and glutamic acid; positively charged amino acids include
- 25 lysine and arginine; and amino acids with uncharged polar head groups having similar hydrophilicity values include leucine, isoleucine, valine, glycine, alanine, asparagine, glutamine, serine, thourseonine, phenylalanine, and tyrosine.
- 30

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

34

Conservative substitutions may be made, for example according to the Table below. Amino acids in the same block in the second column and preferably in the same line in the third column may be substituted for each other:

ALIPHATIC	Non-polar	G A P
		I L V
	Polar - uncharged	C S T M
		N Q
	Polar - charged	D E
		K R
AROMATIC		H F W Y

5

The present invention also encompasses homologous substitution (substitution and replacement are both used herein to mean the interchange of an existing amino acid residue, with an alternative residue) may occur i.e. like-for-like substitution such as basic for basic, acidic for acidic, polar for polar etc. Non-homologous substitution may also occur i.e. from one class of residue to another or alternatively involving the inclusion of unnatural amino acids such as ornithine (hereinafter referred to as Z), diaminobutyric acid ornithine (hereinafter referred to as B), norleucine ornithine (hereinafter referred to as O), pyrilylanine, thienylalanine, naphthylalanine and phenylglycine.

15 Replacements may also be made by unnatural amino acids include; alpha* and alpha-disubstituted* amino acids, N-alkyl amino acids*, lactic acid*, halide derivatives of natural amino acids such as trifluorotyrosine*, p-Cl-phenylalanine*, p-Br-phenylalanine*, p-I-phenylalanine*, L-allyl-glycine*, beta-alanine*, L-alpha-amino butyric acid*, L-gamma-amino butyric acid*, L-alpha-amino isobutyric acid*, L-epsilon-amino caproic acid[#], 7-amino heptanoic acid*, L-methionine sulfone^{##}, L-norleucine*, L-norvaline*, p-nitro-L-phenylalanine*, L-hydroxyproline[§], L-thiopropine*, methyl derivatives of phenylalanine (Phe) such as 4-methyl-Phe*, pentamethyl-Phe*, L-Phe (4-amino)[§], L-Tyr (methyl)*, L-Phe (4-isopropyl)*, L-Tic (1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxyl acid)*, L-diaminopropionic acid[#] and L-Phe (4-benzyl)*. The notation * has been utilised for the purpose of the discussion above (relating to homologous or non-homologous substitution), to indicate the hydrophobic nature of the derivative whereas # has been utilised to indicate the hydrophilic nature of the derivative, ## indicates amphipathic characteristics.

20

25

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

35

Variant amino acid sequences may include suitable spacer groups that may be inserted between any two amino acid residues of the sequence including alkyl groups such as methyl, ethyl or propyl groups in addition to amino acid spacers such as glycine or β -alanine residues.

5 A further form of variation, involves the presence of one or more amino acid residues in peptoid form, will be well understood by those skilled in the art. For the avoidance of doubt, "the peptoid form" is used to refer to variant amino acid residues wherein the α -carbon substituent group is on the residue's nitrogen atom rather than the α -carbon. Processes for preparing peptides in the peptoid form are known in the art, for example Simon RJ *et al.*,
10 PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 and Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

The nucleotide sequences for use in the present invention may include within them synthetic or modified nucleotides. A number of different types of modification to oligonucleotides are known in the art. These include methylphosphonate and phosphorothioate backbones and/or
15 the addition of acridine or polylysine chains at the 3' and/or 5' ends of the molecule. For the purposes of the present invention, it is to be understood that the nucleotide sequences described herein may be modified by any method available in the art. Such modifications may be carried out in to enhance the *in vivo* activity or life span of nucleotide sequences useful in the present invention.

20

The present invention may also involve the use of nucleotide sequences that are complementary to the sequences identified using the methods presented herein, or any derivative, fragment or derivative thereof. If the sequence is complementary to a fragment thereof then that sequence can be used as a probe to identify similar coding sequences in other
25 organisms etc.

HYBRIDISATION

The present invention may also encompass the use of nucleotide sequences that are capable of
30 hybridising to nucleotide sequences, or any derivative, fragment or derivative thereof - such as if the agent is an anti-sense sequence.

The term "hybridization" as used herein shall include "the process by which a strand of nucleic acid joins with a complementary strand through base pairing" as well as the process of
35 amplification as carried out in polymerase chain reaction (PCR) technologies.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

36

The term "variant" also encompasses sequences that are complementary to sequences that are capable of hybridising to other nucleotide sequences.

- 5 Preferably, the term "variant" encompasses sequences that are complementary to sequences that are capable of hybridising under stringent conditions (e.g. 50°C and 0.2xSSC {1xSSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Na₂citrate pH 7.0}) to nucleotide sequences.

- 10 More preferably, the term "variant" encompasses sequences that are complementary to sequences that are capable of hybridising under high stringent conditions (e.g. 65°C and 0.1xSSC {1xSSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Na₂citrate pH 7.0}) to nucleotide sequences.

SECRETION

- 15 A polypeptide may be secreted from the expression host into the culture medium from where the polypeptide may be more easily recovered.

CONSTRUCTS

- 20 The term "construct" - which is synonymous with terms such as "conjugate", "cassette" and "hybrid" - may include a nucleotide sequence useful in the present invention directly or indirectly attached to a promoter. The term "fused" includes direct or indirect attachment. In some cases, the terms do not cover the natural combination of the nucleotide sequence coding for the protein ordinarily associated with the wild type gene promoter and when they are both in their natural
25 environment.

- The construct may even contain or express a marker which allows for the selection of the genetic construct in, for example, a bacterium, preferably of the genus *Bacillus*, such as *Bacillus subtilis*, or plants into which it has been transferred. Various markers exist which may be used, such as for
30 example those encoding mannose-6-phosphate isomerase (especially for plants) or those markers that provide for antibiotic resistance - e.g. resistance to G418, hygromycin, bleomycin, kanamycin and gentamycin.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

37

VECTORS

The term "vector" includes expression vectors and transformation vectors and shuttle vectors.

5 The term "expression vector" means a construct capable of *in vivo* or *in vitro* expression.

The term "transformation vector" means a construct capable of being transferred from one entity to another entity - which may be of the species or may be of a different species. If the construct is capable of being transferred from one species to another - such as from an *Escherichia coli* plasmid to a bacterium, such as of the genus *Bacillus*, then the transformation vector is sometimes called a "shuttle vector". It may even be a construct capable of being transferred from an *E. coli* plasmid to an *Agrobacterium* to a plant.

10

Vectors may be transformed into a suitable host cell as described below to provide for expression of a polypeptide encompassed in the present invention. Thus, in a further aspect the invention provides a process for preparing polypeptides for use in the present invention which comprises cultivating a host cell transformed or transfected with an expression vector as described above under conditions to provide for expression by the vector of a coding sequence encoding the polypeptides, and recovering the expressed polypeptides.

15

20

The vectors may be for example, plasmid, virus or phage vectors provided with an origin of replication, optionally a promoter for the expression of the said polynucleotide and optionally a regulator of the promoter.

25 Vectors may contain one or more selectable marker genes. The most suitable selection systems for industrial micro-organisms are those formed by the group of selection markers which do not require a mutation in the host organism. Examples of fungal selection markers are the genes for acetamidase (*amdS*), ATP synthetase, subunit 9 (*oliC*), orotidine-5'-phosphate-decarboxylase (*pvrA*), phleomycin and benomyl resistance (*benA*). Examples of non-fungal selection markers are the bacterial G418 resistance gene (this may also be used in yeast, but not in filamentous fungi), the ampicillin resistance gene (*E. coli*), the neomycin resistance gene (*Bacillus*) and the *E. coli uidA* gene, coding for β -glucuronidase (GUS).

30

Vectors may be used *in vitro*, for example for the production of RNA or used to transfect or transform a host cell.

35

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

38

Thus, polynucleotides for use in the present invention may be incorporated into a recombinant vector (typically a replicable vector), for example a cloning or expression vector. The vector may be used to replicate the nucleic acid in a compatible host cell. Thus, quantities of
5 polynucleotides may be made by introducing a polynucleotide into a replicable vector, introducing the vector into a compatible host cell, and growing the host cell under conditions which bring about replication of the vector. The vector may be recovered from the host cell. Suitable host cells are described below in connection with expression vectors.

10 Genetically engineered host cells may be used to express an amino acid sequence (or variant, homologue, fragment or derivative thereof) in screening methods for the identification of agents and antagonists. Such genetically engineered host cells could be used to screen peptide libraries or organic molecules. Antagonists and agents such as antibodies, peptides or small
15 organic molecules will provide the basis for pharmaceutical compositions. Such agents or antagonists may be administered alone or in combination with other therapeutics for the treatment of prion infection.

EXPRESSION VECTORS

20 A nucleotide sequence may be incorporated into a recombinant replicable vector. The vector may be used to replicate and express the nucleotide sequence. Expression may be controlled using control sequences which include promoters/enhancers and other expression regulation
signals. Prokaryotic promoters and promoters functional in eukaryotic cells may be used. Tissue specific or stimuli specific promoters may be used. Chimeric promoters may also be
25 used comprising sequence elements from two or more different promoters described above.

The protein produced by a host recombinant cell by expression of a nucleotide sequence may be secreted or may be contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. The coding sequences can be designed with signal sequences, which direct secretion of
30 the substance coding sequences through a particular prokaryotic or eukaryotic cell membrane.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

39

FUSION PROTEINS

5 An amino acid sequence for use in the present invention may be produced as a fusion protein, for example to aid in extraction and purification. Examples of fusion protein partners include glutathione-S-transferase (GST), 6xHis, GAL4 (DNA binding and/or transcriptional activation domains) and β -galactosidase. It may also be convenient to include a proteolytic cleavage site between the fusion protein partner and the protein sequence to allow removal of fusion protein sequences. Preferably the fusion protein will not hinder the activity of the protein sequence.

10 The fusion protein may comprise an antigen or an antigenic determinant fused to the substance of interest. The fusion protein may be a non-naturally occurring fusion protein comprising a substance, which may act as an adjuvant in the sense of providing a generalised stimulation of the immune system. The antigen or antigenic determinant may be attached to either the amino or carboxy terminus of the substance.

15 An amino acid sequence may be ligated to a heterologous sequence to encode a fusion protein. For example, for screening of peptide libraries for agents capable of affecting the substance activity, it may be useful to encode a chimeric substance expressing a heterologous epitope that is recognized by a commercially available antibody.

20

STEREO AND GEOMETRIC ISOMERS

25 The agents may exist as stereoisomers and/or geometric isomers – e.g. they may possess one or more asymmetric and/or geometric centres and so may exist in two or more stereoisomeric and/or geometric forms. The present invention contemplates the use of all the individual stereoisomers and geometric isomers of those agents, and mixtures thereof. The terms used in the claims encompass these forms, provided said forms retain the appropriate functional activity (though not necessarily to the same degree).

30 PHARMACEUTICAL SALT

The agent may be administered in the form of a pharmaceutically acceptable salt.

35 Pharmaceutically-acceptable salts are well known to those skilled in the art, and for example include those mentioned by Berge *et al*, in *J.Pharm.Sci.*, 66, 1-19 (1977). Suitable acid

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

40

addition salts are formed from acids which form non-toxic salts and include the hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, nitrate, sulphate, bisulphate, phosphate, hydrogenphosphate, acetate, trifluoroacetate, gluconate, lactate, salicylate, citrate, tartrate, ascorbate, succinate, maleate, fumarate, gluconate, formate, benzoate, methanesulphonate, ethanesulphonate, 5 benzenesulphonate and p-toluenesulphonate salts.

When one or more acidic moieties are present, suitable pharmaceutically acceptable base addition salts can be formed from bases which form non-toxic salts and include the aluminium, calcium, lithium, magnesium, potassium, sodium, zinc, and pharmaceutically-active amines 10 such as diethanolamine, salts.

A pharmaceutically acceptable salt of an agent may be readily prepared by mixing together solutions of an agent and the desired acid or base, as appropriate. The salt may precipitate 15 from solution and be collected by filtration or may be recovered by evaporation of the solvent.

An agent may exist in polymorphic form.

An agent may contain one or more asymmetric carbon atoms and therefore exist in two or more stereoisomeric forms. Where an agent contains an alkenyl or alkenylene group, cis (E) 20 and trans (Z) isomerism may also occur. The present invention includes the individual stereoisomers of an agent and, where appropriate, the individual tautomeric forms thereof, together with mixtures thereof.

Separation of diastereoisomers or *cis*- and *trans*-isomers may be achieved by conventional 25 techniques, e.g. by fractional crystallisation, chromatography or H.P.L.C. of a stereoisomeric mixture of an agent or a suitable salt or derivative thereof. An individual enantiomer of an agent may also be prepared from a corresponding optically pure intermediate or by resolution, such as by H.P.L.C. of the corresponding racemate using a suitable chiral support or by 30 fractional crystallisation of the diastereoisomeric salts formed by reaction of the corresponding racemate with a suitable optically active acid or base, as appropriate.

The present invention also encompasses all suitable isotopic variations of an agent or a pharmaceutically acceptable salt thereof. An isotopic variation of an agent or a 35 pharmaceutically acceptable salt thereof is defined as one in which at least one atom is replaced by an atom having the same atomic number but an atomic mass different from the

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

41

atomic mass usually found in nature. Examples of isotopes that may be incorporated into an agent and pharmaceutically acceptable salts thereof include isotopes of hydrogen, carbon, nitrogen, oxygen, phosphorus, sulphur, fluorine and chlorine such as ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F and ^{36}Cl , respectively. Certain isotopic variations of an agent and pharmaceutically acceptable salts thereof, for example, those in which a radioactive isotope such as ^3H or ^{14}C is incorporated are useful in drug and/or substrate tissue distribution studies. Tritiated, i.e., ^3H , and carbon-14, i.e., ^{14}C , isotopes are particularly preferred for their ease of preparation and detectability. Further, substitution with isotopes such as deuterium, i.e., ^2H , may afford certain therapeutic advantages resulting from greater metabolic stability, for example, increased *in vivo* half-life or reduced dosage requirements and hence may be preferred in some circumstances. Isotopic variations of an agent of the present invention and pharmaceutically acceptable salts thereof of this invention can generally be prepared by conventional procedures using appropriate isotopic variations of suitable reagents.

