

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-524523

(P2004-524523A)

(43) 公表日 平成16年8月12日(2004.8.12)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/37	C 1 2 Q 1/37	
GO 1 N 33/48	GO 1 N 33/48	
	D	
	Z N A	
	A	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 56 頁)

(21) 出願番号	特願2002-558019 (P2002-558019)	(71) 出願人	599019694
(86) (22) 出願日	平成14年1月18日 (2002.1.18)		エンファー テクノロジー リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月18日 (2003.7.18)		ENFER TECHNOLOGY L I
(86) 国際出願番号	PCT/IE2002/000006		M I T E D
(87) 国際公開番号	W02002/057789		アイルランド国 ダブリン 2, アール
(87) 国際公開日	平成14年7月25日 (2002.7.25)		スフォート テラス, アールスフォート
(31) 優先権主張番号	S20010042		センター, ブロック エイ (番地な
(32) 優先日	平成13年1月19日 (2001.1.19)		し)
(33) 優先権主張国	アイルランド (IE)		Block A, Earlsfort
		(74) 代理人	100105647
			弁理士 小栗 昌平

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 伝達性の海綿状脳症

## (57) 【要約】

伝達性海綿状脳症を検出する方法が記載され、これは ( a ) 試験被験体からの組織、血液、または血液派生物のサンプルを、アルコールおよび洗浄剤で処理する工程、 ( b ) 正常なプリオンタンパク質を分解する薬剤を添加する工程、 ( c ) 異常なプリオンタンパク質を変性する薬剤を添加する工程、 ( d ) プリオン特異的抗体を添加する工程、ならびに ( e ) サンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含する。また記載されるのは、異常なプリオンタンパク質を基質に固定する方法であり、 ( a ) アルコールおよびアニオン性洗浄剤で異常なプリオンタンパク質を含むことが疑われるタンパク質またはサンプルを処理する工程、ならびに ( b ) 基質の存在下で、プロテアーゼを添加する工程を包含する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

TSEを検出する方法であって、(a)試験被験体からの組織、血液、または血液派生物のサンプルを、アルコールおよび洗浄剤で処理する工程、(b)正常なプリオンタンパク質を分解する薬剤を添加する工程、(c)異常なプリオンタンパク質を変性する薬剤を添加する工程、(d)プリオン特異的抗体を添加する工程、ならびに(e)サンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含する、方法。

## 【請求項 2】

異常なプリオンタンパク質を基質に固定する方法であって、(a)前記異常なプリオンタンパク質、または前記異常なプリオンタンパク質を含むことが疑われるサンプルを、アルコールおよび洗浄剤で処理する工程、ならびに(b)その基質の存在下で、プロテアーゼを添加する工程を包含する、方法。

10

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の方法であって、ここで工程(a)がさらにタンパク質を添加を包含する、方法。

## 【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法であって、前記タンパク質が高分子量タンパク質、好ましくは、ウシ血清アルブミン、オボアルブミン、動物起源の正常な血清、Prionex(商標)のようなアルブミン基質、またはそれらの誘導体から選択される、方法。

## 【請求項 5】

請求項 3 または 4 に記載の方法であって、前記タンパク質が5%以下の、好ましくは0.05~0.4%のタンパク質を含有する緩衝液中に処方される、方法。

20

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法であって、ここで工程(a)において使用されるアルコールが、C<sub>1</sub>~C<sub>24</sub>のアルコール、好ましくはC<sub>1</sub>~C<sub>5</sub>アルコールである、方法。

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載の方法であって、ここでアルコールが、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、ノナノール、デカノール、ウンデカノール、ドデカノール、トリデカノール、ペンタデカノール、セチルアルコール、ヘプタデカノール、ステアリルアルコール、ノナデカノール、エイコサノール、ドカサノール、ドデシルアルコール、ラウリルアルコール、オクタデカノール、および一次、二次、および三次誘導体を含む、それぞれの誘導体、好ましくはメタノールまたはエタノールから選択される、アルコールである、方法。

30

## 【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法であって、前記アルコールが30%(重量基準)以下の、好ましくは10~20、より好ましくは8~12%のアルコールを含有する緩衝液中に処方される、方法。

## 【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法であって、ここで工程(a)のアニオン性洗浄剤が、ドデシル硫酸ナトリウム、サルコシル、ドデシル硫酸リチウム、コール酸、デオキシコール酸、Triton X-100、オクタン酸、Brij(商標)35溶液、N-セチル-N,N,N-トリメチル臭化アンモニウム、CHAPS、CHAPSO、ジギトニン、ノナノイル-N-メチルグルクアミド、n-オクチル-B-D-グルコピラノシド、アルキル硫酸ナトリウム、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム、オレイン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、1,2,3-オクタントリオール、3-ジメチルアミノ-1プロピン、コンドロイチナーゼABC、ナトリウムInophore 1、およびそれぞれの誘導体、最も好ましくはドデシル硫酸ナトリウムから選択される、方法。

40

## 【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の方法であって、前記洗浄剤が5~30%、より好ましくは10~20%の洗浄剤を含有する緩衝液中に処方される、方法。

50

## 【請求項 1 1】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれかに記載の方法であって、ここで工程 ( b ) において、正常なプロイオンタンパク質を分解する薬剤がプロテアーゼである、方法。

## 【請求項 1 2】

請求項 1 1 に記載の方法であって、前記プロテアーゼが広い範囲のプロテアーゼ、好ましくはプロテイナーゼ K、サブチリシン、カールスバーグ、ペプシン、およびそれぞれの誘導体から選択される、方法。

## 【請求項 1 3】

請求項 1 1 に記載の方法であって、前記プロテアーゼが  $10 \text{ mg/ml}$  以下、好ましくは  $0.05 \text{ mg/ml} \sim 4 \text{ mg/ml}$ 、より好ましくは  $0.2 \text{ mg/ml} \sim 0.6 \text{ mg/ml}$  のタンパク質を含有する緩衝液中に処方される、方法。 10

## 【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 1 3 のいずれかに記載の方法であって、ここで工程 ( c ) において異常なプロイオンタンパク質を変性する薬剤が、変性化塩溶液である、方法。

## 【請求項 1 5】

請求項 1 4 に記載の方法であって、前記薬剤がグアニジン、尿素、例えば Merck 変性化溶液のような標準変性化溶液、およびそれぞれの誘導体から選択される、方法。

## 【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の方法であって、前記変性化薬剤がさらに  $0.5 \text{ M}$  以下の水酸化ナトリウムを含む、方法。 20

## 【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 6 のいずれかに記載の方法であって、前記変性化塩が  $0.1 \sim 10 \text{ M}$ 、好ましくは  $2 \sim 8 \text{ M}$  変性化塩を含有する緩衝液中に処方される、方法。

## 【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 1 7 のいずれかに記載の方法であって、ここで工程 ( a ) の緩衝液 ( ホモジナイズ緩衝液 ) が、 $5.0 \sim 11.0$  の最終 pH、好ましくは pH  $7.0 \sim 9.0$ 、より好ましくは pH  $7.5 \sim 8.5$  を有するように作製される、方法。

## 【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 1 8 のいずれかに記載の方法であって、ここで工程 ( b ) の緩衝液 ( 特異的緩衝液 ) が、 $2.0 \sim 11.0$  の最終 pH、好ましくは pH  $2.0 \sim 8.5$ 、より好ましくは  $7.5 \sim 8.5$  に作製される、方法。 30

## 【請求項 2 0】

請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載の方法であって、ここで工程 ( c ) の緩衝液 ( アッセイ誘発緩衝液 ) が、 $1 \sim 14$ 、好ましくは  $9 \sim 12$ 、最も好ましくは少なくとも  $11$  の pH を有する、方法。

## 【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の方法であって、ここで工程 ( b ) に続いて、反応混合物が、 $10\%$  以下の、好ましくは  $4 \sim 6\%$  の緩衝化溶液を含有する第 1 の洗浄緩衝液で洗浄される、方法。

## 【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の方法であって、前記アッセイ誘発緩衝液が、約  $5 \sim 30$  分間、好ましくは  $10 \sim 20$  分間、反応混合物とともにインキュベートすることを許容される、方法。 40

## 【請求項 2 3】

請求項 1 ~ 2 2 のいずれかに記載の方法であって、前記アッセイ誘発緩衝液での処理後に、 $5.0 \sim 11.0$  の最終 pH、好ましくは pH  $7.0 \sim 8.0$  を有する第 2 の緩衝液で、混合物が洗浄される、方法。

## 【請求項 2 4】

請求項 2 1 に記載の方法であって、前記第 1 の洗浄緩衝液が、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化亜鉛を含む、方法。 50

## 【請求項 25】

請求項 23 に記載の方法であって、前記第 2 の洗浄緩衝液が、0 ~ 5 % の Tween 20 の選択的な添加を伴う、リン酸緩衝化生理食塩水を含む、方法。

## 【請求項 26】

請求項 1 ~ 25 のいずれかに記載の方法であって、前記血液または組織サンプルが支持体、適切にはマイクロタイタートレイ上に懸濁される、方法。

## 【請求項 27】

請求項 1 ~ 26 のいずれかに記載の方法であって、ここでプリオン特異的抗体が、プリオン配列のアミノ酸番号 60 の 5' 側にあるプリオン配列に対して反応する、方法。

## 【請求項 28】

請求項 1 ~ 27 のいずれかに記載の試験方法であって、試験被験体から血液、または血液派生物、または組織のサンプルを得る工程、組織、血液、または血液派生物のサンプルと、プリオン特異的抗体とを反応する工程、および標準的な免疫アッセイによってサンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含し、前記抗体を添加する前に、組織、血液、または血液派生物のサンプルが、約 0.1 M (TRIS/HCL) またはリン酸緩衝液、最終 pH 7.0 ~ 9.0 を有する緩衝液中の用量に対して作製される、0 ~ 30 % の C<sub>1</sub> ~ C<sub>5</sub> アルコール、5 ~ 30 % のドデシル硫酸ナトリウム、または 5 ~ 30 % のドデシル硫酸ナトリウムおよび 0 ~ 5 % サルコシル、ならびに 0 ~ 5 % ウシ血清アルブミンを含有する第 1 の緩衝液とともに混合される、試験方法。

10

## 【請求項 29】

伝達性海綿状脳症のための試験方法であって、試験被験体からの血液、または血液派生物、または組織のサンプルを得る工程、組織、血液、または血液派生物サンプルと、プリオン特異的抗体とを反応する工程、ならびに標準的なイムノアッセイによってサンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含し、血液または組織サンプルは、不活性な支持体上に分注され、そして抗体との反応の前に、2.0 ~ 11.0、好ましくは 2.0 ~ 8.5、より好ましくは 7.5 ~ 8.5 の最終 pH を伴う緩衝液中に 10 mg/ml 以下の、好ましくは 0.05 mg/ml ~ 4 mg/ml の、より好ましくは 0.2 mg/ml ~ 0.6 mg/ml の、広い範囲のプロテアーゼ酵素を含有する緩衝液とともにインキュベートされる、試験方法。

20

## 【請求項 30】

伝達性海綿状脳症のための試験方法であって、試験被験体から血液、血液派生物、または組織のサンプルを得る工程、組織、血液、または血液派生物のサンプルと、プリオン特異的抗体とを反応する工程、および標準的なイムノアッセイによってサンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含し、サンプルは、抗体との反応の前に、室温にて、少なくとも pH 11 で、逆浸透圧蒸留水中で作製される、0.1 ~ 10 M 変性化溶液、好ましくは 3 ~ 6 M、より好ましくは 0.5 ~ 3 M グアニジン (選択的範囲は 2 ~ 4 M) または 2 ~ 8 M 尿素 (選択的範囲は 4 ~ 6 M)、および 0.5 M 以下の、好ましくは 0.1 ~ 0.2 M 水酸化ナトリウムを含有する緩衝液とともにインキュベートされる、試験方法。

30

## 【請求項 31】

(1) 5.0 ~ 11.0 (選択的範囲は 7.5 ~ 8.5) の最終 pH を有する緩衝液中の容量に対して作製される、0 ~ 30 % の C<sub>1</sub> ~ C<sub>24</sub> アルコール (選択的範囲は 10 ~ 20 %)、5 ~ 30 % 洗浄剤 (選択的範囲は 10 ~ 20 %)、および 0 ~ 5 % プロテイナーゼ (選択的範囲は 0.05 ~ 0.4 %);

40

(2) 2.0 ~ 11.0 (選択的範囲は 2.0 ~ 8.5) の最終 pH を有する緩衝液中の 0.05 mg/ml ~ 4 mg/ml (選択的範囲は 0.2 mg/ml ~ 0.6 mg/ml) のプロテアーゼ酵素;

(3) 0.1 ~ 10 M 変性化溶液 (選択的範囲は 2 ~ 8 M)

から選択される緩衝液。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

50

## 【0001】

本発明は、伝達性海綿状脳症を検出する方法に関し、および特にTSEを同定するために、生存するまたは死亡した動物またはヒトに対して行われ得る試験に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

海綿状脳症は、退行性神経学的疾患の1つの群である。BSE(ウシ海綿状脳症)、スクレイピー(Scrapie)、クロイツフェルト-ヤコブ病(CJD)、ゲルストマン-シエトロイスラー-シャインカー疾病、クールー(Kuru)、伝達性ミンク脳症、シカの慢性疲労性症候群、猫海綿状脳症、およびヘラシカ、naya、より大きなシマカモシカ、ゲムスポック、およびトラのような動物において見出される他の海綿状脳症を含む海綿状脳症の多くの例がある。BSEが、実験室条件下で、マウスおよびブタに伝達され得ることがまた報告されている。感染因子による種の境界のこの交差は、ヒトへの移行が生じ得るといふ益々の懸念を導いた。

10

## 【0003】

ウシ海綿状脳症(BSE)は、「狂牛病」として一般に知られる牛の脳異常である。これは4または5年間までの、ゆっくりした潜伏期間を有し、ウシにおいて、協調性の喪失および千鳥足、それらの周囲への興味の喪失、食餌および水への無関心を含む、精神状態の漸進性退行の症状、または攻撃を含む予測できない挙動を伴う。罹患されたウシはそれらが3~10歳である場合に症状を示す。

