

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4550425号
(P4550425)

(45) 発行日 平成22年9月22日 (2010.9.22)

(24) 登録日 平成22年7月16日 (2010.7.16)

(51) Int. Cl. F I
C07K 1/22 (2006.01) C O 7 K 1/22
GO1N 30/88 (2006.01) G O 1 N 30/88 J
C07K 14/46 (2006.01) C O 7 K 14/46

請求項の数 29 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2003-571742 (P2003-571742)	(73) 特許権者	503021537
(86) (22) 出願日	平成15年2月28日 (2003.2.28)		マイクロセンズ バイオフィージ リミテッド
(65) 公表番号	特表2005-519088 (P2005-519088A)		イギリス ロンドン エヌダブリュ1 0
(43) 公表日	平成17年6月30日 (2005.6.30)		ティーユー ロイヤル・カレッジ・ストリート 2 ロンドン・バイオサイエンス・イノベーション・センター
(86) 国際出願番号	PCT/GB2003/000858	(74) 代理人	100082072
(87) 国際公開番号	W02003/073106		弁理士 清原 義博
(87) 国際公開日	平成15年9月4日 (2003.9.4)	(72) 発明者	アミン レザ レイン
審査請求日	平成18年1月10日 (2006.1.10)		イギリス サーレイ シーアール2 6 ジュエー クロイドン アボンデイル・ロード 72 グランド・フロア・フラット
(31) 優先権主張番号	0204797.5		
(32) 優先日	平成14年2月28日 (2002.2.28)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
(31) 優先権主張番号	0216808.6		
(32) 優先日	平成14年7月18日 (2002.7.18)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 異常型プリオンタンパク質の結合

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

蛋白質の集合していない形態の存在内において、蛋白質の集合した異常形態を選択的に結合させる方法であって、

該方法は選択的な結合状態下で、異常な形態及び正常な形態をともに含む材料を、プロテアーゼ抵抗性の結合因子と接触させる工程を備え、

該結合因子は、複数のアニオン基を有する有機物のポリアニオン材料、或いは複数のカチオン基を有する有機物のポリカチオン材料であって、サンプル内に存する前記蛋白質の前記集合形態に対して結合親和性を備えており、

前記選択的な結合状態が、溶液中に競合因子を含み、該競合因子がイオン基を備え、該イオン基が前記ポリイオン材料よりも、低いイオン基の密度を有することを特徴とする方法。

【請求項 2】

プロテアーゼが前記結合の間存在し、或いは、前記蛋白質が結合の後にプロテアーゼの作用を受けることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記結合因子が、多数のアニオン基を有し、該アニオン基が硫酸基、カルボキシル基或いは磷酸基である、或いは多数のカチオン基を有し、該カチオン基がアミノ基、イミン基或いは 4 級のアモニア基であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記ポリイオン材料がポリアニオン・ポリグリコシドであることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項5】

前記ポリアニオン・ポリグリコシドがポリスルホン化ポリグリコシドであることを特徴とする請求項4記載の方法。

【請求項6】

前記ポリアニオン・ポリグリコシドがポリアニオン・ペントサン誘導体或いはデキストラン誘導体であることを特徴とする請求項5記載の方法。

【請求項7】

前記ポリスルホン化ポリグリコシドがペントサン・ポリ硫酸塩（PPS）或いはデキストラン硫酸塩であることを特徴とする請求項6記載の方法。

10

【請求項8】

前記結合因子が、臭化ヘキサジメチリン、ポリアミドアミンデンドリマ（PAMAMデンドリマ）、ポリL-リシン、ポリジアリルメチル塩化アンモニウム（PDADMAC）或いはポリエチレンイミンであることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項9】

前記競合因子が、アニオンであることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項10】

前記競合因子が、アニオン性界面活性剤であることを特徴とする請求項9記載の方法。

【請求項11】

前記競合因子が、脂肪酸のアミノ酸アミドであることを特徴とする請求項9記載の方法

20

【請求項12】

前記競合因子が、n-ラウロイルサルコシンであることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項13】

pHが蛋白質の異常形態への前記結合因子の前記結合を促すことを特徴とする請求項1乃至12いずれかに記載の方法。

【請求項14】

前記pHが8から9の間であることを特徴とする請求項13記載の方法。

30

【請求項15】

前記pHが8.2から8.6の間であることを特徴とする請求項14記載の方法。

【請求項16】

界面活性剤が存在し、前記蛋白質の異常形態への前記結合因子の結合を促すことを特徴とする請求項1乃至15いずれかに記載の方法。

【請求項17】

前記異常な蛋白質の集合体へ結合した後の前記結合因子が、固定された捕捉因子によって捕捉されることを特徴とする請求項1乃至16いずれかに記載の方法。

【請求項18】

前記捕捉因子がレクチン或いは前記結合因子とともに反応する抗体であることを特徴とする請求項17記載の方法。

40

【請求項19】

選択的に結合可能なタグ部分が前記結合因子にもたらされ、前記捕捉因子が前記タグ部分と結合することを特徴とする請求項17記載の方法。

【請求項20】

前記結合因子が、前記蛋白質の異常形態に曝される前に、固形培地に固定されることを特徴とする請求項1乃至16いずれかに記載の方法。

【請求項21】

前記培地が基質であって、該基質上を前記結合因子が覆うことを特徴とする請求項20記載の方法。

50

【請求項 2 2】

前記結合因子が選択的に結合可能なタグ部分にもたらされるとともに、前記タグ部分によって、前記固形培地に固定されることを特徴とする請求項 2 0 記載の方法。

【請求項 2 3】

前記結合可能なタグ部分が、ビオチン、フルオレセイン、ジニトロフェノール、ディグオキシレニン、核酸、核酸類似配列或いは (H i s) 6 であることを特徴とする請求項 1 9 又は 2 2 記載の方法。

【請求項 2 4】

前記結合因子が固体内に配され、該固体が前記結合力を備える表面を有することを特徴とする請求項 1 乃至 1 6 記載の方法。

10

【請求項 2 5】

前記表面が、ポリマからなり、該ポリマがイオン基を有し、該イオン基がポリマ構造内で共有結合している若しくは前記ポリマの表面群の変化によって生成されることを特徴とする請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 6】

サンプル内の蛋白質の異常な集合体の存在を分析する方法であって、前記方法が、前記結合因子に結合した蛋白質の存在或いは量を見定める請求項 1 乃至 2 5 いずれかに記載される前記蛋白質の異常形態を結合させる工程を備えることを特徴とする方法。

【請求項 2 7】

前記結合が、蛋白質の集合体に対する免疫学的検定方法を施すことによって定性的或いは定量的に見定められることを特徴とする請求項 2 6 記載の方法。

20

【請求項 2 8】

蛋白質の異常な集合体の結合が、正常な非集合蛋白質の存在内で選択的に行われ、結合した蛋白質の集合体が結合していない正常な蛋白質から分離され、前記結合の存在或いは量の決定がなされることを特徴とする請求項 2 6 又は 2 7 記載の方法。

【請求項 2 9】

前記異常な蛋白質が P r P ^S ^C であり、前記正常な形態が P r P ^C であることを特徴とする請求項 1 乃至 2 8 いずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本発明は、プリオンタンパク質 P r P ^C の異常型又は不良型、及び正常型では凝集性を示すことがないタンパク質の凝集性の異常型タンパク質を捕捉するための選択的な条件の元で、一般的には、ペントサンポリ硫酸、デキストラン硫酸若しくは他のポリアニオン性ポリグリコシドを含むポリアニオン物質、又はポリブレン、ポリアミドアミン dendrimer 若しくはポリ (塩化ジアリルジメチルアンモニウム) を含むポリカチオン物質などのポリイオン物質であるプロテアーゼ抵抗性を有する結合因子の使用に関連する。

【0 0 0 2】

感染性海面状脳症、即ち T S E s と呼ばれるプリオン病は、近年になって認識された。牛海綿状脳症 (B S E) は 1985 年に初めて報告された。最初の変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (v C J D) の症例は 1996 年になって報告された。v C J D は、B S E を含む牛肉の消費が原因と考えられている致命的な神経変性病である。人間では、感染から臨床症状までの潜伏期間が長い。

40

【0 0 0 3】

プリオン病の原因となる因子である、プリオンの同定された唯一の構成要素は、P r P ^C の異常イソ型である P r P ^S ^C である (P r P ^S ^C は、P r P ^{res} と呼ばれており、P r P ^C は P r P ^{sen} と呼ばれている。) 。以前は、プロテアーゼ抵抗性を比較的有しているという点で、P r P ^S ^C は P r P ^C と区別されるものであるとみなされていた。しかしながら、近年、P r P ^S ^C のプロテアーゼ感受性型が存在することが、即ち、プロテアー

50

ゼ感受性であるPrPの感染性型が存在していることが報告された。

【0004】

感染性であるがプロテアーゼ感受性であるPrP^{S^c}は凝集することができる(即ち、自然に凝集する)が、依然として凝集していないか、少なくとも一部が凝集しただけである。

【0005】

本明細書では、プロテアーゼ非感受性型及びPrP^{S^c}のプロテアーゼ感受性型と、部分的プロテアーゼ分解で残ったPrP^{S^c}の核部分(技術的には、PrP²⁷⁻³⁰と呼ばれる)の双方は、これらのうちの特定の一つが意味された箇所以外は、PrP^{S^c}とする。「凝集タンパク質」なる用語は、凝集性の抗プロテアーゼPrP^{S^c}と、PrP^{S^c}又は他のタンパク質の感染性の非凝集型又は一部凝集型に加えて、他のタンパク質の類似型の両方の意味を含み、さらに新たに観察されたプロテアーゼ感受性の感染性PrP^{S^c}の意味をも含む。

10

【0006】

PrP^Cは機能不明のGPI固着性の糖タンパク質である。プリオン病のための他のマーカーが示唆されてきたが、PrP^{S^c}は、必須のプリオン構成要素だけでなく、この一群の病気のために容認された唯一信頼でき、しかも普遍的なマーカーである。

【0007】

PrP^{S^c}の存在を評価するための現在有用な方法は、サンプルを、PrP^Cを破壊するために十分な期間プロテナーゼKによるタンパク質加水分解に供し、次いで、PrP^C存在下でPrP^{S^c}選択的でない抗体を使用したイムノアッセイによって、残存するPrP^{S^c}の存在を測定することである(Serban et AL., Neurology, Vol. 40, No.1, Jan 1990)。タンパク質加水分解工程では、プロテアーゼの使用は、元来、捕捉因子又は検出因子としての抗体の存在を排除する。抗体が導入される前に、プロテアーゼは除去又は失活されなければならない。この方法における制限を回避するために好ましい。

20

【0008】

このアッセイは、偽陽性を避けるためにPrP^Cの完全な除去と、偽陰性を避けるためにPrP^{S^c}を分解することのない条件に依存する。選択的なタンパク質分解におけるこのような条件は、アッセイされるサンプルのそれぞれのタイプ毎に構築されなければならない。結果としてもたらされるアッセイの感度は制限される。例えば、ウシの脳組織のアッセイにおいて、感度は動物がBSEの臨床的に顕著な症状を示したときに信頼性の有る陽性の結果が得られるというようなものである。従って、このアッセイは、 $10^4 \sim 10^5$ のプリオン感性的のユニットに対応する $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ の領域に検出限界を有している。

30

【0009】

プリオン病のためのより高感度で、より特異的な診断テストが必要とされている。血液又は他のサンプル型を使用する死前テストは、特定の動物の疾病状況を評価するために、特に要求されている。そのような方法がない状態では、いったん感染した動物が群内で確認されれば、動物の大規模な屠殺が必要とされる。また、人口母集団をスクリーニングし、献血された血液、外科的処置並びに器官及び組織の移植からの潜在的感染から個人を保護するための診断テストが開発されることは重要なことである。

40

【0010】

米国特許第5977324号および米国特許第6221614号の双方ともに、リンタングステン酸(PTA)を使用するPrP^{S^c}の結合方法について記載されている。PTAはPrP^{S^c}以外の多くの種類の蛋白質と結合して沈殿物を形成する非特異性の蛋白質沈殿剤である。サンプル中の蛋白質の濃度は、PTAを使用する回収に大きく影響する。

【0011】

プラスミノーゲンはPrP^Cに関してPrP^{S^c}を選択的に結合することが報告されており、診断のアッセイでの使用が提案された(Fischer et al. Nature, 2000, Nov 23, 408 (6811): 479-83)。しかしながら、この方法は、十分に有用であると實際上立証されていない。プラスミノーゲンは、関連する明細書である米国特許公開第2002/0004586号公報

50

において、選択的に PrP^{Sc} を結合する因子であると特定される。

【0012】

米国特許第6419916号公報及び関連する明細書によれば、ポリアミン合成物であるSUPER FECT (商品名) (PAMAM dendrimerの加熱誘導される分解によって製造された枝分かれポリアミン混合物である。)及び他の同様の枝分かれポリアミンが、インビトロにおける細胞から PrP^{Sc} を除去することができる。このメカニズムは不明瞭である。このような化合物は、露出した負電荷を帯びた成分を備えたアミロイドとして配列した PrP^{Sc} に直接的に結合することができ、また、酸性条件下における構造変化を誘導することが推察される。この効果は、 PrP^{Sc} が除去されるので、 PrP^C の結合及び既存の PrP^{Sc} の合成を阻害することを単に伴わないと考えられる。もし、pHが4未満ならば、ポリアミンは PrP^{Sc} をプロテアーゼ感受性にすることが分かる。インビトロの PrP^{Sc} 除去実験における酸性セル・コンパートメントで、ポリアミンが作用することが推定される。

10

【0013】

このようなポリアミンが PrP^{Sc} と結合すると結論を下すことは推論的であることが、本研究から導かれる。多くの他の可能性が提案される。 PrP^C 上の PrP^{Sc} の結合の選択性が存在しないことが示されるか或いは示唆される。さらに、プロテアーゼ攻撃を可能にするために PrP^{Sc} の配列を変化する作用を単に果たすだけであり、生じた結合が一時的であると推定することはできない。さらに、ポリアミンの作用は、低pH値を要求するようと思われる。実際には、本研究では、このような dendrimer・ポリアミンが、このような低pH値で PrP^{Sc} と結合しないことが示されている。

