

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4533750号
(P4533750)

(45) 発行日 平成22年9月1日(2010.9.1)

(24) 登録日 平成22年6月18日(2010.6.18)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68 Z N A
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02

請求項の数 40 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-539916 (P2004-539916)	(73) 特許権者	505153960
(86) (22) 出願日	平成15年9月26日 (2003.9.26)		アイデックス ラボラトリーズ インコーポレーティッド
(65) 公表番号	特表2006-507484 (P2006-507484A)		アメリカ合衆国 メイン州 ウェストブルック アイデックス ドライブ 1
(43) 公表日	平成18年3月2日 (2006.3.2)	(74) 代理人	100102978
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/030273		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開番号	W02004/029072	(74) 代理人	100128048
(87) 国際公開日	平成16年4月8日 (2004.4.8)		弁理士 新見 浩一
審査請求日	平成18年9月15日 (2006.9.15)	(72) 発明者	フランクル グレイグ (死亡)
(31) 優先権主張番号	10/256,538		アメリカ合衆国 メイン州 ノース ヤーマス フォール ライン ロード 54
(32) 優先日	平成14年9月27日 (2002.9.27)	(72) 発明者	キャッシュマン ニール
(33) 優先権主張国	米国 (US)		カナダ国 オンタリオ州 トロント ディーンウッド クレセント 14
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PrP^{Sc}相互作用分子とその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物試料中のプリオンタンパク質の異常なイソ型を検出するための方法であって、次の工程を含む方法：

(a) プリオンタンパク質の異常なイソ型またはその断片に選択的に結合するペプチドであって、YYXXYYXYY (配列番号1)、YYRRYYRY (配列番号2)、YYAAYYAYY (配列番号3)、YSAASYASY (配列番号4)、YARYARYAR (配列番号7)、YRAARYRAY (配列番号8)、YARRAYRAY (配列番号5)、またはこれらの組合せを含む25以下のアミノ酸からなるペプチドを、該ペプチドとプリオンタンパク質の異常なイソ型またはその断片の複合体形成を可能とする条件下において該生物試料に接触させる工程、および

(b) 該プリオンタンパク質の異常なイソ型が該生物試料中に存在することを示す指標として該複合体を検出する工程。

【請求項 2】

ペプチドが実質的にPrP^Cに結合しない、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

ペプチドが9~20アミノ酸の長さである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

生物試料が組織もしくは細胞、組織もしくは細胞抽出物、体液、または生検材料である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

10

20

生物試料がヒト、家畜またはペットに由来する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

ペプチドが共有結合により検出可能な標識に共役する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

ペプチドが共有結合により固体支持体または担体に共役する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

複合体が、ELISA、RIA、ウェスタンブロッティング、免疫沈降法、蛍光偏光法またはフローサイトメトリーを用いて検出される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

生物試料中のプリオンタンパク質の異常なイソ型が増幅されたプリオンタンパク質の異常なイソ型である、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 10】

非ヒト哺乳動物におけるプリオン病を診断するための方法であって、次の工程を含む方法：

(a) プリオンタンパク質の異常なイソ型またはその断片に選択的に結合するペプチドであって、YYXXYYXY (配列番号1)、YRRYYRY (配列番号2)、YAAYYAYY (配列番号3)、YSAASYASY (配列番号4)、YARYARYAR (配列番号7)、YRAARYRAY (配列番号8)、YARRAYRAY (配列番号5)、またはこれらの組合せを含む25以下のアミノ酸からなるペプチドを、該ペプチドとプリオンタンパク質の異常なイソ型またはその断片の複合体形成を可能とする条件下において該非ヒト哺乳動物の生物試料に接触させる工程、および

20

(b) 存在すれば該非ヒト哺乳動物におけるプリオン病を示す該複合体を検出する工程。

【請求項 11】

プリオン病がウシ海綿状脳症、スクレイピー、伝染性海綿状脳症および慢性消耗病からなる群から選択される、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

ペプチドが実質的にPrP^Cに結合しない、請求項 10 記載の方法。

【請求項 13】

生物試料が組織もしくは細胞、組織もしくは細胞抽出物、体液、または生検材料である、請求項 10 記載の方法。

【請求項 14】

生物試料が家畜またはペットに由来する、請求項 10 記載の方法。

30

【請求項 15】

ペプチドが検出可能な物質と共有結合により共役する、請求項 10 記載の方法。

【請求項 16】

ペプチドが固体支持体と共有結合により共役する、請求項 10 記載の方法。

【請求項 17】

複合体が、ELISA、RIA、ウェスタンブロッティング、免疫沈降法、蛍光偏光法またはフローサイトメトリーを用いて検出される、請求項 10 記載の方法。

【請求項 18】

非ヒト哺乳動物へ、YYXXYYXY (配列番号1)、YRRYYRY (配列番号2)、YAAYYAYY (配列番号3)、YSAASYASY (配列番号4)、YARYARYAR (配列番号7)、YRAARYRAY (配列番号8)、YARRAYRAY (配列番号5)、またはこれらの組合せを含む25以下のアミノ酸からなるペプチドであって、該ペプチドとプリオンタンパク質の異常なイソ型またはその断片の複合体形成を可能とする条件下において薬学的に許容される担体中でプリオンタンパク質の異常なイソ型またはその断片に選択的に結合するペプチドの有効量を投与する工程を含む、非ヒト哺乳動物におけるプリオン病を治療または予防するための方法。

40

【請求項 19】

プリオン病がウシ海綿状脳症およびスクレイピーからなる群から選択される、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

50

ペプチドが実質的にPrP^Cに結合しない、請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 1】

生物試料中のプリオンタンパク質の異常なイソ型を阻害する方法であって、プリオンタンパク質の異常なイソ型またはその断片と選択的に結合するペプチドであって、YYXXYYXY Y (配列番号1)、YRRYYRY (配列番号2)、YAAAYYAYY (配列番号3)、YSAASYASY (配列番号4)、YARYARYAR (配列番号7)、YRAARYRAY (配列番号8)、YARRAYRAY (配列番号5)、またはこれらの組合せを含む25以下のアミノ酸からなるペプチドを用いて、該ペプチドとプリオンタンパク質の異常なイソ型またはその断片の複合体形成を可能とする条件下において該ペプチドおよびプリオンタンパク質の異常なイソ型を含む複合体形成を可能とする十分な期間にわたってその生物試料を処理する工程を含む方法。

10

【請求項 2 2】

生物試料が体液、組織または臓器である、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

生物試料がペプチドで灌流される、請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 4】

ペプチドが実質的にPrP^Cに結合しない、請求項 2 2 記載の方法。

【請求項 2 5】

生物試料からプリオンタンパク質の異常なイソ型を汚染除去するための方法であって、次の工程を含む方法：

- (a) プリオンタンパク質の異常なイソ型またはその断片と選択的に結合するペプチドであって、YYXXYYXY (配列番号1)、YRRYYRY (配列番号2)、YAAAYYAYY (配列番号3)、YSAASYASY (配列番号4)、YARYARYAR (配列番号7)、YRAARYRAY (配列番号8)、YARRAYRAY (配列番号5)、またはこれらの組合せを含む25以下のアミノ酸からなるペプチドを用いて、該ペプチドとプリオンタンパク質の異常なイソ型またはその断片の複合体形成を可能とする条件下において該ペプチドおよびプリオンタンパク質の異常なイソ型を含む複合体形成を可能とする十分な期間にわたってその生物試料を処理する工程；および
- (b) 該生物試料から該複合体を除去する工程。

20

【請求項 2 6】

生物試料が組織、体液または臓器である、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 7】

生物試料がペプチドで灌流される、請求項 2 5 記載の方法。

30

【請求項 2 8】

ペプチドが実質的にPrP^Cに結合しない、請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 2 9】

プリオン病の治療のための物質を同定する方法であって、次の工程を含む方法：

- (a) プリオンタンパク質の異常なイソ型またはその断片に選択的に結合するペプチドであって、YYXXYYXY (配列番号1)、YRRYYRY (配列番号2)、YAAAYYAYY (配列番号3)、YSAASYASY (配列番号4)、YARYARYAR (配列番号7)、YRAARYRAY (配列番号8)、YARRAYRAY (配列番号5)、またはこれらの組合せを含む25以下のアミノ酸からなるペプチド、プリオンタンパク質の異常なイソ型および物質を、該ペプチドおよび該プリオンタンパク質の異常なイソ型の複合体形成を可能とする条件下において混合する工程；および
- (b) 該物質の非存在下における複合体形成に比較して複合体形成が増加または減少するかどうかを調べて、それによって該プリオン病を治療するための物質を同定する工程。

40

【請求項 3 0】

プリオン病が変異型クロイツフェルト・ヤコブ病、ウシ海綿状脳症およびスクレイピーからなる群から選択される、請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 1】

ペプチドが実質的にPrP^Cに結合しない、請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 2】

プリオン病がヒト、家畜またはペットに罹患する、請求項 2 9 記載の方法。

50

【請求項 33】

プリオン病がヒト、ウシ、ヒツジまたはヤギに罹患する、請求項 29 記載の方法。

【請求項 34】

物質が複合体形成を増加させる、請求項 29 記載の方法。

【請求項 35】

物質が複合体形成を減少させる、請求項 29 記載の方法。

【請求項 36】

生物試料中のプリオンタンパク質の異常なイソ型を検出するための装置であって、試料中の分析物を捕集するためのペプチドが予め定められた量で含まれるペプチド固定部分を含む装置であって、該ペプチドがYYXXYYXY (配列番号1)、YRRYYRY (配列番号2)、YYAAYY (配列番号3)、YSAASY (配列番号4)、YARYARY (配列番号7)、YRAARYRAY (配列番号8)、YARRAYRAY (配列番号5)、またはこれらの組合せを含む25以下のアミノ酸からなるペプチドである装置。

10

【請求項 37】

ペプチドが18またはそれよりも少ないアミノ酸から構成される、請求項 36 記載の装置。

【請求項 38】

ペプチドが12またはそれよりも少ないアミノ酸から構成される、請求項 36 記載の装置。

【請求項 39】

分析物が体液である、請求項 36 記載の装置。

20

【請求項 40】

生物試料中のプリオンタンパク質の異常なイソ型またはその断片に特異的な抗体を検出するための方法であって、次の工程を含む方法：

(a) プリオンタンパク質の異常なイソ型またはその断片に特異的な抗体と選択的に結合するペプチドであって、YYAAYY (配列番号3)、YSAASY (配列番号4)、YARYARY (配列番号7)、YRAARYRAY (配列番号8)、YARRAYRAY (配列番号5)、またはこれらの組合せを含む25以下のアミノ酸からなるペプチドを、該ペプチドとプリオンタンパク質の異常なイソ型に特異的な抗体の複合体形成を可能とする条件下において該生物試料に接触させる工程、および

30

(b) プリオンタンパク質の異常なイソ型に特異的な抗体が該生物試料中に存在することを示す指標として該複合体を検出する工程。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