## 【0004】

1986年11月、英国において最初に同定され、10,000を超える症例がそれ以来報告された。罹患されたウシの検死は、神経細胞の破壊に起因する脳組織における空胞形成の特徴的なパターン、および異常なタンパク質繊維の沈着を示し、これは脳をスポンジ(海綿状)組織にする。類似の疾患が、100年にわたってヒトにおいて(例えば、クロイツフェルト-ヤコブ病あるいは(CJD))、および200年にわたってヒツジにおいて報告されている。伝達性の海綿状脳症を担うと考えられる因子は、プリオンとして知られる感染性タンパク質である。プリオンは感染性粒子であり、タンパク質のみを含み、および核酸は何ら含まない感染性粒子であり、核酸の存在は、従来ウイルスの症例において必要とされる。スクレイピーにおいて、特にプリオンタンパク質またはPrP<sup>Sc</sup>として知られる1つのタンパク質が、感染力を伴って精製されることが見出され、そして実験室条件下でハムスターのような他の動物からの脳細胞クラスターにおいてスクレイピー様状態を生じ得る。PrP<sup>Sc</sup>はスクレイピーが感染されたヒツジの脳組織において沈着される特徴的なタンパク質繊維の唯一知られる成分である。このタンパク質、PrP<sup>Sc</sup>は、構造的改変を受けるようであるが、用語PrP<sup>Sc</sup>は、PrP<sup>Sc</sup>の通常の細胞対応物に関して使用される。PrP<sup>Sc</sup>の天然の機能は知られていないが、器官において必要不可欠な構造または機能的な役割を有するようである。

20

30

## 【0005】

再利用される動物組織は、タンパク質補足物質としてウシに日常的に給餌されており、感染源として同定された。BSEは元来、スクレイピーで感染されたヒツジ脳から伝播されたこと、そしてその伝播がBSEで感染されたウシから採集された脳組織の摂取によってはからずも加速されたと考えられる。それゆえ、英国政府は、1988年の初頭から、疑わしい動物およびそれらの屠体の強制的な破棄を導入した。ウシに対する動物組織の給餌は1988年6月、英国において禁止された。

40

## 【0006】

クールー、関連性疾患が、ニューギニア部族民間の葬儀の際の人食い習慣によって伝播されることが知られるので、疾患の最初の報告以来、消費者は牛乳または牛製品を介してヒトに伝達されるかもしれないことを恐れた。1990年後半、ヒトへのBSEの伝達を上回る消費者の懸念が、牛市場における崩壊を誘発した。類似の恐慌が1994年半ば、ドイツを襲った。

## 【0007】

50

1996年、致死性CJD(異型CJD)の新しく記載されるタイプの10症例が同定された。罹患者は、異なる脳組織徴候を有し、全て42歳以下であり、および疾患の遺伝的記録を何ら有しなかった。疑わしい動物の根絶が効果を有する前に、罹患者はBSE感染されたウシとの接触を介して疾患と接触し得ることが提案された。異型CJDの同定は、英国において、牛消費の劇的な暴落に、ならびに世界中の種々の国において、英国のおよびいくつかの例においてアイルランドの牛輸入の禁止に導く。

【0008】

それゆえ、獣医学的および経済学的な両方の理由のために、生存ストック、動物屍体、および食肉において一般的に、ならびに薬品およびヒトにおいて、BSE、スクレイピー、異型CJD、および他の関連性の海綿状脳症での感染を診断するための方法、および検出するための診断キットを提供する緊急の必要性がある。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

発明の目的

従って、本発明の目的は、TSEを担う感染因子について動物、薬品、およびヒトを試験する方法を提供することである。血液または血液由来の物質および固体組織の両方において使用され得る複数組織の試験系を提供することはまた目的である。方法が迅速であり、結果が数時間で利用可能であること、これが安価で、信頼性があり、および使用者に親しみがあるべきであることは、本発明のさらなる目的である。

20

【0010】

今回まで、血液または血液派生物に対して行われ得るTSEを検出する方法は何らなかった。今まで、動物がTSEを被るか否か、ヒトが関連性の疾患を被るか否かを検出する唯一の方法は、脳組織の病理学的な検死試験を行うことであった。従って、血液に対して行われ得る試験は、これが生存する動物またはヒトに対して行われ得るという莫大な利点を有する。このことは、集団中の他の動物への感染の伝播を防ぐ試みにおいて、感染された動物が集団から除去され得、そして屠殺され得るという可能性を生じる。これはまた、感染されたヒトが同定され得ることを意味し、医薬処置が導入され得、そして疾患についての可能性のある治癒が見出され得るという可能性を伴う。試験はまた、ヒト食物連鎖への感染された食肉の介入を防ぎ、従って、ヒトが、異型CJDまたは感染された食肉の摂食によって伝達され得る他の関連性の疾患を請け負う可能性を減少する。これはまた、食肉または食肉由来の製品における消費者信頼を回復し、これは概して農業社会および食肉産業の両方に対して有利である。

30

【0011】

TSEについての試験が血液または血液由来の産物に対して行われ得ることが驚くべき事に今も見出された。試験は、これがまた固体組織サンプルに対して行われ得るという利点を有する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明によれば、TSEを検出する方法が提供され、(a)試験被験体からの組織、血液、または血液派生物のサンプルを、アルコールおよび洗浄剤で処理する工程、(b)正常なプリオンタンパク質を分解する薬剤を添加する工程、(c)異常なプリオンタンパク質を変性する薬剤を添加する工程、(d)プリオン特異的抗体を添加する工程、ならびに(e)サンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含する。

40

【0013】

本発明はまた、異常なプリオンタンパク質を基質に固定する方法を提供し、(a)前記異常なプリオンタンパク質、または前記異常なプリオンタンパク質を含むことが疑われるサンプルを、アルコールおよび洗浄剤で処理する工程、ならびに(b)その基質の存在下で、プロテアーゼを添加する工程を包含する。

【0014】

50

工程 ( a ) はさらにタンパク質、好ましくは、ウシ血清アルブミン、オボアルブミン、動物起源の正常な血清、Prionex ( 商標 ) のようなアルブミン基質、またはそれらの誘導体などのような高分子量タンパク質の添加を包含し得る。タンパク質は、5 % 以下の、好ましくは 0 . 0 5 ~ 0 . 4 % タンパク質を含有する緩衝液中に処方され得る。

【 0 0 1 5 】

好ましくは工程 ( a ) において使用されるアルコールは、 $C_1 \sim C_{24}$  アルコール、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、ノナノール、デカノール、ウンデカノール、ドデカノール、トリデカノール、テトラデカノール、ペンタデカノール、セチルアルコール、ヘプタデカノール、ステアリルアルコール、ノナデカノール、エイコサノール、ドカサノール、ドデシルアルコール、ラウリルアルコール、オクタデカノール、および一次、二次、および三次誘導体を含む、それぞれの誘導体などである。より好ましくはアルコールは、 $C_1 \sim C_5$  アルコールであり、最も好ましくは、メタノール / エタノールである。アルコールは、30 % ( 重量基準 ) 以下の、好ましくは 10 ~ 20 %、より好ましくは 8 ~ 12 % アルコールを含有する緩衝液中に処方され得る。

10

【 0 0 1 6 】

好ましくは工程 ( a ) の洗浄剤は、ドデシル硫酸ナトリウム、サルコシル、ドデシル硫酸リチウム、コール酸、デオキシコール酸、Triton X-100、オクタン酸、Br i j ( 商標 ) 35 溶液、N - セチル - N , N , N - トリメチル臭化アンモニウム、CHAPS ( 3 - [ ( - コールアミドプロピル ) - ジメチルアンモニノ ] - プロパン - スルホネート )、CHAPS O ( 3 - [ ( - コールアミドプロピル ) - ジメチルアンモニノ ] - ヒドロキシプロパン - スルホネート )、ジギトニン、ノナノイル - N - メチルグルクアミド、n - オクチル - B - D - グルコピラノシド、アルキル硫酸ナトリウム、ジオクチルスルホコハクサンナトリウム、オレイン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、1, 2, 3 - オクタントリオール、3 - ジメチルアミノ - 1 プロピン、コンドロイチナーゼ ABC ( Fluka から入手可能 )、ナトリウム Inophore 1 ( Fluka から入手可能 )、およびそれぞれの誘導体など、最も好ましくはドデシル硫酸ナトリウムから選択される。洗浄剤は、5 ~ 30 %、より好ましくは 10 ~ 20 % の洗浄剤を含有する緩衝液中に処方される。洗浄剤はアニオン性洗浄剤であり得る。

20

【 0 0 1 7 】

工程 ( b ) において、正常なプリオンタンパク質を分解する薬剤は適切にはプロテアーゼ、適切には広い範囲のプロテアーゼであり得る。好ましくはプロテアーゼは、プロテイナーゼ K、サブチリシン Carlsberg、ペプシン、およびそれぞれの誘導体などから選択される。プロテアーゼは、10 mg / ml 以下の、好ましくは 0 . 0 5 mg / ml ~ 4 mg / ml、より好ましくは 0 . 2 mg / ml ~ 0 . 6 mg / ml タンパク質を含有する緩衝液中に処方され得る。

30

【 0 0 1 8 】

好ましくは、工程 ( c ) において異常なプリオンタンパク質を分解する薬剤は、変性化塩溶液である。適切には、薬剤は、グアニジン、尿素、標準変性化溶液、例えば、Merck 変性化溶液 ( Merck から市販される )、およびそれぞれの誘導体などから選択される。特に好ましい実施態様において、変性化剤はさらに 0 . 5 M 以下の水酸化ナトリウムを含み得る。変性化塩は、0 . 1 ~ 10 M、好ましくは 2 ~ 8 M 変性化塩を含有する緩衝液中に処方され得る。

40

【 0 0 1 9 】

工程 ( a ) の緩衝液 ( ホモジナイズ緩衝液 ) は、5 . 0 ~ 11 . 0 の最終 pH、好ましくは pH 7 . 0 ~ 9 . 0、より好ましくは pH 7 . 5 ~ 8 . 5 を有するように作製され得る。工程 ( b ) の緩衝液 ( 特異的緩衝液 ) は、2 . 0 ~ 11 . 0 の最終 pH、好ましくは pH 2 . 0 ~ 8 . 5、より好ましくは 7 . 5 ~ 8 . 5 に作製され得る。工程 ( c ) の緩衝液 ( アッセイ誘発緩衝液 ) は、1 ~ 14 の pH、好ましくは pH 9 ~ 12、最も好ましくは少なくとも 11 を有するのがよい。

50

## 【0020】

好ましくは、工程 (b) に続いて、反応混合物は、蒸留水、または 10% 以下の、好ましくは 4 ~ 6% の緩衝化溶液を含有する第 1 の洗浄緩衝液で洗浄される。

## 【0021】

アッセイ誘発緩衝液は、約 5 ~ 30 分間、好ましくは 10 ~ 20 分間、反応混合物とともにインキュベートすることを許容される。適切には、混合物は次いで、5.0 ~ 11.0 の最終 pH、好ましくは pH 7.0 ~ 8.0 を有する第 2 の洗浄緩衝液で洗浄される。

## 【0022】

第 1 の洗浄緩衝液は、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化亜鉛などを含み得る。第 2 の洗浄緩衝液は、0 ~ 5% の Tween 20 などの任意の添加を伴う、リン酸緩衝化生理食塩水などを含む。

10

## 【0023】

好ましくは、血液または組織サンプルは、支持体、適切にはマイクロタイタートレイ上に分注され、次いで好ましくは、さらなるプロセッシングのためにサンプルを澄清化または「洗浄」するために作用する遠心分離工程に任意に供され得る。

## 【0024】

プリオン特異的抗体は、プリオン配列のアミノ酸番号 60 の 3' 側にあるプリオン配列に対して反応する。

## 【0025】

プリオン特異的抗体は、適切には、以下のプリオンペプチドに対して結合する。 :

20

- プリオン配列 N-末端

M V K S H I G S W I L V L F V V A M W S D V G L C K K R P K P G G G W N T G G S  
R Y P G Q - 4 4

G S P G G N R Y P P Q G G G G W G Q P H G G G W G Q P H G G G W G Q P H G G G W  
G Q P - 8 7

G G G G W G Q G G S H S Q W N K P S K P P K T N M K H V A G A A A G A V V G G  
L G G Y - 1 3 1

M L G S A M S S P L I H F G N D Y E D R Y Y T R E N M Y R Y P N Q V Y Y R P V D  
R Y S Q N N - 1 7 7

## 【0026】

ここで、1文字アミノ酸コードが本明細書中で規定され、ならびに、誘導体および配列のフラグメント (当業者によって十分に理解されるような D 異性体アミノ酸を含み得るものを含む)、アミノ酸の置換、欠失、挿入によるこの配列の修飾は、同じ活性を伴うペプチドを生じ得る。

30

## 【0027】

血液サンプルは全血サンプルであり得るか、または血清サンプル、または白血球もしくはリンパ球を含む軟膜調製物のような血液由来のサンプルであり得るかのいずれかである。試験が、固体組織サンプルに対して使用される場合、約 0.3 ~ 1.5 g のサンプルが使用される。

## 【0028】

適切には、血液または組織サンプルはホモジナイズされる。血液サンプルがゼラチン状である場合、酵素分解工程が含まれ得る。酵素分解工程は、DNアーゼ、RNアーゼ、プロテアーゼ、またはリパーゼの添加を包含し得る。

40

## 【0029】

プリオン特異的抗体は、任意の種における多様な種特異的プリオン配列に対して惹起され得る。抗体は、例えば、ウサギにおいて惹起され得、そして免疫アッセイは二次抗体、適切には西洋ワサビペルオキシダーゼと結合されたヤギ (種) 抗ウサギ抗体の使用を包含し得る。

## 【0030】

欠失法は適切には、増強された化学発光アッセイであるが、比色検出、蛍光検出、または

50

放射免疫アッセイ検出がまた使用され得る。

【0031】

特に好ましい実施態様において、伝達性の海綿状脳症についての試験が提供され、試験被験体からの血液または血液派生物、または組織のサンプルを得る工程、組織、血液、または血液派生物サンプルと、プリオン特異的抗体とを反応する工程、および標準的な免疫アッセイによってサンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含し、ここでは組織、血液、または血液誘導体サンプルは、抗体の添加の前に、約0.1M TRIS/HCLまたはリン酸緩衝液中の容量に対して作製される0~30%のC<sub>1</sub>~C<sub>5</sub>アルコール、5~30%ドデシル硫酸ナトリウム、または5~30%ドデシル硫酸ナトリウムおよび0~5%サルコシル、および0~5%ウシ血清アルブミンを含有する第1の緩衝液と混合され、緩衝液は、7.0~9.0の最終pHを有する。

10

【0032】

好ましくは、血液または組織サンプルは、支持体、より好ましくは不活性なプラスチック支持体上に、適切にはマイクロタイタートレイ上に懸濁され、そして7.5~8.5の最終pHを有する約0.1M TRIS/HCLまたはリン酸緩衝液中に1~10mg/mlの広い範囲のプロテアーゼ酵素を含有する第2の緩衝液が添加される。緩衝液は適切には5分の1に希釈されて、0.2mg/ml~2mg/mlの作用強度を与える。次いで、サンプルは、好ましくは10~180分間、約37~70にて、より好ましくは60にてインキュベートされる。