20

【0014】

ペントサンポリサルフェート (ポリ-b-キシロース-2,3-ジスルホネート、PPS) は、一群の高分子量ポリスルホン化ポリグルコシド (PGs) (分子量8,000~12,000) のうちの一つである。ブナ材から製造され、ヘパリンさらにPGに類似した抗凝血剤として長年使用されてきたのは安価な合成物である。PPSおよび他のポリアニオンを含むPGsは、 PrP^C および組換え PrP^{Sc} (rec PrP^{Sc}) の両方と結合することが知られている (例えば、Brimacombe DB et al, Biochem J, 1999 Sep 15; 342 pt 3,605-13参照)。従って、PPSはTSE病の予防又は治療の潜在的な治療剤として提案された。インビボ又はインビトロにおける既存の PrP^{Sc} を除去することを示してはいない。

30

【0015】

製造工程では、ペントサンと呼ばれるキシロース (5員環の糖) の可溶性糖ポリマーを生産するために、ブナ材のおがくずが抽出処理される。その後、このポリマーは、クロロスルホン酸及びピリジンの混合物を使用した硫酸化反応に供され、全ての糖環の水酸基の4つのうちの3つにおいて、加えられた硫酸エステルを有するようになる。その結果、全硫酸塩含有量は、ヘパリンの硫酸塩含有量である約30~35%を越える約50~55重量%となる。このような高度のスルホン化と近似した他の唯一の同様の分子は、硫酸デキストラン (40~45%) である。ペントサンは、3.5~7.0Kという非常に低い分子量を有する。

【0016】

PrP^C の結合に関する PrP^{Sc} のポリアニオン又はポリカチオンによる結合のための選択性は報告されていない。驚くべきことに、ポリイオン物質が PrP^{Sc} のような凝集性の変異タンパク質と結合する条件を明らかにした。さらに、このようなポリアニオンは異常型には結合し、 PrP^C のような非凝集性の正常型には結合しない条件を明らかにした。その結合は十分強固であり、十分に選択的である好ましい条件は、凝集性変異タンパク質 (例えば、 PrP^{Sc}) の存在するためのアッセイにおいて有用であった。

40

【0017】

従って、本発明の第一の態様、即ち、非凝集性の正常型タンパク質の存在下において、凝集性の異常型タンパク質の選択的な結合のための方法が提供される。本発明は、選択的な結合条件下における、前記異常及び正常型を含む物質と、サンプル中に存在する前記凝

50

集型タンパク質との結合活性を有するポリイオン物質との接触からなる。結合条件は、溶液中に競合因子の存在を含むことができ、この競合因子は、ポリイオン物質よりも、異常型タンパク質に対するより劣った結合活性を有する。

【 0 0 1 8 】

ポリイオン物質は、溶液中に存在していてもよく、またイオン性表面基を有するような表面に提供されても構わない。後者の場合、この表面は、ポリマー構造内で共有結合されるか、又はポリマーの表面基の修飾によって調製された前記イオン基を有するポリマーの表面に存在することができる。好適なポリアニオンポリマーの一例は、ビーズ又はシートとして入手可能である、パーフルオロ化され、スルホン化された炭化水素ポリマーであるナフィオンである。ポリカチオンポリマーも使用することができる。

10

【 0 0 1 9 】

もう一つの方法としては、この表面は、前記イオン基を提供する基質の上にコートされたものであるか、或いは基質への結合のいずれかである。このような表面基を有する好適なポリマーの一例は、無水マレイン酸で界面活性化され、表面カルボキシル基又はポリカチオン物質を生成するために T R I S で誘導体化された非イオン性プラスチックである。ポリカチオン又はポリアニオンは、ポリスチレンのようなポリマー上に、代わりに受動的にコートされることができる。

【 0 0 2 0 】

ポリアニオン物質に関しては、溶液中で使用する場合でも、または固体の表面にコートする場合でも、ポリアニオン物質は好ましくはポリアニオン性のポリグルコシドである。

20

【 0 0 2 1 】

一般に、競合因子は、ポリイオン物質に比べて、より小さいイオン基の密度を有する。理論に拘束されることなく、ここで詳述される研究結果は、同種の非凝集性の正常型タンパク質に比べて、イオン基との相互作用のための結合部位をより多く有する凝集性の異常型タンパク質からもたらされると思われる。1 或いは少数のイオン基を有する競合因子は、一定の結合活性で、凝集性又は非凝集性のタンパク質のいずれかと相互作用することができる。しかし、非凝集型に比べて凝集型に対する高い結合活性の結果、ポリイオン物質は、多くのイオン基を介して同時に凝集型タンパク質と結合することができる。

【 0 0 2 2 】

感染したウシの脳による本発明者らの実験結果は、固定化されたポリアニオン（例えば、硫酸デキストラン）及びポリカチオン（例えば、ポリエチレンイミン）が、脳ホモジネート液中の異常型プリオンタンパク質 PrP^{Sc} を捕捉することができるということを示唆する。抗プリオンタンパク質抗体 / 酵素接合を使用して得られたシグナルは、最適なポリアニオン捕捉表面に比べて最適なポリカチオン捕捉表面では約 3 ~ 5 倍高い。

30

【 0 0 2 3 】

いずれの場合においても、非特異的な抗プリオンタンパク質抗体を使用する際、界面活性剤であるサルコシル (N-ラウロイル-サルコシン) は、異常タンパク質の捕捉の特異性を向上するとともに、正常プリオンタンパク質由来のシグナルを除去するのに有用な競合因子として、作用することができる。さらに、トリプシンを有するサンプルの部分的分解は、ポリカチオン又はポリアニオン化合物のいずれかを使用した場合、実質的に PrP^{Sc} 由来のシグナルを増加させるが、特異性には影響しない (採用された条件では、トリプシンは、プロテナーゼ K に対して観察されたように、 PrP^{Sc} を優先的に分解するよりもむしろ PrP^{Sc} のポリイオン結合の阻害剤を除去していることが示唆される。)

40

【 0 0 2 4 】

科学論文では、 PrP^{Sc} が、自然にヘパランのようなポリアミンと結合することが報告されている。これら負帯電したポリマーは、 PrP^{Sc} 構造の正帯電した部分と相互作用を、また、凝集タンパク質と多用な相互作用をするものと考えられる。

【 0 0 2 5 】

硫酸デキストラン又はペントサンポリサルフェートのようなポリアニオンが、通常のヘパランに比べてより高い結合活性で PrP^{Sc} 構造に結合することができ、従って、内在

50

性化合物を置換することができる。従って、表面へ固定化された高度に負電荷を帯びたポリマーは、異常プリオンタンパク質を特異的に捕捉することができる。正常なプリオンタンパク質は凝集せず、内在性ヘパリン又は硫酸デキストランのようなポリアニオンとの高親和性の相互作用はない。選択されたアッセイ条件の元で、界面活性剤であるサルコシルのような低親和性アニオンの存在は、低親和性PrP^c相互作用部位のために固定化されたポリアニオンと競合することによって、捕捉の特異性をさらに向上する。

【0026】

対照的に、ポリカチオンはPrP^{S^c}構造由来の内在性ヘパリンを置換し得ない。その代わりに、ヘパリンのフリーの負電荷とのイオン相互作用を形成するために内在性ヘパリン/PrP^{S^c}凝集体との錯体を直接的に形成しなければならない。従って、自然のこの配置では、無傷のヘパリン/PrP^{S^c}錯体は、固定化されたポリカチオンに強固に結合する一方、自然でない固定化されたポリアニオンの場合、「置換された」PrP^{S^c}構造が代わりに捕捉される。内在性ヘパリンのためのポリアニオンによる競合は、100%の効果は示さず、そして、PrP^{S^c}凝集体の全ては負電荷のポリマーによる結合ではないという点で、最適なポリカチオン捕捉表面で得られた高いシグナルのための理由が提供される。

10

【0027】

凝集性タンパク質が、自然のヘパリンによって自然に結合すると予測されない場合、例えば、サンプルが血液、血清又は組織ではない同種のものである場合、アニオン捕捉因子が望ましいと考えられる。

20

【0028】

上述したイオン相互作用に加えて、PrP^{S^c}凝集体の他の領域と、使用されたポリマーとの間で、付加的な疎水結合が存在すると考えられる。これは、結合の相互作用をより高めることができる。

【0029】

分子の個々の結合部位と、結合因子との間の結合力を意味する「親和力」とは対照的に、「結合活性」という用語は、多価結合因子と多数の結合部位を有する分子の全体的な結合力を表わす通常の意味で使用される。

【0030】

もし、競合因子が使用される場合、競合因子は、好ましくは、n-ラウロイルサルコシンのような脂肪酸のアミノ酸アミドである。このような物質は界面活性という特性を有するが、このような状況では、これらの末端COO⁻基を介する1価の結合因子として、又はミセル形成を介する部分的に多価の因子として作用することができる。従って、本発明の第一の態様、即ち、非凝集性の正常型タンパク質の存在下において、凝集性の異常型タンパク質の選択的な結合のための方法が提供される。本発明は、選択的な結合条件下における、前記異常及び正常型を含む物質と、サンプル中に存在する前記凝集型タンパク質との結合活性を有するポリイオン物質との接触からなる。結合条件は、溶液中に競合因子の存在を含むことができ、この競合因子は、ポリイオン物質よりも、異常型タンパク質に対するより劣った結合活性を有する。

30

【0031】

さらなる態様では、本発明は、非凝集性の正常型タンパク質の存在下における凝集性の異常型タンパク質の選択的な結合に関する方法を提供する。本発明は、例えば、前記異常型の選択的な結合の提供といった条件下における、前記異常型と正常型の双方を含む物質と、ポリアニオン性のポリグルコシドとを接触させる条件からなる。

40

【0032】

本発明の様々な観点における好適な実施例において、前記蛋白の異常形状はPrP^{S^c}であり、前記蛋白の通常形状はPrP^cである。しかしながら、全ての形状において本発明は、異常な蛋白の凝集形状への特異的結合に、広く適用される。

【0033】

使用可能なポリカチオニック選択的結合因子は、ポリリシン、ポリアミドアミンを含む

50

、ポリエチレン・イミン、ポリアミン、例えば、ポリ(デアリル・ジメチル・アンモニウム)及び、1,5ジメチル1,5デアザウンデカメチレン・ポリメチオプロミド(ヘキサジメチリン・プロミド、若しくはポリブレンとしても知られる)等のような、PAMAMデンドリマー、ポリ4級アミンを含有する。

【0034】

好適なポリアニオン・ポリグリコシドは、ポリ硫酸化された、ポリグリコシドである。しかしながら、例えば、カルボキシル酸残基、もしくは硫酸基などのような、他のイオンニック部位は、ウェルもしくはその代わりに使用され得る。

【0035】

むしろ、ポリ硫酸化ポリグリコシドは、ペントサン・ポリ硫酸、若しくは、デキストラン硫酸である。他のポリアニオン・ペントサン、若しくは、デキストラン誘導体は、ポリアニオン・ポリグリコシドとして、使用される。硫酸化(若しくは他のアニオンニック基)の高レベルは好ましい。

10

【0036】

カラギーナン、デキストラン及びペントサンの硫酸化レベルは高い。仮に、潜在的硫酸化の低割合が硫酸基により起きたとしても、構成物はPrP^{Sc}における結合部位に、選択的に、相互作用しないことが証明された。

【0037】

適したアニオンニック選択的結合因子は以下のものを含有する。

ペントサン・ポリ硫酸(分子量3500-5000)、デキストラン硫酸500(分子量500000)、イオタ・カラギーナン及びカラギーナン、例えば、フコダイン、ケラチン硫酸、ヒアルロン酸ポリ硫酸、コロミン酸(バクテリアのポリシアリック酸)、カラギーナン・タイプiii及iv、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、フルセララン、市場に流通している硫酸化ポリサッカライド、例えば、ポリソルベート、シゾフィラン、キサンタンガム、澱粉、セルロース構成物、ペクチン、胃粘膜、セラトニア、アガー、アカシアガム、硫酸化グリコシド1、硫酸化グリコシド2、N-アセチル-Dグルコサミン、若しくはデルマトン硫酸、ライズロン酸などのような、カラギーナン、ヘパリン及びヘパラン、デキストラン硫酸8(分子量8000)、硫酸化ポリグリコシドなど。

20

【0038】

多イオン性物質は、非選択的条件下において、改変型、若しくは変異蛋白の凝集形状と、通常蛋白の非凝集形状の双方に結合する能力と同様に、適した条件下において、選択的に凝集形状に結合する能力を有することとなるよう、選択される。

30

【0039】

所望の選択性は、反応条件の適した修正、特に、競合因子の存在及び濃度、pH値と、洗浄剤により、得られる。むしろ、pH値は、前記選択的結合を供給する為、選択される。

【0040】

pH値は、好ましくは、5.6~9、例えば、7~9、より好ましくは、8~9、例えば、8.2~8.6、特に、8.4が、洗浄液として使用するのに、最適である。適した緩衝液は、リン酸緩衝液とトリス緩衝液を含有する。

40

【0041】

塩濃度は、250mM以下であることが望ましく、さらに低濃度、例えば100mM以下であることが、より好ましい。

【0042】

むしろ、洗浄液が存することにより、洗浄によるもの、若しくは、競合因子として活動することのどちらかにより、前記選択的結合を促進する。

【0043】

特に、洗浄剤は、本目的の為、脂肪酸のアミノ酸アミドであること、例えば、N-ラウロイル・サルコシン、若しくは、他の脂肪酸サルコシンであることが、好ましい。このような洗浄/競合因子の存在は、選択的結合因子がポリアニオンニックであるとき、特に、好

50

ましい。

【0044】

好ましくは、本洗浄液の濃度は、少なくとも、0.05重量%、より好ましくは、少なくとも、0.1重量%以上、さらに好ましくは、少なくとも、0.2重量%、例えば、0.2~2重量%、さらに好適例は、0.5~1.5重量%であることが望ましい。

