

(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2007-520704

(P2007-520704A)

(43) 公表日 平成19年7月26日(2007.7.26)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)		GO 1 N 33/53		D
GO 1 N 33/543 (2006.01)		GO 1 N 33/543		5 2 5 U

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2006-550230 (P2006-550230)	(71) 出願人	504238301
(86) (22) 出願日	平成17年1月19日 (2005.1.19)		バイオメリュール
(85) 翻訳文提出日	平成18年9月15日 (2006.9.15)		フランス国 エフ-69280 マルシー
(86) 国際出願番号	PCT/FR2005/000118		レトワール, シュマン ド ロルム
(87) 国際公開番号	W02005/080590	(71) 出願人	506246586
(87) 国際公開日	平成17年9月1日 (2005.9.1)		ユニヴェルシテ クロード ベルナール
(31) 優先権主張番号	0400492		リヨン
(32) 優先日	平成16年1月20日 (2004.1.20)		フランス国 エフ-69622 ヴィル
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		ルバンヌ セデックス, ブルヴァール
(31) 優先権主張番号	0406538		デュ 11 ノヴァンブル 1918,
(32) 優先日	平成16年6月17日 (2004.6.17)		4 3
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合、及び、タンパク質リガンド以外のリガンドを用いるプリオンタンパク質の検出方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、PrPを含む可能性を有するヒトあるいは動物の生体サンプルにおけるPrPの検出方法に関する。

【解決手段】本発明の方法は、少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を含有する分子、並びに、大環状リガンド及びグリコサミノグリカンから選択されるタンパク質リガンド以外のリガンドを使用することを特徴とする。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子、並びに、大環状リガンド及びグリコサミノグリカンリガンドから選択される、タンパク質リガンド以外のリガンドを使用することを特徴とする、PrPを含む可能性を有するヒトあるいは動物起源の生体サンプルにおけるPrPの検出方法。

【請求項 2】

少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子は、PrPを沈殿させるために、タンパク質リガンド以外のリガンド添加よりも前に生体サンプルに添加されることを特徴とする請求項 1 に記載のPrPの検出方法。

10

【請求項 3】

プロテイナーゼ K をサンプルに添加する付加的な段階を含むことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のPrPの検出方法。

【請求項 4】

以下の段階：

- a) プロテイナーゼ K をサンプルに添加し、PrP^C を分解する、
 - b) そのようにして得られた混合物に、少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子を添加し、PrP凝集体を得る、
 - c) タンパク質リガンド以外のリガンドを添加し、さらに、
 - d) PrP^{Res} の存在を検知する、
- を含むことを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のPrPの検出方法。

20

【請求項 5】

以下の付加的な段階 i) 及び ii) の少なくとも一つの段階：

- i) 反応混合物からのPrP凝集体の分離、及び、
- ii) PrP凝集体の変性、

ここで、これらの段階は、適切な場合には、段階 b) と c) の間に含まれることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のPrPの検出方法。

【請求項 6】

PrP - 特定結合パートナーとPrP間での免疫反作用のPrP - 特定結合パートナーは、適切な場合には、段階 d) において添加されることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のPrPの検出方法。

30

【請求項 7】

タンパク質リガンド以外のリガンドは固体支持体に結合されていることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のPrPの検出方法。

【請求項 8】

少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子は、少なくとも2つのグアニジウム及び/又はアンモニウム官能基を有する分子、好ましくはストレプトマイシン、特に好ましくはその塩であることを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のPrPの検出方法。

【請求項 9】

タンパク質リガンド以外のリガンドは大環状リガンドであることを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のPrPの検出方法。

40

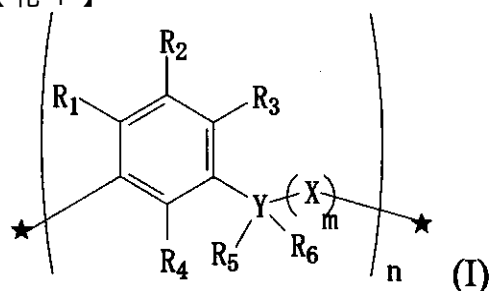
【請求項 10】

大環状リガンドは、メタシクロファン、好ましくはカリックスアレーンから選択されることを特徴とする請求項 9 に記載のPrPの検出方法。

【請求項 11】

大環状リガンドは下記一般式 (I) :

【化 1】



式中、 R_1 は水素原子、水酸基、OR基又はOCOR基であり、Rは下記に示すものであり、 R_2 は水素原子、R、COR、Pol又は CH_2 Pol基であり、この中でPolはホスフェート、スルフェート、アミン、アンモニウム又はカルボン酸基を示し、Rは下記に示すものであり、 R_3 は水素原子、水酸基、OR基又はOCOR基であり、Rは下記に示すものであり、 R_4 は水素原子、水酸基、OR基、 OCH_2R 基又はOCOR基であり、Rは下記に示すものであり、Yは炭素、窒素又は硫黄原子であり、 R_5 と R_6 は各々独立して、存在又は非存在の水素原子、 CH_2 基又は下記に示すR基であるか、あるいは、共に酸素又は硫黄原子であり、Xは CH_2 基、酸素又は硫黄原子であり、mは0又は1の整数であり、Rは水素原子、又は、ハロゲン基で置換若しくは非置換であってもよく、極性又は非極性官能基を運搬する、飽和若しくは非飽和、分岐若しくは非分岐、環状若しくは非環状の炭化水素鎖であり、nは3 - 15の整数であり、置換基 $R_1 - R_5$ 、R、X及びY、並びに、整数mは、ユニットにより本質的に異なっても良いものであることを特徴とする請求項10に記載のPrPの検出方法。

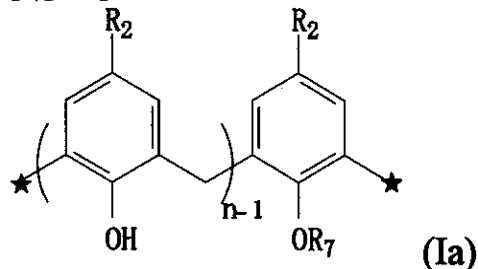
10

20

【請求項12】

大環状リガンドは下記一般式(Ia)：

【化 2】



30

式中、nは4 - 8の整数であり、各々 R_2 は、独立して、スルフェート基又はホスフェート基であり、 R_7 は $(CH_2)_t - (CO)_s - (NH_2)$ 基又は $(CH_2)_t - COOH$ 基であり、ここで、tは0 - 6の整数であり、sは0 - 6の整数であることを特徴とする請求項11に記載のPrPの検出方法。

【請求項13】

リガンドは一般式(Ia)のカリックスアレーンであり、式中、2つの R_2 基が各々スルフェート基であり、nは4、6又は8であり、 R_7 は水素原子、 $-CH_2COOH$ 基、 $-CH_2CONH_2$ 基又は $-CH_2CH_2NH_2$ 基であることを特徴とする請求項12に記載の方法。

40

【請求項14】

大環状リガンドは、一般式(Ia)中、 $n = 6$ 、 $X = Y =$ スルフェート、 R_7 は $-CH_2CH_2NH_2$ のものであることを特徴とする請求項10に記載のPrPの検出方法。

【請求項15】

動物あるいはヒト生物体から由来、又は、得られる生体サンプルを、抗生物質を除いた少なくとも2つのグアニジウム及び/又はアンモニウム官能基を有する分子と接触させる段階を含むことを特徴とするPrP、特にPrP^{Sc}の検出方法。

【請求項16】

50

大環状リガンド及びグリコサミノグリカンから選択される、タンパク質リガンド以外のリガンド、及び、少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子を含むことを特徴とするPrP検出のための診断キット。

【請求項17】

タンパク質リガンド以外のリガンドは固体支持体に結合されていることを特徴とする請求項16に記載の診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、プリオン病の分野に関する。特に本発明は、これらの病気に関するプリオン種の検出方法に関する。 10

【背景技術】

【0002】

天然又は正常なプリオンタンパク質（プリオンタンパク質細胞をPrP^Cと表す。）は、哺乳類のリンパ細胞及び神経細胞に広く発現する糖タンパク質である。PrP^Cの構造変化が、プロテイナーゼK抵抗性異常型タンパク質PrP^Sの出現及び伝播に繋がる。この異常型タンパク質を、本出願においては区別することなく、以降、PrP^S又はPrP^{Res}と表す。本出願において「PrP」という語は、正常あるいは正常でないものでもよく、あるいは、抵抗性あるいは抵抗性でないものでもよいプリオンタンパク質のいずれかの種を表す。 20

【0003】

哺乳類の器官にPrP^Sが蓄積すると、数多くの病気、いわゆるプリオン病又は伝達性海綿状脳症（TSEs）、特に小さな反芻動物に見られる羊海綿状脳症（スクレーピー）、ヘラジカ及びレイヨウの慢性消耗病（CWD）、牛海綿状脳症（BSE）及びヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）の原因となる。感染主における病気の進行は、脳内での異常型タンパク質PrP^Sの蓄積によってもたらされ、これにより脳細胞が修復不可能な損傷を負う。BSEに感染したウシに関しては、発症が遅いこと（2～6年の潜伏期間経過後）及び症状の進行がゆるやかであることが、疫学モデルの発展を著しく遅らせている。BSEは摂取によりヒトに感染し、ヒトにおける新種のクロイツフェルト・ヤコブ病（vCJD）の出現に繋がっている。 30

【0004】

症状が現れていない感染動物中、特に病気に感染した動物の血液や尿のような生理液中において、病気の進行前に異常型タンパク質PrP^Sを検出することは困難である。ヒトの食用動物に含まれるPrP^Sは、感染した組織が摂取された場合にヒトに感染することが現在では判明している。従って、公衆衛生上、主要目的とされるのは、

- 食物連鎖から排除する目的で、ヒトの食用動物中の、
- ヒトの献血及び輸血用血液誘導体中の、

PrP^Sの存在を検出することにより、感染を防ぐことである。実際には、脳に影響が及ぶよりもかなり前に、従って臨床的に明白なプリオン病を連想させる神経の兆候を検出する可能性よりもかなり前に、血液中及びリンパ細胞中に異常型タンパク質PrP^Sの存在により示されるものではあるが、ヒトの生理病理学は知られていない。ヒツジにおける試験的感染の実施は不可能であるので、血液中又は他の生体液中において、検出するための試験の欠如により研究が不可能となり、それ故に献血を経由したヒト間の感染の防止が不可能となり、動物の群れにおいて脳疾患段階前、ひいては、感染した動物を早期に、食肉処理場に到達する前に排除すること可能とするために、脳の病変が始まる前に感染主を処置するという発想を実現不可能なものとしている。 40

【0005】

従って、ヒトあるいは動物の生体サンプル中において、PrP^Sの存在を検出することは極めて重要であり、いくつかの研究グループが免疫検出方法を開発している（特許文献1）。さらに、vCJD処置を目的とした、ペプチド、低分子化合物あるいは抑制剤をP 50

r P^{s c} と共に錯化する方法が盛んに研究されている。しかし、生体サンプル中の P r P^{s c} が少量である場合、先行技術の方法では P r P^{s c} を確実に特定することの困難さに常に直面する。

【0006】

【特許文献1】国際公開第02/086511号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明者らは、予期に反して、プリオンタンパク質を含む可能性を有する生体サンプル中の P r P を診断するための試験における、少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子の使用、及び、タンパク質リガンド以外のリガンドを使用することにより、希釈状態且つ現在使用される方法では検出不可能な条件下で、このタンパク質の検出が可能であること、該診断試験において使用される P r P - 特定結合パートナーへの P r P の結合能を変更することなく、これら2つの成分を組み合わせて使用することを論証した。

10

【課題を解決するための手段】

【0008】

すなわち、本発明の主題は、少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子、及び、タンパク質リガンド以外のリガンドを使用することを特徴とする、P r P を含む可能性を有するヒトあるいは動物起源の生体サンプルにおける P r P、特に P r P^{s c} の検出方法である。

20

【0009】

本発明の主題はまた、タンパク質リガンド以外のリガンド、及び、少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子を含む、P r P 検出のための診断キットに関する。

【0010】

「タンパク質リガンド以外のリガンド」という表現は、P r P と結合可能な化合物であり、且つ、本質的に非タンパク質である化合物を意味する。このリガンドの定義より除かれるタンパク質リガンドとして、抗 P r P 抗体が挙げられる。

【0011】

「少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子」という表現は、少なくとも一つの正電荷を有する分子若しくはグリコシド結合が関係する官能基を有する分子、又は、その両方を有する分子を意味する。

30

【0012】

従って、本発明の方法は、前記のように定義された、少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子の使用、及び、タンパク質リガンド以外のリガンドの使用を組み合わせることにより、生体サンプル中に少量存在する P r P の検出を可能とする利点を有する。

