

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 530554

(P2003 - 530554A)

(43)公表日 平成15年10月14日(2003.10.14)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
G 0 1 N 33/53	ZNA	G 0 1 N 33/53	ZNA D 2 G 0 5 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 45/00	4 C 0 7 6
45/00		47/48	4 C 0 8 4
47/48		A 6 1 P 25/00	4 G 0 6 6
A 6 1 P 25/00		25/20	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 61数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 574490(P2001 - 574490)

(86)(22)出願日 平成13年4月5日(2001.4.5)

(85)翻訳文提出日 平成14年10月7日(2002.10.7)

(86)国際出願番号 PCT/US01/11150

(87)国際公開番号 W001/077687

(87)国際公開日 平成13年10月18日(2001.10.18)

(31)優先権主張番号 09/543,188

(32)優先日 平成12年4月5日(2000.4.5)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ブイ . アイ . テクノロジーズ , インコーポ
レイテッド

アメリカ合衆国 ニューヨーク 11747,メ
ルビル,ダーエア ロード 155

(72)発明者 ハモンド , デイビッド ジェイ .

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10567,
コートランド マナー , チェスター コー
ト 2

(72)発明者 ウィルトシャイアー , バイト ローズ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 11747,
メルビル,ダーエア ロード 155

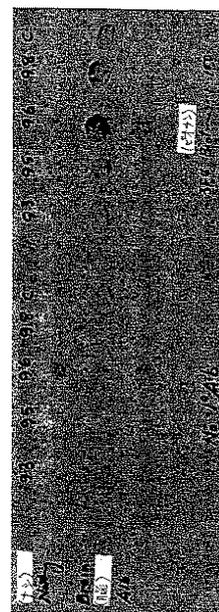
(74)代理人 弁理士 大塩 竹志

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 プリオン結合ペプチドリガンドおよび同一物を使用する方法

(57)【要約】

プリオンタンパク質の領域に結合する短いペプチドリガ
ンドおよび同一物をしようする方法が開示される。これ
らは、ペプチドライブラリーのスクリーニングから得ら
れ、そして診断目的のために、もしくは環境サンプルま
たは生物学的流体からプリオンを除去するために使用さ
れ得る。本発明に従うリガンドとしては、低分子(例え
ば、核酸、核酸アナログ、ペプチド、ペプチド模倣物、
炭水化物、脂質、低有機分子および低無機分子)が挙げ
られる。1つ以上の芳香族官能基(例えば、ポルフィリ
ン環、フタロシアニン、ナフトキノ、イミダゾール、
プリン、またはピリミジン)を含む化合物がまた、本発
明に含まれる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 約6kDa未満のリガンドであって、該リガンドは、アミノ酸配列GWGQPHGG（配列番号1）を含むポリペプチドまたはアミノ酸配列GWGQPHGG（配列番号1）の逆転アイソマーであるアミノ酸アナログを含むポリペプチドに結合する、リガンド。

【請求項2】 前記リガンドが約4kDa未満である、請求項1に記載のリガンド。

【請求項3】 前記リガンドが核酸または核酸アナログである、請求項1に記載のリガンド。

【請求項4】 前記リガンドが炭水化物である、請求項1に記載のリガンド。

【請求項5】 前記リガンドがペプチドまたはペプチド模倣物である、請求項1に記載のリガンド。

【請求項6】 請求項1に記載のリガンドであって、前記リガンドが、ポルフィリン環、フタロシアニン、ナフトキノン、イミダゾール、プリン、またはピリミジンからなる群より選択される部分を含む、リガンド。

【請求項7】 前記リガンドが、20アミノ酸長未満のペプチドリガンドである、請求項1に記載のリガンド。

【請求項8】 前記ポリペプチドが、アミノ酸配列GWGQPHGGGWGQPHGG（配列番号2）を含む、請求項7に記載のリガンド。

【請求項9】 前記ポリペプチドが、アミノ酸配列D（GGHPQGWG）（配列番号39）の逆転アイソマーを含む、請求項7に記載のペプチドリガンド。

【請求項10】 前記ペプチドリガンドのアミノ酸配列が、ストレプトアビジンポリペプチドに存在しない、請求項7に記載のペプチドリガンド。

【請求項11】 前記ペプチドリガンドが、金属の存在下で前記ポリペプチドに結合する、請求項7に記載のペプチドリガンド。

【請求項12】 前記金属が銅である、請求項11に記載のペプチドリガンド。

【請求項13】 前記銅が、約100 nM～約500 μMの濃度で存在する、請求項12に記載のペプチドリガンド。

【請求項14】 前記銅が、約500 nM～約200 μMの濃度で存在する、請求項12に記載のペプチドリガンド。

【請求項15】 請求項7に記載のペプチドリガンドであって、前記ペプチドリガンドが、アミノ酸配列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ を含み、ただし、 X_1 がL、W、またはIであり； X_2 がL、Q、F、またはLであり； X_3 がI、Y、V、F、またはLであり； X_4 がWまたはVであり； X_5 がIであり；そして X_6 がP、A、F、K、またはAである、ペプチドリガンド。

【請求項16】 前記ペプチドリガンドが、LLIWIIP（配列番号3）、WLYWIIP（配列番号4）、WLVWIA（配列番号27）、IQIWIIF（配列番号21）、IFFWIK（配列番号23）、およびLLLVIA（配列番号13）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項15に記載のペプチドリガンド。

【請求項17】 前記ペプチドリガンドが、表Iのペプチドのアミノ酸配列（配列番号3～30）を含む、請求項7に記載のリガンド。

【請求項18】 前記ペプチドが15アミノ酸長未満である、請求項7に記載の方法。

【請求項19】 請求項7に記載の2つ以上のペプチドリガンドのアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項20】 請求項7に記載のペプチドを含む、組成物。

【請求項21】 前記組成物が固体支持体を含む、請求項20に記載の組成物。

【請求項22】 前記ペプチドリガンドが、前記固体支持体に結合される、請求項21に記載の組成物。

【請求項23】 前記支持体が樹脂である、請求項22に記載の組成物。

【請求項24】 前記固体支持体が膜である、請求項22に記載の方法。

【請求項25】 請求項19に記載のポリペプチドを含む、組成物。

【請求項26】 前記組成物が固体支持体を含む、請求項25に記載の組成物。

【請求項27】 前記ペプチドが前記固体支持体に結合される、請求項26に記載の組成物。

【請求項28】 前記固体支持体が樹脂である、請求項27に記載の組成物。

。

【請求項29】 前記固体支持体が膜である、請求項27に記載の組成物。

【請求項30】 プリオンタンパク質のリガンドを同定する方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 配列GWGQPHGGGWGQPHGG (配列番号2) の少なくとも4つの連続するアミノ酸を含むペプチド、またはアミノ酸配列GWGQPHGG (配列番号1) の少なくとも4つの連続するモノマーもしくはアミノ酸配列GWGQPHGG (配列番号1) の逆転アイソマーであるアミノ酸アナログを含むポリペプチドアナログと、試験因子を接触させる工程；および

b) 該試験因子および該ポリペプチドを含む複合体を検出する工程、を包含し、それにより、プリオンタンパク質のリガンドを同定する、方法。

【請求項31】 前記ペプチドが、配列GWGQPHGGGWGQPHGG (配列番号2) の少なくとも5つの連続するアミノ酸を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】 プリオンタンパク質のリガンドを同定する方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 配列D (GGHPQGWGGGHPQGWG) (配列番号34) の少なくとも3つの連続するD - アミノ酸を含むペプチドと、試験因子を接触させる工程；および

b) 該試験因子および該ポリペプチドを含む複合体を検出する工程、を包含し、それにより、プリオンタンパク質のリガンドを同定する、方法。

【請求項33】 前記ペプチドが、配列番号D (GGHPQGWGGGHP

QGWG) (配列番号34)の少なくとも4つの連続するD-アミノ酸を含む、請求項32に記載の方法。

【請求項34】 前記試験因子が、ポリペプチド、ペプチド、ペプチド模倣物、低有機分子、低無機分子、核酸、脂質、および炭化水素からなる群より選択される、請求項32に記載の方法。

【請求項35】 前記試験因子およびポリペプチドが、金属の存在下で接触される、請求項32に記載の方法。

【請求項36】 前記金属が銅である、請求項35に記載の方法。

【請求項37】 前記銅が、100 nM~約500 μMの濃度で存在する、請求項36に記載のペプチドリガンド。

【請求項38】 前記銅が、500 nM~約200 μMの濃度で存在する、請求項32に記載のペプチドリガンド。

【請求項39】 請求項32に記載の方法に従って同定されたりガンド。

【請求項40】 生物学的流体中のプリオンタンパク質の存在を検出する方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 存在する場合、該生物学的流体中のプリオンタンパク質と該ペプチドとの間の複合体の形成を引き起こすのに十分な条件下で、該生物学的流体を請求項1に記載のリガンドと接触させる工程；および

b) 該複合体を検出する工程を包含し、
それにより、該生物学的流体中のプリオンタンパク質の存在を検出する、方法。

【請求項41】 前記生物学的流体が、血液、血漿、血清、脳脊髄液、尿、唾液、乳汁、管液、涙、および精液からなる群より選択される、請求項40に記載の方法。

【請求項42】 環境サンプル中のプリオンタンパク質の存在を検出する方法であって、該方法は、以下の方法：

a) 存在する場合、該サンプル中のプリオンタンパク質と該リガンドとの間の複合体の形成を引き起こすのに十分な条件下で、該環境サンプルを請求項1に記載のリガンドと接触させる工程；および

b) 該複合体を検出する工程を包含し、

それにより、該サンプル中のプリオンタンパク質の存在を検出する、方法。

【請求項43】 前記環境サンプルが、固体環境サンプルの水溶性抽出物を含む、請求項42に記載の方法。

【請求項44】 前記環境サンプルが、土壌、草または干し草を含む、請求項43に記載の方法。

【請求項45】 生物学的流体からプリオンを除去する方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 存在する場合、該生物学的流体中の該プリオンと該リガンドとの間の複合体の形成を引き起こすのに十分な条件下で、該生物学的流体を請求項1に記載のリガンドと接触させる工程；および

b) 該生物学的流体から該複合体を除去する工程を包含し、それにより、該生物学的流体から該標的を除去する、方法。

【請求項46】 前記生物学的流体が、血液、血漿、血清、脳脊髄液、尿、唾液、乳汁、管液、涙、および精液からなる群より選択される、請求項45に記載の方法。

【請求項47】 前記ペプチドリガンドが固体支持体に結合される、請求項45に記載の方法。

【請求項48】 環境サンプルからプリオンを除去する方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 存在する場合、該生物学的流体中の該プリオンと該リガンドとの間の複合体の形成を引き起こすのに十分な条件下で、該サンプルを請求項1に記載のリガンドと接触させる工程；および

b) 該環境サンプルから該複合体を除去する工程を包含し、それにより、該環境サンプルから該プリオンを除去する、方法。

【請求項49】 前記環境サンプルが、土壌、干し草、土壌の可溶性成分、および干し草の可溶性成分からなる群より選択される、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 前記ペプチドリガンドが固体支持体に結合される、請求項48に記載の方法。

【請求項51】 被検体におけるプリオン関連病態の発症を処置または遅延させる方法であって、該方法は、該病態の発症を処置または遅延させるのに十分な量で、該被検体に請求項1に記載のリガンドを投与する工程を包含する、方法。

【請求項52】 前記被検体がヒトである、請求項51に記載の方法。

【請求項53】 前記病態が、クロイツフェルト ヤーコブ病、ゲルストマン シュトロイスラー疾患、家族性不眠症、スクラピー、ウシの海綿状脳症、ミンクの伝染性脳症、ネコの海綿状脳症、外来性有蹄動物脳症および慢性消耗病である、請求項51に記載の方法。

【請求項54】 前記病態がクロイツフェルト ヤーコブ病である、請求項53に記載の方法。

【請求項55】 前記クロイツフェルト ヤーコブ病が、医原性の、新しい変種の、家族性の、または散発性のクロイツフェルト ヤーコブ病である、請求項54に記載の方法。

【請求項56】 サンプル中のプリオンを検出する方法であって、該方法は、以下の工程：

- a) 存在する場合、該リガンドとプリオンとの間の第1の複合体の形成を可能にする条件下で、請求項1に記載のリガンドを含む親和性吸着剤とプリオンタンパク質を含むことが既知であるかまたは疑われているサンプルを接触させる工程；
- b) 該第1の複合体と抗プリオン抗体との間の第2の複合体の形成を可能にする条件下で該抗プリオン抗体を添加する工程；および
- c) 該第2の抗体を検出する工程、を包含し、
それにより、該プリオンを検出する、方法。

【請求項57】 前記サンプルが生物学的流体である、請求項56に記載の方法。

【請求項58】 前記サンプルが環境液体である、請求項56に記載の方法。

【請求項59】 前記サンプルが土壌である、請求項56に記載の方法。

【請求項60】 前記サンプルを前記吸着剤と接触させる前に、該サンプル

中の前記プリオンタンパク質を濃縮する工程をさらに包含する、請求項56に記載の方法。

【請求項61】 前記抗プリオン抗体を添加する前に、前記第1の複合体を洗浄する工程をさらに包含する、請求項56に記載の方法。

【請求項62】 前記免疫吸着剤がビーズ上に存在する、請求項56に記載の方法。

【請求項63】 前記第2の複合体が、化学発光によって検出される、請求項56に記載の方法。

【請求項64】 第2の複合体に関連したシグナルが、化学発光である、請求項62に記載の方法。

【請求項65】 前記第2の複合体に関連したシグナルが、前記サンプルを欠くコントロール溶液中で前記抗プリオン抗体をインキュベートすることによって得られる第2の複合体に関連したシグナルのレベルと比較される、請求項56に記載の方法。

【請求項66】 前記第2の複合体に関連したシグナルが、前記抗プリオン抗体を欠く溶液中で前記サンプルをインキュベートすることによって得られる第2の複合体に関連したシグナルのレベルと比較される、請求項56に記載の方法。