【0045】

同様の効果を有する、他の洗浄液は、CHAPS, Brij, オクチル グルコシド, Tween 20, Triton X-100と、Nonidet P-40を含むものが、使用され得る。しかしながら、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)が高濃度であることは、望ましいことではない。

N-ラウロイルサルコシン(若しくは同様のもの)と他の洗浄剤との組合せは適しており、0.5~2%含まれているのが好ましい。例えば、約1%サルコシン洗浄剤が含まれている例、例えば、0.5~2%、

上で列記したものの内の1つ、特に、Triton X-100またはNonidet P-40が約1%含まれているものがあげられる。

【0046】

トリプシン、キモトリプシン、プロテナーゼK、若しくはその他、プロテアーゼ様のものは、ポリアニオニックか、ポリカチオニック選択的結合因子のどちらか一方へ、凝集蛋白が結合することによってできた、未知の物質による妨害を防ぐのに役立つ。このことは、特に、PrP^S陽性脳サンプルがPrP^S陰性脳で希釈されるというケースでは、サンプルは比較的高濃度の他の蛋白質を含有することとなる。付加した基質の反応抑制は、Dnase及びそれに類するものを含む、他の分解酵素を含有することにより、得られる。

【0047】

前記異常型蛋白質集合体との結合後の選択的結合因子は、固定化捕捉因子によって捕捉される。そして、前記選択的結合因子及び前記捕捉因子との間で形成される複合体の存在が確認され、その量が定量される。

【0048】

前記捕捉因子はレクチン(結合因子は適応するものであり、例えばポリグリコシドである)、或は前記選択的結合因子と反応する抗体である。前記選択的結合因子には、選択的に結合可能なタグ部分が存在し、前記捕捉因子はそのタグ部分と結合する。

【0049】

任意に、或は、選択的結合因子は、前記サンプルにさらされる前に固形培地に固定される。該選択的結合因子には、選択的に結合可能なタグ部分が備わり、該タグにより前記固形媒質に固定される。

【0050】

結合可能なタグ部分が存在する場所として、例えば、ビオチン、フルオレセイン、ジゴキシン、ヒスチジン(HIS)6である。

【0051】

選択的結合因子は、結合可能なタグを介してというよりむしろ、直接的に、固形物質に固定される。例えばPG'sは、共有結合により直接、結合し、PGのヒドロキシル基を残した状態で、例えば、エポキシ或はビニル・スルホン基由来の固定相を利用する。

【0052】

本発明の各側面において、異常型蛋白質の結合が、選択的結合因子の固定或は捕捉の前に起ころうと或は後に起ころうと、該固定化された選択的結合因子/異常型蛋白質複合体は、正常型蛋白質を取り除くために、好適に洗浄段階へと進む。該段階は、選択性を改善するものである。該洗浄段階は、好ましくは、前記競合因子を含有する溶液を用いて実行される。該溶液は、界面活性剤であり、該界面活性剤は、好ましくは、洗浄力を有し、そうでなければ選択的結合を促進する界面活性剤からなる。これは、好ましくは、脂肪酸のアミノアミド、例えばn-ラウロイル・サルコシン或は、他の脂肪酸サルコシン等である。洗浄段階のサルコシン界面活性剤の濃度は、好ましくは、少なくとも0.05%、より好

10

20

30

40

50

ましくは、少なくとも0.1%、さらに好ましくは、少なくとも0.2%であり、例えば、0.2~2%、好ましくは0.5%~1.5%である。また、好ましくは、他の界面活性剤として、その洗浄液が緩衝液によりpHを5.6~8.4の範囲に調整されたものが挙げられる。

【0053】

PrP^SC (或は他の異常蛋白質)の前記結合は、定性的或は定量的に決定される。該決定は、結合PrP^SCを非結合PrP^C(或は他の正常型蛋白質)から分離した後、PrP^SC (或は他の蛋白質集合体)のための免疫学的検定をおこなうことにより行われる。

【0054】

また、任意に正常型蛋白質が取り除かれた後、蛋白質の集合体が選択的に結合し、さらに、ポリアニオン物質、例えばポリグリコシドアニオン(対応してタグ或は検知可能ラベルで標識された)は、既に結合した蛋白質の集合体とサンドイッチ(例えばポリグリコシド-蛋白質集合体 ポリグリコシドラベル)を形成するために、結合する可能性がある。次に、該サンドイッチは、定量或は検出される。サンドイッチ形成の2段階目において、選択的結合条件は、必要ではない可能性がある。

【0055】

上記のごとく、選択的結合因子は、作り変えられた蛋白質との接触の前、或は後に、固体物質に固定される。次にアッセイから正常型蛋白質を取り除くため、固体物質からの前記サンプルの分離が行われ、次の測定のために、作り変えられた蛋白質のみを残す。

【0056】

本文において、固体サポート物質は、マイクロタイター・プレート、計量棒及び層流装置等の微視的な或は、ハンドラベル可能な物質を含むだけでなく、マイクロビーズ及び超常磁性マイクロビーズをも含む。該マイクロビーズ及び超常磁性マイクロビーズは、濾過或は磁気性の捕捉により分離される。ビオチン或は他のタグは、基本的な化学的方法で、硫酸デキストラン或はPPS或は類似物質と接合される。PPSにおける糖のバックボーン残基或は残留物の10のうち1は、ウロン酸メチルエステルであり、これは、そのカルボキシル残基を介してカップリングするための1つの手段となる。カップリングのための他の既知の方法は、ヒドロキシル基(4のうち1は、硫酸反応後も自由である)或は、末端部の還元糖を介するものである。ビオチンは、便利な結合可能タグである。該結合可能タグは、ポリアニオン物質、或は、他の選択的結合因子が、アビジンから誘導された固体物質と或はストレプトアビジン、中性アビジン(neutravidin)或はカプトアビジン(captavidin)であるような結合特性を持つ物質と結合するために用いられる。

【0057】

結合可能タグ部としての使用に適した他の分子は、すべての物質を含む。該物質とは、ポリイオン物質と容易に結合し、適切な捕捉因子による捕捉に役立つものである。例えば、フルオレセインであるような1つの分子は、PPS或は、類似分子に結合する。該結合は、カルボジイミドEDC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)の存在下で、ウロン及びペントサンポリ硫酸塩の側鎖を用いてアミノフルオレセイン誘導体に反応を起こさせることによりなしえる。また、前記フルオレセインであるような1つの分子は、適切で容易に利用可能な抗体によって、捕捉され、それ自体は、固体物質に固定される。この方法の抗体捕捉に適した他のタグは、ジニトロフェノール(DNP)、ジゴキシン、核酸、核酸類似連鎖及び(His)₆を含む。抗体とは違った結合因子もまた使用されうる。例えば、補足的な核酸或は核酸類似連鎖が挙げられる。

【0058】

或は、しかしながら、捕捉因子は使用される。該捕捉因子は、タグ部を介してというよりむしろポリイオン物質それ自体と選択的に結合する。例えば、ポリグリコシド、適切なレクチン或は、抗体によって結合する。PPSと結合するための抗体は、例えばJ. Immunol. method 1990, 1, 24, 126(1); 39-49 においてKongtawelertらによって開示されている。そのような抗体を、固定するための基本的な技術は、当業者には、知られるところ

10

20

30

40

50

である。

【0059】

集合した作り変えられた蛋白質の存在或は、量を決定するための、或は、該作り変えられた蛋白質を集合させるため、既知の或は、将来考案される方法は、使用されることが可能である。該作りかえられた蛋白質として、PrP^SC (PrP^Cのような正常型を取り除くための選択を必要としない)が挙げられる。前記方法は、集合している該作り変えられた蛋白質の存在や量を決定するために使用される。該作り変えられた蛋白質が、選択的結合因子により選択的に結合され、結合していない正常型蛋白質がそこから分離する。該分離は、結合した部分の固定と残りの非結合部を洗浄することにより生じる。前記方法は、既知のELISA、RIA、IRMA及び免疫学的検定法の他の形態をも含む。例えば、Bio-Rad Platelia (登録商標) BSE検定キットで具現化され、serbanらによって開示された方法が挙げられる。

10

【0060】

用いるアッセイの形態によっては、そのアッセイ以前の選択的結合因子から、捕捉された異常型蛋白質を溶出することが必要とされる、或は望ましい。そのような溶出段階を踏む時、チオシアン酸グアニジンであるようなカオトロープ (Chaotrope) が、少なくとも1 M、好ましくは2 ~ 6 M例えば、4 ~ 6 Mの濃度で存在することが望ましい。或は、カオトロープは、ウレアを含んで使用されてもよい。

【0061】

さらに、より大きな結合力を持つ競合因子は、置換するために用いられる。該置換によって、蛋白質が選択的結合因子からはずされる。ナトリウムドデシル硫酸塩は、競合因子として用いることに適しており、好ましくは、0.5 ~ 1重量%、より好ましくは、0.75重量%以上で用いられる。

20

【0062】

本発明に関して、選択的に結合され、決定される蛋白質は、アミロイド蛋白質及びタウ蛋白質を含む。該タウ蛋白質は、アルツハイマー病でプラークを形成する。

【0063】

以下の理論によって結合されない場合には、本発明においてPPS及び類似分子は機能する。該機能とは、関連した蛋白質において負の硫酸基の組が、正のアミノ酸 (Lys及びArg) の組と結合することによりあるいは、結合部における蛋白質のポリヒスチジン金属を介して行われるものである。集合体との結合は、集合している蛋白質によって提供される結合部が増加することにより、強められる。適当なアニオン界面活性剤は、集合していない形態と結合するためにより効果的に競合する。該競合は、選択性を強めるものである。集合しているプリオンと結合するための結合力によって得られる選択性は、少なくとも正常型蛋白質のための選択性の3倍であり、好ましくは少なくとも10 : 1である。

30

【0064】

さらに言えば、本発明は、PrP^CからPrP^SCを分離する過程を含んでいる。該過程は、脂肪酸のアミノ酸アミドの存在下で、選択的にPrP^SCを結合因子と結合させることを含む。そのような結合のための、好ましい条件は、上記に示したとおりであり、その結合した蛋白質は記載どおりにアッセイされる。

40

【0065】

本発明は、添付した図を参照し以下の例によって更に記載し説明される。図1は実施例9における希釈曲線を示す。

【0066】

(実施例1 : ビオチン化ペントサンポリ硫酸及び後の結合力捕捉を用いて行う変異プリオン蛋白質からの正常プリオンの分離)

(概論)

ビオチンは、基本的化学的方法によりペントサンポリ硫酸と接合された。そのビオチン化ペントサンポリ硫酸は、脳ホモジネート液における変異プリオン蛋白質と結合すること

50

が可能となった。また、その結合の後、ペントサンポリ硫酸/プリオン複合体は、捕捉された。該捕捉は、ストレプトアビジンから誘導された超常磁性ビーズを用いて行われた。その捕捉を受けた変異プリオンは、次に該ビーズから溶出し、免疫反応に基づいたBio-Rad Platelia (登録商標) BSE検定キットを用いて検出された。現状においてのキットは、正常プリオンと変異プリオン蛋白質を識別できないため両方の蛋白質にシグナルを検出した。2つのBSE感染及び2つの感染していないウシ脳のバンクは、検査され、使用された。該バンクは、記載した特定の条件において、ペントサンポリ硫酸が特別に脳ホモジネート液からの変異プリオン蛋白質を捕捉するために、使用可能なことを表した。

【0067】

(方法)

超常磁性ビーズの調整

使用直前に、ストレプトアビジン超常磁性ビーズ(シグマ-アルドリッチ社(Sigma-Aldrich Company Ltd.)、S-2415) 400 µLが、磁気性捕捉により洗浄される該洗浄は、連続的3回、1 mL容量ずつのTBST(50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0.5% (v/v) Tween 20 [シグマ-アルドリッチ社(Sigma-Aldrich Company Ltd. P-7949)])において行われた。

ビーズは、最後に400 µLのTBSTにおいて再度懸濁された。

100 µLの分取は、4つのチューブに調整され、液体が取り除かれた後、ビーズが使用可能となる。

【0068】

脳ホモジネート液の調整

1. BSE感染及び非感染の牛の脳組織、300-500 mgを、BSE精製キット(Bio-Rad) 付属の、細碎ビーズを含む、細碎チューブへ加えた。本キットのこれらのチューブ内に予め入っていた溶液は、使用前に、吸引・廃棄した。

2. 細碎後、50% (w/v)の脳ホモジネート液を作成する為、一定量の150 mM塩化ナトリウムを、それぞれのチューブへ加えた。

3. チューブは、細碎機(Bio-Rad社製)で、速度6.5の設定で、45秒間、細碎した。

4. ホモジネートは、150 mM NaClと1:1の割合で、希釈された。

5. 各ホモジネート液50 µL容量は、別々にチューブに収められた。

変異プリオン蛋白質の特異的捕捉

次に20%ラウロイル・サルコシン(シグマ-アルドリッチ社(Sigma-Aldrich Company Ltd.)、L-9150) 10 µLは、ホモジネート液の入った各チューブに加えられ、混合された。

次に、ピオチン化ペントサンポリ硫酸(蒸留滅菌水内で10 µg/mL) 50 µLは、各チューブに加えられ混合され、室温で30分間インキュベートされた。

次に、各反応は、洗浄後のストレプトアビジン超常磁性ビーズのチューブに加えられ、室温で30分間インキュベートされた。

次に該ビーズは、TBST 1 mL容量中で磁気性捕捉によって洗浄された。

【0069】

変異プリオン蛋白質の溶出と免疫検出

最終的に、最後の洗浄の後、各反応からのビーズは、10 µLのCl(Bio-Rad Platelia(登録商標) BSE検定キットに提供されている)を用いて再懸濁された。