【0013】

本発明の検出方法が実施される生体サンプルは、P r P を含有する可能性を有する動物又はヒト起源の任意のサンプルである。そのようなサンプルの例として、脳、中枢神経系組織、脾臓や腸のような器官、及び、セファロスピナル液 (c e p h a l o s p i n a l f l u i d)、尿や血液といった生体液が挙げられる。

40

【0014】

本発明の方法を適用可能な動物は、プリオン病に感染する動物である。例として、ヒツジ種やウシが挙げられるが、これらに限定されるものではない。少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子に含まれる正電荷としては、グアニジウム又はアンモニウム官能基のような塩基性官能基により付与される正電荷が好ましい。少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子に含まれるグリコシド結合としては、マクロライドやアミノグルコシドに見られる結合のよ

50

うなヘテロシドタイプの結合が好ましい。本発明の目的のために好ましい、少なくとも一つの正電荷及び／又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子は、少なくとも一つの正電荷及び少なくとも一つのグリコシド結合の両方を有する分子、及び、少なくとも二つのグアニジウム及び／又はアンモニウム官能基を有する分子、好ましくは非ポリマーである親水性分子系である。

【0015】

本発明の特別な実施態様によれば、少なくとも一つの正電荷及び少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子は、グアニジウム環を有するアミノグルコシドから選択され、ストレプトマイシンが特に好ましい。

【0016】

本発明の他の特別な実施態様によれば、少なくとも二つのグアニジウム及び／又はアンモニウム官能基を有する分子は、ポリアリルアミン、トリエチレンテトラアミン (T E T)、ビス-3-アミノプロピルアミン、スベルミンテトラヒドロクロリド、ジヒドロストレプトマイシンセスキスルフェート及びストレプトマイシンから選択され、後者の二つの化合物は、少なくとも一つの正電荷及び少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子の一群にも属する。

10

【0017】

少なくとも一つの正電荷及び／又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子、特に少なくとも二つのグアニジウム及び／又はアンモニウム官能基を有する分子、好ましくはストレプトマイシン、特に好ましくはその塩の使用により、試験生体サンプル中に存在する Pr P の沈殿が与えられる。この沈殿特性は、Pr P^{s c} の存在下、特にプロテイナーゼ K 処理後に増大する。この沈殿は、少なくとも一つの正電荷及び／又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子と共に処理した後に得られる Pr P 凝集体 (あるいは、少なくとも一つの正電荷及び／又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子により架橋した Pr P と呼ばれる) の形成の結果によるものである。

20

【0018】

従って、この定義に対応する抗生物質を除き、ストレプトマイシンのような、少なくとも二つのグアニジウム及び／又はアンモニウム官能基を有する分子と、動物あるいはヒト生物体から由来、又は、得られる生体サンプルを接触させることを特徴とする方法によって、Pr P、特に Pr P^{s c} の検出が可能である。

30

【0019】

本方法は、

a) 抗生物質を除く、少なくとも二つのグアニジウム及び／又はアンモニウム官能基を有する分子を、動物あるいはヒトの器官から由来、又は、得られる生体サンプルに添加する、

b) 溶液を加熱 (例えば 37 - 150)、その後、遠心分離を行い、上清からペレットを分離する、

c) 電気泳動ゲル上を移行、移動及び免疫検出後に Pr P^{s c} を検出、又は、固体支持体上で捕集、続いて E L I S A - t y p e 免疫検出後に Pr P^{s c} の検出を行う、

からなる段階を経て実施される。

40

【0020】

本方法はまた、付加的な段階として、後で示す条件下での変性段階を含む。本方法はまた、付加的な段階として、好ましくは段階 a) の前に、後で示す条件下でのプロテイナーゼ K の添加段階を含む。同様に、Pr P^{s c} 検出段階は、後で示す条件下で実施可能である。

【0021】

その Pr P^{s c} への結合能のために、抗生物質を除く、少なくとも二つのグアニジウム及び／又はアンモニウム官能基を有する分子は、免疫組織化学による検出の間であっても、Pr P^{s c} の沈殿、検出及び／又は診断、さらに、組織又は生体液から Pr P^{s c} を除去するのに特に有益である。

50

【0022】

タンパク質リガンド以外のリガンドの添加、特に、大環状リガンド又はグリコサミノグリカンの添加により、タンパク質リガンドと異なり、PrPタンパク質の検出感度を増大し、少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子により架橋したPrPをより効果的に捕集することを可能とする。その結果、生体サンプル中に少量のみ存在するPrPが検出可能である。

【0023】

少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子、及び、タンパク質リガンド以外のリガンドの量は、サンプルの特異性に応じて、当業者により容易に決定することができる。例えば、ストレプトマイシンのような少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子の量は、50 - 500 mg/mlであり、好ましくは100 - 300 mg/mlである。

10

【0024】

予期に反して、少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子のPrPへの作用、及び、その後の、このようにして形成したPrP凝集体とのタンパク質リガンド以外のリガンドの錯化、並びに、その逆においても、例えば抗PrP検出抗体を使用するPrPの検出を決して損なわない。

【0025】

本発明の特別な実施態様によれば、少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する前記分子は、PrPを沈殿させるために、タンパク質リガンド以外のリガンド添加よりも前に生体サンプルに添加される。

20

【0026】

好ましくは、PrPの沈殿を促進するために、少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子の添加後、反応媒体は25 - 45 の範囲で適度に、好ましくは37 で加熱される。

【0027】

被試験生体サンプルを少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子と接触させる前に、細胞状PrPのタンパク分解を可能とするため、サンプルをプロテイナーゼKで前処理することができる。そのように処理されたサンプルは、プリオンタンパク質として、抵抗性PrP^{Sc}タンパク質(PrP^{res})のみを含む。プロテイナーゼK処理段階は、PrP^{Sc}又はPrP^{res}に特異的な抗体又はリガンドの非存在下、プリオン病又はPrP^{Sc}と共に試験されるサンプルの汚染を決定するための特徴的な段階である。本発明の方法において使用されるプロテイナーゼKの量は、当業者により容易に決定することが可能であり、例えば、80 µg/ml - 160 µg/mlの範囲内である。

30

【0028】

従って、本発明の好ましい実施態様によれば、本発明におけるPrPの検出方法は、プロテイナーゼKをサンプルに添加する付加的な段階を含む。このプロテイナーゼK分解段階は、少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する前記分子でのPrPの架橋の前後どちらにおいても実施可能である。

40

【0029】

更なる実施態様によれば、本発明の方法は以下の段階を含む。

- a) プロテイナーゼKを前記サンプルに添加し、PrP^Cを分解する、
- b) そのようにして得られた混合物に、少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する前記分子を添加し、PrP凝集体を得る、
- c) タンパク質リガンド以外のリガンドを添加し、さらに、
- d) PrP^{res}の存在を検知する。

プロテイナーゼKによる前処理の有無に関わらず、少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子の存在下で形成した、PrPを含むPrP凝集体は、タンパク質リガンド以外のリガンドとの反応前に反応媒体から分離可能である。

50

分離方法は、当業者に公知のどのような沈殿の分離方法によっても実施可能である。例としては、遠心分離、続いて、上清を除去することによりPrP凝集体を反応媒体から分離することが挙げられる。この分離段階により、プロテイナーゼKのような、その後のPrP検出のための反応に必要な全ての生成物の除去が可能であり、適切な場合には、分解されたタンパク質、並びに、少なくとも一つの正電荷及び/又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子が溶液中に存在しない。

【0030】

本発明の検出方法の感度をさらに向上させるため、PrP凝集体とタンパク質リガンド以外のリガンドとの反応前において、被試験生体サンプル中に存在する前記凝集体の変性を実施することが可能である。この変性段階は、当業者に公知のどのようなタンパク質凝集体の変性方法によっても実施可能である。好ましくは、グアニジンHClの添加により、変性は実施される。

10

【0031】

従って、本発明のPrP検出方法は、好ましくは、少なくとも以下の付加的な段階i)及びii)の一つを含む。

i) 反応混合物からのPrP凝集体の分離、及び、

ii) PrP凝集体の変性。

これらの段階は、適切な場合には、段階b)とc)の間に含まれる。好ましい実施態様によれば、本発明の検出方法は、段階i)とii)を連続して、好ましくは段階b)とc)の間に行う。

20

【0032】

本発明の方法によれば、生体サンプル中におけるPrPの存在の検知は、サンプル中の検体検出のための従来方法により実施可能である。例えば、免疫検出又は非免疫検出により実施可能である。「免疫検出」という語は、PrPとの免疫反応を証明することを意味し、この免疫反応は、検出するPrPとPrP-特定結合パートナー間での結合からなる。あるいは、被試験サンプル中に含まれる可能性を有するPrPとラベル化PrP間での競争反応からなる。「非免疫検出」として、例えば、当業者に公知の電気泳動ゲル染色法が挙げられる。免疫反応によるPrPの検出は、例えば、PrP-特定結合パートナーの添加後に実施可能である。「PrP-特定結合パートナー」という語は、PrPと結合可能な、どのようなパートナーをも意味する。免疫反応の可視化は、PrP-特定結合パートナー/PrP錯体の可視化からなる。

30

【0033】

好ましい実施態様によれば、本発明の方法では、PrP-特定結合パートナーとPrP間での免疫反作用のPrP-特定結合パートナーは、適切な場合には、段階d)において添加される。

【0034】

PrP-特定結合パートナーとして、例えば、抗体、抗体断片、ポリペプチド、タンパク質、核酸、ハプテン及びアプタマーが挙げられる。「抗体」には、多クローン性又は単クローン性抗体、遺伝子組み換えにより得られる抗体及び抗体断片が含まれる。多クローン性抗体は、少なくとも一つの所望のターゲット抗原との動物の免疫処置により得ることが可能であり、PrPの場合、続いて所望の抗原を精製した状態で回復し、前記動物の漿液をサンプリングし、とりわけ、アフィニティークロマトグラフィーにより、抗体、特にPrPにより特異的に認識される抗原が付着したカラム上で、他の漿液構成成分から前記抗体を分離することにより得られる。単クローン性抗体は、ハイブリドーマ法により得ることが可能である。その一般的原理については後述する。

40

【0035】

まず、動物、一般にはマウス(又は、生体内免疫処置の場合は、培養物中の細胞)を所望のターゲット抗原で免疫化する。PrPの場合、PrPのBリンパ球がその後、前記抗原に対し抗体を産生可能となる。これらの抗体産生性リンパ球はその後、「不死化」骨髄腫細胞(例としてマウス細胞)と融合されて、ハイブリドーマのもととなる。このようにし

50

て得られる細胞の異種混合物を用いることでその後、特定の抗体の産生及び無制限に増殖が可能な細胞の選択が実施される。各々のハイブリドーマはクローンとして増殖され、各々が単クローン性抗体の産生をもたらす、所望の抗原に関する単クローン性抗体の認識特性を、例えば、ELISA、1次元若しくは2次元免疫プロット、免疫蛍光、又は、バイオセンサーを用いることにより試験できる。そのように選択された単クローン性抗体は、続いて、特に前述のアフィニティークロマトグラフィー法により精製される。

【0036】

本発明における適当な抗体として、例えば、抗体8G8、12F10 (SpiBio社製、フランス)及び3F4 (Immunok社製)が挙げられる。抗体断片は、PrP結合機能を保存する。

10

【0037】

「ポリペプチド」という語は、少なくとも2つのアミノ酸鎖を意味する。「アミノ酸」という語は、タンパク質をコードする第一級アミノ酸、トランス-4-ヒドロキシ-プロリンのような酵素作用後の誘導アミノ酸、ノルバリン、N-メチル-L-ロイシン又はスタリン(staline) (Hunt S. in Chemistry and Biochemistry of the amino acids, Barrett G C, ed., Chapman and Hall, London, 1985)のような天然のものではあるが、タンパク質中には存在しないアミノ酸、固体支持又は液相合成において使用可能な化学官能基で保護されたアミノ酸、及び、非天然のアミノ酸を意味する。

【0038】

「タンパク質」という語は、繊維質あるいは球状の核タンパク質、リポタンパク質、リンタンパク質、金属タンパク質及び糖タンパク質のようなホロタンパク質及びヘテロタンパク質を含む。「核酸」という語は、オリゴヌクレオチド、デオキシリボ核酸、リボ核酸及びその誘導体を意味する。「オリゴヌクレオチド」という語は、少なくとも2つの、天然あるいは修飾したのものであっても良いヌクレオチド(デオキシリボヌクレオチド若しくはリボヌクレオチド、又は、その両方)を示す。「修飾ヌクレオチド」という語は、例えば、修飾塩基を含む、及び/又は、ヌクレオチド間結合レベル及び/又は主鎖レベルでの修飾を含むヌクレオチドを意味する。修飾塩基の例として、イノシン、メチル-5-デオキシシチジン、ジメチルアミノ-5-デオキシウリジン、ジアミノ-2,6-プリン及びプロモ-5-デオキシウリジンが挙げられる。修飾ヌクレオチド間結合としては、例えば、ホスホロチオエート、N-アルキルホスホロアミデート、アルキルホスホネート及びアルキルホスホジエステル結合が挙げられる。仏国特許出願公開第2607507号明細書において開示されているアルファ-オリゴヌクレオチド、Bioorganic & Medical Chemistry Letters, Volume 8, Issue 16, 8 August 1998, pages 2219-2222に記載のホスホロチオエート-LNA及び2'-チオ-LNAのようなLNA、M. Egholm et al. による論文、J. Am. Chem. Soc. (1992), 114, 1895-1897の主題であるPNAsが、主鎖が修飾されたヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドの例である。