【請求項67】 生物学的流体中のプリオンタンパク質の存在を検出する方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 存在する場合、該生物学的流体中の該プリオンタンパク質とアミノ樹脂との間の複合体の形成を引き起こすのに十分な条件下で、生物学的流体と該樹脂とを接触させる工程；

b) 該複合体を検出する工程、を包含し、
それにより、該生物学的流体中のプリオンタンパク質の存在を検出する、方法。

【請求項68】 前記生物学的流体が、血液、血漿、血清、脳脊髄液、尿、唾液、乳汁、管液、涙、および精液からなる群より選択される、請求項67に記載の方法。

【請求項69】 環境サンプル中のプリオンタンパク質の存在を検出する方

法であって、該方法は、以下の工程：

a) 存在する場合、該サンプル中の該プリオンタンパク質と該アミノ樹脂との間の複合体の形成を引き起こすのに十分な条件下で、環境サンプルとアミノ樹脂とを接触させる工程；

b) 該複合体を検出する工程、を包含し、
それにより、該サンプル中のプリオンタンパク質の存在を検出する、方法。

【請求項70】 前記環境サンプルが、土壤環境サンプルの水溶性部分を含む、請求項69に記載の方法。

【請求項71】 前記環境サンプルが土壤、草または干し草を含む、請求項70に記載の方法。

【請求項72】 生物学的流体からプリオンを除去する方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 存在する場合、該生物学的流体中の該プリオンとアミノ樹脂との間の複合体の形成を引き起こすのに十分な条件下で、該生物学的流体を該アミノ樹脂と接触させる工程；および

b) 該生物学的流体から該複合体を除去する工程、を包含し、
それにより、該生物学的流体からプリオンを除去する、方法。

【請求項73】 前記生物学的流体が、血液、血液組成物、血清、脳脊髄液、尿、唾液、乳汁、管液、涙、および精液からなる群より選択される、請求項72に記載の方法。

【請求項74】 環境サンプルからプリオンを除去する方法であって、該方法は、以下の工程：

a) 存在する場合、該環境サンプル中の該プリオンとアミノ樹脂との間の複合体の形成を引き起こすのに十分な条件下で、該サンプルを該樹脂と接触させる工程；および

b) 該環境サンプルから該複合体を除去する工程、を包含し、
それにより、該環境サンプルからプリオンを除去する、方法。

【請求項75】 前記環境サンプルが、土壤、干し草、土壤の可溶性成分、および干し草の可溶性成分からなる群より選択される、請求項74に記載の方法

。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(発明の分野)

本発明は、一般的に、プリオンタンパク質に結合するリガンド(ペプチドリガンドを含む)に関する。

【0002】

(発明の背景)

ネイティブなプリオンタンパク質(細胞性プリオンタンパク質については「PrP^c」と称される)は、自然界を通して広範に分布し、特に、哺乳動物内で十分に保存されている。感染性タンパク質(スクラピーに関して「PrP^{sc}」と称されるか、または耐性タンパク質に関して「PrP^{res}」と称される)へのネイティブなPrP^cタンパク質の変換は、種々の疾患の伝播を導くと考えられる。疾患と関連するプリオンの例としては、例えば、以下が挙げられる: ヒトにおけるクールーおよびクロイツフェルト-ヤコブ病; ヒツジにおけるスクラピー; ウシにおけるウシ海綿状脳症(BSE); ならびにシカおよびヘラジカにおけるミンクの伝染性脳症および消耗病。

【0003】

BSEは、狂牛病の形態であり、ヒトを含む広範な種々の他の哺乳動物に伝染性である。BSEのヒト形態は、新規異型クロイツフェルト-ヤコブ病、すなわちnvCJDと称される。英国では推定4000万人の人が、1980年代の中頃から後半の間にBSEに汚染された牛肉を摂取した。この口腔萎縮疾患(orally contracted disease)についての潜伏期間が20~30年であり得るので、これらの疾患の真の発病率は、2010年過ぎまで明らかになり得ない。サンプルからプリオンタンパク質を検出および取り除くための能力は、深く重要である。

【0004】

感染された牛肉の摂取に加えて、輸血によってヒトの間でのプリオン関連疾患の伝播の可能性がある。nvCJDの伝播性は、現在のところ知られていない。しかし、これはリンパ球に存在することが見出されていて、そしてプリオンは、

細胞結合されることに加えて血漿中に存在することを示す証拠が存在する。さらに、動物は、プリオン含有土壌に触れることによってか、または感染した干し草ダニを含む干草を摂取することによって、プリオン関連疾患で感染されるようになり得る。

【0005】

(発明の要旨)

本発明は、プリオンタンパク質中のアミノ酸配列に存在するオクタペプチド反復に結合するリガンドの発見に一部基づく。従って、1つの局面において、本発明は、プリオンタンパク質に存在するポリペプチド配列に結合するリガンドを含む。本発明に従うリガンドとしては、低分子(例えば、核酸、核酸アナログ、ペプチド、ペプチド模倣物、炭水化物、脂質、低有機分子および低無機分子)が挙げられる。1つ以上の芳香族官能基(例えば、ポルフィリン環、フタロシアニン、ナフトキノン(naphthoquinone)、イミダゾール、プリン、またはピリミジン)を含む化合物がまた、本発明に含まれる。

【0006】

本発明はまた、支持体(例えば、樹脂または膜)上のプリオン結合リガンドを含む組成物を提供する。

【0007】

さらなる局面において、本発明は、プリオンタンパク質に対するリガンドを同定する方法を提供する。

【0008】

本発明はまた、サンプル(例えば、生物学的流体サンプルまたは環境的サンプル)からプリオンタンパク質を検出および/または除去するための方法を提供する。

【0009】

本発明の別の局面は、被験体におけるプリオン関連病状の発達を処置または妨害する方法を提供する。例えば、本発明のリガンドは、クロイツフェルト-ヤコブ病、ゲルストマン・シュトロイスラー・シャインカ病、致死性家族性不眠症、スクラピー、ウシ海綿状脳症、ミンクの伝染性脳症、ネコ海綿状脳障害、外来

性有蹄動物脳障害および慢性消耗病のような病状を処置する場合に有用であり得る。

【0010】

他に規定されない限り、本明細書中に使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者によって通常理解される意味と同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料に類似または等価な方法および材料が、本発明の実施または試験に使用され得るが、適切な方法および材料は、以下に記載される。本明細書中に言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全体が参考として援用される。争議する場合、定義を含む本明細書は、調整される。さらに、材料、方法、および実施例は、例示のみであり、限定されることは意図されない。

【0011】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および上記の特許請求の範囲から明らかである。明細書および添付の特許請求の範囲において、単数形は、その状況が他の方法で明確に規定されない限り、複数形の指示対象を含む。

【0012】

(発明の詳細な説明)

本発明は、プリオンタンパク質を検出および単離する方法において有用な新規プリオン結合リガンド、ならびにプリオン疾患を診断および処置するための方法を提供する。プリオンに対するリガンドについてのライブラリーをスクリーニングするための方法、およびサンプルからのプリオンタンパク質の除去のための方法がまた、提供される。

【0013】

(リガンド結合プリオンポリペプチド)

本発明のプリオン結合リガンドは、好ましくは小分子である。「小分子」は、本明細書中に使用される場合、約5 kDa未満の分子量、および好ましくは約4 kDa未満の分子量を有する組成物を言及することが意味される。小分子は、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、炭水化物、脂質、または他の有機(炭素含有)分子もしくは無機分子であり得、そしてこれらは、単量体または

多量体であり得る。多くの製薬企業は、化学的混合物および/または生物学的混合物、しばしば、真菌抽出物、細菌抽出物、または藻抽出物の広範囲なライブラリー（これらは、本発明のリガンドとして使用され得る）を有する。

【0014】

1つの局面において、本発明は、プリオンタンパク質由来のペプチドまたはポリペプチドに結合する小分子リガンドを提供する。本明細書中に使用される場合、用語「ペプチド」によって、特定の長さは含意されない。いくつかの実施形態において、ペプチドは、例えば、100、75、50、25、20、17、15、12、10、9、8、7、6、または5アミノ酸未満の長さである。例えば、いくつかの実施形態において、本発明に従うリガンドは、アミノ酸配列GWGQPHGG（配列番号1）を含むポリペプチド（例えば、アミノ酸配列GWGQPHGGGWGQPHGG（配列番号2）を有するポリペプチド）に結合し得る。

【0015】

いくつかの実施形態において、リガンドは、プリオンタンパク質のオクタペプチド領域由来のポリペプチドに結合するアミノ酸配列を含むペプチドである。種々の実施形態において、プリオン結合ペプチドは、表1に列挙される配列番号3～30のうちの1つ以上の、アミノ酸配列を含む。

【0016】

表1は、スクリーニングを介してオクタペプチドに結合することが決定されたペプチド配列を示す。これらの配列は、Toyopearl樹脂上で合成され、そして生理食塩水中で放射能標識したオクタペプチド反復に結合するそれらの能力について試験された。結合のパーセンテージ（％）は、15 μMの出発ペプチドを用いてこの樹脂に結合しなかった放射能の量である。配列110～119を、さらなる100 μMのCuCl₂を含む血漿を用いてスクリーニングし、銅結合部位の飽和を確実にした。「コンセンサス」の列は、芳香族アミノ酸「O」および非芳香族アミノ酸「x」の存在を示す。

【0017】

【表1】

表 1

配列	配列番号	配列	ライブラリ	未結合 (%) [°C]	コンセンサス	説明
コントロール アセチル化				80,82		コントロール
コントロール アミン				91,93		コントロール
84	配列番号 3	LLIWIP	高い	89	xxx0xx	
85	配列番号 4	WLYWIP	高い	90	0x00xx	
86	配列番号 5	WEFYWF	高い	76	0x0000	
87	配列番号 6	YVFNWY	高い	45	0x0x00	
88	配列番号 7	LAWFWR	高い	90	xx000x	
89	配列番号 8	GFFFWW	低い	23	x00000	
90/98 ¹	配列番号 9	FYVFTA	低い	82	00x0xx	
91	配列番号 10	YFIWWE	低い	58	00x00x	
92	配列番号 11	SFPYY	高い	90	x0x000	
93	配列番号 12	LEIRLA	低い	96	xxxxxx	
94	配列番号 13	LLLVIA	低い	83	xxxxxx	
95	配列番号 14	SLEEV	低い	89	xxxx0x	
96	配列番号 15	LRVIS	低い	90	xxxxxx	

97	配列番号 16	QLGHQW	低い	85	xxxx0	
99	配列番号 17	SNYGPY	高い	79	xx0xx0	
100	配列番号 18	PFHPG ²	高い	88	x0xxx	
101	配列番号 19	WIPPYN	高い	84	0xxx0x	
102	配列番号 20	WFPHEF	高い	64	00xx00	
110	配列番号 21	IQIWIF	高い	85	xxx0x0	Cu
111	配列番号 22	LWVLFV	高い	85	x00x0x	Cu
112	配列番号 23	IFFWIK	高い	77	x000xx	Cu
113	配列番号 24	RWISL	高い	89	x0xxxx	Cu
114	配列番号 25	QWWFII	高い	87	x000xx	Cu
115	配列番号 26	VFEYIK	高い	87	x0x0xx	Cu
116	配列番号 27	WLVWIA	高い	85	0xx0xx	Cu
117	配列番号 28	YWFYI	高い	83	000x0x	Cu
118	配列番号 29	TGPII	高い	88	xxxxxx	Cu
119	配列番号 30	HKEOGA	低い	91	xxxxxx	Cu

¹ ペプチド配列 F Y V F T A (配列番号 9) は、2つの異なるペプチド数 (9 および 98) を与えた。

² 第6位は、決定できなかった。

【0018】

例えば、いくつかの実施形態において、ペプチドリガンドは、以下のアミノ酸配列を含む：LLIWIP (配列番号 3)、WLYWIP (配列番号 4)、WLVWIA (配列番号 27)、IQIWIF (配列番号 21)、IFFWIK (配列番号 23)、および LLLVIA (配列番号 13)。

【0019】

好ましくは、ペプチドリガンドのアミノ酸配列は、ストレプトアビジンポリペプチド (例えば、WO 00/02575 に開示されるペプチドのアミノ酸配列

を有するストレプトアビジンポリペプチド)のアミノ酸配列中に存在しない。

【0020】

いくつかの実施形態において、プリオンのペプチド、ペプチドリガンド、および個々の部分またはアナログならびにこれらの誘導体は、化学的に合成され得る。ペプチド合成装置を用いた合成を含む種々のタンパク質合成方法が、当該分野で一般的である。例えば、Peptide Chemistry, A Practical Textbook, Bodansky編, Springer-Verlag, 1988; Merrifield, Science 232:241-247 (1986); Baranyら, Intl. J. Peptide Protein Res. 30:705-739 (1987); Kent, Ann. Rev. Biochem. 57:957-989 (1988); および Kaiserら, Science 243:187-198 (1989)を参照のこと。特定の実施形態において、ペプチドは、合成され、生成され、次いで、スクリーニングのために使用される樹脂に結合され得る。他の実施形態において、ペプチドは、樹脂上で直接合成され、次いで、樹脂に結合したペプチドが精製される。

【0021】

ペプチドは、化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まないように、標準的なペプチド精製技術を用いて精製される。語「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、ペプチドの調製を含み、この調製において、ペプチドは、そのペプチドの合成に關与する化学前駆体または他の化学物質から分離されている。1つの実施形態において、語「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、約30%未満(乾燥重量)の化学前駆体もしくは非ペプチド化学物質を有するペプチドの調製、より好ましくは約20%未満(乾燥重量)の化学前駆体もしくは非ペプチド化学物質を有するペプチドの調製、なおより好ましくは約10%未満(乾燥重量)の化学前駆体もしくは非ペプチド化学物質を有するペプチドの調製、そして最も好ましくは約5%未満(乾燥重量)の化学前駆体もしくは非ペプチド化学物質を有するペプチドの調製を含む。

【0022】

ペプチドの化学合成は、改変アミノ酸または非天然のアミノ酸（D - アミノ酸および他の小さい有機分子を含む）の取り込みを容易にする。ペプチド中の1つ以上のL - アミノ酸と対応するD - アミノ酸異性体との置換が使用されて、酵素学的加水分解に対するペプチドの耐性を増加し、そして生物学的に活性なペプチドの1つ以上の特性（すなわち、プリオンまたはリガンド結合、レセプター結合、機能的な潜在能力または作用の持続期間）を増強し得る。例えば、Dohertyら、*J. Med. Chem.* 36:2585 - 2594 (1993); Kirbyら、*J. Med. Chem.* 36:3802 - 3808 (1993); Moritaら、*FEBS Lett.* 353:84 - 88 (1994); Wangら、*Int. J. Pept. Protein Res.* 42:392 - 399 (1993); FauchereおよびThiunieuau、*Adv. Drug Res.* 23:127 - 159 (1992)を参照のこと。