It will be appreciated by those skilled in the art that an agent may be derived from a prodrug. Examples of prodrugs include entities that have certain protected group(s) and which may not possess pharmacological activity as such, but may, in certain instances, be administered (such as orally or parenterally) and thereafter metabolised in the body to form an agent of the present invention which are pharmacologically active.

It will be further appreciated that certain moieties known as "pro-moieties", for example as described in "Design of Prodrugs" by H. Bundgaard, Elsevier, 1985 (the disclosure of which is hereby incorporated by reference), may be placed on appropriate functionalities of agents. Such prodrugs are also included within the scope of the invention.

The present invention also includes the use of zwitterionic forms of an agent of the present invention. The terms used in the claims encompass one or more of the forms just mentioned.

SOLVATES

The present invention also includes the use of solvate forms of an agent of the present invention.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

42

PRO-DRUG

As indicated, the present invention may also include the use of pro-drug forms of an agent.

5 PHARMACEUTICALLY ACTIVE SALT

An agent may be administered as a pharmaceutically acceptable salt. Typically, a pharmaceutically acceptable salt may be readily prepared by using a desired acid or base, as appropriate. The salt may precipitate from solution and be collected by filtration or may be
10 recovered by evaporation of the solvent.

CHEMICAL SYNTHESIS METHODS

An agent may be prepared by chemical synthesis techniques.

15

It will be apparent to those skilled in the art that sensitive functional groups may need to be protected and deprotected during synthesis of a compound of the invention. This may be achieved by conventional techniques, for example as described in "Protective Groups in Organic Synthesis" by T W Greene and P G M Wuts, John Wiley and Sons Inc. (1991), and by
20 P.J.Kocienski, in "Protecting Groups", Georg Thieme Verlag (1994).

It is possible during some of the reactions that any stereocentres present could, under certain conditions, be racemised, for example if a base is used in a reaction with a substrate having an optical centre comprising a base-sensitive group. This is possible during e.g. a guanylation step. It
25 should be possible to circumvent potential problems such as this by choice of reaction sequence, conditions, reagents, protection/deprotection regimes, etc. as is well-known in the art.

The compounds and salts of the invention may be separated and purified by conventional methods.

30

Separation of diastereomers may be achieved by conventional techniques, e.g. by fractional crystallisation, chromatography or H.P.L.C. of a stereoisomeric mixture of a compound of formula (I) or a suitable salt or derivative thereof. An individual enantiomer of a compound of formula (I) may also be prepared from a corresponding optically pure intermediate or by
35 resolution, such as by H.P.L.C. of the corresponding racemate using a suitable chiral support

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

43

or by fractional crystallisation of the diastereomeric salts formed by reaction of the corresponding racemate with a suitably optically active acid or base.

5 An agent or variants, homologues, derivatives, fragments or mimetics thereof may be produced using chemical methods to synthesize an agent in whole or in part. For example, if they are peptides, then peptides may be synthesized by solid phase techniques, cleaved from the resin, and purified by preparative high performance liquid chromatography (e.g., Creighton (1983) *Proteins Structures And Molecular Principles*, WH Freeman and Co, New York NY). The composition of the synthetic peptides may be confirmed by amino acid analysis or
10 sequencing (e.g., the Edman degradation procedure; Creighton, *supra*).

Synthesis of peptide agents may be performed using various solid-phase techniques (Roberge JY *et al* (1995) *Science* 269: 202-204) and automated synthesis may be achieved, for example, using the ABI 431 A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) in accordance with the instructions
15 provided by the manufacturer. Additionally, the amino acid sequences comprising an agent or any part thereof, may be altered during direct synthesis and/or combined using chemical methods with a sequence from other subunits, or any part thereof, to produce a variant agent.

In an alternative embodiment of the invention, the coding sequence of a peptide agent (or
20 variants, homologues, derivatives, fragments or mimetics thereof) may be synthesized, in whole or in part, using chemical methods well known in the art (see Caruthers MH *et al* (1980) *Nuc Acids Res Symp Ser* 215-23, Horn T *et al* (1980) *Nuc Acids Res Symp Ser* 225-232).

MIMETIC

25 As used herein, the term "mimetic" relates to any chemical which includes, but is not limited to, a peptide, polypeptide, antibody or other organic chemical which has the same qualitative activity or effect as a reference agent.

CHEMICAL DERIVATIVE

The term "derivative" or "derivatised" as used herein includes chemical modification of an agent. Illustrative of such chemical modifications would be replacement of hydrogen by a halo
35 group, an alkyl group, an acyl group or an amino group.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

44

CHEMICAL MODIFICATION

The chemical modification of an agent may either enhance or reduce hydrogen bonding interaction, charge interaction, hydrophobic interaction, Van Der Waals interaction or dipole interaction between the agent and the target.

In one aspect, the identified agent may act as a model (for example, a template) for the development of other compounds.

10 RECOMBINANT METHODS

An agent or target may be prepared by recombinant DNA techniques.

OTHER ACTIVE COMPONENTS

15

A composition may comprise other therapeutic substances in addition to the agent.

ANTIBODY

20 An agent for use in the composition may comprise one or more antibodies.

The "antibody" as used herein includes but is not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab fragments and fragments produced by a Fab expression library. Such fragments include fragments of whole antibodies which retain their binding activity for a target substance, Fv, F(ab') and F(ab')₂ fragments, as well as single chain antibodies (scFv), fusion proteins and other synthetic proteins which comprise the antigen-binding site of the antibody. Furthermore, the antibodies and fragments thereof may be humanised antibodies, for example as described in US-A-239400. Neutralizing antibodies, i.e., those, which inhibit biological activity of the substance polypeptides, are especially preferred for diagnostics and therapeutics.

Antibodies may be produced by standard techniques, such as by immunisation with the substance of the invention or by using a phage display library.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

45

If polyclonal antibodies are desired, a selected mammal (e.g., mouse, rabbit, goat, horse, etc.) is immunised with an immunogenic polypeptide bearing epitope(s) obtainable from an identified agent and/or substance of the present invention. Depending on the host species, various adjuvants may be used to increase immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's, mineral gels such as aluminium hydroxide, and surface-active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol. BCG (Bacilli Calmette-Guerin) and *Corynebacterium parvum* are potentially useful human adjuvants which may be employed if purified the substance polypeptide is administered to immunologically compromised individuals for the purpose of stimulating systemic defence.

Serum from the immunised animal is collected and treated according to known procedures. If serum containing polyclonal antibodies to an epitope obtainable from an identified agent and/or substance of the present invention contains antibodies to other antigens, the polyclonal antibodies may be purified by immunoaffinity chromatography. Techniques for producing and processing polyclonal antisera are known in the art. In order that such antibodies may be made, the invention also provides polypeptides of the invention or fragments thereof haptened to another polypeptide for use as immunogens in animals or humans.

Monoclonal antibodies directed against particular epitopes may also be readily produced by one skilled in the art. The general methodology for making monoclonal antibodies by hybridomas is well known. Immortal antibody-producing cell lines may be created by cell fusion, and also by other techniques such as direct transformation of B lymphocytes with oncogenic DNA, or transfection with Epstein-Barr virus. Panels of monoclonal antibodies produced against orbit epitopes may be screened for various properties; i.e., for isotype and epitope affinity.

Monoclonal antibodies may be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These include, but are not limited to, the hybridoma technique originally described by Koehler and Milstein (1975 Nature 256:495-497), the human B-cell hybridoma technique (Kosbor *et al* (1983) Immunol Today 4:72; Cote *et al* (1983) Proc Natl Acad Sci 80:2026-2030) and the EBV-hybridoma technique (Cole *et al* (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss Inc, pp 77-96). In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies", the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

46

appropriate antigen specificity and biological activity may be used (Morrison *et al* (1984) Proc Natl Acad Sci 81:6851-6855; Neuberger *et al* (1984) Nature 312:604-608; Takeda *et al* (1985) Nature 314:452-454). Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies (US Patent No. 4,946,779) may be adapted to produce the substance specific single chain antibodies.

5

Antibodies may also be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening recombinant immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in Orlandi *et al* (1989, Proc Natl Acad Sci 86: 3833-3837), and Winter G and Milstein C (1991; Nature 349:293-299).

10

Antibody fragments which contain specific binding sites for the substance may also be generated. For example, such fragments include, but are not limited to, the F(ab')₂ fragments which may be produced by pepsin digestion of the antibody molecule and the Fab fragments which may be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragments. Alternatively, Fab expression libraries may be constructed to allow rapid and easy identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity (Huse WD *et al* (1989) Science 256:1275-1281).

15

20 GENERAL ASSAY TECHNIQUES

Any one or more of appropriate targets - such as an amino acid sequence and/or nucleotide sequence of a prion susceptibility protein or gene - may be used for identifying an agent according to the present invention.

25

The target employed in such a test may be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly. The abolition of target activity or the formation of binding complexes between the target and the agent being tested may be measured.

30

The method of the present invention may be a screen, whereby a number of agents are tested for modulating prion infection.

Techniques for drug screening may be based on the method described in Geysen, European Patent Application 84/03564, published on September 13, 1984. In summary, large numbers of different small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic

35

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

47

pins or some other surface. The peptide test compounds are reacted with a suitable target or fragment thereof and washed. Bound entities are then detected - such as by appropriately adapting methods well known in the art. A purified target may also be coated directly onto plates for use in a drug screening techniques. Alternatively, non-neutralising antibodies may be used to capture the peptide and immobilise it on a solid support.

It is expected that the methods of the present invention will be suitable for both small and large-scale screening of test compounds as well as in quantitative assays.

In one preferred aspect, the present invention relates to a method of identifying agents capable of modulating the prion infection.

REPORTERS

A wide variety of reporters may be used to screen for agents identified in the method of the present invention with preferred reporters providing conveniently detectable signals (eg. by spectroscopy). By way of example, a number of companies such as Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI), and US Biochemical Corp (Cleveland, OH) supply commercial kits and protocols for assay procedures. Suitable reporter molecules or labels include those radionuclides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles and the like. Patents teaching the use of such labels include US-A-3817837; US-A-3850752; US-A-3939350; US-A-3996345; US-A-4277437; US-A-4275149 and US-A-4366241.

HOST CELLS

The term "host cell" may include any cell that could comprise the target for the agent of the present invention.

Thus, a further embodiment of the present invention provides host cells transformed or transfected with a polynucleotide that is or expresses the target of the present invention. Preferably said polynucleotide is carried in a vector for the replication and expression of polynucleotides that are to be the target or are to express the target. The cells will be chosen to be compatible with the said vector and may for example be prokaryotic (for example bacterial), fungal, yeast or plant cells.

The gram-negative bacterium *E. coli* is widely used as a host for heterologous gene expression. However, large amounts of heterologous protein tend to accumulate inside the cell. Subsequent purification of the desired protein from the bulk of *E. coli* intracellular proteins can sometimes be difficult.

In contrast to *E. coli*, bacteria from the genus *Bacillus* are very suitable as heterologous hosts because of their capability to secrete proteins into the culture medium. Other bacteria suitable as hosts are those from the genera *Streptomyces* and *Pseudomonas*.

Depending on the nature of the polynucleotide encoding the polypeptide useful in the present invention, and/or the desirability for further processing of the expressed protein, eukaryotic hosts such as yeasts or other fungi may be preferred. In general, yeast cells are preferred over fungal cells because they are easier to manipulate. However, some proteins are either poorly secreted from the yeast cell, or in some cases are not processed properly (e.g. hyperglycosylation in yeast). In these instances, a different fungal host organism should be selected.

Examples of suitable expression hosts within the scope of the present invention are fungi such as *Aspergillus* species (such as those described in EP-A-0184438 and EP-A-0284603) and *Trichoderma* species; bacteria such as *Bacillus* species (such as those described in EP-A-0134048 and EP-A-0253455), *Streptomyces* species and *Pseudomonas* species; and yeasts such as *Kluyveromyces* species (such as those described in EP-A-0096430 and EP-A-0301670) and *Saccharomyces* species. By way of example, typical expression hosts may be selected from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger var. tubigenis*, *Aspergillus niger var. awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae*.

The use of suitable host cells - such as yeast, fungal and plant host cells - may provide for post-translational modifications (e.g. myristoylation, glycosylation, truncation, lipidation and tyrosine, serine or threonine phosphorylation) as may be needed to confer optimal biological activity on recombinant expression products of the present invention.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

49

ORGANISM

The term "organism" includes any organism that could comprise the target according to the present invention and/or products obtained therefrom. Examples of organisms may include a
5 fungus, yeast or a plant.

The term "transgenic organism" in relation to the present invention includes any organism that comprises the target according to the present invention and/or products obtained.

10 THERAPY

Agents identified by the method of the present invention may be used as therapeutic agents --
i.e. in therapy applications.

15 As with the term "treatment", the term "therapy" includes curative effects, alleviation effects, and prophylactic effects.

The therapy may be on mammals such as humans or livestock.

20 The therapy may be for treating conditions associated with prion infection.

25

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS

Pharmaceutical compositions useful in the present invention may comprise a therapeutically effective amount of agent(s) and pharmaceutically acceptable carrier, diluent or excipient
30 (including combinations thereof).

Pharmaceutical compositions may be for human or animal usage in human and veterinary medicine and will typically comprise any one or more of a pharmaceutically acceptable diluent, carrier, or excipient. Acceptable carriers or diluents for therapeutic use are well
35 known in the pharmaceutical art, and are described, for example, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). The choice of

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

50

pharmaceutical carrier, excipient or diluent may be selected with regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice. Pharmaceutical compositions may comprise as - or in addition to - the carrier, excipient or diluent any suitable binder(s), lubricant(s), suspending agent(s), coating agent(s) or solubilising agent(s).

5

Preservatives, stabilizers, dyes and even flavoring agents may be provided in pharmaceutical compositions. Examples of preservatives include sodium benzoate, sorbic acid and esters of p-hydroxybenzoic acid. Antioxidants and suspending agents may be also used.

- 10 There may be different composition/formulation requirements dependent on the different delivery systems. By way of example, pharmaceutical compositions useful in the present invention may be formulated to be administered using a mini-pump or by a mucosal route, for example, as a nasal spray or aerosol for inhalation or ingestible solution, or parenterally in which the composition is formulated by an injectable form, for delivery, by, for example, an
- 15 intravenous, intramuscular or subcutaneous route. Alternatively, the formulation may be designed to be administered by a number of routes.