20

30

【0039】

「ハプテン」という語は、非免疫原性化合物、すなわち、それら自身では抗体の産生により免疫反応を促進できないが、公知の条件下での動物の免疫処置、特にハプテン-タンパク質結合体での免疫処置によって得られる抗体により認識されることが可能な化合物である。これらの化合物の分子量は、通常3000Da未満であり、最も一般的には2000Da未満であり、例えば、グリコシル化ペプチド、代謝産物、ビタミン、ホルモン、プロスタグランジン、トキシン又は様々な医療品、ヌクレオシド及びヌクレオチドであっても良い。

40

【0040】

アプタマーは、本質的にタンパク質あるいは核酸である捕集パートナーであり、その官能基は抗体として作用し、タンパク質リガンドと結合する(Toulme, J. J. and

50

G i e g e , R . , 1 9 9 8 , M e d i c i n e S c i e n c e , 1 4 (2) , 1 5 5 - 1 6 6) 。

【 0 0 4 1 】

これら全てのポリペプチド、タンパク質、ハプテン及びアプタマーは、PrP及びPrP凝集体との結合能を有する。

【 0 0 4 2 】

特に段階b)において実施されるPrP-特定結合パートナーとPrP間の免疫反応の可視化は、当業者に公知であるどのような直接的又は非直接的な手法によっても実施可能である。直接検出、すなわち、ラベル化を使用しない場合、免疫反応は、例えば、プラズモン共鳴又は電極に導電性ポリマーを使用したサイクリックボルタメトリーにより観測可能である。非直接検出、すなわち、ラベル化を使用する場合、PrP-特定結合パートナーを用いてラベル化を実施することが可能であり、それから予めラベル化される。

10

【 0 0 4 3 】

本発明の方法によれば、生体サンプル中に存在するPrPの可視化は、「競争」法に従っても実施可能である。予めラベル化したPrPをその後、特に段階d)において、PrP-特定結合パートナーの代わりに添加する。この場合、検出シグナルはPrP非存在下で最大となり、ラベル化していない、調べているPrPの濃度が競争反応により上昇するに伴い、その後徐々に低下する。

【 0 0 4 4 】

「ラベル化」という語は、直接的又は非直接的に検出シグナルを発生することが可能なラベルを付与することを意味する。これらのラベルは、限定されるものではないが、以下のものからなる。

20

・ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ又はグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼのような、例えば、比色計、蛍光計又は発光計により検出可能なシグナルを発生する酵素、

・発光性化合物又は染料のような発色団、

・ ^{32}P 、 ^{35}S 又は ^{125}I のような放射性分子、

・フルオレセイン、ローダミン、アレクサ又はフィコシアニンのような蛍光分子、及び、

・金粒子、磁性ラテックス粒子又はリポソームのような粒子。

【 0 0 4 5 】

30

例えば他のリガンド/アンチリガンド対により、非直接的な系も使用可能である。リガンド/アンチリガンド対は当業者に公知のものであり、例えば、ビオチン/ストレプトアビジン、ハプテン/抗体、抗原/抗体、ペプチド/抗体、糖/レクチン又はポリヌクレオチド/相捕的ポリヌクレオチドが挙げられる。この場合、結合剤を運搬するのはリガンドである。アンチリガンドは、前段で記載したラベルにより直接検出可能であり、あるいは、それ自身がリガンド/アンチリガンドにより検出可能である。

【 0 0 4 6 】

一定の条件下におけるこれら非直接的な検出系は、シグナルの結果として生ずる。このシグナルの増幅方法は当業者に公知であり、文献J. Histochem. Cytochem. 45: 481 - 491, 1997を参照することが可能である。

40

【 0 0 4 7 】

タンパク質のラベル化は当業者に広く公知であり、例えば、Greg T. HermansonによりBioconjugate Techniques, 1996, Academic Press Inc, 525 B Street, San Diego, CA 92101 USAに記載されている。

【 0 0 4 8 】

使用されるラベル化の種類に応じて、例えば酵素を使用する場合、当業者はラベル化を可視化するために試薬を追加できる。そのような試薬は当業者に公知であり、特にPrinciples and Practice of Immunoassay, 2nd Edition, Edited by C. Prince, D. J. Newman Sto

50

ckton Press, 1997, 345 Park Avenue South, New Yorkに記載されている。

【0049】

PrP検出としては、固相検出、すなわち、被検出タンパク質を捕集することを意図した結合パートナーが固定された固相を使用した固相検出が可能である。本発明の場合、固相に予め固定された捕集パートナーとして働くのは、タンパク質リガンド以外のリガンドである。当業者に公知の固相検出の例は、ELISA-type検出のようなサンドイッチ-タイプ検出である。

【0050】

従って、本発明の好ましい実施態様によれば、タンパク質リガンド以外のリガンドは固体支持体に結合されている。固体支持体としては、例えば、磁性ビーズのようなビーズ、及び、ミトロ滴定(mitrotitration)板が挙げられる。タンパク質リガンド以外のリガンドは当業者に公知の手法、例えば、吸着又は共有結合により固体支持体に結合することが可能であるが、共有結合によるものが好ましい。

10

【0051】

従って、固体支持体は、リガンドにより運搬される官能基と結合を形成可能な官能基を用いて官能基化することが可能である。好ましい実施態様によれば、固体支持体はNHS(N-ヒドロキシスクシンイミド)結合又はNH₂官能基で官能基化される。この官能基はリガンドにより運搬される官能基と反応し得る。この実施態様においては、固体支持体の官能基結合と結合を形成するために反応可能な官能基を運搬するリガンド、特にNH₂又はCOOH結合を運搬するリガンドが特に好ましい。タンパク質リガンド以外のリガンドの例として、例えば、大環状リガンド、グリコサミノグリカンが含まれる。これらリガンドは全て、タンパク質リガンドと異なり、PrPタンパク質検出の感度を増幅する特殊性を有する。

20

【0052】

本発明の一実施態様によれば、タンパク質リガンド以外のリガンドは、大環状リガンド及びグリコサミノグリカンから選択される。グリコサミノグリカンは当業者に広く公知であり、例えば、Polysaccharides, M. Yalpani, Elsevier, Amsterdam, 1988に記載されている。本発明の目的に適したグリコサミノグリカンとして、例えば、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヒアルロン酸又はケラチン硫酸が挙げられる。

30

【0053】

「大環状リガンド」という語は、大環状を形成する環の連続からなる化合物を意味する。大環状リガンドは当業者に公知である。非限定的な例として、シクロファン、メタシクロファン、シクロデキストリン、シクロ(テトラ-クロモトロブ酸)、スプヘランド(spherands)あるいはシクロ(n)ベラトリレン(cyclo[n]veratrylenes)が挙げられる。大環状リガンドは、被試験タンパク質を、かご効果により遊離状態又は凝集状態で捕捉することができるという特別の利点を有する。大環状リガンドは当業者に公知の手法に従って調整可能であり、例えば、Comprehensive Supramolecular Chemistry, Pergamon, Oxford, 1996に記載されている。本発明の方法に好ましい大環状リガンドは、メタシクロファン、特に好ましいカリックスアレーンから選択される。そのようなカリックスアレーン化合物は、Arduini, A. et al., 1996, Macrocyclic Synthesis, Eds. Harwood, L.M. & Moddy, C.J. Oxford University Press, Oxford及びDa Silva et al., 2001, J. Supramol. Chem., 1: 135-138に記載の方法論に従って得ることが可能である。

40

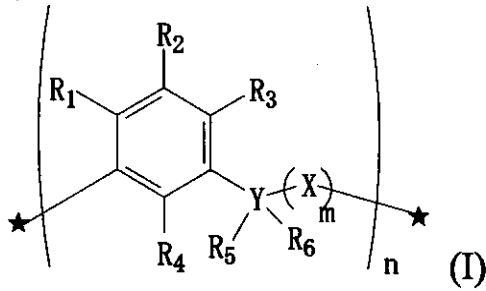
【0054】

好ましい実施態様によれば、大環状リガンドは下記一般式(I)である。

【0055】

50

【化1】



【0056】

式中、 R_1 は水素原子、水酸基、OR基又はOCOR基であり、Rは下記に示すものである。 R_2 は水素原子、R、COR、Pol又は CH_2 Pol基であり、この中でPolはホスフェート、スルフェート、アミン、アンモニウム又はカルボン酸基を示し、Rは下記に示すものである。 R_3 は水素原子、水酸基、OR基又はOCOR基であり、Rは下記に示すものである。 R_4 は水素原子、水酸基、OR基、 OCH_2R 基又はOCOR基であり、Rは下記に示すものである。Yは炭素、窒素又は硫黄原子である。 R_5 と R_6 は各々独立して、存在又は非存在の水素原子、 CH_2 基又は下記に示すR基であるか、あるいは、共に酸素又は硫黄原子である。Xは CH_2 基、酸素又は硫黄原子である。mは0又は1の整数である。Rは水素原子、又は、ハロゲン基で置換若しくは非置換であってもよく、極性又は非極性官能基を運搬する、飽和若しくは非飽和、分岐若しくは非分岐、環状若しくは非環状の炭化水素鎖である。nは3 - 15の整数である。置換基 $R_1 - R_5$ 、R、X及びY、並びに、整数mは、ユニットにより本質的に異なっても良い。

【0057】

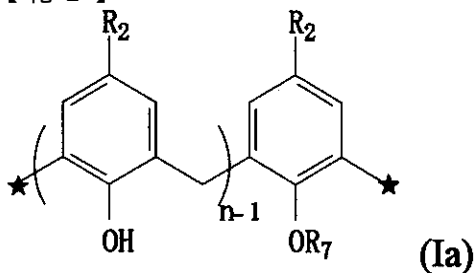
従って、式(I)の化合物は、n個のベンゼン環が存在することを特徴とするユニットが連続したものであり、環上の置換基は、前記の定義の範囲内であれば各々のユニットにおいて異なっても良い。ハロゲン基で置換又は非置換であってもよく、極性又は非極性官能基を運搬する、飽和又は非飽和、分岐又は非分岐、環状又は非環状の炭化水素鎖は、当業者に広く公知のものである。例としては、アルキル、アルケン、アリール及びシクロヘキサンのような飽和した環が挙げられる。非極性基の例は CF_3 であり、極性基の例は上記で定義した置換基Polである。

【0058】

特に好ましい式(I)の化合物は、下記式(Ia)である。

【0059】

【化2】



【0060】

式中、nは4 - 8の整数である。各々 R_2 は、独立して、スルフェート基又はホスフェート基である。 R_7 は $(CH_2)_t - (CO)_s - (NH_2)$ 基又は $(CH_2)_t - COOH$ 基であり、ここで、tは0 - 6の整数であり、sは0 - 6の整数である。特に好ましい式(Ia)の化合物は、2つの R_2 基が各々スルフェート基であり、nは4、6又は8であり、 R_7 は水素原子、 $-CH_2COOH$ 基、 $-CH_2CONH_2$ 基又は $-CH_2CH_2NH_2$ 基であり、本発明の一実施態様である。

【0061】

10

20

30

40

50

好ましい実施態様によれば、大環状リガンドは、一般式 (I a) 中、 $n = 6$ 、 $X = Y =$ スルフェート、 R_7 は $-CH_2CH_2NH_2$ のものである。

【 0 0 6 2 】

本発明の病原性 P r P を免疫検出する方法を実行するために、タンパク質リガンド以外のリガンド、好ましくは大環状リガンド、及び、少なくとも一つの正電荷及び / 又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子を含む診断キットを使用しても良い。

【 0 0 6 3 】

好ましい実施態様によれば、キット中の前記タンパク質リガンド以外のリガンドは、固相検出方法に従って病原性 P r P の検出を実施するため、固体支持体に結合している。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 6 4 】