【0023】

本発明のプリオンペプチドおよびプリオンペプチドリガンドは、L - アミノ酸、D - アミノ酸、または両方の組み合わせのポリマーであり得る。本明細書中に記載されるペプチドリガンドのアナログが非ペプチジル結合で存在するリガンドがまた、本発明に含まれる。

【0024】

例えば、種々の実施形態において、ペプチドリガンドは、D逆転ペプチド（D retro - inverso peptide）である。用語「逆転異性体」は、配列の向きが反転され、そして各アミノ酸残基のキラリティが転化した直線状ペプチドの異性体をいう。例えば、Jamesonら、*Nature*, 368:744 - 746 (1994); Bradyら、*Nature*, 368:692 - 693 (1994)を参照のこと。D - 鏡像異性体と逆合成との組み合わせの最終結果は、各アミド結合におけるカルボキシル基およびアミノ基の位置が交換されるが、各炭素における側鎖の基の位置は保存されるという結果である。他に特に言及しない限り、本発明の任意の所定のL - アミノ酸配列は、対応するネイティブなL - アミノ酸配列についての配列の逆を合成することによって、D逆転ペプチドへと作製され得ることが推定される。例示するために、ペプチドモデル

がプリオン結合リガンドペプチドの110: IQIWI F (配列番号21) (L-アミノ酸の形態)である場合、このペプチドの逆転ペプチドアナログ(D-アミノ酸の形態)は、配列FIWIIQIを有する。

【0025】

ペプチド配列への共有結合的な架橋の導入は、コンフォメーション的および構造的にペプチド骨格を妨げ得る。このストラテジーは、増加した潜在能力、選択性および安定性を有するペプチドアナログを開発するために使用され得る。環状ペプチドのコンフォメーションエントロピーが、その直線状の対応物のコンフォメーションエントロピーよりも低いので、非環式アナログについてのエントロピーよりも、環状アナログについてのエントロピーにより少ない減少を伴って、特定のコンフォメーションの選択が生じ得、それによって、結合についての自由エネルギーをより望ましいものにする。大環状化(macrocyclization)は、しばしば、ペプチドN末端とペプチドC末端との間、側鎖とN末端もしくはC末端との間[例えば、pH8.5において $K_3Fe(CN)_6$ を用いて](Samsonら, *Endocrinology*, 137:5182-5185(1996))、または2つのアミノ酸側鎖間にアミド結合を形成することによって、達成される。例えば、DeGrado, *Adv. Protein Chem.*, 39:51-124(1988)を参照のこと。ジスルフィド架橋がまた、直線状配列に導入されて、その可撓性を減少する。例えば、Roseら, *Adv. Protein Chem.*, 37:1-109(1985); Mosbergら, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 106:505-512(1982)を参照のこと。

【0026】

多数の他の方法が、好首尾に使用されて、その潜在能力、レセプター選択性および生物学的半減期を改善するためにコンフォメーションの制約をペプチド配列に導入する。これらとしては、以下の使用が挙げられる:(i)C-メチルアミノ酸(例えば、Roseら, *Adv. Protein Chem.*, 37:1-109(1985); PrasadおよびBalararam, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 16:307-348(1984));(ii)

N - メチルアミノ酸 (例えば、Aubryら, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 18:195-202 (1981); Manavalan および Momany, *Biopolymers*, 19:1943-1973 (1980)); ならびに (iii) , - 不飽和アミノ酸 (例えば、Bach および Gierasch, *Biopolymers*, 25:5175-S192 (1986); Singhら, *Biopolymers*, 26:819-829 (1987))。これらおよび多くの他のアミノ酸アナログは、市販されるか、または容易に調製され得る。

【0027】

あるいは、ペプチドおよびペプチドリガンドが、組み換えペプチドの発現および精製に関する当該分野で周知の方法によって獲得され得る。本発明に従うペプチドをコードするDNA分子が作製され得る。DNA配列は、公知のコドン使用頻度に基づいてタンパク質配列から縮重される。例えば、OldおよびPrimrose, *Principles of Gene Manipulation* 第3版, Blackwell Scientific Publications, 1985; Wadaら, *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118 (1992)を参照のこと。好ましくは、このDNA分子は、さらなる配列 (例えば、プラスミドのような適切なクローニングベクターへのそのクローニングを容易にする、制限酵素のための認識部位) を含み得る。本発明は、コード領域、非コード領域、または両方を含む核酸 (単独であるかまたは組換えベクターにクローン化されるかのいずれかである)、ならびに、オリゴヌクレオチドならびにこれらに対応するプライマーおよびプライマー対を提供する。核酸は、DNA、RNA、またはこれらの組み合わせであり得る。本発明のベクターは、発現ベクターであり得る。本発明に従うペプチドをコードする核酸は、当該分野で公知の任意の方法 (例えば、この配列の3'末端および5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するPCR増幅ならびに/または所定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチド配列を用いる、cDNAライブラリーもしくはゲノムライブラリーからのクローニングなど) によって獲得され得る。核酸はまた、化学合成によって作製され得る。

【0028】

いくつかの実施形態において、本発明に従うペプチドリガンドは、金属の存在下でプリオンポリペプチドに結合する。金属の1例は、銅である。理論に束縛されることを望まないが、プリオンタンパク質のオクタペプチド領域が、銅[Cu(II)]に結合すると考えられ、この銅[Cu(II)]が、規定された構造を他のランダムなループ構造に誘導し得る。プリオンタンパク質の生理学的役割は、細胞内への銅輸送であると考えられる。Vilesら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2041, 1999。

【0029】

いくつかの実施形態において、本発明に従うペプチドリガンドは、1 nM ~ 500 μMの銅、例えば、10 nM ~ 400 μM、100 nM ~ 300 μM、または500 nM ~ 約100 μMの銅の存在下でプリオンポリペプチドを結合する。

【0030】

1つの特定の実施形態において、プリオンタンパク質、そのフラグメント、誘導体またはアナログの配列は、検出可能な(例えば、放射活性または蛍光)標識を含むように改変される。

【0031】

所望の場合、本発明に従う2以上のペプチドリガンドが、複数のコピーで存在し得る。1以上のペプチドの同一のコピーが存在し得るか(例えば、ホモダイマー、ホモトリマーなど)、または配列が異なるペプチドの複数のコピーがリガンド中に存在し得る(例えば、ヘテロダイマー、ヘテロトリマーなど)。

【0032】

(プリオンを検出および除去するためのリガンドの使用)

プリオンタンパク質およびフラグメントに結合するリガンドは、種々の分析適用、調製適用および診断適用に有用である。1つの実施形態において、プリオンリガンドは、溶液サンプル中のプリオンタンパク質の存在を検出するために使用され得る。いくつかの実施形態において、リガンドは、固体支持体(例えば、樹脂または膜)に結合され得、そして溶液(例えば、生物学的流体)中に存在する標的を結合および検出するために使用され得る。例えば、Doyl e, 米国特許

第5, 750, 344号を参照のこと。生物学的流体の例としては、例えば、血液、血液由来組成物または血清が挙げられる。さらなる生物学的流体としては、脳脊髄液、尿、唾液、乳汁、管液(ductal fluid)、涙または精液が挙げられる。

【0033】

本明細書中で使用される場合、用語「血液由来組成物」および「血液組成物」は交換可能に使用され、そして全血、血漿、血漿分画、血漿沈降物(例えば、寒冷沈降物、エタノール沈降物またはポリエチレングリコール沈降物)、血漿上清(例えば、寒冷上清、エタノール上清またはポリエチレングリコール上清)、溶媒/界面活性剤(SD)血漿、血小板、静脈内免疫グロブリン(IVIg)、IgM、精製凝固因子濃縮物、フィブリノーゲン濃縮物、あるいはヒトまたは動物由来の種々の他の組成物を含むことが意味される。血液由来組成物はまた、当該分野で一般的な任意の種々の方法(イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、および/または疎水性クロマトグラフィーを含む)によってかまたは分画沈殿によって調製された精製凝固因子濃縮物(例えば、第VII因子濃縮物、第IX因子濃縮物、フィブリノーゲン濃縮物など)を含む。

【0034】

別の実施形態において、プリオンタンパク質およびフラグメントに結合するリガンドは、固体サンプルから溶液中に抽出された標的を検出するために使用され得る。例えば、固体サンプルは、水性溶媒または有機溶媒で抽出され得、そして得られた上清を、リガンドと接触させ得る。固体サンプルの例としては、植物産物、特に、プリオンを伝播する因子に曝露された植物産物が挙げられる。例えば、干し草のダニが、プリオンを伝播すると報告されている。従って、本明細書中に記載の方法は、固体サンプル(例えば、草および干し草)中のプリオンを検出するために使用され得る。本発明のリガンドはまた、土壌中のプリオンの存在を検出するためにいくつかの実施形態において使用され得る。他の固体サンプルとしては、脳組織、角膜組織、糞便物質、骨粉、牛肉、牛肉副産物、ヒツジ肉、ヒツジ肉副産物、シカ肉、シカ肉副産物、エルク肉(elk)、およびエルク肉副

産物が挙げられ得る。

【0035】

あるいは、またはさらに、結合は、溶液サンプルまたはサンプル上清から同族の標的（単数または複数）を選択的に除去するために使用され得る。溶液からの標的の選択的な検出および除去のために、リガンドは、固体支持体（例えば、樹脂）に結合され得る。血液または血液組成物のような流体から因子を除去するための樹脂は、当該分野で周知であり、そして例えば、Horowitzら、米国特許第5,541,294号；Buettneraら、米国特許第5,723,579号；Buettnera、米国特許第5,834,318号に記載される。1つの実施形態において、樹脂は、ポリメタクリレート樹脂である。

【0036】

（プリオンタンパク質に対するリガンドを同定する方法）

本発明はまた、プリオンタンパク質に対するリガンドを同定する方法を提供する。この方法は、試験因子と、配列GWGQPHGGGWGQPHGG（配列番号2）の少なくとも3個連続するアミノ酸またはその逆方向（retro-inverso）配列D（GGHPQGWGGGHPQGWG）（配列番号34）の少なくとも3個連続するアミノ酸を含むペプチドを接触させる工程を包含する。試験因子と上記ポリペプチドとの間の複合体の形成は、この試験因子がプリオンタンパク質に対するリガンドであることを示す。

【0037】

「プリオンタンパク質」は、「正常な」プリオンタンパク質であり得、「プロテアーゼ感受性」または「感受性」プリオンタンパク質（PrPcと示される）とも呼ばれる。感染性形態にあるプリオンタンパク質は、「耐性」形態またはスクラピー形態と呼ばれ、それぞれ、「PrPres」タンパク質または「PrPsc」タンパク質と示される。検出され得るさらなるリガンドは、感受性形態および耐性形態の両方の改変体に結合するリガンドである。プリオンの単離体または株は、構造またはコンフォメーションによって変わり得るか、または特徴的な疾患の潜伏期、疾患の長さおよび病態によって変わり得る。改変体のアミノ酸配列は、1以上のアミノ酸で異なり得る。

【0038】

試験因子（例えば、リガンド）は、例えば、ポリペプチド、ペプチド、ペプチド模倣物、有機低分子、無機低分子、核酸、脂質、または糖質であり得る。試験因子は、モノマー化合物またはポリマー化合物であり得る。いくつかの実施形態において、試験因子は、ポルフィリン環、フタロシアニン、ナフトキノン（naphthoquinone）、イミダゾール、プリンまたはピリミジンのような芳香族基を含む。

【0039】

いくつかの実施形態において、ペプチドは、配列GWGQPHGGGWGQPHGG（配列番号2）または配列D（GGHPQGWGGGHPQGWG）（配列番号34）の4、5、6または7個連続するアミノ酸を含む。

【0040】

このスクリーニング方法において使用するために適切なペプチドの例は、オクタペプチド反復GWGQPHGGGWGQPHGG（配列番号2）を含み、そしてカルボキシル末端がアミド化され、そしてアミノ末端が $[^{14}\text{C}]$ 無水酢酸でアセチル化されているペプチドである。このペプチドは、このオクタペプチドのダイマーを示し、そして*アセチルGWGQPHGGGWGQPHGGアミドとして示される。

【0041】

プリオンリガンドについてスクリーニングするために有用な他のペプチドとしては、*アセチルPHGGGWGQPHGGGWGQアミド（配列番号33）のような、その繰り返し配列の順列を含む。配列GWGQPHGG（配列番号1）は、ヒトプリオンタンパク質中で少なくとも4回繰り返されるので、複数の反復を有するペプチドを結合するリガンドが、増加した親和性でプリオンタンパク質に結合すると考えられる。しかし、単一のオクタペプチド反復GWGQPHGG（配列番号1）もまた、リガンドスクリーニングに使用され得、この配列のフラグメント（例えば、HGGGW（配列番号31）または銅結合モチーフHGGG（配列番号32））も同様に使用され得る。

【0042】

理論に束縛されることを望まないが、ペプチドダイマーは、理論的に、2モルの銅とのキレート化を可能にすると考えられる。Vilesら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2041, 1999; Miuraら、Biochem. 38:11560 (1999)。ペプチド G_1WGQP_5HG $GGW_{10}GQPHGG_{16}$ アミド(配列番号2)について、1個の銅は、 H_6 ならびに G_7 と G_8 との間のペプチド結合の窒素および G_8 と G_9 との間のペプチド結合の窒素に結合すると考えられる。第2の銅は、 H_{14} 、 G_{15} と Q_{16} との間のペプチド結合、およびアミド結合の窒素に配位結合し得る。ペプチド $P_1HGGG_5WGQPH_{10}GGGWGQ_{16}$ アミド(配列番号33)について、1個の銅は、最初の H_2 ならびに G_3 と G_4 との間のペプチド結合の窒素および G_4 と G_5 との間のペプチド結合の窒素に結合すると考えられ、そして第2の銅は、 H_{10} ならびに G_{11} と G_{12} との間のペプチド結合および G_{12} と G_{13} との間のペプチド結合に配位結合し得る。従って、いくつかの実施形態において、スクリーニングは、銅のような金属の存在下で行われる。代表的な銅濃度は、100 nM ~ 約500 μ M、好ましくは、約500 nM ~ 約100 μ Mの範囲を含む。