20

【0033】

インキュベーション後、支持体は適切には、0~10%塩溶液を含有する第1の洗浄緩衝液のある容量で洗浄される。好ましくは、室温にて少なくとも11のpHを有する、逆浸透蒸留水中で作製される0.5~3Mグアニジン、または2~8M尿素のいずれか、および0.1~0.2M水酸化ナトリウムを含有する第3の緩衝液が、支持体に添加される。適切には、支持体および第3の緩衝液は、約15分間のインキュベートを許容され、そして0.1Mリン酸緩衝化生理食塩水および0.5%Tween 20(商標)を含有する洗浄緩衝液で洗浄される。

【0034】

次いでサンプル調製物は完成し、そして免疫アッセイに備える。

【0035】

本発明はまた、伝達性の海綿状脳症についての試験を提供し、試験被験体からの血液または血液派生物、または組織のサンプルを得る工程、組織、血液、または血液派生物サンプルと、プリオン特異的抗体とを反応する工程、および標準的な免疫アッセイによってサンプルへの抗体の結合を検出する工程を包含し、ここでは血液または組織のサンプルは、不活性な支持体上に懸濁され、そして2.0~11.0の最終pH、好ましくはpH2.0~8.5、より好ましくは7.5~8.5を有する緩衝液中に10mg/ml以下の、好ましくは0.05mg/ml~4mg/ml、より好ましくは0.2mg/ml~0.6mg/mlの広い範囲のプロテアーゼ酵素を含有する緩衝液とともに、抗体との反応の前に、インキュベートされる。好ましくは不活性な支持体は、サンプルの懸濁後、およびプロテアーゼ(特異的緩衝液)の添加の前に遠心分離される。プロテアーゼは0.1M TRISまたはリン酸を含有する緩衝液中に処方され得る。

30

40

【0036】

本発明のさらなる局面は、伝達性の海綿状脳症についての試験を提供し、試験被験体からの血液または血液派生物、または組織のサンプルを得る工程、組織、血液、または血液派生物サンプルと、プリオン特異的抗体とを反応する工程、および標準的な免疫アッセイによってサンプルへの抗体の結合を検出する工程を包含し、ここではサンプルは、室温にて少なくとも11のpHを有する、逆浸透蒸留水中に作製される0.1~10M変性化溶液、好ましくは3~6M、より好ましくは0.5~3Mグアニジン(選択的範囲は2~4M)または2~8M尿素(選択的範囲は4~6M)、および0.5M以下の、好ましくは0.1~0.2M水酸化ナトリウムを含有する緩衝液とともに、抗体との反応の前に、イン

50

キュベートされる。

【0037】

本発明はまた、以下から選択される緩衝液を提供する：

1. 5.0 ~ 11.0 (選択的範囲は7.5 ~ 8.5)の最終pHを有する緩衝液中の容量に対して作製される、0 ~ 30%のC<sub>1</sub> ~ C<sub>24</sub>アルコール(選択的範囲は10 ~ 20、好ましくは8 ~ 12%)、5 ~ 30%洗浄剤(選択的範囲は10 ~ 20%)、および0 ~ 20%タンパク質(選択的範囲は0.05 ~ 0.4%)。

2. 2.0 ~ 11.0 (選択的範囲は2.0 ~ 8.5)の最終pHを有する緩衝液中の、0.05 mg/ml ~ 4 mg/ml (選択的範囲は0.2 mg/ml ~ 0.6 mg/ml)のプロテアーゼ酵素を含む緩衝液。

3. 0.1 ~ 10 M変性化溶液(選択的範囲は2 ~ 8 M)を含有する緩衝液。

【0038】

全ての緩衝液は、Enfer Scientific Ltdによって製造および供給される。

【0039】

【表1】

ホモジナイズ緩衝液：

成分	作用範囲	選択濃度
メタノールまたはエタノール	0 ~ 30%	16%
ドデシル硫酸ナトリウム	5 ~ 30%	15%
ウシ血清アルブミン	0 ~ 5%	0.1%

【0040】

この緩衝液は必要とされる容量に作製され、0.1 M TRIS / HCL 緩衝液、8.0 ± 1の最終pH中で攪拌する。

【0041】

【表2】

特異的緩衝液：

成分	作用範囲	選択濃度
プロテイナーゼK	0.05 ~ 4 mg/ml	0.4 mg/ml

【0042】

この緩衝液は、0.1 M TRIS / HCL 緩衝液、8.0 ± 1の最終pH中で、必要とされる濃度に作製される。

【0043】

【表3】

アッセイ誘発緩衝液：

成分	作用範囲	選択濃度
グアニジン	0.5 ~ 6 M	3 M
水酸化ナトリウム	0 ~ 0.5 M	0.15 M

【0044】

【表4】

10

20

30

40

OR

成分	作用範囲	選択濃度
尿素	2~8M	6M
水酸化ナトリウム	0~0.5M	0.15M

## 【0045】

この緩衝液は、逆浸透蒸留水中で必要とされる濃度に作製され、そして11よりも大きいべきであるpHを確認する前に室温に達せられる。

10

## 【0046】

## 【表5】

洗浄緩衝液1:

成分	作用範囲	選択濃度
塩化ナトリウム	0~10%	5%

## 【0047】

この緩衝液は、逆浸透蒸留水中で必要とされる濃度に作製され、pHは無関係である。

20

## 【0048】

## 【表6】

洗浄緩衝液2:

成分	作用範囲	選択濃度
リン酸緩衝化生理食塩水	0~5M	0.1M
Tween20	0~5%	0.5%

## 【0049】

この緩衝液は、逆浸透蒸留水中で必要とされる容量に作製され、 $7.6 \pm 1$ のpHを有する。

30

## 【0050】

本発明はさらに以下から選択される緩衝液を提供する:

- 0~20%のC<sub>2</sub>~C<sub>5</sub>アルコール、15~30%ドデシル硫酸ナトリウム、または5~30%ドデシル硫酸ナトリウムおよび0~5%サルコシル、0~0.5%ウシ血清アルブミン、約0.1M TRISまたはリン酸緩衝化生理食塩水中の容量に対して作製され、緩衝液は7.0~9.0の最終pHを有する;
- 7.5~8.5の最終pHを有する、約0.1M TRISまたはリン酸緩衝液中に1~10mg/mlの広い範囲のプロテアーゼ酵素を含有する緩衝液;
- 室温にて少なくとも11のpHを有する、逆浸透蒸留水中に作製される、0.5~3M グアニジンまたは2~8M尿素有する、および0.1~0.2M水酸化ナトリウムを含有する緩衝液。

40

## 【実施例1】

## 【0051】

本発明は今や、以下の実施例を参照してより詳細に記載される。

TSE免疫アッセイについての要件は以下のものである:

- 固体組織、血液、または血液由来の調製物のサンプル。
- 一連の調製用サンプルの処理物
- プリオン特異的抗体
- 検出の感度の高い方法

50

a) 血液のサンプルは、抗凝固薬でコート化された管またはコードされていない血管のいずれかを使用して採取される。2つの選択肢が試験について利用可能である：

i) 全血サンプル

ii) 血液由来のサンプル-血清サンプルまたは軟膜（白血球、リンパ球など）調製物。

【0052】

固体組織のサンプルは、適切な方法、例えばバイオプシーまたは切開によって、動物またはヒトから採取される。

【0053】

b) 実験室に届くと、サンプルはバーコードを使用して同定される。各サンプルに割り当てられたバーコードは、サンプルの起源の場所（屠殺設備、診療所、病院）、サンプルが採取された日付、および追跡可能な識別サンプル番号に対する情報を組込む。各サンプルのある量が、取出され、秤量され、そしてホモジナイズ（消化、超音波処理、またはボルテックス）のためにサンプルボトル/チューブ/ストマッカーバッグに置かれる。サンプルが特にゼラチン状である場合、酵素分解工程-供給社の指示に従って使用されるDNアーゼ、RNアーゼ、プロテアーゼ、またはリパーゼの添加が包含され得る。ホモジナイズされた元来のサンプルを含有するこのサンプルボトルまたはバッグは、元来のサンプルに同一のバーコードを割り当てられる。このことは、システムにわたる十分な追跡可能性を可能にする。ホモジナイズ緩衝液の固定された容量：重量比（1:1~1:25）は、Enfer Products、Castleblake、Rosegreen、Cashel、Co. Tipperaryによって供給され、サンプルボトルに添加され、そしてサンプルは、消化、ボルテックス、または超音波処理によってホモジナイズされる。サンプルが特にゼラチン状である場合、酵素分解工程-供給社の指示に従って使用されるDNアーゼ、RNアーゼ、プロテアーゼ、またはリパーゼの添加が包含され得る。次いでサンプルは、ポリプロピレン96ウェルマイクロタイタープレート上に2連で懸濁される（200  $\mu$ l）。獣医学研究所（Veterinary Research Laboratories、Abbotstown、Dublinによって提供されるブランク、ネガティブ、およびポジティブコントロールがまた、このプレートに添加される。このプレートはプレート遠心分離回転器において、4000 rpmにて10分間、遠心分離される。Enfer Scientific、Castleblake、Rosegreen、Cashel、Co. Tipperaryによって供給される、20  $\mu$ lの特異的緩衝液が、好ましくは、プラスチック性の、全く不活性のマイクロタイタープレート（例えば、イムロン1プラスチックから作製されるDYNEX Microlite 1プレート）に添加される。プレートは、任意のアッセイの完了のために不活性であるのがよい。荷電されたプレートの使用は成果を低減する。遠心分離されたサンプルおよびコントロールのそれぞれの100  $\mu$ lは次いで、ポリプレンの遠心分離されたプレートから特異的緩衝液の容量を含有する不活性なアッセイマイクロライトプレートに移され、そしてプレートカバーガラスがウェル上に置かれる。次いで、プレートは37  $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートされ、カバーガラスが除去され、そしてプレートは、Enfer Scientific、Castleblake、Rosegreen、Cashel、Co. Tipperaryによって供給される、洗浄緩衝液1中で洗浄される。Enfer Scientific、Castleblake、Rosegreen、Cashel、Co. Tipperaryによって供給される、アッセイ誘発緩衝液が200  $\mu$ lの容量にて各ウェルに添加される。プレートはカバーガラスで覆われ、そして37  $^{\circ}$ Cにて15分間インキュベートされる。カバーガラスは、インキュベーションの完了の際に除去され、そしてEnfer Scientific、Castleblake、Rosegreen、Cashel、Co. Tipperaryによって供給される、洗浄緩衝液2が次いでプレート上のサンプルに添加されて、洗浄される。この工程はサンプル調製手順を完了する。

【0054】

c) サンプルは今や、イムノアッセイに備える。これはプリオン特異的抗体を必要とする。このような抗体についての例は、オボアルブミン結合化合成プリオンペプチド、Pro

10

20

30

40

50

teus International UKによってEnfer Scientificに認可されるペプチドでのウサギの注射によって惹起されるウサギ抗-PrPである。このペプチドは、分子モデリング技術、続いてウェスタンブロットおよびELISA分析を使用してProteus International UKによって同定された。ペプチドは、固相ペプチド合成を使用して、大量に合成される。多様な種、任意の種における特異的なプリオン配列に対して惹起される他の抗PrP抗体の使用はまた、このアッセイにおける満足の行く結果を生じる。本明細書中に記載されるペプチドは、アッセイにおいて成功した抗体のただ1つの例にすぎない。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の両方がアッセイについて使用され得る。洗浄緩衝液2中、至適な作用強度希釈にて、この特異的抗体の固定された容量(150 µl)が、マイクロライトプレートに添加され、37にて40分間インキュベートされ、そして洗浄緩衝液2を使用して洗浄される。洗浄緩衝液2中、至適な作用強度希釈にて、DAKO、USAによって供給される種抗ウサギ(種)-HRPの固定された容量(150 µl)が、プレートに添加され、37にて30分間インキュベートされ、そして洗浄液2を使用して洗浄される。結果の検出が今や可能である。

10

## 【0055】

d) 検出は、増強された化学発光の手段による。Jonson & Johnson、UKによって供給される化学発光試薬-Amerlite試薬(150 µl)が、マイクロタイタープレートに添加され、そして37にて3分間インキュベートされる。光シグナルが、Labsystems Chemiluminometerを使用して読取られ、結果は対応するバーコードに割り当てられ、そして結果報告が印刷される。

20

## 【0056】

詳細な調製プロトコル

## 1. ホモジナイズ化

1.1 血液または血液派生物または組織サンプルは、サンプルボトル/チューブ/バッグ中に置かれる。

1.2 1~25、好ましくは10~15倍のサンプル重量のホモジナイズ緩衝液がサンプルに添加される。

1.3 この混合物は、2分間またはサンプルが完全にホモジナイズされるまで、ホモジナイズ(消化、超音波処理、ボルテックス)される。

30

1.4 酵素分解選択が、操作者の判断で、ここで適用され得る。

1.5 粒子物質がサンプル中に残存する場合、得られるホモジネートは濾過され得る。

## 【0057】

## 2. プレーティング

2.1 V-96-ウェルマイクロタイターポリプロピレンプレートは、200 µlの各サンプルの遠心分離のために使用される。

2.2 プレート上の200 µlのブランクコントロールは、遠心分離プレートのA1、2に位置する。

2.3 獣医学研究所、Abbotstown、Castleknock、Dublin、Irelandによって供給される200 µlのネガティブコントロール(公知のネガティブBSEホモジネート)は、プレート上、B1、2およびC1、2の位置に、4複製物に懸濁される。

40

2.5 獣医学研究所、Abbotstown、Castleknock、Dublin、Irelandによって供給される200 µlのポジティブコントロール、(公知のポジティブBSEホモジネート)は、プレート上、D1、2およびE1、2の位置に、4複製物に懸濁される。

2.6 200 µlの各(濾過された、酵素処理された)ホモジネートは、プレート上、残りの位置に、2連に懸濁される。

2.7 プレートは、4000 rpmにて10分間遠心分離される。

2.8 20 µlの特異的緩衝液が、不活性なアッセイマイクロタイタープレート、例え

50

ば、DYNEXマイクロライト1プレートの各ウェルに添加される。

2.9 100  $\mu$ lの各遠心分離されたサンプルおよびコントロールが、遠心分離プレートから取出され、そして不活性なアッセイマイクロライトプレート上の同じ位置に懸濁され、ウェル容量を120  $\mu$ lにする。