本発明は以下の実施例及び図 1 - 1 0 により、さらに詳細に理解されるが、これらに限定されるものではない。

【 実施例 】

【 0 0 6 5 】

実施例 1 : サンプルの前処理

1 . ストレプトマイシンで処理していない、脳抽出物のような固体器官サンプル

最初に、5 % (w / v) グルコース溶液中で器官 (脳等) を均質化し、1 0 % 懸濁液を得る。5 μ l の 2 m g / l プロテイナーゼ K (P K) 溶液、1 μ l の 1 0 % S D S (ドデシル硫酸ナトリウム) 溶液及び 6 μ l の 2 . 5 % (w / v) N - オクチル - β - グリコピラノシド水溶液を 1 0 0 μ l の前記均質化溶液に添加する。混合物を渦状に混ぜて、その後 3 7 $^{\circ}$ C で 6 0 分間培養する。5 0 0 μ l のクロロホルム : メタノール (1 : 2) 混合物をその後添加し、混合物を渦状に混ぜる。続いて 1 5 , 0 0 0 r p m で 1 0 分間、室温にて遠心分離段階を経る。上清をその後除去し、ペレットを 2 5 μ l の 6 M グアニジン塩酸塩溶液中で再懸濁する。懸濁液を 3 7 $^{\circ}$ C で 3 0 分間培養する。最後に 4 0 0 μ l の P B S (リン酸緩衝生理食塩水) 溶液及びツイーン (T w e e n) 2 0 (0 . 0 5 % w / v) を添加する。

【 0 0 6 6 】

2 . ストレプトマイシンで処理した、脳抽出物のような固体器官サンプル

最初に、5 % (w / v) グルコース溶液中で器官 (脳、脾臓等) を均質化し、1 0 % 懸濁液を得る。5 μ l の 2 m g / l プロテイナーゼ K (P K) 溶液、2 0 μ l の 2 . 5 % (w / v) N - オクチル - β - グリコピラノシド水溶液を 1 0 0 μ l の前記均質化溶液に添加する。混合物を渦状に混ぜて、その後 3 7 $^{\circ}$ C で 3 0 分間培養する。1 g / m l のストレプトマイシンスルフェート溶液 2 0 μ l を添加し、混合物を攪拌し、3 7 $^{\circ}$ C で 1 時間再培養する。5 0 0 μ l のクロロホルム : メタノール (1 : 2) 混合物をその後添加し、混合物を渦状に混ぜる。続いて 1 0 , 0 0 0 r p m で 1 0 分間、室温にて遠心分離段階を経る。上清をその後除去し、ペレットを 2 5 μ l の 6 M グアニジン塩酸塩溶液中で再懸濁する。懸濁液を 3 7 $^{\circ}$ C で 3 0 分間培養する。最後に 4 0 0 μ l の P B S 溶液及びツイーン 2 0 (0 . 0 5 % w / v) を添加する。

【 0 0 6 7 】

3 . ストレプトマイシンで処理した、漿液や血漿のような生体液サンプル

プロテイナーゼ K 溶液を 1 0 0 μ l の漿液又は血漿に添加し、酵素の最終濃度を 8 0 μ g / m l とする。溶液をその後渦状に混ぜて、3 7 $^{\circ}$ C で 3 0 分間培養する。1 g / m l のストレプトマイシンスルフェート溶液 2 0 μ l を添加し、混合物を攪拌し、3 7 $^{\circ}$ C で 1 時間再培養する。1 5 , 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離した後に上清を廃棄する。残留ペレットを 2 5 μ l の 6 M グアニジン塩酸塩溶液中で渦状に混ぜることにより再懸濁する。その後懸濁液を 3 7 $^{\circ}$ C で 3 0 分間培養する。その後 4 0 0 μ l の P B S 溶液及びツイーン 2 0 緩衝液 (0 . 0 5 % w / v) を添加し、混合物を渦状に混ぜる。

【 0 0 6 8 】

4 . 神経系から調整した、精製した分解 (P r P ^{r e s}) P r P ^{s c} 原繊維サンプル

最初に、5% (w/v) グルコース溶液中で器官(脳等)を均質化し、10%懸濁液を得、濾過する。100mg組織当たり25 μ gの割合でPKを使用する。渦状に混ぜて均質化後、試験管を培養器に入れ、37 $^{\circ}$ Cで1時間放置する。10mMのPefabloc^(R)と均質化することによりPKの活動を停止する。超遠心分離用の調整は、600 μ lの30%サルコシル(Sarkosyl)と共に、1000 μ lの分解した、すり合わせた材料の均質化を含む。超遠心分離用試験管(Beckman, Quisk Seal, 2.2ml)中の蔗糖クッション(400 μ lの10%蔗糖)上に移す前に、混合物を室温で少なくとも15分間放置する。試験管を超純水で満たし、その後溶封し、超遠心分離ローター中に設置する。超遠心分離は100,000rpm、20 $^{\circ}$ Cで2時間続く。脂質画分を含む2/3の上清をその後吸引除去する。吸収紙の上でひっくり返すことにより、ペレットを乾燥する。その後、ペレットを、100又は200 μ lのPBS(即座の使用のため)又は変性緩衝液(凍結用)に溶解する。後者の場合、ペレットを100 $^{\circ}$ Cで10分間加熱する。冷却後、試験管を12,000rpm、20 $^{\circ}$ Cで5分間遠心分離を行う。上清を-80 $^{\circ}$ Cで凍結する。これらのサンプルは、「陽性」の精製PrP^{res}標準としての役目を果たす。

10

【0069】

実施例2:カリックスアレーンリガンド、p-スルフォナト-3,7-(2-アミノエチロキシ)カリックス-[6]-アレーン(以後C6S)の調整

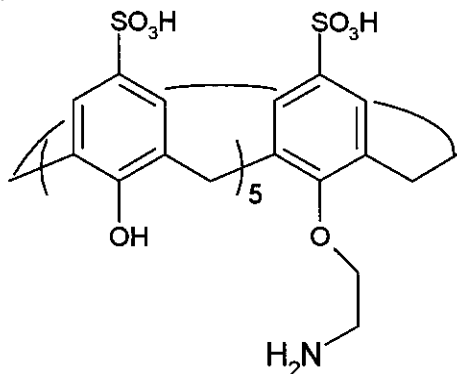
1. 合成

このC6S大環状免疫リガンドは、以下の一般式を有する:

20

【0070】

【化3】



30

【0071】

上記リガンドは、Eric Da Silva and Anthony W. Coleman, Synthesis and complexation properties towards amino acids of mono-substituted p-sulphonato-calix-[n]-arene, Tetrahedron 59 (2003) 7357-7364に記載の方法に従って調整される。このリガンドはその後、後で示す活性表面を有する固体支持体(ビーズ又はプレート)とカップリングすることが可能である。

40

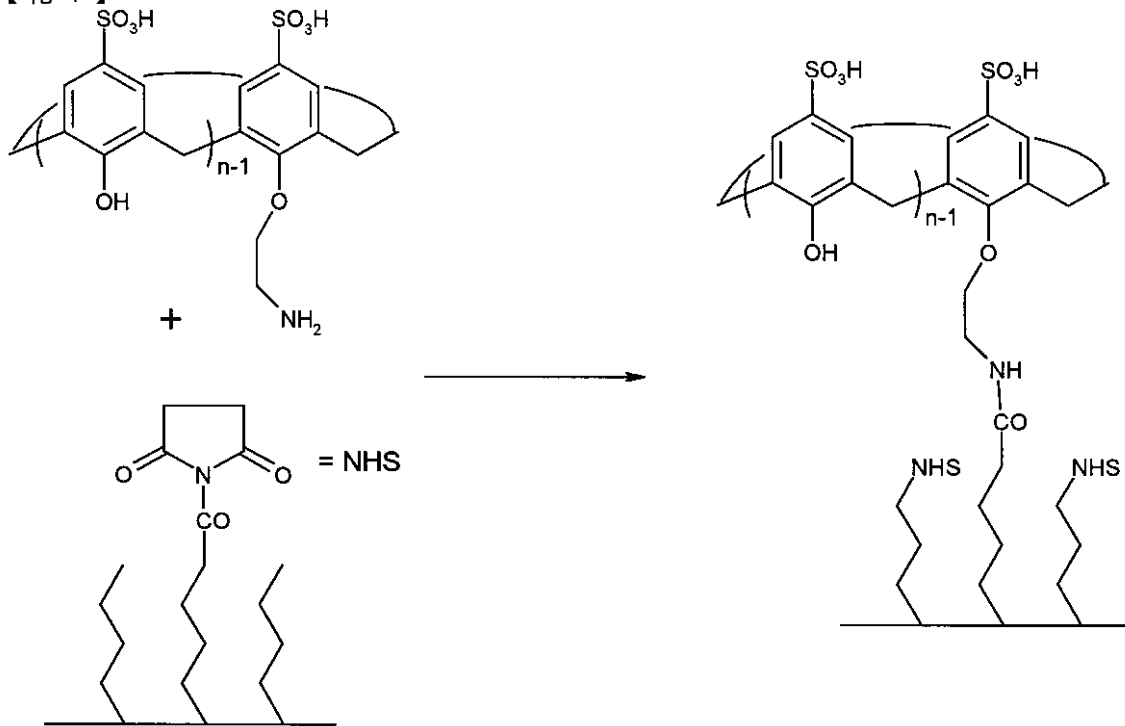
【0072】

2. プレート上へのC6Sのグラフト化

96-ウェル(well)「NHS活性化プレート」は、Covab社(リヨン、フランス)製である。100 μ lのリガンド溶液は、50mMのpH8.2ホスフェート緩衝液中に種々の濃度で溶解する。37 $^{\circ}$ Cで2時間培養後、ウェルを3回(3 \times 200 μ l)、MilliQ水で洗浄する。使用前にプレートは室温で乾燥する。グラフト化の図式:

【0073】

【化4】



10

20

【0074】

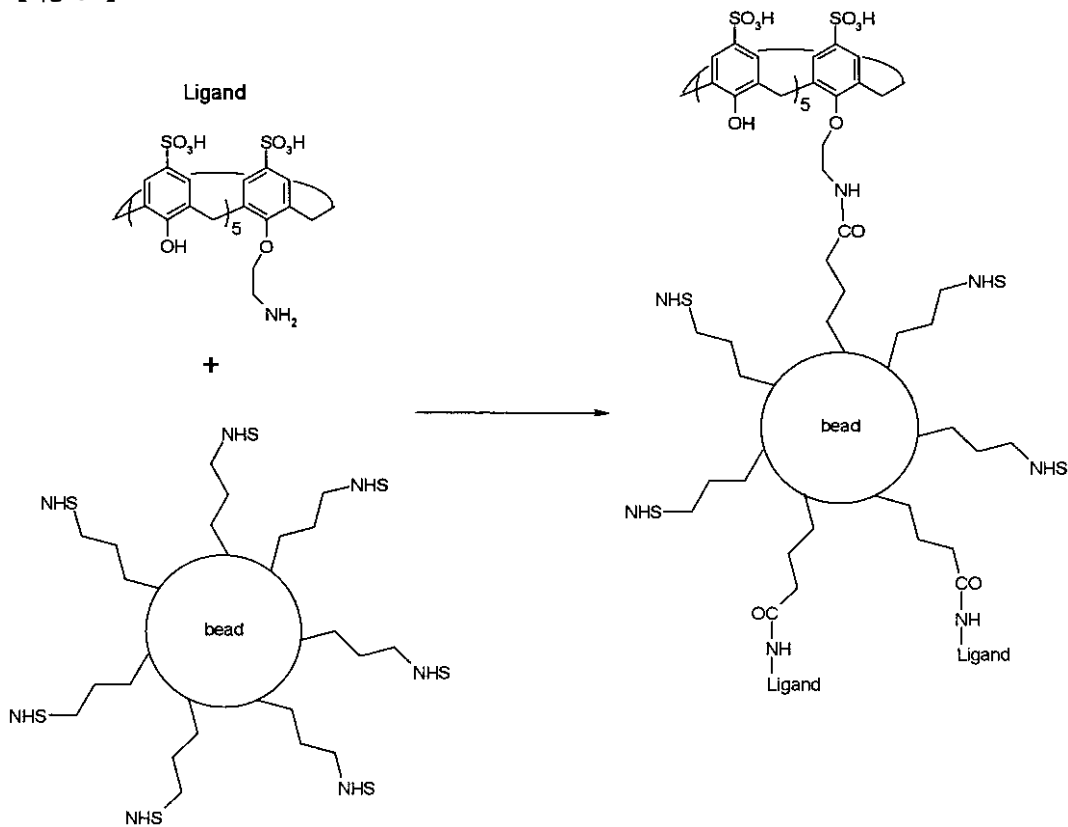
3. ビーズ上へのグラフト化

4 ml の NHS 活性化ビーズ溶液 (2×10^9 ビーズ/ml ; Dynabeads^(R) M270 Amine、DynaLs 社、ノルウェー) を 1 ml 試験管に等分する。ビーズの遠心分離を行い、磁化により沈殿させる。上清を除去し、ビーズを 1 ml の水で 3 回洗浄する。ビーズペレットを、50 mM ホスフェート緩衝液中のカリックスアレーン溶液の種々量に溶解し、pH 8.2 - 600 μ l、120 μ l、60 μ l あるいは 12 μ l のリガンド溶液を 50 mg/ml (50 mM ホスフェート緩衝液、pH 8.2) で添加する。ビーズを室温で 24 時間攪拌する。ビーズを MilliQ 18 水で 3 回洗浄し、未反応のリガンドを除去する。ビーズを 1 ml の水中で保存し、初期濃度 (2×10^9 ビーズ/ml) に戻す。ビーズ溶液を使用する準備が整う。これらのビーズを本文中、「C6S ビーズ」と定義する。C6S をビーズ上へグラフト化する図式：