【0043】

1つの実施形態において、放射標識ペプチドが、リガンドスクリーニングにおいて使用される。例えば、オクタペプチド反復由来の配列のいくつかまたは全てを含む放射標識ペプチドは、化学合成され得、そして合成コンビナトリアルライブラリー中のリガンドに結合する能力についてスクリーニングされ得る。ペプチドとライブラリーのメンバーとの複合体は、放射標識ペプチドを使用して同定され得る。

【0044】

所望の場合、リガンドライブラリーが、スクリーニング方法において使用され得る。本明細書中で使用される場合、リガンドライブラリーは、異なる配列を有する少なくとも2個(例えば、5個; 10個; 50個; 100個; 200個; 500個; 1,000個; 2,500個; 5,000個; 10,000個; 25,000個; またはそれ以上)の分子実体を意味する。ライブラリーは、核酸、糖

質またはペプチドのようなポリマーリガンドを含み得る。ペプチドライブラリーの場合、アミノ酸基本単位は、20個の遺伝子コードされるL-アミノ酸、D-アミノ酸、合成アミノ酸、側鎖改変（例えば、スルフェート基、ホスフェート基、糖質部分）を有するアミノ酸などであり得る。ランダムペプチドライブラリーは、2～100アミノ酸またはそれ以上の長さ（しかし、代表的には、約5～15アミノ酸長）の範囲にあるペプチドの混合物を含み得る。用語「ランダム」とは、単にそのライブラリーの最も代表的な調製物を示し、そしてその組成が未知であることを必要としない。従って、所望の場合、正確に既知の組成の混合物を調製し得る。ライブラリーはまた、非オリゴマーリガンド（例えば、小さい非オリゴマー有機リガンド（ポルフィリン環、フタロシアニン、ナフトキノンおよびイミダゾールのような芳香族リガンドを含む））を含み得る。

【0045】

ペプチドリガンドのスクリーニングのために、生物学的に由来（例えば、ファージ）のライブラリーまたは化学合成コンビナトリアルライブラリーが使用され得る。後者は、一般的に、好ましい。なぜなら、これはより迅速に生成され、そして非天然のアミノ酸を使用し得るので、より大きい多様性を有するからである。コンビナトリアル構造のメンバーは、クロマトグラフィービーズまたはシリコンチップのような不活性支持体の表面上に生成され得る。クロマトグラフィービーズは、例えば、100 μm 直径であり得る。各ビーズは、その表面上に単一の構造が合成され、各ビーズは、固有の構造を有し得る。従って、1,000,000個を超えるビーズを含む1mlの樹脂は、匹敵する数の固有の配列を有し得る。

【0046】

一般に、リガンドライブラリーを構築するための任意の当該分野で認識されている方法を使用し得る。不活性表面上の合成ペプチドコンビナトリアルライブラリーの開発は、リガンド-標的相互作用を研究するための利用可能な多くの異なるペプチドを作製した。ランダムペプチドライブラリーは、マイクロビーズ上にポリマー化されたアミノ酸の標準的な有機合成によって生成され得る。代表的に、ライブラリー中の任意の1個のビーズ上のペプチドは、実質的に同じであるが

; ペプチド配列は、ビーズ間で異なる。例えば、Furkara、Int. J. Pept. Protein Res. 37: 487-493 (1991); Lamら、Nature 354: 82-84 (1991)に記載のように、混合、分割および結合合成方法が、ポリスチレンベースの樹脂ビーズ上に固有のペプチド配列を生成するために使用され得る。表面結合化学合成ライブラリーは、現在、商業供給源から購入され得る。例えば、ペプチドライブラリーは、Peptides International, Inc (Louisville, KY) から得られ得る。

【0047】

リガンドのライブラリーは、ライブラリーのメンバーの相対的な空間的位置が表面上で検出され得るのに十分安定である結合を生じる、任意の結合方法を使用して、表面（例えば、ビーズ）に結合され得る。

【0048】

いくつかの実施形態において、ペプチドリガンドを含むライブラリーは、ポリメタクリレート樹脂上でペプチドを合成することによって構築される。例えば、樹脂上の反応基は、第1の保護アミノ酸の結合部位であり、このアミノ酸は、そのカルボキシル基を介して結合される。結合後、第1のアミノ酸の保護アミノ基は脱保護されて、新しいアミノ末端を露出する。この新しいアミノ末端は、次の保護アミノ酸の結合のための部位として機能する。カップリングおよび脱保護のサイクルを通じて、ライブラリーは、樹脂（例えば、TentaGel樹脂（Peptides International, INC., Louisville, KY））の最初の反応基から伸長する。

【0049】

いくつかの実施態様においては、各々固有のリガンドを有する個々のビーズが、表面上に固定される。他の実施形態において、リガンドライブラリーを含む樹脂は、カラム中に配置されるか、またはバッチ形式でスクリーニングされる。

【0050】

多くのリガンドがビーズの表面上に合成され得るので、多量のビーズ（そのほとんどが、固有のリガンドを有する）を生成することが可能である。しかし、例

例えば、多くのペプチドリガンドを合成し、そして標的に対する結合について全てのビーズをスクリーニングすることは、技術的に困難である。従って、候補リガンドを選択する1つの方法は、結合活性について、より小さいライブラリーをスクリーニングすることを含む。一旦、リードが見出されると、さらなるリガンド(サブライブラリー)が、そのリードリガンドに基づいて合成される。これらのサブライブラリーのスクリーニングは、さらなる改善されたリードが発見されることを導き得る。合成およびスクリーニングの繰り返しのプロセスを通して、好ましいリガンドを同定することが可能である。

【0051】

非結合リガンドと標的に結合されたリガンドとの間の任意の検出可能な差異が、利用され得る。例えば、プリオン標的を認識するプローブ分子は、スクリーニングされるリガンドライブラリーに追加され得、そして結合させられ得る。あるいは(またはさらに)、リガンドに結合した蛍光標識されたプリオン標的は、分光光度的に測定され得る。特定の実施形態において、標的は、それ自体で標識されないが、結合反応後に、標的が、検出可能なシグナル(すなわち、光放出シグナル)を生じるように反応される。放射性標識分子もまた、リガンド-プリオン複合体の存在を検出するために使用され得る。例えば、プリオン標識は、放射活性 ^{14}C 、 ^{35}S または ^{125}I で標識され得る。他の実施形態において、プリオン標的に対する抗体が、検出分子として使用され得る。Carbone 1らは、標的を放射標識する工程(米国特許第5,783,663号; Basteckら、Separation Science and Tech(印刷中)2000)、標的をコンビナトリアルライブラリーに曝露する工程、多量の緩衝液でビーズを洗浄する工程、ビーズを寒天中にプレートする工程、および放射標識した標的に結合したビーズをオートラジオグラフィフィルムによって検出する工程を包含するスクリーニング方法を開発した。

【0052】

いくつかの実施形態において、リガンドは、血漿の存在下で同定される。これは、例えば、ライブラリーのビーズに、次いで、血漿に(所望の場合)ブロッキング溶液を添加し、最後に放射標識したペプチドを血漿に添加することによって

達成され得る。インキュベーション後、ビーズをカラム中に配置し、そして全ての結合していない放射活性が除去されるまで洗浄する。次いで、ビーズをソフトアガー中にプレートし、そして乾燥後、オートラジオグラフィフィルムを被せる。

【0053】

一旦、リガンド-プリオン標的複合体が検出されると、ビーズを単離し、そしてリガンドを同定しそしてさらに特徴付ける。リガンドの同定は、推定の標的-結合リガンドを含むリガンドライブラリーの領域から、元々のライブラリー中のいくつかのメンバーを再スクリーニングすることを含み得る。これは、リガンドライブラリーが、比較的高い密度でプレートする場合に代表的に行われる。

【0054】

例えば、リガンドがペプチドである場合、これは、エドマン分解によって微量配列決定される。次いで、その読み取られた配列を、樹脂上で合成する。放射標識したペプチドの結合は、この第2の樹脂を放射標識したプリオンペプチドに曝露し、そして遠心分離および濾過によって分離後の結合していない放射標識を回収することによって確認される。

【0055】

試験因子がプリオン由来ペプチド(すなわち、オクタペプチド)に対するリガンドであることを確かめるために、リガンドに対するオクタペプチド結合についての二次試験を、当該分野で公知の方法(例えば、平衡結合)を使用して行い得る。研究が行われるマトリクスは、実験条件下で、リガンドに対するペプチドまたはタンパク質の結合の相対的親和性に影響し得る。1つの好ましいマトリクスは、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)である。

【0056】

(プリオンタンパク質を検出する方法)

本発明はまた、生物学的流体中のプリオンタンパク質の存在を検出する方法を提供する。生物学的流体(例えば、試験サンプル)を、本発明に従うリガンドと、生物学的流体中のプリオンタンパク質(存在する場合)とリガンドとの間の複合体の形成を引き起こすのに十分な条件下で接触させる。次いで、複合体を検出

し、それによって、生物学的流体中のプリオンタンパク質の存在を検出する。

【0057】

プリオンタンパク質の存在は、任意の所望の生物学的流体中で試験され得る。適切な生物学的流体としては、代表的に、例えば、血液、血液画分および血液組成物、ならびに脳脊髄液、尿、唾液、乳汁、管液、涙または精液が挙げられる。

【0058】

スクリーニングによって同定された配列がプリオンタンパク質全体を結合する能力を実証するためのさらなるアプローチは、96ウェルマイクロタイタープレートの中の多くのウェルの各々に多くのビーズ(例えば、約200個)を添加することである。次いで、プリオンを含む脳抽出物をビーズに添加し、そしてインキュベーション後、結合していないプリオンを、繰り返しの洗浄によって除去する。次いで、プリオンの存在を、プリオン特異的抗体、ホスファターゼ結合体化二次抗体およびホスファターゼ基質を添加することによって検出する。さらなるコントロールウェルは、非特異的結合、内因性ホスファターゼ、非特異的抗体結合などに起因するシグナルの量を規定する。この形式は、プリオンタンパク質を同定するための高スループットアッセイを形成するよう展開され得る。本発明によって提供されるプリオンタンパク質の検出の方法は、多くの異なる型のサンプルにおいてプリオンタンパク質を検出するために使用され得る。例えば、プリオン含有サンプルは、例えば、血液、血液生成物または血液画分(例えば、血漿および血清)、脳脊髄液、尿、唾液、管液、涙、精液、水または乳汁のような体液流体であり得る。サンプルはまた、脳組織、角膜組織、糞便物質、骨粉、牛肉、牛肉副産物、ヒツジ肉副産物、シカ肉、シカ肉副産物、エルク肉、エルク肉副産物、土壌、干し草または動物飼料のような固体サンプルの抽出物由来の上清であり得る。BSEは、牛肉副産物を補充された食糧を介してウシに伝播され、食糧のような材料中のプリオンタンパク質を検出するための方法が、極めて有用である。

【0059】

(生物学的流体からプリオンを除去する方法)

生物学的流体からプリオンを除去する方法もまた、本発明に包含される。この方法は、生物学的流体を、本発明に従うプリオン結合リガンドと、生物学的流体

中のプリオンタンパク質（存在する場合）とリガンドとの間の複合体の形成を引き起こすのに十分な条件下で接触させる工程を包含する。この複合体は、生物学的流体から除去され、それによって、生物学的流体からプリオンを除去する。

【0060】

プリオンタンパク質は、任意の所望の生物学的流体から除去され得る。適切な生物学的流体としては、代表的に、血液、血液生成物または血液画分（例えば、血漿および血清）、脳脊髄液、尿、唾液、管液、涙、精液、水または乳汁が挙げられる。

【0061】

プリオンタンパク質はまた、アフィニティークロマトグラフィーを使用することによって、サンプル中の他のタンパク質から分離され得る。この場合、プリオンタンパク質またはペプチドを結合する本発明に従うリガンドまたは因子は、固体支持体（例えば、不活性支持体（例えば、膜または樹脂））に結合され、そしてプリオンタンパク質が、その固定された因子に結合する。所望の場合、最初のスクリーニングで得られた配列のうちの1つを、樹脂（例えば、ポリメタクリレート）上に固定する。使用され得る他の型の樹脂としては、例えば、セファロース、架橋アガロース、複合架橋ポリサッカリド、セライト（celite）、アクリレート、ポリスチレンおよびセルロースが挙げられる。膜（例えば、ナイロンおよびセルロースのような）もまた使用され得る。

【0062】

リガンドからのプリオンタンパク質の溶出は、リガンドに対するプリオンの親和性によって影響される。プリオンは、異なるコンフォメーション状態および異なる凝集度で存在する。感染性プリオンは、頻繁に凝集され、そして従って、非凝集の非感染性プリオンタンパク質よりも、樹脂に対する高い親和性を有することが予測される。これは、この凝集体の異なる分子と樹脂上のリガンドとの間の複数の相互作用の可能性に起因する。このより高い親和性は、それ自体で、PrP^{Sc}と比べてPrP^Cについての異なる溶出プロフィールを表し得る。プリオンタンパク質とオクタペプチド反復ペプチドのスクリーニングから決定されたりリガンドとの間の相互作用は、実際に結合する配列に隣接するプリオンタンパク

質の構造によって影響され得る。さらに、リガンドは、プリオンタンパク質自体の他の部位との複数の相互作用に参与し得る。これらは、PrPcとPrPscとの間で異なることが予測される。従って、オクタペプチド反復を含む全ての哺乳動物プリオンタンパク質が、オクタペプチド特異的リガンドに結合するが、リガンドに対するそのタンパク質の全体的な結合親和性は、異なるプリオンについておそらく異なる。プリオンタンパク質の溶出プロフィールは、プリオンタンパク質がプリオンタンパク質を結合するという事実によって影響される。従って、相互作用の強度は、樹脂の表面上の直接的なプリオン間相互作用によっておそらく増強される。

【0063】

(プリオン関連病態を処置または予防する方法)

本発明に従うリガンドは、被験体におけるプリオン関連病態を処置するかまたはその発症を遅延する方法において使用され得る。この方法は、本発明のリガンドを、その病態を処置するかまたはその発症を遅延するのに十分な量で被験体に投与する工程を包含する。いくつかの実施形態において、被験体は、哺乳動物(例えば、ヒト、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ラット、マウスまたはシカ)である。

【0064】

処置され得るプリオン関連病態としては、プリオンまたはプリオン関連因子が、原因因子として関連付けられた病態が挙げられる。これらの状態としては、例えば、クロイツフェルト-ヤコブ病(医原性、新規改変体、家族性または散発性形態を含む)、ゲルストマン-シュトロイスラー症候群、致死性家族性不眠、スクラピー、ウシの海綿状脳症、ミンクの伝染性脳症、ネコの海綿状脳症、外来有蹄類(exotic ungulate)脳症、および慢性消耗病が挙げられる。