発明の背景

本発明は、本明細書において総称してPrP^{S^c}と呼ばれるプリオンタンパク質の疾患特異的な異常なイソ型に選択的に結合してPrP^Cと呼ばれるこのタンパク質の正常なイソ型には結合しない分子(例えば、ペプチド)に関する。これらの分子は試料中におけるPrP^{S^c}の検出およびPrP^{S^c}の精製に有用である。さらに、本発明はPrP^{S^c}検出のための診断用補助剤、正常なPrP^Cの疾患特異的PrP^{S^c}への動員を阻害する医薬品、およびプリオン汚染除去のための方法に関する。

40

【0002】

プリオン病は進行が早く、致命的で、治療不可能な一連の神経変性症候群である。ヒトプリオン病には古典的なクロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)が含まれて、これには散発型、医原型および家族型がある。ごく最近、ウシ海綿状脳症(「BSE」; Cashman, Can. Med. Assoc. J. 157:1381-5, 1997においてレビュー; Coulthart and Cashman, Can. Med. Assoc. J. 165:51-8, 2001)の病原体に汚染されたウシ組織の摂取に由来する可能性が高い変異型CJD(vCJD)がイギリス、フランス、アイルランド、香港、イタリアおよび米国で認識されている(Will et al., Lancet 347:921-25, 1996; Collinge, Lancet 354:3

50

17-23, 1999)。イギリスを中心として173,000頭を超えるウシが症候性BSEを発症していて、おそらくさらに数千頭のウシが検出されずに食料供給に回されているであろう。vCJDの主な流行は、疾患の潜伏期などのあまり理解されていない様々な仮定に基づいて、感染患者は数万から数十万人の範囲であると予想されている。さらに、古典的CJDは汚染された遺体の下垂体ホルモン、硬膜移植、神経外科的器具使用、および角膜移植によってヒトからヒトに偶発的に伝達されている (Brown et al., *Neurology* 55:1075-8, 2000)。現在、血液および血液製剤、一般外科、歯科、ワクチン、ならびに化粧品を介してのvCJDの「二次流行」を除外することはできない。マウスおよびヒツジの実験的BSE/vCJD感染では血中プリオン感染性が検出されるが (Taylor et al., *J. Hosp. Infect.* 46:78-9, 2000; Houston et al., *Lancet* 356:999-1000, 2000) 古典的CJDでは検出されないことは (Ricketts et al., *Emerg. Infect. Dis.* 3:155-63, 1997)、vCJDの血液および血液製剤を介しての伝播に関する特別なリスクを示唆している。米国およびカナダでは、現在、BSEの流行期間中にイギリスに居住した個人について血液提供据置期間を設けており、カナダではフランスからのドナーについても据え置いている。現在、米国およびカナダでは、西ヨーロッパに拡大したドナー据置期間が実施されている。

【 0 0 0 3 】

プリオンは上記の伝染性海綿状脳症に関連する感染性物質である。プリオン病は、海綿状変化 (例えば、通常は主として灰白質における脳の微小腔所形成)、神経細胞の消失、神経細胞消失とは不均衡な星状細胞増殖、および時に脳の離散性プラークにおける異常なアミロイド形成性タンパク質の蓄積を特徴とする神経変性症候群である。これらの疾患を伝播する物質は、核酸成分に関する化学的または物理的証拠が感染性物質中に再現性をもって検出されていない点でウイルスおよびウイロイドとは大きく異なる (Prusiner, *Science* 216: 136-144, 1982)。スクレイピープリオンモデルに関する試験の重要な工程は、スクレイピー関連プリオンタンパク質 (PrP^{Sc}) と呼ばれるタンパク質の発見および精製であった (Bolton et al., *Science* 218:1309-11, 1982; Prusiner et al., *Biochemistry* 21:6942-50, 1982; McKinley et al., *Cell* 35:57-62, 1983)。プロテイナーゼK消化を用いた精製時に、スクレイピーに感染したハムスターの脳において27~30kDのプロテアーゼ抵抗性タンパク質が発見されて、PrP²⁷⁻³⁰と命名され、後にPrP^{Sc}の断片であることが明らかとなった (Bolton et al., *Science* 218:1309-1311, 1982)。

【 0 0 0 4 】

プリオン仮説によると、プリオン感染性はPrP^{Sc}または関連する配座中間体に存在する。PrP^{Sc}はプリオン感染性調製物における最も顕著な (またはおそらく唯一の) 高分子であり、大半のプリオン感染における少なくとも信頼できる代理物であると思われる。PrP^{Sc}はPrP^Cと呼ばれる宿主がコードする細胞性タンパク質の配座変異型であり (Oesch et al., *Cell* 40:735-746, 1985)、これは分子量33~35kDのグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) 関連細胞表面タンパク質である。PrP^Cは正常な脳から単離されていて、プロテアーゼ感受性であり、スクレイピー病誘発活性には関連しないことが明らかとなっている (Bolton and Bendheim *Ciba Found. Symp.* 135:164-177, 1988)。プリオン説によると、PrP^CはPrP^{Sc}との接触によって開始される鋳型指向性プロセスにおいてPrP^{Sc}へと変化する (Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 95:13363-83, 1998)。

【 0 0 0 5 】

PrP^Cは進化的に保存された膜タンパク質であり、その実際の生物学的または生理学的機能は不明である。PrP^Cを持たないマウスは生存可能であり、一部のPrPノックアウトマウスの系統においてプリオン類似タンパク質のドッペル (doppel) の脳におけるアップレギュレートに起因する運動失調症候群を除いて (Moore et al., *J. Mol. Biol.* 292:797-817, 1999)、神経学的および身体的障害の明らかな徴候を示さない (Bueler et al., *Nature* 356:577-582, 1992)。Prnpノックアウトマウスはプリオン感染に対して非感受性であり、感染性の複製におけるPrP^Cの中心的意義を強調している (Bueler et al., *Cell* 73:1339-1347, 1993; Prusiner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90:10608-10612, 1993)。Prnpノックアウトマウスに関する標的化した研究の結果、シナプス機能の障害 (Col

10

20

30

40

50

linge et al., Nature 370: 295-297, 1994) および睡眠調節の変化 (Tobler et al., J. Neurosci. 17:1869-79, 1997) が明らかとなった。さらに、細胞表面での抗体介在性の PrP^C のライゲーションが T 細胞活性化を抑制することが示されていて (Cashman et al., Cell 61:185-192, 1990; Li et al., Cell. Immunol. 207:49-58 2001)、このタンパク質の免疫機能における役割が示唆される。

【0006】

プリオン病に罹患した動物およびヒトの到達可能な末梢の組織および臓器には、PrP^C が PrP^{Sc} よりも多量に存在する。従って、PrP^{Sc} と PrP^C を識別する試薬が使用できることは、試料採取にとって到達可能な血液またはその他の組織におけるプリオン感染に関する試験の開発において非常に価値がある。さらに、BSE および vCJD の流行性の見地から、プリオン病を予防および/または治療する治療用物質には差し迫った必要性がある。従って、当技術分野ではプリオンの存在についての試料の検査、プリオン病を治療するための方法、さらに抗プリオン医薬品および汚染除去剤開発の必要性がある。

10

【発明の開示】

【0007】

発明の概要

以下に極めて詳細に述べられる通り、本発明者らは生物学的液体および組織中に、通常、極めて過剰に存在する正常なイソ型は結合しないでこれらの配座的に異常なイソ型に対して選択的に結合する PrP^{Sc} (およびそのプロテアーゼ抵抗性断片である PrP27-30) の特有の物理化学的特性を利用するための方法を開発した。

20

【0008】

従って、本発明は、表面疎水性、電荷相互作用、および PrP^{Sc} との親和性反応においてペプチドのシート転換能を利用して PrP^{Sc} に選択的に結合する分子 (例えば、ペプチド) を同定するための方法に関する。例えば、ペプチドのようなこれらの分子のサブセットは、プリオンタンパク質配列自体内のアミノ酸配列によって、および/または進化的に保存されたこれらの配列に対するアミノ酸置換によって定義される。その他のペプチドは、疎水性相互作用、パイスタッキング、またはシート相互作用のような物理化学的相互作用に基づいて (YYX アミノ酸残基を含むタンパク質領域のような) PrP^{Sc} の領域に選択的に結合するペプチドである。PrP^{Sc} に選択的に結合するペプチドは環化によって、また酸化時にジスルフィド結合を形成するためにシステインを導入してヘアピンまたはループを形成することによって拘束される可能性がある。プリオン感染の診断試験における用途において、ペプチドはアガロースビーズ、磁気ビーズ、または ELISA プレートのような固体基質に共有結合により結合して、PrP^{Sc} を含む試料と反応し、(プロテイナーゼ K を用いたまたは用いない) 洗浄によって PrP^C を除去することが可能であり、結合型 PrP^{Sc} の検出は PrP^{Sc} 特異的抗体を用いて、または非特徴的な抗体もしくは PrP^{Sc} および PrP^C の双方に結合する分子を用いて効率的かつ特異的に実施することができる。このようなペプチドは、生物試料からの PrP^{Sc} の濃縮においても有用である。

30

【0009】

本発明のペプチドは、治療、診断または汚染除去の目的に適している。好ましい態様において、このペプチドの分子量は約 40,000 ダルトンから約 300 ダルトンである。その他のペプチドは、例えば 30,000 ~ 約 1,000 ダルトン、または約 20,000 ~ 約 2,000 ダルトンのより狭い範囲である可能性がある。本発明のペプチドは、当技術分野において既知の標準的方法に従って合成することができる。

40

【0010】

関連する態様において、本発明は本明細書に述べられるように検出可能に標識されたペプチドに方向付けられて、好ましくはそのペプチドは共有結合により連結した検出可能な標識を持つ。

【0011】

さらにその他の態様において、そのペプチドは有効表面機能性を「増幅」するために用いることのできるポリ(リシン)のような多くの側鎖アミンを持つスペーサーに結合され

50

る。多価抗原ペプチド系（「MAPS」）のペプチドは、一般に分枝リシンコアマトリックスから構成される（Tam, Proc Natl Acad Sci USA 85: 5409-13, 1988; Tam and Zevala, J. Immunol Methods 124: 53-61, 1989; Tam, J. Immunol Methods 196: 17-32, 1996）。分枝リシンコアは、本明細書に述べられる任意のペプチドの多くのコピーを支持するための足場を提供する。

【0012】

従って、第一の局面において、本発明はPrP^Sまたはその断片に結合するペプチドを同定するための方法の特徴とする。この方法は、(a) 約200またはそれよりも少ないアミノ酸のペプチドをそのペプチドとPrP^Sまたはその断片の複合体形成を可能とする条件下においてPrP^Sポリペプチドまたはその断片と接触させる工程、および(b) 複合体の存在によってそのペプチドがPrP^Sまたはその断片に選択的に結合するものとして同定される複合体を検出する工程を含む。好ましい態様において、その複合体はELISA、RIA、ウェスタンブロッティング、免疫沈降法、蛍光偏光法、またはフローサイトメトリーを用いて検出される。

