

(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2009-507833

(P2009-507833A)

(43) 公表日 平成21年2月26日(2009.2.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02 ZNA	4C084
C07K 1/22 (2006.01)	C07K 1/22	4H045
A61P 43/00 (2006.01)	A61P 43/00 IO5	
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	
C07K 7/06 (2006.01)	C07K 7/06	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 99 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-530008 (P2008-530008)
 (86) (22) 出願日 平成18年9月8日 (2006.9.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年4月30日 (2008.4.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/035226
 (87) 国際公開番号 W02007/030804
 (87) 国際公開日 平成19年3月15日 (2007.3.15)
 (31) 優先権主張番号 60/715,761
 (32) 優先日 平成17年9月9日 (2005.9.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/726,686
 (32) 優先日 平成17年10月14日 (2005.10.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/758,934
 (32) 優先日 平成18年1月13日 (2006.1.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 ツェーハー 4002 バーゼル,
 リヒトシュトラッセ 35
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

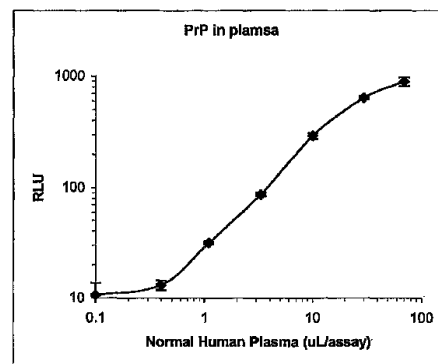
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プリオンに特異的なペプチド試薬

(57) 【要約】

本発明は、コンフォメーション病タンパク質の非病原型に比べて、コンフォメーション病タンパク質の病原型と優先的に反応するペプチド試薬に関する。前記ペプチド試薬は、アミノ末端基領域、カルボキシ末端基領域、およびアミノ末端基領域とカルボキシ末端基領域との間に少なくとも1つのペプチド領域を含み、前記ペプチド領域は3~約30個のN-置換グリシンおよび随意に1つまたはそれ以上のアミノ酸を含む。本発明は、ペプチドを用いてプリオンを検出し、単離する方法、およびプリオン関連疾患の処置および予防においてプリオンを用いる方法にも関する。

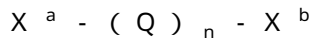
Detection of PrP^C in normal human plasma



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コンフォメーション病タンパク質の非病原型に比べてコンフォメーション病タンパク質の病原型と優先的に反応するペプチド試薬であって、該ペプチド試薬は下記化学式を有し、



式中、各 Q は独立にアミノ酸または N - 置換グリシンであり、 $-(Q)_n-$ はペプチド領域を規定しており、

X^a は、H、 $(C_1 - C_6)$ アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、ヘテロシクロアルキル、 $(C_1 - C_6)$ アシル、アミノ $(C_1 - 6)$ アシル、アミノ酸、アミノ保護基、または 2 ~ 約 100 個のアミノ酸のポリペプチドであり、式中、 X^a はリンカー部分を介して随意に連結される共役部分により随意に置換され、

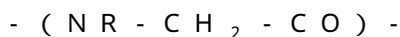
X^b は、H、 $(C_1 - C_6)$ アルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、ヘテロシクロアルキル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシル、 $(C_1 - C_6)$ アルコキシ、アリールオキシ、アラルコキシ、カルボキシ保護基、アミノ酸、または 2 ~ 約 100 個のアミノ酸のポリペプチドであり、式中、 X^b はリンカー部分を介して随意に連結される共役部分により随意に置換され、および

n は 3 ~ 約 30 であり、

式中、該ペプチド領域 $-(Q)_n-$ の少なくとも約 50% は N - 置換グリシンを含むペプチド試薬。

【請求項 2】

前記 N - 置換グリシンは、化学式



を有し、式中、各 R は $(C_2 - C_6)$ アルキル、ハロ $(C_1 - C_6)$ アルキル、 $(C_2 - C_6)$ アルケニル、 $(C_2 - C_6)$ アルキニル、 $(C_6 - C_{10})$ シクロアルキル - アリール、アミノ $(C_1 - C_6)$ アルキル、アンモニウム $(C_1 - C_6)$ アルキル、ヒドロキシ $(C_1 - C_6)$ アルキル、 $(C_1 - C_6)$ アルコキシ $(C_1 - C_6)$ アルキル、カルボキシ、カルボキシ $(C_2 - C_6)$ アルキル、カルバミル、カルバミル $(C_2 - C_6)$ アルキル、グアニジノ、グアニジノ $(C_1 - C_6)$ アルキル、アミジノ、アミジノ $(C_1 - C_6)$ アルキル、チオール、 $(C_1 - C_6)$ アルキルチオール、2 - 10 個の炭素原子のアルキルチオアルキル、N - 含有ヘテロシクリル、N - 含有ヘテロシクリル $(C_1 - C_6)$ アルキル、イミダゾリル、4 - 10 個の炭素原子のイミダゾリルアルキル、ピペリジル、5 - 10 個の炭素原子のピペリジルアルキル、インドリル、9 - 15 個の炭素原子のインドリルアルキル、ナフチル、11 - 16 個の炭素原子のナフチルアルキル、およびアリール $(C_1 - C_6)$ アルキル、から独立に選択され、式中各 R 部分は、ハロゲン、ヒドロキシおよび $(C_1 - C_6)$ アルコキシから独立に選択される 1 - 3 個の置換基で随意に置換されている請求項 1 に記載のペプチド試薬。

【請求項 3】

X^b がリンカー部分を介して随意に連結される共役部分により随意に置換されたアミノ酸である請求項 1 に記載のペプチド試薬。

【請求項 4】

n が約 5 ~ 約 15 である請求項 1 に記載のペプチド試薬。

【請求項 5】

各 Q が N - 置換グリシンである請求項 1 に記載のペプチド試薬。

【請求項 6】

前記ペプチド領域 $-(Q)_n-$ が生理的に適切な pH においてポリイオン性である請求項 1 に記載のペプチド試薬。

【請求項 7】

前記ペプチド領域 $-(Q)_n-$ が生理的に適切な pH において少なくとも 3 + の正味荷

10

20

30

40

50

電を有する請求項 1 に記載のペプチド試薬。

【請求項 8】

前記 N - 置換グリシンが、化学式 - (NR - CH₂ - CO) - を有し、式中、R は (C₂ - C₆) アルキル、ハロ (C₁ - C₆) アルキル、(C₂ - C₆) アルケニル、(C₂ - C₆) アルキニル、(C₆ - C₁₀) シクロアルキル - アリール、アミノ (C₁ - C₆) アルキル、アンモニウム (C₁ - C₆) アルキル、ヒドロキシ (C₁ - C₆) アルキル、(C₁ - C₆) アルコキシ (C₁ - C₆) アルキル、カルボキシ、カルボキシ (C₂ - C₆) アルキル、カルバミル、カルバミル (C₂ - C₆) アルキル、グアニジノ、グアニジノ (C₁ - C₆) アルキル、アミジノ、アミジノ (C₁ - C₆) アルキル、チオール、(C₁ - C₆) アルキルチオール、2 - 10 個の炭素原子のアルキルチオアルキル、N - 含有ヘテロシクリル、N - 含有ヘテロシクリル (C₁ - C₆) アルキル、イミダゾリル、4 - 10 個の炭素原子のイミダゾリルアルキル、ピペリジル、5 - 10 個の炭素原子のピペリジルアルキル、インドリル、9 - 15 個の炭素原子のインドリルアルキル、ナフチル、11 - 16 個の炭素原子のナフチルアルキル、およびアリール (C₁ - C₆) アルキル、から独立に選択され、式中各 R 部分は、ハロゲン、ヒドロキシおよび (C₁ - C₆) アルコキシから独立に選択される 1 - 3 個の置換基で随意に置換されており、前記ペプチド領域 - (Q)_n - は少なくとも 3 個の N - 置換グリシンを含み、式中 R は生理的に適切な pH において荷電している部分である、請求項 1 に記載のペプチド試薬。

10

【請求項 9】

前記荷電 N - 置換グリシンは、アミノ (C₁ - C₆) アルキル、アンモニウム (C₁ - C₆) アルキル、グアニジノ、グアニジノ (C₁ - C₆) アルキル、アミジノ、アミジノ (C₁ - C₆) アルキル、N - 含有ヘテロシクリル、N - 含有ヘテロシクリル (C₁ - C₆) アルキル、から独立に選択される荷電 R 部分を含み、式中各 R 部分はハロゲン、C₁ - C₃ メトキシ、および C₁ - C₃ アルキルから独立に選択される 1 - 3 個の置換基で随意に置換されている請求項 8 のいずれかに記載のペプチド試薬。

20

【請求項 10】

前記ペプチド領域 - (Q)_n - が、配列番号 229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、または 241 を含む請求項 1 に記載のペプチド試薬。

【請求項 11】

前記ペプチド領域 - (Q)_n - が、配列番号 229、230、232、233、237、238、239、または 240 を含む請求項 1 に記載のペプチド試薬。

30

【請求項 12】

前記ペプチド領域 - (Q)_n - が、配列番号 230、237、238、239、または 240 を含む請求項 1 に記載のペプチド試薬。

【請求項 13】

前記ペプチド領域 - (Q)_n - が、配列番号 240 を含む請求項 1 に記載のペプチド試薬。

【請求項 14】

少なくとも 1 つの共役部分を含む請求項 1 に記載のペプチド試薬。

40

【請求項 15】

前記共役部分がリンカー部分を介して連結されている請求項 14 に記載のペプチド試薬。

【請求項 16】

前記共役部分が架橋剤または結合剤である請求項 14 に記載のペプチド試薬。

【請求項 17】

前記共役部分がビオチンまたはメルカプト基を含む請求項 14 に記載のペプチド試薬。

【請求項 18】

前記コンフォメーション病タンパク質が、プリオン関連疾患のコンフォメーション病タンパク質であり、該コンフォメーション病タンパク質の病原型が PrP^{S^c} であり、該コン

50

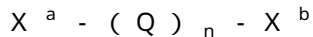
フォメーション病タンパク質の非病原型が PrP^C である請求項 1 に記載のペプチド試薬。

【請求項 19】

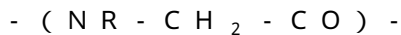
前記ペプチド試薬が、前記コンフォメーション病タンパク質の非病原型に対する親和性よりも少なくとも約 10 倍大きい親和性で、該コンフォメーション病タンパク質の病原型と相互作用する請求項 1 に記載のペプチド試薬。

【請求項 20】

PrP^C に比べて PrP^{S^C} と優先的に反応するペプチド試薬であって、該ペプチド試薬は、下記化学式を有し、



式中、各 Q は独立に下記化学式を有する N - 置換グリシンであり、



式中、各 R は (C₂ - C₆) アルキル、ハロ (C₁ - C₆) アルキル、(C₂ - C₆) アルケニル、(C₂ - C₆) アルキニル、(C₆ - C₁₀) シクロアルキル - アリール、アミノ (C₁ - C₆) アルキル、アンモニウム (C₁ - C₆) アルキル、ヒドロキシ (C₁ - C₆) アルキル、(C₁ - C₆) アルコキシ (C₁ - C₆) アルキル、カルボキシ、カルボキシ (C₂ - C₆) アルキル、カルバミル、カルバミル (C₂ - C₆) アルキル、グアニジノ、グアニジノ (C₁ - C₆) アルキル、アミジノ、アミジノ (C₁ - C₆) アルキル、チオール、(C₁ - C₆) アルキルチオール、2 - 10 個の炭素原子のアルキルチオール、N - 含有ヘテロシクリル、N - 含有ヘテロシクリル (C₁ - C₆) アルキル、イミダゾリル、4 - 10 個の炭素原子のイミダゾリルアルキル、ピペリジル、5 - 10 個の炭素原子のピペリジルアルキル、インドリル、9 - 15 個の炭素原子のインドリルアルキル、ナフチル、11 - 16 個の炭素原子のナフチルアルキル、およびアリール (C₁ - C₆) アルキル、から独立に選択され、式中各 R 部分は、ハロゲン、ヒドロキシおよび (C₁ - C₆) アルコキシから独立に選択される 1 - 3 個の置換基で随意に置換されており、- (Q)_n - がペプチド領域を規定しており、

X^a は、H、(C₁ - C₆) アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、ヘテロシクロアルキル、(C₁ - C₆) アシル、アミノ (C₁ - C₆) アシル、アミノ酸、アミノ保護基、または 2 ~ 約 100 個のアミノ酸のポリペプチドであり、式中、X^a はリンカー部分を介して随意に連結する共役部分により随意に置換され、

X^b は、H、(C₁ - C₆) アルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、ヘテロシクロアルキル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシル、(C₁ - C₆) アルコキシ、アリールオキシ、アラルコキシ、カルボキシ保護基、アミノ酸、または 2 ~ 約 100 個のアミノ酸のポリペプチドであり、式中、X^b はリンカー部分を介して随意に連結される共役部分により随意に置換され、および

n は 4、5、6、7、または 8 であり、

式中該ペプチド領域 - (Q)_n - は生理的に適切な pH において少なくとも 3 + の正味荷電を有するペプチド試薬。

【請求項 21】

以下：

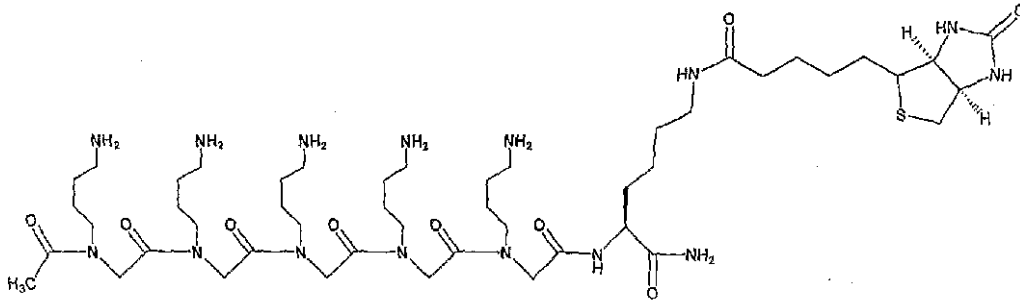
10

20

30

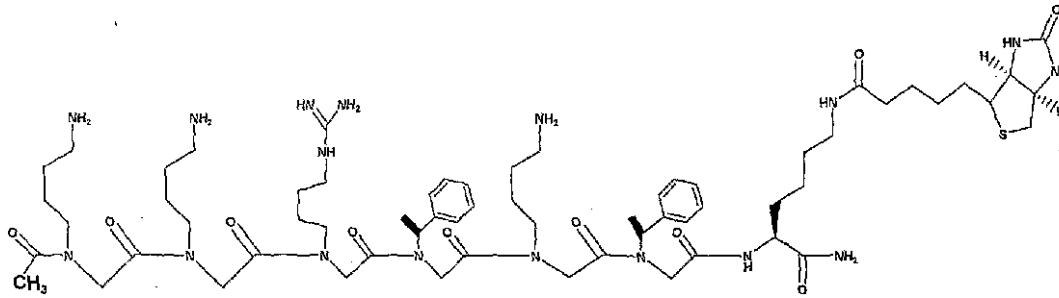
40

【化 1】



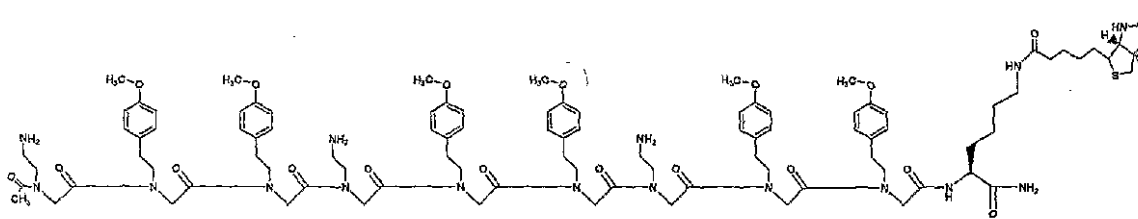
I

10



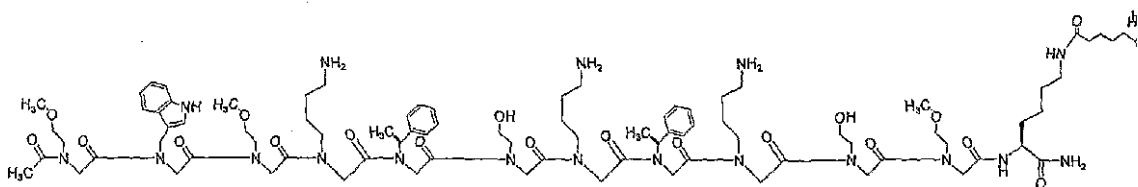
II

20



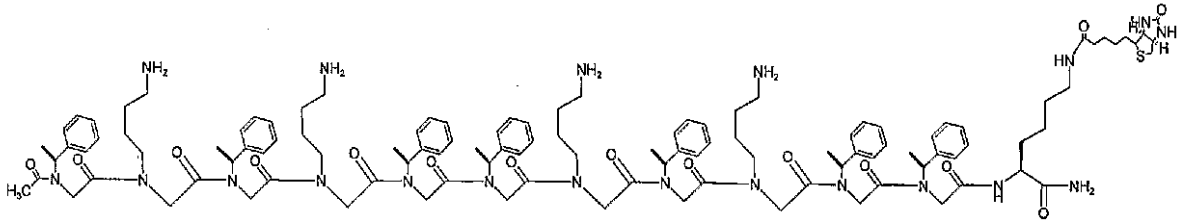
III

30

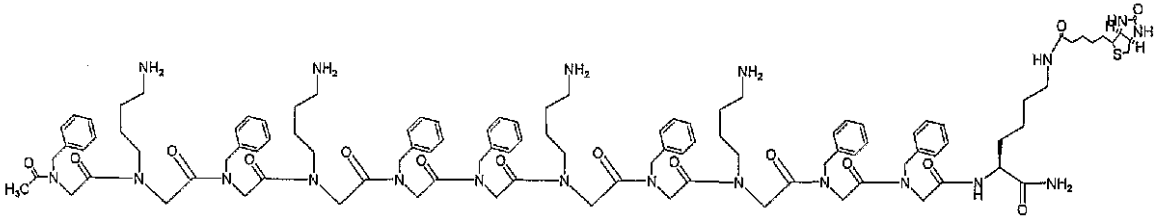


IV

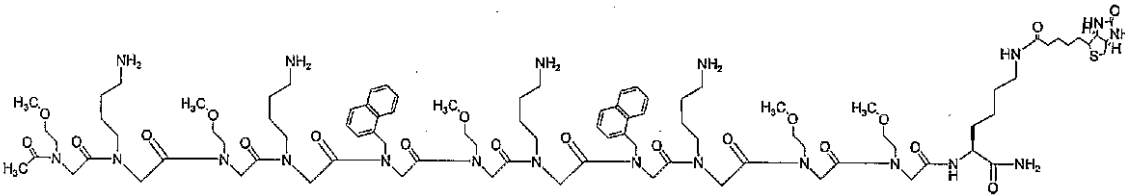
【化 2】



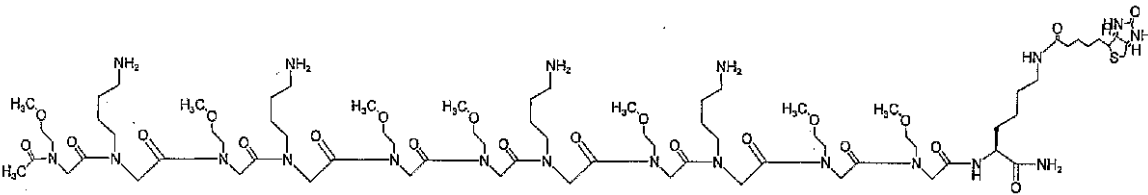
V



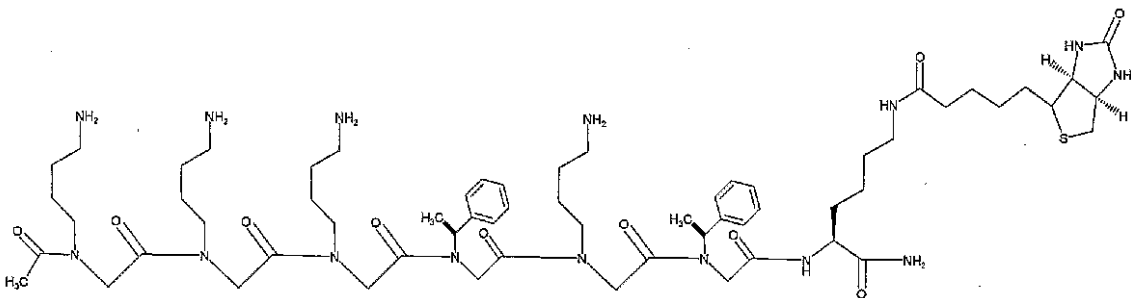
VI



VII



VIII



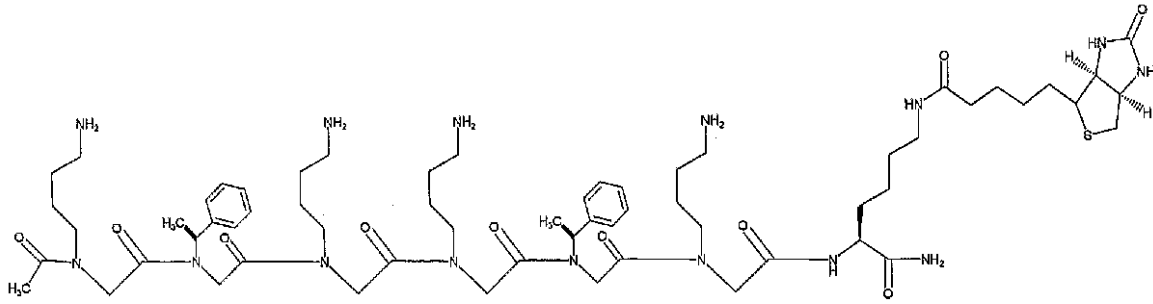
IX

10

20

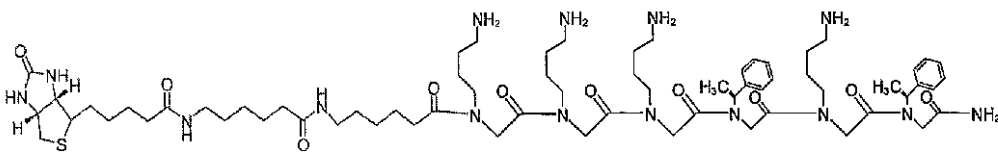
30

【化3】



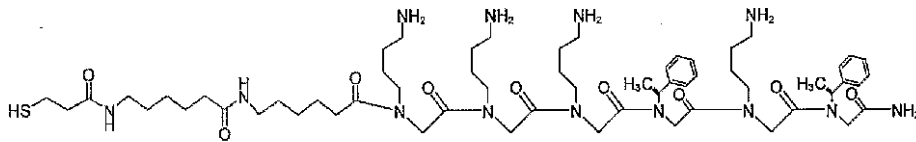
X

10



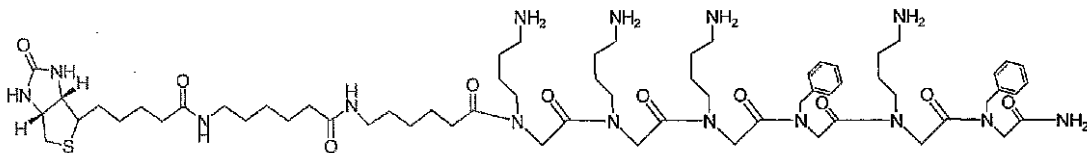
XIa

20



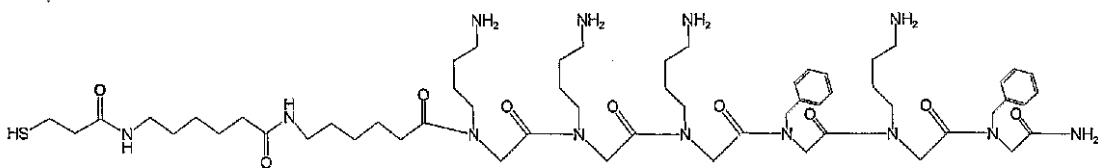
XIb

30



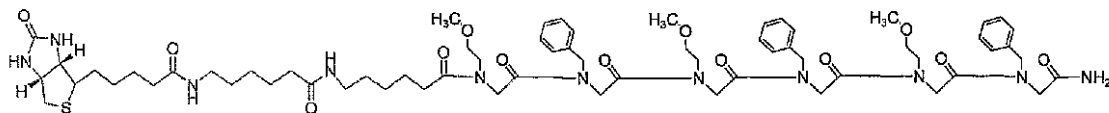
XIIa

40



XIIIb

および



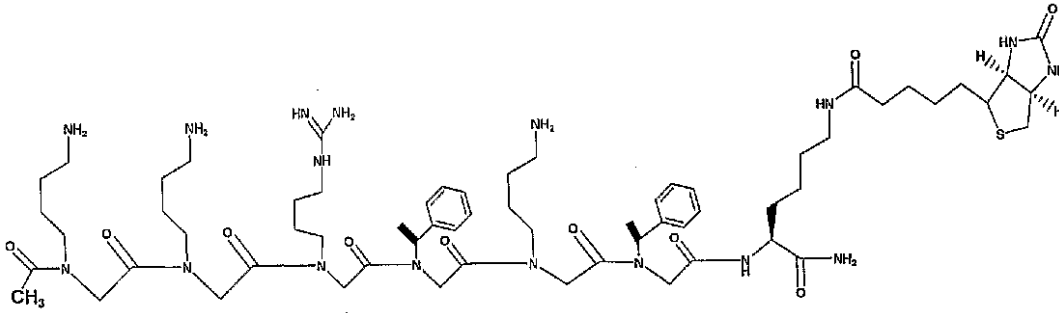
XIII

から選択される、ペプチド試薬。

【請求項22】

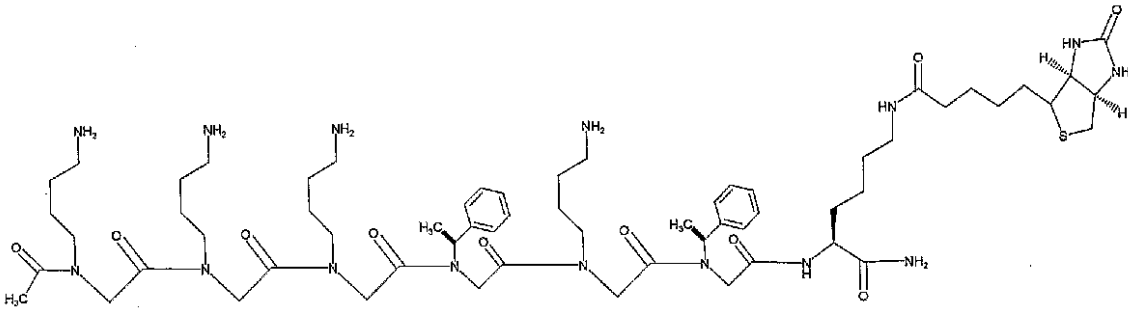
以下：

【化 4】



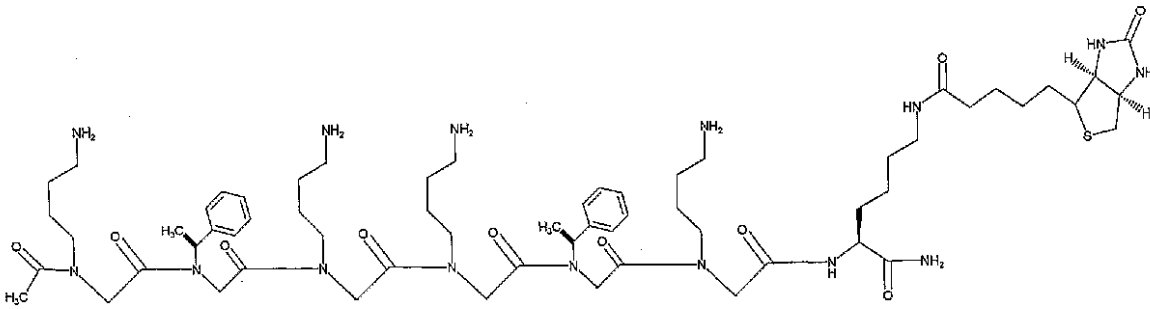
II

10



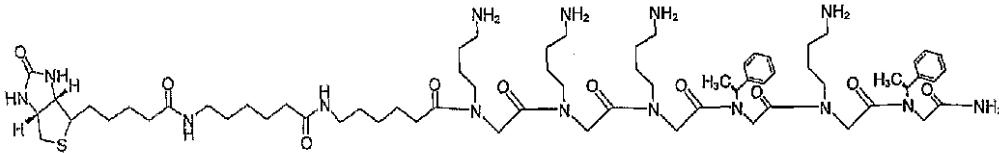
IX

20

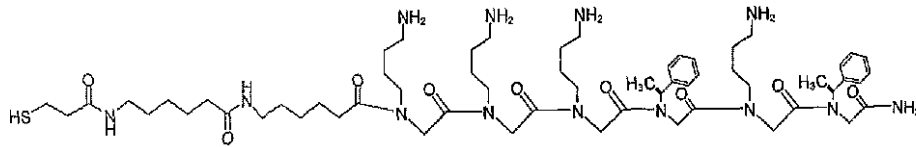


X

【化5】

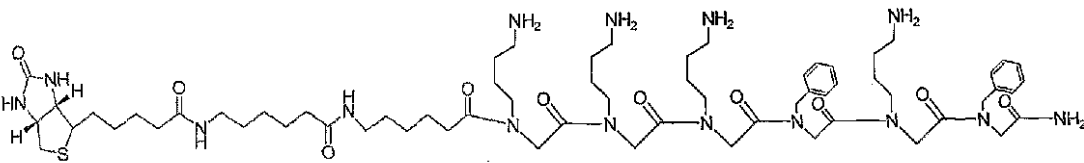


XIa



XIb

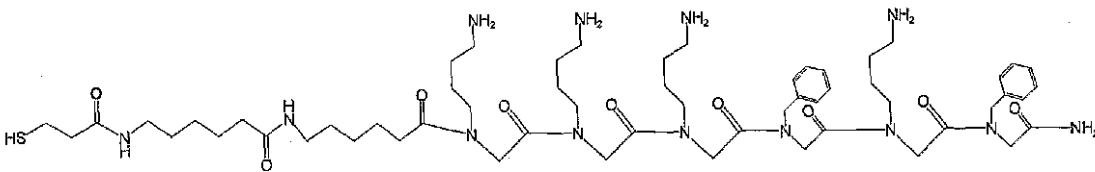
10



XIIa

20

および



XIIb

またはこれらの塩から選択される、ペプチド試薬。

【請求項23】

請求項1～22のいずれか1つに記載のペプチド試薬および病原性プリオンを含む複合体。

30

【請求項24】

固体支持体に連結される請求項1～22のいずれか1つに記載のペプチド試薬を含む組成物。

【請求項25】

請求項1～22のいずれか1つに記載のペプチド試薬および試料を含む組成物。

【請求項26】

前記試料が生物学的試料である請求項25の組成物。

【請求項27】

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、請求項1～22のいずれか1つに記載の第1ペプチド試薬と該試料とを、該病原性プリオンが存在する場合、これに該ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて複合体を形成させる工程と、該複合体の形成を検出する工程とを含み、該複合体の形成は該病原性プリオンの存在を示す、方法。

40

【請求項28】

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、請求項1～22のいずれか1つに記載の第1ペプチド試薬と該試料とを、該病原性プリオンが存在する場合、これに該第1ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて第1複合体を形成させる工程と、該第1複合体の該病原性プリオンに本発明の第2ペプチド試薬が結合で

50

きる条件下で、必要に応じて検出可能に標識された該第2ペプチド試薬と該第1複合体を接触させて第2複合体を形成させる工程と、該第2複合体の形成を検出する工程とを含み、該第2複合体の形成は該病原性プリオンの存在を示す、方法。

【請求項29】

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、請求項1～22のいずれか1つに記載の第1ペプチド試薬と該試料とを、該病原性プリオンが存在する場合、これに該第1ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて第1複合体を形成させる工程と、該第1複合体から未結合の試料を除去する工程と、該第1複合体の該病原性プリオンに本発明の第2ペプチド試薬が結合できる条件下で、必要に応じて検出可能に標識された該第2ペプチド試薬と該第1複合体を接触させて第2複合体を形成させる工程と、該第2複合体の形成を検出する工程とを含み、該第2複合体の形成は該病原性プリオンの存在を示す、方法。

10

【請求項30】

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、請求項1～22のいずれか1つに記載の第1ペプチド試薬と該試料とを、該病原性プリオンが存在する場合、これに該第1ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて第1複合体を形成させる工程と、該第1複合体から未結合の試料を除去する工程と、該病原性プリオンを該第1複合体から解離させて、それによって解離された病原性プリオンを提供する工程と、該解離された病原性プリオンに請求項1に記載の第2ペプチド試薬が結合できる条件下で、必要に応じて検出可能に標識された該第2ペプチド試薬と該解離された病原性プリオンとを接触させて第2複合体を形成させる工程と、該第2複合体の形成を検出する工程とを含み、該第2複合体の形成は該病原性プリオンの存在を示す、方法。

20

【請求項31】

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、請求項1～22のいずれか1つに記載の第1ペプチド試薬と該試料とを、該病原性プリオンが存在する場合、これに該第1ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて第1複合体を形成させる工程と、該第1複合体の該病原性プリオンにプリオン結合試薬が結合できる条件下で、必要に応じて検出可能に標識された該プリオン結合試薬と該第1複合体とを接触させて第2複合体を形成させる工程と、該第2複合体の形成を検出する工程とを含み、該第2複合体の形成は該病原性プリオンの存在を示す、方法。

30

【請求項32】

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、請求項1～22のいずれか1つに記載の第1ペプチド試薬と該試料とを、該病原性プリオンが存在する場合、これに該第1ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて第1複合体を形成させる工程と、該第1複合体から未結合の試料を除去する工程と、該第1複合体の該病原性プリオンにプリオン結合試薬が結合できる条件下で、必要に応じて検出可能に標識された該プリオン結合試薬と該第1複合体とを接触させて第2複合体を形成させる工程と、該第2複合体の形成を検出する工程とを含み、該第2複合体の形成は該病原性プリオンの存在を示す、方法。

40

【請求項33】

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、請求項1～22のいずれか1つに記載の第1ペプチド試薬と該試料とを、該病原性プリオンが存在する場合、これに該第1ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて第1複合体を形成させる工程と、該第1複合体から未結合の試料を除去する工程と、該病原性プリオンを該第1複合体から解離させて、それによって解離された病原性プリオンを提供する工程と、該解離された病原性プリオンにプリオン結合試薬が結合できる条件下で、必要に応じて検出可能に標識された該プリオン結合試薬と該解離された病原性プリオンとを接触させて第2複合体を形成させる工程と、該第2複合体の形成を検出する工程とを含み、該第2複合体の形成は該病原性プリオンの存在を示す、方法。

50

【請求項34】

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 つに記載の第 1 ペプチド試薬と該試料とを、該病原性プリオンが存在する場合、これに該第 1 ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて第 1 複合体を形成させる工程と、該第 1 複合体から未結合の試料を除去する工程と、該病原性プリオンを該第 1 複合体から解離させて、それによって解離された病原性プリオンを提供する工程と、該解離された病原性プリオンにプリオン結合試薬が結合できる条件下で、該プリオン結合試薬と該解離された病原性プリオンとを接触させて第 2 複合体を形成させる工程と、必要に応じて検出可能に標識された第 2 プリオン結合試薬を用いて該第 2 複合体の形成を検出する工程とを含み、該第 2 複合体の形成は該病原性プリオンの存在を示す、方法。

【請求項 3 5】

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、プリオン結合試薬と該試料とを、該病原性プリオンが存在する場合、これに該プリオン結合試薬が結合できる条件下で接触させて第 1 複合体を形成させる工程と、該第 1 複合体から未結合の試料を除去する工程と、該第 1 複合体の該病原性プリオンに請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 つに記載のペプチド試薬が結合できる条件下で、必要に応じて検出可能に標識された該ペプチド試薬と該第 1 複合体とを接触させて第 2 複合体を形成させる工程と、該第 2 複合体の形成を検出する工程とを含み、該第 2 複合体の形成は該病原性プリオンの存在を示す、方法。

【請求項 3 6】

前記プリオン結合試薬が抗プリオン抗体を含む請求項 3 1 ~ 3 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 3 7】

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 つに記載の第 1 ペプチド試薬と該試料とを、該病原性プリオンが存在する場合、これに該第 1 ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて複合体を形成させる工程と、該複合体から未結合の試料を除去する工程と、該病原性プリオンを該複合体から解離して、それによって解離された病原性プリオンを提供する工程と、第 2 固体支持体に該解離された病原性プリオンが付着できるような条件下で、該第 2 固体支持体と該解離された病原性プリオンとを接触させる工程と、必要に応じて検出可能に標識されたプリオン結合試薬を用いて、該付着し解離された病原性プリオンを検出する工程を含み、該プリオン結合試薬の結合は該病原性プリオンの存在を示す、方法。

【請求項 3 8】

前記解離する工程が、前記複合体を高 pH または低 pH に曝露することによって実行される、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記解離する工程後、前記高 pH または低 pH を中和する工程をさらに含む、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記解離された病原性プリオンが変性される、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記プリオン結合試薬が抗プリオン抗体を含む、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 2】

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 つに記載の第 1 ペプチド試薬と該試料とを、該病原性プリオンが存在する場合、これに該第 1 ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて第 1 複合体を形成させる工程と、該第 1 複合体から未結合の試料を除去する工程と、該病原性プリオンを該第 1 複合体から解離して、それによって解離された病原性プリオンを提供する工程と、該解離された病原性プリオンが第 1 抗プリオン抗体に結合できる条件下で、該解離された病原性プリオンと該第 1 抗プリオン抗体を含む第 2 固体支持体とを接触させて第 2 複合体を形成させる工程と、必要に応じて検出可能に標識された第 2 抗プリオン抗体を用いて該第