- Agents may also be used in combination with a cyclodextrin. Cyclodextrins are known to form inclusion and non-inclusion complexes with drug molecules. Formation of a drug-cyclodextrin complex may modify the solubility, dissolution rate, bioavailability and/or stability property of a drug molecule. Drug-cyclodextrin complexes are generally useful for most dosage forms and administration routes. As an alternative to direct complexation with the drug the cyclodextrin may be used as an auxiliary additive, e.g. as a carrier, diluent or solubiliser. Alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins are most commonly used and suitable
- 20 examples are described in WO-A-91/11172, WO-A-94/02518 and WO-A-98/55148.

25

- If an agent is a protein, then said protein may be prepared *in situ* in the subject being treated. In this respect, nucleotide sequences encoding said protein may be delivered by use of non-viral techniques (e.g. by use of liposomes) and/or viral techniques (e.g. by use of retroviral vectors) such that the said protein is expressed from said nucleotide sequence.

30

ADMINISTRATION

- The term "administered" includes delivery by viral or non-viral techniques. Viral delivery mechanisms include but are not limited to adenoviral vectors, adeno-associated viral (AAV)

35

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

51

vectors, herpes viral vectors, retroviral vectors, lentiviral vectors, and baculoviral vectors. Non-viral delivery mechanisms include lipid mediated transfection, liposomes, immunoliposomes, lipofectin, cationic facial amphiphiles (CFAs) and combinations thereof.

- 5 The components useful in the present invention may be administered alone but will generally be administered as a pharmaceutical composition – e.g. when the components are in admixture with a suitable pharmaceutical excipient, diluent or carrier selected with regard to the intended route of administration and standard pharmaceutical practice.
- 10 For example, the components may be administered (e.g. orally) in the form of tablets, capsules, ovules, elixirs, solutions or suspensions, which may contain flavouring or colouring agents, for immediate-, delayed-, modified-, sustained-, pulsed- or controlled-release applications.
- 15 If the pharmaceutical is a tablet, then the tablet may contain excipients such as microcrystalline cellulose, lactose, sodium citrate, calcium carbonate, dibasic calcium phosphate and glycine, disintegrants such as starch (preferably corn, potato or tapioca starch), sodium starch glycolate, croscarmellose sodium and certain complex silicates, and granulation binders such as polyvinylpyrrolidone, hydroxypropylmethylcellulose (HPMC),
20 hydroxypropylcellulose (HPC), sucrose, gelatin and acacia. Additionally, lubricating agents such as magnesium stearate, stearic acid, glyceryl behenate and talc may be included.

Solid compositions of a similar type may also be employed as fillers in gelatin capsules. Preferred excipients in this regard include lactose, starch, a cellulose, milk sugar or high
25 molecular weight polyethylene glycols. For aqueous suspensions and/or elixirs, the agent may be combined with various sweetening or flavouring agents, colouring matter or dyes, with emulsifying and/or suspending agents and with diluents such as water, ethanol, propylene glycol and glycerin, and combinations thereof.

- 30 The routes for administration (delivery) include, but are not limited to, one or more of: oral (e.g. as a tablet, capsule, or as an ingestible solution), topical, mucosal (e.g. as a nasal spray or aerosol for inhalation), nasal, parenteral (e.g. by an injectable form), gastrointestinal, intraspinal, intraperitoneal, intramuscular, intravenous, intrauterine, intraocular, intradermal, intracranial, intratracheal, intravaginal, intracerebroventricular, intracerebral, subcutaneous,

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

52

ophthalmic (including intravitreal or intracameral), transdermal, rectal, buccal, vaginal, epidural, sublingual.

5 It is to be understood that not all of the components of the pharmaceutical need be administered by the same route. Likewise, if the composition comprises more than one active component, then those components may be administered by different routes.

10 If a component is administered parenterally, then examples of such administration include one or more of: intravenously, intra-arterially, intraperitoneally, intrathecally, intraventricularly, intraurethorally, intrasternally, intracranially, intramuscularly or subcutaneously administering the component; and/or by using infusion techniques.

15 For parenteral administration, the component is best used in the form of a sterile aqueous solution which may contain other substances, for example, enough salts or glucose to make the solution isotonic with blood. The aqueous solutions should be suitably buffered (preferably to a pH of from 3 to 9), if necessary. The preparation of suitable parenteral formulations under sterile conditions is readily accomplished by standard pharmaceutical techniques well-known to those skilled in the art.

20 As indicated, the component(s) useful in the present invention may be administered intranasally or by inhalation and is conveniently delivered in the form of a dry powder inhaler or an aerosol spray presentation from a pressurised container, pump, spray or nebuliser with the use of a suitable propellant, e.g. dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, a hydrofluoroalkane such as 1,1,1,2-tetrafluoroethane (HFA 134ATM) or 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropane (HFA 227EATM), carbon dioxide or other suitable gas. In the case of a pressurised aerosol, the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. The pressurised container, pump, spray or nebuliser may contain a solution or suspension of the active compound, e.g. using a mixture of ethanol and the propellant as the solvent, which may additionally contain a lubricant, e.g. sorbitan trioleate. Capsules and cartridges (made, for example, from gelatin) for use in an inhaler or insufflator may be formulated to contain a powder mix of the agent and a suitable powder base such as lactose or starch.

35 Alternatively, the component(s) may be administered in the form of a suppository or pessary, or it may be applied topically in the form of a gel, hydrogel, lotion, solution, cream, ointment

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

53

or dusting powder. The component(s) may also be dermally or transdermally administered, for example, by the use of a skin patch. They may also be administered by the pulmonary or rectal routes. They may also be administered by the ocular route. For ophthalmic use, the compounds may be formulated as micronised suspensions in isotonic, pH adjusted, sterile saline, or, preferably, as solutions in isotonic, pH adjusted, sterile saline, optionally in combination with a preservative such as a benzylalkonium chloride. Alternatively, they may be formulated in an ointment such as petrolatum.

For application topically to the skin, the component(s) may be formulated as a suitable ointment containing the active compound suspended or dissolved in, for example, a mixture with one or more of the following: mineral oil, liquid petrolatum, white petrolatum, propylene glycol, polyoxyethylene polyoxypropylene compound, emulsifying wax and water. Alternatively, it may be formulated as a suitable lotion or cream, suspended or dissolved in, for example, a mixture of one or more of the following: mineral oil, sorbitan monostearate, a polyethylene glycol, liquid paraffin, polysorbate 60, cetyl esters wax, cetearyl alcohol, 2-octyldodecanol, benzyl alcohol and water.

DOSE LEVELS

Typically, a physician will determine the actual dosage which will be most suitable for an individual subject. The specific dose level and frequency of dosage for any particular patient may be varied and will depend upon a variety of factors including the activity of the specific compound employed, the metabolic stability and length of action of that compound, the age, body weight, general health, diet, mode and time of administration, rate of excretion, drug combination, the severity of the particular condition, and the individual undergoing therapy.

FORMULATION

The component(s) may be formulated into a pharmaceutical composition, such as by mixing with one or more of a suitable carrier, diluent or excipient, by using techniques that are known in the art.

ANIMAL TEST MODELS

In vivo models may be used to investigate and/or design therapies or therapeutic agents to

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

54

modulate prion infection. The models could be used to investigate the effect of various tools/lead compounds on a variety of parameters, which are implicated in the development of or treatment of prion infection. These animal test models may be used as, or in, the method of the present invention. The animal test model will be a non-human animal test model.

5

GENERAL RECOMBINANT DNA METHODOLOGY TECHNIQUES

Although in general the techniques mentioned herein are well known in the art, reference may be made in particular to Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989) and Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc. PCR is described in US-A-4683195, US-A-4800195 and US-A-4965188.

In another aspect of the present invention, the amount of prions in a tissue/organ may also be measured by contacting the device with a test animal. This is achieved by studying the time taken for test animals contacted with the device to show clinical symptoms and the time taken for said test animals to die. Briefly, the time at which the test animals are contacted with the device is recorded. The test animals are then monitored for the development of clinical symptoms. Criteria for clinical diagnosis of prion infection in mice are described by Carlson *et al.* (1986), *Cell* 46, 503-511. At the onset of clinical symptoms the time is recorded. The test animals are monitored again, initially on a daily basis and then, as death approaches, more frequently. When death occurs, the time is again recorded. The intervals between the onset of clinical symptoms and death are calculated. This time interval is inversely proportional to the amount of prions in the sample. The logarithms of the time intervals minus a time factor are linear functions of the logarithms of the numbers of prions in the sample. The time factor is determined by maximising the linear relationship between time interval and dose in accordance with Pruisner *et al.* (1982), *Annals of Neurology* 11 353- 358.

EXAMPLES

The present invention is illustrated with reference to the following examples.

EXAMPLE 1

Detection of prions in a sample.

35

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

55

The tissue/organ is the brain of a live human that is to be tested for the presence of prions. Straight stainless steel wire is conventionally sterilised. A stereotactic frame is fixed to the subjects head and light sedation is administered. A 5mm opening is drilled in the skull such that the brain is not exposed. Two straight stainless steel wire segments are entered at opposite
5 sites in the opening and contacted with the brain by insertion into the brain. After 5 minutes, the wires are removed and stored overnight at -20°C in a pre-sterilised sealed tube.

To determine if the metal wires have prions bound to them, mice are used which are susceptible to infection from prions that cause CJD in humans. The mice to be contacted with
10 the sample to be tested are bred in an animal microbiological containment level I facility and identified by ear punching. Prior to contact with the sample, the mice are anaesthetised with halothane/O₂. The wire is thawed at room temperature and contacted with the right parietal lobe of the brains of five mice by permanent insertion. The mice are then maintained in an animal microbiological containment level I facility.

15 The mice are monitored for adverse effects every 3 days. If clinical signs of prion infection appear, the mice are examined daily and culled if showing signs of distress. Criteria for clinical diagnosis of scrapie in mice have been described by Carlson *et al.* (1986), *Cell* 46, 503-511.

20 The brains of the dead mice are stored at -80°C until prion infection is to be confirmed.

Prion infection in the dead test mice is confirmed using Western blot analysis. 10 % (w/v) brain homogenates are prepared in cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl and 10 mM EDTA, pH
25 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 % NP-40, 0.5 % sodium deoxycholate in PBS). Insoluble material is removed by centrifugation at 3000 rpm for 5 minutes. Proteinase K digestion (50 mg/ml) is performed for 1 hour at 37°C . The reaction is terminated by the addition of Pefabloc (Boehringer) to a final concentration of 2 mM. Samples are boiled for 5 minutes in an equal volume of loading buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20 % glycerol, 4 % SDS, 0.02 %
30 bromophenol blue) before electrophoresis on 16 % Tris-glycine gels. Gels are blotted onto Immobilon-P membranes, blocked in 5 % Blotto (5 % non-fat milk powder in PBS with 0.05 % Tween-20) followed by incubation overnight with the antibodies that specifically detect CJD prions. Blots are washed in PBS, 0.05 % Tween-20, and incubated with an alkaline-phosphatase conjugated anti-mouse antibody for 1 hour at room temperature. Blots are washed

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

56

again and developed with a chemifluorescent substrate (Amersham) and visualised on a Storm 840 phosphoimager (Molecular Dynamics).

Thus it is demonstrated that prions are detected in a sample using the methods of the present invention.

EXAMPLE 2

Detection of prions in a sample.

10

The tissue/organ is a frozen brain biopsy of a dead cow that is to be tested for the presence of prions. The tissue is thawed in a microbiological containment level III facility. Five stainless steel wires each measuring 0.15 mm in diameter and 5 mm in length are sterilised by immersing in 1 M NaOH for 1 hour 30 minutes at 11 bar. When the wires are cool they are each inserted into the tissue/organ.

15

After 5 minutes, each wire is removed from the tonsil tissue and stored overnight at -20 °C in separate pre-sterilised sealed tubes to avoid cross contamination between the wires.

20 The wires are assayed for prion infectivity using test mice as in Example 1.

The brains of the dead mice are stored at -80 °C until prion infection is to be confirmed.

Western blotting is performed according to Example 1 except that monoclonal antibodies specific to prions that cause BSE in their appropriate host are used.

25

Thus it is demonstrated that prions are detected in a sample using the methods of the present invention.

Example 3: Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions

Introduction: Prions are unusually resistant to conventional disinfection procedures. An electrode used intracerebrally on a Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) patient transmitted the disease to two patients in succession and finally to a chimpanzee, despite attempted disinfection. Concerns that surgical instruments may transmit variant CJD have been raised by the finding of PrP^{Sc}, a surrogate marker for infectivity, in various tissues other than brain.

Materials and Methods: Stainless steel wire was exposed to scrapie-infected brain or brain homogenate, washed exhaustively and inserted into the brain of indicator mice to measure infectivity.

Results: A contact time of 5 min with scrapie-infected mouse brain suffices to render steel wire highly infectious and insertion of infectious wire into the brain of an indicator mouse for 30 min suffices to cause disease. Infectivity bound to wires persists far longer in the brain than when injected as homogenate, which can explain the extraordinary efficiency of wire-mediated infection. No detectable amounts of PrP could be eluted with NaOH, however the presence of PrP on infectious wires was demonstrated by chemiluminescence. Several recommended sterilisation procedures inactivated wire-bound mouse prions, but exposure to 10% formaldehyde was insufficient.

Conclusions: Prions are readily and tightly bound to stainless steel surfaces and can transmit scrapie to recipient mice after short exposure times. This system mimics contaminated surgical instruments and will allow an assessment of sterilisation procedures.

Overview

Prions are more resistant to inactivation than most conventional pathogens (1-4). An electrode used intracerebrally on a patient suffering from sporadic CJD (sCJD) transmitted the disease to two patients in succession and finally to a chimpanzee, despite exposure to benzene, 70% ethanol and formaldehyde vapour after each use (5, 6). Concerns that surgical instruments may transmit variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) have been raised by the finding of PrP^{Sc} not only in nervous, but also in lymphatic tissue (7-10). We examined the ability of steel surfaces to bind scrapie prions by incubating steel wires overnight with scrapie-infected brain homogenates and inserting them permanently into the brain of indicator mice. This procedure resulted in efficient transmission of disease (11).

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

58

However, long-time exposure of steel wires to brain homogenate does not reflect conditions obtaining during surgical interventions. We show that wires inserted into intact brain for as little as 5 min suffices to render the wires far more infectious than overnight exposure to brain homogenate and as infectious as 0.03 ml of 1% scrapie-infected brain homogenate injected directly into the brain. Furthermore, a contact time of 30 min was sufficient to elicit infection. Our experiments provide a model to assess the effectiveness of sterilisation procedures for steel bound prions and suggest a minimally invasive approach to assess infectivity in organs such as brain and tonsils.