10

【0013】

好ましい態様において、そのペプチドはPrPの断片である。さらなる好ましい態様において、そのペプチドは100~150アミノ酸の鎖長、より好ましくは50~100アミノ酸、または25~50アミノ酸、最も好ましくは9~25アミノ酸の範囲であることができる。ペプチドは、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、またはデカペプチドであることもできる。

20

【0014】

第一の局面の好ましい態様において、そのペプチドはYYX（但し、Xは任意のアミノ酸）またはYSAモチーフを含むことができ、そのモチーフはペプチド内において（例えば、直列に）繰り返すことができる。YYXモチーフはYYR、YYD、YYAおよびYYQのアミノ酸を含むことができる。ペプチドは

YYXXYYXYY (SEQ ID NO: 1)

（ここでXは任意のアミノ酸）モチーフを含む。

YYXXYYXYY

30

モチーフを持つペプチドの例は、

YYRRYYRYY (SEQ ID NO: 2)

のペプチドである。

【0015】

さらなる好ましい態様において、そのペプチドは、例えば4-mapまたは8-mapの足場物質に結合する。そのペプチドは共有結合により検出可能物質、固形支持体、または担体に結合することもできる。

【0016】

本発明は、生物試料中のPrP^Sを検出するための方法の特徴とする。この方法は、(a) ペプチドとPrP^Sポリペプチドまたはその断片の複合体形成を可能とする条件下において生物試料をPrP^Sまたはその断片に選択的に結合する約200またはそれよりも少ないアミノ酸のペプチドと接触させる工程、および(b) PrP^Sがその生物試料中に存在することの指標である複合体を検出する工程を含む。

40

【0017】

好ましい態様において、そのペプチドは実質的にPrP^Cには結合しない。そのペプチドは9~20アミノ酸の長さであることが可能であり、YYX、

YYXXYYXYY

またはYSAモチーフを含むことができる。YYXモチーフの好ましい配列は、YYR、YYD、YYA

50

およびYYQである。好ましい態様において、YYX配列を含むペプチドは共有結合により検出可能な標識に結合される。YYXまたはYSAモチーフを含むペプチドは、共有結合により固体支持体または担体に結合することもできる。

【0018】

生物試料は、任意の組織もしくは細胞、組織もしくは細胞抽出物、体液、または生検材料を含む。好ましい態様において、PrP^{S^c}はヒト、家畜、またはペットに由来する。さらなる好ましい態様において、生物試料に由来するPrP^{S^c}は増幅されたPrP^{S^c}である。好ましい検出方法には、ELISA、RIA、ウェスタンブロッティング、免疫沈降法、蛍光偏光法およびフローサイトメトリーが含まれる。

【0019】

本発明は、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病、ウシ海綿状脳症、スクレイピー、伝染性海綿状脳症および慢性消耗病のようなプリオン病の診断方法も含む。この方法は、(a) ペプチドとPrP^{S^c}ポリペプチドまたはその断片の複合体形成を可能とする条件下において哺乳動物に由来する生物試料をPrP^{S^c}に選択的に結合する約200またはそれよりも少ないアミノ酸のペプチドと接触させる工程、および(b) 存在する場合は哺乳動物におけるプリオン病を示す複合体を検出する工程を含む。

【0020】

好ましい態様において、そのペプチドは実質的にPrP^Cに結合しない。さらなる好ましい態様において、そのペプチドはYYX、YSAまたはYARモチーフを含んで、YYXモチーフはYYR、YYD、YYAおよびYYQからなる群から選択される。YYXモチーフを含むペプチドは、任意で共有結合により検出可能物質または固体基質に結合することができる。

【0021】

診断方法に関して、生物試料は組織もしくは細胞、組織もしくは細胞抽出物、体液、または生検材料を含み、PrP^{S^c}はヒト、家畜またはペットに由来する。複合体の検出は、好ましくは、ELISA、RIA、ウェスタンブロッティング、免疫沈降法、蛍光偏光法またはフローサイトメトリーの使用を介して達成される。

【0022】

本発明は、哺乳動物におけるプリオン病の治療または予防のための方法も特徴とする。この方法は、ペプチドとPrP^{S^c}ポリペプチドまたはその断片の複合体形成を可能とする条件下において薬学的に許容される担体中でPrP^{S^c}またはその断片に選択的に結合する約200またはそれよりも少ないアミノ酸のペプチドの有効量を哺乳動物に投与する工程を含む。プリオン病は、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病、ウシ海綿状脳症、およびスクレイピーからなる群から選択することができる。

【0023】

好ましい態様において、そのペプチドは実質的にPrP^Cに結合しない。好ましくはそのペプチドはYYXまたはYSAモチーフを含んで、YYXモチーフは、YYR、YYD、YYAおよびYYQからなる群から選択される。

【0024】

本発明のさらなる特徴は、生物試料中のPrP^{S^c}を阻害する方法を含む。この方法は、ペプチドとPrP^{S^c}ポリペプチドまたはその断片の複合体形成を可能とする条件下において、そのペプチドおよびPrP^{S^c}を含む複合体の形成を可能とする十分な期間にわたって、PrP^{S^c}またはその断片と選択的に結合する約200またはそれよりも少ないアミノ酸のペプチドを用いてその生物試料を処理する工程を含む。

【0025】

好ましい態様において、生物試料は体液、組織または臓器である。好ましくはその生物試料はそのペプチドで灌流されて、好ましい態様においてそのペプチドは実質的にPrP^{S^c}と結合しない。

【0026】

本発明は、生物試料由来のPrP^{S^c}を汚染除去するための方法も特徴とする。この方法は、(a) ペプチドとPrP^{S^c}ポリペプチドまたはその断片の複合体形成を可能とする条件下に

10

20

30

40

50

において、ペプチドおよびPrP^{S^c}を含む複合体の形成を可能とする十分な期間にわたってPrP^{S^c}またはその断片に選択的に結合する約200またはそれよりも少ないアミノ酸のペプチドを用いてその生物試料を処理する工程、および(b)その生物試料から複合体を除去する工程を含む。その生物試料は、好ましくは、組織、体液または臓器であり、ペプチドで灌流される。

【0027】

好ましい態様において、そのペプチドは実質的にPrP^Cに結合しない。さらなる好ましい態様において、そのペプチドはYYXまたはYSAモチーフを含んで、YYXモチーフはYYR、YYD、YYAおよびYYQからなる群から選択される。

【0028】

本発明は、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病、ウシ海綿状脳症およびスクレイピーからなる群から選択されるプリオン病の治療のために物質を同定する方法も特徴とする。この方法は、(a) PrP^{S^c}またはその断片に選択的に結合する約200またはそれよりも少ないアミノ酸のペプチド、PrP^{S^c}および物質を、そのペプチドおよびPrP^{S^c}の複合体形成を可能とする条件下において結合させる工程、ならびに(b)その物質の非存在下における複合体形成に比較して複合体形成が増加または減少するかどうかを調べて、それによってプリオン病を治療するための物質を同定する工程を含む。用いられる物質は複合体形成を減少または増加させることができる。

【0029】

好ましい態様において、プリオン病はヒト、家畜またはペットに罹患する。そのプリオン病に罹患することのできる動物の非限定的な例には、ヒト、ウシ、ヒツジまたはヤギが含まれる。

【0030】

好ましい態様において、そのペプチドは実質的にPrP^Cに結合しない。さらなる好ましい態様において、そのペプチドはYYXまたはYSAモチーフを含み、ここでYYXモチーフはYYR、YYD、YYAおよびYYQからなる群から選択される。

【0031】

本発明は、生物試料中のPrP^{S^c}を検出するための装置も特徴とする。その装置は、試料中のかなりの量の分析物を捕集するためのペプチドが予め定められた量で含まれるペプチド固定部分を含む。この局面の好ましい態様において、分析物は体液である。

【0032】

好ましい態様において、そのペプチドはYYX、YYR、YYDまたはYYQのアミノ酸配列を含み、かつ、PrP^{S^c}のように抗原性を持つ。そのペプチドは
YYRRYYRYY

またはYYRのアミノ酸配列を持つこともできる。そのペプチドは18またはそれよりも少ないアミノ酸を含み、好ましくは12またはそれよりも少ないアミノ酸、より好ましくは8またはそれよりも少ないアミノ酸、最も好ましくは5またはそれよりも少ないアミノ酸を含む。

【0033】

本発明は、生物試料中の抗PrP^{S^c}抗体を検出するための方法も特徴とする。この方法は、(a) ペプチドと抗PrP^{S^c}抗体の複合体形成を可能とする条件下においてその生物試料をPrP^{S^c}またはその断片に選択的に結合する約200またはそれよりも少ないアミノ酸のペプチドと接触させる工程、および(b)抗PrP^{S^c}抗体がその生物試料中に存在することを示す指標である複合体を検出する工程を含む。

【0034】

「ペプチド」は、ペプチド(即ち、アミド)結合によって連結したアミノ酸残基の鎖を含む分子を意味して、タンパク質およびポリペプチドを含む。ペプチドは、配座嗜好性を持ち、三次元構造を示すと予想することができる。配座嗜好性および三次元構造はいずれも、典型的には、そのポリペプチドの一次(即ち、アミノ酸)配列および/またはジスル

10

20

30

40

50

フィド結合またはその他の共有もしくは非共有結合による鎖内または鎖間相互作用の存在（または不在）によって定義される。本発明の例示的ペプチドは、200またはそれよりも少ないアミノ酸の鎖を持つペプチドである。その他のペプチドは3~100アミノ酸または9~25アミノ酸の範囲である。例示的ペプチドはPrPから得られて、典型的にはYYX、YYR、YYQ、YYDまたはYSAのようなコンセンサス配列を含む。そのペプチドは、所望ならば、固定化したPrP^{Sc}（またはPrP^{Sc}断片）に対するアフィニティープローブとして用いるために検出可能な標識に（例えば、共有結合によって）結合させることができる。その他のペプチドは、例えばアミノ酸残基YYXを含むPrP^{Sc}の領域に対する物理化学的相互作用に基づいてPrP^{Sc}に特異的に結合する任意のアミノ酸配列であることができる。以下に詳細に開示される通り、本発明は、PrP^{Sc}タンパク質に特異的に結合して、好ましくは固有の非変性PrP^{Sc}タンパク質に対して高親和性に結合するペプチドを提供する。このような親和性の測定を実施するための標準的手法は当技術分野において既知であり、本発明のペプチドのPrP^{Sc}への結合における親和性を測定するためにそのまま応用することができる。本発明の好ましいペプチドは、PrP^{Sc}には特異的に結合するがPrPに対しては実質的に結合しないペプチドである。

【0035】

ペプチドとPrP^{Sc}（またはその断片）の間の選択的結合親和性は、一般に約1nMから約1mMの範囲内である。本発明の好ましい態様において、選択的結合は約10nM~約100μMの程度であり、より好ましくは約100nM~約10μMの程度であり、最も好ましくは約100nM~約1μMの程度である。