10

20

30

40

50

2 複合体の該解離された病原性プリオンを検出する工程とを含み、該第 2 抗プリオン抗体の結合が該病原性プリオンの存在を示す、方法。

【請求項 4 3】

前記解離する工程が、前記第 1 複合体を高 pH または低 pH に曝露することによって実行される、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記解離する工程後、前記高 pH または低 pH を中和する工程をさらに含む、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記解離された病原性プリオンが変性される、請求項 4 2 に記載の方法。

10

【請求項 4 6】

前記第 1 プリオン結合試薬が抗プリオン抗体を含む請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 7】

第 2 プリオン結合試薬が抗プリオン抗体を含む請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 8】

試料中の病原性プリオンの存在を検出するための方法であって、該方法は、請求項 1 ~ 2 のいずれか 1 つに記載のペプチド試薬を含む固体支持体と、検出可能に標識されたりガンドとを、該検出可能に標識されたりガンドが該ペプチド試薬に結合できる条件下で合わせ、第 1 複合体を形成させる工程であって、ここで該固体支持体の該ペプチド試薬は該病原性プリオンよりも該リガンドに対してより弱い結合親和性を有する、工程と、該病原性プリオンが該試料中に存在する場合、該第 1 複合体の該ペプチド試薬に該病原性プリオンが結合できる条件下で該第 1 複合体と該試料を合わせ、それにより該第 1 複合体の該検出可能に標識されたりガンドを置換し、該ペプチド試薬と該病原性プリオンとを含む第 2 複合体を形成する工程と、該第 2 複合体の形成を検出する工程とを含み、該第 2 複合体の形成が該病原性プリオンの存在を示す、方法。

20

【請求項 4 9】

請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載の治療上有効量の 1 つまたはそれ以上のペプチド試薬を動物に投与することを含むプリオン関連疾患を処置または予防する方法。

【請求項 5 0】

動物のプリオン関連疾患を処置または予防する方法であって、

30

該動物における 1 つまたはそれ以上の病原性プリオンの存在を決定する工程と、

(a) 請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載の治療上有効量の 1 つまたはそれ以上のペプチド試薬を該動物に投与する工程、または

(b) 治療上有効量の 1 つまたはそれ以上の従来薬剤を該動物に投与する工程と、を包含する、方法。

【請求項 5 1】

動物のプリオン関連疾患の感染部位を決定する方法であって、

(a) 請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載のペプチド試薬を該動物に投与する工程であって、該ペプチド試薬が造影剤に連結されている、工程と

(b) 該造影剤を検出する工程であって、該造影剤の検出により該感染部位を決定する、工程と、

40

を包含する、方法。

【請求項 5 2】

動物のプリオン関連疾患を処置または予防する方法であって、

(a) 請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載のペプチド試薬を含む治療上有効量の第 1 用量を該動物に投与する工程と、

(b) 該動物に免疫反応を誘発するのに十分な量で、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載のペプチド試薬を含む第 2 用量を該動物に投与する工程と、

を包含する、方法。

【請求項 5 3】

50

動物のプリオン関連疾患を処置または予防するための、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載のペプチド試薬の使用。

【請求項 5 4】

動物のプリオン関連疾患を処置または予防する薬剤を調製するための、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載のペプチド試薬の使用。

【請求項 5 5】

動物のプリオン関連疾患の感染部位を決定するための、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載のペプチド試薬の使用。

【請求項 5 6】

試料から病原性プリオンを単離するための方法であって、

(a) 該試料中に存在する場合、該病原性プリオンを請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載のペプチド試薬に結合させることができる条件下で、該ペプチド試薬を含む固体支持体を該試料と接触させて複合体を形成する工程と、

(b) 該複合体から結合していない試料を除去し、それにより単離された病原性プリオンを提供する工程と、
を包含する、方法。

【請求項 5 7】

試料中の病原性プリオンの量を低減するための方法であって、

(a) 該試料中に存在する場合、該病原性プリオンを固体支持体の請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載のペプチド試薬に結合させることができる条件下で、該ペプチド試薬を含む固体支持体を該試料と接触させて複合体を形成する工程と、

(b) 該複合体から結合していない試料を分離し、それにより低減させた量の該病原性プリオンを有する該試料を提供する工程と、
を包含する、方法。

【請求項 5 8】

前記回収した試料中の病原性プリオンの量が検出可能なレベル未満に低減される、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記病原性プリオンの量が約 9 5 ~ 1 0 0 % 低減される、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 0】

病原性プリオンを実質的に含まない血液供給物を調製する方法であって、

(a) 複数の血液試料において病原性プリオンの有無を検出する工程であって、該検出する工程が、存在する場合、該病原性プリオンの請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載のペプチド試薬への結合を含む、工程と、

(b) 該病原性プリオンが検出されない該試料を合わせ、それにより該病原性プリオンを実質的に含まない該血液供給物を提供する工程と、
を包含する、方法。

【請求項 6 1】

病原性プリオンを実質的に含まない食料供給物を調製する方法であって、

(a) 複数の食料試料において病原性プリオンの有無を検出し、該検出する工程が、存在する場合、該病原性プリオンの請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに記載のペプチド試薬への結合を含む、工程と、

(b) 該病原性プリオンが検出されない該試料を合わせ、それにより該病原性プリオンを実質的に含まない食料供給物を提供する工程と、
を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(発明の分野)

本発明は、プリオンの検出および単離、並びにプリオン関連疾患の処置および予防にお

10

20

30

40

50

いて有効なペプチド試薬に関する。本発明は、ペプチド試薬を含む複合体、組成物およびキット、並びにこれらを調製する方法にも関する。

【背景技術】

【0002】

(背景)

プリオンタンパク質 (PrP^C) は、機能が不確かな 33 - 35 kD のタンパク質であり、ヒトにおいては、染色体 20 の短腕上の遺伝子により転写される。27 - 30 kD のプロテアーゼ耐性コア (プリオン、スクレイピータンパク質、または PrP^{Sc}) は、「プリオン病」に關与するいくつかのイソ型を有する機能性成分である。「プリオン病」は、タンパク質コンフォメーション病である。

10

【0003】

タンパク質コンフォメーション病は、タンパク質の異常な構造転位 (PrP^C などのコンフォメーション病タンパク質) により生じ、タンパク質の異常な構造転位が順番に異常なタンパク質型 (例えば、 PrP^{Sc}) の自己会合を引き起こし、その結果組織沈着および損傷を起こす。プリオン (PrP^{Sc}) は、正常な PrP^C の β -らせん構造よりむしろ実質的に β -シート構造を有し、検出可能な核酸が欠如し、一般に、免疫反応を発現しない。一般に、タンパク質コンフォメーション病は、潜伏期間の長さの変動に従って、通常、診断から死亡へ急速に進行する、著しく類似した臨床所見を共有する。

20

【0004】

ヒトでは、プリオン病は、クロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD)、ゲルストマン-ストロイスラーシャインカー症候群、致死性家族性不眠症、およびクールー病を含む「伝達性海綿状脳症」(TSE) とも呼ばれる (例えば、非特許文献 1 : 非特許文献 2 を参照のこと)。動物では、TSE はシープ・スクレイピー、ウシ海綿状脳症 (BSE)、伝達性ミンク脳症、および捕捉ミュールジカおよびヘラジカの慢性消耗性疾患を含む (非特許文献 3)。伝達性海綿状脳症は、霊長類、げっ歯類、および遺伝子導入マウスを含む実験動物に実験的に接種した時に疾患に感染させるプリオンタンパク質の異常な (β -タに富むプロテイナーゼ K 耐性) コンフォメーションが存在するという同じ特質により特徴づけられる。

30

【0005】

最近、BSE の急速な蔓延およびこの蔓延とヒトの TSE 発生の増加との相関関係が、ヒト以外の哺乳類の TSE の検出に関する関心を高めている。これらの疾患に偶発的に感染すると悲劇的な結果 (例えば、非特許文献 4 ; 非特許文献 5 を参照のこと)、除染の難しさ (非特許文献 6) となり、さらに、BSE の心配 (非特許文献 7) があるため、TSE にかかっているヒトおよび動物を識別する診断テストおよび感染した被験者の治療の両方を得ることが急がれている。

【0006】

プリオンは、細菌、ウイルス、およびウイロイドとは全く異なる。支配的な仮説は、他のすべての感染性病原体と異なり、感染は、鑄型として作用し、正常なプリオン・コンフォメーションを正常ではない異常なコンフォメーションに転換するプリオンタンパク質の異常なコンフォメーションにより引き起こされるというものである。プリオンタンパク質の特徴は、1980 年代初頭に初めて明らかにされた。(例えば、非特許文献 8 ; 非特許文献 9 ; 非特許文献 10 を参照のこと)。完全なプリオンタンパク質コード化遺伝子のクローンが作られて以来、トランスジェニック動物において遺伝子配列が決定され、発現された。(例えば、非特許文献 11 を参照のこと。)

40

プリオン病の重要な特徴は、正常な型のプリオンタンパク質 (細胞性または非病原性または PrP^C) から、異常な形をしたタンパク質 (PrP^{Sc}) を形成することである。(例えば、非特許文献 12 ; 非特許文献 13 ; 非特許文献 14 ; 非特許文献 15 参照のこと。) PrP^C の非疾患型が主としてアルファ-らせん状に折り畳まれているのに比べて、 PrP^{Sc} は実質的に β -シート構造をしていることが、光学分光法および結晶学的研

50

究により明らかにされている。(例えば、非特許文献15；非特許文献16；非特許文献17を参照のこと。)構造的変化に続いて生化学特性の変化が起こり、即ちPrP^Cは非変性洗剤に可溶であり、PrP^{S^C}は不溶であり、PrP^Cはプロテアーゼにより容易に消化され、一方、PrP^{S^C}は部分的に耐性であり、「PrPres」(非特許文献17、非特許文献18)「PrP27-30」(27-30kDA)または「PK耐性」(プロテイナーゼK耐性)型として知られているアミノ末端基で切断されたフラグメントを形成することになる。さらに、PrP^{S^C}は、PrP^Cを病原性コンフォメーションに転換することができる。例えば、非特許文献19；非特許文献20を参照のこと。

【0007】

生体中および生体から得られた試料のコンフォメーション病タンパク質の病原性イソ型の検出が、困難であることが判明している。したがって、被験者が死亡する前の、これらの伝達性でアミロイドを含む状態の確定診断および緩和治療は、実質的には未解決の難問となっている。脳生検組織の病理学検査は、被験者にとってリスクがあるが、生検試料が採取される場所によっては病変およびアミロイド沈着を避けることができる。また、動物、患者、および医療職員には生検に関わるリスクがある。さらに、動物の脳テストの結果は、動物が食料供給に入るまでは、通常、得られない。また、通常、プリオン・ペプチドに対して発生した抗体は、変性したPrP^{S^C}およびPrP^Cの両方を認識するが、伝染性(変性していない)PrP^{S^C}を優先的に認識することはできない。(例えば、非特許文献21を参照のこと)。

【0008】

TSEの多数のテストが利用可能である(非特許文献22，非特許文献23；非特許文献24、非特許文献25、非特許文献26を参照のこと)。しかし、これらのすべては、脳組織の試料を利用しており、死後のテストとしてのみ適切である。大抵が時間がかかる可能性のある試料のプロテイナーゼK処置を必要とし、その上、PrP^Cの不完全な消化により誤って正の結果をもたらすことがあり、PK感受性のPrP^{S^C}の消化により誤って負の結果をもたらすことがある。

【非特許文献1】Isselbacher R, eds. (1994). Harrison's Principles of Internal Medicine. New York

【非特許文献2】McGraw-Hill, Inc.; Medori R, N. Engl. J. Med. (1992) 326: 444-9

【非特許文献3】Gajdusek, 「Subacute Spongiform Encephalopathies: Transmissible Cerebral Amyloidoses Caused by Unconventional Viruses」In: Virology, Fields, ed., New York: Raven Press, Ltd., (1990) (pp. 2289-2324)

【非特許文献4】Gajdusek, Infectious Amyloids, and Prusiner Prions In Fields Virology. Fields, et al., eds. Philadelphia: Lippincott-Ravin, Pub. (1996)

【非特許文献5】Brown R, Lancet (1992) 340: 24-27

【非特許文献6】Asher R, In: Laboratory Safety: Principles and Practices, Miller ed., (1986) (pp. 59-71) Am. Soc. Micro

【非特許文献7】British Med. J. (1995) 311: 1415-1421

【非特許文献8】Bolton, McKinley R, Science (1982) 218: 1309-1311

【非特許文献9】Prusiner, Bolton R, Biochemistry (1982) 21: 6942-6950

10

20

30

40

50

【非特許文献10】; McKinley, Bolton, Cell (1983) 35: 57 - 62

【非特許文献11】Basler, Oesch, Cell (1986) 46: 417 - 428

【非特許文献12】Zhang, Biochem. (1997) 36(12): 3543 - 3553

【非特許文献13】Cohen & Prusiner, Ann. Rev. Biochem. (1998) 67: 793 - 819

【非特許文献14】Pan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90: 10962 - 10966

【非特許文献15】Safar, J. Biol. Chem. (1993) 268: 20276 - 20284

【非特許文献15】Wille, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 9 (2001) 9: 3563 - 3568

【非特許文献16】Peretz, J. Mol. Biol. (1997) 273: 614 - 622

【非特許文献17】Cohen & Prusiner, Structural Studies of Prion Proteins. In Prion Biology and Diseases, S. Prusiner, ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1999) 5 (pp: 191 - 228)

【非特許文献18】Baldwin, (1995)

【非特許文献19】Kaneko, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA (1995) 92: 11160 - 11164

【非特許文献20】Caughey, Br Med Bull. (2003) 66: 109 - 20

【非特許文献21】Matsunaga, Proteins: Structure, Function and Genetics (2001) 44: 110 - 118

【非特許文献22】Soto, C. Nature Reviews Microbiol. (2004) 2: 809

【非特許文献23】Biffinger, J. Virol. Meth. (2002) 101: 79

【非特許文献24】Safar, Nature Biotech. (2002) 20: 1147

【非特許文献25】Schaller, Acta Neuropathol. (1999) 98: 437

【非特許文献26】Lane, Clin. Chem. (2003) 49: 1774

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、種々の試料、例えば、生体、血液供給物、家畜ならびにヒトおよび動物へ供給する他の食料から得られた試料中の病原性プリオンタンパク質の存在を検出する組成物および方法を求めるニーズがある。プリオン関連疾患を診断し、治療するための方法および組成物を求めるニーズもある。本発明は、これら、並びに他の重要な目的に関する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

(発明の要旨)

本発明は、プリオンタンパク質などのコンフォメーション病タンパク質と反応し、コンフォメーション病タンパク質の非病原型に比べて病原型と優先的に反応し、下記化学式を有するペプチド試薬に関する。

10

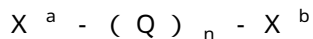
20

30

40

50

【0011】



式中、各Qは独立にアミノ酸またはN-置換グリシンであり、 $-(Q)_n-$ はペプチド領域を規定しており、

X^a は、H、 $(C_1 - C_6)$ アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、ヘテロシクロアルキル、 $(C_1 - C_6)$ アシル、アミノ $(C_1 - C_6)$ アシル、アミノ酸、アミノ保護基、または2~約100個のアミノ酸のポリペプチドであり、 X^a はリンカー部分を介して随意に連結される共役部分により随意に置換され、

X^b は、H、 $(C_1 - C_6)$ アルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、ヘテロシクロアルキル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシル、 $(C_1 - C_6)$ アルコキシ、アリールオキシ、アラルコキシ、カルボキシ保護基、アミノ酸、または2~約100個のアミノ酸のポリペプチドであり、 X^b はリンカー部分を介して随意に結合される共役部分により随意に置換され、

nは3~約30であり、

ペプチド領域 $-(Q)_n-$ の少なくとも約50%はN-置換グリシンを含む。

【0012】

本発明は、ポリオンであり、生理的に適切なpHにおいて正味荷電を有するペプチド試薬にも関する。一部の実施形態では、ペプチド試薬は生理的に適切なpHにおいて少なくとも3+または少なくとも4+の荷電などの正味正荷電を有する。正味荷電は、ペ

【0013】

本発明は、コンフォメーション病タンパク質の非病原型に比べて、コンフォメーション病タンパク質の病原型と優先的に反応するペプチド試薬にさらに関し、この試薬は、アミノ末端基領域、カルボキシ末端基領域、およびアミノ末端基領域とカルボキシ末端基領域との間に少なくとも1つのペプチド領域を有し、ペプチド領域は3~約30個のN-置換グリシンおよび随意に1つ以上のアミノ酸を含む。

【0014】

本発明は、コンフォメーション病タンパク質の非病原型に比べてコンフォメーション病タンパク質の病原型と優先的に反応するペプチド試薬をさらに供給し、該試薬は3~15個の連結するN-置換グリシンを含むペプチド領域を含み、該ペプチド領域は生理的に適切なpHにおいて正味荷電を有する。一部の実施形態では、生理的に適切なpHにおいて、正味荷電は少なくとも3+または少なくとも4+の正味荷電などの正味正荷電である。一部の実施形態では、生理的に適切なpHにおいて、ペプチド試薬は2+~6+、3+~5+、または4+の正味荷電を有する。

【0015】

本発明のペプチド試薬は、治療薬組成物または予防薬組成物の成分として、試料中の病原性プリオンを単離または検出するツール、および/またはプリオン特異性抗体を発生させるためのツールを含む広範囲の用途で使用することができる。例えば、PrP^Cに比べてPrP^{Sc}と優先的に反応するペプチド試薬は、例えば、疾患の診断または献血された血液または臓器提供された臓器の選別の場合、生体またはかつての生体から得られた試料中の病原型の直接検出に有効である。本発明のペプチド試薬は、複合体を形成する試料において何らかのPrP^{Sc}に特異的に結合させるために使用することができる。該複合体は、UV/可視分光法、FTIR、核磁気共鳴分光法、ラマン分光法、質量分析法、HPLC、キャピラリー電気泳動法、表面プラズモン共鳴分光法、マイクロ-エレクトロ-メカニカル・システム(MEMS)などの方法により直接検出できるか、または複合体中または複合体から解離後のPrP^{Sc}への追加のプリオン特異性試薬(例えば、第2ペプチド試薬またはプリオン結合試薬(本明細書で規定された))の結合により検出することができる。

【0016】

10

20

30

40

50

したがって、本発明は、試料中に病原性プリオンの存在を検出する方法に関し、該方法は、本発明の第1ペプチド試薬と試料とを、もし病原性プリオンが存在するならば、これにペプチド試薬が結合できる条件下で、接触させて複合体を形成させる工程と、複合体の形成を検出する工程とを含み、該複合体の形成は、病原性プリオンの存在を示している。

【0017】

試料中の病原性プリオンの検出方法は、本発明の第1ペプチド試薬と試料とをもし病原性プリオンが存在するならば、これに第1ペプチド試薬ができるような条件下で接触させて第1複合体を形成させる工程と、第1複合体の病原性プリオンに第2ペプチド試薬が結合できる条件下で、必要に応じて検出可能に標識された、本発明の第2ペプチド試薬と第1複合体とを接触させて、第2複合体を形成させる工程と、第2複合体の形成を検出する工程とをも含むことができ、該第2複合体の形成は、病原性プリオンの存在を示している。

10

【0018】

別の実施形態では、この方法は、本発明の第1ペプチド試薬と試料とをもし病原性プリオンが存在するならばこれに第1ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて第1複合体を形成させる工程と、結合していない試料を除去する工程と、第1複合体の病原性プリオンに第2ペプチド試薬が結合できる条件下で、必要に応じて検出可能に標識された、本発明の第2ペプチド試薬と第1複合体とを接触させ第2複合体を形成させる工程と、第2複合体の形成を検出する工程とを含み、該第2複合体の形成は、病原性プリオンの存在を示している。第1ペプチド試薬は、随意に固体支持体を含み、この支持体は未結合試料から第1複合体の分離を助長する。

20

【0019】

さらに、本発明の検出方法は、本発明の第1ペプチド試薬と試料とを、もし病原性プリオンが存在するならば、これに第1ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて第1複合体を形成させる工程と、結合していない試料を除去する工程と、病原性プリオンを第1複合体から解離させて、それによって解離された病原性プリオンを提供する工程と、解離された病原性プリオンに第2ペプチド試薬が結合できる条件下で、必要に応じて検出可能に標識された、本発明の第2ペプチド試薬と解離された病原性プリオンとを接触させて第2複合体を形成させる工程と、第2複合体の形成を検出する工程とを含み、該第2複合体の形成は、病原性プリオンの存在を示している。

30

【0020】

試料中の病原性プリオンを検出する方法はさらに、本発明の第1ペプチド試薬と試料とを、もし病原性プリオンが存在するならば、これに第1ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて第1複合体を形成させる工程と、第1複合体の病原性プリオンにプリオン結合試薬が結合できる条件下で、必要に応じて検出可能に標識された、プリオン結合試薬と第1複合体とを接触させて、第2複合体を形成させる工程と第2複合体の形成を検出する工程とを含み、第2複合体の形成は、病原性プリオンの存在を示している。

【0021】

別の実施形態では、この方法は、本発明の第1ペプチド試薬と試料とを、もし病原性プリオンが存在するならば、これに第1ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて第1複合体を形成させる工程と、結合していない試料を除去する工程と、第1複合体の病原性プリオンにプリオン結合試薬が結合できる条件下で、必要に応じて検出可能に標識された、プリオン結合試薬と第1複合体とを接触させて、第2複合体を形成させる工程と、第2複合体の形成を検出する工程とを含み、第2複合体の形成は、病原性プリオンの存在を示している。第1ペプチド試薬は、随意に固体支持体を含み、この支持体は結合していない試料から第1複合体の分離を助長する。

40

【0022】

さらに、本発明の検出方法は、本発明の第1ペプチド試薬と試料とを、もし病原性プリオンが存在するならば、これに第1ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて第

50

1 複合体を形成させる工程と、結合していない試料を除去する工程と、病原性プリオンを第1複合体から解離させる工程と、それによって、解離された病原性プリオンを提供する工程と、解離された病原性プリオンにプリオン結合試薬が結合できる条件下で、必要に応じて検出可能に標識された、プリオン結合試薬と解離された病原性プリオンとを接触させて第2複合体を形成させる工程と、第2複合体の形成を検出する工程とを含み、第2複合体の形成は病原性プリオンの存在を示している。

【0023】

別の実施形態では、本発明の検出方法は、本発明の第1ペプチド試薬と試料とを、もし病原性プリオンが存在するならば、これに第1ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて第1複合体を形成させる工程と、結合していない試料を除去する工程と、病原性プリオンを第1複合体から解離させる工程と、それによって、解離された病原性プリオンを提供する工程と、解離された病原性プリオンにプリオン結合試薬が結合できる条件下で、プリオン結合試薬と解離された病原性プリオンとを接触させて第2複合体を形成する工程と、必要に応じて検出可能に標識された第2プリオン結合試薬を用いて第2複合体の形成を検出する工程とを含み、第2複合体の形成は、病原性プリオンの存在を示している。

10

【0024】

その上、この検出方法は、プリオン結合試薬と試料とを、もし病原性プリオンが存在するならばこれに第1ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて第1複合体を形成させる工程と、未結合の試料を除去する工程と、第1複合体の病原性プリオンにペプチド試薬が結合できる条件下で、必要に応じて検出可能に標識された、請求項1~22のいずれか1つに記載のペプチド試薬と第1複合体とを接触させて第2複合体を形成させる工程と、第2複合体の形成を検出する工程とを含み、第2複合体の形成は前記病原性プリオンの存在を示している。プリオン結合試薬は、固体支持体上に随意に供給される。さらに、この検出方法は、本発明のペプチド試薬を含む固体支持体を供給し、固体支持体と、検出可能に標識されたりガンドとを、検出可能に標識されたりガンドがペプチド試薬に結合できる条件下で合わせ、第1複合体を形成させる工程であって、支持体のペプチド試薬は、病原性プリオンに対するよりもリガンドに対してより弱い結合親和性を有する工程と、病原性プリオンが試料中に存在するならば、第1複合体のペプチド試薬に病原性プリオンが結合できる条件下で第1複合体と試料を合わせる工程と、それにより第1複合体の検出可能に標識されたりガンドを置換する工程と、ペプチド試薬と病原性プリオンを含む第2複合体を形成する工程と、第2複合体の形成を検出する工程とを含み、第2複合体の形成が病原性プリオンの存在を示している。

20

30

【0025】

本発明は、試料中に病原性プリオンの存在を検出する方法をさらに提供し、第1ペプチド試薬と試料とを、もし病原性プリオンが存在するならばこれにペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて複合体を形成させる工程と、複合体から未結合の試料を除去する工程と、病原性プリオンを複合体から解離して、それによって解離された病原性プリオンを提供する工程と、第2固体支持体に解離された病原性プリオンが付着できるような条件下で、固体支持体と解離された病原性プリオンとを接触させる工程と、必要に応じて検出可能に標識されたプリオン結合試薬を用いて、付着し解離された病原性プリオンを検出する工程を含み、プリオン結合試薬の結合は病原性プリオンの存在を示している。一部の実施形態では、解離は、複合体を高pHまたは低pHに曝露することによって実行される。一部の実施形態では、この方法は、解離後高pHまたは低pHを中和する工程をさらに含む。一部の実施形態では、解離された病原性プリオンは変性される。

40

【0026】

本発明は、試料中の病原性プリオンの存在を検出する方法をさらに提供し、第1ペプチド試薬と試料とを、もし病原性プリオンが存在するならばこれに第1ペプチド試薬が結合できる条件下で接触させて第1複合体を形成させる工程と、第1複合体から未結合の試料を除去する工程と、病原性プリオンを第1複合体から解離して、それによって解離された病原性プリオンを提供する工程と、解離された病原性プリオンが第1抗プリオン抗体

50

に結合できる条件下で、解離された病原性プリオンを第1抗プリオン抗体を含む第2固体支持体と接触させて第2複合体を形成させる工程と、必要に応じて検出可能に標識された第2抗プリオン抗体を用いて第2複合体の解離された病原性プリオンを検出する工程とを含み、第2抗プリオン抗体の結合が病原性プリオンの存在を示している検出方法。一部の実施形態では、解離は第1複合体を高pHまたは低pHに曝露することによって実行される。一部の実施形態では、この方法は、解離後高pHまたは低pHを中和する工程をさらに含む。別の実施形態では、解離された病原性プリオンは変性される。

【0027】

プリオン結合試薬を利用する上の方法のすべてにおいて、プリオン結合試薬は、例えば、抗プリオン抗体である。

10

【0028】

本発明は、動物のプリオン関連感染を処置または予防する方法をさらに提供する。

【0029】

本発明は、さらに、試料中のプリオンの検出または単離に関する。

【0030】

本発明は、血液または食品などの実質的にプリオンを含まない試料の供給に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0031】

(詳細な説明)

定義

20

次のような選択用語が、本明細書の文脈において使われる。使われた形に関係なく、用語の複数形と単数形の両方が含まれる。

【0032】

病原性プリオンタンパク質の型(スクレーピータンパク質、病原性タンパク質型、病原性イソ型、病原性プリオンおよびPrP^{S^c}とも呼ばれる)と非病原性プリオン型(細胞タンパク質型、細胞イソ型、非病原性イソ型、非病原性プリオンタンパク質、およびPrP^Cとも呼ばれる)の両方、並びに病原性コンフォメーションまたは正常な細胞コンフォメーションのいずれも有しないプリオンタンパク質の変性型および種々の組み換え型を意味する「プリオン」、「プリオンタンパク質」、「PrPタンパク質」および「PrP」は互換性がある。

30

【0033】

「コンフォメーション病タンパク質」は、タンパク質の構造が変わり(例えば、異常な折り畳み構造または凝集したタンパク質)、ベータブリーツ・シートとの関連における不要な原線維またはアミロイド重合などの異常なコンフォメーションをもたらす、コンフォメーション病と関連するタンパク質の病原性および非病原性のタンパク質の型を意味している。コンフォメーション病タンパク質の例には、PrP^{S^c}とPrP^Cなどのプリオンタンパク質および免疫グロブリン軽鎖可変領域(VL)、即ちアミロイド沈着症などのコンフォメーション病と関連している抗体分子のタンパク質成分、のアミノ酸変化が無制限に含まれる。2つ以上の異なるコンフォメーションを仮定している付随タンパク質を有する疾患の非限定的なリストを以下に示している。

40

【0034】

【化6】

疾患	コンフォメーション病たんぱく質
プリオン疾患(例えば、クロイツフェルト・ヤコブ病、スクレービー、ウシ海綿状脳症)	PrP ^{Sc}
アルツハイマー病	APP, A* ペプチド, *1-アンチチモトリプシン、タン、 非A* 成分
ALS	SODおよび神経フィラメント
ピック病	ピック体
パーキンソン病	レビー小体
1型糖尿病	アミリン
多発性骨髄病-プラズマ細胞疾患	IgGL鎖
家族性アミロイド神経障害	トランスサイレチン
甲状腺のずい様がん	プロカルシトニン
慢性腎不全	ベータ2-ミクログロブリン
うっ血性心不全	心房性ナトリウム利尿因子
老人性心臓および全身性アミロイド沈着症	トランスサイレチン
慢性炎症	血清アミロイドA
アテローム性動脈硬化症	アポA1
家族性アミロイド症	ゲルゾリン

10

20

用語「プリオン」、「プリオンタンパク質」、「PrPタンパク質」、「PrP」または「コンフォメーション病タンパク質」の使用は、本明細書に記載されたポリペプチドに対して正確な配列を有するポリペプチドに限定されることを意味しない。これらの用語が、識別されたか、または識別されていない種(例えば、ヒト、ウシ)あるいは疾患(例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病など)のいずれかからのコンフォメーション病タンパク質を包含していることは明らかである。また、共同所有の特許出願である、2004年8月13日に出願された米国特許出願第10/917,646号、2005年2月11日に出願された米国特許出願第11/056,950号、および2004年8月13日に出願された国際出願PCT/US2004/026363号を参照のこと。これらの特許はすべて、「Prion-Specific Peptide Reagents」と題し、引用により全体が本明細書に組み込まれている。当業者であれば、この開示の教示および当該技術分野を考慮して、例えば、配列比較プログラム(例えば、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST))または構造的特徴またはモチーフの識別およびアラインメントを用いて他の何らかのプリオンタンパク質における本明細書で開示された配列に対応する領域を決めることができる。

30

【0035】

「病原性」は、このタンパク質が実際にこの疾患を生じるか、またはこのタンパク質がこの疾患と関連しており、したがって、この疾患が存在するときに存在することを意味している。したがって、本明細書で使われている病原性タンパク質は、必ずしも疾患の特定の原因物質であるタンパク質ではない。タンパク質の病原性は、感染性であるか、または感染性ではない。病原性コンフォメーション病タンパク質の1例はPrP^{Sc}である。したがって、用語「非病原性」は、通常は疾患を生じないか、通常は疾患を生じることと関係がないタンパク質を意味している。非病原性コンフォメーション病タンパク質の1例は、PrP^Cである。

40

【0036】

タンパク質、例えば、タンパク質フラグメントと相互作用するペプチド試薬に関連して「相互作用する」は、ペプチド試薬が、プリオンタンパク質に、特異的に、非特異的に結合し、または一部の組み合わせではプリオンタンパク質への特定および非特定の結合を意味する。ペプチド試薬は、もし非病原性イソ型に対するよりも病原性に対してより大きな親和性および/または選択性を持って結合するならば、病原性プリオンタンパク質

50

と「優先的に相互作用する」と言われる。病原性プリオンタンパク質と優先的に相互作用するペプチド試薬は、本明細書では、病原性プリオン特異性ペプチド試薬とも呼ばれる。一部の実施形態では、増加した親和性および/または特異性は、少なくとも約2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約50倍、少なくとも約100倍、少なくとも約500倍、または少なくとも約1000倍である。選択的な相互作用は、必ずしも、特定のアミノ酸またはアミノ酸代替物および/または各ペプチドのモチーフの間の相互作用を必要としない。例えば、一部の実施形態では、本発明のペプチド試薬は病原性イソ型と優先的に相互作用するが、それにも関わらず、弱い検出可能なレベル（例えば、興味のあるポリペプチドに対して示した結合の10%以下）において非病原性イソ型と結合することができる。通常、弱い結合またはバックグラウンド結合は、例えば、適切なコントロールの使用により興味のある化合物またはポリペプチドとの選択的な相互作用から容易に識別できる。一般に、本発明のペプチドは、非病原型が 10^6 倍過剰に存在しても病原性プリオンと結合する。

10

【0037】

コンフォメーション病タンパク質と相互作用するペプチド試薬に関する「親和性」または「結合親和性」は、結合の強度を意味し、解離定数(K_d)として定量的に表すことができる。結合親和性は、当業者には周知の技法を用いて測定することができる。

【0038】

「プリオン関連疾患」は、全体または一部が、病原性プリオンタンパク質（例えば、PrP^{Sc}）、例えば、限定はしないが、スクレーピー、ウシ海綿状脳症（BSE）、ネコ科の海綿状脳症、クールー病、クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）、新変異型クロイツフェルト・ヤコブ病（nvCJD）、慢性消耗性疾患（CWD）、ゲルストマン-ストロイスラ-シャインカー病（GSS）、および致死性家族性不眠症（FFI）により生じた疾患を意味している。

20

【0039】

用語「変性される」または「変性した」は、タンパク質構造に適用した時には普通の意味を有し、タンパク質がその本来の第2および第3の構造を失ったことを意味している。病原性プリオンタンパク質については、「変性した」病原性プリオンタンパク質は、もはや本来の病原性コンフォメーションを保持しておらず、したがって、このタンパク質はもはや「病原性」ではない。変性した病原性プリオンタンパク質は、変性した非病原性プリオンタンパク質に類似または同一のコンフォメーションを有する。しかし、本明細書では明確にするために、用語「変性した病原性プリオンタンパク質」は、病原性イソ型としてペプチド試薬により捕捉され、次いで変性される病原性プリオンタンパク質を意味するのに使われることとなる。

30

【0040】

「生理的に適切なpH」は、約5.5~約8.5、または約6.0~約8.0、または通常約6.5~約7.5のpHを意味している。

【0041】

「脂肪族基」は、直鎖または分岐炭化水素部分を意味している。脂肪族基は、ヘテロ原子およびカルボニル部分を含むことができる。

40

【0042】

「アルキル」は、単独で用いても、または別の基の一部として用いても、脂肪族炭化水素鎖を意味し、特に明記しない限り、1~6、1~5、1~4、または1~3個の炭素原子を含む直鎖および分岐鎖を含むが、これらに限定されない。例えば、用語「アルキル」は、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、tert-ブチル、などを包含する。

【0043】

「アルケニル」は、少なくとも1つの二重結合を有する、例えば、2~7、2~6、2~5、または2~4個の炭素原子を含むアルキル基を意味し、例えば、ビニル、アリル、2-メチル-アリル、4-ブテ-3-ニル、4-ヘキセ-5-ニル、3-メチル-ブテ-

50

2 - ニルなどを含むがこれらに限定されない。

【0044】

「アルキニル」は、少なくとも1つの三重結合を有し、例えば、2～7、2～6、2～5、または2～4個の炭素原子を含むアルキル基を意味している。アルキニル基の例には、エチニル、プロピニル、などがある。

【0045】

「アルコキシ」は、単独で用いても、または別の基の一部として用いても、化学式 - O - アルキルの基、例えば、メトキシのその普通の意味を有し、アルキルは本明細書で規定されたとおりである。

【0046】

「ハロ」または「ハロゲン」は、単独または別の基の一部として用いた場合、V I I 族元素、例えば、F、Cl、BrおよびIのその普通の意味を有する。

【0047】

「アリール」は、単独または別の基の一部として用いた場合、芳香族炭化水素系を意味し、1、2または3環、例えば、フェニル、ベンジル、ナフチル、ナフタレン、アントラセン、フェナントレニル、アントラセニル、ピレニル、などの6～20、6～14、または6～10個の環状炭素原子からなる。アリールの定義には、1つ以上の縮合非芳香族カーボシクリルまたはヘテロシクリル環、例えば、1, 2, 3, 4 - テトラヒドロナフタレンおよびインダンを含む芳香族系も含まれる。縮合非芳香族環を含むアリール基は、芳香族部分または非芳香族部分を介して結合することができる。

【0048】

「アリール - アルキル」または「アラルキル」は、化学式 - アルキル - アリール基を意味し、式中アリールおよびアルキルは本明細書の定義を有する。

【0049】

「アリールオキシ」は、化学式 - O - アリールの基、例えば、ヒドロキシフェニルのその普通の意味を有し、アリールは本明細書で規定されたとおりである。

【0050】

「アラルコキシ」は、化学式 - O - アルキル - アリール基、例えば、メトキシフェニルのその普通の意味を有し、アルコキシおよびアリールは本明細書で規定されたとおりである。

【0051】

「シクロアルキル」は、単独で用いても、または別の基の一部として用いても、環状アルキル、アルケニル、またはアルキニル基、例えば、モノ、ビ - 、トリ - 環状、縮合、架橋またはスピロ飽和炭化水素部分、例えば、3～10個の炭素原子の、例えば、シクロプロピルのその普通の意味を有する。用語「シクロアルキル - アリール」は、化学式 - アリール - シクロアルキルの基を意味し、アリールおよびシクロアルキルは本明細書で規定されたとおりである。「シクロアルキルアルキル」は、化学式 - アルキル - シクロアルキルの基、例えば、シクロプロピルメチルまたはシクロヘキシルメチル基を意味し、アルキルおよびシクロアルキルは本明細書で規定されたとおりである。

【0052】

本明細書で使われている「ヘテロアリール」基は、硫黄、酸素または窒素などの少なくとも1つのヘテロ原子を環形成メンバーとして有するヘテロ芳香族を意味している。ヘテロアリール基には、単環系および多環系（例えば、2、3または4個の縮合環を有する）がある。ヘテロアリール基には、ピリジル、ピリミジニル、ピラジニル、ピリダジニル、トリアジニル、フリル（フラニル）、キノリル、イソキノリル、チエニル、イミダゾリル、チアゾリル、インドリル、ピリル、オキサゾリル、ベンゾフリル、ベンゾチエニル、ベンズチアゾリル、イソキサゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、インダゾリル、1, 2, 4 - チアジアゾリル、イソチアゾリル、ベンゾチエニル、プリニル、カルバゾリル、ベンズイミダゾリル、インドリニル、などの非限定的な例がある。一部の実施形態では、ヘテロアリール基は、1から約20個までの炭素原子を有し、別の実施形態で