2% (w/v) SDS 5 µLは、各ビーズの懸濁液に加えられ、混合された。

1 M グアニジンチオシアネート(シグマ-アルドリッチ社(Sigma-Aldrich Company Ltd.)、G-9277)の5 µLは、各ビーズの懸濁液に加えられ、混合された。

反応液は、5分間100 °Cで熱せられた。

次に、R6(Bio-Rad Platelia(登録商標) BSE検定キットに提供されている) 100 µLが加えられ混合された。

10

20

30

40

50

次に、各溶出液の100 µLがBio-Rad Platelia (登録商標) BSE検定キットにおいて使用された。Bio-Rad Platelia (登録商標) BSE検定キットは、前記プロトコルとこのキットに備わった試液を用いるものである。簡潔には、本キットは、正常及び/又は変異プリオン蛋白質の免疫捕捉と抗体と接合した西洋ワサビ・ペルオキシダーゼを用いた免疫検出を備えている。

【0070】

(結果)

マイクロタイター・プレート基盤のPlatelia (登録商標) アッセイにおいて、免疫検出を行った後、各ウェル内のシグナルは、ELISAリーダーを用いて450 nmの波長で測定される。

使用された脳ホモジネート液	OD ₄₅₀
BSE感染ウシ脳サンプル1	0.229
BSE感染ウシ脳サンプル2	0.208
正常ウシ脳サンプル1	0.061
正常ウシ脳サンプル2	0.047

変異プリオンを含む2つのBSE感染ホモジネート液からのシグナルは、明確に、非感染の正常脳ホモジネート液からのシグナルより高い。

【0071】

(考察)

Bio-Rad Platelia (登録商標) BSE検定キットは、正常プリオンと変異プリオンとを識別できない。一般的に、変異プリオン蛋白質のための特異性が生じることは、それ以前に行われるプロテアーゼKによるサンプルの分解によってなし得るのである。該蛋白分解酵素は、プロテアーゼ感受性の正常プリオン蛋白質を消すこととなる。サンプル内のどのような変異プリオン蛋白質もプロテアーゼ分解から、正常プリオンより影響を受けないため、その場に留まり、Platelia (登録商標) アッセイによって検出される。本実験では、サンプルのプロテアーゼ分解の第2の方法を示す。我々は、定義された条件を用いた。該定義された条件とは、溶液内のビオチン化ペントサンポリ硫酸が特別にサンプル内で変異プリオン蛋白質と結合可能である。変異プリオン/ペントサンポリ硫酸複合体は、次に、ストレプトアビジン超常磁性ビーズを用いて捕捉される。洗浄後、変異プリオン蛋白質は、次に溶出し、免疫アッセイにおいて検出される。正常プリオン蛋白質は、このプロトコルで捕捉されず、洗浄され、それゆえ、この免疫アッセイにおいては、検出されない。我々は、この技術を用いることにより2つのBSE感染ウシ脳内において、変異プリオン蛋白質を正確に検出し、2つの正常ウシ脳内では、何ら検出されなかったこと示す。

【0072】

(実施例2：固定ビオチン化ペントサンポリ硫酸を用いて行われる変異プリオン蛋白質からの正常プリオンの分離)

(概論)

ビオチンは、基本的な化学的方法によってペントサンポリ硫酸と接合された。そのビオチン化ペントサンポリ硫酸は、ストレプトアビジン由来の超常磁性ビーズを覆うために用いられた。そのビオチン化ペントサンポリ硫酸に覆われたビーズは、次に確実に脳ホモジネート液からの変異プリオン蛋白質を捕捉するために用いられた。その捕捉された変異プリオン蛋白質は次に、該ビーズから溶出し、免疫に基づくBio-Rad Platelia (登録商標) BSE検定キットを用いて検出された。現状においてのキットは、正常プリオン蛋白質と変

10

20

30

40

50

異プリオン蛋白質を識別することができないため、両方の蛋白質にシグナルを与える。3つのBSE感染及び3つの感染していないウシ脳のバンクは、検査され、使用された。該バンクは、記載した特定の条件において、ペントサンポリ硫酸が特別に変異プリオン蛋白質を脳ホモジネート液から捕捉可能なことを表す。

【0073】

(方法)

ペントサンポリ硫酸で覆われた磁気性ビーズの調整

使用直前に、ストレプトアビジン超常磁性ビーズ(シグマ-アルドリッチ社(Sigma-Aldrich Company Ltd.)、S-2415)600 μ Lが、磁気性捕捉により洗浄される。該洗浄は、連続的に3回、1mL容量ずつのTBST(50mM Tris, 150mM NaCl、pH7.5、0.5%(v/v)Tween20[シグマ-アルドリッチ社(Sigma-Aldrich Company Ltd.P-7949)])において行われた。

ビーズは、最後に400 μ LのTBSTにおいて再度懸濁される。そして、TBST内の10mg/mLピオチン化ペントサンポリ硫酸の60 μ Lが加えられた。該ビーズは、室温で1時間、暗室で放置された。該放置は、該ペントサンポリ硫酸がビーズを覆うことを可能にするため、穏やかに振動を加えつつ行われた。

ビーズが覆われた後、ビーズは磁気性捕捉によって洗浄された。該洗浄は、3つの連続的な1mL容量の5%(w/v)ウシアルブミン(シグマ-アルドリッチ社(Sigma-Aldrich Company Ltd.)、A-7906)、pH8.4リン酸緩衝液によって行われ、最後に60 μ Lの同じ緩衝液中で再懸濁された。その後、ビーズは、使用可能となる。

【0074】

脳ホモジネート液の調整

各脳組織の300-500mgがBSE精製キット(Bio-Rad)付属の細碎ビーズが入った細碎チューブに加えられた。キット内の本来の3つのチューブに入れられた液体は、使用される前に吸引され廃棄される。

均質化後の50%(w/v)の脳ホモジネート液を生成するために算出された容量150mMのNaClが各チューブに加えられる。

そのチューブは、細碎機(Bio-Radから購入される)において、45秒間スピード6.5で均質化される。

該ホモジネートは、5%(w/v)ウシ・アルブミン、pH8.4の50mMリン酸緩衝液を用いて5倍量で溶出する。

各ホモジネート液45 μ L容量は、別々にチューブに収められる。

5 μ L(w/v)SDS(硫酸ドデシルナトリウム)(シグマ-アルドリッチ社(Sigma-Aldrich Company Ltd.)、L-5750)が、各チューブに加えられ、完全に混合された。

450 μ Lの5%(w/v)ウシ・アルブミン、pH8.4の50mMリン酸緩衝液が、各チューブに加えられ混合された。

50 μ Lの20%(w/v)Nラウロイル・サルコシン(シグマ-アルドリッチ社(Sigma-Aldrich Company Ltd.)、L-9150)が加えられ混合された。

【0075】

変異プリオン蛋白質の特異的捕捉

調整済みのペントサンポリ硫酸でおおわれた超常磁性ビーズの10 μ Lを各希釈脳ホモジネート液に加え、振動させつつ暗室に室温で1時間放置した。

各反応液は、3つのTBSTの100 μ L容量を用いて磁気性捕捉により洗浄された。

【0076】

変異プリオン蛋白質の溶出と免疫検出

各反応からのビーズは、10 μ LのCl(Bio-Rad Platelia(登録商標)BSE検定キットに提供されている)を用いて再懸濁された。

0.2%(w/v)SDS5 μ Lは、各ビーズの懸濁液に加えられ、混合された。

1Mグアニジンチオシアネート(シグマ-アルドリッチ社(Sigma-Aldrich Company Ltd.)

10

20

30

40

50

)、G - 9 2 7 7) の 5 μ L は、各ビーズの懸濁液に加えられ、混合された。

反応液は、5 分間 1 0 0 で熱せられた。

次に、R 6 (Bio-Rad Platelia (登録商標) BSE検定キットに提供されている) 1 0 0 μ L が加えられ混合された。

次に、1 0 0 μ L を、Bio-Rad Platelia BSE検出キットのサンプルとして使用した。

該キットの使用に際しては、該キットのプロトコルに従い、且つ、該キットの付属品を用いて行った。要するに、該キットは、通常のプリオン蛋白、及び/又は、変異プリオン蛋白の免疫応答反応と、西洋ワサビのペルオキシダーゼが接合した抗体による免疫検出反応を含む。

【 0 0 7 7 】

(結果)

マイクロタイター・プレートにおけるPlatelia (登録商標) アッセイにおいて、免疫検出を行った後、各ウェル内のシグナルは、アッセイにELISAリーダーを用いて 4 5 0 n m の波長で測定される。

使用された脳ホモジネート液	OD ₄₅₀
BSE感染ウシ 脳サンプル1	0. 4 6 5
BSE感染ウシ 脳サンプル2	0. 3 8 2
BSE感染ウシ 脳サンプル3	0. 4 3 7
正常ウシ脳 サンプル1	0. 0 6 0
正常ウシ脳 サンプル2	0. 0 7 4
正常ウシ脳 サンプル3	0. 0 6 6

変異プリオン蛋白質を含む3つのBSE感染脳ホモジネート液からのこのシグナルは、明確に非感染の正常脳ホモジネート液におけるものより高い。

【 0 0 7 8 】

(考察)

Bio-Rad Platelia (登録商標) BSE検定キットは、正常プリオン蛋白質と変異プリオン蛋白質とを識別できない。一般的に、変異プリオン蛋白質のための特異性が生じることは、それ以前に行われる蛋白質分解酵素Kによるサンプルの分解によってなし得るのである。該蛋白分解酵素は、プロテアーゼ感受性の正常プリオン蛋白質を消すこととなる。サンプル内のどのような変異プリオン蛋白質もプロテアーゼ分解から、正常プリオンより影響を受けないため、その場に留まり、PlateliaTM アッセイによって検出される。本実験では、サンプルのプロテアーゼ分解の第2の方法を示す。我々は、定義された条件を用いた。該定義された条件とは、ペントサンポリ硫酸がサンプルから変異プリオン蛋白質を確実に捕捉できる条件である。この捕捉された変異プリオン蛋白質は、溶出し、免疫アッセイにおいて検出される。正常プリオン蛋白質は、ペントサンポリ硫酸で捕捉されず、洗浄され、それゆえ、この免疫アッセイにおいては、検出されない。我々は、この技術を用いることにより3つのBSE感染ウシ脳内において、変異プリオン蛋白質を正確に検出し、3つの正常ウシ脳内では、何ら検出されなかったこと示す。

【 0 0 7 9 】

(実施例3： P P S のビオチン化)

(方法の原理)

通常、ペントサン硫酸のポリキシロース主鎖における10の糖基の内の1は、ウロン酸残基によって置換される。次に、カルボキシル基の内のメチルエステルにより置換され、分子中に多数のフリー・カルボキシル基が存在することとなる。そして、活性エステルを形成する為、カルボジイミドに誘導され得る。次に、これらはアミド結合を形成する為、アミノ酸に置き換えられる。本実施例では、EDCとNHSは、活性エステルを形成する為、選択され、ビオチン・ヒドラジドはアミノ種として選択される。

2つの反応は以下の条件で実施される。

1つ目は、ビオチン・ヒドラジドは存在する一方、NHSは付加されていない条件。

2つ目は、NHS/EDCがPS及びビオチン・ヒドラジドと同時に反応する条件。

【0080】

(材料)

・ ペントサン硫酸 (ノートン・ヘルスケア) Stephen Dealer氏より贈与

ビオチン・ヒドラジド 100mg

(Pierce#21339、分子量 258.33、バッチAH41461)

EDC 1g (1-エチル-3-(3-ジエチルアミノプロピル)カルボジイミド・メチオジド) (シグマ社製、#16,534-4)

NHS 5g

(N-ヒドロキシ・スクシンイミド) (シグマ社製、#H7377、分子量 115.1)

透析チューブ (分画分子量 3.5k、Pierce#68035)

DMSO (シグマ社製)

【0081】

(方法)

2の反応を、NHSを含め行う場合と、NHSなしで行う場合の2つのパターンで、実施した。

ビオチン・ヒドラジド100mgを、ガラス瓶中のDMSO 6mlで、溶解させる。

この際、加温、及び/又は、超音波処理が必要とされる。終濃度は16.7mg/ml、

もしくは65mMとなる。ペントサン硫酸100mgを、DMSOと水の混合液(50:

50) 10mlに溶解させる。これは通常のプラスチック製コンテナ内で実施可能である

。EDC 100mgを、DMSO 1mlのガラスバイアル中で、溶解させる。

この際、加温が必要とされる。NHS(約40-50mg)を、1.0mlの水で溶解させる。

反応は、直径12mmのpH電極を装備した、マグネット・スターラー上で、小型の円錐形のマグネット・スターラー・バー(直径約10mm)を用いて、円錐形底面を有する一般のポリスチレン・コンテナ中で行われる。

【0082】

(実施例3a： NHS非存在化における反応)

反应用容器に、ペントサン硫酸溶液 5.0mlを注入し、そこにビオチン・ヒドラジド溶液 1.0mlを加えた後、充分攪拌し、pH値を測定する。pH値は、7~8である

ことが望ましい。次に、攪拌しながら、EDC溶液 0.2mlを加える。pH値を調整は、1規定の塩酸溶液を、10μLずつ、ガラスシリンジ及びガラス針から滴下することにより行う。滴下するごとに、pH値を測定する。pH値が、5~6の範囲となるまで、塩酸の滴下を続ける。これは、水酸化イオン(OH⁻)を生じさせるのに、必要である

。反応溶液は、全体を通して、無色透明でなければならない。仮に、ビオチン・ヒドラジドの白い沈殿物が形成されたとすれば、DMSOの濃度が、50%以上になるまで、増加させることが必要となる。その後、該反応溶液を、室温で2~3時間、放置する(若しくは、必要に応じて、一晩放置することも可能)。

【0083】

該反応混合物の最終pH値を記録する。そして、DMSOの濃度が、25%以下にまで希釈

【0083】

該反応混合物の最終pH値を記録する。そして、DMSOの濃度が、25%以下にまで希釈

10

20

30

40

50

する為、同量の1モルの塩化ナトリウムを加え、ヒドラジドのイオン結合を置換し、全内容物を、長さ35cm、平面幅2.2cmの透析チューブに移す。DMSOの濃度は、透析チューブへの損傷を避ける為、25%にまで削減することに留意する。