10 Materials and Methods

Preparation of infectious wire

Stainless steel wire segments (diameter 0.15 mm; 5 mm length) were cut from "Stainless steel suture monofilament wire", Art.Nr. 01614037, USP 4/0, B.Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen, Germany; batch 1/7502 or 1/8452). Gold wire segments (5 x 0.13 mm, Alfa Aesar Johnson Matthey GmbH Germany) were washed ultrasonically for 15 min in 2% Triton X-100, thoroughly rinsed in distilled water, dried at 37 °C for 1 h as described (12). Brains were homogenized in 1 x Dulbecco's phosphate-buffer saline (D-PBS; Gibco BRL, Glasgow, UK) by passing through 21G and 25G needles 8 times each, to give 10% (w/v) homogenates. These were centrifuged at 1,000 rpm (Eppendorf centrifuge 5415c, Hamburg, Germany) for 5 min at room temperature and the supernatants were recovered. We have recently determined that the centrifugation step result in the loss of about 80-90% of the PrP^{Sc} present in the sample (P.Kloehn, unpublished results) so that this step is better avoided. Wires were incubated with centrifuged 10% brain homogenate in PBS for 16 h and washed 5 times 10 min in 50 ml PBS, all at room temperature. The wires were air-dried, stored at room temperature for 1 day and inserted into brain of deeply anaesthetized indicator mice, using a 25-gauge injection needle as a trocar.

Chemiluminescence of surface-bound PrP

Twenty stainless wire segments (0.15 x 5 mm) were inserted into one brain hemisphere for 5 minutes. The other hemisphere was homogenized and centrifuged as described above. Twenty stainless wire segments were incubated with 0.5 ml 10% centrifuged homogenate for 5 min at room temperature, washed five times for 10 min with 50 ml D-PBS, dried for 24 h and immediately assayed for PrP. Wires were incubated with 0.2 ml of D-PBS containing 5% non-fat dry milk (w/v; Marvel, Premier Brands UK Ltd., Wirral, Merseyside, U.K.) for 1 h with agitation. After removal of the blocking reagent, they were incubated for 1 h with 200 ng/ml of

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

59

anti-PrP antibody (6H4; Prionics AG, Zürich, Switzerland) in D-PBS containing 1% non-fat dry milk and washed 3 times for 5 min with 0.2 ml of D-PBS, followed by incubation for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG1 (1: 5000 dilution; Zymed, South San Francisco, California, USA). After washing 5 times for 5 min with D-PBS, the wires were exposed to 0.2 ml of SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, Rockford, ILL, USA) according to the manufacturer's instructions. Chemiluminescence was determined by luminometer (AutoLumat LB953; EG&G Berthold GmbH, Bad Wildbad, Germany).

10 Results

The ability of stainless steel surfaces to bind scrapie infectivity has been previously demonstrated by incubating steel wires (5 x 0.15 mm) for 16 h with 10% w/v brain homogenate of terminally scrapie-sick mice, referred to below as "standard conditions" (11). To model the exposure of surgical instruments to infected tissue more realistically, we inserted wire segments for 5, 30 or 120 min into brains of scrapie-inoculated wild-type mice culled two months before the expected appearance of scrapie symptoms. These "transiently inserted" wires were washed, dried and assayed by permanent implantation into the brain of *Tga20* indicator mice (13). Incubation times of the three groups lay between 65 ± 4 and 69 ± 5 days (Table 1, experiment 1), showing that even the shortest exposure to scrapie-infected brain rendered wires as infectious as intracerebral inoculation with 0.03 ml of 1% homogenate of the same brain homogenate (incubation time of 68 ± 8 days). Gold wires exposed to brain homogenate into brain also acquired infectivity (Table 1, experiment 2).

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

60

Table 1. Infectivity of steel or gold wires after exposure to intact brain or to brain homogenate of scrapie-infected mice

Inoculation	Sick/total	Incubation time \pm s.d. (days)
5		
<u>Experiment 1</u>		
Wire transiently inserted for 5 min	5/5	68 \pm 2
for 30 min	6/6	65 \pm 4
10 for 120 min	6/6	69 \pm 5
Wire exposed to 10% brain homogenate [†]	7/7	75 \pm 5
Brain homogenate [†] (1 %, 0.03 ml)	4/4	68 \pm 8
15		
<u>Experiment 2</u>		
<i>Wires exposed to homogenate</i>		
Steel wire (10 %, w/v)	4/4	85 \pm 4
Gold wire (10 %, w/v)	3/3	74 \pm 2
20 Steel wire (1 %, w/v)	4/4	86 \pm 8
Gold wire (1 %, w/v)	4/4	81 \pm 6

For experiment 1, two C57BL/6 mice were culled 87 days after i.c. inoculation with RML, that is, about 2 months before appearance of clinical symptoms. Wires were inserted into brain for the time indicated or exposed to centrifuged 10% brain homogenate for 16 h and processed as described in the Methods section. For experiment 2, wire segments were exposed to centrifuged brain homogenate of RML-infected, terminally sick CD1 mice as described in Methods.

30

[†]6.8 logLD₅₀ units/ml 10 % homogenate, as determined by end point titration (23) in Tga20 mice.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

61

A second important question regards the length of time an infectious wire must contact brain tissue in order to initiate disease. Infectious wires were prepared by insertion for 5 min into the brain of an infected wild-type mouse culled one month before the expected onset of scrapie symptoms. After washing, the wires were inserted transiently into the brains of anaesthetised indicator mice. As shown in Table 2, all mice exposed to a wire for 30 min or 2 h developed symptoms after 94 ± 10 and 100 ± 18 days, respectively. The infectious wires, with or without subsequent exposure to brain tissue, were ultimately assayed in indicator mice and in all cases caused scrapie disease after about 70 days, showing that no detectable amounts of infectivity were lost by exposure to brain.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

62

Table 2: Transient insertion of infectious wires into brains of indicator mice

Inoculation	Sick/total	Incubation time \pm (days)
Wires infected by exposure to scrapie brain		
(a) <i>Transient insertion into indicator mice</i>		
30 min	4/4 [‡]	94 \pm 10
120 min	2/2 [‡]	100 \pm 18 [‡]
(b) <i>Permanent insertion into indicator mice</i>		
Wires not previously inserted	3/3	71 \pm 2
Wires after transient insertion for:		
30 min	4/4	71 \pm 3
120 min	5/5	68 \pm 1
(c) <i>Controls</i>		
Wires exposed to brain homogenate	6/6	76 \pm 3
Brain homogenate (1%, 0.03 ml)	3/3	69 \pm 3

Infectious wires were prepared by insertion for 5 min into the brain of C57Bl6 x129Sv culled 121 days after i.c. inoculation with RML and washed with 50 ml PBS 5 times for 10

- 5 Infectious wires were inserted into brains of 6 deeply anaesthetised Tga20 indicator mice for times indicated. The recovered wires were washed with 1 ml PBS and implanted into T₁ indicator mice. As controls, wires incubated with centrifuged 10% homogenate (6.8 log I units/ml) of the same brain and the homogenate itself were introduced into indicator mice.

[‡] Two of 6 mice died on the day of the intervention.

- 10 #Four of 6 mice died within a day of the intervention.

[‡] Incubation times were 87 and 113 days

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

63

Earlier experiments had shown that no detectable protein could be eluted with 2 M NaOH (<50 ng protein per wire) from wires exposed to 10% brain homogenate (11). To determine whether wires exposed to brain homogenate or to intact brain had surface-bound PrP, they were incubated with monoclonal PrP antibody 6H4 (14), followed by horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti mouse IgG1 and chemiluminescence was measured in the presence of substrate, thereby demonstrating the chemiluminescence of surface-bound PrP on stainless steel wires exposed to brain or brain homogenates. Stainless steel wire segments were transiently inserted into brains ("dipped") or incubated with 10 % brain homogenates (homogenate) from PrP knockout mice (*Prnp^{0/0}*), uninfected (*Tga20*) and RML-infected, terminally sick *Tga20* mice (RML-*Tga20*). Wires were washed, treated with anti-PrP antibody 6H4 and horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG1 antibody, and chemiluminescence was determined.

Chemiluminescence of wires transiently inserted into infected brain of terminally sick indicator mice was about 5.5 times above reagent background. After background subtraction, the values were about 4 times higher than for wires exposed to infected brain homogenate and about 1.8 times higher than for those transiently inserted into uninfected brain. This experiment shows that PrP was bound to the wire surface; the higher chemiluminescence of the sample from infected brain is in keeping with the finding that total PrP content in terminally infected mouse brain is around 5 times higher than in uninfected controls (13, 15), due to accumulation of PrP^{Sc}. We were not able to differentiate between PrP^C and PrP^{Sc} on wires because proteinase K treatment abolished immunofluorescence in all cases. In an attempt to desorb PrP, we extracted 40 wire segments that had been transiently inserted into scrapie-infected brain, with 0.05 ml 2 M NaOH for 1 h, neutralised the eluate with HCl and analysed half the sample by Western blot analysis. No PrP-specific immunoreactivity was detected under conditions where 0.3 ng purified glycosylated murine PrP, dissolved in NaOH and neutralised as described above, was clearly detectable. Therefore, one wire released less than 15 pg PrP, that is less than 3×10^8 molecules. Assuming that one logLD₅₀ unit of infectivity is associated with 10^5 PrP^{Sc} molecules (16), one wire released less than 3000 logLD₅₀ units. Yet, the incubation time resulting from one wire is about the same as that following injection of 0.03 ml 1% brain homogenate, which corresponds to about 20'000 logLD₅₀ units. This somewhat speculative calculation suggests that the amount of PrP that could have been released from the wire surface does not readily account for the wire's infectivity, raising the question whether infectivity is due to irreversibly bound PrP^{Sc} (or PrP*) (17) rather than to desorbed prions.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

64

Why are wire-bound prions as infectious as concentrated homogenates? Upon intracerebral inoculation with brain homogenate, infectivity is rapidly distributed throughout the mouse (18) and after 4 days or less prions are no longer detectable in the brain (19). Perhaps wire-bound prions are more stable and can therefore act over a longer period of time. We assayed 5 infectious wires directly or after leaving them for 1 or 5 days in brains of *Prnp^{+/-}* or *Prnp^{0/0}* mice. **Table 3** shows that wires remained infectious even after residing in brain tissue for 5 days, albeit at a lower level, as evidenced by incubation times of about 90 days in indicator mice. Because wire-bound infectivity remains at a locally high concentration for 5 days or longer, it may result in a greater total exposure than injected homogenate.

Table 3: Infectivity of prion-coated wire after exposure to brain homogenate, PBS or brain of uninfected mice

Inoculation	Sick/total	Incubation time s.d. (days)
<i>Infectious wire</i>	3/4	62 ± 3
<i>Experiment 1: In vitro exposure of infectious wire to:</i>		
<i>(a) Prnp^{0/0} brain homogenate</i>		
Wire	4/4	89 ± 3
Homogenate	1/4*	108
<i>(b) PBS</i>		
Wire	3/3	85 ± 6
PBS	0/4	>260
<i>Experiment 2: In vivo exposure of infectious wire to:</i>		
<i>(a) Brain of Prnp^{17/17} mice, 1 day</i>		
Wire	3/3	104 ± 20
Surrounding tissue	0/8†	>260
<i>(b) Brain of Prnp^{0/0} mice, 5 days</i>		
Wire	2/3	86 ± 4
Surrounding tissue	0/8†	>260
<i>(c) Brain of Prnp^{20/0} mice, 1 day</i>		
Wire	3/3	79 ± 4
Surrounding tissue	1/8†,*	101
<i>(d) Brain of Prnp^{0/0} mice, 5 days</i>		
Wire	3/3	91 ± 5
Surrounding tissue	0/8†	>260

- 5 Infectious wires were prepared with centrifuged 10% brain homogenate from terminally sick CD1 mice (11). For the *in vitro* assay (expt.1), 20 wires were shaken in Eppendorf tubes for 24 h at 37°C, either with 0.2 ml freshly prepared brain homogenate (10 % w/v in PBS) of uninfected *Prnp^{0/0}* mice or with 0.2 ml PBS/0.1 % albumin, on a thermomixer (1400 rpm). After washing with 0.2 ml of the cognate solution, wires were assayed for infectivity. Thirty- μ l samples of each preparation (0.4 ml) were

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

66

assayed for infectivity in *Tga20* indicator mice. For the *in vivo* experiment (expt.2), infectious wires were implanted into the brain of uninfected *Prnp^{0/0}* (C57Bl6) or *Prnp^{0/0}* mice. After 1 and 5 days respectively, the mice were culled and the brain tissue immediately surrounding the wire was dissected. Wires were washed in 1 ml PBS and assayed. The brain samples (each about 80 mg) were homogenised in PBS to give a 10% homogenate and centrifuged samples were injected i.c. into indicator mice each.

* Scrapie diagnosis was confirmed by histopathology or histoblotting (24)

† One of 9 mice died during or after injection.

10 The wire model provided by the present invention serves as model for the sterilisation of surgical instruments by recommended (1, 3, 20) or other procedures. In a further example, infectious wire segments were subjected to different treatments and assayed. Sodium hydroxide (1 M, 1 h) or guanidinium thiocyanate (4 M, 16 h) rendered the wires completely non-infectious to the limits of the bioassay (Table 4), however all 6 indicator mice challenged with
15 formaldehyde-treated, prion-coated wires succumbed to scrapie after 92±8 days.

Table 4: Infectivity of surface-bound mouse prions after various treatments

Inoculation	Sick/total	Incubation time s.d. (days)
1. Uninfected wires		
Untreated	0/3	>260
2. Infectious wires		
Untreated	6/6	76 ± 5
Sodium hydroxide (1M, 1 h, 25°C)	0/6	>260
Formaldehyde (10%, 1 h, 25°C)	6/6	92 ± 8
Guanidinium thiocyanate (4M, 16 h, 25°C)	0/6	>260

20 Infectious wires were prepared with centrifuged brain homogenates and assayed as described (11). End point titration (23) of the homogenate gave a titre of 6.75 log LD50 units/ml 10 % homogenate. NaOH and formaldehyde solutions were prepared immediately prior to use; 4 M guanidinium thiocyanate was RNA Lysis buffer (#40082, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Wires were exposed to 1 ml solution and washed with 1 ml PBS four times prior to implantation.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

67

These decontamination studies provide a model for studying decontamination of instruments used in surgery. However, it is important to note that in this Example, RML mouse prions, and a mouse-adapted scrapie isolate (21) which is less heat stable than mouse-passaged BSE (301V) or the hamster strain 263K (3, 22) were used. It is clearly desirable to conduct sterilisation experiments of surface-bound infectivity according to the present invention using CJD, vCJD and BSE prions in an appropriately sensitive host. In this Example, the area of contact between wire surface and tissue is relatively small, compared with that of surgical instruments and it is therefore desirable to use scaled-up surfaces, such as those provided by small steel beads, which could conveniently be introduced into larger indicator animals, to further support the results obtained in the mouse.