【0065】

本発明のリガンドは、髄腔内(IT)、脳室内(ICV)または全身的(例えば、腹腔内(IP))に投与され得る。リガンドの可溶性は、可溶化剤(例えば、シクロデキストラン)との混合によって増強され得る。代替的な実施形態において、本発明に従うリガンドは、プリオン関連病態を処置または予防するための

1以上のさらなる因子と共に投与される。

【0066】

(薬学的組成物)

本発明のリガンドは、投与に適切な薬学的組成物に組み込まれ得る。このような組成物は、代表的に、リガンドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む。本明細書中で使用される場合、「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬剤投与に適合性の、任意のおよび全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むことが意図される。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および因子の使用は、当該分野で周知である。任意の従来の媒体または因子が活性化合物と不適合である場合を除いて、組成物におけるそれらの使用が意図される。補助的な活性化合物もまた、組成物中に含まれ得る。改変は、本発明のリガンドに対して、そのリガンドの溶解度またはクリアランスに影響を及ぼすようになされ得る。

【0067】

必要な場合、リガンドは、可溶化剤（例えば、シクロデキストラン）と共に同時投与され得る。

【0068】

本発明の薬学的組成物は、その意図される投与経路と適合性であるよう処方される。投与経路の例としては、非経口（例えば、静脈内）、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（局所）、経粘膜および直腸投与が挙げられる。非経口適用、皮内適用、または皮下適用に使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含み得る：滅菌希釈剤（例えば、注射用水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセロール、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒）；抗菌剤（例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン）；酸化防止剤（例えば、アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸）；緩衝液（例えば、アセテート、シトレートおよびホスフェート）、および張度を調整するための因子（例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース）。pHは、酸または塩基（例えば、塩酸または水酸化ナトリウム）で調整され得る。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチックで作製され

た、アンプル、使い捨てシリンジまたは複数回用量のバイアルに封入され得る。

【0069】

注射可能な用途に適切な薬学的組成物としては、無菌の水溶液（水溶性である場合）または水性分散物および無菌の注射可能な溶液または分散物の即時調製のための無菌の粉末が挙げられる。静脈内投与に関して、適切なキャリアとしては、生理学的食塩水、静菌水、Cremophor EL™（BASF, Parsippany, NJ）またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）が挙げられる。組成物は好ましくは無菌であり、そして容易な注射性（syringability）が存在する程度まで流体であるべきである。組成物は好ましくは、製造条件下および貯蔵条件下で安定であり、そして細菌および真菌のような微生物の汚染作用から保護されなければならない。キャリアは、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）およびそれらの適切な混合物を含有する、溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散物の場合は必要とされる粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持され得る。微生物作用の妨害は、種々の抗細菌剤および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど）によって達成され得る。多くの場合、等張剤（例えば、糖、ポリアルコール（例えば、マンニトール（mannitol）、ソルビトール）、塩化ナトリウム）を組成物中に含むことが好ましい。注射可能な組成物の長期吸収は、組成物中に、吸収を遅延させる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）を含ませることによってもたらされ得る。

【0070】

無菌の注射可能な溶液は、活性な化合物（例えば、本発明によるリガンド）を、必要とされる量で、必要な場合は上記に列挙した1つまたは組み合わせた成分を有する適切な溶媒中に混合し、そして濾過滅菌することによって調製され得る。一般に、分散物は、活性な化合物を、塩基性分散媒および上記に列挙した成分からの必要とされる他の成分を含む無菌ビヒクル中に混合することによって調製される。無菌の注射可能な溶液の調製のための無菌の粉末の場合には、調製方法は

、その予め濾過滅菌された溶液から、活性成分および任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる、減圧乾燥および凍結乾燥である。

【0071】

経口組成物は一般に、不活性な希釈剤または可食キャリアを含む。これらは、ゼラチンカプセル中に封入され得るかまたは錠剤中に圧縮され得る。経口治療投与の目的のために、活性化合物は、賦形剤と混合され得、そして錠剤、トローチ剤またはカプセル剤の形態で用いられ得る。経口組成物はまた、うがい薬として使用するための流体キャリアを用いて調製され得、ここで、流体キャリア中の組成物は、経口的に適用され、そして漱がれ (s w i s h)、そして吐出または嚥下される。薬学的に適合性の結合剤、および/またはアジュバント材料は、組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などは、以下の成分のうちのいずれか、または類似の性質の化合物を含み得る：結合剤（例えば、微結晶性セルロース、トラガカントガムまたはゼラチン）；賦形剤（例えば、澱粉またはラクトース）、崩壊剤（例えば、アルギン酸、Primogelまたはコーンスターチ）；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはSterotes）；グリダント（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）；甘味剤（例えば、スクロースまたはサッカリン）；または矯味矯臭剤（例えば、ペパーミント、サリチル酸メチルまたはオレンジフレーバー (orange flavoring))。

【0072】

吸入による投与のためには、化合物は、エアゾールスプレーの形態で、適切なプロペラント（例えば、二酸化炭素のような気体）を含む加圧容器またはディスペンサーまたはネブライザーから送達される。

【0073】

全身投与もまた、経粘膜手段または経皮手段によって行われ得る。経粘膜投与または経皮投与のために、透過される関門に適切な浸透剤が処方物において用いられる。このような浸透剤は一般に当該分野で公知であり、そして例えば、経粘膜投与のためには、界面活性剤、胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、鼻スプレーまたは坐剤の使用を通して達成され得る。経皮投与

のためには、活性な化合物は、当該分野で一般に公知であるように、軟膏 (o i n t m e n t)、軟膏 (s a l v e)、ゲルまたはクリーム中に処方される。

【 0 0 7 4 】

化合物はまた、(例えば、ココアバターおよび他のグリセリドのような従来の坐剤基剤とともに)坐剤または貯留型浣腸の形態で直腸送達のために調製され得る。

【 0 0 7 5 】

1つの実施形態では、リガンドは、この化合物を身体からの迅速な除去から保護するキャリア(例えば、インプラントおよびマイクロカプセル化送達系を含む、制御放出処方物)を用いて調製される。生分解性の生体適合性ポリマー(例えば、エチレンビニル酢酸、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸)が使用され得る。このような処方物を調製するための方法は、当業者に明らかである。材料はまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc.から商業的に入手され得る。リポソーム懸濁物(ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を用いて感染細胞へと標的化されたりポソームを含む)はまた、薬学的に受容可能なキャリアとして用いられ得る。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載のように、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

【 0 0 7 6 】

所望の場合、経口組成物または非経口組成物は、投与の容易さおよび投薬の均一性のために、投薬単位形態で調製され得る。本明細書中で使用される場合、投薬単位形態とは、処置される被験体への単位投薬量として適切な、物理的に別個の単位をいい、各単位は、必要とされる薬学的キャリアとともに、所望の治療効果を生じるように計算された所定の量のリガンドを含む。本発明の投薬単位形態の詳細は、リガンドの独特の特徴および達成される特定の治療効果、ならびにこのような活性な化合物を個体の処置のために配合する分野に固有の制限によって指図され、そして直接依存する。

【 0 0 7 7 】

本発明のペプチドリガンドをコードする核酸分子は、ベクター中に挿入され得

、そして遺伝子治療ベクターとして用いられ得る。遺伝子治療ベクターは、例えば、静脈内注射、局所投与（例えば、米国特許第5,328,470号を参照のこと）によって、または定位注射（例えば、Chenら、PNAS 91:3054-3057(1994)を参照のこと）によって、被験体に送達され得る。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物は、遺伝子治療ベクターを受容可能な希釈剤中に含み得るか、または遺伝子送達ビヒクルが包埋された徐放マトリックスを含み得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが組換え細胞からインタクトに産生され得る場合（例えば、レトロウイルスベクター）、薬学的調製物は、この遺伝子送達系を産生する1以上の細胞を含み得る。薬学的組成物は、容器、パックまたはディスペンサー中に、投与説明書とともに含まれ得る。

【0078】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態をより完全に例示するために提示される。これらの実施例は、添付の特許請求の範囲によって定義されるように、本発明の範囲を限定しない。

【0079】

（実施例）

（実施例1：一般的方法）

プリオンペプチド。ペプチド*アセチルGWGQPHGGGWGQPHGGアミド（配列番号2）を、11.2mCi/mmolの比放射能で調製し、そしてCommonwealth Biotechnologies of Richmond, Virginiaによって合成した。手短に述べると、全長ペプチドを合成し、脱保護し、そしてカルボキシル末端をアミド化した。このペプチドを逆相HPLCによって精製し、そしてアミノ末端を、放射性無水酢酸でアセチル化した。このペプチドは、95%よりも高い純度を有していた。

【0080】

ビーズ上でのペプチド合成。ペプチドリガンドを、TosoHaasからのToyopearl 650 Mアミノ樹脂（Buettnnerら、Int. J. Pept. Protein Res. 47:70, 1996）上で、標準的なFmocペプチド化学によって直接合成した。単一のアミノカプロン酸（「lea

c a」) を、樹脂のアミノ基に最初に結合体化し、樹脂とリガンドとの間のスペーサーとして作用させた。合成の忠実度およびペプチドの密度をアミノ酸分析によって決定した。これらの値は代表的に、 $30 \mu\text{mol} / \text{g}$ 乾燥重量 $\sim 200 \mu\text{mol} / \text{g}$ 乾燥重量の範囲にわたっていた。側鎖基の脱保護後、いくつかの樹脂サンプルをアミノ末端でアセチル化した。アセチル化が完了した確認を、ニンヒドリン染色が存在しないこと (Methods in Molecular Biology, Humana Press 1994) によって決定した。

【0081】

ペプチドライブラリー。ペプチドライブラリーを、Toyopearl樹脂上で、Buettnerら、Int. J. Peptide Protein Res. 47: 70 - 83 (1996) に従って合成した。ライブラリーは、約 $200 \mu\text{mol} / \text{g}$ 乾燥重量 $\sim 300 \mu\text{mol} / \text{g}$ 乾燥重量の完全密度で合成したか、またはペプチドの合成前の tBocアミノ酸でのアミノ基の部分的ブロッキングによって $50 \mu\text{mol} / \text{g}$ 乾燥重量 $\sim 100 \mu\text{mol} / \text{g}$ 乾燥重量の減少した密度で合成したかのいずれかであった。低密度ライブラリーは、1 ビーズあたり約 $10 \text{pmol} \sim 20 \text{pmol}$ のリガンド密度を有した。

【0082】

さらなるペプチド。この研究の間に用いた他のペプチドは、ペプチド76 (アセチル(dF)LLHPI (配列番号35))、ペプチド55 (銅の非存在下でのみプリオンに結合するようである、HHHPQT (配列番号36)) およびペプチド71 (RYHVYF (配列番号37)) を含んでいた。

【0083】

ライブラリー結合研究。放射標識オクタペプチドの接触を、以下のストラテジーに従って行った。約 30mg ($20,000$ ビーズ) のライブラリーへのタンパク質/ペプチドの非特異的結合を、1%カゼイン中での2時間のインキュベーションによって最小にした。次いで、カゼインの大部分を除去した。次いで、ビーズを、溶媒界面活性剤処理血漿 (VITEX Licensed Facility, Melville, NY 11742) と2時間接触させて、ライブラリー上の非特異的結合部位のさらなるブロッキングを可能にした。溶媒界面活性

剤血漿は、有機溶媒および界面活性剤で処理して血液伝搬性 (b l o o d - b o r n e) 脂質コートウイルスを除去した血漿組成物である。これを達成するために用いられる多くの異なる試薬は、当該分野において提案されている。例えば、米国特許第4,481,189号;同第4,540,573号;同第4,764,369号;同第4,789,545号(全て本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。本発明の最も好ましい試薬は、有効量のアルキルホスフェート試薬(好ましくは、トリ-(n-ブチル)ホスフェート(TNBP))を「溶媒」として、そしてTriton X-100を界面活性剤として含む。これらの試薬を用いたサンプルの処理の後、ダイズ油で抽出し、続いて標準的な疎水性樹脂でのカラムクロマトグラフィーによってウイルス不活化試薬を除去する。これらの方法は、固有タンパク質を変性させることなく、ウイルス不活化血液由来組成物を提供する。

【0084】

次いで、ペプチドを、ブロックされたビーズに20 μM、40 μMまたは50 μM(低密度ライブラリーについて)の最終濃度で添加した。1~5時間のインキュベーション後、ビーズをカラム(BioRad, PolyPrep)に移し、Tween 20を0.05%(W/V)で有するPBS(pH7.4)で洗浄した。溶出物のサンプルを採取し、そして放射能について計数した。溶出物のカウントがバックグラウンドレベル(<50 dpm)まで減少した後、ビーズをカラムから取り出し、そして約45℃に温めた90mlの1%アガロース中に懸濁した。アガロースを薄いフィルムとしてFMC Bioproductsカタログ番号53749からの2枚のGel Bondフィルム上に重層し、室温で乾燥させた。乾燥後、オートラジオグラフィフィルム(Kodak, Biomax MR1)をアガロース上に直接置き、そして数日間暴露した。フィルムを現像し、そしていくつかのスポットが同定された。このフィルムをビーズと並べ、そしてシグナルを生じたビーズを切り出した。通常、各実験につき2枚のフィルムを現像して、シグナルが本物であることを確認し、そして正確なビーズが同定されるのを確実にするのを助けた。

【0085】

プリオン。脳ホモジネートを、スクラピー感染ハムスターから調製した。手短に述べると、スクラピーに感染したハムスターからの脳を単離し、PBS中で(10% W/Vで)均質化した。細胞破片を低速遠心分離によって除去し、そして上清を用いた。ハムスターの脳の抽出物は、VA Medical Center Medical Research Service (Baltimore, MD)のRobert Rohwerによって提供された。いくつかの実施形態では、脳のホモジネートを、10%サルコシル中に可溶化させた。