また該チューブについて使用前、針穴があるか否かを確認する為、水でテストし、針穴で膨張しない様、全容量の三分の一程度とする。

2Lの水に対し、一晚、透析し、これを数回繰り返す。透析を行えば、それだけペントサン硫酸は、その強い陰イオン電荷の効力による非共有イオン結合により、強固に塩基性イオンの状態を保つ。透析後の溶液を凍結乾燥し、乾燥重量を記録する。最終産物として、堅固な白い固形物が得られるはずである。収率は様々であるが、通常は50 - 60%である。収率のロスのはほとんどは、透析中に起こる。ペントサン硫酸の分子量の異種性及び分子量3500以下の種の損失がその原因である。

10

【0084】

(実施例3b: NHS存在化における反応)

この反応は、反応を開始させるEDC反応液の添加に先立ち、NHS 1.0ml (44mg)を反応用瓶へ付加することを除いては、基本的に、前記の場合と同様の手法で実行される。初期のpH値は、6~7の範囲にあり、1規定の塩酸溶液により、約5~6の範囲にまで調節されることとなる。

【0085】

(品質管理)

乾燥重量から回収率を算出した後、水で10mg/mlの溶液を作成し、200nmから400nmのスペクトルを測定した。ピークは、260nmと280nmに表れなければならないが、どちらか一方、もしくは双方にピークが偏っている必要はない。

20

この吸光度は、スルホン化段階において、分子中に取り込まれた、プリン残基によるものである。これらは、例えばクロマトグラフィー中、ペントサン硫酸の濃度を観測するのに使用される。ペントサンは、260nmにおける紫外線吸収、若しくは、より低い濃度においては、トリジンブルー・メタクロマシア (metachromasia) ・アッセイにより、観測されうる。

【0086】

(実施例4: 血漿からプリオン蛋白の除去)

・ 変異プリオン蛋白の除去

30

1. 100µLのペントサン・ポリ硫酸塩でコートした超常磁性ビーズを、新鮮なヒトの血漿に注入された、2つのPrP^{Sc}のそれぞれに加えた。双方とも室温で1時間、振動培養した。

2. ビーズはその後、磁石により血漿から取り除かれた。この上清は、残存する血漿とともに、その後、変異プリオン蛋白の存否について分析された。

・ 前記サンプル中における変異プリオン蛋白の分析

1. 前記2つの血漿サンプルは、プロテナーゼKにより処理された。該状況は、通常のプリオン蛋白は分解することはできるが、変異プリオン蛋白は分解することはできないものである。これらの状況は実験により簡単に決定される。プロテナーゼKにより処理されたサンプルは、免疫応答を利用するBio-Rad Platelia BSE検出キットを使用して、変異プリオン蛋白の存否を確認した。

40

【0087】

(結果)

マイクロウェル・プレート・ベースのPlateliaアッセイで免疫検出反応を実行した後、個々のウェルにおけるシグナルを、450nmの波長において、ELISA用プレートリーダーで、測定した。変異プリオン蛋白は、ペントサン・ポリ硫酸塩で処理されていない、変異プリオン蛋白が混入された血清サンプル中において、直ちに検出できた。これとは対照的に、ペントサン・ポリ硫酸塩で処理されたサンプルでは、該サンプル中に存する変異プリオン蛋白の存在を証明するシグナルは検出されなかった。

【0088】

50

(考察)

この実験は「ペントサン・ポリ硫酸塩は、興味あるサンプルから変異プリオン蛋白を効果的に除去するのに使用され得る」ということを証明した。

【 0 0 8 9 】

(実施例 5 : ペントサン・ポリ硫酸塩が、変異プリオン蛋白に、特異的に結合し得る為の洗浄条件の分析)

【 0 0 9 0 】

(序論)

ビオチンを、通常の化学反応により、ペントサン・ポリ硫酸塩に接合させた。ビオチン化されたペントサン・ポリ硫酸塩は、ストレプトアビジン由来の超常磁性ビーズをコートするのに使われた。コートされたビーズは、それから洗浄の条件を設定する為、使用された。ここで、洗浄の条件とは、ペントサン・ポリ硫酸塩が変異プリオン蛋白に結合するが、通常の細胞性プリオン蛋白には結合しない状況のことをいう。

【 0 0 9 1 】

(方法)

ペントサン・ポリ硫酸塩をコートされた磁氣的ビーズの準備

1 . ストレプトアビジン超常磁性ビーズ (シグマ社製、S-2415) の 6 0 0 μ L を、1 m L T B S (5 0 m M T r i s、1 5 0 m M N a C l、p H 7 . 5) で、3 回連続して、磁氣的捕捉により、洗浄した。

2 . ビーズは、最終的に、5 % ウシ・アルブミン (以下、B S A) (シグマ社製、A - 7 9 0 6) を含む 5 4 0 μ L の T B S と、T B S で 1 0 m g / m L としたビオチン化されたペントサン硫酸 6 0 μ L で、再浮遊させた。ビーズは、室温で 1 時間、緩やかに振動させながら培養され、ペントサン硫酸をビーズにコートさせた。

3 . コーティングの後、ビーズは、5 0 m M リン酸緩衝溶液 (p H 8 . 4)、5 % (w / v) B S A の 1 m L で、3 回連続して、磁氣的捕捉により、洗浄され、最終的に同一緩衝液 6 0 μ L で、再浮遊させた。ビーズはその後、再利用された。

【 0 0 9 2 】

・ 脳のホモジネート液の準備

1 . B S E 感染及び非感染の牛の脳組織、3 0 0 - 5 0 0 m g を、B S E 精製キット (B i o - R a d) 付属の、細碎ビーズを含む、細碎チューブへ加えた。本キットのこれらのチューブ内に予め入っていた溶液は、使用前に、吸引・廃棄した。

2 . 細碎後、5 0 % (w / v) の脳ホモジネート液を作成する為、一定量の 1 5 0 m M 塩化ナトリウムを、それぞれのチューブへ加えた。

3 . チューブは、細碎機 (B i o - R a d 社製) で、速度 6 . 5 の設定で、4 5 秒間、細碎した。

4 . ホモジネート液は、5 % (w / v) B S A、5 0 m M リン酸緩衝溶液 (p H 8 . 4) で、5 倍希釈された。

5 . それぞれのホモジネート液 4 5 μ L を、セパレート・チューブ (遠心チューブ) に移し変えた。

6 . 2 0 % (w / v) S D S (ドデシル硫酸ナトリウム : sodium dodecyl sulfate) (シグマ社製、L-5750) を、それぞれのチューブに付加し、十分に混ぜる。

7 . 4 5 0 μ L の 5 % (w / v) B S A、5 0 m M リン酸緩衝溶液 (p H 8 . 4) は、それからそれぞれのチューブに加えられ、混合された。

8 . 様々な洗浄濃度において、5 0 μ L の N - ラウロイル・サルコシン (シグマ社製、L-9150) は、あらゆるサンプルに加えられ、混合された。1 セット (1 つの B S E に感染した脳と、1 つの B S E に非感染の脳とからなる) は、N - ラウロイル・サルコシンを加えなかった。

【 0 0 9 3 】

(プリオン蛋白の捕捉)

1 . 1 0 μ L のペントサン・ポリ硫酸塩でコートした超常磁性ビーズを、それぞれ希釈さ

10

20

30

40

50

れた脳のリホジネート液に注入され、室温で1時間、振動培養した。

2. それぞれの反応は、その後、100 μ LのTBSで、3回、磁力捕捉により洗浄した。

【0094】

(プリオン蛋白の溶出及び免疫検出)

1. それぞれの反応からのビーズは、C1 (Bio-Rad Platelia BSE検出キット付属品) 10 μ L中で、再浮遊された。

2. 5 μ Lの0.2% (w/v) SDSはそれぞれのビーズ・サスペンションに加えられ、混合された。

3. 5 μ Lの1M グアニジン・チオシアネート (シグマ社製、G-9277) はそれぞれのビーズ・サスペンションに加えられ、混合された。

4. 反応は100、5分で行われた。

5. 100 μ LのR6 (Bio-Rad Platelia BSE検出キット付属品) は、それから加えられ、混合された。

6. それぞれの溶出液 100 μ Lを、Bio-Rad Platelia BSE検出キットのサンプルとして使用した。該キットの使用に際しては、該キットのプロトコルに従い、且つ、該キットの付属品を用いて行った。要するに、該キットは、通常のプリオン蛋白、及び/又は、変異プリオン蛋白の免疫応答反応と、西洋ワサビのペルオキシダーゼが接合した抗体による免疫検出反応を含む。

【0095】

(結果)

マイクロウェル・プレート・ベースのPlateliaアッセイで免疫検出反応を実行した後、個々のウェルにおけるシグナルを、450 nmの波長 (OD₄₅₀) において、ELISA用プレートリーダーで、測定した。

ビーズ捕捉緩衝溶液中のN-ラウロイル・サルコシンの終濃度	使用された牛の脳	OD ₄₅₀
2%	BSE感染脳	0.52
2%	BSE非感染脳	0.14
1%	BSE感染脳	0.33
1%	BSE非感染脳	0.13
0.5%	BSE感染脳	0.45
0.5%	BSE非感染脳	0.13
0.2%	BSE感染脳	0.41
0.2%	BSE非感染脳	0.09
0%	BSE感染脳	0.24
0%	BSE非感染脳	0.86

N-ラウロイル・サルコシンの全ての濃度において、BSE感染脳とBSE非感染脳との間に差異が見られた。0.2%のN-ラウロイル・サルコシンは、洗浄用として最も適した濃度であり、ペントサン硫酸が結合するのを可能とし、通常のプリオン蛋白と結合若しくは捕捉することなく、変異プリオン蛋白を捕捉する。N-ラウロイル・サルコシン非存在化においては、たとえSDS洗浄が存在したとしても、変異プリオン蛋白に結合するペントサン・ポリ硫酸塩と、通常のプリオン蛋白に結合するペントサン硫酸との間に、差異は見られなかった。このような状況のもと、ペントサン・ポリ硫酸塩は、通常のプリオン蛋白と変異プリオン蛋白の双方に結合する。

【0096】

(考察)

1. 上記の条件下における、変異プリオン蛋白に対するペントサン・ポリ硫酸塩の特異的

結合は、N - ラウロイル・サルコシン、若しくは、同様の洗浄剤の存在に依る。洗浄剤非存在下では、ペントサン・ポリ硫酸塩は、変異プリオン蛋白と通常のプリオン蛋白の双方に結合する。

【0097】

(実施例6： ペントサン・ポリ硫酸塩が、変異プリオン蛋白に、特異結合なし得る為のpH値条件の分析)

(序論)

ビオチンは、通常の化学反応により、ペントサン・ポリ硫酸塩に接合した。ビオチン化されたペントサン硫酸は、ストレプトアビジン由来の超常磁性ビーズをコートするのに使われた。コートされたビーズは、それからpH値の条件を設定する為、使用された。ここでpH値の条件とは、ペントサン・ポリ硫酸塩が変異プリオン蛋白に結合するが、通常の細胞性プリオン蛋白には結合しない状況のことをいう。

【0098】

(方法)

・ ペントサン硫酸をコートされた磁氣的ビーズの準備

1. ストレプトアビジン超常磁性ビーズ(シグマ社製、S-2415) 1 mLは、TBS(50 mM Tris、150 mM NaCl、pH 7.5) 1 mLで3回、磁氣的捕捉による洗浄を行った。

2. それぞれのビーズは、最終的に、5% ウシ・アルブミン(以下、BSA)(シグマ社製、A-7906)を含む1 mLのTBSと、TBSで、10 mg/mLとしたビオチン化されたペントサン・ポリ硫酸塩 100 µLで、再浮遊させた。ビーズは、室温で1時間、緩やかに振動させながら培養され、ペントサン・ポリ硫酸塩をビーズにコートさせた。

3. コーティングの後、それぞれのビーズは、50 mM リン酸緩衝溶液(pH 8.4)、5% (w/v) BSAの1 mLで、3回、磁氣的捕捉による洗浄を行った。

4. それぞれのビーズは、それから、5% (w/v) BSAを含む、pH値 5.5, 7.5, 8.4と、9.6の全緩衝用溶液で、再浮遊させた。

【0099】

・ 様々なpH値の緩衝溶液中における脳のホモジネート液の準備

1. BSE感染及び非感染の牛の脳組織、300 - 500 mgを、BSE精製キット(Bio-Rad)付属の、細碎ビーズを含む、細碎チューブへ加えた。本キットのこれらのチューブ内に予め入っていた溶液は、使用前に、吸引・廃棄した。

2. 細碎後、50% (w/v)の脳ホモジネート液を作成する為、一定量の150 mM塩化ナトリウムを、それぞれのチューブへ加えた。

3. チューブは、細碎機(Bio-Rad社製)で、速度6.5の設定で、45秒間、細碎した。

4. それぞれのホモジネート液 50 µLは、5% (w/v) BSAを含む、pH値 5.5, 7.5, 8.4と、9.6の全緩衝用溶液で、5倍希釈された。

5. それぞれのホモジネート液 45 µLを、セパレート・チューブに移し変えた。

6. 20% (w/v) SDS(ドデシル硫酸ナトリウム:sodium dodecyl sulfate)(シグマ社製、L-5750)を、それぞれのチューブに付加し、十分に混ぜた。

7. 5% (w/v) ウシ・アルブミン(BSA)を含む、初期の希釈緩衝用溶液と同じpH値の緩衝用溶液、450 µLが、その後、チューブに加えられ、混合された。

8. 20% (w/v)のN - ラウロイル・サルコシン(シグマ社製、L-9150) 50 µLは、その後、チューブに加えられ、混合された。

【0100】

・ 脳のホモジネート液のビーズ捕捉

1. 対応するpH値の緩衝用溶液中の、10 µLのペントサン・ポリ硫酸塩でコートした超常磁性ビーズを、それぞれ希釈された脳のホモジネート液に注入され、室温で1時間、振動培養した。