Clearly, it is advantageous to use wires "dipped" for short times into brain or tonsils instead of biopsied tissue to determine the presence of PrP^{Sc} by chemiluminescence or infectivity in an appropriate indicator mouse or susceptible cultured cell line.

Example 4 : Intravital assay for prion infectivity by transient insertion of wire segments in brain or spleen and analysis in indicator mice

The ability of stainless steel to bind scrapie infectivity has been previously demonstrated by incubating steel wires for 16 hours with 10 % brain homogenate of terminally scrapie-ill CD1 mice (Zobeley et al. 1999). We show that transient insertion of stainless steel wires into brain of RML-infected C57B16 mice (87 d.p.i.) two months before the expected appearance of scrapie symptoms for 5 minutes suffices to saturate the surface with prion infectivity. Moreover, we found prion infectivity in the spleen of C57B16 mice 49 days after intracerebrally inoculation with RML by transiently inserting wires into the spleen (Table 1). Wires were inserted into the spleen of one mouse (DNA #41682) and removed after 5 and 30 minutes. "Dipped" wires were washed with PBS under standard conditions and immediately assayed by permanent implantation into the brain of indicator mice as described in Example 3. As shown in Table 1, the incubation time was 79 ± 7 and 82 ± 3 days, respectively. In addition, wires were transiently inserted into the whole brain of the same mouse and analysed under the same conditions. Wires exposed to the brain for 5 and 30 min caused disease in indicator mice after 87 ± 5 (4/5) and 103 ± 15 (3/5) days, respectively. A 1% homogenate of the same brain, transmitted disease to all indicator mice in 85 ± 6 (5/5) days (Table 1); the titre by endpoint titration was about 4.5 logLD₅₀ units/ml.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

68

Table 1 Infectivity of stainless steel wire segments exposed to intact brain or spleen of C57Bl6 mice 49 days after RML inoculation.

Inoculum	sick/total	incubation time(days + S.D.)
Wire exposed to brain for 5 min	4/5+	87 ± 5
Wire exposed to brain for 30 min	3/5#	103 ± 15
Wire exposed to spleen for 5 min	4/4	79 ± 7
Wire exposed to spleen for 30 min	4/5	82 ± 3
Brain homogenate (1%)	5/5	85 ± 6
Brain homogenate (0.01%)	0/5	>150
Brain homogenate (0.001%)	0/5	>150
Brain homogenate (0.0001%)	0/5	>150

The dipping experiment was performed as described in Example 3.

5 + The fifth mouse developed behavioural abnormalities after 135 days (DNA#42988).

The fourth mouse developed behavioural abnormalities after 143 days (DNA#43091).

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

69

References to Example 3

1. Ernst, D. R. & Race, R. E. (1993) *J. Virol. Methods* **41**, 193-201.
2. Taylor, D. M., Fraser, H., McConnell, I., Brown, D. A., Brown, K. L., Lanza, K. A. & Smith, G. R. (1994) *Arch. Virol.* **139**, 313-326.
- 5 3. Taylor, D. M. (2000) *Vet. J.* **159**, 10-17.
4. Brown, P., Gibbs, C. J., Jr., Amyx, H. L., Kingsbury, D. T., Rohwer, R. G., Sulima, M. P. & Gajdusek, D. C. (1982) *N. Engl. J. Med.* **306**, 1279-1282.
5. Bernoulli, C., Siegfried, J., Baumgartner, G., Regli, F., Rabinowicz, T., Gajdusek, D. C. & Gibbs, C. J., Jr. (1977) *Lancet* **1**, 478-479.
- 10 6. Gibbs, C. J., Jr., Asher, D. M., Kobrine, A., Amyx, H. L., Sulima, M. P. & Gajdusek, D. C. (1994) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **57**, 757-758.
7. Hill, A. F., Zeidler, M., Ironside, J. & Collinge, J. (1997) *Lancet* **349**, 99-100.
8. Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C. L., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J. & Lantos, P. (1997) *Nature* **389**, 448-450.
- 15 9. Hill, A. F., Butterworth, R. J., Joiner, S., Jackson, G., Rossor, M. N., Thomas, D. J., Frosh, A., Tolley, N., Bell, J. E., Spencer, M., King, A., Al-Sarraj, S., Ironside, J. W., Lantos, P. L. & Collinge, J. (1999) *Lancet* **353**, 183-189.
10. Wadsworth, J. D. F., Joiner, S., Hill, A. F., Campbell, T. A., Desbruslais, M. & Collinge, S. (2001) *Lancet* **In press**.
- 20 11. Zobeley, E., Flechsig, E., Cozzio, A., Enari, M. & Weissmann, C. (1999) *Mol. Med.* **5**, 240-243.
12. Williams, R. L. & Williams, D. F. (1988) *Biomaterials* **9**, 206-212.
13. Fischer, M., Rüllicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (1996) *EMBO J.* **15**, 1255-1264.
- 25 14. Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schulz-Schaeffer, W., Kretschmar, H., Raeber, A., Braun, U., Ehrensperger, F., Hornemann, S., Glockshuber, R., Rick, R., Billeter, M., Wuthrich, K. & Oesch, B. (1997) *Nature* **390**, 74-77.
15. Büeler, H., Raeber, A., Sailer, A., Fischer, M., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (1994) *Mol. Med.* **1**, 19-30.
- 30 16. Bolton, D. C., Rudelli, R. D., Currie, J. R. & Bendheim, P. E. (1991) *J. Gen. Virol.* **72**, 2905-2913.
17. Weissmann, C. (1991) *Nature* **349**, 569-571.
18. Millson, G. C., Kimberlin, R. H., Manning, E. J. & Collis, S. C. (1979) *Vet. Microbiol.* **1979**, 89-99.
- 35

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

70

19. Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M. & Weissmann, C. (1993) *Cell* **73**, 1339-1347.
20. Manuelidis, L. (1997) *J. Neurovirol.* **3**, 62-65.
21. Chandler, R. L. (1961) *Lancet* **1**, 1378-1379.
- 5 22. Taylor, D. M., Fernie, K., McConnell, I. & Steele, P. J. (1998) *Vet. Microbiol.* **64**, 33-38.
23. Reed, J. & Muench, H. (1938) *Am. J. Hygiene* **27**, 493-497.
24. Flechsig, E., Shmerling, D., Hegyi, I., Raeber, A. J., Fischer, M., Cozzio, A., von Mering, C., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (2000) *Neuron* **27**, 399-408.

10 PRION REFERNCES

- Aguzzi, A. : Personal Communication. Zurich, Switzerland, 3/20/1997.
- Aguzzi, A.; Brandner, S. The genetics of prions--a contradiction in terms? *Lancet* **354**: 22-25,
15 1999.
- Aguzzi, A.; Weissmann, C. A suspicious signature. *Nature* **383**: 666-667, 1996.
- Basler, K.; Oesch, B.; Scott, M.; Westaway, D.; Walchli, M.; Groth, D. F.; McKinley, M. P.;
20 Prusiner, S. B.; Weissmann, C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same
chromosomal gene. *Cell* **46**: 417-428, 1986.
- Bertoni, J. M.; Brown, P.; Goldfarb, L. G.; Rubenstein, R.; Gajdusek, D. C. Familial
Creutzfeldt-Jakob disease (codon 200 mutation) with supranuclear palsy. *J.A.M.A.* **268**: 2413-
25 2415, 1992.
- Beyreuther, K.; Masters, C. L.. Catching the culprit prion. *Nature* **370**: 419-420, 1994.
- Bosque, P. J.; Vnencak-Jones, C. L.; Johnson, M. D.; Whitlock, J. A.; McLean, M. J. A PrP
30 gene codon 178 base substitution and a 24-bp interstitial deletion in familial Creutzfeldt-Jakob
disease. *Neurology* **42**: 1864-1870, 1992.
- Brown, P.; Galvez, S.; Goldfarb, L. G.; Nieto, A.; Cartier, L.; Gibbs, C. J., Jr.; Gajdusek, D. C.
Familial Creutzfeldt-Jakob disease in Chile is associated with the codon 200 mutation of the
35 PRNP amyloid precursor gene on chromosome 20. *J. Neurol. Sci.* **112**: 65-67, 1992.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

71

- Brown, P.; Goldfarb, L. G.; Gajdusek, D. C. The new biology of spongiform encephalopathy: infectious amyloidoses with a genetic twist. *Lancet* 337: 1019-1022, 1991.
- 5 Brown, P.; Goldfarb, L. G.; Kovanen, J.; Haltia, M.; Cathala, F.; Sulima, M.; Gibbs, C. J., Jr.; Gajdusek, D. C. Phenotypic characteristics of familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with the codon 178-asn PRNP mutation. *Ann. Neurol.* 31: 282-285, 1992.
- Brown, P.; Goldfarb, L. G.; McCombie, W. R.; Nieto, A.; Squillacote, D.; Sheremata, W.;
10 Little, B. W.; Godec, M. S.; Gibbs, C. J., Jr.; Gajdusek, D. C. : Atypical Creutzfeldt-Jakob disease in an American family with an insert mutation in the PRNP amyloid precursor gene. *Neurology* 42: 422-427, 1992.
- Bueler, H.; Aguzzi, A.; Sailer, A.; Greiner, R.-A.; Autenried, P.; Aguet, M.; Weissman, C.
15 Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73: 1339-1347, 1993.
- Bueler, H.; Raeber, A.; Sailer, A.; Fischer, M.; Aguzzi, A.; Weissmann, C. : High prion and PrP(Sc) levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Molec. Med.* 1: 19-30, 1994.
- 20 Campbell, T. A.; Palmer, M. S.; Will, R. G.; Gibb, W. R. G.; Luthert, P. J.; Collinge, J. A prion disease with a novel 96-base pair insertional mutation in the prion protein gene. *Neurology* 46: 761-766, 1996.
- 25 Carlson, G. A.; Kingsbury, D. T.; Goodman, P. A.; Coleman, S.; Marshall, S. T.; DeArmond, S.; Westaway, D.; Prusiner, S. B. Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell* 46: 503-511, 1986.
- Chapman, J.; Arlazoroff, A.; Goldfarb, L. G.; Cervenakova, L.; Neufeld, M. Y.; Werber, E.;
30 Herbert, M.; Brown, P.; Gajdusek, D. C.; Korczyn, A. D. Fatal insomnia in a case of familial Creutzfeldt-Jakob disease with the codon 200(lys) mutation. *Neurology* 46: 758-761, 1996.
- Chapman, J.; Ben-Israel, J.; Goldhammer, Y.; Korczyn, A. D.. The risk of developing Creutzfeldt-Jakob disease in subjects with the PRNP gene codon 200 point mutation.
35 *Neurology* 44: 1683-1686, 1994.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

72

- Chapman, J.; Brown, P.; Rabey, J. M.; Goldfarb, L. G.; Inzelberg, R.; Gibbs, C. J., Jr.; Gajdusek, D. C.; Korczyn, A. D. Transmission of spongiform encephalopathy from a familial Creutzfeldt-Jakob disease patient of Jewish Libyan origin carrying the PRNP codon 200 mutation. *Neurology* 42: 1249-1250, 1992.
- 5
- Chapman, J.; Korczyn, A. D. Genetic and environmental factors determining the development of Creutzfeldt-Jakob disease in Libyan Jews. *Neuroepidemiology* 10: 228-231, 1991.
- 10
- Chiesa, R.; Drisaldi, B.; Quaglio, E.; Mighele, A.; Piccardo, P.; Ghetti, B.; Harris, D. A. Accumulation of protease-resistant prion protein (PrP) and apoptosis of cerebellar granule cells in transgenic mice expressing a PrP insertional mutation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97: 5574-5579, 2000.
- 15
- Chiesa, R.; Piccardo, P.; Ghetti, B.; Harris, D. : *Neuron* 21: 1339-1351, 1998.
- Collinge, J. : Human prion diseases and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Hum. Mol. Genet.* 6: 1699-1705, 1997.
- 20
- Collinge, J.; Brown, J.; Hardy, J.; Mullan, M.; Rossor, M. N.; Baker, H.; Crow, T. J.; Lofthouse, R.; Poulter, M.; Ridley, R.; Owen, F.; Bennett, C.; Dunn, G.; Harding, A. E.; Quinn, N.; Doshi, B.; Roberts, G. W.; Honavar, M.; Janota, I.; Lantos, P. L. : Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion. 2. Clinical and pathological features. *Brain* 115: 687-710, 1992.
- 25
- Collinge, J.; Harding, A. E.; Owen, F.; Poulter, M.; Lofthouse, R.; Boughey, A. M.; Shah, T.; Crow, T. J. : Diagnosis of Gerstmann-Straussler syndrome in familial dementia with prion protein gene analysis. *Lancet* II: 15-17, 1989.
- 30
- Collinge, J.; Owen, F.; Poulter, M.; Leach, M.; Crow, T. J.; Rossor, M. N.; Hardy, J.; Mullan, M. J.; Janota, I.; Lantos, P. L. : Prion dementia without characteristic pathology. *Lancet* 336: 7-9, 1990.
- 35
- Collinge, J.; Palmer, M. S.; Dryden, A. J. : Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 337: 1441-1442, 1991.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