【0036】

より安定なペプチドを作製するために、コンセンサス配列の一つまたはいくつかのアミノ酸の同一タイプのアミノ酸D体（例えば、L-リシンの代わりにD-リシン）による系統的置換を用いることもできる。さらに、例えば本明細書に述べられるコンセンサス配列または実質的に同一のコンセンサス配列変異を含むいわゆる拘束条件付きペプチドは、例えば、Tam et al. (Eur. J. Biochem. 267:3289-3300, 2000) が述べたようにペプチドを環化する分子内ジスルフィド架橋を形成することのできる内部システイン残基を加えることによって、当技術分野の既知の方法により作製することができる。環化の一般的機序は、Houston et al. (J. Peptide Res. 52:81-88, 1998) に示される通り、側鎖-側鎖の環化または側鎖-末端基の環化も含む。この目的のため、アミノ酸側鎖は結合して一つとなるか、またはペプチド骨格に結合される。もう一つの一般的環化は、Kondejewski et al. (J. Biol. Chem. 274: 13181-13192, 1999) に示されるような末端基-末端基の環化である。

【0037】

「検出可能な標識」は、本発明のペプチドに共有結合によって接続した際にそのペプチドの検出を可能とする物質を意味する。適切な検出可能な標識は当技術分野において周知であり、例としてラジオアイソトープ、蛍光標識（例えば、フルオレセイン）、酵素、エピトープタグ（例えば、FLAGおよびMyc）などが含まれる。適切な酵素の例には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれる。適切な補欠分子族複合体の例にはストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれる。適切な蛍光物質の例にはウンベリフェロン、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、フルオレセインジクロロトリアジニルアミン、塩化ダンシル、またはフィコエリトリンが含まれる。発光物質の例にはルミノールが含まれる。生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが含まれる。適切な放射性物質の例には¹²⁵I、¹³¹I、¹¹¹Inまたは⁹⁹Tcが含まれる。用いられる特定の検出可能な標識は重要ではない。このような因子に対する標識の選択は十分に当技術分野の範囲内である。検出可能な標識のペプチドに対する共有結合による接続は、当技術分野において周知である一般的な方法によって実施される。例えば、¹²⁵Iラジオアイソトープを検出可能な標識として用いる場合、¹²⁵Iのペプチドに対する共有結合による接続はそのペプチド内にアミノ酸であるチロシンが取り込まれて、その結果、そのペプチドがヨウ化されることによって達成することができる。

ペプチド内にチロシンがない場合は、周知の化学反応によってペプチドのNまたはC末端へのチロシンの取り込みを達成することができる。同様に、³²Pは、例えば一般的な化学反応を用いてペプチドのヒドロキシル基を介してリン酸分子としてペプチドに取り込まれることができる。本発明のペプチドを検出可能に標識するためのその他の方法は、当技術分野において周知である。

【0038】

「プリオン病」は、プリオンに介在される、進行の早い、致命的で治療不可能な一群の脳の変性疾患を意味して、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)、変異型CJD、医原性CJD、家族性CJD、クールー病、ゲルストマン・シュトロイスラー症候群、およびヒトにおける致命的家族性不眠症(Prusiner, Science 252: 1515-1522, 1991)、ヒツジおよびヤギにおけるスクレイピー、ならびにウシにおける海綿状脳症、さらに最近報告されたその他の反芻動物およびネコにおけるプリオン病(例えば、Pattison, Emerg. Infect. Dis. 4: 390-394, 1998を参照されたい)などが含まれる。

10

【0039】

「プリオン病の治療」は、プリオン病、特に海綿状変化、神経細胞消失、星状細胞増殖、PrP^{Sc}タンパク質の蓄積、痴呆または死亡に至るプリオン病に伴う症状の発現を抑制、予防、安定化または遅延する能力を意味する。

【0040】

「YYX」は、チロシン-チロシン-Xの配列を持つペプチドを意味して、ここでXは任意のアミノ酸である。「YYR」はチロシン-チロシン-アルギニンの配列を持つペプチドを意味する。「YYQ」は「チロシン-チロシン-グルタミン」の配列を持つペプチドを意味する。「YYD」は「チロシン-チロシン-アスパラギン酸」の配列を持つペプチドを意味する。「YSA」はチロシン-セリン-アラニンの配列を持つペプチドを意味する。「YYA」は「チロシン-チロシン-アスパラギン酸」の配列を持つペプチドを意味する。「YYRRYYRY」は「チロシン-チロシン-アルギニン-アルギニン-チロシン-チロシン-アルギニン-チロシン-チロシン」の配列を持つペプチドを意味する。

20

【0041】

ペプチドのアミノ酸残基は次のように略記する：フェニルアラニンはPheまたはFとする；ロイシンはLeuまたはLとする；イソロイシンはIleまたはIとする；メチオニンはMetまたはMとする；バリンはValまたはVとする；セリンはSerまたはSとする；プロリンはProまたはPとする；スレオニンはThrまたはTとする；アラニンはAlaまたはAとする；チロシンはTyrまたはYとする；ヒスチジンはHisまたはHとする；グルタミンはGlnまたはQとする；アスパラギンはAsnまたはNとする；リシンはLysまたはKとする；アスパラギン酸はAspまたはDとする；グルタミン酸はGluまたはEとする；システインはCysまたはCとする；トリプトファンはTrpまたはWとする；アルギニンはArgまたはRとする；そして、グリシンはGlyまたはGとする。

30

【0042】

「治療用組成物」は、例えばヒト、家畜(例えば、ウシ、ヤギ、ブタ、またはヒツジ)、またはペットなどの哺乳動物などの動物への投与に適した組成物を意味する。

【0043】

「小分子」は、分子量が10,000ダルトンよりも小さいまたは等しい、好ましくは1,000ダルトンよりも小さいまたは等しい、最も好ましくは500ダルトンよりも小さいまたは等しい化合物を意味する。

40

【0044】

本発明の方法において有用な例示的固体支持体は、磁気ビーズまたはその他のビーズ(アガロースなど)、膜(ニトロセルロース、ナイロンなど)、またはその他のプレートウェル(ELISA、または誘導体形成された表面など)を含み、担体は一般にタンパク質(アルブミンまたはチログロブリンなど)またはその他の可溶性分子のような可溶性基質である。

【0045】

50

本明細書に述べられる化合物（例えば、ペプチド）は、例えばPrP^{Sc}に介在されるプリオン病の予防および治療に有用である。

【0046】

本発明は、本明細書に述べられる一つまたはいくつかの化合物および生理学的に許容される担体を含む薬学的組成物も提供する。これらの薬学的組成物は、経口投与剤形、さらに吸入可能な粉末および溶液、ならびに注射可能および注入可能な溶液を含む様々な剤形であることができる。

【0047】

合成ペプチドはプリオン病を治療するためにそのまま使用することも可能であり、プリオン病の予防および治療に有用な医薬品はPrP^{Sc}とPrP^{Sc}結合ペプチドの相互作用を阻害することによってスクリーニングすることができる。PrP^{Sc}は、ヒトへの使用前に、または動物飼料におけるプリオン病予防薬として、プリオン感染性を中和するために生物学的な液体および組織から吸着することができる。例えば、本発明は、潜在的な新薬候補（および潜在的なリード化合物）を同定するための方法およびこれらの化合物の特異性を測定するための方法をさらに提供する。例えば、ペプチドがPrP^{Sc}に対して選択的親和性を示すことを把握することは、例えばその相互作用のアゴニストまたはアンタゴニスト（阻害物質）であるこれらの分子間の結合に影響を及ぼす化合物の同定を可能とする。その結果、このアッセイを用いると、例えば相互作用の妨害またはPrP^{Sc}との結合に関してそのペプチドとの競合において最も有効であるなど、最も所望される特徴を示す化合物を同定するために一つまたはいくつかの候補化合物のライブラリーをスクリーニングすることができる。

【0048】

このような合成ペプチドは診断用試薬として、またプリオン病の治療においても有用性を持つ。

【0049】

本発明は、チャンバー、一つまたはいくつかの吸入口、一つまたはいくつかの排出口、およびペプチドを吸着または化学的に架橋するチャンバー内のマトリックスを含む検出装置または器具の形で、PrP^{Sc}を選択的に結合するペプチドを含む固体支持体をさらに含む。例証的態様において、本発明のペプチドは固体支持体に吸着されて、PrP^{Sc}を含む溶液はその支持体を通過させて、溶液の非結合成分は例えば洗浄によって除去される。混入物質を除去するためにこのようなカラム、器具または装置を洗浄して、続いて攪乱試薬のような溶離液を用いてペプチドマトリックスから結合したPrP^{Sc}を溶出するための方法は当技術分野において周知である。本発明の装置は、特異的結合試薬（例えば、PrP^{Sc}に特異的に結合するペプチドなど）を含む検出チャンバー内において、プラットフォームの表面に特異的に保持されるPrP^{Sc}を検出、モニター、定量または分析するための検出系を提供する。本発明のプラットフォームの製造および使用において有用な検出系には、蛍光、化学発光、または放射能測定が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0050】

本発明のその他の特徴および利点は、以下の好ましい態様の説明および特許請求の範囲から明らかである。

【0051】

発明の詳細な説明

本発明者らは、PrP^{Sc}相互作用分子（例えば、ペプチド）を認識することができる方法を以下に説明する。好ましくはPrP^{Sc}とPrP^Cを識別するPrP^{Sc}の一般的な物理化学的特性を利用する、またはプリオンイソ型相互作用および/もしくは転換の配列特異的および構造特異的分子メカニズムを利用するPrP^{Sc}相互作用分子が同定される。従って、本発明は、PrP^{Sc}に結合して不活化する化合物、またはそうでない場合はプリオンアゴニストとして作用する化合物を同定するための方法を提供する。これらの化合物には、「リード」ペプチド化合物、およびリード化合物と同一またはほぼ等しい分子構造もしくは形状を持つように構築されているが、加水分解またはタンパク質分解に対する感受性の点で、また/また

10

20

30

40

50

はPrP^{Sc}に対する親和性増大などのその他の生物学的特性の点でリード化合物とは異なる「誘導」化合物が含まれる。本発明は、プリオンアンタゴニストおよび特にプリオン病の治療に有用な化合物の有効量を含む組成物も提供する。

【0052】

PrP^{Sc}に選択的に結合するペプチドの発見

本発明は、PrP^{Sc}または断片に結合する一つまたはいくつかのペプチドを同定するための方法を提供する。本発明はPrP^{Sc}との相互作用能を持つペプチドの迅速な同定について規定する。PrP^{Sc}への結合に関して個々のペプチドまたはその他のペプチド供給源（例えば、ペプチドライブラリ）をスクリーニングすることによって、本発明は、例えば（1）配列もしくは組成物がPrPの配列もしくは組成物によっては調べられないペプチド、または（2）配列もしくは組成物がPrPの配列もしくは組成物によって調べられるペプチドを用いてPrP^{Sc}を結合するペプチドを同定する能力などの同等の機能的活性を持つ高度に異なるタンパク質配列の同定を可能とする。PrP^{Sc}またはその断片に結合するペプチドを同定および分離する能力は、新たな化合物のプリオン病薬剤発見プログラムへの投入において非常に価値があることがわかる。