30

【0075】

【化5】



10

20

【0076】

実施例3：PrP^{res}の検出

1. 使用サンプル

陽性のウシの脳、漿液及び血漿サンプルは、Maded et al, 2000, Microbiol pathogenesis, 28: 353-362に記載された、ウェスタンブロットによる脳組織中のPrP^{res}の研究を含む従来参照方法により、TSE (伝達性海綿状脳症)に感染していることが確認された動物由来のものである。陰性のコントロールは、同じ方法によりプリオン病に感染している可能性が排除された動物の脳、漿液及び血漿サンプルである。血漿サンプル用に使用される抗凝血剤はEDTAである。これらのサンプルは、AFSSA (Agence Francaise de Securite Sanitaire des Aliments) [French agency for food product safety]、リヨン、フランスより供給される。

30

【0077】

2. ELISA-type法によるPrP^{res}の検出

使用前に、前記実施例2の2.で得られるプレートのウェルを、脱脂乳(5%)とPBS/ツイーン20(0.05% w/v)の混合物で、37、60分間処理することにより予め飽和する。その後、ウェル毎に800µlのPBS/ツイーン20(0.05% w/v)で、ウェルを3回洗浄する。プレートをひっくり返すことにより残留緩衝液除去する。前記実施例1の3.に従って調整した100µlの各々の生体液サンプルをウェルに分配し、プレートを機械的に400rpmで攪拌しながら37で100分間培養する。この最初の培養に続けて、各々のウェルを800µlのPBS/ツイーン20(0.05% w/v)混合物で3回洗浄し、その後プレートを乾燥する。ペルオキシダーゼでラベル化した抗PrP検知抗体を100µl/ウェルの割合で添加し、プレートを再度37で60分間培養する。使用抗体は、ヒトPrPのアミノ酸145-154により定められる領域及び動物プリオンの相同領域を認識する(抗体AC23)。プレートをその後、800µ

40

50

1のPBS/ツイーン20(0.05%w/v)溶液(PW41、Sanofi Pasteur)で3回すすぎ、プレートをひっくり返すことにより残留緩衝液を除去する。検知は製造者の推奨(bioMerieuxキット)に従って調整した100µlの検知溶液を、ウェル毎に添加することにより実施した。プレートを暗所中、室温で10分間培養する。50µlの硫酸溶液(1.8N)を添加することにより、反応を停止する。得られるシグナルを分光光度計(Spectrophotometer PR2100, Bio Rad)を用いて490nmで読み取る。

【0078】

3. ウェスタンブロット法による脳内のPrP^{res}の検出

使用プロトコルは、動物中でのプリオン病の确实性の診断に使用され、さらに、Madelcetal, 2000, Microbiol pathogenesis, 28:353-362に記載の参照プロトコルである。

【0079】

4. 結果

結果を表1に示す：

表1：ウシの脳を使用して実施するウェスタンブロットタイプの参照プロトコルと比較した、前記ELISA-type法による、同一の動物の漿液及び血漿中のPrP^{res}検出の特定を表す。

【0080】

【表1】

		ELISA			
		漿液		血漿	
		陽性	陰性	陽性	陰性
ウェスタン ブロット 脳	陽性	6	0	3	0
	陰性	0	8	0	1

【0081】

2つの試験(本発明の方法と参照ウェスタンブロット)が一致することから、これらの結果は、本発明の方法により、生体液中のPrPの検出が可能であることを明確に示している。その上、本発明の方法は、漿液や血漿のような生理的な液体にも適用可能である。

【0082】

実施例4：様々な種への本発明の応用

1. サンプル

上記実施例3で使用されるサンプルに加えて、ウェスタンブロットによる脳の組織中のPrP^{res}研究により、プリオン病スクレーパーに感染していることが確認された動物由来の、陽性ヒツジの脳、漿液及び血漿サンプル、及び、(陽性のウシと見なされた)ウシの脳起源のBSE種に感染したヒツジ種の身体の一部からの血漿も使用した。ネズミの漿液サンプルは、マウス適合C506M3スクレーパー種に感染したヒツジ由来の脳の懸濁液100µlを、予め腹膜内注射により接種されたC57BL6マウスから、5%グルコース溶液中10%で採取し、1/200に希釈した。血液は、眼窩の洞様血管(orbital sinus)から接種15日後に採取した。また、これらのサンプルは、AFSSA(Agence Francaise de Securite Sanitaire des Aliments)[French agency for food p

10

20

30

40

50

product safety]、リヨン、フランスより供給された。

【0083】

2. ELISA-type法による生体液中のPrP^{res}の検出

実施例3の2.に記載のプロトコルを再現した。

【0084】

3. 結果

陽性あるいは陰性(+あるいは-)マウスの漿液、ヒツジの漿液及びウシの血漿サンプル中で得られたOD値の結果を図1に示す。この図は驚くべきことに、どのような種を考察しても、プリオン病に感染した動物由来のサンプルの光学濃度値は、コントロールの動物由来のサンプルと比較して著しくプラスであることを証明している。従って、本発明の方法は様々な種に適用可能である。

10

【0085】

実施例5：本発明の方法における様々な抗体の使用

1. サンプル

前記実施例3に記載のウシのサンプルを使用した。

【0086】

2. ELISA-type法による生体液中のPrP^{res}の検出

前記実施例3の2.に記載のプロトコルを、検知抗体として、前記抗体AC23、又は、抗体8D11G12(bioMerieux, フランス)のいずれかを使用して再現した。

20

【0087】

3. 結果

陽性あるいは陰性(+あるいは-)ウシの血漿サンプル中で得られたOD値の結果を図2に示す。この図は、本発明の方法が様々な抗PrP抗体と共に実施可能であることを証明している。

【0088】

実施例6：固体器官中のPrP^{res}の検出

1. サンプル

使用サンプルは、

i) ウェスタンブロット法による脳組織中のPrP^{res}の研究を含む従来の参照方法により、プリオン病に感染あるいは非感染であることが確認された、陽性あるいは陰性のウシ由来の脳サンプル、及び、

30

ii) 既にスクレーピーのマウス適合種を接種(I/C)し、病気に特徴的な兆候を示しているマウスから採取した脳及び脾臓サンプル、

である。これらのサンプルは、AFSSA(Agence Francaise de Securite Sanitaire des Aliments)[French agency for food product safety]、リヨン、フランスより供給された。これらを実施例1の2.に示したように処置した。

【0089】

2. ELISA-type法による固体器官中のPrP^{res}の検出

40

実施例3の2.に記載のプロトコルを再現した。

【0090】

3. 結果

固体器官の同一サンプルでの、参照ウェスタンブロット法により得た結果と、本発明の方法により得た結果を比較した。ELISA-type法による、脳調整時のストレプトマイシンの使用、及び、カリックスアレーンの使用の両方を組み合わせた本発明の方法を使用することにより、全ての陽性サンプル中でのPrP^{res}の検出が可能であることを結果は証明している。本発明の方法を使用することにより、スクレーピーのマウス適合種を接種したマウスから採取した脳及び脾臓中のPrP^{res}の検出も可能である。

【0091】

50

実施例 7 : ヒトの漿液及び血漿中の PrP^{res} の検出1 . サンプル

使用サンプルは、従来の参照方法により、クロイツフェルト・ヤコブ病に感染あるいは非感染であることが確認された、陽性あるいは陰性患者から採取した漿液及び血漿である。

【0092】

2 . E L I S A - t y p e 法による漿液及び血漿中の PrP^{res} の検出

前記実施例 3 の 2 . に記載のプロトコルを、検知抗体として、前記抗体 A C 2 3、又は、抗体 8 D 1 1 G 1 2 (b i o M e r i e u x , フランス) のいずれかを使用して再現した。

【0093】

3 . 結果

結果を図 3 に示す。図 3 は、本発明の方法によって、2 つの異なる検知抗体を使用した、クロイツフェルト・ヤコブ病に関して陽性 (C J D +)、あるいは、陰性 (C J D -) のヒトの漿液及び血漿サンプル中の PrP^{res} 検出後に得られた O D 値のグラフである。驚くべきことに、本発明の方法により、C J D に感染した患者の漿液及び血漿中の PrP^{res} を特異的に検出することが可能であることを図 3 は証明している。従って、本発明の方法はヒトにも適用可能である。

【0094】

実施例 8 : 少なくとも一つの正電荷及び / 又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する様々な分子の使用

1 . サンプルの調整

試験サンプルは、以下に示すように B S E 陽性ウシの脳ホモジェネートから調整した。

・ 1 μ g のプロテイナーゼ K を、5 % グルコース溶液中で懸濁した B S E 陽性ウシの脳の 1 0 % ホモジェネート 1 0 0 μ l に添加し、その後 3 7 ° C で 1 時間培養した。

・ 1 0 0 μ l の L a e m m l i 緩衝液をその後添加し、混合物を渦状に混ぜ、1 0 0 ° C で 5 分間加熱し、1 2 , 0 0 0 回転で 5 分間遠心分離を行い、上清を回収した。この懸濁液 5 , 6 , 8 , 1 0 あるいは 5 0 μ l (2 5 0 , 3 0 0 , 4 0 0 , 5 0 0 あるいは 2 5 0 0 μ g のウシの組織に対応) を、少なくとも一つの正電荷及び / 又は少なくとも一つのグリコシド結合を有する分子を添加又は非添加の状態、以下に示す実験用として使用した。

【0095】

2 . ウェスタンブロット法

L a e m m l i , N a t u r e 2 2 7 (1 9 7 0) , 6 8 0 - 6 8 5 に記載のように、ドデシル硫酸ナトリウム (S D S P A G E) 存在下、1 次元の 1 5 % ポリアクリルアミド電気泳動ゲル上を移行後、タンパク質を電気泳動によりニトロセルロース膜上に移し、室温で 6 0 分間、アミノ酸 1 4 6 - 1 6 0 からなるプリオンタンパク質に特異的なエピトープを認識する単クローン性抗体 (S p i B i o 社製、フランス) と共に免疫ブロットする。補助検出抗体 (1 / 5 0 0 0) は、ホースラディッシュ ペルオキシダーゼ (I g G H + L) に結合したマウス免疫グロブリン H 及び L 鎖に対して割り当てられたヤギ抗体である。ブロットをその後洗浄し、シグナルをフィルム (B i o m e x , K o d a k 社製) 上で E C L キット (アマシャム (A m e r s h a m) バイオサイエンス社製) と共に、あるいは、super Signal Ultra (P i e r c e 社製) 及び Fluor S . M u l t i m a g e r (B i o R a d 社製) 上での可視化のいずれかと共に化学ルミネセンスにより検出する。

【0096】

3 . ジヒドロストレプトマイシンセスキスルフェートを使用した PrP^{Sc} の検出

この分子は、2 つの Guanidinium 官能基と 1 つの Anomium 官能基を有する分子である。ジヒドロストレプトマイシンセスキスルフェートの濃縮物 (0 , 2 . 5 , 5 あるいは 1 0 m g)、又は、比較としてストレプトマイシンの濃縮物を、前記 1 . で調整したサンプル中の一定量の PrP^{Sc} (5 0 μ l) に添加した。3 7 ° C で 1 時間培養後、1 2 , 0 0 0 回転で 5 分間、遠心分離を実施し、上清 (出発上清) を回収した。ペレットも回収し、

10

20

30

40

50

50 μ l の 8 M ウレア溶液 (v/v) 及び 50 μ l の Laemmli 緩衝液をペレットに添加する。渦状に激しく攪拌後、それらを 100 で 5 分間加熱し、12,000 回転で 5 分間遠心分離を行う。最後に上清 (ペレット上清) を回収した。出発上清及びペレット上清を、前記 2. に示した SDS PAGE 上で移行した。この試験結果を図 4 に示す。図 4 は、移行後得られた電気泳動ゲルの図表示であり、その中で 1 - 15 レーンは、ストレプトマイシン系分子の存在下又は非存在下、下記表 2 で示す処置条件に対応する。

【0097】

【表 2】

レーン	処置条件	関係する上清
1	無し; コントロール	出発上清
2	ストレプトマイシン 2.5 mg	出発上清
3	ストレプトマイシン 5 mg	出発上清
4	ストレプトマイシン 10 mg	出発上清
5	ジヒドロストレプトマイシンセスキスルフェート 2.5 mg	出発上清
6	ジヒドロストレプトマイシンセスキスルフェート 5 mg	出発上清
7	ジヒドロストレプトマイシンセスキスルフェート 10 mg	出発上清
8	参照分子量	無し; 参照
9	無し; コントロール	ペレット上清
10	ストレプトマイシン 2.5 mg	ペレット上清
11	ストレプトマイシン 5 mg	ペレット上清
12	ストレプトマイシン 10 mg	ペレット上清
13	ジヒドロストレプトマイシンセスキスルフェート 2.5 mg	ペレット上清
14	ジヒドロストレプトマイシンセスキスルフェート 5 mg	ペレット上清
15	ジヒドロストレプトマイシンセスキスルフェート 10 mg	ペレット上清