2.10 プレートはマイクロタイタープレートシーラーで覆われ、そして37  $^{\circ}$ Cにて60分間インキュベートされる。

2.11 次に、プレートは、洗浄緩衝液1で4回洗浄される。

2.11 Enfer Products、Castleblake、Rosegreen、Cashel、Co. Tipperary、Irelandによって供給される200  $\mu$ lのアッセイ誘発緩衝液は、マイクロタイタープレートの各ウェルに添加され、そしてプレートは15分間、37  $^{\circ}$ Cにてインキュベートされる。 10

2.12 プレートは洗浄緩衝液2で4回洗浄される。

#### 【0058】

##### 3. 免疫アッセイ

3.1 150  $\mu$ lの一次抗体、ウサギ(種)抗-PrP、ポリクローナル/モノクローナル抗体は、至適な希釈にて、プレート上に懸濁される。

3.2 プレートは37  $^{\circ}$ Cで40分間インキュベートされる。

3.3 プレートは洗浄緩衝液2で4回洗浄される。

3.4 150  $\mu$ lの二次抗体、種-抗-ウサギ(種)-HRPが、至適な希釈にて、プレート上に懸濁され、そしてプレートは37  $^{\circ}$ Cにて30分間インキュベートされる。至適な希釈は、格子アッセイ、例えば、至適な光シグナルを決定するために多様な濃度の一次および二次抗体をプロットングすることによって決定される(以下を参照のこと)。 20

3.5 プレートは洗浄緩衝液2で4回洗浄される。

#### 【0059】

##### 4. 検出

4.1 150  $\mu$ lの増強された化学発光試薬-Johnson & Johnson、Clinical Diagnostics、UKによって供給されるAmerlite試薬が、プレートに添加される。

4.2 プレートは37  $^{\circ}$ Cにて3分間インキュベートされる。

4.3 光シグナルは、Medical Supply Company、Dublin、Irelandによって供給されるLabsystems Chemiluminometerを使用して読み取られ、これは完全なIR-Visible-Wスペクトルを走査し、そして結果を外挿することによってプレートの各ウェルからの発光を読み取る。 30

4.4 プレートからの光シグナルが、G.K.S. Software、Dublin Irelandによってカスタマイズされたソフトウェアパッケージに移される。

4.5 各光シグナルは、対応するバーコードに割り当てられ、そして結果がプリントされる。

4.6 結果が、化学発光光単位-L.Uにおいて引用される。

#### 【0060】

##### 試薬の供給源

1. プリオン特異的抗体-抗-PrP-は、Enfer Scientific Ltd.によって供給され、そしてポリクローナル抗体は以下の合成ペプチドに対して惹起される:

#### 【0061】

##### プリオン配列

###### N-末端

MV K S H I G S W I L V L F V V A M W S D V G L C K K R P K P G G G W N T G G S R Y P G Q - 4 4

G S P G G N R Y P P Q G G G G W G Q P H G G G W G Q P H G G G W G Q P H G G G W G Q P H G G G W G Q P - 8 7

GGGGWGWGGSHSQWNKPSKPPKTNMKHVAGAAAAGAVVGG  
LGGY-131

MLGSAMSSPLIHFGNDYEDRYYTRENMYRYPNQVYYR PVD  
RYSQNN-177

【0062】

1文字アミノ酸コード：

A-アラニン、C-システイン、D-アスパラギン酸、E-グルタミン酸、F-フェニルアラニン、G-グリシン、H-ヒスチジン、I-イソロイシン、K-リジン、L-ロイシン、M-メチオニン、N-アスパラギン、P-プロリン、Q-グルタミン、R-アルギニン、S-セリン、T-トレオニン、V-バリン、W-トリプトファン、Y-チロシン。

10

【0063】

この29アミノ酸ペプチドは、ELISA技術について抗-PrP抗体を十分に惹起するために使用される。この配列は、Proteus Internathional UKによって、分子技術を使用して、TSE検出に首尾良く使用され得る抗-PrP抗体の産生に潜在的に有用なペプチドであるとして、同定された。強調された配列は、ウサギ抗-PrP抗体を惹起するために使用される。ペプチド(ポリペプチド、タンパク質)は、活性化オボアルブミン、BSA、またはKLHに結合され、そしてFreund完全アジュバント中で筋肉内または皮下に注射される。ブースター注射は皮下であり、およびFreund不完全アジュバントが使用される。ウサギは、免疫化後30および50日目で、または十分な力価が活性されるまで、採血される。次いで、モノクローナル抗体が必要である場合に産生され得る。

20

【0064】

2. Enfer緩衝液1~3が、Enfer Scientificによって製造および供給される。

【0065】

ホモジナイズ化緩衝液1：16%メタノール/エタノール

15%ドデシル硫酸ナトリウム

0.1%ウシ血清アルブミン

【0066】

緩衝液は、必要とされる容量に作製され、0.1M TRIS/HCL緩衝液、8.0 + 0.1最終pH中で攪拌される。この緩衝液は、16~25にて保存され、1年間の使用期限をとまなう。

30

【0067】

特異的緩衝液2：プロテイナーゼK

【0068】

この緩衝液は、0.1M TRIS/HCL緩衝液、8+0.1の最終pH中で必要とされる濃度(0.1~10mg/ml)に作製される。この緩衝液は、-20にて保存され、1年間の使用期限をとまなう。

【0069】

アッセイ誘発緩衝液：3Mグアニジン、0.1M水酸化ナトリウムまたは6M尿素、0.1M水酸化ナトリウム

40

【0070】

この緩衝液は、ROH<sub>2</sub>O(逆浸透蒸留水)中で必要とされる濃度に作製され、そしてpHを確認する前に室温に達せられ、このpHは好ましくは11よりも大きいべきである。この緩衝液は、16~25にて保存され、1年間の使用期限を伴なう。

【0071】

3. 洗浄緩衝液1~2は、Enfer Scientificによって製造および供給される。

【0072】

洗浄緩衝液1：5%塩化ナトリウム

50

この緩衝液は、ROH<sub>2</sub>O中で必要とされる容量に作製される。pHは無関係である。この緩衝液は室温にて保存され、1年間の使用期限を伴なう。

【0073】

洗浄緩衝液 2 : 0.1 Mリン酸緩衝化生理食塩水、0.5% Tween 20

この緩衝液は、ROH<sub>2</sub>O中で必要とされる容量に作製され、7.6 + 0.1のpHを伴なう。この緩衝液は室温にて保存され、1年間の使用期限を伴なう。

【0074】

4. 化学発光試薬は、Johnson and Johnson、Clinical Diagnostics、UKによって供給され、そして結果は、Medical Supply Company、Dublin、Irelandから入手可能である Labsystems Chemiluminometerを使用して、読み取られる。 10

【0075】

抗体濃度の測定 - Gridアッセイ

ネガティブおよびポジティブコントロールは、ウェルの第2のセット毎に2連でおかれる。一連の抗体希釈物が、表7において示されるように1/500 ~ 1/2000まで作製され、そして試験が実行される。一次抗体添加段階にて、一次抗体の希釈物がネガティブおよびポジティブなサンプルウェル上におかれる。試験の終了時に、最も高いポジティブなコントロール値を与える抗体濃度が、高いネガティブコントロール結果を与えることを伴わずに、使用される。

【0076】

20

【表7】

一次抗体濃度		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/500	A	Neg											
	B	Pos											
1/1000	C	Neg											
	D	Pos											
1/1500	E	Neg											
	F	Pos											
1/2000	G	Neg											
	H	Pos											

30

【実施例2】

【0077】

抗体至適化アッセイが、以下のように行われる：獣医学研究所によって裏づけされる、ポジティブおよびネガティブな組織が使用される。これは、アッセイにおいてコントロールに使用される同じ材料である。 40

【0078】

組織は、ホモジナイズ緩衝液中に1/15希釈され、そして2分間、ホモジナイズされる。次いで、200 μlのネガティブなホモジネートは、A、C、E、およびG列に置かれる。200 μlのポジティブなホモジネートは、B、D、F、およびHに置かれる。プレートは10分間、400 rpmにて遠心分離される。

【0079】

20 μlの特異的緩衝液が、アッセイプレートに添加され、そして100 μlの各サンプルが対応するウェルに移される。

【0080】

次いでプレートは密封され、そして1時間、37にてインキュベートされる。 50

## 【0081】

プレートは、洗浄緩衝液1で洗浄され、200 $\mu$ lの一次緩衝液が添加される。これは15分間、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートされる。

## 【0082】

一連の抗体溶液は、洗浄緩衝液中で作製され、すなわち、1/500、1/1000、1/1500、および1/2000、抗体が、この範囲よりも高い力価または低い力価を有する場合、より高い、または拡張される範囲が、最初のアッセイ後に試行され得る。

## 【0083】

誘発緩衝液中でのインキュベーション後、プレートは洗浄液2で洗浄される。次いで、150 $\mu$ lの各抗体濃度が適切なウェルに添加され、そして40分間、37 $^{\circ}$ Cにてインキュベートされる。プレートは洗浄緩衝液2で洗浄され、そして150 $\mu$ lの二次抗体が全てのウェルに、30分間37 $^{\circ}$ Cにて添加され、次いでプレートは再度洗浄緩衝液2で洗浄され、そして150 $\mu$ lの化学発光基質が全てのウェルに添加される。37 $^{\circ}$ Cでの3分間のインキュベーション後、ウェルは化学発光測定器で読み取られる。

10

## 【0084】

最も良好な結果、すなわち低いネガティブな、好ましくは1.0未満であるが、良好なポジティブな結果、例えば500を与える抗体濃度が、選択される濃度である。

## 【0085】

以前に言及されるように、より高い希釈範囲が、抗体が使用される前に選択され得るが、このアッセイは抗体が使用され得ようがされ得なようが、良好な考えを与える。

20

## 【0086】

## 【表8】

1/500	{	N	4.235	3.897	3.554	4.116	2.698	3.487	4.679	3.229	4.569	3.487	3.778	4.946
	{	P	724.5	759.4	811.6	792.4	772.5	851.3	764.2	844.2	793.4	882.4	816.7	799.2
1/100	{	N	2.987	2.897	2.378	2.556	2.446	2.791	3.016	1.945	2.069	2.449	2.164	2.310
	{	P	563.4	547.2	538.0	587.1	564.2	603.7	589.4	556.1	567.3	613.7	508.6	543.7
1/500	{	N	1.579	0.945	1.344	1.067	1.337	1.298	1.049	0.879	1.346	1.222	1.340	1.206
	{	P	457.6	476.5	503.0	402.1	449.5	432.8	463.7	433.0	492.7	409.7	430.9	443.1
1/2000	{	N	0.861	0.936	0.727	0.914	0.866	0.569	0.612	0.493	0.721	0.642	0.463	0.762
	{	P	366.9	322.3	390.1	377.5	376.1	349.4	346.7	334.8	329.4	367.4	329.4	337.9

10

20

30

40

## 【実施例3】

## 【0087】

異なる組織、すなわち、中枢神経系(CNS)、リンパ組織、および血液において、ならびに異なる種、ヒツジおよびウシにおいてTSEを検出する手段としてのEnfer TSEのアッセイの適切性に対する実験データ。

## 【0088】

2001年における本発明のTSEアッセイを使用する日常的な試験の結果。

## 【0089】

**ウシCNS組織**

試験された全サンプル： 664942  
 検出されたポジティブの数： 134  
 免疫組織化学によって確認されたポジティブの数： 134

## 【0090】

**ヒツジCNS組織**

試験された全サンプル： 16467  
 検出されたポジティブの数： 60  
 免疫組織化学によって確認されたポジティブの数： 60

10

## 【0091】

**ヒツジリンパ組織**

試験された全サンプル： 6974  
 検出されたポジティブの数： 10  
 免疫組織化学によって確認された： 9\*

20

## 【0092】

1つのリンパ組織サンプルを確認することが可能ではなかった。この組織は14週齢の仔ヒツジであり、および感染の非常に初期の段階にあった。これは確認の困難性を説明し得る。

## 【0093】

**ヒツジ血液組織 (1998)**

試験された総数： 3  
 ポジティブの数： 3

30

## 【0094】

これは、臨床的なスクレイピー症例に由来する新鮮な血液であった。全ての症例は、弱くポジティブであることが見出され、そして追跡分析を行うための確認方法は何ら存在しない。

## 【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/057789 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68
- (21) International Application Number: PCT/IE02/00006
- (22) International Filing Date: 18 January 2002 (18.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
S20010042 19 January 2001 (19.01.2001) IE
- (71) Applicant (for all designated States except US): ENFER TECHNOLOGY LIMITED [IE/IE]; Block A, Earlsfort Centre, Earlsfort Terrace, Dublin 2 (IE).
- (72) Inventor; and  
(75) Inventor/Applicant (for US only): O'CONNOR, Michael [IE/IE]; 11 Chestnut Road, Mount Merrion, County Dublin (IE).
- (74) Agents: GATES, Marie, Christina, Esther et al.; Tomkins & Co., 5 Dartmouth Road, Dublin 6 (IE).
- (81) Designated States (national): AU, AG, AI, AM, AT (utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), DE (utility model), DK (utility model), DM, DZ, EC, EE (utility model), ES, FI (utility model), GB, GD, GL, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KI, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BI, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/057789 A2

(54) Title: TEST FOR TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHIES

(57) Abstract: A method of detecting transmissible spongiform encephalopathies is described which involves (a) treating a sample of tissue, blood or a blood derivative from a test subject with alcohol and a detergent, (b) adding an agent which degrades normal prion protein (c) adding an agent which denatures abnormal prion protein, (d) adding a prion-specific antibody and (e) detecting binding of the antibody to the sample. Also described is a method of fixing abnormal prion protein to a substrate comprising (a) treating the protein or a sample suspected to contain the abnormal prion protein with alcohol and an anionic detergent and (b) adding a protease, in the presence of the substrate.

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

1

**Test for Transmissible Spongiform Encephalopathies**

The present invention relates to a method of detecting Transmissible Spongiform Encephalopathies, and in particular to a test which can be conducted on  
5 living or dead animals or humans to identify TSEs.

**Background to the invention**

Spongiform Encephalopathies are a group of degenerative neurological diseases.  
10 There are a number of examples of Spongiform Encephalopathies including BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy), Scrapie, Creutzfeldt-Jacob Disease (CJD) Gerstmann-Straussler--Scheinker Syndrome, Kuru, Transmissible Mink Encephalopathy, Chronic Wasting Disease of Mule Deer, Feline Spongiform Encephalopathies and other Spongiform Encephalopathies found in animals such as elk,  
15 naya, greater kudu, gemsbok and tigers. It has also been reported that BSE can be transmitted under laboratory conditions to mice and pigs. This crossing of species barriers by the infective agent has led to increased concern that transfer to humans could occur.