【0086】

プリオン検出。PrPを、Senetek PLC (St. Louis MO 63128)から入手可能な「3F4」を含む、モノクローナル抗体を用いて検出した。抗体3F4は、PrP^cのネイティブなコンホメーション中のペプチド配列MKHM (アミノ酸109~112、配列番号39)およびまた変性しているが「原線維」でも凝集形態のPrP^{sc}でもないMKHM (配列番号39)を認識する。その結果、3F4を用いてPrP^{sc}の凝集物の存在を検出するために、PrP^{sc}を最初に変性させなければならない。プリオンの検出のために用いられる他のモノクローナル抗体としては、このオクタペプチド反復でまたはその付近でPrP^cおよびPrP^{sc}の両方に結合するFH11が挙げられる。ストレプトアジピンは、Hの側鎖基とQの側鎖基との相互作用を通して配列HPQを結合し、そしてペプチドGWGQPHGG (配列番号1)を含む樹脂に結合し、そしてこれが、このオクタペプチド反復への結合を通して、プリオンタンパク質の検出に有用であり得ることが提案されている (WO 00/02575)。

【0087】

プリオン結合。正常な脳プリオンを結合するためのスクリーニングを、96ウェルマイクロタイタープレート (Falcon, Becton Dickinsonからのカタログ番号3075)を用いて行った。プレートを、Pierceからの100 µl / ウェルの1% (W/V) カゼインを65 にて1時間用いて最初にブロックした。乾燥した樹脂を、ddH₂O中で膨潤させた。ウェルを空にし、そして膨潤した樹脂の懸濁物30 µl (合計約200ビーズ)をこのウェ

ルに添加した。樹脂を沈澱させ、そして余分な水を除去した。供給源材料および試薬の種々の添加を評価した。これらの実験条件下で、 $50\ \mu\text{l}$ の正常脳ホモジネートを、Alpha Therapeutic Corpからの5%ヒト血清アルブミン中に1:3希釈し、そして65 で1時間加熱して残りのホスファターゼを使用前に不活化した。脳/アルブミン調製物を、ビーズとともに室温で1.5時間インキュベートし、その後、非結合タンパク質溶液を除去し、そして1.0%カゼイン中に1000:1に希釈した $100\ \mu\text{l}$ の3F4モノクローナル抗体(Senetek, カタログ番号620-02)を実験ウェル中に添加した。ビーズを、穏やかに攪拌しながら一次抗体とともに4 で一晩インキュベートした。コントロールウェルは、 $100\ \mu\text{l}$ の1%カゼインを有し、適切な場合は抗体を有さなかった。次いで、ビーズを、pH7.4のPBS+ $10\ \mu\text{M}\ \text{CuCl}_2$ で1回洗浄した。二次抗体である抗マウスIgGアルカリホスファターゼ(AKP)結合体(Sigmaからの製品番号A-3688)を1%カゼイン中に1:1000希釈した。インキュベーションを45分間室温で進行させた。この時点でこれを、pH7.4でPBS+Cu+Tween 20(0.05%)中で2回、PBS+Cu中で2回、1M NaCl中で2回、pH9.5の NaHCO_3 +5mM MgCl_2 中で1回洗浄した。次いで、基質(NaHCO_3 + MgCl_2 中に100:1希釈した $100\ \mu\text{l}$ のCDP Star/ウェル)(TropixからのCDP Starカタログ番号6209)を添加した。

【0088】

濾紙(カタログ番号1703932 BioRad)を切断して成形し、そして NaHCO_3 + MgCl_2 で湿らせた。濾紙上の1ドットあたり $25\ \mu\text{l}$ のビーズ懸濁物を添加した。濾紙をシールラップでくるみ、そしてカセット中でオートラジオグラフィフィルムに暴露した。異なるフィルム片を、代表的には1分~10分の範囲にわたる異なる時点で現像した。

【0089】

カラム結合。1:10希釈のPrPsc脳ホモジネートを、脳4mlあたり $20\ \mu\text{l}$ の濃度のサルコシルで処理し、そして30分間インキュベートし、そして遠心分離した。上清を注意深く取り出し、そしてPBSまたは血漿中に適切に希

積した。0.5 mlの樹脂をクロマトグラフィーカラムに添加した。プリオン溶液を、室温で20分間、樹脂と接触させ、その後、2 × 1 mlのアリコートのPBS + 10 μM CuCl₂を添加した。素通りを回収した。いくつかの実験では、樹脂を、5カラム容量の100%血漿と接触させ、次いで結晶中のプリオンの50%溶液を添加した。

【0090】

画分は、SDS-PAGE緩衝液中に溶解したか、または50 mM Tris、10 mM NaCl、2 mM CaCl₂中の1 mg/mlプロテイナーゼKで37 °Cで1時間、最初に処理したかのいずれかであった。最終的なプロテイナーゼK活性は10 μg/120 μlであった。血漿が存在する場合、インキュベーション時間は1.5時間に延長された。この時点で、0.5 mlのメタノール中の22 mgのPMSF (Sigma, St. Louis, MO) 5 μlを添加した。このサンプルを約100 °Cで10分間加熱し、その後、SDSを、最終濃度2%まで添加し、そして再度10分間煮沸した。次いで、サンプルを、0.05%ジチオトレイトールを含有するサンプル緩衝液中で調製し、そして約100 °Cで3分間、再度加熱した。

【0091】

ウェスタンブロット。タンパク質サンプルを、Novex (Tris-Glycine SDS Sample緩衝液カタログ番号LC2676)からのSDS-PAGE緩衝液中に厳密に溶解し、そして95 °Cより高温で3分間加熱した。15 μlのサンプルを14%ゲル (Novexカタログ番号EC6485) にローディングし、そして125 Vの電圧で90分間電気泳動した。この時点で、タンパク質を、予め100%メタノール中に浸漬したPVDFメンブレン (Novex 0.2 μm Pore Sizeカタログ番号LC2002) に転写した。タンパク質を250 mAで1時間転写した。このメンブレンを、TBST (50 mM Tris、0.15 M NaCl + 0.05% Tween 20 pH 7.4) 中の5%脱脂粉乳を用いて室温で1時間ブロッキングした。この時点で、1:1,000希釈の3F4 (Senetekから、5%脱脂粉乳中) を添加した。インキュベーションは、1~16時間であり、この時点で一次抗体を

除去した。このメンブレンをP B S T中で3回洗浄し、その後、二次抗体を添加した。二次抗体（A m e r s h a mからのヒツジ抗マウス西洋ワサビペルオキシダーゼまたはS i g m aからのホスファターゼ結合体化抗マウスI g Gのいずれか）を、1 : 3 0 0 0の希釈でT S B T中の5%脱脂粉乳中に添加した。

【0092】

ペルオキシダーゼ検出系およびホスファターゼ検出系を評価した。二次抗体を室温で60分間結合させ、次いでT B S Tで3回洗浄した。発色試薬は、A m e r s h a mからの「E C L +」またはP i e r c eカタログ番号34075からのSuperSignal West Dura Extended Duration SubstrateまたはT r o p i xからの「C P - S t a r」のいずれかであった。

【0093】

（実施例2：オクタペプチドスクリーニング）

オクタペプチドのスクリーニングから得られた配列の結果を、表1の第2欄に示す。これらの配列は、芳香族アミノ酸の普及を示し、多数の類似性を有する。例えば、28のうち12は、コンセンサス配列O x x Oを有しており、ここでOは芳香族アミノ酸であり、そしてxはアミノ酸である。他の類似性（例えば、R W I I S L（配列番号24）およびL R V I I S（配列番号15））もまた見出される。構造W L Y W I P（配列番号4）周辺のコンセンサス配列の出現が、多数のペプチドにおいて見出される（表2を参照のこと）。例えば、W L V W I A（配列番号27）は、L L I W I P（配列番号3）と同様に、W L Y W I P（配列番号4）と正確に同じ6のうち4つのアミノ酸を有する。他のペプチドは、非常に類似の構造を有する。インキュベーション前に血漿およびオクタペプチドへと添加されたさらなる100 μ M C u C l ₂の存在下でのスクリーニングおよびP B S（G i b c o B R L , L i f e T e c h n o l o g i e sカタログ番号14080-055）中の10 μ M銅での洗浄後に、多数のペプチドが得られた。これらの構造は、コメントの欄にC uを含むことによって示され、そして芳香族アミノ酸の特徴的な優勢性を示し、このことは、銅の結合が、オクタペプチドトリガンドとの相互作用を阻害しないことを示唆する。結合をまた、低pH

(4.5)で評価し、次いでpH4.5で洗浄したが、手掛かりは得られなかった。

【0094】

樹脂に対する放射標識オクタペプチドの平衡結合の結果をまた表1に示す。各サンプルについて、15mgの乾燥重量の樹脂を計量し、そしてpH7.4のPBS中で膨潤させた。樹脂を400 μ lのPBSで5回洗浄し、次いで10 μ M CuCl₂を含有する緩衝液で2回洗浄した。放射標識オクタペプチドを、15 μ Mの最終濃度になるように添加した。これを室温にて2時間インキュベートした。最終容量は、400 μ lの溶液+45 μ lの樹脂であった。この時点で、非結合ペプチドを、Milliporeフィルターユニット(Ultra Free-mc Centrifugal Filter Device Cat. 8UFC30HVNB)遠心分離によって除去した。次いで、素通り溶液を放射能について計数した。全てのペプチドを、末端の遊離アミノ基を用いて評価した。

【0095】

実験設定(例えば、フィルター)に対するペプチドの非特異的結合の量は、約1.5%であると評価された。この実験において用いた15mgの乾燥樹脂は膨潤して約45mgの重量になり、このことは、30 μ lの溶液がゲル中に存在したことを実証する。従って、30 μ l/430 μ l、すなわち、7%の遊離オクタペプチドがゲル中に支持された。反応混合物の総容量は430 μ lであったので、樹脂に対する結合が生じなかったのであれば、約92%の理論的回収率が予想される。この数字は、このアミノ樹脂について見られる。しかし、アセチル化アミノ樹脂は、同じ結合能力を有する。

【0096】

この実験において用いた特定の条件下での最大の親和性結合剤はGFFFWW(配列番号8)であった。1つの実験から、リガンドについてのオクタペプチドの親和性を結論することは可能ではない。なぜなら、結合の化学量論は既知ではなく、遊離のリガンドの実際の濃度も既知でないからである。最大の親和性結合剤は、5個の芳香族基を有し、そして2番目および3番目に優れた親和性結合剤

は両方とも4個の芳香族基を有する。両方とも5個の芳香族基を有するが、76%の結果を有するWEFYWF(配列番号5)と、GFFFWW(23%) (配列番号8)との間には顕著な差が存在する。10 μ M Cu(これは、15 μ Mの濃度で添加されたオクタペプチドの総銅結合能力の33%のみに結合するのに充分である)の存在下で生理食塩水中で結合研究を行った。しかし、この条件は、高親和性リガンドとより低い親和性のリガンドとの区別を確かめるのを可能にした。結合に対する銅の効果を、GFFFWW(配列番号8)に対する15 μ Mオクタペプチドの結合について評価した。銅が添加されていないときは、92%の放射能がアミノ樹脂を素通りし、一方、22%のみがGFFFWW(配列番号8)樹脂を素通りした。15 μ M CuCl₂では、これらの数字はそれぞれ92%および19%であり; 30 μ M Cuでは、これらはそれぞれ94%および18%であり、そして60 μ Mでは、数字はそれぞれ92%および17%である。従って、添加した銅は、樹脂単独への、または樹脂-ペプチド複合体への、放射性プリオンペプチドの結合に対してほとんどまたは全く効果を有さない。銅が、結合に重要ではないか、あるいは、ペプチド合成または精製の間ペプチドに既に結合しているかのいずれかであることによって、観察される効果がないことが生じ得る。いずれの樹脂でもpH4.5では結合は観察されなかった。

【0097】

表1はまた、放射標識オクタペプチド反復カラムへ結合することが示されたペプチド配列を示す。配列を、高密度ライブラリーまたは低密度ライブラリーのいずれかから選択した。結合百分率(%)は、15 μ Mの出発ペプチドを用いて樹脂に結合しなかった放射能の量である。配列110~119を、さらに100 μ M CuCl₂の存在下でスクリーニングして、銅結合部位の飽和を確実にした。コンセンサスカラムは、芳香族「O」アミノ酸および非芳香族「x」アミノ酸の存在を示す。

【0098】

(実施例3:樹脂に対するプリオン結合)

配列93:LEIRLA(配列番号12)を有するビーズ、95:SLEEVV(配列番号14)を有するビーズ、96:LRVIIS(配列番号15)を有

するビーズ、90/98: FYVFTA (配列番号9) を有するビーズおよびコントロールアミノ樹脂を有するについてのオートラジオグラフィフィルムシグナルを図1に示す。「C」と記したサンプルは、ペプチドが結合していないコントロール樹脂である。各サンプルは、約200ビーズの同じペプチド配列を含んでいた。左側の「No 1°Ab」には、プリオン特異的3F4抗体を添加せず、一方、他の5つのサンプルを、3F4プリオン特異抗体でプローブした。一番上の列の、標記した「なし」は、脳抽出物もアルブミンも含まないコントロールであった。2列目の(「脳」)は、アルブミン中の脳抽出物と接触させたビーズを示す。3列目の(「Alb」)は、アルブミンのみを添加したサンプルを示す。全てのサンプルに、ヤギ抗マウスIgG二次抗体を添加した。プロービング後、ビーズを濾紙に移し、そして結合したプリオンの量を化学発光強度によって決定した。

【0099】

ペプチド96からの結果は、脳+二次抗体3F4とのインキュベーションが、コントロール(正常またはアルブミン)よりもずっと大きなシグナルを生じること示した。実験は、正常な脳の抽出物を用いたインキュベーションおよび3F4を用いたプロービングにより、多数の樹脂について二連であった。二連のもの各々について極めて類似の結果が得られた。このことは、このアッセイが、プリオン結合を評価するために再現可能な方法であることを示唆する。図1はまた、遊離アミノ樹脂(C)がいくつかのプリオンタンパク質を結合することを示す。

【0100】

図2。ペプチド84、85、96、98、101、111を含有するアセチル化樹脂、アセチル化コントロール樹脂(上のサンプル)および非アセチル化ペプチド110、112、113、114、115、116およびアミノコントロール樹脂(下のサンプル)に対する非感染プリオンからのPrPcの二次結合研究を実証する。アルブミン中に懸濁した正常な脳を全てのウェルに添加した。-3F4と記された列には、3F4を添加しておらず、一方、+3F4と記された列は3F4プローブを含んでいた。+3F4と-3F4との間の強度の差は、ペプ

チドに結合したPrPcの量を示す。プリオンに対するアセチル化樹脂84および85の結合は、洗浄プロトコルに耐えるに充分には安定ではなかった。このアッセイにおいて最も強い結合剤は、ペプチド110、112、113、115および116であることが見出された。アセチル化ペプチド110は一様に、このアッセイによって決定された最良の結合剤のうちの1つである。