10

20

30

【0098】

図 4 に示すように、試験分子の非存在下では、上清中にある全ての PrP^{S^c} バンドは特定され、ストレプトマイシン又はジヒドロストレプトマイシンセスキスルフェート存在下では、PrP^{S^c} 物質はペレット中で検出される。ストレプトマイシンのように、媒体に添加されるジヒドロストレプトマイシンセスキスルフェートは、PrP の架橋を引き起し、簡単な遠心分離 (超遠心分離の必要が無い) で完全な PrP の沈殿を与えることが、結果から示されている。そのようにして得られた凝集体は、適切な場合には、本発明の方法によるタンパク質リガンド以外のリガンドとの反応後に PrP の検出を可能とする。

【0099】

4. トリエチレンテトラアミン (TET) を使用した PrP^{S^c} の検出

この分子は、4つのアンモニウム官能基を有する分子である。この実験のために、TET の濃縮物 (105, 210, 420, 630 あるいは 840 μ g) を前記 1. により調整した BSE に感染したウシ科動物の脳 250 μ g から得た一定量 (5 μ l) の PrP^{S^c} に添加した。混合物を即座に 12,000 回転で 5 分間遠心分離を行い、上清をウェスタンブロットによる免疫検出に使用した。この試験結果を図 5 に示す。図 5 は、移行後得られた電気泳動ゲルの図表示であり、その中で 1 - 7 レーンは、TET 存在あるいは非存在下での、下記表 3 で示す処置条件に対応する。

40

【0100】

【表 3】

レーン	処置条件
1	処置無し; コントロール
2	TET 105 µg
3	TET 210 µg
4	TET 420 µg
5	TET 630 µg
6	TET 840 µg
7	参照分子量

10

【0101】

図5の結果が示すように、105, 210, 420, 630あるいは840 µgの添加によって、媒体中のトリエチレンテトラアミンの量が増加すると、分子無しのコントロールと比較して、自発的にプリオンタンパク質の分子量の増加が引き起こされる。従って、プリオンタンパク質の検出は、トリエチレンテトラアミンの添加量に比例する。試験の条件下において、TETはストレプトマイシンのPrPへの効果と同様の効果をもたらす、すなわち、PrPの架橋がTET添加量に比例することが、アクリルアミドゲル中で移行したバンドの見掛け分子量の増加により具体化される、ということがこれらの結果により実証される。

20

【0102】

5. ビス-3-アミノプロピルアミンを使用したPrP^SCの検出

この分子は、3つのアンモニウム官能基を有する分子である。ビス-3-アミノプロピルアミン(130, 260, 520, 780あるいは1040 µg)を、前記1.で調整したサンプル中の一定量(5 µl)のPrP^SCに添加し、混合物を室温で30分間培養した以外は、前記3.と同様の手順を再現した。この結果を図6に示す。図6は、ペレット上清の移行後得られた電気泳動ゲルの図表示であり、その中でいくつかのレーン1-7は、ビス-3-アミノプロピルアミン存在下あるいは非存在下での、下記表4で示す処置条件に対応する。

30

【0103】

【表 4】

レーン	処置条件
1	参照分子量
2	処置無し; コントロール
3	<u>ビス-3-アミノプロピルアミン</u> 130 µg
4	<u>ビス-3-アミノプロピルアミン</u> 260 µg
5	<u>ビス-3-アミノプロピルアミン</u> 520 µg
6	<u>ビス-3-アミノプロピルアミン</u> 780 µg
7	<u>ビス-3-アミノプロピルアミン</u> 1040 µg

40

【0104】

図6の結果が示すように、130, 260, 520, 780あるいは1040 µgの添加によって、媒体中のビス-3-アミノプロピルアミンの量が増加すると、分子無しのコントロールと比較して、3つのプリオンタンパク質バンドの、見かけ上の分子量の増加が引き起こされる。これらの条件下、前記4.で言及した遠心分離条件においてプリオンタンパク質は沈殿する。これは、ストレプトマイシンによりもたらされる効果と類似の効果に

50

についても確証するものである。

【0105】

6. 結論

媒体に添加される試験分子により、PrPの架橋が引き起こされ、これにより簡単な遠心分離で完全なるPrPの沈殿が可能となることを結果が示している。そのようにして得られた凝集体は、適切な場合には、本発明の方法によるタンパク質リガンド以外のリガンドとの反応後、PrPの検出を可能とする。

【0106】

実施例9：カリックスアレーンC6S及びストレプトマイシンでサンプルを処理することによるウェスタンブロット法を用いたウシの脳内におけるPrP^{res}の検出

使用サンプルは、ウェスタンブロットによる脳組織中のPrP^{res}の研究を含む従来の参照方法により、プリオン病に感染していることが確認された、陽性のウシ科動物由来の脳サンプルである。最初に、5% (w/v) グルコース溶液中で器官を均質化し、10%懸濁液を得る。1μlの0.1MカリックスアレーンC6S溶液を、100μlの前記均質化溶液に添加し、その後混合物を渦状に混ぜて、37℃で1時間培養する。7μlの2mg/lプロテイナーゼK(PK)溶液を添加し、混合物を渦状に混ぜて、37℃で30分間培養する。濃度の異なる(5%, 10%あるいは20%)ストレプトマイシンスルフェートを含む20μlの溶液を添加し、混合物を攪拌し、その後37℃で1時間再培養する。100μlの変性Laemmli緩衝液を添加後、混合物を100℃で5分間加熱し、12,000rpmで5分間、遠心分離を行う。上清を廃棄し、ペレットを回収する。50μlの8Mウレア溶液(50% v/v)及びLaemmli緩衝液をペレットに添加する。渦状に激しく攪拌後、混合物を100℃で5分間加熱し、12,000回転で5分間遠心分離を行い、その後上清を回収し、Laemmli, Nature 227(1970), 680-685に記載されたように、それらをSDS-PAGE上に移行する。移行後、タンパク質を電気泳動によりニトロセルロース膜上に移し、周囲の温度で60分間、アミノ酸126-160からなる特定のエピトープを認識する単クローン性抗体(SpiBio社製、フランス)と共に免疫ブロットする。補助抗体(1/5000)は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(IgG H+L)に結合したマウス免疫グロブリンH及びL鎖に対して割り当てられたヤギ抗体である。ブロットをその後洗浄し、シグナルをフィルム(Biomex, Kodak社製)上でECLキット(アマシャム(Amersham) バイオサイエンス社製)と共に、あるいは、super Signal Ultra(Pierce社製)及びFluor S-Multimager(BioRad社製)上での可視化のいずれかと共に化学ルミネセンスにより検出する。

【0107】

結果を図7に示す。ここで、レーン1-3は、カリックスアレーン及びストレプトマイシンで処理していないコントロールサンプルに対応し、レーン4-6はカリックスアレーン単独で処理(前記手順による処理であるが、ストレプトマイシンでの処理段階は含まない)したサンプルに対応し、レーン7-15はカリックスアレーンで処理し、その後5%(レーン7-9)、10%(レーン10-12)あるいは20%(レーン13-15)の比率においてストレプトマイシンで処理したサンプルに対応する。結果が証明するように、カリックスアレーンとストレプトマイシンを共に使用すると、PrP^{res}の検出が改善し、この方法の感度は使用するストレプトマイシンの量とともに増大する。

【0108】

実施例10：ヘパリン及びストレプトマイシンでサンプルを処理することによるウェスタンブロット法を用いた生体液中におけるPrP^{res}の検出

1. サンプル

1.1：陽性あるいは陰性標準生成のための脾臓抽出物の調整

新変異型クロイツフェルト・ヤコブ病で死亡した患者の脾臓の剖検サンプル、あるいは、クロイツフェルト・ヤコブ病(CJD)に感染していない患者の脾臓の剖検サンプルから、脾臓抽出物を調整した。まず、リーシス緩衝液(0.5% NP-40(Nonide

10

20

30

40

50

t P - 40) + 0.5% DOC (デオキシコール酸ナトリウム) 中で脾臓サンプルを均質化し、10%懸濁液を得た。そのようにして得たホモジェネートを、その後500gで5分間遠心分離を行い、細胞残骸を除去した。上清は、血液サンプルをオーバーロードするために保存した。

1.2: 血液サンプルの処置

クロイツフェルト・ヤコブ病に感染していない患者(正常ドナー)から採取し、グリコサミノグリカン、この場合はヘパリン(そのリチウム塩の状態)と接触させた、いくつかの血液のプールを調整する。

1.3: 陽性あるいは陰性標準でオーバーロードしたサンプルの生成及び処置

1.3.1: オーバーローディング

ヘパリンで予め処置した血液のプールをいくつかのアリコットに分配し、下記表5で示す量に従って、CJD陽性あるいは陰性の脾臓ホモジェネート(1%, 5%あるいは10%)で、各々のアリコットをオーバーロードした。

【0109】

【表5】

オーバーロード 濃度	ホモジェネート添加量 (μ l)	血漿量 (μ l)
血漿コントロール	0	2150
1%	12.5	1235
5%	62.5	1185
10%	125	1125

【0110】

1.3.2: プロテイナーゼKでの分解

オーバーロード後、0 - 300 μ g/mlの最終濃度(250 μ lのサンプル中、0 - 50 - 100 - 200あるいは300 μ g/ml)であるプロテイナーゼK(PK)でサンプルを分解した。渦状に混ぜた後、培養器中、37 で30分間サンプルを培養した。

1.3.3: ストレプトマイシンとの培養

25 μ lの1g/ml(蒸留水中)のストレプトマイシン(Gibco社製)を、その後混合物に添加し(最終濃度200mg/ml)、それから渦状に混ぜて均質化した後、培養器中、37 で60分間、サンプルを培養した。

1.3.4: ウェスタンブロット法のための調整

培養後、サンプルを15,000rpmで10分間、遠心分離を行い、上清を除去した。ペレットを50 μ lのSDS変性緩衝液中で再溶解し、100 で10分間加熱後、サンプルを12,000rpmで5分間、再度遠心分離を行った。上清をウェスタンブロット法による分析用に採取した。

【0111】

2. ウェスタンブロット法によるオーバーロードした血液中のPrP^{res}の検出

2.1: 電気泳動及び移行

15 μ lの各々の上清を12%のビストリスアクリルアミドゲル(NuPage、インビトロジェン社製)にロードした。200ボルトで45分間、移行を実施し、その後、21ボルト、110ミリアンペア、2ワットで1時間、半乾燥システム(グラフィイト電極)を使用して、タンパク質を再水和したPVDF膜上に移す。

2.2: 免疫可視化

その後、膜を以下の段階に沿って処置した。

10

20

30

40

50

- ・ P B S - 0 . 0 5 % ツイーン (P B S T) + 5 % ミルク中での膜の飽和、
- ・ + (2 - 8) での一晚培養、
- ・ P B S T 中での膜のすすぎ、
- ・ 0 . 2 μ g / m l 、 P B S T 中で使用される主抗体 : 3 F 4 (P r o t e o g e n i x , 9 6 2 0 . 1 0 3) の添加、
- ・ 周囲の温度 (A T) での 1 時間の培養、
- ・ P B S T 中での洗浄、
- ・ P B S T 中 1 / 2 0 , 0 0 0 に希釈状態で使用される第 2 抗体 : ペルオキシダーゼ - 連結 抗マウス (p e r o x i d a s e - c o u p l e d a n t i - m o u s e) (J a c k s o n 社製、 1 1 5 - 0 3 5 - 0 6 2) の添加、
- ・ 周囲の温度での 3 0 分間の培養、
- ・ P B S T 中での洗浄、
- ・ P B S 中、 p H 7 . 2 での洗浄、
- ・ オートラジオグラフィック物質 (s u p e r S i g n a l , P i e r c e 社製) の含浸、
- ・ 写真現像。

10

【 0 1 1 2 】

3 . 結果

結果を図 8 - 1 0 に示す。図 8 は、 1 % の C J D + あるいは C J D - 脾臓ホモジェネートでオーバーロードした正常サンプルの移行後に得られたウェスタンブロット後の電気泳動ゲル (図 8 B) の図表示 (図 8 A) であり、図 9 は、 5 % の C J D + あるいは C J D - 脾臓ホモジェネートでオーバーロードした正常サンプルの移行後に得られたウェスタンブロット後の電気泳動ゲル (図 9 B) の図表示 (図 9 A) であり、図 1 0 は、 1 0 % の C J D + あるいは C J D - 脾臓ホモジェネートでオーバーロードした正常サンプルの移行後に得られたウェスタンブロット後の電気泳動ゲル (図 1 0 B) の図表示 (図 1 0 A) である。これらのゲルにおいて、レーン 1 - 5 及び 8 - 1 2 のサンプルは下記表 6 に示す特性を有する。6 レーンは分子量マーカーレーンに対応し、7 レーンは、クロイツフェルト・ヤコブ病で死亡した患者の脳抽出物から採取し、C J D の確実な分解のために決まって使用される参照方法 (M a d e c e t a l . , 2 0 0 0 , M i c r o b i o l . P a t h o g e n e s i s , 2 8 : 3 5 3 - 3 6 2) に従って調整した陽性コントロールサンプルに