2. それぞれの反応は、その後、100 µLのTBSで、3回、磁力捕捉により洗浄した

10

20

30

40

50

。

【0101】

・ 変異プリオン蛋白の溶出及び免疫検出

1. それぞれの反応からのビーズは、C 1 (Bio-Rad Platelia BSE検出キット付属品) 10 μ L 中で、再浮遊された。
2. 5 μ L の 0.2% (w/v) SDS はそれぞれのビーズ・サスペンションに加えられ、混合された。
3. 5 μ L の 1 M グアニジン・チオシアネート (シグマ社製、G-9277) はそれぞれのビーズ・サスペンションに加えられ、混合された。
4. 反応は 100、5分で行われた。
5. 100 μ L の R 6 (Bio-Rad Platelia BSE検出キット付属品) は、加えられ、混合された。
6. それぞれの溶出液 100 μ L を、Bio-Rad Platelia BSE検出キットのサンプルとして使用した。該キットの使用に際しては、該キットのプロトコールに従い、且つ、該キットの付属品を用いて行った。要するに、該キットは、通常のプリオン蛋白、及び/又は、変異プリオン蛋白の免疫応答反応と、西洋ワサビのペルオキシダーゼが接合した抗体による免疫検出反応を含む。

10

【0102】

(結果)

マイクロウェル・プレート・ベースのPlateliaアッセイで免疫検出反応を実行した後、個々のウェルにおけるシグナルを、450 nmの波長 (OD_{450}) において、ELISA用プレートリーダーで測定した。

20

使用された緩衝溶液中の pH 値	使用された牛の脳	(OD_{450})
5.7	BSE感染脳	0.79
5.7	BSE非感染脳	0.30
7.5	BSE感染脳	1.57
7.5	BSE非感染脳	1.25
8.4	BSE感染脳	0.42
8.4	BSE非感染脳	0.04
9.6	BSE感染脳	0.08
9.6	BSE非感染脳	0.04

30

【0103】

pH 値 7.5 及びそれ以下では、ペントサン・ポリ硫酸塩をコートされたビーズは、通常のプリオン蛋白と変異プリオン蛋白の双方に結合した。pH 値 9.6 及びそれ以上では、ペントサン・ポリ硫酸塩をコートされたビーズは、通常のプリオン蛋白と変異プリオン蛋白の双方とも結合しなかった。pH 値 8.4 では、ペントサン・ポリ硫酸塩をコートされたビーズは、変異プリオン蛋白を捕捉するが、通常のプリオン蛋白を捕捉しなかった。この pH 値では、ペントサン・ポリ硫酸塩は、変異プリオン蛋白に特異的に結合することが示された。

40

【0104】

(考察)

上記試験状況下における、変異プリオン蛋白に対するペントサン・ポリ硫酸塩の特異的結合は、pH 値に依存する。pH 値 8.4 では、ペントサン・ポリ硫酸塩は、変異プリオン蛋白に結合するが、通常のプリオン蛋白には結合しない。pH 値 7.5 及びそれ以下では、通常のプリオン蛋白と変異プリオン蛋白はともに結合され、pH 値 9.6 及びそれ以上では、通常のプリオン蛋白と変異プリオン蛋白はともに結合しなかった。従って、変異プリオン蛋白に対するペントサン・ポリ硫酸塩の特異的結合は、これらの条件下においては、pH 値 8.4 付近が最適であると結論付けられた。

【0105】

50

実施例 7 : PrP^Cの結合を選択的に抑制するための低電荷密度競合ポリアニオンを使用する高電荷密度ポリアニオンリガントに対するPrP^{res} (PrP^{Sc})の特異的捕捉の証明

(背景)

PrPは、固定されるポリアニオンと結合されうる。捕捉緩衝液に競合ポリアニオンが存在しない場合に於いて、PrP^{res}及びPrP^{Sc}は捕捉される。PrP^{res}の捕捉のための特異性は、捕捉緩衝液に於いて、捕捉ポリアニオンよりも低電荷密度のポリアニオンが含有されることによって達成される。このような例に於いては、硫酸デキストランが高電荷密度捕捉として使用され、N-ラウロイル・サルコシン(マルチ分子の洗浄性のミセルを形成する)及びペントサン・ポリ硫酸塩又はフコイダンが弱性電荷密度競合ポリアニオンとして使用される。

10

【0106】

(方法)

1. マクスソルプ・マイクロタイター・ウェル(Maxisorp microtitre wells)は、標準的な手法により硫酸デキストランでコートされた。

2. 1 mgの脳が含有される脳ホモジネート液 100 µl、トリス(Tris) pH8.3 50 mM、BSA 1% (w/v)、トリトン(Triton)X-100 1% (v/v)が、コートされたウェルへ添加された。幾つかの場合に於いて、この捕捉緩衝液はまた、1% (w/v) N-ラウロイル・サルコシン、フコイダン、硫酸デキストラン、又は、各濃度のポリ硫酸ペントサンが含有された。

3. プリオン・プロテインの捕捉を促すための2時間の培養の後、ウェルはトリス pH8.3 50 mM、BSA 1% (w/v)、トリトンX-100 1% (v/v)で3回洗浄された。

20

4. 次に、ウェルは、PBSで3回洗浄された。

5. 5Mのグアニジウム・チオキヤネート(guanidinium thiocyanate) 100 µlが、各ウェルに添加され、4で5分間培養された。

6. ウェルは、PBSで3回洗浄され、次に、Bio-rad Platelia(登録商標)のBSE検出キットのプロトコルに従って、このキットに付属されるアンチ-プリオン・プロテイン接合体で捕捉されたプリオン・プロテインが検出された。

7. 生じるシグナルがOD450に於いて、ELISAリーダにより測定された。

【0107】

30

(結果)

使用された競合ポリアニオン	BSE感染脳、或いは、BSE非感染脳	OD 4 5 0
なし	BSE感染	0. 1 0
なし	BSE非感染脳	0. 1 5
N-ラウロイル・サルコシン 1 % (w/v)	BSE感染	0. 9 5
N-ラウロイル・サルコシン 1 % (w/v)	BSE非感染脳	0. 0 3
ポリ硫酸ペントサン 1 mg/ml	BSE感染	0. 2 6
ポリ硫酸ペントサン 1 mg/ml	BSE非感染脳	0. 0 3
ポリ硫酸ペントサン 0. 1 mg/ml	BSE感染	0. 1 4
ポリ硫酸ペントサン 0. 1 mg/ml	BSE非感染脳	0. 0 7
フコイダン 1 mg/ml	BSE感染	0. 1 3
フコイダン 1 mg/ml	非感染脳	0. 0 3
硫酸デキストラン 1 mg/ml	BSE感染	0. 0 2
硫酸デキストラン 1 mg/ml	非感染脳	0. 0 3

10

20

【0108】

考察

捕捉緩衝液に競合ポリアニオンが存在しない場合に於いて、全体のシグナルは低く、感染又は非感染脳からのシグナルに於ける差異は無い、つまり、PrP^{res}の特異的捕捉が存在しない。しかしながら、感染脳からのシグナルは、捕捉緩衝液の競合ポリアニオンを含有することにより増加しており、非感染又は感染していない脳に対応するシグナルは、抑制されている。この実施例に於いて、感染脳及び非感染脳間の最適な分化は、捕捉緩衝液に於いてN-ラウロイル・サルコシン 1 % (w/v) の使用により達成される。加えて、感染脳及び非感染脳間の分化は、フコイダン又はポリ硫酸ペントサンにより達成される。ポリ硫酸ペントサンによる分化は、0. 1 ~ 1 mg/ml の捕捉緩衝液に於いて、競合ポリアニオン、ポリ硫酸ペントサンの濃度を増加させることにより増加している。コントロールとして、もし捕捉緩衝液に硫酸デキストランが含有されていれば、予測どおりに、シグナルは、競合すること及び、固定する硫酸デキストランに対するPrPの結合を抑制することで、バックグラウンドに対して削減される

30

40

【0109】

実施例 8 : 表面コートされる高電荷密度ポリアニオンに対するPrP^{res}の特異的捕捉の証明

(背景)

この実験に於いて、PrP^{res}がポリアニオンの表面へ特異的に捕捉されたことが証明された。この場合、表面は、誘導された無水マレイン酸ポリスチレンにより供給された。非電荷ポリソープ及びマキシソープ・ウェルがコントロールとして使用された。他の実験に於いても、これらの非電荷表面がポリアニオン硫酸デキストランを伴い誘導されて、PrP^{res}

50

と結合したことが証明された。

【 0 1 1 0 】

(方法)

1. ポリスチレン・マイクロプレート・ウェル (Perbio Science UK Ltd., Cheshire) を活性化させた無水マレイン酸は、TBS 5% (w/v) BSA、室温で60分間で誘導された。このことによって、樹脂に表面が電荷されたカルボキシル基が生成された (生成資料を参照)。非電荷コントロールとして、ポリソープ及びマキシソープ・ウェル (Nunc) が分析された。更に、マキシソープ・ウェルもまた、実施例 9 に於いて記載される手法を利用することにより、ポリアニオン硫酸デキストラン・リガンドによりコートされた。

2. 1 mg の感染脳又は非感染脳、トリス (Tris) pH8.3 50 mM、BSA 1% (w/v)、トリトン (Triton) X-100 1% (v/v)、1% (w/v) N-ラウロイル・サルコシンが含有される脳ホモジネート 100 µl、が、コートされたウェルへ添加された。

3. プリオンの捕捉を促すために2時間の培養の後、ウェルはトリス pH8.3 50 mM、1% (w/v) の N-ラウロイル・サルコシンで3回洗浄された。

4. 次いで、ウェルは、PBSで3回洗浄された。

5. 5 M のグアニジウム・チオキヤネート (guanidinium thiocyanate) 100 µl が、各ウェルに添加され、4 で5分間培養された。

6. ウェルは、PBSで3回洗浄され、次に、Bio-rad Platelia (登録商標) のBSE検出キットのプロトコルに従って、このキットに付属されるアンチ・プリオン・プロテイン接合体で捕捉されたプリオン・プロテインが検出された。

7. 生じるシグナルがOD450に於いて、ELISAリーダにより測定された。

【 0 1 1 1 】

(結果)

使用されたウェルのタイプ	BSE感染脳又はBSE非感染脳	OD450
陰イオン	BSE感染脳	0.2
陰イオン	BSE非感染脳	0.03
ポリソープ (Polysorp)	BSE感染脳	0.05
ポリソープ	BSE非感染脳	0.03
マキシソープ (Maxisorp)	BSE感染脳	0.02
マキシソープ	BSE非感染脳	0.02
硫酸デキストランがコートされたマキシソープ	BSE感染脳	1.0
硫酸デキストランがコートされたマキシソープ	BSE非感染脳	0.02

【 0 1 1 2 】

(考察)

この実験の条件下において、陰イオンのポリスチレン表面は、特異的にPrP^{Sc}を捕捉する。非荷電プラスチックは、ポリアニオン系リガンドでコートされない限りこの効果を有さない。

【 0 1 1 3 】

実施例 9 : ネガティブ・サンプルにおける、ポジティブ・ブレイン・サンプルの希釈の効果の研究。

(材料)

ポジティブ・サンプル : PrP^{Sc}が陽性であると知られている、脳のホモジネート液の 25% の検査液

ネガティブ・サンプル : PrP^{Sc}が陰性であると知られている、脳のホモジネート液の 25% の検査液

【 0 1 1 4 】

(準備)

マキシソープ・プレートは、以下のコーティング・プロトコルでコートされた。pH 7.4のカーボネート緩衝液中の1mgのポリブレンが、プレートに被覆され、一晩中放置され、3回洗浄された。次に該プレートは、PBS中の1mgの硫酸デキストランでコートされた。

6時間後、プレートはPBSで3回洗浄され、次に400μLの5%のBSA溶液を添加することにより、5%のBSAでブロックされ、30分間放置された。次にプレートは、3回洗浄され、乾燥された。

【 0 1 1 5 】

(サンプルの準備)

ネガティブ・ブレインにおけるサンプル希釈の準備

サンプル	方法
Neat+ve	40μLの+veサンプル
1/5	8μLの+veサンプル+32μLの-veサンプル
1/10	5μLの+veサンプル+45μLの-veサンプル
1/100	6μLの(10倍希釈+veサンプル)+54μLの-veサンプル
1/250	20μLの(100倍希釈+veサンプル)+30μLの-veサンプル
1/1000	10μLの(250倍希釈+veサンプル)+30μLの-veサンプル
Neat-ve	25μLの-veサンプル

10

20

水におけるサンプル希釈の準備

サンプル	方法
Neat+ve	40μLの+veサンプル
1/5	8μLの+veサンプル+32μLの水
1/10	5μLの+veサンプル+45μLの水
1/100	6μLの(10倍希釈+veサンプル)+54μLの水
1/250	20μLの(100倍希釈+veサンプル)+30μLの水
1/1000	10μLの(250倍希釈+veサンプル)+30μLの水

30

【 0 1 1 6 】

(分析を行う前のサンプルの準備)

40μLのサンプルが、60μLの水、25μLの捕捉緩衝液、250mMのトリスpH 8.4、5%のBSA、5%のトリトンX-100、5%のサーコシル、1.25mg/mlのトリプシンと混合された。

分析は、以下の分析プロトコルに沿って実行された。

1. 100μLのサンプルをプレートに加え、室温で120分間培養する。

2. 50mMのトリスpH 8.4及び1%のサーコシルで3回洗浄し、PBSで3回洗浄した。

3. 20%のPEGに100μLの4MGuSCNに加え、2 から 8 で10分間培養する。

4. PBSで3回洗浄する。

5. 100μLのバイオラド社(Bio-Rad)のプラテリア(Platelia)(登録商標)の酵素抗体接合体を加え、2 から 8 で60分間培養する。

6. バイオラド社(Bio-Rad)のプラテリア(Platelia)(登録商標)洗浄で5回洗浄する。

7. 100μLのBio-Rad社のBSE検出キットの基質を加え、暗所で30分間暗室で放置した。

8. 100μLのBio-Rad社のBSE検出キットの反応停止溶液を加え、読み取る。

【 0 1 1 7 】

40

50

(プレートのレイアウト)

	1	1
A	Neat + ve	水で10倍希釈
B	ネガティブ・ブレインで5倍希釈	水で100倍希釈
C	ネガティブ・ブレインで10倍希釈	水で250倍希釈
D	ネガティブ・ブレインで100倍希釈	水で1000倍希釈
E	ネガティブ・ブレインで250倍希釈	
F	ネガティブ・ブレインで1000倍希釈	
G	Neat - ve	
H	水で5倍希釈	