10

20

30

40

50

は、約3から約20個までの炭素原子を有する。一部の実施形態では、ヘテロアリアル基は、3～約14、3～約7、または5～6個の環形成原子を含む。一部の実施形態では、ヘテロアリアル基は、1～約4、1～約3、または1～2個のヘテロ原子を有する。

【0053】

本明細書で使われている「ヘテロシクロアルキル」は、環状化されたアルキル、アルケニル、およびアルキニル基を含む非芳香族複素環を意味し、環形成炭素原子の1つ以上がO、NまたはS原子などのヘテロ原子により置換される。「ヘテロシクロアルキル」基の例には、モルホリノ、チオモルホリノ、ピペラジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、2,3-ジヒドロベンゾフリル、1,3-ベンゾジオキサール、ベンゾ-1,4-ジオキサソール、ペリリジニル、ピロリジニル、イソキサゾリジニル、イソチアゾリジニル、ピラゾリジニル、オキサゾリジニル、チアゾリジニル、イミダゾリジニル、などがある。ヘテロシクロアルキルの定義には、非芳香族ヘテロサイクリック環、例えば、フタルイミジル、ナフタルイミジル、ならびにインドレンおよびイソインドレン基などの複素環のベンゾ誘導体に縮合した（即ち、共通した結合を有する）1つ以上の芳香族環を有する部分も含まれる。一部の実施形態では、ヘテロシクロアルキル基は、1から約20個までの炭素原子を有し、別の実施形態では、約3から約20個までの炭素原子を有する。一部の実施形態では、ヘテロシクロアルキル基は、3～約14、3～約7、または5～6個の環形成原子を含む。一部の実施形態では、ヘテロシクロアルキル基は、1～約4、1～約3、または1～2個のヘテロ原子を有する。一部の実施形態では、ヘテロシクロアルキル基は、0～3個の二重結合を有する。一部の実施形態では、ヘテロシクロアルキル基は、0～2個の二重または三重結合を含む。

【0054】

「ヘテロアリアルアルキル」は、化学式 - アルキル - ヘテロアリアル基を意味し、アルキルおよびヘテロアリアルは本明細書で規定されたとおりである。

【0055】

「アシル」は、化学式 - C(O) - アルキルの基を意味する。一部の実施形態では、アシル基は、1～10、1～8、1～6、または1～4の炭素原子を有する。

【0056】

「アミノアシル」は、化学式 - C(O) - アルキル - アミノの基を意味し、アルキルは本明細書で規定されたとおりである。

【0057】

「アルキルアミノ」は、化学式 - NH - アルキルの基を意味し、アルキルは本明細書で規定されたとおりである。

【0058】

「ジアルキルアミノ」は、化学式 - N(アルキル)₂ の基を意味し、アルキルは本明細書で規定されたとおりである。

【0059】

「ハロアルキル」は、1つ以上のハロゲンにより置換されたアルキル基を意味し、アルキルおよびハロゲンは本明細書で規定されたとおりである。

【0060】

「アルコキシャルキル」は、化学式 - アルキル - アルコキシの基を意味し、アルキルおよびアルコキシは本明細書で規定されたとおりである。

【0061】

「カルボキシャルキル」は、化学式 - アルキル - COOHの基を意味し、アルキルは本明細書で規定されたとおりである。

【0062】

「カルバミル」は、化学式 - C(O)NH₂ の基を意味する。

【0063】

「カルバミルアルキル」は、化学式 - アルキル - C(O)NH₂ の基を意味し、アルキルは本明細書で規定されたとおりである。

10

20

30

40

50

【0064】

「グアニジノアルキル」は、化学式 - アルキル - $\text{NHC} (= \text{NH}) \text{NH}_2$ の基を意味し、アルキルは本明細書で規定されたとおりである。

【0065】

「チオール」は、化学式 - SH の基を意味している。

【0066】

「アルキルチオール」は、化学式 - S - アルキルの基を意味し、アルキルは本明細書で規定されたとおりである。

【0067】

「アルキルチオアルキル」は、化学式 - アルキル - S - アルキル意味し、アルキルは本明細書で規定されたとおりである。

10

【0068】

「イミダゾリルアルキル」は、化学式 - アルキル - イミダゾリルの基を意味し、アルキルは本明細書で規定されたとおりである。

【0069】

「ピペリジルアルキル」は、化学式 - アルキル - ピペリジニルの基を意味し、アルキルは本明細書で規定されたとおりである。

【0070】

「ナフチルアルキル」は、化学式 - アルキル - ナフチルの基、例えば、(8' - ナフチル)メチルを意味し、ナフチルはその通常の意味を有し、アルキルは本明細書で規定されたとおりである。

20

【0071】

「インドリルアルキル」は、化学式 - アルキル - インドールの基、例えば、3' - インドリルエチル、および3' - インドリルメチルを意味し、インドールは、その通常の意味を有し、アルキルは本明細書で規定されたとおりである。

【0072】

「N - 含有ヘテロシクリル」は、少なくとも1つの環形成N原子を含む、何らかのヘテロアリアルまたはヘテロシクロアルキル基を指すことを意味している。N - 含有ヘテロシクリル基の例には、ピリジニル、イミダゾリル、ピペリジニル、ピペラジニル、ピロリル、インドリル、などがある。

30

【0073】

「N - 含有ヘテロシクリルアルキル」は、N - 含有ヘテロシクリルアルキルにより置換されたアルキルを指すことを意味している。

【0074】

「アミノ」および「1級アミノ」は NH_2 を意味している。「2級アミノ」は、 NHR を意味し、「3級アミノ」は NR_2 を意味し、Rは何らかの適切な置換基である。

【0075】

「アンモニウム」は、 $-\text{N}(\text{R})_3^+$ を指すものとし、Rはアルキル、シクロアルキル、アリアル、シクロアルキルアルキル、アリアルアルキルなどの何らかの適切な部分である。

40

【0076】

「アミノ酸」は、天然に存在し、遺伝学的にコード化された20の α -アミノ酸またはそれらの保護された誘導体のいずれかを指している。アミノ酸の保護された誘導体は、アミノ部分、カルボキシ部分、または側鎖部分に1つ以上の保護基を含むことができる。

【0077】

アミノ保護基の例には、ホルミル、トリチル、フタルイミド、トリクロロアセチル、クロロアセチル、プロモアセチル、ヨードアセチル、およびベンジルオキシカルボニル、4 - フェニルベンジルオキシカルボニル、2 - メチルベンジルオキシカルボニル、4 - メトキシベンジルオキシカルボニル、4 - フルオロベンジルオキシカルボニル、4 - クロロベンジルオキシカルボニル、3 - クロロベンジルオキシカルボニル、2 - クロロベンジルオ

50

キシカルボニル、2, 4 - ジクロロベンジルオキシカルボニル、4 - プロモベンジルオキシカルボニル、3 - プロモベンジルオキシカルボニル、4 - ニトロベンジルオキシカルボニル、4 - シアノベンジルオキシカルボニル、t - ブトキシカルボニル、2 - (4 - ケセニル) - イソプロポキシカルボニル、1, 1 - ジフェニルエタ - 1 - イルオキシカルボニル、1, 1 - ジフェニルプロパ - 1 - イルオキシカルボニル、2 - フェニルプロパ - 2 - イルオキシカルボニル、2 - (p - トルイル) - プロパ - 2 - イルオキシカルボニル、シクロペンタニルオキシ - カルボニル、1 - メチルシクロペンタニルオキシカルボニル、シクロヘキサニルオキシカルボニル、1 - メチルシクロヘキサニルオキシカルボニル、2 - メチルシクロヘキサニルオキシカルボニル、2 - (4 - トルイルスルホニル) - エトキシカルボニル、2 - (メチルスルホニル) エトキシカルボニル、2 - (トリフェニルホスフィン) - エトキシカルボニル、フルオレニルメトキシカルボニル(「FMOC」)、2 - (トリメチルシリル) エトキシカルボニル、アリルオキシカルボニル、1 - (トリメチルシリルメチル) プロパ - 1 - エニルオキシカルボニル、5 - ベンズイソキサリルメトキシカルボニル、4 - アセトキシベンジルオキシカルボニル、2, 2, 2 - トリクロロエトキシカルボニル、2 - エチニル - 2 - プロポキシカルボニル、シクロプロピルメトキシカルボニル、4 - (デシルオキシ) ベンジルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、1 - ピペリジルオキシカルボニルなどのウレタン型保護基；ベンゾイルメチルスルホニル基、2 - ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィン・オキサイド、および同じようなアミノ保護基がある。

10

20

30

40

50

【0078】

カルボキシ保護基の例には、メチル、p - ニトロベンジル、p - メチルベンジル、p - メトキシベンジル、3, 4 - ジメトキシベンジル、2, 4 - ジメトキシベンジル、2, 4, 6 - トリメトキシベンジル、2, 4, 6 - トリメチルベンジル、ペンタメチルベンジル、3, 4 - メチレンジオキシベンジル、ベンズヒドリル、4, 4' - ジメトキシベンズヒドリル、2, 2', 4, 4' - テトラメトキシベンズヒドリル、t - ブチル、t - アミル、トリチル、4 - メトキシトリチル、4, 4' - ジメトキシトリチル、4, 4', 4'' - トリメトキシトリチル、2 - フェニルプロパ - 2 - イル、トリメチルシリル、t - ブチルジメチルシリル、フェナシル、2, 2, 2 - トリクロロエチル、ベータ - (ジ(n - ブチル)メチルシリル)エチル、p - トルエンスルホニルエチル、4 - ニトロベンジルスルホニルエチル、アリル、シナミル、1 - (トリメチルシリルメチル) プロパ - 1 - エン - 3 - イル、および同じような部分がある。

【0079】

用いた保護基の種類は、誘導体化保護基が、残りの分子を混乱させることなく、適切なポイントで優先的に除去できる限り重要ではない。保護基の別の例は、E. Haslam, *Protecting Groups in Organic Chemistry*, (J. G. W. McOmie, ed., 1973), at Chapter 2; および T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, (1991), at Chapter 7, にある。これらの文献各々の開示は、引用により全体が本明細書に組み込まれている。

【0080】

「ペプトイド」は、一般に、少なくとも1つ、好ましくは2つ以上のアミノ酸置換基、好ましくはN - 置換グリシンを含むペプチド模倣体を指すように使われる。ペプトイドは、とりわけ、米国特許第5, 811, 387号に記載されている。

【0081】

「N - 置換グリシン」は、化学式 - (NR - CH₂ - CO) - の残基を意味し、式中、各Rは(C₂ - C₆)アルキル、ハロ(C₁ - C₆)アルキル、(C₂ - C₆)アルケニル、(C₂ - C₆)アルキニル、(C₆ - C₁₀)シクロアルキル - アリール、アミノ(C₁ - C₆)アルキル、アンモニウム(C₁ - C₆)アルキル、ヒドロキシ(C₁ - C₆)アルキル、(C₁ - C₆)アルコキシ(C₁ - C₆)アルキル、カルボキシ、カルボキ

シ (C₂ - C₆) アルキル、カルバミル、カルバミル (C₂ - C₆) アルキル、グアニジノ、グアニジノ (C₁ - C₆) アルキル、アミジノ、アミジノ (C₁ - C₆) アルキル、チオール、(C₁ - C₆) アルキルチオール、2 - 10 個の炭素原子のアルキルチオアルキル、N - 含有ヘテロシクリル、N - 含有ヘテロシクリル (C₁ - C₆) アルキル、イミダゾリル、4 - 10 個の炭素原子のイミダゾリルアルキル、ピペリジル、5 - 10 個の炭素原子のピペリジルアルキル、インドリル、9 - 15 個の炭素原子のインドリルアルキル、ナフチル、11 - 16 個の炭素原子のナフチルアルキル、およびアリール (C₁ - C₆) アルキル、から独立に選択されるものなどのような非水素部分であり、式中各 R 部分は、ハロゲン、ヒドロキシおよび (C₁ - C₆) アルコキシから独立に選択される 1 - 3 個の置換基で随意に置換されている。

10

【0082】

- (NR - CH₂ - CO) - の一部の実施形態では、R は (C₂ - C₆) アルキル、ハロ (C₁ - C₆) アルキル、(C₂ - C₆) アルケニル、(C₂ - C₆) アルキニル、(C₆ - C₁₀) シクロアルキル - アリール、アミノ (C₁ - C₆) アルキル、ヒドロキシ (C₁ - C₆) アルキル、(C₁ - C₆) アルコキシ (C₁ - C₆) アルキル、カルボキシ、カルボキシ (C₂ - C₆) アルキル、カルバミル、カルバミル (C₂ - C₆) アルキル、グアニジノ、グアニジノ (C₁ - C₆) アルキル、チオール、(C₁ - C₆) アルキルチオール、2 - 10 個の炭素原子のアルキルチオアルキル、イミダゾリル、4 - 10 個の炭素原子のイミダゾリルアルキル、ピペリジル、5 - 10 個の炭素原子のピペリジルアルキル、インドリル、9 - 15 個の炭素原子のインドリルアルキル、ナフチル、11 - 16 個の炭素原子のナフチルアルキル、ジフェニル (C₁ - C₆) アルキルまたはアリール (C₁ - C₆) アルキルであり、式中各 R 部分は、ハロゲン、ヒドロキシおよび (C₁ - C₆) アルコキシから独立に選択される 1 - 3 個の置換基で随意に置換されている。

20

【0083】

- (NR - CH₂ - CO) - の一部の実施形態では、R は (C₂ - C₆) アルキル、アミノ (C₁ - C₆) アルキル、ヒドロキシ (C₁ - C₆) アルキル、(C₁ - C₆) アルコキシ (C₁ - C₆) アルキル、グアニジノ (C₁ - C₆) アルキル、9 - 15 個の炭素原子のインドリルアルキル、11 - 16 個の炭素原子のナフチルアルキル、ジフェニル (C₁ - C₆) アルキルまたはアリール (C₁ - C₆) アルキルであり、ハロゲン、ヒドロキシおよび (C₁ - C₆) アルコキシから独立に選択される 1 - 3 個の置換基で置換されている。

30

【0084】

- (NR - CH₂ - CO) - の一部の実施形態では、R は生理的に適切な pH で荷電している部分である。生理的に適切な pH で正に荷電した R の例には、例えば、アミノ (C₁ - C₆) アルキル、アンモニウム (C₁ - C₆) アルキル、グアニジノ、グアニジノ (C₁ - C₆) アルキル、アミジノ、アミジノ (C₁ - C₆) アルキル、N - 含有ヘテロシクリル、および N - 含有ヘテロシクリル (C₁ - C₆) アルキルがあり、式中各 R 部分は、ハロゲン、C₁ - C₃ メトキシ、および C₁ - C₃ アルキルから独立に選択される 1 - 3 個の置換基で随意に置換されている。

40

【0085】

- (NR - CH₂ - CO) - の一部の実施形態では、R は生理的に適切な pH において中性である部分である。生理的に適切な pH において中性の R の例には、(C₂ - C₆) アルキル、ハロ (C₁ - C₆) アルキル、(C₂ - C₆) アルケニル、(C₂ - C₆) アルキニル、(C₆ - C₁₀) シクロアルキル - アリール、(C₁ - C₆) アルコキシ (C₁ - C₆) アルキル、2 - 10 個の炭素原子のアルキルチオアルキル、ジフェニル (C₁ - C₆) アルキルおよびアリール (C₁ - C₆) アルキルがある。別の例には、エチル、プロパ - 1 - イル、プロパ - 2 - イル、1 - メチルプロパ - 1 - イル、2 - メチルプロパ - 1 - イル、3 - フェニルプロピ - 1 - イル、3 - メチルブチル、ベンジル、4 - クロロ - ベンジル、4 - メトキシ - ベンジル、4 - メチル - ベンジル、2 - メチルチオエタ - 1 - イル、および 2, 2 - ジフェニルエチルがある。

50

【0086】

- (NR - CH₂ - CO) - の一部の実施形態では、Rはアミノ(C₁ - C₆)アルキル(例えば、アミノブチル)である。

【0087】

N - 置換グリシンの別の例には、Rがエチル、プロパ - 1 - イル、プロパ - 2 - イル、1 - メチルプロパ - 1 - イル、2 - メチルプロパ - 1 - イル、3 - フェニルプロピ - 1 - イル、3 - メチルブチル、ベンジル、4 - ヒドロキシベンジル、4 - クロロ - ベンジル、4 - メトキシ - ベンジル、4 - メチル - ベンジル、2 - ヒドロキシエチル、メルカプトエチル、2 - アミノエチル、3 - プロピオン酸、3 - アミノプロピル、4 - アミノブチル、2 - メチルチオエタ - 1 - イル、カルボキシメチル、2 - カルボキシエチル、カルバミルメチル、2 - カルバミルエチル、3 - グアニジノプロパ - 1 - イル、イミダゾリルメチル、2, 2 - ジフェニルエチルまたはインドル - 3 - イル - エチルであるものがある。

10

【0088】

N - 置換グリシンの塩類、エステル類、および保護型(例えば、FmocまたはBocなどでN - 保護された)も含まれる。

【0089】

N - 置換グリシンを含むアミノ酸代替物を作る方法は、とりわけ、米国特許第5, 811, 387号で開示され、この特許は引用により全体が本明細書に組み込まれている。

【0090】

「モノマー」または「サブユニット」は、他のモノマーに連結して鎖、例えば、ペプチドを形成することができる分子を指している。アミノ酸およびN - 置換グリシンは、モノマーの実例である。他のモノマーと連結した場合、モノマーは「残基」と呼ばれる。

20

【0091】

本明細書で使われている「ペプチド試薬」は、1つ以上の残基が、本明細書で説明したN - 置換グリシンを含み、コンフォメーション病タンパク質の病原型、特に病原性プリオンタンパク質と優先的に反応するペプチド様のポリマーを指している。N - 置換グリシンの各々を、随意にアミノ酸および/または他のアミノ酸代替物と共に直鎖または分岐鎖内に連結すると、本明細書で説明した「ペプチド試薬」を作ることができる。これらの連結は、通常ペプチド結合(即ち、アミド)を構成する。

【0092】

「ペプチド」は、ペプチド結合、即ち1つのアミノ酸のアミノ基が別のアミノ酸のカルボキシル基に連結することにより、接続された少なくとも2つのアミノ酸を含むアミド化合物を意味している。ペプチドは、本明細書では「オリゴペプチド」または「ポリペプチド」と互換性があるものとして使われ、これらの用語の使用により特定のサイズのポリマーを意味することはない。本発明で使用するのに適した非制限的な長さのペプチドには、長さ3 ~ 5残基、長さ6 ~ 10残基(またはこれらの間のいずれかの整数)、長さ11 ~ 20残基(またはこれらの間のいずれかの整数)、長さ21 ~ 75残基(またはこれらの間のいずれかの整数)、長さ75 ~ 100残基(またはこれらの間のいずれかの整数)、または長さが100より大きい残基のポリペプチドがある。通常、本発明で有用なペプチドは意図した用途に適した最大長を有することができる。このペプチドは、長さが、約2と約100との間の残基、約2と約50との間の残基、約2と約20との間の残基、約2と約10との間の残基、約2と約8との間の残基、または約2と約5との間の残基の間にある。

30

40

【0093】

ペプチド中のアミノ酸とそのアミノ酸代替物との間の「類似性」は、正確である必要はない。例えば、N - 置換グリシン残基(例えば、-(NR - CH₂ - CO) -)を用いてリジンを置換してもよく、式中Rは、アミノメチル、2 - アミノエチル、3 - アミノプロピル、4 - アミノブチル、5 - アミノペンチル、または6 - アミノヘキシルなどのアミノアルキルである。セリンは、例えば、ヒドロキシメチル、2 - ヒドロキシエチル、3 - ヒドロキシプロピル、2 - ヒドロキシプロピル、などのヒドロキシアルキル基で置換するこ

50

とができる。一般に、最初のアプローチとして、普通のアミノ酸は、類似の特性、例えば、疎水性、親水性、極性、非極性、芳香族性など、の側鎖を有するN-置換グリシン似体で置換することができる。アミノ酸置換ペプチドのさらなるテストおよび最適化は、本明細書で開示された方法により行うことができる。

【0094】

「共役部分」は、ペプチド試薬に共有結合した分子である。共役部分の例には、エフェクタ分子、基質、標識、架橋剤、結合剤、ポリマー足場材料、抗原、スペーサ分子などがある。ペプチドおよびその類似体への共役基の結合は、先行技術において十分記録されている。共役部分は、ペプチド試薬に直接または連結部分を介して結合させることができる。この種の実施形態では、共役部分は、アミノ末端基領域またはカルボキシ末端基領域においてペプチド試薬に結合する。別の実施形態では、共役部分はアミノ末端基サブユニットまたはカルボキシ末端基サブユニットなどの末端基サブユニットに結合する。この種の実施形態では、共役部分は、架橋剤または結合剤である。一部の実施形態では、共役部分はビオチンまたはメルカプト基を含む。一部の実施形態では、共役部分は検出可能な標識を含む。一部の実施形態では、ペプチド試薬は2個以上の共役基を含む。

10

【0095】

用語「標識」、「標識付の」、「検出可能な標識」、「検出可能なように標識された」は、放射性同位元素、蛍光体、発光体、化学発光体、酵素、酵素基質、酵素補助因子、酵素阻害剤、発光団、染料、金属イオン、金属ゾル、リガンド（例えば、ビオチンまたはハプテン）、蛍光ナノ粒子、金ナノ粒子、などを含むがこれらに限定されない。用語「蛍光体」は、蛍光プローブなどの検出できる範囲で蛍光を示しうる物質またはその一部を指している。本発明で使用できる標識の特定の例には、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、ウンベリフェロン、テキサスレッド、ルミノール、アクリジニウムエステル、NADPH、ベータ・ガラクトシダーゼ、セイヨウワサビ・ペルオキシダーゼ、グルコース・オキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼおよびウレアーゼがあるが、これらに限定されない。標識は、エピトープタグ（例えば、His-Hisタグ）、抗体、あるいは増幅可能なまたはそうでなければ検出可能なオリゴヌクレオチドでもよい。

20

【0096】

用語「エフェクタ化合物」は、生物学的受容体部位に結合し、そのように結合した後に生化学事象を生じるあらゆる化合物を含む。したがって、エフェクタ化合物は、治療薬並びに殺虫剤を含むがこれらに限定されない。

30

【0097】

用語「架橋剤」は、他の分子またはポリマー性足場と共有結合を形成しうる官能基を有する部分を指している。架橋剤の例には、1つ以上の末端基メルカプト、ヒドロキシル、アミノ、カルボキシル、および類似の官能基を有するものを含む。一部の実施形態では、架橋剤は、少なくとも1つのメルカプト官能基を有する。

【0098】

用語「結合剤」は、非共有相互作用を介して別の分子と、またはポリマー足場材料などの物質と結合しうる部分を指している。結合剤の一例は、ビオチンまたはその誘導体である。

40

【0099】

「リンカー部分」、「連結部分」または「リンカー」は、共役部分をペプチド試薬に連結する部分を指している。一部の実施形態では、リンカー部分は化学式 - {NH(CH₂)_mC(O)}_p - との連結領域を少なくとも1つ有する基であり、式中mは1~10であり、pは1~5である。一部の実施形態では、リンカー部分はアミノヘキサン酸(Ahx)の残基またはそのフラグメントを少なくとも1つ含む。この種の部分は、プリオンタンパク質とペプチド試薬との相互作用をさらに強め、および/またはプリオンタンパク質の検出能力をさらに強める。

【0100】

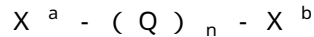
ペプチド試薬

50

本発明は、プリオンタンパク質などのコンフォメーション病タンパク質と反応するペプチド試薬、およびペプチド試薬を含む複合体、組成物およびキット、ならびにこれらを用いて PrP^{Sc} などのコンフォメーション病タンパク質を検出し、単離する方法を提供する。本発明のペプチド試薬は、タンパク質コンフォメーション病、例えば、TSE などのプリオン疾患の処置および予防、並びに病原性プリオンを実質的に含まない血液または食料を供給する方法において利用することができる。

【0101】

本発明は、下記化学式を有するコンフォメーション病タンパク質の非病原型に比べて、コンフォメーション病タンパク質の病原型と優先的に反応する、ペプチド試薬を提供する、



式中、各 Q は独立にアミノ酸または N - 置換グリシンであり、 $-(Q)_n-$ はペプチド領域を規定し、

X^a は、H、 $(C_1 - C_6)$ アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、ヘテロシクロアルキル、 $(C_1 - C_6)$ アシル、アミノ $(C_1 - C_6)$ アシル、アミノ酸、アミノ保護基、または 2 ~ 約 100 個のアミノ酸のポリペプチドであり、 X^a はリンカー部分を介して随意に結合される共役部分により随意に置換され、

X^b は、H、 $(C_1 - C_6)$ アルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、ヘテロシクロアルキル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシル、 $(C_1 - C_6)$ アルコキシ、アリールオキシ、アラルコキシ、カルボキシ保護基、アミノ酸、または 2 ~ 約 100 個のアミノ酸のポリペプチドであり、 X^b はリンカー部分を介して随意に結合される共役部分により随意に置換され、

n は 3 ~ 約 30 (即ち、n は 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または 30 以上であり)、

ペプチド領域 $-(Q)_n-$ の少なくとも約 50% は N - 置換グリシンを含む。

【0102】

一部の実施形態では、各 Q は独立に N - 置換グリシンである。

【0103】

一部の実施形態では、ペプチド試薬は $X^a - (Q)_n - X^b$ の化学式有し、n は約 4 ~ 約 30、好ましくは約 5 ~ 約 30 であり、ペプチド領域 $-(Q)_n-$ の少なくとも約 50% は N - 置換グリシンを含む。ただし、ペプチド領域 $-(Q)_n-$ は、

- (a) - A A B A - ;
- (b) - A A B A B - ;
- (c) - A B A C C - ;
- (d) - A A A A A - ;
- (e) - A B C B A - ;
- (f) - A A B C A - ; または
- (g) - A B A B A - ;

から独立に選択される少なくとも 1 つの小領域を含むという条件付である。式中、A、B および C は、各々異なる N - 置換グリシンである。

【0104】

一部の実施形態では、 X^a は、 $(C_1 - C_6)$ アシルまたはアミノ $(C_1 - C_6)$ アシルであり、各々は、連結部分を介して随意に結合している共役部分により随意に置換されている。

【0105】

一部の実施形態では、 X^a は、 $(C_1 - C_6)$ アシルまたはアミノ $(C_1 - C_6)$ アシルであり、各々は、架橋試薬または結合試薬から選択される共役部分により随意に置換され、各々はリンカー部分を介して随意に結合している。

10

20

30

40

50

【0106】

一部の実施形態では、 X^a は、 $(C_1 - C_6)$ アシルまたはアミノ $(C_1 - C_6)$ アシルであり、各々は、ビオチンまたはメルカプトから選択される共役部分により随意に置換され、該共役部分は連結部分を介して随意に結合している。

【0107】

一部の実施形態では、 X^b は、リンカー部分を介して随意に結合している共役部分により随意に置換されたアミノ酸である。

【0108】

一部の実施形態では、 X^b は、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノである。

【0109】

一部の実施形態では、 X^b はアミノである。

10

【0110】

一部の実施形態では、 n は、約5～約15、5～約10、または6である。

【0111】

一部の実施形態では、 n は、4～10、4～8、5～7または6である。

【0112】

一部の実施形態では、 X^b は、共役部分により随意に置換されたアミノ酸であり、 n は6である。

【0113】

一部の実施形態では、リンカー部分は、化学式 $- \{ NH(CH_2)_m C(O) \}_p -$ を有する領域を含む。

20

【0114】

一部の実施形態では、 m は1～10である。

【0115】

一部の実施形態では、 m は1～8である。

【0116】

一部の実施形態では、 m は5である。

【0117】

一部の実施形態では、 p は1～5である。

【0118】

一部の実施形態では、 p は1～3である。

30

【0119】

一部の実施形態では、 p は1または2である。

【0120】

一部の実施形態では、 X^b は、リンカー部分を介して随意に結合している共役部分により随意に置換されたアミノ酸であり、 n は6である。

【0121】

一部の実施形態では、 X^b は、アミノ、アルキルアミノ、またはジアルキルアミノであり、 X^a は、H、 $(C_1 - C_6)$ アルキル、 $(C_1 - C_6)$ アシル、アミノ $(C_1 - C_6)$ アシル、アミノ酸、またはアミノ保護基であり、 X^a は、共役部分により置換され、該共役部分はリンカー部分を介して随意に連結され、 n は6である。

40

【0122】

一部の実施形態では、 X^b は、アミノ、アルキルアミノ、またはジアルキルアミノであり、 X^a は、H、 $(C_1 - C_6)$ アルキル、 $(C_1 - C_6)$ アシル、アミノ $(C_1 - C_6)$ アシル、アミノ酸、またはアミノ保護基であり、 X^a は、架橋剤または結合剤から選択される共役部分により置換され、該共役部分はリンカー部分を介して随意に結合しており、 n は6である。

【0123】

一部の実施形態では、 X^b は、アミノ、アルキルアミノ、またはジアルキルアミノであり、 X^a は、H、 $(C_1 - C_6)$ アルキル、 $(C_1 - C_6)$ アシル、アミノ $(C_1 - C_6)$

50

アシル、アミノ酸、またはアミノ保護基であり、 X^a は、ビオチンまたはメルカプトを含む共役部分により置換され、共役部分はリンカー部分を介して随意に連結しており、該リンカー部分の少なくとも一部は化学式 - $\{NH(CH_2)_mC(O)\}_p$ - を有し、 n は 6 であり、 m は 1 ~ 10 であり、 p は 1 ~ 5 である。

【0124】

一部の実施形態では、各 Q は独立にアミノ酸または化学式 - $(NR-CH_2-CO)$ - を有する N - 置換グリシンであり、式中各 R は、 (C_2-C_6) アルキル、ハロ (C_1-C_6) アルキル、 (C_2-C_6) アルケニル、 (C_2-C_6) アルキニル、 (C_6-C_{10}) シクロアルキル - アリール、アミノ (C_1-C_6) アルキル、アンモニウム (C_1-C_6) アルキル、ヒドロキシ (C_1-C_6) アルキル、 (C_1-C_6) アルコキシ (C_1-C_6) アルキル、カルボキシ、カルボキシ (C_2-C_6) アルキル、カルバミル、カルバミル (C_2-C_6) アルキル、グアニジノ、グアニジノ (C_1-C_6) アルキル、アミジノ、アミジノ (C_1-C_6) アルキル、チオール、 (C_1-C_6) アルキルチオール、2 - 10 個の炭素原子のアルキルチオアルキル、N - 含有ヘテロシクリル、N - 含有ヘテロシクリル (C_1-C_6) アルキル、イミダゾリル、4 - 10 個からなる炭素原子のイミダゾリルアルキル、ピペリジル、5 - 10 個の炭素原子のピペリジルアルキル、インドリル、9 - 15 個の炭素原子のインドリルアルキル、ナフチル、11 - 16 個からなる炭素原子のナフチルアルキル、およびアリール (C_1-C_6) アルキルから独立に選択され、式中各 R 部分は、ハロゲン、ヒドロキシおよび (C_1-C_6) アルコキシから独立に選択される 1 - 3 個の置換基で随意に置換されている。

10

20

【0125】

一部の実施形態では、各 Q は独立にアミノ酸または化学式 - $(NR-CH_2-CO)$ - を有する N - 置換グリシンであり、式中各 R は、 (C_2-C_6) アルキル、ハロ (C_1-C_6) アルキル、 (C_2-C_6) アルケニル、 (C_2-C_6) アルキニル、 (C_6-C_{10}) シクロアルキル - アリール、アミノ (C_1-C_6) アルキル、ヒドロキシ (C_1-C_6) アルキル、 (C_1-C_6) アルコキシ (C_1-C_6) アルキル、カルボキシ、カルボキシ (C_2-C_6) アルキル、カルバミル、カルバミル (C_2-C_6) アルキル、グアニジノ、グアニジノ (C_1-C_6) アルキル、チオール、 (C_1-C_6) アルキルチオール、2 - 10 個の炭素原子のアルキルチオアルキル、イミダゾリル、4 - 10 個の炭素原子のイミダゾリルアルキル、ピペリジル、5 - 10 個の炭素原子のピペリジルアルキル、インドリル、9 - 15 個の炭素原子のインドリルアルキル、ナフチル、11 - 16 個の炭素原子のナフチルアルキル、ジフェニル (C_1-C_6) アルキルまたはアリール (C_1-C_6) アルキルから独立に選択され、式中各 R 部分は、ハロゲン、ヒドロキシおよび (C_1-C_6) アルコキシから独立に選択される 1 - 3 個の置換基で随意に置換されている。

30

【0126】

一部の実施形態では、各 Q は独立にアミノ酸または化学式 - $(NR-CH_2-CO)$ - の N - 置換グリシンであり、式中各 R は、 (C_2-C_6) アルキル、アミノ (C_1-C_6) アルキル、ヒドロキシ (C_1-C_6) アルキル、 (C_1-C_6) アルコキシ (C_1-C_6) アルキル、グアニジノ (C_1-C_6) アルキル、9 - 15 個の炭素原子のインドリルアルキル、11 - 16 個の炭素原子のナフチルアルキル、ジフェニル (C_1-C_6) アルキルまたはアリール (C_1-C_6) アルキルから独立に選択され、ハロゲン、ヒドロキシおよび (C_1-C_6) アルコキシから独立に選択される 1 - 3 個の置換基で置換されている。

40

【0127】

一部の実施形態では、各 Q は独立にアミノ酸または N - (4 - アミノブチル) グリシン、N - (1 - フェニルエチル) グリシン、N - (2 - アミノエチル) グリシン、N - (2 - [4 - メトキシフェニル] エチル) グリシン、N - (2 - メトキシエチル) グリシン、N - (2 - ヒドロキシエチル) グリシン、N - ((1H - インドール - 3 - イル) メチル) グリシン、または N - ベンジルグリシンから選択される N - 置換グリシンである。

【0128】

50

一部の実施形態では、各 Q は独立にアミノ酸または N - (4 - アミノブチル) グリシンまたは N - ベンジルグリシンから選択される N - 置換グリシンである。

【 0 1 2 9 】

一部の実施形態では、各 Q は独立に N - 置換グリシンである。

【 0 1 3 0 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - は、少なくとも 3 または少なくとも 4 個の N - 置換グリシンを含み、該グリシンは生理的に適切な pH において荷電している。一部の実施形態では、この荷電は正である。一部の実施形態では、ペプチド領域の残りの N - 置換グリシンは生理的に適切な pH において中性である。

【 0 1 3 1 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - は、2 ~ 6、3 ~ 5、または 4 個の N - 置換グリシンを含み、該グリシンは生理的に適切な pH において荷電している。一部の実施形態では、この荷電は正である。一部の実施形態では、ペプチド領域の残りの N - 置換グリシンは生理的に適切な pH において中性である。

【 0 1 3 2 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - の 2 個の N - 置換グリシン残基が、生理的に適切な pH において正に荷電しており、ペプチド領域の残りの N - 置換グリシン残基が生理的に適切な pH において中性である。

【 0 1 3 3 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - の 3 個の N - 置換グリシン残基が、生理的に適切な pH において正に荷電しており、ペプチド領域の残りの N - 置換グリシン残基が生理的に適切な pH において中性である。

【 0 1 3 4 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - の 4 個の N - 置換グリシン残基が、生理的に適切な pH において正に荷電しており、ペプチド領域の残りの N - 置換グリシン残基が生理的に適切な pH において中性である。

【 0 1 3 5 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - の 5 個の N - 置換グリシン残基が、生理的に適切な pH において正に荷電しており、ペプチド領域の残りの N - 置換グリシン残基が生理的に適切な pH において中性である。

【 0 1 3 6 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - は生理的に適切な pH においてポリイオン性である。

【 0 1 3 7 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - は生理的に適切な pH においてポリカチオン性である。

【 0 1 3 8 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - は生理的に適切な pH においてポリアニオン性である。

【 0 1 3 9 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - は生理的に適切な pH において少なくとも 3 + の正味荷電を有する。

【 0 1 4 0 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - は生理的に適切な pH において少なくとも 4 + の正味荷電を有する。

【 0 1 4 1 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - は生理的に適切な pH において 2 + ~ 6 + の正味荷電を有する。

【 0 1 4 2 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - は生理的に適切な pH において 3 +

10

20

30

40

50

~ 5 + の正味荷電を有する。

【 0 1 4 3 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - は生理的に適切な pH において 4 + の正味荷電を有する。

【 0 1 4 4 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - は、生理的に適切な pH において正に荷電している少なくとも 3 個の N - 置換グリシンを含む。

【 0 1 4 5 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - は、生理的に適切な pH において正に荷電している少なくとも 4 個の N - 置換グリシンを含む。

10

【 0 1 4 6 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - は、生理的に適切な pH において正に荷電している 2 ~ 6 個の N - 置換グリシンを含む。

【 0 1 4 7 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - は、生理的に適切な pH において正に荷電している 3 ~ 5 個の N - 置換グリシンを含む。

【 0 1 4 8 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - は、生理的に適切な pH において正に荷電している 4 個の N - 置換グリシンを含む。