20

30

【 0 1 1 3 】

【表 6】

レーン	オーバーロード源	PK (μg/ml)	沈澱量 (μl)
1	CJD+ 脾臓	0	15
2		50	
3		100	
4		200	
5		300	
8	CJD-脾臓	0	15
9		50	
10		100	
11		200	
12		300	

10

20

【0114】

結果が実証するように、CJD陽性脾臓ホモジェネートでオーバーロードした血液サンプル中で、オーバーロード後の密度がどのようなものであっても、プロテイナーゼK抵抗バンドを示す。実際、(CJD(-)脾臓でオーバーロードした)陰性サンプルに対するプロテイナーゼKの濃度が100 μg/ml以上では、このバンドは消失する一方で、陽性サンプルでは、それに対するプロテイナーゼKの濃度がどのようなものであっても、このバンドは残存する。従って、ヘパリン及びストレプトマイシンの使用を組み合わせた試験の実現により、血液サンプル中のリンパ起源(脾臓)のPrP^{res}検出の感度及び特定が確証される。これは、神経侵害段階及び/又は最初の病気の臨床兆候前に採取した、病原性プリオン(PrP^{sc})で汚染された個体血液中のPrP^{res}の検出用に試験が実施される、生理病理学的状況に良く対応する。

30

【産業上の利用可能性】

【0115】

正常なキャリアー及び/又は無症状段階にある、汚染された個体からの献血のスクリーニングを公衆衛生の観点から使用できる。

【図面の簡単な説明】

【0116】

【図1】本発明の方法によって、陽性(+)あるいは陰性(-)であるマウスの漿液、ヒツジの漿液及びウシの血漿サンプル中におけるPrP^{res}検出後に得られたOD値のグラフ。

40

【図2】本発明の方法によって、2つの異なる検知抗体を使用した、陽性(血漿+)あるいは陰性(血漿-)であるウシの血漿サンプル中におけるPrP^{res}検出後に得られたOD値のグラフ。

【図3】本発明の方法によって、2つの異なる検知抗体を使用した、クロイツフェルト・ヤコブ病に関して陽性(CJD+)、あるいは、陰性(CJD-)のヒトの漿液及び血漿サンプル中のPrP^{res}検出後に得られたOD値のグラフ。

【図4】ストレプトマイシンセスキスルフェート(5-7レーン及び13-15レーン)、あるいは、ストレプトマイシン(2-4レーン及び10-12レーン)のどちらかで処

50

理した B S E 感染したウシの脳サンプルの移行後に得られたウェスタンブロット後の電気泳動ゲル (図 4 B) の図表示 (図 4 A) 、 1 及び 9 レーンは未処置のコントロールに対応し、 8 レーンは分子量マーカーレーンに対応する。

【 図 5 】 トリエチレントトラアミンの増加量 (2 - 6 レーン) で処理した、 B S E 感染したウシの脳サンプルの移行後に得られたウェスタンブロット後の電気泳動ゲル (図 5 B) の図表示 (図 5 A) 、 1 レーンは未処置のコントロールに対応し、 8 レーンは分子量マーカーレーンに対応する。

【 図 6 】 ビス - 3 - アミノプロピルアミンの増加量 (3 - 7 レーン) で処理した、 B S E 感染したウシの脳サンプルの移行後に得られたウェスタンブロット後の電気泳動ゲル (図 6 B) の図表示 (図 6 A) 、 2 レーンは未処置のコントロールに対応し、 1 レーンは分子量マーカーレーンに対応する。

10

【 図 7 】 ストレプトマイシン及びカリックスアレーン p - スルフォナト - 3 , 7 - (2 - アミノ - エチロキシ) カリックス - [6] - アレーン (7 - 1 5 レーン) で処理した、 B S E 感染したウシの脳サンプルの移行後に得られたウェスタンブロット後の電気泳動ゲル (図 7 B) の図表示 (図 7 A) 、 1 - 3 レーンはストレプトマイシン又はカリックスアレーン未添加のコントロールサンプルに対応し、 4 - 6 レーンはカリックスアレーンのみ添加したサンプルに対応する。

【 図 8 】 クロイツフェルト・ヤコブ病に対し陽性あるいは陰性 (それぞれ、 C J D + 、 あるいは、 C J D -) の 1 % 脾臓ホモジェネートでオーバーロードし、ストレプトマイシン及びヘパリン (1 - 5 レーン : C J D + 、 8 - 1 2 レーン : C J D -) で処置した、正常なヒトの血液 (あるいはクロイツフェルト・ヤコブ病に対し陰性) サンプルの移行後に得られたウェスタンブロット後の電気泳動ゲル (図 8 B) の図表示 (図 8 A) 、 6 レーンは分子量マーカーレーンに対応し、 7 レーンは陽性コントロールサンプルに対応する。

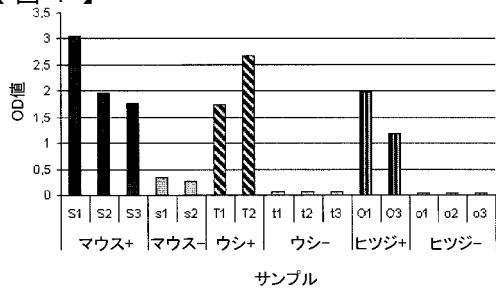
20

【 図 9 】 クロイツフェルト・ヤコブ病に対し陽性あるいは陰性 (それぞれ、 C J D + 、 あるいは、 C J D -) の 5 % 脾臓ホモジェネートでオーバーロードし、ストレプトマイシン及びヘパリン (1 - 5 レーン : C J D + 、 8 - 1 2 レーン : C J D -) で処置した、正常なヒトの血液サンプルの移行後に得られたウェスタンブロット法後の電気泳動ゲル (図 9 B) の図表示 (図 9 A) 、 6 レーンは分子量マーカーレーンに対応し、 7 レーンは陽性コントロールサンプルに対応する。

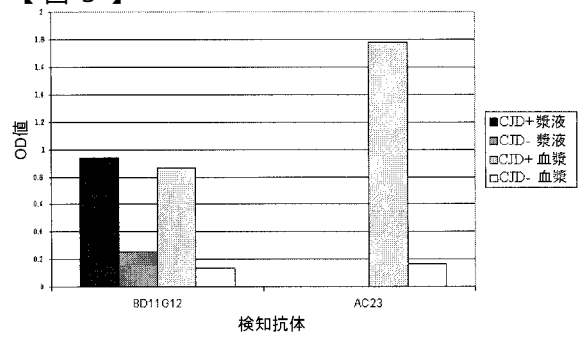
【 図 1 0 】 クロイツフェルト・ヤコブ病に対し陽性あるいは陰性 (それぞれ、 C J D + 、 あるいは、 C J D -) の 1 0 % 脾臓ホモジェネートでオーバーロードし、ストレプトマイシン及びヘパリン (1 - 5 レーン : C J D + 、 8 - 1 2 レーン : C J D -) で処置した、正常なヒトの血液サンプルの移行後に得られたウェスタンブロット後の電気泳動ゲル (図 1 0 B) の図表示 (図 1 0 A) 、 6 レーンは分子量マーカーレーンに対応し、 7 レーンは陽性コントロールサンプルに対応する。

30

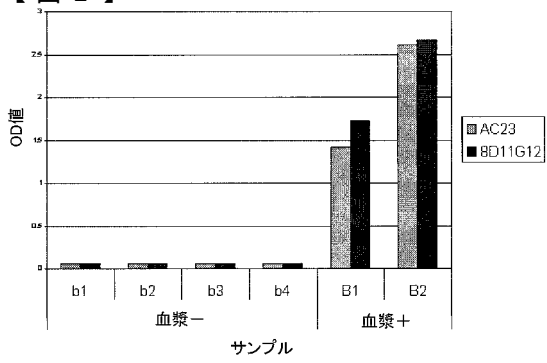
【 図 1 】



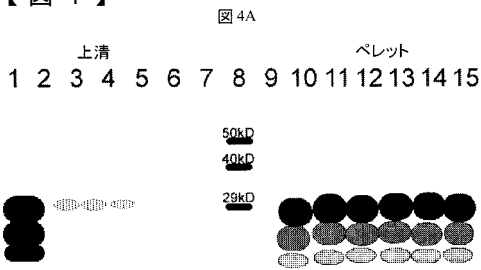
【 図 3 】



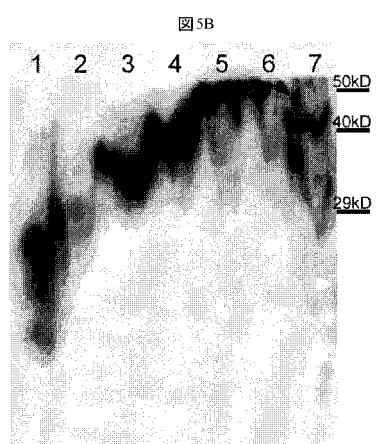
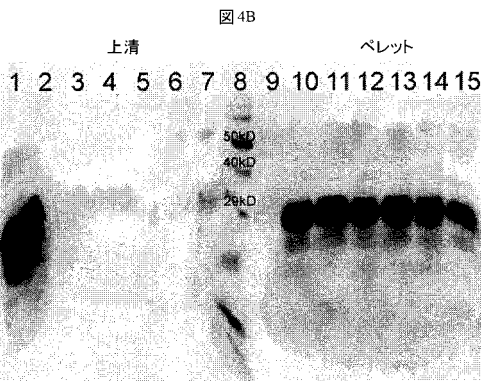
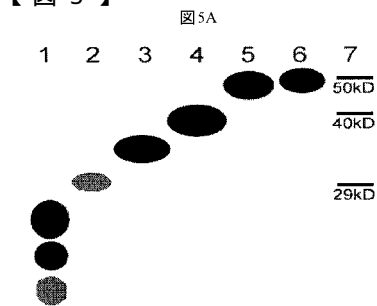
【 図 2 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

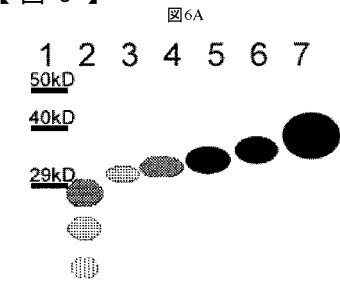
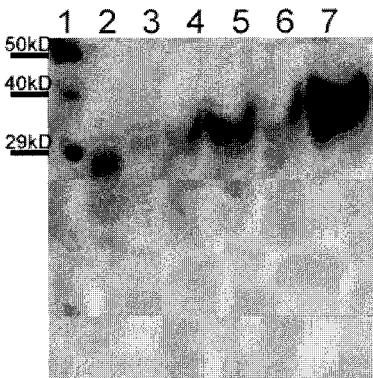


図6B



【 図 7 】

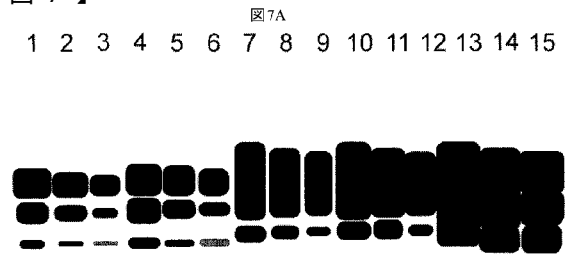
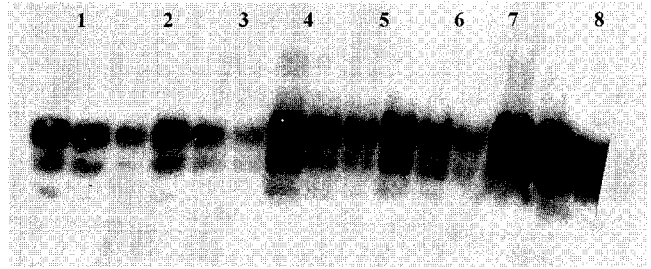


図7B



【 図 8 】

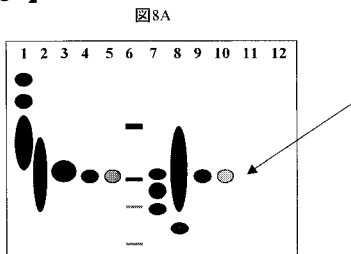
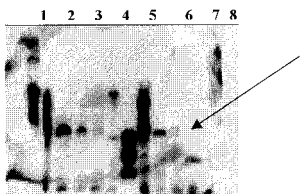