73

- Collinge, J.; Poulter, M.; Davis, M. B.; Baraitser, M.; Owen, F.; Crow, T. J.; Harding, A. E.: Presymptomatic detection or exclusion of prion protein gene defects in families with inherited prion diseases. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 1351-1354, 1991.
- 5 Collinge, J.; Sidle, K. C. L.; Heads, J.; Ironside, J.; Hill, A. F. : Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383: 685-690, 1996.
- Collinge, J.; Whittington, M.; Sidle, K. C. L.; Smith, C. J.; Palmer, M.; Clarke, A. R.;
10 Jefferys, J. G. R. : Prion protein is necessary for normal synaptic function. (Letter) *Nature* 370: 295-297, 1994.
- Colombo, R. : Age and origin of the PRNP E200K mutation causing familial Creutzfeldt-Jacob disease in Libyan Jews. (Letter) *Am. J. Hum. Genet.* 67: 528-531, 2000.
- 15 de Silva, R.; Ironside, J. W.; McCardle, L.; Esmonde, T.; Bell, J.; Will, R.; Windl, O.; Dempster, M.; Estibeiro, P.; Lathe, R. : Neuropathological phenotype and 'prion protein' genotype correlation in sporadic Creutzfeldt-Jacob disease. *Neurosci. Lett.* 179: 50-52, 1994.
- 20 Deslys, J.-P.; Jaegly, A.; d'Aignaux, J. H.; Mouthon, F.; de Villemeur, T. B.; Dormont, D. : Genotype at codon 129 and susceptibility to Creutzfeldt-Jacob disease. *Lancet* 351: 1251 only, 1998.
- Dlouhy, S. R.; Hsiao, K.; Farlow, M. F.; Foroud, T.; Conneally, P. M.; Johnson, P.; Prusiner, S. B.; Hodes, M. E.; Ghetti, B. : Linkage of the Indiana kindred of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease to the prion protein gene. *Nature Genet.* 1: 64-67, 1992.
- 25 Doh-ura, K.; Kitamoto, T.; Sakaki, Y.; Tateishi, J. : CJD discrepancy. (Letter) *Nature* 353: 801-802, 1991.
- 30 Doh-ura, K.; Tateishi, J.; Sasaki, H.; Kitamoto, T.; Sakaki, Y. : Pro-to-leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Straussler syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 974-979, 1989.
- 35 Duchen, L. W.; Poulter, M.; Harding, A. E. : *Brain* 116: 555-567, 1993.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

74

- Farlow, M. R.; Yee, R. D.; Dlouhy, S. R.; Conneally, P. M.; Azzarelli, B.; Ghetti, B. : Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. I. Extending the clinical spectrum. *Neurology* 39: 1446-1452, 1989.
- 5
- Forloni, G.; Angeretti, N.; Chiesa, R.; Monzani, E.; Salmona, M.; Bugiani, O. : Neurotoxicity of a prion protein fragment. (Letter) *Nature* 362: 543-546, 1993.
- Gabizon, R.; Rosenmann, H.; Meiner, Z.; Kahana, I.; Kahana, E.; Shugart, Y.; Ott, J.;
- 10 Prusiner, S. B. : Mutation and polymorphism of the prion protein gene in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). *Am. J. Hum. Genet.* 53: 828-835, 1993.
- Gajdusek, D. C. : The transmissible amyloidoses: genetical control of spontaneous generation of infectious amyloid proteins by nucleation of configurational change in host precursors:
- 15 kuru-CJD-GSS-scrapie-BSE. *Europ. J. Epidemiol.* 7: 567-577, 1991.
- Gambetti, P.; Petersen, R.; Monari, L.; Tabaton, M.; Autilio-Gambetti, L. : Fatal familial insomnia and the widening spectrum of prion diseases. *Brit. Med. Bull.* 49: 980-994, 1993.
- 20 Ghetti, B.; Tagliavini, F.; Masters, C. L.; Beyreuther, K.; Giaccone, G.; Verga, L.; Farlow, M. R.; Conneally, P. M.; Dlouhy, S. R.; Azzarelli, B.; Bugiani, O. : Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. II. Neurofibrillary tangles and plaques with PrP-amyloid coexist in an affected family. *Neurology* 39: 1453-1461, 1989.
- 25 Giaccone, G.; Verga, L.; Bugiani, O.; Frangione, B.; Serban, D.; Prusiner, S. B.; Farlow, M. R.; Ghetti, B.; Tagliavini, F. : Prion protein preamyloid and amyloid deposits in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease, Indiana kindred. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 9349-9353, 1992.
- Goldfarb, L. G.; Brown, P.; Cervenakova, L.; Gajdusek, D. C. : Molecular genetic studies of
- 30 Creutzfeldt-Jakob disease. *Molec. Neurobiol.* 8: 89-97, 1994.
- Goldfarb, L. G.; Brown, P.; Goldgaber, D.; Asher, D. M.; Rubenstein, R.; Brown, W. T.; Piccardo, P.; Kascsak, R. J.; Boellaard, J. W.; Gajdusek, D. C. : Creutzfeldt-Jakob disease and kuru patients lack a mutation consistently found in the Gerstmann-Straussler-Scheinker
- 35 syndrome. *Exp. Neurol.* 108: 247-250, 1990.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

75

- 5 Goldfarb, L. G.; Brown, P.; Haltia, M.; Cathala, F.; McCombie, W. R.; Kovanen, J.;
Cervenakova, L.; Goldin, L.; Nieto, A.; Godec, M. S.; Asher, D. M.; Gajdusek, D. C. :
Creutzfeldt-Jakob disease cosegregates with the codon 178-asn PRNP mutation in
families of European origin. *Ann. Neurol.* 31: 274-281, 1992.
- 10 Goldfarb, L. G.; Brown, P.; McCombie, W. R.; Goldgaber, D.; Swergold, G. D.; Wills, P. R.;
Cervenakova, L.; Baron, H.; Gibbs, C. J., Jr.; Gajdusek, D. C. : Transmissible familial
Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding
repeats in the PRNP gene. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88: 10926-10930, 1991.
- 15 Goldfarb, L. G.; Brown, P.; Mitrova, E.; Cervenakova, L.; Goldin, L.; Korczyn, A. D.;
Chapman, J.; Galvez, S.; Cartier, L.; Rubenstein, R.; Gajdusek, D. C. : Creutzfeldt-Jacob
disease associated with the PRNP codon 200-lys mutation: an analysis of 45 families. *Europ. J.*
Epidemiol. 7: 477-486, 1991.
- 20 Goldfarb, L. G.; Haltia, M.; Brown, P.; Nieto, A.; Kovanen, J.; McCombie, W. R.; Trapp, S.;
Gajdusek, D. C. : New mutation in scrapie amyloid precursor gene (at codon 178) in Finnish
Creutzfeldt-Jakob kindred. (Letter) *Lancet* 337: 425, 1991.
- 25 Goldfarb, L. G.; Mitrova, E.; Brown, P.; Toh, B. H.; Gajdusek, D. C. : Mutation in codon 200
of scrapie amyloid protein gene in two clusters of Creutzfeldt-Jakob disease in Slovakia.
(Letter) *Lancet* 336: 514-515, 1990.
- 30 Goldfarb, L. G.; Petersen, R. B.; Tabaton, M.; Brown, P.; LeBlanc, A. C.; Montagna, P.;
Cortelli, P.; Julien, J.; Vital, C.; Pendelbury, W. W.; Haltia, M.; Wills, P. R.; Hauw, J. J.;
McKeever, P. E.; Monari, L.; Schoursank, B.; Swergold, G. D.; Autilio-Gambetti, L.;
Gajdusek, D. C.; Lugaresi, E.; Gambetti, P. : Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-
Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 258: 806-808,
1992.
- 35 Goldgaber, D.; Goldfarb, L. G.; Brown, P.; Asher, D. M.; Brown, W. T.; Lin, S.; Teener, J.
W.; Feinstone, S. M.; Rubenstein, R.; Kascsak, R. J.; Boellaard, J. W.; Gajdusek, D. C. :
Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler-Scheinker's
syndrome. *Exp. Neurol.* 106: 204-206, 1989.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

76

- Goldhammer, Y.; Gabizon, R.; Meiner, Z.; Sadeh, M. : An Israeli family with Gerstmann-Straussler-Scheinker disease manifesting the codon 102 mutation in the prion protein gene. *Neurology* 43: 2718-2719, 1993.
- 5 Griffith, J. S. : Self-replication and scrapie. *Nature* 215: 1043-1044, 1967.
- Haltia, M.; Kovanen, J.; Goldfarb, L. G.; Brown, P.; Gajdusek, D. C. : Familial Creutzfeldt-Jakob disease in Finland: epidemiological, clinical, pathological and molecular genetic studies. *Europ. J. Epidemiol.* 7: 494-500, 1991.
- 10 Hegde, R. S.; Mastrianni, J. A.; Scott, M. R.; DeFea, K. A.; Tremblay, P.; Torchia, M.; DeArmond, S. J.; Prusiner, S. B.; Lingappa, V. R. : A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* 279:827-834, 1998.
- 15 Hegde, R. S.; Tremblay, P.; Groth, D.; DeArmond, S. J.; Prusiner, S. B.; Lingappa, V. R. : Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature* 402: 732-736, 1999.
- 20 Horwich, A. L.; Weissman, J. S. : Deadly conformations--protein misfolding in prion disease. *Cell* 89: 499-510, 1997.
- Hsiao, K.; Baker, H. F.; Crow, T. J.; Poulter, M.; Owen, F.; Terwilliger, J. D.; Westaway, D.; Ott, J.; Prusiner, S. B. : Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* 338: 342-345, 1989.
- 25 Hsiao, K.; Cass, C.; Conneally, P. M.; Dlouhy, S. R.; Hodes, M. E.; Farlow, M. R.; Ghetti, B.; Prusiner, S. B. : Atypical Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome with neurofibrillary tangles: no mutation in the prion protein open-reading-frame in a patient of the Indiana kindred. (Abstract) *Neurobiol. Aging* 11: 302, 1990.
- 30 Hsiao, K.; Dlouhy, S. R.; Farlow, M. R.; Cass, C.; Da Costa, M.; Conneally, P. M.; Hodes, M. E.; Ghetti, B.; Prusiner, S. B. : Mutant prion proteins in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease with neurofibrillary tangles. *Nature Genet.* 1: 68-71, 1992.
- 35 Hsiao, K.; Meiner, Z.; Kahana, E.; Cass, C.; Kahana, I.; Avrahami, D.; Scarlato, G.;

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

77

- Abramsky, O.; Prusiner, S. B.; Gabizon, R. : Mutation of the prion protein in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease. *New Eng. J. Med.* 324: 1091-1097, 1991.
- 5 Hsiao, K. K.; Groth, D.; Scott, M.; Yang, S.-L.; Serban, H.; Rapp, D.; Foster, D.; Torchia, M.; DeArmond, S. J.; Prusiner, S. B. : Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 9126-9130, 1994.
- 10 Ironside, J. W.; Sutherland, K.; Bell, J. E.; McCardle, L.; Barrie, C.; Estebeiro, K.; Zeidler, M.; Will, R. G. : A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease: neuropathological and clinical features. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 61: 523-530, 1996.
- Jendroska, K.; Hoffmann, O.; Schelosky, L.; Lees, A. J.; Poewe, W.; Daniel, S. E. : Absence of disease related prion protein in neurodegenerative disorders presenting with Parkinson's syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 57: 1249-1251, 1994.
- 15 Kitamoto, T.; Ohta, M.; Doh-ura, K.; Hitoshi, S.; Terao, Y.; Tateishi, J. : Novel missense variants of prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease or Gerstmann-Straussler syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191: 709-714, 1993.
- 20 Kocisko, D. A.; Come, J. H.; Priola, S. A.; Chesebro, B.; Raymond, G. J.; Lansbury, P. T.; Caughey, B. : Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370: 471-474, 1994.
- 25 Krasemann, S.; Zerr, I.; Weber, T.; Poser, S.; Kretschmar, H.; Hunsmann, G.; Bodemer, W. : Prion disease associated with a novel nine octapeptide repeat insertion in the PRNP gene. *Molec. Brain Res.* 34: 173-176, 1995.
- 30 Kretschmar, H. A.; Neumann, M.; Stavrou, D. : Codon 178 mutation of the human prion protein gene in a German family (Backer family): sequencing data from 72-year-old celloidin-embedded brain tissue. *Acta Neuropath.* 89: 96-98, 1995.
- Kretschmar, H. A.; Stowring, L. E.; Westaway, D.; Stubblebine, W. H.; Prusiner, S. B.; DeArmond, S. J. : Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* 5: 315-324, 1986.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

78

- Kuwahara, C.; Takeuchi, A. M.; Nishimura, T.; Haraguchi, K.; Kubosaki, A.; Matsumoto, Y.; Saeki, K.; Matsumoto, Y.; Yokoyama, T.; Itohara, S.; Onodera, T. : Prions prevent neuronal cell-line death. (Letter) *Nature* 400: 225-226, 1999.
- 5 Laplanche, J.-L.; El Hachimi, K. H.; Durieux, I.; Thuillet, P.; Defebvre, L.; Delasnerie-Laupretre, N.; Peoc'h, K.; Foncin, J.-F.; Destee, A. : Prominent psychiatric features and early onset in an inherited prion disease with a new insertional mutation in the prion protein gene. *Brain* 122: 2375-2386, 1999.
- 10 Laplanche, J. L.; Chatelain, J.; Thomas, S.; Launay, J. M.; Gaultier, C.; Derouesne, C. : Uncommon phenotype for a codon 178 mutation of the human PrP gene. (Letter) *Ann. Neurol.* 31: 345, 1992.
- Lee, H. S.; Sambuughin, N.; Cervenakova, L.; Chapman, J.; Pocchiari, M.; Litvak, S.; Qi, H. Y.; Budka, H.; del Ser, T.; Furukawa, H.; Brown, P.; Gajdusek, D. C.; Long, J. C.; Korczyn, A. D.; Goldfarb, L. G. : Ancestral origins and worldwide distribution of the PRNP 200K mutation causing familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 1063-1070, 1999.
- 20 Liao, Y.-C. J.; Lebo, J.; Lebo, R. V.; Clawson, G. A.; Smuckler, E. A. : Human prion protein cDNA: molecular cloning, chromosomal mapping, and biological implications. *Science* 233: 364-367, 1986.
- Lindquist, S. : Mad cows meet Psi-chotic yeast: the expansion of the prion hypothesis. *Cell* 89: 495-498, 1997.
- 25 Little, B. W.; Brown, B. W.; Rodgers-Johnson, P.; Perl, D. P.; Gajdusek, D. C. : Familial myoclonic dementia masquerading as Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 20: 231-239, 1986.
- 30 Lugaresi, E.; Medori, R.; Montagna, P.; Baruzzi, A.; Cortelli, P.; Lugaresi, A.; Tinuper, P.; Zucconi, M.; Gambetti, P. : Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *New Eng. J. Med.* 315: 997-1003, 1986.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