【 0 1 4 9 】

一部の実施形態では、ペプチド領域 - (Q)_n - の N - 置換グリシンは化学式 - (N R - C H₂ - C O) - を有し、式中 R は、(C₂ - C₆) アルキル、ハロ (C₁ - C₆) アルキル、(C₂ - C₆) アルケニル、(C₂ - C₆) アルキニル、(C₆ - C₁₀) シクロアルキル - アリール、アミノ (C₁ - C₆) アルキル、アンモニウム (C₁ - C₆) アルキル、ヒドロキシ (C₁ - C₆) アルキル、(C₁ - C₆) アルコキシ (C₁ - C₆) アルキル、カルボキシ、カルボキシ (C₂ - C₆) アルキル、カルバミル、カルバミル (C₂ - C₆) アルキル、グアニジノ、グアニジノ (C₁ - C₆) アルキル、アミジノ、アミジノ (C₁ - C₆) アルキル、チオール、(C₁ - C₆) アルキルチオール、2 - 10 個の炭素原子のアルキルチオアルキル、N - 含有ヘテロシクリル、N - 含有ヘテロシクリル (C₁ - C₆) アルキル、イミダゾリル、4 - 10 個の炭素原子のイミダゾリルアルキル、ピペリジル、5 - 10 個の炭素原子のピペリジルアルキル、インドリル、9 - 15 個の炭素原子のインドリルアルキル、ナフチル、11 - 16 個の炭素原子のナフチルアルキル、およびアリール (C₁ - C₆) アルキルから独立に選択され、式中各 R 部分は、ハロゲン、ヒドロキシおよび (C₁ - C₆) アルコキシから独立に選択される 1 - 3 個の置換基で随意に置換され、ペプチド領域 - (Q)_n - は、少なくとも 3、少なくとも 4、2 ~ 6、3 ~ 5、または 4 個の N - 置換グリシンを含み、式中 R は生理的に適切な pH において荷電している部分である。

20

30

【 0 1 5 0 】

一部の実施形態では、ペプチド試薬の N - 置換グリシンはすべて連続する。

【 0 1 5 1 】

一部の実施形態では、ペプチド試薬は、少なくとも 1 つの共役部分を含む。

40

【 0 1 5 2 】

一部の実施形態では、ペプチド試薬は、リンカー部分を介して結合した少なくとも 1 つの共役部分を含む。

【 0 1 5 3 】

本発明は、コンフォメーション病タンパク質の非病原型に比べてコンフォメーション病タンパク質の病原型と優先的に反応するペプチド試薬をさらに提供し、該ペプチド試薬はアミノ末端基領域、カルボキシ末端基領域、およびアミノ末端基領域とカルボキシ末端基領域との間に少なくとも 1 つのペプチド領域を含み、該ペプチド試薬が約 3 ~ 約 30 個の N - 置換グリシンおよび随意に 1 つ以上のアミノ酸を含む。一部の実施形態では

50

、ペプチド領域は、約 4 ~ 約 30 個、または約 5 ~ 約 30 個の N - 置換グリシンを含む。
 一部の実施形態では、ペプチド領域は、約 4 ~ 約 30 個、または約 5 ~ 約 30 個の N - 置換グリシンおよび

- (a) - A A B A - ;
- (b) - A A B A B - ;
- (c) - A B A C C - ;
- (d) - A A A A A - ;
- (e) - A B C B A - ;
- (f) - A A B C A - ; または
- (g) - A B A B A - ;

10

から選択されるペプチド小領域を含み、式中 A、B および C は、各々異なる N - 置換グリシンであり、各小領域配列は、アミノ末端基からカルボキシ末端基の方向に左から右へ読む。

【 0 1 5 4 】

一部の実施形態では、ペプチド領域は、約 50 ~ 約 100 %、約 75 ~ 約 100 %、または 100 % の N - 置換グリシンを含む。

【 0 1 5 5 】

一部の実施形態では、ペプチド領域は、サブユニットの数で約 5 ~ 約 50、約 5 ~ 約 30、約 5 ~ 約 15、約 5 ~ 約 7、または 6 個のサブユニット長である。

【 0 1 5 6 】

一部の実施形態では、ペプチド試薬は、全長で、約 5 ~ 約 50、約 5 ~ 約 30、約 5 ~ 約 15、または約 6 ~ 約 9 個のサブユニットを有する。

20

【 0 1 5 7 】

一部の実施形態では、少なくとも 1 つのペプチド領域は、ペプチド試薬の全長の約 50 % より大きく、約 75 % より大きく、または約 90 % より大きい。

【 0 1 5 8 】

一部の実施形態では、N - 置換グリシンはすべてペプチド領域において連結する。

【 0 1 5 9 】

一部の実施形態では、ペプチド領域の N - 置換グリシンは、化学式 - (N R - C H ₂ - C O) - を有し、式中 R は本明細書を通して規定されたとおりである。

30

【 0 1 6 0 】

一部の実施形態では、ペプチド領域は、生理的に適切な pH においてポリオン性であり、荷電したペプチド領域については本明細書をとおして説明したいずれかの実施形態に記載の特性を有する。

【 0 1 6 1 】

本発明は、コンフォメーション病タンパク質の非病原型に比べてコンフォメーション病タンパク質の病原型と優先的に反応するペプチド試薬をさらに提供し、該試薬は 3 ~ 15 個の連結する N - 置換グリシンを含むペプチド試薬を含み、該ペプチド領域は生理的に適切な pH において正味の荷電を有する。一部の実施形態では、正味荷電は、生理的に適切な pH において少なくとも 3 + または少なくとも 4 + などの正味の正荷電である。一部の実施形態では、ペプチド試薬自身は、生理的に適切な pH において 2 + ~ 6 +、3 + ~ 5 +、または 4 + の正味荷電を有する。

40

【 0 1 6 2 】

一部の実施形態では、ペプチド領域の連結する N - 置換グリシンの少なくとも 2、少なくとも 3、または少なくとも 4 個が生理的に適切な pH において荷電している。別の実施形態では、ペプチド領域の連結する N - 置換グリシンの少なくとも 2 個が、1 級アミノ、2 級アミノ、3 級アミノ、アンモニウム (4 級アミノ)、グアニジノ、アミジノ、または N - 含有ヘテロシクリルから選択される少なくとも 1 つの部分を含む。

【 0 1 6 3 】

さらに別の実施形態では、ペプチド領域の連結する N - 置換グリシンの少なくとも 2

50

個が、1級アミノ、2級アミノ、アンモニウム、グアニジノ、アミジノ、またはN-含有ヘテロシクリルから選択される少なくとも1つのN-置換基を含む。

【0164】

さらに別の実施形態では、連続するN-置換グリシンの少なくとも2個が、本明細書で提示された定義によるR基であるN-置換基を含む。

【0165】

さらに別の実施形態では、ペプチド試薬は、6個の連結するN-置換グリシンのペプチド領域を含み、ペプチド試薬自身は、生理的に適切なpHにおいて3+または4+の正味荷電を有する。

【0166】

本発明は、ペプチド試薬を作り、病原性プリオンタンパク質を検出するためにペプチド試薬を用いる方法、ペプチド試薬を用いて病原性プリオンタンパク質を単離する方法、試料から病原性プリオンタンパク質を除去または低減する方法、および種々の方法を行うためのコンポーネントを含むキットも提供する。

【0167】

「ペプチド試薬」は、アミノ末端基領域、カルボキシ末端基領域およびアミノ末端基領域とカルボキシ末端基領域との間にある少なくとも1つの「ペプチド領域」を有するペプチド分子を指している。アミノ末端基領域は、通常N-置換グリシンを全く含まない該試薬のアミノ末端側の領域を指している。アミノ末端基領域は、H、アルキル、置換アルキル、アシル、アミノ保護基、アミノ酸、ペプチド、などでよい。一部の実施形態では、アミノ末端基領域は、X^aに相当する。カルボキシ末端基領域は、N-置換グリシンを含まないペプチドのカルボキシ末端基上の領域を指している。カルボキシ末端基領域は、H、アルキル、アルコキシ、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、カルボキシ保護基、アミノ酸、ペプチドなどを含む。一部の実施形態では、カルボキシ末端基領域はX^bに相当する。一部の実施形態では、ペプチド試薬の全長は、約5~約50サブユニット、約5~約30サブユニット、約5~約15サブユニット、または約6~約9サブユニットである。一部の実施形態では、ペプチド試薬はカルボキシ末端基アミドである。ペプチド領域は、一般に、ペプチド試薬の一部を指し、該試薬ではその中の少なくとも3個のアミノ酸がN-置換グリシンで置換されている。

【0168】

「ペプチド領域」(本明細書では「-(Q)_n-」とも表される)は、アミノ末端基に最も近いN-置換グリシンを含み該グリシンで始まり、カルボキシ末端基に最も近いN-置換グリシンを含み該グリシンで終わる。一部の実施形態では、ペプチド領域は、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%、または100%のN-置換グリシンを含む。一部の実施形態では、ペプチド領域は、約25~約100%、約50~約100%、約75~約100%のN-置換グリシンを含む。一部の実施形態では、ペプチド領域は、100%のN-置換グリシンを含む。一部の実施形態では、ペプチド領域は、該ペプチド試薬の全長の約50%より大きい(例えば、約50-100%)。一部の実施形態では、ペプチド領域は、該ペプチド試薬の全長の約60%より大きい(例えば、約60-100%)。一部の実施形態では、ペプチド領域は、該ペプチド試薬の全長の約75%より大きい(例えば、約75-100%)。一部の実施形態では、ペプチド領域は、該ペプチド試薬の全長の約90%より大きい(例えば、約90-100%)。一部の実施形態では、ペプチド領域は、該ペプチド試薬の全長の100%である。

【0169】

一部の実施形態では、ペプチド領域は少なくとも3個のN-置換グリシンを含む。一部の実施形態では、ペプチド領域は少なくとも4個のN-置換グリシンを含む。一部の実施形態では、ペプチド領域は少なくとも5個のN-置換グリシンを含む。一部の実施形態では、ペプチド領域は少なくとも6個のN-置換グリシンを含む。一部の実施形態

10

20

30

40

50

では、ペプチド領域は3～約30、約5～約30個のN-置換グリシン、および随意に1つ以上のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、ペプチド領域は、約5～約50、5～約30、5～約15、5～約10、5～約9、5～約8、5～約7個のサブユニット長である。一部の実施形態では、ペプチド領域は、3、4、5、6、7、8、9、または10個のサブユニット長である。一部の実施形態では、ペプチド領域は6個のサブユニット長である。一部の実施形態では、ペプチド領域のN-置換グリシンのすべては連結する。一部の実施形態では、ペプチド領域のサブユニットのすべては、N-置換グリシンである。

【0170】

別の実施形態では、ペプチド試薬は、4～12、4～10、4～9、4～8、5～7、または6個の連結するN-置換グリシンのペプチド領域を含む。

10

【0171】

一部の実施形態によれば、ペプチド領域は生理的に適切なpHにおいてポリイオン性である。用語「ポリイオン性」は、ペプチド領域が、生理的に適切なpHにおいて荷電している2個以上の残基を含むことを意味している。一部の実施形態では、ペプチド領域は生理的に適切なpHにおいて、ペプチド試薬はポリカチオン性またはポリアニオン性である。別の実施形態では、ペプチド領域は、生理的に適切なpHにおいて、少なくとも3+または少なくとも4+の正味荷電を有する。さらに別の実施形態では、ペプチド領域は、生理的に適切なpHにおいて2+～6+、3+～5+、または4+の正味荷電を有する。

20

【0172】

荷電しているN-置換グリシン残基の非限定的な例には、N-(5-アミノペンチル)グリシン、N-(4-アミノブチル)グリシン、N-(3-アミノプロピル)グリシン、N-(2-アミノエチル)グリシン、N-(5-グアニジノペンチル)グリシン、N-(4-グアニジノブチル)グリシン、N-(3-グアニジノプロピル)グリシン、およびN-(2-グアニジノエチル)グリシンがある。

【0173】

一部の実施形態では、ペプチド領域は、生理的に適切なpHにおいて正に荷電している少なくとも3または少なくとも4個のN-置換グリシンを含む。

【0174】

一部の実施形態では、ペプチド領域は、生理的に適切なpHにおいて正に荷電している2～6、3～5、または4個のアミノN-置換グリシンを含む。

30

【0175】

一部の実施形態では、ペプチド領域は、化学式-(NR-CH₂-CO)-を有し、残基の少なくとも3、少なくとも4、2～6、3～5、または4個が、生理的に適切なpHにおいて荷電している。

【0176】

一部の実施形態では、ペプチド領域の荷電残基が、化学式-(NR-CH₂-CO)-を有し、式中Rはアミノ(C₁-C₆)アルキル、アンモニウム(C₁-C₆)アルキル、グアニジノ、グアニジノ(C₁-C₆)アルキル、アミジノ、アミジノ(C₁-C₆)アルキル、N-含有ヘテロシクリル、およびN-含有ヘテロシクリル(C₁-C₆)アルキルから独立に選択され、式中各R部分は、ハロゲン、(C₁-C₃)メトキシ、および(C₁-C₃)アルキルから独立に選択される1-3個の置換基で随意に置換される。一部の実施形態では、Rはアミノブチルなどのアミノ(C₁-C₆)アルキルである。

40

【0177】

一部の実施形態では、ペプチド試薬は、生理的に適切なpHにおいて少なくとも3+または少なくとも4+の正味荷電を有する。さらに別の実施形態では、ペプチド試薬は、生理的に適切なpHにおいて2+～6+、3+～5+、または4+の正味荷電を有する。

【0178】

50

ペプチド試薬のペプチド領域は少なくとも1つのペプチド小領域を含み、該小領域は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12以上の残基の連結するN-置換グリシンの配列を指している。一部の実施形態では、ペプチド領域は、

- (a) - A A B A - ;
- (b) - A A B A B - ;
- (c) - A B A C C - ;
- (d) - A A A A A - ;
- (e) - A B C B A - ;
- (f) - A A B C A - ; または
- (g) - A B A B A - ;

から独立に選択される少なくとも1つのペプチド小領域を含む。

【0179】

A、BおよびCは、各々異なるN-置換グリシンを表している。例えば、小領域に存在している各Aは特定のN-置換グリシンを指し、小領域に存在している各Bは別の特定のN-置換グリシンを指しているが、AとBとは互いに異なる。したがって、CはAかBのいずれかと異なるN-置換グリシンである。小領域配列は、アミノからカルボキシ方向に、即ち左から右へ、読むことを意味している。一部の実施形態では、Aが疎水性残基である場合は、Bは親水性残基であり、逆の場合も同じである。一部の実施形態では、ペプチド小領域は均一であり、即ちただ1つの型のN-置換グリシンを含む。一部の実施形態では、Aが脂肪族残基である場合は、Bは環状残基である。一部の実施形態では、Bが脂肪族残基である場合は、Aは環状残基である。一部の実施形態では、AとBとの両方が脂肪族である。一部の実施形態では、AとBとは脂肪族であり、Cは環状である。一部の実施形態では、N-置換グリシンはすべて小領域 - A A B A -、例えば、- (N - (2 - メトキシエチル)グリシン)₂ - N - (4 - アミノブチル)グリシン - (N - (2 - メトキシエチル)グリシン) - などの脂肪族であり、式中AはN - (2 - メトキシエチル)グリシンであり、BはN - (4 - アミノブチル)グリシンである。

【0180】

一部の実施形態では、ペプチド領域は、トリペプチド、即ち3個の連結するN-置換グリシンである。トリペプチドペプチド小領域の例には、- (N - (2 - (4 - ヒドロキシフェニル)エチル)グリシン)₂ - N - (4 - グアニジノブチル)グリシン、- N - (4 - アミノブチル)グリシン - (V)₂ - があり、式中VはN - ベンジルグリシンまたはN - (2 - メトキシエチル)グリシン -、N - ベンジルグリシン - W - N - ベンジルグリシンであり、式中WはN - (4 - アミノブチル)グリシンまたはN - (2 - メトキシエチル)グリシン、および - N - (4 - アミノエチル)グリシン - (N - (2 - (4 - メトキシフェニル)エチル)グリシン)₂ - である。一部の実施形態では、トリペプチド小領域は、少なくとも1つの脂肪族残基および1つの環状残基、例えば、(A)₂ - B、B₂ - A、またはB - A - Bを含み、式中Aは脂肪族残基、Bは環状残基である。

【0181】

一部の実施形態では、ペプチド領域はN - (4 - アミノブチル)グリシン - (S) - N - (1 - フェニルエチル)グリシン・ジペプチドなどのジペプチドである。

【0182】

一部の実施形態では、ペプチド試薬は、本明細書で後に示す、配列番号229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、または241から選択される配列を含む。一部の実施形態では、ペプチド試薬は、配列番号229、230、232、233、234、235、237、238、239、または240から選択される配列を含む。一部の実施形態では、ペプチド試薬は、配列番号229、230、235、237、238、239、または240から選択される配列を含む。一部の実施形態では、ペプチド試薬は、配列番号230、237、238、239、または240から選択される配列を含む。一部の実施形態では、本発明は、ペプチド試薬I、II、VII、IX、X、XIa、XIb、XIIa、またはXIIbを

10

20

30

40

50

含む。一部の実施形態では、本発明は、ペプチド試薬 I I、I X、X、X I a、X I b、X I I a、または X I I b を含む。

【 0 1 8 3 】

本発明のペプチド試薬は、コンフォメーション病タンパク質のペプチド・フラグメントのアミノ酸を N - 置換グリシンにより置換することによりコンセプトを巧みに処理することができる。親ペプチド・フラグメントは、コンフォメーション病タンパク質に結合できるのが好ましい。親ペプチド・フラグメントの例には、下記配列番号の配列を有するものがある。

【 0 1 8 4 】

【 数 1 】

12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162,

10

20

【 0 1 8 5 】

【 数 2 】

163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, および 228

一部の実施形態では、ペプチド・フラグメントの少なくとも 1 つの非プロリン残基は、N - 置換グリシンにより置換され、ペプチド試薬を形成する。一部の実施形態では、ペプチド・フラグメントの少なくとも 3 個のアミノ酸残基が、各々、N - 置換グリシンにより置換され、ペプチド試薬を形成する。一部の実施形態では、少なくとも 5 個のアミノ酸残基が N - 置換グリシンにより置換される。

30

【 0 1 8 6 】

一部の実施形態では、コンフォメーション病タンパク質はプリオンタンパク質である。例えば、ペプチド・フラグメントは、2004年8月13日に出願された共同所有の特許出願である米国特許出願第 10 / 9 1 7 , 6 4 6 号、2005年2月11日に出願された米国特許出願第 11 / 0 5 6 , 9 5 0 号、および 2004年8月13日に出願された国際出願 P C T / U S 2 0 0 4 / 0 2 6 3 6 3 号の配列番号 2 に示されたマウスのプリオン配列に従って番号を付けられた残基 23 - 43 または 85 - 156 (例えば、23 - 30、86 - 111、89 - 112、97 - 107、113 - 135、および 136 - 156) に対応するこれらの領域のいずれかから導くことができ、これらの特許の発明の名称はすべて、" P r i o n - S p e c i f i c P e p t i d e R e a g e n t s " であり、各特許は引用により全体が本明細書に組み込まれている。

40

【 0 1 8 7 】

一部の実施形態では、ペプチド・フラグメントは、配列番号 14、50、51、52、12、72、68 または 115 ~ 219 のいずれか 1 つから選択される。一部の実施形態では、ペプチド・フラグメントは、配列番号 14、50、51、52、または 161 ~ 219 のいずれか 1 つから選択される。一部の実施形態では、ペプチド・フラグメントは、配列番号 12、72、68 または 115 ~ 160 のいずれか 1 つから選択される。

50

一部の実施形態では、ペプチド・フラグメントは、配列番号14、50、または68のいずれか1つから選択される。

【0188】

出発点として、ペプチド・フラグメント中のアミノ酸残基は、置換スキームに従ってN-置換グリシンにより置換することができ、疎水性アミノ酸残基は疎水性N-置換グリシンにより置換され、親水性アミノ酸残基は親水性N-置換グリシンにより置換される。一部の実施形態では、ペプチドのアミノ酸モノマーは、次の置換スキームに従ってN-置換グリシンにより置換することができ、修飾ペプチドを形成する。

【0189】

(a) Ala、Gly、Ile、Leu、Pro、およびValはN-(アルキル)グリシン、N-(アラルキル)グリシン、またはN-(ヘテロアリアルキル)グリシンにより置換することができる、

(b) Asp、Asn、Cys、Gln、Glu、Met、Ser、およびThrは、N-(ヒドロキシアルキル)グリシン、N-(アルコキシ)グリシン、N-(アミノアルキル)グリシンまたはN-(グアニジノアルキル)グリシンにより置換することができる。

【0190】

(c) Phe、Trp、およびTyrは、N-(アラルキル)グリシン、N-(ヘテロアリアルキル)グリシン、N-(ヒドロキシアラルキル)グリシン、またはN-(アルコキシアラルキル)グリシンにより置換することができ、および

(d) Arg、His、およびLysは、N-(アミノアルキル)グリシンまたはN-(グアニジノアルキル)グリシンにより置換することができる。

【0191】

修飾ペプチドは、本明細書で説明した方法によりプリオンタンパク質の病原型への結合についてテストすることができる。上のスキームによるアミノ酸モノマーの追加置換は、N-置換グリシンを用いて行うことができ、適切な結合が得られるまで再テストすることができる(即ち、プリオンの病原型と優先的に反応するペプチド試薬)。

【0192】

ペプチドを作る方法は、米国特許第5,811,387号および米国特許第5,831,005号において開示され、これらの特許の各々は引用により全体並びに本明細書で開示された方法が本明細書に組み込まれている。

【0193】

本発明のペプチド試薬は、モノマー、マルチマー、環状分子、分岐分子、リンカーなどを含む。本明細書で説明したいずれかの配列のマルチマー(即ち、ダイマー、トリマーなど)または生物学的機能がマルチマーと同等なことも考慮されている。マルチマーは、同一のモノマーから構成されたホモマルチマーでもよく、例えば、各モノマーは以下で説明する配列番号229などの同じペプチド配列である。あるいは、マルチマーは、マルチマーが含むすべてのモノマーが同一でないヘテロマルチマーもありうる。

【0194】

マルチマーは、モノマーを互いに直接結合して形成するか、または基質にモノマーを直接結合して形成することができ、例えば、多抗原性ペプチド(MAPS)(例えば、対称性MAPS)、PEG足場材料などのポリマー足場材料に結合したペプチドおよび/またはスパーサ・ユニット有り無し両方で直列に連結したペプチドがある。あるいは、リンカーをモノマーに加え、モノマーを結合させてマルチマーを形成することができる。リンカーを用いたマルチマーの非限定的な例には、例えば、グリシンリンカーを用いたタンデムリピート、リンカーを介して基質に結合したMAPSおよび/またはリンカーを介して足場材料に結合した直線的に連結したペプチドがある。当業者には周知のように、2官能性スパーサユニット(ホモ2官能性またはヘテロ2官能性のいずれか)を用いてリンカー部分を含めてもよい。

【0195】

一部の実施形態では、ペプチド試薬は、プリオン関連疾患のコンフォメーション病タンパク質と反応するが、コンフォメーション病タンパク質の病原型はPrP^{S^c}であり、コンフォメーション病タンパク質の非病原型はPrP^Cである。一部の実施形態では、ペプチド試薬は1つ以上の種からのPrP^{S^c}に対して特異的であり、例えば、ペプチド試薬は2つ以上のヒト、ウシ、ヒツジ、シカ、ヘラジカ、ヤギ、マウス、またはハムスターからのプリオンタンパク質に対して特異的である。一部の実施形態では、ペプチド試薬は、単一種からのPrP^{S^c}に対して特異的である。

【0196】

一部の実施形態では、ペプチド試薬は、コンフォメーション病タンパク質の非病原型に関する親和性よりも、少なくとも約2倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍、500倍、または1000倍大きい親和性を有するコンフォメーション病タンパク質の病原型と反応する。一部の実施形態では、親和性は、コンフォメーション病タンパク質の非病原型に関する親和性よりも、少なくとも約10倍大きい。一部の実施形態では、親和性は少なくとも100倍大きい。

10

【0197】

本発明は、本明細書で説明した1つ以上のペプチド試薬およびプリオンタンパク質を含む複合体をさらに提供する。一部の実施形態では、該複合体は本明細書で説明したペプチド試薬および病原性プリオンを含む。一部の実施形態では、病原性プリオンはPrP^{S^c}である。一部の実施形態では、複合体は病原性プリオンおよび/またはペプチド試薬、プリオン結合試薬または随意に標識されたリガンドを含む。本明細書で使われている用語「複合体」は、プリオン、病原性および非病原性試薬、およびペプチド試薬および/またはプリオン結合試薬との間の会合体を意味する。したがって、複合体は、必ずしもプリオンとペプチド試薬との間の会合体ではなく、プリオンとプリオン結合試薬との間の会合体でもよい。複体内の分子は、例えば、イオン性、疎水性、水素の各結合、ファンデルワールスなどの十分な分子間力により一緒に結合され、本明細書で使われている説明した方法および組成物では複合体を単一ユニットとして機能させることができる。

20

【0198】

組成物

本発明は、本明細書で説明した本発明のペプチド試薬を含む組成物をさらに提供する。一部の実施形態では、該組成物は、ペプチド試薬および生物学的試料などの試料を含む。生物学的試料は、生命体またはかつての生命体から作られた試料である。生物学的試料の非限定的な例は、臓器（例えば、脳、肝臓、および腎臓）、細胞、全血、血液画分、血液成分、血漿、血小板、血清、脳脊髄液（CSF）、脳組織、神経系組織、筋肉組織、筋肉および脂肪組織（例えば、肉）、骨髄、尿、涙、非神経系組織、ビーフ、ポークまたは子牛の肉などの生命体またはかつての生命体から得られる食料のほか、および植物性素材などの他の有機物質である。生物学的試料は、献血または選別、生検、解剖、または検視、または動物の選別および食肉処理および仕上げ製品の品質保証テストなどの食料調製の間の処理または操作などの健康に関連した操作の間に得ることができる。

30

【0199】

本発明は、固体支持体および少なくとも1つの本発明のペプチド試薬を含む組成物も提供する。固体支持体は、例えば、ニトロセルロース、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス、ポリフッ化ビニル、ジアゾ紙、ナイロン膜、活性ビーズ、および/または磁気反応ビーズ、またはポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリスチレン・ラテックス、ポリカーボネート、ナイロン、デキストラン、キチン、砂、シリカ、軽石、アガロース、セルロース、ガラス、金属、ポリアクリルアミド、シリコン、ゴム、または多糖類；ジアゾ紙；または固相合成、親和性分離、精製、交配反応、免疫アッセイおよび他のこの種の用途に使われるあらゆる物質がありうる。支持体は、微粒子または連続表面の形態とすることができ、膜、メッシュ、プレート、ペレット、スライド、ディスク、毛細管、中空繊維、針、ピン、チップ、中実繊維、ゲル（例えば、シリカゲル）およびビーズ（例えば、気孔ガラスビーズ、シリカゲル、ジビニルベンゼンで随意に架橋したポリスチレンビーズ、

40

50

グラフトコポリビーズ、ポリアクリルアミド・ビーズ、ラテックス・ビーズ、N - N' - ビスアクリロイルエチレンジアミンで随意に架橋したジメチルアクリルアミド・ビーズ、酸化鉄磁気ビーズ、および疎水性ポリマーで被覆したガラスビーズ)を含む。一部のこのような実施形態では、固体支持体は、ニトロセルロース、ポリスチレン・ラテックス、ポリフッ化ビニル、ジアゾ紙、ナイロン膜、活性ビーズ、および磁気反応ビーズからなる群から選択される。

【0200】

一部の実施形態では、ペプチド試薬を含む組成物は、薬学的組成物であり、即ち薬学的に許容でき、薬理学的に許容できる。一部の実施形態では、この組成物は、少なくとも1つの薬学的に許容できる担体または賦形剤をさらに含む。薬学的な担体は、固体でも液体でもよい。固体担体は、香料添加剤、甘味剤、潤滑剤、可溶化剤、懸濁剤、充填剤、流動促進剤、圧縮助剤、結合剤、または錠剤崩壊剤としても作用できる1つ以上の物質を含むことができる。薬学的な担体は、封入物質でもよい。粉末では、担体は微粉碎されたペプチド試薬と混合している微粉碎固体を含む。適切な担体は、通常、タンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸コポリマ、脂質集合体(油滴またはリポソームなどの)などの大きく、徐々に代謝される巨大分子、および不活性なウイルス粒子である。この種の担体は、当業者にはよく知られている。

10

【0201】

賦形剤は、嵩を大きくし、満足な処理および圧縮特性を与え、溶解速度の制御に役立つ、および/またはそうでなければコア物質に望ましい物理特性を追加する成分である。例えば、賦形剤は、ワシントンD.C.のアメリカ薬学協会、およびロンドンの英国薬学協会の薬学的賦形剤ハンドブック(the Handbook of Pharmaceutical Excipient)(1986)において説明された当業者には周知の希釈剤、結合剤、潤滑剤および崩壊剤である。このハンドブックは引用により全体が本明細書に組み込まれている。適切な賦形剤には、例えば、ヒプロメローズ、HPC、HEC、カルボキシメチルセルロース、微晶質セルロース、エチルセルロース、メチルセルロース、およびそれらの誘導体および塩類などのセルロース性物質、PEGなどの他の有機化合物、タルク、ラクトース、ならびにスクロース、グルコース、フルクトース、マルトースなどの他の糖類、ならびにマルトデキストリン、アカシア、デキストリン、アルギン酸、エチルセルロース樹脂、ゼラチン、グァーガム、メチルセルロース、アルファ化澱粉、アルギン酸ナトリウム、澱粉、ゼイン、ポリビニルピロリドン、ビニルピロリドン-酢酸ビニル・コポリマ、酢酸ビニル-クロトン酸コポリマおよびエチルアクリレート-メタクリレート酸コポリマ;プロピレングリコール、グリセリン、トリメチロールプロパン、PEGポリマー、ジブチルセバケート、アセチレート化モノグリセリド、ジエチルフタレート、トリアセチン、グリセリルトリアセテート、アセチルトリエチルサイトレートおよびトリエチルサイトレートなどの可塑剤;ならびにタルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸、水素化植物油、ラウリル硫酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、安息香酸ナトリウムと酢酸ナトリウムとの混合物などの潤滑油、塩化ナトリウム、ロイシン、および(登録商標)Carbowax 4000がある。

20

30

【0202】

本発明の医薬組成物は、他の分子、例えば、抗原および免疫グロブリン、サイトカイン、リンフォカイン、およびケモカイン、例えば、以下に限定されるものではないが、インターロイキン2(IL-2)、修飾IL-2(cys125-ser125)、顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン12(IL-12)、アルファ-またはガンマ-インターフェロン、ケモカインIP-10、およびRANTES、MIP1-、およびMIP1-などのケモカインと併用して投与することもできる。併用して投与した場合、該組成物は他の分子と同時にまたは逐次的に投与することができ、もし同時に投与投与する場合は、該組成物および他の分子を含む混合物などの単回投与ユニットとして、または該組成物または他の分子のいずれかを含む各ユニットを、別々の異なる投与ユニットとして投与することができる。

40

50

【0203】

本明細書で説明した医薬組成物は、治療上有効量のペプチド試薬を含むことができる。本明細書で使われている「治療上有効な量」は、医薬が投与される哺乳類、例えば、ヒトまたはヒト以外の哺乳類などの感染しているか、いないか、さらされているか、いないかとは無関係に、動物において保護および/または治療の反応を誘起する量を意味している。治療上有効な量は、他にも因子があるが、特に処置される動物、処置される動物の年齢および全身状態、抗体を合成するための該動物の免疫系の能力、望ましい保護の度合い、処置される状態の重篤さ、選択される特定の組成物および、投与モードにより変動する。普通の技量の医師でも、治療上有効な量、並びに最高の臨床効果を達成するための適切な用量および投与（単数または複数）の頻度を定めることができる。例えば、本発明の組成物は、単回に、または複数回の投与計画の一部として投与することができ、さらに、毎日、週1回、月1回、年1回、半年に1回、2年に1回などの頻度で投与することもできる。医薬組成物は、例えば、筋肉注射で、筋肉内に、粘膜内に、皮下に、皮内に、皮膚を介して経皮的に、腔内に、腹腔内に、直腸内に、経口で、鼻から、直腸に、眼球に、腸に、および/または静脈内に、など制限なしに種々のモードにより投与することができる。組成物は、投与に適合させることができ、例えば、経口投与は錠剤またはカプセルの型、随意に腸溶性コートを施したり、液体、または制御放出にすることができ、鼻内投与の場合は、鼻腔用スプレー、点鼻薬、ゲルまたは粉末の型にすることができ。投与計画は、第1投与と第2投与とを含めてもよい。主要投与などの第1投与およびブースターなどの第2投与は、粘膜に、非経口で、またはそれらの組み合わせで投与することもできる。投与ルートは示されているが、適切な投与ルート、および用量は、一般に、ケース・バイ・ケースで担当医が決める。この種の判断は当業者には日常の判断である（例えば、Harrison's Principles of Internal Medicine (1998), Fauciら、eds. 14th ed. New York; McGraw Hillを参照のこと。）

10

20

検出

本発明は、プリオンタンパク質、特に病原性プリオンタンパク質の存在を検出する方法をさらに提供する。この検出方法は、病原性プリオン型と優先的に反応する本発明のペプチド試薬の特性に依存する。これらの検出方法は、例えば、試料中のコンフォメーション病タンパク質、特に病原性プリオンタンパク質を検出する方法、プリオン関連疾患（例えば、ヒトまたはヒト以外の動物）を診断する方法、実質的にPrP^{Sc}を含まない輸血、血液製品供給、または食料供給を保証する方法、移植用臓器または組織の試料を分析する方法、手術道具および手術用機器の汚染除去、ならびに病原性プリオンの有無に関する認識が重要である他の何らかの状況を監視する方法と共に用いることができる。

30

40

【0204】

したがって、本発明は、試料中の病原性プリオンの存在を検出する方法に関し、該方法は、もし存在するならば病原性プリオンにペプチド試薬の結合を可能にする条件下で試料を本発明の第1ペプチド試薬と接触させて複合体を形成する工程と、複合体の形成を検出する工程とを含み、該複合体の形成は病原性プリオンの存在を示している。ペプチド試薬を病原性プリオンに結合させる典型的な条件は、本明細書の実施例で説明している。他の適切な結合条件は、当業者が容易に定めることができる。

【0205】

試料中の病原性プリオンの検出方法は、もし存在するならば病原性プリオンに第1ペプチド試薬が結合できる条件下で、試料を本発明の第1ペプチド試薬と接触させて第1複合体を形成する工程と、第1複合体の病原性プリオンに第2ペプチド試薬を結合させて第2複合体を形成させることができるような条件下で、必要に応じて検出可能に標識された本発明の第2ペプチド試薬と第1複合体を接触させて第2複合体を形成する工程と、第2複合体の形成を検出する工程とを含むこともでき、第2複合体の形成は病原性プリオンの存在を示している。第2複合体は、第2ペプチド試薬および病原性プリオン、および随意に、第1ペプチド試薬を含むことができる。

50

【0206】

別の実施形態では、この方法は、もし存在するならば病原性プリオンに第1ペプチド試薬が結合できる条件下で、試料を本発明の第1ペプチド試薬と接触させて複合体を形成する工程と、結合していない試料をすべて除去する工程と、第1複合体の病原性プリオンに第2ペプチド試薬を結合させ第2複合体を形成することができるような条件下で、必要に応じて検出可能に標識された本発明の第2ペプチド試薬と第1複合体とを接触させて第2複合体を形成する工程と、第2複合体の形成を検出する工程とを含み、第2複合体の形成は病原性プリオンの存在を示している。第1ペプチド試薬は、固体支持体を随意に含み、該支持体は結合していない試料から第1複合体を分離する際に役立つ。

【0207】

さらに、本発明の検出方法は、もし存在するならば病原性プリオンに第1ペプチド試薬の結合を可能にする条件下で、試料を本発明の第1ペプチド試薬と接触させて第1複合体を形成する工程と、結合していない試料を除去し、病原性プリオンを第1複合体から解離し、それによって解離された病原性プリオンを供給し、第2ペプチド試薬の解離された病原性プリオンへの結合を可能にする条件下で、第2複合体を形成し、必要に応じて検出可能に標識された、本発明の第2ペプチド試薬と解離された病原性プリオンとを接触させて第2複合体を形成し、第2複合体の形成を検出する工程とを含み、第2複合体の形成が病原性プリオンの存在を示している。第1複合体の解離は、タンパク質結合相互作用を妨害する従来の方法、例えば、塩またはカオトロピック剤の添加、温度の上昇、洗剤または変性剤の添加、および機械的妨害により達成することができ、本明細書で説明した高pHまたは低pHにおける処理を含めてもよい。

【0208】

試料中の病原性プリオンの検出方法は、もし存在するならば病原性プリオンに第1ペプチド試薬が結合できる条件下で、試料を本発明の第1ペプチド試薬と接触させて第1複合体を形成する工程と、第1複合体の病原性プリオンにプリオン結合試薬が結合できる条件下で、必要に応じて検出可能に標識されたプリオン結合試薬（本明細書で説明されている）と第1複合体とを接触させて第2複合体を形成させる工程と、第2複合体の形成を検出する工程とを含み、第2複合体の形成が病原性プリオンの存在を示している。第2複合体は、プリオン結合試薬および病原性プリオン、あるいは随意に、第1ペプチド試薬を含むことができる。

【0209】

別の実施形態では、この方法は、もし存在するならば、病原性プリオンに第1ペプチド試薬が結合できる条件下で、試料を本発明の第1ペプチド試薬と接触させて第1複合体を形成する工程と、結合していない試料をすべて除去する工程と、第1複合体の病原性プリオンにプリオン結合試薬を結合させ第2複合体を形成する条件下で、必要に応じて検出可能に標識されたプリオン結合試薬と第1複合体を接触させる工程と、第2複合体の形成を検出する工程とを含み、第2複合体の形成は病原性プリオンの存在を示している。第1ペプチド試薬は、固体支持体を随意に含み、該支持体は結合されていない試料から第1複合体を分離する際に役立つ。

【0210】

さらに、本発明の検出方法は、もし存在するならば病原性プリオンに第1ペプチド試薬が結合できる条件下で、試料を本発明の第1ペプチド試薬と接触させて第1複合体を形成する工程と、結合していない試料を除去する工程と、病原性プリオンを第1複合体から解離し、それによって解離された病原性プリオンを提供する工程と、解離された病原性プリオンにプリオン結合試薬が結合できる条件下で、必要に応じて検出可能に標識されたプリオン結合試薬と解離された病原性プリオンとを接触させて第2複合体を形成する工程と、第2複合体の形成を検出する工程とを含み、第2複合体の形成が病原性プリオンの存在を示している。