20 Bovine spongiform Encephalopathy (BSE) is a degenerative brain disorder of cattle which is popularly known as "mad cow disease". It has a slow incubation period, up to four or five years with symptoms of progressive degeneration of the mental state in cows include loss of co-ordination and staggering gait, lack of interest in their surroundings, disinterest in feed and water, or unpredictable behaviour, including  
25 aggressiveness. Affected cattle show symptoms when they are three to ten years old.

First identified in Great Britain in November 1986, over 100,000 cases have since been recorded there. Post mortems of affected cattle reveal a characteristic pattern of vacuolation in the brain tissue due to destruction of neural cells and the deposition of  
30 unusual protein fibres, that give the brain a spongy (spongiform) texture. Similar spongiform diseases have been recognised in humans (for example, Creutzfeldt-Jakob disease or (CJD) for over a century and in sheep (scrapie) for over 200 years. The agent

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

2

thought to be responsible for Transmissible Spongiform Encephalopathies is an infective protein known as a prion. The prion is an infective particle comprising protein only and no nucleic acid, the presence of nucleic acid being required in the case of a conventional virus. In Scrapie in particular one protein known as prion protein or PrP<sup>Sc</sup> has been found to co-purify with infectivity and can produce a Scrapie-like condition in brain cell cultures from other animals, such as hamsters under laboratory conditions. PrP<sup>Sc</sup> is the only known component of the characteristic protein fibres deposited in the brain tissue of Scrapie-infected sheep. This protein, the PrP<sup>Sc</sup> appears to undergo a structural modification, whereas the term PrP<sup>C</sup> is used in respect of the normal cellular counterpart of PrP<sup>Sc</sup>. The natural function of PrP<sup>C</sup> is not known, but it appears likely that it has an essential structure or functional role in the organism.

Recycled animal tissue, which had been routinely fed to British dairy cows as a protein supplement has been identified as the source of the infection. It is believed that BSE was originally spread from sheep's brains infected with scrapie and that its spread was accidentally accelerated by the ingestion of brain tissue taken from cows that had become infected with BSE. Therefore, the British Government introduced compulsory destruction of suspect animals and their carcasses beginning in 1988. The feeding of animal tissue to cows was banned in Britain in July 1988.

Since the initial report of the disease, consumers have feared that it might be transferable to humans through milk or beef products, particularly since Kuru, a related disease is known to be spread by ritualistic cannibalism among New Guinea tribesmen. In late 1990, consumer concern over the transmission of BSE to humans triggered a collapse in the beef market. A similar scare struck Germany in mid-1994.

In 1996 ten cases of a newly described type of fatal CJD (Variant CJD) were identified. The victims had distinct brain tissue symptoms, were all under the age of 42, and had no hereditary record of the disease. It has been suggested that the victims may have contacted the disease through contact with BSE-infected cattle before the eradication of suspected animals had taken effect. The identification of Variant CJD led

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

3

to a dramatic drop in beef consumption in Britain, and the banning of British and in some instances Irish beef imports in various countries worldwide.

Therefore, for both veterinary and economic reasons, there is an urgent need to provide a method for diagnosis and a diagnostic kit to detect infection with BSE, Scrapie, Variant CJD and other related spongiform Encephalopathies, in livestock, animal carcasses and meat generally, as well as in pharmaceuticals and humans.

#### **Object of the invention**

10

It is thus an object of the present invention to provide a method of testing animals, pharmaceuticals and humans for the infective agent responsible for TSE. It is also an object to provide a multitissue test system which can be used on both blood or blood derived products and solid tissue. It is a further object that the method be rapid, with the result being available in a matter of hours, and that it should be cheap, reliable and user friendly.

Until this time there has been no method of detecting TSE which could be conducted on blood or blood derivatives. Up to now the only method of determining whether animals were suffering from TSE or human beings were suffering from a related disease was to carry out a pathological post mortem examination of brain tissue. Thus a test which could be tested on blood has the enormous advantage that it can be conducted on living animals or human beings. This gives rise to the possibility that infected animals could be removed from the population and slaughtered, in an attempt to prevent the spread of infection to other animals in the population. It would also mean that infected human beings could be identified, with the possibility that medical treatment could be administered and a possible cure could be found for the disease. The test would also prevent the entry of infected meat into the human food chain, thus reducing the possibility of humans contracting variant CJD or other related diseases which may be transmitted by eating infected meat. It would also restore consumer confidence in meat or meat-derived products, which would be advantageous to both the farming community and the meat industry in general.

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

4

It has now surprisingly been found that a test for TSEs can be carried out on blood or blood derived products. The test has the advantage that it can also be carried out on solid tissue samples.

5

#### Summary of the Invention

According to the present invention there is provided a method of detecting TSE comprising (a) treating a sample of tissue, blood or a blood derivative from a test subject with alcohol and a detergent, (b) adding an agent which degrades normal prion protein (c) adding an agent which denatures abnormal prion protein, (d) adding a prion - specific antibody and (e) detecting binding of the antibody to the sample.

The invention also provides a method of fixing abnormal prion protein to a substrate comprising (a) treating the protein or a sample suspected to contain the abnormal prion protein with alcohol and an anionic detergent and (b) adding a protease, in the presence of the substrate.

Step (a) may further comprise the addition of a protein, preferably a high molecular weight protein such as bovine serum albumin, ovalbumin, normal serum of animal origin, an albumin substitute such as Prionex (trade mark), derivatives of such or the like. The protein may be formulated in a buffer containing up to 5%, preferably 0.05 to 0.4% protein.

Preferably the alcohol used in step (a) is a C<sub>1</sub> to C<sub>24</sub> alcohol such as methanol, ethanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, nonanol, decanol, undecanol, dodecanol, tridecanol, tetradecanol, pentadecanol, cetyl alcohol, heptadecanol, stearyl alcohol, nonadecanol, eicosanol, docasanol, dodecyl alcohol, lauryl alcohol, octadecanol, and derivatives of each, including primary, secondary and tertiary derivatives, or the like. More preferably the alcohol is a C<sub>1</sub> to C<sub>5</sub> alcohol, most preferably methanol/ethanol. The alcohol may be formulated in a buffer containing up to 30% (by weight), preferably 10 to 20% more preferably 8 to 12% alcohol.

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

5

Preferably the detergent of step (a) is selected from sodium dodecyl sulphate, sarcosyl, lithium dodecyl sulphate, cholic acid, deoxycholic acid, Triton X-100, octanoic acid, Brij (trade mark) 35 solution, N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromide, CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propane-sulphonate), CHAPSO (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-hydroxypropane-sulphonate), Digitonin, nonanoyl-N-methylglucamide, n-Octyl-B-D-glucopyranoside, alkyl sodium sulphate, dioctyl sodium sulfosuccinate, sodium oleate, sodium lauryl sulphate, 1,2,3-Octanetriol, 3-Diethylamino-1 propyne, Chondroitinase ABC (available from Fluka), sodium Ionophore 1 (available from Fluka), and derivatives of each or the like, most preferably sodium dodecyl sulphate. The detergent may be formulated in a buffer containing 5 to 30%, more preferably 10 to 20% detergent. The detergent may be an anionic detergent.

In step (b) the agent which degrades normal prion protein may suitably be a protease, suitably a broad spectrum protease. Preferably the protease is selected from proteinase K, subtilisin Carlsberg, pepsin and derivatives of each or the like. The protease may be formulated in a buffer containing up to 10mg/ml, preferably 0.05mg/ml to 4mg/ml, more preferably 0.2mg/ml to 0.6mg/ml protein.

Preferably the agent which denatures abnormal prion protein in step (c) is a denaturing salt solution. Suitably the agent is selected from guanidine, urea, a standard denaturing solution e.g. Merck denaturing solution (commercially available from Merck) and derivatives of each or the like. In a particularly preferred embodiment the denaturing agent may further include up to 0.5M sodium hydroxide. The denaturing salt may be formulated in a buffer containing 0.1 to 10M, preferably 2 to 8M denaturing salt.

The buffer of step (a) (homogenising buffer) may be made up to have a final pH of 5.0 to 11.0, preferably pH 7.0 to 9.0, more preferably pH 7.5 to 8.5. The buffer of step (b) (differential buffer) may be made up to a final pH of 2.0 to 11.0, preferably pH 2.0 to 8.5, more preferably 7.5 to 8.5. The buffer of step (c) (assay priming buffer) should have a pH of 1 to 14, more preferably pH 9 to 12, most preferably at least 11.

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

6

Preferably, following step (b) the reaction mixture is washed with distilled water or a first wash buffer comprising up to 10%, preferably 4 to 6% buffered solution.

5 The assay priming buffer is allowed to incubate with the reaction mixture for about 5 to 30 minutes, preferably 10 to 20 minutes. Suitably, the mixture is then washed with a second wash buffer having a final pH of 5.0 to 11.0, preferably pH 7.0 to 8.0.

10 The first wash buffer may comprise sodium chloride, calcium chloride, zinc chloride or the like. The second wash buffer may comprise phosphate buffered saline or the like with the optional addition of 0 to 5% Tween 20 or the like.

Preferably the blood or tissue sample is dispensed onto a support, suitably a microtitre tray, and may then preferably be subjected to an optional centrifuge step which serves to clarify or "clean up" the samples for further processing.

15 The prion specific antibody is raised to a prion sequence which is to the 3' side of amino-acid number 60 of the prion sequence.

The prion specific antibody is suitably directed against the prion peptide:-

20

## PRION SEQUENCE N-TERM

MVKS~~H~~IGSWILVLFV~~V~~AMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQ-44  
 GSPGGNRYPPQGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQP-87  
GGGGWGQGGSHSQWNKPSKPPKTNMKHVAGAAAAGAVVGGGLGGY- 131

25 MLGSAMSSPLIHFGNDYEDRYTRENMYRYPNQVYYRPVDRYSNQNN-177  
 wherein the single letter amino acid code is as defined herein, as well as derivative and fragments of the sequences, including those that may include D-isomer amino acids as well be understood by those skilled in the art, modification of this sequence by substitution, deletion or insertion of amino acids could result in a peptide with the same  
 30 activity.

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

7

The blood sample may either be a whole blood sample, or it may be a blood derived sample such as a serum sample or a buffycoat preparation which includes white blood cells and leucocytes. If the test is used on a solid tissue sample a sample of about 0.3g to 1.5g is used.

5

Suitably the blood or tissue sample is homogenised. If the blood sample is gelatinous an enzyme degradation step may be included. The enzyme degradation step may include the addition of DNase, Rnase, a protease or a lipase.

10

The prion specific antibody may be raised to a variety of species - specific prion sequences in any species. The antibody may be for example raised in rabbits, and the immunoassay may involve the use of a secondary antibody, suitably a goat (species) anti-rabbit antibody conjugated with horseradish peroxidase.

15

The detection method is suitably an enhanced chemiluminescence assay, although colourimetric detection, fluorimetric detection or radioimmunoassay detection could also be used.

20

In a particularly preferred embodiment there is provided a test for Transmissible Spongiform Encephalopathies comprising obtaining a sample of blood or a blood derivative or tissue from a test subject, reacting the tissue, blood or blood derivative sample with a prion specific antibody and detecting the binding of the antibody to the sample by standard immunoassay, wherein the tissue, blood or blood derivative sample is mixed prior to addition of the antibody with a first buffer comprising 0 to 30% of C<sub>1</sub> to C<sub>5</sub> alcohol, 5 to 30% sodium dodecyl sulphate, or 5 to 30% sodium dodecyl sulphate and 0 to 5% sarcosyl, and 0 to 5% bovine serum albumin made up to volume in about 0.1 M TRIS/HCL or phosphate buffer, the buffer having a final pH of 7.0 to 9.0.

25

30

Preferably the blood or tissue sample is dispensed onto a support, more preferably an inert plastic support, suitably a microtitre tray, and a second buffer comprising 1 to 10 mg/ml of a broad spectrum protease enzyme in about 0.1 M TRIS/HCL or phosphate buffer with a final pH of 7.5 to 8.5, is added. The buffer is

WO 02/057789

PCT/TE02/00006

8

suitably diluted 1 in 5 to give a working strength of 0.2 mg/ml to 2 mg/ml. The sample is then incubated, preferably for about 10 to 180 mins at about 37 - 70°C, more preferably at 60°C.

5 Following incubation, the support suitably is washed with a volume of a first wash buffer comprising 0 to 10% salt solution. Preferably, a third buffer comprising either 0.5 to 3M guanidine or 2 to 8M urea, and 0.1 to 0.2M sodium hydroxide made up in reverse osmosis distilled water with a pH of at least 11 at room temperature, is added to the support. Suitably, the support and third buffer are allowed to incubate for about  
10 15 minutes and are washed with a wash buffer comprising 0.1M phosphate buffered saline and 0.5% Tween 20™.

The sample preparation is then complete and ready for immunoassay.

15 The invention also provides a test for Transmissible Spongiform Encephalopathies comprising obtaining a sample of blood or blood derivative or tissue from a test subject, reacting the tissue, blood or blood derivative sample with a prion specific antibody and detecting the binding of the antibody to the sample by standard immunoassay, wherein the blood or tissue sample is dispensed onto an inert support and  
20 incubated with a buffer comprising up to 10 mg/ml, preferably 0.05mg/ml to 4mg/ml, more preferably 0.2mg/ml to 0.6mg/ml, of a broad spectrum protease enzyme in a buffer with a final pH of 2.0 to 11.0, preferably pH 2.0 to 8.5, more preferably 7.5 to 8.5, prior to reaction with the antibody. Preferably the inert support is centrifuged following dispense of the sample and before addition of the protease(differential buffer). The  
25 protease may be formulated in a buffer comprising 0.1M TRIS or phosphate.

In a further aspect the invention provides a test for Transmissible Spongiform Encephalopathies comprising obtaining a sample of blood or a blood derivative or tissue from a test subject, reacting the tissue, blood or blood derivative sample with a prion  
30 specific antibody and detecting the binding of the antibody to the sample by standard immunoassay, wherein the sample is incubated with a buffer comprising 0.1 to 10M denaturing solution, preferably 3 to 6M, more preferably 0.5 to 3M Guanidine (optimal

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

9

range 2 to 4M) or 2 to 8M urea (optimal range 4 to 6M), and up to 0.5M, preferably 0.1 to 0.2M sodium hydroxide made up in reverse osmosis distilled water, with a pH of at least 11 at room temperature, prior to reaction with the antibody.