【0053】

PrP^{Sc}

PrP^{Sc}は、タンパク質が誤って折り畳まれたプリオンタンパク質のプリオン病関連性配座イソ型として定義される。天然および実験的なプリオン感染は、ヒト、ヒツジ、ヤギ、ヘラジカ、シカ、ウシ、マウスおよびハムスターにおいて認識されている（但し、これらに限定はされない）。異常配座のセット（起源となる動物およびプリオンの系統に応じて、例えばPrP^{Sc}、PrP^{BSE}、PrP^{CWD}、PrP^{CJD}PrP^{vCJD}と称される；本明細書では一般的にPrP^{Sc}が用いられる）はある程度のプロテアーゼ抵抗性および高いシート含有率を持つ可能性がある。PrP^{Sc}断片は典型的にはプリオン感染性を保持し得る十分な大きさのPrP^{Sc}の部分として定義される。プリオン感染性の「タンパク質唯一」説は、正常な細胞表面膜タンパク質であるPrP^Cの分子が異常なイソ型によって触媒される鑄型指向性プロセスによってPrP^{Sc}に転換されると仮定する。

【0054】

ペプチド

本発明のペプチドは、一般にPrP^{Sc}またはその断片に対するイソ型選択的親和性を持ち、PrP^Cにはほとんどまたは全く結合しない分子である。以下により詳細に述べられる通り、本発明のペプチドは典型的には好ましくはPrPの3~75アミノ酸残基を含むPrPの断片、またはその多量体である。SwissProtに寄託された例示的PrPアミノ酸配列は、P04156（ヒト）、P04925（マウス）、P97895（ゴールドンハムスター）、P23907（ヒツジ）、P52113（ヤギ）、002841（オジロジカ）、P79142（ワピチ）、P10279（ウシ）、Q01880（ウシ）およびO18754（ネコ）を含む。その他の態様において、本発明のペプチドは、報告されたPrP配列から直接誘導される配列、または物理化学的類似性（例えば、Bacon and Anderson, *J. Mol. Biol.* 191: 153-61, 1986）もしくは進化における置換の可能性（例えば、Dayhoff et al., *Atlas Protein Seq. Struc.* 5: 345-352, 1978）より示される通り固有配列と相同のアミノ酸置換を含む配列によって構成されるPrP配列の多量体を含む。これらの配列には、YYX、YYR、YYQまたはYYDのようなPrP繰り返しモチーフを含む配列が含まれるが、これに限定されるものではない。特定の態様において、そのペプチドはMAPSの形であり、このMAPSは4-mapおよび8-map形式を含む標準的方法（Tam, *Proc Natl Acad Sci US A* 85: 5409-13, 1988; Tam and Zevala, *J. Immunol Methods* 124: 53-61, 1989; Tam, *J. Immunol Methods* 196: 17-32, 1996）に従って作製される。共役分子としての用途のために一つまたはいくつかのN末端システインをペプチド配列に付加することができる。ペプチドは遺伝子組み替え法ばかりでなく当技術分野において周知の化学的方法を用いても作製することができる。固相ペプチド合成は、リンカー基を介して不溶性ポリマー支持体に -アミノおよび側鎖保護アミノ酸残基を連続的に付加するバッチ式または連続流プロセスとして実施することができる。メチルアミン誘導ポリエチレングリコールのようなり

ンカー基はポリ(スチレン-コ-ジビニルベンゼン)に接続して支持体であるレジンを形成する。アミノ酸残基は酸不安定Boc(t-ブチルオキシカルボニル)または塩基不安定Fmoc(9-フルオレニルメトキシカルボニル)によってN-保護される。保護アミノ酸のカルボキシル基はリンカー基のアミンと共役して残基を固相支持体レジんに固着する。BocまたはFmocの場合の保護基の除去には、それぞれ、トリフルオロ酢酸またはピペリジンが用いられる。各々の付加アミノ酸は共役物質または予め活性化されたアミノ酸誘導体を用いて固着された残基に付加されて、レジンは洗浄される。ペプチド全長は、連続的脱保護、アミノ酸誘導体の共役、ならびにジクロロメタンおよび/またはN,N-ジメチルホルムアミドを用いた洗浄によって合成される。そのペプチドはペプチドのC末端とリンカー基の間で開裂してペプチドの酸またはアミドを生じる。これらのプロセスは、例えばMerrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154, 1963; Atherton, Solid Phase Peptide Synthesis, IRL Press, Oxford (1989); および Erickson and Merrifield, In: The Proteins, (Neurath, H. and Hill, R. L., eds.) Academic Press, New York, vol. 2, pp. 255-527, 1976に述べられている。ABI 431Aペプチド合成器(ABI)のような機械での自動合成を実施することもできる。タンパク質またはその一部は、調製用高速液体クロマトグラフィーにより精製することが可能であり、その組成物はアミノ酸分析またはシーケンシングによって確認することができる(Creighton, Proteins, Structures and Molecular Properties, W H Freeman, New York N.Y., 1984)。

【0055】

本発明の方法に従って、PrP^Sに選択的に結合する一つまたはいくつかのペプチドを同定するために、一つのペプチド(任意で検出可能な標識に抱合される)または多数のペプチドをPrP^Sに接触させる。所望の、任意の、合成または配座拘束ペプチドライブラリーをペプチド供給源として用いることが可能であり、例えばPrP^Sに結合するペプチドを同定するためにスクリーニングすることができる。当技術分野では、化学的に合成されたライブラリーまたはインビトロにおける翻訳に基づくライブラリーなど、使用することのできる多くのライブラリーが知られている。使用可能な配座拘束ライブラリーには、酸化環境においてジスルフィド結合により架橋してシステインを形成する不変システイン残基、修飾ペプチド(例えば、フッ素、金属、同位体標識の取り込み、リン酸化されるなど)、天然発生性でない一つまたはいくつかのアミノ酸を含むペプチド、非ペプチド構造物、および-カルボキシグルタミン酸の重要な分画を含むペプチドを含むライブラリーが含まれるが、これらに限定されるものではない。PrP^Sまたはその断片には選択的に結合するがPrPには結合しないペプチドについてのペプチドライブラリーまたは個々のペプチドのスクリーニングは、広く知られている様々な任意の方法を用いて達成される。

【0056】

PrP^Sまたはその断片をペプチドまたは多くのポリペプチドと接触させる工程は多くの方法で達成することができる。例えば、PrP^Sを固体支持体に固定することが可能であり、複数のポリペプチドの溶液を固定したPrP^Sと接触させる。この方法はアフィニティークロマトグラフィーのプロセスと同等であり、アフィニティマトリックスは固定化されたPrP^Sを含む。続いて、PrP^Sについて選択的親和性を持つペプチドをアフィニティ選択によって精製する。固体支持体の性質、PrP^Sの固体支持体への接着のためのプロセス、溶媒、およびアフィニティ分離または選択方法の条件は通常の方法に従って実施されて、当業者に周知である。

【0057】

ポリペプチド自身のアミノ酸配列を決定しなければならない場合は、マイクロシーケンシング法を用いることができる。このシーケンシング法は、所望ならば、質量分析を含むことができる。

【0058】

一部の状況において、選択的アフィニティ相互作用の存在(即ち、洗浄工程後に結合状態を維持する認識単位の存在)の検討または検出を試みる前にPrP^Sと複数のポリペプチドの混合物から未結合のペプチドを洗浄除去することが望ましい可能性がある。

【 0 0 5 9 】

PrP^{S^c}（またはその断片）とその相互作用性ペプチドの間の選択的結合の程度は様々である可能性があり、一般に約1nM～約1mMの範囲である。本発明の好ましい態様において、選択的結合は約10nM～約100 μMの程度であり、より好ましくは約100nM～約10 μMの程度であり、最も好ましくは約100nM～約1 μMの程度である。結合は、同等の実験条件下においてペプチドがPrP^CよりもPrP^{S^c}についてより高い親和性を示す場合に選択的であると言われる。結合親和性は、当技術分野において既知の任意の方法によって定量的または定性的に評価することができる。

【 0 0 6 0 】

PrP^{S^c}と、配列または組成がPrPの配列または組成によって決定されないペプチドの相互作用についてのスクリーニング

10

PrP^{S^c}とペプチドの相互作用は、PrP内に含まれる特定の配列とは無関係の分子間における物理化学的力に起因する可能性がある。このような相互作用の例には次が含まれる。

【 0 0 6 1 】

疎水性相互作用

PrP^{S^c}はPrP^Cに比較して高い疎水性を示し、おそらくこれが異常イソ型の低い溶解度および高い凝集傾向に寄与するのであろう。さらに、低pHおよび変性剤に誘発される組換え型PrP^Cでは分子表面の疎水性の増大が観察されて、PrP^{S^c}を連想させるシート含有量の増加を起こす (Swietnicki et al., J. Biol. Chem. 272:27517-27520, 1997)。疎水性分子は、分子の接近および疎水性分子表面の減少に伴う水のエントロピーの増大によって引き起こされるファンデルワールス相互作用に起因して (Lodish et al., eds., Molecular Cell Biology, Palgrave Publishers, 2000)、水性環境中の他の疎水性分子と結合する。従って、疎水性アミノ酸を含むペプチドは選択的にPrP^{S^c}に結合する。最も高い疎水性から最も低い疎水性までにグレード化される疎水性アミノ酸 (Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol. 157:105-32, 1982) はフェニルアラニン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、バリン、システインである。その他の疎水性アミノ酸 (Engleman et al., Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 15:321-53, 1986) はトリプトファン、アラニン、スレオニン、グリシンおよびセリンである。特定のペプチドの極端な疎水性はそれらをPrP^{S^c}選択的結合において使用に適さないものとする可能性があるが、これは全般的なタンパク質接着性 (PrP^Cを含む) および試料との相互作用の前に自己接着性のためにPrP^{S^c}結合が中和されるためである。従って、この用途には中間の疎水性のアミノ酸を含むペプチドが優れていることが証明されて、または水性試料における溶解度を高めるために親水性アミノ酸を所々に挟み込んだ疎水性アミノ酸が優れていることが証明される可能性がある。