【0211】

別の実施形態では、本発明の検出方法は、もし存在するならば病原性プリオンに第1ペ

10

20

30

40

50

プトイド試薬が結合できる条件下で、試料を本発明の第1ペプトイド試薬と接触させて第1複合体を形成する工程と、結合していない試料を除去する工程と、病原性プリオンを第1複合体から解離させて、それによって解離された病原性プリオンを提供する工程と、解離された病原性プリオンにプリオン結合試薬が結合できる条件下で、プリオン結合試薬と解離された病原性プリオンとを接触させて第2複合体を形成する工程と、第2プリオン結合試薬を用いて第2複合体の形成を検出する工程とを含み、第2複合体の形成は病原性プリオンの存在を示している。

【0212】

解離された病原性プリオンは、第1複合体から解離中または解離後および第2複合体の形成前に変性されるのが好ましい。通常、複合体から病原性プリオンの解離を生じさせる因子（例えば、カオトロピック剤、熱、高pHまたは低pH）は、病原性プリオンタンパク質の変性を促進するが、もし望ましいならば、複合体からの病原性プリオンの解離は、例えば、低濃度（例えば、0.4～1.0M）のグアニジニウム塩化水素、グアニジニウム・イソチオシアネートを用いて、タンパク質を変性せずに達成することができる。プリオンタンパク質を変性せずに複合体から病原性プリオンを解離する追加の条件については国際公開第2006076497号（国際出願PCT/US2006/001090号）を参照のこと。

10

【0213】

別の実施形態では、この検出方法は、もし存在するならば病原性プリオンに第1ペプトイド試薬が結合できる条件下で、試料を本発明の第1ペプトイド試薬と接触させて第1複合体を形成する工程と、結合していない試料を除去する工程と、第1複合体の病原性プリオンにペプトイド試薬が結合できる条件下で、必要に応じて検出可能に標識された本発明のペプトイド試薬と該複合体とを接触させて第2複合体を形成する工程と、第2複合体の形成を検出する工程とを含み、第2複合体の形成は、病原性プリオンの存在を示している。プリオン結合試薬は、固体支持体上に随意に供給される。

20

【0214】

一部の実施形態では、解離工程は、塩またはグアニジニウム・チオシアネート（GdnSCN）もしくはグアニジニウム塩化水素（GdnHCl）などのカオトロピック剤と結合病原性プリオンタンパク質とを接触させる工程を含む。GdnSCNまたはGdnHClの適切な濃度の例は、約3Mと約6Mとの間にある。

30

【0215】

一部の実施形態では、解離工程は、結合病原性プリオンタンパク質の高pHまたは低pHへの露出を含み、それによって、解離された病原性プリオンタンパク質は変性される。例えば、pHは12より上か、2より下にあってもよい。一部の実施形態では、pHは12.5と13.0との間にあってもよい。高いpHは、NaOHを添加して0.05～0.15Nの濃度にするにより得られる。高pHまたは低pHへの露出は、15分程度または10分程度行われてもよい。一部の実施形態では、高pHまたは低pHは、リン酸またはそのナトリウム塩の添加により7.0と7.5との間に中和される。

【0216】

「プリオン結合試薬」は、いくつかのコンフォメーションのプリオンタンパク質に結合する試薬であり、例えば、プリオン結合試薬は、プリオンタンパク質の1つ以上の変性型、即ち、PrP^C型（非病原性イソ型）またはPrP^{Sc}（病原性イソ型）に結合してもよい。この種のプリオン結合試薬は、1つより多いこれらのプリオンタンパク質型に結合するであろう。プリオン結合試薬は説明されており、例えば、抗プリオン抗体（Peretzら、1997 J. Mol. Biol. 273: 614; Peretzら、2001 Nature 412: 739; Williamsonら、1998 J. Virol. 72: 9413; Polymenidouら、The Lancet 2005 4: 805; 米国特許第4,806,627号; 米国特許第6,765,088号; および米国特許第6,537,548号）、モチーフ・グラフトしたハイブリッド・ポリペプチド（国際公開第03/085086号を参照のこと）、特定のカチオン性またはアニオン性

40

50

ポリマー（国際公開第03/073106号を参照のこと）、「増殖触媒」である特定のペプチド（国際公開第02/097444号を参照のこと）、プリオン特異性ペプチド試薬（例えば、国際公開第2006/076687号および米国特許出願公開第20060035242号を参照のこと）およびプラスミノゲンを含む。プリオン結合試薬を利用する方法のすべてにおいて、好ましいプリオン結合試薬は抗プリオン抗体である。

【0217】

さらに、この検出方法は、本発明のペプチド試薬を含む固体支持体を提供する工程と、該支持体を検出できるように標識されたりガンドと合体する工程を含むことができ、該支持体のペプチド試薬は、第1複合体を形成するために、病原性プリオンに対するよりもリガンドに対してより弱い結合親和性を有する工程と、もし試料中に存在するならば、第1複合体のペプチド試薬に病原性プリオンが結合できる条件下で、試料を第1複合体と合体させる工程と、それにより第1複合体の検出できるように標識されたりガンドを置換する工程と、ペプチド試薬および病原性プリオンを含む第2複合体を形成する工程と、第2複合体の形成を検出する工程とを含むことができ、第2複合体の形成は病原性プリオンの存在を示している。

10

【0218】

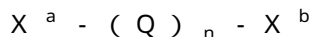
試料中に病原性プリオンの存在を検出する方法において使用する場合、該試料は、病原性プリオンタンパク質を含むことが知られているか、含む疑いがあるものでよい。一部の実施形態では、試料は、病原性プリオン、例えば、PrP^{Sc}を含む疑いがある。一部の実施形態では、試料は生物学的試料（即ち、生命体またはかつての生命体から調製された試料）、または非生物学的試料である。一部の実施形態では、試料は生物学的試料である。生物学的試料の非限定的な例は、臓器（例えば、脳、肝臓、および腎臓）、細胞、全血、血液画分、血液成分、血漿、血小板、血清、脳脊髄液（CSF）、脳組織、神経系組織、筋肉組織、筋肉および脂肪組織（例えば、肉）、骨髄、尿、涙、非神経系組織、生命体またはかつての生命体から得られる食料、ならびに植物性素材などの他の有機物質である。一部の実施形態では、生物学的試料は、全血、血液画分、血液成分、血漿、血小板または血清を含む。一部の実施形態では、生物学的試料は、生検、解剖、または検視から得られる。一部の実施形態では、試料は非生物学的試料である。非生物学的試料の非限定的な例は、医薬品、化粧品、およびパーソナル・ケア製品、ならびに生命体またはかつての生命体から得られたものではない食料等である。試料は、その中およびペプチド試薬に存在するかもしれない病原性プリオンタンパク質とペプチド試薬との間の接触を保証するために普通の方法（例えば、加熱、粉碎、超音波処理、特定の消化酵素への露出）で予備処理してよい。

20

30

【0219】

本発明の検出方法は、本明細書で説明したペプチド試薬のいずれかを利用することができる。一部の実施形態では、本発明の検出方法は、プリオンタンパク質などのコンフォメーション病タンパク質と反応し、コンフォメーション病タンパク質の非病原型に比べて病原型と優先的に反応する、下記化学式を有するペプチド試薬を利用し、



式中、各Qは独立にアミノ酸またはN-置換グリシンであり、 $-(Q)_n-$ はペプチド領域を規定しており、

40

X^a はH、 $(C_1 - C_6)$ アルキル、シクロアルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、ヘテロシクロアルキル、 $(C_1 - C_6)$ アシル、アミノ $(C_1 - C_6)$ アシル、アミノ酸、アミノ保護基、または2~100個のアミノ酸のポリペプチドであり、式中、 X^a はリンカー部分を介して随意に結合される共役部分により随意に置換される、

X^b はH、 $(C_1 - C_6)$ アルキル、アリール、アラルキル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、ヘテロシクロアルキル、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、ヒドロキシ、 $(C_1 - C_6)$ アルコキシ、アリールオキシ、アラルコキシ、カルボキシ保護基、アミノ酸、または2~100個のアミノ酸のポリペプチド、式中、 X^b はリンカー

50

部分を介して随意に結合する共役部分により随意に置換され、 n は3～約30であり、式中ペプチド領域 - (Q)_n - の少なくとも約50%はN-置換グリシンを含む。

【0220】

この種の実施形態では、 n は約4～約30、好ましくは約5～約30であり、ペプチド領域 - (Q)_n - は、

- (a) - A A B A - ;
- (b) - A A B A B - ;
- (c) - A B A C C - ;
- (d) - A A A A A - ;
- (e) - A B C B A - ;
- (f) - A A B C A - ; または
- (g) - A B A B A - ;

10

から独立に選択される少なくとも1つの小区域を含み、式中、A、BおよびCは、各々異なるN-置換グリシンである。

【0221】

検出方法の一部の実施形態では、該ペプチド試薬はアミノ末端基領域、カルボキシ末端基領域、およびアミノ末端基領域とカルボキシ末端基領域との間に少なくとも1つのペプチド領域を含み、該ペプチド領域が約3～約30個のN-置換グリシンおよび随意に1つ以上のアミノ酸を含む。一部の実施形態では、ペプチド領域は、

- (a) - A A B A - ;
- (b) - A A B A B - ;
- (c) - A B A C C - ;
- (d) - A A A A A - ;
- (e) - A B C B A - ;
- (f) - A A B C A - ; または
- (g) - A B A B A - ;

20

から選択されるペプチド小区域を含み、式中A、BおよびCは、各々異なるN-置換グリシンである。

【0222】

本発明の検出方法の一部の実施形態では、ペプチド試薬はコンフォメーション病タンパク質の3～30個のアミノ酸ペプチド・フラグメントのペプチド類似体を含み、該フラグメントは配列番号

30

【0223】

【数3】

27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, および 228

40

からなる配列の群から選択され、ここで

50

(a) ペプチド・フラグメントの少なくとも1つの非プロリン残基は、N-置換グリシンにより置換され、ペプチド類似体を形成し、または

(b) ペプチド・フラグメントの少なくとも5個のアミノ酸残基が、各々、N-置換グリシンにより置換され、ペプチド類似体を形成する。

【0224】

上の方法の一部の実施形態では、ペプチド残基のいずれか1つ以上のアミノ酸残基のN-置換グリシンによる置換は、次の置換スキームに対応する。

【0225】

i) Ala、Gly、Ile、Leu、ProおよびValはN-(アルキル)グリシン、N-(アラルキル)グリシン、またはN-(ヘテロアリーラルキル)グリシンにより置換することができる、

ii) Asp、Asn、Cys、Gln、Met、Ser、およびThrは、N-(ヒドロキシアリキル)グリシン、N-(アルコキシ)グリシン、またはN-(グアニジノアルキル)グリシンにより置換することができる、

iii) Phe、Trp、およびTyrは、N-(アラルキル)グリシン、N-(ヘテロアリーラルキル)グリシン、N-(ヒドロキシアラルキル)グリシン、N-(アルコキシアラルキル)グリシンにより置換することができる、および

iv) Arg、His、およびLysは、N-(アミノアルキル)グリシンまたはN-(グアニジノアルキル)グリシンにより置換することができる。

【0226】

この種の実施形態では、ペプチド試薬は、上で説明したコンフォメーション病タンパク質の5~30個のアミノ酸ペプチド・フラグメントからなるペプチド類似体を含む。

【0227】

試料中の病原性プリオンの存在を検出する方法の一部の実施形態では、ペプチド試薬は、例えば、配列番号229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、および241からなる群から選択される配列を有する本明細書で説明した配列を含む。一部の実施形態では、ペプチド試薬は、配列番号229、230、232、233、234、235、237、238、239、または240から選択される配列を含む。一部の実施形態では、ペプチド試薬は、配列番号229、230、235、237、238、239、または240から選択される配列を含む。一部の実施形態では、ペプチド試薬は、配列番号230、237、238、239、または240から選択される配列を含む。一部の実施形態では、本発明の方法は、ペプチド試薬I、II、VII、IX、X、XIa、XIb、XIIa、またはXIIbの1つ以上を利用している。一部の実施形態では、本発明の方法は、ペプチド試薬II、IX、X、XIa、XIb、XIIa、またはXIIbの1つ以上を利用している。一部の実施形態では、この方法において使われるペプチド試薬は、配列番号229、236、231、232、233、234または235から選択される配列を含む。一部の実施形態では、ペプチド試薬は、配列番号230、237、238、239、または240から選択される配列を含む。この種の実施形態では、ペプチド試薬は配列番号230、237または240を含む。この種の実施形態では、ペプチド試薬は配列番号240を含む。

【0228】

一部の実施形態では、試料中の病原性プリオンの存在を検出する方法は、もし存在するならば病原性プリオンタンパク質への第1ペプチド試薬の結合を可能にする条件下で、第1ペプチド試薬と試料とを接触させて第1ペプチド試薬および病原性プリオンを含む複合体を形成し、次いで、病原性プリオンがあれば、第1ペプチド試薬への病原性プリオンの結合により試料中の病原性プリオンの存在を検出する工程を含む。第1ペプチド試薬への病原性プリオンの結合は、複合体の形成を検出することにより検出され、複合体の形成は病原性プリオンの存在を示している。一般に、この方法の好ましい実施形態では、第1ペプチド試薬および病原性プリオンタンパク質を含む複合体は、検出する前に

10

20

30

40

50

、試料の残り（即ち、結合していない試料）から分離される。複合体の形成は、複合体中の病原性プリオンを検出することにより、または複合体（結合していない試料から分離後）を解離し、解離された病原性プリオンを検出することにより検出することができる。解離された病原性プリオンは、病原性コンフォメーション中に存在していることもあれば、存在していないこともある。一部の実施形態では、解離された病原性プリオンは変性プリオン・コンフォメーションにある。解離された病原性プリオンは、当該技術分野で周知の方法、例えば、抗プリオン抗体を結合することにより検出することができる。抗プリオン抗体は、適切なプリオンイソ型に対して特異的であり、本明細書でさらに説明する。異なるプリオンイソ型を認識する抗体は、当該技術分野で説明されている（例えば、米国特許第5,846,533、6,765,088、6,261,790、4,806,627、6,165,784、6,528,269号、欧州特許第891552、909388号、Polymenidouら、The Lancet 2005 4:805を参照のこと）。

10

【0229】

上の方法の好ましい実施形態では、病原性プリオンは、カオトロピック剤を用いたペプチド試薬により、または本明細書で説明した高pHまたは低pH処理を用いることにより複合体から解離される。

【0230】

さらに、試料中の病原性プリオンを検出する方法は、まずプリオン特異性ペプチド試薬を用いて複合体を形成し、次いで、分析方法を用いて複合体を検出することができる。分析方法は、UV/可視分光法、FTIR、NMR分光法、ラマン分光法、質量分析法、HPLC、キャピラリー電気泳動法、表面プラズモン共鳴分光法、マイクロ-エレクトロ-メカニカル・システム(MEMS)、または当該技術分野で周知の他の方法などの方法を含めてもよい。

20

【0231】

一部の実施形態では、ペプチド試薬またはプリオン結合試薬は、検出可能な標識を含む。本発明において使用するのに適した検出可能な標識は、例えば、本明細書の上で規定した検出可能な分子を含む。一部の実施形態では、この標識は、酵素、放射性同位元素、毒素または蛍光プローブを含む。さらに、検出可能な標識には、オリゴヌクレオチド・タグがあり、該タグはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、転写介在増幅(TMA)、分岐DNA(b-DNA)、核酸配列をベースとする増幅(NASBA)、などを含む核酸検出の方法により検出することができる。好ましい検出可能な標識には、酵素、特にアルカリ性ホスファターゼ(AP)、セイヨウワサビ・ペルオキシダーゼ(HRP)、および蛍光化合物がある。当該技術分野でよく知られているように、酵素は、検出可能な基質、例えば、発色性基質または蛍光発生基質と併用して検出可能な信号を発生する。

30

【0232】

本発明の検出方法の一部の実施形態では、1つ以上のペプチド試薬が固体支持体に連結される。本発明では、固体支持体は、不溶性マトリックスであればなんでもよく、重要な分子（例えば、本発明のペプチド試薬、プリオンタンパク質、抗体など）が連結または結合できる剛性または半剛性表面があればよい。典型的な固体支持体には、上ですでに説明したものがあがるが、これらに限定されない。本明細書で説明したペプチド試薬は、支持体に共有結合で、または吸着、カップリングにより、または結合ペアの使用により結合することができる。例えば、ペプチド試薬は、当該技術分野で周知の技法を用いて固体支持体に容易に連結することができる。支持体への固定は、タンパク質が優れた固相結合特性を有する場合などのタンパク質にペプチド試薬をまず連結することにより強められる。適切なカップリングタンパク質には、ウシ血清アルブミン(BSA)、キーホール・リンペット・ヘモシアニン、免疫グロブリン分子、サイログロブリン、オポアルブミンなどの巨大分子、および当業者に周知の他のタンパク質があるが、これらに限定されない。ペプチド試薬は、分子の結合ペアの反応を介して固体支持体に連結することもできる。結合ペアの1つは、固体支持体に連結され、結合ペアのもう1つはペプチド試薬に結

40

50

合する（合成前、中、または後）。例えば、支持体は、アビジンまたはストレプトアビジンを含むことができ、ペプチド試薬はビオチンを含むことができる。ビオチン - アビジンおよびビオチン - ストレプトアビジンに加えて、ペプチドを支持体に結合する他の適切な結合ペアには、抗原 - 抗体、ハプテン - 抗体、ミメトープ - 抗体、受容体 - ホルモン、受容体 - リガンド、作動薬 - 拮抗薬、レクチン - 炭水化物、タンパク質 A - 抗体 Fc があるが、これらに限定されない。この種の結合ペアは、よく知られており（例えば、米国特許第 6,551,843 および 6,586,193 号を参照のこと）、当業者は適切な結合ペアを選択し、これらを本発明で使用するのに適合させる能力がある。一方、ペプチド試薬は、当該技術分野でよく知られている共役化学を用いて固体支持体に共有結合させることができる。チオール含有ペプチド試薬は、当該技術分野で周知の標準方法を用いて、固体支持体、例えば、カルボキシル化磁気ビーズに直接結合される（例えば、Chrissey, L. A., Lee, G. U. and O'Ferrall, C. E. (1996). Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films. *Nucleic Acids Research* 24(15), 3031-3039; Kitagawa, T., Shimozono, T., Aikawa, T., Yoshida, T. and Nishimura, H. (1980). Preparation and characterization of hetero-bifunctional cross-linking reagents for protein modifications. *Chem. Pharm. Bull.* 29(4), 1130-1135 を参照のこと）。カルボキシル化磁気ビーズは、まず、ヘテロ 2 官能性架橋剤に連結され、該架橋剤はカーボジイミドの化学を用いたマレイミド官能基（Pierce BioTechnology Inc. からの BMPH）を含む。チオール化ペプチドまたはペプチドは、次いで、BMPH 被覆ビーズのマレイミド官能基に共有結合する。本発明の検出方法の実施形態で用いた場合、固体支持体は、本発明のペプチド試薬および結合していない試料からの病原性プリオンを含む複合体の分離で役立つ。チオール・カップリングの場合、特に便利な磁気ビーズは、Dyna1 からの（登録商標）Dyna beads M-270 Carboxylic Acid である。ペプチド試薬は、リンカー、例えば、1 つ以上のアミノヘキサ酸部分も含めてもよい。

【0233】

試料中の病原性プリオンの存在を検出する方法の一部の実施形態では、この方法は、もし存在するならば病原性プリオンに第 1 ペプチド試薬が結合できる条件下で、試料を本発明の第 1 ペプチド試薬と接触させて第 1 複合体を形成する工程と、第 1 複合体の病原性プリオンに第 2 ペプチド試薬が結合できる条件下で、検出できるように標識された本発明の第 2 ペプチド試薬と第 1 複合体を接触させる工程と、次いで、第 2 ペプチド試薬に病原性プリオンが結合できる検出する工程とを含む。一部の実施形態では、第 2 ペプチド試薬への病原性プリオンタンパク質の結合は、第 2 複合体の形成を検出することにより検出ことができ、第 2 複合体の形成は病原性プリオンの存在を示している。一部の実施形態では、ペプチド試薬は異なっている。一部の実施形態では、第 1 および第 2 ペプチド試薬は同じである。一部の実施形態では、第 1 ペプチド試薬はビオチンを含む。別の実施形態では、第 1 ペプチド試薬は固体支持体に連結している。

【0234】

本発明の検出方法の一部の実施形態では、この方法は、もし存在するならば病原性プリオンに第 1 ペプチド試薬が結合できる条件下で、試料を本発明の第 1 ペプチド試薬と接触させて第 1 複合体を形成する工程と、試料中に存在する、例えば、非病原性プリオンを含めてもよい結合していない試料を除去する工程と、病原性プリオンを第 1 複合体から解離させて、それによって解離された病原性プリオンを提供する工程と、解離された病原性プリオンに第 2 ペプチド試薬が結合できる条件下で、検出できるように標識された本発明の第 2 ペプチド試薬と解離された病原性プリオンとを接触させて第 2 複合体を形成する工程と、第 2 複合体の形成を検出する工程とを含み、第 2 複合体の形成は病原性プリ

10

20

30

40

50

オンの存在を示している。この実施形態では、解離された病原性プリオンは病原性コンフォメーションを保持する。

【0235】

一般に、「解離病原性プリオン」または「解離プリオン」には、病原性コンフォメーションを保持するプリオンタンパク質、並びに変性された病原性プリオンタンパク質を含めてもよい。これは、変性プリオンは、病原性コンフォメーションまたは正常な細胞コンフォメーションのいずれも有さず、感染のおそれもないからである。

【0236】

一方、本発明のペプチド試薬は、病原性プリオンタンパク質を直接捕捉して第1複合体を形成するのに使われ、第1複合体が、上で説明したように、結合していない試料物質から分離される場合は、必要に応じて検出可能に標識された、プリオン結合試薬は、病原性プリオンが第1複体内に結合している間、または第1複合体からプリオンタンパク質の解離後のいずれかに病原性プリオンの検出に使用することができる。本明細書ですでに説明したように、プリオン結合試薬は、いくつかのコンフォメーションに結合する試薬であり、例えば、プリオン結合試薬はプリオンタンパク質の1つ以上の変性型、即ち、PrP^C型（非病原性イソ型）、またはPrP^{Sc}（病原性イソ型）に結合してよい。この種のプリオン結合試薬は、1つより多いこれらのプリオンタンパク質型に結合するであろう。プリオン結合試薬は説明されており、該試薬には、例えば、抗プリオン抗体（Peretzら、1997 J. Mol. Biol. 273: 614; Peretzら、2001 Nature 412: 739; Williamsonら、1998 J. Virol 72: 9413; Polymenidouら、The Lancet 2005 4: 805; 米国特許第4,806,627号; 米国特許第6,765,088号; および米国特許第6,537,548号）、モチーフ・グラフトされたハイブリッド・ポリペプチド（国際公開第03/085086号を参照のこと）、特定のカチオン性またはアニオン性ポリマー（国際公開第03/073106号を参照のこと）、「増殖触媒」である特定のペプチド（国際公開第02/097444号を参照のこと）、プリオン特異性ペプチド試薬（例えば、国際公開第2006/076687号および米国特許出願公開第20060035242号を参照のこと）およびプラスミノゲンがある。使われた特定のプリオン結合試薬が、プリオンの変性型に結合するならば、第1複合体の病原性プリオンタンパク質は、プリオン結合試薬により検出する前に変性されることは明らかである。プリオン結合試薬、特に抗プリオン抗体、は特定の動物種からのプリオンタンパク質に対して選択的であってよい。したがって、プリオン・コンフォメーションに対する特異性および種特異性の観点では、適切な結合特性を有するプリオン結合試薬が選択されるのは明らかであろう。

【0237】

本発明のペプチド試薬は、したがって、試料中の病原性プリオンの「捕捉」試薬としてか、または捕捉された病原性プリオンの「検出」試薬として使用することができる。ペプチド試薬が病原性プリオンの捕捉のために使われる場合は、捕捉されたプリオンは試料の残り（ペプチド試薬を用いて形成された複合体により）から除去することができ、ペプチド試薬へ複合体化する間、または複合体の解離後のいずれかに、該プリオンは普通的手段（例えば、ELISA、ウェスタン・ブロット、免疫沈殿、など）により検出することができる。捕捉されたプリオンは、代わりに、検出できるように標識を付けられている第2ペプチド試薬を用いて検出することができる。

【0238】

ELISA

試料中の病原性プリオンを検出する特に好ましい方法は、本発明のペプチド試薬の使用と改良されたELISA技法とを組み合わせる方法である。このアッセイは、プリオンタンパク質の病原型と非病原型との間の差異を見分けるペプチド試薬のパワーを改良されたELISA技法と組み合わせる。ペプチド試薬は病原性プリオンと優先的に反応するので、これらの試薬は試料中に存在する病原性プリオンを分離し、濃縮するのに使われ

る。通常、病原性イソ型のN-末端基消化さえ生じる、病原性イソ型と非病原性イソ型との間の差異を見分けるためにプロテイナーゼKによる消化を利用する方法とは異なり、本発明の方法においてペプチド試薬を使用することは、病原性プリオンタンパク質全長の分離を生じる結果になる。したがって、プリオンタンパク質のN-末端基端部におけるエピトープ、例えば、残基23-90の領域におけるエピトープを認識する抗プリオン抗体、並びにプリオンタンパク質の他の領域のエピトープを認識する抗プリオン抗体は、検出に使用することができる。大抵の種からのプリオンタンパク質のN-末端基領域は、リピート配列を含む(オクタリピートGQPHGGGS/Wの4コピーまたはウシPrPの5コピー)。この領域内の抗体結合は、アッセイの感度が向上すると生じる結合活性の上昇を示す。

10

【0239】

上で説明したペプチド試薬を用いて非病原性イソ型(これは多くの生物学的試料に存在する)から病原性プリオンタンパク質が一旦分離されると、病原性プリオンタンパク質は、ペプチド試薬から解離することができ、本明細書で説明した多数のELISAフォーマットにおいて検出することができる。病原性プリオンは、ペプチド試薬からの解離プロセスにおいて変性されるが、必ずそのようになるわけではない。ELISAを行う前に捕捉されたPrP^{Sc}を変性されるのが好ましい。何故ならば、親和性の高い抗プリオン抗体の多くは、PrPの変性型に結合し、変性PrPに結合する多くの抗プリオン抗体が知られており、商業的に利用できるからである。病原性プリオンの解離および変性は、高濃度のカオトロピック剤、例えば、グアニジニウム・チオシアネートまたはグアニジニウムHClなどの3M~6Mのグアニジニウム塩を用いて達成することができる。ELISAを行う前にカオトロピック剤を除去するか、希釈しなければならない。何故ならば、カオトロピック剤は、ELISAで使われる抗プリオン抗体の結合を妨害するからである。これは、洗浄工程を追加したり、試料の容積を大きくすることが必要になり、これらは両方とも、アッセイを迅速に行ったり、処理量を多くしたい場合には望ましくない。

20

【0240】

本発明者らは、一部の実施形態では、病原性プリオンタンパク質の変性、およびペプチド試薬からの解離のためにカオトロピック剤を使用する代わりに高pHまたは低pHを使用するのが好ましいことを発見した。病原性プリオンタンパク質はペプチド試薬から容易に解離したり、pHを12より上に上げたり(例えば、NaOHにより)、2より下にする成分(例えば、H₃PO₄)を添加することにより変性される。その上、ELISAにおいて洗浄を追加したり、試料の量を増やすことなく、直接使用することができるので、適切な酸または塩基を添加してpHを中性に容易に再調整することができる。

30

【0241】

このように、本発明は、試料中の病原性プリオンの存在を検出する方法を提供し、この方法は、もし存在するならば病原性プリオンタンパク質にペプチド試薬が結合できる条件下で、プリオンタンパク質の病原型と優先的に反応するペプチド試薬と病原性プリオンを含む疑いのある試料を接触させる工程と、結合していない試料物質を除去する工程と、ペプチド試薬から病原性プリオンを解離する工程と、プリオン結合試薬を用いて解離された病原性プリオンの存在を検出する工程とを含む。使われた特定のプリオン結合試薬がプリオンの変性型に結合するならば、「捕捉された」病原性プリオンタンパク質はプリオン結合試薬を用いて検出する前に変性されるべきであろう。プリオン結合試薬が抗プリオン抗体であれば好ましい。

40

【0242】

抗体、修飾抗体およびプリオン、特にPrP^Cまたは変性PrPに結合する他の試薬は、すでに説明し、これらの一部は商業的に利用できる(例えば、抗プリオン抗体 Peretzら、1997 J. Mol. Biol. 273:614; Peretzら、2001 Nature 412:739; Williamsonら、1998 J. Virol. 72:9413; Polymenidouら、2005 Lancet 4:805; 米国特許第6,765,088号を参照のこと。これらおよびその他の一部は、カリ

50

フォルニア州南サンフランシスコ, InPro Biotechnology, ミシガン州アン・アーバー, Cayman Chemicals, チューリッヒ, Prionics AG から商業的に入手できる; 修飾抗体の説明については国際公開第03/085086号も参照のこと)。この方法で使用するのに適した抗体には、制限なしに、3F4 (米国特許第4,806,627号), D18 (Peretzら, J. Mol. Biol. 1997 273:614), D13 (Peretz 1997, 上記を参照), 6H4 (Liuら, J. Histochem. Cytochem. 2003 51:1065), MAB5242 (Chemicon), 7D9 (Kascsakら, 1987 J. Virol. 61:3688), BDI115 (Biodesign International), SAF32, SAF53, SAF83, SAF84 (フランスのSPI Bio から入手できるSAF抗体), 19B10 (国際公開第2004/4033628号), 7VC (国際公開第2004/4033628号), 12F10 (SPI Bio), PRI308 (SPI Bio), 34C9 (Prionics AG), Fab HuM-P (Peretzら, Nature 2001 412:739), POM1~POM19 (Polymenidouら, 2005, 上記を参照), Fab HuM-R1 (Peretz 1997, 上記を参照) および Fab HuM-R72 (Peretz 1997, 上記を参照) を含む。他の抗プリオン抗体は、当該技術分野において周知の方法により容易に作ることができる。好ましい抗プリオン抗体は、病原性プリオンの変性型に結合する抗体であろう。特に好ましい抗プリオン抗体は、プリオンタンパク質のN-末端基領域におけるエピトープを認識する抗体であろう。いくつかの抗プリオン抗体は、動物種の一つまたは限定された数からのプリオンタンパク質に対して特異的であり、他は多くの動物種からのプリオンタンパク質を結合することができる。分析する試料およびテストの目的に基づいて適切な抗プリオン抗体を選ぶことは明らかであろう。

【0243】

好ましい実施形態では、ペプチド試薬は固体支持体上に供給される。ペプチド試薬は、試料を接触させる前に固体支持体上に供給することができるか、または試料を接触させ試料中の何らかの病原性プリオンに結合させた後(例えば、ビオチン化ペプチド試薬およびアビジンまたはストレプトアビジンを含む固体支持体を用いることにより)、ペプチド試薬を固体支持体に結合するように適合させることができる。

【0244】

このようにして、本発明は、下記工程を含む試料中の病原性プリオンの存在を検出する方法をさらに提供する。

【0245】

- (a) 第1固体支持体上に第1ペプチド試薬を提供する工程と、
- (b) 病原性プリオンが試料中に存在する場合、ペプチド試薬に結合して第1複合体を形成させる条件下で、第1固体支持体を試料と接触させる工程と、
- (c) 結合していない試料物質を除去する工程と、
- (d) 病原性プリオンタンパク質を第1複合体から解離させる工程と、
- (e) プリオン結合試薬を用いて解離された病原性プリオンを検出する工程。

ペプチド試薬は、本明細書で説明した試薬のいずれかがよく、ペプチド試薬は配列番号229-241からなる群から選択される配列から導かれる。プリオン結合試薬については、本明細書でさらに説明する。プリオン結合試薬は、抗プリオン抗体であるのが好ましい。第1固体支持体は磁気ビーズが好ましく、ポリスチレン/酸化鉄ビーズがより好ましい。

【0246】

固体支持体上にペプチド試薬を取り付ける方法は、当該技術分野においては従来の方法であり、本明細書でも説明されており、タンパク質およびペプチドを種々の固体表面に取り付ける周知の方法を含む。試料中の病原性プリオンをペプチド試薬に結合させることが可能な条件下で、ペプチド試薬を含む固体支持体と試料を接触させ、第1複合体を形成する。この種の結合条件は、当業者により簡単に決められ、本明細書でさらに説明す

る。通常、この方法は、マイクロタイター・プレートのウェルの中または小さな容量のプラスチック・チューブの中で行われるが、あらゆる便利な容器が適切である。試料は、一般に、液体か懸濁液であり、ペプチド試薬の前か後に反応容器に加えられる。第1複合体が一旦できると、結合していない試料物質（即ち、結合していない病原性プリオンタンパク質を含む、ペプチド試薬に結合していない試料のあらゆる成分）は、例えば、遠心分離、沈殿、ろ過、磁力、などにより反応溶液（結合していない試料物質を含む）から固体支持体を分離することにより除去することができる。第1複合体を有する固体支持体は、この方法の次の工程を行う前に、残留試料物質を除去するために、随意に1つ以上の洗浄工程にかけられる。

【0247】

結合していない試料物質の除去および随意的洗浄に続いて、結合した病原性プリオンタンパク質が第1複合体から解離される。解離は多数の方法で行うことができる。1つの実施形態では、カオトロピック剤、好ましくは、グアニジニウム化合物、例えば、グアニジニウム・チオシアネートまたはグアニジニウム塩化水素が、3Mと6Mとの間の濃度になるように添加される。このような濃度にてカオトロピック剤を添加すると、ペプチド試薬から病原性プリオンタンパク質を解離させ、病原性プリオンタンパク質の変性も生じる。

【0248】

別の実施形態では、解離は、pHを12以上に上げる（「高いpH」）か、pHを2以下に下げる（「低いpH」）ことにより達成される。第1複合体を高pHまたは低pHにさらすと、ペプチド試薬から病原性プリオンタンパク質が解離し、病原性プリオンタンパク質を変性させる。この実施形態では、第1複合体は高いpHにさらすのが好ましい。一般に、12.0と13.0との間のpHが十分であり、12.5と13.0との間のpHを用いるのが好ましく、12.7~12.9のpHがより好ましく、12.9のpHが最も好ましい。一方、第1複合体の低pHへの露出は、ペプチド試薬から病原性プリオンタンパク質を解離し、変性されるのに使用することができる。この場合、1.0と2.0との間のpHが十分である。第1複合体の高pHまたは低pHへの露出は、短時間、例えば、60分、好ましくは15分程度、より好ましくは、10分程度行われる。これより長い時間さらすと、病原性プリオンタンパク質の構造が著しく劣化し、検出工程で使われる抗プリオン抗体により認識されたエピトープが破壊される。病原性プリオンタンパク質を解離するのに十分な時間露出後、酸性試薬（高いpH解離条件が使われた場合）または塩基性試薬（低いpH解離条件が使われた場合）のいずれかを添加することにより、pHは中性（即ち、約7.0と7.5との間のpH）に容易に再調整することができる。当業者は、適切なプロトコルを容易に決めることができ、本明細書には実施例が記載されている。

【0249】

一般に、高いpHの解離条件にするためには、約0.05N~約0.2Nの濃度になるようにNaOHを添加すれば十分である。好ましくは、NaOHは0.05Nと0.15Nとの間の濃度になるようにNaOHを添加し、より好ましくは、0.1NのNaOHが使われる。ペプチド試薬から病原性プリオンの解離が一旦達成されると、適量の酸性溶液、例えば、リン酸、リン酸ナトリウムの添加により、pHは中性（即ち、約7.0と7.5との間）に再調整することができる。

【0250】

一般に、低いpHの解離条件にするためには、約0.2M~約0.7Mの濃度になるようにH₃PO₄を添加すれば十分である。好ましくは、H₃PO₄は0.3Mと0.6Mとの間の濃度になるように添加し、より好ましくは、0.5MのH₃PO₄が使われる。ペプチド試薬から病原性プリオンの解離が一旦達成されると、適量の塩基性溶液、例えば、NaOHまたはKOHの添加により、pHは中性（即ち、約7.0と7.5との間）に再調整することができる。

【0251】

次いで、解離された病原性プリオンタンパク質は、ペプチド試薬を含む固体支持体から分離される。この分離は、結合していない物質（今は解離された病原性プリオンタンパク質）の部分が保持され、固体支持体物質の部分が廃棄されることを除いて、上で説明した結合していない試料物質の除去に類似した方法で達成することができる。

【0252】

解離された病原性プリオンタンパク質は、プリオン結合試薬を用いて検出することができる。多数のこの種のプリオン結合剤が知られており、本明細書で説明している。解離された病原性プリオンタンパク質を検出する好ましいプリオン結合試薬は、抗プリオン抗体である。多数の抗プリオン抗体が記載されており、多くが商業的に入手でき、例えば、Fab D18 (Peretzら、(2001) Nature 412:739-743)、3F4 (ミズーリ州セントルイス、Sigma Chemicalから入手できる；米国特許第4,806,627号も参照のこと)、SAF-32 (ミシガン州アンアーバー、Cayman Chemical)、6H4 (スイス、Prionics AG；米国特許第6,765,088号も参照のこと)、POM1~POM19 (Polymenidouら、The Lancet 2005, 4:805) および上に記載され、当該技術分野で周知のその他の抗体がある。解離された病原性プリオンタンパク質は、ELISA型アッセイ、即ち、直接ELISAまたは抗体サンドイッチELISA型アッセイのいずれかで検出することができる。なお、これらのELISAについては後で詳しく説明する。用語「ELISA」は、抗プリオン抗体を用いた検出の説明に使われるが、このアッセイは抗体が「酵素連結」しているものに限定されない。これらの検出抗体は、本明細書で説明し、免疫アッセイの分野で周知の検出可能な標識を付けることができる。