10

【0118】

得られた結果を以下に示す

脳の10mgの希釈

-ve脳におけるホモジネート

サンプルラベル	-ve脳のmg	+ve脳のmg	希釈倍率	OD
Neat + ve	0.00	10.00	1	4
1 / 5	8.00	2.00	5	1.992
1 / 10	9.00	1.00	10	1.252
1 / 100	9.90	0.10	100	0.175
1 / 250	9.96	0.04	250	0.077
1 / 1000	9.99	0.01	1000	0.039
Neat - ve	10.00	0.00	0	0.021

20

脳の10mgの希釈

水におけるホモジネート

サンプルラベル	-ve脳のmg	+ve脳のmg	希釈倍率	OD
Neat + ve	0.00	10.00	1	4
1 / 5	0.00	2.00	5	2.377
1 / 10	0.00	1.00	10	1.395
1 / 100	0.00	0.10	100	0.145
1 / 250	0.00	0.04	250	0.053
1 / 1000	0.00	0.01	1000	0.016

30

要約

+ve脳のmg	OD	
	-ve脳で希釈する	水で希釈する
10.00	4	4
2.00	1.992	2.377
1.00	1.252	1.395
0.10	0.175	0.145
0.04	0.077	0.053
0.01	0.039	0.016
0.00	0.021	-----

40

これらの結果が、図1で示される。図1では、水及びネガティブ脳夫々を伴うポジティブ脳の希釈が希釈曲線として示されている。2つの曲線は基本的に同じであり、ネガティ

50

脳材料の存在によってアッセイが影響を受けることがないことを証明している。

【0119】

実施例10：アルツハイマーの脳及び同年齢の正常な対照群の脳における凝集タウ蛋白質の捕捉

規定の条件の下、正常な非凝集プリオンが捕捉されないために、多様な選択的な捕捉因子が、凝集病原性のプリオン蛋白質の捕捉に特異的であることが示される。凝集プリオン蛋白質は、広範囲のベータ・プリーテッド・シート構造を有するが、大部分の正常なプリオンは、構造がアルファ・ヘリックスである。

この例は、アルツハイマー病で見られるタウ集合体のような、凝集他のベータ・プリーテッド・シート蛋白質を、同様に選択的に捕捉することができることを示す。

10

【0120】

(方法)

1. アルツハイマーの脳及び同年齢の正常な対照群の脳の25% (w/v) ホモジネート液が、蒸留水で準備した。

2. 4 µLの脳を捕捉緩衝液 (50 mM トリス pH8.4, 1% (v/v) トリトン X-100, 1% (v/v) N-ラウロイルサルコシン, 1% (v/v) BSA) で100 µLまでにした。

3. 25 µLの脳を、25 µgのトリプシンを含む捕捉緩衝液で100 µLまでにした

4. 上記段階2及び3で準備された2つの100 µLのサンプルが、デキストラン硫酸塩でコーティングが施されたマイクロタイター・ウェルに加えられ、室温で2時間培養された。

20

5. 次にウェルは、50 mM トリス pH8.4, 1% (v/v) N-ラウロイル・サルコシンで3回洗浄された。

6. サンプルは、PBS 0.1% (v/v) Tween 20において、抗タウ蛋白質モノクローナル抗体で培養された。

7. 1時間後、室温のウェルは、PBS 0.1% (v/v) Tween 20で3回洗浄された。

8. 固定された一次抗体が、標準的な方法で抗マウスIgG西洋わさびペルオキシダーゼ接合体が検出された。

【0121】

(結果)

抗タウ蛋白質抗体との結果

30

脳	1 mg の脳 トリプシンなし	10 mg の脳 トリプシンあり
アルツハイマーの脳1	1.32	1.26
アルツハイマーの脳2	0.85	0.62
対照群1	0.56	0.20
対照群2	0.97	0.51

【0122】

(考察)

大部分の高齢者の脳は、凝集タウを含むが、アルツハイマー病では、同年齢の対照群よりも多くの集合体が存在していることが既知である。選択的な捕捉因子は、これら集合体を捕捉する。

40

この例において、トリプシン消化は、蛋白質の結合を増加し、シグナルを減少するが、この条件下では、シグナルをバックグラウンドにまで減少しない。治療を行わないシグナルに対するトリプシンを用いた治療後のシグナルの割合は、対照群よりもアルツハイマーの脳において高い。

このことは、アルツハイマーの脳に於いては、同年齢の対照群と比較して、よりプロテアーゼ抵抗性を有するタウ蛋白質凝集体が存在することが証明される。

50

【 0 1 2 3 】

(実施例 1 1 P R P ^{5 c} 陽性サンプルに対するトリプシン滴定の効果)

(方法)

硫酸デキストラン・コーティングされたプレート:

臭化ヘキサジメチレン 1 m g (ポリブレン) (pH7.4の10 m g / m l 炭酸塩緩衝液 100 μ l) がマキシソープ・プレートにコーティングされ、室温で一晩静置された。

各プレートは、その後、P B S で3回洗浄され、硫酸デキストラン 1 m g (MW50000) (PH8.6のT R I S 緩衝液ストック溶液 10 m g / m l) でコーティングされ、室温で4時間静置された。

プレートは、その後、P B S で3回洗浄され、そしてT B S 内で5% B S A 溶液 300 μ l でブロッキングされ、室温で30分間静置された。 10

プレートは、その後、P B S で3回洗浄された。

【 0 1 2 4 】

(捕捉緩衝液)

5% B S A、5% サルコシル、5% T R I T O N を含む 250 m M T R I S 緩衝液。

【 0 1 2 5 】

(サンプル)

弱陽性及び強陽性を示す脳 B I 6 3 及び S V 1 0 (25% ホモジネート) は、アッセイでサンプルを提供するため以下のように処理された。

脳ホモジネート 25 μ l に、捕捉緩衝液 25 μ l、pH8.4のT R I S 250 m M、5%のT R I T O N X - 100、5%のサルコシル 65 μ l を混合する。 20

このサンプルに、多様な濃度のトリプシン 10 μ l が加えられた。

洗浄緩衝液

pH8.4のT R I S 50 m M に1%のサルコシルを加える。

【 0 1 2 6 】

(方法)

アッセイプロトコル

1 サンプル 100 μ l をプレートに加え、室温で120分間培養する。

2 pH8.4のT R I S 50 m M と1%サルコシルを用いて3回洗浄し、P B S で3回洗浄する。 30

3 (20% P E G に) 4 M G u S C N 100 μ l を加え、2~8 で10分間培養する。

4 P B S を用いて3回洗浄する。

5 バイオラド社製プラテリア (登録商標) 酵素抗体接合 100 μ l を加え、2~8 で10分間培養する。

6 バイオラド社製プラテリア (登録商標) 洗浄液で5回洗浄する。

7 バイオラド社製プラテリア (登録商標) 基質 100 μ l を加え、暗所で30分間培養する。

8 バイオラド社製プラテリア (登録商標) 停止液 100 μ l を加え、読み取る。

【 0 1 2 7 】

(結果)

5 m g の陽性脳 B i 6 3

トリプシン (μ g)	OD
1000	0.135
100	0.14
25	0.169
10	0.173
1	0.068
0	0.068

5 m g の陽性脳 S V 1 0

40

50

トリプシン (μg)	OD
25	2.858
0	0.894

【0128】

(結論)

トリプシンの存在によって、シグナルが増加した。また、多様な濃度の異なるトリプシンは、アッセイに有害な影響を及ぼすことなく使用することができる。

【0129】

(実施例12：ポリカチオンによるPRP^{s.c}の特異的結合の実証)

(方法)

この実施例は、PRP^{s.c}の特異的捕捉のため様々なポリカチオンが使用されることを実証する。リガンドは、ポリスチレン・マイクロプレートに受動的にコーティングされるか、もしくは無水マレイン酸プレートの適切な箇所へと積極的にコーティング(すなわち結合)されるかのどちらかであった。

【0130】

(選択的結合因子固定化)

すべての選択的結合因子が16~25の濃度10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のpH9.6炭酸塩緩衝液50mMで一晩かけて固定化される。固定化後、ウェルはPBSで3回洗浄され、その後、PBSに30分浸漬された5%(w/v)BSAでブロッキングされる。ブロッキング後、使用前に、ウェルはPBSで2回洗浄される。PAMAデンドリマー・スターバスト、ポリエリジン、ポリエチレンジアミンがマキシソープ及び無水マレイン酸マイクロプレート上にコーティングされる。この一方で、ポリブレン及びpDADMACは、このマキシソープ・プレート上のみでコーティングされる。

【0131】

PRP^{s.c}の捕捉

1 BSE感染したウシ及びBSE感染していないウシの脳が、商業的に定義されたプロトコルに従って蒸留水内で均質化される。

2 均質化された脳0.5mgは、リガンドでコーティングされたウェルにおいて捕捉される。このウェルの総量は、100 μl でpH8.3のTRIS50mM、1%(w/v)N-ラウロイルサルコシン、1%(v/v)TRITONX 100、1%(w/v)BSA、0.5mg/mlのトリプシン(豚の膵臓)からなる

3 18~25で2時間捕捉した後、ウェルはpH8.3のTRIS50mM、1%(w/v)N-ラウロイルサルコシンを用いて3回洗浄される。

4 ウェルは、その後PBSで3回洗浄され、4~8の100 μl の4Mグアニジニウム・チオアシン酸、20%のPEG8000を用いて10分間培養される。

5 ウェルは、PBSを用いて3回洗浄され、その後、アンチプリオン・モノクローナル抗体ホースラディッシュ・ペルオキシターゼ接合を用いて培養される。

6 60分後、ウェルは加えられたPBS0.1%(v/v)Tween20及び100 μl のTMB基質を用いて5回洗浄される。

7 30分後、各反応のOD450が、測定され、記録される。(以下の表参照)

【0132】

(結果)

10

20

30

40

結合因子	受動的吸光度		受動的吸光度	
	陽性	陰性	陽性	陰性
PAMAデンドリマー・スターバスト	0.938	0.030	0.097	0.026
ポリブレン	0.019	0.016	ND	ND
ポリLリシン	0.070	0.017	0.001	0.001
pDADMAC	1.828	0.037	ND	ND
ポリエチレンイミン	0.188	0.030	0.402	0.055

10

*アルドリッチ 40903 - 0 - mw 400,000 - 500,000

【0133】

(考察)

pDADMAC及びPAMAデンドリマー・スターバスト・ポリカチオンは、受動的にポリスチレン・マイクロプレートにコーティングされる時、PRP^{s/c}特有のリガンドとして十分に機能する。pDADMACはこの結合因子の連続においてもっともよく機能する。ポリエチレンイミンは、アミノ基を通じて無水マレイン酸マイクロプレート上に固定化されるとき、ある程度機能する。

この実験は、使用される既定の捕捉緩衝液条件のもとで、感染脳からPRP^{s/c}を明確に捕捉するために、多様なポリカチオンが使用されることが可能であると例証する。これらの因子は、受動的にもしくは積極的にポリスチレン表面に固定可能である。他の実験は、捕捉緩衝液中の1% (w/v) N-ラウロイルサルコシンの存在によって、陽性脳20mgからの最大シグナルが達成可能であると例証した。N-ラウロイルサルコシンがなければ、シグナルは減少する。これは、捕捉因子が定義された緩衝液条件のもとで最大に機能することを示す。

20

【0134】

(実施例13:アルツハイマーの脳において凝集したアミロイド及びタウの捕捉及びポリカチオニック結合因子による標準年齢に適合するコントロール)

(背景)

pDADMACは、定義された条件のもとで、凝集した病原プリオン蛋白の捕捉に特有であると示されてきた。通常非凝集プリオンは、捕捉されない。凝集プリオン蛋白が、広範囲にわたりシート構造を有するのに対し、通常プリオンはほとんどヘリックス構造である。結合因子は、アルツハイマー病において見られるようなアミロイドやタウの集合のような他の集まったシート蛋白を認識すると主張される。以下の実験は、この仮説を調べるために実行された。

30

【0135】

(方法)

1 25% (v/w)のアルツハイマーのホモジネート及び年齢に適合するコントロール脳が蒸留水中で調製された。

40

2 80µlの脳ホモジネートは、捕捉緩衝液(pH8.3のTRIS50mM、1% (v/v) TRITON-X100、1% (w/v) N-ラウロイルサルコシン、1% (w/v) BSA)中で100µl作成され、ポリカチオニック・コーティングされたマイクロウェルに加えられた。このマイクロウェルは、ウェルをポリ(ジアリルジメチル塩化アンモニウム)(pDADMAC)でコーティングすることによって形成される。(アルドリッチ・ケミカル・カンパニー・インク、カタログ番号40、903-0)

3 室温で2時間培養した後、ウェルは、50mM pH8.4のTRIS pH8.4、1% (w/v) N-ラウロイルサルコシンで3回洗浄され、その後PBS0.1% (v/v) TWEEN 20内のアンチ・タウモノクローナル抗体を用いて培養される。

4 室温で1時間静置した後、ウェルはPBS0.1% (v/v) TWEEN 20を用い

50

て3回洗浄される。

5 固定化された一次抗体が標準化された手法に従うアンチマウス I g G 西洋ワサビ・ペルオキシターゼ接合を用いて検出された。

【 0 1 3 6 】

(結果)

脳	ブレイン・バンクによる分類	OD450
67/97	陽性	1.85
73/97	陽性	0.80
163/97	陽性	0.61
149/97	陽性	0.45
97/97	陰性	0.05
98/98	陰性	0.08

10

【 0 1 3 7 】

(考察)

ポリカチオン結合因子は、タウ凝集体の捕捉を可能にする。捕捉されたタウがアンチタウ抗体を用いて検出されるとき、アルツハイマー病の脳は、すべて高い陽性シグナルを示したが、陰性コントロール脳は低レベルの陰性シグナルを示した。結論として、特定の条件の下でのポリカチオンを用いての捕捉は、アルツハイマー病の脳をアルツハイマーでない脳と分離することを可能にする。