20

30

【 0 0 6 2 】

パイスタッキング相互作用

本発明者らは、変性および低pHの影響を受けた組換え型PrPが分子表面にPrP^Cよりも多くのチロシル基を示して、PrP繰り返しモチーフのチロシン-チロシン-アルギニンに対して方向付けられたモノおよびポリクローナル抗体は多くの種に由来するPrP^{S^c}には結合するがPrP^Cには結合しないことを実証した (例えば、WO/0078344を参照されたい)。従って、疾患特異的な形にリフォールディングされるPrPはPrP^Cよりも溶媒到達可能なより多くのチロシン側鎖を持つと考えられる。表面チロシルの到達性の増大は、本発明のペプチド試薬に含まれる芳香族アミノ酸とのパイスタッキングによるイソ型特異的アフィニティー相互作用に利用することができる。パイスタッキングは電子豊富な芳香環外周と電子不足の芳香環中心との相互作用を通じて発生して、置き換え型パラレル相互作用、またはエッジ-ツー-フェース (edge-to-face) もしくは「T」相互作用の配座により介在される可能性がある (McGaughey et al, J. Biol. Chem. 273:15458-63, 1998)。古典的にパイスタッキングを受けると考えられる芳香族残基には、チロシン、トリプトファンおよびフェニルアラニンが含まれる。芳香族アミノ酸を含むペプチドは、PrP^{S^c}の分子表面に露出したチロシンまたはその他の芳香族残基とのパイスタッキングを介してPrP^{S^c}と特異的に相互作用する。

40

50

【 0 0 6 3 】

電荷相互作用

PrP^SはPrP^Cよりも強い表面疎水性を示すが、特異的な相互作用には荷電した、つまり極性のある分子が関与することができる。生理学的な溶液およびpHにおいてPrP^S上で溶媒に曝露される可能性のあるこのような荷電した極性分子には、グリカン（特に多くのグリカンアンテナの末端である負の電荷を持つシアリン酸残基；Endo et al., *Biochemistry* 28:8380-8, 1989）、ならびにアルギニン、リシン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸のような荷電したアミノ酸側鎖が含まれる。

【 0 0 6 4 】

ベータシート相互作用

PrP^SはPrP^Cよりも多くのベータシート配座を含む。ペプチドは鎖配座をとることができるためにPrP^Sのベータシート豊富な構造に「取り込まれる」ことが可能である。さらに、ベータシート配座に拘束されるペプチドはPrP^Sと選択的に相互作用する親和性試薬を構成することができる。平行および逆平行ベータシートは、一方の鎖のC=O基と隣接する鎖のNH基の間の水素結合によって安定化する。加えて、タンパク質中の鎖のアミノ酸はしばしばタンパク質内部に埋め込まれる疎水性の側鎖になったり、分子表面の親水性側鎖になったりする。従って、配列拘束特性は合成ペプチドまたは構造的に拘束されるペプチドによって擬似することが可能であり、ひいてはPrP^Sとの特異的親和性相互作用に利用されることができる。この方法で、合成ペプチドは関連する内因性PrP鎖とのドメイン交換における外因性鎖と見なされることができる。3Dドメイン交換については、近年、単量体タンパク質が多量体組立品を形成することのできるメカニズムとして認識されている（Bennett et al, *Protein Science*, 4:2455-2468, 1995にてレビュー）。

【 0 0 6 5 】

PrP^Sと、配列または組成がPrPの配列または組成によって決定されるペプチドとの相互作用に関するスクリーニング

もう一つの一連の例において、PrP^Sとペプチドの相互作用は、PrP内に含まれる特異的配列に依存してプリオンタンパク質の自己との相互作用によって生じる物理化学的力に起因する可能性がある。このような自己相互作用によってプリオン感染症伝播の中心であるPrP^CのPrP^Sへの転換が起こる可能性がある。

【 0 0 6 6 】

本発明の一つの例において、ペプチドはPrP^SによるPrP^Cの認識および動員の分子プロセスに参与するPrPのドメインを擬似するように構築される。これらの相互作用は、イオン相互作用、水素結合、疎水性相互作用、および芳香族残基のスタッキングのような多くの分子間力を利用することができる。本発明は特に単一のモチーフを持つペプチドまたはそのモチーフの直接の繰り返しのいずれかとしてのPrPモチーフを含む診断補助材に関する。PrP配列において3回繰り返す一つのこのようなモチーフは、二カ所におけるC末端アルギニンに関連する2つの連続したチロシン（YYR）、および三番目の位置におけるC末端のグルタミンまたはアスパラギン酸（YYQ/D）を含む。YYXモチーフの配列は、ウシ、ヒト、ヒツジ、マウスおよびハムスターなどを含む多くの種を通じて保存される。YYRに方向付けられるポリおよびモノクローナル抗体はPrP^Sを特異的に免疫沈降することが示されており、モチーフ側鎖がプリオンタンパク質の配座転換において異なる溶媒到達可能性を示すことが証明された。例えば、WO/0078344を参照されたい。従って、溶媒に曝露されたPrP^S中のYYRモチーフと合成ポリアミノ酸鎖の特異的相互作用は、生物試料中のPrP^Sの選択的認識に利用することができる。

【 0 0 6 7 】

もう一つの局面において、本発明は、PrP^CではなくPrP^Sにおいて示差的に溶媒に曝露されるアミノ酸側鎖を含む短い合成プリオンペプチド（例えば、3~10アミノ酸、または4~12アミノ酸を含む）に関する。この相互作用に参与する重要なアミノ酸残基は同定することができて、PrP^CではなくPrP^Sに選択的に結合するための特異的な人工配列（ペプチド）を構築することができる。PrP^CのPrP^Sへの転換（従ってPrP^Sにおいて潜在的に示差

10

20

30

40

50

的に溶媒到達可能である)に關与するモチーフの例は医学および生物学の文献(例えば、Horiuchi et al., J. Biol. Chem. 276:15489-97, 2001を参照されたい)に示されている。

【0068】

特筆すべき点として、いくつかの群のアミノ酸は、いくつかの分子間力によってしばしばタンパク質と相互作用する可能性を持つ。例えば、トリプトファンは疎水性およびパイスタッキング相互作用によって相互作用することが可能であり、チロシンは芳香族パイスタッキングおよびそのヒドロキシル基を必要とする水素結合によって相互作用する可能性がある。このように、本発明のもう一つの例は、プリオンタンパク質配列を元とするが進化的に保存されたアミノ酸置換を持つペプチドを介するPrP^{Sc}との相互作用である。

10

【0069】

PrPペプチドとPrP^{Sc}との相互作用を実証するために、正常(N)またはスクレイピー(Sc)のハムスター脳溶解物の50 µgを、結合緩衝液(PBS、3% Igepal CA630および3% Tween-20)中の、17D10抗体コーティングトシル活性化磁気ビーズ 100 µl (17D10; 図1、レーン2および3)、

YYRRYYRYY

ペプチドと共役したスルフォリンクレジン 100 µl (10-mer; 図1、レーン4および5)、またはFIP対照ペプチドと共役したスルフォリンクレジン 100 µl (対照; 図1、レーン6および7)と共に室温で2.5時間、インキュベートした。続いて、ビーズ(またはレジン)を洗浄緩衝液(PBS、2% Igepal CA630および2% Tween-20)で3回洗浄して、ゲルローディング緩衝液に再懸濁した。この試料を16% トリスグリシングルに適用して、プロットはモノクローナル6H4およびヤギ抗マウスIgG-HRP抱合物を加えて発色させた。プリオンタンパク質アミノ酸配列に由来するこの繰り返しモチーフを用いると、スクレイピーに感染したマウス脳に由来するプリオンタンパク質であるPrP^{Sc}の沈降は観察されるが、正常マウス脳に由来する正常イソ型のPrP^Cは沈降しない(図1)。FIP対照ペプチドはいずれのイソ型も沈降させなかった。

20

【0070】

さらに、

YYRRYYRYY

30

ペプチドとウシPrP^{Sc}の相互作用についても検討した(図2)。様々な濃度のBSE陽性(Sc)または陰性(N)ウシ脳溶解物を、IP結合緩衝液中の

cys-YYRRYYRYY

(「YYR」10-mer)または

cys-YARRAYRAY

(「YAR」; SEQ ID NO:5; 10-mer)でコーティングしたトシル活性化磁気ビーズ 100 µlと共に室温で2.5時間、インキュベートした。続いてビーズをIP洗浄緩衝液で3回洗って、ゲルローディング緩衝液に再懸濁した。試料を4~12% NuPage MESゲルに適用して、プロットはモノクローナル6H4およびヤギ抗マウスIgG-HRP抱合物を加えて発色させた。レーンの割り当ては次の通りである: レーン1、YYR 10-merおよび正常溶解物10 µg; レーン2、YYR 10-merおよびBSE溶解物10 µg; レーン3、YAR 10-merおよび正常溶解物10 µg; レーン4、YAR 10-merおよびBSE溶解物10 µg; レーン5、YYR 10-merおよびBSE溶解物20 µg; レーン6、YYR 10-merおよびBSE溶解物10 µg; レーン7、YYR 10-merおよびBSE溶解物5 µg; レーン8、YYR 10-merおよびBSE溶解物1 µg。これらのデータは、PrP^{Sc}のYYR関連アフィニティー沈降は種限定的ではないことを示している。トシルビーズに共役したYAR 10-merはBSE陽性試料からPrP^{Sc}を捕捉できなかったが、ストレプトアビジンでコーティングした磁気ビーズに共役したこのペプチドのピオチン化型は有効な捕捉試薬として機能することに留意

40

50

されたい。

【 0 0 7 1 】

YYRRYYRYY

(10-mer) ペプチドに関連するペプチドがPrP^{S^c}の捕捉を促進するかどうかを調べるために、スクレイパー (Sc) マウス脳溶解物50 μgに、IP結合緩衝液中、

cys-YYRRYYRYY

(「(YYA)₃」; 図3、レーン1および6)、

cys-AYRRYARYA

10

(「(AYR)₃」; SEQ ID NO:6; 図3、レーン2)、

cys-YARRAYRAY

(「(YAR)₃」; 図3、レーン3)、

cys-YYAAYYAYY

(「(YYA)₃」; 図3、レーン4)、または

cys-YSAASYASY

20

(「(YSA)₃」; 図3、レーン5)でコーティングしてIP結合緩衝液に混合したトシル活性化磁気ビーズ100 μlと共に室温で2.5時間、インキュベートした。続いて、ビーズをIP洗浄緩衝液で3回洗って、ゲルローディング緩衝液に再懸濁した。試料を16%トリス-グリシンゲルに適用して、プロットをモノクローナル6H4およびヤギ抗マウスIgG-HRP抱合物で発色させた。図3に示すように、PrP^{S^c}の沈降はYYR繰り返し配列、YYAおよびYSA置換では認められたが、YARまたはAYRの繰り返しでは認められなかった。これらのデータは、トシル活性化ビーズに共役したペプチドを用いたアフィニティー沈降法におけるチロシン対および/または一つのチロシンのヒドロキシル分子の重要な役割を示唆する。但し、(YAR)₃ペプチドのピオチン化型は、ストレプトアビジン磁気ビーズに共役させた際に有効な捕捉試薬である。この方法で評価されてPrP^{S^c}を選択的に結合することが示されているその他のペプチド配列には、

30

YARYARYAR (SEQ ID NO: 7), YRAARYRAY (SEQ ID NO: 8)