79

- Lugaresi, E.; Montagna, P.; Baruzzi, A.; Cortelli, P.; Tinuper, P.; Zucconi, M.; Gambetti, P. L.; Medori, R. : *Insomnie familiale a evolution maligne: une nouvelle maladie thalamique*. Rev. Neurol. 142: 791-792, 1986.
- 5 Mallucci, G. R.; Campbell, T. A.; Dickinson, A.; Beck, J.; Holt, M.; Plant, G.; de Pauw, K. W.; Hakin, R. N.; Clarke, C. E.; Howell, S.; Davies-Jones, G. A. B.; Lawden, M.; Smith, C. M. L.; Ince, P.; Ironside, J. W.; Bridges, L. R.; Dean, A.; Weeks, I.; Collinge, J. : *Inherited prion disease with an alanine to valine mutation at codon 117 in the prion protein gene*. Brain 122: 1823-1837, 1999.
- 10 Manetto, V.; Medori, R.; Cortelli, P.; Montagna, P.; Tinuper, P.; Baruzzi, A.; Rancurel, G.; Hauw, J.-J.; Vanderhaeghen, J.-J.; Mailleux, P.; Bugiani, O.; Tagliavini, F.; Bouras, C.; Rizzuto, N.; Lugaresi, E.; Gambetti, P. : *Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of 5 new cases*. Neurology 42: 312-319, 1992.
- 15 Manson, J. C.; Clarke, A. R.; McBride, P. A.; McConnell, I.; Hope, J. : *PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology*. Neurodegeneration 3: 331-340, 1994.
- 20 Manuelidis, L.; Sklaviadis, T.; Manuelidis, E. E. : *Evidence suggesting that PrP is not the infectious agent in Creutzfeldt-Jakob disease*. EMBO J. 6: 341-347, 1987.
- Mastrianni, J. A.; Curtis, M. T.; Oberholtzer, J. C.; Da Costa, M. M.; DeArmond, S.; Prusiner, S. B.; Garbern, J. Y. : *Prion disease (PrP-A117V) presenting with ataxia instead of dementia*. Neurology 45: 2042-2050, 1995.
- 25 Medori, R. : *Personal Communication*. New York, N. Y., 5/17/1990.
- Medori, R.; Montagna, P.; Tritschler, H. J.; LeBlanc, A.; Cortelli, P.; Tinuper, P.; Lugaresi, E.; Gambetti, P. : *Fatal familial insomnia: a second kindred with mutation of prion protein gene at codon 178*. Neurology 42: 669-670, 1992.
- 30 Medori, R.; Tritschler, H.-J. : *Prion protein gene analysis in thoursee kindreds with fatal familial insomnia (FFI): codon 178 mutation and codon 129 polymorphism*. Am. J. Hum. Genet. 53: 822-827, 1993.
- 35

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

80

- Medori, R.; Tritschler, H.-J.; LeBlanc, A.; Villare, F.; Manetto, V.; Chen, H. Y.; Xue, R.; Leal, S.; Montagna, P.; Cortelli, P.; Tinuper, P.; Avoni, P.; Mochi, M.; Baruzzi, A.; Hauw, J. J.; Ott, J.; Lugaresi, E.; Autilio-Gambetti, L.; Gambetti, P. : Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *New Eng. J. Med.* 326: 444-449, 1992.
- 5
- Meggendorfer, F. : Klinische und genealogische Beobachtungen bei einem Fall von spastischer Pseudoklerose Jakobs. *Z. Ges. Neurol. Psychiat.* 128: 337-341, 1930.
- Meiner, Z.; Gabizon, R.; Prusiner, S. B. : Familial Creutzfeldt-Jakob disease: codon 200 prion disease in Libyan Jews. *Medicine* 76: 227-237, 1997.
- 10
- Mestel, R. : Putting prions to the test. *Science* 273: 184-189, 1996.
- Mitrova, E.; Lowenthal, A.; Appel, B. : Familial Creutzfeldt-Jakob disease with temporal and spatial separation of affected members. *Europ. J. Epidemiol.* 6: 233-238, 1990.
- 15
- Monari, L.; Chen, S. G.; Brown, P.; Parchi, P.; Petersen, R. B.; Mikol, J.; Gray, F.; Cortelli, P.; Montagna, P.; Ghetti, B.; Goldfarb, L. G.; Gajdusek, D. C.; Lugaresi, E.; Gambetti, P.; Autilio-Gambetti, L. : Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: different prion proteins determined by a DNA polymorphism. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 2839-2842, 1994.
- 20
- Montrasio, F.; Frigg, R.; Glatzel, M.; Klein, M. A.; Mackay, F.; Aguzzi, A.; Weissmann, C. : Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* 288: 1257-1259, 2000.
- 25
- Mouillet-Richard, S.; Ermonval, M.; Chebassier, C.; Laplanche, J. L.; Lehmann, S.; Launay, J. M.; Kellermann, O. : Signal transduction through prion protein. *Science* 289: 1925-1928, 2000.
- 30
- Mouillet-Richard, S.; Teil, C.; Lenne, M.; Hugon, S.; Taleh, O.; Laplanche, J.-L. : Mutation at codon 210 (V210I) of the prion protein gene in a North African patient with Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol. Sci.* 168: 141-144, 1999.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

81

- Nieto, A.; Goldfarb, L. G.; Brown, P.; McCombie, W. R.; Trapp, S.; Asher, D. M.; Gajdusek, D. C. : Codon 178 mutation in ethnically diverse Creutzfeldt-Jakob disease families. (Letter) *Lancet* 337: 622-623, 1991.
- 5 Oesch, B.; Westaway, D.; Walchli, M.; McKinley, M. P.; Kent, S. B. H.; Aebersold, R.; Barry, R. A.; Tempst, P.; Teplow, D. B.; Hood, L. E.; Prusiner, S. B.; Weissmann, C. : A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40: 735-746, 1985.
- Owen, F.; Poulter, M.; Collinge, J.; Crow, T. J. : A codon 129 polymorphism in the PRIP
10 gene. *Nucleic Acids Res.* 18: 3103, 1990.
- Owen, F.; Poulter, M.; Collinge, J.; Crow, T. J. : Codon 129 changes in the prion protein gene in Caucasians. (Letter) *Am. J. Hum. Genet.* 46: 1215-1216, 1990.
- Owen, F.; Poulter, M.; Collinge, J.; Leach, M.; Lofthouse, R.; Crow, T. J.; Harding, A. E. :
15 *Molec. Brain Res.* 13: 155-157, 1992.
- Owen, F.; Poulter, M.; Lofthouse, R.; Collinge, J.; Crow, T. J.; Risby, D.; Baker, H. F.; Ridley, R. M.; Hsiao, K.; Prusiner, S. B. : Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. (Letter) *Lancet* I: 51-52, 1989.
- 20 Owen, F.; Poulter, M.; Shah, T.; Collinge, J.; Lofthouse, R.; Baker, H.; Ridley, R.; McVey, J.; Crow, T. J. : An in-frame insertion in the prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Molec. Brain Res.* 7: 273-276, 1990.
- 25 Pablos-Mendez, A.; Netto, E. M.; Defendini, R. : Infectious prions or cytotoxic metabolites? *Lancet* 341: 159-161, 1993.
- Palmer, M. S.; Collinge, J. : Mutations and polymorphisms in the prion protein gene. *Hum. Mutat.* 2: 168-173, 1993.
- 30 Palmer, M. S.; Dryden, A. J.; Hughes, J. T.; Collinge, J. : Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 352: 340-342, 1991. Note: Erratum: *Nature* 352: 547 only, 1991.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

82

- Perry, R. T.; Go, R. C. P.; Harrell, L. E.; Acton, R. T. : SSCP analysis and sequencing of the human prion protein gene (PRNP) detects two different 24 bp deletions in an atypical Alzheimer's disease family. *Am. J. Med. Genet.* 60: 12-18, 1995.
- 5 Pocchiari, M.; Salvatore, M.; Cutruzzola, F.; Genuardi, M.; Allcatelli, C. T.; Masullo, C.; Macchi, G.; Alema, G.; Galgani, S.; Xi, Y. G.; Petraroli, R.; Silvestrini, M. C.; Brunori, M. : A new point mutation of the prion protein gene in Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 34: 802-807, 1993.
- 10 Poulter, M.; Baker, H. F.; Frith, C. D.; Leach, M.; Lofthouse, R.; Ridley, R. M.; Shah, T.; Owen, F.; Collinge, J.; Brown, J.; Hardy, J.; Mullan, M. J.; Harding, A. E.; Bennett, C.; Doshi, R.; Crow, T. J. : Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion. I. Genealogical and molecular studies. *Brain* 115: 675-685, 1992.
- 15 Prusiner, S. B. : Prions causing degenerative neurological diseases. *Annu. Rev. Med.* 38: 381-398, 1987.
- Prusiner, S. B. : Molecular biology of prion diseases. *Science* 252: 1515-1522, 1991.
- 20 Prusiner, S. B. : Biology and genetics of prion diseases. *Ann. Rev. Microbiol.* 48: 655-686, 1994.
- Prusiner, S. B. : Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136-144, 1982.
- 25 Prusiner, S. B. : Molecular biology and genetics of prion diseases. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 61: 473-493, 1996.
- Puckett, C.; Concannon, P.; Casey, C.; Hood, L. : Genomic structure of the human prion protein gene. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 320-329, 1991.
- 30 Reder, A. T.; Mednick, A. S.; Brown, P.; Spire, J. P.; Cauter, V.; Wollmann, R. L.; Cervenakova, L.; Goldfarb, L. G.; Garay, A.; Ovsiew, F.; Gajdusek, D. C.; Roos, R. P. : Clinical and genetic studies of fatal familial insomnia. *Neurology* 45: 1068-1075, 1995.
- 35

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

83

- Riek, R.; Wider, G.; Billeter, M.; Hornemann, S.; Glockshuber, R.; Wuthrich, K. : Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc.Nat. Acad. Sci.* 95: 11667-11672, 1998.
- 5 Rivera, H.; Zuffardi, O.; Maraschio, P.; Caiulo, A.; Anichini, C.; Scarinci, R.; Vivarelli, R.: Alternate centromere inactivation in a pseudodicentric (15;20)(pter;pter) associated with a progressive neurological disorder. *J. Med. Genet.* 26: 626-630, 1989.
- Robakis, N. K.; Devine-Gaga, E. A.; Jenkins, E. C.; Kasczak, R. J.; Brown, W. T.; Krawczun, M. S.; Silverman, W. P. : Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the p arm of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140: 758-765, 1986.
- 10 Sailer, A.; Bueler, H.; Fischer, M.; Aguzzi, A.; Weissmann, C. : No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* 77: 967-968, 1994.
- Sakaguchi, S.; Katamine, S.; Nishida, N.; Moriuchi, R.; Shigamatsu, K.; Sugimoto, T.; Nakatani, A.; Kataoka, Y.; Houtani, T.; Shirabe, S.; Okada, H.; Hasegawa, S.; Miyamoto, T.; Noda, T. : Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380: 528-531, 1996.
- 20 Samaia, H. B.; Mari, J. J.; Vallada, H. P.; Moura, R. P.; Simpson, A. J. G.; Brentani, R. R. : A prion-linked psychiatric disorder. *Nature* 390: 241 only, 1997.
- 25 Schellenberg, G. D.; Anderson, L.; O'dahl, S.; Wisjman, E. M.; Sadovnick, A. D.; Ball, M. J.; Larson, E. B.; Kukull, W. A.; Martin, G. M.; Roses, A. D.; Bird, T. D. : APP-717, APP-693, and PRIP gene mutations are rare in Alzheimer disease. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 511-517, 1991.
- 30 Schnittger, S.; Gopal Rao, V. V. N.; Deutsch, U.; Gruss, P.; Balling, R.; Hansmann, I. : PAX1, a member of the paired box-containing class of developmental control genes, is mapped to human chromosome 20p11.2 by in situ hybridization (ISH and FISH). *Genomics* 14: 740-744, 1992.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

84

- Scott, M.; Foster, D.; Miranda, C.; Serban, D.; Coufal, F.; Walchli, M.; Torchia, M.; Groth, D.; Carlson, G.; DeArmond, S. J.; Westaway, D.; Prusiner, S. B. : Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59: 847-857, 1989.
- 5 Shibuya, S.; Higuchi, J.; Shin, R.-W.; Tateishi, J.; Kitamoto, T. : Protective prion protein polymorphisms against sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. (Letter) *Lancet* 351: 419 only, 1998.
- 10 Shmerling, D.; Hegyi, I.; Fischer, M.; Blattler, T.; Brandner, S.; Gotz, J.; Rulicke, T.; Flechsig, E.; Cozzio, A.; von Mering, C.; Hangartner, C.; Aguzzi, A.; Weissmann, C. : Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* 93: 203-214, 1998.
- 15 Simon, E. S.; Kahana, E.; Chapman, J.; Treves, T. A.; Gabizon, R.; Rosenmann, H.; Zilber, N.; Korczyn, A. D. : Creutzfeldt-Jakob disease profile in patients homozygous for the PRNP E200K mutation. *Ann. Neurol.* 47: 257-260, 2000.
- 20 Sparkes, R. S.; Simon, M.; Cohn, V. H.; Fournier, R. E. K.; Lem, J.; Klisak, I.; Heinzmann, C.; Blatt, C.; Lucero, M.; Mohandas, T.; DeArmond, S. J.; Westaway, D.; Prusiner, S. B.; Weiner, L. P. : Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83: 7358-7362, 1986.
- 25 Speer, M. C.; Goldgaber, D.; Goldfarb, L. G.; Roses, A. D.; Pericak-Vance, M. A. : Support of linkage of Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome to the prion protein gene on chromosome 20p12-pter. *Genomics* 9: 366-368, 1991.
- 30 Supattapone, S.; Bosque, P.; Muramoto, T.; Wille, H.; Aagaard, C.; Peretz, D.; Nguyen, H.-O. B.; Heinrich, C.; Torchia, M.; Safar, J.; Cohen, F. E.; DeArmond, S. J.; Prusiner, S. B.; Scott, M. : Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell* 96: 869-878, 1999.
- Tagliavini, F.; Prelli, F.; Ghiso, J.; Bugiani, O.; Serban, D.; Prusiner, S. B.; Farlow, M. R.; Ghetti, B.; Frangione, B. : Amyloid protein of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