【0101】

図2に示した二次結合研究は、アミノ樹脂Toyopearl 650 Mがプリオンを結合するが、一方、アセチル化樹脂はこれを結合しないことを確認した。アミノ樹脂に対するプリオンタンパク質の結合は、アミノ基とのイオン性相互作用を通して部分的に容易にされ得るが、オクタペプチド自体はアミノ樹脂には結合しない。従って、アミノ樹脂自体を用いてプリオンを結合して、例えば、プリオンをサンプル（例えば、生物学的流体または環境サンプル）から検出および/または除去し得る。

【0102】

（実施例4：プリオンタンパク質の除去）

スクラピー感染したハムスターの脳のホモジネートからのプリオンの除去を図3に示す。図3は、感染した脳からのプリオンの種々のペプチド樹脂への結合のウェスタンブロットティングを示す。この実験では、ペプチド樹脂を、アミノ末端でアセチル化し、そして感染した脳と20分間接触させた。貫流を収集し、分析した。カラムに吸着されたプリオンを、SDS-PAGE緩衝液の懸濁によって除去し、引続いてウェスタンブロットティングによって評価した。レーン1および5(MW)は、分子量マーカールを含んだ。希釈していない開始物質をレーン2に提供する。アセチル化された樹脂(レーン3、B_{AC})は、強いバンド(貫流中にプリオンタンパク質が存在することを示す)を示し、コントロール樹脂へのプリオンの最小の結合を示している。レーン4は、ペプチド110の貫流中にプリオンシグナルがないことを示し、このタンパク質がカラムに結合することを示している。ペプチド87(レーン6)およびペプチド89(レーン7)は、貫流中のタンパク質シグナルの欠如によって証明されるように、全てのプリオンに結合した。ペプチド76(アセチル(dF)LLHP I、配列番号35)は、全ての

プリオンと結合しなかった。ペプチド71（ポジティブコントロール：アセチル（dR）YHVYF、配列番号37）は、全てのプリオンと結合したが、ペプチド55（アセチルHHHPQT、配列番号36）は、プリオンを貫流させた。抽出物のプロテイナーゼK消化物は、同じ結果を示した。

【0103】

図4は、感染した脳（血漿へスパイクした）からのプリオンの結合を示すウェスタンブロッティングを示す。ペプチド樹脂をアミノ末端でアセチル化し、次いで感染したハムスターの脳を含む血漿と接触させた。樹脂をカラム容量の5倍の血漿と接触させ、その後プリオン結合を分析した。血漿の洗浄は、任意の非特異的結合部位を遮断した。次いで、感染した脳のホモジネートを、血漿で50：50に希釈し、そして樹脂に適用した。各樹脂からの貫流を、プリオンタンパク質の存在について分析した。非結合物質を収集し、そして分析した。レーン1は、開始物質を含み、レーン2は、アミノ樹脂コントロールであり、レーン3は、アミノ-ペプチド89であり、レーン4は、アセチル化した塩基性樹脂コントロールであり、レーン5は、ペプチド82を含む樹脂に対する貫流を含み、レーン6は、ペプチド（アセチル化（dR）YHVYF（83）（配列番号37））を含む樹脂に対する貫流を含み、レーン7は、ペプチド89を含む樹脂に対する貫流を含み、レーン8は、ペプチド（アセチル（dF）LLHPI（75）（配列番号35））を含む樹脂に対する貫流を含み、そしてレーン9は、ペプチド110を含む樹脂に対する貫流を含む。

【0104】

図4の結果は、アセチル化樹脂（Ac B）およびペプチド75（アセチル（dF）LLHPI、配列番号35）を含むコントロール樹脂が、全ての検出可能なタンパク質を樹脂上に保持するほど十分に強くは、プリオンと結合しなかったことを示す。ペプチド82および83を含むポジティブコントロールは、ペプチド89および110のように全てのプリオンと結合した。アミノ樹脂89は、貫流中に存在する少量のシグナルによって示されるように、100%のプリオンとは結合しなかった。この実験において、アミノ樹脂（Am B、レーン2）は、全ての検出可能なプリオンと結合した。アセチル化したペプチド89および11

0は、荷電したアミノ酸のいずれも含まなかったもので、これらは、イオン性相互作用によってプリオンと相互作用し得ない。ペプチド75（アセチル(dF)LLHP I（配列番号35））は、非常に疎水性であるが、プリオンの効率的な結合物質ではなかった。従って、疎水性ペプチド配列単独では、プリオンタンパク質の効率的な結合に十分ではない。

【0105】

図3および4をひとまとめにして考えると、オクタペプチドリピートに作製されたペプチドは、実際にオクタペプチドに結合し、そしてまた、プリオンタンパク質PrPcおよびPrPscにも結合する。

【0106】

オクタペプチドリピート配列は、親和性のリガンドを標的化するための誘因性の標的を提示する。このことは、オクタペプチドリピート配列が、全ての公知の哺乳動物プリオンの複数のコピー中に存在し、プリオンタンパク質について選択性であり、感染性プリオンおよび非感染性プリオンの両方に接近可能であることに起因する。オクタペプチドは、生理学的な量の銅の存在下で規定された構造を形成する。重要なことは、オクタペプチドは、感染力に重要であると考えられていることである。従って、オクタペプチドリピートを欠如するプリオンは、非感染性である可能性がないか、または全長PrPscと比較して減少した病原性を有し得るかのいずれかである。

【0107】

オクタペプチドリピートに対する結合物質についてのスクリーニングは、少ない割合のビーズ（約20,000中に1）のみがオクタペプチドと結合したことを明らかにした。このことは、高度の選択性を示す。ビーズの配列決定に続いて、出現した多数の異なるコンセンサス配列は、オクタペプチドが、構造の関連するファミリーによって検出され得る多数の構造を形成し得ることを示唆する。例えば、多くが、2つの他のアミノ酸によって分離される2つ（以上）の芳香族アミノ酸を有した。Congo red、ポルフィリン、またはフタロシアニンのような芳香族の構造は、プリオンと相互作用することが公知であるが、それらの相互作用の様式は未知である。これらもまたオクタペプチドリピートを標的化し

得る可能性がある。感染したプリオンは、プラークを形成し得、このプラークは、プラークさえも示唆する Congo red によって染色され得、芳香族のリガンドに対して接近可能である。

【0108】

プリオンに対する特定のリガンドの親和性は、使用される2つのアッセイ系（リガンドへのオクタペプチドの結合、およびリガンドへのプリオンタンパク質の結合）で異なった。隣接するアミノ酸の存在または複数の相互作用（プリオンタンパク質の表面上の異なる構造に対するリガンドの親和性または相反を提供し得る）の存在によって全てのタンパク質において影響されているオクタペプチドリピート構造によってこの差異を説明することが可能である。

【0109】

オクタペプチドリピートは、ヒスチジンのような銅のキレート剤に結合することが予測され得る。しかし、28の全ての配列中に、全部で4つのヒスチジンのみが存在した。無作為選択は、約9（28の総アミノ酸×1つのペプチド当たり6のアミノ酸/18の異なるアミノ酸）が存在することを示唆する。フェニルアラニン（21）、トリプトファン（24）、およびチロシン（15）ならびにイソロイシン（25）の数と比較した場合に、ヒスチジンの数は、非常に少ない。他のアミノ酸の数は、低いレベルで存在した（例えば、アスパラギン酸は、見出されなかった）。これらの観察は、プリオン結合ペプチドリガンドにおける配列の選択が無作為でないことを立証する。このことは、さらに、コンセンサス配列の作製によって確立される。

【0110】

（表2．WLYWIP（配列番号4）の構造に基づくコンセンサス配列）

【0111】

【表2】

1番目のアミノ酸	2番目のアミノ酸	3番目のアミノ酸	4番目のアミノ酸	5番目のアミノ酸	6番目のアミノ酸	配列番号
L	L	I	W	I	P	配列番号3
W	L	Y	W	I	P	配列番号4
W	L	V	W	I	A	配列番号27
I	Q	I	W	I	F	配列番号21
I	F	F	W	I	K	配列番号23
L	L	L	V	I	A	配列番号13

(実施例4：ヘキサペプチドリガンドに結合していない樹脂およびヘキサペプチドリガンドに結合した樹脂からのプリオン除去の比較)

種々の樹脂からのプリオンの除去を調べた。試験した樹脂には、アセチル化650M、アミノ650M、SP Sepharose、DEAE Sepharoseおよびシリカが含まれた。プリオンの除去もまた、アミノ650M塩基性樹脂に結合させた樹脂を使用して調べた。ヘキサペプチドリガンドを、EACA spacerアームを介してアミノ650M塩基性樹脂に結合させた。塩基性樹脂上の残っているアミノ基もリガンドのN末端アミノ酸のいずれもアセチル化されなかった。

【0112】

乾燥樹脂を、 dH_2O で1時間膨潤させた。各樹脂からの1mLのカラムをポリプロピレンチューブにパッケージングした。この樹脂を、1カラム容量の1M NaClで再製し、リン酸緩衝化生理食塩液でpH7.4に戻した。樹脂を、5カラム容量の5%ヒト血清アルブミンで遮断した。

【0113】

0.5カラム容量の部分的に精製した可溶性PrP^C調製物(226ng/mL)(ヒト血小板由来)を各カラムに添加し、室温で20分間接触させた。非結合物質を1カラム容量のリン酸緩衝化生理食塩液で溶出し、最小で2倍希釈の開始物質を溶出液中に得た。開始物質を伴う各カラムからの溶出液を解離増強ランタニド蛍光免疫アッセイ(dissociated enhanced lanthanide fluoroimmunoassay)(DELFIA)によって試験した。濃度は、PrP^C標準物質との比較によって得た。

【0114】

結果を表3に示す。PrP^Cの溶出濃度および非結合PrP^Cの割合を示す。

【0115】

【表3】

表3

樹脂	溶出液中の PrP ^c の濃度 (ng/mL)	非結合 (%)
アセチル化 650 M	84	63
アセチル 650 M	75.00	56
SP Sepharose	1.25	0.9
DEAE Sepharose	71	53
シリカ	0.056	0.04
WLYWIP (配列番号4)	38	28
YVFNWF (配列番号40)	0.011	0.008
SNWGFY (配列番号41)	0.011	0.008
YFIWWE (配列番号10)	0.016	0.012
WFPFFF (配列番号42)	0.009	0.007
IFFWIK (配列番号23)	0.011	0.008
RWIISL (配列番号24)	0.013	0.01

これらの研究において、アミノ樹脂およびアセチル化樹脂は、PrP^cに有意には結合しないようであった。pH 7.4で、DEAE-セファロースもまたPrP^cに結合しないようである。負に荷電した材料（例えば、シリカおよびSP Sepharose）は結合するようである。多数のペプチドリード（peptide lead）を試験し、そして7のうちの6が有意に結合（>99%結合）することを示した。樹脂のうちの1つ（ペプチドWLYWIPを含む）は、弱い結合を示した。従って、このペプチド樹脂は、非結合ヘキサペプチド樹脂コントロールとして作用し得る。

【0116】

(他の実施形態)

本発明は、その詳細な説明と組合せて記載されているが、上記説明は、例示することを意図しており、本発明の範囲を限定せず、本発明は添付の特許請求の範囲によって規定されることが、理解されるべきである。他の局面、利点、および改変は、上記特許請求の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、ペプチド配列93、95、96および98の二次結合研究を実証する。

【図2】

図2は、アセチル化樹脂（ペプチド84、85、96、98、101、111を含む）、アセチル化コントロール樹脂（上のサンプル）、ならびにアセチル化していないペプチド（110、112、113、114、115、116）およびアミノコントロール樹脂（下のサンプル）に対する非感染プリオンからの、PrP^cの二次結合研究を実証する。