、ウシPrP (158 ~ 183)、およびウシPrP (130 ~ 147)が含まれる。PrP^{S^c}の選択的捕捉に関して陰性のペプチドには、

NHSTHNTGH (SEQ ID NO: 9),

DRYYWYFDV (SEQ ID NO: 10)およびDEAYYKGFAY (SEQ ID NO: 11)

が含まれる。

40

【 0 0 7 2 】

ペプチド : PrP^{S^c}の特異性は次の競合実験においても調べられた。

YYAAYYAYYおよびYSAASYASY (SEQ ID NO: 10)

のペプチドがマウスPrP^{S^c}の捕捉に関して

YYRRYYRYY

ビーズと競合することを実証するために、

cys-YYRRYYRYY

50

でコーティングしたトシル活性化磁気ビーズ 100 μ l に、IP結合緩衝液中500 μ g/ml フリーペプチドを加えて4 晩、インキュベートした。正常(N)またはスクレイピー(Sc)マウス脳溶解物の50 μ gを各試料に加えた後、ビーズを室温で2.5時間、インキュベートした。その後、試料をIP洗浄液で3回洗って、ゲルローディング緩衝液に再懸濁した。試料を16% トリスグリシゲルに適用して、プロットはモノクローナル6H4およびヤギ抗マウスIgG-HRP抱合体で発色させた。データを図4に示す：レーン1、正常マウス溶解物、競合ペプチドなし；レーン2、スクレイピー溶解物、競合ペプチドなし；レーン3、スクレイピー溶解物および

cys-YARRAYRAY

10

(「(YAR)₃」)；レーン4、スクレイピー溶解物および
cys-YYAAYYAYY

(「(YYA)₃」)；レーン5、スクレイピー溶解物および
cys-YSAASYASY

(「(YSA)₃」)；レーン6、スクレイピー溶解物および
cys-AYRRYARYA

(「(AYR)₃」)。これらのデータは、フリーの
YYAAYYAYY および **YSAASYASY**

20

がPrP^{Sc}の捕捉に関してトシル活性化

YYRRYYRYY

ビーズと競合することを示す。驚いたことに、

YARRAYRAY

のフリーペプチドは、そのペプチドのビオチン化型がPrP^{Sc}の有効なリガンドであるにも関わらず、結合に関して競合できなかった。いずれの場合も、これらのデータは、YYR関連ペプチドとPrP^{Sc}の特異的アフィニティー相互作用におけるチロシン対、特に内部チロシンのヒドロキシル分子の関与について図2に示されるデータを拡大する。

30

【0073】

用途

本明細書に述べられるペプチドは、例えば、次の診断、治療、予防接種、および汚染除去目的のために、またプリオン病を診断もしくはこれと戦う、またはプリオン試料の汚染除去に利用できる新規化合物のスクリーニングに用いられる可能性がある。

【0074】

診断

本明細書に開示されるペプチドは、一般的にプリオン病の検出またはモニタリングにおける診断用途に用いられる。例えば、

40

YYRRYYRYY

のペプチドは、標準的および/または増幅検出アッセイを用いて生物試料(例えば、組織生検材料、細胞、または液体など)におけるPrP^{Sc}の有無をモニターするために用いることができる。このようなアッセイおよび方法はPrP^{Sc}の直接的検出を伴い、多量の試料のPrP^{Sc}の存在についてのスクリーニングに特に適している。例えば、本明細書に述べられるペプチドはいずれもペプチド：PrP^{Sc}複合体形成を測定するために検出可能に標識することができる。所望ならば、本明細書に述べられるペプチドのPrP^{Sc}の捕捉に関する特異性のために、分析前にプロテアーゼを用いて任意で試験試料を前処理する。任意のエピトー

50

プタグ、放射能、蛍光、色素産生性（例えば、アルカリホスファターゼまたはホースラディッシュペルオキシダーゼ）もしくは化学発光標識、または標識されたハプテン特異的抗体もしくはその他の結合パートナー（アビジンなど）を用いて可視化することのできるハプテン（例えば、ジゴキシゲニンまたはビオチン）などを含めて、これらの検出アッセイでは、直接的または間接的に可視化することのできる適切な標識を使用することができる。例えば、細胞表面（例えば、白血球）のPrP^{S^c}は、本明細書に述べられるペプチドを用いて本明細書に述べられるような標準的フローサイトメトリー法によって容易に検出することができる。適切な対照試料と比較して多量の標識複合体を含むことが明らかとなった試料はPrP^{S^c}の存在を示すと見なされて、従って、プリオン関連疾患を示す。

【0075】

さらに、本発明のペプチドを用いてプリオン病の診断に有用な新規化合物を同定することができる。例えば、標準的方法に従って、本明細書に述べられる一つまたはいくつかのペプチドの結合相互作用を阻害する能力を持つ化合物を同定するために、合成化合物ライブラリまたは小分子ライブラリがスクリーニングされる。

【0076】

このようなライブラリは、当技術分野において既知である方法に従って、天然産物、合成（もしくは半合成）抽出物、または化合物ライブラリから導かれる可能性がある。薬剤の発見および開発分野の業者は、化合物の正確な供給源が本発明のスクリーニング手順にとっては重要でないことを理解する。天然化合物供給源の例には、植物、真菌、原核生物または動物の供給源、および既存の化合物の修飾が含まれるが、これらに限定されるものではない。糖類、脂質、ペプチドおよび核酸を基剤とする化合物、即ち、アダマーを含む任意の数の化学的化合物の任意または方向付けられた合成品（例えば、半合成品または完全合成品）の作製にも多くの方法が有効である。合成化合物のライブラリは市販のものを入手することが可能であり、または当技術分野において既知の方法に従って作製することが可能である。さらに、所望ならば、標準的な化学的、物理学的または生化学的方法を用いて任意のライブラリまたは化合物が容易に修飾される。

【0077】

極めて低い濃度でペプチドの結合を阻害する化合物は「高親和性競合物」と呼ばれて、本発明の診断方法において有用である。次に、ペプチドの活性を擬似するこのような高親和性競合物についてPrP^{S^c}の効率的な認識および結合を調べる。同定後直ちに、プリオン感染に関する事実上の診断試験の捕捉相において、またはもう一つの選択肢として遮断様式アッセイにおいて用いるために、高親和性競合物を固体基質（例えば、ELISAのウェルまたはビーズ）に共役させることができる。

【0078】

ワクチン

本発明のペプチドならびにその混合物および組成物は、感染に対して感受性および/または感染に罹っている宿主におけるプリオン病に対する予防または治療の免疫応答を誘発することができるワクチンの活性成分としても有用である。投与経路、抗原の用量、注射の回数および頻度は種によって異なり、その他の感染性疾患または癌に対して免疫または治療を提供するために現在、医療機関および/または実験的に用いられているものと同様である可能性がある。例えば、ワクチンは、本発明のペプチド、その類似体、またはその混合物もしくは配合物を、その組成物を投与されたヒトを含む哺乳動物において、投与された哺乳動物をある期間にわたってプリオン感染から保護し得る免疫を惹起するために有効な量で含む薬学的に許容される組成物である。YYXアミノ酸残基（またはYYR、YYDもしくはYYQアミノ酸残基）を含むペプチドまたは関連する化合物を用いた免疫化によって誘発されるPrP^{S^c}特異的免疫は脳およびその他の組織におけるPrP^Cの発現または機能に影響を及ぼすことなくPrP^{S^c}の分解を促進または疾患の症状を軽減するために有用であり、その結果、臨床的に症候性のプリオン病患者における臨床状態が改善することも可能である。

【0079】

当技術分野において既知の標準的方法に従って、異なるタイプのワクチンを開発することができる。例えば、ワクチンはペプチドを基剤とするワクチン、核酸を基剤とするワクチン、細菌を基剤とするワクチン、またはウイルスを基剤とするワクチンであることができる。より具体的には、ペプチドワクチンに関して、PrP^{Sc}特異的エピトープに対応するペプチドまたはその機能的誘導体は、1) 同一配列の単量体または多量体として、2) ワクチンの有効性を高める手段としてPrP^{Sc}特異的エピトープの免疫原性を高めるために、エピトープ（例えば、クラスI/IIターゲティング配列）および/もしくは追加の抗体、TヘルパーまたはCTLエピトープの凝集を助長して、提示または加工を促進することができる追加配列の連続的または不連続の組み合わせ、3) 化学的に修飾または抱合してワクチンの免疫原性または送達を亢進する物質とする（例えば、脂肪酸もしくはアシル鎖、破傷風トキソイド、またはコレラ毒素）、4) 上記の任意の組み合わせ、5) 上記と、アルミニウム塩、サポニンまたはトリテルペン、MPL、およびコレラ毒素などのアジュバント、ならびに/またはリポソーム、VPLもしくはウイルス様粒子、マイクロエマルジョン、弱毒化もしくは死滅細菌もしくはウイルスベクター、および崩壊性マイクロスフェアなどの送達賦形剤との併用、6) 任意の経路で、またはエクスピボにおいて細胞に抗原を負荷する手段としての投与を含む多くの方法で予防用または治療用ワクチンとして利用することができる。

10

【0080】

予防薬または治療薬としての核酸を基剤とするワクチンの用途の例には次が含まれる：1) PrP^{Sc}特異的エピトープの発現（転写および/または翻訳）をコードする核酸、2) 翻訳融合物または独立した転写単位であるPrP^{Sc}特異的エピトープの加工および提示、凝集、分泌、（特定の細胞タイプに対する）ターゲティングを促進する追加の核酸配列、3) 翻訳融合物または独立した転写単位であるアジュバント/免疫調節物質として機能する追加の核酸配列、4) 翻訳融合物または独立物として、PrP^{Sc}特異的エピトープの免疫原性またはワクチンの有効性を高める追加の抗体、TヘルパーまたはCTLエピトープ、5) 上記の任意の組み合わせ、6) 上記が生理食塩液を用いて（「裸の」DNA）、またはアジュバント（例えば、アルミニウム塩、QS-21、MPL）、免疫調節物質（例えば、rIL-2、rGM-CSF、rIL-12）および/または核酸送達物質（例えば、ポリマー、脂質、ペプチドを基剤とする崩壊性粒子、マイクロエマルジョン、VPL、弱毒化した細菌またはウイルスベクター）と組み合わせ任意の経路またはエクスピボ負荷によって投与される。

20

30

【0081】

弱毒化または死滅細菌またはウイルスベクターは、抗原またはその抗原の発現をコードするDNA/RNAを送達するために用いることができる。これらは、抗原をエクスピボにおいて細胞に負荷するための手段としても用いることができる。

【0082】

ワクチンは当技術分野において既知の標準的方法に従って調製されて、ワクチン産生のための新しいまたは改良された方法に容易に応用することができる。

【0083】

汚染除去

PrP^{Sc}は、本明細書に開示されるペプチドを用いてヒトでの使用前にプリオン感染性を中和するために、または動物飼料におけるプリオン病予防薬として生物学的な液体および組織から吸着することができる。