10

20

【0253】

この方法の1つの実施形態では、解離された病原性プリオンタンパク質は、第2固体支持体の表面で受動的に被覆される。この種の受動コーティングの方法は、周知の方法であり、通常、100mMのNaHCO₃において約37℃で数時間または4℃で一晩、pH8にて行われる。他のコーティング・バッファーは周知である（例えば、50mMのカーボネートpH9.6、10mMのTris pH8、または10mMのPBS pH7.2）。第2固体支持体は、本明細書に記載されているか、または当該技術分野で周知の支持体であればよく、好ましくは第2固体支持体はマイクロタイター・プレート、例えば、96ウエルのポリスチレン・プレートである。解離が高濃度のカオトロピック剤を用いて行われた場合は、第2固体支持体上にコーティングする前に少なくとも約2倍に希釈して、カオトロピック剤の濃度は下げる必要がある。解離が高pHまたは低pHを用いて行われ、次いで、中和した場合は、解離された病原性プリオンタンパク質は、希釈せずにコーティングに使用することができる。

30

【0254】

解離された病原性プリオンタンパク質を第2固体支持体上に一旦被覆すると、支持体は洗浄して、固体支持体に付着していない成分を除去することができる。第2固体支持体上に被覆したプリオンタンパク質に抗体を結合させることが可能な条件下で、抗プリオン抗体が添加される。第2固体支持体上にコーティングする前に、解離された病原性プリオンタンパク質が変性されたならば、用いた抗体はプリオンタンパク質の変性型に結合する抗体になるであろう。この種の抗体には、周知の抗体（上で説明した抗体など）、並びにマウス、ウサギ、ラットなどにおいて免疫反応を発現させるために、周知の方法、例えば、rPrP、PrP^Cまたはそれらのフラグメントを用いて作られる抗体がある（米国特許第4,806,627、6,165,784、6,528,269、6,379,905、6,261,790、6,765,088、5,846,533号、欧州特許第891552および909388号を参照のこと）。プリオンタンパク質のN-末端基端部においてエピトープを認識する抗プリオン抗体、例えば、残基23-90の領域内でエピトープを認識する抗体は特に好ましい。

40

【0255】

したがって、本発明は1つの実施形態では、試料中の病原性プリオンの存在を検出する

50

方法を提供し、該方法は下記工程を含む。

【0256】

- (a) 第1固体支持体上に第1ペプチド試薬を提供する工程と、
- (b) 試料中に存在する場合、病原性プリオンが、ペプチド試薬に結合して第1複合体を形成させる条件下で、第1ペプチド試薬を試料と接触させる工程と、
- (c) 結合していない試料物質を除去する工程と、
- (d) 病原性プリオンタンパク質を第1複合体から解離させる工程と、
- (e) 解離された病原性プリオンタンパク質を第1固体支持体から分離させる工程と、
- (f) 解離したプリオンタンパク質を第2固体支持体に付着させることができる条件下で、解離された病原性プリオンタンパク質を第2固体支持体と接触させる工程と、
- (g) プリオン結合試薬を用いて第2固体支持体上に付着した病原性プリオンを検出する工程。

10

【0257】

この実施形態では、第1固体支持体は好ましくは電磁ビーズであり、第2固体支持体は好ましくはマイクロタイター・プレートであり、プリオン結合試薬は好ましくは抗プリオン抗体、特に3F4、6H4、SAF32またはPolymenidou, 上記を参照、に記載された1つ以上のPOM抗体である。プリオン結合試薬は検出できるように標識を付けている。

【0258】

この方法の別の実施形態では、解離された病原性プリオンタンパク質は、抗体サンドイッチ型ELISAを用いて検出される。この実施形態では、解離したプリオンタンパク質は、第1抗プリオン抗体を含む第2固体支持体上で「再捕捉」される。再捕捉されたプリオンタンパク質を有する第2固体支持体は、随意に洗浄して結合していない物質を除去し、次いで、第2抗プリオン抗体を再捕捉されたプリオンタンパク質に結合させることができる条件下で、第2抗プリオン抗体と接触させる。第1および第2抗プリオン抗体は、通常、異なる抗体であり、プリオンタンパク質上の異なるエピトープを認識するのが好ましい。例えば、第1抗プリオン抗体は、プリオンタンパク質のN-末端基端部においてエピトープを認識し、第2抗プリオン抗体N-末端基以外の所でエピトープを認識し、その逆も成り立つ。第1抗体は、例えば、オクタリピート領域(残基23-90)においてエピトープを認識するSAF32でもよく、第2抗体は、残基109-112においてエピトープを認識する3F4でもよく、一方、第1抗体が3F4であり、第2抗体がSAF32であってもよい。第1および第2抗体の他の組み合わせは、容易に選択することができる。この実施形態では、第1ではなく、第2抗プリオン抗体が検出できるように標識を付けることになる。ペプチド試薬からの病原性プリオンタンパク質の解離がカオトロピック剤を用いて行われる場合は、検出アッセイを行う前に、カオトロピック剤は除去し、少なくとも15倍に希釈しなければならない。解離が高pHまたは低pHおよび中和を用いて行われる場合は、解離したプリオンは、希釈せずに使用することができる。解離された病原性プリオンタンパク質が、検出を行う前に変性される場合は、第1および第2抗体は両方が変性プリオンタンパク質に結合するであろう。

20

30

【0259】

このようにして本発明は試料中に病原性プリオンの存在を検出する方法を提供し、この方法は以下の工程を含む。

40

【0260】

- (a) 第1固体支持体上に、本明細書で説明した第1ペプチド試薬を提供する工程と、
- (b) 試料中に存在する場合、病原性プリオンが、ペプチド試薬に結合して第1複合体を形成する条件下で、第1ペプチド試薬を試料と接触させる工程と、
- (c) 結合していない試料物質を除去する工程と、
- (d) 病原性プリオンタンパク質を第1複合体から解離させ、それにより病原性プリオンタンパク質が変性される工程と、

50

(e) 解離した変性病原性プリオンタンパク質を第 1 固体支持体から分離させる工程と

(f) 解離したプリオンタンパク質を第 1 抗プリオン抗体に結合させることができる条件下で、解離した変性病原性プリオンタンパク質を第 1 抗プリオン抗体を含む第 2 固体支持体と接触させる工程と、

(g) 第 2 抗プリオン抗体を有する第 2 固体支持体上の結合プリオンタンパク質を検出する工程。

【 0 2 6 1 】

この実施形態では、第 1 固体支持体は好ましくは電磁ビーズであり、第 2 固体支持体は好ましくはマイクロタイター・プレートまたは電磁ビーズであり、第 1 および第 2 抗プリオン抗体は好ましくは異なる抗体であり、第 1 および第 2 抗体は好ましくは変性プリオンタンパク質に結合し、好ましくは、第 1 または第 2 抗プリオン抗体の少なくとも 1 つはプリオンタンパク質の N - 末端基領域におけるエピトープを認識する。一部の実施形態では、第 2 抗プリオン抗体は検出できるように標識を付け、別の実施形態では、第 2 抗プリオン抗体は標識付き酵素である。

10

【 0 2 6 2 】

上で説明した病原性プリオンを検出する方法のいずれかは、プリオン関連疾患を診断する方法において使用することができる。

【 0 2 6 3 】

診断および処置

20

本発明は、プリオン関連疾患を処置または予防する方法をさらに提供し、この方法は、1 つ以上のペプチド試薬または本明細書で説明した該試薬の組成物を動物に投与することを含む。本発明は、動物のプリオン関連疾患感染のレベルを決める方法も提供し、この方法は、診断を行い、処置または予防の必要性を評価するのに使用することができる。処置または予防が必要であるならば、それがプリオン関連疾患であっても、そうでなくてもよい。即ち、プリオン感染が存在しないと判断されれば、非プリオン関連疾患、障害、健康状態または症状に対する処置または予防が必要になる。この種の処置は、例えば、普通の薬剤でよい。本発明は、プリオン関連疾患の場所を特定する方法も提供する。

【 0 2 6 4 】

本明細書で使われている用語「処置」または「処置している」は、疾患または障害の進行を治療、改善または止めることを意味するか、またはこの種の疾患または障害の 1 つ以上の症状または副作用を改善するかまたは回復に無かわせることを意味している。

30

【 0 2 6 5 】

本明細書で使われている用語「投与している」は、ペプチド試薬またはその組成物を直接投与することを意味し、治療上効果的な量のペプチド試薬を受け入れる動物に与える。

【 0 2 6 6 】

本明細書で使われているフレーズ「治療上有効な量」は、生物学的または医学的な反応を発現する活性なペプチド試薬または組成物の量を指し、このような反応は、研究者、獣医、医師、または他の臨床医が組織、システム、動物、患者またはヒトにおいて求めているもので、次の事項の 1 つ以上を含む。

40

【 0 2 6 7 】

(1) 疾患を予防、例えば、疾患、状態または障害にかかりやすいが、この疾患の病状または総体症状をまだ経験したり発現していない個体の疾患、状態または障害を予防している、

(2) 疾患の抑制、例えば、この疾患の病状または総体症状をまだ経験したり発現している個体の疾患、状態または障害を抑制している、および

(3) 疾患の改善、例えば、この疾患の重篤度を低減するなど、疾患、状態または障害の病状または総体症状をまだ経験したり発現している個体の疾患、状態または障害を改善している (即ち、病状および / または総体症状を回復に向かわせる) 。

50

【0268】

一部の実施形態では、この方法は、動物から試料を取得する工程と、本発明の何らかの検出方法に従って病原性プリオンの存在を検出する工程と、検出された病原性プリオンの有無からプリオン疾患感染のレベルを決定する工程とを含む。

【0269】

一部の実施形態では、動物のプリオン関連疾患感染の部位を決める方法を提供し、この方法は、本発明のペプチド試薬またはその組成物を動物に投与する工程と、ペプチド試薬が造影剤に連結される工程と、造影剤を検出する工程と、それにより動物のプリオン関連疾患の感染を限局化する工程とを含む。

【0270】

動物のプリオン関連疾患を処置または予防する方法の一部の実施形態では、この方法は、本発明の検出方法により動物の1つ以上の病原性プリオンの存在を決定する工程と、本発明の1つ以上のペプチド試薬、または該試薬を含む組成物を1つ以上の病原性プリオンが存在するという判断に従って動物に投与する工程、または1つ以上の病原性プリオンが存在しないという判断に従って動物に1つ以上の普通の薬剤を投与する工程とを含む。一部の実施形態では、この方法は、プリオン関連疾患感染が存在するという判断に従い、1つ以上の普通の薬剤を動物に投与する工程を含む。一部の実施形態では、テスト用試料は、臓器、細胞、全血、血液画分、血液成分、血漿、血小板、血清、脳脊髄液(CSF)、脳組織、神経系組織、筋肉組織、筋肉および脂肪組織(例えば、肉)、骨髓、尿、涙、非神経系組織を含む。

【0271】

動物のプリオン関連疾患を処置または予防する方法の一部の実施形態では、この方法は、本発明のペプチド試薬、または該試薬を含む組成物を含む第1投与を動物に投与する工程と、ペプチド試薬、または該試薬を含む組成物を、その動物に免疫反応を誘発させるのに十分な量の第2投与を投与する工程とを含む。

【0272】

本明細書で使われている「免疫反応」は、ペプチド試薬がワクチン内に存在する時のようにペプチド試薬に対して、動物における体液性および/または細胞免疫学的反応の発生である。したがって、免疫反応は、一般に、分泌腺、細胞および/または抗体仲介免疫反応の動物における発生を生じる結果になる。通常、この種の反応には、1つ以上の次のような作用、即ち、免疫グロブリンA、D、E、GまたはMなどの免疫学的クラスのうちいずれかからの抗体の産生、BおよびTリンパ球の増殖、免疫学的細胞への活性化、増殖および分化信号の供給、およびヘルパーT細胞、抑制遺伝子T細胞、および/または細胞毒性T細胞の拡張の1つ以上が含まれるがこれらに限定されない。産生された抗体の量は、関与した動物、投与した組成物の投与回数、アジュバントの存在、などにより変わるであろう。

【0273】

本発明の一部のペプチド試薬組成物は、アジュバントをさらに含む。動物のプリオン関連疾患を処置または予防する方法のこの種の実施形態では、第1投与および/または第2投与は少なくとも1つのアジュバントを含む。この種の実施形態では、第1および第2両方の投与はアジュバントを含む。本発明の投与および組成物において有効なアジュバントの非限定的な例は、全体が本明細書に組み込まれている国際公開第05/016127号に記載されている。

【0274】

動物のプリオン関連疾患を処置または予防する方法の一部の実施形態では、この動物は病原性プリオンに感染していると診断されている。一部の実施形態では、この動物は、病原性プリオンに感染していると診断された第2動物に近接近していた。「近接近」は、診断された動物と同じ群れまたは動物のコミュニティー、同じ農場、牧場にいた、またはこの動物と共に輸送、処理されたことを意味している。一部の実施形態では、この動物は、病原性プリオンに感染したと診断された第2動物の家族である。一部の実施形態では、こ

10

20

30

40

50

の動物は、プリオン関連疾患と関係した症状を呈する。一部の実施形態では、この動物は、プリオン関連疾患のリスクがある。「リスクに」ある動物は、遺伝的にまたはそうでなければ、例えば、環境的に、プリオン関連疾患を発生、感染、受容する、さらされている方向の素因を有する動物である可能性がある。環境的素因には、例えば、プリオン関連疾患にさらされた地理的または物理学的エリアに住んでいる群れまたはコミュニティーにいる動物が含まれる。一部の実施形態では、リスクのある動物は、病原性プリオンに感染したか、または感染した疑いのある動物の子孫である。一部の実施形態では、リスクにある動物は、第2動物から導かれ消化された生物学的物質を有し、第2動物はプリオン関連疾患に感染しているか、またはそのリスクがある。

【0275】

第1投与を含む組成物は、第2投与の組成物と同じかまたは異なっている。一部の実施形態では、第2投与の組成物は第1投与の組成物と同じかまたは異なっている。一部の実施形態では、第1および第2投与の組成物は、異なっている。一部の実施形態では、この方法は、普通の薬剤の投与をさらに含む。一部の実施形態では、普通の薬剤は、抗体、オリゴヌクレオチド、有機化合物、またはペプチド模倣薬を含む。一部の実施形態では、普通の薬剤は、インターロイキン2 (IL-2)、修飾IL-2 (cys125-ser125)、顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子 (GM-CSF)、インターロイキン12 (IL-12)、アルファ-またはガンマ-インターフェロン、ケモカインIP-10、およびRANTES、MIP1-、およびMIP1-などのケモカインを含むがこれらに限定されない抗原または免疫グロブリン、サイトカイン、リンフォカイン、およびケモカインである。

【0276】

本発明の処置および予防方法のいずれかにおいて、動物は、ヒトまたはヒト以外を含む。ヒト以外の動物では、動物は野生、即ち、飼いならされていない動物、例えば、シカ、ヘラジカ、ムース、アンテロープ、熊、野生羊、ラマ、バイソン、馬、ラバと雄ロバ、ヒョウ、ピューマ、クーガー、虎、ライオン、およびチータなどの大型のネコ、および小型哺乳類、例えば、ウサギ、プレーリードッグ、アライグマ、スカンク、など、または鳥類、または例えば、飼いならされたペット、例えば、ネコ、犬、白イタチ、ウサギ、ラット、またはマウス、家畜、例えば、乳牛、牛、羊、豚、ヤギ、馬、ラバおよび雄ロバ、または鳥類、例えば、ニワトリ、めんどり、アヒル、ガチョウ、七面鳥、および他の家禽類、および研究用動物、例えば、類人猿、猿、およびルーマーなどのヒト以外の霊長類、マウス、ラット、ハムスターおよびモルモットなどのげっし類を含む飼いならされた動物でよい。本発明で使用するのに適した動物は、年齢はいくつでもよく、大人と新生児を含む。一部の実施形態では、動物は哺乳類である。一部の実施形態では、哺乳類はヒトである。一部の実施形態では、哺乳類はヒト以外である。一部の実施形態では、上で説明した組成物を投与する。一部の実施形態では、哺乳類は、ネコ、イヌ、白イタチ、ウサギ、ラット、マウス、ウシ、去勢ウシ、ヒツジ、子牛、ブタ、ヤギ、馬、ラバ、雄ラバ、シカ、ヘラジカ、熊、バイソン、クーガー、ピューマ、類人猿、サル、ルーマー、ハムスターまたはモルモットを含む。一部の実施形態では、哺乳類は、ウシ、去勢ウシ、シカ、ヒツジ、子牛、ブタまたはヤギを含む。一部の実施形態では、この組成物は、筋肉注射で、粘膜内に、鼻から、皮下に、皮内に、経皮的に、腔内に、直腸内に、経口でまたは静脈内に投与される。

【0277】

単離，低減および除去

本発明は、試料から病原性プリオンを単離または試料中の病原性プリオンの量を低減する方法も提供する。

【0278】

試料から病原性プリオンを単離する方法は、本発明のペプチド試薬を含む固体支持体を提供する工程と、もし試料中に存在するならば、病原性プリオンをペプチド試薬に結合させることができる条件下で、固体支持体を試料と接触させて複合体を形成する工程と

10

20

30

40

50

、結合していない試料を除去する工程と、それにより単離された病原性プリオンを提供する工程とを含む。一部の実施形態では、この方法は、複合体から病原性プリオンを解離する工程を含む。

【0279】

試料中の病原性プリオンの量を低減する方法は、本発明のペプチド試薬を含む固体支持体を提供する工程と、もし試料中に存在するならば、病原性プリオンをペプチド試薬に結合させることができる条件下で、固体支持体を試料と接触させる工程と、結合していない試料を回収する工程と、それにより病原性プリオンの量が低減した試料を提供する工程とを含む。一部の実施形態では、病原性プリオンの量は、検出可能なレベル以下に下げられる。一部の実施形態では、病原性プリオンの量は、約80～100、約85～100、約90～100または約95～100%だけ下げられる。

10

【0280】

本発明は、実質的に病原性プリオンを含まない血液供給物を調製する方法を提供し、この血液供給物は、血液バンクからの血液供給物または手術する前に患者自身から集めた血液、例えば、手術中の自己血輸血などの集めた血液試料を含む。血液供給物は、例えば、制限なしに、全血、血漿、血小板または血清を含むことができる。一部の実施形態では、この方法は、本発明の検出方法により複数の試料中の病原性プリオンの有無を検出する工程と、病原性プリオンが検出されない試料を合体する工程と、それにより実質的に病原性プリオンを含まない血液供給物を提供する工程とを含む。一部の実施形態では、本発明の検出方法は、もし存在するならば病原性プリオンにペプチド試薬を結合させて複合体を形成する工程と、ペプチド試薬に結合させることにより試料中の病原性プリオンの存在を検出する工程とを含み、複合体の形成は病原性プリオンの存在を示している。一部の実施形態では、この複合体は、ペプチド試薬を含み、病原性プリオンタンパク質は、検出する前に、試料の残り（即ち、結合していない試料）から分離される。一部の実施形態では、複合体の形成は、複合体中に病原性プリオンを検出するか、または複合体を解離し（結合していない試料から分離後）、次いで、解離された病原性プリオンを検出することにより、検出することができる。

20

【0281】

本発明は、実質的に病原性プリオンを含まない供給用肉（例えば、ヒトまたは動物が消費するために使われる、ウシ、ヒツジまたはブタの筋肉および脂肪組織（即ち、肉）、例えば、ビーフ、子羊の肉、マトンまたはポーク）などの食料供給物を調製する方法も提供する。一部の実施形態では、この方法は、本発明の検出方法による複数の試料の中の病原性プリオンの有無を検出し、次いで、病原性プリオンが検出されない試料を合体し、それにより実質的に病原性プリオンを含まない食料供給物を提供する工程を含む。一部の実施形態では、食料供給物は、食料供給物に入る予定の生命体またはかつての生命体あるいは供給用に入れる予定の食料から集める。一部の実施形態では、本発明の検出方法は、もし存在すれば、病原性プリオンにペプチド試薬を結合することを可能にして複合体を形成し、次いで、ペプチド試薬へのその結合により試料中の病原性プリオンの存在を検出する工程を含む。一部の実施形態では、ペプチド試薬への病原性プリオンの結合は、複合体の形成を検出することにより検出することができ、複合体の形成は病原性プリオンの存在を示している。一部の実施形態では、複合体はペプチド試薬を含み、病原性プリオンタンパク質は、検出する前に、試料の残り（即ち、結合していない試料）から分離される。一部の実施形態では、複合体の形成は、複合体中の病原性プリオンを検出することにより、または複合体を解離し（結合していない試料から分離後）、および解離された病原性プリオンを検出することにより検出することができる。

30

40

【0282】

デザイン

本発明のペプチド試薬をデザインする方法が、本発明によりさらに提供される。出発点として、ペプチド試薬は、プリオンタンパク質の特定のペプチド・フラグメントの配列（例えば、配列番号12-228を有するペプチド・フラグメント）に基づいて、ペプ

50

チド・フラグメントの配列の中のアミノ酸残基をN-置換グリシンにより置換することにより、米国特許第5,811,387、5,831,005、5,877,278、5,977,301および6,033,631号、並びにSimonら、(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367、に記載された方法を用いた修飾ペプチドの合成、本明細書に記載された方法による病原性プリオンタンパク質への結合に関する修飾ペプチドのテストによりデザインすることができる。なおこれらの特許および文献は引用により全体が本明細書に組み込まれている。追加の置換は、適切なペプチド試薬が実現するまで下の置換スキームにより行うことができる。

【0283】

さらに、ペプチド試薬のデザインは、下の実施例5に記載されたthe Solid-phase Submonomer Synthesis Protocol for Peptides (ペプチドの固相サブモノマー合成プロトコル)の態様を含む。

10

【0284】

一部の実施形態では、本発明のペプチド試薬を調製する方法は下記の工程を含む。

【0285】

a) プリオンタンパク質のペプチド・フラグメントを供給し、ペプチド・フラグメントの第1アミノ酸を次の置換スキームによりN-置換グリシンを用いて置換する工程と、

i) Ala、Gly、Ile、Leu、Pro、およびValはN-(アルキル)グリシン、N-(アラキル)グリシン、またはN-(ヘテロアリーラルキル)グリシンにより置換する工程と、

20

ii) Asp、Asn、Cys、Gln、Met、Ser、およびThrは、N-(ヒドロキシアリキル)グリシン、N-(アルコキシ)グリシン、またはN-(グアニジノアルキル)グリシンにより置換する工程と、

iii) Phe、Trp、およびTyrは、N-(アラキル)グリシン、N-(ヘテロアリーラルキル)グリシン、N-(ヒドロキシアラキル)グリシン、N-(アルコキシアラキル)グリシンにより置換する工程と、

iv) Arg、His、およびLysは、N-(アミノアルキル)グリシンまたはN-(グアニジノアルキル)グリシンにより置換する工程と、

b) ペプチド・フラグメントの第2アミノ酸を工程a)によるN-置換グリシンを用いて置換する工程と、

30

c) ペプチド・フラグメントの第3アミノ酸を工程a)によるN-置換グリシンを用いて置換する工程と、

d) 随意に、工程c)を1-27回反復する工程と、

それにより、3-30個のN-置換グリシンを含む、デザインしたペプチドを供給し、デザインしたペプチド試薬を合成する工程。

【0286】

上の方法の一部の実施形態では、ペプチド・フラグメントは、配列番号

【0287】

【数 4】

12, 13, 14, 15, 16, 17,
 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42,
 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67,
 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92,
 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112,
 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130,
 131, 132, 133, 134, 135, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148,
 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166,
 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184,
 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202,

10

【0 2 8 8】

【数 5】

203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220,
 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, および 228

からなる群から選択される配列を有するペプチドを含む。

20

【0 2 8 9】

上の方法の一部の実施形態では、ペプチド・フラグメントは、配列番号

【0 2 9 0】

【数 6】

66, 67, 68, 72, 81, 96,
 97, 98, 107, 108, 109, 14, 35, 36, 37, 40, 50, 51, 77, 89, 100, 101, 110, 56, 57, 65, 82, 84,
 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128,
 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146,
 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164,
 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 278, 279, 180, 181, 182,
 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200,
 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218,
 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, および 228

30

からなる群から選択される配列を有するペプチドを含む。

【0 2 9 1】

上の方法の一部の実施形態では、ペプチド・フラグメントは、配列番号

【0 2 9 2】

【数 7】

12, 14, 50, 51, 52, 68,
 72, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132,
 133, 134, 135, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150,
 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168,
 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186,
 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204,
 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, および 219

50

からなる群から選択される配列を有するペプチドを含む。

【0293】

上の方法の一部の実施形態では、ペプチド・フラグメントは、配列番号

【0294】

【数8】

14, 50, 51, 52, 161,

162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179,
180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197,
198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215,
216, 217, 218, および 219

10

からなる群から選択される配列を有するペプチドを含む。

【0295】

上の方法の一部の実施形態では、ペプチド・フラグメントは、配列番号

【0296】

【数9】

12, 68, 72, 115, 116,

117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134,
135, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152,
153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, および 160

20

からなる群から選択される配列を有するペプチドを含む。

【0297】

ペプチド試薬をデザインする方法の一部の実施形態では、ペプチド・フラグメントは、配列番号12、14、50、51、52、67、68、72および109からなる群から選択される配列を有するペプチドを含む。

【0298】

一部の実施形態では、この方法は、ペプチド試薬に、各々はリンカー部分を介してペプチド試薬に随意に連結した、エフェクタ分子、基質、または標識から選択される共役部分を追加することをさらに含む。一部の実施形態では、共役部分はビオチンを含む。一部の実施形態では、共役部分はメルカプト基を含む。

30

【0299】

他の用途

本発明は、本発明の少なくとも1つのペプチド試薬を含む固体支持体を提供する。固体支持体は、すでに上で説明したとおりでよい。本発明は、試料中の病原性プリオンの存在を検出するキットを提供する。一部の実施形態では、このキットは本発明のペプチド試薬を含む。一部の実施形態では、このキットは本発明のペプチド試薬を含む固体支持体を含む。この試薬は、例えば、無制限に、検出できるように標識された、抗体、発色団、色原体、抗プリオン抗体などのプリオン結合試薬、モチーフ・グラフトしたハイブリッド・ポリペプチド、カチオン性またはアニオン性ポリマー、増殖触媒およびプラスミノーゲンまたはバッファーなどの検出試薬でよい。一部の実施形態では、キットは2つ以上の本発明のペプチド試薬を含む。一部のキットの実施形態では、正および/または負の対照が随意に含まれる。

40

【0300】

本明細書で開示された発明をより効率的に理解できるように、以下に実施例を提示する。これらの実施例は説明のためだけのものであり、何らかの形で本発明を制限するものと解釈してはならない。

【実施例】

50

【0301】

実施例 1

ペプチド領域の配列

表 1 は、本発明のペプチド試薬を調製するのに適したペプチド領域（アミノからカルボキシに向けて）の例を示している。表 2 は表 1 において使われた略語の手がかりを提示している。表 3 は各配列の関連構造を提示している。表 1 の配列を含むペプチド試薬は、本明細書で説明したアッセイにより、PrP^{Sc}への選択的な結合についてテストした。個々の試薬の調製については、以下で説明する。

【0302】

表 1：本発明のペプチド試薬の代表的なペプチド領域

10

【0303】

【化 7】

ペプチド領域の配列	配列番号
Nab-Nab-Nab-Nab-Nab	229
Nab-Nab-Ngb-Nspe-Nab-Nspe	230
Nae-Nmpe-Nmpe-Nae-Nmpe-Nmpe-Nae-Nmpe-Nmpe	231
Nme-Ntrp-Nme-Nab-Nspe-Nhye-Nab-Nspe-Nhye-Nme	232
Nspe-Nab-Nspe-Nab-Nspe-Nspe-Nab-Nspe-Nab-Nspe-Nspe	233
Nbn-Nab-Nbn-Nab-Nbn-Nbn-Nab-Nbn-Nab-Nbn-Nbn	234
Nme-Nab-Nme-Nab-Nnm-Nme-Nab-Nnm-Nab-Nme-Nme	235
Nme-Nab-Nme-Nab-Nme-Nme-Nab-Nme-Nab-Nme-Nme	236
Nab-Nab-Nab-Nspe-Nab-Nspe	237
Nab-Nspe-Nab-Nab-Nspe-Nab	238
Nab-Nab-Nab-Nspe-Nab-Nspe	239
Nab-Nab-Nab-Nbn-Nab-Nbn	240
Nme-Nbn-Nme-Nbn-Nme-Nbn	241

20

30

表 2：表 1 の手がかりとなる略語

【0304】

【化 8】

ペプチド残基 の略語	アミノ酸代替物
Ntyr	N-(2-(4-ヒドロキシフェニル)エチル)グリシン
Nhph	N-(4-ヒドロキシフェニル)グリシン
Nspe	(S)-N-(1-フェニルエチル)グリシン
Nme	N-(2-メトキシエチル)グリシン
Ncpm	N-(シクロプロピルメチル)グリシン
Ntrp	N-(2-3'-インドリルエチル)グリシン
Nab	N-(4-アミノブチル)グリシン
Nmpe	N-(2-(4-メトキシフェニル)エチル)グリシン
Ndmb	N-(3,5-ジメトキシベンジル)グリシン
Nbn	N-ベンジルグリシン
Nhye	N-(2-ヒドロキシエチル)グリシン
Nip	N-イソプロピルグリシン

10

20

【 0 3 0 5 】

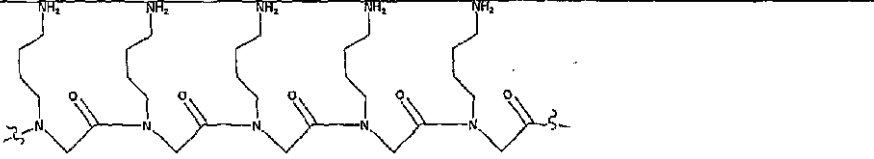
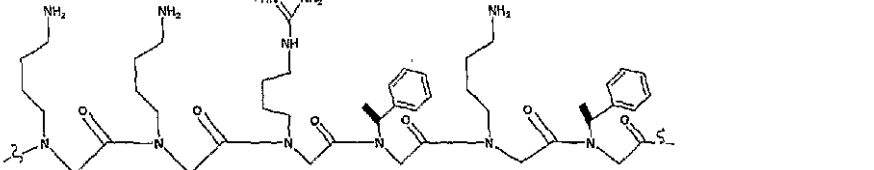
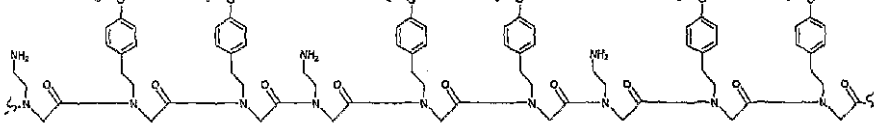
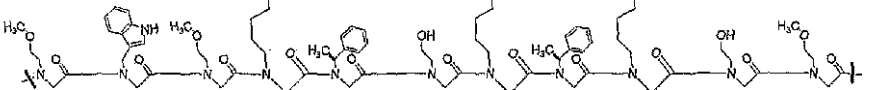
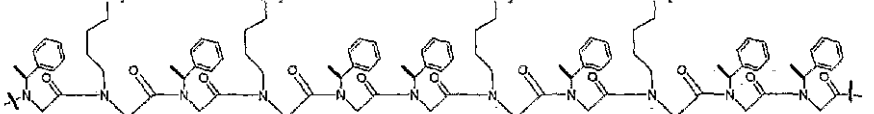
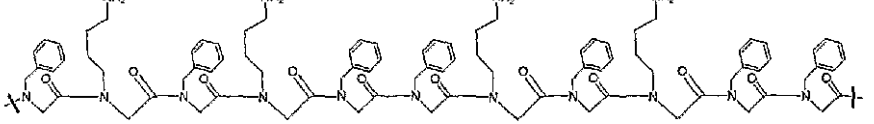
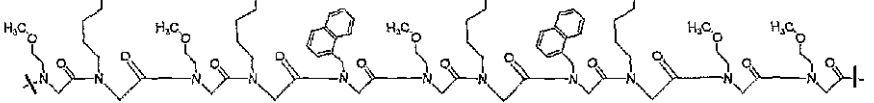
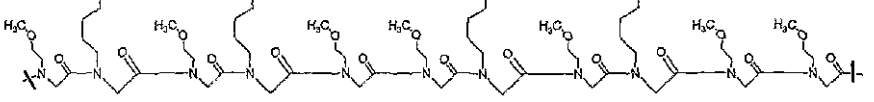
【化 9】

Nnm	N-((8'-ナフチル)メチル)グリシン
Ngb	N-(4-ガアニジノブチル)グリシン
Nae	N-(4-アミノエチル)グリシン

表 3 : 表 1 のペプチド領域の関連構造

【 0 3 0 6 】

【化10】

配列番号	構造
229	
230	
231	
232	
233	
234	
235	
236	

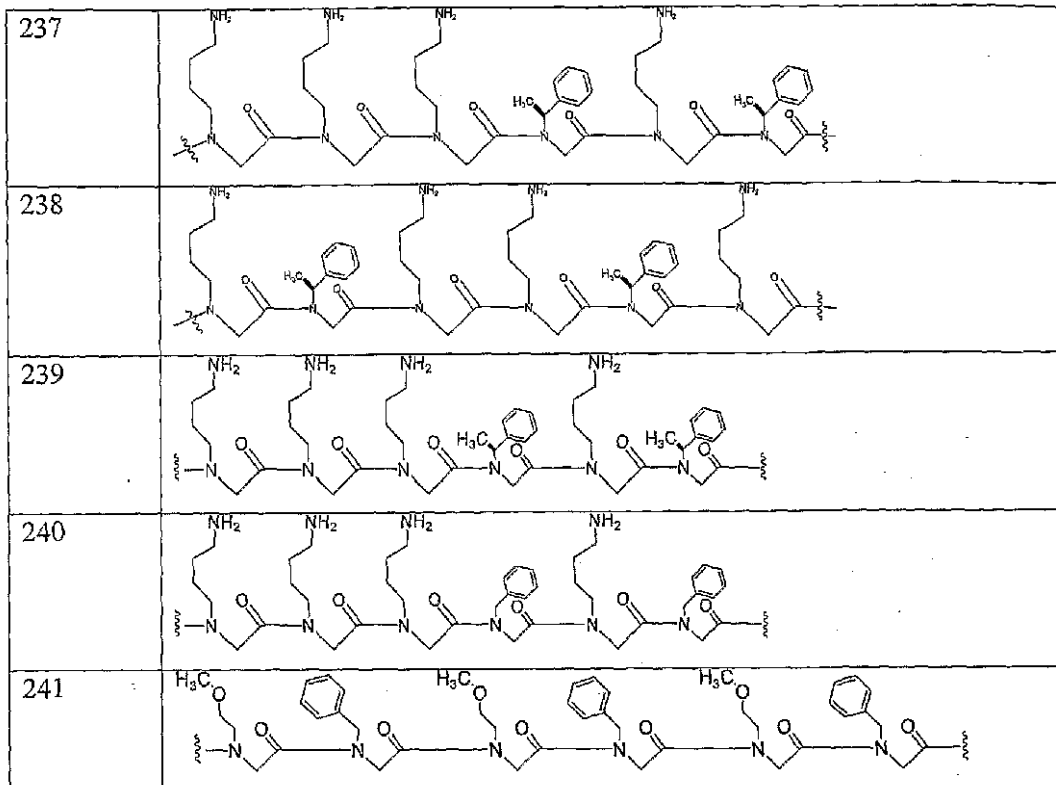
10

20

30

【0307】

【化 1 1】



10

20

実施例 2

ペプチド試薬

次のペプチド試薬は、米国特許第 5,811,387、5,831,005、5,877,278、5,977,301 および 6,033,631 号、並びに Simon ら、(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367、で開示された手順などの N-置換グリシン残基を含むペプチド分子を調製する合成方法を用いて調製し、これらの特許および文献の各々は引用により全体が本明細書に組み込まれており、実施例 5 に記載されたプロトコルを用いている。以下の試薬の各々は、本明細書で説明したアッセイによりプリオンタンパク質に対する結合親和性についてテストした。

30

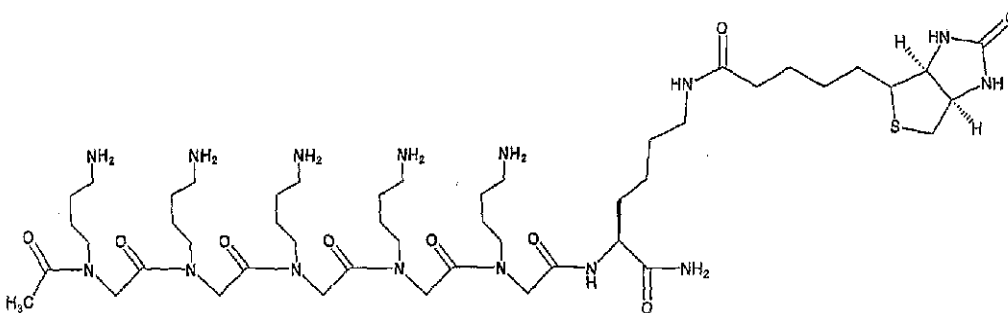
【0308】

ペプチド試薬 I

以下のペプチド試薬は配列番号 229 を含む。

【0309】

【化 1 2】



40

質量 (理論値) : 1054.42、質量 (実測値) : 1054.2。質量の実測はすべて Waters (マサチューセッツ州ミルフォード) の Micromass ZQ LC/MS System で測定した。