図8B



【 図 9 】

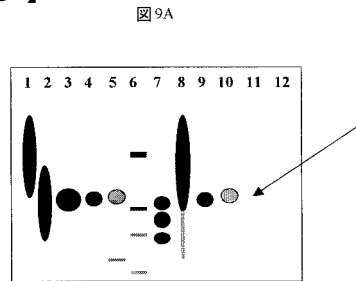
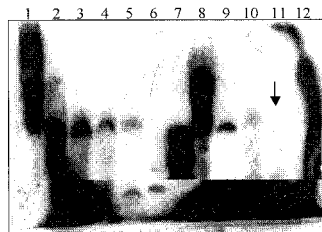


図9B



【 図 1 0 】

図 10A

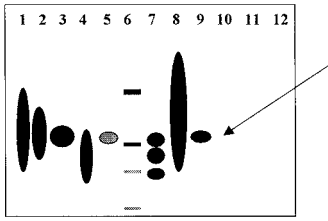
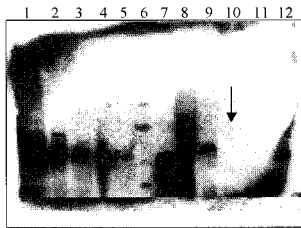


図 10B



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/000118

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/37		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12Q		
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, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 2005/026740 A (HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES & DEVELOPMENT LTD; GABIZON, RUTH) 24 March 2005 (2005-03-24) abstract; claims 1,5	1
P,A	WO 2004/059322 A (COLEMAN ANTHONY WILLIAM ; SHAHGALDIAN PATRICK (FR); BIOMERIEUX SA (FR)) 15 July 2004 (2004-07-15) the whole document ----- -/-	1,3,7, 9-14,16, 17
<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) *C* 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 May 2005		Date of mailing of the international search report 07/06/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Jenn, T

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/FR2005/000118

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PRUSINER S B ET AL: "Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods." CELL. DEC 1983, vol. 35, no. 2 Pt 1, December 1983 (1983-12), pages 349-358, XP009036909 ISSN: 0092-8674 abstract; figures 1,3; table 2 page 351, right-hand column, paragraph 2 page 356, left-hand column, paragraph 5 page 356, right-hand column, paragraph 3 page 356, right-hand column, paragraph 4 page 357, left-hand column, paragraph 3	15
X	WO 02/065133 A (SALAMA ABDULGABAR ; KIESEWETTER HOLGER (DE)) 22 August 2002 (2002-08-22) abstract; claims 1-4 page 5, line 27 - page 6, line 8	15
X	MEYER R K ET AL: "DETECTION OF BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY-SPECIFIC PRPSC BY TREATMENT WITH HEAT AND GUANIDINE THIOCYANATE" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. E73, no. 11, November 1999 (1999-11), pages 9386-9392, XP000911755 ISSN: 0022-538X abstract page 9386, right-hand column, paragraph 4 page 9388, left-hand column, paragraph 6 - right-hand column, paragraph 2 page 9388, right-hand column, paragraph 5	15
X	WO 00/62068 A (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LIMITED; COLLINGE, JOHN; WADSWORTH, JONAT) 19 October 2000 (2000-10-19) claims 1,2,14,19; figure 3f page 8, line 3 - line 12 page 12, line 11 - line 24 page 14, line 27 - page 15, line 1	15
A	US 2002/137114 A1 (TURECEK PETER ET AL) 26 September 2002 (2002-09-26) abstract; claims 30,36 paragraph '0042!	1-17
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/000118

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DA SILVA E ET AL: "Synthesis and complexation properties towards amino acids of mono-substituted p-sulphonato-calix-'n'-arenes" TETRAHEDRON, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 59, no. 37, 8 September 2003 (2003-09-08), pages 7357-7364, XP004453335 ISSN: 0040-4020 cited in the application * Schéma 1 * abstract</p>	1-17
A	<p>WANG FEI ET AL: "Cytotoxicity of poly(phenolic)sulfonates and their sodium salts in L1210 lymphoid leukemia cells" METAL-BASED DRUGS, vol. 5, no. 3, 1998, pages 147-160, XP009036854 ISSN: 0793-0291 abstract; table 1</p>	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR2005/000118

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005026740 A	24-03-2005	WO 2005026740 A1	24-03-2005
WO 2004059322 A	15-07-2004	FR 2849205 A1 AU 2003299390 A1 WO 2004059322 A1	25-06-2004 22-07-2004 15-07-2004
WO 02065133 A	22-08-2002	DE 10107083 A1 WO 02065133 A2 EP 1360502 A2 JP 2004518966 T US 2004096902 A1	29-08-2002 22-08-2002 12-11-2003 24-06-2004 20-05-2004
WO 0062068 A	19-10-2000	AU 773102 B2 AU 3829100 A BR 0009675 A CA 2369629 A1 EP 1169644 A1 WO 0062068 A1 JP 2002541480 T NZ 514691 A US 6887676 B1	13-05-2004 14-11-2000 26-03-2002 19-10-2000 09-01-2002 19-10-2000 03-12-2002 27-02-2004 03-05-2005
US 2002137114 A1	26-09-2002	WO 02057793 A2	25-07-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2005/000118

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12Q1/37		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G01N C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
E	WO 2005/026740 A (HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES & DEVELOPMENT LTD; GABIZON, RUTH) 24 mars 2005 (2005-03-24) abrégé; revendications 1,5	1
P,A	WO 2004/059322 A (COLEMAN ANTHONY WILLIAM ; SHAHGALDIAN PATRICK (FR); BIOMERIEUX SA (FR)) 15 juillet 2004 (2004-07-15) le document en entier	1, 3, 7, 9-14, 16, 17
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 25 mai 2005		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 07/06/2005
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Jenn, T

4

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2005/000118

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>PRUSINER S B ET AL: "Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods." CELL. DEC 1983, vol. 35, no. 2 Pt 1, décembre 1983 (1983-12), pages 349-358, XP009036909 ISSN: 0092-8674 abrégé; figures 1,3; tableau 2 page 351, colonne de droite, alinéa 2 page 356, colonne de gauche, alinéa 5 page 356, colonne de droite, alinéa 3 page 356, colonne de droite, alinéa 4 page 357, colonne de gauche, alinéa 3</p>	15
X	<p>WO 02/065133 A (SALAMA ABDULGABAR ; KIESEWETTER HOLGER (DE)) 22 août 2002 (2002-08-22) abrégé; revendications 1-4 page 5, ligne 27 - page 6, ligne 8</p>	15
X	<p>MEYER R K ET AL: "DETECTION OF BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY-SPECIFIC PRPSC BY TREATMENT WITH HEAT AND GUANIDINE THIOCYANATE" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. E73, no. 11, novembre 1999 (1999-11), pages 9386-9392, XP000911755 ISSN: 0022-538X abrégé page 9386, colonne de droite, alinéa 4 page 9388, colonne de gauche, alinéa 6 - colonne de droite, alinéa 2 page 9388, colonne de droite, alinéa 5</p>	15
X	<p>WO 00/62068 A (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LIMITED; COLLINGE, JOHN; WADSWORTH, JONAT) 19 octobre 2000 (2000-10-19) revendications 1,2,14,19; figure 3f page 8, ligne 3 - ligne 12 page 12, ligne 11 - ligne 24 page 14, ligne 27 - page 15, ligne 1</p>	15
A	<p>US 2002/137114 A1 (TURECEK PETER ET AL) 26 septembre 2002 (2002-09-26) abrégé; revendications 30,36 alinéa '0042!</p>	1-17

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demande internationale No
 PCT/FR2005/000118

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DA SILVA E ET AL: "Synthesis and complexation properties towards amino acids of mono-substituted p-sulphonato-calix-'n'-arenes" TETRAHEDRON, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 59, no. 37, 8 septembre 2003 (2003-09-08), pages 7357-7364, XP004453335 ISSN: 0040-4020 cité dans la demande * Schéma 1 * abrégé	1-17
A	WANG FEI ET AL: "Cytotoxicity of poly(phenolic)sulfonates and their sodium salts in L1210 lymphoid leukemia cells" METAL-BASED DRUGS, vol. 5, no. 3, 1998, pages 147-160, XP009036854 ISSN: 0793-0291 abrégé; tableau 1	1-17

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR2005/000118

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2005026740	A	24-03-2005	WO 2005026740 A1	24-03-2005
WO 2004059322	A	15-07-2004	FR 2849205 A1 AU 2003299390 A1 WO 2004059322 A1	25-06-2004 22-07-2004 15-07-2004
WO 02065133	A	22-08-2002	DE 10107083 A1 WO 02065133 A2 EP 1360502 A2 JP 2004518966 T US 2004096902 A1	29-08-2002 22-08-2002 12-11-2003 24-06-2004 20-05-2004
WO 0062068	A	19-10-2000	AU 773102 B2 AU 3829100 A BR 0009675 A CA 2369629 A1 EP 1169644 A1 WO 0062068 A1 JP 2002541480 T NZ 514691 A US 6887676 B1	13-05-2004 14-11-2000 26-03-2002 19-10-2000 09-01-2002 19-10-2000 03-12-2002 27-02-2004 03-05-2005
US 2002137114	A1	26-09-2002	WO 02057793 A2	25-07-2002

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(71) 出願人 305023584

サントル・ナショナル・ド・ラ・ルシェルシュ・シアンティフィック
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
フランス国、75794 パリ・セデックス 16、リュ・ミシェル・アンジュ 3
3 rue Michel Ange, 75794 PARIS CEDEX 16, France

(71) 出願人 506246597

アジョンス フランセーズ ド セキュリテ サニテール デザリマン
フランス国 エフ - 94701 メゾン - アルフォー, アヴェニュー デュ ジェネラル ルクレク,
27 - 31

(74) 代理人 100086586

弁理士 安富 康男

(72) 発明者 ベンシク - レイニエール, アンナ

フランス国 エフ - 38110 サンクレール ド ラ トール, ルート デュ プラトール,
1280

(72) 発明者 コールマン, アンソニー, ウィリアム

フランス国 エフ - 69300 カリュイール エ キュイール, リュ ド マルノール, 5
5

(72) 発明者 ダ シルヴァ, エリック

フランス国 エフ - 69007 リヨン, リュ カミーユ ロイ, 20

(72) 発明者 デュパン, マリリン

フランス国 エフ - 69670 ボーニュレイ, シャタネー

(72) 発明者 ルクレール, エドウィッジ

フランス国 エフ - 69001 リヨン, リュ デ ピエール ブランシュ, 12

(72) 発明者 マルタン, アンブローズ

フランス国 エフ - 69390 シャルリー, ルート デュ バ プリバ, 605シー

(72) 発明者 ムサ, アリー

フランス国 エフ - 69600 ウラン, シュマン デュ グラン ルヴォワイエ, 52

(72) 発明者 ベロン, エルベ

フランス国 エフ - 69290 サン ジェニ レゾリエール, アレ ド ラ ギゴニエール,
4

(72) 発明者 ロンゾン, フレデリック

フランス国 エフ - 69610 モンロマン, ル ヴァネル

专利名称(译)	使用至少一种正电荷和/或至少一种糖苷键和蛋白质配体以外的配体检测朊病毒蛋白的方法		
公开(公告)号	JP2007520704A	公开(公告)日	2007-07-26
申请号	JP2006550230	申请日	2005-01-19
[标]申请(专利权)人(译)	生物梅里埃公司 单威赛引用克劳德·伯纳德·里昂 法国国家科学研究中心 一个约翰斯法国文化安全撒尼尾部设计再制造		
申请(专利权)人(译)	生物梅里埃 Université 克劳德·伯纳德·里昂 全国中心德拉RECHERCHE青色科学 Ajonsu 法国文化安全 Saniteru Dezariman		
[标]发明人	ベンシックレイニエールアンナ コールマンアンソニーウィリアム ダシルヴァエリック デュパンマリリン ルクレールエドウィッジ マルタンアンブローズ ムサアリー ペロンエルベ ロンゾンフレデリック		
发明人	ベンシック-レイニエール, アンナ コールマン, アンソニー, ウィリアム ダシルヴァ, エリック デュパン, マリリン ルクレール, エドウィッジ マルタン, アンブローズ ムサ, アリー ペロン, エルベ ロンゾン, フレデリック		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C12Q1/37 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N2800/2828		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.525.U		
优先权	2004000492 2004-01-20 FR 2004006538 2004-06-17 FR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及的具有包括朊病毒的可能性人类或动物的生物样品中检测的PrP方法。本发明的方法，使用比从大环配位体和粘多糖选择的蛋白质配位体以外的至少一种正电荷和/或含有至少一个糖苷键的分子，以及，配体它的特点是。技术领域

および、並ひに、整数 m は、ユーツ
とする請求項 10 に記載の PrP
【請求項 12】
大環状リガンドは下記一般式 (I
【化 2】