- 5 The invention also provides a buffer selected from:
1. 0 to 30% of C<sub>1</sub> to C<sub>24</sub> alcohol (optimal range 10 to 20, preferably 8 to 12%) 5 to 30% detergent (optimal range 10 to 20%), and a 0 to 20% protein (optimal range 0.05 to 0.4%) made up to volume in a buffer having a final pH of 5.0 to 11.0 (optimal range 7.5 to 8.5).
  - 10 2. A buffer comprising of 0.05mg/ml to 4mg/ml (optimal range 0.2mg/ml to 0.6mg/ml) of a protease enzyme in a buffer having a final pH of 2.0 to 11.0 (optimal range 2.0 to 8.5).
  3. A buffer comprising 0.1 to 10M denaturing solution (optimal range 2 to 8M).
- 15 All buffers are produced and supplied by Enfer Scientific Ltd.

**Homogenising Buffer:**

Ingredients	Working Range	Optimal Concentration
Methanol or Ethanol	0 to 30%	16%
Sodium Dodecyl Sulphate	5 to 30%	15%
Bovine Serum Albumin	0 to 5%	0.1%

This buffer is made up to the required volume, stirring in 0.1M TRIS/HCL Buffer, final  
 20 pH of 8.0 ± 1.

**Differential Buffer:**

Ingredients	Working Range	Optimal Concentration
Proteinase K	0.05 to 4mg/ml	0.4mg/ml

This buffer is made up to the required concentration in 0.1M TRIS/HCL Buffer, final  
 25 pH of 8.0 ± 1.

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

10

**Assay Priming Buffer:**

Ingredients	Working Range	Optimal Concentration
Guanidine	0.5 to 6M	3M
Sodium Hydroxide	0 to 0.5M	0.15M

**OR**

Ingredients	Working Range	Optimal Concentration
Urea	2 to 8M	6M
Sodium Hydroxide	0 to 0.5M	0.15M

5

This buffer is made up to the required concentration in reverse osmosis distilled water and allowed to reach room temperature before checking the pH, which should be greater than 11.

10 **Wash Buffer 1:**

Ingredients	Working Range	Optimal Concentration
Sodium Chloride	0 to 10%	5%

This buffer is made up to the required volume in reverse osmosis distilled water, pH irrelevant.

15 **Wash Buffer 2:**

Ingredients	Working Range	Optimal Concentration
Phosphate Buffered Saline	0 to 5M	0.1M
Tween 20	0 to 5%	0.5%

This buffer is made up to the required volume in reverse osmosis distilled water, with a pH of  $7.6 \pm 1$ .

20 The invention further provides a buffer selected from:

WO 02/057789

PCT/TE02/00006

11

1. 0 to 20% of C<sub>2</sub> to C<sub>5</sub> alcohol, 15 to 30% sodium dodecyl sulphate, or 5 to 30% sodium dodecyl sulphate and 0 to 5% Sarcosyl, 0 to 0.5% bovine serum albumin and made up to volume in about 0.1M TRIS or phosphate buffer, the buffer having a final pH of 7.0 to 9.0;
- 5 2. A buffer comprising 1 to 10 mg/ml of a broad spectrum protease enzyme in about 0.1M TRIS or phosphate buffer with a final pH of 7.5 to 8.5;
3. A buffer comprising either 0.5 to 3M Guanidine or 2 to 8M urea, and 0.1 to 0.2M sodium hydroxide made up in reverse osmosis distilled water, with a pH of at least 11 at room temperature.

10

The invention will now be described in greater detail with reference to the following example.

#### EXAMPLE

15

The requirements for the TSE immunoassay are as follows:

- a) A sample of solid tissue, blood or blood derived preparation.
  - b) A series of preparative sample treatments.
  - 20 c) A prion specific antibody.
  - d) Sensitive method of detection.
- a) A sample of blood is taken using either an anti-coagulant coated tube or a non-coated blood tube. Two options are available for testing:
- 25 i) Whole blood sample.
  - ii) A blood derived sample - serum sample or a buffycoat (white blood cells, leucocytes etc.) preparation.
- A sample of solid tissue is taken from an animal or human by a suitable method e.g. biopsy or dissection.
- 30 b) On reaching the laboratory the sample is identified using barcodes. The barcode assigned to each sample incorporates information on the place of origin of the sample

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

12

(slaughter plant, clinic, hospital), the date the sample is taken and a traceable identification sample number. An amount of each sample, is removed, weighed and placed into a sample bottle/tube/stomacher bag for homogenisation (stomaching, sonication or vortexing). If the sample is particularly gelatinous, an enzymatic degradation step can be included - addition of DNase, Rnase, protease or lipase used in accordance with supplier instructions. This sample bottle or bag containing the homogenised original sample will be assigned an identical barcode to the original sample. This allows full traceability throughout the system. A fixed volume to weight ratio (1:1 to 1:25) of Homogenising Buffer, supplied by Enfer Products, Castleblake, Rosegreen, Cashel, Co. Tipperary, is added to the sample bottle and the sample homogenised by stomaching, vortexing or sonication. If the sample is particularly gelatinous, an enzymatic degradation step can be included -addition of DNase, Rnase, protease or lipase used in accordance with supplier instructions. The sample is then dispensed (200 $\mu$ l) in duplicate onto a polypropylene 96 well microtitre plate. Blank, Negative and Positive controls supplied by Veterinary Research Laboratories, Abbotstown, Dublin are also added to this plate. This plate is centrifuged in a plate centrifuging rotor at 4000 rpm for 10 minutes. 20ul of Differential Buffer, supplied by Enfer Scientific, Castleblake, Rosegreen, Cashel, Co. Tipperary, is added preferably to a plastic, totally inert microtitre plate (e.g. DYNEX Microlite 1 plate made from immulon 1 plastic). The plate has to be inert for optimal completion of the assay. Use of charged plates decreases the results. 100 $\mu$ l of each of the centrifuged samples and controls is then transferred from the polypropylene centrifuged plate to the inert assay microlite plate containing the volume of Differential Buffer and a plate coverslip placed over the wells. The plate is then incubated at 37°C for 60 minutes, the coverslip removed and the plate washed in Wash Buffer 1, supplied by Enfer Scientific, Castleblake, Rosegreen, Cashel, Co. Tipperary. Assay priming Buffer, supplied by Enfer Scientific, Castleblake, Rosegreen, Cashel Co. Tipperary, is added to each well at a volume of 200 $\mu$ l. The plate is covered with a coverslip and incubated at 37°C for 15 minutes. The coverslip is removed on completion of the incubation and washed with Wash Buffer 2, supplied by Enfer Scientific, Castleblake, Rosegreen, Cashel Co. Tipperary, is then added to the samples on the plate. This step completes the sample preparation procedure.

WO 02/057789

PCT/TE02/00006

13

c) The samples are now ready for immunoassay. This requires a prion specific antibody. An example for such an antibody is a rabbit anti - PrP, raised by injecting rabbits with ovalbumin conjugated synthetic prion peptides, a peptide which is licenced to Enfer Scientific by Proteus International UK. This peptide was identified by Proteus International UK using molecular modelling techniques followed by Western Blot and ELISA analysis. The peptides are synthesised in bulk using solid-phase peptide synthesis. Use of other anti-PrP antibodies raised to a variety of species - specific prion sequences in any species, will also yield satisfactory results in this assay. The peptide described herein is only one example of an antibody that has been successful in the assay. Both polyclonal and monoclonal antibodies can be used for assay. A fixed volume (150 $\mu$ l) of this specific antibody at optimal working strength dilution in Wash Buffer 2 is added to the microtitre plate, incubated at 37°C for 40 minutes and washed using Wash Buffer 2. A fixed volume (150 $\mu$ l) of species-anti-rabbit(species)-HRP supplied by DAKO, USA at optimal working strength dilution in Wash Buffer 2 is added to the plate, incubated at 37°C for 30 minutes and washed using Wash Buffer 2. Detection of results is now possible.

d) Detection of results is by means of Enhanced Chemiluminescence. A fixed volume of a chemiluminescent reagent- Amerlite reagent (150 $\mu$ l) supplied by Johnson & Johnson, UK, is added to the microtitre plate and incubated at 37°C for 3 minutes. The light signal is read using a Labsystems Chemiluminometer, the results assigned to the corresponding barcode and a results report printed.

#### DETAILED PREPARATIVE PROTOCOL

25

##### 1. HOMOGENISATION

1.1 Blood or blood derived or tissue sample is placed into a sample bottle/tube/bag.

1.2 1 to 25, preferably 10 to 15 times the sample weight of Homogenising Buffer is added to the sample.

30 1.3 This mixture is homogenised (stomacher, sonicator, vortex) for 2 minutes or until the sample is totally homogenised.

1.4 Enzymatic degradation option may be applied here at the discretion of the operator.

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

14

1.5 The resultant homogenate may be filtered, if particulate matter remains in the sample.

## 2. PLATING

- 5 2.1 A V-96-well microtitre polypropylene plate is used for centrifugation of 200 $\mu$ l of each sample.
- 2.2 200 $\mu$ l of blank control, onto the plate, positions A1,2 of the centrifuge plate.
- 2.3 200 $\mu$ l of negative control (known negative BSE homogenate), supplied by the Veterinary Research Laboratories, Abbotstown, Castleknock, Dublin, Ireland is
- 10 dispensed - 4 replicates- onto the plate, positions B1,2 and C1,2.
- 2.5 200 $\mu$ l of positive control, (known positive BSE homogenate), supplied by the Veterinary Research Laboratories, Abbotstown, Castleknock, Dublin, Ireland is dispensed - 4 replicates- onto the plate, positions D1,2 and E1,2.
- 2.6 200 $\mu$ l of each (filtered, enzymatically treated) homogenate is dispensed in
- 15 duplicate onto the plate, into the remaining positions.
- 2.7 The plate is centrifuged at 4000rpm for 10 minutes.
- 2.8 20 $\mu$ l of Differential Buffer is added to each well of an inert assay microtitre plate e.g. a DYNEX microlite 1 plate.
- 2.9 100 $\mu$ l of each centrifuged sample and control is removed from the centrifuge
- 20 plate and dispensed onto the same position on the inert assay microlite plate, bringing the well volume to 120 $\mu$ l.
- 2.10 The plate is covered with a microtitre plate sealer and incubated at 37°C for 60 minutes.
- 2.11 The plate is then washed 4 times with Wash Buffer 1.
- 25 2.11 200 $\mu$ l of Assay priming Buffer supplied by Enfer Products, Castleblake, Rosegreen Cashel, Co. Tipperary, Ireland, are added to each well of the microtitre plate and the plate incubated for 15 minutes at 37°C.
- 2.12 The plate is washed 4 times with Wash Buffer 2.

## 30 3. IMMUNOASSAY

- 3.1 150 $\mu$ l of primary antibody, rabbit (species) anti-PrP, polyclonal/monoclonal antibody at optimal dilution is dispensed onto the plate.

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

15

- 3.2 The plate is incubated at 37°C for 40 minutes.
- 3.3 The plate is washed 4 times with Wash Buffer 2.
- 3.4 150µl of secondary antibody, species-anti-rabbit(species)-HRP at optimal dilution is dispensed onto the plate and the plate incubated at 37°C for 30 minutes. Optimal dilution is determined by a grid assay e.g. plotting varying concentrations of primary and secondary antibody to determine optimal light signal (see below).
- 3.5 The plate is washed 4 times with Wash Buffer 2.
4. DETECTION
- 4.1 150µl of an enhanced chemiluminescent reagent-Amerlite reagent, supplied by Johnson & Johnson Clinical Diagnostics, UK is added to the plate.
- 4.2 The plate is incubated at 37°C for 3 minutes.
- 4.3 The light signal is read using a Labsystems Chemiluminometer, supplied by Medical Supply Company, Dublin, Ireland, which reads the luminescence from each well of the plate by scanning the entire IR-Visible-W spectra and extrapolating results.
- 4.4 The light signals from the plate are transferred to a customised software package, designed by G.K.S. Software, Dublin Ireland.
- 4.5 Each light signal is assigned to a corresponding bar-code and a report printed.
- 4.6 Results are quoted in chemiluminescent light units - L.U.

20

## SOURCE OF REAGENTS

1. Prion Specific Antibodies - anti-PrP- are supplied by Enfer Scientific Ltd. and are polyclonal antibodies raised to the following synthetic prion peptide:

25 PRION SEQUENCE

N-TERM -

MVKSHIGSWILVLFVVAMWSDVGLCKKRPKPGGGWNTGGSRYPGQ- 44

GSPGGNRYPPQGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQPHGGGGWGQ- 87

GGGGWGQGGSHSQWNKPSKPKTNMKHVAGAAAAGAVVGGLGGY- 131

MLGSAMSSPLIHFGNDYEDRYTRENMYRYPNQVYYRFPVDRYSNQNN-177

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

16

Single Letter Amino Acid Code:

A -Alanine, C- Cysteine, D -AsparticAcid, E- GlutamicAcid, F- Phenylalanine, G-  
5 Glycine, H - Histidine, I - Isoleucine, K - Lysine, L - Leucine, M- Methionine,  
N-Asparagine, P - Proline, Q - Glutamine, R -Arginine, S- Serine, T- Threonine, V-  
Valine, W- Tryptophan, Y- Tyrosine.

This 29 amino acid peptide is used to satisfactorily raise anti-PrP antibodies for the  
10 ELISA technique. This sequence was identified by Proteus International UK, using  
molecular techniques, as being a potentially useful peptide for production of anti-PrP  
antibodies that could be used successfully for TSE detection. The highlighted sequence  
is used to raise rabbit anti-PrP antibodies. The peptide (polypeptide, protein) is  
conjugated to activated ovalbumin, BSA or KLH and injected intra-muscularly or  
15 sub-cutaneously in Freund's Complete Adjuvant. Booster injections are sub-cutaneous  
and Freund's Incomplete Adjuvant is used. The rabbits are bled at 30 and 50 days post  
immunisation, or until a satisfactory titre is reached. Monoclonal antibodies can then be  
produced if required.

20

2. Enfer Buffers 1-3 are produced and supplied by Enfer Scientific.

Homogenising Buffer 1: 16% Methanol/Ethanol  
15 % Sodium Dodecyl Sulphate  
25 0.1% Bovine Serum Albumin

The buffer is made up to the required volume, stirring in 0.1M TRIS/HCL Buffer, final  
pH of 8.0±0.1. This buffer is stored from 16-25°C with an expiry of 1 year.

30 Differential Buffer 2: Proteinase K



WO 02/057789

PCT/IE02/00006

18

Negative and positive controls are put in duplicate into every second set of wells. A series of antibody dilutions are made up 1/500 to 1/2000 as shown in Table 1 and the test is run. At the primary antibody addition stage the dilutions of primary antibody are put onto the negative and positive sample wells. At the end of the test the antibody concentration which gives the highest positive control value, without giving a high negative control result is used.