【0310】

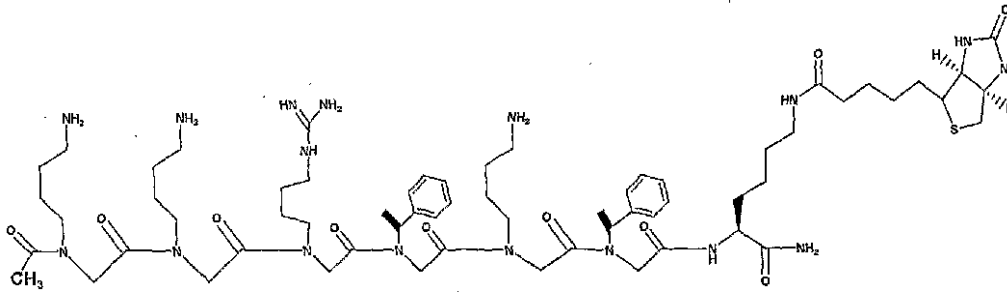
ペプチド試薬 I I

50

以下のペプチド試薬は配列番号 230 を含む。

【0311】

【化13】



10

質量 (理論値) : 1290.70、質量 (実測値) : 1290.8。

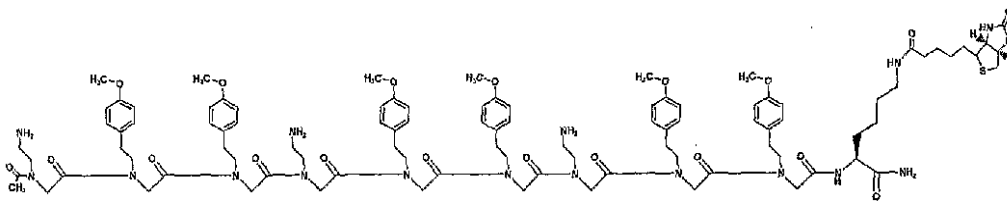
【0312】

ペプチド試薬 III I

以下のペプチド試薬は配列番号 231 を含む。

【0313】

【化14】



20

質量 (理論値) : 1861.30、質量 (実測値) : 1861.6。

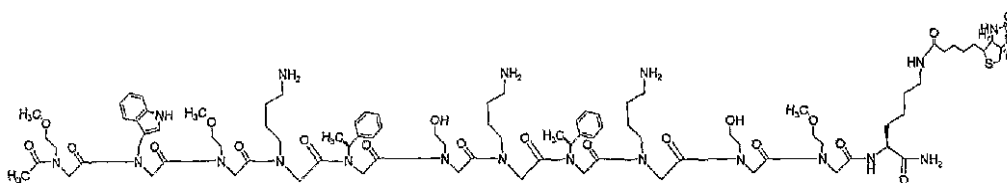
【0314】

ペプチド試薬 I V

以下のペプチド試薬は配列番号 232 を含む。

【0315】

【化15】



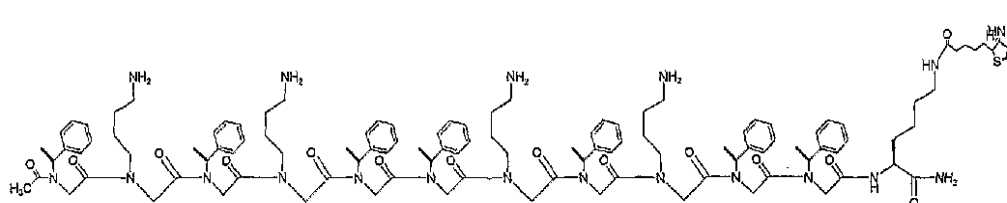
30

ペプチド試薬 V

以下のペプチド試薬は配列番号 233 を含む。

【0316】

【化16】



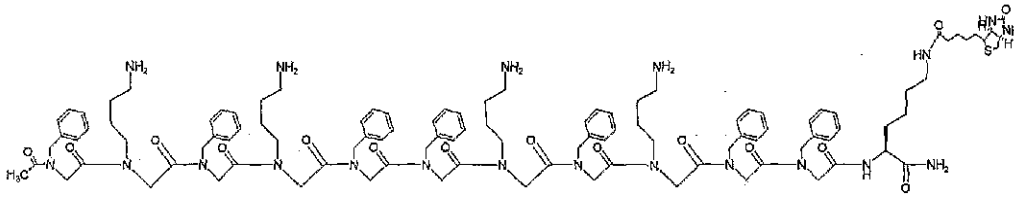
40

ペプチド試薬 V I

以下のペプチド試薬は配列番号 234 を含む。

【0317】

【化 17】



質量（理論値）：1956.49；質量（実測値）：1956.2。

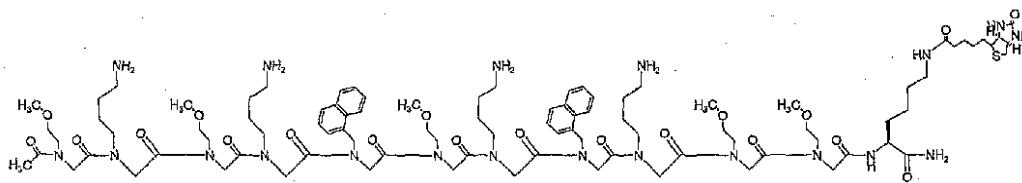
【0318】

ペプチド試薬VII

以下のペプチド試薬は配列番号235を含む。

【0319】

【化 18】



質量（理論値）：1896.39、質量（実測値）：1896.4。

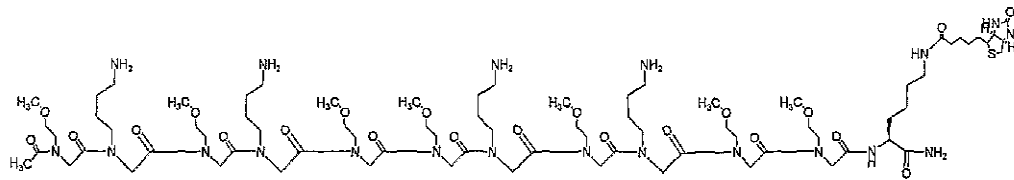
【0320】

ペプチド試薬VIII

以下のペプチド試薬は配列番号236を含む。

【0321】

【化 19】



質量（理論値）：1732.18、質量（実測値）：1732.4。

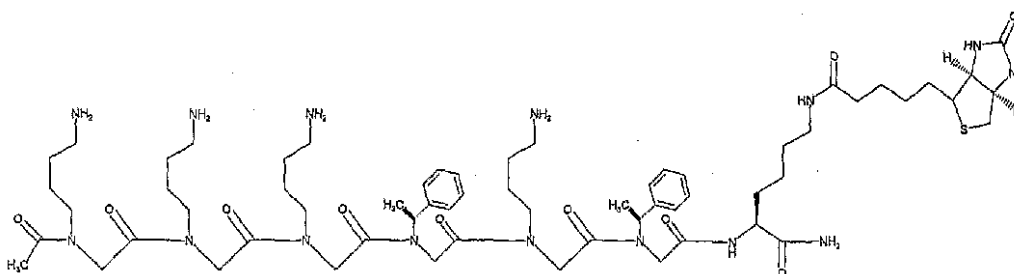
【0322】

ペプチド試薬IX

以下のペプチド試薬は配列番号237を含む。

【0323】

【化 20】



質量（理論値）：1248.65、質量（実測値）：1248.4。

【0324】

ペプチド試薬X

以下のペプチド試薬は配列番号238を含む。

【0325】

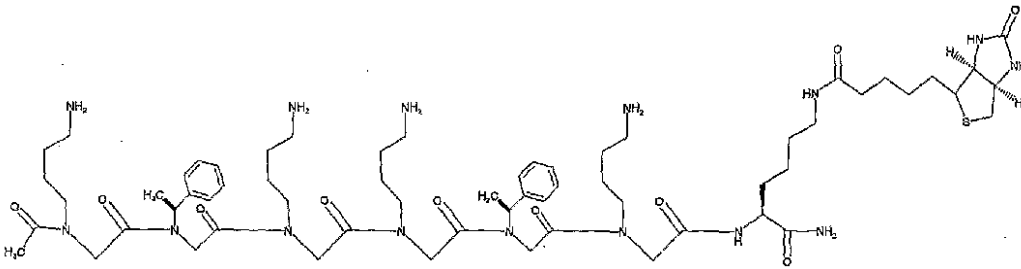
10

20

30

40

【化 2 1】



質量（理論値）：1248.65、質量（実測値）：1248.4。

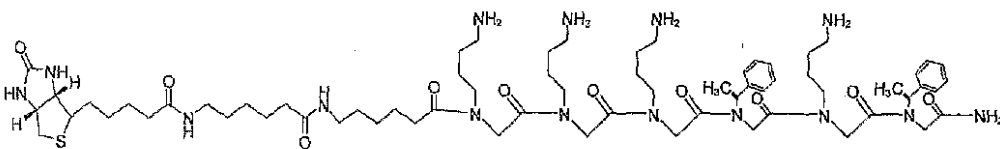
【0326】

ペプチド試薬 X I a および X I b

以下のペプチド試薬、X I a および X I b、は配列番号 239 を含む。

【0327】

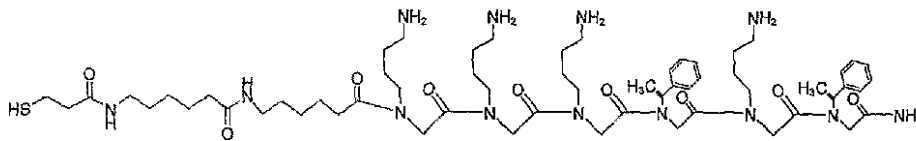
【化 2 2】



X I a

10

20



X I b.

X I a : 質量（理論値）：1304.76、質量（実測値）：1304.6

X I b : 質量（理論値）：1166.59、質量（実測値）：1166.2。

30

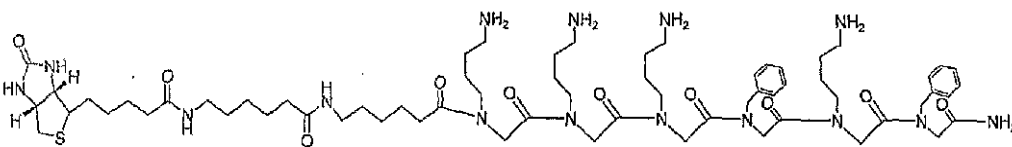
【0328】

ペプチド試薬 X I I a および X I I b

式 X I I a および X I I b の以下のペプチド試薬は配列番号 240 を含む。

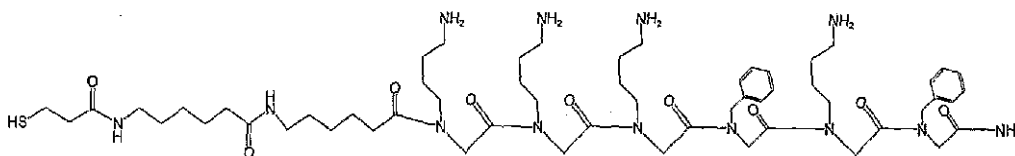
【0329】

【化 2 3】



X I I a

40



X I I b.

X I I a : 質量（理論値）：1276.71、質量（実測値）：1276.6。

【0330】

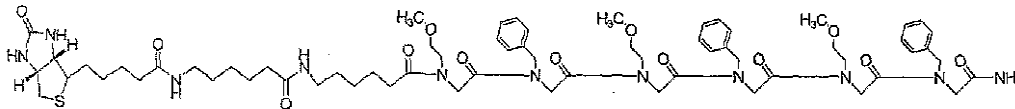
ペプチド試薬 X I I I

以下のペプチド試薬は配列番号 241 を含む。

50

【0331】

【化24】



質量(理論値) : 1256.58、質量(実測値) : 1256.6。

【0332】

実施例3

結合アッセイ

プルダウン・アッセイ

実施例2のペプチド試薬は、磁気ビーズのプルダウン・アッセイを用いて病原性プリオンタンパク質へ特異的に結合するこれらの試薬の能力をテストした。このアッセイでは、ペプチド試薬は、2つの方法のうちの一つで磁気ビーズに取り付けた。即ち、1) ペプチド試薬は、ストレプトアビジンで被覆した磁気ビーズに取り付けることができるビオチンで標識された、または2) チオール・プロピオン酸を介して、ペプチドを磁気ビーズに共有結合させた。ビーズへのペプチド試薬の取り付けモードは、ペプチド試薬の結合活性化に対してほとんど効果がなかったが、ペプチド試薬をビーズに共有結合させた場合は、希釈剤として用いた血漿試料からのバックグラウンド干渉はほとんど認められなかった。磁気ビーズは、Dyna1 (ウイスコンシン州ブラウン・ディア) から得た。通常、10マイクロリットル(10 μ l)のストレプトアビジンM-280 Dynabeads (登録商標)(cat# 112.05)が、ビオチン化ペプチド試薬を用いた単一プルダウン反応に使われた。

10

20

30

40

50

【0333】

死亡したCJD患者および健康な(即ち、CJDではない)死亡した個体からのヒトの脳ホモジネート(0.25Mスクロース中10%w/v)は、英国のポッターズパーのBlanche Lane South Mimmsにある国立生物学的製剤研究所(the National Institute for Biological Standards and Controls: NIBSC)から得た。本明細書に記載した大抵の実験では、3名のCJD患者(1人は新変異型患者および2名の孤発性患者)からの試料を合体し、そのヒトの脳ホモジネートについてアッセイを行った。200 μ lのアリコート、1% Triton X100および1% Tween-20を含むTBSバッファ(50mMトリス-HCl pH7.5および37.5mM NaCl)において1:1のvol:volで希釈し、これらの試料は、各々、数秒の超音波分解を数回繰り返した。脳ホモジネート・アリコートは、-70 $^{\circ}$ Cに保持した。

【0334】

PrP^{Sc}へのペプチド試薬の結合性を評価するために、CJD脳ホモジネートは健康な個体のヒト血漿へ加えた。一般に、2つの負の対照試料、即ち、1) 正常なヒトの血漿、および2) 正常な(CJDでない)ヒトの脳のホモジネートを加えた正常なヒトの血漿、を用いた。ヒト血漿の標準アッセイ濃度は、試料総容積の0から80%までの範囲で変えた。

【0335】

典型的なプロトコルでは、1つのプルダウン・テスト(96のウエルプレートのマイクロタイターの1つのウエルにおいて最後には100 μ l)について、10 μ lのストレプトアビジンM-280 Dynabeads (登録商標)(cat# 112.05)が使われる。適切な量のビーズは、1% Tweenおよび1% Triton X-100(TBSTT)を含むTBSを用いて使用する前に1度洗浄する。ビーズペレットは、原液容積の10倍、即ちTBSTTを有する100 μ lの溶液に再懸濁させる。その後、0.1 μ lのビオチン化ペプチド試薬試薬原液(H₂O中10mM)をビーズ溶液に添加し、室温で1時間750rpm、または37 $^{\circ}$ Cで30分750rpm(エッペンドルフ、サーモミキサーR)にて混合する。結合していないペプチドを含む上澄み液は廃棄され、ビー

ズは、チューブの底にビーズを保持する磁気装置を用いてTBSおよびTween-20の0.05% (TBST)を用いて3度洗浄した。この段階で、ペプチド試薬で被覆したストレプトアビジン磁気ビーズが得られる。次に、ペプチド被覆磁気ビーズ(オリジナル出発容積は μl に相当している)は、最終容積 $100\mu\text{l}$ において、血漿(最終濃度0-80%)、 $1\times\text{TBS}$ 、1% Triton X-100、および1% Tween-20の存在下で、種々の濃度のCJD10%脳ホモジネートと混合する。典型的な反応容積は、96のウェルを有するプレートのウェルにおいて $100\mu\text{l}$ である。このプレートは、37で1時間750rpm(エッペンドルフ、サーモミキサーR)にて振とうする。ビーズは、結合していないタンパク質を除去するために、プレート洗浄器ELx405マグマ(バーモント州ウィヌースキのBio-Tek Instruments, Inc.)を用いて、0.05%のTween-20を含むTBS溶液で4回洗浄した。このマイクロタイター・プレート洗浄器は、磁気ビーズ技術を用いる用途用に特別にデザインされている。第2キャリアは、磁気プレートをマイクロプレートのボトムに近接して配置し、臨界吸引サイクルの間に磁気ビーズを確保する。

10

20

30

40

50

【0336】

E L I S A

ブルダウン・アッセイの最終洗浄後、PrP^{Sc}はビーズから溶離され、変性され、ELISA(酵素免疫測定吸着法)フォーマットにおいてモノクローナル(mAb)抗プリオン抗体を用いて検出する。1つのアッセイ・フォーマット(間接ELISA)では、PrP^{Sc}に結合した量に比例する抗プリオン抗体の検出は、一次モノクローナルを認識している二次ポリクローナル抗体で達成される。二次抗体は、酵素アルカリ性ホスファターゼに共役している。化学発光基質を用いて培養した場合は、酵素は化合物を壊し、発光を生じ、発光は標準マイクロプレート化学発光読み取り器により測定される。測定されたユニットは、相対的光ユニット(RLU)として規定される。第2フォーマット(直接ELISA)では、検出は、アルカリ性ホスファターゼに共役しているモノクローナル(mAb)抗プリオン抗体を用いてなされ、したがって、二次抗体は必要ではない。同じ化学発光基質(Lumigen, Inc.製のLumi-Phos Plus)は、両フォーマットで使われる。サンドイッチELISAフォーマットも、本明細書で説明したように使用することができる。ELISAは、あらゆる数のフォーマット、例えば、プレート上、ビーズ上、磁気粒子上で行うことができる。変性され、溶離されたプリオンは、固体支持体上に受動的に被覆されるか、抗体-抗原サンドイッチ型配置に結合され、抗プリオン抗体は固体支持体上に被覆されている。

【0337】

結果

ELISA結合アッセイの結果を下に要約する。

【0338】

テストした本発明の代表的ペプチド試薬の大部分は、配列番号68のペプチド試薬の結合効率と類似した該効率を有する。以前の研究では、配列番号68のペプチドは、プリオンタンパク質に対する良好な結合効率を有し(例えば、2005年2月11日出願された米国特許出願第11/056,950号を参照のこと)、したがって、本発明のペプチド試薬の結合効率を測定するための基準として使われた。表4のデータは、ペプチド試薬(共同所有の出願である2004年8月13日出願された米国特許出願第10/917,646号、2005年2月11日出願された米国特許出願第11/056,950号、および2004年8月13日出願された国際出願PCT/US2004/026363号に記載されている配列番号68)に比べて種々のペプチド試薬を用いてブルダウン/ELISAアッセイで得られた信号を示している。10% CJD脳ホモジネートの $1\mu\text{l}$ 試料からまたは10%の正常な脳ホモジネートの $1\mu\text{l}$ 試料からの信号を、両方とも70%血漿において、示している。右端のカラムは、ペプチド配列番号68アッセイの実験的平均値の%として、ペプチド試薬アッセイの実験的平均値を報告している。

【0339】

表 4 : 配列番号 68 のペプチドに比べた 70 % ヒト血漿における代表的ペプチド試薬のパーセント結合率

【 0 3 4 0 】

【 化 2 5 】

配列番号によるペプチドまたはペプチド	対照平均値 (1ul 10% 正常な BH)	実験平均値 (1ul 10% CJD BH)	実験 SD*	実験平均値 (68の%とし て)
ストレプトアビジンビーズ (ペプチド対照なし)	16.4	21.1	3.7	5.0
68	19.2	852.7	72.0	100.0
237	20.1	1039.4	41.0	121.9
239	16.9	1024.2	41.7	120.1
240 (XIIa)	21.4	1044.4	60.4	122.5
241	15.4	28.0	1.2	3.3

*SD = 標準偏差

10

表 5 : 配列番号 68 のペプチドに比べた 70 % ヒト血漿における代表的ペプチド試薬のパーセント結合率

【 0 3 4 1 】

【 化 2 6 】

配列番号によるペプチドまたはペプチド	対照平均値 (1ul 10% 正常な BH)	実験平均値 (1ul 10% CJD BH)	実験 SD*	実験平均値 (68の%とし て)
ストレプトアビジンビーズ (ペプチド対照なし)		11.2	1.2	2.7
68		418.4	30.1	100.1
230 (II)	7.02	463.5	24.8	110.8
237 (IX)	9.47	528.8	24.9	126.5
238 (X)	7.28	478.7	44.5	114.5

*SD = 標準偏差

20

30

表 6 : 配列番号 68 のペプチドに比べた 20 % ヒト血漿における代表的ペプチド試薬のパーセント結合率

【 0 3 4 2 】

【 化 2 7 】

配列番号によるペプチドまたはペプチド	平均	SD*	平均 (68の%)
ストレプト・アビジンビーズ(ペプチド対照なし)	2.38	0.82	2.79
68	84.98	13.55	100.00
14	4.74	1.23	5.58
229	88.64	7.19	104.31
230	106.10	5.58	124.85
231	1.83	0.43	2.15

40

【 0 3 4 3 】

【化28】

234	8.32	1.33	9.79
235	8.85	1.93	10.42
236	1.47	0.30	1.73

SD = 標準偏差

表4および5に示したように、70%血漿中ではテストした代表的なペプチド試薬の多くが、基準ペプチドである配列番号68よりも結合親和性が大きく、約10~25%大きいことが多い。表4および5は、プリオンタンパク質の病原型に対するペプチド試薬の特異性も示している(プリオンタンパク質の非病原型のみが正常な脳ホモジネート中に存在すると期待される)。表6は、20%ヒト血漿中で希釈されたCJD脳ホモジネートにおけるペプチド試薬を用いたブルダウン/ELISAアッセイの結果を示している。

10

【0344】

表7: 配列番号68のペプチドに比べた70%ヒト血漿における磁気ビーズに直接結合した代表的ペプチド試薬のパーセント結合率

【0345】

【化29】

下記配列番号により磁気ビーズに共有結合したペプチドまたはペプチド	平均	SD*	平均 (68の%)
	68	137.9	21.29
240(XIIb)	174.3	10.51	126.4

SD = 標準偏差

20

配列番号240(XIIb)を含むペプチド試薬は、磁気ビーズに共有結合し、配列番号68を含むペプチドも、磁気ビーズに共有結合した。共有結合した試薬が、ビオチン化ペプチド試薬およびSAビーズに結合したペプチドについて、上で説明したブルダウン/ELISA反応において使われた。ビーズへの試薬の共有結合は、ビーズが病原性プリオンと優先的に反応する能力にはほとんど影響しなかった。

【0346】

病原型に対する試薬の特異性

30

上の表4および5に示したように、ペプチド試薬は、CJD患者からのヒトの脳ホモジネートに存在するPrP^{Sc}をブルダウンすることができるが、ヒト血漿または対照の正常なヒトの脳ホモジネートに存在するPrP^Cをブルダウンすることはない。ペプチド試薬が、CJD脳ホモジネートおよび正常な(即ち、CJDではない)脳ホモジネートへの結合を比較する追加の実験は、下に示す。

【0347】

表8 70%ヒト血漿における10%の正常またはCJDの脳ホモジネートの2マイクロリッターへのペプチド試薬の結合

【0348】

【化30】

40

下記配列番号によるペプチドまたはペプチド	ヒト脳ホモジネートを加えた血漿結合			
	正常 平均	正常 SD	CJD 平均	CJD SD
229(I)	3.31	0.3	124.47	20.21

表9 . 70%ヒト血漿における10%のCJDの脳ホモジネートの0.1マイクロリッターまたは正常な脳ホモジネートの1マイクロリッターへのペプチド試薬の結合

【0349】

50

【化31】

下記配列番号によるペプチドまたはペプチド	ヒト脳ホモジネートを加えた血漿結合			
	正常平均	正常SD	CJD平均	CJDSD
239(XIa)	16.91	1.68	147.49	32.33
239(XIb)	33.28	0.65	255.51	2.91
240(XIIa)	21.42	0.59	187.89	12.74
241(XIII)	15.43	2.6	17.36	2.57

10

表10の実験は、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(vCJD)および孤発性クロイツフェルト・ヤコブ病(sCJD-BH)の混合物よりむしろヒトのvCJD脳ホモジネートの試料について行った。

【0350】

表10.70%ヒト血漿における正常またはvCJDの脳ホモジネートへの磁気ビーズを共有結合させたペプチド試薬(XIb)の結合

【0351】

20

【化32】

下記へのペプチド試薬配列番号240(XIb)の結合	平均	SD
7.5 nL ヒト vCJD 10% 脳ホモジネート	121.1	6.7
2.5 nL ヒト vCJD 10% 脳ホモジネート	57.3	8.2
0.833 nL ヒト vCJD 10% 脳ホモジネート	49.2	3.4
15 nLの正常なヒトの10% 脳ホモジネート	13.2	2.9

30

表11.磁気ビーズへ共有結合したペプチド試薬240(XIb)の結合

【0352】

【化34】

下記への配列番号240(XIb)の結合	平均	SD
TBS バッファー	278.5	43.9
TBSTT バッファー	264.3	24.9
70%のヒト血漿を有するTBSTT	269.5	32.9
20nLの10%の正常なヒト脳ホモジネートを含む70%のヒト血漿を有するTBSTT	306.4	41.3
20nLの10%ヒトCJD脳ホモジネートを含む70%のヒト血漿を有するTBSTT	1390.8	76.0

40

これらの実験の間に特定のヒト血漿試料は、結合反応を妨害し、これらの血漿を希釈剤として用いた場合はより低い信号が得られることが認められた。比較実験は磁気ビーズに共有結合した試薬およびビオチン-ストレプトアビジン結合を介して磁気ビーズに結合し

50

た同じペプチド試薬を用いて行った(表12対表13)。共有結合したペプチド試薬は、希釈剤として用いた血漿試料中の変動に対して敏感ではなかった。

【0353】

表12：種々のヒト血漿中でストレプトアビジン磁気ビーズに結合した代表的ビオチン化ペプチド試薬を用いたブルダウン・アッセイ

【0354】

【化35】

下記ヒト血漿を用いたペプチド配列番号240(XIIa)	平均	SD*	平均(対照の%)
対照ヒト血漿	1109.67	80.93	100.0
ヒト血漿ロット KC011886	441.40	38.74	39.78
ヒト血漿ロット KC011892	406.60	64.93	36.64
ヒト血漿ロット KC28719	720.50	102.03	64.93
ヒト血漿ロット KC032907	458.50	151.48	41.32

*SD = 標準偏差

10

表13：種々のヒト血漿中で磁気ビーズに直接結合した代表的ペプチド試薬を用いたブルダウン・アッセイ

【0355】

【化36】

下記ヒト血漿を用いたペプチド配列番号240(XIIb)	平均	SD*	平均(対照の%)
対照ヒト血漿	154.99	52.13	100.0
ヒト血漿ロット KC011886	205.80	12.50	132.78
ヒト血漿ロット KC011892	197.63	11.57	127.51
ヒト血漿ロット KC28719	195.33	33.42	126.03
ヒト血漿ロット KC032907	193.77	30.12	125.02

*SD = 標準偏差

20

表12のアッセイは、表13のアッセイよりも2.5倍多くのCJD脳ホモジネートを用いた。対照ヒト血漿は、各組の実験の場合と同じであり、妨害物質を含まないことを予め示した。これらの結果は、共有結合したペプチド試薬は、血漿対照に比べて(および事実対照血漿よりも高い信号を示す)、多数の異なる血漿においてはるかに低い信号を示すSAビーズに連結したビオチン化ペプチドに比べて、異なる血漿が使われた場合、結合の妨害を全く示さない。

30

【0356】

ヒト試料の場合上で説明したものと類似したブルダウン/ELISAアッセイは、マウス、シリア・ハムスターおよびヒツジを含む異なる動物種からの種々の試料について行われた(スクレーパー・シーブおよび正常なシーブからの脳ホモジネートおよび血液試料の両方についてテストした)。これらの種の各々について、その種からのプリオンタンパク質の病原型が、疾患した動物からの試料では検出されたが、本発明のペプチド試薬を用いた非疾患動物からは検出されなかった。

40

【0357】

実施例4 - サンドイッチELISA

サンドイッチELISAは、ヒト血漿の試料中に存在するPrP^Cを測定するために開発された。ヒト血漿中に存在するPrP^Cを測定するために、標準曲線(図1B)を作るために既知量の組み換えヒトPrP(rPrP)タンパク質を用いてサンドイッチELISAを行った。ヒト血漿の量を増加させた場合、PrP^Cの量は、rPrPを用いた標準曲線(図1A)を用いて決定した。サンドイッチELISAの場合、96のウエルがあるマイクロタイター・プレートにmAb SAF32(「捕捉」抗体と呼ばれた)を用いて

50

被覆した。この抗体は、ヒト PrP、即ち残基 23 - 90 のオクタリピートに結合し、次いで、全長 PrP^C および PrP^S^C 変性残基 23 - 231 に結合することとなる。このプレートはカゼインを用いて 37 で 1 時間ブロックした。ヒト血漿中の PrP^C のレベルを決めるために、異なる量の血漿を SFA32 被覆プレートに添加し、振とうせずに 37 で 2 時間培養した。プレートを洗浄し、酵素アルカリ性ホスファターゼ（「検出」抗体、3F4-AP）に共役した 3F4 抗体（ヒト PrP 残基 109 - 112 を結ぶ抗体）を、37 で 1 時間添加した。これらのプレートを洗浄し、化学発光基質を添加し、37 で 30 分後にカウントした。PrP^C の量を計るために、同じフォーマットのサンドイッチ ELISA を用いて組み換えヒト PrP の濃度を上げながら SFA32 被覆プレートを培養した。rPrP の標準曲線を用いて、このバッチのヒト血漿中の PrP^C の濃度を約 488 pg / 70 μl であると測定した。

10

20

30

40

50

【0358】

この同じサンドイッチ ELISA を用いて、ヒト血漿試料からの PrP^S^C または PrP^C をプルダウンするためにペプチド試薬の特異性を評価した。ペプチド試薬 XIIb は、説明した磁気ビーズ（Dynabeads M-270 カルボン酸）に共有共役した。ビーズに連結されたペプチド試薬は、70 ul のヒト血漿、1% の Tween-20、1% の Triton X-100 および TBS を含む 100 ul のアッセイ中で 1 時間混合した。PrP^S^C の特異的なプルダウンを調べるために、vCJD と診断された患者から調製された 10% の脳ホモジネート（BH）を 0.05 μl および正常な個体からの対照を添加した血漿を用いて実験を反復した。洗浄後、ビーズは、PrP^S^C を溶離し、変性されるために 15 μl の 3M の GdnSCN で処理した。捕捉抗体の変性を予防するために、GdnSCN を 210 μl の H₂O で希釈し、溶液を SFA32 で被覆したマイクロタイター・プレートに添加し、抗原の総容積を 250 μl にした。10% の正常な脳ホモジネート、または 10% の nCJD の脳ホモジネートのいずれかの 0.05 μl を用いて実験を行った。これらのプレートを洗浄し、PrP は、化学発光 AP 基質（Lumiphos Plus）を用いて検出した。血漿中の PrP^C の量は、直接検出した場合（即ち、何らのプルダウンなしに）約 887 LU を測定し、ペプチド試薬ビーズを用いてプルダウンされた PrP^C の量は、わずか 23 LU というバックグラウンド・レベルの寄与に過ぎない。0.05 μl の正常な BH が 70 μl の血漿にスパイクされる場合は同じことが言える。0.05 μl の vCJD BH が 70 μl の血漿にスパイクされる場合は 4 倍に増加した信号が検出された。標準曲線として rPrP を用いると、ペプチド試薬ビーズは、約 488 pg の PrP^C を含む血漿にスパイクされた場合、47 pg の PrP^S^C をプルダウンし、一方、ペプチドがわずか 7 pg の PrP^C を結合したことは、最低 70 倍の濃縮を示唆している（表 14）。

【0359】

表 14 . ペプチド試薬ビーズを用いた PrP^S^C の特定のプルダウン

【0360】

【化 37】

3M GdnSCN			
		LU	pg
プルダウンなし	70ul 血漿 (70%)	887.8	487.7 PrPC
プルダウン	70ul 血漿 (70%)	23.3	6.0 PrPC
プルダウン	70ul 血漿 (70%) + 50 nl 10% 正常 BH	25.6	7.3 PrPC
プルダウン	70ul 血漿 (70%) + 50 nl 10% vCJD BH	97.1	47.1 PrPSc

実施例 5 - サンドイッチ ELISA を用いた pH 変性

カオトロピック剤を用いた解離およびプルダウン・工程後の病原性プリオンの変性の代替法として、解離 / 変性を生じるために高 pH または低 pH を用いる方法を開発した。この方法の利点は、GdnSCN を用いる状況とは異なり、pH 変性条件は、反応容積を顕著に増やすことなく、または洗浄工程を追加することなく、pH 変性条件を容易に変更す

ることができることである。

【0361】

ブルダウンは、70%のヒト血漿を含む100 μ l溶液においてスパイクされた0.10 μ lのvCJDの10%脳ホモジネートの試料と共にペプチド試薬XIIbに連結した磁気ビーズを用いて、実施例4の場合と同様に行った。37Cで1時間混合後、表15に示した種々のpH条件下で、ビーズを洗浄し、処置した。対照として、3MのGdnSCNまたはトリス緩衝食塩水(TBS)をpH7.5で用い、ビーズを処置した。室温で10分間培養後、表に示したように、溶液を約7の中性pHにした。上澄み液をSAF32(捕捉抗体)で被覆した96ウエルのマイクロタイター・プレートに添加し、4で12時間培養した。アルカリ性ホスファターゼで標識された3F4抗体を、実施例4に記載したとおりに検出に用いた。ビーズの解離および変性の場合に3MのGdnSCNを用いて処理したブルダウン試料は、予想どおり、対照血漿ではなく、vCJDスパイク血漿から信号を発した。ブルダウン試料の、pH7.5における緩衝液による処理では、予想どおり、vCJDスパイク血漿または対照血漿のいずれからも目立った信号はなかった。ブルダウン試料は、表に示した種々のpHの溶液で処理した。高pHまたは低pHにおけるいくつかの処理では、ビーズからプリオンタンパク質を解離および変性されることができ、pH13における処理は、3MのGdnSCNと同じ程度に効率的であった。

10

【0362】

重要なことは、GdnSCN試料の容積(希釈後)は225 μ lであったが、pH13で処理した試料の容積は、中和後わずか75 μ lであったことである。

20

【0363】

表15

【0364】

【化38】

処置	pH	中和	最終 pH	ELISA データ				
				vCJD + 血漿		血漿		S/N
				平均	SD	平均	SD	
15 μ l GdnSCN 3M	5.9	210 μ l H ₂ O	6.0	430.4	26.0	37.7	21.8	11
70 μ l TBST	7.5	不必要	7.5	25.5	6.8	11.8	0.4	2
低 pH								
処置	pH	中和	最終 pH					
H ₃ PO ₄ (50 μ l)		NaOH (25 μ l)						
0.00007M	4	0.0031N	7	27.0	8.7	26.8	7.8	1

30

【0365】

【化39】

0.00075M	3	0.031N	7	26.6	3.2	25.8	3.0	1
0.12M	2	0.31N	7	122.5	9.7	92.7	3.7	1
0.5M	1	3.1N	7	264.0	33.5	30.4	11.6	9
高 pH								
処置	pH	中和	最終 pH					
NaOH (50 μl)		NaH₂PO₄ (20 μl)						
0.0001M	10	0.0003M	7	34.8	34.4	197.6	83.8	0
0.001M	11	0.003M	7	11.8	0.3	14.6	1.7	1
0.1M	12	0.03M	7	76.1	8.1	16.1	2.1	5
0.1M	13	0.3M	7	458.1	9.5	15.1	2.6	30

10

実施例6 - 直接ELISAを用いたpH変性

高pHまたは低pHによる解離および変性についても、検出のためのAP標識付き3F4抗体を用いる直接ELISAフォーマットを併用してテストした。このプロセスは、中和工程を含む該工程まで実施例5と同様に行った。上澄み液中のPrPは、NaHCO₃バッファ-中pH8.9においてマイクロタイター・プレートのウエル上に直接被覆した。これらのプレートは、密封し、4℃で一晩培養した。次の日、プレートは洗浄し、カゼインでブロックし、プレート上のPrPを化学発光基質を用いてAP標識付き3F4により検出した。結果は表16に示している。

20

【0366】

表16

【0367】

【化40】

				ELISA データ				
				vCJD+血漿		血漿		
処置	pH	中和	最終 pH	平均	SD	平均	SD	S/N
50 μ l GdnSCN 3M	5.9	50 μ l NaHCO ₃	8.5	60.5	5.7	5.5	1.8	
100 μ l TBST	7.5	不必要	7.5	2.2	0.3	2.2	0.1	1
低pH処置	pH	中和	最終 pH					
H₃PO₄ (50 μl)		NaOH (25 μl)						
0.00007M	4	0.0031N	7	7.6	2.0	8.7	1.0	1
0.00075M	3	0.031N	7	21.8	2.4	19.9	1.5	1

30

40

【0368】

【化 4 1】

0.12M	2	0.31N	7	14.6	0.5	8.0	0.3	2
0.5M	1	3.1N	7	57.1	6.0	11.9	1.4	5
高pH処置	pH	中和	最終 pH					
NaOH (50 μ l)		NaH ₂ PO ₄ (20 μ l)						
0.0001M	10	0.0003M	7	2.8	0.3	3.1	0.3	1
0.001M	11	0.003M	7	8.8	7.7	3.6	0.6	2
0.1M	12	0.03M	7	7.3	1.6	5.1	1.0	1
0.1M	13	0.3M	7	36.9	2.3	5.2	1.8	7

実施例 7 - 磁気ビーズに関するサンドイッチ E L I S A

通常、サンドイッチ E L I S A は、96 のウエルを有するポリスチレン製のマイクロタイター・プレートを用いて行ない、捕捉抗体がプレート上に被覆され、次いで、抗原の結合、洗浄、および検出が同じウエルでなされる。しかし、固相マトリックスとして磁気ビーズを利用する別のフォーマットを使用することができる。このフォーマットでは、捕捉抗体で被覆される磁気ビーズは、まず抗原と混合し、その後検出抗体を添加する。

【0369】

プレート E L I S A を用いる場合に使用するために開発した pH により解離および変性を行う方法が、固体支持体として磁気ビーズと同等に使えるかどうかをテストするために、次のような実験を行った。ペプチド試薬 X I I b に連結された磁気ビーズを用いてスパイクしたヒト血漿試料からの P r P S c のプルダウンを、前に説明したとおりに行った。プルダウンビーズは、50 μ l の 0.1 N の NaOH を用いて変性し、NaH₂PO₄ (20 μ l) を用いて中和した。上澄み液は、清浄なポリプロピレン・ウエルに移した。