20

【 0 1 3 8 】

実施例 1 4 : P R P ^S ^C の捕捉のマトリクス阻害における異なるプロテアーゼ及びDNASEの効果

背景

ポリカチオン・コーティングされたプレートに対する P R P ^S ^C の捕捉の有効性について、異なるプロテアーゼの効果が調べられる。このプレートは、ウェルをポリ(ジアルリジメチル塩化アンモニウム)(pDADMAC)でコーティングすることによって形成される。(アルドリッチ・ケミカル・カンパニー・インク、カタログ番号40、903-0)

【 0 1 3 9 】

方法

1 脳ホモジネート 8 0 μ l が、異なるプロテアーゼ及び/又はDNASEを含む 2 0 m l の捕捉緩衝液 (p H 8 . 3 の T R I S 2 5 0 m M 、 5 % (v / v) T R I T O N X - 1 0 0 、 5 % (w / v) N - ラウロイルサルコシン、 5 % (w / v) B S A) を加えることによって作成された。

2 ホモジネートは、その後ポリカチオン・コーティングされたマイクロウェルに加えられた。

3 室温で 2 時間培養した後、ウェルは P B S を用いて 6 回洗浄された。

4 1 0 0 μ l の 4 M グアニジン・チオシアネート、 2 0 % (w / v) の P E G が各ウェルに加えられた。

40

5 室温で 1 0 分培養した後、ウェルは P B S を用いて 3 回洗浄される。

6 1 0 0 μ l のアンチプリオン蛋白ホースラディッシュ・ペルオキシターゼ接合 (P B S 0 . 1 % (v / v) T W E E N 2 0 及び 5 % (w / v) B S A において 1 : 1 5 0 0 に希釈された) が加えられた。

7 室温で 1 時間静置した後、ウェルは、 P B S 0 . 1 % (v / v) T W E E N 2 0 を用いて 5 回洗浄される。

8 固定化された接合は、以下の標準プロトコルに従う T M B 溶液を用いて検出された。

【 0 1 4 0 】

(結果)

捕捉緩衝液におけるキモトリプシン、トリプシン、DNASE、プロテイナーゼKの効果をア

50

セスする

使用されたプロテアーゼもしくはDnase	感染したウシの脳
プロテアーゼ、Dnaseのどちらもない (濃度がともに6.25 mg/ml)	0.122
キモトリプシン/トリプシン	0.139
DNASE/トリプシン(濃度が1 mg/mlの DNASE、6.25 mg/mlのトリプシン)	0.639
キモトリプシン/Dnase(濃度が1 mg/m lのDNASE、6.25 mg/mlのキモ)	0.616
キモトリプシン/Dnase/トリプシン(濃度 が1 mg/mlのDNASE、6.25 mg/m lのキモトリプシン、トリプシン)	0.460
トリプシン(濃度6.25 mg/ml)	0.568
キモトリプシン(濃度6.25 mg/ml)	0.171
Dnase(濃度1 mg/ml)	0.180
プロテイナーゼK(濃度1 mg/ml)	0.531
プロナーゼ(濃度1.25 mg/ml)	0.222
プロナーゼ(濃度6.25 mg/ml)	0.178

10

20

【0141】

捕捉緩衝液中のトリプシン及びキモトリプシンを滴定する

使用されるプロテアーゼ	感染したウシの脳
トリプシン6.25 mg/ml	0.732
トリプシン1.25 mg/ml	0.726
キモトリプシン3.125 mg/ml	0.568
キモトリプシン0.625 mg/ml	0.433

【0142】

(考察)

特定条件のもとでポリカチオニックリガンドがPRP^Sの接合に特有であることを例証してきた。しかしながら、シグナルはマトリクス効果によって減少しうる。このマトリクス効果は脳ホモジネートの構成要素に由来する。この構成要素は結合に干渉し、シグナルを減少させる。このマトリクス効果が減少し、また感染脳からのシグナルがプロテアーゼの使用により増加することは可能である。この研究によって、トリプシン、キモトリプシン、プロテイナーゼKは、マトリクス障害の除去に有効である。また(調べられた濃度において)プロナーゼは少し効果がある。6.25~1.15 mg/mlの濃度のトリプシンは、一様に有効であるのにたいし、キモトリプシンは濃度が増すにつれより有効となる。DNASEは、例証可能であるが、マトリクス障害にはわずかにしか有効でない。

30

40

【0143】

(実施例15: pH及び塩分がもたらすプリオン蛋白質のpDADMAC捕捉への影響)

(背景)

pH及び塩分濃度が、PrP^Sのポリカチオンで覆われたプレート(ポリ(ジアリルジメチルアンモニウムクロリド)でウェルを被膜することによって形成される)(pDADMAC)(アルドリッチ・ケミカル・カンパニ(Aldrich Chemical Company Inc)、カタログ番号40,903-0)への捕捉の有効性に影響を与えることが調査された。

【0144】

(方法)

1.80 µLの脳ホモジネート液が20 µLの捕捉緩衝液(250 mM トリス: pH

50

、5% (v/v) トリトン X - 100、5% (w/v) N - ラウロイル・サルコシン、5% (w/v) BSA 及び 6.25 mg/ml のトリプシンに対する表を参照) の添加によって、100 µL とされる。該捕捉緩衝液は、様々な濃度の塩分を含み、pH が調整されている。

2. ホモジネート液は、その後、ポリカチオンで被膜されたマイクロウェルに加えらる。

3. 室温で2時間暗室での放置の後、ウェルはPBSで6回洗浄される。

4. 100 µL の4M グアニジン (Guanidine) ・チオシアネート、20% (w/v) PEG が各ウェルに加えらる。

5. 室温で10分間暗室での放置の後、ウェルは3度PBSで洗浄される。

6. 100 µL の抗プリオン蛋白質セイヨウワサビ・ペルオキシターゼ結合体 (これは、PBS 0.1% (v/v) Tween20 及び 5% (w/v) BSA 内で1:1500で希釈されている) が加えられる。

7. 室温で1時間後、ウェルは5回、PBS 0.1% (v/v) Tween20で洗浄される。

8. 固定された結合体は、標準プロトコルに従うTMB溶液で検知される。そして、反応のOD450が計測される。

【0145】

(結果)

(pHの影響)

捕捉緩衝液 pH	感染したウシの脳	陰性のウシの脳
5	0.177	0.119
6	0.082	0.1
7	0.093	0.045
8.4	0.226	0.039
9	0.24	0.038
10	0.25	0.037

【0146】

(塩分の影響)

捕捉緩衝液	感染したウシの脳	感染していないウシの脳
20 mM NaCl	0.476	0.038
100 mM NaCl	0.361	0.039
250 mM NaCl	0.191	0.028
1 M NaCl	0.06	0.024

【0147】

(考察)

捕捉緩衝液のpHが低下すると、感染していない脳からの信号が増加する一方で、感染した脳からの信号は低下する。8.0以上のpHにおいて、最適な陽陰信号比が得られる。

捕捉緩衝液内の塩分濃度が増加すると、感染した脳からの信号は漸進的に減少する。このことは、低い塩分濃度或いは塩分がない状態であることが、PrP^{Sc}捕捉に対する最適条件であることを示している。

【0148】

(実施例16: N - ラウロイル・サルコシンとプロテアーゼの濃度変化が、PrP^{Sc}のpDADMAC捕捉へ与える影響)

(背景)

トリプシンの存在或いは不存在におけるN - ラウロイル・サルコシン濃度が、ポリカチオンで被膜されたプレート (ポリ (ジアチルジメチル アンモニウム クロリド) でウェルを被膜することによって形成される) (pDADMAC) (アルドリッチ・ケミカル・カンパ

ニ (Aldrich Chemical Company Inc)、カタログ番号 40, 903-0) への PrPSc の捕捉の効果への影響が調査された。

【0149】

1. 80 μ L の感染した脳 のホモジネート液が 20 μ L の捕捉緩衝液 (250 mM トリス pH 8.3、5% (v/v) トリトン X-100、5% (w/v) BSA) に添加よって、100 μ L とされる。該捕捉緩衝液は、プロテアーゼ及び N-ラウロイル・サルコシンの異なる濃度を有する。

2. ホモジネート液は、その後、ポリカチオンで被膜されたマイクロウェルに加えられる。

3. 室温で 2 時間の培養の後、ウェルは PBS で 6 回洗浄される。

4. 100 μ L の 4 M グアニジン (Guanidine) ・チオシアネート、20% (w/v) PEG が各ウェルに加えられる。

5. 室温で 10 分間の培養の後、ウェルは 3 度 PBS で洗浄される。

6. 100 μ L の抗プリオン蛋白質セイウワサビ・ペルオキシターゼ結合体 (これは、PBS 0.1% (v/v) Tween20 及び 5% (w/v) BSA 内で 1:1500 で希釈されている) が加えられる。

7. 室温で 1 時間後、ウェルは 5 回、PBS 0.1% (v/v) Tween20 で洗浄される。

8. 固定された結合体は、標準プロトコルに従う TMB 溶液で検知される。

【0150】

(結果)

捕捉緩衝液に用いられる界面活性剤とプロテアーゼ	使用された因子濃度	OD450
N-ラウロイル・サルコシン トリプシン	0	0.08
	1.25 mg/ml	
N-ラウロイル・サルコシン トリプシン	2.5%	1.181
	1.25 mg/ml	
N-ラウロイル・サルコシン トリプシン	5%	2.267
	1.25 mg/ml	
N-ラウロイル・サルコシン トリプシン	10%	2.628
	1.25 mg/ml	
N-ラウロイル・サルコシン トリプシン	0	0.171
	6.25 mg/ml	
N-ラウロイル・サルコシン トリプシン	2.5%	2.384
	6.25 mg/ml	
N-ラウロイル・サルコシン トリプシン	5%	2.725
	6.25 mg/ml	
N-ラウロイル・サルコシン トリプシン	10%	2.883
	6.25 mg/ml	

【0151】

(考察)

N - ラウロイル・サルコシンが存在しない場において、低濃度のトリプシンであるとき、感染した脳からの信号はない。高濃度トリプシンに対しては、しかしながら、N - ラウロイル・サルコシンが存在しなくとも、ある程度の信号が得られた。

【0152】

本発明は特定の好適な実施形態を用いて説明されてきたが、本発明の要旨内において、多くの変更形態及び応用形態が可能である。同じ結果を得るための同じ方法を実施するような、本発明の請求項で述べられるいかなる変更形態も、本出願によって守られるべき技術範囲となる。

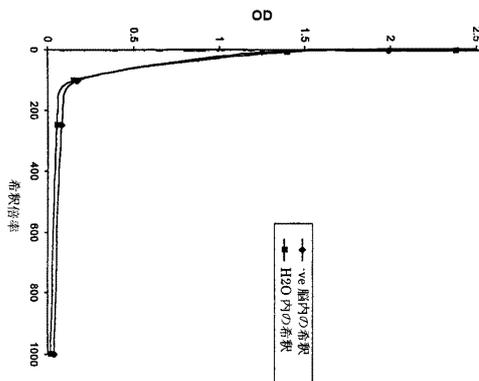
本明細書において、明確には示されていないが、「或いは・又は (or)」との用語は、述べている状態が「いずれか」或いは「両方」の条件であるときにおいて、真の値を返す分岐条件子の意味で用いられており、単一の条件を要求する「排他的な分岐条件子 (exclusive or)」と対立するものとなる。用語「～からなる (comprising)」は、「～から構成される (consisting of)」という意味よりもむしろ、「～を有する (including)」の意味で用いられている。

【図面の簡単な説明】

【0153】

【図1】実施例9の結果を示す図である。

【図1】



フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 0229614.3
(32)優先日 平成14年12月19日(2002.12.19)
(33)優先権主張国 英国(GB)

前置審査

- (72)発明者 クリストファ ジェイ. スタンレイ
イギリス ケンブリッジシア ビーイー28 3ビーエヌ ハンティングドン ウッドハースト
チャーチ・ストリート ハラダイン・ハウス
(72)発明者 スチュアート マーク ウィルソン
イギリス ロンドン エスイー25 6ティーダブル サウス・ノーウッド ロス・ロード 16
7

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 米国特許第20015578(US, B1)
米国特許第06037458(US, A)
国際公開第00/072851(WO, A1)
特表2000-513377(JP, A)
特表2000-500005(JP, A)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1999年, vol.96, no.25, p.14529-14534
Biochem. J., 1999年, vol.342, no.3, p.605-613

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/22
G01N 30/88
C07K 14/47
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed

专利名称(译)	异常朊蛋白的结合		
公开(公告)号	JP4550425B2	公开(公告)日	2010-09-22
申请号	JP2003571742	申请日	2003-02-28
申请(专利权)人(译)	微千手噬菌体生物有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	微千手噬菌体生物有限公司		
[标]发明人	アミンレザレイン クリストファジェイスタンレイ スチュアートマークウィルソン		
发明人	アミンレザレイン クリストファジェイ.スタンレイ スチュアートマークウィルソン		
IPC分类号	C07K1/22 G01N30/88 C07K14/46 G01N33/68 C07K14/47 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/6803 G01N33/54326 G01N33/68 G01N33/6896 G01N2333/968 G01N2800/2828		
FI分类号	C07K1/22 G01N30/88.J C07K14/46		
优先权	2002004797 2002-02-28 GB 2002016808 2002-07-18 GB 2002029614 2002-12-19 GB		
其他公开文献	JP2005519088A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

感染蛋白质的聚集形式，即PrP，淀粉样蛋白和tau，在正常形式的蛋白质存在下选择性结合。这通过在选择性结合条件下使用聚离子结合因子，即硫酸葡聚糖或戊聚糖（阴离子），或多胺化合物，即pDADMAC（阳离子）来完成。所述选择性结合条件包括使用弱碱性pH的正月桂酰肌氨酸。此后，分析感染蛋白质的聚集形式。

使用された脳ホモジネート液	OD ₄₅₀
BSE感染ウシ 脳サンプル1	0.229
BSE感染ウシ 脳サンプル2	0.208
正常ウシ脳 サンプル1	0.061
正常ウシ脳 サンプル2	0.047