85

- (Indiana kindred) is an 11 kd fragment of prion protein with an N-terminal glycine at codon 58. *EMBO J.* 10: 513-519, 1991.
- 5 Tagliavini, F.; Prelli, F.; Porro, M.; Rossi, G.; Giaccone, G.; Farlow, M. R.; Dlouhy, S. R.; Ghetti, B.; Bugiani, O.; Frangione, B. : Amyloid fibrils in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease (Indiana and Swedish kindreds) express only PrP peptides encoded by the mutant allele. *Cell* 79: 695-703, 1994.
- 10 Tateishi, J.; Brown, P.; Kitamoto, T.; Hoque, Z. M.; Roos, R.; Wollman, R.; Cervenakova, L.; Gajdusek, D. C. : First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature* 376: 434-435, 1995.
- 15 Telling, G. C.; Parchi, P.; DeArmond, S. J.; Cortelli, P.; Montagna, P.; Gabizon, R.; Mastrianni, J.; Lugaresi, E.; Gambetti, P.; Prusiner, S. B. : Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274: 2079-2082, 1996.
- 20 Telling, G. C.; Scott, M.; Mastrianni, J.; Gabizon, R.; Torchia, M.; Cohen, F. E.; DeArmond, S. J.; Prusiner, S. B. : Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83: 79-90, 1995.
- 25 Ter-Avanesyan, M. D.; Dagkesamanskaya, A. R.; Kushnirov, V. V.; Smirnov, V. N. : The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-mendelian determinant [psi+] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137: 671-676, 1994.
- Tobler, I.; Gaus, S. E.; Deboer, T.; Ackermann, P.; Fischer, M.; Rulicke, T.; Moser, M.; Oesch, B.; McBride, P. A.; Manson, J. C. : Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380: 639-642, 1996.
- 30 Westaway, D.; DeArmond, S. J.; Cayetano-Canlas, J.; Groth, D.; Foster, D.; Yang, S.-L.; Torchia, M.; Carlson, G. A.; Prusiner, S. B. : Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell* 76: 117-129, 1994.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

86

- Whittington, M. A.; Sidle, K. C. L.; Gowland, I.; Meads, J.; Hill, A. F.; Palmer, M. S.; Jefferys, J. G. R.; Collinge, J. : Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein. *Nature Genet.* 9: 197-201, 1995.
- Wickner, R. B. : [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prior analog in
5 *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 264: 566-569, 1994.
- Windl, O.; Giese, A.; Schulz-Schaeffer, W.; Zerr, I.; Skworc, K.; Arendt, S.; Oberdieck, C.; Bodemer, M.; Poser, S.; Kretschmar, H. A. : Molecular genetics of human prion diseases in
10 Germany. *Hum. Genet.* 105: 244-252, 1999.
- Yamada, M.; Itoh, Y.; Fujigasaki, H.; Naruse, S.; Kaneko, K.; Kitamoto, T.; Tateishi, J.; Otomo, E.; Hayakawa, M.; Tanaka, J.; Matsushita, M.; Miyatake, T. : A missense mutation at codon 105 with codon 129 polymorphism of the prion protein gene in a new variant of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Neurology* 43: 2723-2724, 1993.
15

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

87

CLAIMS

1. A method for detecting the presence of prions in a tissue/organ; said method comprising the steps of:
- 5
- (a) contacting the tissue/organ with a device, wherein said device is capable of binding prions;
- (b) removing said device from contact with said tissue/organ; and
- 10
- (c) determining if said device is binding prions.
2. A non-invasive method for detecting the presence of prions in a tissue/organ; said method comprising the steps of:
- 15
- (a) contacting the tissue/organ with a device, wherein said device is capable of binding prions;
- (b) removing said device from contact with said tissue/organ; and
- 20
- (c) determining if said device is binding prions.
3. A method according to claims 1 or claim 2 wherein the device is capable of preserving prions against degradation.
- 25
4. A method according to any of claims 1 to 3 wherein the tissue/organ is a mammalian tissue/organ.
5. A method according to claim 4 wherein the tissue/organ is a livestock or a human tissue/organ.
- 30
6. A method according to any of claims 1 to 5 wherein the tissue/organ is an tissue/organ in which prions accumulate.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

88

7. A method according to claim 6 wherein the tissue/organ is selected from brain, spleen,
lymph node or tonsil.
8. A method according to any preceding claim wherein the device comprises metal.
- 5 9. A method according to claim 8 wherein the metal comprises one or more metal(s) selected
from the group consisting of steel, stainless steel, silver, gold or combinations thereof.
- 10 10. A method according to claim 8 or claim 9 wherein the device(s) comprise one or more
wires.
11. A method for determining if a device is binding prions comprising the steps of:
- 15 contacting one or more test animal(s) with a device;
- incubating the test animal(s);
- monitoring the test animal(s) for adverse effects or death; and optionally
- 20 performing a biopsy on any test animal(s) that display adverse effects or death for
evidence of prions.
12. A method according to claim 11 wherein said device is contacted with one or more test
animals for 1 hour or more per test animal.
- 25 13. A method according to claim 12 wherein said device is contacted with one or more test
animals for 5 hours or more per test animal.
14. A method according to claim 13 wherein said device is contacted with one or more test
30 animals for more than 5 hours per test animal.
15. A method according to any one of claims 11 to 14 wherein the test animal(s) are
mammals.
- 35 16. A method according to claim 15 wherein the test animal(s) are mice.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

89

17. A method according to claim 16 wherein the test animal(s) are transgenic mice.
18. A method according to claim 17 wherein the transgenic mice comprise one or more PrP
5 transgene(s).
19. A method according to claim 18 wherein the PrP transgene(s) encode a mammalian PrP.
20. A method according to claim 19 wherein the PrP transgene(s) encode a livestock or a
10 human PrP.
21. A method for determining if a device is binding prions comprising the steps of:
- 15 (a) contacting a cell line with a device;
- (b) incubating the cell line; and
- (c) determining if the cell line contain prions.
- 20 22. A method according to claim 21 wherein it is determined if the cell line(s) contain prions
using a protein assay, an immunoassay, Western blotting or cell blotting.
23. A method for determining if a device is binding prions by detecting said prions directly on
the surface of said device.
25
24. A method according to claim 23 wherein it is determined if prions are bound to the surface
of said device using a protein assay, an immunoassay or Western blotting.
25. A method according to any of claims 1 to 24 wherein the device is contacted with the
30 tissue/organ for 120 minutes or less.
26. A method according to any of claims 1 to 24 wherein the device is contacted with the
tissue/organ for 30 minutes or less.

WO 02/059615

PCT/GB02/00257

90

27. A method according to any of claims 1 to 24 wherein the device is contacted with the tissue/organ for 5 minutes or less.

28. A device capable of binding prions, wherein said device comprises metal.

5

29. A device according to claim 28 wherein the device comprises any one or more metal(s) selected from the group consisting of steel, stainless steel, silver, gold or combinations thereof.

10

30. A device according to claim 28 or claim 29 wherein said device comprises one or more wires.

31. A device as defined in any one of claims 28 to 30, wherein prions are preserved when bound to said device.

15

20

25

30

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059615 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68
- (21) International Application Number: PCT/GB02/00257
- (22) International Filing Date: 22 January 2002 (22.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0101762.3 23 January 2001 (23.01.2001) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): MEDICAL RESEARCH COUNCIL [GB/GB]; 20 Park Crescent, London W1N 4AL (GB).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): ENARI, Masato [JP/JP]; National Cancer Center Research Institute, Radiobiology Division, Tsukiji 5-1-1, Chuo-ku, Tokyo 104-0045 (JP). FLECHSIG, Eckhard [DE/GB]; MRC Prion Unit/Department of Neurodegenerative Diseases, Institute of Neurology, University of London, Queen Square House, Queen Square, London WC1N 3BG (GB). WEISSMANN, Charles [CH/GB]; MRC Prion Unit, Institute of Neurology, Queen Square, London WC1N 3BG (GB). COLLINGE, John [GB/GB]; MRC Prion Unit, Institute of Neurology, Queen Square, London WC1N 3BG (GB).
- (74) Agents: HARDING, Charles, Thomas et al.; D Young & Co, 21 New Fetter Lane, London EC4A 1DA (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GM, GT, HN, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report:
13 March 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/059615 A3

(54) Title: METHOD FOR DETECTION OF THE PRESENCE OF PRION PROTEINS

(57) Abstract: The invention relates to methods for determining the presence of prions in a tissue/organ or fluid therefrom; said method comprising the steps of: contacting the tissue/organ with one or more devices, wherein said devices are capable of binding prions; removing said devices from contact with said tissue/organ; determining if said devices are binding prions wherein the device is contacted with the tissue/organ for 120 minutes.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 02/00257
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZOBELEY EVA ET AL: "Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface." MOLECULAR MEDICINE (NEW YORK), vol. 5, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 240-243, XP001119947 ISSN: 1076-1551 the whole document	1-11, 15, 16, 23-31
X	SERBAN D ET AL: "RAPID DETECTION OF CREUTZFELDT-JAKOB DISEASE AND SCRAPIE PRION PROTEINS" NEUROLOGY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, PHILADELPHIA, US, vol. 40, no. 1, January 1990 (1990-01), pages 110-117, XP001105804 ISSN: 0028-3878 the whole document	1-7, 23-27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone ** 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 *K* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
9 December 2002		09/01/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vanmontfort, D

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/GB 02/00257
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HILL A F ET AL: "Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples" LANCET, XX, XX, vol. 353, no. 9148, 16 January 1999 (1999-01-16), pages 183-189, XP004265850 ISSN: 0140-6736 the whole document ---	1-7, 23-27
X	US 6 008 435 A (SCOTT MICHAEL R ET AL) 28 December 1999 (1999-12-28) cited in the application column 15, line 25-46; claim 10; example 5 ---	11-20
X	BOSQUE PATRICK J ET AL: "Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 74, no. 9, May 2000 (2000-05), pages 4377-4386, XP002224177 ISSN: 0022-538X cited in the application the whole document ---	21, 22
X	GRATHWOHL K -U D ET AL: "Improvement of PrP-Sc-detection in mouse spleen early at the preclinical stage of scrapie with collagenase-completed tissue homogenization and Sarkosyl-NaCl extraction of PrP-Sc." ARCHIVES OF VIROLOGY, vol. 141, no. 10, 1996, pages 1863-1874, XP00119950 ISSN: 0304-8608 page 1865, paragraph 3 page 1867, paragraph 2; figure 2 page 1871, paragraph 2 ---	28
P,X	FLECHSIG ECKHARD ET AL: "Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions." MOLECULAR MEDICINE (BALTIMORE), vol. 7, no. 10, October 2001 (2001-10), pages 679-684, XP00119948 ISSN: 1076-1551 the whole document --- -/--	1-31

Form PCT/GB210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB 02/00257

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WEISSMANN CHARLES ET AL: "Molecular biology of prions." ACTA NEUROBIOLOGIAE EXPERIMENTALIS (WARSAW), vol. 62, no. 3, 2002, pages 153-166, XPO01119946 ISSN: 0065-1400 page 159, column 2, paragraph 1 -page 162, column 1, paragraph 2; figures 4-6; tables 1,2 -----	1-31

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1982)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/GB 02/00257

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6008435	A	28-12-1999	
		US 5792901 A	11-08-1998
		US 5908969 A	01-06-1999
		US 5763740 A	09-06-1998
		US 5565186 A	15-10-1996
		AU 752933 B2	03-10-2002
		AU 9295398 A	12-04-1999
		CA 2302836 A1	01-04-1999
		EP 1017795 A1	12-07-2000
		JP 2001517775 T	09-10-2001
		WO 9915640 A1	01-04-1999
		US 6020537 A	01-02-2000
		AU 710963 B2	30-09-1999
		AU 6642796 A	26-02-1997
		BR 9609969 A	12-01-1999
		EP 0868201 A1	07-10-1998
		JP 11510496 T	14-09-1999
		NZ 313887 A	28-01-1999
		US 6150583 A	21-11-2000
		WO 9704814 A1	13-02-1997
		US 5789655 A	04-08-1998
		AU 691277 B2	14-05-1998
		AU 2284195 A	05-12-1995
		BR 9507894 A	23-09-1997
		CA 2190160 A1	23-11-1995
		DE 759028 T1	25-10-2001
		EP 0759028 A1	26-02-1997
		JP 10503925 T	14-04-1998
		NZ 284278 A	24-09-1998
		WO 9531466 A1	23-11-1995

フロントページの続き

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

(72) 発明者 フレヒジグ エックハルド

イギリス国 ダブリュシー 1 エヌ 3 ビージー ロンドン クイーン スクエア クイーン スクエア
ハウス ユニバーシティ オブ ロンドン インスティテュート オブ ニューロロジ
ディパートメント オブ ニューロディジェネラティブ ディジーズ エムアールシー プリオン
ユニット

(72) 発明者 ヴァイスマン チャールズ

イギリス国 ダブリュシー 1 エヌ 3 ビージー ロンドン クイーン スクエア インスティテ
ュート オブ ニューロロジ エムアールシー プリオン ユニット

(72) 発明者 コリンジ ジョン

イギリス国 ダブリュシー 1 エヌ 3 ビージー ロンドン クイーン スクエア インスティテ
ュート オブ ニューロロジ エムアールシー プリオン ユニット

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ79 QR56 QS12 QS24 QS33 QS36
QS39 QX01

专利名称(译)	方法
公开(公告)号	JP2004530107A 公开(公告)日 2004-09-30
申请号	JP2002559681 申请日 2002-01-22
[标]申请(专利权)人(译)	医药研究委员会
申请(专利权)人(译)	医学研究理事会
[标]发明人	江成政人 フレヒジグエックハルド ヴァイスマンチャールズ コリンジジョン
发明人	江成 政人 フレヒジグ エックハルド ヴァイスマン チャールズ コリンジ ジョン
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02 G01N33/553 G01N33/68
CPC分类号	G01N33/553 G01N33/6896 G01N2800/2828
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/02
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR56 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01
优先权	2001001762 2001-01-23 GB
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明，在能够结合朊病毒的一个或多个装置被接触的组织/器官从与这样的组织/器官接触提取装置，朊病毒确定是否连接到装置由涉及一种用于确定在组织/器官或它们的液体朊病毒该方法包括将组织/器官接触和120分钟的装置的存在。

脂肪族	無極性	GAP
		ILV
	極性無電荷	CSTM
		NQ
	極性電荷	DE
		KR
芳香族		HFVY