**Table 1**

Primary Antibody Conc.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1/500	A	Neg											
	B	Pos											
1/1000	C	Neg											
	D	Pos											
1/1500	E	Neg											
	F	Pos											
1/2000	G	Neg											
	H	Pos											

10

**Example 2**

The antibody optimisation assay is carried out as follows: positive and negative tissue, confirmed by the Veterinary Research Laboratory is used. This is the same material used for controls in the assay.

The tissue is diluted 1/15 in Homogenising buffer and homogenised for 2 minutes. 200ul of negative homogenate is then placed in rows A, C, E and G. 200ul of positive homogenate is placed in rows B, D, F and H. The plate is centrifuged for 10 mins at 400 rpm.

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

19

20ul of differential buffer is added to the assay plate and 100ul of each sample is transferred to corresponding wells.

The plate is then sealed and incubated for 1 hour at 37°C,

The plate is washed with wash buffer 1 and 200ul of primary buffer is added. This is  
5 incubated for 15 minutes at 37°C.

A series of antibody solutions are made up in wash buffer 2, i.e. 1/500, 1/1000, 1/1500 and 1/2000, if the antibody has a higher titre or lower titre than this range a higher or extended range can be tried after the initial assay.

10

Following incubation in priming buffer the plate is washed with wash buffer 2.

150ul of each antibody concentration is then added to the appropriate wells and incubated for 40 minutes at 37°C. The plate is washed with wash buffer 2 and 150ul of secondary antibody is added to all wells for 30 minutes at 37°C and then the plate is

15 washed again with wash buffer 2 and 150ul of chemiluminescence substrate is added to all wells. After a 3 minute incubation at 37°C the wells are read the chemiluminometer.

The antibody concentration which gives the best result i.e. low negative preferably <1.0, while giving a good positive result eg 500 is the concentration chosen.

20

As mentioned earlier a higher dilution range can be selected before the antibody is used, but this assay gives a good idea whether or not the antibody can be used.

WO 02/057789

20

PCT/IE02/00006

1/500	{	N	4.235	3.897	3.554	4.116	2.698	3.487	4.679	3.229	4.569	3.487	3.778	4.946
	{	P	724.5	759.4	811.6	792.4	772.5	851.3	764.2	844.2	793.4	882.4	816.7	799.2
1/100	{	N	2.987	2.897	2.378	2.556	2.446	2.791	3.016	1.945	2.069	2.449	2.164	2.310
	{	P	563.4	547.2	538.0	587.1	564.2	603.7	589.4	556.1	567.3	613.7	508.6	543.7
1/500	{	N	1.579	0.945	1.344	1.067	1.337	1.298	1.049	0.879	1.346	1.222	1.340	1.206
	{	P	457.6	476.5	503.0	402.1	449.5	432.8	463.7	433.0	492.7	409.7	430.9	443.1
1/2000	{	N	0.861	0.936	0.727	0.914	0.866	0.569	0.612	0.493	0.721	0.642	0.463	0.762
	{	P	366.9	322.3	390.1	377.5	376.1	349.4	346.7	334.8	329.4	367.4	329.4	337.9

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

21

**Example 3**

**Experimental Data** on the suitability of the Enfer TSE assay as a means of detecting TSE in different tissues, namely, central nervous tissues (CNS), lymph tissue and blood and in different species, ovine and bovine.

**Results of routine testing using the TSE Assay of the invention in 2001.****Bovine CNS tissue**

10 Total samples tested : 664942  
No. of positives detected : 134  
No. of positives confirmed : 134  
by immunohistochemistry

**Ovine CNS tissue**

15 Total samples tested : 16467  
No. of positives detected : 60  
No. of positives confirmed : 60  
by immunohistochemistry

20

**Ovine Lymph tissue**

Total samples tested : 6974  
No. of positives detected : 10  
Confirmed : 9\*  
25 by immunohistochemistry

It was not possible to confirm one lymph tissue sample. This tissue was from a 14 week old lamb and was in the very early stages of infection. This may explain the difficulties with confirmation.

30

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

22

**Ovine Blood tissue (1998)**

Total tested : 3

No. of positives : 3

5 This was fresh blood derived from clinical Scrapie cases. All cases were found to be weakly positive and no confirmatory method exists to do a follow up analysis.

10

15

20

25

30

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

23

**CLAIMS**

- 5 1. A method of detecting TSE comprising (a) treating a sample of tissue, blood or a blood derivative from a test subject with alcohol and a detergent, (b) adding an agent which degrades normal prion protein (c) adding an agent which denatures abnormal prion protein, (d) adding a prion - specific antibody and (e) detecting binding of the antibody to the sample.
- 10 2. A method of fixing abnormal prion protein to a substrate comprising (a) treating the protein or a sample suspected to contain the abnormal prion protein with alcohol and a detergent and (b) adding a protease, in the presence of the substrate.
- 15 3. A method as claimed in claim 1 or 2 wherein step (a) further comprises the addition of a protein.
4. A method as claimed in claim 3 wherein the protein is a high molecular weight protein, preferably selected bovine serum albumin, ovalbumin, normal serum of animal  
20 origin, an albumin substitute such as Prionex (trade mark), or derivatives of such.
5. A method as claimed in claim 3 or 4 wherein the protein is formulated in a buffer containing up to 5%, preferably 0.05 to 0.4% protein.
- 25 6. A method as claimed in any preceding claim wherein the alcohol used in step (a) is a C<sub>1</sub> to C<sub>24</sub> alcohol, preferably a C<sub>1</sub> to C<sub>5</sub> alcohol.
7. A method as claimed in claim 6 wherein the alcohol is selected from methanol, ethanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, nonanol, decanol,  
30 undecanol, dodecanol, tridecanol, , pentadecanol, cetyl alcohol, heptadecanol, stearyl alcohol, nonadecanol, eicosanol, docasanol, dodecyl alcohol, lauryl alcohol,

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

24

octadecanol, and derivatives of each, including primary, secondary and tertiary derivatives, preferably methanol or ethanol.

8. A method as claimed in any preceding claim wherein the alcohol is formulated in a buffer containing up to 30% (by weight), preferably 10 to 20 more preferably 8 to 5 12% alcohol.
9. A method as claimed in any preceding claim wherein the anionic detergent of step (a) is selected from sodium dodecyl sulphate, sarcosyl, lithium dodecyl sulphate, cholic acid, deoxycholic acid, Triton X-100, octanoic acid, Brij (trade mark) 35 solution, 10 N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromide, CHAPS, CHAPSO, Digitonin, nonanoyl-N-methylglucamide, n-Octyl-B-D-glucopyranoside, alkyl sodium sulphate, dioctyl sodium sulfosuccinate, sodium oleate, sodium lauryl sulphate, 1,2,3-Octanetriol, 3-Diethylamino-1 propyne, Chondroitinase ABC, sodium Ionophore 1, and derivatives of each, most preferably sodium dodecyl sulphate.
- 15 10. A method as claimed in any preceding claim wherein the detergent is formulated in a buffer containing 5 to 30%, more preferably 10 to 20% detergent.
11. A method as claimed in any preceding claim wherein in step (b) the agent which 20 degrades normal prion protein is a protease.
12. A method as claimed in claim 11 wherein the protease is a broad spectrum protease, preferably selected from proteinase K, subtilisin Carlsberg, pepsin and derivatives of each.
- 25 13. A method as claimed in wherein claim 11 wherein the protease is formulated in a buffer containing up to 10mg/ml, preferably 0.05mg/ml to 4mg/ml, more preferably 0.2mg/ml to 0.6mg/ml protein.
- 30 14. A method as claimed in any preceding claim wherein the agent which denatures abnormal prion protein in step (c) is a denaturing salt solution.

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

25

15. A method as claimed in claim 14 wherein the agent is selected from guanidine, urea, a standard denaturing solution e.g. Merck denaturing solution and derivatives of each.
- 5 16. A method as claimed in any preceding claim wherein the denaturing agent further includes up to 0.5M sodium hydroxide.
17. A method as claimed in any preceding claim wherein the denaturing salt is formulated in a buffer containing 0.1 to 10M, preferably 2 to 8M denaturing salt.
- 10 18. A method as claimed in any preceding claim wherein the buffer of step (a) (homogenising buffer) is made up to have a final pH of 5.0 to 11.0, preferably pH 7.0 to 9.0, more preferably pH 7.5 to 8.5.
- 15 19. A method as claimed in any preceding claim wherein the buffer of step (b) (differential buffer) is made up to a final pH of 2.0 to 11.0, preferably pH 2.0 to 8.5, more preferably 7.5 to 8.5.
- 20 20. A method as claimed in any preceding claim wherein the buffer of step (c) (assay priming buffer) has a pH of 1 to 14, preferably 9 to 12, more preferably at least 11.
21. A method as claimed in any preceding claim wherein following step (b) the reaction mixture is washed with a first wash buffer comprising up to 10%, preferably 4 to 6% buffered solution.
- 25 22. A method as claimed in any preceding claim wherein the assay priming buffer is allowed to incubate with the reaction mixture for about 5 to 30 minutes, preferably 10 to 20 minutes.
- 30 23. A method as claimed in any preceding claim wherein after treatment with the assay priming buffer the mixture is washed with a second wash buffer having a final pH of 5.0 to 11.0, preferably pH 7.0 to 8.0.

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

26

24. A method as claimed in claim 21 wherein the first wash buffer comprises sodium chloride, calcium chloride, zinc chloride.
25. A method as claimed in claim 23 wherein the second wash buffer comprises phosphate buffered saline with the optional addition of 0 to 5% Tween 20.
26. A method as claimed in any preceding claim wherein the blood or tissue sample is dispensed onto a support, suitably a microtitre tray.
27. A method as claimed in any preceding claim wherein the prion specific antibody is raised to a prion sequence which is to the 5' side of amino-acid number 60 of the prion sequence.
28. A test as claimed in any preceding claim comprising obtaining a sample of blood or a blood derivative or tissue from a test subject, reacting the tissue, blood or blood derivative sample with a prion specific antibody and detecting the binding of the antibody to the sample by standard immunoassay, wherein the tissue, blood or blood derivative sample is mixed prior to addition of the antibody with a first buffer comprising 0 to 30% of C<sub>1</sub> to C<sub>3</sub> alcohol, 5 to 30% sodium dodecyl sulphate, or 5 to 30% sodium dodecyl sulphate and 0 to 5% sarcosyl, and 0 to 5% bovine serum albumin made up to volume in about 0.1 M TRIS/HCL or phosphate buffer, the buffer having a final pH of 7.0 to 9.0.
29. A test for Transmissible Spongiform Encephalopathies comprising obtaining a sample of blood or blood derivative or tissue from a test subject, reacting the tissue, blood or blood derivative sample with a prion specific antibody and detecting the binding of the antibody to the sample by standard immunoassay, wherein the blood or tissue sample is dispensed onto an inert support and incubated with a buffer comprising up to 10 mg/ml, preferably 0.05mg/ml to 4mg/ml, more preferably 0.2mg/ml to 0.6mg/ml, of a broad spectrum protease enzyme in a buffer with a final pH of 2.0 to 11.0, preferably pH 2.0 to 8.5, more preferably 7.5 to 8.5, prior to reaction with the antibody.

WO 02/057789

PCT/IE02/00006

27

30. A test for Transmissible Spongiform Encephalopathies comprising obtaining a sample of blood or a blood derivative or tissue from a test subject, reacting the tissue, blood or blood derivative sample with a prion specific antibody and detecting the binding of the antibody to the sample by standard immunoassay, wherein the sample is incubated with a buffer comprising 0.1 to 10M denaturing solution, preferably 3 to 6M, more preferably 0.5 to 3M Guanidine (optimal range 2 to 4M) or 2 to 8M urea (optimal range 4 to 6M), and up to 0.5M, preferably 0.1 to 0.2M sodium hydroxide made up in reverse osmosis distilled water, with a pH of at least 11 at room temperature, prior to reaction with the antibody.

31. A buffer selected from:

- (1). 0 to 30% of C<sub>1</sub> to C<sub>24</sub> alcohol (optimal range 10 to 20%) 5 to 30% detergent (optimal range 10 to 20%), and a 0 to 5% proteinase (optimal range 0.05 to 0.4%) made up to volume in a buffer having a final pH of 5.0 to 11.0 (optimal range 7.5 to 8.5).
- (2). 0.05mg/ml to 4mg/ml (optimal range 0.2mg/ml to 0.6mg/ml) of a protease enzyme in a buffer having a final pH of 2.0 to 11.0 (optimal range 2.0 to 8.5).
- (3). 0.1 to 10M denaturing solution (optimal range 2 to 8M).

20

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/057789 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68 CH, CN, CO, CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (utility model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE (utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KL, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/01/0200006
- (22) International Filing Date: 18 January 2002 (18.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: S20010042 19 January 2001 (19.01.2001) IE
- (71) Applicant (for all designated States except US): ENFER TECHNOLOGY LIMITED [IE/IE]; Block A, Earlsfort Centre, Earlsfort Terrace, Dublin 2 (IE).
- (72) Inventor; and  
(75) Inventor/Applicant (for US only): O'CONNOR, Michael [IE/IE]; 11 Chestnut Road, Mount Merrion, County Dublin (IE).
- (74) Agents: GATES, Marie, Christina, Esther et al.; Tomkins & Co., 5 Dartmouth Road, Dublin 6 (IE).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (utility model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (88) Date of publication of the international search report: 13 March 2003
- Published: — with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/057789 A3

(54) Title: TEST FOR TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHIES

(57) Abstract: A method of detecting transmissible spongiform encephalopathies is described which involves (a) treating a sample of tissue, blood or a blood derivative from a test subject with alcohol and a detergent, (b) adding an agent which degrades normal prion protein (c) adding an agent which denatures abnormal prion protein, (d) adding a prion-specific antibody and (e) detecting binding of the antibody to the sample. Also described is a method of fixing abnormal prion protein to a substrate comprising (a) treating the protein or a sample suspected to contain the abnormal prion protein with alcohol and an anionic detergent and (b) adding a protease, in the presence of the substrate.