【図3】

図3は、種々のペプチド樹脂に対する感染脳からのプリオン結合のウエスタンブロットを表示する。

【図4】

図4は、アセチル化ペプチド樹脂に対する血漿にスパイクされた感染脳からのプリオン結合を示す、ウエスタンブロットを表示する。

【図1】

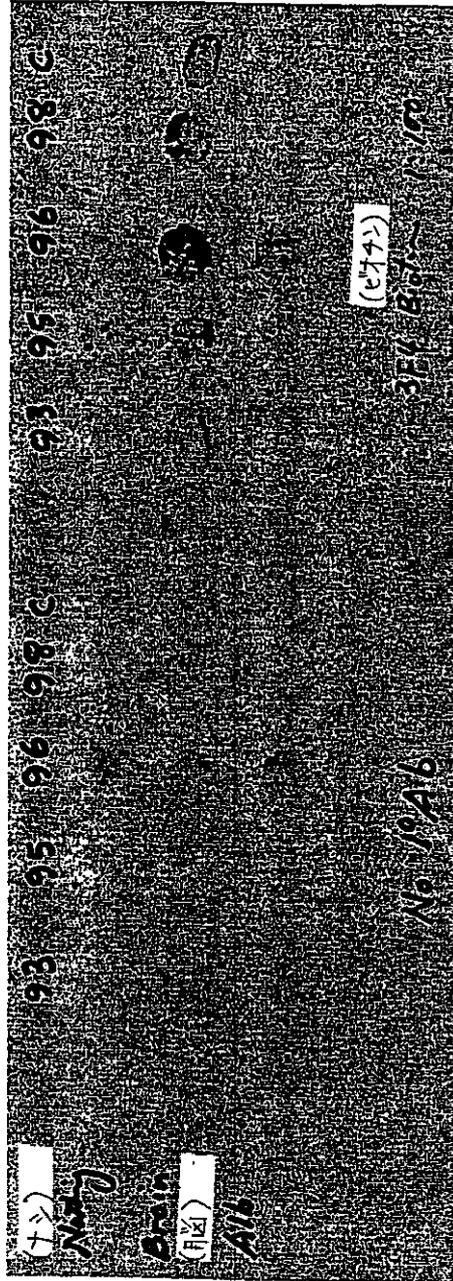


Figure 1

【図2】

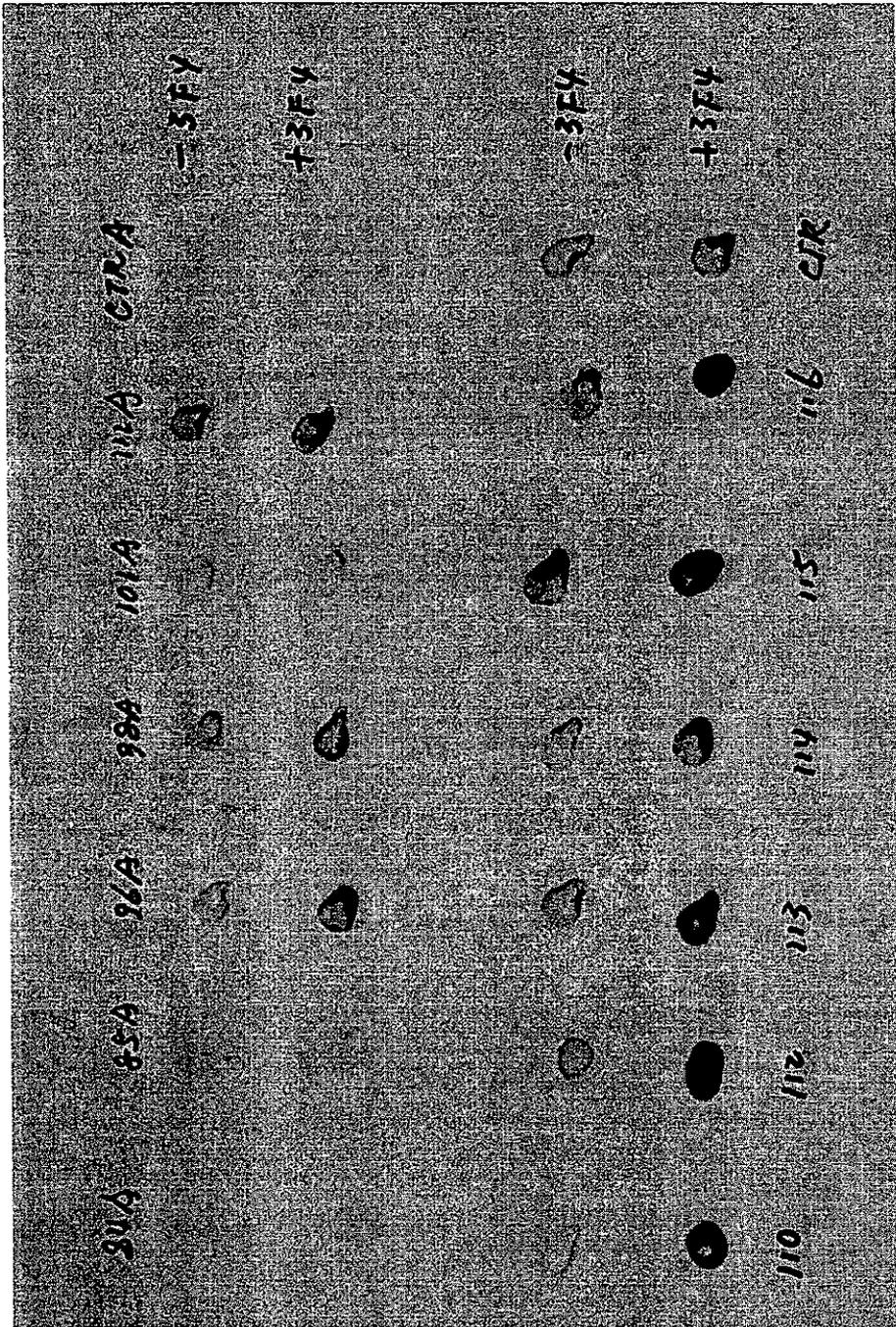


Figure 2

【図3】



Figure 3

【图4】

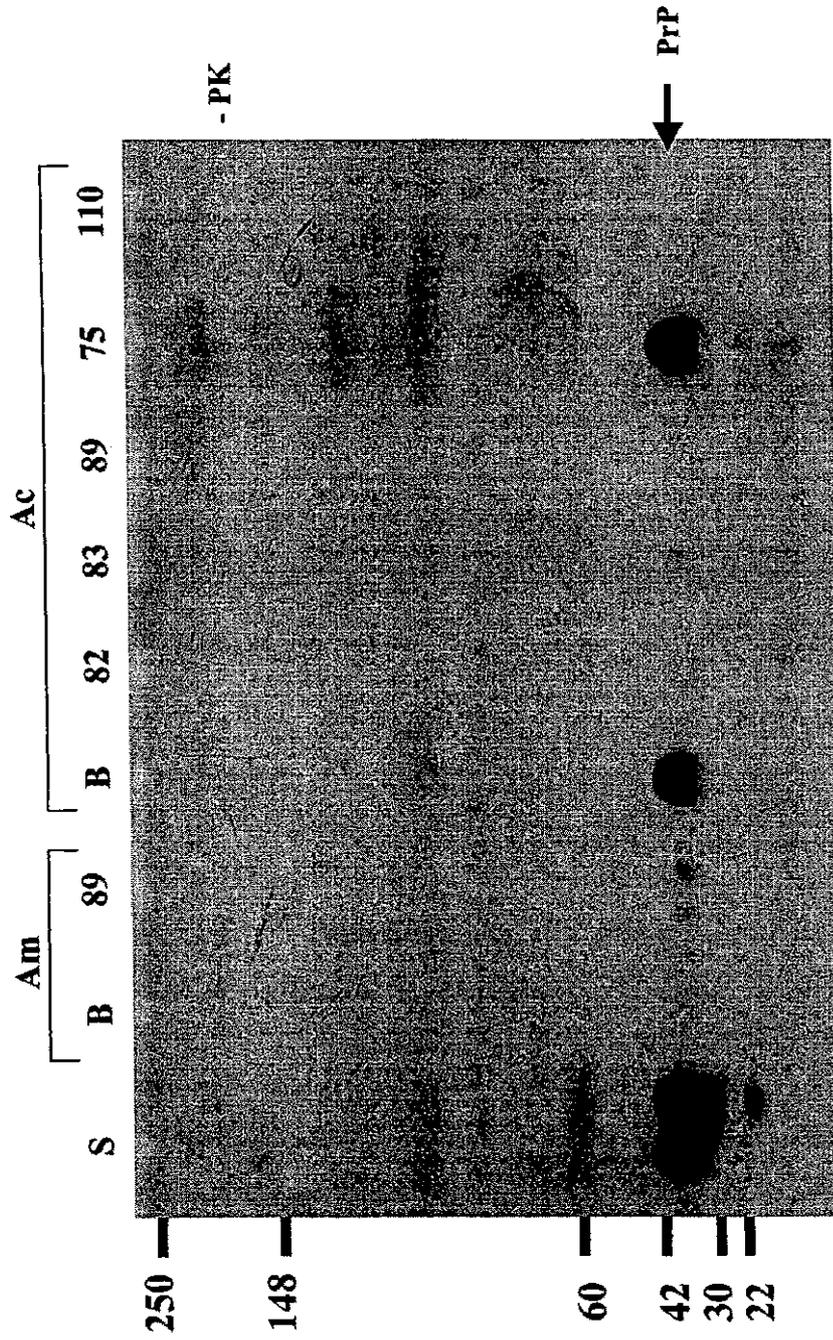


Figure 4

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No. PCT/US 01/11150
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K7/06 C07K14/00 C07K17/00 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 C07K 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) CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 02575 A (V I TECHNOLOGIES) 20 January 2000 (2000-01-20) cited in the application the whole document ---	1-75
X	WO 99 15651 A (PRIONICS AG) 1 April 1999 (1999-04-01) claims 17, 18 ---	1-75
X	WO 98 35236 A (ENFER TECHNOLOGY LTD.) 13 August 1998 (1998-08-13) the whole document ---	67-72
X	WO 93 23432 A (NEW YORK UNIVERSITY & ISTITUTO CARLO BESTA) 25 November 1993 (1993-11-25) page 12, line 36 -page 13, line 7 ---	67-75
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search: 31 January 2002		Date of mailing of the international search report: 22/02/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer: Masturzo, P

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 01/11150

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 11155 A (PROTEUS MOLECULAR DESIGN LIMITED) 10 June 1993 (1993-06-10) page 27, line 23 - line 28 ---	67-75
A	M P HORNSHAW ET AL.: "Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol. 207, no. 2, 15 February 1995 (1995-02-15), pages 621-629, XP002188767 ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL., US ISSN: 0006-291X the whole document ---	1-75
A	J H VILES ET AL.: "Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 96, March 1999 (1999-03), pages 2042-2047, XP002188768 NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON., US ISSN: 0027-8424 the whole document ---	1-75
E	WO 01 40265 A (V I TECHNOLOGIES) 7 June 2001 (2001-06-07) claims 38-41 ---	67-75
E	WO 01 23425 A (UNIVERSITÄT ZÜRICH) 5 April 2001 (2001-04-05) claims 10-21 -----	67-75

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-75

Present claims 1-66 relate to an extremely large number of possible compounds and methods for their use. In fact, the claims contain so many options (any chemical entity might bind the peptide of claim 1) that a lack of clarity within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear and concise, namely claims 1-66 only insofar as defining peptidic ligands for the peptides as defined in claim 1.

Claims 67-75 relate to diagnostic methods and methods for elimination of prions from biological fluids and from environmental samples, based on the use of an amino resin. As it is not clear what an amino resin means in this context (where the only examples refer to immobilized short peptidic ligands of the sequence of claim 1) and therefore a lack of clarity within the meaning of Art. 6 PCT arises, these claims were only searched insofar as dependent on peptides according to claim 1.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 01/11150

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0002575 A	20-01-2000	AU 5091199 A	01-02-2000
		EP 1094827 A1	02-05-2001
		WO 0002575 A1	20-01-2000
WO 9915651 A	01-04-1999	DE 19741607 A1	25-03-1999
		AU 9744898 A	12-04-1999
		WO 9915651 A1	01-04-1999
		EP 1012287 A1	28-06-2000
WO 9835236 A	13-08-1998	AU 738606 B2	20-09-2001
		AU 6004698 A	26-08-1998
		EP 0909388 A2	21-04-1999
		WO 9835236 A2	13-08-1998
		US 2001010918 A1	02-08-2001
WO 9323432 A	25-11-1993	AU 4376093 A	13-12-1993
		WO 9323432 A1	25-11-1993
WO 9311155 A	10-06-1993	AT 177754 T	15-04-1999
		AU 675053 B2	23-01-1997
		AU 3089292 A	28-06-1993
		CA 2124953 A1	10-06-1993
		DE 69228701 D1	22-04-1999
		DE 69228701 T2	29-07-1999
		DK 616613 T3	27-09-1999
		EP 0616613 A1	28-09-1994
		ES 2128362 T3	16-05-1999
		WO 9311155 A1	10-06-1993
		GR 3029740 T3	30-06-1999
		JP 7501798 T	23-02-1995
		NZ 246059 A	28-08-1995
		US 5773572 A	30-06-1998
ZA 9209392 A	27-07-1993		
WO 0140265 A	07-06-2001	AU 4309201 A	12-06-2001
		WO 0140265 A2	07-06-2001
WO 0123425 A	05-04-2001	AU 5241100 A	30-04-2001
		WO 0123425 A1	05-04-2001
		US 2002004586 A1	10-01-2002
		US 2001053533 A1	20-12-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 P 25/20		A 6 1 P 31/12	
			1 1 1
	1 1 1	43/00	
B 0 1 J 20/24		B 0 1 J 20/24	B
C 0 7 K 7/00		C 0 7 K 7/00	
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 21/78	C
		33/566	
		A 6 1 K 37/02	

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

(72)発明者 カーボネル, ルーベン
 アメリカ合衆国 ノース カロライナ
 27612, ラリー, ゴッドフレイ ドラ
 イブ 6105

(72)発明者 シェン, ホングル
 アメリカ合衆国 ノース カロライナ
 27607, ラリー, ヒルズボロウ スト
 リート 3111 - ビー 4

Fターム(参考) 2G054 AA06 AA07 AB04 BB02 CA23
 CE02 EA01 EA03 GA04 GE07
 JA06
 4C076 AA95 BB01 BB40 EE59 FF68
 4C084 AA02 AA07 AA17 BA02 BA09
 BA17 BA23 CA01 MA01 NA13
 NA14 ZA012 ZB332 ZC412
 ZC612
 4G066 AC03B BA03 CA54 DA11
 DA12 FA12
 4H045 AA10 AA30 BA14 BA15 BA16
 BA17 EA50 FA33 FA51 FA58

专利名称(译)	朊病毒结合肽配体及其使用方法		
公开(公告)号	JP2003530554A	公开(公告)日	2003-10-14
申请号	JP2001574490	申请日	2001-04-05
[标]申请(专利权)人(译)	朝源科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	浮标, 眼睛, 技术公司		
[标]发明人	ハモンドデイビッドジェイ ウィルトシャイアーバイトローズ カーボネルルーベン シエンホングル		
发明人	ハモンド, デイビッド ジェイ. ウィルトシャイアー, バイト ローズ カーボネル, ルーベン シエン, ホングル		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K45/00 A61K47/48 A61P25/00 A61P25/20 A61P31/12 A61P43/00 B01J20/24 C07K7/00 C07K7/06 C07K17/00 G01N21/78 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	A61P25/00 A61P25/20 C07K7/06 C07K17/00 G01N33/6896 G01N2800/2828		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D A61K45/00 A61K47/48 A61P25/00 A61P25/20 A61P31/12 A61P43/00.111 B01J20/24.B C07K7/00 G01N21/78.C G01N33/566 A61K37/02		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/AA07 2G054/AB04 2G054/BB02 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054/GE07 2G054/JA06 4C076/AA95 4C076/BB01 4C076/BB40 4C076/EE59 4C076/FF68 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA02 4C084/BA09 4C084/BA17 4C084/BA23 4C084/CA01 4C084/MA01 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZB332 4C084/ZC412 4C084/ZC612 4G066/AC03B 4G066/BA03 4G066/CA54 4G066/DA11 4G066/DA12 4G066/FA12 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/EA50 4H045/FA33 4H045/FA51 4H045/FA58		
优先权	09/543188 2000-04-05 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了结合the病毒蛋白区域的短肽配体及其使用方法。这些是从筛选肽库中获得的, 可用于诊断目的或从环境样品或生物液体中去除remove病毒。根据本发明的配体包括小分子, 例如核酸, 核酸类似物, 肽, 拟肽, 碳水化合物, 脂质, 有机和无机小分子。本发明还包括含有一个或多个芳族官能团(例如, 卟啉环, 酞菁, 萘醌, 咪唑, 嘌呤或嘧啶)的化合物。