40

【0084】

もう一つの局面において、本発明は生物試料からPrP^{Sc}を汚染除去するための方法の特徴とする。好ましい態様において、この方法は次の工程を伴う：(a) 生物試料をペプチド（またはその断片もしくは同族体）で処理して、そのペプチドとPrP^{Sc}複合体形成を可能とする工程；および(b) 生物試料からPrP^{Sc}複合体を除去する工程。このような汚染除去手順は、ストレプトアビジンを介しての除去に備えてビオチン、ハプテン、またはFLAGもしくはMycのようなエピトープタグに共役したペプチド（またはその断片もしくは同族体）を用いた生物試料の灌流の利用、または抗体アフィニティーカラムクロマトグラフィ

50

ーもしくは結合によるPrP^{Sc}の直接的不活化を伴うこともできる。

【0085】

従って、本明細書に述べられる方法および組成物は、例えば移植を意図するなど、プリオンで汚染されていることが明らかであるまたは疑いがある生物試料の汚染除去において有用である。特に、生物試料は本発明のペプチドと共にインキュベートすることが可能であり、複合体は標準的な方法を用いて除去することが可能である。または、本発明のペプチドを複合体形成する生物試料と共にインキュベートすることが可能であり、それによってプリオンの感染を阻害することが可能である。

【0086】

治療薬

本発明は、動物（例えば、ヒト、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、イヌ、またはネコ）におけるプリオン病の治療または予防の方法を特徴とする。一つの好ましい態様において、この方法は、本明細書に開示される方法に従って同定されるPrP^CのPrP^{Sc}への転換を遮断してPrP^{Sc} : PrP^{Sc}凝集形成を阻害し、またはPrP^CのPrP^{Sc}への動員を遮断する治療上有効な量のPrPペプチドを動物に投与する工程を伴う。もう一つの局面において、本発明は本発明のPrPペプチド、または例えばYYXを含むペプチドと抗YYXペプチドの相互作用を擬似する合成ライブラリから合理的にデザインするまたは得ることのできるアミノ酸残基YYX（またはYYR、YYDもしくはYYQアミノ酸残基）を含むペプチドのPrP^{Sc}特異的曝露を利用する化合物のような構造的に関連する化合物を含むプリオン病の治療および予防のための薬学的調製物を特徴とする。これらの化合物はプリオン診断において、またはプリオン病の治療薬として有用である。所望ならば、本発明のペプチドは薬学的に許容される塩の形で提供されることができる。好ましい塩の例は、例えば、酢酸、乳酸、マレイン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、コハク酸、安息香酸、サリチル酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、またはパモ酸のような治療上許容される有機酸、およびタンニン酸またはカルボキシメチルセルロースのようなポリマー酸との塩、ならびに例えば塩酸などのハロゲン化水素酸、硫酸またはリン酸のような無機酸との塩である。さらに、本発明の任意のペプチドは、生物分解性生体適合性ポリマーを用いた徐放性調製物として、またはミセル、ゲルおよびリポソームを用いることによって、伝統的な方法（例えば、経口、非経口、経皮、または経粘膜）の一つにおいて哺乳動物、特にヒトに投与することが可能である。

【0087】

さらに、チロシン側鎖誘導体などを含むYYRエピトープの構造から派生する小分子が転換反応を遮断する可能性がある。最後に、チロシン環の酵素溶解またはチロシン環の大きな置換物との共有結合による誘導体形成のような重要な残基の直接的化学的修飾もPrP^CのPrP^{Sc}への転換反応を混乱させることができる。

【0088】

例えば、このような化合物は本発明の抗体を用いて同定することができる。従って、標準的方法に従って本明細書に述べられる一つまたはいくつかのペプチドの結合相互作用を阻害する能力を持つ化合物を同定するために、合成ライブラリもしくは小分子ライブラリ、または両者（後記）がスクリーニングされる。このような分子の結合を阻害する化合物は、本発明の治療方法において有用である。一旦同定されると、このような化合物は何らかの適切なモデル系においてプリオン病と戦う能力について調べられる。

【0089】

試験アンタゴニスト（例えば、本明細書に述べられるペプチド）がインビボにおいてプリオン病の発症に対する保護を付与するかどうかについての評価は、一般に、このような疾患を発症することが知られている動物を使用する工程を伴う（例えば、Chandler, Lancet 6:1378-1379, 1961; Eklund et al., J. Infectious Disease 117:15-22, 1967; Field, Brit. J. Exp. Path. 8:129-239, 1969）。適切な動物（例えば、マウスまたはハムスター）に標準的な方法に従って試験化合物を投与して、無投与対照動物と比較したプリオン関連疾患の発生率の低下または発症もしくは進行の遅延を保護の指標として検出する。

10

20

30

40

50

試験化合物は予めプリオン物質を注射された動物に投与することが可能であり、または、プリオンおよびその化合物を予めインキュベートしてそのプリオン/化合物混合物を試験動物に注射することによって試験化合物のプリオン物質中和能について調べることができる。プリオン病の治療または予防に用いられる分子（例えば、上記のようなアンタゴニスト）は「抗プリオン治療薬」と呼ばれる。

【0090】

本明細書に基づく抗プリオン治療薬は、薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤と共に単位投与剤形として投与することができる。例えば、プリオン病もしくはプリオン病前駆症状を患う動物、またはプリオン病を発症する危険のある動物にこのような抗プリオン治療薬を投与するための適切な調製物または組成物を提供するには、慣例的な薬学的手法を採用することが可能である。例えば、非経口、静脈内、皮下、筋肉内、頭蓋内、眼窩内、眼内、心室内、包内、脊椎内、槽内、腹腔内、鼻内、エーロゾル、または経口投与などの適切な投与経路を用いることができる。

10

【0091】

調製物を作製するための技術分野において周知の方法は、例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」に示されている。非経口投与のための調製物は、例えば、賦形剤、滅菌水、または生理食塩液、ポリエチレングリコールのようなポリアルキレングリコール、植物性の油脂、または水素化ナフタレンを含むことができる。化合物の放出の制御には、生体適合性、生物分解性のラクチドポリマー、ラクチド/グリコリド、またはポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーを用いることができる。抗プリオン治療用化合物の潜在的に有用なその他の非経口送達系には、エチレン-酢酸ビニルコポリマー粒子、浸透圧ポンプ、移植可能注入システム、およびリポソームが含まれる。吸入用の調製物は乳糖のような賦形剤を含むことができ、また例えばポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、グリコール酸およびデオキシコール酸を含む水溶液とすることが可能であり、または点鼻薬の形で、もしくはゲルとして投与するための油性溶液とすることが可能である。

20

【0092】

本発明の方法は、例えば、ヒト、家庭内ペット、動物園の動物（トラ、外来性反芻動物、およびヒト以外の霊長類など）または家畜のような任意の動物における、本明細書に述べられる疾患の抑制または治療のために用いることができる。ヒト以外の動物が投与される場合、用いられる抗プリオン治療薬は好ましくはその種に特異的である。

30

【0093】

関連する局面において、本発明は上記のいずれかの方法に従って同定される治療用および診断用化合物を特徴とする。

【0094】

本明細書では様々な刊行物が引用されていて、それらの開示は参照として全体が組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【0095】

(図1)

40

YYRRYYRYY

のペプチドがハムスター脳溶解物中のPrP^{Sc}を捕捉することを示す。

(図2)

YYRRYYRYY

のペプチドがウシ脳溶解物中のPrP^{Sc}を捕捉することを示す。

(図3)

YYRRYYRYY

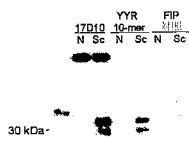
50

のペプチドがマウス脳溶解物中のPrP^{Sc}を捕捉することを示す。
(図4)

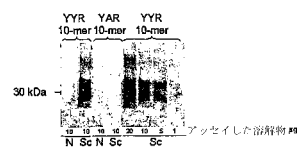
YYAAYYAYY (SEQ ID NO: 3) および
YSAASYASY (SEQ ID NO: 4)

のペプチドがマウスPrP^{Sc}の捕捉に関して
YYRRYYRYY 結合ピーズ
と競合することを示す。

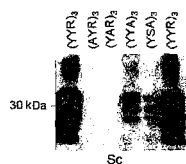
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】



【配列表】

0004533750000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 0 7 K 7/06	(2006.01)	C 0 7 K 7/06	

- (72)発明者 パーラミジオティス ユスターシュ
カナダ国 ケベック州 ブーシェルビル アルフレッド ラリバート 208
- (72)発明者 ラ ボワジエール シルヴィ
カナダ国 ケベック州 モントリオール ヘンリ-ジュリアン 4858-3
- (72)発明者 ロートン ロバート
アメリカ合衆国 メイン州 ゴーラム バーナム ロード 3
- (72)発明者 エステイー リサ
アメリカ合衆国 メイン州 ウエストブルック クインビー アベニュー 38
- (72)発明者 ピナール マーク
カナダ国 ケベック州 モントリオール グロブナー アベニュー 4747

審査官 浅野 美奈

- (56)参考文献 特表2002-531065(JP,A)
国際公開第00/078344(WO,A1)
特表2003-531356(JP,A)
特表2003-530554(JP,A)
国際公開第01/000235(WO,A1)
国際公開第01/077687(WO,A1)
特表2000-516572(JP,A)
特表2005-531775(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/68
A61K 38/00
A61P 25/28
A61P 37/02
C12Q 1/02
G01N 33/15
G01N 33/50
G01N 33/53
C07K 7/06

专利名称(译)	PrPSc相互作用分子及其用途		
公开(公告)号	JP4533750B2	公开(公告)日	2010-09-01
申请号	JP2004539916	申请日	2003-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	卡普里岛的制药公司Retiddo		
申请(专利权)人(译)	Kapurion制药公司Retiddo		
当前申请(专利权)人(译)	IDEXX实验室股份有限公司Retiddo		
[标]发明人	フランクールグレイグ死亡 キャッシュマンニール パーラミジオティスユスターシュ ラボワジエールシルヴィ ロートンロバート エステイーリサ ピナールマーク		
发明人	フランクール グレイグ(死亡) キャッシュマン ニール パーラミジオティス ユスターシュ ラボワジエール シルヴィ ロートン ロバート エステイー リサ ピナール マーク		
IPC分类号	G01N33/68 A61K38/00 A61P25/28 A61P37/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C07K7/06 A61K38/08 A61K38/10 A61K38/16 C07K C07K1/00 G01N33/543		
CPC分类号	A61P25/28 G01N33/6896 G01N2469/20 G01N2500/00 G01N2800/2828		
FI分类号	G01N33/68.ZNA A61K37/02 A61P25/28 A61P37/02 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D C07K7/06		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	10/256538 2002-09-27 US		
其他公开文献	JP2006507484A5 JP2006507484A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了特异性结合PrP Sc的肽。还公开了通过序列非依赖性和/或序列依赖性筛选测定法鉴定这些肽的方法。描述了鉴定的肽的方法和各种应用，包括用于鉴定治疗朊病毒病的药剂的用途。