## 【手続補正書】

【提出日】平成15年4月17日(2003.4.17)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

TSEを検出する方法であって、(a)試験被験体からの組織、血液、または血液派生物のサンプルを、アルコールおよび洗浄剤で処理する工程、(b)正常なプリオンタンパク質を分解する薬剤を添加する工程、(c)異常なプリオンタンパク質を変性する薬剤を添加する工程、(d)プリオン特異的抗体を添加する工程、ならびに(e)サンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含する、方法。

## 【請求項2】

異常なプリオンタンパク質を基質に固定する方法であって、(a)前記異常なプリオンタンパク質、または前記異常なプリオンタンパク質を含むことが疑われるサンプルを、アルコールおよび洗浄剤で処理する工程、ならびに(b)その基質の存在下で、プロテアーゼを添加する工程を包含する、方法。

## 【請求項3】

請求項1または2に記載の方法であって、ここで工程(a)がさらにタンパク質を添加することを包含する、方法。

## 【請求項4】

請求項3に記載の方法であって、前記タンパク質が高分子量タンパク質、好ましくは、ウシ血清アルブミン、オボアルブミン、動物起源の正常な血清、加水分解されたコラーゲンのようなアルブミン基質、またはそれらの誘導体から選択される、方法。

## 【請求項5】

請求項3または4に記載の方法であって、前記タンパク質が5%以下、好ましくは0.05~0.4%のタンパク質を含有する緩衝液中に処方される、方法。

## 【請求項6】

請求項1~5のいずれかに記載の方法であって、ここで工程(a)において使用されるアルコールが、C<sub>1</sub>~C<sub>24</sub>のアルコール、好ましくはC<sub>1</sub>~C<sub>5</sub>アルコールである、方法。

## 【請求項7】

請求項6に記載の方法であって、前記アルコールが、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール、ノナノール、デカノール、ウンデカノール、ドデカノール、トリデカノール、ペンタデカノール、セチルアルコール、ヘプタデカノール、ステアリルアルコール、ノナデカノール、エイコサノール、ドカサノール、ドデシルアルコール、ラウリルアルコール、オクタデカノール、および一次、二次、および三次誘導体を含む、それぞれの誘導体、好ましくはメタノールまたはエタノールから選択される、アルコールである、方法。

## 【請求項8】

請求項1~7のいずれかに記載の方法であって、前記アルコールが30%(重量基準)以下の、好ましくは10~20、より好ましくは8~12%のアルコールを含有する緩衝液中に処方される、方法。

## 【請求項9】

請求項1~8のいずれかに記載の方法であって、ここで工程(a)のアニオン性洗浄剤が、ドデシル硫酸ナトリウム、サルコシル、ドデシル硫酸リチウム、コール酸、デオキシコール酸、Triton X-100、オクタン酸、ポリオキシエチレンラウリルエーテルの30%水溶液、N-セチル-N,N,N-トリメチル臭化アンモニウム、CHAPS、CHAPSO、ジギトニン、ノナノイル-N-メチルグルクアミド、n-オクチル-B-D-グ

ルコピラノシド、アルキル硫酸ナトリウム、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム、オレイン酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、1, 2, 3-オクタントリオール, 3-ジメチルアミノ-1プロピン、コンドロイチナーゼABC、ナトリウムInophore 1、およびそれぞれの誘導体、最も好ましくはドデシル硫酸ナトリウムから選択される、方法。

【請求項10】

請求項1～9のいずれかに記載の方法であって、前記洗浄剤が5～30%、より好ましくは10～20%の洗浄剤を含有する緩衝液中に処方される、方法。

【請求項11】

請求項1～10のいずれかに記載の方法であって、ここで工程(b)において、正常なブリオンタンパク質を分解する薬剤がプロテアーゼである、方法。

【請求項12】

請求項11に記載の方法であって、前記プロテアーゼが広い範囲のプロテアーゼ、好ましくはプロテイナーゼK、サブチリシン、カールスバーグ、ペプシン、およびそれぞれの誘導体から選択される、方法。

【請求項13】

請求項11に記載の方法であって、前記プロテアーゼが10mg/ml以下、好ましくは0.05mg/ml～4mg/ml、より好ましくは0.2mg/ml～0.6mg/mlのタンパク質を含有する緩衝液中に処方される、方法。

【請求項14】

請求項1～13のいずれかに記載の方法であって、ここで工程(c)において異常なブリオンタンパク質を変性する薬剤が、変性化塩溶液である、方法。

【請求項15】

請求項14に記載の方法であって、前記薬剤がグアニジン、尿素、カオトロピックな薬剤の標準変性化溶液、およびそれぞれの誘導体から選択される、方法。

【請求項16】

請求項1～15のいずれかに記載の方法であって、前記変性化薬剤がさらに0.5M以下の水酸化ナトリウムを含む、方法。

【請求項17】

請求項1～16のいずれかに記載の方法であって、前記変性化塩が0.1～1.0M、好ましくは2～8M変性化塩を含有する緩衝液中に処方される、方法。

【請求項18】

請求項1～17のいずれかに記載の方法であって、ここで工程(a)の緩衝液(ホモジナイズ緩衝液)が、5.0～11.0の最終pH、好ましくはpH7.0～9.0、より好ましくはpH7.5～8.5を有するように作製される、方法。

【請求項19】

請求項1～18のいずれかに記載の方法であって、ここで工程(b)の緩衝液(特異的緩衝液)が、2.0～11.0の最終pH、好ましくはpH2.0～8.5、より好ましくは7.5～8.5に作製される、方法。

【請求項20】

請求項1～19のいずれかに記載の方法であって、ここで工程(c)の緩衝液(アッセイ誘発緩衝液)が、1～14、好ましくは9～12、最も好ましくは少なくとも11のpHを有する、方法。

【請求項21】

請求項1～20のいずれかに記載の方法であって、ここで工程(b)に続いて、反応混合物が、10%以下の、好ましくは4～6%の緩衝化溶液を含有する第1の洗浄緩衝液で洗浄される、方法。

【請求項22】

請求項1～21のいずれかに記載の方法であって、前記アッセイ誘発緩衝液が、約5～30分間、好ましくは10～20分間、反応混合物とともにインキュベートすることを許容

される、方法。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 22 のいずれかに記載の方法であって、ここでアッセイ誘発緩衝液での処理後に、5.0 ~ 11.0 の最終 pH、好ましくは pH 7.0 ~ 8.0 を有する第 2 の緩衝液で、混合物が洗浄される、方法。

【請求項 24】

請求項 21 に記載の方法であって、前記第 1 の洗浄緩衝液が、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化亜鉛を含む、方法。

【請求項 25】

請求項 23 に記載の方法であって、前記第 2 の洗浄緩衝液が、0 ~ 5 % の Tween 20 の選択的な添加を伴う、リン酸緩衝化生理食塩水を含む、方法。

【請求項 26】

請求項 1 ~ 25 のいずれかに記載の方法であって、前記血液または組織サンプルが支持体、適切にはマイクロタイタートレイ上に懸濁される、方法。

【請求項 27】

請求項 1 ~ 26 のいずれかに記載の方法であって、ここでプリオン特異的抗体が、プリオン配列のアミノ酸番号 60 の 5'側にあるプリオン配列に対して反応する、方法。

【請求項 28】

請求項 1 ~ 27 のいずれかに記載の試験方法であって、試験被験体から血液、または血液派生物、または組織のサンプルを得る工程、組織、血液、または血液派生物のサンプルと、プリオン特異的抗体とを反応する工程、および標準的な免疫アッセイによってサンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含し、前記抗体を添加する前に、組織、血液、または血液派生物のサンプルが、約 0.1 M (TRIS/HCL) またはリン酸緩衝液、最終 pH 7.0 ~ 9.0 を有する緩衝液中の用量に対して作製される、0 ~ 30 % の C<sub>1</sub> ~ C<sub>5</sub> アルコール、5 ~ 30 % のドデシル硫酸ナトリウム、または 5 ~ 30 % のドデシル硫酸ナトリウムおよび 0 ~ 5 % サルコシル、ならびに 0 ~ 5 % ウシ血清アルブミンを含有する第 1 の緩衝液とともに混合される、試験方法。

【請求項 29】

伝達性海綿状脳症のための試験方法であって、試験被験体からの血液、または血液派生物、または組織のサンプルを得る工程、組織、血液、または血液派生物サンプルと、プリオン特異的抗体とを反応する工程、ならびに標準的な免疫アッセイによってサンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含し、血液または組織サンプルは、不活性な支持体上に分注され、そして抗体との反応の前に、2.0 ~ 11.0、好ましくは 2.0 ~ 8.5、より好ましくは 7.5 ~ 8.5 の最終 pH を伴う緩衝液中に 10 mg/ml 以下の、好ましくは 0.05 mg/ml ~ 4 mg/ml の、より好ましくは 0.2 mg/ml ~ 0.6 mg/ml の、広い範囲のプロテアーゼ酵素を含有する緩衝液とともにインキュベートされる、試験方法。

【請求項 30】

伝達性海綿状脳症のための試験方法であって、試験被験体から血液、血液派生物、または組織のサンプルを得る工程、組織、血液、または血液派生物のサンプルと、プリオン特異的抗体とを反応する工程、および標準的な免疫アッセイによってサンプルに対する抗体の結合を検出する工程を包含し、サンプルは、抗体との反応の前に、室温にて、少なくとも pH 11 で、逆浸透圧蒸留水中で作製される、0.1 ~ 10 M 変性化溶液、好ましくは 3 ~ 6 M、より好ましくは 0.5 ~ 3 M グアニジン (選択的範囲は 2 ~ 4 M) または 2 ~ 8 M 尿素 (選択的範囲は 4 ~ 6 M)、および 0.5 M 以下の、好ましくは 0.1 ~ 0.2 M 水酸化ナトリウムを含有する緩衝液とともにインキュベートされる、試験方法。

【請求項 31】

(1) 5.0 ~ 11.0 (選択的範囲は 7.5 ~ 8.5) の最終 pH を有する緩衝液中の容量に対して作製される、0 ~ 30 % の C<sub>1</sub> ~ C<sub>24</sub> アルコール (選択的範囲は 10 ~ 20 %)、5 ~ 30 % 洗浄剤 (選択的範囲は 10 ~ 20 %)、および 0 ~ 5 % プロテイナーゼ

( 選択的範囲は 0 . 0 5 ~ 0 . 4 % ) ;

( 2 ) 2 . 0 ~ 1 1 . 0 ( 選択的範囲は 2 . 0 ~ 8 . 5 ) の最終 p H を有する緩衝液中の  
0 . 0 5 m g / m l ~ 4 m g / m l ( 選択的範囲は 0 . 2 m g / m l ~ 0 . 6 m g / m l )  
のプロテアーゼ酵素 ;

( 3 ) 0 . 1 ~ 1 0 M 変性化溶液 ( 選択的範囲は 2 ~ 8 M )  
から選択される緩衝液。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/IE 02/00006
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 601N33/68		
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 601N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 35236 A (ENFER TECH LTD ;CONNOR MICHAEL O (IE)) 13 August 1998 (1998-08-13) page 7, line 1 -page 15, line 10 ---	1-31
X	DE 39 21 839 A (HENKEL KGAA) 17 January 1991 (1991-01-17) page 2, line 19-25,51-53,64-68 ---	31
A	EP 0 861 900 A (ZUERICH ERZIEHUNGSDIREKTION) 2 September 1998 (1998-09-02) page 9, line 40 -page 10, line 25 page 11, line 21 -page 12, line 55 page 15, line 14-39 page 8, line 21-23 ---	1-31
-/-		
<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 principles 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 *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 November 2002		Date of making of the international search report 02/12/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vanmontfort, D

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/IE 02/00006

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 773 572 A (MEE ROGER PAUL ET AL) 30 June 1998 (1998-06-30) column 19, line 35-40 column 20, line 12-21 -----	1-31
A	US 5 633 349 A (REICHL HERWIG) 27 May 1997 (1997-05-27) column 4, line 47 -column 5, line 44; claims 1-11 -----	1-31

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.  
PCT/IE 02/00006

Patent document class. in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
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			
			NZ 333518 A	29-06-2001			
			US 2001010918 A1	02-08-2001			
DE 3921839	A	17-01-1991	DE 3921839 A1	17-01-1991			
			AT 105583 T	15-05-1994			
			DE 59005691 D1	16-06-1994			
			DK 482046 T3	26-09-1994			
			WO 9100333 A1	10-01-1991			
			EP 0482046 A1	29-04-1992			
			ES 2052262 T3	01-07-1994			
			JP 2975428 B2	10-11-1999			
			JP 4506475 T	12-11-1992			
			PT 94540 A , B	20-03-1991			
			EP 0861900	A	02-09-1998	WO 9837210 A1	27-08-1998
						EP 0861900 A1	02-09-1998
AU 742838 B2	10-01-2002						
AU 6498698 A	09-09-1998						
EP 1007700 A1	14-06-2000						
NZ 336656 A	31-05-2002						
US 5773572	A	30-06-1998	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 6379905 B1	30-04-2002			
			ZA 9209392 A	27-07-1993			
			US 5633349	A	27-05-1997	AT 408191 B	25-09-2001
AT 162991 A	15-05-1993						
AT 149355 T	15-03-1997						
DE 59208095 D1	10-04-1997						
DK 530173 T3	21-04-1997						
EP 0530173 A2	03-03-1993						
ES 2101077 T3	01-07-1997						
GR 3023206 T3	30-07-1997						

## フロントページの続き

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

(74)代理人 100105474

弁理士 本多 弘徳

(74)代理人 100108589

弁理士 市川 利光

(74)代理人 100115107

弁理士 高松 猛

(74)代理人 100090343

弁理士 濱田 百合子

(72)発明者 オコーナー, マイケル

アイルランド国, カウンティー ダブリン, マウント メリオン, チェスナット ロード 1  
1

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ79 QR16 QR48 QS02 QS33 QX01

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004524523A5</a>	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2002558019	申请日	2002-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	ENFER TECH		
申请(专利权)人(译)	Enfa科技有限公司		
[标]发明人	オコーナーマイケル		
发明人	オコーナー,マイケル		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/37 G01N33/48 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 C12Q1/37 G01N2333/4709 G01N2800/2828		
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/37.ZNA G01N33/48.A		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ79 4B063/QR16 4B063/QR48 4B063/QS02 4B063/QS33 4B063/QX01		
优先权	S20010042 2001-01-19 IE		
其他公开文献	JP3930807B2 JP2004524523A		

#### 摘要(译)

描述了一种检测传染性海绵状脑病的方法，该方法包括以下步骤：(a) 用酒精和洗涤剂处理来自受试者的组织，血液或血液衍生物样品，(b) 添加降解蛋白质的药物，(c) 添加使异常朊病毒蛋白变性的药剂，(d) 添加朊病毒特异性抗体，和(e) 检测抗体与样品的结合。还描述了将异常朊病毒蛋白固定在基质上的方法，包括以下步骤：(a) 用醇和阴离子洗涤剂处理怀疑含有异常朊病毒蛋白的蛋白质或样品，和(b) 在底物存在下加入蛋白酶。