【0370】

この溶液に、「捕捉」抗体として抗プリオン抗体を被覆した新しい磁気ビーズを添加した。一組のビーズは 3 F 4 抗体で被覆し、別の組のビーズは残基 121 と 231 との間のプリオンタンパク質の C 末端基の中のエピトープを認識する抗体 (C17) で被覆した。抗体被覆ビーズおよびプルダウンからの溶離液は 2 時間培養した。これらのビーズは一度洗浄し、AP 標識付きの検出抗体を添加した。検出抗体 (C2) として用いた抗体は、P r P のオクタリピード領域、残基 23 - 90、に結合している抗体である。これらのビーズおよび検出抗体は、さらに 2 時間培養した。次いで、ビーズは洗浄し、化学発光 AP 基質を添加し、30 分間混合し、化学発光は L u m i n o s k a n A s c e n t (T h e r m o L a b s y s t e m s) で測定した。

【0371】

プレート・フォーマットにおいて同じ捕捉および検出の各抗体を用いた E L I S A は、比較のため行った。結果は表 17 に示している。両フォーマットにおいて、1 n l の 10 % B H v C J D 中の P r P S c の存在は、70 μ l の血漿溶液からスパイクおよびプルダウンの後で検出した。

【0372】

表 17

【0373】

10

20

30

40

【化 4 2】

プレート								
vCJD	3F4 プレート				C17 プレート			
(nL BH/asy)	Avg LU	SD	CV%	S/N	AvgLU	SD	CV%	S/N
10	60.07	8.69	14.47	13.2	124.18	11.49	9.25	2.7
5	19.34	1.11	5.73	4.3	74.71	13.19	17.66	1.6
1	8.90	0.72	8.08	2.0	50.75	4.70	9.27	1.1
0	4.55	1.30	28.61	1.0	45.56	2.40	5.26	1.0

10

ピース								
vCJD	3F4ピース				C17ピース			
(nL BH/asy)	Avg LU	SD	CV%	S/N	Avg LU	SD	CV%	S/N
10	2.83	0.67	23.80	1.7	41.86	10.23	24.43	3.5
5	2.25	0.99	44.01	1.4	26.08	1.49	5.69	2.2
1	3.11	0.63	20.24	1.9	16.53	1.06	6.39	1.4
0	1.62	0.31	18.88	1.0	11.84	0.66	5.59	1.0

20

実施例 8 - ペプチド試薬をデザインするのに有効なペプチド

本発明のペプチド試薬を作るのに有効なペプチドの非限定的な例は、表 18 に示した配列から導かれる。この表のペプチドは、普通の 1 字アミノ酸コードにより表され、左はこれらのアミノ末端基、右はカルボキシ末端基を用いて描かれる。この表の配列のいずれかは、アミノ末端基および/またはカルボキシ末端基において Gly リンカー (G_n、ここで n = 1, 2, 3, または 4) を随意に含めてよい。角括弧内のアミノ酸は、別のペプチドにおいてその位置で使用する代替の残基を示している。丸括弧は、そのペプチド試薬からその残基(類)が存在しても、存在しなくてもよいことを示している。「2」がフォローした二重丸括弧(例えば、配列番号 111)は、その配列が二重括弧の間のペプチドの 2 つのコピーを含むことを示している。コピー番号記号表示(例えば、配列番号 111 における「K」)に続く残基は、その残基から二重括弧の間のペプチドの各コピーが延びている残基を示している。したがって、配列番号 111 は、QWNKPSKPKTN ペプチド配列(即ち、配列番号 14)のダイマーであり、各々は、リジンの α- および ε- アミノ官能基を介してリジン(K)残基へのこれらのカルボキシ末端基により連結されている。「MAPS」を含む配列は、複数の抗原部位を有するペプチドを示している。用語「ブランチ」に先行する数はコピー数を示している。したがって、配列番号 112 は、GGGKKRPPGGWNTGGG の 4 コピーを含み、この配列は各末端に Gly リンカーを有する配列番号 67 であり、一方、配列番号 113 は、GGGKKRPPKPPGGWNTGGG の 8 コピーを含み、この配列は、やはり、各末端に Gly リンカーを有する配列番号 67 である。

30

40

【0374】

表 18 : 本発明のペプチド試薬を作るペプチド配列の例

【0375】

【化43】

ペプチド配列	配列番号
KKRPK	12
MANLGCWMLVLFVATWSDLGLC	13
(GGG)QWNKPSKPKTN	14
QWNKPSKPKTNMKHV	15
NQNN[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTKGEN	16
TTKGENFTETD	17
GENFTETD	18
GENFTETD[V/I]K[M/I]MERSVVEQMC[I/V]TQY[E/Q]ESQAYY[Q/D](G)(R)R[G/S][S/A]S	19
NQNN[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTKGENFTETD[V/I]K[M/I]MERSVVEQMC[I/V]TQY[E/Q]ESQAYY[Q/D](G)(R)R[G/S][S/A]S	20
[A/V/T/M][V/I]LFSSPPVILLISFLFL[I/M]VG	21
G[N/S]D[W/Y]EDRYREN[M/H/Y]RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R]Y[S/N]NQNN[N/T]FVH	22
N[N/T]FVHDCVNIT[I/V]K[Q/E]HTVTTTTK	23
VYYR	24
RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R]	25
KKRPKPGG(G)WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG	26
WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG(G)	27
WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG(G)[G/T]WGQPHGG	28
GGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTN	29
GGTHSQWNKPSKPKTN	30
WNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGG(G)[G/T]WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGG	31
GQPHGGGW	32
RPIHFGSDYEDRYRENMHR	33
RPMIHFNDWEDRYRENMYR	34
(GGGG)C(GG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV(GGGG)C	35
(GGGG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV	36
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV(GGGG)	37
[M/L]KH[M/V]	38
KPKTN[M/L]KH[M/V]	39
C(GG)GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHV(GGGG)C	40

10

20

30

【0376】

【化 4 4】

SRPIHFGSDYEDRYRENMHRYPN	41
PMIHFNDWEDRYRENMYRPVD	42
AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	43
RPMIHFNDWEDRYRENMYR(GGG)	44
GGGRPMIHFNDWEDRYRENMYRGG	45
(GG)C(GGG)RPMIHFNDWEDRYRENMYR(GGG)C	46
AGAAAAGAVVGGLGG	47
GGLGG	48
LGS	49
QWNKPSKPKTN(GGG)	50
QWNKPSKPKTN(GGG)QWNKPSKPKTN	51
QWNKPSKPKTNLKHV(GGG)	52
GGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTN	53
GGTHNQWNKPSKPKTN	54
(GGG)AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	55
(GGG)AGAAAAGAVVGGLGG	56
(KKK)AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	57
YMLGSAM[S/N]R	58
[S/N]RP[M/I/L][I/L]H	59
YMLGSAM[S/N]RP[M/I/L][I/L]H	60
YMLGSAM[S/N]RP[M/I/L][I/L]HFG[N/S]D	61
[W/Y]EDRYRENM[H/Y]RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R]Y	62
[W/Y]EDRYRENM[H/Y]RYPNQVYYRP[M/V]D[Q/E/R]Y[S/N]N	63
QN[N/T]	64
D[Q/E/R]Y[S/N]NQ[N/T]	64
(KKK)AGAAAAGAVVGGLGG	65
(GGG)KKRPKPGGWNTGGSRYPGQS	66
(GGG)KKRPKPGGWNTGG	67
(GGG)KKRPKPGG	68
PHGGGWGQHGGSWGQPHGGSWGQ	69
PHGGGWGQPHGGSWGQ	70
PHGGGWGQ	71
(GGG)KKRPKPGGGKKRPKPGG	72
(GGG)GPKRKGP	73
(GGG)WNTGGSRYPGQS	74
(GGG)WNKPSKPKT	75
(GGG)RPMIHFNDWEDRYRENMYR(GG)C	76
QWNKPSKPKTNLKHV(GGG)	77
(GGG)AGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	78
(GGG)NKPSKPK	79
(GGG)KPSKPK	80
(GGG)KKRPKPGGGQWNKPSKPKTN	81
KKKAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMDDD	82
DDAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM	83
KKKAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMKKK	84
(GGG)KKKKKKKK	85
DDAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMDDD	86
(GGG)NNKQSPWPTKK	87

10

20

30

40

【 0 3 7 7 】

【化 4 5】

DKDKGGV GALAGA A VA AGGDKDK	88
(GGG)QANKPSKPKTN	89
(GGG)QWNKASKPKTN	90
(GGG)QWNKPSKAKTN	91
(GGG)QWNAPSKPKTN	92
(GGG)QWNKPSAPKTN	93
(GGG)QWNKPSKPATN	94
(GGG)QWNKASKAKTN	95
(GGG)KKRAKPGG	96
(GGG)KKRPKAGG	97
(GGG)KKRAKAGG	98
(GGG)QWNKASKPKTN	99
(GGG)QWAKPSKPKTN	100
(GGG)QWNKPAKPKTN	101
(GGG)QWNKPSKPKAN	102
(GGG)QWNKPSKPKTA	103
(GGG)AKRPKPGG	104
(GGG)KARPKPGG	105
(GGG)KKAPKPGG	106
(GGG)KKRPAPGG	107
(GGG)KKAPKAGG	108
(GGG)KKRPKPGGGWNTGG	109
QWNKPSKPKTNGGGQWNKPSKPKTNGGGQWNKPSKPKTN	110
((QWNKPSKPKTN))2K	111
4-分枝 MAPS-GGGKKRPKPGGWNTGGG	112
8-分枝 MAPS-GGGKKRPKPGGWNTGGG	113
KKKAGAAAAGAVVGGGLGG-CONH2	114
DLGLCKKRPKPGGXWNTGG	115
DLGLCKKRPKPGGXWNTG	116
DLGLCKKRPKPGGXWNT	117
DLGLCKKRPKPGGXWN	118
DLGLCKKRPKPGGXW	119
DLGLCKKRPKPGGX	120
LGLCKKRPKPGGXWNTG	121
LGLCKKRPKPGGXWNT	122
LGLCKKRPKPGGXWN	123
LGLCKKRPKPGGXW	124
LGLCKKRPKPGGX	125
GLCKKRPKPGGXWNTGG	126
GLCKKRPKPGGXWNTG	127
GLCKKRPKPGGXWNT	128
GLCKKRPKPGGXWN	129
GLCKKRPKPGGXW	130
GLCKKRPKPGGX	131
LCKKRPKPGGXWNTGG	132
LCKKRPKPGGXWNTG	133
LCKKRPKPGGXWNT	134
LCKKRPKPGGXWN	135

10

20

30

40

【 0 3 7 8 】

【化 4 6】

LCKKRPKPGGXW	136
LCKKRPKPGGX	137
CKKRPKPGGXWNTGG	138
CKKRPKPGGXWNTG	139
CKKRPKPGGXWNT	140
CKKRPKPGGXWN	141
CKKRPKPGGXW	142
CKKRPKPGGX	143
KKRPKPGGXWNTGG	144
KKRPKPGGXWNTG	145
KKRPKPGGXWNT	146
KKRPKPGGXWN	147
KKRPKPGGXW	148
KKRPKPGGX	149
DVGLCKKRPKPGGXWNTGG	150
DVGLCKKRPKPGGXWNTG	151
DVGLCKKRPKPGGXWNT	152
DVGLCKKRPKPGGXWN	153
DVGLCKKRPKPGGXW	154
DVGLCKKRPKPGGX	155
VGLCKKRPKPGGXWNTG	156
VGLCKKRPKPGGXWNT	157
VGLCKKRPKPGGXWN	158
VGLCKKRPKPGGXW	159
VGLCKKRPKPGGX	160
THSQWNKPSKPKTNMKHM	161
THSQWNKPSKPKTNMKH	162
THSQWNKPSKPKTNMK	163
THSQWNKPSKPKTNM	164
THSQWNKPSKPKTN	165
HSQWNKPSKPKTNMKHM	166
HSQWNKPSKPKTNMKH	167
HSQWNKPSKPKTNMK	168
HSQWNKPSKPKTNM	169
HSQWNKPSKPKTN	170
SQWNKPSKPKTNMKHM	171
SQWNKPSKPKTNMKH	172
SQWNKPSKPKTNMK	173
SQWNKPSKPKTNM	174
SQWNKPSKPKTN	175
QWNKPSKPKTNMKHM	176
QWNKPSKPKTNMKH	177
QWNKPSKPKTNMK	178
QWNKPSKPKTNM	179
THSQWNKPSKPKTNMKHV	180
HSQWNKPSKPKTNMKHV	181
SQWNKPSKPKTNMKHV	182
QWNKPSKPKTNMKHV	183

10

20

30

40

【 0 3 7 9 】

【化 4 7】

THGQWNKPSKPKTNMKHM	184
THGQWNKPSKPKTNMKH	185
THGQWNKPSKPKTNMK	186
THGQWNKPSKPKTNM	187
THGQWNKPSKPKTN	188
HGQWNKPSKPKTNMKHM	189
HGQWNKPSKPKTNMKH	190
HGQWNKPSKPKTNMK	191
HGQWNKPSKPKTNM	192
HGQWNKPSKPKTN	193
GQWNKPSKPKTNMKHM	194
GQWNKPSKPKTNMKH	195
GQWNKPSKPKTNMK	196
GQWNKPSKPKTNM	197
GQWNKPSKPKTN	198
THGQWNKPSKPKTNMKHV	199
HGQWNKPSKPKTNMKHV	200
GQWNKPSKPKTNMKHV	201
THNQWNKPSKPKTNMKHM	202
THNQWNKPSKPKTNMKH	203
THNQWNKPSKPKTNMK	204
THNQWNKPSKPKTNM	205
THNQWNKPSKPKTN	206
HNQWNKPSKPKTNMKHM	207
HNQWNKPSKPKTNMKH	208
HNQWNKPSKPKTNMK	209
HNQWNKPSKPKTNM	210
HNQWNKPSKPKTN	211
NQWNKPSKPKTNMKHM	212
NQWNKPSKPKTNMKH	213
NQWNKPSKPKTNMK	214
NQWNKPSKPKTNM	215
NQWNKPSKPKTN	216
THNQWNKPSKPKTNMKHV	217
HNQWNKPSKPKTNMKHV	218
NQWNKPSKPKTNMKHV	219
PHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQ	220
GGWGQGGGTHSQWNKPSKPKTNMKHM	221
QWNKPSKPKTNMKHMGGGQWNKPSKPKTNMKHM	222
GGWGQGGGTH[N/S]QWNKPSKPKTN[L/M]KH[V/M](GGGG)	223
PHGGGWGQHG[G/S]SWGQPHGG[G/S]WGQ	224
QWNKPSKPKTN[L/M]KH[V/M](GGG)	225
GGGAWNKPSKPKTN	226
4-分枝 MAPS-(GGG)QWNKPSKPKTN(GGG)	227
8-分枝 MAPS-(GGG)KKRPKPGWNT(GGG)	228

実施例 9

ペプトイドの固相サブモノマー合成のプロトコル

一般的実験。溶媒は試薬グレードであり、精製せずにそのまま用いた。プロモ酢酸は、Aldrich (99%グレード) から入手し、DICはChemimpex Internationalから入手した。すべての反応および洗浄は、特に明記しない限り、35で行った。樹脂の洗浄は、樹脂に洗浄溶媒(通常DMFまたはDMSO)を添加することを意味し、樹脂をかき混ぜるので、均一なスラリーが得られ(通常、約20秒)、続いて樹脂から溶媒を徹底的に除去する。溶媒は反応容器のフリットボトムを通して真空

10

20

30

40

50

る過によりできるだけ除去し、樹脂を乾燥させる（通常、約10秒）。樹脂スラリーはフリット容器のボトムを通してアルゴンをバブリングしてかき混ぜた。試薬を溶かすために用いた溶媒は、ハウス・バキュームの下で5分間超音波分解により使用する前に脱ガスする必要がある。洗浄溶媒では、容量を調節して（1～5 mL）利用できるDMF、DMSOおよびジクロロメタンを含むディスペンサがあると非常に便利である。

【0380】

ダイマーは長期間貯蔵すると環状化してジケトンピペラジンを形成することができるので、ダイマー段階で合成を止めない方が好ましい。合成を休止するのは、置換洗浄後が好ましい。

【0381】

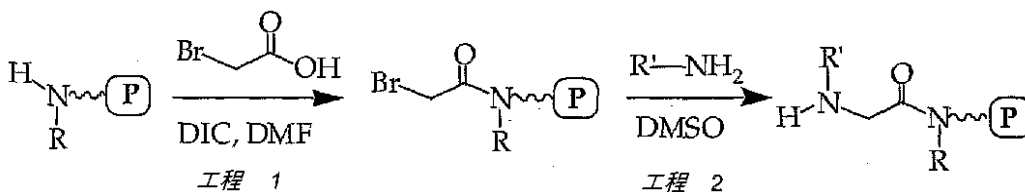
最初の樹脂の膨潤およびFmoc脱保護。フリット付き反応容器に、100 mgのFmoc-Rinkアミド樹脂（0.50 mmol/g樹脂）を入れる。この樹脂に2 mLのDMFを添加し、この溶液を樹脂が膨潤するまで5分かき混ぜる。必要ならば、樹脂の塊を壊すためにガラス棒を用いてよい。次いで、DMFを抜き取る。2 mLの20%ピペリジンのDMF溶液を樹脂に添加し、Fmoc基は取り除く。これを1分かき混ぜ、次いで液を抜き取る。さらに、2 mLの20%ピペリジンのDMF溶液を樹脂に添加し、20分かき混ぜ、液を抜き取る。次いで、樹脂をDMF（5×2 mL）で洗浄する。

【0382】

サブモノマー合成サイクル。次いで、非ブロック化したアミンを1.13 mLの1.2 Mプロモ酢酸DMF溶液を樹脂に添加し、続いて200 μ L（0.93当量）の純N,N'-ジイソプロピルカーボジイミド（DIC）を添加してアシル化する。この溶液は35で20分かき混ぜ、次いで、液を抜きとる。次いで、この樹脂はDMF（3×2 mL）で洗浄する。

【0383】

【化48】



次いで、アシル化工程は、1級アミンを用いた求核移動が行われる。洗浄樹脂に対して0.85 mLのアミン1 MのNMP溶液が添加される。この溶液を35で30分かき混ぜ、次いで、液が抜かれる。この樹脂は、次いで、DMF（3×2 mL）で洗浄する。これにより1つの反応サイクルが完成する。

【0384】

アシル化/移動サイクルは、望ましいオリゴマーが得られるまで、例えば、3～約30回反復される。

【0385】

ビオチンおよびチオール基共役。随意に、ビオチンはビオチン（0.4 M）およびHOBt（0.4 M）のDMSO 2.0 mL溶液の添加によりN-末端基に連結され、次いで、純DICの1.05当量の添加が続く。この反応混合物は35で1時間かき混ぜられ、その後この反応混合物は液を抜かれ、DMSO（2×3 mL）、次いで、DMF（3×2 mL）で洗浄した。随意に、システインの組み込みによりチオール基を組み込んだ。システインは、アミノ酸カップリング・工程、即ちFmoc-Cys(Trt)（Nova Biochem）を、Fmoc-Cys(Trt)（0.4 M）およびHOBt（0.4 M）DMF溶液を2.0 mL添加し、次いで、1.05当量の純DICを添加し、N-末端に連結することを介して加えた。この反応混合物は、35で1時間かき混ぜ、その後この反応混合物を液抜きし、DMF（3×3 mL）で樹脂を洗浄した。Fmoc基は、次いで、2 mLの20%ピペリジンDMF溶液を樹脂に添加して除去する。これを1分間か

10

20

30

40

50

き混ぜ、次いで、液抜きした。別の2 mLの20%ピペリジンDMF溶液を樹脂に添加し、20分かき混ぜ、次いで、液抜きした。この樹脂は、次いで、DMF(5×2 mL)で洗浄した。

【0386】

開裂(50 μmolの樹脂について)。合成反応および樹脂の洗浄後、この樹脂はジクロロメタン(2×2 mL)で洗浄し、1分間空気乾燥した。乾燥樹脂は、テフロン(登録商標)・マイクロ攪拌バーを含むガラスのシンチレーション小瓶に入れ、次いで、約5 mLのTFA/トリイソプロピルシラン/水 95/2.5/2.5(v/v/v)を添加する。この溶液を15分間攪拌する。各試料の開裂混合物を、20 μmのポリエチレン・フリットを取り付けた8 mL固相抽出(SPE)カラムを通してろ過し50 mLの円錐形ポリプロピレン遠心分離チューブに入れた。この樹脂を、次いで、1 mLの95%TFAで洗浄し、ろ液を集めた。次いで、ろ液を遠心分離チューブにおいて等容積の水で希釈した。この溶液を、次いで、凍結乾燥し乾燥させた。乾燥生成物を10 mLの1:1アセトニトリル/酸水溶液に溶解し、再び凍結乾燥して乾燥させた。

10

【0387】

オリゴマーのキャラクテリゼーション。個々のペプチド・オリゴマーをC-18カラム(Vydac, 5 μm, 300, 4.5×250 mm)で逆相HPLCにより分析した。1 mL/minの流速(溶媒A=0.1%TFA水溶液, 溶媒B=0.1%TFAアセトニトリル溶液)において、40分で0~80%Bの直線的勾配を用いる。主なピークを集め、エレクトロスプレーMS分析を受けて分子量を決める。

20

【0388】

ペプチドの精製。ペプチドは、生物学者が使用する前に逆相HPLCにより精製する。通常、これらの化合物は、C18カラムで分析し、精製する。したがって、これらの化合物は、少量の10%アセトニトリル/水に溶解し、50×20 mm ID(内径)DuraGel HS C18カラム(Peek Scientific)で精製する。30 mL/minの流速において(溶媒A=0.1%TFA水溶液, 溶媒B=0.1%TFAアセトニトリル溶液)、40分で5~65%Bの直線勾配が使われる。集めた生成物画分を合体し、凍結乾燥して白い粉末を得る。

【0389】

実施例10

ペプチド試薬XIIbのブルダウン効率

ビーズに共有結合したペプチド試薬XIIbの能力は、下で説明したブルダウン・アッセイによりテストした。

30

【0390】

vCJDまたは正常な脳ホモジネート(BH)は、1%Tween 20および1%Triton X-100を有するTBSにおいて50%プールした正常なヒト血漿にスパイクされた。対照試料は、いずれのBHの場合もスパイクされなかった。次いで、各試料(10%BHの10 nLを含むか全く含まない)100 μLを、3 μLのXIIbビーズ(30 mg/mL)と混合し、得られた混合物を750 rpmにてコンスタントに振とうしながら37 °Cで1時間培養した。これらのビーズは、次に0.05%のTween 20を含むTBSTを用いて4回洗浄し、ビーズに結合したPrP^{Sc}は0.1 NのNaOHを添加して解離させた。変性プリオンタンパク質は、後に0.3 MのNaH₂PO₄により中和し、ELISAプレートに移動させた。

40

【0391】

ブルダウン効率は、ブルダウン試料からの信号をブルダウンなしにグアニジニウム・チオシアネート(GdnSCN)により変性された同一試料からの信号と比較することにより計算した。vCJDまたは正常な脳からのプリオンタンパク質を等容積の5%BHおよび6 MのGdnSCNと混合して変性し、室温で10分間培養した。次いで、この試料は、単なる対照として用いた、TBST中でブルダウン試料の同じ濃度へ希釈した。100 μLの直接変性した各試料は、後に、ブルダウン試料と同じELISAプレートに移動さ

50

せた。

【0392】

ELISAプレートは、0.1M NaHCO₃中2.5μg/mLの捕捉抗体3F4により被覆した。コーティング操作は、4で一晚行い、次いで、TBS Tにより3度洗浄した。このプレートは、次に、37で1時間、TBS中1%カゼインによりブロックした。プルダウン試料および直接変性した試料の両方からのプリオンタンパク質は、300rpmにてコンスタントに振とうしながら、3F4と共に37で1時間ELISAプレート内で培養し、このプレートはTBS Tで6回洗浄した。アルカリ性ホスファターゼ(AP)共役検出抗体は、0.1%カゼインTBS T中で0.1μg/mLに希釈し、次いで、ELISAプレートに添加した。このプレートは37で1時間培養し、TBS Tで6回洗浄した。信号は、強化されたLumi-Phos化学発光基質を用いて発生させ、照度計により相対光単位(RLU)で読みとった。

10

【0393】

結果は表19に示している。脳組織からのプリオンタンパク質は、3MのGdnSCNにより完全に変性し、その抗体により検出することができる。この実験では、XIIbピーズを用いてプリオンタンパク質プルダウンにより発生した信号を、GdnSCNにより直接変性したタンパク質から得られた信号と比較した。データは、プルダウンおよび直接変性した試料のバックグラウンド(BHなし)は、それぞれ、9.0および7.7RLUであることを示した。直接変性した10nLの10%の正常BHは、14.6RLUの信号を有し、正常な脳におけるPrPcレベルを反映している。一方では、プルダウン法により検出された10nLの10%正常BHは、9.9RLUの読みを示し、これはそのバックグラウンドに似ている。これは、ペプチドXIIbの特異性を証明した。10nLの10%vCJD試料を、プルダウンおよび直接変性法によりテストし、データは53.0および56.3RLUを示し、これはXIIbピーズのプルダウン効率がほぼ100%に達したことを意味している。

20

【0394】

【化49】

表 19

	vCJD BH (RLU)			正常な BH (RLU)			BHなし (RLU)		
	平均	sd	%cv	平均	sd	%cv	平均	sd	%cv
プルダウン	53.0	6.5	12.3	9.9	0.8	8.0	9.0	1.1	12.3
プルダウンなし	56.3	2.6	4.6	14.6	0.7	4.5	7.7	2.3	29.4

30

実施例 11

プリオン・ストレインの区別

折り畳まれているものを開く際の熱力学的特性の違いを測定することにより、プリオン・ストレイン間の構造的な差を検出することができる。化学的変性剤の濃度を上げてPrP^{Sc}を培養すると各ストレインの特徴であるプリオン配座異性体の変性プロフィールを得ることができる。以前の研究は、変性剤で処理後畳まれたまま残っているPrP^{Sc}の比率を測定するためにプロテイナーゼK(PK)抵抗を用いた。ここでは、ペプチド試薬XIIbが、折り畳まれたPrP^{Sc}とそうでないPrP^{Sc}とを区別するのに使用できるか、したがって、変性プロフィールが普通の方法では測定できないPK感受性ストレインにおけるコンフォメーション状態の測定を可能にするかどうかをテストした。

40

【0395】

vCJDストレインの変性プロフィールを作るために、vCJD脳ホモジネート(NIBSC CJD Resource Centre)は、試料を希釈し、ペプチド試薬XIIbを用いたプルダウン(実施例3および下のXIIbプルダウンの説明を参照のこと)にかける前に種々のグアニジン塩化水素を用いて培養した。次いで、XIIbに結合した物質は溶離し、サンドイッチELISAアッセイにより検出した。変性剤の各濃度に

50

おける PrP^{S^c} プルダウンのグラフ表示によると、グアニジン塩化水素の濃度は、X I I bによりプルダウンされ折り畳まれた PrP^{S^c} の画分と逆比例した。形成されたデータ点は、単一シグモイド曲線は1つの主要な遷移において折り畳まれていない脳ホモジネートにおける1つの PrP^{S^c} 配座異性体の存在を示唆している(図4の白丸()を参照のこと)。したがって、X I I bは、化学的変性剤を用いて処置すると分裂する PrP^{S^c} について構造上のエピトープを認識していると考えられている。孤発性 C J D ストレイン (s C J D , N I B S C C J D 資料館) を分析して、 v C J D ストレインに比べた場合、X I I bにより認識された構造上のエピトープは、s C J D ストレインにおいてより安定であると考えられていることを示している v C J D (図4, 灰色の点を参照のこと) の変性プロフィールの右にシフトした類似のシグモイド曲線を得た。各ストレインを分析して、PrP^{S^c} の相対的なコンフォメーション安定性の目安として、即ち、G d n H C l 濃度は最高変性の半分 (G d n H C l _{1/2}) に存在する、1つの固有値を有する曲線を定義することができる等価なパターンを一貫して得た。v C J D の変性プロフィールは、1.6 M の G d n H C l の G d n H C l _{1/2} を有した。対照的に、s C J D 脳ホモジネートは、2.0 M の G d n H C l の G d n H C l _{1/2} を有するグアニジン変性に対してより安定であった。したがって、X I I bは、プリオン・ストレインの間のコンフォメーション変動性を分析するツールとして使用することができる。

10

【0396】

X I I b プルダウン

感染脳ホモジネート (75 - 200 nL , 10%) は、室温で1時間、0 ~ 4 M の濃度範囲のグアニジン溶液中で変性した。変性後、すべての試料は、T B S T T 中で0.1 M グアニジン塩化水素の最終濃度に調節し、折り畳まれた PrP^{S^c} は、標準プルダウン操作を用いて X I I b ビーズによりプルダウンした。プルダウンした物質は、溶離し、C 1 7 捕捉抗体および 3 F 4 - A P 検出抗体を用いてサンドイッチ E L I S A により三重に測定した。

20

【0397】

当業者が認識しているように、本発明の意図から逸脱することなく本発明の好ましい実施形態を、数多く、変更および修飾することができる。この種の変化はすべて本発明の範囲に入る。本、この特許文書で言及したことを含む、特許、出願、および印刷された刊行物の各々は、引用により全体が本明細書に組み込まれている。

30

【図面の簡単な説明】

【0398】

【図1】ヒト血漿試料における PrP^C の E L I S A 検出。図1 A は血漿を増量した場合の E L I S A (R L U) 測定を示している。図1 B は組み換え PrP タンパク質の既知量を用いた E L I S A (R L U) 測定の標準曲線を示している。

【図2】図2 ヒト (配列番号 1) およびマウス (配列番号 2) のプリオンタンパク質のアミノ酸配列を示している。

【図3】図3 ヒト (配列番号 3)、シリア・ハムスター (ハムスター) (配列番号 4)、ウシ (配列番号 5)、ヒツジ (配列番号 6)、マウス (配列番号 7)、ヘラジカ (配列番号 8)、ファロージカ (ファロー) (配列番号 9)、ミュールジカ (ミュール) (配列番号 10)、およびオジロジカ (白) (配列番号 11) からのプリオンタンパク質のアラインメントを示している。ヘラジカ、ファロージカ、ミュールジカ、およびオジロジカのみが2つの残基、S / N 1 2 8 および Q / E 2 2 6 において互いに異なる (肉太文字で示した)。

40

【図4】図4 v C J D および s C J D の変性プロフィールを示している。

【配列表】

2009507833000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/US2006/035226
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K5/00 C07K7/00 A61K38/08 A61K38/10 A61K31/16		
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) C07K A61K		
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, WPI Data, EMBASE, 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 02/052046 A2 (CHIRON CORPORATION, USA) 4 July 2002 (2002-07-04) page 15, line 14 - page 16, line 7; figures 1c,1d	1,2, 4-10, 14-16, 18,24-26
X	HAYNES, RUSSELL D. ET AL: "Comblike, Monodisperse Polypeptoid Drag-Tags for DNA Separations by End-Labeled Free-Solution Electrophoresis (ELFSE)" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 16, no. 4, 4 July 2005 (2005-07-04), pages 929-938, XP002416791 compound 3	1-5, 18-20
----- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 31 January 2007		Date of mailing of the international search report 13/02/2007
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 James, Sonya

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/035226

G(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIRSHENBAUM, KENT ET AL: "Sequence-specific polypeptoids: a diverse family of heteropolymers with stable secondary structure" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 95, no. 8, 14 April 1998 (1998-04-14), pages 4303-4308, XP002416792 table 2	1,2,4-7, 9
X	US 2003/040468 A1 (BARRON ANNE LISE E [US] ET AL) 27 February 2003 (2003-02-27) figure 7a	1,2,4,5, 18,19
X	WO 94/06451 A1 (CHIRON CORP., USA) 31 March 1994 (1994-03-31) table 1	1,2,4-9, 18-20,24
X	GORSKE, BENJAMIN C. ET AL: "Expedient Synthesis and Design Strategies for New Peptoid Construction" ORGANIC LETTERS, vol. 7, no. 8, 14 April 2005 (2005-04-14), pages 1521-1524, XP002416793 table 1	1,2,4,5, 18-20
X	HUANG, CHIN-YI ET AL: "Lipitoids - novel cationic lipids for cellular delivery of plasmid DNA in vitro" CHEMISTRY & BIOLOGY, vol. 5, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 345-354, XP002416794 table 1	1,2, 4-10, 14-16, 18,24-26
X	WO 2005/060697 A2 (CHIRON CORPORATION, USA) 7 July 2005 (2005-07-07) figure 1	1,2, 4-10, 14-16, 18,24-26
X	REDDY, M. MURALIDHAR ET AL: "Transformation of Low-Affinity Lead Compounds into High-Affinity Protein Capture Agents" CHEMISTRY & BIOLOGY, 11(8), 1127-1137 CODEN: CBOLE2; ISSN: 1074-5521, vol. 11, no. 8, August 2004 (2004-08), pages 1127-1137, XP002416795 figures 2,3	1,4-7, 14-16, 18,19, 24-26
	----- -/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/035226

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/016127 A2 (CHIRON CORP [US]; MICHELITSCH MELISSA D [US]; HU CELINE [US] CHIRON CO) 24 February 2005 (2005-02-24) cited in the application	1,17,23, 27-37, 48-61
X	claim 12; table 4	1,17
X	claim 19	23
X	claims 22-37	27-37, 48,51,55
X	claims 46-50	49-54
X	claim 53	57-59
X	claims 54,55	60,61
A	the whole document	2-16, 18-22, 24-26, 38-47

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/035226**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **49-53, 55**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2006 /035226

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 49, 50, 52 and 53 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.

Although claims 51 and 55 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/035226

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 02052046	A2	04-07-2002	CA 2431219 A1	04-07-2002
			EP 1404867 A2	07-04-2004
			JP 2005502309 T	27-01-2005
US 2003040468	A1	27-02-2003	US 2005209152 A1	22-09-2005
WO 9406451	A1	31-03-1994	AT 228532 T	15-12-2002
			AU 679945 B2	17-07-1997
			AU 5292093 A	12-04-1994
			BG 99521 A	31-01-1996
			BR 9307092 A	30-03-1999
			CA 2144067 A1	31-03-1994
			DE 69332524 D1	16-01-2003
			DE 69332524 T2	24-04-2003
			EP 0671928 A1	20-09-1995
			FI 951356 A	26-04-1995
			HU 72614 A2	28-05-1996
			JP 8501565 T	20-02-1996
			JP 3461505 B2	27-10-2003
			JP 3596752 B2	02-12-2004
			JP 2000239242 A	05-09-2000
JP 2003012622 A	15-01-2003			
KR 0168709 B1	15-01-1999			
NZ 256952 A	27-07-1997			
PL 308204 A1	24-07-1995			
WO 2005060697	A2	07-07-2005	AU 2004305111 A1	07-07-2005
			CA 2549720 A1	07-07-2005
			EP 1709195 A2	11-10-2006
WO 2005016127	A2	24-02-2005	AU 2004264953 A1	24-02-2005
			BR PI0413495 A	17-10-2006
			CA 2535261 A1	24-02-2005
			EP 1653844 A2	10-05-2006
			KR 20060066088 A	15-06-2006
			MX PA06001588 A	25-08-2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K	7/08	(2006.01)	C 0 7 K 7/08
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K 14/47

(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, LV, 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, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ベレッツ, デイビッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7, コーポレート インテレクトチュアル プロパティー - アール 3 3 8, ノバルティス ヴァクシンズ アンド ダイアグノスティクス 気付

(72)発明者 コノリー, マイケル ディー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7, コーポレート インテレクトチュアル プロパティー - アール 3 3 8, ノバルティス ヴァクシンズ アンド ダイアグノスティクス 気付

(72)発明者 ズッカーマン, ロナルド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7, コーポレート インテレクトチュアル プロパティー - アール 3 3 8, ノバルティス ヴァクシンズ アンド ダイアグノスティクス 気付

(72)発明者 ガオ, マン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7, コーポレート インテレクトチュアル プロパティー - アール 3 3 8, ノバルティス ヴァクシンズ アンド ダイアグノスティクス 気付

(72)発明者 シミズ, ロバート エム.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7, コーポレート インテレクトチュアル プロパティー - アール 3 3 8, ノバルティス ヴァクシンズ アンド ダイアグノスティクス 気付

(72)発明者 ティモテオ, ガリバー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 6 2 - 8 0 9 7, エミリービル, ピー.オー. ボックス 8 0 9 7, コーポレート インテレクトチュアル プロパティー - アール 3 3 8, ノバルティス ヴァクシンズ アンド ダイアグノスティクス 気付

Fターム(参考) 4C084 AA01 AA02 BA01 BA08 BA18 BA32 CA59 NA14 ZB212
 4H045 AA20 AA30 BA10 BA14 BA15 BA16 CA40 EA20 EA50 GA20

专利名称(译)	朊病毒特异性拟肽试剂		
公开(公告)号	JP2009507833A	公开(公告)日	2009-02-26
申请号	JP2008530008	申请日	2006-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华公司		
[标]发明人	ペレツデイビッド コノリーマイケルディー ズッカーマンロナルド ガオマン シミズロバートエム ティモテオガリバー		
发明人	ペレツ, デイビッド コノリー, マイケル ディー, ズッカーマン, ロナルド ガオ, マン シミズ, ロバート エム. ティモテオ, ガリバー		
IPC分类号	A61K38/00 C07K1/22 A61P43/00 G01N33/53 C07K7/06 C07K7/08 C07K14/47 A23L7/104		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/28 C07K14/001 C07K14/47 Y02P20/55		
FI分类号	A61K37/02.ZNA C07K1/22 A61P43/00.105 G01N33/53.D C07K7/06 C07K7/08 C07K14/47		
F-TERM分类号	4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA32 4C084/CA59 4C084/NA14 4C084/ZB212 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/GA20		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/715761 2005-09-09 US 60/726686 2005-10-14 US 60/758934 2006-01-13 US		
其他公开文献	JP5209477B2 JP2009507833A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及与构象疾病蛋白的非致病形式相比优先与构象疾病蛋白的致病性相互作用的拟肽，其中拟肽试剂包含氨基末端区域，羧基末端区域和至少一个氨基末端区域和羧基末端区域之间的拟肽区域，其中拟肽区域包含3至约30个N-取代的甘氨酸，和任选的一个或多个氨基酸。本发明还涉及使用拟肽检测和分离朊病毒以及治疗和预防朊病毒相关疾病的方法。

